



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΗΧΑΝΙΣΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΟΛΟΓΙΑ: ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΟΥ

ΦΟΥΚΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ, M.Sc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΕΝΖΥΜΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΗΧΑΝΙΣΤΙΚΗ ΕΝΖΥΜΟΛΟΓΙΑ: ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΟΥ

ΦΟΥΚΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ
ΧΗΜΙΚΟΣ, M.Sc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2017

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Χημείας της Σχολής Θετικών
Επιστημών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμων του
συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: **816/27-05-2011**

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων: **Εμμανουήλ Μ. Παπαμιχαήλ**

Μέλη:

Χαράλαμπος Σταμάτης

Τσουκάτος Δημόκριτος

Ημερομηνία ορισμού θέματος: **854/11-07-2012**

Θέμα: «**Μηχανιστική ενζυμολογία: εφαρμογές στην παραγωγή βιοκαυσίμου**»

Ορισμός Επταμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: **954/8-09-2017**

- 1. Εμμανουήλ Μ. Παπαμιχαήλ**
- 2. Χαράλαμπος Σταμάτης**
- 3. Τσουκάτος Δημόκριτος**
- 4. Κούκκου Άννα-Ειρήνη**
- 5. Αθανάσιος Κουτίνας**
- 6. Κανελλάκη Μαρία**
- 7. Μπεκατώρου Αργυρώ**

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «**Άριστα / 10**» στις **3-10-2017**

Η Πρόεδρος του Τμήματος Χημείας
Λέκκα Μαρία - Ελένη, Καθηγήτρια

Η Γραμματέας του Τμήματος
Ζωή-Βαλεντίνα Βαμβέτσου

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Εμμανουήλ Μ. Παπαμιχαήλ-Ομότιμος Καθηγητής (Επιβλέπων)

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Χαράλαμπος Σταμάτης-Καθηγητής

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Τσουκάτος Δημόκριτος-Καθηγητής

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Κούκκου Άννα-Ειρήνη-Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Αθανάσιος Κουτίνας-Ομότιμος Καθηγητής

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Κανελλάκη Μαρία-Καθηγήτρια

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών

Μπεκατώρου Αργυρώ-Επίκουρος Καθηγήτρια

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Πατρών

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Εμμανουήλ Μ. Παπαμιχαήλ-Ομότιμος Καθηγητής (Επιβλέπων)

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Τσουκάτος Δημόκριτος-Καθηγητής

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Χαράλαμπος Σταμάτης-Καθηγητής

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων



Ε. Π. Ανταγωνιστικότητα και Επιχειρηματικότητα (ΕΠΑΝ II), ΠΕΠ Μακεδονίας – Θράκης, ΠΕΠ Κρήτης και Νήσων Αιγαίου, ΠΕΠ Θεσσαλίας – Στερεάς Ελλάδας – Ηπείρου, ΠΕΠ Αττικής

Τμήμα της παρούσας διδακτορικής διατριβής χρηματοδοτήθηκε στο πλαίσιο του έργου με τίτλο **«Αγροτοβιομηχανικά υγρά και στερεά απόβλητα ως πρώτες ύλες για την παραγωγή μιας νέας γενιάς βιοκαυσίμου» (11ΣΥΝ_8_839)** της πράξης «Συνεργασία 2011 - Συμπράξεις παραγωγικών και ερευνητικών φορέων σε εστιασμένους ερευνητικούς και τεχνολογικούς τομείς» στο Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα και Επιχειρηματικότητα» (ΕΠΑΝ-II), Άξονας Προτεραιότητας (Α.Π.) 1 «Δημιουργία και Αξιοποίηση της Καινοτομίας Υποστηριζόμενη από Έρευνα και Τεχνολογική Ανάπτυξη».

Η παρούσα διατριβή
αφιερώνεται στους
γονείς μου

Πρόλογος

Η παρούσα διδακτορική διατριβή με τίτλο **μηχανιστική ενζυμολογία: εφαρμογές στην παραγωγή βιοκαυσίμου** εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ενζυμολογίας του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, υπό την επίβλεψη του Ομότιμου Καθηγητή Εμμανουήλ Μ. Παπαμιχαήλ.

Η εκπόνηση της διδακτορικής διατριβής έγινε στο πλαίσιο του προγράμματος **ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ 2011, Κωδ. Έργου: 11ΣΥΝ_8_839**.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Εμμανουήλ Μ. Παπαμιχαήλ, ο οποίος στάθηκε αρωγός σε όλα τα στάδια για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας, καθώς και για τον εποικοδομητικό διάλογο, την εμπιστοσύνη και την ελευθερία που μου επέδειξε όλα αυτά τα χρόνια. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Τσουκάτο Δημόκριτο και τον Καθηγητή κ. Χαράλαμπο Σταμάτη, καθώς και τον Ομότιμο Καθηγητή κ. Αθανάσιο Κουτίνα, ο οποίος ήταν και ο Επιστημονικός Υπεύθυνος του προαναφερθέντος Έργου (11ΣΥΝ_8_839), όπως και τον Επίκουρο Καθηγητή κ. Βασίλειο Σακκά για τις συμβουλές και την στήριξη που μου προσέφεραν. Τέλος ευχαριστώ τους συναδέλφους του Εργαστηρίου Ενζυμολογίας καθώς και τα μέλη του Εργαστηρίου Οργανικής Χημείας για την συνεργασία που είχαμε όλο αυτό το διάστημα.

Περίληψη

Τα βιοκαύσιμα αποτελούν την ευνοϊκότερη επιλογή εναλλακτικής πηγής καυσίμων. Έτσι, σκοπός της παρούσης διατριβής ήταν η μελέτη αντιδράσεων και μηχανισμών ενζυμικής εστεροποίησης με υδρολάσες (KM-IFO-0288-A, CALB, LipA), που ως τελικό στόχο είχε την παραγωγή βιοκαυσίμου, μέσω αντιδράσεων εστεροποίησης λιπαρών οξέων προερχόμενων από οξυγένεση υπολειμμάτων βιομηχανιών ποτοποιίας (Μίγμα Α), με αιθανόλη και 1-βουτανόλη, σε υψηλές % αποδόσεις και συγκεντρώσεις εστέρα ώστε μια τέτοια παραγωγή να καταστεί οικονομικά συμφέρουσα και βιώσιμη με απώτερο σκοπό την σταδιακή απεξάρτηση από τα ορυκτά καύσιμα. Για την επίτευξη των παραπάνω σκοπών και στόχων χρησιμοποιήθηκαν δόκιμες κινητικές μεθοδολογίες, όπως η καταμέτρηση πρωτονίων (P.I.), ο υπολογισμός του ισοτοπικού φαινομένου διαλύτη (S.I.E.) και του κινητικού ισοτοπικού φαινομένου (K.I.E.), η μεθοδολογία των αποκριτικών επιφανειών (RSM), καθώς και η ανάλυση πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA).

Έτσι, για την πρωτεάση KM-IFO-0288-A, πραγματοποιήθηκε ένας πλήρης χαρακτηρισμός βασισμένος σε μία νέα αλληλουχία πειραμάτων (διαγράμματα τιμών P.I., pH και απόλυτης θερμοκρασίας σε συστήματα αυξανόμενης ιονικής ισχύος, καθώς και P.I. σε ένα ικανό εύρος τιμών pH, όπου αυτή η υδρολάση ήταν δραστική) με σκοπό την περεταίρω διερεύνηση του μηχανισμού της αλλά και της καταλληλότητάς της για χρήση σε μη συμβατικά μέσα αντίδρασης. Ακολούθησε ακινητοποίηση της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A, καθώς και αντιδράσεις εστεροποίησης με Μίγμα Α και αιθανόλη, σε σύστημα χωρίς διαλύτη (άνυδρες συνθήκες), για παραγωγή βιοκαυσίμου, καταλυόμενες από την πρωτεάση KM-IFO-0288-A.

Στην συνέχεια με χρήση των ενζύμων ακινητοποιημένη λιπάση Β από *Candida antarctica* (CALB) και ακινητοποιημένη λιπάση Α από *B. subtilis* (LipA) πραγματοποιήθηκε μια σειρά εστεροποιήσεων του Μίγματος Α με αιθανόλη και 1-βουτανόλη, σε διαλύτη άνυδρο κ-εξάνιο. Σε αυτές τις εστεροποιήσεις εφαρμόστηκαν: (α) η μεθοδολογία των αποκριτικών επιφανειών, για την βελτιστοποίηση των αποκρίσεων σε % απόδοση και ολική συγκέντρωση εστέρα στο μίγμα της αντίδρασης εστεροποίησης και (β) ολική λύση κάθε εφαρμοσθέντος πειραματικού σχεδιασμού μέσω της ανάλυσης πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA). Ακολούθησε κινητική μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης εστεροποίησης βουτυρικού οξέος με αιθανόλη και δευτεριωμένη αιθανόλη με CALB, σε διαλύτη άνυδρο κ-εξάνιο, καθώς και υπολογισμός του K.I.E. της κάθε παραμέτρου.

Ως συμπεράσματα, από τις προηγούμενες πειραματικές διαδικασίες, προέκυψε αρχικά η ανάπτυξη μίας νέας μεθοδολογίας που επιτρέπει την διερεύνηση των μηχανισμών δράσης και της δυναμικής συμπεριφοράς ενζύμων. Συγκεκριμένα, προσδιορίστηκε ότι: (α) οι ισοτοπικοί παράγοντες κλασμάτωσης ϕ^T αναφέρονται στα μεταφερόμενα πρωτόνια των καταλυτικών καταλοίπων, (β) η pH-εξαρτώμενη μετατροπή των δεσμών υδρογόνου, στους οποίους αναφέρεται ο ϕ^T , σε LBHB (δεσμοί υδρογόνου χαμηλού φράγματος), έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της πυρηνοφιλίας της καταλυτικής S (γ) η μετατροπή περιοχών της πρωτεΐδας σε περιοχές αυξημένης ευπλασίας (IDPRs), που εξαρτώνται τόσο από την τιμή pH όσο και από την ιονική ισχύ του μίγματος της αντίδρασης.

Στην συνέχεια αναπτύχθηκε μια ολοκληρωμένη και οικονομικά αποδοτική διεργασία μέσω της οποίας σε αντιδραστήρα μεμβράνης υπερεξάτμισης (διερευνήθηκε η ευεργετική συμβολή της απομάκρυνσης του παραγόμενου H_2O από το μίγμα της αντίδρασης) πραγματοποιήθηκε παραγωγή βιοκαυσίμου νέας γενιάς η οποία έφθασε σε απόδοση 97.4 % σε 16 ώρες και σε συγκέντρωση εστέρα 3.35 M, γεγονός που συνιστά αύξηση περίπου 500 % σε σχέση με προηγούμενες αναφορές.

Ένα ακόμη σημαντικό συμπέρασμα προέκυψε από την προσαρμογή των κινητικών δεδομένων (για πρώτη φορά σε μελέτες ενζυμικής κινητικής) με εξισώσεις επιφάνειας, όπου προσδιορίστηκαν πιο αξιόπιστα οι παράμετροι του ισχύοντος μηχανισμού εστεροποίησης, ανεξάρτητα από τις συγκεντρώσεις των χρησιμοποιούμενων υποστρωμάτων. Έτσι, καθώς και με την εφαρμογή της τεχνικής του K.I.E. αποδείχτηκε ότι ακολουθείται κινητική συστήματος τύπου ring-pong bi-bi με αναστολή και από τα δύο υποστρώματα.

Λέξεις-κλειδιά

Βιοκαύσιμα, Υδρολάσες, Βελτιστοποίηση διαδικασιών, KM-IFO-0288-A, CALB, LipA, Ενζυμικά καταλυόμενη εστεροποίηση, Μηχανισμός δράσης.

Abstract

Biofuels are the most favorable alternative source of fuels. Thus, the aim of this thesis was to study the reactions and mechanisms of enzymatic esterification by hydrolases (KM-IFO-0288-A, CALB, LipA), targeting to the production of biofuel through esterification reactions of fatty acids derived from the oxygenation of residues from the beverage industries (Mixture A) with ethanol and 1-butanol at high yields and ester concentrations so that to make this production economically viable and sustainable with the ultimate goal of gradual self-sufficiency from fossil fuels. In order to achieve the above objectives, protocols of kinetic methodologies were employed, such as proton inventories (P.I.), calculation of the solvent isotope effect (S.I.E.) and kinetic isotope effect (K.I.E.), response surface methodology (RSM), and multi criteria decision analysis (MCDA).

Consequently, for the KM-IFO-0288-A protease a full characterization was performed based on a new experimental sequence (P.I., pH and absolute temperature profiles in systems of increasing ionic strength, as well as P.I. in a broad pH range where the used hydrolase was active) in order to further investigate its mechanism and appropriateness for use in non-conventional reaction media. Then, immobilization of the KM-IFO-0288-A protease was achieved, followed by esterification reactions with Mixture A and ethanol, in anhydrous solvent-free reaction environment targeting to biofuel production catalyzed by KM-IFO-0288-A protease.

Subsequently and by using the enzymes, immobilized lipase B, from *Candida antarctica* (CALB), and immobilized lipase A, from *B. subtilis* (LipA), a series of esterifications of Mixture A were performed with ethanol and 1-butanol, in anhydrous *n*-hexane as solvent. Throughout these esterification reactions the following were applied: (a) the methodology of response surfaces to optimize the responses in % yield and the total ester concentration, in the esterification reaction mixture, and (b) the total solution of each operated experimental design by the multiple criteria decision analysis (MCDA). It followed a kinetic study of the enzymatic reaction of esterification of butyric acid with ethanol and deuterated ethanol with CALB, in anhydrous *n*-hexane solvent, as well as the estimation of K.I.E.

As conclusions emerged, from the previous experimental processes, firstly the development of a new methodology that allows the investigation of the mechanisms of action and the dynamic behavior of enzymes. In particular, it was found that: (a) the isotopic fractionation factors ϕ^T are referred to the transferred protons from the catalytic residues, (b) a pH-dependent conversion of the referred ϕ^T hydrogen bonds to LBHB (low barrier

hydrogen bonds) results an increase of nucleophilicity of catalytic S, and (c) conversion of some areas of protease's structure in areas of increased flexibility facilitating catalysis and depending on both the pH value and the ionic strength of the reaction mixture.

Thereafter, an integrated and cost-effective process was developed by which a pervaporation membrane reactor (it was investigated the beneficial contribution of the removal of the produced H₂O from the reaction mixture) produced a new generation biofuel which reached a yield of 97.4% in 16 hours and at ester concentration of 3.35 M, representing an increase of about 500% relative to previous reports.

Another important conclusion was the best fitting of the kinetic data (firstly in enzyme kinetic studies) by surface equations, where the parameters of the existing esterification mechanism were determined more reliably, irrespectively of the concentrations of the used substrates. Thus, as well as by the application of the technique of K.I.E., it has been shown that ping-pong bi-bi type kinetics are followed during the abovementioned esterification reactions, which are inhibited by both substrates.

Keywords

Biofuel; Hydrolases; Process optimization; KM-IFO-0288-A; CALB; LipA; Enzyme-catalyzed esterification; Mechanism of action

Σκοπός της διατριβής

Ο γενικός σκοπός της παρούσης διατριβής ήταν η μελέτη αντιδράσεων και μηχανισμών εστεροποίησης με υδρολάσες (KM-IFO-0288-A, CALB, LipA), με τελικό στόχο την παραγωγή βιοκαυσίμου σε υψηλές % αποδόσεις και συγκεντρώσεις εστέρα, στο μίγμα της αντίδρασης, ώστε μια τέτοια παραγωγή να καταστεί οικονομικά συμφέρουσα και βιώσιμη.

Ο γενικός σκοπός της παρούσης διατριβής μπορεί να διαιρεθεί σε τρεις επιμέρους:

- Στην ανάπτυξη μίας νέας μεθοδολογίας που επιτρέπει και την διερεύνηση των μηχανισμών δράσης, αλλά και της δυναμικής συμπεριφοράς των ενζύμων, η οποία κρίνεται απαραίτητη σε αντιδράσεις που πραγματοποιούνται σε μη συμβατικά μέσα.
- Στην χρήση της μεθοδολογίας των αποκριτικών επιφανειών και ανάλυσης πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA), για την βελτιστοποίηση της αντίδρασης εστεροποίησης λιπαρών οξέων προερχόμενων από οξυγένεση υπολειμμάτων βιομηχανιών ποτοποιίας (υγρή βινάσσα), είτε με αιθανόλη είτε και με 1-βουτανόλη και με καταλύτη ένα από τα ακινητοποιημένα ένζυμα KM-IFO-0288-A, CALB και LipA.
- Στην διερεύνηση του μηχανισμού δράσης των αντιδράσεων εστεροποίησης και στον αξιόπιστο προσδιορισμό των παραμέτρων τους ανεξάρτητα από τις συγκεντρώσεις των χρησιμοποιούμενων υποστρωμάτων.

Τόσο ο γενικός σκοπός, όσο και οι τρεις επιμέρους σκοποί, επιτεύχθηκαν με την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας.

Συντμήσεις και συμβολισμοί

Οι συντμήσεις οι οποίες χρησιμοποιούνται στην παρούσα Διατριβή έχουν προταθεί από την Επιτροπή Βιοχημικής Ονοματολογίας της Διεθνούς Ένωσης Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC) και της Διεθνούς Ένωσης Βιοχημείας (IUD).

Όλα τα αμινοξέα αναφέρονται με τον κανόνα του ενός γράμματος

Nu: Πυρηνόφιλο κατάλοιπο

Sm: Μικρά κατάλοιπα

CALB: Ακίνητοποιημένη λιπάση B από *Candida antarctica*

LipA: Ακίνητοποιημένη λιπάση-A από *Bacillus subtilis*

KM-IFO-0288-A: Σερίνοπρωτεΐνάση από τον μικροοργανισμό *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288

logP: Μέτρο της υδροφοβικότητας των διαλυτών, P είναι ο συντελεστής κατανομής μιας ένωσης μεταξύ οκτανόλης και H₂O

P.I.: Τεχνική καταμέτρησης πρωτονίων

n: Ατομικό κλάσμα δευτερίου

v: Αριθμός των πρωτονίων που ανταλλάσσονται κατά την διάρκεια της ενζυμικής αντίδρασης

LBHB: Δεσμός υδρογόνου χαμηλού φράγματος (Low Barrier Hydrogen Bond)

Z: Σύνθετος παράγοντας κλασμάτωσης - αναδιοργάνωσης του διαλύτη

K.I.E.: Κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο

M.M.I.: Ροπή αδράνειας της μάζας

EXC: Ισοτοπικές μεταβολές σε διεγερμένα δονητικά επίπεδα

ZPE: Δονητικές ενέργειες θεμελιώδους κατάστασης

R: Σταθερά των αερίων

T: Απόλυτη θερμοκρασία

G.S.: Θεμελιώδης κατάσταση

T.S.: Μεταβατική κατάσταση

E.I.E.: Ισοτοπικό φαινόμενο ισορροπίας

A.I.C.: Κριτήριο πληροφόρησης κατά Akaike

RSM: Μεθοδολογία των αποκριτικών επιφανειών

IDPRs: Περιοχές αυξημένης ευπλασίας (intrinsically disordered protein regions)

MCDA: Ανάλυση πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων

GBK: Εξίσωση Gross-Butler-Kresge

kDa: kilodaltons

pNA: p-νιτροανιλίνη

Suc-: Ηλεκτρολυομάδα {HOOCCH₂CH₂CO-}

Ι.Φ.Δ.: Ισοτοπικό Φαινόμενο Διαλύτη

φ: Ισοτοπικός παράγοντας κλασμάτωσης

I/I: Ιονική ισχύ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Πρόλογος	ix
Περίληψη	x
Λέξεις-κλειδιά	xi
Abstract	xii
Keywords	xiii
Σκοπός της διατριβής	xiv
Συντμήσεις και συμβολισμοί	xv
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	xvii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	xxiv
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ	xxvi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ	xxviii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ	xxxii
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΞΙΣΩΣΕΩΝ	xxxviii
I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
I.1. Πρωτεολυτικά ένζυμα	2
I.1.1. Κατάταξη, ονοματολογία και οικογένειες πρωτεασών	2
I.1.2. Σερινοπρωτεΐνάσες	3
I.1.2.1. Εισαγωγή	3
I.1.2.2. Γενικά αποδεκτός μηχανισμός δράσης των Σερινοπρωτεΐνασών	5
I.1.2.3. Η Σερινοπρωτεΐνάση KM-IFO-0288-A	8
I.2. Λιπάσες	9
I.2.1. Εισαγωγή	9
I.2.2. Κατάταξη, ονοματολογία και οικογένειες λιπασών	9
I.2.3. Βιομηχανικές εφαρμογές λιπασών	10
I.2.4. Γενικά χαρακτηριστικά λιπασών	11
I.2.5. Δομικά χαρακτηριστικά λιπασών	12
I.2.5.1. Ενεργός περιοχή	12
I.2.5.2. Διεπιφανειακή ενεργοποίηση	13
I.2.6. Η λιπάση B από το μικροοργανισμό <i>Candida antarctica</i>	14
I.2.7. Η λιπάση A από το μικροοργανισμό <i>Bacillus subtilis</i>	17
I.3. Δράση ενζύμων σε οργανικούς διαλύτες	19
I.4. Η τιμή pH στους οργανικούς διαλύτες	23

I.5. Μέθοδοι απομάκρυνσης H_2O από το μίγμα αντίδρασης	24
I.5.1. Μοριακά κόσκινα (Molecular sieves)	24
I.5.2. Υπερεξάτμιση (Pervaporation)	24
I.6. Βιοκαύσιμα	27
I.6.1. Εισαγωγή	27
I.6.2. Βιοκαύσιμα ως απάντηση στα συμβατικά καύσιμα	27
I.6.3. Κατάταξη Βιοκαυσίμων	29
I.6.3.1. Πρώτης γενιάς υγρά βιοκαύσιμα	29
I.6.3.2. Δεύτερης γενιάς υγρά βιοκαύσιμα	29
I.6.3.3. Τρίτης γενιάς υγρά βιοκαύσιμα	30
I.6.3.4. Τέταρτης γενιάς υγρά βιοκαύσιμα	30
I.7. Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων	31
I.7.1. Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων με ένα υπόστρωμα	31
I.7.1.1. Η σημασία των παραμέτρων Michaelis-Menten	33
I.7.1.1.1. Η έννοια της k_{cat} . Η καταλυτική σταθερά.	33
I.7.1.1.2. Η έννοια της K_m . Πραγματικές και φαινόμενες σταθερές ισορροπίας	33
I.7.1.1.3. Η έννοια της παραμέτρου k_{cat}/K_m . Η σταθερά εξειδίκευσης	35
I.7.1.2. Μεταβολή των κινητικών παραμέτρων με την τιμή pH του μέσου της αντίδρασης	35
I.7.1.2.1. Εξάρτηση των παραμέτρων Michaelis-Menten από την τιμή pH του μέσου της αντίδρασης	36
I.7.1.3. Εξάρτηση των παραμέτρων Michaelis-Menten από την απόλυτη θερμοκρασία του μέσου της αντίδρασης: εφαρμογή των εξισώσεων Arrhenius και Eyring	42
I.7.2. Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων με δύο υποστρώματα	45
I.7.2.1. Κινητική στάσιμης κατάστασης (αντιδράσεις με δύο υποστρώματα): μέθοδος King -Altman	45
I.7.2.2. Σύστημα τύπου διαταγμένο bi-bi	49
I.7.2.3. Σύστημα τύπου ping-pong bi-bi	49
I.7.2.4. Αναστολή υποστρώματος	50
I.7.2.4.1. Αναστολή υποστρώματος αντιδράσεων σε σύστημα τύπου διαταγμένο bi-bi	50

I.7.2.4.2. Αναστολή υποστρώματος αντιδράσεων σε σύστημα τύπου ping-pong bi-bi	51
I.8 Ισοτοπικό φαινόμενο διαλύτη και η μεθοδολογία καταμέτρησης πρωτονίων	52
I.8.1. Προέλευση του ισοτοπικού φαινομένου διαλύτη	54
I.8.2. Μίγματα H ₂ O/D ₂ O	55
I.8.3. Ισοτοπικοί παράγοντες κλασμάτωσης	56
I.8.4. Αποκλίσεις της τιμής pH από την ισοτοπική σύσταση του διαλύματος	60
I.8.5. Περιορισμοί της τεχνικής καταμέτρησης πρωτονίων	61
I.9 Κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο (K.I.E.)	62
I.9.1. Εισαγωγή	62
I.9.2. Είδη ισοτοπικών φαινομένων	64
I.9.3. Εσωτερικό K.I.E.	65
I.9.4. Σχεδιάζοντας πειράματα K.I.E.: ανταγωνιστική και μη-ανταγωνιστική μέθοδος	66
I.9.5. Κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο σε συστήματα τύπου ping-pong bi-bi	67
I.10. Προσαρμογή πειραματικών δεδομένων ενζυμικής κινητικής με μη γραμμικές εξισώσεις	68
I.10.1. Κριτήρια επιλογής πολυπαραμετρικών μη γραμμικών εξισώσεων για βέλτιστη προσαρμογή πειραματικών δεδομένων	68
I.11. Η μεθοδολογία των αποκριτικών επιφανειών (RSM) ως εργαλείο βελτιστοποίησης στην χημεία	70
I.11.1. Εισαγωγή	70
I.11.2. Χρήσιμοι ορισμοί	71
I.11.3. Έννοιες και πρακτικά βήματα για την εφαρμογή της μεθοδολογίας RSM	72
I.11.3.1. Βασικές αρχές πειραματισμού	74
I.11.3.2. Επιλογή των μεταβλητών	75
I.11.3.3. Επιλογή του πειραματικού σχεδιασμού	75
I.11.3.4. Αξιολόγηση του προσαρμοζόμενου μοντέλου	76
I.11.4. Συμμετρικοί πειραματικοί σχεδιασμοί δευτέρας τάξης	78
I.11.4.1. Πλήρεις παραγοντικοί σχεδιασμοί τριών επιπέδων	78
I.11.4.2. Σχεδιασμοί Box–Behnken	78
I.11.4.3. Σύνθετοι κεντρικοί σχεδιασμοί	79

I.11.5.	Βελτιστοποίηση πολλαπλών αποκρίσεων χρησιμοποιώντας την μεθοδολογία των αποκριτικών επιφανειών	80
I.11.7.	Πειραματικά σφάλματα	82
I.11.7.1.	Συστηματικά σφάλματα (ϵ_{σ})	83
I.11.7.2.	Τυχαία σφάλματα (ϵ_{τ})	83
II.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	85
II.A.	Εισαγωγικά	86
II.A.1.	Υλικά	86
II.A.2.	Όργανα	86
II.A.3.	Προσδιορισμός των παραγόμενων εστέρων με αέρια χρωματογραφία	87
II.B.	Η πρωτεάση KM-IFO-0288-A	89
II.B.1.	Επίδραση [NaCl], μεταλλικών αλάτων και οργανικών διαλυτών στις τιμές των παραμέτρων k_{cat}/K_m , k_{cat} και K_m της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A - υπόστρωμα: Suc-(Ala) ₂ -Pro-Phe-pNA	89
II.B.2.	Μεταβολή των παραμέτρων k_{cat}/K_m , k_{cat} και $1/K_m$ της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A, ως συνάρτηση της τιμής pH του μέσου της αντίδρασης	89
II.B.2.1.	Μεταβολή των παραμέτρων k_{cat}/K_m , k_{cat} και $1/K_m$ της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A, σε δύο θερμοκρασίες ως συνάρτηση της τιμής pH του μέσου της αντίδρασης	91
II.B.2.2.	Μεταβολή των παραμέτρων k_{cat}/K_m , k_{cat} και $1/K_m$ της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A, ως συνάρτηση της τιμής pH του μέσου της αντίδρασης σε διάλυμα ιονικής ισχύος 1.5 M	92
II.B.3.	Εξάρτηση των παραμέτρων k_{cat}/K_m και k_{cat} της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A, ως συνάρτηση της απόλυτης θερμοκρασίας και της ιονικής ισχύος του μέσου της αντίδρασης	93
II.B.4.	Μεταβολή των παραμέτρων k_{cat}/K_m και k_{cat} της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A, ως συνάρτηση της ισοτοπικής σύστασης n και της ιονικής ισχύος του μέσου της αντίδρασης	93
II.B.5.	Προσδιορισμός των παραμέτρων k_{cat}/K_m και k_{cat} σε ρυθμιστικά διαλύματα διαφορετικής ισοτοπικής σύστασης n και τιμής pH	95
II.B.6.	Ακινητοποίηση της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A σε κρυστάλλους χλωριούχου νατρίου	96

II.B.7.	Εστεροποίηση του μίγματος Α με αιθανόλη και με καταλύτη την ακινητοποιημένη σε κρυστάλλους χλωριούχου νατρίου πρωτεάση KM-IFO-0288-A	97
II.Γ.	Μελέτη αντιδράσεων εστεροποίησης με ακινητοποιημένες λιπάσες: Λιπάση Β από <i>Candida antarctica</i> (CALB) και λιπάση Α από <i>Bacillus subtilis</i> (LipA)	98
II.Γ.1	Πειραματικοί σχεδιασμοί για τη παραγωγή βιοκαυσίμων	98
II.Γ.1.1.	Πειραματικός σχεδιασμός με την λιπάση CALB	100
II.Γ.1.1.1.	Κύκλοι ενζύμου και πρωτόκολλο ανακύκλωσης της ακινητοποιημένης CALB	109
II.Γ.1.1.2.	Εναλλακτικός τρόπος απομάκρυνσης του παραγόμενου H ₂ O	109
II.Γ.1.2.	Πειραματικός σχεδιασμός με την λιπάση LipA	110
II.Γ.2.	Κινητική μελέτη της αντίδρασης εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με αιθανόλη, με καταλύτη την CALB	114
II.Γ.2.1.	Προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων της αντίδρασης εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο, με καταλύτη την CALB	114
II.Γ.2.2.	Προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων της αντίδρασης εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με δευτεριωμένη αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο, με καταλύτη την CALB	115
III	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	117
III.B	Με την Πρωτεάση KM-IFO-0288-A	118
III.B.1.	Επίδραση της [NaCl] επί των παραμέτρων Michaelis-Menten της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A	118
III.B.1.1.	Επίδραση των μεταλλικών κατιόντων επί των παραμέτρων Michaelis-Menten της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A	119
III.B.1.2.	Επίδραση των επιφανειακά ενεργών χημικών ενώσεων και οργανικών διαλυτών στην δραστηριότητα της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A	120
III.B.2.	Μεταβολή των παραμέτρων k_{cat}/K_m , k_{cat} και $1/K_m$ της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A, σε δύο θερμοκρασίες, ως συνάρτηση της τιμής pH του μέσου της αντίδρασης	121
III.B.2.1.	Μεταβολή των παραμέτρων k_{cat}/K_m , k_{cat} και $1/K_m$ της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A, ως συνάρτηση της τιμής pH του μέσου της αντίδρασης και προσδιορισμός των αντίστοιχων pK_a σε διάλυμα ιονικής ισχύος 1.5 M και θερμοκρασίας $\theta = 35^\circ\text{C}$	128

III.B.3. Μεταβολή των παραμέτρων k_{cat}/K_m και k_{cat} της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A, ως συνάρτηση της απόλυτης θερμοκρασίας και της ιονικής ισχύος του μέσου της αντίδρασης_____	132
III.B.4. Μεταβολή των παραμέτρων k_{cat}/K_m και k_{cat} της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A, ως συνάρτηση της ισοτοπικής σύστασης n και της ιονικής ισχύος του μέσου της αντίδρασης_____	135
III.B.5. Προσδιορισμός των παραμέτρων k_{cat}/K_m και k_{cat} σε ρυθμιστικά διαλύματα διαφορετικής ισοτοπικής σύστασης n και τιμής pH _____	141
III.B.6. Εστεροποίηση του Μίγματος Α με αιθανόλη και με καταλύτη την ακινητοποιημένη σε κρυστάλλους χλωριούχου νατρίου πρωτεάση KM-IFO-0288-A_____	153
III.Γ. Αποτελέσματα εστεροποιήσεων με τις λιπάσες: CALB και LipA_____	154
III.Γ.1. Πειραματικός σχεδιασμός με την λιπάση CALB _____	154
III.Γ.1.1 Εστεροποιήσεις για την παραγωγή βιοκαυσίμου νέας γενιάς _____	173
III.Γ.1.2. Σύγκριση σύνθεσης αιθύλεστερα έναντι βουτύλεστερα _____	173
III.Γ.1.3. Κύκλοι επαναχρησιμοποίησης της CALB και η σημασία του παραγόμενου H_2O _____	175
III.Γ.1.4. Απομάκρυνση του παραγόμενου H_2O σε αντιδράσεις εστεροποίησης, με μεμβράνη υπερεξάτμισης_____	176
III.Γ.2. Πειραματικός σχεδιασμός με την λιπάση LipA _____	178
III.Γ.2.1. Εστεροποιήσεις για την παραγωγή βιοκαυσίμου νέας γενιάς _____	186
III.Γ.3. Κινητική αντιδράσεων εστεροποίησης με δύο υποστρώματα_____	188
III.Γ.3.1. Πορεία της αντίδρασης και το K.I.E. σε σύστημα τύπου ping-pong bi-bi με αναστολή δύο υποστρωμάτων_____	188
III.Γ.3.2. Πορεία της αντίδρασης και το K.I.E. σε σύστημα διατεταγμένο bi-bi με αναστολή δύο υποστρωμάτων _____	190
III.Γ.3.3. Προσδιορισμός των παραμέτρων της αντίδρασης εστεροποίησης βουτυρικού οξέος με αιθανόλη, σε διαλύτη κ-εξάνιο και με καταλύτη την CALB, με προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων σε εξίσωση επιφάνειας (surface fitting) _____	192
III.Γ.3.4. Το πρωτοταγές κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο των παραμέτρων της αντίδρασης εστεροποίησης βουτυρικού οξέος με αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο και με καταλύτη την CALB_____	197
IV ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ _____	200

<i>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ</i>	206
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	2211

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1:	Η τριτοταγής δομή της Χυμοθρυψίνης με τα καταλυτικά κατάλοιπά της	4
Εικόνα 2:	Απεικόνιση της δομής του συμπλόκου παγκρεατική Ελαστάση με τον αναστολέα $\text{CF}_3\text{C}(\text{O})\text{-VA-NHPh-p-CF}_3$	5
Εικόνα 3:	Πιθανοί τρόποι κατάλυσης των λιπασών	11
Εικόνα 4:	Απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής της CALB	14
Εικόνα 5:	Εστιασμένη απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής της CALB όπου με κόκκινο χρώμα φαίνεται η καταλυτική τριάδα, ενώ με ανοικτό πράσινο φαίνεται το συντηρημένο πενταπεπτίδιο (TWSQG)	15
Εικόνα 6:	Η μικρή α_5 -έλικα που φαίνεται με πράσινο χρώμα (κατάλοιπα 142-146) και η μεγάλη α_{10} -έλικα που φαίνεται με μπλε χρώμα (κατάλοιπα 268-287) για την λιπάση CALB. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται τα τέσσερα υδρόφοβα κατάλοιπα (I^{189} , L^{287} , A^{282} και I^{285}) που οριοθετούν την θέση πρόσδεσης της αλκοόλης, ενώ με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται η καταλυτική τριάδα.	16
Εικόνα 7:	Απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής της LipA, με κόκκινο χρώμα, όπου φαίνεται η καταλυτική της τριάδα που αποτελείται από τα κατάλοιπα D^{133} , H^{156} , S^{77}	18
Εικόνα 8:	Μόρια H_2O στην επιφάνια της CALB, (Α) σε διαλύτη H_2O και (Β) σε διαλύτη κυκλοεξάνιο.	20
Εικόνα 9:	Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας της μεμβράνης υπερεξάτμισης	25
Εικόνα 10:	Σχηματική αναπαράσταση της υπερεξάτμισης με την χρήση (Α) αντλίας κενού και (Β) αέριου υπό υψηλή πίεση	26
Εικόνα 11:	Ταξινόμηση των εξισώσεων κατανομής των ενζυμικών μορφών	48
Εικόνα 12:	Μορφοποίηση των εκφράσεων με την βοήθεια συντελεστών	48
Εικόνα 13:	Κατανομή υδρογόνου μεταξύ δότη και δέκτη	57
Εικόνα 14:	Τυπικά στάδια κατά την εφαρμογή της RSM	72
Εικόνα 15:	Εισροές και εκροές σε μία διεργασία	73
Εικόνα 16:	Σχεδιασμοί τριών επιπέδων για την βελτιστοποίηση (α) δύο και (β, γ) τριών παραγόντων, αντίστοιχα	78
Εικόνα 17:	Κεντρικοί σύνθετοι σχεδιασμοί για την βελτιστοποίηση (α) δύο μεταβλητών ($\alpha = 1.41$) και (β) τριών μεταβλητών ($\alpha = 1.68$)	80
Εικόνα 18:	Χρωματογράφημα GC-FID για την εστεροποίηση του Μίγματος Α με αιθανόλη.	88

Εικόνα 19:	Γενική γραφική αναπαράσταση των αντιδραστήρων που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή της νέας γενιάς βιοκαυσίμου. Όλα τα περιφερειακά μέρη του αντιδραστήρα περιγράφονται στο κείμενο _____	100
Εικόνα 20:	Θερμοστατούμενος αντιδραστήρας μεμβράνης υπερεξάτμισης (ACE) ____	110
Εικόνα 21:	Δυσδιάστατο πλέγμα διασταυρούμενων σημείων x_i, y_j (με $i, j = \{0.1 - 2.5\}$ M), κάθε σημείο αποτελεί και ένα πείραμα _____	114
Εικόνα 22:	Καταλυτική τριάδα στην μεταβατική κατάσταση _____	151

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1:	Υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού _____	2
Σχήμα 2:	Το γενικό σχήμα δράσης των τριών σταδίων, για σερινοπρωτεΐνάσες _____	5
Σχήμα 3:	Ακυλίωση σερινοπρωτεΐνασών: (α) Μεταφορά δύο πρωτονίων (σύστημα συμπλόκου μεταφοράς φορτίου) και (β) Μεταφορά ενός πρωτονίου (κατάλυση γενικού οξέος-γενικής βάσης) _____	7
Σχήμα 4:	Συνολική πορεία δράσης της σερινοπρωτεάσης KM-IFO-0288-A. _____	8
Σχήμα 5:	Γενικό σχήμα δράσης των σερινοπρωτεΐνασών. _____	32
Σχήμα 6:	Η K_m μπορεί να είναι ίση ή διαφορετική από την K_s . _____	34
Σχήμα 7:	Δραστικές υδρογονικές καταστάσεις του ενζύμου _____	37
Σχήμα 8:	Ο ελάχιστος μηχανισμός δράσης, των τριών σταδίων _____	43
Σχήμα 9:	Σύστημα τύπου διαταγμένο bi-bi για ενζυμικές αντιδράσεις με δύο υποστρώματα _____	46
Σχήμα 10:	Κύριο μοτίβο της μεθοδολογίας King-Altman για ένα σύστημα τύπου διαταγμένο bi-bi _____	47
Σχήμα 11:	Επιμέρους μοτίβα της μεθοδολογίας King-Altman για ένα σύστημα τύπου διαταγμένο bi-bi _____	47
Σχήμα 12:	Σύστημα τύπου διαταγμένο bi-bi για ενζυμικές αντιδράσεις με δύο υποστρώματα _____	49
Σχήμα 13:	Σύστημα τύπου ping-pong bi-bi για ενζυμικές αντιδράσεις με δύο υποστρώματα _____	50
Σχήμα 14:	Σύστημα τύπου διαταγμένο bi-bi με αναστολή υποστρώματος _____	51
Σχήμα 15:	Σύστημα τύπου ping-pong bi-bi με αναστολή υποστρώματος _____	51
Σχήμα 16:	Η ισορροπία σε μίγματα H_2O/D_2O _____	57
Σχήμα 17:	Απλούστερο μοντέλο ενζυμικής αντίδρασης _____	66
Σχήμα 18:	Απλούστερο μοντέλο ενζυμικής αντίδρασης για το σύστημα τύπου ping-pong bi-bi _____	67
Σχήμα 19:	Πορεία προς την δημιουργία του ακυλενζύμου _____	139
Σχήμα 20:	Πορεία από το ακυλένζυμο προς τον σχηματισμό ελεύθερου ενζύμου (E) _____	140
Σχήμα 21:	Πορεία αντίδρασης για σύστημα τύπου ping-pong bi-bi με αναστολή και από τα δύο υποστρώματα _____	188
Σχήμα 22:	Σύστημα τύπου διαταγμένο bi-bi με αναστολή και από τα δύο υποστρώματα _____	190

Σχήμα 23: Σύνδεση των k_{cat}/K_{mS1} και k_{cat}/K_{mS2} με συγκριμένο τμήμα της αντίδρασης για την πορεία του συστήματος τύπου ping-pong bi-bi με αναστολή και από τα δύο υποστρώματα _____199

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Σχέσεις σταθερών ταχύτητας για κάθε επιμέρους μοτίβο και για κάθε ενζυμική μορφή _____	47
Πίνακας 2: Εξαγωγή αποτελεσμάτων ανάλυσης διασποράς σε πίνακα ANOVA _____	77
Πίνακας 3: θερμοκρασιακό προφίλ μετρήσεων GC _____	87
Πίνακας 4: Εστεροποίηση μέσω της CALB του Μίγματος Α, με αιθανόλη _____	103
Πίνακας 5: Εστεροποίηση μέσω της CALB του Μίγματος Α, με 1-βουτανόλη _____	106
Πίνακας 6: Εστεροποίηση μέσω της LipA του Μίγματος Α, με αιθανόλη _____	112
Πίνακας 7: Εστεροποίηση μέσω της LipA του Μίγματος Α, με 1-βουτανόλη _____	113
Πίνακας 8: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων (pH, k_{cat}/K_m) από την Εξίσωση 13, της ενζυμικής αντίδρασης της KM-IFO-0288-A με το συνθετικό πεπτιδικό υπόστρωμα Suc-(Ala) ₂ -Pro-Phe-pNA στους $\theta = 25^\circ\text{C}$. _____	121
Πίνακας 9: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων (pH, k_{cat}) από την Εξίσωση 10, της ενζυμικής αντίδρασης της KM-IFO-0288-A με το συνθετικό πεπτιδικό υπόστρωμα Suc-(Ala) ₂ -Pro-Phe-pNA στους $\theta = 25^\circ\text{C}$. _____	122
Πίνακας 10: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων (pH, $1/K_m$) από την Εξίσωση 13, της ενζυμικής αντίδρασης της KM-IFO-0288-A με το συνθετικό πεπτιδικό υπόστρωμα Suc-(Ala) ₂ -Pro-Phe-pNA στους $\theta = 25^\circ\text{C}$. _____	123
Πίνακας 11: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων (pH, k_{cat}/K_m) από την Εξίσωση 13, της ενζυμικής αντίδρασης της KM-IFO-0288-A με το συνθετικό πεπτιδικό υπόστρωμα Suc-(Ala) ₂ -Pro-Phe-pNA στους $\theta = 35^\circ\text{C}$. _____	124
Πίνακας 12: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων (pH, k_{cat}) από την Εξίσωση 13, της ενζυμικής αντίδρασης της KM-IFO-0288-A με το συνθετικό πεπτιδικό υπόστρωμα Suc-(Ala) ₂ -Pro-Phe-pNA στους $\theta = 35^\circ\text{C}$. _____	125
Πίνακας 13: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων (pH, $1/K_m$) από την Εξίσωση 13, της ενζυμικής αντίδρασης της KM-IFO-0288-A με το συνθετικό πεπτιδικό υπόστρωμα Suc-(Ala) ₂ -Pro-Phe-pNA στους $\theta = 35^\circ\text{C}$. _____	126

- Πίνακας 14: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων (pH , $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$) από την Εξίσωση 13, της ενζυμικής αντίδρασης της KM-IFO-0288-A με το συνθετικό πεπτιδικό υπόστρωμα $\text{Suc}-(\text{Ala})_2\text{-Pro-Phe-pNA}$ στους $\theta = 35^\circ\text{C}$ και $I/I = 1.5 \text{ M}$. _____ 129
- Πίνακας 15: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων (pH , k_{cat}) από την Εξίσωση 10, της ενζυμικής αντίδρασης της KM-IFO-0288-A με το συνθετικό πεπτιδικό υπόστρωμα $\text{Suc}-(\text{Ala})_2\text{-Pro-Phe-pNA}$ στους $\theta = 35^\circ\text{C}$ και $I/I = 1.5 \text{ M}$. _____ 130
- Πίνακας 16: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων (pH , $1/K_{\text{m}}$) από την Εξίσωση 13, της ενζυμικής αντίδρασης της KM-IFO-0288-A με το συνθετικό πεπτιδικό υπόστρωμα $\text{Suc}-(\text{Ala})_2\text{-Pro-Phe-pNA}$ στους $\theta = 35^\circ\text{C}$ και $I/I = 1.5 \text{ M}$. _____ 131
- Πίνακας 17: Οι υπολογιζόμενες ενζυμικές παράμετροι, οι θερμοδυναμικές σταθερές τους και οι σταθερές ταχύτητας _____ 133
- Πίνακας 18: Αποτελέσματα προσαρμογής των βέλτιστων μοντέλων της εξίσωσης GBK στα πειραματικά δεδομένα $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}} = f(n)$, σε τέσσερις διαφορετικές τιμές ιονικής ισχύος για την υδρόλυση υποστρώματος $\text{Suc}-(\text{Ala})_2\text{-Pro-Phe-pNA}$, από την πρωτεΐνωση KM-IFO-0288-A. _____ 136
- Πίνακας 19: Αποτελέσματα προσαρμογής των βέλτιστων μοντέλων της εξίσωσης GBK στα πειραματικά δεδομένα $k_{\text{cat}} = f(n)$, σε τέσσερις διαφορετικές τιμές ιονικής ισχύος για την υδρόλυση του υποστρώματος $\text{Suc}-(\text{Ala})_2\text{-Pro-Phe-pNA}$, από την πρωτεΐνωση KM-IFO-0288-A. _____ 137
- Πίνακας 20: Αποτελέσματα προσαρμογής του βέλτιστου μοντέλου της εξίσωσης GBK στα πειραματικά δεδομένα $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}} = f(n)$, σε ένα εύρος τιμών pH από 6 έως 10.5, για την υδρόλυση του υποστρώματος $\text{Suc}-(\text{Ala})_2\text{-Pro-Phe-pNA}$, από την πρωτεΐνωση KM-IFO-0288-A. Ο αριθμός των πρωτονίων που μεταφέρονται στην T.S. ήταν σταθερός και ίσο με δύο ($\nu = 2$). _____ 142
- Πίνακας 21: Αποτελέσματα προσαρμογής του βέλτιστου μοντέλου της εξίσωσης GBK στα πειραματικά δεδομένα $k_{\text{cat}} = f(n)$, σε ένα εύρος τιμών pH από 6 έως 10.5, για την υδρόλυση του συνθετικού πεπτιδικού υποστρώματος $\text{Suc}-(\text{Ala})_2\text{-Pro-Phe-pNA}$, από την πρωτεΐνωση KM-IFO-0288-A. Ο αριθμός των πρωτονίων που μεταφέρονται στην T.S. ήταν σταθερός και ίσο με δύο ($\nu = 2$). _____ 146

Πίνακας 22: Πειραματικός σχεδιασμός (ANOVA των αποκριτών επιφανειών των απλοποιημένων μοντέλων δευτέρου βαθμού): Επιδράσεις και σημαντικότητα (significance) των παραμέτρων εστεροποίησης ^{α,β}	156
Πίνακας 23: Υπολογιζόμενες τιμές των συντελεστών παλινδρόμησης των εξεταζόμενων μοντέλων δευτέρου βαθμού ^α	157
Πίνακας 24: Βελτιστοποιημένοι παράμετροι των αντιδράσεων εστεροποίησης όπως αυτοί προκύψαν από την ανάλυση πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA) ^α	158
Πίνακας 25: Πλήρης πίνακας ANOVA για την εστεροποίηση του μίγματος A με 1-βουτανόλη και καταλύτη την CALB με απομάκρυνση του παραγόμενου H ₂ O, για την απόκριση % απόδοση	159
Πίνακας 26: Πειραματικός σχεδιασμός (τμήμα ANOVA των αποκριτών επιφανειών των απλοποιημένων μοντέλων δευτέρου βαθμού): Επιδράσεις και σημαντικότητα (significance) των παραμέτρων εστεροποίησης ^{α,β}	180
Πίνακας 27: Υπολογιζόμενες τιμές των συντελεστών παλινδρόμησης των εξεταζόμενων μοντέλων δευτέρου βαθμού ^α	181
Πίνακας 28: Βελτιστοποιημένοι παράμετροι των αντιδράσεων εστεροποίησης όπως αυτοί προκύψαν από την ανάλυση πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA) ^α	181
Πίνακας 29: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων $z_m^H = f(x_i, y_j)$ από την Εξίσωση τύπου ring-pong bi-bi για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB.	192
Πίνακας 30: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων $z_m^H = f(x_i, y_j)$ από την Εξίσωση τύπου διατεταγμένου bi-bi για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB.	193
Πίνακας 31: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων $z_m^D = f(x_i, y_j)$ από την Εξίσωση τύπου ring-pong bi-bi για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με δευτεριομένη αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB.	194
Πίνακας 32: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων $z_m^D = f(x_i, y_j)$ από την Εξίσωση τύπου διατεταγμένου bi-bi για την αντίδραση	

εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με δευτεριομένη αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB. _____	195
Πίνακας 33: Πληροφοριακό κριτήριο κατά Akaike για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB _____	197
Πίνακας 34: Πληροφοριακό κριτήριο κατά Akaike για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με δευτεριομένη αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB _____	197
Πίνακας 35: Το Κ.Ι.Ε. για κάθε παράμετρο του συστήματος τύπου ring-pong bi-bi για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με απλή και δευτεριομένη αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB. _____	198

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

- Διάγραμμα 1: Ημικλασική περιγραφή του κινητικού ισοτοπικού φαινομένου για πρωτόνιο (H), δευτέριο (D) και τρίτιο (T). Η κύρια συνεισφορά στο K.I.E. προέρχεται από την διαφορά στην ενέργεια δονήσεως μηδενικής κατάστασης (ZPE) μεταξύ των αντιδρώντων στη βασική κατάσταση (r) και τη μεταβατική κατάσταση (T.S.) _____ 64
- Διάγραμμα 2: Εκτιμώμενα ποσοστά των εξαρτήσεων των παραμέτρων k_{cat}/K_m (συνεχής γραμμή, Δ), k_{cat} (διακεκομμένη γραμμή, ■) και K_m (ημι-διακεκομμένη γραμμή, ○), παρουσίας έναντι απουσίας NaCl, σε τιμή pH 7.75 και $\theta = 25^\circ\text{C}$ (υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A) _____ 118
- Διάγραμμα 3: Οι % τιμές των παραμέτρων k_{cat}/K_m , k_{cat} και K_m απουσίας έναντι παρουσίας, σε χαμηλές όσο και υψηλές συγκεντρώσεις των μεταλλικών Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} και Fe^{2+} (υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A) _____ 120
- Διάγραμμα 4: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $k_{cat}/K_m = f(\text{pH})$ για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A στους $\theta = 25^\circ\text{C}$. Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην προσαρμογή της Εξίσωσης 13 στα πειραματικά δεδομένα (pH, k_{cat}/K_m). _____ 122
- Διάγραμμα 5: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $k_{cat} = f(\text{pH})$ για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A στους $\theta = 25^\circ\text{C}$. Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην προσαρμογή της Εξίσωσης 10 στα πειραματικά δεδομένα (pH, k_{cat}). _____ 123
- Διάγραμμα 6: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $1/K_m = f(\text{pH})$ για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A στους $\theta = 25^\circ\text{C}$. Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην προσαρμογή της Εξίσωσης 13 στα πειραματικά δεδομένα (pH, $1/K_m$). _____ 124
- Διάγραμμα 7: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $k_{cat}/K_m = f(\text{pH})$ για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A στους $\theta = 35^\circ\text{C}$. Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί

- στην προσαρμογή της Εξίσωσης 13 στα πειραματικά δεδομένα (pH, k_{cat}/K_m). _____ 125
- Διάγραμμα 8: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $k_{cat} = f(pH)$ για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A στους $\theta = 35^\circ\text{C}$. Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην προσαρμογή της Εξίσωσης 13 στα πειραματικά δεδομένα (pH, k_{cat}). _____ 126
- Διάγραμμα 9: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $1/K_m = f(pH)$ για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A στους $\theta = 35^\circ\text{C}$. Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην προσαρμογή της Εξίσωσης 13 στα πειραματικά δεδομένα (pH, $1/K_m$). _____ 127
- Διάγραμμα 10: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $k_{cat}/K_m = f(pH)$ για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A στους $\theta = 35^\circ\text{C}$ και $I/I = 1.5\text{ M}$. Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην προσαρμογή της Εξίσωσης 13 στα πειραματικά δεδομένα (pH, k_{cat}/K_m). _____ 129
- Διάγραμμα 11: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $k_{cat} = f(pH)$ για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A στους $\theta = 35^\circ\text{C}$ και $I/I = 1.5\text{ M}$. Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην προσαρμογή της Εξίσωσης 10 στα πειραματικά δεδομένα (pH, k_{cat}). _____ 130
- Διάγραμμα 12: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $1/K_m = f(pH)$ για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A στους $\theta = 35^\circ\text{C}$ και $I/I = 1.5\text{ M}$. Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην προσαρμογή της Εξίσωσης 13 στα πειραματικά δεδομένα (pH, $1/K_m$). _____ 131
- Διάγραμμα 13: Γραφικές παραστάσεις της συνάρτησης $k_{cat}/K_m = f(T)$ για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A σε τιμή $pH = 7.75$ και για ιονική ισχύ $I/I = 0.1\text{ M}$, $I/I = 0.5\text{ M}$, $I/I = 1.5\text{ M}$, αντίστοιχα. Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην προσαρμογή της Εξίσωσης 17 στα πειραματικά δεδομένα (T, k_{cat}/K_m). _____ 133

- Διάγραμμα 14: Γραφικές παραστάσεις της συνάρτησης $k_{cat} = f(T)$ για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A σε τιμή pH = 7.75 και για ιονική ισχύ I/I = 0.1 M, I/I = 0.5 M, I/I = 1.5 M αντίστοιχα. Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην προσαρμογή της Εξίσωσης 18 στα πειραματικά δεδομένα (T, k_{cat}). _____ 133
- Διάγραμμα 15: Ενεργειακό διάγραμμα της πορείας αντίδρασης για την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA, από την πρωτεΐνωση KM-IFO-0288-A, σε τρεις διαφορετικές τιμές ιονικής ισχύος (I/I). Η μαύρη γραμμή απεικονίζει την I/I = 0.1 M, η κόκκινη την I/I = 0.5 M και η πράσινη γραμμή απεικονίζει την I/I = 1.5 M _____ 134
- Διάγραμμα 16: Γραφικές παραστάσεις των συναρτήσεων $k_{cat}/K_m = f(n)$ για την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA, από την πρωτεΐνωση KM-IFO-0288-A. Οι κόκκινες γραμμές αντιστοιχούν στην μορφή της εξίσωσης GBK που προσαρμόστηκε καλύτερα στα πειραματικά δεδομένα (Πίνακας 18). _____ 136
- Διάγραμμα 17: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $S.I.E.(k_{cat}/K_m) = f(I/I)$. Οι τιμές προέκυψαν από την προσαρμογή της εξίσωσης GBK στα πειραματικά δεδομένα (Πίνακας 18) _____ 137
- Διάγραμμα 18: Γραφικές παραστάσεις των συναρτήσεων $k_{cat} = f(n)$ για την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA, από την πρωτεΐνωση KM-IFO-0288-A. Οι κόκκινες γραμμές αντιστοιχούν στην μορφή της εξίσωσης GBK που προσαρμόστηκε καλύτερα στα πειραματικά δεδομένα (Πίνακας 19). _____ 138
- Διάγραμμα 19: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $S.I.E.(k_{cat}) = f(I/I)$. Οι τιμές προέκυψαν από την προσαρμογή της εξίσωσης GBK στα πειραματικά δεδομένα (Πίνακας 19). _____ 139
- Διάγραμμα 20: Γραφικές παραστάσεις των συναρτήσεων $k_{cat}/K_m = f(n)$ για την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA, από την πρωτεΐνωση KM-IFO-0288-A. Οι κόκκινες γραμμές αντιστοιχούν στην μορφή της εξίσωσης GBK που προσαρμόστηκε καλύτερα στα πειραματικά δεδομένα (Πίνακας 20). _____ 143
- Διάγραμμα 21: Γραφικές παραστάσεις της μεταβολής των παραμέτρων της εξίσωσης 33 ως συνάρτηση της τιμής pH του μέσου της αντίδρασης για την υδρόλυση

	του υποστρώματος Suc-(Ala) ₂ -Pro-Phe-pNA, από την πρωτεΐνάση KM-IFO-0288-A. _____	145
Διάγραμμα 22:	Γραφικές παραστάσεις των συναρτήσεων $k_{cat} = f(n)$ για την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala) ₂ -Pro-Phe-pNA, από την πρωτεΐνάση KM-IFO-0288-A. Οι κόκκινες γραμμές αντιστοιχούν στην μορφή της εξίσωσης GBK που προσαρμόστηκε καλύτερα στα πειραματικά δεδομένα (Πίνακας 21). _____	147
Διάγραμμα 23:	Γραφικές παραστάσεις της μεταβολής των παραμέτρων της εξίσωσης 33 ως συνάρτηση της τιμής pH του μέσου της αντίδρασης για την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala) ₂ -Pro-Phe-pNA, από την πρωτεΐνάση KM-IFO-0288-A. _____	149
Διάγραμμα 24:	Σύγκριση διαγραμμάτων ϕ^T και k^{lim} ως συνάρτηση του pH για (α) ακυλίωση και (β) απακυλίωση _____	150
Διάγραμμα 25:	Καμπύλη προόδου της αντίδρασης εστεροποίησης 0.1 M Μίγματος Α με αιθανόλη μέσω της ακινητοποιημένης σε κρυστάλλους χλωριούχου νατρίου πρωτεάση KM-IFO-0288-A _____	153
Διάγραμμα 26:	Σημαντικά αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού (εστεροποίηση με αιθανόλη όπου το παραγόμενο H ₂ O παραμένει στον αντιδραστήρα): (α) προβλεπόμενων ως προς αυτά των πραγματικών τιμών, (β) έως (ε) περιγράμματα όπου απεικονίζονται οι πιο σημαντικές αλληλεπιδράσεις και (ζ) ράμπες όπου απεικονίζεται γραφικά η λύση του πειραματικού σχεδιασμού όπως αυτή προκύπτει από την ανάλυση πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA) _____	162
Διάγραμμα 27:	Σημαντικά αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού (εστεροποίηση με αιθανόλη όπου το παραγόμενο H ₂ O απομακρύνεται συνεχώς από τον αντιδραστήρα): (α) προβλεπόμενων ως προς αυτά των πραγματικών τιμών, (β) έως (ζ) περιγράμματα όπου απεικονίζονται οι πιο σημαντικές αλληλεπιδράσεις και (ζ) ράμπες όπου απεικονίζεται γραφικά η λύση του πειραματικού σχεδιασμού όπως αυτή προκύπτει από την ανάλυση πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA) _____	165
Διάγραμμα 28:	Σημαντικά αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού (εστεροποίηση με 1-βουτανόλη όπου το παραγόμενο H ₂ O παραμένει στον αντιδραστήρα): (α) προβλεπόμενων ως προς αυτά των πραγματικών τιμών, (β) έως (ε) περιγράμματα όπου απεικονίζονται οι πιο σημαντικές	

- αλληλεπιδράσεις και (ζ) ράμπες όπου απεικονίζεται γραφικά η λύση του πειραματικού σχεδιασμού όπως αυτή προκύπτει από την ανάλυση πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA) _____ 168
- Διάγραμμα 29: Σημαντικά αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού (εστεροποίηση με 1-βουτανόλη όπου το H_2O απομακρύνεται συνεχώς από τον αντιδραστήρα): (α) προβλεπόμενων ως προς αυτά των πραγματικών τιμών, (β) έως (ε) περιγράμματα όπου απεικονίζονται οι πιο σημαντικές αλληλεπιδράσεις και (ζ) ράμπες όπου απεικονίζεται γραφικά η λύση του πειραματικού σχεδιασμού όπως αυτή προκύπτει από την ανάλυση πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA) _____ 171
- Διάγραμμα 30: Περιγράμματα των εκτιμώμενων τιμών της συνάρτησης επιθυμητού, στις περιπτώσεις εστεροποίησης με: (α) Αιθανόλη, ενώ το παραγόμενο H_2O διατηρούνταν στον αντιδραστήρα, (β) αιθανόλη, ενώ το παραγόμενο H_2O απομακρύνονταν συνεχώς από τον αντιδραστήρα, (γ) 1-βουτανόλη ενώ το παραγόμενο H_2O διατηρούνταν στον αντιδραστήρα, (δ) 1-βουτανόλη, ενώ το παραγόμενο H_2O απομακρύνονταν συνεχώς από τον αντιδραστήρα _____ 172
- Διάγραμμα 31: Γραφική απεικόνιση της σταθερότητας που παρουσιάζει η λιπάση CALB μετά από δέκα συνεχείς κύκλους εστεροποίησης, υπό τις συνθήκες αντίδρασης που περιγράφονται στο κείμενο και με την χρήση τόσο αιθανόλης όσο και 1-βουτανόλης. Θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στο ότι με συνεχή απομάκρυνση του παραγόμενου H_2O από τα μίγματα αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις του Μίγματος Α. _____ 176
- Διάγραμμα 32: Καμπύλη προόδου της αντίδρασης εστεροποίησης του Μίγματος Α με αιθανόλη μέσω της CALB _____ 177
- Διάγραμμα 33: Καμπύλη προόδου της αντίδρασης εστεροποίησης του Μίγματος Α με 1-βουτανόλη μέσω της CALB _____ 178
- Διάγραμμα 34: Σημαντικά αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού (εστεροποίηση με αιθανόλη όπου το παραγόμενο H_2O παραμένει στον αντιδραστήρα): (α) προβλεπόμενων ως προς αυτά των πραγματικών τιμών, (β) έως (δ) περιγράμματα όπου απεικονίζονται οι πιο σημαντικές αλληλεπιδράσεις και (ε) ράμπες όπου απεικονίζεται γραφικά η λύση του πειραματικού

- σχεδιασμού όπως αυτή προκύπτει από την ανάλυση πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA) _____ 183
- Διάγραμμα 35: Σημαντικά αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού (εστεροποίηση με 1-βουτανόλη όπου το παραγόμενο H_2O παραμένει στον αντιδραστήρα): (α) προβλεπόμενων ως προς αυτά των πραγματικών τιμών, (β) έως (δ) περιγράμματα όπου απεικονίζονται οι πιο σημαντικές αλληλεπιδράσεις και (ε) ράμπες όπου απεικονίζεται γραφικά η λύση του πειραματικού σχεδιασμού όπως αυτή προκύπτει από την ανάλυση πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA) _____ 185
- Διάγραμμα 36: Περιγράμματα των εκτιμώμενων τιμών της συνάρτησης επιθυμητού, στις περιπτώσεις εστεροποίησης με: (α) Αιθανόλη, ενώ το παραγόμενο H_2O διατηρούνταν στον αντιδραστήρα, (β) 1-βουτανόλη ενώ το παραγόμενο H_2O διατηρούνταν στον αντιδραστήρα _____ 186
- Διάγραμμα 37: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $V^H = f(S_1, S_2)$ για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB. Το πράσινο πλέγμα-επιφάνεια αντιστοιχεί στην προσαρμοσμένη εξίσωση συστήματος τύπου ring-pong bi-bi (54) στα πειραματικά δεδομένα. _____ 193
- Διάγραμμα 38: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $V^H = f(S_1, S_2)$ για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB. Το τουρκουάζ πλέγμα-επιφάνεια αντιστοιχεί στην προσαρμοσμένη εξίσωση συστήματος τύπου διατεταγμένου bi-bi (57) στα πειραματικά δεδομένα. _____ 194
- Διάγραμμα 39: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $V^D = f(S_1, S_2)$ για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με δευτεριομένη αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB. Το πράσινο πλέγμα-επιφάνεια αντιστοιχεί στην προσαρμοσμένη εξίσωση συστήματος τύπου ring-pong bi-bi (54) στα πειραματικά δεδομένα. _____ 195
- Διάγραμμα 40: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $V^D = f(S_1, S_2)$ για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με δευτεριομένη αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB. Το μπλε πλέγμα-επιφάνεια αντιστοιχεί στην προσαρμοσμένη εξίσωση συστήματος τύπου διατεταγμένου bi-bi (57) στα πειραματικά δεδομένα. _____ 196

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΞΙΣΩΣΕΩΝ

Εξίσωση 2:	Ενιαία κλίμακα του βαθμού οξύτητας μιας διαλυμένης χημικής ένωσης σε σύγκριση με την κλίμακα τιμών pH_____	24
Εξίσωση 9:	Γενική εξίσωση εξάρτησης παραμέτρων ενζυμικής κινητικής από την τιμή pH του μέσου της αντίδρασης_____	37
Εξίσωση 10:	Εξάρτηση παραμέτρων ενζυμικής κινητικής από την τιμή pH του μέσου της αντίδρασης (με δύο pK_a)_____	40
Εξίσωση 11:	Εξάρτηση παραμέτρων ενζυμικής κινητικής από την τιμή pH του μέσου της αντίδρασης (με τρεις pK_a)_____	40
Εξίσωση 12 :	Εξάρτηση παραμέτρων ενζυμικής κινητικής από την τιμή pH του μέσου της αντίδρασης (με τέσσερις pK_a)_____	41
Εξίσωση 13 :	Εξάρτηση παραμέτρων ενζυμικής κινητικής από την τιμή pH του μέσου της αντίδρασης, όπου δύο πρωτονιακές καταστάσεις είναι δραστικές (με δύο pK_a)_____	41
Εξίσωση 15:	Εξίσωση Arrhenius_____	43
Εξίσωση 16:	Εξάρτηση της παραμέτρου k_{cat}/K_m από την απόλυτη θερμοκρασία T_____	44
Εξίσωση 17:	Εξάρτηση (δεύτερη εξίσωση) της παραμέτρου k_{cat}/K_m από την απόλυτη θερμοκρασία T_____	44
Εξίσωση 18:	Εξάρτηση της παραμέτρου k_{cat} από την απόλυτη θερμοκρασία T_____	44
Εξίσωση 20α:	Εξίσωση υπολογισμού θερμοδυναμικών σταθερών ενεργοποίησης_____	45
Εξίσωση 20β:	Εξίσωση υπολογισμού θερμοδυναμικών σταθερών ενεργοποίησης_____	45
Εξίσωση 22:	Γενική εξίσωση ταχύτητας για σύστημα τύπου διαταγμένο bi-bi_____	48
Εξίσωση 23:	Εξίσωση ταχύτητας για σύστημα τύπου διαταγμένο bi-bi απουσία προϊόντων_____	49
Εξίσωση 24:	Εξίσωση ταχύτητας για σύστημα τύπου ping-pong bi-bi απουσία προϊόντων_____	50
Εξίσωση 25:	Εξίσωση ταχύτητας για σύστημα τύπου διαταγμένο bi-bi απουσία προϊόντων με αναστολή υποστρώματος_____	51
Εξίσωση 26:	Εξίσωση ταχύτητας για σύστημα τύπου ping-pong bi-bi απουσία προϊόντων με αναστολή υποστρώματος_____	52
Εξίσωση 27:	Εξίσωση Gross-Butler-Kresge_____	53
Εξίσωση 28:	Εξίσωση υπολογισμού του ισοτοπικού παράγοντα κλασμάτωσης ϕ _____	57

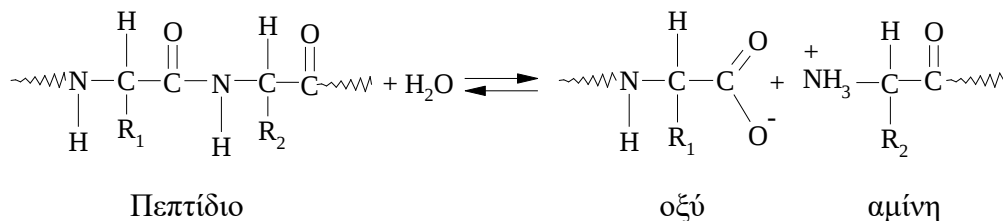
Εξίσωση 29:	Απλοποιημένες μορφές της εξίσωσης Gross-Butler-Kresge όπου υποτίθεται ότι μεταφέρεται ένα πρωτόνιο κατά την θεμελιώδη κατάσταση ισορροπίας (G.S.) και ένα κατά την μεταβατική κατάσταση (T.S.)_____	59
Εξίσωση 30:	Απλοποιημένες μορφές της εξίσωσης Gross-Butler-Kresge όπου υποτίθεται ότι μεταφέρονται δύο πρωτόνια κατά την μεταβατική κατάσταση (T.S.)__	59
Εξίσωση 31:	Απλοποιημένες μορφές της εξίσωσης Gross-Butler-Kresge, που αναφέρονται στην μεταφορά n πρωτονίων κατά την μεταβατική κατάσταση (T.S.)_____	59
Εξίσωση 32:	Απλοποιημένες μορφές της εξίσωσης Gross-Butler-Kresge που αναφέρονται στην μεταφορά n πρωτονίων κατά την μεταβατική κατάσταση (T.S.), ενώ συνεισφέρει και ένας σύνθετος παράγοντας κλασμάτωσης Z _	59
Εξίσωση 33α:	Απλοποιημένες μορφές της εξίσωσης Gross-Butler-Kresge για k_{cat}/K_m , που αναφέρονται στην μεταφορά n πρωτονίων κατά την διάρκεια περισσότερων της μίας σειριακές μεταβατικές καταστάσεις στις οποίες συνεισφέρουν δύο επιμέρους στάδια, ένα φυσικό (C_{Ph}) και ένα χημικό (C_{Ch})_____	60
Εξίσωση 33β:	Απλοποιημένες μορφές της εξίσωσης Gross-Butler-Kresge για k_{cat} , που αναφέρονται στην μεταφορά n πρωτονίων κατά την διάρκεια περισσότερων της μίας σειριακές μεταβατικές καταστάσεις στις οποίες συνεισφέρουν δύο επιμέρους στάδια, ένα φυσικό (C_{Ph}) και ένα χημικό (C_{Ch})_____	60
Εξίσωση 34:	Εξίσωση Bigeleisen_____	62
Εξίσωση 35:	Εξίσωση υπολογισμού του κινητικού ισοτοπικού φαινομένου_____	63
Εξίσωση 37:	Σχέση μεταξύ του παρατηρούμενου και του εσωτερικού κινητικού ισοτοπικού φαινομένου_____	66
Εξίσωση 38:	Σχέση μεταξύ του παρατηρούμενου και του εσωτερικού κινητικού ισοτοπικού φαινομένου για μη αντιστρεπτή αντίδραση_____	66
Εξίσωση 41:	Μοντέλο γραμμικής συνάρτησης περιγραφής της απόκρισης_____	75
Εξίσωση 42:	Μοντέλο πρώτης τάξης περιγραφής της απόκρισης_____	76
Εξίσωση 43:	Μοντέλο δεύτερης τάξης περιγραφής της απόκρισης_____	76
Εξίσωση 44:	Εξίσωση συνολικής συνάρτησης επιθυμητού (Derringer)_____	81
Εξίσωση 45:	Εξίσωση μεμονωμένων επιθυμητών για μέγιστο_____	81
Εξίσωση 46:	Εξίσωση μεμονωμένων επιθυμητών για ελάχιστο_____	81
Εξίσωση 47:	Εξίσωση μεμονωμένων επιθυμητών μεταξύ μέγιστου και ελάχιστου_____	82

Εξίσωση 50:	Εξίσωση ποσοτικοποίησης των ολοκληρωμάτων των κορυφών του GC για την εύρεση της % εστεροποίησης_____	88
Εξίσωση 51:	Εξίσωση ποσοτικοποίησης των ολοκληρωμάτων των κορυφών του GC για την εύρεση της ολικής συγκέντρωσης εστέρα_____	88
Εξίσωση 52:	Εξίσωση πυκνότητας του Μίγματος A_____	98
Εξίσωση 53:	Εξίσωση μέσου μοριακού βάρους του Μίγματος A_____	98
Εξίσωση 54:	Εξίσωση ταχύτητας για σύστημα τύπου ring-pong bi-bi απουσία προϊόντων με αναστολή και από τα δύο υποστρώματα_____	188
Εξίσωση 55:	Παράμετροι της εξίσωσης ταχύτητας για πορείες αντίδρασης σε σύστημα τύπου ring-pong bi-bi με αναστολή και από τα δύο υποστρώματα_____	189
Εξίσωση 56:	Κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο των παραμέτρων της εξίσωσης ταχύτητας για πορείες αντίδρασης σε σύστημα τύπου ring-pong bi-bi με αναστολή και από τα δύο υποστρώματα_____	189
Εξίσωση 57:	Εξίσωση ταχύτητας για σύστημα τύπου διαταγμένο bi-bi απουσία προϊόντων με αναστολή και από τα δύο υποστρώματα_____	190
Εξίσωση 58:	Παράμετροι της εξίσωσης ταχύτητας για πορείες αντίδρασης σε σύστημα τύπου διαταγμένο bi-bi με αναστολή και από τα δύο υποστρώματα_____	191
Εξίσωση 59:	Κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο των παραμέτρων της εξίσωσης ταχύτητας για πορείες αντίδρασης σε σύστημα τύπου διαταγμένο bi-bi με αναστολή και από τα δύο υποστρώματα_____	191

I. ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

I.1. Πρωτεολυτικά ένζυμα

Τα πρωτεολυτικά ένζυμα (πρωτεάσες) συνιστούν μια ομάδα ενζύμων τα οποία καταλύουν την αντιστρεπτή υδρόλυση ενός πεπτιδικού δεσμού [1] (Σχήμα 1):



Σχήμα 1: Υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού

Οι πρωτεάσες κατέχουν σημαντικό ρόλο στη ζωή και ορίζονται ως ένζυμα τα οποία υδρολύουν πρωτεΐνες και πεπτίδια στα δομικά τους συστατικά, τα αμινοξέα. Όλοι οι οργανισμοί (συμπεριλαμβανομένων των ανθρώπων και άλλων θηλαστικών) εισάγουν με τη διατροφή αμινοξέα από το περιβάλλον ή μπορούν να συνθέσουν μερικά από αυτά και τα μετατρέπουν αρχικά, σε βιολογικά πολυμερή (πολυπεπτίδια). Έπειτα, μέσω ποικίλων μηχανισμών ελέγχουν το μέγεθος και την μορφή τους για να συνθέσουν τις αναγκαίες πρωτεΐνες. Οι πρωτεάσες είναι απαραίτητες για την λειτουργία και την αποικοδόμηση των πρωτεϊνών. Οι δράσεις τους είναι εξειδικευμένες, χωρίς αυτό να σημαίνει ότι οι πρωτεάσες αποτελούν υποδείγματα ενζυμικής εξειδίκευσης, όπως άλλωστε αυτό είναι γνωστό για όλη την τάξη των υδρολασών [2]. Οι πρωτεάσες είναι πολυάριθμες και συμβάλλουν ρυθμιστικά στην σύλληψη, την γέννηση, την πέψη, την αύξηση, την ωρίμανση, την γήρανση και τον θάνατο όλων των οργανισμών. Αντίστοιχους ρόλους έχουν επίσης στα βακτήρια και τα παράσιτα. Έχει χαρακτηριστεί η δράση, σε περισσότερες από πεντακόσιες ανθρώπινες πρωτεάσες, οι οποίες αντιστοιχούν στο 2 % του ανθρωπίνου γονιδιώματος. Επίσης, οι πρωτεάσες φαίνεται να καταλύουν μια μεγάλη ποικιλία φυσιολογικών διεργασιών σε φυτά, έντομα, θαλάσσιους οργανισμούς και μικροοργανισμούς [3].

I.1.1. Κατάταξη, ονοματολογία και οικογένειες πρωτεασών

Η Διεθνής Επιτροπή επί των Ενζύμων (International Commission on Enzymes / International Union of Biochemistry and Molecular Biology - I.U.B.M.B.) ως τμήμα της Διεθνούς Ένωσης Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας (International Union of Pure and Applied Chemistry - I.U.P.A.C.), έθεσε το 1961 κανόνες για την συστηματική κατάταξη και

ονοματολογία των ενζύμων. Τα ένζυμα ανάλογα με την αντίδραση την οποία καταλύουν χωρίστηκαν σε τάξεις, ομάδες και υποομάδες και απέκτησαν έναν κωδικό αριθμό EC (Enzyme Commission), ο οποίος αποτελείται από τέσσερα μέρη καθένα από τα οποία δηλώνει την αντίστοιχη κατηγορία στην οποία ανήκει το ένζυμο. Περαιτέρω διαχωρισμοί μπορούν να γίνουν βασισμένοι στη μοριακή σύσταση του καταλυτικού κέντρου, για ορισμένες ομάδες ενζύμων.

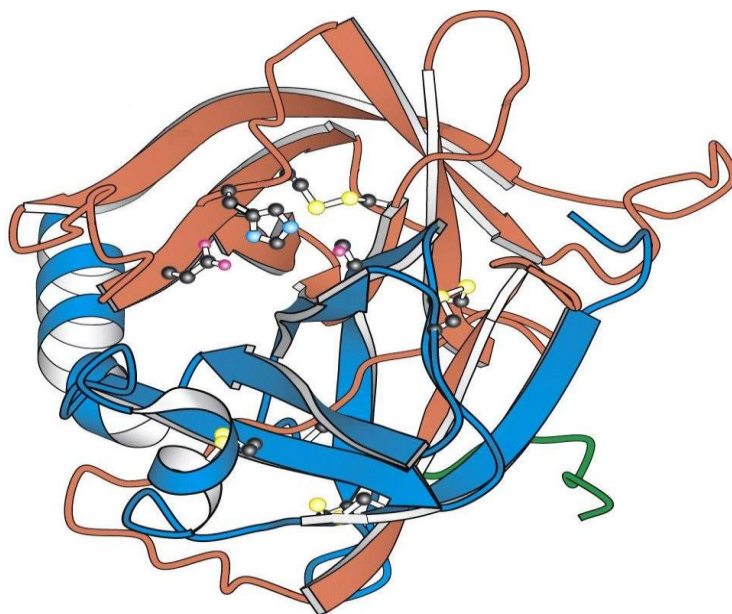
Ο όρος "πρωτεάση" είναι απόλυτα και συστηματικά συνώνυμος με τον όρο "πεπτιδάση" και αναφέρεται σε εκείνες τις υδρολάσες που καταλύουν την υδρολυτική διάσπαση πεπτιδικών δεσμών (EC 3.4._._). Οι πρωτεάσες ή πεπτιδάσες χωρίζονται σε δύο υποομάδες ενζύμων, τις ενδοπεπτιδάσες ή πρωτεϊνάσες (EC 3.4.21-99._), οι οποίες υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς που βρίσκονται εντός του μορίου της πρωτεΐνης και τις εξωπεπτιδάσες (EC 3.4.11-19._), οι οποίες υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς που βρίσκονται είτε στο άμινο-τελικό είτε στο καρβόξυ-τελικό άκρο της πεπτιδικής αλυσίδας.

Ο χωρισμός των πρωτεασών σε οικογένειες έγινε με βάση τον τρόπο που καταλύουν την υδρολυτική διάσπαση των πεπτιδικών ή εστερικών δεσμών και την σύσταση του καταλυτικού τους κέντρου, σε πλήρη συμφωνία με τους κανόνες της συστηματικής κατάταξης και ονοματολογίας των ενζύμων. Οι σημαντικότερες και οι περισσότερο μελετημένες οικογένειες πρωτεασών είναι οι σερινοπρωτεϊνάσες (EC 3.4.21._), οι κυστεϊνοπρωτεϊνάσες (EC 3.4.22._), οι μεταλλοπρωτεϊνάσες (EC 3.4.24._) και οι ασπαρτικοπρωτεϊνάσες (EC 3.4.23._) [4].

