

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΒΙΟΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΙ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΣΕ ΙΟΝΤΙΚΑ ΥΓΡΑ

Διδακτορική Διατριβή
ΚΑΤΣΟΥΡΑ ΜΑΡΙΑ – ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΒΙΟΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΙ ΦΥΣΙΚΩΝ
ΑΝΤΙΟΞΕΙΔΩΤΙΚΩΝ ΣΕ ΙΟΝΤΙΚΑ ΥΓΡΑ

Διδακτορική Διατριβή
ΚΑΤΣΟΥΡΑ ΜΑΡΙΑ – ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2010

Στην οικογένεια μου,

Περίληψη

Σκοπό της παρούσας μελέτης αποτελεί η ανάπτυξη μίας βιοκαταλυτικής διεργασίας για την τροποποίηση της δομής διαφόρων φυσικών αντιοξειδωτικών σε μία νέα πολλά υποσχόμενη κατηγορία περιβαλλοντικά φιλικών, χαμηλής τοξικότητας μέσων, τα ιοντικά υγρά. Η τροποποίηση εστιάζει στην αύξηση του λιπόφιλου χαρακτήρα των ενώσεων αυτών, και πραγματοποιείται μέσω αντιδράσεων ακυλίωσης με την εφαρμογή μικροβιακών λιπασών. Η σημασία μίας αποτελεσματικής βιοκαταλυτικής διεργασίας για την τροποποίηση φυσικών αντιοξειδωτικών σε ιοντικά υγρά, έγκειται όχι μόνο στη σύνθεση λιπόφιλων παραγώγων των φυσικών αντιοξειδωτικών με εφαρμογές στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών, αλλά και στην βαθύτερη κατανόηση των καταλυτικών ιδιοτήτων και της σχέσης δομής – λειτουργίας των λιπασών στα νέα αυτά μέσα.

Αρχικά μελετήθηκε η σταθερότητα δύο λιπασών, της λιπάσης B από *Candida antarctica* και της λιπάσης από *Rhizomucor miehei*, σε διάφορα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά με ανιόντα BF_4^- ή PF_6^- . Η μελέτη έδειξε πως η επώαση των ενζύμων σε ιοντικά υγρά οδηγεί σε σημαντική σταθεροποίηση ή ακόμα και σε αύξηση της δραστηρότητάς τους. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει ένα σαφές πλεονέκτημα της εφαρμογής των ιοντικών υγρών έναντι των συμβατικών οργανικών διαλυτών που χρησιμοποιούνται ευρέως για την επίτευξη της ενζυμικής τροποποίησης φυσικών βιοδραστικών ενώσεων, όπως των φυσικών αντιοξειδωτικών. Στη σταθερότητα των λιπασών σε ιοντικά υγρά επιδρά σημαντικά το είδος του ενζυμικού σκευάσματος, η φύση του φορέα ακινητοποίησης, η θερμοκρασία επώασης, το περιεχόμενο στο μέσο νερό και η φύση του ιοντικού υγρού. Η φύση του ιοντικού υγρού ασκεί σημαντική επίδραση, καθώς σε όλες τις περιπτώσεις, η αύξηση της αλκυλικής αλυσίδας του ιμιδαζολικού κατιόντος και η παρουσία του PF_6^- ανιόντος οδήγησε σε αύξηση της σταθερότητας. Τα αποτελέσματα αυτά αποδόθηκαν στις διαφορετικές ιδιότητες των ιοντικών υγρών (υδροφοβικότητα, βασικότητα δεσμών υδρογόνου, πυρηνοφιλικότητα), οι οποίες εξαρτώνται από τη φύση των ιόντων του ιοντικού υγρού. Οι ιδιότητες αυτές καθορίζουν την αλληλεπίδραση του ιοντικού υγρού με το απαραίτητο στρώμα νερού που περιβάλλει το ένζυμο αλλά και την άμεση επίδρασή του στην ενζυμική δομή. Η άμεση αυτή επίδραση μελετήθηκε μέσω φασματοσκοπικών τεχνικών, όπως FTIR και φθορισμός, και παρατηρήθηκε σημαντική συσχέτιση μεταξύ των δομικών μεταβολών των λιπασών και της σταθερότητάς τους σε ιοντικά υγρά.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η δυνατότητα χρήσης των ιοντικών υγρών ως μέσων για την καταλυόμενη από λιπάσες σύνθεση λιπόφιλων παραγώγων διαφόρων φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως φλαβονοειδών, φαινολικών γλυκοσιδίων, φαινολικών οξέων και βιταμινών. Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν πως ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά με ανιόντα BF_4^- ή PF_6^- αποτελούν, στις περισσότερες περιπτώσεις, ιδανικά μέσα για την ενζυμική τροποποίηση των φυσικών αντιοξειδωτικών. Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων η χρήση των ιοντικών υγρών οδήγησε σε σημαντικά υψηλότερες αποδόσεις, αρχικές ταχύτητες και σε αυξημένη τόπο-εκλεκτικότητα, συγκριτικά με οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται ευρέως για την τροποποίηση φυσικών αντιοξειδωτικών. Επιπρόσθετα, με την χρήση των ιοντικών υγρών ως μέσων κατέστη δυνατή η σύνθεση νέων βιοδραστικών παραγώγων, όπως υβριδικών αντιοξειδωτικών βιταμινών και φαινολικών γλυκοσιδίων. Ποικίλες παράμετροι (φύση και συγκέντρωση υποστρωμάτων, προέλευση και ποσότητα λιπάσης, φύση του ιοντικού υγρού κ.α.) βρέθηκαν να επιδρούν στην πορεία των βιοκαταλυτικών αντιδράσεων τροποποίησης φυσικών αντιοξειδωτικών. Μεταξύ αυτών, η διαλυτότητα τόσο του αντιοξειδωτικού όσο και των συντιθέμενων προϊόντων, η οποία εξαρτάται από τη φύση του ιοντικού υγρού, επιδρά σημαντικά στην απόδοση των ενζυμικών αντιδράσεων. Η χρήση των ιοντικών υγρών ως μέσων, οδήγησε στη σύνθεση λιπόφιλων παραγώγων σε κλίμακα γραμμαρίου, μέσω μίας βιοκαταλυτικής διεργασίας ενός και μόνου βήματος. Είναι σημαντικό, πως υπό βέλτιστες συνθήκες η ποσότητα των συντιθέμενων παραγώγων σε ιοντικά υγρά είναι αυξημένη έως και 8 φορές συγκριτικά με οργανικούς διαλύτες. Προκειμένου να καθοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες εφαρμόστηκε η μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (RSM). Η RSM αποδείχθηκε αποτελεσματική και για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ επιλεγμένων παραμέτρων αλλά και για τη μοντελοποίηση της επίδρασης των παραμέτρων στην απόδοση των ενζυμικών αντιδράσεων.

Τέλος, επιλεγμένα ενζυμικά συντιθέμενα, λιπόφιλα παράγωγα φυσικών αντιοξειδωτικών απομονώθηκαν από τα ιοντικά υγρά και η βιολογική τους δράση μελετήθηκε μέσω της ικανότητας αναστολής της δράσης των οξειδωτικών ενζύμων, οξειδάση της ξανθίνης και λιποξυγονάση. Τα αποτελέσματα των μελετών κατέδειξαν πως υβριδικά αντιοξειδωτικά των βιταμινών με το λιποϊκό οξύ διατηρούν την ανασταλτική δράση των πρόδρομων βιταμινών και πως οι εστέρες του φερουλικού οξέος επιδεικνύουν σημαντικά αυξημένη ανασταλτική δράση συγκριτικά με το μη τροποποιημένο υπόστρωμα.

Summary

The present study focuses on the development of a novel biocatalytic process for the modification of the structure of natural antioxidants, employing “green”, environmentally friendly and non toxic ionic liquids as reaction media. The enzymatic modification of natural antioxidants is performed through acylation reactions catalyzed by the “work horses” of biotechnology, i.e. lipases, aiming at the synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants. The importance of the feasibility of this biocatalytic process lies not only in the synthesis of lipophilic biologically active derivatives of natural antioxidants which can be applied in pharmaceutical, cosmetic and food industries, but also in the clarification and understanding of the catalytic properties and structure-function relationships of lipases in this novel category of non-conventional media.

In this sense, the thermal stability of two microbial lipases, lipase B from *Candida antarctica* and lipase from *Rhizomucor miehei*, was studied in several imidazolium based BF_4^- - or PF_6^- -containing ionic liquids. The study shows that the use of ionic liquids results in the stabilization or even, in some cases, activation of the used lipases. The significant stabilization of lipases in ionic liquids is considered to be highly advantageous, especially in comparison to conventional organic solvents widely employed for the modification of natural compounds, such as antioxidants. Several parameters, such as the type of enzyme preparation (immobilized, lyophilized or free), type of immobilization carrier, incubation temperature, water content and ionic liquid nature, were found to affect lipase stability in ionic liquids. The ionic composition of ionic liquids imposes a considerable effect, as in all cases stability was improved with the elongation of the alkyl chain of imidazolium cation and in the presence of PF_6^- as compared to the BF_4^- anion. This result can be attributed to the significant effect of different ionic liquids, depending on their properties (hydrophobicity, hydrogen bond basicity, nucleophilicity), on both the water layer surrounding the enzyme molecules as well as their direct effect on enzyme conformation. As the latter effect is still not well described in literature, several spectroscopic techniques (FTIR, fluorescence) were employed and it was found that structural modifications imposed by ionic liquids strongly correlate to lipase stability in these novel media.

Since the use of ionic liquids proved to be advantageous in terms of lipase stability, further studies focused on their use as reaction media for the lipase-catalyzed synthesis of lipophilic derivatives of several natural antioxidants (polyphenolic compounds, vitamins and

other antioxidants). Results showed that imidazolium based BF_4^- or PF_6^- -containing ionic liquids can effectively be employed for the biocatalytic modification of several natural antioxidants. In most cases, the use of ionic liquids resulted in significantly higher conversion yields, reaction rates and increased regio-selectivity as compared to conventional organic solvents widely employed for the modification of natural antioxidants. Moreover, using ionic liquids the enzymatic synthesis of several novel bioactive compounds is described, such as hybrid antioxidants of phenolic glucosides and vitamins. Several reaction parameters (nature and concentrations of substrates, origin and amount of lipase, nature of ionic liquid, etc) were found to impose a significant effect on the performance of the aforementioned enzymatic modification. Among these parameters, the solubility of both substrate and products, which strongly depends upon the nature of ionic liquid used, significantly affects the performance of the biocatalytic reactions. The use of ionic liquids as reaction media resulted in the synthesis of great amounts of lipophilic derivatives in a single step biocatalytic process. More importantly, under optimum conditions, the amount of synthesized derivatives of natural antioxidants was up to eight-fold higher, as compared to organic solvents. In order to define optimum conditions response surface methodology (RSM) was employed. In addition, RSM proved to be an efficient tool for studying the interaction between selected reaction parameters and also for modeling the effect of these parameters.

Finally, the enzymatically synthesized lipophilic derivatives of natural antioxidants were isolated and their biological activities were investigated through their ability to act as inhibitors of xanthine oxidase and lipoxygenase. These studies revealed that synthesized hybrid antioxidants of vitamins with lipoic acid maintain the inhibitory activity of unmodified vitamins and that ferulic acid lipophilic derivatives show significantly enhanced inhibitory activity as compared to the unmodified compound.

Ευχαριστίες

Κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της διδακτορικής μου διατριβής είχα την τύχη να γνωρίσω και να συνεργαστώ με ανθρώπους, οι οποίοι με βοήθησαν και συνέβαλλαν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Έτσι θα ήθελα ιδιαίτερα να ευχαριστήσω:

Τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Χαράλαμπο Σταμάτη για την καθοδήγηση που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της εργασίας αυτής, για την υποστήριξή του και την εμπιστοσύνη που μου έχει δείξει από το 2004 που βρίσκομαι στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, για όλα αυτά που με έχει διδάξει και κυρίως γιατί με την αγάπη του για την βιοτεχνολογία με έμαθε να την αγαπώ και εγώ με τη σειρά μου και να νιώθω το εργαστήριο πραγματικά σαν σπίτι μου.

Τον καθηγητή κ. Δημήτρη Κέκο για το ενδιαφέρον του, ως μέλους της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για την πορεία της εργασίας αυτής.

Τον αναπληρωτή καθηγητή κ. Επαμεινώνδα Βουτσά, μέλος της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, για τη βοήθειά του, το ενδιαφέρον και την πολύ καλή μας συνεργασία.

Τον καθηγητή κ. Φραγκίσκο Κολίση, για τη συμβολή του στην ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής.

Την Αγγελική Πολύδερα, μέλος Ι.Δ.Α.Χ. του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας, για τη βοήθεια που μου πρόσφερε απλόχερα όλα αυτά τα χρόνια, τη συμπαράστασή της και τις πάντα χρήσιμες συμβουλές της, και κυρίως γιατί με το χαμόγελό της και την όμορφη διάθεσή της οι ώρες στο εργαστήριο περνούσαν πάντα ευχάριστα.

Τον Κώστα Κονιδάρη, μέλος Ε.Τ.Ε.Π. του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας, για τη σημαντική βοήθειά του, για την απίστευτη διάθεσή του να βοηθήσει σε οτιδήποτε και όποτε και αν του το ζητούσα και κυρίως για τις συζητήσεις μας και τα πειράγματά μας που ομόρφυναν τις εργαστηριακές μου μέρες.

Τον υποψήφιο διδάκτορα Γιάννη Παυλίδη, τον συμφοιτητή, τον φίλο και αδερφό, που με ανέχεται εδώ και 10 χρόνια, που με έχει στηρίξει πραγματικά, που πάντα όση δουλειά και αν είχε έβρισκε το χρόνο να με βοηθήσει, και ειδικά για τον χρόνο που αφιέρωσε για μένα όσον αφορά στην λήψη και αποτίμηση των φασμάτων FTIR και CD, τον ευχαριστώ για όλα αυτά τα χρόνια που περάσαμε εντός και εκτός εργαστηρίου.

Τον Μανώλη Καλογερή, για την πάντα καλή του διάθεση, για την πολύτιμη βοήθειά του προπτυχιακά και μεταπτυχιακά και κυρίως για τις συζητήσεις μας σε επιστημονικά αλλά και καθημερινά ζητήματα.

Τον Ali Taha, μεταδιδακτορικό ερευνητή, για τις ωραίες στιγμές που περάσαμε μαζί και για την «ανατολίτικη» νότα στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας.

Την διδάκτορα Κατερίνα Τζιάλλα, για την καλή μας συνεργασία και αλληλοβοήθεια κατά την εκπόνηση των διδακτορικών μας διατριβών.

Τους πτυχιακούς φοιτητές, Ευαγγελία Σερέτη, Τάσο Φιλιππίδη, Δημήτρη Μπασαγιάννη, Χρύσα Κίτσιου, Δήμητρα Κογιάννου, Αθηνά Παπαδοπούλου, Βάσω-Μιχαέλα Πατήλα και Κάλη Κυριακίδη για τη βοήθειά τους, την διάθεσή τους να μάθουν και τις ωραίες στιγμές που περάσαμε όλα αυτά τα χρόνια.

Τον καθηγητή κ. Αλέξανδρο Τσελέπη για την πολύ καλή μας συνεργασία και για τη διεξαγωγή της μελέτης της βιολογικής δράσης των συντιθέμενων παραγώγων φυσικών αντιοξειδωτικών ως προς την ικανότητα αναστολής της οξείδωσης των LDL/HDL.

Τον επίκουρο καθηγητή κ. Δημήτρη Γουρνή για τη φιλοξενία του στο Εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων υλικών για την λήψη των φασμάτων FTIR.

Την λέκτορα κ. Μπαδέκα Αναστασία για τη φιλοξενία της στο Εργαστήριο Χημείας Τροφίμων για την λήψη των φασμάτων ATR-FTIR.

Τον καθηγητή κ. Γεώργιο Παπαδόπουλο για τη φιλοξενία του στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας και Βιοχημείας στο Τ.Ε.Ι. Άρτας για τη λήψη των φασμάτων κυκλικού διχρωισμού.

Τον μεταδιδάκτορα ερευνητή κ Πέτρο Καταπόδη για την πολύτιμη βοήθειά του στην λήψη και αποτίμηση των φασμάτων φασματομετρίας μάζας.

Την καθηγήτρια Sladjan Kostić Rajačić, για την λήψη και αποτίμηση των φασμάτων NMR των φλαβονοειδών και των παραγώγων τους.

Τον καθηγητή κ. Vladimir Křen και τα μέλη του Εργαστηρίου Βιομετασχηματισμών της Ακαδημίας Επιστημών της Πράγας, για τη φιλοξενία τους αλλά και για τη λήψη και αποτίμηση των φασμάτων NMR της σιλιμπίνης και των παραγώγων της.

Τους καλούς μου φίλους και συμφοιτητές Αντώνη Αντωνόπουλο και Κατερίνα Ζαραλή που ήταν κοντά μου όλα αυτά τα χρόνια και με στήριζαν με κάθε τρόπο, που ένιωθαν τις δυσκολίες μου και τις χαρές μου και δικές τους και ίσως χωρίς να το καταλαβαίνουν μου προσέφεραν τις ισορροπίες εκείνες που ήταν απαραίτητες για να καταφέρω να ολοκληρώσω τη διδακτορική μου διατριβή.

Τον φίλο μου Γιώργο γιατί ήταν κοντά μου, στήριξε την προσπάθειά μου και ανέχτηκε τις ιδιοτροπίες μου, μου έδινε τη δύναμη να συνεχίσω όταν την έχανα και που πίστευε και πιστεύει σε εμένα.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την εμπιστοσύνη στις επιλογές μου, για την κάθε είδους στήριξη που μου παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια, που μου εξασφάλισαν όλες τις ανέσεις για να μπορώ να αφιερωθώ στη δουλειά μου, επειδή πιστεύουν στις ικανότητές μου και γιατί χωρίς αυτούς τίποτε δεν θα είχε νόημα. Για όλους αυτούς τους λόγους η διδακτορική αυτή διατριβή είναι αφιερωμένη στη μαμά μου Ανθούλα, στον μπαμπά μου Χαράλαμπο, και στα αδέρφια μου Ελεάνα και Ηλία.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ίδρυμα Προποντίς για τη χορήγηση υποτροφίας κατά τα έτη 2007-2009.

Δημοσιεύσεις σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά

Από την παρούσα εργασία προέκυψαν οι ακόλουθες δημοσιεύσεις :

Katsoura M.H., Polydera A.C., Tsironis L., Tselepis A.D., Stamatis H. **(2006)** Use of ionic liquids as reaction media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency. *Journal of Biotechnology* 123, 491-503.

Katsoura M.H., Polydera A.C., Katapodis P., Kolisis F.N., Stamatis H. **(2007)** Effect of different reaction parameters on the lipase-catalyzed selective acylation of polyhydroxylated natural compounds in ionic liquids. *Process Biochemistry* 42, 1326-1334.

Katsoura M.H., Theodosiou E., Stamatis H., Kolisis F.N. **(2008)** Strategies for the biocatalytic lipophilization of phenolic antioxidants, in *Fessner W.D and Anthonsen T. (Eds), Modern Biocatalysis*. Willey Interscience, pp. 123-133.

Katsoura M.H., Polydera A.C., Tsironis L.D., Petraki M.P., Kostić Rajačić S., Tselepis A.D., Stamatis H. **(2009)** Efficient enzymatic preparation of hydroxycinnamates in ionic liquids enhances their antioxidant effect on lipoproteins oxidative modification. *New Biotechnology* 26(1-2), 83-91.

Theodosiou E., Katsoura M.H., Loutrari H., Purchartová K., Křen V., Kolisis F.N., Stamatis H. **(2009)** Enzymatic preparation of acylated derivatives of silybin in organic and ionic liquids media and evaluation of their anti-tumor proliferative activity. *Biocatalysis and Biotransformations* 27(3), 161-169.

Περιεχόμενα

Εισαγωγή	1
Θεωρητικό μέρος	5
1. Εφαρμογή λιπασών σε βιοκαταλυτικές διεργασίες	5
1.1 Βιοκατάλυση	5
1.2 Λιπάσες	8
1.2.1 Δομή και καταλυτική δράση	8
1.2.2 Εφαρμογές των λιπασών	13
1.3 Λιπάσες σε μη συμβατικά μέσα	15
1.3.1 Πλεονεκτήματα μη συμβατικών μέσων	15
1.3.2 Μέθοδοι βελτίωσης των καταλυτικών ιδιοτήτων των ενζύμων σε μη συμβατικά μέσα	20
1.3.3 Κατηγορίες μη συμβατικών μέσων	25
1.3.3.1 Διφασικά συστήματα νερού- οργανικού διαλύτη (water:water immiscible)	25
1.3.3.2 Συστήματα ελεύθερα διαλυτών (solvent free systems)	26
1.3.3.3 Αντίστροφα μικκύλια (reverse micelles)	26
1.3.3.4 Υπερκρίσιμα ρευστά (supercritical fluids)	27
1.3.3.5 Ιοντικά υγρά	28
2. Ιοντικά υγρά – «Πράσινοι διαλύτες, υψηλής τεχνολογίας για βιοκαταλυτικές διεργασίες	29
2.1 Μειονεκτήματα της χρήσης οργανικών διαλυτών	29
2.2 Ιστορία των ιοντικών υγρών	31
2.3 Γενικά χαρακτηριστικά των ιοντικών υγρών	32
2.4 Ιδιότητες των ιοντικών υγρών	35
2.4.1 Σημείο τήξης	36
2.4.2 Τάση ατμών	37
2.4.3 Ιζώδες	37
2.4.4 Πυκνότητα	38
2.4.5 Διαλυτότητα και διαλυτική ικανότητα	39
2.4.6 Πολικότητα	39
2.4.7 Θερμική σταθερότητα	40
2.4.8 Τοξικότητα	40
2.4.9 Βιοαποικοδομησιμότητα	41
2.5 Εφαρμογές των ιοντικών υγρών	42
2.6 Βιοκαταλυτικές διεργασίες σε ιοντικά υγρά	44
2.6.1 Διεργασίες με ολόκληρα κύτταρα	45
2.6.2 Ενζυμική κατάλυση	46
2.7 Παράμετροι που επιδρούν στη διεξαγωγή βιοκαταλυτικών αντιδράσεων σε ιοντικά υγρά	51
2.7.1 Επίδραση της καθαρότητας των ιοντικών υγρών	51
2.7.2 Επίδραση της πολικότητας	52
2.7.3 Επίδραση του ιζώδους	53
2.7.4 Επίδραση της ιοντικής σύστασης	53
2.7.5 Επίδραση του νερού	56
2.7.6 Σταθερότητα και δομή των ενζύμων σε ιοντικά υγρά	58
2.7.7 Διαλυτοποίηση των ενζύμων σε ιοντικά υγρά	62
2.7.8 Διαλυτότητα υποστρωμάτων σε ιοντικά υγρά	63

2.7.9 Απομόνωση προϊόντων	64
2.8 Αξιοποίηση των ιοντικών υγρών για την βιοκαταλυτική τροποποίηση φυσικών Προϊόντων	66
3. Βιοδραστικές ενώσεις – Φυσικά αντιοξειδωτικά	67
3.1 Εισαγωγή	67
3.2 Βλαπτικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών-Οξειδωτικό στρες	67
3.3 Φυσικά αντιοξειδωτικά	69
3.3.1 Κατηγορίες φυσικών αντιοξειδωτικών	72
3.3.1.1 Βιταμίνες	72
3.3.1.2 Πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά	76
3.3.1.3 Άλλα φυσικά αντιοξειδωτικά-Λιποϊκό οξύ	83
3.3.2 Περιορισμοί της χρήσης των φυσικών αντιοξειδωτικών	84
3.3.3 Τροποποιημένα παράγωγα φυσικών αντιοξειδωτικών	86
4. Τροποποίηση της δομής φυσικών αντιοξειδωτικών	91
4.1 Εισαγωγή	91
4.2 Χημική μεθοδολογία	92
4.3 Βιοτεχνολογικές διεργασίες για τη σύνθεση και τροποποίηση φυσικών αντιοξειδωτικών	93
4.3.1 Βιοτεχνολογία φυτών	94
4.3.2 Βιοκαταλυτικές διεργασίες-Βιομηχανική Βιοτεχνολογία	98
4.4 Βιοκαταλυτική τροποποίηση φυσικών αντιοξειδωτικών	100
4.4.1 Βιοκαταλυτική τροποποίηση φλαβονοειδών	102
4.4.2 Βιοκαταλυτική τροποποίηση φαινολικών οξέων	106
Υλικά και Μέθοδοι	111
5.1 Υλικά	111
5.1.1 Αντιδραστήρια	111
5.1.1.1 Ενζύμα	111
5.1.1.2 Υποστρώματα	112
5.1.1.3 Ιοντικά υγρά	114
5.1.1.4 Οργανικοί διαλύτες	116
5.1.1.5 Άλλα αντιδραστήρια/υλικά	116
5.1.2 Υλικά χρωματογραφίας	116
5.2 Μεθοδολογία	117
5.2.1 Χημική σύνθεση βινυλ-εστέρων φαινολικών οξέων	117
5.2.2 Χημική σύνθεση MOM-υποκατεστημένου κουμαρικού οξέος	117
5.2.3 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών	118
5.2.4 Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE	118
5.2.5 Καθαρισμός πρωτεϊνών	119
5.2.6 Παρασκευή διασυνδεδεμένων ενζυμικών συσσωματωμάτων (CLEAs) της Λιπάσης B από <i>Candida antarctica</i>	120
5.2.7 Αντιδράσεις τροποποίησης φυσικών αντιοξειδωτικών	120
5.2.7.1 Ενζυμική αντίδραση ακυλίωσης φλαβονοειδών	120
5.2.7.2 Ενζυμική αντίδραση ακυλίωσης φαινολικών γλυκοσιδίων και σιλμπίνης	121
5.2.7.3 Ενζυμική αντίδραση εστεροποίησης φαινολικών οξέων	121
5.2.7.4 Ενζυμική αντίδραση σύνθεσης υβριδικών αντιοξειδωτικών	122
5.2.7.5 Πειραματικός σχεδιασμός για τη μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης	122
5.2.7.6 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των ενζυμικών αντιδράσεων	124
5.2.7.7 Διαχωρισμός αντιδρώντων-Καθαρισμός ιοντικού υγρού	127

5.2.8 Μελέτες σταθερότητας των λιπασών σε ιοντικά υγρά	128
5.2.8.1 Μελέτη θερμικής σταθερότητας	128
5.2.8.2 Μελέτη σταθερότητας λιπασών προ-επωασμένων σε ιοντικά υγρά (ionic liquid pretreated)	128
5.2.8.3 Μελέτη λειτουργικής σταθερότητας	129
5.2.9 Δομικές μελέτες των λιπασών σε ιοντικά υγρά	130
5.2.9.1 Μελέτες μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού	130
5.2.9.2 Μελέτες μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου (FTIR)	132
5.2.9.3 Μελέτες μέσω κυκλικού διχρωισμού	135
5.2.10 Μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης των συντιθέμενων παραγώγων – Ικανότητα Αναστολής της δράσης οξειδωτικών ενζύμων	137
5.2.10.1 Αναστολή της δράσης της οξειδάσης της ξανθίνης	137
5.2.10.2 Αναστολή της δράσης της λιποξυγονάσης τύπου I από το φυτό σόγια	138
Αποτελέσματα και Συζήτηση	141
6. Μελέτη σταθερότητας λιπασών σε ιοντικά υγρά	141
6.1 Μελέτη σταθερότητας ακινητοποιημένων λιπασών	143
6.2 Μελέτη σταθερότητας λυοφιλιωμένων λιπασών	151
6.3 Μελέτη σταθερότητας ελεύθερων λιπασών	157
6.4 Δομικές μελέτες των λιπασών σε ιοντικά υγρά	167
6.4.1 Δομικές μελέτες λιπασών σε ιοντικά υγρά μέσω κυκλικού διχρωισμού	167
6.4.2 Δομικές μελέτες λιπασών σε ιοντικά υγρά μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού	170
6.4.3 Δομικές μελέτες λιπασών σε ιοντικά υγρά μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου	181
6.4.3.1 Ανάλυση της δομής ακινητοποιημένων λιπασών μέσω FTIR	184
6.4.3.2 Ανάλυση της δομής λυοφιλιωμένων λιπασών μέσω FTIR	189
6.4.3.3 Ανάλυση της δομής ελεύθερων λιπασών μέσω FTIR	193
7. Βιοκαταλυτική τροποποίηση της δομής φυσικών αντιοξειδωτικών σε ιοντικά υγρά	199
7.1 Μελέτη ενζυμικής ακυλίωσης φαινολικών γλυκοσιδίων	200
7.2 Μελέτη ενζυμικής ακυλίωσης γλυκοσιλιωμένων φλαβονοειδών	208
7.3 Ενζυμική ακυλίωση της σιλμπίνης σε ιοντικά υγρά	218
7.4 Επίδραση παραμέτρων στην απόδοση και εκλεκτικότητα της ενζυμικής ακυλίωσης φυσικών αντιοξειδωτικών σε ιοντικά υγρά	222
7.4.1 Μελέτη της επίδρασης της φύσης του ακυλο-δότη	223
7.4.2 Μελέτη της επίδρασης του μοριακού λόγου των υποστρωμάτων	230
7.4.3 Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας επώασης και της ενυδάτωσης του μέσου	235
7.5 Βελτιστοποίηση της βιοκαταλυτικής σύνθεσης λιπόφιλων παραγώγων φυσικών αντιοξειδωτικών σε ιοντικά υγρά μέσω της μεθοδολογίας επιφάνειας απόκρισης	237
7.5.1 Πρώτος πειραματικός σχεδιασμός	239
7.5.2 Δεύτερος πειραματικός σχεδιασμός	245
7.6 Μελέτη εστεροποίησης φαινολικών οξέων σε ιοντικά υγρά	250
7.6.1 Μελέτη εστεροποίησης φαινολικών οξέων με τη χρήση ακινητοποιημένων λιπασών διαφορετικής προέλευσης	252
7.6.2 Μελέτη εστεροποίησης διαφόρων φαινολικών οξέων στο ιοντικό υγρό [bmim]PF ₆	255
7.6.3 Μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης των υποστρωμάτων	259

7.6.4 Μελέτη της επίδρασης της φύσης της αλκοόλης	261
7.6.5 Μελέτη της επίδρασης της φύσης του ιοντικού υγρού	262
7.6.6 Μελέτη λειτουργικής σταθερότητας λιπασών κατά τη σύνθεση λιπόφιλων παραγώγων φαινολικών οξέων σε ιοντικά υγρά	270
7.7 Μελέτη της δυνατότητας σύνθεσης υβριδικών αντιοξειδωτικών σε ιοντικά υγρά	271
7.7.1 Σύνθεση υβριδικών αντιοξειδωτικών φαινολικών γλυκοσιδίων	272
7.7.2 Σύνθεση υβριδικών αντιοξειδωτικών της σιλμπίνης	276
7.7.3 Σύνθεση υβριδικών αντιοξειδωτικών βιταμινών	277
8. Μελέτη βιολογικής δράσης των συντιθέμενων παραγώγων	281
8.1 Μελέτη δυνατότητας αναστολής της οξειδάσης της ζανθίνης	281
8.2 Μελέτη της δυνατότητας αναστολής της 15-λιποξυγονάσης	289
Συμπεράσματα	293
Βιβλιογραφία	303
Συντομογραφίες	331
Συμβολισμοί ιοντικών υγρών	332
Παράρτημα	335

Εισαγωγή

Βιοτεχνολογικές διεργασίες, αν και είναι ήδη γνωστές εδώ και χιλιάδες χρόνια, τις τελευταίες δεκαετίες έχουν διεισδύσει δυναμικά στον τομέα της υγείας και της γεωργίας, και πλέον ένα νέο πεδίο της σύγχρονης βιοτεχνολογίας, η «λευκή βιοτεχνολογία», κερδίζει συνεχώς έδαφος. Η λευκή βιοτεχνολογία αποτελεί την εφαρμογή της σύγχρονης βιοτεχνολογίας για την βιώσιμη παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας από ανανεώσιμες πρώτες ύλες, μέσω της χρήσης ζωντανών κυττάρων ή/και απομονωμένων ενζύμων. Μεταξύ των διαφόρων εφαρμογών που έχουν αναπτυχθεί στα πλαίσια της λευκής βιοτεχνολογίας, η βιοκαταλυτική τροποποίηση φυσικών βιοδραστικών ενώσεων, όπως των φυσικών αντιοξειδωτικών, προσελκύει σήμερα έντονο ενδιαφέρον ως μία βιώσιμη, περιβαλλοντικά φιλική εναλλακτική των κλασικών χημικών διεργασιών που εφαρμόζονται στη βιομηχανία. Η βιοκαταλυτική τροποποίηση της δομής των φυσικών αντιοξειδωτικών μπορεί να συμβάλλει αφενός στη τροποποίηση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ενώσεων αυτών και αφετέρου στη σύνθεση νέων βιοδραστικών παραγώγων με βελτιωμένες βιολογικές δράσεις.

Με βάση τα παραπάνω, σκοπό της παρούσας μελέτης αποτελεί η ανάπτυξη μίας βιοκαταλυτικής διεργασίας για την τροποποίηση της δομής διαφόρων φυσικών αντιοξειδωτικών. Η τροποποίηση εστιάζει στην αύξηση του λιπόφιλου χαρακτήρα των ενώσεων αυτών, και πραγματοποιείται μέσω αντιδράσεων ακυλίωσης με την εφαρμογή λιπασών μικροβιακής προέλευσης. Η αξιοποίηση των λιπασών προϋποθέτει τη χρήση μέσων χαμηλής περιεκτικότητας σε νερό, των λεγόμενων μη συμβατικών μέσων. Μεταξύ των διαφόρων μη συμβατικών μέσων στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε μία νέα πολλά υποσχόμενη κατηγορία περιβαλλοντικά φιλικών, χαμηλής τοξικότητας μέσων, τα ιοντικά υγρά. Η μελέτη της βιοκαταλυτικής τροποποίησης φυσικών αντιοξειδωτικών σε ιοντικά υγρά παρουσιάζει ενδιαφέρον καθώς μπορεί να συμβάλλει τόσο στην βαθύτερη κατανόηση των καταλυτικών ιδιοτήτων των λιπασών στα νέα αυτά μέσα, όσο και στην ανάπτυξη μίας αποτελεσματικής διεργασίας για τη σύνθεση λιπόφιλων παραγώγων των φυσικών αντιοξειδωτικών, τα οποία μπορούν να βρουν εφαρμογή στις βιομηχανίες τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών.

Η παρούσα εργασία διαρθρώνεται σε τέσσερις βασικές ενότητες, οι οποίες περιλαμβάνουν το θεωρητικό μέρος, τα υλικά και τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν, μία εκτενή συζήτηση των αποτελεσμάτων και τέλος τα συμπεράσματα που προέκυψαν.

Στα κεφάλαια 1 έως 4 (θεωρητικό μέρος) επιχειρείται η θεωρητική και βιβλιογραφική προσέγγιση του θέματος και αναλυτικότερα γίνεται αναφορά στις αρχές που διέπουν την εφαρμογή των ενζύμων στα μη συμβατικά μέσα, με έμφαση στη δράση των λιπασών, οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Γίνεται μία εκτενής αναφορά των ιδιοτήτων και εφαρμογών των ιοντικών υγρών, καθώς και μία ανασκόπηση του πεδίου, όσον αφορά στην χρήση αυτών ως μέσων για την πραγματοποίηση βιοκαταλυτικών αντιδράσεων. Επίσης παρατίθενται στοιχεία για την προέλευση, τις βιολογικές δράσεις, τις εφαρμογές και περιορισμούς των εφαρμογών φυσικών αντιοξειδωτικών διαφόρων κατηγοριών. Με βάση τα δεδομένα αυτά καταδεικνύεται η σημασία της τροποποίησης της δομής των φυσικών αντιοξειδωτικών και γίνεται αναφορά στις διάφορες μεθοδολογίες που μπορούν να εφαρμοστούν, με έμφαση στην βιοκαταλυτική τροποποίηση της δομής των φυσικών αντιοξειδωτικών, η οποία αποτελεί και το κεντρικό σημείο της παρούσας εργασίας.

Στη δεύτερη ενότητα (Κεφάλαιο 5) αναφέρονται τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν.

Στην τρίτη ενότητα (Κεφάλαια 6 έως 8) παρατίθενται τα αποτελέσματα τα οποία συσχετίζονται με τα μέχρι σήμερα γνωστά βιβλιογραφικά δεδομένα. Αναλυτικά τα κεφάλαια περιλαμβάνουν:

Τη μελέτη της σταθερότητας δύο λιπασών, της λιπάσης B από *Candida antarctica* και της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* σε ιοντικά υγρά, αποτελούμενα από διαφορετικά ιμιδαζολικά κατιόντα (C_2 - C_8 mim) και ανιόντα τετραφθοριούχου βορίου (BF_4^-) ή εξαφθοριούχου φωσφόρου (PF_6^-). Η μελέτη στοχεύει στην κατανόηση της επίδρασης διαφόρων παραμέτρων στη σταθερότητα των λιπασών στα νέα αυτά μέσα, όπως της προέλευσης της λιπάσης, του είδους του ενζυμικού σκευάσματος (ακινητοποιημένο, λυοφιλωμένο και ελεύθερο), της φύσης και ιδιοτήτων των ιοντικών υγρών, της θερμοκρασίας και του περιεχόμενου νερού, στοιχεία τα οποία δεν είναι πλήρως μελετημένα και αποσαφηνισμένα με βάση τη μέχρι σήμερα βιβλιογραφία. Το πρώτο κεφάλαιο ολοκληρώνεται με τη μελέτη των σχέσεων δομής-σταθερότητας των διαφόρων σκευασμάτων των δύο λιπασών σε ιοντικά υγρά. Η μελέτη αυτή συμβάλλει τόσο στην ενίσχυση της γνώσης σχετικά με την επίδραση των ιοντικών υγρών στα δομικά χαρακτηριστικά των λιπασών, αλλά και παρέχει πληροφορίες σχετικά με τη δυνατότητα αξιοποίησης διαφόρων τεχνικών για το δομικό χαρακτηρισμό των ενζύμων στη νέα αυτά μη συμβατικά μέσα.

Το δεύτερο κεφάλαιο αφορά στη μελέτη της δυνατότητας ενζυμικής τροποποίησης της δομής φυσικών αντιοξειδωτικών διαφόρων κατηγοριών σε ιοντικά υγρά. Τα φυσικά

αντιοξειδωτικά που χρησιμοποιήθηκαν περιλαμβάνουν διάφορες πολυφαινολικές ενώσεις, βιταμίνες και άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις. Η τροποποίηση στοχεύει στην αύξηση του λιπόφιλου χαρακτήρα των φυσικών αντιοξειδωτικών και πραγματοποιείται μέσω αντιδράσεων ακυλίωσης καταλυόμενων από λιπάσες. Καθώς τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα αφορούν στην πραγματοποίηση των ενζυμικών αντιδράσεων ακυλίωσης των φυσικών αντιοξειδωτικών κυρίως σε οργανικούς διαλύτες, η ανάπτυξη της νέας αυτής βιοκαταλυτικής διεργασίας σε ιοντικά υγρά προϋποθέτει την πλήρη κατανόηση των παραμέτρων εκείνων που επιδρούν στις ενζυμικές αντιδράσεις. Για το λόγο αυτό μελετάται η επίδραση της φύσης του αντιοξειδωτικού, του ακυλο-δότη, της προέλευσης του ενζύμου, της ιοντικής σύστασης του ιοντικού υγρού, της συγκέντρωσης υποστρωμάτων και ενζύμου, της διαλυτότητας των αντιδρώντων και προϊόντων, της θερμοκρασίας και του περιεχόμενου νερού στην απόδοση, εκλεκτικότητα και ποσότητα των παραγόμενων λιπόφιλων παραγώγων των φυσικών αντιοξειδωτικών. Τέλος, με σκοπό τη μοντελοποίηση της επίδρασης διαφόρων παραμέτρων, τη μελέτη της αλληλεπίδρασης μεταξύ των παραμέτρων και τη βελτιστοποίηση της βιοκαταλυτικής διεργασίας, μελετάται η δυνατότητα εφαρμογής μίας στατιστικής μεθόδου, της μεθοδολογίας επιφάνειας απόκρισης.

Η μελέτη ολοκληρώνεται στο τρίτο κεφάλαιο, με τη μελέτη της βιολογικής δράσης και της σχέσης δομής-βιολογικής δράσης των συντιθέμενων παραγώγων. Πιο συγκεκριμένα, μελετήθηκε η ικανότητα αναστολής της δράσης δύο οξειδωτικών ενζύμων, της οξειδάσης της ξανθίνης και της λιποξυγονάσης, τα οποία εμπλέκονται στην εμφάνιση ποικίλων ασθενειών αλλά και στην αλλοίωση της ποιότητας διαφόρων διατροφικών σκευασμάτων.

Τέλος, στην τέταρτη ενότητα (Κεφάλαιο 9) αναπτύσσονται συνοπτικά τα συμπεράσματα των πειραμάτων της παρούσας μελέτης, γίνεται σύγκριση με βιβλιογραφικά δεδομένα και προτείνονται μελλοντικοί στόχοι.

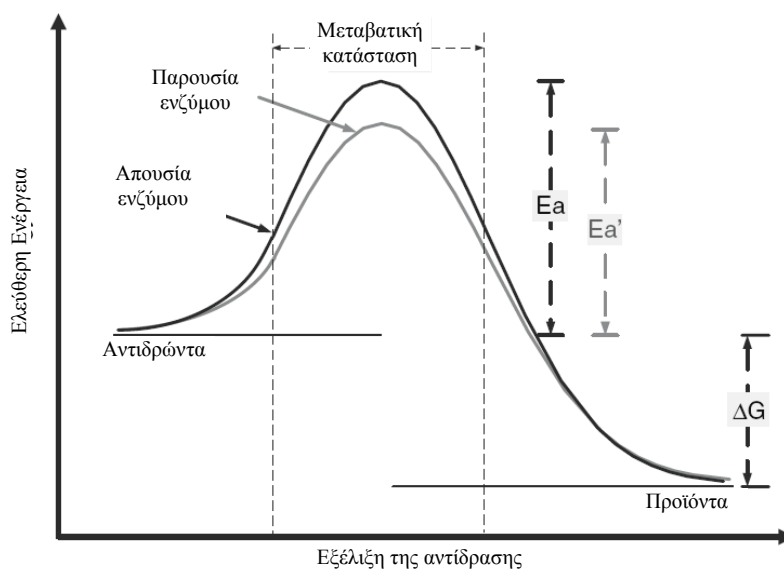
Θεωρητικό μέρος

1. Εφαρμογή λιπασών σε βιοκαταλυτικές διεργασίες

1.1 Βιοκατάλυση

Η εφαρμογή διαφόρων βιολογικών λειτουργιών για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας αποτελεί έναν ευρύ, σύγχρονο ορισμό της **βιοτεχνολογίας**. Οι βιοτεχνολογικές μετατροπές κατηγοριοποιούνται σε ποικίλες επιμέρους διεργασίες (ζυμώσεις, ζυμώσεις πρόδρομων συστατικών, βιομετασχηματισμούς), ανάλογα με τον αριθμό των απαραίτητων βημάτων και με βάση την πολυπλοκότητα των υποστρωμάτων. Οι **βιομετασχηματισμοί** ή αλλιώς οι **βιοκαταλυτικές διεργασίες**, αφορούν στη μετατροπή μίας αρχικής ένωση στο επιθυμητό προϊόν με τη χρήση ολόκληρων κυττάρων ή (μερικώς) απομονωμένων ενζύμων, μέσω μίας διαδικασίας ενός και μόνου βήματος.

Τα ένζυμα έχουν την ικανότητα να πραγματοποιούν ποικίλες χημικές αντιδράσεις πολλές από τις οποίες είναι τόσο πολύπλοκες ώστε είναι αδύνατον να επιτευχθούν με τη χρήση χημικών καταλυτών. Τα ένζυμα, ωστόσο, δεν υπόκεινται σε διαφορετικές επιστημονικές αρχές από εκείνες που διέπουν τους χημικούς καταλύτες, καθώς δρουν μέσω της μείωσης της ενέργειας ενεργοποίησης που απαιτείται για το σχηματισμό του μεταβατικού συμπλόκου, το οποίο οδηγεί στη σύνθεση του τελικού προϊόντος (**Εικόνα 1.1**).



Εικόνα 1.1 Μηχανισμός κατάλυσης, όπου E_a και E_a' η ενέργεια ενεργοποίησης στην περίπτωση εξέλιξης της αντίδρασης απουσία και παρουσία του ενζύμου, αντίστοιχα. Η τιμή ΔG αντιστοιχεί στη μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας της αντίδρασης.

Ωστόσο, τα ένζυμα επιδεικνύουν διαφορετικές ιδιότητες και πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τους χημικούς καταλύτες (**Πίνακας 1.1**). Οι περισσότερες από τις ιδιότητες των ενζύμων σχετίζονται άμεσα με τη μοριακή τους δομή. Η ενζυμική δραστηριότητα, δηλαδή η ικανότητα των ενζύμων να καταλύουν μία χημική αντίδραση, βασίζεται στην ύπαρξη της κατάλληλης δομής του ενεργού κέντρου. Η ενζυμική σταθερότητα αποτελεί μία άλλη σημαντική ιδιότητα, η οποία καθορίζεται από διάφορες διεργασίες αποδιάταξης σε συγκεκριμένες περιοχές συνήθως κοντά ή στην ενζυμική επιφάνεια. Αν και με τον όρο αυτό εννοείται, συνήθως, η θερμική σταθερότητα, εντούτοις σημαντικές ιδιότητες αποτελούν επίσης η σταθερότητα αποθήκευσης και η σταθερότητα επαναχρησιμοποίησης του ενζύμου. Μία άλλη σημαντική ιδιότητα, η οποία καθορίζεται από τη δομή του ενζύμου αποτελεί η εκλεκτικότητα, η οποία διακρίνεται επιμέρους στην εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα, την τόπο-εκλεκτικότητα και την ενάντιο-εκλεκτικότητα [Kovac *et al.*, 2000].

Πίνακας 1.1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα των ενζύμων ως καταλυτών.

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Υψηλή εκλεκτικότητα	Μεγάλη δομική πολυπλοκότητα
Υψηλή δραστηριότητα υπό ήπιες συνθήκες αντίδρασης	Υψηλό κόστος παραγωγής
Δυνατότητα μετατροπής πολύπλοκων υποστρωμάτων	Απενεργοποίηση σε ακραίες συνθήκες
Βιοαποικοδομήσιμοι καταλύτες	Σχετικά μικρός αριθμός εμπορικά διαθέσιμων βιοκαταλυτών
Μη τοξικοί	

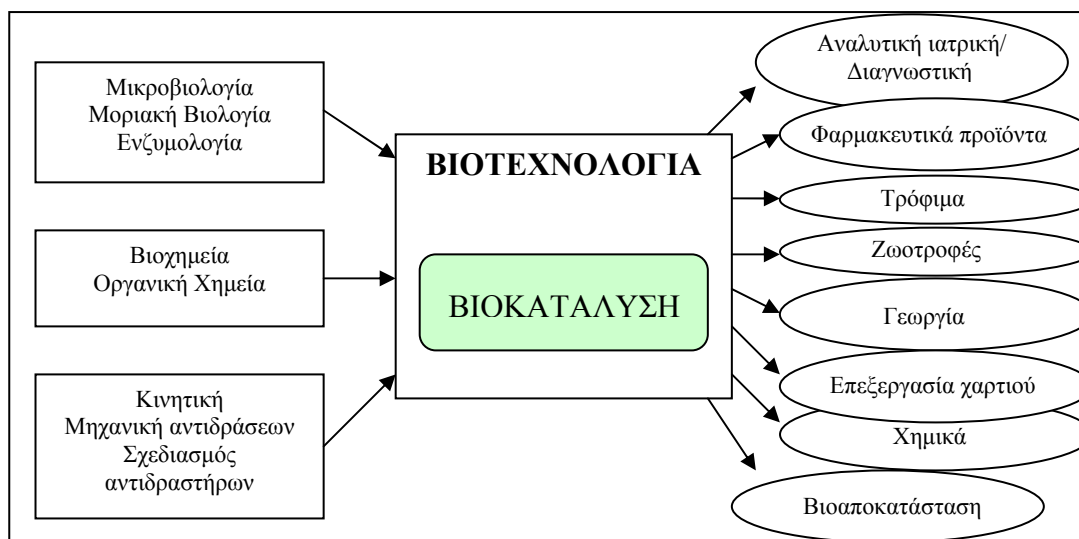
Η βιοτεχνολογία αποτελεί μία σημαντική κινητήρια δύναμη στην ανθρώπινη ιστορία. Βιοτεχνολογικές μέθοδοι για την παρασκευή και διατήρηση τροφίμων και ποτών αναπτύχθηκαν μόλις το 4000-2000 π.Χ. Με το πέρασμα στην βιομηχανική εποχή και την ανάπτυξη σημαντικής ερευνητικής δραστηριότητας η βιοτεχνολογία βρήκε νέες εφαρμογές στους τομείς υγείας (**κόκκινη βιοτεχνολογία**) και στην γεωργία (**πράσινη βιοτεχνολογία**), ενώ τα τελευταία χρόνια η **λευκή βιοτεχνολογία** κερδίζει συνεχώς έδαφος μέσω της εφαρμογής των «εργαλείων» της φύσης στη βιομηχανική παραγωγή.

Η κύρια δύναμη που οδηγεί στην ανάπτυξη και ενσωμάτωση της βιοτεχνολογίας στην βιομηχανική παραγωγή είναι τόσο οικονομική, καθώς η λευκή βιοτεχνολογία υπόσχεται

ιδιαίτερα αποτελεσματικές διεργασίες με μικρότερο λειτουργικό κόστος, όσο και κοινωνικοπολιτική, καθώς οι βιοτεχνολογικές διεργασίες ικανοποιούν την απαίτηση για περιβαλλοντικά φιλικές διεργασίες [Wohlgemuth, 2009, Tang & Zhao, 2009].

Στα πλαίσια της λευκής βιοτεχνολογίας, βιοκαταλυτικές διεργασίες έχουν εφαρμοστεί σε διάφορους τομείς (**Εικόνα 1.2**) για την παραγωγή χημικών προϊόντων (commodity chemicals), εξειδικευμένων χημικών (fine chemicals), φαρμακευτικών ενώσεων (pharmaceuticals), τροφίμων και καλλυντικών, αναλυτικών και διαγνωστικών προϊόντων, βιοκαυσίμων, βιοδιασπώμενων πολυμερών καθώς επίσης και για την προστασία του περιβάλλοντος και τη βιο-αποκατάσταση [Bommarius & Riebel, 2004a, Patel, 2007, Woodley, 2008, Mahmoudian, 2009, Tan *et al.*, 2009].

Το μέλλον της λευκής βιοτεχνολογίας και η διεύρυνση των εφαρμογών της βασίζεται σε επιστημονικά και τεχνολογικά επιτεύγματα στους τομείς ανάπτυξης και σχεδιασμού βιοδιεργασιών (process development), στην πρόοδο της ενζυμικής / μεταβολικής μηχανικής (enzyme / metabolic engineering), στην εφαρμογή της συνθετικής βιολογίας (synthetic biology), στην επέκταση της υπολογιστικής βιολογίας, στην ανάπτυξη αποτελεσματικών κατιουσών διεργασιών (downstream processing) και την αύξηση του αριθμού βιοκαταλυτών με ενδιαφέρουσες ιδιότητες [Woodley, 2008, Cirino & Sun, 2008, Tang & Zhao, 2009].



Εικόνα 1.2 Ο κεντρικός ρόλος της βιοκατάλυσης μεταξύ διαφόρων συναφών επιστημών (βιολογία, χημεία, χημική μηχανική) και βιομηχανικών κλάδων στους οποίους βρίσκει εφαρμογή.

Μεταξύ των διαθέσιμων βιοκαταλυτών, οι λιπάσες έχουν χρησιμοποιηθεί κατά κόρον σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς [Schmid & Verger, 1998, Jaeger & Eggert, 2002, Hasan *et al.*, 2006]. Η ευρεία εφαρμογή τους, οφείλεται στην εκπληκτική χήμειο-, τόπο- και

στέρεο-εκλεκτικότητά τους, στη δυνατότητα μαζικής παραγωγής τους από μικροβιακούς οργανισμούς, όπως βακτήρια και μύκητες, στη δυνατότητα ορθολογικού ανασχεδιασμού τους, καθώς οι κρυσταλλογραφικές δομές των περισσότερων είναι γνωστές, και τέλος στο γεγονός ότι δεν απαιτούν καταλυτικούς συμπαράγοντες, με αποτέλεσμα να μειώνεται σημαντικά το κόστος των διεργασιών (**Πλαίσιο 1.1**) [Jaeger & Eggert, 2002, Bornscheuer & Kaslauskas, 2004, Hult & Berglund, 2007].

Πλαίσιο 1.1 Πλεονεκτήματα της χρήσης των λιπασών.

Υψηλή τόπο-, στέρεο- και ενάντιο-εκλεκτικότητα
Υψηλή δραστικότητα σε μη συμβατικά συστήματα
Μεγάλη σταθερότητα σε θερμοκρασία, pH, και οργανικούς διαλύτες
Μετατροπή πολλών διαφορετικών υποστρωμάτων
Δεν απαιτούν καταλυτικούς συμπαράγοντες
Παράγονται σε μεγάλες ποσότητες
Δυνατότητα αντιστροφής υδρολυτικών αντιδράσεων

1.2 Λιπάσες

1.2.1 Δομή και καταλυτική δράση

Οι **λιπάσες** (EC 3.1.1.3) ανήκουν στην κατηγορία των υδρολυτικών ενζύμων (ένζυμα που καταλύουν την υδρόλυση χημικών δεσμών). Η φυσική τους δράση είναι η υδρόλυση τριγλυκεριδίων μακριάς αλυσίδας, σε γλυκερίδια και λιπαρά οξέα, κατά την διαδικασία της πέψης [Schmid & Verger, 1998].

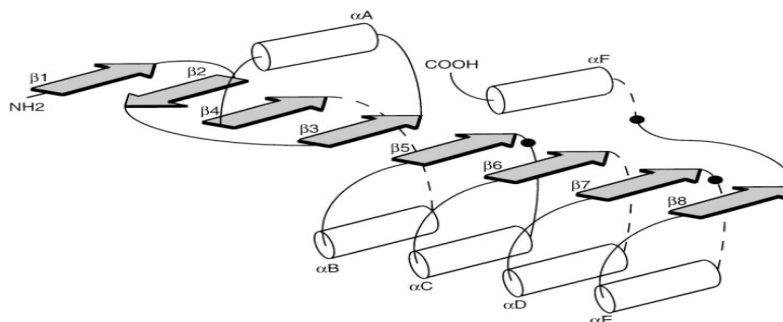
Τα ένζυμα αυτά παράγονται μαζικά από φυτά [Bhardwaj *et al.*, 2001], ζώα [Carriere *et al.*, 1994] και μικροοργανισμούς [Olempska-Beer *et al.*, 2006]. Οι μικροβιακές λιπάσες προσελκύουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον εξαιτίας των ποικίλων βιομηχανικών εφαρμογών τους [Hasan *et al.*, 2006]. Η παγκόσμια αγορά για τα ένζυμα αυτά προσδιορίζεται στα 20 εκατομμύρια US\$ [Mala & Takeuchi, 2008]. Οι λιπάσες έχουν μελετηθεί εκτενώς ως προς τι μοναδικές τους καταλυτικές ιδιότητες, οι οποίες μπορούν να βρουν εφαρμογή στη χημεία των ελαίων, στην οργανική σύνθεση, σε απορρυπαντικά και διατροφικά σκευάσματα, στην επεξεργασία υφασμάτων και δέρματος [Saxena *et al.*, 2003, Hasan *et al.*, 2006].

Στην πλειοψηφία τους, τα ένζυμα αυτά αποτελούν εξωκυτταρικές, όξινες γλυκοπρωτεΐνες, μοριακού βάρους μεταξύ των 20 και 60 kDa. Οι περισσότερες απομονωμένες λιπάσες περιέχουν ένα ποσοστό 2–15% υδατανθρακικών ομάδων. Η ανάλυση της πρωτοταγούς δομής λιπασών διαφορετικής προέλευσης έδειξε πως ο αριθμός των αμινοξέων μπορεί να ποικίλει από 270 έως 641 κατάλοιπα [Hari Krishna & Karanth, 2002].

Η πρώτη μελέτη της δομής μικροβιακής λιπάσης ήταν αυτή της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* [Brady *et al.*, 1990] και πραγματοποιήθηκε μέσω κρυσταλλογραφικής ανάλυσης ακτίνων Χ. Η τεχνική αυτή αποτελεί και σήμερα το πιο ευρέως διαδεδομένο εργαλείο για την ανάλυση της τρισδιάστατης δομής βιολογικών μακρομορίων. Εντούτοις, τα τελευταία χρόνια έχουν εφαρμοστεί νέες προσεγγίσεις για τη μελέτη των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής ή των αλληλεπιδράσεων με άλλα μόρια ή βιομόρια. Αυτές περιλαμβάνουν ενόργανες τεχνικές (κυκλικός διχρωισμός CD, φασματοσκοπία υπερύθρου FTIR, φασματοσκοπία μάζας MS, πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός NMR, φασματοσκοπία συντονισμού ηλεκτρικού spin ESR, διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης DSC, φθορισμομετρία κ.α.), μεθόδους χημικής τροποποίησης των πρωτεϊνικών μορίων και εφαρμογή εργαλείων βιοπληροφορικής διαθέσιμων μέσω διαδικτυακών βάσεων δεδομένων [Mala & Takeuchi, 2008].

Όλες οι λιπάσες, των οποίων οι τρισδιάστατες δομές είναι γνωστές, ανήκουν στην κατηγορία των α/β υδρολασών [Ollis *et al.*, 1992, Grochulski *et al.*, 1994, Egloff *et al.*, 1995, Uppenberg *et al.*, 1995, Schrag *et al.*, 1997]. Η δομή αυτή αποτελείται από ένα κεντρικό β-πτυχωτό φύλλο, έως οκτώ β-πτυχών (b1–b8), συνδεδεμένο με έξι, το περισσότερο, α-έλικες (A–F), με ελάχιστες διαφοροποιήσεις (**Εικόνα 1.3**).

Μία σημαντική δομική περιοχή των λιπασών αποτελεί η θέση πρόσδεσης του υποστρώματος. Η διερεύνηση της δομής και δράσης των λιπασών έχει καταδείξει πως, ένζυμα με διαφορετική προέλευση έχουν σημαντικά διαφορετικές θέσεις πρόσδεσης [Pleiss *et al.*, 1998, Schmidt-Danner, 1999]. Οι διαφορές στο μέγεθος και την υδροφοβικότητα/λιποφιλικότητα των θέσεων πρόσδεσης καθορίζουν και την εξειδίκευση της λιπάσης.



Εικόνα 1.3 Αναδίπλωση α/β υδρολάσης. Οι α-έλικες απεικονίζονται ως κύλινδροι και οι β-πτυχές ως βέλη. Η θέση κάθε καταλοίπου του ενεργού κέντρου εμφανίζεται ως συμπαγής κύκλος, το κατάλοιπο σερίνης βρίσκεται μετά την β₅ πτυχή, τα κατάλοιπα ασπαραγινικού/ γλουταμινικού μετά την β₇ πτυχή και η ιστιδίνη στην θηλιά μεταξύ της β₈ πτυχής και της έλικας F.

Ανάλογα με την γεωμετρία της θέσης πρόσδεσης, προκύπτουν τρεις υποομάδες (Πίνακας 1.2),

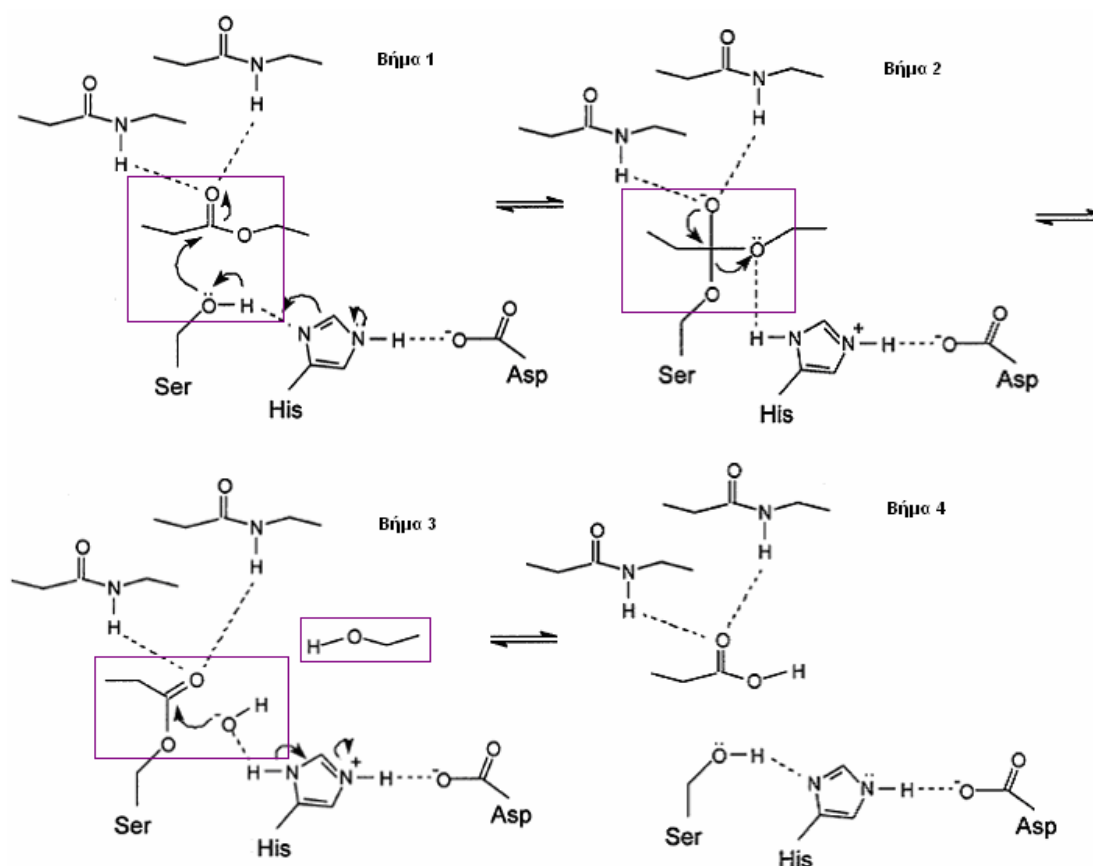
1. Μία σχισμοειδής θέση πρόσδεσης,
2. Μία χοανοειδής θέση πρόσδεσης, και
3. Μία θέση πρόσδεσης με μορφή σήραγγας.

Πίνακας 1.2 Σχηματική αναπαράσταση της θέσης πρόσδεσης και προσδιορισμός της θέσης του καλύμματος (lid) τριών μικροβιακών λιπασών [Pleiss *et al.*, 1998].

Όψη	Πλάγια όψη	Εμπρόσθια όψη	Κάτοψη
Λιπάση B από <i>C. antarctica</i>			
Λιπάση από <i>R. miehei</i>			
Λιπάση από <i>C. rugosa</i>			

Το ενεργό κέντρο των λιπασών εμφανίζει μεγάλη ομοιότητα με εκείνο των σερινοπρωτεασών. Αποτελείται από μία σερίνη (Ser), μία ιστοιδίνη (His) και ένα ασπαραγινικό (Asp) ή γλουταμινικό (Glu) οξύ, την αποκαλούμενη καταλυτική τριάδα [Brady *et al.*, 1990, Schmidt-Danner, 1999, Petersen *et al.*, 2001]. Η πυρηνόφιλη σερίνη βρίσκεται στο C-τελικό άκρο της b5 πτυχής, στο εσωτερικό ενός ιδιαίτερα συντηρημένου πενταπεπτιδίου GX₁SX₂G (όπου το G αντιστοιχεί σε γλυκίνη, το S σε σερίνη, το X₁ σε ιστοιδίνη και το X₂ σε γλουταμινικό ή ασπαραγινικό), σχηματίζοντας μία χαρακτηριστική β-στροφή, τον «πυρηνόφιλο αγκώνα» [Jaeger *et al.*, 1999, Akoh *et al.*, 2004].

Ο καταλυτικός μηχανισμός (**Εικόνα 1.4**) στηρίζεται στην σερίνη του ενεργού κέντρου και μία άλλη δομική περιοχή, την οξυανιονική οπή. Η οξυανιονική οπή σχηματίζεται από δύο αμιδικές ομάδες ενός καταλοίπου του N-τελικού άκρου της λιπάσης και ενός, γειτονικού της σερίνης του καταλυτικού κέντρου, καταλοίπου προς την πλευρά του C-τελικού άκρου και σταθεροποιείται μέσω δυνάμεων van der Waals με την b₅-πτυχή [Paiva *et al.*, 2000].



Εικόνα 1.4 Καταλυτικός μηχανισμός λιπασών.

Η υδρόλυση του υποστρώματος ξεκινά με μία πυρηνόφιλη προσβολή από το οξυγόνο του υδροξυλίου της καταλυτικής σερίνης προς τον ενεργοποιημένο καρβονυλικό άνθρακα

του εστέρα. Δημιουργείται τότε ένα μεταβατικό τετραεδρικό ενδιάμεσο, το οποίο χαρακτηρίζεται από το αρνητικό φορτίο του καρβονυλικού οξυγόνου του εστέρα και από τέσσερα άτομα συνδεδεμένα με τον καρβονυλικό άνθρακα σε τετραεδρική διάταξη. Σε αυτό το στάδιο του καταλυτικού μηχανισμού αναγνωρίζονται και οι απαραίτητοι δεσμοί υδρογόνου που σταθεροποιούν το υπόστρωμα στη μεταβατική κατάσταση. Αυτοί σχηματίζονται μεταξύ,

1. του ασπαραγινικού/γλουταμινικού του ενεργού κέντρου και της ιστιδίνης,
2. της ιστιδίνης και της σερίνης,
3. της ιστιδίνης και της αλκυλομάδας του υποστρώματος, και
4. του καρβοξυλικού οξυγόνου του υποστρώματος και των αμινοξέων της οξυανιονικής οπής.

Η απουσία κάποιου από αυτούς τους δεσμούς, λόγω της στερεοδιάταξης του υποστρώματος, μπορεί να προκαλέσει την αστάθεια του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος, δηλαδή της μεταβατικής κατάστασης, με αποτέλεσμα η κατάλυση είτε να γίνεται πολύ αργά, είτε να μην πραγματοποιείται καθόλου. Η πυρηνόφιλη προσβολή ενισχύεται από την ιστιδίνη του ενεργού κέντρου, στην οποία μεταφέρεται ένα πρωτόνιο, από την υδροξυλομάδα της σερίνης. Ακολουθώντας, το πρωτόνιο μεταφέρεται στο εστερικό οξυγόνο με αποτέλεσμα τη σχάση του εστερικού δεσμού. Σε αυτό το στάδιο το οξικό τμήμα του υποστρώματος και η πυρηνόφιλη σερίνη εστεροποιούνται με αποτέλεσμα τη δημιουργία του ομοιοπολικού ενδιαμέσου και το αλκυλικό τμήμα του υποστρώματος αποχωρεί.

Το επόμενο στάδιο είναι αυτό της απακυλίωσης, όπου ένα μόριο νερού υδρολύει το ομοιοπολικό ενδιάμεσο. Αυτό το μόριο νερού ενεργοποιείται από την ιστιδίνη, η οποία του αποσπά ένα πρωτόνιο. Το προκύπτον ιόν (OH^-) προσβάλλει τον καρβονυλικό άνθρακα της ακυλομάδας που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με τη σερίνη. Και πάλι σχηματίζεται ένα μεταβατικό, αρνητικά φορτισμένο τετραεδρικό ενδιάμεσο, το οποίο σταθεροποιείται μέσω αλληλεπιδράσεων με την οξυανιονική οπή. Η ιστιδίνη δίνει ένα πρωτόνιο στο οξυγόνο της καταλυτικής σερίνης, η οποία στη συνέχεια απελευθερώνει την ακυλομάδα. Μετά την απομάκρυνση του δεύτερου προϊόντος το ένζυμο είναι και πάλι έτοιμο να δεχτεί υπόστρωμα και να το υδρολύσει [Cygler *et al.*, 1994, Jaeger *et al.*, 1999].

Το ενεργό κέντρο των λιπασών καλύπτεται από ένα επιφανειακό κινούμενο στοιχείο, το αποκαλούμενο κάλυμμα ή καπάκι (lid or flap). Πρόκειται για μία ολιγοπεπτιδική ομάδα, αποτελούμενη από μία ή δύο α-έλικες ή από ένα τμήμα βρόχου, συνδεδεμένη με το ένζυμο μέσω ευέλικτων δομικών στοιχείων [Brzozowski *et al.*, 1991, Grochulski *et al.*, 1993, Pleiss *et al.*, 1998, Jaeger *et al.*, 1999]. Η δομική αυτή περιοχή έχει συνδεθεί με το φαινόμενο της

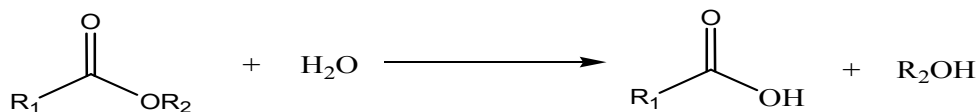
διεπιφανειακής ενεργοποίησης των λιπασών. Κατά την επαφή της λιπάσης με την διεπιφάνεια, το κάλυμμα μετακινείται, μετατρέποντας την «κλειστή» μορφή του ενζύμου σε «ανοιχτή». Το άνοιγμα του καλύμματος συνιστά μία αλλαγή της διαμόρφωσης της λιπάσης. Συγκεκριμένα, καθώς το κάλυμμα απομακρύνεται από το ενεργό κέντρο, η υδρόφιλη πλευρά του (εκτεθειμένη στον διαλύτη στην φυσική διαμόρφωση του ενζύμου), βυθίζεται μερικώς σε μία πολική κοιλότητα, προηγούμενα γεμάτη με ομοιόμορφα κατανομημένα μόρια νερού. Ταυτόχρονα, η υδρόφοβη πλευρά του καλύμματος καθίσταται πλήρως εκτεθειμένη, επεκτείνοντας έτσι σημαντικά την μη πολική επιφάνεια γύρω από το ενεργό κέντρο. Η διαδικασία αυτή οδηγεί σε αύξηση της συγγένειας του ενζύμου για το υπόστρωμά του, και παράλληλα επιτρέπει την πρόσδεση της λιπάσης στην διεπιφάνεια [Verger, 1997, Overbeeke *et al.*, 2000]. Ωστόσο, το κάλυμμα δεν αποτελεί κοινό δομικό στοιχείο όλων των λιπασών. Η λιπάση B από *Candida antarctica*, δεν διαθέτει κάλυμμα και δεν επιδεικνύει το φαινόμενο της διεπιφανειακής ενεργοποίησης [Verger, 1997]. Άλλα ένζυμα επιδεικνύουν διεπιφανειακή ενεργοποίηση μόνο παρουσία συγκεκριμένων υποστρωμάτων [Jaeger & Reetz, 1998, Hari Krishna & Karanth, 2002].

1.2.2 Εφαρμογές των λιπασών

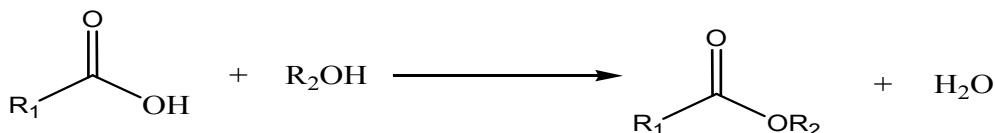
Το μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για τις λιπάσες πηγάζει πιθανά από τρεις κύριους λόγους. Πρώτον τη μοριακή βάση της καταλυτικής λειτουργίας αυτών των ενζύμων. Οι λιπάσες, αν και είναι υδατοδιαλυτά ένζυμα, καταλύουν αντιδράσεις με αδιάλυτα στο νερό λιπιδικά υποστρώματα σε μεσεπιφάνειες νερού-ελαίου. Η δυνατότητα αυτή συνδέεται με τα μοναδικά χαρακτηριστικά των λιπασών, και έχει καταστήσει τα ένζυμα αυτά χρήσιμα μοντέλα για τη μελέτη των αντιδράσεων που καταλύονται σε μεσεπιφάνειες [Alberghina & Lotti, 1998]. Ο δεύτερος λόγος συνδέεται με τη συσχέτιση των λιπασών με παθολογικές καταστάσεις, όπως η αθηρογένεση και η υπερλιπιδαιμία [Farroqui *et al.*, 1987, Tsutsumi, 2003 Hasham & Pillarisetti, 2006] και τη σημασία τους στη ρύθμιση και το μεταβολισμό, καθώς προϊόντα της λιπολυτικής τους δράσης (ελεύθερα λιπαρά οξέα και διακυλ-γλυκερόλες) διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην κυτταρική ενεργοποίηση και σε διαδικασίες μεταγωγής σήματος [Watt & Steinberg, 2008]. Οι λιπάσες εμφανίζουν την ικανότητα κατάλυσης όχι μόνο υδρολυτικών αντιδράσεων αλλά και αντιδράσεων σύνθεσης (**Εικόνα 1.5**). Τέλος, η υψηλή τόπο-εκλεκτικότητα, στέρεο-εκλεκτικότητα και εκλεκτικότητά τους ως προς το υπόστρωμα, μειώνουν το σχηματισμό παραπροϊόντων, το κόστος επεξεργασίας αποβλήτων και το ενεργειακό κόστος των διεργασιών καθώς δρουν υπό ήπιες συνθήκες πίεσης και

θερμοκρασίας [Kazlauskas & Bornscheuer, 1998, Schmidt-Danner, 1999, Villeneuve *et al.*, 2000, Jaeger & Eggert, 2002, Villeneuve, 2007].

Υδρόλυση

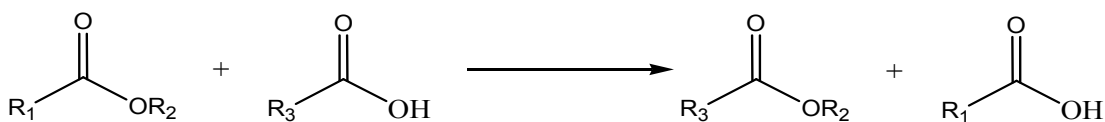


Εστεροποίηση

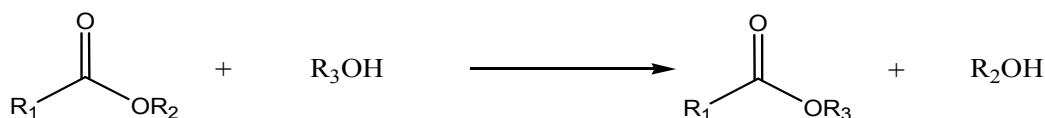


Μετεστεροποίηση

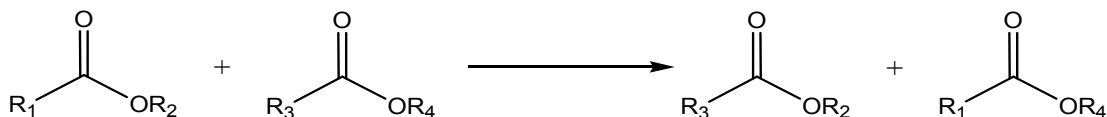
Οξείδωση



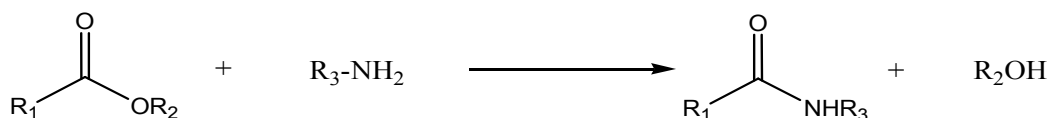
Αλκοόλυση



Διεστεροποίηση



Αμινόλυση



Εικόνα 1.5 Αντιδράσεις καταλύμενες από λιπάσες.

Μέσω της ικανότητας κατάλυσης συνθετικών αντιδράσεων οι λιπάσες μπορούν να εφαρμοστούν στην βιομηχανία φαρμάκων για το διαχωρισμό ρακεμικών μιγμάτων ή τη σύνθεση χειρόμορφων ενώσεων [Gotor-Fernández *et al.*, 2006, Ghanem, 2007]. Στον τομέα των τροφίμων μπορούν να βρουν εφαρμογές στην τροποποίηση λιπών και ελαίων, διεργασίες στις οποίες η τόπο-εκλεκτικότητα και εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα επιτρέπει τη σύνθεση συγκεκριμένων τριγλυκεριδίων [Hills, 2003, Gupta *et al.*, 2003, Salameh & Wiegel,

2007], καθώς επίσης και σε αντιδράσεις λιποφιλίσωσης μέσω συνδυασμού υδρόφιλων ενώσεων (σάκχαρα, αμονιξέα, βιταμίνες, πολυφαινολικά συστατικά) με λιπόφιλα μόρια [Villeneuve, 2007].

Ωστόσο, η επίτευξη των συνθετικών αυτών αντιδράσεων είναι θερμοδυναμικά ανέφικτη σε υδατικά μέσα και άρα απαραίτητη προϋπόθεση για τη βιομηχανική τους αξιοποίηση αποτελεί η εφαρμογή των λιπασών σε μέσα χαμηλής περιεκτικότητας σε νερό, τα επονομαζόμενα «**μη συμβατικά μέσα**».

1.3 Λιπάσες σε μη συμβατικά μέσα

1.3.1 Πλεονεκτήματα μη συμβατικών μέσων

Παρά την ύπαρξη κάποιων πρώιμων δεδομένων [Sym, 1936] και επιχειρημάτων που στήριζαν τη δυνατότητα των ενζύμων να διατηρούν την καταλυτική τους δραστηριότητα σε σχεδόν άνυδρους οργανικούς διαλύτες, η επικρατούσα αντίληψη ήταν πως τα ένζυμα παρέμεναν καταλυτικά ενεργά αποκλειστικά σε υδατικά διαλύματα. Για τον λόγο αυτό, τα αποτελέσματα του Klibanov στα τέλη της δεκαετίας του '70 σχετικά με την εστεροποίηση της N-ακετυλ-L-τρυπτοφάνης σε χλωροφόρμιο [Klibanov *et al.*, 1977], προκάλεσαν έκπληξη στην επιστημονική κοινότητα.

Σε σύντομο χρονικό διάστημα [Zaks & Klibanov, 1986], κατέστη προφανές πως ούτε η προέλευση, το είδος του ενζύμου ή η φύση του διαλύτη αποτελούσαν περιοριστικούς παράγοντες για την χρήση των οργανικών διαλυτών ως μέσων καθώς διάφορα ένζυμα, όπως λιπάσες, πρωτεάσες, οξειδοαναγωγάσες και άλλα, δρουν σε διάφορους οργανικούς διαλύτες.

Το μεγάλο ενδιαφέρον για την πραγματοποίηση βιοκαταλυτικών αντιδράσεων στους οργανικούς διαλύτες πήγαζε από το γεγονός πως τα μέσα αυτά αποτελούσαν μία εναλλακτική στους περιορισμούς που επέβαλλε η χρήση των ενζύμων σε υδατικά μέσα. Τα πλεονεκτήματα της εφαρμογής των οργανικών διαλυτών ως μέσων για την επίτευξη ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων μπορούν γενικά να συνοψιστούν στα εξής σημεία:

1. Αυξημένη διαλυτότητα υδρόφοβων υποστρωμάτων, αδιάλυτων ή μερικώς διαλυτών στο νερό.
2. Μετατόπιση της ισορροπίας υδρολυτικών αντιδράσεων προς την κατεύθυνση της σύνθεσης η οποία δεν ευνοείται θερμοδυναμικά σε υδατικά μέσα.
3. Περιορισμός των εξαρτώμενων από το νερό παράπλευρων αντιδράσεων, όπως της υδρόλυσης, της ρακεμοποίησης και του πολυμερισμού.

4. Δυνατότητα εύκολης απομόνωσης των ενζύμων καθώς αυτά δεν διαλυτοποιούνται σε υδρόφοβα μέσα.
5. Εύκολη απομόνωση προϊόντων με τη χρήση διαλυτών χαμηλού σημείου ζέσεως και υψηλής τάσης ατμών.
6. Δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των οργανικών διαλυτών.
7. Περιορισμός των μικροβιακών επιμολύνσεων.

Επιπρόσθετα των πλεονεκτημάτων αυτών εντυπωσιακή ήταν η ανακάλυψη πως τα ένζυμα, σε αυτά τα αφύσικα περιβάλλοντα, αποκτούν ιδιότητες όπως αυξημένη σταθερότητα, διαφορετική στέρεο-εκλεκτικότητα ή εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα, μοριακή μνήμη καθώς και τη δυνατότητα κατάλυσης ασυνήθιστων αντιδράσεων [Klibanov, 1989, Otto *et al.*, 1998, Holland, 2001, Hari Krishna and Karanth, 2002, Villeneuve, 2007, Illanes, 2008]. Οι καταλυτικές ιδιότητες των ενζύμων στα μη συμβατικά μέσα φαίνεται να εξαρτώνται από ποικίλες παραμέτρους.

Η φύση του χρησιμοποιούμενου διαλύτη αποτελεί μία παράμετρο που επιδρά σημαντικά στα καταλυτικά χαρακτηριστικά των ενζύμων σε άνυδρους οργανικούς διαλύτες. Οι οργανικοί διαλύτες μπορούν να τροποποιήσουν την δομή των ενζύμων, μεταβάλλοντας τη δραστικότητα, σταθερότητα και εκλεκτικότητα [Dordick, 1992, Hari Krishna & Karanth, 2002, Krieger *et al.*, 2004, Clark, 2004]. Ωστόσο, η φύση του οργανικού διαλύτη δεν είναι σημαντική μόνο όσον αφορά την τροποποίηση της ενζυμικής δομής, καθώς τα μέσα αυτά μπορούν να τροποποιούν και την αλληλεπίδραση μεταξύ του ενζύμου και των υποστρωμάτων ή των προϊόντων. Έχει αναφερθεί πως υψηλή διαλυτότητα ενός υποστρώματος σε ένα διαλύτη, οδηγεί σε μείωση της διαθεσιμότητας των μορίων του υποστρώματος στο ένζυμο και κατά συνέπεια σε μείωση του καταλυτικού ρυθμού μέσω αύξησης της σταθεράς K_m [Dordick, 1992, Gupta & Roy, 2004, Guo & Xu, 2006]. Αντίστοιχα, στην περίπτωση των προϊόντων, ενώσεις οι οποίες αλληλεπιδρούν ισχυρά με το ενεργό κέντρο του ενζύμου και δεν μπορούν να διαφύγουν προς τον κύριο όγκο του διαλύτη παραμένουν συνδεδεμένες στο ένζυμο [Dordick, 1992, Van Tol *et al.*, 1995, Anderson *et al.*, 2002, Gupta & Roy, 2004].

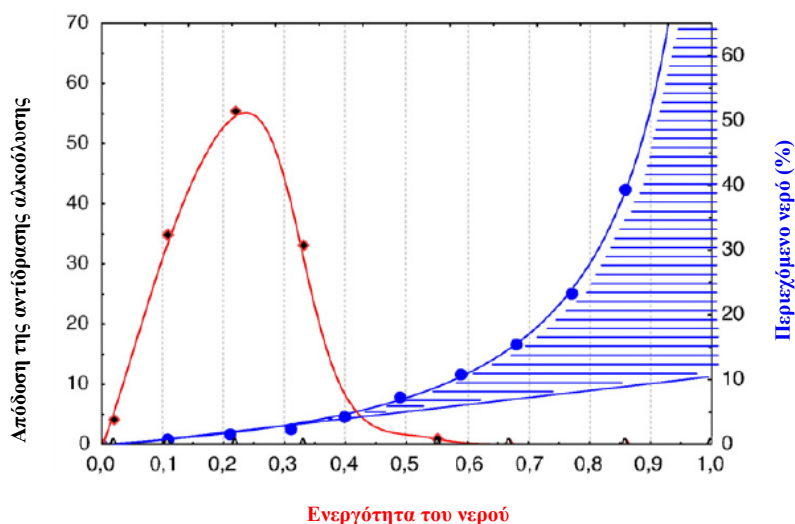
Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη για μία συγκεκριμένη βιοκαταλυτική διεργασία, ακόμα και σήμερα δεν μπορεί να βασιστεί πλήρως σε μία σειρά καθορισμένων αρχών. Βασικό κριτήριο για την επιλογή αυτή συνιστά η συμβατότητα του οργανικού διαλύτη, όσον αφορά στην ικανότητα διατήρησης της ενζυμικής δραστικότητας και σταθερότητας [Hari Krishna & Karanth, 2002, Bommarius & Riebel, 2004a].

Λαμβάνοντας υπόψη την υδροφιλικότητα του διαλύτη, έχει διατυπωθεί η άποψη πως η ενζυμική δραστηριότητα και σταθερότητα είναι υψηλότερη σε υδρόφοβα παρά σε υδρόφιλα μέσα, εξαιτίας της ικανότητας των τελευταίων να απομακρύνουν μόρια νερού από το απαραίτητο στρώμα νερού του ενζυμικού μορίου [Arnold, 1990, Gupta, 1992, Bommarius & Riebel, 2004a, Alvaro & Illanes, 2008]. Για την περιγραφή της επίδρασης της υδροφοβικότητας των διαλυτών, επιχειρήθηκε η συσχέτιση της ενζυμικής δραστηριότητας με την παράμετρο $\log P$, του συντελεστή κατανομής ανάμεσα στην οκτανόλη και το νερό [Laane *et al.*, 1987]. Η παράμετρος $\log P$ αποτελεί μέτρο της υδροφοβικότητας του διαλύτη. Χρησιμοποιώντας την παράμετρο αυτή βέλτιστοι διαλύτες, όσον αφορά στην ενζυμική δραστηριότητα, είναι εκείνοι με $\log P > 4$, ακολουθούμενοι από εκείνους με $2 < \log P < 4$, ενώ μειωμένη δραστηριότητα παρατηρείται σε διαλύτες με $\log P < 2$. Η τιμή $\log P$ του διαλύτη, αν και αποτελεί έναν ευρέως χρησιμοποιούμενο δείκτη, δεν μπορεί να εφαρμοστεί για να εξηγήσει καθολικά την εξάρτηση των καταλυτικών χαρακτηριστικών των ενζύμων από τη φύση του διαλύτη. Το γεγονός αυτό οφείλεται στον αυστηρό φορμαλισμό της παραμέτρου $\log P$, η οποία δεν λαμβάνει υπόψη ειδικές αλληλεπιδράσεις του διαλύτη με το ένζυμο (όπως για παράδειγμα την περίπτωση αναστολής της ενζυμικής δράσης) ή την επίδραση άλλων παραμέτρων, όπως για παράδειγμα της διηλεκτρικής σταθεράς του μέσου, στην ενζυμική δραστηριότητα [Zaks & Klibanov, 1988, Narayan & Klibanov, 1993]. Η διηλεκτρική σταθερά ϵ αποτελεί μία ευρέως διαδεδομένη κλίμακα μέτρησης της πολικότητας του διαλύτη. Η επίδραση της διηλεκτρικής σταθεράς θεωρείται σημαντική καθώς πρακτικά όλες οι μη ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις στις πρωτεΐνες είναι ηλεκτροστατικής φύσης [Narayan & Klibanov, 1993]. Άλλες παράμετροι οι οποίες έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατηγοριοποίηση των διαθέσιμων οργανικών διαλυτών, περιλαμβάνουν την ικανότητα μετουσίωσης (denaturing capacity), την διαλυτότητα του νερού, τη διπολική ροπή (dipole moment, μ), την πολωσιμότητα κ.α. [Bommarius & Riebel, 2004a].

Μία άλλη σημαντική παράμετρο, η οποία επιδρά στις καταλυτικές ιδιότητες των ενζύμων, αποτελεί η περιεκτικότητα του συστήματος σε νερό. Το νερό επιδρά στα ένζυμα με διαφορετικούς τρόπους, είτε τροποποιώντας τη δομή τους μέσω σχηματισμού ομοιοπολικών δεσμών και διαταράσσοντας τους δεσμούς υδρογόνου, είτε τροποποιώντας τη διάχυση των αντιδρώντων, ή επηρεάζοντας τη θέση της θερμοδυναμικής ισορροπίας της αντίδρασης. Συνήθως, η βέλτιστη περιεκτικότητα του μέσου σε νερό κυμαίνεται σε μία μικρή περιοχή τιμών. Για την ποσοτικοποίηση της περιεκτικότητας σε νερό χρησιμοποιείται συχνά η **θερμοδυναμική ενεργότητα του νερού (a_w)**. Η a_w μπορεί να οριστεί ως ο λόγος της πίεσης

ατμών του νερού σε διάλυμα (p) προς την πίεση ατμών του καθαρού νερού (p_0): $a_w = p/p_0$. Η παράμετρος αυτή καθορίζει ουσιαστικά την θέση της θερμοδυναμικής ισορροπίας υδρολυτικών αντιδράσεων καθώς και την κατανομή του νερού μεταξύ διαφορετικών φάσεων, οι οποίες ανταγωνίζονται για τα μόρια νερού [Halling, 1989]. Η δραστηρότητα επηρεάζεται σαφέστατα από το επίπεδο ενυδάτωσης του ενζύμου και η a_w , σε αντίθεση με το περιεχόμενο στο μέσο νερό, συχνά προβλέπει μία βέλτιστη τιμή, η οποία δεν μεταβάλλεται ακόμα και εάν άλλες παράμετροι του συστήματος της αντίδρασης μεταβληθούν [Halling, 1994, Bell *et al.*, 2001]. Αποτελέσματα διάφορων μελετών καταδεικνύουν τη θετική επίδραση χαμηλών τιμών ενεργότητας του νερού στην απόδοση των ενζυμικών συνθετικών αντιδράσεων [Wehtje & Adlercreutz, 1997, Humeau *et al.*, 1998, Viklund *et al.*, 2003, Adamczak *et al.*, 2005, Sakaki *et al.*, 2006]. Η μελέτη της επίδρασης της a_w και του περιεχομένου νερού στην ικανότητα ενζυμικής κατάλυσης αντιδράσεων μεταφοράς ακυλίου αποδίδεται συνήθως με καμπύλες, όπως αυτή της **Εικόνας 1.6**. Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την ρύθμιση της αρχικής a_w του συστήματος της αντίδρασης, όπως η χρήση κορεσμένων διαλυμάτων αλάτων [Halling, 1992, Zacharis *et al.*, 1997] ή τον συνεχή έλεγχο κατά τη διάρκεια της αντίδρασης [Kaur *et al.*, 1997, Won & Lee, 2001, Petersson *et al.*, 2007].

Άλλες σημαντικές παράμετροι που επιδρούν στα καταλυτικά χαρακτηριστικά των λιπασών στα μη συμβατικά μέσα περιλαμβάνουν το pH, τη θερμοκρασία, τη παρουσία προσθέτων, τη φύση και συγκέντρωση των υποστρωμάτων [Reetz, 2002, Bommarius & Riebel, 2004a, Illanes *et al.*, 2008].

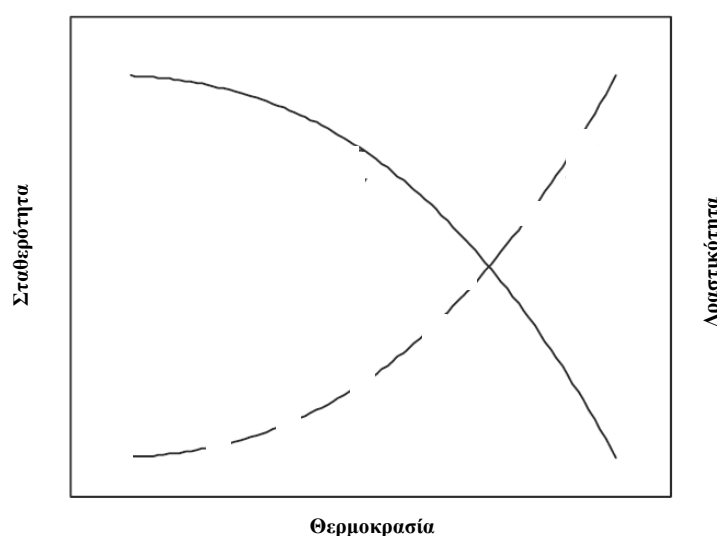


Εικόνα 1.6 Επίδραση της ενεργότητας του νερού και του περιεχομένου νερού στην απόδοση ενζυμικής αντίδρασης αλκοόλυσης [Foglia & Villeneuve, 1997].

Εξαιτίας της ιοντικής δομής των ενζύμων, το pH αποτελεί μία παράμετρο η οποία επηρεάζει σημαντικά τις καταλυτικές τους ιδιότητες. Η αλλαγή της τιμής του pH μπορεί να τροποποιήσει την κατανομή των φορτίων στο ενεργό κέντρο και την επιφάνεια του ενζυμικού μορίου. Όσον αφορά στην ενζυμική δραστηριότητα, έχει παρατηρηθεί η μείωση της ταχύτητας των ενζυμικών αντιδράσεων σε ακραίες τιμές pH, με τη βέλτιστη δραστηριότητα να παρατηρείται συνήθως σε μεσαίες τιμές [Yang *et al.*, 1993, Bommarius & Riebel, 2004a, Illanes *et al.*, 2008].

Όπως και σε κάθε βιολογικό σύστημα, έτσι και στην περίπτωση των ενζυμικών αντιδράσεων, η θερμοκρασία διαδραματίζει σημαντικό ρόλο. Η παράμετρος αυτή επηρεάζει τόσο την ενζυμική δραστηριότητα όσο και την σταθερότητα. Η αύξηση της τιμής της θερμοκρασίας οδηγεί σε αύξηση της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης αλλά και σε αύξηση του ρυθμού απενεργοποίησης του ενζύμου (**Εικόνα 1.7**).

Σε χαμηλές θερμοκρασίες (συνήθως μέχρι 30°C) και για μικρά χρονικά διαστήματα επώασης, ο ρυθμός απενεργοποίησης είναι αμελητέος και έτσι η ταχύτητα της αντίδρασης αυξάνει με αύξηση της θερμοκρασίας. Ωστόσο, σε υψηλότερες θερμοκρασίες, η συγκέντρωση των ενεργών ενζυμικών μορίων μειώνεται, και σε πολύ υψηλές τιμές (>60°C) σε πολλές περιπτώσεις η απενεργοποίηση είναι τόσο γρήγορη που η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης θεωρείται μηδενική [Beadle *et al.*, 1999]. Η σταθερότητα των ενζύμων αποτελεί ιδιότητα εξαρτώμενη από το χρόνο και άρα το θερμοκρασιακό βέλτιστο αναμένεται να μειώνεται με την πάροδο του χρόνου επαφής του ενζυμικού μορίου με το μέσο της αντίδρασης [Halling, 2001, Bommarius & Riebel, 2004a, Illanes *et al.*, 2008].



Εικόνα 1.7 Σχηματική απεικόνιση της επίδρασης της θερμοκρασίας στην ενζυμική σταθερότητα (συνεχής γραμμή) και δραστηριότητα (διακεκομμένη γραμμή) [Illanes *et al.*, 2008].

Καθώς οι αντιδράσεις ακυλίωσης που καταλύονται από λιπάσες είναι αντιστρεπτές, η δυνατότητα μετατόπισης της θερμοδυναμικής ισορροπίας της ενζυμικής αντίδρασης προς την κατεύθυνση της σύνθεσης είναι ιδιαίτερα σημαντική. Η δυνατότητα αυτή παρέχεται με τη ρύθμιση του μοριακού λόγου των υποστρωμάτων, ώστε το ένα από τα δύο να χρησιμοποιείται σε περίσσεια. Στη πλειοψηφία των αντιδράσεων μεταξύ ενός υδρόφιλου και ενός υδρόφοβου μορίου, συνήθως το υδρόφιλο είναι αυτό που χρησιμοποιείται σε περίσσεια [Reetz, 2002, Mellou *et al.*, 2005, Chebil *et al.*, 2007a, Vafiadi *et al.*, 2008]. Μία εναλλακτική προσέγγιση αποτελεί η χρήση εστέρων των ακυλο-δοτών. Σε αυτή την περίπτωση συνήθως τα παραγόμενα παραπροϊόντα απομακρύνονται υπό μειωμένη πίεση, δυνατότητα η οποία δεν παρέχεται σε αντιδράσεις απευθείας εστεροποίησης, όπου παραπροϊόν αποτελεί το νερό [Compton *et al.*, 2000, Passicos *et al.*, 2004].

Η χρήση προσθέτων (άλατα, ολιγοσακχαρίτες, στεμματοειδείς αιθέρες) έχει εφαρμοστεί επίσης σε αρκετές περιπτώσεις για τη ρύθμιση της ενζυμικής δραστηριότητας, σταθερότητας και εκλεκτικότητας [Triantafyllou *et al.*, 1997, Reetz, 2002, Villeneuve, 2007].

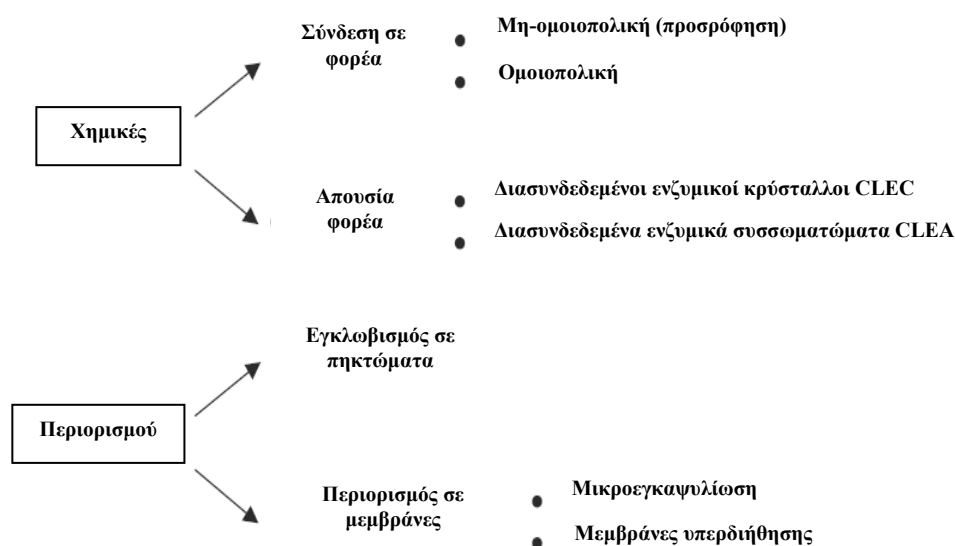
1.3.2 Μέθοδοι βελτίωσης των καταλυτικών ιδιοτήτων των ενζύμων σε μη συμβατικά μέσα

Παρά τα ποικίλα πλεονεκτήματα, σημαντικό θέμα και μειονέκτημα της χρήσης των οργανικών διαλυτών ως μέσων σε βιοκαταλυτικές διεργασίες, αποτελεί η μεγάλη μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας στα μέσα αυτά σε σχέση με το νερό. Πολλές μελέτες επικεντρώθηκαν στο ζήτημα αυτό οδηγώντας όχι μόνο στον προσδιορισμό των αιτιών αυτού του φαινομένου αλλά και στον σχεδιασμό στρατηγικών για την επίλυσή του. Διάφορες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί και περιλαμβάνουν την ακινητοποίηση των ενζύμων [Villeneuve *et al.*, 2000, Vulfson *et al.*, 2001, Adamczak & Hari Krishna, 2004, Mateo *et al.*, 2007, Illanes, 2008], καθώς και την εφαρμογή της πρωτεϊνικής μηχανικής για τη βελτιστοποίηση των καταλυτικών τους ιδιοτήτων σε υδατικά και μη μέσα [Kragl *et al.*, 1996, Adamczak & Hari Krishna, 2004, Bommaris & Riebel, 2004b, Hudson *et al.*, 2005].

Η ακινητοποίηση θεωρείται γενικά απαραίτητη για την εφαρμογή των βιοκαταλυτών σε μη συμβατικά μέσα. Κατά την κλασική μέθοδο εφαρμογής των ενζύμων υπό τη μορφή λυοφιλωμένης σκόνης συχνά τα μόρια του ενζύμου δεν είναι εύκολα προσβάσιμα από τα υποστρώματα ή υφίστανται σημαντικές δομικές τροποποιήσεις, οι οποίες οδηγούν σε απενεργοποίηση [Sheldon, 2007]. Η ακινητοποίηση των ενζύμων προσδίδει σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με τους μη ακινητοποιημένους βιοκαταλύτες, όπως αυξημένη

σταθερότητα, δυνατότητα εύκολης ανάκτησης του βιοκαταλύτη από το σύστημα της αντίδρασης, δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του βιοκαταλύτη [Mateo *et al.*, 2007, Sheldon, 2007]. Οι διάφορες μέθοδοι ακινητοποίησης μπορούν να διακριθούν σε εκείνες που επιτυγχάνονται μέσω της αλληλεπίδρασης του ενζύμου (συνήθως μέσω χημικών δεσμών) με κάποιο υλικό και σε εκείνες όπου το ένζυμο εγκλωβίζεται σε έναν περιορισμένο χώρο (Εικόνα 1.8).

Η πρώτη κατηγορία μπορεί περαιτέρω να διακριθεί σε μεθόδους, οι οποίες περιλαμβάνουν τη χημική πρόσδεση του ενζύμου μέσω ομοιοπολικών δεσμών σε έναν αδρανή φορέα (carrier-bound) και σε εκείνες όπου τα ενζυμικά μόρια συνδέονται μεταξύ τους μέσω κάποιου δι-λειτουργικού παράγοντα, απουσία κάποιου φορέα (carrier-free).



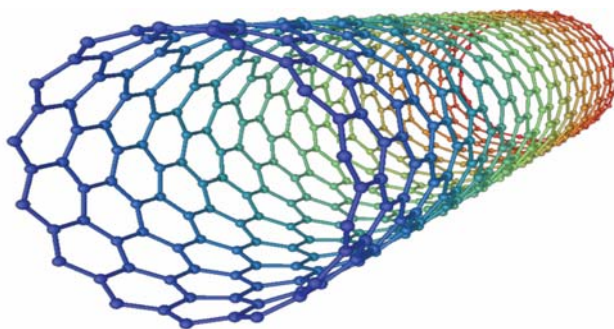
Εικόνα 1.8 Μέθοδοι ακινητοποίησης ενζύμων.

ι) Σύνδεση σε φορέα : Οι ιδιότητες των ακινητοποιημένων ενζύμων εξαρτώνται σημαντικά από τις ιδιότητες του φορέα ακινητοποίησης αλλά και από τις ιδιότητες του ενζύμου. Η αλληλεπίδραση μεταξύ αυτών οδηγεί σε ένα ακινητοποιημένο σκεύασμα με ειδικές χημικές, βιοχημικές, μηχανικές και κινητικές ιδιότητες [Sheldon, 2007].

Διάφορα υλικά έχουν χρησιμοποιηθεί ως φορείς και η επιλογή καθορίζεται από χαρακτηριστικά όπως ο υψηλός λόγος επιφάνειας προς όγκο, η συμβατότητα και η ικανότητα του φορέα να παραμένει αδιάλυτος στο μέσο της αντίδρασης, η αυξημένη μηχανική και χημική σταθερότητα, η ικανότητα διαχωρισμού και επαναχρησιμοποίησης [Illanes, 2008].

Τα είδη των φορέων που έχουν χρησιμοποιηθεί περιλαμβάνουν συνθετικά οργανικά πολυμερή, βιοπολυμερή ή ανόργανα στερεά. Συνθετικά οργανικά πολυμερή, όπως οι

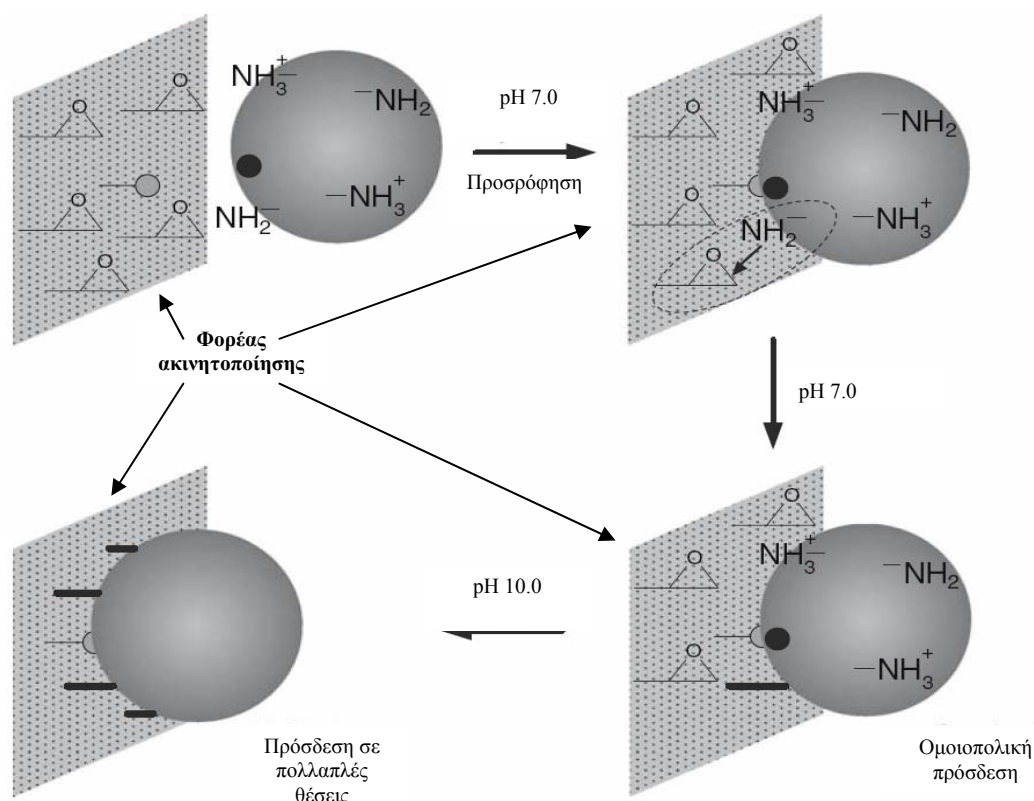
ακρυλικές ρητίνες αποτελούν φορείς ακινητοποίησης ευρέως χρησιμοποιούμενων σκευασμάτων, όπως η ακινητοποιημένη λιπάση Novozym 435[®] (λιπάση Β από *Candida antarctica*) [Kirk & Christensen, 2002, Sheldon, 2007]. Μία ευρέως χρησιμοποιούμενη και χαμηλού κόστους τεχνική ακινητοποίησης αποτελεί η χρήση του ανόργανου στερεού silica υπό τη μορφή κόκκων (granulated silica), η οποία έχει εφαρμοστεί στην περίπτωση διαφόρων εμπορικών σκευασμάτων, όπως η Lipozyme TLIM (λιπάση από *Thermomyces lanuginosa*) [Kirk & Christensen, 2002]. Άλλα ανόργανα στερεά περιλαμβάνουν την αλουμίνα (alumina), τους ζεόλιθους (zeolites), το σελίτη (celite) κ.α [Sheldon, 2007]. Ποικίλα βιοπολυμερή, όπως η κυτταρίνη, η αγαρόζη, η χυτοσάνη βρίσκουν επίσης εφαρμογή στην ακινητοποίηση ενζύμων [Krajewska, 2004]. Τέλος, έντονο ενδιαφέρον έχουν προσελκύσει και τα νανοδομημένα υλικά, και κυρίως τα νανοϋλικά βασισμένα σε άνθρακα (**Εικόνα 1.9**). Το ενδιαφέρον αυτό βασίζεται στα πλεονεκτήματα της χρήσης τους, όπως η δυνατότητα μείωσης των φαινομένων μεταφοράς μάζας και η αύξηση της λειτουργικής επιφάνειας [Asuri *et al.*, 2007, Jiang *et al.*, 2009].



Εικόνα 1.9 Νανοςωλήνας άνθρακα μονού τοιχώματος.

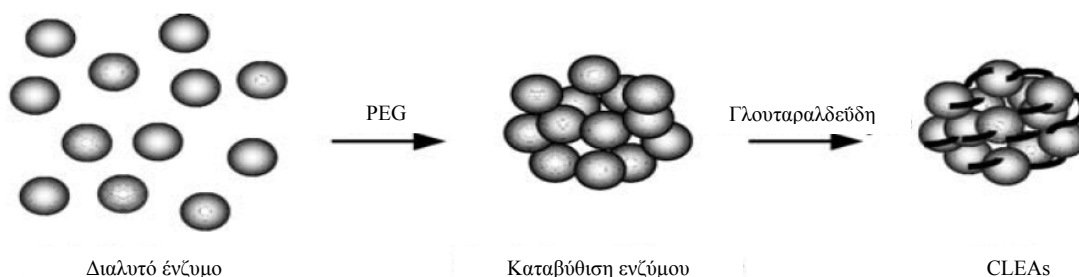
Η σύνδεση των ενζύμων στους φορείς μπορεί να γίνει μέσω ομοιοπολικής πρόσδεσης ή μέσω προσρόφησης. Στην περίπτωση ομοιοπολικής πρόσδεσης του ενζύμου (**Εικόνα 1.10**) αν και επιτυγχάνεται υψηλή λειτουργική σταθερότητα και παρέχεται η δυνατότητα προσαρμογής των επιθυμητών χαρακτηριστικών του βιοκαταλύτη για μία συγκεκριμένη διεργασία, συνήθως η απόδοση της ακινητοποίησης είναι χαμηλή, τα κινητικά χαρακτηριστικά του ενζύμου μεταβάλλονται σημαντικά και η απομόνωση του φορέα είναι γενικά δύσκολη [Cao, 2005, Petkar *et al.*, 2006]. Αντίθετα, κατά την προσρόφησης τους στον στερεό φορέα (μη-ομοιοπολική πρόσδεση), η απομόνωση και επαναχρησιμοποίηση του φορέα είναι δυνατή και η απόδοση της ακινητοποίησης γενικά υψηλή (**Εικόνα 1.10**). Ωστόσο, το μεγάλο μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η δυνατότητα διαφυγής του ενζύμου

από τον φορέα ακόμα και με μικρή τροποποίηση του μέσου της αντίδρασης [Mateo *et al.*, 2000, Torres *et al.*, 2003, Pessela *et al.*, 2005].



Εικόνα 1.10 Ακινητοποίηση ενζύμου σε πολυλειτουργικό φορέα [Illanes *et al.*, 2008].

ii) Διασύνδεση απουσία φορέα : Η διασύνδεση των ενζυμικών μορίων μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω δι-λειτουργικών παραγόντων, όπως η γλουταραλδεύδη. Η πρωτεΐνη μπορεί να βρίσκεται σε διαλυτή μορφή (διασυνδεδεμένο ένζυμο, CLE) [Tyagi *et al.*, 1999], υπό μορφή κρυστάλλων (διασυνδεδεμένοι ενζυμικοί κρύσταλλοι, CLEC) [Roy & Abraham, 2004], ή με τη μορφή συσσωματωμάτων (διασυνδεδεμένα ενζυμικά συσσωματώματα, CLEA) (Εικόνα 1.11) [Mateo *et al.*, 2004, Sheldon *et al.*, 2007]. Το προφανές πλεονέκτημα αυτών των σκευασμάτων είναι η υψηλή ειδική δραστηριότητα (δραστηριότητα (U) ανά mg βιοκαταλύτη) εξαιτίας της απουσίας του αδρανούς φορέα [Cao *et al.*, 2003].



Εικόνα 1.11 Διαδικασία σχηματισμού διασυνδεδεμένων ενζυμικών συσσωματωμάτων (CLEAs).

Η δεύτερη κατηγορία όπου το ένζυμο εγκλωβίζεται σε έναν περιορισμένο χώρο περιλαμβάνει μεθόδους εγκλωβισμού σε πηκτώματα ή τον περιορισμό σε ημιπερατές μεμβράνες. Για τον εγκλωβισμό σε πηκτώματα χρησιμοποιούνται συνήθως η πολυβινυλική αλκοόλη, η πολυουρεθάνη καθώς και πηκτώματα με βάση το αλγινικό οξύ ή το πολυακρυλαμίδιο [Wang & Ruckenstein, 1993, Wang *et al.*, 1995, Pizarro *et al.*, 1997]. Ωστόσο, η διαφυγή των ενζύμων από το υλικό αποτελεί σημαντικό μειονέκτημα της μεθόδου και η αντιμετώπισή του προϋποθέτει την αύξηση της ποσότητας της γέλης, η οποία με τη σειρά της οδηγεί σε αύξηση των φαινομένων μεταφοράς μάζας.

Ο περιορισμός σε ημιπερατές μεμβράνες επιτρέπει την εύκολη μετακίνηση των υποστρωμάτων και προϊόντων προς και από το ένζυμο καθώς και την ακινητοποίηση περισσότερων του ενός ενζυμικών τύπων για την πραγματοποίηση συζευγμένων αντιδράσεων. Ο περιορισμός μπορεί να επιτευχθεί σε μεμβράνες υπερδιήθησης ή μέσω της μικροεγκαψυλίσωσης [Khan & Vulfson, 2001, Bommarius & Karau, 2005].

Οι αυξημένες απαιτήσεις για την ανεύρεση και απομόνωση νέων λιπασών αλλά και βελτιστοποίησης των ιδιοτήτων ήδη γνωστών ενζυμικών μορίων μπορούν να ικανοποιηθούν με την εφαρμογή τεχνικών της μοριακής βιολογίας, όπως η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA και η πρωτεϊνική μηχανική, οι οποίες επιτρέπουν την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων ενζύμων με γενετικά βελτιωμένες καταλυτικές ιδιότητες και σχετικά χαμηλό κόστος.

Τη δυνατότητα αξιοποίησης αυτών των τεχνικών, παρέχουν μελέτες μοριακής μοντελοποίησης, οι οποίες έχουν αποσαφηνίσει τις παραμέτρους που επιδρούν στις καταλυτικές ιδιότητες των λιπασών. Οι μέθοδοι αυτές χρησιμοποιούν τεχνικές γενετικής μηχανικής, όπως η τοπο-κατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση [Davis *et al.*, 1990, Vernet *et al.*, 1993, Klein *et al.*, 1997, Rotticci *et al.*, 2001, Yang *et al.*, 2002, Wang *et al.*, 2007a] και η κατευθυνόμενη εξέλιξη [Tobin *et al.*, 2000, Jaeger *et al.*, 2001, Fujii *et al.*, 2005, Nakagawa *et al.*, 2007, Alvaro & Illanes, 2008].

Επιπρόσθετα της πρωτεϊνικής μηχανικής και η «**μηχανική του μέσου**» μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στην τροποποίηση των καταλυτικών ιδιοτήτων των ενζύμων [Vermue & Tramper, 1995, Bommarius & Riebel, 2004a, Alvaro & Illanes, 2008]. Η μηχανική του μέσου αφορά στην τροποποίηση του μικροπεριβάλλοντος των βιοκαταλυτών λαμβάνοντας ταυτόχρονα υπόψη τις ιδιότητες των υποστρωμάτων και προϊόντων μίας ενζυμικής αντίδρασης [Hari Krishna & Karanth, 2002]. Η κατάλληλη ρύθμιση της χημικής σύστασης του μέσου μπορεί να συμβάλλει στην επίτευξη των συνθετικών στόχων μίας βιοκαταλυτικής διεργασίας, σε τέτοιο βαθμό ώστε, η μηχανική του μέσου να αποτελεί τα τελευταία χρόνια

ένα σημαντικό πεδίο έρευνας και ανάπτυξης βιοδεργασιών με βιομηχανικές εφαρμογές [Carrea & Riva, 2006].

Η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη είναι σημαντική και ιδιαίτερα σε αντιδράσεις που περιλαμβάνουν υδρόφιλα και υδρόφοβα υποστρώματα [Lang *et al.*, 2000]. Οι παράμετροι που πρέπει να ληφθούν υπόψη στην περίπτωση αυτή περιλαμβάνουν την σημαντική διαφορά στη πολικότητα και συγγένεια των υποστρωμάτων για το διαλύτη καθώς και την διασφάλιση ικανοποιητικών αποδόσεων και ταχυτήτων της ενζυμικής αντίδρασης. Έτσι ο κατάλληλος διαλύτης θα πρέπει πρωτίστως να μην απενεργοποιεί ταχύτατα το ένζυμο. Την απαίτηση αυτή ικανοποιούν συνήθως διαλύτες με $\log P > 4$, οι οποίοι ωστόσο δεν είναι κατάλληλοι για αντιδράσεις με υποστρώματα σημαντικά διαφορετικής πολικότητας. Για τον λόγο αυτό επιλέγονται συνήθως διαλύτες μικρότερης πολικότητας όπως το ακετονιτρίλιο, η τριτοταγής βουτανόλη, η 2-μεθυλ-2-βουτανόλη κ.α, οι οποίοι επιτρέπουν έστω και την μερική διαλυτοποίηση των υποστρωμάτων [Villeneuve *et al.*, 2007].

Άλλες παράμετροι, οι οποίες πρέπει να ληφθούν υπόψη αφορούν στην άρση των περιορισμών μεταφοράς μάζας, τη χαμηλή τοξικότητα του διαλύτη, τον χειρισμό των παραπροϊόντων και αποβλήτων της ενζυμικής διαδικασίας και το συνολικό κόστος της.

Εξαιτίας διάφορων περιορισμών που έχουν ενσκήψει όσον αφορά στην χρήση οργανικών διαλυτών, νέες τάσεις εξετάζουν την εφαρμογή των λιπασών σε άλλες κατηγορίες μη συμβατικών μέσων.

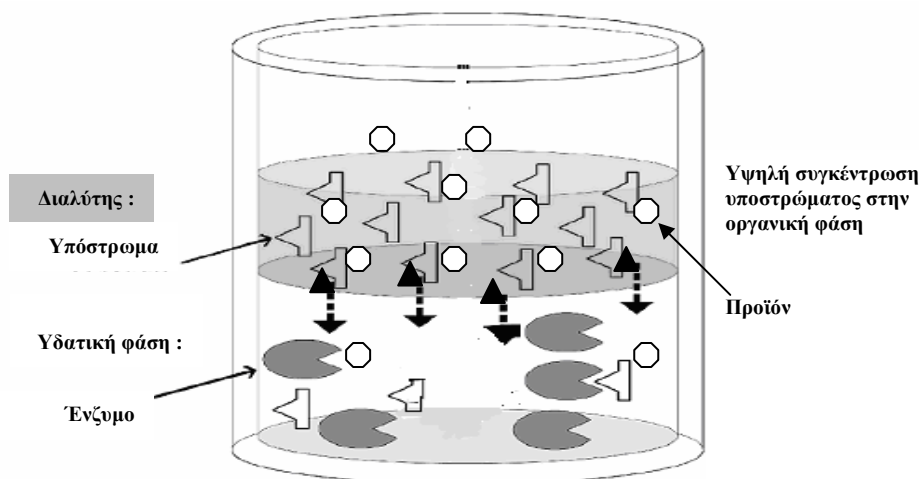
1.3.3 Κατηγορίες μη συμβατικών μέσων

Η πλειοψηφία των γνώσεων όσον αφορά στην εφαρμογή των ενζύμων σε μη συμβατικά συστήματα, προέρχονται, όπως αναφέρεται και στις προηγούμενες παραγράφους, από μελέτες σε άνυδρους οργανικούς διαλύτες. Επιπρόσθετα, ωστόσο, των μη υδατικών, μονοφασικών οργανικών συστημάτων που έχουν χρησιμοποιηθεί κατά κόρον, διάφορα νέα μη συμβατικά μέσα έχουν εφαρμοστεί για την πραγματοποίηση αντιδράσεων καταλυόμενων από λιπάσες. Αυτά περιλαμβάνουν:

1.3.3.1 Διφασικά συστήματα νερού-οργανικού διαλύτη (water:water immiscible).

Τα συστήματα αυτά αποτελούνται από δύο μακροσκοπικά διακριτές φάσεις, μία υδατική η οποία περιέχει το ένζυμο, και μία δεύτερη ενός μη αναμίξιμου με το νερό οργανικού διαλύτη, όπως οι υδρογονάνθρακες και οι αιθέρες (**Εικόνα 1.12**). Στα συστήματα αυτά επιτυγχάνεται αφενός διαχωρισμός του ενζύμου από την οργανική φάση και αφετέρου

μετατόπιση της αντίδρασης προς την ολική μετατροπή των υποστρωμάτων, λόγω συνεχούς απομάκρυνσης των προϊόντων. Διφασικά συστήματα έχουν χρησιμοποιηθεί για την τροποποίηση λιπόφιλων υποστρωμάτων [Murakami *et al.*, 2000, Wei *et al.*, 2002, Bommarius & Riebel, 2004a, Terreni *et al.*, 2005].



Εικόνα 1.12 Σχηματική αναπαράσταση ενός διφασικού συστήματος νερού-οργανικού διαλύτη.

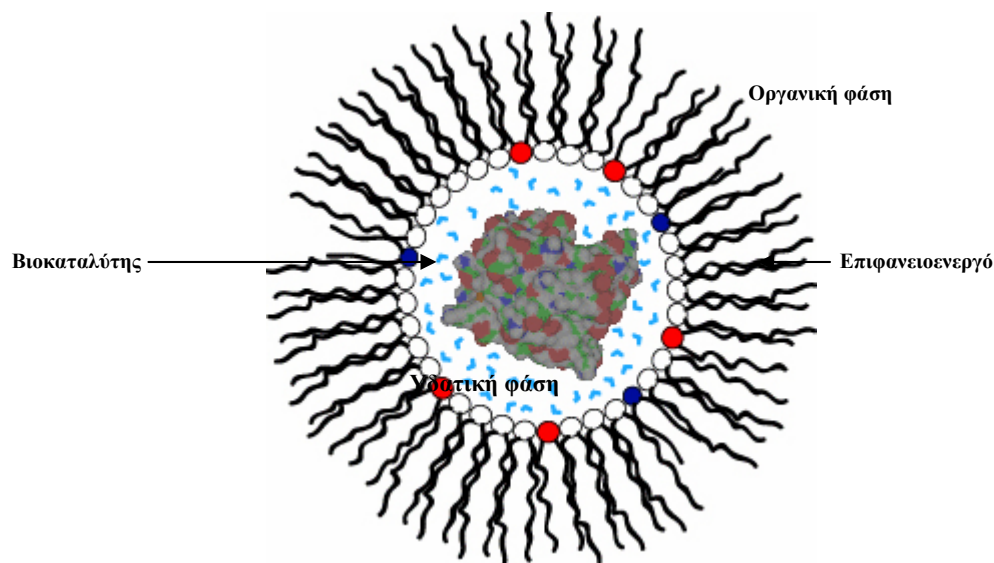
1.3.3.2 Συστήματα ελεύθερα διαλυτών (*solvent-free systems*).

Τα συστήματα αυτά βρίσκουν ευρεία εφαρμογή σε περιπτώσεις όπου είναι επιθυμητό να περιοριστεί η χρήση οργανικών διαλυτών, όπως για παράδειγμα σε διεργασίες σύνθεσης προσθέτων τροφίμων. Διάφορα πλεονεκτήματα σχετίζονται με την χρήση συστημάτων ελεύθερων διαλυτών. Η απουσία διαλύτη διευκολύνει τις κατιούσες διαδικασίες, εφόσον λιγότερα συστατικά είναι παρόντα μετά το τέλος της αντίδρασης, ελαχιστοποιώντας έτσι το κόστος της διαδικασίας. Τα συστήματα αυτά, επιπλέον, επιτρέπουν τη χρήση υψηλών συγκεντρώσεων υποστρωμάτων. Ένα σύστημα ελεύθερο διαλυτών μπορεί να είναι ένα μίγμα αντίδρασης αποτελούμενο αποκλειστικά από τα υποστρώματα σε ισομοριακές ποσότητες ή ένα από αυτά να χρησιμοποιείται σε περίσσεια [Guyot *et al.*, 1997, Stamatidis *et al.*, 1999a, Won & Lee, 2001, Kontogianni *et al.*, 2003, Hasan *et al.*, 2006].

1.3.3.3 Αντίστροφα μικκύλια (*reverse micelles*)

Τα συστήματα αυτά αφορούν σε ένζυμα παγιδευμένα σε ενυδατωμένα αντίστροφα μικκύλια επιφανειοενεργών (απορρυπαντικά, φωσφολιπίδια) σε οργανικούς διαλύτες. Τα αντίστροφα μικκύλια σχηματίζονται αυθόρμητα όταν επιφανειοενεργά διαλύονται σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες. Είναι κλειστά, σχεδόν σφαιρικά συσσωματώματα

επιφανειοενεργών μορίων (διαμέτρου 15–20Å), το εξωτερικό στρώμα των οποίων αποτελείται από τις υδρόφοβες ουρές των επιφανειοενεργών, ενώ ο εσωτερικός πυρήνας από τις πολικές κεφαλές αυτών των μορίων (**Εικόνα 1.13**).

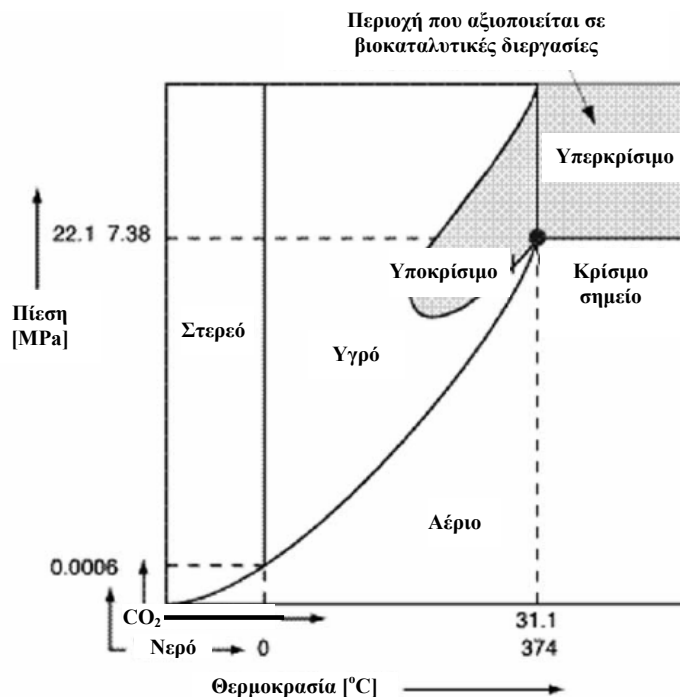


Εικόνα 1.13 Σχηματική αναπαράσταση αντίστροφου μικκυλίου.

Μία κύρια ιδιότητα των αντίστροφων μικκυλίων αποτελεί η ικανότητά τους να διαλυτοποιούν σημαντικές ποσότητες νερού και άλλων πολικών συστατικών [Carvalho & Cabral, 2000, Stamatis *et al.*, 1999b, 2001a, Bommarius & Riebel, 2004a].

1.3.3.4 Υπερκρίσιμα ρευστά (*supercritical fluids*)

Αντί για ένα λιπόφιλο οργανικό διαλύτη, υπερκρίσιμα ρευστά, όπως το διοξείδιο του άνθρακα (**Εικόνα 1.14**), μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαλύτες ή συν-διαλύτες για την ενζυμική τροποποίηση λιπόφιλων οργανικών συστατικών. Τα μέσα αυτά συνδυάζουν εξαιρετικά χαμηλό ιξώδες και καλή διάχυση των αερίων μαζί με υψηλή διαλυτότητα των αντιδρώντων και δυνατότητα εύκολης απομόνωσης των προϊόντων [Russel *et al.*, 1994, Stamatis *et al.*, 2001b, Garcia *et al.*, 2004, Cantone *et al.*, 2007].



Εικόνα 1.14 Διάγραμμα φάσης του διοξειδίου του άνθρακα.

1.3.3.5 Ιοντικά υγρά

Σε μία προσπάθεια αναζήτησης περιβαλλοντικά φιλικών μέσων, σύμφωνα με τις αρχές της πράσινης χημείας, τα ιοντικά υγρά (άλατα τα οποία παραμένουν υγρά σε θερμοκρασία δωματίου) έχουν προσελκύσει την τελευταία δεκαετία έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον ως μέσα για την πραγματοποίηση βιοκαταλυτικών αντιδράσεων. Τα μέσα αυτά επιδεικνύουν σε πολλές περιπτώσεις σημαντικά πλεονεκτήματα και ανώτερες ιδιότητες σε σχέση με τους ευρέως χρησιμοποιούμενους οργανικούς διαλύτες [Park & Kazlauskas, 2003, van Rantwijk & Sheldon, 2007, Roosen *et al.*, 2008] και θα περιγραφούν εκτενώς στο Κεφάλαιο 2.

2. Ιοντικά υγρά – «Πράσινοι» διαλύτες, υψηλής τεχνολογίας για βιοκαταλυτικές διεργασίες

2.1 Μειονεκτήματα της χρήσης οργανικών διαλυτών

Οι οργανικοί διαλύτες αποτελούν αναμφίβολα την καλύτερα μελετημένη και περισσότερο ευρέως χρησιμοποιούμενη κατηγορία των μη συμβατικών μέσων. Μέσω της μελέτης της συμπεριφοράς των ενζύμων στα μέσα αυτά, σημαντική πρόοδος έχει παρατηρηθεί στην κατανόηση των βασικών φαινομένων που διέπουν τις βιοκαταλυτικές διεργασίες σε μη συμβατικά μέσα. Μία άλλη διαπίστωση ωστόσο, σχετίζεται με το γεγονός πως η χρήση των μη συμβατικών αυτών μέσων δεν αποτελεί πανάκεια καθώς τα πλεονεκτήματα της χρήσης τους προφανώς δεν ισχύουν για όλους τους οργανικούς διαλύτες ή για όλες τις βιοκαταλυτικές αντιδράσεις.

Ένα από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα σχετίζεται με την απενεργοποίηση των ενζύμων σε οργανικούς διαλύτες υψηλής πολικότητας. Διάφορες μέθοδοι για την αντιμετώπιση του γεγονότος αυτού έχουν αναπτυχθεί, αυξάνοντας ωστόσο την πολυπλοκότητα των βιοκαταλυτικών συστημάτων καθώς και το κόστος των διεργασιών. Ο περιορισμός αυτός στη χρήση πολικών και πρωτικών διαλυτών έχει, ως επακόλουθο, επιβάλλει περιορισμούς στη διαλυτότητα των υποστρωμάτων. Ενώ τέλος, η πτητικότητα των οργανικών διαλυτών καθιστά δύσκολη την επαναχρησιμοποίησή τους και τη χρήση τους συχνά επιβλαβή για το περιβάλλον.



Εικόνα 2.1 Υδρόφοβο ιοντικό υγρό [emim]NTf₂ (κάτω φάση) το οποίο διαχωρίζεται από το εξίσου υδρόφοβο εννεάνιο από μία υδατική φάση (μπλε χρώματος). Η συγκεκριμένη απεικόνιση τονίζει πως τα μέσα αυτά θεωρούνται «πράσινοι», περιβαλλοντικά φιλικό διαλύτες [Wasserscheid, 2006].

Για όλους αυτούς τους λόγους, τις τελευταίες δεκαετίες, το έντονο ενδιαφέρον της ακαδημαϊκής κοινότητας αλλά και της βιομηχανίας έχει συγκεντρώσει η δυνατότητα εφαρμογής νέων «πράσινων» διαλυτών. Με βάση μία σειρά «πράσινων» αρχών [Anastas & Williamson, 1998] οι διαλύτες αυτοί πρέπει να είναι περιβαλλοντικά φιλικοί, λιγότερο επικίνδυνοι και να συμβάλλουν στη βελτίωση των βιομηχανικών διεργασιών (**Πλαίσιο 2.1**). Επιπλέον, τα μέσα αυτά καλούνται να διευρύνουν το φάσμα διαλυτότητας υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται σε βιοκαταλυτικές αντιδράσεις. Τα ιοντικά υγρά αποτελούν μία κατηγορία μη συμβατικών μέσων που φαίνεται να πληρεί τα παραπάνω κριτήρια (**Εικόνα 2.1**), διατηρώντας τα πλεονεκτήματα της βιοκατάλυσης σε μη συμβατικά μέσα αλλά και προσφέροντας λύση στα μειονεκτήματα της χρήσης των οργανικών διαλυτών.

Πλαίσιο 2.1 «Πράσινες» αρχές [Anastas & Williamson, 1998].

1. Η αποφυγή παραγωγής αποβλήτων είναι προτιμότερη από την εύρεση τρόπων επεξεργασίας και καθαρισμού των αποβλήτων μετά τη σύνθεσή τους.
2. Οι συνθετικές διεργασίες πρέπει να σχεδιάζονται έτσι ώστε να μεγιστοποιούν την ενσωμάτωση όλων των χρησιμοποιούμενων συστατικών στο τελικό προϊόν.
3. Όπου είναι δυνατόν, θα πρέπει οι συνθετικές διεργασίες να σχεδιάζονται έτσι ώστε να χρησιμοποιούν και να παράγουν ενώσεις με μικρή ή και μηδενική τοξικότητα για τον άνθρωπο και το περιβάλλον.
4. Τα προϊόντα πρέπει να σχεδιάζονται έτσι ώστε να διατηρούν αποτελεσματικά τον λειτουργικό τους ρόλο μειώνοντας ταυτόχρονα την τοξικότητά τους.
5. Η χρήση βοηθητικών ενώσεων (διαλύτες, παράγοντες διαχωρισμού κ.α.) θα πρέπει να είναι περιορισμένη και στην περίπτωση χρήσης τους, οι ενώσεις αυτές πρέπει να είναι αβλαβείς.
6. Το ενεργειακό κόστος θα πρέπει να είναι γνωστό και το ελάχιστο δυνατό. Οι συνθετικές διεργασίες θα πρέπει να διεξάγονται σε κανονικές συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας.
7. Οι πρώτες ύλες και τα ακατέργαστα συστατικά πρέπει να είναι ανανεώσιμα.
8. Η άσκοπη εφαρμογή συνθετικών βημάτων (στάδια προστασίας/αποπροστασίας, αποκλεισμού ομάδων και φυσικές/χημικές διαδικασίες τροποποίησης) πρέπει όπου είναι δυνατόν να αποφεύγεται.
9. Καταλυτικά αντιδραστήρια, κατά το δυνατόν εκλεκτικά, υπερέχουν των αντιδραστηρίων που επιβάλλει η στοιχειομετρία της αντίδρασης.
10. Τα προϊόντα θα πρέπει να σχεδιάζονται έτσι ώστε μετά τη χρήση τους να μην παραμένουν στο περιβάλλον αλλά να διασπώνται σε αβλαβή καταβολικά προϊόντα.
11. Οι αναλυτικές τεχνικές θα πρέπει συνεχώς να βελτιώνονται ώστε να επιτρέπουν σε πραγματικό χρόνο, τον εκ' των προτέρων προσδιορισμό και έλεγχο του σχηματισμού επικίνδυνων ενώσεων.
12. Τόσο οι ενώσεις όσο και το σκεύασμα μίας ένωσης που χρησιμοποιείται σε μία χημική διεργασία θα πρέπει να επιλέγεται έτσι ώστε να ελαχιστοποιεί την πιθανότητα πρόκλησης χημικού ατυχήματος.

Ο σύγχρονος ορισμός των **ιοντικών υγρών** χρησιμοποιεί το σημείο ζέσεώς του νερού ως σημείο αναφοράς και σύμφωνα με αυτόν, τα ιοντικά υγρά αποτελούν άλατα, τα οποία παραμένουν υγρά σε θερμοκρασίες κάτω των 100°C. Στην πράξη, τα περισσότερα ιοντικά υγρά που έχουν χρησιμοποιηθεί παραμένουν υγρά ακόμα και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Και στις δύο περιπτώσεις, ο ορισμός των ιοντικών υγρών βασίζεται στη θερμοκρασία και δεν δίνει καμία πληροφορία για τη σύσταση τους, πέραν του ότι αποτελούνται αποκλειστικά από ιόντα.

Διάφορα συνώνυμα χρησιμοποιούνται αντί του όρου «ιοντικό υγρό» όπως «τηγμένο άλας θερμοκρασίας δωματίου» (room temperature molten salt), «τηγμένο άλας χαμηλής θερμοκρασίας» (low temperature molten salt), «υγρό οργανικό άλας» (liquid organic salt). Το χαρακτηριστικό εκείνο που διαθέτουν τα ιοντικά υγρά και τα «τηγμένα άλατα» (molten salts) είναι το εύρος ρευστότητάς τους. Κανένας σχεδόν μοριακός διαλύτης δεν εμφανίζει παρόμοιο εύρος ρευστότητας με εκείνο των ιοντικών υγρών ή τηγμένων αλάτων. Η διαφορά ωστόσο μεταξύ ιοντικών υγρών και τηγμένων αλάτων εντοπίζεται στην κλίμακα θερμοκρασίας για την οποία τα συστατικά αυτά είναι ρευστά, αποδεικνύοντας πως οι δύο όροι δεν είναι ταυτόσημοι.

2.2 Ιστορία των ιοντικών υγρών

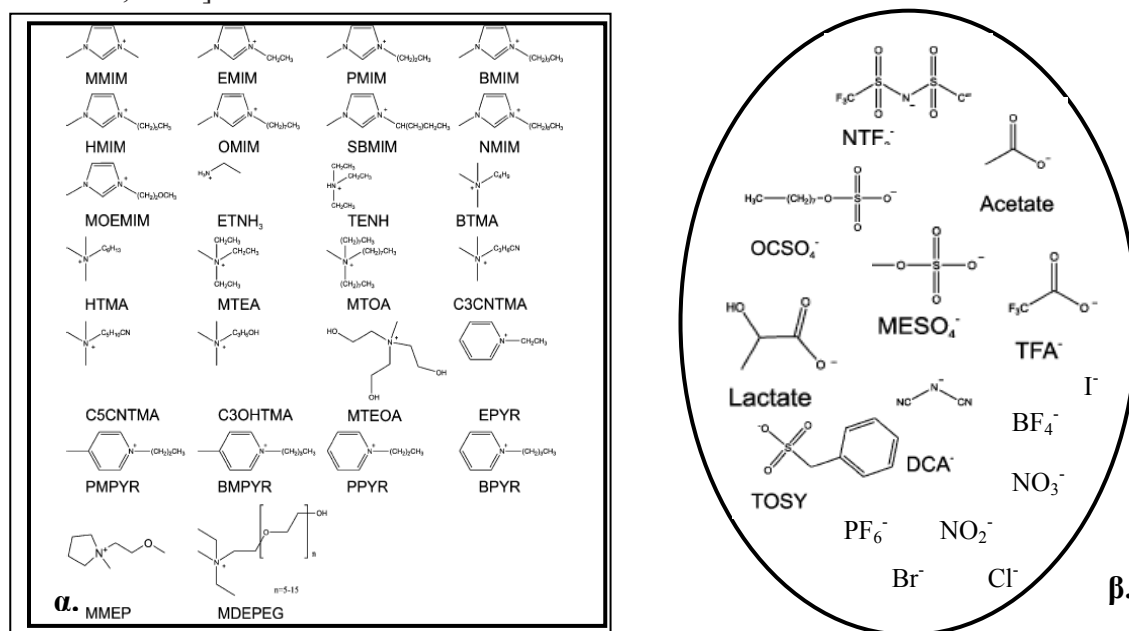
Τα ιοντικά υγρά αποτελούν μία «νέα» και ενδιαφέρουσα κατηγορία διαλυτών, αλλά ταυτόχρονα και μία κατηγορία ενώσεων των οποίων η ιστορία ξεκινά ήδη από τον 1^ο Παγκόσμιο Πόλεμο. Το 1914 σε μία προσπάθεια αναζήτησης νέων εκρηκτικών υλών ανακαλύφθηκε το νιτρικό αιθυλαμμώνιο με σημείο τήξης 12°C. Στα μέσα του 19^{ου} αιώνα σε αντιδράσεις Friedel–Crafts χρησιμοποιήθηκε μία ένωση γνωστή ως το «κόκκινο έλαιο» (red oil). Η ταυτοποίηση της ένωσης αυτής ως ιοντικό υγρό έγινε, φυσικά, πολλά χρόνια αργότερα με την χρησιμοποίηση τεχνικών πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Την δεκαετία του 1960 στο Πανεπιστήμιο του Όρεγκον αναφέρθηκε πως μίγματα μονοσθενούς χαλκού και αλκυλ-αμμωνιακού χλωρίου εμφανιζόταν συχνά σε υγρή κατάσταση [Yoke *et al.*, 1963]. Μία δεκαετία αργότερα, στο Πανεπιστήμιο της Αλαμπάμα συντέθηκε μία ασυνήθιστη κατηγορία υγρών αλάτων με μοριακό τύπο $M[Al_2(CH_3)_6X]$, όπου το M είναι ένα οργανικό ή ανόργανο κατιόν και το X είναι κάποιο αλογόνο [Atwood & Atwood, 1976]. Ωστόσο, καμία από τις προαναφερόμενες ενώσεις δεν αποτελεί τον άμεσο πρόγονο των σημερινών ιοντικών υγρών. Τα περισσότερα από τα σύγχρονα ιοντικά υγρά έχουν προέλθει απευθείας από υψηλής-θερμοκρασίας τηγμένα άλατα σε μία προσπάθεια να διατηρηθούν τα πλεονεκτήματα των τηγμένων αλάτων χωρίς τα μειονεκτήματά τους. Το 1963 ξεκίνησε στην Ακαδημία της Πολεμικής Αεροπορίας των Η.Π.Α. ένα πρόγραμμα με στόχο την αντικατάσταση του ηλεκτρολύτη τηγμένου άλατος LiCl/KCl που χρησιμοποιούταν σε θερμικές μπαταρίες. Αν και το μίγμα LiCl/KCl αποτελεί ένα ανόργανο άλας με χαμηλή θερμοκρασία τήξης (355°C),

η χρήση τέτοιων θερμοκρασιών δημιουργούσε πρόβλημα στο εσωτερικό της μπαταρίας. Για τον λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε εναλλακτικά ένα μίγμα $\text{NaCl}/\text{AlCl}_3$ με σημείο τήξης 107°C , πολύ κοντά σε εκείνο που χρησιμοποιεί ο ορισμός των ιοντικών υγρών. Στις έρευνες που ακολούθησαν, το μίγμα άλατος 1-βουτυλπυριδίνιο του χλωρίου/ AlCl_3 βρέθηκε να έχει καλύτερη συμπεριφορά και χαμηλότερη θερμοκρασία τήξης από το προηγούμενο μίγμα. Αυτό το μίγμα σηματοδότησε μία νέα εποχή για τη χρήση των ιοντικών υγρών ως μη-υδατικών νέων διαλυτών, καθώς ήταν η πρώτη φορά που οι ενώσεις αυτές προσέλκυσαν το ενδιαφέρον πολλών ερευνητικών ομάδων. Ωστόσο, τα πυριδινικά κατιόντα εμφάνιζαν το μειονέκτημα της εύκολης αναγωγής τους και σύντομα, μετά από αναζήτηση περισσότερο ανθεκτικών κατιόντων, αντικαταστάθηκαν από δι-αλκυλιμιδαζολικά κατιόντα, όπως το 1-αιθυλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο [emim], του οποίου το μίγμα με AlCl_3 οδήγησε στη σύνθεση ιοντικών υγρών ποικίλης σύστασης, με σημεία τήξης χαμηλότερα από τη θερμοκρασία δωματίου [Wilkes *et al.*, 1982]. Οι χημικές και φυσικές ιδιότητες των ιοντικών αυτών υγρών μελετήθηκαν, και οι ενώσεις αυτές χρησιμοποιήθηκαν σε οργανικές αντιδράσεις, όπου αποδείχθηκαν εξαιρετικοί διαλύτες αλλά και καταλύτες. Μετέπειτα προσπάθειες για τη σύνθεση και χαρακτηρισμό αλάτων αποτελούμενων από ιμιδαζολικά κατιόντα αλλά με περισσότερο σταθερά στο νερό ανιόντα, οδήγησαν το 1992 στην σύνθεση ιοντικών υγρών που περιείχαν νιτρικά, θειικά, οξικά ανιόντα καθώς και ανιόντα τετραφθοριούχου βορίου ή εξαφθοριούχου φωσφόρου [Wilkes & Zaworotko, 1992].

2.3 Γενικά χαρακτηριστικά των ιοντικών υγρών

Η χρήση των σταθερών ανιόντων τετραφθοριούχου βορίου και εξαφθοριούχου φωσφόρου σε ιοντικά υγρά και κυρίως η ανάπτυξη μεθόδων για την πιο αποτελεσματική σύνθεση ιοντικών υγρών [Gordon, 2002], μπορούν να θεωρηθούν τα πρώτα σημαντικά βήματα για την εμπορική σύνθεση των ενώσεων αυτών. Η εμπορική σύνθεση ιοντικών υγρών διαφέρει από την εργαστηριακή, καθώς προσανατολίζεται στην παραγωγή προϊόντων με την υψηλότερη δυνατή ποιότητα, η οποία μπορεί να επιτευχθεί με ένα λογικό κόστος. Για κάποια ιοντικά υγρά οι εταιρίες εγγυώνται τιμές καθαρότητας ακόμα και μεγαλύτερες από 99%. Τις πιο κοινές προσμίξεις αποτελούν ίχνη ουσιών, προϊόντα οξείδωσης και θερμικής αποδιάταξης, τα οποία προέρχονται από τα αρχικά αντιδρώντα, πτητικές προσμίξεις από οργανικούς διαλύτες που χρησιμοποιούνται κατά τη διαδικασία εκχύλισης, αλογόνα, πρωτικές ενώσεις και φυσικά νερό, το οποίο είναι παρόν σχεδόν σε κάθε ιοντικό υγρό, ωστόσο σε μικρότερο ή μεγαλύτερο βαθμό ανάλογα με την φύση του ιοντικού υγρού [Hilgers

& Wasserscheid, 2002]. Η παρουσία των προσμίξεων αυτών μπορεί να επιδρά στο χρώμα, στις ιδιότητες (σημείο τήξης, πυκνότητα, ιξώδες), και τη σταθερότητα του ιοντικού υγρού, αλλά πιθανά και στη δραστηρότητα των χρησιμοποιούμενων (βιο)καταλυτών, και πρέπει συνεπώς να λαμβάνεται υπόψη ανάλογα με την εφαρμογή του ιοντικού υγρού [Seddon *et al.*, 2000]. Η εύρεση μεθόδων για την ανάλυση και εξάλειψη των προσμίξεων αποτελεί ένα αναπτυσσόμενο κομμάτι της έρευνας αλλά και ιδιαίτερα επίπονο, δεδομένου του μεγάλου αριθμού των διαθέσιμων ιοντικών υγρών [Hilgers & Wasserscheid, 2002, Deetlefs & Seddon, 2003].



Εικόνα 2.2 Ευρέως χρησιμοποιούμενα, εμπορικά διαθέσιμα α. κατιόντα και β. ανιόντα ιοντικών υγρών.

Τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα ιοντικά υγρά αποτελούνται από μόνο-, δι-, και τρι-υποκατεστημένα ιμιδαζολικά κατιόντα. Ωστόσο, τα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά δεν αποτελούν τη μοναδική κατηγορία διαθέσιμων μέσων. Ήδη από το 1970 υπάρχουν αναφορές για τετρα-αλκυλφωσφορικά ιοντικά υγρά [Bradaric *et al.*, 2003], και σήμερα υπάρχουν εμπορικά διαθέσιμα ιοντικά υγρά με υποκατεστημένα πυριδινικά, πυρολιδινικά, αμμωνιακά, γουανιδινικά και άλλα κατιόντα (**Εικόνα 2.2α**). Τα κατιόντα αυτά μπορούν να συνδυάζονται με ένα μεγάλο αριθμό διαθέσιμων ανιόντων, αποτελούμενων από σουλφίδια, σουλφονίδια, αμίδια, ιμίδια, αλογόνα, ενώσεις του βορίου, του φωσφόρου, του αντιμονίου ή και καρβοξυλικές ενώσεις (**Εικόνα 2.2β**).

Τις πρώτες ύλες για τη σύνθεση των προαναφερόμενων εμπορικά διαθέσιμων ιοντικών υγρών, αποτελούν συνθετικά χημικά προερχόμενα από την επεξεργασία του

πετρελαίου. Δεδομένης της ευρείας χρήσης της πηγής αυτής και της κοινωνικοπολιτικής αστάθειας σε κάποιες από τις μεγαλύτερες πετρελαιοπαραγωγούς χώρες του κόσμου, εναλλακτικά, μη-τοξικά, βιοαποικοδομήσιμα και βιοανανεώσιμα υλικά προσελκύουν το ενδιαφέρον για την σύνθεση ιοντικών υγρών. Μία από τις κύριες πηγές των υλικών αυτών αποτελεί η φύση [Handy, 2003, Imperato *et al.*, 2007]. Θεωρητικά τόσο το άνιον όσο και το κατίον των ιοντικών υγρών μπορεί να προέρχεται από φυσικές πηγές. Τα βιοανανεώσιμα φυσικά συστατικά αποτελούν μία ιδανική εναλλακτική τόσο από περιβαλλοντικής όσο και από οικονομικής σκοπιάς.

Όσον αφορά το ανιόν φαίνεται να υπάρχουν περιορισμένες επιλογές καθώς τα περισσότερα από τα ευρέως απαντώμενα φυσικά ανιόντα οδηγούν σε ιοντικά υγρά με υψηλά σημεία τήξης [Handy, 2003]. Εξετάζοντας κλασικά οργανικά ανιόντα που απαντώνται στη φύση, προκύπτει πως τα πιο συχνά είναι τα καρβοξυλικά άλατα του οξικού, γαλακτικού και τρυγικού οξέος. Έχουν γίνει προσπάθειες για τη σύνθεση ανιόντων των ιοντικών υγρών με την χρήση αλάτων του γαλακτικού οξέος [Earle *et al.*, 1999, Pernak *et al.*, 2004]. Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί υποκατάστατα σακχάρων [Carter *et al.*, 2004, Pernak *et al.*, 2005], ουσίες όπως η καμφορά [Nobuoka *et al.*, 2005] αλλά και αμινοξέα [Fukumoto *et al.*, 2005, Ohno & Fukumoto, 2007]. Τα ανιόντα αυτά έχουν συνδυαστεί με ιμιδαζολικά, αμμωνιακά, φωσφορικά αλλά και πυρολιδινικά κατίοντα και έχουν μελετηθεί οι ιδιότητές τους. Στις περισσότερες περιπτώσεις ωστόσο απαιτείται περαιτέρω μελέτη για τη βελτίωση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων και την αύξηση της σταθερότητας των ιοντικών αυτών υγρών [Imperato *et al.*, 2007].

Η κατάσταση είναι τελείως διαφορετική όσον αφορά το κατίον των ιοντικών υγρών. Διάφορα φυσικά συστατικά όπως αμίνες, αμινικές αλκοόλες και αμινοξέα, έχουν χρησιμοποιηθεί για την σύνθεση ασύμμετρων κατιόντων αμινοξέων, εστέρων αμινοξέων [Tao *et al.*, 2005, 2006] αλλά και χειρόμορφων ιμιδαζολικών κατιόντων [Bao *et al.*, 2003, Ni *et al.*, 2005]. Χειρόμορφα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά έχουν συντεθεί και από αίθυλεστερες του τρυγικού και γαλακτικού οξέος [Wang *et al.*, 2005]. Χειρόμορφα κατίοντα έχουν συντεθεί επίσης από διάφορες φυσικές ενώσεις όπως τα σάκχαρα [Handy *et al.*, 2003, Poletti *et al.*, 2007], το πινένιο [Wang, 2003], την (1*R*, 2*S*, 5*R*)-(-)-μενθόλη [Pernak & Feder-Kubis, 2005], τη νικοτίνη [Kitazume, 2001] και τη χολίνη [Fujita *et al.*, 2005].

Η επέκταση των διαθέσιμων ιοντικών υγρών έχει σε πολύ μεγάλο βαθμό υποβοηθηθεί από την βελτίωση των μεθόδων σύνθεσης των ιοντικών υγρών [Gordon, 2002]. Η σημασία του γεγονότος αυτού δεν έγκειται απλά στην δυνατότητα αύξησης του αριθμού των

διαθέσιμων ιοντικών υγρών αλλά στη δυνατότητα προσαρμογής και επιλογής των ιδιοτήτων των ιοντικών υγρών μέσω της επιλογής του ανιόντος και κατιόντος από τα οποία συντίθενται. Η επιλογή του ανιόντος ελέγχει τις χημικές ιδιότητες και τη σταθερότητα του ιοντικού υγρού [Earle *et al.*, 2004], ενώ η επιλογή του κατιόντος καθορίζει τις φυσικές τους ιδιότητες [Seddon *et al.*, 2000].

2.4 Ιδιότητες των ιοντικών υγρών

Ο σχεδιασμός των ιδιοτήτων των ιοντικών υγρών (designer solvents) (Πίνακας 2.1) μέσω επιλογής της ιοντικής τους σύστασης αποτελεί μία δυνατότητα που δεν ισχύει για καμία άλλη κατηγορία μοριακών διαλυτών και συνεπώς ένα από τα κυριότερα πλεονεκτήματα της κατηγορίας αυτών των μη συμβατικών μέσων.

Εξαιτίας της δυνατότητας αυτής, το κύριο ερευνητικό ενδιαφέρον της μηχανικής του μέσου για την ανάπτυξη βιοκαταλυτικών διεργασιών, έχει μετατοπιστεί στην εφαρμογή των ιοντικών υγρών [Carrea & Riva, 2006].

Πίνακας 2.1 Ιδιότητες οι οποίες χαρακτηρίζουν τα ιοντικά υγρά [Wilkes, 2004].

Θερμικές ιδιότητες	Φυσικές ιδιότητες	Φασματοσκοπικές ιδιότητες	Χημικές ιδιότητες	Ασφάλεια	Ηλεκτρο-χημικές ιδιότητες
Σημείο τήξης	Επιφανειακή τάση	Οπτική ενεργότητα	Οξύτητα-βασικότητα	Επικινδυνότητα	Ιοντική αγωγιμότητα
Σημείο ζέσης	Πυκνότητα	Απορρόφηση		Τοξικότητα	Διηλεκτρική σταθερά
Θερμοχωρητικότητα	Ιξώδες	Κρίσιμη θερμοκρασία		Απόρριψη	
Θερμική σταθερότητα	Τάση ατμών	Κρίσιμη πίεση			
Θερμική αγωγιμότητα		Δείκτης διάθλασης			

Ο καθορισμός όμως του τρόπου με τον οποίο η διαφοροποίηση του ανιόντος/κατιόντος/υποκαταστατών κ.α. επιδρά στις ιδιότητες των ιοντικών υγρών και η πρόβλεψη των επιδράσεων αυτών με ένα συστηματικό τρόπο, αποτελούν αντικείμενο έρευνας.

2.4.1 Σημείο τήξης

Το φορτίο, το μέγεθος και η κατανομή φορτίου μεταξύ των ιόντων αποτελούν παράγοντες οι οποίοι επιδρούν στα σημεία τήξης των αλάτων. Γενικά στα οργανικά άλατα παρατηρείται πως η αυξημένη συμμετρία των ιόντων τους επιτρέπει τον σχηματισμό κανονικών κρυστάλλων, αυξάνοντας έτσι τα σημεία τήξης. Αντίθετα, όπως συμβαίνει στην περίπτωση των ιοντικών υγρών, η αδυναμία σχηματισμού κανονικών κρυστάλλων λόγω ασυμμετρίας των ιόντων αποτελεί την αιτία της εμφάνισης χαμηλών σημείων τήξης των ενώσεων αυτών (**Πίνακας 2.2**).

Οι θερμοκρασίες μετάβασης των ιοντικών υγρών από την στερεή στην υγρή κατάσταση μπορούν να κυμαίνονται κοντά στη θερμοκρασία δωματίου ή να είναι ιδιαίτερα χαμηλές, ακόμη και ίσες με $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Το σημείο τήξης των ιοντικών υγρών εξαρτάται κυρίως από το μέγεθος των ιόντων που τα αποτελούν. Έχει παρατηρηθεί πως αύξηση του μεγέθους του ανιόντος ή/και του κατιόντος οδηγούν σε μείωση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ιόντων, με αποτέλεσμα τη μείωση του σημείου τήξης (**Πίνακας 2.3**) [Huddleston *et al.*, 2001, Holbrey & Rogers, 2002].

Πίνακας 2.2 Σημεία τήξης διαφόρων ιοντικών υγρών [Huddleston *et al.*, 2001].

Ιοντικό υγρό	Σημείο τήξης ($^{\circ}\text{C}$)
[bmim]Cl	41
[bmim]NO ₃	38
[bmim]NO ₂	55
[bmim]BF ₄	-81
[emim]PF ₆	58
[pmim]PF ₆	40
[i-pmim]PF ₆	102
[bmim]PF ₆	10
[hmim]PF ₆	-61
[emim]NTf ₂	4
[bmim]NTf ₂	-25
[bmim]CH ₃ CO ₂	45

2.4.2 Τάση ατμών

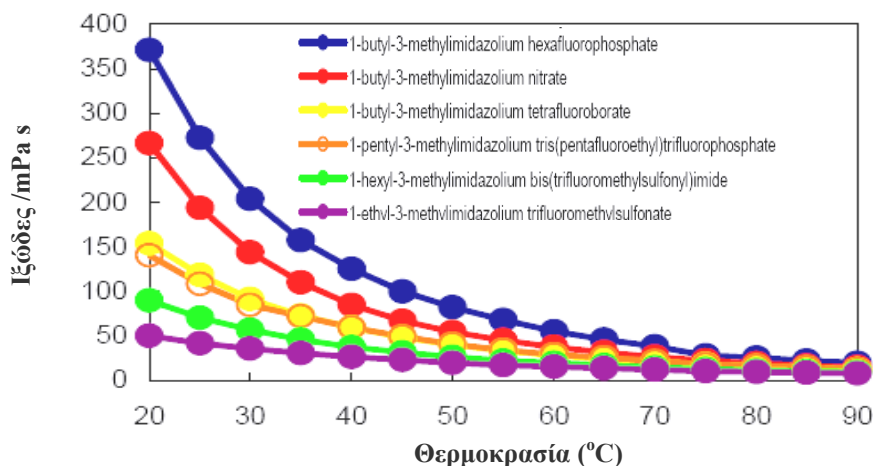
Μία ενδιαφέρουσα ιδιότητα των ιοντικών υγρών αποτελεί η χαμηλή τάση ατμών τους. Είναι προφανές πως η χρήση των μη πτητικών ιοντικών υγρών μπορεί να συμβάλλει θετικά στη μείωση της ατμοσφαιρικής ρύπανσης. Επιπλέον, μπορεί να διευκολύνει και να απλοποιήσει την απομόνωση πτητικών προϊόντων, μία διαδικασία επίπονη με τη χρήση διαλυτών χαμηλών σημείων ζέσης. Τέλος, η μη πτητικότητα των ιοντικών υγρών επιτρέπει την εφαρμογή τους σε συστήματα με υπερκρίσιμα ρευστά, οδηγώντας σε διαδικασίες που συνδυάζουν δύο περιβαλλοντικά φιλικά μέσα [Anthony *et al.*, 2002, Wilkes, 2004].

2.4.3 Ιξώδες

Το ιξώδες ενός υγρού οφείλεται στην ανάπτυξη δια-μοριακών δυνάμεων μεταξύ των μορίων του διαλύτη (αλληλεπίδραση μεταξύ αντίθετα φορτισμένων ομάδων), καθώς και άλλων ασθενών αλληλεπιδράσεων, όπως οι δυνάμεις van der Waals, και εκδηλώνεται μακροσκοπικά με το βαθμό δυσκολίας ροής του υγρού. Με βάση το ιξώδες τα υγρά διακρίνονται σε Νευτώνια και μη-Νευτώνια. Τα Νευτώνια υγρά έχουν σταθερό ιξώδες ανεξάρτητα του ρυθμού παραμόρφωσης και στην κατηγορία αυτή περιλαμβάνονται και τα ιοντικά υγρά. Η γνώση της τιμής του ιξώδους των ιοντικών υγρών είναι σημαντική καθώς επηρεάζει τα φαινόμενα μεταφοράς των αντιδρώντων στα μέσα αυτά και πρακτικά θέματα, όπως την ανάδευση [Mantz & Trulove, 2002].

Το ιξώδες των ιοντικών υγρών είναι σημαντικά μεγαλύτερο από εκείνο των μοριακών διαλυτών και κυμαίνεται σε θερμοκρασία δωματίου από 10 cP έως και περισσότερο από 1000 cP [Wilkes, 2004]. Παρατηρείται και στα ιοντικά υγρά εξάρτηση της τιμής του ιξώδους από τη θερμοκρασία (**Εικόνα 2.3**) [Baker *et al.*, 2001, Jacquemin *et al.*, 2006], ωστόσο το μεγάλο εύρος τιμών ιξώδους των ιοντικών υγρών οφείλεται πιθανότατα στην παρουσία προσμίξεων και τη παρουσία ή μη του νερού.

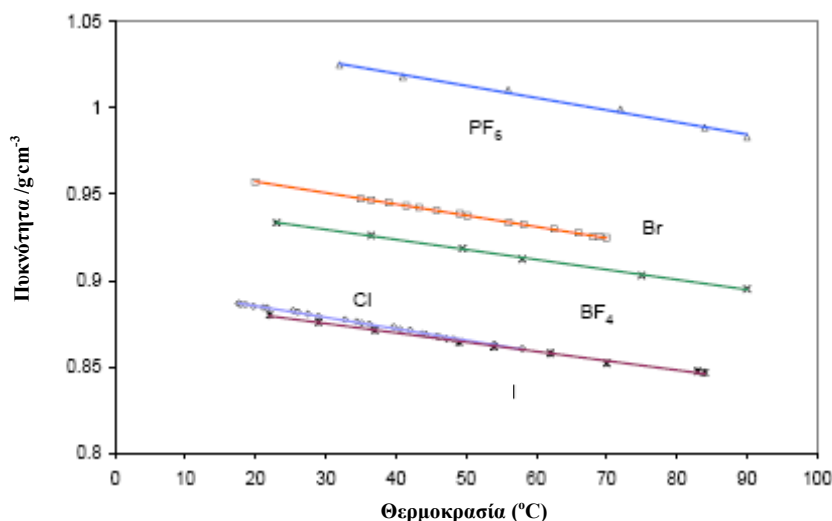
Επίσης, στο ιξώδες φαίνεται να επιδρά και η φύση του ανιόντος και κατιόντος [Tokuda *et al.*, 2005, Bonhôte *et al.*, 1996]. Έχει παρατηρηθεί γενικά πως ιοντικά υγρά με υποκαταστάτες μικρότερης αλκυλικής αλυσίδας στο κατιόν εμφανίζουν μικρότερο ιξώδες. Επιπλέον, το ιξώδες μπορεί να μειωθεί και με τροποποίηση της φύσης του ανιόντος κατά τη σειρά, $\text{Cl}^- > \text{PF}_6^- > \text{BF}_4^- \approx \text{NO}_3^- > \text{NTf}_2^-$ [van Rantwijk *et al.*, 2003].



Εικόνα 2.3 Εξάρτηση του ιξώδους από την θερμοκρασία. Σύγκριση μεταξύ ιοντικών υγρών με διαφορετικά κατιόντα και ανιόντα [http://quill.qub.ac.uk/sources].

2.4.4 Πυκνότητα

Η πυκνότητα αποτελεί ενδεχομένως την πιο άμεσα υπολογιζόμενη και αδιαμφισβήτητη φυσική ιδιότητα των ιοντικών υγρών. Οι αναφερόμενες τιμές πυκνότητας των ιοντικών υγρών κυμαίνονται μεταξύ του 1.12 g cm^{-3} και 2.4 g cm^{-3} [Mantz & Trulove, 2002]. Η τιμή της πυκνότητας σχετίζεται με το μοριακό βάρος των ανιόντων και αυξάνεται με την αύξηση αυτού (Εικόνα 2.4) [Jacquemin *et al.*, 2006].



Εικόνα 2.4 Εξάρτηση της πυκνότητας από την θερμοκρασία και το είδος του ανιόντος [http://quill.qub.ac.uk/sources].

Όσον αφορά το κατιόν, παρατηρείται μείωση της πυκνότητας με την αύξηση του μεγέθους της αλκυλικής αλυσίδας των υποκαταστατών του [Tokuda *et al.*, 2005, Jacquemin *et al.*, 2006]. Η πυκνότητα του ιοντικού υγρού μειώνεται γραμμικά με την αύξηση της

θερμοκρασίας, ενώ μικρή επίδραση φαίνεται να έχει και η παρουσία νερού [Fredlake *et al.*, 2004, Jacquemin *et al.*, 2006].

2.4.5 Διαλυτότητα και διαλυτική ικανότητα

Τα ιοντικά υγρά πλεονεκτούν έναντι άλλων μέσων, καθώς έχουν την ικανότητα να διαλυτοποιούν πληθώρα ανόργανων, οργανικών και πολυμερών συστατικών [Jain *et al.*, 2005]. Μεταβάλλοντας την ιοντική σύσταση των ιοντικών υγρών είναι δυνατή η αλλαγή της διαλυτότητας των ενώσεων στα μέσα αυτά. Για παράδειγμα η λιποφιλικότητα των ιοντικών υγρών εξαρτάται από το βαθμό υποκατάστασης του κατιόντος [Holbrey *et al.*, 2002].

Σημαντική παράμετρο αποτελεί και η αναμιξιμότητα των ιοντικών υγρών με άλλους διαλύτες. Η διαλυτότητα των ιοντικών υγρών στους οργανικούς διαλύτες εξαρτάται από την τιμή της διηλεκτρικής σταθεράς (ϵ) του διαλύτη [Wasserschheid & Keim, 2000, Carda-Broch *et al.*, 2003]. Έχει παρατηρηθεί πως τα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά είναι αναμίξιμα με πολικούς διαλύτες αλλά μη αναμίξιμα με αλκάνια και άλλους μη-πολικούς διαλύτες, με αποτέλεσμα τα μέσα αυτά να μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διφασικά συστήματα. Η αναμιξιμότητα των ιοντικών υγρών με το νερό μπορεί επίσης να μεταβάλλεται, από πλήρη αναμιξιμότητα έως και μηδενική [Anthony *et al.*, 2001]. Η διαλυτότητα των ιοντικών υγρών στο νερό αποτελεί μία κρίσιμη παράμετρο καθώς, εξαιτίας της μη-πητικότητάς τους, αποτελεί το πιο πιθανό τρόπο διεϊσδυσής τους στο περιβάλλον. Η αλληλεπίδραση των ιοντικών υγρών με το νερό ελέγχεται κυρίως από το ανιόν του ιοντικού υγρού, με το κατιόν να διαδραματίζει δευτερεύον ρόλο [Wasserschheid & Keim, 2000]. Η αιτία για το φαινόμενο αυτό είναι πως, ισχυροί δεσμοί υδρογόνου μπορούν να αναπτυχθούν μεταξύ των μορίων του νερού και του ανιόντος του ιοντικού υγρού [Cammara *et al.*, 2001].

2.4.6 Πολικότητα

Η πολικότητα αποτελεί την ιδιότητα εκείνη η οποία χρησιμοποιείται συνήθως για να περιγράψει τη συμπεριφορά διαλύτη-διαλυμένης ουσίας. Διάφορες τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της πολικότητας των ιοντικών υγρών (χρώση του Reichardt E_T^N , χρώση Nile red, φθορίζοντες ανιχνευτές). Τα αποτελέσματα αυτών κατατάσσουν τα ιοντικά υγρά ως πολικούς διαλύτες, με τιμές πολικότητας παρόμοιες με εκείνες των μικρών αλκοολών και άλλων πολικών, μη-πρωτικών διαλυτών (DMSO, DMF, κ.α.) [Bonhôte *et al.*, 1996, Carmichael & Seddon, 2000, Muldoon *et al.*, 2001]. Η πολικότητα εξαρτάται από την σύσταση του ιοντικού υγρού. Έχει αναφερθεί κάποια

συσχέτιση ανάμεσα στην μείωση του μήκους της αλυσίδας των αλκυλικών υποκαταστατών του κατιόντος, καθώς και του μεγέθους του ανιόντος, με την αύξηση της πολικότητας [Carmichael & Seddon, 2000]. Οι τιμές πολικότητας των ιοντικών υγρών είναι σε πολλές περιπτώσεις ευαίσθητες στην θερμοκρασία και την παρουσία του νερού [Baker *et al.*, 2002].

2.4.7 Θερμική σταθερότητα

Η θερμική σταθερότητα καθορίζει την ανώτερη τιμή θερμοκρασίας για την οποία δεν παρατηρείται θερμική αποδιάταξη των ιοντικών υγρών που βρίσκονται στην υγρή φάση. Η αποδιάταξη των ιοντικών υγρών γίνεται μέσω μίας διαδικασίας, η οποία είναι ουσιαστικά αντίστροφη της $SN2$ πυρηνόφιλης υποκατάστασης που οδηγεί στο σχηματισμό του ιοντικού υγρού [Holbrey & Rogers, 2002]. Η θερμοκρασία αποδιάταξης διαφοροποιείται ανάλογα με το ανιόν. Για κάποια από τα περισσότερα ευρέως απαντώμενα ανιόντα, η σειρά σταθερότητας είναι γενικά, $Cl^- < [BF_4]^- \sim [PF_6]^- < [NTf_2]^-$ [Bonhôte *et al.*, 1996, Holbrey & Seddon, 1999, Huddleston *et al.*, 2001]. Ωστόσο, τα περισσότερα ιοντικά υγρά που χρησιμοποιούνται ως διαλύτες είναι τόσο σταθερά, που το ανώτερο θερμοκρασιακό όριο δεν περιορίζει την επιλογή κάποιου εξ' αυτών και επιπλέον τους επιτρέπει να χρησιμοποιηθούν σε διεργασίες που απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες [Wilkes, 2004].

2.4.8 Τοξικότητα

Τα ιοντικά υγρά θεωρούνται «πράσινοι» διαλύτες εξαιτίας της αμελητέας τάσης ατμών τους. Ωστόσο αναπόφευκτα, με τη βιομηχανική εφαρμογή των ενώσεων αυτών, ποσότητες τους θα διαφύγουν στο περιβάλλον όπου, εξαιτίας της υψηλής σταθερότητάς τους, θα αποτελέσουν ανθεκτικούς ρυπαντές. Στην περίπτωση αυτή, η γνώση της τοξικότητας των ιοντικών υγρών αποτελεί σημαντικό κριτήριο για την εφαρμογή τους σε διάφορες διεργασίες. Οι αρχικές μελέτες επικεντρώθηκαν στα ευρέως χρησιμοποιούμενα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά. Τα αποτελέσματα των μελετών αυτών βασιζόταν είτε σε θεωρητικές αναλύσεις των σχέσεων δομής-τοξικότητας [Jastorff *et al.*, 2003], είτε σε πειραματικά δεδομένα βιολογικών τεστ (σε προκαρυωτικά και ευκαρυωτικά κύτταρα) [Pernak *et al.*, 2003, Ranke *et al.*, 2004] και ενζυμικών δοκιμασιών [Stock *et al.*, 2004, Składanowski *et al.*, 2005]. Σε όλα τα υπό μελέτη συστήματα καταδείχθηκε η αύξηση της τοξικότητας των ιμιδαζολικών ιοντικών υγρών με την αύξηση της αλκυλικής αλυσίδας των υποκαταστατών του κατιόντος (αλυσίδες 6 ατόμων άνθρακα ή μεγαλύτερες). Το γεγονός αυτό δικαιολογείται με βάση την ικανότητα μεγάλων αλκυλικών αλυσίδων να ενσωματώνονται στις πολικές κεφαλές του στρώματος

φωσφολιπιδίων των μεμβρανών προκαλώντας πολική νάρκωση (polar narcosis) του κυττάρου ή οργανισμού [Couling *et al.*, 2006]. Η συσχέτιση αυτή φαίνεται να ισχύει και για άλλες κατηγορίες ιοντικών υγρών αποτελούμενα από πυριδινικά, φωσφορικά και αμμωνιακά κατιόντα [Wells & Coombe, 2006]. Ωστόσο, συγκριτικά με τα ιμιδαζολικά, τα φωσφορικά και κυρίως τα τεταρτοταγή αμμωνιακά ιοντικά υγρά φαίνεται να είναι λιγότερο τοξικά και κάποια από αυτά περισσότερο περιβαλλοντικά φιλικά ακόμα και από τους οργανικούς διαλύτες [Stock *et al.*, 2004, Wells & Coombe, 2006, Couling *et al.*, 2006, Pretti *et al.*, 2006, Docherty *et al.*, 2006]. Η επίδραση του κατιόντος φαίνεται να εξαρτάται από την κυτταρική σειρά και το είδος του οργανισμού, καθώς μελέτες σε άλγη οδήγησαν σε αντίστροφη συσχέτιση τοξικότητας-μήκους υποκαταστατών, αποδίδοντας την διαφοροποίηση σε δομικές διαφορές στα κυτταρικά τοιχώματα των μελετούμενων οργανισμών [Latała *et al.*, 2005]. Η επίδραση του ανιόντος φαίνεται να είναι δευτερεύουσα όσον αφορά την τοξικότητα, γεγονός ιδιαίτερα σημαντικό και θετικό, καθώς η φύση του ανιόντος επηρεάζει σημαντικά τις υπόλοιπες ιδιότητες των ιοντικών υγρών και άρα καθορίζει σε μεγάλο βαθμό τις εφαρμογές τους.

Αν και η ιοντική σύσταση των ιοντικών υγρών επηρεάζει την τοξικότητά τους δεν αποτελεί τη μοναδική σημαντική παράμετρο. Η αναμιξιμότητα ή όχι του ιοντικού υγρού με το νερό, η λιποφιλικότητα, η προσρόφηση και μεταφορά του διαμέσου εδαφικών στρωμάτων, η συγκέντρωσή του, οι φυσικοχημικές παράμετροι του μελετούμενου οικοσυστήματος και το είδος του μικροοργανισμού είναι δυνατόν να επηρεάζουν την τοξικότητα που επιδεικνύουν οι ενώσεις αυτές και πρέπει συνεπώς να αξιολογηθεί η επίδρασή τους [Gorman-Lewis & Fein, 2004, Stepnowski & Storoniak, 2005, Latała *et al.*, 2005, Ganske & Bornshceuer, 2006, Torrecilla *et al.*, 2009].

2.4.9 Βιοαποικοδομησιμότητα

Αν και τα αποτελέσματα μελετών τοξικότητας των ιοντικών υγρών δεν είναι ιδιαίτερα ενθαρρυντικά, δεν αποτελούν το μοναδικό κριτήριο για την εφαρμογή ή μη των ενώσεων αυτών. Είναι γνωστό πως μία ένωση, η οποία απελευθερώνεται στο περιβάλλον βιο-συσσωρεύεται και σταδιακά οδηγεί σε χρόνια τοξικά αποτελέσματα. Η οξείδωση οργανικών ρυπαντών από διάφορους παράγοντες (ακτινοβολία, όζον κ.α.) εφαρμόζεται ήδη πολλά χρόνια. Στην περίπτωση των ιμιδαζολικών ιοντικών υγρών βρέθηκε πως οι ενώσεις αυτές είναι σχετικά ανθεκτικές στην φωτοαποικοδόμηση, ανάλογα με την ιοντική τους σύσταση [Stepnowski & Zaleska, 2005]. Στη φύση ωστόσο, την περισσότερο πιθανή και

περιβαλλοντικά φιλική κατάληξη μίας χημικής ουσίας αποτελεί η βιοαποικοδόμησή της. Η φυσική αυτή διεργασία αποτελεί μία συλλογική προσπάθεια μικροβίων με διαφορετικές μεταβολικές ικανότητες, η οποία οδηγεί τελικά στο σχηματισμό μη τοξικών, ανόργανων προϊόντων όπως διοξείδιο του άνθρακα, νερό και/ή βιομάζα.

Οι πρώτες μελέτες οδήγησαν στο συμπέρασμα πως ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά με ανιόντα BF_4^- , PF_6^- και Br^- είναι βιοαποικοδομήσιμα σε μικρό μόνο βαθμό, εκτός και αν η αλκυλική αλυσίδα του υποκαταστάτη συνδέεται στον ιμιδαζολικό δακτύλιο μέσω εστερικού δεσμού [Gathergood & Scammels, 2002]. Ωστόσο, αυτά τα ιοντικά υγρά απέχουν αρκετά από τα να θεωρηθούν άμεσα βιοαποικοδομήσιμα. Στα πρώτα άμεσα βιοαποικοδομήσιμα ιοντικά υγρά τα παραπάνω ανιόντα αντικαταστάθηκαν από το οκτυλσουλφίδιο (octylOSO_3^-) και συνδυάστηκαν με πεντυλ- ή οκτυλ- αλκυλικές ή πολύ-αιθερικές αλυσίδες συνδεδεμένες μέσω εστερικών δεσμών στο κατιόν [Gatherwood *et al.*, 2004, 2006, Morrissey *et al.*, 2009]. Τα νέα αυτά ιοντικά υγρά δεν επέδειξαν μόνο υψηλή βιοαποικοδομησιμότητα αλλά επίσης ιδιαίτερα χαμηλή τοξικότητα ακόμα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις [Morrissey *et al.*, 2009].

Τροποποιήσεις δοκιμάστηκαν ακόμα και σε πυριδινικά ιοντικά υγρά. Σε αυτή την κατηγορία η βιοαποικοδομησιμότητα αυξήθηκε με την ενσωμάτωση εστερικών δεσμών στο κατιόν αλλά βρέθηκε να μην επηρεάζεται σημαντικά από την φύση του ανιόντος [Harjani *et al.*, 2009].

Βιοαποικοδομήσιμα ιοντικά υγρά έχουν συντεθεί επίσης χρησιμοποιώντας βιοανανεώσιμες πρώτες ύλες, όπως το νικοτινικό οξύ [Harjani *et al.*, 2009].

2.5 Εφαρμογές των ιοντικών υγρών

Με βάση τις προαναφερόμενες ιδιότητες των ιοντικών υγρών τα πλεονεκτήματα της χρήσης των μέσων αυτών συνοψίζονται στα εξής σημεία:

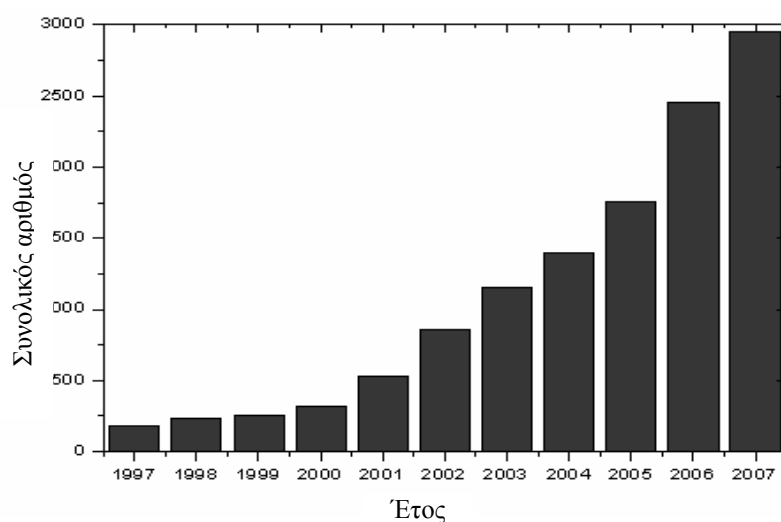
- Το μεγάλο εύρος ρευστότητάς τους παρέχει πρωτοφανείς δυνατότητες κινητικού ελέγχου.
- Η αμελητέα τάση ατμών τους τα καθιστά «πράσινους» υποκαταστάτες των οργανικών πτητικών συστατικών στην χημική βιομηχανία.
- Η υψηλή θερμική τους σταθερότητα επιτρέπει τη χρήση τους για την πραγματοποίηση αντιδράσεων σε υψηλές θερμοκρασίες.
- Έχουν την ικανότητα να διαλυτοποιούν ποικίλα οργανικά, ανόργανα, οργανομεταλλικά και πολυμερή συστατικά.

- Η ικανότητα τους να διαλυτοποιούν αέρια όπως H_2 , CO , O_2 και CO_2 , επιτρέπει τη χρήση τους σε αντιδράσεις που εμπεριέχουν αέρια υποστρώματα.

- Η υψηλή χημική τους σταθερότητα επιτρέπει την αποθήκευσή τους για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

- Η ιοντική τους φύση επιτρέπει την προσαρμογή και σχεδιασμό των ιδιοτήτων τους μέσω κατάλληλης επιλογής των ιοντικών ειδών που τα αποτελούν.

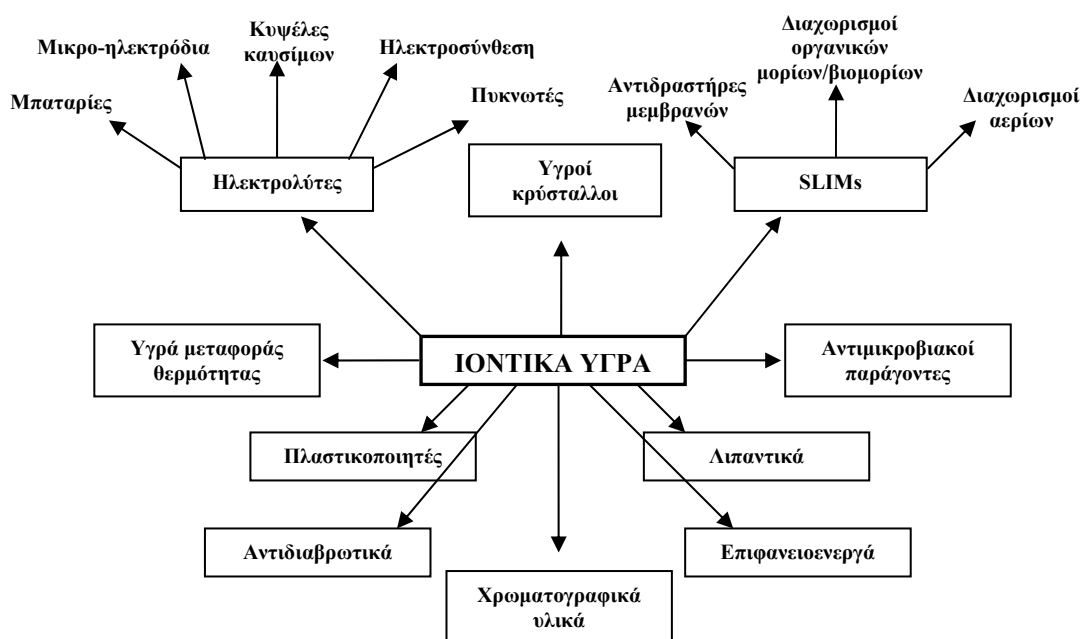
Τα παραπάνω χαρακτηριστικά δικαιολογούν το μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον για τα ιοντικά υγρά (**Εικόνα 2.5**) και καθιστούν τα μέσα αυτά ιδιαίτερα ελκυστικά για ένα μεγάλο αριθμό εφαρμογών.



Εικόνα 2.5 Αποτελέσματα του SciFinder για διεθνή άρθρα σχετικά με ιοντικά υγρά έως το Δεκέμβριο του 2007.

Τα μέσα αυτά βρήκαν αρχικά εφαρμογή σε ηλεκτροχημικές διεργασίες, εξαιτίας των ηλεκτροχημικών τους δυναμικών, της καλής αγωγιμότητας και ιδιοτήτων μεταφοράς [Trulove & Mantz, 2002]. Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί σε διαδικασίες εκχύλισης και απομόνωσης μεταλλικών ιόντων, οργανικών μορίων και βιομορίων, αποθείωσης καυσίμων, και διαχωρισμού αερίων [Brennecke *et al.*, 2002, Holbrey *et al.*, 2002, Zhao *et al.*, 2005]. Πολυάριθμες είναι οι αναφορές για την εφαρμογή των ιοντικών υγρών σε ποικίλες αντιδράσεις οργανικής κατάλυσης, ανόργανης σύνθεσης ή πολυμερισμού, όπου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαλύτες, καταλύτες, ενεργοποιητές καταλυτών ή ως συν-καταλύτες, επιτυγχάνοντας υψηλούς καταλυτικούς ρυθμούς και εκλεκτικότητα [Seddon, 1997, Holbrey & Seddon, 1999, Gordon, 2001, Earle, 2002, Wasserscheid, 2002, Welton, 2004, Jain *et al.*, 2005]. Επιπρόσθετα, τα ιοντικά υγρά χρησιμοποιούνται σε καινοτόμες βιομηχανικές

εφαρμογές ως υγρά μεταφοράς θερμότητας (σε συστήματα ψύξης ή συσσωρευτές ηλιακής ενέργειας), για τον διαχωρισμό αζεοτροπικών μιγμάτων σε διαδικασίες απόσταξης, ως λιπαντικά, ως υγροί κρύσταλλοι σε ηλεκτρονικές συσκευές και σε ίνες υψηλής ανθεκτικότητας, σε υποστηριγμένες μεμβράνες ιοντικών υγρών (supported ionic liquid membranes, SILMs) για τον διαχωρισμό αερίων, οργανικών μορίων και βιομορίων, σε μεμβρανικούς αντιδραστήρες, ως πληρωτικά υλικά σε αέριους-υγρούς χρωματογράφους και ηλεκτροφορητικές συσκευές, ως πλαστικοποιητές, ως επιφανειοενεργά, ως αντιμικροβιακοί παράγοντες, ως αντιδιαβρωτικές ενώσεις (**Εικόνα 2.6**) [Zhao, 2006].



Εικόνα 2.6 Επιπλέον των εφαρμογών τους ως χημικοί καταλύτες και μέσα για την πραγματοποίηση χημικών ή βιοκαταλυτικών αντιδράσεων, τα ιοντικά υγρά γνωρίζουν σήμερα ποικίλες εφαρμογές [Zhao, 2006].

2.6 Βιοκαταλυτικές διεργασίες σε ιοντικά υγρά

Ενώ ήδη από το 1980 τα ιοντικά υγρά βρήκαν εφαρμογή σε αντιδράσεις χημικής κατάλυσης, η πρώτη βιοκαταλυτική διεργασία σε ιοντικό υγρό πραγματοποιήθηκε 20 χρόνια αργότερα. Το ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ χρησιμοποιήθηκε σε διφασικό σύστημα σαν δεξαμενή υποστρώματος, ενώ ολόκληρα κύτταρα του μικροοργανισμού *Rhodococcus* R312, παρόντα στην υδατική φάση, κατέλυσαν τον βιομετασχηματισμό του 1,3-δικυανοβενζενίου [Cull *et al.*, 2000]. Σχεδόν παράλληλα, τα ιοντικά υγρά κέντρισαν το ενδιαφέρον των συγγραφέων εξαιτίας της μη πτητικής τους φύσης, η οποία τα καθιστά μία περιβαλλοντικά φιλική εναλλακτική των οργανικών διαλυτών, και μελέτησαν την καταλυόμενη από το ένζυμο

θερμολυσίνη σύνθεση της Z-ασπαρτάμης [Erbeldinger *et al.*, 2000]. Το ένζυμο όχι μόνο διατήρησε τη δραστηριότητά του στο κορεσμένο με νερό ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ αλλά επέδειξε και ιδιαίτερα υψηλή σταθερότητα, μεγαλύτερη και από εκείνη στον οργανικό διαλύτη (οξικός αιθυλεστέρας). Στα τέλη του 2000 αναφέρθηκε για πρώτη φορά η εφαρμογή της λιπάσης B από το μικροοργανισμό *Candida antarctica* (σε ακινητοποιημένη και λυοφιλιωμένη μορφή) σε άνυδρα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά για την κατάλυση αντιδράσεων αλκοόλυσης, αμμωνιόλυσης και υπερυδρόλυσης, οδηγώντας σε καταλυτικούς ρυθμούς συγκρίσιμους ή και υψηλότερους σε σχέση με συμβατικούς οργανικούς διαλύτες [Lau *et al.*, 2000].

Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών άνοιξαν το δρόμο σε ένα ταχέως αναπτυσσόμενο πεδίο εφαρμογής των ιοντικών υγρών ως μέσων για την πραγματοποίηση ποικίλων αντιδράσεων, καταλυόμενων από ένζυμα πρακτικά όλων των κατηγοριών ή και από ολόκληρα κύτταρα. Τα ιοντικά υγρά ωστόσο βρίσκουν εφαρμογή στην βιοκατάλυση όχι απλά ως μέσα, αλλά ως προσδέτες υποστρωμάτων, ως πρόσθετα κατά τη διαδικασία λυοφιλοποίησης των ενζύμων, στην παρασκευή των ILCE (Ionic Liquid Coated Enzyme), σε τριαδικά συστήματα, σε SILM (supported ionic liquid membranes) [de Maria, 2008].

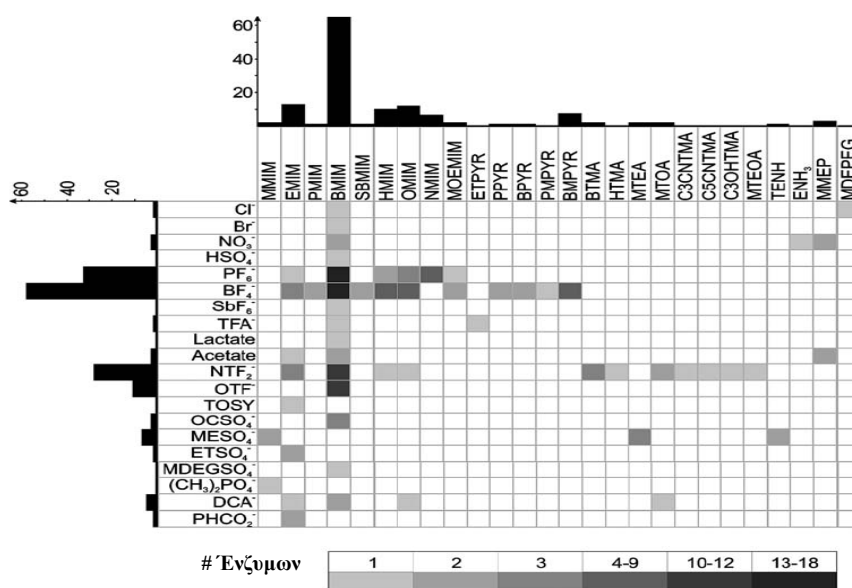
2.6.1 Διεργασίες με ολόκληρα κύτταρα

Οι περισσότερες αναφορές βιοκαταλυτικών διεργασιών σε ιοντικά υγρά αφορούν στη χρήση απομονωμένων ενζύμων. Ωστόσο, η πρώτη μελέτη σε ιοντικά υγρά πραγματοποιήθηκε με τη χρήση ολόκληρων κυττάρων, τα οποία διατήρησαν υψηλότερο ποσοστό της δραστηριότητάς τους στο διαφασικό σύστημα του ιοντικού υγρού παρά σε εκείνο με οργανικό διαλύτη [Cull *et al.*, 2000]. Τα διαφασικά συστήματα βρίσκουν ευρεία εφαρμογή σε βιοκαταλυτικές διεργασίες με ολόκληρα κύτταρα καθώς σε αυτά επιτυγχάνεται η διαλυτοποίηση υδρόφοβων υποστρωμάτων και προϊόντων, καθώς και η αποφυγή της τοξικής επίδρασης των αντιδρώντων στις κυτταρικές μεμβράνες. Η μελέτη βιοκαταλυτικών διεργασιών με κύτταρα διαφόρων οργανισμών επιβεβαίωσε την υπόθεση πως τα ιοντικά υγρά είναι λιγότερο τοξικά για τις κυτταρικές μεμβράνες σε σχέση με τους κλασικούς οργανικούς διαλύτες [Cull *et al.*, 2000, Lou *et al.*, 2004, Pfruender *et al.*, 2004, 2006, Matsuda *et al.*, 2006]. Επιπλέον, στα διαφασικά συστήματα με ιοντικά υγρά έχει παρατηρηθεί μικρότερος βαθμός συσσωμάτωσης των κυττάρων σε σχέση με τους οργανικούς διαλύτες [Cull *et al.*, 2000, Howarth *et al.*, 2001, Matsuda *et al.*, 2006]. Στα πλεονεκτήματα αυτών των συστημάτων, συμπεριλαμβάνεται και η αύξηση της ταχύτητας και απόδοσης των

βιομετατροπών καθώς και η υψηλή σταθερότητα επαναχρησιμοποίησης των μικροβιακών κυττάρων [Lou *et al.*, 2004, 2006a, Wang *et al.*, 2009]. Πιθανά η αλληλεπίδραση του ιοντικού υγρού με φορτισμένες ομάδες του υποστρώματος ή της κυτταρικής μεμβράνης οδηγεί σε αλλαγή στην ιοντική κατάσταση της μεμβράνης, επιτρέποντας την ευκολότερη διέλευση των υποστρωμάτων διαμέσου αυτής [Lenourgy *et al.*, 2005].

2.6.2 Ενζυμική κατάλυση

Διάφορα ιοντικά υγρά έχουν χρησιμοποιηθεί ως μέσα σε πλήθος βιοκαταλυτικών αντιδράσεων καταλυόμενων από ένζυμα κάθε κατηγορίας (Εικόνα 2.7).



Εικόνα 2.7 Αριθμός ενζύμων τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί σε διαφορετικά ιοντικά υγρά. Οι χρωματικοί κώδικες αντιστοιχούν στον αριθμό των ενζύμων ανά συνδυασμό ανιόντος/κατιόντος, ενώ οι μπάρες στον αριθμό των ενζύμων ανά ιόν. Οι συντομογραφίες των ιόντων δίνονται στο παράρτημα [Roosen *et al.*, 2008].

Οι λιπάσες αποτελούν την κατηγορία εκείνη των ενζύμων με τις περισσότερες εφαρμογές σε βιοκαταλυτικές αντιδράσεις, εξαιτίας της ικανότητας διατήρησης της δραστηριότητάς τους και της ανθεκτικότητάς τους στην παρουσία μη συμβατικών μέσων. Τα ένζυμα αυτά αποτελούν και την πλειοψηφία των ενζύμων που έχουν μελετηθεί σε ιοντικά υγρά (Πίνακας 2.3).

Πίνακας 2.3 Αντιδράσεις καταλυόμενες από λιπάσες σε ιοντικά υγρά.

Ιοντικό υγρό	Μορφή*	Προέλευση	Αντίδραση	Πηγή
[bmim]PF ₆ [bmim]BF ₄	N, I	<i>Candida antarctica</i> λιπάση B	Αλκοόλυση, αμμωνιόλυση, υπερυδρόλυση	Lau <i>et al.</i> , 2000
[moemim]BF ₄	N	<i>Pseudomonas cepacia</i> <i>Candida antarctica</i> λιπάση B	Ακετυλίωση της 1-φαινυλ αιθανόλης	Park & Kazlauskas, 2001
[bmim]PF ₆ [bmim]Tfms [bmim]NTf ₂ [bmp]BF ₄	N	<i>Candida antarctica</i> λιπάση B <i>Pseudomonas sp.</i> <i>Alcaligenes sp.</i> <i>Thermomyces lanuginosa</i> <i>Rhizomucor miehei</i> <i>Candida rugosa</i>	Ακετυλίωση της γλυκόζης Μετεστεροποίηση, κινητικός διαχωρισμός αλκοολών	Schöfer <i>et al.</i> , 2001
[bmim]PF ₆ [nmim]PF ₆ [bmim]BF ₄ [hmim]BF ₄	N	<i>Candida rugosa</i>	Εστεροποίηση του 2- χλωροπροπανοϊκού οξέος με την 1-βουτανόλη	Bélafi-Bakó <i>et al.</i> , 2002
[emim]NTf ₂ [bmim]NTf ₂ [mtoa]NTf ₂ [bmim]PF ₆ [bmim]PF ₆ [bmim]BF ₄	N, I	<i>Candida antarctica</i> λιπάσες A και B <i>Rhizomucor miehei</i>	Κινητικός διαχωρισμός	Lozano <i>et al.</i> , 2002
scCO ₂ /[bmim]NTf ₂	I	<i>Pseudomonas cepacia</i>	Μετεστεροποίηση της 2- υδροξυμεθυλ-1,4- βενζοδιοξάνης	Nara <i>et al.</i> , 2002
[bmim]PF ₆	N, I	<i>Candida rugosa</i> <i>Candida antarctica</i> λιπάση B	Ακυλίωση 1-οκτανόλης με τον βινυλεστέρα του οξικού οξέος	Reetz <i>et al.</i> , 2002
[bmim]PF ₆ [moemim]PF ₆ [bdmim]BF ₄	N	<i>Candida rugosa</i>	Μετεστεροποίηση και σύνθεση πολυεστέρων	Kaar <i>et al.</i> , 2003
[bmim]PF ₆ [moemim]PF ₆ [bdmim]BF ₄	I	<i>Candida antarctica</i> λιπάση B	Ακυλίωση γλυκοσιδίων	Kim <i>et al.</i> , 2003
[emim]BF ₄ [emim]NTf ₂ [bmim]BF ₄ [bmim]PF ₆	I	<i>Candida antarctica</i> λιπάση B	Μετεστεροποιήσεις με τον βινυλεστέρα του οξικού οξέος ως ακυλοδότη	Itoh <i>et al.</i> , 2003
scCO ₂ /[bmim]NTf ₂	N, I	<i>Candida antarctica</i> λιπάση B	Μετεστεροποιήσεις	Lozano <i>et al.</i> , 2003
[emim]BF ₄ [omim]BF ₄ [bmim]BF ₄ [hmim]BF ₄ [bdmim]BF ₄ [hdmim]BF ₄ [bmp]BF ₄ [hmim]PF ₆ [omim]PF ₆ [bmim]PF ₆ [emim]Tfms [bdmim]Tfms	I	<i>Candida antarctica</i> λιπάση B	Αντιδράσεις εστεροποίησης Σύνθεση αμινών	Reetz <i>et al.</i> , 2002 Irimescu & Kato, 2004

Συνέχεια στην επόμενη σελίδα

Πρωτεάσες και αμιδάσες πεπτιδίων, γλυκοσιδάσες, λυάσες και οξειδοαναγωγάσες έχουν βρει επίσης εφαρμογή σε ιοντικά υγρά (**Πίνακας 2.4**) [van Rantwijk & Sheldon, 2007].

Ιοντικό υγρό	Κατηγορία	Μορφή*	Ενζυμο/προέλευση	Αντίδραση	Πηγή
[bmim]NTf ₂	Εστεράση	N, I	<i>Bacillus subtilis</i>	Μετεστεροποίηση της	Persson &
[bmim]PF ₆			<i>Bacillus</i>	1-φαινυλαιθανόλης	Bornscheuer, 2003
[bmim]BF ₄			<i>stearothermophilus</i>		
[bmim]PF ₆	Πρωτεάση	N	Θερμολυσίνη	Σύνθεση της Z-ασπαρτάμης	Erbeldinger <i>et al.</i> , 2000

48

[bmim]PF ₆ [omim]PF ₆		N	α-χυμοθρυψίνη	Μετεστεροποίηση του αιθυλεστέρα της <i>N</i> - ακετυλ-L- φαινυλαλανίνης με την 1-προπανόλη	Laszlo & Compton, 2001
[emim]BF ₄ [emim]NTf ₂ [bmim]PF ₆ [bmim]BF ₄ [bmim]NTf ₂ [mtoa]NTf ₂ [bmim]NTf ₂ [emim]NTf ₂		I	α-χυμοθρυψίνη	Αντιδράσεις μετεστεροποίησης	Lozano <i>et al.</i> , 2001a Park & Kazlauskas, 2001
[EtPy]CF ₃ COO		N	<i>Bacillus licheniformis</i>	Μετεστεροποίηση του αιθυλεστέρα της <i>N</i> - ακετυλ-L- φαινυλαλανίνης με την 1-βουτανόλη Υδρόλυση	Eckstein <i>et al.</i> , 2002 Zhao & Malhotra, 2002
[emim]BF ₄ [EtPy]BF ₄ [bmim]BF ₄		N		Κινητικός διαχωρισμός εστέρων αμινοξέων	Zhao <i>et al.</i> , 2003
		N	Παπαΐνη	Υδρόλυση του μεθυλεστέρα της D,L- <i>p</i> - υδροξυφαινυλγλυκίνης	Lou <i>et al.</i> , 2004, 2005
[bmim]PF ₆ [bmim]BF ₄ [bmim]NTf ₂		N	Υδρολάση εποξειδίων	Στερεοεκλεκτική υδρόλυση εποξειδίων	Chiappe <i>et al.</i> , 2004
[bmim]PF ₆ [bmim]BF ₄ [bmim]MeSO ₄ [omim]BF ₄ [omim]PF ₆ [omim] MeSO ₄ [bmim]PF ₆		I	G αμιδάση πενικιλίνης	Σύνθεση αμιδίων	Basso <i>et al.</i> , 2005
		I	Σαμπτιλυσίνη	Σύνθεση δι- και τρι- πεπτιδίων αλανίνης	Sangeetha <i>et al.</i> , 2008
[bmim]NTf ₂	Δεϋδρογονάση	N	Αλκοολική δεϋδρογονάση	Εναντιοεκλεκτική αναγωγή της 2- οκτανόνης	Eckstein <i>et al.</i> , 2004
[bmim]PF ₆ [bmim]OHCH ₂ COO [bdmim]PF ₆ [hpmim]PF ₆ [hpmim]OHCH ₂ COO [hpmim]Cl		N	Δεϋδρογονάση της μορφίνης	Οξείδωση κωδεΐνης σε κωδεϊνόνη	Walker & Bruce, 2004a
[bmim]NTf ₂ [bmim]PF ₆ [omim]PF ₆ [bmim]PF ₆	Υπεροξειδάση	N	Κυτόχρωμα c Μικρουπεροξειδάση γλουταμικού -11	Οξείδωση της γλουταμικού	Laszlo & Compton, 2002
		N	Υπεροξειδάση από <i>Coprinus cinereus</i>	Οξείδωση θειοανισολών	Okrasa <i>et al.</i> , 2003
[mmim]MeSO ₄ [bmim]OctSO ₄ [omim]PF ₆	Ρακεμάση	N	<i>Pseudomonas putida</i>	Κινητικός διαχωρισμός μανδελικού οξέος	Kaftzik <i>et al.</i> , 2004
[bmp]BF ₄ [bmim]PF ₆	Λακκάση	N	<i>Trametes sp.</i>	Οξείδωση ανθρακενίου	Hinckley <i>et al.</i> , 2002
[mmim]MeSO ₄	β- γαλακτοσιδάση	N	<i>Bacillus circulans</i>	Σύνθεση <i>N</i> - ακετυλοζαμίνης	Kaftzik <i>et al.</i> , 2002

Συνέχεια στην επόμενη σελίδα

[bmim]PF ₆	C	Ζύμη αρτοποιίας	Εναντιοεκλεκτική αναγωγή κετονών	Howarth <i>et al.</i> , 2001
[bmim]PF ₆ [bmim]NTf ₂ [mtoa]NTf ₂	C	<i>Lactobacillus Kefir</i>	Αναγωγή της 4- χλωροακετοφαινόνης	Pfruender <i>et al.</i> , 2004
[bmim]PF ₆ [bmim]BF ₄	C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Αναγωγή του ακετυλτριμεθυλ σιλανίου	Lou <i>et al.</i> , 2006a
[emim]PF ₆ [bmim]PF ₆ [hmim]PF ₆ [emim] NTf ₂ [bmim]NTf ₂	C	<i>Rhodotorula sp.</i>	Αναγωγή 4- μεθοξυακετογενόνης	Wang <i>et al.</i> , 2009

* N : υδατικό διάλυμα, I: ακινητοποιημένο, C: κύτταρα

Βιοκαταλυτικές αντιδράσεις στα ιοντικά υγρά έχουν μελετηθεί όχι μόνο με την εφαρμογή διαφόρων κατηγοριών ενζύμων αλλά και με τη παρασκευή και χρήση διαφόρων ενζυμικών σκευασμάτων.

Οι εστεράσες από *Bacillus subtilis* και *Bacillus stearothermophilus* ακινητοποιημένες σε σελίτη ήταν ικανές να καταλύσουν αντιδράσεις μετεστεροποίησης σε διάφορα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά, σε αντίθεση με τις ελεύθερες μορφές των ενζύμων αυτών [Persson & Bornscheuer, 2003].

Διάφορα ακινητοποιημένα σε silica σκεύασμα της λιπάσης CaLB, επικαλυμμένα με ιοντικό υγρό παρουσίασαν αυξημένη δραστηριότητα σε συστήματα scCO₂-ιοντικού υγρού, η οποία αποδόθηκε σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των αλκυλικών αλυσίδων της τροποποιημένης silica και των αλκυλικών αλυσίδων του κατιόντος των ιοντικών υγρών [Lozano *et al.*, 2007a]. Η χρήση διασυνδεδεμένων ενζυμικών συσσωματωμάτων (CLEAs) της CaLB οδήγησε σε αυξημένη σταθερότητα του σκεύασματος σε διάφορα ιοντικά υγρά [Toral *et al.*, 2007]. Η χρήση της τροποποιημένης με PEG λιπάσης CaLB, αύξησε σημαντικά την απόδοση μετεστεροποίησης της γλυκόζης σε διαφασικό σύστημα ιμιδαζολικών ιοντικών υγρών με οργανικό διαλύτη (τριτοταγή βουτανόλη) σε σχέση με το εμπορικό σκεύασμα της λιπάσης [Ganske & Bornscheuer, 2005a].

Διάφορες τεχνικές ακινητοποίησης χρησιμοποιήθηκαν για την αύξηση της καταλυτικής δραστηριότητας της λιπάσης από *Candida rugosa*. Η αντίδραση μετεστεροποίησης ρακεμικού μίγματος της 1-φαινυλ αιθανόλης πραγματοποιήθηκε με υψηλότερη απόδοση χρησιμοποιώντας διασυνδεδεμένα ενζυμικά συσσωματώματα (CLEAs) ή μικρο-κρυστάλλους επικαλυμένους με πρωτεΐνη (PCMCs) σε σχέση με την ελεύθερη μορφή του ενζύμου [Shah & Gupta, 2007a]. Σημαντική αύξηση της ταχύτητας της αντίδρασης μετεστεροποίησης παρατηρήθηκε και στην περίπτωση χρήσης PREP (Propanol-

Rinsed Enzyme Preparation) της σαμπιλιψίνης στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆, συγκριτικά με το λυοφυλιωμένο σκεύασμα του ενζύμου [Shah & Gupta, 2007b]. Σαμπιλιψίνη εγκαυλιωμένη σε xerogel οδήγησε σε υψηλές αποδόσεις σύνθεσης δι- και τρι-πεπτιδίων της αλανίνης στο υδρόφοβο [bmim]PF₆ [Sangeetha *et al.*, 2008].

Μία διαφορετική εφαρμογή των ιοντικών υγρών αποτελεί η χρήση τους όχι ως διαλύτες, αλλά ως φορείς ακινητοποίησης. Η επικάλυψη της λιπάσης από *Pseudomonas cepacia* με το ιοντικό υγρό [rrmim]PF₆, εκμεταλλευόμενου του σημείου τήξης του, οδήγησε σε σημαντική αύξηση της ενάντιο-εκλεκτικότητάς του σε οργανικούς διαλύτες [Lee *et al.*, 2002]. Η ικανότητα αυτή των ιοντικών υγρών επισημάνθηκε και κατά την εφαρμογή άλλων λιπασών σε συστήματα ιοντικών υγρών με υπερκρίσιμο CO₂ [Lozano *et al.*, 2002, Reetz *et al.*, 2002]. Η τεχνική αυτή αξιοποιήθηκε και για την σταθεροποίηση της CaLB κατά τη διεξαγωγή ενζυμικών αντιδράσεων σε υψηλές θερμοκρασίες στο εξάνιο ή σε συστήματα χωρίς διαλύτη [Lozano *et al.*, 2007a,b]. Η θετική επίδραση του ιοντικού υγρού στη σταθερότητα των ενζύμων επισημάνθηκε και κατά τη διαδικασία ακινητοποίησης λιπασών σε sol-gel παρουσία ιοντικών υγρών [Lee *et al.*, 2007a]. Η σταθεροποιητική δράση των ιοντικών υγρών μελετήθηκε μέσω φασματοσκοπίας μάζας MALDI-TOF και αποδόθηκε στην ικανότητα του ιοντικού υγρού να συνδέεται με το ένζυμο παρέχοντας του ένα μικροπεριβάλλον με μικρότερη ή μεγαλύτερη ευελιξία για την κατάλυση της ενζυμικής αντίδρασης [Itoh *et al.*, 2004, 2006].

Ο εγκλωβισμός της υπεροξειδάσης HRP σε στρώμα ιοντικού υγρού [bmim]BF₄ με sol-gel πραγματοποιήθηκε και μπορεί να βρει εφαρμογή σε βιοαισθητήρες [Liu *et al.*, 2005a].

2.7 Παράμετροι που επιδρούν στη διεξαγωγή βιοκαταλυτικών αντιδράσεων σε ιοντικά υγρά

Για τη πραγματοποίηση των προαναφερόμενων αντιδράσεων τα ιοντικά υγρά χρησιμοποιήθηκαν ως μέσα είτε σε καθαρή μορφή, είτε σε μονοφασικά συστήματα με νερό ή οργανικούς διαλύτες, είτε σε διφασικά συστήματα, οδηγώντας στην πλειοψηφία των περιπτώσεων σε αυξημένη δραστηριότητα και εκλεκτικότητα σε σχέση με τους οργανικούς διαλύτες. Οι μελέτες αυτές επεσήμαναν την επίδραση ποικίλων παραμέτρων στα καταλυτικά χαρακτηριστικά των ενζύμων σε ιοντικά υγρά.

2.7.1 Επίδραση της καθαρότητας των ιοντικών υγρών

Την πρώτη εφαρμογή της λιπάσης CaLB [Lau, 2000] ακολούθησε η μελέτη διαφόρων λιπασών και εστερασών σε διάφορα ιμιδαζολικά και πυριδινικά ιοντικά υγρά για τον κινητικό διαχωρισμό της 1-φαινυλ αιθανόλης [Schöfer *et al.*, 2001]. Οι χρησιμοποιούμενες λιπάσες διατήρησαν την καταλυτική τους δραστικότητα, σε αντίθεση με τις εστεράσες, και κάποιες επέδειξαν υψηλότερη εκλεκτικότητα στα ιοντικά υγρά με ανιόντα $[\text{CF}_3\text{SO}_3]^-$ και $[(\text{CF}_3\text{SO}_2)_2\text{N}]^-$. Η λιπάση CaLB διαχωρίστηκε από το ιοντικό υγρό και επαναχρησιμοποιήθηκε σε τρεις συνεχόμενους κύκλους χωρίς σημαντική απώλεια της δραστικότητας, ενώ η ενάντιο-εκλεκτικότητα παρέμεινε σταθερή. Ωστόσο η απώλεια της δραστικότητας στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆, έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα άλλων μελετών, υποδεικνύοντας την επίδραση της καθαρότητας των ιοντικών υγρών στην καταλυτική δράση των ενζύμων. Η σημασία αυτής της παραμέτρου αποδείχθηκε με την αύξηση της ταχύτητας της αντίδρασης ακυλίωσης της γλυκόζης από τη CaLB, με την εφαρμογή σταδίων καθαρισμού των BF₄⁻ ιμιδαζολικών ιοντικών υγρών [Park & Kazlauskas, 2001].

2.7.2 Επίδραση της πολικότητας

Μία από τις ενδιαφέρουσες ιδιότητες των ιοντικών υγρών αποτελεί η υψηλή πολικότητά τους. Στην κανονικοποιημένη κλίμακα πολικότητας (E_T^N), η οποία θέτει το τετραμεθυλοσιλάνιο στο 0.0 και το νερό στο 1.0, η πολικότητα των περισσότερων ιοντικών υγρών βρίσκεται συνήθως στην κλίμακα από 0.6-0.7, όπως και αυτή των κατώτερων αλκοολών και του φορμαμίδιου. Έχει παρατηρηθεί για τα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά κάποια συσχέτιση ανάμεσα στην μείωση του μήκους της αλυσίδας των αλκυλικών υποκαταστατών του δακτυλίου του κατιόντος [Zhao, 2003] με την αύξηση της πολικότητας, αλλά η σχέση αυτή εξαρτάται και από τη φύση του ανιόντος, οδηγώντας σε πολλές περιπτώσεις σε αντιφατικά αποτελέσματα [Carmichael & Seddon, 2000, Muldoon *et al.*, 2001, Ulbert *et al.*, 2004]. Θα πρέπει εξάλλου να λαμβάνεται υπόψη πως οι τιμές πολικότητας των ιοντικών υγρών είναι σε πολλές περιπτώσεις ευαίσθητες στην θερμοκρασία και την παρουσία του νερού.

Στην περίπτωση των ιοντικών υγρών η συσχέτιση πολικότητας-ενζυμικής δραστικότητας δεν είναι καθολική όπως στην περίπτωση των οργανικών διαλυτών [Park & Kazlauskas, 2001, Schöfer *et al.*, 2001, Kaar *et al.*, 2003, Ulbert *et al.*, 2004, van Rantwijk & Sheldon, 2007, Zhao *et al.*, 2009a]. Για την αντίδραση εστεροποίησης του ασκορβικού οξέος

από το ελαϊκό οξύ παρατηρήθηκε αύξηση της ταχύτητας της αντίδρασης με αύξηση της πολικότητας των ιοντικών υγρών [Park *et al.*, 2003]. Η θερμική σταθερότητα της λιπάσης από *Candida rugosa* συσχετίστηκε επίσης με την πολικότητα, υποδεικνύοντας πως όσο μεγαλύτερη είναι η πολικότητα του ιοντικού υγρού, τόσο μεγαλύτερη είναι και η σταθερότητα του ενζύμου [Ulbert *et al.*, 2005]. Αύξηση της πολικότητας του ιοντικού υγρού οδήγησε σε αύξηση της δραστηριότητας και εκλεκτικότητας της λιπάσης CaLB σε αντιδράσεις μετεστεροποίησης [Lozano *et al.*, 2001b]. Στην περίπτωση ιμιδαζολικών ιοντικών υγρών με BF_4^- , PF_6^- και NTf_2^- ανιόντα καταδείχθηκε αύξηση της ενάντιο-εκλεκτικότητας της αντίδρασης με μείωση της πολικότητας του ιοντικού υγρού, επιλέγοντας ως βέλτιστο το [bmim]PF₆ [Habulin & Knez, 2009].

Σε άλλες περιπτώσεις επισημαίνεται, ωστόσο, πως οι αλλαγές στην πολικότητα των ιοντικών υγρών κυμαίνονται σε μικρή κλίμακα, με αποτέλεσμα η παράμετρος αυτή να μην μπορεί να συσχετιστεί με τη σημαντική διαφοροποίηση της καταλυτικής δράσης των ενζύμων στα μελετώμενα μέσα [Schöfer *et al.*, 2001, Kaar *et al.*, 2003, Yang & Pan, 2005, Zhao, 2005; Yang *et al.*, 2008].

2.7.3 Επίδραση του ιξώδους

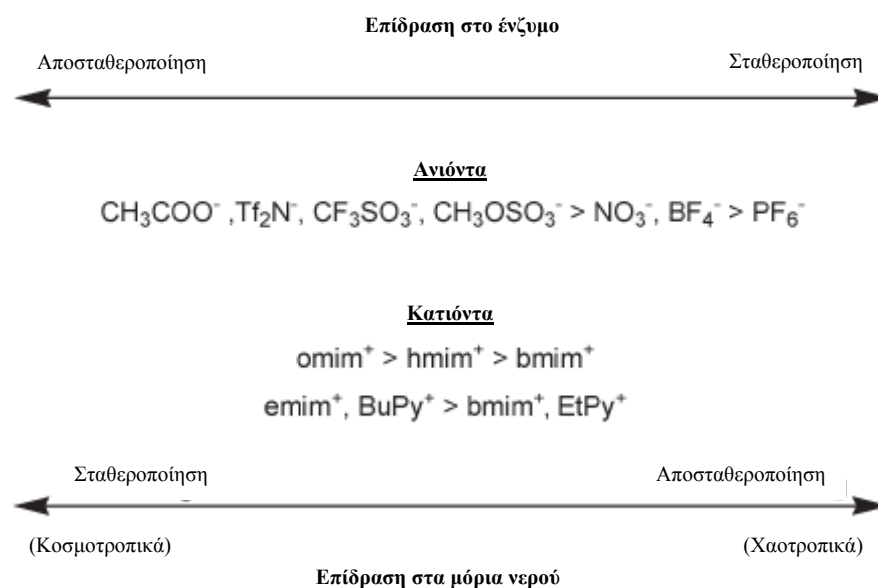
Κατά μία άλλη άποψη η δραστηριότητα των ενζύμων στα ιοντικά υγρά μπορεί να σχετίζεται περισσότερο με το ιξώδες παρά με την πολικότητα των ιοντικών υγρών καθώς, αυξανόμενου του ιξώδους των ιοντικών υγρών, παρεμποδίζεται η μεταφορά των αντιδρώντων από και προς το ενεργό κέντρο των ενζύμων. Την άποψη αυτή ενισχύει η αντίστροφη σχέση πολικότητας-ιξώδους. Συνεπώς, ενώ η μικρή αύξηση στην πολικότητα των ιοντικών υγρών δεν μπορεί να εξηγήσει τη σημαντική βελτίωση στην δραστηριότητα των ενζύμων, αυτή μπορεί να εξηγηθεί με βάση τη σημαντική μείωση στο ιξώδες των ιοντικών υγρών [Yang & Pan, 2005]. Δεδομένου, ωστόσο, ότι ο χρόνος μίας βιοκαταλυτικής αντίδρασης υπολογίζεται σε ώρες και όχι σε λεπτά, η επίδραση της παραμέτρου αυτής, εκτός εξαιρετικών περιπτώσεων, δεν αναμένεται να είναι σημαντική [van Rantwijk & Sheldon, 2007].

2.7.4 Επίδραση της ιοντικής σύστασης

Η πολικότητα και το ιξώδες δεν αποτελούν τις μοναδικές παραμέτρους που επηρεάζουν τη δραστηριότητα των ενζύμων στα ιοντικά υγρά. Ως προς το ανιόν υποδεικνύεται πως η δραστηριότητα διαφόρων λιπασών διατηρείται σε BF_4^- , PF_6^- και NTf_2^- ιοντικά υγρά

(ιμιδαζολικά και πυρολιδινικά), αλλά όχι σε Cl^- , NO_3^- , CF_3SO_3^- , CH_3CO_2^- , CF_3CO_2^- και $\text{N}(\text{CN})_2^-$ ιοντικά υγρά [Kaar *et al.*, 2003, Husson *et al.*, 2008]. Η επίδραση αυτή είναι δυνατόν να οφείλεται στην μικρότερη βασικότητα των δεσμών υδρογόνου των συμβατών ανιόντων. Τα συμβατά ανιόντα διασκορπίζουν το αρνητικό τους φορτίο με αποτέλεσμα τη μικρότερη αλληλεπίδραση με τους εσωτερικούς δεσμούς υδρογόνου των ενζύμων [Park & Kazlauskas, 2003]. Επιπλέον, τα συμβατά ανιόντα είναι λιγότερο πυρηνόφιλα, με αποτέλεσμα να επιδεικνύουν μικρότερη αλληλεπίδραση με θετικά φορτισμένες περιοχές των ενζύμων και άρα μικρότερη τάση διατάραξης της διαμόρφωσής τους [Sheldon *et al.*, 2002]. Ωστόσο, η απώλεια της δραστηριότητας σε ιοντικά υγρά με μη συμβατά ανιόντα είναι συνήθως αναστρέψιμη, με επαναφορά των ενζύμων σε υδατικό περιβάλλον [Summers & Flowers, 2000, Kaar *et al.*, 2003, Lang *et al.*, 2006]. Η μοναδική εξαίρεση που έχει αναφερθεί αφορά τη λιπάση CaLB στο ιοντικό υγρό [bmim]lactate, στο οποίο η απενεργοποίηση ήταν μη αντιστρεπτή και αποδόθηκε στο σχηματισμό συσσωματωμάτων, όπως διαπιστώθηκε μέσω πειραμάτων SANS (Small Angle Neutron Scattering) [Sate *et al.*, 2007].

Ωστόσο, έχει επισημανθεί πως επιπλέον του ανιόντος και το κατιόν μπορεί να επιδρά στις καταλυτικές ιδιότητες των ενζύμων σε ιοντικά υγρά, μέσω χημικών αλληλεπιδράσεων με την πρωτεΐνη αλλά κυρίως μέσω της ικανότητάς του να τροποποιεί τη δομή του νερού και να επηρεάζει συνεπώς την ενυδάτωση των πρωτεϊνών [Bauduin *et al.*, 2004, Boström *et al.*, 2004, Collins, 2004]. Η σειρά που περιγράφει την ικανότητα των ιόντων να σταθεροποιούν τα ένζυμα είναι γνωστή ως σειρά Hofmeister (**Εικόνα 2.8**).



Εικόνα 2.8 Επίδραση των ιόντων στα μόρια νερού και στα ενζυμικά μόρια [Zhao, 2005].

Σύμφωνα με τη σειρά Hofmeister, τα ισχυρά ενυδατωμένα ιόντα που έχουν την ικανότητα να αυξάνουν τη δομή του νερού καλούνται κοσμοτροπικά, ενώ τα μη ισχυρά ενυδατωμένα ιόντα που μειώνουν τη δομή του νερού καλούνται χαοτροπικά. Τα κοσμοτροπικά ιόντα είναι συνήθως μικρά και υψηλά φορτισμένα, ενώ τα χαοτροπικά είναι μεγάλα και με χαμηλό φορτίο [Baldwin, 1996]. Η κοσμοτροπικότητα των ιόντων μπορεί να ποσοτικοποιηθεί μέσω του ιξώδους, των β-συντελεστών και άλλων παραμέτρων [Zhao, 2005]. Τα κοσμοτροπικά ιόντα εμφανίζουν θετικούς β-συντελεστές, ενώ τα χαοτροπικά αρνητικούς.

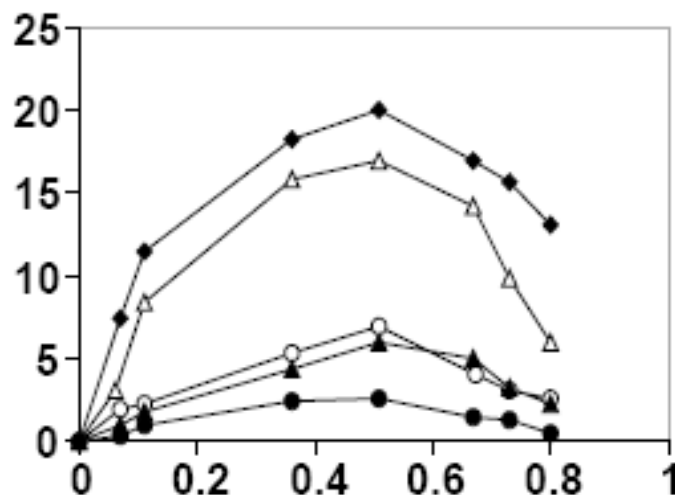
Από διάφορες μελέτες σταθερότητας των πρωτεϊνών έχει διατυπωθεί πως κοσμοτροπικά ανιόντα σταθεροποιούν, ενώ κοσμοτροπικά κατιόντα αποσταθεροποιούν τις πρωτεΐνες [Baldwin, 1996, Collins, 2004]. Στην περίπτωση των υδρόφοβων ή άνυδρων ιοντικών υγρών [Schöfer *et al.*, 2001, Park & Kazlauskas, 2001, Kaftzick *et al.*, 2002, Maruyama *et al.*, 2002, Kaar *et al.*, 2003, Lau *et al.*, 2004, Ulbert *et al.*, 2004, Maruyama *et al.*, 2004] η δραστηριότητα, ενάντιο-εκλεκτικότητα και σταθερότητα των ενζύμων δεν μπορεί να συσχετιστεί με τη σειρά Hofmeister [Zhao, 2005]. Η εξήγηση σε μοριακό επίπεδο επιχειρήθηκε με την εφαρμογή φασματοσκοπικών τεχνικών (φασματοσκοπία φθορισμού, κυκλικό διχρωισμό, FTIR), οι οποίες δείχνουν την ύπαρξη μίας συμπαγούς πρωτεϊνικής δομής που προκύπτει από τη τροποποίηση της δευτεροταγούς δομής λόγω μετατροπής των α-ελίκων σε β-πτυχές [De Diego *et al.*, 2005]. Αντίθετα, παρουσία νερού σε υδρόφιλα ιοντικά υγρά ή υδρόφιλων ιοντικών υγρών σε νερό, η επίδραση των ιόντων σχετίζεται με τη σειρά Hofmeister, καθώς τα ιοντικά υγρά διαχωρίζονται σε μεμονωμένα ιόντα στο νερό [Lozano *et al.*, 2001a,b, 2003, Kaftzick *et al.*, 2002, Persson & Bornscheuer, 2003, Turner, 2003, Yang *et al.*, 2008, 2009].

Όσον αφορά στο κατιόν, στα υδρόφιλα ιοντικά υγρά παρουσία νερού, η επίδραση είναι αρκετά σαφής. Στα μέσα αυτά τα ένζυμα επιδεικνύουν υψηλότερη σταθερότητα και δραστηριότητα κατά τη σειρά μείωσης της κοσμοτροπικότητας του κατιόντος [Zhao, 2005]. Η ύπαρξη μεγάλων αλκυλικών αλυσίδων στο κατιόν φαίνεται να οδηγεί στην αποσταθεροποίηση των ενζύμων μέσω ισχυρών αλληλεπιδράσεων με κοσμοτροπικές περιοχές της επιφάνειας του ενζύμου, όπως οι καρβοξυλικές ομάδες και μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με υδρόφοβες εσωτερικές περιοχές του ενζύμου, οδηγώντας σε τροποποίηση της φυσικής διαμόρφωσής του [Lange *et al.*, 2005, Constantinescu *et al.*, 2007].

Η επίδραση του ανιόντος δεν συσχετίζεται πάντα με τη σειρά Hofmeister. Για κάποια ένζυμο η επίδραση του ανιόντος στη δραστικότητα είναι αντίστροφη εκείνης που προβλέπει η σειρά Hofmeister [Lou *et al.*, 2006b, Zheng *et al.*, 2006, Hussain *et al.*, 2008] και αυτό συμβαίνει συχνά παρουσία ενός κοσμοτροπικού κατιόντος. Το γεγονός αυτό μπορεί πιθανά να συσχετιστεί με την μεγαλύτερη τάση του κοσμοτροπικού κατιόντος να σχηματίζει ιοντικό ζεύγος με το κοσμοτροπικό ανιόν, μειώνοντας έτσι τη διαθεσιμότητά του και άρα και την ικανότητά του να σταθεροποιεί το ένζυμο [Yang, 2009]. Το γενικό συμπέρασμα είναι πως το κατιόν και ανιόν των ιοντικών υγρών συνεργιστικά επιδρούν στην δραστικότητα και σταθερότητα των ενζύμων.

2.7.5 Επίδραση του νερού

Μία άλλη σημαντική ιδιότητα των ιοντικών υγρών αποτελεί η αναμιξιμότητά τους με το νερό και η παρουσία αυτού στο σύστημα της αντίδρασης. Το νερό μπορεί να είναι παρόν ακόμα και στα μη αναμίξιμα με το νερό ιοντικά υγρά, καθώς και αυτά θεωρούνται υγροσκοπικά [Seddon *et al.*, 2000]. Η παρουσία ακόμα και μικρού ποσοστού νερού σε κάποια ιοντικά υγρά, που περιέχουν άτομα φθορίου (BF_4^- , PF_6^-), μπορεί να προκαλέσει μερική υδρόλυση παράγοντας HF, το οποίο αναστέλλει τη δράση πολλών ενζύμων [van Rantwijk & Sheldon, 2007]. Ωστόσο, η παρουσία κάποιας ποσότητας νερού είναι απαραίτητη για τη δράση των ενζύμων. Στην περίπτωση της α -χυμοθρυψίνης, παρατηρήθηκε πως γενικά απαιτούνται μικρότερες τιμές ενεργότητας του νερού για την διατήρηση της καταλυτικής δραστικότητας συγκριτικά με τους οργανικούς διαλύτες [Lozano *et al.*, 2001a]. Η επίδραση του νερού στην δραστικότητα και εκλεκτικότητα της λιπάσης από *Pseudomonas sp.* μελετήθηκε κατά τον κινητικό διαχωρισμό της 1-φαινυλ αιθανόλης [Eckstein *et al.*, 2002]. Η χρήση κορεσμένων διαλυμάτων αλάτων αποδέχθηκε ικανοποιητική μέθοδος για τη ρύθμιση της ενεργότητας του νερού (a_w) στα ιοντικά υγρά. Η παράμετρος αυτή φάνηκε να έχει μικρότερη επίδραση στην εκλεκτικότητα της αντίδρασης στα ιοντικά υγρά σε σχέση με τον χρησιμοποιούμενο οργανικό διαλύτη. Μία άλλη μέθοδος για τον έλεγχο της ενεργότητας του νερού στα ιοντικά υγρά αποτελεί η χρήση ένυδρων ζευγών αλάτων [Berberich *et al.*, 2003]. Η μέθοδος αυτή ήταν αποτελεσματική για άλατα τα οποία δεν διαλύονται στα ιοντικά υγρά. Η σημασία του ελέγχου της ενεργότητας του νερού στην πορεία της ενζυμικής αντίδρασης καθώς και η επίδραση της φύσης του ιοντικού υγρού στη ρύθμιση της τιμής της ενεργότητας του νερού έχει καταδειχθεί από διάφορες μελέτες [Berberich *et al.*, 2003, Ulbert *et al.*, 2005, Barahona *et al.*, 2006, Zhang *et al.*, 2006] (**Εικόνα 2.9**).



Εικόνα 2.9 Επίδραση της ενεργότητας του νερού (a_w) στην ποσότητα του ενζυμικά παραγόμενου βουτυλ-2-χλωρο-προπιονικού εστέρα σε διάφορους οργανικούς διαλύτες (μαύρα σύμβολα) και στα ιοντικά υγρά (λευκά σύμβολα) [bmim]PF₆ (Δ) και [omim]PF₆ (○) [Ulbert *et al.*, 2005].

Η επίδραση του νερού βρέθηκε να εξαρτάται και από τη φύση του ιοντικού υγρού. Η πλειοψηφία των μελετών σταθερότητας των ενζύμων αφορά σε υδρόφοβα ιοντικά υγρά. Τα υδρόφοβα μέσα πλεονεκτούν έναντι των υδρόφιλων, καθώς τα τελευταία έχουν την ικανότητα να απομακρύνουν μόρια νερού από την επιφάνεια του ενζύμου (απαραίτητο στρώμα νερού) [Zaks & Klibanov, 1988, Itoh *et al.*, 2001, Kaar *et al.*, 2003]. Για την ακινητοποιημένη λιπάση PCL το υδρόφιλο [bmim]BF₄ δεν αποτέλεσε ικανοποιητικό μέσο για την υπό μελέτη αντίδραση αλκοόλυσης, σε σχέση με το περισσότερο υδρόφοβο [bmim]PF₆ [Nara *et al.*, 2004]. Το ίδιο ιοντικό υγρό χρησιμοποιήθηκε για την υδρόλυση του ρακεμικού μίγματος εστέρα οδηγώντας σε σημαντικά υψηλότερη ενάντιο-εκλεκτικότητα σε σχέση με το αναμίξιμο με το νερό [bmim]BF₄ [Xin *et al.*, 2005]. Η σημασία διατήρησης του νερού που είναι προσδεδεμένο στο ένζυμο καταδείχθηκε και στην περίπτωση εφαρμογής μικροκυμάτων έναντι συμβατικής θέρμανσης του μίγματος αντίδρασης. Η δυνατότητα διατήρησης του στρώματος αυτού σε υδρόφοβα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά οδήγησε σε σημαντική αύξηση της δραστηριότητας της ακινητοποιημένης λιπάσης CaLB [Zhao *et al.*, 2009a]. Η χρήση υδρόφοβων ιμιδαζολικών ιοντικών υγρών ως συνδιαλυτών είχε θετική επίδραση τόσο στη δραστηριότητα όσο και σταθερότητα λιπασών από *Pseudomonas aeruginosa* και *Pseudomonas cepacia*, σε αντίθεση με τα υδρόφιλα ιοντικά υγρά [Singh *et al.*, 2009, Vidya & Chadha, 2009]. Επώαση της λιπάσης από *Candida rugosa* στο υδρόφοβο [bmim]PF₆ απουσία υποστρωμάτων οδήγησε σε υψηλή δραστηριότητα για την αντίδραση εστεροποίησης της

μενθόλης [Yuan *et al.*, 2006]. Ομοίως, υψηλή δραστικότητα και σταθερότητα παρατηρήθηκε με επώαση της λιπάσης από *Mucor javanias* στο [bmim]PF₆ [Dang *et al.*, 2007]. Αντίθετα, η αναμιξιμότητα ή μη των ιοντικών υγρών με το νερό δεν φάνηκε να επηρεάζει τη δραστικότητα της CaLB και της εστεράσης από ήπαρ χοίρου [Irimescu & Kato, 2004, Wallert *et al.*, 2005, van Rantwijk *et al.*, 2006]. Η ασυμφωνία αυτή είναι δυνατό να οφείλεται στην διαφορετική αλληλεπίδραση του ιοντικού υγρού με φορτισμένες ομάδες του εκάστοτε ενζύμου και υποστρώματος [Sureshkumar & Lee, 2009].

Γενικά, όσο περισσότερο υδρόφιλο είναι ένα ιοντικό υγρό, τόσο μεγαλύτερη ποσότητα νερού απαιτείται για τη διατήρηση της βέλτιστης ενζυμικής δραστικότητας και σταθερότητας. Το γεγονός αυτό επαληθεύτηκε για την αντίδραση μετεστεροποίησης που καταλύεται από την λιπάση από *Pseudomonas cepacia*, της οποίας η ταχύτητα αυξήθηκε στο υδρόφιλο [bmim]BF₄, όταν το ιοντικό υγρό αυτό δεν υπέστη κάποια διαδικασία αφυδάτωσης [Nara *et al.*, 2002]. Η υδροφοβικότητα και αναμιξιμότητα του ιοντικού υγρού με το νερό εξαρτάται κυρίως από το ανιόν, λόγω της αλληλεπίδρασης του ανιόντος με το νερό μέσω σχηματισμού δεσμών υδρογόνου, τουλάχιστον στις περιπτώσεις εκείνες που το κατιόν αποτελεί ασθενή δότη δεσμών υδρογόνου [Köddermann *et al.*, 2006].

Δεδομένου ότι στο νερό, το οποίο αποτελεί το φυσικό περιβάλλον δράσης των ενζύμων, το κύριο χαρακτηριστικό είναι η δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου, ο σχεδιασμός ιοντικών υγρών που μιμούνται τη μοριακή δομή του νερού ως προς τη δυνατότητα δημιουργίας δεσμών υδρογόνου θα είχε θετική επίδραση στη διαλυτοποίηση και τις καταλυτικές ιδιότητες των ενζύμων. Προς αυτή τη κατεύθυνση μικρές τροποποιήσεις στην αλκυλική αλυσίδα του κατιόντος ή η επιλογή κατάλληλων ανιόντων επέδρασαν θετικά στη σταθερότητα και δραστικότητα των ενζύμων [Lau *et al.*, 2004, Lange *et al.*, 2005, de Gonzalo *et al.*, 2007, Okochi *et al.*, 2007]. Ωστόσο, ο σχεδιασμός αυτών των ιοντικών υγρών απαιτεί προσαρμογή της ικανότητας σχηματισμού δεσμών υδρογόνου, ώστε αυτοί να μην τροποποιούν τους δεσμούς υδρογόνου στο ενζυμικό μόριο αλλάζοντας τη καταλυτικά ενεργή διαμόρφωσή του.

2.7.6 Σταθερότητα και δομή των ενζύμων σε ιοντικά υγρά

Απαραίτητη για την κατανόηση των βιοκαταλυτικών συστημάτων ιοντικών υγρών είναι η μελέτη όχι μόνο της δραστικότητας αλλά και της σταθερότητας των ενζύμων στα μέσα αυτά.

Μελέτη της θερμικής σταθερότητας διαφόρων σκευασμάτων της CaLB έδειξε αύξηση της εναπομείνουσας δραστηριότητας μετά από επώαση στους 80°C στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆, ενώ στις ίδιες συνθήκες γραμμική απενεργοποίηση με το χρόνο παρατηρήθηκε στον οργανικό διαλύτη [Sheldon *et al.*, 2002]. Υψηλή σταθερότητα της λιπάσης αυτής παρατηρήθηκε και σε άλλα υδρόφοβα ιμιδαζολικά και τετρακυλ-αμμωνιακά ιοντικά υγρά, ενώ η παρουσία του υποστρώματος οδήγησε σε αύξηση του χρόνου ημίσειας ζωής της λιπάσης κατά 1660 φορές σε σχέση με εκείνον σε συμβατικούς οργανικούς διαλύτες, όπως το εξάνιο [Lozano *et al.*, 2001b, 2003]. Σε διφασικά συστήματα ιοντικών υγρών με υπερκρίσιμο CO₂ επισημάνθηκε η προστατευτική δράση του ιοντικού υγρού έναντι της επαγόμενης από τη θερμοκρασία και της παρουσίας scCO₂ απενεργοποίησης της λιπάσης CaLB [Lozano *et al.*, 2002, 2004a,b].

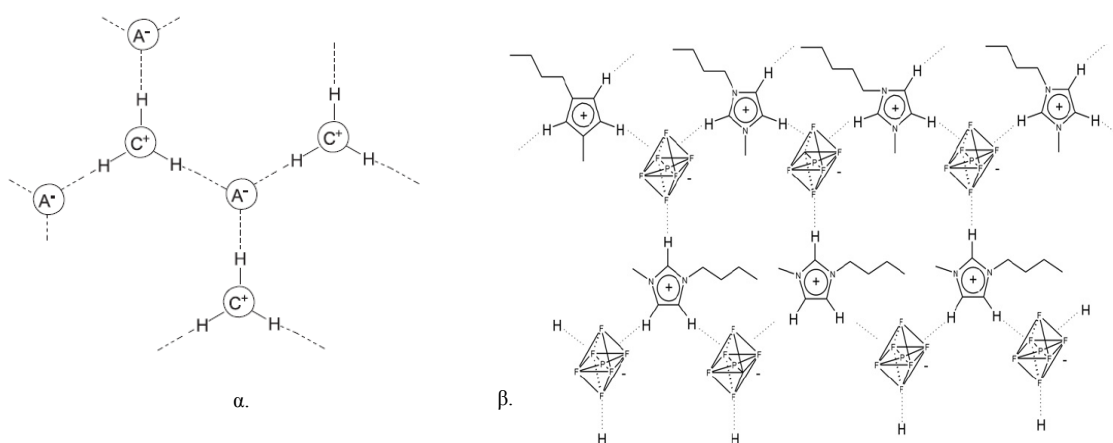
Στην περίπτωση της λιπάσης από *Candida rugosa*, μελετήθηκε η κινητική απενεργοποίησης σε θερμοκρασία 30°C και 50°C σε διάφορους οργανικούς διαλύτες και ιοντικά υγρά. Σε ένα μοντέλο δύο βημάτων, παρατηρήθηκε μεγαλύτερη μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας κατά το πρώτο βήμα ($k_1 > k_2$), και πως η σταθερότητα ήταν μεγαλύτερη στα ιοντικά υγρά [bmim]PF₆ και [omim]PF₆, σε σχέση με τους οργανικούς διαλύτες (εναπομείνουσα δραστηριότητα $\alpha_{\text{οργ.διαλ.}} < \alpha_{\text{ιοντικών}}$ και $k_{1\text{οργ.διαλ.}} > k_{1\text{ιοντικών}}$). Ο χρόνος ημίσειας ζωής του ενζύμου, ήταν μεγαλύτερος στα χρησιμοποιούμενα ιοντικά υγρά και βρέθηκε να σχετίζεται άμεσα με την πολικότητα του μέσου (οργανικός διαλύτης ή ιοντικό υγρό) στην κανονικοποιημένη κλίμακα Reichard [Ulbert *et al.*, 2004].

Αυξημένη σταθερότητα σε ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά επέδειξε και η ακινητοποιημένη εστεράση από *Bacillus stearothermophilus* [Persson & Bornscheuer, 2003]. Υψηλή ήταν και η σταθερότητα της λιπάσης από *Candida rugosa* σε υψηλές θερμοκρασίες στα ιοντικά υγρά σε σχέση με τους οργανικούς διαλύτες [Frater *et al.*, 2003]. Η ακινητοποιημένη σε PEG κυταρινάση από *Trichoderma reesei* χρησιμοποιήθηκε στο ιοντικό υγρό [bmim]Cl επιδεικνύοντας υψηλή δραστηριότητα και σταθερότητα [Turner *et al.*, 2003]. Η β-γαλακτοσιδάση από τον θερμοφίλο *Pyrococcus furiosus* παρέμεινε σταθερή σε υδατικό διάλυμα με 50% [mmim][MeSO₄] σε υψηλές θερμοκρασίες [Lang *et al.*, 2006]. Η παπαΐνη από *Papaya latex*, διατήρησε τη δραστηριότητά της σε υδατικό διάλυμα του ιοντικού υγρού [bmim]AcO και αύξησε της δραστηριότητά της παρουσία BF₄⁻ ιοντικών υγρών [Lou *et al.*, 2006c].

Διάφορες υποθέσεις έχουν διατυπωθεί για να εξηγήσουν την υψηλή σταθερότητα των ενζύμων στα ιοντικά υγρά. Τα αποτελέσματα των πρώτων μελετών κατέδειξαν πως η

σταθερότητα των ενζύμων είναι περισσότερο αυξημένη στα υδρόφοβα ιοντικά υγρά. Το γεγονός αυτό αποδόθηκε στη μεγαλύτερη τάση των υδρόφοβων μέσων να διατηρούν το απαραίτητο στρώμα νερού, μειώνοντας έτσι την άμεση επαφή πρωτεΐνης-ιοντικού υγρού [Laszlo & Compton, 2001, Lozano *et al.*, 2001a]. Σε μετέπειτα μελέτες, οι οποίες πραγματοποιήθηκαν υπό ελεγχόμενες συνθήκες ενεργότητας του νερού, οι διαφορές στη σταθερότητα των ενζύμων μεταξύ διαφόρων ιοντικών υγρών και οργανικών διαλυτών, δεν μπορούσαν να αποδοθούν στο διαφορετικό βαθμό ενυδάτωσης του ενζύμου. Η αυξημένη σταθερότητα αποδόθηκε σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ιοντικού υγρού και του ενζύμου με αποτέλεσμα μία πιο συμπαγή δομή της πρωτεΐνης, χωρίς ωστόσο να αποδεικνύεται η υπόθεση αυτή με δομικές μελέτες [Persson & Bornscheuer, 2003]. Επιπλέον, η παρατηρούμενη, σε κάποιες περιπτώσεις, ενεργοποίηση των ενζύμων στα ιοντικά υγρά δεν μπορούσε απλά να εξηγηθεί με βάση την υδροφοβικότητά τους. Η ενεργοποίηση αποδόθηκε είτε στην αλληλεπίδραση των υποστρωμάτων με το ενεργό κέντρο των ενζύμων είτε στον σχηματισμό ενός ισχυρού ιοντικού πλέγματος, το οποίο περιέχει αλλά δεν διαλυτοποιεί τα ένζυμα, παρέχοντας ένα ικανοποιητικό μικροπεριβάλλον για την καταλυτική τους δράση [Lozano *et al.*, 2001b].

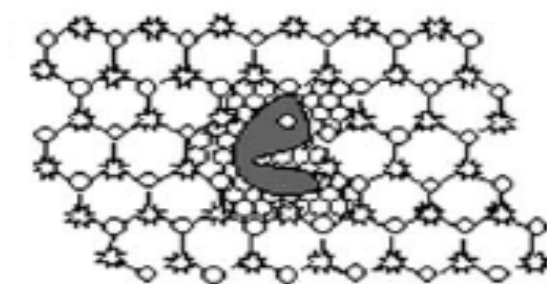
Την υπόθεση αυτή φαίνεται να ενισχύει η μελέτη της τρισδιάστατης δομής των διαλκυλ-ιμιδαζολικών ιοντικών υγρών. Τα μέσα αυτά εμφανίζουν μία ιδιαίτερα οργανωμένη τρισδιάστατη δομή, στην οποία τα ανιόντα και κατιόντα συνδέονται μεταξύ τους μέσω δεσμών υδρογόνου, σχηματίζοντας ένα εκτεταμένο δίκτυο (**Εικόνα 2.10**).



Εικόνα 2.10 α. Απλοποιημένο δυσδιάστατο μοντέλο της υπερμοριακής δομής διαλκυλ-ιμιδαζολικών ιοντικών υγρών με απεικόνιση των δεσμών υδρογόνου ανάμεσα στον ιμιδαζολικό δακτύλιο (C) και τα ανιόντα (A) [Dupont, 2004] και **β.** Δυσδιάστατο απλοποιημένο μοντέλο της πολυμερικής υπερμοριακής δομής του υδρόφοβου ιοντικού υγρού [bmim]PF₆ [Fehér *et al.*, 2007].

Η ισχύς των δεσμών υδρογόνου εξαρτάται από τη φύση του ανιόντος και ακολουθεί τη σειρά $\text{CF}_3\text{CO}_2^- > \text{BF}_4^- > \text{PF}_6^-$. Σε δύο διαστάσεις, ο ιμιδαζολικός δακτύλιος του κατιόντος περιβάλλεται από τουλάχιστο τρία ανιόντα και αντίστροφα [Dupont *et al.*, 2004].

Ένζυμικά μόρια και αντιδρώντα παγιδεύονται στο δίκτυο αυτό, με αποτέλεσμα να δημιουργούνται νανοδομές πολικών και μη πολικών περιοχών (**Εικόνα 2.11**). Η σταθερότητα των ενζύμων στις νανοδομές αυτές οφείλεται σε ηλεκτροστατικές και στερεοχημικές επιδράσεις. Σύμφωνα με την άποψη αυτή, η σταθεροποίηση των ενζύμων μπορεί να εξηγηθεί θεωρώντας ότι τα ιοντικά υγρά αποτελούν όχι απλά το μέσο μίας ενζυμικής αντίδρασης, αλλά μάλλον φορείς ακινητοποίησης [Lozano *et al.*, 2001b]. Ωστόσο, ο εγκλεισμός του ενζύμου σε ένα τέτοιο ιοντικό πλέγμα δεν έχει πάντα θετική επίδραση στις καταλυτικές του ιδιότητες. Για την ακινητοποιημένη CaLB έχει αναφερθεί μείωση της δραστηριότητας και ενάντιο-εκλεκτικότητας στο [emim]NTf₂, η οποία αποδόθηκε σε μία μη ευνοϊκή διαμόρφωση του ενζύμου στο ιοντικό πλέγμα του ιοντικού αυτού υγρού [Habulin & Knez, 2009].



Εικόνα 2.11 Σχηματική αναπαράσταση του «εγκλεισμού» των ενζυμικών μορίων σε υδατικές περιοχές του υπερμοριακού δικτύου των ιοντικών υγρών [Lozano *et al.*, 2005].

Προκειμένου να εξηγηθούν τα αποτελέσματα σταθερότητας των ενζύμων στα ιοντικά υγρά, με βάση τις αλλαγές στη διαμόρφωση των μορίων, έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές, όπως η φθορισμομετρία, ο κυκλικός διχρωϊσμός (CD), και η φασματοσκοπία υπερύθρου (FTIR). Μία πιθανή εξήγηση της αυξημένης θερμοσταθερότητας των ενζύμων σε ιοντικά υγρά προέρχεται από δεδομένα φθορισμομετρίας. Η μελέτη της μονελίνης, μίας πρωτεΐνης που περιέχει ένα κατάλοιπο τρυπτοφάνης, υπέδειξε αλλαγές στην ενυδάτωση της και μία περισσότερο συμπαγή δομή στα ιοντικά υγρά [Baker *et al.*, 2004]. Η ακινητοποιημένη σε PEG κυτταρινάση από *Trichoderma reesei* απενεργοποιείται σε υψηλές συγκεντρώσεις του ιοντικού υγρού λόγω μετουσίωσης, όπως κατέδειξε ανάλυση με φθορισμομετρία [Turner *et al.*, 2003]. Φασματοσκοπικές μελέτες της θερμοσταθερότητας της α-χυμοθρυψίνης υπέδειξαν αύξηση του σημείου τήξης και της θερμοχωρητικότητας καθώς

και δομικές αλλαγές του ενζύμου στα ιοντικά υγρά, οι οποίες οδηγούν σε μία περισσότερο συμπαγή και άρα σταθερή δομή [De Diego *et al.*, 2004]. Μελέτη της CaLB μέσω κυκλικού διχρωισμού κατέδειξε πως η απώλεια των α-ελίκων στα ιοντικά υγρά είναι μικρότερη σε σχέση με εκείνη στο νερό και τον οργανικό διαλύτη. Ωστόσο, μία σημαντική αύξηση των β-πτυχών παρατηρήθηκε στα υπό μελέτη ιοντικά υγρά, η οποία μπορεί να αποδοθεί στην απώλεια δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μορίων νερού και των α-ελίκων, φαινόμενο όμοιο με εκείνο της λυοφιλιωποίησης του ενζύμου [De Diego *et al.*, 2005]. Δομικές μελέτες με FTIR και φασματοσκοπία φθορισμού κατέδειξαν αύξηση των β-πτυχών και β-στροφών έναντι των α-ελίκων και μετατόπιση του $\lambda_{\max}$ προς μικρότερα μήκη κύματος (blueshift) στα υδατικά μίγματα με BF_4^- ιοντικά υγρά στην περίπτωση της παπαΐνης από *Papaya latex* [Lou *et al.*, 2006c]. Η δομή της λυοφιλιωμένης πρωτεΐνης από *Bacillus licheniformis* διατηρήθηκε, όπως κατέδειξε η μελέτη της περιοχής amide I μέσω φασματοσκοπίας FTIR, σε χαμηλές συγκεντρώσεις του [emim]AcO ιοντικού υγρού σε υδατικό διάλυμα, σε αντίθεση με το υδατικό διάλυμα ακετονιτριλίου [Zhao *et al.*, 2006a].

2.7.7 Διαλυτοποίηση των ενζύμων σε ιοντικά υγρά

Η πρώτη μελέτη χρήσης της θερμολυσίνης [Erbeldinger *et al.*, 2000] και της λυσοζύμης [Summers & Flowers, 2000] οδήγησε σε μία σημαντική παρατήρηση όσον αφορά στη διαλυτοποίηση των ενζύμων σε ιοντικά υγρά. Οι ποσότητες εκείνες που ήταν διαλυτές στα ιοντικά υγρά ήταν και ανενεργές [Sheldon *et al.*, 2000, Schöfer *et al.*, 2001, Turner *et al.*, 2003], πιθανά εξαιτίας του γεγονότος πως η διαλυτοποίηση ενός ενζύμου απαιτεί την διάσπαση των αρχικών δεσμών της πρωτεΐνης και τη δημιουργία νέων ισχυρότερων δεσμών. Ωστόσο, η απενεργοποίηση ήταν αντιστρεπτή καθώς το ένζυμο με προσθήκη νερού ανακτούσε πλήρως τη δραστηριότητά του.

Υπάρχουν όμως και περιπτώσεις ενζύμων τα οποία διαλυτοποιήθηκαν σε ιοντικά υγρά επιδεικνύοντας υψηλή δραστηριότητα αλλά και σταθερότητα. Η λιπάση CaLB, αν και διαλυτοποιήθηκε στο ιοντικό υγρό [mtea]MeSO₄, διατήρησε τη δραστηριότητά της χωρίς να υποστεί σημαντική αλλαγή στη διαμόρφωσή της όπως καταδείχθηκε με ανάλυση FTIR [Lau *et al.*, 2004, van Rantwijk *et al.*, 2006]. Η δεϋδρογονάση της μορφίνης διαλυτοποιήθηκε στο άνυδρο ιοντικό υγρό [HOPMIIm][glycolate] και κατέλυσε την οξείδωση της κωδεΐνης, επιδεικνύοντας μεγαλύτερη δραστηριότητα από εκείνη του λυοφιλιωμένου ενζύμου σε οργανικούς διαλύτες ή στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ [Walker & Bruce, 2004a]. Διαλυτοποίηση του κυτοχρώματος c παρατηρήθηκε στα ιοντικά υγρά [mprrl]H₂PO₄ και

[HOEtMe₃N]H₂PO₄, ωστόσο το ένζυμο διατήρησε τη καταλυτικά ενεργή δευτεροταγή δομή του όπως κατέδειξε η ανάλυση με FTIR [Fujita *et al.*, 2005]. Επίσης, η σταθερότητα αποθήκευσης του κυτοχρώματος ήταν σημαντικά υψηλότερη στα ιοντικά αυτά υγρά, σε σχέση με το υδατικό διάλυμα, καθώς το ένζυμο διατήρησε τη δραστηρότητά του για περίοδο τουλάχιστον 6 μηνών [Fujita *et al.*, 2006].

Η διαφορετική επίδραση της διαλυτοποίησης των ενζύμων σε ιοντικά υγρά αποδίδεται στην διαφορετική φύση των ανιόντων ως προς την ικανότητα αυτών να δρουν ως δότες ή δέκτες πρωτονίων [Lau *et al.*, 2004]. Πιθανά, στις περιπτώσεις διατήρησης της δραστηρότητας των ενζύμων, η δραστηρότητα των πρωτονίων του ανιόντος να είναι παρόμοια με εκείνη στο νερό [Fujita *et al.*, 2005].

2.7.8 Διαλυτότητα υποστρωμάτων σε ιοντικά υγρά

Ένα από τα πλεονεκτήματα των ιοντικών υγρών αφορά στην ικανότητα διαλυτοποίησης διαφόρων ενώσεων. Η δυνατότητα αυτή φάνηκε να έχει θετική επίδραση στην πορεία βιοκαταλυτικών αντιδράσεων με διάφορα υποστρώματα.

Για την αντίδραση ακυλίωσης της γλυκόζης [Park & Kazlauskas, 2001], η σημαντική βελτίωση της απόδοσης στα ιοντικά υγρά, σε σχέση με εκείνη στους οργανικούς διαλύτες, αποδόθηκε στην ικανότητα των ιοντικών υγρών να διαλυτοποιούν μεγάλες ποσότητες υδρόφιλων συστατικών, όπως οι υδρογονάνθρακες. Η τάση αυτή εξηγεί και την υψηλή απόδοση εστεροποίησης του ασκορβικού οξέος από το ελαϊκό οξύ σε BF₄⁻ ιοντικά υγρά [Park *et al.*, 2003]. Η δυνατότητα χρήσης υπερκορεσμένων σε γλυκόζη μιγμάτων ιοντικού υγρού-οργανικού διαλύτη οδήγησε σε αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης εστεροποίησης [Lee *et al.*, 2008]. Μίγματα του [mmim][MeSO₄] με νερό έχουν χρησιμοποιηθεί για την εναντιοεκλεκτική αναγωγή κετονών από οξειδοαναγωγικά ένζυμα (δεϋδρογονάση από τον μικροοργανισμό *Candida boidinii*) οδηγώντας σε δεκαπλάσια διαλυτότητα του υποστρώματος σε σχέση με εκείνη στο υδατικό διάλυμα [Kaftzik *et al.*, 2002]. Στην περίπτωση υδρόλυσης εποξειδίων η χρήση του ιοντικού υγρού συνέβαλλε στην αύξηση της διαλυτότητας των υδρόφοβων υποστρωμάτων [Chiappe *et al.*, 2004].

Όσον αφορά στην αλληλεπίδραση διαλύτη-διαλυμένης ουσίας τα ιοντικά υγρά φαίνεται να δρουν σαν μη πολικά μέσα με μη πολικές ενώσεις, και να επιδεικνύουν πολικό χαρακτήρα με πολικές ενώσεις, σε τέτοιο βαθμό ώστε να θεωρούνται ως ενώσεις αποτελούμενες από μικροδομές με πολικό και μη-πολικό χαρακτήρα [Dupont *et al.*, 2002, Antonietti *et al.*, 2004].

Έχει διατυπωθεί η άποψη πως η ικανότητα των ιοντικών υγρών να διαλυτοποιούν πολύπλοκες ενώσεις, εξαρτάται κυρίως από την ικανότητα του ανιόντος να συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου [Anderson *et al.*, 2002]. Ωστόσο, και η δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου ανάμεσα σε ιμιδαζολικά κατιόντα και το υπόστρωμα έχει αναφερθεί να συμβάλλει στην αύξηση της διαλυτότητάς τους [Husson *et al.*, 2008].

Συνεπώς και σε αυτή την περίπτωση η κατάλληλη επιλογή των ιοντικών ειδών και ο σχεδιασμός του ιοντικού υγρού μπορεί να συνεισφέρει στην αύξηση της διαλυτότητας των υποστρωμάτων. Η δυνατότητα αυτή αξιοποιήθηκε στην περίπτωση του ιοντικού υγρού [bmim]PF₆, στο οποίο η ενσωμάτωση μίας υδροξυλομάδας αύξησε την διαλυτότητα του ενζύμου, του υποστρώματος και του καταλυτικού συμπαραγόντα στο ιοντικό υγρό καθώς και τη σταθερότητα του προϊόντος (κωδεΐνη) [Lee *et al.*, 2007a]. Επιπλέον των ιμιδαζολικών, η χρήση τετρα-αμμωνιακών ιοντικών υγρών με υδρόφιλες ομάδες στο κατιόν, ιοντικών υγρών με υποκατεστημένα κατιόντα γλυκόλης ή αμινοξικών ιοντικών υγρών οδήγησε σε αύξηση της διαλυτότητας των υποστρωμάτων (τριγλυκεριδίων, υδρογονανθράκων) [Guo *et al.*, 2006, Zhao *et al.*, 2008, Zhao *et al.*, 2006b].

2.7.9 Απομόνωση προϊόντων

Τα μονοφασικά συστήματα ιοντικών υγρών παρουσιάζουν ένα βασικό μειονέκτημα. Προϋποθέτουν, συνήθως, την χρήση οργανικών διαλυτών για την απομάκρυνση των αντιδρώντων μίας βιοκαταλυτικής αντίδρασης [Yuan *et al.*, 2006, Itoh *et al.*, 2003].

Τα διφασικά συστήματα ιοντικών υγρών με scCO₂ είναι ιδιαίτερα καθώς το CO₂ διαλύεται στη φάση του ιοντικού υγρού, μειώνοντας έτσι το ιξώδες του, ενώ το ιοντικό υγρό δεν διαλυτοποιείται στο scCO₂. Εξαιτίας αυτών των χαρακτηριστικών, το scCO₂ έχει χρησιμοποιηθεί σε βιοκαταλυτικές αντιδράσεις για την απομόνωση οργανικών συστατικών διαλυτοποιημένων στη φάση του ιοντικού υγρού. Η αρνητική επίδραση του scCO₂ στα ένζυμα, μέσω αλλαγών του pH ή επαγωγής δομικών αλλαγών κατά την διαδικασία συμπίεσης-αποσυμπίεσης [Cantone *et al.*, 2007], μπορεί να αρθεί με την διαλυτοποίηση του ενζύμου στη φάση του ιοντικού υγρού και την παρουσία των υποστρωμάτων/προϊόντων στη υπερκρίσιμη φάση [Lozano *et al.*, 2002, 2004a, Reetz *et al.*, 2002].

Διφασικά συστήματα νερού-ιοντικού υγρού χρησιμοποιήθηκαν σε αντιδράσεις καταλυόμενες από δεϋδρογονάσες εξαρτώμενες από καταλυτικούς συμπαραγόντες. Οι καταλυτικοί συμπαραγόντες βρίσκονται στην υδατική φάση και είναι φυσικά διαχωρισμένοι από τα αντιδρώντα, τα οποία βρίσκονται κυρίως στην φάση του ιοντικού υγρού. Ο

διαχωρισμός αυτός επιτρέπει την επαναχρησιμοποίηση των υψηλού κόστους συν-καταλυτών, οδηγεί σε αύξηση της σταθερότητας του ενζύμου και υψηλές ταχύτητες σε σχέση με τους οργανικούς διαλύτες [Eckstein *et al.*, 2004, Walker & Bruce, 2004b].

Ένα διαφορετικό διφασικό σύστημα δημιουργήθηκε χρησιμοποιώντας το υδρόφοβο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ και περίσσεια υποστρώματος (αλκοόλης). Στην ανώτερη φάση του υποστρώματος εντοπίστηκε το προϊόν, η ποσότητα του υποστρώματος (οξύ) που δεν αντέδρασε και το παραπροϊόν, ενώ η κατώτερη φάση του ιοντικού υγρού περιείχε αποκλειστικά το ένζυμο (CaLB). Η απομάκρυνση της ανώτερης φάσης επέτρεψε, χωρίς να απαιτείται η χρήση οργανικών διαλυτών, την συνεχόμενη επαναχρησιμοποίηση του ενζύμου και ιοντικού υγρού [Fehér *et al.*, 2007].

Εξαιτίας της μη πτητικής φύσης των ιοντικών υγρών, η απομάκρυνση του νερού αλλά και άλλων πτητικών (παρα)προϊόντων είναι επίσης δυνατή μέσω υπερεξάτμισης ή μέσω εφαρμογής μειωμένης πίεσης, με αποτέλεσμα τη μετατόπιση της θερμοδυναμικής ισορροπίας της ενζυμικής αντίδρασης προς την κατεύθυνση της σύνθεσης [Itoh *et al.*, 2002, Bélafi-Bakó *et al.*, 2002, Nara *et al.*, 2003, Ulbert *et al.*, 2004, Lourenco *et al.*, 2007]. Ωστόσο, η εξάτμιση δεν μπορεί να εφαρμοστεί σε περίπτωση χρήσης πτητικών υποστρωμάτων. Στην αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος μπορεί να συμβάλλει η δυνατότητα σχεδιασμού ενός ιοντικού υγρού με επιθυμητές ιδιότητες. Η δυνατότητα αυτή αξιοποιήθηκε σε αντιδράσεις μετεστεροποίησης με τη χρήση βινυλ-εστέρων. Η ακεταλδεΐδη, παραπροϊόν των αντιδράσεων αυτών, ολιγομερίζεται και συσσωρεύεται στο μέσο με αποτέλεσμα τη μείωση της σταθερότητας επαναχρησιμοποίησης του ενζύμου [Itoh *et al.*, 2001]. Η διαδικασία αυτή αποδόθηκε στην ύπαρξη πρωτονίου στην θέση-2 του ιμιδαζολικού δακτυλίου του [bmim]PF₆ ιοντικού υγρού. Σχεδιάστηκαν έτσι νέα ιοντικά υγρά χωρίς το πρωτόνιο αυτό ([bdmim]BF₄ και [bdmim]PF₆) στα οποία δεν παρατηρήθηκε συσσώρευση της ακεταλδεΐδης και στα οποία η λιπάση επαναχρησιμοποιήθηκε για δέκα συνεχόμενους κύκλους χωρίς απώλεια της δραστηριότητας [Itoh *et al.*, 2003].

Στα ιοντικά υγρά θετική επίδραση στην δραστηριότητα των ενζύμων έχει και η χρήση προσθέτων. Η προσθήκη οργανικής βάσης επέτρεψε την επαναχρησιμοποίηση της λιπάσης από *Pseudomonas cepacia* απομακρύνοντας το όξινο παραπροϊόν της αντίδρασης κινητικού διαχωρισμού δευτεροταγών αλκοολών [Rasalkar *et al.*, 2004].

2.8 Αξιοποίηση των ιοντικών υγρών για την βιοκαταλυτική τροποποίηση φυσικών προϊόντων

Τα «πράσινα» χαρακτηριστικά των ιοντικών υγρών, σε συνδυασμό με την δυνατότητα ρύθμισης των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων και τα βελτιωμένα καταλυτικά χαρακτηριστικά που αποκτούν τα ένζυμα στα μέσα αυτά, δικαιολογούν το μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον για τα ιοντικά υγρά. Η εφαρμογή τους ως μέσα σε βιοκαταλυτικές διεργασίες επεκτείνεται την τελευταία δεκαετία συνεχώς, καταδεικνύοντας κατά περιπτώσεις σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι της χρήσης των οργανικών διαλυτών.

Μία τέτοια περίπτωση αποτελεί η τροποποίηση της δομής ενώσεων φυτικής προέλευσης, όπως τα φυσικά αντιοξειδωτικά. Η τροποποίηση των ενώσεων αυτών, συγκεντρώνει μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον καθώς μπορεί να οδηγήσει στην σύνθεση παραγώγων με τροποποιημένες φυσικοχημικές ιδιότητες (όπως αυξημένη λιποφιλικότητα) αλλά και με νέες βελτιωμένες βιολογικές δράσεις, επιτρέποντας την εφαρμογή τους σε διατροφικά, καλλυντικά και φαρμακευτικά σκευάσματα. Η εφαρμογή των ιοντικών υγρών στον τομέα αυτό μπορεί να προσφέρει λύσεις στους περιορισμούς που επέβαλλε η χρήση των οργανικών διαλυτών, μέσω της αύξησης της διαλυτότητας των υποστρωμάτων, της συμβατότητας τους με κανόνες διεθνών οργανισμών τροφίμων και φαρμάκων σχετικά με την χρήση διαλυτών χαμηλής τοξικότητας, καθώς και μέσω της δυνατότητας εφαρμογής των τεχνικών της μηχανικής του μέσου για την επιλογή των επιθυμητών καταλυτικών χαρακτηριστικών των ενζύμων.

3. Βιοδραστικές ενώσεις-Φυσικά αντιοξειδωτικά

3.1 Εισαγωγή

Η χρήση φυτών με φαρμακευτικές ιδιότητες ξεκινά σχεδόν με την εμφάνιση των ανθρώπων στην Γη. Η επιλογή των φυτών αυτών καθοδηγούνταν αρχικά από το ένστικτο, για να μετατραπεί στη συνέχεια σε εμπειρική γνώση. Για εκατομμύρια χρόνια, η ανθρωπότητα ωφελήθηκε από αυτές τις προσεγγίσεις αλλά με την ανάπτυξη της επιστήμης και της τεχνολογίας τέθηκαν ερωτήματα σχετικά με το τι καταναλώνουμε, πως θα αντιμετωπίσουμε αποτελεσματικότερα τις ασθένειες και πως θα διατηρήσουμε αποτελεσματικά τις φυσικές μας πηγές.

Μεταξύ των ουσιών με φαρμακευτική δράση, τα φυσικά αντιοξειδωτικά προσέλκυσαν το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Το έντονο αυτό ενδιαφέρον πηγάζει από την συσχέτιση των ενώσεων αυτών με οξειδωτικές διεργασίες. Οι οξειδωτικές διεργασίες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην παθογένεση πολλών χρόνιων εκφυλιστικών νόσων [Gutteridge 1993, Moskovitz *et al.*, 2002, Kanner, 2007] αλλά και στην αλλοίωση της ποιότητας τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών [Kanner & Rosenthal, 1992, Decker 1998, German 1999, Alamed *et al.*, 2009].

Στο παρόν κεφάλαιο αναπτύσσεται αναλυτικά η βλαπτική επίδραση των ελευθέρων ριζών και η σημασία των φυσικών αντιοξειδωτικών στην αντιμετώπιση των επιδράσεων αυτών. Πιο συγκεκριμένα περιγράφονται οι γενικοί μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης των φυσικών αυτών συστατικών και παρατίθενται πληροφορίες για τη σύνθεση, δομή και βιολογική δράση ορισμένων σημαντικών κατηγοριών φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως οι βιταμίνες, τα πολυφαινολικά συστατικά και το λιποϊκό οξύ. Τέλος, επισημαίνονται οι περιορισμοί της εφαρμογής των φυσικών αντιοξειδωτικών και αναδεικνύεται η σημασία της τροποποίησης της δομής και των ιδιοτήτων τους μέσω της σύνθεσης παραγώγων αυτών.

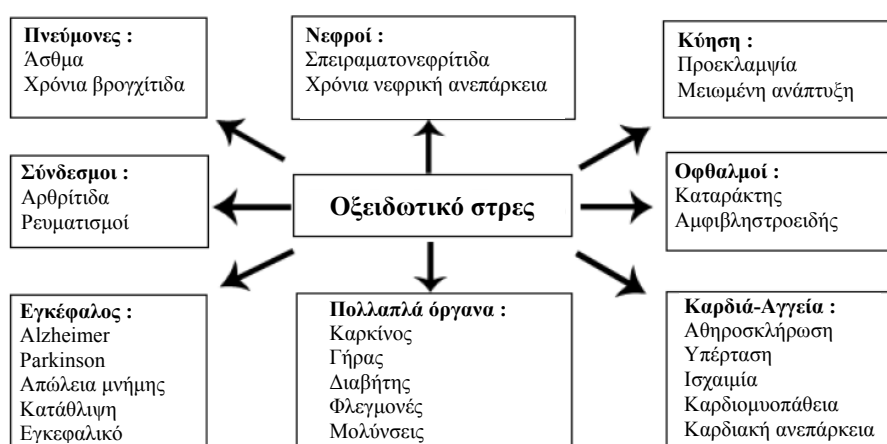
3.2 Βλαπτικές επιδράσεις των ελευθέρων ριζών-Οξειδωτικό στρες

Οι ελεύθερες ρίζες (άτομα ή μόρια τα οποία περιέχουν ένα ή περισσότερα ασύζευκτα ηλεκτρόνια) αποτελούν προϊόντα του φυσιολογικού κυτταρικού μεταβολισμού και παίζουν διττό ρόλο: άλλοτε είναι ευεργετικές για τα κύτταρα και τους οργανισμούς [Fiknel, 1998, Droge, 2002, Yannakopoulou, 2009] και άλλοτε βλαπτικές [Halliwell and Gutteridge, 1990, Diplock, 1991, Halliwell, 1999].

Υπό φυσιολογικές συνθήκες, κύριες πηγές παραγωγής ελευθέρων ριζών αποτελούν η διαρροή ηλεκτρονίων από τις μιτοχονδριακές και τις μικροσωμιακές αλυσίδες μεταφοράς ηλεκτρονίων, η φαγοκυττάρωση και τα ενδογενή ενζυμικά συστήματα [Halliwell & Gutteridge, 1999, German and Traber, 2001, Pham-Hui *et al.*, 2008]. Οι ευεργετικές δράσεις των ελευθέρων ριζών παρατηρούνται σε χαμηλές/μεσαίες συγκεντρώσεις και αφορούν σε φυσιολογικούς ρόλους στην κυτταρική απόκριση στο στρες, στη μεταγωγή σήματος, στην κυτταρική διαφοροποίηση, στη μεταγραφή γονιδίων, στον κυτταρικό πολλαπλασιασμό, στη φλεγμονή και την απόπτωση [German and Traber, 2001, Droge, 2002, Genestra *et al.*, 2007, Pacher *et al.*, 2007, Valko *et al.*, 2007, Pham-Hui *et al.*, 2008, Hultqvist *et al.*, 2009].

Οι δράσεις των δραστικών ριζών, οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν βιολογικές βλάβες, είναι γνωστές ως οξειδωτικό στρες (προκειμένου για ρίζες οξυγόνου) και στρες αζώτου (στην περίπτωση των ριζών αζώτου). Το οξειδωτικό στρες είναι απόρροια της υπερπαραγωγής δραστικών ριζών ή/και ανεπάρκειας των αντιοξειδωτικών μηχανισμών στα βιολογικά συστήματα [Halliwell & Gutteridge, 1999, Johns, 2006]. Η περίσσεια των δραστικών ριζών προκαλεί βλάβες σε βιολογικά μακρομόρια όπως τα κυτταρικά λιπίδια, οι πρωτεΐνες ή το DNA [Southorn, 1988, Halliwell *et al.*, 1992, Halliwell, 1996a, 2007, Valko *et al.*, 2004, 2005].

Πολλές ερευνητικές μελέτες καταδεικνύουν το ρόλο των ελευθέρων ριζών στην εμφάνιση προβλημάτων υγείας στις σύγχρονες κοινωνίες (**Εικόνα 3.1**) [Southorn, 1988, Halliwell *et al.*, 1992, Moskovitz *et al.*, 2002, Valko *et al.*, 2006, Harrison & Gongora, 2009, Well *et al.*, 2009, Heistad *et al.*, 2009, Pan *et al.*, 2009].



Εικόνα 3.1 Ασθένειες σχετιζόμενες με το οξειδωτικό στρες.

Στην πλειοψηφία των περιπτώσεων, οι ελεύθερες ρίζες διαδραματίζουν δευτερεύοντα ρόλο στην εξέλιξη μίας νόσου, ωστόσο σε άλλες αποτελούν την κύρια αιτία εμφάνισής τους.

Όσον αφορά στον ανθρώπινο οργανισμό, ποικίλοι μηχανισμοί έχουν αναπτυχθεί προκειμένου να προστατευθεί από την εκτεταμένη συσσώρευση ελευθέρων ριζών. Οι προστατευτικοί αυτοί μηχανισμοί περιλαμβάνουν ενζυμικούς ή μη-ενζυμικούς αντιοξειδωτικούς μηχανισμούς, όπως διαδικασίες δέσμευσης ή αποτοξικοποίησης ελευθέρων ριζών, αναστολή της σύνθεσης ελευθέρων ριζών και σχηματισμό χηλικών συμπλόκων με μέταλλα. Οι μηχανισμοί αυτοί αναφέρονται ως ενδογενείς, και διακρίνονται από εκείνους που προέρχονται από τη διατροφή και οι οποίοι χαρακτηρίζονται ως εξωγενείς [Chow, 1979, Halliwell 1999, Hayes & McLellan, 1999, Massela *et al.*, 2005].

3.3 Φυσικά αντιοξειδωτικά

Υπάρχουν σήμερα αρκετά δεδομένα τα οποία υποδεικνύουν πως η κατανάλωση συγκεκριμένων φυτικών προϊόντων, πλούσιων σε αντιοξειδωτικά, συντελεί στη διατήρηση της ανθρώπινης υγείας και την πρόληψη χρόνιων ασθενειών [German and Traber, 2001, Halliwell, 2002, Fusco *et al.*, 2007, Bruckdorfer, 2008, Romieu *et al.*, 2008, Herrera *et al.*, 2009].

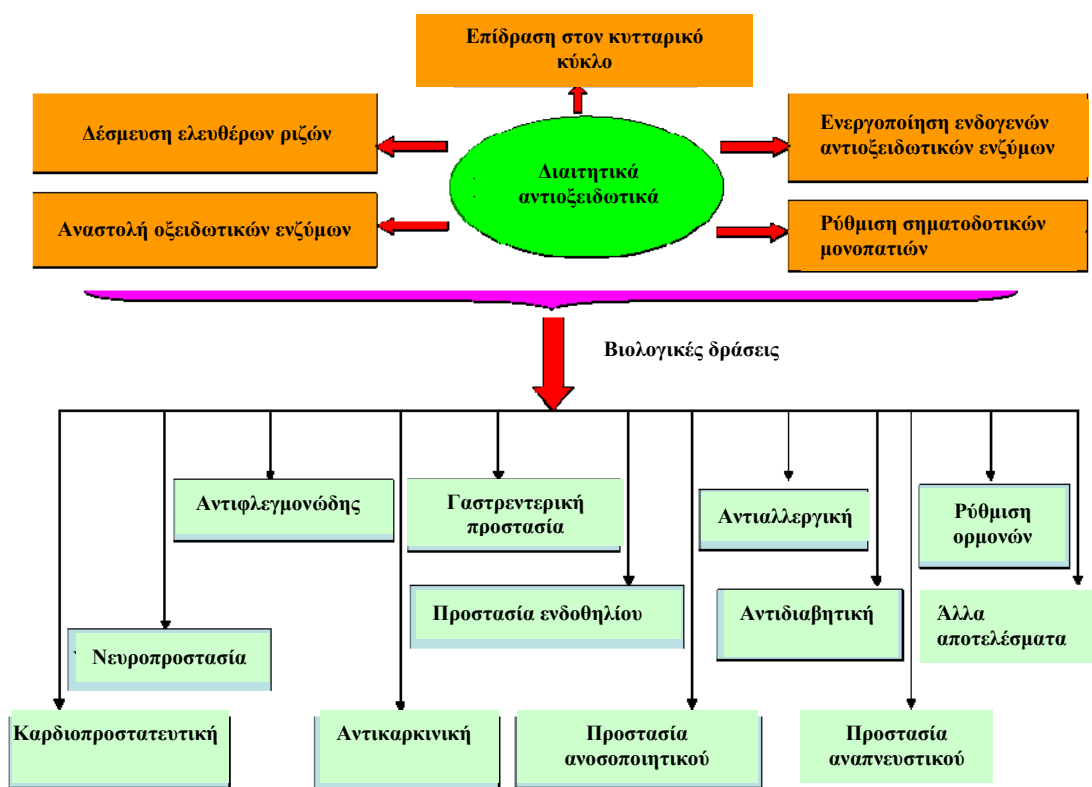
Ως **αντιοξειδωτικό** μπορεί να χαρακτηριστεί οποιαδήποτε ουσία, η οποία όταν είναι παρούσα σε χαμηλές συγκεντρώσεις συγκριτικά με εκείνες των υποστρωμάτων που πρόκειται να οξειδωθούν, καθυστερεί ή αναστέλλει την οξείδωση αυτών των υποστρωμάτων.

Οι μηχανισμοί αντιοξειδωτικής δράσης των φυσικών αντιοξειδωτικών, μπορούν να περιλαμβάνουν (**Εικόνα 3.2**) [Halliwell & Gutteridge 1999]:

(1) την εξουδετέρωση ή δέσμευση ελευθέρων ριζών.

Πολλές ελεύθερες ρίζες αποτελούν ιδιαίτερα δραστικούς οξειδωτικούς παράγοντες, με αποτέλεσμα να οξειδώνουν άλλα οργανικά μόρια και να παράγονται έτσι και άλλες ελεύθερες ρίζες [German and Traber, 2001]. Η προσθήκη, για παράδειγμα, ενός ηλεκτρονίου στο μοριακό οξυγόνο δημιουργεί την ελεύθερη ρίζα του ανιόντος του υπεροξειδίου (O_2^-). Η ρίζα αυτή μπορεί στη συνέχεια να αντιδράσει με άλλα μόρια και να οδηγήσει στη γένεση δευτερογενών δραστικών ριζών οξυγόνου (ρίζα υδροξυλίου) είτε άμεσα, είτε μέσω διεργασιών που καταλύονται από μέταλλα και ένζυμα [Miller *et al.*, 1990, Liochev & Fridovich, 1994, Valko *et al.*, 2005]. Άλλες δραστικές ρίζες οξυγόνου που μπορούν να παραχθούν στους ζώντες οργανισμούς είναι οι ρίζες υπεροξειδίου ($ROO\bullet$). Η απλούστερη ρίζα υπεροξειδίου είναι η $HOO\bullet$, η οποία είναι η πρωτονιωμένη μορφή του ανιόντος υπεροξειδίου και είναι γνωστή ως ρίζα υδροϋπεροξειδίου. Η ρίζα υδροϋπεροξειδίου είναι

υπεύθυνη για την έναρξη της υπεροξειδωσης (peroxidation) των λιπιδίων [Aikens & Dix, 1991].



Εικόνα 3.2 Μηχανισμοί και βιολογικές δράσεις φυτικών αντιοξειδωτικών [Han *et al.*, 2007].

Η ικανότητα συγκεκριμένων αντιοξειδωτικών να αλληλεπιδρούν με τις ελεύθερες ρίζες ώστε να μην έχουν πλέον την δυνατότητα να οξειδώσουν άλλα μόρια, διακόπτοντας έτσι τις αλυσιδωτές αντιδράσεις σύνθεσης ελευθέρων ριζών, αποτελεί το κύρια βήμα κατά τη εξουδετέρωση ή δέσμευση ελευθέρων ριζών. Οι αντιοξειδωτικές ενώσεις μπορούν, λαμβάνοντας ένα ηλεκτρόνιο από μια ρίζα ή προσφέροντας ένα ηλεκτρόνιο, να σταθεροποιούν τις ελεύθερες ρίζες.

Η αποτελεσματικότητα του μηχανισμού αυτού καθορίζεται από τρεις βασικές προϋποθέσεις, (i) την αναγωγική ικανότητα (οξειδοαναγωγικό δυναμικό) του αντιοξειδωτικού (ii) την αποτελεσματική συγκέντρωση ή/και εντόπιση του αντιοξειδωτικού στην θέση όπου λαμβάνει χώρα η οξειδωτική διεργασία, και (iii) την σταθερότητα της παραγόμενης ρίζας του αντιοξειδωτικού, απαιτείται δηλαδή η αντιοξειδωτική ρίζα να είναι αδρανής, ώστε να μην μπορεί να αντιδράσει με άλλα μόρια [German and Traber, 2001].

Επιπλέον της μεταφοράς ηλεκτρονίων, πολλά αντιοξειδωτικά είναι ικανά να εξουδετερώνουν τις ελεύθερες ρίζες μέσω του σχηματισμού συμπλόκων [Shahidi & Wanasundara, 1992].

(2) την αναστολή της σύνθεσης ελευθέρων ριζών μέσω αναστολής της δράσης ενζύμων :

Η δυνατότητα αυτή αποτελεί ένα σημαντικό μηχανισμό αντιοξειδωτικής δράσης, καθώς διάφορα ένζυμα συμβάλλουν με την καταλυτική τους δράση στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες. Ο επιβλαβής αυτός ρόλος επιτυγχάνεται μέσω της σύνθεσης δραστικών ριζών οξυγόνου, υπεροξειδικών και υδροξυλικών ριζών ως αποτέλεσμα της οξείδωσης διαφόρων υποστρωμάτων (ξανθίνη, πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, NADH), η οποία καταλύεται από ένζυμα όπως, η οξειδάση της ξανθίνης, η μονοξυγονάση, η NADH οξειδάση, οι κυκλοξυγονάσες, οι λιποξυγονάσες κ.α. [Hanasaki *et al.*, 1994, Pietta, 2000, Lapenna *et al.*, 2003, Özyürek *et al.*, 2009].

(3) τον σχηματισμό χηλικών συμπλόκων με μέταλλα που εμπλέκονται στη δημιουργία ελευθέρων ριζών :

Τα μεταλλικά ιόντα χαλκού και σιδήρου συμμετέχουν σε πλήθος σημαντικών βιολογικών λειτουργιών (σχηματισμό του ATP, λειτουργία αιμοπρωτεϊνών, συστατικά ενζύμων) [Weinberg, 1990]. Ωστόσο, η εκτεταμένη συσσώρευση των μετάλλων αυτών μπορεί να οδηγήσει σε διάφορες παθολογικές καταστάσεις, μέσω της πρόκλησης οξειδωτικού στρες. Στις οξειδωτικές διεργασίες τα μεταλλικά ιόντα συμμετέχουν ως καταλύτες, οδηγώντας στη σύνθεση της δραστικής υδροξυλικής ρίζας μέσω της αντίδρασης Fenton [Morel *et al.*, 1998, Valko *et al.*, 2005, Leonard *et al.*, 2004] :



(4) την ρύθμιση ή προστασία των ενδογενών αντιοξειδωτικών μηχανισμών : Η δυνατότητα αυτή αποτελεί μία έμμεση αντιοξειδωτική δράση και επιτυγχάνεται μέσω της ικανότητας των φυσικών αντιοξειδωτικών να συμμετέχουν στην αναγέννηση άλλων αντιοξειδωτικών μορίων από τις οξειδωμένες μορφές τους [Burton & Ingold, 1981, Sies, 1993, Packer *et al.*, 1995, Jones *et al.*, 2002] καθώς και να δρουν ως μεταγωγείς σήματος και να ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση [Ursini *et al.*, 1994, Mariappan *et al.*, 2006, Viña *et al.*, 2007, Virgili *et al.*, 2008, Tuñón *et al.*, 2009]. Μέσω της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης τα φυσικά αντιοξειδωτικά μπορούν να επιδεικνύουν επίσης αντιφλεγμονώδεις, αντικαρκινικές, αντιαγγειογενετικές και άλλες ιδιότητες.

3.3.1 Κατηγορίες φυσικών αντιοξειδωτικών

Μόρια όπως οι βιταμίνες είναι γνωστά για τις αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες και αποτελούν απαραίτητα συστατικά της διατροφής. Άλλα αντιοξειδωτικά, όπως οι ουβικινόλες και θειόλες, συντίθενται από τον οργανισμό, αλλά τα επίπεδά τους μπορούν να αυξηθούν σημαντικά μέσω της διατροφής. Σημαντική τα τελευταία χρόνια θεωρείται και η πρόσληψη μίας άλλης κατηγορίας διαιτητικών φυσικών αντιοξειδωτικών, αυτής των φυτικών πολυφαινόλων [Cadenas & Packer, 2002].

3.3.1.1 Βιταμίνες

Μεταξύ των διαφόρων τάξεων μικροθρεπτικών συστατικών (micronutrients), οι βιταμίνες έχουν αναγνωριστεί ως απαραίτητοι διαιτητικοί παράγοντες. Διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις λιπο-διαλυτές βιταμίνες (A, D, E και K), και τις υδατο-διαλυτές βιταμίνες (C, B₁, B₂, B₆, B₁₂, νιασίνη, φολικό, παντοθενικό οξύ), των οποίων ο βιοχημικός ρόλος είναι να δρουν ως πρόδρομοι συνενζύμων σε ποικίλες μεταβολικές διεργασίες. Τις τελευταίες δεκαετίες, η διερεύνηση της σχέσης της διατροφής με την εμφάνιση ασθενειών κατέδειξε τον κεντρικό ρόλο συγκεκριμένων βιταμινών, περιγράφοντας τις ενώσεις αυτές ως «αντιοξειδωτικές βιταμίνες» (**Πίνακας 3.1**) [Rucker *et al.*, 2001].

Μεταξύ των αντιοξειδωτικών βιταμινών σημαντική θέση κατέχει η βιταμίνη C, η οποία ανακαλύφθηκε μόλις το 1915 ως αντισκορβουτικός παράγοντας [Zilva, 1932]. Η βιταμίνη C ή ασκορβικό οξύ είναι μία λακτόνη αποτελούμενη από έξι άτομα άνθρακα. Συντίθεται στα φυτά από διάφορα πρόδρομα συστατικά και είναι άφθονη στα φύλλα και συγκεκριμένα στους χλωροπλάστες [Wheeler *et al.*, 1998]. Ο φυσιολογικός της ρόλος στα φυτά είναι η συμμετοχή στη φωτοσυνθετική διαδικασία, στη διαδικασία της αύξησης του φυτού καθώς και στη προστασία του φυτού από στρεσογόνους παράγοντες [Smirnoff, 2000]. Επιπλέον των φυτών, και τα περισσότερα ζώα είναι ικανά να συνθέσουν ασκορβικό οξύ από γλυκόζη στο ήπαρ (θηλαστικά) ή τα νεφρά (πουλιά και ερπετά) [Smirnoff, 2000].

Ο άνθρωπος, ωστόσο, και κάποια άλλα πρωτεύοντα έχουν χάσει την ικανότητα αυτή, πιθανά εξαιτίας εκτεταμένων μεταλλάξεων στο γονίδιο που κωδικοποιεί το τελικό ένζυμο (gunolactone oxidase) στο βιοσυνθετικό μονοπάτι του ασκορβικού οξέος [Nishikimi *et al.*, 1994]. Η αδυναμία αυτή κατατάσσει ένα ευρέως διαδεδομένο χημικό συστατικό ως βιταμίνη.

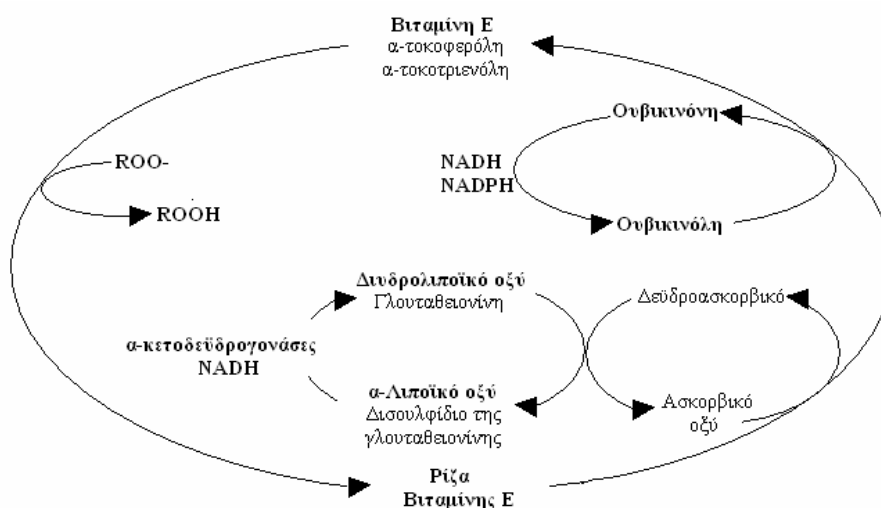
Πίνακας 3.1 Αντιοξειδωτικές βιταμίνες.

Αντιοξειδωτικές βιταμίνες	Δομή
Βιταμίνη Α (ρετινόλη)	
Β-καροτένιο (προβιταμίνη Α)	
Βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ)	
Βιταμίνη B ₆	
Βιταμίνη Ε (τοκοφερόλη)	
Βιταμίνη Κ (κινόνες)	

Η βιταμίνη C αποτελεί ενζυμικό συμπράγοντα σε αντιδράσεις οξειδοαναγωγής και καταλύτη σε ένα ευρύ φάσμα βιοχημικών αντιδράσεων και διεργασιών. Το ασκορβικό και άλατα αυτού χρησιμοποιούνται επίσης ως διατροφικά πρόσθετα σε τρόφιμα, ως αναστολείς σε ενζυμικές αντιδράσεις ωρίμανσης (enzymatic browning) και ως αντιοξειδωτικά συντηρητικά [Johnston *et al.*, 2001].

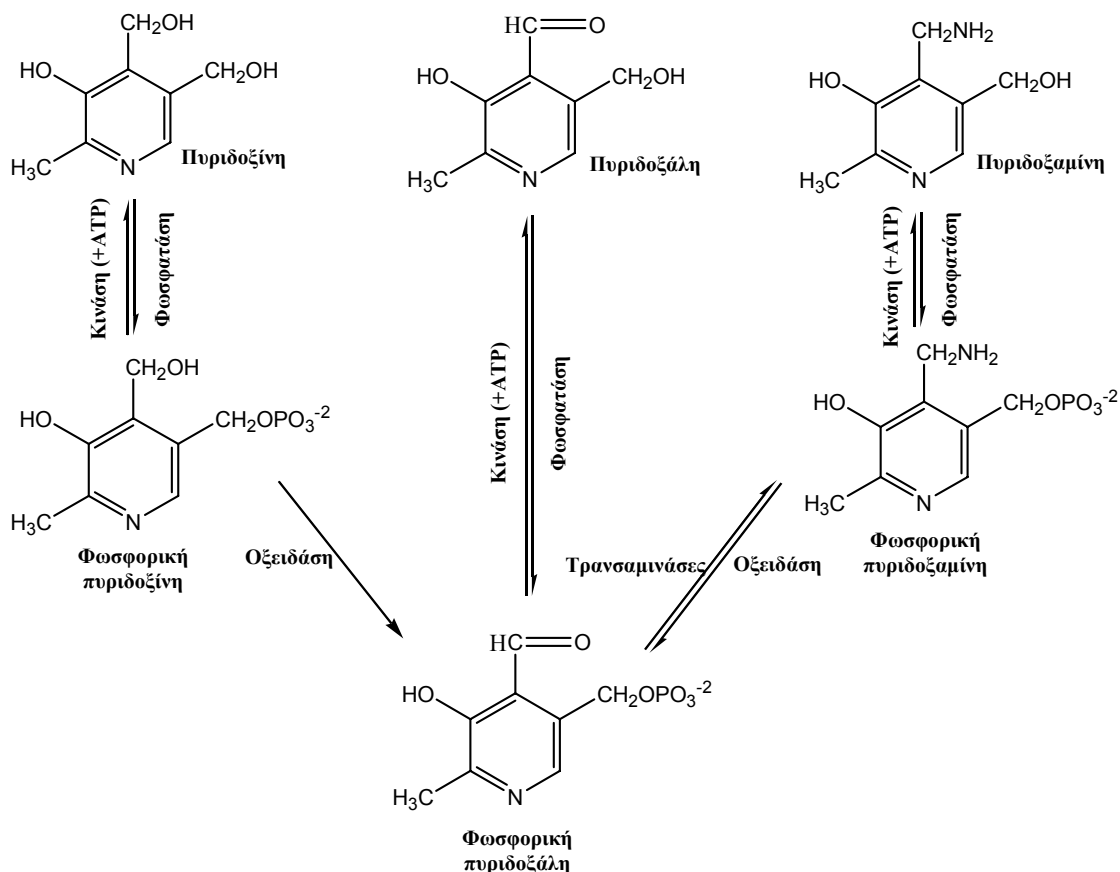
Όσον αφορά τις αντιοξειδωτικές του ιδιότητες, το ασκορβικό οξύ μπορεί να δρα ως δότης ηλεκτρονίων. Στην ικανότητα αυτή αποδίδονται οι γνωστές βιολογικές δράσεις του. Ενδοκυτταρικά, η βιταμίνη C μπορεί να επιδεικνύει την αντιοξειδωτική της δράση μέσω της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης, της ρύθμισης της μετάφρασης των μορίων mRNA, ή της αναστολής της οξειδωτικής βλάβης ενδοκυτταρικών πρωτεϊνών [Toth *et al.*, 1995, Stadtman & Berlett, 1997]. Η αντιοξειδωτική δράση της βιταμίνης εντοπίζεται και στον εξωκυτταρικό χώρο μέσω της προστασίας από οξειδωτικούς παράγοντες και οξειδωτικές βλάβες. Το

ασκορβικό οξύ μπορεί άμεσα να δεσμεύσει δραστικές ρίζες οξυγόνου, αζώτου και χλωρίου [Halliwell, 1996b]. Μπορεί επίσης να συμβάλλει στην αναγέννηση άλλων αντιοξειδωτικών μορίων, όπως η α-τοκοφερόλη, η γλουταθειονίνη, το β-καροτένιο (**Εικόνα 3.3**) [Packer *et al.*, 1979, Niki *et al.*, 1982, Halliwell, 1996b].



Εικόνα 3.3 Ανακύκλωση της τοκοφερόλης. Η οξειδωμένη μορφή της βιταμίνης (η οποία στην εικόνα απεικονίζεται στη μεμβράνη) μπορεί να αναχθεί από διάφορες ενώσεις, συμπεριλαμβανομένου και του ασκορβικού οξέος. Στη συνέχεια το ασκορβικό οξύ μπορεί επίσης να αναγεννηθεί μέσω αντίδρασης με θειολικές ενώσεις, όπως το λιποϊκό οξύ.

Η βιταμίνη B₆ αποτελεί επίσης μία σημαντική υδατοδιαλυτή βιταμίνη, εξαιτίας των πολυάριθμων χημικών και μεταβολικών λειτουργιών της. Η βιταμίνη αυτή είναι γνωστή για περισσότερο από 70 χρόνια και περιλαμβάνει την πυριδοξίνη, την πυριδοξαμίνη και την πυριδοξάλη, οι οποίες διαφέρουν ανάλογα με τον υποκαταστάτη στη θέση 4' [Snell *et al.*, 1942]. Ο υποκαταστάτης αυτός είναι μία υδροξυλομάδα στην πυριδοξίνη, μία αλδεϋδομάδα στην πυριδοξάλη και μία αμινομάδα στην πυριδοξαμίνη (**Εικόνα 3.4**).



Εικόνα 3.4 Μεταβολικές αλληλομετατροπές των συστατικών της βιταμίνης B₆.

Αν και οι τρεις ενώσεις μπορούν να φωσφορυλιωθούν, η 5' φωσφορική πυριδοξάλη (PLP) αποτελεί την περισσότερο δραστική μορφή και χρησιμοποιείται ως συμπράγοντας σε πολλές σημαντικές ενζυμικές αντιδράσεις [Leklem, 2001, Mooney *et al.*, 2009]. Οξειδοαναγωγάσεις, τρανσφεράσεις, υδρολάσεις, λυάσεις και ισομεράσεις, αποτελούν εξαρτώμενα από την PLP ένζυμα. Η PLP συμμετέχει σε σημαντικά στάδια του μεταβολισμού των αμινοξέων [Drewke *et al.*, 2001, Mittenhuber, 2001], των λιπαρών οξέων [Nakamura & Nara, 2004], καθώς και στον καταβολισμό υδρογονανθράκων [Helmreich, 1992]. Συμμετέχει επίσης στη διαδικασία της γλυκονογένεσης, στη διαδικασία σύνθεσης νευροδιαβιβαστικών ουσιών όπως η ταυρίνη, η ντοπαμίνη και η νορεπινεφρίνη [Leklem, 2001], μπορεί να δρα ως ρυθμιστής της δράσης των στεροειδών [Cidlowski & Thanassi, 1981] και ως ρυθμιστής της έκφρασης γονιδίων [Oka *et al.*, 1995, 1997]. Βασικός είναι ο ρόλος της και στην ερυθροποίηση, με συνέπεια την εμφάνιση αναιμιών ελλείψει της βιταμίνης αυτής [Leklem, 2001].

Όσον αφορά την πυριδοξίνη, έχει επισημανθεί η ιδιαίτερη σημασία της ένωσης αυτής, μεταξύ των συστατικών της βιταμίνης B₆, στην προστασία των κυττάρων από τις επιπτώσεις

του οξειδωτικού στρες, μέσω των αντιοξειδωτικών της ιδιοτήτων [Matxain *et al.*, 2009, Mooney *et al.*, 2009]. Υπάρχουν ενδείξεις για την εξαρτώμενη από την πυριδοξίνη σταθεροποίηση της ρίζας οξυγόνου καθώς και για την ικανότητα της ίδιας της πυριδοξίνης να δρα ως αντιοξειδωτικό [Ehrenschaft *et al.*, 1998, Osmani *et al.*, 1999, Bilski *et al.*, 2000, 2002]. Η βιταμίνη αυτή έχει επίσης την ικανότητα να δεσμεύει υπεροξειδικές ρίζες και να αναστέλλει την οξείδωση λιπιδικών μορίων *in vitro* [Denslow *et al.*, 2005]. Μέσω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των συστατικών της, η βιταμίνη B₆ φαίνεται να συνδέεται και με την εμφάνιση κάποιων μορφών καρκίνου [Tsao *et al.*, 2007, Theodoratou *et al.*, 2008].

3.3.1.2 Πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά

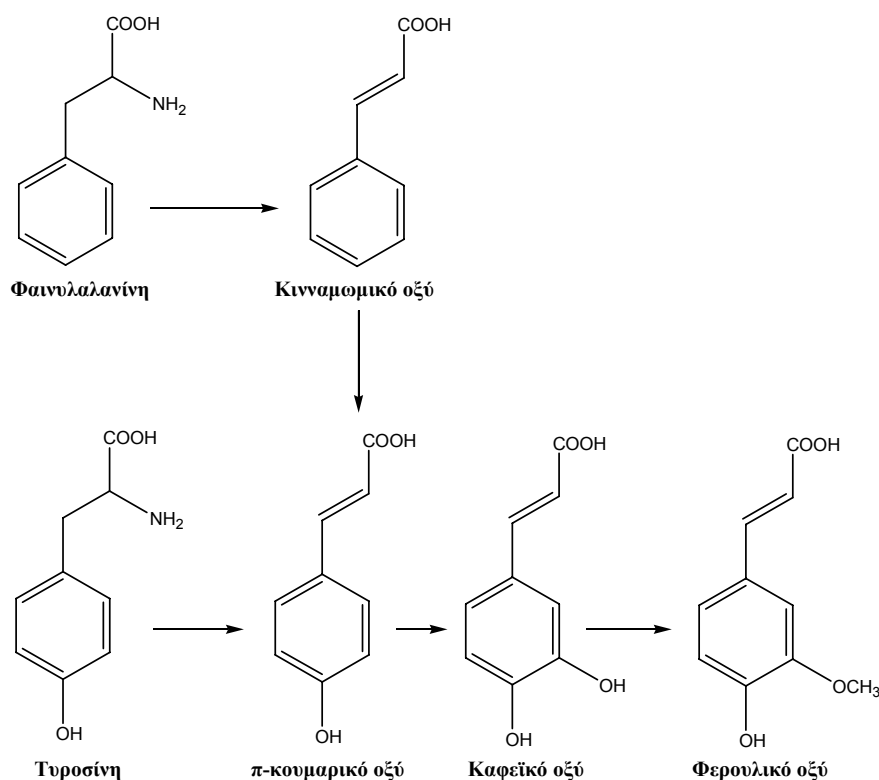
Μία σημαντική κατηγορία μικροθρεπτικών συστατικών αποτελούν βιοδραστικές ενώσεις, οι οποίες περιέχονται ουσιαστικά σε κάθε φυτό και είναι γνωστές με τον όρο «φυτοχημικά» (phytochemicals). Μία ευρέως γνωστή κατηγορία φυτοχημικών αποτελούν οι φυτικές πολυφαινόλες. Γενικά, τα φυτά διαθέτουν την δυνατότητα βιοσύνθεσης πολυφαινολικών συστατικών, σε αντίθεση με τα ζώα και τους μύκητες [Iwashina, 2000]. Εξάιρεση αποτελεί η απομόνωση κάποιων συστατικών από τους μύκητες *Aspergillus candidus* [Bird & Marshall, 1969, Marchelli & Vining, 1973, Gottlieb, 1975] και *Phallus impudicus* [Bohm, 1975]. Πολυφαινολικές ενώσεις έχουν επίσης αναγνωριστεί στο πράσινο άλγος *Nitella hookeri* καθώς και σε κάποια ηπατικά φυλλόβρυα [Markham and Porter 1969].

Οι φυτικές πολυφαινόλες είναι δευτερογενείς μεταβολίτες μικρού μοριακού βάρους, οι οποίοι απομονώνονται από μία μεγάλη ποικιλία φυτών. Οι ενώσεις αυτές διαδραματίζουν διαφορετικούς ρόλους στην οικολογία των φυτών, προσελκύνοντας επικονιαστές, προστατεύοντας ενάντια σε βλαπτικά για το φυτό έντομα, παρέχοντας προστασία ενάντια σε ιούς, μύκητες και βακτήρια, δρώντας ως καταλύτες κατά τις φωτεινές αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης ή/και ως ρυθμιστές των καναλιών μετάλλων που εμπλέκονται στη φωτοφωσφορύλωση, δεσμεύοντας δραστικές ομάδες οξυγόνου (ROS) που παράγονται από το σύστημα μεταφοράς ηλεκτρονίων της φωτοσύνθεσης και προστατεύοντας τα φυτά από την υπεριώδη ακτινοβολία και την επαγόμενη από αυτή δημιουργία ελευθέρων ριζών [Gould & Lister, 2006].

Ως διατροφικά συστατικά, οι φυτικές πολυφαινόλες αποτελούν την κύρια πηγή αντιοξειδωτικών. Η ομάδα των πολυφαινολών, περιλαμβάνει περισσότερα από 8,000 δομικά διαφορετικά συστατικά, αν και ένας μικρότερος αριθμός είναι σημαντικός από διαιτητικής άποψης. Οι φυτικές πολυφαινόλες κατηγοριοποιούνται σύμφωνα με τον αριθμό των

φαινολικών δακτυλίων και τις δομικές ομάδες που συνδέουν τους δακτυλίους αυτούς σε: (1) φαινολικά οξέα, τα οποία περιλαμβάνουν υδροξυ-βενζοϊκά οξέα και υδροξυ-κινναμωμικά οξέα (2) την πολυπληθή ομάδα των φλαβονοειδών, η οποία περιλαμβάνει τις φλαβονόλες, φλαβόνες, ισοφλαβόνες, φλαβανόνες, ανθοκυανιδίνες και φλαβανόλες, (3) στιλβένια, και (4) λιγνίνες και πολυμερή αυτών.

Τα πιο διαδεδομένα φαινολικά συστατικά των φυτών αποτελούν τα υδροξυ-κινναμωμικά οξέα. Οι ενώσεις αυτές συντίθενται μέσω του μονοπατιού του φαινυλπροπανοϊκού οξέος (phenylpropanoid pathway), από το οποίο προέρχονται όλες οι κατηγορίες πολυφαινολικών ενώσεων. Οι κύριοι πρόδρομοι των φαινολικών οξέων είναι η φαινυλαλανίνη, η οποία συντίθεται μέσω του μονοπατιού του σικιμικού οξέος, καθώς και η τυροσίνη (**Εικόνα 3.5**) [Harborne, 1986].

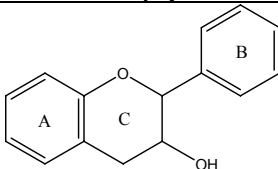
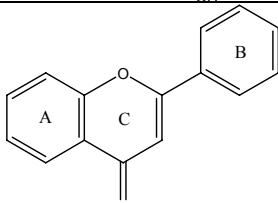
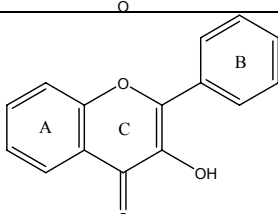
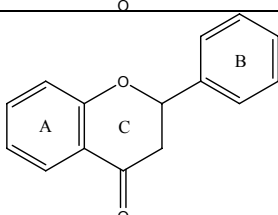
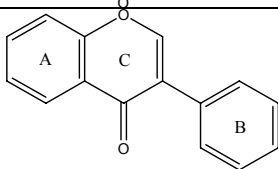
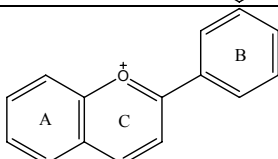


Εικόνα 3.5 Κύρια μονοπάτια της βιοσύνθεσης των φαινολικών οξέων [Rice-Evans *et al.* 1997].

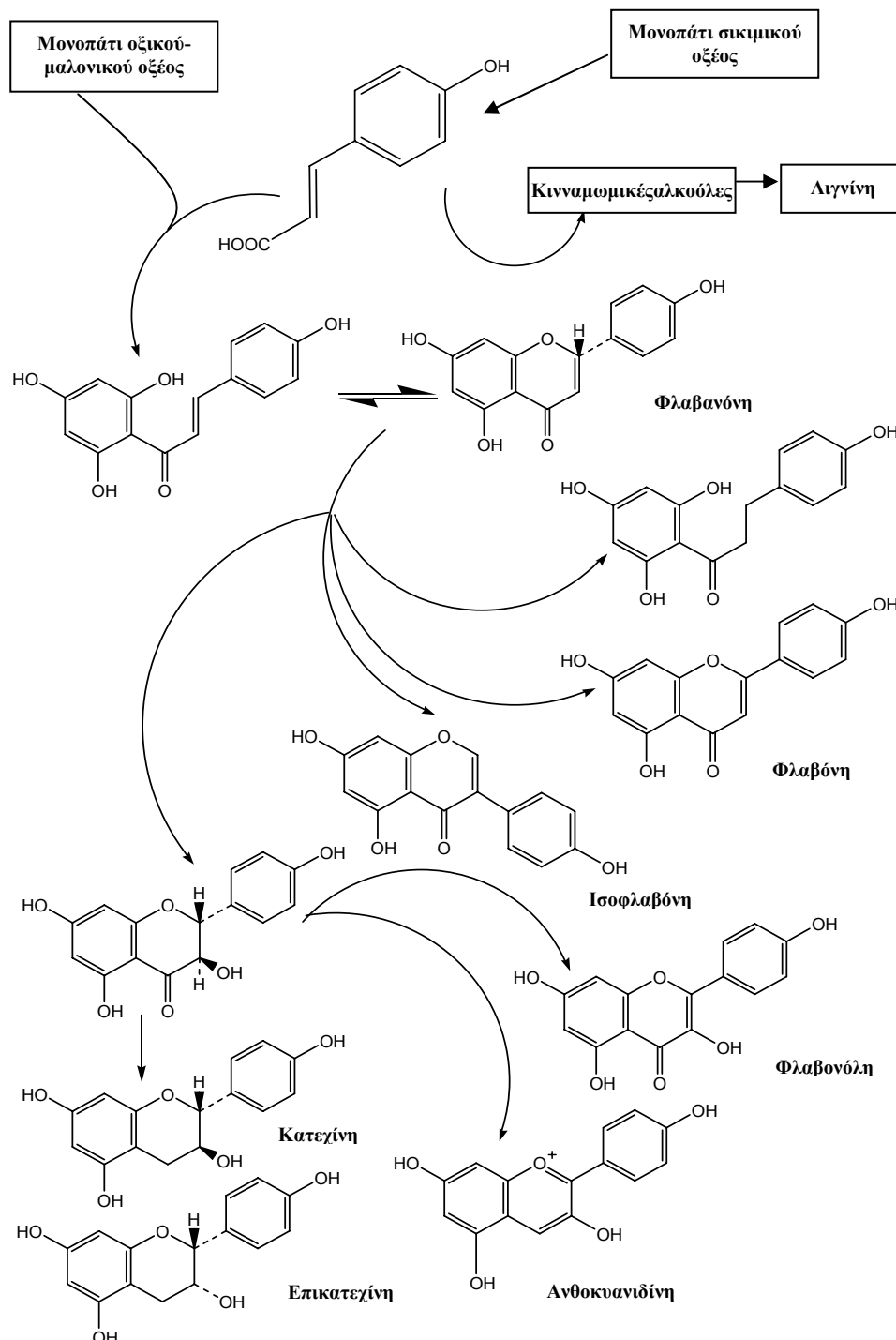
Τα φαινολικά οξέα απαντώνται συνήθως στη συζευγμένη τους μορφή, ως αποτέλεσμα ενζυμικής υδροξυλίωσης, *O*-γλυκοσυλίωσης, *O*-μεθυλίωσης ή εστεροποίησης [Rice-Evans *et al.*, 1997]. Οι ενώσεις αυτές συνιστούν περίπου το ένα τρίτο και τα φλαβονοειδή τα υπόλοιπα δύο τρίτα των διαιτητικών πολυφαινολικών συστατικών. Από τα φλαβονοειδή, μεγαλύτερο

ενδιαφέρον στρέφεται προς τις ομάδες των φλαβονών, φλαβανονών, ισοφλαβονών, φλαβονολών, φλαβανολών και ανθοκυανιδινών [Aherne & O'Brien, 2002, Erlund, 2004, Han *et al.*, 2007] (Πίνακας 3.2).

Πίνακας 3.2 Ταξινόμηση, δομή και διατροφική πηγή των φλαβονοειδών.

Κατηγορία	Δομή	Φλαβονοειδές	Διατροφική πηγή
Φλαβονόλες		(+)-κατεχίνη (-)-επικατεχίνη	Τσάι
Φλαβόνες		Απιγενίνη Ρουτίνη Λουτεολίνη	Επιδερμίδα φρούτων Κόκκινο κρασί, κίτρο, κόκκινες πιπεριές, σίκαλη
Φλαβανόλες		Καμφερόλη Κερσετίνη Μυρισετίνη	Μαύρο τσάι, μαρούλι, κόκκινο κρασί, ελαιόλαδο, επιδερμίδα μήλου
Φλαβανόνες		Ναριγκίνη Ναριγκενίνη Εσπεριδίνη Ταξιφολίνη	Κίτρο, λεμόνι, πορτοκάλι και άλλα εσπεριδοειδή
Ισοφλαβόνες		Γενιστεΐνη Γενιστίνη	Σόγια
Ανθοκυανιδίνες		Απιγενιδίνη Κυανιδίνη	Κεράσια, φράουλες, βατόμουρα

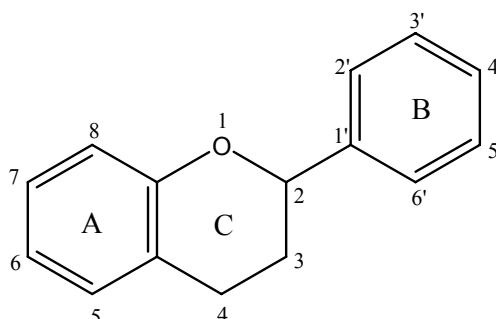
Το βιοσυνθετικό μονοπάτι των φλαβονοειδών αποτελεί επίσης τμήμα του ευρύτερου μονοπατιού του φαινυλπροπανοϊκού οξέος. Οι κύριοι πρόδρομοι των φλαβονοειδών είναι η φαινυλαλανίνη, η οποία συντίθεται μέσω του μονοπατιού του σικιμικού οξέος, και το μαλονικό συνένζυμο A (malonyl-CoA), το οποίο προέρχεται από το κιτρικό οξύ που συντίθεται μέσω του κύκλου του Krebs (Εικόνα 3.6) [Harborne, 1986, Davies & Schwinn, 2006].



Εικόνα 3.6 Κύρια μονοπάτια της βιοσύνθεσης των φλαβονοειδών [Rice-Evans *et al.* 1997].

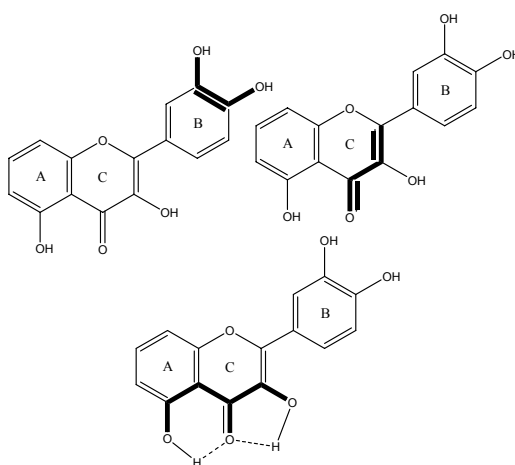
Η βασική δομή των φλαβονοειδών αντιστοιχεί στην 2-φαινυλ-βενζο-πυρόνη. Η δομή αυτή αποτελείται από 15 άτομα άνθρακα διευθετημένα σε τρεις δακτυλίους ($C_6-C_3-C_6$) (Εικόνα 3.7). Τα φλαβονοειδή απαντώνται συχνά ως γλυκοσίδια. Το σάκχαρο που συμμετέχει συνήθως στη σύνθεση των γλυκοσιδίων είναι η γλυκόζη, αν και η γαλακτόζη, η ραμνόζη, η ξυλόζη και η αραβινόζη έχουν επίσης παρατηρηθεί [Rice-Evans *et al.*, 1997]. Τα

μέλη της ομάδας των φλαβονοειδών υπόκεινται, μετά την σύνθεσή τους, σε διάφορα στάδια τροποποίησης με αποτέλεσμα να υδροξυλιώνονται, μεθυλιώνονται, ακετυλιώνονται, σουλφυλιώνονται ή να διμερίζονται [Rice-Evans *et al.*, 1997, Hassig *et al.*, 1999, Pietta, 2000, Heim *et al.*, 2002].



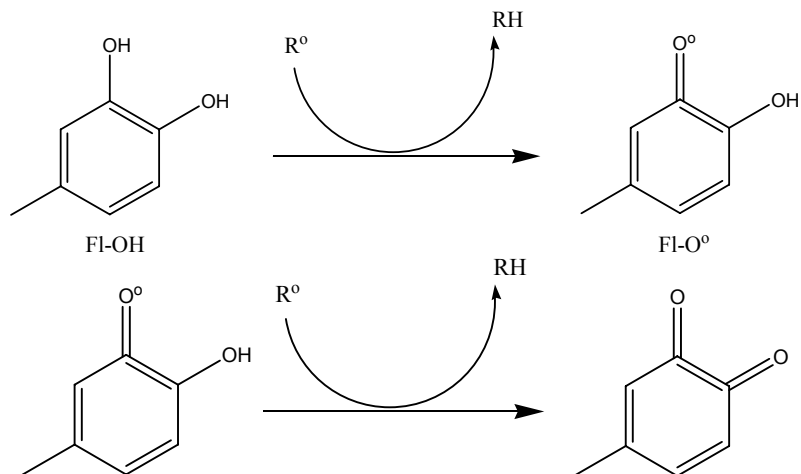
Εικόνα 3.7 Βασική δομή των φλαβονοειδών (φλαβονοειδικός πυρήνας).

Τις τελευταίες δεκαετίες έχει καταδειχθεί ο ζωτικής σημασίας ρόλος των φυτικών πολυφαινολών για τα ίδια τα φυτά αλλά και για τον άνθρωπο. Πιστεύεται ότι στην παρουσία των ενώσεων αυτών οφείλονται οι ευεργετικές δράσεις ροφημάτων, όπως το τσάι και το κρασί, και τροφίμων, όπως τα λαχανικά και τα φρούτα.



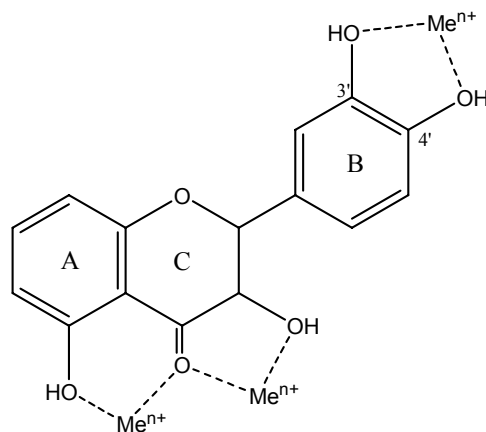
Εικόνα 3.8 Δομικές ομάδες (επισημαίνονται με έντονες γραμμές) οι οποίες συμμετέχουν στην δέσμευση ελευθέρων ριζών [Soobrattee *et al.*, 2005].

Τα προστατευτικά αποτελέσματα των πολυφαινολικών συστατικών αποδίδονται στην ικανότητά τους να δεσμεύουν (**Εικόνα 3.8**) και να σταθεροποιούν τις δραστικές ρίζες οξυγόνου και αζώτου (**Εικόνα 3.9**) [Afanasev *et al.*, 1989, Robak & Gryglewski, 1988, Van Acker *et al.*, 1995, Havsteen, 2002, Han *et al.*, 2007].



Εικόνα 3.9 Σταθεροποίηση ελευθέρων ριζών (R°) από φλαβονοειδή (FI) [Pietta, 2000].

Μπορούν επίσης να σχηματίζουν χηλικά σύμπλοκα με μέταλλα (**Εικόνα 3.10**) [Ferrali *et al.*, 1997, Arora *et al.*, 1998, Kostyuk *et al.*, 2001, Heim *et al.*, 2002, Khohar & Apenten, 2003, Leopoldini *et al.*, 2006, Ren *et al.*, 2008], να ενεργοποιούν αντιοξειδωτικά ένζυμα [Elliot *et al.*, 1992, Myhrstad *et al.*, 2002, Anter *et al.*, 2004, Dangles & Dufour, 2006], και να αναστέλλουν τη δράση οξειδασών [Cos *et al.*, 1998, Pietta, 2000, Havsteen, 2002, Andersen & Markham, 2006].



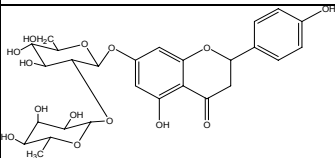
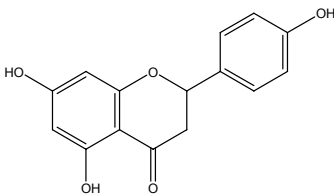
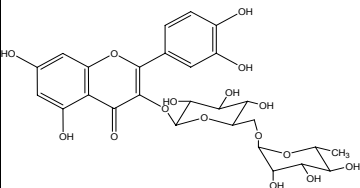
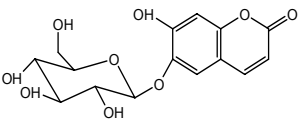
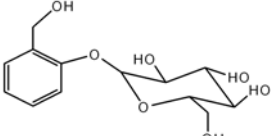
Εικόνα 3.10 Θέσεις πρόσδεσης μεταλλικών ιόντων [Pietta, 2000].

Αν και οι περισσότερες βιολογικές δράσεις των πολυφαινολικών συστατικών οφείλονται στις αντιοξειδωτικές τους ικανότητες, τα συστατικά αυτά μπορούν έμμεσα να επιδεικνύουν την προστατευτική τους δράση μέσω της ενεργοποίησης ενδογενών αντιοξειδωτικών μηχανισμών [Chen *et al.*, 2000, Havsteen, 2002], καθώς και μέσω της ρύθμισης κυτταρικών σηματοδοτικών μονοπατιών [Pan *et al.*, 2000, Aggarwal & Shisodia, 2004, Chen *et al.*, 2005]. Μέσω των δράσεων αυτών, οι φυτικές πολυφαινόλες επιδεικνύουν

αντιοξειδωτικές, αντικαρκινικές ή αντιφλεγμονώδεις δράσεις [Rice-Evans & Packer, 1998, Havsteen, 2002, Soobrattee *et al.*, 2005, Andersen & Markham, 2006, Han *et al.*, 2007, Garcia-Lafuente, 2009, Crozier *et al.*, 2009].

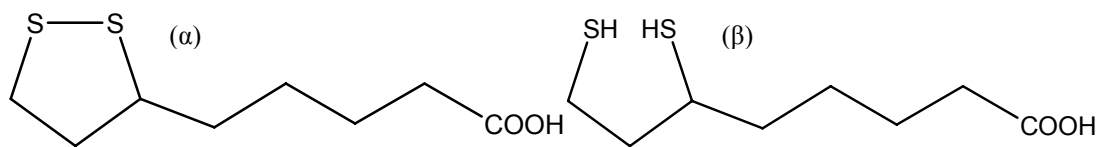
Τα πολυφαινολικά συστατικά επιδεικνύουν επίσης αντιμικροβιακές δράσεις ενάντια σε διάφορα βακτήρια και στελέχη μυκήτων και προστατευτικές δράσεις ενάντια σε βακτηριακές τοξίνες [Havsteen, 2002, Cushnie & Lamb, 2005, Andersen & Markham, 2006]. Σε διάφορες μελέτες έχει παρατηρηθεί και η προστατευτική δράση των συστατικών αυτών απέναντι σε διάφορους ιούς [Pietta, 2000, Havsteen, 2002, Cushnie & Lamb, 2005, Naithani *et al.*, 2008] (Πίνακας 3.3).

Πίνακας 3.3 Σημαντικά πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά και κύριες βιολογικές τους δράσεις.

Αντιοξειδωτικό	Δομή	Βιολογικές δράσεις	Βιβλιογραφική αναφορά
Ναριγκίνη		Αντιοξειδωτική Αναστολή οξειδωτικών ενζύμων Αντιαθηρωματική Αντιφλεγμονώδης Αντικαρκινική Αντιμεταλλαξιγόνος Αντιμικροβιακή Αντι-ιική	Bear & Teel, 2000 Russo <i>et al.</i> , 2000 Mellou <i>et al.</i> , 2005 Yu <i>et al.</i> , 2005a Heinonen & Moilanen, 2007 Tripoli <i>et al.</i> , 2007 Ribeiro <i>et al.</i> , 2008 Tsui <i>et al.</i> , 2008 Ozyurek <i>et al.</i> , 2009 Wu <i>et al.</i> , 2009
Ναριγκενίνη		Αντιοξειδωτική Αναστολή λιποξυγονασών Αντιαθηρωματική Αντιφλεγμονώδης Αντικαρκινική Μεταβολισμός ορμονών	Ruh <i>et al.</i> , 1995 Moroney <i>et al.</i> , 1988 Peterson & Dwyer, 1998 Cheng & Breen, 2000 Manthey <i>et al.</i> , 2001 Erlund, 2004
Ρουτίνη		Αντιοξειδωτική Αναστολή οξειδωτικών ενζύμων Αντιαθηρωματική Αντιφλεγμονώδης Αντικαρκινική Αντιμικροβιακή	Cassidy <i>et al.</i> , 2000 Russo <i>et al.</i> , 2000 Selloum <i>et al.</i> , 2001 Ren <i>et al.</i> , 2003 Milde <i>et al.</i> , 2004 Cushnie & Lamb, 2005 Nones <i>et al.</i> , 2009
Εσκουλίνη		Αντιοξειδωτική Αναστολή οξειδωτικών ενζύμων Αντικαρκινική Αντιφλεγμονώδης	Duncan <i>et al.</i> , 1998 Fylaktakidou <i>et al.</i> , 2004
Σαλικίνη		Αντιοξειδωτική Αντιφλεγμονώδης Αναλγητική Αντικαρκινική	Khayyal <i>et al.</i> , 2005 Hostanska <i>et al.</i> , 2007 Cassileth <i>et al.</i> , 2007 Efferth <i>et al.</i> , 2007 Enayat & Banerjee, 2009

3.3.1.3 Άλλα φυσικά αντιοξειδωτικά-Λιποϊκό οξύ

Το α-λιποϊκό οξύ απομονώθηκε το 1951 με τη μορφή δύο εναντιομερών του *R* και *S*-λιποϊκού οξέος [Reed *et al.*, 1951]. Συχνά τα βιολογικά αποτελέσματα του ενός εναντιομερούς εξουδετερώνονται από το άλλο, και θεωρείται ότι το *R*-λιποϊκό οξύ είναι ανώτερο από βιολογικής και φαρμακολογικής σκοπιάς σε σχέση με το *S* εναντιομερές [Tirosh *et al.*, 2002]. Το λιποϊκό οξύ αποτελείται από οκτώ άτομα άνθρακα και περιέχει δύο άτομα θείου σε μία δομή διθειολικού δακτυλίου (**Εικόνα 3.11α**). Εντάχθηκε αρχικά στην κατηγορία των βιταμινών [Rosenberg *et al.*, 1959], αλλά βρέθηκε αργότερα ότι τόσο ζωικοί οργανισμοί όσο και ο άνθρωπος έχουν την ικανότητα να συνθέτουν το συστατικό αυτό [Carreau, 1979]. Για περισσότερες από 5 δεκαετίες το ερευνητικό ενδιαφέρον για το λιποϊκό οξύ και τις βιολογικές του δράσεις αυξάνεται συνεχώς, καθώς στην ελεύθερη μορφή του αποτελεί ένα πολύ ισχυρό αντιοξειδωτικό [Packer *et al.*, 1995, Tirosh *et al.*, 2002, Moreau *et al.*, 2002, Smith *et al.*, 2004, Bilska & Wlodek, 2005].



Εικόνα 3.11 Δομές του α) λιποϊκού οξέος και β) του ανηγμένου του παραγώγου, διυδρολιποϊκού οξέος.

Στον οργανισμό η συγκέντρωση της ελεύθερης μορφής του λιποϊκού οξέος είναι ιδιαίτερα χαμηλή, καθώς αυτό εγκλωβίζεται στους ιστούς των νεφρών, της καρδιάς και των σκελετικών μυών, μέσω της σύνδεσής του με πρωτεΐνες [Moreau *et al.*, 2002]. Ωστόσο, με την λήψη του ως διατροφικό συμπλήρωμα έχει παρατηρηθεί αύξηση της ελεύθερης μορφής σε διάφορα όργανα [Peinado *et al.*, 1989, Constantinescu *et al.*, 1995, Moreau *et al.*, 2002]. Όταν λαμβάνεται μέσω της διατροφής, το λιποϊκό οξύ απορροφάται ταχύτατα και προσλαμβάνεται από τα κύτταρα, στα οποία ανάγεται στην περισσότερο δραστική μορφή του διυδρολιποϊκού οξέος (**Εικόνα 3.11β**) [Handelman *et al.*, 1994, Podda *et al.*, 1994].

Η ελεύθερη και ανηγμένη μορφή του λιποϊκού οξέος δρουν μαζί ως ένα ισχυρό οξειδοαναγωγικό ζεύγος. Το λιποϊκό οξύ μπορεί να δεσμεύει υδροξυλικές ρίζες, υποχλωριώδες οξύ και ρίζες οξυγόνου, ενώ το διυδρολιποϊκό οξύ αντιδρά άμεσα με υπεροξειδικές, υδροξυλικές ρίζες και υποχλωριώδες οξύ [Packer *et al.*, 1995, Moini *et al.*, 2002, Smith *et al.*, 2004]. Τόσο το λιποϊκό όσο και το διυδρολιποϊκό οξύ μπορούν να

σχηματίζουν χηλικά σύμπλοκα με μέταλλα μέσω της καρβοξυλικής ομάδας ή των περιεχόμενων ατόμων θείου του δακτυλίου [Tirosh *et al.*, 2002, Smith *et al.*, 2004]. Υποστηρίζεται επίσης πως τα συστατικά αυτά μπορούν να επηρεάσουν τη δράση ρυθμιστικών πρωτεϊνών και γονιδίων που συμμετέχουν στο μεταβολισμό και σε διαδικασίες φυσιολογικής ανάπτυξης [Roy & Packer, 1998, Sen, 2000]. Το λιποϊκό οξύ, συμμετέχει επίσης και σε διάφορα πολυενζυμικά συστήματα [Moreau *et al.*, 2002]. Ήδη από το 1959 είχε διατυπωθεί η άποψη πως το λιποϊκό οξύ και η ανηγμένη του μορφή μπορούν να δρουν ως αντιοξειδωτικές ενώσεις βιταμινών, όπως η βιταμίνη C και οι τοκοφερόλες (**Εικόνα 3.3**). Σήμερα πολλές έρευνες συμφωνούν με την άποψη αυτή δείχνοντας ότι οι ενώσεις αυτές μπορούν να αναγεννούν άλλα αντιοξειδωτικά από τις οξειδωμένες ή ανενεργές μορφές τους, αλλά και να δρουν συνεργιστικά με άλλες αντιοξειδωτικές ενώσεις [Packer *et al.*, 1995, Bast and Haenen, 2003, Gonzalez-Perez *et al.*, 2008].

3.3.2 Περιορισμοί της χρήσης των φυσικών αντιοξειδωτικών

Το 1992, σε αναγνώριση της σημασίας των αντιοξειδωτικών, συντάχθηκε η επανομαζόμενη «διακήρυξη του Saas Fee» (**Πλαίσιο 3.1**).

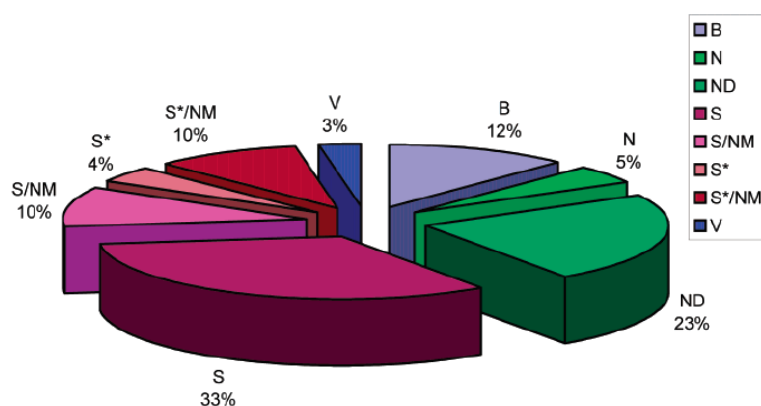
Πλαίσιο 3.1 Διακήρυξη του Saas Fee [Rice-Evans & Packer, 1998].

1. Η εκτενής έρευνα στο πεδίο των ελευθέρων ριζών οδήγησε στο συμπέρασμα πως τα διαιτητικά αντιοξειδωτικά διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην πρόληψη και αντιμετώπιση διαφόρων παθήσεων. Σε αυτές περιλαμβάνονται καρδιαγγειακές, εγκεφαλοαγγειακές παθήσεις, συγκεκριμένες μορφές καρκίνου και άλλες διαταραχές, πολλές από τις οποίες σχετίζονται με το γήρας.
2. Κατά κοινή ομολογία απαιτείται σήμερα περαιτέρω ερευνητική δραστηριότητα σε επιστημονικό επίπεδο, καθώς και σε επίπεδο κλινικών και τυχαίων δοκιμών, η οποία αναμένεται να οδηγήσει σε αύξηση των διαθέσιμων γνώσεων.
3. Βασικό στόχο αποτελεί η πρόληψη ασθενειών. Αυτός μπορεί να επιτευχθεί μέσω της χρήσης αντιοξειδωτικών τα οποία αποτελούν φυσικές ενώσεις.
4. Έχει καταστεί σαφές πως υπάρχουν πολυάριθμες πηγές ελευθέρων ριζών, όπως το όξον, η ηλιακή και άλλες μορφές ακτινοβολίας, το νέφος και άλλοι ατμοσφαιρικοί ρυπαντές. Η βέλτιστη πρόσληψη αντιοξειδωτικών μπορεί να αποτελεί ένα σημαντικό μέτρο πρόληψης ενάντια στους κινδύνους αυτούς.
5. Επιτακτική είναι και η ανάγκη ενημέρωσης της κοινωνίας σχετικά με τις θετικές επιδράσεις της κατανάλωσης φυσικών αντιοξειδωτικών. Πολλά είναι τα δεδομένα σχετικά με την ασφαλή πρόσληψη ακόμα και μεγάλων ποσοτήτων αντιοξειδωτικών όπως, οι βιταμίνες E και C, τα καροτενοειδή, το α-λιποϊκό οξύ και άλλα.
6. Στην ενημέρωση σχετικά με τα ευεργετικά αποτελέσματα της κατανάλωσης φυσικών αντιοξειδωτικών, όποτε αυτά αποδεικνύονται αδιαμφισβήτητα, θα πρέπει να συμμετέχουν ενεργά κυβερνητικοί οργανισμοί, υγειονομικοί φορείς και τα μέσα ενημέρωσης.

Στην διακήρυξη αυτή επισημαίνεται ο μεγάλος αριθμός περιβαλλοντικών πηγών δραστικών ριζών και ο κύριος ρόλος των φυσικών αντιοξειδωτικών στην αντιμετώπιση των

προκαλούμενων από ρίζες βλαβών καθώς και στην πρόληψη διαφόρων ασθενειών. Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές καλείται η επιστημονική κοινότητα να εντείνει την έρευνα και οι αρμόδιοι οργανισμοί να συμβάλλουν στην ενημέρωση όταν η χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών είναι αποδεδειγμένα επωφελής για τον άνθρωπο.

Η ερευνητική δραστηριότητα στον τομέα αυτό έχει πράγματι συνεισφέρει σημαντικά στην ανακάλυψη πολλών μορίων με αντιοξειδωτικές ικανότητες, καθώς και των μηχανισμών μέσω των οποίων επιδεικνύουν τις βιολογικές τους δράσεις. Οι γνώσεις αυτές κίνησαν το ενδιαφέρον των βιομηχανιών φαρμάκων, τροφίμων και καλλυντικών για την εφαρμογή των αντιοξειδωτικών σε διάφορα σκευάσματα. Ενδεικτικό είναι το γεγονός, πως σε μία περίοδο 20 περίπου ετών, από το 1980 έως και το 2001, μέχρι και το 75% των φαρμακευτικών σκευασμάτων προέρχονται από φυσικά προϊόντα, συμπεριλαμβανομένων και πολλών φυσικών αντιοξειδωτικών (**Εικόνα 3.12**) [Newman *et al.*, 2003].



Εικόνα 3.12 Νέα εγκεκριμένα φάρμακα κατά την περίοδο 1981-2002 και η προέλευσή τους, όπου "B": βιολογικής προέλευσης (συνήθως πεπτίδια ή πρωτεΐνες), "N": φυσικό προϊόν, "ND": προερχόμενο από φυσικό προϊόν, "S": συνθετικό φάρμακο, "S*": συνθετικό φάρμακο, αλλά η δραστική ένωση προέρχεται από φυσικό προϊόν, "V": εμβόλιο. Ο συμβολισμός "NM" περιγράφει μιμητικές ενώσεις φυσικών προϊόντων [Newman, 2003].

Το ενδιαφέρον για τη βιομηχανική χρήση των φυσικών αντιοξειδωτικών αποκάλυψε ωστόσο και διάφορους περιορισμούς των δυνατοτήτων και εφαρμογών τους. Ένας από τους περιορισμούς σχετίζεται εύλογα με το γεγονός πως τα αντιοξειδωτικά τα οποία προέρχονται από φυσικές πηγές δεν επαρκούν για να καλύψουν τις ανάγκες των σύγχρονων βιομηχανιών [Karmee, 2009]. Η λύση που προτάθηκε και εφαρμόστηκε από την βιομηχανία τροφίμων για την αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος ήταν η παρασκευή συνθετικών, μη φυσικών αντιοξειδωτικών όπως τα BHA (βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη), BHT (βουτυλιωμένο

υδροξυτολουένιο), PG (προπυλεστέρας του γαλλικού οξέος), TBHQ (*t*-βουτυλ υδροκινόνη) [Pratt & Hudson, 1990]. Ωστόσο, η εφαρμογή των ουσιών αυτών εγείρει ανησυχίες εξαιτίας τόσο του σχηματισμού τοξικών προϊόντων μετά την αποδόμησή τους, όσο και της χρήσης οργανικών διαλυτών, καταλυτών και αντιδρώντων κατά τη σύνθεση των συνθετικών αυτών μορίων, η οποία επιβάλλει τον εκτεταμένο καθαρισμό τους ώστε να απομακρυνθούν [Pratt & Hudson, 1990, Roller, 1995]. Επιπλέον, ορισμένα μόνο συνθετικά αντιοξειδωτικά είναι εγκεκριμένα από διεθνείς οργανισμούς, καθώς οι ενώσεις αυτές μπορεί να είναι τοξικές σε υψηλές δόσεις, ενώ οι καταναλωτές τα θεωρούν συχνά ως χημικά επικίνδυνα για την ανθρώπινη υγεία [Roller, 1995, Figueroa-Espinoza & Villeneuve, 2005].

Ένας άλλος σημαντικός περιορισμός προέρχεται από την παρατήρηση, ότι η αποτελεσματικότητα ενός αντιοξειδωτικού μορίου εξαρτάται όχι μόνο από τη δομή αλλά και από τις φυσικοχημικές του ιδιότητες [Decker, 1998]. Μία σημαντική φυσικοχημική ιδιότητα, η οποία καθορίζει την αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών ως θεραπευτικών συστατικών, μπορεί να σχετίζεται με την λιποφιλικότητά τους. Η ιδιότητα αυτή επιδρά στην ικανότητα των αντιοξειδωτικών να διασχίζουν τη λιπιδική μεμβράνη και να εισέρχονται στο κύτταρο [Kodelia *et al.*, 1994, Haraguchi, 2001, Mellou *et al.*, 2005]. Η διαλυτότητα του αντιοξειδωτικού στο σημείο εκείνο όπου λαμβάνει χώρα μία οξειδωτική διεργασία καθορίζει επίσης και την εφαρμογή και αποτελεσματικότητα των αντιοξειδωτικών σε διατροφικά αλλά και φαρμακευτικά ή καλλυντικά σκευάσματα, καθώς επηρεάζει τον εντοπισμό και προσανατολισμό των αντιοξειδωτικών σε πολυφασικά (παρουσία υδατικών και λιπιδικών φάσεων) συστήματα [Schuler, 1990, Figueroa-Espinoza & Villeneuve, 2005]. Ωστόσο, τα περισσότερα φυσικά αντιοξειδωτικά εμφανίζουν ένα σχετικά υδρόφιλο χαρακτήρα, με αποτέλεσμα να περιορίζονται σημαντικά οι εφαρμογές τους.

3.3.3 Τροποποιημένα παράγωγα φυσικών αντιοξειδωτικών

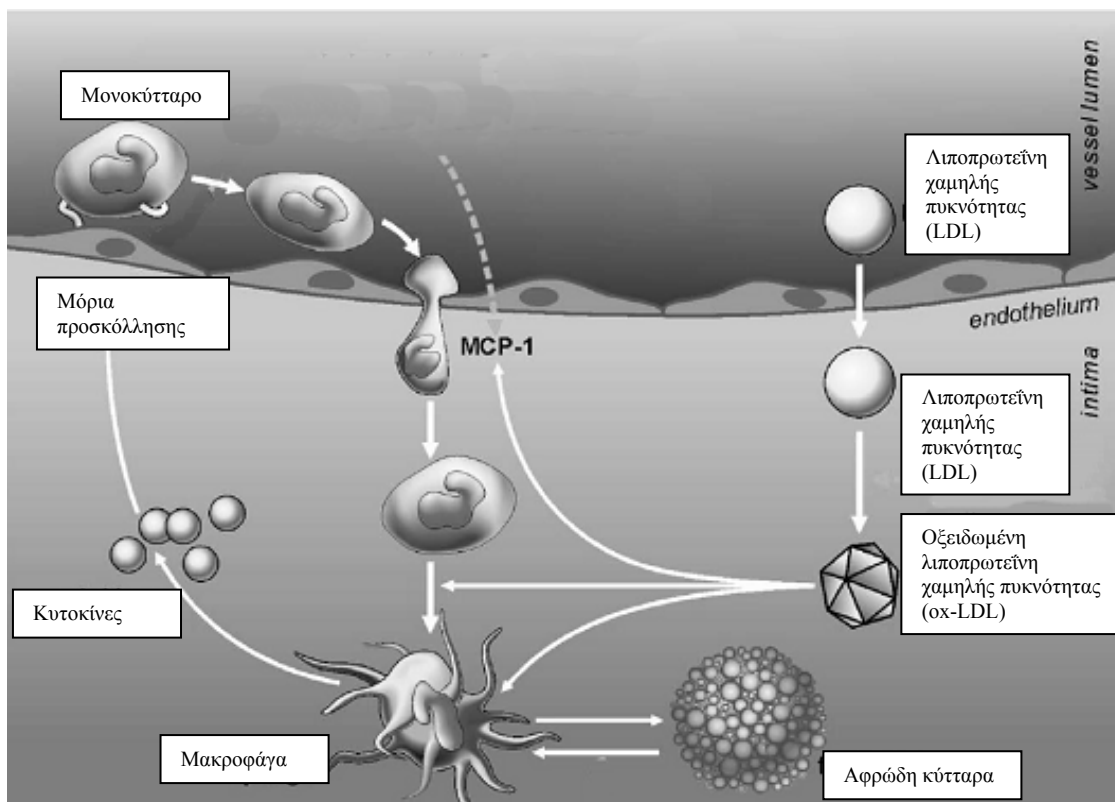
Η τροποποίηση των βιοδραστικών ενώσεων αποτελεί μία ιδανική λύση για τους προαναφερόμενους περιορισμούς, αλλά και την παραγωγική κρίση που αντιμετωπίζει η ερευνητική και, κατά συνέπεια, η βιομηχανική κοινότητα [Altreuter & Clark, 1999, Newman *et al.*, 2003]. Η άποψη αυτή ενισχύεται από ήδη υπάρχοντα αποτελέσματα, τα οποία προβάλλουν τα ποικίλα πλεονεκτήματα της σύνθεσης παραγώγων φυσικών αντιοξειδωτικών.