I.1.2. Σερινοπρωτεϊνάσες

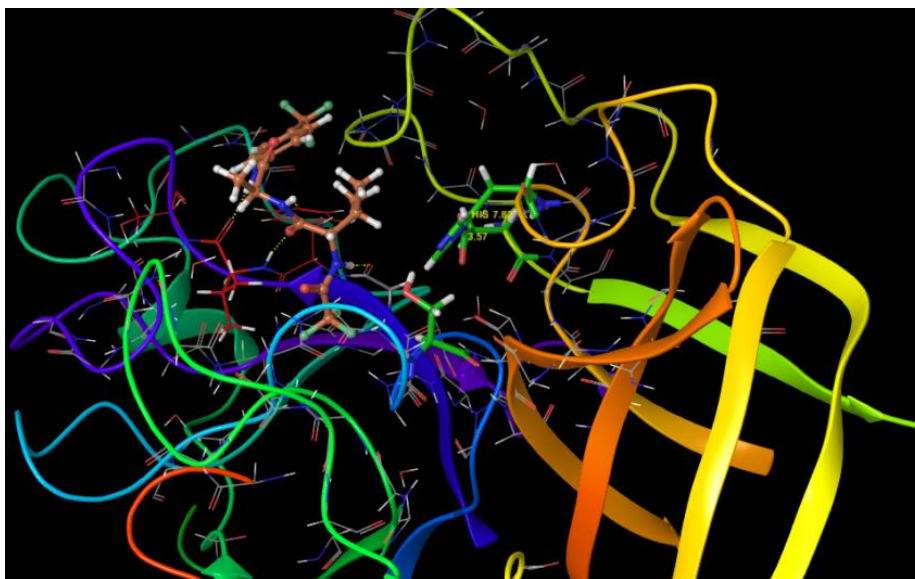
I.1.2.1. Εισαγωγή

Οι σερινοπρωτεϊνάσες είναι πολύ διαδεδομένες στη φύση και περιλαμβάνουν ένζυμα από διάφορες πηγές όπως ιοί, βακτήρια και ευκαρυωτικοί οργανισμοί. Μεταξύ των περισσότερο μελετημένων σερινοπρωτεϊνών είναι οι: Χυμοθρυψίνη (EC 3.4.21.1), Θρυψίνη (EC 3.4.21.4), Θρομβίνη (EC 3.4.21.5), α -Λυτική ενδοπεπτιδάση (EC 3.4.21.12), Σουμπτιλίσίνη (EC 3.4.21.62), Παγκρεατική Ελαστάση (EC 3.4.21.71) κ.α. [4]. Στην Εικόνα 1 απεικονίζεται η δομή της Χυμοθρυψίνης, ενώ στην Εικόνα 2 απεικονίζεται η δομή του συμπλόκου παγκρεατικής Ελαστάσης και του αναστολέα $\text{CF}_3\text{C}(\text{O})\text{-VA-NHPh-p-CF}_3$.



Εικόνα 1: Η τριτοταγής δομή της Χυμοθρυψίνης με τα καταλυτικά κατάλοιπά της

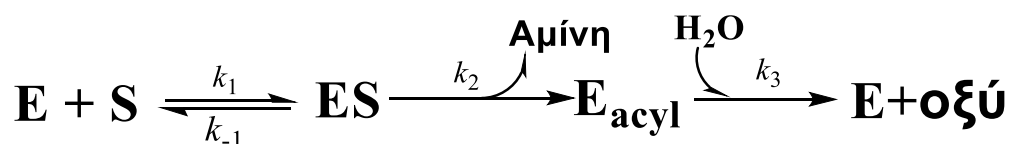
Με γνώμονα τις έως τώρα γνωστές δομές ενζύμων και τις διακριτές διαφορές μεταξύ υποοικογενειών, οι σερινοπρωτεϊνάσες μπορούν να συσχετισθούν μεταξύ τους γενετικά. Υπάρχουν ομοιότητες του μηχανισμού δράσης τους και μάλιστα ακόμα και μεταξύ ενζύμων των οποίων διαφέρουν οι αρχές εξέλιξης [4]. Όλα αυτά τα ένζυμα έχουν ένα κοινό χαρακτηριστικό, την ύπαρξη μιας ενεργού **S** στο καταλυτικό τους κέντρο, της οποίας το αλκοολικό οξυγόνο δρα ως πυρηνόφιλο, με διαφορετικό μηχανισμό, κάτω από διαφορετικές συνθήκες. Το καταλυτικό κέντρο των σερινοπρωτεϊνών συνίσταται από μια τριάδα αμινοξέων, ένα ηλεκτρονιόφιλο **D**¹⁰², μία **H**⁵⁷ και μία πυρηνόφιλη **S**¹⁹⁵ (αρίθμηση Χυμοθρυψίνης), δηλαδή μία καταλυτική τριάδα. Ο γεωμετρικός προσανατολισμός των δραστικών αυτών καταλοίπων, ανεξάρτητα από την υποοικογένεια κάθε σερινοπρωτεϊνάσης, είναι παρόμοιος και δεν φαίνεται να επηρεάζεται από τις επιμέρους δευτεροταγείς δομές ούτε και την τριτοταγή δομή τους [4].



Εικόνα 2: Απεικόνιση της δομής του συμπλόκου παγκρεατική Ελαστάση με τον αναστολέα CF₃C(O)-VA-NHPh-p-CF₃

1.1.2.2. Γενικά αποδεκτός μηχανισμός δράσης των Σερινοπρωτεϊνών

Ένα κοινά αποδεκτό γενικό σχήμα δράσης για τις σερινοπρωτεΐνες είναι το ακόλουθο Σχήμα 2 [5].



Σχήμα 2: Το γενικό σχήμα δράσης των τριών σταδίων, για σερινοπρωτεΐνες

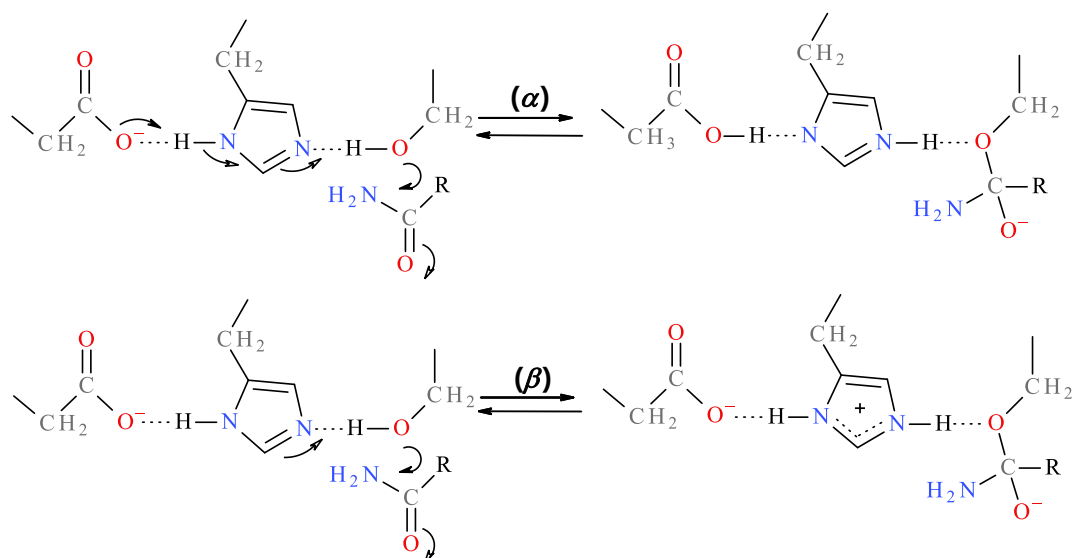
Οι σερινοπρωτεΐνες χρησιμοποιούν έναν μηχανισμό διπλής αντικατάστασης στον οποίο η δραστική S του καταλυτικού κέντρου ακυλιώνεται με ταυτόχρονη απομάκρυνση μίας αμίνης ενώ σχηματίζεται το ενδιάμεσο ακυλένζυμο, το οποίο με τη σειρά του υδρολύεται για να δώσει το καρβοξυλικό προϊόν (Οξύ). Η απακυλίωση είναι ένα στάδιο μηχανιστικά ανάλογο της ακυλίωσης [6]. Συγκεκριμένα, το οξυγόνο του H₂O (διαλύτης), λαμβάνει μέρος στην αντίδραση, ως το πυρηνόφιλο αντιδραστήριο και προσβάλλει τον καρβονυλικό άνθρακα του ακυλενζύμου, οπότε μέσω ενός τετραεδρικού ενδιάμεσου ελευθερώνεται το δεύτερο προϊόν (Οξύ) [7] και το ελεύθερο ένζυμο. Αρκετά δομικά χαρακτηριστικά, τα οποία διαφέρουν από ένζυμο σε ένζυμο (όπως τα αμινοξέα του πρωτεϊνικού σκελετού που απαρτίζουν τις S₁, S₂,...κλπ. υποπεριοχές της ενεργού περιοχής), φαίνεται ότι επηρεάζουν τόσο την ακυλίωση όσο και την απακυλίωση.

Έως σήμερα, έχουν προταθεί διάφοροι πιθανοί τρόποι δράσης της καταλυτικής τριάδας των σερινοπρωτεϊνών [7] ($\mathbf{D}^{102}/\mathbf{H}^{57}/\mathbf{S}^{195}$, αρίθμηση Χυμοθρυψίνης) από τους οποίους οι περισσότεροι αποδεκτοί είναι οι εξής:

- το σύστημα ή σύμπλοκο μεταφοράς φορτίου (Σ.Μ.Φ.)
- η κατάλυση γενικού οξέος - γενικής βάσης.

Το σύστημα μεταφοράς φορτίου (Charge Relay System) [7] συνίσταται από αλυσίδες δεσμών υδρογόνου μεταξύ, της πυρηνόφιλης $\mathbf{S}^{195}$ και του ιμιδαζολίου της $\mathbf{H}^{57}$ και μεταξύ του α -καρβοξυλίου του $\mathbf{D}^{102}$ και του ιμιδαζολίου της $\mathbf{H}^{57}$ (αρίθμηση Χυμοθρυψίνης). Δεσμοί υδρογόνου έχουν βρεθεί, επίσης, μεταξύ των καταλυτικών καταλοίπων και άλλων ομάδων του σκελετού των σερινοπρωτεϊνών [8]. Ονομάστηκε σύστημα μεταφοράς φορτίου επειδή αρνητικό φορτίο μεταφέρεται, μέσω δεσμών υδρογόνου, χωρίς να εντοπίζεται σε ένα συγκεκριμένο καταλυτικό κατάλοιπο. Το $\mathbf{D}$ της καταλυτικής τριάδας, εκτός από την διατήρηση του κατάλληλου προσανατολισμού του ιμιδαζολίου της καταλυτικής $\mathbf{H}$, δρα και ως τελική βάση δεσμεύοντας ένα πρωτόνιο, κατά την κατάλυση, ενώ η καταλυτική $\mathbf{H}$ λειτουργεί ως ενδιάμεσο για την μεταφορά του πρωτονίου [9] (Σχήμα 3α).

Στην κατάλυση γενικού οξέος-γενικής βάσης (General Acid-Base Catalysis), το $\mathbf{D}$ της καταλυτικής τριάδας σταθεροποιεί ηλεκτροστατικά, με το αρνητικό φορτίο του, την θετικά φορτισμένη $\mathbf{H}$ κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Στην περίπτωση αυτή, κανένα πρωτόνιο δεν μεταφέρεται προς το $\mathbf{D}$, ενώ η $\mathbf{H}$ λειτουργεί ως δότης ενός πρωτονίου (ακυλίωση) και στην συνέχεια ως δέκτης ενός πρωτονίου (απακυλίωση) ώστε να είναι δυνατή η κατάλυση γενικού οξέος - γενικής βάσης (Σχήμα 3β).



Σχήμα 3: Ακυλίωση σερίνοπρωτεϊνάσων: (α) Μεταφορά δύο πρωτονίων (σύστημα συμπλόκου μεταφοράς φορτίου) και (β) Μεταφορά ενός πρωτονίου (κατάλυση γενικού οξέος-γενικής βάσης)

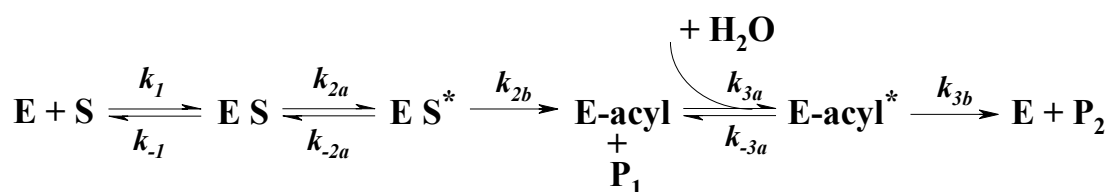
Κατά τη διαδικασία της ακυλίωσης των σερίνοπρωτεϊνάσων η καταλυτική **S**, έχει δώσει το πρωτόνιο της στην καταλυτική **H** και έχει ήδη γίνει αρκετά πυρηνόφιλη για να προσβάλλει τον καρβονυλικό άνθρακα του προς υδρόλυση πεπτιδικού δεσμού του υποστρώματος. Η πυρηνόφιλη προσβολή από τη **S** οδηγεί στην δημιουργία του ακυλενζύμου μέσω ενός τετραεδρικού ενδιάμεσου οξυανιόντος, το οποίο σταθεροποιείται με δεσμούς υδρογόνου σε συγκεκριμένη περιοχή του ενζύμου, που ονομάζεται οπή οξυανιόντος [10]. Ο σχηματισμός της οπής του οξυανιόντος είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την κατάλυση από τις σερίνοπρωτεϊνάσες. Το τετραεδρικό ενδιάμεσο οξυανιόν αν και με πολύ μικρή διάρκεια ζωής μπορεί να ανιχνευθεί κάτω από κατάλληλες συνθήκες. Η κατάλυση με σύστημα μεταφοράς φορτίου παρόλο που διαθέτει ένα πιο ασθενές πυρηνόφιλο σε σχέση με την κατάλυση μέσω γενικού οξέος-γενικής βάσης, είναι πιο αποτελεσματική λόγω τη αυξημένης σταθερότητάς του.

Χρήσιμα συμπεράσματα σχετικά με τον αριθμό και το είδος των πρωτονίων που μεταφέρονται κατά την πορεία από την αρχική στην μεταβατική κατάσταση των σταδίων ακυλίωσης και απακυλίωσης των σερίνοπρωτεϊνάσων προκύπτουν με εφαρμογή της μεθοδολογίας καταμέτρησης πρωτονίων [11].

I.1.2.3. Η Σερινοπρωτεΐνάση KM-IFO-0288-A

Κατά την εκπόνηση του μεταπτυχιακού διπλώματος, απομονώθηκε, καθαρίστηκε και χαρακτηρίστηκε μερικώς, μία νέα σερινοπρωτεΐνάση με μοριακό βάρος 45 kDa από το εξωκυττάριο υγρό καλλιέργειας του ευκαρυωτικού μικροοργανισμού *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288. Το νέο αυτό ένζυμο, το οποίο ονομάστηκε σερινοπρωτεΐνάση KM-IFO-0288-A, ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten σε μέσα αντίδρασης βέλτιστης τιμής pH = 7.75 και βέλτιστης θερμοκρασίας τους $\theta = 35^{\circ}\text{C}$ όταν δρα επί συνθετικών πεπτιδικών υποστρωμάτων, π.χ. του Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA.

Αποσαφηνίστηκε ο μηχανισμός δράσης της KM-IFO-0288-A που στηρίχθηκε: (α) στην εφαρμογή κινητικών μεθόδων υπολογισμού των εξαρτήσεων των παραμέτρων Michaelis-Menten από την τιμή pH, από την απόλυτη θερμοκρασία, καθώς και από το ατομικό κλάσμα δευτερίου (*n*) του μέσου της αντίδρασης, (β) στον υπολογισμό και το μέγεθος των σταθερών ταχύτητας και των τιμών των pK_a των ιονιζόμενων ομάδων του ενζύμου. Διαπιστώθηκε ότι το υπό μελέτη νέο ένζυμο υδρολύει εξειδικευμένα συνθετικά πεπτιδικά υποστρώματα μέσω σχηματισμού Σ.Μ.Φ., όπου η αναδιοργάνωση του διαλύτη διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στην πορεία πρόσδεσης του υποστρώματος στο ένζυμο προς σχηματισμό του ακυλενζύμου, όσο και κατά την πορεία της απακυλίωσης του ενζύμου. Η συνολική αντίδραση φαίνεται ότι ακολουθεί τον παρακάτω μηχανισμό (Σχήμα 4), που είναι διαφορετικός και με περισσότερα στάδια από αυτόν των τριών σταδίων και περιλαμβάνει την συμμετοχή φυσικών και χημικών σταδίων με μία μέση συνεισφορά ~ 35 % και ~ 65 %, αντίστοιχα [12].



Σχήμα 4: Συνολική πορεία δράσης της σερινοπρωτεάσης KM-IFO-0288-A.

Η μορφή των καμπυλών των παραμέτρων Michaelis-Menten ως προς την τιμή pH, καθώς και η παρέκκλιση από τον γενικά παραδεκτό για τις σερινοπρωτεΐνάσες απλό μηχανισμό τριών σταδίων, έκανε επιτακτική την περεταίρω μελέτη αυτού του νέου ενζύμου.

I.2. Λιπάσες

I.2.1. Εισαγωγή

Οι λιπάσες ως υδρολάσες των εστέρων της τριακυλογλυκερόλης, (EC. 3.1.1.3) είναι ένζυμα ευρέως διαδεδομένα και καταλύουν την διάσπαση των λιπών και ελαίων απελευθερώνοντας ελεύθερα λιπαρά οξέα, διακυλογλυκερόλες, μονοακυλογλυκερόλες και γλυκερόλη. Αυτά τα ένζυμα διαδραματίζουν μείζονα ρόλο στην βιολογική διάσπαση των λιπιδίων. Οι λιπάσες απαιτούνται στο πεπτικό σύστημα των ζώων διευκολύνοντας την υδρόλυση των λιπιδίων των τροφών, τα οποία με τις βιοχημικές πορείες της β -οξειδωσης των λιπαρών οξέων, της ανοικοδόμησής τους και της βιοσύνθεσης λιπιδίων, χρησιμοποιούνται ως ενεργειακή δεξαμενή του οργανισμού. Εμπλέκονται επίσης στο μεταβολισμό των ενδοκυτταρικών λιπιδίων και επομένως στη λειτουργία των βιολογικών μεμβρανών. Ωστόσο η εμπορική αξιοποίηση των λιπασών για βιομηχανικές εφαρμογές αφορά κυρίως τις βακτηριακές λιπάσες και η χρήση δύο εξ αυτών αποτελεί μεγάλο μέρος του αντικειμένου της παρούσης εργασίας [13].

I.2.2. Κατάταξη, ονοματολογία και οικογένειες λιπασών

Τα βακτήρια, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες παράγουν διάφορες εξωκυττάριες λιπάσες στις οποίες συμπεριλαμβάνονται οι καρβοξυλεστεράσες (EC 3.1.1.1), που υδrolύουν μικρούς εστέρες που είναι εν μέρει διαλυτοί στο H_2O και οι πραγματικές λιπάσες (EC 3.1.1.3), οι οποίες εμφανίζουν μέγιστη δραστικότητα προς αδιάλυτα στο H_2O τριγλυκερίδια μακράς αλυσίδας.

Οι λιπάσες ανήκουν στην οικογένεια των σερίνο-υδρολασών, όπου η δραστικότητά τους βασίζεται σε μία καταλυτική τριάδα (D/H/S), όμοια με τις σερινοπρωτεάσες. Τα βακτηριακά λιπολυτικά ένζυμα έχουν ταξινομηθεί σε 8 οικογένειες όπου η μεγαλύτερη οικογένεια υποδιαιρείται σε 6 υποοικογένειες σύμφωνα με τους Agrigny και Jaeger οι οποίοι βασίστηκαν στα συντηρημένα μοτίβα αλληλουχίας και στις βιολογικές ιδιότητες αυτών των ενζύμων. Η οικογένεια I περιλαμβάνει τις περισσότερες από τις λιπάσες που παράγονται από τους μικροοργανισμούς *Pseudomonas*, *Bacillus* και *Staphylococcus*. Οι πραγματικές λιπάσες ανήκουν σε αυτή την οικογένεια και διαθέτουν το συμβατικό καταλυτικό πενταπεπτίδιο G-X-S-X-G. Η οικογένεια II διαθέτει μία ελαφρώς τροποποιημένη εκδοχή

του καταλυτικού πενταπεπτιδίου, **G-D-S-X-L**. Οι εστεράσες που παράγονται από τους μικροοργανισμούς *Streptomyces*, *Aeromonas* και *Salmonella* ανήκουν σε αυτή την οικογένεια. Η οικογένεια III περιλαμβάνει λιπάσες του *Streptomyces* sp., αλλά σε αντίθεση με την οικογένειά II οι λιπάσες αυτές είναι εξωκυττάρια. Λιπάσες οι οποίες εμφανίζουν ομοιότητα με τις hormone-sensitive lipases (HSL) των θηλαστικών ομαδοποιούνται στην οικογένεια IV, ενώ λιπάσες μεσόφιλων βακτηρίων, όπως *Pseudomonas oleovorans* και *Haemophilus influenza* ανήκουν στην οικογένεια V. Η οικογένεια VI περιέχει τις μικρότερες εστεράσες και τα ενεργά ένζυμα αυτής της οικογένειας είναι διμερή, ενώ η οικογένεια VII διαθέτει τις μεγαλύτερες εστεράσες. Τέλος η οικογένεια VIII είναι παρόμοια με αυτήν των β-λακταμασών [14].

I.2.3. Βιομηχανικές εφαρμογές λιπασών

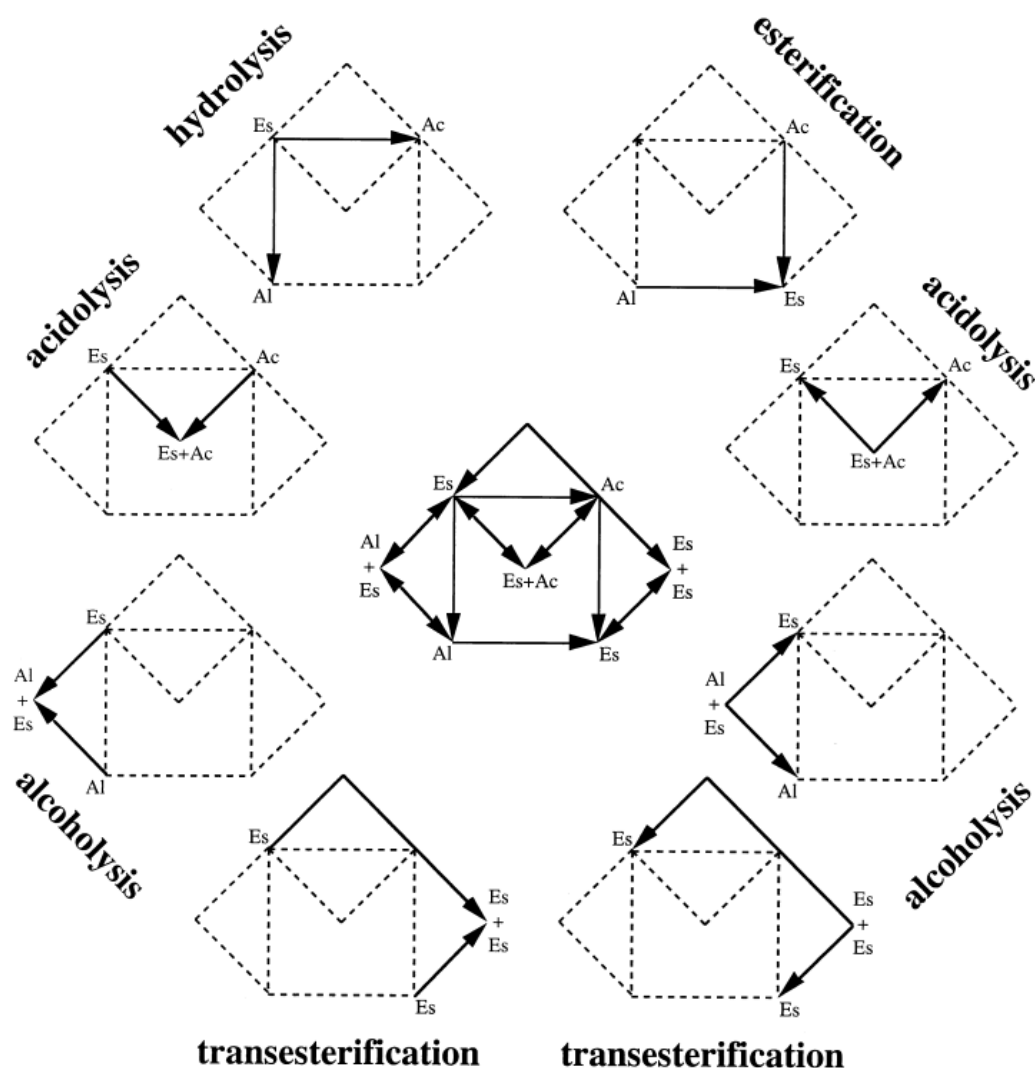
Οι μικροβιακές λιπάσες αποτελούν μια σημαντική ομάδα βιοτεχνολογικά πολύτιμων ενζύμων, κυρίως λόγω των πολλών εφαρμογών τους και της εύκολης μαζικής παραγωγής τους. Η οικογένεια των μικροβιακών λιπασών είναι ιδιαίτερα διαφοροποιημένη όσο αφορά, τις ενζυμικές ιδιότητες και την εξειδίκευση του υποστρώματος τους και έτσι καθίστανται ιδιαίτερα ελκυστικές για βιομηχανικές εφαρμογές. Μαζί με τις πρωτεάσες, οι λιπάσες θεωρούνται ότι είναι η τρίτη μεγαλύτερη ομάδα βιομηχανικών ενζύμων με βάση το συνολικό όγκο πωλήσεων και των εφαρμογών τους [15]. Η πλειοψηφία των ενζύμων που χρησιμοποιούνται για βιομηχανικές εφαρμογές είναι μικροβιακής προέλευσης και παράγονται με συμβατικές αερόβιες ζυμώσεις [16].

Οι λιπάσες χρησιμοποιούνται ευρέως στην βιομηχανία:

- στην επεξεργασία των λιπών και ελαίων
- στα απορρυπαντικά
- στη σύνθεση καθαρών χημικών και φαρμακευτικών προϊόντων
- στην κατασκευή χαρτιού και παραγωγή καλλυντικών
- στην επιτάχυνση της υποβάθμισης υλικών όπως, λιπαρών υλών που βρίσκονται σε απόβλητα και συνθετικών πλαστικών όπως είναι η πολυουρεθάνη κ.α.

1.2.4. Γενικά χαρακτηριστικά λιπασών

Τις τελευταίες δεκαετίες υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον στην έρευνα πάνω στις λιπάσες και πιθανότατα αυτό σχετίζεται με τρεις κύριους λόγους: (α) την ενζυμική καταλυτική λειτουργία τους σε μοριακή βάση, (β) την σύνδεσή τους με την χρήση στην ιατρική και (γ) την σημασία τους στην ρύθμιση του μεταβολισμού. Τέλος, ανακαλύφθηκε ότι οι λιπάσες είναι ισχυρά καταλυτικά εργαλεία, όχι μόνο για υδρόλυση, αλλά επίσης για διάφορες αντιδράσεις, όπως είναι η εστεροποίηση, η μετεστεροποίηση κ.α., σε οργανικούς διαλύτες (Εικόνα 3) [17].



Εικόνα 3: Πιθανοί τρόποι κατάλυσης των λιπασών

Αυτοί οι βιοκαταλύτες (οι λιπάσες) παρουσιάζουν ορισμένα σημαντικά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλα ένζυμα. Πράγματι, η εξειδίκευση, η τοποεκλεκτικότητα και η εναντιοεκλεκτικότητα, τους επιτρέπουν να καταλύουν αντιδράσεις με μειωμένα έως

καθόλου παράπλευρα προϊόντα, σχετικά χαμηλού κόστους διαχείριση αποβλήτων κ.λπ. και όλα αυτά υπό συνθήκες ήπιας θερμοκρασίας και πίεσης. Κατά συνέπεια, τον τελευταίο καιρό έχει δοθεί ιδιαίτερη προσοχή στις λιπάσες, για την εμπορική αξιοποίησή τους [18].

Εξαιτίας της ικανότητας των λιπασών να διατηρούν την καταλυτική τους δραστηριότητα σε οργανικούς διαλύτες, γίνονται έρευνες ώστε να προσδιοριστούν οι δυνατότητές τους στην μετατροπή των λιπών και ελαίων σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας, ως πρόσθετα τροφίμων ή ως δομικοί λίθοι για βιομηχανικές εφαρμογές. Παραδείγματα εφαρμογών των λιπασών υπάρχουν πολλά, όπως, στον διαχωρισμό ρακεμικών μιγμάτων, στην σύνθεση φαρμακευτικών και επιφανειοδραστικών ουσιών, καθώς και στην βιομετατροπή των ελαίων και λιπών σε προϊόντα υψηλής προστιθέμενης αξίας κ.α. [19].

Ωστόσο, η ασάφεια του μηχανισμού δράσης τους, η χαμηλή δραστηριότητα, η σταθερότητα, η εκλεκτικότητα ορισμένων εξ' αυτών και το σχετικά απαγορευτικό κόστος των ελεύθερων μη ακινητοποιημένων ενζύμων, θέτουν τα κύρια εμπόδια στην ραγδαία επέκταση της τεχνολογίας των βιομηχανικών λιπασών σε μεγάλη κλίμακα.

I.2.5. Δομικά χαρακτηριστικά λιπασών

I.2.5.1. Ενεργός περιοχή

Το πυρηνόφιλο κατάλοιπο βρίσκεται σε ένα εξαιρετικά συντηρημένο πενταπεπτίδιο **Sm-X-Nu-X-Sm**, όπου **Sm** αντιστοιχεί σε μικρά κατάλοιπα, συνήθως **G**, η οποία μπορεί ενίοτε να είναι υποκατεστημένη από **A**, **V**, ή πιο σπάνια **S** και **T**, το **X** αντιστοιχεί σε οποιοδήποτε κατάλοιπο, το **Nu** αντιστοιχεί στο πυρηνόφιλο κατάλοιπο, το οποίο στις λιπάσες είναι **S**. Αυτό το πενταπεπτίδιο σχηματίζει μια πολύ απότομη γ -στροφή, εντοπισμένη συνήθως, μεταξύ της β_5 -πτύχωσης και της $C\alpha$ -έλικας και ονομάζεται πυρηνόφιλος αγκώνας. Αυτό το μοτίβο, β -πτύχωση/ γ -στροφή/ α -έλικα αναγκάζει της δίεδρες γωνίες της κύριας αλυσίδας του πυρηνόφιλου κατάλοιπου, να υιοθετήσουν μη ευνοούμενες ενεργειακά στερεοδιατάξεις, επιβάλλοντας έτσι τοπικούς στερικούς περιορισμούς για τα γειτονικά του κατάλοιπα [20] [21].

Ο πυρηνόφιλος αγκώνας είναι το πιο συντηρημένο χαρακτηριστικό μοτίβο της α/β -δομής υδρολάσης [22]. Σε μια τέτοια τυπική δομή, το καταλυτικό **D** βρίσκεται σε ένα αντίστροφο βρόχο μετά την β_7 πτύχωση, αλληλοεπιδρώντας με την καταλυτική **H** μέσω ενός δεσμού υδρογόνου. Ωστόσο, σε ορισμένες λιπάσες, το **D** μπορεί να βρεθεί μετά την β_6 πτύχωση. Οι

λιπάσες είναι το μόνο παράδειγμα α/β υδρολασών που μπορούν να διαθέτουν κατάλοιπο **E** στην καταλυτική τριάδα αντί του **D** [23]. Η **H** είναι το μόνο κατάλοιπο της καταλυτικής τριάδας που είναι απολύτως διατηρημένο. Αυτό το κατάλοιπο βρίσκεται σε ένα βρόχο, τοποθετημένο μετά την β_8 πτύχωση. Το σχήμα και το μήκος αυτού του βρόχου μπορεί να διαφέρει σημαντικά μεταξύ των διάφορων μελών αυτής της οικογένειας.

1.2.5.2. Διεπιφανειακή ενεργοποίηση

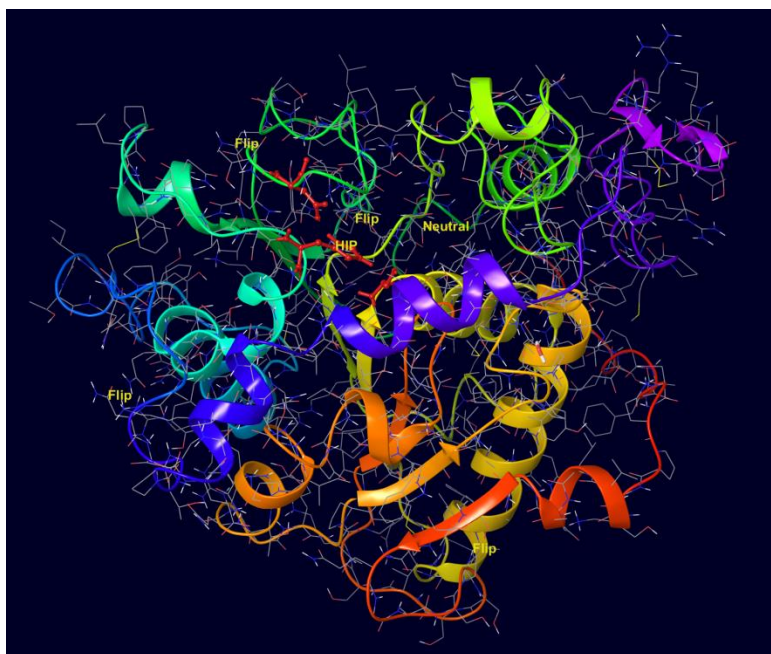
Η διεπιφανειακή ενεργοποίηση είναι ένα φαινόμενο όπου οι λιπάσες υφίστανται μία διαμορφωτική αλλαγή που έχει ως επακόλουθο την αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα όταν αυτές προσροφώνται επάνω σε μια επιφάνεια λιπιδίων (διεπιφάνεια). Οι λιπάσες παρουσιάζουν ένα ελικοειδές τμήμα με μεγάλη κινητικότητα, το οποίο ονομάζεται καπάκι (lid) και συνήθως αποτελείται από α -έλικες. Κρυσταλλογραφικές μελέτες δομών λιπασών έχουν δείξει ότι αυτή η περιοχή μπορεί να υιοθετήσει δύο διακριτές διαμορφώσεις, την ανοικτή διαμόρφωση όπου η ενεργός περιοχή του ενζύμου είναι εκτεθειμένη στον διαλύτη και την κλειστή διαμόρφωση όπου επιφανειακές θηλιές προστατεύουν την ενεργό περιοχή από την έκθεση στον διαλύτη. Στην κλειστή διαμόρφωση, οι επιφανειακές θηλιές απαιτείται να υποβληθούν σε αλλαγή θέσης, προκειμένου το υπόστρωμα να έχει πρόσβαση και να προσδεθεί στην ενεργό περιοχή. Η κίνηση του καπακιού προκαλεί αλλαγή στην επιφάνεια του ενζύμου, με αποτέλεσμα να εκτίθενται υδρόφοβα κατάλοιπα με συνολική επιφάνεια ακόμα και $\approx 450 \text{ \AA}^2$ [24], [25].

Ο μηχανισμός ενεργοποίησης μέσω του οποίου λειτουργεί (ανοίγει και κλείνει) το καπάκι δεν είναι ακόμη πλήρως κατανοητός. Ανάλογα με την δομική αρχιτεκτονική του καπακιού, έχουν προταθεί διάφοροι μηχανισμοί μετάβασης. Σε λιπάσες που το καπάκι αποτελείται από μία μόνο έλικα, η μετάβαση έχει προταθεί ότι γίνεται, με μία γρήγορη και μονοκόμματη κίνηση. Αντιθέτως, σε λιπάσες που διαθέτουν ένα πιο σύνθετο καπάκι, όπως αυτό της λιπάσης από *Candida rugosa*, η δευτεροταγής δομή του καπακιού τους αλλάζει κατά τη διαδικασία του ανοίγματος και ως εκ τούτου, αναμένεται μια μερική αναδίπλωση η οποία δυσχεραίνει την κινητική αυτού του ενζύμου [26]. Η διαμορφωτική αναδιάταξη που συντελείται κατά το άνοιγμα του καπακιού συνδέεται με το φαινόμενο της διεπιφανειακής ενεργοποίησης. Μερικές λιπάσες παρουσιάζουν μια σημαντική αύξηση της ενζυμικής δράσης τους όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος υπερβαίνει το όριο διαλυτότητάς τους, δηλαδή όταν το υπόστρωμα ως αδιάλυτο, δημιουργεί μια υδρόφοβη διεπιφάνεια στην οποία

μπορεί να προσκολληθεί η λιπάση μέσω του καπακιού και να παραμένει το καταλυτικό της κέντρο προσβάσιμο στο υπόστρωμα, επιταχύνοντας έτσι την κινητική του ενζύμου.

I.2.6. Η λιπάση B από το μικροοργανισμό *Candida antarctica*

Η πρώτη κρυσταλλογραφική μελέτη της λιπάσης B από *Candida antarctica* (CALB), της πιο ευρέως χρησιμοποιούμενης λιπάσης σε βιοτεχνολογικές μεθόδους, παρουσιάστηκε το 1994. Η CALB είναι μια σφαιρική πρωτεΐνη με διαστάσεις 30 Å×40 Å×50 Å και μοριακό βάρος 33.273 KDa, ενώ οι διαστάσεις της ενεργού περιοχής είναι περίπου 10 Å×4 Å εύρος και 12 Å βάθος (Εικόνα 4) [27].

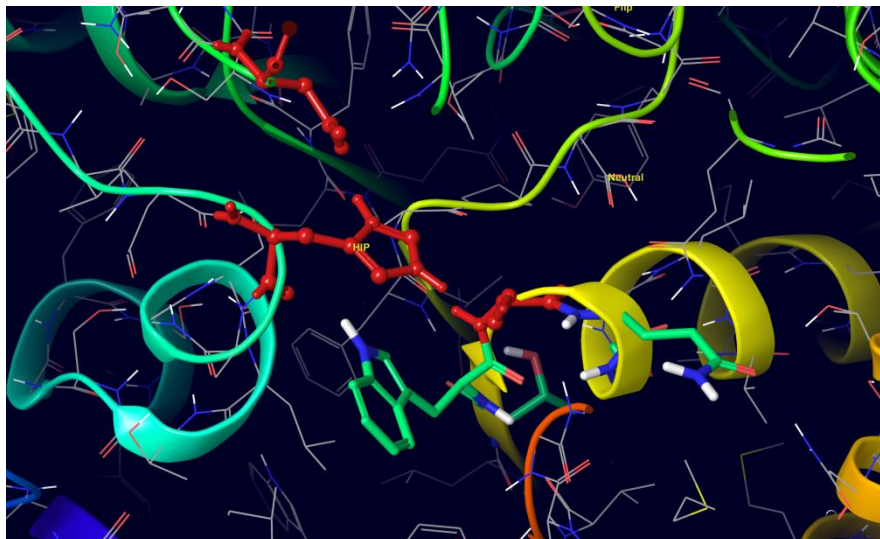


Εικόνα 4: Απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής της CALB

Η CALB συνίσταται από 317 κατάλοιπα αμινοξέων. Αμινοξέα όπως **V**, **L**, **I**, **G**, **A**, συμβάλλουν στο 40.1 % της αλληλουχίας του ενζύμου, ενώ **S** και **T**, συμβάλλουν στο 18.3 % των συνολικών καταλοίπων αμινοξέων. Το υπόλοιπο των καταλοίπων αμινοξέων αποτελείται από 15.8 % σε **D**, **E**, **N** και **Q**, 9.46 % σε **P**, 7.6 % σε **W**, **Y** και **F**, 5.6 % σε **R**, **K** και **H** και το τελευταίο 3.15 % αντιστοιχεί σε **C** και **M** [28].

Η CALB περιέχει μόνο επτά β-πτυχώσεις και επομένως αποκλίνει από την παραδοσιακή α/β-δομή υδρολάσης. Η καταλυτική της τριάδα αποτελείται από τα κατάλοιπα **D**¹⁸⁷, **H**²²⁴, **S**¹⁰⁵ όπως φαίνεται με κόκκινο χρώμα στην Εικόνα 5. Το συντηρημένο πενταπεπτίδιο **Sm-**

X-Nu-X-Sm (συνήθως **GxSxG**) που περιβάλλει την καταλυτική **S** της CALB, είναι διαφορετικό από ότι στις περισσότερες λιπάσες. Το πρώτο κατάλοιπο **G** έχει αντικατασταθεί από ένα κατάλοιπο **T** (**TWSQG**).

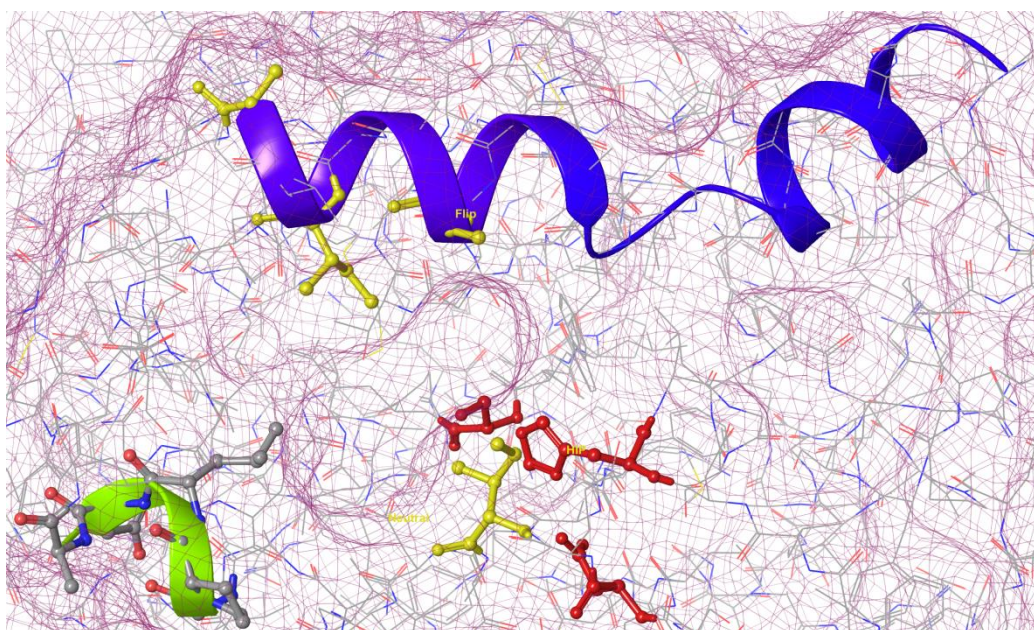


Εικόνα 5: Εστιασμένη απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής της CALB όπου με κόκκινο χρώμα φαίνεται η καταλυτική τριάδα, ενώ με ανοικτό πράσινο φαίνεται το συντηρημένο πενταπεπτίδιο (TWSQG)

Η κρυσταλλική δομή της CALB έδειξε ότι διαθέτει ένα αρκετά στενό και βαθύ κανάλι που οδηγεί σε μια ευρεία ενεργό περιοχή που εμπεριέχει και την οπή οξανιόντος. Το σχήμα αυτού του καναλιού είναι πιθανώς υπεύθυνο για την υψηλή στερεοεξειδίκευση του ενζύμου. Προσομοιώσεις μοριακής δυναμικής της λιπάσης CALB σε καθαρούς οργανικούς διαλύτες (μεθανόλη, χλωροφόρμιο, ισοπεντάνιο, τολουόλιο και κυκλοεξάνιο), έδειξαν μία μείωση κατά 10 % στην υδρόφιλη και 1 % αύξηση στην υδρόφοβη επιφάνεια της πρωτεΐνης. Η προσομοίωση μοριακής δυναμικής της CALB αποδείχθηκε ότι εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την διηλεκτρική σταθερά του διαλύτη, δείχνοντας μεγάλη ευελιξία στο H₂O και χαμηλή ευελιξία στους οργανικούς διαλύτες. Αξιοσημείωτο είναι, ότι μειώνοντας την διηλεκτρική σταθερά του διαλύτη, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στον αριθμό των μορίων H₂O που συνδέονται στην επιφάνεια του ενζύμου, δημιουργώντας δίκτυα H₂O (Clusters) [29].

Το μεγάλο πλεονέκτημα της CALB, που την κάνει να διαφέρει από τις άλλες λιπάσες έγκειται στο γεγονός ότι δεν απαιτείται διεπιφανειακή ενεργοποίηση για την καταλυτική της δράση, παρόλο που διαθέτει δύο έλικες με μεγαλύτερη κινητικότητα σε σχέση με την υπόλοιπη δομή της που οριοθετούν την είσοδο στην ενεργό περιοχή, μία κοντή έλικα (μήκους 4 καταλοίπων) και μία μεγαλύτερη έλικα (μήκους 19 καταλοίπων) (Εικόνα 6). Έχει

προταθεί ότι η CALB μπορεί να πάρει και την ανοικτή αλλά και την κλειστή διαμόρφωση, όμως αυτή η εναλλαγή δεν πυροδοτείται από την επαφή της με μια λιπόφιλη επιφάνεια όπως συμβαίνει στις άλλες λιπάσες, αλλά εξαρτάται από την τιμή pH. Υπεύθυνη για αυτήν την συμπεριφορά είναι η δυνατότητα σχηματισμού μίας γέφυρας άλατος μεταξύ του D^{145} της $\alpha 5$ -έλικας και K^{290} της $\alpha 10$ -έλικας (Εικόνα 6) [30]. Η διεπιφανειακή ενεργοποίηση για τις λιπάσες δεν θα πρέπει να σχετίζεται μόνο με βάση την παρουσία ή απουσία μιας περιοχής καπακιού στην δομή του ενζύμου, αλλά θα πρέπει να σχετίζεται και με την σύνθεση αμινοξέων των περιοχών του καπακιού, αλλά και πώς αυτές αντιδρούν σε αλλαγές στην διηλεκτρική σταθερά ή στην ιονική ισχύ του μέσου αντίδρασης [31].



Εικόνα 6: Η μικρή $\alpha 5$ -έλικα που φαίνεται με πράσινο χρώμα (κατάλοιπα 142-146) και η μεγάλη $\alpha 10$ -έλικα που φαίνεται με μπλε χρώμα (κατάλοιπα 268-287) για την λιπάση CALB. Με κίτρινο χρώμα απεικονίζονται τα τέσσερα υδρόφοβα κατάλοιπα (I^{189} , L^{287} , A^{282} και I^{285}) που οριοθετούν την θέση πρόσδεσης της αλκοόλης, ενώ με κόκκινο χρώμα απεικονίζεται η καταλυτική τριάδα.

Η ενεργός περιοχή της λιπάσης CALB έχει δύο περιοχές (sides) που αντιστοιχούν στα σημεία όπου τα υποστρώματα δεσμεύονται για να πραγματοποιηθεί κατάλυση. Υπάρχει η θέση πρόσδεσης της ακυλομάδας και η θέση πρόσδεσης της αλκοόλης. Τέσσερα υδρόφοβα κατάλοιπα (δύο κατάλοιπα **I**, **L** και **A**) οριοθετούν την θέση πρόσδεσης της αλκοόλης, σχηματίζοντας ένα στενό τούνελ μέσα από το οποίο πρέπει να περάσει το υπόστρωμα (Εικόνα 6). Τα τετραεδρικά ενδιάμεσα που δημιουργούνται κατά την κατάλυση σταθεροποιούνται μέσω δεσμών υδρογόνου στην οπή οξυανιόντος.

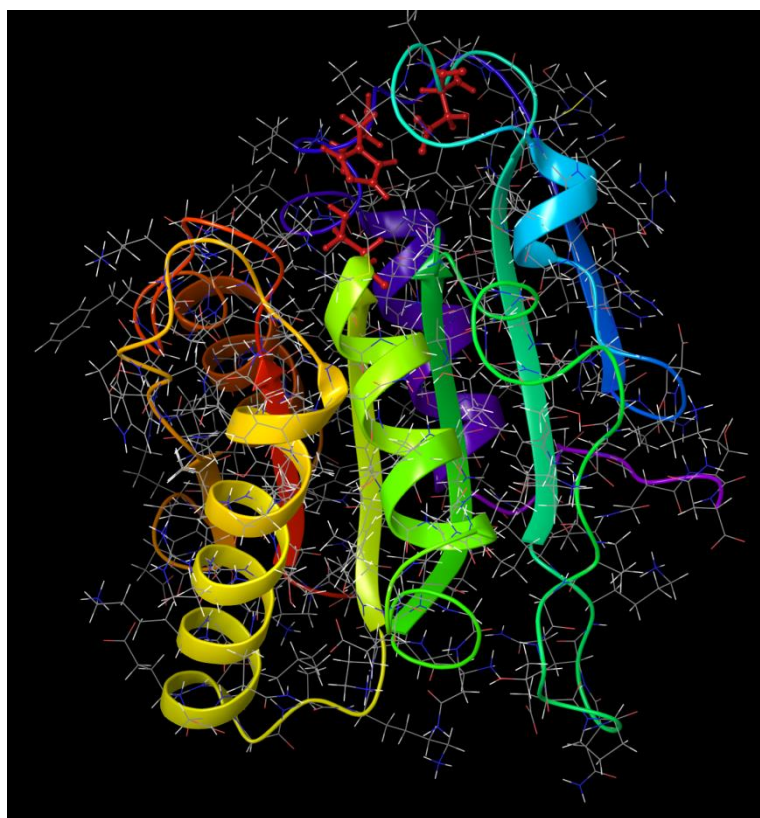
Μπορεί ένα ελεύθερο ένζυμο να χαρακτηρίζεται ως αποτελεσματικό για ένα ορισμένο τύπο αντιδράσεων, αλλά η εφαρμογή του συχνά να περιορίζεται λόγω της έλλειψης μακροπρόθεσμης σταθερότητας υπό τις συνθήκες της διεργασίας, καθώς επίσης και από τις δυσκολίες στην ανάκτηση και ανακύκλωσή του. Τα ακινητοποιημένα ένζυμα προσφέρουν κάποια λειτουργικά πλεονεκτήματα έναντι των ελεύθερων ενζύμων, με κυριότερα, την εύκολη απομάκρυνσή τους από το μείγμα της αντίδρασης, την αυξημένη σταθερότητά τους και την προσαρμοστικότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου, αφού η μήτρα μπορεί να τροποποιήσει ή να προσδώσει νέες ιδιότητες στο ένζυμο. Η ακινητοποίηση είναι επομένως συχνά το κλειδί για τη βελτίωση της λειτουργικής απόδοσης ενός ενζύμου και συμβάλλει στην προσαρμογή των ιδιοτήτων του ενζύμου για μία συγκεκριμένη εφαρμογή [28].

Αρκετές παραλλαγές της λιπάσης B από *Candida antarctica* έχουν δημιουργηθεί για να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες βιομηχανικές εφαρμογές. Η CALB είναι γνωστό ότι δέχεται ως υποστρώματα πολλές διαφορετικές αλκοόλες, αλλά πολύ λίγα οξέα αποτελούν υποστρώματα για το ένζυμο αυτό. Οξέα με ογκώδεις ακυλομάδες παρουσιάζουν προβλήματα στερεοχημικής παρεμπόδισης, λόγω του περιορισμένου μεγέθους της θέσης πρόσδεσης. Εξαιτίας αυτού, η CALB γενικά καταλύει αντιδράσεις μόνο με οξέα ευθείας αλυσίδας, προτιμώντας εκείνα με 5 έως 12 άτομα άνθρακα.

I.2.7. Η λιπάση A από το μικροοργανισμό *Bacillus subtilis*

Εξωκυτταρική λιπολυτική δραστηριότητα του *B. subtilis* παρατηρήθηκε για πρώτη φορά το 1979. Παρόλο ταύτα η έρευνα δεν ξεκίνησε πριν το 1992, όταν το γονίδιο της λιπάσης lipA κλωνοποιήθηκε, βρέθηκε η αλληλουχία του, υπερεκφράστηκε και στην συνέχεια η απομονωμένη πρωτεΐνη χαρακτηρίστηκε. Αργότερα βρέθηκε και ένα δεύτερο γονίδιο, lipB, το οποίο είναι 68 % ταυτόσημο με το lipA σε επίπεδο νουκλεϊνικών οξέων. Η λιπάση-A από *B. subtilis* (LipA) που η καταλυτική της τριάδα αποτελείται από τα κατάλοιπα D^{133} , H^{156} , S^{77} όπως φαίνεται με κόκκινο χρώμα στην Εικόνα 7, είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα διότι έχει μοριακή μάζα 19.348 kDa και 181 κατάλοιπα αμινοξέων κατατάσσοντάς την σε μια από τις μικρότερες λιπάσες σε σύγκριση με λιπάσες άλλων οργανισμών. Επιπλέον, η LipA είναι πολύ ανθεκτική σε μέσα αντίδρασης με βασικές τιμές pH, παρουσιάζοντας βέλτιστη δραστηριότητα σε τιμή pH = 10. Έχει χαρακτηριστεί ως λιπάση παρά ως εστεράση, διότι είναι σε θέση να υδρολύει Sn-1 και Sn-3 εστέρες της γλυκερόλης με λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας. Παρ όλα αυτά, παρουσιάζει υψηλότερη δραστηριότητα σε εστέρες γλυκερόλης με

λιπαρά οξέα αλυσίδων μεσαίου μήκους (C₈), κάνοντας την από αυτήν την άποψη να μοιάζει με μια εστεράση [32].



Εικόνα 7: Απεικόνιση της τρισδιάστατης δομής της LipA, με κόκκινο χρώμα, όπου φαίνεται η καταλυτική της τριάδα που αποτελείται από τα κατάλοιπα D¹³³, H¹⁵⁶, S⁷⁷

Η LipA δεν απαιτεί διεπιφανειακή ενεργοποίηση, γεγονός που μαζί με το μικρό της μέγεθος, δείχνει ότι δεν διαθέτει ένα καπάκι. Εκτός από την LipA, δύο ακόμα υδρολάσες χωρίς καπάκι είναι γνωστές, η Κουτινάση από το *Fusarium solani* και η Ακετυλξυλάνη, μία εστεράση από τον *Penicillium purpurogenum*. Αυτά τα ένζυμα διαθέτουν μια εύκολα προσβάσιμη ενεργό περιοχή καθώς και μια προσχηματισμένη οπή οξυανιόντος, η οποία σταθεροποιεί τα αρνητικά φορτισμένα τετραεδρικά ενδιάμεσα της καταλυόμενης αντίδρασης. Ωστόσο, οι αλληλουχίες τους δεν δείχνουν καμία ομολογία με αυτήν της LipA, και έτσι παραμένει ανοικτό το ερώτημα εάν η ενεργός περιοχή της μοιάζει με εκείνες της Κουτινάσης από το *Fusarium solani* και της εστεράσης Ακετυλξυλάνης από τον *Penicillium purpurogenum* [32].

Λόγω της πολύ χαμηλής εξειδίκευσης υποστρώματος, η LipA έχει βρει σημαντικές βιομηχανικές εφαρμογές στον διαχωρισμό ρακεμικών μιγμάτων, στην σύνθεση εστέρων και

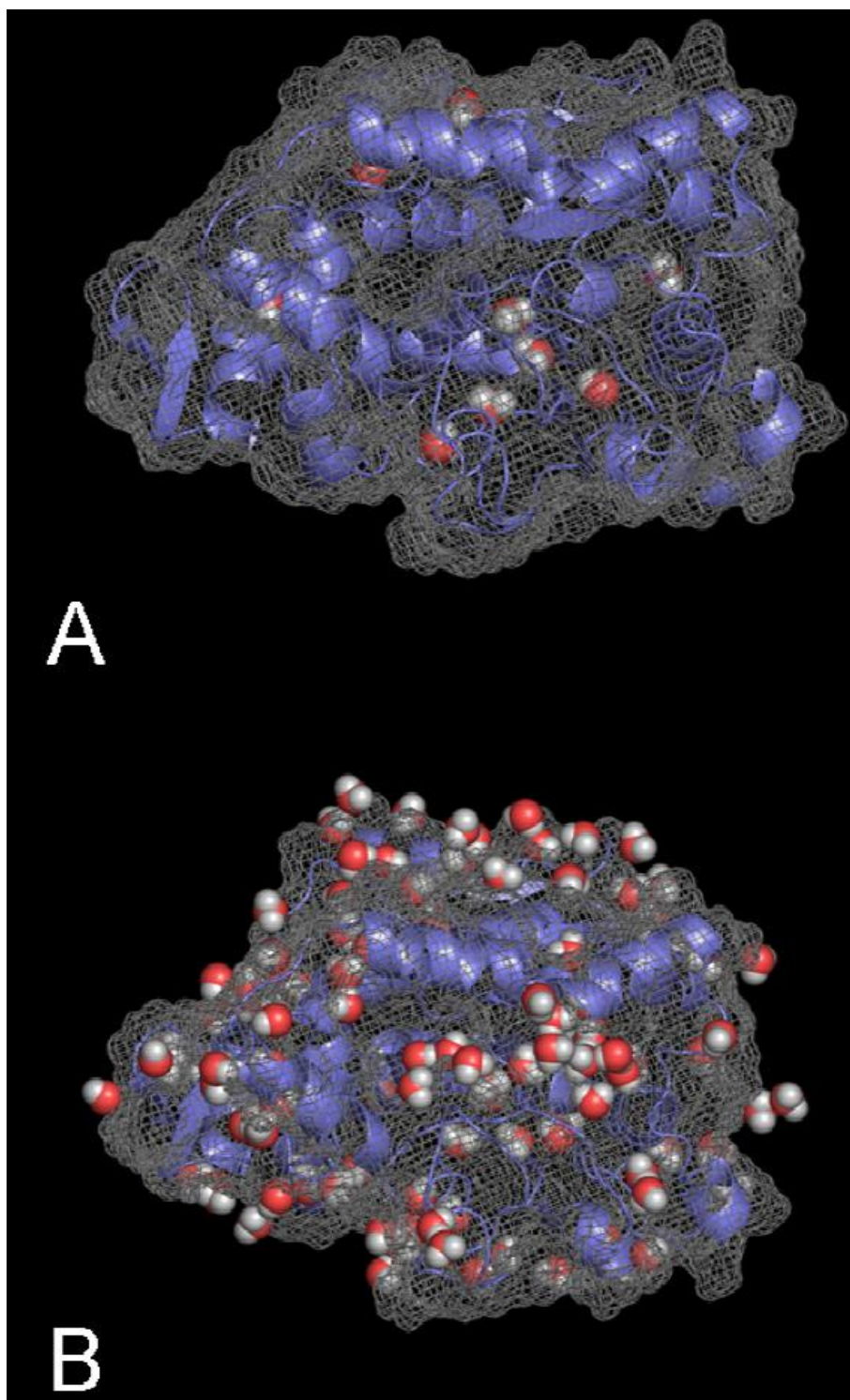
σε αντιδράσεις μετεστεροποίησης. Επιπλέον, χρησιμοποιείται ως πρόσθετο σε απορρυπαντικά πλυντηρίου.

I.3. Δράση ενζύμων σε οργανικούς διαλύτες

Οι ταχύτητες των ενζυμικών αντιδράσεων σε οργανικούς διαλύτες είναι 4-5 τάξεις μεγέθους χαμηλότερες σε σχέση με αυτές σε διαλύτη H_2O . Η αιτία αυτού του φαινομένου δεν θα πρέπει να αποδοθεί σε ένα μοναδικό παράγοντα, αλλά σε ένα σύνολο παραγόντων που ρυθμίζουν την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης. Οι παράγοντες αυτοί βρίσκονται σε μια λεπτή ισορροπία μεταξύ τους και η διατάραξη αυτής της ισορροπίας προκαλεί την μείωση της ενζυμικής ταχύτητας. Όλοι αυτοί οι παράγοντες όμως, σχετίζονται με τα προσδεμένα μόρια H_2O στο ένζυμο.

Υπάρχουν δυο διακριτοί πληθυσμοί των ενζυμικά προσδεμένων H_2O : (α) Το σφιχτά προσδεμένο H_2O /κρυσταλλογραφικό H_2O (tightly bound water) το οποίο δεν ανταλλάσσεται με άλλα μόρια H_2O στο ένζυμο ή με τον διαλύτη (bulk solvent) και είναι απαραίτητο για την διατήρηση της καταλυτικά ενεργής διαμόρφωσης του ενζύμου και (β) το ασθενώς προσδεμένο H_2O (loosely bound water), που ανταλλάσσεται ελεύθερα και συνεχώς με τον διαλύτη. Η κατανομή του ασθενώς προσδεμένου H_2O στην επιφάνεια του ενζύμου δεν είναι κανονική/ομοιόμορφη, αλλά υπάρχουν κάποιες προτιμώμενες περιοχές πρόσδεσής του, όπως είναι οι φορτισμένες ομάδες των επιφανειακών αμινοξέων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το H_2O να οργανώνεται σε συμπλέγματα (clusters) εκλεκτικά σε αυτές τις περιοχές, αφήνοντας τις άλλες εκτεθειμένες στον οργανικό διαλύτη. Ο αριθμός και το μέγεθος των συμπλεγμάτων διαφέρει ανάλογα με το είδος του οργανικού διαλύτη. Σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες, με αύξηση του προστιθέμενου H_2O , αυξάνεται ο αριθμός των συμπλεγμάτων στην επιφάνεια του ενζύμου, ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται και το μέγεθός τους, αφού το προστιθέμενο H_2O ενσωματώνεται στα είδη υπάρχοντα συμπλέγματα. Παίρνοντας ως παράδειγμα την CALB, σε διαλύτη H_2O υπάρχουν 13 προσδεμένα μόρια H_2O , στην μεθανόλη 26 και στην ισοπροπανόλη 31, δηλαδή ο αριθμός τους αυξάνεται ανάλογα του $\log P$ (Μέτρο της υδροφοβικότητας των διαλυτών, P είναι ο συντελεστής κατανομής μιας ένωσης μεταξύ οκτανόλης και H_2O) και αντιστρόφως ανάλογα της διηλεκτρικής σταθεράς του διαλύτη (Εικόνα 8). Στους πολικούς οργανικούς διαλύτες τα συμπλέγματα H_2O είναι πολύ μικρά, συνήθως λιγότερο των τριών μορίων H_2O , διότι υπάρχει μια δυναμική ισορροπία όπου το H_2O αμφιταλαντεύεται ανάμεσα στα συμπλέγματα

και τον διαλύτη. Η υψηλή ταχύτητα ανταλλαγής μορίων H_2O με διαλύτη είναι και ένας από τους λόγους αύξησης της ευπλασίας του ενζύμου. Έτσι σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες παρόλο που υπάρχουν περισσότερα μόρια H_2O στην επιφάνεια του ενζύμου, αυτό είναι πιο άκαμπτο (rigid) διότι αυτό δεν παρουσιάζει υψηλή ταχύτητα ανταλλαγής.



Εικόνα 8: Μόρια H_2O στην επιφάνεια της CALB, (A) σε διαλύτη H_2O και (B) σε διαλύτη κυκλοεξάνιο.

Ένας άλλος λόγος αυξομείωσης της ευπλασίας του ενζύμου είναι η διαφορά συμπεριφοράς των αμινοξέων σε οργανικούς διαλύτες. Συγκεκριμένα τα υδρόφοβα αμινοξέα (**V, Y, T, F, L, I, W**) που είναι πακεταρισμένα στον πυρήνα του ενζύμου (Core) δεν φαίνεται να επηρεάζονται, όπως τα υδρόφιλα αμινοξέα (**D, R, E, N**) που βρίσκονται στην επιφάνεια του ενζύμου και σχηματίζουν ιονικούς και δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τους. Αυτοί οι δεσμοί είναι πιο ισχυροί από ότι στους υδατικούς διαλύτες διότι πλέον δεν επιδιαλυτώνονται από το H_2O και έτσι το ένζυμο χάνει μέρος της ευπλασίας/ευκαμψίας του (flexibility). Η ισχύς αυτών των δεσμών στους οργανικούς διαλύτες είναι ανάλογη του $\log P$ και αντιστρόφως ανάλογη της διηλεκτρικής σταθεράς. Έτσι, για μέγιστη ευκαμψία θα πρέπει να βρεθεί ισορροπία ανάμεσα στην διηλεκτρική σταθερά και το $\log P$ του διαλύτη, ώστε και να υπάρχει το κατάλληλο μέγεθος των συμπλεγμάτων, για μειωμένες αλληλεπιδράσεις των υδρόφιλων αμινοξέων, αλλά και τα μόρια H_2O των συμπλεγμάτων να διαθέτουν υψηλή ταχύτητα ανταλλαγής.

Κατά την διάρκεια προσομοιώσεων με Y/Π με την CALB, βρέθηκε ότι σε μίγμα H_2O και μεθανόλης, τα 9 μόρια H_2O (κρυσταλλικά H_2O) που είχαν προσδιοριστεί στην κρυσταλλική της δομή είναι σφιχτά προσδεμένα και δεν ανταλλάσσονται, με δύο από αυτά, το H_2O^{318} και το H_2O^{325} να βρίσκονται στο καταλυτικό κέντρο. Τα υπόλοιπα μόρια H_2O του ενζύμου ανταλλάσσονται με μεθανόλη, εκ των οποίων πέντε παρευρίσκονται στο καταλυτικό κέντρο. Αφαίρεση ή αντικατάσταση μορίων H_2O που παρευρίσκονται στο καταλυτικό κέντρο μπορεί να προκαλέσει μικρές διαμορφωτικές αλλαγές, που έχουν ως αποτέλεσμα την μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα. Οι πολικοί οργανικοί διαλύτες έχουν την ικανότητα, ευρισκόμενοι στην κατάλληλη απόσταση, να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου με τα επιφανειακά, αλλά και με τα πιο κρίσιμα μόρια H_2O , αυτά που παρευρίσκονται στο καταλυτικό κέντρο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να τα απομακρύνουν (stripping). Αυτή η ικανότητα των οργανικών διαλυτών είναι ανάλογη της διηλεκτρικής σταθεράς τους και αντιστρόφως ανάλογη του μεγέθους τους. Μπορεί αυτή η ικανότητα να είναι εν μέρει επιθυμητή, διότι μέσω αυτής αυξάνεται η κινητικότητα του H_2O και άρα η ευπλασία του, αλλά τα πέντε μόρια H_2O που ανταλλάσσονται με μεθανόλη στο καταλυτικό κέντρο της CALB έχει ως αποτέλεσμα η μεθανόλη να δημιουργεί δεσμό υδρογόνου με την καταλυτική **S**, αποπροσανατολίζοντάς την, από τον απαραίτητο δεσμό υδρογόνου για την λειτουργία του συμπλόκου μεταφοράς φορτίου με την καταλυτική **H** (απόσταση $> 3.5 \text{ \AA}$), με αποτέλεσμα την κατακόρυφη πτώση της ενζυμικής δραστηριότητας.

Ανακεφαλαιώνοντας, όλα τελικά εξαρτώνται από το είδος του χρησιμοποιούμενου ενζύμου, δηλαδή ένζυμα τα οποία έχουν το καταλυτικό τους κέντρο προοργανωμένο (pre-

organized) ή είναι ακινητοποιημένα, η ενζυμική τους δραστηριότητα δεν επηρεάζεται τόσο από την ευπλασία, οπότε οι περισσότερες αρνητικές επιδράσεις που ασκούνταν από τους μη πολικούς διαλύτες, πλέον δεν υφίστανται. Κάτι που θα πρέπει όμως να προσεχτεί, είναι τα μόρια H_2O να μην είναι τόσα (συνήθως χρειάζονται περισσότερα από 500 μόρια H_2O) ώστε να σχηματιστεί μια υδατική στοιβάδα γύρω από το ένζυμο που θα προκαλούσε μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας λόγω φαινομένων μεταφοράς μάζας του υποστρώματος διάμεσου της διπλοστοιβάδας Helmotz-Stern. Από την άλλη βέβαια η δραστηριότητα επηρεάζεται και από το είδος του καταλυτικού κέντρου του ενζύμου, δηλαδή κατά πόσο είναι ή δεν είναι εκτεθειμένο στο μέσο της αντίδρασης π.χ. στην CALB το καταλυτικό κέντρο είναι περισσότερο προστατευμένο από τον διαλύτη από ότι είναι αυτό της LipA. Έτσι ένζυμα όπως η CALB δεν επηρεάζονται τόσο πολύ από την αφαίρεση σημαντικών μορίων H_2O (με εξαίρεση την μεθανόλη, που λόγω του πολύ μικρού μεγέθους της μπορεί να εισχωρήσει στο καταλυτικό κέντρο) που προκαλείται από τους πολικούς οργανικούς διαλύτες και θα επηρεαζόταν ακόμα λιγότερο εάν το καταλυτικό κέντρο του ήταν πλήρως προστατευμένο από το διαλύτη όταν το υπόστρωμα θα είχε προσδεθεί στο ένζυμο [33], [34], [29], [35], [36], [37].

Παρόλο που η βιβλιογραφία επικεντρώνεται περισσότερο στην χρήση λιπασών για αντιδράσεις εστεροποίησης και μετεστεροποίησης σε οργανικούς διαλύτες, εντούτοις δεν είναι η μόνη οικογένεια ενζύμων που είναι ανθεκτική σε οργανικούς διαλύτες. Οι πρωτεάσες και ιδιαίτερα οι σερινοπρωτεάσες είναι ανθεκτικές και καταλυτικά ενεργές σε οργανικούς διαλύτες απουσία H_2O [38], [39], [40]. Το καταλυτικό κέντρο άλλωστε των σερινοπρωτεασών και των λιπασών είναι πανομοιότυπο, ενώ οι σερινοπρωτεάσες ταυτόχρονα δεν διαθέτουν καπάκι (lid) που να ελέγχει την είσοδο των υποστρωμάτων και το οποίο πολλές φορές αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για τις περισσότερες λιπάσες [41]. Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες πρωτεάσες για αντιδράσεις εστεροποίησης και μετεστεροποίησης είναι η Σουμπτιλίσίνη (Carlsberg), α -Χυμοθρυψίνη, θερμολυσίνη κ.α. δίνοντας μια ευρεία γκάμα χρησιμοποιούμενων υποστρωμάτων από αιθανόλη και 1-βουτανόλη έως ολιγοσακχαρίτες, κυκλοδεξτρίνες (CDs) και διάφορα στεροειδή ως δέκτες ακυλίου και από λιπαρά οξέα έως πολυπεπίδια ως δότες ακυλίου [38], [42], [43], [44].

Ορισμένα υποστρώματα είναι διαλυτά μόνο σε πολικούς υδρόφιλους οργανικούς διαλύτες, στους οποίους τα περισσότερα ένζυμα, όπως και οι λιπάσες, παρουσιάζουν πολύ μειωμένη δραστηριότητα [39], [42], [41]. Σε τέτοιους διαλύτες βρέθηκε ότι οι πρωτεάσες παραμένουν δραστικές, ιδιαίτερα ύστερα από την λυοφιλοποίησή τους με διάφορα πρόσθετα όπως είναι τα απλά άλατα π.χ. $NaCl$ ή προστατευτικά λυοφιλοποίησης όπως η

σουκρόζη και τρεχαλόζη [45], [46], [47]. Η παράμετρος k_{cat}/K_m της Σουμπτιλίσινης ενεργοποιημένης με 98 % (w/w) KCl βρέθηκε ότι είναι αυξημένη κατά 20000 φορές για μια αντίδραση μετεστεροποίησης, σε σχέση με την μη λυοφιλοποιημένη με KCl Σουμπτιλίσίνη [48].

I.4. Η τιμή pH στους οργανικούς διαλύτες

Η έννοια της μέτρησης των συγκεντρώσεων των αντιδρώντων και η εκτίμηση συμβατικών παραμέτρων, όπως είναι η τιμή pH, είναι ένα δύσκολο έργο σε συστήματα οργανικών διαλυτών. Τα υδατικά διαλύματα είναι τα μόνα μέσα όπου η τιμή pH διατηρεί την καλά γνωστή σημασία της, ενώ σε μη-υδατικά μέσα αυτή η κλίμακα δεν είναι έγκυρη. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητο, να χρησιμοποιούνται ειδικές μέθοδοι και διαδικασίες ώστε να ξεπεραστούν τα υπάρχοντα προβλήματα. Η τιμή pH κάθε μέσου αντίδρασης επηρεάζει τις σημαντικές λειτουργικές ομάδες ενός ενζύμου, των οποίων ο ιονισμός επηρεάζει άμεσα την ταχύτητα της αντίδρασης. Ο ιονισμός των λειτουργικών ομάδων των ενζύμων σε οργανικούς διαλύτες εξακολουθεί να επηρεάζεται και να είναι σημαντικός για την ταχύτητα της αντίδρασης, παρόλο που η έννοια της τιμής pH είναι διαφορετική. Ωστόσο, είναι σημαντικό να αναφερθεί, ότι οι ιονιζόμενες ενώσεις όταν λυοφιλοποιούνται (συμπεριλαμβανομένων των ενζύμων και φυσικά των λιπασών), διατηρούν την κατάσταση ιονισμού τους, σύμφωνα με την τιμή pH του υδατικού διαλύματος από όπου υπήρχαν τελευταία. Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται μνήμη pH (pH memory) και είναι μία ιδιότητα ιδιαίτερα χρήσιμη στις ενζυμικές αντιδράσεις σε μη συμβατά μέσα [49].

Ο Mandel πρωτοστάτησε παρουσιάζοντας μια ενιαία κλίμακα για την ποσοτική σύγκριση του βαθμού οξύτητας μιας διαλυμένης χημικής ένωσης (συμπεριβαλλομένων των ενζύμων) σε διαφορετικά μέσα. Ως εκ τούτου, είναι δυνατόν να εκτιμηθούν οι οξύτητες H^+ (διαλ.) ανεξάρτητα από τον διαλύτη σύμφωνα με την Εξίσωση 1.

$$\mu_{\text{απολ.}}(H^+, \text{διαλ.}) = \Delta_{\text{διαλ.}} G^+(H^+) = pH \times (-5.71 \text{ kJ mol}^{-1}) \quad (1)$$

Οι τιμές $\Delta_{\text{διαλ.}} G^+(H^+)$ μπορούν να βρεθούν από πίνακες στη βιβλιογραφία. Επισημαίνεται, ότι οι πρότυπες συνθήκες αντιστοιχούν σε $1.0 \text{ mol L}^{-1} H^+(\text{διαλ.})$ σε 298.15 K και 1 atm και τιμή $pH = 0$. Έτσι οι απόλυτες οξύτητες ανεξάρτητα από τον διαλύτη μπορούν πλέον να συγκριθούν με την κλίμακα τιμών pH (Εξίσωση 2) [50].

$$\text{pH}_{\text{απολ.}} = \frac{\mu_{\text{απολ.}}(\text{H}^+, \text{διαλ.})}{-5.71 \text{ kJmol}^{-1}} \quad (2)$$

Η φύση, η επίδραση και η μέτρηση της τιμής του pH σε οργανικούς διαλύτες είναι μια ιδιαίτερα δύσκολη και απαιτητική διεργασία, έτσι με την κλίμακα της απόλυτης θερμοδυναμικής οξύτητας δίνεται η ικανότητα κατανόησης και εκτίμησης της τιμής οξύτητας (ως ισοδύναμο της τιμής pH) ανεξάρτητα από το μέσο της αντίδρασης [51].

I.5. Μέθοδοι απομάκρυνσης H₂O από το μίγμα αντίδρασης

Όπως περιγράφηκε, το H₂O που υπάρχει στο μίγμα αντίδρασης είτε εμπεριέχεται από την αρχή (ως πρόσθετο των διαφόρων αντιδραστηρίων/υγρασία) είτε παράγεται κατά την διάρκειά της, είναι απαραίτητο να ρυθμιστεί σε μια ορισμένη τιμή. Οι δύο κύριες μέθοδοι απομάκρυνσης του H₂O, όπου και θα αναλυθούν περεταίρω είναι, είτε με χρήση μοριακών κοσκίνων, είτε με χρήση μεμβρανών υπερεξάτμισης. Έχουν χρησιμοποιηθεί και άλλες μέθοδοι απομάκρυνσης H₂O, όπως είναι η χρήση αλάτων, η διαβίβαση αερίου, η απόσταξη και η χημική καταστροφή του, αλλά η αποτελεσματικότητά τους είναι αρκετά περιορισμένη.

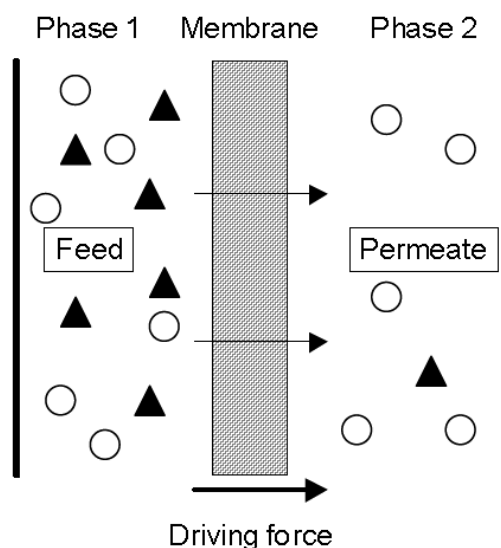
I.5.1. Μοριακά κόσκινα (Molecular sieves)

Τα μοριακά κόσκινα είναι υλικά από ζεόλιθο με μεγέθη πόρων από περίπου 3 Å έως και 10 Å. Κατά τη διαδικασία αφυδάτωσης ενός μίγματος, αυτό αφήνεται να περάσει μέσα από μια στήλη γεμισμένη με ένα προσφάτως ενεργοποιημένο στρώμα μοριακών κοσκίνων. Καθώς η μάζα του μίγματος εισέρχεται στο στρώμα μοριακών κοσκίνων, το H₂O μέσω ασθενών συνεκτικών δυνάμεων που ονομάζονται δυνάμεις van der Waals διαχέεται και προσροφάται μέσα στους πόρους της δομής του [52], [53].

I.5.2. Υπερεξάτμιση (Pervaporation)

Η υπερεξάτμιση είναι η επιλεκτική εξάτμιση ενός συστατικού από ένα υγρό μίγμα με τη χρήση ειδικής μεμβράνης. Γενικά, μια μεμβράνη υπερεξάτμισης ορίζει την διεπαφή μεταξύ των δύο φάσεων θέτοντας ένα φράγμα επιλεκτικής διαπερατότητας. Αυτό απεικονίζεται

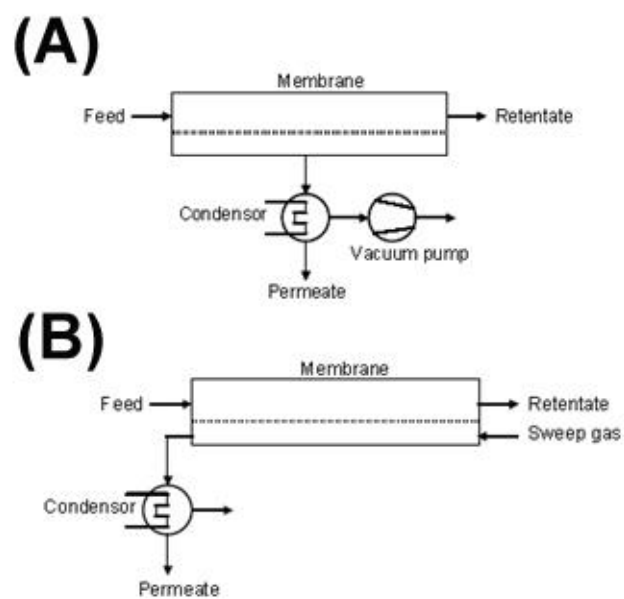
σχηματικά στην Εικόνα 9, όπου η φάση 1 είναι η τροφοδοσία (Feed), ενώ η φάση 2 αναφέρεται ως πέρασμα ή διήθημα (Permeate). Ο διαχωρισμός επιτυγχάνεται επειδή η μεμβράνη έχει την ικανότητα να μεταφέρει ένα τύπο μορίων από το μίγμα πιο εύκολα από άλλα είδη.