Ένα από τα πλεονεκτήματα αυτά, όπως αποδεικνύεται από διάφορες μελέτες, συνδέεται με τη δυνατότητα διερεύνησης της σχέσης δομής-βιολογικής δράσης των φυσικών αντιοξειδωτικών. Όπως είναι λογικό, η βιολογική δράση των φυσικών αντιοξειδωτικών

σχετίζεται με τη μοριακή τους δομή [Rice-Evans *et al.*, 1996, Heim *et al.*, 2002]. Εξαιτίας όμως της δομικής πολυπλοκότητας των ενώσεων η σχέση αυτή δεν είναι πλήρως κατανοητή και αποσαφηνισμένη. Η σύνθεση αναλόγων φυσικών αντιοξειδωτικών και η διερεύνηση της βιολογικής τους δράσης έχει συνεισφέρει στην αναγνώριση σημαντικών δομικών ομάδων των φαινολικών οξέων [Silva *et al.*, 2000, Chalas *et al.*, 2001, Stamatis *et al.*, 1999, 2001, Vafiadi *et al.*, 2008], των φλαβονοειδών [Heim *et al.*, 2002, Nicolosi *et al.*, 2002, Mellou *et al.*, 2005, Fragopoulou *et al.*, 2008] και βιταμινών [Oves *et al.*, 2004, Um *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2008].

Η μελέτη δε των βιολογικών ιδιοτήτων των συντιθέμενων παραγώγων καταδεικνύει σε πολλές περιπτώσεις και τη βελτιωμένη δράση αυτών συγκριτικά με τα μη-τροποποιημένα υποστρώματα. Ενδεικτικά, η εστεροποίηση γλυκοσιλωμένων φλαβονοειδών με πολυακόρεστα λιπαρά οξέα, προσδίδει στα συντιθέμενα παράγωγα νέες αντι-αγγειογενετικές και αντικαρκινικές ιδιότητες, τις οποίες δεν εμφάνιζαν τα πρόδρομα συστατικά [Mellou *et al.*, 2006]. Επιπλέον, βελτίωση των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων φλαβονοειδών, φαινολικών οξέων και βιταμινών παρατηρήθηκε μέσω της πραγματοποίησης αντιδράσεων ακυλίωσης, οξείδωσης, καρβοξυλίωσης κ.α., οι οποίες συνέβαλαν στην αύξηση της βιοδιαθεσιμότητας [Alluis *et al.*, 2000], της θερμικής ή χημικής σταθερότητας [Watabane *et al.*, 2000, Song *et al.*, 2004, Kim *et al.*, 2008], ή/και στην τροποποίηση του υδρόφιλου ή υδρόφοβου χαρακτήρα των πρόδρομων ενώσεων [Stamatis *et al.*, 1999, Silva *et al.*, 2000, Kikuzaki *et al.*, 2002, Kubo *et al.*, 2002, Ha *et al.*, 2004, Gažák *et al.*, 2004, Karboune *et al.*, 2005, Chigorimbo-Murefu *et al.*, 2008].

Η αύξηση του υδρόφοβου χαρακτήρα, συγκεκριμένα, μπορεί να επηρεάσει την αλληλεπίδραση των αντιοξειδωτικών με λιπιδικά συστήματα, και άρα αποτελεί κατά περιπτώσεις επιθυμητό χαρακτηριστικό. Λιπόφιλα παράγωγα φλαβονοειδών επέδειξαν βελτιωμένη αντιβακτηριακή δράση συγκριτικά με τα πρόδρομα μόρια, γεγονός το οποίο αποδόθηκε στην αυξημένη αλληλεπίδραση ή και διαπερατότητα των λιπόφιλων παραγώγων διαμέσου της κυτταρικής μεμβράνης [Mellou *et al.*, 2005]. Παρομοίως, ακυλιωμένα παράγωγα του ρετιναμιδίου εμφάνισαν υψηλότερη κυτταροτοξικότητα συγκριτικά με την μη-τροποποιημένη ένωση, με αποτέλεσμα να μπορούν να βρουν εφαρμογές ως αντικαρκινικές ενώσεις [Um *et al.*, 2004].



Εικόνα 3.13 Δράσεις της οξειδωμένης λιποπρωτεΐνης χαμηλής πυκνότητας (LDL) κατά τη διαδικασία της αθηρογένεσης [van Leuven *et al.*, 2008].

Μία ακόμα πιο χαρακτηριστική περίπτωση αποτελεί η διαδικασία οξείδωσης της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL). Η οξειδωμένη LDL (ox-LDL) πιστεύεται ότι διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της αθηρογένεσης (**Εικόνα 3.13**) [Mertens & Holvoet, 2001]. Μπορεί να προκαλέσει την έκφραση μορίων προσκόλλησης (E-σελεκτίνη, ICAM-1, VCAM-1) από ενδοθηλιακά κύτταρα, η οποία με τη σειρά της μπορεί να οδηγήσει στην προσκόλληση μονοκυττάρων στα ενδοθηλιακά κύτταρα, την είσοδο τους στο αγγειακό σύστημα, τη διαφοροποίησή τους σε μακροφάγα και τελικά στη μετατροπή τους σε αφρώδη κύτταρα (foam cells), τα οποία συμμετέχουν στα αρχικά στάδια σχηματισμού της αθηρωματικής πλάκας [Navab *et al.*, 1995, Steinberg, 1997]. Επιπλέον, η ox-LDL μπορεί να διεγείρει τα T-κύτταρα μέσω του κύριου συμπλέγματος ιστοσυμβατότητας (MHC) και του CD4⁺ υποδοχέα των T-κυττάρων. Τα διεγερμένα T-κύτταρα εκκρίνουν ιντερλευκίνη 1 (IL-1) η οποία ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των λείων μυϊκών κυττάρων, την ιντερλευκίνη 2 (IL-2) που ενεργοποιεί τα μονοκύτταρα και ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των T-κυττάρων και την ιντερφερόνη γ (IFN-γ) που προκαλεί την έκφραση του MHC στα ενδοθηλιακά και λεία μυϊκά κύτταρα. Επίσης τα αλδεϋδικά προϊόντα της οξείδωσης της LDL ασκούν μία άμεση

τοξική επίδραση στο ενδοθήλιο και τα αιμοπετάλια [Stemme & Hansson, 1994]. Δημιουργείται, συνεπώς, ένας φαύλος κύκλος οξείδωσης, τροποποίησης των λιποπρωτεϊνών και περαιτέρω φλεγμονής η οποία διατηρείται και ενισχύεται από την παρουσία της οξειδωμένης LDL.

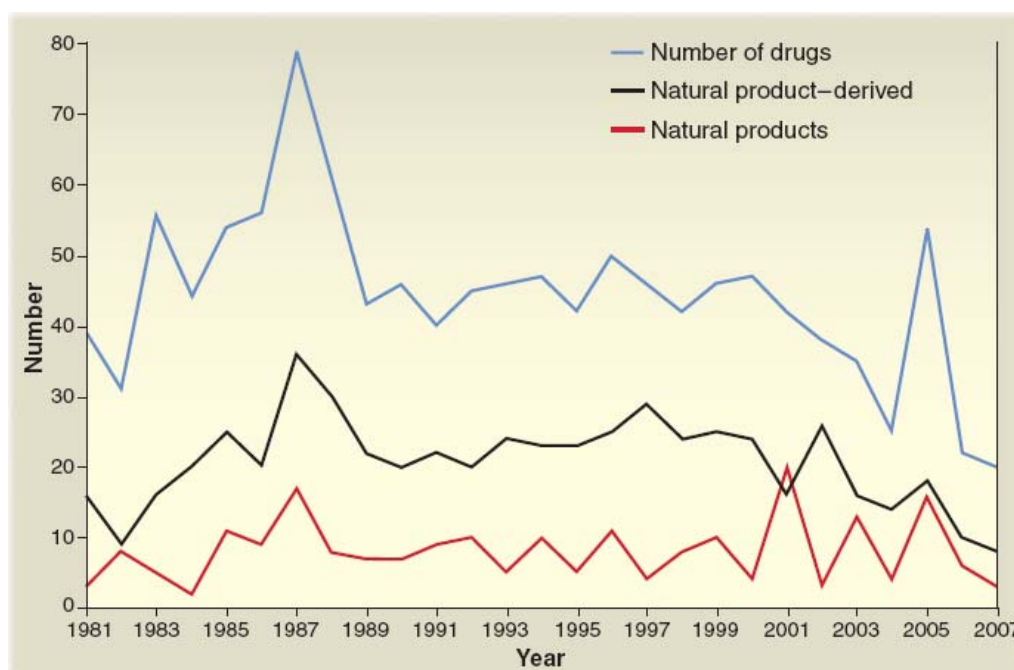
Ακυλιωμένα, λιπόφιλα παράγωγα φλαβονοειδών [Mellou *et al.*, 2005], βιταμινών [Kato *et al.*, 1988, Ohta *et al.*, 1997, Liu *et al.*, 1998] και φαινολικών οξέων [Chalas *et al.*, 2001, Chigorimbo-Murefu *et al.*, 2008, Vafiadi *et al.*, 2008] επέδειξαν αυξημένη προστατευτική ικανότητα ενάντια στην οξείδωση της LDL, πιθανά εξαιτίας της δυνατότητας ενσωμάτωσή τους στο λιπιδικό τμήμα της λιποπρωτεΐνης, επιτρέποντας έτσι την προσέγγιση στο σημείο όπου λαμβάνει χώρα η υπεροξείδωση λιπιδικών μορίων [Kodelia *et al.*, 1994, Mellou *et al.*, 2005].

Η τροποποίηση των φυσικών αντιοξειδωτικών αποτελεί, συνεπώς, ένα ιδιαίτερα ελκυστικό εργαλείο για την ενίσχυση της γνώσης αλλά και για την εμπορική αξιοποίηση των ενώσεων αυτών, μέσω της εισαγωγής επιθυμητών χαρακτηριστικών και της βελτίωσης των βιολογικών τους ιδιοτήτων. Μοναδική προϋπόθεση προς την κατεύθυνση αυτή αποτελεί η ανάπτυξη διεργασιών, οι οποίες να οδηγούν στη δημιουργία πραγματικής μοριακής ποικιλότητας (molecular diversity).

4. Τροποποίηση της δομής φυσικών αντιοξειδωτικών

4.1 Εισαγωγή

Ενώσεις υψηλής δομικής πολυπλοκότητας μπορούν να συντίθενται από τους ζωντανούς οργανισμούς μέσω αναρίθμητων ενζυμικών αντιδράσεων. Με το πέρασμα των ετών, τυχαίες μεταλλάξεις στο DNA μπορούν να οδηγήσουν στη σύνθεση ενζυμικών μορίων με τροποποιημένες λειτουργίες, τα οποία μπορούν να τροποποιούν διαφορετικές πρόδρομες ενώσεις ή τις ίδιες πρόδρομες ενώσεις με διαφορετικό τρόπο, οδηγώντας στην σύνθεση νέων ενώσεων. Μέσω αυτών των διαδικασιών έχει δημιουργηθεί η εκπληκτική ποικιλότητα φυσικών ενώσεων όπως τη γνωρίζουμε σήμερα, με αποτέλεσμα ανάμεσα στις ενώσεις αυτές να έχουν αναγνωριστεί πολλές με εφαρμογές στη σύνθεση φαρμακευτικών και άλλων προϊόντων (**Εικόνα 4.1**) [Newman *et al.*, 2003, Li & Vederas, 2009]. Ωστόσο, η εκμετάλλευση αυτών των διαδικασιών, οι οποίες λαμβάνουν χώρα στα πλαίσια του εξελικτικού χρόνου, φαίνεται να είναι σε μεγάλο ασύμφορη για τη βιομηχανική παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.



Εικόνα 4.1 Αριθμός εγκεκριμένων φαρμάκων κατά την περίοδο 1981-2007. Ένας μεγάλος αριθμός αυτών προέρχεται ή αποτελεί φυσικό προϊόν [Li & Vederas, 2009].

Η δημιουργία μοριακής ποικιλότητας μέσω της ανακάλυψης νέων βιοδραστικών ενώσεων ή της τροποποίησης ήδη γνωστών συστατικών είναι δυνατή σήμερα μέσω διαφόρων

μεθοδολογιών, όπως η κλασική χημική μεθοδολογία και οι βιοτεχνολογικές προσεγγίσεις (βιοτεχνολογία φυτών, βιοκατάλυση). Προκειμένου για τα φυσικά αντιοξειδωτικά, οι διαδικασίες αυτές μπορούν να συμβάλλουν, στην αύξηση της παραγωγής ώστε να καλύπτονται οι σημερινές ποσοτικές απαιτήσεις καθώς και στη σύνθεση ενώσεων με τροποποιημένες φυσικοχημικές ιδιότητες ή/και με νέες βιολογικές δράσεις, διευρύνοντας έτσι τις εφαρμογές τους.

4.2 Χημική μεθοδολογία

Χημικές διεργασίες για τη σύνθεση αντιοξειδωτικών ενώσεων έχουν αναπτυχθεί και χρησιμοποιηθεί από διάφορες βιομηχανίες φαρμάκων και τροφίμων. Συνθετικά αντιοξειδωτικά όπως τα BHA (βουτυλιωμένη υδρόξυανισόλη), BHT (βουτυλιωμένο υδρόξυτολουένιο), PG (προπυλεστέρας του γαλλικού οξέος) και η TBHQ (*t*-βουτυλ υδροκινόνη) έχουν βρει ποικίλες εφαρμογές. Ωστόσο, η χρήση τους εγείρει ανησυχίες και οι ενώσεις αυτές δεν είναι σύμφωνες με διεθνείς κανονισμούς σχετικά με την διαφύλαξη της ανθρώπινης υγείας και του περιβάλλοντος, όπως αναφέρεται και στην Παράγραφο 3.3.2. Το γεγονός αυτό έχει ενισχύσει το ενδιαφέρον για την χρήση φυσικών αντιοξειδωτικών και ταυτόχρονα την ανάγκη ανάπτυξης διεργασιών για την τροποποίηση της δομής και ιδιοτήτων των ενώσεων αυτών.

Η χημική σύνθεση, ωστόσο, παραγώγων των φυσικών αντιοξειδωτικών αποτελεί μία επίπονη διαδικασία. Η χρήση διαβρωτικών οξέων, η τροποποίηση των ενώσεων σε αλκαλικά περιβάλλοντα και υπό υψηλές θερμοκρασίες, η ανάγκη προστασίας-αποπροστασίας λειτουργικών ομάδων αποτελούν σημαντικούς περιορισμούς. Οι διαδικασίες αυτές αφενός δεν τηρούν τις προδιαγραφές για εφαρμογές στη παραγωγή διατροφικών και άλλων σκευασμάτων και αφετέρου οδηγούν σε υψηλό κόστος διεργασιών [Nihei *et al.*, 2004, Figueroa-Espinoza & Villeneuve, 2005, Torres *et al.*, 2008]. Επιπρόσθετα οι κλασικές χημικές συνθετικές πορείες εμφανίζουν γενικά χαμηλή εκλεκτικότητα, οδηγώντας στην πραγματοποίηση παράπλευρων αντιδράσεων, περιλαμβάνουν διεργασίες πολλαπλών σταδίων, απαιτώντας επιπλέον βήματα καθαρισμού για την απομάκρυνση των παραπροϊόντων και των καταλυτών και οδηγούν έτσι σε ένα μεγάλο όγκο παραγόμενων αποβλήτων [Sheldon, 1994, Hills, 2003]. Για την αντιμετώπιση αυτού του περιορισμού έχουν χρησιμοποιηθεί νέες προσεγγίσεις βασισμένες στις αρχές της επανομαζόμενης «πράσινης χημείας» (Πλαίσιο 2.1), οι οποίες περιλαμβάνουν τον σχεδιασμό, ανάπτυξη και εφαρμογή χημικών διεργασιών και προϊόντων για τη μείωση ή εξάλειψη της χρήσης και σύνθεσης

ενώσεων επικίνδυνων για την ανθρώπινη υγεία και το περιβάλλον [Lenardao *et al.*, 2003]. Παρά όμως την ενσωμάτωση αυτών των αρχών στους περισσότερους τομείς της χημικής σύνθεσης, οι βιομηχανίες δεν μπορούν να ανατρέψουν την αρνητική εικόνα τους στην αντίληψη του κόσμου και συνεχίζουν να δέχονται αυξημένες πιέσεις για περαιτέρω βελτίωση των διεργασιών τους [Meyer *et al.*, 2009].

Η βιοτεχνολογία και ιδιαίτερα ο κλάδος της βιοκατάλυσης, αποτελεί σήμερα μία εναλλακτική, απλή, και περιβαλλοντικά φιλική προσέγγιση. Η προσέγγιση αυτή επιτρέπει την σύνθεση νέων ενώσεων τέτοιας δομικής πολυπλοκότητας, η οποία δεν μπορεί να επιτευχθεί μέσω της κλασικής χημικής μεθοδολογίας, και μάλιστα υπό ήπιες συνθήκες και με υψηλή εκλεκτικότητα, περιορίζοντας σημαντικά το οικονομικό και περιβαλλοντικό κόστος αυτών των διεργασιών [Bommarius & Riebel, 2004c, Short, 2005, Illanes, 2008b, Woodley, 2008, Zhou *et al.*, 2008, Meyer *et al.*, 2009].

4.3 Βιοτεχνολογικές διεργασίες για τη σύνθεση και τροποποίηση φυσικών αντιοξειδωτικών

Ο όρος «**βιοτεχνολογία**» εισήχθη για πρώτη φορά το 1919 από τον Karl Ereky και αναφερόταν στην αξιοποίηση μεθόδων που επέτρεπαν την σύνθεση προϊόντων από διάφορες πρώτες ύλες με την χρήση ζώντων οργανισμών. Ωστόσο, ο σύγχρονος ορισμός της έχει επεκταθεί ώστε να συμπεριλάβει την εφαρμογή της επιστήμης και της τεχνολογίας στους ζωντανούς οργανισμούς, σε συστήματα αυτών και προϊόντα, με σκοπό την παραγωγή γνώσης, αγαθών και υπηρεσιών [πηγή: www.oecd.org, Organization for Economic Co-operation and Development].

Η εφαρμογή της βιοτεχνολογίας σε ποικίλους παραγωγικούς τομείς υποστηρίζεται σήμερα σημαντικά, καθώς μπορεί να ανταποκριθεί στις σύγχρονες οικονομικές απαιτήσεις, μπορεί υπό προϋποθέσεις να είναι σύμφωνη με διεθνείς κανονισμούς για την διαφύλαξη της ανθρώπινης υγείας και του περιβάλλοντος και έχει επιδείξει σημαντικά επιστημονικά και τεχνολογικά επιτεύγματα. Η αξιοποίηση των επιμέρους επιτευγμάτων της βιοτεχνολογίας από την βιομηχανία, ενισχύεται συνεχώς μέσω της ανακάλυψης και παραγωγής νέων βιοκαταλυτών και διεργασιών, νέων τεχνικών και νέων ανασυνδυασμένων ή ακραιόφιλων οργανισμών.

Προκειμένου για τα φυτικά αντιοξειδωτικά, διάφορες βιοτεχνολογικές εφαρμογές μπορούν και έχουν εφαρμοστεί για την αύξηση των παραγόμενων ποσοτήτων αλλά και την τροποποίηση της δομής τους προς την σύνθεση νέων παραγώγων, με εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών [Schoemaker *et al.*, 2003, Pollard &

Woodley, 2006, Meyer *et al.*, 2009]. Αυτές περιλαμβάνουν διάφορες προσεγγίσεις της βιοτεχνολογίας φυτών αλλά κυρίως τη χρήση ενζύμων, ενζυμικών συστημάτων ή και ολόκληρων κυττάρων για το σκοπό αυτό.

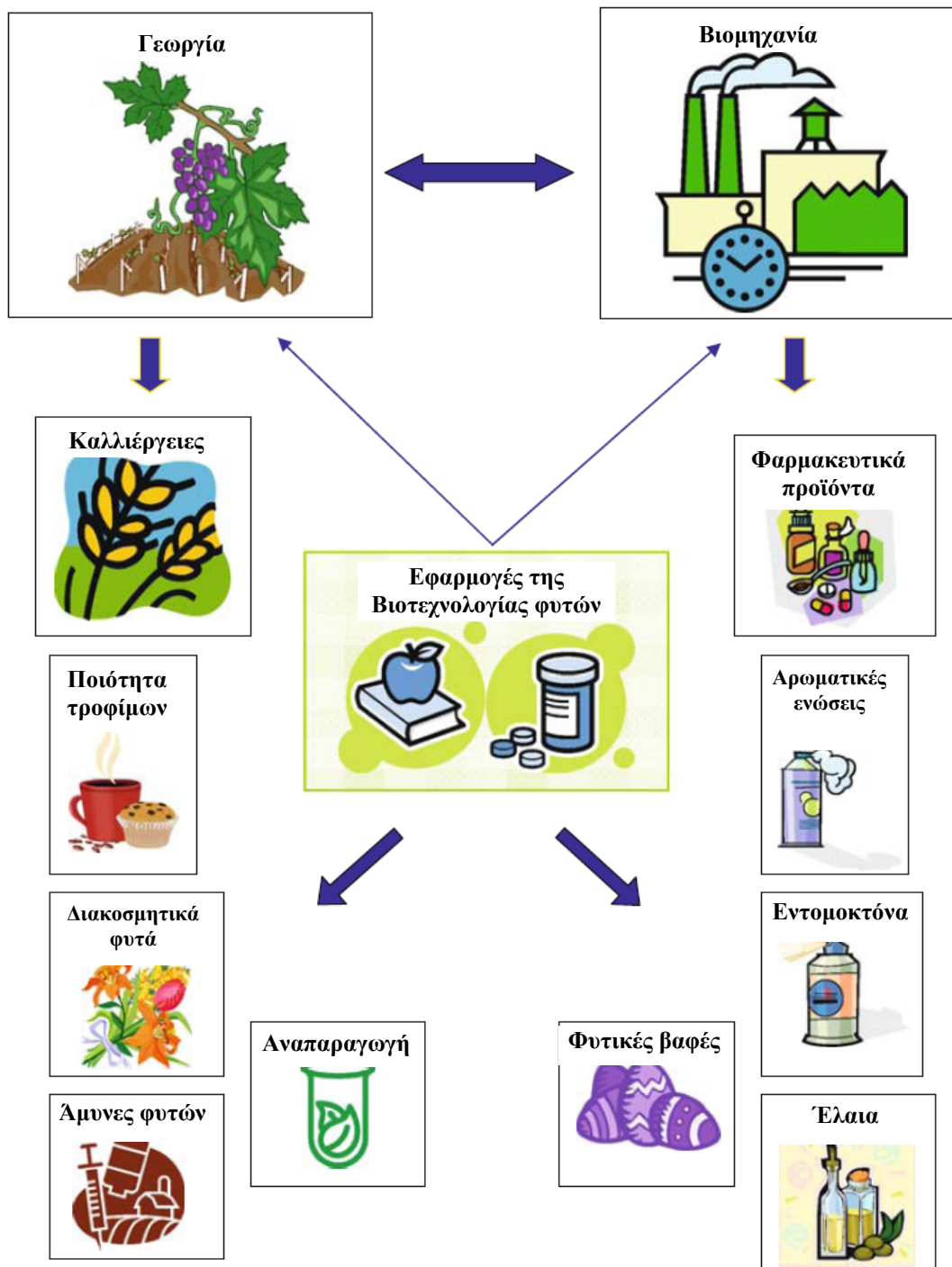
4.3.1 Βιοτεχνολογία φυτών

Η **βιοτεχνολογία φυτών** αφορά στην κατανόηση του μεταβολισμού των φυτών και του τρόπου με τον οποίο ελέγχεται η βιοσύνθεση φυτικών μεταβολιτών από συγκεκριμένα ένζυμα, μεταγραφικούς παράγοντες, τη διαθεσιμότητα υποστρωμάτων και τελικών προϊόντων. Σκοπός της εφαρμογής αυτής της γνώσης είναι η οικονομικά βιώσιμη παραγωγή ειδικά σχεδιασμένων φυτών, τα οποία αναπτύσσονται σε ένα ασφαλές περιβάλλον και μπορούν να εφαρμοστούν στη γεωργία, την ιατρική και τη βιομηχανία.

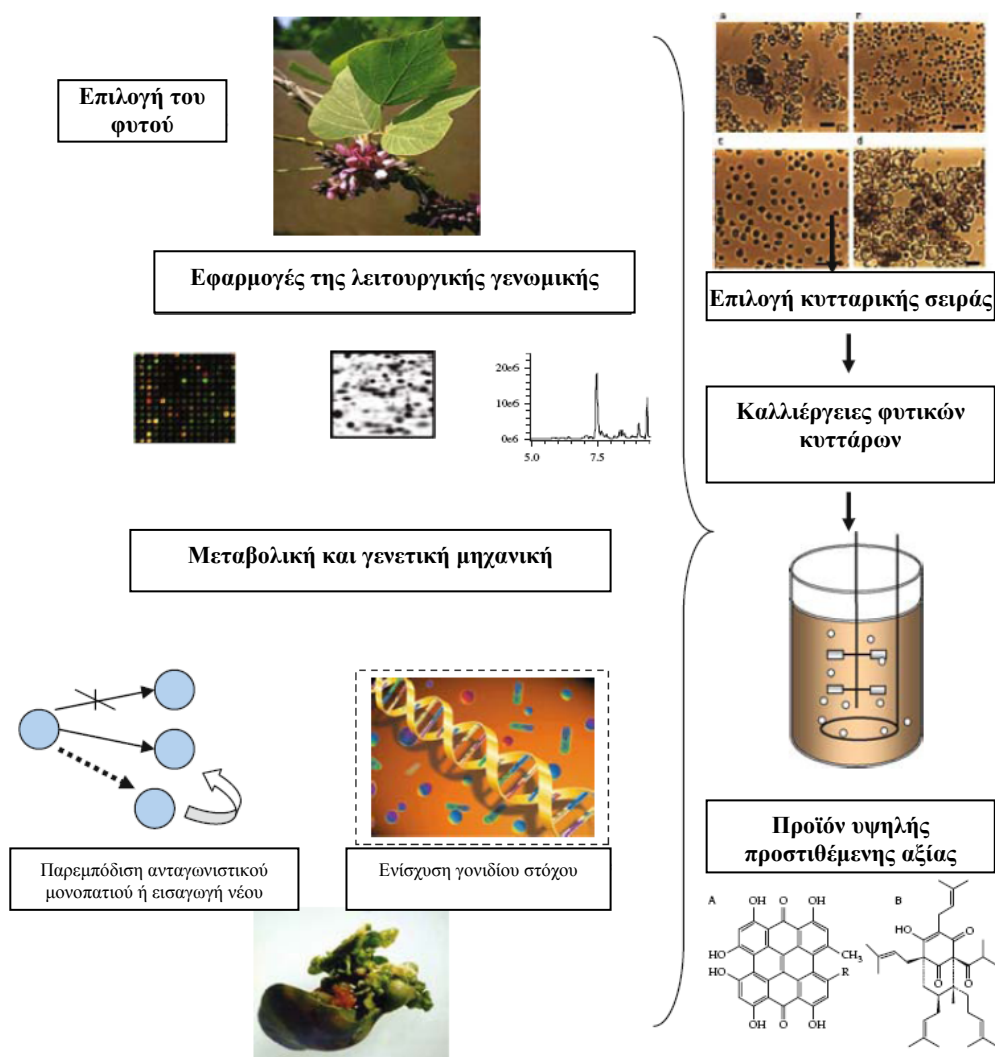
Καθώς τα φυτά αποτελούν πηγές πολλών δευτερογενών μεταβολιτών με ενδιαφέρουσες εφαρμογές σε ποικίλα σκευάσματα (μυκητοκτόνα, εντομοκτόνα, φυσικά διατροφικά πρόσθετα, καλλυντικά, φάρμακα) η εκμετάλλευση της συνθετικής μηχανής των φυτικών κυττάρων αποτελεί μία ενδιαφέρουσα εναλλακτική της χημικής σύνθεσης για την παραγωγή φυτοχημικών (**Εικόνα 4.2**) [Kirakosyan *et al.*, 2009].

Έτσι λοιπόν, ενώ η «παραδοσιακή» βιοτεχνολογία χρησιμοποιούσε διάφορους κυτταρικούς τύπους για την παραγωγή προϊόντων, με την ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA και προσεγγίσεων γενωμικής (genomics), πρωτεωμικής (proteomics) και μεταβολομικής (metabolomics) επανεξετάζεται η χρήση καλλιεργειών φυτικών κυττάρων για την εμπορική σύνθεση μεταβολιτών υψηλής προστιθέμενης αξίας (**Εικόνα 4.3**) [Cseke *et al.*, 2006].

Ο σχεδιασμός τέτοιων διεργασιών σε μεγάλη κλίμακα μπορεί να είναι οικονομικά βιώσιμος, ωστόσο η υψηλή τιμή του τελικού προϊόντος αποτελεί τον βασικό τους περιορισμό και οφείλεται στην αργή ανάπτυξη των καλλιεργειών φυτικών κυττάρων [Verpoorte *et al.*, 1994]. Αν και η ετερόλογη έκφραση συγκεκριμένων βιοσυνθετικών μονοπατιών σε μικροοργανισμούς, όπως οι ζύμες και τα βακτήρια (συνθετική βιολογία), μπορεί να αποτελέσει μία εναλλακτική προσέγγιση, τα μέχρι τώρα παραδείγματα εφαρμογής της [Keasling, 2008] είναι ελάχιστα και οδηγούν επίσης σε πολύ υψηλό κόστος του τελικού προϊόντος.



Εικόνα 4.2 Σχηματική απεικόνιση των εφαρμογών της Βιοτεχνολογίας φυτών.



Εικόνα 4.3 Βασικά στάδια της βιοτεχνολογίας φυτών για την παραγωγή μεταβολιτών υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Επιπρόσθετα των καλλιεργειών φυτικών κυττάρων, η βιοτεχνολογία φυτών αξιοποιεί την ανάπτυξη τεχνικών γενετικής και μεταβολικής μηχανικής για την επίτευξη της σύνθεσης των μεγαλύτερων δυνατών ποσοτήτων δευτερογενών μεταβολιτών.

Η εφαρμογή των αρχών της μεταβολικής μηχανικής εστιάζει στην ανακάλυψη μεταβολικών μονοπατιών, με σκοπό την εκμετάλλευση αυτών των μονοπατιών για την τροποποίηση των τελικών προϊόντων. Βασίζεται ουσιαστικά στην ανακατεύθυνση των ενζυμικών αντιδράσεων για την αποικοδόμηση περιβαλλοντικών τοξινών, την δημιουργία ανθεκτικών φυτών, τη βελτίωση της παραγωγής προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας και τη σύνθεση νέων ενώσεων [Kirakosyan *et al.*, 2009, Levin, 2009]. Τα βιοσυνθετικά μονοπάτια των αλκαλοειδών, φλαβονοειδών και τερπενοειδών είναι σήμερα τα καλύτερα

μελετημένα από ενζυμικής και γονιδιακής σκοπιάς [Mahato *et al.*, 1992, Koes *et al.*, 1994, Weisshaar & Jenkins, 1998, Winkel-Shirley, 2001]. Ωστόσο, καθώς ο μεταβολισμός των φυτικών κυττάρων περιλαμβάνει χιλιάδες αλληλεπιδρώντα μονοπάτια και διεργασίες, οι οποίες ρυθμίζονται τόσο από περιβαλλοντικούς όσο και από γενετικούς παράγοντες, η μεταβολική μηχανική ακόμα και γνωστών συνθετικών μονοπατιών των φυτών δεν εξασφαλίζει πάντα τα επιθυμητά αποτελέσματα.

Μία τρίτη εναλλακτική προσέγγιση αποτελεί η χρήση γενετικά τροποποιημένων οργανισμών (Genetically Modified Organisms, GMOs). Στόχο της γενετικής μηχανικής, μέσω της δημιουργίας γενετικά τροποποιημένων φυτών (των οποίων το γονιδίωμα έχει τροποποιηθεί με την εισαγωγή ξένου DNA προερχόμενο από βακτήρια, μύκητες, ιούς ή ζωικούς οργανισμούς), αποτελεί η παραγωγή αυξημένων ποσοτήτων ή/και νέων δευτερογενών μεταβολιτών. Οι στρατηγικές που χρησιμοποιούνται για την επίτευξη αυτού του στόχου είναι η διαγονιδιακή ρύθμιση δομικών γονιδίων που εμπλέκονται στην βιοσύνθεση δευτερογενών μεταβολιτών, η διαγονιδιακή ρύθμιση γονιδίων που κωδικοποιούν μεταγραφικούς παράγοντες και άλλων ρυθμιστικών γονιδίων ή/και γενετικών τόπων ρύθμισης ποσοτικών χαρακτηριστικών (Quantitative Trait Loci, QTL), τα οποία επηρεάζουν σημαντικά τα επίπεδα των παραγόμενων μεταβολιτών [Davies, 2007, Levin, 2009]. Αν και η γενετική τροποποίηση των φυτών έχει συμβάλει σημαντικά στην κατανόηση των μηχανισμών που επηρεάζουν την αύξηση των επιπέδων δευτερογενών μεταβολιτών, όπως τα φλαβονοειδή και οι βιταμίνες [Galili *et al.*, 2002, Levin *et al.*, 2006, Davies, 2007], δεν έχει εφαρμοστεί μέχρι σήμερα για την τροποποίηση της δομής αυτών. Ο εμπλουτισμός δε του φυτού δεν εξασφαλίζει απαραίτητα και την θετική επίδραση του στη διατήρηση της υγείας και την αντιμετώπιση χρόνιων παθήσεων. Επιπλέον, τα σημαντικά μειονεκτήματα (**Πίνακας 4.1**) της παραγωγής γενετικά τροποποιημένων φυτών οδηγούν στη μειωμένη αποδοχή τους από τις σύγχρονες κοινωνίες και περιορίζουν συνεπώς σημαντικά την εμπορική τους αξιοποίηση [Ellstrand, 2000, Gadgil, 2000, Keiko & Kazuki, 2006, Kaufman *et al.*, 2009].

Πίνακας 4.1 Ερωτήματα σχετικά με τα οφέλη και κινδύνους των γενετικά τροποποιημένων φυτών

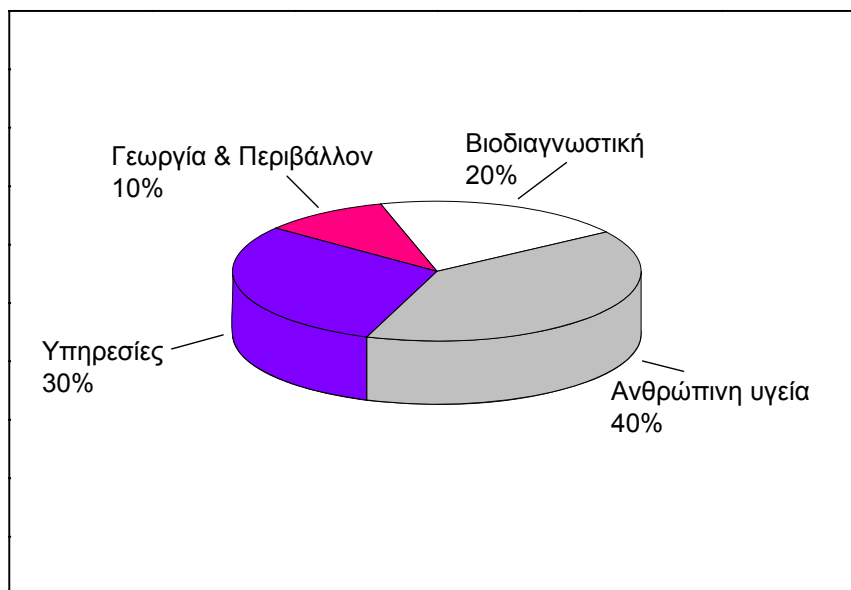
Επηρεαζόμενος τομέας	Ερωτήματα σχετικά με τα οφέλη	Ερωτήματα σχετικά με τους κινδύνους
Γεωργία και βιομηχανία	Υπάρχουν εναλλακτικές για την ενίσχυση του γεωργικού, οικονομικού και οικολογικού οφέλους ? Υπάρχει κάποιο άμεσο πλεονέκτημα για την προστασία του ανθρώπου και των καλλιεργειών ?	Μπορούν με τον κατάλληλο σχεδιασμό να περιοριστούν οι κίνδυνοι (π.χ. η διαφυγή γονιδίων στο οικοσύστημα) ? Η γενετική τροποποίηση του φυτού ως προς ένα χαρακτηριστικό έχει μελετηθεί ως προς τις αρνητικές συνέπειες ?
Οικολογία	Μπορεί η καλλιέργεια γενετικά τροποποιημένων φυτών να επιλύσει υπάρχοντα περιβαλλοντικά προβλήματα ?	Το τροποποιημένο χαρακτηριστικό μπορεί να ενισχύσει την προσαρμογή του φυτού έξω από το ελεγχόμενο περιβάλλον ? Μπορεί το νέο χαρακτηριστικό να μεταδοθεί σε άλλα είδη οδηγώντας στο σχηματισμό υβριδίων ?
Κοινωνία	Τα πλεονεκτήματα των γενετικά τροποποιημένων φυτών θα αφορούν όλες τις κοινωνίες ? Υπάρχουν συγκεκριμένα οφέλη για τον άνθρωπο (π.χ. διατροφή) ή το οικοσύστημα (π.χ. αποκατάσταση εδαφών) ?	Υπάρχουν μηχανισμοί ικανοί να διερευνήσουν τις επιδράσεις της εκτεταμένης χρήσης γενετικά τροποποιημένων φυτών ? Υπάρχουν οργανισμοί οι οποίοι θα μπορούσαν να αντιμετωπίσουν τις τυχόν επιβλαβείς επιδράσεις των γενετικά τροποποιημένων φυτών ?

4.3.2 Βιοκαταλυτικές διεργασίες- Βιομηχανική Βιοτεχνολογία

Η αναγνώριση των πράσινων και άλλων πλεονεκτημάτων της βιοκατάλυσης (**Πλαίσιο 4.1**) έχει οδηγήσει στην ενσωμάτωση ενός μεγάλου αριθμού βιοκαταλυτικών διεργασιών σε ποικίλες βιομηχανικές διεργασίες (**Εικόνα 4.4**) [Bornscheuer & Kazlauskas, 1999, Zaks, 2001, Bommarius & Riebel, 2004c, Pollard & Woodley, 2006].

Πλαίσιο 4.1 «Πράσινα» πλεονεκτήματα της βιοκατάλυσης.

Μπορεί να λαμβάνει χώρα σε υδατικά διαλύματα
Χαρακτηρίζεται από υψηλή τόπο- και ενάντιο-εκλεκτικότητα (μείωση του παράγοντα E)
Πραγματοποιείται υπό ήπιες συνθήκες (μείωση του παράγοντα E)
Δεν απαιτεί την χρήση επικίνδυνων ενώσεων
Αξιοποιεί ανανεώσιμες πρώτες ύλες
Οι καταλυτικές ιδιότητες των βιοκαταλυτών μπορούν να προσαρμόζονται ανάλογα με την διεργασία
Εμφανίζουν μειωμένες ενεργειακές απαιτήσεις



Εικόνα 4.4 Κατανομή βιοτεχνολογικών διεργασιών ανά τομέα στην Ευρώπη (πηγή : EuropaBio, 2006).

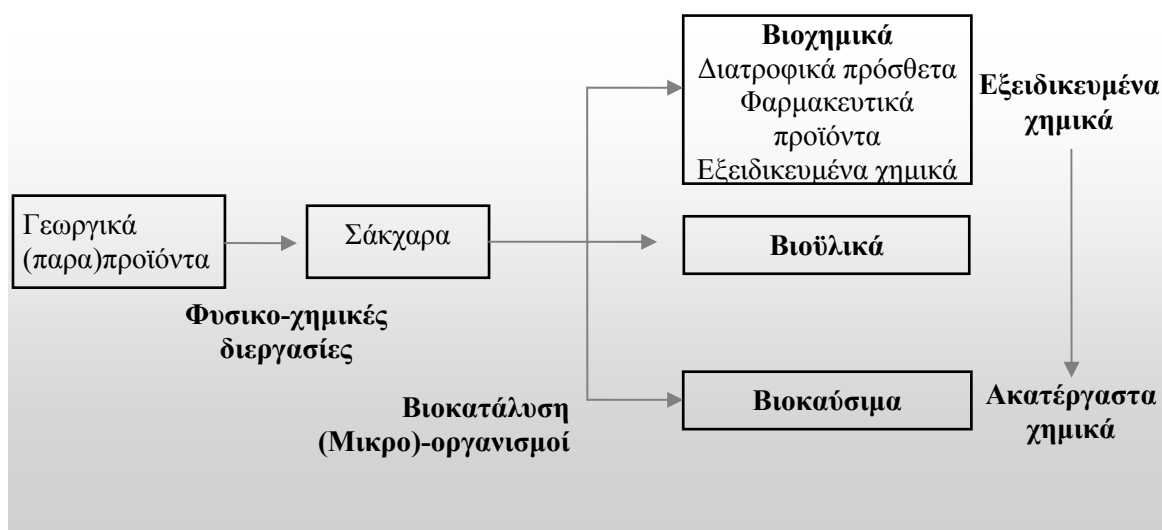
Στις περιπτώσεις αυτές θα πρέπει, ωστόσο, να ικανοποιηθούν συγκεκριμένες απαιτήσεις, οι οποίες συνδέονται πρωτίστως με την οικονομική βιωσιμότητα των διεργασιών. Αυτές αφορούν στην απόδοση και παραγωγικότητα των βιοδιεργασιών, οι οποίες θα πρέπει να είναι συγκρίσιμες με εκείνες των χημικών διεργασιών, καθώς και στο κόστος των χρησιμοποιούμενων βιοκαταλυτών [Pollard & Woodley, 2006]. Το κόστος των βιοκαταλυτών μπορεί να αντισταθμιστεί μέσω της επαναχρησιμοποίησής του, και ως προς αυτό οι τεχνικές ακινητοποίησης μπορούν να συμβάλλουν σημαντικά, όπως έχει αναφερθεί στην Παράγραφο 1.3.2. Επιπρόσθετα, στις συνθετικές βιομηχανικές διεργασίες τα βιομόρια αυτά θα χρησιμοποιούνται σε μη υδατικά συστήματα. Τη λύση καλούνται να δώσουν τομείς ανάπτυξης διεργασιών (process development) και πρωτεϊνικής μηχανικής, με στόχο την αύξηση της απόδοσης και παραγωγικότητας, με ταυτόχρονη διατήρηση των καταλυτικών ιδιοτήτων των ενζύμων.

Ένας άλλος περιορισμός σχετίζεται με τον σχετικά μικρό αριθμό των εμπορικά διαθέσιμων ενζύμων. Ωστόσο, η εφαρμογή τεχνικών κατευθυνόμενης εξέλιξης [Arnold & Volkov, 1999], μεταβολικής μηχανικής [Chartrain *et al.*, 2000], και η ανάπτυξη μεθοδολογιών ανίχνευσης υψηλής ρυθμο-απόδοσης (high-throughput screening) [Demirjian *et al.*, 1999], σε συνδυασμό με την ανάπτυξη της τεχνολογίας ζυμώνσεων και κλωνοποίησης

του DNA μπορούν να συνεισφέρουν σημαντικά στην αναγνώριση και παραγωγή σταθερών βιοκαταλυτών με αυξημένη δραστηριότητα και εκλεκτικότητα [Zaks, 2001, Tao & Xu, 2009].

Ως απόρροια των νέων αυτών επιστημονικών επιτευγμάτων, η βιοκατάλυση αποτελεί σήμερα μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση για την εκλεκτική σύνθεση νέων, πολύπλοκων βιοδραστικών ενώσεων βιομηχανικού ενδιαφέροντος [Schoemaker *et al.*, 2003, Zhou *et al.*, 2008] στα πλαίσια της λεγόμενης «βιομηχανικής βιοτεχνολογίας».

Η **βιομηχανική βιοτεχνολογία**, γνωστή και ως **λευκή βιοτεχνολογία**, αποτελεί τη σύγχρονη προσέγγιση για την επωφελή σύνθεση βιοχημικών, βιοϋλικών και βιοκαυσίμων από ανανεώσιμες πηγές, μέσω της χρήσης κυττάρων ή/και απομονωμένων ενζύμων. Η εφαρμογή της οδηγεί σε περισσότερο φιλικές προς το περιβάλλον διεργασίες, με μικρότερη παραγωγή αποβλήτων και μικρότερη κατανάλωση ενέργειας (**Εικόνα 4.5**). Οι ήδη υπάρχουσες διεργασίες αποδεικνύουν τη στενή συσχέτιση των εφαρμογών της βιομηχανικής βιοτεχνολογίας με κοινωνικά, περιβαλλοντικά και οικονομικά οφέλη [πηγή : www.europabio.org].



Εικόνα 4.5 Σχηματική απόδοση μίας τυπικής διεργασίας της βιομηχανικής βιοτεχνολογίας (πηγή : www.europabio.org).

4.4 Βιοκαταλυτική τροποποίηση φυσικών αντιοξειδωτικών

Εξαιτίας των σημαντικών βιολογικών ιδιοτήτων των παραγώγων φυσικών αντιοξειδωτικών [§3.3.3], μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει συγκεντρώσει η βιοκαταλυτική τροποποίηση της δομής τους. Η τροποποίηση αυτή αποσκοπεί όχι μόνο στην διαλυτοποίησή τους σε πολυφασικά συστήματα (όπως αυτά σχηματίζονται σε διατροφικά και φαρμακευτικά

σκευάσματα), αλλά και στην σύνθεση αναλόγων τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη των σχέσεων δομής-βιολογικής δράσης.

Ο τύπος της βιοκαταλυτικής διεργασίας που θα αναπτυχθεί εξαρτάται από τις επιθυμητές ιδιότητες των συντιθέμενων παραγώγων. Έτσι, προκειμένου να αυξηθεί ο υδρόφιλος χαρακτήρας των φυσικών αντιοξειδωτικών μπορούν να πραγματοποιηθούν αντιδράσεις γλυκοσυλίσωσης με την χρήση γλυκοσιδασών και ειδικών τρανσφερασών σακχάρων [Riva & Roda, 2000, Riva, 2001, Danieli *et al.*, 2001], ενώ για την αύξηση του λιπόφιλου χαρακτήρα αυτών των ενώσεων έχουν χρησιμοποιηθεί υδρολυτικά ένζυμα, όπως οι πρωτεάσες και κυρίως οι λιπάσες.

Η αύξηση του λιπόφιλου χαρακτήρα των φυσικών αντιοξειδωτικών είναι σημαντική καθώς επιδρά στην ικανότητά τους να διασχίζουν τη λιπιδική μεμβράνη και να εισέρχονται στο κύτταρο [Haraguchi, 2001] ή στον εντοπισμό και προσανατολισμό τους στα συστήματα όπου λαμβάνουν χώρα οξειδωτικές διεργασίες [Schuler, 1990, Figueroa-Espinoza & Villeneuve, 2005]. Η αύξηση της λιποφιλικότητας μπορεί να επιτευχθεί μέσω ενζυμικών αντιδράσεων ακυλίωσης. Οι αντιδράσεις ακυλίωσης, οι οποίες καταλύονται από λιπάσες, είναι θερμοδυναμικά ανέφικτες σε υδατικά μέσα και άρα απαραίτητη προϋπόθεση για την επίτευξη αυτού του τύπου τροποποίησης είναι η εφαρμογή μη συμβατικών μέσων. Για την πραγματοποίηση των αντιδράσεων αυτών θα πρέπει επιπλέον να αντιμετωπιστεί ο περιορισμός που επιβάλλει ο συνδυασμός ενός υδρόφιλου και ενός υδρόφοβου υποστρώματος. Υπό αυτή την θεώρηση, θα πρέπει να δοθεί έμφαση στην επιλογή του κατάλληλου μέσου αντίδρασης, το οποίο θα επιτρέψει αρχικά την διαλυτοποίηση των υποστρωμάτων [Hari Krishna & Karanth, 2002]. Άλλοι παράγοντες που πρέπει να ληφθούν υπόψη για την επιλογή του κατάλληλου μέσου αφορούν στη δυνατότητα (i) διατήρησης της ενζυμικής δραστηριότητας και σταθερότητας, (ii) εύκολης ανάκτησης των αντιδρώντων και (iii) στην τοξικότητά τους η οποία είναι σημαντική ανάλογα με την επιθυμητή εφαρμογή (φάρμακα, τρόφιμα, καλλυντικά) του προϊόντος [Dordick, 1992, Vermue & Tramper, 1995, Hari Krishna & Karanth, 2002].

Προκειμένου να αναγνωριστούν τα κατάλληλα συστήματα αντίδρασης για την ενζυμική ακυλίωση φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως τα φλαβονοειδή, τα φαινολικά οξέα και οι βιταμίνες, έχει μελετηθεί η δυνατότητα χρησιμοποίησης διάφορων μέσων αντίδρασης. Η πλειοψηφία αυτών αφορά σε οργανικούς διαλύτες, αλλά πρόσφατα και τα ιοντικά υγρά φαίνεται να έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον ως μέσα για την τροποποίηση της δομής φυτικών αντιοξειδωτικών.

4.4.1 Βιοκαταλυτική τροποποίηση φλαβονοειδών

Πολυ-υδροξυλιωμένα παράγωγα, όπως τα φλαβονοειδή, αποτελούν ενδιαφέροντα μόρια για την σύνθεση σταθερών αναλόγων, όπως αυτά απαντώνται σε φυτικούς οργανισμούς, αλλά και νέων βιοδραστικών ενώσεων. Αποτελούν δε μία ιδανική κατηγορία ενώσεων, εξαιτίας της δομικής τους πολυπλοκότητας, για τη μελέτη της καταλυτικής συμπεριφοράς των ενζύμων και συγκεκριμένα της εκλεκτικότητας τους. Εξαιτίας των παραπάνω, η δυνατότητα ενζυμικής σύνθεσης λιπόφιλων παραγώγων των φλαβονοειδών έχει προσελκύσει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον (**Πίνακας 4.2**).

Στις πρώιμες μελέτες χρησιμοποιήθηκαν διάφορα ένζυμα όπως πρωτεάσες [Danieli *et al.*, 1990], διάφορες μικροβιακές λιπάσες [Danieli *et al.*, 1997, Nakajima *et al.*, 1999], ενζυμικά διαλύματα από καλλιέργειες κυττάρων [Nakajima, 2000], αλλά και χημαιο-ενζυμικές προσεγγίσεις [Danieli *et al.*, 1993, Riva *et al.*, 1996, Patti *et al.*, 2000, Gao *et al.*, 2001], προκειμένου να διερευνηθεί η δυνατότητα βιοκαταλυτικής τροποποίησης διαφόρων φλαβονοειδών (ρουτίνη, εσπεριδίνη, ναριγκίνη, κερσετίνη). Στις περισσότερες περιπτώσεις επιτεύχθηκαν ικανοποιητικές αποδόσεις με την χρήση ενεργοποιημένων ακυλο-δοτών (όπως οι βινυλ-εστέρες λιπαρών αλλά και φαινολικών οξέων). Ωστόσο, οι οργανικοί διαλύτες (όπως η πυριδίνη) ή τα μίγματα διαλυτών που επιλέχθηκαν, θεωρούνται αρκετά τοξικά και μάλλον ακατάλληλα για την σύνθεση προϊόντων με εφαρμογές σε διατροφικά σκευάσματα.

Παρά το μειονέκτημα αυτό, τα αποτελέσματα των αρχικών μελετών υπήρξαν σημαντικά καθώς κατέδειξαν τη δυνατότητα αξιοποίησης της βιοκατάλυσης για την τροποποίηση φυσικών αντιοξειδωτικών. Οι μελέτες που ακολούθησαν επικεντρώθηκαν στη μελέτη των παραμέτρων εκείνων που επηρεάζουν την πορεία της ενζυμικής αντίδρασης ακυλίωσης των φλαβονοειδών.

Προς αντικατάσταση τοξικών μέσων, όπως η πυριδίνη, χρησιμοποιήθηκαν λιγότερο τοξικοί οργανικοί διαλύτες (τριτοταγής βουτανόλη, ακετόνη, μεθανόλη κ.α.) ή ακόμα και συστήματα ελεύθερα διαλυτών [Kontogianni *et al.*, 2001, 2003]. Η χρήση αυτών των οργανικών διαλυτών οδήγησε σε μείωση των αποδόσεων των ενζυμικών αντιδράσεων, κυρίως εξαιτίας της χαμηλότερης διαλυτότητας των φλαβονοειδών. Η χρήση ακετυλιωμένων παραγώγων φλαβονοειδών σε αντιδράσεις αλκοόλυσης, ήταν μία αποτελεσματική προσέγγιση που εφαρμόστηκε προκειμένου να αυξηθεί η διαλυτότητα των φλαβονοειδών [Lambusta *et al.*, 2003].

Πίνακας 4.2 Βιβλιογραφική ανασκόπηση των αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης διαφόρων φλαβονοειδών.

Ένζυμο	Φλαβονοειδές	Μέσο	Απόδοση	Πηγή
Πρωτεάση από <i>Bacillus licheniformis</i>	Ρουτίνη, Εσπεριδίνη, Ναριγκίνη, Κερσετίνη		<14% (μετά από 48h, 45°C)	Danieli <i>et al.</i> , 1990
	Ισοκερκετρίνη	Πυριδίνη	<45% (μετά από 7d, 45°C)	Danieli <i>et al.</i> , 1993
Novozym 435®	Ισοκερκετρίνη, Ρουτίνη, Ναριγκίνη	Μίγμα πυριδίνης Me ₂ CO (χημειοενζυμική)	<74% (μετά από 12d, 45°C)	Riva <i>et al.</i> , 1996
Novozym 435®	Ισοκερκετρίνη, Κερσετίνη, Ναριγκίνη	Ακετόνη-πυριδίνη	<79% (μετά από 60h, 45°C)	Danieli <i>et al.</i> , 1997
Amano-A, Amano-AY, Amano-F, Amano-M, Amano-PS	Ισοκερκετρίνη, Ρουτίνη, Ναριγκίνη, Χρυσανθεμίνη, Αρμπουτίνη	Ακετονιτρίλιο, Ακετόνη, THF, CHCl ₃ , CH ₂ Cl ₂ , DMF, διοξάνη, DMSO	<68% (μετά από 10d, 37°C)	Nakajima <i>et al.</i> , 1999
Ενζυμικό διάλυμα από καλλιέργεια κυττάρων <i>Ipomoea batatas</i>	Ισοκερκετρίνη, Χρυσανθεμίνη	Νερό		Nakajima <i>et al.</i> , 2000
Λιπάσες από <i>Candida cylindracea</i> , <i>Pseudomonas cepacia</i> , πάγκρεας χοίρου	Παράγωγα κατεχίνης	THF, <i>t</i> -BME and CH ₂ Cl ₂ (χημειοενζυμική)	<90% (μετά από 36h, 45°C)	Patti <i>et al.</i> , 2000
Lipozyme IM				
Novozym 435				
Κυτταρινάση από <i>Aspergillus niger</i> , αμυλάση από <i>Bacillus species</i> , γλυκοσιδάση από <i>Bacillus stearothermophilus</i>	Ισοκερκετρίνη, Ναριγκίνη, Κατεχίνη, Κερκετίνη, Λουτεολίνη, Γλυκοσίδια κατεχίνης	Τριτοταγής-βουτανόλη-πυριδίνη (9:1 v/v)	<70% (μετά από 5d, 37°C)	Gao <i>et al.</i> , 2001
Novozym 435				
Lipozyme IM				
Novozym 435®	Ρουτίνη, Ναριγκίνη	Τριτοταγής-βουτανόλη, ακετόνη, THF, χλωροφόρμιο, ακετονιτρίλιο, μεθανόλη	<60% (μετά από 220h, 45°C)	Kontogianni <i>et al.</i> , 2001
		συστήματα χωρίς διαλύτη		
Λιπάση από <i>Rhizomucor miehei</i> , λιπάση από <i>Pseudomonas cepacia</i>	Κερκετίνη, Κατεχίνη και Υπερακετυλιωμένη κερκετίνη και κατεχίνη	THF, ακετονιτρίλιο	<40% (μετά από 48d, 45°C)	Lambusta <i>et al.</i> , 2003
Novozym 435®	Ρουτίνη, Ναριγκίνη	τριτοταγής-βουτανόλη, ακετόνη, THF, συστήματα χωρίς διαλύτη	<60% (μετά από 240h, 45°C)	Kontogianni <i>et al.</i> , 2003

Συνέχεια στην επόμενη σελίδα

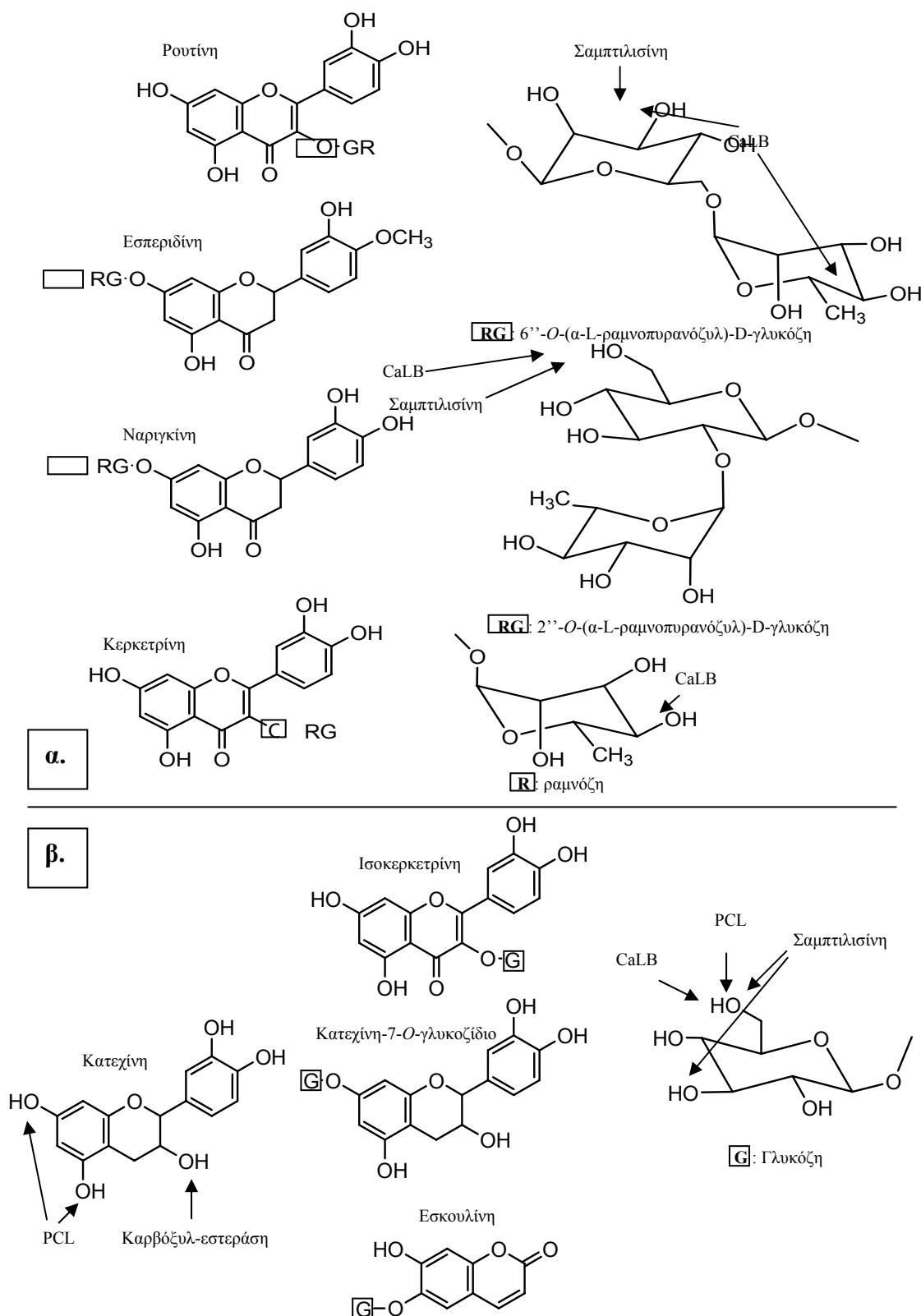
Novozym 435 [®]	Ναριγκίνη	2-Μέθυλ-2-βουτανόλη	<43% (μετά από 55h, 60°C)	Gayot <i>et al.</i> , 2003
Novozym 435 [®]	Ρουτίνη, Ναριγκίνη, Εσπεριδίνη, Εσκουλίνη	2-Μέθυλ-2-βουτανόλη	<80% (μετά από 12h, 60°C)	Ardhaoui <i>et al.</i> , 2004a
Novozym 435 [®]	Ρουτίνη, Εσκουλίνη	2-Μέθυλ-2-βουτανόλη	<90% (60°C)	Ardhaoui <i>et al.</i> , 2004b
Novozym 435 [®]	Ρουτίνη, Εσκουλίνη	2-Μέθυλ-2-βουτανόλη	<90% (60°C)	Ardhaoui <i>et al.</i> , 2004c
Novozym 435 [®]	Ναριγκίνη, Εσκουλίνη	2-Μέθυλ-2-βουτανόλη	<92% (μετά από 120h, 60°C)	Passicos <i>et al.</i> , 2004
Novozym 435 [®]	Ναριγκίνη	Τριτοταγής-βουτανόλη, ακετόνη	20-80% (μετά από 120h, 50°C)	Mellou <i>et al.</i> , 2005
<i>Candida antarctica</i> λιπάση B	Ισοκεκετρίνη, Ρουτίνη	Μελέτη τόπο-εκλεκτικότητας		De Oliveira <i>et al.</i> , 2009

Επιπλέον της φύσης του μέσου, η περιεκτικότητα του σε νερό αποτελεί μία άλλη σημαντική παράμετρο, η οποία επιδρά στην απόδοση ενζυμικών αντιδράσεων, και ιδιαίτερα σε περιπτώσεις αντιδράσεων απευθείας εστεροποίησης. Η διερεύνηση αυτής της παραμέτρου έδειξε, όπως ήταν αναμενόμενο, την επίτευξη υψηλότερων αποδόσεων σε άνυδρους οργανικούς διαλύτες, αλλά και την περαιτέρω βελτίωση της απόδοσης με τη χρήση άνυδρων υποστρωμάτων και τη συνεχή απομάκρυνση του παραγόμενου νερού μέσω μοριακών κόσκινων [Kontogianni *et al.*, 2003, Gayot *et al.*, 2003].

Καθώς η απόδοση μίας ενζυμικής αντίδρασης επηρεάζεται από την φύση των υποστρωμάτων μελετήθηκε, επιπρόσθετα, η χρήση ακυλο-δοτών με διαφορετικό μήκος αλκυλικής αλυσίδας, διαφορετικούς υποκαταστάτες, και βαθμό ακορεστότητας [Kontogianni *et al.*, 2001, 2003, Ardhaoui *et al.*, 2004a,b,c].

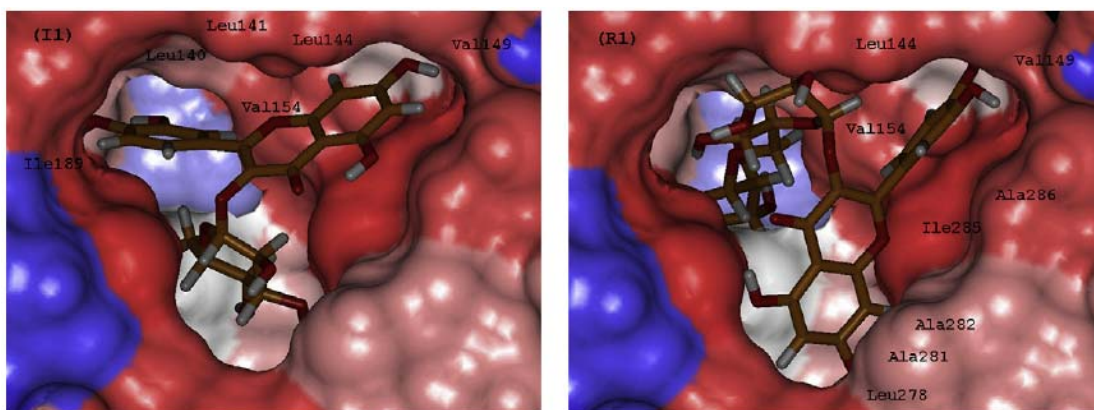
Βελτίωση των αποδόσεων των ενζυμικών αντιδράσεων επιτεύχθηκε επιπλέον με την ρύθμιση των τιμών των συγκεντρώσεων των υποστρωμάτων [Kontogianni *et al.*, 2001, 2003, Enaud *et al.*, 2004, Passicos *et al.*, 2004, Chebil *et al.*, 2007b], της ποσότητας του ενζύμου, της θερμοκρασίας της αντίδρασης [Enaud *et al.*, 2004] και μέσω της ανάπτυξης τεχνικών απομάκρυνσης του πτητικού παραπροϊόντος [Enaud *et al.*, 2004, Passicos *et al.*, 2004].

Εκτός από την δραστικότητα και εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα, η μελέτη των διαφόρων ενζυμικών αντιδράσεων κατέδειξε συγκεκριμένες θέσεις ακυλίωσης των φλαβονοειδών (**Εικόνες 4.6α,β**) και άρα την υψηλή τόπο-εκλεκτικότητα των βιοκαταλυτικών αντιδράσεων τροποποίησης.



Εικόνα 4.6 Τόπο-εκλεκτικότητα της λιπάσης B από *Candida antarctica* (CaLB) και της πρωτεάσης Σαμπτιλίνη, ως προς τις θέσεις ακυλίωσης **α.** γλυκοσυλιωμένων φλαβονοειδών και **β.** άγλυκων και μονοσακχαριωμένων φλαβονοειδών.

Η παρατηρούμενη τόπο-εκλεκτικότητα των ενζύμων μπορεί να υποστηριχθεί και από δεδομένα σε μοριακό επίπεδο, προερχόμενα από προσεγγίσεις μοριακής μηχανικής (molecular mechanics) και δυναμικής (molecular dynamics) (**Εικόνα 4.7**) [De Oliveira *et al.*, 2009].



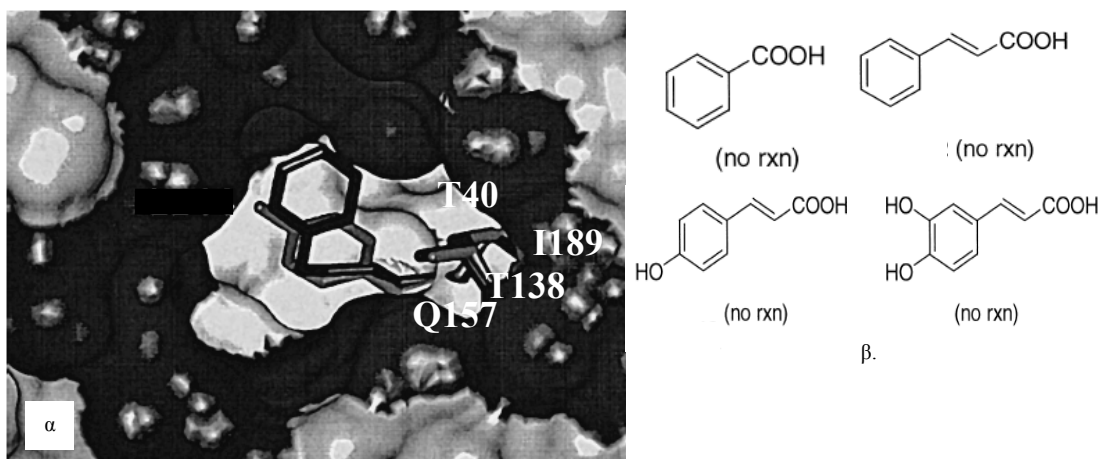
Εικόνα 4.7 Μοριακή απεικόνιση της πρόσδεσης δύο γλυκοσυλιωμένων φλαβονοειδών (ισοκερκετρίνη, ρουτίνη) στην λιπάση B από *Candida antarctica*. Σύμφωνα με υπολογιστικά δεδομένα η ομάδα του σακχάρου των φλαβονοειδών προσανατολίζεται προς τη καταλυτική τριάδα του ενεργού κέντρου της λιπάσης ενώ το μη γλυκοσидικό τμήμα των φλαβονοειδών εντοπίζεται στην είσοδο της θέσης πρόσδεσης. Υδρόφοβες περιοχές του ενζύμου αποδίδονται με κόκκινο χρώμα, ενώ υδρόφιλες με μπλε/λευκό χρώμα [De Oliveira *et al.*, 2009].

4.4.2 Βιοκαταλυτική τροποποίηση φαινολικών οξέων

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν, όπως και τα φλαβονοειδή, αντιοξειδωτικές ενώσεις φυτικής προέλευσης με σημαντικές βιολογικές δράσεις. Ωστόσο, η σχετικά χαμηλή διαλυτότητά τους σε μη πρωτικά μέσα περιορίζει την εφαρμογή τους σε διατροφικά και καλλυντικά σκευάσματα. Η υδροφοβικότητα των ενώσεων αυτών μπορεί να αυξηθεί μέσω ενζυμικών αντιδράσεων εστεροποίησης της καρβοξυλικής τους ομάδας με κάποια αλκοόλη, οδηγώντας στην σύνθεση ενός αμφίφιλου μορίου. Η πραγματοποίηση αυτού του τύπου αντίδρασης, μπορεί να εξασφαλίσει επιπλέον την διατήρηση ή και τροποποίηση της βιολογικής δράσης του αρχικού υποστρώματος (φαινολικού οξέος).

Η δυνατότητα εστεροποίησης των φαινολικών οξέων έχει μελετηθεί μέσω της χρήσης διαφόρων κατηγοριών ενζύμων, όπως εστεράσες [Giuliani *et al.*, 2001, Topakas *et al.*, 2003], κουτινάσες [Stamatis *et al.*, 2001c], ταννάσες [Yu *et al.*, 2004] και κυρίως λιπάσες [Guyot *et al.*, 1997, Buisman *et al.*, 1998, Stamatis *et al.*, 1999a, 2001c, Silva *et al.*, 2000, Priya & Chadha, 2003, Sabally *et al.*, 2005, Lee *et al.*, 2006, Cassani *et al.*, 2007]. Η δράση των

ενζύμων αυτών μελετήθηκε σε ποικίλα μη συμβατικά μέσα, όπως συστήματα χωρίς διαλύτη, μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο, τριαδικά συστήματα και οργανικούς διαλύτες διαφορετικής πολικότητας. Οι περισσότερες μελέτες επεσήμαναν τη σημαντική επίδραση της δομής, της φύσης των υποκαταστατών και του βαθμού ακορεστότητας της πλευρικής αλυσίδας του οξέος στην απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης [Guyot *et al.*, 1997, Buisman *et al.*, 1998, Stamatis *et al.*, 1999a, Compton *et al.*, 2000, Priya & Chadha, 2003, Cassani *et al.*, 2007]. Μελέτες μοριακής προσομοίωσης υπέδειξαν στερεοχημικές και ηλεκτρονιακές επιδράσεις οι οποίες δυσχεραίνουν την πρόσδεση των παραγώγων του κινναμωμικού ή βενζοϊκού οξέος στο ενεργό κέντρο των λιπασών, δικαιολογώντας έτσι τις ιδιαίτερα χαμηλές αποδόσεις των ενζυμικών αντιδράσεων εστεροποίησης σε οργανικούς διαλύτες (**Εικόνα 4.8**) [Otto *et al.*, 2000]. Ωστόσο, με την επιλογή των κατάλληλων μέσων (οργανικών διαλυτών, όπως το εξάνιο, το ισο-οκτάνιο ή μικρογαλακτωμάτων) ή με τη χρήση εξειδικευμένων ενζύμων (όπως η εστεράση του φερουλικού) η εστεροποίηση ορισμένων παραγώγων είναι δυνατή [Lee *et al.*, 2006, Topakas *et al.*, 2003, Cassani *et al.*, 2007].



Εικόνα 4.8α. Θέση πρόσδεσης ακυλίου της λιπάσης B από *Candida antarctica* όπου με άσπρο απεικονίζεται η υδρόφιλη βάση και με μαύρο η υδρόφοβη είσοδος. Μελέτες μοριακής δυναμικής καταδεικνύουν την ύπαρξη στερεοχημικών αλληλεπιδράσεων ανάμεσα στο δακτύλιο των φαινολικών οξέων και των καταλοίπων Thr138, Thr40, Gln157 και Ile189, οι οποίες μειώνουν την πρόσβαση των φαινολικών οξέων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, περιορίζοντας την ευελιξία του αρωματικού δακτυλίου τους. **β.** Τα αποτελέσματα αυτά εξηγούν την αδυναμία εστεροποίησης (no rxn) της γλυκόζης ή φαινολικών γλυκοζιδίων από το βενζοϊκό και το κινναμωμικό οξύ ή τα παράγωγά τους (φερουλικό, κουμαρικό οξύ) [Otto *et al.*, 2000].

Προσπάθειες βελτίωσης των αποδόσεων επικεντρώθηκαν και στην χρήση εστέρων φαινολικών οξέων, μέσω της πραγματοποίησης αντιδράσεων αλκοόλυσης και όχι απευθείας

εστεροποίησης [Compton *et al.*, 2000, Guyot *et al.*, 2000], με ταυτόχρονη απομάκρυνση κατά περιπτώσεις του παραγόμενου παραπροϊόντος (αλκοόλη) υπό κενό [Compton *et al.*, 2000]. Άλλες παράμετροι που μελετήθηκαν και βρέθηκαν να επιδρούν στην απόδοση των ενζυμικών αντιδράσεων περιλαμβάνουν την ποσότητα του νερού στο σύστημα της αντίδρασης [Yu *et al.*, 2004, Lue *et al.*, 2005, Vosmann *et al.*, 2006], την θερμοκρασία [Lue *et al.*, 2005, Twu *et al.*, 2005, Lee *et al.*, 2006], τις ποσότητες των αντιδρώντων και του ενζύμου [Lue *et al.*, 2005, Twu *et al.*, 2005, Vafiadi *et al.*, 2008]. Αντιδράσεις ενζυμικής εστεροποίησης των φαινολικών οξέων επιχειρήθηκαν και με την χρήση αλκοολών διαφορετικού μήκους αλκυλικής αλυσίδας [Yu *et al.*, 2004, Sabally *et al.*, 2005, Lue *et al.*, 2005, Lee *et al.*, 2006, Vosmann *et al.*, 2006, Weitkamp *et al.*, 2006].

Ωστόσο, οι σημαντικές διαφοροποιήσεις στην απόδοση των ενζυμικών αντιδράσεων τροποποίησης φαινολικών οξέων και κυρίως η αδυναμία εστεροποίησης των βιοδραστικών παραγώγων του κινναμωμικού οξέος σε μία ευρεία γκάμα οργανικών διαλυτών (Πίνακας 4.3) καταδεικνύει την απαίτηση για μία περισσότερο αποτελεσματική βιοκαταλυτική διεργασία.

Πίνακας 4.3 Βιβλιογραφική ανασκόπηση των αντιδράσεων ενζυμικής ακυλίωσης διαφόρων φαινολικών οξέων.

Ένζυμο	Φαινολικό οξύ	Μέσο	Απόδοση	Πηγή
Novozym 435	Καφεϊκό, Κινναμωμικό, Φερουλικό, Διϋδροκαφεϊκό, 3,4-διϋδροφαινυλοξικό, Υδροξυκινναμωμικά οξέα	Απουσία διαλύτη	<97% (50°C μετά από 15d)*	Guyot <i>et al.</i> , 1997
Λιπάση B από <i>Candida antarctica</i> , <i>Humicola lanuginosa</i> , <i>Candida cylindracea</i> , <i>Rhizopus</i> , <i>Candida cylindracea</i> , <i>Pseudomonas sp.</i> , <i>Geotrichum candidum</i>	Κινναμωμικό, Συριγικό	Δι-αιθυλαιθέρας <i>t</i> -βουτυλμέθυλ αιθέρας, 1-βουτανόλη, κυκλοεξάνιο, <i>n</i> -πεντάνιο	<85% (50°C ή 34°C μετά από 5d)*	Buisman <i>et al.</i> , 1998
Novozym 435 Lipozyme RMIM	Κινναμωμικό, Καφεϊκό, Φερουλικό, Κουμαρικό	Ακετόνη, 2-μέθυλ-2-προπανόλη 2-μέθυλ-2-βουτανόλη Απουσία διαλύτη	<57% (50°C μετά από 12d)*	Stamatis <i>et al.</i> , 1999a
Novozym 435	Φερουλικό	2-μέθυλ-2-προπανόλη	14% (60°C μετά από 13d)	Compton <i>et al.</i> , 2000
Συνέχεια στην επόμενη σελίδα				

Εστεράση	Φερουλικό	Μικρογαλάκτωμα νερού σε έλαιο	60% (40°C μετά από 8h)	Giuliani <i>et al.</i> , 2001
Λιπάση, εστεράση, Κουτινάση	Κινναμωμικό, Φερουλικό, Κουμαρικό, π-υδροξυφαίνυλ προπιονικό	Απουσία διαλύτη <i>t</i> -βουτανόλη	3-97% (45°C μετά από 12d)	Stamatis <i>et al.</i> , 2001c
Εστεράση	Κινναμωμικό, Φερουλικό, Κουμαρικό, π-υδροξυφαίνυλ προπιονικό, π-υδροξυφαίνυλ οξικό	Μικρογαλάκτωμα	13-70% (30°C μετά από 224h)	Topakas <i>et al.</i> , 2003
Novozym 435 Lipozyme IM 20	Διϋδροκαφεϊκό	Εξάνιο Εξάνιο/2-βουτανόλη Εξάνιο/ <i>t</i> -βουτανόλη	16-76%	Sabally <i>et al.</i> , 2005
Novozym 435	Υδροξυφαίνυλ προπιονικό	Απουσία διαλύτη	95.9% (53°C μετά από 58h)	Twu <i>et al.</i> , 2005
Novozym 435	Φερουλικό, π-μεθοξυκινναμωμικό	Ακετόνη, <i>t</i> -βουτανόλη, Βενζόλιο, Εξάνιο, Επτάνιο, Ισοοκτάνιο	<90% (65, 70, 80°C μετά από 72h)	Lee <i>et al.</i> , 2006
Novozym 435, Lipozyme RMIM, Lipozyme TLIM	Κινναμωμικό, Φερουλικό, Καφεϊκό, Σιναπικό	Απουσία διαλύτη	0-98% (80°C μετά από <144h)	Vosmann <i>et al.</i> , 2006
Novozym 435, Lipozyme RMIM,	Κινναμωμικό, π-υδροξυφαίνυλ οξικό, π-υδροξυφαίνυλ προπιονικό, Κουμαρικό, Φερουλικό	Τριαδικό εξανίου/1-προπανόλης/νερού	5-95% (30°C μετά από 240h)	Zoumpantioti <i>et al.</i> 2006
Novozym 435 Lipozyme RMIM	Εστέρες κινναμωμικού, φερουλικού, κουμαρικού	Απουσία διαλύτη	52-95% (80°C μετά από <72h)	Weitkamp <i>et al.</i> , 2006
Novozym 435	Κινναμωμικό <i>p</i> -κουμαρικό Φερουλικό	Εξάνιο	5-98% (50°C μετά από 360h)	Cassani <i>et al.</i> , 2007
Εστεράση από <i>Aspergillus niger</i> και CLEAs	Εστέρες φερουλικού καφεϊκού, κουμαρικού, σιναπικού	Μικρογαλακτώματα απουσία επιφανειοενεργού	<78% (35°C μετά από 5d)	Vafiadi <i>et al.</i> , 2008
Novozym 435, Λιπάση από <i>C. rugosa</i> , <i>Chromobacterium Viscosum</i> , <i>Pseudomonas</i> sp.	Βινυλ-εστέρας του φερουλικού	Ακετονιτρίλιο <i>t</i> -βουτυλμεθυλ αιθέρας	<56% (45, 50°C)	Chigorimbo-Murefu <i>et al.</i> , 2008

*Εστεροποίηση μόνο στην περίπτωση του κινναμωμικού οξέος.

Υλικά και Μέθοδοι

5.1 Υλικά

5.1.1 Αντιδραστήρια

5.1.1.1 Ένζυμα

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες μικροβιακές λιπάσες:

- Novozym 435[®]: Λιπάση B από *Candida antarctica*, ακινητοποιημένη σε υδρόφοβο φορέα αποτελούμενο από μακροπορώδη ακρυλική ρητίνη (Lewatit[®] VP OC 1600), προσφορά της εταιρείας Novozymes.
- CALB-SEP: Λιπάση B από *Candida antarctica*, ακινητοποιημένη σε φορέα μέτριας υδροφοβικότητας, προσφορά της εταιρείας Viazym.
- CALB-HP: Λιπάση B από *Candida antarctica*, ακινητοποιημένη σε φορέα υψηλής υδροφοβικότητας, προσφορά της εταιρείας Viazym.
- Λυοφιλωμένη λιπάση B από *Candida antarctica*, με ενεργότητα 10.8 U/mg (1 U αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου η οποία οδηγεί στη σύνθεση 1 μmol βουτυρικού οξέος ανά min σε pH 8.0 και θερμοκρασία 50°C), της εταιρείας Sigma.
- Novozym 735[®]: Υγρό σκεύασμα της λιπάσης B από *Candida antarctica*, προσφορά της εταιρείας Novozymes.
- Lipozyme RM IM: Λιπάση από *Rhizomucor miehei*, ακινητοποιημένη σε ανιονική ρητίνη (Duolite A568), προσφορά της εταιρείας Novozymes.
- Λυοφιλωμένη λιπάση από *Rhizomucor miehei*, με ενεργότητα 0.92 U/mg (1 U αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου η οποία οδηγεί στη σύνθεση 1 μmol ελαϊκού οξέος ανά min σε pH 8.0 και θερμοκρασία 40°C), της εταιρείας Sigma.
- Lipozyme TL IM: Λιπάση από *Thermomyces lanuginosa*, ακινητοποιημένη σε κοκκοποιημένη silica, προσφορά της εταιρείας Novozymes.
- Lipozyme 100T: Λιπάση από *Thermomyces lanuginosa*, ακινητοποιημένη σε κοκκοποιημένη silica, προσφορά της εταιρείας Novozymes.
- Λυοφιλωμένη λιπάση από *Candida rugosa*, με ενεργότητα 1.14 U/mg (1 U αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου η οποία οδηγεί στη σύνθεση 1 μmol ελαϊκού οξέος ανά min σε pH 8.0 και θερμοκρασία 40°C), της εταιρείας Sigma.

Χρησιμοποιήθηκαν ακόμα τα εξής ένζυμα,

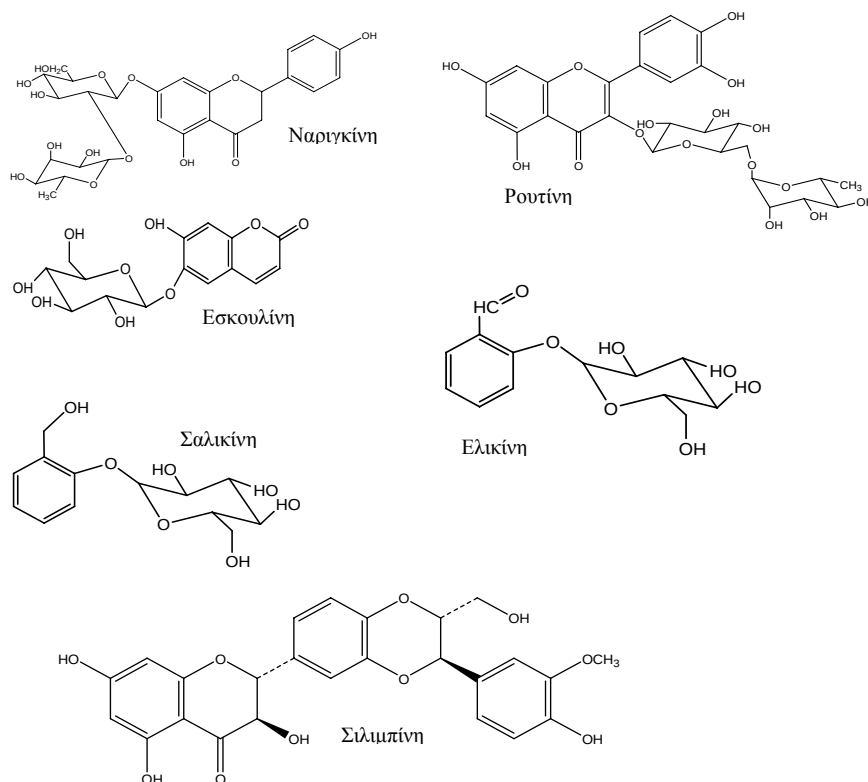
- Οξειδάση της ξανθίνης από αποβουτυρωμένο γάλα, σε λυοφιλωμένη μορφή, με ενεργότητα 0.14 U/mg (1 U ενζύμου μετατρέπει 1 μmol ξανθίνης σε ουρικό οξύ ανά min σε pH 7.5 και θερμοκρασία 25°C), της εταιρείας Sigma.

- Λιποξυγονάση (τύπου 1-B) από *Glycine max* (σόγια), σε λυοφιλιωμένη μορφή, με ενεργότητα 158000 U/mg (1 U προκαλεί αύξηση της A_{234} κατά 0.001 ανά min σε pH 9.0 και θερμοκρασία 25°C όταν ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται το λινελαϊκό οξύ σε όγκο 3.0 mL. 1 A_{234} U αντιστοιχεί στην οξείδωση 0.12 μ mol λινελαϊκού οξέος), της εταιρείας Sigma.

5.1.1.2 Υποστρώματα

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα φυσικά αντιοξειδωτικά:

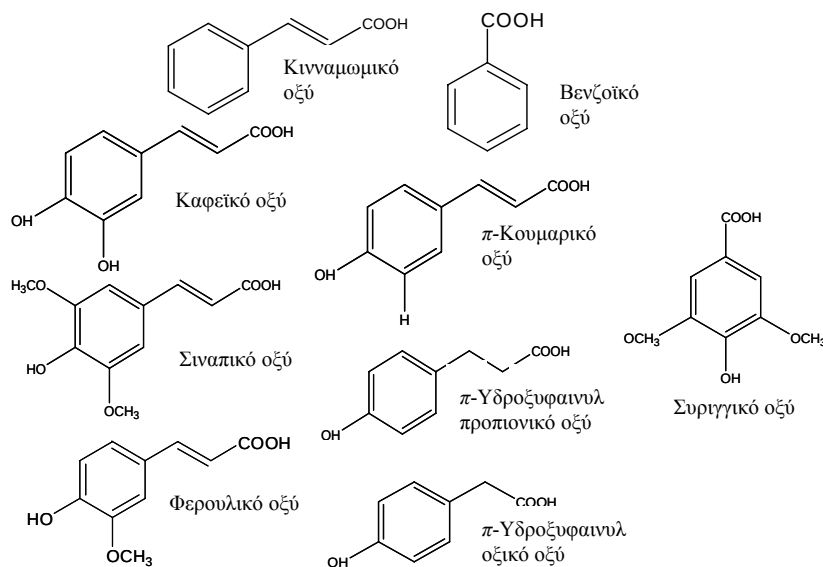
- Φλαβονοειδή : ναριγκίνη, ρουτίνη, ναριγκενίνη, σιλιμπίνη (**Εικόνα 5.1**).
- Φαινολικά γλυκοσίδια : εσκούλίνη, ελικίνη, σαλικίνη (**Εικόνα 5.1**).



Εικόνα 5.1 Δομές των υπό μελέτη πολυφαινολικών ενώσεων.

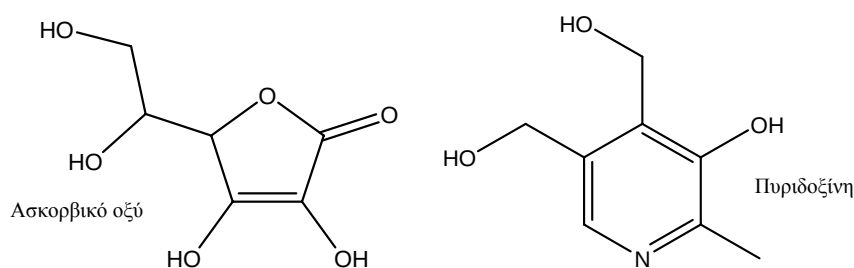
- Φαινολικά οξέα : κινναμωμικό οξύ και τα παράγωγα αυτού, δηλαδή το φερουλικό οξύ, το π-κουμαρικό οξύ, το καφεϊκό οξύ, το σιναπικό οξύ, το π-υδροξυ-κινναμωμικό οξύ, το 3-(π-υδροξυφαινυλ)-προπιονικό οξύ, π-υδροξυφαινυλ-προπιονικό οξύ και το π-υδροξυφαινυλ-οξικό οξύ. Χρησιμοποιήθηκαν ακόμη το βενζοϊκό οξύ και το παράγωγο αυτού, το συριγγικό οξύ (**Εικόνα 5.2**).

- Εστέρες φαινολικών οξέων όπως ο αιθυλ-εστέρας του φερουλικού οξέος, βινυλ-εστέρας του φερουλικού, κουμαρικού και καφεϊκού οξέος παρασκευασμένοι στο Ινστιτούτο Χημείας, Τεχνολογίας και Μεταλλουργίας, του Κέντρου Χημείας (Βελιγράδι, Σερβία), και μεθόξυμεθυλ-υποκατεστημένοι εστέρες του κουμαρικού οξέος και του βινυλ-εστέρα του κουμαρικού οξέος, παρασκευασμένοι στο Ινστιτούτο Μικροβιολογίας, της Ακαδημίας Επιστημών (Πράγα, Τσεχία).

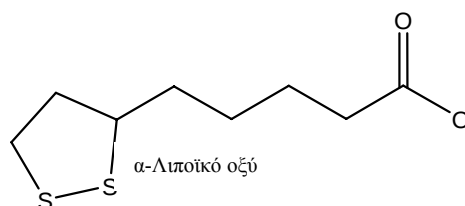


Εικόνα 5.2 Δομές των υπό μελέτη φαινολικών οξέων.

- Βιταμίνες : πυριδοξίνη (κύριο συστατικό του συμπλέγματος βιταμινών B₆), η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) καθώς και ο παλμιτικός εστέρας του ασκορβικού οξέος.



- Το α-λιποϊκό οξύ, ως μίγμα R και S- λιποϊκού οξέος.



Ως ακυλοδότες χρησιμοποιήθηκαν,

- Απλά λιπαρά οξέα : οξικό οξύ (C_2), βουτυρικό οξύ (C_4), δεκανοϊκό οξύ (C_{10}), λαυρικό οξύ (C_{12}), στεαρικό οξύ (C_{18}) και ακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως το ελαϊκό οξύ ($C_{18:1}$), το λινελαϊκό οξύ ($C_{18:2}$) και το λινολενικό οξύ ($C_{18:3}$), καθώς και οι βινυλ-εστέρες του βουτυρικού και λαυρικού οξέος, ο μεθυλ-εστέρας του παλμιτικού οξέος, ο μεθυλ-εστέρας του ελαϊκού οξέος και ο αιθυλ-εστέρας του λινελαϊκού οξέος.
- Αλκοόλες : μεθανόλη, αιθανόλη, προπανόλη, 1-βουτανόλη, 1-εξανόλη, 1-οκτανόλη, μενθόλη, γερανιόλη, 1-φαινυλ αιθανόλη.

Ως υπόστρωμα σε υδρολυτικές αντιδράσεις χρησιμοποιήθηκε,

- Βουτυλ-εστέρας της π-νιτροφαινόλης.

Ως υποστρώματα για τις βιολογικές μελέτες χρησιμοποιήθηκαν,

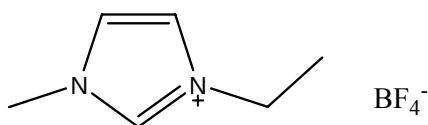
- Άλας νατρίου του λινελαϊκού οξέος ($C_{18:2}$)
- Υποξανθίνη.

Τα προαναφερόμενα αντιδραστήρια είναι προϊόντα των εταιρειών Sigma, Aldrich και Fluka. Ο βαθμός καθαρότητας των παραπάνω αντιδραστηρίων ήταν ο υψηλότερος δυνατός.

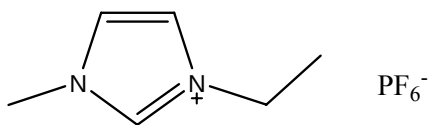
5.1.1.3 Ιοντικά υγρά

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά :

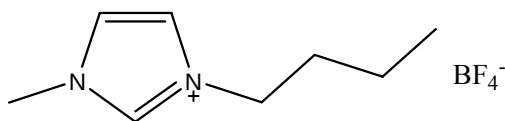
- [emim]BF₄: 1-αιθυλ-3-μεθυλμιδαζόλιο τετραφθοριούχο βόριο



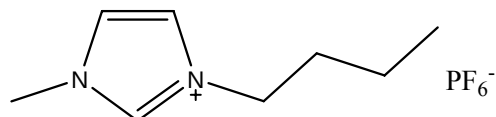
- [emim]PF₆: 1-αιθυλ-3-μεθυλμιδαζόλιο εξαφθοριούχος φωσφόρος



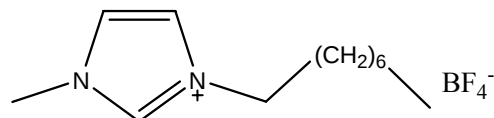
- [bmim]BF₄: 1-βουτυλ-3-μεθυλμιδαζόλιο τετραφθοριούχο βόριο



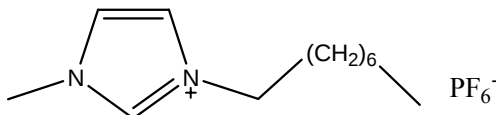
- [bmim]PF₆: 1-βουτυλ-3-μεθυλμιδαζόλιο εξαφθοριούχος φωσφόρος



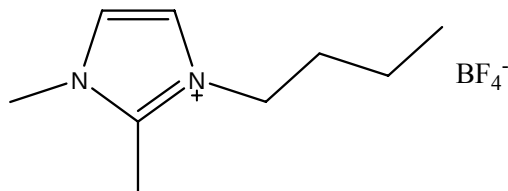
- [omim]BF₄: 1-οκτυλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο τετραφθοριούχο βόριο



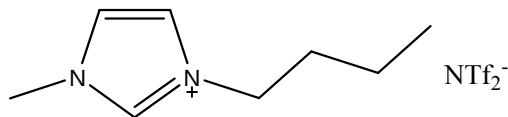
- [omim]PF₆: 1-οκτυλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο εξαφθοριούχος φωσφόρος



- [bdmim]BF₄: 2,3 δι-βουτυλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο τετραφθοριούχο βόριο

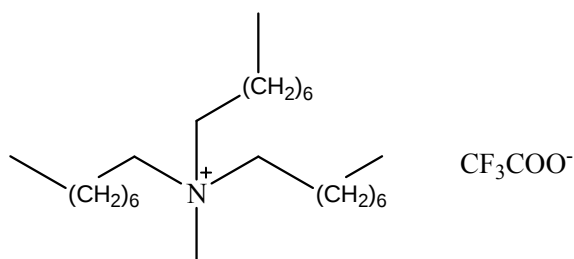


- [bmim]NTf₂: 1-βουτυλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο δις(τριφθορο-μεθυλ-σουλφονυλ) ιμίδιο

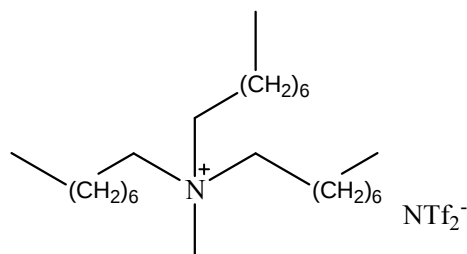


Καθώς και τα αμμωνιακά ιοντικά υγρά:

- [mtoa]TFA: μεθυλ-τριοκτυλαμμώνιο τριφθορο οξικό



- [mtoa]NTf₂: μεθυλ-τριοκτυλαμμώνιο δις(τριφθορο-μεθυλ-σουλφονυλ) ιμίδιο



Τα ιοντικά υγρά ήταν υψηλής καθαρότητας (> 99%) και προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Fluka, Merck, Alfa Aesar και Solvent Innovation.

5.1.1.4 Οργανικοί διαλύτες

Οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθαρότητας αναλυτικής βαθμίδας και προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Merck και LabScan. Το ακετονιτρίλιο, η μεθανόλη και το νερό που χρησιμοποιήθηκαν ως διαλύτες έκλουσης στην υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) ήταν υψηλής καθαρότητας (HPLC grade) και προέρχονται από τις εταιρείες Merck, Fisher Scientific και Acros Organics.

5.1.1.5 Άλλα αντιδραστήρια/υλικά

Τα αντιδραστήρια για την παρασκευή των υδατικών διαλυμάτων (βάσεις, οξέα, άλατα) ήταν καθαρότητας αναλυτικής βαθμίδας και προϊόντα των Fluka και Riedel-Hain.

Τα αντιδραστήρια για την ηλεκτροφόρηση : SDS (Sodium dodecylsulfate), Tris, γλυκίνη, ακρυλαμίδιο/δις-ακρυλαμίδιο, TEMED (N,N,N',N'-τετραμεθυλαιθυλενοδιαμίνη), υπερθειϊκό αμμώνιο, κυανού της βρωμοφαινόλης, μερκαπτοαιθανόλη, Coomassie blue ήταν καθαρότητας αναλυτικής βαθμίδας και προϊόντα των Fluka και Sigma.

Για την αφυδάτωση των διαλυτών χρησιμοποιήθηκαν μοριακά κόσκινα πόρων 3 και 4 Å των εταιρειών Sigma και Fluka.

Οι φορείς ακινητοποίησης Lewatit® VP OC 1600 και Duolite A568 ήταν μία προσφορά των εταιριών LANXESS (Germany) και Rohm & Haas (France), αντίστοιχα.

5.1.2 Υλικά χρωματογραφίας

Για την υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC) χρησιμοποιήθηκε η στήλη μ-Bondapak™ C₁₈ ανάστροφης φάσης, μήκους 300 mm, διαμέτρου 3.9 mm και μεγέθους σωματιδίων 10 μm, της εταιρείας Waters καθώς και η στήλη Discovery C₁₈ ανάστροφης φάσης, μήκους 250 mm, διαμέτρου 10 mm και μεγέθους σωματιδίων 5 μm της εταιρείας Discovery.

Χρησιμοποιήθηκαν φίλτρα (nylon membrane) πόρων 0.45 μm των εταιρειών Pall και Whatman.

Για την χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας χρησιμοποιήθηκαν πλάκες silica gel 60 F₂₅₄, πλαστικές και αλουμινίου της εταιρείας Merck.

Για την χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιήθηκε Silica gel 60 (0.040-0.063 mm) της εταιρείας Merck.

5.2 Μεθοδολογία

5.2.1 Χημική σύνθεση βινυλ-εστέρων φαινολικών οξέων

Μίγμα φερουλικού οξέος (10 mmol), $\text{Pd}(\text{OAc})_2$ (1.56 mmol) και KOH (1 mmol) προστίθεται σε 17 mL βινυλ-εστέρα οξικού οξέος (1.08 mmol) και αναδεύεται σε θερμοκρασία δωματίου για 12 h. Στη συνέχεια το μίγμα φιλτράρεται και το στερεό υπόλειμμα ξεπλένεται τρις με ποσότητα βινυλ-εστέρα του οξικού οξέος. Ο βινυλ-εστέρας του οξικού οξέος εξατμίζεται υπό κενό. Η απομόνωση του βινυλ-εστέρα του φερουλικού οξέος πραγματοποιείται μέσω χρωματογραφίας στήλης (κινητή φάση χλωροφορμίου-τολουολίου-ακετόνης-μυρμηκικού οξέος, 85:10:5:1 (v/v/v/v)).

Για τη σύνθεση του βινυλ-εστέρα του κουμαρικού οξέος παρασκευάζεται μίγμα π-κουμαρικού (10mmol), βινυλ-εστέρα του οξικού οξέος (7.5 mL, 160 mmol), $\text{Hg}(\text{OAc})_2$ (4% w/w) σε τετραϋδροφουράνιο (THF) (5 mL). Το μίγμα αναδεύεται υπό ατμόσφαιρα αργού για 30 min, και στη συνέχεια προστίθεταιθειϊκό οξύ (1 μL , 0.02 mmol) και το μίγμα της αντίδρασης επωάζεται στους 40°C υπό ανάδευση για 12 h. Η αντίδραση τερματίζεται με την προσθήκη περίσσειας οξικού νατρίου. Ο διαλύτης απομακρύνεται και το στερεό υπόλειμμα επαναδιαλυτοποιείται σε οξικό αιθυλεστέρα. Το μίγμα εκχυλίζεται διαδοχικά με υδατικό διάλυμα KI και NaCl . Η οργανική φάση συλλέγεται και εξατμίζεται υπό κενό. Η απομόνωση του βινυλ-εστέρα του κουμαρικού οξέος πραγματοποιείται μέσω χρωματογραφίας στήλης (κινητή φάση χλωροφορμίου-τολουολίου-ακετόνης-μυρμηκικού οξέος, 85:10:5:1 (v/v/v/v)).

5.2.2 Χημική σύνθεση MOM-υποκατεστημένου κουμαρικού οξέος

Για την εισαγωγή του $\text{CH}_2\text{-OCH}_3(\text{MOM})$ -υποκαταστάτη στην υδροξυλομάδα του π-κουμαρικού οξέος (3 mmol), ποσότητες NaH (6 mmol) και MOM-Cl (4.5 mmol) προστίθενται σε 10 mL διμεθυλ-φορμαδιδίου (DMF). Το μίγμα αναδεύεται για 1 h σε θερμοκρασία δωματίου. Ο διαλύτης εξατμίζεται και το MOM-υποκατεστημένο κουμαρικό οξύ απομονώνεται μέσω χρωματογραφίας στήλης (κινητή φάση χλωροφορμίου-τολουολίου-ακετόνης-μυρμηκικού οξέος, 85:10:5:1 (v/v/v/v)).

Για τη σύνθεση του βινυλ-εστέρα του MOM-υποκατεστημένου κουμαρικού οξέος ακολουθείται πρωτόκολλο όμοιο με εκείνο στην περίπτωση σύνθεσης του βινυλ-εστέρα του φερουλικού οξέος (§ 5.2.1).

5.2.3 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών

Ο ποσοτικός προσδιορισμός των πρωτεϊνών πραγματοποιείται με τη μέθοδο Bradford [Bradford, 1976]. Για τον προσδιορισμό χρησιμοποιείται το διάλυμα Bradford το οποίο περιέχει τη χρωστική Coomassie blue. Παρουσία πρωτεΐνης το pK_a της χρωστικής μετατοπίζεται και το διάλυμα μετατρέπεται από κόκκινο σε μπλε. Ο προσδιορισμός της ποσότητας ενός άγνωστου πρωτεϊνικού δείγματος, επιτυγχάνεται μέσω της εφαρμογής πρότυπης καμπύλης.

Για την πρότυπη παρασκευάζονται διαλύματα αλβουμίνης (BSA) συγκέντρωσης από 0.1 έως 1 mg/mL. Ποσότητα 10 μ L των ενζυμικών διαλυμάτων προστίθεται σε κυψελίδα η οποία περιέχει 950 μ L διαλύματος Bradford (100 mg/mL) και 40 μ L υδατικού διαλύματος. Το διάλυμα αναδεύεται και επωάζεται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να αναπτυχθεί το χρώμα. Στη συνέχεια, μετράται η απορρόφηση του δείγματος στα 595 nm.

Στην περίπτωση των λυοφιλιωμένων σκευασμάτων της λιπάσης B από *Candida antarctica* και της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* η πρωτεϊνική συγκέντρωση προσδιορίζεται ίση με 13.8% και 15%, αντίστοιχα.

5.2.4 Ηλεκτροφόρηση SDS-PAGE (Sodium dodecylsulfate–polyacrylamide gel electrophoresis)

Σε ηλεκτροφορητική συσκευή (BIORAD) προστίθεται υδατικό διάλυμα αгарόζης 1%. Εφόσον στερεοποιηθεί προστίθεται το πήκτωμα διαχωρισμού. Το πήκτωμα αυτό παρασκευάζεται με τη προσθήκη 3.6 mL νερού, 3.75 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 1.5M pH 8.8, 150 μ L διαλύματος SDS 10%, 6 mL διαλύματος ακρυλαμιδίου/δισ-ακρυλαμιδίου 30%, 25 μ L TEMED και τελευταία προστίθενται 150 μ L διαλύματος υπερθειϊκού αμμωνίου 10% ώστε να αρχίσει ο πολυμερισμός. Το μίγμα προστίθεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης, καλύπτεται με διάλυμα ηλεκτροφόρησης (0.025M Tris, 0.192M γλυκίνης, 0.1% SDS, pH 8.3) και αφήνεται για χρόνο 30 min ώστε να πολυμεριστεί. Μετά την πάροδο 30 min το διάλυμα ηλεκτροφόρησης απορρίπτεται και το πολυμερισμένο πήκτωμα διαχωρισμού καλύπτεται από το πήκτωμα φόρτωσης. Το πήκτωμα αυτό παρασκευάζεται με τη προσθήκη 1.525 mL νερού, 625 μ L ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 0.5M pH 6.8, 25 μ L διαλύματος SDS 10%, 325 μ L διαλύματος ακρυλαμιδίου/δισ-ακρυλαμιδίου 30%, 2.5 μ L TEMED και τελευταία προστίθενται 25 μ L διαλύματος υπερθειϊκού αμμωνίου 10% ώστε να αρχίσει ο πολυμερισμός. Το μίγμα προστίθεται στη συσκευή ηλεκτροφόρησης στην οποία έχουμε εισαγάγει το χτένι, καλύπτεται με διάλυμα

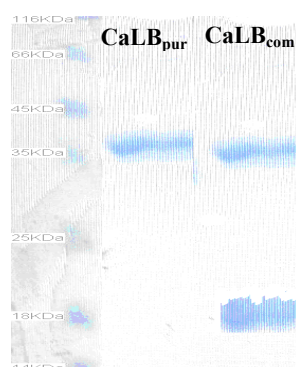
ηλεκτροφόρησης (0.025M Tris, 0.192M γλυκίνης, 0.1% SDS, pH 8.3) και αφήνεται για χρόνο 90 min ώστε να πολυμεριστεί.

Τα πρωτεϊνικά δείγματα παρασκευάζονται με την προσθήκη 5 μ L διαλύματος φόρτωσης (285 μ L ρυθμιστικού διαλύματος, 50 μ L διαλύματος κυανού της βρωμοφαινόλης 0.25%, 50 μ L μερκαπτοαιθανόλης) σε 20 μ L ενζυμικού διαλύματος. Ομοίως παρασκευάζεται και το διάλυμα των μαρτύρων (markers).

Τα δείγματα και ο μάρτυρας προστίθενται στο πήκτωμα φόρτωσης, το οποίο έχει καλυφθεί με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός πραγματοποιείται στα 200 V, 0.04 A. Μετά το πέρας της διαδικασίας το πήκτωμα μεταφέρεται σε διάλυμα χρώσης (250 mL αιθανόλη, 50 mL οξικού οξέος, 62.5 mL διαλύματος Coomassie blue 1%) στο οποίο αφήνεται για περίπου 1 h υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ο αποχρωματισμός του πηκτώματος πραγματοποιείται σε διάλυμα αποχρωματισμού (300 mL μεθανόλη, 50 mL οξικό οξύ, 650 mL νερό) υπό ανάδευση εωσότου εμφανιστούν ευδιάκριτες ζώνες.

5.2.5 Καθαρισμός πρωτεϊνών

Η λιπάση B από *Candida antarctica* (CaLB) απομονώθηκε από το εμπορικά διαθέσιμο υγρό σκεύασμα Novozym 735 (Novozymes). Η πρωτεϊνική συγκέντρωση του σκευάσματος, η οποία προσδιορίζεται μέσω της μεθόδου Bradford, ισούται με 10%. Η SDS-PAGE του σκευάσματος αυτού καταδεικνύει την παρουσία μίας επιπλέον ζώνης στα 18 kD (Εικόνα 5.3).



Εικόνα 5.3 SDS-PAGE της εμπορικής λιπάσης B από *Candida antarctica* (CaLB_{com}) και της απομονωμένης λιπάσης (CaLB_{pur}).

Για τον καθαρισμό χρησιμοποιείται σύστημα χρωματογραφίας της εταιρίας BIORAD, το οποίο ελέγχεται από κατάλληλο λογισμικό BioLogic LP Data View Software 1.03

(BIORAD). Ο καθαρισμός της λιπάσης πραγματοποιείται μέσω χρωματογραφίας ιοντο-ανταλλαγής [Trodler *et al.*, 2008]. Το ισοηλεκτρικό σημείο της CaLB ισούται με 6.0. Σε τιμές pH μικρότερες από 5 η CaLB είναι θετικά φορτισμένη και μπορεί να προσδεθεί σε κατιο-ανταλλακτική στήλη. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε υλικό χρωματογραφίας SP sepharose Fast Flow (με λειτουργική ομάδα σουλφοπροπυλίου, $-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{SO}_3^-$) της εταιρείας Sigma.

Όγκος δείγματος ίσος με 2 mL φορτώνεται στη στήλη. Η στήλη ξεπλένεται με τριπλάσιο όγκο διαλύματος 10 mM μυρμηκικού νατρίου, 10 mM κιτρικού νατρίου, 10 mM οξικού νατρίου, pH 3. Η έκλυση της CaLB πραγματοποιείται μέσω έκπλυσης της στήλης με πενταπλάσιο όγκο διαλύματος 10 mM μυρμηκικού νατρίου, 10 mM κιτρικού νατρίου, 10 mM οξικού νατρίου, pH 5.5 (στο pH αυτό η πρωτεΐνη είναι ουδέτερη).

Η SDS-PAGE της εκλουόμενης κορυφής (**Εικόνα 5.3**) καταδεικνύει την ύπαρξη μίας μοναδικής πρωτεϊνικής ζώνης στα 33 kDa, το οποίο αντιστοιχεί στο μοριακό βάρος της CaLB [Uppenberg *et al.*, 1994].

5.2.6 Παρασκευή διασυνδεδεμένων ενζυμικών συσσωματωμάτων (CLEAs) της λιπάσης B από *Candida antarctica*

Ποσότητα 25 mg λιπάσης B από *Candida antarctica* διαλυτοποιείται σε 0.5 mL ρυθμιστικού διαλύματος $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ (100 mM, pH 7). Στο ενζυμικό διάλυμα προστίθεται 1.5 mL ακετόνης (παράγοντας καταβύθισης) και 40 μL γλουταραλδεΐδης (25% σε νερό). Το μίγμα επωάζεται υπό ανάδευση στους 20°C για 17 h. Μετά την πάροδο των 17 h προστίθεται 0.5 mL ακετόνης και το μίγμα φυγοκεντρείται. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το στερεό υπόλειμμα ξεπλένεται με ακετόνη (3x 2.5 mL). Ο οργανικός διαλύτης απομακρύνεται υπό κενό και το παρασκεύασμα των CLEAs φυλάσσεται στους 4°C.

5.2.7 Αντιδράσεις τροποποίησης φυσικών αντιοξειδωτικών

5.2.7.1 Ενζυμική αντίδραση ακυλίωσης φλαβονοειδών

Η ενζυμική ακυλίωση των φλαβονοειδών πραγματοποιείται σε συγκεντρώσεις από 25 έως 100 mM, με χρήση διάφορων ακυλιωτικών παραγόντων (ελεύθερων λιπαρών οξέων ή αντίστοιχων βινυλ-εστέρων τους) σε 0.5 mL ιοντικού υγρού ή 5 mL οργανικού διαλύτη, που έχουν προ-αφυδατωθεί παρουσία μοριακών κόσκινων 4Å (για τουλάχιστον 120 h σε θερμοκρασία δωματίου). Ο μοριακός λόγος του ακυλο-δότη ως προς το φλαβονοειδές κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 3 και 15. Η ακυλίωση των φλαβονοειδών καταλύεται από

διάφορες ακινητοποιημένες λιπάσες μικροβιακής προέλευσης (Novozym 435[®], Lipozyme TL IM, Lipolase 100T και Lipozyme RM IM). Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιείται ποσότητα ακινητοποιημένου σκευάσματος ίση με 80 mg/mL. Το μίγμα της αντίδρασης τοποθετείται σε κλειστά φυαλίδια και επωάζεται σε ανακινούμενο επωαστήρα σε θερμοκρασία 60 ή 50°C (στην περίπτωση του οργανικού διαλύτη) υπό ανάδευση (250 rpm). Οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται παρουσία μοριακών κοσκίων 3Å (100 mg/mL), για την απομάκρυνση του παραγόμενου νερού.

5.2.7.2 Ενζυμική αντίδραση ακυλίωσης φαινολικών γλυκοσιδίων και σιλιμπίνης

Η ενζυμική ακυλίωση των διαφόρων φαινολικών γλυκοσιδίων ή της σιλιμπίνης πραγματοποιείται σε συγκεντρώσεις από 25 έως 100 mM, με χρήση του βινυλ-εστέρα του βουτυρικού οξέος ως ακυλο-δότη, σε όγκο 0.5 mL ιοντικού υγρού ή 2 mL ακετόνης, που έχει προηγουμένως αφυδατωθεί με την προσθήκη 4Å μοριακών κόσκινων (για τουλάχιστον 120 h σε θερμοκρασία δωματίου). Ο μοριακός λόγος του ακυλο-δότη ως προς το αντιοξειδωτικό κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 3 και 15. Οι αντιδράσεις ακυλίωσης καταλύονται από τη Novozym 435[®]. Σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιείται ποσότητα ακινητοποιημένου σκευάσματος ίση με 80 mg/mL. Το μίγμα της αντίδρασης τοποθετείται σε κλειστά φυαλίδια και επωάζεται σε ανακινούμενο επωαστήρα σε θερμοκρασία 60 ή 50°C (στην περίπτωση της ακετόνης) υπό ανάδευση (250 rpm).

5.2.7.3 Ενζυμική αντίδραση εστεροποίησης φαινολικών οξέων

Η ενζυμική εστεροποίηση φαινολικών οξέων (ή εστέρων φαινολικών οξέων) πραγματοποιείται σε συγκέντρωση αντιοξειδωτικού από 50 mM έως 100 mM, σε όγκο 0.5 mL ιοντικού υγρού ή 1 mL οργανικού διαλύτη, που έχει προηγουμένως αφυδατωθεί με την προσθήκη 4Å μοριακών κόσκινων (για τουλάχιστον 120 h σε θερμοκρασία δωματίου). Ο μοριακός λόγος της αλκοόλης ως προς το αντιοξειδωτικό κυμαίνεται μεταξύ των τιμών 0.5 και 4. Οι αντιδράσεις ακυλίωσης καταλύονται από διάφορες ακινητοποιημένες λιπάσες (Novozym 435[®], Lipozyme TL IM, Lipolase 100T και Lipozyme RM IM σε συγκέντρωση ίση με 80 mg/mL), λυοφιλιωμένες λιπάσες (λιπάση B από *Candida antarctica* και λιπάση από *Rhizomucor miehei* σε συγκέντρωση ίση με 8 mg/mL ή 16 mg/mL, αντίστοιχα), ελεύθερες λιπάσες (λιπάση B από *Candida antarctica* και λιπάση από *Rhizomucor miehei*) διαλυτοποιημένες σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris/HCl 25 mM, pH 7.5 (τελική περιεκτικότητα νερού στο ιοντικό υγρό 2.5%) (συγκέντρωση ενζύμου 2 mg/mL ή 4 mg/mL, αντίστοιχα), ή

τέλος από CLEAs της λιπάσης B από *Candida antarctica* (συγκέντρωση ενζύμου 8 mg/mL). Το μίγμα της αντίδρασης τοποθετείται σε κλειστά φυαλίδια και επωάζεται σε ανακινούμενο επωαστήρα σε θερμοκρασία 60 ή 50°C (στην περίπτωση των οργανικών διαλυτών) υπό ανάδευση (250 rpm) και παρουσία 100 mg/mL 3Å μοριακών κόσκινων (μόνο στην περίπτωση απευθείας εστεροποίησης) για την απομάκρυνση του παραγόμενου νερού.

5.2.7.4 Ενζυμική αντίδραση σύνθεσης υβριδικών αντιοξειδωτικών

Η ενζυμική σύνθεση υβριδικών αντιοξειδωτικών της εσουλίνης, της σιλιμπίνης ή του β-D-γαλακτοπυρανοζιδίου της σιλιμπίνης, πραγματοποιείται σε συγκέντρωση 25 mM αντιοξειδωτικού, σε όγκο 0.25 mL ιοντικού υγρού, που έχει προηγουμένως αφυδατωθεί με την προσθήκη 4Å μοριακών κόσκινων (για τουλάχιστον 120 h σε θερμοκρασία δωματίου). Ως ακυλο-δότες χρησιμοποιούνται φαινολικά οξέα ή εστέρες φαινολικών οξέων σε συγκέντρωση 50 mM. Οι αντιδράσεις ακυλίωσης καταλύονται από ποσότητα 100 mg/mL Novozym 435® ή 40 mg/mL διασυνδεδεμένων ενζυμικών συσσωματωμάτων (CLEAs) των λιπασών A ή B από *Candida antarctica*. Το μίγμα της αντίδρασης τοποθετείται σε κλειστά φυαλίδια και επωάζεται σε ανακινούμενο επωαστήρα σε θερμοκρασία 60°C υπό ανάδευση (250 rpm).

Οι αντιδράσεις σύνθεσης υβριδικών αντιοξειδωτικών βιταμινών (ασκορβικό οξύ, πυριδοξίνη) πραγματοποιούνται σε συγκέντρωση βιταμίνης 20 mM, με χρήση του λιποϊκού οξέος ως ακυλο-δότη (200 mM), σε όγκο 0.25 mL ιοντικού υγρού που έχει προηγουμένως αφυδατωθεί με την προσθήκη 4Å μοριακών κόσκινων (για τουλάχιστον 120 h σε θερμοκρασία δωματίου). Οι αντιδράσεις σύνθεσης υβριδικών αντιοξειδωτικών καταλύονται από τη Novozym 435® (συγκέντρωση ενζύμου ίση με 80 mg/mL). Το μίγμα της αντίδρασης τοποθετείται σε κλειστά φυαλίδια και επωάζεται σε ανακινούμενο επωαστήρα σε θερμοκρασία 70°C υπό ανάδευση (650 rpm).

Σε όλες τις προαναφερόμενες περιπτώσεις παρασκευάζονται και τα αντίστοιχα τυφλά δείγματα, στα οποία δεν προστίθεται ένζυμο. Όλα τα πειράματα επαναλαμβάνονται εις τριπλούν και τα αποτελέσματα δίνονται ως ο μέσος όρος των τριών μετρήσεων.

5.2.7.5 Πειραματικός σχεδιασμός για την μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης

Η μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (RSM) χρησιμοποιήθηκε για τη μοντελοποίηση και βελτιστοποίηση της % απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης ακυλίωσης της ναριγκίνης από τον βινυλ-εστέρα του βουτυρικού οξέος, η οποία πραγματοποιείται στο [bmim]BF₄. Η

διεξαγωγή των πειραμάτων βασίζεται σε ένα σύνθετο σχεδιασμό που περιγράφεται από πέντε επίπεδα-τριών μεταβλητών και αποτελείται από ένα παραγοντικό σχεδιασμό (factorial design) και από ακραία σημεία σε απόσταση 1.68 από το κεντρικό σημείο (MODDE 7.0, Umetrics AB, Umeå, Sweden). Ο σχεδιασμός περιλαμβάνει 17 πειράματα (8 παραγοντικών σημείων, 3 κεντρικών σημείων και 6 ακραίων σημείων). Οι παράμετροι οι οποίες μελετώνται, τα επίπεδά τους (με κωδικούς 1, 0 και 1.68) και οι πραγματικές τιμές τους δίνονται στους **Πίνακες 5.1 και 5.2**. Στα κεντρικά σημεία πραγματοποιήθηκαν τρεις επαναλήψεις των πειραμάτων ώστε να προσδιοριστεί το καθαρό σφάλμα.

Πίνακας 5.1 Πρώτος πειραματικός σχεδιασμός για τη μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του ενζύμου (E), του μοριακού λόγου του βινυλ-εστέρα του βουτυρικού οξέος προς την ναριγκίνη (MR) και του χρόνου της αντίδρασης (RT) στην % απόδοση της αντίδρασης ακυλίωσης της ναριγκίνης.

A/A	E (mg/mL)*	MR*	RT (h)*
1	35 (-1)	3 (-1)	8 (-1)
2	75 (+1)	3 (-1)	8 (-1)
3	35 (-1)	10 (+1)	8 (-1)
4	75 (+1)	10 (+1)	8 (-1)
5	35 (-1)	3 (-1)	30 (+1)
6	75 (+1)	3 (-1)	30 (+1)
7	35 (-1)	10 (+1)	30 (+1)
8	75 (+1)	10 (+1)	30 (+1)
9	21.4 (-1.68)	6.5 (0)	19 (0)
10	88.6 (+1.68)	6.5 (0)	19 (0)
11	55 (0)	0.6 (-1.68)	19 (0)
12	55 (0)	12.4 (+1.68)	19 (0)
13	55 (0)	6.5 (0)	0.5 (-1.68)
14	55 (0)	6.5 (0)	37.5 (+1.68)
15	55 (0)	6.5 (0)	19 (0)
16	55 (0)	6.5 (0)	19 (0)
17	55 (0)	6.5 (0)	19 (0)

* Πραγματικές (και κωδικοποιημένες τιμές) των παραμέτρων

Πίνακας 5.2 Δεύτερος πειραματικός σχεδιασμός για τη μελέτη της επίδρασης του μοριακού λόγου του βινυλ-εστέρα του βουτυρικού οξέος προς την ναριγκίνη (MR), του χρόνου της αντίδρασης (RT) και της συγκέντρωσης της ναριγκίνης (N) στην % απόδοση της αντίδρασης ακυλίωσης της ναριγκίνης.

A/A	MR *	RT (h) *	N (mg/mL) *
1	7 (-1)	30 (-1)	50 (-1)
2	15 (+1)	30 (-1)	50 (-1)
3	7 (-1)	100 (+1)	50 (-1)
4	15 (+1)	100 (+1)	50 (-1)
5	7 (-1)	30 (-1)	90 (+1)
6	15 (+1)	30 (-1)	90 (+1)
7	7 (-1)	100 (+1)	90 (+1)
8	15 (+1)	100 (+1)	90 (+1)
9	4.3 (-1.68)	65 (0)	70 (0)
10	17.7 (+1.68)	65 (0)	70 (0)
11	11 (0)	6 (-1.68)	70 (0)
12	11 (0)	124 (+1.68)	70 (0)
13	11 (0)	65 (0)	36.4 (-1.68)
14	11 (0)	65 (0)	103.6 (+1.68)
15	11 (0)	65 (0)	70 (0)
16	11 (0)	65 (0)	70 (0)
17	11 (0)	65 (0)	70 (0)

* Πραγματικές (και κωδικοποιημένες τιμές) των παραμέτρων

Πολλαπλή ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης (multiple linear regression, MLR) πραγματοποιήθηκε (MODDE 7.0, Umetrics AB, Umeå, Sweden) ώστε οι πειραματικές τιμές της απόκρισης να αποδοθούν από το ακόλουθο πολυωνυμικό μοντέλο:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^3 \beta_i x_i + \sum_{i=1}^3 \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{i=1}^2 \sum_{j>i}^3 \beta_{ij} x_i x_j \quad (\text{Εξίσωση 1}),$$

όπου y είναι η απόκριση, x_i και x_j οι ανεξάρτητες μεταβλητές και β_0 , β_i , β_{ii} and β_{ij} οι συντελεστές παλινδρόμησης του μοντέλου (τομής, γραμμικός, δευτεροβάθμιος και αλληλεπίδρασης, αντίστοιχα).

5.2.7.6 Ποιοτική και ποσοτική ανάλυση των ενζυμικών αντιδράσεων

Η ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των αντιδρώντων και προϊόντων των ενζυμικών αντιδράσεων πραγματοποιείται μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης HPLC, σε υγρό

χρωματογράφο της εταιρείας Shimadzu (Japan), εφοδιασμένο με ανιχνευτή UV/Vis πολλαπλών διόδων (Diode array), ο οποίος ελέγχεται από το λογισμικό Shimadzu Class vp. (Japan) (Εικόνα 5.4).



Εικόνα 5.4 Εξαρτήματα του υγρού χρωματογράφου της εταιρείας Shimadzu.

Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα, οι ενζυμικές αντιδράσεις τερματίζονται με την διαλυτοποίηση του μίγματος σε μεθανόλη (αραίωση του μίγματος 1:2) και στη συνέχεια με απομάκρυνση του βιοκαταλύτη με φιλτράρισμα. Στην περίπτωση των αντιδράσεων όπου ο βιοκαταλύτης βρίσκεται με τη μορφή υδατικού διαλύματος, και δεν μπορεί να διαχωριστεί από το μίγμα, η προσθήκη της μεθανόλης εξασφαλίζει την αδρανοποίηση του ενζύμου. Το δείγμα στη συνέχεια φιλτράρεται και η σύστασή του αναλύεται μέσω υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC).

Στην περίπτωση της ανάλυσης των φλαβονοειδών, φαινολικών γλυκοσιδίων και της σιλιμίνης, η έκλουση γίνεται με βαθμίδωση από 10 έως 100% ενός συστήματος δύο διαλυτών, αποτελούμενο από ακετονιτρίλιο σε νερό-οξικό οξύ (0.1%), για 25 λεπτά. Η έκλουση πραγματοποιείται στους 27°C, με σταθερή ροή και ίση με 1 mL/min. Ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο φλαβονοειδές η ανίχνευση γίνεται στα 280, 275 ή 254 nm.

Στην περίπτωση των φαινολικών οξέων, πραγματοποιείται ισοκρατική έκλουση με 80% ή 50% ακετονιτρίλιο σε νερό-οξικό οξύ (0.1%), ανάλογα με την χρησιμοποιούμενη αλκοόλη, για 25 λεπτά. Η έκλουση πραγματοποιείται στους 27°C, με σταθερή ροή και ίση με 1 mL/min. Ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο φαινολικό οξύ η ανίχνευση γίνεται στα 280 ή 325 nm.

Στην περίπτωση της σύνθεσης υβριδικών αντιοξειδωτικών της σιλιμπίνης και της εσκουλίνης η έκλουση γίνεται με βαθμίδωση από 75% έως 20% ακετονιτρίλιου/οξικού οξέος/νερού (10:2:88) σε μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο, για 35 λεπτά. Η έκλουση πραγματοποιείται στους 27°C, με σταθερή ροή και ίση με 1 mL/min. Η ανίχνευση γίνεται στα 275 nm (για τη σιλιμπίνη) και 280 nm (για την εσκουλίνη).

Εναλλακτικά, στην περίπτωση υβριδικών αντιοξειδωτικών της σιλιμπίνης, πραγματοποιήθηκε ποιοτικός προσδιορισμός των συστατικών του μίγματος της αντίδρασης μέσω χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) χρησιμοποιώντας ως διαλύτη έκλουσης μίγμα χλωροφορμίου-ακετόνης-μυρμηκικού οξέος 9:2:1 (v/v/v). Οι αντίστοιχες ζώνες ανιχνεύονται υπό ακτινοβολία UV (254 nm) και ακολούθως με εμβάπτιση της πλάκας σε μεθανολικό διάλυμαθειϊκού οξέος 5% (v/v) και θέρμανση.

Στην περίπτωση της σύνθεσης υβριδικών αντιοξειδωτικών βιταμινών, η έκλουση γίνεται με βαθμίδωση από 75% έως 20% ενός συστήματος δύο διαλυτών, μεθανόλης σε νερό-οξικό οξύ (0.1%), για 30 λεπτά. Η έκλουση πραγματοποιείται στους 30°C, με σταθερή ροή και ίση με 1 mL/min. Η ανίχνευση γίνεται στα 292 nm στην περίπτωση της πυριδοξίνης και στα 254 nm στην περίπτωση του ασκορβικού οξέος.

Σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις οι συνολικές αποδόσεις των ενζυμικών αντιδράσεων προσδιορίζονται βάσει της μείωσης της ποσότητας του υποστρώματος (αντιοξειδωτικού) το οποίο χρησιμοποιείται σε έλλειμμα:

$$\alpha = \frac{P_t}{S_t + P_t} \text{ (Εξίσωση 2),}$$

όπου α η συνολική απόδοση της αντίδρασης, P_t το εμβαδόν της κορυφής του προϊόντος (ή το άθροισμα των κορυφών των προϊόντων) το οποίο παράγεται μετά από χρόνο αντίδρασης t και S_t το εμβαδόν της κορυφής του υποστρώματος το οποίο δεν έχει αντιδράσει μετά από χρόνο αντίδρασης t .

Στις περιπτώσεις εκείνες όπου παρατηρείται η σύνθεση δύο προϊόντων (μονοεστέρα και διεστέρα) η απόδοση ως προς το μονοεστέρα προσδιορίζεται βάσει της αύξησης της ποσότητας του και η απόδοση ως προς τον διεστέρα υπολογίζεται ως η διαφορά της απόδοσης ως προς το μονοεστέρα από τη συνολική απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης. Οι αποδόσεις εκφράζονται ως ποσοστά επί τοις εκατό (%).

Οι αρχικές ταχύτητες των αντιδράσεων υπολογίζονται από την κλίση στο γραμμικό τμήμα της καμπύλης αύξησης της συγκέντρωσης του παραγόμενου εστέρα με το χρόνο και εκφράζεται ως mmol προϊόντος $\text{h}^{-1} \text{ g}^{-1}$ βιοκαταλύτη.

5.2.7.7 Διαχωρισμός αντιδρώντων-Καθαρισμός ιοντικού υγρού

Για τον καθαρισμό του ιοντικού υγρού και την απομόνωση των συντιθέμενων παραγώγων αναπτύχθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν διάφορα πρωτόκολλα.

Στην περίπτωση των φαινολικών οξέων αρχικά το μίγμα της αντίδρασης φιλτράρεται προκειμένου να απομακρυνθεί το ενζυμικό σκεύασμα. Στη συνέχεια το μίγμα εκχυλίζεται με διαιθυλαιθέρα (5x10 mL) και η οργανική φάση η οποία περιέχει το φαινολικό οξύ και τον συντιθέμενο εστέρα συλλέγεται και εκχυλίζεται με κορεσμένο υδατικό διάλυμα όξινου ανθρακικού νατρίου, προκειμένου να απομακρυνθεί το φαινολικό οξύ (5x10 mL). Η οργανική φάση, η οποία περιέχει τον εστέρα του φαινολικού οξέος, συλλέγεται και ο διαιθυλεστέρας εξατμίζεται υπό κενό.

Στην περίπτωση των φλαβονοειδών αρχικά το μίγμα της αντίδρασης φιλτράρεται προκειμένου να απομακρυνθεί το ενζυμικό σκεύασμα. Στη συνέχεια το μίγμα εκχυλίζεται με *n*-εξάνιο (5x10 mL) για την απομάκρυνση της περίσσειας του άκυλο-δότη. Η εκχύλιση του φλαβονοειδούς και των εστέρων του από την φάση του ιοντικού υγρού πραγματοποιείται με τη χρήση του οξικού αιθυλεστέρα.

Στην περίπτωση των φαινολικών γλυκοσιδίων αρχικά το μίγμα της αντίδρασης φιλτράρεται προκειμένου να απομακρυνθεί το ενζυμικό σκεύασμα. Στη συνέχεια το μίγμα εκχυλίζεται με μίγμα μεθυλ-*tert*-βουτυλ αιθέρα (MTBE)-οξικού αιθυλεστέρα 2:1 (v/v) (5x10 mL).

Η απομόνωση εστέρων της σιλιμπίνης πραγματοποιείται μέσω παρασκευαστικής TLC χρησιμοποιώντας μίγμα πετρελαϊκού αιθέρα-αιθυλ-εστέρα του οξικού οξέος 3:2 (v/v) που περιείχε 5% (v/v) οξικό οξύ.

Η απομόνωση εστέρων βιταμινών πραγματοποιείται μέσω παρασκευαστικής TLC ή μέσω χρωματογραφίας στήλης χρησιμοποιώντας μίγμα χλωροφορμίου-μεθανόλης-μυρμηκικού οξέος 10:1:1 (v/v/v).

Σε όλες τις περιπτώσεις εστέρες υψηλής καθαρότητας λαμβάνονται μέσω ημι-παρασκευαστικής HPLC και με τη βοήθεια αυτοματοποιημένου συλλέκτη κλασμάτων (Fraction Collector, Shimadzu, Japan), ο οποίος ελέγχεται από το λογισμικό Shimadzu Class vp. (Japan). Η απομόνωση των ενζυμικά συντιθέμενων εστέρων των φυσικών αντιοξειδωτικών πραγματοποιείται σε στήλη Discovery C₁₈ ανάστροφης φάσης χρησιμοποιώντας τις προαναφερόμενες (§ 5.2.7.6) μεθόδους ανάλυσης, σε ροή 4 mL/min.

5.2.8 Μελέτες σταθερότητας των λιπασών σε ιοντικά υγρά

5.2.8.1 Μελέτη θερμικής σταθερότητας

Για την μελέτη της θερμικής σταθερότητας διαφόρων σκευασμάτων των λιπασών από *Candida antarctica* και *Rhizomucor miehei*, ποσότητα 80 mg/mL ή 160 mg/mL αυτών προστίθεται αντίστοιχα σε 100 μ L ιοντικού υγρού και τα δείγματα επωάζονται στους 30°C ή 60°C για χρονικά διαστήματα έως 120 h. Σε όλες τις περιπτώσεις τα ιοντικά υγρά είχαν προαφυδατωθεί με την προσθήκη 4Å μοριακών κόσκινων (για τουλάχιστον 120 h σε θερμοκρασία δωματίου).

Η εναπομείνασα δραστηριότητα προσδιορίζεται μέσω της αντίδρασης υδρόλυσης του βουτυλ-εστέρα της *p*-νιτροφαινόλης (pNPB). Η ενζυμική αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη stock διαλύματος pNPB σε DMSO, στα φυαλίδια όπου περιέχεται η λιπάση και το ιοντικό υγρό (τελική συγκέντρωση pNPB στο ιοντικό υγρό 50 mM). Το μίγμα αντίδρασης επωάζεται στους 40°C υπό ανάδευση (700 rpm). Ανά 2.5 min και για χρονικό διάστημα 30 min λαμβάνονται από το μίγμα της αντίδρασης 2.5 μ L, τα οποία προστίθενται σε μίγμα ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 25 mM, pH 7.5-DMSO 1:1 (v/v) (τελικός όγκος 200 μ L) που περιέχεται σε μικροπλάκα πολυστυρενίου 96 θέσεων. Η ενζυμική υδρόλυση του pNPB προς *p*-νιτροφαινόλη παρακολουθείται σε φωτόμετρο Plate reader της εταιρείας Digital and Analog Systems (DAS), παράλληλα με τυφλό δείγμα στο οποίο δεν έχει προστεθεί ένζυμο. Όλα τα πειράματα πραγματοποιούνται εις τριπλούν. Η δραστηριότητα του ενζύμου προσδιορίζεται βάσει της αρχική ταχύτητας της αντίδρασης, όπως αυτή υπολογίζεται από τη κλίση του γραμμικού τμήματος της καμπύλης της αύξησης της απορρόφησης της *p*-νιτροφαινόλης συναρτήσει του χρόνου. Η εναπομείνασα δραστηριότητα εκφράζεται ως ποσοστό % της δραστηριότητας μετά από επώαση του ενζύμου στο ιοντικό υγρό σε μία θερμοκρασία σε σχέση με την αρχική δραστηριότητα του ενζύμου ($t=0$ h) στην ίδια θερμοκρασία.

5.2.8.2 Μελέτη σταθερότητας λιπασών προ-επωασμένων σε ιοντικά υγρά (ionic liquid pretreated)

Για την μελέτη της σταθερότητας λυοφιλιωμένων λιπασών από *Candida antarctica* και *Rhizomucor miehei*, ποσότητα 80 mg/mL ή 160 mg/mL αυτών προστίθεται αντίστοιχα σε 25 μ L ιοντικού υγρού και τα δείγματα επωάζονται στους 30°C ή 60°C για χρονικά διαστήματα έως 120 h. Σε όλες τις περιπτώσεις τα ιοντικά υγρά είχαν προαφυδατωθεί με την προσθήκη 4Å μοριακών κόσκινων (για τουλάχιστον 120 h σε θερμοκρασία δωματίου). Στη

συνέχεια τα μίγματα ενζύμου - ιοντικού υγρού επαναιωρούνται σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 25 mM, pH 7.5.

Η εναπομείνασα δραστικότητα προσδιορίζεται μετά την επαναιώρηση του ενζύμου στο υδατικό διάλυμα, μέσω της αντίδρασης υδρόλυσης του βουτυλ-εστέρα της *p*-νιτροφαινόλης (pNPB). Σε κυψελίδα χαλαζία προστίθενται 25 μ L ή 100 μ L (στην περίπτωση της λιπάσης από *Rhizomucor miehei*) του προαναφερόμενου υδατικού διαλύματος, στο οποίο περιέχεται το ένζυμο, και ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 25 mM, pH 7.5 μέχρι τελικό όγκο 1 mL (τελική περιεκτικότητα σε ιοντικό υγρό 0.25% και 0.5% στην περίπτωση της RmL). Η αντίδραση υδρόλυσης ξεκινά με την προσθήκη ποσότητας stock διαλύματος pNPB σε DMSO (τελική συγκέντρωση pNPB 0.5 mM).

Η σύνθεση της *p*-νιτροφαινόλης παρακολουθείται σε θερμοστατούμενο φωτόμετρο διπλής δέσμης της εταιρείας Shimadzu (Japan), το οποίο ελέγχεται από κατάλληλο λογισμικό, παράλληλα με τυφλό δείγμα στο οποίο δεν έχει προστεθεί ένζυμο. Όλα τα πειράματα πραγματοποιούνται εις τριπλούν. Η δραστικότητα του ενζύμου προσδιορίζεται βάσει της αρχική ταχύτητας της αντίδρασης, όπως αυτή υπολογίζεται από τη κλίση του γραμμικού τμήματος της καμπύλης της αύξησης της απορρόφησης της *p*-νιτροφαινόλης συναρτήσει του χρόνου. Η εναπομείνασα δραστικότητα εκφράζεται ως ο λόγος της δραστικότητας μετά από επώαση του ενζύμου στο ιοντικό υγρό σε μία θερμοκρασία προς την αρχική δραστικότητα του ενζύμου ($t=0$ h) στην ίδια θερμοκρασία.

5.2.8.3 Μελέτη λειτουργικής σταθερότητας

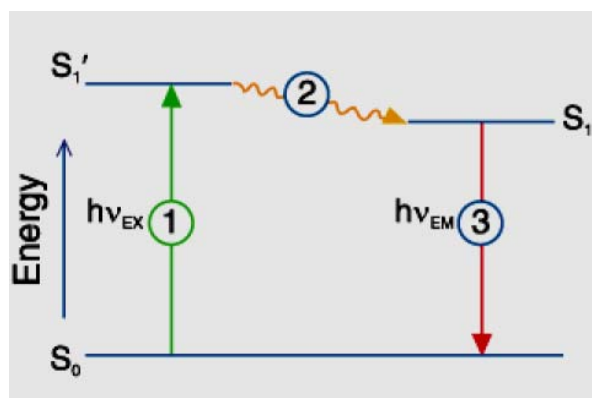
Για τη μελέτη της σταθερότητας επαναχρησιμοποίησης των ακινητοποιημένων ενζύμων (Novozym 435[®], Lipozyme RMIM), 80 mg/mL ακινητοποιημένου ενζύμου προστίθεται σε φυαλίδιο που περιέχει ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ και υποστρώματα, κινναμωμικό οξύ (50 mM) και οκτανόλη (50 mM). Πραγματοποιούνται επτά συνεχόμενοι κύκλοι αντίδρασης (24 h ανά κύκλο) στους 60°C υπό ανάδευση (250 rpm). Μετά το τέλος κάθε κύκλου το μίγμα της αντίδρασης εκχυλίζεται με διαιθυλαιθέρα (5 x 1 mL) προκειμένου να απομακρυνθούν τα υποστρώματα και το προϊόν. Στη συνέχεια στο ιοντικό υγρό όπου περιέχεται η ακινητοποιημένη λιπάση, προστίθεται διχλωρομεθάνιο και το ένζυμο απομακρύνεται με φιλτράρισμα. Η απομάκρυνση όποιας περίσσειας οργανικού διαλύτη από το ένζυμο πραγματοποιείται υπό κενό και η λιπάση προστίθεται σε νέο διάλυμα υποστρωμάτων σε ιοντικό υγρό για την έναρξη νέου κύκλου αντίδρασης. Ο υπολογισμός της

απόδοσης της αντίδρασης μετά από κάθε κύκλο αντίδρασης γίνεται μέσω HPLC, όπως αναφέρεται στην Παράγραφο 5.2.7.6.

5.2.9 Δομικές μελέτες των λιπασών σε ιοντικά υγρά

5.2.9.1 Μελέτες μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού

Θεωρητικό υπόβαθρο: Η διαδικασία στην οποία οφείλεται ο φθορισμός των ενώσεων απεικονίζεται σχηματικά στην **Εικόνα 5.5**. Σε ένα πρώτο στάδιο η φθορίζουσα ένωση διεγείρεται προς μία ανώτερη ηλεκτρονιακή κατάσταση S_1' μέσω της προσφοράς ενός φωτονίου. Η ένωση παραμένει σε αυτή την διεγερμένη κατάσταση μόνο για κάποια nanosec και στο διάστημα αυτό υφίσταται διάφορες δομικές αλλαγές και υπόκειται σε ποικίλων ειδών αλληλεπιδράσεις με το μοριακό της περιβάλλον. Τελικά μεταβαίνει σε μία νέα κατάσταση S_1 . Η εκπομπή φωτονίου επαναφέρει την φθορίζουσα ένωση στην αρχική κατάσταση S_0 . Ωστόσο η απώλεια ενέργειας κατά τη μετάβαση στην κατάσταση S_1 οδηγεί σε μείωση του φωτονίου εκπομπής σε σχέση με εκείνου της διέγερσης και συνεπώς σε υψηλότερο μήκος κύματος κατά την εκπομπή.



Εικόνα 5.5 Σχηματική απεικόνιση του φαινομένου του φθορισμού. Στο στάδιο 1 η ένωση προσλαμβάνει φωτόνια και μεταβαίνει στη διεγερμένη κατάσταση S_1' . Στο στάδιο 2 παρατηρείται απώλεια ενέργειας προς μία νέα κατάσταση S_1 από την οποία στο στάδιο 3 η ένωση επιστρέφει στην αρχική κατάσταση S_0 μέσω εκπομπής φωτονίων.

Στις πρωτεΐνες απαντώνται τρία αμινοξέα με εγγενείς φθορίζουσες ιδιότητες, η φαινυλαλανίνη (Phe), η τυροσίνη (Tyr) και η τρυπτοφάνη (Trp). Εξ' αυτών, οι περισσότερες μελέτες αφορούν την Tyr και Trp των οποίων η κβαντική ενέργεια (εκπεμπόμενα φωτόνια/διεγερμένα φωτόνια) είναι αρκετά υψηλή ώστε να δίνει ένα ικανοποιητικό σήμα φθορισμού. Σε μήκος κύματος 280 nm διεγείρονται τόσο η Trp, όσο και η Tyr. Για την εκλεκτική διέγερση της Trp χρησιμοποιούνται τα 295 nm.

Τα σήματα φθορισμού που μπορούν να προσδιοριστούν είναι η ένταση του φθορισμού I (σε συγκεκριμένα μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής), το μέγιστο εκπομπής $\lambda_{\max}$ (μήκος κύματος εκπομπής στο οποίο η ένταση φθορισμού είναι μέγιστη) κ.α [Eftink, 2002]. Τα φάσματα φθορισμού των καταλοίπων Tyr και Trp μπορούν να παρέχουν πληροφορίες για τις δομικές αλλαγές που υφίστανται οι πρωτεΐνες κατά την αποδιάταξή τους. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι η ένταση I και το $\lambda_{\max}$ επηρεάζονται από το περιβάλλον των καταλοίπων, το οποίο μεταβάλλεται κατά την αποδιάταξη των πρωτεϊνικών μορίων [Monsellier & Bedouelle, 2005]. Οι Trp, για παράδειγμα, που είναι πλήρως εκτεθειμένες στο διαλύτη (νερό) οδηγούν σε ένα μέγιστο εκπομπής $\lambda_{\max} \approx 350$ nm, μερικώς εκτεθειμένες στο διαλύτη οδηγούν σε $\lambda_{\max} \approx 340$ nm, θαμμένες στο εσωτερικό της πρωτεΐνης αλλά αλληλεπιδρώντας με γειτνιάζουσες πολικές ομάδες σε $\lambda_{\max} \approx 315$ -330 nm, και πλήρως θαμμένες στο μη πολικό εσωτερικό των πρωτεϊνών σε $\lambda_{\max} \approx 308$ nm. Έτσι λοιπόν κατά την αποδιάταξη των πρωτεϊνών παρατηρείται αύξηση της τιμής του $\lambda_{\max}$ (red-shift), ενώ όταν η πρωτεΐνη υιοθετεί μία περισσότερο συμπαγή δομή τότε παρατηρείται μείωση της τιμής του $\lambda_{\max}$ (blue-shift) [Eftink, 1994]. Σε αντίθεση με το σήμα $\lambda_{\max}$, η μέγιστη τιμή της έντασης του φθορισμού $I_{\max}$ δεν μπορεί εύκολα να συσχετιστεί με την αλλαγή της δομής των πρωτεϊνών. Η παράμετρος αυτή εξαρτάται σημαντικά από τη συγκέντρωση της φθορίζουσας ένωσης (σε αντίθεση με το $\lambda_{\max}$) και άρα υπόκειται σε πειραματικά σφάλματα, και επιπλέον μπορεί να επηρεάζεται από φαινόμενα απόσβεσης φθορισμού (fluorescence quenching) από γειτνιάζουσες ομάδες αμινοξέων, άλλες ενώσεις στο δείγμα ή και από τον διαλύτη [Santoro & Bolen, 1988, Tan et al., 1998, Dumoulin et al., 2002, Monsellier & Bedouelle, 2005].

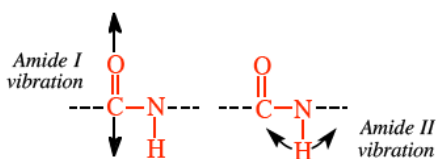
Πειραματική διαδικασία : Η φθορισμομετρική ανάλυση της λιπάσης B από *Candida antarctica* (CaLB) και της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* (RmL) πραγματοποιήθηκε σε φασματοφθορισμόμετρο RF-1301PC (Shimadzu, Japan) ελεγχόμενο από λογισμικό της εταιρίας Shimadzu (Japan). Ποσότητες 2.5 ή 5 μ L ενζυμικών διαλυμάτων των λιπασών προστέθηκαν σε 1 mL τελικό όγκο ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 25mM, pH 7.5, ή 500 μ L ιοντικού υγρού (τελική συγκέντρωση CaLB, RmL 0.2 mg/mL και 0.4 mg/mL, αντίστοιχα, στην περίπτωση του νερού και 0.4 mg/mL και 0.8 mg/mL, αντίστοιχα, στην περίπτωση του ιοντικού υγρού). Τα δείγματα επωάζονται στους 30 ή 60°C για χρονικά διαστήματα έως 24 h και στη συνέχεια μεταφέρονται σε κυψελίδα χαλαζία, όπου διεγείρονται στα 295 nm. Το φάσμα των λιπασών καταγράφεται σε εύρος από 300 έως 400 nm, χρησιμοποιώντας slit διέγερσης (excitation slit) ίσο με 3 nm και slit εκπομπής (emission slit) ίσο με 5 nm. Στην

περίπτωση του ιοντικού υγρού ήταν απαραίτητη η αφαίρεση του τυφλού φάσματος (απουσία ενζύμου) ώστε να εξαιρεθεί η επίδραση του φθορισμού του διαλύτη από το φάσμα φθορισμού του ενζύμου.

Στην περίπτωση των προ-επωασμένων σε ιοντικό υγρό λιπάσων, τα δείγματα ετοιμάζονται όπως περιγράφεται στην Παράγραφο 5.2.8.2 και επωάζονται για χρονικά διαστήματα έως 24 h. Ποσότητες 2.5 και 5 μL (στην περίπτωση της λιπάσης από *Rhizomucor miehei*) προστίθενται σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl 25mM, pH 7.5 σε κυβέτα χαλαζία (τελική συγκέντρωση ιοντικού υγρού 0.25 και 0.5%, αντίστοιχα). Τα δείγματα διεγείρονται στα 295 nm. Η εκπομπή καταγράφηκε σε εύρος από 300 έως 400 nm, χρησιμοποιώντας διαφορετικά slit διέγερσης (excitation slit) 5-15 nm και slit εκπομπής (emission slit) 10 ή 15 nm. Σε όλες τις περιπτώσεις ήταν απαραίτητη η αφαίρεση του τυφλού φάσματος (απουσία ενζύμου) ώστε να εξαιρεθεί η επίδραση του φθορισμού του διαλύτη (υδατικό διάλυμα ιοντικού υγρού) από το φάσμα φθορισμού του ενζύμου.

5.2.9.2 Μελέτες μέσω φασματοσκοπίας υπέρυθρου (FTIR)

Θεωρητικό υπόβαθρο : Η φασματοσκοπία υπέρυθρου (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την ανάλυση της δομής των πρωτεϊνών, μέσω του οποίου εξάγονται πληροφορίες για τη δευτεροταγή δομή τους [Gallagher, 2005, Hammes, 2005a]. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου περιλαμβάνει την ακτινοβολία ενός δείγματος με υπέρυθρη ακτινοβολία και την ανίχνευση των μηκών κύματος της ακτινοβολίας στην υπέρυθρη περιοχή του φάσματος που απορροφούνται από το δείγμα. Χαρακτηριστικές ζώνες του φάσματος των πρωτεϊνών αποτελούν οι επονομαζόμενες περιοχές των Amide I, II και III. Αυτές οι ζώνες προέρχονται από τους σχηματιζόμενους μεταξύ των αμινοξικών καταλοίπων πεπτιδικούς δεσμούς. Πιο συγκεκριμένα, η απορρόφηση στην περιοχή Amide I συνδέεται με την έκταση του δεσμού C=O των αμινοξέων, στην περιοχή Amide II και III με την κάμψη του δεσμού N-H, και την έκταση του δεσμού C-N (Εικόνα 5.6) [Gallagher, 2005].



Εικόνα 5.6 Δονήσεις υπεύθυνες για την εμφάνιση των περιοχών Amide I και III στο υπέρυθρο φάσμα των πρωτεϊνών.

Καθώς και οι τρεις αυτοί δεσμοί συμμετέχουν στο σχηματισμό δεσμών μεταξύ των διαφορετικών στοιχείων της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών, συνεπώς οι περιοχές Amide I, II και III σχετίζονται με την παρουσία των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής. Η περιοχή Amide II ($1380\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$), υστερεί έναντι των άλλων ως προς τη δυνατότητα ποσοτικοποίησης των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών, ενώ οι περιοχές Amide I ($1600\text{-}1700\text{ cm}^{-1}$) και III ($1215\text{-}1335\text{ cm}^{-1}$), χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανάλυση της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών. Ωστόσο, εξαιτίας της αλληλοεπικάλυψης των μεμονωμένων κορυφών, οι οποίες αντιστοιχούν στα διαφορετικά στοιχεία δευτεροταγούς δομής στις περιοχές amide I και III, απαιτείται η χρήση κατάλληλων μεθόδων ανάλυσης για την διάκριση μεταξύ των διαφορετικών κορυφών και την ποσοτικοποίησή τους [Byler & Susi, 1986, Dong *et al.*, 1990].

Συνοψίζοντας βιβλιογραφικά δεδομένα ανάλυσης της δομής ποικίλων πρωτεϊνών μέσω FTIR [Surewicz & Mantsch, 1988, Görne-Tschelnokow *et al.*, 1993, Kim *et al.*, 1994, Dong *et al.*, 1995, Xu *et al.*, 1997, van de Weert *et al.*, 2001, Barth & Zscherp, 2002, Mizutani *et al.*, 2003, Barth, 2007, Foresti *et al.*, 2009] η ανάθεση των διαφόρων στοιχείων δευτεροταγούς δομής (α -έλικα, β -πτυχή, β -στροφή, τυχαίο σπείραμα) παρατίθεται στον **Πίνακα 5.3**. Πρέπει να σημειωθεί πως η ανάθεση των στοιχείων αυτών στη βιβλιογραφία αφορά συνήθως περιοχές και όχι μεμονωμένες κορυφές. Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί πως τμήματα με όμοια δομή δεν εμφανίζουν απαραίτητα κορυφές με ακριβώς ίδιες συχνότητες και ότι αυτές μπορούν να διαφοροποιούνται έως και κατά 15 cm^{-1} [Byler & Susi, 1986].

Πίνακας 5.3 Σύνοψη βιβλιογραφικών δεδομένων για την ανάθεση των στοιχείων δευτεροταγούς δομής πρωτεϊνών μέσω της ανάλυσης φασμάτων FTIR στην περιοχή amide I.

Κυματάριθος (cm^{-1})	Ανάθεση
1620-1628	Ενδομοριακά β -συσσωματώματα
1629-1632	β -πτυχές
1636-1640	β -πτυχές
1645-1657	Τυχαίο σπείραμα
1648-1652	α -έλικα
1655-1658	α -έλικα
1668-1674	β -στροφές
1681-1683	β -στροφές, β -πτυχές
1684-1696	β -πτυχές, αντιπαράλληλα β -φύλλα

Πειραματική διαδικασία : Τα φάσματα IR των διαφόρων σκευασμάτων της λιπάσης B από *Candida antarctica* και της λιπάσης από *Rhizomucor miehei*, λαμβάνονται σε φασματοφωτόμετρο Perkin Elmer Spectrum BX (USA) εφοδιασμένο με ανιχνευτή DTGS (Deuterated Triglycine Sulfate). Το σύστημα ελέγχεται από λογισμικό Perkin Elmer Spectrum. Σε όλες τις περιπτώσεις τα φάσματα λαμβάνονται με τη χρήση εξαρτήματος εξασθενημένης ολικής ανάκλασης (Attenuated Total Reflection, ATR). Το εσωτερικό στοιχείο ανάκλασης του ATR αποτελείται από κρύσταλλο ZnSe. Στον κρύσταλλο προστίθεται ποσότητα ιοντικού υγρού ή νερού ίση με 500 μL και ποσότητες ακινητοποιημένου, λυοφιλιωμένου ή υδατικού διαλύματος των λιπασών σε τελική συγκέντρωση ενζύμου 80 mg/mL ακινητοποιημένης, 20 mg/mL λυοφιλιωμένης και 5 mg/mL ελεύθερης λιπάσης. Στην περίπτωση της ελεύθερης λιπάσης, προστίθεται ποσότητα υδατικού διαλύματος της λιπάσης ώστε η τελική περιεκτικότητα του ιοντικού υγρού σε νερό να ισούται με 5.0% κ.ο. Σε όλες τις περιπτώσεις τα ιοντικά υγρά είχαν προαφυδατωθεί με την προσθήκη 4Å μοριακών κόσκινων (για τουλάχιστον 120 h σε θερμοκρασία δωματίου). Στην περίπτωση των λυοφιλιωμένων λιπασών αναλύθηκαν επίσης δείγματα αυτών σε KBr. Ποσότητα 1 mg της λιπάσης αναμίχθηκε με 300 mg KBr και το μίγμα πιέζεται σε δισκίο με τη χρήση υδραυλικής πρέσας. Η παρασκευή των δισκίων KBr έχει δείχθει πως δεν επηρεάζει την πρωτεΐνη [Prestrelski *et al.*, 1993a].

Τα φάσματα λαμβάνονται στην περιοχή από 4000-700 cm^{-1} ως ο μέσος όρος 32 σαρώσεων σε ανάλυση 2 cm^{-1} . Κάθε δείγμα αναλύεται εις τριπλούν. Τα φάσματα στην περίπτωση των υδατικών διαλυμάτων διορθώνονται μέσω της αφαίρεσης του φάσματος του νερού, ακολουθώντας το κριτήριο απαλοιφής της κορυφής στα 3400-3200 cm^{-1} ώστε να προκύψει μία ευθεία γραμμή τάσης. Για τα πειράματα μέσω της παρασκευής δισκίων KBr, το σήμα του KBr δισκίου απουσία του ενζύμου αναλύεται υπό τις ίδιες συνθήκες και αφαιρείται από το πρωτεϊνικό φάσμα.

Ο χειρισμός των φασμάτων πραγματοποιείται μέσω του προγράμματος OriginPro 8.0. Τα φάσματα αναλύονται σε όλες τις περιπτώσεις μέσω της δεύτερης παραγώγου ώστε να καθοριστεί ο αριθμός και η θέση των κορυφών στην περιοχή του amide I.

Για την ποσοτικοποίηση του βαθμού ομοιότητας μεταξύ των φασμάτων δεύτερης παραγώγου, προσδιορίζεται ο συντελεστής συσχέτισης r [Prestrelski *et al.*, 1993a]:

$$r = \frac{\sum x_i y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}} \quad (\text{Εξίσωση 3})$$

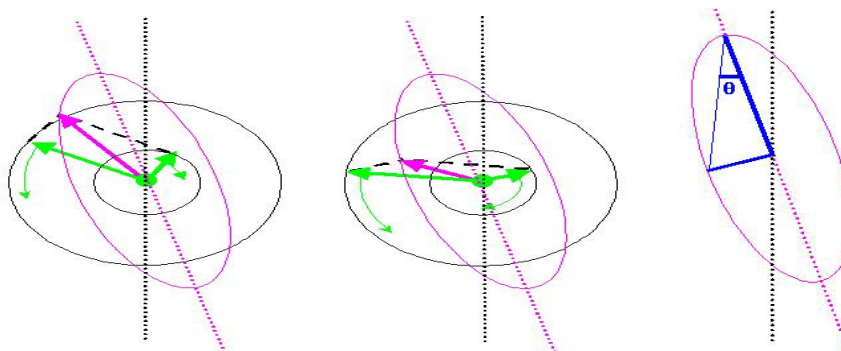
όπου, x_i και y_i οι τιμές απορρόφησης του φάσματος αναφοράς και του φάσματος του δείγματος για κάθε τιμή συχνότητας i . Οι x και y αντιμετωπίζονται ως ανεξάρτητες μεταβλητές. Για τον προσδιορισμό του συντελεστή r λαμβάνονται υπόψη όλες οι τιμές απορρόφησης του ομαλοποιημένου φάσματος δεύτερης παραγώγου στην περιοχή από 1700-1600 cm^{-1} , η οποία αντιστοιχεί στην περιοχή amide I.

Η μέθοδος αυτή θεωρείται ικανοποιητική για τη σύγκριση φασμάτων πρωτεϊνών σε διαφορετικά περιβάλλοντα. Στην παρούσα μελέτη ο συντελεστής r χρησιμοποιείται για τη σύγκριση των φασμάτων διαφόρων ενζυμικών σκευασμάτων (ελεύθερο, λυοφιλιωμένο, ακινητοποιημένο) της λιπάσης B από *Candida antarctica* και της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* σε ιοντικά υγρά με αυτό των δύο λιπασών στο νερό. Στην περίπτωση των λυοφιλιωμένων λιπασών σε ιοντικά υγρά ως φάσμα αναφοράς λαμβάνεται και εκείνο των λυοφιλιωμένων σκευασμάτων σε KBr.

Στην περίπτωση όμοιων φασμάτων η τιμή του συντελεστή r θα ισούται με 1.0. Αντίθετα, διαφορετικά φάσματα θα οδηγήσουν σε μικρότερες τιμές του συντελεστή r .

5.2.9.3 Μελέτες μέσω κυκλικού διχρωισμού

Θεωρητικό υπόβαθρο : Το φαινόμενο του κυκλικού διχρωισμού παρατηρείται όταν μία ουσία απορροφά διαφορετικά την δεξιά συνιστώσα του πολωμένου φωτός σε σχέση με την αριστερή συνιστώσα σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος.



Εικόνα 5.7 Μία ακτίνα πολωμένου φωτός (με μωβ χρώμα) μπορεί να περιγραφεί από δύο ανύσματα (με πράσινο χρώμα). Η ένταση των δύο ανυσμάτων είναι διαφορετική εξαιτίας της διαφορετικής απορρόφησης του δεξιά και αριστερά πολωμένου φωτός. Η αλλαγή της έντασης του μωβ ανύσματος προκαλεί την περιστροφή των πράσινων ανυσμάτων προς αντίθετες κατευθύνσεις, με αποτέλεσμα να διαγράφεται μία ελλειπτική τροχιά. Ο λόγος του μικρού προς το μεγάλο άξονα της έλλειψης αποτελεί τη γωνία θ (μπλε χρώμα). Η γωνία θ αποτελεί την «ελλειπτικότητα».

Συνεπώς, ο κυκλικός διχρωσμός είναι η διαφορά της απορρόφησης ανάμεσα στην αριστερή και δεξιά συνιστώσα του κυκλικά πολωμένου φωτός σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος [Hammes, 2005b].

Το άθροισμα των εντάσεων των δύο συνιστωσών του φωτός αν απεικονιστεί σε διαφορετικές χρονικές στιγμές διαγράφει μία ελλειπτική τροχιά, εξαιτίας της ανισότητας των δύο συνιστωσών (**Εικόνα 5.7**).

Ο λόγος του μικρού προς το μεγάλο άξονα της έλλειψης αποτελεί εξ' ορισμού την εφαπτομένη της γωνίας θ . Η γωνία αυτή αποτελεί την ελλειπτικότητα (ellipticity), η οποία είναι ευθέως ανάλογη του κυκλικού διχρωσμού (CD), και συνδέεται με αυτόν μέσω της σχέσης,

$$\theta = 32.98 \text{ CD}$$

Προκειμένου, να εξαιρεθούν οι επιδράσεις του μήκους της κυψελίδας και της συγκέντρωσης του δείγματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μοριακή ελλειπτικότητα, η οποία ορίζεται ως,

$$[\theta] = 100 \theta / C \cdot l,$$

όπου C η μοριακότητα του δείγματος και l το μήκος της κυψελίδας. Οι μονάδες της μοριακής ελλειπτικότητας είναι,

$$100 \text{ deg dm}^3 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} = 100 \text{ deg dm}^3 / 1000 \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1} = 100 \text{ deg cm}^2 / 10 \text{ mol}^{-1} =$$

$$\text{deg cm}^2 \text{ dmol}^{-1}$$

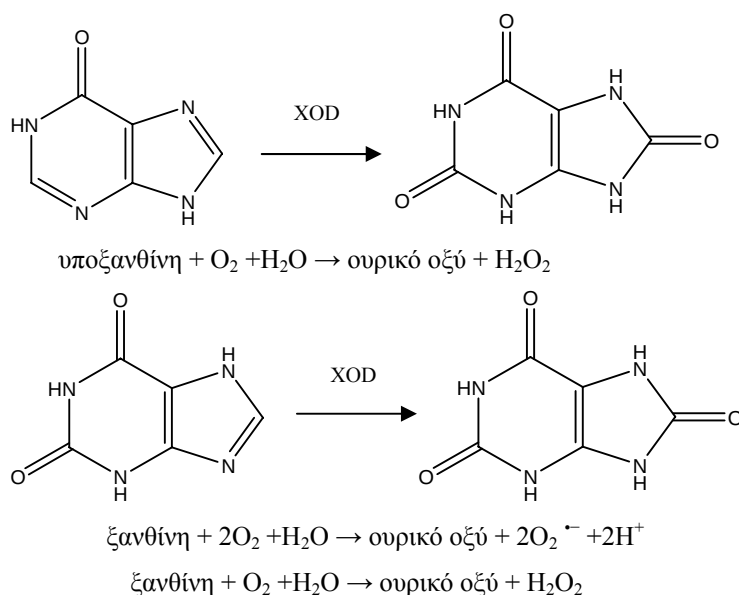
Ο κυκλικός διχρωσμός αποτελεί μία τεχνική η οποία έχει χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για το δομικό χαρακτηρισμό των πρωτεϊνών. Η δυνατότητα αξιοποίησης αυτής της τεχνικής βασίζεται στο γεγονός πως από το άπω-υπεριώδες φάσμα (far-UV) του κυκλικού διχρωσμού μπορούν να εξαχθούν πληροφορίες για τη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών [Hammes, 2005b]. Ο προσδιορισμός και η ποσοτικοποίηση των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής βασίζεται σε μεθόδους που χρησιμοποιούν μία σειρά πρότυπων πρωτεϊνικών μορίων, των οποίων η δευτεροταγής δομή έχει καθοριστεί μέσω δεδομένων κρυσταλλογραφίας. Έτσι, σε πρωτεΐνες πλούσιες σε β -πτυχές, όπως η κονκαβαλίνη, έχει παρατηρηθεί μία χαρακτηριστική θετική κορυφή στα 195 nm και ένα ελάχιστο στα 215 nm. Πρωτεΐνες πλούσιες σε α -έλικες, όπως η μυογλοβίνη, δίνουν ένα χαρακτηριστικό φάσμα με μέγιστο στα 190 nm και ελάχιστο στα 208 και 220 (ή 222) nm [Rogers & Hirst, 2004].

Πειραματική διαδικασία : Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού στο άπω-υπεριώδες (200-260 nm) λαμβάνονται σε φασματοπολαρίμετρο Jasco J-815 (Japan) εφοδιασμένο με σύστημα Peltier για έλεγχο της θερμοκρασίας. Στην περίπτωση των υδατικών διαλυμάτων των ενζύμων χρησιμοποιείται κυβέτα χαλαζία μήκους 1.0 cm, ενώ στην περίπτωση των ιοντικών υγρών χρησιμοποιείται κυβέτα χαλαζία μήκους 0.1 cm. Τα φάσματα λαμβάνονται με εύρος (bandwidth) 2 nm και σε ταχύτητα σάρωσης 10 nm/min. Σε όλες τις περιπτώσεις λαμβάνονται και τα αντίστοιχα φάσματα του μέσου απουσία ενζύμου, τα οποία αφαιρούνται από το φάσμα της πρωτεΐνης. Η συγκέντρωση της λιπάσης B από *Candida antarctica* και της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* κυμαίνεται από 0.4 έως 1.2 mg/mL. Η ποσοτικοποίηση των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής των λιπασών γίνεται μέσω του προγράμματος DICHROPROT 2000 (<http://dicroprot-pbil.ibcp.fr>) [Deleage & Geourion, 1993] χρησιμοποιώντας τον αλγόριθμο SELCON 2 [Sreerama & Woody, 1993].

5.2.10 Μελέτη αντιοξειδωτικής δράσης των συντιθέμενων παραγώγων - Ικανότητα αναστολής της δράσης οξειδωτικών ενζύμων

5.2.10.1 Αναστολή της δράσης της οξειδάσης της ξανθίνης

Η οξειδάση της ξανθίνης είναι μία πολύπλοκη μολυβδοφλαβοπρωτεΐνη, η οποία οδηγεί στην παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων δραστικών ριζών υπεροξειδίου και υπεροξειδίου του υδρογόνου, μέσω της αντίδρασης οξείδωσης της ξανθίνης ή της υποξανθίνης σε ουρικό οξύ (Εικόνα 5.8) [Hille & Nishino, 1995, Harris *et al.*, 1999].



Εικόνα 5.8 Αντιδράσεις οι οποίες καταλύονται από την οξειδάση της ξανθίνης.

Η δραστηριότητα της οξειδάσης της ξανθίνης προσδιορίζεται φωτομετρικά μέσω της παραγωγής ουρικού οξέος με μέτρηση στα 295 nm. Σε κυψελίδα προστίθενται 400 μL υδατικού διαλύματος υποξανθίνης (σε ρυθμιστικό διάλυμα NaH_2PO_4 100 mM, pH 7.4, συγκέντρωσης 1 mM) η οποία αποτελεί το υπόστρωμα (τελική συγκέντρωση 0.4 mM) και 595 μL από το ρυθμιστικό διάλυμα. Το μίγμα επωάζεται για 5 min στους 37°C. Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη, 5 μL υδατικού διαλύματος (ρυθμιστικό διάλυμα NaH_2PO_4 100 mM, pH 7.4) οξειδάσης της ξανθίνης (τελική ποσότητα 1 U/mL). Η ενζυμική αντίδραση πραγματοποιείται στους 37°C και παρακολουθείται για χρόνο 8 min.

Για τη μελέτη της δυνατότητας αναστολής του ενζύμου από διάφορα φυσικά αντιοξειδωτικά και τα ενζυμικά συντιθέμενα λιπόφιλα παράγωγά τους, παρασκευάζονται διαλύματα συγκέντρωσης 1 mM των ενώσεων αυτών σε ρυθμιστικό διάλυμα NaH_2PO_4 100 mM, pH 7.4 (στην περίπτωση των λιπόφιλων εστέρων των φυσικών αντιοξειδωτικών στο υδατικό διάλυμα προστίθεται 1 % Tween 20). Από τα διαλύματα αυτά προστίθενται στο μίγμα της αντίδρασης διαφορετικές ποσότητες ώστε να λαμβάνονται τελικές συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικού από 5 έως 1000 μM .

Για όλες τις υπό μελέτη περιπτώσεις παρασκευάζονται και τα αντίστοιχα τυφλά δείγματα, στα οποία δεν προστίθεται ένζυμο. Όλα τα πειράματα επαναλαμβάνονται εις τριπλούν και τα αποτελέσματα δίνονται ως ο μέσος όρος των τριών μετρήσεων.

Η αναστολή της οξειδάσης της ξανθίνης από τα φυσικά αντιοξειδωτικά και τα ενζυμικά συντιθέμενα λιπόφιλα παράγωγά τους υπολογίζεται με βάση τη μείωση της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης και εκφράζεται ως ποσοστό επί τοις εκατό (%) της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης απουσία αντιοξειδωτικού.

5.2.10.2 Αναστολή της δράσης της λιποξυγονάσης τύπου I από το φυτό σόγια

Η λιποξυγονάση από το φυτό *Glycine max* (σόγια) (SLO) αποτελεί μία φυτική 15-λιποξυγονάση η οποία καταλύει την οξείδωση του λινελαϊκού οξέος προς 13-υδροϋπεροξυ-οκταδεκαδιενοϊκό οξύ (13-HPODE) [Yamamoto, 1992]. Η δομική και λειτουργική ομοιότητα του ενζύμου αυτού με τις λιποξυγονάσεις των θηλαστικών, καθιστούν την SLO κοινά αποδεκτή ως μοντέλο της δράσης λιποξυγονασών άλλων οργανισμών [Detsi *et al.*, 2007, Serpen & Gökmen, 2007].

Η δραστηριότητα της λιποξυγονάσης προσδιορίζεται φωτομετρικά μέσω της παραγωγής του 13-HPODE με μέτρηση στα 234 nm. Σε κυψελίδα προστίθενται 90 μL

υδατικού διαλύματος άλατος νατρίου του λινελαϊκού οξέος (SLA) (1 mM SLA σε ρυθμιστικό διάλυμα NaH_2PO_4 100 mM, pH 6.8 το οποίο περιέχει 1% Tween 20), το οποίο αποτελεί το υπόστρωμα, και 900 μL από το ρυθμιστικό διάλυμα (τελική συγκέντρωση SLA 90 μM). Το μίγμα επωάζεται για 5 min στους 37°C. Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 10 μL υδατικού διαλύματος (ρυθμιστικό διάλυμα NaH_2PO_4 100 mM, pH 6.8) λιποξυγονάσης, ώστε η τελική ποσότητα του ενζύμου να ισούται με 0.1 mg/mL. Η ενζυμική αντίδραση πραγματοποιείται στους 37°C και παρακολουθείται για χρόνο 6 min.

Επισημαίνεται πως η βέλτιστη τιμή pH για την SLO κυμαίνεται ανάμεσα από pH 9.0-10.0 [Schilstra *et al.*, 1992]. Ωστόσο έχει αναφερθεί πως υπό αλκαλικές συνθήκες δεν παρατηρείται αναστολή της δράσης του ενζύμου και για το λόγο αυτό η μελέτη πραγματοποιείται σε pH 6.8, όπου η SLO διατηρεί μεγάλο μέρος της δραστηριότητάς της [Maccarrone *et al.*, 1995].

Για τη μελέτη της δυνατότητας αναστολής του ενζύμου από διάφορα φυσικά αντιοξειδωτικά και τα ενζυμικά συντιθέμενα λιπόφιλα παράγωγά τους, παρασκευάζονται διαλύματα συγκέντρωσης 1 mM των ενώσεων αυτών σε ρυθμιστικό διάλυμα NaH_2PO_4 100 mM, pH 6.8 (στην περίπτωση των λιπόφιλων εστέρων των φυσικών αντιοξειδωτικών στο υδατικό διάλυμα προστίθεται 1 % Tween 20). Από τα διαλύματα αυτά προστίθενται στο μίγμα της αντίδρασης διαφορετικές ποσότητες ώστε να λαμβάνονται τελικές συγκεντρώσεις αντιοξειδωτικού από 5 έως 250 μM .

Για όλες τις υπό μελέτη περιπτώσεις παρασκευάζονται και τα αντίστοιχα τυφλά δείγματα, στα οποία δεν προστίθεται ένζυμο. Όλα τα πειράματα επαναλαμβάνονται εις τριπλούν και τα αποτελέσματα δίνονται ως ο μέσος όρος των τριών μετρήσεων.

Η αναστολή της λιποξυγονάσης από τα φυσικά αντιοξειδωτικά και τα ενζυμικά συντιθέμενα λιπόφιλα παράγωγά τους υπολογίζεται με βάση τη μείωση της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης και εκφράζεται ως ποσοστό επί τοις εκατό (%) της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης απουσία αντιοξειδωτικού.

Αποτελέσματα και Συζήτηση

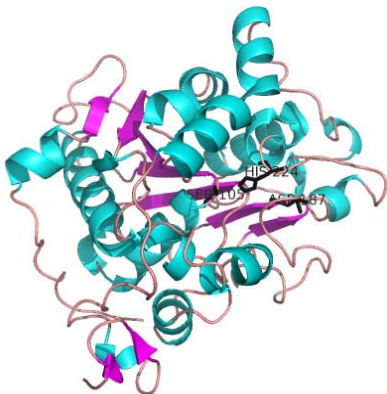
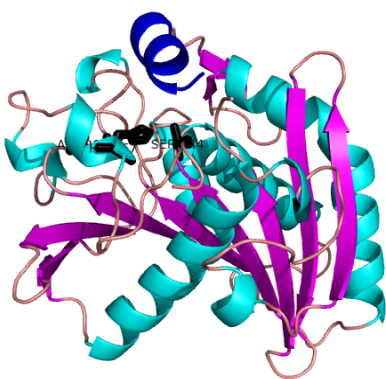
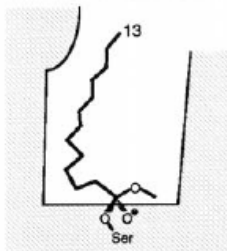
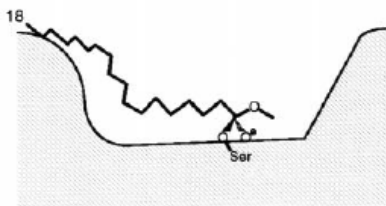
6. Μελέτη σταθερότητας λιπασών σε ιοντικά υγρά

Τα ιοντικά υγρά αποτελούν πολλά υποσχόμενα μέσα για την πραγματοποίηση βιοκαταλυτικών αντιδράσεων, καθώς ένζυμα διαφόρων κατηγοριών διατηρούν τις καταλυτικές τους ιδιότητες στα μέσα αυτά και σε πολλές περιπτώσεις επιδεικνύουν αυξημένη δραστηριότητα, εκλεκτικότητα και σταθερότητα [Park & Kazlauskas, 2003, Yang & Pan, 2005, van Rantwijk & Sheldon, 2007, Roosen *et al.*, 2008, Sureshkumar & Lee, 2009]. Το μεγαλύτερο όμως πλεονέκτημα των ιοντικών υγρών αποτελεί η μοναδική, μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών μη-συμβατικών μέσων, δυνατότητα τροποποίησης των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων μέσω κατάλληλης επιλογής των ιοντικών ειδών από τα οποία αποτελούνται. Καθώς λοιπόν οι ιδιότητες του ιοντικού υγρού μπορούν να επιδρούν στα καταλυτικά χαρακτηριστικά των ενζύμων [Fehér *et al.*, 2007, van Rantwijk & Sheldon, 2007], παρέχεται η δυνατότητα ορθολογικού σχεδιασμού μίας αποτελεσματικής βιοκαταλυτικής διεργασίας. Ο σχεδιασμός αυτός προϋποθέτει, ωστόσο, την πλήρη κατανόηση της επίδρασης του μέσου στη δομή και τις καταλυτικές ιδιότητες των ενζυμικών μορίων.

Στο κεφάλαιο αυτό θα μελετηθεί η σταθερότητα δύο λιπασών διαφορετικής μικροβιακής προέλευσης σε διάφορα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά, σε μία προσπάθεια αναγνώρισης των παραμέτρων εκείνων οι οποίες επιδρούν στην ενζυμική σταθερότητα στη νέα αυτή κατηγορία μη συμβατικών μέσων.

Τα υπό μελέτη ένζυμα περιλαμβάνουν τη λιπάση B από *Candida antarctica* και τη λιπάση από *Rhizomucor miehei* (**Πίνακας 6.1**). Οι λιπάσες αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί σε πλήθος βιοκαταλυτικών διεργασιών [Alcantára *et al.*, 1998, Reetz *et al.*, 2002, Lutz, 2004, Cabrera *et al.*, 2009], δέχονται ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, επιδεικνύουν διαφορετική εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα [Norin *et al.*, 1994, Pleiss *et al.*, 1998] και διαφορετικά καταλυτικά χαρακτηριστικά ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο μέσο [Turner & Vulfson, 2000, Salis *et al.*, 2003]. Επιπλέον, οι τρισδιάστατες δομές τους είναι γνωστές [Brady *et al.*, 1990, Vasel *et al.*, 1993, Uppenberg *et al.*, 1994, 1995] και διάφορα ενζυμικά σκευάσματα αυτών είναι εμπορικά διαθέσιμα.

Πίνακας 6.1 Χαρακτηριστικά της λιπάσης B από *Candida antarctica* και της λιπάσης από *Rhizomucor miehei*.

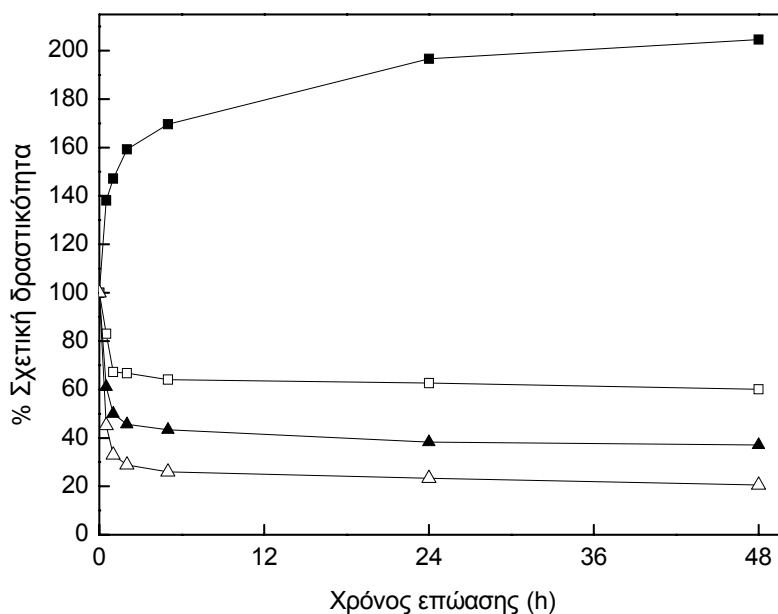
	Λιπάση B από <i>Candida antarctica</i>	Λιπάση από <i>Rhizomucor miehei</i>
Τρισδιάστατη δομή		
Κωδικός PDB	1TCA	3TGL
Κατάλοιπα	317	269
Καταλυτική τριάδα	Ser105, His224, Asp187	Ser144, His257, Asp203
Οξυανιονική οπή	Thr40, Gln106	Ser82, Leu145
Κάλυμμα	όχι	Ser84 – Leu92
Διεπιφανειακή ενεργοποίηση	όχι	ναι
Θέση πρόσδεσης	Χοανοειδής 	Σχισμοειδής 
Εξειδίκευση	Λιπαρά οξέα μικρού και μεσαίου μήκους αλκυλικής αλυσίδας	Λιπαρά οξέα μεγάλου μήκους αλκυλικής αλυσίδας
Στοιχεία δευτεροταγούς δομής	35% α-έλικα 12% β-πτυχή	28% α-έλικα 19% β-πτυχή
Μοριακό βάρος	33kDa	30kDa
Ισοηλεκτρικό σημείο	6.0	3.8

Επιπλέον της προέλευσης της λιπάσης, θα διερευνηθεί η επίδραση διαφόρων παραμέτρων στην σταθερότητα των ενζύμων, όπως της φύσης του ιοντικού υγρού, όσον αφορά το κατιόν και ανιόν, της παρουσίας του νερού, της θερμοκρασίας και του είδους του ενζυμικού σκευάσματος (λυοφιλιωμένο, ακινητοποιημένο, ελεύθερο). Τέλος, με σκοπό την βαθύτερη κατανόηση των μοριακών μηχανισμών σταθεροποίησης ή απενεργοποίησης των λιπασών σε ιοντικά υγρά, θα μελετηθεί η δυνατότητα εφαρμογής φασματοσκοπικών τεχνικών

(φθορισμός, φασματοσκοπία υπερύθρου, κυκλικός διχρωισμός) για την παρακολούθηση πιθανών δομικών αλλαγών των ενζύμων στα μέσα αυτά.

6.1 Μελέτη σταθερότητας ακινητοποιημένων λιπασών

Με σκοπό τη μελέτη της σταθερότητας των λιπασών σε ιοντικά υγρά, η ακινητοποιημένη λιπάση Β από *Candida antarctica* (Novozym 435) και η ακινητοποιημένη λιπάση από *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RMIM) επώαστηκαν σε ένα αναμίξιμο με το νερό ($[\text{bmim}]\text{BF}_4$) και ένα μη-αναμίξιμο με το νερό ($[\text{bmim}]\text{PF}_6$) ιοντικό υγρό σε θερμοκρασία 60°C. Σε όλες τις περιπτώσεις τα ιοντικά υγρά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν προαφυδατωμένα. Η δραστητικότητα των λιπασών μετά από την επώασή τους στα ιοντικά υγρά προσδιορίστηκε φωτομετρικά μέσω της ενζυμικής υδρόλυσης του βουτυρικού εστέρα της π-νιτροφαινόλης (§ 5.2.8.1).



Σχήμα 6.1 Προφίλ σταθερότητας των ακινητοποιημένων λιπασών Novozym 435 (μαύρα σύμβολα) και Lipozyme RMIM (λευκά σύμβολα) στα ιοντικά υγρά $[\text{bmim}]\text{PF}_6$ ($\square, \blacksquare$) και $[\text{bmim}]\text{BF}_4$ ($\triangle, \blacktriangle$) στους 60°C. Σε όλες τις περιπτώσεις, δραστητικότητα ίση με 100% αντιστοιχεί στη δραστητικότητα του ενζύμου σε χρόνο 0 h.

Σύμφωνα με τα προφίλ σταθερότητας του **Σχήματος 6.1** είναι σαφές πως η σταθερότητα των λιπασών διαφοροποιείται σημαντικά ανάλογα τόσο με την προέλευσή τους, όσο και με τη φύση του ιοντικού υγρού.

Στη περίπτωση της Novozym 435, η επώαση στο ιοντικό υγρό $[\text{bmim}]\text{PF}_6$ στους 60°C οδήγησε όχι σε απενεργοποίηση αλλά σε διπλασιασμό της δραστητικότητας μετά από 48 h. Για

την ακινητοποιημένη αυτή λιπάση έχει αναφερθεί πως η επώαση σε υδατικό διάλυμα οδηγεί σε απώλεια του 50% της δραστηριότητας μετά από μόλις 1 h επώασης στους 50°C [Arroyo *et al.*, 1999], ενώ απενεργοποίηση (με απώλεια της δραστηριότητας, η οποία κυμαίνεται από 20 έως και 100%) έχει αναφερθεί σε διάφορους οργανικούς διαλύτες μετά από 6 h έως 24 h επώασης στους 60°C [Cao *et al.*, 1999, Li *et al.*, 2006]. Συνεπώς, η σταθεροποιητική αυτή επίδραση του ιοντικού υγρού [bmim]PF₆ είναι ιδιαίτερα εντυπωσιακή.

Ωστόσο, η επίδραση του [bmim]PF₆ διαφοροποιείται ανάλογα με την υπό μελέτη λιπάση, καθώς για τη Lipozyme RMIM στις ίδιες συνθήκες παρατηρείται απώλεια της δραστηριότητας κατά σχεδόν 20% μέσα στη πρώτη ώρα επώασης, χωρίς όμως περαιτέρω μείωση ακόμα και μετά την πάροδο των 48 h. Και σε αυτή την περίπτωση η χρήση του ιοντικού υγρού φαίνεται να πλεονεκτεί έναντι των συμβατικών οργανικών διαλυτών καθώς για τη συγκεκριμένη λιπάση έχει αναφερθεί χαμηλότερο θερμοκρασιακό βέλτιστο και σημαντική απώλεια της δραστηριότητας σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από 50°C [Garcia *et al.*, 1993, Mat Hadzir *et al.*, 2001, Gunawan *et al.*, 2004, Gunawan & Suhendra, 2008].

Επιπλέον της επίδρασης της προέλευσης της λιπάσης, η πιο σημαντική ίσως παρατήρηση συνδέεται με τη διαφοροποίηση της σταθερότητας των ενζύμων ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο ιοντικό υγρό. Σύμφωνα με το **Σχήμα 6.1**, τόσο για τη Novozym 435, όσο και για τη Lipozyme RMIM παρατηρείται μειωμένη σταθερότητα στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ συγκριτικά με το [bmim]PF₆. Παρόμοια τάση έχει αναφερθεί και στην περίπτωση μελέτης της σταθερότητας εστερασών, αμυλασών και ακυλασών στα δύο αυτά ιοντικά υγρά [Persson & Bornscheuer, 2003, Zhang *et al.*, 2006, de los Rios *et al.*, 2007, Ha *et al.*, 2008].

Η διατήρηση των καταλυτικών ιδιοτήτων των ενζύμων σε μη συμβατικά μέσα βασίζεται στην ύπαρξη μικρών ποσοτήτων νερού [Zaks & Klibanov, 1988]. Τα μόρια νερού μπορούν να διακριθούν σε εκείνα, τα οποία βρίσκονται στο εσωτερικό της πρωτεΐνης και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην διατήρηση της καταλυτικά ενεργής διαμόρφωσης των ενζύμων μέσω του σχηματισμού ενός δικτύου δεσμών υδρογόνου, και σε εκείνα τα οποία βρίσκονται στην επιφάνεια του ενζύμου και τα οποία όντας σε μία κατάσταση δυναμικής ισορροπίας μπορούν να ανταλλάσσονται με άλλα ελεύθερα μόρια νερού [Teeter, 1991, Brunne *et al.*, 1993, Nakasako, 2004]. Δεδομένης της σημασίας του νερού η σταθεροποιητική επίδραση του [bmim]PF₆ έναντι του [bmim]BF₄ είναι πιθανό να σχετίζεται με τον υδρόφιλο/υδρόφοβο χαρακτήρα του ιοντικού υγρού. Όπως και στην περίπτωση των οργανικών διαλυτών [Klibanov, 1997, Fágáin, 2003, Clarck, 2004, Micaelo & Soares, 2007], αναμίξιμα με το νερό ιοντικά υγρά (όπως το [bmim]BF₄) μπορούν να αποσταθεροποιούν τα

ένζυμα εξαιτίας της ικανότητάς τους να απομακρύνουν απαραίτητα μόρια νερού από την επιφάνεια του ενζυμικού μορίου. Αντίθετα, το μη αναμίξιμο με το νερό [bmim]PF₆ πιθανά επικαλύπτει την επιφάνεια του ακινητοποιημένου ενζύμου, ασκώντας μία προστατευτική δράση στο απαραίτητο στρώμα νερού της λιπάσης [Sheldon *et al.*, 2002, Yuan *et al.*, 2006, Chen *et al.*, 2006, Shan *et al.*, 2008].

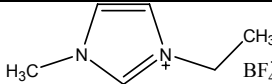
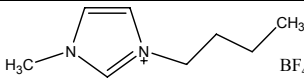
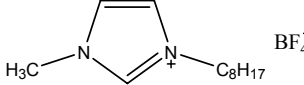
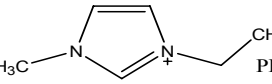
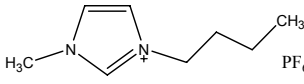
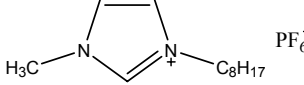
Η αλληλεπίδραση του ιοντικού υγρού με τα μόρια νερού του ενζύμου αποτελεί μία από τις πιθανές εξηγήσεις για τη σταθεροποίηση των λιπασών στα μέσα αυτά. Εναλλακτικά, η άμεση επίδραση του ιοντικού υγρού στο ένζυμο θα μπορούσε να επηρεάσει σημαντικά τη σταθερότητά του. Διάφορες μελέτες κατέληξαν στο συμπέρασμα αυτό και πιο συγκεκριμένα στην ύπαρξη ηλεκτροστατικών και άλλων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ιοντικού υγρού και του ενζύμου, οι οποίες βελτιώνουν την σταθερότητά του [Kaar *et al.*, 2003, Persson & Bornscheuer, 2003, Yuan *et al.*, 2006]. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές αναμένεται να εξαρτώνται από τις ιδιότητες του ιοντικού υγρού. Δεδομένου δε ότι η διαφοροποίηση της σταθερότητας των Novozym 435 και Lipozyme RMIM παρατηρείται σε δύο ιοντικά υγρά αποτελούμενα από το ίδιο κατιόν και διαφορετικά ανιόντα, η επίδραση του ανιόντος είναι πιθανά περισσότερο σημαντική.

Μεταξύ των διαφόρων φυσικοχημικών ιδιοτήτων των ιοντικών υγρών η πολικότητα, η βασικότητα των δεσμών υδρογόνου και η πυρηνοφιλικότητα φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά την ενζυμική δραστηριότητα και σταθερότητα [Fehér *et al.*, 2007, Zhao *et al.*, 2008]. Όσον αφορά την πολικότητα, τα δύο ιοντικά υγρά παρουσιάζουν παρόμοιες τιμές (Πίνακας 6.2) και κατά συνέπεια η παράμετρος αυτή δεν μπορεί να δικαιολογήσει τη σημαντική διαφοροποίηση της σταθερότητας των δύο λιπασών μεταξύ του [bmim]PF₆ και του [bmim]BF₄.

Εναλλακτικά, έχει αναφερθεί πως η βασικότητα των δεσμών υδρογόνου του ανιόντος διαφοροποιείται σημαντικά ανάλογα με τη φύση του, και αυξάνεται κατά τη σειρά PF₆⁻ < BF₄⁻ (με βάση την κατανομή του αρνητικού φορτίου) [Dupont, 2004]. Επιπρόσθετα το ανιόν PF₆⁻ είναι λιγότερο πυρηνόφιλο συγκριτικά με το BF₄⁻ (με βάση την πολικότητα των δεσμών P-F και B-F) [Lau *et al.*, 2004]. Λιγότερο πυρηνόφιλα ανιόντα και με μικρότερη βασικότητα δεσμών υδρογόνου εμφανίζουν μικρότερη τάση να αλληλεπιδρούν με τα θετικά φορτισμένα κατάλοιπα και με τους εσωτερικούς δεσμούς υδρογόνου των ενζυμικών μορίων, αντίστοιχα, και θεωρούνται ότι σταθεροποιούν τα ένζυμα [Kaar *et al.*, 2003, Lou *et al.*, 2006c, Zhao *et al.*, 2009, Yang *et al.*, 2009]. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγήσει την υψηλότερη

σταθερότητα των ακινητοποιημένων λιπασών στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆, μέσω της ικανότητας διατήρησης της δομής τους.

Πίνακας 6.2 Ιδιότητες ιμιδαζολικών ιοντικών υγρών.

Ιοντικό υγρό	Δομή	Ιξώδες ¹ (cPs)	Αναμιξιμότητα με νερό ²	log <i>P</i> (E _N ^T) ³
[emim]BF ₄		43	+	-2.57±0.06 (0.71)
[bmim]BF ₄		233	+	-2.44±0.23 (0.68)
[omim]BF ₄		427	-	-1.34±0.09
[emim]PF ₆		δ.π. ⁴	-	δ.π. ⁴
[bmim]PF ₆		450	-	-2.39±0.27 (0.68)
[omim]PF ₆		682	-	-1.33±0.07 (0.63)

¹ Αναφέρεται σε άνυδρα ιοντικά υγρά σε θερμοκρασία 25°C.

² Με (+) υποδηλώνεται η πλήρης αναμιξιμότητα και με (-) η μη-αναμιξιμότητα

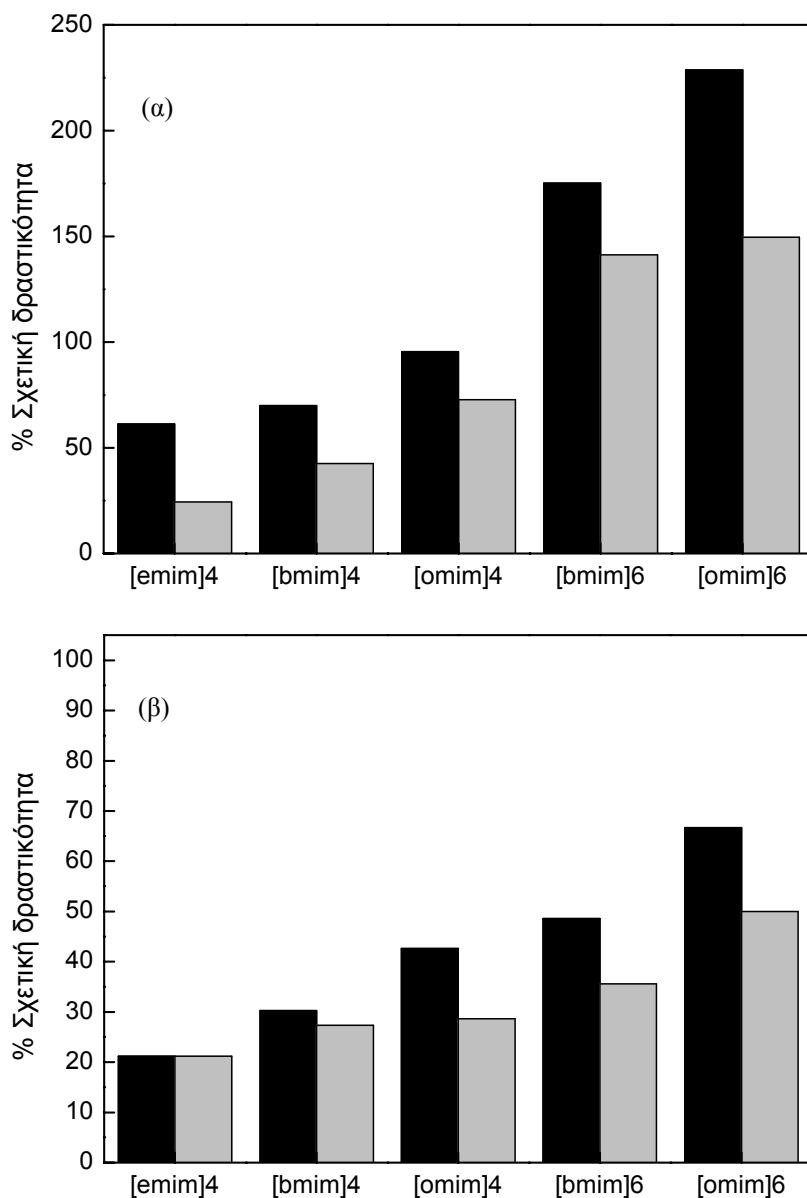
³ Τιμή πολικότητας των ιοντικών υγρών με βάση την κανονικοποιημένη κλίμακα Reichardt.

⁴ Δεν προσδιορίστηκε.

Ωστόσο, η ενεργοποίηση της λιπάσης Novozym 435 στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ δύσκολα μπορεί να εξηγηθεί μέσω απλά προστατευτικών μηχανισμών [Kaar *et al.*, 2003]. Πιθανά, το συγκεκριμένο ιοντικό υγρό επάγει μία τροποποίηση της δομής της λιπάσης, η οποία να καταλήγει σε μία νέα ενεργοποιημένη διαμόρφωση. Η δυνατότητα διατήρησης ή και τροποποίησης της δομής των δύο λιπασών σε ιοντικά υγρά θα μελετηθεί εκτενώς στην Παράγραφο 6.4.

Αν και η επίδραση του ανιόντος φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντική, εντούτοις η επίδραση και του κατιόντος στη σταθερότητα των ενζύμων δεν μπορεί να αγνοηθεί, δεδομένου ότι η φύση τόσο του ανιόντος όσο και του κατιόντος επηρεάζουν τις φυσικοχημικές ιδιότητες του ιοντικού υγρού (**Πίνακας 6.2**).

Προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση της φύσης του κατιόντος, αλλά και γενικότερα των ιδιοτήτων του ιοντικού υγρού, στη σταθερότητα των ακινητοποιημένων λιπασών, προσδιορίστηκε η % σχετική δραστικότητα της Novozym 435 και της Lipozyme RMIM μετά από 1 και 5 ημέρες επώασης στους 60°C σε διάφορα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά (**Σχήματα 6.2α και β**).



Σχήμα 6.2 Επίδραση της φύσης του ιοντικού υγρού στη σταθερότητα της ακινητοποιημένης λιπάσης (**α**) Novozym 435 και (**β**) Lipozyme RMIM μετά από 24 h (μαύρες μπάρες) και 120 h (γκρι μπάρες) επώασης στους 60°C.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του **Σχήματος 6.2**, η επίδραση της φύσης του ιοντικού υγρού στην σταθερότητα των ακινητοποιημένων λιπασών είναι ιδιαίτερα σημαντική. Τόσο

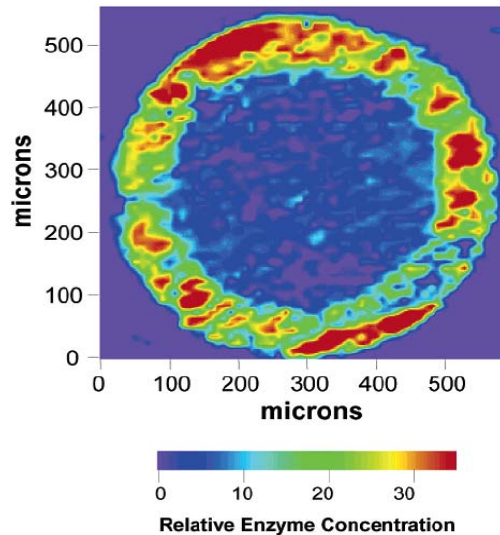
στην περίπτωση της Novozym 435 όσο και της Lipozyme RMIM, παρατηρήθηκε αύξηση της σταθερότητας με την αύξηση της αλκυλικής αλυσίδας του κατιόντος, ανεξάρτητα του ανιόντος των ιοντικών υγρών. Έχει αναφερθεί πως η επιμήκυνση της αλκυλικής αλυσίδας του κατιόντος οδηγεί σε αύξηση της υδροφοβικότητας, ενώ η πολικότητα του ιοντικού υγρού φαίνεται να μειώνεται σε κάποιο βαθμό (**Πίνακας 6.2**) [Carmichael & Seddon, 2000, Zhao, 2003]. Συνεπώς, η αύξηση της σταθερότητας με την επιμήκυνση της αλκυλικής αλυσίδας του κατιόντος μπορεί πιθανά να εξηγηθεί με βάση το γεγονός ότι υδρόφοβα, λιγότερο πολικά ιοντικά υγρά εμφανίζουν μικρότερη τάση να απομακρύνουν μόρια νερού από το απαραίτητο στρώμα νερού του ενζύμου [de los Rios *et al.*, 2007, Zhao *et al.*, 2009].

Όσον αφορά το ανιόν, και σε συμφωνία με τα προαναφερόμενα αποτελέσματα, υψηλότερη σταθερότητα εμφανίζουν οι δύο ακινητοποιημένες λιπάσες στα PF_6^- συγκριτικά με τα BF_4^- -ιοντικά υγρά. Η λιπάση Novozym 435 εμφανίζεται ακόμα και ενεργοποιημένη στα δύο ιοντικά υγρά με ανιόν PF_6^- ([bmim] PF_6 και [omim] PF_6) και είναι ιδιαίτερα εντυπωσιακό πως η δραστηριότητα του ενζύμου παραμένει στο 150% ακόμα και μετά από 5 ημέρες επώασης στους 60°C. Είναι, επίσης, αξιοσημείωτο το γεγονός πως η αυξημένη σταθερότητα στα ιοντικά υγρά με ανιόν PF_6^- ισχύει, όχι μόνο, ανεξάρτητα της λιπάσης, αλλά και ανεξάρτητα του κατιόντος, υποδεικνύοντας πως η σταθερότητα των λιπασών είναι εξαρτώμενη κυρίως από το ανιόν. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και για τη δραστηριότητα και εκλεκτικότητα ενζύμων διαφόρων κατηγοριών (λακκάσες, εστεράσες κ.α.) αλλά και λιπασών διαφορετικής μικροβιακής προέλευσης (λιπάσες από *Candida rugosa*, *Pseudomonas sp.* κ.α.) σε διάφορα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά [Itoh *et al.*, 2001, Nara *et al.*, 2002, Sheldon *et al.*, 2002, Kaar *et al.*, 2003, Yang & Pan, 2005, Sureshkumar & Lee, 2009].

Μία επίσης σημαντική παρατήρηση, με βάση τα αποτελέσματα σταθερότητας σε διάφορα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά, συνδέεται με την αυξημένη σταθερότητα της Novozym 435 συγκριτικά με τη Lipozyme RMIM.

Προκειμένου να εξηγηθεί η διαφορετική σταθερότητα των δύο λιπασών σε ιοντικά υγρά θα πρέπει να ληφθεί υπόψη αφενός η διαφορετική τους προέλευση και κατά συνέπεια και δομή και αφετέρου το γεγονός ότι οι δύο υπό μελέτη λιπάσες είναι ακινητοποιημένες σε φορείς με διαφορετικές ιδιότητες. Η Novozym 435, αντιστοιχεί στην λιπάση B από *Candida antarctica* η οποία είναι προσροφημένη στον υδρόφοβο φορέα Lewatit VP OC 1600 (Lanxess), μία μακροπορώδη μεθακρυλική ρητίνη [Mei *et al.*, 2003, Chen *et al.*, 2008a]. Αν και το ακριβές πρωτόκολλο ακινητοποίησης δεν είναι γνωστό, ο κύριος μηχανισμός ακινητοποίησης της λιπάσης βασίζεται πιθανά σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις [Cabrera *et al.*,

2009]. Η απεικόνιση της λιπάσης μέσω μικροφασματοσκοπίας υπερύθρου (IR microspectroscopy) καταδεικνύει πως η λιπάση εντοπίζεται στο εξωτερικό τμήμα του σφαιριδίου πάχους 80-100 μm (**Εικόνα 6.1**) [Mei *et al.*, 2003].



Εικόνα 6.1 Απεικόνιση της κατανομής των μορίων της λιπάσης B από *Candida antarctica* στο φορέα ακινητοποίησης του εμπορικού σκευάσματος Novozym 435 [Mei *et al.*, 2003].

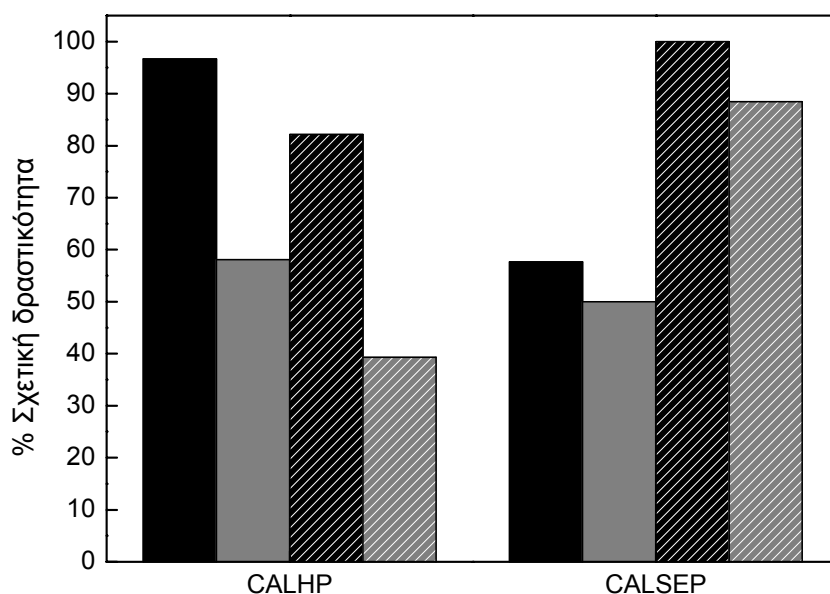
Η ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της ακινητοποιημένης και ελεύθερης λιπάσης (μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου) αποκαλύπτει πως η ακινητοποίηση δεν οδηγεί σε δομικές αλλαγές του ενζύμου [Mei *et al.*, 2003]. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει πως, μεταξύ των μεθόδων ακινητοποίησης, η προσρόφηση του ενζύμου σε στερεό φορέα μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων δεν τροποποιεί σημαντικά την ενεργή διαμόρφωση των ενζύμων [Oladejo *et al.*, 1995, Knezevic *et al.*, 1998, Bastida *et al.*, 1998]. Επιπρόσθετα, για την ακινητοποιημένη αυτή λιπάση, η ανάλυση μέσω φασματοσκοπίας μάζας αποκάλυψε πως τα μόρια του ενζύμου είναι γλυκοσυλιωμένα και πιθανά η τροποποίηση αυτού του είδους να εξηγεί την αυξημένη θερμοσταθερότητα του συγκεκριμένου ακινητοποιημένου σκευάσματος [Petry *et al.*, 2006].

Η δε Lipozyme RMIM, αντιστοιχεί στη λιπάση από *Rhizomucor miehei* ακινητοποιημένη στον υδρόφιλο φορέα DuoliteA568 (Duolite International SA), μία μακροπορώδη ανιο-ανταλλακτική ρητίνη βασισμένη σε διασυνδεδεμένα μόρια φαινόλης-φορμαλδεΐδης [Lima *et al.*, 1995, Kristensen *et al.*, 2005]. Με βάση τη φύση του φορέα αναμένεται η προσρόφηση του ενζύμου να οφείλεται στην ύπαρξη ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της λιπάσης και των θετικά φορτισμένων ομάδων του φορέα [de Fuentes *et al.*, 2001, Petry *et al.*, 2006]. Η απεικόνιση της λιπάσης μέσω ηλεκτρονικής

μικροσκοπίας αποκαλύπτει πως η λιπάση εντοπίζεται στην εξωτερική επιφάνεια των σωματιδίων [Lima *et al.*, 1995] και η ανάλυση της δευτεροταγούς δομής της ακινητοποιημένης λιπάσης (μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου) αποκαλύπτει πως η ακινητοποίηση οδηγεί σε δομικές αλλαγές του ενζύμου (ποσοστό α-έλικας 21% για το ακινητοποιημένο και 28% για το ελεύθερο ένζυμο) [Majumder *et al.*, 2007].

Οι προαναφερόμενες διαφορές μεταξύ των δύο ακινητοποιημένων λιπασών θα μπορούσαν πιθανά να εξηγήσουν τη διαφορετική σταθερότητα αυτών σε ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά. Δεδομένης, ωστόσο, της διαφορετικής προέλευσης και δομής των δύο ενζύμων η αυξημένη σταθερότητα της Novozym 435 συγκριτικά με τη Lipozyme RMIM δεν μπορεί να συσχετιστεί μόνο με τις διαφορετικές ιδιότητες των φορέων τους.

Προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω η επίδραση του φορέα ακινητοποίησης επιλέχθηκαν δύο εμπορικά σκευάσματα της ίδιας λιπάσης (λιπάση B από *Candida antarctica*), η CALHP και η CALSEP, ακινητοποιημένα σε φορείς διαφορετικής υδροφοβικότητας. Η σταθερότητα αυτών μελετήθηκε στα ιοντικά υγρά [bmim]PF₆ και [bmim]BF₄ στους 60°C (**Σχήμα 6.3**).



Σχήμα 6.3 Επίδραση του φορέα ακινητοποίησης στη σταθερότητα της ακινητοποιημένης λιπάσης B από *Candida antarctica* μετά από 24 h (■,▨) και 120 h (■,▨) επώασης στα ιοντικά υγρά [bmim]PF₆ (■,▨) και [bmim]BF₄ (▨,▨) στους 60°C.

Σύμφωνα με το **Σχήμα 6.3** η σταθερότητα της ακινητοποιημένης λιπάσης B από *Candida antarctica* διαφοροποιείται σημαντικά ανάλογα τόσο με τη φύση του μέσου όσο και με τη φύση του φορέα ακινητοποίησης. Η CALHP, ένα εμπορικό σκεύασμα της λιπάσης

ακίνητοποιημένο σε υψηλής υδροφοβικότητας φορέα, εμφανίζει υψηλότερη σταθερότητα στο περισσότερο υδρόφοβο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆, ενώ η CALSEP, ένα εμπορικό σκεύασμα της λιπάσης ακίνητοποιημένο σε μέτριας υδροφοβικότητας φορέα, εμφανίζει υψηλότερη σταθερότητα στο υδρόφιλο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄.

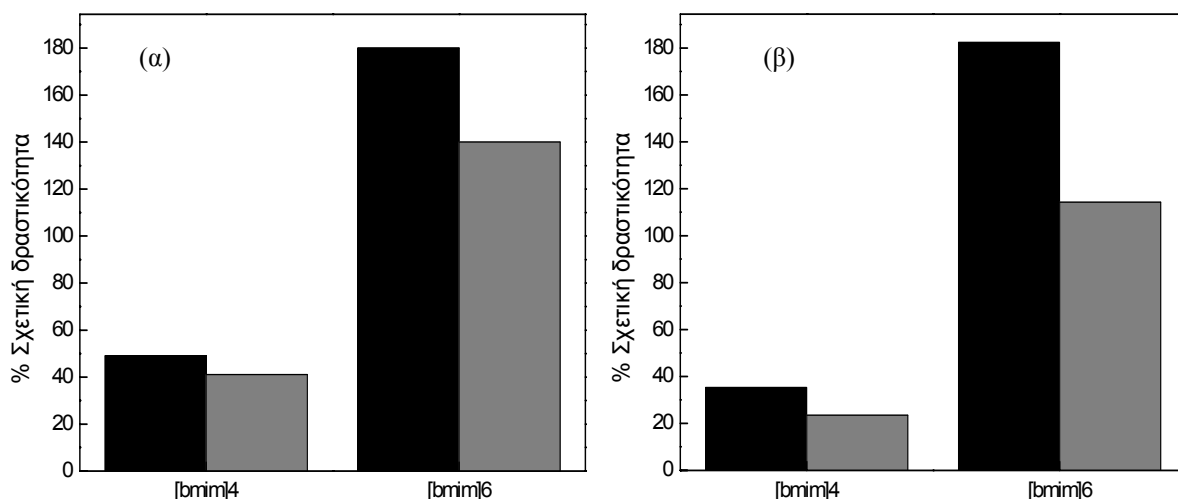
Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν πως η ακινητοποίηση των λιπασών σε διαφορετικούς φορείς μπορεί να τροποποιήσει την σταθερότητά τους, όπως έχει αναφερθεί αντίστοιχα και για τη δραστηριότητα και εκλεκτικότητα [de Fuentes *et al.*, 2001, Lima *et al.*, 1995, Kristensen *et al.*, 2005, Cabrera *et al.*, 2009]. Υποδεικνύουν όμως ταυτόχρονα και τη σημασία της αλληλεπίδρασης μεταξύ ενζύμου-φορέα-ιοντικού υγρού, μία αλληλεπίδραση ιδιαίτερα πολύπλοκη και ελάχιστα μελετημένη στα νέα αυτά μέσα.

6.2 Μελέτη σταθερότητας λυοφιλιωμένων λιπασών

Με βάση τα αποτελέσματα της Παραγράφου 6.1 τα ιοντικά υγρά ασκούν μία σημαντική σταθεροποιητική επίδραση στις ακίνητοποιημένες λιπάσες Novozym 435 και Lipozyme RMIM. Αντίστοιχα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά στην περίπτωση ακίνητοποιημένων ενζύμων διαφόρων κατηγοριών [Sheldon *et al.*, 2002, Kaar *et al.*, 2003, Basso *et al.*, 2005, Chen *et al.*, 2006, van Rantwijk *et al.*, 2006, Zhao *et al.*, 2009].

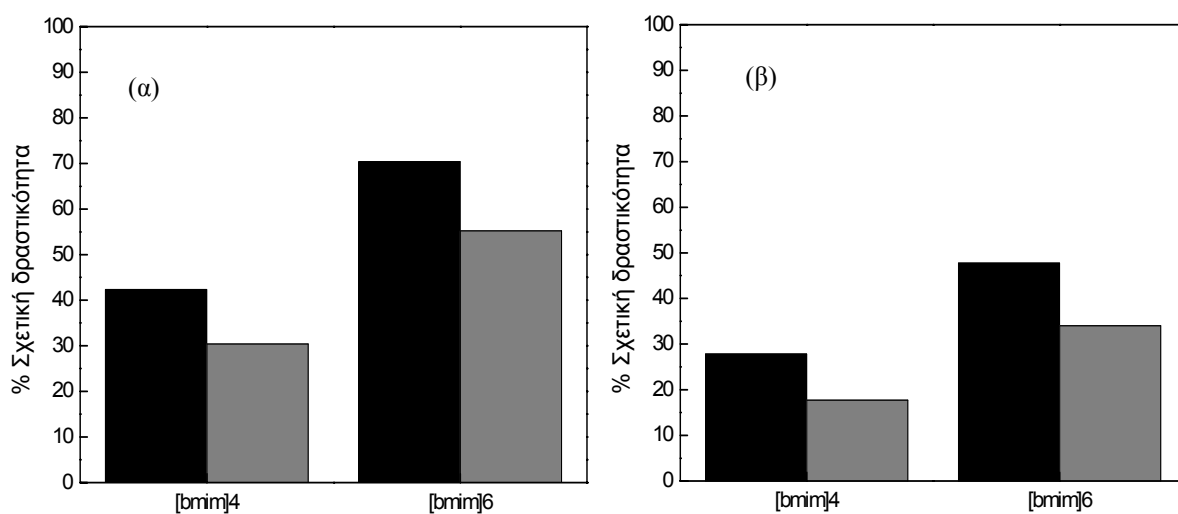
Η μελέτη της σταθερότητας των δύο ακίνητοποιημένων λιπασών κατέδειξε τη σημασία και την πολυπλοκότητα των αλληλεπιδράσεων μεταξύ ενζύμου-ιοντικού υγρού-φορέα ακινητοποίησης. Προκειμένου να αποσαφηνιστεί η αλληλεπίδραση μεταξύ του ιοντικού υγρού και του ενζύμου (χωρίς τη μεσολάβηση κάποιου φορέα ακινητοποίησης) προσδιορίστηκε η σταθερότητα της λυοφιλιωμένης λιπάσης B από *Candida antarctica* (IyoCaLB) και της λυοφιλιωμένης λιπάσης από *Rhizomucor miehei* (IyoRmL) στα ιοντικά υγρά [bmim]PF₆ και [bmim]BF₄ σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες (**Σχήμα 6.4**).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του **Σχήματος 6.4**, παρατηρείται σημαντική επίδραση της φύσης του ιοντικού υγρού στην σταθερότητα της λιπάσης IyoCaLB. Η επώαση της IyoCaLB στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ οδηγεί σε ενεργοποίηση του ενζύμου. Η ενεργοποίηση αυτή παρατηρείται τόσο στους 30°C όσο και στους 60°C. Αντίθετα, η επώαση της λιπάσης στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ μειώνει σημαντικά τη σταθερότητά της, ανεξάρτητα της θερμοκρασίας επώασης, αν και η IyoCaLB εμφανίζεται γενικά περισσότερο σταθερή στους 30°C συγκριτικά με τους 60°C.



Σχήμα 6.4 Επίδραση της φύσης του ιοντικού υγρού στη σταθερότητα της λυοφιλωμένης λιπάσης CaLB μετά από 24 h (μαύρες μπάρες) και 120 h (γκρι μπάρες) επώασης στους (α) 30°C και (β) 60°C.

Η σταθερότητα της lyoRmL μετά από 24 h και 120 h επώασης στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ σε δύο θερμοκρασίες (30°C και 60°C) απεικονίζεται στο **Σχήμα 6.5**.



Σχήμα 6.5 Επίδραση της φύσης του ιοντικού υγρού στη σταθερότητα της λυοφιλωμένης λιπάσης RmL μετά από 24 h (μαύρες μπάρες) και 120 h (γκρι μπάρες) επώασης στους (α) 30°C και (β) 60°C.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του **Σχήματος 6.5** παρατηρείται και στην περίπτωση της lyoRmL διαφοροποίηση της σταθερότητας ανάλογα με τη φύση του ιοντικού υγρού. Η χρήση του ιοντικού υγρού [bmim]PF₆ φαίνεται να οδηγεί σε υψηλότερη σταθερότητα συγκριτικά με το [bmim]BF₄, ανεξάρτητα της θερμοκρασίας επώασης. Ωστόσο, σε καμία περίπτωση δεν παρατηρείται ενεργοποίηση της συγκεκριμένης λιπάσης και με σύγκριση

μεταξύ των δύο ενζύμων, η IyoRmL είναι γενικά λιγότερο σταθερή από την IyoCaLB σε όλα τα υπό μελέτη μέσα και στις δύο θερμοκρασίες.

Με βάση τα προηγούμενα αποτελέσματα αξίζει να σημειωθεί αρχικά, η δυνατότητα των δύο λυοφιλιωμένων λιπασών να διατηρούν τη δραστηριότητά τους στα ιοντικά υγρά [bmim]PF₆ και [bmim]BF₄. Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός πως οι λυοφιλιωμένες λιπάσες δεν διαλυτοποιούνται στα υπό μελέτη ιοντικά υγρά. Το γεγονός αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό, καθώς έχει αναφερθεί πως ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά με ανιόντα όπως τα NO₃⁻, EtSO₄⁻ κ.α. διαλυτοποιούν τα ένζυμα οδηγώντας ταυτόχρονα στη (μερικώς αντιστρεπτή) απενεργοποίησή τους [Sheldon *et al.*, 2002, Kaar *et al.*, 2003, Turner *et al.*, 2003, Lau *et al.*, 2004]. Η ικανότητα διαλυτοποίησης μορίων εξαρτάται από διάφορες ιδιότητες των ιοντικών υγρών, αλλά κυρίως από την ικανότητα του ανιόντος να συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου [Anderson *et al.*, 2002]. Τα ανιόντα αυτά τα οποία αλληλεπιδρούν ισχυρά με τα μόρια του ενζύμου, ώστε να καταστρέψουν τους ενδομοριακούς δεσμούς οδηγώντας σε διαλυτοποίηση, μπορούν επίσης να επιδράσουν στους διαμοριακούς δεσμούς σε τέτοιο βαθμό ώστε να λάβει χώρα η αποδιάταξη του μορίου [Lau *et al.*, 2004]. Ωστόσο, ανιόντα με μικρή ικανότητα να συμμετέχουν σε δεσμούς υδρογόνου και με υψηλές στερεοχημικές απαιτήσεις, ώστε να μην μπορούν να αλληλεπιδρούν άμεσα με το πρωτεϊνικό μόριο, μπορούν να συμβάλλουν στην διατήρηση της δραστηριότητας των ενζύμων, και σε αυτή την κατηγορία συμπεριλαμβάνονται και τα ανιόντα PF₆⁻ και BF₄⁻. Μεταξύ δε αυτών των δύο ανιόντων η παρουσία του PF₆⁻ φαίνεται να επιδρά σημαντικά και θετικά στη σταθερότητα των δύο λυοφιλιωμένων λιπασών.

Το γεγονός αυτό είναι σημαντικό καθώς τα αποτελέσματα στην περίπτωση των λυοφιλιωμένων λιπασών συμφωνούν απόλυτα με τα αντίστοιχα στην περίπτωση των ακινητοποιημένων (§ 6.1). Ανεξάρτητα της παρουσίας ή μη του φορέα ακινητοποίησης παρατηρείται ενεργοποίηση της λιπάσης B από *Candida antarctica* στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ και σημαντικά υψηλότερη σταθερότητα της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* σε αυτό το μέσο συγκριτικά με το [bmim]BF₄. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πιθανά μία άμεση θετική επίδραση των υδρόφοβων ιοντικών υγρών (όπως το [bmim]PF₆) στα ένζυμα, ανεξάρτητα της παρουσίας ή μη του φορέα ακινητοποίησης.

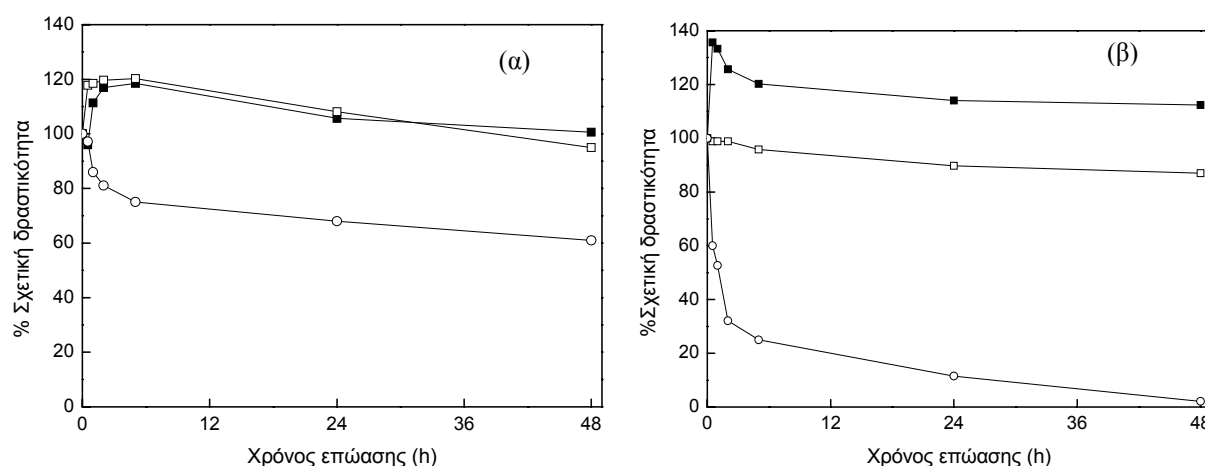
Κοινή γνώση, βάσει των μελετών βιοκαταλυτικών αντιδράσεων σε οργανικούς διαλύτες, αποτελεί το γεγονός πως περισσότερο πολικοί διαλύτες έχουν την τάση να απομακρύνουν τα «απαραίτητα» μόρια νερού των ενζυμικών μορίων, οδηγώντας στην απενεργοποίησή τους [Laane *et al.*, 1987, Zaks & Klibanov, 1988]. Ωστόσο, τα δύο υπό μελέτη ιοντικά υγρά χαρακτηρίζονται από παρόμοιες τιμές πολικότητας (Πίνακας 6.2).

Συνεπώς η διαφορά στην πολικότητα των [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ δεν μπορεί να δικαιολογήσει τη σημαντική διαφοροποίηση της σταθερότητας των λιπασών σε αυτά. Επιπρόσθετα, η IyoCaLB αποτελεί μία λιπάση ικανή να διατηρεί τη δραστηρότητά της σε οργανικούς διαλύτες ακόμα και απουσία του απαραίτητου στρώματος νερού [Anderson *et al.*, 1998, Réjasse *et al.*, 2004, Lau *et al.*, 2004, van Rantwijk *et al.*, 2006]. Συνεπώς, η ικανότητα του ιοντικού υγρού να αποσπά μόρια νερού δεν αποτελεί τον κύριο μηχανισμό απενεργοποίησης των δύο λιπασών στο υδρόφιλο [bmim]BF₄.

Η όμοια επίδραση των ιοντικών υγρών ανεξάρτητα του ενζυμικού σκευάσματος (ακίνητοποιημένο – λυοφιλιωμένο) πιθανά να συνδέεται με την ικανότητα ή μη του μέσου να διατηρεί τη δομή της λιπάσης, ή ακόμα και να επάγει μία νέα ενεργοποιημένη διαμόρφωση η οποία θα μπορούσε πιθανά να εξηγήσει την ενεργοποίηση της λιπάσης B από *Candida antarctica* στα υπό μελέτη ιοντικά υγρά.

Μία πρώτη ένδειξη για το γεγονός αυτό προέρχεται από τα αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας των δύο λυοφιλιωμένων λιπασών, οι οποίες προ-επωάζονται στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ ή [bmim]BF₄ και μετά την πάροδο συγκεκριμένου χρονικού διαστήματος επαναδιαλυτοποιούνται σε νερό για τη μέτρηση της δραστηρότητάς τους μέσω της ενζυμικής υδρόλυσης του βουτυρικού εστέρα της π-νιτροφαινόλης (§ 5.2.8.2).

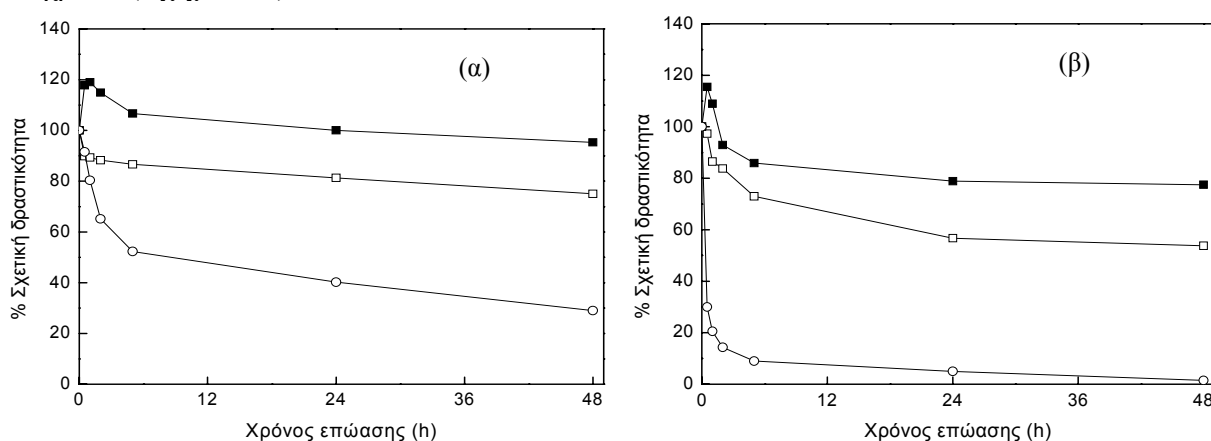
Στο **Σχήμα 6.6** απεικονίζονται τα προφίλ σταθερότητας της IyoCaLB (σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες, 30°C και 60°C), η οποία επωάζεται σε νερό ή προ-επωάζεται στα ιοντικά υγρά [bmim]PF₆ και [bmim]BF₄ και στη συνέχεια επαναδιαλυτοποιείται σε νερό.



Σχήμα 6.6 Προφίλ σταθερότητας της λυοφιλιωμένης λιπάσης CaLB σε υδατικό διάλυμα (○) ή μετά από επώαση στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ (■) και [bmim]BF₄ (□) και επαναδιαλυτοποίηση σε νερό στους (α) 30°C και (β) 60°C.

Τα αποτελέσματα του **Σχήματος 6.6** είναι ιδιαίτερα εντυπωσιακά. Και στις δύο μελετώμενες θερμοκρασίες η προ-επώαση της lyoCaLB στα ιοντικά υγρά [bmim]PF₆ και [bmim]BF₄ οδηγεί σε σημαντική σταθεροποίηση και κατά περιπτώσεις ακόμα και ενεργοποίηση, ενώ υπό τις ίδιες συνθήκες παρατηρείται μείωση της δραστηριότητας με το χρόνο για την λιπάση η οποία δεν έχει επωαστεί σε ιοντικό υγρό.

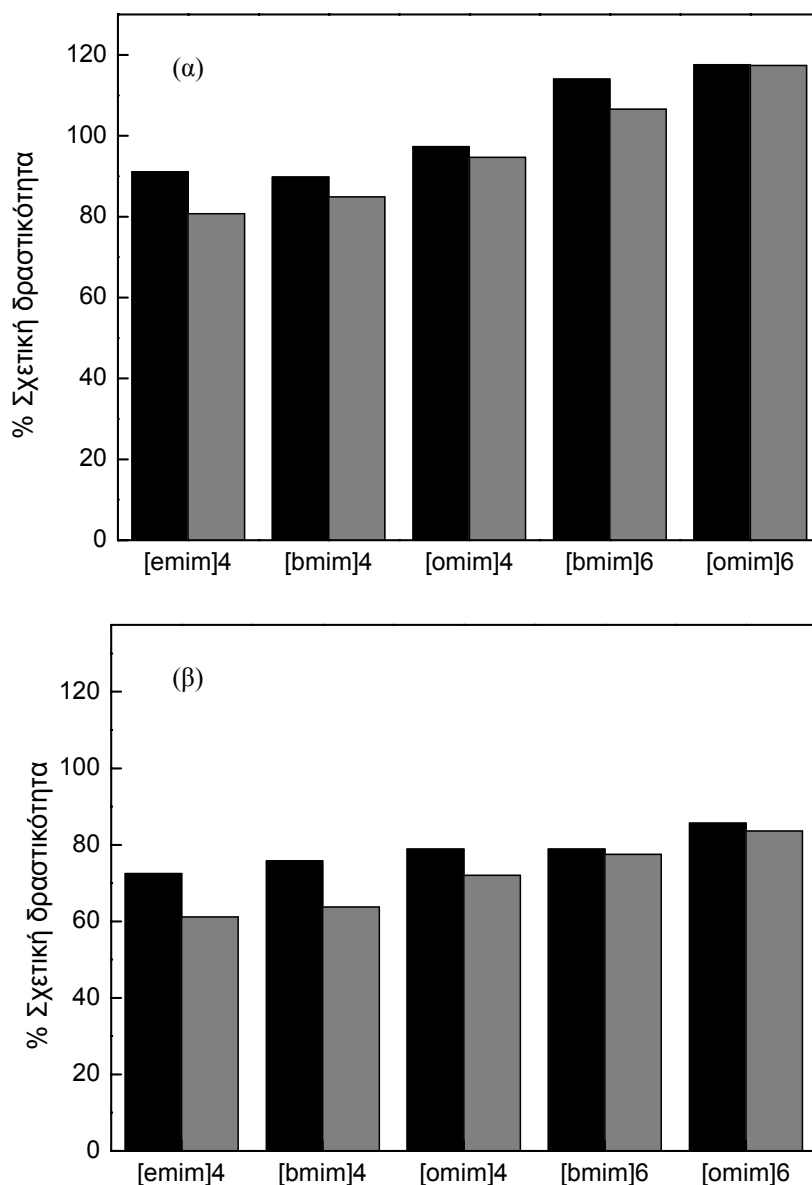
Αντίστοιχα αποτελέσματα λαμβάνονται και στην περίπτωση της lyoRmL (**Σχήμα 6.7**). Η λιπάση αυτή, μετά από επώαση στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ και επαναδιαλυτοποίηση σε νερό διατηρεί μεγάλο μέρος της δραστηριότητάς της, ενώ μετά από επώαση στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ εμφανίζεται ακόμη και ενεργοποιημένη. Αντίθετα, η επώασή της σε υδατικό διάλυμα στις αντίστοιχες θερμοκρασίες οδηγεί σε σημαντική απώλεια της δραστηριότητας με το χρόνο (**Σχήμα 6.7**).



Σχήμα 6.7 Προφίλ σταθερότητας της λυοφιλιωμένης λιπάσης RmL σε υδατικό διάλυμα (○) ή μετά από επώαση στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ (■) και [bmim]BF₄ (□) και επαναδιαλυτοποίηση σε νερό στους (α) 30°C και (β) 60°C.

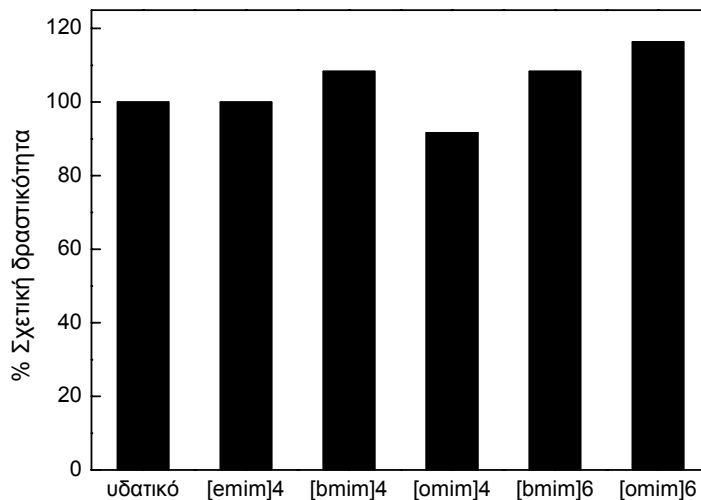
Η θετική επίδραση στην σταθερότητα των δύο λυοφιλιωμένων λιπασών μέσω της προ-επώασης των σε ιοντικά υγρά, παρατηρήθηκε όχι μόνο στα [bmim]PF₆ και [bmim]BF₄ αλλά και σε διάφορα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά (**Σχήμα 6.8**).

Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά και στην περίπτωση της λιπάσης από *M. javanicus*, για την οποία παρατηρήθηκε αύξηση της σταθερότητας μετά από επώαση στο ιοντικό υγρό [emim]BF₄ συγκριτικά με την επώαση της σε υδατικό διάλυμα [Dang *et al.*, 2007].



Σχήμα 6.8 % Σχετική δραστηριότητα μετά από επαναδιαλυτοποίηση σε νερό **(α)** της λυοφιλιωμένης λιπάσης CaLB και **(β)** της λυοφιλιωμένης λιπάσης RmL, οι οποίες έχουν προ-επωαστεί σε διάφορα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά για 24 h (μαύρες μπάρες) και 120 h (γκρι μπάρες) στους 60°C.

Δεδομένου ότι μετά την επαναδιαλυτοποίηση της λιπάσης στο υδατικό διάλυμα περιέχεται και μικρή ποσότητα ιοντικού υγρού (0.25%), ελέγχθηκε εάν η ποσότητα αυτή ασκεί κάποια επίδραση στη δραστηριότητα της λιπάσης (**Σχήμα 6.9**).



Σχήμα 6.9 Δραστηριότητα της λιπάσης B από *Candida antarctica* σε υδατικά διαλύματα περιεκτικότητας 0.25% κ.ο. ιμιδαζολικών ιοντικών υγρών σε σχέση με τη δραστηριότητα της λιπάσης σε καθαρό υδατικό διάλυμα στους 60°C.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του **Σχήματος 6.9** η δραστηριότητα της λιπάσης B από *Candida antarctica* σε υδατικά διαλύματα τα οποία περιέχουν 0.25 % ιοντικού υγρού, δεν παρουσιάζει σημαντική διαφοροποίηση σε σχέση με το καθαρό υδατικό διάλυμα. Στο αποτέλεσμα αυτό κατέληξαν και οι Dang *et al.*, [2007] για υδατικά διαλύματα περιεκτικότητας έως και 3 % ιοντικού υγρού [emim]BF₄.

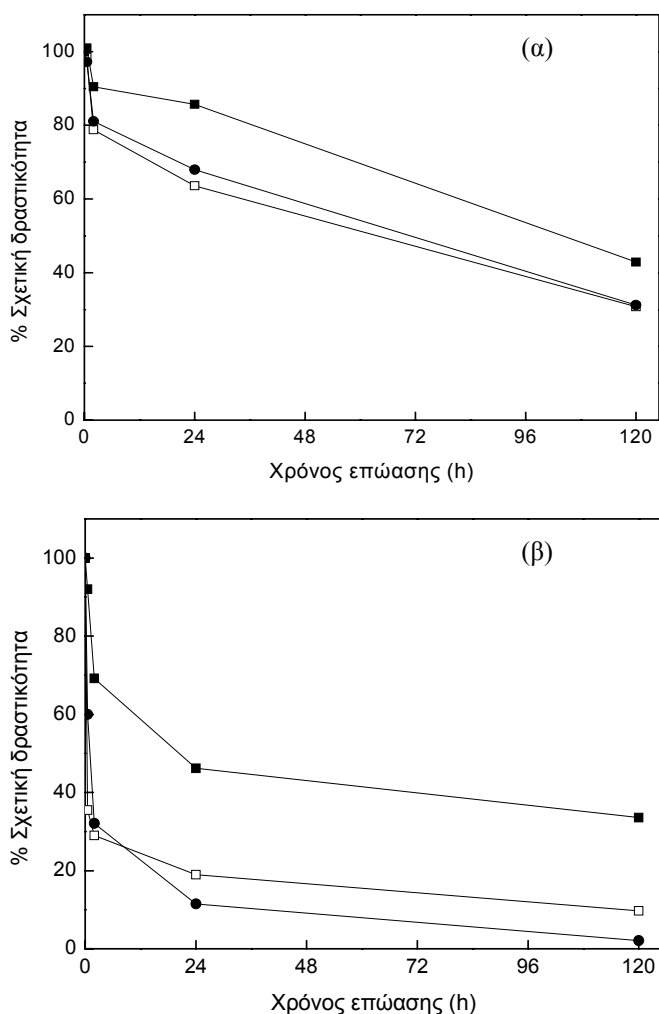
Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει πως η αύξηση της σταθερότητας της προεπωασμένης σε ιοντικό υγρό λιπάσης δεν οφείλεται στην παρουσία του ιοντικού υγρού στο υδατικό διάλυμα αλλά πιθανά σε μία δομική αλλαγή την οποία υφίστανται οι δύο λυοφιλιωμένες λιπάσες κατά την επώασή τους στο ιοντικό υγρό και η οποία διατηρείται ακόμα και μετά την επαναιώρηση των ενζύμων στο νερό. Η επίδραση αυτή θα μελετηθεί αναλυτικά στην Παράγραφο 6.4.

6.3 Μελέτη σταθερότητας ελεύθερων λιπασών

Τα αποτελέσματα των Παραγράφων 6.1 και 6.2 αφορούν στη μελέτη της σταθερότητας ακινητοποιημένων και λυοφιλιωμένων λιπασών σε άνυδρα (προαφυδατωμένα) ιοντικά υγρά. Ωστόσο, η παρουσία του νερού είναι γνωστό ότι επιδρά σημαντικά στα καταλυτικά χαρακτηριστικά των ενζύμων τόσο σε οργανικούς διαλύτες [Halling, 1984, Kuhl & Halling, 1991, Turner *et al.*, 1995] όσο και σε ιοντικά υγρά [Ulbert *et al.*, 2004, Micaêlo & Soares, 2008]. Δεδομένης της φύσης των ιοντικών υγρών, τα μέσα αυτά έχουν την ικανότητα

να δίστανται σε ιόντα παρουσία νερού τα οποία μπορούν να αλληλεπιδρούν με το υδατικό στρώμα το οποίο περιβάλλει το ένζυμο ή ακόμα και άμεσα με την πρωτεϊνική δομή [Zhao, 2005].

Προκειμένου να μελετηθεί η σταθερότητα των λιπασών σε ιοντικά υγρά παρουσία νερού, υδατικά διαλύματα της λιπάσης B από *Candida antarctica* (aqCaLB) και της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* (aqRmL) επώαστηκαν στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆. Στο **Σχήμα 6.10** απεικονίζονται τα προφίλ σταθερότητας των δύο λιπασών στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ καθώς και στο νερό σε δύο θερμοκρασίες, 30°C και 60°C.



Σχήμα 6.10 Προφίλ σταθερότητας της λιπάσης B από *Candida antarctica* στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ (□), [bmim]PF₆ (■) παρουσία 2.5% κ.ο. νερού και σε καθαρό νερό (●) στους (α) 30°C και (β) 60°C.

Σύμφωνα με το **Σχήμα 6.10** η δραστηριότητα της aqCaLB μειώνεται με το χρόνο επώασης σε όλα τα υπό μελέτη μέσα. Η σταθερότητα, ωστόσο, της λιπάσης διαφοροποιείται σημαντικά ανάλογα με το μέσο και τη θερμοκρασία επώασης. Όσον αφορά τη θερμοκρασία

παρατηρείται αναμενόμενη μείωση της σταθερότητας με αύξηση της τιμής αυτής από 30°C σε 60°C. Ανεξάρτητα του μέσου, με την αύξηση της θερμοκρασίας παρατηρείται η γρήγορη απενεργοποίηση της λιπάσης μετά από επώαση 24 h και μείωση του ρυθμού απενεργοποίησης με περαιτέρω επώαση έως τις 120 h. Η αρνητική επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερότητα του υδατικού διαλύματος της λιπάσης είναι περισσότερο έντονη συγκριτικά με το λυοφιλιωμένο ένζυμο (§ 6.2).

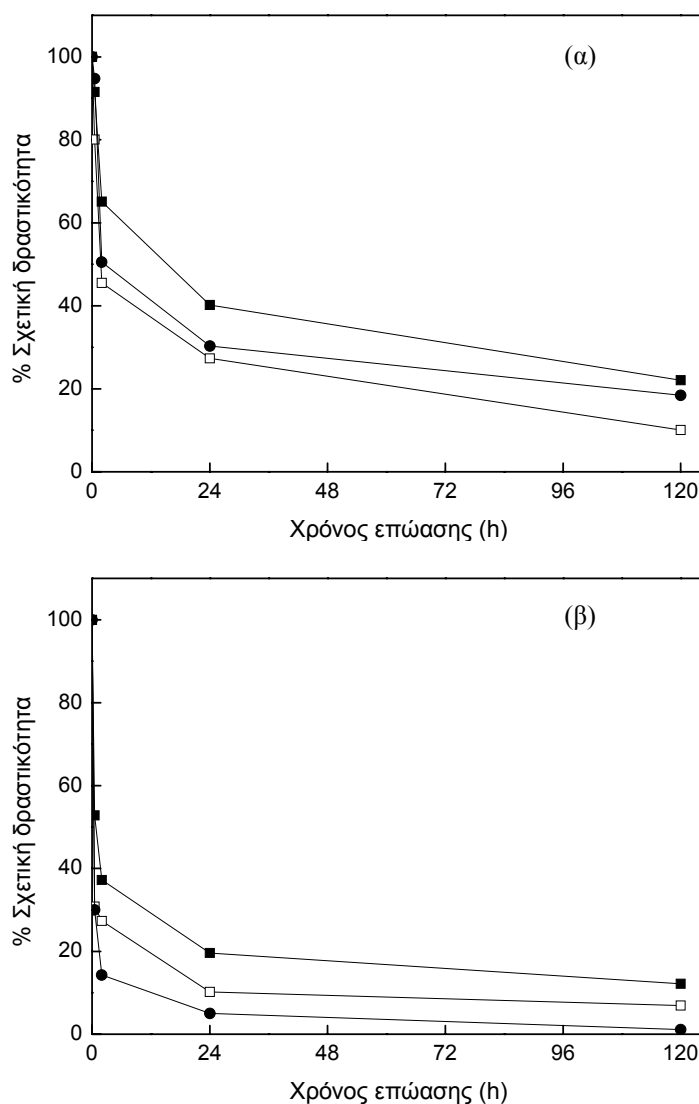
Όσον αφορά στη φύση του μέσου, παρατηρείται σταθεροποιητική επίδραση στο υδρόφοβο ιοντικό υγρό, καθώς και στις δύο θερμοκρασίες, η aqCaLB εμφανίζει υψηλότερη σταθερότητα στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός πως στο μέσο αυτό η σταθερότητα της ελεύθερης λιπάσης CaLB είναι υψηλότερη ακόμα και από εκείνη σε καθαρό νερό. Η σταθερότητα της λιπάσης στο υδρόφιλο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ είναι παρόμοια με εκείνη σε καθαρό νερό.

Στην περίπτωση της aqRmL παρατηρείται επίσης μείωση της δραστηρότητας με τον χρόνο επώασης σε όλα τα υπό μελέτη μέσα (**Σχήμα 6.11**). Συγκριτικά με την aqCaLB, η aqRmL είναι λιγότερο σταθερή και στις δύο θερμοκρασίες. Στη θερμοκρασία των 60°C παρατηρείται ταχεία απενεργοποίηση του ενζύμου, με σημαντική απώλεια της δραστηρότητας κατά την πρώτη κιόλας ώρα επώασης, επιβεβαιώνοντας τη χαμηλή θερμοσταθερότητα αυτής της λιπάσης [Noel & Combes, 2003].

Όσον αφορά στη φύση του μέσου καταδεικνύεται, και στην περίπτωση της aqRmL, η θετική επίδραση του ιοντικού υγρού [bmim]PF₆ στη σταθερότητα του ενζύμου έναντι τόσο του [bmim]BF₄ όσο και του καθαρού νερού.

Σύμφωνα με τα προαναφερόμενα αποτελέσματα και σε σύγκριση με τα άλλα δύο ενζυμικά σκευάσματα (ακινητοποιημένο, λυοφιλιωμένο) τα υδατικά διαλύματα είναι λιγότερο σταθερά σε ιοντικά υγρά. Ωστόσο, είναι σημαντικό πως και υπό αυτή τη μορφή ενζυμικού σκευάσματος, οι μελετώμενες λιπάσες διατηρούν τη δραστηρότητά τους σε ιοντικά υγρά. Είναι δε αξιοσημείωτο το γεγονός πως και οι δύο λιπάσες εμφανίζονται περισσότερο σταθερές συγκριτικά με την περίπτωση επώασής τους στο φυσικό τους περιβάλλον, το νερό.

Μία άλλη σημαντική παρατήρηση συνδέεται με το γεγονός πως τα ενζυμικά διαλύματα της CaLB και RmL είναι περισσότερο σταθερά στο υδρόφοβο [bmim]PF₆ συγκριτικά με το υδρόφιλο [bmim]BF₄, μία τάση, η οποία λαμβάνοντας υπόψη και τα αποτελέσματα των Παραγράφων 6.1 και 6.2, φαίνεται να ισχύει ανεξάρτητα του ενζυμικού σκευάσματος.

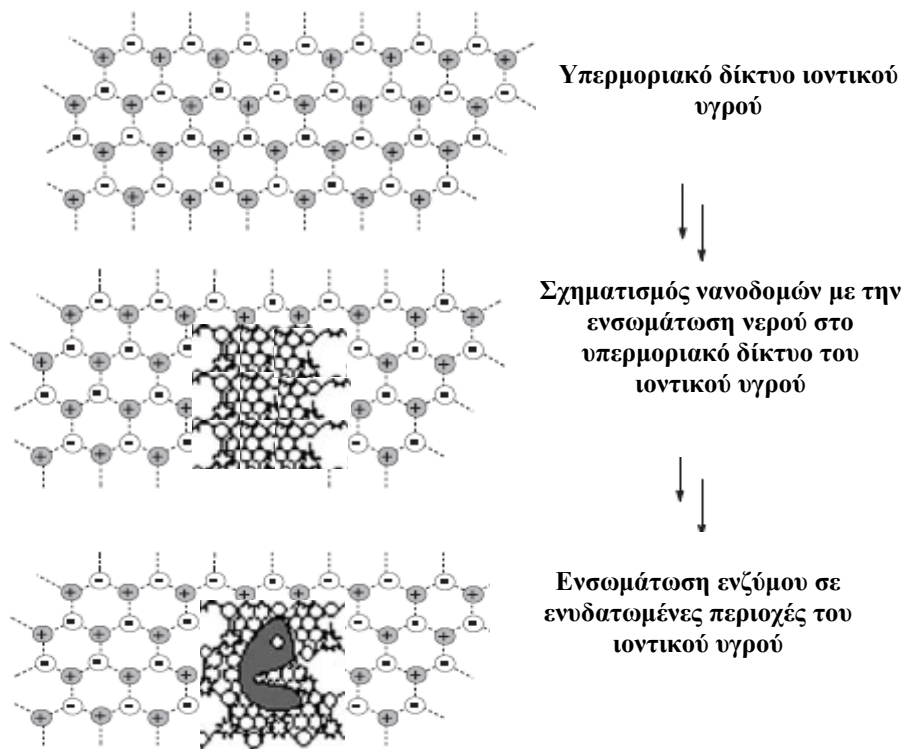


Σχήμα 6.11 Προφίλ σταθερότητας της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ (□), [bmim]PF₆ (■) παρουσία 2.5% κ.ο. νερού και σε καθαρό νερό (●) στους (α) 30°C και (β) 60°C.

Τα υδρόφοβα ιοντικά υγρά τα οποία περιέχουν νερό δεν θεωρούνται ομογενείς διαλύτες αλλά πιστεύεται ότι αποτελούν πολυμερικά υπερμοριακά δίκτυα στα οποία τα ιόντα είναι συνδεδεμένα μέσω δεσμών υδρογόνου [Dupont, 2004, Wang & Voth, 2006, Chang *et al.*, 2008]. Η μονομερής μονάδα του δικτύου αποτελείται από ένα ιμιδαζολικό κατιόν το οποίο περιβάλλεται από τουλάχιστον τρία ανιόντα και κάθε ανιόν περιβάλλεται από τουλάχιστον τρία κατιόντα (**Εικόνα 6.2**) [Dupont, 2004].

Η ενσωμάτωση άλλων μορίων στο δίκτυο του ιοντικού υγρού μπορεί να τροποποιήσει τις φυσικές ιδιότητές του μέσου και ανάλογα με τη φύση του μορίου (π.χ. στην περίπτωση του νερού) να οδηγήσει στο σχηματισμό νανοδομών αποτελούμενων από πολικές και μη-

πολικές περιοχές [Dupont, 2004]. Τα ενυδατωμένα ιοντικά υγρά επιτρέπουν στα ουδέτερα μόρια να βρίσκονται σε λιγότερο πολικές περιοχές και σε πολικά συστατικά να διαχέονται στις περισσότερες πολικές περιοχές.



Εικόνα 6.2 Σχηματική απεικόνιση της ενσωμάτωσης νερού και εν συνεχεία του ενζύμου στις ενυδατωμένες νανοδομές του υπερμοριακού δικτύου του ιοντικού υγρού.

Υπό αυτή τη θεώρηση, τα υδατικά διαλύματα των δύο λιπασών σε υδρόφοβα ιοντικά υγρά μπορεί να θεωρηθεί ότι περιέχονται σε υδρόφιλες περιοχές του δικτύου. Με βάση τα στοιχεία των Dupont [2004] και Lozano *et al.*, [2005] μία πιθανή απεικόνιση του υπερμοριακού δικτύου των ιοντικών υγρών και η ενσωμάτωση των ενζυμικών μορίων σε υδρόφιλες περιοχές του δικτύου αυτού αποδίδεται στην **Εικόνα 6.2**. Συνεπώς το ιοντικό υγρό μπορεί να θεωρηθεί ως μέσο ακινητοποίησης και όχι απλά ως μέσο επώασης [Lozano *et al.*, 2001b, 2005], γεγονός το οποίο μπορεί πιθανά να εξηγήσει την σταθεροποίηση των aqCaLB και aqRmL στο υδρόφοβο [bmim]PF₆.

Αντίθετα, η σταθερότητα των δύο λιπασών στο υδρόφιλο [bmim]BF₄ παρουσία νερού αναμένεται να σχετίζεται με τη σειρά Hofmeister, καθώς το ιοντικό αυτό υγρό διάσπεται σε ιόντα στο νερό. Σύμφωνα με τη σειρά αυτή ο συνδυασμός χαοτροπικών ανιόντων και κοσμοτροπικών κατιόντων αποσταθεροποιεί τα ένζυμα. Τα ιόντα χαρακτηρίζονται ως κοσμοτροπικά ή χαοτροπικά ανάλογα με την ικανότητά τους να αλληλεπιδρούν με το νερό

και να τροποποιούν τη δομή του νερού. Όσον αφορά το τελευταίο, το νερό αποτελεί μία πολυμερή δομή χαμηλής εντροπίας το οποίο απαντάται είτε ως χαμηλής πυκνότητας νερό (Low Density Water, LDW) είτε ως υψηλής πυκνότητας νερό (High Density Water, HDW), το οποίο είναι περισσότερο και λιγότερο δομημένο, αντίστοιχα [Zhao, 2005]. Οι δύο αυτοί τύποι συνδέονται με την ακόλουθη ισορροπία :



Ένα κοσμοτροπικό ιόν αλληλεπιδρά ισχυρότερα με το νερό από ότι τα μόρια του νερού μεταξύ τους και τείνει να αυξάνει τη δομή του νερού μετατοπίζοντας την προαναφερόμενη ισορροπία προς το LDW. Το αντίθετο φαινόμενο παρατηρείται στην περίπτωση ενός χαοτροπικού ιόντος [Yang, 2009].

Συνεπώς, η σταθεροποιητική επίδραση των κοσμοτροπικών ανιόντων στα ένζυμα μπορεί να εξηγηθεί μέσω της ισχυρής αλληλεπίδρασής τους με τα μόρια νερού, τα οποία συνδέονται με το ενζυμικό μόριο, με αποτέλεσμα τον αμοιβαίο αποκλεισμό τους από την ενζυμική επιφάνεια. Έτσι το ενζυμικό μόριο ελαχιστοποιεί την επιφάνεια η οποία εκτίθεται στο διαλύτη και άρα υιοθετεί μία περισσότερο συμπαγή και λιγότερο ευέλικτη δομή [Collins *et al.*, 2007, Trodler & Pleiss, 2008]. Αντίθετα τα χαοτροπικά ανιόντα δεν αλληλεπιδρούν ισχυρά με τα μόρια του νερού και προτιμούν να συνδέονται στη μεσεπιφάνεια πρωτεΐνης-νερού αποσταθεροποιώντας τα ένζυμα. Όσον αφορά τα κατιόντα φαίνεται ότι αυτά έχουν την ικανότητα να επιδρούν στα ενζυμικά μόρια έμμεσα μέσω αλληλεπίδρασης με τα ανιόντα. Συγκεκριμένα έχει αναφερθεί πως κοσμοτροπικά κατιόντα μειώνουν τη διαθεσιμότητα των κοσμοτροπικών ανιόντων στο διάλυμα (μέσω σχηματισμού ζευγών) και μετριάζουν την κοσμοτροπική συμπεριφορά των ανιόντων αυτών [Eggers & Valentine, 2001].

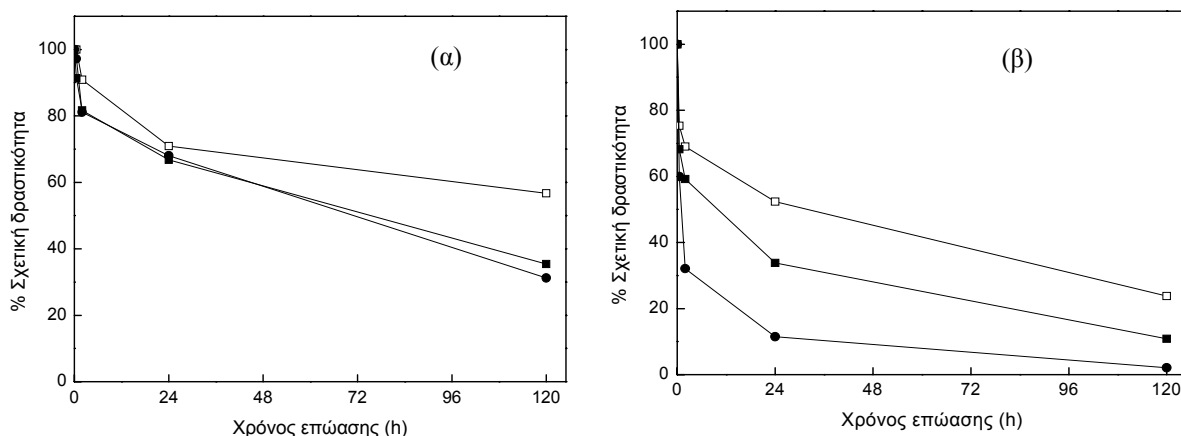
Η κοσμοτροπικότητα των ιόντων μπορεί να ποσοτικοποιηθεί από διάφορες θερμοδυναμικές παραμέτρους, μεταξύ των οποίων η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη είναι ο συντελεστής ιξώδους B. Συνήθως κοσμοτροπικά ιόντα χαρακτηρίζονται από περισσότερο θετικές τιμές του συντελεστή ιξώδους B συγκριτικά με τα χαοτροπικά ιόντα. Το ανιόν BF_4^- είναι χαοτροπικό (ο συντελεστής ιξώδους B ισούται με -0.093) [Zhao, 2005] και αν και οι συντελεστές ιξώδους B των ιμιδαζολικών κατιόντων δεν είναι γνωστοί, εντούτοις προκαταρκτικά αποτελέσματα υποδεικνύουν πως το $[\text{bmim}]^+$ είναι κοσμοτροπικό [Pandey *et al.*, 2004, Miki *et al.*, 2005]. Ο συνδυασμός συνεπώς του χαοτροπικού ανιόντος και του κοσμοτροπικού κατιόντος μπορεί πιθανά να εξηγήσει την χαμηλότερη σταθερότητα των δύο λιπασών στο ιοντικό υγρό $[\text{bmim}]\text{BF}_4$.

Βέβαια ο συνδυασμός χαοτροπικού ανιόντος και κοσμοτροπικού κατιόντος ισχύει επίσης και για το [bmim]PF₆, και μάλιστα το ανιόν PF₆⁻ είναι περισσότερο χαοτροπικό (ο συντελεστής ιξώδους B ισούται με -0.21) από το ανιόν BF₄⁻ [Zhao, 2005]. Ωστόσο, οι δύο λιπάσες ήταν περισσότερο σταθερές σε αυτό το ιοντικό υγρό, αποδεικνύοντας πως η σειρά Hofmeister δεν εφαρμόζεται ικανοποιητικά στην περίπτωση αυτή. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγηθεί, όπως αναφέρθηκε και προηγουμένως, μέσω της ύπαρξης του εκτεταμένου δικτύου ιόντων τα οποία συνδέονται μεταξύ τους με δεσμούς υδρογόνου ή ακόμα και με βάση την υψηλή υδροφοβικότητα του μέσου. Και στις δύο περιπτώσεις η διάσταση του ιοντικού υγρού [bmim]PF₆ σε ιόντα περιορίζεται σημαντικά επιδεικνύοντας μικρότερη τάση αποσταθεροποίησης του ενζύμου από το χαοτροπικό PF₆⁻ και το κοσμοτροπικό [bmim]⁺ [Yang, 2009].

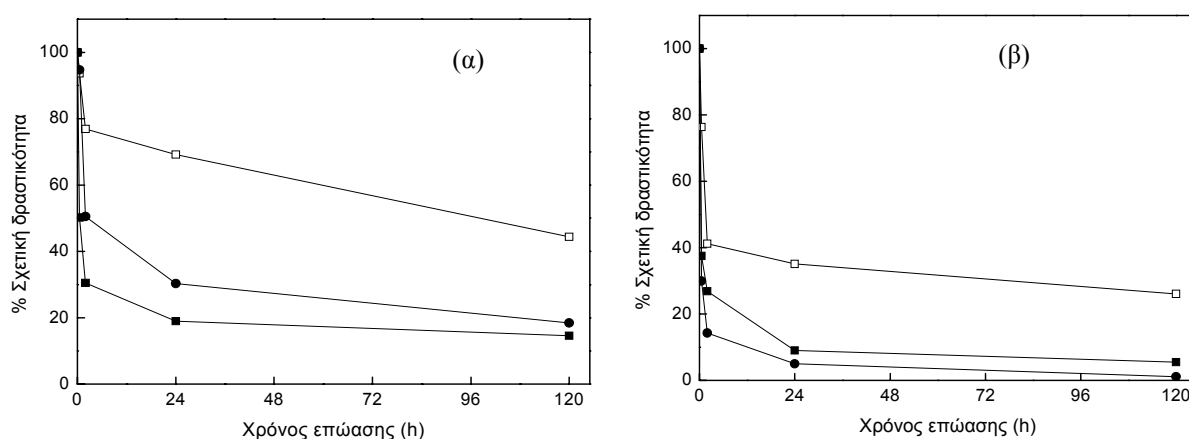
Η αλληλεπίδραση του [bmim]BF₄ με το νερό το οποίο περιβάλλει το ένζυμο δεν περιγράφεται μόνο μέσω της κοσμοτροπικότητας των ιόντων του. Πιθανά η χαμηλότερη σταθερότητα των δύο λιπασών στο υδρόφιλο [bmim]BF₄ μπορεί να εξηγηθεί και μέσω της τάσης αυτού του ιοντικού υγρού να απομακρύνει μόρια νερού από την ενζυμική επιφάνεια επάγοντας τη μετουσίωσή του [Laszlo & Compton, 2001, Kaar *et al.*, 2003, Eckstein *et al.*, 2004, Zhao, 2005].

Τα προηγούμενα αποτελέσματα αφορούν στη μελέτη της σταθερότητας των δύο λιπασών παρουσία 2.5 % κ.ο. νερού στο ιοντικό υγρό. Προκειμένου, να μελετηθεί η επίδραση μεγαλύτερων ποσοτήτων νερού στη σταθερότητα των ενζύμων, υδατικά διαλύματα των CaLB και RmL προστέθηκαν στα ιοντικά υγρά [bmim]PF₆ και [bmim]BF₄ ώστε η τελική ποσότητα του νερού στο μέσο επώασης να ισούται με 5.0 % κ.ο. Στα **Σχήματα 6.12** και **6.13** απεικονίζονται τα προφίλ σταθερότητας των δύο λιπασών στα ιοντικά υγρά [bmim]PF₆ και [bmim]BF₄ παρουσία 5.0 % κ.ο. νερού καθώς και σε καθαρό νερό σε θερμοκρασία 30°C και 60°C.

Με βάση τον υδρόφιλο χαρακτήρα του [bmim]BF₄ και αν ο μηχανισμός απενεργοποίησης στηρίζεται στην απομάκρυνση μορίων νερού από την ενζυμική επιφάνεια, η αύξηση της περιεκτικότητας του μέσου αυτού σε νερό θα ήταν αναμενόμενο να επιδράσει θετικά στην ενζυμική σταθερότητα.



Σχήμα 6.12 Προφίλ σταθερότητας της λιπάσης B από *Candida antarctica* στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ (□), [bmim]PF₆ (■) παρουσία 5.0 % κ.ο. νερού και σε καθαρό νερό (●) στους (α) 30°C και (β) 60°C.



Σχήμα 6.13 Προφίλ σταθερότητας της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ (□), [bmim]PF₆ (■) παρουσία 5.0 % κ.ο. νερού και σε καθαρό νερό (●) στους (α) 30°C και (β) 60°C.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα των **Σχημάτων 6.12** και **6.13** η υπόθεση αυτή επαληθεύεται. Και για τις δύο υπό μελέτη λιπάσες, η αύξηση του περιεχόμενου νερού από 2.5 σε 5.0 % κ.ο. στο υδρόφιλο [bmim]BF₄ βελτίωσε σημαντικά τη σταθερότητα των ενζύμων. Η aqCaLB διατήρησε διπλάσιο ποσοστό της δραστηριότητάς της όταν επώαστηκε στο [bmim]BF₄ παρουσία 5.0 % νερού, ανεξάρτητα της θερμοκρασίας επώασης. Η aqRmL τετραπλασίασε την εναπομείνουσα δραστηριότητά της στην θερμοκρασία των 30°C και την τριπλασίασε στη θερμοκρασία των 60°C, με την αύξηση της περιεκτικότητας του [bmim]BF₄ σε νερό.

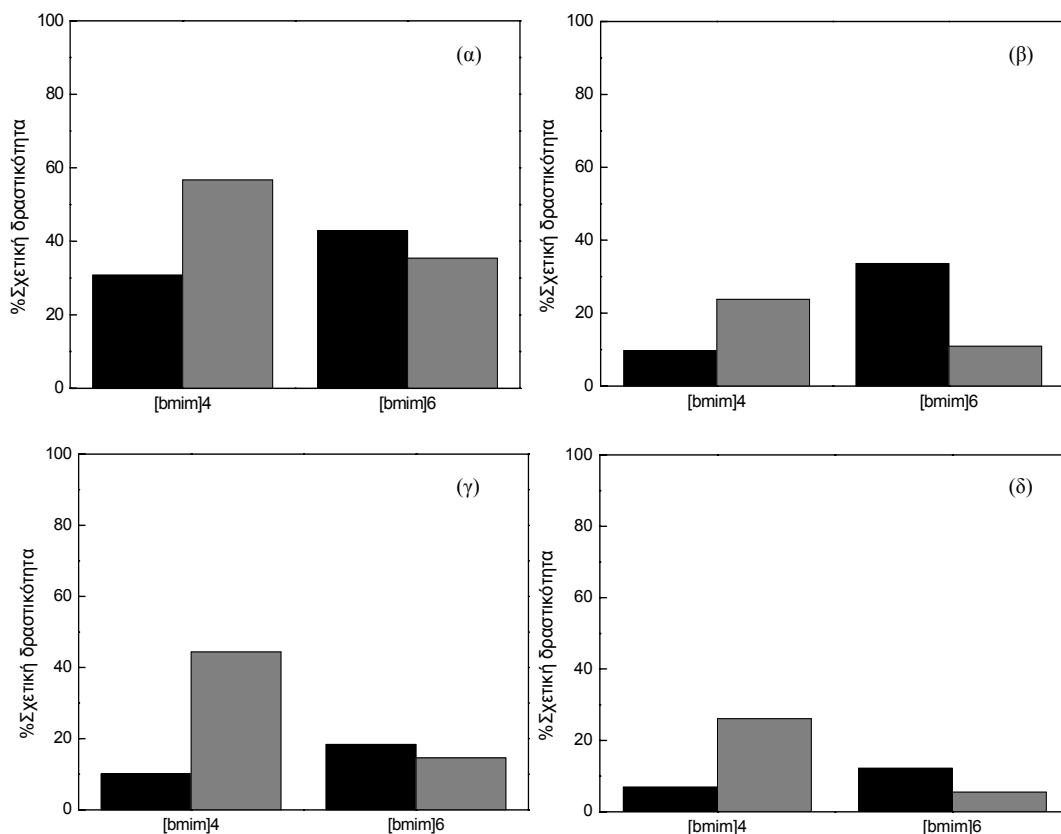
Ενδιαφέρον παρουσιάζει, ωστόσο, το γεγονός ότι η αύξηση του περιεχόμενου νερού επέδρασε αρνητικά στην σταθερότητα των δύο λιπασών στο υδρόφοβο [bmim]PF₆. Η ύπαρξη

μίας βέλτιστης τιμής περιεκτικότητας σε νερό για τη σταθερότητα των ενζύμων αποτελεί μία καλά μελετημένη τάση στην περίπτωση των οργανικών διαλυτών [Valivety *et al.*, 1992, Soares *et al.*, 2003, Halling *et al.*, 2004] και έχουν αναφερθεί αντίστοιχα αποτελέσματα για ένζυμα διαφόρων κατηγοριών σε ιοντικά υγρά [Laszlo & Compton, 2001, Ulbert *et al.*, 2004, Barahona *et al.*, 2006, Micaêlo & Soares, 2008]. Συγκεκριμένα δε για τα υδρόφοβα ιοντικά υγρά, όπως το [bmim]PF₆, έχει αναφερθεί πως μικρότερες ποσότητες νερού απαιτούνται για τη διατήρηση της βέλτιστης ενζυμικής δραστηριότητας και σταθερότητας [Zhao, 2005].

Λαμβάνοντας υπόψη και τη θερμοκρασία επώασης παρατηρείται επίσης, με βάση τα αποτελέσματα των **Σχημάτων 6.12** και **6.13**, ότι η μείωση της σταθερότητας στο [bmim]PF₆ με την αύξηση της περιεκτικότητας του μέσου σε νερό είναι περισσότερο έντονη στη θερμοκρασία των 60°C, τόσο στην περίπτωση της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* όσο και για την περισσότερο θερμοσταθερή λιπάση B από *Candida antarctica*. Η αποσταθεροποίηση των ενζύμων σε υψηλές θερμοκρασίες οφείλεται στην απώλεια της φυσικής, καταλυτικά ενεργής διαμόρφωσης τους, και είναι δυνατόν να σχετίζεται με την ποσότητα του νερού στο μη συμβατικό μέσο [Halling, 1984, Kuhl & Halling, 1991, Turner *et al.*, 1995]. Πρόσφατα οι Micaêlo & Soares, [2008] κατέδειξαν με μελέτες πρωτεϊνικής δυναμικής (protein dynamics) πως σε μικρή περιεκτικότητα νερού το υδρόφοβο [bmim]PF₆ ελαχιστοποιεί την επίδραση της αύξησης της θερμοκρασίας στη μέση τετραγωνική απόκλιση (rmsd) της θέσης των C_α ατόμων σε σχέση με την κρυσταλλογραφική δομή της κουτινάσης, επιτρέπει δηλαδή την υιοθέτηση μίας δομής παρόμοιας με τη φυσική διαμόρφωση του ενζύμου. Αντίθετα, οι ερευνητές αναφέρουν ότι η αύξηση της περιεκτικότητας του ιοντικού υγρού σε νερό σε συνδυασμό με υψηλή θερμοκρασία επώασης, διαταράσσει συγκεκριμένες περιοχές της ενζυμικής δομής οδηγώντας σε αποσταθεροποίηση του ενζύμου [Micaêlo & Soares, 2008].

Η τροποποίηση της δομής των aqCaLB και aqRmL με την αύξηση του περιεχόμενου νερού από 2.5 σε 5.0 % στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ αποτελεί μία πιθανή εξήγηση για τη μείωση της σταθερότητας των δύο λιπασών και θα μελετηθεί αναλυτικά στην Παράγραφο 6.4.

Επιπλέον, της μείωσης της σταθερότητας των ενζύμων στο [bmim]PF₆ με την αύξηση του περιεχόμενου νερού, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός πως παρατηρείται στο μέσο αυτό και μικρότερη σταθερότητα των δύο λιπασών συγκριτικά με το [bmim]BF₄ (**Σχήμα 6.14**).



Σχήμα 6.14 Σχετική δραστηριότητα (%) της λιπάσης B από *Candida antarctica* (α, β) και της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* (γ, δ) στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ παρουσία 2.5% κ.ο. νερού (μαύρες μπάρες) και 5.0% κ.ο. νερού (γκρι μπάρες) μετά από 120 h επώασης στους (α, γ) 30°C και (β, δ) 60°C.

Με βάση τα προαναφερόμενα αποτελέσματα σταθερότητας, οι δύο λιπάσες επέδειξαν, ανεξάρτητα της προέλευσης, του ενζυμικού σκευάσματος και τις θερμοκρασίας επώασης, αντίθετη συμπεριφορά, δηλαδή υψηλότερη σταθερότητα στο υδρόφοβο [bmim]PF₆.

Η εξήγηση για τη διαφοροποίηση αυτή μπορεί να συνδέεται πιθανά με τη σειρά Hofmeister. Σε μικρές περιεκτικότητες νερού, η υψηλή υδροφοβικότητα του [bmim]PF₆ περιορίζει την διάστασή του σε ιόντα, εξαιτίας της μικρής διαθεσιμότητας μορίων νερού στον κύριο όγκο του διαλύτη [Yang, 2009]. Ωστόσο, έχει παρατηρηθεί πως αυξανόμενης της ποσότητας του νερού, το ένζυμο είναι ικανό να συγκρατήσει ένα ποσοστό μόνο αυτού του νερού στην επιφάνειά του και έτσι η προστιθέμενη ποσότητα εντοπίζεται βασικά στον κύριο όγκο του ιοντικού υγρού [Micaêlo & Soares, 2008]. Σε αυτή την περίπτωση η διάσταση του ιοντικού υγρού σε ιόντα είναι πιθανό να λαμβάνει χώρα, με συνέπεια το ισχυρά χαοτροπικό ανιόν PF₆⁻ να οδηγεί σε σημαντική αποσταθεροποίηση του ενζύμου συγκριτικά με το λιγότερο χαοτροπικό BF₄⁻.

6.4 Δομικές μελέτες λιπασών σε ιοντικά υγρά

Τα αποτελέσματα των προηγούμενων παραγράφων καταδεικνύουν τη σημαντική σταθεροποιητική επίδραση των ιοντικών υγρών στις λιπάσες από *Candida antarctica* και *Rhizomucor miehei*. Η σταθερότητα των λιπασών στα νέα αυτά μέσα φαίνεται να εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους, όπως την προέλευση της λιπάσης, το είδος του ενζυμικού σκευάσματος, τη θερμοκρασία, τη περιεκτικότητα του μέσου σε νερό και κυρίως από τη φύση του ιοντικού υγρού. Η σταθερότητα των λιπασών μπορεί πιθανά να εξηγηθεί μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ιοντικού υγρού και του ενζυμικού μορίου. Προκειμένου να εκμεταλλευτεί κάποιος πλήρως τις δυνατότητες των ιοντικών υγρών για αντιδράσεις ενζυμικής κατάλυσης είναι απαραίτητη η κατανόηση των μηχανισμών απενεργοποίησης ή και ενεργοποίησης των ενζύμων στα νέα αυτά μέσα.

Η απώλεια της δραστηριότητας των ενζύμων στα μη συμβατικά μέσα συνδέεται συνήθως με αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεϊνικής δομής και διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές μπορούν να εφαρμοστούν για την παρακολούθηση αυτών των αλλαγών. Στις τεχνικές αυτές συμπεριλαμβάνονται μεταξύ άλλων ο κυκλικός διχρωσμός, η φασματοσκοπία φθορισμού και η φασματοσκοπία υπερύθρου. Η εφαρμογή των μεθόδων αυτών έχει αναφερθεί για την παρακολούθηση και τη συσχέτιση δομικών αλλαγών της κυτταρινάσης από *Tricoderma reesi* [Turner *et al.*, 2003], της μονελλίνης [Baker *et al.*, 2004], της λιπάσης B από *Candida antarctica* [Lau *et al.*, 2004, De Diego *et al.*, 2005], της παπαΐνης [Lou *et al.*, 2006c], της α-χυμοθρυψίνης [De Diego *et al.*, 2004, Lozano *et al.*, 2005] και του κυτοχρώματος c [Fujita *et al.*, 2005] με τη σταθερότητα αυτών σε διάφορα ιοντικά υγρά.

Στην παράγραφο αυτή θα εξεταστεί η δυνατότητα εφαρμογής των προαναφερόμενων τεχνικών για τη μελέτη της τροποποίησης της δομής της λιπάσης B από *Candida antarctica* και της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* σε ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά και μέσω των τεχνικών αυτών θα επιχειρηθεί η κατανόηση των σχέσεων δομής-σταθερότητας των ενζύμων στα μέσα αυτά.

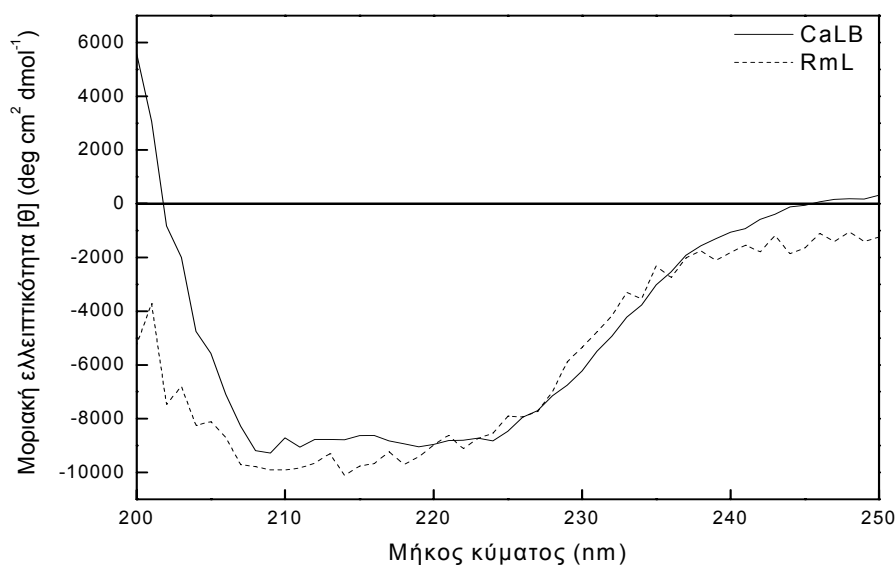
6.4.1 Δομικές μελέτες λιπασών σε ιοντικά υγρά μέσω κυκλικού διχρωσμού

Ο κυκλικός διχρωσμός αποτελεί μία φασματοσκοπική τεχνική η οποία επιτρέπει την ανάλυση δομικών αλλαγών στη δευτεροταγή δομή του ενζύμου. Στο απώτερο υπεριώδες (far-UV, 190-240 nm) ο πεπτιδικός δεσμός των πρωτεϊνών απορροφά και το φάσμα κυκλικού διχρωσμού μίας πρωτεΐνης επιτρέπει, μετά από ανάλυση με κατάλληλους αλγορίθμους, τον προσδιορισμό των περιεχόμενων στοιχείων δευτεροταγούς δομής, όπως οι α-έλικες και οι β-

πτυχές [Hammes, 2005b]. Η τεχνική αυτή έχει εφαρμοστεί για τη μελέτη της δευτεροταγούς δομής πρωτεϊνών κυρίως σε υδατικά διαλύματα [Rodger & Norden, 1996] αλλά και σε οργανικούς διαλύτες [Vecchio *et al.*, 1999, Simon *et al.*, 2001, McCabe *et al.*, 2005].

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση των ιοντικών υγρών στη δομή της λιπάσης B από *Candida antarctica* και της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* επιχειρήθηκε ο προσδιορισμός των στοιχείων δευτεροταγούς δομής τους μέσω του κυκλικού διχρωισμού. Δεδομένου ότι τα [bmim]PF₆ και [bmim]BF₄ δεν διαλυτοποιούν τις υπό μελέτη λιπάσες, αυτές προστέθηκαν στα ιοντικά υγρά με τη μορφή των υδατικών τους διαλυμάτων (aqCaLB και aqRmL). Επιπρόσθετα, αναλύθηκε και η δομή των δύο λιπασών σε νερό ως σημείο αναφοράς θεωρώντας ότι τα διαλύματα αυτά αντιστοιχούν στη φυσική διαμόρφωση των ενζύμων.

Η ανάλυση του φάσματος των δύο λιπασών σε υδατικό διάλυμα (**Σχήμα 6.15**) πραγματοποιήθηκε μέσω του αλγόριθμου SELCON 2 [Sreerama & Woody, 1993].



Σχήμα 6.15 Φάσμα κυκλικού διχρωισμού της λιπάσης B από *Candida antarctica* (μαύρη γραμμή) και της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* (διακεκομμένη γραμμή) σε υδατικό διάλυμα Tris-HCl, pH 7.5.

Τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής που προσδιορίστηκαν μέσω των φασμάτων κυκλικού διχρωισμού δίνονται στον **Πίνακα 6.3**. Τα στοιχεία αυτά συμφωνούν με τα αντίστοιχα τα οποία προκύπτουν από την ανάλυση των κρυσταλλογραφικών δομών [Brzozowski *et al.*, 1992, Uppenberg *et al.*, 1994], καταδεικνύοντας τη δυνατότητα αξιοποίησης αυτής της τεχνικής για την ανάλυση της δευτεροταγούς δομής των ενζύμων.

Πίνακας 6.3 Ποσοτικός προσδιορισμός των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής της λιπάσης B από *Candida antarctica* και της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* σε υδατικό διάλυμα Tris-HCl, pH 7.5 μέσω των φασμάτων κυκλικού διχρωισμού.

Στοιχεία δευτεροταγούς δομής	Λιπάση	
	B από <i>Candida antarctica</i>	<i>Rhizomucor miehei</i>
α-έλικα	32.4 (35.0) ¹	28.0 (27.9) ²
β-πτυχή	10.9 (12.3) ¹	15.4 (19.3) ²
Άλλα	46.5 (52.7) ¹	56.6 (52.8) ²

¹ Στοιχεία δευτεροταγούς δομής από την X-ray ανάλυση της δομής της λιπάσης [Uppenberg *et al.*, 1994].

² Στοιχεία δευτεροταγούς δομής από την X-ray ανάλυση της δομής της λιπάσης [Brzozowski *et al.*, 1992]

Ωστόσο, στην περίπτωση επώασης των δύο λιπασών υπό τη μορφή των υδατικών τους διαλυμάτων (aqCaLB και aqRmL) στα ιοντικά υγρά η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού δεν ήταν δυνατόν να εφαρμοστεί. Η αδυναμία εφαρμογής της τεχνικής αυτής οφείλεται αφενός στη μικρή ένταση του σήματος και αφετέρου στον υψηλό θόρυβο εξαιτίας της υψηλής απορρόφησης του ιμιδαζολικού δακτυλίου των ιοντικών υγρών στην συγκεκριμένη περιοχή του φάσματος (200-250 nm). Η ανάλυση δεν μπόρεσε να πραγματοποιηθεί ακόμα και στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκαν υδατικά διαλύματα των ενζύμων παρουσία έως 2.5 % ιοντικού υγρού. Στο ίδιο συμπέρασμα, δηλαδή την αδυναμία εφαρμογής της συγκεκριμένης τεχνικής, προκειμένου για ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά φαίνεται να καταλήγουν και οι Lau *et al.*, [2004].

Ωστόσο, οι Lozano *et al.*, [2005] ανέλυσαν μέσω του φάσματος κυκλικού διχρωισμού τη δομή της λιπάσης B από *Candida antarctica* (υπό τη μορφή υδατικού διαλύματος) στο νερό, στο εξάνιο και στα ιοντικά υγρά [emim]NTf₂ και [btma]NTf₂. Με βάση την ανάλυση του φάσματος παρατήρησαν πως η επώαση της λιπάσης στο νερό και τον οργανικό διαλύτη οδήγησε σε μείωση των α-ελίκων και β-πτυχών με ταυτόχρονη αύξηση του τυχαίου σπειράματος, αλλαγές οι οποίες δικαιολογούν την απενεργοποίηση των ενζύμων στα μέσα αυτά. Στα ιοντικά υγρά, ωστόσο, παρατηρήθηκε μία μικρή μείωση των α-ελίκων και αύξηση των β-πτυχών, ενώ το ποσοστό του τυχαίου σπειράματος παρέμεινε πρακτικά ανεπηρέαστο [De Diego *et al.*, 2005, Lozano *et al.*, 2005]. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν την υιοθέτηση μίας νέας δραστικής διαμόρφωσης του ενζύμου στα ιοντικά υγρά, η οποία αποδόθηκε από τους συγγραφείς στην ικανότητα των ιοντικών υγρών να σχηματίζουν ένα υπερμοριακό δίκτυο το οποίο περιβάλλει τη λιπάση με τέτοιο τρόπο ώστε το ιοντικό υγρό να

αποτελεί πιθανά ένα «φορέα ακινητοποίησης» και όχι απλά το μέσο επώασης [De Diego *et al.*, 2005].

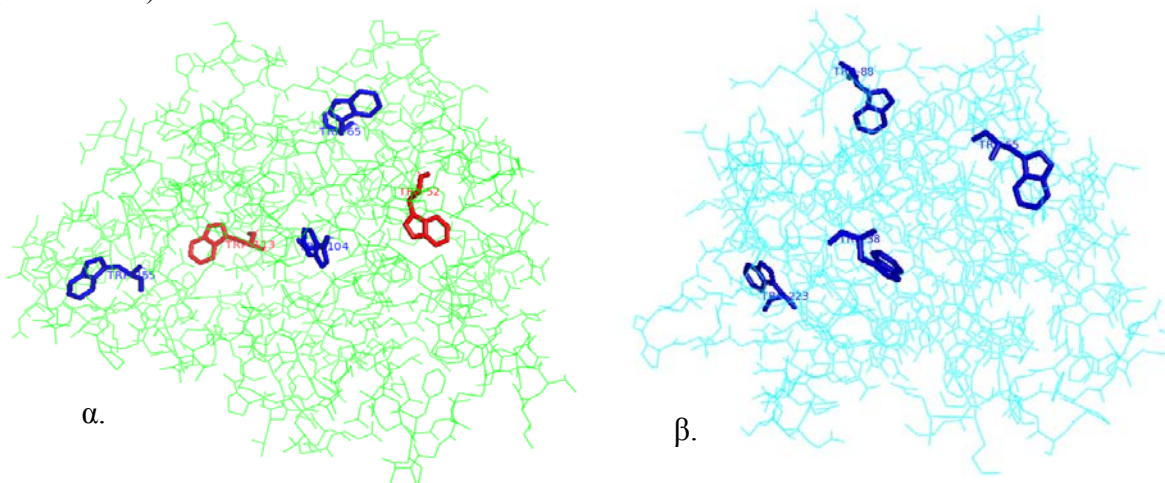
6.4.2 Δομικές μελέτες λιπασών σε ιοντικά υγρά μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού

Η φασματοσκοπία φθορισμού αποτελεί μία τεχνική η οποία εφαρμόζεται ευρέως για την παρακολούθηση της διαδικασίας αποδιάταξης πρωτεϊνικών μορίων [Royer *et al.*, 1993, Eftink, 1994, 2002, Monsellier & Bedouelle, 2005]. Η ευρεία εφαρμογή της στηρίζεται στην υψηλή ευαισθησία της μεθόδου, η οποία επιτρέπει τη χρήση μικρομοριακών ποσοτήτων πρωτεΐνης. Το γεγονός αυτό μειώνει τις απαιτούμενες ποσότητες ενζύμου και τους περιορισμούς που σχετίζονται με τη συσσωμάτωση των ενζυμικών μορίων στην περίπτωση όπου χρησιμοποιούνται υψηλές συγκεντρώσεις του ενζύμου [Eftink, 1994]. Οι ενδογενείς φθορίζουσες ομάδες των πρωτεϊνών περιλαμβάνουν κυρίως τα κατάλοιπα τρυπτοφάνης και τυροσίνης. Τα κατάλοιπα τρυπτοφάνης αποτελούν ιδιαίτερα χρήσιμους ανιχνευτές καθώς ο δακτύλιος ινδολίου είναι ιδιαίτερα ευαίσθητος σε αλλαγές στο μικροπεριβάλλον του και καθώς λίγα μόνο αμινοξέα τρυπτοφάνης απαντώνται σε ενζυμικά μόρια.

Μεταξύ των διαφόρων χαρακτηριστικών των φασμάτων φθορισμού, η ένταση (I) του εκπεμπόμενου φωτός και το μήκος κύματος στο οποίο η ένταση I είναι μέγιστη ($\lambda_{\max}$) είναι τα περισσότερο ευρέως χρησιμοποιούμενα [Eftink, 2002]. Γενικά η αξιοποίηση της έντασης φθορισμού για την παρακολούθηση της αποδιάταξης των ενζύμων παρουσιάζει κάποιες δυσκολίες, καθώς το σήμα αυτό σχετίζεται με την ποσότητα της πρωτεΐνης. Επιπρόσθετα, κατά περιπτώσεις, η ένταση φθορισμού μπορεί να αυξάνεται, να μειώνεται ή ακόμα και να μην διαφοροποιείται σημαντικά ανάμεσα στη φυσική και αποδιαταγμένη μορφή του ενζύμου και συνεπώς δεν υπάρχει κάποιος γενικός κανόνας για την συσχέτιση αυτής της παραμέτρου με την αποδιάταξη των πρωτεϊνών [Santoro & Bolen, 1988, Tan *et al.*, 1998, Dumoulin *et al.*, 2002]. Η παράμετρος $\lambda_{\max}$ ωστόσο, δεν εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ενζύμου. Η τιμή του $\lambda_{\max}$ εξαρτάται από την πολικότητα του περιβάλλοντος των καταλοίπων τρυπτοφάνης και μπορεί να κυμαίνεται από 308 έως περισσότερο από 350 nm, με τα κατάλοιπα να εμφανίζουν εκπομπή σε μικρότερα μήκη κύματος (blue shift) σε μη πολικά περιβάλλοντα. Η αποδιάταξη του ενζύμου οδηγεί πάντα σε αύξηση του $\lambda_{\max}$ (red shift) σε τιμές περίπου ίσες με 345-355 nm [Eftink, 1994].

Με βάση τα παραπάνω, η φασματοσκοπία φθορισμού χρησιμοποιήθηκε με σκοπό τη μελέτη της αποδιάταξης της λιπάσης B από *Candida antarctica* και της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* καθώς και την κατανόηση των δομικών μεταβάσεων, οι οποίες

επηρεάζουν τη δομή των ενζύμων σε ιοντικά υγρά. Η αρχή της μεθόδου επιβάλλει τον περιορισμό της μελέτης μόνο σε διαλύματα και συνεπώς η ανάλυση αφορά στην ελεύθερη μορφή των δύο λιπασών (aqCalB και aqRmL). Η μελέτη στηρίζεται στην εκλεκτική διέγερση των καταλοίπων τρυπτοφάνης και για το λόγο αυτό η διέγερση πραγματοποιείται στα 295 nm. Σύμφωνα με τις δομές των δύο λιπασών οι οποίες έχουν δημοσιευθεί στην Protein Data Bank (PDB) η λιπάση B από *Candida antarctica* περιέχει πέντε κατάλοιπα τρυπτοφάνης εκ' των οποίων τρία βρίσκονται κοντά στην επιφάνεια του ενζυμικού μορίου και η λιπάση από *Rhizomucor miehei* περιέχει τέσσερα προσβάσιμα στον διαλύτη κατάλοιπα τρυπτοφάνης (Εικόνα 6.3).



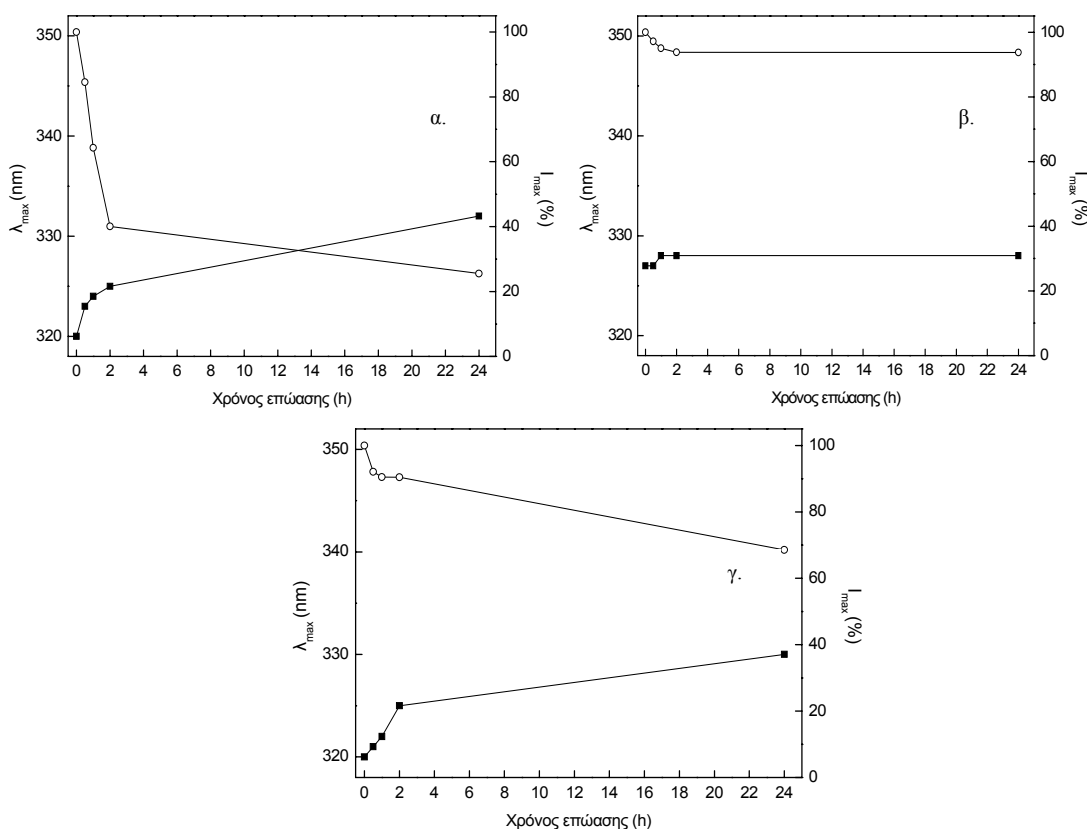
Εικόνα 6.3 Δομή **α.** της λιπάσης B από *Candida antarctica* και **β.** της λιπάσης από *Rhizomucor miehei*. Οι λιπάσες αυτές περιέχουν πέντε και τέσσερα κατάλοιπα τρυπτοφάνης, αντίστοιχα τα οποία απεικονίζονται ως ράβδοι. Εξ' αυτών με μπλε χρώμα απεικονίζονται τα κατάλοιπα εκείνα τα οποία βρίσκονται στην επιφάνεια του ενζυμικού μορίου (Πρόγραμμα PyMOL, χρήση του προσθέτου Pro-MOL v. 3.02).

Η μελέτη πραγματοποιείται μετά από επώαση των υδατικών διαλυμάτων των λιπασών για χρονικά διαστήματα από 0 έως 24 h στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ στη θερμοκρασία των 30°C και 60°C και σε δύο διαφορετικές περιεκτικότητες νερού 2.5 % και 5.0 % κ.ο.

Η αρχικά διερεύνηση, ωστόσο, κατάδειξε πως μεταξύ των ιοντικών αυτών υγρών η μελέτη είναι δυνατή μόνο στα ιοντικά υγρά τα οποία περιέχουν ανιόντα PF₆⁻, καθώς στα ιοντικά υγρά με ανιόν BF₄⁻ η ένταση φθορισμού είναι ιδιαίτερα χαμηλή και άρα η ανάλυση θεωρείται επισφαλής. Το γεγονός αυτό οφείλεται σε ένα φαινόμενο γνωστό ως απόσβεση φθορισμού (Παράρτημα Α) και έχει βρεθεί να συνδέεται με ειδικές ενδομοριακές αντιδράσεις απόσβεσης εξαιτίας της γειννίας με πλευρικές ομάδες αμινοξέων (πρωτονιωμένες

ιστιδίνες, κυστίνες, κυστεΐνες, τυροσίνες), εξαιτίας των πεπτιδικών δεσμών αυτών καθαυτών, των πρωτονιωμένων καταστάσεων καρβοξυλικών ομάδων, αλκυλ-αμινών, φαινολών και ιμιδαζολικών ομάδων ή ακόμα και με την παρουσία διαλυτών εξωγενών ενώσεων [Eftink, 2002].

Η μεταβολή του $\lambda_{\max}$ και της μέγιστης τιμής της έντασης φθορισμού $I_{\max}$ συναρτήσει του χρόνου επώασης της aqCaLB στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ καθώς και στο νερό στη θερμοκρασία των 30°C απεικονίζεται στο **Σχήμα 6.16**. Η ένταση του φθορισμού έχει εκφραστεί ως ποσοστό % της αρχικής τιμής (σε χρόνο 0 h) σε κάθε υπό μελέτη μέσο.



Σχήμα 6.16 Μεταβολή του $\lambda_{\max}$ (μαύρα σύμβολα) και $I_{\max}$ (λευκά σύμβολα), συναρτήσει του χρόνου στην περίπτωση επώασης της λιπάσης B από *Candida antarctica* **α.** σε υδατικό διάλυμα και στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ **β.** παρουσία 2.5% και **γ.** 5.0% κ.ο. νερού στους 30°C.

Μία πρώτη παρατήρηση με βάση τα αποτελέσματα του **Σχήματος 6.16** σχετίζεται με την τιμή του $\lambda_{\max}$ σε χρόνο 0 h. Στην περίπτωση επώασης της λιπάσης στο νερό και στο ιοντικό υγρό παρουσία 5.0% κ.ο. νερού το $\lambda_{\max}$ ισούται με 320 nm υποδεικνύοντας πως δεν υπάρχει σημαντική διαφοροποίηση στο μικροπεριβάλλον των καταλοίπων τρυπτοφάνης στα δύο αυτά μέσα και πιθανά η λιπάση διατηρεί μία δομή όμοια με τη φυσική διαμόρφωση και στο κορεσμένο με νερό ιοντικό υγρό. Αντίθετα, στο ιοντικό υγρό παρουσία 2.5% κ.ο. νερού

το $\lambda_{\max}$ είναι μετατοπισμένο προς μεγαλύτερο μήκος κύματος (327 nm). Η διαφοροποίηση αυτή συνδέεται πιθανά με μία διαφορετική διαμόρφωση της λιπάσης στο ιοντικό υγρό και συγκεκριμένα η αύξηση του $\lambda_{\max}$ υποδεικνύει την σχετικά αυξημένη έκθεση των καταλοίπων τρυπτοφάνης στο διαλύτη [Burstein *et al.*, 1973, Eftink, 2002]. Παρόμοια μετατόπιση του $\lambda_{\max}$ προς μεγαλύτερα μήκη κύματος παρατήρησαν και οι De Diego *et al.*, [2005] για την λιπάση B από *Candida antarctica* στα ιοντικά υγρά [emim]NTf₂ και [btma]NTf₂, την οποία αιτιολόγησαν με βάση τη μετατροπή των α -ελίκων προς μία περισσότερο ανοιχτή δομή του ενζύμου, όπως οι β -πτυχές.

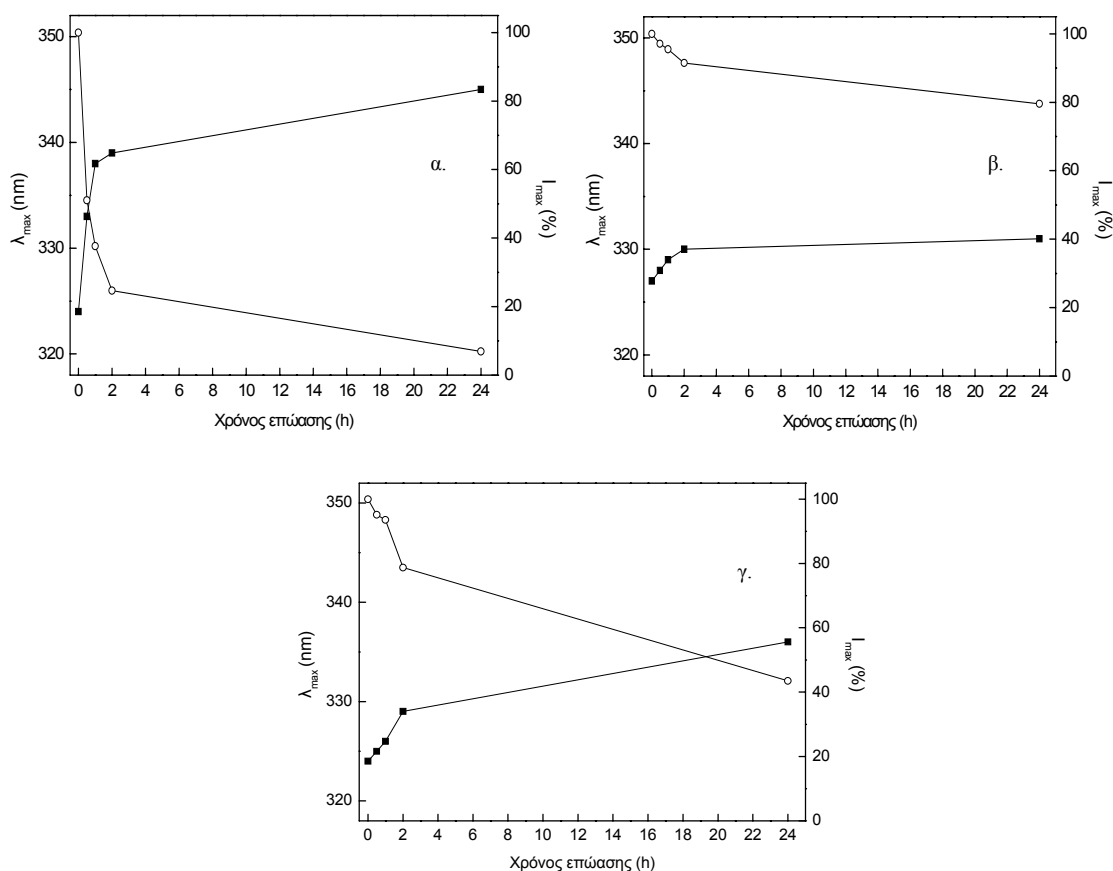
Επιπρόσθετα αυτής της διαφοροποίησης τα αποτελέσματα του **Σχήματος 6.16** καταδεικνύουν τη διαφορετική μεταβολή των $\lambda_{\max}$ και $I_{\max}$ συναρτήσει του χρόνου επώασης ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο μέσο. Στην περίπτωση του νερού παρατηρείται ένα κλασικό προφίλ αποδιάταξης της λιπάσης, το οποίο συνδέεται με την αύξηση του $\lambda_{\max}$ (από 320 nm σε 332 nm) και μείωση του $I_{\max}$ συναρτήσει του χρόνου επώασης. Οι αλλαγές αυτές στα σήματα φθορισμού φαίνεται να συμφωνούν με το προφίλ απενεργοποίησης της λιπάσης (**Σχήμα 6.10α**), η δραστηριότητα της οποίας μειώνεται περίπου στο 60% της αρχικής μετά από 24 h επώασης στο νερό. Η τιμή του $\lambda_{\max}$ μετά από 24 h (332 nm), υποδεικνύει πως η λιπάση δεν αποδιατάσσεται πλήρως, καθώς έχει βρεθεί πως το $\lambda_{\max}$ των ελεύθερων τρυπτοφανών σε υδατικό διάλυμα ισούται περίπου με 350 nm [Burstein *et al.*, 1973].

Παρόμοια αύξηση του $\lambda_{\max}$ (από 320 nm σε 330 nm) εμφανίζει η aqCaLB και στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ παρουσία 5.0% κ.ο. νερού. Στην περίπτωση αυτή και σύμφωνα με το **Σχήμα 6.12α** το προφίλ απενεργοποίησης της λιπάσης είναι όμοιο με αυτό στο νερό με μείωση της δραστηριότητας μετά από 24 h επώασης περίπου στο 60% της αρχικής. Η ταύτιση των αποτελεσμάτων σταθερότητας και φασματοσκοπίας φθορισμού υποδεικνύει πιθανά την παρόμοια διαδικασία αποδιάταξης της λιπάσης B από *Candida antarctica* στο νερό και στο ιοντικό υγρό παρουσία 5.0% κ.ο. νερού.

Αντίθετα, στην περίπτωση του [bmim]PF₆ παρουσία 2.5% κ.ο. νερού, η αύξηση του $\lambda_{\max}$ και η μείωση του $I_{\max}$ είναι ιδιαίτερα μικρές. Πρακτικά, μετά τις 2 h επώασης της λιπάσης το $\lambda_{\max}$ παραμένει σταθερό και ίσο με 328 nm. Αντίστοιχα, τα αποτελέσματα σταθερότητας δείχνουν μείωση της δραστηριότητας στο 90% μετά τις 2 h επώασης χωρίς περαιτέρω μείωση ακόμα και μετά από 24 h επώασης. Η παρατήρηση αυτή, σε συνάρτηση με το μετατοπισμένο $\lambda_{\max}$ της λιπάσης σε σχέση με το νερό (327 nm στο ιοντικό υγρό έναντι 320 nm στο νερό), υποδεικνύουν πιθανά την υιοθέτηση μίας νέας διαμόρφωσης της λιπάσης B από *Candida antarctica* στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ παρουσία 2.5% κ.ο. νερού, στην οποία

τα κατάλοιπα τρυπτοφάνης βρίσκονται μερικώς εκτεθειμένα στο μέσο. Το ιοντικό υγρό είναι ικανό να διατηρεί τη νέα αυτή διαμόρφωση ακόμα και μετά από 24 h επώασης, με αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του ενζύμου.

Στην περίπτωση επώασης της aqCaLB στα προαναφερόμενα μέσα και στη θερμοκρασία των 60°C τα αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας της προηγούμενης παραγράφου (§ 6.3) κατέδειξαν τη μείωση της σταθερότητας της λιπάσης συγκριτικά με τη θερμοκρασία των 30°C. Τα αποτελέσματα φασματοσκοπίας φθορισμού φαίνεται να επιβεβαιώνουν την παρατήρηση αυτή (Σχήμα 6.17).



Σχήμα 6.17 Μεταβολή του $\lambda_{\max}$ (μαύρα σύμβολα) και $I_{\max}$ (λευκά σύμβολα), συναρτήσει του χρόνου στην περίπτωση επώασης της λιπάσης B από *Candida antarctica* **α.** σε υδατικό διάλυμα και στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ **β.** παρουσία 2.5% και **γ.** 5.0% κ.ο. νερού στους 60°C.

Πιο αναλυτικά, στην περίπτωση επώασης της λιπάσης στο νερό παρατηρείται μεγαλύτερη αύξηση του $\lambda_{\max}$ (από 324 σε 345 nm) και μείωση του $I_{\max}$ συγκριτικά με τους 30°C. Η διαφορετική τιμή του $\lambda_{\max}$ ανάμεσα στις δύο θερμοκρασίες ακόμα και σε χρόνο 0 h (320 nm και 324 nm στους 30°C και 60°C, αντίστοιχα) υποδεικνύει πιθανά μία άμεση αποδιάταξη του μορίου με την προσθήκη του ενζύμου στο νερό στη θερμοκρασία των 60°C.

Η τιμή δε του $\lambda_{\max}$ μετά από 24 h (345 nm) καταδεικνύει πως τα κατάλοιπα τρυπτοφάνης είναι πλήρως εκτεθειμένα στο διαλύτη [Burstin *et al.*, 1973], το ενζυμικό μόριο έχει δηλαδή αποδιαταχθεί. Το γεγονός αυτό δικαιολογεί ότι μετά την πάροδο των 24 h η aqCaLB διατηρεί στο νερό μόλις το 10% της αρχικής της δραστηριότητας (**Σχήμα 6.10β**).

Μετατοπισμένο σε μεγαλύτερα μήκη κύματος είναι το $\lambda_{\max}$ και στην περίπτωση επώασης της aqCaLB στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ μετά από 24 h στους 60°C, συγκριτικά με τους 30°C. Στους 60°C η τιμή του $\lambda_{\max}$ ισούται με 331 και 336 nm παρουσία 2.5% και 5% κ.ο. νερού στο ιοντικό υγρό αντίστοιχα, ενώ οι αντίστοιχες τιμές στους 30°C ήταν 328 και 330 nm. Η μετατόπιση του $\lambda_{\max}$ σε μεγαλύτερα μήκη κύματος υποδεικνύει την αυξημένη έκθεση των καταλοίπων τρυπτοφάνης στο μέσο και άρα μία περισσότερο αποδιαταγμένη ενζυμική δομή. Το γεγονός αυτό δικαιολογεί τη χαμηλότερη σταθερότητα της aqCaLB στο ιοντικό υγρό στους 60°C συγκριτικά με τους 30°C (§ 6.3).

Επιπρόσθετα της διαφορετικής επίδρασης της θερμοκρασίας επώασης στην ενζυμική δομή, τα αποτελέσματα του **Σχήματος 6.17** φανερώνουν και μία ενδιαφέρουσα διαφοροποίηση ανάλογα με το μέσο επώασης της λιπάσης.

Όπως αναφέρθηκε προηγούμενα στη θερμοκρασία των 60°C παρατηρείται στο νερό η σχεδόν πλήρης αποδιάταξη του ενζυμικού μορίου. Η επώαση ωστόσο, της aqCaLB στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ φαίνεται να ασκεί μία σταθεροποιητική επίδραση. Πιο συγκεκριμένα, παρουσία 5.0% κ.ο. νερού κυρίως η αύξηση του $\lambda_{\max}$, αλλά και η μείωση του $I_{\max}$, είναι μικρότερη συγκριτικά με την αντίστοιχη στο νερό. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την ικανότητα του ιοντικού υγρού να διατηρεί εν μέρει τη διαμόρφωση του ενζύμου, επιδεικνύοντας μία σταθεροποιητική επίδραση έναντι του νερού. Πράγματι, με βάση τη μελέτη σταθερότητας (**Σχήμα 6.12β**), η λιπάση διατηρεί το 35% της αρχικής της δραστηριότητας στο κορεσμένο με νερό ιοντικό υγρό, όταν μετά από 24 h επώασης στο νερό το αντίστοιχο ποσοστό ισούται με μόλις 10%.

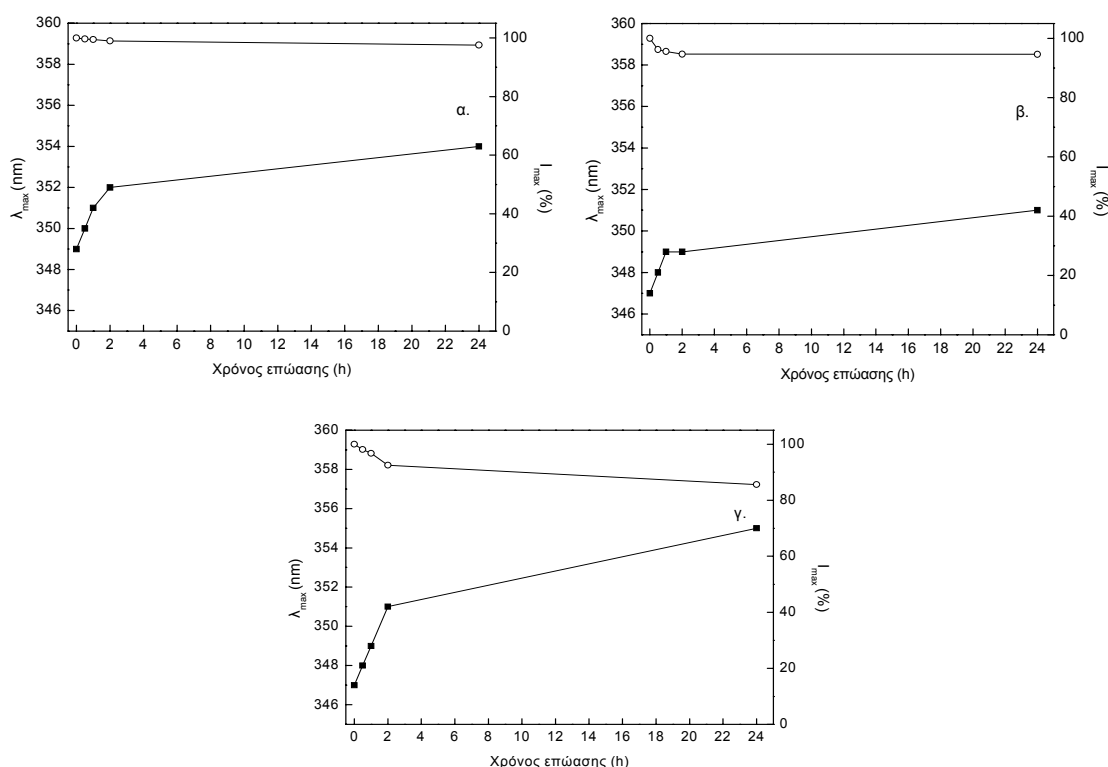
Περισσότερο εντυπωσιακά είναι τα αποτελέσματα στην περίπτωση επώασης της λιπάσης CaLB στο [bmim]PF₆ παρουσία 2.5% κ.ο νερού στους 60°C. Τα αποτελέσματα σταθερότητας (§ 6.3) έδειξαν πως το μέσο αυτό ασκεί τη μεγαλύτερη σταθεροποιητική επίδραση στη λιπάση συγκριτικά τόσο με το κορεσμένο σε νερό ιοντικό υγρό όσο και με το νερό (η εναπομείνουσα δραστηριότητα της aqCaLB στο [bmim]PF₆ παρουσία 2.5% κ.ο νερού ισούται με 50% μετά από 24 h επώασης). Τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας φθορισμού δικαιολογούν αυτή τη σταθεροποιητική επίδραση, καθώς στην περίπτωση του [bmim]PF₆ παρουσία 2.5% κ.ο νερού παρατηρήθηκε η μικρότερη αύξηση του $\lambda_{\max}$ και μείωση του $I_{\max}$. Η

εκπομπή στα 327 nm (σε χρόνο 0 h) υποδεικνύει πως ανεξάρτητα της θερμοκρασίας η προσθήκη της λιπάσης στο ιοντικό υγρό επάγει πιθανά μία νέα ενζυμική διαμόρφωση. Το ιοντικό υγρό έχει την ικανότητα να διατηρεί αυτή τη νέα διαμόρφωση, η οποία δεν μεταβαίνει με την πάροδο του χρόνου προς μία πλήρως αποδιαταγμένη δομή.

Συνολικά, και με βάση τα προαναφερόμενα αποτελέσματα συμπεραίνεται η καλή συσχέτιση των αποτελεσμάτων της φασματοσκοπίας φθορισμού με τα αποτελέσματα σταθερότητας στην περίπτωση επώασης του υδατικού διαλύματος της λιπάσης B από *Candida antarctica* στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆.

Στην συνέχεια, μελετήθηκε μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού η διαδικασία αποδιάταξης και στην περίπτωση της ελεύθερης λιπάσης από *Rhizomucor miehei* (aqRmL). Η μελέτη πραγματοποιείται μετά από επώαση της aqRmL για χρονικά διαστήματα από 0 έως 24 h στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ στη θερμοκρασία των 30°C και 60°C και σε δύο διαφορετικές περιεκτικότητες νερού 2.5 % και 5.0 % κ.ο.

Η εξέλιξη των $\lambda_{\max}$ και $I_{\max}$ της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* συναρτήσει του χρόνου στο νερό και στο [bmim]PF₆ παρουσία 2.5% και 5.0% κ.ο νερού στους 30°C απεικονίζεται στα διαγράμματα του **Σχήματος 6.18**.



Σχήμα 6.18 Μεταβολή του $\lambda_{\max}$ (μαύρα σύμβολα) και $I_{\max}$ (λευκά σύμβολα), συναρτήσει του χρόνου στην περίπτωση επώασης της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* **α.** σε υδατικό διάλυμα και στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ **β.** παρουσία 2.5% και **γ.** 5.0% κ.ο. νερού στους 30°C.

Στην περίπτωση της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* τα φάσματα φθορισμού παρουσιάζουν αρκετές διαφορές συγκριτικά με τα αντίστοιχα της λιπάσης B από *Candida antarctica*. Σύμφωνα με την κρυσταλλογραφική ανάλυση της δομής της λιπάσης [Derewenda *et al.*, 1992], τα κατάλοιπα τρυπτοφάνης είναι περισσότερο εκτεθειμένα στην επιφάνεια του ενζύμου (**Εικόνα 6.3**) με αποτέλεσμα το $\lambda_{\max}$ να είναι μετατοπισμένο σε μεγαλύτερα μήκη κύματος (347-349 nm).

Ωστόσο, σε σύγκριση με το νερό, η λιπάση στο [bmim]PF₆ εμφανίζει το μέγιστο φθορισμού μετατοπισμένο προς μικρότερα μήκη κύματος (blue shift). Η μετατόπιση αυτή έχει παρατηρηθεί και στην περίπτωση της παπαΐνης σε ιοντικά υγρά [Lou *et al.*, 2006] και μπορεί να αποδοθεί σε δομικές αλλαγές στο μικροπεριβάλλον των καταλοίπων τρυπτοφάνης, πιθανά εξαιτίας της διευθέτησης των καταλοίπων αυτών σε ένα περισσότερο υδρόφοβο περιβάλλον.

Όσον αφορά το $\lambda_{\max}$ παρατηρείται στο νερό και στο ιοντικό υγρό παρουσία 5% κ.ο. νερού μετατόπιση αυτού σε μεγαλύτερα μήκη κύματος συναρτήσει του χρόνου επώασης. Με βάση τη μεταβολή του $\lambda_{\max}$ η διαδικασία αποδιάταξης φαίνεται να πραγματοποιείται με παρόμοιο τρόπο στα δύο μέσα, αν και σε μεγαλύτερο βαθμό στο ιοντικό υγρό. Τα αποτελέσματα αυτά εξηγούν ικανοποιητικά τα προφίλ σταθερότητας (§ 6.3), καθώς παρατηρείται στο νερό και στο ιοντικό υγρό μία απότομη πτώση της δραστηριότητας της λιπάσης στο 50% και 30% της αρχικής μετά από 2 h επώασης και περαιτέρω μείωση στο 30% και 20% μετά από 24 h, αντίστοιχα.

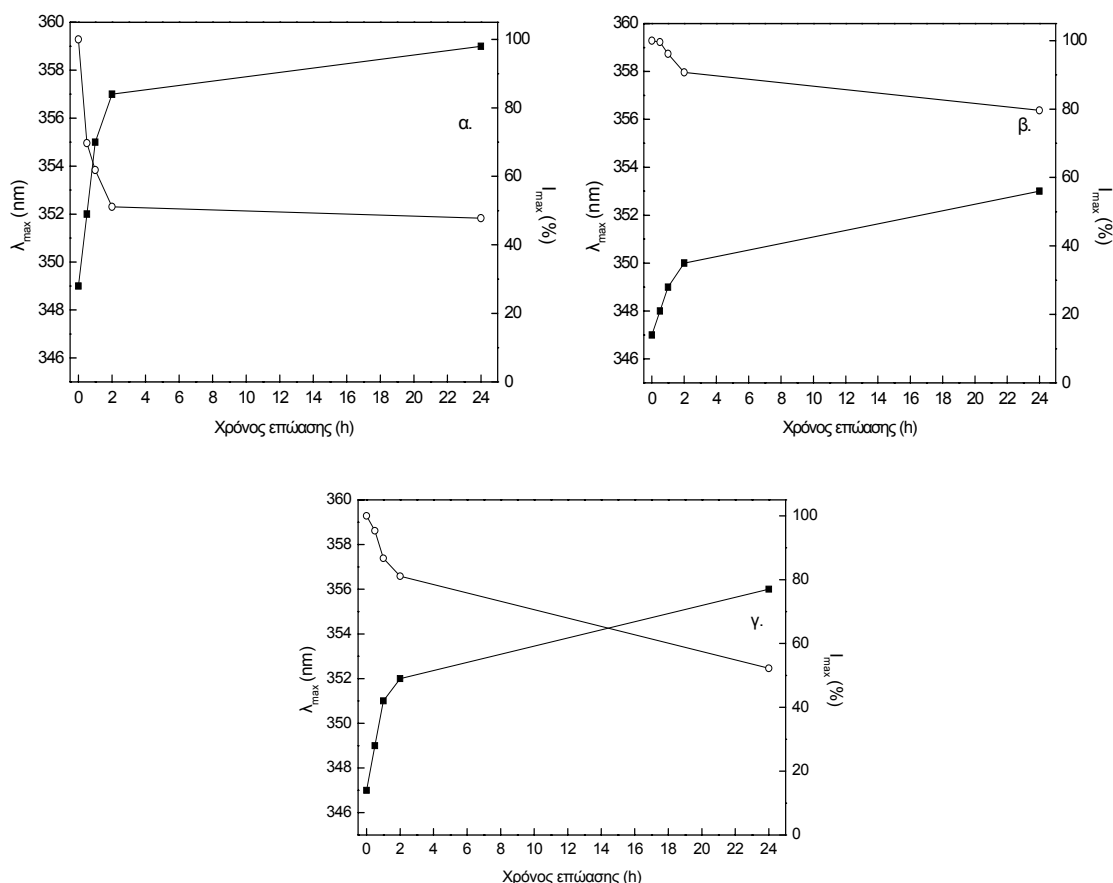
Αντίθετα, στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ παρουσία 2.5% κ.ο. νερού, παρατηρείται η μικρότερη μεταβολή του $\lambda_{\max}$ καταδεικνύοντας πως η διαδικασία αποδιάταξης λαμβάνει χώρα σε μικρότερο βαθμό μεταξύ των διαφόρων μέσων. Στο μέσο αυτό εξάλλου παρατηρείται και η υψηλότερη σταθερότητα (**Σχήμα 6.11**).

Παρά την αύξηση του $\lambda_{\max}$, τα προφίλ απενεργοποίησης της aqRmL στα προαναφερόμενα μέσα διαφέρουν από τα αντίστοιχα της aqCaLB με βάση τη μεταβολή του $I_{\max}$ συναρτήσει του χρόνου. Σε όλες τις περιπτώσεις, η ένταση του φθορισμού παρουσιάζει μικρή μόνο μείωση και η μεταβολή αυτού του σήματος δεν μπορεί να συσχετιστεί ικανοποιητικά με τα προφίλ σταθερότητας της λιπάσης στα διαφορετικά μέσα.

Στην περίπτωση επώασης της λιπάσης στους 60°C η αύξηση του $\lambda_{\max}$ και η μείωση του $I_{\max}$ είναι ιδιαίτερα σημαντικές και μεγαλύτερες σε σχέση με τους 30°C (**Σχήμα 6.19**), όπως παρατηρήθηκε αντίστοιχα και στην περίπτωση της aqCaLB. Η διαδικασία της αποδιάταξης φαίνεται να πραγματοποιείται με παρόμοιο τρόπο μεταξύ των διαφορετικών

μέσων και είναι εντονότερη κατά σειρά στο νερό, στο [bmim]PF₆ παρουσία 5.0% κ.ο νερού και λιγότερο έντονη στο [bmim]PF₆ παρουσία 2.5% κ.ο νερού. Η σειρά αυτή συμφωνεί απόλυτα και με τη παρατηρούμενη σειρά σταθερότητας της λιπάσης (§ 6.3).

Τα προαναφερόμενα αποτελέσματα καταδεικνύουν την δυνατότητα αξιοποίησης της φασματοσκοπίας φθορισμού για την παρακολούθηση της διαδικασίας αποδιάταξης και στην περίπτωση της ελεύθερης λιπάσης aqRmL στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ καθώς και την καλή συσχέτιση αυτών με τα αντίστοιχα αποτελέσματα σταθερότητας.



Σχήμα 6.19 Μεταβολή του $\lambda_{\max}$ (μαύρα σύμβολα) και $I_{\max}$ (λευκά σύμβολα), συναρτήσει του χρόνου στην περίπτωση επώασης της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* **α.** σε υδατικό διάλυμα και στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ **β.** παρουσία 2.5% και **γ.** 5.0% κ.ο. νερού στους 60°C.

Μία άλλη ενδιαφέρουσα περίπτωση αποτελεί η παρακολούθηση αλλαγών στη δομή των λιπασών όταν αυτές έχουν προ-επωαστεί σε ιοντικά υγρά και στη συνέχεια επαναδιαλυτοποιούνται στο νερό. Η περίπτωση αυτή μελετήθηκε στην Παράγραφο 6.2 και παρατηρήθηκε ότι η προ-επώαση των λυοφιλιωμένων λιπασών lyoCaLB και lyoRmL σε διάφορα μιδαζολικά (C₂-C₈) ιοντικά υγρά με ανιόντα BF₄⁻ και PF₆⁻ οδήγησε σε σημαντική βελτίωση της σταθερότητάς τους ή ακόμα και σε ενεργοποίηση μετά από

επαναδιαλυτοποίηση στο νερό συγκριτικά με την περίπτωση που τα ένζυμα επώαστηκαν σε νερό.

Η παρακολούθηση των αλλαγών μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού, στην περίπτωση αυτή, παρουσιάζει ενδιαφέρον και για έναν ακόμα λόγο. Οι προηγούμενες μελέτες περιορίστηκαν σε PF_6^- ιοντικά υγρά εξαιτίας της απόσβεσης φθορισμού σε BF_4^- ιοντικά υγρά. Η μικρή, ωστόσο, περιεκτικότητα του ιοντικού υγρού στο νερό (ίση με 0.25% κ.ο.) μετά την επαναδιαλυτοποίηση του ενζύμου στην περίπτωση των προ-επωασμένων λιπασών, επιτρέπει την εφαρμογή της φασματοσκοπικής τεχνικής και στην περίπτωση ιμιδαζολικών ιοντικών υγρών που περιέχουν ανιόντα BF_4^- (Παράρτημα Α).

Η τιμή των λ_{max} και I_{max} για τη λιπάση Β από *Candida antarctica* μετά από επώαση 0 και 120 h σε διάφορα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά στους 60°C και επαναδιαλυτοποίηση σε νερό δίνεται στον **Πίνακα 6.4**.

Πίνακας 6.4 Μεταβολή του λ_{max} και I_{max} στην περίπτωση επώασης της λυοφιλιωμένης λιπάσης Β από *Candida antarctica*, η οποία έχει προ-επωαστεί σε διάφορα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά για 0 και 120 h στους 60°C και στη συνέχεια επαναδιαλυτοποιείται σε νερό.

Ιοντικό υγρό	Χρόνος επώασης (h)	λ_{max} (nm)	I_{max}
[emim]BF ₄	0	322	546.6
	120	323	525.4
[bmim]BF ₄	0	322	698.1
	120	323	691.7
[omim]BF ₄	0	322	622.9
	120	323	661.9
[bmim]PF ₆	0	320	504.2
	120	320	466.2
[omim]PF ₆	0	319	525.9
	120	319	415.7

Σύμφωνα με τις τιμές του λ_{max} παρατηρείται σε όλες τις περιπτώσεις μία μετατόπιση του μέγιστου φθορισμού προς μικρότερα μήκη κύματος (319-322 nm) συγκριτικά με το νερό (324 nm). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει τη μείωση της προσβασιμότητας των καταλοίπων τρυπτοφάνης στον διαλύτη, πιθανά εξαιτίας μίας δομικής αλλαγής της λιπάσης και

επαναδιάταξης των καταλοίπων προς τον υδρόφοβο πυρήνα του ενζύμου [Lou *et al.*, 2006]. Η δομική αυτή αλλαγή θα μπορούσε να οδηγήσει σε μία περισσότερο συμπαγή δομή με υψηλή σταθερότητα στα υπό μελέτη μέσα. Η υπόθεση αυτή έχει διατυπωθεί για να εξηγήσει την σταθερότητα διαφόρων ενζύμων σε ιοντικά υγρά χωρίς όμως να στηριχθεί σε δεδομένα δομικών μελετών [Persson & Bornscheuer, 2003, Kaar *et al.*, 2003].

Είναι επιπλέον αξιοσημείωτο το γεγονός πως στα ιοντικά υγρά [bmim]PF₆ και [omim]PF₆ το μέγιστο απορρόφησης μετατοπίζεται σε μικρότερο μήκος κύματος (319 nm-320nm) και στα μέσα αυτά η λιπάση εμφανίζει αύξηση της δραστηριότητάς της μετά από επώαση στο ιοντικό υγρό.

Τα αποτελέσματα είναι ακόμα πιο ενδιαφέροντα στην περίπτωση της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* (Πίνακας 6.5).

Πίνακας 6.5 Μεταβολή του $\lambda_{\max}$ και $I_{\max}$ στην περίπτωση επώασης της λυοφιλιωμένης λιπάσης από *Rhizomucor miehei*, η οποία έχει προ-επωαστεί σε διάφορα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά για 0 και 120 h στους 60°C και στη συνέχεια επαναδιαλυτοποιείται σε νερό.

Ιοντικό υγρό	Χρόνος επώασης (h)	$\lambda_{\max}$ (nm)	$I_{\max}$
[emim]BF ₄	0	339	663.9
	120	340	782.4
[bmim]BF ₄	0	341	730.6
	120	341	762.2
[omim]BF ₄	0	343	409.1
	120	344	504.0
[bmim]PF ₆	0	342	772.4
	120	343	858.8
[omim]PF ₆	0	343	825.7
	120	343	849.4

Ενώ το μέγιστο φθορισμού της λιπάσης σε νερό είναι 349 nm, στα ιοντικά υγρά κυμαίνεται σε αρκετά μικρότερα μήκη κύματος από 339 έως 344 nm. Η μετατόπιση αυτή αντιστοιχεί στη μετάβαση των καταλοίπων τρυπτοφάνης από πλήρως εκτεθειμένα στο διαλύτη σε μερικώς εκτεθειμένα [Eftink, 2002]. Επιπρόσθετα, παρατηρείται σε όλες τις περιπτώσεις αύξηση της μέγιστης έντασης $I_{\max}$. Αν και η μεταβολή αυτή δεν είναι εύκολο να

εξηγηθεί εντούτοις η μείωση της προσβασιμότητας των καταλοίπων τρυπτοφάνης στο διαλύτη και γενικότερα η αλλαγή του περιβάλλοντός τους θα μπορούσε να περιορίσει τα φαινόμενα απόσβεσης φθορισμού από τον διαλύτη ή από γειτονικά αμινοξέα [Eftink *et al.*, 1991]. Η μείωση της επιφάνειας του ενζυμικού μορίου και πιθανά η υιοθέτηση μίας περισσότερο συμπαγούς δομής θα μπορούσε να εξηγήσει τη σημαντική σταθεροποίηση της λιπάσης καθώς με προ-επώαση η LyoRmL διατηρεί το 80% περίπου της δραστικότητάς της, ενώ στο νερό απενεργοποιείται πλήρως (**Σχήμα 6.8**). Στην παρατήρηση αυτή καταλήγουν με βάση τα αποτελέσματα σταθερότητας της προ-επωασμένης σε ιοντικά υγρά λιπάσης από *Mucor javanicus* και οι Dang *et al.*, [2007]. Με βάση τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας φθορισμού στην παρούσα μελέτη η υπόθεση αυτή φαίνεται να επιβεβαιώνεται και για την περίπτωση των λιπασών από *Candida antarctica* και *Rhizomucor miehei*.

6.4.3 Δομικές μελέτες λιπασών σε ιοντικά υγρά μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου FTIR

Η εφαρμογή της φασματοσκοπίας φθορισμού εξήγησε ικανοποιητικά τα αποτελέσματα σταθερότητας των ελεύθερων λιπασών από *Candida antarctica* και *Rhizomucor miehei* σε ιοντικά υγρά, μέσω της μελέτης της διαδικασίας αποδιάταξης της ενζυμικής δομής.

Περαιτέρω μελέτη των δομικών αλλαγών των δύο λιπασών επιχειρήθηκε μέσω της φασματοσκοπίας υπερύθρου FTIR. Η φασματοσκοπία υπερύθρου αποτελεί μία καθιερωμένη τεχνική για την ανάλυση της δομής πρωτεϊνικών μορίων [Byler & Susi, 1986, Surewicz *et al.*, 1993, Dong *et al.*, 1996, Hammes, 2005a]. Εξαιτίας της δυνατότητας ανάλυσης δειγμάτων διαφορετικών φυσικών καταστάσεων, η FTIR έχει εφαρμοστεί για την παρακολούθηση δομικών αλλαγών πρωτεϊνών διαλυτών στο νερό, λυοφιλιωμένων ενζύμων [Forato *et al.*, 1998, Vecchio *et al.*, 1999], ακινητοποιημένων ενζύμων [Sabbani *et al.*, 2006, Majumder *et al.*, 2007], ενζυμικών διαλυμάτων ή εναιωρημάτων σε οργανικούς διαλύτες [Griebenow & Klibanov, 1997, Quiroga *et al.*, 2007, Secundo *et al.*, 2007] και πρόσφατα ενζύμων σε ιοντικά υγρά [Lau *et al.*, 2004, Fujita *et al.*, 2005, Lou *et al.*, 2006].

Η περιοχή amide I μεταξύ των 1600-1700 cm^{-1} (η οποία οφείλεται στην δονητική έκταση του δεσμού C=O) χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση πρωτεϊνών. Η περιοχή αυτή αποτελείται από διάφορες αλληλοεπικαλυπτόμενες κορυφές οι οποίες μπορούν να ανατεθούν στα διαφορετικά στοιχεία δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών (α -έλικες, β -πτυχές, β -στροφές, τυχαίο σπείραμα) [Byler & Susi, 1986, Surewicz & Mantsch, 1988]. Η εφαρμογή του μετασχηματισμού Fourier για την καταγραφή των δεδομένων οδήγησε στη

δυνατότητα λήψης φασμάτων υψηλής ποιότητας [Surewicz & Mantsch, 1988]. Στη συνέχεια η δεύτερη παράγωγος του φάσματος μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον καθορισμό της θέσης των αλληλοεπικαλυπτόμενων κορυφών και την ανάθεσή τους στα διαφορετικά στοιχεία δευτεροταγούς δομής [Byler & Susi, 1986, Surewicz & Mantsch, 1988, Jackson *et al.*, 1989].

Η φασματοσκοπία υπερύθρου ATR-FTIR εφαρμόστηκε προκειμένου να μελετηθούν πιθανές δομικές αλλαγές της λιπάσης B από *Candida antarctica* και της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* υπό τη μορφή διαφόρων ενζυμικών σκευασμάτων (ελεύθερη, λυοφιλιωμένη, ακινητοποιημένη) καθώς και να διερευνηθεί η σχέση δομής-σταθερότητας των δύο λιπασών στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆.

Με βάση τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας φθορισμού (§ 6.4.2), παρατηρήθηκε μία διαφοροποίηση του μέγιστου φθορισμού $\lambda_{\max}$ των λιπασών στα ιοντικά υγρά σε σχέση με το νερό, η οποία υποδεικνύει μία διαφοροποίηση της δομής των ενζύμων σε σχέση με τη φυσική διαμόρφωσή τους. Η παρατήρηση αυτή φαίνεται να επιβεβαιώνεται και με βάση τα φάσματα FTIR. Η ποσοτικοποίηση του βαθμού ομοιότητας μεταξύ των φασμάτων δεύτερης παραγώγου των διαφόρων ενζυμικών σκευασμάτων των δύο λιπασών σε ιοντικά υγρά με το φάσμα δεύτερης παραγώγου των λιπασών στο νερό (το οποίο θεωρείται πως αντιστοιχεί στη φυσική διαμόρφωση του ενζύμου) πραγματοποιήθηκε μέσω του συντελεστή συσχέτισης r (§ 5.2.9.2) [Prestrelski *et al.*, 1993a]. Οι τιμές του συντελεστή r μεταξύ των φασμάτων δεύτερης παραγώγου της ακινητοποιημένης, λυοφιλιωμένης και ελεύθερης λιπάσης B από *Candida antarctica* στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ στους 60°C σε σχέση με το νερό δίνονται στον **Πίνακα 6.6**.

Πίνακας 6.6 Συντελεστές συσχέτισης των φασμάτων δεύτερης παραγώγου διαφόρων ενζυμικών σκευασμάτων της λιπάσης B από *Candida antarctica* στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ στους 60°C σε σχέση με το νερό.

Ενζυμικό σκεύασμα	Μέσο	r
Novozym 435	[bmim]BF ₄	0.678
	[bmim]PF ₆	0.475
LyoCaLB	[bmim]BF ₄	0.648 (0.664)*
	[bmim]PF ₆	0.407 (0.447)*
aqCaLB	[bmim]BF ₄ -5.0% νερό	0.660
	[bmim]PF ₆ -5.0% νερό	0.443

*Ως φάσμα αναφοράς λαμβάνεται εκείνο της λυοφιλιωμένης λιπάσης σε KBr.

Τιμή του συντελεστή r ίση με 1 υποδηλώνει πως τα φάσματα είναι όμοια, και κατά συνέπεια δεν παρατηρούνται δομικές αλλαγές της πρωτεΐνης. Αντίθετα όταν υπάρχουν σημαντικές δομικές αλλαγές, τα φάσματα διαφοροποιούνται και η τιμή του συντελεστή r είναι μικρή [Kendrick *et al.*, 1996]. Με βάση τα παραπάνω, μπορούμε να παρατηρήσουμε πως σε όλες τις περιπτώσεις η τιμή του συντελεστή r είναι γενικά μικρή και άρα η δομή της λιπάσης στα ιοντικά υγρά διαφοροποιείται σε σχέση με τη φυσική διαμόρφωση του ενζύμου στο νερό. Το γεγονός ότι η διαφοροποίηση αυτή συσχετίζεται με την επίδραση του μέσου και όχι με την επίδραση του ενζυμικού σκευάσματος (δηλ. με την επίδραση της ακινητοποίησης ή λυοφιλιωποίησης) προέρχεται αφενός από την παρατήρηση των Mei *et al.*, [2003] πως το φάσμα FTIR της ακινητοποιημένης λιπάσης Novozym 435 ταυτίζεται με εκείνο της ελεύθερης λιπάσης και αφετέρου από τις παραπλήσιες τιμές του συντελεστή συσχέτισης r θεωρώντας ως φάσμα αναφοράς είτε εκείνο της λιπάσης στο νερό είτε εκείνο της λυοφιλιωμένης λιπάσης (Πίνακας 6.6). Με σύγκριση των συντελεστών r μεταξύ των δύο μέσων, το υδρόφοβο [bmim]PF₆ φαίνεται να επάγει μία σημαντικότερη τροποποίηση της δομής συγκριτικά με το [bmim]BF₄.

Η ίδια τάση φαίνεται να ισχύει και στην περίπτωση της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* (Πίνακας 6.7). Για τη λιπάση αυτή ωστόσο, η μεγάλη τιμή του συντελεστή r στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ (> 0.800) υποδεικνύει τη μεγαλύτερη ικανότητα του μέσου αυτού να διατηρεί πιθανά μία διαμόρφωση του ενζύμου περισσότερο όμοια με εκείνη στο νερό.

Πίνακας 6.7 Συντελεστές συσχέτισης των φασμάτων δεύτερης παραγώγου διαφόρων ενζυμικών σκευασμάτων της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ στους 60°C σε σχέση με το νερό.

Ενζυμικό σκεύασμα	Μέσο	r
Lipozyme RMIM	[bmim]BF ₄	0.807
	[bmim]PF ₆	0.516
LyoRmL	[bmim]BF ₄	0.818 (0.731)*
	[bmim]PF ₆	0.504 (0.422)*
aqRmL	[bmim]BF ₄ -5.0% νερό	0.849
	[bmim]PF ₆ -5.0% νερό	0.589

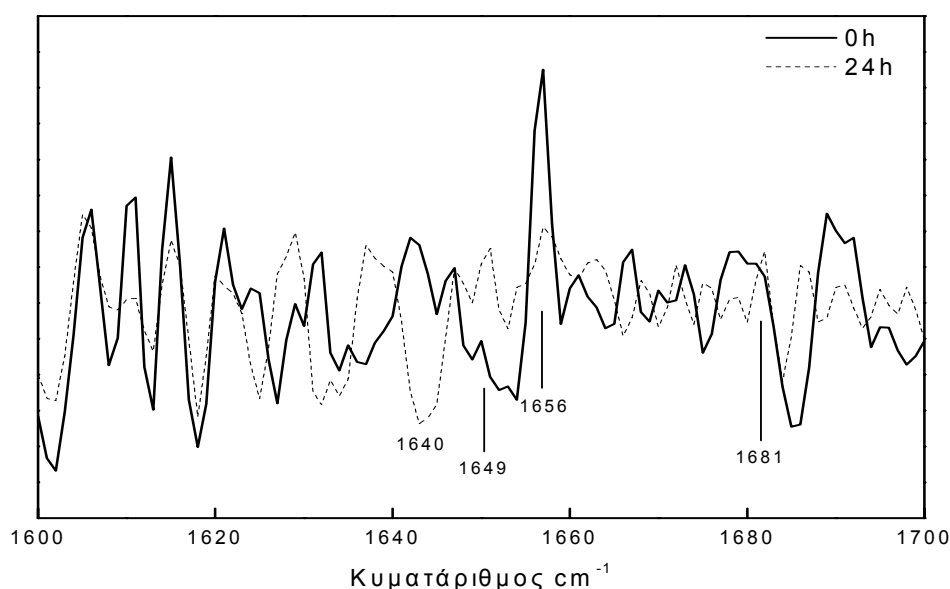
*Ως φάσμα αναφοράς λαμβάνεται εκείνο της λυοφιλιωμένης λιπάσης σε KBr.

Η διαφοροποίηση της δομής των λιπασών στα ιοντικά υγρά μπορεί να συνδέεται άμεσα με τη σταθερότητα των ενζύμων στα μέσα αυτά. Προκειμένου να αποσαφηνιστεί η

σχέση δομής-σταθερότητας των μικροβιακών λιπασών, διάφορα σκευάσματα αυτών επώαστηκαν για 0 και 24 h στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ στους 60°C και στη συνέχεια οι δομές τους αναλύθηκαν μέσω της φασματοσκοπίας υπερύθρου. Η αναγνώριση των στοιχείων δευτεροταγούς δομής και η ανίχνευση πιθανών διαφοροποιήσεων αυτών μετά την επώαση των λιπασών σε ιοντικά υγρά πραγματοποιήθηκε μέσω της ανάλυσης του φάσματος δεύτερης παραγώγου στην περιοχή amide I [Prestrelski *et al.*, 1993a,b, Dong *et al.*, 1996, Lau *et al.*, 2004, Lou *et al.*, 2006].

6.4.3.1 Ανάλυση της δομής ακινητοποιημένων λιπασών μέσω FTIR

Τα φάσματα δεύτερης παραγώγου της ακινητοποιημένης λιπάσης B από *Candida antarctica* (Novozym 435) στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ απεικονίζονται στο **Σχήμα 6.20**.



Σχήμα 6.20 Σύγκριση των ATR-FTIR φασμάτων δεύτερης παραγώγου στην περιοχή amide I μετά από 0 h (συνεχής γραμμή) και 24 h (διακεκομμένη γραμμή) επώασης της Novozym 435 στους 60°C στο [bmim]BF₄.

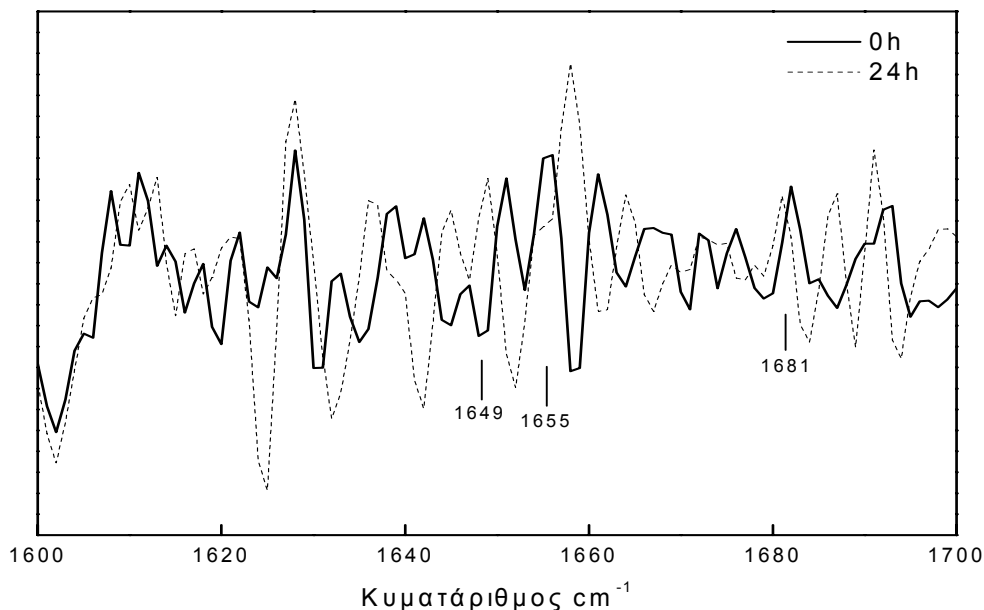
Η ανάθεση των διαφόρων στοιχείων δευτεροταγούς δομής (α-έλικα, β-πτυχή, β-στροφή, τυχαίο σπείραμα) παρατίθεται στον **Πίνακα 5.3** (§ 5.2.9.2). Πρέπει να σημειωθεί πως η ανάθεση των στοιχείων αυτών στη βιβλιογραφία αφορά συνήθως περιοχές και όχι μεμονωμένες κορυφές. Επιπρόσθετα, έχει αναφερθεί πως τμήματα με όμοια δομή δεν εμφανίζουν απαραίτητα κορυφές με ακριβώς ίδιες συχνότητες και ότι αυτές μπορεί να διαφοροποιούνται ακόμα και κατά 15 cm⁻¹ [Byler & Susi, 1986].