Εικόνα 9: Σχηματική αναπαράσταση της λειτουργίας της μεμβράνης υπερεξάτμισης

Η κινητήρια δύναμη για τη μεταφορά μάζας μπορεί να είναι η διαφορά πίεσης, το ηλεκτρικό δυναμικό, η συγκέντρωση και η θερμοκρασία [54], [55].

Η υπερεξάτμιση περιλαμβάνει έναν αριθμό διαδοχικών βημάτων, αρχικά η μεμβράνη προσροφά εκλεκτικά ένα ή περισσότερα από τα συστατικά του μίγματος, τα οποία στην συνέχεια διαχέονται διαμέσου της μεμβράνης και εξατμίζονται στην πλευρά του διηθήματος. Η κινητήρια δύναμη στην υπερεξάτμιση είναι συνήθως η διαφορά πίεσης που είτε επιτυγχάνεται με την εφαρμογή μιας αντλίας κενού είτε εφαρμόζοντας από την πλευρά της τροφοδοσίας αέριο υπό υψηλή πίεση (Εικόνα 10 A και Εικόνα 10 B) [56].



Εικόνα 10: Σχηματική αναπαράσταση της υπερεξάτμισης με την χρήση (Α) αντλίας κενού και (Β) αέριου υπό υψηλή πίεση

I.6. Βιοκαύσιμα

I.6.1. Εισαγωγή

Η αυξανόμενη βιομηχανοποίηση και μηχανοκίνηση έχει οδηγήσει σε μια απότομη αύξηση της ζήτησης καυσίμων με βάση το πετρέλαιο. Σήμερα τα ορυκτά καύσιμα καταλαμβάνουν το 80 % της πρωτογενούς ενέργειας που καταναλώνεται στον κόσμο, εκ των οποίων το 58 % καταναλώνεται από το τομέα των μεταφορών [57]. Οι πηγές των ορυκτών καυσίμων εξαντλούνται με γοργούς ρυθμούς, επιπλέον έχει βρεθεί ότι η καύση αυτών συμβάλλει στην δημιουργία των αερίων του θερμοκηπίου (GHG). Η κατανάλωση των ορυκτών καυσίμων για την κάλυψη των αναγκών σε ενέργεια έχει οδηγήσει σε πολλές αρνητικές επιπτώσεις, όπως είναι η αλλαγή του κλίματος, η υποχώρηση των παγετώνων που έχει ως αποτέλεσμα την άνοδο της στάθμης της θάλασσας και την απώλεια της βιοποικιλότητας κλπ. Η αύξηση ταυτόχρονα της ζήτησης ενέργειας έχει οδηγήσει σε αύξηση της τιμής του αργού πετρελαίου, επηρεάζοντας άμεσα την παγκόσμια οικονομία. Όλες αυτές οι αρνητικές επιπτώσεις έχουν οδηγήσει σε μια στροφή προς τις εναλλακτικές ανανεώσιμες πηγές ενέργειας, οι οποίες θα είναι βιώσιμες, αποτελεσματικές, οικονομικά αποδοτικές και με πολύ μικρότερες εκπομπές αερίων του θερμοκηπίου [58].

Τα βιοκαύσιμα αποτελούν την ευνοϊκότερη επιλογή εναλλακτικής πηγής καυσίμων λόγω της ανανεωσιμότητάς τους, της βιοαποικοδομησιμότητάς τους καθώς και τα αποδεκτά τους επίπεδα εκπομπής αερίων του θερμοκηπίου [59].

I.6.2. Βιοκαύσιμα ως απάντηση στα συμβατικά καύσιμα

Βιοκαύσιμα (biofuels) ονομάζονται τα καύσιμα εκείνα στερεά, υγρά ή αέρια, τα οποία προέρχονται από βιομάζα, το βιοδιασπώμενο δηλαδή κλάσμα προϊόντων ή αποβλήτων διαφόρων ανθρώπινων ή μη δραστηριοτήτων. Προέρχονται από οργανικά προϊόντα και θεωρούνται ανανεώσιμα καύσιμα και ως εκ τούτου έχουν το χαρακτηριστικό των χαμηλότερων εκπομπών CO₂ στο συνολικό κύκλο ζωής τους σε σχέση με τα συμβατικά ορυκτά καύσιμα, στοιχείο που εξαρτάται άμεσα από την προέλευση αλλά και τον τρόπο παραγωγής και διανομής τους [60].

Κατά την καύση των βιοκαυσίμων εκπέμπονται περίπου ίσες ποσότητες CO₂ με τα αντίστοιχα πετρελαϊκής προέλευσης. Επειδή όμως ο οργανικής προέλευσης άνθρακας που

περιέχουν έχει δεσμευτεί από την ατμόσφαιρα κατά την ανάπτυξη της οργανικής ύλης, το ισοζύγιο εκπομπών σε όλο τον κύκλο ζωής του βιοκαυσίμου είναι θεωρητικά μηδενικό. Στην πράξη επειδή κατά την παραγωγή και διακίνηση της πρώτης ύλης αλλά και των ίδιων των βιοκαυσίμων υπεισέρχονται και άλλες δραστηριότητες κατά τις οποίες παράγονται εκπομπές CO₂, το τελικό όφελος από τα καύσιμα αυτά μπορεί να είναι από μεγάλο έως πολύ μικρό [61], [62], [63].

Ως βιοκαύσιμα θεωρούνται τα ακόλουθα καύσιμα όπως ορίζει ο Νόμος [64] 3468/2006 ΦΕΚ.Α' 129, αρθ.2, §§7,8:

- ·Βιοντίζελ (πετρέλαιο βιολογικής προέλευσης) είναι οι μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων που παράγονται από φυτικά ή ζωικά λίπη και είναι ποιότητας πετρελαίου ντίζελ, για χρήση ως βιοκαύσιμο.
- ·Βιοαιθανόλη είναι η αιθανόλη που παράγεται από βιομάζα ή από βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα αποβλήτων, για χρήση ως βιοκαύσιμο.
- ·Βιοαέριο είναι το καύσιμο αέριο που παράγεται από βιομάζα ή από βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα βιομηχανικών και αστικών αποβλήτων, το οποίο μπορεί να καθαριστεί και να αναβαθμιστεί σε ποιότητα φυσικού αερίου, για χρήση ως βιοκαύσιμο ή το ξηλαέριο.
- ·Βιομεθανόλη είναι η μεθανόλη που παράγεται από βιομάζα, για χρήση ως βιοκαύσιμο
- ·Βιοδιμεθυλαιθέρας είναι ο διμεθυλαιθέρας που παράγεται από βιομάζα, για χρήση ως βιοκαύσιμο.
- ·Συνθετικά Βιοκαύσιμα είναι οι συνθετικοί υδρογονάνθρακες ή τα μίγματα συνθετικών υδρογονανθράκων που παράγονται από βιομάζα.
- ·Βιοϋδρογόνο είναι το υδρογόνο που παράγεται από βιομάζα ή βιοαποικοδομήσιμο κλάσμα βιομηχανικών και αστικών αποβλήτων, για χρήση ως βιοκαύσιμο.
- ·Καθαρά Φυτικά Έλαια είναι τα έλαια που παράγονται από ελαιούχα φυτά μέσω συμπίεσης, έκθλιψης ή ανάλογων μεθόδων, φυσικά ή εξευγενισμένα αλλά μη χημικώς τροποποιημένα.
- ·Βιο-ETBE είναι ο αιθυλο-τριτοταγής-βουτυλαιθέρας (ETBE) που παράγεται από βιοαιθανόλη, για χρήση ως βιοκαύσιμο.
- ·Βιο-MTBE είναι ο μεθυλο-τριτοταγής-βουτυλαιθέρας (MTBE) που παράγεται από βιομεθανόλη, για χρήση ως βιοκαύσιμο.

I.6.3. Κατάταξη Βιοκαυσίμων

Τα βιοκαύσιμα διαχωρίζονται σε τέσσερις κύριες κατηγορίες 1^{ης}, 2^{ης}, 3^{ης} και 4^{ης} γενιάς [63]. Ο διαχωρισμός αυτός γίνεται βάση των υλών που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή τους. Έτσι υπάρχουν τα βιοκαύσιμα 1^{ης} γενιάς που για την παραγωγή τους χρησιμοποιούνται ενεργειακές καλλιέργειες ως πρώτη ύλη και είναι αυτά τα οποία κατά βάση παράγονται αυτή τη στιγμή σε όλο τον κόσμο. Τα βιοκαύσιμα 2^{ης} γενιάς όπου σαν πρώτη ύλη χρησιμοποιούνται λιγνοκυτταρινούχα υλικά όπως υπολείμματα ξύλου, υπολειμματική βιομάζα κ.α. Τα βιοκαύσιμα 3^{ης} γενιάς όπου σαν πρώτη ύλη χρησιμοποιούνται μικροάλγη και φυτικά δεν θα ανταγωνίζονται τη χλωρίδα που χρησιμοποιείται για διατροφικές ανάγκες και τέλος τα βιοκαύσιμα 4^{ης} γενιάς, η παραγωγή των οποίων θα βασίζεται στην δέσμευση και την αποθήκευση του διοξειδίου του άνθρακα απευθείας από την ατμόσφαιρα [65], [60].

I.6.3.1. Πρώτης γενιάς υγρά βιοκαύσιμα

Τα υγρά βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς είναι το είδος των υγρών καυσίμων που παράγεται γενικά από σάκχαρα ή σπόρους και απαιτούν μια σχετικά απλή διαδικασία για την παραγωγή του τελικού προϊόντος. Το πιο γνωστό βιοκαύσιμο πρώτης γενιάς είναι η αιθανόλη που παράγεται με τη ζύμωση της ζάχαρης που εξάγεται από φυτά καλλιεργειών και άμυλο που περιέχεται στους κόκκους καλαμποκιού ή άλλων αμυλούχων φυτών. Καύσιμα πρώτης γενιάς παράγονται είδη σε μεγάλες ποσότητες από πολλές χώρες. Η βιωσιμότητα της παραγωγής βιοκαυσίμων πρώτης γενιάς ωστόσο είναι αμφίβολη, λόγω της σύγκρουσης με την αλυσίδα εφοδιασμού τροφίμων γεγονός που τα κάνει να έχουν υψηλό κόστος παραγωγής [63]. Η ταχεία επέκταση της παγκόσμιας παραγωγής βιοκαυσίμων από σιτηρά, ζάχαρη, και ελαιούχων καλλιεργειών έγινε η αφορμή να αυξηθεί το κόστος πολλών τροφίμων. Οι περιορισμοί αυτοί ευνοούν την αναζήτηση μη βρώσιμων πηγών βιομάζας για την παραγωγή βιοκαυσίμων [66].

I.6.3.2. Δεύτερης γενιάς υγρά βιοκαύσιμα

Τα υγρά βιοκαύσιμα δεύτερης γενιάς παράγονται γενικά μέσω δύο ριζικά διαφορετικών προσεγγίσεων, δηλαδή μέσω βιολογικής ή μέσω θερμοχημικής επεξεργασίας. Η πρώτη ύλη τους προέρχεται από: α) λιγνοκυτταρινούχα βιομάζα, δηλαδή μη βρώσιμα υπολείμματα

φυτικής παραγωγής τροφίμων, είτε βιομάζα από μη βρώσιμα φυτά (π.χ. χόρτα ή δέντρα που καλλιεργούνται ειδικά για παραγωγή ενέργειας), β) απόβλητα βιομηχανιών ή διαφόρων ανθρώπινων ή μη δραστηριοτήτων. Το κύριο πλεονέκτημα της παραγωγής βιοκαυσίμων δεύτερης γενιάς από μη edώδιμα προϊόντα είναι ότι περιορίζει τον άμεσο ανταγωνισμό μεταξύ της αλυσίδας παραγωγής τροφίμων έναντι της παραγωγής βιοκαυσίμων όπως συνέβαινε στα βιοκαύσιμα πρώτης γενιάς. Ιδιαίτερα όταν η παραγωγή τους γίνεται τοπικά στους σταθμούς παραγωγής της πρώτης ύλης και με ενζυμικές διεργασίες, τότε η παραγωγή τους είναι οικονομικά συμφέρουσα αλλά και το αποτύπωμα άνθρακα είναι σχεδόν μηδενικό [60].

I.6.3.3. Τρίτης γενιάς υγρά βιοκαύσιμα

Η παραγωγή των βιοκαυσίμων τρίτης γενιάς γίνεται, είτε από μικροβιακή βιομάζα είτε από μικροάλγη. Θεωρούνται ότι αποτελούν μια βιώσιμη εναλλακτική πηγή ενέργειας που στερείται τα σημαντικότερα μειονεκτήματα που συνδέονται με τα βιοκαύσιμα πρώτης και υπό προϋποθέσεις δεύτερης γενιάς, που είναι ο ανταγωνισμός για τις καλλιέργειες που χρησιμοποιούνται για τις διατροφικές ανάγκες κ.α. [66].

I.6.3.4. Τέταρτης γενιάς υγρά βιοκαύσιμα

Η παραγωγή βιοκαυσίμων τέταρτης γενιάς γίνεται είτε από γενετικά τροποποιημένους μικροοργανισμούς είτε από γενετικά τροποποιημένη μικροάλγη. Το πλεονέκτημα των βιοκαυσίμων τέταρτης γενιάς είναι ότι η γενετική τροποποίηση έχει κάνει εφικτή την δέσμευση και την αποθήκευση του διοξειδίου του άνθρακα απευθείας από την ατμόσφαιρα σε πολύ υψηλούς ρυθμούς, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται αρνητικό ισοζύγιο CO₂ [67].

I.7. Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

I.7.1. Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων με ένα υπόστρωμα

Τα ένζυμα, ως καταλύτες, επιταχύνουν όμοια και αντιστρεπτά χημικές αντιδράσεις που ευνοούνται θερμοδυναμικά. Η Ενζυμική Κινητική, ως τμήμα της Ενζυμολογίας, μελετά τους ενζυμικούς μηχανισμούς, τις συνθήκες και τις ταχύτητες των ενζυμικών αντιδράσεων. Η ανάπτυξη, π.χ. νέων φαρμάκων, αντιδραστηρίων αναλύσεων, κ.λπ. βασίστηκε στη γνώση των ενζυμικών μηχανισμών. Η κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων κατατάσσεται συστηματικά στην κινητική των καταλυόμενων χημικών αντιδράσεων. Οι ιδιαιτερότητές της προκύπτουν μόνο από τη μακρομοριακή φύση του καταλύτη, που είναι μια φυσική πρωτεΐνη (ένζυμο). Έχει βρεθεί ότι η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης εξαρτάται από τους εξής παράγοντες [68]:

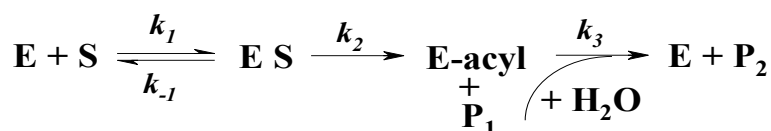
- (α) Την συγκέντρωση του υποστρώματος [S]
- (β) Την συγκέντρωση του ενζύμου [E]
- (γ) Την θερμοκρασία στην οποία γίνεται η ενζυμική αντίδραση
- (δ) Την τιμή του pH του μέσου (ρυθμιστικού διαλύματος) της αντίδρασης
- (ε) Την παρουσία διαφόρων ενζυμικών ή μη ενζυμικών τροποποιητών

Η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης, ως συνάρτηση πολλών παραμέτρων είναι η μαθηματική έκφραση της καταλυτικής διαδικασίας σε όρους σταθερών ταχύτητας και συγκεντρώσεων των αντιδρώντων. Η ενζυμική κινητική αποτελεί μερική περίπτωση της χημικής κινητικής. Επομένως, η επίδραση των ενζύμων μειώνει την απαιτούμενη ενέργεια ενεργοποίησης κατά τη μετατροπή των αντιδρώντων σε προϊόντα. Η διαφορά επιπέδων ελεύθερης ενέργειας μεταξύ αντιδρώντων και προϊόντων μιας αντίδρασης έχει τιμή ΔG^0 , που δεν αλλάζει με τη παρουσία του ενζύμου. Εκείνο που αλλάζει είναι η ενέργεια ενεργοποίησης $\Delta G^\ddagger$.

Οι Michaelis και Menten επιβεβαίωσαν πειραματικά τις θεωρητικές προτάσεις του Henri, προτείνοντας μάλιστα μια νέα ελαφρώς τροποποιημένη μαθηματική έκφραση (εξίσωση), η οποία δίνει την μεταβολή της ταχύτητας συναρτήσει της συγκέντρωσης του υποστρώματος η οποία και έγινε γνωστή ως εξίσωση Michaelis-Menten ή εξίσωση Henri-Michaelis-Menten. Από τότε, η εξίσωση των Michaelis-Menten έγινε ευρέως αποδεκτή και μέχρι σήμερα αποτελεί την βασική εξίσωση της ενζυμικής κινητικής. Η θεωρητική βάση στην οποία στηρίχθηκαν οι Michaelis και Menten για την παραγωγή της εξίσωσης τους είναι ίδια με αυτήν στην οποία στηρίχθηκε ο Henri και ονομάζεται θεωρία στάσιμης κατάστασης. Η

εξίσωση Michaelis-Menten είναι μία ορθογώνια υπερβολή της οποίας οι δύο ασύμπτωτες αντιστοιχούν στις τιμές των παραμέτρων $V_{\max}$ και K_m . Επομένως, η εξίσωση Michaelis-Menten μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό των παραμέτρων $V_{\max}$ και K_m (ή καλύτερα των k_{cat} και k_{cat}/K_m , αν είναι γνωστή η $[E]_0$).

Ένας γενικά αποδεκτός τρόπος δράσης των σερινοπρωτεϊνών είναι αυτός που περιγράφεται με το παρακάτω γενικό σχήμα αντιδράσεων (Σχήμα 5) [69], [70].



Σχήμα 5: Γενικό σχήμα δράσης των σερινοπρωτεϊνών.

Η ταχύτητα της αντίδρασης με καταλύτες σερινοπρωτεΐνες μεταβάλλεται ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος σύμφωνα με την εξίσωση Michaelis-Menten. Εφαρμόζοντας, όμως, την θεωρία της στάσιμης κατάστασης στο σχήμα αντιδράσεων (Σχήμα 5), οι παράμετροι της εξίσωσης Michaelis-Menten εκφράζονται με περισσότερο πολύπλοκες σχέσεις. Αποδεικνύεται, λοιπόν, ότι ισχύουν οι ακόλουθες σχέσεις:

$$\frac{k_{\text{cat}}}{K_m} = \frac{k_2}{K_S} \quad (3)$$

$$k_{\text{cat}} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3} \quad (4)$$

$$K_m = K_S \frac{k_3}{k_2 + k_3} \quad (5)$$

όπου $K_S = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}$. Όπως φαίνεται από την (εξίσωση 5), η K_S δεν πρέπει για κανένα λόγο να συγχέεται με την K_m .

Σημαντικό ρόλο στην κινητική των σερινοπρωτεϊνών παίζει η τάξη μεγέθους των σταθερών ταχύτητας k_2 και k_3 . Στις δύο ακραίες περιπτώσεις όπου $k_2 \ll k_3$ και $k_2 \gg k_3$, από τις εξισώσεις (3) ως (5) προκύπτει ότι: (α) αν ισχύει ότι $k_2 \ll k_3$, τότε το στάδιο που καθορίζει την ταχύτητα της αντίδρασης είναι η ακυλίωση. Οι εξισώσεις (4) και (5) απλοποιούνται και προκύπτει ότι $k_{\text{cat}} = k_2$ και $K_m = K_S$. Έτσι, η k_{cat} αντιπροσωπεύει, πλέον, την σταθερά ταχύτητας της ακυλίωσης, ενώ η K_m αποκτά την ίδια φυσική σημασία της ομώνυμης σταθεράς του Σχήματος 5 αφού πλέον είναι ίση με την K_S . (β) αν αντίθετα ισχύει

ότι $k_2 \gg k_3$, τότε το στάδιο που καθορίζει την ταχύτητα της αντίδρασης είναι η απακυλίωση. Οι εξισώσεις (4) και (5) απλοποιούνται και προκύπτει ότι $k_{cat} = k_3$ και $K_m = K_S \frac{k_3}{k_2}$. Η k_{cat} αντιπροσωπεύει, πλέον, την σταθερά ταχύτητας της απακυλίωσης ενώ η K_m αποκτά μια πιο σύνθετη φυσική σημασία.

I.7.1.1. Η σημασία των παραμέτρων Michaelis-Menten

I.7.1.1.1. Η έννοια της k_{cat} . Η καταλυτική σταθερά.

Στον απλό μηχανισμό Michaelis-Menten όπου υπάρχει μόνο το ES και όλα τα στάδια πρόσδεσης είναι ταχεία, η k_{cat} , είναι απλά η σταθερά ταχύτητας πρώτης τάξης, για την χημική μετατροπή του ES προς E+P. Σε πιο πολύπλοκες αντιδράσεις, η k_{cat} , είναι συνάρτηση όλων των σταθερών ταχύτητας πρώτης τάξης και δεν μπορεί να αποδοθεί σε κάποια επιμέρους πορεία εκτός και αν υπάρχουν άλλα απλοποιητικά στοιχεία. Στο παράδειγμα της αντίδρασης του Σχήματος 5, η k_{cat} φαίνεται να είναι συνάρτηση των k_2 και k_3 . Αλλά αν μία από αυτές τις σταθερές ταχύτητας (k_2 ή k_3) είναι πολύ μικρότερη από την άλλη, τότε αυτή θα ισούται με την k_{cat} . Ως προέκταση της τελευταίας πρότασης προκύπτει ότι η k_{cat} δεν μπορεί να είναι μεγαλύτερη από οποιαδήποτε σταθερά ταχύτητας πρώτης τάξης κατά την προς τα προϊόντα πορεία.

Η k_{cat} είναι μια πρώτης τάξης σταθερά ταχύτητας που αναφέρεται στις ιδιότητες και τις αντιδράσεις των συμπλόκων ενζύμου-υποστρώματος, ενζύμου ενδιάμεσου και ενζύμου-προϊόντος [71].

I.7.1.1.2. Η έννοια της K_m . Πραγματικές και φαινόμενες σταθερές ισορροπίας

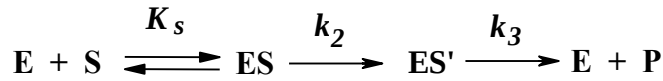
Αν και ισχύει μόνο για τον μηχανισμό Michaelis-Menten ή για όμοιες καταστάσεις ότι $K_m = K_S$, η αληθής σταθερά διάσπασης του ES, η K_m , μπορεί να θεωρηθεί για κάποιες αιτίες ως φαινόμενη σταθερά διάσπασης. Για παράδειγμα, η $[E]$ στο διάλυμα μπορεί να υπολογιστεί από την σχέση,

$$\frac{[E][S]}{\sum[ES]} = K_m \quad (6)$$

όπου $\sum[ES]$ είναι το άθροισμα όλων των προσδεμένων ενζυμικών ειδών.

Η γενική ιδέα των φαινόμενων τιμών είναι πολύ χρήσιμη, ενώ εμφανίζεται και σε άλλα φαινόμενα, όπως στις τιμές pK_a . Πολύ συχνά μια τιμή pK_a δεν αναπαριστά τον μικροσκοπικό ιονισμό κάποιας συγκεκριμένης ομάδας αλλά είναι ένας συνδυασμός αυτής της τιμής καθώς και ποικίλων σταθερών ισορροπίας μεταξύ διαφόρων διαμορφωτικών καταστάσεων του μορίου. Το αποτέλεσμα είναι μια φαινόμενη τιμή pK_a , η οποία τιτλοδοτείται ως μια απλή pK_a . Αυτή η απλή στη σκέψη προσέγγιση δεν θα πρέπει να γίνεται αποδεκτή σε κάθε κατάσταση και όταν γίνεται αναφορά σε επιδράσεις θερμοκρασίας, pH, κ.λπ. στην φαινόμενη K_m με επηρεασμό όλων των επιμέρους σταθερών ταχύτητας. Τα ίδια εφαρμόζονται και στις τιμές της k_{cat} .

Μια απεικόνιση του ότι η K_m είναι μέτρο του ποσού του ενζύμου που είναι προσδεμένο σε οποιαδήποτε μορφή σε οποιοδήποτε υπόστρωμα δίνεται από τον ακόλουθο μηχανισμό τριών σταδίων (Σχήμα 6):



Σχήμα 6: Η K_m μπορεί να είναι ίση ή διαφορετική από την K_s .

Εφαρμογή της προσέγγισης της στάσιμης κατάστασης στο $[ES']$ δίνει:

$$[ES'] = [ES] \frac{k_2}{k_3} \quad (7)$$

Όταν $k_3 \ll k_2$, ισχύει $[ES'] \gg [ES]$, έτσι ώστε το $[ES']$ έχει μεγαλύτερη συνεισφορά στην K_m από ότι το ES και είναι το κυρίαρχο είδος του προσδεμένου ενζύμου. Η K_m θα πρέπει να είναι μικρότερη από την K_s κατά έναν παράγοντα περίπου k_2/k_3 , δηλαδή:

$$K_m \approx K_s \frac{k_3}{k_2} \quad (8)$$

Σε όλες τις περιπτώσεις, η K_m , θα πρέπει να θεωρείται ως ίση προς την συγκέντρωση του υποστρώματος για την οποία παρατηρείται η σχέση $v = V_{max}/2$.

Η K_m είναι μια φαινόμενη σταθερά διάσπασης, η οποία θα πρέπει να επεξεργάζεται ως η συνολική σταθερά διάσπασης όλων των ενζυμικά προσδεμένων ειδών [71].

I.7.1.1.3. Η έννοια της παραμέτρου k_{cat}/K_m . Η σταθερά εξειδίκευσης

Προηγουμένως τονίστηκε ιδιαίτερα ότι η ταχύτητα της αντίδρασης σε χαμηλές συγκεντρώσεις υποστρώματος δίνεται από τον τύπο $v = (k_{cat}/K_m)[E]_0[S]$. Δηλαδή η παράμετρος k_{cat}/K_m θεωρείται ως σταθερά ταχύτητας δευτέρας τάξης. Ωστόσο, αυτή δεν είναι μια αληθής μικροσκοπική σταθερά ταχύτητας, εκτός από την ακραία περίπτωση όπου το στάδιο που ρυθμίζει την αντίδραση είναι η σύμπλεξη ενζύμου και υποστρώματος.

Η σπουδαιότητα της k_{cat}/K_m είναι ότι συσχετίζει την ταχύτητα της αντίδρασης ως προς την συγκέντρωση του ελεύθερου παρά του ολικού ενζύμου. Αυτό φαίνεται εύκολα από την σχέση $v = (k_{cat}/K_m)[E]_0[S]$. Η τιμή της k_{cat}/K_m δεν μπορεί να είναι μεγαλύτερη από την τιμή οποιασδήποτε άλλης σταθεράς ταχύτητας δευτέρας τάξης της αντίδρασης ως προς τα προϊόντα. Έτσι η k_{cat}/K_m θέτει το χαμηλότερο όριο για την σταθερά πρόσδεσης ενζύμου και υποστρώματος.

I.7.1.2. Μεταβολή των κινητικών παραμέτρων με την τιμή pH του μέσου της αντίδρασης

Οι κινητικές παράμετροι των ενζύμων επηρεάζονται με την μεταβολή των τιμών pH των μέσων αντίδρασης κατά παρόμοιο τρόπο που επηρεάζονται και οι σταθερές ιονισμού των οξέων ή των βάσεων. Αυτό το γεγονός δεν αποτελεί έκπληξη δεδομένου ότι τα κατάλοιπα (αμινοξέα), που συνιστούν τα καταλυτικά κέντρα των ενζύμων, διαθέτουν δραστικές πλευρικές αλυσίδες με όξινο ή βασικό χαρακτήρα (στις περισσότερες των περιπτώσεων, χωρίς να αποκλείονται κατάλοιπα με υδρόφοβες είτε και αρωματικού χαρακτήρα πλευρικές αλυσίδες). Επομένως, κάποια πρωτονιακή μορφή του ενζύμου (όξινη ή βασική) θα είναι καταλυτικά ενεργή, οπότε η κατάλυση θα εξαρτάται από την ιονική της μορφή σε κάθε συγκεκριμένη τιμή pH του μέσου της αντίδρασης.

Αν και τα ένζυμα περιέχουν πλήθος ιονισμένων ομάδων, συνήθως το διάγραμμα της ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης ως προς την τιμή pH, παίρνει τη μορφή απλής μονής ή διπλής καμπύλης ιονισμού. Αυτό συμβαίνει επειδή οι μόνοι ιονισμοί που έχουν σημασία είναι εκείνοι των ομάδων του καταλυτικού κέντρου που εμπλέκονται στην κατάλυση, ή άλλων ομάδων που είναι υπεύθυνες για τη διατήρηση της δραστικής διαμόρφωσης του ενζύμου.

Η τιμή pH του μέσου, στο οποίο πραγματοποιείται η ενζυμική αντίδραση, επηρεάζει αντιστρεπτά ή μη αντιστρεπτά, σε μια ευρεία περιοχή θερμοκρασιών την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης με επιδράσεις που ασκούνται:

- Στις ιονιζόμενες ομάδες του ενζύμου, κυρίως του καταλυτικού κέντρου και της ενεργού περιοχής (επίδραση στην k_{cat}/K_m)
- Στη συγγένεια ενζύμου-υποστρώματος (επίδραση στην K_m)
- Στον ιονισμό του συμπλόκου ES (επίδραση στην k_{cat})
- Στη σταθερότητα των δομών του ενζυμικού μορίου (επίδραση στις k_{cat} , K_m και k_{cat}/K_m).

Από την μορφή των καμπυλών $k = f(\text{pH})$, ή $K = f(\text{pH})$, εξάγονται σημαντικά συμπεράσματα για τον μηχανισμό δράσης του υπό μελέτη ενζύμου. Επιπλέον, η ίδια καμπύλη μας δίνει τον αριθμό των κατάλοιπων των αμινοξέων που είναι απαραίτητα για την πρόοδο της αντίδρασης στο συγκεκριμένο στάδιο της ενζυμικής αντίδρασης στο οποίο αναφέρεται η υπό μελέτη κινητική παράμετρος [72].

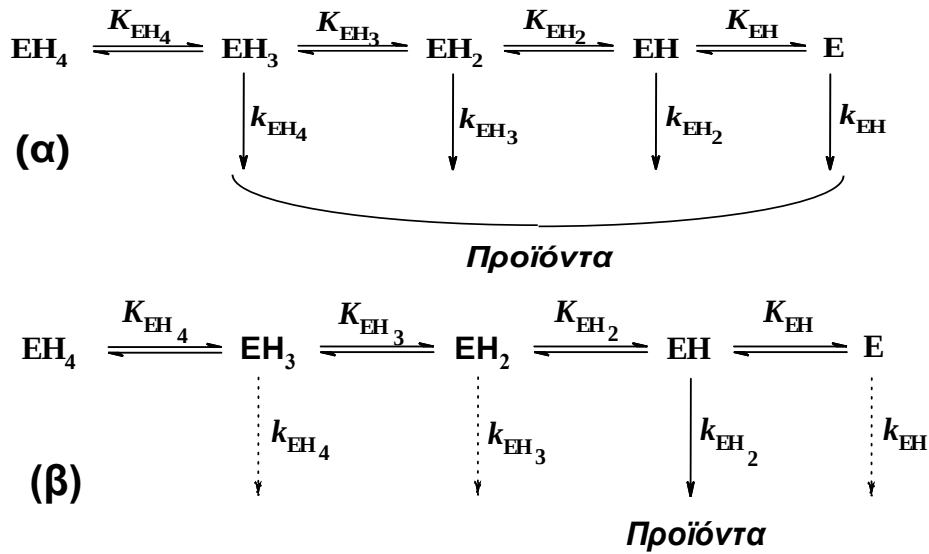
1.7.1.2.1. Εξάρτηση των παραμέτρων Michaelis-Menten από την τιμή pH του μέσου της αντίδρασης

Είναι κοινότυπο να αποδίδονται τιμές pK_a στο ελεύθερο ένζυμο E από διαγράμματα εξαρτήσεων της k_{cat}/K_m ως προς την τιμή pH, με βάση την υπόθεση ότι οι μεταφορές πρωτονίων προς και από τα E και S, είναι πολύ πιο ταχείες από τον σχηματισμό είτε και την διάσπαση του συμπλόκου ES. Είναι, επίσης, κοινότυπο να θεωρηθεί ότι παραγωγική σύνδεση (μεταξύ ενός ενζυμικού είδους και ενός υποκαταστάτη, π.χ. υποστρώματος) επιτρέπεται μόνο σε μονήρη πρωτονιακή κατάσταση του ενζύμου. Ωστόσο, και οι δύο προηγούμενες υποθέσεις ισχύουν σε περιπτώσεις υποστρωμάτων που δεν «προσκολλώνται» στο ένζυμο (non-sticky substrates), δηλαδή σε περιπτώσεις όπου τα υποστρώματα αποσυνδέονται από το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου με ταχύτητα συγκρίσιμη ή και πιο αργή από αυτήν με την οποία το σύμπλοκο ES σχηματίζει προϊόντα [73]. Η προσκόλληση του υποστρώματος είναι ανάλογη προς τον λόγο k_2/k_{-1} [74]. Παρ' όλα αυτά και σε γενικές γραμμές, τα διαγράμματα των εξαρτήσεων των παραμέτρων Michaelis-Menten ως προς την τιμή pH, δείχνουν πολλές δραστικές υδρογονικές θέσεις, συμπεριλαμβάνοντας ίσο αριθμό τιμών pK_a και ίσο ή λιγότερο αριθμό σταθερών ταχύτητας ανεξάρτητων από την τιμή pH.

Για να προσδιοριστούν ποσοτικά τέτοιες παράμετροι, όπως οι τιμές pK_a , είναι αναγκαίος ο σχεδιασμός και η χρησιμοποίηση των κατάλληλων εξισώσεων, οι οποίες θα παραχθούν με χρήση μοντέλων (προτύπων), όπου οι ιονισμοί ενζύμων και υποστρωμάτων θεωρούνται ότι ευρίσκονται σε στάσιμη κατάσταση (steady-state-approximation) [75]. Οι παρακάτω αντιδράσεις (Σχήμα 7α & β) περιγράφουν με ακρίβεια τις περισσότερες από τις περιπτώσεις που μπορεί να συναντήσει ένας ερευνητής, ενώ με χρήση της γενικής Εξίσωσης 9 είναι δυνατή η κατάστρωση κάθε μερικής περίπτωσης.

$$k_{\text{obs}} = \sum_{i=1}^n \frac{(k)_{\text{XH}_{i-1}}^{\text{lim}}}{\left(1 + \sum_{j=1}^n B_{ij}\right)} \quad (9)$$

Στην εξίσωση 9, k_{obs} είναι η προσδιοριζόμενη τιμή της σταθεράς ταχύτητας, $(k)^{\text{lim}}$ είναι η αντίστοιχη οριακή μέγιστη τιμή της, για την υδρογονική κατάσταση EH_{i-1} , n είναι ο αριθμός των δραστικών υδρογονικών θέσεων, B_{ij} είναι μια περιγραφή της ποσότητας $K_{\text{XH}_p}[\text{H}^+]^m$, ενώ m και p είναι στοιχεία από δύο Μήτρες I και II, που αντιστοιχούν στους δείκτες i και j αντίστοιχα [76].



Σχήμα 7: Δραστικές υδρογονικές καταστάσεις του ενζύμου

Το Σχήμα 7 της αντίδρασης περιλαμβάνει (α) τέσσερις δραστικές υδρογονικές καταστάσεις από E ως EH_3 και μία EH_4 μη δραστική, χαρακτηρίζεται από τέσσερις μακροσκοπικές όξινες σταθερές διάστασης και τέσσερις, ανεξάρτητες από την τιμή pH, σταθερές ταχύτητας. Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες αντίδρασης, όπου ενδεχομένως να χρησιμοποιηθεί ένζυμο με περισσότερες από τέσσερις δραστικές υδρογονικές καταστάσεις, γίνεται φανερό ότι θα χρειαστούν επιπλέον παράγοντες EH_n ($n = 1, 2, 3, \dots, n$), αλλά και

αντίστοιχες αντιδράσεις ισορροπίας με τις σταθερές τους (K_{EHn}), (β) Όμοιο σχήμα αντίδρασης όπου μόνο μία υδρογονική κατάσταση, η ΕΗ είναι δραστική και χαρακτηρίζεται από τέσσερις μακροσκοπικές όξινες σταθερές διάστασης και από μία μόνο ανεξάρτητη από την τιμή pH, σταθερά ταχύτητας. Αυτή η τελευταία αποτελεί μερική περίπτωση της (α). Κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες αντίδρασης ενδέχεται να χρησιμοποιηθεί ένζυμο με λιγότερες από τέσσερις δραστικές υδρογονικές καταστάσεις, οπότε γίνεται φανερό ότι θα χρειαστούν λιγότεροι παράγοντες EH_n ($n = 1, 2, 3, \dots, n$), αλλά και λιγότερες αντιδράσεις ισορροπίας.

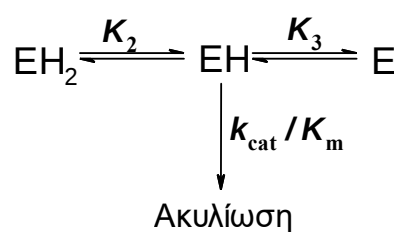
Μήτρα I

	j=1	2	3	4	5	6...n
i=1	1	2	3	4	5	6...n
2	-1	1	2	3	4	5...n-1
3	-2	-1	1	2	3	4...n-2
4	-3	-2	-1	1	2	3...n-3
5	-4	-3	-2	-1	1	2...n-4
6	-5	-4	-3	-2	-1	1...n-5
...	...	...	...	...	...	...
N	1-n	2-n	3-n	4-n	5-n	6-n...1

Μήτρα II

	j=1	2	3	4	5	...n
i=1	-1	-1.2	-1.2.3	-1.2.3.4	-1.2.3.4.5	...-1.2.3...n
2	1	-2	-2.3	-2.3.4	-2.3.4.5	...-2.3.4...n
3	1.2	2	-3	-3.4	-3.4.5	...-3.4.5...n
4	1.2.3	2.3	3	-4	-4.5	...-4.5.6...n
5	1.2.3.4	2.3.4	3.4	4	-5	...-5.6.7...n
6	1.2.3.4.5	2.3.4.5	3.4.5	4.5	5	...-6.7.8...n
...	...	...	...	...	...	...
n	1.2.3...n	2.3.4...n	3.4.5...n	4.5.6...n	5.6.7...n	...-n

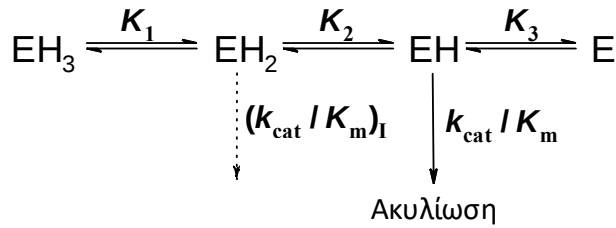
Μοντέλο I:



Στο Μοντέλο I υποτίθεται ότι δύο ενεργά κατάλοιπα, είτε του καταλυτικού κέντρου είτε και του υποστρώματος, είναι απαραίτητα για να πραγματοποιηθεί το στάδιο στο οποίο αναφέρεται η παράμετρος k_{cat}/K_m . Οι ιονισμοί των πλευρικών αλυσίδων αυτών των δύο ενεργών καταλοίπων δίνουν συνολικά τρεις πρωτονιακές καταστάσεις, από τις οποίες μόνο μια είναι δραστική (EH).

$$(k_{\text{cat}} / K_m)_{\text{obs}} = \frac{(k_{\text{cat}} / K_m)^{\text{lim}}}{1 + 10^{pK_1 - \text{pH}} + 10^{\text{pH} - pK_2}} \quad (10)$$

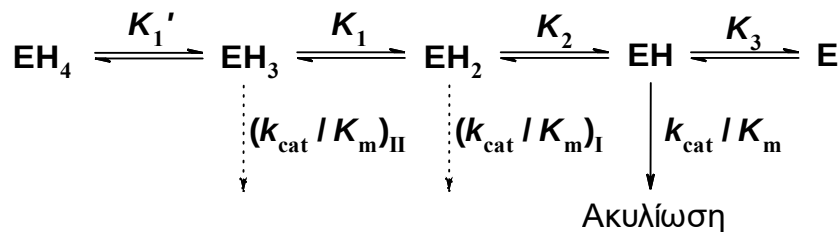
Μοντέλο II:



Στο Μοντέλο II υποτίθεται ότι τρία ενεργά κατάλοιπα, είτε του καταλυτικού κέντρου είτε και του υποστρώματος, είναι απαραίτητα για να πραγματοποιηθεί το στάδιο στο οποίο αναφέρεται η παράμετρος k_{cat}/K_m . Οι ιονισμοί των πλευρικών αλυσίδων αυτών των τριών ενεργών καταλοίπων δίνουν συνολικά τέσσερις πρωτονιακές καταστάσεις, από τις οποίες μόνο μια είναι δραστική (EH).

$$(k_{\text{cat}} / K_m)_{\text{obs}} = \frac{(k_{\text{cat}} / K_m)^{\text{lim}}}{1 + 10^{pK_1 + pK_2 - 2\text{pH}} + 10^{pK_2 - \text{pH}} + 10^{\text{pH} - pK_3}} \quad (11)$$

Μοντέλο III:

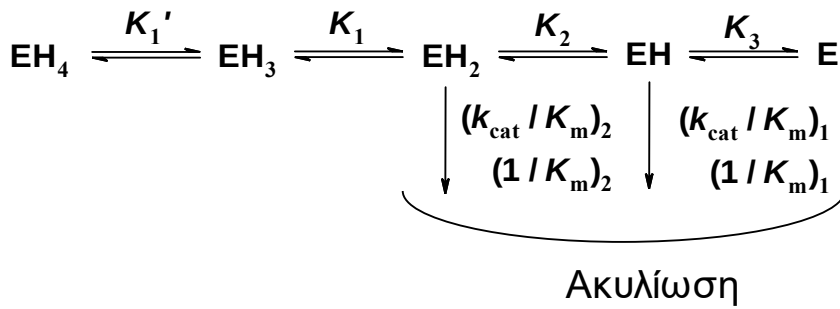


Στο Μοντέλο III υποτίθεται ότι τέσσερα ενεργά κατάλοιπα, είτε του καταλυτικού κέντρου είτε και του υποστρώματος, είναι απαραίτητα για να πραγματοποιηθεί το στάδιο

στο οποίο αναφέρεται η παράμετρος k_{cat}/K_m . Οι ιονισμοί των πλευρικών αλυσίδων αυτών των τεσσάρων ενεργών καταλοίπων δίνουν συνολικά πέντε πρωτονιακές καταστάσεις, από τις οποίες μόνο μια είναι δραστική (EH).

$$(k_{\text{cat}} / K_m)_{\text{obs}} = \frac{(k_{\text{cat}} / K_m)^{\text{lim}}}{1 + 10^{pK_1' + pK_1 + pK_2 - 3\text{pH}} + 10^{pK_1 + pK_2 - 2\text{pH}} + 10^{pK_2 - \text{pH}} + 10^{\text{pH} - pK_3}} \quad (12)$$

Μοντέλο IV:



Στο Μοντέλο IV υποτίθεται ότι τέσσερα ενεργά κατάλοιπα, είτε του καταλυτικού κέντρου είτε και του υποστρώματος, είναι απαραίτητα για να πραγματοποιηθεί το στάδιο στο οποίο αναφέρεται η παράμετρος k_{cat}/K_m . Οι ιονισμοί των πλευρικών αλυσίδων αυτών των τεσσάρων ενεργών καταλοίπων δίνουν συνολικά πέντε πρωτονιακές καταστάσεις, από τις οποίες μόνο δυο είναι δραστικές (EH, EH₂).

$$(k_{\text{cat}} / K_m)_{\text{obs}} = \frac{(k_{\text{cat}} / K_m)_1^{\text{lim}}}{1 + 10^{pK_1' - \text{pH}} + 10^{\text{pH} - pK_1}} + \frac{(k_{\text{cat}} / K_m)_2^{\text{lim}}}{1 + 10^{pK_2 - \text{pH}} + 10^{\text{pH} - pK_3}} \quad (13)$$

Το Μοντέλο IV αντιστοιχεί σε μια καμπύλη μη-συμμετρική, με περισσότερες της μίας κορυφές. Η Εξίσωση 13 εμφανίζει δύο κορυφές με μία τιμή pK_a σε κάθε όξινη και σε κάθε βασική πτέρυγα, όπου δεν υπάρχει καμιά ταύτιση μεταξύ των υπολογιζόμενων τιμών, των συνολικά τεσσάρων pK_a [77].

Η μη γραμμική προσαρμογή των παραμετρικών εξισώσεων (10), (11), (12) και (13) στα πειραματικά δεδομένα (pH , k_{cat}/K_m) έγινε με τη χρήση του κριτηρίου των ελαχίστων τετραγώνων με στατιστικά βάρη $\left[\sum_{i=1}^n \mathbf{w}_i (\mathbf{y}_i - \bar{\mathbf{y}}_i)^2 \right]$. Τα κριτήρια επιλογής της παραμετρικής εξίσωσης που προσαρμόζεται καλύτερα σε πειραματικά δεδομένα αναλύονται στην ενότητα I.10.1.

I.7.1.3. Εξάρτηση των παραμέτρων Michaelis-Menten από την απόλυτη θερμοκρασία του μέσου της αντίδρασης: εφαρμογή των εξισώσεων Arrhenius και Eyring

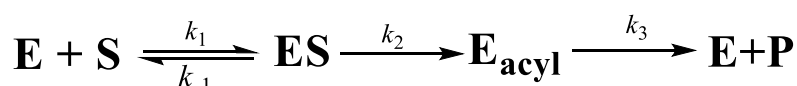
Η θερμοκρασία του διαλύματος στην οποία επωάζεται και στη συνέχεια δρα το ένζυμο είναι σημαντικός παράγοντας και επηρεάζει την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης. Τα αποτελέσματα της επίδρασης της θερμοκρασίας πάνω σε ένα ένζυμο μπορεί να είναι αντιστρεπτά ή όχι, σε μια ευρεία περιοχή τιμών pH του μέσου της αντίδρασης. Ωστόσο, σε χαμηλές θερμοκρασίες ($\theta < 30^{\circ}\text{C}$) οι ενζυμικές αντιδράσεις επηρεάζονται κατά τον ίδιο τρόπο με οποιαδήποτε χημική αντίδραση. Η δημιουργία π.χ. του συμπλόκου ES και η διάσπασή του σε E και P (Σχήμα 8) επηρεάζονται από κινητικές σταθερές των οποίων η σχέση με τη θερμοκρασία ακολουθεί το νόμο του Arrhenius $k = Ae^{-E/RT}$. Όμως, όσο υψηλότερη είναι η θερμοκρασία ($\theta > 30^{\circ}\text{C}$), τόσο περισσότερο μετουσιώνεται το ένζυμο (άρα μειώνεται η $[E]_0$) ενώ ανάλογη είναι και η επίδραση στην ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης.

Ο ορθός τρόπος καταγραφής της δραστηριότητας ενός ενζύμου, ως συνάρτηση της θερμοκρασίας του μέσου της αντίδρασης συνίσταται στην καταγραφή των πειραματικών δεδομένων, κρατώντας σταθερή την $[S]$, στις δύο διακριτές περιοχές, στη μία ισχύει $[S] \ll K_m$ ενώ στη δεύτερη να ισχύει $[S] \gg K_m$. Σε περιπτώσεις συστημάτων ενζύμου-υποστρώματος όπου δεν είναι δυνατόν να προσδιορισθεί η ενζυμική δραστηριότητα στις δύο αυτές διακριτές περιοχές, προσδιορίζεται η ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης σε μια ευρεία περιοχή συγκεντρώσεων υποστρώματος για κάθε μία θερμοκρασία και στην συνέχεια γίνεται απ' ευθείας προσαρμογή της εξίσωσης Michaelis-Menten στα πειραματικά δεδομένα. Έτσι, καταγράφονται οι εξαρτήσεις των παραμέτρων k_{cat}/K_m και k_{cat} αντίστοιχα, ως προς την θερμοκρασία του μέσου της αντίδρασης.

Η τιμή της παραμέτρου k_{cat}/K_m από μόνη της δίνει λίγες πληροφορίες για τον μηχανισμό μιας ενζυμικής αντίδρασης. Είναι χρήσιμη κυρίως ως μέτρο της ενζυμικής δραστηριότητας και της εξειδίκευσης των υποστρωμάτων που υφίστανται τη δράση του ενζύμου αφού αύξηση της τιμής της συνεπάγεται και μεγαλύτερη εξειδίκευση. Γι' αυτό άλλωστε είναι γνωστή και ως σταθερά εξειδίκευσης. Εντούτοις, η εξάρτησή της από την απόλυτη θερμοκρασία και η μορφή της καμπύλης $k_{cat}/K_m = f(T)$ μπορεί, κάτω από ορισμένες προϋποθέσεις, να δώσει πληροφορίες για το στάδιο το οποίο καθορίζει την ταχύτητα της αντίδρασης, την τιμή των σταθερών ταχύτητας και της ενέργειας ενεργοποίησης κάθε σταδίου της αντίδρασης. Όλα τα παραπάνω, αποτελούν σημαντικά δεδομένα για το

μηχανισμό δράσης ενός ενζύμου και πολύ δύσκολα υπολογίζονται με κάποια άλλη μεθοδολογία.

Η ενζυμική δραστηριότητα, μέτρο της οποίας είναι και η παράμετρος k_{cat}/K_m , αυξάνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Το ένζυμο όμως, ως πρωτεΐνη, μετά από κάποια θερμοκρασία μετουσιώνεται και χάνει την δραστηριότητά του. Όταν τα ένζυμα επωάζονται σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από την θερμοκρασία στην οποία παρουσιάζουν την μέγιστη δραστηριότητα και δεν χάνουν την δραστηριότητα τους όταν επανέλθουν στην βέλτιστη τους θερμοκρασία, αυτό αποτελεί απόδειξη ότι η μείωση της δραστηριότητας σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες από την θερμοκρασία της μέγιστης δραστηριότητας δεν οφείλεται σε μετουσίωση του ενζύμου. Τέτοια ένζυμα είναι συνήθως μικροβιακής προέλευσης. Σε αυτές τις περιπτώσεις, η καμπύλη $k_{cat}/K_m = f(T)$ μπορεί να δώσει πληροφορίες για τον μηχανισμό της ενζυμικής αντίδρασης [78], [79] και τότε για τον ελάχιστο μηχανισμό των τριών σταδίων ισχύουν τα παρακάτω:



Σχήμα 8: Ο ελάχιστος μηχανισμός δράσης, των τριών σταδίων

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{k_2}{K_S} \Leftrightarrow \frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{k_2}{\frac{k_{-1} + k_2}{k_1}} = \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2} = k_1 \frac{\frac{k_2}{k_{-1}}}{1 + \frac{k_2}{k_{-1}}} = k_1 \frac{\alpha}{1 + \alpha} \quad (14)$$

$$\text{όπου } \alpha = \frac{k_2}{k_{-1}}.$$

Η εξίσωση Arrhenius αναφέρεται στην μεταβολή της κάθε σταθεράς ταχύτητας k_j ως προς την απόλυτη θερμοκρασία T .

$$k_j = (k_j)_0 e^{\left[\frac{E_j}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]} \quad (\text{εξίσωση Arrhenius, 15})$$

όπου k_j η σταθερά ταχύτητας σε απόλυτη θερμοκρασία T , $(k_j)_0$ η σταθερά της ταχύτητας στην απόλυτη θερμοκρασία αναφοράς T_0 , E_j η ενέργεια ενεργοποίησης για την αντίδραση στην οποία αναφέρεται η σταθερά ταχύτητας k_j , R είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων ($8.3144 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), T η απόλυτη θερμοκρασία (K).

Με εφαρμογή της εξίσωσης Arrhenius για κάθε μία από τις σταθερές ταχύτητας στον τύπο της παραμέτρου k_{cat}/K_m προκύπτει η Εξίσωση 16 [79] η οποία δίνει την εξάρτηση της

παραμέτρου k_{cat}/K_m από την απόλυτη θερμοκρασία T . Η ίδια σχέση χρησιμοποιείται υπό την μορφή της Εξίσωσης 17, ενώ για την παράμετρο k_{cat} ισχύει η εξίσωση 18.

$$\frac{k_{\text{cat}}}{K_m} = \left\{ \frac{\alpha_0 e^{\left[\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]}}{1 + \alpha_0 e^{\left[\frac{E_a}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]}} \right\} (k_1)_0 e^{\left[\frac{E_1}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]} \quad (16)$$

$$\frac{k_{\text{cat}}}{K_m} = \frac{(k_1)_0 (k_2)_0 e^{\left[\frac{-(E_1+E_2)}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]}}{(k_{-1})_0 e^{\left[\frac{E_1}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]} + (k_2)_0 e^{\left[\frac{E_2}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]}} \quad (17)$$

$$k_{\text{cat}} = \frac{(k_2)_0 (k_3)_0 e^{\left[\frac{-(E_2+E_3)}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]}}{(k_2)_0 e^{\left[\frac{E_2}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]} + (k_3)_0 e^{\left[\frac{E_3}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_0} \right) \right]}} \quad (18)$$

Στις παραπάνω εξισώσεις, $(k_1)_0$, $(k_{-1})_0$, $(k_2)_0$ και $(k_3)_0$ είναι οι τιμές των αντίστοιχων σταθερών ταχύτητας στην θερμοκρασία αναφοράς T_0 (συνήθως $T_0 = 298.15 \text{ K}$), E_1 , E_{-1} , E_2 , E_3 , είναι οι ενέργειες ενεργοποίησης των: (α) σταδίου σύνδεσης του ενζύμου με το υπόστρωμα, (β) της αντίστροφης αντίδρασης, (γ) της αντίδρασης διάσπασης του συμπλόκου ES προς ακυλένζυμο και (δ) της αντίδρασης διάσπασης του ακυλενζύμου προς ελεύθερο ένζυμο και προϊόντα, αντίστοιχα, ενώ $E_a = E_{-1} - E_2$, T είναι η θερμοκρασία σε K, R είναι η παγκόσμια σταθερά των αερίων ($8.3144 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$) και α_0 είναι ο λόγος των σταθερών ταχύτητας k_2/k_{-1} στην απόλυτη θερμοκρασία αναφοράς T_0 .

Εάν $\alpha \gg 1$, τότε $k_2 \gg k_{-1}$, και η παράμετρος $k_{\text{cat}}/K_m = k_1$. Σε αυτήν την περίπτωση, η μεταβολή της k_{cat}/K_m με την θερμοκρασία είναι ίδια με την μεταβολή της σταθεράς ταχύτητας k_1 με την θερμοκρασία. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί η Εξίσωση 19, και οι παράγωγες Εξισώσεις 20α και 20β, οι οποίες στηρίζονται στη σχέση μεταξύ της αλλαγής της ελεύθερης ενέργειας Gibbs και των αλλαγών στην ενθαλπία και την εντροπία, δηλαδή $\Delta G = \Delta H - T \Delta S$. Στις αμέσως παρακάτω εξισώσεις k είναι μία οποιαδήποτε σταθερά ταχύτητας, η τιμή της οποίας εξαρτάται από την μεταβολή της απόλυτης θερμοκρασίας κατά την εξίσωση Arrhenius, $k = Ae^{-E_a/RT}$ ενώ k_B είναι η σταθερά Boltzmann, h είναι η σταθερά Planck, R είναι η σταθερά των αερίων ($8.3144 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$), ενώ η τιμή της ποσότητας $\ln(k_B/h)$ ισούται προς 23.76 [80], [72], [81]:

$$k = (k_B/h) T e^{-\Delta G^\ddagger/RT} = (k_B/h) T e^{-\Delta H^\ddagger/RT} e^{\Delta S^\ddagger/R} \quad (19)$$

$$\ln(k/T) = \ln(k_B/h) - \Delta H^\ddagger/RT + \Delta S^\ddagger/R \quad (20\alpha)$$

$$R [\ln(k/T) - \ln(k_B/h)] = \Delta S^\ddagger - \Delta H^\ddagger/T \quad (20\beta)$$

Επομένως, από τις παραπάνω Εξισώσεις 16 ως 20β είναι δυνατόν να υπολογιστούν, τόσο οι σημαντικές σταθερές ταχύτητας, όσο και οι αντίστοιχες ενέργειες ενεργοποίησης, αλλά και οι θερμοδυναμικές παράμετροι ενεργοποίησης $\Delta G^\ddagger$, $\Delta H^\ddagger$ και $\Delta S^\ddagger$ [79], [78].

I.7.2. Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων με δύο υποστρώματα

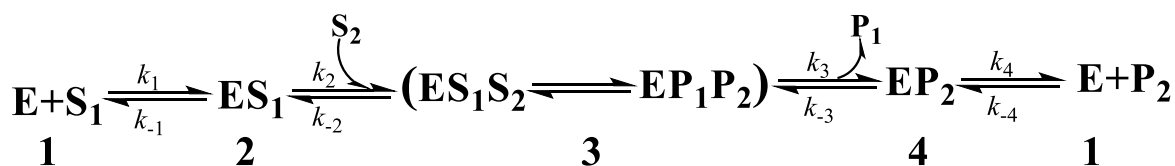
I.7.2.1. Κινητική στάσιμης κατάστασης (αντιδράσεις με δύο υποστρώματα): μέθοδος King -Altman

Η παραγωγή των εξισώσεων ταχύτητας για αντιδράσεις με περισσότερα υποστρώματα είναι ένα δύσκολο έργο σε σύγκριση με αυτό των αντιδράσεων με μόνο ένα υπόστρωμα. Οι εξισώσεις ταχύτητας για συστήματα με πολλαπλά υποστρώματα σε ισορροπία, μπορεί να προκύψει αλγεβρικά με τη βοήθεια της υπόθεσης σταθερής κατάστασης. Ωστόσο, καθώς ο αριθμός των ενζυμικών ειδών αυξάνεται, οι αλγεβρικοί χειρισμοί γίνονται ολοένα και πιο περίπλοκοι. Η απλή και κομψή μέθοδος των King και Altman επιτρέπει στους μηχανισμούς ταχύτητας σταθερής κατάστασης υψηλής πολυπλοκότητας να καταγραφούν με όρους ξεχωριστών σταθερών ταχύτητας χωρίς την εμπλοκή πολύπλοκων αλγεβρικών επεξεργασιών [82].

Καταρχήν, η εξίσωση ταχύτητας σταθερής κατάστασης για οποιονδήποτε ενζυμικό μηχανισμό μπορεί να παραχθεί με τον ίδιο τρόπο όπως και για τον απλό μηχανισμό Michaelis-Menten. Αυτό που χρειάζεται είναι να γραφτούν οι εξισώσεις για τους ρυθμούς μεταβολής των συγκεντρώσεων όλων των ενδιάμεσων, να τεθούν ίσες με το μηδέν και να λυθεί το προκύπτω σύστημα εξισώσεων. Στην πράξη, ωστόσο, αυτή η μέθοδος είναι εξαιρετικά επίπονη και επιρρεπής σε μια σειρά σφαλμάτων για όλους εκτός από τους απλούς μηχανισμούς με ένα υπόστρωμα [83], [84].

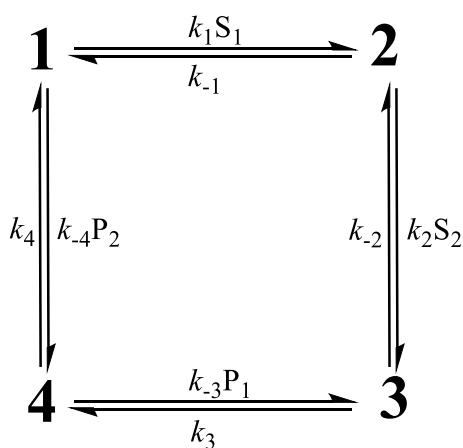
Το 1956, οι King και Altman περιέγραψαν μια σχηματική μέθοδο που είναι απλή στην εφαρμογή της σε οποιοδήποτε μηχανισμό που αποτελείται από μια σειρά ημιαντιδράσεων μεταξύ των διαφόρων μορφών ενός ενζύμου. Η μέθοδος των King και Altman πρόσφερε μια ανεκτίμητη υπηρεσία στην ενζυμολογία, διότι, με τη βοήθειά της, αναπτύχθηκαν οι

νόμοι ταχύτητας για πολλούς από τους κύριους μηχανισμούς αντίδρασης στην ενζυμική κινητική.

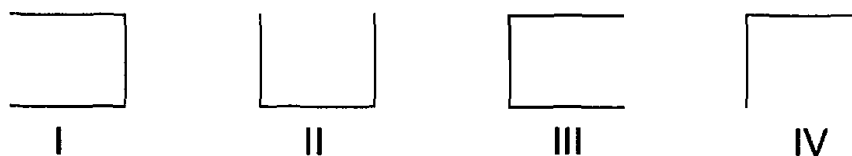


Σχήμα 9: Σύστημα τύπου διαταγμένο bi-bi για ενζυμικές αντιδράσεις με δύο υποστρώματα

Η παραγωγή του νόμου ταχύτητας π.χ. για σύστημα τύπου διαταγμένο bi-bi (Σχήμα 9), με τη βοήθεια της μεθόδου King-Altman συνίσταται στα στάδια: (1) σχεδιασμό του κύριου μοτίβου (master pattern) ως ένα κλειστό βρόχο, που θα δείχνει όλες τις μορφές του ενζύμου και τις αντιδράσεις μεταξύ τους (Σχήμα 10), (2) σχεδιασμό όλων των επιμέρους μοτίβων από το κύριο μοτίβο. Δεδομένου ότι ο μηχανισμός έχει μόνο τέσσερις ενζυμικές μορφές E, ES₁, (ES₁S₂ == EP₁P₂) και EP₂, οι οποίες είναι συνδεδεμένες σε ένα ενιαίο κλειστό βρόχο, θα υπάρχουν τέσσερα επιμέρους μοτίβα (Σχήμα 11), (3) κατάστρωση όλων των σχέσεων των σταθερών ταχύτητας για κάθε επιμέρους μοτίβο και για κάθε ενζυμική μορφή, επειδή είναι τέσσερα τα επιμέρους μοτίβα και τέσσερις οι ενζυμικές μορφές, θα προκύψουν 16 σχέσεις (Πίνακας 1), (4) ταξινόμηση των σταθερών ταχύτητας με την μορφή των εξισώσεων κατανομής των ενζυμικών μορφών (Εικόνα 11), (5) καταγραφή όλων των εκφράσεων με μορφή συντελεστών, προκειμένου να καθιστούν οι επόμενες ενέργειες ευκολότερες (Εικόνα 12), (6) η ταχύτητα σταθερής κατάστασης του πλέγματος προκύπτει, από την διαφορά μεταξύ των εκφράσεων της ταχύτητας για την κανονική και αντίστροφη πορεία οποιουδήποτε βήματος (Εξίσωση 21). Ο παρονομαστής σε αυτήν την εξίσωση είναι το άθροισμα όλων των σταθερών ταχύτητας της Εικόνας 12 [85], [82], (7) η εξίσωση 21 γράφεται με όρους των σταθερών ταχύτητας και στην συνέχεια πραγματοποιείται περαιτέρω ομαδοποίηση των παραμέτρων της (Εξίσωση 22).



Σχήμα 10: Κύριο μοτίβο της μεθοδολογίας King-Altman για ένα σύστημα τύπου διαταγμένο bi-bi



Σχήμα 11: Επιμέρους μοτίβα της μεθοδολογίας King-Altman για ένα σύστημα τύπου διαταγμένο bi-bi

Πίνακας 1: Σχέσεις σταθερών ταχύτητας για κάθε επιμέρους μοτίβο και για κάθε ενζυμική μορφή

Ενζυμικά είδη	Υπόδειγμα I	Υπόδειγμα II	Υπόδειγμα III	Υπόδειγμα IV
E	$[P_1]k_{-1}k_{-2}k_{-3}$	$[S_2]k_2k_3k_4$	$k_{-1}k_3k_4$	$k_{-1}k_{-2}k_4$
ES ₁	$[S_1][P_1]k_1k_{-2}k_{-3}$	$[P_1][P_2]k_{-2}k_{-3}k_{-4}$	$[S_1]k_1k_3k_4$	$[S_1]k_1k_{-2}k_4$
ES ₁ S ₂	$[S_1][S_2][P_1]k_1k_2k_{-3}$	$[S_2][P_1][P_2]k_2k_{-3}k_{-4}$	$[P_1][P_2]k_{-1}k_{-3}k_{-4}$	$[S_1][S_2]k_1k_2k_4$
EP ₂	$[S_1][S_2]k_1k_2k_3$	$[S_1][P_2]k_2k_3k_{-4}$	$[P_2]k_{-1}k_3k_{-4}$	$[P_2]k_{-1}k_{-2}k_{-4}$

$$\frac{[E]}{[E]_0} = \frac{[P_1]k_{-1}k_{-2}k_{-3} + [S_2]k_2k_3k_4 + k_{-1}k_3k_4 + k_{-1}k_{-2}k_4}{\text{παρανομαστής}}$$

$$\frac{[ES_1]}{[E]_0} = \frac{[S_1][P_1]k_1k_{-2}k_{-3} + [P_1][P_2]k_{-2}k_{-3}k_{-4} + [S_1]k_1k_3k_4 + [S_1]k_1k_{-2}k_4}{\text{παρανομαστής}}$$

$$\frac{[ES_1S_2]}{[E]_0} = \frac{[S_1][S_2][P_1]k_1k_2k_{-3} + [S_2][P_1][P_2]k_2k_{-3}k_{-4} + [P_1][P_2]k_{-1}k_{-3}k_{-4} + [S_1][S_2]k_1k_2k_4}{\text{παρανομαστής}}$$

$$\frac{[EP_2]}{[E]_0} = \frac{[S_1][S_2]k_1k_2k_3 + [S_1][P_2]k_2k_3k_{-4} + [P_2]k_{-1}k_3k_{-4} + [P_2]k_{-1}k_{-2}k_{-4}}{\text{παρανομαστής}}$$

Εικόνα 11: Ταξινόμηση των εξισώσεων κατανομής των ενζυμικών μορφών

$$\begin{aligned} \text{Constant} &= k_{-1}k_4(k_{-2} + k_3) \\ (\text{CoefS}_1)S_1 &= k_1k_4(k_{-2} + k_3)S_1 \\ (\text{CoefS}_2)S_2 &= k_2k_3k_4S_2 \\ (\text{CoefP}_1)P_1 &= k_{-1}k_{-2}k_{-3}P_1 \\ (\text{CoefP}_2)P_2 &= k_{-1}k_{-4}(k_{-2} + k_3)P_2 \\ (\text{CoefS}_1S_2)S_1S_2 &= k_1k_2(k_3 + k_4)S_1S_2 \\ (\text{CoefP}_1P_2)P_1P_2 &= k_{-3}k_{-4}(k_{-1} + k_{-2})P_1P_2 \\ (\text{CoefS}_1P_1)S_1P_1 &= k_1k_{-2}k_{-3}S_1P_1 \\ (\text{CoefS}_2P_2)S_2P_2 &= k_2k_3k_{-4}S_2P_2 \\ (\text{CoefS}_1S_2P_1)S_1S_2P_1 &= k_1k_2k_{-3}S_1S_2P_1 \\ (\text{CoefS}_2P_1P_2)S_2P_1P_2 &= k_2k_{-3}k_{-4}S_2P_1P_2 \end{aligned}$$

Εικόνα 12: Μορφοποίηση των εκφράσεων με την βοήθεια συντελεστών

$$V = \left[k_1[E]_0[S_1] \left(\frac{k_2k_3k_4[S_2]}{\text{παρανομαστής}} \right) \right] - \left[k_{-1}[E]_0 \left(\frac{k_{-2}k_{-3}k_{-4}[P_1][P_2]}{\text{παρανομαστής}} \right) \right] \quad (21)$$

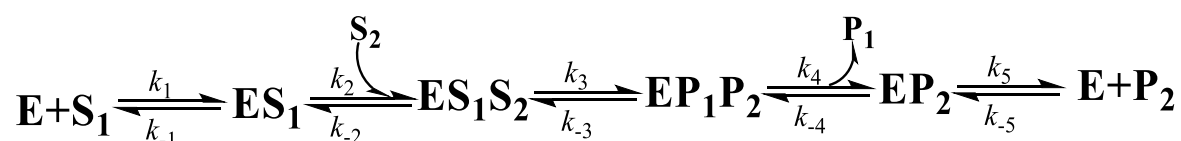
$$V = \frac{V_{m_1}V_{m_2} \left([S_1][S_2] - \frac{[P_1][P_2]}{K_{eq}} \right)}{K_{iS_1}K_{mS_2}V_{m_2} + K_{mS_2}V_{m_2}[S_1] + K_{mS_1}V_{m_2}[S_2] + V_{m_2}[S_1][S_2] + \frac{K_{mP_2}V_{m_1}}{K_{eq}}[P_1] + \frac{K_{mP_1}V_{m_1}}{K_{eq}}[P_2] + \frac{V_{m_1}}{K_{eq}}[P_1][P_2] + \frac{K_{mP_2}V_{m_1}}{K_{iS_1}K_{eq}}[S_1][P_1] + \frac{K_{mS_1}V_{m_2}}{K_{iP_2}}[S_2][P_2] + \frac{V_{m_2}}{K_{iP_1}}[S_1][S_2][P_1] + \frac{V_{m_1}}{K_{iS_2}K_{eq}}[S_2][P_1][P_2]} \quad (22)$$

Η Εξίσωση 22 είναι αρκετά γενική και εφαρμόζεται όχι μόνο κατά την έναρξη της αντίδρασης, δηλαδή με την πλήρη απουσία των P₁ και P₂, αλλά και σε οποιαδήποτε στιγμή κατά την διάρκεια επίτευξης της ισορροπίας.

Οι παραπάνω εξισώσεις ταχύτητας σταθερής κατάστασης προέκυψαν με την βοήθεια της μεθόδου Cornish-Bowden [86].

I.7.2.2. Σύστημα τύπου διαταγμένο bi-bi

Ένα σύστημα τύπου διαταγμένο bi-bi είναι αρκετά κοινό στις ενζυμικές αντιδράσεις [87]. Σε αυτόν τον μηχανισμό, υπάρχουν δύο υποστρώματα S₁, S₂ και τα δύο προϊόντα της αντίδρασης, P₁ και P₂, τα οποία προσδένονται και αντίστοιχα απελευθερώνονται από το ένζυμο με ένα διαταγμένο τρόπο (Σχήμα 12). Το υπόστρωμα S₁ είναι το υπόστρωμα που προστίθεται και το προϊόν P₁ αυτό που απελευθερώνεται πρώτα, ενώ το υπόστρωμα S₂, και το άλλο προϊόν P₂, δεν μπορούν να προστεθούν ή αντίστοιχα απελευθερωθούν πριν από την δέσμευση ή αντίστοιχα απελευθέρωση των πρώτων υποστρωμάτων. Έτσι, τα σύμπλοκα ES₂ και του EP₂ δεν σχηματίζονται [82].



Σχήμα 12: Σύστημα τύπου διαταγμένο bi-bi για ενζυμικές αντιδράσεις με δύο υποστρώματα

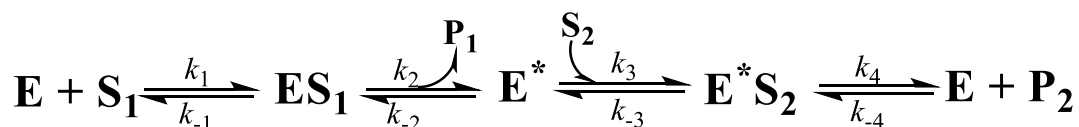
Η Εξίσωση ταχύτητας που περιγράφει τέτοια συστήματα απουσία προϊόντων είναι:

$$\frac{V}{[E]_0} = \frac{k_{\text{cat}} [S_1][S_2]}{K_{\text{isS}_1} K_{\text{mS}_2} + K_{\text{mS}_1} [S_2] + K_{\text{mS}_2} [S_1] + [S_1][S_2]} \quad (23)$$

I.7.2.3. Σύστημα τύπου ping-pong bi-bi

Μια ενζυμική αντίδραση με δυο υποστρώματα, όπου το πρώτο προϊόν P₁ απελευθερώνεται πριν το δεύτερο υπόστρωμα S₂ δεσμευτεί, ονομάζεται σύστημα τύπου ping-pong bi-bi (Σχήμα 13) [87]. Σε ένα τέτοιο μηχανισμό το πρώτο υπόστρωμα S₁ συνδέεται και το πρώτο προϊόν P₁ απελευθερώνεται πριν από την πρόσδεση του δεύτερου

υποστρώματος S_2 , ενώ το δεύτερο προϊόν P_2 , εγκαταλείπει τελευταίο το ένζυμο [82]. Η πορεία της αντίδρασης μπορεί να γραφεί ως:



Σχήμα 13: Σύστημα τύπου ring-pong bi-bi για ενζυμικές αντιδράσεις με δύο υποστρώματα

Η Εξίσωση ταχύτητας [88] που περιγράφει τέτοια συστήματα απουσία προϊόντων είναι:

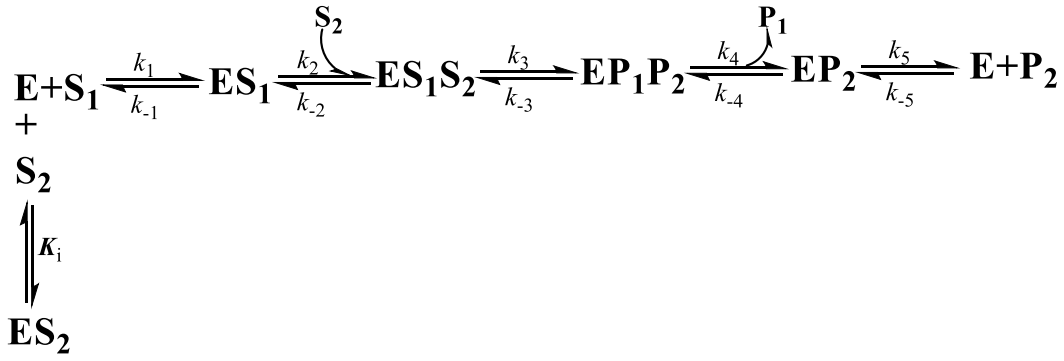
$$\frac{V}{[E]_0} = \frac{k_{cat} [S_1][S_2]}{K_{mS_2} [S_1] + K_{mS_1} [S_2] + [S_1][S_2]} \quad (24)$$

I.7.2.4. Αναστολή υποστρώματος

Σε υψηλές συγκεντρώσεις, τα υποστρώματα δρουν συχνά ως αναστολείς, δημιουργώντας ενζυμικά μορφώματα που δεν δύνανται να παράγουν προϊόντα. Αυτοί οι αναστολείς από εδώ και πέρα θα ονομάζονται dead-end ή αναστολείς υποστρώματος αδιεξόδου. Για όσους ασχολούνται με την ενζυμική κινητική, η αναστολή υποστρώματος αποτελεί ένα σημαντικό διαγνωστικό εργαλείο για την μελέτη των μηχανισμών [83], [89].

I.7.2.4.1. Αναστολή υποστρώματος αντιδράσεων σε σύστημα τύπου διαταγμένο bi-bi

Όταν τα δύο υποστρώματα είναι δομικά παρόμοια, ένα από αυτά π.χ. το S_2 μπορεί να αντιδράσει με το ελεύθερο ένζυμο για να δώσει ένα σύμπλοκο ES_2 (σύμπλοκο αδιεξόδου) το οποίο δεν μπορεί να αντιδράσει παραπέρα (Σχήμα 14).



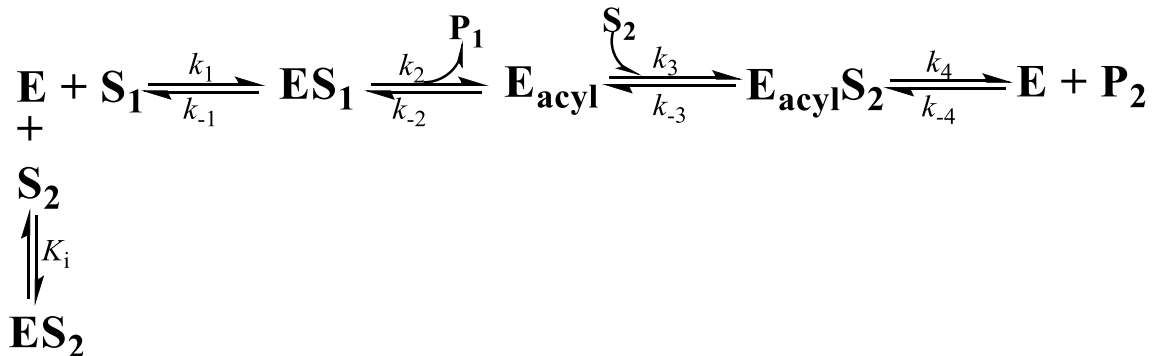
Σχήμα 14: Σύστημα τύπου διαταγμένο bi-bi με αναστολή υποστρώματος

Η εξίσωση ταχύτητας για τέτοιες περιπτώσεις αποτελεί μια τροποποιημένη μορφή της εξίσωσης ταχύτητας απουσία προϊόντων (Εξίσωση 23), συγκεκριμένα ο όρος $K_{mS1}[S_2]$ στον παρονομαστή πολλαπλασιάζεται με τον όρο $\left(1 + \frac{[S_2]}{K_i}\right)$ όπου K_i είναι η σταθερά διάστασης του συμπλόκου ES_2 .

$$\frac{V}{[E]_0} = \frac{k_{\text{cat}} [S_1][S_2]}{K_{iS_1} K_{mS_2} + K_{mS_1} [S_2] \left(1 + \frac{[S_2]}{K_{iS_2}}\right) + K_{mS_2} [S_1] + [S_1][S_2]} \quad (25)$$

I.7.2.4.2. Αναστολή υποστρώματος αντιδράσεων σε σύστημα τύπου ping-pong bi-bi

Η ανταγωνιστική αναστολή του υποστρώματος που προκύπτει από το συνδυασμό του S_2 με το E για την παραγωγή ενός συμπλόκου αδιεξόδου ES_2 είναι χαρακτηριστική των συστημάτων τύπου ping-pong bi-bi (Σχήμα 15).