Πράγματι, στα φάσματα δεύτερης παραγωγού της Novozym 435 παρατηρείται μία μετατόπιση των κορυφών κοντά στα 1630, 1640 και 1690 cm^{-1} . Και στις τρεις περιπτώσεις τα στοιχεία στα 1630, 1640 και 1690 cm^{-1} , με βάση τον **Πίνακα 5.3**, αντιστοιχούν σε β-πτυχές. Η παρατηρούμενη μετατόπιση μετά από επώαση του ενζύμου για 24 h στο ιοντικό υγρό υποδεικνύει πιθανές ανακατανομές των β-πτυχών της λιπάσης και αλλαγές των δεσμών υδρογόνου μεταξύ αυτών των στοιχείων δευτεροταγούς δομής [Surewicz & Mantsch, 1988, Xu *et al.*, 1997]. Μετατοπίσεις αυτού του τύπου έχουν συνδεθεί με την απομάκρυνση μορίων νερού από το μικροπεριβάλλον του ενζύμου, η οποία έχει ως αποτέλεσμα την τροποποίηση των δονητικών ιδιοτήτων [Byler & Susi, 1986, Surewicz & Mantsch, 1988, Prestelski *et al.*, 1993b]. Η υπόθεση αυτή θα μπορούσε να δικαιολογηθεί με βάση τον υδρόφιλο χαρακτήρα του [bmim]BF₄ και συνεπώς την αυξημένη τάση να απομακρύνει μόρια νερού από το απαραίτητο στρώμα νερού του ενζύμου.

Παρά τις προαναφερόμενες μετατοπίσεις οι υπόλοιπες κορυφές στα δύο φάσματα φαίνεται να απορροφούν στις ίδιες συχνότητες. Ωστόσο, παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση της έντασης και συγκεκριμένα αύξηση της κορυφής στα 1650 cm^{-1} και μείωση εκείνης κοντά στα 1656 cm^{-1} . Οι κορυφές αυτές, σύμφωνα με τον **Πίνακα 5.3**, αντιστοιχούν σε τυχαίο σπείραμα και α-έλικες, αντίστοιχα. Οι αλλαγές αυτές είναι ενδεικτικές της απώλειας της δευτεροταγούς δομής και κατά συνέπεια της αποδιάταξης του ενζυμικού μορίου στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄. Αυτή η αλλαγή της διαμόρφωσης προς μία μερικά αποδιαταγμένη δομή, μπορεί να εξηγήσει ικανοποιητικά τα αποτελέσματα σταθερότητας της Novozym 435, η οποία μετά από 24 h επώασης στους 60°C στο [bmim]BF₄ διατηρεί μόλις το 40% της αρχικής της δραστηριότητας (§ 6.1).

Σημαντική αποσταθεροποίηση σε αυτό το ιοντικό υγρό παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της ακινητοποιημένης λιπάσης από *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RMIM), η οποία μετά από 24 h επώασης στους 60°C διατήρησε μόλις το 20% της αρχικής της δραστηριότητας. Η σύγκριση των φασμάτων δεύτερης παραγωγού για τη Lipozyme RMIM μετά από 0 και 24 h στο [bmim]BF₄ (**Σχήμα 6.21**) καταδεικνύει σημαντικές μετατοπίσεις των κορυφών και αλλαγές στην ένταση. Η εμφάνιση τέτοιων σημαντικών αλλαγών στα φάσματα έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ως ενδεικτική ενός αποδιαταγμένου και συνεπώς απενεργοποιημένου ενζυμικού μορίου [Quiroga *et al.*, 2007] καθώς όταν η δευτεροταγής δομή ενός ενζύμου διαφοροποιείται σε τέτοιο βαθμό είναι μάλλον απίθανο το ένζυμο να διατηρεί την καταλυτική του δραστηριότητα [Dong *et al.*, 1996]. Το στοιχείο ίσως εκείνο το οποίο είναι περισσότερο ευδιάκριτο και ενδεικτικό της αποδιάταξης της λιπάσης είναι η

αύξηση των κορυφών κοντά στα 1645 cm^{-1} η οποία αντιστοιχεί σε αύξηση του τυχαίου σπειράματος.

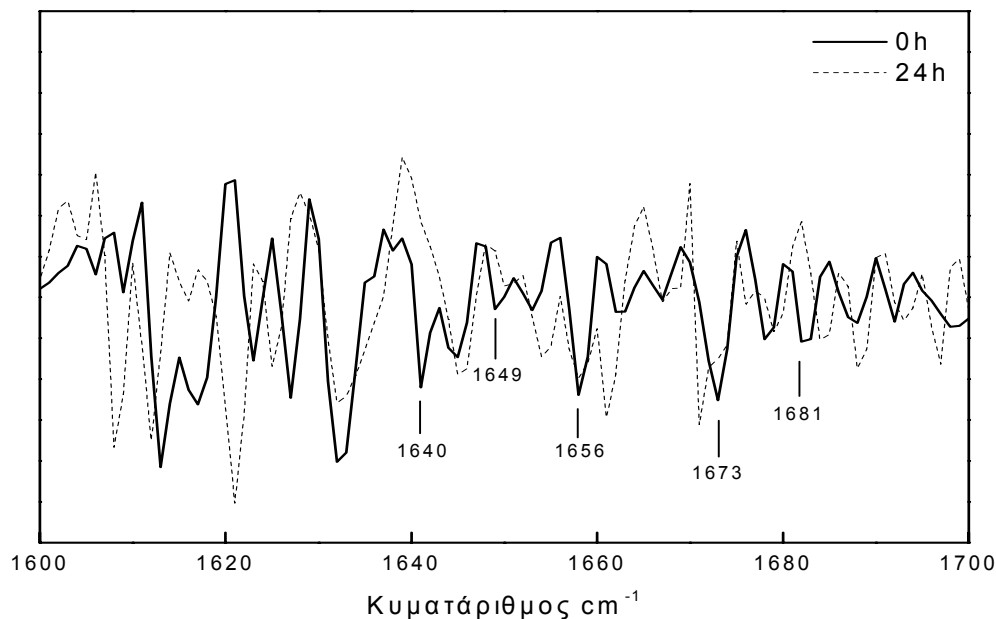


Σχήμα 6.21 Σύγκριση των ATR-FTIR φασμάτων δεύτερης παραγώγου στην περιοχή amide I μετά από 0 h (συνεχής γραμμή) και 24 h (διακεκομμένη γραμμή) επώασης της Lipzyme RMIM στους 60°C στο $[\text{bmim}]\text{BF}_4$.

Η επώαση συνεπώς το δύο ακινητοποιημένων λιπασών στο υδρόφιλο $[\text{bmim}]\text{BF}_4$ φαίνεται να οδηγεί σε σημαντική τροποποίηση της δευτεροταγούς δομής τους, με ανακατανομή στοιχείων όπως οι β-πτυχές, μείωση των α-ελίκων και αύξηση του τυχαίου σπειράματος. Οι τροποποιήσεις αυτές υποδεικνύουν πως η αποσταθεροποίηση των δύο λιπασών στο ιοντικό υγρό $[\text{bmim}]\text{BF}_4$ οφείλεται στην αποδιάταξη του πρωτεϊνικού μορίου.

Αντίθετα, στην περίπτωση του υδρόφοβου $[\text{bmim}]\text{PF}_6$ καταδεικνύεται η σταθεροποιητική επίδραση του ιοντικού υγρού στις δύο υπό μελέτη ακινητοποιημένες λιπάσες (§ 6.1). Στην περίπτωση δε της Novozym 435 αναφέρθηκε ακόμη και ενεργοποίηση, με αύξηση της δραστηρότητας μετά από 24 h επώασης σε 200%.

Τα φάσματα δεύτερης παραγώγου για τη Novozym 435 στο $[\text{bmim}]\text{PF}_6$ απεικονίζονται στο **Σχήμα 6.22**.

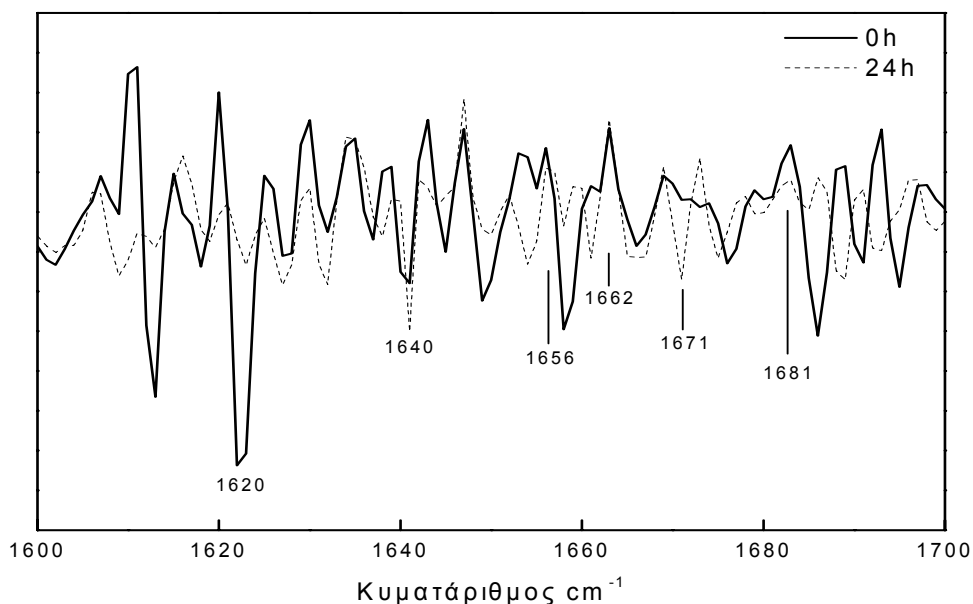


Σχήμα 6.22 Σύγκριση των ATR-FTIR φασμάτων δεύτερης παραγωγού στην περιοχή amide I μετά από 0 h (συνεχής γραμμή) και 24 h (διακεκομμένη γραμμή) επώασης της Novozym 435 στους 60°C στο [bmim]PF₆.

Με σύγκριση των δύο φασμάτων παρατηρείται αρχικά πως, σε αντίθεση με τα αντίστοιχα φάσματα στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄, στην περίπτωση αυτή δεν υπάρχουν μετατοπίσεις των κορυφών. Ωστόσο, τα δύο φάσματα παρουσιάζουν μεταξύ τους διαφορές, όσον αφορά την ένταση και πλάτος των κορυφών. Πιο συγκεκριμένα οι κορυφές στα 1630 και 1638 cm⁻¹ εμφανίζονται σημαντικά πεπλατυσμένες και με μεγαλύτερη ένταση μετά από 24 h επώασης της λιπάσης. Μεγαλύτερη εμφανίζεται και η κορυφή στα 1682 cm⁻¹. Αντίθετα, η κορυφή στα 1656 cm⁻¹ εμφανίζεται μικρότερη μετά από 24 h επώασης, ενώ η κορυφή στα 1650 cm⁻¹ παραμένει αμετάβλητη. Οι αλλαγές αυτές υποδεικνύουν μία τροποποίηση της δευτεροταγούς δομής η οποία συνδέεται με αύξηση των β-πτυχών και β-στροφών και ταυτόχρονη μείωση των α-ελίκων, ενώ δεν παρατηρείται μεταβολή του τυχαίου σπειράματος. Παρόμοιες μεταβολές έχουν αναφερθεί κατά τη διαδικασία λυοφιλιωποίησης ενζυμικών μορίων [Prestrelski *et al.* 1993a,b, Griebenow & Klibanov, 1995, Vecchio *et al.*, 1999]. Οι μεταβολές αυτές κατά τη λυοφιλιωποίηση αποδίδονται στη μείωση της αλληλεπίδρασης, μέσω δεσμών υδρογόνου, μεταξύ των α-ελίκων και των μορίων του νερού. Οι δεσμοί αυτοί αναπληρώνονται μέσω του σχηματισμού ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου, οι οποίοι οδηγούν στο σχηματισμό β-πτυχών και συνεπώς σε μία περισσότερο άκαμπτη ενζυμική δομή [Vecchio *et al.*, 1999].

Κατά την επώαση της λιπάσης στο [bmim]PF₆, τέτοιου είδους δομικές τροποποιήσεις μπορεί να συνδέονται με τον υδρόφοβο χαρακτήρα του ιοντικού υγρού, το οποίο σχηματίζει ένα υπερμοριακό δίκτυο [Dupont *et al.*, 2004] όπου τα μόρια νερού είναι δυνατόν να κατανέμονται μεταξύ του μικρο- και μακρο-περιβάλλοντος του ενζύμου, με αποτέλεσμα μία περισσότερο οργανωμένη δομή του νερού γύρω από την πρωτεΐνη. Αντίστοιχες αλλαγές παρατηρήθηκαν μέσω κυκλικού διχρωισμού στην περίπτωση επώασης της ελεύθερης λιπάσης B από *Candida antarctica* στα υδρόφοβα ιοντικά υγρά [emim]NTf₂ και [btma]NTf₂ [De Diego *et al.*, 2005]. Σε συμφωνία με τη μελέτη αυτή, καθίσταται σαφής η ικανότητα του υδρόφοβου [bmim]PF₆ να αλληλεπιδρά με το ενζυμικό μόριο επάγοντας μία νέα περισσότερο άκαμπτη δομή. Το γεγονός αυτό μπορεί να εξηγήσει την παρατηρούμενη στο [bmim]PF₆ ενεργοποίηση της Novozym 435 (§ 6.1).

Σημαντική σταθεροποιητική επίδραση ασκεί το ιοντικό αυτό υγρό και στην ακινητοποιημένη λιπάση Lipozyme RMIM. Η συγκεκριμένη λιπάση διατηρεί το 70% της δραστηριότητάς της μετά από 24 h επώασης στο [bmim]PF₆. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να εξηγηθεί ικανοποιητικά με βάση την ανάλυση της δομής μέσω FTIR (**Σχήμα 6.23**).



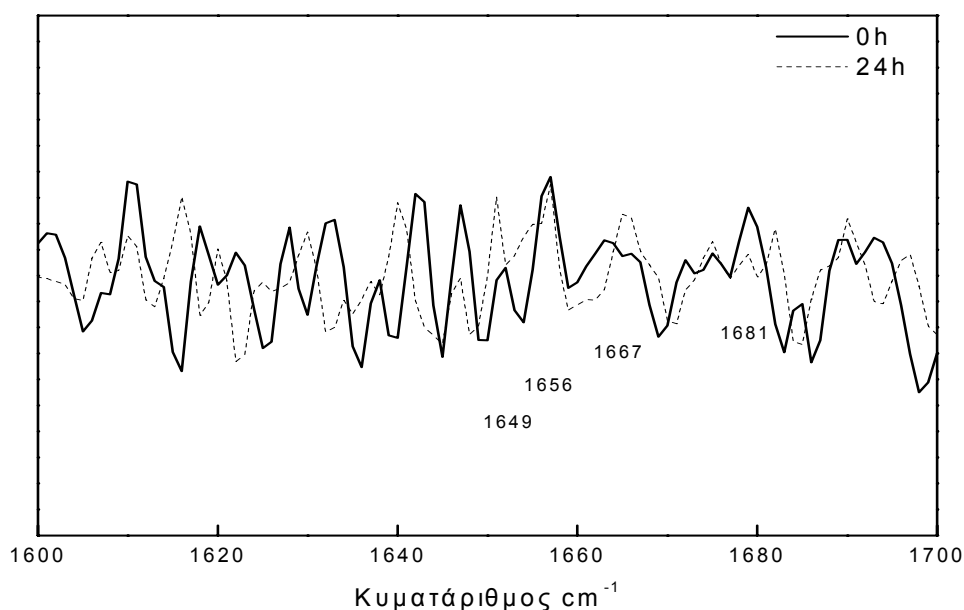
Σχήμα 6.23 Σύγκριση των ATR-FTIR φασμάτων δεύτερης παραγώγου στην περιοχή amide I μετά από 0 h (συνεχής γραμμή) και 24 h (διακεκομμένη γραμμή) επώασης της Lipozyme RMIM στους 60°C στο [bmim]PF₆.

Μεταξύ των φασμάτων δεύτερης παραγώγου μετά από 0 και 24 h επώασης (**Σχήμα 6.23**) παρατηρείται μεγάλος βαθμός ομοιότητας. Η θέση και ένταση των κορυφών στα 1630 και 1656 cm⁻¹, οι οποίες αντιστοιχούν σε β-πτυχές και α-έλικες παραμένουν αμετάβλητες. Οι

διαφορές εντοπίζονται κοντά στα 1683 και 1690 cm^{-1} , όπου οι κορυφές εμφανίζονται κάπως μετατοπισμένες μετά από 24 h επώασης και παρατηρείται επίσης και μία πολύ μικρή αύξηση της έντασης της κορυφής στα 1647 cm^{-1} , η οποία σχετίζεται πιθανά με μία μικρή αύξηση του τυχαίου σπειράματος. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν την ικανότητα διατήρησης της καταλυτικά ενεργής διαμόρφωσης της λιπάσης στο υδρόφοβο [bmim]PF₆ και άρα την υψηλή σταθερότητα της στο συγκεκριμένο ιοντικό υγρό.

6.4.3.2 Ανάλυση της δομής λυοφιλιωμένων λιπασών μέσω FTIR

Τα φάσματα δεύτερης παραγώγου της λυοφιλιωμένης λιπάσης B από *Candida antarctica* (IyoCaLB) στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ απεικονίζονται στο **Σχήμα 6.24**.



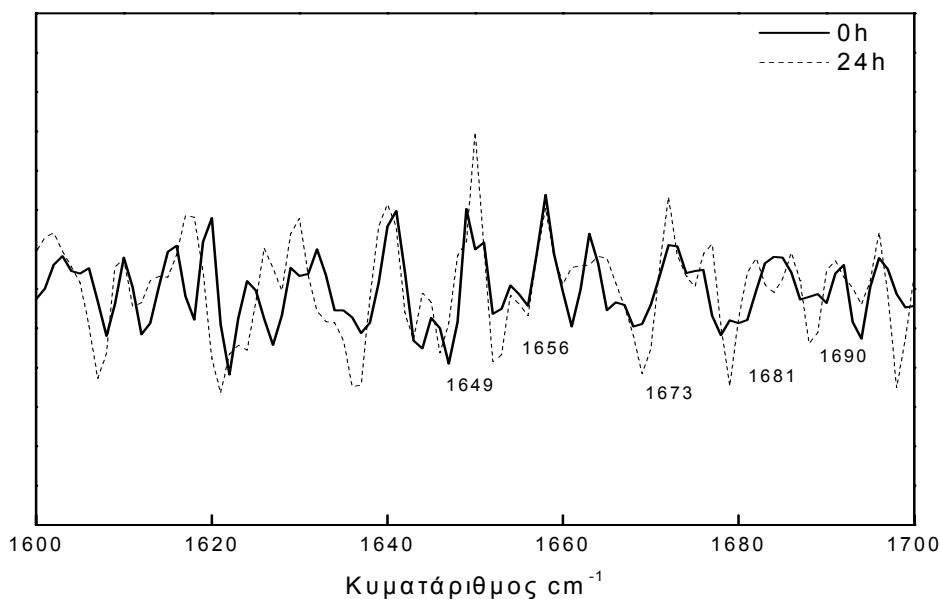
Σχήμα 6.24 Σύγκριση των ATR-FTIR φασμάτων δεύτερης παραγώγου στην περιοχή amide I μετά από 0 h (συνεχής γραμμή) και 24 h (διακεκομμένη γραμμή) επώασης της IyoCaLB στους 60°C στο [bmim]BF₄.

Με σύγκριση των φασμάτων παρατηρείται αρχικά η μετατόπιση των κορυφών κοντά στα 1630 και 1640 cm^{-1} , οι οποίες αντιστοιχούν σε β-πτυχές. Η διαφοροποίηση αυτή είναι όμοια με εκείνη στην περίπτωση του ακινητοποιημένου σκευάσματος Novozym 435 (§ 6.4.3.1), η οποία αποδόθηκε σε ανακατανομή των β-πτυχών, πιθανά εξαιτίας του υδρόφιλου χαρακτήρα του [bmim]BF₄ και της ικανότητάς του να αλληλεπιδρά με τα απαραίτητα μόρια νερού του ενζύμου. Η συμφωνία των αποτελεσμάτων μεταξύ των δύο διαφορετικών σκευασμάτων φαίνεται να επιβεβαιώνει την σημασία της επίδρασης του συγκεκριμένου ιοντικού υγρού. Επιπλέον των μετατοπίσεων, κύρια χαρακτηριστικά του φάσματος μετά από

24 h επώασης της λιπάσης, αποτελούν η αύξηση των κορυφών στα 1650, 1667, 1673 και 1690 cm^{-1} . Η αύξηση στα 1650 cm^{-1} υποδεικνύει την αύξηση του τυχαίου σπειράματος και συνεπώς τη μετάβαση σε μία αποδιαταγμένη ενζυμική δομή. Οι υπόλοιπες κορυφές ανατίθενται κατά σειρά σε μη συνδεδεμένα με δεσμούς υδρογόνου καρβονύλια β-στροφών (1667, 1673 cm^{-1}) και αντιπαράλληλα β-φύλλα (1690 cm^{-1}) [Yang *et al.*, 1985, Mantsch *et al.*, 1993, Jackson & Mantsch, 1995, Wellner *et al.*, 1996] και η αύξηση των κορυφών αυτών είναι ενδεικτική της παρουσίας πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων [Halverson *et al.*, 1991, Lau *et al.*, 2004]. Ο σχηματισμός πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων σε οργανικούς διαλύτες έχειδειχθεί πως εξαρτάται από την ικανότητα του διαλύτη να απομακρύνει μόρια νερού από το απαραίτητο στρώμα νερού του ενζύμου [Uppenberg *et al.*, 1994, Lau *et al.*, 2004, van Rantwijk *et al.*, 2006]. Το υδρόφιλο [bmim]BF₄ αναμένεται να έχει αυτή την ικανότητα με αποτέλεσμα να οδηγεί στη δημιουργία συσσωματωμάτων. Ωστόσο, είναι πιθανό η συσσωμάτωση να οφείλεται στην άμεση αλληλεπίδραση μεταξύ του κατιόντος ή/και του ανιόντος με το ενζυμικό μόριο μέσω φορτισμένων ομάδων ή ανακατανομής των δεσμών υδρογόνου [Lau *et al.*, 2000, 2004, van Rantwijk *et al.*, 2006]. Σε κάθε περίπτωση η συσσωμάτωση υποδεικνύει την αλληλεπίδραση μεταξύ του πρωτεϊνικού μορίου με το μέσο, μέσω πιθανά δεσμών υδρογόνου, υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, η οποία οδηγεί σε μετουσίωση και απενεργοποίηση των ενζυμικών μορίων [Sate *et al.*, 2007]. Η παρουσία, συνεπώς, των προαναφερόμενων στοιχείων μπορεί να δικαιολογήσει την αποσταθεροποίηση της IyoCaLB μετά από 24 h επώασης στο [bmim]BF₄ (§ 6.2).

Παρόμοιες είναι οι αλλαγές και στο φάσμα της λυοφιλιωμένης λιπάσης από *Rhizomucor miehei* (IyoRmL) (Σχήμα 6.25).

Με σύγκριση των φασμάτων παρατηρείται, και σε αυτήν την περίπτωση, η μετατόπιση των κορυφών κοντά στα 1630 και 1640 cm^{-1} . Παρατηρείται επίσης αποδιάταξη της ενζυμικής δομής, μέσω της αύξησης του τυχαίου σπειράματος (αύξηση της κορυφής στα 1650 cm^{-1}) καθώς και η παρουσία ενζυμικών συσσωματωμάτων (αύξηση των κορυφών στα 1667, 1673 και 1690 cm^{-1}). Οι αλλαγές αυτές είναι όμοιες με εκείνες στην περίπτωση της IyoCaLB, και συμφωνούν με τα παρόμοια προφίλ απενεργοποίησης των δύο λιπασών στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ (§ 6.2). Στο ιοντικό αυτό υγρό, η IyoRmL διατηρεί μετά από 24 h επώασης στους 60°C το 30% της αρχικής της δραστηρότητας.

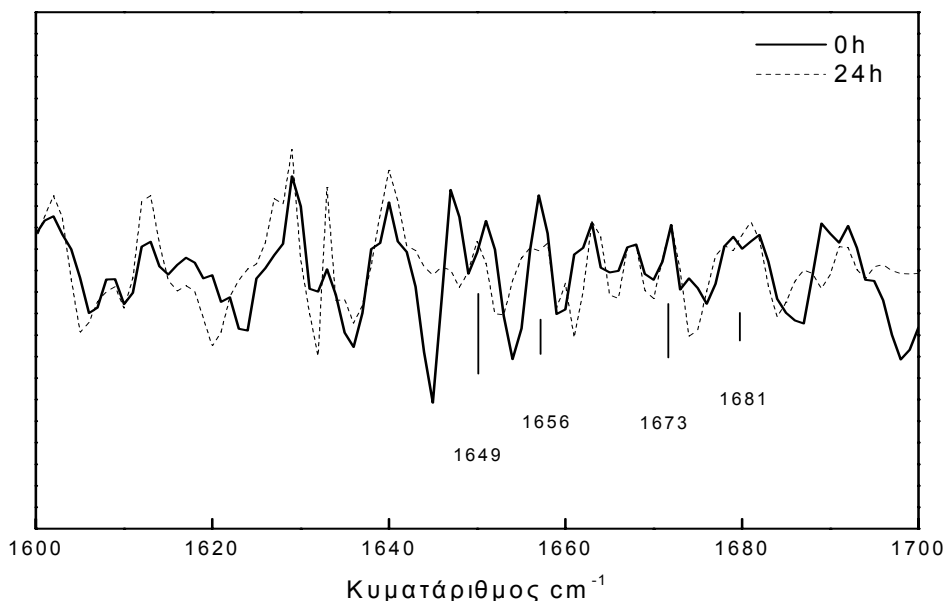


Σχήμα 6.25 Σύγκριση των ATR-FTIR φασμάτων δεύτερης παραγωγού στην περιοχή amide I μετά από 0 h (συνεχής γραμμή) και 24 h (διακεκομμένη γραμμή) επώασης της lyoRmL στους 60°C στο [bmim]BF₄.

Σε αντίθεση με το ιοντικό υγρό [bmim]BF₄, στο υδρόφοβο [bmim]PF₆ οι δύο λυοφιλιωμένες λιπάσες επέδειξαν υψηλότερη σταθερότητα (§ 6.2). Πιο συγκεκριμένα, η lyoCaLB εμφάνισε ενεργοποίηση μετά από 24 h επώασης στο [bmim]PF₆ στους 60°C (**Σχήμα 6.4β**), όπως είχε παρατηρηθεί αντίστοιχα και για το ακινητοποιημένο σκεύασμα της λιπάσης αυτής.

Τα φάσματα δεύτερης παραγωγού της lyoCaLB μετά από 0 και 24 h απεικονίζονται στο **Σχήμα 6.26**.

Τα κύρια χαρακτηριστικά του φάσματος μετά από 24 h επώασης αποτελούν η αύξηση των κορυφών στα 1630 και 1640 cm⁻¹, η μείωση της κορυφής στα 1656 cm⁻¹ και η διατήρηση των υπόλοιπων κορυφών, μεταξύ αυτών και της κορυφής στα 1650 cm⁻¹. Οι παρατηρούμενες αλλαγές συμφωνούν απόλυτα με τις αντίστοιχες του φάσματος στην περίπτωση της ακινητοποιημένης λιπάσης Novozym 435 και υποδεικνύουν τη μετατροπή των α-ελίκων σε β-πτυχές, δηλαδή την τροποποίηση της ενζυμικής δομής προς μία περισσότερο άκαμπτη διαμόρφωση. Η υιοθέτηση της νέας διαμόρφωσης εξηγεί ικανοποιητικά την ενεργοποίηση της lyoCaLB στο ιοντικό υγρό.



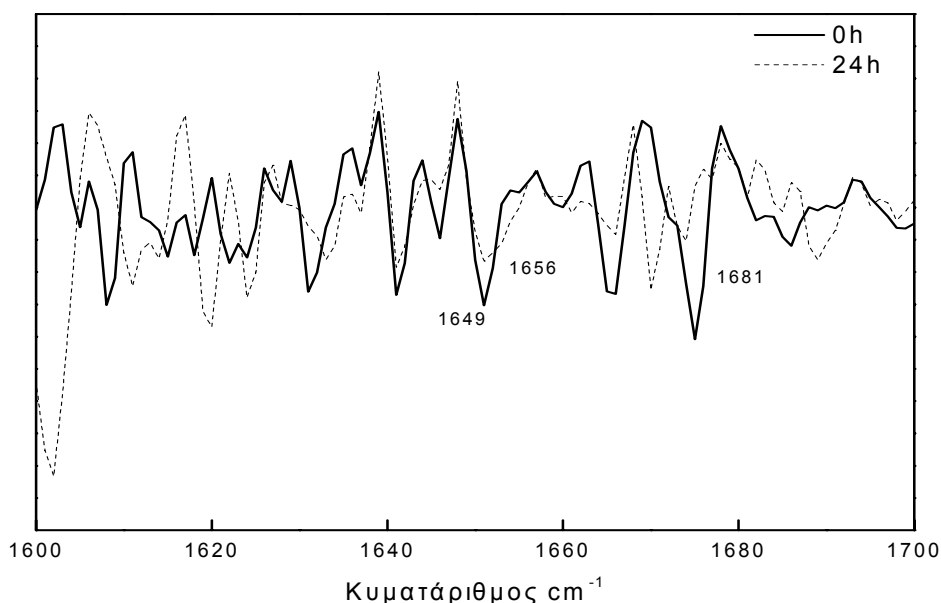
Σχήμα 6.26 Σύγκριση των ATR-FTIR φασμάτων δεύτερης παραγωγού στην περιοχή amide I μετά από 0 h (συνεχής γραμμή) και 24 h (διακεκομμένη γραμμή) επώασης της IyoCaLB στους 60°C στο [bmim]PF₆.

Είναι δε αξιοσημείωτο το γεγονός πως η ενεργοποίηση συνοδεύεται από όμοιες δομικές αλλαγές, ανεξάρτητα του ενζυμικού σκευάσματος (ακίνητοποιημένο, λυοφιλιωμένο) και πως η φασματοσκοπία υπέρυθρου αποτελεί μία ικανοποιητική τεχνική για την παρακολούθηση αυτών των αλλαγών. Ο παρόμοιος βαθμός τροποποίησης της δευτεροταγούς δομής υποδεικνύει πως αυτή συνδέεται κυρίως με τη φύση του ιοντικού υγρού, είναι δηλαδή απόρροια της άμεσης επίδρασης μεταξύ του ιοντικού υγρού [bmim]PF₆ και της λιπάσης.

Στην περίπτωση της IyoRmL τα φάσματα δεύτερης παραγωγού απεικονίζονται στο **Σχήμα 6.27**.

Με σύγκριση των φασμάτων μετά από 0 και 24 h δεν παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση. Όπως είχε αναφερθεί προηγουμένως, στην περίπτωση του ακίνητοποιημένου σκευάσματος, οι κορυφές στα 1640 και 1656 cm⁻¹, οι οποίες ανατίθενται σε β-πτυχές και α-έλικες αντίστοιχα, δεν τροποποιούνται σημαντικά. Τα στοιχεία εκείνα τα οποία εμφανίζονται σχετικά διαφοροποιημένα αφορούν στις κορυφές στα 1650, 1673 και 1684 cm⁻¹. Η μικρή αύξηση της κορυφής στα 1650 cm⁻¹ υποδεικνύει μία αύξηση του τυχαίου σπειράματος, ενώ η αύξηση εκείνης στα 1673 cm⁻¹, η οποία στο φάσμα των 0 h εμφανίζεται μόνο ως ώμος, συνδέεται πιθανά με τη δημιουργία ενζυμικών συσσωματωμάτων. Η αύξηση των στοιχείων αυτών υποδεικνύει πιθανά μία μερική αποδιάταξη του ενζύμου. Αντίθετα, η αύξηση των β-στροφών (αύξηση της κορυφής στα 1684 cm⁻¹) έχει συσχετιστεί με την αυξημένη

θερμοσταθερότητα πρωτεϊνών [Marcelino & Gierasch, 2008]. Ο συνδυασμός των προαναφερόμενων τροποποιήσεων καταδεικνύει την ικανότητα του [bmim]PF₆ να διατηρεί μία καταλυτικά ενεργή διαμόρφωση του ενζύμου δικαιολογώντας την σταθεροποιητική επίδραση του ιοντικού αυτού υγρού στην lyoRmL (**Σχήμα 6.15β**).



Σχήμα 6.27 Σύγκριση των ATR-FTIR φασμάτων δεύτερης παραγώγου στην περιοχή amide I μετά από 0 h (συνεχής γραμμή) και 24 h (διακεκομμένη γραμμή) επώασης της lyoRmL στους 60°C στο [bmim]PF₆.

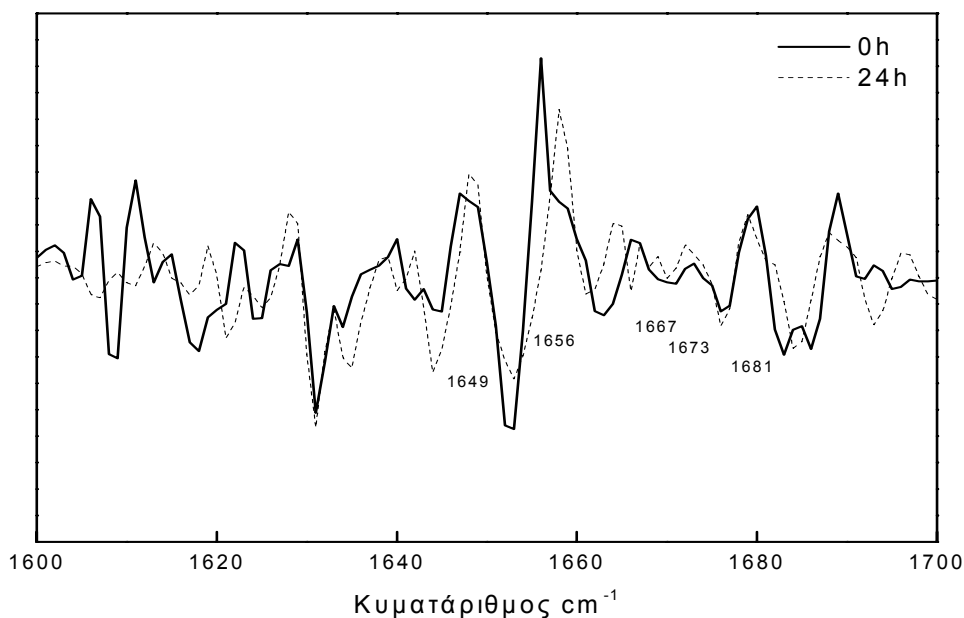
6.4.3.3 Ανάλυση της δομής ελεύθερων λιπασών μέσω FTIR

Η τελευταία μελέτη αφορά στην ανάλυση της δομής των ελεύθερων λιπασών μέσω FTIR, μετά από επώαση για 0 και 24 h στα ιοντικά υγρά στους 60°C παρουσία 5% κ.ο. νερού.

Τα φάσματα δεύτερης παραγώγου στην περίπτωση της ελεύθερης λιπάσης B από *Candida antarctica* (aqCaLB) μετά από επώαση στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ απεικονίζονται στο **Σχήμα 6.28**.

Μία βασική παρατήρηση με βάση το **Σχήμα 6.28** συνδέεται με το σημαντικό βαθμό ομοιότητας των φασμάτων. Το γεγονός αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα προαναφερόμενα αποτελέσματα, στην περίπτωση της ακινητοποιημένης και λυοφιλωμένης λιπάσης. Η επώαση αυτών των ενζυμικών σκευασμάτων στο άνυδρο [bmim]BF₄ φάνηκε να οδηγεί σε ανακατανομή των β-πτυχών, μείωση των α-ελίκων και αύξηση του τυχαίου σπειράματος, δομικές αλλαγές οι οποίες αντικατοπτρίζουν την αποδιάταξη του ενζυμικού μορίου και δικαιολογούν τη χαμηλή σταθερότητα της λιπάσης σε αυτό το ιοντικό υγρό. Ωστόσο, η ομοιότητα μεταξύ των φασμάτων στην περίπτωση της aqCaLB υποδεικνύει πιθανά πως

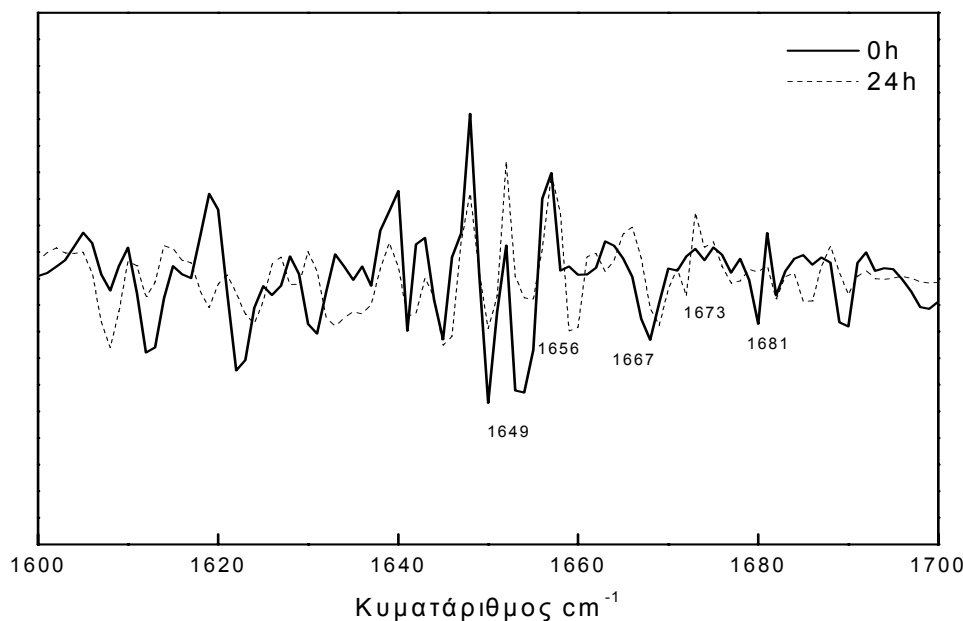
παρουσία νερού, το υδρόφιλο [bmim]BF₄ εμφανίζει μικρότερη τάση τροποποίησης της διαμόρφωσης της λιπάσης.



Σχήμα 6.28 Σύγκριση των ATR-FTIR φασμάτων δευτέρης παραγώγου στην περιοχή amide I μετά από 0 h (συνεχής γραμμή) και 24 h (διακεκομμένη γραμμή) επώασης της aqCaLB στους 60°C στο [bmim]BF₄ παρουσία 5% κ.ο. νερού.

Πράγματι, με βάση το φάσμα παρατηρείται μικρή μείωση της κορυφής στα 1638 και 1656 cm⁻¹ και αύξηση της κορυφής στα 1649 cm⁻¹, οι οποίες ανατίθενται σε β-πτυχές, α-έλικες και τυχαίο σπείραμα, αντίστοιχα. Οι αλλαγές αυτές μπορούν να οδηγήσουν σε μία μερικώς αποδιαταγμένη δομή, δικαιολογώντας τη μικρή απώλεια της δραστηριότητας (40%) μετά από 24 h επώασης. Ωστόσο, το κυρίαρχο στοιχείο της λιπάσης, η α-έλικα, διατηρείται ακόμα και μετά από 24 h επώασης. Η παρουσία του στοιχείου αυτού έχει συνδεθεί με την ευελιξία του πρωτεϊνικού μορίου [Trodler & Pleiss, 2008] και άρα στην περίπτωση της aqCaLB το ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ έχει την ικανότητα να διατηρεί μία ευέλικτη καταλυτικά ενεργή διαμόρφωση της λιπάσης.

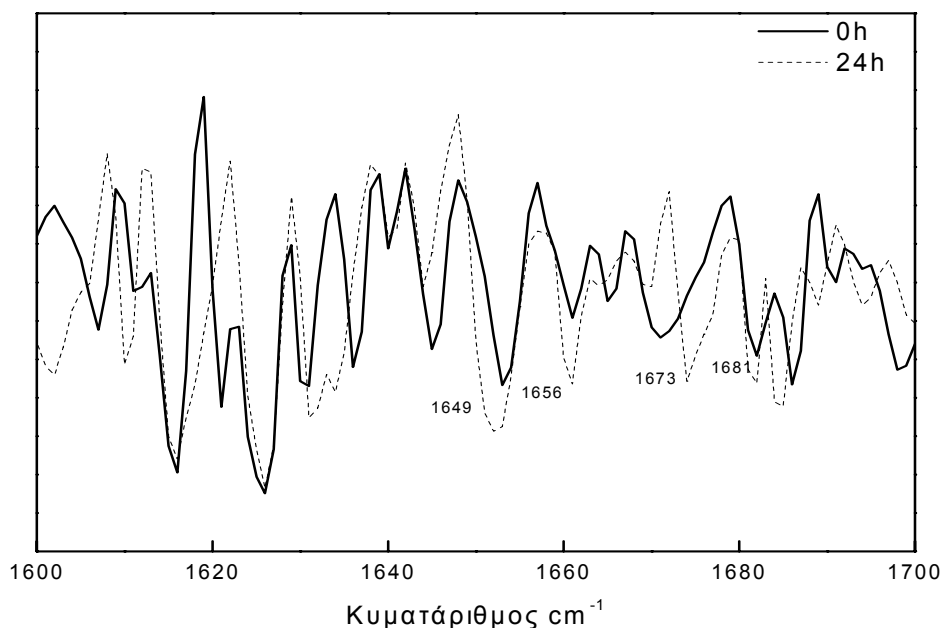
Στην περίπτωση της ελεύθερης λιπάσης από *Rhizomucor miehei* (aqRmL) η σύγκριση των φασμάτων μετά από 0 και 24 h επώασης στο [bmim]BF₄ καταδεικνύει περισσότερο έντονες αλλαγές συγκριτικά με την aqCaLB (**Σχήμα 6.29**).



Σχήμα 6.29 Σύγκριση των ATR-FTIR φασμάτων δεύτερης παραγωγού στην περιοχή amide I μετά από 0 h (συνεχής γραμμή) και 24 h (διακεκομμένη γραμμή) επώασης της aqRmL στους 60°C στο [bmim]BF₄ παρουσία 5% κ.ο. νερού.

Συγκεκριμένα, παρατηρείται σημαντική αύξηση της κορυφής στα 1650 cm⁻¹, η οποία συνδέεται με αύξηση του τυχαίου σπειράματος. Επιπλέον μειωμένες εμφανίζονται οι κορυφές κοντά στα 1640 cm⁻¹ και πιο έντονες οι κορυφές στα 1660, 1667 και 1673 cm⁻¹. Οι αλλαγές αυτές αντιστοιχούν σε μείωση των β-πτυχών και πιθανά εμφάνιση πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων [Halverson *et al.*, 1991, Lau *et al.*, 2004]. Οι αλλαγές αυτές στη δευτεροταγή δομή της λιπάσης μπορούν να δικαιολογήσουν την μεγαλύτερη απώλεια της δραστηριότητας (60%) σε σχέση με την aqCaLB (§ 6.3). Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός πως, όπως και στην περίπτωση της CaLB, η επώαση της aqRmL στο [bmim]BF₄ παρουσία 5% κ.ο. νερού φαίνεται να συμβάλλει στην εμφάνιση μικρότερων τροποποιήσεων της δευτεροταγούς δομής συγκριτικά με την επώαση του ενζύμου στο άνυδρο ιοντικό υγρό.

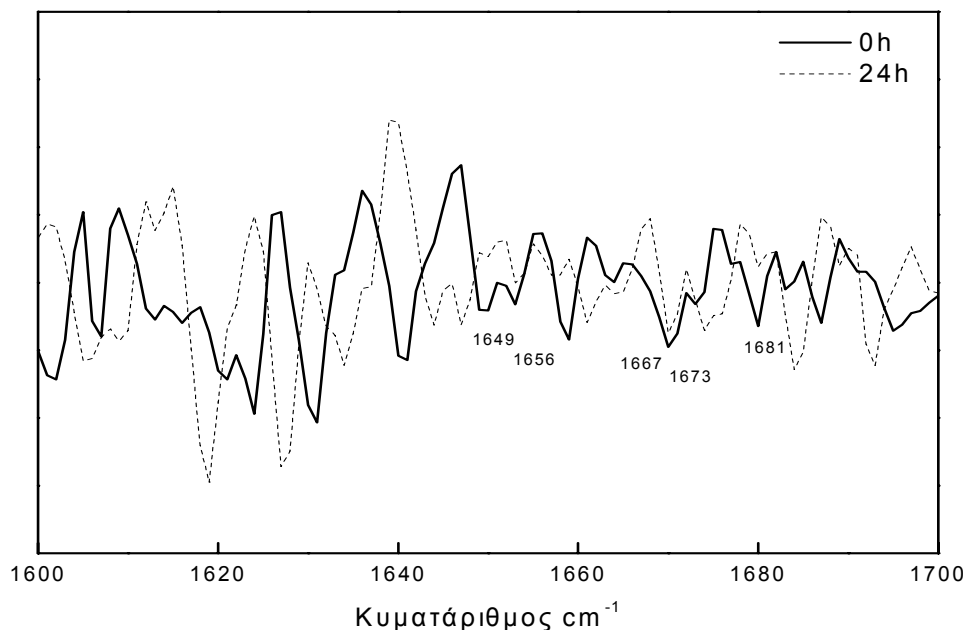
Σημαντική διαφοροποίηση συγκριτικά με όλες τις προαναφερόμενες περιπτώσεις παρατηρείται και στην περίπτωση επώασης της aqCaLB στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ παρουσία 5% κ.ο. νερού (**Σχήμα 6.30**).



Σχήμα 6.30 Σύγκριση των ATR-FTIR φασμάτων δεύτερης παραγώγου στην περιοχή amide I μετά από 0 h (συνεχής γραμμή) και 24 h (διακεκομμένη γραμμή) επώασης της aqCaLB στους 60°C στο [bmim]PF₆ παρουσία 5% κ.ο. νερού.

Χαρακτηριστικά σημεία του φάσματος της λιπάσης, μετά από 24 h επώασης, αποτελούν η αύξηση της κορυφής στα 1650 cm⁻¹, η μείωση της κορυφής στα 1656 και 1681 cm⁻¹ και η εμφάνιση νέων κορυφών στα 1673 και 1690 cm⁻¹. Οι αλλαγές αυτές υποδεικνύουν την αύξηση του τυχαίου σπειράματος, τη μείωση των α-ελίκων και β-στροφών και πιθανά τη δημιουργία συσσωματωμάτων [Halverson *et al.*, 1991, Lau *et al.*, 2004]. Συνολικά παρατηρείται μία τροποποίηση της διαμόρφωσης της λιπάσης προς μία αποδιαταγμένη δομή, γεγονός το οποίο μπορεί να εξηγήσει την αποσταθεροποίηση της aqCaLB στο [bmim]PF₆ (§ 6.3). Τα αποτελέσματα της ανάλυσης μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου συμφωνούν με εκείνα της φασματοσκοπίας φθορισμού (**Σχήμα 6.17γ**). Η εφαρμογή της τεχνικής αυτής αποκάλυψε ένα κλασικό προφίλ απενεργοποίησης της aqCaLB στο κορεσμένο με νερό [bmim]PF₆, με αύξηση της έκθεσης των καταλοίπων τρυπτοφάνης στο μέσο συναρτήσει του χρόνου επώασης, εξαιτίας της αποδιάταξης της ενζυμικής δομής (§ 6.4.2).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα φασματοσκοπίας φθορισμού ακόμα πιο έντονη ήταν η αποδιάταξη στην περίπτωση της aqRmL μετά από επώαση στο κορεσμένο με νερό [bmim]PF₆ (**Σχήμα 6.19γ**). Η ανάλυση της δομής της λιπάσης μέσω FTIR φαίνεται να ενισχύει τα προαναφερόμενα αποτελέσματα (**Σχήμα 6.31**).



Σχήμα 6.31 Σύγκριση των ATR-FTIR φασμάτων δεύτερης παραγώγου στην περιοχή amide I μετά από 0 h (συνεχής γραμμή) και 24 h (διακεκομμένη γραμμή) επώασης της aqRmL στους 60°C στο [bmim]PF₆ παρουσία 5% κ.ο. νερού.

Η σύγκριση των φασμάτων δεύτερης παραγώγου για την aqRmL μετά από 0 και 24 h στο [bmim]PF₆ καταδεικνύει σημαντικές μετατοπίσεις των κορυφών και αλλαγές στην ένταση. Όπως είχε παρατηρηθεί αντίστοιχα και στην περίπτωση της Lipozyme RMIM στο [bmim]BF₄ (§ 6.4.3.1), η εμφάνιση τέτοιων σημαντικών αλλαγών στα φάσματα είναι ενδεικτική ενός αποδιαταγμένου και συνεπώς απενεργοποιημένου ενζυμικού μορίου [Quiroga *et al.*, 2007]. Διαφοροποίηση της δευτεροταγούς δομής της λιπάσης σε τέτοιο βαθμό αναμένεται να οδηγήσει σε σημαντική απώλεια της καταλυτικής δραστηριότητας [Dong *et al.*, 1996]. Όντως τα αποτελέσματα σταθερότητας δείχνουν πως η επώαση της aqRmL στο [bmim]PF₆ παρουσία 5% κ.ο. νερού οδήγησε σε απώλεια της δραστηριότητας κατά 90% μετά από 24 h επώασης στους 60°C.

Συνολικά τα προαναφερόμενα αποτελέσματα αποδεικνύουν πως η φασματοσκοπία υπερύθρου αποτελεί μία ιδιαίτερα χρήσιμη τεχνική για την παρακολούθηση δομικών αλλαγών των ενζύμων σε ιοντικά υγρά. Η εφαρμογή της δεν περιορίζεται από το είδος του ενζυμικού σκευάσματος (ακινητοποιημένο, λυοφιλιωμένο, ελεύθερο), τη φύση του ιοντικού υγρού και την παρουσία ή όχι νερού. Επιπλέον, το πιο σημαντικό ίσως γεγονός αποτελεί η δυνατότητα αξιοποίησης της φασματοσκοπίας υπερύθρου για την κατανόηση των σχέσεων δομής-σταθερότητας των λιπασών σε ιοντικά υγρά, καθώς σε όλες τις περιπτώσεις

καταδείχθηκε η πολύ καλή συσχέτιση μεταξύ της διαφοροποίησης των στοιχείων δευτεροταγούς δομής και των παρατηρούμενων προφίλ σταθερότητας των λιπασών στα νέα αυτά μέσα.

7. Βιοκαταλυτική τροποποίηση της δομής φυσικών αντιοξειδωτικών σε ιοντικά υγρά

Τα αποτελέσματα των προηγούμενων παραγράφων καθιστούν σαφές πως η χρήση των ιοντικών υγρών προσδίδει ανώτερες ιδιότητες στις λιπάσες, συμβάλλοντας στη σταθεροποίησή τους. Η σταθεροποίηση αυτή απορρέει τόσο από την αλληλεπίδραση του ιοντικού υγρού με το απαραίτητο στρώμα νερού του ενζύμου, όσο και από την άμεση επίδραση του στην ενζυμική δομή. Με βάση τα δεδομένα αυτά, περαιτέρω μελέτη των καταλυτικών ιδιοτήτων των λιπασών, όπως η δραστηριότητα και εκλεκτικότητα αυτών σε ιοντικά υγρά, καθώς και της δυνατότητας εφαρμογής τους στην παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, επιχειρείται στα νέα αυτά μη συμβατικά μέσα μέσω της τροποποίησης της δομής φυσικών αντιοξειδωτικών.

Η τροποποίηση της δομής των φυσικών αντιοξειδωτικών εστιάζεται σε αντιδράσεις εστεροποίησης με τη χρήση διαφόρων ακυλο-δοτών. Το ενδιαφέρον για τις αντιδράσεις αυτές οφείλεται στην ανάγκη τροποποίησης των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των φυσικών αντιοξειδωτικών, με έμφαση στην αύξηση του λιπόφιλου χαρακτήρα τους, προκειμένου οι ενώσεις αυτές να βρουν εφαρμογή σε πολυφασικά και λιπιδικά σκευάσματα, όπως αυτά απαντώνται σε τρόφιμα, φάρμακα και καλλυντικά. Επιπρόσθετα, μέσω της σύνθεσης παραγώγων των φυσικών αντιοξειδωτικών, είναι η δυνατή η σύνθεση αναλόγων τα οποία μπορούν να αποτελέσουν πολύτιμα εργαλεία για τη μελέτη των σχέσεων δομής-βιολογικής δράσης των φυσικών αντιοξειδωτικών.

Όσον αφορά στη μελέτη των καταλυτικών ιδιοτήτων των λιπασών, η πολύπλοκη δομή των φυσικών αντιοξειδωτικών μπορεί να οδηγήσει στην αποκάλυψη χρήσιμων πληροφοριών σχετικά με την δραστηριότητα και εκλεκτικότητα των ενζύμων αυτών για συγκεκριμένες θέσεις ακυλίωσης των υποστρωμάτων.

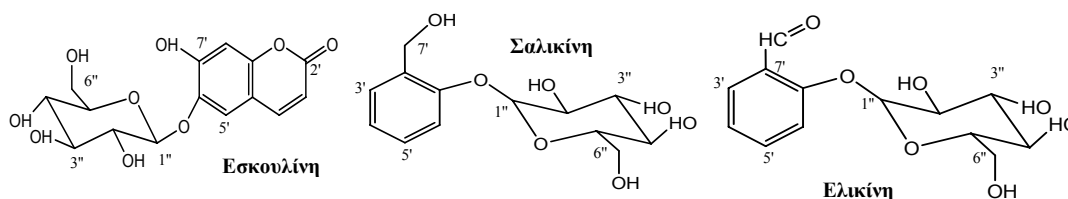
Η δυνατότητα τροποποίησης της δομής φυσικών αντιοξειδωτικών σε ιοντικά υγρά συνοδεύεται από πλεονεκτήματα, όπως το γεγονός ότι τα μέσα αυτά αποτελούν μία «πράσινη», περιβαλλοντικά φιλική εναλλακτική των ευρέως χρησιμοποιούμενων τοξικών και επιβλαβών για το περιβάλλον οργανικών διαλυτών. Επιπρόσθετα, για την πραγματοποίηση των συγκεκριμένων αντιδράσεων εστεροποίησης των υδρόφιλων φυσικών αντιοξειδωτικών με διάφορους υδρόφοβους ακυλο-δότες, η δυνατότητα των ιοντικών υγρών να διαλυτοποιούν τόσο πολικές όσο και μη-πολικές ενώσεις αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα.

Με βάση τα παραπάνω, στο υποκεφάλαιο αυτό θα μελετηθεί η δυνατότητα τροποποίησης της δομής διαφόρων φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως φλαβονοειδών,

φαινολικών γλυκοσιδίων, φαινολικών οξέων και βιταμινών, η οποία πραγματοποιείται μέσω αντιδράσεων εστεροποίησης ή μετεστεροποίησης. Οι προαναφερόμενες αντιδράσεις πραγματοποιούνται με τη χρήση λιπασών μικροβιακής προέλευσης. Προκειμένου να περιγραφεί πλήρως το νέο αυτό βιοκαταλυτικό σύστημα θα μελετηθεί η επίδραση διαφόρων παραμέτρων, όπως της φύσης του ιοντικού υγρού και των υποστρωμάτων, της προέλευσης της μικροβιακής λιπάσης, της συγκέντρωσης των υποστρωμάτων και του ενζύμου, της θερμοκρασίας και του νερού στην απόδοση και εκλεκτικότητα των ενζυμικών αντιδράσεων.

7.1 Μελέτη ενζυμικής ακυλίωσης φαινολικών γλυκοσιδίων

Φαινολικά γλυκοσίδια, όπως η εσκουλίνη, η σαλικίνη και η ελικίνη (Εικόνα 7.1), προσελκύουν ερευνητικό ενδιαφέρον εξαιτίας των βιολογικών τους δράσεων. Η ελικίνη, η οποία απομονώνεται από διάφορα φυτά του είδους *Crepis*, είναι γνωστή για τις αντικαρκινικές και επουλωτικές τις ιδιότητες [Zenk, 1967]. Η σαλικίνη απομονώνεται συνήθως από τον κορμό της λεύκας ή της ιτιάς και χρησιμοποιείται ως αναλγητικό, ενώ επιδεικνύει επίσης και αντιμικροβιακή, αντι-ιική και αντιφλεγμονώδη δράση [van Hoof *et al.*, 1989, Seo *et al.*, 2005]. Η εσκουλίνη, τέλος, αποτελεί ένα από τα περισσότερο δραστικά συστατικά του φυτού *Cortex fraxini*. Επιδεικνύει ποικίλες βιολογικές δράσεις, όπως αναστολή της δράσης οξειδωτικών ενζύμων, αντιοξειδωτικές και αντιμικροβιακές ικανότητες καθώς και αντικαρκινική δράση [Chang & Chiang, 1995, Duncan *et al.*, 1998, Kostova, 2005, Kaneko *et al.*, 2007].



Εικόνα 7.1 Δομές χρησιμοποιούμενων φαινολικών γλυκοσιδίων.

Η δυνατότητα αύξησης του λιπόφιλου χαρακτήρα των φυσικών αυτών αντιοξειδωτικών μελετήθηκε σε δύο ιοντικά υγρά, τα οποία διαφέρουν ως προς την υδροφοβικότητά τους, το αναμίξιμο με το νερό [bmim]BF₄ και το μη αναμίξιμο με το νερό [bmim]PF₆, καθώς και στην ακετόνη, έναν ευρέως χρησιμοποιούμενο οργανικό διαλύτη. Η τροποποίηση της δομής των φυσικών αντιοξειδωτικών πραγματοποιείται μέσω αντιδράσεων μετεστεροποίησης, με τη χρήση του βουτυρικού βινυλ-εστέρα ως ακυλο-δότη. Οι αντιδράσεις καταλύονται από την ακινητοποιημένη λιπάση B από *Candida antarctica* (Novozym 435)

(Πίνακας 7.1). Κριτήριο για την επιλογή της συγκεκριμένης λιπάσης αποτελεί η αυξημένη σταθερότητά της σε ιοντικά υγρά, σύμφωνα με τα αποτελέσματα του κεφαλαίου 6. Επιπρόσθετα, η Novozym 435 έχει κατά κόρον χρησιμοποιηθεί σε αντιδράσεις εστεροποίησης σε μη-συμβατικά μέσα, εξαιτίας των ιδιαίτερων βιοκαταλυτικών χαρακτηριστικών της, όπως η υψηλή (θερμο)σταθερότητα, η ανθεκτικότητά της απέναντι σε ποικίλους οργανικούς διαλύτες, η υψηλή εκλεκτικότητα και η δυνατότητα τροποποίησης ποικίλων υποστρωμάτων [Lutz, 2004, McCabe *et al.*, 2005, Villeneuve, 2007].

Πίνακας 7.1 Απόδοση (%) και εκλεκτικότητα της αντίδρασης ακυλίωσης διαφόρων φυσικών αντιοξειδωτικών (30 mM) από τον βουτυρικό βινυλ-εστέρα (300 mM), η οποία καταλύεται από την Novozym 435 στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ στους 60°C, και στην ακετόνη στους 50 °C, μετά από 72 h επώασης.

Φυσικά αντιοξειδωτικά	Απόδοση (%) (% παραγόμενος μονοεστέρας*)		
	[bmim]BF ₄	[bmim]PF ₆	Ακετόνη
Εσκουλίνη	85.8 (98.1)	90.6 (80.6)	77.9 (78.1)
Ελικίνη	89.9 (68.3)	78.8 (64.6)	86.7 (52.8)
Σαλικίνη	92.2 (23.6)	79.2 (41.9)	99.8 (28.4)

*Αναφέρεται σε ποσοστό % επί του συνόλου των παραγόμενων εστέρων

Με βάση τις τιμές του Πίνακα 7.1, παρατηρείται πως η ακινητοποιημένη λιπάση Novozym 435 έχει την ικανότητα εστεροποίησης διαφόρων φαινολικών γλυκοσιδίων και μάλιστα με ιδιαίτερα υψηλές αποδόσεις στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆. Κατά την ακυλίωση της εσκουλίνης και της ελικίνης, η χρήση των ιοντικών υγρών οδήγησε σε αποδόσεις υψηλότερες ακόμα και από τον οργανικό διαλύτη.

Σε όλες τις περιπτώσεις μέσω χρωματογραφικής ανάλυσης με HPLC ανιχνεύεται ένα κύριο προϊόν με χρόνους έκλουσης από 11.5 έως 12.6 min (Παράρτημα Β).

Η ανάλυση της δομής των προϊόντων με χρόνο έκλουσης από 11.5 έως 12.6 min μέσω φασματομετρίας μάζας ηλεκτροψεκασμού (ESI-MS) (Παράρτημα Γ) υποδεικνύει μία διαφορά των φορτισμένων ιόντων [M+Na]⁺ των προϊόντων κατά 70 μονάδες μάζας συγκριτικά με τα υποστρώματα, η οποία αποδίδεται στην σύνθεση μονοακυλιωμένων παράγωγων (βουτυλ-εστέρων) των φαινολικών γλυκοσιδίων (Πίνακας 7.2).

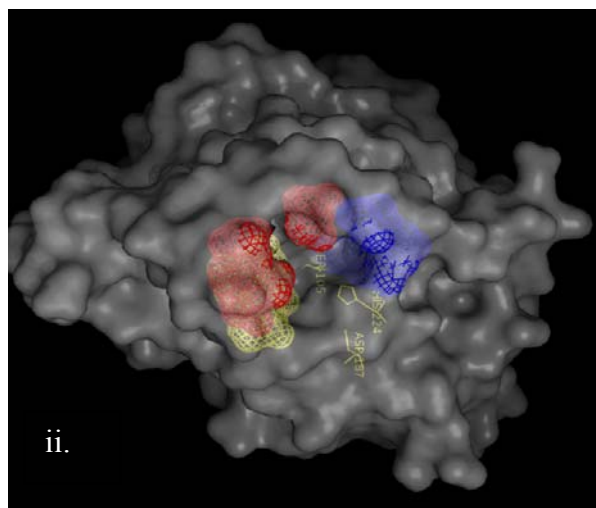
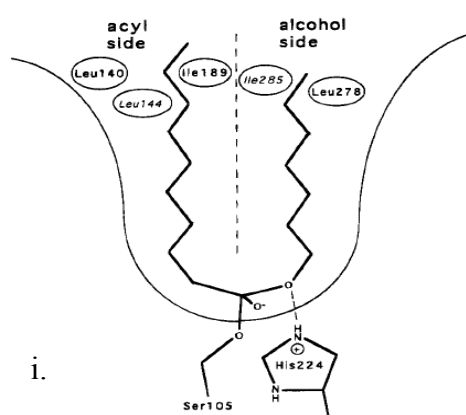
Η θέση ακυλίωσης στους ενζυμικά συντιθέμενους εστέρες των φαινολικών γλυκοσιδίων καθορίστηκε μέσω σύγκρισης των φασμάτων ^{13}C NMR των υποστρωμάτων και των μονοακυλιωμένων παραγώγων. Από την ανάλυση των φασμάτων αυτών προκύπτει μία χαρακτηριστική μετατόπιση (2.3-2.8 ppm) του σήματος που αντιστοιχεί στον C6" της ομάδας του σακχάρου καθώς και μία χαρακτηριστική μετατόπιση (2.3-2.5 ppm) του σήματος που αντιστοιχεί στον C5" της ομάδας του σακχάρου στην περίπτωση των παραγώγων συγκριτικά με τα αντίστοιχα σήματα των μη τροποποιημένων υποστρωμάτων. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν πως η ακυλίωση των φαινολικών γλυκοσιδίων πραγματοποιείται στην πρωτοταγή υδροξυλική ομάδα 6"-OH της γλυκόζης και είναι σύμφωνα με άλλες βιβλιογραφικές αναφορές οι οποίες καταδεικνύουν την υψηλή εκλεκτικότητα της λιπάσης για τις περισσότερο πυρηνόφιλες πρωτοταγείς υδροξυλικές ομάδες [Danieli *et al.*, 1997, Gao *et al.*, 2001, Kontogianni *et al.*, 2001, Gayot *et al.*, 2003, Ardhaoui *et al.*, 2004a,b,c, Mellou *et al.*, 2005, Li *et al.*, 2006].

Πίνακας 7.2 Χρόνοι έκλουσης κατά την χρωματογραφική ανάλυση μέσω HPLC (R_t) και m/z φορτισμένων ιόντων $[\text{M}+\text{Na}]^+$ των φυσικών αντιοξειδωτικών και των ακυλιωμένων παραγώγων τους.

Συστατικό	R_t (min)	Μοριακό βάρος	$[\text{M}+\text{Na}]^+$ (m/z)
Ελικίνη	7.7	284.3	307.0
Μονοεστέρας ελικίνης	12.2	354.4	377.1
Διεστέρας ελικίνης	14.7	424.5	447.1
Εσκουλίνη	7.9	340.3	362.9
Μονοεστέρας εσκουλίνης	11.5	410.4	433.0
Διεστέρας εσκουλίνης	13.8	480.5	503.1
Σαλικίνη	5.8	286.3	308.9
Μονοεστέρας σαλικίνης	11.7	356.4	379.0
Διεστέρας σαλικίνης	14.3	426.5	449.1
Τριεστέρας σαλικίνης	16.5	496.6	519.2

Η εκλεκτικότητα αυτή μπορεί να εξηγηθεί με βάση τη δομή της λιπάσης B από *Candida antarctica*. Κρυσταλλογραφικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι η περιοχή του ενεργού κέντρου της λιπάσης αποτελείται από δύο θέσεις πρόσδεσης, εκ' των οποίων η μία μπορεί να δεχτεί την ακυλ-ομάδα και η άλλη την ομάδα της αλκοόλης του υποστρώματος (**Εικόνα 7.2**). Η θέση πρόσδεσης της αλκοόλης αποτελείται από τα υδρόφοβα κατάλοιπα Trp104, Leu278,

Ala281, Ala282 και Ile285, ενώ η βάση της είναι γενικά υδρόφιλη και αποτελείται από τα κατάλοιπα Asp134, Thr138, Gln157 και τα καταλυτικά αμινοξέα Ser105, Gln187 και His224 [Uppenberg *et al.*, 1995, Pleiss *et al.*, 1998]. Η θέση πρόσδεσης της αλκοόλης είναι λιγότερο ευρύχωρη από τη θέση πρόσδεσης της ακυλ-ομάδας, εξαιτίας της παρουσίας των καταλοίπων Ala281, Ala282 και Ile285, τα οποία εξέχουν προς την ομάδα της αλκοόλης του υποστρώματος [Uppenberg *et al.*, 1995].

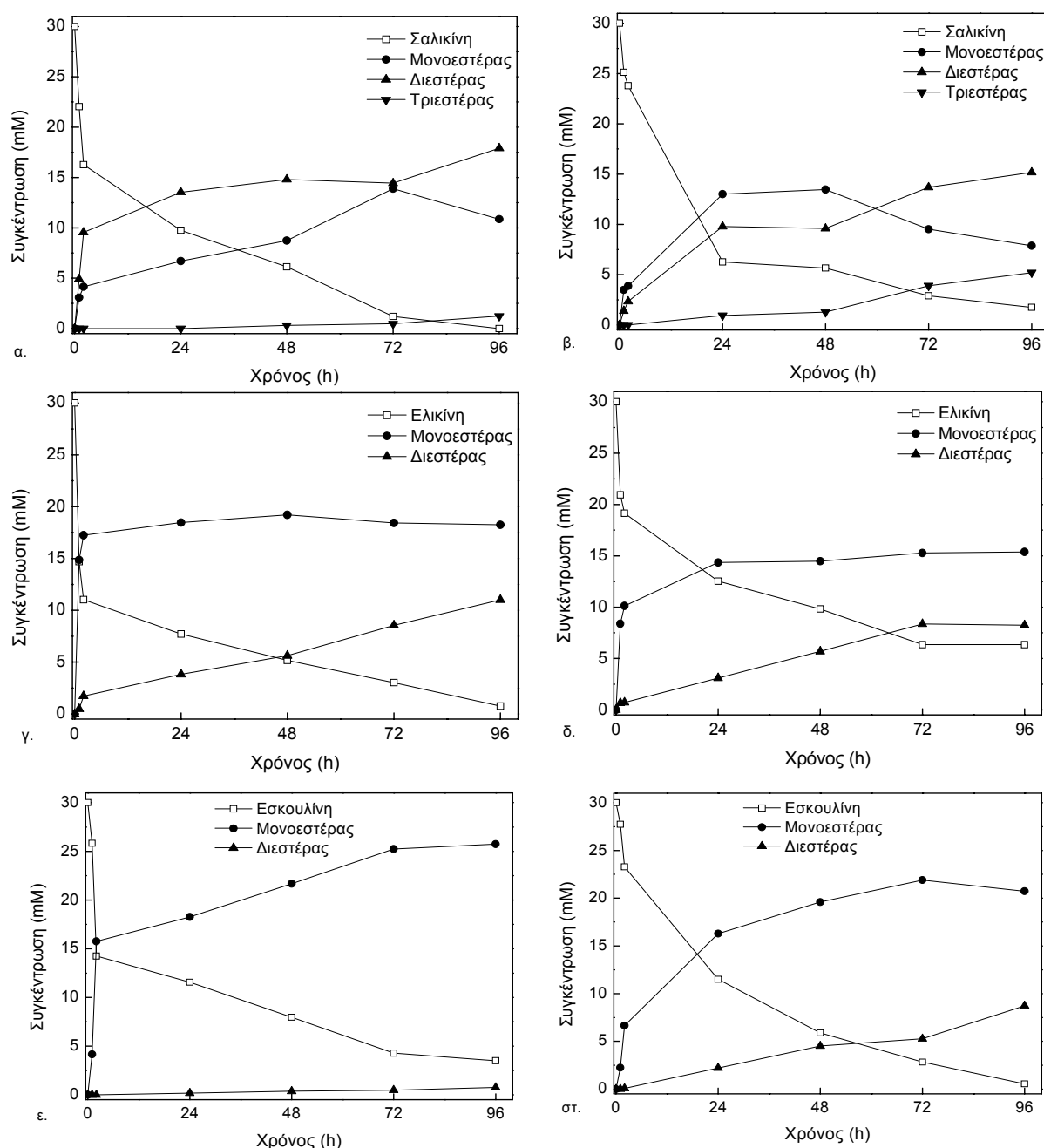


Εικόνα 7.2 (i) Σχηματική αναπαράσταση της θέσης πρόσδεσης της λιπάσης B από *Candida antarctica* και (ii) μοριακή απεικόνισή της όπου με κόκκινο και μπλε χρώμα απεικονίζονται τα υδρόφοβα κατάλοιπα της θέσης πρόσδεσης του οξέος και της αλκοόλης αντίστοιχα και με κίτρινο χρώμα η υδρόφιλη βάση με τα κατάλοιπα της καταλυτικής τριάδας [Πρόγραμμα PyMOL και χρήση του προσθέτου ProMOL 3.2].

Με βάση τα δεδομένα αυτά, μελέτες μοριακής μοντελοποίησης δείχνουν ότι ο περισσότερο εννοούμενος προσανατολισμός των φαινολικών γλυκοσιδίων προς το ενεργό κέντρο της λιπάσης, τοποθετεί το μη γλυκοσιδικό τμήμα του υποστρώματος προς την υδρόφοβη είσοδο της θέσης πρόσδεσης και την ομάδα του σακχάρου προς την υδρόφιλη βάση, με τέτοιο τρόπο ώστε η πρωτοταγής υδροξυλική ομάδα του σακχάρου να κατευθύνεται προς το ενεργό κέντρο [Otto *et al.*, 2000].

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός, πως επιπλέον του κύριου προϊόντος, σε όλες τις περιπτώσεις η χρωματογραφική ανάλυση κατέδειξε και ένα δεύτερο προϊόν με μεγαλύτερο χρόνο έκλουσης, από 13.8 έως 14.7 min. Στην περίπτωση δε της σαλικίνης ανιχνεύεται και τρίτο προϊόν με χρόνο έκλουσης 16.5 min (Παράρτημα Β). Όσον αφορά αυτά τα προϊόντα με μεγαλύτερο χρόνο έκλουσης, η πρώτη ένδειξη για τη φύση τους προέρχεται από την κινητική

μελέτη των αντιδράσεων ακυλίωσης των φαινολικών γλυκοσιδίων, η οποία απεικονίζεται στο **Σχήμα 7.1**.



Σχήμα 7.1 Κινητικές των αντιδράσεων ακυλίωσης της σαλικίνης, της ελικίνης και της εσκούλίνης (30 mM) από τον βουτυρικό βινυλ-εστέρα (300 mM) στα ιοντικά υγρά α., γ., ε. [bmim]BF₄ και β., δ., στ. [bmim]PF₆ στους 60°C.

Σύμφωνα με τα διαγράμματα του **Σχήματος 7.1**, με εξαίρεση τη σαλικίνη, κατά τις πρώτες ώρες της αντίδρασης παρατηρείται η σύνθεση σχεδόν αποκλειστικά του μονοεστέρα και στη συνέχεια η αύξηση της συγκέντρωσης του δεύτερου προϊόντος. Κατά περιπτώσεις η

αύξηση της συγκέντρωσης του δεύτερου προϊόντος, μετά τις 72 h αντίδρασης σχετίζεται με τη μείωση της συγκέντρωσης του μονοεστέρα, γεγονός το οποίο αποτελεί ένδειξη πιθανά της περαιτέρω ακυλίωσης των μονοακυλιωμένων παραγώγων των φαινολικών γλυκοσιδίων προς παραγωγή διακυλιωμένων παραγώγων.

Η υπόθεση αυτή αποδεικνύεται από τα αποτελέσματα της φασματομετρίας μάζας (**Πίνακας 7.2**), σύμφωνα με τα οποία η διαφορά μάζας μεταξύ των ιόντων $[M+Na]^+$ του δεύτερου προϊόντος και των υποστρωμάτων ισούται με 140 μονάδες μάζας. Παρόμοια, στην περίπτωση της σαλικίνης το ιόν $[M+Na]^+$ του τρίτου προϊόντος διαφέρει κατά 210 μονάδες μάζας από τον υποστρώμα υποδεικνύοντας ότι πρόκειται για ένα τριακυλιωμένο παράγωγο. Η σύνθεση αυτού του παραγώγου θα μπορούσε να δικαιολογηθεί με βάση τη δομή της σαλικίνης (**Εικόνα 7.1**), ενός φαινολικού γλυκοσιδίου με δύο πρωτοταγείς υδροξυλικές ομάδες στο μόριό του.

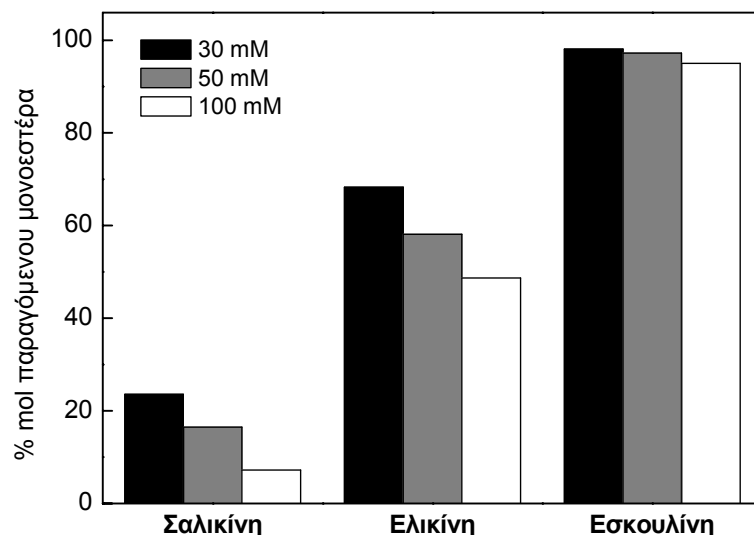
Η δυνατότητα περαιτέρω εστεροποίησης των μονοακυλιωμένων παραγώγων προς παραγωγή διεστέρων ή και τριεστέρων έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά για τη λιπάση B από *Candida antarctica* [Danielli *et al.*, 1997, Chebil *et al.*, 2007b] και οφείλεται στην ικανότητα της συγκεκριμένης λιπάσης να καταλύει την ακυλίωση και δευτεροταγών υδροξυλικών ομάδων [Kontogianni *et al.*, 2003, Ardhaoui *et al.*, 2004a,b, Passicos *et al.*, 2004].

Μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση με βάση τις τιμές του **Πίνακα 7.1**, σχετίζεται με το γεγονός ότι ενώ σε όλες τις περιπτώσεις συντίθενται περισσότερα του ενός ακυλιωμένα παράγωγα, η εκλεκτικότητα των αντιδράσεων ακυλίωσης διαφοροποιείται ανάλογα με τη φύση του υποστρώματος αλλά και με τη φύση του μέσου.

Ανάλογα με τη φύση του υποστρώματος, η εκλεκτικότητα, ανεξάρτητα του χρησιμοποιούμενου μέσου, μειώνεται κατά τη σειρά εσκουλίνη > ελικίνη > σαλικίνη. Οι παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις, δεδομένου πως το γλυκοσιδικό τμήμα είναι το ίδιο για όλα τα υποστρώματα, είναι πιθανό να συνδέονται με τη φύση του μη γλυκοσιδικού τμήματος κάθε υποστρώματος. Βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί, πως η ύπαρξη περισσότερο πολύπλοκων υποκαταστατών σε σάκχαρα αυξάνει την εκλεκτικότητα της λιπάσης προς τις πρωτοταγείς υδροξυλικές ομάδες του υποστρώματος [MacManus & Vulfson, 1995, Danielli *et al.*, 1997]. Το γεγονός αυτό μπορεί να δικαιολογήσει την αυξημένη εκλεκτικότητα της λιπάσης στην περίπτωση της ακυλίωσης της εσκουλίνης.

Ωστόσο, η δυνατότητα σύνθεσης διακυλιωμένων παραγώγων της εσκουλίνης και της σαλικίνης στα υπό μελέτη μέσα έρχεται σε αντίθεση με άλλες βιβλιογραφικές αναφορές [Otto *et al.*, 1998, 2000, Ardhaoui *et al.*, 2004a,b]. Η ασυμφωνία αυτή μπορεί να οφείλεται στη

χρήση διαφορετικών ακυλο-δοτών, καθώς στις μελέτες αυτές χρησιμοποιήθηκαν οξέα μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας (οκτανοϊκό, παλμιτικό οξύ). Μία άλλη πιθανή αιτία αποτελεί πιθανά η χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων των υποστρωμάτων [Chebil *et al.*, 2007b]. Πράγματι, η μεταβολή της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού οδήγησε και σε αλλαγή της εκλεκτικότητας ως προς τον μονοεστέρα (**Σχήμα 7.2**).



Σχήμα 7.2 Επίδραση της συγκέντρωσης του υποστρώματος στην τόπο-εκλεκτικότητα της αντίδρασης ακυλίωσης διαφόρων φαινολικών γλυκοσιδίων από τον βουτυρικό βινυλ-εστέρα, η οποία καταλύεται από την Novozym 435 στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ στους 60°C μετά από 72 h αντίδρασης. Ο μοριακός λόγος του ακυλο-δότη προς το αντιοξειδωτικό ισούται με 10.

Επιπλέον της επίδρασης της φύσης του αντιοξειδωτικού, σημαντική είναι και η διαφοροποίηση της τόπο-εκλεκτικότητας ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο μέσο. Με εξαίρεση την περίπτωση της ακυλίωσης της σαλικίνης στο [bmim]BF₄, σε όλες τις περιπτώσεις το ποσοστό του παραγόμενου μονοεστέρα είναι σημαντικά μεγαλύτερο στα ιοντικά υγρά συγκριτικά με την ακετόνη. Παρά λοιπόν τις υψηλές αποδόσεις των αντιδράσεων ακυλίωσης σε όλα τα υπό μελέτη μέσα, στα ιοντικά υγρά η λιπάση επιδεικνύει υψηλότερη τόπο-εκλεκτικότητα σε σχέση με τον οργανικό διαλύτη.

Μεταξύ δε των δύο ιοντικών υγρών η τοπο-εκλεκτικότητα του ενζύμου είναι μεγαλύτερη στο [bmim]BF₄, γεγονός το οποίο έχει αναφερθεί και στην περίπτωση της ακυλίωσης μονοσακχαριδίων [Kim *et al.*, 2003, Chebil *et al.*, 2007b]. Η αυξημένη εκλεκτικότητα στο [bmim]BF₄ μπορεί να αποδοθεί είτε στην αλληλεπίδραση μεταξύ του ιοντικού υγρού και της λιπάσης [Kim *et al.*, 2003, de Diego *et al.*, 2005], είτε στην αλληλεπίδραση μεταξύ του ιοντικού υγρού και των αντιδρώντων/προϊόντων [Park &

Kazlauskas, 2001]. Όσον αφορά στο πρώτο, τα αποτελέσματα της παραγράφου 6.4 καταδεικνύουν την υιοθέτηση διαφορετικών ενζυμικών δομών στα δύο ιοντικά υγρά η οποία μπορεί να αντικατοπτρίζει τη διαφορετική εκλεκτικότητά τους. Όσον αφορά στο δεύτερο, στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄, όπου παρατηρείται και η υψηλότερη εκλεκτικότητα, η διαλυτότητα των φαινολικών γλυκοσιδίων είναι από 2 έως 11 φορές μεγαλύτερη σε σχέση με το [bmim]PF₆ και την ακετόνη (Πίνακας 7.3).

Πίνακας 7.3 Επίδραση του μέσου στη διαλυτότητα διαφόρων φυσικών αντιοξειδωτικών. Η μέτρηση της διαλυτότητας πραγματοποιήθηκε στους 60°C στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆, και στους 50 °C στην περίπτωση της ακετόνης.

Φυσικά αντιοξειδωτικά	Διαλυτότητα (mM)		
	[bmim]BF ₄	[bmim]PF ₆	Ακετόνη
Εσκουλίνη	68.0	20.0	6.5
Ελικίνη	40.0	19.5	19.5
Σαλικίνη	23.0	5.5	2.0

Η αυξημένη διαλυτότητα των φαινολικών γλυκοσιδίων στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ συγκριτικά με το [bmim]PF₆ υποδεικνύει πως η φύση του ανιόντος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο. Δεδομένης της δομής των αντιοξειδωτικών, τα υποστρώματα αυτά μπορούν να δρουν ως δότες Η και να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με το ιοντικό υγρό [Guo *et al.*, 2007]. Η δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου επιδρά σημαντικά στην διαλυτότητα των πολυφαινολικών ενώσεων σε ιοντικά υγρά [Guo *et al.*, 2007]. Ωστόσο, το ανιόν PF₆⁻ εμφανίζει μικρότερη τάση να συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου συγκριτικά με το BF₄⁻ (οι τιμές οξύτητας δεσμών υδρογόνου (HBA, Hydrogen Bond Acidity), ισούνται με 0.50 και 0.61 αντίστοιχα) [Oehlke *et al.*, 2006], γεγονός το οποίο μπορεί να δικαιολογήσει τη μικρότερη διαλυτότητα των φαινολικών γλυκοσιδίων στο [bmim]PF₆.

Τη συσχέτιση μεταξύ της διαλυτότητας των αντιδρώντων και της εκλεκτικότητας επιχείρησαν να εξηγήσουν οι Park & Kazlauskas [2001]. Η αυξημένη διαλυτότητα του μονοακυλιωμένου παραγώγου σε σχέση με τη διαλυτότητα του μη τροποποιημένου υποστρώματος, μπορεί να οδηγήσει στην περαιτέρω ακυλίωση του προς τη σύνθεση διακυλιωμένων παραγώγων [Park & Kazlauskas, 2001]. Στο περισσότερο υδρόφοβο [bmim]PF₆, το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, η διαλυτότητα των υδρόφοβων συντιθέμενων εστέρων των φαινολικών γλυκοσιδίων αναμένεται να είναι μεγαλύτερη

συγκριτικά με εκείνη των υδρόφιλων υποστρωμάτων, δικαιολογώντας έτσι τη μειωμένη εκλεκτικότητα στο μέσο αυτό. Η αντίθετη τάση, δηλαδή αυξημένη διαλυτότητα των φαινολικών γλυκοσιδίων συγκριτικά με τους υδρόφοβους εστέρες, αναμένεται να ισχύει στο υδρόφιλο [bmim]BF₄.

Ανάλογα με τη φύση του μέσου διαφοροποιείται σημαντικά όχι μόνο η εκλεκτικότητα αλλά και η δραστηριότητα της λιπάσης Novozym 435. Στην περίπτωση του [bmim]BF₄, όπου παρατηρείται η μεγαλύτερη διαλυτότητα των φαινολικών γλυκοσιδίων, οι αρχικές ταχύτητες ακυλίωσης της εσκουλίνης, της σαλικίνης και της ελκίνης είναι 0.42, 0.80 και 1.53 mmol h⁻¹ g⁻¹ βιοκαταλύτη αντίστοιχα, ενώ στο [bmim]PF₆ οι αρχικές ταχύτητες είναι γενικά μικρότερες 0.25, 0.48 και 1.0 mmol h⁻¹ g⁻¹ βιοκαταλύτη, αντίστοιχα.

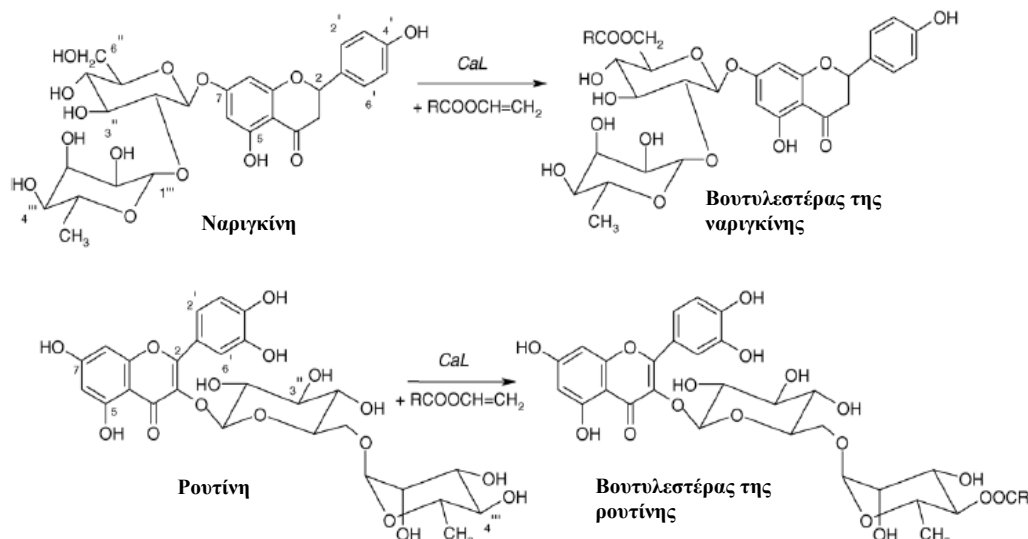
Συγκριτικά με τον οργανικό διαλύτη, η αυξημένη διαλυτότητα των φαινολικών γλυκοσιδίων στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ παρουσιάζει επίσης το πλεονέκτημα της δυνατότητας σύνθεσης μεγάλων ποσοτήτων των ακυλιωμένων παραγώγων σε μία βιοκαταλυτική διεργασία ενός σταδίου. Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός πως με τη χρήση συγκεντρώσεων των φαινολικών γλυκοσιδίων κοντά στο όριο διαλυτότητάς τους, η παραγόμενη ποσότητα μονοακυλιωμένων λιπόφιλων παραγώγων στο [bmim]BF₄ ήταν 15.5 g/L (στην περίπτωση της εσκουλίνης), η οποία είναι σημαντικά υψηλότερη από εκείνες που έχουν αναφερθεί στην περίπτωση των οργανικών διαλυτών [Otto *et al.*, 2000, Ardhaoui *et al.*, 2004b].

7.2 Μελέτη ενζυμικής ακυλίωσης γλυκοσιλιωμένων φλαβονοειδών

Επιπλέον των φαινολικών γλυκοσιδίων, φυσικά αντιοξειδωτικά με ενδιαφέρουσες βιολογικές δράσεις αποτελούν τα φλαβονοειδή. Τα φλαβονοειδή αποτελούνται από μία χαρακτηριστική δομή, τον λεγόμενο φλαβονοειδικό πυρήνα, απαντώνται συνήθως σε γλυκοσιλιωμένη μορφή και είναι δομικά πολύπλοκα μόρια, τα οποία αποτελούν ενδιαφέροντα υποστρώματα για τη μελέτη της δυνατότητας ακυλίωσής τους σε ιοντικά υγρά.

Μεταξύ των φλαβονοειδών, επιλέχθηκαν ενώσεις όπως η ρουτίνη ένα δισακχαριωμένο φλαβονοειδες, αποτελούμενο αποκλειστικά από δευτεροταγή υδροξύλια, η ναριγκίνη ένα επίσης δισακχαριωμένο φλαβονοειδές με ένα πρωτοταγές υδροξύλιο και η ναριγκενίνη ένα άγλυκο φλαβονοειδές. Οι ενώσεις αυτές επιλέχθηκαν με βάση τόσο τις δομικές διαφορές τους, όσο και βάσει των βιολογικών τους ιδιοτήτων οι οποίες περιλαμβάνουν αντιοξειδωτική, αντιμικροβιακή, αντιφλεγμονώδη, αντικαρκινική, αντιμεταλλαξιγόνο, αντιαθηρωματική κ.α. δράσεις (Πίνακας 3.3).

Η δυνατότητα αύξησης του λιπόφιλου χαρακτήρα των ενώσεων αυτών μελετήθηκε αρχικά σε δύο ιοντικά υγρά, τα οποία διαφέρουν ως προς την υδροφοβικότητά τους, το αναμίξιμο με το νερό [bmim]BF₄ και το μη αναμίξιμο με το νερό [bmim]PF₆ καθώς και σε έναν ευρέως χρησιμοποιούμενο οργανικό διαλύτη, την ακετόνη. Η τροποποίηση πραγματοποιείται μέσω αντιδράσεων μετεστεροποίησης (**Εικόνα 7.3**).



Εικόνα 7.3 Ενζυμική αντίδραση ακυλίωσης της ναριγκίνης και της ρουτίνης, η οποία καταλύεται από την ακινητοποιημένη λιπάση B από *Candida antarctica* (Novozym 435) σε ιοντικά υγρά.

Η απόδοση των ενζυμικών αντιδράσεων μετεστεροποίησης, με τη χρήση του βουτυρικού βινυλεστέρα ως ακυλο-δότη, οι οποίες καταλύονται από την ακινητοποιημένη λιπάση B από *Candida antarctica* (Novozym 435) αποδίδεται στον **Πίνακα 7.4**.

Πίνακας 7.4 Απόδοση (%) της αντίδρασης ακυλίωσης διαφόρων φυσικών αντιοξειδωτικών (50 mM) από τον βουτυρικό βινυλ-εστέρα (500 mM), η οποία καταλύεται από την Novozym 435 στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ στους 60°C, και στην ακετόνη στους 50°C, μετά από 96 h αντίδρασης.

Φυσικά αντιοξειδωτικά	Απόδοση (%)		
	[bmim]BF ₄	[bmim]PF ₆	Ακετόνη
Ναριγκίνη	61.6	63.0	91.0
Ρουτίνη	63.8	0.0	69.0
Ναριγκενίνη	0.0	0.0	0.0

Σύμφωνα με τις τιμές του **Πίνακα 7.4** η ακυλίωση των υπό μελέτη φυσικών αντιοξειδωτικών είναι δυνατή τόσο στα ιοντικά υγρά όσο και στον οργανικό διαλύτη. Η απόδοση των αντιδράσεων τροποποίησης των φλαβονοειδών οδηγεί σε όλα τα μέσα σε σχετικά χαμηλότερες αποδόσεις συγκριτικά με τις αντιδράσεις ακυλίωσης των λιγότερο πολύπλοκων φαινολικών γλυκοσιδίων.

Η αδυναμία εστεροποίησης της ναριγκενίνης, ενός φλαβονοειδούς που στερείται σακχάρου, υποδεικνύει πως η λιπάση Novozym 435 δεν έχει την δυνατότητα εστεροποίησης αρωματικών υδροξυλομάδων, γεγονός το οποίο έχει αναφερθεί και στην περίπτωση της κερκετίνης ενός επίσης άγλυκου φλαβονοειδούς [Chebil *et al.*, 2007b]. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και με βάση την ανάλυση της δομής του συντιθέμενου εστέρα της ναριγκίνης (Παράρτημα Γ). Με σύγκριση των ^{13}C φασμάτων NMR της ναριγκίνης, του βουτυρικού βινυλ-εστέρα και του προϊόντος προέκυψε πως δεν παρατηρείται ακυλίωση των υδροξυλικών ομάδων των φαινολικών δακτυλίων του φλαβονοειδούς.

Πιο συγκεκριμένα, το σήμα στα 63.6 ppm ανατέθηκε στον C_6'' της ομάδας του σακχάρου του βουτυρικού εστέρα της ναριγκίνης. Η ανάλυση δείχνει μία μετατόπιση αυτού του σήματος κατά 2.8 ppm συγκριτικά με την ναριγκίνη (60.9 ppm). Επιπρόσθετα το σήμα στα 72.4 ppm (το οποίο αντιστοιχεί στον C_5'' της ομάδας του σακχάρου εμφανίζεται μετατοπισμένο κατά 2.5 ppm, σε σχέση με τη ναριγκίνη (75.9 ppm). Με βάση τις παρατηρήσεις αυτές προκύπτει πως η ακυλίωση της ναριγκίνης πραγματοποιήθηκε στην 6'' υδροξυλική ομάδα της γλυκόζης (**Εικόνα 7.3**). Το αποτέλεσμα αυτό είναι σε συμφωνία και με άλλες μελέτες, οι οποίες αφορούν στην ακυλίωση της ναριγκίνης με διάφορα λιπαρά οξέα σε οργανικούς διαλύτες [Danieli *et al.*, 1990, Gao *et al.*, 2001, Gayot *et al.*, 2003, Kontogianni *et al.*, 2001, Mellou *et al.*, 2005].

Επιπλέον της ακινητοποιημένης λιπάσης B από *Candida antarctica*, η δυνατότητα ακυλίωσης της ναριγκίνης και της ρουτίνης στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ διερευνήθηκε με τη χρήση τριών ακόμα λιπασών, διαφορετικής μικροβιακής προέλευσης (**Πίνακας 7.5**).

Πίνακας 7.5 Επίδραση της προέλευσης του ενζύμου στην αρχική ταχύτητα της αντίδρασης και την % απόδοση, για την ακυλίωση της ναριγκίνης (50 mM) από τον βουτυρικό βινυλ-εστέρα (500 mM) σε ιοντικά υγρά μετά από 96 h επώασης σε θερμοκρασία 60°C.

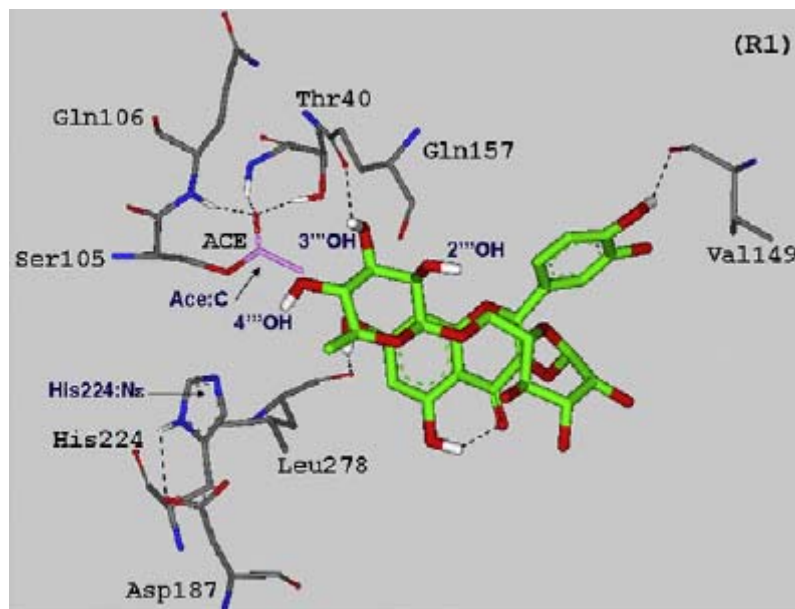
Λιπάση	Αρχική ταχύτητα αντίδρασης (mmol h ⁻¹ g ⁻¹ βιοκαταλύτη)		Απόδοση (%)	
	[bmim]BF ₄	[bmim]PF ₆	[bmim]BF ₄	[bmim]PF ₆
Novozyme 435®	0.28	0.30	61.6	63.0
Lipozyme RMIM	0.49	0.20	49.5	50.0
Lipozyme TLIM	0.44	0.19	88.2	37.5
<i>Candida rugosa</i>	δ.π.*	δ.π.*	Ίχνη	<5

* Δεν προσδιορίστηκε.

Σύμφωνα με τις τιμές του **Πίνακα 7.5**, η ενζυμική ακυλίωση της ναριγκίνης είναι δυνατή και μάλιστα με ικανοποιητικές αποδόσεις με τη χρήση των ακινητοποιημένων λιπάσων από *Rhizomucor miehei* (Lipozyme RMIM) και από *Thermomyces lanuginosa* (Lipozyme TLIM), με μόνη εξαίρεση τη λιπάση από *Candida rugosa*. Στην περίπτωση της ρουτίνης, η χρήση των Lipozyme RMIM και Lipozyme TLIM οδήγησε σε αποδόσεις 4.5% και 16.0% αντίστοιχα στο [bmim]BF₄, δηλαδή σημαντικά χαμηλότερες συγκρινόμενες τόσο με εκείνη στην περίπτωση της Novozym 435, όσο και με τις αντίστοιχες τιμές απόδοσης στην περίπτωση της ναριγκίνης (σημειώνεται πως οι προαναφερόμενες τιμές αποδόσεις, όπως και αυτές του **Πίνακα 7.5**, δεν προσδιορίστηκαν κατά την ισορροπία, αλλά μετά από 96 h αντίδρασης).

Η διαφοροποίηση αυτή καθιστά σαφή την δυνατότητα ή μη της κάθε λιπάσης, ανάλογα με την προέλευσή της να καταλύει την εστεροποίηση δευτεροταγών υδροξυλικών ομάδων. Στην περίπτωση της ρουτίνης, μίας ένωσης η οποία περιέχει αποκλειστικά δευτεροταγή υδροξύλια, τη δυνατότητα αυτή φαίνεται να διαθέτει η λιπάση B από *Candida antarctica*, σε συμφωνία και με άλλες βιβλιογραφικές αναφορές χρήσης του ενζύμου αυτού σε οργανικούς διαλύτες [Kontogianni *et al.*, 2003, Ardhaoui *et al.*, 2004a,b, Passicos *et al.*, 2004, Mellou *et al.*, 2006]. Η δυνατότητα αυτή επιβεβαιώνεται από μελέτες μοριακής μοντελοποίησης [De Oliveira *et al.*, 2009]. Η ανάλυση πρόσδεσης (docking analysis) αποκαλύπτει πως ο φλαβονοειδικός πυρήνας της ρουτίνης σταθεροποιείται στην είσοδο της θέσης πρόσδεσης της λιπάσης μέσω δεσμών υδρογόνου (4'-OH. . Val149:O και 7-OH. . Leu278:O) και μέσω μη-πολικών αλληλεπιδράσεων των αρωματικών του δακτυλίων με τις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων Leu144, Val149, Val154, Ala281, Ala282, Ile285 και

Val286. Η ομάδα του σακχάρου (ραμνόζη) της ρουτίνης φέρει τρεις υδροξυλικές ομάδες (2'''-OH, 3'''-OH και 4'''-OH) και τοποθετείται στην υδρόφιλη βάση της θέσης πρόσδεσης κοντά στα κατάλοιπα της καταλυτικής τριάδας (**Εικόνα 7.4**). Μεταξύ των τριών υδροξυλομάδων, η 4'''-OH βρέθηκε να ικανοποιεί τα κριτήρια απόστασης από τα καταλυτικά αμινοξέα και τα αμινοξέα της οξυανιονικής οπής ώστε να μπορεί να θεωρηθεί δραστική.

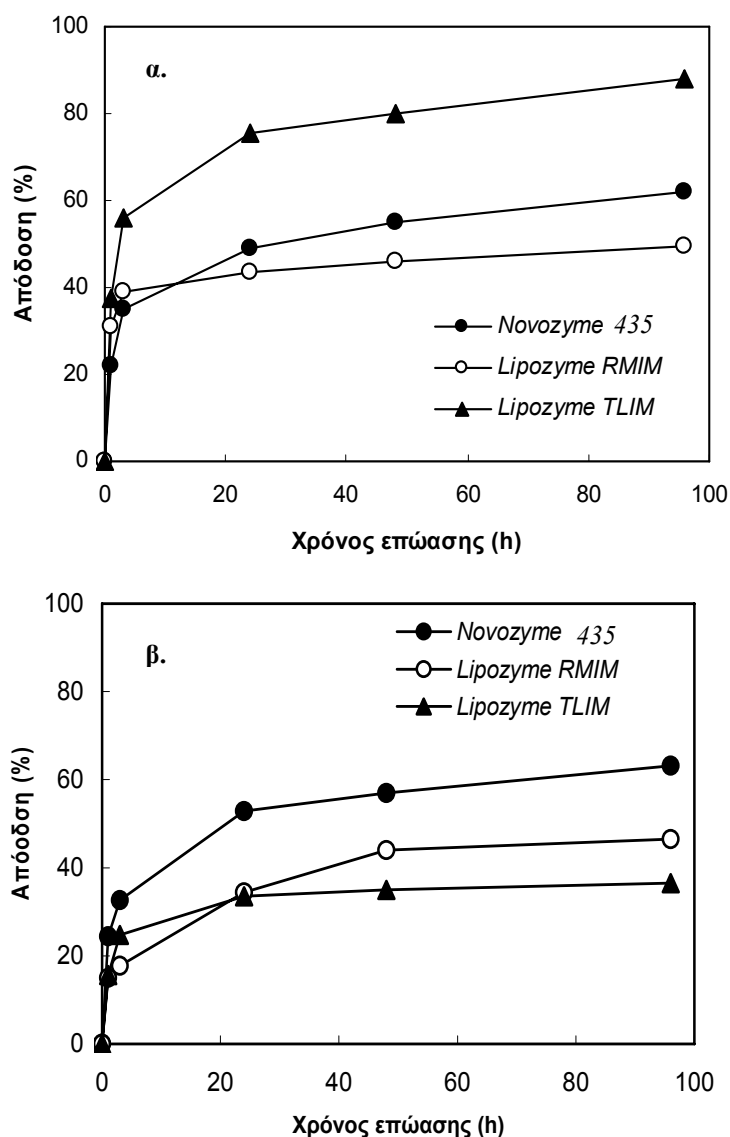


Εικόνα 7.4 Προσανατολισμός και αλληλεπιδράσεις της ρουτίνης, μέσω δεσμών υδρογόνου, (διακεκομμένες γραμμές) με τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου και της οξυανιονικής οπής της λιπάσης B από *Candida antarctica* [De Oliveira *et al.*, 2009].

Σύμφωνα με τις τιμές του **Πίνακα 7.5** και την κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων (**Σχήμα 7.3**) οι αρχικές ταχύτητες της ακυλίωσης της ναριγκίνης διαφοροποιούνται ανάλογα με τη προέλευση της λιπάσης και τη φύση του ιοντικού υγρού.

Οι ακινητοποιημένες λιπάσες από *T. lanuginosa* και *R. miehei* καταλύουν την ακυλίωση της ναριγκίνης στο [bmim]BF₄ επιδεικνύοντας αρχικές ταχύτητες αυξημένες κατά 60% συγκριτικά με τις αντίστοιχες στο [bmim]PF₆. Τα δύο αυτά ιοντικά υγρά διαφέρουν σημαντικά ως προς το ιξώδες τους, το οποίο ισούται με 245.9 MPas και 60.3 MPas (στους 60°C) για το ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ και [bmim]BF₄, αντίστοιχα [Jacquemin *et al.*, 2006]. Το γεγονός αυτό θα μπορούσε να δικαιολογήσει τις παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις στην αρχική ταχύτητα λόγω της μείωσης των περιορισμών διάχυσης των υποστρωμάτων στο [bmim]BF₄. Ωστόσο, στην περίπτωση της ακινητοποιημένης λιπάσης B από *C. antarctica*, οι παρατηρούμενες αρχικές ταχύτητες είναι παρόμοιες στα δύο υπό μελέτη ιοντικά υγρά,

επισημαίνοντας πως και η προέλευση της λιπάσης επιδρά σημαντικά στην δραστικότητα του ενζύμου.



Σχήμα 7.3 Κινητική της αντίδρασης ακυλίωσης της ναριγκίνης (50 mM) από τον βουτυρικό βινυλ-εστέρα (500 mM), η οποία καταλύεται από διάφορες ακινητοποιημένες λιπάσες στα ιοντικά υγρά **α.** [bmim]BF₄ και **β.** [bmim]PF₆ σε θερμοκρασία 60°C.

Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός πως η Novozym 435 καταλύει την ακυλίωση της ναριγκίνης και της ρουτίνης στα ιοντικά υγρά επιδεικνύοντας αρχικές ταχύτητες αυξημένες κατά 2 έως 4 φορές συγκριτικά με εκείνες που έχουν αναφερθεί σε συμβατικούς οργανικούς διαλύτες, όπως η τριτοταγής-βουτανόλη, η ακετόνη και η 2-μεθυλ-2-βουτανόλη [Kontogianni *et al.*, 2003, Passicos *et al.*, 2004, Mellou *et al.*, 2005]. Παρόμοια υψηλή δραστικότητα λιπασών σε ιοντικά υγρά σε σχέση με οργανικούς διαλύτες έχει παρατηρηθεί και στην

περίπτωση ακυλίωσης σακχάρων [Park & Kazlauskas, 2001, Kim *et al.*, 2003], καθώς και σε αντιδράσεις εστεροποίησης ή μετεστεροποίησης διαφόρων υποστρωμάτων [Schöfer *et al.*, 2001, Kaag *et al.*, 2003, Lau *et al.*, 2004, Cantone *et al.*, 2007].

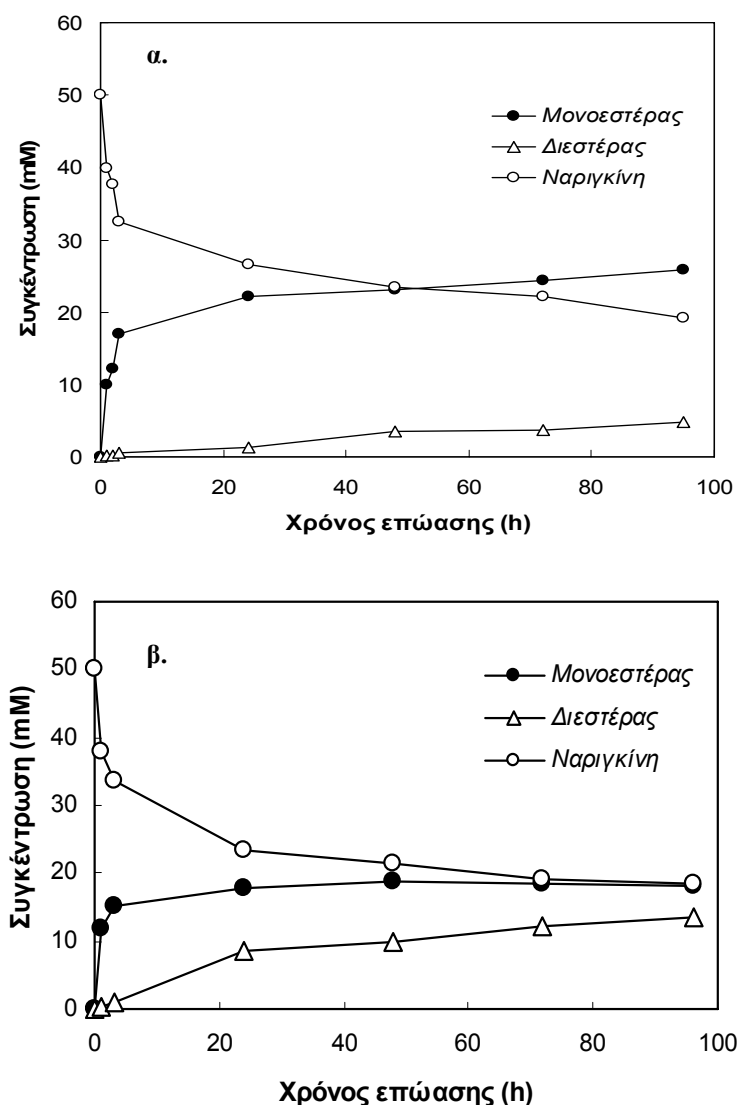
Στην περίπτωση των οργανικών διαλυτών, η μείωση της πολικότητας του διαλύτη μπορούσε να συσχετιστεί ικανοποιητικά με την αύξηση της δραστηριότητας των ενζύμων. Τα ιοντικά υγρά, ωστόσο, αποτελούν μέσα υψηλής πολικότητας, γεγονός το οποίο αποδεικνύεται και από την τιμή του $\log P$ των ιοντικών υγρών [bmim]PF₆ και [bmim]BF₄, που ισούται με -2.38 ± 0.25 και -2.44 ± 0.23 , αντίστοιχα [Ulbert *et al.*, 2004]. Στα μέσα αυτά η αύξηση της δραστηριότητας των λιπασών μπορεί πιθανά να εξηγηθεί με βάση την αλληλεπίδραση του ιοντικού υγρού με την πρωτεϊνική δομή ή το ενεργό κέντρο του ενζύμου [Sheldon *et al.*, 2002, Lau *et al.*, 2004, Yang & Pan, 2005]. Πρακτικά, η πολύπλοκη φύση των ιοντικών υγρών μπορεί να οδηγήσει στην εμφάνιση ποικίλων αλληλεπιδράσεων, όπως οι δεσμοί υδρογόνου, οι δυνάμεις van der Waals, ιοντικές αλληλεπιδράσεις κ.α. Μεταξύ αυτών των αλληλεπιδράσεων, η δυνατότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου επιδρά σημαντικά και στην διαλυτότητα των φλαβονοειδών σε ιοντικά υγρά [Guo *et al.*, 2007]. Ιδανικό ιοντικό υγρό θεωρείται εκείνο το οποίο εξασφαλίζει την υψηλή διαλυτότητα του υποστρώματος και ταυτόχρονα εμφανίζει την μικρότερη δυνατή αρνητική επίδραση στη δραστηριότητα του ενζύμου.

Στο υδρόφιλο [bmim]BF₄ η διαλυτότητα της ναριγκίνης και της ρουτίνης βρέθηκε ίση με 100 mM και 25 mM, αντίστοιχα στους 60°C. Οι τιμές αυτές είναι κατά 2 έως 4 φορές υψηλότερες από εκείνες σε οργανικούς διαλύτες, όπως η ακετόνη και η τριτοταγής βουτανόλη, οι οποίοι έχουν χρησιμοποιηθεί για την ενζυμική τροποποίηση φλαβονοειδών [Kontogianni *et al.*, 2001, Mellou *et al.*, 2005]. Η αυξημένη δραστηριότητα των λιπασών στο μέσο αυτό θα μπορούσε λοιπόν να εξηγηθεί με βάση την αυξημένη διαλυτότητα των φλαβονοειδών, η οποία μπορεί να επηρεάσει τη διαθεσιμότητα του υποστρώματος προς το ένζυμο.

Επιπλέον της θετικής επίδρασης στην ενζυμική δραστηριότητα, η αυξημένη διαλυτότητα των φλαβονοειδών στα ιοντικά υγρά συμβάλλει και στην σύνθεση αυξημένων ποσοτήτων των λιπόφιλων παραγώγων των φλαβονοειδών σε μία διαδικασία ενός και μόνο βήματος. Πράγματι, όταν η χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση ναριγκίνης και ρουτίνης κυμαινόταν στο όριο διαλυτότητάς τους, η παραγόμενη ποσότητα του μονοακυλιωμένου λιπόφιλου παραγώγου στο [bmim]BF₄ μετά από 96 h επώασης στους 60°C έφτανε τα 30 g/L στην περίπτωση της ναριγκίνης και 5.5 g/L στην περίπτωση της ρουτίνης, ήταν δηλαδή

αυξημένη από 2 έως και 8 φορές σε σχέση με εκείνες που έχουν αναφερθεί σε οργανικούς διαλύτες [Kontogianni *et al.*, 2001, 2003, Gayot *et al.*, 2003].

Επιπλέον της δραστηριότητας των λιπασών, μέσω των αντιδράσεων τροποποίησης των φλαβονοειδών, μελετήθηκε επίσης και η τόπο-εκλεκτικότητά τους. Όπως και στην περίπτωση των φαινολικών γλυκοσιδίων έτσι και στην περίπτωση της ναριγκίνης, μέσω της χρωματογραφικής ανάλυσης του μίγματος της αντίδρασης ακυλίωσης, επιπλέον του προαναφερόμενου κύριου προϊόντος (βουτυρικός εστέρας της ναριγκίνης) με χρόνο έκλουσης 12.4 min ανιχνεύεται και ένα δεύτερο προϊόν με μεγαλύτερο χρόνο έκλουσης (14.2 min) (Παράρτημα Β). Η σύνθεση των δύο προϊόντων συναρτήσει του χρόνου της αντίδρασης απεικονίζεται στο **Σχήμα 7.4**.



Σχήμα 7.4 Κινητική της αντίδρασης ακυλίωσης της ναριγκίνης (50 mM) από τον βουτυρικό βινυλεστέρα (500 mM), η οποία καταλύεται από τη λιπάση Novozym 435 στα ιοντικά υγρά **α.** [bmim]BF₄ και **β.** [bmim]PF₆ σε θερμοκρασία 60°C.

Καθώς η δυνατότητα ακετυλίωσης φυτικών γλυκοσιδίων (τα οποία περιέχουν το ίδιο γλυκοσιδικό τμήμα με τη ναριγκίνη) στις θέσεις 6''-OH και 4'''-OH της ραμνογλυκόζης από τη λιπάση B από *Candida antarctica*, έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά [Teng *et al.*, 2005], κατά αντίστοιχο τρόπο το δεύτερο προϊόν θα μπορούσε να είναι ένα διακυλιωμένο παράγωγο της ναριγκίνης στις θέσεις 6''-OH και 4'''-OH της ραμνογλυκόζης. Η ικανότητα της συγκεκριμένης λιπάσης να καταλύει την εστεροποίηση και δευτεροταγών υδροξυλικών ομάδων, καταδεικνύεται επίσης από την δυνατότητα ακυλίωσης της ρουτίνης ενός φλαβονοειδούς αποτελούμενο αποκλειστικά από δευτεροταγείς υδροξυλικές ομάδες (Πίνακας 7.4).

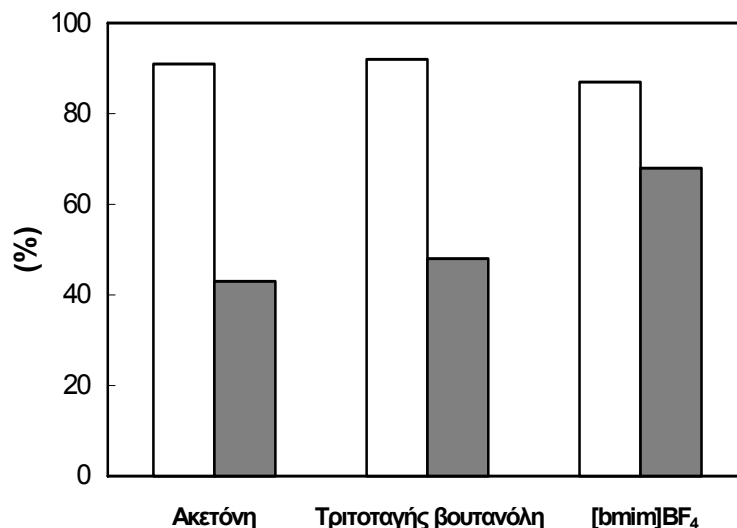
Η εκλεκτικότητα των αντιδράσεων ακυλίωσης της ρουτίνης και της ναριγκίνης ήταν μεγαλύτερη στην περίπτωση χρήσης των ακινητοποιημένων λιπάσεων Lipozyme TLIM και Lipozyme RMIM (Πίνακας 7.6) συγκριτικά με τη Novozym 435, ενισχύοντας τα προηγούμενα αποτελέσματα της μειωμένης δυνατότητας των δύο αυτών λιπάσεων να καταλύουν την εστεροποίηση δευτεροταγών υδροξυλικών ομάδων.

Πίνακας 7.6 Επίδραση της προέλευσης του ενζύμου στην τόπο-εκλεκτικότητα των αντιδράσεων ακυλίωσης της ναριγκίνης και της ρουτίνης (50 mM) από τον βουτυρικό βινυλ-εστέρα (500 mM) στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ μετά από επώαση για 96 h σε θερμοκρασία 60°C.

Λιπάση	mol% παραγόμενου μονοεστέρα	
	Ναριγκίνη	Ρουτίνη
Novozym 435 [®]	84.2	93.8
Lipozyme TLIM	90.7	100.0
Lipozyme RMIM	91.5	100.0

Από τα αποτελέσματα του **Σχήματος 7.4** παρατηρείται πως μεγαλύτερη ποσότητα διεστέρα της ναριγκίνης παρήχθη στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ συγκριτικά με το [bmim]BF₄, γεγονός το οποίο υποδεικνύει πως η φύση του ιοντικού υγρού επιδρά στην εκλεκτικότητα της βιοκαταλυτικής διεργασίας. Παρομοίως, μειωμένη τόπο-εκλεκτικότητα στο [bmim]PF₆ παρατηρήθηκε στην αντίδραση ακυλίωσης της β-D-γλυκόζης η οποία καταλύεται από την ακινητοποιημένη λιπάση B από *C. antarctica* [Park & Kazlauskas, 2001]. Το ποσοστό του παραγόμενου μονοεστέρα της ναριγκίνης στο μίγμα των προϊόντων της ήταν μεγαλύτερο στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ ακόμα και συγκριτικά με διάφορους οργανικούς διαλύτες (**Σχήμα 7.5**). Η αυξημένη τόπο-εκλεκτικότητα σε αυτό το ιοντικό υγρό παρατηρήθηκε και στην

περίπτωση των φαινολικών γλυκοσιδίων (§ 7.1) και έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά στην περίπτωση ακυλίωσης διαφόρων μονοσακχαριδίων [Park & Kazlauskas, 2001, Kim *et al.*, 2003, Nara *et al.*, 2004].



Σχήμα 7.5 Απόδοση (%) (λευκές μπάρες) και ποσοστό παραγόμενου μονοεστέρα (γκρι μπάρες) για την αντίδραση ακυλίωσης της ναριγκίνης (50 mM) από τον βουτυρικό βινυλ-εστέρα (500 mM), η οποία καταλύεται από τη λιπάση Novozym 435 σε οργανικούς διαλύτες και στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ μετά από 144 h επώσης σε θερμοκρασία 50°C και 60°C, αντίστοιχα.

Το φαινόμενο αυτό μπορεί να αποδοθεί στην ειδική αλληλεπίδραση μεταξύ του ιοντικού υγρού και του ενζύμου [de Diego *et al.*, 2005, Kim *et al.*, 2003] αλλά και στην αλληλεπίδραση μεταξύ ιοντικού υγρού και υποστρώματος. Στη πρώτη περίπτωση, οι δομικές αλλαγές των λιπασών οι οποίες παρατηρήθηκαν στα υπό μελέτη ιοντικά υγρά (§ 6.4) θα μπορούσαν να συμβάλλουν στη διαφορετική τόπο-εκλεκτικότητα τους. Στη δεύτερη περίπτωση, θεωρώντας ότι η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να εκφραστεί μέσω της διαλυτότητας του υποστρώματος, οι Park & Kazlauskas [2001] αναφέρουν ότι η αυξημένη εκλεκτικότητα στην αντίδραση ακυλίωσης της β-D-γλυκόζης σε ιοντικά υγρά, συγκριτικά με τους οργανικούς διαλύτες, μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη διαλυτότητα των μονοακυλιωμένων παραγώγων στους οργανικούς διαλύτες η οποία επιτρέπει την περαιτέρω ακυλίωσή τους προς παραγωγή διεστέρων. Αντίστοιχα θα μπορούσε να εξηγηθεί η αυξημένη τόπο-εκλεκτικότητα, στην περίπτωση ακυλίωσης της ναριγκίνης στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄. Τόσο στους οργανικούς διαλύτες όσο και στο [bmim]PF₆, η αυξημένη διαλυτότητα του περισσότερο λιπόφιλου μονοεστέρα της ναριγκίνης θα μπορούσε να αυξήσει

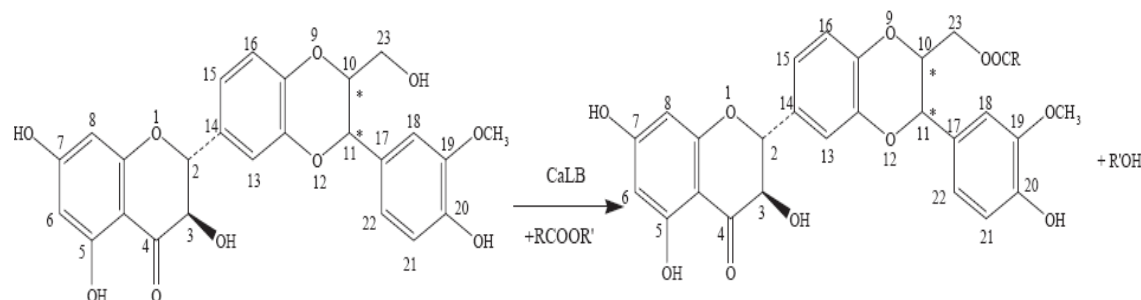
τη διαθεσιμότητα αυτού του παραγώγου στο μικροπεριβάλλον του ενζύμου επιτρέποντας έτσι την περαιτέρω ακυλίωσή του προς παραγωγή διεστέρα [Katsoura *et al.*, 2006, 2007].

Αξίζει στο σημείο αυτό να τονιστεί πως η παραγωγή διεστέρα σε αντιδράσεις ακυλίωσης της ναριγκίνης με ακυλο-δότες μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας, οι οποίες καταλύονται από τη Novozym 435, δεν έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά σε οργανικούς διαλύτες (όπως ακετόνη, τριτοταγή βουτανόλη και 2-μεθυλ-2-βουτανόλη) [Ardhaoui *et al.*, 2004a,b,c, Gayot *et al.*, 2003, Kontogianni *et al.*, 2001, Mellou *et al.*, 2005]. Συνεπώς, με βάση τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στην παράγραφο αυτή, η τόπο-εκλεκτικότητα της ενζυμικής αντίδρασης ακυλίωσης φλαβονοειδών εξαρτάται από διάφορες παραμέτρους, όπως τη φύση του μέσου, την προέλευση της λιπάσης αλλά και από τη φύση του αντιοξειδωτικού και του ακυλο-δότη.

7.3 Ενζυμική ακυλίωση της σιλιμπίνης σε ιοντικά υγρά

Η σιλιμπίνη αποτελεί το κύριο συστατικό της σιλιμαρίνης, ενός συμπλέγματος το οποίο απομονώνεται από το φυτό *Silybum marianum* (γνωστό και ως γαϊδουράγκαθο). Η φλαβονολιγνάνη αυτή αποτελεί μία ενδιαφέρουσα ένωση η οποία επιδεικνύει πληθώρα βιολογικών δράσεων όπως αντιοξειδωτική [Valenzuela *et al.*, 1987, Míguez *et al.*, 1994, Mira *et al.*, 1994, Wenzel *et al.*, 1996], αντιμικροβιακή [Lee *et al.*, 2003], αντικαρκινική, αντιαγγειογενετική [Bhatia *et al.*, 1999, Jiang *et al.*, 2000, Singh & Agarwal 2003, Yang *et al.*, 2003, 2005, Džubák & Hajdúch 2006, Singh *et al.*, 2006, Gažák *et al.*, 2007, Russo 2007], προστασία του ήπατος [Morazzoni & Bombardelli 1995, de Groot & Rauen 1998, Flora *et al.*, 1998], ενώ επιβεβαιωμένη είναι και η θεραπευτική της δράση απέναντι στην ηπατίτιδα, στην κύρωση του ήπατος και τον ίκτερο [Lieber 2000, Horváth *et al.*, 2001, Jacobs *et al.*, 2002, Kvasnicka *et al.*, 2003].

Ωστόσο, η σιλιμπίνη επιδεικνύει μειωμένη διαλυτότητα τόσο στο νερό όσο και σε λιπιδικά μέσα με αποτέλεσμα η βιοδιαθεσιμότητά της και η θεραπευτική της δράση να μειώνονται σημαντικά εξαιτίας της χαμηλής απορρόφησής της [Pepping 1999, Kosina *et al.*, 2002]. Όπως και στην περίπτωση των φαινολικών γλυκοσιδίων και των φλαβονοειδών, η σύνθεση εστέρων της σιλιμπίνης μπορεί να συμβάλλει στην άρση του προαναφερόμενου περιορισμού. Επιπρόσθετα, η μελέτη της δυνατότητας εστεροποίησης της σιλιμπίνης από λιπάσες σε ιοντικά υγρά παρουσιάζει ενδιαφέρον, εξαιτίας της δομικής πολυπλοκότητας του μορίου (Εικόνα 7.5).



Εικόνα 7.5 Σχηματική αναπαράσταση της αντίδρασης ακυλίωσης της σιλιμπίνης από τον βουτυρικό βινυλ-εστέρα, η οποία καταλύεται από την λιπάση Novozym 435.

Η δυνατότητα ακυλίωσης της σιλιμπίνης από τον βουτυρικό βινυλ-εστέρα μελετήθηκε στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄, [bmim]PF₆ και στην ακετόνη, χρησιμοποιώντας την ακινητοποιημένη λιπάση Β από *Candida antarctica* (Novozym 435). Η απόδοση και αρχική ταχύτητα των προαναφερόμενων αντιδράσεων αποδίδεται στον **Πίνακα 7.7**.

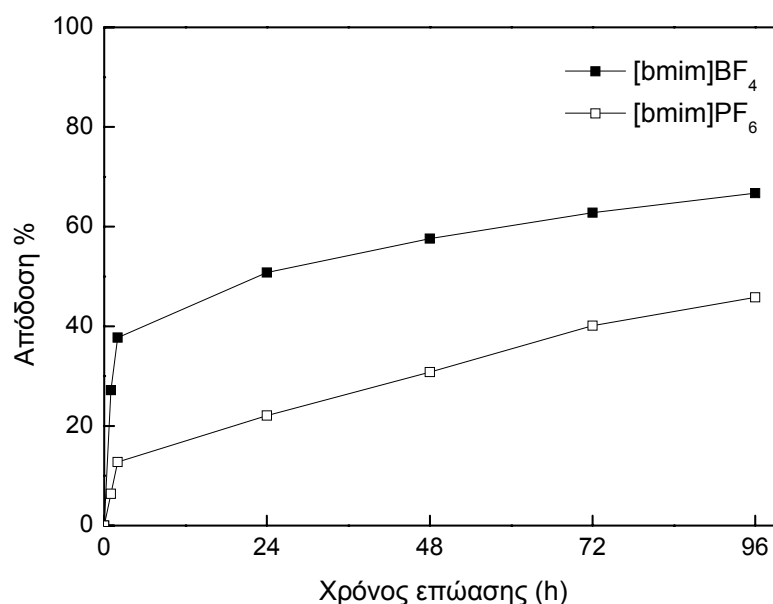
Πίνακας 7.7 Απόδοση (%) και αρχική ταχύτητα για την ενζυμική αντίδραση ακυλίωσης της σιλιμπίνης (30 mM) από τον βουτυρικό βινυλ-εστέρα (300 mM), η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 μετά από 96 h επώασης στους 60°C στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄, [bmim]PF₆ και στους 50°C στην περίπτωση της ακετόνης.

Μέσο αντίδρασης	Αρχική ταχύτητα (mmol h ⁻¹ g ⁻¹ βιοκαταλύτη)	Απόδοση (%)
[bmim]BF ₄	0.31	66.7
[bmim]PF ₆	0.08	51.9
Ακετόνη	1.58	100.0

Σύμφωνα με τον **Πίνακα 7.7** η Novozym 435 μπορεί να καταλύσει την ακυλίωση αυτού του τόσο πολύπλοκου μορίου σε όλα τα υπό μελέτη μέσα και μάλιστα με υψηλές αποδόσεις. Σε όλες τις περιπτώσεις η χρωματογραφική ανάλυση του μίγματος της αντίδρασης κατέδειξε την ύπαρξη ενός μοναδικού προϊόντος (Παράρτημα Β). Το μοριακό βάρος του συντιθέμενου βουτυρικού εστέρα της σιλιμπίνης (C₂₉H₂₈O₁₁Na) υπολογίζεται ίσο με 575.15 και η ανάλυση μέσω φασματοσκοπίας μάζας HRMS (ESI FTMS) κατέδειξε πως το φορτισμένο ιόν [M⁺Na⁺] του προϊόντος αντιστοιχεί σε $m/z = 575.15$, καταδεικνύοντας πως πρόκειται για το ακυλιωμένο παράγωγο της σιλιμπίνης.

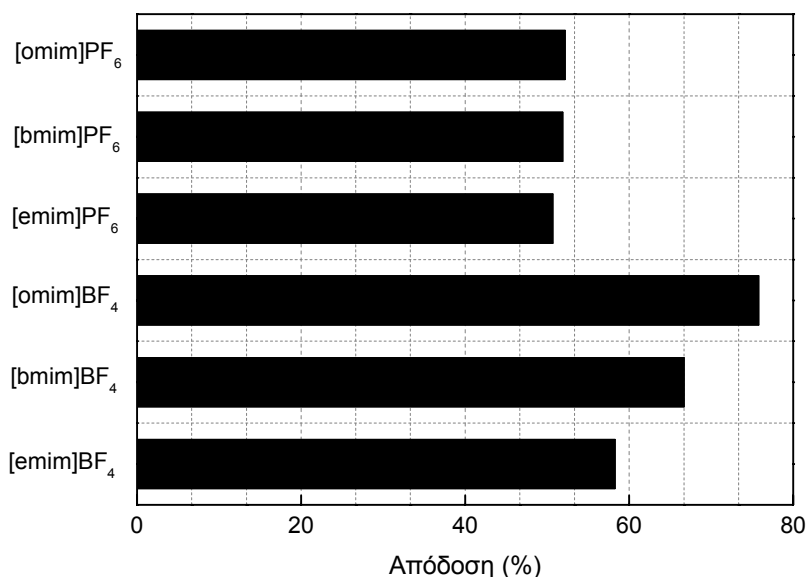
Λαμβάνοντας δε υπόψη, όπως αναφέρθηκε και στις προηγούμενες παραγράφους, την υψηλή εκλεκτικότητα της συγκεκριμένης λιπάσης για τις πρωτοταγείς υδροξυλικές ομάδες και την αδυναμία ακυλίωσης αρωματικών υδροξυλίων [Otto *et al.*, 2000, Passicos *et al.*, 2004, Mellou *et al.*, 2005], αναμένεται πως η ακυλίωση της σιλιμπίνης μπορεί να πραγματοποιηθεί στο μοναδικό πρωτοταγές υδροξύλιο στη θέση C23 (**Εικόνα 7.5**). Το γεγονός αυτό επιβεβαιώθηκε με σύγκριση των ^1H NMR φασμάτων της σιλιμπίνης και του εστέρα της, μέσω της απώλειας του σήματος της 23-OH και της παρουσίας πρόσθετων σημάτων, εξαιτίας της ενσωμάτωσης της ομάδας του ακυλίου. Επιπλέον, και τα δύο H-23 πρωτόνια εμφανίστηκαν μετατοπισμένα λόγω της ακυλίωσης (Παράρτημα Γ).

Όσον αφορά στην επίδραση του μέσου, η απόδοση της αντίδρασης ακυλίωσης της σιλιμπίνης ήταν μεγαλύτερη στο υδρόφιλο [bmim]BF₄ συγκριτικά με το υδρόφοβο [bmim]PF₆, κατ' αντιστοιχία με τα προηγούμενα αποτελέσματα σχετικά με την ακυλίωση των φαινολικών γλυκοσιδίων και των φλαβονοειδών. Στο μέσο αυτό, όπου η διαλυτότητα της σιλιμπίνης είναι σημαντικά μεγαλύτερη συγκριτικά με το [bmim]PF₆ (39.7 g/L και 3.5 g/L, αντίστοιχα), παρατηρείται και υψηλότερη ταχύτητα (**Σχήμα 7.6**), σε συμφωνία με βιβλιογραφικά δεδομένα [Park & Kazlauskas, 2001, Ardhaoui *et al.*, 2004b] καθώς και με τα αποτελέσματα στην περίπτωση ακυλίωσης των προαναφερόμενων φυσικών αντιοξειδωτικών (§ 7.1 και 7.2).



Σχήμα 7.6 Κινητική της αντίδρασης ακυλίωσης της σιλιμπίνης (30 mM) από τον βουτυρικό βινυλ-εστέρα (300 mM), η οποία καταλύεται από την Novozym 435 στους 60°C στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ (μαύρα σύμβολα) και [bmim]PF₆ (λευκά σύμβολα).

Με βάση την σύσταση των ιόντων τους, τα δύο υπό μελέτη ιοντικά υγρά φέρουν το ίδιο ιμιδαζολικό κατιόν και διαφορετικά ανιόντα. Κατά την ακυλίωση των φυσικών αντιοξειδωτικών σε ιοντικά υγρά παρατηρήθηκε διαφοροποίηση των καταλυτικών ιδιοτήτων των λιπασών (δραστικότητα, εκλεκτικότητα) ανάλογα με την ιοντική σύσταση του μέσου. Παρουσιάζει, συνεπώς, ενδιαφέρον η μελέτη της επίδρασης της ιοντικής σύστασης του ιοντικού υγρού στην απόδοση των ενζυμικών αντιδράσεων σύνθεσης λιπόφιλων παραγώγων φυσικών αντιοξειδωτικών. Για το σκοπό αυτό επιλέχθηκαν διάφορα ιοντικά υγρά τα οποία αποτελούνται από ανιόντα είτε τετραφθοριούχου βορίου BF_4^- ή εξαφθοριούχου φωσφόρου PF_6^- και από ιμιδαζολικά κατιόντα τα οποία φέρουν αλκυλικούς υποκαταστάτες διαφορετικού μήκους ανθρακικής αλυσίδας $\text{C}_2\text{-C}_8$ στην θέση 1 (**Σχήμα 7.7**).



Σχήμα 7.7 Επίδραση της φύσης του ιοντικού υγρού στην απόδοση (%) της ενζυμικής αντίδρασης ακυλίωσης της σιλιμπίνης (30 mM) από τον βουτυρικό βινυλ-εστέρα (300 mM), η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 μετά από 96 h επώασης στους 60°C.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του **Σχήματος 7.7** η απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης ακυλίωσης της σιλιμπίνης εξαρτάται από τη φύση του ιοντικού υγρού. Στην περίπτωση των ιοντικών υγρών με ανιόν PF_6^- παρατηρείται μικρή αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης ακυλίωσης της σιλιμπίνης με την αύξηση της αλκυλικής αλυσίδας του κατιόντος. Στην περίπτωση, ωστόσο, των ιοντικών υγρών με ανιόν BF_4^- παρατηρείται σημαντική αύξηση της απόδοσης με αύξηση της αλκυλικής αλυσίδας του κατιόντος, οδηγώντας σε μία ιδιαίτερα υψηλή τιμή απόδοσης, ίση με 75.8% στο [omim]BF₄. Η παρατηρούμενη αύξηση της απόδοσης συμφωνεί με βιβλιογραφικά δεδομένα ενζυμικών αντιδράσεων ακυλίωσης σε

BF_4^- ιοντικά υγρά [Schöfer *et al.*, 2001, Li *et al.*, 2006]. Η τάση αυτή μπορεί πιθανά να εξηγηθεί με βάση την διαφοροποίηση των ιδιοτήτων των ιοντικών υγρών ανάλογα με την ιοντική τους σύσταση. Έχει αναφερθεί πως η επιμήκυνση της αλκυλικής αλυσίδας του κατιόντος οδηγεί σε αύξηση της υδροφοβικότητας, ενώ γενικά η πολικότητα του ιοντικού υγρού φαίνεται να μειώνεται (Πίνακας 6.2) [Carmichael & Seddon, 2000, Zhao, 2003]. Λιγότερο πολικά και περισσότερο υδρόφοβα ιοντικά υγρά εμφανίζουν μικρότερη τάση να απομακρύνουν μόρια νερού από το απαραίτητο στρώμα νερού του ενζύμου, οδηγώντας σε υψηλότερη ενζυμική δραστηριότητα και σταθερότητα [Zhao *et al.*, 2009].

Όσον αφορά στη φύση του ανιόντος, σε όλες τις περιπτώσεις και ανεξάρτητα του κατιόντος, υψηλότερες αποδόσεις παρατηρήθηκαν στα BF_4^- συγκριτικά με τα PF_6^- -ιοντικά υγρά, υποδεικνύοντας την σημαντική επίδραση του ανιόντος στην απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης. Η εξάρτηση της ενζυμικής δραστηριότητας από το ανιόν έχει αναφερθεί για διάφορες βιοκαταλυτικές αντιδράσεις σε ιοντικά υγρά [Kaar *et al.*, 2003, Yuan *et al.*, 2006, Li *et al.*, 2006, Chen *et al.*, 2008] και μπορεί να αιτιολογηθεί βάσει της σημαντικότερης, συγκριτικά με το κατιόν, επίδρασης της φύσης του ανιόντος στις ιδιότητες του ιοντικού υγρού (υδροφοβικότητα, ιξώδες, βασικότητα δεσμών υδρογόνου, πυρηνοφιλικότητα) [Yu *et al.*, 2005b, Li *et al.*, 2006].

7.4 Επίδραση παραμέτρων στην απόδοση και εκλεκτικότητα της ενζυμικής ακυλίωσης φυσικών αντιοξειδωτικών σε ιοντικά υγρά

Οι καταλυτικές ιδιότητες των ενζύμων στα μη συμβατικά μέσα εξαρτώνται από ποικίλες παραμέτρους (§ 1.3). Τα προαναφερόμενα αποτελέσματα καταδεικνύουν την επίδραση της δομής του αντιοξειδωτικού στην απόδοση των ενζυμικών αντιδράσεων, καθώς τα φαινορικά γλυκοσίδια οδήγησαν σε υψηλότερες αποδόσεις συγκριτικά με τα περισσότερο πολύπλοκα φλαβονοειδή, ενώ άγλυκα αντιοξειδωτικά, όπως η ναριγκενίνη δεν εστεροποιούνται στα ιοντικά υγρά, υπό τις πειραματικές συνθήκες που εφαρμόστηκαν στην παρούσα μελέτη. Η δομή του αντιοξειδωτικού βρέθηκε να επιδρά και στην εκλεκτικότητα των ενζυμικών αντιδράσεων, μέσω της παρουσίας ή μη πρωτοταγών υδροξυλικών ομάδων. Η τόπο-εκλεκτικότητα επηρεάζεται δε σημαντικά από την εκλεκτικότητα κάθε ενζύμου, ανάλογα με την προέλευσή του, ως προς τις δευτεροταγείς υδροξυλικές ομάδες των φυσικών αντιοξειδωτικών. Σε όλες τις περιπτώσεις τέλος, ανεξάρτητα του υποστρώματος και της χρησιμοποιούμενης λιπάσης, αναγνωρίζεται η σημαντική επίδραση της φύσης του ιοντικού

υγρού όσον αφορά το κατιόν αλλά κυρίως το ανιόν, στην απόδοση και εκλεκτικότητα των ενζυμικών αντιδράσεων.

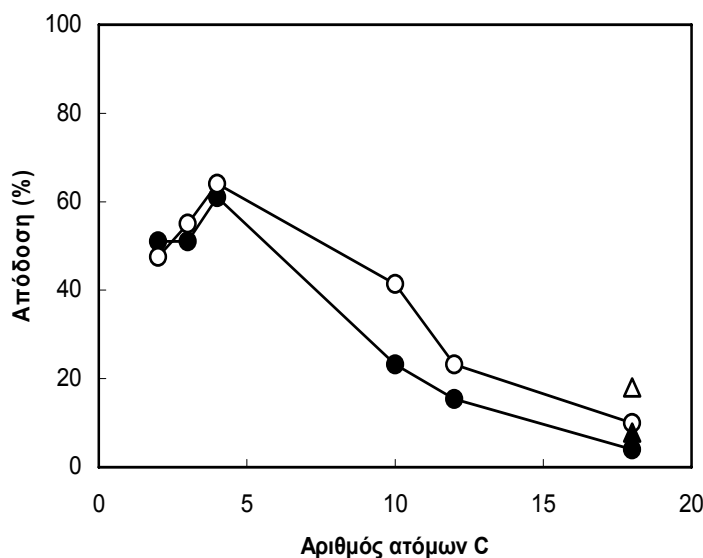
Επιπλέον των προαναφερόμενων, με σκοπό την εις βάθος μελέτη του νέου αυτού βιοκαταλυτικού συστήματος, αλλά και τη βελτίωση των αποδόσεων των αντιδράσεων σύνθεσης λιπόφιλων παραγώγων φυσικών αντιοξειδωτικών, μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας, η φύση του ακυλο-δότη, η συγκέντρωση των υποστρωμάτων και η ενυδάτωση του ιοντικού υγρού.

7.4.1 Μελέτη της επίδρασης της φύσης του ακυλο-δότη

Η δυνατότητα ακυλίωσης διαφόρων φυσικών αντιοξειδωτικών μελετήθηκε στα ιοντικά υγρά με τη χρήση του βουτυρικού βινυλ-εστέρα ως ακυλο-δότη. Ωστόσο, ενδιαφέρον παρουσιάζει η διερεύνηση της δυνατότητας ακυλίωσης των φυσικών αντιοξειδωτικών με ακυλο-δότες διαφορετικής ανθρακικής αλυσίδας και η μελέτη της επίδρασης της παραμέτρου αυτής στην απόδοση των ενζυμικών αντιδράσεων. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε η ακυλίωση της ναριγκίνης και της ρουτίνης, η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆, χρησιμοποιώντας βινυλ-εστέρες διαφορετικών λιπαρών οξέων, καθώς και ελεύθερα οξέα (όπως το ελαϊκό οξύ) ως ακυλο-δότες.

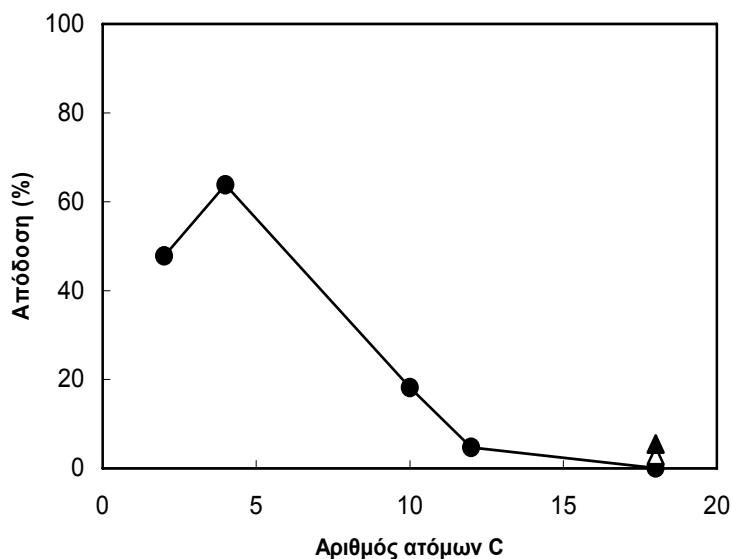
Το **Σχήμα 7.8** απεικονίζει την επίδραση του μήκους της αλκυλικής αλυσίδας του ακυλο-δότη στην απόδοση της ενζυμικής ακυλίωσης της ναριγκίνης μετά από 96 h επώασης στους 60°C στα δύο ιοντικά υγρά.

Είναι προφανές πως η φύση του ακυλο-δότη επηρεάζει σημαντικά την απόδοση της αντίδρασης. Η μεγαλύτερη απόδοση κυμαίνεται περίπου στο 65% και επιτυγχάνεται με τη χρήση ακυλο-δοτών μικρής ανθρακικής αλυσίδας (έως 4 ατόμων άνθρακα) και στα δύο χρησιμοποιούμενα ιοντικά υγρά. Αντίθετα, η χρήση ακυλο-δοτών μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας οδήγησε σε αρκετά χαμηλότερες αποδόσεις και ιδιαίτερα στο περισσότερο υδρόφιλο [bmim]BF₄. Στην περίπτωση χρήσης ακυλο-δοτών με ανθρακική αλυσίδα 18 ατόμων άνθρακα, υψηλότερες αποδόσεις παρατηρούνται στην περίπτωση του ελαϊκού οξέος (C_{18:1}) συγκριτικά με την περίπτωση χρήσης του βινυλ-εστέρα του στεαρικού οξέος (C₁₈).



Σχήμα 7.8 Επίδραση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας διαφόρων βινυλ-εστέρων (●,○) καθώς και του ελαϊκού οξέος (Δ,▲) στην απόδοση (%) της ακυλίωσης της ναριγκίνης (50 mM), η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 στο [bmim]BF₄ (μαύρα σύμβολα) και το [bmim]PF₆ (λευκά σύμβολα) μετά από 96 h επώασης στους 60°C. Ο μοριακός λόγος του ακυλο-δότη προς τη ναριγκίνη είναι ίσος με 10.

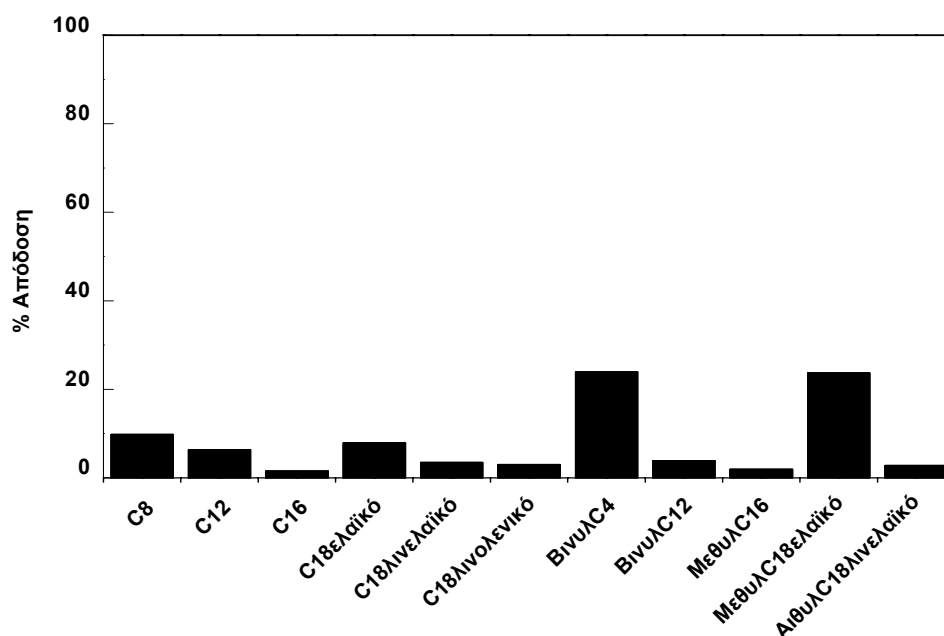
Η ίδια τάση παρατηρείται και στην περίπτωση της ενζυμικής ακυλίωσης της ρουτίνης από τη Novozym 435 στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ (**Σχήμα 7.9**).



Σχήμα 7.9 Επίδραση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας διαφόρων βινυλ-εστέρων (●) καθώς και του ελαϊκού (Δ) και λινελαϊκού οξέος (▲) στην απόδοση (%) της ακυλίωσης της ρουτίνης (25 mM), η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ μετά από 144 h επώασης στους 60°C. Ο μοριακός λόγος του ακυλο-δότη προς τη ρουτίνη είναι ίσος με 10.

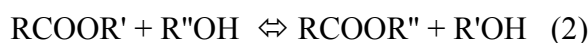
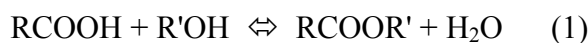
Η υψηλότερη απόδοση λαμβάνεται με τη χρήση του βινυλ-εστέρα του βουτυρικού οξέος (με αλυσίδα 4 ατόμων άνθρακα) ενώ η χρήση ακυλο-δοτών μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας οδηγεί σε ακόμα χαμηλότερες αποδόσεις συγκριτικά με τη ναριγκίνη. Μικρή θετική επίδραση είχε και για αυτό το υπόστρωμα η χρήση ακόρεστων λιπαρών οξέων, όπως το λινελαϊκό ($C_{18:2}$) και ελαϊκό οξύ ($C_{18:1}$), συγκριτικά με το αντίστοιχο κορεσμένο ακυλο-δότη (βινυλ-εστέρα του στεαρικού οξέος). Παρόμοια επίδραση έχει αναφερθεί και στην περίπτωση ακυλίωσης της ρουτίνης σε οργανικούς διαλύτες [Ardhaoui *et al.*, 2004a].

Η επίδραση της φύσης του ακυλο-δότη μελετήθηκε επιπλέον και κατά την ακυλίωση της σιλιμπίνης, η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ (Σχήμα 7.10).



Σχήμα 7.10 Επίδραση της φύσης του ακυλο-δότη στην απόδοση (%) της ακυλίωσης της σιλιμπίνης (30 mM), η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ μετά από 120 h επώασης στους 60°C. Ο μοριακός λόγος των υποστρωμάτων είναι ίσος με 1.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα παρατηρείται για την αντίδραση ακυλίωσης της σιλιμπίνης σημαντική επίδραση του τύπου της αντίδρασης στην απόδοση της ενζυμικής ακυλίωσης. Σε όλες τις περιπτώσεις, υψηλότερες αποδόσεις παρατηρήθηκαν μέσω πραγματοποίησης αντιδράσεων μετεστεροποίησης (1) συγκριτικά με τις αντιδράσεις απευθείας εστεροποίησης (2) :



Η διαφοροποίηση αυτή, μπορεί να εξηγηθεί μέσω της παρουσίας του νερού, το οποίο αποτελεί παραπροϊόν στην αντίδραση απευθείας εστεροποίησης και μπορεί να μετατοπίσει την θερμοδυναμική ισορροπία της αντίδρασης προς την κατεύθυνση της υδρόλυσης [Lee *et al.*, 2006]. Επιπρόσθετα, καθώς ως ακυλο-δότες χρησιμοποιήθηκαν βινυλ-εστέρες λιπαρών οξέων, πιθανή εξήγηση αποτελεί και η δυνατότητα μετατόπισης της ισορροπίας της αντίδρασης προς την κατεύθυνση της σύνθεσης, λόγω απομάκρυνσης της ιδιαίτερα πτητικής ακεταλδεΐδης, η οποία προκύπτει από τον ταυτομερισμό της παραγόμενης βινυλ-αλκοόλης [Yang *et al.*, 1999].

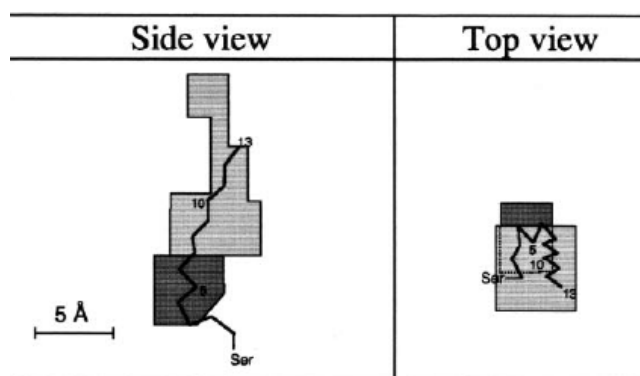
Επιπλέον του τύπου της αντίδρασης, σημαντική είναι και η επίδραση της αλκυλικής αλυσίδας του ακυλο-δότη στην απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης ακυλίωσης της σιλιμπίνης (**Σχήμα 7.10**). Όπως και στην περίπτωση ακυλίωσης της ναριγκίνης και της ρουτίνης, η υψηλότερη απόδοση παρατηρείται με χρήση ακυλο-δοτών μικρής ανθρακικής αλυσίδας (C₄).

Οι βιβλιογραφικές αναφορές για την επίδραση της φύσης του ακυλο-δότη, σε αντιδράσεις καταλυόμενες από την λιπάση B από *Candida antarctica* σε οργανικούς διαλύτες, καταλήγουν σε πολλές περιπτώσεις σε αντικρουόμενα αποτελέσματα. Κατά την ενζυμική σύνθεση εστέρων γλυκόζης αναφέρθηκε χαμηλή εκλεκτικότητα της λιπάσης για λιπαρά οξέα C₈ έως C₁₈ [Björkling, 1989], ενώ από άλλους συγγραφείς αναφέρεται σημαντική διαφοροποίηση των αποδόσεων με αύξηση της αλκυλικής αλυσίδας του ακυλο-δότη από C₁₂ έως C₁₈, με χαμηλές αποδόσεις με τη χρήση μικρότερων ακυλο-δοτών (<C₁₂) [Pedersen *et al.*, 2002]. Συγκεκριμένα, για την εστεροποίηση φλαβονοειδών, όπως η ρουτίνη και η ναριγκίνη, σε οργανικούς διαλύτες έχει αναφερθεί ότι η αύξηση της ανθρακικής αλυσίδας του λιπαρού οξέος από C₈ έως C₁₂ δεν επιδρά στην απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης [Kontogianni *et al.*, 2003], ενώ στην περίπτωση χρήσης μικρότερων ακυλο-δοτών (C₆ έως C₁₂) για την εστεροποίηση της ρουτίνης αναφέρθηκε σημαντική επίδραση, με αύξηση της απόδοσης αυξάνοντας το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας του λιπαρού οξέος [Ardhaoui *et al.*, 2004a].

Ωστόσο, η επίδραση τη φύσης του ακυλο-δότη στην απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης ακυλίωσης φυσικών αντιοξειδωτικών στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ είναι σημαντικά διαφορετική από εκείνη στην περίπτωση των οργανικών διαλυτών. Στα ιοντικά υγρά η λιπάση B από *Candida antarctica*, ανεξάρτητα της φύσης του αντιοξειδωτικού, εμφανίζει υψηλή εκλεκτικότητα για ακυλο-δότες μικρής ανθρακικής αλυσίδας (C₄). Παρόμοια υψηλή εκλεκτικότητα έχει αναφερθεί για την λιπάση αυτή και στην

περίπτωση ακυλίωσης μίας απλής αλκοόλης (της 1-βουτανόλης) στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ [de los Ríos *et al.*, 2008].

Η λεπτομερής ανάλυση της θέσης πρόσδεσης της λιπάσης (docking analysis) από τους Pleiss *et al.*, [1998] έδειξε ότι η λιπάση B από *Candida antarctica* διαθέτει μία χοανοειδή, απότομη θέση πρόσδεσης με διαστάσεις 9.5 x 4.5Å. Το υπόστρωμα τοποθετείται παράλληλα προς το μεγάλο σε μήκος άξονα και προσδένεται σε μία στενή σχισμή στην υδρόφιλη βάση της χοανοειδούς θέσης πρόσδεσης, η οποία δημιουργείται από το κατάλοιπο Asp134 και την καταλυτική σερίνη Ser105. Το υπόστρωμα ευθυγραμμίζεται από τα κατάλοιπα Thr138, Ile189 και Val190 από την αριστερή πλευρά και από το Gln157 και το κατάλοιπο της οξυανιονικής οπής Thr40 στην δεξιά πλευρά. Στο τέλος αυτής της σχισμής, κοντά στο Gln157, το λιπαρό οξύ κάμπτεται απότομα και βρίσκεται σε μία ομαλή και υδρόφοβη περιοχή η οποία αποτελείται από τα κατάλοιπα Val154, Ile285, Leu144 και Val149 (**Εικόνα 7.6**) [Pleiss *et al.*, 1998].



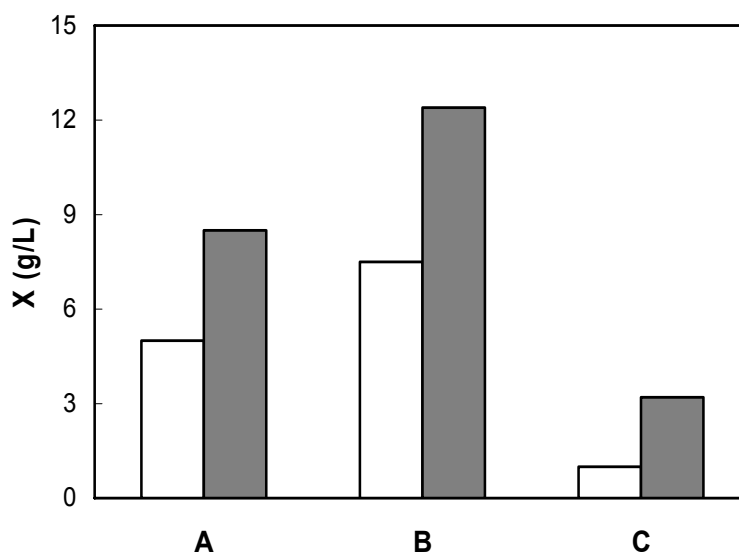
Εικόνα 7.6 Σχηματική απεικόνιση των δεδομένων GRID (METHYL ανιχνευτής: σκούρο γκρι, DRY ανιχνευτής: ανοιχτό γκρι) για τη θέση πρόσδεσης της λιπάσης B από *Candida antarctica*, στην οποία έχει συνδεθεί το υπόστρωμα [Pleiss *et al.*, 1998].

Σύμφωνα με την ανάλυση αυτή η θέση πρόσδεσης της λιπάσης B από *Candida antarctica* είναι σχετικά μικρή (C₁₃) και άρα η λιπάση αναμένεται να εμφανίζει υψηλή εκλεκτικότητα προς λιπαρά οξέα μικρής και μεσαίας αλκυλικής αλυσίδας και χαμηλή εκλεκτικότητα για μεγάλα λιπαρά οξέα. Το γεγονός αυτό δικαιολογεί τα παρατηρούμενα αποτελέσματα στην περίπτωση των ιοντικών υγρών, αλλά η ασυμφωνία με τις αντίστοιχες αντιδράσεις σε οργανικούς διαλύτες υποδεικνύει την ιδιαίτερα σημαντική επίδραση του μέσου στην εκλεκτικότητα των λιπάσεων.

Μεγάλης αλκυλικής αλυσίδας λιπαρά οξέα και εστέρες αυτών αναμένεται να εμφανίζουν μεγαλύτερη διαλυτότητα στους λιγότερο πολικούς οργανικούς διαλύτες, οι οποίοι

χρησιμοποιήθηκαν για την εστεροποίηση των φλαβονοειδών, συγκριτικά με τα ιοντικά υγρά. Η μειωμένη διαλυτότητα των μεγάλων ακυλο-δοτών στα ιοντικά υγρά, και ιδιαίτερα στο περισσότερο πολικό [bmim]BF₄, αναμένεται να μειώσει τη διαθεσιμότητα των υποστρωμάτων αυτών προς το ένζυμο μειώνοντας την απόδοση της βιοκαταλυτικής διεργασίας [Park & Kazlauskas, 2001].

Προκειμένου να αυξηθεί η διαλυτότητα μεγάλης αλυσίδας ακυλο-δοτών και να βελτιωθεί η απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης ακυλίωσης των φλαβονοειδών, ένας λιγότερο πολικός διαλύτης, όπως η ακετόνη, προστέθηκε στο μίγμα της αντίδρασης. Η ικανότητα της Novozym 435 να καταλύει την αντίδραση ακυλίωσης της ναριγκίνης και της ρουτίνης με μεγάλα λιπαρά οξέα (12 ατόμων άνθρακα) μελετήθηκε στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆, παρουσία 50% (v/v) ακετόνης (**Σχήμα 7.11**). Στα μίγματα αυτά παρατηρούνται τιμές διαλυτότητας των φλαβονοειδών παρόμοιες με εκείνες στην περίπτωση των καθαρών ιοντικών υγρών (§ 7.2).



Σχήμα 7.11 Συγκέντρωση (g/L) μονοακυλιωμένων παραγώγων ναριγκίνης (A&B) και ρουτίνης (C), τα οποία συντίθενται μέσω της αντίδρασης ακυλίωσης τους από τον βινυλ-εστέρα του λαυρικού οξέος, η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 μετά από 72 h επώασης στους 50°C, στα ιοντικά υγρά (λευκές μπάρες) bmim[BF₄] (A&C) και bmim[PF₆] (B) ή σε μίγματα (γκρι μπάρες), bmim[BF₄]:ακετόνης 50/50 (v/v) (A&C) και bmim[PF₆]:ακετόνης 50/50 (v/v) (B). Οι αρχικές συγκεντρώσεις ρουτίνης και ναριγκίνης είναι 25 και 85 mM, αντίστοιχα. Ο μοριακός λόγος των υποστρωμάτων ισούται με 10.

Όπως φαίνεται στο **Σχήμα 7.11** η ποσότητα των παραγόμενων μονοεστέρων κατά την ακυλίωση της ναριγκίνης και της ρουτίνης με το λαυρικό οξύ αυξάνεται σημαντικά στα

μίγματα οργανικού διαλύτη-ιοντικών υγρών, συγκριτικά με τη χρήση καθαρού ιοντικού υγρού. Σε όλες τις περιπτώσεις, οι αντιδράσεις ακυλίωσης της ρουτίνης και της ναριγκίνης με λιπαρά οξέα μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας οδήγησαν στη σύνθεση ενός μοναδικού προϊόντος. Η δομή των προϊόντων αυτών καθορίστηκε από τη σύγκριση των φασμάτων ^{13}C NMR του φλαβονοειδούς και του ακυλιωμένου παραγώγου του. Η ανάλυση δείχνει ότι η ακυλίωση της ναριγκίνης πραγματοποιήθηκε στη θέση 6''-OH της ομάδας του σακχάρου, όπως αναφέρθηκε και για τις αντιδράσεις ακυλίωσης του αντιοξειδωτικού αυτού από τον βουτυρικό βινυλ-εστέρα. Η δε ακυλίωση της ρουτίνης πραγματοποιήθηκε στη θέση 4'''-OH της ομάδας της ραμνόζης. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τα αποτελέσματα ακυλίωσης των φυσικών αυτών αντιοξειδωτικών σε οργανικούς διαλύτες [Danieli *et al.*, 1990, Kontogianni *et al.*, 2001, Ardhaoui *et al.*, 2004a,b].

Η θετική επίδραση της χρήσης μιγμάτων ιοντικού υγρού-οργανικού διαλύτη στην απόδοση των ενζυμικών αντιδράσεων, παρατηρήθηκε και στην περίπτωση ακυλίωσης της ρουτίνης και της ναριγκίνης με ακυλο-δότες μεγαλύτερης αλκυλικής αλυσίδας, όπως το ελαϊκό οξύ (**Πίνακας 7.8**).

Πίνακας 7.8 Απόδοση (%) της αντίδρασης ακυλίωσης της ναριγκίνης (50 mM) και της ρουτίνης (25 mM) από το ελαϊκό οξύ, η οποία καταλύεται από τη Novozym 435, στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄, [bmim]PF₆, σε οργανικούς διαλύτες, καθώς και σε μίγματα ιοντικού υγρού-οργανικού διαλύτη (50% v/v) μετά από 96 h επώασης στους 50°C και 60°C (στην περίπτωση των ιοντικών υγρών). Ο μοριακός λόγος των υποστρωμάτων ισούται με 10.

Μέσο αντίδρασης	Απόδοση %	
	Ναριγκίνη	Ρουτίνη
[bmim]BF ₄	7.8	2.9
[bmim]PF ₆	18.0	0.0
Ακετόνη	25.7	20.4
Εξάνιο	Ίχνη	0.0
[bmim]BF ₄ - Ακετόνη	11.4	26.7
[bmim]PF ₆ - Ακετόνη	37.0	Ίχνη
[bmim]BF ₄ - Εξάνιο	3.1	Ίχνη
[bmim]PF ₆ - Εξάνιο	7.1	Ίχνη

Αξίζει να σημειωθεί πως η ποσότητα των παραγόμενων εστέρων των φλαβονοειδών στα μίγματα ιοντικού υγρού-οργανικού διαλύτη (έως και 12.4 g/L λαυρικού εστέρα της

ναριγκίνης) είναι έως και 4 φορές υψηλότερη συγκριτικά με εκείνη που έχει αναφερθεί σε καθαρούς οργανικούς διαλύτες ή σε μέσα ελεύθερα διαλυτών σε μία βιοκαταλυτική διεργασία ενός και μόνου βήματος [Kontogianni *et al.*, 2003].

7.4.2 Μελέτη της επίδρασης του μοριακού λόγου των υποστρωμάτων

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση του μοριακού λόγου των υποστρωμάτων, η ενζυμική αντίδραση ακυλίωσης της ναριγκίνης επιλέχθηκε ως πρότυπη αντίδραση (**Πίνακας 7.9**). Για το σκοπό αυτό η συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού και της ακινητοποιημένης λιπάσης (Novozym 435) διατηρήθηκε σταθερή και ίση με 50 mM και 80 mg/mL αντίστοιχα, ενώ η ποσότητα του ακυλο-δότη (βινυλ-εστέρας του βουτυρικού οξέος) μεταβάλλεται από 150 έως 750 mM, οδηγώντας σε μοριακούς λόγους ακυλο-δότη προς αντιοξειδωτικό που κυμαίνονται από 3 έως 15. Η χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση ναριγκίνης ήταν πλήρως διαλυτή και στα δύο υπό μελέτη ιοντικά υγρά ([bmim]BF₄ και [bmim]PF₆).

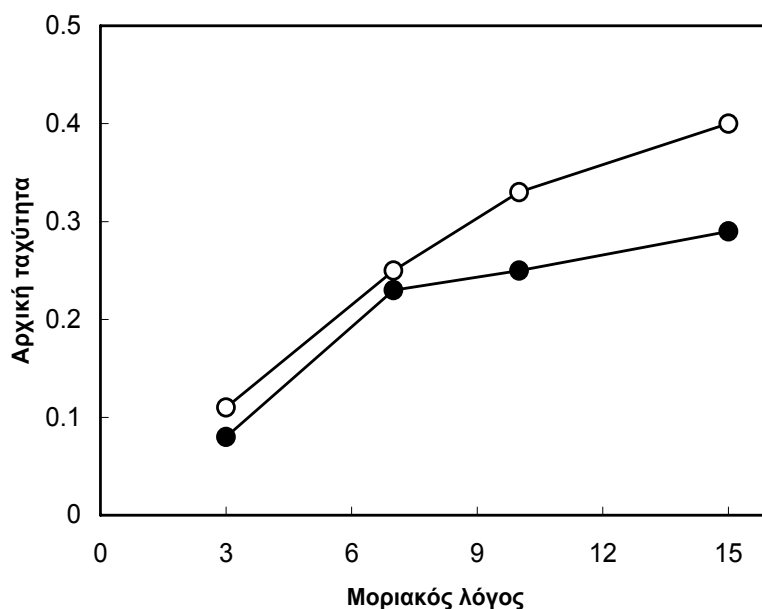
Πίνακας 7.9 Επίδραση του μοριακού λόγου του βουτυρικού βινυλ-εστέρα προς τη ναριγκίνη (50 mM) στην απόδοση (%) της αντίδρασης, η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ μετά από 72 h επώασης στους 60°C.

Μοριακός λόγος	% Απόδοση	
	[bmim]BF ₄	[bmim]PF ₆
3	44.3	45.2
7	50.1	52.0
10	55.6	57.2
15	58.0	69.5

Σύμφωνα με τις τιμές του **Πίνακα 7.9**, η απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης ακυλίωσης της ναριγκίνης εξαρτάται από το μοριακό λόγο των υποστρωμάτων. Ανεξάρτητα του χρησιμοποιούμενου ιοντικού υγρού, με την αύξηση του μοριακού λόγου παρατηρήθηκε αύξηση της % απόδοσης. Η θετική επίδραση του μοριακού λόγου στην απόδοση ενζυμικών αντιδράσεων έχει αναφερθεί και στην περίπτωση ενζυμικής ακυλίωσης σακχάρων και γλυκοσιδίων σε οργανικούς διαλύτες [Kontogianni *et al.*, 2001, Mellou *et al.*, 2005, Passicos *et al.*, 2004], σε μίγματα ιοντικών υγρών-οργανικών διαλυτών [Li *et al.*, 2006, Chen *et al.*, 2008] ή και σε καθαρά ιοντικά υγρά [Tian *et al.*, 2009, Habulin & Knez, 2009]. Καθώς οι λιπάσες έχουν την ικανότητα κατάλυσης αντιδράσεων σύνθεσης αλλά και υδρόλυσης

εστερικών δεσμών, η αύξηση της απόδοσης με την αύξηση του μοριακού λόγου μπορεί να εξηγηθεί με βάση τη μετατόπιση της θερμοδυναμικής ισορροπίας της αντίδρασης προς την κατεύθυνση της σύνθεσης, εξαιτίας της περίσσειας του ακυλο-δότη.

Για μοριακούς λόγους μεταξύ των τιμών 3-10, παρόμοιες τιμές απόδοσης παρατηρήθηκαν στα δύο χρησιμοποιούμενα ιοντικά υγρά. Η χρήση ωστόσο, μεγαλύτερης συγκέντρωσης ακυλο-δότη (750 mM, ώστε ο μοριακός λόγος να ισούται με 15) οδήγησε σε υψηλότερη απόδοση στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆, συγκριτικά με το [bmim]BF₄. Το αποτέλεσμα αυτό είναι πιθανόν να συνδέεται με τη μικρότερη διαλυτότητα του βουτυρικού βινυλ-εστέρα στο περισσότερο υδρόφιλο [bmim]BF₄. Το γεγονός αυτό είναι δυνατόν να οδηγήσει στη δημιουργία ενός διφασικού συστήματος το οποίο να δυσχεραίνει την πρόσβαση του αντιοξειδωτικού στο ένζυμο μειώνοντας τόσο την απόδοση όσο και την αρχική ταχύτητα της αντίδρασης (Σχήμα 7.12).

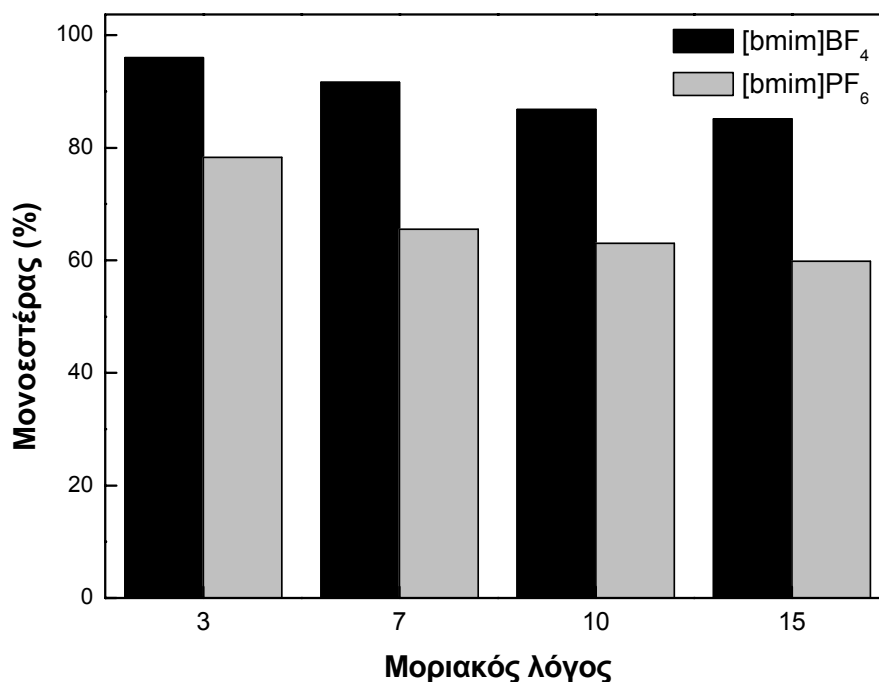


Σχήμα 7.12 Επίδραση του μοριακού λόγου του βουτυρικού βινυλ-εστέρα προς τη ναριγκίνη (50 mM) στην αρχική ταχύτητα της αντίδρασης (εκφρασμένη σε mmol h⁻¹ gr⁻¹ βιοκαταλύτη), η οποία καταλύεται από τη Novozym 435, στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ (μαύρα σύμβολα) και [bmim]PF₆ (λευκά σύμβολα) στους 60°C.

Ο μοριακός λόγος επιπλέον της απόδοσης και ταχύτητας, βρέθηκε να επιδρά και στην εκλεκτικότητα της αντίδρασης ακυλίωσης της ναριγκίνης (Σχήμα 7.13).

Όσον αφορά στην εκλεκτικότητα, και στα δύο ιοντικά υγρά, η αύξηση του μοριακού λόγου των υποστρωμάτων οδήγησε σε μείωση της ποσότητας του παραγόμενου μονοεστέρα, παρατηρήθηκε δηλαδή μείωση της τόπο-εκλεκτικότητας της ενζυμικής αντίδρασης. Η μείωση

της τόπο-εκλεκτικότητας ήταν εντονότερη στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ συγκριτικά με το [bmim]BF₄, επιβεβαιώνοντας τα προηγούμενα αποτελέσματα (§ 7.1 και 7.2) σχετικά με τη σημαντική επίδραση της φύσης του ιοντικού υγρού στην εκλεκτικότητα της λιπάσης.



Σχήμα 7.13 Επίδραση του μοριακού λόγου του βουτυρικού βινυλ-εστέρα προς τη ναριγκίνη (50 mM) στο ποσοστό του παραγόμενου μονοεστέρα μετά από 72 h επώασης του μίγματος της αντίδρασης, η οποία καταλύεται από τη Novozym 435, στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ στους 60°C.

Η δυνατότητα αύξησης των αποδόσεων των ενζυμικών αντιδράσεων ακυλίωσης φυσικών αντιοξειδωτικών μέσω της αύξησης του μοριακού λόγου επιβεβαιώνεται και από τη μελέτη της επίδρασης της παραμέτρου αυτής στην περίπτωση ακυλίωσης άλλων φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως της σιλιμπίνης (**Πίνακας 7.10**).

Πίνακας 7.10 Επίδραση του μοριακού λόγου του βουτυρικού βινυλ-εστέρα προς τη σιλιμπίνη (30 mM) στην απόδοση (%) της αντίδρασης, η οποία καταλύεται από τη Novozym 435, στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ μετά από 96 h επώασης στους 60°C.

Μοριακός Λόγος	% Απόδοση	
	[bmim]BF ₄	[bmim]PF ₆
1	26.5	23.9
3	55.2	35.4
5	62.2	49.4
10	66.7	51.9

Σύμφωνα με αποτελέσματα του **Πίνακα 7.10** η απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης ακυλίωσης της σιλιμπίνης αυξήθηκε έως και 2.5 φορές με αύξηση της τιμής του μοριακού λόγου από 1 σε 10. Σε όλες τις περιπτώσεις οι παρατηρούμενες αποδόσεις ήταν μεγαλύτερες στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ συγκριτικά με το [bmim]PF₆, όπως αναφέρθηκε και στις προηγούμενες παραγράφους.

Ωστόσο, κατά την αντίδραση ακυλίωσης της σιλιμπίνης με ακυλο-δότες μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας (C₁₈), όπως το ελαϊκό οξύ και ο μεθυλεστέρας του, η αύξηση του μοριακού λόγου οδήγησε σε μείωση των αποδόσεων και στα δύο χρησιμοποιούμενα ιοντικά υγρά (**Πίνακας 7.11**). Βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί αύξηση της απόδοσης με την αύξηση του μοριακού λόγου του ελαϊκού/μεθυλεστέρα του ελαϊκού οξέος προς τη σιλιμπίνη όταν χρησιμοποιείται ως μέσο η ακετόνη [Theodosiou *et al.*, 2009].

Πίνακας 7.11 Επίδραση του μοριακού λόγου του ελαϊκού οξέος ή του μεθυλεστέρα του ελαϊκού οξέος προς τη σιλιμπίνη (30 mM) στην απόδοση (%) της αντίδρασης, η οποία καταλύεται από τη Novozym 435, στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ μετά από 120 h επώασης στους 60°C.

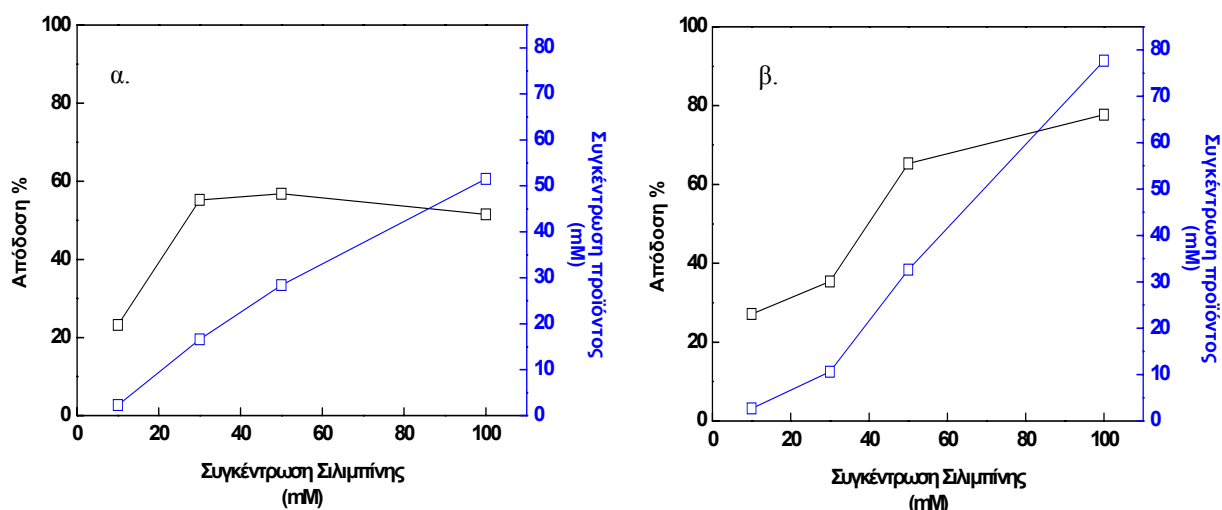
Μοριακός λόγος	% Απόδοση			
	Ελαϊκό οξύ		Μεθυλεστέρας του ελαϊκού οξέος	
	[bmim]BF ₄	[bmim]PF ₆	[bmim]BF ₄	[bmim]PF ₆
1	0.6	13.6	0.5	23.7
3	0.8	13.3	0.8	22.7
5	0.6	11.3	0.9	21.9
7	0.4	8.2	0.7	15.4
10	0.2	7.7	0.8	15.2
15	0.1	3.8	0.7	14.9

Είναι δε αξιοσημείωτο πως, ανάμεσα στα δύο ιοντικά υγρά, σημαντικά χαμηλότερες αποδόσεις παρατηρήθηκαν στο περισσότερο υδρόφιλο [bmim]BF₄, συγκριτικά με το [bmim]PF₆. Η σύγκριση των αποτελεσμάτων ανάμεσα στα δύο ιοντικά υγρά υποδεικνύει πως η μείωση της απόδοσης με την αύξηση του μοριακού λόγου μπορεί πιθανά να εξηγηθεί μέσω της μειωμένης διαλυτότητας μεγάλων ακυλο-δοτών στα ιοντικά υγρά και ειδικότερα στο υδρόφιλο [bmim]BF₄. Λόγω της μειωμένης διαλυτότητας, καθώς αυξάνει η περίσσεια των υποστρωμάτων αυτών πιθανά δημιουργείται ένα διφασικό σύστημα, το οποίο αναμένεται να

μειώσει τη διαθεσιμότητα του υποστρώματος προς τη λιπάση και συνεπώς την απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης ακυλίωσης της σιλιμπίνης [Park & Kazlauskas, 2001].

Για τις μελετώμενες αντιδράσεις εστεροποίησης σημαντική είναι η επίδραση όχι μόνο της συγκέντρωσης του ακυλο-δότη αλλά και του αντιοξειδωτικού. Στις αντιδράσεις αυτού του τύπου, σχηματίζεται ένα ομοιοπολικό σύμπλοκο ενζύμου-ακυλίου, η πυρηνόφιλη προσβολή του οποίου από το νερό οδηγεί στην υδρόλυση του εστέρα, ενώ η προσβολή από το αντιοξειδωτικό οδηγεί στη σύνθεση του ακυλιωμένου παραγώγου του αντιοξειδωτικού. Η συνθετική αντίδραση προϋποθέτει την ταχεία δημιουργία των συμπλόκων ενζύμου-ακυλίου και την πυρηνόφιλη προσβολή από το αντιοξειδωτικό. Η πρώτη προϋπόθεση εξασφαλίζεται από την χρήση ενεργοποιημένων ακυλο-δοτών, όπως ο βουτυρικός βινυλ-εστέρας [Yang *et al.*, 1999, Lozano *et al.*, 2003], ενώ η δεύτερη από την παρουσία μικρής ποσότητας νερού (τα χρησιμοποιούμενα ιοντικά υγρά έχουν προαφυδατωθεί) και μεγάλης συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού.

Η μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης της σιλιμπίνης έδειξε πως αύξηση της τιμής αυτής από 10 σε 100 mM βελτιώνει την απόδοση αλλά και αυξάνει σημαντικά την ποσότητα του παραγόμενου ακυλιωμένου λιπόφιλου παραγώγου της σιλιμπίνης (**Σχήμα 7.14**).



Σχήμα 7.14 Απόδοση (%) (μαύρα σύμβολα) και ποσότητα του παραγόμενου εστέρα (μπλε σύμβολα) για διαφορετικές συγκεντρώσεις σιλιμπίνης κατά την αντίδραση ακυλίωσής της από τον βουτυρικό βινυλ-εστέρα, η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 στα ιοντικά υγρά **α.** [bmim]BF₄ και **β.** [bmim]PF₆ μετά από 96 h επώσης στους 60°C. Ο μοριακός λόγος των υποστρωμάτων ισούται με 3.

7.4.3 Μελέτη της επίδρασης της θερμοκρασίας επώασης και της ενυδάτωσης του μέσου

Επιπρόσθετα της φύσης και συγκέντρωσης των υποστρωμάτων, σημαντικές παραμέτρους, οι οποίες επιδρούν σε βιοκαταλυτικές διεργασίες σε μη συμβατικά μέσα, αποτελούν η θερμοκρασία της αντίδρασης και ο βαθμός ενυδάτωσης του μέσου. Με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης αυτών των παραμέτρων σε βιοκαταλυτικά συστήματα βασισμένα σε ιοντικά υγρά, η ενζυμική ακυλίωση της ναριγκίνης από τον βουτυρικό βινυλ-εστέρα χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη αντίδραση. Η επίδραση της θερμοκρασίας επώασης μελετήθηκε στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ (Πίνακας 7.12).

Πίνακας 7.12 Επίδραση της θερμοκρασίας επώασης στην αρχική ταχύτητα, την απόδοση (%) και την ποσότητα του παραγόμενου μονοεστέρα για την ακυλίωση της ναριγκίνης (30 mM) από τον βουτυρικό βινυλ-εστέρα (300 mM), η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆.

Θερμοκρασία (°C)	Αρχική ταχύτητα (mmol h ⁻¹ g ⁻¹ βιοκαταλύτη)		Απόδοση (%) μετά από 96 h (mol% παραγόμενου μονοεστέρα *)	
	[bmim]BF ₄	[bmim]PF ₆	[bmim]BF ₄	[bmim]PF ₆
35	0.07	0.05	38.2 (92.7)	19.5 (82.3)
40	0.21	0.22	46.5 (92.6)	43.3 (74.3)
50	0.46	0.42	60.7 (85.3)	61.9 (69.9)
60	0.57	0.54	61.6 (84.2)	63.0 (57.1)

* Αναφέρεται σε ποσοστό επί του συνόλου των παραγόμενων εστέρων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 7.12, αύξηση της θερμοκρασίας από 35 σε 60°C οδήγησε σε αύξηση τόσο της αρχικής ταχύτητας, όσο και της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης ακυλίωσης. Παρόμοια συμπεριφορά έχει αναφερθεί και σε οργανικούς διαλύτες [Anderson *et al.*, 1998, Enaud *et al.*, 2004], σε μίγματα οργανικών διαλυτών/ιοντικών υγρών [Ganske & Bornscheuer, 2005b] ή και σε καθαρά ιοντικά υγρά [Dhake *et al.*, 2009]. Με εξαίρεση τη θερμοκρασία των 35°C, παρόμοιες αποδόσεις παρατηρούνται σε όλες τις περιπτώσεις στα δύο ιοντικά υγρά. Η χαμηλότερη απόδοση στο [bmim]PF₆ στη θερμοκρασία αυτή συγκριτικά με το [bmim]BF₄, είναι πιθανόν να οφείλεται στην ύπαρξη περιορισμών διάχυσης των υποστρωμάτων προς το ένζυμο, εξαιτίας του υψηλού ιξώδους του ιοντικού αυτού υγρού. Στη θερμοκρασία των 30°C το ιξώδες του [bmim]PF₆ ισούται με 209.1 mPas ενώ το ιξώδες του [bmim]BF₄ είναι σημαντικά μικρότερο και ίσο με 75.4 mPas [Jacquemin

et al., 2006]. Η αύξηση των αποδόσεων και αρχικών ταχυτήτων της ενζυμικής αντίδρασης ακυλίωσης στα ιοντικά υγρά λόγω της αύξησης της θερμοκρασίας, είναι δυνατόν να εξηγηθεί μέσω της μείωσης των περιορισμών διάχυσης, εξαιτίας της μείωσης του ιξώδους (από 209.1 mPas σε 60.3 mPas στο [bmim]PF₆ και από 75.4 mPas σε 24.9 mPas στο [bmim]BF₄, με αύξηση της θερμοκρασίας από 30°C σε 60°C) [Harris *et al.*, 2005, Jacquemin *et al.*, 2006, van Rantwijk & Sheldon, 2007].

Όσον αφορά τον παραγόμενο μονοεστέρα, παρατηρείται μείωση της ποσότητας αυτού με την αύξηση της θερμοκρασίας επώασης (**Πίνακας 7.12**). Η μείωση της τόπο-εκλεκτικότητας φαίνεται να συνδέεται με την αυξημένη διαλυτότητα του μονοεστέρα (§ 7.2) στο μέσο της αντίδρασης [Park & Kazlauskas, 2001]. Η αύξηση της θερμοκρασίας πιθανά συμβάλλει στην αύξηση της διαλυτότητας του μονοακυλιωμένου παραγώγου. Είναι, ωστόσο, αξιοσημείωτο το γεγονός πως ανεξάρτητα της θερμοκρασίας επώασης, η τόπο-εκλεκτικότητα της ενζυμικής αντίδρασης ακυλίωσης της ναριγκίνης είναι αυξημένη στο [bmim]BF₄ συγκριτικά με εκείνη στο [bmim]PF₆, γεγονός το οποίο επιβεβαιώνει τη σημαντική επίδραση του μέσου στην εκλεκτικότητα.

Η παρουσία του νερού μπορεί να επιδρά με ποικίλους τρόπους στην έκβαση μίας ενζυμικής αντίδρασης. Στην περίπτωση των ιοντικών υγρών μπορεί να μεταβάλλει τις φυσικοχημικές ιδιότητες τους [Jacquemin *et al.*, 2006] αλλά και να επιδράσει σημαντικά στην θερμοδυναμική ισορροπία των αντιδράσεων εστεροποίησης, στην διάχυση των υποστρωμάτων προς το ένζυμο, στην δραστηριότητα και σταθερότητα των ενζύμων [Persson & Bornscheuer, 2003, de los Ríos *et al.*, 2007, Habulin & Knez, 2009]. Για το λόγο αυτό, μελετήθηκε η επίδραση της περιεκτικότητας των ιοντικών υγρών σε νερό κατά την ενζυμική ακυλίωση της ναριγκίνης από τον βουτυρικό βινυλ-εστέρα (**Πίνακας 7.13**).

Το ποσοστό του νερού κυμάνθηκε από <0.1 (προαφυδατωμένο ιοντικό υγρό) έως και 2.0 % κ.β. Η περιεκτικότητα σε νερό ρυθμίστηκε με την προσθήκη συγκεκριμένων ποσοτήτων νερού στο μέσο της αντίδρασης (ιοντικό υγρό το οποίο περιέχει τα υποστρώματα), το οποίο είχε προηγουμένα αφυδατωθεί μέσω επώασης παρουσία ενεργοποιημένων μοριακών κοσκίων διαμέτρου 4Å για 120 h. Οι προστιθέμενες ποσότητες νερού ήταν διαλυτές όχι μόνο στο αναμίξιμο με το νερό [bmim]BF₄, αλλά και στο υδρόφοβο [bmim]PF₆, το οποίο μπορεί να διαλυτοποιήσει μία σημαντική ποσότητα νερού (έως και 3.7 % κ.β. στους 45°C) [Wong *et al.*, 2002, Barahona *et al.*, 2006].

Πίνακας 7.13 Επίδραση του νερού στην αρχική ταχύτητα, την απόδοση (%) και την ποσότητα του παραγόμενου μονοεστέρα για την αντίδραση ακυλίωσης της ναριγκίνης (30 mM) από τον βουτυρικό βινυλ-εστέρα (300 mM), η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ στους 60°C.

Περιεχόμενο νερό (% κ.β.)	Αρχική ταχύτητα (mmol h ⁻¹ g ⁻¹ βιοκαταλύτη)		Απόδοση (%) μετά από 96 h (mol% παραγόμενου μονοεστέρα*)	
	[bmim]BF ₄	[bmim]PF ₆	[bmim]BF ₄	[bmim]PF ₆
<0.1	0.57	0.54	61.6 (84.2)	63.0 (57.1)
0.5	0.41	0.49	46.6 (96.0)	61.1 (66.9)
1.0	0.32	0.37	43.2 (97.1)	55.9 (67.5)
2.0	0.20	0.29	37.7 (100.0)	43.4 (88.0)

* Αναφέρεται σε ποσοστό επί του συνόλου των παραγόμενων εστέρων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του **Πίνακα 7.13**, και στα δύο χρησιμοποιούμενα ιοντικά υγρά η αύξηση του περιεχόμενου νερού οδήγησε σε μείωση τόσο της αρχικής ταχύτητας όσο και της απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης. Η αρνητική επίδραση της παρουσίας του νερού στην καταλυτική δράση της λιπάσης B από *Candida antarctica* έχει αναφερθεί για ποικίλες αντιδράσεις μετεστεροποίησης σε συστήματα απουσία διαλυτών, σε οργανικούς διαλύτες αλλά και ιοντικά υγρά [Lau *et al.*, 2000, Chamouleau *et al.*, 2001, Berberich *et al.*, 2003, Gayot *et al.*, 2003, Pirozzi & Greco, 2004]. Η μείωση της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης με την αύξηση της ποσότητας του νερού μπορεί να αποδοθεί στην επίδραση του νερού στην ταχύτητα υδρόλυσης του ακυλο-δότη (βουτυρικός βινυλεστέρας) ή στην ύπαρξη περιορισμών διάχυσης των υδρόφοβων υποστρωμάτων διαμέσω του στρώματος νερού το οποίο περιβάλλει το ένζυμο [Chamouleau *et al.*, 2001, Pirozzi & Greco, 2004]. Τα ιοντικά υγρά, ως ιοντικής φύσεως μέσα, μπορούν παρουσία νερού να διασταθούν σε μεμονωμένα ιόντα και έτσι πιθανά η αρνητική επίδραση της παρουσίας του νερού να οφείλεται στην αλληλεπίδραση των μεμονωμένων ιόντων με τα μόρια του ενζύμου ή/και των υποστρωμάτων και προϊόντων [Zhao, 2005].

7.5 Βελτιστοποίηση της βιοκαταλυτικής σύνθεσης λιπόφιλων παραγώγων φυσικών αντιοξειδωτικών σε ιοντικά υγρά μέσω της μεθοδολογίας επιφάνειας απόκρισης (RSM)

Κατά την ανάπτυξη μίας βιοκαταλυτικής διεργασίας βασικό στάδιο αποτελεί η μοντελοποίηση και βελτιστοποίησή της, με σκοπό την αύξηση της αποτελεσματικότητας της

διεργασίας. Μία κλασική εμπειρική μέθοδος βελτιστοποίησης, όπως αυτή που περιγράφεται στην προηγούμενη παράγραφο (§ 7.4), βασίζεται στη μεταβολή μίας παραμέτρου κάθε φορά διατηρώντας σταθερές τις υπόλοιπες. Οι μέθοδοι όμως αυτές είναι χρονοβόρες, δεν μπορούν να αποδώσουν τη συνολική επίδραση των παραμέτρων αλλά κυρίως τείνουν να αγνοούν τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραμέτρων. Εναλλακτικά, οι στατιστικές μέθοδοι αποδεικνύονται πολύτιμα εργαλεία για τη βελτιστοποίηση επιθυμητών αποκρίσεων καθώς ξεπερνούν τους περιορισμούς των κλασικών εμπειρικών μεθόδων [Garrido-Vidal *et al.*, 2003]. Η μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (Response surface methodology, RSM) αποτελεί μία συλλογή μαθηματικών και στατιστικών τεχνικών, χρήσιμη για τον σχεδιασμό πειραμάτων, την μοντελοποίηση και την ανάλυση της (αλληλ)επίδρασης ποικίλων ανεξάρτητων μεταβλητών (παραμέτρων) [Myers & Montgomery, 1995]. Το βασικό πλεονέκτημα της RSM αποτελεί ο μειωμένος αριθμός πειραματικών δοκιμών οι οποίες απαιτούνται για την εκτίμηση της επίδρασης πολλαπλών παραμέτρων, αλλά και των μεταξύ τους αλληλεπιδράσεων. Εξαιτίας του γεγονότος αυτού, η RSM έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη μελέτη και βελτιστοποίηση βιοκαταλυτικών διεργασιών [Ismail *et al.*, 1998, Hamsaveni *et al.*, 2001, Soo *et al.*, 2004, Linder *et al.*, 2005, Basri *et al.*, 2007, Zhang *et al.*, 2008a].

Με βάση τα παραπάνω και με σκοπό τη μαθηματική περιγραφή και βελτιστοποίηση της βιοκαταλυτικής σύνθεσης λιπόφιλων παραγώγων φυσικών αντιοξειδωτικών σε ιοντικά υγρά, η επίδραση ποικίλων παραμέτρων καθώς και η αλληλεπίδραση μεταξύ των μελετήθηκε με την εφαρμογή της μεθοδολογίας επιφάνειας απόκρισης, χρησιμοποιώντας δύο πειραματικούς σχεδιασμούς. Ως πρότυπη αντίδραση επιλέχθηκε η ενζυμική ακυλίωση της ναριγκίνης από τον βουτυρικό βινυλ-εστέρα, η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄. Το συγκεκριμένο ιοντικό υγρό επιλέχθηκε ως μέσο καθώς η υψηλή διαλυτότητα της ναριγκίνης σε αυτό επιτρέπει τη τροποποίηση μεγάλων ποσοτήτων του υποστρώματος σε μία βιοκαταλυτική διεργασία ενός σταδίου, ενώ η τόπο-εκλεκτικότητα της διεργασίας είναι υψηλή στο μέσο αυτό (§ 7.2). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της προηγούμενης παραγράφου η αντίδραση ακυλίωσης πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία 60°C και σε προαφυδατωμένο ιοντικό υγρό (περιεχόμενο νερό < 0.1 % κ.β.), παράμετροι οι οποίες οδήγησαν σε υψηλές αποδόσεις χωρίς να απενεργοποιούν τη χρησιμοποιούμενη λιπάση.

7.5.1 Πρώτος πειραματικός σχεδιασμός

Κατά τον πρώτο πειραματικό σχεδιασμό, η συγκέντρωση του ενζύμου (E), ο μοριακός λόγος του ακυλο-δότη προς τη ναριγκίνη (MR) και ο χρόνος της αντίδρασης (RT) διερευνήθηκαν ως παράμετροι οι οποίες επιδρούν στην ενζυμική ακυλίωση της ναριγκίνης (50 mM). Αποσκοπώντας στη σύνθεση σχεδόν αποκλειστικά του μονοακυλιωμένου παραγώγου της ναριγκίνης και με βάση τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραμάτων επιλέχθηκαν τα εύρη τιμών που αναγράφονται στον **Πίνακα 7.14**.

Πίνακας 7.14 Πρώτος πειραματικός σχεδιασμός για τη μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης του ενζύμου (E), του μοριακού λόγου του βουτυρικού βινυλ-εστέρα προς τη ναριγκίνη (MR) και του χρόνου της αντίδρασης (RT) στην % απόδοση ακυλίωσης της ναριγκίνης (50 mM), η οποία προσδιορίζεται πειραματικά ή προβλέπεται από το μοντέλο.

A/A	E (mg/mL) [*]	MR [*]	RT (h) [*]	Παρατηρούμενη απόδοση (%)	mol % μονοεστέρα	Προβλεπόμενη απόδοση (%)
1	35 (-1)	3 (-1)	8 (-1)	13.7	98.6	11.8
2	75 (+1)	3 (-1)	8 (-1)	22.3	98.6	24.8
3	35 (-1)	10 (+1)	8 (-1)	21.0	98.8	17.5
4	75 (+1)	10 (+1)	8 (-1)	43.7	95.0	44.2
5	35 (-1)	3 (-1)	30 (+1)	19.2	98.7	17.2
6	75 (+1)	3 (-1)	30 (+1)	31.7	98.0	30.2
7	35 (-1)	10 (+1)	30 (+1)	21.0	98.7	22.9
8	75 (+1)	10 (+1)	30 (+1)	46.8	95.3	49.6
9	21.4 (-1.68)	6.5 (0)	19 (0)	11.1	98.6	13.7
10	88.6 (+1.68)	6.5 (0)	19 (0)	50.3	93.4	47.1
11	55 (0)	0.6 (-1.68)	19 (0)	9.5	100.0	11.0
12	55 (0)	12.4 (+1.68)	19 (0)	33.4	97.7	32.2
13	55 (0)	6.5 (0)	0.5 (-1.68)	21.5	98.6	25.8
14	55 (0)	6.5 (0)	37.5 (+1.68)	32.6	98.1	34.9
15	55 (0)	6.5 (0)	19 (0)	35.6	97.8	30.4
16	55 (0)	6.5 (0)	19 (0)	31.6	98.1	30.4
17	55 (0)	6.5 (0)	19 (0)	29.2	98.4	30.4

^{*} Πραγματικές τιμές και κωδικοποιημένα επίπεδα (σε παρένθεση) των παραμέτρων της αντίδρασης.

Το πολυωνυμικό μοντέλο που αποδίδει την % απόδοση της ακυλίωσης της ναριγκίνης (απόκριση y) ως συνάρτηση των διαφόρων παραμέτρων που χρησιμοποιήθηκαν στον πειραματικό σχεδιασμό, μετά από υπολογισμό των συντελεστών της Εξίσωσης 1 (§ 5.2.7.5) μέσω πολλαπλής ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης (Multiple Linear Regression analysis, MLR) είναι το ακόλουθο:

$$y = -6.42 + 0.18 E + 2.38 MR + 0.24 RT - 0.25 MR^2 + 0.05 E \times MR \quad (2)$$

Όλοι οι συντελεστές προσδιορίστηκαν με επίπεδο εμπιστοσύνης 95% και τιμή- $p < 0.05$. Οι δευτεροβάθμιοι όροι E^2 και RT^2 , καθώς και οι όροι αλληλεπίδρασης $E*RT$ και $MR*RT$, δεν ήταν στατιστικά σημαντικοί (τιμή- $p > 0.05$) και συνεπώς δεν συμπεριλήφθηκαν στην εξίσωση (2).

Η αξία του πολυωνυμικού μοντέλου που προσαρμόζεται στα δεδομένα εκφράζεται από δύο συντελεστές. Τον συντελεστή προσδιορισμού $R^2=0.95$ (ποσοστό μεταβλητότητας της απόκρισης y η οποία εξηγείται από το μοντέλο) και από την παράμετρο $Q^2=0.89$ (ποσοστό μεταβλητότητας της απόκρισης y η οποία προβλέπεται από το μοντέλο). Καθώς οι τιμές των R^2 και Q^2 βρίσκονται κοντά στη μονάδα αποδεικνύεται η αξία και η καλή ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου. Η ανάλυση διακύμανσης, ANOVA (Παράρτημα Δ) για την % απόδοση ακυλίωσης της ναριγκίνης δίνεται στον **Πίνακα 7.15**.

Πίνακας 7.15 Ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) για τον πρώτο πειραματικό σχεδιασμό.

Πηγή μεταβλητότητας	Άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο τετράγωνο	F-τεστ
Παλινδρόμηση (regression)	2202.9	5	440.6	41.99 ^a
Υπόλοιπα (residuals)	115.4	11	10.5	
Έλλειψη προσαρμογής (lack of fit)	94.2	9	10.5	0.99 ^b
Καθαρό σφάλμα (pure error)	21.2	2	10.6	
Ολική (total)	2318.3	16	144.9	

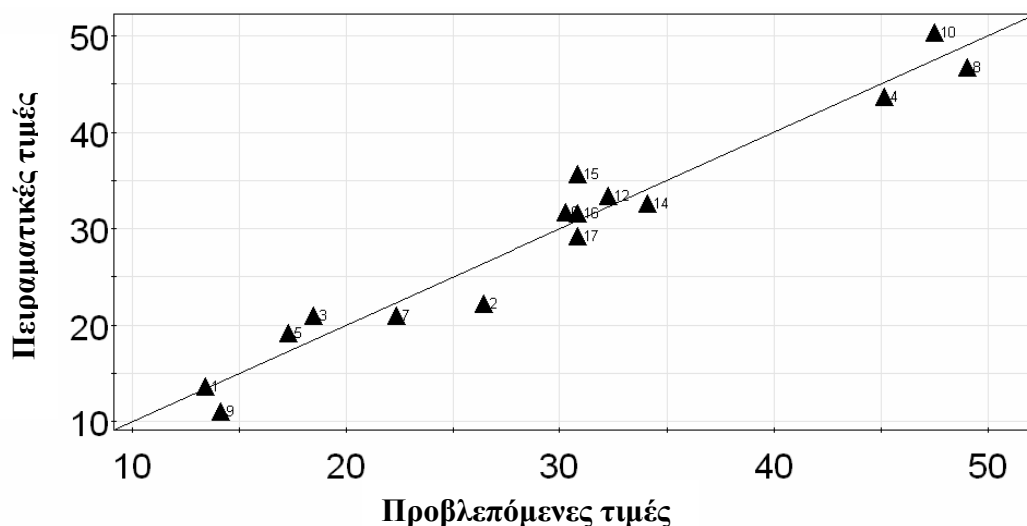
Ισχύει ότι $R^2=0.95$, $F_{0.95, 5, 11} = 3.20$ και $F_{0.95, 9, 2} = 19.4$

^a F-τεστ (παλινδρόμηση/υπόλοιπα)

^b F-τεστ (έλλειψη προσαρμογής /καθαρό σφάλμα)

Η μικρή τιμή του καθαρού σφάλματος, υποδεικνύει την καλή επαναληψιμότητα (η τιμή της οποίας εκτιμάται ως 0.93) των ληφθέντων δεδομένων. Η στατιστική σημαντικότητα της εξίσωσης (2) του μοντέλου επιβεβαιώνεται μέσω ενός στατιστικού ελέγχου F (F-τεστ). Η τιμή F της παλινδρόμησης (ίση με 41.99 σύμφωνα με τον **Πίνακα 7.15**) είναι μεγαλύτερη από την κρίσιμη τιμή F ($F_{0.95, 5, 11} = 3.20$), αποδεικνύοντας τη σημαντικότητα του μοντέλου, ενώ η τιμή F για την έλλειψη προσαρμογής (ίση με 0.99 σύμφωνα με τον **Πίνακα 7.15**) είναι μικρότερη από την κρίσιμη τιμή F ($F_{0.95, 9, 2} = 19.4$), αποδεικνύοντας την καλή προσαρμογή του μοντέλου.

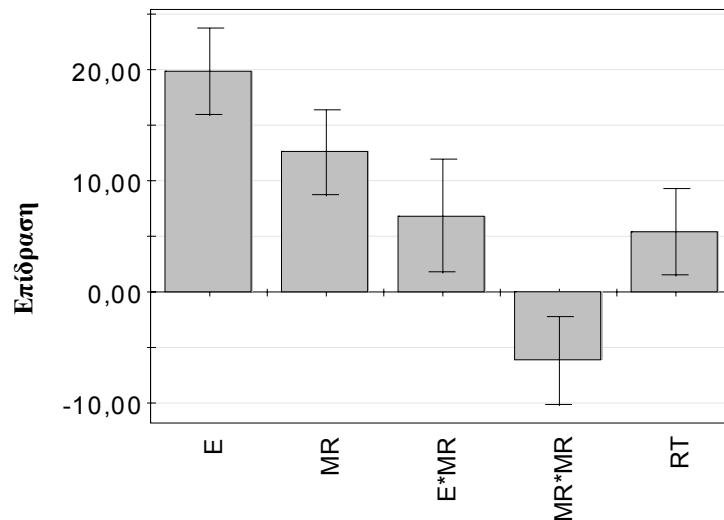
Επιπρόσθετα, μεταξύ των πειραματικών και προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών για την % απόδοση της αντίδρασης ακυλίωσης παρατηρείται ικανοποιητική συσχέτιση (**Σχήμα 7.15**).



Σχήμα 7.15 Διάγραμμα πειραματικών και προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών (MODDE 7.0, Umetrics AB, Umeå, Sweden). Το διάγραμμα δείχνει την καλή συσχέτιση των πειραματικών σημείων με τις προβλεπόμενες τιμές.

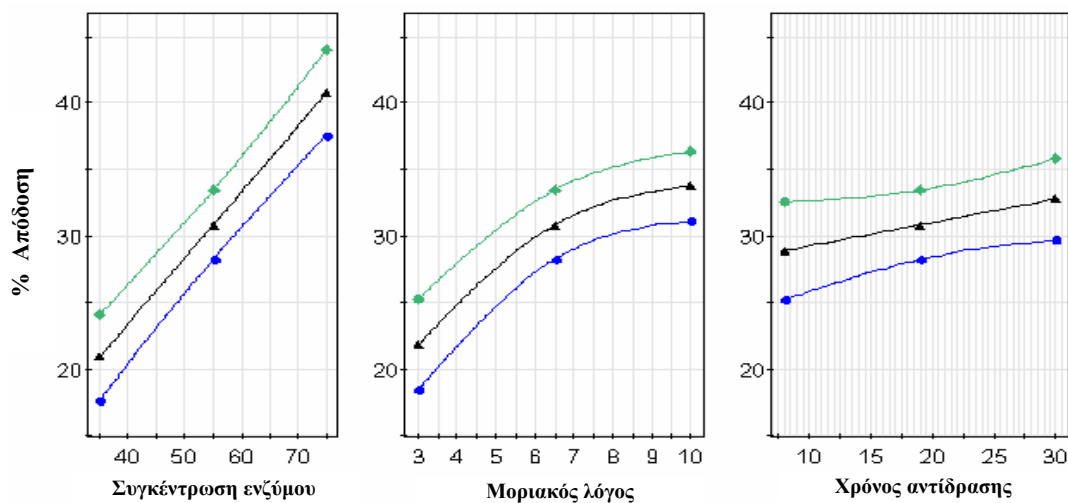
Σύμφωνα με τα παραπάνω, υποδεικνύεται πως εργαλεία, όπως η RSM, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και να αποδώσουν ικανοποιητικά τη σχέση της απόδοσης ακυλίωσης φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως η ναριγκίνη, με ποικίλες παραμέτρους.

Εφόσον το μοντέλο αποδεικνύεται ικανοποιητικό, στη συνέχεια αξιολογούνται οι συντελεστές των παραμέτρων, οι οποίοι υπολογίζονται από το μοντέλο. Όσον αφορά την επίδραση των υπό μελέτη παραμέτρων παρατηρείται από το διάγραμμα του **Σχήματος 7.16**, η θετική τιμή των επιδράσεων των παραμέτρων αυτών (19.86, 12.58 και 5.38 για την συγκέντρωση του ενζύμου, το μοριακό λόγο και το χρόνο της αντίδρασης, αντίστοιχα). Οι θετικές τιμές υποδεικνύουν πως με αύξηση των τιμών των τριών παραμέτρων αυξάνει επίσης και η % απόδοση της αντίδρασης ακυλίωσης της ναριγκίνης. Η τιμή δε κάθε επίδρασης δείχνει πόσο σημαντική είναι η αντίστοιχη παράμετρος, και έτσι με βάση το **Σχήμα 7.16** προκύπτει ότι η συγκέντρωση του ενζύμου ασκεί τη μεγαλύτερη επίδραση και ο χρόνος της αντίδρασης τη μικρότερη επίδραση στην % απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης.



Σχήμα 7.16 Διάγραμμα επίδρασης των υπό μελέτη παραμέτρων στην % απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης ακυλίωσης της ναριγκίνης (MODDE 7.0, Umetrics AB, Umeå, Sweden).

Η επίδραση κάθε μίας παραμέτρου στην % απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης ακυλίωσης περιγράφεται αναλυτικότερα από τα διαγράμματα του **Σχήματος 7.17**.

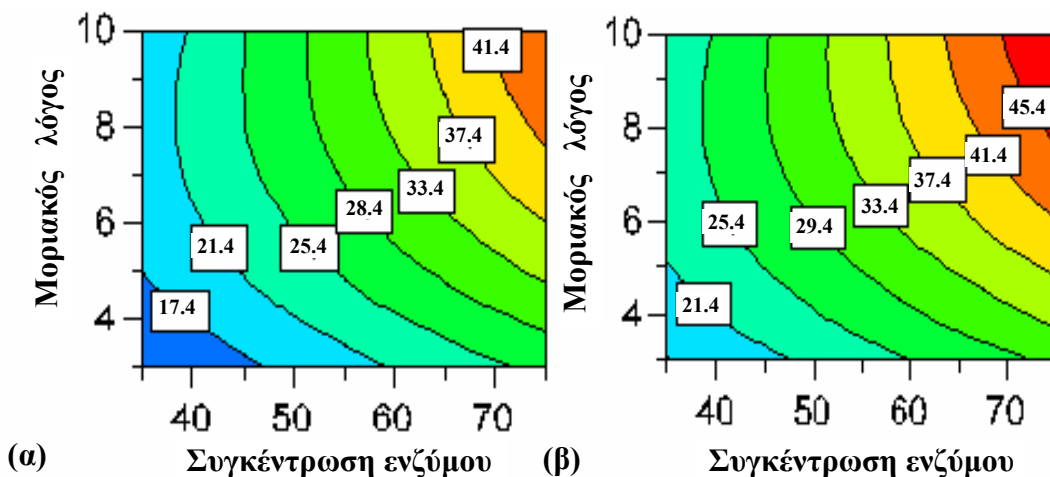


Σχήμα 7.17 Επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου, του μοριακού λόγου των υποστρωμάτων και του χρόνου της αντίδρασης στην % απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης ακυλίωσης της ναριγκίνης (MODDE 7.0, Umetrics AB, Umeå, Sweden). Με μαύρο χρώμα απεικονίζονται οι προβλεπόμενες τιμές ενώ με πράσινο και μπλε οι τιμές απόδοσης στο ανώτερο και κατώτερο αντίστοιχα όριο του διαστήματος εμπιστοσύνης (επίπεδο εμπιστοσύνης 95%).

Με βάση τα διαγράμματα αυτά, αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου από 35 σε 75 mg/mL οδηγεί σε διπλασιασμό της απόδοσης. Η θετική επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου στην απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης μπορεί να αποδοθεί στην ύπαρξη

περισσότερων διαθέσιμων ενεργών κέντρων για τη μετατροπή της ναριγκίνης [Twu *et al.*, 2005, Zhang *et al.*, 2008a]. Η αύξηση του μοριακού λόγου των υποστρωμάτων από 3 σε 7 αυξάνει την απόδοση κατά 1.5 φορές. Η θετική επίδραση του μοριακού λόγου μπορεί να εξηγηθεί με βάση τη μετατόπιση της θερμοδυναμικής ισορροπίας της αντίδρασης προς την κατεύθυνση της σύνθεσης εξαιτίας της περίσσειας του ακυλο-δότη [Coulon *et al.*, 1996, Kontogianni *et al.*, 2001, Passicos *et al.*, 2004, Mellou *et al.*, 2005]. Ωστόσο, περαιτέρω αύξηση του μοριακού λόγου (από 7 έως 10) οδηγεί σε μικρή μόνο αύξηση της απόδοσης. Πιθανά η χρήση μεγάλων ποσοτήτων βουτυρικού βινυλ-εστέρα να μην επιδρά σημαντικά στην απόδοση εξαιτίας του κορεσμού των ενεργών κέντρων των ενζυμικών μορίων.

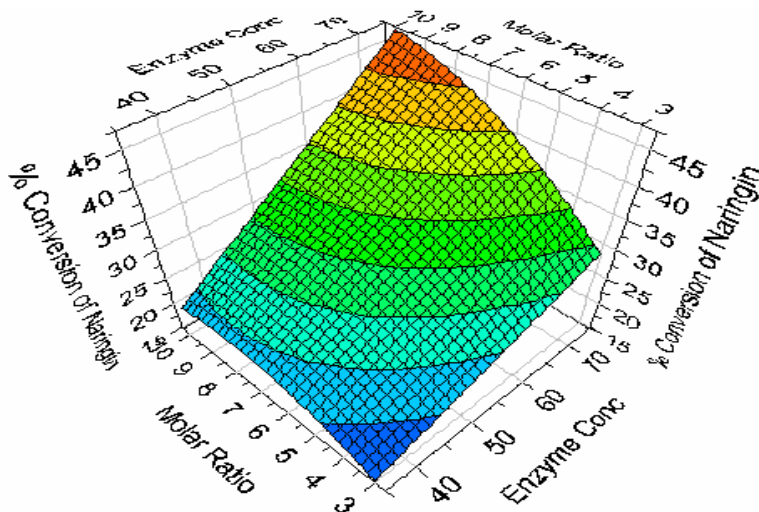
Με βάση το **Σχήμα 7.17** μεταξύ των τριών παραμέτρων όντως η αύξηση του χρόνου της αντίδρασης φαίνεται να οδηγεί στη μικρότερη, συγκριτικά με τις άλλες παραμέτρους, αύξηση της % απόδοσης της αντίδρασης. Η μικρή θετική επίδραση της παραμέτρου αυτής ως συνάρτηση των άλλων δύο παραμέτρων μπορεί να γίνει αντιληπτή μέσω διαγραμμάτων ισοϋψών (**Σχήμα 7.18**).



Σχήμα 7.18 Διαγράμματα ισοϋψών για την % απόδοση της αντίδρασης ακυλίωσης της ναριγκίνης συναρτήσει της συγκέντρωσης του ενζύμου και του μοριακού λόγου του ακυλο-δότη προς τη ναριγκίνη μετά από χρόνο αντίδρασης **(α)** 9 h και **(β)** 30 h στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ (MODDE 7.0, Umetrics AB, Umeå, Sweden). Οι αριθμοί εντός του διαγράμματος ισοϋψών αντιστοιχούν στην % απόδοση της αντίδρασης.

Σύμφωνα με το **Σχήμα 7.18**, ανεξάρτητα του συνδυασμού των τιμών της συγκέντρωσης του ενζύμου και του μοριακού λόγου, η % απόδοση της ενζυμικής ακυλίωσης παρουσιάζει αύξηση έως μόλις 1.2 φορές, με αύξηση του χρόνου της αντίδρασης από 9 σε 30 h. Η απόδοση της αντίδρασης φαίνεται να επηρεάζεται ωστόσο σημαντικά από την

αλληλεπίδραση μεταξύ της συγκέντρωσης του ενζύμου και του μοριακού λόγου των υποστρωμάτων (Σχήμα 7.19).



Σχήμα 7.19 Διάγραμμα ισοϋψών για την % απόδοση της ακυλίωσης της ναριγκίνης από τον βινυλ-εστέρα του βουτυρικού οξέος ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του ενζύμου και του μοριακού λόγου των υποστρωμάτων μετά από 30 h αντίδρασης στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄. (MODDE 7.0, Umetrics AB, Umeå, Sweden).

Σύμφωνα με το τρισδιάστατο διάγραμμα ισοϋψών, η επίδραση της αύξησης του μοριακού λόγου του βουτυρικού βινυλ-εστέρα προς τη ναριγκίνη στην απόδοση της αντίδρασης είναι περισσότερο σημαντική όταν χρησιμοποιείται μεγαλύτερη συγκέντρωση ενζύμου. Με βάση τον καταλυτικό μηχανισμό της λιπάσης, ο σχηματισμός του ακυλο-ενζύμου αποτελεί καθοριστικό στάδιο της αντίδρασης ακυλίωσης και έτσι η ύπαρξη περισσότερων ενζυμικών μορίων και περίσσειας ακυλο-δότη αναμένεται να επιδρά σημαντικά και θετικά στην έκβαση της ενζυμικής αντίδρασης [Garcia-Alles & Goto, 1998, Erbeltinger *et al.*, 2000, Habulin & Knez, 2009].

Με βάση λοιπόν τον πρώτο πειραματικό σχεδιασμό, η μέγιστη απόδοση που επιτυγχάνεται πλησιάζει το 50%, ενώ παράγεται σχεδόν αποκλειστικά το μονοακυλωμένο λιπόφιλο παράγωγο της ναριγκίνης (το ποσοστό του παραγόμενου μονοεστέρα στο μίγμα των προϊόντων είναι υψηλότερο από 93%) (Πίνακας 7.14). Η μέγιστη απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης ακυλίωσης της ναριγκίνης στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ στους 60°C, επιτυγχάνεται μετά από 30 h αντίδρασης, όταν η συγκέντρωση του ενζύμου και ο μοριακός λόγος των υποστρωμάτων ισούνται με 75 mg/mL και 10, αντίστοιχα.

7.5.2 Δεύτερος πειραματικός σχεδιασμός

Με σκοπό την περαιτέρω βελτίωση της απόδοσης της βιοκαταλυτικής διεργασίας, και χωρίς να ληφθεί υπόψη η σύσταση του μίγματος των ακυλιωμένων παραγώγων της ναριγκίνης, πραγματοποιήθηκε και δεύτερος πειραματικός σχεδιασμός. Στο νέο αυτό πειραματικό σχεδιασμό επιλέχθηκαν διαφορετικές παράμετροι (συγκέντρωση ναριγκίνης, N) και διαφορετικό εύρος τιμών του μοριακού λόγου (MR) και του χρόνου της αντίδρασης (RT), σε σχέση με τον πρώτο πειραματικό σχεδιασμό (**Πίνακας 7.16**). Με βάση ωστόσο, τα αποτελέσματα του πρώτου πειραματικού σχεδιασμού, χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση ενζύμου ίση με 80 mg/mL.

Πίνακας 7.16 Δεύτερος πειραματικός σχεδιασμός για τη μελέτη της επίδρασης του μοριακού λόγου του βουτυρικού βινυλεστέρα προς τη ναριγκίνη (MR), της συγκέντρωσης της ναριγκίνης (N) και του χρόνου της αντίδρασης (RT) στην % απόδοση ακυλίωσης της ναριγκίνης και το ποσοστό του παραγόμενου μονοεστέρα, που προσδιορίζονται πειραματικά ή προβλέπονται από το μοντέλο.

A/A	MR [*]	RT (h) [*]	N (mM) [*]	Παρατηρούμενη απόδοση (%)	Προβλεπόμενη απόδοση (%)	% mol μονοεστέρα	Προβλεπόμενες τιμές % mol μονοεστέρα
1	7 (-1)	30 (-1)	50 (-1)	41.2	39.5	95.6	99.2
2	15 (+1)	30 (-1)	50 (-1)	59.7	59.0	90.6	90.2
3	7 (-1)	100 (+1)	50 (-1)	51.0	52.8	89.8	88.3
4	15 (+1)	100 (+1)	50 (-1)	87.9	87.1	76.9	77.4
5	7 (-1)	30 (-1)	90 (+1)	53.5	54.0	88.6	88.3
6	15 (+1)	30 (-1)	90 (+1)	50.0	48.0	85.8	87.7
7	7 (-1)	100 (+1)	90 (+1)	58.5	59.0	85.1	86.1
8	15 (+1)	100 (+1)	90 (+1)	66.4	67.9	78.0	76.6
9	4.3 (-1.68)	65 (0)	70 (0)	49.0	48.3	93.7	92.8
10	17.7 (+1.68)	65 (0)	70 (0)	71.1	72.2	79.6	79.8
11	11 (0)	6 (-1.68)	70 (0)	44.4	46.6	94.1	91.8
12	11 (0)	124 (+1.68)	70 (0)	76.3	74.4	76.5	77.0
13	11 (0)	65 (0)	36.4 (-1.68)	57.4	58.1	90.6	90.0
14	11 (0)	65 (0)	103.6 (+1.68)	54.6	54.2	85.9	85.8
15	11 (0)	65 (0)	70 (0)	65.7	68.0	82.5	82.4
16	11 (0)	65 (0)	70 (0)	69.1	68.0	81.9	82.4
17	11 (0)	65 (0)	70 (0)	69.2	68.0	82.5	82.4

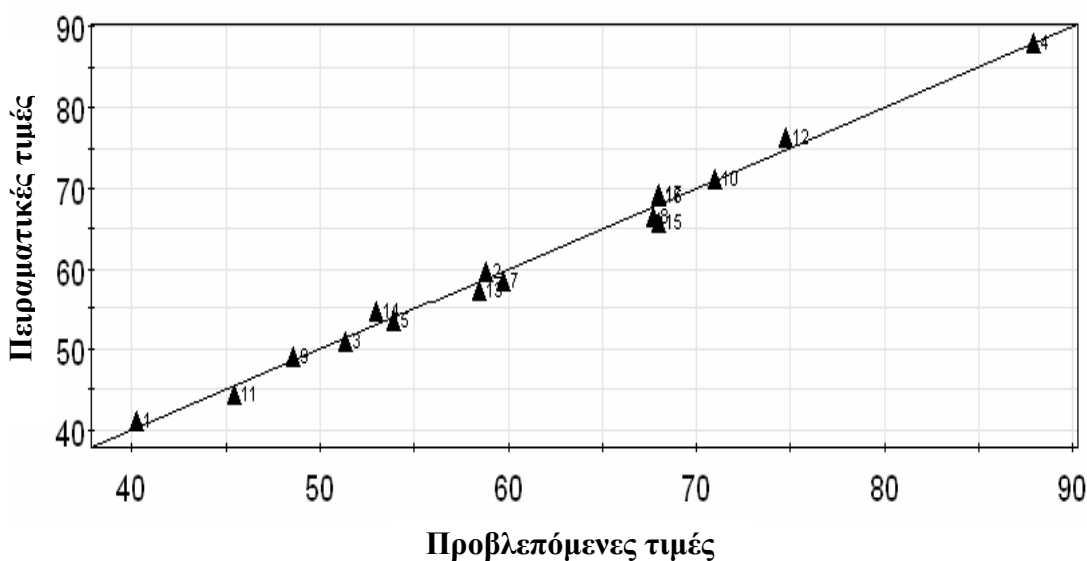
^{*} Πραγματικές τιμές και κωδικοποιημένα επίπεδα (σε παρένθεση) των παραμέτρων της αντίδρασης.

Το πολυωνυμικό μοντέλο το οποίο αποδίδει την % απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης ακυλίωσης της ναριγκίνης (απόκριση y) ως συνάρτηση των μελετούμενων παραμέτρων του δεύτερου πειραματικού σχεδιασμού, μετά τον προσδιορισμό των

συντελεστών της Εξίσωσης 1 (§ 5.2.4.5) μέσω πολλαπλής ανάλυσης γραμμικής παλινδρόμησης (Multiple Linear Regression analysis, MLR) είναι το ακόλουθο:

$$y = -99.70 + 4.90 MR + 0.43 RT + 2.47N - 0.17 MR^2 - 0.0022 RT^2 - 0.010 N^2 + 0.027 MR \times RT - 0.080 MR \times N - 0.0030 RT \times N \quad (3)$$

Οι συντελεστές της εξίσωσης αυτής προσδιορίστηκαν με επίπεδο εμπιστοσύνης 95% και τιμή- $p < 0.05$. Ο συντελεστής προσδιορισμού R^2 βρέθηκε ίσος με 0.99, ενώ το ποσοστό μεταβλητότητας της απόδοσης το οποίο προβλέπεται από το μοντέλο (Q^2) ισούται με 0.91. Καθώς οι τιμές των R^2 και Q^2 βρίσκονται πολύ κοντά στη μονάδα αποδεικνύεται η αξία και η καλή ικανότητα πρόβλεψης του μοντέλου. Επιπρόσθετα, η προσδιοριζόμενη επαναληψιμότητα για τον πειραματικό σχεδιασμό είναι υψηλή και ίση με 0.97, όπως επίσης καλός είναι και ο συσχετισμός πειραματικών και προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών όπως φαίνεται και στο **Σχήμα 7.20**.



Σχήμα 7.20 Διάγραμμα πειραματικών και προβλεπόμενων από το μοντέλο τιμών (MODDE 7.0, Umetrics AB, Umeå, Sweden). Η ιδιαίτερα μικρή απόσταση των σημείων από την ευθεία υποδηλώνει την πολύ καλή συσχέτιση των πειραματικών με τις προβλεπόμενες τιμές.

Η ανάλυση διακύμανσης, ANOVA (Παράρτημα Δ) για την % απόδοση ακυλίωσης της ναριγκίνης για αυτόν τον πειραματικό σχεδιασμό δίνεται στον **Πίνακα 7.17**.

Πίνακας 7.17 Ανάλυση διακύμανσης (ANOVA) για τον δεύτερο πειραματικό σχεδιασμό.

Πηγή μεταβλητότητας	Άθροισμα τετραγώνων	Βαθμοί ελευθερίας	Μέσο τετράγωνο	F-τεστ
Παλινδρόμηση (regression)	2353.84	9	261.538	56.80 ^a
Υπόλοιπα (residuals)	32.2309	7	4.60441	
Έλλειψη προσαρμογής (lack of fit)	24.2909	5	4.85818	1.22 ^b
Καθαρό σφάλμα (pure error)	7.94	2	3.97	
Ολική (total)	2386.07	16	149.129	

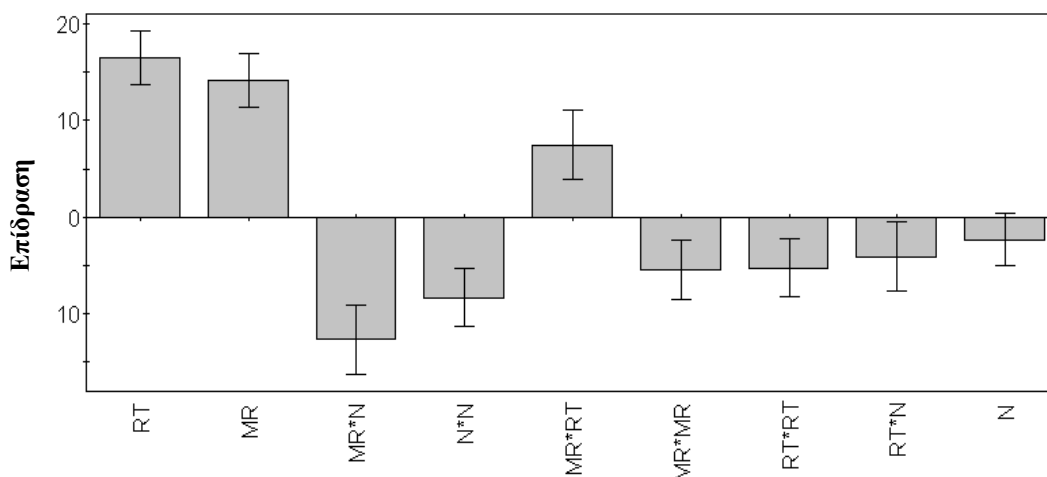
Ισχύει ότι $R^2=0.95$, $F_{0.95, 9, 7} = 3.68$ και $F_{0.95, 5, 2} = 19.3$

^a F-τεστ (παλινδρόμηση/υπόλοιπα)

^b F-τεστ (έλλειψη προσαρμογής /καθαρό σφάλμα)

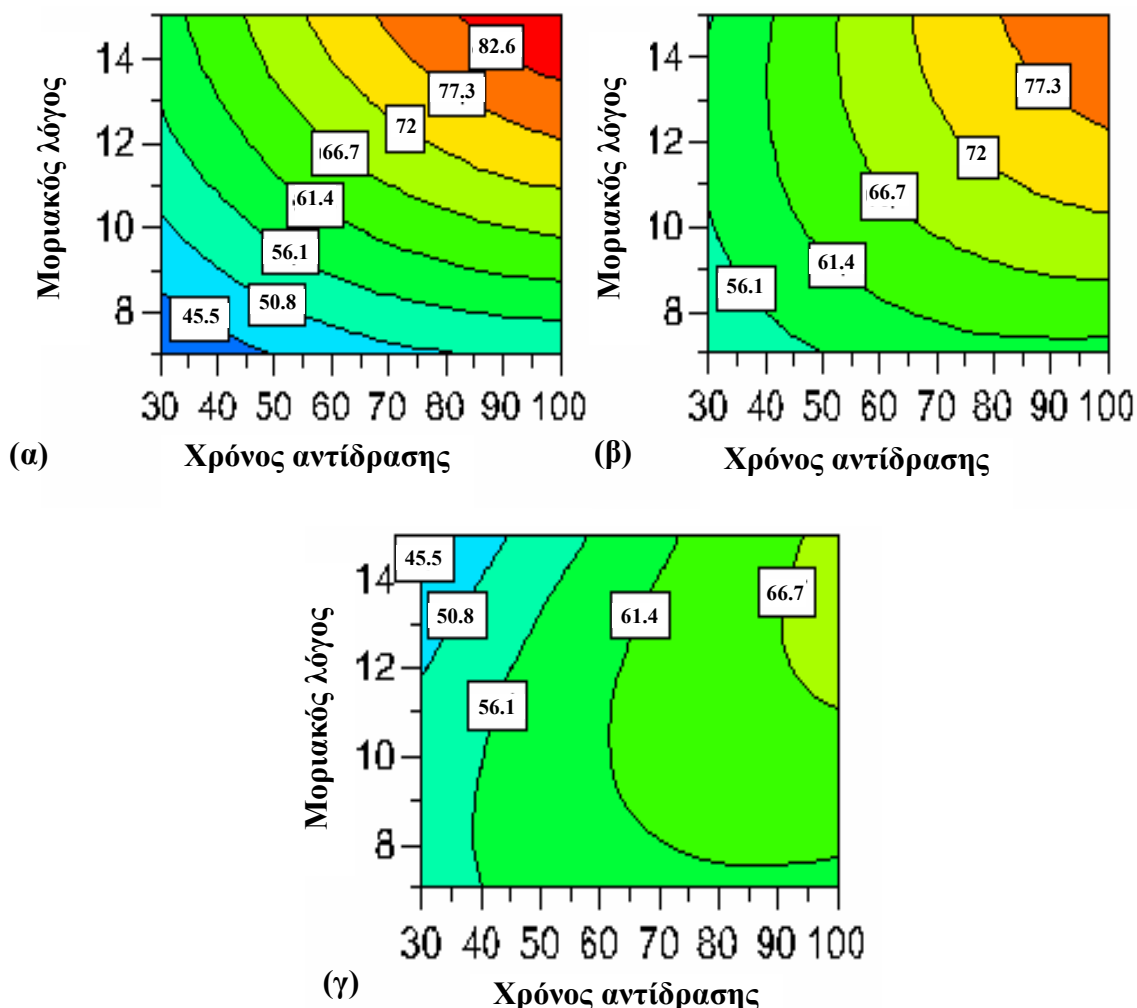
Η σημαντικότητα της εξίσωσης (3) του μοντέλου επιβεβαιώνεται μέσω του στατιστικού ελέγχου F (F-τεστ). Η τιμή F της παλινδρόμησης (ίση με 56.80 σύμφωνα με τον **Πίνακα 7.17**) είναι μεγαλύτερη από την κρίσιμη τιμή F ($F_{0.95, 5, 11} = 3.68$), αποδεικνύοντας τη σημαντικότητα του μοντέλου, ενώ η τιμή F για την έλλειψη προσαρμογής (ίση με 1.22 σύμφωνα με τον **Πίνακα 7.17**) είναι μικρότερη από την κρίσιμη τιμή F ($F_{0.95, 9, 2} = 19.3$), αποδεικνύοντας και για τον δεύτερο πειραματικό σχεδιασμό την καλή προσαρμογή του μοντέλου.

Όπως και για τον πρώτο πειραματικό σχεδιασμό, ο μοριακός λόγος των υποστρωμάτων και ο χρόνος της αντίδρασης είχαν θετική επίδραση στην % απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης (τιμή επιδράσεων ίση με 14.20 και 16.55, αντίστοιχα), ενώ η συγκέντρωση της ναριγκίνης είχε αρνητική επίδραση (**Σχήμα 7.21**).



Σχήμα 7.21 Διάγραμμα επίδρασης των υπό μελέτη παραμέτρων στην % απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης ακυλίωσης της ναριγκίνης (MODDE 7.0, Umetrics AB, Umeå, Sweden).

Τα διαγράμματα ισοϋψών του **Σχήματος 7.22** αποδίδουν την % απόδοση ακυλίωσης της ναριγκίνης ως συνάρτηση του μοριακού λόγου των υποστρωμάτων και του χρόνου της αντίδρασης για τρεις χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις του φλαβονοειδούς.



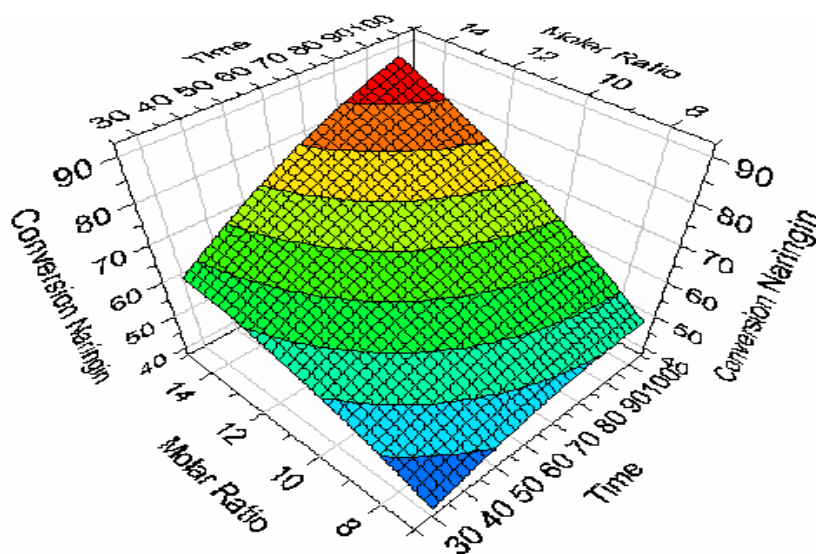
Σχήμα 7.22 Διαγράμματα ισοϋψών για την % απόδοση της αντίδρασης ακυλίωσης της ναριγκίνης συναρτήσει του χρόνου της αντίδρασης και του μοριακού λόγου του ακυλο-δότη προς τη ναριγκίνη σε συγκεντρώσεις αυτής **(α)** 50 mM, **(β)** 70 mM και **(γ)** 90 mM (MODDE 7.0, Umetrics AB, Umeå, Sweden). Οι τιμές εντός του διαγράμματος ισοϋψών αντιστοιχούν στην % απόδοση της αντίδρασης.

Σύμφωνα με τα διαγράμματα ισοϋψών, η αύξηση του μοριακού λόγου και του χρόνου συμβάλλει στην αύξηση της απόδοσης, ανεξάρτητα της χρησιμοποιούμενης συγκέντρωσης ναριγκίνης. Η αύξηση της συγκέντρωσης της ναριγκίνης από 50 σε 70 mM οδηγεί σε αύξηση της % απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης για συγκεκριμένες, ωστόσο, τιμές μοριακού λόγου. Περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης (έως 90 mM) επιδρά αρνητικά στην απόδοση της αντίδρασης (**Σχήμα 7.22γ**). Η ανασταλτική δράση των υψηλών συγκεντρώσεων του φλαβονοειδούς μπορεί να αποδοθεί σε μία πιθανή αύξηση του ιξώδους ή/και σε αλλαγή της

πολικότητας του μέσου της αντίδρασης, τα οποία μπορούν να επηρεάσουν την διαμόρφωση της λιπάσης και να οδηγήσουν σε φαινόμενα περιορισμών διάχυσης ή και κατανομής του υποστρώματος στα μέσα αυτά [Lozano *et al.*, 2004a,b, Enaud *et al.*, 2004, Compton *et al.*, 2000].

Ωστόσο, παρά την αρνητική επίδραση της συγκέντρωσης της ναριγκίνης στην απόδοση της αντίδρασης, παρατηρήθηκε πως σε υψηλές συγκεντρώσεις του φλαβονοειδούς η ποσότητα του παραγόμενου μονοεστέρα ήταν ιδιαίτερα υψηλή. Πιο συγκεκριμένα, όταν η συγκέντρωση της ναριγκίνης ήταν 100 mM, η παραγόμενη ποσότητα μονοεστέρα έφτασε τα 31.6 g/L, ποσότητα παρόμοια με αυτή που έχει αναφερθεί στην περίπτωση της 2-μέθυλ-2-βουτανόλης υπό μειωμένη πίεση [Passicos *et al.*, 2004] και κατά 8 φορές αυξημένη σε σχέση με την τριτοταγή βουτανόλη ή την ακετόνη [Kontogianni *et al.*, 2001, 2003].

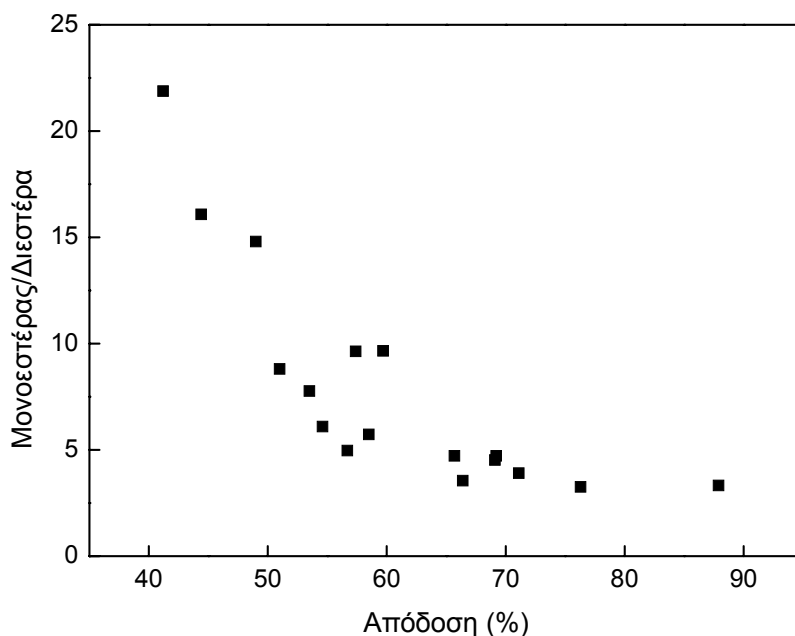
Μετά και τον δεύτερο πειραματικό σχεδιασμό η βέλτιστη % απόδοση ακυλίωσης της ναριγκίνης ισούται με 87%, απόδοση σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με την αντίστοιχη του πρώτου πειραματικού σχεδιασμού. Η μέγιστη αυτή τιμή απόδοσης επιτυγχάνεται μετά από 100 h αντίδρασης, για συγκέντρωση ναριγκίνης ίση με 47 mM και μοριακό λόγο υποστρωμάτων 15 (Σχήμα 7.23).



Σχήμα 7.23 Διάγραμμα ισοϋψών για την απόδοση της ακυλίωσης της ναριγκίνης από τον βινυλ-εστέρα του βουτυρικού οξέος ως συνάρτηση του μοριακού λόγου των υποστρωμάτων και του χρόνου της αντίδρασης στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ και σε συγκέντρωση ναριγκίνης ίση με 50 mM.

Υπό αυτές τις βέλτιστες συνθήκες, το ποσοστό του παραγόμενου μονοεστέρα στο μίγμα των προϊόντων ισούται με 78%. Ωστόσο, σύμφωνα με τον πρώτο πειραματικό σχεδιασμό, το ποσοστό του παραγόμενου μονοεστέρα στο μίγμα των προϊόντων ήταν 93%

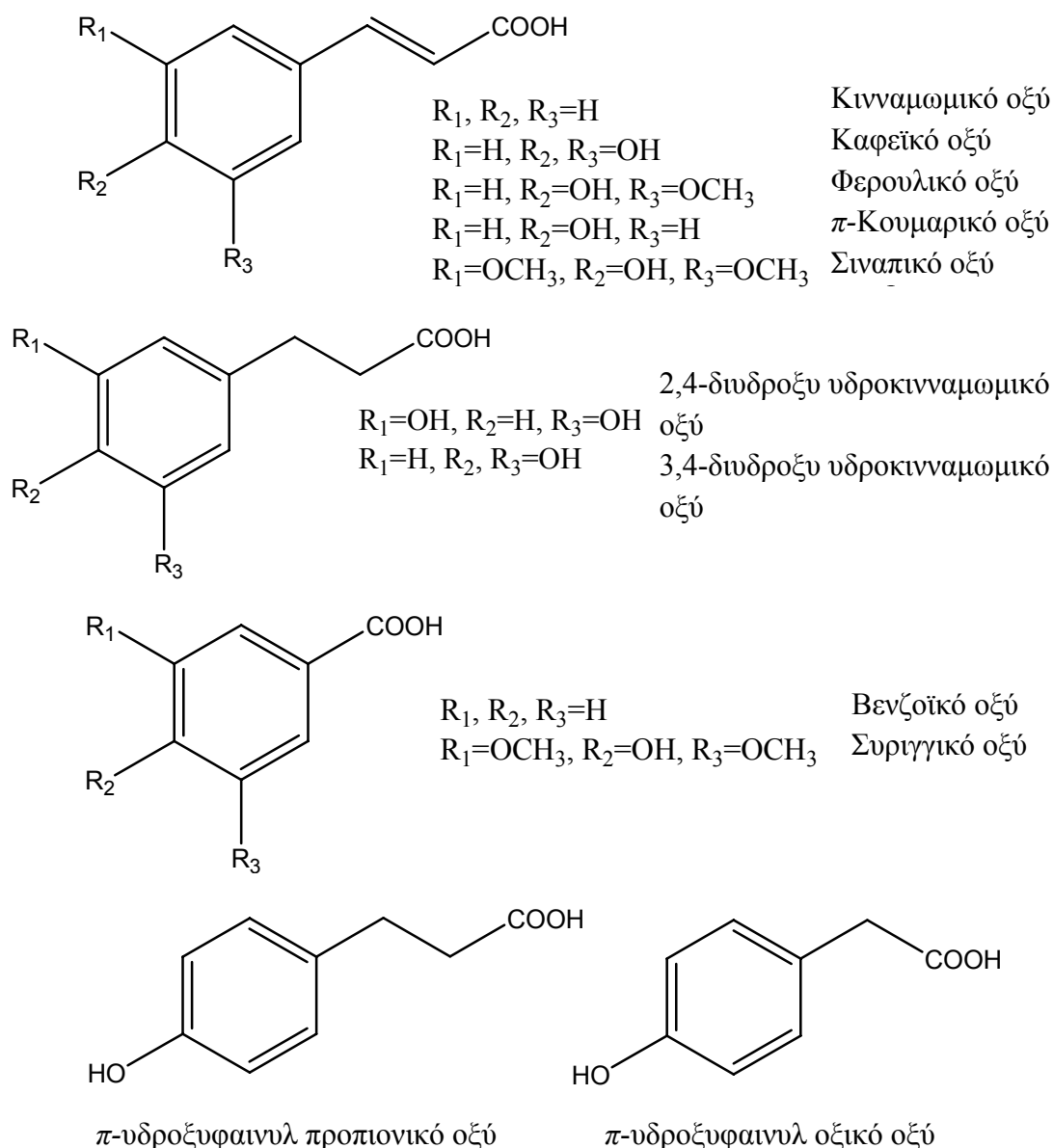
όταν η απόδοση ήταν ίση με 50% και ακόμα υψηλότερο (95.6%) ήταν όταν η απόδοση ήταν ίση με 39.5 % (**Πίνακας 7.16**). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν πως υπάρχει κάποια συσχέτιση της τοπο-εκλεκτικότητας με την απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης. Η γραφική απεικόνιση των δεδομένων του **Πίνακα 7.16** αποδεικνύει πως η σχέση τόπο-εκλεκτικότητας-απόδοσης αποδίδεται μέσω μίας υπερβολής, και άρα οι δύο αυτές αποκρίσεις εμφανίζουν αντίστροφη συσχέτιση (**Σχήμα 7.24**).



Σχήμα 7.24 Σχέση μεταξύ της τόπο-εκλεκτικότητας (όπως αυτή εκφράζεται με τον λόγο του παραγόμενου μονοεστέρα προς τον διεστέρα) και της % απόδοσης της ενζυμικής αντίδρασης ακυλίωσης της ναριγκίνης, η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ στους 60°C. Τα δεδομένα του γραφήματος προέρχονται από τα αποτελέσματα του δεύτερου πειραματικού σχεδιασμού.

7.6 Μελέτη εστεροποίησης φαινολικών οξέων σε ιοντικά υγρά

Τα φαινολικά οξέα αποτελούν μαζί με τα φλαβονοειδή τα κύρια διαιτητικά πολυφαινολικά συστατικά [Rice-Evans *et al.*, 1997, Erlund, 2004]. Το ενδιαφέρον για τις ενώσεις αυτές προέρχεται από τις σημαντικές βιολογικές τους δράσεις, όπως αντιοξειδωτική, αντιφλεγμονώδη, αντιαλλεργική, αντιμικροβιακή, αντι-ιική, αντικαρκινική κ.α. [Graf, 1992, Castelluccio *et al.*, 1996, Rice-Evans *et al.*, 1996, Natella *et al.*, 1999, Silva *et al.*, 2000]. Τα φαινολικά οξέα διακρίνονται σε δύο κύριες κατηγορίες, τα παράγωγα του κινναμωμικού και του βενζοϊκού οξέος (**Εικόνα 7.7**).



Εικόνα 7.7 Δομές φαινολικών οξέων.

Η τροποποίηση των φαινολικών οξέων μέσω αντιδράσεων εστεροποίησης με αλκοόλες μπορεί να οδηγήσει στη σύνθεση λιπόφιλων παραγώγων, τα οποία αφενός θα μπορούν να προσεγγίσουν στα σημεία όπου λαμβάνουν χώρα οξειδωτικές διεργασίες [Schuler, 1990, Chalas *et al.*, 2001, Figueroa-Espinoza & Villeneuve, 2005] και αφετέρου θα εμφανίζουν αυξημένη διαλυτότητα σε λιπιδικά σκευάσματα όπως αυτά περιέχονται σε διατροφικά, καλλυντικά και φαρμακευτικά σκευάσματα [Figueroa-Espinoza & Villeneuve, 2005].

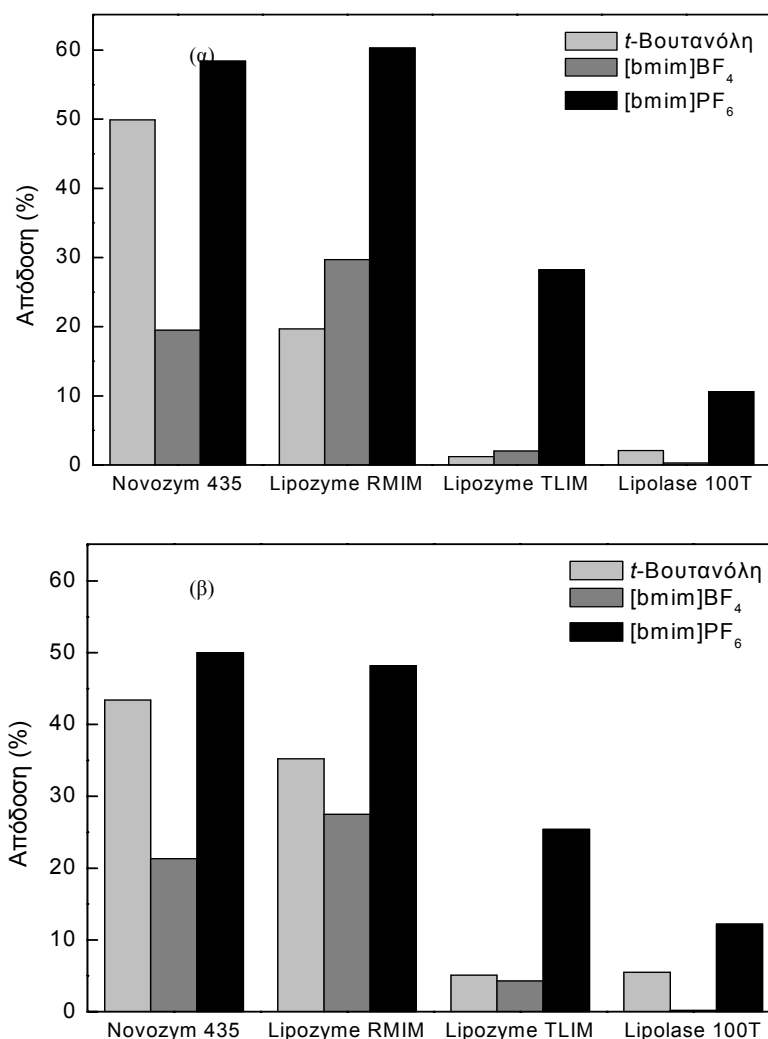
Το ενδιαφέρον για τη μελέτη της δυνατότητας εστεροποίησης των φυσικών αυτών αντιοξειδωτικών σε ιοντικά υγρά πηγάζει από το γεγονός ότι η πλειοψηφία των αντιδράσεων

ενζυμικής τροποποίησής τους (και κυρίως των παραγώγων του κινναμωμικού οξέος) σε οργανικούς διαλύτες [Buisman *et al.*, 1998, Stamatis *et al.*, 1999a, Compton *et al.*, 2000, Cassani *et al.*, 2007] ή συστήματα ελεύθερα διαλυτών [Guyot *et al.*, 1997, Vosmann *et al.*, 2006, Weitkamp *et al.*, 2006] οδήγησε σε χαμηλές αποδόσεις ή/και ταχύτητες. Στις περιπτώσεις δε εκείνες όπου παρατηρήθηκαν υψηλές αποδόσεις, οι αντιδράσεις εστεροποίησης πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση συγκεκριμένων (συνήθως μικρών) αλκοολών, ενεργοποιημένων βινυλ-εστέρων των φαινολικών οξέων ή εξειδικευμένων ενζύμων (όπως η εστεράση του φερουλικού οξέος) [Gao *et al.*, 2000, Armesto *et al.*, 2003, Topakas *et al.*, 2003, Lee *et al.*, 2006, Vafiadi *et al.*, 2008].

7.6.1 Μελέτη εστεροποίησης φαινολικών οξέων με τη χρήση ακινητοποιημένων λιπασών διαφορετικής προέλευσης

Προκειμένου να διαπιστωθεί η δυνατότητα εστεροποίησης φαινολικών οξέων με τη χρήση ακινητοποιημένων λιπασών διαφορετικής προέλευσης, επιλέχθηκαν οι λιπάσες Novozym 435 (λιπάση B από *Candida antarctica*), Lipozyme RMIM (λιπάση από *Rhizomucor miehei*), Lipozyme TLIM και Lipolase 100T (λιπάσες από *Thermomyces lanuginosa*). Οι λιπάσες αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί σε πλήθος βιοκαταλυτικών αντιδράσεων, δέχονται ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων και επιδεικνύουν διαφορετική εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα [Norin, 1994, Pleiss *et al.*, 1998] και διαφορετικά καταλυτικά χαρακτηριστικά ανάλογα με το μέσο της αντίδρασης [Turner & Vulfson, 2000, Salis *et al.*, 2003].

Στο **Σχήμα 7.25** απεικονίζεται η ικανότητα των προαναφερόμενων ενζύμων να καταλύουν την αντίδρασης εστεροποίησης του κινναμωμικού οξέος από την βουτανόλη ή την οκτανόλη. Ως μέσα πραγματοποίησης των ενζυμικών αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκαν τα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆, καθώς και ένας ευρέως χρησιμοποιούμενος οργανικός διαλύτης η τριτοταγής-βουτανόλη [Stamatis *et al.*, 1999a, Compton *et al.*, 2000, Gao *et al.*, 2000, Stevenson *et al.*, 2006].

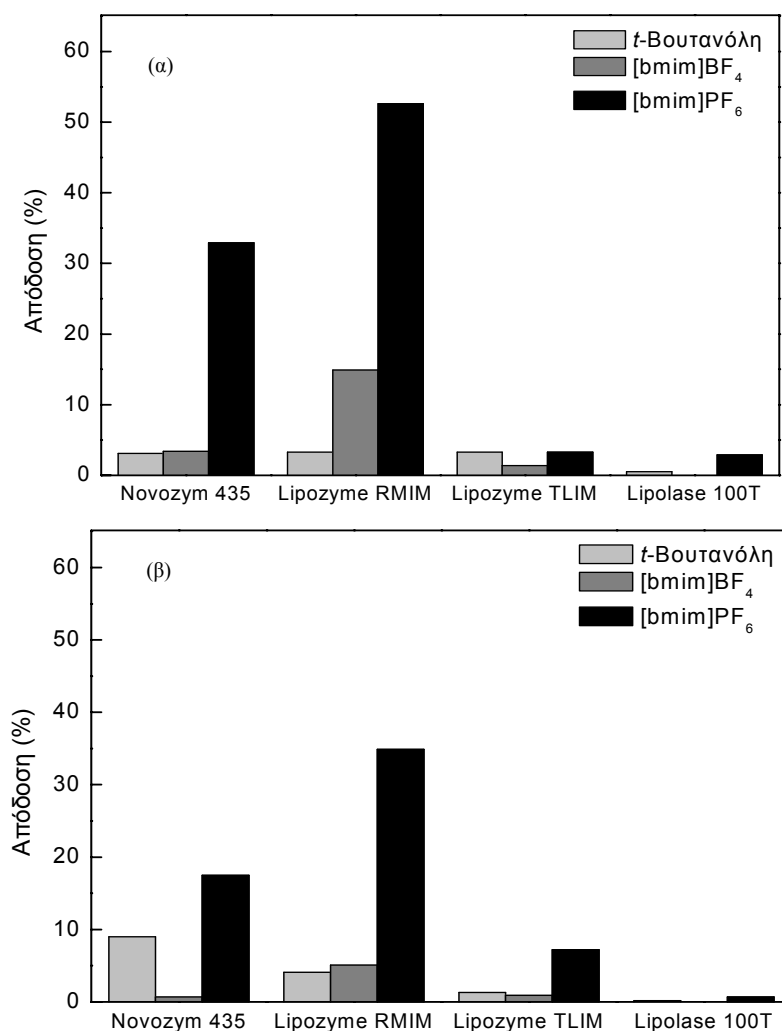


Σχήμα 7.25 Μελέτη της δυνατότητας εστεροποίησης του κινναμωμικού οξέος (50 mM) από (α) την βουτανόλη και (β) την οκτανόλη, η οποία καταλύεται από διάφορες ακινητοποιημένες λιπάσες στην τριτοταγή βουτανόλη και τα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ μετά από 72 h στους 50°C και 60°C, αντίστοιχα. Τα υποστρώματα χρησιμοποιούνται σε ισομοριακές ποσότητες.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του **Σχήματος 7.25** φαίνεται πως όλες οι υπό μελέτη λιπάσες είναι ικανές να καταλύσουν την εστεροποίηση του κινναμωμικού οξέος, τόσο με την βουτανόλη όσο και με την οκτανόλη. Η αποτελεσματικότητα, ωστόσο, των λιπασών να καταλύουν τις αντιδράσεις αυτές διαφοροποιείται ανάλογα με την προέλευσή τους. Ανεξάρτητα της χρησιμοποιούμενης αλκοόλης, οι λιπάσες Novozym 435 και Lipozyme RMIM οδηγούν σε παρόμοιες τιμές αποδόσεων, οι οποίες είναι έως και 3 φορές υψηλότερες συγκριτικά με εκείνες των αντιδράσεων που καταλύονται από τις λιπάσες Lipozyme TLIM και Lipolase 100T.

Αυτό όμως που είναι ιδιαίτερα εντυπωσιακό είναι πως όλες οι χρησιμοποιούμενες λιπάσες καταλύουν την εστεροποίηση του κινναμωμικού οξέος με σημαντικά υψηλότερες αποδόσεις στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆, συγκριτικά με τον οργανικό διαλύτη. Η ενζυμική αντίδραση είναι επίσης εφικτή και στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄, ωστόσο στην περίπτωση αυτή παρατηρούνται χαμηλότερες αποδόσεις σε σχέση με τα άλλα δύο υπό μελέτη μέσα.

Καθώς η εστεροποίηση του κινναμωμικού οξέος είναι εφικτή και μάλιστα ιδιαίτερα ικανοποιητική στο ιοντικό υγρό, μελετήθηκε στη συνέχεια η δυνατότητα τροποποίησης του φερουλικού οξέος, ενός παραγώγου του κινναμωμικού οξέος, για το οποίο έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά χαμηλές αποδόσεις εστεροποίησης σε οργανικούς διαλύτες. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα του **Σχήματος 7.26**.



Σχήμα 7.26 Μελέτη της δυνατότητας εστεροποίησης του φερουλικού οξέος (50 mM) από **(α)** την βουτανόλη και **(β)** την οκτανόλη, η οποία καταλύεται από διάφορες ακινητοποιημένες λιπάσες στην τριτοταγή βουτανόλη, και τα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ μετά από 72 h στους 50°C και 60°C, αντίστοιχα. Τα υποστρώματα χρησιμοποιούνται σε ισομοριακές ποσότητες.

Η υψηλότερη απόδοση στην τριτοταγή-βουτανόλη είναι περίπου 10% για την αντίδραση εστεροποίησης του φερουλικού οξέος από την οκτανόλη, η οποία καταλύεται από τη Novozym 435. Χαμηλές αποδόσεις παρατηρήθηκαν και σε άλλους οργανικούς διαλύτες, όπως η ακετόνη και το ακετονιτρίλιο (2.2% και 12.4% αντίστοιχα), σε συμφωνία και με άλλες μελέτες σε οργανικούς διαλύτες [Guyot *et al.*, 1997, Stamatis *et al.*, 1999a, Compton *et al.*, 2000]. Ωστόσο, στο μη αναμίξιμο με το νερό ιοντικό υγρό [bmim]PF₆, η εστεροποίηση του φερουλικού οξέος είναι εφικτή και μάλιστα με αποδόσεις έως και 5 φορές υψηλότερες συγκριτικά με την τριτοταγή-βουτανόλη, υποδεικνύοντας την ανωτερότητα του ιοντικού αυτού υγρού ως μέσου για την τροποποίηση παραγώγων του κινναμωμικού οξέος, έναντι των συμβατικών οργανικών διαλυτών.

Σύμφωνα με το **Σχήμα 7.26** στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆, η εκλεκτικότητα των λιπασών για το φερουλικό οξύ, διαφοροποιείται σημαντικά ανάλογα με την προέλευσή τους. Σε αντίθεση με το κινναμωμικό οξύ, η λιπάση Lipozyme RMIM οδηγεί σε υψηλότερες αποδόσεις συγκριτικά με τη Novozym 435, ενώ οι λιπάσες από *Thermomyces lanuginosa* καταλύουν την αντίδραση εστεροποίησης με χαμηλές αποδόσεις. Για την εστεροποίηση φαινολικών οξέων μελετήθηκε επίσης και η δυνατότητα χρήσης διασυνδεδεμένων ενζυμικών συσσωματωμάτων, CLEAs της λιπάσης B από *Candida antarctica*. Ωστόσο, η χρήση αυτού του σκευάσματος οδήγησε σε πολύ χαμηλές αποδόσεις (<1%) τόσο για το κινναμωμικό όσο και για το φερουλικό οξύ.

7.6.2 Μελέτη εστεροποίησης διαφόρων φαινολικών οξέων στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆

Με σκοπό τη περαιτέρω μελέτη της δυνατότητας εστεροποίησης φαινολικών οξέων αλλά και της εκλεκτικότητας των λιπασών για τα υποστρώματα αυτά, το ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ χρησιμοποιήθηκε ως μέσο (**Πίνακας 7.18**). Οι αντιδράσεις εστεροποίησης πραγματοποιήθηκαν με την οκτανόλη και χρησιμοποιήθηκαν οι λιπάσες Novozym 435 και Lipozyme RMIM, οι οποίες με βάση τα προηγούμενα πειράματα οδήγησαν σε υψηλότερες αποδόσεις. Η συγκεκριμένη αλκοόλη (οκτανόλη) επιλέχθηκε με βάση το ενδιαφέρον για τη σύνθεση παραγώγων φαινολικών οξέων με αυξημένη λιποφιλικότητα, τα οποία όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο, δεν μπορούν να συντεθούν με ικανοποιητικές αποδόσεις σε άλλα μη συμβατικά μέσα.

Πίνακας 7.18 Εστεροποίηση διαφορετικών φαινολικών οξέων (50 mM) με την οκτανόλη, η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 ή την Lipozyme RMIM στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ μετά 72 h επώασης στους 60°C. Τα υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν σε ισομοριακές ποσότητες.

Φαινολικό οξύ	Απόδοση (%) (Αρχική ταχύτητα *)	
	Novozym 435	Lipozyme RMIM
Κινναμωμικό	56.2 (0.056)	54.2 (0.069)
π-Κουμαρικό	27.4 (0.004)	32.9 (0.007)
Φερουλικό	17.5 (0.003)	34.9 (0.013)
Καφεϊκό	8.4 (0.001)	11.6 (0.002)
Σιναπικό	0.4 (0.003)	31.2 (0.015)
π-Υδροξυ φαινυλ οξικό	62.6 (0.225)	13.4 (0.058)
π- Υδροξυ φαινυλ προπιονικό	60.6 (0.160)	38.5 (0.149)
2,4-Διυδροξυ υδροκινναμωμικό	23.3 (0.002)	27.7 (0.002)
3,4- Διυδροξυ υδροκινναμωμικό	35.5 (0.002)	30.0 (0.001)
Βενζοϊκό	0.0	0.0
Συριγγικό	0.0	0.0

* Εκφράζεται σε mmol προϊόντος h⁻¹ g⁻¹ βιοκαταλύτη.

Σύμφωνα με τον **Πίνακα 7.18** η εστεροποίηση διαφόρων παραγώγων του κινναμωμικού οξέος είναι δυνατή στο [bmim]PF₆ οδηγώντας σε μέτριες έως υψηλές αποδόσεις και αρχικές ταχύτητες. Οι αποδόσεις αυτές, και ειδικά στην περίπτωση του π-κουμαρικού και καφεϊκού οξέος, είναι σημαντικά υψηλότερες συγκριτικά με εκείνες οι οποίες έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία κατά την πραγματοποίηση των αντιδράσεων σε οργανικούς διαλύτες [Guyot *et al.*, 1997, Stamatis *et al.*, 1999a, 2001c, Topakas *et al.*, 2003, Zoumpantioti *et al.*, 2006]. Ωστόσο, καμία από τις χρησιμοποιούμενες ακινητοποιημένες λιπάσες δεν είναι ικανή να καταλύσει την εστεροποίηση του βενζοϊκού οξέος και του παραγώγου του, του συριγγικού οξέος στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σύμφωνα με εκείνα στην περίπτωση των οργανικών διαλυτών και μπορούν να εξηγηθούν με βάση την ύπαρξη στερεοχημικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ογκώδους φαινολικού δακτυλίου του υποστρώματος και των καταλοίπων της θέσης πρόσδεσης του ενζύμου [Buisman *et al.*, 1998, Otto *et al.*, 2000].

Σε όλες τις περιπτώσεις η χρωματογραφική ανάλυση μέσω HPLC κατέδειξε την ύπαρξη ενός μοναδικού προϊόντος (Παράρτημα Β) το οποίο αναγνωρίστηκε μέσω

φασματομετρίας μάζας (LC-MS) ως ο μονοεστέρας των φαινολικών οξέων (Παράρτημα Γ). Σε συμφωνία και με τα αποτελέσματα του **Σχήματος 7.26** η ακινητοποιημένη λιπάση Lipozyme RMIM καταλύει την αντίδραση εστεροποίησης παραγώγων του κινναμωμικού οξέος με υψηλότερες αποδόσεις και αρχικές ταχύτητες συγκριτικά με τη Novozym 435, η οποία επέδειξε υψηλότερη εκλεκτικότητα για το *π*-υδροξυφαινυλ οξικό και το *π*-υδροξυφαινυλ προπιονικό οξύ.

Μελέτες μοριακής μοντελοποίησης αποκάλυψαν πως η λιπάση B από *Candida antarctica* δεν έχει την ικανότητα να καταλύει την εστεροποίηση παραγώγων του κινναμωμικού οξέος [Otto *et al.*, 2000]. Η παρουσία του διπλού δεσμού στο μόριο της ένωσης (**Εικόνα 7.7**) μειώνει την ευελιξία του και κατά συνέπεια δυσχεραίνει την πρόσβαση του φαινολικού οξέος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Επιπρόσθετα της στερεοχημικής παρεμπόδισης, η ύπαρξη ηλεκτρονιακών επιδράσεων θεωρήθηκε πιθανή εξαιτίας της παρουσίας αρωματικών υδροξυλικών ομάδων κυρίως σε *πάρα*-θέση [Otto *et al.*, 2000]. Αν και τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσαν να δικαιολογήσουν τις χαμηλές αποδόσεις στην περίπτωση του καφεϊκού και σιναπικού οξέος, εντούτοις η δυνατότητα εστεροποίησης του *π*-κουμαρικού και φερουλικού οξέος στο [bmim]PF₆ υποδηλώνει την σημασία της αλληλεπίδρασης μεταξύ του ιοντικού υγρού και του ενζύμου ή/και του υποστρώματος [Kaar *et al.*, 2003, Li *et al.*, 2006, van Rantwijk & Sheldon, 2007, Chen *et al.*, 2008].

Η παρουσία *para*-υδροξυλικών ομάδων δεν έχει καμία επίδραση όταν η πλευρική ομάδα του αρωματικού δακτυλίου του φαινολικού οξέος είναι κορεσμένη [Stamatis *et al.*, 1999a], όπως στην περίπτωση των *π*-υδροξυφαινυλ οξικού, *π*-υδροξυφαινυλ προπιονικού και του 3,4-διυδροξυ υδροκινναμωμικού οξέος, η εστεροποίηση των οποίων οδήγησε σε υψηλότερες αποδόσεις με χρήση της Novozym 435 (**Πίνακας 7.18**).

Τα προαναφερόμενα αποτελέσματα αφορούν στη σύνθεση παραγώγων των φαινολικών οξέων μέσω αντιδράσεων απευθείας εστεροποίησης. Ωστόσο, το νερό, το οποίο αποτελεί το παραπροϊόν στις αντιδράσεις αυτού του τύπου, μπορεί να μετατοπίσει την ισορροπία της αντίδρασης προς την κατεύθυνση της υδρόλυσης, οδηγώντας σε μείωση των αποδόσεων. Η επίδραση του τύπου της αντίδρασης (απευθείας εστεροποίηση ή μετεστεροποίηση) στην απόδοση της ενζυμικής τροποποίησης φαινολικών οξέων αποδίδεται στον **Πίνακα 7.19**.

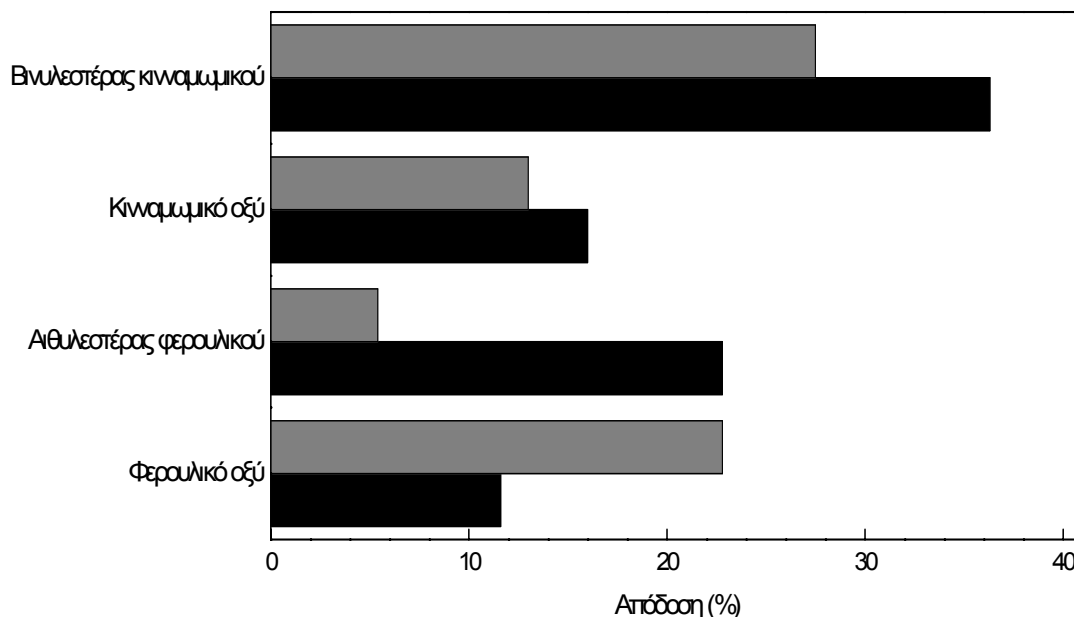
Πίνακας 7.19 Απόδοση (%) και αρχική ταχύτητα της αντίδρασης απευθείας εστεροποίησης ή μετεστεροποίησης διαφόρων φαινολικών οξέων (50 mM) με την οκτανόλη, η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 ή την Lipozyme RMIM στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆, μετά από 72 h επώασης στους 60°C. Τα υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν σε ισομοριακές ποσότητες.

Υπόστρωμα	Απόδοση % (Αρχική ταχύτητα *)	
	Novozyme 435	Lipozyme RMIM
Φερουλικό οξύ	17.5 (0.003)	34.9 (0.013)
Αιθυλεστέρας του φερουλικού οξέος	38.5 (0.008)	37.0 (0.024)
Κινναμωμικό οξύ	56.2 (0.059)	54.2 (0.069)
Βινυλεστέρας του κινναμωμικού οξέος	63.9 (0.586)	60.7 (0.490)
π-Κουμαρικό οξύ	27.4 (0.004)	32.9 (0.007)
Βινυλεστέρας του κουμαρικού οξέος	38.1 (0.181)	43.6 (0.385)

* Εκφράζεται σε mmol προϊόντος h⁻¹ g⁻¹ βιοκαταλύτη.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του **Πίνακα 7.19**, η χρήση εστέρων των φαινολικών οξέων οδήγησε σε αύξηση των αποδόσεων και της αρχικής ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να εξηγηθεί με βάση την παρεμπόδιση της αντίστροφης υδρόλυσης και τη μετατόπιση της ισορροπίας της αντίδρασης προς την κατεύθυνση της σύνθεσης, εξαιτίας του ισομερισμού της παραγόμενης βινυλ-αλκοόλης προς την πτητική ακεταλδεΐδη [Yang *et al.*, 1999, Schöfer *et al.*, 2001]. Όσον αφορά την επίδραση της λιπάσης, παρατηρείται υψηλή εκλεκτικότητα της Novozym 435 για τον εστέρα του κινναμωμικού οξέος και υψηλή εκλεκτικότητα της Lipozyme RMIM για τον εστέρα του κουμαρικού οξέος, σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των αντιδράσεων απευθείας εστεροποίησης. Εξαίρεση αποτελεί η περίπτωση του αιθυλεστέρα του φερουλικού οξέος, όπου συγκριτικά με το φερουλικό οξύ παρατηρήθηκε διπλασιασμός της απόδοσης με χρήση της Novozym 435, ενώ η Lipozyme RMIM οδήγησε σε παρόμοια τιμή απόδοσης με την εστεροποίηση του φερουλικού οξέος. Το γεγονός αυτό μπορεί να αποδοθεί πιθανά στην απενεργοποίηση του ενζύμου από τη παραγόμενη αιθανόλη [Malcata *et al.*, 1992, Oliveira *et al.*, 2001, de los Ríos *et al.*, 2008]. Η αρνητική επίδραση του αιθυλεστέρα του φερουλικού οξέος είναι ακόμα πιο έντονη στην περίπτωση χρήσης της ελεύθερης λιπάσης από *Rhizomucor miehei* (**Σχήμα 7.27**) ενισχύοντας τη προηγούμενη παρατήρηση. Ωστόσο, είναι αξιοσημείωτο το γεγονός πως στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ η εστεροποίηση των φαινολικών

οξέων και των παραγώγων τους είναι δυνατή και μάλιστα με ικανοποιητικές αποδόσεις όχι μόνο με τη χρήση ακινητοποιημένων αλλά και με ελεύθερα ένζυμα (**Σχήμα 7.27**).



Σχήμα 7.27 Εστεροποίηση φαινολικών οξέων και των αντίστοιχων εστέρων τους με την οκτανόλη, η οποία καταλύεται από την ελεύθερη λιπάση Β από *Candida antarctica* ή τη λιπάση από *Rhizomucor miehei* στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ (παρουσία 2.5% κ.ο. νερού), μετά από 72 h επώασης στους 60°C. Τα υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν σε ισομοριακές ποσότητες.

7.6.3 Μελέτη της επίδρασης της συγκέντρωσης των υποστρωμάτων

Η διερεύνηση της εστεροποίησης των φλαβονοειδών (§ 7.4) κατέδειξε τη σημαντική επίδραση της συγκέντρωσης των υποστρωμάτων στην απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης. Με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης του μοριακού λόγου των υποστρωμάτων στην πορεία της ενζυμικής εστεροποίησης των φαινολικών οξέων, η συγκέντρωση του υποστρώματος και της ακινητοποιημένης λιπάσης (Lipozyme RMIM) διατηρήθηκε σταθερή και ίση με 50 mM και 80 mg/mL, αντίστοιχα, ενώ η συγκέντρωση της οκτανόλης κυμάνθηκε από 25 έως 200 mM (**Πίνακας 7.20**).

Σύμφωνα με τον **Πίνακα 7.20** ο μοριακός λόγος της αλκοόλης προς το φαινολικό οξύ δεν επιδρά σημαντικά στην απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης εστεροποίησης. Ωστόσο, σε όλες τις περιπτώσεις η αύξηση του μοριακού λόγου οδηγεί σε μείωση της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης. Πιθανά το αποτέλεσμα αυτό να συνδέεται με τη χαμηλή διαλυτότητα της οκτανόλης στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός διφασικού συστήματος το οποίο περιορίζει τη διάχυση των υδρόφιλων οξέων προς το ένζυμο [Park & Kazlauskas, 2001].

Πίνακας 7.20 Επίδραση του μοριακού λόγου της οκτανόλης προς το φαινολικό οξύ (50 mM) στην απόδοση (%) και αρχική ταχύτητα της αντίδρασης εστεροποίησης, η οποία καταλύεται από την Lipozyme RMIM στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆, μετά από 72 h επώασης στους 60°C.

Φαινολικό οξύ	Απόδοση (%) (Αρχική ταχύτητα *)			
	0.5	1	2	4
Φερουλικό	36.9 (0.023)	34.9 (0.013)	38.8 (0.006)	37.6 (0.003)
Κινναμωμικό	47.8 (0.074)	54.2 (0.069)	56.3 (0.054)	59.4 (0.038)
π-Κουμαρικό	32.5 (0.009)	32.9 (0.007)	36.6 (0.005)	35.3 (0.003)
Καφεϊκό	10.4 (<0.001)	11.6 (<0.001)	11.8 (<0.001)	10.9 (<0.001)

* Εκφράζεται σε mmol προϊόντος h⁻¹ g⁻¹ βιοκαταλύτη.

Αντίθετα με την αύξηση της συγκέντρωσης της οκτανόλης, η αύξηση της συγκέντρωσης του φαινολικού οξέος (φερουλικό οξύ) από 15 σε 75 mM, οδήγησε σε αύξηση της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης εστεροποίησης αλλά και σε μείωση της απόδοσης (Πίνακας 7.21).

Πίνακας 7.21 Επίδραση της συγκέντρωσης του φερουλικού οξέος στην απόδοση (%) και αρχική ταχύτητα της αντίδρασης εστεροποίησής του με την οκτανόλη, η οποία καταλύεται από την Lipozyme RMIM στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆, μετά από 72 h επώασης στους 60°C. Τα υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν σε ισομοριακές ποσότητες.

Συγκέντρωση (mM)	Απόδοση (%) (Αρχική ταχύτητα)*
15	60.5 (0.006)
25	58.8 (0.010)
50	34.9 (0.013)
75	33.9 (0.025)

* Εκφράζεται σε mmol προϊόντος h⁻¹ g⁻¹ βιοκαταλύτη.

Αν και η επίδραση αυτής της παραμέτρου στην απόδοση της ενζυμικής εστεροποίησης είναι αρνητική, η ποσότητα του παραγόμενου οκτυλεστέρα του φερουλικού οξέος τριπλασιάστηκε με την αύξηση της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού φτάνοντας τα 7.8 g/L, ποσότητα έως και 3 φορές μεγαλύτερη από αυτές που έχουν αναφερθεί στην περίπτωση των οργανικών διαλυτών [Guyot *et al.*, 1997, Stamatis *et al.*, 1999a, 2001c, Compton *et al.*, 2000].

7.6.4 Μελέτη της επίδρασης της φύσης της αλκοόλης

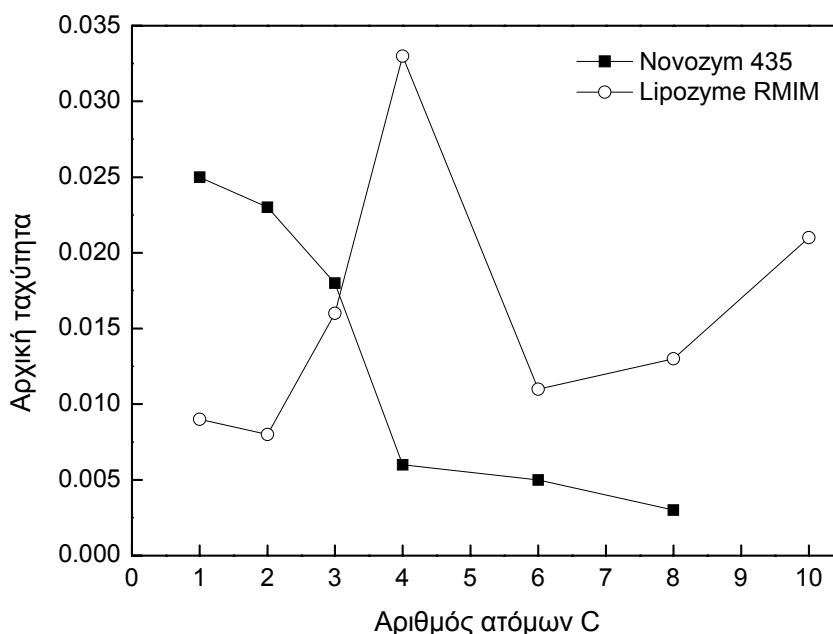
Η αρχική μελέτη της δυνατότητας εστεροποίησης φαινολικών οξέων σε διάφορα μέσα (§ 7.6.1) υπέδειξε μία διαφοροποίηση των αποδόσεων της ενζυμικής εστεροποίησης τόσο του κινναμωμικού όσο και του φερουλικού οξέος, ανάλογα με την χρησιμοποιούμενη αλκοόλη (**Σχήματα 7.25** και **7.26**). Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της φύσης της αλκοόλης, η αντίδραση εστεροποίησης του φερουλικού οξέος επιλέχθηκε ως πρότυπη αντίδραση (**Πίνακας 7.22**).

Πίνακας 7.22 Επίδραση της αλκοόλης στην απόδοση (%) της αντίδρασης εστεροποίησης του φερουλικού οξέος (50 mM), η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 ή τη Lipozyme RMIM στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ μετά από 72 h επώασης στους 60°C. Τα υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν σε ισομοριακές ποσότητες.

Αλκοόλη	Απόδοση (%)	
	Novozym 435	Lipozyme RMIM
Μεθανόλη	41.7	24.4
Αιθανόλη	40.7	38.8
Προπανάλη	39.7	48.2
Βουτανόλη	32.9	52.6
Εξανόλη	30.3	38.1
Οκτανόλη	17.5	34.9
Γερανιόλη	6.7	36.1
Φαινυλαιθανόλη	2.8	17.5
(±) Μενθόλη	0.0	0.0

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του **Πίνακα 7.22** η εστεροποίηση του φερουλικού οξέος στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ είναι δυνατή με τη χρήση διαφορετικών αλκοολών. Ωστόσο, παρατηρείται διαφορετική εκλεκτικότητα των λιπασών ως προς την αλκοόλη ανάλογα με την προέλευσή τους. Με χρήση της ακινητοποιημένης Novozym 435 τόσο η απόδοση, όσο και η αρχική ταχύτητα (**Σχήμα 7.28**) μειώνεται με την αύξηση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας της αλκοόλης, σε συμφωνία και με αντίστοιχα αποτελέσματα στην περίπτωση των οργανικών διαλυτών [Yadav & Devi, 2004, Cassani *et al.*, 2007]. Αντίθετα, στην περίπτωση της Lipozyme RMIM παρατηρείται ένα τελείως διαφορετικό προφίλ, σύμφωνα με το οποίο η λιπάση εμφανίζει αυξημένη εκλεκτικότητα για αλκοόλες 4 και 10 ατόμων άνθρακα (μέγιστη αρχική ταχύτητα παρατηρείται στην περίπτωση της βουτανόλης

και γερανιόλης). Παρόμοια εκλεκτικότητα έχει επιδείξει η λιπάση αυτή σε αντιδράσεις εστεροποίησης σε οργανικούς διαλύτες [Gandh, 1995, Chowdary & Prapulla, 2003], η οποία έχει αποδοθεί στην παρουσία δύο θέσεων πρόσδεσης υποστρώματος στο μόριο του ενζύμου [Malcata *et al.*, 1992].



Σχήμα 7.28 Επίδραση του μήκους της αλκοόλης στην αρχική ταχύτητα (εκφρασμένη σε mmol προϊόντος h⁻¹ g⁻¹ βιοκαταλύτη) της αντίδρασης εστεροποίησης του φερουλικού οξέος (50 mM), η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 ή τη Lipozyme RMIM στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ στους 60°C. Τα υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν σε ισομοριακές ποσότητες.

7.6.5 Μελέτη της επίδρασης της φύσης του ιοντικού υγρού

Τα προαναφερόμενα αποτελέσματα αναφέρονται σε αντιδράσεις εστεροποίησης φαινολικών οξέων, οι οποίες πραγματοποιούνται στο υδρόφοβο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆. Μία ενδιαφέρουσα παρατήρηση όμως, όσον αφορά στην επίδραση του μέσου, προέρχεται από τα αποτελέσματα των **Σχημάτων 7.25** και **7.26**. Σύμφωνα με αυτά, παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση των αποδόσεων στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆. Προκειμένου να μελετηθεί περαιτέρω η επίδραση του μέσου στην πορεία της ενζυμικής εστεροποίησης φαινολικών οξέων, χρησιμοποιήθηκαν ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά τα οποία περιέχουν διαφορετικού μήκους αλκυλικής αλυσίδας υποκαταστάτες στο κατιόν (C₂ έως C₈) και δύο διαφορετικά ανιόντα, BF₄⁻ ή PF₆⁻. Στον **Πίνακα 7.23** παρατίθενται αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση της φύσης του ιοντικού υγρού στην απόδοση και αρχική ταχύτητα επιλέγοντας ως πρότυπη αντίδραση για τη μελέτη αυτή την εστεροποίηση του φερουλικού

οξέος με διάφορες αλκοόλες (αιθανόλη, βουτανόλη, οκτανόλη), η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 ή την Lipozyme RMIM.

Πίνακας 7.23 Απόδοση (%) και αρχική ταχύτητα για την αντίδραση εστεροποίησης του φερουλικού οξέος (50 mM) με την βουτανόλη, η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 ή τη Lipozyme RMIM σε διαφορετικά ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά μετά από 72 h επώασης στους 60°C. Τα υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν σε ισομοριακές ποσότητες.

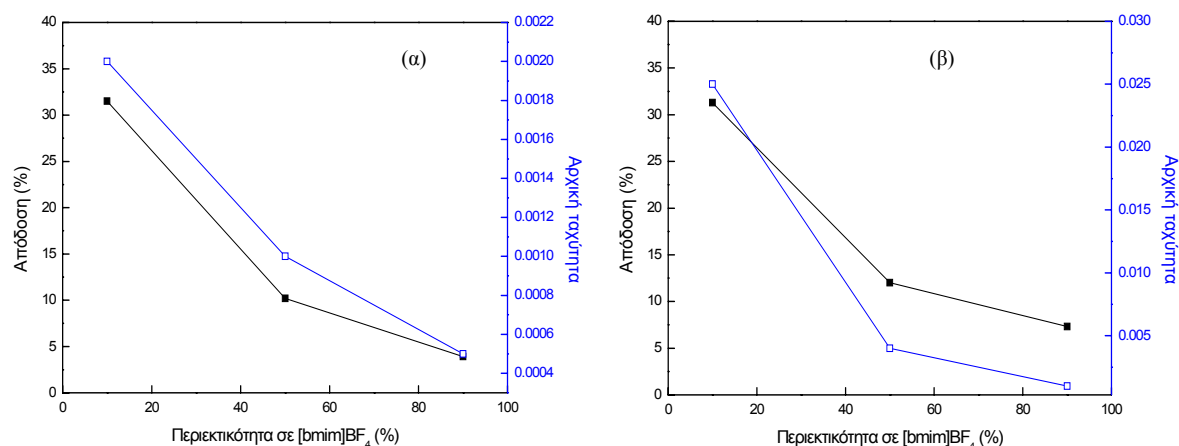
Ιοντικό υγρό	Απόδοση (%)	
	(Αρχική ταχύτητα [*])	
	Novozym 435	Lipozyme RMIM
[emim]BF ₄	2.3 (<0.001)	4.9 (<0.001)
[bmim]BF ₄	3.4 (<0.001)	14.9 (<0.001)
[omim]BF ₄	7.6 (<0.001)	18.2 (<0.001)
[emim]PF ₆	23.4 (0.004)	34.1 (0.021)
[bmim]PF ₆	32.9 (0.006)	52.6 (0.033)
[omim]PF ₆	55.6 (0.001)	59.2 (0.004)

^{*} Εκφράζεται σε mmol προϊόντος h⁻¹ g⁻¹ βιοκαταλύτη.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του **Πίνακα 7.23** η φύση τόσο του ανιόντος όσο και του κατιόντος επιδρούν σημαντικά στην απόδοση και αρχική ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης εστεροποίησης. Ανεξάρτητα της χρησιμοποιούμενης λιπάσης η μεγαλύτερη απόδοση παρατηρήθηκε στο ιοντικό υγρό [omim]PF₆ και η χαμηλότερη στο [emim]BF₄.

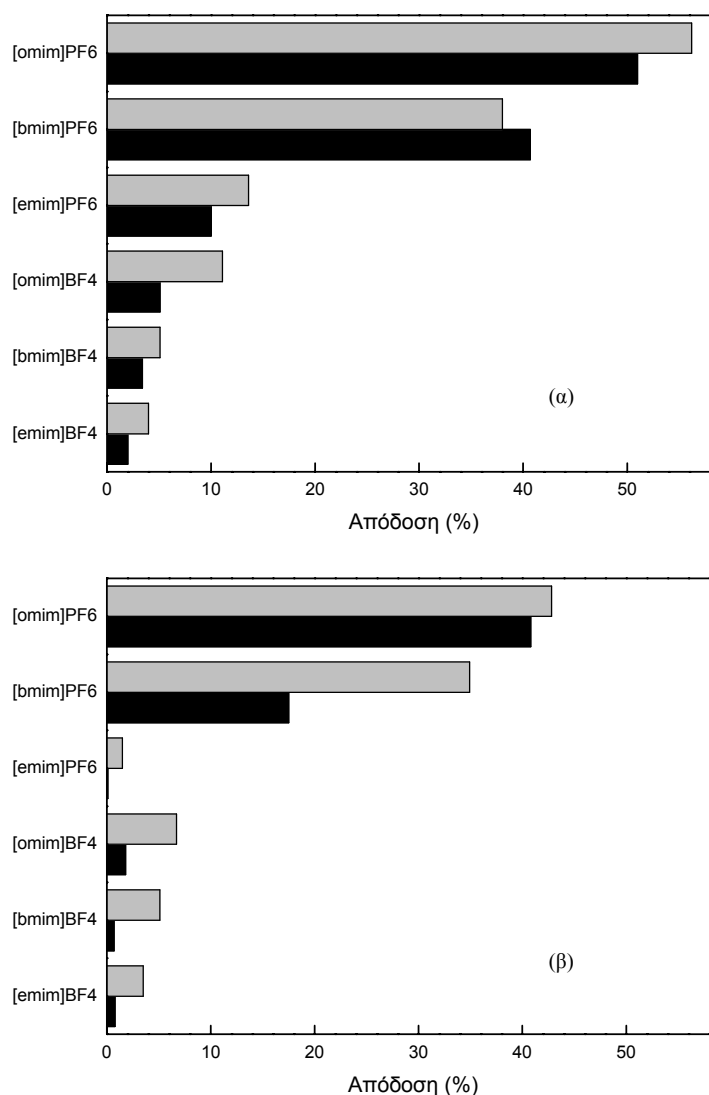
Όσον αφορά το κατιόν, παρατηρήθηκε πως η αύξηση της ανθρακικής αλυσίδας του υποκαταστάτη του ιμιδαζολικού δακτυλίου οδήγησε σε αύξηση της απόδοσης ανεξάρτητα του ανιόντος του ιοντικού υγρού και της χρησιμοποιούμενης λιπάσης. Ωστόσο, είναι προφανές, με βάση τα αποτελέσματα του **Πίνακα 7.23**, πως η επίδραση του ανιόντος είναι περισσότερο σημαντική από εκείνη του κατιόντος, όπως είχε παρατηρηθεί αντίστοιχα και στην περίπτωση της σιλιμπίνης (§ 7.3). Ανεξάρτητα του κατιόντος, οι αποδόσεις στα ιοντικά υγρά με ανιόν PF₆⁻ είναι αρκετά υψηλότερες (έως 60% στο [omim]PF₆) συγκριτικά με εκείνες στα ιοντικά υγρά με ανιόν BF₄⁻. Επιπρόσθετα των αποδόσεων, και οι αρχικές ταχύτητες είναι σημαντικά υψηλότερες στα PF₆⁻ συγκριτικά με τα BF₄⁻ ιοντικά υγρά, με εξαίρεση το ιοντικό υγρό [omim]PF₆. Η σχετικά μικρότερη αρχική ταχύτητα στο ιοντικό αυτό υγρό μπορεί να αποδοθεί στο υψηλό ιξώδες (**Πίνακας 6.2**) ή πιθανά στη μικρότερη διαλυτότητα του φερουλικού οξέος στο μέσο αυτό.

Η αρνητική επίδραση των ιοντικών υγρών με ανιόν BF_4^- στην πορεία της ενζυμικής αντίδρασης εστεροποίησης του φερουλικού οξέος από την βουτανόλη παρατηρήθηκε και στην περίπτωση όπου μίγματα των ιοντικών υγρών $[\text{bmim}]\text{BF}_4$ και $[\text{bmim}]\text{PF}_6$ χρησιμοποιήθηκαν ως μέσα (Σχήμα 7.29). Και με τις δύο χρησιμοποιούμενες λιπάσες η αύξηση της περιεκτικότητας του μίγματος των ιοντικών υγρών σε $[\text{bmim}]\text{BF}_4$ οδήγησε σε μείωση τόσο της απόδοσης όσο και της αρχικής ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης εστεροποίησης.



Σχήμα 7.29 Απόδοση (%) και αρχική ταχύτητα (εκφρασμένη σε mmol προϊόντος $\text{h}^{-1} \text{g}^{-1}$ βιοκαταλύτη) για την αντίδραση εστεροποίησης του φερουλικού οξέος (50 mM) με την βουτανόλη, η οποία καταλύεται από **(α)** τη Novozym 435 και **(β)** τη Lipozyme RMIM σε μίγματα ιοντικών υγρών $[\text{bmim}]\text{BF}_4$ - $[\text{bmim}]\text{PF}_6$ μετά από 72 h επώασης στους 60°C . Τα υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν σε ισομοριακές ποσότητες.

Η θετική επίδραση της αύξησης της αλκυλικής αλυσίδας του κατιόντος και της παρουσίας του ανιόντος PF_6^- στην απόδοση της ενζυμικής εστεροποίησης του φερουλικού οξέος παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της χρήσης άλλων αλκοολών όπως της αιθανόλης και της οκτανόλης (Σχήμα 7.30).



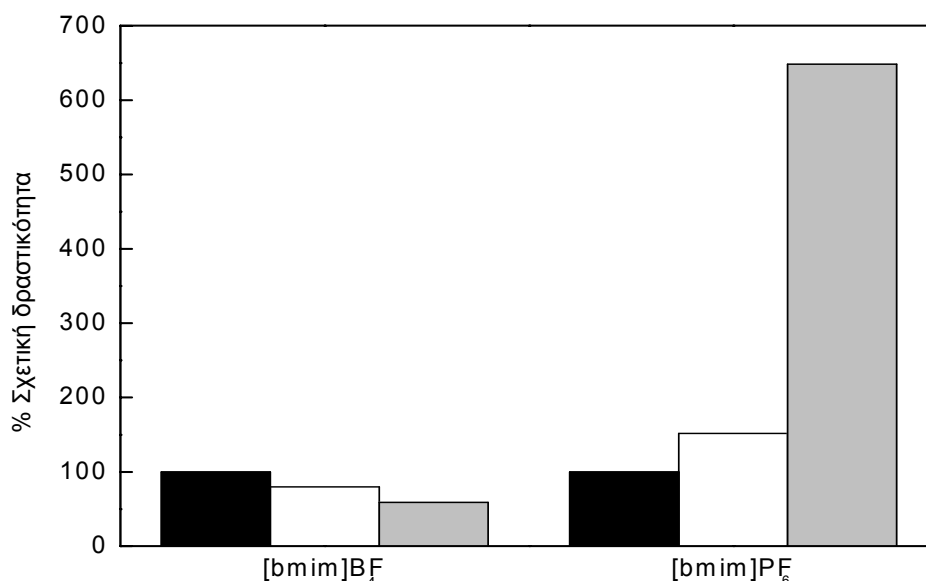
Σχήμα 7.30 Επίδραση της φύσης του ιοντικού υγρού στην απόδοση (%) της αντίδρασης εστεροποίησης του φερουλικού οξέος (50 mM) με **(α)** την αιθανόλη και **(β)** την οκτανόλη, η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 (μαύρες μπάρες) ή τη Lipzyme RMIM (γκρι μπάρες) μετά από 72 h επώασης στους 60°C. Τα υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν σε ισομοριακές ποσότητες.

Η συμφωνία ανάμεσα στα ληφθέντα αποτελέσματα, ανεξάρτητα της αλκοόλης και του χρησιμοποιούμενου ενζύμου, υποδηλώνει τη σημαντική επίδραση της φύσης του ιοντικού υγρού στην πορεία της ενζυμικής αντίδρασης. Η πολικότητα του μέσου αποτελεί μία ιδιότητα των μη συμβατικών μέσων, η οποία επηρεάζει σημαντικά την δραστικότητα των ενζύμων [Bommarius & Riebel, 2004a, Alvaro & Illanes, 2008]. Στην περίπτωση των ιμιδαζολικών ιοντικών υγρών, έχει αναφερθεί πως η αύξηση της αλκυλικής αλυσίδας του ιμιδαζολικού δακτυλίου του κατιόντος οδηγεί σε μείωση της πολικότητας των ιοντικών υγρών με ανιόν BF_4^- [Zhao, 2003], ενώ για ιοντικά υγρά με ανιόν PF_6^- έχουν αναφερθεί αντιφατικά

αποτελέσματα σχετικά με την επίδραση της φύσης του κατιόντος [Carmichael & Seddon, 2000, Muldoon *et al.*, 2001]. Ωστόσο, διάφορες μελέτες βιοκαταλυτικών αντιδράσεων σε ιοντικά υγρά επισημαίνουν πως δεν υπάρχει σαφής συσχέτιση ανάμεσα στην πολικότητα του μέσου και την απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης [Schöfer *et al.*, 2001, Laszlo & Compton, 2002, Kaar *et al.*, 2003, Yang & Pan, 2005, Zhao, 2005, Yang *et al.*, 2008]. Η παρατήρηση αυτή βασίζεται στο γεγονός πως οι αναφερόμενες τιμές πολικότητας των ιμιδαζολικών ιοντικών υγρών δεν διαφοροποιούνται σημαντικά (0.71 για το [emim]BF₄, 0.68 για τα [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆, 0.63 για το [omim]PF₆, στην κανονικοποιημένη κλίμακα πολικότητας Reichardt, E_T^N) [Park & Kazlauskas, 2001, Ulbert *et al.*, 2004, Lee *et al.*, 2005], ώστε με βάση αυτές να εξηγηθεί η σημαντική διαφοροποίηση της ενζυμικής δραστηριότητας. Συνεπώς, και στην περίπτωση εστεροποίησης των φαινολικών οξέων οι παρατηρούμενες αποδόσεις δεν φαίνεται να σχετίζονται με την πολικότητα του ιοντικού υγρού.

Οι υψηλότερες αποδόσεις στα PF₆⁻ συγκριτικά με τα BF₄⁻ ιοντικά υγρά θα μπορούσαν εναλλακτικά να εξηγηθούν με βάση τη διαφορετική υδροφοβικότητα των μέσων αυτών. Τα ιοντικά υγρά με ανιόν BF₄⁻ είναι αρκετά υδρόφιλα και έχει αναφερθεί πως έχουν την ικανότητα να αποσπούν μόρια νερού από το μικροπεριβάλλον του ενζύμου [Gubicza *et al.*, 2003, Wang *et al.*, 2007b] ή να αλληλεπιδρούν με το ενζυμικό μόριο οδηγώντας στην απενεργοποίησή του [Yang *et al.*, 2008]. Τα αποτελέσματα της Παραγράφου 6.1 επιβεβαιώνουν την αρνητική επίδραση του ανιόντος BF₄⁻ (Σχήμα 6.1) στην σταθερότητα των ακινητοποιημένων λιπάσων Novozym 435 και Lipozyme RMIM συγκριτικά με τα ιοντικά υγρά με ανιόν PF₆⁻, τα οποία επάγουν την αύξηση της σταθερότητας των δύο λιπασών.

Ωστόσο, τα προαναφερόμενα αποτελέσματα σταθερότητας μπορούν εν μέρει να εξηγήσουν τις μικρότερες αποδόσεις στα υδρόφιλα σε σχέση με τα υδρόφοβα μέσα, καθώς οι υπό μελέτη λιπάσες δεν απενεργοποιούνται πλήρως στα BF₄⁻ ιοντικά υγρά. Επιπλέον, τα αποτελέσματα της Παραγράφου 6.1 αφορούν στη σταθερότητα “αποθήκευσης” (storage stability) των λιπασών, η οποία ενδέχεται να διαφέρει από την σταθερότητα των ενζύμων, παρουσία των αντιδρώντων. Με σκοπό την διερεύνηση αυτής της υπόθεσης μελετήθηκε η επίδραση του φερουλικού οξέος στην σταθερότητα των Novozym 435 και Lipozyme RMIM στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ (Σχήμα 7.31). Τα δύο ένζυμα επωάστηκαν στα δύο ιοντικά υγρά παρουσία του φερουλικού οξέος και μετά το πέρας 24 h προστέθηκε ισομοριακή ποσότητα βουτανόλης για την έναρξη της ενζυμικής αντίδρασης εστεροποίησης.



Σχήμα 7.31 Δραστηριότητα των λιπασών Novozym 435 (γγκι μπάρες) και Lipozyme RMIM (λευκές μπάρες) μετά από 24 h επώασης τους παρουσία φερούλικού οξέος, κατά την αντίδραση εστεροποίησης του φερούλικού οξέος (50 mM) με την βουτανόλη (50 mM) στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ στους 60°C. Η δραστηριότητα εκφράζεται ως ποσοστό % της δραστηριότητας των λιπασών απουσία υποστρώματος (μαύρες μπάρες), η οποία θεωρείται ως το 100%.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του **Σχήματος 7.31** επώαση των ενζύμων στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ παρουσία του φερούλικού οξέος, οδήγησε σε μείωση της δραστηριότητάς του συγκριτικά με την επώαση τους απουσία του υποστρώματος. Η αρνητική επίδραση της παρουσίας του υποστρώματος φαίνεται να είναι σημαντικότερη στην περίπτωση της Novozym 435, γεγονός το οποίο μπορεί πιθανά να εξηγήσει τις πολύ χαμηλές αποδόσεις στην περίπτωση αυτής της λιπάσης (**Πίνακας 7.23**).

Αντίθετα, επώαση των δύο λιπάσεων παρουσία του φερούλικού οξέος στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ οδήγησε σε σημαντική αύξηση της δραστηριότητάς τους συγκριτικά με την περίπτωση επώασης απουσία υποστρώματος. Το αποτέλεσμα αυτό, σε συμφωνία με άλλες βιβλιογραφικές αναφορές, μπορεί να εξηγηθεί μέσω της ανάπτυξης ειδικών αλληλεπιδράσεων του υποστρώματος με το ενεργό κέντρο του ενζύμου σε αυτό το ιοντικό υγρό [Lozano *et al.*, 2001b, Chen *et al.*, 2006], οι οποίες συμβάλλουν στην σταθεροποίηση της καταλυτικά ενεργής διαμόρφωσης του ενζύμου και αναστέλλουν τη μετουσίωσή του [Illanes *et al.*, 1996]. Το γεγονός αυτό μπορεί να δικαιολογήσει τις σημαντικά υψηλότερες αποδόσεις για την εστεροποίηση του φερούλικού οξέος στα PF₆⁻ ιοντικά υγρά.

Η αλληλεπίδραση ενζύμου-ιοντικού υγρού αποτελεί μία από τις πιθανές εξηγήσεις για την διαφοροποίηση των αποδόσεων ανάλογα με τη φύση του ιοντικού υγρού. Επιπρόσθετα, η επίδραση του διαλύτη στην συγγένεια του ενζύμου για το υποστρώμα θεωρείται σημαντική στα μη συμβατικά μέσα και μπορεί να προσδιοριστεί μέσω της επίδρασης του μέσου στην διαλυτοποίηση των αντιδρώντων [Park & Kazlauskas, 2001, Guo *et al.*, 2006].

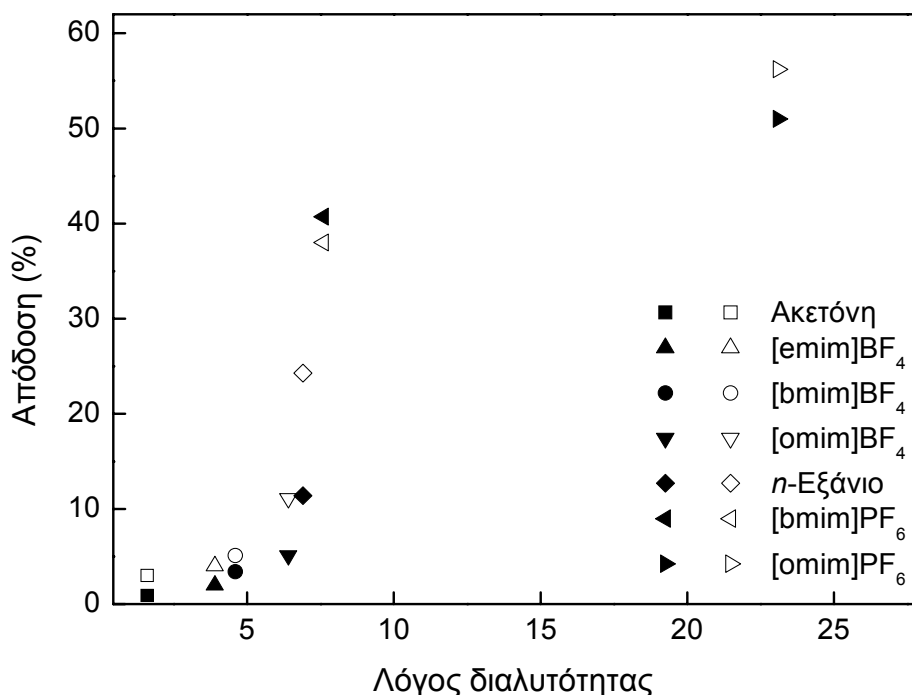
Η διαλυτότητα τόσο του φερουλικού οξέος, όσο και του ενζυμικά συντιθέμενου παραγώγου του, του αιθυλεστέρα του φερουλικού οξέος, μελετήθηκε σε διάφορα ιοντικά υγρά και σε δύο οργανικούς διαλύτες, την ακετόνη και το εξάνιο (**Πίνακας 7.24**).

Πίνακας 7.24 Επίδραση της διαλυτότητας του υποστρώματος και του προϊόντος στην απόδοση (%) της ενζυμικής αντίδρασης εστεροποίησης του φερουλικού οξέος (50 mM) με την αιθανόλη, η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 και τη Lipozyme RMIM μετά από 72 h επώσης σε διάφορα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά στους 60°C και σε οργανικούς διαλύτες στους 50°C. Τα υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν σε ισομοριακές ποσότητες.

Μέσο αντίδρασης	Απόδοση (%)		Διαλυτότητα (mM)	
	Novozym 435	Lipozyme RMIM	Φερουλικό οξύ	Αιθυλεστέρας του φερουλικού οξέος
[emim]BF ₄	2.0	4.0	116	399
[bmim]BF ₄	3.4	5.1	104	419
[omim]BF ₄	5.1	11.1	90	501
[bmim]PF ₆	40.7	38.0	72	486
[omim]PF ₆	51.0	56.2	28	572
<i>n</i> -εξάνιο	11.4	24.3	2	12
Ακετόνη	0.9	3.0	355	497

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του **Πίνακα 7.24**, τόσο η απόδοση της αντίδρασης, όσο και η διαλυτότητα του φερουλικού οξέος και του παραγώγου του, διαφοροποιούνται σημαντικά ανάλογα με τη φύση του μέσου. Η μικρότερη απόδοση παρατηρήθηκε στην ακετόνη, όπου η διαλυτότητα του υποστρώματος ήταν μέγιστη μεταξύ των υπό μελέτη μέσων, ενώ η μεγαλύτερη απόδοση παρατηρήθηκε στο ιοντικό υγρό [omim]PF₆, όπου η διαλυτότητα του προϊόντος ήταν μέγιστη μεταξύ των υπό μελέτη μέσων. Οι παρατηρήσεις αυτές υποδεικνύουν πως η διαλυτότητα τόσο του υποστρώματος όσο και του προϊόντος

πρέπει να ληφθούν υπόψη προκειμένου να εξηγηθούν τα παρατηρούμενα αποτελέσματα στα διαφορετικά μέσα.



Σχήμα 7.32 Επίδραση του λόγου της διαλυτότητας του προϊόντος προς το υποστρώμα στην απόδοση (%) της αντίδρασης εστεροποίησης του φερουλικού οξέος (50 mM) με την αιθανόλη, η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 (μαύρα σύμβολα) και τη Lipozym RMIM (λευκά σύμβολα) μετά από 72 h επώασης σε διάφορα ιοντικά υγρά στους 60°C και οργανικούς διαλύτες στους 50°C.

Όπως απεικονίζεται στο **Σχήμα 7.32** η σχετική διαλυτότητα υποστρώματος-προϊόντος συνδέεται άμεσα με την απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης εστεροποίησης του φερουλικού οξέος. Είναι δε αξιοσημείωτο το γεγονός πως η συσχέτιση αυτή είναι ίδια στην περίπτωση της Novozym 435 και Lipozyme RMIM, και συνεπώς η παρατηρούμενη τάση είναι ανεξάρτητη από τη χρησιμοποιούμενη λιπάση. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει τη σημαντική επίδραση του μέσου στην διαλυτοποίηση των αντιδρώντων, και κατ' επέκταση και στην απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης εστεροποίησης. Η υψηλή διαλυτότητα μίας ένωσης οφείλεται στην ύπαρξη ισχυρών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της ένωσης και του μέσου. Είναι αναμενόμενο σε ένα ισχυρά υδρόφοβο μέσο, όπως τα ιοντικά υγρά που περιέχουν ανιόν PF_6^- και μεγάλους αλκυλικούς υποκαταστάτες στον ιμιδαζολικό δακτύλιο, η μικρή αλληλεπίδραση με το υδρόφιλο φερουλικό οξύ να αυξάνει την δραστηριότητα του υποστρώματος και συνεπώς τη διαθεσιμότητά του προς το ένζυμο και την ικανότητά του να αντιδρά [Park & Kazlauskas, 2001, Chen *et al.*, 2008b]. Αντίθετα, το περισσότερο υδρόφοβο προϊόν (αιθυλεστέρα του

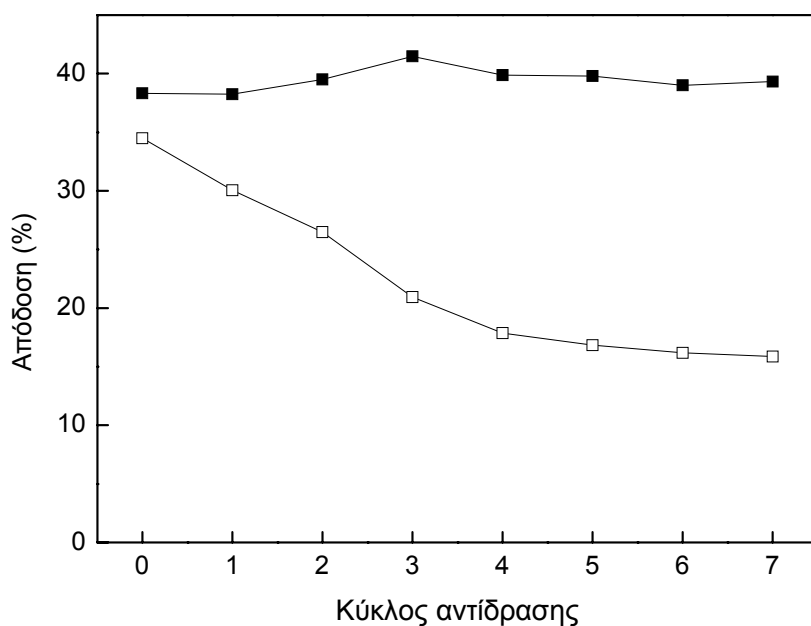
φερουλικού οξέος) αλληλεπιδρά πιο ισχυρά με ένα υδρόφοβο περιβάλλον και καθίσταται λιγότερο δραστικό. Αυτό σημαίνει πως είτε δεν είναι διαθέσιμο προς το ενεργό κέντρο του ενζύμου ώστε να πραγματοποιηθεί η υδρόλυσή του ή ότι εξαιτίας της υψηλής ενδιάλυτός του, αποφεύγεται η συσσώρευσή του γύρω από την ενζυμική επιφάνεια, και συνεπώς δεν παρεμποδίζεται η προσέγγιση των υποστρωμάτων προς το ένζυμο. Εξαιτίας αυτών των επιδράσεων, σε όλα τα υπό μελέτη μέσα παρατηρείται αύξηση της απόδοσης με την αύξηση του λόγου της διαλυτότητας του προϊόντος προς το υπόστρωμα.

Τα προαναφερόμενα αποτελέσματα καθιστούν σαφές πως, ιοντικά υγρά με ανιόν PF_6^- μπορούν να θεωρηθούν ιδανικά μέσα για την ενζυμική τροποποίηση της δομής παραγώγων του κινναμωμικού οξέος, εξαιτίας της ύπαρξης ευνοϊκών αλληλεπιδράσεων, οι οποίες παρατηρούνται μεταξύ ενζύμου-αντιδρώντων-ιοντικού υγρού και οδηγούν σε αυξημένη ενζυμική σταθερότητα και υψηλή σχετική διαλυτότητα προϊόντος/υποστρώματος.

7.6.6 Μελέτη λειτουργικής σταθερότητας λιπάσων κατά τη σύνθεση λιπόφιλων παραγώγων φαινολικών οξέων σε ιοντικά υγρά

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα των ιοντικών υγρών αποτελεί το γεγονός ότι η αμελητέα τάση ατμών και η μη αναμιξιμότητά τους με διάφορους οργανικούς διαλύτες καθιστά εύκολη την απομόνωση των αντιδρώντων και την επαναχρησιμοποίηση τόσο του ενζύμου όσο και του ιοντικού υγρού.

Η δυνατότητα αυτή μελετήθηκε αναπτύσσοντας ένα απλό πρωτόκολλο απομόνωσης των ενζυμικά παραγόμενων λιπόφιλων εστέρων των φαινολικών οξέων, το οποίο βασίζεται σε διαδοχικές εκχυλίσσεις με οργανικό διαλύτη (§ 5.2.7.7 και 5.2.8.3). Μέσω της διαδικασίας αυτής απομονώνεται η ακινητοποιημένη λιπάση, η οποία στη συνέχεια προστίθεται σε φρέσκο μίγμα υποστρωμάτων-ιοντικού υγρού, προκειμένου να μελετηθεί η λειτουργική σταθερότητα των λιπασών. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη αντίδραση η εστεροποίηση του κινναμωμικού οξέος με την οκτανόλη στο ιοντικό υγρό $[\text{bmim}]\text{PF}_6$, η οποία καταλύεται από τις ακινητοποιημένες λιπάσες Novozym 435 και Lipozyme RMIM (Σχήμα 7.33).



Σχήμα 7.33 Σταθερότητα επαναχρησιμοποίησης των ακινητοποιημένων λιπάσων Novozym 435 (μαύρα σύμβολα) και Lipozyme RMIM (λευκά σύμβολα) στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ στους 60°C.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του **Σχήματος 7.33** στην περίπτωση της Novozym 435 δεν παρατηρείται απώλεια της δραστηριότητας ακόμα και μετά από επτά συνεχόμενους κύκλους αντίδρασης. Αντίθετα, η Lipozyme RMIM εμφανίζεται λιγότερο σταθερή, καθώς η απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης εστεροποίησης μειώνεται μετά από κάθε κύκλο. Ήδη μετά τον τέταρτο κύκλο η απόδοση της αντίδρασης έχει μειωθεί κατά 50% συγκριτικά με τον πρώτο κύκλο. Χαμηλότερη σταθερότητα της Lipozyme RMIM συγκριτικά με τη Novozym 435 είχε παρατηρηθεί επίσης στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ απουσία υποστρώματος (§ 6.1).

7.7 Μελέτη της δυνατότητας σύνθεσης υβριδικών αντιοξειδωτικών σε ιοντικά υγρά

Ένα σημαντικό κλάδο της χημείας των φαινολικών αντιοξειδωτικών αποτελεί η σύνθεση υβριδικών μορίων [Burlakova *et al.*, 2008a]. Στις περισσότερες περιπτώσεις η σύνθεση υβριδικών μορίων δεν παρέχει ένα πολυ-λειτουργικό μόριο, αλλά καταλήγει στη σύνδεση μορίων τα οποία διαθέτουν αντιοξειδωτική δράση με άλλα μόρια τα οποία αλληλεπιδρούν με ειδικούς, για μία συγκεκριμένη ασθένεια, στόχους ή με μόρια τα οποία καθορίζουν τις υδρόφοβες-υδρόφιλες αλληλεπιδράσεις του μορίου [Behl, 1996, Lee *et al.*, 2007b, Burlakova *et al.*, 2008b]. Τα υβριδικά αντιοξειδωτικά γνωρίζουν σήμερα ευρεία εφαρμογή στην αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών, οι οποίες εξελίσσονται μέσω πολύπλοκων μηχανισμών (νευροεκφυλιστικά και μεταβολικά νοσήματα, καρκίνος κ.α.) και

για τις οποίες η χορήγηση μεμονωμένων αντιοξειδωτικών δεν επαρκεί ή απαιτούνται και άλλες βιοδραστικές ενώσεις με διαφορετικές βιολογικές ιδιότητες [Burlakova *et al.*, 2008α, Liu *et al.*, 2008, Bolognesi *et al.*, 2009].

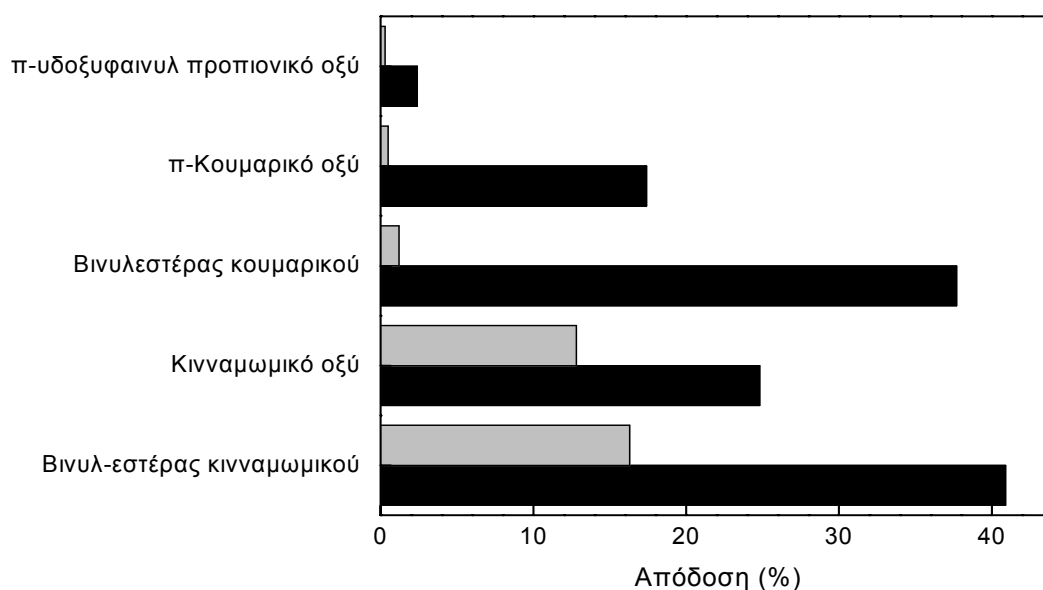
Όσον αφορά τα πολυφαινολικά αντιοξειδωτικά, είναι γνωστό πως, στη φύση οι ενώσεις αυτές υφίστανται συχνά περαιτέρω ακυλίωση των υδροξυλικών τους ομάδων με διάφορα φαινολικά οξέα. Η σύνθεση των παραγώγων αυτών πιστεύεται ότι καθορίζει την αλληλεπίδρασή τους με συγκεκριμένους κυτταρικούς τύπους ή/και ιστούς [Havsteen *et al.*, 2002, Ishihara & Nakajima, 2003, Erlund, 2004]. Ωστόσο, ελάχιστες είναι οι αναφορές σχετικά με την βιοκαταλυτική σύνθεση υβριδικών αντιοξειδωτικών πολυφαινολικών ενώσεων [Otto *et al.*, 1998, Nakajima *et al.*, 2000, Gao *et al.*, 2000, Humeau *et al.*, 2000, Stevenson *et al.*, 2006]. Αν και η βιολογική δράση των παραγώγων αυτών δεν είναι γνωστή, υποθετικά ο συνδυασμός δύο αντιοξειδωτικών θα μπορούσε να βελτιώσει τις βιολογικές δράσεις των αρχικών υποστρωμάτων, τροποποιώντας ταυτόχρονα τον υδρόφιλο χαρακτήρα των προγονικών ενώσεων. Σαφέστατα, η ύπαρξη μίας απλής βιοκαταλυτικής διεργασίας για την σύνθεση υβριδικών αντιοξειδωτικών θα επέτρεπε την διερεύνηση των βιολογικών τους ιδιοτήτων και τη μελέτη των σχέσεων δομής-βιολογικής δράσης των νέων παραγώγων.

Η μελέτη της ενζυμικής τροποποίησης της δομής διαφόρων φυσικών αντιοξειδωτικών κατέδειξε την ανωτερότητα των ιοντικών υγρών ως μέσων για την πραγματοποίηση αυτών των αντιδράσεων. Τα ιοντικά υγρά οδηγούν σε υψηλές αποδόσεις τροποποίησης διαφόρων κατηγοριών φυσικών αντιοξειδωτικών, υψηλότερες ακόμα και συγκριτικά με άλλα μη συμβατικά μέσα, και επιτρέπουν την υψηλή διαλυτότητα των φυσικών αυτών υποστρωμάτων, παρέχοντας συνεπώς τη δυνατότητα σύνθεσης μεγάλων ποσοτήτων λιπόφιλων παραγώγων σε μία βιοκαταλυτική διεργασία ενός και μόνου βήματος.

Με βάση τα πλεονεκτήματα αυτά μελετήθηκε στα ιοντικά υγρά η δυνατότητα σύνθεσης διαφόρων υβριδικών αντιοξειδωτικών. Ως υποστρώματα χρησιμοποιήθηκαν φλαβονοειδή, φαινολικά γλυκοσίδια και βιταμίνες και ως ακυλο-δότες διάφορα παράγωγα του κινναμωμικού οξέος καθώς και το λιποϊκό οξύ.

7.7.1 Σύνθεση υβριδικών αντιοξειδωτικών φαινολικών γλυκοσιδίων

Με σκοπό τη σύνθεση υβριδικών αντιοξειδωτικών φαινολικών γλυκοσιδίων, μελετήθηκε η ενζυμική ακυλίωση της εσκουλίνης, η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ χρησιμοποιώντας διάφορα φαινολικά οξέα καθώς και τους αντίστοιχους βινυλ-εστέρες τους ως ακυλο-δότες (Σχήμα 7.34).



Σχήμα 7.34 Απόδοση (%) για την ενζυμική ακυλίωση της εσκουλίνης (25 mM) με διάφορα φαινολικά οξέα (50 mM), η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ (γκρι μπάρες) και [bmim]PF₆ (μαύρες μπάρες) μετά από 72 h επώασης στους 60 °C.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του **Σχήματος 7.34** η ενζυμική σύνθεση υβριδικών αντιοξειδωτικών της εσκουλίνης είναι δυνατή σε ιοντικά υγρά και μάλιστα με ικανοποιητικές αποδόσεις. Η ανάλυση μέσω φασματοφωτομετρίας μάζας επιβεβαιώνει την σύνθεση των υβριδικών αντιοξειδωτικών της εσκουλίνης (Παράρτημα Γ).

Οι Otto *et al.*, διερευνώντας τη δυνατότητα ακυλίωσης ενός άλλου φαινολικού γλυκοζιδίου, της σαλικίνης, με παράγωγα του κινναμωμικού οξέος κατέληξαν πως η λιπάση B από *Candida antarctica* δεν μπορεί να καταλύσει την σύνθεση αυτών των υβριδικών αντιοξειδωτικών, λόγω στερεοχημικών και ηλεκτρονιακών επιδράσεων στην θέση πρόσδεσης του ακυλίου [Otto *et al.*, 2000]. Επιπρόσθετα, μελέτες μοριακής μοντελοποίησης της θέσης πρόσδεσης της αλκοόλης αποκάλυψαν ότι αυτή αποτελείται κυρίως από υδρόφοβα κατάλοιπα όπως τα Ala281, Ala282 και Ile285. Αν και η θέση πρόσδεσης είναι αρκετά μεγάλη ώστε να δεχτεί ογκώδη υδρόφοβα άγλυκα τμήματα των μορίων, η παρουσία μίας στεφάνης αποτελούμενης από τα κατάλοιπα Leu144, Ile189, Leu278, Ala282 και Val286 περιορίζει την πρόσβαση της αλκοόλης όταν υπάρχουν υποκαταστάτες σε κοντινή απόσταση από την καταλυτική τριάδα του ενεργού κέντρου της λιπάσης. Έτσι, στην περίπτωση ακυλίωσης φαινολικών γλυκοσιδίων, όπως η σαλικίνη και η εσκουλίνη, η παρουσία των πολικών υδροξυλικών ομάδων του αρωματικού τους δακτυλίου περιορίζει την πρόσβαση των

υποστρώματων αυτών στη θέση πρόσδεσης λόγω στερεοχημικών και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων (**Εικόνα 7.8**) [Otto *et al.*, 2000].



Εικόνα 7.8 Θέση πρόσδεσης της αλκοόλης της λιπάσης Β από *Candida antarctica*. Με λευκό χρώμα απεικονίζεται η υδρόφιλη βάση και με μαύρο τα υδρόφοβα κατάλοιπα της θέσης πρόσδεσης. Τα άγλυκα τμήματα των γλυκοσιδίων (υποκατεστημένα στο άτομο C σε β-διαμόρφωση της ομάδας του σακχάρου) τοποθετούνται σε μία υδρόφοβη σχισμή ανάμεσα στα κατάλοιπα Leu278 και Ile189. Η θέση πρόσδεσης της αλκοόλης περιορίζεται από μία στεφάνη υδρόφοβων αμινοξέων τα οποία μπορούν να αλληλεπιδρούν στερεοχημικά με πολικούς υποκαταστάτες του άγλυκου τμήματος υποστρώματων, όπως η σαλικίνη [Otto *et al.*, 2000].

Συνεπώς, η δυνατότητα σύνθεσης υβριδικών αντιοξειδωτικών φαινολικών γλυκοσιδίων σε ιοντικά υγρά υποδεικνύει την επίδραση του μέσου στην διαμόρφωση του ενζυμικού μορίου και την τροποποίηση της εκλεκτικότητας του ως προς τα φαινολικά υποστρώματα και τονίζει το πλεονέκτημα χρήσης των ιοντικών υγρών για την τροποποίηση φυσικών αντιοξειδωτικών και τη σύνθεση υβριδικών μορίων.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του **Σχήματος 7.34** σε όλες τις περιπτώσεις, και ανεξάρτητα του ιοντικού υγρού, η πραγματοποίηση αντιδράσεων μετεστεροποίησης οδήγησε σε υψηλότερες αποδόσεις. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η θετική αυτή επίδραση οφείλεται στη μετατόπιση της θερμοδυναμικής ισορροπίας της αντίδρασης προς τη σύνθεση, εξαιτίας του ισομερισμού της παραγόμενης βινυλ-αλκοόλης προς την πτητική ακεταλδεΐδη [Yang *et al.*, 1999].

Με βάση τα αποτελέσματα του **Σχήματος 7.34** προκύπτει ότι η φύση του ιοντικού υγρού, και κυρίως του ανιόντος επιδρά σημαντικά στην απόδοση της ενζυμικής σύνθεσης υβριδικών αντιοξειδωτικών. Η χρήση του ιοντικού υγρού [bmim]PF₆, το οποίο είχε οδηγήσει σε μεγαλύτερες αποδόσεις ακυλίωσης της εσκουλίνης με τον βουτυρικό βινυλ-εστέρα (§ 7.1),

αλλά και εστεροποίησης των φαινολικών οξέων με αλειφατικές αλκοόλες (§ 7.6), οδήγησε σε υψηλές αποδόσεις σύνθεσης υβριδικών αντιοξειδωτικών της εσκουλίνης. Η ακυλίωση του φαινολικού γλυκοσιδίου από τον βουτυρικό βινυλ-εστέρα στο [bmim]BF₄ οδήγησε σε ιδιαίτερα υψηλή απόδοση (85.8% σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Παραγράφου 7.1). Αντίθετα, η χρήση του [bmim]BF₄, οδήγησε σε ιδιαίτερα χαμηλές αποδόσεις εστεροποίησης φαινολικών οξέων με αλειφατικές αλκοόλες, και φαίνεται ότι έχει αρνητική επίδραση και στην εστεροποίηση των φαινολικών οξέων με την εσκουλίνη. Συνεπώς, η αλληλεπίδραση του ιοντικού υγρού κυρίως με το φαινολικό οξύ και όχι με την εσκουλίνη, φαίνεται ότι καθορίζει την πορεία της ενζυμικής αντίδρασης.

Επιπρόσθετα της επίδρασης του ανιόντος, μελετήθηκε η επίδραση της φύση του κατιόντος του ιοντικού υγρού στην απόδοση της σύνθεσης υβριδικών αντιοξειδωτικών της εσκουλίνης. Ως ακυλο-δότες χρησιμοποιήθηκαν το κινναμωμικό και το φερουλικό οξύ σε αντιδράσεις οι οποίες καταλύονται από τις ακινητοποιημένες λιπάσες Novozym 435 και Lipozyme RMIM σε PF₆⁻ ιοντικά υγρά (**Πίνακας 7.25**).

Πίνακας 7.25 Απόδοση (%) για την ενζυμική ακυλίωση της εσκουλίνης (25 mM) με το κινναμωμικό ή το φερουλικό οξύ (50 mM), η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 ή τη Lipozyme RMIM σε διάφορα ιοντικά υγρά μετά από 72 h επώασης στους 60 °C.

Ιοντικό υγρό	Απόδοση %			
	Κινναμωμικό οξύ		Φερουλικό οξύ	
	Novozym	Lipozyme	Novozym	Lipozyme
	435	RMIM	435	RMIM
[emim]PF ₆	4.5	2.2	0.3	1.1
[bmim]PF ₆	15.6	10.4	2.0	11.6
[omim]PF ₆	46.4	27.4	6.0	13.7

Όπως και κατά την εστεροποίηση φαινολικών οξέων με αλειφατικές αλκοόλες (§ 7.6), η αύξηση της αλκυλικής αλυσίδας του κατιόντος επιδρά θετικά στην απόδοση της ενζυμικής αντίδρασης, καθώς τόσο για το κινναμωμικό όσο και για το φερουλικό οξύ, η μεγαλύτερη απόδοση παρατηρείται στο υψηλής υδροφοβικότητας ιοντικό υγρό [omim]PF₆. Η τάση δε αυτή φαίνεται να ισχύει ανεξάρτητα της χρησιμοποιούμενης λιπάσης (**Πίνακας 7.25**). Η προέλευση, ωστόσο, της λιπάσης επιδρά διαφορετικά στην απόδοση ανάλογα με τη φύση του φαινολικού οξέος. Όπως και στην περίπτωση εστεροποίησης με την οκτανόλη (**Πίνακας 7.18**), η λιπάση Novozym 435 εμφανίζει υψηλότερη εκλεκτικότητα για το κινναμωμικό οξύ,

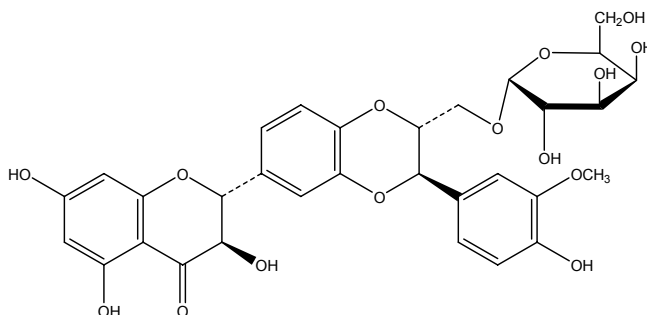
ενώ η Lipozyme RMIM εμφανίζει υψηλή εκλεκτικότητα για το παράγωγό του, το φερουλικό οξύ.

7.7.2 Σύνθεση υβριδικών αντιοξειδωτικών της σιλιμπίνης

Στην περίπτωση της σιλιμπίνης μελετήθηκε η δυνατότητα σύνθεσης υβριδικών αντιοξειδωτικών με χρήση διάφορων φαινολικών οξέων (κινναμωμικό, φερουλικό, π-κουμαρικό) ως ακυλο-δοτών. Οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν στα ιοντικά υγρά [bmim]BF₄ και [bmim]PF₆ καθώς και στην ακετόνη. Εκτός από το μέσο διερευνήθηκε επίσης και η επίδραση της χρήσης διαφορετικών ενζυμικών σκευασμάτων και για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκαν δύο ακινητοποιημένες λιπάσες, η Novozym 435 και η Lipozyme RMIM, καθώς και ένα εμπορικά διαθέσιμο παρασκεύασμα διασυνδεδεμένων ενζυμικών συσσωματωμάτων (CLEAs) της λιπάσης A από *Candida antarctica*. Ωστόσο, καμία από τις χρησιμοποιούμενες λιπάσες δεν ήταν ικανή να καταλύσει τη συνθετική αντίδραση στα υπό μελέτη μέσα.

Στη συνέχεια και με σκοπό την πραγματοποίηση αντιδράσεων μετεστεροποίησης χρησιμοποιήθηκαν ως ακυλο-δότες βινυλ-εστέρες του π-κουμαρικού και του φερουλικού οξέος. Με χρήση των ουσιών αυτών το παραγόμενο παραπροϊόν είναι η βινυλ-αλκοόλη, η οποία ισομερίζεται προς την ιδιαίτερα πτητική ακεταλδεΐδη με αποτέλεσμα να μετατοπίζεται η ισορροπία της αντίδρασης προς την κατεύθυνση της σύνθεσης [Yang *et al.*, 1999, Schöfer *et al.*, 2001].

Δεδομένης δε της δομής της σιλιμπίνης, διερευνήθηκε κατά πόσο η αδυναμία σύνθεσης υβριδικών αντιοξειδωτικών οφείλεται στην έλλειψη της ομάδας του σακχάρου και έτσι χρησιμοποιήθηκε επίσης ένα γλυκοζυλιωμένο παράγωγό της, το β-D-γαλακτοπυρανοζίδιο της σιλιμπίνης (**Εικόνα 7.9**).



Εικόνα 7.9 Δομή του β-D-γαλακτοπυρανοζιδίου της σιλιμπίνης.

Ακόμα όμως και με χρήση των βινυλ-εστέρων αυτών κανένα από τα προαναφερόμενα ενζυμικά σκευάσματα δεν ήταν ικανό να καταλύσει τη σύνθεση υβριδικών αντιοξειδωτικών της σιλιμπίνης ή του γλυκοζυλιωμένου παραγώγου στα υπό μελέτη μέσα αντίδρασης. Εναλλακτικά, συντέθηκε και χρησιμοποιήθηκε ως ακυλο-δότης ένα παράγωγο του κουμαρικού οξέος, το οποίο προέκυψε με υποκατάσταση των υδροξυλικών ομάδων του φαινολικού δακτυλίου από την ομάδα $\text{CH}_2\text{-OCH}_3$ (MOM) και στην συνέχεια από αυτό συντέθηκε και ο αντίστοιχος βινυλ-εστέρας του MOM-υποκατεστημένου κουμαρικού οξέος. Και σε αυτή την περίπτωση, ωστόσο, δεν παρατηρήθηκε η σύνθεση του επιθυμητού υβριδικού αντιοξειδωτικού.

Δεδομένης της δυνατότητας σύνθεσης υβριδικών αντιοξειδωτικών των φαινολικών γλυκοσιδίων σε ιοντικά υγρά, η αδυναμία ακυλίωσης της σιλιμπίνης με φαινολικά οξέα οφείλεται πιθανά στη δομική πολυπλοκότητα του μορίου αυτού.

7.7.3 Σύνθεση υβριδικών αντιοξειδωτικών βιταμινών

Η βιταμίνη C (ασκορβικό οξύ) αποτελεί ένα άφθονο φυτικό συστατικό, το οποίο μπορεί να δράσει ως δότης ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα να έχει προσελκύσει έντονο ενδιαφέρον ως πιθανό υδατοδιαλυτό αντιοξειδωτικό. Οι αντιοξειδωτικές ιδιότητες της βιταμίνης C έχουν καταδειχθεί από πολλές πειραματικές μελέτες και συνίστανται στην δέσμευση ελευθέρων ριζών στο κυτταρόπλασμα, στη προστασία των ενδοθηλιακών κυττάρων από ROS καθώς και στην αναγέννηση, από την οξειδωμένη στην ενεργοποιημένη κατάσταση, της τοκοφερόλης, μίας σημαντικής αντιοξειδωτικής βιταμίνης [Carr *et al.*, 2000, Antoniadou *et al.*, 2003, Siekmeier *et al.*, 2007, Willcox *et al.*, 2008].

Μία άλλη σημαντική βιταμίνη με αντιφλεγμονώδεις και αντιοξειδωτικές ικανότητες είναι η πυριδοξίνη. Η πυριδοξίνη αποτελεί το κύριο διαιτητικό και βιολογικά δραστικό συστατικό του συμπλέγματος βιταμινών B₆ και είναι μία υδατοδιαλυτή βιταμίνη, η οποία δρα ως συνένζυμο σε περισσότερες από 100 ενζυμικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα κατά το μεταβολισμό αμινοξέων, υδατανθράκων, νευροδιαβιβαστών, λιπιδίων κ.α [Ehrenschaft *et al.*, 1999, Stocker *et al.*, 2003, Ullegaddi *et al.*, 2004, Chen & Xiong, 2005]. Διάφορες μελέτες έχουν δείξει πως χαμηλά επίπεδα της πυριδοξίνης συμβάλλουν στην εμφάνιση οξειδωτικού στρες και ασθενειών που σχετίζονται με το οξειδωτικό στρες [Verhoef *et al.*, 1996, Siri *et al.*, 1998, Endo *et al.*, 2006].

Η βιοκαταλυτική σύνθεση εστέρων της βιταμίνης C αλλά και της πυριδοξίνης, χρησιμοποιώντας κορεσμένα ή ακόρεστα λιπαρά οξέα, εστέρες λιπαρών οξέων και

τριγλυκερίδια έχει μελετηθεί σε οργανικούς διαλύτες ή συστήματα ελεύθερα διαλυτών [Humeau *et al.*, 1998, Bradoo *et al.*, 1999, Watanabe *et al.*, 1999, 2000, Tang *et al.*, 2000, Song & Wei, 2002, Kuwabara *et al.*, 2003, Viklund *et al.*, 2003, Adamczak *et al.*, 2005, Baldessari *et al.*, 1998, Baldessari & Mangone, 2002, Zhang *et al.*, 2007], αλλά και σε ιοντικά υγρά [Park *et al.*, 2003, Bai *et al.*, 2008, Chen *et al.*, 2008].

Χρησιμοποιώντας τα ιοντικά υγρά ως μέσα και με σκοπό τη μελέτη της σύνθεσης υβριδικών αντιοξειδωτικών βιταμινών, το α-λιποϊκό οξύ χρησιμοποιήθηκε ως ακυλο-δότης (**Πίνακας 7.26**). Η επιλογή της συγκεκριμένης ένωσης βασίζεται στο γεγονός ότι το α-λιποϊκό οξύ αποτελεί ένα αντιοξειδωτικό και διατροφικό συμπλήρωμα, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί για τη θεραπεία διαφόρων παθολογικών καταστάσεων συνδεδεμένων με το οξειδωτικό στρες και το οποίο δρα συνεργιστικά ή/και συμμετέχει στην αναγέννηση άλλων αντιοξειδωτικών μορίων, όπως το ασκορβικό οξύ, από την οξειδωμένη τους μορφή [Packer, 1995, Roy & Packer, 1998, Marangon *et al.*, 1999, Zulkhairi *et al.*, 2008, Anup *et al.*, 2008, Zhang *et al.*, 2008b].

Πίνακας 7.26 Ενζυμική ακυλίωση της βιταμίνης C και της πυριδοξίνης (20 mM) με το λιποϊκό οξύ (200 mM), η οποία καταλύεται από τη Novozym 435 σε διάφορα ιοντικά υγρά και οργανικούς διαλύτες μετά από 72 h επώασης στους 70°C και 50°C.

Μέσο αντίδρασης	Απόδοση %	
	(mol % παραγόμενου μονοεστέρα)*	
	Βιταμίνη C [#]	Πυριδοξίνη
[bmim]BF ₄	6.2	13.8 (89.1)
[bmim]PF ₆	4.0	73.4 (80.0)
[mtoa]TFA	5.5	59.1 (61.2)
[mtoa]NTf ₂	6.1	99.8 (47.1)
Ακετονιτρίλιο	47.0	63.9 (73.9)
2-Μεθυλ-2-βουτανόλη	46.9	61.4 (75.1)
Τριτοταγής-βουτανόλη	20.4	44.5 (80.6)

* Αναφέρεται σε ποσοστό επί του συνόλου των παραγόμενων εστέρων.

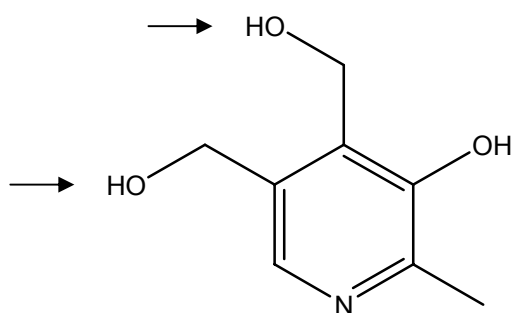
[#] Παρατηρείται σύνθεση ενός μόνο προϊόντος.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του **Πίνακα 7.26**, η σύνθεση υβριδικών αντιοξειδωτικών βιταμινών με το λιποϊκό οξύ είναι δυνατή τόσο σε οργανικούς διαλύτες όσο και σε ιοντικά υγρά. Η σύνθεση αυτή δεν έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά και συνεπώς η

δυνατότητα πραγματοποίησης αυτής της αντίδρασης και μάλιστα με ικανοποιητικές αποδόσεις παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον.