Σχήμα 15: Σύστημα τύπου ping-pong bi-bi με αναστολή υποστρώματος

Σε αυτήν την περίπτωση, ο όρος $K_{mS_1}[S_2]$ στον παρονομαστή της Εξίσωσης 24, πολλαπλασιάζεται με $\left(1 + \frac{[S_2]}{K_{iS_2}}\right)$ και προκύπτει η εξίσωση (26).

$$\frac{V}{[E]_0} = \frac{k_{cat} [S_1][S_2]}{K_{mS_2} [S_1] + K_{mS_1} [S_2] \left(1 + \frac{[S_2]}{K_{iS_2}}\right) + [S_1][S_2]} \quad (26)$$

I.8 Ισοτοπικό φαινόμενο διαλύτη και η μεθοδολογία καταμέτρησης πρωτονίων

Ισοτοπικό φαινόμενο διαλύτη (Ι.Φ.Δ.) ονομάζεται το φαινόμενο που παράγεται από την εισαγωγή ενός ατόμου δευτερίου (D) στην θέση ενός πρωτονίου (H), ως αποτέλεσμα ανταλλαγής μεταξύ διαλυμένης χημικής ένωσης (π.χ. του μορίου ενός ενζύμου ή του [ES]) και του διαλύτη. Ο διαλύτης μπορεί να είναι απλά H_2O , αλλά μπορεί να είναι και οποιοσδήποτε άλλος πολικός οργανικός διαλύτης. Το Ι.Φ.Δ. αναφέρεται σε μεταβολές είτε των σταθερών ταχύτητας είτε των σταθερών ισορροπίας μιας αντίδρασης (π.χ. ενζυμικής), σε μίγματα H_2O και οξειδίου του δευτερίου (D_2O) [11].

Στην ενζυμική κινητική, γίνονται μια σειρά πειραμάτων σε υδατικά διαλύματα διαφορετικής περιεκτικότητας σε H_2O και D_2O με αποτέλεσμα να παράγονται ισοτοπικά φαινόμενα που προέρχονται από την αλλαγή της σύστασης του διαλύτη. Αυτά τα πειράματα μπορούν να οδηγήσουν στον προσδιορισμό του αριθμού των πρωτονίων που μεταφέρονται μεταξύ διαφόρων ανταλλάξιμων θέσεων στο μόριο ενός ενζύμου ή στο μόριο του υποστρώματός του και εμπλέκονται στο μηχανισμό κατάλυσης, κατά τη διάρκεια μιας ενζυμικής αντίδρασης. Η κεντρική ιδέα αυτής της διαδικασίας συνίσταται στην βαθμιαία μεταβολή του ατομικού κλάσματος του δευτερίου του διαλύτη, που έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή των τιμών των σταθερών, είτε αυτές είναι σταθερές ταχύτητας είτε σταθερές ισορροπίας. Αυτή ακριβώς η τεχνική καλείται τεχνική καταμέτρησης πρωτονίων (Proton Inventory - PI). Συγκεκριμένα, προσδιορίζονται οι σταθερές της ενζυμικής αντίδρασης (σταθερές ταχύτητας ή σταθερές ισορροπίας) σε μια σειρά από ρυθμιστικά διαλύματα με διαλύτη διαφορετικής περιεκτικότητας σε δευτέριο (δηλαδή διαφορετικού ατομικού κλάσματος δευτερίου $n = \frac{[D_2O]}{[H_2O] + [D_2O]}$). Αυτή η σειρά αρχίζει με διαλύτη H_2O και

συνεχίζεται δια μέσου μιγμάτων διαφορετικής περιεκτικότητας σε H₂O και D₂O, με συνεχώς αυξανόμενο ατομικό κλάσμα δευτερίου n και τελειώνει με σχεδόν καθαρό D₂O. Έτσι, προσδιορίζεται η μεταβολή μιας σταθεράς ως συνάρτηση του ατομικού κλάσματος δευτερίου n του διαλύτη [90].

Τα πειραματικά αποτελέσματα που προκύπτουν είναι της μορφής (n, k_n) για σταθερές ταχύτητας ή (n, K_n) για σταθερές ισορροπίας και προσδιορίζουν την μορφή της καμπύλης αυτών των σταθερών ως συναρτήσεων του n [$k_n = f(n)$ ή $K_n = f(n)$, αντίστοιχα]. Σε πολλές περιπτώσεις, οι παραπάνω μορφές αποτελούν χρήσιμα εργαλεία για την διερεύνηση του μηχανισμού μιας ενζυμικής αντίδρασης. Π.χ. η μορφή της καμπύλης μπορεί να μας δώσει τον αριθμό των πρωτονίων που συμμετέχουν στον μηχανισμό της κατάλυσης [91]. Εάν είναι ευθεία τότε ένα μόνο πρωτόνιο συμμετέχει στον μηχανισμό της κατάλυσης, εάν είναι καμπύλη δευτεροβάθμιας συνάρτησης τότε συμμετέχουν δύο πρωτόνια εάν είναι καμπύλη εκθετικής συνάρτησης τότε συμμετέχουν περισσότερα από δύο πρωτόνια. Τέλος υπάρχουν και πιο δύσκολες περιπτώσεις, όπως καμπύλες που στρέφουν τα κοίλα προς τα επάνω, όπου η συμμετοχή του αριθμού των πρωτονίων δεν μπορεί να καθοριστεί οπτικά και είναι απαραίτητη η προσαρμογή της κατάλληλης εξίσωσης. Τέτοιες εξισώσεις, που περιγράφουν την μεταβολή μιας σταθεράς ως συνάρτηση του ατομικού κλάσματος δευτερίου n , είναι οι απλοποιημένες μορφές της γενικής εξίσωσης Gross-Butler-Kresge (Εξίσωση 27) [11].

$$k_n = k_0 \frac{\prod_i^{\nu} (1 - n + n\phi_i^T)}{\prod_j^{\mu} (1 - n + n\phi_j^G)} \quad (27)$$

Στην Εξίσωση 27, οι k_n και k_0 (ή K_n και K_0) είναι οι υπό μελέτη ενζυμικές σταθερές ταχύτητας (ή σταθερές ισορροπίας) σε διαλύτη ατομικού κλάσματος δευτερίου n και σε H₂O, αντίστοιχα, ενώ ν και μ αναφέρονται στον αριθμό των πρωτονίων που ανταλλάσσονται κατά την διάρκεια της ενζυμικής αντίδρασης στη μεταβατική (T) και στην αρχική κατάσταση (G), αντίστοιχα και συμμετέχουν στον μηχανισμό. Τέλος ϕ_i^T και ϕ_j^G είναι οι ισοτοπικοί παράγοντες κλασμάτωσης του $i^{\text{ου}}$ πρωτονίου που ανταλλάσσεται στην μεταβατική και του $j^{\text{ου}}$ πρωτονίου που ανταλλάσσεται στην αρχική κατάσταση, αντίστοιχα και συμμετέχουν στον μηχανισμό.

Η μεθοδολογία καταμέτρησης πρωτονίων, για να μπορέσει να συμβάλλει στην ανάλυση του μηχανισμού μιας ενζυμικής αντίδρασης, βασίζεται σε συμπεράσματα που προκύπτουν τόσο από το σχήμα της καμπύλης των διαφόρων συναρτήσεων $k_n = f(n)$ ή $K_n = f(n)$, όσο και από το είδος της βέλτιστης εξίσωσης που προσαρμόζεται στα πειραματικά δεδομένα. Το

μέγεθος του συνολικού ισοτοπικού φαινομένου, δηλαδή ο λόγος k_n/k_0 , έχει επίσης σημαντική βαρύτητα. Θα πρέπει εδώ να σημειωθεί ότι η μεθοδολογία καταμέτρησης πρωτονίων, για να μπορέσει να προσδιορίσει τον μηχανισμό της αντίδρασης, λαμβάνει υπ' όψη και άλλες πληροφορίες για το συγκεκριμένο σύστημα ενζύμου-υποστρώματος, οι οποίες προέρχονται και από την εφαρμογή άλλων μεθοδολογιών. Αποτελεί όμως το πιο ισχυρό εργαλείο στα χέρια ενός ερευνητή ενζυμολόγου αφού σε πολλές περιπτώσεις δίνει πληροφορίες για τον μηχανισμό μιας ενζυμικής αντίδρασης που πολύ δύσκολα θα έδιναν άλλες μεθοδολογίες.

1.8.1. Προέλευση του ισοτοπικού φαινομένου διαλύτη

Στην περίπτωση του ισοτοπικού φαινομένου διαλύτη, οι παρατηρούμενες τιμές μπορεί να προκύψουν από (α) τις διαφορές μεταξύ HOH και DOD όσο αφορά τις γενικές ιδιότητές τους, όπως είναι η διηλεκτρική σταθερά, το ιξώδες κ.τ.λ., (β) τις διαφορές μεταξύ της ελεύθερης ενέργειας ενεργοποίησης που προκύπτουν από τις αλληλεπιδράσεις των αντιδρώντων άμεσα με τα μόρια H_2O στην βασική, μεταβατική ή τελική κατάσταση και (γ) τις διαφορές μεταξύ της ελεύθερης ενέργειας ενεργοποίησης που προκύπτουν από αλληλεπιδράσεις στις ανταλλάξιμες υδρογονικές θέσης των αντιδρώντων στην βασική, μεταβατική ή τελική κατάσταση [92].

Οι γενικές ιδιότητες των διαλυτών, HOH και DOD είναι τόσο όμοιες ώστε οι διαφορές τους σπάνια έχουν βρεθεί να παράγουν ισοτοπικό φαινόμενο διαλύτη εύλογου μεγέθους. Εκτός εάν υπάρχουν ενδείξεις για το αντίθετο, η προέλευση αυτή θεωρείται συνήθως για ενζυμολογικές μελέτες ότι είναι αμελητέα.

Η άμεση συμμετοχή των μορίων H_2O σε αντιδράσεις, μπορούν εύκολα να παράγουν ισοτοπικό φαινόμενο διαλύτη. Για παράδειγμα, σε υδρολυτικές αντιδράσεις μέσω κατάλυσης γενικής βάσεως στις οποίες το H_2O προσβάλλει ένα ηλεκτρόφιλο κέντρο, η απομάκρυνση ενός πρωτονίου από το νουκλεόφιλο μόριο H_2O θα πρέπει να οδηγεί σε ένα κανονικό ισοτοπικό φαινόμενο. Μελέτες σε τέτοια μοντέλα έχουν δείξει [93] ότι μπορούν να παράγουν τιμές ισοτοπικού φαινομένου διαλύτη γύρω στο 2-4.

Τα πρωτόνια που συνδέονται με ηλεκτροαρνητικά άτομα όπως O, N, ή S γενικά ανταλλάσσονται ταχέως με δευτέριο (D) αμέσως μόλις έρθουν σε επαφή με τα επισημασμένα μόρια του H_2O . Για τις επιφανειακές θέσεις των πρωτεϊνών, η ανταλλαγή αυτή συνήθως γίνεται εντός του χρόνου ανάμιξης των δύο διαλυμάτων, ισοτοπικού και μη

ισοτοπικού ή τη στιγμή της προσθήκης του ενζύμου στο μίγμα διαλύτη και ισοτοπικού διαλύτη. Οι πρωτονιακές θέσεις εντός της δομής των πρωτεϊνών γενικά πιστεύεται ότι ανταλλάσσονται μόνο όταν υπάρχουν διαμορφωτικές αλλαγές που τις εκθέτουν στο ισοτοπικό μίγμα διαλυτών και μάλιστα σε αυτήν την περίπτωση οι αντιδράσεις ανταλλαγής χρησιμοποιούνται για την διερεύνηση αυτών των διαμορφωτικών αλλαγών [92].

Ένα παράδειγμα: το κατάλοιπο **S** στο καταλυτικό κέντρο των σερίνο-υδρολασών όπως στην θρυψίνη και την ακετυλοχολινεστεράση περιέχει μια ομάδα υδροξυλίου που το πρωτόνιο της ανταλλάσσεται ταχέως με τις υδρογονικές θέσεις του διαλύτη, αυτή η ομάδα υδροξυλίου προκαλεί νουκλεόφιλη προσβολή στο πεπτιδικό ή εστερικό υπόστρωμα με τη βοήθεια π.χ. του μηχανισμού γενικής βάσεως που διευκολύνεται μέσω της δομής του ενζύμου. Όπως και στο μοντέλο αντίδρασης που αναφέρθηκε προηγουμένως, αυτή η αλληλεπίδραση δίνει τιμές ισοτοπικού φαινομένου διαλύτη από 2-4 [92], [90].

I.8.2. Μίγματα H_2O/D_2O

Ανταλλάξιμες υδρογονικές θέσεις στο μόριο μιας χημικής ένωσης ορίζονται οι θέσεις του υδρογόνου στις οποίες μπορεί να γίνει ανταλλαγή πρωτονίου με δευτέριο. Όταν μια χημική ένωση, η οποία διαθέτει ανταλλάξιμες υδρογονικές θέσεις, βρεθεί σε μίγμα H_2O/D_2O τότε μπορεί να αλλάξουν οι τιμές των παραμέτρων μιας αντίδρασης στην οποία συμμετέχει ανάλογα με το αν στην υδρογονική θέση υπάρχει πρωτόνιο ή δευτέριο. Είναι δυνατόν να καταστρωθούν απλές μαθηματικές εκφράσεις που συσχετίζουν τις διάφορες σταθερές μιας ενζυμικής αντίδρασης σε μίγματα H_2O/D_2O με ισοτοπικούς παράγοντες κλασμάτωσης. Η κατάστρωση των εκφράσεων αυτών γίνεται με τη βοήθεια κατάλληλων υποθέσεων και με τη χρήση διαφόρων ενζυμικών κινητικών μετρήσεων [90].

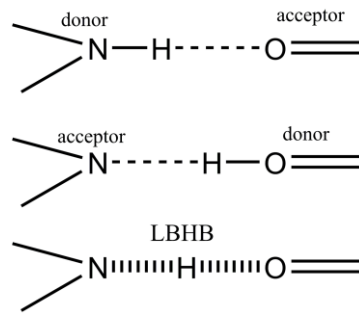
Πραγματοποιώντας κινητικές μελέτες του Ι.Φ.Δ. σε μια σειρά μιγμάτων H_2O/D_2O για μια σειρά από διαλυμένες χημικές ενώσεις με διάφορες υδρογονικές θέσεις μπορεί να καταστρωθεί ένας κατάλογος με υδρογονικές θέσεις που συνεισφέρουν στο Ι.Φ.Δ. και το μέγεθος της συνεισφοράς για την κάθε μία. Είναι περισσότερο επιθυμητό, κατά τη διάρκεια μιας αντίδρασης, να ταυτοποιήθουν τα ισοτοπικά φαινόμενα για κάθε μια από τις υδρογονικές θέσεις, παρά για όλες τις θέσεις μαζί και για το σκοπό αυτό γίνεται χρήση των ισοτοπικών παραγόντων κλασμάτωσης.

1.8.3. Ισοτοπικοί παράγοντες κλασμάτωσης

Ορίζονται ως εσωτερικές ϕ -θέσεις οι υδρογονικές θέσεις επάνω στο δομικό σκελετό της διαλυμένης χημικής ένωσης στις οποίες γίνεται ανταλλαγή πρωτονίου με δευτέριο. Ακόμη ορίζονται ως εξωτερικές ϕ -θέσεις οι υδρογονικές θέσεις επάνω στα μόρια του (πολυμερούς) H_2O , οι οποίες αλληλοεπιδρούνε ισχυρά με την διαλυμένη χημική ένωση. Η διάκριση μεταξύ εσωτερικών και εξωτερικών ϕ -θέσεων σχετίζεται με τον μηχανισμό της αντίδρασης και καθίσταται εμφανής μόνο με χρήση δεδομένων που προέρχονται από Ι.Φ.Δ. [92].

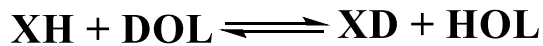
Το κλειδί για την κατανόηση των μεγεθών των παραγόντων κλασμάτωσης έγκειται στον θεμελιώδη κανόνα που διέπει την κατανομή των ισοτόπων. Το βαρύτερο ισότοπο (δευτέριο) θα τείνει να συσσωρεύεται στη θέση εκείνη όπου η δέσμευση είναι ισχυρότερη, ενώ το ελαφρύτερο ισότοπο θα τείνει να συσσωρεύεται στη θέση εκείνη όπου η δέσμευση είναι πιο ασθενής και όσο μεγαλύτερη είναι η διαφορά στην πρόσδεση σε σχέση με το ελεύθερο H_2O , τόσο μεγαλύτερη είναι οι ισοτοπικοί παράγοντες κλασμάτωσης [90].

Στην πραγματικότητα οι περισσότεροι δεσμοί στην βασική ή τελική κατάσταση δεν διαφέρουν σε ισχύ από ότι οι αντίστοιχοι του H_2O για αυτό οι περισσότεροι ισοτοπικοί παράγοντες κλασμάτωσης, εάν δεν υπάρχει κάποια διαμορφωτική αλλαγή, είναι περίπου ίση με την μονάδα. Εξαίρεση αποτελούν οι δεσμοί μεταξύ θείου και υδρογόνου (S-H), που είναι πιο ασθενείς σε σχέση με αυτούς του H_2O (πρότυπο), λόγω της μειωμένης ηλεκτροαρνητικότητας του θείου και έτσι οι παράγοντες κλασμάτωσης λαμβάνουν τιμές όπως $\phi^G \approx 0.42-0.46$. Η χρησιμότητα όμως της τεχνικής αυτής έγκειται στο γεγονός ότι μπορεί να ανιχνεύσει αλλαγές στην ισχύ των δεσμών κατά την μεταβατική κατάσταση. Το ανταλλάξιμο υδρογόνο μπορεί και μετακινείται (εν πτήση) μεταξύ δύο ηλεκτροαρνητικών ατόμων, αυτού που διαθέτει το μεγαλύτερο ποσοστό του ηλεκτρονικού νέφους στην κατοχή του και ονομάζεται δότης και του άλλου που έχει επισυνάψει τον δεσμό υδρογόνου και ονομάζεται δέκτης (Εικόνα 13). Έτσι όσο μικρότερη είναι η υπολογιζόμενη τιμή του ϕ^T τόσο πιο ασθενής είναι ο ομοιοπολικός δεσμός με τον δότη και τόσο πιο ισχυρός είναι ο δεσμός υδρογόνου με τον δέκτη. Παράδειγμα μικρού ισοτοπικού παράγοντα κλασμάτωσης $\phi^T \approx 0.2 - 0.3$ αποτελεί ο δεσμός υδρογόνου LBHB όπου το υδρογόνο ισαπέχει από τα δυο άτομα συμμετρικά και κάτι τέτοιο μπορεί να συμβεί εάν τα άτομα, μέσω διαμορφωτικών αλλαγών κατά την μεταβατική κατάσταση, έρθουν πολύ κοντά ($<2.45\text{\AA}$) ή τα άτομα που μετέχουν στον δεσμό παρουσιάζουν ίδιες pK_a [11], [90], [94].



Εικόνα 13: Κατανομή υδρογόνου μεταξύ δότη και δέκτη

Όταν μια χημική ένωση X, η οποία διαθέτει μια θέση για ανταλλαγή πρωτονίου με δευτέριο, βρεθεί μέσα σε μίγμα $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$ με ατομικό κλάσμα δευτερίου n (το αντίστοιχο ατομικό κλάσμα πρωτονίου θα είναι $1-n$) δημιουργείται η ακόλουθη ισορροπία όπου $L = \{\text{H}, \text{D}\}$ (Σχήμα 16):



Σχήμα 16: Η ισορροπία σε μίγματα $\text{H}_2\text{O}/\text{D}_2\text{O}$

Ως ισοτοπικός παράγοντας κλασμάτωσης ϕ της συγκεκριμένης υδρογονικής θέσης ορίζεται η σταθερά της παραπάνω ισορροπίας, κατά την Εξίσωση 28

$$\phi = \frac{[\text{XD}][\text{HOL}]}{[\text{XH}][\text{DOL}]} \quad (28)$$

$$\Leftrightarrow \phi = \frac{\frac{[\text{XD}]}{[\text{XH}]}}{\frac{[\text{DOL}]}{[\text{HOL}]}} \Rightarrow \phi = \frac{[\text{XD}]}{[\text{XH}]} \frac{[\text{HOL}]}{[\text{DOL}]} \Rightarrow \frac{[\text{XD}]}{[\text{XH}]} = \phi \frac{n}{1-n}$$

και επιπλέον ότι:

$$\begin{aligned} [\text{XL}] &= [\text{XD}] + [\text{XH}] = [\text{XH}] \left(1 + \frac{[\text{XD}]}{[\text{XH}]} \right) \\ [\text{XH}] \left(1 + \phi \frac{n}{1-n} \right) &= [\text{XH}] \frac{(1-n+n\phi)}{1-n} \Rightarrow \\ [\text{XH}] &= \frac{[\text{XL}](1-n)}{(1-n+n\phi)} \quad \text{ή} \quad [\text{XD}] = \frac{[\text{XL}]n\phi}{(1-n+n\phi)} \end{aligned}$$

Εάν η χημική ένωση διαθέτει περισσότερες από μία υδρογονικές θέσεις για ανταλλαγή πρωτονίου με δευτέριο, τότε θα είναι της μορφής $XL_1, L_2, \dots L_v$ κι έτσι με ανάλογο τρόπο προκύπτουν οι σχέσεις:

$$\frac{[XH_1H_2\dots H_v]}{[XL_1L_2\dots L_v]} = \frac{(1-n)^v}{\prod_i^v (1-n+n\phi_i)}$$

$$\frac{[XH_1\dots D_i\dots H_v]}{[XL_1L_2\dots L_v]} = \frac{(1-n)^{v-1}}{\prod_i^v (1-n+n\phi_i)}$$

$$\frac{[XD_1D_2\dots D_v]}{[XL_1L_2\dots L_v]} = \frac{n^v}{\prod_i^v (1-n+n\phi_i)}$$

Από τις παραπάνω σχέσεις και με την βοήθεια του ορισμού της σταθεράς ταχύτητας ή της σταθεράς ισορροπίας, προκύπτει η γενική μορφή της εξίσωσης Gross-Butler-Kresge (Εξίσωση 27).

Τα ένζυμα επειδή είναι πρωτεϊνικά μόρια, έχουν στον δομικό σκελετό τους πολλά πρωτόνια που ανταλλάσσονται με τον διαλύτη. Λίγα από αυτά όμως συνεισφέρουν στο Ι.Φ.Δ. και συνήθως ελάχιστα είναι τα πρωτόνια που συμβάλλουν καθοριστικά στη διαμόρφωση του Ι.Φ.Δ, όταν όμως η αθροιστική συνεισφορά αυτών των πρωτονίων είναι μεγάλη, τότε συνεισφέρει και ένας άλλος παράγοντας κλασμάτωσης που από εδώ και πέρα θα αναφέρεται ως παράγοντας κλασμάτωσης Z και η τιμή του θα οφείλεται: (1) στην ύπαρξη μιας αλυσίδας πρωτονιακών θέσεων (πάρα πολλών) ανταλλαγής στο διάλυμα ή στην εκτεθειμένη επιφάνεια του ενζύμου, με την κάθε θέση να συνεισφέρει αθροιστικά σε αυτήν την τιμή, (2) το συνολικό ισοτοπικό φαινόμενο να προκύπτει από μεταβολές στην επιδιалύτωση και (3) το συνολικό ισοτοπικό φαινόμενο να προκύπτει από μη ειδικευμένες μεταβολές στην δομή του ενζύμου. Π.χ. ένας παράγοντας κλασμάτωσης Z ίσος με 0.84 για την k_{cat} θα αντιπροσωπεύει ένα συνολικό χαλάρωμα ενός μεγάλου αριθμού δεσμών κατά την μετάβαση του συστήματος από το σύμπλοκο ενζύμου υποστρώματος στην μεταβατική κατάσταση. Αυτοί οι δεσμοί υδρογόνου μπορεί να υπάρχουν είτε μεταξύ του συμπλόκου μόνο, είτε στην επιφάνεια επιδιалύτωσης του. Από την άλλη, ένας παράγοντας κλασμάτωσης Z ίσος με 1.65 για την k_{cat}/K_m , θα μπορούσε να αντιστοιχεί σε ένα συνολικό σφίξιμο ενός μεγάλου αριθμού δεσμών οπουδήποτε στο σύστημα ξεκινώντας από ελεύθερο ένζυμο και υπόστρωμα [11], [90].

Χωρίς ένα κατάλληλο μοντέλο είναι δύσκολο να προβλεφθεί η ισοτοπική συνεισφορά κάθε πρωτονίου ξεχωριστά, στην αρχική, στην μεταβατική και στην τελική κατάσταση ή ακόμα και σε πιο πολύπλοκες περιπτώσεις όπου υπάρχουν συνεισφορές από ένα σύνθετο παράγοντα κλασμάτωσης Z στο αντιδρών σύστημα. Επίσης, η προσαρμογή της γενικής εξίσωσης Gross-Butler-Kresge στα πειραματικά δεδομένα είναι προβληματική, αφού παραμένει ακόμη πολύπλοκη. Έτσι χρειάζεται να γίνουν διάφορες υποθέσεις οι οποίες βασίζονται σε ήδη υπάρχοντα δεδομένα που αφορούν την συγκεκριμένη ενζυμική αντίδραση (και προέρχονται, ίσως, από άλλου είδους μεθοδολογίες), ώστε η γενική εξίσωση GBK να μπορεί να μετασχηματιστεί σε μια περισσότερο απλοποιημένη μορφή κι έτσι να είναι δυνατή η ανάλυση των πειραματικών δεδομένων. Κάθε τέτοια μορφή αντιστοιχεί σε συγκεκριμένο αριθμό μεταφερόμενων πρωτονίων από την αρχική στην μεταβατική ή τελική κατάσταση. Επιπλέον οι λιγότερες σε αριθμό παράμετροι της απλοποιημένης εξίσωσης GBK προσδιορίζονται με μεγαλύτερη στατιστική ακρίβεια, όπως φαίνεται και από τα παρακάτω υποδείγματα:

Υπόδειγμα 1: Μεταφέρεται ένα πρωτόνιο κατά την θεμελιώδη κατάσταση ισορροπίας (G.S.) και ένα κατά την μεταβατική κατάσταση (T.S.):

$$k_n = k_0 \frac{(1 - n + n\phi^T)}{(1 - n + n\phi^G)} \quad (29)$$

Υπόδειγμα 2: Μεταφέρονται δύο πρωτόνια κατά την μεταβατική κατάσταση (T.S.) με διαφορετική τιμή των ισοτοπικών παραγόντων κλασμάτωσης:

$$k_n = k_0 (1 - n + n\phi_1^T)(1 - n + n\phi_2^T) \quad (30)$$

Υπόδειγμα 3: Μεταφέρονται v πρωτόνια κατά την μεταβατική κατάσταση (T.S.) με ίδια τιμή των ισοτοπικών παραγόντων κλασμάτωσης:

$$k_n = k_0 (1 - n + n\phi_1^T)^v \quad (31)$$

Υπόδειγμα 4: Μεταφέρονται v πρωτόνια κατά την μεταβατική κατάσταση (T.S.) ενώ συνεισφέρει επιπλέον και ένας σύνθετος παράγοντας κλασμάτωσης Z , γνωστός ως επίδραση του μέσου (medium effect):

$$k_n = k_0 Z^n (1 - n + n\phi_1^T)^v \quad (32)$$

Υπόδειγμα 5: Όταν υπάρχουν περισσότερες της μίας σειριακές μεταβατικές καταστάσεις στις οποίες συνεισφέρουν δύο επιμέρους στάδια, ένα φυσικό (C_{Ph}) και ένα χημικό (C_{Ch}) στο

οποίο και μεταφέρονται ν πρωτόνια, τότε οι πιο κατάλληλες απλοποιημένες μορφές της εξίσωσης GBK είναι οι Εξισώσεις 33α και 33β [95].

$$k_n = k_0 Z^n \left(C_{Ph} + \frac{C_{Ch}}{(1-n + n\phi^T)^\nu} \right)^{-1} \quad (33\alpha)$$

$$k_n = k_0 \left(\frac{C_{Ph}}{Z^n} + \frac{C_{Ch}}{(1-n + n\phi^T)^\nu} \right)^{-1} \quad (33\beta)$$

Στις εξισώσεις 33α & β το Z είναι ένας σύνθετος παράγοντας κλασμάτωσης που σχετίζεται με την αναδιοργάνωση του διαλύτη, C_{Ph} και C_{Ch} είναι δύο συντελεστές της μεταβατικής κατάστασης που αντιστοιχούν στο φυσικό και στο χημικό στάδιο, αντίστοιχα, ϕ^T είναι παράγοντας κλασμάτωσης της μεταβατικής κατάστασης που αντιστοιχεί στο χημικό (C_{Ch}) στάδιο. Ως ν αναφέρεται ο αριθμός των πρωτονίων που μεταφέροντα αποκλειστικά κατά το χημικό (C_{Ch}) στάδιο.

Στην μεθοδολογία καταμέτρησης πρωτονίων όταν η παραγόμενη καμπύλη στρέφει τα κοίλα προ τα πάνω (θολωτή - dome-shaped), όπως αυτή του Υποδείγματος 5, τότε μία λογική εξήγηση είναι ότι υπάρχει συνεισφορά περισσότερων του ενός σειριακών βημάτων για τον καθορισμό της ταχύτητας της αντίδρασης του υπό μελέτη σταδίου. Μία δεύτερη εξήγηση είναι ότι υπάρχει ένας ανταγωνισμός μεταξύ συνεισφορών που δημιουργούν ένα αντίστροφο ισοτοπικό φαινόμενο διαλύτη και που τείνουν να κάνουν ταχύτερη την αντίδραση σε DOD, αλλά και συνεισφορών που δημιουργούν κανονικό ισοτοπικό φαινόμενο διαλύτη και που τείνουν να κάνουν ταχύτερη την αντίδραση σε HOH. Δεν είναι σπάνιο να παρατηρήσει κανείς τέτοιες καμπύλες να παράγουν ακόμη και μέγιστα.

I.8.4. Αποκλίσεις της τιμής pH από την ισοτοπική σύσταση του διαλύματος

Οι περισσότερες ενζυμικές αντιδράσεις έχουν σταθερές ταχύτητας που εξαρτώνται από την τιμή του pH, έτσι γεννάται το ερώτημα πως θα πρέπει τόσο η τιμή pH και η τιμή pD να ρυθμίζονται σε μελέτες καταμέτρησης πρωτονίων (Proton Inventory). Η ισότητα $pH = pD$ ισχύει στην βέλτιστη τιμή pH δράσης του ενζύμου όπου εκεί παρουσιάζει μια

σταθεροποίηση [92]. Έτσι η σωστή αντιμετώπιση αυτού του προβλήματος και την μείωση των αποκλίσεων, είναι για κάθε ρυθμιστικό διάλυμα να ρυθμίζεται η τιμή του pH σύμφωνα με τον εμπειρικό τύπο: $pL = pH \text{ (Μέτρηση πεχαμέτρου)} + 0.221 \times n + 0.173 \times n^2$ ή ακόμα απλούστερα από τον εμπειρικό τύπο: $pL = pH \text{ (Μέτρηση πεχαμέτρου)} + 0.4$ για $n = 1$ (ή καλύτερα για n όσο γίνεται πλησίον της τιμής 1), όπου τα υπόλοιπα ρυθμιστικά διαλύματα διαφορετικής ισοτοπικής σύστασης θα παρασκευαστούν με απλή ανάμιξη του διαλύματος με $n = 0$ με εκείνο όπου ισχύει $n = 1$ (ή το πλησιέστερο), όπως θα περιγραφεί και στο πειραματικό μέρος [96].

I.8.5. Περιορισμοί της τεχνικής καταμέτρησης πρωτονίων

Οι δύο μεγαλύτεροι περιορισμοί της τεχνικής καταμέτρησης πρωτονίων είναι: (1) το μοντέλο που προσαρμόζει καλύτερα τα πειραματικά δεδομένα ποτέ δεν είναι μόνο ένα, αν και ο αριθμός τους περιορίζεται συνήθως και από άλλους παράγοντες και (2) ενώ τα δεδομένα δίνουν μια ιδέα του αριθμού των συνεισφερόμενων στο ισοτοπικό φαινόμενο πρωτονίων, δεν είναι δυνατόν να εντοπισθούν δομικά οι θέσεις αυτές. Μπορεί πολλές φορές να θεωρηθεί αυθαίρετα ότι τα πρωτόνια που μεταφέρονται είναι αυτά του καταλυτικού κέντρου, π.χ. σε ένα μηχανισμό μέσω συμπλόκου μεταφοράς φορτίου, ωστόσο αυτό δεν μπορεί να αποδειχθεί. [11].

I.9 Κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο (K.I.E.)

I.9.1. Εισαγωγή

Το κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο (K.I.E.), το οποίο είχε διαδραματίσει σημαντικό ρόλο στην εξέλιξη της οργανικής χημείας, άρχισε να εφαρμόζεται ενεργά στο πεδίο της ενζυμολογίας κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1970 [97]. Παρά το γεγονός ότι αρχικά θεωρήθηκε ότι μια ισοτοπική υποκατάσταση απλά θα διπλασιάσει το ποσό των πειραματικών πληροφοριών, εντούτοις, ο αντίκτυπος του K.I.E. στην κατανόηση των λειτουργιών και των μηχανισμών των ενζύμων έχει ξεπεράσει κατά πολύ αυτή την αρχική προσδοκία. Ένας κατάλογος με τις κύριες πληροφορίες που μπορούν να εξαχθούν από τον προσδιορισμό του K.I.E. σε συνδυασμό και με μετρήσεις μέσω αρχικών ταχυτήτων των παραμέτρων των εξισώσεων ταχύτητας, παρουσιάζεται παρακάτω και είναι [98]:

- Ο προσδιορισμός της σειράς με την οποία πολλαπλά υποστρώματα, προσδένονται σε ένα ένζυμο κατά τη διάρκεια του σχηματισμού του παραγωγικού καταλυτικού συμπλόκου
- Ο προσδιορισμός των σταδίων που ρυθμίζουν την ταχύτητα της συνολικής αντίδρασης (αντιδράσεις με πολλαπλά στάδια), μαζί με τον υπολογισμό των σταθερών ταχύτητας των μεμονωμένων βημάτων
- Η ικανότητα συμπεράσματος, της δομής των χημικών ενδιαμέσων και των ενεργοποιημένων συμπλόκων
- Η ανίχνευση φαινομένων σήραγγας

Το κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο είναι ο λόγος των σταθερών ταχύτητας της αντίδρασης όταν ένα από τα άτομα των αντιδρώντων έχει υποκατασταθεί με το αντίστοιχο ισότοπο του. Έτσι αν k^H και k^D αντιπροσωπεύουν τις σταθερές ταχύτητας για μια αντίδραση μεταφοράς πρωτονίου με τη συμμετοχή των υποστρωμάτων με το ελαφρύ (H) και βαρύ (D) ισότοπο αντίστοιχα, τότε η Εξίσωση Bigeleisen (Εξίσωση 34) περιγράφει το K.I.E. για αυτήν αντίδραση [99]:

$$K.I.E. = \frac{k_H}{k_D} = M.M.I. \times EXC \times ZPE \quad (34)$$

Όπου: M.M.I. = Mass Moment of Inertia (Ροπή αδράνειας της μάζας), EXC = Exchange Correlation energy (ισοτοπικές μεταβολές σε διεγερμένα δονητικά επίπεδα) και ZPE = Zero Point Energies (δονητικές ενέργειες θεμελιώδους κατάστασης).

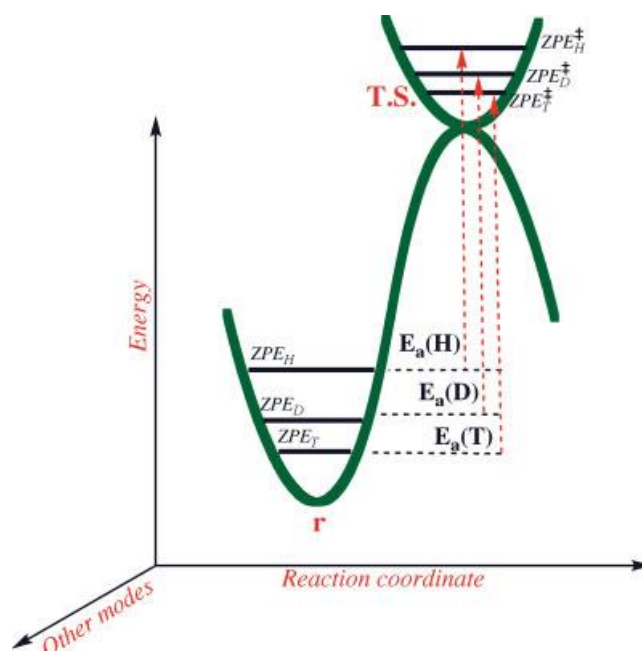
Η M.M.I. αναφέρεται στον λόγο των μοριακών μαζών και των ροπών αδρανείας, επειδή το υδρογόνο ή αντίστοιχα το δευτέριο είναι πολύ ελαφρύτερα από το υπόλοιπο μόριο. Είναι συνήθως μια καλή προσέγγιση να θεωρηθεί η M.M.I. ίση με την μονάδα [99]. Οι EXC αποτελούν έναν διορθωτικό παράγοντα του κινητικού ισοτοπικού φαινομένου για τους πληθυσμούς των διεγερμένων δονητικών επιπέδων. Η συνεισφορά και αυτού του παράγοντα συνήθως είναι αμελητέα όταν οι αντιδράσεις δεν γίνονται σε υψηλές θερμοκρασίες [100]. Η ZPE αναφέρεται στην ενέργεια δονήσεως μηδενικής κατάστασης [100], [82]. Εάν η διαφορά στην ενέργεια δονήσεως μηδενικής κατάστασης για έκταση (stretching) του δεσμού άνθρακα-υδρογόνου ή δευτερίου χάνεται κατά την μετάβαση από την αρχική στην μεταβατική κατάσταση (αφού η σταθερά δύναμης του δεσμού μειώνεται κατά την διάρκεια της διάσπασης του δεσμού) τότε η εξίσωση Bigeleisen προβλέπει ένα κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο K.I.E. = 7. Εάν υπάρχει και η συνεισφορά από την κάμψη δεσμού τότε το κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο θα εμφανίζονταν ως K.I.E. = 20, πολύ σπάνια όμως παρατηρείται εξάλειψη αυτής της διαφοράς, για την κάμψη δεσμού στην μεταβατική κατάσταση και επομένως δεν λαμβάνεται υπόψη. Από την θεωρία μεταβατικής κατάστασης και την υπόθεση του ημικλασικού μοντέλου [101], ότι δηλαδή η ισοτοπική επίδραση στους συντελεστές Arrhenius (Arrhenius prefactors) είναι κοντά στη μονάδα, μπορεί να γίνει η εξής προσέγγιση [102]:

$$\text{KIE} = \frac{k_{\text{H}}}{k_{\text{D}}} \approx e^{\left(\frac{\Delta G_{\text{D,H}}^{\ddagger}}{RT}\right)} \quad (35)$$

Όπου $\Delta G_{\text{D,H}}^{\ddagger}$ είναι η διαφορά στην ενέργεια ενεργοποίησης μεταξύ των βαρέων και ελαφρών ισοτόπων, το R είναι η σταθερά των αερίων, και T είναι η απόλυτη θερμοκρασία της αντίδρασης σε βαθμούς Kelvin. Για τις αντιδράσεις όπου υπάρχει μεταφορά υδρογόνου, ο κυρίαρχος όρος στην Εξίσωση 34 είναι η συνεισφορά ZPE κι έτσι αυτή μπορεί να εκφραστεί ως [103]:

$$\Delta G_{\text{D,H}}^{\ddagger} = \Delta G_{\text{D}}^{\ddagger} - \Delta G_{\text{H}}^{\ddagger} \approx (ZPE_{\text{D}}^{\text{T.S.}} - ZPE_{\text{D}}^{\text{G.S.}}) - (ZPE_{\text{H}}^{\text{T.S.}} - ZPE_{\text{H}}^{\text{G.S.}}) \quad (36)$$

Σε αυτή την ημικλασική επεξεργασία, το μέγεθος του K.I.E. εξαρτάται κυρίως από τις διαφορές στην ZPE για κάθε ισότοπο μεταξύ της θεμελιώδους κατάστασης (G.S. ή r) και της μεταβατικής κατάστασης (T.S.) (Διάγραμμα 1) [104].



Διάγραμμα 1: Ημικλασική περιγραφή του κινητικού ισοτοπικού φαινομένου για πρωτόνιο (H), δευτέριο (D) και τρίτιο (T). Η κύρια συνεισφορά στο Κ.Ι.Ε. προέρχεται από την διαφορά στην ενέργεια δονήσεως μηδενικής κατάστασης (ZPE) μεταξύ των αντιδρώντων στη βασική κατάσταση (r) και τη μεταβατική κατάσταση (T.S.)

Έτσι η μικρότερη ZPE για τα δευτεριωμένα υποστρώματα μεταφράζεται σε υψηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης για την αντίδραση, οδηγώντας σε ένα κανονικό πρωτοταγές ισοτοπικό φαινόμενο [102].

1.9.2. Είδη ισοτοπικών φαινομένων

Για αντιδράσεις μεταφοράς υδρογόνου, μπορεί κανείς να ορίσει δύο τύπους κινητικού ισοτοπικού φαινομένου, ανάλογα με τη θέση του ισοτοπικά επισημασμένου ατόμου. Έτσι πρωτοταγές (1°) Κ.Ι.Ε. υπάρχει όταν τα άτομα που συμμετέχουν άμεσα στο σχηματισμό ή διάσπαση του δεσμού είναι ισοτοπικά επισημασμένα, ενώ δευτεροταγές (2°) Κ.Ι.Ε. υπάρχει όταν τα επισημασμένα άτομα είναι σε διαφορετικές θέσεις από αυτές που σχηματίζεται ή διασπάται ο δεσμός.

Ανάλογα την τιμή του Κ.Ι.Ε., μπορεί επίσης να χαρακτηριστεί ως κανονικό ή αντίστροφο, όπου στο κανονικό Κ.Ι.Ε. υπάρχουν τιμές μεγαλύτερες από την μονάδα, ενώ στο αντίστροφο υπάρχουν τιμές κάτω από την μονάδα (το βαρύ ισότοπο αντιδρά ταχύτερα

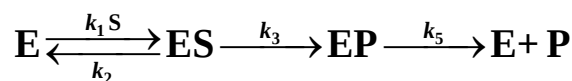
από το ελαφρύ). Το μέγεθος του πρωτοταγούς Κ.Ι.Ε. μπορεί να ερμηνευθεί ως ένδειξη της θέσης της T.S. σε σχέση με τα αντιδρώντα και προϊόντα, δηλαδή εάν το Κ.Ι.Ε. είναι μικρό σε σύγκριση με την θεωρητικά μέγιστη τιμή του, τότε η T.S. (μεταβατική κατάσταση) θυμίζει έντονα ή τα αντιδρώντα ή τα προϊόντα. Από την άλλη πλευρά, όταν το Κ.Ι.Ε. πλησιάζει την υπολογισμένη μέγιστη τιμή του, τότε αυτό είναι μία ένδειξη ότι η δομή της T.S. μοιάζει σε μια μέση κατάσταση μεταξύ αντιδρώντων και προϊόντων (αυτό βέβαια με την προϋπόθεση ότι η ταχύτητα της αντίδρασης ρυθμίζεται από μία T.S.) [105].

Το (2°) Κ.Ι.Ε. διακρίνεται περαιτέρω σε (α -2°) Κ.Ι.Ε., όπου παράγεται από την αλλαγή του υβριδισμού του άνθρακα δίπλα από τον δεσμό που διασπάται ($sp_3 \leftrightarrow sp_2$) και σε (β -2°) Κ.Ι.Ε. όπου οφείλεται στην σταθεροποίηση των παρακείμενων από τον υπό διάσπαση δεσμό, μέσω υπερσυζυγίας (Hyperconjugation) των κενών τους π -τροχιακών. Παραδοσιακά, συγκρίσεις του (2°) Κ.Ι.Ε. και του (2°) ισοτοπικού φαινομένου ισορροπίας (EIE) έχουν χρησιμοποιηθεί για να προσδιοριστεί η φύση της T.S. [105] (δηλαδή με το εάν μοιάζει στην δομή των αντιδρώντων ή των προϊόντων). Το EIE προκύπτει από την κατανομή των ισοτόπων, όταν έχει επέλθει ισορροπία στα αντιδρώντα ή προϊόντα [106].

I.9.3. Εσωτερικό Κ.Ι.Ε.

Από την Εξίσωση 35, γίνεται προφανές ότι, ενώ οι μετρήσεις Κ.Ι.Ε. είναι ένα εξαιρετικά χρήσιμο εργαλείο για την διερεύνηση των αντιδράσεων χωρίς αξιοσημείωτη τροποποίηση του συστήματος τους, υπάρχει όμως τουλάχιστον ένα μειονέκτημα στην εφαρμογή τους σε αντιδράσεις μεταφοράς υδρογόνου. Το μετρηθέν Κ.Ι.Ε. θα πρέπει να ανακλά στις σχετικές ταχύτητες του ισοτοπικά ευαίσθητου βήματος που είναι η μεταφορά του υδρογόνου ή του δευτέρου, και όχι στις ταχύτητες των άλλων μη ισοτοπικά ευαίσθητων βημάτων, δηλαδή η διάσπαση του ισοτοπικά ευαίσθητου δεσμού θα πρέπει να είναι στο καθοριστικό για την ταχύτητα βήμα (Rate-limiting step). Όταν αυτό δεν γίνεται, το μετρούμενο Κ.Ι.Ε. δεν θα είναι πραγματικά αντιπροσωπευτικό της αντίδρασης μεταφοράς υδρογόνου και αυτό το φαινόμενο ονομάζεται κινητική πολυπλοκότητα. Οι μηχανισμοί των ενζυμικών αντιδράσεων παρέχουν πολλά παραδείγματα τέτοιων κινητικά πολύπλοκων πορειών που γενικά εμπεριέχουν αρκετά βήματα, όπως την δέσμευση υποστρώματος, ισομερισμό, διαμορφωτικές αλλαγές, απελευθέρωση του προϊόντος. Ενώ η ταυτότητα του σταδίου που ρυθμίζει την αντίδραση μπορεί να ποικίλλει, εντούτοις το βήμα του ενδιαφέροντος για το

κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο δεν μπορεί να είναι άλλο από το χημικό (μεταφορά υδρογόνου) [102].



Σχήμα 17 απλούστερο μοντέλο ενζυμικής αντίδρασης

Στο ακόλουθο απλό μοντέλο της ενζυμικής αντίδρασης η πραγματική χημική μετατροπή αντιπροσωπεύεται από τη σταθερά ταχύτητας k_3 , το παρατηρούμενο όμως $K.I.E._{obs}$ για την k_3 θα καλύπτεται (masked) λόγω της κινητικής πολυπλοκότητας της αντίδρασης, έτσι η τιμή του θα εμφανίζεται μειωμένη σε σχέση με το εσωτερικό $K.I.E._{int}$. Η σχέση μεταξύ του παρατηρούμενου και του $K.I.E._{int}$ μπορεί να εκφραστεί με όρους C_f για την αντίδραση προς τα εμπρός και C_r για την αντίστροφη [107].

$$KIE_{obs} = \frac{KIE_{int} + C_f + C_r \times EIE}{1 + C_f + C_r} \quad (37)$$

Όπου C_f είναι ο λόγος των σταθερών ταχύτητας για το ισοτοπικό ευαίσθητο βήμα προς τα ισοτοπικά μη ευαίσθητα βήματα που οδηγούν στην διάσπαση του ES (k_3/k_2 για Σχήμα 17), ενώ το EIE αντιπροσωπεύει το ισοτοπικό φαινόμενο ισορροπίας (equilibrium isotope effect). Όταν το C_r είναι κοντά στο μηδέν, όπως συμβαίνει για μια μη αντιστρεπτή αντίδραση σαν αυτή του Σχήματος 17, τότε η έκφραση για το παρατηρούμενο $K.I.E.$ απλουστεύεται στην Εξίσωση 38

$$KIE_{obs} = \frac{KIE_{int} + C_f}{1 + C_f} \quad (38)$$

Δεδομένου ότι το εσωτερικό $K.I.E._{int}$ εκφράζει μόνο τα χημικά βήματα, η εξαγωγή της τιμής του έχει μεγάλη σημασία στην ενζυμική κινητική και για αυτόν το λόγο πολλές διαφορετικές μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί, όπως η μέθοδος κατά Northrop [106], [102].

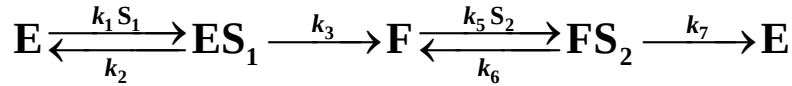
I.9.4. Σχεδιάζοντας πειράματα $K.I.E.$: ανταγωνιστική και μη-ανταγωνιστική μέθοδος

Δεδομένου ότι το $K.I.E.$ είναι μία αναλογία των ταχυτήτων της αντίδρασης, υπάρχουν δύο βασικοί τρόποι για την διεκπεραίωση μετρήσεων $K.I.E.$: (α) μη ανταγωνιστικά, όπου οι ταχύτητες της αντίδρασης μετρούνται ανεξάρτητα για κάθε ισοτοπομερές, έτσι το $K.I.E.$ υπολογίζεται από την αναλογία των ταχυτήτων και (β) ανταγωνιστικά, όπου και τα δύο

ισοτοπομεροί συνυπάρχουν και αντιδρούν ταυτόχρονα. Το Κ.Ι.Ε. σε αυτήν την περίπτωση υπολογίζεται άμεσα από τον ρυθμό κατανάλωσης του βαρέως ισότοπου στο προϊόν ή στον εμπλουτισμό σε βαρύ ισότοπο, στο αντιδρόν (για κανονικό Κ.Ι.Ε.), έτσι παρακάμπτονται οι μετρήσεις των ξεχωριστών ταχυτήτων της αντίδρασης αποτρέποντας και το πολλαπλασιασμό των σχετικών σφαλμάτων. Πειράματα με την μη ανταγωνιστική μέθοδο μπορούν να διερευνήσουν τις επιπτώσεις των ισωτόπων τόσο για την k_{cat}/K_m όσο και για την k_{cat} , ενώ η ανταγωνιστική μέθοδος περιορίζεται στην μέτρηση των επιπτώσεων των ισωτόπων μόνο για την k_{cat}/K_m [108].

I.9.5. Κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο σε συστήματα τύπου ping-pong bi-bi

Σε ένα σύστημα τύπου ping-pong bi-bi (Σχήμα 18), συνήθως μόνο μία από τις δύο ημιαντιδράσεις είναι ευαίσθητη στην ισοτοπική υποκατάσταση.



Σχήμα 18: Απλούστερο μοντέλο ενζυμικής αντίδρασης για το σύστημα τύπου ping-pong bi-bi

Στον μηχανισμό αυτό οι σταθερές ταχύτητας k_3 και k_7 δεν είναι απλές μικροσκοπικές σταθερές, αλλά είναι οι καθαρές σταθερές ταχύτητας για την μετατροπή του ES_1 σε F και του FS_2 σε E , αντίστοιχα και περιέχουν συνεισφορές από διαμορφωτικές αλλαγές του βήματος διάσπασης του δεσμού καθώς και την απελευθέρωση των προϊόντων [109]. Αν υποτεθεί ότι μόνο η σταθερά ταχύτητας k_3 είναι ευαίσθητη στην ισοτοπική υποκατάσταση τότε οι εκφράσεις για V_m , V_m/K_{mS_1} και V_m/K_{mS_2} θα δίνονται από τις Εξισώσεις:

$$\frac{V_m}{[E]_0} = \frac{k_3 k_7}{k_3 + k_7}, \quad \frac{V_m}{K_{mS_1} [E]_0} = \frac{k_1 k_3}{k_2 + k_3}, \quad \frac{V_m}{K_{mS_2} [E]_0} = \frac{k_5 k_7}{k_6 + k_7} \quad (39)$$

Οι αντίστοιχες εκφράσεις για το κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο δίνονται από τις Εξισώσεις:

$$^D V_m = \frac{^D k_3 + \frac{k_3}{k_7}}{1 + \frac{k_3}{k_7}}, \quad ^D \left(\frac{V_m}{K_{mS_1}} \right) = \frac{^D k_3 + \frac{k_3}{k_2}}{1 + \frac{k_3}{k_2}}, \quad ^D \left(\frac{V_m}{K_{mS_2}} \right) = 1 \quad (40)$$

Το ισοτοπικό φαινόμενο των $^D \left(\frac{V_m}{K_{mS_2}} \right)$ είναι ίσο με 1, λόγω της έλλειψης ενός ισοτοπικά

ευαίσθητου βήματος στην δεύτερη ημιαντίδραση [82].

I.10. Προσαρμογή πειραματικών δεδομένων ενζυμικής κινητικής με μη γραμμικές εξισώσεις

Η προσαρμογή μη γραμμικών μορφών εξισώσεων, όπως είναι και η Michaelis-Menten, στα αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα θεωρείται, προ πολλών ετών, ως η ασφαλέστερη και πλέον αξιόπιστη στατιστική μέθοδος, η οποία δίνει τις ορθότερες υπολογιζόμενες τιμές των διάφορων μη γραμμικών παραμέτρων.

Η προσαρμογή της μη γραμμικής εξίσωσης στα πειραματικά δεδομένα γίνεται με την βοήθεια της μεθόδου των ελαχίστων τετραγώνων, αν και τα πειραματικά δεδομένα από την ενζυμική κινητική δεν φαίνεται να ακολουθούν, τις περισσότερες φορές, την κανονική κατανομή, λόγω βέβαια του μικρού σχετικά αριθμού μετρήσεων και της εξ' αυτού μη δυνατότητας χρήσης των στατιστικών πινάκων [110], [111].

I.10.1. Κριτήρια επιλογής πολυπαραμετρικών μη γραμμικών εξισώσεων για βέλτιστη προσαρμογή πειραματικών δεδομένων

Για την επιλογή της παραμετρικής μη γραμμικής εξίσωσης που προσαρμόζεται καλύτερα στα πειραματικά δεδομένα, είναι απολύτως αναγκαία η εφαρμογή μιας σειράς γενικά αποδεκτών στατιστικών κριτηρίων επιλογής της βέλτιστης εξίσωσης [112], [110]. Στη συνέχεια, περιγράφονται τα σημαντικότερα από τα κριτήρια αυτά.

(α) Ανάλυση Υπολοίπων (Residuals Analysis): Υπόλοιπα είναι οι διαφορές $e_i = y_i - \bar{y}_i$

και κανονικοποιημένα υπόλοιπα είναι οι λόγοι $e_{is} = \frac{e_i}{s}$, όπου $s^2 = \frac{\sum_{i=1}^n (y_i - \bar{y}_i)^2}{n-1}$ (n είναι ο αριθμός των πειραματικών σημείων). Εάν απεικονιστούν τα κανονικοποιημένα υπόλοιπα (e_{is}) για κάθε ένα πειραματικό σημείο διαδοχικά σε διάγραμμα δύο διαστάσεων, θα πρέπει τα σημεία που θα προκύψουν να είναι τυχαία. Η μέση τιμή των κανονικοποιημένων υπολοίπων πρέπει να είναι ίση ή τουλάχιστον να τείνει προς το μηδέν [113].

(β) Δοκιμασία συχνότητας (F test): Το άθροισμα των τετραγώνων των υπολοίπων πολλαπλασιασμένα με το κατάλληλο στατιστικό τους βάρος παριστάνεται ως **SSR** και

δίνεται από τον τύπο $SSR = \sum_{i=1}^n w_i (y_i - \bar{y}_i)^2$. Η τιμή της δοκιμασίας συχνότητας (F test)

μεταξύ δύο υπό έλεγχο εξισώσεων με αντίστοιχο αριθμό παραμέτρων P_1 και P_2 (με $P_1 \neq P_2$)

$$\frac{SSR[1] - SSR[2]}{P_2 - P_1}$$

δίνεται από τον τύπο $F = \frac{SSR[1] - SSR[2]}{P_2 - P_1}$, όπου n είναι ο αριθμός των πειραματικών σημείων.

Με τη χρήση των κατάλληλων στατιστικών Πινάκων [114] διαπιστώνεται ότι αν μεταξύ των δύο υπό έλεγχο εξισώσεων υπάρχει σημαντική στατιστική διαφορά προσαρμογής τότε επιλέγεται εκείνη που έχει την μικρότερη τιμή του αθροίσματος των τετραγώνων των υπολοίπων πολλαπλασιασμένα με το κατάλληλο στατιστικό τους βάρος, SSR [115].

(γ) Κριτήριο Πληροφόρησης κατά Akaike (Akaike's Information Criterion): Η τιμή του κριτηρίου πληροφόρησης κατά Akaike δίνεται από τον τύπο $A.I.C. = n \times \ln(SSR) + 2P$, όπου n είναι ο αριθμός των πειραματικών σημείων και P είναι ο αριθμός των παραμέτρων της εξίσωσης που προσαρμόζεται κάθε φορά σε αυτά. Επιλέγεται εκείνη η εξίσωση που έχει την μικρότερη τιμή του κριτηρίου πληροφόρησης κατά Akaike [116], [117]. Στην παρούσα εργασία όλες οι προσαρμογές των μη γραμμικών εξισώσεων στα αντίστοιχα πειραματικά δεδομένα και η επιλογή των καταλληλότερων εξισώσεων, έγιναν με συγκριτική ανάλυση, χρησιμοποιώντας όλα τα παραπάνω κριτήρια επιλογής με την βοήθεια του ολοκληρωμένου λογισμικού πακέτου στατιστικής ανάλυσης που εμπεριέχεται στο OriginPro 2016.

I.11. Η μεθοδολογία των αποκριτικών επιφανειών (RSM) ως εργαλείο βελτιστοποίησης στην χημεία

I.11.1. Εισαγωγή

Η μεθοδολογία των αποκριτικών επιφανειών αναπτύχθηκε από τους Box και Wilson (1951) - Box και Youle (1955) και επαναδιατυπώθηκε από τον Box (1999). Στη συνέχεια αρκετά βιβλία επάνω στη μεθοδολογία των αποκριτικών επιφανειών αναπτύχθηκαν από τους Box και Draper (1987), Khuri και Cornell (1966), Myers και Montgomery (2002), οι οποίοι έδωσαν ποικίλα παραδείγματα για μεγάλο εύρος εφαρμογών, δείχνοντας ιδιαίτερο ενδιαφέρον στη χημική βιομηχανία [118].

Ο όρος βελτιστοποίηση αναφέρεται στη βελτίωση της απόδοσης ενός συστήματος, μιας διαδικασίας ή ενός προϊόντος, προκειμένου να επιτευχθεί μεγιστοποίηση των οφελών από αυτό. Ο όρος βελτιστοποίηση έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην χημεία, ως μέσο για την ανακάλυψη των συνθηκών που πρέπει να εφαρμοστούν σε μια διαδικασία ώστε να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή απόκριση.

Παραδοσιακά, η βελτιστοποίηση στην χημεία διεξαγόταν παρακολουθώντας την επιρροή ενός παράγοντα κάθε φορά πάνω στην πειραματική απόκριση, ενώ οι άλλοι διατηρούνται σε ένα σταθερό επίπεδο. Αυτή η τεχνική βελτιστοποίησης ονομάζεται, μεταβολή ενός παράγοντα κάθε φορά (One Factor at a Time). Το σημαντικότερο μειονέκτημά της, είναι ότι δεν μελετάει τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των μεταβλητών (ως αλληλεπίδραση ορίζεται η αποτυχία ενός παράγοντα να παράγει την ίδια επίπτωση στην απόκριση σε διαφορετικά επίπεδα ενός άλλου παράγοντα). Κατά συνέπεια, αυτή η τεχνική δεν απεικονίζει πλήρως την επίδραση της παραμέτρου στην απόκριση. Ένα άλλο μειονέκτημα της βελτιστοποίησης ενός παράγοντα κάθε φορά, είναι η αύξηση του αριθμού των πειραμάτων που είναι αναγκαία για τη διεξαγωγή της έρευνας, η οποία οδηγεί σε αύξηση του χρόνου και των εξόδων, καθώς και στην αύξηση της κατανάλωσης των αντιδραστηρίων και υλικών [119].

Με σκοπό να ξεπεραστεί αυτό το πρόβλημα, η βελτιστοποίηση πραγματοποιείται με τη χρήση πολυπαραγοντικών στατιστικών τεχνικών. Μεταξύ των πιο αρμοζόντων πολυπαραγοντικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται στην βελτιστοποίηση είναι η μεθοδολογία των αποκριτικών επιφανειών (RSM). Η μεθοδολογία αυτή είναι μια συλλογή από μαθηματικές και στατιστικές τεχνικές που στηρίζονται στην προσαρμογή μιας πολυωνυμικής εξίσωσης στα πειραματικά δεδομένα και η οποία θα πρέπει να μπορεί να

περιγράφει την συμπεριφορά ενός συνόλου δεδομένων με απώτερο στόχο να καταστούν δυνατές οι στατιστικές προβλέψεις. Μπορεί να εφαρμοστεί και όταν μία απόκριση ή μία σειρά αποκρίσεων του ενδιαφέροντος επηρεάζονται από πολλές μεταβλητές. Ο στόχος είναι να βελτιστοποιήσει ταυτόχρονα τα επίπεδα αυτών των μεταβλητών για την επίτευξη της καλύτερης απόδοσης του συστήματος [120].

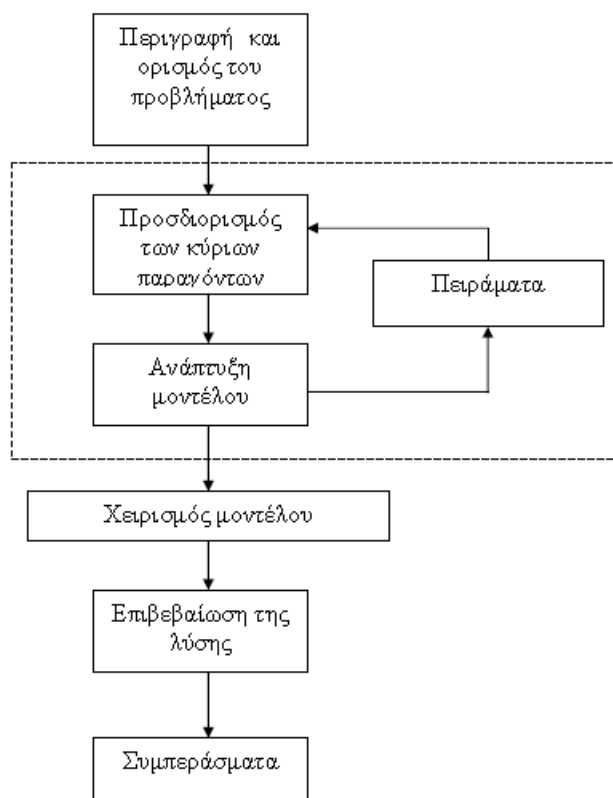
Πριν από την εφαρμογή της μεθοδολογίας RSM, πρώτα, είναι απαραίτητο να επιλεγεί ένας πειραματικός σχεδιασμός που θα καθορίζει ποια πειράματα πρέπει να διεξάγονται στην πειραματική περιοχή η οποία μελετάται. Πειραματικός σχεδιασμός για πρώτης τάξης μοντέλα (π.χ., παραγοντικά πειράματα) μπορεί να χρησιμοποιηθεί όταν τα πειραματικά δεδομένα δεν παρουσιάζουν καμπυλότητα. Ωστόσο, για την προσέγγιση μιας απόκρισης σε πειραματικά δεδομένα που δεν μπορούν να περιγραφούν με γραμμικές συναρτήσεις, θα πρέπει να χρησιμοποιούνται πειραματικοί σχεδιασμοί δευτέρου βαθμού, όπως: τριών επιπέδων παραγοντικά πειράματα (three-level factorial design), Box-Behnken και κεντρικός σύνθετος σχεδιασμός (central composite design).

I.11.2. Χρήσιμοι ορισμοί

Πειραματικός χώρος/πεδίο είναι το πειραματικό πεδίο που πρέπει να διερευνηθεί και ορίζεται από το ελάχιστο και το μέγιστο όριο των πειραματικών μεταβλητών που μελετούνται. Πειραματικός σχεδιασμός είναι ένα συγκεκριμένο σύνολο πειραμάτων που ορίζεται από μία μήτρα η οποία αποτελείται από διαφορετικούς συνδυασμούς επιπέδων των μεταβλητών που μελετήθηκαν. Ο Doehlert είναι ένα παράδειγμα πειραματικού σχεδιασμού δευτέρου βαθμού. Αυτός ο σχεδιασμός καθορίζει ένα συγκεκριμένο σύνολο συνδυασμών για τα επίπεδα των μεταβλητών, που πρέπει να εφαρμοστούν πειραματικά για τον προσδιορισμό της επιθυμητής απόκρισης. Παράγοντες ή ανεξάρτητες μεταβλητές είναι πειραματικές μεταβλητές που μπορεί να αλλάξουν ανεξάρτητα μεταξύ τους. Τα επίπεδα μιας μεταβλητής είναι οι διαφορετικές τιμές μιας μεταβλητής στην οποία θα πρέπει να διεξάγονται τα πειράματα [120]. Αποκρίσεις ή εξαρτημένες μεταβλητές είναι οι μετρούμενες τιμές των αποτελεσμάτων από τα πειράματα. Συνήθως οι αποκρίσεις μπορεί να είναι το αναλυτικό σήμα (ανάλυση μεταξύ χρωματογραφικών κορυφών), η τελική οξύτητα, η % απόδοση μιας αντίδρασης κ.α. Ένα καλό μαθηματικό μοντέλο που προσαρμόζεται στα πειραματικά δεδομένα θα πρέπει να παρουσιάζει χαμηλές αποκλίσεις.

Ι.11.3. Έννοιες και πρακτικά βήματα για την εφαρμογή της μεθοδολογίας RSM

Η RSM αποτελείται από μια ομάδα μαθηματικών και στατιστικών τεχνικών που βασίζονται στην προσαρμογή εμπειρικών μοντέλων στα πειραματικά δεδομένα που λαμβάνονται από τον πειραματικό σχεδιασμό. Για αυτόν το σκοπό, γραμμικές ή δευτέρου βαθμού πολυωνυμικές εξισώσεις επιστρατεύονται για την περιγραφή του υπό μελέτη συστήματος.



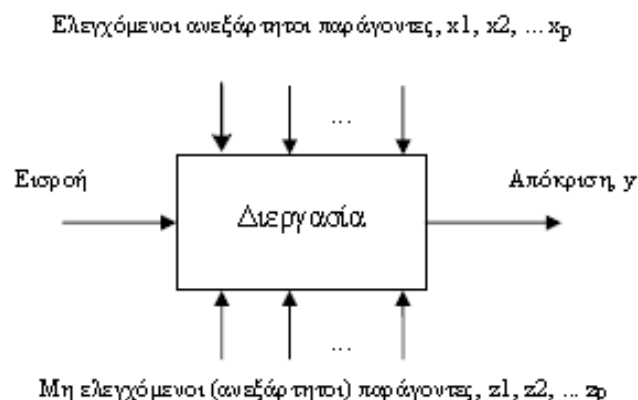
Εικόνα 14: Τυπικά στάδια κατά την εφαρμογή της RSM

Τα κύρια στάδια της εφαρμογής της RSM, ως τεχνικής βελτιστοποίησης είναι τα εξής:

- (1) η επιλογή των ανεξάρτητων μεταβλητών που θα επιφέρουν τις σημαντικότερες επιπτώσεις στο σύστημα, μέσω προ-πειραματικού σχεδιασμού, καθώς και η οριοθέτηση της πειραματικής περιοχής σύμφωνα με τον στόχο της μελέτης και την εμπειρία του ερευνητή,
- (2) η επιλογή του πειραματικού σχεδιασμού και η εκτέλεση των πειραμάτων σύμφωνα με την επιλεγμένη πειραματική μήτρα,
- (3) η μαθηματική/στατιστική επεξεργασία των πειραματικών δεδομένων που λαμβάνονται μέσω της προσαρμογής μιας πολυωνυμικής συνάρτησης,
- (4) η αξιολόγηση της προσαρμογής του μοντέλου,
- (5) η εξακρίβωση της

αναγκαιότητας εκτελέσεως πειραμάτων προς τη βέλτιστη περιοχή και (6) η απόκτηση των βέλτιστων τιμών για κάθε μελετηθείσα μεταβλητή (Εικόνα 14).

Η πιο κοινή διεξαγωγή πειραμάτων αφορά την μελέτη της επίδρασης παραγόντων (factors) σε κάποιο αποτέλεσμα ή στην απόκριση ενός συστήματος ή μίας διεργασίας. Υπάρχουν ανεξάρτητοι παράγοντες, ελεγχόμενοι και μη ελεγχόμενοι, που επηρεάζουν τη διεργασία. Κατά την διεργασία απαιτούνται εισροές που παράγουν τουλάχιστον μία εκροή, ως αποτέλεσμα ή απόκριση. Ο όρος απόκριση αντιστοιχεί στον κοινά χρησιμοποιούμενο όρο response και συνεπώς θα χρησιμοποιείται στη συνέχεια. Με βάση τα παραπάνω, το γενικό μοντέλο μίας διεργασίας ή ενός συστήματος φαίνεται στην Εικόνα 15 [121], [119].



Εικόνα 15: Εισροές και εκροές σε μία διεργασία

Οι στόχοι ενός πειράματος λοιπόν μπορεί να περιλαμβάνουν τα παρακάτω:

- Κατανόηση για το ποιοι παράγοντες επηρεάζουν περισσότερο την απόκριση y
- Απόφαση για το σε ποιες τιμές θα τεθούν τα πιο σημαντικά x (ελεγχόμενες παράμετροι) έτσι ώστε το y να είναι σχεδόν πάντα κοντά στην επιθυμητή (βέλτιστη) τιμή του
- Απόφαση για το σε ποιες τιμές θα τεθούν τα x ώστε η διασπορά του y να είναι μικρή
- Απόφαση για το σε ποιες τιμές θα τεθούν τα σημαντικά x ώστε οι επιδράσεις από τους μη ελεγχόμενους παράγοντες στην απόκριση y να είναι μικρές.

Η στατιστική σχεδίαση των πειραμάτων αναφέρεται στην διεργασία του σχεδιασμού πειραμάτων με τέτοιο τρόπο ώστε αποτελέσματα τα οποία θα μπορούν να αναλυθούν με στατιστικές μεθόδους, θα συλλέγονται με στόχο την εξαγωγή έγκυρων και αντικειμενικών συμπερασμάτων. Εφόσον τα δεδομένα που παράγονται περιέχουν πάντα πειραματικά σφάλματα, οι στατιστικές μέθοδοι είναι η μόνη αντικειμενική προσέγγιση στην ανάλυση των δεδομένων [119]. Με βάση τα παραπάνω, υπάρχουν δύο πλευρές σε ένα πειραματικό πρόβλημα:

- Η σχεδίαση του πειράματος
- Η στατιστική ανάλυση των δεδομένων

Γενικά, όταν κάποιος υλοποιήσει το τέλειο πείραμα, η στατιστική ανάλυση δεν χρειάζεται. Τα αποτελέσματα είναι ξεκάθαρα και μπορούν να εξαχθούν συμπεράσματα χωρίς στατιστική ανάλυση. Σπάνια όμως διεξάγονται τέλεια πειράματα. Γενικά, το τέλειο πείραμα αποτελείται από άμεσες συγκρίσεις και έχει επανάληψη των δεδομένων. Άμεσες συγκρίσεις σημαίνει ότι από το πείραμα έχουν πλήρως εξαιρεθεί οι μη ελεγχόμενοι παράγοντες (μπορούν να χαρακτηριστούν και ως ανεπιθύμητοι παράγοντες), ενώ επανάληψη (replication) σημαίνει απλώς ότι τα ίδια αποτελέσματα θα εξαχθούν με επανάληψη του πειράματος δηλ. ότι τα αποτελέσματα που εξάχθηκαν δεν είναι αποτέλεσμα απλώς της τύχης [119], [121], [122].

I.11.3.1. Βασικές αρχές πειραματισμού

Οι τέσσερις βασικές αρχές του (καλού) πειραματικού σχεδιασμού είναι:

- Επανάληψη (replication)

Ως επανάληψη (δεν πρέπει να συγχέεται με την επαναληψιμότητα, που είναι η δυνατότητα επανάληψης) νοείται η ανεξάρτητη επανάληψη των συνδυασμών των παραγόντων και αποτελεί μία εκτίμηση του τυχαίου πειραματικού σφάλματος. Είναι συχνά καλύτερο να αυξηθεί ο αριθμός των πειραμάτων με επαναλαμβανόμενες παρατηρήσεις στην ίδια τιμή παρά να προστίθενται νέες παρατηρήσεις σε διαφορετικές τιμές.

- Τυχαία επιλογή δειγμάτων (randomization)

Η τυχαία κατανομή είναι η βάση του καλού πειραματικού σχεδιασμού. Ουσιαστικά σημαίνει απλώς ότι τόσο η κατανομή των υλικών του πειράματος, αλλά και η σειρά με την οποία θα γίνουν τα πειράματα, αποφασίζονται τυχαία. Γενικά οι στατιστικές μέθοδοι απαιτούν οι παρατηρήσεις να είναι ανεξάρτητες και τυχαίες.

- Ομαδοποίηση (blocking)

Η ομαδοποίηση βοηθάει στην ανάλυση των δεδομένων και στην μείωση του πειραματικού σφάλματος. Ο στόχος της ομαδοποίησης είναι ουσιαστικά η κατάταξη του συνόλου των δεδομένων σε ομάδες που να είναι όσο το δυνατό περισσότερο ομογενοποιημένες. Αυτό βοηθάει στο ότι το πειραματικό λάθος θα υπολογιστεί για κάθε ομάδα ξεχωριστά και στη συνέχεια όλα τα πειραματικά λάθη θα αθροιστούν για το σύνολο

του πειράματος. Με αυτό τον τρόπο υπολογίζεται μικρότερο πειραματικό λάθος σε σχέση με τον υπολογισμό όταν δεν γίνει ομαδοποίηση.

I.11.3.2. Επιλογή των μεταβλητών

Πολυάριθμες μεταβλητές/παράγοντες μπορεί να επηρεάσουν την απόκριση του συστήματος που μελετάται, με αποτέλεσμα να είναι πρακτικά αδύνατο να εντοπιστούν και να ελεγχθούν οι συνεισφορές από όλες αυτές τις μεταβλητές. Ως εκ τούτου, είναι απαραίτητο να επιλεχθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν περισσότερο την απόκριση. Θα πρέπει να πραγματοποιηθεί προ-πειραματικός σχεδιασμός για να προσδιοριστεί ποιες από τις πειραματικές μεταβλητές επηρεάζουν περισσότερο την απόκριση που έχει επιλεγεί. Πλήρεις ή κλασματικοί παραγοντικοί σχεδιασμοί δύο επιπέδων (2^k) μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον σκοπό αυτό κυρίως επειδή είναι αρκετά αποτελεσματικοί και οικονομικοί [120].

I.11.3.3. Επιλογή του πειραματικού σχεδιασμού

Το απλούστερο μοντέλο που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε RSM βασίζεται σε μία γραμμική συνάρτηση. Για την εφαρμογή της, είναι απαραίτητο οι αποκρίσεις που λαμβάνονται να προσαρμόζονται επιτυχώς στην ακόλουθη Εξίσωση:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad (41)$$

όπου k είναι ο αριθμός των μεταβλητών, β_0 είναι ο σταθερός όρος, β_i αντιπροσωπεύει τους συντελεστές/παραμέτρους των γραμμικών παραμέτρων, x_i αντιπροσωπεύει τις μεταβλητές, και ε το τυχαίο σφάλμα. Αν $E(\varepsilon) = 0$, τότε το μη τυχαίο τμήμα παριστάνει την αληθή μέση απόκριση και το E θεωρείται ως πειραματικό σφάλμα. Αν το παραπάνω μοντέλο είναι μια ανεπαρκής παράσταση της μέσης απόκρισης, τότε το E περιέχει, εκτός από το πειραματικό σφάλμα και ένα μη τυχαίο σφάλμα, το συστηματικό. Το συστηματικό σφάλμα οφείλεται στην απουσία παραγόντων υψηλότερου του πρώτου βαθμού όπως και στην απουσία άλλων μεταβλητών που έχουν κάποια επίδραση στην απόκριση. Ως εκ τούτου, οι αποκρίσεις δεν θα πρέπει να παρουσιάζουν/εμπεριέχουν καμπυλότητα. Τα δύο επίπεδων παραγοντικά πειράματα χρησιμοποιούνται για την εκτίμηση των κύριων παραγόντων, αλλά

αποτυγχάνουν όταν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των παραγόντων, είναι σημαντικές. Έτσι, η προσθήκη ενός κεντρικού σημείου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αξιολόγηση της καμπυλότητας. Σε αυτήν την περίπτωση οι αποκρίσεις θα πρέπει να προσαρμόζονται σε ένα πολυώνυμο που περιλαμβάνει πρόσθετους όρους που θα περιγράφουν και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των κύριων παραγόντων. Έτσι το μοντέλο πρώτης τάξης αναβαθμίζεται με έναν επιπλέον όρο στη μορφή της Εξίσωσης 42:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{1 \leq i \leq j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (42)$$

όπου β_{ij} αντιπροσωπεύει τους συντελεστές των παραγόντων αλληλεπίδρασης.

Το μοντέλο δεύτερης τάξης προκύπτει από την αδυναμία του μοντέλου πρώτης τάξης να περιγράψει την απόκριση, εξαιτίας της ύπαρξης κυρτότητας στην επιφάνεια. Στην φάση αυτή το μοντέλο πρώτης τάξης αναβαθμίζεται σε ένα μοντέλο δεύτερης τάξης, το οποίο έχει τη μορφή της Εξίσωσης 43:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{1 \leq i \leq j}^k \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \varepsilon \quad (43)$$

όπου β_{ii} αντιπροσωπεύει τους συντελεστές των παραγόντων δευτέρου βαθμού.

Για την εκτίμηση των παραμέτρων της Εξίσωσης 43, ο πειραματικός σχεδιασμός πρέπει να διασφαλίζει ότι όλες οι μελετώμενες μεταβλητές διεξάγονται σε τουλάχιστον τρία επίπεδα. Μεταξύ των πιο γνωστών δεύτερης τάξης συμμετρικών σχεδιασμών είναι ο τριών επιπέδων παραγοντικός σχεδιασμός (3^k παραγοντικοί σχεδιασμοί), ο σχεδιασμός κατά Box-Behnken, κεντρικοί σύνθετοι σχεδιασμοί, Doehlert σχεδιασμοί κ.α. Αυτοί οι συμμετρικοί σχεδιασμοί διαφέρουν μεταξύ τους σε σχέση με την επιλογή των πειραματικών σημείων και τον αριθμό των επιπέδων για τις μεταβλητές. Μετά την απόκτηση των δεδομένων, που σχετίζονται με κάθε πειραματικό σημείο του επιλεγμένου σχεδιασμού, είναι απαραίτητο μια μαθηματική εξίσωση να προσαρμοσθεί στα πειραματικά δεδομένα για να περιγραφεί η συμπεριφορά της απόκρισης που μελετάται.

I.11.3.4. Αξιολόγηση του προσαρμοζόμενου μοντέλου

Το μαθηματικό μοντέλο που βρέθηκε μετά την προσαρμογή της συνάρτησης/εξίσωσης στα πειραματικά δεδομένα μπορεί μερικές φορές να μην περιγράφει ικανοποιητικά το πείραμα. Ο πιο αξιόπιστος τρόπος για να αξιολογηθεί η ποιότητα του μοντέλου που προσαρμόζεται είναι με την εφαρμογή της ανάλυσης διασποράς (ANOVA). Στην ANOVA,

η αξιολόγηση της μεταβολής των δεδομένων γίνεται με τη μελέτη της διασποράς. Σε ένα κλασικό στατιστικό πρόγραμμα, τα αποτελέσματα της ανάλυσης διασποράς παρουσιάζονται στον κλασικό πλέον Πίνακα ANOVA, που αναλύεται παρακάτω.