Στην περίπτωση του ασκορβικού οξέος, η χρήση των οργανικών διαλυτών οδηγεί σε μέτριες αποδόσεις, οι οποίες ωστόσο είναι σημαντικά υψηλότερες συγκριτικά με την περίπτωση των ιοντικών υγρών. Σχετικά χαμηλές αποδόσεις για την ενζυμική ακυλίωση του ασκορβικού οξέος με ακόρεστα λιπαρά οξέα, έχουν αναφερθεί σε ιοντικά υγρά όπως το [bmim]BF₄ και το [mtoa]TFA [Park *et al.*, 2003, Chen *et al.*, 2008]. Στα μέσα αυτά η διαλυτότητα της βιταμίνης ήταν υψηλή αλλά η συσσώρευση του προϊόντος (λόγω χαμηλής διαλυτότητάς του στο ιοντικό υγρό) γύρω από τα μόρια του ενζύμου έδρασε ανασταλτικά οδηγώντας στις παρατηρούμενες χαμηλές αποδόσεις.

Σε αντίθεση με το ασκορβικό οξύ, η σύνθεση υβριδικών αντιοξειδωτικών της πυριδοξίνης με το λιποϊκό οξύ πραγματοποιείται με ικανοποιητικές αποδόσεις, οι οποίες στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ και κυρίως στο [mtoa]NTf₂ είναι υψηλότερες ακόμα και από εκείνες στους οργανικούς διαλύτες (**Πίνακας 7.26**). Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε για την αντίδραση ακυλίωσης της πυριδοξίνης με το λιποϊκό οξύ η σύνθεση δύο προϊόντων, γεγονός το οποίο μπορεί να δικαιολογηθεί με βάση τη δομή του μορίου, στο οποίο περιλαμβάνονται δύο πρωτοταγείς υδροξυλικές ομάδες (**Εικόνα 7.10**). Αντίστοιχα αποτελέσματα, σχετικά με την σύνθεση δύο προϊόντων, αναφέρονται και στην περίπτωση ενζυμικής ακυλίωσης της πυριδοξίνης από τον οξικό ανυδρίτη στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ και από τον οξικό βινυλεστέρα σε οργανικούς διαλύτες [Zhang *et al.*, 2007, Bai *et al.*, 2008].



Εικόνα 7.10 Δομή της πυριδοξίνης. Με βέλη επισημαίνονται οι δύο πρωτοταγείς υδροξυλικές ομάδες στο μόριο της βιταμίνης.

Ωστόσο, η τόπο-εκλεκτικότητα της αντίδρασης διαφοροποιείται ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο μέσο. Κατά την ακυλίωση φλαβονοειδών και φαινολικών γλυκοσιδίων παρατηρήθηκε διαφοροποίηση της εκλεκτικότητας της αντίδρασης ανάλογα με τη φύση του

ανιόντος, σε ιοντικά υγρά με κατιόν $[\text{bmim}]^+$ (§ 7.1 και 7.2). Σε αντιστοιχία με τα προαναφερόμενα αποτελέσματα η τόπο-εκλεκτικότητα είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση ακυλίωσης της πυριδοξίνης σε BF_4^- συγκριτικά με το PF_6^- ιοντικό υγρό. Σύμφωνα, όμως με τα αποτελέσματα του **Πίνακα 7.26** παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση της εκλεκτικότητας ανάλογα και με το κατιόν του ιοντικού υγρού. Στα ιοντικά υγρά με κατιόν $[\text{bmim}]^+$ το ποσοστό του παραγόμενου μονοεστέρα είναι συγκρίσιμο ή και μεγαλύτερο από εκείνο στους οργανικούς διαλύτες, ενώ στα ιοντικά υγρά με κατιόν $[\text{mtoa}]^+$ παρατηρείται η χαμηλότερη τόπο-εκλεκτικότητα μεταξύ των χρησιμοποιούμενων μέσων.

Έχει αναφερθεί πως, η εκλεκτικότητα χημικών και βιοκαταλυτικών αντιδράσεων επηρεάζεται σημαντικά από τη δομή του ιοντικού υγρού και κυρίως από τη φύση των υποκαταστατών του κατιόντος [Aggarwal *et al.*, 2002, Guo *et al.*, 2006]. Η ικανότητα του ιοντικού υγρού να συμμετέχει σε δεσμούς υδρογόνου καθορίζεται από τους υποκαταστάτες του κατιόντος και ρυθμίζεται από το ανιόν, προσδίδοντας μοναδικές διαλυτικές ικανότητες στα μέσα αυτά [Anderson *et al.*, 2002, Crowhurst *et al.*, 2003, Sharma *et al.*, 2006, Zhao *et al.*, 2009b]. Τα ιοντικά υγρά με κατιόν $[\text{bmim}]^+$ έχουν την δυνατότητα να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου κυρίως μέσω του πρωτονίου στη θέση C_2 του ιμιδαζολικού δακτυλίου [Aggarwal *et al.*, 2002], γεγονός το οποίο θα μπορούσε να οδηγήσει στον «εγκλωβισμό» του παραγόμενου μονοεστέρα της πυριδοξίνης στο κύριο όγκο του διαλύτη περιορίζοντας τη περαιτέρω ακυλίωσή του προς διεστέρα [Guo *et al.*, 2006].

Με βάση τα προαναφερόμενα αποτελέσματα καθίσταται σαφές πως τα ιοντικά υγρά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα για τη σύνθεση υβριδικών αντιοξειδωτικών. Η ύπαρξη μίας αποτελεσματικής βιοκαταλυτικής διεργασίας για τη σύνθεση των μορίων αυτών μπορεί να αποτελέσει ένα σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη των βιολογικών ιδιοτήτων και της σχέσης δομής-βιολογικής δράσης των ενώσεων αυτών, αλλά και να επιτρέψει την εφαρμογή των υβριδικών αντιοξειδωτικών σε διάφορα εμπορικά σκευάσματα.

8. Μελέτη βιολογικής δράσης των συντιθέμενων παραγώγων

Όπως περιγράφεται και στις προηγούμενες παραγράφους, η ύπαρξη μίας αποτελεσματικής βιοκαταλυτικής διεργασίας για την τροποποίηση των φυσικών αντιοξειδωτικών αποτελεί ένα ιδιαίτερα ελκυστικό εργαλείο για την ενίσχυση της γνώσης αλλά και για την εμπορική αξιοποίηση των ενώσεων αυτών, μέσω της εισαγωγής επιθυμητών χαρακτηριστικών και της βελτίωσης των βιολογικών τους ιδιοτήτων. Η άποψη αυτή ενισχύεται από ήδη υπάρχοντα αποτελέσματα, τα οποία καταδεικνύουν τα ποικίλα πλεονεκτήματα της σύνθεσης παραγώγων φυσικών αντιοξειδωτικών. Τα πλεονεκτήματα αυτά αφορούν τόσο στη δυνατότητα διερεύνησης της σχέσης δομής-βιολογικής δράσης φυσικών αντιοξειδωτικών [Stamatis *et al.*, 1999a, Chalas *et al.*, 2001, Heim *et al.*, 2002, Um *et al.*, 2004, Mellou *et al.*, 2005, Vafiadi *et al.*, 2008, Fragopoulou *et al.*, 2007, Kim *et al.*, 2008], όσο και στη βελτίωση της βιολογικής δράσης των νέων παραγώγων συγκριτικά με τα μη-τροποποιημένα υποστρώματα [Kato *et al.*, 1988, Ohta *et al.*, 1997, Liu *et al.*, 1998, Chalas *et al.*, 2001, Um *et al.*, 2004, Mellou *et al.*, 2005, 2006, Katsoura *et al.*, 2006, 2009, Chigorimbo-Murefu *et al.*, 2008, Vafiadi *et al.*, 2008].

Με βάση τα παραπάνω, στην παράγραφο αυτή θα μελετηθεί η αντιοξειδωτική δράση διάφορων φυσικών αντιοξειδωτικών και των ενζυμικά συντιθέμενων λιπόφιλων παραγώγων τους, μέσω της ικανότητας τους να αναστέλλουν την δράση οξειδωτικών ενζύμων. Μέσω της μελέτης αυτής θα επιχειρηθεί επίσης η διερεύνηση των σχέσεων δομής-αντιοξειδωτικής δράσης των υπό μελέτη ενώσεων.

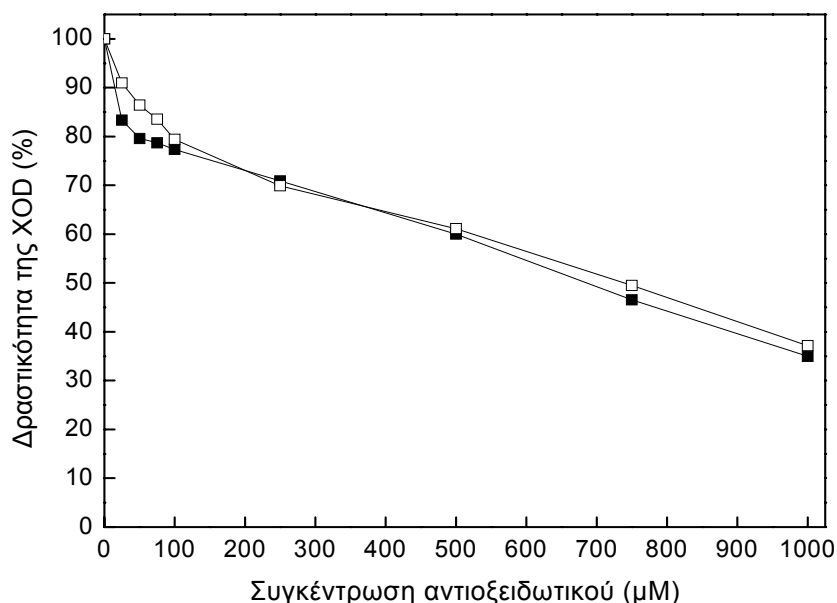
8.1 Μελέτη δυνατότητας αναστολής της οξειδάσης της ξανθίνης

Η οξειδάση της ξανθίνης (XOD, EC1.2.3.2) αποτελεί μία πολύπλοκη μολυβδοφλαβοπρωτεΐνη, η οποία καταλύει την οξείδωση της υποξανθίνης και της ξανθίνης σε ουρικό οξύ [Hille & Nishino, 1995, Harris *et al.*, 1999]. Μέσω της αντίδρασης αυτής, η XOD αποτελεί μία κύρια βιολογική πηγή ελευθέρων ριζών οξυγόνου $O_2^{\cdot -}$ και υπεροξειδίου του υδρογόνου [Britigan *et al.*, 1990, Halliwell & Gutteridge, 1990, Hippeli & Elstner, 1997]. Κατά συνέπεια, το ένζυμο αυτό εμπλέκεται στην εμφάνιση διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, όπως η ισχαιμία και άλλοι τύποι βλαβών σε ιστούς και αγγεία, οι φλεγμονώδεις παθήσεις, η αθηροσκλήρωση, η χρόνια καρδιακή ανεπάρκεια, η αρθρίτιδα και σε ορισμένους τύπους καρκίνου [Hogg, 1998, Pascual, 2000, Borges *et al.*, 2002, Harrison,

2002, Lin & Yin, 2007]. Η δε δραστηριότητά της XOD έχει αναφερθεί ότι αυξάνεται υπό συνθήκες οξειδωτικού στρες [Adkins & Taylor, 1990, Sanhueza *et al.*, 1992, Miesel & Zuber, 1993, Koyama *et al.*, 1999]. Η μειωμένη δραστηριότητα της XOD μπορεί να θεωρηθεί συνεπώς ευεργετική για την ανθρώπινη υγεία και επιτυγχάνεται με τη χρήση αναστολέων. Η αλλοπουρινόλη, ένα ανάλογο της υποξανθίνης, αποτελεί τον περισσότερο ευρέως χρησιμοποιούμενο αναστολέα της XOD [Elion *et al.*, 1963]. Ωστόσο, η χρήση της ένωσης αυτής έχει συνδεθεί με την εμφάνιση ποικίλων παρενεργειών [Hamanaka *et al.*, 1998, Okamoto *et al.*, 2003]. Εναλλακτικά, φυσικές ενώσεις, όπως τα πολυφαινολικά συστατικά, έχουν μελετηθεί ως προς την ικανότητά τους να αναστέλλουν τη δράση της XOD [Nijveldt *et al.*, 2001, van Hoorn *et al.*, 2002, Özyürek *et al.*, 2009, Gong *et al.*, 2009, Ammar *et al.*, 2009].

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν ως αναστολείς ενζυμικά συντιθέμενα παράγωγα φυσικών αντιοξειδωτικών, υβριδικά παράγωγα βιταμινών με το λιποϊκό οξύ και εστέρες του φερουλικού οξέος, καθώς και τα αντίστοιχα μη τροποποιημένα υποστρώματα. Η δυνατότητα αναστολής της XOD από τις προαναφερόμενες ενώσεις μελετήθηκε φωτομετρικά μέσω του προσδιορισμού της παραγωγής του ουρικού οξέος χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα την υποξανθίνη (§ 5.2.10.1) [Cos *et al.*, 1998, Dew *et al.*, 2005].

Ο βαθμός αναστολής της XOD από το ασκορβικό οξύ και την πυριδοξίνη, συναρτήσει της συγκέντρωσης του οξειδωτικού απεικονίζεται στο **Σχήμα 8.1**.



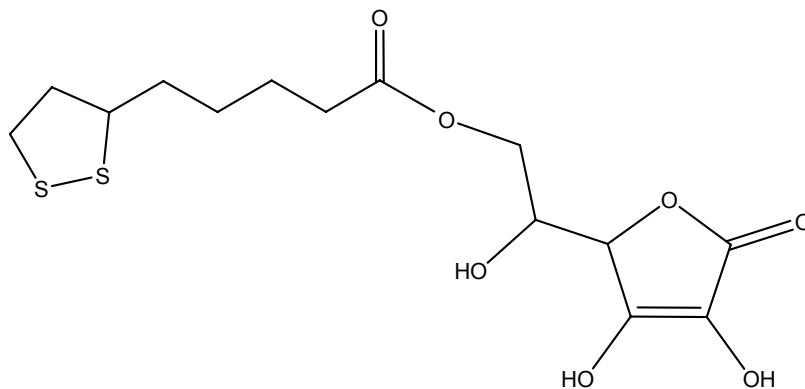
Σχήμα 8.1 Εξάρτηση της αναστολής της οξειδάσης της ξανθίνης (XOD) από τη συγκέντρωση του ασκορβικού οξέος (μαύρα σύμβολα) και της πυριδοξίνης (λευκά σύμβολα).

Παρατηρείται πως οι δύο βιταμίνες εμφανίζουν παρόμοια ικανότητα αναστολής της οξειδάσης της ξανθίνης. Η αναστολή φαίνεται να εξαρτάται από τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού. Για συγκεντρώσεις μικρότερες των 100 μM το ασκορβικό οξύ φαίνεται να αναστέλλει ισχυρότερα τη δράση της XOD συγκριτικά με την πυριδοξίνη, ενώ σε μεγαλύτερες τιμές συγκέντρωσης οι δύο βιταμίνες επιδεικνύουν την ίδια ικανότητα αναστολής.

Στην περίπτωση του ασκορβικού οξέος έχει αναφερθεί, επιπλέον της δυνατότητας αναστολής της XOD, η ικανότητα δέσμευσης των παραγόμενων από το ένζυμο ελευθέρων ριζών υπεροξειδίου [Lavelli *et al.*, 2000, Wu *et al.*, 2002]. Με βάση τα αποτελέσματα του **Σχήματος 8.1** παρατηρείται, ωστόσο, αναστολή της XOD από σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις του αντιοξειδωτικού. Το γεγονός αυτό έχει αποδοθεί στη παρουσία του δακτυλίου της λακτόνης [Mashino *et al.*, 2000].

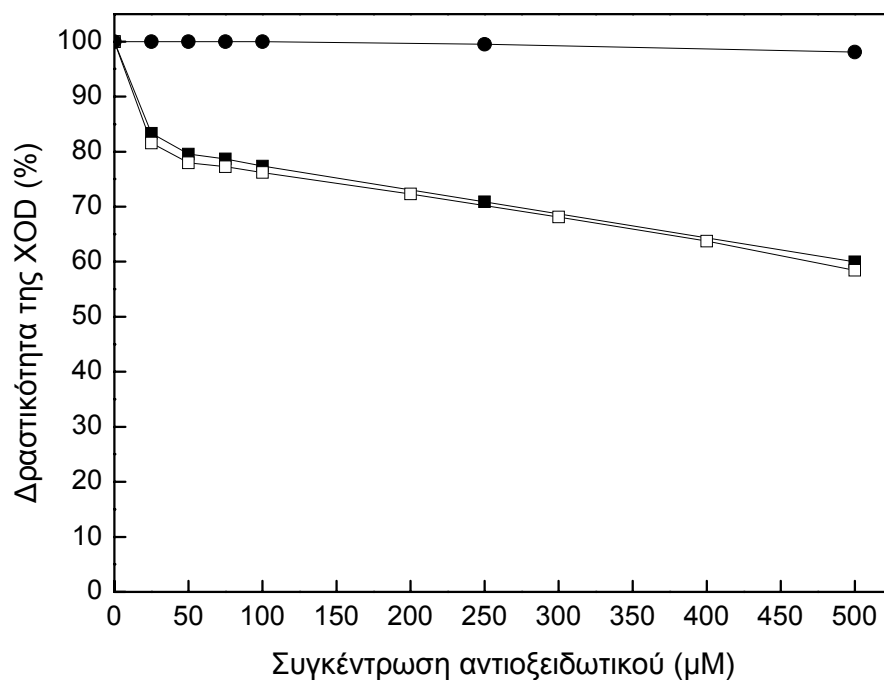
Δεδομένου πως οι δύο υπό μελέτη βιταμίνες είναι ικανές να αναστείλουν τη δράση της XOD, μελετήθηκε στη συνέχεια η βιολογική δράση και των ενζυμικά συντιθέμενων παραγώγων τους με το λιποϊκό οξύ.

Η εστεροποίηση του ασκορβικού οξέος από το λιποϊκό οξύ οδηγεί στη σύνθεση ενός μονοακυλιωμένου υβριδικού αντιοξειδωτικού (**Εικόνα 8.1**).



Εικόνα 8.1 Δομή του ενζυμικά συντιθέμενου μονοεστέρα του λιποϊκού οξέος με το ασκορβικό οξύ.

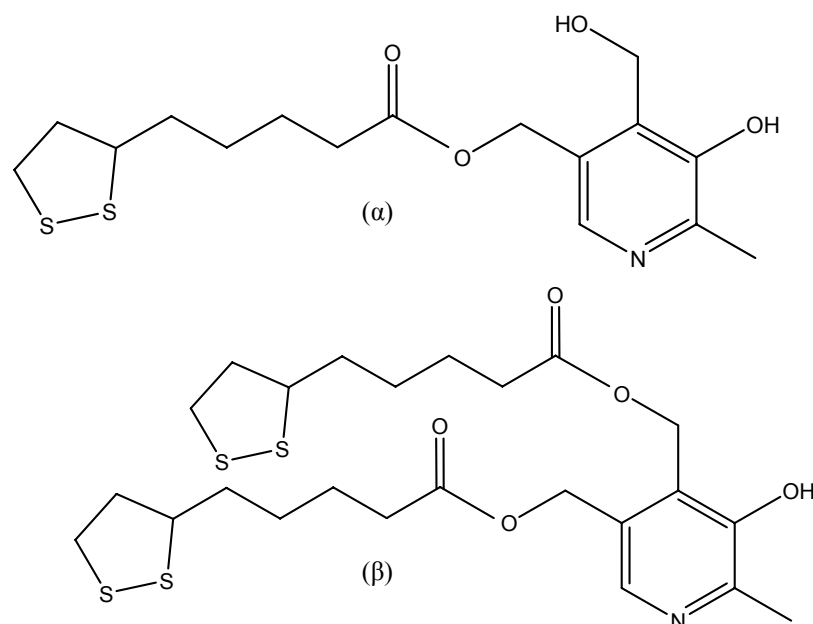
Ο βαθμός αναστολής της XOD από το ασκορβικό οξύ και το παράγωγό του απεικονίζεται στην **Σχήμα 8.2**.



Σχήμα 8.2 Εξάρτηση της αναστολής της οξειδάσης της ξανθίνης (XOD) από τη συγκέντρωση του λιποϊκού οξέος (●), του ασκορβικού οξέος (■) και του εστέρα αυτού με το λιποϊκό οξύ (□).

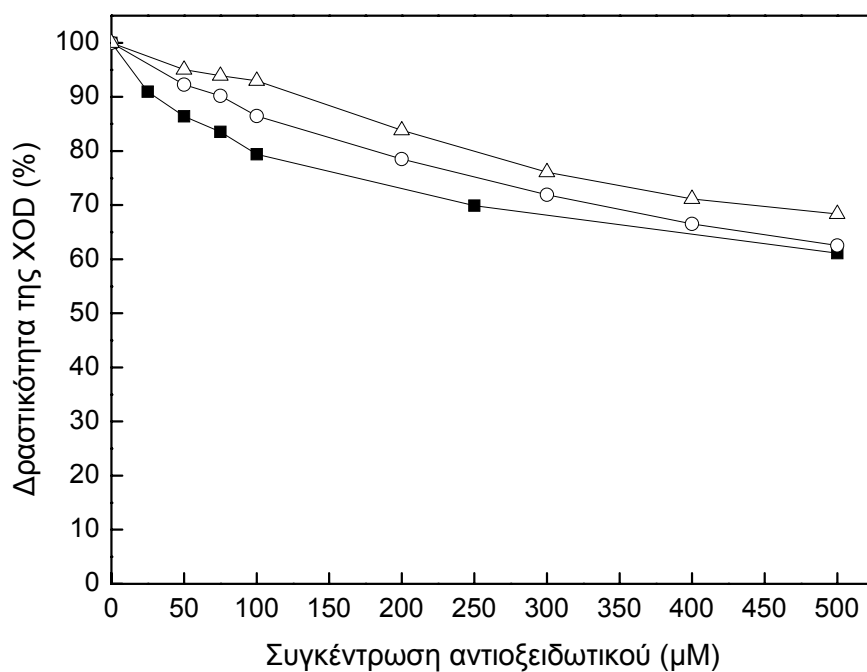
Παρατηρείται πως το νέο λιπόφιλο φυσικό αντιοξειδωτικό αναστέλλει τη δράση της XOD με έναν εξαρτώμενο από τη συγκέντρωσή του τρόπο, όπως συμβαίνει αντίστοιχα και στην περίπτωση του ασκορβικού οξέος. Το νέο λιπόφιλο αντιοξειδωτικό φαίνεται να διατηρεί τη βιολογική δράση της πρόδρομης ένωσης (ασκορβικό οξύ). Αξίζει να σημειωθεί, ωστόσο, πως υπό τις ίδιες συνθήκες το δεύτερο υπόστρωμα, δηλαδή το λιποϊκό οξύ, δεν διαθέτει την ικανότητα αναστολής της οξειδάσης της ξανθίνης (**Σχήμα 8.2**). Το γεγονός αυτό καταδεικνύει τη σημασία της σύνθεσης υβριδικών αντιοξειδωτικών, η οποία συνίσταται στην ενσωμάτωση νέων βιολογικών δράσεων σε ένα νέο μόριο μέσω του συνδυασμού δύο βιοδραστικών ενώσεων.

Στην περίπτωση εστεροποίησης της πυριδοξίνης από το λιποϊκό οξύ παρατηρήθηκε η σύνθεση δύο προϊόντων, του μόνο- και δι-ακυλιωμένου παραγώγου (**Εικόνα 8.2**).



Εικόνα 8.2 Δομή του ενζυμικά συντιθέμενου (α) μονοεστέρα και (β) διεστέρα του λιποϊκού οξέος με την πυριδοξίνη.

Η ικανότητα των νέων αυτών παραγώγων και της πρόδρομης ένωσης να αναστέλλουν τη δράση της XOD απεικονίζεται στο **Σχήμα 8.3**.

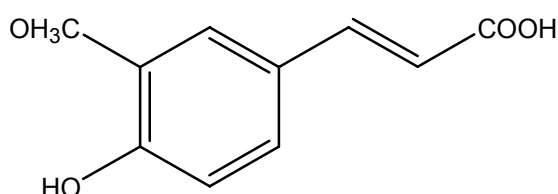


Σχήμα 8.3 Εξάρτηση της αναστολής της οξειδάσης της ξανθίνης (XOD) από τη συγκέντρωση της πυριδοξίνης (■), του μονοεστέρα (○) και διεστέρα (Δ) αυτής με το λιποϊκό οξύ.

Παρατηρείται και στην περίπτωση αυτή πως η αναστολή της XOD από τα ενζυμικά συντιθέμενα υβριδικά αντιοξειδωτικά εξαρτάται από τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού. Ωστόσο, η ακυλίωση της πυριδοξίνης από το λιποϊκό οξύ φαίνεται να μειώνει σε κάποιο βαθμό την ικανότητα αναστολής της δράσης του ενζύμου. Αυτό που έχει ενδιαφέρον είναι πως, η ταυτόχρονη ακυλίωση της πυριδοξίνης και στις δύο πρωτοταγείς υδροξυλικές ομάδες φαίνεται να οδηγεί σε μικρότερη ικανότητα αναστολής της XOD, συγκριτικά με το μονοακυλιωμένο παράγωγο, όμως το μόριο διατηρεί ακόμα μέρος της βιολογικής του δράσης. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πιθανά τη σημασία της ύπαρξης ελεύθερων υδροξυλικών ομάδων για την αναστολή του ενζύμου. Αν και η αναστολή της XOD από την πυριδοξίνη ή παράγωγα αυτής δεν έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά, η σημασία της παρουσίας ελεύθερων υδροξυλικών ομάδων στο μόριο του αναστολέα επισημάνθηκε στην περίπτωση μελέτης διαφόρων υδροξυλιωμένων φλαβονών [Cos *et al.*, 1998, van Hoorn *et al.*, 2002]. Η σημασία της ύπαρξης των ομάδων αυτών αποδόθηκε στην ικανότητα της υδροξυλιωμένης ένωσης να συμμετέχει στο σχηματισμό δεσμών υδρογόνου με συγκεκριμένες περιοχές του ενζύμου ή στη δομική ομοιότητά της με τη ξανθίνη, το φυσικό υπόστρωμα της XOD [van Hoorn *et al.*, 2002].

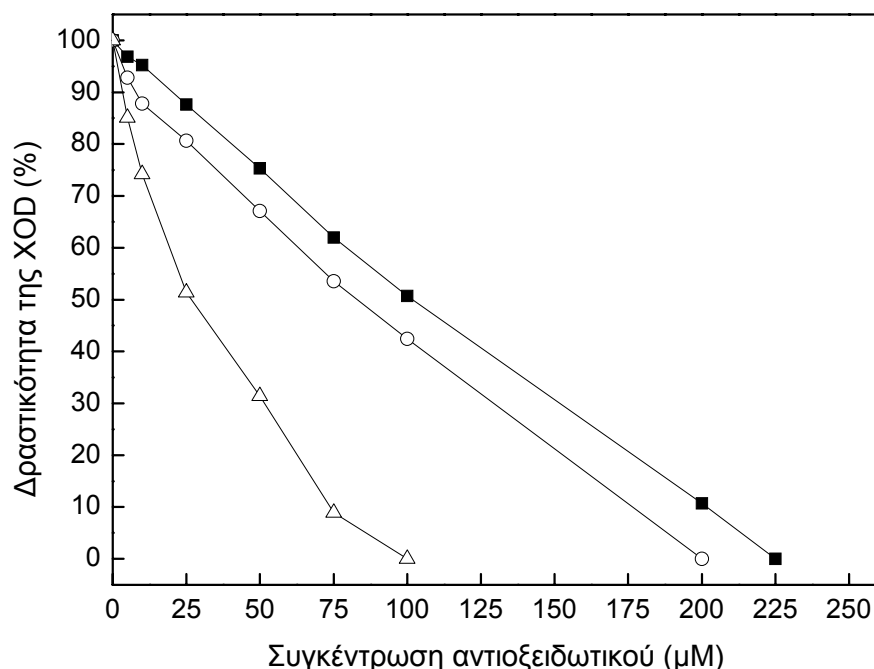
Η προηγούμενη μελέτη κατέδειξε πως τα ενζυμικά συντιθέμενα υβριδικά αντιοξειδωτικά των δύο βιταμινών έχουν την ικανότητα να δρουν ως αναστολείς της δράσης της οξειδάσης της ξανθίνης, αν και οι ενώσεις αυτές, συμπεριλαμβανομένων και των πρόδρομων ενώσεων, εμφανίζουν μία γενικά ασθενή ικανότητα αναστολής της δράσης του ενζύμου.

Το φερουλικό οξύ (**Εικόνα 8.3**) αποτελεί μία επίσης ενδιαφέρουσα ένωση με ποικίλες βιολογικές δράσεις, μεταξύ των οποίων και της ικανότητας αναστολής ενζύμων τα οποία εμπλέκονται σε οξειδωτικές διεργασίες [Graf, 1992, Kikuzaki *et al.*, 2002, Nenadis *et al.*, 2003, Srinivasan *et al.*, 2007, Zhao & Moghadasian, 2008].



Εικόνα 8.3 Δομή του φερουλικού οξέος.

Η ικανότητα αναστολής της δράσης της οξειδάσης της ξανθίνης από το φερουλικό οξύ καθώς και από τους ενζυμικά συντιθέμενους αιθυλ- και οκτυλεστέρες του απεικονίζεται στην (Σχήμα 8.4).



Σχήμα 8.4 Εξάρτηση της αναστολής της οξειδάσης της ξανθίνης (XOD) από τη συγκέντρωση του φερουλικού οξέος (■), του αιθυλεστέρα του φερουλικού οξέος (○) και του οκτυλεστέρα του φερουλικού οξέος (Δ).

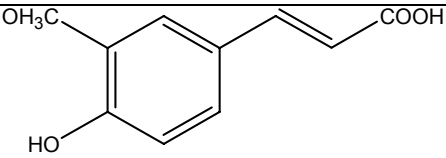
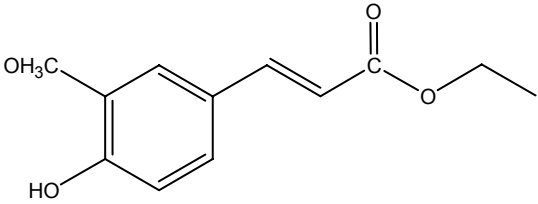
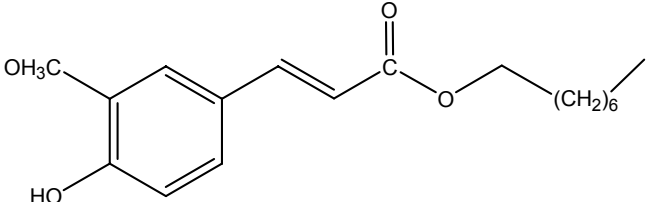
Σύμφωνα με το **Σχήμα 8.4** παρατηρείται αρχικά η αυξημένη ανασταλτική δράση του φερουλικού οξέος συγκριτικά με τις δύο βιταμίνες (ασκορβικό οξύ και πυριδοξίνη). Η ικανότητα αυτή του φερουλικού οξέος έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά και έχει συνδεθεί με τη παρουσία της α,β -ακόρεστης COOH ομάδας καθώς και με την υδροξυλική ομάδα στο φαινολικό δακτύλιο της ένωσης (**Εικόνα 8.3**) [Chan *et al.*, 1995, Talla *et al.*, 1996, Zhang *et al.*, 2003]. Η αναστολή της XOD από το φερουλικό οξύ φαίνεται να εξαρτάται από τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού και σε συγκέντρωση αυτού ίση με 225 μM η δράση του ενζύμου αναστέλλεται πλήρως.

Όσον αφορά στα παράγωγα του φερουλικού οξέος παρατηρείται πως ο αιθυλεστέρας αυτού εμφανίζει σχετικά μεγαλύτερη ικανότητα αναστολής της XOD συγκριτικά με το μη τροποποιημένο υπόστρωμα. Επίσης και για την ένωση αυτή παρατηρείται εξάρτηση του βαθμού αναστολής από τη συγκέντρωσή της.

Όσον αφορά τον οκτυλεστέρα του φερουλικού οξέος, το παράγωγο αυτό εμφανίζει σημαντική ικανότητα αναστολής της XOD, μεγαλύτερη από εκείνη του φερουλικού οξέος ή του αιθυλεστέρα αυτού. Πλήρης αναστολή του ενζύμου παρατηρείται σε συγκέντρωση 2.25 φορές μικρότερη (100 μ M) από εκείνη του φερουλικού οξέος.

Τα προαναφερόμενα αποτελέσματα καταδεικνύουν τη βελτίωση της ανασταλτικής δράσης με την αύξηση της αλκυλικής αλυσίδας του συντιθέμενου εστέρα. Δεδομένου ότι οι ομάδες εκείνες οι οποίες θεωρούνται σημαντικές για την ανασταλτική δράση (δηλ. το αρωματικό υδροξύλιο και η προπενοϊκή αλυσίδα) διατηρούνται στα παράγωγα του φερουλικού, η αυξημένη ανασταλτική δράση των παραγώγων θα μπορούσε να συσχετιστεί με την αυξημένη λιποφιλικότητα τους (**Πίνακας 8.1**). Παρόμοια συμπεριφορά έχει αναφερθεί και στην περίπτωση αλκυλ-παραγώγων της υποξανθίνης [Biagi *et al.*, 1993, 2001], όπου η αυξημένη ανασταλτική δράση των λιπόφιλων παραγώγων αποδόθηκε στην καλύτερη αλληλεπίδραση αυτών με τη λιπόφιλη θέση πρόσδεσης, η οποία εντοπίζεται κοντά στο ενεργό κέντρο της οξειδάσης της ξανθίνης [Biagi *et al.*, 1993].

Πίνακας 8.1 Δομή του φερουλικού οξέος και των ενζυμικά συντιθέμενων παραγώγων του και τιμή του συντελεστή κατανομής αυτών μεταξύ του νερού και της οκτανόλης ($\log P$).

Βιοδραστική ένωση	Δομή	$\log P^1$
Φερουλικό οξύ		1.51 (1.51) ²
Αιθυλεστέρας του φερουλικού οξέος		2.20
Οκτυλεστέρας του φερουλικού οξέος		5.25

¹ Η τιμή $\log P$ λαμβάνεται μέσω του προγράμματος ALOGPS v.2.1

(<http://www.vcclab.org/lab/alogps/start.html>) [Tetko & Tanchuk, 2002] και προσδιορίζεται με τη χρήση της υπολογιστικής μεθόδου XLOGP3 [Cheng *et al.*, 2007].

² Η τιμή αυτή αντιστοιχεί στην πειραματικά προσδιοριζόμενη τιμή του $\log P$.

8.2 Μελέτη της δυνατότητας αναστολής της 15-λιποξυγονάσης

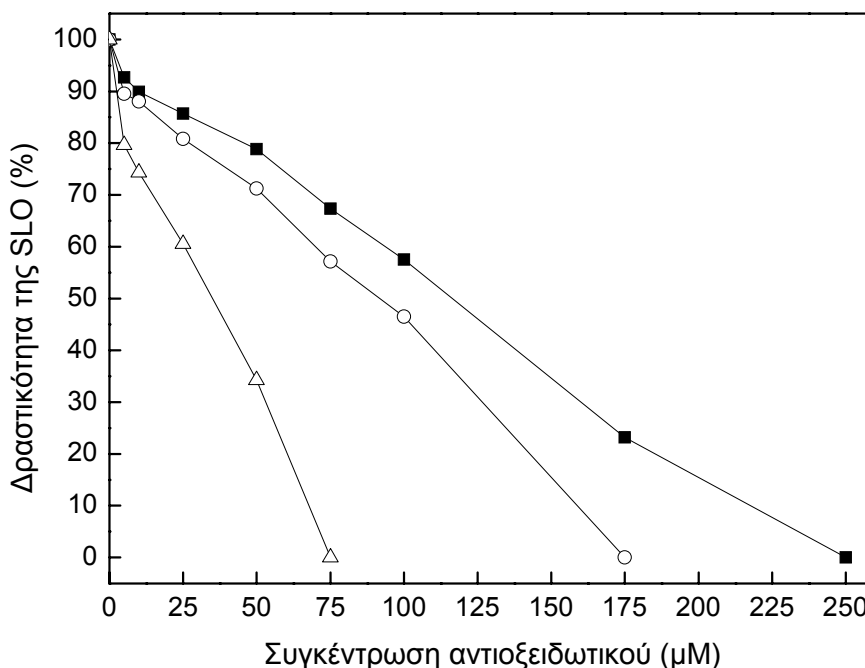
Αντιδράσεις οξειδωσης πολυακόρεστων λιπαρών οξέων καταλυόμενες από διοξυγονάσες αποτελούν διεργασίες, οι οποίες θεωρούνται η κύρια αιτία της γήρανσης και συμμετέχουν στην εμφάνιση διαφόρων ασθενειών, όπως ο καρκίνος, η αθηροσκλήρωση, οι φλεγμονώδεις και καρδιακές παθήσεις [Furstenberger *et al.*, 1991, Halliwell *et al.*, 1992, Sigal *et al.*, 1994, Cornicelli & Trivedi, 1999, Kelavkar *et al.*, 2001, Werz & Steinhilber, 2006, Detsi *et al.*, 2007]. Επιπρόσθετα, οι διοξυγονάσες, μέσω αντιδράσεων οξειδωσης λιπιδικών μορίων, εμπλέκονται στην αλλοίωση της ποιότητας τροφίμων [Barrett & Theerakulkait, 1995, Choe & Min, 2009]. Συνεπώς, η αναστολή της δράσης των ενζύμων αυτών παρουσιάζει ερευνητικό ενδιαφέρον.

Οι λιποξυγονάσες (LOX, EC 1.13.11.12) ανήκουν στην κατηγορία των διοξυγονασών που φέρουν σίδηρο και καταλύουν την οξείδωση πολυακόρεστων λιπαρών οξέων, τα οποία περιέχουν μία *cis-cis*-1,4-ομάδα πενταδιενίου, προς τα αντίστοιχα συζυγή *cis-trans*-διενοϊκά μονο-υδροϋπεροξειδία [Gardner, 1991]. Είναι ευρέως διαδεδομένες στη φύση και απαντώνται σε όλα τα ανώτερα φυτά και ζώα [Nikolaev *et al.*, 1990, Yamamoto, 1992]. Από τους οργανισμούς αυτούς έχουν απομονωθεί λιποξυγονάσες με διαφορετική τόπο-εκλεκτικότητα (5-LOX, 12-LOX, 15-LOX) [Nikolaev *et al.*, 1990, Yamamoto, 1992].

Η λιποξυγενάση τύπου-I από το φυτό *Glycine max* (σόγια) αποτελεί μία 15-LOX, η οποία καταλύει την οξείδωση του λινελαϊκού οξέος προς το 13-υδροϋπερόξυ-οκταδεκαδιενοϊκό οξύ (13-HPODE) [Yamamoto, 1992]. Εξαιτίας, των δομικών και λειτουργικών ομοιοτήτων με τις λιποξυγονάσες των θηλαστικών, η λιποξυγονάση από το φυτό σόγια (SLO) χρησιμοποιείται ευρέως ως μοντέλο λιποξυγονασών από άλλες πηγές [Srinivasulu & Rao, 1993, Maccarrone *et al.*, 1995, Lapenna *et al.*, 2003, Nicolaidis *et al.*, 2004, Chaillou & Nazareno, 2006, Detsi *et al.*, 2007, Serpen & Gökmen, 2007].

Με βάση τα αποτελέσματα της προηγούμενης παραγράφου, τα ενζυμικά συντιθέμενα λιπόφιλα παράγωγά του φερουλικού οξέος εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα αναστολής της δράσης ενός άλλου οξειδωτικού ενζύμου, της οξειδάσης της ξανθίνης. Στην παράγραφο αυτή μελετάται, επίσης, η δυνατότητα αναστολής της λιποξυγονάσης από το φυτό σόγια (SLO) από το φερουλικό οξύ και τον αιθυλ- και οκτυλεστέρα του φερουλικού οξέος. Η δυνατότητα αναστολής της SLO από τις προαναφερόμενες ενώσεις μελετήθηκε φωτομετρικά μέσω του προσδιορισμού της παραγωγής του 13-HPODE, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το άλας νατρίου του λινελαϊκού οξέος (§ 5.2.10.2) [Maccarrone *et al.*, 1995, Detsi *et al.*, 2007].

Ο βαθμός αναστολής της SLO από το φερουλικό οξύ και τα παράγωγά του απεικονίζεται στο **Σχήμα 8.5**.



Σχήμα 8.5 Εξάρτηση της αναστολής της λιποξυγενάσης τύπου-I από το φυτό σόγια (SLO) από τη συγκέντρωση του φερουλικού οξέος (■), του αιθυλεστέρα του φερουλικού οξέος (○) και του οκτυλεστέρα του φερουλικού οξέος (Δ).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του **Σχήματος 8.5**, το φερουλικό οξύ έχει την ικανότητα να αναστέλλει τη δράση της SLO με έναν εξαρτώμενο από τη συγκέντρωση τρόπο. Εξάρτηση του βαθμού αναστολής της SLO από τη συγκέντρωση του αντιοξειδωτικού παρατηρείται επίσης και στην περίπτωση των ενζυμικά συντιθέμενων παραγώγων του φερουλικού οξέος.

Ωστόσο, τα παράγωγα αυτά εμφανίζουν αυξημένη ικανότητα αναστολής της δράση της SLO, σε σχέση με το φερουλικό οξύ. Μεταξύ των δύο προϊόντων, ο οκτυλεστέρας αναστέλλει πλήρως τη δράση της SLO σε συγκέντρωση περίπου 2.3 και 3.3 φορές μικρότερη συγκριτικά με τον αιθυλεστέρα του φερουλικού και το φερουλικό οξύ, αντίστοιχα. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και στην περίπτωση της μελέτης αναστολής της SLO από λιπόφιλα παράγωγα ενός άλλου φαινολικού οξέος, του γαλλικού οξέος [Ha *et al.*, 2004].

Μελέτες της SLO έχουν καταδείξει πως οι αναστολείς μπορούν να δρουν μέσω ποικίλων μηχανισμών, για παράδειγμα μέσω πρόσδεσης σε περιοχές διαφορετικές από το ενεργό κέντρο του ενζυμικού μορίου [Lomnitski *et al.*, 1993], μέσω της αναστολής του

σχηματισμού της ενεργοποιημένης Fe(III) μορφής του ενζύμου [Sud'ina *et al.*, 1993] ή μέσω της αλληλεπίδρασης με το λιπόφιλο εσωτερικό της χοανοειδούς περιοχής [Boyington *et al.*, 1993], η οποία οδηγεί στο ενεργό κέντρο [Kuninori *et al.*, 1992, Maccarrone *et al.*, 1995].

Η τελευταία αυτή περίπτωση πιθανά εξηγεί τα παρατηρούμενα αποτελέσματα στην περίπτωση των λιπόφιλων παραγώγων του φερουλικού οξέος καθώς, η σειρά αύξησης της λιποφιλικότητας των υπό μελέτη ενώσεων (**Πίνακας 8.1**) είναι σύμφωνη με τη σειρά αύξησης της ανασταλτικής δράσης των ενώσεων (φερουλικό οξύ < αιθυλεστέρας του φερουλικού οξέος < οκτυλεστέρας του φερουλικού οξέος).

Συμπεράσματα

9. Συμπεράσματα

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η δυνατότητα βιοκαταλυτικής τροποποίησης της δομής φυσικών αντιοξειδωτικών, σε μία νέα κατηγορία μη συμβατικών μέσων, τα ιοντικά υγρά. Η βιοκαταλυτική τροποποίηση αφορά σε αντιδράσεις εστεροποίησης των φυσικών αντιοξειδωτικών με διάφορα οξέα και αλκοόλες, οι οποίες πραγματοποιούνται με τη χρήση λιπασών μικροβιακής προέλευσης. Μέσω των αντιδράσεων αυτών επιχειρείται η αύξηση του λιπόφιλου χαρακτήρα των φυσικών αντιοξειδωτικών και η σύνθεση νέων βιοδραστικών παραγώγων. Η επίτευξη των παραπάνω στόχων συμβάλλει στην αντιμετώπιση ενός από τους σημαντικότερους περιορισμούς εφαρμογής των φυσικών αντιοξειδωτικών, αυτόν της δυνατότητας χρήσης τους σε λιπιδικά σκευάσματα, αλλά και παρέχει τη δυνατότητα σύνθεσης νέων βιοδραστικών παραγώγων και μελέτης των σχέσεων δομής-βιολογικής τους δράσης.

Η αξιοποίηση των ιοντικών υγρών ως μέσων για την τροποποίηση της δομής φυσικών αντιοξειδωτικών στη παρούσα μελέτη, εντάσσεται στα πλαίσια αναζήτησης νέων περιβαλλοντικά φιλικών μέσων για την πραγματοποίηση βιοκαταλυτικών αντιδράσεων. Ο χαρακτηρισμός των ιοντικών υγρών ως «πράσινων διαλυτών» βασίζεται στο γεγονός ότι αποτελούν μη πτητικά μέσα, χαμηλής τοξικότητας και υψηλής θερμικής και χημικής σταθερότητας. Επιπλέον, η χρήση των ιοντικών υγρών συνοδεύεται από πλήθος πλεονεκτημάτων, όπως η αυξημένη διαλυτότητα υδρόφοβων ή/και υδρόφιλων ενώσεων και η δυνατότητα ρύθμισης των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων, μέσω κατάλληλης επιλογής των ιοντικών ειδών από τα οποία αποτελούνται, μία δυνατότητα μοναδική μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών μη συμβατικών μέσων. Τέλος, αν και το πεδίο είναι ακόμη σχετικά νέο, διάφορες μελέτες καταδεικνύουν πως, στα νέα αυτά μη συμβατικά μέσα ένζυμα διαφόρων κατηγοριών επιδεικνύουν βελτιωμένες καταλυτικές ιδιότητες (σταθερότητα, δραστηριότητα, εκλεκτικότητα), συγκριτικά με τους συμβατικούς οργανικούς διαλύτες [Park & Kazlauskas, 2003, Yang & Pan, 2005, van Rantwijk & Sheldon, 2007, Roosen *et al.*, 2008, Sureshkumar & Lee, 2009]. Ωστόσο, τα καταλυτικά χαρακτηριστικά των ενζύμων στα ιοντικά υγρά και κυρίως η εξάρτηση αυτών από τη φύση και ιδιότητες των ιοντικών υγρών δεν είναι πλήρως μελετημένα και αποσαφηνισμένα. Για το λόγο αυτό στην παρούσα μελέτη επιχειρείται ταυτόχρονα και η διερεύνηση των καταλυτικών χαρακτηριστικών των χρησιμοποιούμενων μικροβιακών λιπασών σε ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά.

Με βάση τα παραπάνω, μελετήθηκε αρχικά η σταθερότητα διαφόρων ενζυμικών σκευασμάτων της λιπάσης B από *Candida antarctica* και της λιπάσης από *Rhizomucor miehei*, σε διάφορα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά, σε μία προσπάθεια αναγνώρισης των παραμέτρων εκείνων οι οποίες επιδρούν στην ενζυμική σταθερότητα στη νέα αυτή κατηγορία μη συμβατικών μέσων. Με βάση τα αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας, συμπεραίνεται πως διάφορα ενζυμικά σκευάσματα των δύο μικροβιακών λιπασών διατηρούν τη δραστηριότητά τους σε διαφορετικής σύστασης ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά. Η σύγκριση μάλιστα των αποτελεσμάτων αυτών με αντίστοιχα βιβλιογραφικά δεδομένα στην περίπτωση οργανικών διαλυτών [Arroyo *et al.*, 1999, Cao *et al.*, 1999, Li *et al.*, 2006, Réjasse *et al.*, 2006], υποδεικνύει το πλεονέκτημα χρήσης ιοντικών υγρών όσον αφορά στη σταθεροποιητική τους επίδραση προς τις δύο λιπάσες, ενώ τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης καταδεικνύουν κατά περιπτώσεις την αυξημένη σταθεροποιητική επίδραση των ιοντικών υγρών ακόμα και σε σχέση με το νερό. Όσον αφορά στην επίδραση διαφόρων παραμέτρων, παρατηρήθηκε αρχικά πως η προέλευση της λιπάσης επηρεάζει σημαντικά τη σταθερότητα της καθώς, σε όλες τις περιπτώσεις, η λιπάση B από *Candida antarctica* επιδεικνύει υψηλότερη σταθερότητα συγκριτικά με τη λιπάση από *Rhizomucor miehei*. Σημαντική είναι επίσης και η επίδραση του είδους του ενζυμικού σκευάσματος καθώς η σειρά σταθερότητας αυτών είναι ελεύθερο < λυοφιλιωμένο < ακινητοποιημένο, ανεξάρτητα της προέλευσης της λιπάσης και του χρησιμοποιούμενου ιοντικού υγρού. Η χρήση ιμιδαζολικών ιοντικών υγρών διαφορετικής σύστασης επέτρεψε τη μελέτη της επίδρασης της φύσης του μέσου στη σταθερότητα των δύο λιπασών και κατέδειξε τη σημαντική επίδραση αυτής της παραμέτρου. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε αυξημένη σταθερότητα των δύο λιπασών σε ιοντικά υγρά, τα οποία περιέχουν μεγάλου μήκους αλκυλικούς υποκαταστάτες (C_8) στο κατιόν και ανιόν PF_6^- . Όσον αφορά στην επίδραση του κατιόντος, η παρατηρούμενη αύξηση της σταθερότητας με την αύξηση της αλκυλικής αλυσίδας αυτού μπορεί να συνδεθεί με την αύξηση της υδροφοβικότητας και μείωση της πολικότητας του ιοντικού υγρού, καθώς υδρόφοβα, λιγότερο πολικά, ιοντικά υγρά εμφανίζουν μικρότερη τάση να απομακρύνουν μόρια νερού από το απαραίτητο στρώμα νερού του ενζύμου. Όσον αφορά στο ανιόν, παρατηρείται ότι τα PF_6^- ιοντικά υγρά επάγουν μία σημαντική σταθεροποιητική επίδραση ή ακόμα και κατά περιπτώσεις ενεργοποίηση των δύο λιπασών, συγκριτικά με τα BF_4^- ιοντικά υγρά. Η βασικότητα των δεσμών υδρογόνου και η πυρηνοφιλία αποτελούν ιδιότητες εξαρτώμενες κυρίως από το ανιόν και φαίνεται να επηρεάζουν σημαντικά την ενζυμική δραστηριότητα και σταθερότητα. Καθώς η βασικότητα των δεσμών υδρογόνου του ανιόντος

αυξάνεται κατά τη σειρά $\text{PF}_6^- < \text{BF}_4^-$, ενώ η πυρηνοφιλία κατά την αντίθετη, η αυξημένη σταθερότητα των λιπασών στα PF_6^- ιοντικά υγρά μπορεί να εξηγηθεί μέσω της μικρότερης τάσης του λιγότερο πυρηνόφιλου και με μικρότερη βασικότητα δεσμών υδρογόνου PF_6^- ανιόντος να αλληλεπιδρά με τα θετικά φορτισμένα κατάλοιπα και με τους εσωτερικούς δεσμούς υδρογόνου των ενζυμικών μορίων, αντίστοιχα, σταθεροποιώντας τα ένζυμα. Μία άλλη πιθανή εξήγηση σχετίζεται με τον υδρόφιλο χαρακτήρα των ιοντικών υγρών. Μη αναμίξιμα με το νερό ιοντικά υγρά, όπως το $[\text{bmim}]\text{PF}_6$, πιθανά επικαλύπτουν την επιφάνεια του ενζύμου, ασκώντας μία προστατευτική δράση στο απαραίτητο στρώμα νερού της λιπάσης. Αντίθετα, υδρόφιλα ιοντικά υγρά, όπως το $[\text{bmim}]\text{BF}_4$, εμφανίζουν τη τάση να απομακρύνουν μόρια νερού από την ενζυμική επιφάνεια, επάγοντας τη μετουσίωσή του. Υπό τη θεώρηση αυτή, η παρουσία επιπλέον νερού θα μπορούσε να συμβάλλει στην αύξηση της σταθερότητας των λιπασών σε υδρόφιλα ιοντικά υγρά. Το γεγονός αυτό επαληθεύτηκε στην περίπτωση των ελεύθερων λιπασών, όπου η αύξηση της περιεκτικότητας του $[\text{bmim}]\text{BF}_4$ σε νερό από 2.5 σε 5.0% κ.ο. συνέβαλλε στην αύξηση της σταθερότητας του ενζύμου. Η αντίθετη τάση παρατηρήθηκε στο $[\text{bmim}]\text{PF}_6$, δηλαδή μείωση της σταθερότητας των λιπασών με αύξηση της περιεκτικότητας σε νερό, και μπορεί πιθανά να εξηγηθεί μέσω της σειράς Hofmeister. Σε αυτή την περίπτωση, η διάσταση του ιοντικού υγρού σε ιόντα είναι πιθανό να λαμβάνει χώρα, με συνέπεια το ισχυρά χαοτροπικό ανιόν PF_6^- να οδηγεί σε σημαντική αποσταθεροποίηση του ενζύμου, συγκριτικά με το λιγότερο χαοτροπικό BF_4^- . Η περίπτωση αυτή αποτελεί και τη μοναδική απόκλιση από τα παρατηρούμενα αποτελέσματα, σύμφωνα με τα οποία η σταθερότητα των υπό μελέτη λιπασών, ανεξάρτητα της προέλευσής τους και του είδους του ενζυμικού σκευάσματος, ήταν αυξημένη στο υδρόφοβο $[\text{bmim}]\text{PF}_6$ συγκριτικά με το $[\text{bmim}]\text{BF}_4$.

Προκειμένου να εξηγηθούν τα αποτελέσματα σταθερότητας των λιπασών και οι παρατηρούμενες διαφοροποιήσεις, ανάλογα με τη φύση του ιοντικού υγρού, μελετήθηκε η σχέση δομής-σταθερότητας της λιπάσης B από *Candida antarctica* και της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* σε ιοντικά υγρά. Για το σκοπό αυτό διερευνήθηκε η δυνατότητα εφαρμογής διαφόρων φασματοσκοπικών τεχνικών, μέσω των οποίων μπορούν να ανιχνευτούν δομικές αλλαγές των ενζυμικών μορίων και να κατανοηθούν οι μηχανισμοί απενεργοποίησης ή και ενεργοποίησης των ενζύμων στα νέα αυτά μέσα. Από τη μελέτη αυτή, και ως προς τη δυνατότητα εφαρμογής των τεχνικών, φάνηκε πως ο κυκλικός διχρωισμός δεν μπορεί να εφαρμοστεί για τη μελέτη της δομής των λιπασών, εξαιτίας της υψηλής απορρόφησης του ιμιδαζολικού δακτυλίου του κατιόντος των ιοντικών υγρών. Περιορισμοί

παρατηρήθηκαν και στην περίπτωση της φασματοσκοπίας φθορισμού, οι οποίοι αφορούν στη μελέτη των λιπασών σε ιοντικά υγρά με ανιόν BF_4^- , λόγω του φαινομένου της απόσβεσης φθορισμού. Ωστόσο, η τεχνική αυτή ήταν δυνατόν να εφαρμοστεί για τη μελέτη δομικών μεταβολών των δύο λιπασών στο ιοντικό υγρό $[\text{bmim}]\text{PF}_6$. Στην περίπτωση αυτή μελετήθηκε η διαδικασία αποδιάταξης της ελεύθερης λιπάσης B από *Candida antarctica* και της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* στο νερό και στο ιοντικό υγρό $[\text{bmim}]\text{PF}_6$ παρουσία 2.5 και 5.0% κ.ο. νερού σε δύο θερμοκρασίες. Η διαδικασία αποδιάταξης μελετήθηκε μέσω της μεταβολής του λ_{max} και I_{max} συναρτήσει του χρόνου επώασης. Με βάση τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας φθορισμού παρατηρήθηκε ότι, η αποσταθεροποίηση των δύο ελεύθερων λιπασών στο νερό και στο κορεσμένο με νερό $[\text{bmim}]\text{PF}_6$ συνδέεται με την αποδιάταξή τους, η οποία καταδεικνύεται από την αυξημένη έκθεση των καταλοίπων τρυπτοφάνης στο μέσο, μέσω της αύξησης του λ_{max} και μείωσης του I_{max} . Αντίθετα, στο $[\text{bmim}]\text{PF}_6$ παρουσία 2.5% κ.ο. νερού παρατηρείται, και στις δύο θερμοκρασίες, μικρότερη μεταβολή του λ_{max} και I_{max} και άρα η ικανότητα διατήρησης της δομής των δύο λιπασών, η οποία δικαιολογεί την υψηλή σταθερότητά τους στο μέσο αυτό. Στην περίπτωση αυτή καταδεικνύεται πιθανά η υιοθέτηση μίας νέας διαμόρφωσης των δύο λιπασών, όπως αυτή αντικατοπτρίζεται από την αλλαγή της παραμέτρου λ_{max} , συγκριτικά με την περίπτωση του νερού και του κορεσμένου με νερό $[\text{bmim}]\text{PF}_6$. Η υπόθεση αυτή επιβεβαιώνεται και από τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας υπερύθρου. Η παράμετρος που χρησιμοποιήθηκε είναι ο συντελεστής συσχέτισης r μεταξύ των φασμάτων δευτέρας παραγώγου στην περιοχή amide I, θεωρώντας ως φάσμα αναφοράς αυτό στο νερό. Η τιμή του συντελεστή r στην περίπτωση των ακινητοποιημένων, λυοφιλιωμένων και ελεύθερων λιπασών στα ιοντικά υγρά $[\text{bmim}]\text{BF}_4$ και $[\text{bmim}]\text{PF}_6$ είναι γενικά μικρή, και άρα η δομή της λιπάσης στα ιοντικά υγρά διαφοροποιείται σε σχέση με τη φυσική διαμόρφωση του ενζύμου στο νερό. Με σύγκριση των συντελεστών μεταξύ των δύο μέσων, το υδρόφοβο $[\text{bmim}]\text{PF}_6$ φαίνεται να επάγει μία σημαντικότερη τροποποίηση της δομής συγκριτικά με το $[\text{bmim}]\text{BF}_4$. Η συσχέτιση των δομικών αυτών αλλαγών με τη σταθερότητα των δύο λιπασών στα ιοντικά υγρά επιχειρήθηκε μέσω της αναγνώρισης των στοιχείων δευτεροταγούς δομής από τα φάσματα δευτέρας παραγώγου στην περιοχή amide I και την ανίχνευση πιθανών διαφοροποιήσεων αυτών μετά την επώαση των διαφόρων σκευασμάτων των λιπασών σε ιοντικά υγρά για 0 και 24 h στους 60°C . Με βάση τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας υπερύθρου παρατηρήθηκε πως, στο υδρόφιλο $[\text{bmim}]\text{BF}_4$ η μειωμένη σταθερότητα των ακινητοποιημένων και λυοφιλιωμένων λιπασών συνδέεται με τη σημαντική τροποποίηση της δευτεροταγούς δομής τους, με ανακατανομή

στοιχείων, όπως οι β-πτυχές, μείωση των α-ελίκων και αύξηση του τυχαίου σπειράματος. Οι αλλαγές αυτές είναι πιθανό να σχετίζονται με την ικανότητα του [bmim]BF₄ να απομακρύνει μόρια νερού από το απαραίτητο στρώμα νερού του ενζύμου ή να αλληλεπιδρά με το πρωτεϊνικό μόριο μέσω δεσμών υδρογόνου, υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Αντίθετα, στο υδρόφοβο [bmim]PF₆ η ενεργοποίηση της ακινητοποιημένης και λυοφιλιωμένης λιπάσης B από *Candida antarctica*, συνδέεται με την υιοθέτηση μίας νέας περισσότερο άκαμπτης ενζυμικής δομής, μέσω αύξησης των β-πτυχών, β-στροφών και ταυτόχρονης μείωσης των α-ελίκων χωρίς μεταβολή του τυχαίου σπειράματος. Στην περίπτωση δε της ακινητοποιημένης και λυοφιλιωμένης λιπάσης από *Rhizomucor miehei* η υψηλή σταθερότητα στο ιοντικό αυτό υγρό εξηγείται από την ύπαρξη μικρών μόνο δομικών αλλαγών, δηλαδή μέσω της ικανότητας του [bmim]PF₆ να διατηρεί την καταλυτικά ενεργή διαμόρφωση της λιπάσης. Διαφορετική είναι η εικόνα στην περίπτωση επώασης των ελεύθερων λιπασών στα κορεσμένα με νερό ιοντικά υγρά. Πιο συγκεκριμένα, η μειωμένη σταθερότητα των δύο λιπασών στο [bmim]PF₆ παρουσία 5% κ.ο. νερού σχετίζεται με την αύξηση του τυχαίου σπειράματος, τη μείωση των α-ελίκων και β-στροφών και πιθανά τη δημιουργία συσσωματωμάτων, συνολικά δηλαδή με μία τροποποίηση της διαμόρφωσης της λιπάσης προς μία αποδιαταγμένη δομή. Αντίθετα, παρουσία 5.0% κ.ο. νερού, το ιοντικό υγρό [bmim]BF₄ εμφανίζει μικρότερη τάση τροποποίησης της διαμόρφωσης των ενζύμων, όπως καταδεικνύεται από το σημαντικό βαθμό ομοιότητας των φασμάτων των δύο ελεύθερων λιπασών (μετά από 0 και 24 h επώασης), και η ικανότητα αυτή φαίνεται να σχετίζεται με την σταθεροποίηση των ενζύμων στο μέσο αυτό.

Τα αποτελέσματα της μελέτης σταθερότητας καθιστούν σαφές πως η χρήση των ιοντικών υγρών προσδίδει ανώτερες ιδιότητες στις λιπάσες, συμβάλλοντας στη σταθεροποίησή τους. Η σταθεροποίηση αυτή απορρέει τόσο από την αλληλεπίδραση του ιοντικού υγρού με το απαραίτητο στρώμα νερού του ενζύμου, όσο και από την άμεση επίδρασή του στην ενζυμική δομή. Με βάση τα δεδομένα αυτά, η περαιτέρω μελέτη των καταλυτικών ιδιοτήτων, δραστηριότητα και εκλεκτικότητα, των λιπασών στα ιοντικά υγρά επιχειρήθηκε μέσω της τροποποίησης της δομής διαφόρων φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως φλαβονοειδών, φαινολικών γλυκοσιδίων, φαινολικών οξέων και βιταμινών, η οποία πραγματοποιείται μέσω αντιδράσεων εστεροποίησης ή μετεστεροποίησης. Οι προαναφερόμενες αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση λιπασών διαφορετικής μικροβιακής προέλευσης.

Τα αποτελέσματα της μελέτης αυτής καταδεικνύουν πως, ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά βασισμένα σε ανιόντα BF_4^- και PF_6^- αποτελούν ιδανικά μέσα για την καταλυόμενη από λιπάσες σύνθεση λιπόφιλων παραγώγων διαφόρων φυσικών αντιοξειδωτικών. Συγκριτικές μελέτες με χρήση των ιοντικών υγρών ή ευρέως χρησιμοποιούμενων συμβατικών οργανικών διαλυτών ως μέσων δείχνουν πως, κατά περιπτώσεις, οι αποδόσεις των αντιδράσεων είναι μεγαλύτερες στα ιοντικά υγρά. Ενδεικτική είναι η περίπτωση των φαινολικών οξέων, η εστεροποίηση των οποίων σε οργανικούς διαλύτες οδηγεί σε ιδιαίτερα χαμηλές αποδόσεις [Guyot *et al.*, 1997, Buisman *et al.*, 1998, Stamatis *et al.*, 1999a, Compton *et al.*, 2000, Cassani *et al.*, 2007], είναι εφικτή με τη χρήση εξειδικευμένων ενζύμων, με τη χρήση μεγάλης ποσότητας βιοκαταλυτών ή ενεργοποιημένων υποστρωμάτων και απαιτεί μεγάλους χρόνους επώασης σε αντίθεση με την περίπτωση των ιοντικών υγρών [Gao *et al.*, 2000, Armesto *et al.*, 2003, Topakas *et al.*, 2003, Lee *et al.*, 2006, Vafiadi *et al.*, 2008]. Στα νέα αυτά μη συμβατικά μέσα παρατηρούνται επίσης υψηλές ταχύτητες και μεγαλύτερη τόπο-εκλεκτικότητα, συγκριτικά με τους οργανικούς διαλύτες [Kontogianni *et al.*, 2003, Passicos *et al.*, 2004, Mellou *et al.*, 2005]. Επιπρόσθετα, μέσω της υψηλής διαλυτότητας των φυσικών αντιοξειδωτικών παρέχεται η δυνατότητα σύνθεσης, σε μία βιοκαταλυτική διεργασία ενός και μόνου βήματος, μεγάλων ποσοτήτων των λιπόφιλων παραγώγων των ενώσεων αυτών, οι οποίες είναι σημαντικά υψηλότερες από εκείνες που έχουν αναφερθεί στην περίπτωση ευρέως χρησιμοποιούμενων οργανικών διαλυτών [Guyot *et al.*, 1997, Stamatis *et al.*, 1999a, 2001c, Compton *et al.*, 2000, Otto *et al.*, 2000, Kontogianni *et al.*, 2001, 2003, Gayot *et al.*, 2003, Ardhaoui *et al.*, 2004b].

Επιπλέον της δυνατότητας τροποποίησης της δομής διαφόρων φυσικών αντιοξειδωτικών σε ιοντικά υγρά, μελετήθηκε και η επίδραση ποικίλων παραμέτρων στην πορεία των βιοκαταλυτικών αντιδράσεων. Η πιο σημαντική ίσως εξ' αυτών συνδέεται με τη φύση του ιοντικού υγρού. Τα μέσα αυτά αναφέρονται ως «designer solvents» καθώς παρέχουν την δυνατότητα καθορισμού των ιδιοτήτων τους, μέσω κατάλληλης επιλογής των ιόντων τους, μία δυνατότητα μοναδική μεταξύ των διαφόρων κατηγοριών μη συμβατικών μέσων. Με βάση τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης, οι διαφορές στη φύση και άρα και στις ιδιότητες των ιοντικών υγρών επηρεάζουν σημαντικά τόσο την αλληλεπίδραση του μέσου με τα υποστρώματα/προϊόντα (π.χ. τη διαλυτότητα αυτών), όσο και τα καταλυτικά χαρακτηριστικά των λιπασών, και μέσω αυτών την πορεία των ενζυμικών αντιδράσεων τροποποίησης των φυσικών αντιοξειδωτικών. Χαρακτηριστική είναι η επίδραση της φύσης του ιοντικού υγρού στην τόπο-εκλεκτικότητα των ενζυμικών αντιδράσεων, όπου

παρατηρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις αυξημένη εκλεκτικότητα στα μέσα εκείνα όπου η διαλυτότητα των αντιοξειδωτικών ήταν αυξημένη, δηλαδή στα BF_4^- συγκριτικά με τα PF_6^- ιοντικά υγρά. Σημαντική, εξάλλου, είναι και η επίδραση του κατιόντος, καθώς σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε η θετική επίδραση της αύξησης της αλκυλικής αλυσίδας αυτού στην απόδοση των ενζυμικών αντιδράσεων.

Μία άλλη σημαντική παράμετρο αποτελεί η φύση των υποστρωμάτων. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η εστεροποίηση των φυσικών αντιοξειδωτικών είναι δυνατή με τη χρήση διαφόρων λιπαρών οξέων, αλκοολών ή ακόμη και άλλων αντιοξειδωτικών (όπως το λιποϊκό οξύ), αλλά η απόδοση των ενζυμικών αντιδράσεων φαίνεται να εξαρτάται από τη φύση των υποστρωμάτων αυτών. Στην περίπτωση της ναριγκίνης, της ρουτίνης και της σιλιμπίνης υψηλότερες αποδόσεις παρατηρήθηκαν με χρήση ακυλο-δοτών μικρής ανθρακικής αλυσίδας (έως 4 ατόμων άνθρακα). Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τη διαφορετική εκλεκτικότητα της λιπάσης (Novozym 435) στα ιοντικά υγρά, συγκριτικά με τους οργανικούς διαλύτες [Pedersen *et al.*, 2002, Kontogianni *et al.*, 2003, Ardhaoui *et al.*, 2004a], και αποδεικνύει τη σημαντική επίδραση του μέσου. Επιπλέον του μέσου, διαφορετική εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα παρατηρείται και ανάλογα με την προέλευση της λιπάσης. Στην περίπτωση των φαινολικών οξέων, η Novozym 435 επιδεικνύει αυξημένη εκλεκτικότητα για αλκοόλες μικρής αλυσίδας (έως 2 ατόμων άνθρακα), ενώ η Lipozyme RMIM για αλκοόλες 4 και 10 ατόμων άνθρακα. Στην πορεία των ενζυμικών αντιδράσεων επιδρά και η φύση του αντιοξειδωτικού. Στην περίπτωση των πολυφαινολικών ενώσεων, η παρουσία ή μη γλυκοσιδικών ομάδων και η ύπαρξη πρωτοταγών ή δευτεροταγών υδροξυλικών ομάδων διαφοροποιεί σημαντικά την απόδοση και εκλεκτικότητα των ενζυμικών αντιδράσεων. Αντίστοιχα, στην περίπτωση των φαινολικών οξέων, παρατηρήθηκε διαφοροποίηση της απόδοσης και ταχύτητας της αντίδρασης ανάλογα με το είδος των υποκαταστατών του φαινολικού δακτυλίου και την παρουσία διπλού δεσμού στην ακυλική αλυσίδα του υποστρώματος.

Επιπλέον των προαναφερόμενων παραμέτρων, στην απόδοση, ταχύτητα και εκλεκτικότητα φαίνεται να επιδρούν η συγκέντρωση των υποστρωμάτων, η ποσότητα του ενζύμου, η θερμοκρασία της αντίδρασης και το περιεχόμενο στο μέσο νερό. Η μελέτη της επίδρασης διαφόρων παραμέτρων μέσω εμπειρικών μεθόδων, όπου μία παράμετρος μεταβάλλεται κάθε φορά διατηρώντας σταθερές τις υπόλοιπες, κατέδειξε τη σημαντική και θετική επίδραση της αύξησης του μοριακού λόγου των υποστρωμάτων και της θερμοκρασίας και την αρνητική επίδραση της αύξησης της περιεκτικότητας του μέσου σε νερό, στην

απόδοση των ενζυμικών αντιδράσεων τροποποίησης των φυσικών αντιοξειδωτικών. Αρνητική, ως προς την απόδοση, ήταν και η επίδραση της αύξησης της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού. Ωστόσο, με αύξηση της συγκέντρωσης του αντιοξειδωτικού, και βάσει της ικανότητας των ιοντικών υγρών να διαλυτοποιούν μεγάλες ποσότητες των αντιοξειδωτικών, κατέστη δυνατή η σύνθεση, σε ένα βιοκαταλυτικό στάδιο, ποσοτήτων των λιπόφιλων εστέρων σημαντικά μεγαλύτερων συγκριτικά με τους συμβατικούς οργανικούς διαλύτες [Kontogianni *et al.*, 2001, 2003, Gayot *et al.*, 2003, Ardhaoui *et al.*, 2004b, Mellou *et al.*, 2005]. Επιπρόσθετα της προαναφερόμενης εμπειρικής μελέτης, διερευνήθηκε η δυνατότητα αξιοποίησης στατιστικών μεθόδων, όπως η μεθοδολογία επιφάνειας απόκρισης (RSM). Η μελέτη κατέδειξε πως η RSM μπορεί να εφαρμοσθεί επιτυχώς για τη μελέτη της επίδρασης διαφόρων παραμέτρων (μοριακός λόγος υποστρωμάτων, συγκέντρωση αντιοξειδωτικού, ποσότητα ενζύμου, χρόνος αντίδρασης), αλλά και την αποκάλυψη των μεταξύ των αλληλεπιδράσεων, με απώτερο στόχο τη μαθηματική περιγραφή και βελτιστοποίηση των βιοκαταλυτικών αντιδράσεων τροποποίησης φυσικών αντιοξειδωτικών σε ιοντικά υγρά.

Με βάση τα προαναφερόμενα αποτελέσματα, η παρούσα μελέτη συμβάλλει στην ανάπτυξη μίας αποτελεσματικής βιοκαταλυτικής διεργασίας για την αύξηση του λιπόφιλου χαρακτήρα φυσικών αντιοξειδωτικών διαφόρων κατηγοριών, αξιοποιώντας ως μέσα τα «πράσινα», περιβαλλοντικά φιλικά ιοντικά υγρά. Η σημασία της τροποποίησης αυτής έγκειται όχι μόνο στη δυνατότητα εφαρμογής των λιπόφιλων παραγώγων σε υδρόφοβα/λιπιδικά σκευάσματα, αλλά και στην ύπαρξη ενός χρήσιμου εργαλείου για τη σύνθεση νέων βιοδραστικών ενώσεων. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνεται μέσω της μελέτης της αντιοξειδωτικής δράσης διαφόρων συντιθέμενων παραγώγων. Στην περίπτωση της σύνθεσης υβριδικών αντιοξειδωτικών βιταμινών με το λιποϊκό οξύ, η μελέτη της δυνατότητας αναστολής της δράσης του οξειδωτικού ενζύμου, οξειδάση της ξανθίνης, δείχνει την ικανότητα των συντιθέμενων παραγώγων να διατηρούν την αντιοξειδωτική δράση των πρόδρομων βιταμινών, αλλά κυρίως τη δυνατότητα ενσωμάτωσης μίας νέας βιολογικής ιδιότητας, την οποία δεν διαθέτει το λιποϊκό οξύ. Στην περίπτωση δε των λιπόφιλων παραγώγων του φερουλικού οξέος, οι συντιθέμενοι εστέρες εμφανίζουν σημαντικά βελτιωμένη αντιοξειδωτική δράση συγκριτικά με το μη τροποποιημένο υπόστρωμα, μέσω της αυξημένης ικανότητας αναστολής της δράσης των οξειδωτικών ενζύμων, οξειδάση της ξανθίνης και 15-λιποξυγονάση. Σημαντικά αυξημένη αντιοξειδωτική δράση εμφάνισαν εξάλλου και άλλα ενζυμικά συντιθέμενα παράγωγα φυσικών αντιοξειδωτικών, όπως ο ελαϊκός εστέρας της ρουτίνης και οι εστέρες του φερουλικού οξέος, μέσω της ικανότητας

αναστολής της επαγόμενης από ιόντα χαλκού οξείδωσης της χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνης (LDL) [Katsoura et al., 2006, 2009].

Επιπρόσθετα, είναι σημαντικό πως οι ενώσεις αυτές μπορούν να αποτελέσουν μοντέλα για την κατανόηση των σχέσεων δομής-βιολογικής δράσης των φυσικών αντιοξειδωτικών. Συγκεκριμένα, η μελέτη της ικανότητας αναστολής των οξειδωτικών ενζύμων κατέδειξε τη σημασία της παρουσίας ελεύθερων υδροξυλικών ομάδων στο μόριο του αντιοξειδωτικού και του βαθμού λιποφιλικότητας της ένωσης, στοιχεία από τα οποία φαίνεται να εξαρτάται η αλληλεπίδραση του αντιοξειδωτικού με το μόριο του ενζύμου. Αντίστοιχα, οι μελέτες της ικανότητας αναστολής της LDL κατέδειξαν τη σημασία της παρουσίας ακόρεστων δεσμών στα ενζυμικά συντιθέμενα παράγωγα των φλαβονοειδών [Katsoura et al., 2006], καθώς και τη θετική επίδραση της αύξησης της λιποφιλικότητας των παραγώγων [Katsoura et al., 2006, 2009], πιθανά εξαιτίας της επίδρασης του λιπόφιλου χαρακτήρα του αντιοξειδωτικού στην ικανότητα ενσωμάτωσής του στο λιπιδικό τμήμα της LDL, στο οποίο λαμβάνουν χώρα οξειδωτικές διεργασίες.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης καταδεικνύεται η σημασία της εφαρμογής της βιοκατάλυσης για την τροποποίηση της δομής φυσικών βιοδραστικών ενώσεων, όπως των φυσικών αντιοξειδωτικών. Τα πλεονεκτήματα της βιοκαταλυτικής τροποποίησης εστιάζονται στην πραγματοποίηση των ενζυμικών αντιδράσεων υπό ήπιες συνθήκες, στη δυνατότητα τροποποίησης ποικίλων φυσικών ενώσεων, στην υψηλή εκλεκτικότητα των χρησιμοποιούμενων βιοκαταλυτών χωρίς να απαιτούνται επιπλέον στάδια προστασίας-αποπροστασίας των λειτουργικών ομάδων των φυσικών υποστρωμάτων. Παρέχεται έτσι η δυνατότητα σύνθεσης νέων βιολογικά ενεργών ενώσεων μέσω μίας διεργασίας ενός και μόνο βήματος, με επακόλουθο τη μείωση τόσο του οικονομικού όσο και του περιβαλλοντικού κόστους των διεργασιών.

Με βάση τη γνώση που έχει αποκτηθεί στο πεδίο αυτό μελλοντικές προοπτικές που προτείνονται περιλαμβάνουν:

- Την εφαρμογή περιβαλλοντικά φιλικότερων ιοντικών υγρών ως μέσων για την πραγματοποίηση βιοκαταλυτικών αντιδράσεων. Ακολουθώντας τις σύγχρονες απαιτήσεις, τα ιοντικά αυτά υγρά μπορούν να προέρχονται από βιοανανεώσιμες πηγές (π.χ. από αμινοξέα, σάκχαρα κ.α.), να είναι άμεσα βιοαποικοδομήσιμα και ακόμα μικρότερης τοξικότητας από τα έως τώρα ευρέως χρησιμοποιούμενα ιοντικά υγρά.

- Την εφαρμογή των ιοντικών υγρών σε συνδυασμό με τα περιβαλλοντικά φιλικά, μη τοξικά υπερκρίσιμα ρευστά, όπως το υπερκρίσιμο CO₂. Ο συνδυασμός αυτός παρέχει τη

δυνατότητα εύκολης απομόνωσης των προϊόντων (λιπόφιλες ενώσεις εμφανίζουν υψηλή διαλυτότητα σε υπερκρίσιμα ρευστά), περιορίζοντας έτσι ακόμα περισσότερο την ανάγκη χρήσης πτητικών, τοξικών οργανικών διαλυτών.

- Τη μελέτη της επίδρασης της φύσης του φορέα ακινητοποίησης στα καταλυτικά χαρακτηριστικά λιπασών ακινητοποιημένων σε νανοϋλικά και την εφαρμογή αυτών για τη βιοκαταλυτική τροποποίηση φυσικών βιοδραστικών ενώσεων σε ιοντικά υγρά. Η χρήση των νανοϋλικών ως φορέων ακινητοποίησης συμβάλλει στη μείωση των φαινομένων μεταφοράς μάζας, στην αύξηση της λειτουργικής επιφάνειας του βιοκαταλύτη και μπορεί να επιδρά θετικά στη σταθερότητα των ενζύμων.

- Τη μελέτη των σχέσεων δομής-καταλυτικής δράσης ενζύμων διαφορετικών κατηγοριών, λακκάσες ή οξειδάσες, σε ιοντικά υγρά, και την αξιοποίηση αυτών για τη βιοκαταλυτική σύνθεση νέων βιοδραστικών παραγώγων φυσικών ενώσεων, όπως οξειδωμένα ολιγομερή φαινολικών αντιοξειδωτικών ή υδροξυλιωμένα παράγωγα μονοφαινολών.

Βιβλιογραφία

- Adamczak M. & Hari Krishna S. (2004) Strategies for improving enzymes for efficient biocatalysis. *Food Technol Biotechnol* 42(4), 251–264.
- Adamczak M., Bornscheuer U.T., Bednarski W. (2005) Synthesis of ascorbyl oleate by immobilized *Candida antarctica* lipases. *Process Biochem* 40, 3177–80.
- Adkins W.K. & Taylor A.E. (1990) Role of xanthine oxidase and neutrophils in ischemia–reperfusion injury in rabbit lung. *J Appl Physiol* 69, 2012.
- Afanasev E.B., Dorozhko A.I., Brodskii A.V., Kostyuk V.A., Potapovitch A.I. (1989) Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. *Biochem Pharmacol* 38, 1763–1769.
- Aggarwal A., Lancaster N.L., Sethi A.R., Welton T. (2002) The role of hydrogen bonding in controlling the selectivity of Diels–Alder reactions in room-temperature ionic liquids. *Green Chem* 4, 517–520.
- Aggarwal B.B. & Shisodia S. (2004) Suppression of the nuclear factor- κ B activation pathway by spice-derived phytochemicals: reasoning for seasoning. *Ann NY Acad Sci* 1030, 434–441.
- Aherne S.A. & O'Brien N.M. (2002) Dietary flavonols: Chemistry, food content and metabolism. *Nutrition* 18, 75–81.
- Aikens J. & Dix T.A. (1991) Peroxy radical (HOO $\cdot$) Initiated lipid-peroxidation. The role of fatty-acid hydroperoxides. *J Biol Chem* 266, 15091–15098.
- Akoh C.C., Lee G.C., Liaw Y.C., Huang T.H., Shaw J.F. (2004) GDSL family of serine esterases/lipases. *Prog Lipid Res* 43, 534–552.
- Alamed J., Chaibou W., McClements D.J., Decker E.A. (2009) Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. *J Agric Food Chem* 57 (7), 2969–2976.
- Alberghina L. & Lotti M. (1998) Lipases and lipids: structure, specificity and applications in biocatalysis. *Chem Phys Lipids* 93.
- Alcantara A.R., de Fuentes I.E., Sinisterra J.V. (1998) *Rhizomucor miehei* lipase as the catalyst in the resolution of chiral compounds: an overview. *Chem Phys Lipids* 93, 169–184.
- Alluis B., Perol N., Hajji H.E., Dangles O. (2000) Water-soluble flavonol (3-Hydroxy-2-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one) derivatives: Chemical synthesis, colouring, and antioxidant properties. *Helv Chim Acta* 83, 428–443.
- Altreuter D.H. & Clark D.S. (1999) Combinatorial biocatalysis: taking the lead from Nature. *Curr Opin Biotechnol* 10, 130–136.
- Alvaro G. and Illanes A. (Eds) (2008) Improvement of Lipases by Medium and Biocatalyst Engineering in *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications* Springer Science pp. 299–304.
- Ammar R.B., Bhouri W., Sghaier M.B., Boubaker J., Skandrani I., Neffati A., Buhel I., Ghedira K. (2009) Antioxidant and free radical-scavenging properties of three flavonoids isolated from the leaves of *rhamnus alaternus* L. (rhamnaceae) : A structure-activity relationship study. *Food Chem* 116(1), 258–264.
- Anastas P.T. & Williamson T.C. (1998) Frontiers in green chemistry. *Green Chem* 1–26.
- Andersen Ø.M. & Markham K.R. (Eds) (2006) Introduction in *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL pp. 1.
- Anderson E.M., Larsson K.M., Kirk O. (1998) One biocatalyst - many applications: The use of *Candida antarctica* B-lipase in organic synthesis. *Biocatal Biotransform* 16(3), 181–204.
- Anderson J.L., Ding J., Welton T., Armstrong D.W. (2002) Characterizing ionic liquids on the basis of multiple solvation interactions. *J Am Chem Soc* 124, 14247–14254.
- Anter E., Thomas S.R., Schulz E., Shapira O.M., Vita J.A., Keaney J.F. (2004) Activation of endothelial nitric-oxide synthase by the p38 MAPK in response to black tea polyphenols. *J Biol Chem* 279, 46637.
- Anthony J.L., Brennecke J.F., Holbrey J.D., Maginn E.J., Mantz R.A., Rogers R.D., Trulove P.C., Visser A.E., Welton T. (2002) Physicochemical properties of ionic liquids in *Ionic liquids in synthesis*. P. Wasserscheid and T. Welton (Eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 41–126.
- Anthony J.L., Maginn E.J., Brennecke J.F. (2001) Solution thermodynamics of imidazolium-based ionic liquids and water. *J Phys Chem B* 105, 10942–10949.
- Antoniades C., Tousoulis D., Tentolouris C., Toutouzias P., Stefanidis C. (2003) Oxidative stress, antioxidant vitamins, and atherosclerosis. From basic research to clinical practice. *Herz* 28, 628–638.
- Antonietti M., Kuang D., Smarsly B., Zhou Y. (2004) Ionic liquids for the convenient synthesis of functional nanoparticles and other inorganic nanostructures. *Angew Chem Int. Ed.* 43(38), 4988–4992.
- Anup K., Sabharwal Z., James M. (2008) May α -Lipoic acid and ascorbate prevent LDL oxidation and oxidant stress in endothelial cells? *Mol Cell Biochem* 309, 125–132.
- Ardhaoui M., Falcimaigne A., Engasser J.M., Moussou P., Pauly G., Ghoul M. (2004a) Acylation of natural flavonoids using lipase of *Candida antarctica* as biocatalyst. *J Mol Catal B: Enzym* 29, 63–67.
- Ardhaoui M., Falcimaigne A., Engasser J.M., Moussou P., Pauly G., Ghoul M. (2004c) Enzymatic synthesis of new aromatic and aliphatic esters of flavonoids using *Candida antarctica* lipase as biocatalyst. *Biocatal Biotransform* 22(4), 253–259.
- Ardhaoui M., Falcimaigne A., Ognier S., Engasser J.M., Moussou P., Pauly G., Ghoul M. (2004b) Effect of acyl donor chain length and substitutions pattern on the enzymatic acylation of flavonoids. *J Biotechnol* 110, 265–271.
- Armesto N., Ferrero M., Fernandez S., Gotor V. (2003) Novel enzymatic synthesis of 4-O-cinnamoyl quinic and shikimic acid derivatives. *J Org Chem* 68, 5784–5787.
- Arnold F.H. & Volkov A.A. (1999) Directed evolution of biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol* 3, 54–59.
- Arnold F.H. (1990) Engineering enzymes for non-aqueous solvents. *Trends Biotechnol* 8, 244–249.

- Arora A., Nair M.G., Strasburg G.M. (1998) Structure-activity relationships for antioxidant activities of a series of flavonoids in a liposomal system. *Free Radic Biol Med* 24, 1355–1363.
- Arroyo M., Sánchez-Montero J.M., Sinisterra J.V. (1999) Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media. *Enzyme Microb Technol* 24, 3–12.
- Atwood J.L. & Atwood J.D. (1976) Inorganic compounds with unusual properties in *Advances in Chemistry Series No. 150*, American Chemical Society: Washington, DC, p.p. 112–127.
- Asuri P., Bale S.S., Pangule R.C., Shah D.A., Kane R.S., Dordick J.S. (2007) Structure, function, and stability of enzymes covalently attached to single-walled carbon nanotubes. *Langmuir* 23, 12318–12321.
- Bai S., Ren M., Wang L., Sun Y. (2008) Regioselective acylation of pyridoxine catalyzed by immobilized lipase in ionic liquid. *Front Chem Eng China* 2(3), 301–307.
- Baker S.N., Baker G.A., Bright F.V. (2002) Temperature-dependent microscopic solvent properties of dry and wet 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate: correlation with $E_T^{(30)}$ and Kamlet-Taft polarity scales. *Green Chem* 4, 165–169.
- Baker S.N., Baker G.A., Kane M.A., Bright F.V. (2001) The cybotactic region surrounding fluorescent probes dissolved in 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate: Effects of temperature and added carbon dioxide. *J Phys Chem B* 105, 9663.
- Baker S.N., McCleskey M., Pandey S., Baker G.A. (2004) Fluorescence studies of protein thermostability in ionic liquids. *Chem Commun* 940–941.
- Baldessari A. & Mangone C.P. (2002) Enzyme-catalyzed preparation of novel fatty acid derivatives of pyridoxine with surfactant activity. *Biocatal Biotransform* 20(4), 275–279.
- Baldessari A., Mangone C.P., Gros E.G. (1998) Lipase-catalyzed acylation and deacylation reactions of pyridoxine, a member of vitamin-b6 group. *Helv Chim Acta* 81, 2407–2413.
- Baldwin R.L. (1996) How Hofmeister ion interactions affect protein stability. *Biophys J* 71(4), 2056–2063.
- Bao W., Wang Z., Li Y. (2003) Synthesis of chiral ionic liquids from natural amino acids. *J Org Chem* 68, 591–593.
- Barahona D., Pfromm P.H., Rezac M.E. (2006) Effect of water activity on the lipase catalyzed esterification of geraniol in ionic liquid [bmim]PF₆. *Biotechnol Bioeng* 93, 318–324.
- Barrett D.M. & Theerakulkait C. (1995) Quality indicators in blanched, frozen, stored vegetables. *Food Technol* 49(62), 64–65.
- Barth A. & Zscherp C. (2002) What vibrations tell us about proteins. *Quarterly Rev Biophys* 35(4), 369–430.
- Barth A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim Biophys Acta-Bioenergetics* 1767(9), 1073–1101.
- Basri M., Rahman R.N.Z.A., Ebrahimpour A., Salleh A.B., Gunawan E.R., Rahman M.B.A. (2007) Comparison of estimation capabilities of response surface methodology (RSM) with artificial neural network (ANN) in lipase-catalyzed synthesis of palm-based wax ester. *BMC Biotechnol* 7, 53–67.
- Basso A., Cantone S., Linda P., Ebert C. (2005) Stability and activity of immobilised penicillin G amidase in ionic liquids at controlled a_w . *Green Chem* 7(9), 671–676.
- Bast A. & Haenen G.R. (2003) Lipoic acid: a multifunctional antioxidant. *Biofactors* 17(1-4), 207–13.
- Bastida A., Sabuquillo P., Armisen P., Fernández-Lafuente R., Hugué J., Guisán J.M. (1998) A single step purification, immobilization, and hyperactivation of lipases via interfacial adsorption on strongly hydrophobic supports. *Biotechnol Bioeng* 58(5), 486–493.
- Bauduin P., Renoncourt A., Touraud D., Kunz W., Ninham B.W. (2004) Hofmeister effect on enzymatic catalysis and colloidal structures. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 9, 43–47.
- Beadle B.M., Baase W.A., Wilson D.B. (1999) Comparing the thermodynamic stabilities of a related thermophilic and mesophilic enzyme. *Biochemistry* 38(8), 2570–2576.
- Bear W.L. & Teel R.W. (2000) Effects of citrus flavonoids on the mutagenicity of heterocyclic amines and on cytochrome P450 1A2 activity. *Anticancer Res* 20(5B), 3609–3614.
- Behl C. (1996) Alzheimer disease and oxidative stress: Implications for novel therapeutic approaches. *J Biol Chem* 271, 264–282.
- Bélafi-Bakó K., Dörmö N., Gubicza L. (2002) Application of pervaporation for removal of water produced during enzymatic esterification in ionic liquids. *Desalination* 149, 267–268.
- Bell G., Halling P.J., May L., Moore B.D., Robb D.A., Ulijn R., Valivety R.H. (2001) Methods for Measurement and Control of Water in Nonaqueous Biocatalysis in *Biotechnology, Vol. 15: Enzymes in Nonaqueous Solvents: Methods and Protocols*, E. N. Vulfson, P. J. Halling, and H. L. Holland (Eds) Humana Press Inc., pp. 105–126.
- Berberich J.A., Kaar J.L., Russell A.J. (2003) Use of salt hydrate pairs to control water activity for enzyme catalysis in ionic liquids. *Biotechnol Prog* 19, 1029–1032.
- Bhardwaj K., Raju A., Rajasekharan R. (2001) Identification, purification and characterization of a thermally stable lipase from rice bran. A new member of the (phospho) lipase family. *Plant Physiol* 127, 1728–38.
- Bhatia N., Zhao J., Wolf D.M., Agarwal R. (1999) Inhibition of human carcinoma cell growth and DNA synthesis by silibinin, an active constituent of milk thistle: comparison with silymarin. *Cancer Lett* 147, 77–84.
- Biagi G., Giorgi I., Livi O., Scartoni V., Tonetti I., Lucacchini A. (1993) Xanthine oxidase (XO): relative configuration of complexes formed by the enzyme, 2- or 8-*n*-alkyl hypoxanthines and 2-*n*-alkyl-8-azahypoxanthine. *XII, Farmaco* 48, 357–374.
- Biagi G., Giorgi I., Pacchini F., Livi O., Scartoni V. (2001) 2-Alkyloxyalkylthiohypoxanthines as new potent inhibitors of xanthine oxidase. *Il Farmaco* 56, 809–813.
- Bilska A. & Włodek L. (2005) Lipoic acid - the drug of the future? *Pharmacol Rep* 57(5), 570–7.

- Bilski P., Daub M.E., Chignell C.F. (2002) Direct detection of singlet oxygen via its phosphorescence from cellular and fungal cultures. *Meth Enzymol* 352, 41-52.
- Bilski P., Li M.Y., Ehrenshaft M., Daub M.E., Chignell C.F. (2000) Vitamin B6 (pyridoxine) and its derivatives are efficient singlet oxygen quenchers and potential fungal antioxidants. *Photochem Photobiol* 71, 129-134.
- Bird A.E. & Marshall A.C. (1969) Structure of chlorflavonin. *J Chem Soc* 2418-2420.
- Björkling F., Godtfredsen S.E., Kirk O. (1989) A highly selective enzyme-catalysed esterification of simple glucosides. *J Chem Soc Chem Commun* (14), 934-935.
- Bohm B.A. (1975) Chalcones, aurones and dihydrochalcones in *The Flavonoids*, J.B. Harborne, T.J. Mabry & H. Mabry (Eds). Chapman and Hall, London, pp. 442-504.
- Bolognesi M.L., Cavalli A., Bergamini C., Fato R., Lenaz G., Rosini M., Bartolini M., Andrisano V., Melchiorre C. (2009) Toward a rational design of multitarget-directed antioxidants: Merging menaquinone and lipoic acid molecular frameworks. *J Med Chem* 52, 7883-7886.
- Bommarius A. & Karau A. (2005) Deactivation of formate dehydrogenase (FDH) in solution and at gas-liquid interfaces. *Biotechnol Prog* 21, 1663-1672.
- Bommarius A.S. & Riebel B.R. (Eds) (2004a) Characterization of a (Bio-)catalyst in *Biocatalysis*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 19-42.
- Bommarius A.S. & Riebel B.R. (Eds) (2004b) Molecular Biology Tools for Biocatalysis in *Biocatalysis*. WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, pp. 61-90.
- Bommarius A.S. & Riebel B.R. (Eds) (2004c) Introduction to biocatalysis in *Biocatalysis*, WILEY-VCH, Weinheim, pp. 1-18.
- Bonhôte P., Dias A.-P., Papageorgiou N., Kalyanasundaram K., Grätzel M. (1996) Hydrophobic, highly conductive ambient-temperature molten salts. *Inorg Chem* 35, 1168-1178.
- Borges F., Fernandes E., Roleira F. (2002) Progress towards the discovery of xanthine oxidase inhibitors. *Curr Med Chem* 9, 195-217.
- Bornscheuer U.T. & Kazlauskas R.J. (1999) Hydrolases in Organic Synthesis – Regio- and Stereoselective Biotransformations, Wiley-VCH.
- Bornscheuer U.T., Kazlauskas R.J. (2004) Catalytic promiscuity in biocatalysis: using old enzymes to form new bonds and follow new pathways. *Angew Chem Int Ed Engl* 43, 6032-40.
- Boström M., Williams D.R.M., Ninham B.W. (2004) Why the properties of proteins in salt solutions follow a Hofmeister series. *Curr Opin Colloid Interface Sci* 9(1-2), 48-52.
- Boydington J.C., Gaffney B.J., Amzel L.M. (1993) The three-dimensional structure of an arachidonic acid 15-lipoxygenase. *Science* 260, 1482-1486.
- Bradaric C.J., Downard A., Kennedy C., Robertson A.J., Zhou Y.H. (2003) Industrial preparation of phosphonium ionic liquids in *Ionic Liquids as Green Solvents: Progress and Prospects*, R.D. Rogers and K.R. Seddon (Eds.), ACS Symp. Ser., Vol. 856 (American Chemical Society, Washington D.C., pp. 41-56).
- Bradford M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Bradoo S., Saxena R.K., Gupta R. (1999) High yields of ascorbyl palmitate by thermostable lipase-mediated esterification. *J Am Oil Chem Soc* 76, 1291-1295.
- Brady L., Brzozowski A.M., Derewenda Z.S., Dodson E., Dodson G., Tolley S., Turkenburg J.P., Chistiansen L., Høj-Jensen B., Nørskov L., Thim L., Menge U. (1990) A serine protease triad forms the catalytic centre of triglyceride lipase. *Nature (London)*, 343, 767-770.
- Brennecke J.F., Anthony J.L., Maginn E.J. (2002) gas solubilities in ionic liquids in *Ionic liquids in synthesis*, P. Wasserscheid and T. Welton (Eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 81-93.
- Britigan B.E., Pou S., Rosen G.M., Lilleg D.M., Buettner G.R. (1990) Hydroxyl radical is not a product of the reaction of xanthine oxidase and xanthine: The confounding problem of adventitious iron bound to xanthine oxidase. *J Biol Chem* 265, 17533-17538.
- Bruckdorfer K.R. (2008) Antioxidants and CVD. *Proc Nutr Soc* 67(2), 214-22.
- Brunne R.M., Liepinsh E., Otting G., Wuthrich K., van Gunsteren W.F. (1993) Hydration of proteins - a comparison of experimental residence times of water-molecules solvating the bovine pancreatic trypsin-inhibitor with theoretical-model calculations. *J Mol Biol* 231(4), 1040-1048.
- Brzozowski A.M., Derewenda U., Derewenda Z.S., Dodson G., Lawson D.M., Turkenburg J.P., Björkling F., Høj-Jensen B., Patkar S.A., Thim L. (1991) A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature (London)*, 351, 491-494.
- Brzozowski A.M., Derewenda Z.S., Dodson E.J., Dodson G.G. Turkenburg J.P. (1992) Structure and molecular model refinement of *rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase: a case study of the use of simulated annealing in partial model refinement. *Acta Cryst B* 48, 307-319.
- Buisman G.J.H., van Helteren C.T.W., Kramer G.F.H., Veldsink J.W., Derksen J.T.P., Cuperus F.P. (1998) Enzymatic esterifications of functionalized phenols for the synthesis of lipophilic antioxidants. *Biotechnol Lett* 20, 131-136.
- Burlakova E., Molochkina E., Nikiforov G. (2008a) Hybrid antioxidants. *Chem Chemical Tech* 2, 163-171.
- Burlakova E., Molochkina E., Nikiforov G. (2008b) Hybrid antioxidants. *Oxidation Commun* 31, 739-757.
- Burstein E.A., Vedenkina N.S., Ivkova M.N. (1973) Fluorescence and the location of tryptophan residues in protein molecules. *Photochem Photobiol* 18(4), 263-279.
- Burton G.W. & Ingold K.U. (1981) Autoxidation in biological molecules: 1. The antioxidant activity of vitamin E and related chain-breaking phenolic antioxidant in vitro. *J Am Chem Soc* 103, 6472-6477.

- Byler D.M. & Susi H. (1986) Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra. *Biopolymers* 25(3), 469-487.
- Cabrera Z., Fernandez-Lorente G., Fernandez-Lafuente R., Palomo J.M., Guisan J.M. (2009) Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. *J Mol Catal B: Enzym* 57, 171-176.
- Cadenas E. & Packer L. (Eds) (2002) in *Handbook of Antioxidants: Second Edition*, Marcel Dekker Inc, New York.
- Cammarata L., Kazarian S.G., Salter P.A., Welton T. (2001) Molecular states of water in room temperature ionic liquids. *Phys Chem Chem Phys* 3, 5192-5200.
- Cantone S., Hanefeld U., Basso A. (2007) Biocatalysis in non-conventional media—ionic liquids, supercritical fluids and the gas phase. *Green Chem* 9, 954-971.
- Cao L., van Langen L., Sheldon, R. (2003) Immobilised enzymes: carrier-bound or carrier-free? *Curr Opin Biotechnol* 14, 1-8.
- Cao L. (2005) Carrier-bound immobilized enzymes. Principles, application and design. Wiley-VCH, Weinheim, pp 563.
- Cao L., Bornscheuer U.T., Schmid R.D. (1999) Lipase-catalyzed solid-phase synthesis of sugar esters. influence of immobilization on productivity and stability of the enzyme. *J Mol Catal B Enzym* 6(3), 279-285.
- Carda-Broch S., Berthod A., Armstrong D.W. (2003) Solvent properties of the 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid. *Anal Bioanal Chem* 375, 191-199.
- Carmichael A.J., Seddon K.R. (2000) Polarity study of some 1-alkyl-3-methylimidazolium ambient-temperature ionic liquids with the solvatochromic dye, Nile red. *J Phys Org Chem* 13, 591-595.
- Carr A.C., Zhu B.Z., Frei B. (2000) Potential antiatherogenic mechanisms of ascorbate (vitamin C) and α -tocopherol (vitamin E). *Circ Res* 87, 349-354.
- Carrea G., Riva S. (2006) Medium engineering in *Asymmetric organic synthesis with enzymes*, pp. 3-21.
- Carreau J.P. (1979) Biosynthesis of lipoic acid via unsaturated fatty acids. *Meth Enzymol* 62, 152-158.
- Carriere F., Thirstrup K., Hjorth S. (1994) Cloning of the classical guinea pig pancreatic lipase and comparison with the lipase related protein 2. *FEBS Lett* 388, 63-68.
- Carter E.B., Culver S.L., Fox P.A., Goode R.D., Ntai I., Tickell M.D., Traylor R.K., Hoffman N.W., Davis J.H. (2004) Sweet success: Ionic liquids derived from non-nutritive sweeteners. *Chem Commun* 630-631.
- Carvalho C.M.L., Cabral J.M.S. (2000) Reverse micelles as reaction media for lipases. *Biochimie* 82(11), 1063-1085.
- Cassani J., Luna H., Navarro A., Castillo E. (2007) Comparative esterification of phenylpropanoids versus hydroxyphenylpropanoids acids catalyzed by lipase in organic solvent media. *Electronic J Biotechnol* 10, 508-513.
- Cassidy A., Hanley B., Lamuela-Raventos R.M. (2000) Isoflavones, lignans and stilbenes - origins, metabolism and potential importance to human health. *J Sci Food Agric* 80(7), 1044-1062.
- Cassileth B., Trevisan C., Gubili J. (2007) Complementary therapies for cancer pain. *Curr Pain Headache Rep* 11, 265-269.
- Castelluccio C., Bolwell G.P., Gerrish C., Rice-Evans C. (1996) Differential distribution of ferulic acid to the major plasma constituents in relation to its potential as an antioxidant. *Biochem J* 316, 691-694.
- Chaillou L.L. & Nazareno M.A. (2006) New method to determine antioxidant activity of polyphenols. *J Agric Food Chem* 54, 8397-8402.
- Chalas J., Claiss C., Edeas M., Messaoudi C., Vergnes L., Abella A., Lindenbaum A. (2001) Effect of ethyl esterification of phenolic acids on low-density lipoprotein oxidation. *Biomed Pharmacother* 55, 54-60.
- Chamouleau F., Coulon D., Girardin M., Ghoul M. (2001) Influence of water activity and water content on sugar esters lipase-catalyzed synthesis in organic media. *J Mol Catal - B Enzym* 11(4-6), 949-954.
- Chan W.S., Wen P.C., Chiang H.C. (1995) Structure-activity relationship of caffeic acid analogues on xanthine oxidase inhibition. *Anticancer Res* 15, 703-707.
- Chang H.C., Jiang J.C., Liou Y.C., Hung C.H., Lai T.Y., Lin S.H. (2008) Local structures of water in 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate probed by high-pressure infrared spectroscopy. *Anal Sci* 24(10), 1305-1309.
- Chang W.S. & Chiang H.C. (1995) Structure-activity relationship of coumarins in xanthine oxidase inhibition. *Anticancer Res* 15(5 B), 1969-1973.
- Chartrain M., Salmon P.M., Robinson D.K., Buckland B.C. (2000) Metabolic engineering and directed evolution for the production of pharmaceuticals. *Curr Opin Biotechnol* 11, 209-214.
- Chebil L., Anthoni J., Humeau C., Gerardin C., Engasser J.M., Ghoul M. (2007b) Enzymatic acylation of flavonoids: Effect of the nature of the substrate, origin of lipase, and operating conditions on conversion yield and regioselectivity. *J Agric Food Chem* 55(23), 9496-9502.
- Chebil L., Humeau C., Anthoni J., Dehez F., Engasser J.M., Ghoul M. (2007a) Solubility of flavonoids in organic solvents. *J Chem Eng Data* 52 (5), 1552-1556.
- Chen B., Guo Z., Let M.B., Lue B.M., Xu X. (2008b) Preparation of CLA ascorbyl ester with improved volumetric productivity by an ionic liquid-based reaction system. *Org Biomol Chem* 6, 3196-3201.
- Chen B., Hu J., Miller E.M., Xie W., Cai M., Gross R.A. (2008a) *Candida antarctica* lipase B chemically immobilized on epoxy-activated micro- and nanobeads: catalysts for polyester synthesis. *Biomacromolecules* 9, 463-471.
- Chen C., Yu R., Owuor E.D., Kong A.N. (2000) Activation of antioxidant response element (ARE), mitogen-activated protein kinases (MAPKs) and caspases by major green tea polyphenol components during cell survival and death. *Arch Pharm Res* 23, 605-612.
- Chen C.Y., Jang J.H., Li M.H., Surh Y.J. (2005) Resveratrol upregulates heme oxygenase-1 expression via activation of NF-E2-related factor 2 in PC12 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 331, 993-1000.

- Chen H. & Xiong L. (2005) Pyridoxine is required for post-embryonic root development and tolerance to osmotic and oxidant stresses. *Plant J* 44, 396–408.
- Chen Z.G., Zong M.H., Li G.J. (2006) Lipase-catalyzed acylation of konjac glucomannan in ionic liquids. *J Chem Technol Biotechnol* 81(7), 1225–1231.
- Cheng I.F. & Breen K. (2000) On the ability of four flavonoids, baiclein, luteolin, naringenin, and quercetin, to suppress the Fenton reaction of the iron-ATP complex. *Biometals* 13, 77–83.
- Cheng T., Zhao Y., Li X., Lin F., Xu Y., Zhang X., Li Y., Wang R., Lai L. (2007) Computation of octanol-water partition coefficients by guiding an additive model with knowledge. *J Chem Inf Model* 47, 2140–2148.
- Chiappe C., Leandri E., Lucchesi S., Pieraccini D., Hammock B.D., Morisseau C. (2004) Biocatalysis in ionic liquids: The stereoconvergent hydrolysis of trans- β -methylstyrene oxide catalyzed by soluble epoxide hydrolase. *J Mol Catal B: Enzymatic* 27(4-6), 243–248.
- Chigorimbo-Murefu N.T.L., Riva S., Burton S.G. (2008) Lipase-catalysed synthesis of esters of ferulic acid with natural compounds and evaluation of their antioxidant properties. *J Mol Catal B: Enzym* 56, 277–282.
- Choe E. & Min D.B. (2009) Mechanisms of antioxidants in the oxidation of foods. *Comprehensive Rev Food Sci Food Safety* 8(4), 345–358.
- Chow C.K. (1979) Nutritional influence on cellular antioxidant defense systems. *American J Clin Nutrition* 32, 1066–1081.
- Chowdary G.V. & Prapulla S.G. (2003) Enzymatic synthesis of ethyl hexanoate by transesterification. *Internat J Food Sci Technol* 38, 127–133.
- Cidlowski J.A. & Thanassi J.W. (1981) Pyridoxal phosphate: a possible cofactor in steroid hormone action. *J Steroid Biochem* 15, 11–16.
- Cirino P.C. & Sun L. (2008) Advancing biocatalysis through enzyme, cellular and platform engineering. *Biotechnol Prog* 24, 515–519.
- Clark D.S. (2004) Characteristics of nearly dry enzymes in organic solvents: implications for biocatalysis in the absence of water. *Phil Trans R Soc Lond B* 359, 1299–1307.
- Collins K.D. (2004) Ions from the Hofmeister series and osmolytes: Effects on proteins in solution and in the crystallization process. *Methods* 34(3), 300–311.
- Collins K.D., Neilson G.W., Enderby J.E. (2007) Ions in water: Characterizing the forces that control chemical processes and biological structure. *Biophys Chem* 128(2-3), 95–104.
- Compton D.L., Laszlo J.A., Berhow M.A. (2000) Lipase-catalyzed synthesis of ferulate esters. *JAOCs* 77(5), 513–519.
- Constantinescu A., Pick U., Handelman G.J., Haramaki N., Han D., Podda M., Tritschler H.J., Packer L. (1995) Reduction and transport of lipoic acid by human erythrocytes. *Biochem Pharmacol* 50, 253–261.
- Constantinescu D., Weingartner H., Herrmann C. (2007) Protein denaturation by ionic liquids and the Hofmeister series: a case study of aqueous solutions of ribonuclease A. *Angew Chem Int Ed* 46, 8887–8889.
- Cornicelli J.A. & Trivedi B.K. (1999) 15-lipoxygenase and its inhibition: a novel therapeutic target for vascular disease. *Curr Pharm Des* 5, 11–20.
- Cos P., Ying L., Calomme M., Hu J.P., Cimanga K., Van Poel B., Pieters L., Vlietnick A.J., Vanden Berghe D. (1998) Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. *J Nat Prod* 61, 71–76.
- Couling D.J., Bernot R.J., Docherty K.M., Dixon J.K., Maginn E.J. (2006) Assessing the factors responsible for ionic liquid toxicity to aquatic organisms via quantitative structure–property relationship modelling. *Green Chem* 8, 82–90.
- Coulon D., Ismail A., Girardin M., Rovel B., Ghoul M. (1996) Effect of different biochemical parameters on the enzymatic synthesis of fructose oleate. *J Biotechnol* 51, 115–21.
- Crowhurst L., Mawdsley P.R., Perez-Arlandis J.M., Salter P.A., Welton T. (2003) Solvent–solute interactions in ionic liquids. *Phys Chem Chem Phys* 5, 2790–2794.
- Crozier A., Jaganath I.B., Clifford M.N. (2009) Dietary phenolics: chemistry, bioavailability and effects on health. *Nat Prod Rep* 26, 1001–1043.
- Cseke L., Kirakosyan A., Kaufman P., Warber S., Duke J., Briellmann H. (2006) Natural products from plants, 2nd ed. Taylor-Francis, CRC Press, Boca Raton, FL.
- Cull S.G., Holbrey J.D., Vargas-Mora V., Seddon K.R., Lye G.J. (2000) Room-temperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations. *Biotechnol Bioeng* 69, 227–233.
- Cushnie T.P. & Lamb A.J. (2005) Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents* 26(5), 343–56.
- Cygler M., Grochulski P., Kazlauskas R.J., Schrag J.D., Bouthillier F., Rubin B., Serreqi A.N., Gupta A.K. (1994) A structural basis for the chiral preferences of lipases. *J Am Chem Soc* 116, 3180–3186.
- Dang D.T., Ha S.H., Lee S.M., Chang W.J., Koo Y.M. (2007) Enhanced activity and stability of ionic liquid-pretreated lipase. *J Mol Catal B: Enzymatic* 45(3-4), 118–121.
- Dangles O. & Dufour C. (2006) Flavonoid–protein interactions in *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*, Øyvind M. Andersen, Kenneth R. Markham (Eds), Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp 443–469.
- Danieli B., Bertario A., Carrea G., Redigolo B., Secundo F., Riva S. (1993) Chemo-enzymatic synthesis of 6st-O-(3-arylprop-2-enoyl) derivatives of the flavonol glucoside isoquercitrin. *Helv Chim Acta* 76, 2981–2991.
- Danieli B., De Bellis P., Carrea G., Riva S. (1990) Enzyme-mediated regioselective acylations of flavonoid disaccharide monoglycosides. *Helv Chim Acta* 73, 1837–1844.
- Danieli B., Falcone L., Monti D., Riva S., Gebhardt S., Schubert-Zsilavecz M. (2001) Regioselective enzymatic glycosylation of natural polyhydroxylated compounds: galactosylation and glucosylation of protopanaxatriol ginsenosides. *J Org Chem* 66, 262–269.

- Danieli B., Luisetti M., Sampognaro G., Carrea G., Riva S. (1997) Regioselective acylation of polyhydroxylated natural compounds catalyzed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435) in organic solvents. *J Mol Catal B: Enzym* 3, 193-201.
- Davies K.M. & Schwinn K.E. (2006) Molecular biology and biotechnology of flavonoid biosynthesis in *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*, Øyvind M. Andersen, Kenneth R. Markham (Eds), Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 144-218.
- Davies K.M. (2007) Genetic modification of plant metabolism for human health benefits. *Mutat Res* 622, 122-137.
- Davis R.C., Stahnke G., Wong H., Doolittle M.H., Ameis D., Will H., Schotz M.C. (1990) Hepatic lipase: site-directed mutagenesis of a serine residue important for catalytic activity. *J Biol Chem* 265, 6291-6295.
- 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, 916-24.
- De Diego T., Lozano P., Gmouh S., Vaultier M., Iborra J.L. (2005) Understanding structure - Stability relationships of *Candida antartica* lipase B in ionic liquids. *Biomacromolecules* 6, 1457-1464.
- de Fuentes I.E., Viseras C.A., Ubiali D., Terreni M., Alcántara A.R. (2001) Different phyllosilicates as supports for lipase immobilisation. *J Mol Catal B: Enzym* 11, 657-663.
- de Gonzalo G., Lavandera I., Durchschein K., Wurm D., Faber K., Kroutil W. (2007) Asymmetric biocatalytic reduction of ketones using hydroxyfunctionalised water-miscible ionic liquids as solvents. *Tetrahedron: Asymm* 18, 2541-2546.
- de Groot H., Rauen M. (1998) Tissue injury by reactive oxygen species and the protective effects of flavonoids. *Fundam Clin Pharmacol* 12, 249-255.
- de los Ríos A.P., Hernández-Fernández F.J., Rubio M., Gomez D., Villora G. (2007) Stabilization of native penicillin G acylase by ionic liquids. *J Chem Tech Biotechnol* 82, 190-195.
- de los Ríos A.P., Hernández-Fernández F.J., Tomás-Alonso F., Gómez D., Villora G. (2008) Synthesis of esters in ionic liquids. the effect of vinyl esters and alcohols. *Proc Biochem* 43(8), 892-895.
- de Maria P. (2008) "Nonsolvent" applications of ionic liquids in biotransformations and organocatalysis. *Angew Chem Int Ed* 47, 6960-6968.
- De Oliveira E.B., Humeau C., Chebil L., Maia E.R., Dehez F., Maigret B., Ghoul M., Engasser J.M. (2009) A molecular modelling study to rationalize the regioselectivity in acylation of flavonoid glycosides catalyzed by *Candida antarctica* lipase B. *J Mol Catal B: Enzym* 59, 96-105.
- Decker E.A. (1998) Strategies for manipulating the prooxidative/antioxidative balance of foods to maximize oxidative stability. *Trends Food Sci Technol* 9, 241-248.
- Deetlefs M. & Seddon K.R. (2003) Improved preparations of ionic liquids using microwave irradiation. *Green Chem* 5(2), 181-186.
- Deleage, G., & Geourjon C. (1993) An interactive graphic program for calculating the secondary structure content of proteins from circular dichroism spectrum. *Computer Appl Biosci* 9(2), 197-199.
- Demirjian D.C., Shah P.C., Moris-Varas F. (1999) Screening for novel enzymes. *Top Curr Chem* 200, 1-29.
- Denslow S.A., Walls A.A., Daub M.E. (2005) Regulation of biosynthetic genes and antioxidant properties of vitamin B6 vitamers during plant defense responses. *Physiol Mol Plant Pathol* 66, 244-255.
- Derewenda Z.S., Derewenda U., Dodson G.G. (1992) The crystal and molecular structure of the rhizomucor miehei triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. *J Mol Biol* 227(3), 818-839.
- Detsi A., Bouloubasi D., Prousis K.C., Koufaki M., Athanasellis G., Melagraki G. (2007) Design and synthesis of novel quinolinone-3-aminoamides and their α -lipoic acid adducts as antioxidant and anti-inflammatory agents. *J Medic Chem* 50(10), 2450-2458.
- Dew T.P., Day A.J., Morgan M.R.A. (2005) Xanthine oxidase activity in vitro: Effects of food extracts and components. *J Agric Food Chem* 53, 6510-6515.
- Dhake K.P., Qureshi Z.S., Singhal R.S., Bhanage B.M. (2009) *Candida antarctica* lipase B-catalyzed synthesis of acetamides using [BMIm(PF₆)] as a reaction medium. *Tetrahedron Lett* 50(23), 2811-2814.
- Diplock A.T. (1991) Antioxidant nutrients and disease prevention: an overview. *Am J Clin Nutr* 53, 189S-193S.
- Docherty K.M., Hebbeler S.Z., Kulpa C.F. (2006) An assessment of ionic liquid mutagenicity using the Ames Test. *Green Chem* 8, 560-567.
- Dong A., Huang P., Caughey W.S. (1990) Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra. *Biochem* 29, 3303-3308.
- Dong A., Meyer J.D., Kendrick S.B., Manning M.C., Carpenter J.F. (1996) Effect of secondary structure on the activity of enzymes suspended in organic solvents. *Arch Biochem Biophys* 334, 406-414.
- Dong A., Prestrelski S.J., Allison S.D., Carpenter J.F. (1995) Infrared spectroscopic studies of lyophilization- and temperature induced protein aggregation. *J Pharm Sci* 84, 415-424.
- Dordick J.S. (1992) Designing Enzymes for Use in Organic Solvents. *Biotechnol Prog* 8, 259-267.
- Drewke C. & Leistner E. (2001) Biosynthesis of vitamin B6 and structurally related derivatives. *Vitam Horm* 61, 121-155.
- Droge W. (2002) Free radicals in the physiological control of cell function. *Physiol Rev* 82, 47-95.
- Dumoulin M., Conrath K., Van Meirhaeghe A., Meersmen F., Heremans K., Frenken L.G.J., Muyldermans S., Wyns L., Matagne A. (2002) Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Sci* 11, 500-515.
- Duncan S.H., Flint H.J., Stewart C.S. (1998) Inhibitory activity of gut bacteria against escherichia coli O157 mediated by dietary plant metabolites. *FEMS Microbiol Lett* 164(2), 283-288.
- Dupont J. (2004) On the solid, liquid and solution structural organization of imidazolium ionic liquids. *J Braz Chem Soc* 15, 341-350.

- Dupont J., De Souza R.F., Suarez P.A.Z. (2002) Ionic liquid (molten salt) phase organometallic catalysis. *Chem Rev* 102(10), 3667-3692.
- Džubák P. & Hajdúch M. (2006) New derivatives of silybin and 2,3-dehydrosilybin and their cytotoxic and P-glycoprotein modulatory activity. *Bioorg Med Chem* 14, 3793-3810.
- Earle M. (2002) Stoichiometric organic reactions and acid-catalyzed reactions in ionic liquids in *Ionic Liquids in Synthesis* P. Wasserscheid and T. Welton (Eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 174-213.
- Earle M.J., Katdare S.P., Seddon K.R. (2004) Paradigm confirmed: The first use of ionic liquids to dramatically influence the outcome of chemical reactions. *Org Lett* 6 (5), 707-710.
- Earle M.J., McCormac P.B., Seddon K.R. (1999) Diels-Alder reactions in ionic liquids: A safe recyclable alternative to lithium perchlorate-diethyl ether mixtures. *Green Chem* 1, 23-25.
- Eckstein M., Filho M.V., Liese A., Kragl U. (2004) Use of an ionic liquid in a two-phase system to improve an alcohol dehydrogenase catalysed reduction. *Chem Commun* 10(9), 1084-1085.
- Eckstein M., Sasing M., Kragl U., Adlercreutz P. (2002) At low water activity α -chymotrypsin is more active in an ionic liquid than in non-ionic organic solvents. *Biotechnol Lett* 24, 867-872.
- Efferth T., Li P.C.H., Konkimalla V.S.B., Kaina B. (2007) From traditional Chinese medicine to rational cancer therapy. *Trends Mol Medicine* 13, 353-361.
- Eftink M.R. (1994) The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. *Biophys J* 66, 482-501.
- Eftink M.R. (2002) Intrinsic fluorescence of proteins in *Topics in Fluorescence Spectroscopy, Volume 6, Protein Fluorescence*, Lakowicz J.R. (Ed), Kluwer Academic Publishers, pp. 1-16.
- Eftink M.R., Gryczynski I., Wiczek W., Laczkó G., Lakowicz J.R. (1991) Effects of temperature on the fluorescence intensity and anisotropy decays of staphylococcal nuclease and the less stable nuclease-conA-SG28 mutant. *Biochem* 30(37), 8945-8953.
- Eggers D.K. & Valentine J.S. (2001) Crowding and hydration effects on protein conformation: A study with sol-gel encapsulated proteins. *J Mol Biol* 314(4), 911-922.
- Egloff M.P., Marguet F., Buono G., Verger R., Cambillau C., van Tilbeurgh H. (1995) The 2.46 Å resolution structure of the pancreatic lipase-colipase complex inhibited by a C11 alkyl phosphonate. *Biochemistry* 34, 2751-2762.
- Ehrenschaft M., Bilski P., Li M.Y., Chignell C.F., Daub M. (1999) A highly conserved sequence is a novel gene involved in de novo vitamin B6 biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 96, 9374-9378.
- Ehrenschaft M., Jenns A.E., Chung K.R., Daub M.E. (1998) *SOR1*, a gene required for photosensitizer and singlet oxygen resistance in *Cercospora* fungi, is highly conserved in divergent organisms. *Mol Cell* 1, 603-609.
- Elion G.B., Callahan S., Nathan H., Bieber S., Rundles R.W., Hitching G.H. (1963) Potentiation by inhibition of drug degradation: 6-substituted purines and xanthine oxidase. *Biochem Pharmacol* 12, 85-93.
- Elliott A.J., Scheiber S.A., Thomas C., Pardini R.S. (1992) Inhibition of glutathione reductase by flavonoids. *Biochem Pharmacol* 44, 1603-1608.
- Ellstrand N. (2000) The elephant that is biotechnology: Comments on "Genetically modified crops: risks and promise" by Gordon Conway. *Conserv Ecol* 4, 8.
- Enaud E., Humeau C., Piffaut B., Girardin M. (2004) Enzymatic synthesis of new aromatic esters of phloridzin. *J Mol Catal B: Enzym* 27, 1-6.
- Enayat S. & Banerjee S. (2009) Comparative antioxidant activity of extracts from leaves, bark and catkins of *Salix aegyptiaca* sp. *Food Chem* 116, 23-28.
- Endo N., Nishiyama K., Otsuka A., Kanouchi H., Taga M., Oka T. (2006) Antioxidant activity of vitamin B6 delays homocysteine-induced atherosclerosis in rats. *British J Nutr* 95, 1088-1093.
- Erbeldinger M., Mesiano A.J., Russell A.J. (2000) Enzymatic catalysis of formation of α -aspartame in ionic liquid -an alternative to enzymatic catalysis in organic solvents. *Biotechnol Prog* 16, 1129-1131.
- Erlund I. (2004) Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. *Nutrition Res* 24, 851-874.
- Fágán C. (2003) Enzyme stabilization—recent experimental progress. *Enzyme Microb Technol* 33, 137-149.
- Farroqui A.A., Taylor W.A., Horrocks L.A. (1987) Phospholipases, lysophospholipases and lipases and their involvement in various diseases. *Neurochem Pathol* 7, 99-128.
- Fehér E., Major B., Bélafi-Bakó K., Gubicza L. (2007) On the background of enhanced stability and reusability of enzymes in ionic liquids. *Biochem Soc Transactions* 35(6), 1624-1627.
- Ferrali M., Signorini C., Caciotti B., Sugherini L., Ciccoli L., Giachetti D., Comporti M. (1997) Protection against oxidative damage of erythrocyte membranes by the flavonoid quercetin and its relation to iron chelating activity. *FEBS Lett* 416, 123-129.
- Figueroa-Espinoza M.C. & Villeneuve P. (2005) Phenolic acids enzymatic lipophilization. *J Agric Food Chem* 53, 2779-2787.
- Finkel T. (1998) Oxygen radicals and signalling. *Curr Opin Cell Biol* 10, 248-253.
- Flora K., Hahn M., Rosen H., Benner K. (1998) Milk thistle (*Silybum marianum*) for the therapy of liver disease. *Am J Gastroenterol* 93, 139-143.
- Foglia T.A. & Villeneuve P. (1997) Carica papaya latex-catalyzed synthesis of structured triacylglycerols. *J Am Oil Chem Soc* 74, 1447-50.
- Forato L.A., Bernardes-Filho R., Colnago L.A. (1998) Protein structure in KBr pellets by infrared spectroscopy. *Anal Biochem* 259(1), 136-141.
- Foresti M.L., Valle G., Bonetto R., Ferreira M.L., Briand L.E. (2009) FTIR, SEM and fractal dimension characterization of lipase B from *Candida antarctica* immobilized onto titania at selected conditions. *Applied Surface Sci* 256, 1624-1635.

- Fragopoulou E., Nomikos T., Karantonis H.C., Apostolakis C., Pliakis E., Samiotaki M., Panayotou G., Antonopoulou S. (2007) Biological activity of acetylated phenolic compounds. *J Agric Food Chem* 55(1), 80-89.
- Frater T., Ulbert O., Bélafi-Bakó K., Gubicza L. (2003) Thermal stability enhancements of *Candida rugosa* lipase in ionic liquids. *Commun Agric Appl Biol Sci* 68, 293-6.
- Fredlake C.P., Crosthwaite J.M., Hert D.G., Aki S.N.V.K., Brennecke J.F. (2004) Thermophysical properties of imidazolium-based ionic liquids. *J Chem Eng Data* 49(4), 954-964.
- Fujii R., Nakagawa Y., Hiratake J. (2005) Directed evolution of *Pseudomonas aeruginosa* lipase for improved amide-hydrolyzing activity. *Protein Eng Des Sel* 18(2), 93-101.
- Fujita K., Forsyth M., MacFarlane D.R., Reid R.W., Elliott G.D. (2006) Unexpected improvement in stability and utility of cytochrome c by solution in biocompatible ionic liquids. *Biotechnol Bioeng* 94(6), 1209-1213.
- Fujita K., MacFarlane D.R., Forsyth M. (2005) Protein solubilising and stabilising ionic liquids. *Chem Commun* 4804-4806
- Fukumoto K., Yoshizawa M., Ohno H. (2005) Room temperature ionic liquids from 20 natural amino acids. *J Am Chem Soc* 127, 2398-2399.
- Furstenberger G., Hagedorn H., Jacobi T., Besemfelder E., Stephan M., Lehmann W., Marks F. (1991) Characterization of an 8-lipoxygenase activity induced by the phorbol ester tumor promoter 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse skin *in vivo*. *J Biol Chem* 266, 15738-15745.
- Fusco D., Colloca G., Lo Monaco M.R., Cesari M. (2007) Effects of antioxidant supplementation on the aging process. *Clin Interv Aging* 2(3), 377-87.
- Fylaktakidou K.C., Hadjipavlou-Litina D.J., Litinas K.E., Nicolaides D.N. (2004) Natural and synthetic coumarin derivatives with anti-inflammatory/antioxidant activities. *Curr Pharmac Design* 10(30), 3813-3833.
- Gadgil M. (2000) Comments on "Genetically modified crops: risks and promise" by Gordon Conway. *Conserv Ecol* 4, 9.
- Galili G., Galili S., Lewinsohn E., Tadmor Y. (2002) Genetic, molecular, and genomic approaches to improve the value of plant foods and feeds. *Crit Rev Plant Sci* 21(3), 167-204.
- Gallagher W. (2005) FTIR analysis of protein structure. Source : www.chem.uwec.edu/Chem455/S05/Pages/manuals_content.html
- Gandhi N.N., Sawant S.B., Joshi J.B. (1995) Specificity of a lipase in ester synthesis: effect of alcohol. *Biotechnol Prog* 11(3), 282-287.
- Ganske F. & Bornscheuer U.T. (2005a) Lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in ionic liquids. *Org Lett* 7, 3097-3098.
- Ganske F. & Bornscheuer U.T. (2005b) Optimization of lipase-catalyzed glucose fatty acid ester synthesis in a two-phase system containing ionic liquids and *t*-BuOH. *J Mol Catal B: Enzym* 36(1-6), 40-42.
- Ganske F. & Bornscheuer U.T. (2006) Growth of *Escherichia coli*, *Pichia pastoris* and *Bacillus cereus* in the presence of the ionic liquids [BMIM][BF₄] and [BMIM][PF₆] and organic solvents. *Biotechnol Lett* 28, 465-469.
- Gao C., Mayon P., MacManus D.A., Vulfson E.N. (2000/2001) Novel enzymatic approach to the synthesis of flavonoid glycosides and their esters. *Biotech Bioeng* 71(3), 234-243.
- Garcia S., Lourenco N.M.T., Lousa D. (2004) A comparative study of biocatalysis in nonconventional solvents: ionic liquids, supercritical fluids and organic media. *Green Chem* 6, 466-470.
- Garcia T., Martinez M., Aracil J. (1993) Enzymatic synthesis of an analogue of Jojoba Oil: Optimization statistical analysis. *Enz Microb Technol* 15, 607-611.
- García-Alles L.F. & Gotor V. (1998) Lipase-catalyzed transesterification in organic media: Solvent effects on equilibrium and individual rate constants. *Biotechnol Bioeng* 59(6), 684-694.
- Garcia-Lafuente A., Guillamon E., Villares A., Rostagno M.A., Martinez J.A. (2009) Flavonoids as anti-inflammatory agents: implications in cancer and cardiovascular disease. *Inflamm Res* 58, 537-552.
- Gardner H.W. (1991) Recent investigations into the lipoxygenase pathway of plants. *Biochim Biophys Acta* 1084, 221-239.
- Garrido-Vidal D., Pizarro C., Gonzalez-Saiz J.M. (2003) Study of process variables in industrial acetic fermentation by a continuous pilot fermentor and response surfaces. *Biotechnol Prog* 19, 1468-1479.
- Gathergood N. & Scammells P.J. (2002) Design and preparation of room-temperature ionic liquids containing biodegradable side chains. *Australian J Chem* 55(9), 557-560.
- Gathergood N., Garcia M.T., Scammells P.J. (2004) Biodegradable ionic liquids: Part I. Concept, preliminary targets and evaluation. *Green Chem* 6, 166-175.
- Gathergood N., Scammells P.J., Garcia M.T. (2006) Biodegradable ionic liquids: Part III. The first readily biodegradable ionic liquids. *Green Chem* 8, 156-160.
- Gayot S., Santarelli X., Coulon D. (2003) Modification of flavonoid using lipase in non-conventional media: effect of the water content. *J Biotechnol* 101, 29-36.
- Gažák R., Svobodová A., Psotová J., Sedmera P., Příkrylová V., Walterová D., Křen V. (2004) Oxidised derivatives of silybin and their antiradical and antioxidant activity. *Bioorg Medicinal Chem* 12, 5677-5687.
- Gažák R., Walterová D., Křen V. (2007) Silybin and silymarin _ new and emerging applications in medicine. *Curr Med Chem* 14, 315-338.
- Genestra M. (2007) Oxyl radicals, redox-sensitive signalling cascades and antioxidants. Review. *Cell Signal* 19, 1807-19.
- German J.B & Traber M.G. (2001) Nutrients and oxidation: Actions, transport, and metabolism of dietary antioxidants *in Handbook of vitamins*, Rucker R.B. (Ed), New York, pp. 569-588.

- German J.B. (1999) Food processing and lipid oxidation. *Adv Exp Med Biol* 459, 23-50.
- Ghanem A. (2007) Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron* 63, 1721-54.
- Giuliani S., Piana C., Setti L., Hochkoeppler A., Pifferi P.G., Williamson G., Faulds C.B. (2001) Synthesis of pentyferulate by a feruloyl esterase from *Aspergillus niger* using water-in-oil microemulsions. *Biotechnol Lett* 23, 325-330.
- Gong J., Huang K., Wang F., Yang L., Feng Y., Li H. (2009) Preparation of two sets of 5,6,7-trioxygenated dihydroflavonol derivatives as free radical scavengers and neuronal cell protectors to oxidative damage. *Bioorg Medic Chem* 17(9), 3414-3425.
- González-Pérez O., Moy-López N.A., Guzmán-Muñoz J. (2008) Alpha-tocopherol and alpha-lipoic acid. An antioxidant synergy with potential for preventive medicine. *Rev Invest Clin* 60(1), 58-67.
- Gordon C.M. (2001) New developments in catalysis using ionic liquids. *Applied Catal A: General* 222, 101-117.
- Gordon C.M. (2002) Synthesis of ionic liquids in *Ionic Liquids in Synthesis*, P. Wasserscheid and T. Welton (Eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 7-20.
- Gorman-Lewis D.J. & Fein J.B. (2004) Experimental study of the adsorption of an ionic liquid onto bacterial and mineral surfaces. *Environ Sci Technol* 38, 2491-2495.
- Görne-Tschelnokow U., Naumann D., Weise C., Hucho F. (1993) Secondary structure and temperature behavior of acetylcholinesterase studies by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Eur J Biochem* 213, 1235-1242.
- Gotor-Fernández V., Brieva R., Gotor V. (2006) Lipases: useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *J Mol Catal B Enzym* 40, 111-20.
- Gottlieb O.R. (1975) Flavonols in *The Flavonoids*, J.B. Harborne, T.J. Mabry & H. Mabry, (Eds), Chapman and Hall, London, pp. 296-375.
- Gould K.S. & Lister C. (2006) Flavonoid functions in plants in *Flavonoids: Chemistry, Biochemistry, and Applications*, Øyvind M. Andersen, Kenneth R. Markham (Eds), Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, pp. 397-441.
- Graf E. (1992) Antioxidant potential of ferulic acid. *Free Rad Biol Med* 13(4), 435-448.
- 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, 351-362.
- Griebenow K. & Klibanov A.M. (1995) Lyophilization-induced reversible changes in the secondary structure of proteins. *Proceedings Nat Acad Sci USA* 92(24), 10969-10976.
- Grochulski P., Bouthillier F., Kazlauskas R.J., Serreqi A.N., Schrag J.D., Ziomek E., Cygler M. (1994) Analogs of reaction intermediates identify a unique substrate binding site in *Candida rugosa* lipase. *Biochemistry* 33, 3494-3500.
- Grochulski P., Li Y., Schrag J.D., Bouthillier F., Smith P., Harrison D., Rubin B., Cygler M. (1993) Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *J Biol Chem* 268, 12843-12847.
- Gubicza L., Nemestóthy N., Fráter T., Bélafi-Bakó K. (2003) Enzymatic esterification in ionic liquids integrated with pervaporation for water removal. *Green Chem* 5, 236-239.
- Gunawan E.R. & Suhendra D. (2008) Four-factor response surface optimization of the enzymatic synthesis of wax esters from palm kernel oil. *IJC* 8, 83-100.
- Gunawan E.R., Basri M., Rahman M.B.A., Rahman R.N.Z.A., Salleh A.B. (2004) Lipase-catalyzed synthesis of palm-based wax esters. *J Oleo Sci* 53, 471-477.
- Guo Z. & Xu X. (2006) Lipase-catalyzed glycerolysis of fats and oils in ionic liquids: a further study on the reaction system. *Green Chem* 8, 54-62.
- Guo Z. & Xu X. (2005) New opportunity for enzymatic modification of fats and oils with industrial potentials. *Org Biomol Chem* 3, 2615-2619.
- Guo Z., Chen B., Murillo R.L., Tan T., Xu X. (2006) Functional dependency of the structures of ionic liquids: Do substituents govern the selectivity of enzymatic glycerolysis? *Org Biomol Chem* 4, 2772-2776.
- Guo Z., Lue B., Thomasen K., Meyer A.S., Xu X. (2007) Predictions of flavonoid solubility in ionic liquids by COSMO-RS: Experimental verification, structural elucidation, and solvation characterization. *Green Chem* 9(12), 1362-1373.
- Gupta M.N. & Roy I. (2004) Enzymes in organic media. Forms, functions and applications. *Eur J Biochem* 271, 2575-2583.
- Gupta M.N. (1992) Enzyme function in organic solvents. *Eur J Biochem* 203, 25-32.
- Gupta R., Rath P., Bradoo S. (2003) Lipase mediated upgradation of dietary fats and oils. *Crit Rev Food Sci Nutr* 43(6), 635-44.
- Gutteridge J.M. (1993) Free radicals in diseases processes: a compilation of cause and consequence. *Free Radic Res Commun* 19, 141-158.
- Guyot B., Bosquette B., Pina M., Graille J. (1997) Esterification of phenolic acids from green coffee with an immobilized lipase from *Candida antarctica* in solvent-free medium. *Biotechnol Lett* 19(6), 529-532.
- Guyot B., Gueule D., Pina M., Graille J., Farines V., Farines M. (2000) Enzymatic synthesis of fatty esters in 5-caffeoyl quinic acid. *Eur J Lipid Sci Technol* 93-96.
- Ha S.H., Lee S.H., Dang D.T., Kwon M.S., Chang W.J., Yu Y.J., Byun I.S., Koo Y.M. (2008) Enhanced stability of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *Korean J Chem Eng* 25, 291-294.
- Ha T.J., Nihei K.I., Kubo I. (2004) Lipxygenase inhibitory activity of octyl gallate. *J Agric Food Chem* 52, 3177-3181.
- Habulin M. & Knez Z. (2009) Optimization of (R,S)-1-phenylethanol kinetic resolution over *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *J Mol Catal B: Enzymatic* 58(1-4), 24-28.
- Halling P.J. (1984) Effects of water on equilibria catalysed by hydrolytic enzymes in biphasic reaction systems. *Enzyme Microb Technol* 6(11), 513-516.

- Halling P.J. (1989) Organic liquids and biocatalysts: theory and practice. *Trends Biotechnol* 7, 50–2.
- Halling P.J. (1992) Salt hydrates for water activity control with biocatalysts in organic media. *Biotechnol Tech* 6, 271–276.
- Halling P.J. (1994) Thermodynamic predictions for biocatalysis in non conventional media: theory, tests and recommendations for experimental design and analysis. *Enzyme Microb Technol* 16, 178–206.
- Halling P.J. (2001) Control of enzyme activity in nonaqueous solvents in *Biotechnology, Vol. 15: Enzymes in Nonaqueous Solvents: Methods and Protocols*. E. N. Vulfson, P. J. Halling, and H. L. Holland (Eds), Humana Press Inc., pp. 243–423.
- Halling P.J., Finney J.L., Ho M.W., Franks F., Littlechild J.A. (2004) What can we learn by studying enzymes in non-aqueous media? *Phil Trans Royal Soc B: Biol Sci* 359(1448), 1287–1297.
- Halliwell B. & Gutteridge J.M.C. (1990) Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. *Methods Enzymol* 186, 1–85.
- Halliwell B. & Gutteridge J.M.C. (1999) Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford: Oxford University Press.
- Halliwell B. (1996a) Antioxidants in human health and disease. *Annu Rev Nutr* 16, 33–50.
- Halliwell B. (1996b) Vitamin C: antioxidant or pro-oxidant in vivo? *Free Radic Res* 25, 439–454.
- Halliwell B. (1999) Antioxidant defence mechanisms: From the beginning to the end (of the beginning). *Free Rad Res* 31, 261–272.
- Halliwell B. (2002) Food-derived antioxidants: How to evaluate their importance in food and in vivo in *Handbook of antioxidants*, Enrique Cadenas and Lester Packer (Eds). Marcel Dekker, Inc., New York.
- Halliwell B. (2007) Biochemistry of oxidative stress. *Biochem Soc Trans* 35, 1147–50.
- Halliwell B., Cross C.E., Gutteridge J.M.C. (1992) Free radicals, antioxidants and human disease: where are we now? *J Lab Clin Med* 119, 598–620.
- Halverson K.J., Sucholeiki I., Ashburn T.T., Lansbury P.T. (1991) Location of β -sheet-forming sequences in amyloid proteins by FTIR. *J Am Chem Soc* 113, 6701–6703.
- Hamanaka H., Mizutani H., Nouchi N., Shimizu Y., Shimizu M. (1998) Allopurinol hypersensitivity syndrome: hypersensitivity to oxypurinol but not allopurinol. *Clin Exp Dermatol* 23, 32.
- Hammes G.G. (Ed) (2005a) Vibrations in macromolecules in *Spectroscopy for the Biological Sciences*, John Wiley & Sons, Inc, pp. 89–102.
- Hammes G.G. (Ed) (2005b) Circular dichroism, optical rotary dispersion and fluorescence polarization in *Spectroscopy for the Biological Sciences*, John Wiley & Sons, Inc, pp. 63–84.
- Hamsaveni D.R., Prapulla S.G., Divakar S. (2001) Response surface methodological approach for the synthesis of isobutyl isobutyrate. *Process Biochem* 36, 1103–1109.
- Han X., Shen T., Lou H. (2007) Dietary polyphenol and their biological significance. *Int J Mol Sci* 8, 950–988.
- Hanasaki Y., Ogawa S., Fukui S. (1994) The correlation between active oxygens scavenging and antioxidative effects of flavonoids. *Free Rad Biol Med* 16, 845–850.
- Handelman G.J., Han D., Tritschler H., Packer L. (1994) α -Lipoic acid reduction by mammalian cells to the dithiol form and release into the culture medium. *Biochem Pharmacol* 47(10), 1725–30.
- Handy S.T. (2003) Greener solvents: Room temperature ionic liquids from biorenewable sources. *Chem - A European J* 9(13), 2938–2944.
- Handy S.T., Okello M., Dickenson G. (2003) Solvents from biorenewable sources: ionic liquids based on fructose. *Org Lett* 5, 2513–2515.
- Haraguchi H. (2001) Antioxidative plant constituents in *Bioactive Compounds from Natural Sources. Isolation, Characterisation and Biological Properties*, C. Tringali (Ed.), Taylor & Francis, London, pp. 337.
- Harborne J.B. (1986) in *Plant Flavonoids in Biology and Medicine*; Cody, V., Middleton, E., Harborne, J. B. (Eds) Alan R. Liss: New York, pp. 15–24.
- Hari Krishna S. & Karanth N.G. (2002) Lipases and lipase catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. *Catal Rev* 44(4), 499–591.
- Harjani J.R., Singer R.D., Garcia M.T., Scammells P.J. (2009) Biodegradable pyridinium ionic liquids: design, synthesis and evaluation. *Green Chem* 11, 83–90.
- Harris C.M., Sanders S.A., Massey V. (1999) Role of the flavin midpoint potential and NAD binding in determining NAD versus oxygen reactivity of xanthine oxidoreductase. *J Biol Chem* 274(8), 4561–4569.
- Harris K.R., Woolf L.A., Kanakubo M. (2005) Temperature and pressure dependence of the viscosity of the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate. *J Chem Eng Data* 50(5), 1777–1782.
- Harrison D.G. & Gongora M.C. (2009) Oxidative stress and hypertension. *Med Clin North Am* 93(3), 621–35.
- Harrison R. (2002) Structure and function of xanthine oxidoreductase: Where are we now? *Free Radic Biol Med* 33, 774–797.
- Hasan F., Shah A.A., Hameed A. (2006) Industrial applications of lipases. *Enzyme Microb Technol* 39, 235–251.
- Hasham S.N. & Pillarisetti S. (2006) Vascular lipases, inflammation and atherosclerosis. *Clin Chim Acta* 372(1–2), 179–83.
- Hassig A., Liang W.X., Schwabl H., Stampfli K. (1999) Flavonoids and tannins: plant-based antioxidants with vitamin character. *Med Hypotheses* 52, 479–481.
- Havsteen B.H. (2002) The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Therapeutics* 96, 67–202.

- Hayes J.D. & McLellan L.I. (1999) Glutathione and glutathione-dependent enzymes represent a co-ordinately regulated defences against oxidative stress. *Free Radic Res* 31, 273-300.
- Heim K.E., Tagliaferro A.R., Bobilya D.J. (2002) Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. *J Nutr Biochem* 13, 572-584.
- Heistad D.D., Wakisaka Y., Miller J., Chu Y., Pena-Silva R. (2009) Novel aspects of oxidative stress in cardiovascular diseases. *Circ J* 73(2), 201-7.
- Helmreich E.J. (1992) How pyridoxal 5'-phosphate could function in glycogen phosphorylase catalysis. *Biofactors* 3, 159-172.
- Herrera E., Jiménez R., Aruoma O.I., Hercberg S., Sánchez-García I., Fraga C. (2009) Aspects of antioxidant foods and supplements in health and disease. *Nutr Rev* 67 Suppl 1, S140-4.
- Hilgers C. & Wasserscheid P. (2002) Quality aspects and other questions related to commercial ionic liquid production in *Ionic Liquids in Synthesis*, P. Wasserscheid and T. Welton (Eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 21-32.
- Hille R. & Nishino T. (1995) Xanthine oxidase and xanthine dehydrogenase. *FASEB Journal* 9(11), 995-1003.
- Hills G. (2003) Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. *Eur J Lipid Sci Technol* 105, 601-7.
- Hinckley G., Mozhaev V.V., Budde C., Khmelnsky Y.L. (2002) Oxidative enzymes possess catalytic activity in systems with ionic liquids. *Biotechnol Lett* 24, 2083-2087.
- Hippeli S. & Elstner E.F. (1997) OH-radical-type reactive oxygen species: a short review on the mechanisms of OH-radical and peroxynitrite toxicity. *Z Naturforsch*, 52C, 555-563.
- Hogg N. (1998) Free radicals in disease. *Semin Reprod Endocrinol* 16, 241-248.
- Holbrey J.D. & Rogers R.D. (2002) Melting points and phase diagrams in *Ionic Liquids in Synthesis*, P. Wasserscheid and T. Welton (Eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 41-55.
- Holbrey J.D. & Seddon K.R. (1999) The phase behaviour of 1-alkyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborates; ionic liquids and ionic liquid crystals. *J Chem Soc - Dalton Transactions* (13), 2133-2139.
- Holbrey J.D., Visser A.E., Rogers R.D. (2002) Solubility and solvation in ionic liquids in *Ionic Liquids in Synthesis*, P. Wasserscheid and T. Welton (Eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 68-81.
- Holland H.L. (2001) Synthetic applications In *Methods in Biotechnology, Vol. 15: Enzymes in Nonaqueous Solvents: Methods and Protocols* E. N. Vulfson, P. J. Halling, and H. L. Holland (Eds) Humana Press Inc., pp. 243-423.
- Horváth M.E., Gonzalez-Cabello R., Blazovics A. (2001) Effect of silibinin and vitamin E on restoration of cellular immune response after partial hepatectomy. *J Ethnopharmacol* 77, 227-232.
- Hostanska K., Jürgenliemk G., Abel G., Nahrstedt A., Saller R. (2007) Willow bark extract (BNO1455) and its fractions suppress growth and induce apoptosis in human colon and lung cancer cells. *Cancer Det. Prevention* 31, 129-139.
- Howarth J., James P., Dai J. (2001) Immobilized baker's yeast reduction of ketones in an ionic liquid, [bmim]PF₆ and water mix. *Tetrahedron Lett* 42, 7517-7519.
- Huddleston J.G., Visser A.E., Reichert W.M., Willauer H.D., Broker G.A., Rogers R.D. (2001) Characterization and comparison of hydrophilic and hydrophobic room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation. *Green Chem* 156-164.
- Hudson E., Eppler E., Clark D. (2005) Biocatalysis in semi-aqueous and nearly anhydrous conditions. *Curr Opin Biotech* 16, 637-643.
- Hult K. & Berglund P. (2007) Enzyme promiscuity: mechanism and applications. *Trends Biotechnol* 25, 231-8.
- Hultqvist M., Olsson L.M., Gelderman K.A., Holmdahl R. (2009) The protective role of ROS in autoimmune disease. *Trends Immunol* 30(5), 201-8.
- Humeau C., Girardin M., Rovel B., Miclo A. (1998) Enzymatic synthesis of fatty acid ascorbyl esters. *J Mol Catal B Enzym* 5, 19-23.
- Hussain W., Pollard D.J., Truppo M., Lye G.J. (2008) Enzymatic ketone reductions with co-factor recycling: improved reactions with ionic liquid co-solvents. *J Mol Catal B: Enzymatic* 55, 19-29.
- Husson E., Humeau C., Blanchard F., Framboisier X., Marc I., Chevalot I. (2008) Chemo-selectivity of the N,O-enzymatic acylation in organic media and in ionic liquids. *J Mol Catal B: Enzymatic* 55(3-4), 110-117.
- Illanes A. (ed) (2008a) Study Cases of Enzymatic Processes in *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Springer Science pp. 353-378.
- Illanes A. (Ed) (2008b) Introduction in *Enzyme Biocatalysis Principles and Applications*, Springer Science, pp. 1-55.
- Illanes A., Altamirano C., Wilson L. (2008) Homogeneous Enzyme Kinetics in *Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications*. Illanes A. (ed) Springer Science pp. 107-154.
- Illanes A., Altamirano C., Zúñiga M.E. (1996) Thermal inactivation of immobilized penicillin amylase in the presence of substrates and products. *Biotechnol Bioeng* 50, 609-616.
- Imperato G., König B., Chiappe C. (2007) Ionic green solvents from renewable resources. *Eur J Org Chem* 1049-1058.
- Irimescu R. & Kato K. (2004) Investigation of ionic liquids as reaction media for enzymatic enantioselective acylation of amines. *J Mol Catal B Enzymatic* 30, 189-194.
- Ishihara K. & Nakajima N. (2003) Structural aspects of acylated plant pigments: stabilization of flavonoid glucosides and interpretation of their functions. *J Mol Catal B: Enzym* 23, 411-417.
- Ismail A., Soultani S., Ghoul M. (1998) Optimization of the enzymatic synthesis of butyl glucoside using response surface methodology. *Biotechnol Progr* 14, 874-878.
- Itoh T., Akasaki E., Kudo K., Shirakami S. (2001) Lipase-catalyzed enantioselective acylation in the ionic liquid solvent system: reaction of enzyme anchored to the solvent. *Chem Lett* 1, 262-263.
- Itoh T., Akasaki E., Nishimura Y. (2002) Efficient lipase-catalyzed enantioselective acylation under reduced pressure conditions in an ionic liquid solvent system. *Chem Lett* 31, 154-155.

- Itoh T., Han S., Matsushita Y., Hayase S. (2004) Enhanced enantioselectivity and remarkable acceleration on the lipase-catalyzed transesterification using novel ionic liquids. *Green Chem* 6(9), 437–439.
- Itoh T., Matsushita Y., Abe Y., Han S., Wada S., Hayase S., Kawatsura M., Takai S., Morimoto M., Hirose Y. (2006) Increased enantioselectivity and remarkable acceleration of lipase-catalyzed transesterification by using an imidazolium PEG-Alkyl sulfate ionic liquid. *Chem Eur J* 12(36), 9228–9237.
- Itoh T., Nishimura Y., Ouchi N., Hayase S. (2003) 1-Butyl-2,3 dimethylimidazolium tetrafluoroborate: the most desirable ionic liquid solvent for recycling use of enzyme in lipase-catalyzed transesterification using vinyl acetate as acyl donor. *J Mol Catal B: Enzymatic* 26(1-2), 41–45.
- Iwashina T. (2000) The structure and distribution of the flavonoids in plants. *J Plant Res* 113, 287–299.
- Jackson M. & Mantsch H.H. (1995) The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 30, 95–120.
- Jackson M., Hafts P.I., Chapman D. (1989) Fourier transform infrared spectroscopic studies of lipids, polypeptides and proteins. *J Molec Structure* 204, 329–355.
- Jacobs B.P., Dennehy C., Ramirez G., Sapp J., Lawrence V.A. (2002) Milk thistle for the treatment of liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Am J Med* 113, 506–515.
- Jacquemin J., Husson P., Padua A.A.H., Majer V. (2006) Density and viscosity of several pure and water-saturated ionic liquids. *Green Chem* 8, 172–180.
- Jaeger K.E. & Eggert T. (2002) Lipases for biotechnology. *Cur Opin Biotechnol* 13, 390–397.
- Jaeger K.E. & Reetz M.T. (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *TIB TECH*, 16, 396–403.
- Jaeger K.E., Dijkstra B.W., Reetz M.T. (1999) Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. *Annual Rev Microbiol* 53, 315–51.
- Jaeger KE, Eggert T, Eipper A. (2001) Directed evolution and the creation of enantioselective biocatalyst. *Appl Microbiol Biotechnol* 55:519–530
- Jain N., Kumar A., Chauhan S., Chauhan S.M.S. (2005) Chemical and biochemical transformations in ionic liquids. *Tetrahedron* 61, 1015–1060.
- Jastorff B., Störmann R., Ranke J., Mölter K., Stock F., Oberheitmann B., Hoffman W., Hoffmann J., Nüchter M., Ondruschka B., Filser J. (2003) How hazardous are ionic liquids? structure–activity relationships and biological testing as important elements for sustainability evaluation. *Green Chem* 5, 136–142.
- Jiang C., Agarwal R., Lu J. (2000) Anti-angiogenic potential of a cancer chemopreventive flavonoid antioxidant, silymarin: inhibition of key attributes of vascular endothelial cells and angiogenic cytokine secretion by cancer epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 276, 371–378.
- 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: Enzymatic* 58, 103–109.
- Johns D.P. (2006) Redefining oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 8, 1865–1879.
- Johnston C.S., Steinberg F.M., Rucker R.B. (2001) Ascorbic Acid in *Handbook of vitamins* 3rd edition, Marcel Dekker Inc, New York.
- Jones W., Li X., Qu Z.C., Perriott L., Whitesell R.R., May J.M. (2002) Uptake, recycling, and antioxidant actions of α-lipoic acid in endothelial cells. *Free Rad Biol Med* 33, 83–93.
- Kaar J.L., Jesionowski A.M., Berberich J.A., Moulton R., Russell A.J. (2003) Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability. *J Am Chem Soc* 125, 4125–4131.
- Kaftzik N., Kroutil W., Faber K., Kragl U. (2004) Mandelate racemase activity in ionic liquids: Scopes and limitations. *J Mol Catal A: Chem* 214(1), 107–112.
- Kaftzik N., Wasserscheid P., Kragl U. (2002) Use of ionic liquids to increase the yield and enzyme stability in the β-galactosidase catalysed synthesis of N-acetylglucosamine. *Organ Proc Res Dev* 6, 553–557.
- Kaneko T., Tahara S., Takabayashi F. (2007) Inhibitory effect of natural coumarin compounds, esculetin and esculin, on oxidative DNA damage and formation of aberrant crypt foci and tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine in rat colons. *Biol Pharmaceut Bull* 30(11), 2052–2057.
- Kanner J. & Rosenthal I. (1992) An assessment of lipid oxidation in foods. *Pure Appl Chem* 64, 1959–1964.
- Kanner J. (2007) Dietary advanced lipid oxidation endproducts are risk factors to human health. *Mol Nutr Food Res* 51, 1094–1101.
- Karboune S., Safari M., Lue B.M., Yeboah F.K., Kermasha S. (2005) Lipase-catalyzed biosynthesis of cinnamoylated lipids in a selected organic solvent medium. *J Biotechnol* 119, 281–290.
- Karmee S.K. (2009) Biocatalytic synthesis of ascorbyl esters and their biotechnological applications. *Appl Microbiol Biotechnol* 81, 1013–1022.
- Kato K., Terao S., Shimamoto N., Hirata M. (1988) Studies on scavengers of active oxygen species. 1. Synthesis and biological activity of 2-O-alkylascorbic acids. *J Med Chem* 31, 793–8.
- Katsoura M.H., Polydera A.C., Tsironis L., Tselepis A.D., Stamatis H. (2006) Use of ionic liquids as reaction media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency. *J Biotechnol* 123, 491–503.
- Katsoura M.H., Polydera A.C., Katapodis P., Kolisis F.N., Stamatis H. (2007) Effect of different reaction parameters on the lipase-catalyzed selective acylation of polyhydroxylated natural compounds in ionic liquids. *Proc Biochem* 42, 1326–1334.
- Katsoura M.H., Polydera A.C., Tsironis L.D., Petraki M.P., Kostić Rajačić S., Tselepis A.D., Stamatis H. (2009) Efficient enzymatic preparation of hydroxycinnamates in ionic liquids enhances their antioxidant effect on lipoproteins oxidative modification. *New Biotechnol* 26(1-2), 83–91.

- Kaufman P.B., Chang S.C., Kirakosyan A. (2009) Risks and benefits associated with genetically modified (GM) plants in *Recent Advances in Plant Biotechnology*, Ara Kirakosyan, Peter B. Kaufman (Eds), Springer, pp. 333-346.
- Kaur J., Wehtje E., Adlercreutz P., Chand S., Mattiasson B. (1997) Water transfer kinetics in a water activity control system designed for biocatalysis in organic media. *Enzyme Microb Technol* 21, 496-501.
- Kazlauskas R.J., Bornscheuer U.T. (1998) Biotransformations with lipases in *Biotransformation I, Biotechnology*. D.R. Kelly (Ed), Wiley-VCH, Weinheim, Vol. 8a, pp. 37-191, 607.
- Keasling J.D. (2008) Synthetic biology for synthetic chemistry. *ACS Chem Biol* 3, 64-76.
- Keiko Y.S. & Kazuki S. (2006) Review: genetically modified plants for the promotion of human health. *Biotechnol Lett* 28, 1983-1991.
- Kelavkar U.P., Nixon J.B., Cohen C., Dillehay D., Eling T.E., Badr K.F. (2001) Overexpression of 15-lipoxygenase-1 in PC-3 human prostate cancer cells increases tumorigenesis. *Carcinogenesis* 22, 1765-1773.
- Kendrick B.S., Dong A., Allison S.D., Manning M.C., Carpenter J.F. (1996) Quantitation of the area of overlap between second-derivative amide I infrared spectra to determine the structural similarity of a protein in different states. *J Pharm Sci* 85, 155-158.
- Khan J.A. & Vulfson E.N. (2001) Microencapsulation of Enzymes and Cells for Nonaqueous Biotransformations in *Biotechnology, Vol. 15: Enzymes in Nonaqueous Solvents: Methods and Protocols* E. N. Vulfson, P. J. Halling, and H. L. Holland (Eds), Humana Press Inc., pp. 243-423.
- Khayyal M.T., El-Ghazaly M.A., Abdallah D.M., Okpanyi S.N., Kelber O., Weiser D. (2005) Mechanisms involved in the anti-inflammatory effect of a standardized willow bark extract. *Drug Res* 55, 677-687.
- Khokhar S. & Apenten R.K.O. (2003) Iron binding characteristics of phenolic compounds: Some tentative structure-activity relations. *Food Chem* 81(1), 133-140.
- Kikuzaki H., Hisamoto M., Hirose K., Akiyama K., Taniguchi H. (2002) Antioxidant properties of ferulic acid and its related compounds. *J Agric Food Chem* 50, 2161-2168.
- Kim H., Kim B., Kim H., Um S., Lee J., Ryoo H., Jung H. (2008) Synthesis and *in vitro* biological activity of retinyl retinoate, a novel hybrid retinoid derivative. *Bioorg Med Chem* 16, 6387-6393.
- Kim K.W., Song B., Choi M.Y., Kim M.J. (2001) Biocatalysis in ionic liquids: markedly enhanced enantioselectivity of lipase. *Organ Lett* 3, 1507-1509.
- Kim M.-J., Choi M.Y., Lee J.K., Ahn Y. (2003) Enzymatic selective acylation of glycosides in ionic liquids: significantly enhanced reactivity and regioselectivity. *J Mol Catal B: Enzymatic* 26, 115-118.
- Kim Y., Rose C.A., Liu Y., Ozaki Y., Datta G., Tu A.T. (1994) FT-IR and near-infrared FT-Raman studies of the secondary structure of insulinotropin in the solid state: α -helix to β -sheet conversion induced by phenol and/or high shear force. *J Pharm Sci* 83, 1175-1180.
- Kirakosyan A., Cseke L.J., Kaufman P.B. (2009) The use of plant cell biotechnology for the production of phytochemicals in *Recent Advances in Plant Biotechnology*. Ara Kirakosyan, Peter B. Kaufman (Eds), Springer, pp. 15-34.
- Kirk O. & Christensen M.W. (2002) Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin. *Org Proc Res Dev* 6, 446-451.
- Kitazume T. (2001) Preparation of optically active ion liquid of nicotinium bis(trifluoromethylsulfonyl)amides for solvents. US 0031875.
- Klein R.R., King G., Moreau R.A., Haas M.J. (1997) Altered acyl chain length specificity of *Rhizopus delemar* lipase through mutagenesis and molecular modelling. *Lipids* 32, 123-130.
- Klibanov A.M. (1989) Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biochem Sci* 14(4), 141-4.
- Klibanov A.M. (1997) Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends Biotechnol* 15, 97-101.
- Klibanov A.M., Samokhin G.P., Martinek K., Berezin I.V. (1977) A new approach to preparative enzymatic synthesis. *Biotechnol Bioeng* 19, 1351-1361, reprinted in *Biotechnol. Bioeng.*, 2000, 67, 737-747.
- Knezevic Z., Mojovic L., Adnadjevic B. (1998) Palm oil hydrolysis by lipase from *Candida cylindracea* immobilized on zeolite type Y. *Enzyme Microb Technol* 22, 275-280.
- Köddermann T., Wertz C., Heintz A., Ludwig R. (2006) Ion-pair formation in the ionic liquid 1-ethyl-3-methylimidazolium bis(triflyl)imide as a function of temperature and concentration. *Chem Phys Chem* 7(9), 1944-1949.
- Kodelia G., Athanasiou K., Kolisis F.N. (1994) Enzymatic synthesis of butyryl-rutin ester in organic solvents and its cytogenic effects in mammalian cells in culture. *Appl Biochem Biotechnol* 44, 205-211.
- Koes R.E., Quattrocchio F., Mol J.N.M. (1994) The flavonoid biosynthetic pathway in plants: function and evolution. *BioEssays* 16, 123-132.
- Kontogianni A., Skouridou V., Sereti V., Stamatis H., Kolisis F.N. (2003) Lipase-catalyzed esterification of rutin and naringin with fatty acids of medium carbon chain. *J Mol Catal B: Enzym* 21(1-2), 59-62.
- Kontogianni A., Skouridou V., Sereti V., Stamatis H., Kolisis F.N. (2001) Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by lipase in low toxicity media. *Eur J Lipid Sci Technol* 103, 655-660.
- Kosina P., Kren V., Gebhardt R., Grambal F., Ulrichova J., Walterova D. (2002) Antioxidant properties of silybin glycosides. *Phytotherapy* 16, S33-S39.
- Kostova I. (2005) Synthetic and natural coumarins as cytotoxic agents. *Curr Medicinal Chem - Anti-Cancer Agents* 5(1), 29-46.
- Kostyuk V.A., Potapovich A.I., Vladykovskaya E.N., Korkina L.G., Alfarsev A.B. (2001) Influence of metal ions on flavonoid protection against asbestos-induced cell injury. *Arch Biochem Biophys* 385, 129-137.
- Kovac A., Scheib H., Pleiss J., Schmid R.D., Paltauf F. (2000) Molecular basis of lipase stereoselectivity. *Eur J Lipid Sci Technol* 61-77.

- Koyama K., Kaya M., Ishigaki T., Tsujita J., Hori S., Seino T., Kasugai A. (1999) Role of xanthine oxidase in delayed lipid peroxidation in rat liver induced by acute exhausting exercise. *Eur J Appl Physiol* 80, 28.
- Kragl U., Kruse U., Hummel W. (1996) Enzyme engineering aspects of biocatalysis: cofactor regeneration as example. *Biotechnol Bioeng* 52(2), 309–319.
- Krajewska B. (2004) Application of chitin- and chitosan-based materials for enzyme immobilizations: A review. *Enz Microb Technol* 35, 126–139.
- 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.
- Kristensen J.B., Xu X., Mu H. (2005) Diacylglycerol synthesis by enzymatic glycerolysis: screening of commercially available lipases. *JAOCs* 82, 329–334.
- Kubo I., Masuoka N., Xiao P., Haraguchi H. (2002) Antioxidant activity of dodecyl gallate. *J Agric Food Chem* 50, 3533–3539.
- Kuhl P. & Halling P.J. (1991) Salt hydrates buffer water activity during chymotrypsin-catalysed peptide synthesis. *Biochim Biophys Acta - Prot Struct Mol Enzymol* 1078(3), 326–328.
- Kuninori T., Nishiyama J., Shirakawa M., Shimoyama A. (1992) Inhibition of soybean lipoxygenase-1 by n-alcohols and n-alkylthiols. *Biochim Biophys Acta* 1125, 49–55.
- Kuwabara K., Watanabe Y., Adachi S., Nakanishi K., Matsuno R. (2003) Synthesis of 6-O-unsaturated acyl L-ascorbates by immobilized lipase in acetone in the presence of molecular sieve. *Biochem Eng J* 16(1), 17–22.
- Kvasnicka F., Biba B., Sevcik R., Voldrich M., Kratka J. (2003) Analysis of the active components of silymarin. *J Chromatogr A* 990, 239–245.
- Laane C., Boeren S., Vos K., Veeger C. (1987) Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol Bioeng* 30, 81–87.
- Lambusta D., Nicolosi G., Patti A., Sanfilippo C. (2003) Application of lipase catalysis in organic solvents for selective protection–deprotection of bioactive compounds. *J Mol Catal B: Enzym* 22, 271–277.
- Lang M., Kamrat T., Nidetzky B. (2006) Influence of ionic liquid cosolvent on transgalactosylation reactions catalyzed by thermostable β -glycosylhydrolase CelB from *Pyrococcus furiosus*. *Biotechnol Bioeng* 95(6), 1093–1100.
- Lang S., Syltatk C., Rau U. (2000) Enzymatic synthesis and modification of glycolipids in *Enzymes in lipid modification*. Bornscheuer UT (Ed). Weinheim: Wiley-VCH, pp. 361–93.
- Lange C., Patil G., Rudolph R. (2005) Ionic liquids as refolding additives: N'-alkyl and N'-(ω -hydroxyalkyl) N-methylimidazolium chlorides. *Protein Sci* 14 (10), 2693–2701.
- Lapenna D., Ciofani G., Pierdomenico S.D., Giamberardino M.A., Cuccurullo F. (2003) Dihydrolipoic acid inhibits 15-lipoxygenase-dependent lipid peroxidation. *Free Rad Biol Med* 35, 1203–1209.
- Laszlo J.A. & Compton D.L. (2001) α -Chymotrypsin catalysis in imidazolium-based ionic liquids. *Biotechnol Bioeng* 75, 181–186.
- 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: Enzymatic* 18(1-3), 109–120.
- Latała A., Stepnowski P., Nedzi M., Mroziak W. (2005) Marine toxicity assessment of imidazolium ionic liquids: Acute effects on the Baltic algae *Oocystis submarina* and *Cyclotella meneghiniana*. *Aquatic Toxicol* 73, 91–98.
- Lau R.M., Sorgedraeger M.J., Carrea G., van Rantwijk F., Secundo F., Sheldon R.A. (2004) Dissolution of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids: effects on structure and activity. *Green Chem* 6, 483–487.
- Lau R.M., van Rantwijk F., Seddon K.R., Sheldon R.A. (2000) Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids. *Org Lett* 2, 4189–4191.
- Lavelli V., Peri C., Rizzolo A. (2000) Antioxidant activity of tomato products as studied by model reactions using xanthine oxidase, myeloperoxidase, and copper-induced lipid peroxidation. *J Agric Food Chem* 48, 1442–1448.
- Lee C.H., Lee E., Kim S.H., Jung H.K. (2007b) Hydroxylated hydrocinnamides as hypocholesterolemic agents. *Bull Korean Chem Soc* 28, 1787.
- Lee D.G., Kim H.K., Park Y., Park S.C., Woo E.R., Jeong H.G., Hahn K.S. (2003) Gram-positive bacteria specific properties of silybin derived from *Silybum marianum*. *Arch Pharmacol Res* 26, 597–600.
- Lee G.S., Widjaja A., Ju Y.H. (2006) Enzymatic synthesis of cinnamic acid derivatives. *Biotechnol Lett* 28, 581–585.
- Lee J.K. & Kim M.J. (2002) Ionic liquid-coated enzyme for biocatalysis in organic solvent. *J Org Chem* 67, 6845–6847.
- Lee S.H., Doan T.T., Ha S.H., Koo Y.M. (2007a) Using ionic liquids to stabilize lipase within sol-gel derived silica. *J Mol Catal B: Enzymatic* 45(1-2), 57–61.
- Lee S.H., Ha S.H., Hiep N.M., Chang W.J., Koo Y.M. (2008) Lipase-catalyzed synthesis of glucose fatty acid ester using ionic liquids mixtures. *J Biotechnol* 133(4), 486–489.
- Lee S.M., Chang W.J., Choi A.R., Koo Y.M. (2005) Influence of ionic liquids on the growth of *Escherichia coli*. *Korean J Chem Eng* 22, 687–690.
- Leklem J.E. (2001) Vitamin B6 in *Handbook of vitamins* 3rd edition, Marcel Dekker Inc, New York.
- Lenardao E.J., Freitag R.A., Dabdoub M.J., Batista A.C.F., Silveira C.D. (2003) Green chemistry - The 12 principles of green chemistry and its insertion in the teach and research activities. *Quimica Nova* 26, 123–129.
- Lenourry A., Gardiner G.M., Stephens G. (2005) Hydrogenation of C–C double bonds in an ionic liquid reaction system using the obligate anaerobe, *Sporomusa termitida*. *Biotechnol Lett* 27, 161–165.
- Leonard S.S., Harris G.K., Shi X. (2004) Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med* 37, 1921–1942.
- Leopoldini M., Russo N., Chiodo S., Toscano M. (2006) Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin. *J Agric Food Chem* 54(17), 6343–6351.