Πίνακας 2: Εξαγωγή αποτελεσμάτων ανάλυσης διασποράς σε πίνακα ANOVA

Source	DF	SS	MS	F	P
Factor	4	16.190	4.048	8.69	0.000041
Error	39	18.167	0.466		
Cor Total	43	34.357			

Ο όρος **SS** (sum of the square) σημαίνει το άθροισμα των τετραγώνων. Αναλυτικότερα, υπάρχει η διακύμανση των δειγματικών μέσων γύρω από τον ολικό μέσο, δηλαδή διασπορά μεταξύ των δειγμάτων/διεργασιών (Factor), ο οποίος ισούται με $SS_{bg} = n \sum_j^k (\bar{y}_j - \bar{y})^2$ και η διακύμανση των παρατηρήσεων γύρω από τον μέσο κάθε δείγματος/διεργασίας, δηλαδή διασπορά μέσα στο κάθε δείγμα (Error), το οποίο ισούται με $SS_{wg} = \sum_{j=1}^k \sum_{i=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_j)^2$ [123].

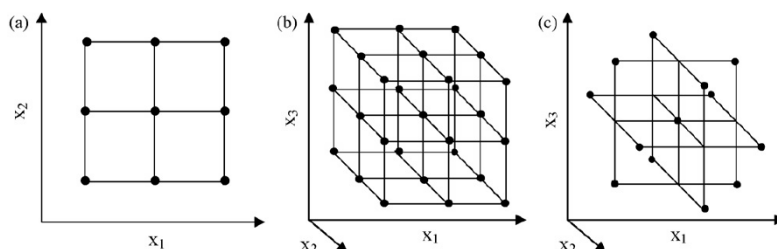
Το άθροισμα των **SS_{bg}** και **SS_{wg}** ισούται με το ολικό άθροισμα των τετραγώνων (SST/Cor Total). Ο όρος **MS** (Mean of Squares) σημαίνει το μέσο άθροισμα των τετραγώνων και ισούται με το πηλίκο των **SS** με τους αντίστοιχους βαθμούς ελευθερίας (**DF**). Έτσι, **MS_{bg}** = **SS_{bg}/(k-1)** και **MS_{wg}** = **SS_{wg}/(n-k)**.

Το **F_{k-1,N-k}** ισούται με το πηλίκο **MS_{bg}/MS_{wg}**, ενώ η τιμή **p** αντιστοιχεί στην πιθανότητα εμφάνισης τιμών ίσων ή μεγαλύτερων της τιμής **F** (8.69) σε μία κατανομή **F_{k-1,N-k}** (**F_{4,39}**). Αν η τιμή αυτή είναι μικρότερη του 5 % (**p**-τιμή < 0.05), αφού 95 % είναι το επίπεδο εμπιστοσύνης που τίθεται, τότε συμπεραίνεται ότι ο λόγος **F** είναι πολύ μεγάλος και συνεπώς η διασπορά μεταξύ των διεργασιών πολύ μεγαλύτερη της διασποράς εντός των διεργασιών, που είναι αποτέλεσμα πειραματικού σφάλματος [124], [125].

I.11.4. Συμμετρικοί πειραματικοί σχεδιασμοί δευτέρας τάξης

I.11.4.1. Πλήρεις παραγοντικοί σχεδιασμοί τριών επιπέδων

Οι πλήρεις παραγοντικοί σχεδιασμοί τριών επιπέδων έχουν περιορισμένη εφαρμογή σε RSM όταν ο αριθμός των παραγόντων είναι υψηλότερος από δύο, επειδή ο αριθμός των πειραμάτων που απαιτούνται για αυτού του είδους τους σχεδιασμούς (που υπολογίζεται με την σχέση $N = 3^k$, όπου N είναι ο αριθμός των περαμάτων και k είναι ο αριθμός των παραγόντων), είναι πολύ μεγάλος με αποτέλεσμα να χάνουν την αποτελεσματικότητά τους στη μοντελοποίηση δευτεροβάθμιων εξισώσεων. Επειδή ένας πλήρης παραγοντικός σχεδιασμός τριών επιπέδων με περισσότερους από δύο παράγοντες απαιτεί περισσότερα πειράματα (runs) από ότι μπορεί συνήθως να πραγματοποιηθούν στην πράξη, για αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται πιο συχνά σχεδιασμοί που εμπεριέχουν μικρότερο αριθμό πειραματικών σημείων, όπως οι: Box-Behnken, κεντρικοί σύνθετοι σχεδιασμοί, και σχεδιασμοί Doehlert [126]. Ωστόσο, για δύο παράγοντες, η αποτελεσματικότητά τους είναι συγκρίσιμη με αυτήν των κεντρικών σύνθετων σχεδιασμών και κάτω από ορισμένες συνθήκες τα αποτελέσματά τους είναι πολύ πιο ακριβή [127]. Η Εικόνα 16 αναπαριστά παραγοντικούς σχεδιασμούς τριών επιπέδων για την βελτιστοποίηση δύο ή τριών παραγόντων.



Εικόνα 16: Σχεδιασμοί τριών επιπέδων για την βελτιστοποίηση (α) δύο και (β, γ) τριών παραγόντων, αντίστοιχα

I.11.4.2. Σχεδιασμοί Box–Behnken

Οι Box και Behnken [128] πρότειναν την εκλεκτική επιλογή σημείων από πλήρεις παραγοντικούς σχεδιασμούς τριών επιπέδων, που θα επιτρέπουν την αποτελεσματική εκτίμηση των συντελεστών πρώτης και δεύτερης τάξης του μαθηματικού μοντέλου που προσαρμόζεται. Αυτοί οι σχεδιασμοί είναι, με αυτό τον τρόπο, πιο αποτελεσματικοί και

οικονομικοί σε σύγκριση με τους αντίστοιχους 3^k σχεδιασμούς, ιδιαίτερα για μεγάλους αριθμούς παραγόντων.

Στους Box-Behnken σχεδιασμούς [129] [130], τα πειραματικά σημεία βρίσκονται πάνω σε μια υπερσφαίρα, σε ίση απόσταση από το κεντρικό σημείο (Εικόνα 16c). Τα κύρια χαρακτηριστικά τους είναι:

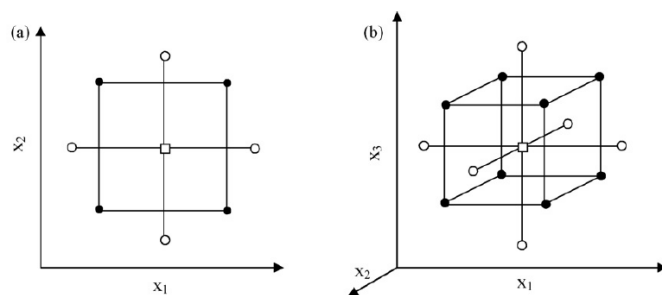
- Τα απαιτούμενα πειραματικά σημεία δίνονται από την σχέση $N = 2k(k-1) + cp$, όπου k είναι ο αριθμός των παραγόντων και cp είναι ο αριθμός των κεντρικών σημείων
- Όλοι οι παράγοντες προσαρμόζονται σε τρία μόνο επίπεδα (-1, 0, 1) με ισαπέχοντα μεταξύ τους διαστήματα.

Η Εικόνα 16c παρουσιάζει ένα σχεδιασμό κατά Box-Behnken για τρεις παράγοντες βελτιστοποίησης, δίνοντας συνολικά 13 πειραματικά σημεία, σε σύγκριση με τα 27 πειραματικά σημεία ενός 3^3 σχεδιασμού (Εικόνα 16b). Αυτός ο πειραματικός σχεδιασμός έχει εφαρμοστεί για την βελτιστοποίηση διάφορων χημικών και φυσικών διεργασιών, ωστόσο, η εφαρμογή του εξακολουθεί να είναι πολύ μικρότερη σε σύγκριση με τους σύνθετους κεντρικούς σχεδιασμούς.

I.11.4.3. Σύνθετοι κεντρικοί σχεδιασμοί

Οι σύνθετοι κεντρικοί σχεδιασμοί παρουσιάστηκαν από τους Box και Wilson. Αυτοί οι σχεδιασμοί αποτελούνται από τα εξής μέρη: (1) έναν πλήρη παραγοντικό ή κλασματικό παραγοντικό σχεδιασμό, (2) έναν επιπλέον σχεδιασμό, που συχνά αναφέρεται ως σχεδιασμός αστεριού λόγω της μορφής του, στον οποίο τα πειραματικά σημεία είναι σε μια συγκεκριμένη απόσταση από το κέντρο του και (3) ένα κεντρικό σημείο. Η Εικόνα 17 απεικονίζει έναν πλήρη σύνθετο κεντρικό σχεδιασμό για την βελτιστοποίηση δύο και τριών παραγόντων. Οι πλήρεις περιστρεφόμενοι σύνθετοι κεντρικοί σχεδιασμοί παρουσιάζουν τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

- Τα απαιτούμενα πειραματικά σημεία δίνονται από την σχέση $N = k^2 + 2k + cp$, όπου k είναι ο αριθμός των παραγόντων και cp είναι ο αριθμός των κεντρικών σημείων
- Η α -τιμή εξαρτάται από τον αριθμό των παραγόντων και μπορεί να υπολογιστεί από την σχέση $\alpha = 2^{(k-p)/4}$. Για δύο, τρεις, και τέσσερις μεταβλητές, η α -τιμή ισούται με 1.41, 1.68, και 2.00 αντίστοιχα.
- Όλοι οι παράγοντες μελετώνται σε πέντε επίπεδα ($-\alpha$, -1, 0, +1, $+\alpha$).



Εικόνα 17: Κεντρικοί σύνθετοι σχεδιασμοί για την βελτιστοποίηση (α) δύο μεταβλητών ($\alpha = 1.41$) και (β) τριών μεταβλητών ($\alpha = 1.68$)

I.11.5. Βελτιστοποίηση πολλαπλών αποκρίσεων χρησιμοποιώντας την μεθοδολογία των αποκριτικών επιφανειών

Είναι σχετικά απλό να βρεθούν οι ιδανικές συνθήκες για μία μόνο απόκριση χρησιμοποιώντας την μεθοδολογία των αποκριτικών επιφανειών. Ωστόσο, πολλές φορές είναι απαραίτητη η βελτιστοποίηση περισσότερων αποκρίσεων ταυτόχρονα. Η πιο απλή στρατηγική που υιοθετείται σε τέτοιες περιπτώσεις είναι η οπτική επιθεώρηση. Εάν το πλήθος των σημαντικών παραγόντων επιτρέπει την γραφική απεικόνιση των προσαρμοσμένων μοντέλων, και εάν δεν υπάρχουν πάρα πολλές αποκρίσεις, τότε οι επιφάνειες μπορεί να αλληλοεπικαλυφθούν ώστε να μπορέσει οπτικά να βρεθεί η πειραματική περιοχή που ικανοποιεί όλες τις αποκρίσεις που μελετήθηκαν [131].

Εάν οι βέλτιστες τιμές για κάθε απόκριση εντοπίζονται σε διαφορετικές περιοχές, είναι πιο δύσκολο να βρεθούν οι συνθήκες που ικανοποιούν ταυτόχρονα όλες τις αποκρίσεις. Το επίπεδο δυσκολίας αυξάνεται καθώς οι περιοχές αυτές είναι απομακρυσμένες και δεν τέμνονται. Μία προσέγγιση για την επίλυση του προβλήματος της βελτιστοποίησης πολλών αποκρίσεων είναι η χρήση της πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA). Η μεθοδολογία αυτή εφαρμόζεται όταν πολλές αποκρίσεις θα πρέπει να ικανοποιούνται ταυτόχρονα και είναι αναγκαίο να βρεθεί ένας συμβιβασμός μεταξύ τους. Η συνάρτηση Derringer ή συνάρτηση επιθυμητού [132], είναι η πιο σημαντική και συχνά χρησιμοποιούμενη σήμερα μεθοδολογία πολλαπλών κριτηρίων για τη βελτιστοποίηση πολλαπλών αποκρίσεων.

Η μεθοδολογία αυτή βασίζεται αρχικά στην κατασκευή μίας συνάρτησης επιθυμητού για κάθε ξεχωριστή απόκριση. Συνοπτικά, οι μετρούμενες ιδιότητες που σχετίζονται με κάθε απόκριση μετατρέπονται σε μια αδιάστατη κλίμακα επιθυμητού (d_i). Μέσα από τις

επιμέρους λειτουργίες, ο αναλυτής εισάγει τις προδιαγραφές που κάθε απόκριση πρέπει να πλήρη στην διαδικασία της μέτρησης. Η κλίμακα του επιθυμητού κυμαίνεται από $\mathbf{d} = 0$, για μια εντελώς ανεπιθύμητη απόκριση, σε $\mathbf{d} = 1$, για μια πλήρως επιθυμητή απόκριση, επάνω από την οποία μια περαιτέρω βελτίωση δεν θα έχει καμία σημασία. Αυτός ο μετασχηματισμός καθιστά δυνατό να συνδυαστούν αποτελέσματα που ελήφθησαν για ιδιότητες που μετρούνται σε διαφορετικές τάξεις μεγέθους. Στην συνέχεια, έχοντας υπολογίσει τα μεμονωμένα επιθυμητά, είναι εύκολο να υπολογιστεί το συνολικό επιθυμητό ($\mathbf{D}$). Η συνολική συνάρτηση επιθυμητού $\mathbf{D}$ ορίζεται ως ο σταθμισμένος γεωμετρικός μέσος όρος των μεμονωμένων επιθυμητών ($\mathbf{d}_i$) σύμφωνα με την ακόλουθη Εξίσωση:

$$\mathbf{D} = \sqrt[m]{\mathbf{d}_1 \mathbf{d}_2 \dots \mathbf{d}_m} \quad (44)$$

όπου $\mathbf{m}$ είναι αριθμός των αποκρίσεων που μελετήθηκαν στη διαδικασία βελτιστοποίησης. Έτσι, η μέθοδος της ταυτόχρονης βελτιστοποίησης ανάγεται στο να βρεθούν τα επίπεδα των παραγόντων που επιδεικνύουν το μέγιστο συνολικό επιθυμητό.

Υπάρχουν διάφοροι τύποι πιθανών μετασχηματισμών για τη λήψη των μεμονωμένων επιθυμητών. Έτσι, εάν η επιθυμητή τιμή ($\mathbf{T}$) είναι η μέγιστη για την απόκριση $\mathbf{y}$, τότε το μεμονωμένο επιθυμητό ($\mathbf{d}$) περιγράφεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$\mathbf{d} = \begin{cases} 0 & \text{αν } \mathbf{y} < \mathbf{L} \\ \left(\frac{\mathbf{y} - \mathbf{L}}{\mathbf{T} - \mathbf{L}} \right)^s & \text{αν } \mathbf{L} \leq \mathbf{y} \leq \mathbf{T} \\ 1 & \text{αν } \mathbf{y} > \mathbf{T} \end{cases} \quad (45)$$

όπου $\mathbf{L}$ είναι η χαμηλότερη αποδεκτή τιμή για την απόκριση και $\mathbf{s}$ είναι το στατιστικό βάρος. Έτσι, όταν $\mathbf{s} = 1$, η συνάρτηση επιθυμητού είναι γραμμική. Όταν επιλέγεται $\mathbf{s} > 1$, δίνεται σημαντικό βάρος στα σημεία πλησίον της τιμής στόχου. Όταν επιλέγεται $\mathbf{s} < 1$, τότε αυτή η τελευταία απαίτηση είναι χαμηλής σημασίας. Ωστόσο, εάν η τιμή στόχος για την απόκριση $\mathbf{y}$ είναι ένα ελάχιστο, τότε το μεμονωμένο επιθυμητό ($\mathbf{d}$) δίνεται από την εξίσωση:

$$\mathbf{d} = \begin{cases} 1 & \text{αν } \mathbf{T} < \mathbf{y} \\ \left(\frac{\mathbf{U} - \mathbf{y}}{\mathbf{U} - \mathbf{T}} \right)^t & \text{αν } \mathbf{T} \leq \mathbf{y} \leq \mathbf{U} \\ 0 & \text{αν } \mathbf{y} > \mathbf{U} \end{cases} \quad (46)$$

όπου $\mathbf{U}$ είναι η ανώτερη αποδεκτή τιμή για την απόκριση και το $\mathbf{t}$ είναι το στατιστικό βάρος. Η ίδια λογική εφαρμόζεται και για το $\mathbf{t}$ όπως στο $\mathbf{s}$. Εάν η τιμή στόχου ($\mathbf{T}$) βρίσκεται μεταξύ

του χαμηλότερου ορίου (**L**) και το ανώτερου όριο (**U**), τότε πρέπει να χρησιμοποιηθεί μια διμερής συνάρτηση επιθυμητού. Η λειτουργία αυτή εκφράζεται από την ακόλουθη εξίσωση:

$$d = \begin{cases} 0 & \text{αν } y < L \\ \left(\frac{y-L}{T-L}\right)^s & \text{αν } L \leq y \leq T \\ \left(\frac{U-y}{U-T}\right)^t & \text{αν } T \leq y \leq U \\ 0 & \text{αν } y > U \end{cases} \quad (47)$$

Όπως αποδεικνύεται, το **t** και το **s** ελέγχουν τον ρυθμό μεταβολής της συνάρτησης επιθυμητού. Όταν αυτοί οι παράμετροι μεταβάλλονται, είναι εφικτό να αποδίδουν διαφορετική τιμή επιθυμητού στις αποκρίσεις και κατά συνέπεια, να αυξάνουν ή να μειώνουν το εύρος των αποδεκτών τιμών στην διαδικασία βελτιστοποίησης.

Η εφαρμογή της συνάρτησης επιθυμητού στην διαδικασία βελτιστοποίησης φέρνει πλεονεκτήματα όπως αποτελεσματικότητα και αντικειμενικότητα στην βελτιστοποίηση πολλαπλών αποκρίσεων [131].

I.11.7. Πειραματικά σφάλματα

Αν τελικώς συλλεχθούν **n** δείγματα και μετρηθεί κάποια παράμετρος για κάθε δείγμα (**y_i**), με **i = 1, ...n**, τότε μπορεί να υπολογιστεί μία μέση τιμή $\bar{y}$ του δείγματος. Η μέση αυτή τιμή συνοδεύεται από ένα απόλυτο ή πειραματικό σφάλμα (δηλαδή μία απόκλιση ή διαφορά) από μία τιμή **μ** που ορίζεται ως η πραγματική (και άγνωστη σε εμάς) τιμή της παραμέτρου που μετρείται. Επίσης και οι μεμονωμένες μετρήσεις **y_i** θα αποκλίνουν από την πραγματική τιμή του πληθυσμού. Το πειραματικό (ή απόλυτο) σφάλμα (**ε_π**) ορίζεται ως:

$$e_{\pi} = \bar{y} - \mu \text{ και } e_{\pi i} = y_i - \mu \text{ (μεμονωμένης μέτρησης)} \quad (48)$$

όπου το **i** συμβολίζει τον αριθμό των μεμονωμένων μετρήσεων.

Το πειραματικό σφάλμα, που είναι η απόκλιση από την πραγματική τιμή (θα καλείται απόλυτο ή πειραματικό σφάλμα, ενώ συχνά αποκαλείται και θόρυβος), προϋποθέτει γνώση της πραγματικής τιμής, και αποτελείται από τα τυχαία σφάλματα (random errors ή **ε_τ**) και συστηματικά σφάλματα (systematic errors ή **ε_σ**)

$$e_{\pi} = e_{\sigma} + e_{\tau} \text{ και } e_{\pi i} = e_{\sigma i} + e_{\tau i} \text{ (μεμονωμένης μέτρησης)} \quad (49)$$

Γενικά, ο άρτιος τρόπος αναφοράς οποιουδήποτε πειραματικού αποτελέσματος ή μέτρησης, είναι το να συνοδεύεται με το αντίστοιχο σφάλμα του, ϵ_{π} . Συχνά δεν μπορεί να γίνει διάκριση μεταξύ τυχαίων και συστηματικών σφαλμάτων, οπότε αυτά αναφέρονται συνολικά ως πειραματικά σφάλματα. Σε κάθε περίπτωση, ο στόχος σε ένα εργαστηριακό πείραμα είναι να ελαχιστοποιηθεί το συστηματικό σφάλμα, ώστε το πειραματικό σφάλμα να ισούται, όσο αυτό είναι δυνατό, με το τυχαίο σφάλμα, το οποίο δεν μπορεί να αποφευχθεί ποτέ [121], [120].

I.11.7.1. Συστηματικά σφάλματα (ϵ_{σ})

Τα συστηματικά σφάλματα έχουν καθορισμένη τιμή και ουσιαστικά ταυτίζονται με την έννοια της απόκλισης (bias). Τα συστηματικά σφάλματα λοιπόν είναι υπεύθυνα για την απόκλιση μετρήσεων από την πραγματική τιμή και δεν ελαχιστοποιούνται με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις. Ελαχιστοποιούνται μόνο αν ελεγχθούν και βαθμονομηθούν τα όργανα και δίνεται η μέγιστη προσοχή στην διεξαγωγή του πειράματος. Τα συστηματικά σφάλματα αποτελούνται από σφάλματα οργάνων (π.χ. διαρροές, επιδράσεις θερμοκρασίας σε ανιχνευτές κ.λπ.), προσωπικά σφάλματα (λόγω επεμβάσεων από τον πειραματιστή, όπως οι εκτιμήσεις δεικτών σε ένα μετρητή, εκτίμηση του τελικού χρώματος μετά από εισαγωγή δείκτη, προκατάληψη) και σφάλματα της μεθόδου (όπως μη ιδανική συμπεριφορά αντιδραστηρίων, προσροφήσεις υγρών σε στερεά, μη σταθερότητα αντιδραστηρίων, χημικές αλληλεπιδράσεις). Τα σφάλματα μεθόδου είναι συνήθως πιο δύσκολα να ανιχνευτούν και να διορθωθούν σε σχέση με τις άλλες δύο κατηγορίες σφαλμάτων. Ο μόνος τρόπος να ανιχνευτούν είναι με την σύγκριση των αποτελεσμάτων της μεθόδου με πρότυπα υλικά. Σε κάθε περίπτωση, με προσεκτικές αναλύσεις, τα συστηματικά σφάλματα μπορούν να ελαχιστοποιηθούν ή και να μηδενιστούν.

I.11.7.2. Τυχαία σφάλματα (ϵ_{τ})

Τα τυχαία σφάλματα οφείλονται απλά στην ύπαρξη μη προσδιορισμένων λαθών (τυχαίων σφαλμάτων) που εμφανίζονται σε οποιαδήποτε μέτρηση. Η κατανομή των τυχαίων σφαλμάτων είναι κανονική, εφόσον και η κατανομή των μετρούμενων τιμών είναι κανονική.

Οι πολλές επαναλαμβανόμενες μετρήσεις του ίδιου δείγματος είναι ο τρόπος ποσοτικοποίησης των τυχαίων σφαλμάτων.

II. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

II.A. Εισαγωγικά

II.A.1. Υλικά

Όλοι οι οργανικοί διαλύτες, τα διάφορα άλατα, τα υποστρώματα Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA, τα ένζυμα (CALB ακινητοποιημένη σε υδρόφοβη μήτρα - Novozym[®] 435, propyl laurate units/g $\geq$ 5.000 U/g, 20 % w/w σε ελεύθερη λιπάση και LipA ακινητοποιημένη σε υδρόφιλη μήτρα - ChiralVision[®]), το οξείδιο δευτερίου (D₂O), οι αλκοόλες (αιθανόλη, αιθανόλη με δευτεριωμένο υδροξύλιο $\geq$ 99.5 και 1-βουτανόλη), το βουτυρικό οξύ, τα Molecular sieves 3Å, τα πρότυπα (Ethyl και Butyl propionate, Ethyl και Butyl butyrate, Ethyl και Butyl valerate) αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma-Aldrich. Η μεμβράνη pervaporation PERVAP 4100-342 αγοράστηκε από την εταιρεία SULZER.

II.A.2. Όργανα

- Οι μετρήσεις της απορρόφησης των διαλυμάτων στο ορατό και στο υπεριώδες έγιναν σε φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης perkin elmer uv/vis model LAMBDA 25, εφοδιασμένο με σύστημα θερμοστατούμενων κυψελίδων και πρόγραμμα ενζυμικής κινητικής.
- DANI MASTER GC-FID (Flame Ionization Detector), κολώνα DB-5 Agilent Technologies, 30m length, 0.32mm internal diameter, 1μm Film thickness
- Οι τιτλοδοτήσεις των διαλυμάτων για τον προσδιορισμό της τιμής pH έγιναν στον τιτλοδότη Metrohm AG 907 titrando.
- Ο προσδιορισμός του περιεχόμενου H₂O έγινε με την μέθοδο Karl Fischer (συσκευή Metrohm 851 Titrand/Tiamo)
- Πολυκάναλη περισταλτική αντλία magician
- Θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας IKA RCT basic
- Θερμοστατούμενος αντιδραστήρας των 150ml, όπου στον πυθμένα του έχει φίλτρο (Jacketed filter reactor by ACE)
- Μηχανικός αναδευτήρας IKA RW 20 digital
- θερμαινόμενος/ψυχόμενος κυκλοφορητής (PolyScience, ILL-USA)
- διαφραγματική αντλία κενού (BUCHI v-700, Switzerland) συζευγμένη με παγίδα υγρού αζώτου.

II.A.3. Προσδιορισμός των παραγόμενων εστέρων με αέρια χρωματογραφία

Για τον προσδιορισμό των παραγόμενων εστέρων (Προπιονικός βουτυλεστέρας ή αιθυλεστέρας, Βουτυρικός βουτυλεστέρας ή αιθυλεστέρας, Βαλερικός βουτυλεστέρας ή αιθυλεστέρας) χρησιμοποιήθηκε ο αέριος χρωματογράφος DANI MASTER GC Fast. Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιήθηκε ήταν ιονισμού φλόγας (FID). Ο τύπος της στήλης που εφαρμόστηκε ήταν DB-5 Agilent Technologies (30m × 0.32 mm id × 1 μm film thickness). Τα αέρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά την ανάλυση GC ήταν τα εξής: Ήλιο 6 ml/min 3 bar αέρας 300 ml/min 3 bar υδρογόνο 60 ml/min 2 bar.

Το θερμοκρασιακό προφίλ που εφαρμόστηκε κατά τη διάρκεια των μετρήσεων GC συνοψίζεται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: θερμοκρασιακό προφίλ μετρήσεων GC

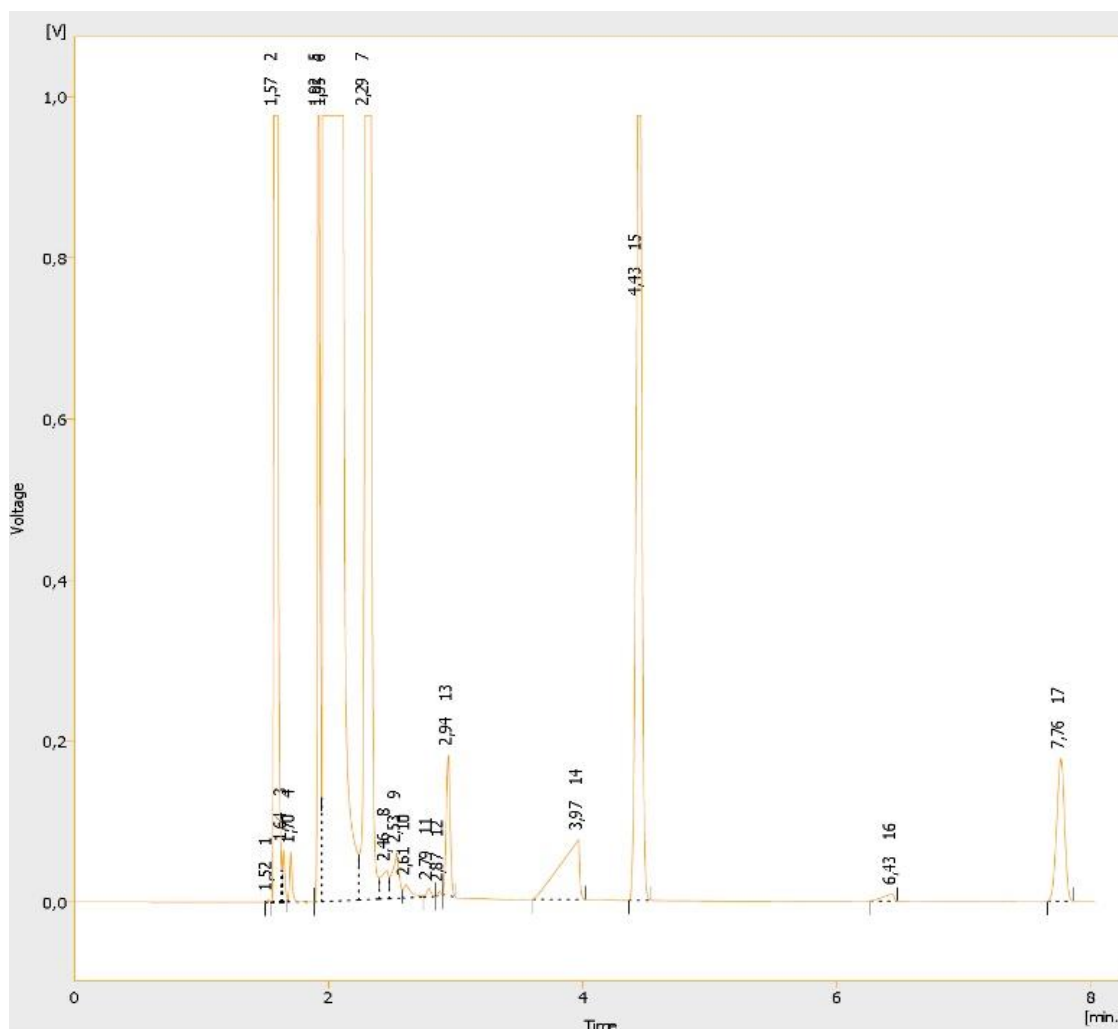
Αρχική θερμοκρασία	80 °C	15 λεπτά	2°C/λεπτό
Τελική θερμοκρασία	110 °C	5 λεπτά	0°C/λεπτό
Θερμοκρασία ανιχνευτή	250 °C		
Θερμοκρασία έγχυσης	250 °C		
Αναλογία διαίρεσης (Split Ratio)	1:20		

Για την ποσοτικοποίηση των ολοκληρωμάτων των κορυφών του GC (Εικόνα 18) και την εύρεση της % εστεροποίησης και της συγκέντρωσης εστέρα ([Ester]), χρησιμοποιήθηκαν οι εξισώσεις 50 και 51 [133] που υπερέχουν σε ακρίβεια, σε σχέση με την μέθοδο μέσω των πρότυπων καμπυλών, διότι δεν υπεισέρχονται σφάλματα λόγω εξάτμισης εξανίου ή αιθανόλης κατά την διάρκεια της αντίδρασης ή ακόμα και σφάλματα του πειραματιστή κατά την αραίωση των δειγμάτων. Βέβαια η χρήση τους για περισσότερα από τρία οξέα στο μίγμα της αντίδρασης καθίσταται πολύ δύσκολη λόγω του κακού διαχωρισμού των κορυφών τους.

$$\% \text{ Εστεροποίηση} = \frac{\sum_{i=1}^3 \frac{(\text{Εμβαδό κορυφής εστέρα})_i \times \text{PCA}_i \times 100}{(\text{Εμβαδό κορυφής εστέρα})_i + (\text{Εμβαδό κορυφής αντίστοιχου Οξέος})_i}}{100} \quad (50)$$

$$[\text{Εστέρα}]_{\text{total}} = \frac{[\text{Μίγμα οξέων}]_{\text{αρχικό}} \times \% \text{ Εστεροποίηση}}{100} \quad (51)$$

Η ποσότητα του δείγματος για την τροφοδοσία του GC, ήταν 1.5 μ l και γινόταν κατόπιν κατάλληλης αραιώσεώς του. Οι χρόνοι κατακράτησης των εστέρων ήταν μεταξύ 7 και 14 λεπτών ανάλογα με το εάν ήταν αιθύλ- ή βουτύλ- εστέρας.



Εικόνα 18: Χρωματογράφημα GC-FID για την εστεροποίηση του Μίγματος Α με αιθανόλη, όπου το Προπιονικό οξύ αντιστοιχεί στην κορυφή 9, ο Προπιονικός αιθυλεστέρας αντιστοιχεί στην κορυφή 13, το Βουτυρικό οξύ αντιστοιχεί στην κορυφή 14, ο Βουτυρικός αιθυλεστέρας αντιστοιχεί στην κορυφή 15, το Βαλερικό οξύ αντιστοιχεί στην κορυφή 16 και ο Βαλερικός αιθυλεστέρας αντιστοιχεί στην κορυφή 17.

II.B. Η πρωτεάση KM-IFO-0288-A

II.B.1. Επίδραση [NaCl], μεταλλικών αλάτων και οργανικών διαλυτών στις τιμές των παραμέτρων k_{cat}/K_m , k_{cat} και K_m της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A - υπόστρωμα: Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA

Οι κινητικές μετρήσεις με την πρωτεάση KM-IFO-0288-A πραγματοποιήθηκαν σε διαλύματα τιμών pH 7.75 και σε θερμοκρασία 25°C, σε χαμηλές [S] ($< 20 \times K_m$) και σε υψηλές [S] ($> 5 \times K_m$) συγκεντρώσεις του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA προκειμένου να διερευνηθεί [134]:

- η επίδραση της [NaCl] στις παραμέτρους Michaelis-Menten (k_{cat}/K_m , k_{cat} και K_m), σε ένα εύρος συγκεντρώσεων 0.0 M - 3.0 M [74].
- η επίδραση των μεταλλικών αλάτων CaCl₂, CuSO₄, FeCl₂ και ZnCl₂ στις παραμέτρους Michaelis-Menten, σε δυο αρχικές συγκεντρώσεις άλατος (1 mM (L) και 10.0 mM (H)) [135].
- η επίδραση των επιφανειακά ενεργών SDS και Triton X-100 (έως 1 %) καθώς και των οργανικών διαλυτών DMSO, DMF, αιθανόλη και 1,4-διοξάνη (έως 50 %) στην παράμετρο k_{cat}/K_m .

II.B.2. Μεταβολή των παραμέτρων k_{cat}/K_m , k_{cat} και $1/K_m$ της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A, ως συνάρτηση της τιμής pH του μέσου της αντίδρασης

Μελετήθηκε η εξάρτηση των παραμέτρων k_{cat}/K_m , k_{cat} και $1/K_m$ ως προς την τιμή pH του ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης, της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A, με το συνθετικό πεπτιδικό υπόστρωμα Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA σε: (α) δύο διαφορετικές θερμοκρασίες και (β) σε δύο διαφορετικές τιμές ιονικής ισχύος του ρυθμιστικού διαλύματος. Η πειραματική πορεία πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές τιμές pH του ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης φασματοφωτομετρικά. Η αποχωρούσα ομάδα *π*-νιτροανιλίνη, μετά την ενζυμική υδρόλυση του υποστρώματος και στις συνθήκες της αντίδρασης, έχει μοριακό συντελεστή απόσβεσης $\epsilon_{410 \text{ nm}} = 8800 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [136]. Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά

ρυθμιστικά διαλύματα για τις διάφορες τιμές pH. Συγκεκριμένα, για τιμές pH από 4.00 έως 5.00 ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M οξικών, από 5.50 έως 8.00 ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M φωσφορικών, από 8.20 έως 9.55 ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M Tris-HCl και τέλος από 10.25 έως 10.50 ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M ανθρακικών.

➤ **Ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M οξικών:**

Διάλυμα A: οξικό οξύ (CH_3COOH) (5.78 ml σε 1000 ml)

Διάλυμα B: άνυδρο οξικό νάτριο (CH_3COONa) (8.2 g σε 1000 ml)

➤ **Ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M φωσφορικών:**

Διάλυμα A: δισόξινο φωσφορικό κάλιο (KH_2PO_4) (13.61 g σε 1000 ml)

Διάλυμα B: όξινο φωσφορικό νάτριο ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) (17.81g σε 1000 ml)

➤ **Ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M Tris-HCl:**

Διάλυμα A: Tris base (12.11 g σε 1000 ml)

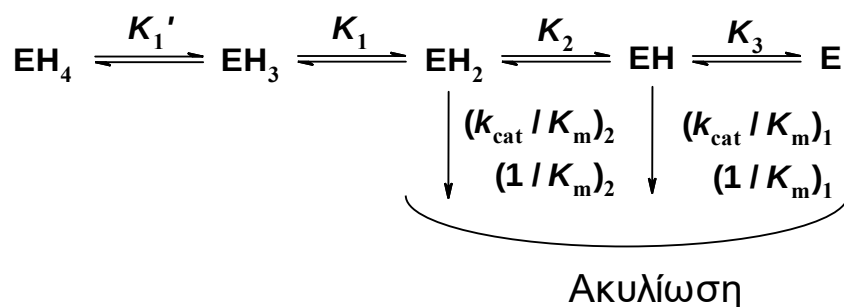
Διάλυμα B: 0.5 M HCl.

➤ **Ρυθμιστικό διάλυμα 0.1 M ανθρακικών:**

Διάλυμα A: άνυδρο ανθρακικό νάτριο (Na_2CO_3) (10.6 g σε 1000 ml)

Διάλυμα B: όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO_3) (8.4 g σε 1000 ml)

Για την ανάλυση των πειραματικών δεδομένων (pH, k_{cat}/K_m) έγινε κυρίως χρήση του Μοντέλου IV:



Στο Μοντέλο IV θεωρείται ότι υπάρχουν πέντε πρωτονιακές καταστάσεις, από τις οποίες μόνο δυο είναι δραστικές (EH, EH_2).

$$(k_{\text{cat}}/K_m)_{\text{obs}} = \frac{(k_{\text{cat}}/K_m)_1^{\text{lim}}}{1 + 10^{pK_1' - \text{pH}} + 10^{\text{pH} - pK_1}} + \frac{(k_{\text{cat}}/K_m)_2^{\text{lim}}}{1 + 10^{pK_2 - \text{pH}} + 10^{\text{pH} - pK_3}} \quad (13)$$

Η μη γραμμική προσαρμογή της παραμετρικής Εξίσωσης 13 στα πειραματικά δεδομένα (pH, k_{cat}/K_m) έγινε με τη χρήση του κριτηρίου των ελαχίστων τετραγώνων με στατιστικά βάρη $\left[\sum_{i=1}^n w_i (y_i - \bar{y}_i)^2 \right]$. Τα κριτήρια επιλογής της παραμετρικής εξίσωσης που προσαρμόζεται καλύτερα σε πειραματικά δεδομένα αναλύονται στην ενότητα I.10.1.

II.B.2.1. Μεταβολή των παραμέτρων k_{cat}/K_m , k_{cat} και $1/K_m$ της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A, σε δύο θερμοκρασίες ως συνάρτηση της τιμής pH του μέσου της αντίδρασης

Όλες οι κινητικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μεθοδολογία των αρχικών ταχυτήτων, σε σταθερή θερμοκρασία $\theta = 25^\circ\text{C}$, αλλά και $\theta = 35^\circ\text{C}$ και βασίστηκαν στην μεταβολή της συγκέντρωσης της απελευθερούμενης π -νιτροανιλίνης στην μονάδα του χρόνου, κατά την υδρόλυση του υποστρώματος. Συγκεκριμένα, οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα ιονικής ισχύος 0.1 M διαφορετικής κάθε φορά τιμής pH και μετρήθηκε η μεταβολή της απορρόφησης στην μονάδα του χρόνου σε μήκος κύματος $\lambda = 410 \text{ nm}$ για τα πρώτα λεπτά της αντίδρασης.

Για τις κινητικές μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το ενζυμικό παρασκεύασμα της πρωτεΐνης KM-IFO-0288-A, με τίτλο $[E]_0 = 500 \text{ nM}$ και υπόστρωμα Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA, σε συγκεντρώσεις 85 μM , 1000 μM και 4000 μM , σε διαλύματα 5 % σε DMSO. Οι παραπάνω αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε μια σειρά ρυθμιστικών διαλυμάτων με τιμές pH από 6.00 έως 10.50. Τα ρυθμιστικά διαλύματα παρασκευάστηκαν όπως περιγράφεται στην ενότητα II.B.2. και η διαδικασία ήταν η ακόλουθη: Σε κυψελίδα χωρητικότητας 1 ml προστίθενται διαδοχικά 945 μl ρυθμιστικού διαλύματος, 40 μl DMSO, 5 μl ενζυμικού παρασκευάσματος και τέλος 10 μl διαλύματος υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA σε DMSO και με κατάλληλο πρόγραμμα παρακολουθείται η αύξηση της συγκέντρωσης της π -νιτροανιλίνης ως συνάρτηση του χρόνου ($\Delta\text{Abs}_{410 \text{ nm}}/\text{min}$). Αυτή βρέθηκε γραμμική από 1 min ως 5 min τουλάχιστον με συντελεστή συσχέτισης > 0.999 . Για κάθε σειρά κινητικών μετρήσεων (δηλαδή για κάθε διαφορετική τιμή pH) χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος, ενώ για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος πραγματοποιήθηκαν οκτώ μετρήσεις και λαμβάνονταν η μέση τιμή τους.

Η εξίσωση Michaelis-Menten $\frac{V}{[E]_0} = \frac{k_{cat} \times [S]}{K_m + [S]}$ προσάρμοσε τα πειραματικά δεδομένα

από τις κινητικές μετρήσεις ($[S]_i$, v_i) και υπολογίστηκαν οι παράμετροι k_{cat}/K_m , k_{cat} και $1/K_m$. Η προσαρμογή της εξίσωσης στα πειραματικά δεδομένα έγινε με τη χρήση του προγράμματος OriginPro 2016. Ως κριτήριο σύγκλισης χρησιμοποιήθηκε αυτό των ελαχίστων τετραγώνων, με στατιστικά βάρη (ενότητα I.10.1.).

II.B.2.2. Μεταβολή των παραμέτρων k_{cat}/K_m , k_{cat} και $1/K_m$ της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A, ως συνάρτηση της τιμής pH του μέσου της αντίδρασης σε διάλυμα ιονικής ισχύος 1.5 M

Όλες οι κινητικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μεθοδολογία των αρχικών ταχυτήτων, σε σταθερή θερμοκρασία $\theta = 35^\circ\text{C}$, και βασίστηκαν στην μεταβολή της συγκέντρωσης της απελευθερούμενης π-νιτροανιλίνης στη μονάδα του χρόνου, κατά την υδρόλυση του υποστρώματος. Συγκεκριμένα, οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα ιονικής ισχύος 1.5 M διαφορετικής κάθε φορά τιμής pH και μετρήθηκε η μεταβολή της απορρόφησης σε μήκος κύματος $\lambda = 410 \text{ nm}$ για τα πρώτα λεπτά της αντίδρασης.

Για τις κινητικές μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε ενζυμικό παρασκεύασμα της πρωτεΐνης KM-IFO-0288-A, με τίτλο $[E]_0 = 500 \text{ nM}$ και υπόστρωμα Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA, σε συγκεντρώσεις 85 μM , 1000 μM και 4000 μM , σε διαλύματα 5 % σε DMSO. Οι παραπάνω αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε μια σειρά ρυθμιστικών διαλυμάτων με τιμές pH από 6.00 έως 10.50. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η εξής: Σε κυψελίδα χωρητικότητας 1 ml προστίθενται διαδοχικά 945 μl ρυθμιστικού διαλύματος, 40 μl DMSO, 5 μl ενζυμικού παρασκευάσματος και τέλος 10 μl διαλύματος υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA σε DMSO και με κατάλληλο πρόγραμμα παρακολουθείται η αύξηση της συγκέντρωσης της π-νιτροανιλίνης ως συνάρτηση του χρόνου ($\Delta\text{Abs}_{410 \text{ nm}}/\text{min}$). Αυτή βρέθηκε γραμμική από 1 min ως 5 min τουλάχιστον με συντελεστή συσχέτισης > 0.999 . Για κάθε σειρά κινητικών μετρήσεων (δηλαδή για κάθε διαφορετική τιμή pH) χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος, ενώ για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος πραγματοποιήθηκαν οκτώ μετρήσεις και λαμβάνονταν η μέση τιμή τους.

Η εξίσωση Michaelis-Menten $\frac{V}{[E]_0} = \frac{k_{cat} \times [S]}{K_m + [S]}$ προσάρμοσε τα πειραματικά δεδομένα

από τις κινητικές μετρήσεις ($[S]_i$, v_i) και υπολογίστηκαν οι παράμετροί της. Η προσαρμογή της εξίσωσης στα πειραματικά δεδομένα έγινε με τη χρήση του προγράμματος OriginPro 2016. Ως κριτήριο σύγκλησης χρησιμοποιήθηκε αυτό των ελαχίστων τετραγώνων, με στατιστικά βάρη (ενότητα I.10.1.).

II.B.3. Εξάρτηση των παραμέτρων k_{cat}/K_m και k_{cat} της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A, ως συνάρτηση της απόλυτης θερμοκρασίας και της ιονικής ισχύος του μέσου της αντίδρασης

Μελετήθηκε η υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την πρωτεάση KM-IFO-0288-A. Ο προσδιορισμός των παραμέτρων k_{cat}/K_m και k_{cat} σε διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας και σε τρεις διαφορετικές τιμές ιονικής ισχύος (η ρύθμιση της ιονικής ισχύς έγινε με χλωριούχο νάτριο), έγινε φωτομετρικά με την μεθοδολογία των αρχικών ταχυτήτων. Συγκεκριμένα, οι ενζυμικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε μια σειρά θερμοκρασιών που κυμαίνονταν από $\theta = 10^\circ\text{C}$ έως $\theta = 70^\circ\text{C}$ σε ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών 0.1 M με ιονική ισχύ: 0.1 M, 0.5 M και 1.5 M (η ρύθμιση έγινε με NaCl) τιμής pH = 7.75 και μετρήθηκε η μεταβολή της απορρόφησης σε μήκος κύματος $\lambda = 410 \text{ nm}$ για τα πρώτα λεπτά της αντίδρασης.

Για τις κινητικές μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε ενζυμικό παρασκεύασμα της πρωτεΐνης KM-IFO-0288-A, με τίτλο $[E]_0 = 500 \text{ nM}$ και το υπόστρωμα Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA σε συγκεντρώσεις $[S] = 85 \text{ }\mu\text{M}$, $1000 \text{ }\mu\text{M}$ και $4000 \text{ }\mu\text{M}$ σε διαλύματα 5 % σε DMSO. Η διαδικασία των κινητικών μετρήσεων και η ανάλυση τους ήταν η ίδια όπως αυτή που έχει ήδη περιγραφεί παραπάνω.

Τέλος, έγινε προσαρμογή των εξισώσεων 17 και 18 στα πειραματικά δεδομένα (OriginPro 2016). Οι εξισώσεις αυτές αποτελούν εφαρμογές της εξίσωσης Arrhenius όπως έχει περιγραφή λεπτομερώς στο Γενικό μέρος (ενότητα I.7.1.3.). Η μη γραμμική προσαρμογή αυτών των εξισώσεων στα πειραματικά δεδομένα έγινε με τη χρήση του κριτηρίου των ελαχίστων τετραγώνων με στατιστικά βάρη (ενότητα I.10.1.).

II.B.4. Μεταβολή των παραμέτρων k_{cat}/K_m και k_{cat} της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A, ως συνάρτηση της ισοτοπικής σύστασης n και της ιονικής ισχύος του μέσου της αντίδρασης

Προσδιορίστηκαν οι παράμετροι k_{cat}/K_m και k_{cat} σε μίγματα H₂O/D₂O διαφορετικής περιεκτικότητας σε δευτέριο (διαφορετικού n) και σε τέσσερις διαφορετικές τιμές ιονικής ισχύος (η ρύθμιση της ιονικής ισχύος έγινε με χλωριούχο νάτριο), για την υδρόλυση του συνθετικού πεπτιδικού υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA με τη μεθοδολογία των

αρχικών ταχυτήτων, από την πρωτεΐνάση KM-IFO-0288-A. Οι σχετικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών 0.1 M τιμής $pL = 7.75$ και $\theta = 35^{\circ}C$, διαφορετικού ατομικού κλάσματος δευτερίου n και διαφορετικής ιονικής ισχύος: 0.1 M, 0.5 M, 1.5 M και 3 M (η ρύθμιση έγινε με NaCl) και μετρήθηκε η μεταβολή της απορρόφησης σε μήκος κύματος $\lambda = 410$ nm για τα πρώτα λεπτά της αντίδρασης. Για την ρύθμιση της τιμής pL (όπου $L = H$ ή D) αυτών των ρυθμιστικών διαλυμάτων, ελήφθη υπόψη η σχέση $pD = \text{ένδειξη πεχαμέτρου} + 0.40$ [137]. Τα ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών, σε μίγματα H_2O/D_2O διαφορετικής περιεκτικότητας σε δευτέριο, παρασκευάστηκαν σταθμικά από δύο ισοδύναμα (ως προς τις αντίστοιχες τιμές pH ή pD) ρυθμιστικά διαλύματα, με διαλύτη H_2O ή D_2O , αντίστοιχα. Το καθένα από αυτά τα ρυθμιστικά διαλύματα με διαλύτη H_2O ή D_2O παρασκευάστηκε χωριστά και μετρήθηκε η τιμή pL αυτών, επίσης χωριστά. Ειδικότερα, για τα ρυθμιστικά διαλύματα με διαλύτη D_2O και για τον προσδιορισμό του περιεχόμενου ατομικού κλάσματος δευτερίου, ελήφθησαν υπόψη και οι ποσότητες των περιεχομένων πρωτονίων κάθε τυχόν επιβάρυνσης, όπως των αλάτων Na_2HPO_4 και KH_2PO_4 . Συνολικά παρασκευάστηκαν έξι διαφορετικά ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών με ατομικά κλάσματα δευτερίου $n = \{0.0, 0.12, 0.25, 0.50, 0.75, 0.99\}$.

Γενικά, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: σε κυψελίδα χωρητικότητας 1 ml προστίθενται διαδοχικά 945 μl του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος, 40 μl DMSO, 5 μl ενζυμικού παρασκευάσματος και τέλος 10 μl διαλύματος υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA σε DMSO και με κατάλληλο πρόγραμμα παρακολουθείται η αύξηση της συγκέντρωσης της π -νιτροανιλίνης ως συνάρτηση του χρόνου $\Delta Abs_{410nm}/min$. Αυτή βρέθηκε γραμμική από 1 min ως 5 min τουλάχιστον με συντελεστή συσχέτισης > 0.999 .

Για κάθε σειρά κινητικών μετρήσεων (δηλαδή για κάθε διαφορετική τιμή ατομικού κλάσματος δευτερίου n) χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος, ενώ για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις (λόγω του πολύ υψηλού κόστους του D_2O) και λαμβάνονταν η μέση τιμή των τριών μετρήσεων. Η εξίσωση Michaelis-Menten προσάρμοσε τα πειραματικά δεδομένα από τις κινητικές μετρήσεις ($[S]_i$, v_i) και υπολογίστηκαν οι παράμετροί της. Η προσαρμογή της εξίσωσης στα πειραματικά δεδομένα έγινε με τη χρήση του προγράμματος OriginPro 2016. Ως κριτήριο σύγκλισης χρησιμοποιήθηκε αυτό των ελαχίστων τετραγώνων με στατιστικά βάρη (ενότητα I.10.1.).

II.B.5. Προσδιορισμός των παραμέτρων k_{cat}/K_m και k_{cat} σε ρυθμιστικά διαλύματα διαφορετικής ισοτοπικής σύστασης n και τιμής pH

Προσδιορίστηκαν οι παράμετροι k_{cat}/K_m και k_{cat} σε μίγματα H_2O/D_2O διαφορετικής περιεκτικότητας σε δευτέριο (διαφορετικού n) και τιμής pH του ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης, για την υδρόλυση του συνθετικού πεπτιδικού υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την πρωτεΐνα KM-IFO-0288-A. Οι σχετικές αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.1 M και $\theta = 35^\circ C$, διαφορετικού ατομικού κλάσματος δευτερίου $n = \{0.0, 0.12, 0.25, 0.50, 0.75, 0.99\}$ και για τιμές pH από 6.00 έως 10.5. Για τη ρύθμιση της τιμής pL (όπου L = H ή D) αυτών των ρυθμιστικών διαλυμάτων, ελήφθη υπόψη η ίδια σχέση που αναφέρθηκε προηγουμένως. Τα ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών, σε μίγματα H_2O/D_2O διαφορετικής περιεκτικότητας σε δευτέριο, παρασκευάστηκαν σταθμικά από δύο ισοδύναμα (ως προς τις αντίστοιχες τιμές pH ή pD) ρυθμιστικά διαλύματα, με διαλύτη H_2O ή D_2O , αντίστοιχα. Το καθένα από αυτά τα ρυθμιστικά διαλύματα με διαλύτη H_2O ή D_2O παρασκευάστηκε χωριστά και μετρήθηκε η τιμή pL αυτών, επίσης χωριστά. Ειδικότερα, για τα ρυθμιστικά διαλύματα με διαλύτη D_2O και για τον προσδιορισμό του περιεχόμενου ατομικού κλάσματος δευτερίου, ελήφθησαν υπόψη και οι ποσότητες των περιεχομένων πρωτονίων κάθε τυχόν επιβάρυνσης, όπως των αλάτων Na_2HPO_4 και KH_2PO_4 .

Όλες οι κινητικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μεθοδολογία των αρχικών ταχυτήτων, σε σταθερή θερμοκρασία $\theta = 35^\circ C$ και βασίστηκαν στη μεταβολή της συγκέντρωσης της απελευθερούμενης π -νιτροανιλίνης στη μονάδα του χρόνου, κατά την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA. Γενικά, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: σε κυψελίδα χωρητικότητας 1 ml προστίθενται διαδοχικά 945 μl ρυθμιστικού διαλύματος, 40 μl DMSO, 5 μl ενζυμικού παρασκευάσματος και τέλος 10 μl διαλύματος υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA σε DMSO και με κατάλληλο πρόγραμμα παρακολουθείται η αύξηση της συγκέντρωσης της π -νιτροανιλίνης ως συνάρτηση του χρόνου $\Delta Abs_{410 \text{ nm}}/\text{min}$. Αυτή βρέθηκε γραμμική από 1 min ως 5 min τουλάχιστον με συντελεστή συσχέτισης > 0.999 .

Για κάθε σειρά κινητικών μετρήσεων χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος, ενώ για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος πραγματοποιήθηκαν τρεις μετρήσεις και λαμβάνονταν η μέση τιμή των τριών μετρήσεων. Η εξίσωση Michaelis-Menten προσάρμοσε τα πειραματικά δεδομένα των κινητικών μετρήσεων ($[S]_i$, v_i) και υπολογίστηκαν οι παράμετροι k_{cat}/K_m και k_{cat} . Η προσαρμογή της

εξίσωσης στα πειραματικά δεδομένα έγινε με τη χρήση του προγράμματος OriginPro 2016. Ως κριτήριο σύγκλησης χρησιμοποιήθηκε αυτό των ελαχίστων τετραγώνων με στατιστικά βάρη (ενότητα I.10.1.).

II.B.6. Ακίνητοποίηση της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A σε κρυστάλλους χλωριούχου νατρίου

Όπως περιγράφηκε στην ενότητα I.3., η δραστηριότητα των πρωτεασών που προέρχονται από αλόφιλους μικροοργανισμούς διατηρείται σε υψηλά επίπεδα σε πολικούς οργανικούς διαλύτες και ιδιαίτερα ύστερα από την λυοφιλοποίησή τους παρουσία αλάτων [39], [42]. Αυτό συμβαίνει διότι (1) τα αλόφιλα ένζυμα έχουν εκ φύσεως εξελιχθεί στο να δρουν σε περιβάλλοντα χαμηλής περιεκτικότητας σε H_2O , (2) το $NaCl$ προστατεύει το ένζυμο κατά την λυοφιλοποίηση, (3) η πρωτεάση είναι αλόφιλη, οπότε θα παρουσιάζει αυξημένη δραστηριότητα σε αυξημένη συγκέντρωση $NaCl$ και (4) τα φορτισμένα κατάλοιπα στην επιφάνεια της πρωτεάσης που είναι επιδιαλυτωμένα από μόρια H_2O , αντικαθίστανται από τα ιόντα του $NaCl$ τα οποία παίζουν αυτά πλέον το ρόλο του «λιπαντικού» (lubricate) βοηθώντας στην δυναμική του ενζύμου που είναι απαραίτητη για την κατάλυση, ενώ ταυτόχρονα δεν μπορούν να απομακρυνθούν όπως το H_2O από πολικούς οργανικούς διαλύτες (π.χ. αιθανόλη). Για αυτούς του λόγους επιλέχτηκε η ακίνητοποίηση της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A να γίνει σε κρυστάλλους χλωριούχου νατρίου. Η πειραματική πορεία αυτής της ακίνητοποίησης/ενεργοποίησης είναι πολύ απλή και συνίσταται στην λυοφιλοποίηση του ενζυμικού παρασκευάσματος από ένα διάλυμα με υψηλή συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου.

Το διαθέσιμο ενζυμικό παρασκεύασμα της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A είχε συγκέντρωση 0.725 mg/ml. Κατά την ακίνητοποίηση χρησιμοποιήθηκαν 3 ml τα οποία περιείχαν 2.175 mg του ενζύμου και αναμίχθηκαν με 2 ml τα οποία περιείχαν 68 mg KH_2PO_4 , 89 mg $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$ και 146 mg $NaCl$. Το τελικό ρυθμιστικό διάλυμα ήταν όγκου 5 ml, 0.1 M φωσφορικών pH= 7.75 και 0.5 M σε $NaCl$ και μετά το τέλος της λυοφιλοποίησής του περιείχε 300 mg (≈ 0.7 % w/w) ακινητοποιημένης σε κρυστάλλους $NaCl$ πρωτεάσης KM-IFO-0288-A [48]. Η λυοφιλοποίηση του δείγματος πραγματοποιήθηκε σε τρία στάδια: ψύξη, πρωτογενή ξήρανση και δευτερογενή ξήρανση [45]. Στο στάδιο της ψύξης, η θερμοκρασία του πρωτεϊνικού διαλύματος μειώθηκε πολύ γρήγορα κάτω από το ευθηκτικό σημείο της, με ψύξη με υγρό N_2 , ώστε να εξασφαλιστεί ότι

στα επόμενα βήματα θα συμβεί εξάχνωση παρά τήξη. Η πρωτογενής ξήρανση πραγματοποιήθηκε κατά τα πρώτα στάδια της λυοφιλοποίησης. Τέλος, κατά τη διάρκεια της δευτερογενούς ξήρανσης, τα μόρια H_2O που είναι δεσμευμένα στην πρωτεΐνη απελευθερώθηκαν με αύξηση της θερμοκρασίας ώστε να μηδενιστούν οποιεσδήποτε φυσικοχημικές αλληλεπιδράσεις έχουν δημιουργηθεί μεταξύ των μορίων του H_2O και της πρωτεΐνης [138]. Σε οποιοδήποτε σημείο της λυοφιλοποίησης μπορεί να συμβεί αδρανοποίηση του ενζύμου, ωστόσο αυτή είναι αναστρέψιμη σε μεγάλο βαθμό εάν η παραγόμενη λυοφιλοποιημένη μορφή του ενζύμου επαναιωρηθεί σε H_2O , ενώ κάτι τέτοιο δεν συμβαίνει και κατά την επαναιώρηση του σε οργανικό διαλύτη π.χ. κ-εξάνιο. Όπως περιγράφηκε και στην ενότητα I.3., το H_2O είναι ένας κρίσιμος παράγοντας για τη διατήρηση της δομής και της λειτουργίας των ενζύμων. Απώλεια των κρυσταλλογραφικών και επιφανειακών μορίων H_2O που είναι οργανωμένα σε συμπλέγματα έχει ως αποτέλεσμα το ένζυμο να είναι πλήρως ανενεργό εάν προστεθεί ως έχει σε οργανικό διαλύτη. Έτσι χρησιμοποιήθηκε χλωριούχο νάτριο για την προστασία του ενζύμου από απενεργοποίηση κατά τη φάση της ψύξης και της ξήρανσης [139], [140].

II.B.7. Εστεροποίηση του μίγματος Α με αιθανόλη και με καταλύτη την ακινητοποιημένη σε κρυστάλλους χλωριούχου νατρίου πρωτεάση KM-IFO-0288-A

Σε θερμοστατούμενο αντιδραστήρα ολικού όγκου 60ml, εφοδιασμένο με κάθετο ψυκτήρα, σύστημα δειγματοληψίας και μονάδα απομάκρυνσης του παραγομένου H_2O με molecular sieves $3\text{\AA}$, πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις εστεροποίησης του Μίγματος Α με αιθανόλη σε σύστημα χωρίς διαλύτη (solvent free) με την ακινητοποιημένη σε κρυστάλλους χλωριούχου νατρίου πρωτεάση KM-IFO-0288-A. Οι συνθήκες της αντίδρασης ήταν οι εξής:

- Ολική συγκέντρωση οξέων του Μίγματος Α: 0.1 M ή 0.2 M
- Μάζα του ακινητοποιημένου ενζύμου KM-IFO-0288-A σε κρυστάλλους χλωριούχου νατρίου: 100 mg (≈ 0.7 mg η μάζα του καθαρού ενζύμου).
- Θερμοκρασία: $\theta = 35^\circ\text{C}$
- Ανάδευση: 100 rpm
- Περιεχόμενο H_2O περίπου 0.01 %v

II.Γ. Μελέτη αντιδράσεων εστεροποίησης με ακινητοποιημένες λιπάσες: Λιπάση B από *Candida antarctica* (CALB) και λιπάση A από *Bacillus subtilis* (LipA)

II.Γ.1 Πειραματικοί σχεδιασμοί για τη παραγωγή βιοκαυσίμων

Η μελέτη βελτιστοποίησης των συνθηκών παραγωγής βιοκαυσίμου πραγματοποιήθηκε σε έναν από τους τρεις αντιδραστήρες, όπως θα αναλυθεί παρακάτω. Τα υποστρώματα της αντίδρασης εστεροποίησης ήταν το Μίγμα A, που αποτελείται από τα οργανικά οξέα: προπιονικό, βουτυρικό και βαλερικό σε κατά μέσο όρο αναλογία ($PCA_i = v_i/v_{total}$): 0.14, 0.74, 0.12, αντίστοιχα και μία εκ των αλκοολών αιθανόλη ή 1-βουτανόλη [141]. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτήν την μελέτη ήταν: CALB και LipA.

Τα οξέα του Μίγματος A προήλθαν από την οξυγένεση υπολειμμάτων (wastes) βιομηχανιών ποτοποιίας και συγκεκριμένα υγρής βινάσσας. Η παραγωγή των οξέων έγινε από την ομάδα του πανεπιστημίου Πατρών (Ομάδα Βιοτεχνολογίας Τροφίμων, Τμ. Χημείας, Παν/μίου Πατρών). Το τελικό προϊόν ύστερα από επεξεργασία με molecular sieves 3Å (Μίγμα A) περιείχε κατά μέσο όρο και σε αναλογία v/v τα οργανικά οξέα προπιονικό (14 %), βουτυρικό (74 %) και βαλερικό (12 %) [142], [143], [144].

Η πυκνότητα και το μέσο μοριακό βάρος του Μίγματος A προκύπτουν από τις εξισώσεις (52) και (53), αντίστοιχα [145], [141]:

$$\overline{Mw}_A = \frac{\sum_{i=1}^3 [\text{Πυκνότητα}_i \text{ (g/mL)} \times PCA_i]}{\sum_{i=1}^3 \frac{[\text{Πυκνότητα}_i \text{ (g/mL)} \times PCA_i]}{MW_i}} \quad (52)$$

$$\overline{d}_A = \frac{\sum_{i=1}^3 (w_i \times d_i)}{\sum_{i=1}^3 (w_i)}, \text{ όπου } w_i \text{ είναι ο συντελεστής βαρύτητας} \quad (53)$$

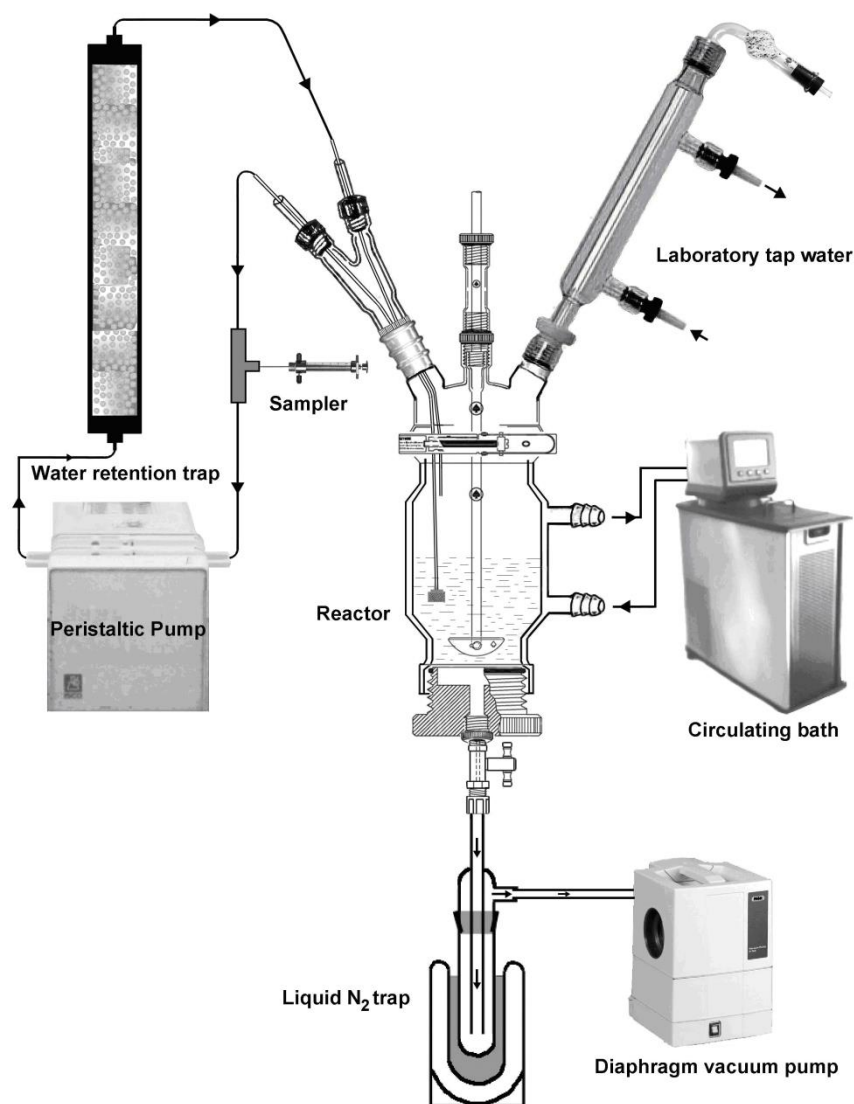
έτσι για το Μίγμα A ισχύουν $\overline{Mw}_A = 87.1168$, $\overline{d}_A = 0.963 \text{ g/mL}$.

Οι αντιδραστήρες που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη βελτιστοποίησης των συνθηκών παραγωγής βιοκαυσίμων ήταν τρεις και πιο συγκεκριμένα:

1. Αντιδραστήρας-1: θερμοστατούμενος αντιδραστήρας 150 ml της ACE, με ψυκτήρα (στον οποίο είχε τοποθετηθεί σωληνάκι $CaCl_2$) και σύστημα δειγματοληψίας.

2. Αντιδραστήρας-2: θερμοστατούμενος αντιδραστήρας 150 ml της ACE, με ψυκτήρα (στον οποίο είχε τοποθετηθεί σωληνάκι CaCl_2) και σύστημα δειγματοληψίας, καθώς και με εγκατεστημένο κύκλωμα κυκλοφορίας του μίγματος της αντίδρασης διαμέσου παγίδας συγκράτησης H_2O που εμπεριέχει κατάλληλη ποσότητα molecular sieves 3Å. Η κυκλοφορία του μίγματος της αντίδρασης γινόταν μέσω περισταλτικής αντλίας.
3. Αντιδραστήρας-3: θερμοστατούμενος αντιδραστήρας μεμβράνης υπερεξάτμισης 150 ml της ACE με ψυκτήρα (στον οποίο είχε τοποθετηθεί σωληνάκι CaCl_2) και σύστημα δειγματοληψίας. Η μεμβράνη που χρησιμοποιήθηκε είχε εμβαδό 0.001385 m^2 . Η υποπίεση διατηρούταν σταθερή με αντλία κενού στην τιμή 10 mbar, καθόλη την διάρκεια της αντίδρασης, ενώ οι ατμοί που διαπερνούσαν την μεμβράνη οδηγούνταν σε παγίδα υγρού N_2 .

Στις περιπτώσεις όπου το H_2O απομακρύνονταν, το περιεχόμενο του ήταν περίπου 0.01 % (ανεξαρτήτως της συσκευής απομάκρυνσης). Η ανάδευση σε όλους τους αντιδραστήρες γινόταν μέσω ενός μηχανικού αναδευτήρα (IKA RW 20 digital).



Εικόνα 189: Γενική γραφική αναπαράσταση των αντιδραστήρων που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή της νέας γενιάς βιοκαυσίμου. Όλα τα περιφερειακά μέρη του αντιδραστήρα περιγράφονται στο κείμενο

II.Γ.1.1. Πειραματικός σχεδιασμός με την λιπάση CALB

Για την διαδικασία εύρεσης των βέλτιστων συνθηκών για την αντίδραση εστεροποίησης του μίγματος A μέσω της CALB πραγματοποιήθηκαν τέσσερις ορισμένοι από τον χρήστη (user defined) πειραματικοί σχεδιασμοί με το πρόγραμμα Design-Expert Software v10, όπου ως αλκοόλη χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη ή 1-βουτανόλη, είτε με την διατήρηση του H₂O που παράγεται κατά την εστεροποίηση μέσα στο μίγμα της αντίδρασης είτε με την συνεχή απομάκρυνση του περισσότερο από 99.99 %. Αναλυτικότερα κάθε ένας πειραματικός σχεδιασμός αποτελείται από έναν απλό 2⁴ παραγοντικό πειραματικό σχεδιασμό 16 σημείων

(factorial design) με επιπρόσθετα σημεία: τα κέντρα των ακμών 32 σημεία (center of edges), τα κέντρα των επιφανειών 8 σημεία (Plane centroids), και το ολικό κεντρικό 1 σημείο $\times$ 4 φορές (overall centroid), δηλαδή επιλέχθηκαν συνολικά 60 σημεία σχεδιασμού (ή 60 μεμονωμένα πειράματα). Οι αποκρίσεις των πειραμάτων ήταν δύο, η % απόδοση του παραγόμενου εστέρα (Yield %) και η απόλυτη συγκέντρωση του εστέρα στο μίγμα της αντίδρασης (mol/L). Η ανάλυση του πειραματικού σχεδιασμού έγινε με την μεθοδολογία των αποκριτικών επιφανειών (response surface methodology). Οι παράγοντες ελέγχου (Factors) των ξεχωριστών πειραμάτων για κάθε πειραματικό σχεδιασμό ήταν: η συγκέντρωση του Μίγματος Α σε mol/L, η αναλογία της χρησιμοποιούμενης αλκοόλης ως προς το Μίγμα Α $\left(\text{Ratio} = \frac{[\text{Αλκοόλης}]}{[\text{Μίγματος Α}]} \right)$, τα γραμμάρια (g) της ακινητοποιημένης λιπάσης και τέλος οι ώρες (h) αντίδρασης. Οι τιμές των παραγόντων ελέγχου και των προκυπτουσών αποκρίσεων του κάθε πειράματος παρουσιάζονται στους Πίνακες 4 και 5. Οι σταθεροί παράγοντες (Held constant factors) των απεικονιζόμενων πειραμάτων ήταν η θερμοκρασία που ρυθμίστηκε στους $\theta = 40^{\circ}\text{C}$, η ανάδευση που ρυθμίστηκε στις 150 στροφές (rpm) και ο ρυθμός κυκλοφορίας του μίγματος της αντίδρασης (10 ml/min), όπου ύστερα από πειράματα προ σχεδιασμού (pre experimental design) φάνηκε ότι η συνεισφορά τους δεν ήταν σημαντική. Ακόμα παράγοντες όπως η ατμοσφαιρική πίεση τέθηκαν ως ελεύθερες (allowed to vary Factors), διότι εκτός του ότι ο έλεγχός τους είναι πολύ δύσκολος, η συνεισφορά τους στις αποκρίσεις του παρόντος θεωρείται αμελητέα. Γενικά, για ένα τυπικό πείραμα (Run) π.χ. για το Run 1 του παρακάτω πίνακα ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: σε σταθερή θερμοκρασία $\theta = 40^{\circ}\text{C}$ και ανάδευση 150 rpm στον Αντιδραστήρα-2 προστέθηκαν διαδοχικά για τα 90 ml της αντίδρασης, 0.27 gr ενζύμου CALB ($[E]_0=90 \mu\text{M}$), 66.5 ml κ-εξανίου, 9.2 ml αιθανόλη, 14.3 ml Μίγμα Α και τέλος προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα molecular sieves $3\text{\AA}$ στην παγίδα συγκράτησης H_2O . Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται έχουν επεξεργαστεί κατάλληλα με molecular sieves $3\text{\AA}$ ώστε να έχουν περιεχόμενο H_2O περίπου 0.01 %v/v. Ο προσδιορισμός των παραγόμενων εστέρων και των καταναλισκόμενων οξέων γινόταν με την χρήση αέριου χρωματογράφου GC-FID όπως παρουσιάστηκε παραπάνω [141].

Όλοι οι πειραματικοί σχεδιασμοί, καθώς και η προσαρμογή (fitting) των μοντέλων δευτέρου βαθμού, των ανεξάρτητων μεταβλητών, επιτεύχθηκαν μέσω του λογισμικού Design-Expert® (Stat-Ease Inc., Minneapolis, USA), όπως και ο προσδιορισμός της σημαντικότητας των συντελεστών και των αντίστοιχων p-τιμών. Ο πιο αξιόπιστος τρόπος για να αξιολογηθεί η ποιότητα του μοντέλου που προσαρμόζεται είναι με την εφαρμογή της

ανάλυσης διασποράς (ANOVA), στην προκειμένη περίπτωση έγινε εφαρμογή της ανάλυσης διασποράς κατά δύο παράγοντες (Two-way ANOVA) με σκοπό να αξιολογηθούν τα ανεπτυγμένα μοντέλα, των οποίων σε όλες τις περιπτώσεις προσδιορίστηκε η σημαντικότητα, μέσω του F-test (Fisher test), ενώ το ποσοστό της διακύμανσης για κάθε μοντέλο υπολογιζόταν μέσω του συντελεστή προσδιορισμού R^2 . Για όλα τα μοντέλα δημιουργήθηκαν τα τρισδιάστατα μοντέλα των αποκρίσεων, ακολουθούμενα από τα αντίστοιχα περιγράμματα (contour) και τις ράμπες (ramps), με σκοπό να απεικονιστούν οι αλληλεπιδράσεις των ανεξάρτητων μεταβλητών [141].