- Levin I. (2009) Regulating phytonutrient levels in plants – toward modification of plant metabolism for human health in *Recent Advances in Plant Biotechnology*, Ara Kirakosyan, Peter B. Kaufman (Eds), Springer, pp. 289-331.
- Levin I., Ric De Vos C.H., Tadmor Y., Bovy A., Lieberman M., Oren-Shamir M. (2006) High pigment tomato mutants - more than just lycopene (a review). *Israel J Plant Sci* 54(3), 179-190.
- Li J.W.H. & Vederas J.C. (2009) Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier? *Science* 325, 161-165.
- Li X.F., Zong M.H., Wu H., Lou W.Y. (2006) Markedly improving Novozym 435-mediated regioselective acylation of 1- β -D-arabinofuranosylcytosine by using co-solvent mixtures as the reaction media. *J Biotechnol* 124, 552-560.
- Lide D.R. (1998) Handbook of chemistry and physics. 76th ed CRC Press.
- Lieber CS. (2000) Alcoholic liver disease: new insights in pathogenesis lead to new treatments. *J Hepatol* 32(Suppl. 1), 113-128.
- Lima F.V., Pyle D.L., Asenjo J.A. (1995) Factors affecting the esterification of lauric acid using an immobilized biocatalyst : enzyme characterization and studies in a well-mixed reactor. *Biotechnol Bioeng* 46, 69.
- Lin C.C. & Yin M.C. (2007) B vitamins deficiency and decreased anti-oxidative state in patients with liver cancer. *Eur J Nutr* 46, 293-299.
- Linder M., Kochanowski N., Fanni J., Parmentier M. (2005) Response surface optimisation of lipase-catalysed esterification of glycerol and n-3 polyunsaturated fatty acids from salmon oil. *Proc Biochem* 40(1), 273-279.
- Liochev S.I. & Fridovich I. (1994) The role of O₂ in the production of HO: *In vitro* and *in vivo*. *Free Radic Biol Med* 16, 29-33.
- Liu J. (2008) The effects and mechanisms of mitochondrial nutrient alpha lipoic acid on improving age-associated mitochondrial and cognitive dysfunction: an overview. *Neurochem Res* 33, 194-203.
- Liu Y., Shi L., Wang M., Li Z., Liu H., Li J. (2005a) A novel room temperature ionic liquid sol-gel matrix for amperometric biosensor application. *Green Chem* 7(9), 655-658.
- Liu Z.Q., Ma L.P., Liu Z.L. (1998) Making vitamin C lipophilic enhances its protective effect against free radical induced peroxidation of low density lipoprotein. *Chem Phys Lipids* 95, 49-57.
- Lomnitski L., Bar-Natan R., Sklan D., Grossman S. (1993) The interaction between β -carotene and lipoxygenase in plant and animal systems. *Biochim Biophys Acta* 1167, 331-338.
- Lou W.-Y., Xu R., Zong M.-H. (2005) Hydroxynitrile lyase catalysis in ionic liquid-containing systems. *Biotechnol Lett* 27, 1387.
- Lou W.-Y., Zong M.-H., Liu Y.-Y., Wang J.-F. (2006b) Efficient enantioselective hydrolysis of d,l-phenylglycine methyl ester catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase B in ionic liquid containing systems. *J Biotechnol* 125, 64-74.
- Lou W.Y., Zong M.H., Smith T.J. (2006a) Use of ionic liquids to improve whole-cell biocatalytic asymmetric reduction of acetyltrimethylsilane for efficient synthesis of enantiopure (S)-1-trimethylsilylethanol. *Green Chem* 8, 147-155.
- Lou W.-Y., Zong M.-H., Smith T.J., Wu H., Wang J.-F. (2006c) Impact of ionic liquids on papain: An investigation of structure-function relationships. *Green Chem* 8(6), 509-512.
- Lou W.Y., Zong M.H., Zhang Y.Y., Wu H. (2004) Efficient synthesis of optically active organosilyl alcohol via asymmetric reduction of acyl silane with immobilized yeast. *Enzyme Microb Technol* 35, 190-196.
- Lourenco N.M.T., Barreiros S., Afonso C.A.M. (2007) Enzymatic resolution of indinavir precursor in IL with reuse of biocatalyst and media by product sublimation. *Green Chem* 9, 734-736.
- Lozano P., De Diego T., Carrie D., Vaultier M., Iborra J.L. (2003) Enzymatic ester synthesis in ionic liquids. *J Mol Catal B Enzymatic* 21, 9-13.
- Lozano P., De Diego T., Carrie D., Vaultier M., Iborra J.L. (2001b) Over-stabilization of *Candida antarctica* lipase B by ionic liquids in ester synthesis. *Biotechnol Lett* 23, 1529-1533.
- Lozano P., De Diego T., Carrie D., Vaultier M., Iborra J.L. (2002) Continuous green biocatalytic processes using ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *Chem Commun* 1, 692-693.
- Lozano P., De Diego T., Carrié D., Vaultier M., Iborra J.L. (2004a). Criteria to design green enzymatic processes in ionic liquid/supercritical carbon dioxide systems. *Biotechnol Prog* 20, 661-669.
- Lozano P., De Diego T., Carrié D., Vaultier M., Iborra J.L. (2004b) Synthesis of glycidyl esters catalyzed by lipases in ionic liquids and supercritical carbon dioxide. *J Mol Catal A: Chem* 214, 113-119.
- Lozano P., De Diego T., Gmouh S., Vaultier M., Iborra J.L. (2005) Dynamic structure-function relationships in enzyme stabilization by ionic liquids. *Biocatal Biotransform* 23(3/4), 169-176.
- Lozano P., De Diego T., Guegan J.P., Vaultier M., Iborra J.L. (2001a) Stabilization of α -chymotrypsin by ionic liquids in transesterification reactions. *Biotechnol Bioeng* 75(5), 563-569.
- Lozano P., De Diego T., Sauer T., Vaultier M., Gmouh S., Iborra J.L. (2007a) On the importance of the supporting material for activity of immobilized *Candida antarctica* lipase B in ionic liquid/hexane and ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic media. *J Supercrit Fluids* 40(1), 93-100.
- Lozano P., Piamtongkam R., Kohns K., De Diego T., Vaultier M., Iborra J.L. (2007b) Ionic liquids improve citronellyl ester synthesis catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase B in solvent-free media. *Green Chem* 9(7), 780-784.
- 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 Biotechnol* 80, 462-468.
- Lutz S. (2004) Engineering lipase B from *Candida antarctica*. *Tetrahedron: Asym* 15, 2743-2748.
- Maccarrone M., Veldink G.A., Vliegthart J.F.G., Agro A.F. (1995) Inhibition of soybean lipoxygenase-1 by chain-breaking antioxidants. *Lipids* 30(1), 51-54.

- MacManus D.A. & Vulfson E.N. (1995) Substituent effects on the regioselectivity of enzymatic acylation of 6-O-alkylglycopyranosides using *Pseudomonas cepacia* lipase. *Carbohydrate Res* 279, 281-291.
- Mahato S.B., Nandy A.K., Roy G. (1992) Triterpenoids. *Phytochem* 31, 2199-2249.
- Mahmoudian M. (2009) Biocatalysis and key future trends in the big pharma. *Chim Oggi* 27, 1-2.
- Majumder A.B., Shah S., Gupta M.N. (2007) Enantioselective transacetylation of (*R,S*)- β -citronellol by propanol rinsed immobilized *Rhizomucor miehei* lipase. *Chem Central J* 1, 10-15.
- Mala J.G.S. & Takeuchi S. (2008) Understanding structural features of microbial lipases—An overview. *Anal Chem Insights* 3, 9-19.
- Malcata F.X., Reyes H.R., Garcia H.S., Hill C.G., Amundson C.H. (1992) Kinetics and mechanisms of reactions catalysed by immobilized lipases. *Enzyme Microb Technol* 14(6), 426-446.
- Mantouros L., Coman S., Parvulescu V.I. (2008) Comparative behavior of various lipases in benign water and ionic liquids solvents. *J Mol Catal A: Chem* 279, 223-229.
- Manthey J.A., Grohmann K., Guthrie N. (2001) Biological properties of citrus flavonoids pertaining to cancer and inflammation. *Curr Med Chem* 8, 135- 53.
- Mantsch H.H., Perczel A., Hollosi M., Fasman G.D. (1993) Characterization of β -turns in cyclic hexapeptides in solution by fourier transform ir spectroscopy. *Biopolymers* 33, 201-207.
- Mantz R.A. & Trulove P.C. (2002) Viscosity and density of ionic liquids in *Ionic Liquids in Synthesis*, P. Wasserscheid and T. Welton (Eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 56-68.
- Marangon K., Devaraj S., Tirosh O., Packer L., Jialal I. (1999) Comparison of the effect of alpha-lipoic acid and alpha-tocopherol supplementation on measures of oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 27, 1114-1121.
- Marcelino A.M.C. & Gierasch L.M. (2008) Roles of β -turns in protein folding: from peptide models to protein engineering. *Biopolymers* 89, 380-391.
- Marchelli R. & Vining L.C. (1973) The biosynthetic origin of chlorflavonin, a flavonoid antibiotic from *Aspergillus candidus*. *Canad J Biochem* 51, 1624-1629.
- Marcilla R., De Geus M., Mecerreyes D., Duxbury C.J., Koning C.E., Heise A. (2006) Enzymatic polyester synthesis in ionic liquids. *Eur Polym J* 42, 1215-1221.
- Mariappan D., Winkler J., Parthiban V., Doss M.X., Hescheler J., Sachinidis A. (2006) Dietary small molecules and large-scale gene expression studies: an experimental approach for understanding their beneficial effects on the development of malignant and non-malignant proliferative diseases. *Curr Med Chem* 13(13), 1481-9.
- Markham K.R. & Porter L.J. (1969) Flavonoids in the green algae (Chlorophyta). *Phytochem* 8, 1777-1781.
- Maruyama T., Nagasawa S., Goto M. (2002) Poly(ethylene glycol)-lipase complex that is catalytically active for alcoholysis reactions in ionic liquids. *Biotechnol Lett* 24(16), 1341-1345.
- Maruyama T., Yamamura H., Kotani T., Kamiya N., Goto M. (2004) Poly(ethylene glycol)-lipase complexes that are highly active and enantioselective in ionic liquids. *Org Biomol Chem* 2(8) 1239-1244.
- Masella R., Di Benedetto R., Vari R., Filesi C., Giovannini C. (2005) Novel mechanisms of natural antioxidant compounds in biological systems: involvement of glutathione and glutathione-related enzymes. *J Nutr Biochem* 16, 577-586.
- Mashino T., Takigawa Y., Saito N., Wong L.Q., Mochizuki M. (2000) Antioxidant activity and xanthine oxidase inhibition activity of reductic acid: ascorbic acid analogue. *Bioorg Medic Chem Lett* 10, 2783-2785.
- Mat Hadzir N., Basri M., Rahman M.B.A., Razak C.N.A., Rahman R.N.Z.A., Salleh A.B. (2001) Enzymatic alcoholysis of triolein to produce wax ester. *J Chem Technol Biotechnol* 76, 511-515.
- Mateo C., Abian O., Fernandez-Lafuente R. (2000) Reversible enzyme immobilization via a very strong and non-distorting ionic adsorption on support-polyethylenimine composites. *Biotechnol Bioeng* 68, 98-105.
- 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, 1451-1463.
- Mateo C., Palomo J.M., van Langen L. (2004) A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates. *Biotechnol Bioeng* 86, 273-276.
- Matsuda T., Yamagishi Y., Koguchi S., Iwaib N., Kitazume T. (2006) An effective method to use ionic liquids as reaction media for asymmetric reduction by *Geotrichum candidum*. *Tetrahedron Lett* 47, 4619-4622.
- Matxain J.M., Padro D., Ristila M., Strid A., Eriksson L.A. (2009) Evidence of high $\bullet$ OH radical quenching efficiency by Vitamin B6. *J Phys Chem B* 113, 9629-9632.
- 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.
- 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., Kolis F.N., Stamatis H. (2005) Biocatalytic preparation of acylated derivatives of flavonoid glycosides enhances their antioxidant and antimicrobial activity. *J Biotechnol* 116, 295-303.
- Mellou F., Loutfari H., Stamatis H., Roussos C., Kolis F.N. (2006) Enzymatic esterification of flavonoids with unsaturated fatty acids: Effect of the novel esters on vascular endothelial growth factor release from K562 cells. *Proc Biochem* 41, 2029-2034.
- Mertens A. & Holvoet P. (2001) Oxidized LDL and HDL: antagonists in atherothrombosis. *FASEB J* 15, 2073-2084.
- Meyer H.P., Gishalpa O., Leresche J.E. (2009) Biotransformations and the pharma industry in *Handbook of Green Chemistry*, Grabtree R.H. (Ed), Willey, Weinheim pp. 171-212.
- Micaelo N.M. & Soares C.M. (2007) Modeling hydration mechanisms of enzymes in nonpolar and polar organic solvents. *Febs J* 274(9), 2424-2436.

- Micaêlo N.M. & Soares C.M. (2008) Protein structure and dynamics in ionic liquids. insights from molecular dynamics simulation studies. *J Phys Chem B* 112(9), 2566-2572.
- Miesel R. & Zuber M. (1993) Elevated levels of xanthine oxidase in serum of patients with inflammatory and autoimmune inflammatory diseases. *Inflammation* 17, 551-561.
- Miguez M.P., Anundi I., Sainz-Pardo L.A., Lindros K.O. (1994) Comparative study of the hepatoprotective effect of silymarin and silybin on isolated rat hepatocytes. *Toxicol in Vitro* 8, 581-583.
- Miki K., Westh P., Nishikawa K., Koga Y. (2005) Effect of an "ionic liquid" cation, 1-butyl-3-methylimidazolium, on the molecular organization of H₂O. *J Phys Chem B* 109(18), 9014-9019.
- Milde J., Elstner E.F., Graßmann J. (2004) Synergistic inhibition of low-density lipoprotein oxidation by rutin, γ -terpinene, and ascorbic acid. *Phytomed* 11(2-3), 105-113.
- Miller D.M., Buettner G.R., Aust S.D. (1990) Transition metals as catalysts of "autoxidation" reactions. *Free Radic Biol Med* 8, 95-108.
- Mira L., Silva M., Manso C.F. (1994) Scavenging of reactive oxygen species by silibinin dihemisuccinate. *Biochem Pharmacol* 48, 753-759.
- Mittenhuber G. (2001) Phylogenetic analyses and comparative genomics of vitamin B6 (pyridoxine) and pyridoxal phosphate biosynthesis pathways. *J Mol Microbiol Biotechnol* 3, 1-20.
- Mizutani Y., Matzumura Y., Imamura K., Nakanishi K., Mori T. (2003) Effects of water activity and lipid addition on secondary structure of zein in powder systems. *J Agric Food Chem* 51, 229-235.
- Mohile S.S., Potdar M.K., Harjani J.R., Nara S.J., Salunkhe M.M. (2004) Ionic liquids: Efficient additives for candida rugosa lipase-catalysed enantioselective hydrolysis of butyl 2-(4-chlorophenoxy)propionate. *J Mol Catal B: Enzym* 30(5-6), 185-188.
- Moini H., Packer L., Saris N.E. (2002) Antioxidant and prooxidant activities of alpha-lipoic acid and dihydrolipoic acid. *Toxicol Appl Pharmacol* 182(1), 84-90.
- Monsellier E. & Bedouelle H. (2005) Quantitative measurement of protein stability from unfolding equilibria monitored with the fluorescence maximum wavelength. *Protein Eng Des Selection* 18, 445-456.
- Mooney S., Leuendorf J.E., Hendrickson C., Hellmann H. (2009) Vitamin B6: A long known compound of surprising complexity. *Molecules* 14, 329-351.
- Morazzoni P. & Bombardelli E. (1995) *Silybum marianum* (Carduus marianus). *Fitoterapia* 66, 3-42.
- Moreau R., Zhang W.J., Hagen T.M. (2002) Cellular effects of lipoic acid and its role in aging in *Handbook of antioxidants*, Enrique Cadenas & Lester Packer (Eds), Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 491.
- Morel I., Cillard P., Cillard J. (1998) Flavonoid-metal interactions in biological systems in *Flavonoids in health and disease*, Rice-Evans C. and Packer L. (Eds), Marcel Dekker Inc, New York, pp. 163-178.
- Moroney M.A., Alcaraz M.J., Forder R.A. (1988) Selectivity of neutrophil 5-lipoxygenase and cycle-oxygenase inhibition by an anti-inflammatory flavonoid glycoside and related aglycone flavonoids. *J Pharm Pharmacol* 40, 787-92.
- Morrissey S., Pegot B., Coleman D., Garcia M.T., Ferguson D., Quilty B., Gathergood N. (2009) Biodegradable, non-bactericidal oxygen-functionalised imidazolium esters: A step towards 'greener' ionic liquids. *Green Chem* 11, 475-483.
- Moskovitz J., Yim M.B., Chock P.B. (2002) Free radicals and disease. *Arch Biochem Biophys* 397, 354-359.
- Muldoon M.J., Gordon C.M., Dunkin I.R. (2001) Investigations of solvent-solute interactions in room temperature ionic liquids using solvatochromic dyes. *J Chem Soc Perkin Trans 2*, 433-435.
- Murakami Y., Yoshida T., Hayashi S. (2000) Continuous enzymatic production of peptide precursor in aqueous/organic biphasic medium. *Biotechnol Bioeng* 69, 57-65.
- Myers R.H. & Montgomery D.C. (1995) Response surface methodology: Process and product optimization using designed experiments, John Wiley & Sons Inc, New York.
- Myhrstad M.C.W. (2002) Flavonoids increase the intracellular glutathione level by transactivation of the glutamylcysteine synthetase catalytical subunit promoter. *Free Rad Biol Med* 32, 386.
- Naithani R., Huma L.C., Holland L.E., Shukla D., McCormick D.L., Mehta R.G., Moriarty R.M. (2008) Antiviral activity of phytochemicals: a comprehensive review. *Mini Rev Med Chem* 8(11), 1106-33.
- Nakagawa Y., Hasegawa A., Hiratake J. (2007) Engineering of *Pseudomonas aeruginosa* lipase by directed evolution for enhanced amidase activity: mechanistic implication for amide hydrolysis by serine hydrolases. *Protein Eng Des Sel* 20(7), 339-346.
- Nakajima N., Ishihara K., Hamada H., Kawabe S.I., Furuya T. (2000) Regioselective acylation of flavonoid glycoside with aromatic acid by an enzymatic reaction system from cultured cells of *Ipomoea batatas*. *J Biosci Bioeng* 90(3), 347-349.
- Nakajima N., Ishihara K., Itoh T., Furuya T., Hamada H. (1999) Lipase-catalyzed direct and regioselective acylation of flavonoid glucoside for mechanistic investigation of stable plant pigments. *J Biosci Bioeng* 87(1), 105-107.
- Nakamura M.T. & Nara T.Y. (2004) Structure, function, and dietary regulation of delta-6, delta-5, and delta-9 desaturases. *Annu Rev Nutr* 24, 345-376.
- Nakasako M. (2004) Water-protein interactions from high-resolution protein crystallography. *Philos T Roy Soc B* 359(1448), 1191-1204.
- Nara S. J., 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, 1371-1373.
- Nara S.J., Harjani J.R., Salunkhe M.M., (2002) Lipase-catalysed transesterification in ionic liquids and organic solvents: a comparative study. *Tetrahedron Lett* 43, 2979-2982.
- Nara S.J., Mohile S.S., Harjani J.R., Naik P.U., Salunkhe M.M. (2004) Influence of ionic liquids on the rates and regioselectivity of lipase-mediated biotransformations on 3,4,6-tri-O-acetyl-glucal. *J Mol Catal B: Enzym* 268, 39-43.

- Narayan S. & Klibanov A.M. (1993) Are Water-immiscibility and apolarity of the solvent relevant to enzyme efficiency? *Biotechnol Bioeng* 41, 390-393.
- Natella F., Nardidi M., Di Felice M., Scaccini C. (1999) Benzoic and cinnamic acid derivatives as antioxidants: structure-activity relation. *J Agric Food Chem* 47, 1453-1459.
- Navab M., Fogelman A.M., Berliner J.A., Territo M.C., Demer L.L., Frank J.S., Watson A.D., Edwards P.A., Lusis A.J. (1995) Pathogenesis of atherosclerosis. *Am J Cardiol* 76, 18C-23C.
- Nenadis N., Zhang H.Y., Tsimidou M.Z. (2003) Structure-antioxidant activity relationship of ferulic acid derivatives: effect of carbon side chain characteristic groups. *J Agric Food Chem* 51, 1874-1879.
- Newman D.J., Cragg G.M., Snader K.M. (2003) Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. *J Nat Prod* 66, 1022-1037.
- Ni B., Headley A.D., Li G. (2005) Design and synthesis of C-2 substituted chiral imidazolium ionic liquids from amino acid derivatives. *J Org Chem* 70, 10600-10602.
- Nicolaides D.N., Gautam D.R., Litinas K.E., Hadjipavlou-Litina D.J., Fylaktakidou K.C. (2004) Synthesis and evaluation of the antioxidant and anti-inflammatory activities of some benzo[k]hellactone derivatives and analogues. *Eur J Medic Chem* 39, 323-332.
- Nicolosi G., Spatafora C., Tringali C. (2002) Chemo-enzymatic preparation of resveratrol derivatives. *J Mol Catal B: Enzym* 16, 223-229.
- Nihei K.I., Nihei A., Kubo I. (2004) Molecular design of multifunctional food additives: antioxidative antifungal agents. *J Agric Food Chem* 52, 5011-2020.
- Nijveldt R.J., van Hoorn D.E.C., Boelens P.G., van Norren K., van Leeuwen P.A.M. (2001) Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am J Clin. Nutr* 74, 418-425.
- Niki E., Tsuchiya J., Tanimura R., Kamiya Y. (1982) Regeneration of vitamin E from alphachromanoxyl radical by glutathione and vitamin C. *Chem Lett* 789.
- Nikolaev V., Reddanna P., Whelan J., Hildenbrandt G., Reddy C.C. (1990) Stereochemical nature of the products of linoleic acid oxidation catalyzed by lipoxygenases from potato and soybean. *Biochem Biophys Res Commun* 170, 491-496.
- Nishikimi M., Fukuyama R., Minoshima S., Shimizu N., Yagi K. (1994) Cloning and chromosomal mapping of the human nonfunctional gene for l-gulonolactone oxidase, the enzyme for l-ascorbic acid biosynthesis missing in man. *J Biol Chem* 269, 13685-13688.
- Nobuoka K., Kitaoka S., Kunimitsu K., Iio M., Haran T., Wakisaka A., Ishikawa Y. (2005) Camphor ionic liquid: Correlation between stereoselectivity and cation-anion interaction. *J Org Chem* 70, 10106-10108.
- Noel M. & Combes D. (2003) Effects of temperature and pressure on rhizomucor miehei lipase stability. *J Biotechnol* 102(1), 23-32.
- Nones K., Dommels Y.E.M., Martell S., Butts C., McNabb W.C., Park Z.A., Zhu S., Roy N.C. (2009) The effects of dietary curcumin and rutin on colonic inflammation and gene expression in multidrug resistance gene-deficient (mdr1a-/-) mice, a model of inflammatory bowel diseases. *British J Nutr* 101(2), 169-181.
- 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.
- Oehlke A., Hofmann K., Spange S. (2006) New aspects on polarity of 1-alkyl-3-methylimidazolium salts as measured by solvatochromic probes. *New J Chem* 30(4), 533-536.
- Ohno H. & Fukumoto K. (2007) Amino acid ionic liquids. *Acc Chem Res* 40, 1122-1129.
- Ohta T., Nakano T., Egashira Y., Sanada H. (1997) Antioxidant activity of ferulic acid beta-glucuronide in the LDL oxidation system. *Biosci Biotechnol Biochem* 61, 1942-3.
- Oka T., Komori N., Kuwahata M. (1995) Pyridoxal 5'-phosphate modulates expression of cytosolic aspartate aminotransferase gene by inactivation of glucocorticoid receptor. *J Nutr Sci Vitaminol* 41, 363-375.
- Oka T., Kuwahata M., Sugitatsu H., Tsuge H., Asagi K., Kohri H., Horiuchi S., Natori Y. (1997) Modulation of albumin gene expression by amino acid supply in rat liver is mediated through intracellular concentration of pyridoxal 5'-phosphate. *J Nutr Biochem* 8, 211-216.
- Okamoto K., Eger B.T., Nishino T., Kondo S., Pai E.F., Nishino T. (2003) An extremely potent inhibitor of xanthine oxidoreductase: Crystal structure of the enzyme-inhibitor complex and mechanism of inhibition. *J Biol Chem* 278(3), 1848-1855.
- Okochi M., Nakagawa I., Kobayashi T., Hayashi S., Furusaki S., Honda H. (2007) Enhanced activity of 3-hydroxysteroid dehydrogenase by addition of the co-solvent 1-butyl-3-methylimidazolium (1)-lactate in aqueous phase of biphasic systems for reductive production of steroids. *J Biotechnol* 128, 376-382.
- Okrasa K., Guibe-Jampel E., Therisod M. (2003) Ionic liquids as a new reaction medium for oxidase-peroxidase-catalyzed sulfoxidation. *Tetrahedron: Asym* 14, 2487.
- Oladejo D.K., Halling P.J., Larsen V.F. (1995) Effect of different supports on the reaction rate of *Rhizomucor miehei* lipase in organic media. *Biocatal Biotransform* 12, 47-54.
- Olempska-Beer Z.S., Merker R.I., Ditto M.D. (2006) Food processing enzymes from recombinant microorganisms-a review. *Reg Toxicol Pharmacol* 45, 144-58.
- Oliveira A.C., Rosa M.F., Aires-Barros M.R., Cabral J.M.S. (2001) Enzymatic esterification of ethanol and oleic acid - a kinetic study. *J Mol Catal B: Enzym* 11, 999-1005.
- Ollis D.L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolow F., Franken S.M., Harel M., Remington S.J., Silman I., Schrag J. (1992) The alpha:beta hydrolase fold. *Protein Eng* 5, 197-211.
- Osmani A.H., May G.S., Osmani S.A. (1999) The extremely conserved pyroA gene of *Aspergillus nidulans* is required for pyridoxine synthesis and is required indirectly for resistance to photosensitizers. *J Biol Chem* 274, 23565-23569.

- Otto R.T., Bornscheuer U.T., Scheib H., Pleiss J., Syltatk C., Schmidt R.D. (1998) Lipase-catalyzed esterification of unusual substrates: synthesis of glucuronic acid and ascorbic acid (Vitamin C) esters. *Biotechnol Lett* 20, 1091–4.
- Otto R.T., Scheib H., Bornscheuer U.T., Pleiss J., Syltatk C., Schmid R.D. (2000) Substrate specificity of lipase B from *Candida antarctica* in the synthesis of arylaliphatic glycolipids. *J Mol Catal B: Enzym* 8, 201–211.
- Overbeeke P.L.A., Govardhan C., Khalaf N., Jongejan J.A., Heijnen J.J. (2000) Influence of lid conformation on lipase enantioselectivity. *J Mol Catal B Enzymatic* 10, 385–393.
- Oves D., Gotor-Fernández V., Fernández S., Ferrero M. Gotor V. (2004) Regioselective enzymatic syntheses of C-3 and C-5 carbonate A-ring stereoisomeric precursors of vitamin D. *Tetrahedron: Asymm* 15, 2881–2887.
- Özyürek M., Bektaşoğlu B., Güçlü K., Apak R. (2009) Measurement of xanthine oxidase inhibition activity of phenolics and flavonoids with a modified cupric reducing antioxidant capacity (CUPRAC) method. *Anal Chim Acta* 636, 42–50.
- Pacher P., Beckman J.S., Liaudet L. (2007) Nitric oxide and peroxynitrite in health and disease. *Physiol Rev* 87, 315–424.
- Packer J.E., Slater T.F., Wilson R.L. (1979) Direct observation of a free radical interaction between vitamin E and vitamin C. *Nature* 278, 737.
- Packer L., Witt E.h., Tritschler H.J. (1995) Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Rad Biol Med* 19, 227–250.
- 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.
- Pan J.S., Hong M.Z., Ren J.L. (2009) Reactive oxygen species: a double-edged sword in oncogenesis. *World J Gastroenterol* 15(14), 1702–7.
- Pan M.H., Lin-Shiau S.Y., Lin J.K. (2000) Comparative studies on the suppression of nitric oxide synthase by curcumin and its hydrogenated metabolites through down-regulation of IkappaB kinase and NfkappaB activation in macrophages. *Biochem Pharmacol* 60, 1665–1676.
- Pandey S., Fletcher K.A., Baker S.N., Baker G.A. (2004) Correlation between the fluorescent response of microfluidity probes and the water content and viscosity of ionic liquid and water mixtures. *Analyst* 129(7), 569–573.
- Park S. & Kazlauskas R.J. (2001) Improved preparation and use of room-temperature ionic liquids in lipase-catalyzed enantio- and regioselective acylations. *J Org Chem* 66, 8395–8401.
- Park S. & Kazlauskas R.J. (2003) Biocatalysis in ionic liquids – advantages beyond green technology. *Curr Opin Biotechnol* 14, 432–437.
- Park S., Viklund F., Hult K., Kazlauskas R.J. (2003) Vacuum-driven lipase-catalysed direct condensation of L-ascorbic acid and fatty acids in ionic liquids: synthesis of a natural surface active antioxidant. *Green Chem* 5, 715–719.
- Pascual E. (2000) Gout update: From lab to the clinic and back. *Curr Opin Rheumatol* 12, 213–218.
- Passicos E., Santarelli X., Coulon D. (2004) Regioselective acylation of flavonoids catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase under reduced pressure. *Biotechnol Lett* 26, 1073–1076.
- Patel R.N. (Ed) (2007) Biocatalysis in pharmaceutical and biotechnology industries. CRC Press Taylor & Francis Group.
- Patti A., Piattelli M., Nicolosi G. (2000) Use of *Mucor miehei* lipase in the preparation of long chain 3-O-acylcatechins. *J Mol Catal B: Enzym* 10, 577–582.
- Pedersen N.R., Wimmer R., Emmersen J., Degn P., Pedersen L.H. (2002) Effect of fatty acid chain length on initial reaction rates and regioselectivity of lipase-catalysed esterification of disaccharides. *Carbohydrate Res* 337(13), 1179–1184.
- Peinado J., Sies H., Akerboom T.P.M. (1989) Hepatic lipoate uptake. *Arch Biochem Biophys* 273, 389–395.
- Pepping J. (1999) Milk thistle: *Silybum marianum*. *Am J Health-Syst Pharm* 56, 1195–1197.
- Pernak J. & Feder-Kubis J. (2005) Synthesis and properties of chiral ammonium-based ionic liquids. *Chem Eur J* 11, 4441–4449.
- Pernak J., Goc I., Mirska I. (2004) Anti-microbial activities of protic ionic liquids with lactate anion. *Green Chem* 6, 323–329.
- Pernak J., Sobaszekiewicz K., Mirska I. (2003) Anti-microbial activities of ionic liquids. *Green Chem* 5, 52–56.
- Pernak J., Stefaniak F., Weglewski J. (2005) Phosphonium acesulfamate based ionic liquids. *Eur J Org Chem* 650–652.
- 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.
- Pessela B.C.C., Betancor L., Lopez-Gallego F. (2005) Increasing the binding strength of proteins to PEI coated supports by immobilizing at high ionic strength. *Enzyme Microb Technol* 37, 295–299.
- Petersen M.T.N., Fojan P., Petersen S.B. (2001) How do lipases and esterases work: the electrostatic contribution. *J Biotechnol* 85, 115–147.
- Peterson J. & Dwyer J. (1998) Flavonoids: dietary occurrence and biochemical activity. *Nutr Res* 18, 1995–2018.
- Petersson A.E.V., Adlercreutz P., Mattiasson B. (2007) A water activity system for enzymatic reactions in organic media. *Biotechnol Bioeng* 97, 235–41.
- Petkar M, Lali M, Caimi P. (2006) Immobilization of lipases for non-aqueous synthesis. *J Mol Catal B: Enzymatic* 39, 83–90.
- Petry I., Ganesan A., Pitt A., Moore B.D., Halling P.J. (2006) Proteomic methods applied to the analysis of immobilized biocatalysts. *Biotechnol Bioeng* 95, 984–991.
- Pfruender H., Amidjojo M., Kragl U., Weuster-Botz D. (2004) Efficient whole-cell biotransformation in a biphasic ionic liquid/water system. *Angew Chem Int Ed* 43, 4529–4531.
- Pfruender H., Jones R., Weuster-Botz D. (2006) Water immiscible ionic liquids as solvents for whole cell biocatalysis. *J Biotechnol* 124, 182–190.

- Pham-Huy L.A., He H., Pham-Huy C. (2008) Free radicals, antioxidants in disease and health. *Int J Biomed Sci* 4.
- Pietta P.G. (2000) Flavonoids as antioxidants. *J Nat Prod* 63, 1035-1042.
- Pirozzi D. & Greco Jr. G. (2004) Activity and stability of lipases in the synthesis of butyl lactate. *Enzyme Microb Technol* 34(2), 94-100.
- Pizarro C., Fernandez-Torroba M.A., Benito C. (1997) Optimization by experimental design of polyacrylamide gel composition as support for enzyme immobilization by entrapment. *Biotechnol Bioeng* 53(5), 497-506.
- Pleiss J., Fischer M., Schmid R.D. (1998) Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chem Phys Lipids* 93, 67-80.
- Podda M., Han D., Koh B., Fuchs J., Packer L. (1994) Conversion of lipoic acid to dihydrolipoic acid in human keratinocytes. *Clin Res* 42, 41A.
- Poletti L., Chiappe C., Lay L., Pieraccini D., Polito L., Russo G. (2007) Glucose-derived ionic liquids: exploring low-cost sources for novel chiral solvents. *Green Chem* 9, 337-341.
- Pollard D.J. & Woodley J.M. (2006) Biocatalysis for pharmaceutical intermediates: the future is now. *TRENDS Biotechnol* 25, 66-73.
- Pratt D.E. & Hudson B.J.F. (1990) Natural antioxidants not exploited commercially in *Food antioxidants*, Hudson B.J.F. (ed), Elsevier, London, p. 171.
- Prestrelski S.J., Arakawa T., Carpenter J.F. (1993b) Separation of freezing- and drying-induced denaturation of lyophilized proteins using stress-specific stabilization: II. Structural studies using infrared spectroscopy. *Arch Biochem Biophys* 303, 465-473.
- Prestrelski S.J., Tedeschi N., Arakawa T., Carpenter J.F. (1993a) Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophys J* 65, 661-671.
- Pretti C., Chiappe C., Pieraccini D., Gregori M., Abramo F., Monnia G., Intorre L. (2006) Acute toxicity of ionic liquids to the zebrafish (*Danio rerio*). *Green Chem* 8, 238-240.
- Priya K. & Chadha A. (2003) Synthesis of hydrocinnamic esters by *Pseudomonas cepacia* lipase. *Enzyme Microb Technol* 32, 485-490.
- Quiroga E., Cami G., Marchese J., Barberis S. (2007) Organic solvents effect on the secondary structure of *araujiain hI*, in different media. *Biochem Eng J* 35, 198-202.
- Ranke J., Mölter K., Stock F., Bottin-Weber U., Poczobutt J., Hoffmann J., Ondruschka B., Filser J., Jastorff B. (2004) Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays. *Ecotoxicol Environmental Safety* 58, 396-404.
- Rasalkar M., Potdar M.K., Salunke M.M. (2004) *Pseudomonas cepacia* lipase-catalysed resolution of racemic alcohols in ionic liquid using succinic anhydride: Role of triethylamine in enhancement of catalytic activity. *J Mol Catal B: Enzym* 27(4-6), 267-270.
- Reed L.J., DeBusk B.G., Gunsalus I.C., Hornberger Jr.C.S. (1951) Crystalline α -lipoic acid: a catalytic agent associated with pyruvate dehydrogenase. *Science* 114, 93-94.
- Reetz M.T. (2002) Lipases as practical biocatalysts. *Curr Opin Chem Biol* 6, 145-150.
- Reetz M.T., Wiesenhofer W., Francio G., Leitner W. (2002) Biocatalysis in ionic liquids: batchwise and continuous flow processes using supercritical carbon dioxide as the mobile phase. *Chem Commun* 1, 992-993.
- Réjasse B., Lamare S., Legoy M.D., BessonEn T. (2004) Stability improvement of immobilized *Candida antarctica* lipase B in an organic medium under microwave radiation. *Org Biomol Chem* 2, 1086-1089.
- Réjasse B., BessonEn T., Legoy M.D., Lamare S. (2006) Influence of microwave radiation on free *Candida antarctica* lipase B activity and stability. *Org Biomol Chem* 4, 3703-3707.
- Ren J., Meng S., Lekka C.E., Kaxiras E. (2008) Complexation of flavonoids with iron: Structure and optical signatures. *J Phys Chem B* 112(6), 1845-1850.
- Ren W., Qiao Z., Wang H., Zhu L., Zhang L. (2003) Flavonoids: Promising anticancer agents. *Med Res Rev* 23(4), 519-534.
- Ribeiro I.A., Rocha J., Sepodes B., Mota-Filipe H., Ribeiro M.H. (2008) Effect of naringin enzymatic hydrolysis towards naringenin on the anti-inflammatory activity of both compounds. *J Mol Catal B: Enzym* 52-53, 13-18.
- Rice-Evans C. & Packer L. (Eds) (1998) in *Flavonoids in health and disease*, Marcel Dekker Inc, New York.
- Rice-Evans C., Miller N.J., Paganga G. (1996) Structure- antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radic Biol Med* 20, 933-956.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G. (1997) Antioxidant properties of phenolic compounds. *Trends Plant Sci* 2, 152-159.
- Riva S. & Roda G. (2000) Sugar transformations using enzymes in non-aqueous media in *Methods in Non-aqueous Enzymology*, Gupta M.N. (Ed), Basel: Birkäuser Verlag, pp. 146-159.
- Riva S. (2001) Biocatalytic modification of natural products. *Curr Opin Chem Biol* 5, 106-111.
- Riva S., Danieli B., Luisetti M. (1996) A two-step efficient chemoenzymatic synthesis of flavonoid glycoside malonates. *J Nat Prod* 59(6), 618-621.
- Robak J. & Gryglewski R.J. (1988) Flavonoids are scavengers of superoxide anions. *Biochem Pharmacol* 37, 837-841.
- Rodger A. & Norden B. (1996) Circular and linear dichroism. *OUP* 15-32.
- Rogers D.M. & Hirst J.D. (2004) Calculations of protein circular dichroism from first principles. *Chirality* 16, 234-243.
- Roller S. (1995) The quest for natural antimicrobials as novel means of food preservation: status report on a european research project. *Inter Biodeterior Biodegrad* 333-345.
- Romieu I., Castro-Giner F., Kunzli N., Sunyer J. (2008) Air pollution, oxidative stress and dietary supplementation: a review. *Eur Respir J* 31(1), 179-97.

- Roosen C., Müller P., Greiner L. (2008) Ionic liquids in biotechnology: applications and perspectives for biotransformations. *Appl Microbiol Biotechnol* 81, 607–614.
- Rosenberg H.R. & Culik R. (1959) Effect of α -lipoic acid on vitamin C and vitamin E deficiencies. *Arch Biochem Biophys* 80, 86–93.
- Rotticci D., Rotticci-Mulder J.C., Denman S., Norin T., Hult K. (2001) Improved enantioselectivity of a lipase by rational protein engineering. *Chem BioChem* 2, 766–770.
- Roy J.J. & Abraham T.E. (2004) Strategies in making cross-linked enzyme crystals. *Chem Rev* 104(9), 3705–3721.
- Roy S. & Packer L. (1998) Redox regulation of cell functions by α -lipoate: biochemical and molecular aspects. *Biofactors* 8(1-2), 17–21.
- Royer C.A., Mann C.J., Matthews C.R. (1993) Resolution of the fluorescence equilibrium unfolding profile of trp aporepressor using single tryptophan mutants. *Protein Sci* 2(11), 1844–1852.
- Rucker R.B., Suttie J.W., McCormick D.B., Machlin J.L. (2001) in *Handbook of vitamins* 3rd edition, Marcel Dekker Inc, New York.
- Ruh M.F., Zacharewski T., Connor K., Howell J., Chen I., Safe S. (1995) Naringenin: a weakly estrogenic bioflavonoid that exhibits antiestrogenic activity. *Biochem Pharmacol* 50, 1485–93.
- Russell A.J., Beckman E.J., Chaudhary A.K. (1994) Studying enzyme activity in supercritical fluids. *Chemtech* 24(3), 33–37.
- Russo A., Acquaviva R., Campisi A., Sorrenti V., Di Giacomo C., Virgata G., Barcellona M.L., Vanella A. (2000) Bioflavonoids as antiradicals, antioxidants and DNA cleavage protectors. *Cell Biol Toxicol* 16(2), 91–98.
- Russo G.L. (2007) Ins and outs of dietary phytochemicals in cancer chemoprevention. *Biochem Pharmacol* 74, 533–544.
- Sabally K., Karboune S., Yebaoh F.K., Kermasha S. (2005) Enzymatic esterification of dihydrocaffeic acid with linoleyl alcohol in organic solvent media. *Biocatal Biotrans* 23(1), 37–44.
- Sabbani S., Hedenström E., Nordin O. (2006) The enantioselectivity of candida rugosa lipase is influenced by the particle size of the immobilising support material accurel. *J Mol Catal B: Enzym* 42(1-2), 1–9.
- Sakaki K., Aoyama A., Nakane T., Ikegami T., Negishi H., Watanabe K. (2006) Enzymatic synthesis of sugar esters in organic solvent coupled with pervaporation. *Desalination* 193, 260–6.
- Salameh M. & Wiegel J. (2007) Lipases from extremophiles and potential for industrial applications. *Adv Appl Microbiol* 61, 253–83.
- Salis A., Svensson I., Monduzzi M., Solinas V., Adlercreutz P. (2003) The atypical lipase B from *Candida antarctica* is better adapted for organic media than the typical lipase from *Thermomyces lanuginosa*. *Biochim Biophys Acta - Proteins Proteomics* 1646(1-2), 145–151.
- Sangeetha K., Morris V.B., Abraham T.E. (2008) Stability and catalytic properties of encapsulated subtilisin in xerogels of alkoxisilanes. *Appl Catal A: Gen* 341(1-2), 168–173.
- Sanhuesa J., Valdes J., Campos R., Garrido A., Valenzuela A. (1992) Changes in the xanthine dehydrogenase/xanthine oxidase ratio in the rat kidney subjected to ischemia–reperfusion stress: preventive effect of some flavonoids. *Res Commun Chem Pathol Pharmacol* 78, 211.
- Santoro M.M. & Bolen D.W. (1988) Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. unfolding of phenylmethanesulfonyl α -chymotrypsin using different denaturants. *Biochem* 27(21), 8063–8068.
- Sate D., Janssen M.H.A., Stephens G., Sheldon R.A., Seddon K.R., Lu J.R. (2007) Enzyme aggregation in ionic liquids studied by dynamic light scattering and small angle neutron scattering. *Green Chem* 9, 859–867.
- Saxena R.K., Sheoran A., Giri B. (2003) Purification strategies for microbial lipases. *J Microbiol Methods* 52, 1–18.
- Schilstra M.J., Veldink G.A., Verhagen J., Vliegthart J.F.G. (1992) Effect of lipid hydroperoxide on lipoxigenase kinetics. *Biochem* 31, 7692–7699.
- Schmid R.D. & Verger R. (1998). Lipases: interfacial enzymes with attractive applications. *Angew Chem* 37, 1608–1633.
- Schmidt-Danner C. (1999) Recombinant microbial lipases for biotechnological applications. *Bioorg Medicinal Chem* 7, 2123–2130.
- Schoemaker H.E., Mink D., Wubbolts M.G. (2003) Dispelling the Myths—Biocatalysis in Industrial Synthesis. *Science* 299, 1694–1697.
- Schöfer S.H., Kaftzik N., Wasserscheid P., Kragl U. (2001) Enzyme catalysis in ionic liquids: lipase catalysed kinetic resolution of 1-phenylethanol with improved enantioselectivity. *Chem Commun* 1, 425–426.
- Schrag J.D., Li Y., Cygler M., Lang D., Burgdorf T., Hecht H.J., Schmid R., Schomburg D., Rydel T.J., Oliver J.D., Strickland L.C., Dunaway C.M., Larson S.B., Day J., McPherson A. (1997) The open conformation of a Pseudomonas lipase. *Structure* 5, 187–202.
- Schuler P. (1990) Natural antioxidants exploited commercially in *Food Antioxidants*, Hudson, B.J.F. (Ed.), Elsevier Science Publishers, pp. 113–127.
- Secundo F., Barletta G.L., Dumitriu E., Carrea G. (2007) Can an inactivating agent increase enzyme activity in organic solvent? Effects of 18-crown-6 on lipase activity, enantioselectivity, and conformation. *Biotechnol Bioeng* 97(1), 12–18.
- Seddon K.R. (1997) Ionic liquids for clean technology. *J Chem Tech Biotechnol* 68, 351–356.
- Seddon K.R., Stark A., Torres M.-J. (2000) Influence of chloride, water, and organic solvents on the physical properties of ionic liquids. *Pure Appl Chem* 72(12), 2275–2287.
- Selloum L., Reichl S., Müller M., Sebihi L., Arnhold J. (2001) Effects of flavonols on the generation of superoxide anion radicals by xanthine oxidase and stimulated neutrophils. *Arch Biochem Biophys* 395(1), 49–56.
- Sen C.K. (2000) Cellular thiols and redox-regulated signal transduction. *Curr Top Cell Regul* 36, 1–30.

- Seo E.S., Lee J.H., Park J.Y., Kim D., Han H.J., Robyt J.F. (2005) Enzymatic synthesis and anti-coagulant effect of salicin analogs by using the *leuconostoc mesenteroides* glucansucrase acceptor reaction. *J Biotechnol* 117(1), 31-38.
- Serpen A. & Gökmen V. (2007) Effects of β -carotene on soybean lipoxygenase activity: Kinetic studies. *Europ Food Res Technol* 224(6), 743-748.
- Shah S., Gupta M.N. (2007a) Kinetic resolution of ($\pm$)-1-phenylethanol in [Bmim][PF₆] using high activity preparations of lipases. *Bioorg Med Chem Lett* 17(4), 921-924.
- Shah S., Gupta M.N. (2007b) Obtaining high transesterification activity for subtilisin in ionic liquids. *BBA-Gen Subj* 1770(1), 94-98.
- Shahidi F. & Wanasundara P.D. (1992) Phenolic antioxidants. *Crit Rev Food Sci* 32, 67-103.
- Shan H., Li Z., Li M., Ren G., Fang Y. (2008) Improved activity and stability of *Pseudomonas capaci* lipase in a novel biocompatible ionic liquid, 1 isobutyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate. *J Chem Technol Biotechnol* 83(6), 886-891.
- Sharma N.K., Tickell M.D., Anderson J.L., Kaar J., Pino V., Wicker B.F., Armstrong D.W., Davis J.H., Russell A.J. (2006) Do ion tethered functional groups affect IL solvent properties? The case of sulfoxides and sulfones. *Chem Commun* 646-648.
- Sheldon R.A. (1994) Consider the environmental quotient. *ChemTech* 38-47.
- Sheldon R.A. (2007) Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis Catal* 349, 1289-1307.
- Sheldon R.A., Madeira Lau R., Sorgedraeger M.J., Van Rantwijk F., Seddon K.R. (2002) Biocatalysis in ionic liquids. *Green Chem* 4, 147-151.
- Sheldon R.A., Sorgedraeger M., Janssen M.H.A. (2007) Use of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) for performing biotransformations. *Chem Today* 25(1), 62-67.
- Short P.L. (2005) Reflecting on a life in chemicals. *Chem Eng News* 83(21), 27-28.
- Siekmeier R., Steffen C., März W. (2007) Role of oxidants and antioxidants in atherosclerosis: results of in vitro and in vivo investigations. *J Cardiovasc Pharmacol Therap* 12, 265-282.
- Sies H. (1993) Strategies of antioxidant defence. *Eur J Biochem* 215, 213-219.
- Sigal E., Laughton C.W., Mulkins M.A. (1994) Oxidation, lipoxygenase, and atherogenesis. *Ann NY Acad Sci* 714, 211-224.
- Silva F.A.M., Borges F., Guimaraes C., Lima J.L.F.C., Matos C., Reis S. (2000) Phenolic acids and derivatives: studies on the relationship among structure, radical scavenging activity, and physicochemical parameters. *J Agric Food Chem* 48, 2122-2126.
- Simon L.M., Kotorman M., Garab G., Laczko I. (2001) Structure and activity of α -chymotrypsin and trypsin in aqueous organic media. *Biochem Biophys Res Commun* 280, 1367-1371.
- Singh M., Singh R.S., Banerjee U.C. (2009) Stereoselective synthesis of (R)-1-chloro-3(3,4-difluorophenoxy)-2-propanol using lipases from *Pseudomonas aeruginosa* in ionic liquid-containing system. *J Mol Catal B: Enzym* 56(4), 294-299.
- Singh R.P. & Agarwal R. (2003) Tumor angiogenesis: a potential target in cancer control by phytochemicals. *Curr Cancer Drug Targets* 3, 205-217.
- Singh R.P., Deep G., Chittezhath M., Kaur M., Dwyer-Nield L.D., Malkinson A.M., Agarwal R. (2006) Effect of silibinin on the growth and progression of primary lung tumors in mice. *J Natl Cancer Inst* 98, 846-855.
- Siri P.W., Verhoef P., Kok F.J. (1998) Vitamins B6, B12, and folate: association with plasma total homocysteine and risk of coronary atherosclerosis. *J Am Col Nutr* 17, 435-441.
- Składanowski A.C., Stepnowski P., Kleszczynski K., Dmochowska B. (2005) AMP deaminase in vitro inhibition by xenobiotics. A potential molecular method for risk assessment of synthetic nitro- and polycyclic musks, imidazolium ionic liquids and *N*-glucopyranosyl ammonium salts. *Environ Toxicol Pharmacol* 19, 291-296.
- Smirnoff N. (2000) Ascorbic acid: metabolism and functions of a multi-faceted molecule. *Curr Opin Plant Biol* 3, 229-235.
- Smith A.R., Shenvi S.V., Widlansky M., Suh J.H., Hagen T.M. (2004) Lipoic acid as a potential therapy for chronic diseases associated with oxidative stress. *Curr Med Chem* 11(9), 1135-46.
- Snell E.E., Guirard B.M., Williams R.J. (1942) Occurrence in natural products of a physiologically active metabolite of pyridoxine. *J Biol Chem* 143, 519-530.
- Soares C.M., Teixeira V.H., Baptista A.M. (2003) Protein structure and dynamics in nonaqueous solvents: Insights from molecular dynamics simulation studies. *Biophys J* 84(3), 1628-1641.
- Song Q.X. & Wei D.Z. (2002) Study of vitamin-C ester synthesis by immobilized lipase from *Candida sp.* *J Mol Catal B: Enzym* 18, 261-266.
- Song Q.X., Wei D.Z., Zhou W.Y., Xu W.Q., Yang S.L. (2004) Enzymatic synthesis and antioxidant properties of L-ascorbyl oleate and L-ascorbyl linoleate. *Biotechnol Lett* 26, 1777-1780.
- Soo E.L., Salleh A.B., Basri M., Rahman R.N.Z.A., Kamaruddin K. (2004) Response surface methodological study on lipase-catalyzed synthesis of amino acid surfactants. *Proc Biochem* 39, 1511-1518.
- Soobrattee M.A., Neergheen V.S., Luximon-Ramma A., Aruoma O.I., Bahorun T. (2005) Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: Mechanism and actions. *Mut Res* 579(1-2), 200-213.
- Southorn P.A. (1988) Free radicals in medicine. II: Involvement in human disease. *Mayo Clin Proc* 63, 390-408.
- Sreerama N. & Woody R.W. (1993) A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Anal Biochem* 209, 32-44.

- Srinivasan M., Sudheer A.R., Menon V.P. (2007) Ferulic acid: Therapeutic potential through its antioxidant property. *J Clin Biochem Nutr* 40, 92-100.
- Srinivasulu S. & Rao A.G.A. (1993) Kinetic and structural studies on the interaction of surfactants with lipoxygenase II from soybeans (*Glycine max*). *J Agric Food Chem* 41, 366-371.
- Stadtman E.R. & Berlett B.S. (1997) Reactive oxygen-mediated protein oxidation in aging and disease. *Chem Res Toxicol* 10, 485-494.
- Stamatis H., Sereti V., Kolisis F.N. (1999a). Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants. *J Am Oil Chem Soc* 12, 1505-1510.
- Stamatis H., Sereti V., Kolisis F.N. (2001b) Lipase-catalyzed synthesis of sugar fatty acid esters in supercritical carbon dioxide in *Methods in Biotechnology, Vol. 15: Enzymes in Nonaqueous Solvents: Methods and Protocols*. E. N. Vulfson, P. J. Halling, and H. L. Holland (Eds) Humana Press Inc., pp. 517-522.
- Stamatis H., Sereti V., Kolisis F.N. (2001c). Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media. *J Mol Catal B: Enzym* 11, 323-328.
- Stamatis H., Xenakis A., Kolisis F.N. (1999b) Bioorganic reactions in microemulsions: The case of lipases. *Biotechnol Advances* 17(4-5), 293-318.
- Stamatis H., Xenakis A., Kolisis F.N. (2001a) Synthesis of esters catalyzed by lipases in water-in-oil microemulsions in *Methods in Biotechnology, Vol. 15: Enzymes in Nonaqueous Solvents: Methods and Protocols* E. N. Vulfson, P. J. Halling, and H. L. Holland (Eds) Humana Press Inc., pp. 331-338.
- Steinberg D. (1997) Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* 272, 20963-20966.
- Stemme S. & Hansson G.K. (1994) Immune mechanisms in atherogenesis. *Ann Med* 26, 141-146.
- Stepnowski P. & Storonik P. (2005) Lipophilicity and metabolic route prediction of imidazolium ionic liquids. *Environ Sci & Pollut Res* 12(4), 199 - 204.
- Stepnowski P. & Zaleska A. (2005) Comparison of different advanced oxidation processes for the degradation of room temperature ionic liquids. *J Photochem Photobiol A: Chem* 170(1), 45-50.
- Stevenson D.E., Parkar S.G., Zhang J., Stanley R.A., Jensen D.J., Cooney J.M. (2006) Combinatorial enzymic synthesis for functional testing of phenolic acid esters catalysed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435®). *Enzyme Microb Technol* 40, 1078-1086.
- Stock F., Hoffman J., Ranke J., Störmann R., Ondruschka B., Jastorff B. (2004) Effects of ionic liquids on the acetylcholinesterase—a structure–activity relationship consideration. *Green Chem* 6, 286-290.
- Stocker P., Lesgards J.F., Vidal N., Chalier F., Prost M. (2003) ESR study of a biological assay on whole blood: antioxidant efficiency of various vitamins. *Biochim Biophys Acta* 1621, 1-8.
- Sud'ina G.F., Mirzoeva O.K., Pushkareva M.A., Korshunova G.A., Sumbatyan N.V., Varfolomeev S.D. (1993) Caffeic acid phenethyl ester as a lipoxygenase inhibitor with antioxidant properties. *FEBS Lett* 329, 21-24.
- Summers C.A. & Flowers R.A. (2000) Protein renaturation by the liquid organic salt ethylammonium nitrate. *Protein Sci* 9, 2001-2008.
- Sureshkumar M. & Lee C.K. (2009) Biocatalytic reactions in hydrophobic ionic liquids. *J Mol Catal B: Enzymatic* 60, 1-12.
- Surewicz W.K. & Mantsch H.H. (1988) New insight into protein secondary structure from resolution-enhanced infrared spectra. *Biochim Biophys Acta* 952, 115-130.
- Surewicz W.K., Mantsch H.H., Chapman D. (1993) Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: A critical assessment. *Biochemistry* 32, 389-394.
- Sym E.A. (1936) Action of esterase in the presence of organic solvents. *Biochem J* 30(4), 609-617.
- Talla S.R., Halter R.C., Dwivedi C. (1996) Xanthine oxidase inhibitory activity of caffeic, chlorogenic and ferulic acids. *Biochem Arch* 12, 245-247.
- Tan P.H., Sandmaier B.M., Stayton, P.S. (1998) Contributions of a highly conserved V(H)/V(L) hydrogen bonding interaction to scFv folding stability and refolding efficiency. *Biophys J* 75(3), 1473-1482.
- Tan T., Xu J.H., Asano Y. (2009) Biocatalysis in biorefinery: A green and highly efficient way to convert renewables. *J Mol Catal B: Enzym* 56, 77.
- Tang L., Zhang H., Shehate M.M., Sun Y. (2000) A kinetic study of the synthesis of ascorbate fatty acid esters catalysed by immobilized lipase in organic media. *Biotechnol Appl Biochem* 32, 35-39.
- Tang W.L. & Zhao H. (2009) Industrial biotechnology: Tools and applications. *Biotechnol J* 4, 1725-1739.
- Tao G.H., He L., Liu W.S., Xu L., Xiong W., Wang T., Kou Y. (2006) Preparation, characterization and application of amino acid-based green ionic liquids. *Green Chem* 8, 639-646.
- Tao G.H., He L., Sun N., Kou Y. (2005) New generation ionic liquids: Cations derived from amino acids. *Chem Commun* 3562-3564.
- Tao J. & Xu J.H. (2009) Biocatalysis in development of green pharmaceutical processes. *Curr Opin Chem Biol* 13, 43-50.
- Teeter M.M. (1991) Water-protein interactions - Theory and experiment. *Annu Rev Biophys Bio* 20, 577-600.
- Teng R.W., Bui T.K.A., McManus D., Armstrong D., Mau S.L., Bacic A. (2005) Regioselective acylation of several polyhydroxylated natural compounds by *Candida antarctica* lipase B. *Biocatal Biotransform* 23(2), 109-116.
- Terreni M., Ubiali D., Pagani G. (2005) Penicillin G acylase catalyzed acylation of 7-ACA in aqueous two-phase systems using kinetically and thermodynamically controlled strategies: improved enzymatic synthesis of 7-[(1-hydroxy-1-phenyl)-sacetamido]-3-acetoxymethyl-3-cephem-4-carboxylic acid. *Enzyme Microb Technol* 36, 672-679.

- Tetko I.V. & Tanchuk V.Y. (2002) Application of associative neural networks for prediction of lipophilicity in ALOGPS 2.1 program. *J Chem Inf Comput Sci* 42, 1136-1145.
- Theodoratou E., Farrington S.M., Tenesa A., McNeill G., Cetnarskyj R., Barnettson R.A., Porteous M.E., Dunlop M.G., Campbell H. (2008) Dietary vitamin B6 intake and the risk of colorectal cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 17, 171-182.
- Theodosiou E., Katsoura M.H., Loutrari H., Purchartová K., Křen V., Kolis F. N., Stamatis H. (2009) Enzymatic preparation of acylated derivatives of silybin in organic and ionic liquid media and evaluation of their antitumor proliferative activity. *Biocatal Biotransform* 27(3), 161-169.
- Tian J., Wang Q., Zhang Z. (2009) Lipase-catalyzed acylation of l-carnitine with conjugated linoleic acid in [bmim]PF₆ ionic liquid. *Europ Food Res Technol* 229(2), 357-363.
- Tirosh O., Roy S., Packer L. (2002) Lipoic acid: cellular metabolism, antioxidant activity, and clinical relevance in *Handbook of antioxidants*, Enrique Cadenas and Lester Packer (Eds). Marcel Dekker, Inc., New York, pp. 477-491.
- Tobin M.B., Gustafsson C., Huisman G.W. (2000) Directed evolution: the 'rational' basis for 'irrational' design. *Curr Opin Struc Biol* 10, 421-427.
- Tokuda H., Hayamizu K., Ishii K., Susan A.B.H., Watanabe M. (2005) Physicochemical properties and structures of room temperature ionic liquids. *J Phys Chem B* 109, 6103-6110.
- Topakas E., Stamatis H., Biely P., Kekos D., Macris B.J., Christakopoulos P. (2003) 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.
- Toral A.R., Ríos A.P.D.L., Hernández F.J., Janssen M.H.A., Schoevaart R., van Rantwijk F., Sheldon R.A. (2007) Cross-linked *Candida antarctica* lipase b is active in denaturing IL. *Enzyme Microb Technol* 40, 1095-1099.
- Torrecilla J.S., Garca J., Rojo E., Rodriguez F. (2009) Estimation of toxicity of ionic liquids in *Leukemia Rat Cell Line* and *Acetylcholinesterase* enzyme by principal component analysis, neural networks and multiple lineal regressions. *J Hazardous Materials* 164, 182-194.
- Torres P., Kunamneni A., Ballesteros A., Plou F.J. (2008) Enzymatic modification for ascorbic acid and alpha-tocopherol to enhance their stability in food and nutritional applications. *Open Food Sci J* 2, 1-9.
- Torres R., Mateo C., Fuentes M. (2003) Reversible immobilization of invertase on Sepabeadspolyethylenimine: stabilization of a multimeric enzyme. *Biotechnol Prog* 18, 1221-1226.
- Toth I., Roger J.T., McPhee J.A., Elliott S.M., Abramson S.L., Bridges K.R. (1995) Ascorbic acid enhances ironinduced ferritin translation in human leukemia and hepatoma cells. *J Biol Chem* 270, 2846-2852.
- Triantafyllou A.O., Wehtje E., Adlercreutz P., Mattiasson B. (1997) How do additives affect enzyme activity and stability in nonaqueous media? *Biotechnol Bioeng* 54, 67-76.
- Tripoli E., Guardia M., Giammanco S., Majo D., Giammanco M. (2007) Citrus flavonoids: Molecular structure, biological activity and nutritional properties: A review. *Food Chem* 104, 466-479.
- Trodler P. & Pleiss J. (2008) Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents. *BMC Struc Biol* 8, 9.
- Trodler P., Nieveler J., Rusnak M., Schmid R.D., Pleiss J. (2008) Rational design of a new one-step purification strategy for *Candida antarctica* lipase B by ion-exchange chromatography. *J Chrom A*, 1179, 161-167.
- Trulove P.C. & Mantz R.A. (2002) Electrochemical properties of ionic liquids in *Ionic Liquids in Synthesis*, P. Wasserscheid and T. Welton (Eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 103-126.
- Tsao S.M., Yin M.C., Liu W.H. (2007) Oxidant stress and B vitamins status in patients with non-small cell lung cancer. *Nutr Cancer* 59, 8-13.
- Tsui V.W.K., Wong R.W.K., Rabie A.B.M. (2008) The inhibitory effects of naringin on the growth of periodontal pathogens in vitro. *Phytother Res* 22(3), 401-406.
- Tsutsumi K. (2003) Lipoprotein lipase and atherosclerosis. *Curr Vasc Pharmacol* 1(1), 11-17.
- Tuñón M.J., García-Mediavilla M.V., Sánchez-Campos S., González-Gallego J. (2009) Potential of flavonoids as anti-inflammatory agents: modulation of pro-inflammatory gene expression and signal transduction pathways. *Curr Drug Metab* 10(3), 256-71.
- Turner M.B., Spear S.K., Huddleston J.G., Holbrey J.D., Rogers R.D. (2003) Ionic liquid salt-induced inactivation and unfolding of cellulase from *Trichoderma reesei*. *Green Chem* 5(4), 443-447.
- Turner N.A. & Vulfson E.N. (2000) At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity? *Enzyme Microb Technol* 27, 108-13.
- Turner N.A., Duchateau D.B., Vulfson E.N. (1995) Effect of hydration on thermostability of serine esterases. *Biotechnol Lett* 17(4), 371-376.
- Twu Y.K., Shih I.L., Yen Y.H., Ling Y.F., Shieh C.J. (2005) Optimization of lipase-catalyzed synthesis of octyl hydroxyphenylpropionate by response surface methodology. *J Agric Food Chem* 53, 1012-1016.
- Tyagi R., Batra R., Gupta M. (1999) Amorphous enzyme aggregates: stability toward heat and aqueous-organic cosolvent mixtures. *Enzyme Microb Technol* 24, 348-354.
- Ulbert O., Bélafi-Bakó K., Tonova K., Gubicza L. (2005) Thermal stability enhancement of *Candida rugosa* lipase using ionic liquids. *Biocatal Biotransform* 23(3-4), 177-183.
- Ulbert O., Fréter T., Bélafi-Bakó K., Gubicza L. (2004) Enhanced enantioselectivity of *Candida rugosa* lipase in ionic liquids as compared to organic solvents. *J Mol Catal B: Enzym* 31(1), 39-45.
- Ullegaddi R., Powers H.J., Gariballa S.E. (2004) B-group vitamin supplementation mitigates oxidative damage after acute ischemic stroke. *Clin Sci* 107, 477-484.

- Um S.J., Kwon Y.J., Han H.S., Park S.H., Park M.S., Rho Y.S., Sin H.S. (2004) Synthesis and biological activity of novel retinamide and retinoate derivatives. *Chem Pharm Bull* 52(5), 501-506.
- Uppenberg J., Hansen M.T., Patkar S., Jones T.A. (1994) The sequence, crystal structure determination and refinement of two crystal forms of lipase B from *Candida antarctica*. *Structure* 2, 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, 16838-16851.
- Ursini F., Maiorino M., Morazzoni P., Roveri A., Pifferi G.A. (1994) Novel antioxidant flavonoid (IdB 1031) affecting molecular mechanisms of cellular activation. *Free Rad Biol Med* 16, 547-553.
- Vafiadi, C., Topakas, E., Alissandratos, A., Faulds, C.B., Christakopoulos, P. Enzymatic synthesis of butyl hydroxycinnamates and their inhibitory effects on LDL-oxidation. *J. Biotechnol.* 2008, 133, 497-504.
- Valenzuela A., Guerra R., Garrido A. (1987) Silybin dihemisuccinate protects rat erythrocytes against phenylhydrazine-induced lipid peroxidation and hemolysis. *Planta Med* 53, 402-405.
- Valivety R.H., Halling P.J., Macrae A.R. (1992) Reaction rate with suspended lipase catalyst shows similar dependence on water activity in different organic solvents. *Biochim Biophys Acta* 1118, 218-222.
- Valko M., Izakovic M., Mazur M., Rhodes C.J., Telser J. (2004) Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. *Mol Cell Biochem* 266, 37-56.
- Valko M., Leibfritz D., Moncola J., Cronin M.D. (2007) Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. Review. *Int J Biochem Cell Biol* 39, 44-84.
- Valko M., Morris H., Cronin M.T.D. (2005) Metals, toxicity and oxidative stress. *Curr Med Chem* 12, 1161-208.
- Valko M., Rhodes C.J., Moncol J., Izakovic M., Mazur M. (2006) Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem Biol Interact* 160, 1-40.
- van Acker S.A., Tromp M.N., Haenen G.R., van der Vijgh W.J., Bast A. (1995) Flavonoids as scavengers of nitric oxide radical. *Biochem Biophys Res Commun* 214, 755-759.
- van de Weert M., Haris P.I., Hennink W.E., Crommelin D.J.A. (2001) Fourier transform infrared spectrometric analysis of protein conformation: effect of sampling method and stress factors. *Anal Biochem* 297(2), 160-169.
- van Hoof L., Totté J., Corthout J., Pieters L.A., Mertens F., Van den Berghe D.A. (1989) Plant antiviral agents, VI. isolation of antiviral phenolic glucosides from *populus cultivar beaupre* by droplet counter-current chromatography. *J Nat Prod* 52(4), 875-878.
- Van Hoorn D.E.C., Nijveldt R.J., Van Leeuwen P.A.M., Hofman Z., M'Rabet L., De Bont D.B.A., Van Norren K. (2002) Accurate prediction of xanthine oxidase inhibition based on the structure of flavonoids. *European J Pharmacol* 451, 111-118.
- van Leuven S.I., Stroes E.S., Kastelein J.J.P. (2008) High-Density Lipoprotein: A fall from grace? *Annals Medicine* 40, 584-593.
- van Rantwijk F. & Sheldon R.A. (2007) Biocatalysis in ionic liquids. *Chem Rev* 107, 2757-2785.
- van Rantwijk F., Madeira-Lau R., Sheldon R.A. (2003) Biocatalytic transformations in ionic Liquids. *TRENDS Biotechnol* 21, 131-138.
- van Rantwijk F., Secundo F., Sheldon R.A. (2006) Structure and activity of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *Green Chem* 8, 282-286.
- Van Tol J.B.A., Stevens R.M.M., Veldhuizen W.J., Jongejan J.A., Duine J.A. (1995) Do organic solvents affect the catalytic properties of lipase? Intrinsic kinetic parameters of lipases in ester hydrolysis and formation in various organic solvents. *Biotechnol Bioeng* 47, 71-81.
- Vasel B., Hecht H.J., Schmid R.D., Schomburg D. (1993) 3D-Structures of the ipase from *Rhizomucor miehei* at different temperatures and computer modelling of a complex of the lipase with triaurylglycerol. *J Biotechnol* 28, 99-115.
- 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, 545-551.
- Verger R. (1997) Interfacial activation of lipases: facts and artefacts. *TIBTECH* 15, 32-38.
- Verhoef P., Stampfer M.J., Buring J.E., Gaziano J.M., Allen R.H., Stabler S.P., Reynolds R.D., Kok F.J., Hennekens C.H., Willett W.C. (1996) Homocysteine metabolism and risk of myocardial infarction: relation with vitamins B6, B12, and folate. *Am J Epidemiol* 143, 845-859.
- Vermue M.H. & Tramper J. (1995) Interrelations of chemistry and biotechnology. Biocatalysis in nonconventional media — medium engineering aspects. *Pure Appl Chem* 67, 345-373.
- Vernet T., Ziomek E., Recktenwald A., Schrag J.D., de Montigny C., Tessier D.C., Thomas D.Y., Cygler M. (1993) Cloning and expression of *Geotrichum candidum* lipase II gene in yeast: probing of the enzyme active site by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 268, 26212-26219.
- Verpoorte R., van der Heijden R., Hoge J.H.C., ten Hoopen H.J.G. (1994) Plant cell biotechnology for the production of secondary metabolites. *Pure Appl Chem* 66, 2307-2310.
- Vidya P. & Chadha A. (2009) The role of different anions in ionic liquids on *Pseudomonas cepacia* lipase catalyzed transesterification and hydrolysis. *J Mol Catal B: Enzym* 57(1-4), 145-148.
- Viklund F., Alander J., Hult K. (2003) Antioxidative properties and enzymatic synthesis of ascorbyl FA esters. *J Am Oil Chem Soc* 80, 795-9.
- Villeneuve P. (2007) Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnol Advances* 25, 515-536.
- Villeneuve P., Muderhwa J.M., Graille J., Haas M.J. (2000) Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches. *J Mol Catal B: Enzymatic* 9, 113-148.

- Viña J., Gomez-Cabrera M.C., Borrás C. (2007) Fostering antioxidant defences: up-regulation of antioxidant genes or antioxidant supplementation? *Br J Nutr* 98, Suppl 1, S36-40.
- Virgili F. & Marino M. (2008) Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. *Free Radic Biol Med* 45(9), 1205-16.
- Vosmann K., Weitkamp P., Weber N. (2006) Solvent-free lipase-catalyzed preparation of long-chain alkyl phenylpropanoates and phenylpropyl alkanoates. *J Agric Food Chem* 54, 2969-2976.
- Vulfson E.N., Halling P.J., Holland H.L. (2001) *Introduction in Enzymes in Nonaqueous Solvents Methods and Protocols*. Humana Press Inc.
- Walker A.J. & Bruce N.C. (2004a) Combined biological and chemical catalysis in the preparation of oxycodone. *Tetrahedron* 60(3), 561-568.
- Walker A.J. & Bruce N.C. (2004b) Cofactor-dependent enzyme catalysis in functionalized ionic solvents. *Chem Commun* 10(22), 2570-2571.
- Wallert S., Drauz K., Grayson I., Gröger H., Dominguez de Maria, P. Bolm C. (2005) Ionic liquids as additives in the pig liver esterase (PLE) catalysed synthesis of chiral disubstituted malonates. *Green Chem* 7(8), 602-605.
- Wang J., Hou W., Qian Y. (1995) Immobilization of microbial cells using polyvinyl alcohol (PVA) – polyacrylamide gels. *Biotechnol Tech* 9(3), 203-208.
- Wang J., Zhang Q., Huang H. (2007a) Increasing synthetic performance of penicillin G acylase from *Bacillus megaterium* by site-directed mutagenesis. *Appl Microbiol Biotechnol* 74, 1023-1030.
- Wang S.F., Chen T., Zhang Z.L., Pang D.W. (2007b) Activity and stability of horseradish peroxidase in hydrophilic room temperature ionic liquid and its application in non-aqueous biosensing. *Electrochem Commun* 9(6), 1337-1342.
- Wang W., Zong M.H., Lou W.Y. (2009) Use of an ionic liquid to improve asymmetric reduction of 4'-methoxyacetophenone catalyzed by immobilized *Rhodotorula sp.* AS2.2241 cells. *J Mol Catal B: Enzym* 56, 70-76.
- Wang X. & Ruckenstein E. (1993) Preparation of porous polyurethane particles and their use in enzyme immobilization. *Biotechnol Prog* 9, 661-665.
- Wang Y. & Voth G.A. (2006) Tail aggregation and domain diffusion in ionic liquids. *J Phys Chem B* 110(37), 18601-18608.
- Wang Y. (2003) Synthesis and application of novel chiral ionic liquids derived from α -pinene, M. Sc. Thesis, Newark, NJ, New Jersey Institute of Technology, Department of Chemistry and Environmental Science.
- Wang Z., Wang Q., Zhang Y., Bao W. (2005) Synthesis of new chiral ionic liquids from natural acids and their applications in enantioselective Michael addition. *Tetrahedron Lett* 46, 4657-4660.
- Wasserscheid P. & Keim W. (2000) Ionic liquids-New "solutions" for transition metal catalysis. *Angew Chem Int Ed* 39, 3772-3789.
- Wasserscheid P. (2002) Transition metal catalysis in ionic liquids in *Ionic Liquids in Synthesis*, P. Wasserscheid and T. Welton (Eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 213-258.
- Wasserscheid P. (2006) Chemistry: Volatile times for ionic liquids. *Nature* 439, 797.
- Watanabe Y., Adachi S., Nakanishi K., Matsuno R. (1999) Condensation of L-ascorbic acid and medium chain fatty acids by immobilized lipase in acetonitrile with low water content. *Food Sci Technol Res* 5(2), 188-192.
- Watanabe Y., Minemoto Y., Adachi S., Nakanishi K., Shimada Y., Matsuno R. (2000) Lipase-catalyzed synthesis of 6-O-eicosapentaenoyl L-ascorbate in acetone and its autoxidation. *Biotechnol Lett* 22, 637-640.
- Watt M.J. & Steinberg G.R. (2008) Regulation and function of triacylglycerol lipases in cellular metabolism. *Biochem J* 414(3), 313-25.
- Wehtje E., Adlercreutz P. (1997) Water activity and substrate concentration effects on lipase activity. *Biotechnol Bioeng* 55, 798-806.
- Wei D.Z., Zhu J.H., Cao J.X. (2002) Enzymatic synthesis of cephalixin in aqueous two-phase systems. *Biochem Eng J* 11, 95-99.
- Weinberg E.D. (1990) Cellular iron metabolism in health and disease. *Drug Metab Rev* 22(5), 531-579.
- Weisshaar B. & Jenkins G.I. (1998) Phenylpropanoid biosynthesis and its regulation. *Curr Opin Plant Biol* 1, 251-257.
- Weitkamp P., Vosmann K., Weber N. (2006) Highly efficient preparation of lipophilic hydroxycinnamates by solvent-free lipase-catalyzed transesterification. *J Agric Food Chem* 54, 7062-7068.
- Wellner N., Belton S., Tatham A.S. (1996) Fourier transform IR spectroscopic study of hydration-induced structure changes in the solid state of ω -gliadins. *Biochem J* 319, 741-747.
- Wells A.S. & Coombe V.T. (2006) On the freshwater ecotoxicity and biodegradation properties of some common ionic liquids. *Org Proc Res Development* 10, 794-798.
- Wells P.G., McCallum G.P., Chen C.S., Henderson J.T., Lee C.J., Perstin J., Preston T.J., Wiley M.J., Wong A.W. (2009) Oxidative stress in developmental origins of disease: teratogenesis, neurodevelopmental deficits, and cancer. *Toxicol Sci* 108(1), 4-18.
- Welton T. (2004) Ionic liquids in catalysis. *Coordination Chem Rev* 248, 2459-2477.
- Wenzel S., Stoltz H., Soose M. (1996) Effects of silibinin and antioxidants on high glucose-induced alterations of fibronectin turnover in human mesangial cell cultures. *J Pharmacol Exp Ther* 279, 1520-1526.
- Werz O. & Steinhilber D. (2006) Therapeutic options for 5-lipoxygenase inhibitors. *Pharmacol Ther* 112, 701-718.
- Wheeler G.L., Jones M.A., Smirnoff N. (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* 393, 365-369.
- Wilkes J.S. & Zaworotko M.J. (1992) Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquids. *J Chem Soc Chem Commun* 965-967.

- Wilkes J.S. (2002) Introduction in *Ionic Liquids in Synthesis*, P. Wasserscheid and T. Welton (Eds.), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 1-6.
- Wilkes J.S. (2004) Properties of ionic liquid solvents for catalysis. *J Mol Catal A: Chemical* 214, 11-17.
- Wilkes J.S., Levisky J.A., Wilson R.A., Hussey C.L. (1982) Dialkylimidazolium chloroaluminate melts: A new class of room-temperature ionic liquids for electrochemistry, spectroscopy, and synthesis. *Inorg Chem* 21, 1263-1264.
- Willcox B.J., Curb J.D., Rodriguez B.L. (2008) Antioxidants in cardiovascular health and disease: Key lessons from epidemiologic studies. *American J Cardiol* 101, 75-86.
- Winkel-Shirley B. (2001) Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology and biotechnology. *Plant Physiol* 126, 485-493.
- Wolgemuth R. (2009) The locks and keys to industrial biotechnology. *New Biotech* 25, 205-213.
- Won K. & Lee S.B. (2001) Computer-aided control of water activity for lipase-catalyzed esterification in solvent-free systems. *Biotechnol Prog* 17, 258-64.
- Wong D.S.H., Chen J.P., Chang J.M., Chou C.H. (2002) Phase equilibria of water and ionic liquids [emim][PF₆] and [bmim][PF₆]. *Fluid Phase Equilib* 194-197, 1089-1095.
- Woodley J.M. (2008) New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. *Trends Biotechnol* 26, 321-327.
- Wu C.H., Lin J.A., Hsieh W.C., Yen G.C. (2009) Low-Density-Lipoprotein (LDL)-bound flavonoids increase the resistance of LDL to oxidation and glycation under pathophysiological concentrations of glucose in vitro. *J Agric Food Chem* 57 (11), 5058-5064.
- Wu F., Tymk K., Wilson J.X. (2002) Ascorbate inhibits iNOS expression in endotoxin- and IFN γ -stimulated rat skeletal muscle endothelial cells. *FEBS Lett* 520, 122-126.
- Xin J., Zhao Y., Zhao G., Zheng Y., Ma X., Xia C., Li S. (2005) Enzymatic resolution of (R,S)-Naproxen in water-saturated ionic liquid. *Biocatal Biotransform* 23, 353-361.
- Xu K., Griebenow K., Klibanov A.M. (1997) Correlation between catalytic activity and secondary structure of subtilisin dissolved in organic solvents. *Biotechnol Bioeng* 56.
- Yadav G.D. & Devi K.M. (2004) Immobilized lipase-catalysed esterification and transesterification reactions in non-aqueous media for the synthesis of tetrahydrofurfuryl butyrate: comparison and kinetic modelling. *Chem Eng Sci* 59, 373-383.
- Yamamoto S. (1992) Mammalian lipoxygenases: Molecular structures and functions. *Biochim Biophys Acta - Lipids Lipid Metab* 1128(2-3), 117-131.
- Yang H., Henke E., Bornscheuer U.T. (1999) The use of vinyl esters significantly enhanced enantioselectivities and reaction rates in lipase-catalyzed resolutions of arylaliphatic carboxylic acids. *J Org Chem* 64(5), 1709-1712.
- Yang S., Zhou L., Tang H. (2002) Rational design of a more stable penicillin G acylase against organic cosolvent. *J Mol Catal B Enzymatic* 18, 285-290.
- Yang S.H., Lin J.K., Chen W.S., Chiu J.H. (2003) Anti-angiogenic effect of silymarin on colon cancer LoVo cell line. *J Surg Res* 113, 133-138.
- Yang S.H., Lin J.K., Huang C.J., Chen W.S., Li S.Y., Chiu J.H. (2005) Silibinin inhibits angiogenesis via Flt-1, but not KDR, receptor up-regulation. *J Surg Res* 128, 140-146.
- Yang W.J., Griffiths P.R., Byler D.M., Susi H. (1985) Protein conformation by infrared spectroscopy: resolution enhancement by Fourier self-deconvolution. *Appl Spectrosc* 39, 282-287.
- Yang Z. & Pan W.B. (2005) Ionic liquids: green solvents for nonaqueous biocatalysis. *Enzyme Microb Tech* 37, 17-28.
- Yang Z. (2009) Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. *J Biotechnol* 144, 12-22.
- Yang Z., Yue Y.J., Huang W.C., Zhuang X.M., Xing M. (2009) Importance of the ionic nature of ionic liquids in affecting enzyme performance. *J Biochem* 145, 355-364.
- Yang Z., Yue Y.J., Xing M. (2008) Tyrosinase activity in ionic liquids. *Biotechnol Lett* 30, 153-158.
- Yang Z., Zacherl D., Russell A.J. (1993) pH dependence of subtilisin dispersed in organic solvents. *J Am Chem Soc* 115, 12251-12257.
- Yiannakopoulou E. (2009) Oxidative stress – antioxidant mechanisms: Clinical implications. *Arch Hellenic Med* 26(1), 23-35.
- Yoke J.T., Weiss J.F., Tollin G. (1963) Reactions of triethylamine with copper (I) and copper (II) halides. *Inorg Chem* 2, 1210-1216.
- Yu H., Wu J., Ching C.B. (2005b) Kinetic resolution of ibuprofen in ionic liquid by *Candida rugosa* lipase. *Chirality* 2005, 17, 16.
- Yu J., Wang L., Walzem R.L., Miller E.G., Pike L.M., Patil B.S. (2005a) Antioxidant activity of citrus limonoids, flavonoids, and coumarins. *J Agric Food Chem* 53(6), 2009-2014.
- Yu X., Li Y., Wu D. (2004) Enzymatic synthesis of gallic acid esters using microencapsulated tannase: effect of organic solvents and enzyme specificity. *J Mol Catal B: Enzym* 30, 69-73.
- Yuan Y., Bai S., Sun Y. (2006) Comparison of lipase-catalyzed enantioselective esterification of ($\pm$)-menthol in ionic liquids and organic solvents. *Food Chem* 97, 324-330.
- 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, 367-374.
- Zaks A. & Klibanov A.M. (1986) Enzyme-catalyzed processes in organic solvents. *Proc Natl Acad Sci USA* 82, 3192-3196.
- Zaks A. & Klibanov A.M. (1988) Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *J Biol Chem* 263, 3194-3201.

- Zaks A. (2001) Industrial biocatalysis. *Curr Opin Chem Biol* 5, 130–136.
- Zenk M.H. (1967) Pathways of salicyl alcohol and salicin formation in *salix purpurea* L. *Phytochem* 6(2), 245-252.
- Zhang D.H., Bai S., Ren M.Y., Sun Y. (2008a) Optimization of lipase-catalyzed enantioselective esterification of ($\pm$)-menthol in ionic liquid. *Food Chem* 109, 72–80.
- Zhang D.H., Bai S., Sun Y. (2007) Lipase-catalyzed regioselective synthesis of monoester of pyridoxine (vitamin B6) in acetonitrile. *Food Chem* 102, 1012–1019.
- Zhang L.W., Chen S.R., Yang P. (2003) Study on the structure-activity relationship of derivative antioxidants of cinnamic acid. *Chin J Struct Chem* 22, 341-345.
- Zhang W.G., Wei D.Z., Yang X.P., Song Q.X. (2006) Penicillin acylase catalysis in the presence of ionic liquids. *Bioprocess Biosyst Eng* 29(5-6), 379–383.
- Zhang W.J., Bird K.E., McMillen T.S., LeBoeuf R.C., Hagen T.M., Frei B. (2008b) Dietary α -Lipoic acid supplementation inhibits atherosclerotic lesion development in apolipoprotein e-deficient and apolipoprotein e/low-density lipoprotein receptor-deficient mice. *Circulation* 117, 421-428.
- Zhao H. & Malhotra S.V. (2002) Enzymatic resolution of amino acid ester using ionic liquid N-ethyl pyridinium trifluoroacetate. *Biotechnol Lett* 24, 1257-1260.
- Zhao H. (2003) Current studies on some physical properties of ionic liquids. *Phys Chem Liquids* 41, 545–557.
- Zhao H. (2005) Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity, and its implication for biocatalysis using ionic liquids. *J Mol Catal B: Enzymatic* 37, 16–25.
- Zhao H. (2006) Innovative applications of ionic liquids as “green” engineering liquids. *Chem Eng Comm* 193, 1660–1677.
- Zhao H., Baker G.A., Song Z., Olubajo O., Crittle T., Peters D. (2008) Designing enzyme-compatible ionic liquids that can dissolve carbohydrates. *Green Chem* 10, 696–705.
- Zhao H., Baker G.A., Song Z., Olubajo O., Zanders L., Campbell S.M. (2009) Effect of ionic liquid properties on lipase stabilization under microwave irradiation. *J Mol Catal B: Enzym* 57(1-4), 149–157.
- Zhao H., Jackson L., Song Z., Olubajo O. (2006a) Using ionic liquid [EMIM][CH₃COO] as an enzyme-'friendly' co-solvent for resolution of amino acids. *Tetrahedron Asymm* 17(17), 2491-2498.
- Zhao H., Jackson L., Song Z., Olubajo O. (2006b) Enhancing protease enantioselectivity by ionic liquids based on chiral- or α -amino acids. *Tetrahedron: Asymm* 17, 1549–1553.
- Zhao H., Luo R.G., Malhotra S.V. (2003) Kinetic study on the enzymatic resolution of homophenylalanine ester using ionic liquids. *Biotechnol Prog* 19, 1016–1018.
- Zhao H., Xia S., Ma P. (2005) Use of ionic liquids as 'green' solvents for extractions. *J Chem Technol Biotechnol* 80(10), 1089-1096.
- Zhao Q., Eichhorn J., Pitner W.R., Anderson J.L. (2009) Using the solvation parameter model to characterize functionalized ionic liquids containing the tris (pentafluoroethyl)trifluorophosphate (FAP) anion. *Anal Bioanal Chem* 395, 225–234.
- Zhao Z. & Moghadasian M.H. (2008) Chemistry, natural sources, dietary intake and pharmacokinetic properties of ferulic acid: A review. *Food Chem* 109, 691–702.
- Zheng L., Zhang S., Yu X., Zhao L., Gao G., Yang X., Duan H., Cao S. (2006) Enhancement of enantioselectivity in lipase-catalyzed resolution of N-(2-ethyl-6-methylphenyl)alanine by additives. *J Mol Catal B: Enzym* 38, 17–23.
- Zhou H., Xie X., Tang Y. (2008) Engineering natural products using combinatorial biosynthesis and biocatalysis. *Curr Opin Biotechnol* 19, 590–596.
- Zilva S.S. (1932) The non-specificity of the phenolindophenol reducing capacity of lemon juice and its fractions as a measure of their antiscorbutic activity. *Biochem J* 26, 1624–1627.
- Zoumpantioti M., Karali M., Xenakis A., Stamatis H. (2006) Lipase biocatalytic processes in surfactant free microemulsion-like ternary systems and related organogels. *Enzyme Microb Technol* 39(4), 531-539.
- Zulkhairi A., Zaiton Z., Jamaluddin M., Sharida F., Mohd T.H.B., Hasnah B., Nazmi H.M., Khairul O., Zanariyah A. (2008) Alpha lipoic acid possesses dual antioxidant and lipid lowering properties in atherosclerotic-induced New Zealand White rabbit. *Biomed Pharmacother* 62, 716-722.

Συντομογραφίες

ATP	Τριφωσφορική αδενοσίνη
BHA	Βουτυλιωμένη υδροξυανισόλη
BHT	Βουτυλιωμένο υδροξυτολουένιο
[bmim]4	1-βουτυλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο τετραφθοριούχο βόριο
[bmim]6	1-βουτυλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο εξαφθοριούχος φωσφόρος
CaLB	Λιπάση B από <i>Candida antarctica</i>
CD	Κυκλικός διχρωισμός
CLE	Διασυνδεδεμένο ένζυμο
CLEAs	Διασυνδεδεμένα ενζυμικά συσσωματώματα
CLECs	Διασυνδεδεμένοι ενζυμικοί κρύσταλλοι
DMF	Διμεθυλ φορμαμίδιο
DMSO	Διμεθυλ σουλφοξείδιο
DNA	Δεσοξυριβονουκλεϊκό οξύ
DSC	Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης
[emim]4	1-αιθυλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο τετραφθοριούχο βόριο
[emim]6	1-αιθυλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο εξαφθοριούχος φωσφόρος
ESI-MS	Φασματομετρία μάζας ηλεκτροψεκασμού ιονισμού
ESR	Φασματοσκοπία συντονισμού ηλεκτρικού spin
FTIR	Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier
GMO	Γενετικά τροποποιημένος οργανισμός
HBA	Οξύτητα δεσμών υδρογόνου
HRP	Υπεροξειδάση από <i>Horse Radish</i>
ILCE	Ένζυμο επικαλυμμένο με ιοντικό υγρό
IR	Φασματοσκοπία υπερύθρου
LDL	Χαμηλής πυκνότητας λιποπρωτεΐνη
LOX	Λιποξυγονάση
MALDI-TOF	Ιοντισμός εκρόφησης με την βοήθεια υλικού μήτρας-Αναλυτής μαζών χρόνου πτήσης
MHC	Κύριο σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας
MS	Φασματομετρία μάζας
NADH	Φωσφορικό νικοτιναμινό-αδενινοδινουκλεοτίδιο
NMR	Πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός
[omim]4	1-οκτυλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο τετραφθοριούχο βόριο
[omim]6	1-οκτυλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο εξαφθοριούχος φωσφόρος
Ox-LDL	Οξειδωμένη λιποπρωτεΐνη χαμηλής πυκνότητας
PCMC	Μικροκρύσταλλοι επικαλυμμένοι με πρωτεΐνη
PEG	Πολυ-αιθυλενογλυκόλη
PG	Προπυλεστέρας του γαλλικού οξέος
PLP	5' φωσφορική πυριδοξάλη
PREP	Ενζυμικό παρασκεύασμα που έχει εκπλυθεί με προπανόλη
QTL	Γενετικός τόπος ρύθμισης ποσοτικών χαρακτηριστικών
RmL	Λιπάση από <i>Rhizomucor miehei</i>
SANS	Μικρογωνιακή σκέδαση νετρονίων
SILM	Υποστηριγμένη μεμβράνη ιοντικού υγρού
SLA	Άλας νατρίου του λινελαϊκού οξέος
SLO	Λιποξυγονάση από σόγια
TBHQ	<i>tert</i> -Βουτυλ υδροκινόννη

THF	Τετραϋδρο φουράνιο
XOD	Οξειδάση της ξανθίνης

Συμβολισμοί Ιοντικών Υγρών

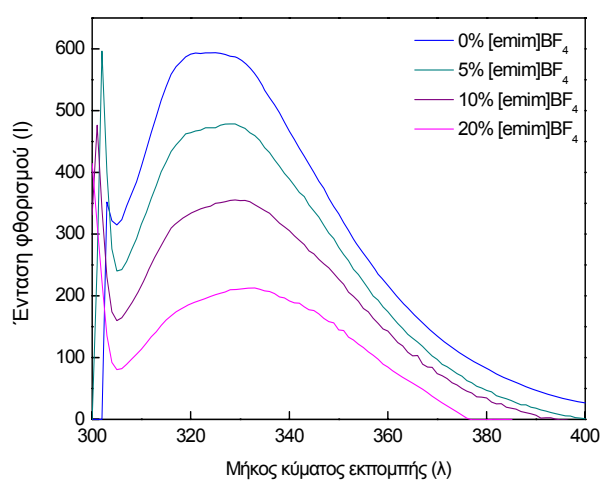
[bmim]	1-βουτυλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο
[emim]	1-αιθυλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο
[hmim]	1-εξυλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο
[mmim]	1-μεθυλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο
[moemim]	1-μεθοξυαιθυλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο
[nmim]	1-εννεϋλ-3-μεθυλιμιδαζόλιο
[omim]	1-οκτυλ-3-μεθυλ ιμιδαζόλιο
[pmim]	1-πεντυλ-3-μεθυλ ιμιδαζόλιο
[sbmim]	1-μεθυλ-3-βουτυλθειώδες ιμιδαζόλιο
[bmpyr]	N-βουτυλ-4-μεθυλ πυριδίνιο
[bpyr]	N-βουτυλ-πυριδίνιο
[etpyr]	N-αιθυλ-πυριδίνιο
[pmpyr]	N-προπυλ-4-μεθυλ πυριδίνιο
[ppyr]	N-προπυλ-πυριδίνιο
[btma]	Βενζυλ-τριμεθυλαμμώνιο
[htma]	Εξυλ-τριμεθυλαμμώνιο
[mtea]	Μεθυλ-τριαιθυλαμμώνιο
[mtea]	Τρις-(2-υδροξυαιθυλ)-μεθυλαμμώνιο
[mtoa]	Μεθυλ-τριοκτυλαμμώνιο
[MMEP]	Μεθυλ-μεθοξυαιθυλ πυριδίνιο
[tenh]	Τριαιθυλαμμώνιο
BF ₄	Τετραφθοριούχο βόριο
DCA	Δικυαναμίδιο
MDEGSO ₄	diethylenglycol monomethyl ether sulfate
NTf ₂	Δις(τριφθορομεθυλ)σουλφονυλιμίδιο
OTF	Τριφθορομεθανοσουλφίδιο
PF ₆	Εξαφθοριούχος φωσφόρος
TFA	Τριφθορο οξικό
TOSY	Τοσυλικό

Παράρτημα

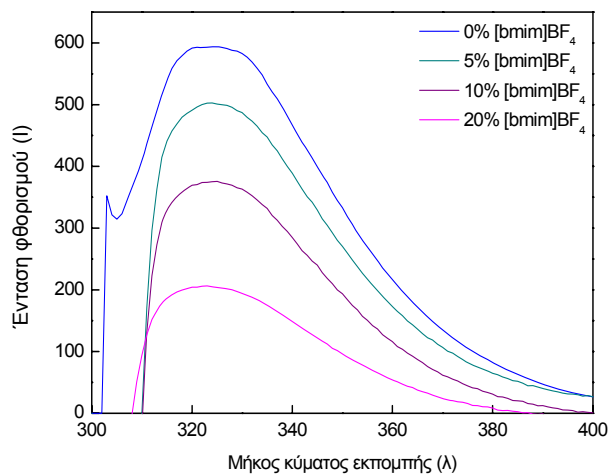


ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α. Φάσματα φθορισμού

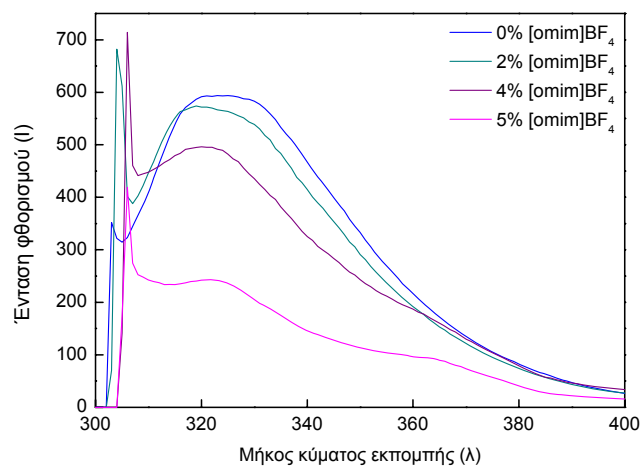
Φαινόμενο απόσβεσης φθορισμού:



$[emim]BF_4$

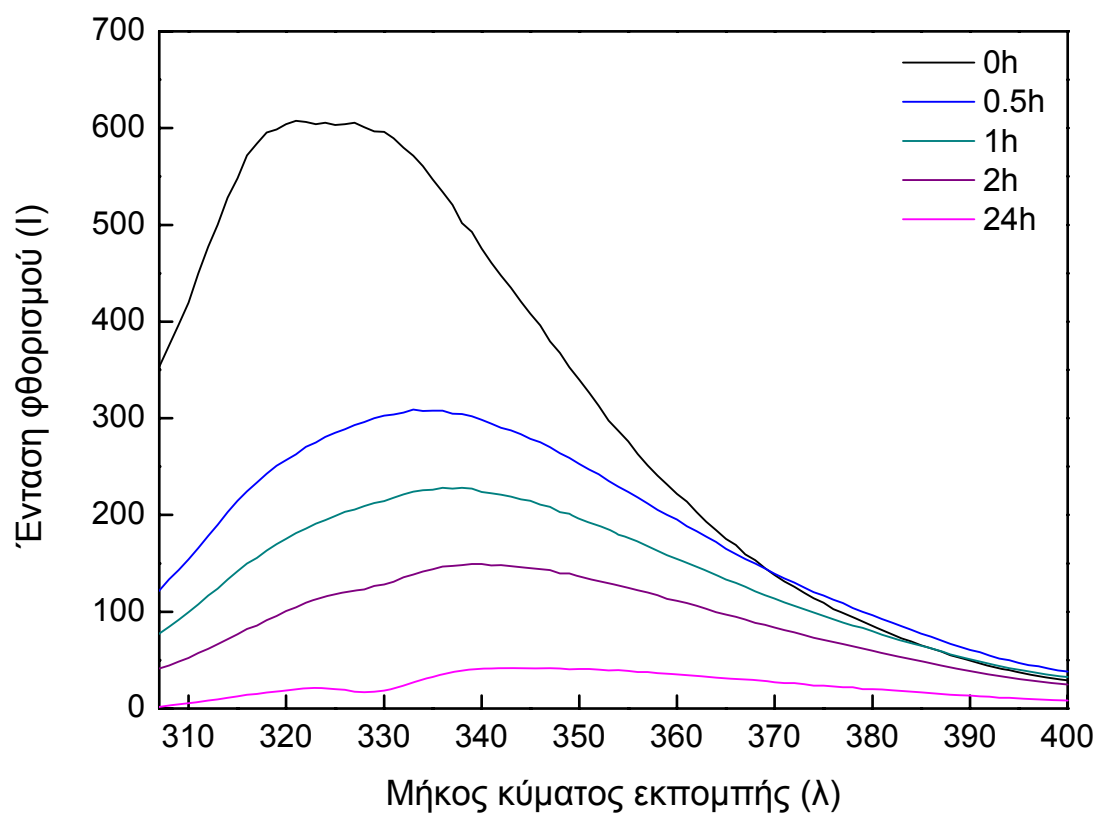


$[bmim]BF_4$

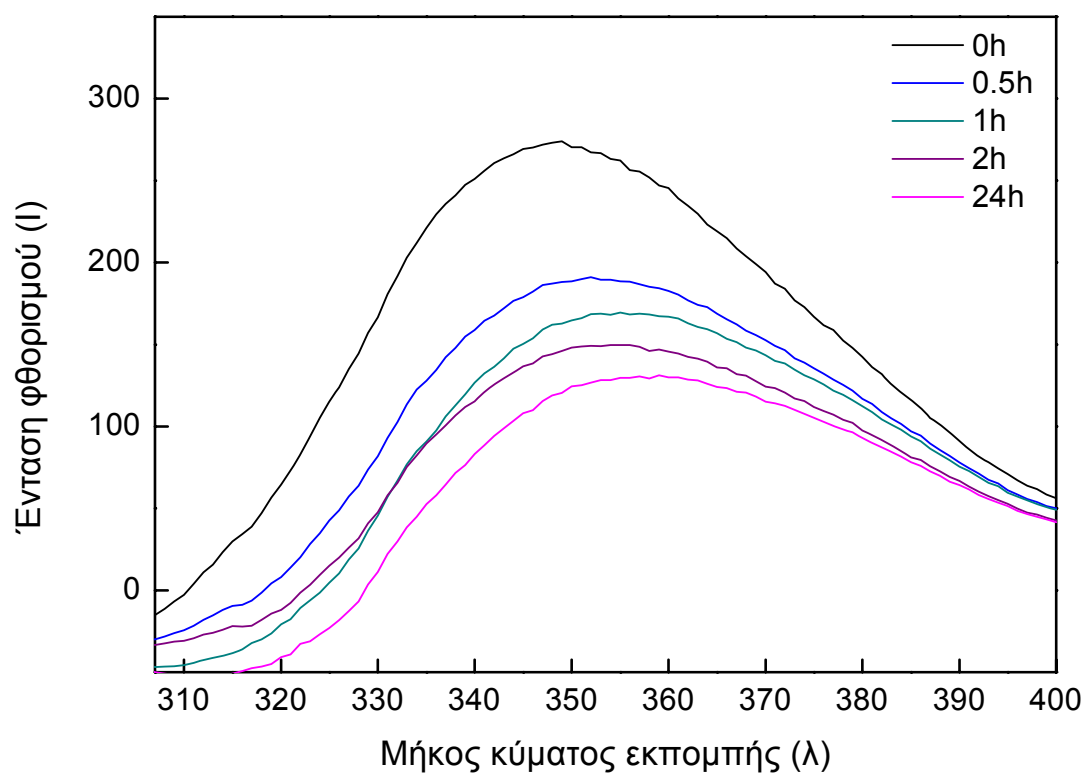


$[omim]BF_4$

Φάσματα φθορισμού της λιπάσης B από *Candida antarctica* στο νερό στους 60°C:

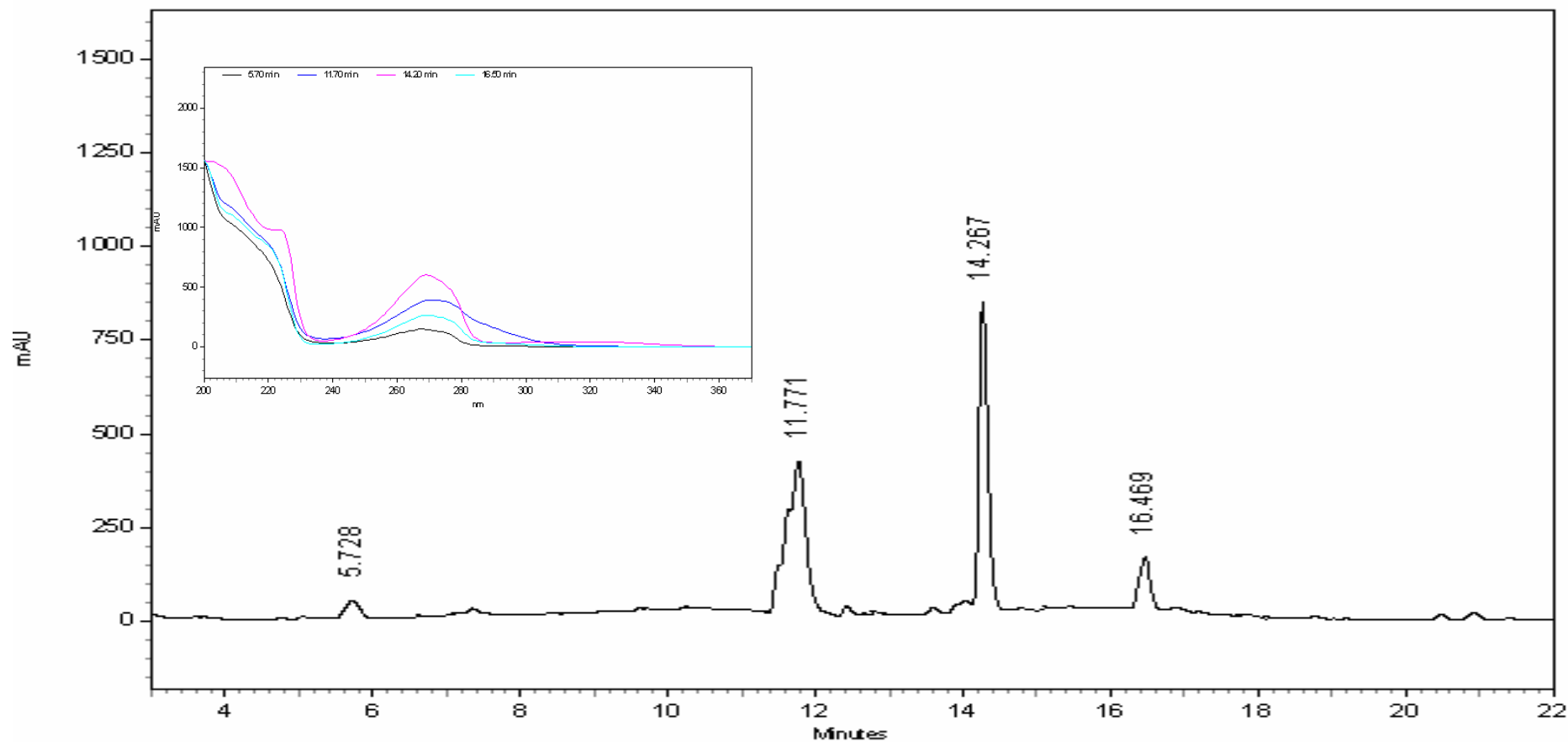


Φάσματα φθορισμού της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* στο νερό στους 60°C:



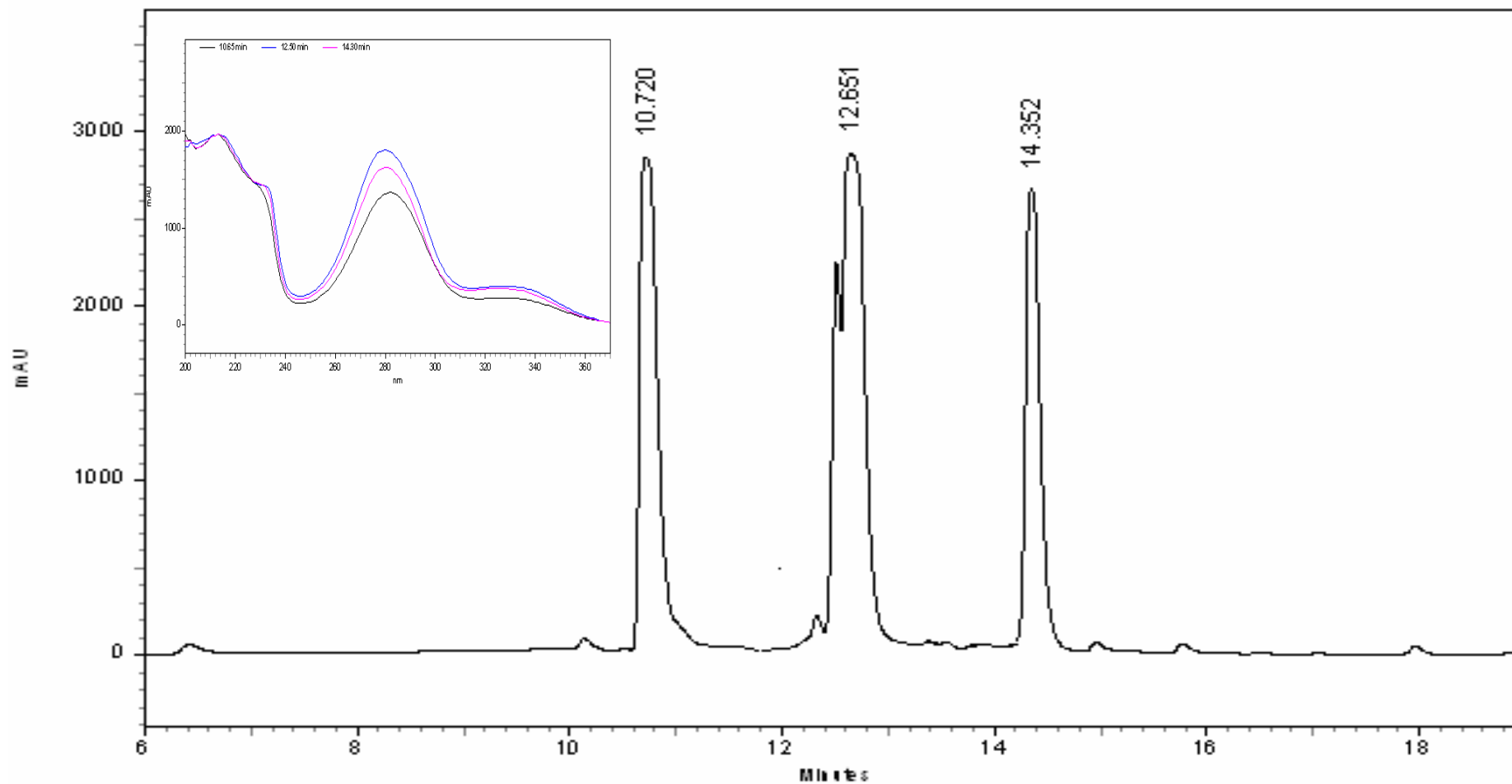
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β. Χρωματογραφήματα HPLC-Φάσματα ενώσεων (ως ένθετα διαγράμματα)

Β1. Αντίδραση : Σαλικίνη+Βινύλ-εστέρας του βουτυρικού οξέος



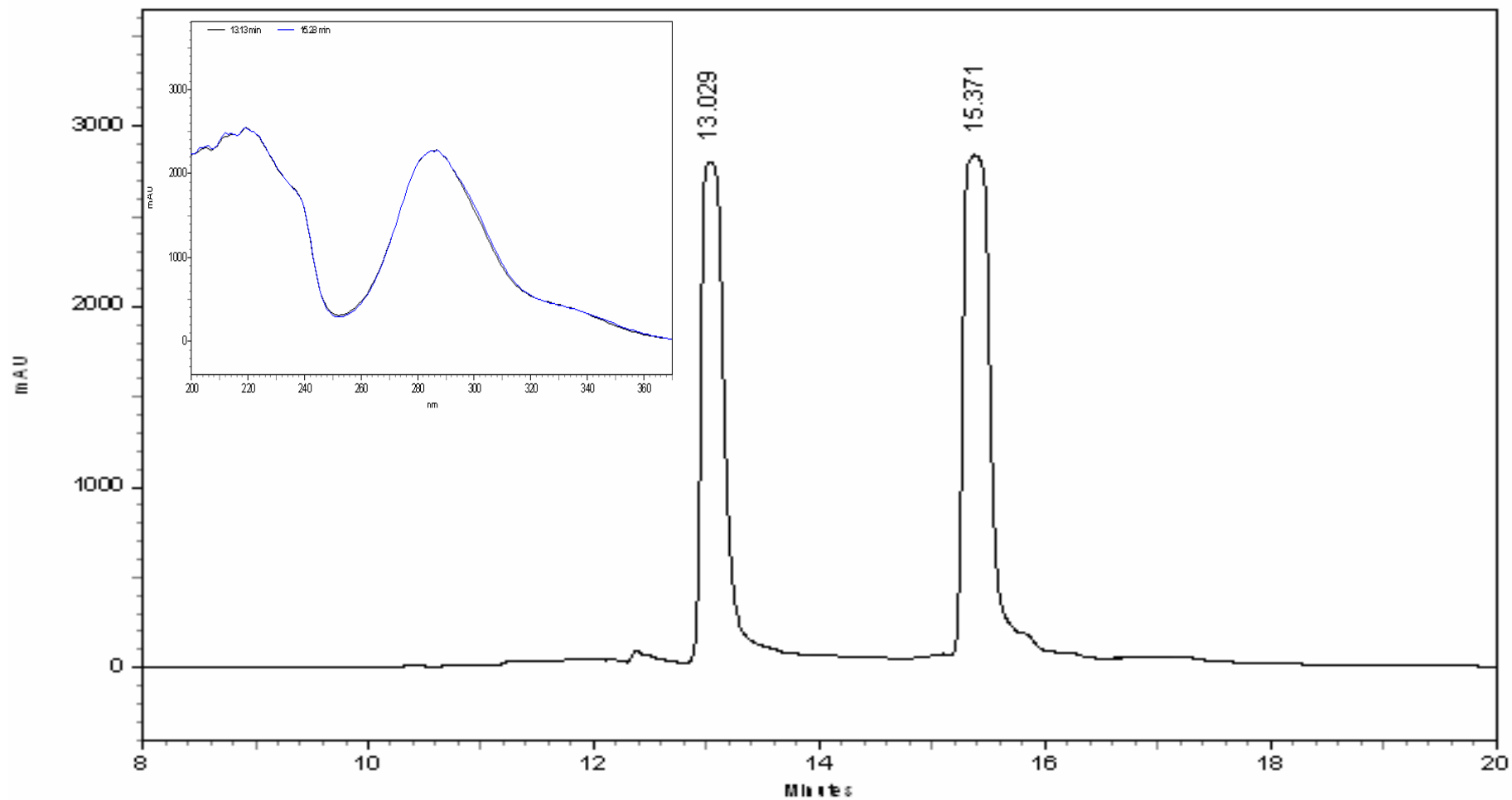
Χρόνοι έκλουσης : 5.7 – Σαλικίνη
 11.7 – Βουτυρικός εστέρας της σαλικίνης
 14.2 – Δι-βουτυρικός εστέρας της σαλικίνης
 16.4 – Τρι-βουτυρικός εστέρας της σαλικίνης

B2. Αντίδραση : Ναριγκίνη+Βινυλ-εστέρας του βουτυρικού οξέος

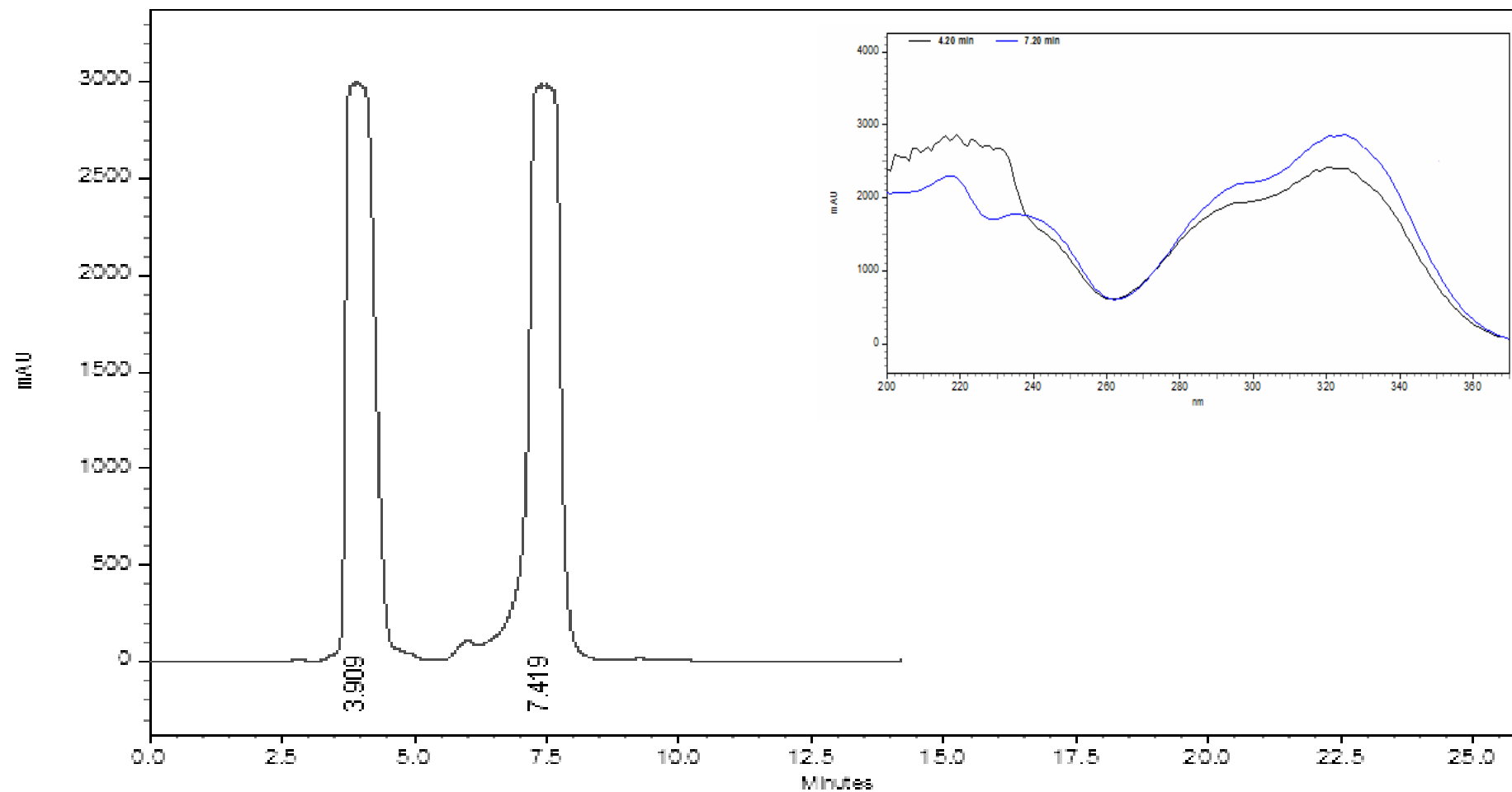


Χρόνοι έκλουσης : 10.7 – Ναριγκίνη
 12.6 – Βουτυρικός εστέρας της ναριγκίνης
 14.3 – Δι-βουτυρικός εστέρας της ναριγκίνης

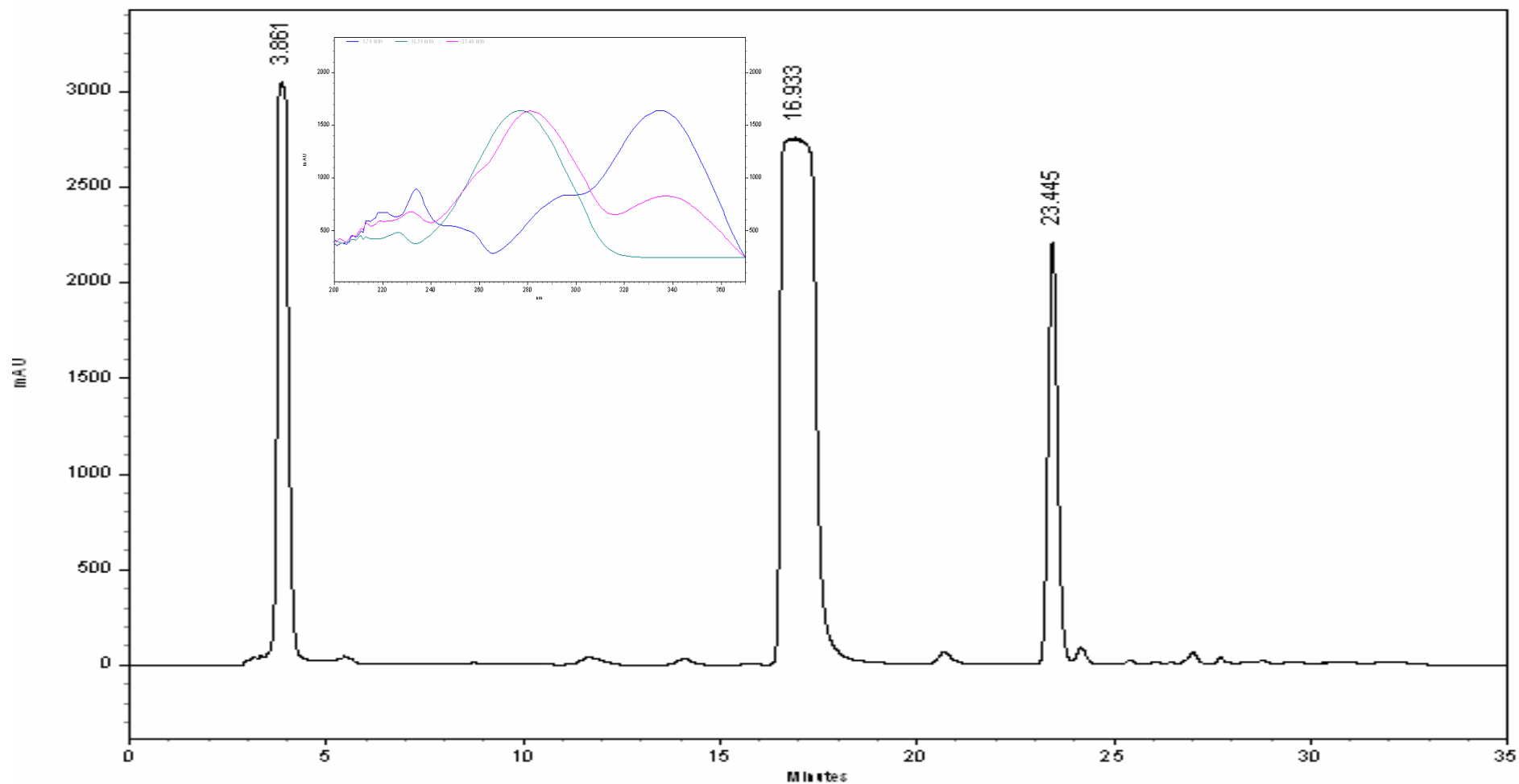
Β3. Αντίδραση : Σιλμπίνη+Βινυλ-εστέρας του βουτυρικού οξέος



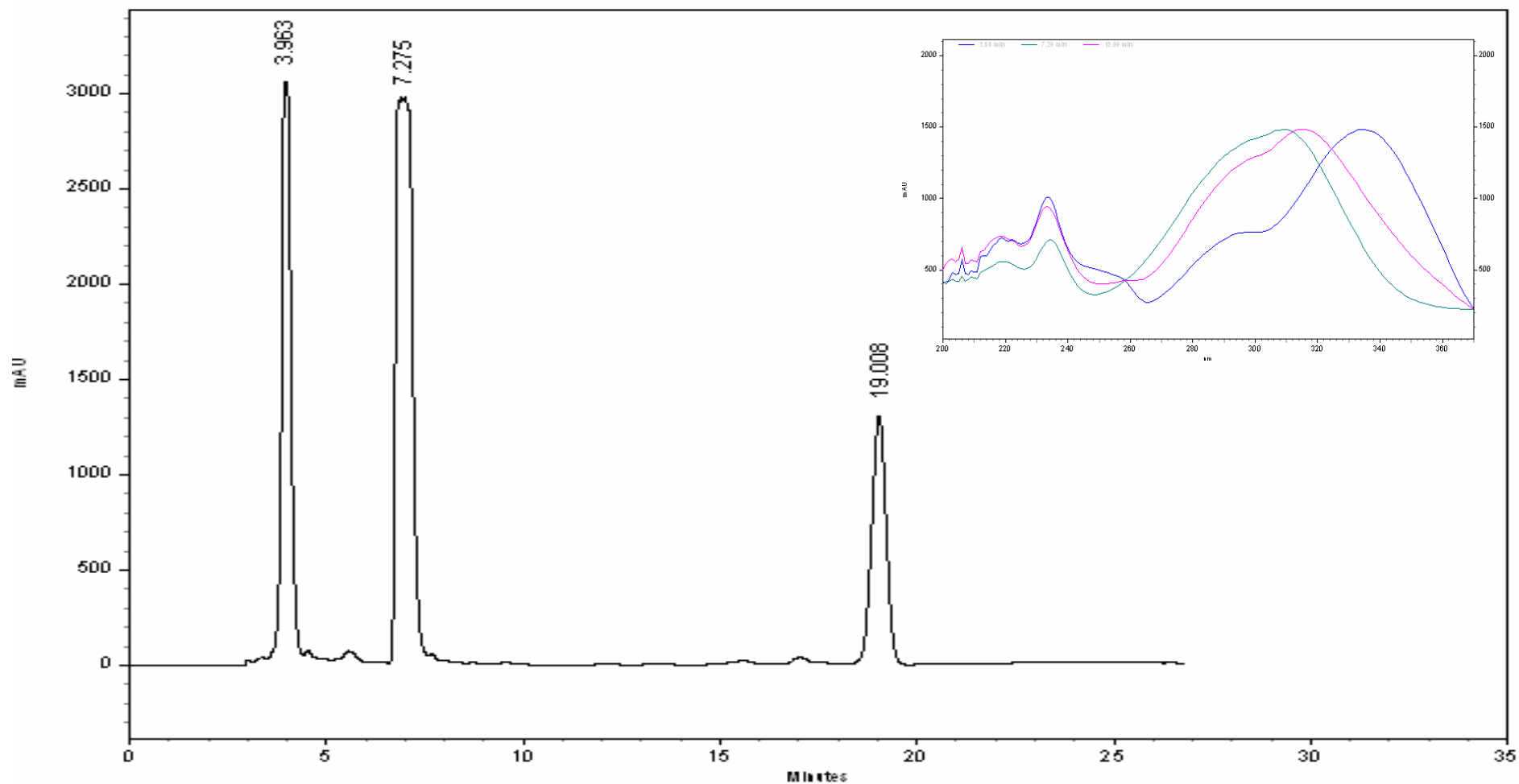
Χρόνοι έκλουσης : 13.0 – Σιλμπίνη
15.3 – Βουτυρικός εστέρας της σιλμπίνης

Β4. Αντίδραση : Φερουλικό οξύ+Οκτανόλη

Χρόνοι έκλουσης : 3.9 – Φερουλικό οξύ
7.4 – Οκτυλεστέρας του φερουλικού οξέος

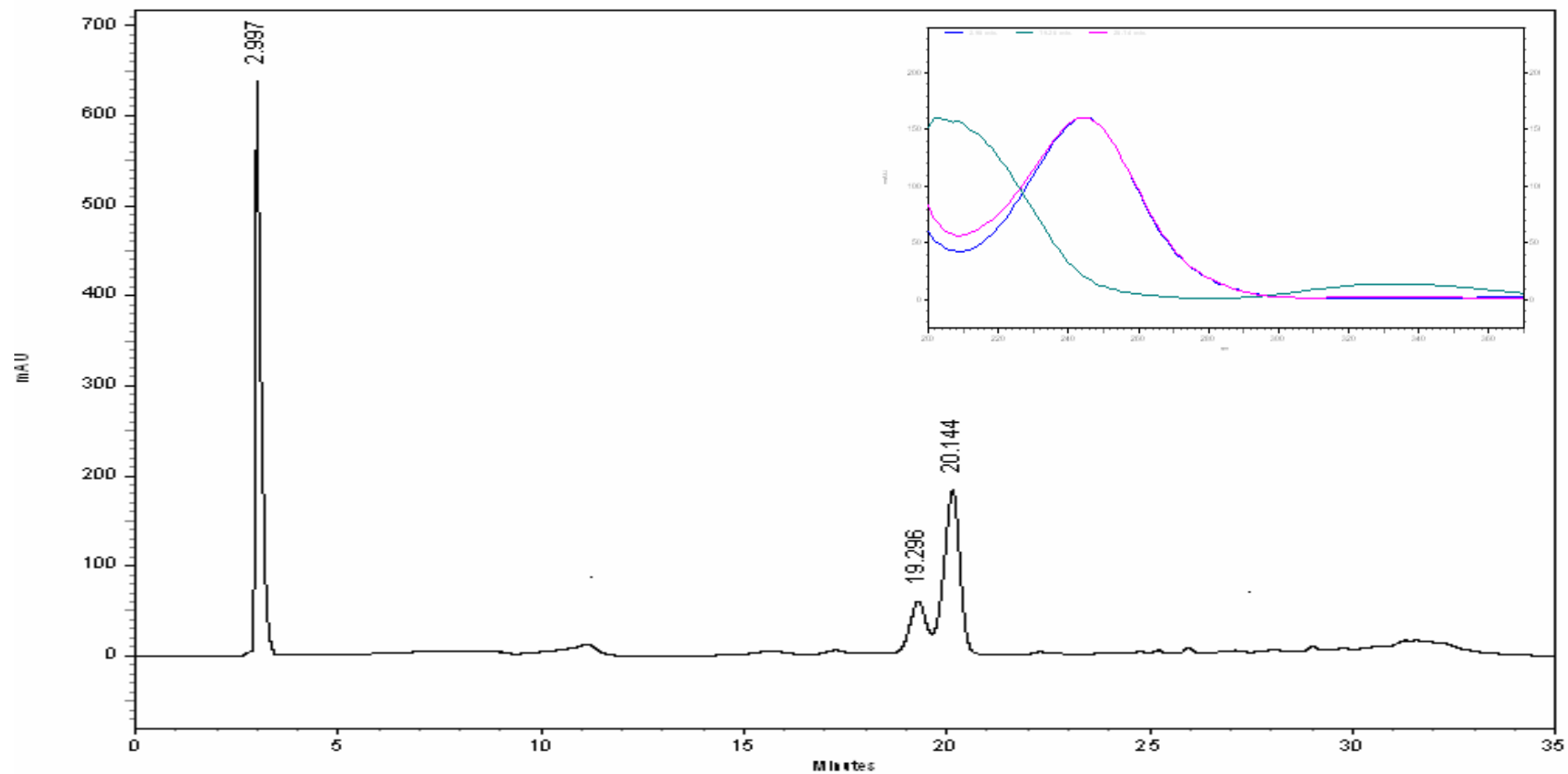
Β5. Αντίδραση : Εσκουλίνη+ Κινναμωμικό οξύ

Χρόνοι έκλουσης : 3.8 – Εσκουλίνη
16.9 – Κινναμωμικό οξύ
23.4 – Κινναμωμικός εστέρας της εσκουλίνης

Β6. Αντίδραση : Εσκουλίνη+ Κουμαρικό οξύ

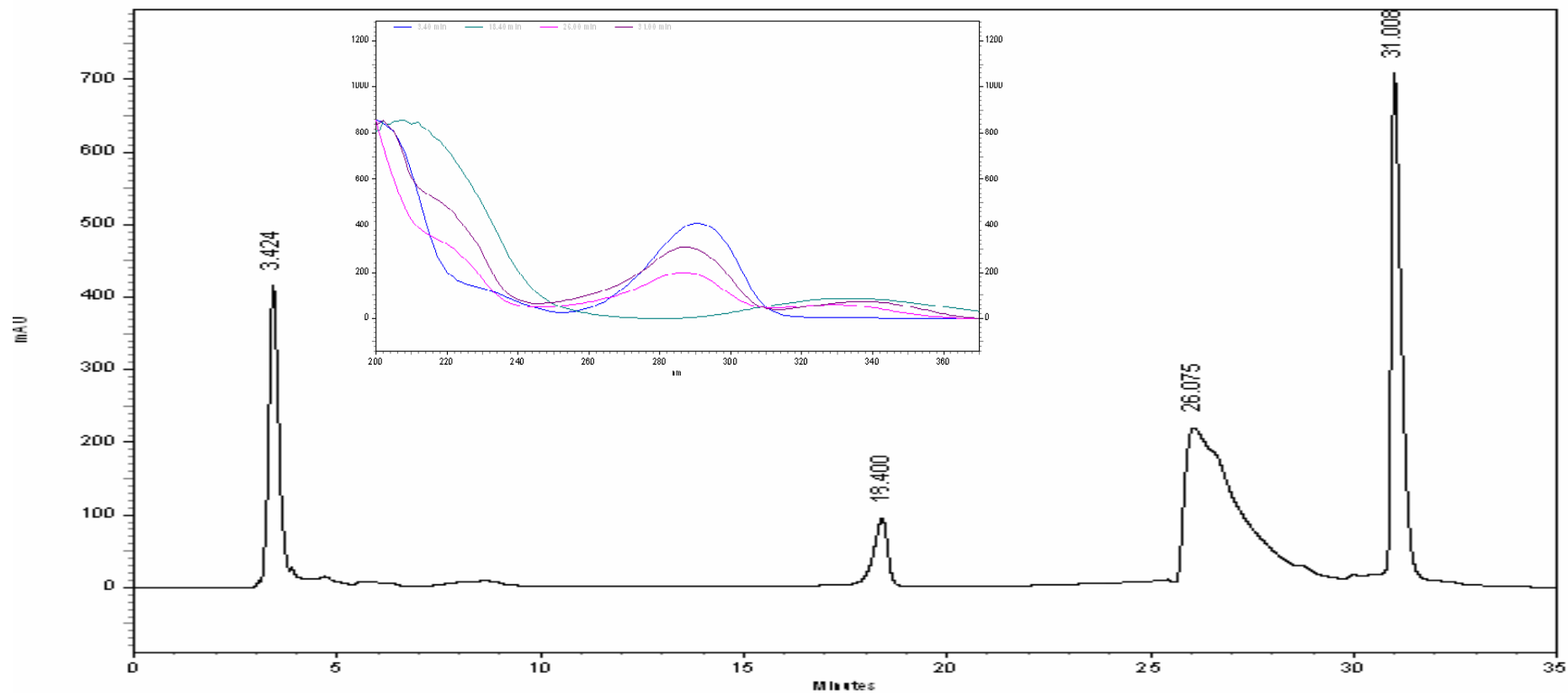
Χρόνοι έκλουσης : 3.9 – Εσκουλίνη
7.2 – Κουμαρικό οξύ
19.8 – Κουμαρικός εστέρας της εσκουλίνης

B7. Αντίδραση : Ασκορβικό οξύ+Λιποϊκό οξύ



Χρόνοι έκλουσης : 2.9 – Ασκορβικό οξύ
 19.2 – Λιποϊκό οξύ
 20.1 – Λιποϊκός εστέρας του ασκορβικού

Β8. Αντίδραση : Πυριδοξίνη+Λιποϊκό οξύ

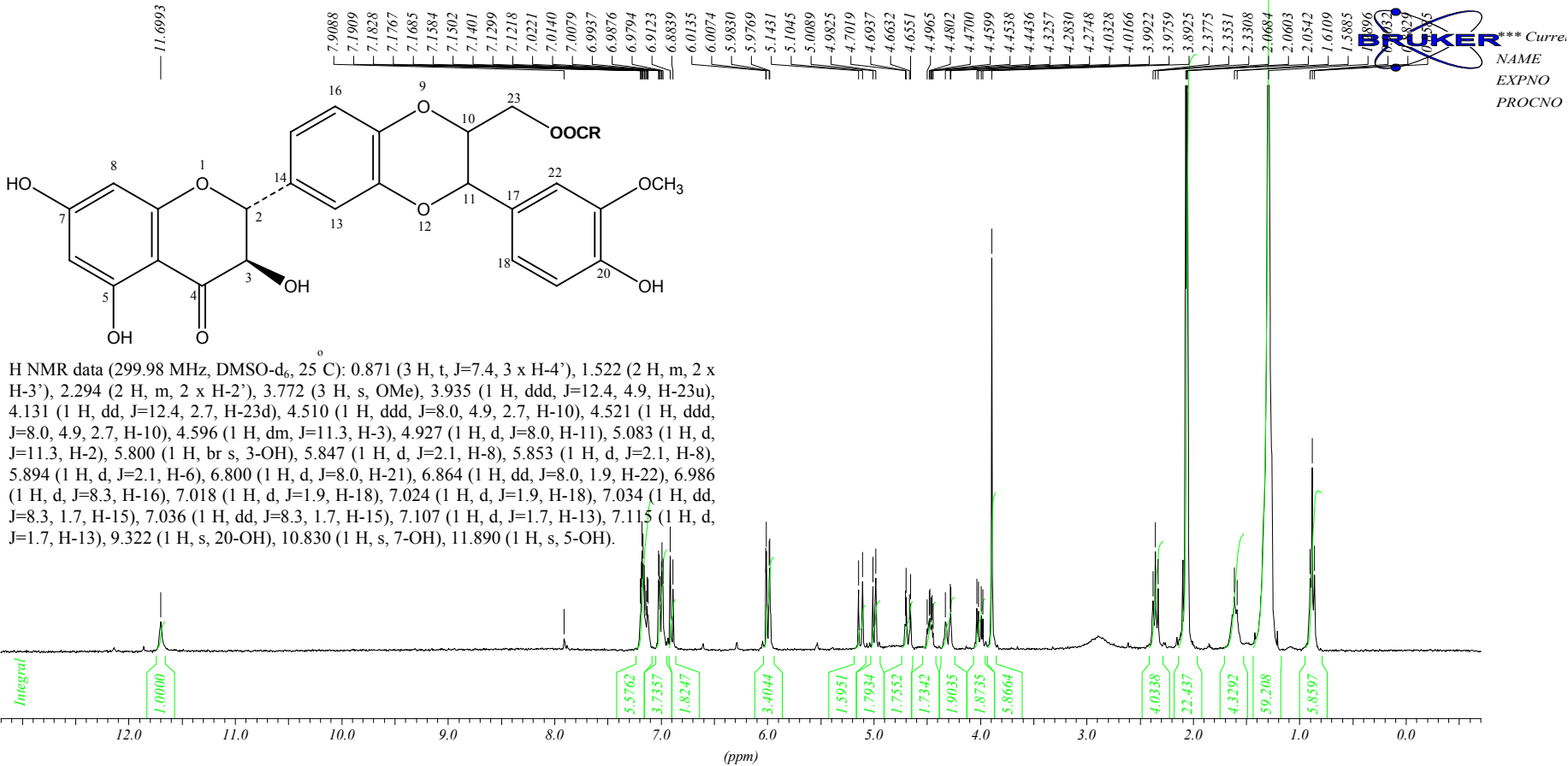


Χρόνοι έκλουσης : 3.4 – Πυριδοξίνη
 19.4 – Λιποϊκό οξύ
 26.0 – Λιποϊκός εστέρας της πυριδοξίνης
 31.0 – Δι-λιποϊκός εστέρας της πυριδοξίνης

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Γ.

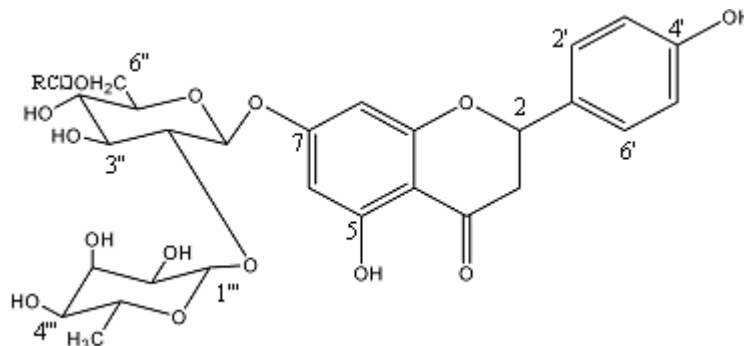
Φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR)

Γ1. Βουτυρικός εστέρας της σιλιμπίνης

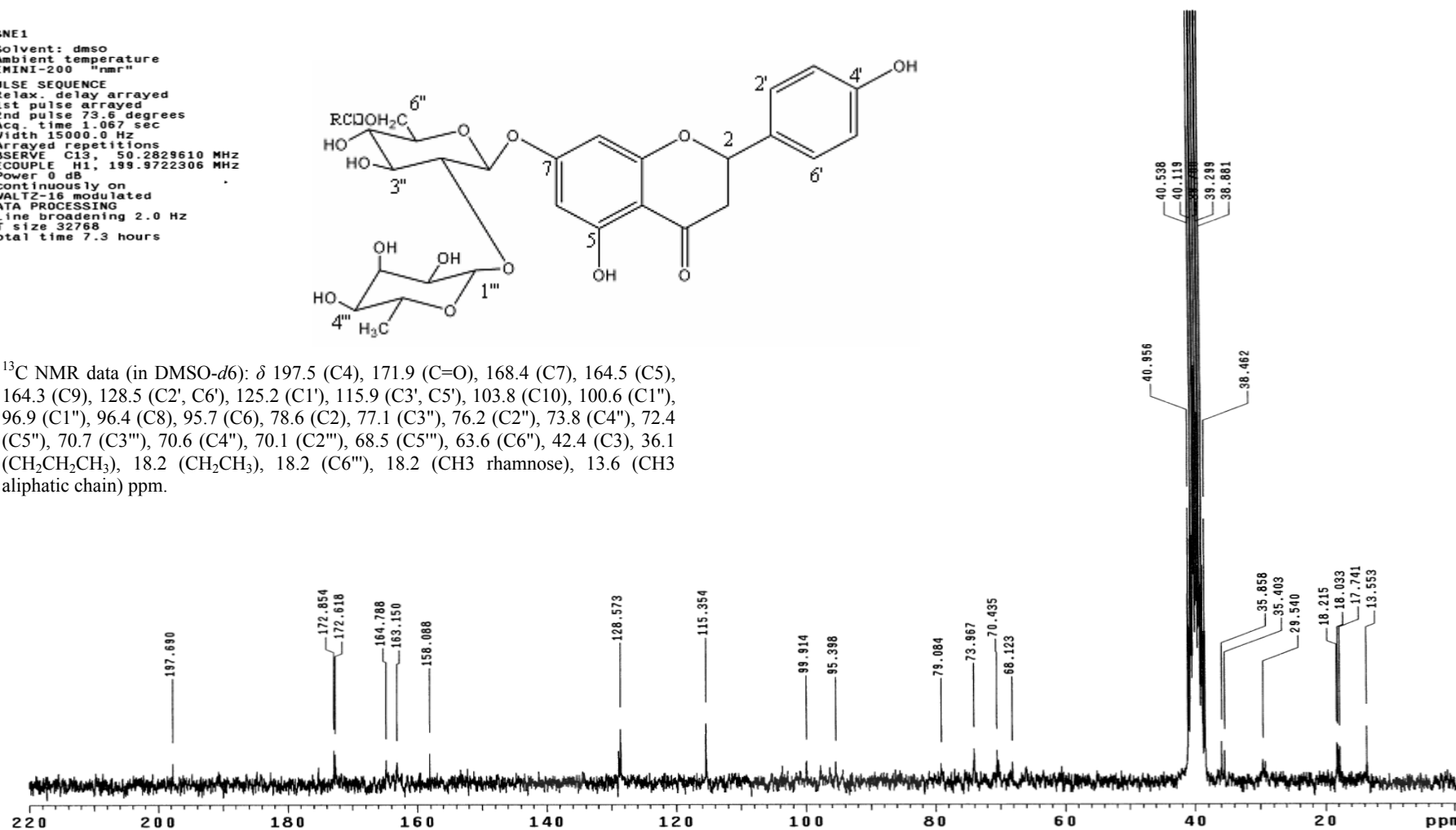


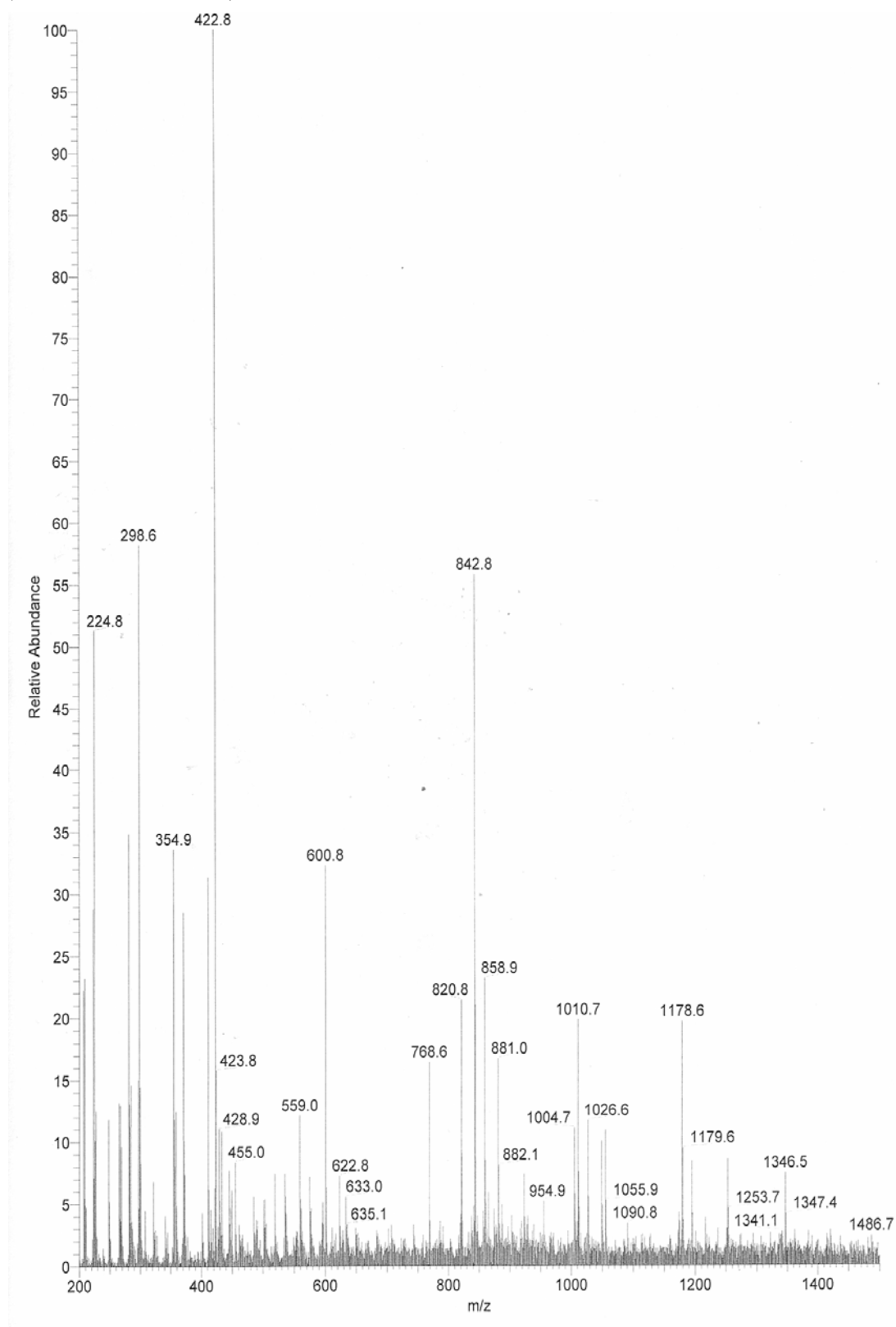
Γ2. Βουτυρικός εστέρας της ναριγκίνης

HSNE1
 Solvent: dmsd
 Ambient temperature
 GEMINI-200 ^1H nmr
 PULSE SEQUENCE
 Relax. delay arrayed
 1st pulse arrayed
 2nd pulse 73.6 degrees
 Acq. time 1.067 sec
 Width 15000.0 Hz
 Arrayed repetitions
 OBSERVE C13, 50.2829610 MHz
 DECOUPLE H1, 199.9722306 MHz
 Power 0 dB
 continuously on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 2.0 Hz
 FT size 32768
 Total time 7.3 hours



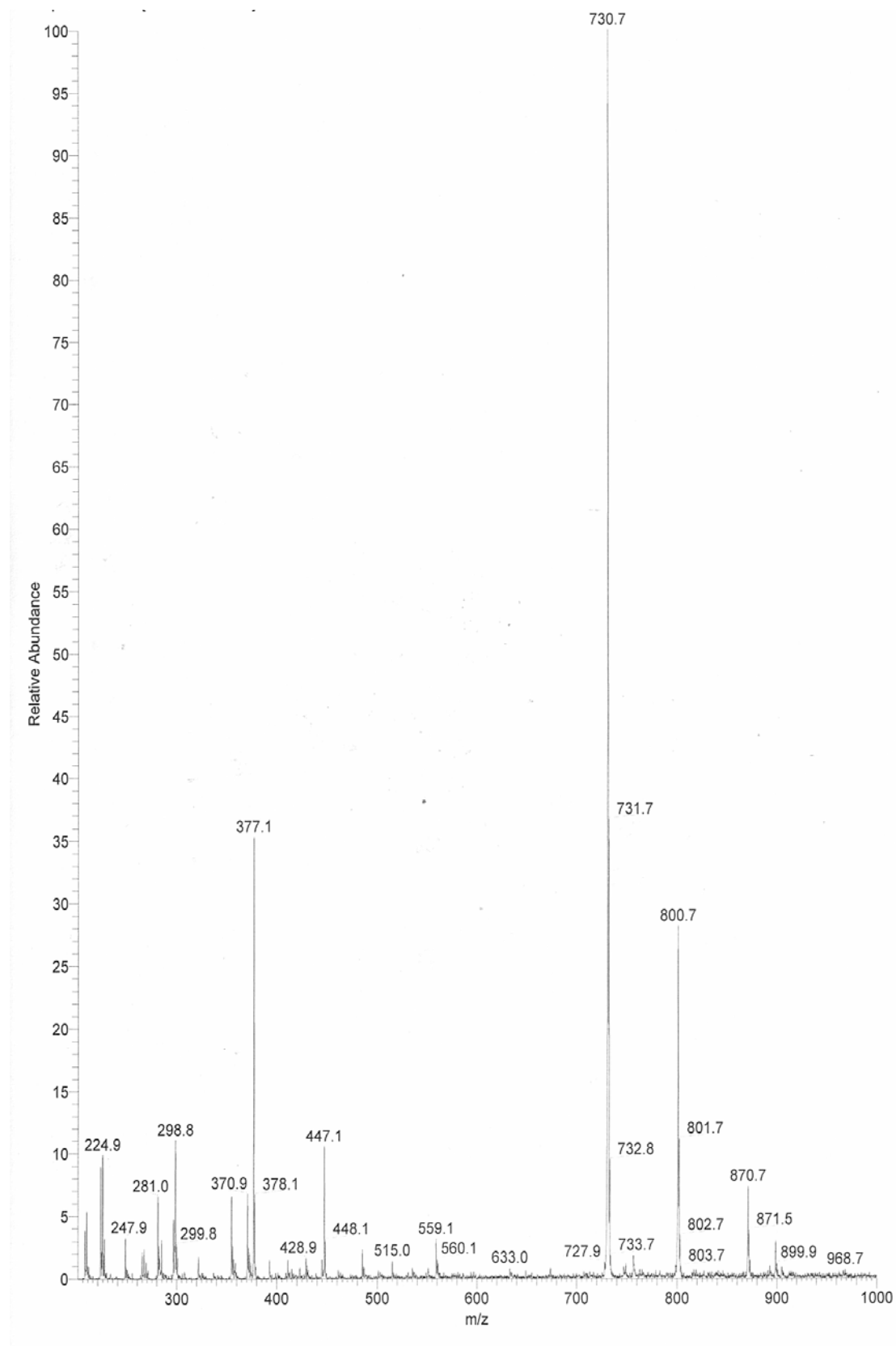
^{13}C NMR data (in DMSO- d_6): δ 197.5 (C4), 171.9 (C=O), 168.4 (C7), 164.5 (C5), 164.3 (C9), 128.5 (C2', C6'), 125.2 (C1'), 115.9 (C3', C5'), 103.8 (C10), 100.6 (C1''), 96.9 (C1''), 96.4 (C8), 95.7 (C6), 78.6 (C2), 77.1 (C3''), 76.2 (C2''), 73.8 (C4''), 72.4 (C5''), 70.7 (C3'''), 70.6 (C4''), 70.1 (C2'''), 68.5 (C5'''), 63.6 (C6''), 42.4 (C3), 36.1 (CH₂CH₂CH₃), 18.2 (CH₂CH₃), 18.2 (C6'''), 18.2 (CH₃ rhamnose), 13.6 (CH₃ aliphatic chain) ppm.



Φάσματα Φασματομετρίας Μάζας (MS)**Γ4. Βουτυρικός εστέρας της εσκουλίνης***(Positive ionization mode)*

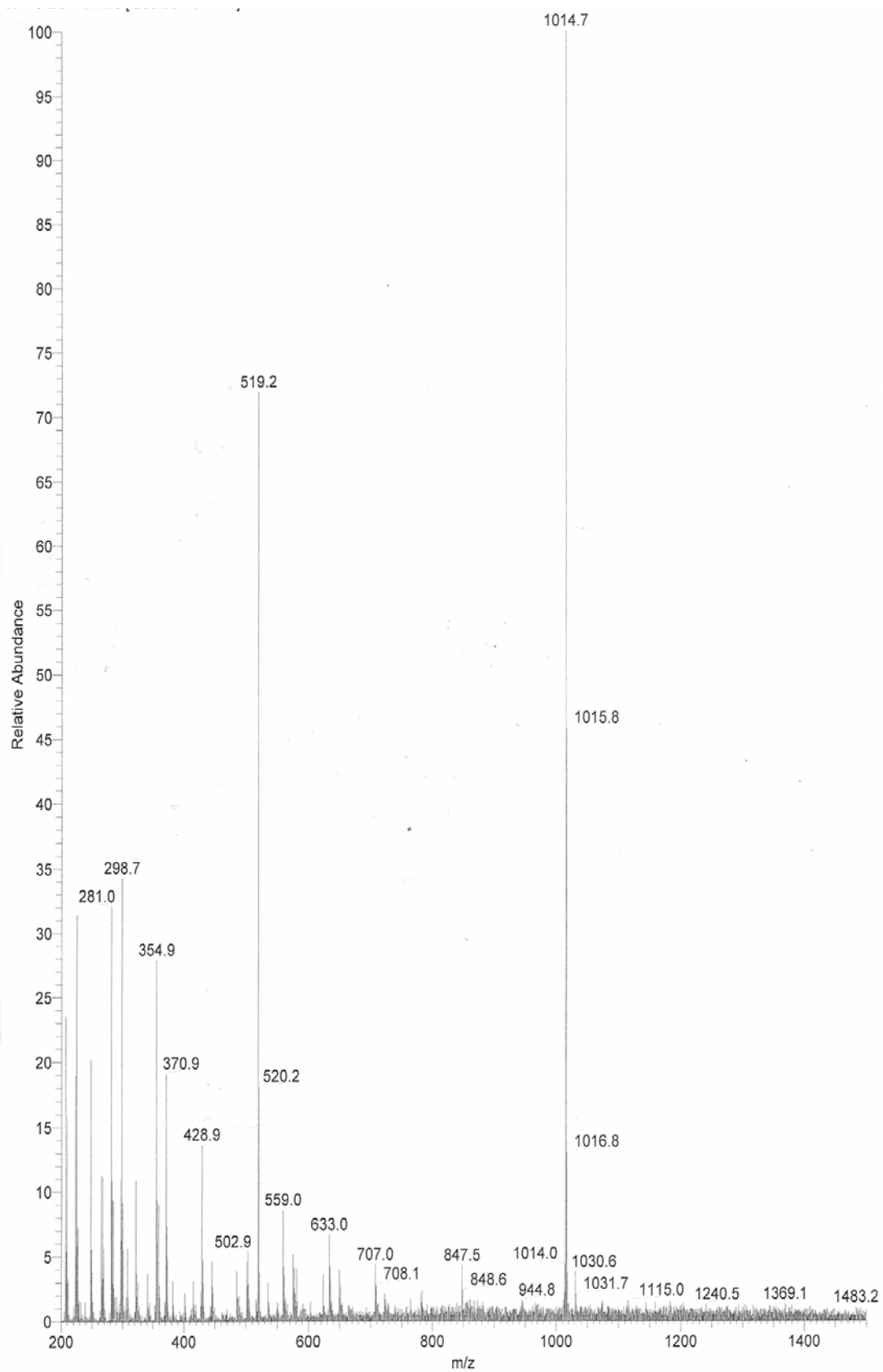
Γ5. Βουτυρικός εστέρας της ελικίνης

(Positive ionization mode)



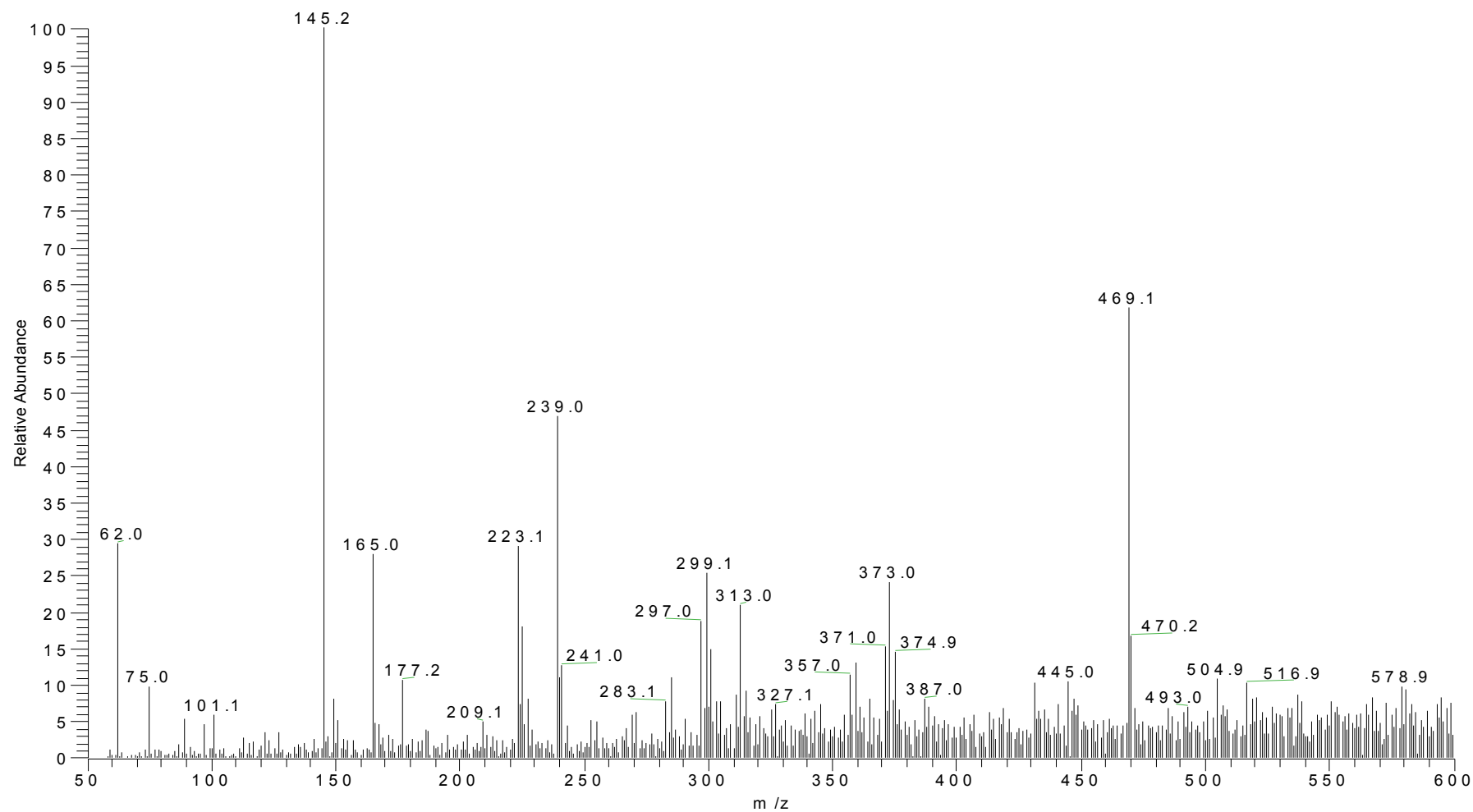
Γ6. Τριβουτυρικός εστέρας της σαλικίνης

(Positive ionization mode)



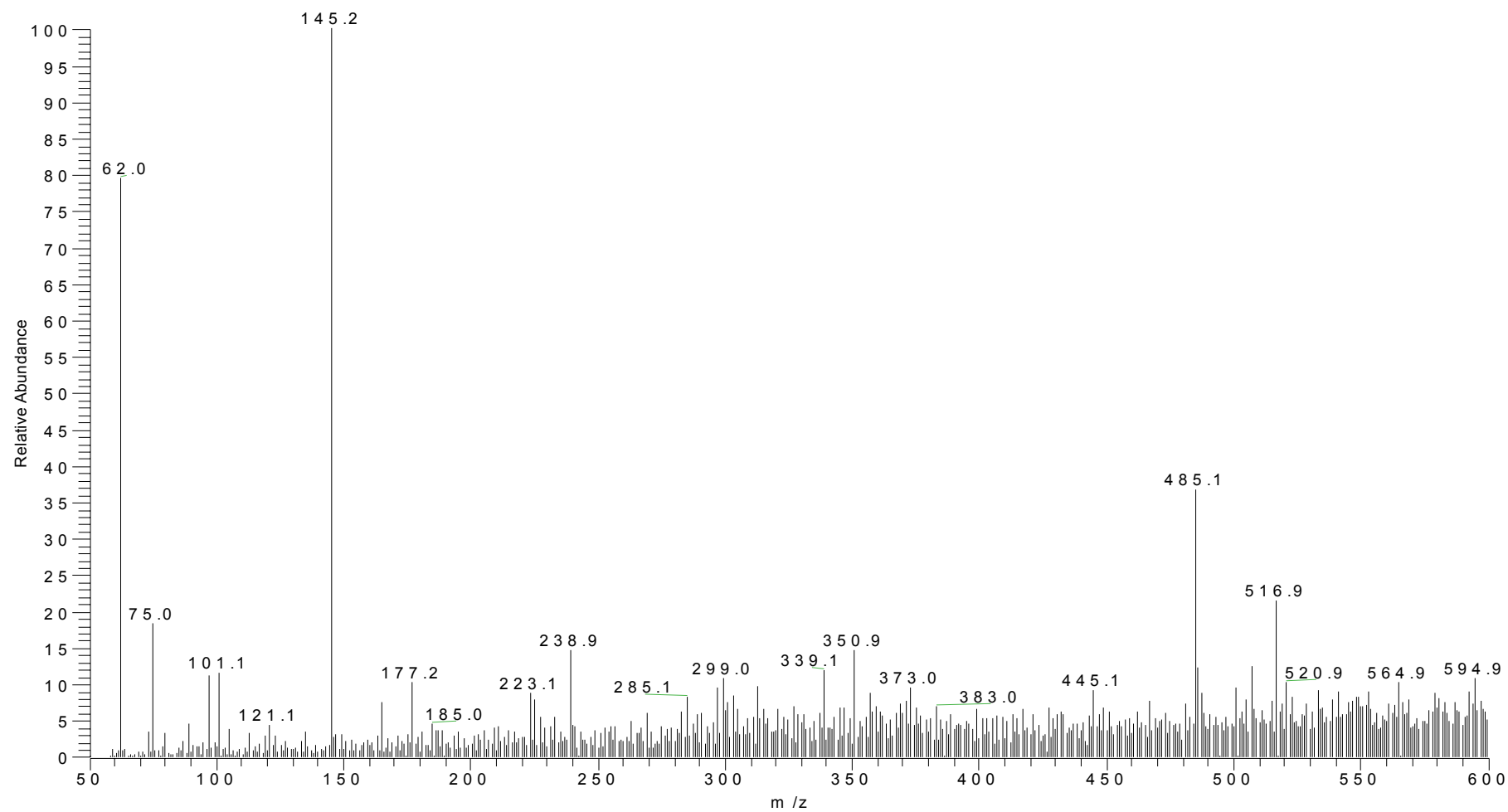
Γ7. Κινναμωμικός εστέρας της εσκουλίνης

(Negative ionization mode)



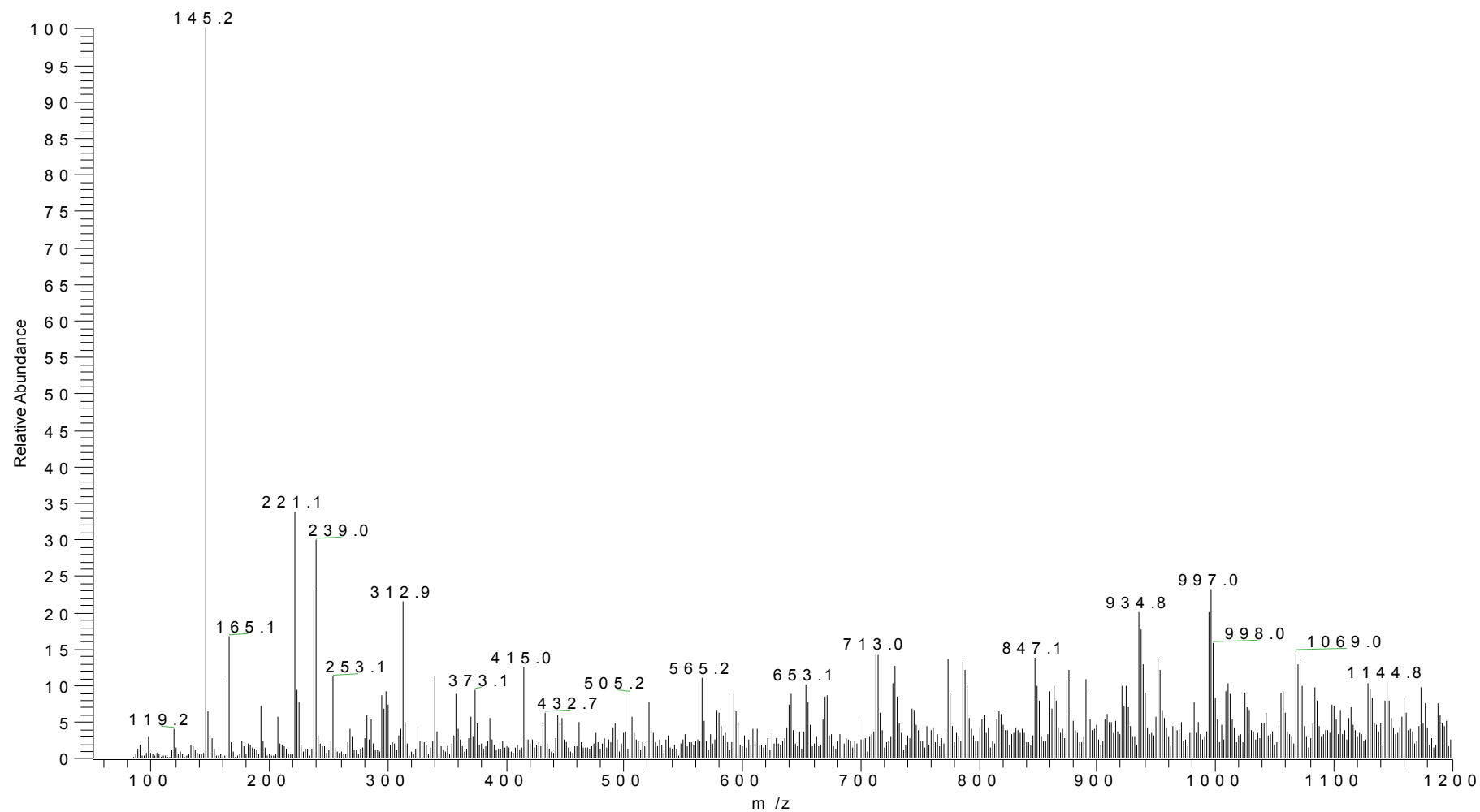
Γ8. Κουμαρικός εστέρας της εσκουλίνης

(Negative ionization mode)



Γ9. Αιθυλεστέρας του φερονλικού οξέος

(Negative ionization mode)



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Δ. Στατιστικά εργαλεία

Επίπεδο εμπιστοσύνης

Έστω $X_1, \dots, X_n$ ένα τυχαίο δείγμα με μία άγνωστη παράμετρο θ . Έστω $L = L(X_1, \dots, X_n)$ και $U = U(X_1, \dots, X_n)$ το κάτω και άνω όριο ενός διαστήματος αντίστοιχα. Τα όρια αυτά είναι συναρτήσεις των τυχαίων μεταβλητών του δείγματος. Το **επίπεδο εμπιστοσύνης** φανερώνει την πιθανότητα το διάστημα (L, U) να περιέχει το θ , δηλαδή :

$$\text{Επίπεδο εμπιστοσύνης} = P(L < \theta < U) = 1 - \alpha$$

και συμβολίζεται με $100(1-\alpha)\%$.

Τιμή p

Η **τιμή p** ενός στατιστικού τεστ είναι η μικρότερη τιμή του επιπέδου σημαντικότητας α για την οποία απορρίπτεται η αρχική υπόθεση βάσει των παρατηρούμενων δεδομένων. Η τιμή του α δίνεται από την σχέση :

$$p(x) = P(T(X) \geq T(X_0) | H_0)$$

όπου, $T(X) \geq C_\alpha$ είναι η κρίσιμη περιοχή του τεστ με $T(X)$ το κατάλληλο στατιστικό για τον έλεγχο, $T(X_0)$ η τιμή του στατιστικού που καθορίζει την κρίσιμη περιοχή και C_α σταθερά τέτοια ώστε να έχουμε τεστ επιπέδου α .

Αν $\alpha > p$ η αρχική υπόθεση απορρίπτεται.

Πολλαπλή ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης (MLR)

Η **πολλαπλή ανάλυση γραμμικής παλινδρόμησης** εφαρμόζεται για την εύρεση της σχέσης ανάμεσα σε διάφορες ανεξάρτητες μεταβλητές με μία εξαρτημένη μεταβλητή. Το πρόγραμμα MODDE 7.0 (Umetrics AB, Umeå, Sweden) χρησιμοποιεί την ανάλυση ιδιοζουσών τιμών (Singular Value Decomposition, SVD) για την επίλυση του συστήματος εξισώσεων :

$$Y = X * B + E$$

Όπου Y ένας $n \times m$ πίνακας αποκρίσεων,

X ένας $n \times p$ πίνακας, με p τον αριθμό των όρων του μοντέλου συμπεριλαμβανομένης και της σταθεράς,

B ο πίνακας των συντελεστών παλινδρόμησης

και E ο πίνακας των υπολοίπων.

Ανάλυση διακύμανσης, ANOVA

Η **ανάλυση διακύμανσης** (Analysis Of Variance, ANOVA) εξετάζει τη σχέση της εξαρτημένης μεταβλητής με τις ανεξάρτητες, κατανέμοντας στην ουσία τη συνολική διακύμανση SS σε ένα μέρος εξαιτίας του μοντέλου παλινδρόμησης και σε ένα μέρος εξαιτίας των υπολοίπων. Ισχύει δηλαδή,

$$SS = SS_{regr} + SS_{resid}$$

Η ανάλυση της διακύμανσης μπορεί να παρουσιασθεί ως εξής:

Πηγή Μεταβλητότητας	Βαθμοί Ελευθερίας	Άθροισμα Τετραγώνων	Μέσο τετράγωνο	F-test
Παλινδρόμηση	$DF = n - p - \sum_k (n_k - 1)$	$SSR = \sum_{i=1}^v (\hat{y}_i - \bar{y})^2$	$MSR = \frac{SSR}{DF}$	$F = \frac{MSR}{MSE}$
Υπόλοιπα	$DF_{resid} = (n - p)$	$SSE = \sum_{i=1}^v (y_i - \hat{y})^2$	$MSE = S^2 = \frac{SSE}{DF_{resid}}$	
Ολική	$DF_{tot} = (n + p)$	$SST = \sum_{i=1}^v (y_i - \bar{y})^2$		

όπου n : ο αριθμός των πειραμάτων

n_k : ο αριθμός των επαναλήψεων στο k σετ

p : ο αριθμός των όρων του μοντέλου, συμπεριλαμβανομένης της σταθεράς

Εάν υπάρχουν επαναλαμβανόμενα δεδομένα τότε το άθροισμα τετραγώνων των υπολοίπων κατανέμεται περαιτέρω στο καθαρό σφάλμα SS_{pe} και την έλλειψη προσαρμογής SS_{lof} :

$$SS_{resid} = SS_{lof} + SS_{pe}$$

Και ισχύει :

$$SS_{pe} = \sum_{ki} (e_{ki} - e_k)^2$$

$$DF_{pe} = \sum_k (n_k - 1)$$

$$DF_{lof} = n - p - \sum_k (n_k - 1)$$

Στατιστικός έλεγχος F. Οι στατιστικές συναρτήσεις SSR και SSE είναι ανεξάρτητες μεταξύ τους και τα μέσα τετράγωνα ακολουθούν την X^2 κατανομή με βαθμούς ελευθερίας τους αντίστοιχους των αθροισμάτων των τετραγώνων. Επομένως η συνάρτηση F ακολουθεί την

$F_{1,n-2}$ κατανομή και μπορεί να χρησιμοποιηθεί, για να ελέγξουμε την σημαντικότητα της παλινδρόμησης. Ουσιαστικά ελέγχουμε την ισχύ της υπόθεσης, ότι τα δεδομένα μας μπορούν να περιγραφούν ικανοποιητικά από το μοντέλο.

Στην ANOVA δίδονται :

Το τεστ ποιότητας προσαρμογής της Παλινδρόμησης : $F = \frac{MSR}{MSE}$

και το τεστ ποιότητας προσαρμογής της Έλλειψης προσαρμογής : $F = \frac{SS_{lof} / DF_{lof}}{SS_{pe} / DF_{pe}}$

Μέτρα Ποιότητας Προσαρμογής (Goodness of Fit)

Συντελεστής προσδιορισμού R^2

Με τον **συντελεστή προσδιορισμού R^2** μπορούμε να ελέγξουμε την αξία του γραμμικού μοντέλου, το οποίο προσαρμόζουμε στα δεδομένα. Ο συντελεστής προσδιορισμού εκφράζει το ποσοστό της μεταβλητότητας της απόκρισης Y που εξηγείται από το μοντέλο. Όσο πιο κοντά βρίσκεται η τιμή του R^2 στην μονάδα, τόσο πιο ισχυρή γίνεται η γραμμική σχέση εξάρτησης των μεταβλητών.

Ισχύει ότι :

$$R^2 = \frac{(SS - SS_{resid})}{SS}$$

Παράμετρος Q^2

Η παράμετρος αυτή εκφράζει το ποσοστό μεταβλητότητας της απόκρισης y η οποία προβλέπεται από το μοντέλο.

Ισχύει ότι :

$$Q^2 = \frac{(SS - PRESS)}{SS}$$

$$\text{όπου, } PRESS = \sum_i \frac{(y - \bar{y})^2}{(1 - h_i)^2}$$

και h_i το i διαγώνιο στοιχείο του **πίνακα H** (H , ο οποίος συσχετίζει τις προβλεπόμενες $\bar{y}$ με τις παρατηρούμενες τιμές y).