Πίνακας 4: Εστεροποίηση μέσω της CALB του Μίγματος Α, με αιθανόλη

Run order (H ₂ O) ^α	Run order (H ₂ O) ^β	F-1 (H ₂ O) ^α [ACID] (M)	F-1 (H ₂ O) ^β [ACID] (M)	F-2 Ratio	F-3 (H ₂ O) ^α CALB (g)	F-3 (H ₂ O) ^β CALB (g)	F-4 (H ₂ O) ^α Time (h)	F-4 (H ₂ O) ^β Time (h)	R-1 (H ₂ O) ^α Yield (%)	R-1 (H ₂ O) ^β Yield (%)	R-2 (H ₂ O) ^α [Ester] (M)	R-2 (H ₂ O) ^β [Ester] (M)
4	1	2.25	2.75	1.00	0.27	0.09	8.0	8.00	71.5	75.96	1.61	2.09
6	8	2.75	2.75	1.00	0.18	0.18	16.0	8.00	67.1	79.61	1.85	2.19
11	12	1.75	1.75	1.00	0.27	0.09	12.0	16.00	78.8	85.37	1.38	1.50
12	14	1.75	2.75	1.00	0.09	0.27	12.0	16.00	61.4	92.97	1.07	2.56
13	15	2.25	2.75	1.00	0.18	0.09	12.0	16.00	67.2	86.9	1.51	2.39
15	17	2.75	1.75	1.00	0.27	0.18	8.0	8.00	70.7	79	1.94	1.38
18	18	2.75	1.75	1.00	0.09	0.27	8.0	16.00	58.7	93.97	1.61	1.65
21	21	1.75	2.75	1.00	0.09	0.27	16.0	12.00	63.1	92.05	1.10	2.53
27	22	1.75	2.75	1.00	0.27	0.09	8.0	12.00	73.4	82.9	1.28	2.28
29	23	2.75	2.25	1.00	0.27	0.27	16.0	8.00	77.3	82	2.13	1.85
31	26	2.75	2.25	1.00	0.18	0.09	8.0	8.00	65.5	75.2	1.80	1.69
34	30	2.75	1.75	1.00	0.27	0.27	12.0	8.00	75.2	82.14	2.07	1.44
39	31	2.75	2.25	1.00	0.09	0.09	16.0	16.00	66.1	84.3	1.82	1.90
40	33	2.25	1.75	1.00	0.09	0.18	8.0	16.00	60.0	89.3	1.35	1.56
43	38	1.75	1.75	1.00	0.27	0.09	16.0	12.00	79.1	81.68	1.38	1.43
45	39	2.75	2.75	1.00	0.09	0.18	12.0	16.00	60.0	90.17	1.65	2.48
47	40	2.25	2.25	1.00	0.27	0.27	16.0	16.00	78.2	93.2	1.76	2.10
48	44	1.75	2.25	1.00	0.18	0.18	16.0	12.00	68.1	86.61	1.19	1.95
50	52	1.75	1.75	1.00	0.09	0.27	8.0	12.00	60.7	88.64	1.06	1.55
55	54	1.75	2.75	1.00	0.18	0.27	8.0	8.00	64.2	83.59	1.12	2.30
57	55	2.25	1.75	1.00	0.09	0.09	16.0	8.00	62.4	76.28	1.40	1.34
2	3	1.75	2.25	2.00	0.27	0.18	16.0	16.00	94.6	93.25	1.66	2.10
7	5	2.25	2.75	2.00	0.18	0.27	12.0	16.00	82.4	95.84	1.85	2.64

10	7	2.25	2.25	2.00	0.18	0.18	12.0	12.00	81.1	88.46	1.83	1.99
20	9	2.25	2.25	2.00	0.18	0.09	16.0	12.00	87.2	81.13	1.96	1.83
25	24	2.25	1.75	2.00	0.18	0.09	8.0	16.00	76.1	88.54	1.71	1.55
26	27	1.75	2.75	2.00	0.27	0.09	8.0	16.00	89.2	87.73	1.56	2.41
28	29	2.75	1.75	2.00	0.18	0.27	12.0	8.00	81.3	90.1	2.24	1.58
30	34	2.75	2.75	2.00	0.09	0.27	16.0	8.00	78.8	84.86	2.17	2.33
32	35	2.75	1.75	2.00	0.27	0.18	8.0	12.00	78.1	91.12	2.15	1.60
35	36	2.25	2.25	2.00	0.27	0.18	12.0	8.00	89.8	80.47	2.02	1.81
36	43	2.25	2.75	2.00	0.09	0.18	12.0	12.00	77.8	87.68	1.75	2.41
37	45	2.75	2.25	2.00	0.27	0.18	16.0	12.00	88.3	90.02	2.43	2.03
41	46	2.75	2.25	2.00	0.09	0.27	8.0	12.00	64.2	94.07	1.77	2.12
42	49	2.25	2.25	2.00	0.18	0.18	12.0	12.00	81.6	90.29	1.84	2.03
46	53	1.75	2.25	2.00	0.18	0.18	12.0	12.00	88.2	88.34	1.54	1.99
49	56	1.75	2.75	2.00	0.09	0.09	16.0	8.00	86.5	72.02	1.51	1.98
51	59	2.25	1.75	2.00	0.18	0.27	12.0	16.00	83.1	97.95	1.87	1.71
58	60	1.75	1.75	2.00	0.09	0.09	8.0	8.00	75.1	77.74	1.31	1.36
1	2	2.75	2.75	3.00	0.27	0.18	12.0	16.00	82.1	89	2.26	2.45
3	4	2.25	2.75	3.00	0.18	0.18	12.0	8.00	80.0	77.72	1.80	2.14
5	6	1.75	2.25	3.00	0.09	0.18	8.0	12.00	71.2	89.14	1.25	2.01
8	10	2.75	1.75	3.00	0.27	0.18	8.0	8.00	78.3	83.4	2.15	1.46
9	11	2.25	2.25	3.00	0.09	0.09	16.0	8.00	81.9	70.55	1.84	1.59
14	13	2.25	1.75	3.00	0.27	0.09	8.0	12.00	87.0	85.73	1.96	1.50
16	16	1.75	2.25	3.00	0.09	0.27	12.0	16.00	78.1	96.08	1.37	2.16
17	19	1.75	2.25	3.00	0.18	0.27	8.0	8.00	82.0	88.9	1.43	2.00
19	20	1.75	2.75	3.00	0.09	0.09	16.0	8.00	83.3	67.27	1.46	1.85
22	25	2.75	1.75	3.00	0.09	0.27	12.0	12.00	67.4	92.3	1.85	1.62
23	28	2.25	2.75	3.00	0.09	0.09	8.0	16.00	67.8	84.24	1.53	2.32
24	32	1.75	1.75	3.00	0.18	0.27	16.0	8.00	92.1	90.62	1.61	1.59
33	37	2.25	2.75	3.00	0.27	0.27	16.0	12.00	92.1	92.87	2.07	2.55

38	41	1.75	1.75	3.00	0.27	0.27	8.0	16.00	84.8	95.15	1.48	1.67
44	42	2.75	1.75	3.00	0.18	0.18	8.0	16.00	71.1	95.24	1.95	1.67
52	47	2.75	2.75	3.00	0.18	0.09	16.0	12.00	83.2	76.56	2.29	2.105
53	48	1.75	1.75	3.00	0.27	0.09	16.0	16.00	93.6	92.43	1.64	1.62
54	50	1.75	2.25	3.00	0.27	0.09	12.0	16.00	92.1	88.3	1.61	1.99
56	51	2.75	2.75	3.00	0.27	0.27	16.0	16.00	86.2	94.94	2.37	2.61
59	57	2.75	1.75	3.00	0.09	0.09	8.0	8.00	58.0	74.13	1.60	1.30
60	58	2.75	2.75	3.00	0.09	0.27	16.0	8.00	73.5	85.63	2.02	2.36

^a(H₂O): Το H₂O διατηρούταν κατά την διάρκεια της αντίδρασης

^b(H₂O): Το H₂O απομακρύνονταν συνεχώς κατά την διάρκεια της αντίδρασης

F-1: Παράγοντας-1, [ACID]=[Μίγμα Α] (M); F-2: Παράγοντας-2, Ratio=Λόγος [Ethanol]/[ACID]; F-3: Παράγοντας-3, Ποσότητα CALB (g); F-4: Παράγοντας-4, Χρόνος (h); R-1: Απόκριση-1, % απόδοση του παραγόμενου εστέρα Yield (%); R-2: Απόκριση-2, απόλυτη συγκέντρωση του εστέρα στο μίγμα της αντίδρασης [Ester] (M)

Πίνακας 5: Εστεροποίηση μέσω της CALB του Μίγματος Α, με 1-βουτανόλη

Run order	Run order	F-1	F-1	F-2	F-3	F-3	F-4	F-4	R-1	R-1	R-2	R-2
(H ₂ O) ^α	(H ₂ O) ^β	(H ₂ O) ^α	(H ₂ O) ^β		(H ₂ O) ^α	(H ₂ O) ^β	(H ₂ O) ^α	(H ₂ O) ^β	(H ₂ O) ^α	(H ₂ O) ^β	(H ₂ O) ^α	(H ₂ O) ^β
		[ACID]	[ACID]	Ratio	CALB	CALB	Time	Time	Yield	Yield	[Ester]	[Ester]
		(M)	(M)		(g)	(g)	(h)	(h)	(%)	(%)	(M)	(M)
1	4	3.50	2.50	1.00	0.09	0.09	12.00	12.00	77.61	87.11	2.72	2.18
2	6	2.50	2.50	1.00	0.09	0.09	6.00	6.00	67.07	67.64	1.68	1.69
5	14	2.50	3.00	1.00	0.09	0.27	9.00	6.00	78.57	75.28	1.97	2.26
7	16	3.50	2.50	1.00	0.09	0.27	9.00	12.00	70.40	95.71	2.46	2.39
16	18	3.00	3.50	1.00	0.27	0.27	6.00	12.00	74.85	94.03	2.25	3.29
18	21	2.50	2.50	1.00	0.18	0.18	6.00	6.00	81.13	80.29	2.03	2.01
20	23	2.50	3.50	1.00	0.27	0.09	12.00	12.00	95.28	80.20	2.38	2.81
21	25	2.50	3.50	1.00	0.09	0.09	12.00	9.00	85.45	74.60	2.14	2.61
22	27	3.50	3.50	1.00	0.27	0.27	9.00	9.00	83.44	87.08	2.92	3.05
29	28	3.50	2.50	1.00	0.27	0.09	12.00	9.00	91.36	79.32	3.20	1.98
31	32	3.50	2.50	1.00	0.09	0.27	6.00	9.00	55.79	88.41	1.95	2.21
35	33	3.50	3.50	1.00	0.27	0.18	6.00	6.00	75.51	76.96	2.65	2.69
36	40	3.00	3.00	1.00	0.27	0.09	12.00	12.00	92.25	83.55	2.77	2.51
38	45	2.50	3.00	1.00	0.27	0.09	9.00	6.00	89.98	60.88	2.25	1.83
42	46	3.00	2.50	1.00	0.09	0.27	12.00	6.00	80.70	78.45	2.42	1.96
45	47	3.50	2.50	1.00	0.18	0.18	12.00	12.00	85.85	92.46	3.01	2.31
48	49	3.00	3.50	1.00	0.18	0.27	9.00	6.00	85.20	81.10	2.56	2.84
50	51	2.50	3.50	1.00	0.18	0.09	12.00	6.00	91.23	62.06	2.28	2.17
55	56	2.50	3.00	1.00	0.27	0.27	6.00	12.00	77.16	94.18	1.93	2.83
56	58	3.50	3.50	1.00	0.18	0.18	6.00	12.00	67.85	88.3	2.38	3.09
59	60	3.00	3.00	1.00	0.09	0.18	6.00	9.00	59.63	88.56	1.79	2.66
3	3	2.50	3.00	1.50	0.27	0.27	6.00	9.00	86.19	85.21	2.16	2.56
9	10	3.00	3.00	1.50	0.18	0.18	9.00	9.00	82.74	84.6	2.48	2.54

11	11	3.00	3.50	1.50	0.18	0.09	12.00	6.00	89.68	57.24	2.69	2.00
12	13	2.50	2.50	1.50	0.27	0.27	12.00	12.00	94.49	94.96	2.36	2.37
13	22	3.00	2.50	1.50	0.27	0.27	9.00	6.00	83.76	85.13	2.51	2.13
14	24	3.50	3.00	1.50	0.09	0.18	6.00	9.00	50.83	88.23	1.78	2.65
15	26	3.00	3.50	1.50	0.18	0.27	9.00	6.00	84.02	85.96	2.52	3.01
23	29	3.50	3.00	1.50	0.27	0.18	6.00	9.00	80.72	86.20	2.832	2.59
27	30	3.00	3.00	1.50	0.18	0.18	9.00	12.00	80.29	92.46	2.41	2.78
34	37	2.50	2.50	1.50	0.09	0.09	12.00	6.00	79.76	60.14	1.99	1.50
39	39	2.50	2.50	1.50	0.18	0.09	9.00	12.00	85.33	80.21	2.13	2.01
41	41	3.50	3.50	1.50	0.18	0.18	9.00	9.00	74.81	82.26	2.62	2.88
46	43	3.00	3.50	1.50	0.09	0.27	9.00	12.00	66.35	94.50	1.99	3.31
51	44	3.00	3.00	1.50	0.18	0.18	6.00	6.00	75.75	78.58	2.27	2.36
52	48	3.50	3.00	1.50	0.27	0.09	12.00	9.00	91.07	68.02	3.19	2.04
53	50	2.50	3.00	1.50	0.09	0.18	6.00	9.00	60.94	84.06	1.52	2.52
58	55	3.00	2.50	1.50	0.18	0.18	9.00	9.00	82.93	86.74	2.49	2.17
60	57	3.50	3.50	1.50	0.09	0.09	12.00	12.00	69.09	72.12	2.42	2.52
4	1	3.50	2.50	2.00	0.18	0.18	12.00	6.00	75.97	70.92	2.66	1.77
6	2	3.50	3.50	2.00	0.27	0.18	12.00	6.00	87.51	68.50	3.06	2.40
8	5	2.50	3.50	2.00	0.18	0.18	12.00	12.00	86.18	78.6	2.16	2.75
10	7	3.00	3.00	2.00	0.09	0.09	6.00	6.00	45.38	47.41	1.36	1.42
17	8	3.00	3.00	2.00	0.27	0.09	6.00	12.00	75.43	67.89	2.26	2.04
19	9	3.00	3.50	2.00	0.09	0.27	12.00	12.00	64.22	89.59	1.93	3.14
24	12	2.50	2.50	2.00	0.18	0.18	6.00	12.00	71.06	88.26	1.78	2.2
25	15	2.50	3.00	2.00	0.09	0.27	9.00	6.00	70.05	76.12	1.75	2.28
26	17	3.50	2.50	2.00	0.18	0.09	6.00	9.00	62.12	71.10	2.17	1.78
28	19	3.50	3.50	2.00	0.09	0.09	9.00	9.00	53.83	57.77	1.88	2.02
30	20	2.50	2.50	2.00	0.27	0.27	12.00	12.00	91.03	92.3	2.28	2.31
32	31	3.50	2.50	2.00	0.09	0.09	12.00	12.00	62.28	79.28	2.18	1.98
33	34	3.50	3.50	2.00	0.09	0.27	6.00	6.00	42.64	83.48	1.49	2.92

37	35	3.50	3.50	2.00	0.27	0.27	6.00	9.00	77.93	88.2	2.73	3.09
40	36	2.50	3.50	2.00	0.27	0.09	9.00	6.00	88.08	49.48	2.20	1.73
43	38	3.00	3.00	2.00	0.18	0.18	9.00	9.00	81.87	83.60	2.46	2.51
44	42	2.50	3.50	2.00	0.09	0.09	6.00	12.00	55.81	65.00	1.40	2.28
47	52	2.50	3.00	2.00	0.27	0.27	6.00	12.00	80.49	89.57	2.01	2.69
49	53	3.00	2.50	2.00	0.27	0.27	12.00	9.00	88.23	88.2	2.66	2.21
54	54	3.50	2.50	2.00	0.27	0.27	9.00	6.00	85.05	79.71	2.98	1.99
57	59	2.50	2.50	2.00	0.09	0.09	12.00	6.00	77.51	55.96	1.94	1.40

^a(H₂O): Το H₂O διατηρούταν κατά την διάρκεια της αντίδρασης

^b(H₂O): Το H₂O απομακρύνονταν συνεχώς κατά την διάρκεια της αντίδρασης

F-1: Παράγοντας-1, [ACID]=[Μίγμα Α] (M); F-2: Παράγοντας-2, Ratio=Λόγος [Ethanol]/[ACID]; F-3: Παράγοντας-3, Ποσότητα CALB (g); F-4: Παράγοντας-4, Χρόνος (h); R-1: Απόκριση-1, % απόδοση του παραγόμενου εστέρα Yield (%); R-2: Απόκριση-2, απόλυτη συγκέντρωση του εστέρα στο μίγμα της αντίδρασης [Ester] (M)

II.Γ.1.1.1. Κύκλοι ενζύμου και πρωτόκολλο ανακύκλωσης της ακινητοποιημένης CALB

Προσδιορίστηκε η % απόδοση του παραγόμενου εστέρα (Yield %) του ενζύμου CALB, έπειτα από κάθε κύκλο και για δέκα συνεχείς κύκλους εστεροποίησης του Μίγματος Α με 1-βουτανόλη ή αιθανόλη, στον αντιδραστήρα-1 ή αντιδραστήρα-2 (δηλαδή χωρίς ή με απομάκρυνση του παραγόμενου από την αντίδραση H_2O). Οι αντιδράσεις έγιναν στις βέλτιστες συνθήκες όπως αυτές βρέθηκαν από τους πειραματικούς σχεδιασμούς. Γενικά, η διαδικασία που ακολουθήθηκε για ένα τυπικό πείραμα ανακύκλωσης ήταν ίδια με αυτή που ακολουθήθηκε και σε οποιοδήποτε Run του πειραματικού σχεδιασμού.

Το πρωτόκολλο ανακύκλωσης του ακινητοποιημένου ενζύμου που ακολουθήθηκε κατά τους δέκα συνεχείς κύκλους ήταν το εξής: μετά την ολοκλήρωση της κάθε αντίδρασης εστεροποίησης γινόταν διήθηση υπό κενό στο μίγμα της αντίδρασης με γυάλινο ηθμό, όπου το υπερκείμενο συλλέγονταν για μέτρηση της % απόδοσης, ενώ το διήθημα ξεπλένονταν γρήγορα τρεις φορές με άνυδρο κ-εξάνιο. Τέλος το διήθημα αφήνονταν ξανά για 15 min στο άνυδρο κ-εξάνιο για την πλήρη απομάκρυνση τυχόν υπολειμμάτων της αντίδρασης. Μετά την απομάκρυνση του διαλύτη με την βοήθεια του κενού, το διήθημα αφήνεται να στεγνώσει στον αέρα για 5 min, στην συνέχεια μεταφέρεται σε προζυγισμένο φιαλίδιο και διατηρείται στο ψυγείο για τον επόμενο κύκλο αντιδράσεων [141]. Η χρήση του προζυγισμένου φιαλιδίου γίνεται, για έλεγχο τυχόν απωλειών του ακινητοποιημένου ενζύμου.

II.Γ.1.1.2. Εναλλακτικός τρόπος απομάκρυνσης του παραγόμενου H_2O

Στις βέλτιστες συνθήκες όπως αυτές βρέθηκαν από τους άνωθεν πειραματικούς σχεδιασμούς με την CALB στον αντιδραστήρα-2, πραγματοποιήθηκαν πειράματα εστεροποίησης του Μίγματος Α με 1-βουτανόλη και αιθανόλη, μέσω του αντιδραστήρα-3, στον οποίο το παραγόμενο από την αντίδραση εστεροποίησης H_2O απομακρύνεται συνεχώς διαμέσου μιας μεμβράνης υπερεξάτμισης (pervaporation), όπως και περιγράφηκε προηγουμένως (Εικόνα 19). Η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε και στις δύο περιπτώσεις ήταν παρόμοια με αυτή των αντίστοιχων πειραματικών σχεδιασμών.



Εικόνα 20: Θερμοστατούμενος αντιδραστήρας μεμβράνης υπερεξάτμισης (ACE)

II.Γ.1.2. Πειραματικός σχεδιασμός με την λιπάση LipA

Για την διαδικασία εύρεσης των βέλτιστων συνθηκών για την αντίδραση εστεροποίησης του μίγματος A μέσω της LipA πραγματοποιήθηκαν με το πρόγραμμα Design-Expert Software v10 trial δύο κεντρικοί σύνθετοι περιστροφική (central composite rotatable design CCRD) πειραματικοί σχεδιασμοί, με τρεις παράγοντες (factors) σε πέντε επίπεδα (level). Ως αλκοόλη χρησιμοποιήθηκε αιθανόλη ή 1-βουτανόλη, ενώ το H₂O που παράγεται κατά την εστεροποίηση μέσα στο μίγμα της αντίδρασης διατηρούνταν ως έχει. Οι αποκρίσεις των πειραμάτων ήταν δύο, η % απόδοση του παραγόμενου εστέρα (Yield %) και η απόλυτη συγκέντρωση του εστέρα στο μίγμα της αντίδρασης (mol/L). Η ανάλυση του πειραματικού σχεδιασμού έγινε με την μεθοδολογία των αποκριτικών επιφανειών. Οι παράγοντες ελέγχου (Factors) των ξεχωριστών πειραμάτων για κάθε πειραματικό σχεδιασμό ήταν: η συγκέντρωση του Μίγματος A σε mol/L, η αναλογία της χρησιμοποιούμενης αλκοόλης ως προς το Μίγμα A $\left(\text{Ratio} = \frac{[\text{Αλκοόλης}]}{[\text{Μίγματος A}]} \right)$ και η % αρχική ποσότητα H₂O. Οι τιμές των παραγόντων ελέγχου και των προκυπτουσών αποκρίσεων του κάθε πειράματος παρουσιάζονται στους Πίνακες 6 και 7. Οι σταθεροί παράγοντες (Held constant factors) των απεικονιζόμενων πειραμάτων ήταν η ποσότητα του ενζύμου, που τέθηκε ίση με 0.004 g/ml.

Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους $\theta = 40^{\circ}\text{C}$ και η ανάδευση ρυθμίστηκε στις 150 στροφές (rpm), όπου ύστερα από πειράματα προ σχεδιασμού, όπου και φάνηκε ότι η συνεισφορά τους δεν ήταν σημαντική. Ακόμα παράγοντες όπως η ατμοσφαιρική πίεση τέθηκαν ως ελεύθερες (allowed to vary Factors), διότι εκτός του ότι ο έλεγχος τους είναι πολύ δύσκολος, η συνεισφορά τους στις αποκρίσεις του παρόντος θεωρείται αμελητέα.

Γενικά, για ένα τυπικό πείραμα (Run) π.χ. για το Run 1 του παρακάτω πίνακα ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: σε σταθερή θερμοκρασία $\theta = 40^{\circ}\text{C}$ και ανάδευση 150 rpm στον αντιδραστήρα-1 προστέθηκαν διαδοχικά 0.36 gr LipA για τα 90 ml της αντίδρασης, 80.57 ml κ-εξάνιο, 2.63 ml αιθανόλη, 4.1 ml Μίγμα Α και τέλος προστίθεται 2.7 ml H_2O . Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται έχουν επεξεργαστεί κατάλληλα με molecular sieves ώστε να έχουν περιεχόμενο H_2O περίπου 0.01 %v. Ο προσδιορισμός των παραγόμενων εστέρων και των καταναλισκόμενων οξέων γινόταν με την χρήση αέριου χρωματογράφου GC-FID.

Πίνακας 6: Εστεροποίηση μέσω της LipA του Μίγματος A, με αιθανόλη

Std order	Run order	F-1 H ₂ O %	F-2 Acid (M)	F-3 Ratio	R-1 Yield %	R-2 [Ester]
4	1	3.00	0.50	1.00	0.48	0.0024
10	2	3.68	0.35	2.00	0.957	0.003349
2	3	3.00	0.20	1.00	31.1	0.0622
15	4	2.00	0.35	2.00	0.1	0.00035
6	5	3.00	0.20	3.00	21.7	0.0434
8	6	3.00	0.50	3.00	1.57	0.00785
7	7	1.00	0.50	3.00	2.1	0.0105
3	8	1.00	0.50	1.00	0.1	0.0005
16	9	2.00	0.35	2.00	0.6	0.0021
13	10	2.00	0.35	0.32	7.55	0.026425
5	11	1.00	0.20	3.00	12	0.024
9	12	0.32	0.35	2.00	0.9	0.00315
17	13	2.00	0.35	2.00	2.5	0.00875
18	14	2.00	0.35	2.00	3.01	0.010535
11	15	2.00	0.10	2.00	55	0.055
12	16	2.00	0.60	2.00	0.68	0.00408
1	17	1.00	0.20	1.00	37.7	0.0754
14	18	2.00	0.35	3.68	1.4	0.0049

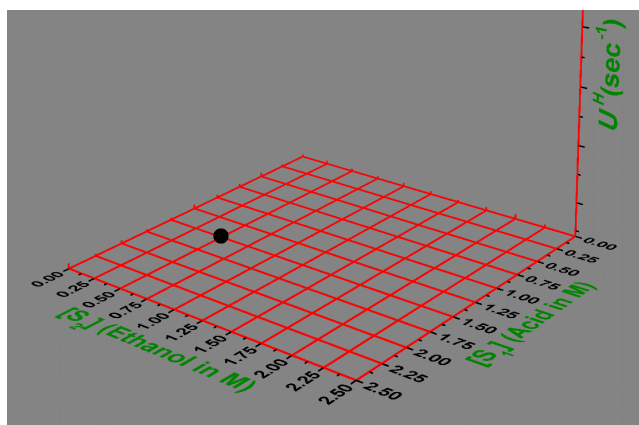
Πίνακας 7: Εστεροποίηση μέσω της LipA του Μίγματος Α, με 1-βουτανόλη

Std order	Run order	F-1 H ₂ O %	F-2 Acid (M)	F-3 Ratio	R-1 Yield %	R-2 [Ester]
4	1	3.00	0.50	1.00	23.26	0.1163
10	2	3.68	0.35	2.00	62	0.217
2	3	3.00	0.20	1.00	71.9	0.1438
15	4	2.00	0.35	2.00	78.06	0.273
6	5	3.00	0.20	3.00	98.4	0.1968
8	6	3.00	0.50	3.00	57.6	0.288
7	7	1.00	0.50	3.00	56.3	0.2815
3	8	1.00	0.50	1.00	37.73	0.189
16	9	2.00	0.35	2.00	87.4	0.306
13	10	2.00	0.35	0.32	32.3	0.113
5	11	1.00	0.20	3.00	98.83	0.198
9	12	0.32	0.35	2.00	68.9	0.2411
17	13	2.00	0.35	2.00	73.82	0.26
18	14	2.00	0.35	2.00	68.32	0.239
11	15	2.00	0.10	2.00	98.3	0.0983
12	16	2.00	0.60	2.00	31.8	0.1908
1	17	1.00	0.20	1.00	94.8	0.1896
14	18	2.00	0.35	3.68	78.26	0.2739

II.Γ.2. Κινητική μελέτη της αντίδρασης εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με αιθανόλη, με καταλύτη την CALB

II.Γ.2.1. Προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων της αντίδρασης εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο, με καταλύτη την CALB

Προσδιορίστηκαν οι παράμετροι k_{cat} , K_{mS1} , K_{mS2} , K_{iS1} , K_{iS2} , k_{cat}/K_{mS1} , k_{cat}/K_{mS2} είτε και K_{ii} για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB. Οι αντιδράσεις εστεροποίησης γίνονταν σε θερμοστατούμενο αντιδραστήρα των 60 ml, ο οποίος είχε τροποποιηθεί με σκοπό την απομάκρυνση του παραγόμενου από την αντίδραση H_2O με την χρήση molecular sieves. Οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων κυμαίνονταν σε ένα εύρος από 0.1-2.5 M, δημιουργώντας ένα δυσδιάστατο πλέγμα διασταυρούμενων σημείων x_i , y_j (με $i, j = \{0.1 - 2.5\}$ M), όπου κάθε τέτοιο σημείο αποτελεί και ένα πείραμα (Εικόνα 21). Η σειρά επιλογής κάθε πειράματος γινόταν μέσω μιας γεννήτριας επιλογής τυχαίων αριθμών με σκοπό την μείωση και κανονικοποίηση των παραγόμενων πειραματικών σφαλμάτων.



Εικόνα 19: Δυσδιάστατο πλέγμα διασταυρούμενων σημείων x_i , y_j (με $i, j = \{0.1 - 2.5\}$ M), κάθε σημείο αποτελεί και ένα πείραμα

Όλες οι κινητικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μεθοδολογία των αρχικών ταχυτήτων και βασίστηκαν στην μεταβολή των συγκεντρώσεων του παραγόμενου βουτυρικού αιθυλεστέρα και καταναλισκόμενου βουτυρικού οξέος κατά τα πρώτα 25 λεπτά της αντίδρασης όπου η εστεροποίηση ήταν μικρότερη από 10 %. Γενικά, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

Για το σημείο (1.5, 0.1), δηλαδή για συγκέντρωση οξέος ίση με 1.5 M και συγκέντρωση αιθανόλης ίση με 0.1 M, ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία. Σε σταθερή θερμοκρασία $\theta = 40^{\circ}\text{C}$ και ανάδευση στις 100 rpm στον αντιδραστήρα που περιγράφηκε προστίθενται, 20 mg ενζύμου CALB ($[E]_0 = 4.04 \mu\text{M}$), 25.6 ml *κ*-εξανίου, 4.2 ml βουτυρικό οξύ, 175 μl αιθανόλη και τέλος κατάλληλη ποσότητα molecular sieves. Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν είχαν επεξεργαστεί κατάλληλα με molecular sieves ώστε να έχουν περιεχόμενο H_2O περίπου 0.01 %/v. Κατά τα πρώτα 25 λεπτά της αντίδρασης λαμβάνονταν δείγμα των 100 μl ανά 5 λεπτά και γίνονταν ο προσδιορισμός του παραγόμενου βουτυρικού αιθυλεστέρα και καταναλισκόμενου βουτυρικού οξέος με την χρήση αέριου χρωματογράφου όπως έχει περιγραφεί. Η κλίση της παραγόμενης ευθείας, με συντελεστή συσχέτισης τουλάχιστον > 0.98 δίνει την αρχική ταχύτητα του εν λόγω σημείου. Κάθε πείραμα πραγματοποιούνταν τρεις φορές και λαμβάνονταν η μέση τιμή των τριών μετρήσεων. Οι εξισώσεις για συστήματα τύπου ping-pong bi-bi και διατεταγμένου bi-bi με αναστολή και για το οξύ και για την αιθανόλη, προσάρμοσαν τα πειραματικά δεδομένα των κινητικών μετρήσεων $z_m^H = f(x_i, y_j)$ και υπολογίστηκαν οι παράμετροι k_{cat} , K_{mS1} , K_{mS2} , K_{iS1} , K_{iS2} , k_{cat}/K_{mS1} , k_{cat}/K_{mS2} είτε και K_{ii} . Η προσαρμογή των εξισώσεων στα πειραματικά δεδομένα αλλά και η σύγκριση των δυο μοντέλων έγινε με τη χρήση του προγράμματος OriginPro 2016. Ως κριτήριο σύγκλησης χρησιμοποιήθηκε αυτό των ελαχίστων τετραγώνων.

II.Γ.2.2. Προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων της αντίδρασης εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με δευτεριωμένη αιθανόλη σε διαλύτη *κ*-εξάνιο, με καταλύτη την CALB

Προσδιορίστηκαν οι κινητικές παράμετροι k_{cat}^D , K_{mS1}^D , K_{mS2}^D , K_{iS1}^D , K_{iS2}^D , $(k_{cat}/K_{mS1})^D$, $(k_{cat}/K_{mS2})^D$ είτε και K_{ii}^D για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με δευτεριωμένη αιθανόλη σε διαλύτη *κ*-εξάνιο με καταλύτη την CALB. Οι αντιδράσεις εστεροποίησης γίνονταν σε θερμοστατούμενο αντιδραστήρα των 60 ml, ο οποίος είχε τροποποιηθεί με σκοπό την απομάκρυνση του παραγόμενου από την αντίδραση H_2O με την χρήση molecular sieves. Οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων κυμαίνονταν σε ένα εύρος από 0.1-2.5 M, δημιουργώντας ένα δυσδιάστατο πλέγμα διασταυρούμενων σημείων x_i, y_j (με $i, j = \{0.1 - 2.5\}$ M), όπου κάθε τέτοιο σημείο αποτελεί και ένα πείραμα (Εικόνα 21). Η σειρά

επιλογής κάθε πειράματος γινόταν μέσω μιας γεννήτριας επιλογής τυχαίων αριθμών με σκοπό την μείωση και κανονικοποίηση των παραγόμενων πειραματικών σφαλμάτων.

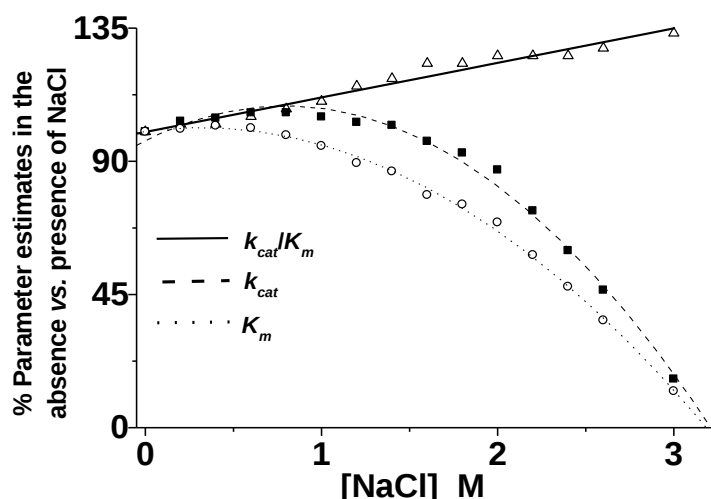
Όλες οι κινητικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη μεθοδολογία των αρχικών ταχυτήτων και βασίστηκαν στην μεταβολή των συγκεντρώσεων του παραγόμενου βουτυρικού αιθυλεστέρα και καταναλισκόμενου βουτυρικού οξέος κατά τα πρώτα 25 λεπτά της αντίδρασης όπου η εστεροποίηση ήταν κάτω από το 10 %. Γενικά, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: Για το σημείο (1.5, 0.1), δηλαδή για συγκέντρωση οξέος ίση με 1.5 M και συγκέντρωση αιθανόλης ίση με 0.1 M. Σε σταθερή θερμοκρασία $\theta = 40^{\circ}\text{C}$ και ανάδευση στις 100 rpm στον αντιδραστήρα που περιγράφηκε προστίθενται, 20 mg ενζύμου CALB ($[E]_0 = 4.04 \mu\text{M}$), 25.6 ml εξανίου, 4.2 ml βουτυρικό οξύ, 175 μl δευτερωμένη αιθανόλη και τέλος κατάλληλη ποσότητα molecular sieves. Όλοι οι διαλύτες που χρησιμοποιούνται έχουν επεξεργαστεί κατάλληλα με molecular sieves ώστε να έχουν περιεχόμενο H_2O περίπου 0.01 % v/v. Κατά τα πρώτα 25 λεπτά της αντίδρασης λαμβάνονταν δείγμα των 100μl ανά 5 λεπτά και γίνονταν ο προσδιορισμός του παραγόμενου βουτυρικού αιθυλεστέρα και καταναλισκόμενου βουτυρικού οξέος με την χρήση αέριου χρωματογράφου όπως έχει περιγραφεί. Η κλίση της παραγόμενης ευθείας, με συντελεστή συσχέτισης τουλάχιστον > 0.98 δίνει την αρχική ταχύτητα του εν λόγω σημείου. Κάθε πείραμα πραγματοποιούνταν τρεις φορές και λαμβάνονταν η μέση τιμή των τριών μετρήσεων. Οι εξισώσεις για συστήματα τύπου ring-pong bi-bi και διαταγμένο bi-bi με αναστολή και για το οξύ και για την δευτερωμένη αιθανόλη, προσάρμοσαν τα πειραματικά δεδομένα των κινητικών μετρήσεων $z_m^D = f(x_i, y_j)$ και υπολογίστηκαν οι παράμετροι k_{cat}^D , K_{mS1}^D , K_{mS2}^D , K_{iS1}^D , K_{iS2}^D , $(k_{cat}/K_{mS1})^D$, $(k_{cat}/K_{mS2})^D$ είτε και K_{ii}^D . Η προσαρμογή των εξισώσεων στα πειραματικά δεδομένα αλλά και η σύγκριση των δυο μοντέλων έγινε με τη χρήση του προγράμματος OriginPro 2016. Ως κριτήριο σύγκλησης χρησιμοποιήθηκε αυτό των ελαχίστων τετραγώνων.

III ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

III.B Με την Πρωτεάση KM-IFO-0288-A

III.B.1. Επίδραση της [NaCl] επί των παραμέτρων Michaelis-Menten της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A

Οι παράμετροι Michaelis-Menten για την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την πρωτεάση KM-IFO-0288-A επηρεάστηκαν ουσιαστικά με την αύξηση της [NaCl]. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται μεταβάλλοντας την [NaCl] εντός της περιοχής 0.0 M – 3.0 M, για τις παραμέτρους k_{cat}/K_m , k_{cat} και K_m , φαίνονται στο Διάγραμμα 2 και παρουσιάζονται ως το ποσοστό της κάθε επιμέρους παραμέτρου με παρουσία έναντι απουσίας NaCl. Η τιμή της παραμέτρου k_{cat}/K_m αυξάνεται γραμμικά συναρτήσει της [NaCl] τουλάχιστον έως 3 M. Οι τιμές των k_{cat} και K_m συναρτήσει της [NaCl] βρέθηκε να αυξάνονται έως 0.8 M και 0.4 M, αντίστοιχα και στην συνέχεια να μειώνονται υιοθετώντας μια πτώση δευτέρου βαθμού. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η πρωτεάση KM-IFO-0288-A είναι δραστική σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, δεδομένου ότι υπό τις συγκεκριμένες συνθήκες η συγγένεια του χρησιμοποιούμενου υποστρώματος εμφανίζεται αυξημένη (μείωση της K_m), καθώς και από το γεγονός ότι παρουσιάζει αυξημένη καταλυτική δράση (αυξημένη k_{cat}/K_m), όλα αυτά συνηγορούν στο ότι πρόκειται για μια αλόφιλη πρωτεάση [135], [134].

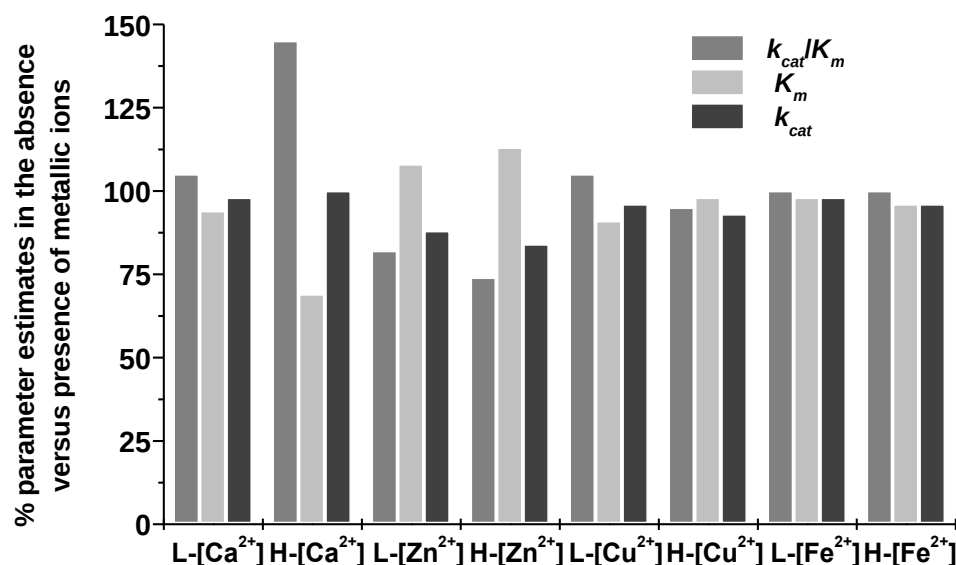


Διάγραμμα 2: Εκτιμώμενα ποσοστά των εξαρτήσεων των παραμέτρων k_{cat}/K_m (συνεχής γραμμή, Δ), k_{cat} (διακεκομμένη γραμμή, ■) και K_m (ημι-διακεκομμένη γραμμή, ○), παρουσίας έναντι απουσίας NaCl, σε τιμή pH 7.75 και $\theta = 25^\circ\text{C}$ (υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A)

III.B.1.1. Επίδραση των μεταλλικών κατιόντων επί των παραμέτρων Michaelis-Menten της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A

Οι παράμετροι Michaelis-Menten για την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την πρωτεάση KM-IFO-0288-A επηρεάστηκαν ουσιαστικά από την παρουσία χαμηλών όσο και υψηλών συγκεντρώσεων των μεταλλικών κατιόντων. Μια θετική επίδραση παρατηρήθηκε στις τιμές της παραμέτρου k_{cat}/K_m , τόσο σε χαμηλές όσο και υψηλές $[Ca^{2+}]$, ενώ δεν παρατηρήθηκε σχεδόν καμία επίδραση τόσο στην K_m (94 %) όσο και στην k_{cat} (98 %) σε χαμηλές $[Ca^{2+}]$. Επιπλέον, η διαπίστωση ότι η τιμή της k_{cat} παραμένει ανεπηρέαστη, σε συνδυασμό με την σημαντικά χαμηλωμένη τιμή της παραμέτρου K_m σε υψηλή $[Ca^{2+}]$, εξηγεί την αυξημένη τιμή της παραμέτρου k_{cat}/K_m η οποία είναι πιο έντονη σε υψηλές από ό, τι σε χαμηλές $[Ca^{2+}]$. Αυτά τα αποτελέσματα, τα οποία παρουσιάζονται στο Διάγραμμα 3, δείχνουν σαφώς ότι η αυξημένη $[Ca^{2+}]$ στο μείγμα της αντίδρασης, συμβάλλει στην αύξηση της συγγένειας μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος.

Από την άλλη πλευρά, η προσθήκη Zn^{2+} έδειξε το αντίθετο αποτέλεσμα σύμφωνα με το Διάγραμμα 3. Σε αυτή την περίπτωση, η αυξημένη $[Zn^{2+}]$ στο μείγμα της αντίδρασης συμβάλλει στη μείωση της συγγένειας μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος επηρεάζοντας την παράμετρο K_m . [146], [147]. Τέλος, η προσθήκη κατιόντων δισθενούς σιδήρου και χαλκού στο μείγμα της αντίδρασης έδειξε ότι δεν έχουν καμία επίδραση τόσο στις χαμηλές όσο και στις υψηλές συγκεντρώσεις [134].



Διάγραμμα 3: Οι % τιμές των παραμέτρων k_{cat}/K_m , k_{cat} και K_m απουσίας έναντι παρουσίας, σε χαμηλές όσο και υψηλές συγκεντρώσεις των μεταλλικών Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} και Fe^{2+} (υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A)

III.B.1.2. Επίδραση των επιφανειακά ενεργών χημικών ενώσεων και οργανικών διαλυτών στην δραστηριότητα της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A

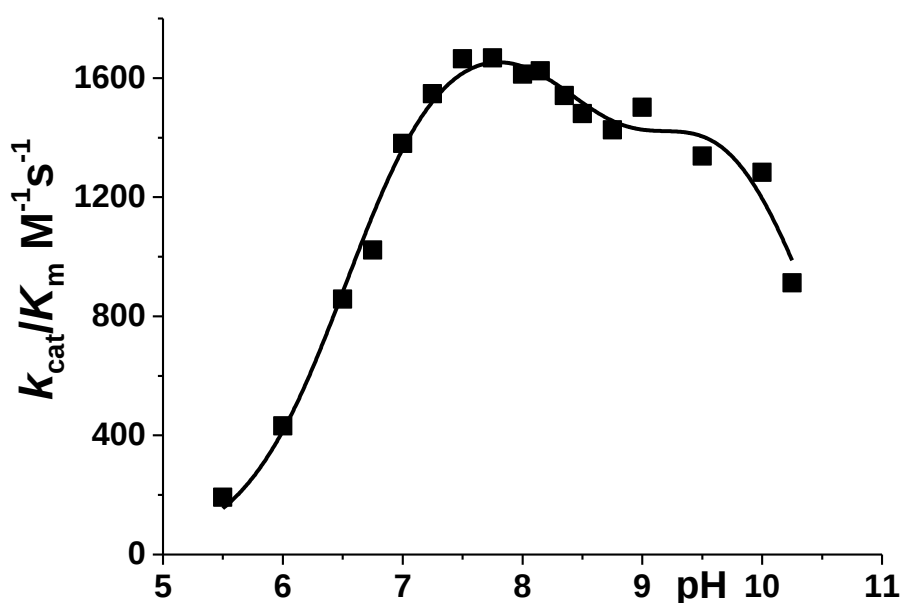
Τα επιφανειακά ενεργά SDS και Triton X-100, καθώς και οι οργανικοί διαλύτες DMSO, DMF, αιθανόλη και 1,4-διοξάνη έδειξαν παρόμοιες επιδράσεις επί της παραμέτρου k_{cat}/K_m της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A, της οποίας η μεταβολή σε όλες τις περιπτώσεις μπορεί να περιγραφεί ως μια εκθετική πτώση 1^{ου} βαθμού. Οι επιφανειακά ενεργές χημικές ενώσεις προκάλεσαν 50 % απενεργοποίηση σε περιεκτικότητα 0.35 % και 0.50 % σε SDS και Triton X-100, αντίστοιχα, ενώ 50 % απενεργοποίηση προκλήθηκε σε περιεκτικότητα 13 %, όλων των χρησιμοποιούμενων οργανικών διαλυτών [148], [134].

III.B.2. Μεταβολή των παραμέτρων k_{cat}/K_m , k_{cat} και $1/K_m$ της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A, σε δύο θερμοκρασίες, ως συνάρτηση της τιμής pH του μέσου της αντίδρασης

Στην ενότητα II.B.2.1. μελετήθηκε η μεταβολή των παραμέτρων k_{cat}/K_m , k_{cat} και $1/K_m$ σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες ως συνάρτηση της τιμής pH του μέσου της αντίδρασης, για την υδρόλυση του συνθετικού πεπτιδικού υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την πρωτεάση KM-IFO-0288-A. Η Εξίσωση 13 ή 10 προσάρμοσε τα πειραματικά δεδομένα (pH, { k_{cat}/K_m , k_{cat} και $1/K_m$ }) και υπολογίστηκαν οι παράμετροί της [134]. Τα αποτελέσματα της προσαρμογής παρουσιάζονται στους Πίνακες 8 έως 13 και στα Διαγράμματα 4 έως 9.

Πίνακας 8: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων (pH, k_{cat}/K_m) από την Εξίσωση 13, της ενζυμικής αντίδρασης της KM-IFO-0288-A με το συνθετικό πεπτιδικό υπόστρωμα Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA στους $\theta = 25^\circ\text{C}$.

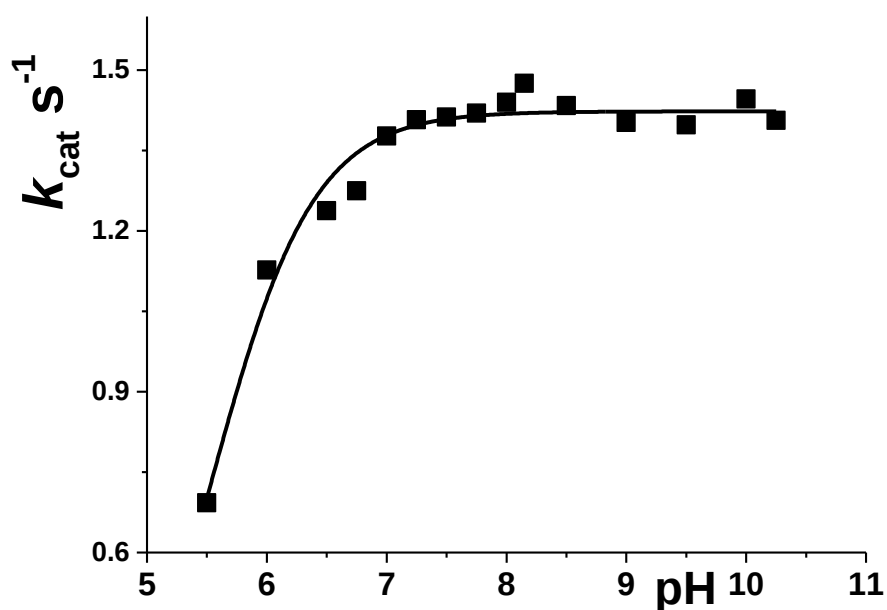
Model	$k_{cat}/K_m = f(\text{pH}) \quad \theta = 25^\circ\text{C}, I/I = 0.1 \text{ M}$	
Equation	13	
Adj.R-Square	0.980	
$k_{cat}/K_m \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	Value	$\pm$ Standard Error
$(k_{cat}/K_m)_1^{\text{lim}}$	1832.536	24.136
$(k_{cat}/K_m)_2^{\text{lim}}$	1673.958	71.204
$(k_{cat}/K_m)_2^{\text{lim}}/(k_{cat}/K_m)_1^{\text{lim}}$	1.094	
$\text{p}K_{a1}$	6.535	0.063
$\text{p}K_{a2}$	8.712	0.147
$\text{p}K_{a3}$	9.017	0.148
$\text{p}K_{a4}$	10.386	0.050



Διάγραμμα 4: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $k_{cat}/K_m = f(\text{pH})$ για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A στους $\theta = 25^\circ\text{C}$. Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην προσαρμογή της Εξίσωσης 13 στα πειραματικά δεδομένα (pH, k_{cat}/K_m).

Πίνακας 9: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων (pH, k_{cat}) από την Εξίσωση 10, της ενζυμικής αντίδρασης της KM-IFO-0288-A με το συνθετικό πεπτιδικό υπόστρωμα Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA στους $\theta = 25^\circ\text{C}$.

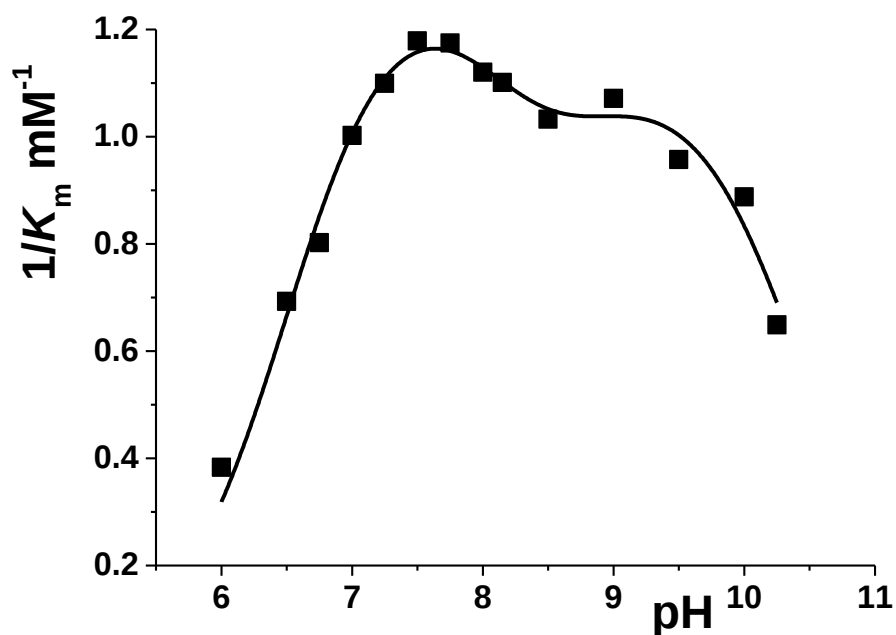
Model	$k_{cat} = f(\text{pH}) \quad \theta = 25^\circ\text{C}, I/I = 0.1 \text{ M}$	
Equation	10	
Adj.R-Square	0.950	
$k_{cat} \text{ (s}^{-1}\text{)}$	Value	$\pm$ Standard Error
$(k_{cat})^{\text{lim}}$	1.422	0.010
pK_{a1}	5.512	0.042



Διάγραμμα 5: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $k_{cat} = f(\text{pH})$ για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A στους $\theta = 25^\circ\text{C}$. Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην προσαρμογή της Εξίσωσης 10 στα πειραματικά δεδομένα (pH, k_{cat}).

Πίνακας 10: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων (pH, $1/K_m$) από την Εξίσωση 13, της ενζυμικής αντίδρασης της KM-IFO-0288-A με το συνθετικό πεπτιδικό υπόστρωμα Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA στους $\theta = 25^\circ\text{C}$.

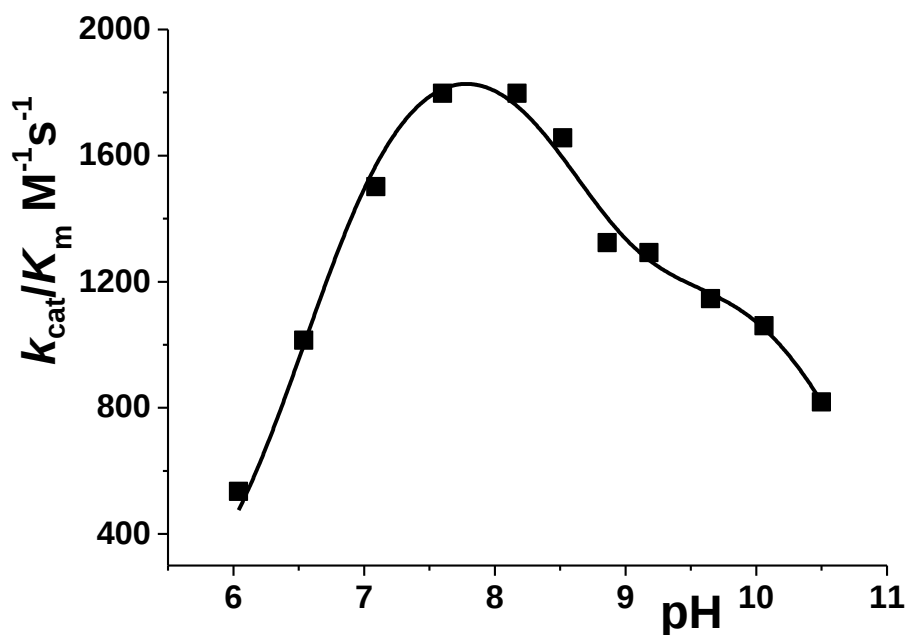
Model	$K_m^{-1} = f(\text{pH})$ $\theta = 25^\circ\text{C}$, $I/I = 0.1 \text{ M}$	
Equation	13	
Adj.R-Square	0.955	
$K_m^{-1} (\text{mM}^{-1})$	Value	$\pm$ Standard Error
$(K_m^{-1})_1^{\text{lim}}$	1.339	0.069
$(K_m^{-1})_2^{\text{lim}}$	1.135	0.112
$(1/K_m)_1^{\text{lim}}/(1/K_m)_2^{\text{lim}}$	1.177	
$\text{p}K_{a1}$	6.510	0.078
$\text{p}K_{a2}$	8.328	0.307
$\text{p}K_{a3}$	8.576	0.406
$\text{p}K_{a4}$	10.42	0.157



Διάγραμμα 6: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $1/K_m = f(\text{pH})$ για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A στους $\theta = 25^\circ\text{C}$. Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην προσαρμογή της Εξίσωσης 13 στα πειραματικά δεδομένα (pH, $1/K_m$).

Πίνακας 11: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων (pH, k_{cat}/K_m) από την Εξίσωση 13, της ενζυμικής αντίδρασης της KM-IFO-0288-A με το συνθετικό πεπτιδικό υπόστρωμα Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA στους $\theta = 35^\circ\text{C}$.

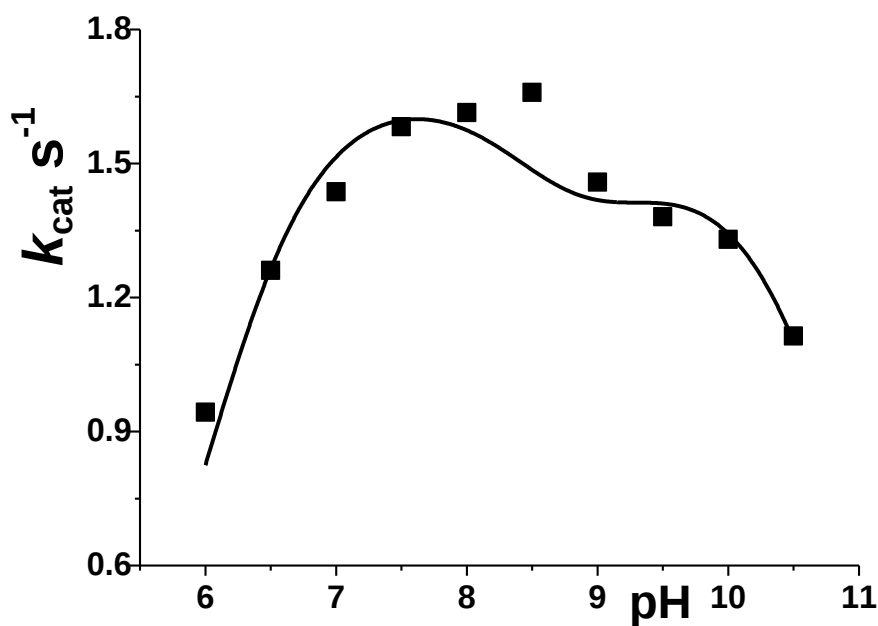
Model	$k_{\text{cat}}/K_m = f(\text{pH}) \quad \theta = 35^\circ\text{C}, I/I = 0.1 \text{ M}$	
Equation	13	
Adj.R-Square	0.978	
$k_{\text{cat}}/K_m \text{ (M}^{-1}\text{s}^{-1}\text{)}$	Value	$\pm$ Standard Error
$(k_{\text{cat}}/K_m)_1^{\text{lim}}$	2045.111	26.958
$(k_{\text{cat}}/K_m)_2^{\text{lim}}$	1233.777	39.623
$(k_{\text{cat}}/K_m)_2^{\text{lim}}/(k_{\text{cat}}/K_m)_2^{\text{lim}}$	1.572	
$\text{p}K_{\text{a}1}$	6.559	0.057
$\text{p}K_{\text{a}2}$	8.805	0.188
$\text{p}K_{\text{a}3}$	9.102	0.468
$\text{p}K_{\text{a}4}$	10.763	0.325



Διάγραμμα 7: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $k_{cat}/K_m = f(pH)$ για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A στους $\theta = 35^{\circ}C$. Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην προσαρμογή της Εξίσωσης 13 στα πειραματικά δεδομένα (pH, k_{cat}/K_m).

Πίνακας 12: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων (pH, k_{cat}) από την Εξίσωση 13, της ενζυμικής αντίδρασης της KM-IFO-0288-A με το συνθετικό πεπτιδικό υπόστρωμα Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA στους $\theta = 35^{\circ}C$.

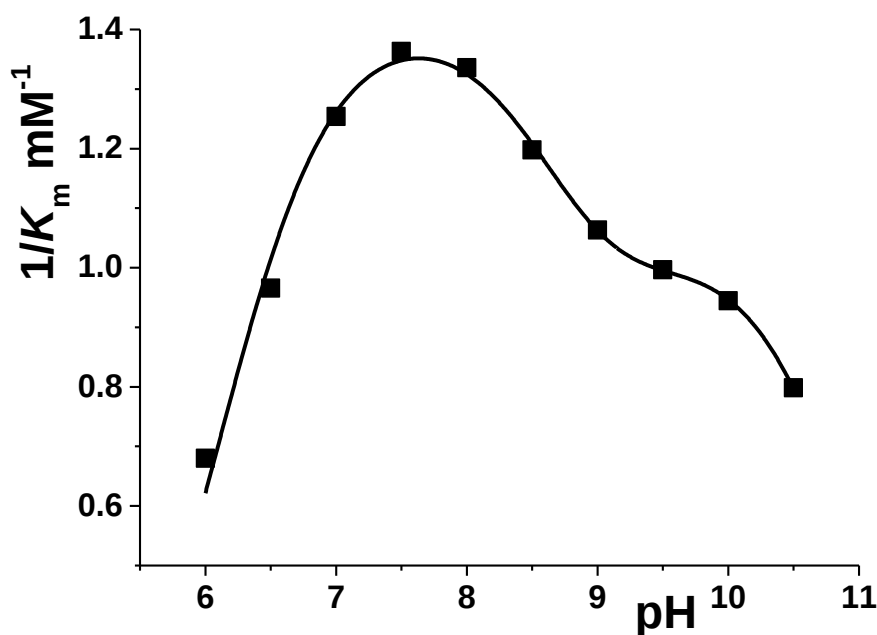
Model	$k_{cat} = f(pH)_{\theta=35^{\circ}C, I/I=0.1 M}$	
Equation	13	
Adj.R-Square	0.993	
k_{cat} (s^{-1})	Value	$\pm$ Standard Error
$(k_{cat})_1^{lim}$	1.678	0.029
$(k_{cat})_2^{lim}$	1.510	0.039
$(k_{cat})_1^{lim}/(k_{cat})_2^{lim}$	1.152	
pK_{a1}	6.016	0.055
pK_{a2}	8.760	0.114
pK_{a3}	8.937	0.135
pK_{a4}	10.917	0.155



Διάγραμμα 8: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $k_{cat} = f(\text{pH})$ για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A στους $\theta = 35^\circ\text{C}$. Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην προσαρμογή της Εξίσωσης 13 στα πειραματικά δεδομένα (pH, k_{cat}).

Πίνακας 13: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων (pH, $1/K_m$) από την Εξίσωση 13, της ενζυμικής αντίδρασης της KM-IFO-0288-A με το συνθετικό πεπτιδικό υπόστρωμα Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA στους $\theta = 35^\circ\text{C}$.

Model	$K_m^{-1} = f(\text{pH})$ $\theta = 35^\circ\text{C}$, $I/I = 0.1 \text{ M}$	
Equation	13	
Adj.R-Square	0.971	
K_m^{-1} (mM ⁻¹)	Value	± Standard Error
$(K_m^{-1})_1^{\text{lim}}$	1.434	0.012
$(K_m^{-1})_2^{\text{lim}}$	1.047	0.019
$(1/K_m)_1^{\text{lim}}/(1/K_m)_2^{\text{lim}}$	1.429	
pK _{a1}	6.117	0.052
pK _{a2}	8.884	0.245
pK _{a3}	9.136	0.428
pK _{a4}	10.983	0.276



Διάγραμμα 9: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $1/K_m = f(\text{pH})$ για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A στους $\theta = 35^\circ\text{C}$. Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην προσαρμογή της Εξίσωσης 13 στα πειραματικά δεδομένα (pH, $1/K_m$).

Οι πίνακες 8, 10, 11, 13 και τα αντίστοιχα διαγράμματα, δείχνουν ότι οι τιμές των pK_a των παραμέτρων k_{cat}/K_m , $1/K_m$ για θερμοκρασίες $\theta = 25^\circ\text{C}$ και $\theta = 35^\circ\text{C}$ συμφωνούν μεταξύ τους, μέσα στα όρια του πειραματικού σφάλματος. Η κύρια διαφορά εντοπίζεται στον λόγο των δυο κορυφών $(k_1)^{\text{lim}}/(k_2)^{\text{lim}}$, όπου παρουσιάζει μια σημαντική μεταβολή από ≈ 1.1 στο ≈ 1.5 , κάτι που σημαίνει ότι το ένζυμο στην περιοχή της δεύτερης κορυφής στους $\theta = 35^\circ\text{C}$ εμφανίζει μειωμένη δραστηριότητα [149]. Η τιμή της $pK_{a1} \approx 6.5$ φαίνεται να οφείλεται στην δράση της καταλυτικής **H** ως βάση, η οποία αποσπά ένα πρωτόνιο από την καταλυτική **S** καθιστώντας την καλύτερη ως πυρηνόφιλο [150]. Για την παράμετρο k_{cat} (Πίνακες 9, 12 και τα αντίστοιχα διαγράμματα), παρόλο που οι πρώτες τους pK_{a1} εμφανίζουν την ίδια τιμή ≈ 5.5 ή 6.01 και στις δυο θερμοκρασίες, από εκεί και πέρα διαφέρουν στο ότι στους $\theta = 35^\circ\text{C}$ εμφανίζεται και εδώ μια δεύτερη κορυφή όπως συνέβαινε και στις παραμέτρους k_{cat}/K_m και $1/K_m$, και έτσι δεν περιγράφονται από τον απλό ιονισμό μιας ομάδας όπως συμβαίνει στους $\theta = 25^\circ\text{C}$. Στην περίπτωση αυτή η τιμή των $pK_{a1} \approx 5.5$ ή 6.01 φαίνεται να οφείλεται στην δράση της καταλυτικής **H** ως βάση, η οποία αποσπά ένα πρωτόνιο από ένα μόριο H_2O καθιστώντας το ικανό πυρηνόφιλο ώστε να προσβάλει τον καρβονυλικό άνθρακα του ακυλενζύμου. Η τιμή της pK_{a1} που εμφανίζεται μειωμένη είναι κάτι το συνηθισμένο και

οφείλεται στο περισσότερο υδρόφοβο μικροπεριβάλλον (μειωμένη διηλεκτρική σταθερά) του ακυλενζύμου, καθώς κάποια από τα μόρια H_2O της ενεργού περιοχής έχουν εκτοπιστεί από το υπόστρωμα (acyl), καθώς και στην απομάκρυνση του αρνητικού φορτίου της αποχωρούσας ομάδας που γειτνιάζε με την καταλυτική **H**, π.χ. στο ένζυμο Σουμπτιλίσίνη έχει παρατηρηθεί μια μείωση στην pK_{a1} κατά τρεις μονάδες pH.

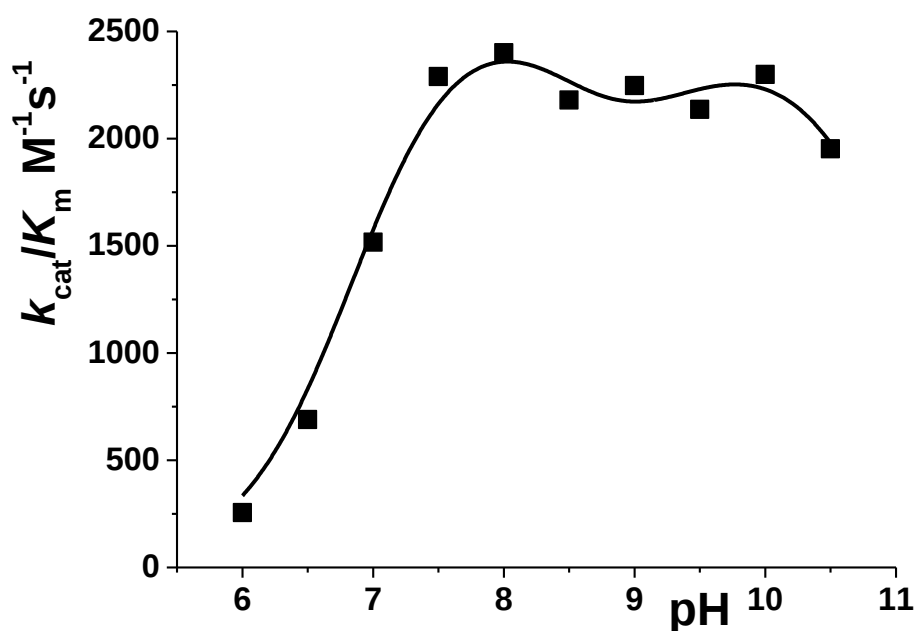
Οι μακροσκοπικές σταθερές ιονισμού pK_{a2} , pK_{a3} δεν φαίνεται να αντιστοιχούν στον ιονισμό κάποιου συγκεκριμένου καταλοίπου, αλλά η τιμή τους ίσως προκύπτει ως μέσος όρος πολλών ιονισμών που μπορούν να επηρεάσουν την δραστικότητα του ενζύμου ή σε μια μη σταθερή μορφή του ενζύμου μας. Σε όλες τις περιπτώσεις η pK_{a4} οφείλεται στην δράση της καταλυτικής **H** ως οξύ αυτή τη φορά, προσφέροντας ένα πρωτόνιο στην απελευθερούμενη αμίνη. Η μεγάλη αύξηση της pK_a της καταλυτικής **H**, στην βιβλιογραφία αναφέρεται ως pK_a cycling και οφείλεται στην δημιουργία ενός ισχυρού δεσμού υδρογόνου (LBHB) μεταξύ της καταλυτικής **H** και του **D** [151], που μπορεί να προκύψει ύστερα από μια διαμορφωτική αλλαγή του ενζύμου που θα φέρνει τα κατάλοιπα σε απόσταση $\leq 2.6 \text{ \AA}$ [152], [153].

III.B.2.1. Μεταβολή των παραμέτρων k_{cat}/K_m , k_{cat} και $1/K_m$ της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A, ως συνάρτηση της τιμής pH του μέσου της αντίδρασης και προσδιορισμός των αντίστοιχων pK_a σε διάλυμα ιονικής ισχύος 1.5 M και θερμοκρασίας $\theta = 35^\circ\text{C}$

Στην Ενότητα II.B.2.2. μελετήθηκε η μεταβολή των παραμέτρων k_{cat}/K_m , k_{cat} και $1/K_m$ σε διάλυμα ιονικής ισχύος 1.5 M και θερμοκρασίας $\theta = 35^\circ\text{C}$ ως συνάρτηση της τιμής pH του μέσου της αντίδρασης, για την υδρόλυση του συνθετικού πεπτιδικού υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την πρωτεάση KM-IFO-0288-A. Η Εξίσωση 13 ή 10 προσάρμοσε τα πειραματικά δεδομένα (pH, $\{k_{cat}/K_m, k_{cat} \text{ και } 1/K_m\}$) και υπολογίστηκαν οι παράμετροί της. Τα αποτελέσματα της προσαρμογής παρουσιάζονται στους Πίνακες 14 έως 16 και στα Διαγράμματα 10 έως 12.

Πίνακας 14: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων (pH, k_{cat}/K_m) από την Εξίσωση 13, της ενζυμικής αντίδρασης της KM-IFO-0288-A με το συνθετικό πεπτιδικό υπόστρωμα Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA στους $\theta = 35^\circ\text{C}$ και $I/I = 1.5\text{ M}$.

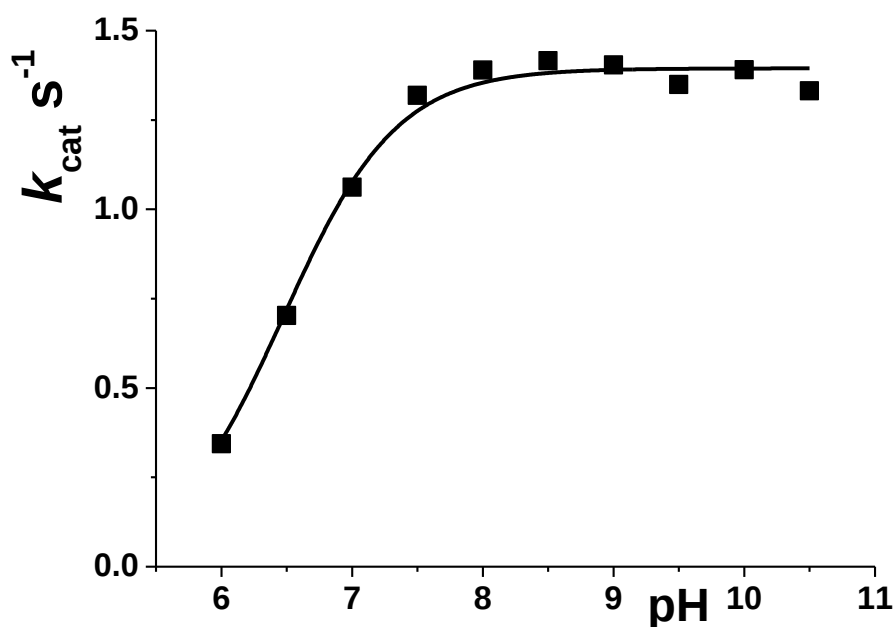
Model	$k_{cat}/K_m = f(\text{pH}) \theta = 35^\circ\text{C}, I/I = 1.5\text{ M}$	
Equation	13	
Adj.R-Square	0.988	
$k_{cat}/K_m (\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	Value	$\pm$ Standard Error
$(k_{cat}/K_m)_1^{\text{lim}}$	2672.241	75.239
$(k_{cat}/K_m)_2^{\text{lim}}$	2458.359	53.317
$(k_{cat}/K_m)_2^{\text{lim}}/(k_{cat}/K_m)_1^{\text{lim}}$	1.087	
$\text{p}K_{a1}$	6.848	0.113
$\text{p}K_{a2}$	8.744	0.285
$\text{p}K_{a3}$	9.001	0.308
$\text{p}K_{a4}$	11.118	0.213



Διάγραμμα 10: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $k_{cat}/K_m = f(\text{pH})$ για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A στους $\theta = 35^\circ\text{C}$ και $I/I = 1.5\text{ M}$. Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην προσαρμογή της Εξίσωσης 13 στα πειραματικά δεδομένα (pH, k_{cat}/K_m).

Πίνακας 15: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων (pH, k_{cat}) από την Εξίσωση 10, της ενζυμικής αντίδρασης της KM-IFO-0288-A με το συνθετικό πεπτιδικό υπόστρωμα Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA στους $\theta = 35^\circ\text{C}$ και $I/I = 1.5 \text{ M}$.

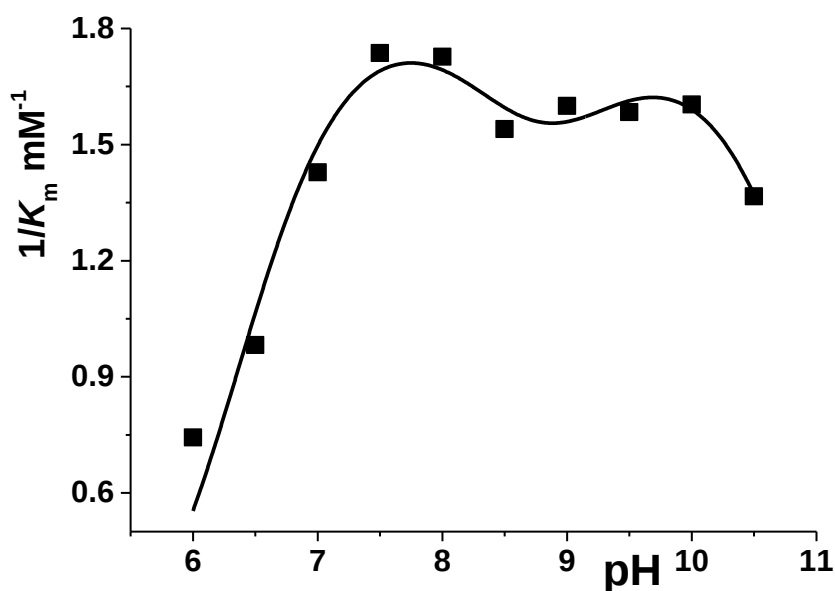
Model	$k_{\text{cat}} = f(\text{pH}) \quad \theta = 35^\circ\text{C}, I/I = 1.5 \text{ M}$	
Equation	10	
Adj.R-Square	0.996	
$k_{\text{cat}} (\text{s}^{-1})$	Value	$\pm$ Standard Error
$(k_{\text{cat}})^{\text{lim}}$	1.394	0.014
pK _a	6.471	0.045



Διάγραμμα 11: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $k_{\text{cat}} = f(\text{pH})$ για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A στους $\theta = 35^\circ\text{C}$ και $I/I = 1.5 \text{ M}$. Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην προσαρμογή της Εξίσωσης 10 στα πειραματικά δεδομένα (pH, k_{cat}).

Πίνακας 16: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων (pH, $1/K_m$) από την Εξίσωση 13, της ενζυμικής αντίδρασης της KM-IFO-0288-A με το συνθετικό πεπτιδικό υπόστρωμα Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA στους $\theta = 35^\circ\text{C}$ και $I/I = 1.5 \text{ M}$.

Model	$K_m^{-1} = f(\text{pH})_{\theta = 35^\circ\text{C}, I/I = 1.5 \text{ M}}$	
Equation	13	
Adj.R-Square	0.966	
$K_m^{-1} (\text{mM}^{-1})$	Value	$\pm$ Standard Error
$(K_m^{-1})_1^{\text{lim}}$	1.855	0.133
$(K_m^{-1})_2^{\text{lim}}$	1.771	0.264
$(1/K_m)_1^{\text{lim}}/(1/K_m)_2^{\text{lim}}$	1.047	
pK_{a1}	6.373	0.128
pK_{a2}	8.673	0.306
pK_{a3}	8.917	0.392
pK_{a4}	11.032	0.350

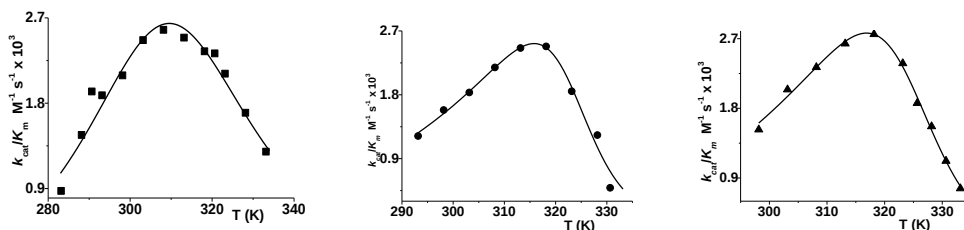


Διάγραμμα 12: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $1/K_m = f(\text{pH})$ για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A στους $\theta = 35^\circ\text{C}$ και $I/I = 1.5 \text{ M}$. Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην προσαρμογή της Εξίσωσης 13 στα πειραματικά δεδομένα (pH, $1/K_m$).

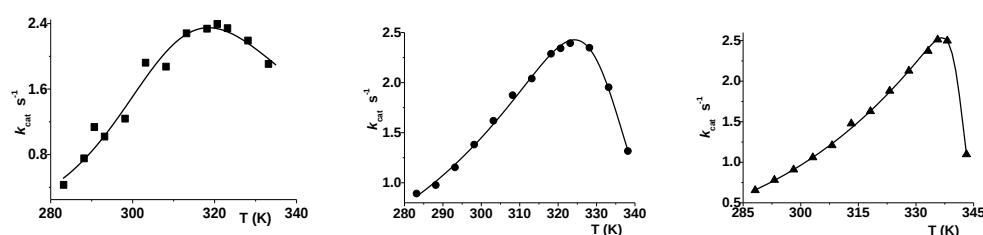
Στους $\theta = 35^{\circ}\text{C}$ η αύξηση της ιονικής ισχύος από $I/I = 0.1 \text{ M}$ σε 1.5 M έχει σαν αποτέλεσμα οι καμπύλες των παραμέτρων Michaelis-Menten ως συνάρτηση της τιμής pH να έχουν την ίδια μορφή με αυτές για $\theta = 25^{\circ}\text{C}$ και $I/I = 0.1 \text{ M}$, με το λόγο των δυο κορυφών $(k)_1^{\text{lim}}/(k)_2^{\text{lim}}$ να είναι ξανά ≈ 1.1 [154]. Οι ομοιότητες δεν σταματούν εδώ, αφού και οι τιμές pK_a καθώς και η απόδοση τους είναι ίδιες, στα πλαίσια του πειραματικού σφάλματος. Η μόνη διαφορά εμφανίζεται στην pK_{a1} της k_{cat} όπου παρουσιάζεται αυξημένη κατά μια μονάδα φτάνοντας την μικροσκοπική τιμή της καταλυτικής H όπως αυτή έχει βρεθεί με φασματοσκοπία NMR στις σερινοπρωτεΐνες.

III.B.3. Μεταβολή των παραμέτρων k_{cat}/K_m και k_{cat} της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A, ως συνάρτηση της απόλυτης θερμοκρασίας και της ιονικής ισχύος του μέσου της αντίδρασης

Στην Ενότητα II.B.3. μελετήθηκε η μεταβολή των παραμέτρων k_{cat}/K_m και k_{cat} , σε ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών $\text{pH} = 7.75$ διαφορετικής τιμής θερμοκρασίας και σε τρεις διαφορετικές τιμές ιονικής ισχύος (η ρύθμιση της ιονικής ισχύος έγινε με χλωριούχο νάτριο), για την υδρόλυση του συνθετικού πεπτιδικού υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την πρωτεάση KM-IFO-0288-A. Στη συνέχεια, οι Εξισώσεις Polgár (17 και 18), καθώς και η εξίσωση Eyring (20) προσαρμόστηκαν στα πειραματικά δεδομένα (T , $\{k_{\text{cat}}/K_m$ και $k_{\text{cat}}\}$) και με την χρήση του προγράμματος OriginPro 2016 προσδιορίστηκαν οι παράμετροί τους [134]. Ως κριτήριο σύγκλισης χρησιμοποιήθηκε αυτό των ελαχίστων τετραγώνων, με στατιστικά βάρη (Ενότητα I.10.1.). Τα αποτελέσματα της προσαρμογής παρουσιάζονται στον Πίνακα 17 και στα Διαγράμματα 13 έως 15.



Διάγραμμα 13: Γραφικές παραστάσεις της συνάρτησης $k_{cat}/K_m = f(T)$ για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A σε τιμή pH = 7.75 και για ιονική ισχύ I/I = 0.1 M, I/I = 0.5 M, I/I = 1.5 M, αντίστοιχα. Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην προσαρμογή της Εξίσωσης 17 στα πειραματικά δεδομένα (T, k_{cat}/K_m).

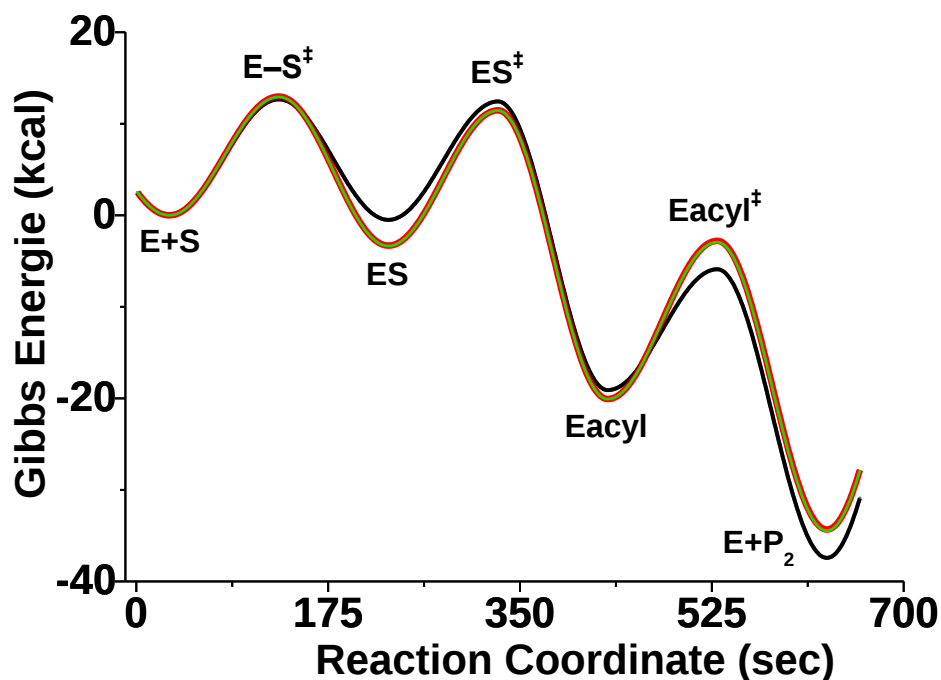


Διάγραμμα 14: Γραφικές παραστάσεις της συνάρτησης $k_{cat} = f(T)$ για την περίπτωση της ενζυμικής υδρόλυσης του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την KM-IFO-0288-A σε τιμή pH = 7.75 και για ιονική ισχύ I/I = 0.1 M, I/I = 0.5 M, I/I = 1.5 M αντίστοιχα. Η συνεχής γραμμή αντιστοιχεί στην προσαρμογή της Εξίσωσης 18 στα πειραματικά δεδομένα (T, k_{cat}).

Πίνακας 17: Οι υπολογιζόμενες ενζυμικές παράμετροι, οι θερμοδυναμικές σταθερές τους και οι σταθερές ταχύτητας

Παράμετρος	0.1 M [NaCl], * 308.15 K	0.5 M [NaCl], * 313.15 K	1.5 M [NaCl], * 313.15 K
k_{cat}/K_m	$\Delta H^\ddagger = 11077 \text{ J mol}^{-1}$ $\Delta S^\ddagger = -155 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger = 58840 \text{ J mol}^{-1}$ $k_1 = 4440 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}; k_{-1} = 1945 \text{ s}^{-1}$ $k_2/k_{-1} = 1.45$ $k_2 = 2828 \text{ s}^{-1}; k_3 = 1818 \text{ s}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger = 24555 \text{ J mol}^{-1}$ $\Delta S^\ddagger = -102 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger = 56496 \text{ J mol}^{-1}$ $k_1 = 2663 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}; k_{-1} = 11 \text{ s}^{-1}$ $k_2/k_{-1} = 12.2$ $k_2 = 134 \text{ s}^{-1}; k_3 = 2.1 \text{ s}^{-1}$	$\Delta H^\ddagger = 26038 \text{ J mol}^{-1}$ $\Delta S^\ddagger = -96 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger = 56100 \text{ J mol}^{-1}$ $k_1 = 2878 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}; k_{-1} = 11 \text{ s}^{-1}$ $k_2/k_{-1} = 11.7$ $k_2 = 128.5 \text{ s}^{-1}; k_3 = 2.6 \text{ s}^{-1}$
k_{cat}	* 318.15 K $\Delta H^\ddagger = 29861 \text{ J mol}^{-1}$ $\Delta S^\ddagger = -143 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger = 75356 \text{ J mol}^{-1}$	* 323.15 K $\Delta H^\ddagger = 21746 \text{ J mol}^{-1}$ $\Delta S^\ddagger = -169 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger = 76358 \text{ J mol}^{-1}$	* 335.15 K $\Delta H^\ddagger = 20556 \text{ J mol}^{-1}$ $\Delta S^\ddagger = -177 \text{ J mol}^{-1} \text{ K}^{-1}$ $\Delta G^\ddagger = \Delta H^\ddagger - T \Delta S^\ddagger = 79878 \text{ J mol}^{-1}$

Οι τυπικές αποκλίσεις υπολογίστηκαν ως: 10 % > T.A. > 1 %, k_1 σε $\text{M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, k_{-1} , k_2 , και k_3 σε s^{-1} .



Διάγραμμα 15: Ενεργειακό διάγραμμα της πορείας αντίδρασης για την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA, από την πρωτεΐνα KM-IFO-0288-A, σε τρεις διαφορετικές τιμές ιονικής ισχύος (I/I). Η μαύρη γραμμή απεικονίζει την I/I = 0.1 M, η κόκκινη την I/I = 0.5 M και η πράσινη γραμμή απεικονίζει την I/I = 1.5 M

Από τον πίνακα 17 συμπεραίνεται ότι με αύξηση της ιονικής ισχύος η πρόσδεση του υποστρώματος γίνεται λιγότερο κολλώδης (less sticky substrate), από $k_2/k_{-1} \approx 1.5$ γίνεται $k_2/k_{-1} \approx 12$, αύξηση 8 φορές. Σε χαμηλή ιονική ισχύ ενώ στην ταχύτητα της αντίδρασης συνεισφέρουν τόσο η ακυλίωση όσο και η απακυλίωση $k_2/k_3 = 1.55$, σε αυξημένη ιονική ισχύ το καθοριστικό βήμα για την ταχύτητα της αντίδρασης είναι η απακυλίωση $k_2/k_3 \geq 50$. Από το ενεργειακό Διάγραμμα 15 παρατηρείται ότι για 0.1 M ιονική ισχύ το σύμπλοκο ES είναι λιγότερο σταθεροποιημένο από το E + S, ενώ σε υψηλότερη ιονική ισχύ το ES αλλά και τα υπόλοιπα ενδιάμεσα σε οποιαδήποτε ιονική ισχύ είναι πολύ περισσότερο σταθεροποιημένα. Επίσης οι δύο πρώτες μεταβατικές καταστάσεις έχουν παρόμοιες ενέργειες ενεργοποίησης, ανεξαρτήτως ιονικής ισχύος, ενώ η τρίτη μεταβατική κατάσταση (Eacyl[‡]) έχει σε χαμηλή ιονική ισχύ πολύ μικρότερη ενέργεια ενεργοποίησης [155], [156], [157].

III.B.4. Μεταβολή των παραμέτρων k_{cat}/K_m και k_{cat} της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A, ως συνάρτηση της ισοτοπικής σύστασης n και της ιονικής ισχύος του μέσου της αντίδρασης

Προσδιορίστηκαν οι παράμετροι k_{cat}/K_m και k_{cat} σε μίγματα H_2O/D_2O διαφορετικής περιεκτικότητας σε δευτέριο (διαφορετικού n) για τέσσερις διαφορετικές τιμές ιονικής ισχύος (η ρύθμιση της ιονικής ισχύς έγινε με χλωριούχο νάτριο), για την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA σε $\theta = 35\text{ }^\circ\text{C}$, από την πρωτεΐνάση KM-IFO-0288-A [134].

Στις γραφικές παραστάσεις $k_{cat}/K_m = f(n)$ και $k_{cat} = f(n)$, που στρέφουν τα κοίλα προς τα επάνω (dome shaped) προσαρμόζονται οι εξισώσεις GBK 33α και 33β, αντίστοιχα,

$$k_n = k_0 Z^n \left(C_{Ph} + \frac{C_{Ch}}{(1-n + n\phi^T)^v} \right)^{-1} \quad (33\alpha)$$

$$k_n = k_0 \left(\frac{C_{Ph}}{Z^n} + \frac{C_{Ch}}{(1-n + n\phi^T)^v} \right)^{-1} \quad (33\beta)$$

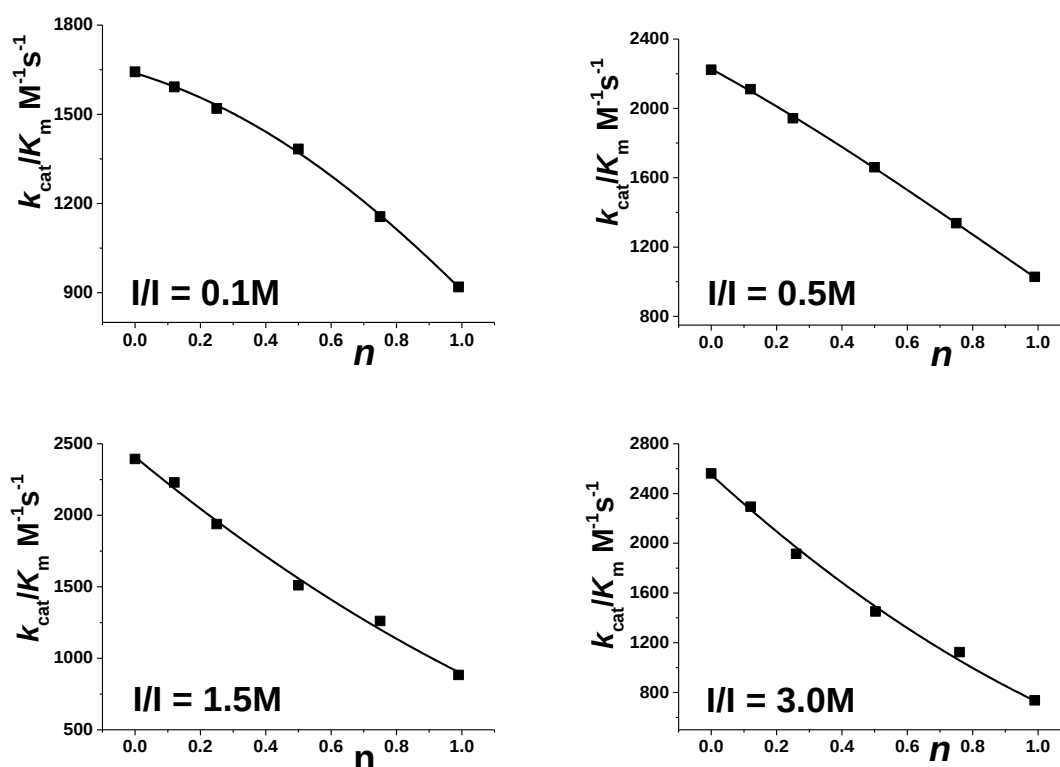
ενώ όταν στρέφει τα κοίλα προς τα κάτω (bowl shaped) προσαρμόζεται η εξίσωση 31.

$$k_n = k_0 (1 - n + n\phi^T)^v \quad (31)$$

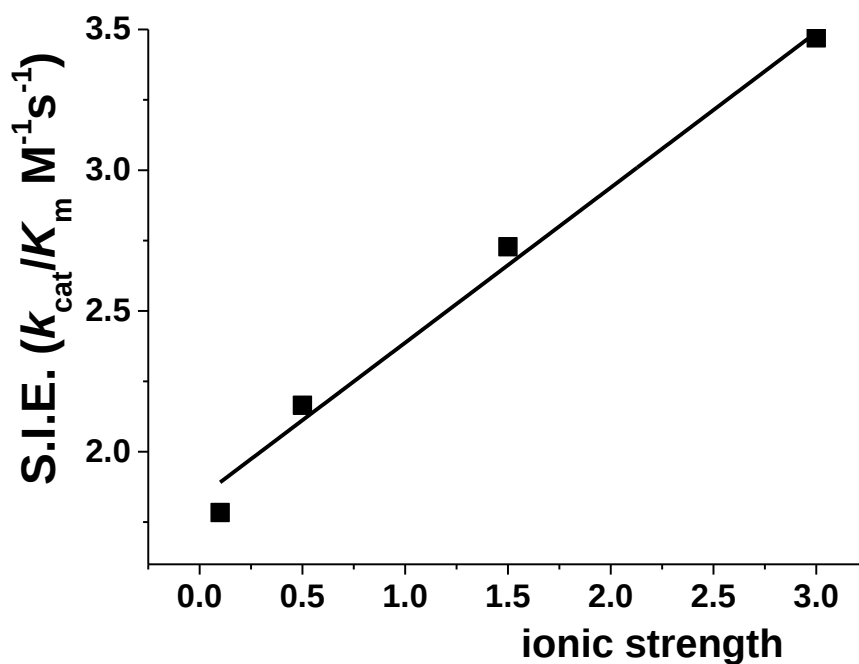
Στους Πίνακες 18 και 19 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη προσαρμογή των βέλτιστων μοντέλων της εξίσωσης GBK στα πειραματικά δεδομένα [σχέσεις: $k_{cat}/K_m = f(n)$, $k_{cat} = f(n)$] ενώ στα διαγράμματα 16 και 19 παρουσιάζονται οι γραφικές τους παραστάσεις.

Πίνακας 18: Αποτελέσματα προσαρμογής των βέλτιστων μοντέλων της εξίσωσης GBK στα πειραματικά δεδομένα $k_{\text{cat}}/K_m = f(n)$, σε τέσσερις διαφορετικές τιμές ιονικής ισχύος για την υδρόλυση υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA, από την πρωτεΐνωση KM-IFO-0288-A.

	Εξισώσεις G.B.K (31 ή 33)			
	k_{cat}/K_m			
ιονική ισχύς (M)	0.1	0.5	1.5	3
$(k_{\text{cat}}/K_m)^{\text{lim}}(\text{M}^{-1}\text{s}^{-1})$	1638.5±3.7	2227.1±4.2	2407.7±7.6	2549.9±4.0
ϕ^T	0.521±0.014	0.539±0.011	0.608±0.014	0.531±0.015
C_{ch}	0.636±0.042	0.941±0.047	1	1
C_{Ph}	0.364±0.042	0.059±0.047	-	-
I.Φ.Δ.	1.7	2.1	2.7	3.5



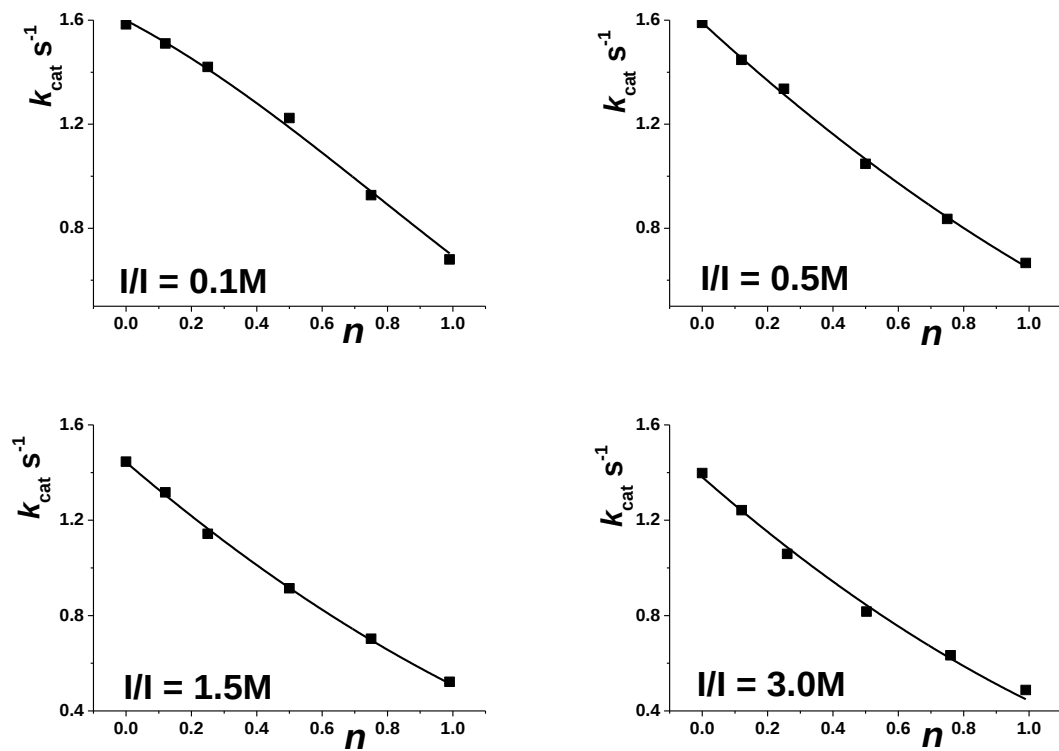
Διάγραμμα 16: Γραφικές παραστάσεις των συναρτήσεων $k_{\text{cat}}/K_m = f(n)$ για την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA, από την πρωτεΐνωση KM-IFO-0288-A. Οι κόκκινες γραμμές αντιστοιχούν στην μορφή της εξίσωσης GBK που προσαρμόστηκε καλύτερα στα πειραματικά δεδομένα (Πίνακας 18).



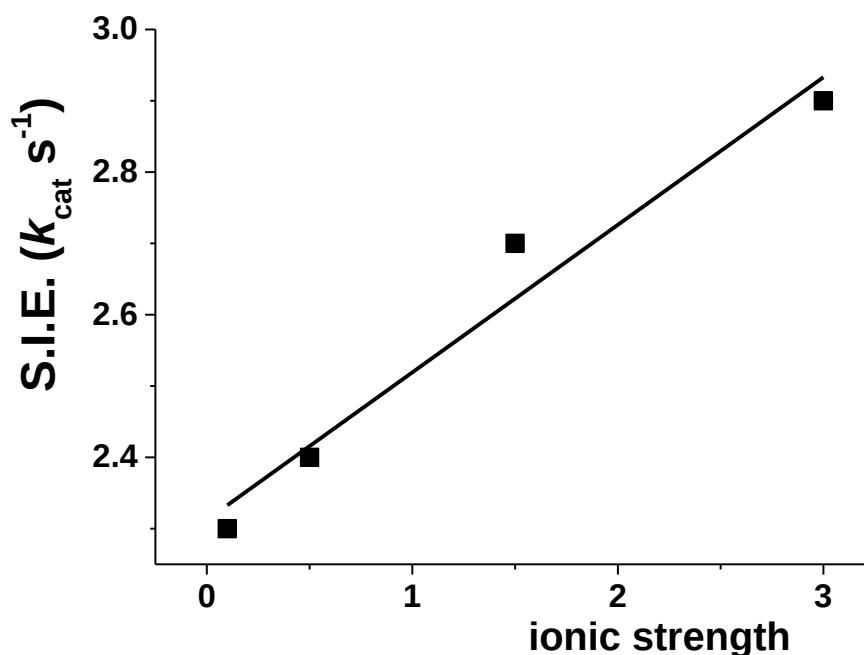
Διάγραμμα 17: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $S.I.E.(k_{cat}/K_m) = f(I/I)$. Οι τιμές προέκυψαν από την προσαρμογή της εξίσωσης GBK στα πειραματικά δεδομένα (Πίνακας 18)

Πίνακας 19: Αποτελέσματα προσαρμογής των βέλτιστων μοντέλων της εξίσωσης GBK στα πειραματικά δεδομένα $k_{cat} = f(n)$, σε τέσσερις διαφορετικές τιμές ιονικής ισχύος για την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA, από την πρωτεΐνωση KM-IFO-0288-A.

	Εξισώσεις G.B.K (31 ή 33)			
	k_{cat}			
ιονική ισχύς (M)	0.1	0.5	1.5	3
$k_{cat}^{lim} (s^{-1})$	1.60±0.013	1.59±0.010	1.44±0.008	1.38±0.016
ϕ^T	0.550±0.012	0.637±0.007	0.593±0.014	0.565±0.007
C_{ch}	0.64±0.16	1	1	1
C_{Ph}	0.36±0.16	-	-	-
I.Φ.Δ.	2.3	2.4	2.7	2.9

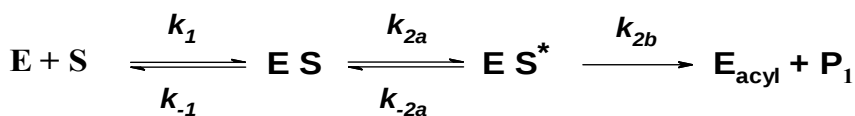


Διάγραμμα 18: Γραφικές παραστάσεις των συναρτήσεων $k_{\text{cat}} = f(n)$ για την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA, από την πρωτεΐνα KM-IFO-0288-A. Οι κόκκινες γραμμές αντιστοιχούν στην μορφή της εξίσωσης GBK που προσαρμόστηκε καλύτερα στα πειραματικά δεδομένα (Πίνακας 19).



Διάγραμμα 19: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $S.I.E.(k_{cat}) = f(I/I)$. Οι τιμές προέκυψαν από την προσαρμογή της εξίσωσης GBK στα πειραματικά δεδομένα (Πίνακας 19).

Η συνάρτηση $k_{cat}/K_m = f(n)$ για ιονική ισχύ 0.1 M στρέφει τα κοίλα προς τα κάτω, εμφανίζει κανονικό Ι.Φ.Δ. ≈ 1.7 , ενώ η μεταφορά πρωτονίων περιγράφεται από δύο ίσους ισοτοπικούς παράγοντες κλασμάτωσης στην μεταβατική κατάσταση ($\Phi^T = 0.52$). Κάτω από αυτές τις συνθήκες, το σύστημα διαθέτει περισσότερες της μίας σειριακές μεταβατικές καταστάσεις, με την συμμετοχή ενός φυσικού και ενός χημικού σταδίου κατά την πορεία της κατάλυσης. Η k_{cat}/K_m είναι η σταθερά που κυριαρχεί στην πορεία προς την δημιουργία του ακυλενζύμου (Σχήμα 19):



Σχήμα 19: Πορεία προς την δημιουργία του ακυλενζύμου

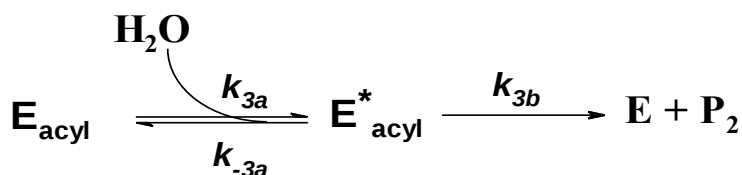
Αρχικά, το ένζυμο και το υπόστρωμα συνδυάζονται και σχηματίζουν το σύμπλοκο ES, το οποίο στη συνέχεια, αλλά και με την διαμεσολάβηση ενός φυσικού σταδίου, σχηματίζει ένα άλλο ενζυμικό μόρφωμα το ενεργοποιημένο ES^* . Αυτή η διαμορφωτική αλλαγή συνοδεύεται από γενική αναδιοργάνωση του διαλύτη, όπως συμπεραίνεται από την τιμή του σύνθετου παράγοντα κλασμάτωσης $Z = 1.50$, ο οποίος εκφράζει μία γενική αναδιοργάνωση

διαλύτη που πραγματοποιείται κατά τη διάρκεια της πρόσδεσης του υποστρώματος στο ένζυμο. Το φυσικό αυτό στάδιο που συνεισφέρει κατά περίπου 36 % στην πορεία προς την ακυλίωση του ενζύμου, με την επίδραση και των ομάδων της ενεργού περιοχής, βοηθά το υπόστρωμα για αποτελεσματικότερη αλληλεπίδραση στην μεταβατική κατάσταση. Τελικά το ακυλένζυμο (E_{acyl}) σχηματίζεται από το ES^* μέσω ενός απλού χημικού σταδίου, το οποίο συνεισφέρει κατά περίπου 64 % στην πορεία προς την ακυλίωση του ενζύμου. Η k_{cat}/K_m έχει την μορφή της $\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{k_2}{K_s} = \frac{k_2 k_1}{k_2 + k_{-1}} = \frac{k_1 k_{2a} k_{2b}}{k_{-1}(k_{2a} + k_{2b})}$, με $\frac{C_{ch}}{C_{ph}} = \frac{k_{-a}}{k_b} = \frac{0.64}{0.36} = 1.8$ [7], [95].

Η συνάρτηση $k_{cat} = f(n)$ για ιονική ισχύ 0.1 M στρέφει τα κοίλα προς τα κάτω, εμφανίζει κανονικό Ι.Φ.Δ. ≈ 2.3 , ενώ η μεταφορά πρωτονίων περιγράφεται από δύο ίσους ισοτοπικούς παράγοντες κλασμάτωσης στην μεταβατική κατάσταση ($\phi^T = 0.55$). Κάτω από αυτές τις συνθήκες, το σύστημα μας διαθέτει περισσότερες της μίας σειριακές μεταβατικές καταστάσεις, με την συμμετοχή ενός φυσικού και ενός χημικού σταδίου κατά την πορεία της κατάλυσης. Η k_{cat} είναι η σταθερά που κυριαρχεί στην πορεία προς την δημιουργία του ακυλενζύμου (Σχήμα 20), οπότε η k_{cat} έχει την μορφή της $k_{cat} = \frac{k_2 k_3}{k_2 + k_3}$, με

$$\frac{C_{ch}}{C_{ph}} = \frac{k_{-a}}{k_b} = \frac{0.64}{0.36} = 1.8 \text{ [7], [95].}$$

Η παράμετρος k_{cat} εκφράζει την απακυλίωση του ακυλενζύμου κατά το Σχήμα 20 που και σε αυτό συμπεριλαμβάνονται ένα φυσικό και ένα χημικό στάδιο, όπως αναφέρθηκε αμέσως παραπάνω. Στην περίπτωση αυτή, όπου η παράμετρος k_{cat} κυριαρχεί στην πορεία από το ES^* προς τον σχηματισμό ελεύθερου ενζύμου (E) και του προϊόντος P_2 , υπολογίστηκαν συνεισφορές περίπου 36 % και 64 % για το φυσικό και το χημικό στάδιο, αντίστοιχα και όμοια αναδιοργάνωση του διαλύτη, όπως και στην πορεία προς την ακυλίωση ($Z = 1.5$).



Σχήμα 20: Πορεία από το ακυλένζυμο προς τον σχηματισμό ελεύθερου ενζύμου (E)

Όπως και στην πορεία που κυριαρχείται από την παράμετρο k_{cat}/K_m , όμοια και στην πορεία που κυριαρχείται από την παράμετρο k_{cat} η διαμεσολάβηση του φυσικού σταδίου

συμβάλλει στον σχηματισμό του ενεργοποιημένου μορφώματος ακυλενζύμου E^*_{acyl} , από το ακυλένζυμο (E_{acyl}). Το φυσικό αυτό στάδιο, με την επίδραση και των ομάδων της ενεργού περιοχής, βοηθά το υπόστρωμα για αποτελεσματικότερη αλληλεπίδραση στην μεταβατική κατάσταση.

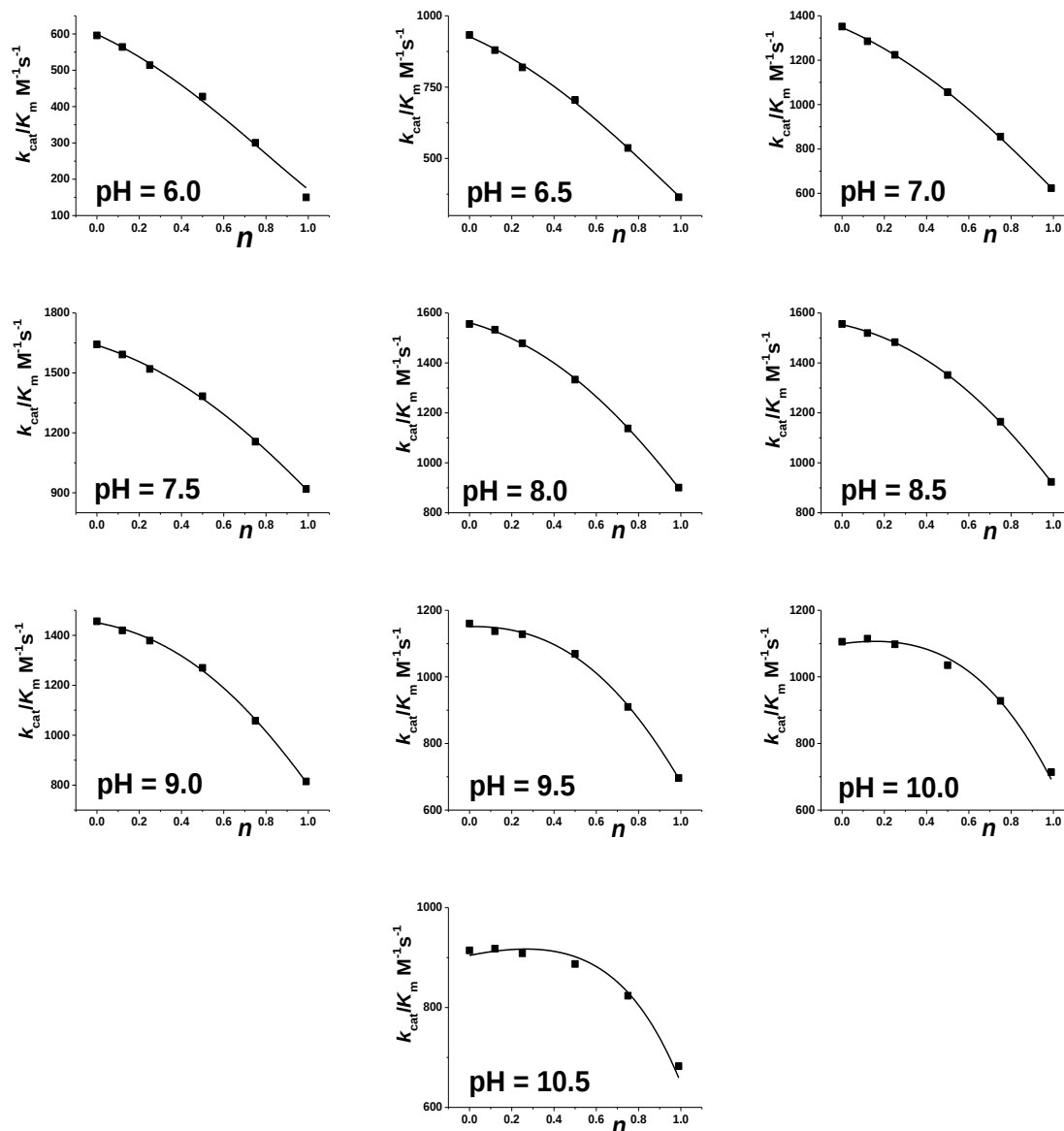
Η αύξηση της ιονικής ισχύος του διαλύματος κατά την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την πρωτεΐνωση KM-IFO-0288-A, όπως φαίνεται στους Πίνακες 18 και 19, έχει ως αποτέλεσμα να μειώνεται η συνεισφορά του φυσικού σταδίου και τελικώς σε υψηλές συγκεντρώσεις χλωριούχου νατρίου να απουσιάζει πλήρως. Τα Διαγράμματα 17 και 19, δείχνουν μια αύξηση του ισοτοπικού φαινομένου διαλύτη, κάτι αναμενόμενο από την στιγμή που σε υψηλές τιμές ιονικής ισχύος η πρωτεάση καταλύει πλέον με τον απλό μηχανισμό τριών σταδίων με καθοριστικό βήμα για την ταχύτητα της αντίδρασης (rate limiting step) να είναι η απακυλίωση ($k_2/k_3 \geq 50$) όπου το χημικό στάδιο κυριαρχεί και το οποίο αντίθετα με το φυσικό βήμα συνεισφέρει στο ισοτοπικό φαινόμενο διαλύτη.

III.B.5. Προσδιορισμός των παραμέτρων k_{cat}/K_m και k_{cat} σε ρυθμιστικά διαλύματα διαφορετικής ισοτοπικής σύστασης n και τιμής pH

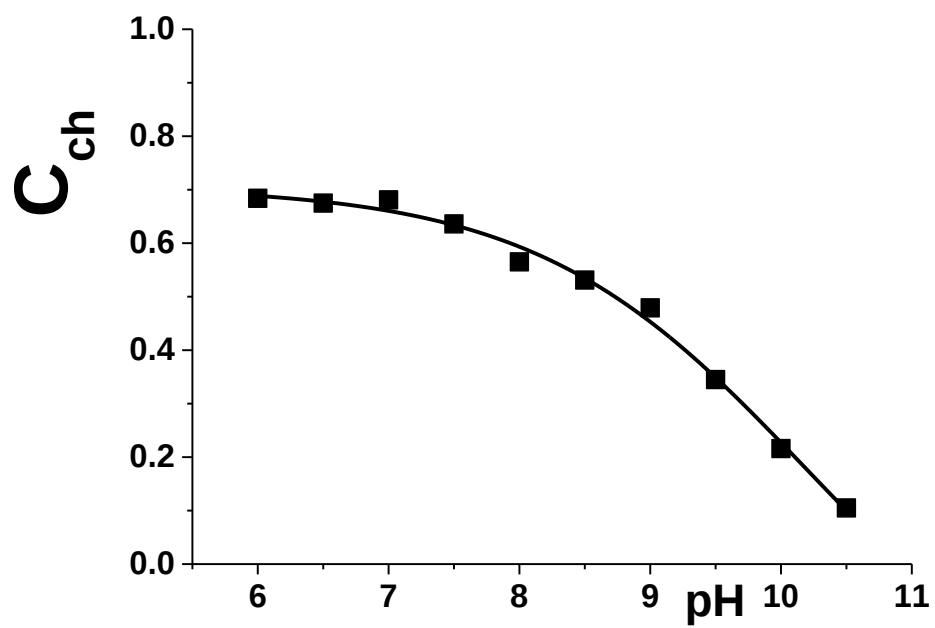
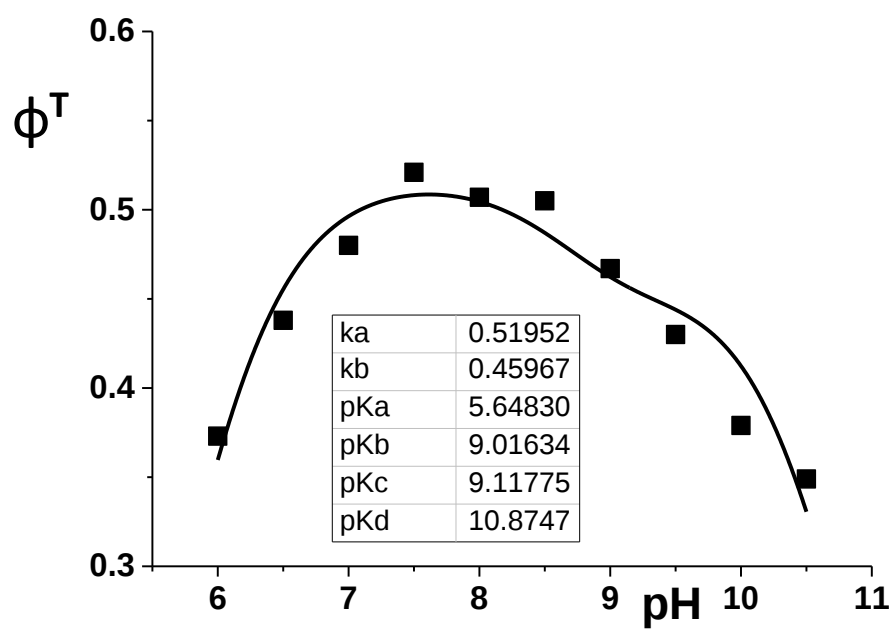
Στην Ενότητα II.B.5. μελετήθηκε η μεταβολή των παραμέτρων k_{cat}/K_m και k_{cat} σε μίγματα H₂O/D₂O διαφορετικής περιεκτικότητας σε δευτέριο (διαφορετικού n) και τιμής pH του ρυθμιστικού διαλύματος της αντίδρασης, για την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA από την πρωτεΐνωση KM-IFO-0288-A. Η εξίσωση 33 προσαρμόστηκε στα πειραματικά δεδομένα (n , $\{k_{cat}/K_m$ και $k_{cat}\}$) με τη χρήση του προγράμματος OriginPro 2016 και προσδιορίστηκαν οι παράμετροί της. Ο ισοτοπικός παράγοντας κλασμάτωσης Z του μέσου τίθεται κατά την προσαρμογή σταθερός και ίσος με $Z = 1.5$. Ως κριτήριο σύγκλισης χρησιμοποιήθηκε αυτό των ελαχίστων τετραγώνων, με στατιστικά βάρη (Ενότητα I.10.1.). Τα αποτελέσματα της προσαρμογής παρουσιάζονται στους Πίνακες 20 και 21 και στα Διαγράμματα 20-23.

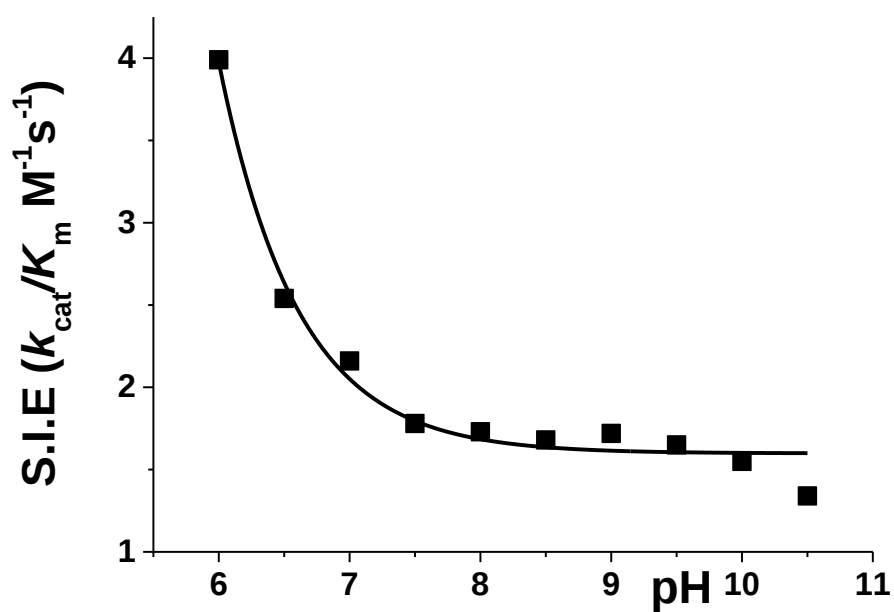
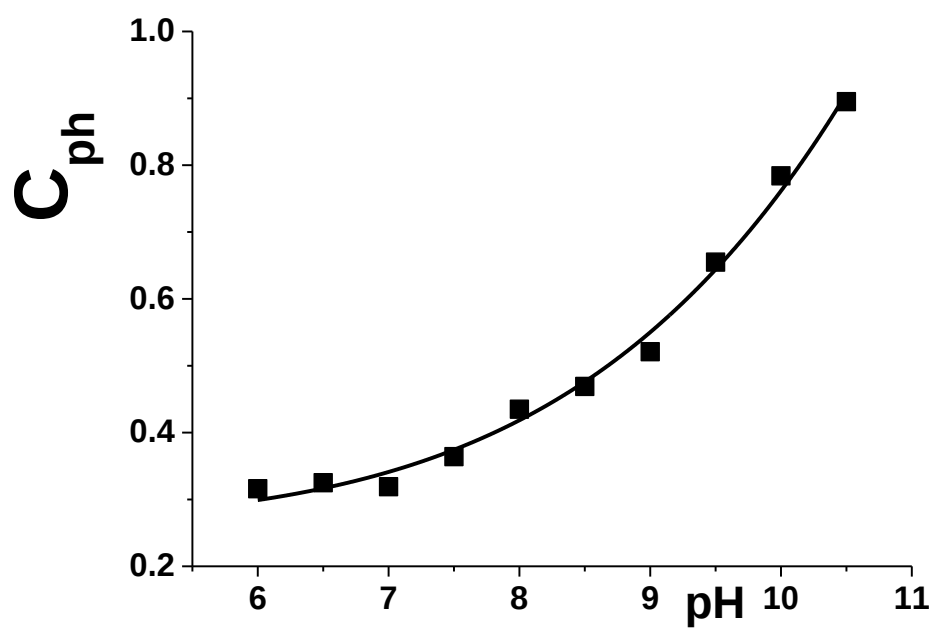
Πίνακας 20: Αποτελέσματα προσαρμογής του βέλτιστου μοντέλου της εξίσωσης GBK στα πειραματικά δεδομένα $k_{cat}/K_m = f(n)$, σε ένα εύρος τιμών pH από 6 έως 10.5, για την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA, από την πρωτεΐνωση KM-IFO-0288-A. Ο αριθμός των πρωτονίων που μεταφέρονται στην T.S. ήταν σταθερός και ίσο με δύο ($\nu = 2$).

	Εξισώσεις G.B.K (33)				
	k_{cat}/K_m				
pH	$(k_{cat}/K_m)^{lim} (M^{-1}s^{-1})$	ϕ^T	C _{ch}	C _{ph}	I.Φ.Δ.
6	598.900	0.373	0.684	0.316	3.97
6.5	926.722	0.438	0.675	0.325	2.54
7	1346.771	0.480	0.681	0.319	2.16
7.5	1638.523	0.521	0.636	0.364	1.78
8	1560.894	0.507	0.565	0.435	1.73
8.5	1553.233	0.505	0.531	0.469	1.68
9	1450.211	0.467	0.479	0.521	1.72
9.5	1150.970	0.430	0.345	0.655	1.65
10	1099.638	0.379	0.216	0.784	1.55
10.5	904.314	0.349	0.105	0.895	1.34



Διάγραμμα 20: Γραφικές παραστάσεις των συναρτήσεων $k_{cat}/K_m = f(n)$ για την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA, από την πρωτεΐνα KM-IFO-0288-A. Οι κόκκινες γραμμές αντιστοιχούν στην μορφή της εξίσωσης GBK που προσαρμόστηκε καλύτερα στα πειραματικά δεδομένα (Πίνακας 20).

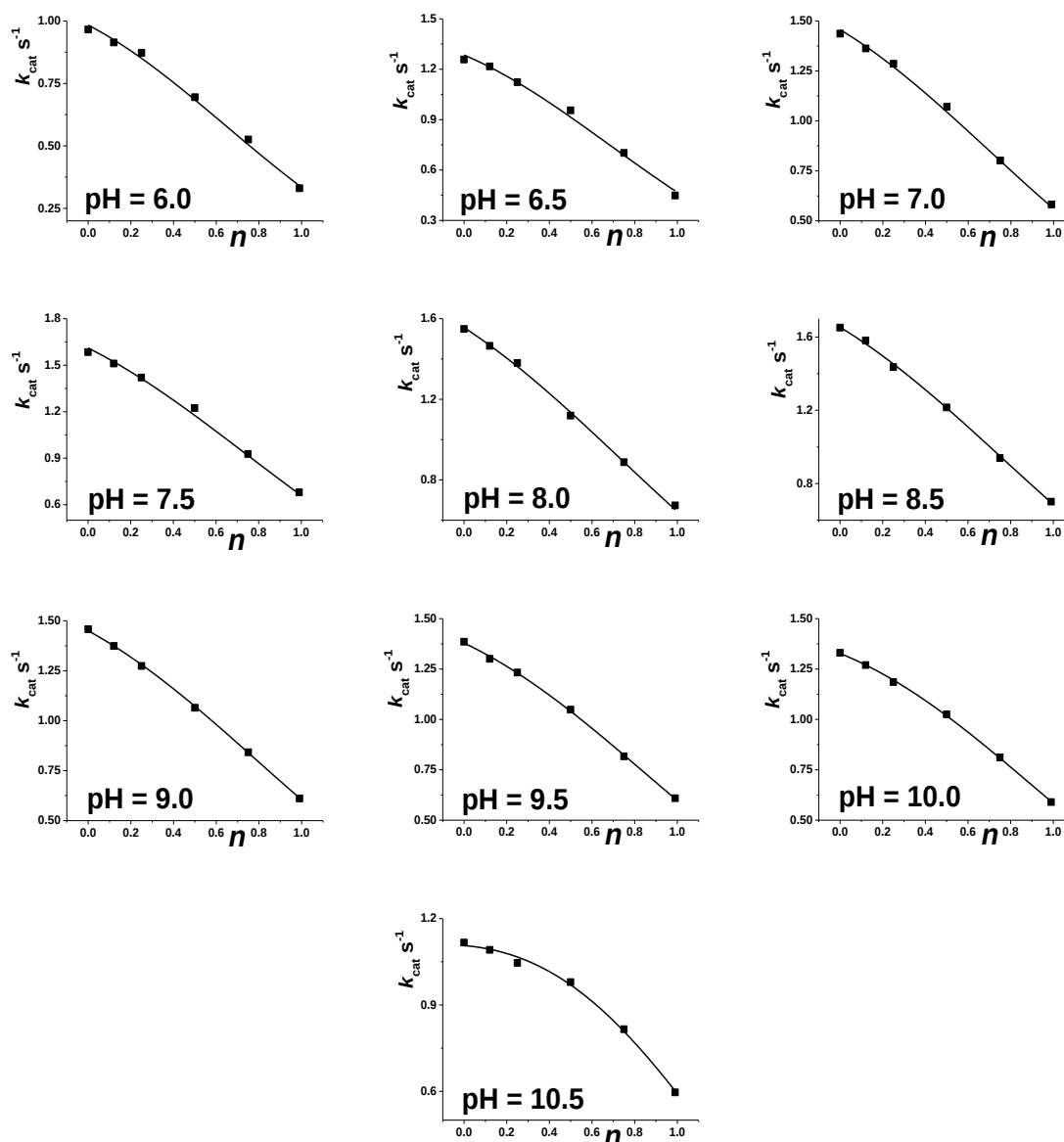




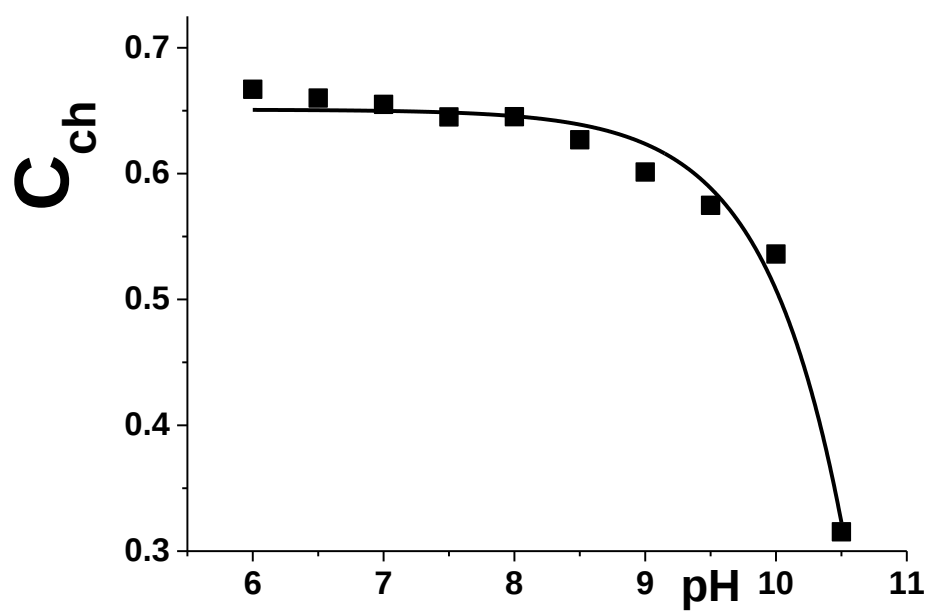
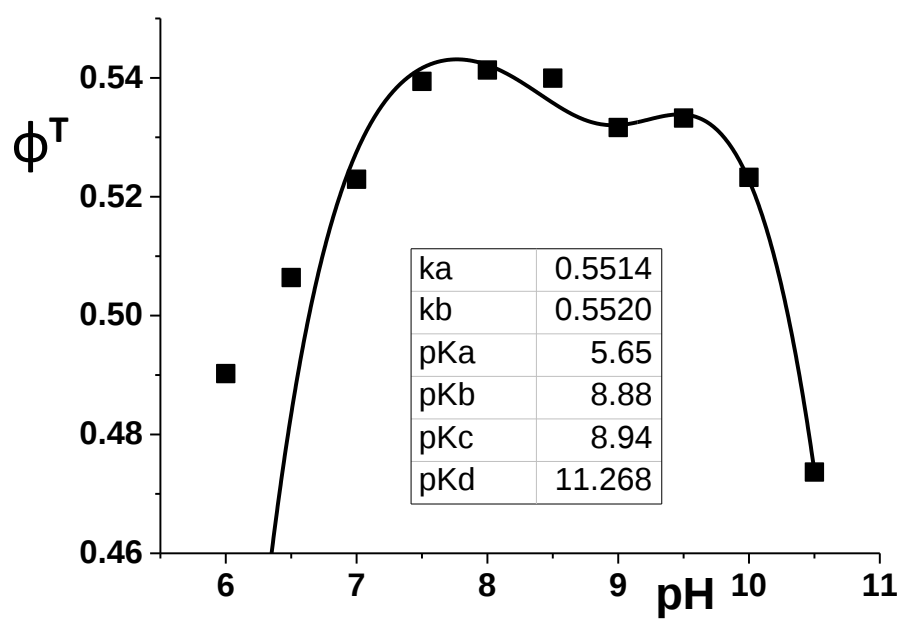
Διάγραμμα 21: Γραφικές παραστάσεις της μεταβολής των παραμέτρων της εξίσωσης 33 ως συνάρτηση της τιμής pH του μέσου της αντίδρασης για την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA, από την πρωτεΐνωση KM-IFO-0288-A.

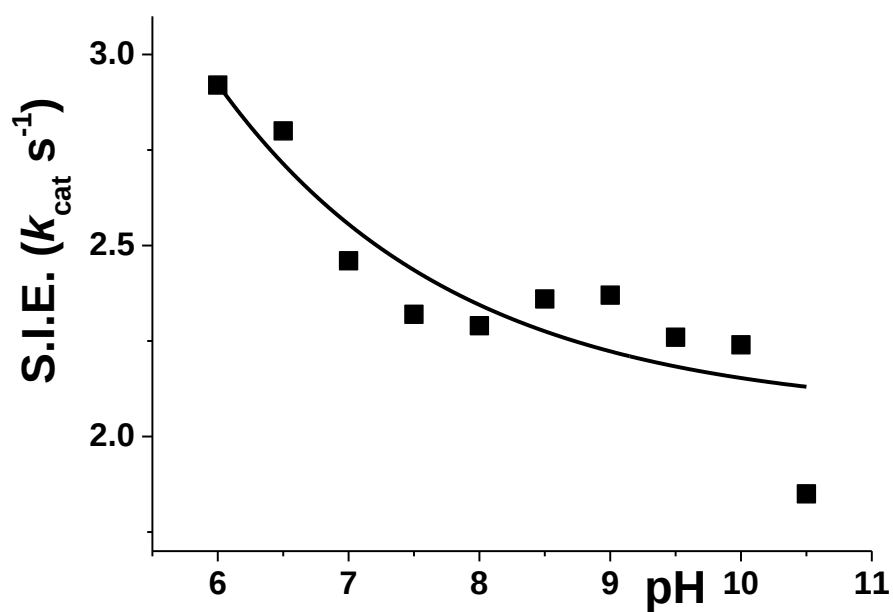
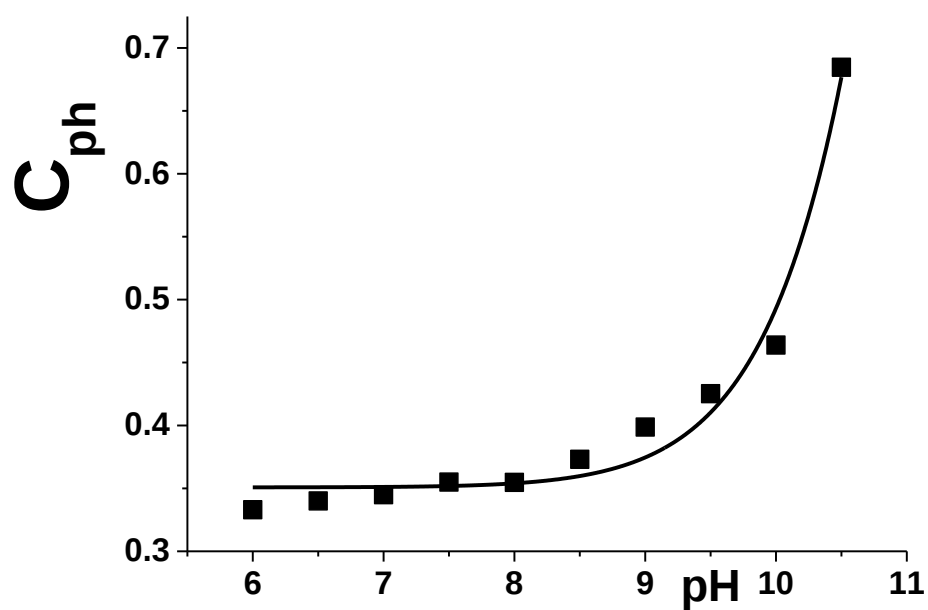
Πίνακας 21: Αποτελέσματα προσαρμογής του βέλτιστου μοντέλου της εξίσωσης GBK στα πειραματικά δεδομένα $k_{cat} = f(n)$, σε ένα εύρος τιμών pH από 6 έως 10.5, για την υδρόλυση του συνθετικού πεπτιδικού υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA, από την πρωτεΐνωση KM-IFO-0288-A. Ο αριθμός των πρωτονίων που μεταφέρονται στην T.S. ήταν σταθερός και ίσο με δύο ($\nu = 2$).

	Εξισώσεις G.B.K (33)				
	k_{cat}				
pH	$k_{cat}^{lim} (s^{-1})$	ϕ^T	C_{ch}	C_{ph}	I.Φ.Δ.
6	0.983	0.490	0.667	0.333	2.92
6.5	1.284	0.506	0.66	0.34	2.8
7	1.456	0.523	0.655	0.345	2.46
7.5	1.610	0.539	0.645	0.355	2.32
8	1.555	0.542	0.639	0.361	2.29
8.5	1.650	0.539	0.627	0.373	2.36
9	1.450	0.531	0.602	0.398	2.37
9.5	1.379	0.533	0.575	0.425	2.26
10	1.327	0.523	0.537	0.463	2.24
10.5	1.106	0.473	0.316	0.684	1.85



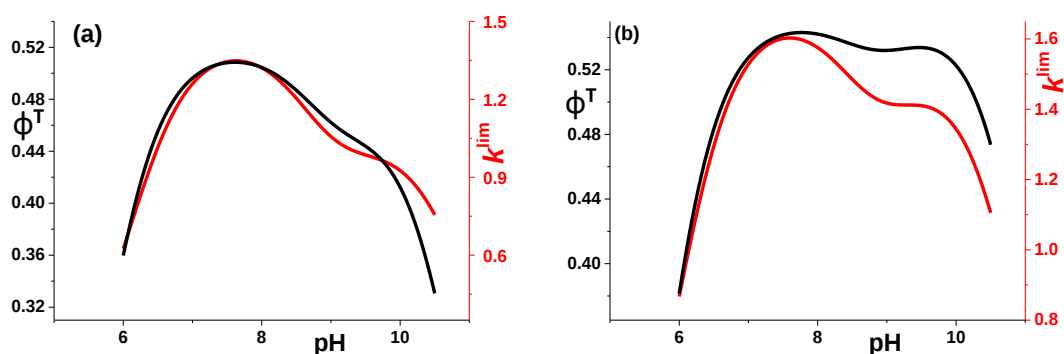
Διάγραμμα 22: Γραφικές παραστάσεις των συναρτήσεων $k_{\text{cat}} = f(n)$ για την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA, από την πρωτεΐνα KM-IFO-0288-A. Οι κόκκινες γραμμές αντιστοιχούν στην μορφή της εξίσωσης GBK που προσαρμόστηκε καλύτερα στα πειραματικά δεδομένα (Πίνακας 21).





Διάγραμμα 23: Γραφικές παραστάσεις της μεταβολής των παραμέτρων της εξίσωσης 33 ως συνάρτηση της τιμής pH του μέσου της αντίδρασης για την υδρόλυση του υποστρώματος Suc-(Ala)₂-Pro-Phe-pNA, από την πρωτεΐνάση KM-IFO-0288-A.

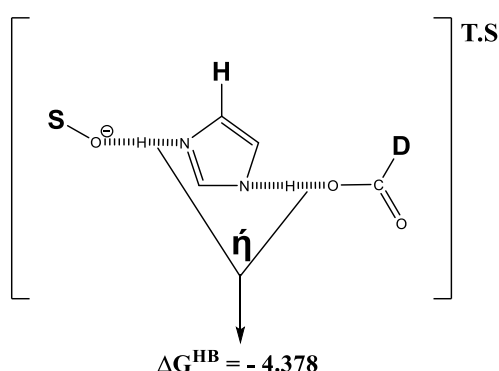
Από τα διαγράμματα 21 και 23 φαίνεται ότι και κατά την ακυλίωση όσο και κατά την απακυλίωση οι παράγοντες της τροποποιημένης εξίσωσης GBK έχουν παρόμοια συμπεριφορά. Ο ισοτοπικός παράγοντας κλασμάτωσης της μεταβατικής κατάστασης ϕ^T ως συνάρτηση της τιμής pH εμφανίζει τις ίδιες τιμές pK_a με αυτές του pH-προφίλ για τις ίδιες συνθήκες (Διάγραμμα 24), αποδεικνύοντας για πρώτη φορά την ταυτότητα των πρωτονίων που μεταφέρονται στην μεταβατική κατάσταση, δηλαδή ότι το ϕ^T αναφέρεται στα πρωτόνια που μεταφέρονται (εν πτήση) μεταξύ των καταλυτικών καταλοίπων, αφού η τιμή του είναι ανάλογη και αυτή της ιονικής κατάστασης της καταλυτικής **H**.



Διάγραμμα 24: Σύγκριση διαγραμμάτων ϕ^T και k^{lim} ως συνάρτηση του pH για (a) ακυλίωση και (b) απακυλίωση

Μέσω του ϕ^T γίνεται δυνατή η μέτρηση της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας Gibbs των δεσμών υδρογόνου ($\Delta G^{\text{HB}} = (7 \pm 0.7) \times \text{RT} \ln \phi^T$ σε kcal/mol) ως συνάρτηση του pH, που αναπτύσσονται μεταξύ των καταλυτικών καταλοίπων στην μεταβατική κατάσταση (Εικόνα 22). Στην βέλτιστη τιμή pH του ενζύμου για ακυλίωση το ΔG^{HB} είναι -2.704 kcal/mol ενώ για τιμή pH = 6 το ΔG^{HB} είναι -4.091 kcal/mol και για τιμή pH = 10.5 το ΔG^{HB} είναι -4.378 kcal/mol. Παρατηρείται λοιπόν, ότι σε υψηλές τιμές pH, λόγω μετατροπής του δεσμού υδρογόνου σε LBHB (σταθεροποίηση κατά $\Delta \Delta G^{\text{HB}} = 1.68$ kcal/mol) η καταλυτική **S** γίνεται πολύ καλύτερο πυρηνόφιλο διευκολύνοντας την κατάλυση. Μέσω του ϕ^T δεν είναι δυνατή η διάκριση της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας Gibbs των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των καταλυτικών καταλοίπων (**S** ↔ **H** ή **H** ↔ **D**), αλλά πιθανότατα αυτό που υπολογίζεται αποτελεί περισσότερο ένα μέσο όρο αυτών. Αναλυτικότερα, σε τιμές pH κοντά στην pK_{a4} η κατάλυση προχωρά μέσω αυξημένων διαμορφωτικών αλλαγών του ενζύμου ($C_{\text{ph}} > 80\%$), που έχει ως αποτέλεσμα το μήκος των δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των καταλυτικών καταλοίπων στην μεταβατική κατάσταση να μειώνεται και

τελικώς αυτοί (ή αυτός) να μετατρέπονται σε LBHB (σταθεροποίηση κατά $\Delta G^{\text{HB}} = 1.68$ kcal/mol). Ο πιο ισχυρός πλέον δεσμός υδρογόνου έχει ως αποτέλεσμα την «αύξηση» του μερικού αρνητικού φορτίου της καταλυτικής S, κάνοντάς την πολύ καλύτερο πυρηνόφιλο, με αποτέλεσμα να διευκολύνεται η πυρηνόφιλη προσβολή στον καρβονυλικό άνθρακα του υπό διάσπαση πεπτιδικού δεσμού. Αυτή η συμπεριφορά, όπως θα συζητηθεί παρακάτω, πυροδοτείται από το αυξανόμενο αρνητικό φορτίο στην επιφάνεια της πρωτεάσης με την αύξηση της τιμής pH, όπου και ένα από τα αποτελέσματα της είναι η μερική αντιστάθμιση της απώλειας της καταλυτικής ισχύος από την μειωμένη πιθανότητα εύρεσης του ενζύμου στην κατάλληλη ιονική κατάσταση σε αυτήν την τιμή pH.



Εικόνα 20: Καταλυτική τριάδα στην μεταβατική κατάσταση

Από τα διαγράμματα μεταβολής του χημικού και φυσικού σταδίου ως συνάρτηση της τιμής pH παρατηρείται μια pH-ξαρτώμενη αλλαγή του σταδίου που ρυθμίζει την αντίδραση, έτσι σε χαμηλές τιμές $\text{pH} \leq 7$ η αντίδραση ρυθμίζεται από το χημικό στάδιο κάτι που φαίνεται και από το υψηλό ισοτοπικό φαινόμενο διαλύτη που παρουσιάζει σε αυτές τις τιμές, ενώ σε πιο αλκαλικές τιμές παρατηρείται μια εκθετική αύξηση της συμμετοχής του φυσικού σταδίου, όπου σε τιμή $\text{pH} = 10.5$ φτάνει σε συμμετοχή το 90 % έχοντας Ι.Φ.Δ = 1.3

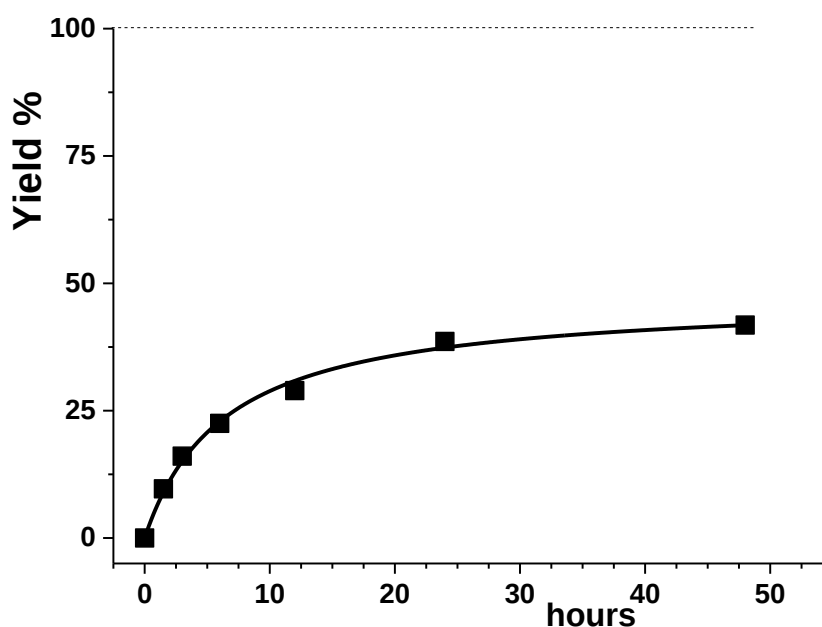
Ένζυμα που εμφανίζουν αυξημένη δραστηριότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις αλάτων, όπως NaCl κατατάσσονται σε μια κατηγορία γνωστή ως αλόφιλα ένζυμα [158], [159], [46], [47]. Χαρακτηριστικό αυτών των ενζύμων είναι το αυξημένο ποσοστό όξινων καταλοίπων στην επιφάνειά τους, με αποτέλεσμα αυτές να διαθέτουν ένα υψηλό καθαρό αρνητικό φορτίο. Τα αλόφιλα ένζυμα διαθέτουν μια σταθερή διαμόρφωση σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις είναι ασταθή και ξεδιπλώνουν (unfold) [160]. Το υψηλό αρνητικό φορτίο στην επιφάνειά τους φαίνεται ότι αποσταθεροποιεί την δομή τους λόγω των απωθητικών δυνάμεων που αναπτύσσονται. Η υψηλή ιονική ισχύς του διαλύματος έχει ως αποτέλεσμα την εξασθένιση αυτών των απωθητικών δυνάμεων που αναπτύσσονται

μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων καταλοίπων στην επιφάνεια του ενζύμου, με αποτέλεσμα την σταθεροποίησή του. Το φορτίο βέβαια στην επιφάνεια των ενζύμων είναι pH-ξαρτώμενο, όπου σε υψηλές τιμές pH το καθαρό αρνητικό φορτίο αυξάνεται με αποτέλεσμα την περεταίρω αποσταθεροποίηση της δομής του [161], [162], [163].

Η ανάλυση του pH-προφίλ για $\theta = 35^{\circ}\text{C}$, $I/I = 0.1 \text{ M}$ καθώς και ο λόγος των δύο κορυφών $(k)_1^{\text{lim}}/(k)_2^{\text{lim}} = 1.5$ της πρωτεΐνης KM-IFO-0288-A, δείχνει ότι σε τιμές $\text{pH} \approx 8 - 10.5$ λόγω του αυξανόμενου αρνητικού φορτίου στην επιφάνειά της, αυτή συμπεριφέρεται τοπικά ως μια πρωτεΐνη με intrinsically disordered protein regions (IDPRs), δηλαδή διαθέτει/αναπτύσσονται περιοχές αυξημένης ευπλασίας [164], [165]. Ακριβώς αυτό παρατηρείται και στα πειράματα proton inventory σε αυτό το εύρος τιμών pH με το ολοένα και αυξανόμενο φυσικό στάδιο C_{ph} (έως 90 %) και το μειούμενο ισοτοπικό φαινόμενο διαλύτη που το συνοδεύει. Όπως αναφέρθηκε η αυξανόμενη συγκέντρωση του χλωριούχου νατρίου σταθεροποιεί την δομή του ενζύμου μετριάζοντας της ηλεκτροστατικές δυνάμεις που αναπτύσσονται στην επιφάνειά της. Αυτό ακριβώς είναι που παρατηρείται και στο pH-προφίλ για $\theta = 35^{\circ}\text{C}$, $I/I = 1.5 \text{ M}$ όπου ο λόγος των δύο κορυφών είναι περίπου στο $(k)_1^{\text{lim}}/(k)_2^{\text{lim}} = 1.1$, δηλαδή η αυξανόμενη συγκέντρωση του χλωριούχου νατρίου σταθεροποιεί την δομή του ενζύμου εξομαλύνοντας το pH-προφίλ της. Παρόμοιο pH-προφίλ παρατηρείται και σε $\theta = 25^{\circ}\text{C}$, $I/I = 0.1 \text{ M}$, όπου στο ένζυμο προσφέρεται λιγότερη δυναμική ενέργεια, λόγω της μειωμένης θερμοκρασίας, με αποτέλεσμα αυτό να καθίσταται πιο σταθερό και να μην αναπτύσσει IDPRs συμπεριφορά. Από τα πειράματα proton inventory με αυξανόμενη συγκέντρωση χλωριούχου νατρίου, παρατηρείται ότι η αύξηση αυτή έχει ως αποτέλεσμα την μείωση και τελικώς την εξάλειψη του φυσικού σταδίου που απαιτείται για την πραγματοποίηση της κατάλυσης (εξάλειψη της IDPRs συμπεριφοράς), όπου πλέον δεν πραγματοποιείται κατάλυση μέσω δυο σειριακών μεταβατικών καταστάσεων (V.T.S.), αλλά μέσω ενός απλού μηχανισμού τριών σταδίων.

III.B.6. Εστεροποίηση του Μίγματος Α με αιθανόλη και με καταλύτη την ακινητοποιημένη σε κρυστάλλους χλωριούχου νατρίου πρωτεάση KM-IFO-0288-A

Πραγματοποιήθηκαν δύο αντιδράσεις εστεροποίησης του Μίγματος Α με αιθανόλη, μέσω της ακινητοποιημένης σε κρυστάλλους χλωριούχου νατρίου πρωτεάσης KM-IFO-0288-A. Η % απόδοση για την εστεροποίηση με 0.2 M [Μίγμα Α] μετά από 48 ώρες δεν ξεπέρασε το 13 %, ενώ με την [Μίγμα Α] να είναι 0.1 M, η % απόδοση μετά από 48 ώρες έφτασε το 41 % (Διάγραμμα 25). Από την καμπύλη προόδου της αντίδρασης εστεροποίησης με [Μίγμα Α] = 0.1 M παρατηρείται ότι ενώ της 8 πρώτες ώρες η ταχύτητα παραγωγής εστέρα είναι αρκετά υψηλή, μετά τις 16 ώρες αυτή σχεδόν μηδενίζεται. Από αυτήν την συμπεριφορά διαπιστώνεται ότι η συγκεκριμένη πρωτεάση δεν είναι ανθεκτική παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων οξέος, πιθανότατα λόγω αλλαγής της τιμής pH στο μικροπεριβάλλον του καταλυτικού κέντρου. Επειδή ο στόχος είναι η παραγωγή εστέρων σε υψηλές συγκεντρώσεις, ώστε μια τέτοια παραγωγή να είναι οικονομικά συμφέρουσα, δεν επιχειρήθηκε βελτιστοποίηση των συνθηκών με την πρωτεάση KM-IFO-0288-A διότι αυτή προφανώς δεν θα μπορούσε να φτάσει τους επιθυμητούς στόχους.



Διάγραμμα 25: Καμπύλη προόδου της αντίδρασης εστεροποίησης 0.1 M Μίγματος Α με αιθανόλη μέσω της ακινητοποιημένης σε κρυστάλλους χλωριούχου νατρίου πρωτεάσης KM-IFO-0288-A

III.Γ. Αποτελέσματα εστεροποιήσεων με τις λιπάσες: CALB και LipA

III.Γ.1. Πειραματικός σχεδιασμός με την λιπάση CALB

Η μεθοδολογία RSM χρησιμοποιήθηκε για να εξεταστεί η επίδραση των ανεξάρτητων μεταβλητών στις αποκρίσεις του συστήματος, οι οποίες και θα πρέπει να βελτιστοποιηθούν στην περιοχή ενδιαφέροντος. Η Εξίσωση 43 προσαρμόστηκε στα πειραματικά δεδομένα και για τις δύο αποκρίσεις του κάθε σχεδιασμένου πειραματισμού, με σκοπό να απεικονιστούν γραφικά οι εξαρτήσεις των σημαντικών μεταβλητών.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \varepsilon \quad (43)$$

Στην Εξίσωση 43, όπως αναλύθηκε και στο Γενικό μέρος, y και β_0 συμβολίζουν την απόκριση και ένα σταθερό όρο, αντίστοιχα, ενώ β_i, β_{ij} , είναι β_{ii} συμβολίζουν τους συντελεστές για τις γραμμικές επιδράσεις, αλληλεπιδράσεις μεταξύ μεταβλητών και επιδράσεις δευτέρου βαθμού αντίστοιχα, όπου x_i και x_j είναι οι ανεξάρτητες μεταβλητές (παράγοντες). Η εξίσωση αυτή μπορεί να απλοποιηθεί αφαιρώντας τους όρους που οι συντελεστές τους υπολογίστηκαν μέσω ANOVA να είναι στατιστικά μη σημαντικοί ($p > 0.05$). Στη συνέχεια, με την χρήση του λογισμικού Design Expert®, έγινε εφαρμογή της ανάλυσης πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA) για να επιτευχθεί ο βέλτιστος συμβιβασμός μεταξύ όλων των αποκρίσεων, ο οποίος και εκφράζεται μέσω της συνάρτησης επιθυμητού [132], [141].

Από την εφαρμογή των τεσσάρων πειραματικών σχεδιασμών, όπως αναλύθηκε και στην ενότητα II.C.1.1., λήφθηκαν οι αποκρίσεις, % απόδοση και συγκέντρωση του συντιθέμενου εστέρα, για κάθε ένα από τα 60 πειράματα ανά πειραματικό σχεδιασμό. Οι τιμές των αποκρίσεων για την ανάπτυξη των μοντέλων απεικονίζονται στην ενότητα II.C.1.1. ενώ η ανάλυση τους παρουσιάζεται παρακάτω και βασίστηκε στους μελετηθέντες παράγοντες, δηλαδή [Μίγμα A], λόγος [αλκοόλης]/[Μίγμα A] (αιθανόλη ή 1-βουτανόλη), ποσότητα σε γραμμάρια της ακινητοποιημένης λιπάσης CALB και ο χρόνος αντίδρασης σε ώρες. Επιπλέον, οι επιδράσεις και η σημαντικότητα των παραμέτρων εστεροποίησης αξιολογήθηκαν από την εφαρμογή της ανάλυσης διασποράς κατά δύο παράγοντες (Two-way ANOVA) (Πίνακας 22). Προφανώς, σε όλες τις περιπτώσεις που εμφανίζονται στον Πίνακα 22, όλες οι παράμετροι έχουν εκτιμηθεί ως σημαντικές (p -τιμές < 0.05), συμπεριλαμβανομένων αυτών που αναφέρονται στα μοντέλα και τους επιλεγμένους όρους

τους (όπως A, B, C, D, AB, AC, AD, BC, BD, CD, A², B², C², D²). Εξάλλου σε όλες τις περιπτώσεις, οι εκτιμώμενες τιμές των Adjusted-R² και Predicted-R² είναι σε πλήρη συμφωνία μεταξύ τους, καθώς και οι τιμές του Adequate Precision είναι πολύ μεγαλύτερες του τέσσερα (>> 4) όπως απαιτείται [166]. Στον Πίνακα 22 παρουσιάζεται για λόγους συντομίας και οικονομίας χώρου ένας απλουστευμένος και συμπυκνμένος πίνακας ANOVA. Στο τέλος παρουσιάζεται για την εστεροποίηση του μίγματος A με 1-βουτανολη υπό συνεχή απομάκρυνση H₂O και ως απόκριση την % απόδοση, ένας πλήρης πίνακας ANOVA καθώς και η ανάλυσή του (Πίνακας 25). Στη συνέχεια, οι συντελεστές παλινδρόμησης των εξεταζόμενων μοντέλων δεύτερου βαθμού υπολογίστηκαν (Πίνακας 23) και χρησιμοποιήθηκαν για τη κατάστρωση των αντίστοιχων εξισώσεων, των οποίων η γενική μορφή απεικονίζει η Εξίσωση 43. Σε κάθε Διάγραμμα από 26 έως 29 παρατίθενται: τα διαγράμματα προβλεπόμενων ως προς αυτά των πραγματικών τιμών (predicted vs. actual data), τα περιγράμματα (contours) όπου απεικονίζονται οι πιο σημαντικές αλληλεπιδράσεις (**p**-τιμές ≤ 0.05) και τα διαγράμματα ράμπες (ramps) όπου απεικονίζεται γραφικά η λύση του κάθε πειραματικού σχεδιασμού όπως αυτή προκύπτει από την ανάλυση πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA) [131] και παρουσιάζεται αναλυτικά στον Πίνακα 24. Τέλος ακολουθούν τα περιγράμματα του επιθυμητού της κάθε λύσης (Διάγραμμα 30) [141].

Πίνακας 22: Πειραματικός σχεδιασμός (ANOVA των αποκριτών επιφανειών των απλοποιημένων μοντέλων δευτέρου βαθμού): Επιδράσεις και σημαντικότητα (significance) των παραμέτρων εστεροποίησης ^{α,β}

Το H ₂ O δεν απομακρύνονταν από τον αντιδραστήρα				Το H ₂ O απομακρύνονταν συνεχώς από τον αντιδραστήρα				
ΑΘΡΟΙΣΜΑΤΑ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ								
	με αιθανόλη		με 1-βουτανόλη		με αιθανόλη		με 1-βουτανόλη	
Source	% Yield	[Ester]	% Yield	[Ester]	% Yield	[Ester]	% Yield	[Ester]
Model	5726.92	6.71	8881.44	10.80	2779.00	8.32	8006.54	12.15
A-Acid	392.29	4.06	697.27	2.85	60.29	6.82	173.12	4.69
B-Ratio	1572.72	0.70	491.25	0.46	19.15	3.72E-3	502.18	0.47
C-Enzyme	1926.07	0.98	4118.20	3.89	1079.30	0.57	3813.14	3.62
D-Time	732.92	0.39	2631.66	2.38	1345.04	0.69	2422.73	2.10
AB	150.38	0.01		0.030	73.63	0.03		0.04
AC		0.04	122.38	0.38	12.75	0.048	125.45	
AD		0.03		0.06		0.04	37.17	
BC			296.58	0.29	43.50	0.03	278.48	0.27
BD	74.76	0.04				3.79E-3		
CD	17.21	9.88E-3	96.60	0.09	41.40	0.02	94.33	0.08
A ²		9.61E-3						
B ²	860.58	0.38	42.19	0.07	41.29	0.02	82.74	0.08
C ²			209.76	0.26			410.56	0.37
D ²			14.99		41.20	0.024		
Residual	234.75	0.12	269.32	0.27	134.61	0.064	291.07	0.08
Lack of Fit	232.53	0.11	265.01	0.26	131.49	0.06	281.10	0.37
Pure Error	2.22	1.12E-3	4.30	3.87E-3	3.12	1.58E-3	9.97	0.08
Corr Total	5961.67	6.82	9153.55	11.07	2913.61	8.38	8299.75	0.37

^α Σε όλες τις περιπτώσεις, οι **p**-τιμές υπολογίστηκαν ως σημαντικές, εκτός από αυτές της έλλειψης προσαρμογής (Lack-of-fit) όπου υπολογίστηκαν ως μη σημαντικές.

^β Οι μέσες τιμές των Adjusted R² και Predicted R², υπολογίστηκαν ως 0.97 και 0.96, αντίστοιχα, ενώ οι υπολογισμένες τιμές των Adeq. Precision σε όλες τις περιπτώσεις ήταν πολύ μεγαλύτερες του τέσσερα

Πίνακας 23: Υπολογιζόμενες τιμές των συντελεστών παλινδρόμησης των εξεταζόμενων μοντέλων δευτέρου βαθμού ^α

Factor	Το H ₂ O δεν απομακρύνονταν από τον αντιδραστήρα				Το H ₂ O απομακρύνονταν συνεχώς από τον αντιδραστήρα			
	με αιθανόλη		με 1-βουτανόλη		με αιθανόλη		με 1-βουτανόλη	
	% Yield	[Ester]	% Yield	[Ester]	% Yield	[Ester]	% Yield	[Ester]
Intercept	10.04945	-0.98897	55.14603	0.37567	31.54398	-0.44689	29.59382	-0.97520
A-Acid	2.55887	0.86875	-15.97155	0.00237	1.14631	0.56324	-5.51360	0.45211
B-Ratio	44.34659	0.82697	5.64324	0.72013	12.56935	0.22065	13.50577	0.85914
C-Enzyme	99.69130	0.48395	139.73350	1.43520	36.76984	-0.44464	198.59391	2.69227
D-Time	0.64685	-0.02114	6.66164	0.02498	4.75553	0.066975	5.83187	0.10869
AB	-4.33562	-0.03896		0.12191	-3.03375	-0.063041		-0.14229
AC		0.79957	43.45833	2.40670	14.02778	0.86472	44.00000	2.38799
AD		0.01628		0.029796		0.017760	-0.71854	
BC			67.65278	2.10017	12.95486	0.32301	65.55556	2.03021
BD	0.38211	0.00863				0.00272		
CD	-2.03733	-0.04881	-6.43519	-0.19421	-3.15972	-0.07108	-6.35880	-0.18948
A ²		-0.11291						
B ²	-8.26437	-0.17837	-8.22025	-0.31372	-1.85001	-0.04005	-10.74040	-0.33665
C ²			-565.68663	-18.53938			-738.41029	-22.04530
D ²			-0.15915		-0.11550	- 0.00281		

^α Τα τυπικά σφάλματα των παραγόντων που υπολογίστηκαν ήταν σχετικά μικρά ($0.1 \% \leq str\ error \leq 7 \%$). Σε όλες τις περιπτώσεις οι συντελεστές συσχέτισης ήταν $R^2 > 0.93$.

Πίνακας 24: Βελτιστοποιημένοι παράμετροι των αντιδράσεων εστεροποίησης όπως αυτοί προκύψαν από την ανάλυση πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA) ^α

	Το H ₂ O δεν απομακρύνονταν από τον αντιδραστήρα		Το H ₂ O απομακρύνονταν συνεχώς από τον αντιδραστήρα	
	Εστεροποιούμενες αλκοόλες			
Παράμετρος	Αιθανόλη	1-βουτανόλη	αιθανόλη	1-βουτανόλη
[Μίγμα A] (M)	1.78	3.30	2.75	3.46
Λόγος = [αλκοόλη]/[Μίγμα A]	2.57	1.02	1.67	1.11
% Απόδοση (εστέρας)	90.24	90.15	90.1	97.4
[Εστέρας] ^β (M)	1.62	3.20	2.47	3.35
Επιθυμητό %	80	94	94	100

^α Όλες οι αντιδράσεις εστεροποίησης διεξήχθησαν εντός 16 ωρών, χρησιμοποιώντας 0.15 g CALB στους 40°C

^β Η τελική συγκέντρωση εστέρα στο μίγμα της αντίδρασης

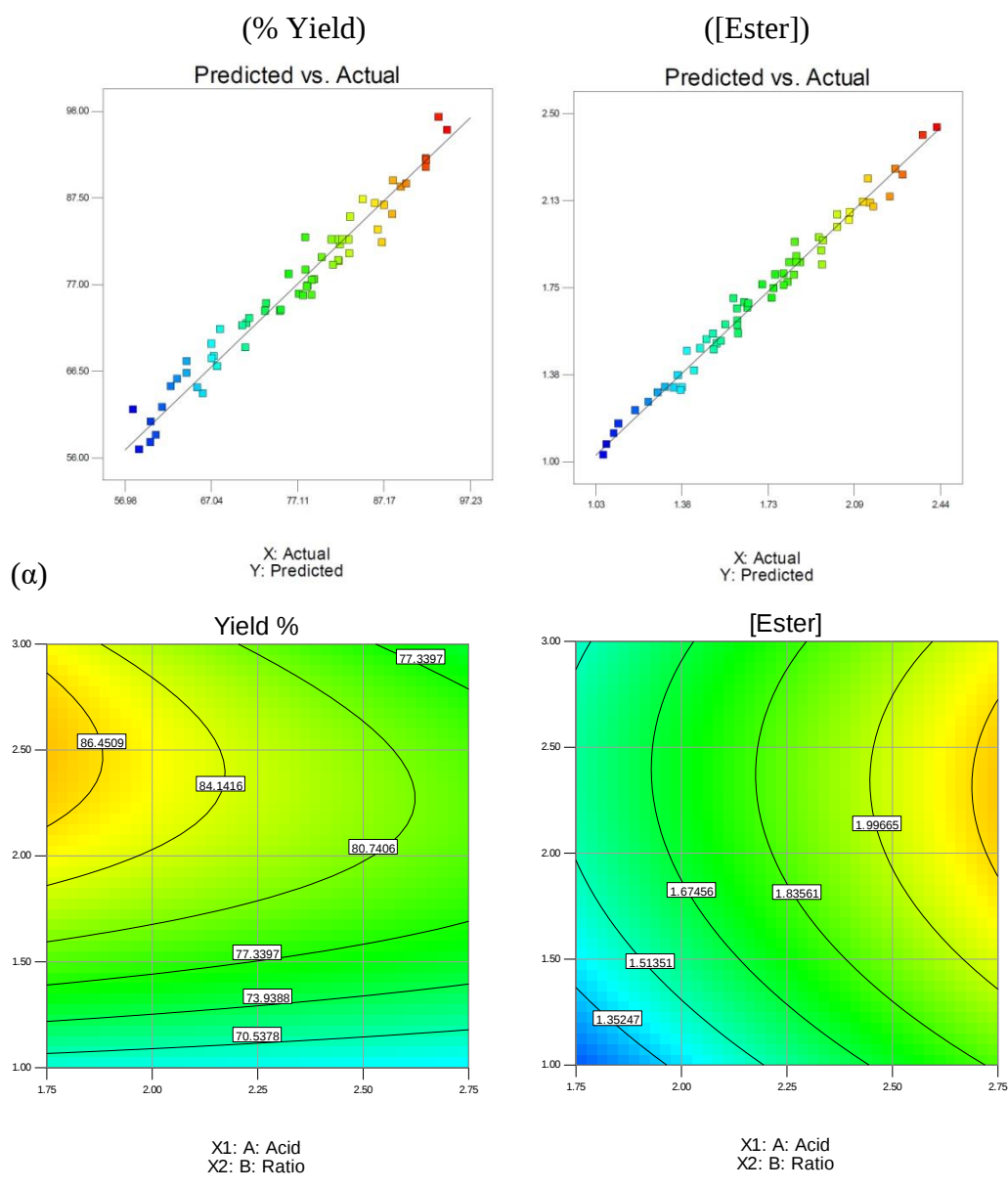
Πίνακας 25: Πλήρης πίνακας ANOVA για την εστεροποίηση του μίγματος Α με 1-βουτανόλη και καταλυτή την CALB με απομάκρυνση του παραγόμενου H₂O, για την απόκριση % απόδοση

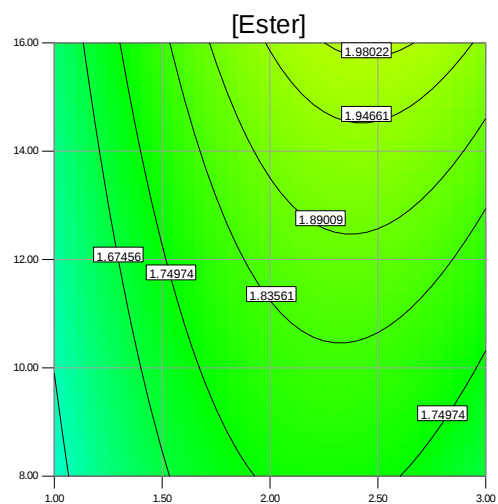
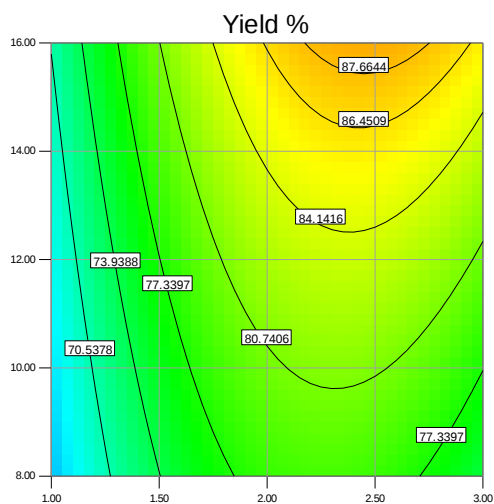
Source	Sum of Squares (SS)	df	Mean Square	F Value	p-value Prob > F	
Model	8006.54	10	800.65	132.03	< 0.0001	significant
A-Acid	173.12	1	173.12	28.55	< 0.0001	
B-Ratio	502.18	1	502.18	82.81	< 0.0001	
C-Enzyme	3813.14	1	3813.14	628.81	< 0.0001	
D-Time	2422.73	1	2422.73	399.52	< 0.0001	
AC	125.45	1	125.45	20.69	< 0.0001	
AD	37.17	1	37.17	6.13	0.0169	
BC	278.48	1	278.48	45.92	< 0.0001	
CD	94.33	1	94.33	15.55	0.0003	
B ²	82.74	1	82.74	13.64	0.0006	
C ²	410.56	1	410.56	67.70	< 0.0001	
Residual	291.07	48	6.06			
Lack of Fit	281.10	46	6.11	1.23	0.5516	not significant
Pure Error	9.97	2	4.99			
Cor Total	8299.75	59				

Από τον Πίνακα 25, υπολογίστηκε η τιμή $F = 132.03$ του μοντέλου, από την οποία συμπεραίνεται ότι το μοντέλο που επιλέχτηκε είναι επιτυχημένο (significant). Υπάρχει μόνο μια πιθανότητα 0.0001 % ότι αυτή η μεγάλη τιμή F θα μπορούσε να προέλθει λόγω θορύβου (ϵ_n). Οι p -τιμές μικρότερες από 0.05 δείχνουν τους όρους του μοντέλου που είναι σημαντικοί. Στην προκριμένη περίπτωση οι σημαντικοί όροι είναι: A, B, C, D, AC, AD, BC, CD, B², C². Τιμές μεγαλύτερες από 0.10 υποδηλώνουν όρους που δεν είναι σημαντικοί. Εάν υπάρχουν πολλοί όροι μη σημαντικοί στο μοντέλο που επιλέχτηκε (χωρίς να υπολογίζονται

εκείνοι που απαιτούνται για την υποστήριξη της ιεραρχίας), τότε υποβιβασμός του μοντέλου (αφαίρεση δηλαδή των μη σημαντικών όρων), οδηγεί σε περεταίρω βελτίωση του.

Η έλλειψη προσαρμογής (Lack of Fit F-value) που ισούται με 1.23 σημαίνει ότι αυτή δεν είναι σημαντική σε σχέση με το καθαρό σφάλμα. Μη σημαντική έλλειψη προσαρμογής είναι το επιθυμητό αποτέλεσμα.

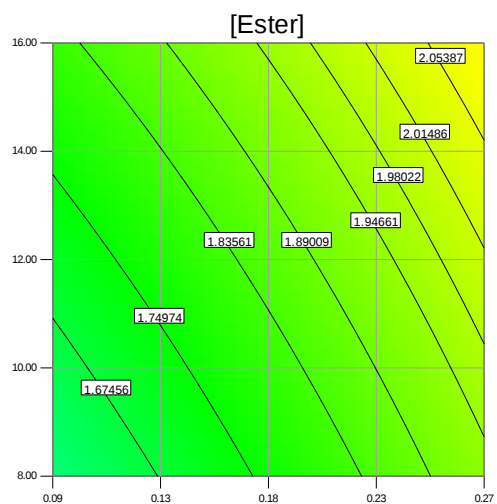
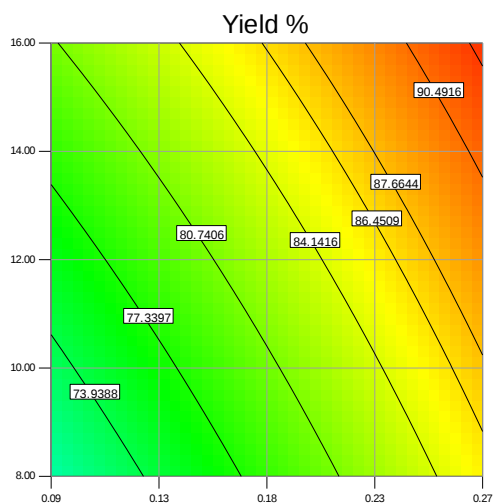




(γ)

X1: B: Ratio
X2: D: Time

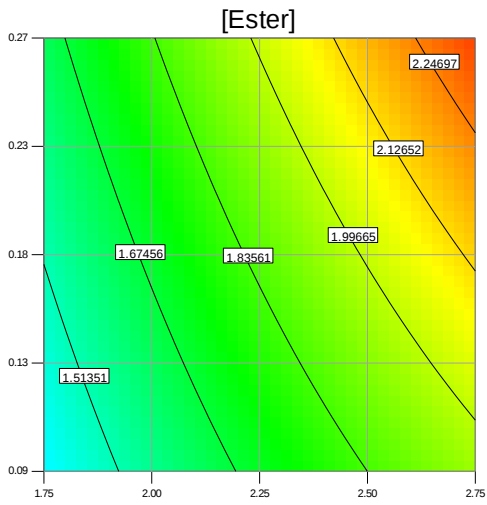
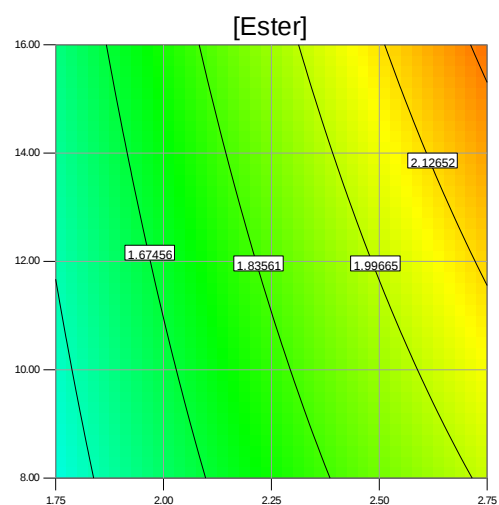
X1: B: Ratio
X2: D: Time



(δ)

X1: C: Enzyme
X2: D: Time

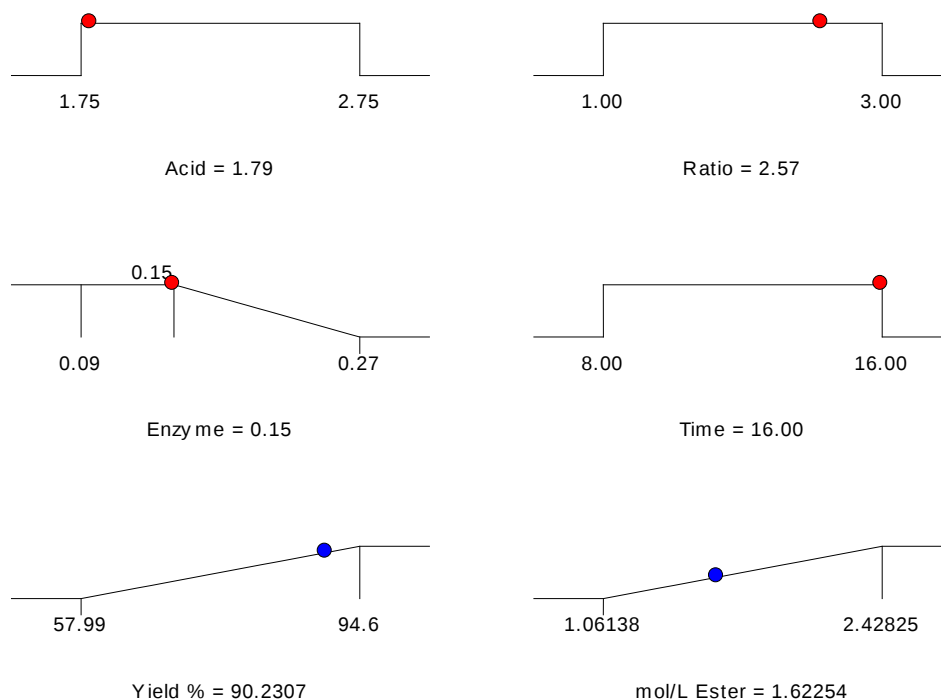
X1: C: Enzyme
X2: D: Time



(ϵ)

X1: A: Acid
X2: D: Time

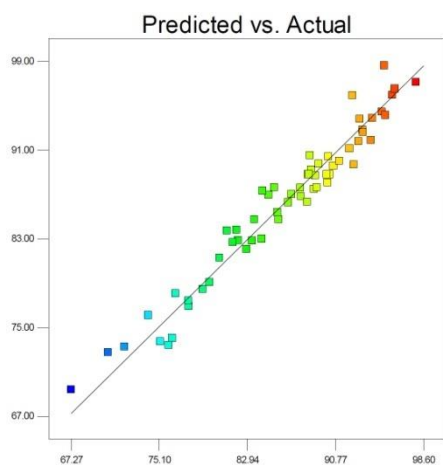
X1: A: Acid
X2: C: Enzyme



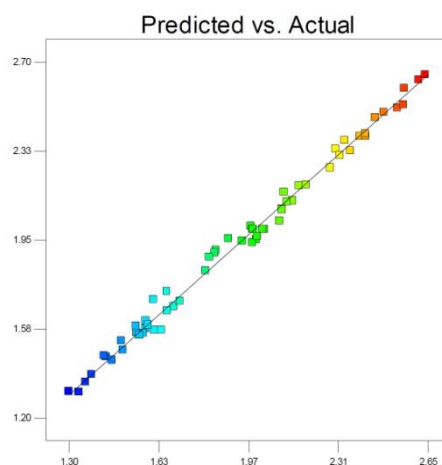
(ζ) Desirability = 0.844

Διάγραμμα 26: Σημαντικά αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού (εστεροποίηση με αιθανόλη όπου το παραγόμενο H_2O παραμένει στον αντιδραστήρα): (α) προβλεπόμενων ως προς αυτά των πραγματικών τιμών, (β) έως (ε) περιγράμματα όπου απεικονίζονται οι πιο σημαντικές αλληλεπιδράσεις και (ζ) ράμπες όπου απεικονίζεται γραφικά η λύση του πειραματικού σχεδιασμού όπως αυτή προκύπτει από την ανάλυση πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA)

(% Yield)



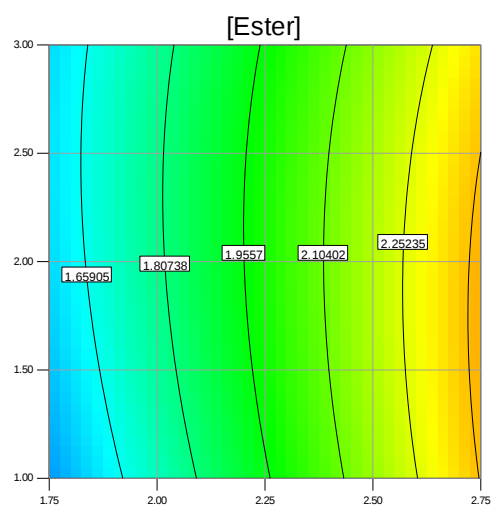
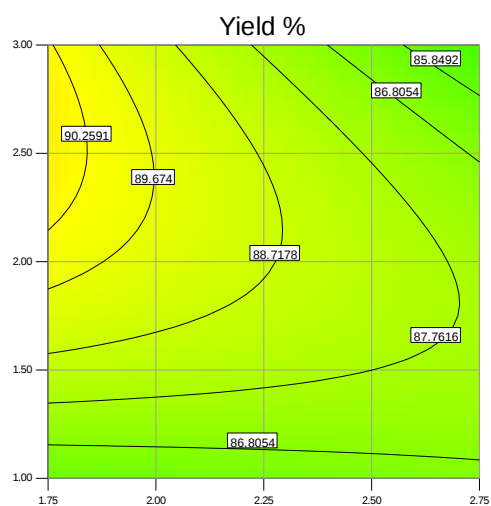
([Ester])



(α)

X: Actual
Y: Predicted

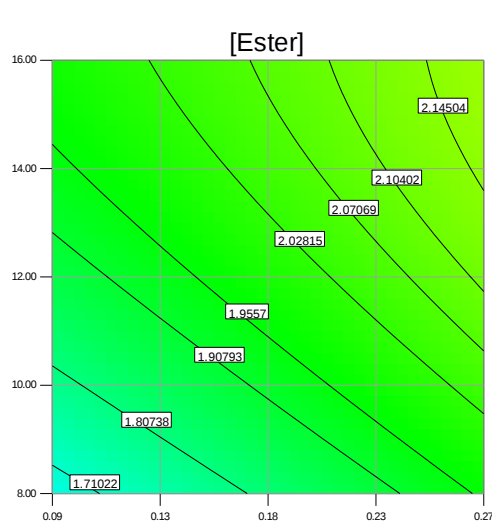
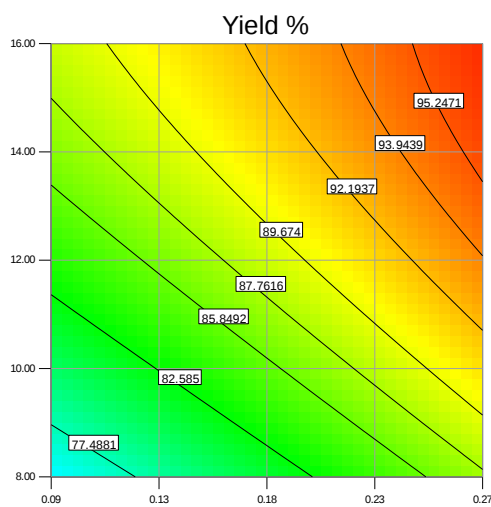
X: Actual
Y: Predicted



(β)

X1: A: Acid
X2: B: Ratio

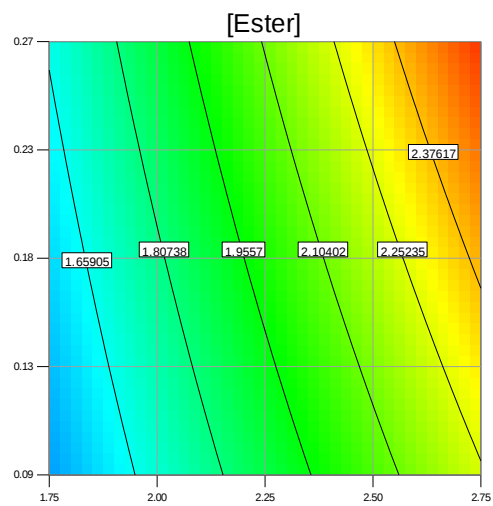
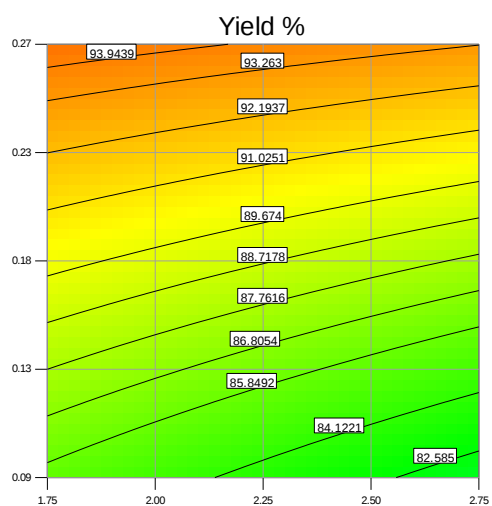
X1: A: Acid
X2: B: Ratio



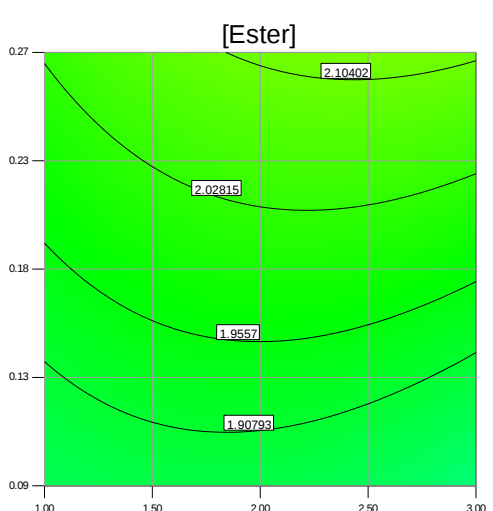
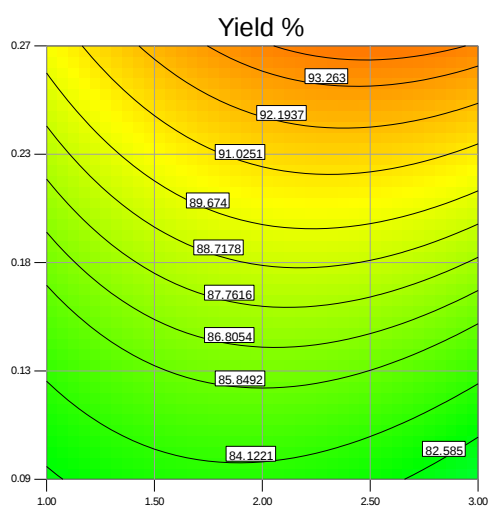
(γ)

X1: C: Enzyme
X2: D: Time

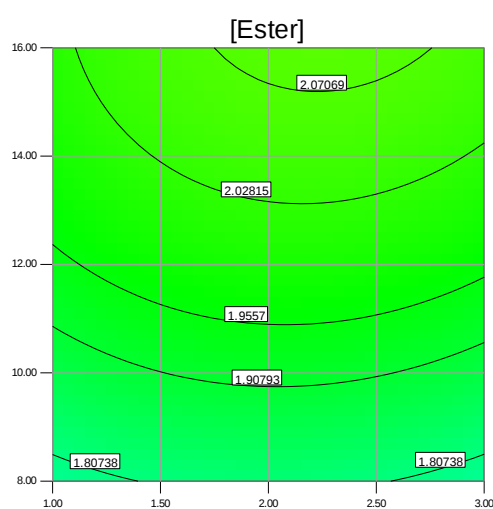
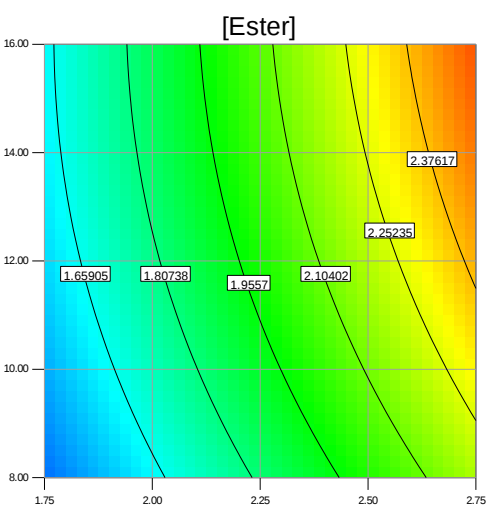
X1: C: Enzyme
X2: D: Time



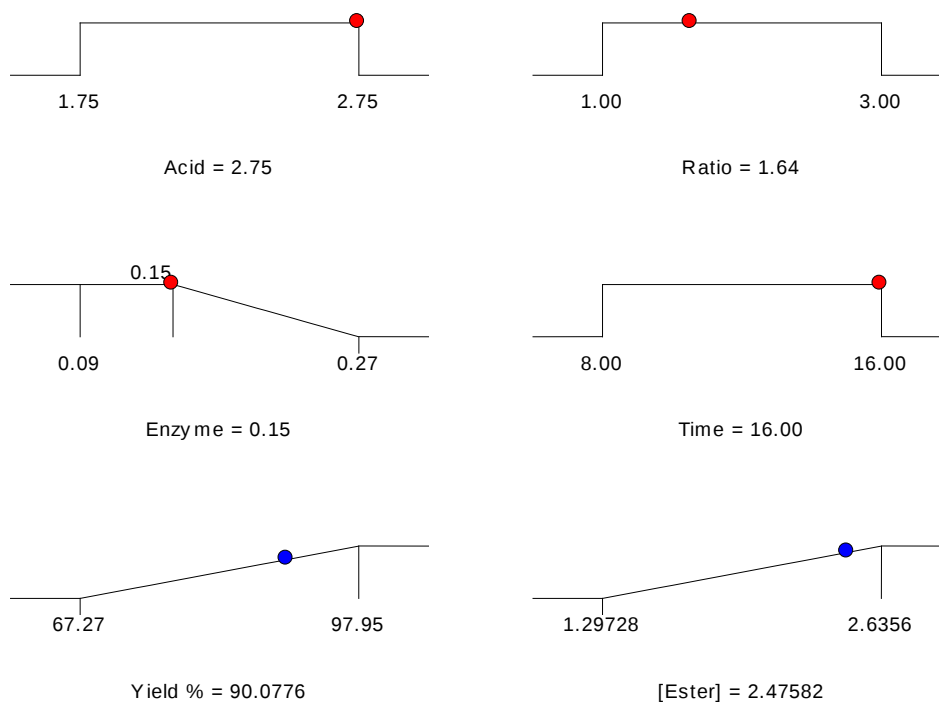
(δ)



(ε)

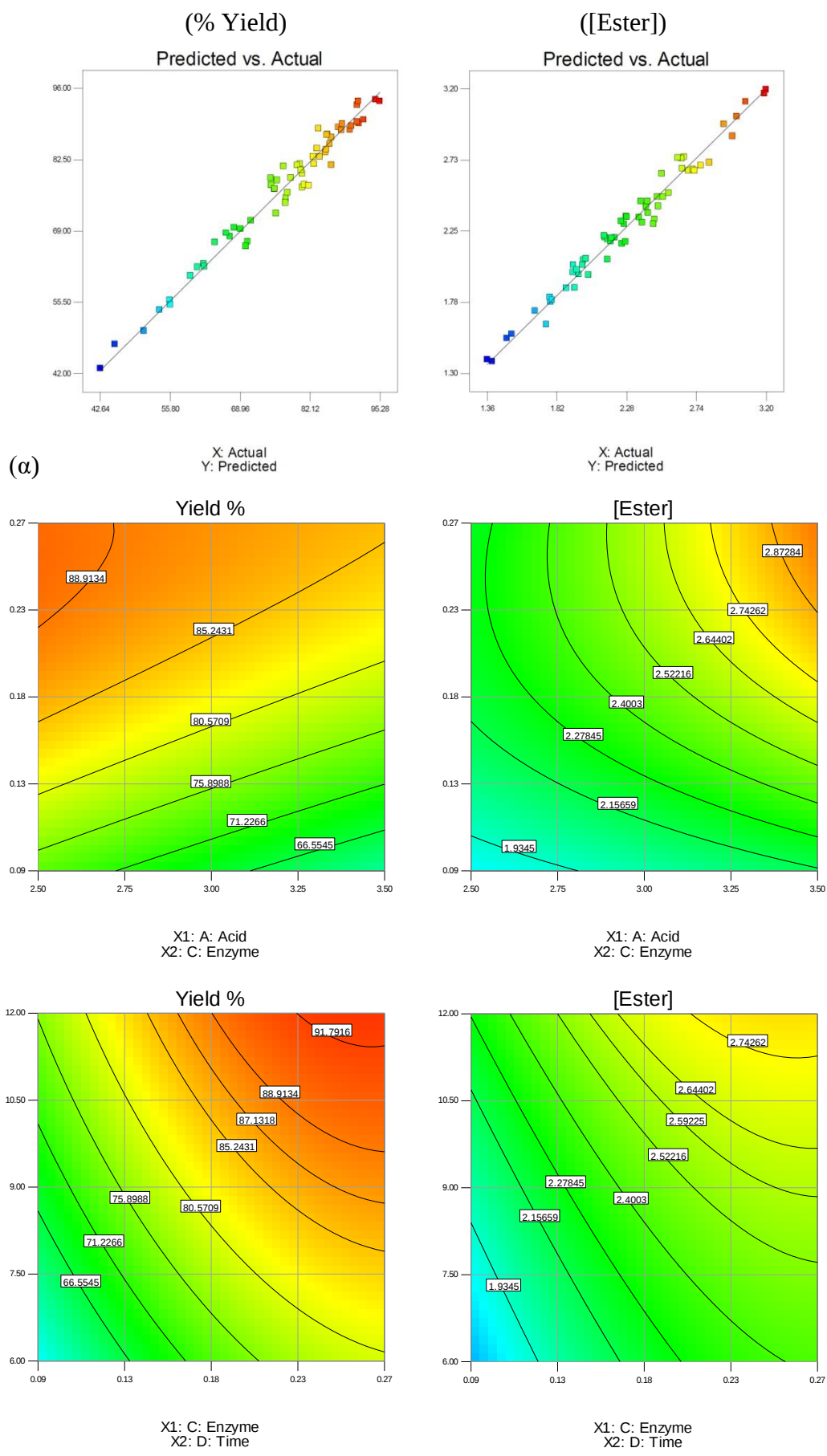


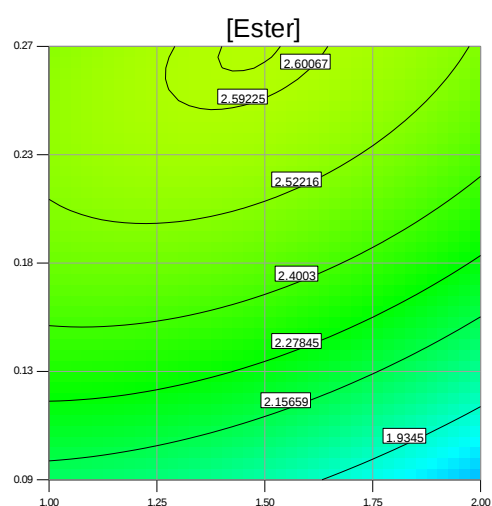
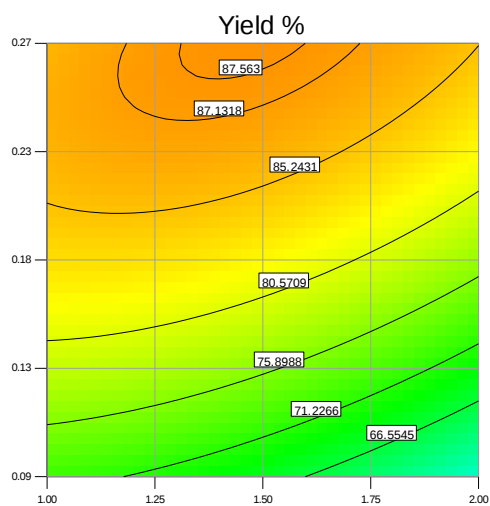
(ς)



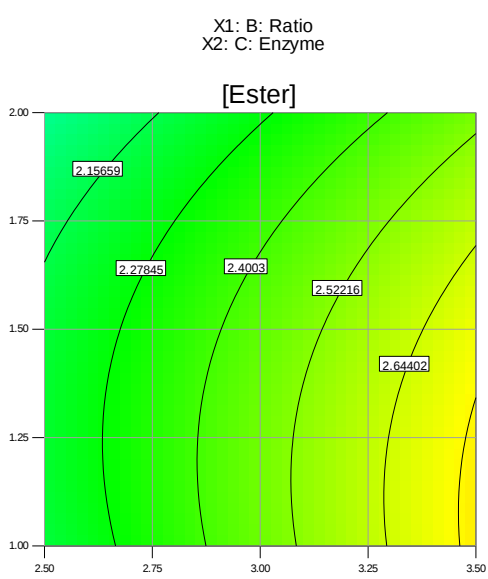
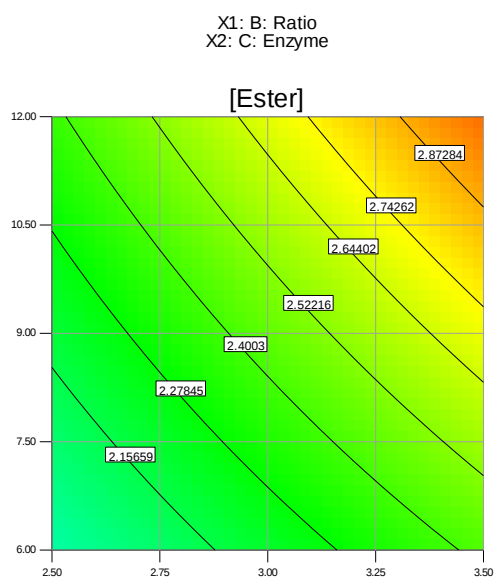
(ζ) Desirability = 0.836

Διάγραμμα 27: Σημαντικά αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού (εστεροποίηση με αιθανόλη όπου το παραγόμενο H_2O απομακρύνεται συνεχώς από τον αντιδραστήρα): (α) προβλεπόμενων ως προς αυτά των πραγματικών τιμών, (β) έως (ζ) περιγράμματα όπου απεικονίζονται οι πιο σημαντικές αλληλεπιδράσεις και (ζ) ράμπες όπου απεικονίζεται γραφικά η λύση του πειραματικού σχεδιασμού όπως αυτή προκύπτει από την ανάλυση πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA)

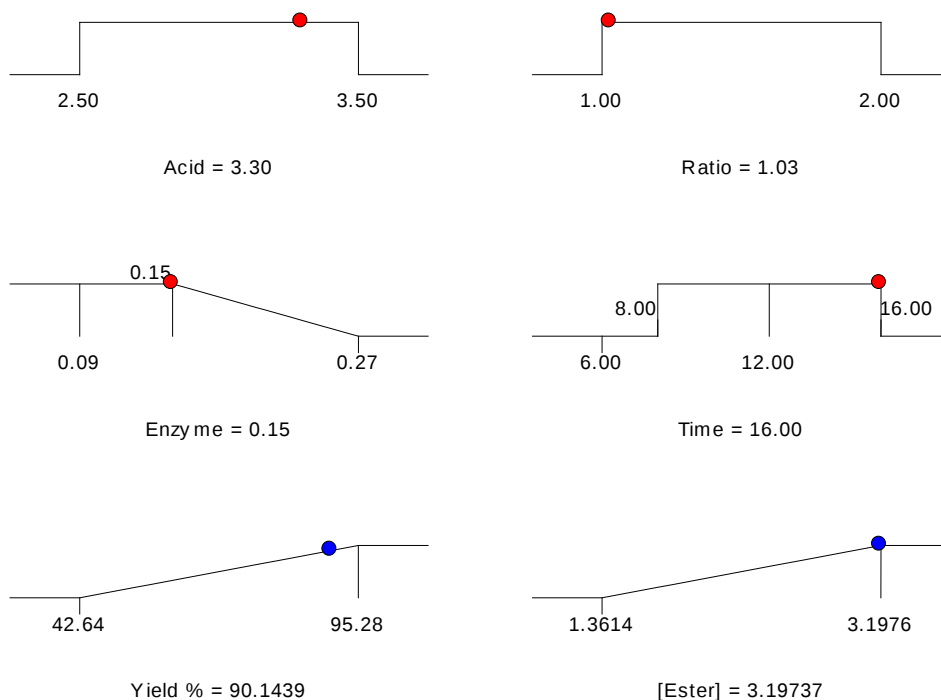




(δ)



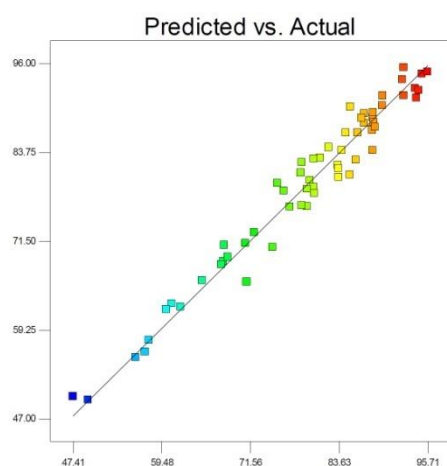
(ϵ)



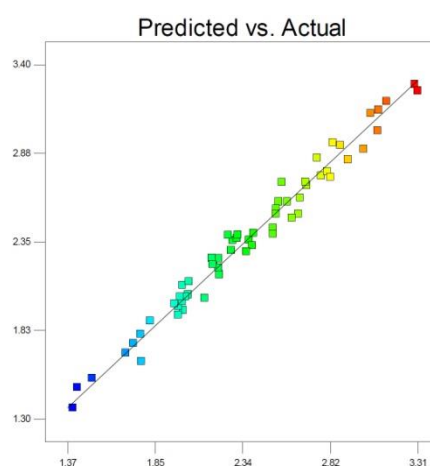
(ζ) Desirability = 0.954

Διάγραμμα 28: Σημαντικά αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού (εστεροποίηση με 1-βουτανόλη όπου το παραγόμενο H_2O παραμένει στον αντιδραστήρα): (α) προβλεπόμενων ως προς αυτά των πραγματικών τιμών, (β) έως (ε) περιγράμματα όπου απεικονίζονται οι πιο σημαντικές αλληλεπιδράσεις και (ζ) ράμπες όπου απεικονίζεται γραφικά η λύση του πειραματικού σχεδιασμού όπως αυτή προκύπτει από την ανάλυση πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA)

(% Yield)

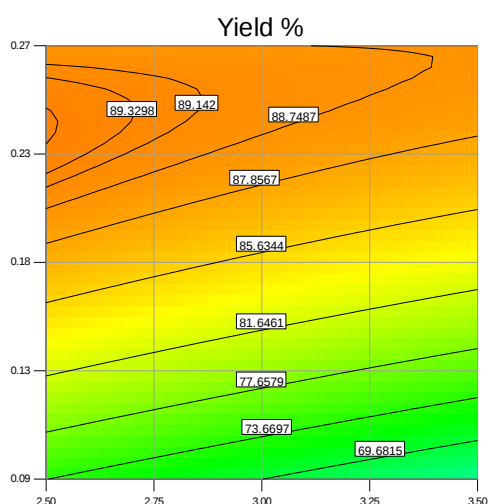


([Ester])

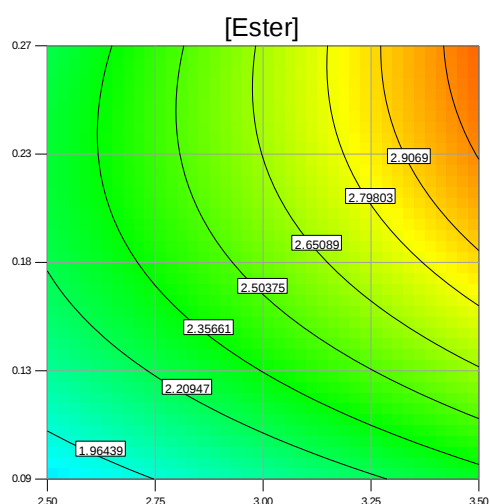


(α)

X: Actual
Y: Predicted

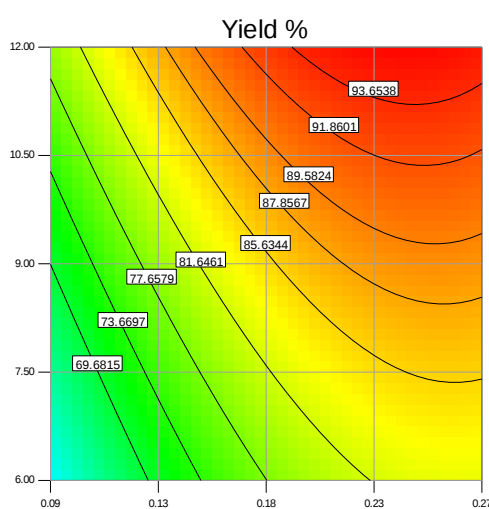


X: Actual
Y: Predicted

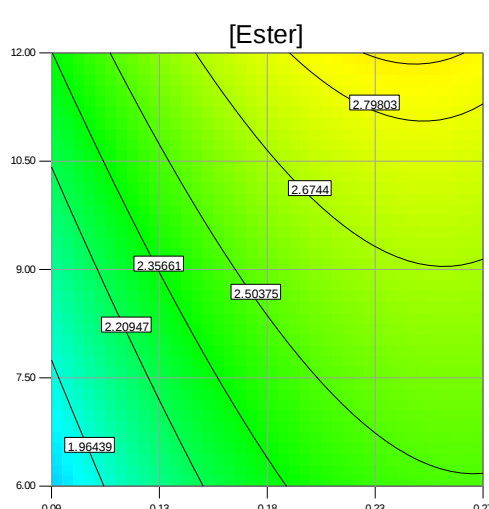


(β)

X1: A: Acid
X2: C: Enzyme



X1: A: Acid
X2: C: Enzyme



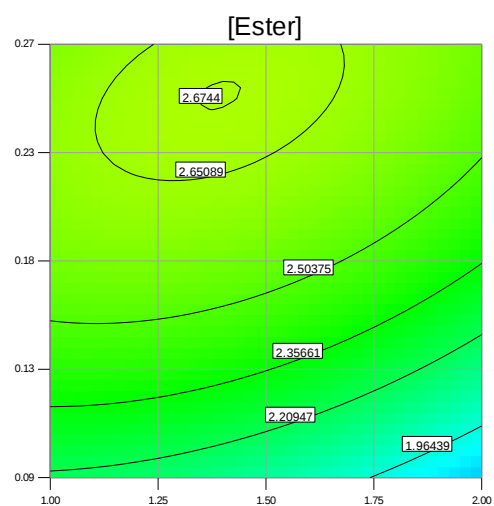
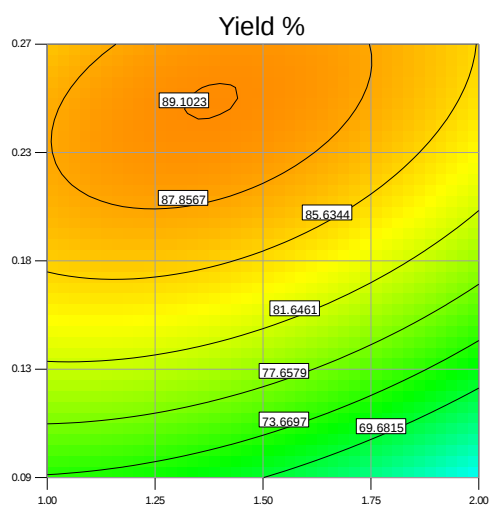
(γ)

X1: C: Enzyme
X2: D: Time

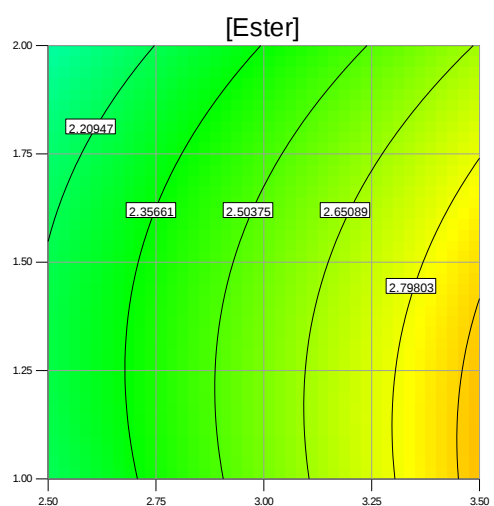
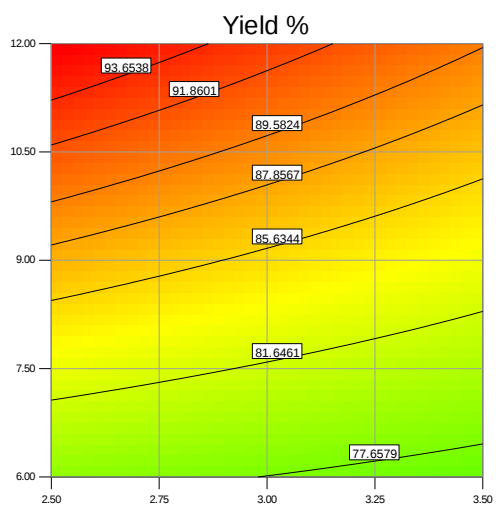


X1: C: Enzyme
X2: D: Time

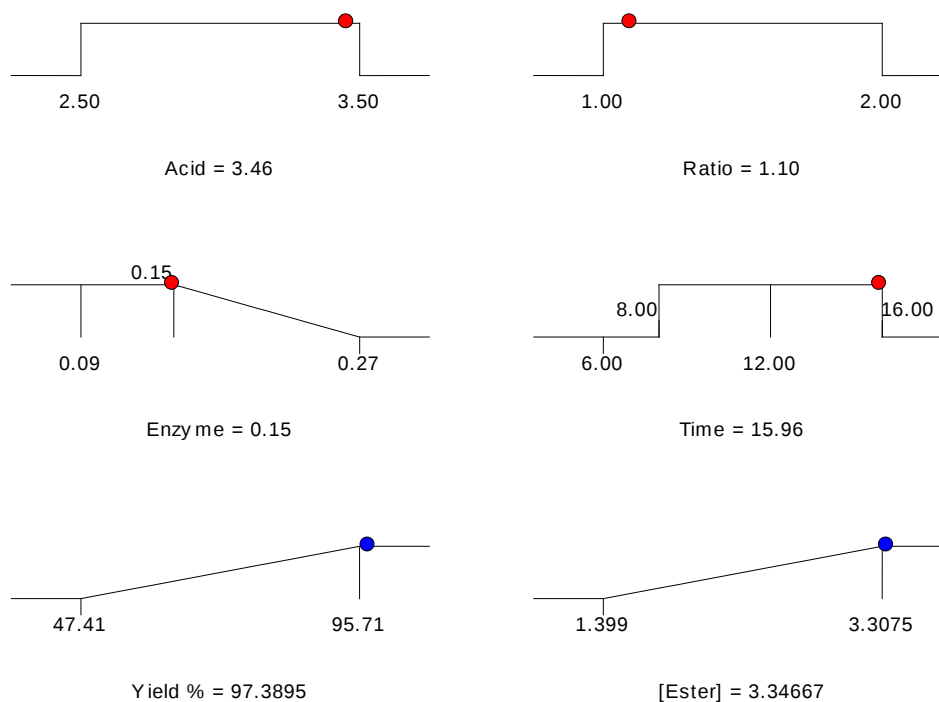




(δ)

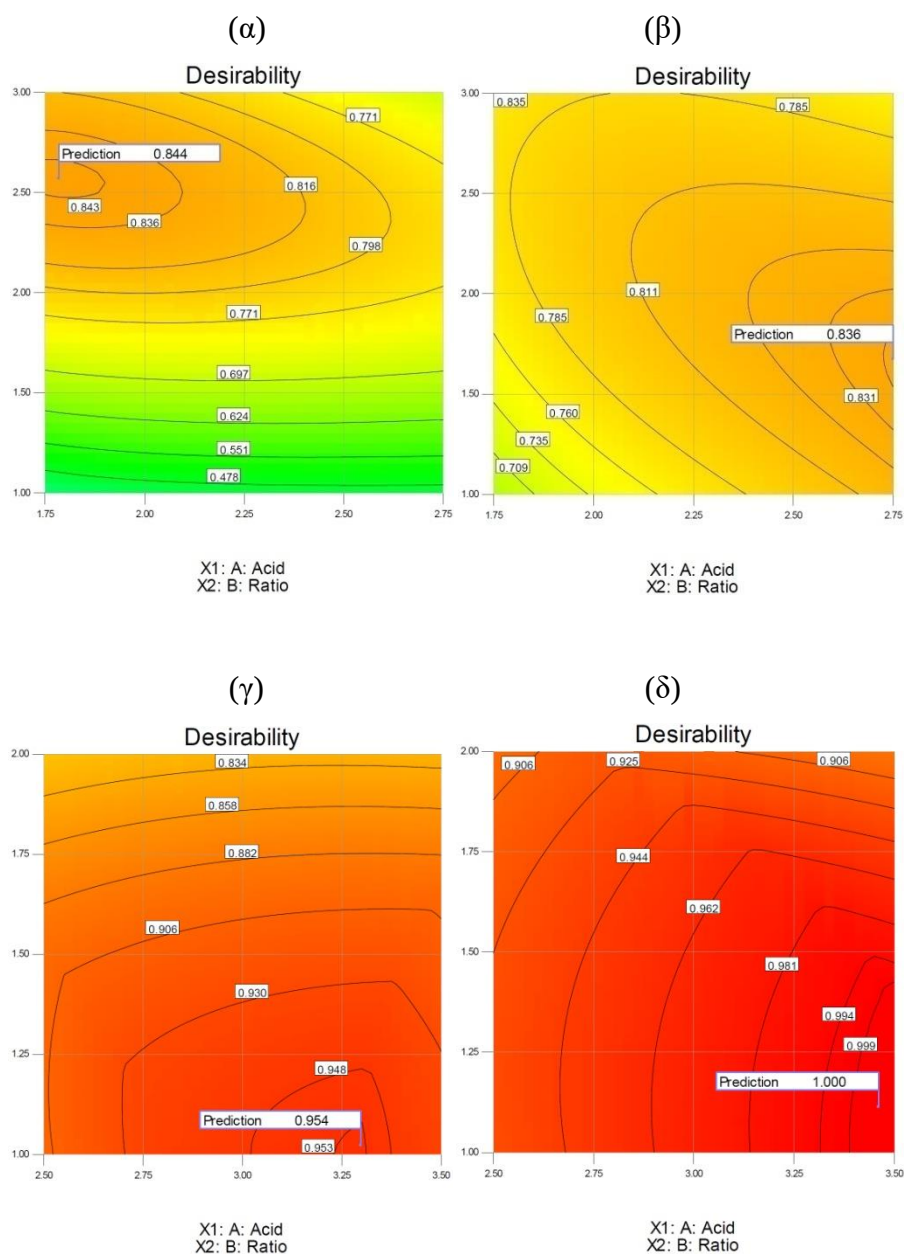


(ε)



(ς) Desirability = 1.000

Διάγραμμα 29: Σημαντικά αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού (εστεροποίηση με 1-βουτανόλη όπου το H_2O απομακρύνεται συνεχώς από τον αντιδραστήρα): (α) προβλεπόμενων ως προς αυτά των πραγματικών τιμών, (β) έως (ε) περιγράμματα όπου απεικονίζονται οι πιο σημαντικές αλληλεπιδράσεις και (ς) ράμπες όπου απεικονίζεται γραφικά η λύση του πειραματικού σχεδιασμού όπως αυτή προκύπτει από την ανάλυση πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA)



Διάγραμμα 30: Περιγράμματα των εκτιμώμενων τιμών της συνάρτησης επιθυμητού, στις περιπτώσεις εστεροποίησης με: (α) Αιθανόλη, ενώ το παραγόμενο H_2O διατηρούνταν στον αντιδραστήρα, (β) αιθανόλη, ενώ το παραγόμενο H_2O απομακρύνονταν συνεχώς από τον αντιδραστήρα, (γ) 1-βουτανόλη ενώ το παραγόμενο H_2O διατηρούνταν στον αντιδραστήρα, (δ) 1-βουτανόλη, ενώ το παραγόμενο H_2O απομακρύνονταν συνεχώς από τον αντιδραστήρα

III.Γ.1.1 Εστεροποιήσεις για την παραγωγή βιοκαυσίμου νέας γενιάς

Τα αποτελέσματα, τα οποία απεικονίζονται στον Πίνακα 24, αποδεικνύουν ότι το παραγόμενο H_2O , κατά τη διάρκεια και των τεσσάρων CALB-καταλυόμενων εστεροποιήσεων, επηρεάζει σημαντικά τόσο την % απόδοση όσο και την τελική συγκέντρωση των συντιθέμενων εστέρων ([Ester]). Επιπροσθέτως, παρατηρήθηκαν τα ακόλουθα ζητήματα: (α) αυξημένη υδροφοβία της 1-βουτανόλης, καθώς και η μείωση της υδροφιλικής φύσης της αιθανόλης, όταν το παραγόμενο H_2O απομακρύνεται συνεχώς από το μίγμα αντίδρασης, (β) η αξιοσημείωτη μείωση της συγκέντρωσης αιθανόλης που απαιτείται για την εστεροποίηση κάτω από συνθήκες συνεχούς άντλησης H_2O έναντι παρουσίας του, και (γ) την χρήση μόνο λίγων mg της CALB για την πραγματοποίηση των περιγραφόμενων εστεροποιήσεων. Σε προηγούμενες εργασίες, παρόλο που έχουν αναφερθεί υψηλά ποσοστά εστεροποίησης ($> 90\%$), ωστόσο τόσο οι συγκεντρώσεις των χρησιμοποιούμενων λιπαρών οξέων όσο και των παραγόμενων εστέρων είναι σε πολύ χαμηλά επίπεδα ($\leq 0.7\text{ M}$) σε σχέση με τις συγκεντρώσεις της παρούσας εργασίας, με αποτέλεσμα να επιτευχθεί αύξηση της τάξεως του 500% στην παραγωγή βιοκαυσίμου [141], [167], [168].

III.Γ.1.2. Σύγκριση σύνθεσης αιθύλεστέρα έναντι βουτύλεστέρα

Καθώς η εστεροποίηση πραγματοποιείται σε ένα περιβάλλον αυξημένης πολικότητας, όταν το παραγόμενο H_2O διατηρείται στο μίγμα της αντίδρασης, το μεγαλύτερο κλάσμα της υδρόφιλης αιθανόλης είναι αναμειγμένο στην υδατική φάση, ενώ υπό παρόμοιες συνθήκες, το αντίθετο φαίνεται ότι συμβαίνει για την υδρόφοβη 1-βουτανόλη, δηλαδή το μεγαλύτερο κλάσμα της βρίσκεται στην φάση του διαλύτη (κ-εξάνιο). Διαπιστώθηκε ότι στην πρώτη περίπτωση (αιθανόλη ως αλκοόλη εστεροποίησης), μικρότερη συγκέντρωση Μίγματος Α και υπό την παρουσία υψηλότερων συγκεντρώσεων αιθανόλης, απαιτούνταν για την απενεργοποίηση της CALB σε σχέση με την χρήση 1-βουτανόλη ως αλκοόλη για την εστεροποίηση. Αντίθετα όταν η υδροφιλικότητα του μίγματος της αντίδρασης δεν αυξάνεται λόγω της συνεχούς απομάκρυνσης του παραγόμενου H_2O , υψηλότερες συγκεντρώσεις Μίγματος Α απαιτούνται για την απενεργοποίηση της CALB και υπό την παρουσία μικρότερης συγκέντρωσης αλκοόλης (πολύ χαμηλότερης στην περίπτωση της 1-βουτανόλης). Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μπορούν να χρησιμοποιηθούν πολύ υψηλότερες

συγκεντρώσεις Μίγματος Α, όπου και αντιδρούν σχεδόν ισομοριακά με την 1-βουτανόλη όταν το παραγόμενο H_2O απομακρύνεται συνεχώς από το μίγμα της αντίδρασης. Αυτό είναι ένα λογικό, αλλά και επιθυμητό αποτέλεσμα το οποίο είναι περισσότερο πιθανό να βασίζεται στην υδροφοβικότητα της 1-βουτανόλης.

Αυτά τα αποτελέσματα δείχνουν σαφώς ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του Μίγματος Α (αν και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αλκοόλης), και σε περιβάλλοντα μειωμένης υδροφοβικότητας (παρουσία του παραγόμενου H_2O), προωθείται η αδρανοποίηση της CALB, η οποία αντανάκλαται τόσο στην υπολογισμένη % απόδοση εστέρα όσο και στην συγκέντρωση του παραγόμενου εστέρα, κάτι που πιθανότατα οφείλεται στην δραματική μείωση της τιμής pH στο μικροπεριβάλλον της ενεργού περιοχής της χρησιμοποιούμενης ακινητοποιημένης λιπάσης. Ένα αντίθετο γεγονός πιθανότατα συμβαίνει σε περιβάλλοντα υψηλότερης υδροφοβίας (απομάκρυνση του παραγόμενου H_2O , ή 1-βουτανόλη ως αλκοόλη εστεροποίησης).

Λόγω του ακινητοποιημένου ενζύμου η πολικότητα του διαλύτη, όσο αφορά την ευπλασία του ενζύμου δεν είναι μείζονος σημασίας, όπως αναφέρθηκε και στο Γενικό μέρος. Η 1-βουτανόλη δεν αναμιγνύεται με το παραγόμενο H_2O (πολύ μικρή αναμιξιμότητα) και αφού το ένζυμο είναι ακινητοποιημένο σε υδρόφοβη μήτρα το H_2O ουσιαστικά αποκλείεται από την τοπολογία της αντίδρασης με αποτέλεσμα να μην καταστρέφεται το ένζυμο (το μίγμα οξέων παρουσία H_2O , σε αντίθεση με την απουσία του, επηρεάζει την κατάσταση ιονισμού των καταλυτικών καταλοίπων στο μικροπεριβάλλον του ενζύμου) σε υψηλές συγκεντρώσεις οξέος (3.2 M παρουσία H_2O , 3.35 M απουσία του), παρά μόνο επηρεάζει την ισορροπία της αντίδρασης (η 1-βουτανόλη δεν είναι πλήρως μη αναμίξιμη με το H_2O) αποτρέποντας την να ξεπεράσει το 90 % και να φτάσει το 98 % που παρατηρήθηκε με την απομάκρυνσή του.

Αντίθετα η αιθανόλη είναι πλήρως αναμίξιμη με το H_2O με αποτέλεσμα χωρίς την απομάκρυνσή του η ισορροπία πάλι να μην ξεπερνά το 90 %, ενώ για συγκέντρωση Μίγματος Α μεγαλύτερη από 1.78 M το ένζυμο αδρανοποιείται για τους ίδιους λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω. Απουσία H_2O η αιθανόλη παρουσιάζει μειωμένες ταχύτητες αντίδρασης σε σχέση με την 1-βουτανόλη, λόγω της εκτεταμένης απομάκρυνσης σημαντικών μορίων H_2O από το ένζυμο που αυτή προκαλεί. Επιπλέον, η παρατηρούμενη μείωση της αναλογίας [αλκοόλης]/[Μίγμα Α] σε περισσότερο υδρόφοβα περιβάλλοντα (ειδικά για αιθανόλη) έχει διπλή έννοια: (α) υποδηλώνει μειωμένες ανάγκες για αλκοόλη οι οποίες συνοδεύονται από αυξημένη κατανάλωση οξέος, και (β) πλέον δεν χρειάζεται η αιθανόλη, μέσω της ελεγχόμενης απομάκρυνσης μορίων H_2O , να προστατέψει μερικώς το

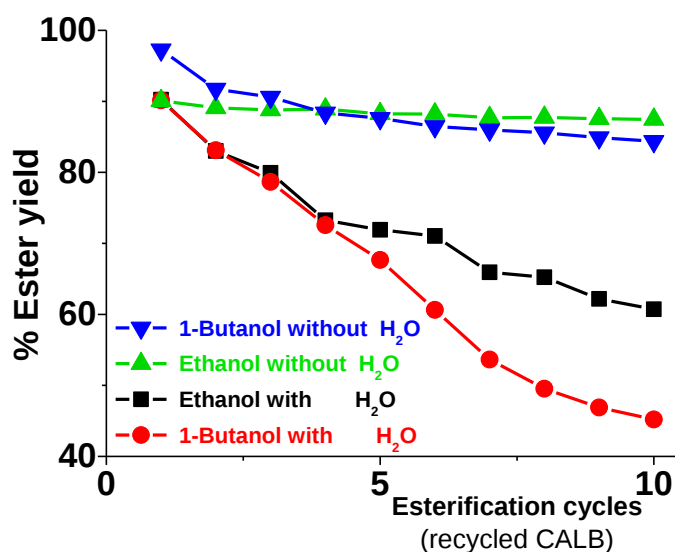
ένζυμο από το παραγόμενο H_2O (η αιθανόλη έχει την ικανότητα ευρισκόμενη στην κατάλληλη απόσταση, να σχηματίζει δεσμούς υδρογόνου με μόρια H_2O και να τα απομακρύνει από την επιφάνεια του ενζύμου), αφού αυτό απομακρύνεται, έτσι ο λόγος $[αλκοόλης]/[Μίγμα A]$ μειώνεται από το 2.6 στο 1.7, διότι επιπροσθέτως η αιθανόλη σε αντίθεση με την 1-βουτανόλη δημιουργεί αναστολή υποστρώματος σε υψηλές συγκεντρώσεις της.

Αν και δεν φαίνεται καθαρά, ωστόσο αυτά τα αποτελέσματα θα μπορούσαν να ερμηνευτούν από την επιρροή της τιμής pH, στα μελετώμενα μέσα αντίδρασης της ακινητοποιημένης λιπάσης. Φαίνεται πιο πιθανό τώρα ότι υποστρώματα όπως λιπαρά οξέα και αλκοόλες και υπό τις αναφερθείσες συνθήκες αντίδρασης (ιδιαίτερα παρουσία H_2O), συμβάλλουν στην διαμόρφωση της τιμής pH και στις επιπτώσεις που παρουσιάζει στην πυρηνόφιλη ισχύ και γενικά στην λειτουργία των καταλυτικών καταλοίπων στο μικροπεριβάλλον των χρησιμοποιούμενων ενζύμων [50]. Τέλος, τα συζητηθέντα αποτελέσματα σε αυτό το τμήμα είναι πολύ πιθανό να οφείλονται επιπλέον και στις θερμοδυναμικές ιδιότητες των χρησιμοποιούμενων αλκοολών (αιθανόλη και 1-βουτανόλη), οι οποίες επηρεάζουν τον τρόπο σύνδεσής τους επάνω στην CALB, και έτσι επάγουν θετικές είτε αρνητικές επιπτώσεις στα αποτελέσματα της εστεροποίησης.

III.Γ.1.3. Κύκλοι επαναχρησιμοποίησης της CALB και η σημασία του παραγόμενου H_2O

Δεν είναι ασυνήθιστο να λαμβάνεται υπόψη το κόστος των συνθετικών αντιδράσεων, ειδικά των ενζυμικών, καθώς τα ένζυμα είναι γενικά ακριβά αντιδραστήρια και ιδιαίτερα οι ακινητοποιημένες μορφές τους, ως εκ τούτου, η επαναχρησιμοποίηση της CALB συμβάλει σημαντικά στη μείωση του κόστους παραγωγής της προτεινόμενης νέας γενιάς βιοκαυσίμων. Όπως αναλύθηκε και στην ενότητα II.C.1.1.1., διεξήχθησαν δέκα διαδοχικές εστεροποιήσεις χρησιμοποιώντας την ανακυκλωμένη CALB, είτε με αιθανόλη είτε με 1-βουτανόλη ως αλκοόλη εστεροποίησης, και στις δύο περιπτώσεις με τη διατήρηση του παραγόμενου H_2O στο μίγμα της αντίδρασης, καθώς και με τη συνεχή αφαίρεση του μέσω των χρησιμοποιούμενων συσκευών (Ενότητα II.C.1), όπως απεικονίζεται στο Διάγραμμα 31 [141]. Η CALB έδειξε σημαντική σταθερότητα μετά από δέκα συνεχείς κύκλους εστεροποίησης υπό άνυδρες συνθήκες, παρουσιάζοντας στο τέλος των δέκα κύκλων

εστεροποίησης απόδοση 90 %, ενώ με την διατήρηση του παραγόμενου H_2O στο μίγμα της αντίδρασης παρουσιάστηκε σημαντική πτώση στο ποσοστό εστεροποίησης, έως και 55 %.

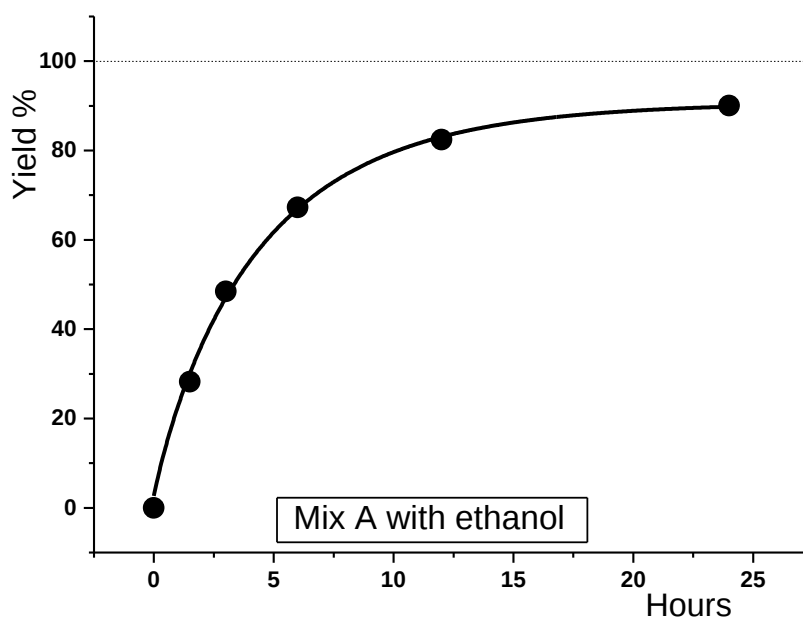


Διάγραμμα 31: Γραφική απεικόνιση της σταθερότητας που παρουσιάζει η λιπάση CALB μετά από δέκα συνεχείς κύκλους εστεροποίησης, υπό τις συνθήκες αντίδρασης που περιγράφονται στο κείμενο και με την χρήση τόσο αιθανόλης όσο και 1-βουτανόλης. Θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη έμφαση στο ότι με συνεχή απομάκρυνση του παραγόμενου H_2O από τα μίγματα αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις του Μίγματος Α.

III.Γ.1.4. Απομάκρυνση του παραγόμενου H_2O σε αντιδράσεις εστεροποίησης, με μεμβράνη υπερεξάτμισης

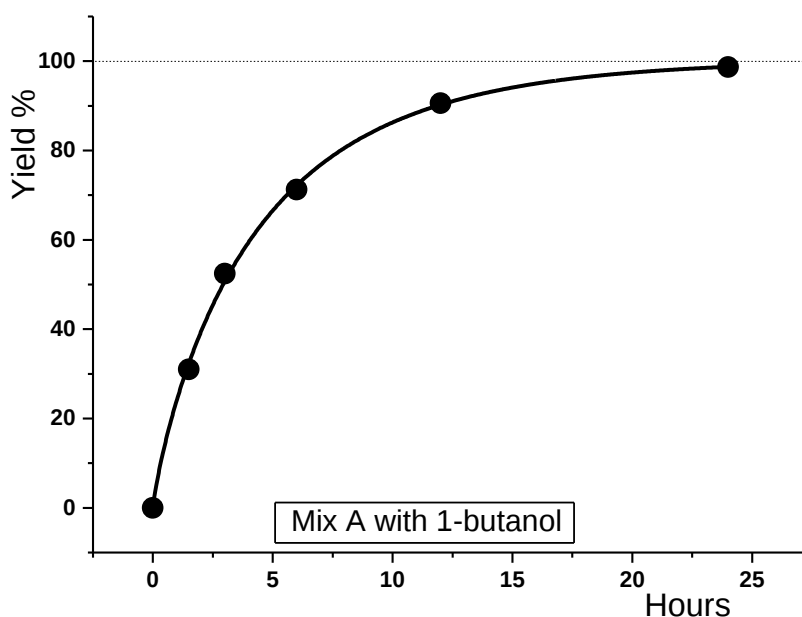
Τα αποτελέσματα των εστεροποιήσεων στις βέλτιστες συνθήκες όπως αυτές παρουσιάστηκαν στην ενότητα II.C.1.1.2. αναλύονται παρακάτω:

Στον αντιδραστήρα-3, όπου το παραγόμενο νερό απομακρύνονταν με μεμβράνη υπερεξάτμισης (per vaporation), η καμπύλη προόδου της αντίδρασης εστεροποίησης του Μίγματος Α με αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο, παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 32, το ποσοστό εστεροποίησης μετά από 16 ώρες ήταν στο 85.6 %, ενώ στις 24 ώρες άγγιζε το 90.6 %.



Διάγραμμα 32: Καμπύλη προόδου της αντίδρασης εστεροποίησης του Μίγματος Α με αιθανόλη μέσω της CALB

Στον αντιδραστήρα-3 η καμπύλη προόδου της αντίδρασης εστεροποίησης του Μίγματος Α με 1-βουτανόλη παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 33. Το ποσοστό εστεροποίησης μετά από 16 ώρες ήταν στο 95.6 %, ενώ στις 24 ώρες άγγιξε το 98.65 %.



Διάγραμμα 33: Καμπύλη προόδου της αντίδρασης εστεροποίησης του Μίγματος Α με 1-βουτανόλη μέσω της CALB

Παρατηρείται ότι και με τους δύο αντιδραστήρες, παίρνονται παρόμοια ποσοστά εστεροποίησης για την 1-βουτανόλη, ενώ για την αιθανόλη εμφανίζονται ελαφρώς μειωμένα, πιθανότατα επειδή ένα μικρό ποσοστό της αιθανόλης ήταν ικανό να διαπεράσει την διαχωριστική μεμβράνη υπερεξάτμισης (per vaporization) και το οποίο είχε ως αποτέλεσμα να αλλοιωθεί ο λόγος της αιθανόλης προς Μίγμα Α. Τέτοια φαινόμενα δεν παρατηρήθηκαν κατά την εστεροποίηση με 1-βουτανόλη. Προφανώς η 1-βουτανόλη αλλά και οι παραγόμενοι εστέρες λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους τους, αλλά και της μικρότερης συγγένειας τους με το υλικό της μεμβράνης, δεν κατάφεραν να την διαπεράσουν.

III.Γ.2. Πειραματικός σχεδιασμός με την λιπάση LipA

Από την εφαρμογή των δύο πειραματικών σχεδιασμών, όπως αναλύθηκε και στην ενότητα II.C.1.2., λήφθηκαν οι αποκρίσεις, % απόδοση και συγκέντρωση του συντιθέμενου εστέρα, για κάθε ένα από τα 18 πειράματα ανά πειραματικό σχεδιασμό. Οι τιμές των αποκρίσεων για την ανάπτυξη των μοντέλων απεικονίζονται στην ενότητα II.C.1.2. ενώ η ανάλυσή τους παρουσιάζεται παρακάτω και βασίστηκε στους μελετηθέντες παράγοντες,

δηλαδή % αρχικό H₂O, [Μίγματος A], [αλκοόλης]/[Μίγματος A] (αιθανόλη ή 1-βουτανόλη). Επιπλέον, οι επιδράσεις και η σημαντικότητα των παραμέτρων εστεροποίησης αξιολογήθηκαν με εφαρμογή της ανάλυσης διασποράς κατά δύο παράγοντες (Two-way ANOVA) (Πίνακας 26). Προφανώς, και σε όλες τις περιπτώσεις που εμφανίζονται στον Πίνακα 26, όλοι οι παράμετροι έχουν εκτιμηθεί ως σημαντικοί (p-τιμές ≤ 0.05), συμπεριλαμβανομένων αυτών που αναφέρονται στα μοντέλα και τους επιλεγμένους όρους τους (όπως A, B, C, AB, AC, BC, A², B², C²). Εξάλλου σε όλες τις περιπτώσεις, οι εκτιμώμενες τιμές των Adjusted-R² και Predicted-R² είναι σε πλήρη συμφωνία μεταξύ τους, καθώς και η τιμές του Adequate Precision είναι πολύ μεγαλύτερες του τέσσερα (> 4) όπως απαιτείται [166].

Στη συνέχεια, οι συντελεστές παλινδρόμησης των εξεταζόμενων μοντέλων δεύτερου βαθμού υπολογίστηκαν (Πίνακας 27) και χρησιμοποιήθηκαν για τη κατάστρωση των αντίστοιχων εξισώσεων, των οποίων η γενική μορφή απεικονίζεται στην Εξίσωση 43. Στην συνέχεια στα Διαγράμματα 34 και 35 παρατίθενται: τα διαγράμματα προβλεπόμενων ως προς αυτά των πραγματικών τιμών (predicted vs. actual data), τα περιγράμματα (contours) όπου απεικονίζονται οι πιο σημαντικές αλληλεπιδράσεις αλλά και τα διαγράμματα των κύριων επιδράσεων (main effect) όπου κρίνεται απαραίτητο. Ακολουθούν τα διαγράμματα των ραμπών (ramps) όπου απεικονίζεται γραφικά η λύση του κάθε πειραματικού σχεδιασμού όπως αυτή προκύπτει από την ανάλυση πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA) [131] και παρουσιάζεται αναλυτικά στον Πίνακα 28. Τέλος ακολουθούν τα περιγράμματα του επιθυμητού της κάθε λύσης (Διάγραμμα 36).

Πίνακας 26: Πειραματικός σχεδιασμός (τμήμα ANOVA των αποκριτών επιφανειών των απλοποιημένων μοντέλων δευτέρου βαθμού): Επιδράσεις και σημαντικότητα (significance) των παραμέτρων εστεροποίησης ^{α, β}

Το H ₂ O δεν απομακρύνονταν από των αντιδραστήρα				
ΑΘΡΟΙΣΜΑΤΑ ΤΕΤΡΑΓΩΝΩΝ				
Source	με αιθανόλη		με 1-βουτανόλη	
	% Yield	[Ester]	% Yield	[Ester]
Model	4149.01	8.108E-3	9076.13	0.065
A-Water			169.44	1.731E-3
B-Acid	2632.38	5.314E-3	6628.78	6.686E-3
C-Ratio	131.35	6.057E-4	1891.78	0.026
AC				1.916E-3
BC	182.31	9.170E-4		5.141E-3
A ²				1.471E-3
B ²	1202.97	1.271E-3		0.021
C ²			386.12	6.909E-3
Residual	174.37	1.452E-3	849.58	4.012E-3
Lack of Fit	168.33	1.378E-3	654.89	1.647E-3
Pure Error	6.04	7.398E-5	194.70	2.365E-3
Corr Total	4323.38	9.560E-3	9925.71	0.069

^αΣε όλες τις περιπτώσεις, οι *p*-τιμές υπολογίστηκαν ως σημαντικές, εκτός από αυτές της έλλειψης προσαρμογής (Lack-of-fit) όπου υπολογίστηκαν ως μη σημαντικές.

^βΟι μέσες τιμές των *Adjusted R²* και *Predicted R²*, υπολογίστηκαν ως 0.94 και 0.89 αντίστοιχα, ενώ οι υπολογισμένες τιμές των *Adeq. Precision* σε όλες τις περιπτώσεις ήταν πολύ μεγαλύτερες του τέσσερα

Πίνακας 27: Υπολογιζόμενες τιμές των συντελεστών παλινδρόμησης των εξεταζόμενων μοντέλων δευτέρου βαθμού ^α

Factor	Το H ₂ O δεν απομακρύνονταν από των αντιδραστήρα			
	με αιθανόλη		με 1-βουτανόλη	
	% Yield	[Ester]	% Yield	[Ester]
Intercept	114.85	0.17	85.33	-0.255
A-Water			-3.52	9.326E-4
B-Acid	-448.39	-0.57	-146.87	1.075
C-Ratio	-14,24	-0.03	33.05	0.047
AC				0.015
BC	31.82	0.07		0.169
A ²				-0.011
B ²	417.41	0.43		-1.807
C ²			-5.32	-0.023

^αΤα τυπικά σφάλματα των παραγόντων που υπολογίστηκαν ήταν σχετικά μικρά ($0.8 \% \leq str\ error \leq 9 \%$). Σε όλες τις περιπτώσεις οι συντελεστές συσχέτισης ήταν $R^2 > 0.95$.

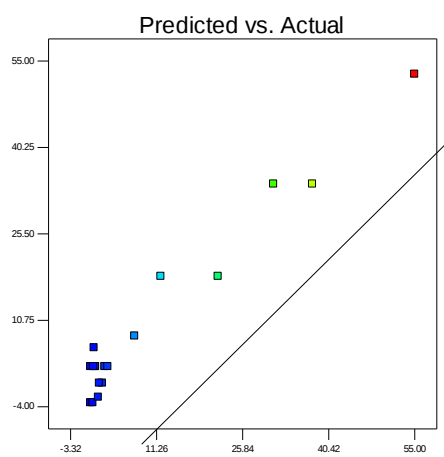
Πίνακας 28: Βελτιστοποιημένοι παράμετροι των αντιδράσεων εστεροποίησης όπως αυτοί προκύψαν από την ανάλυση πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA) ^α

Παράμετρος	Το H ₂ O δεν απομακρύνονταν από τον αντιδραστήρα	
	Εστεροποιούμενες αλκοόλες	
	με αιθανόλη	με 1-βουτανόλη
% H ₂ O	No effect	1.4
[Μίγμα A] (M)	0.20	0.27
Λόγος = [αλκοόλη]/[Μίγμα A]	1.00	2.76
% Απόδοση (εστέρας)	34	91
[Εστέρας] ^β (M)	0.06	0.25
Επιθυμητό %	0.65	0.84

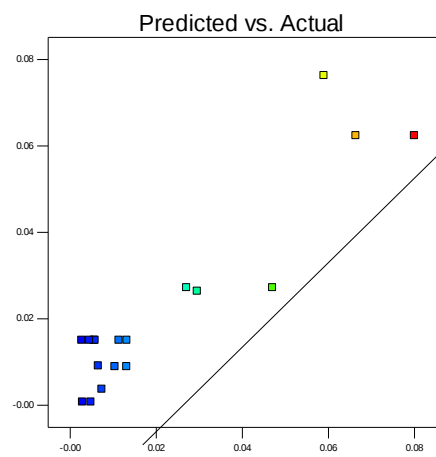
^αΌλες οι αντιδράσεις εστεροποίησης διεξήχθησαν εντός 16 ωρών, χρησιμοποιώντας 0.36 g LipA στους $\theta = 40^\circ\text{C}$

^βΗ τελική συγκέντρωση εστέρα στο μίγμα της αντίδρασης

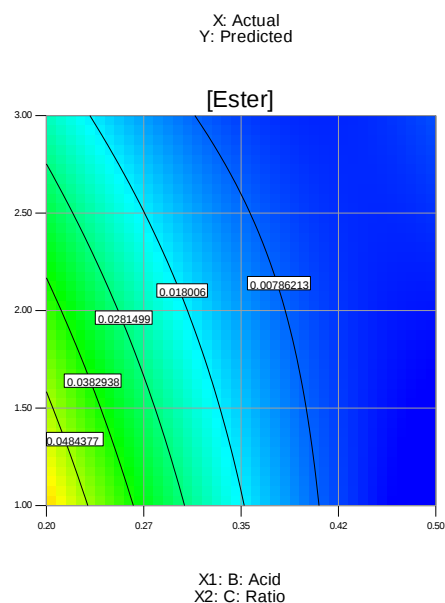
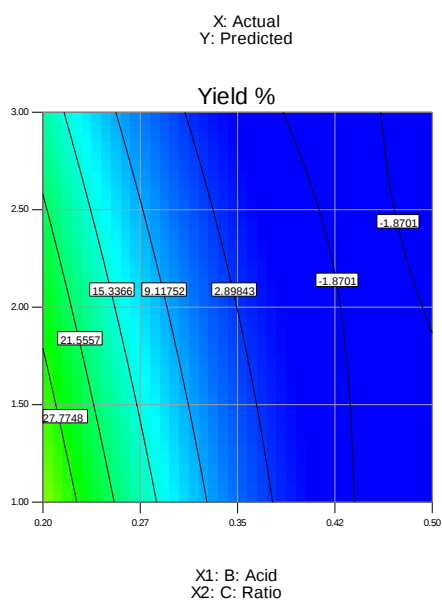
(% Yield)



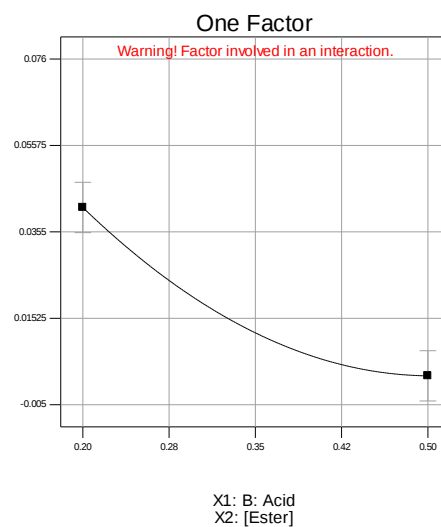
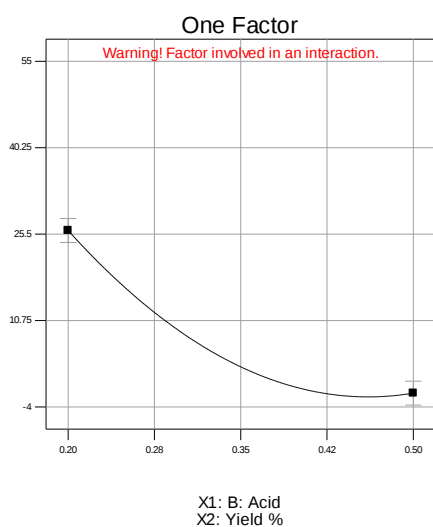
([Ester])



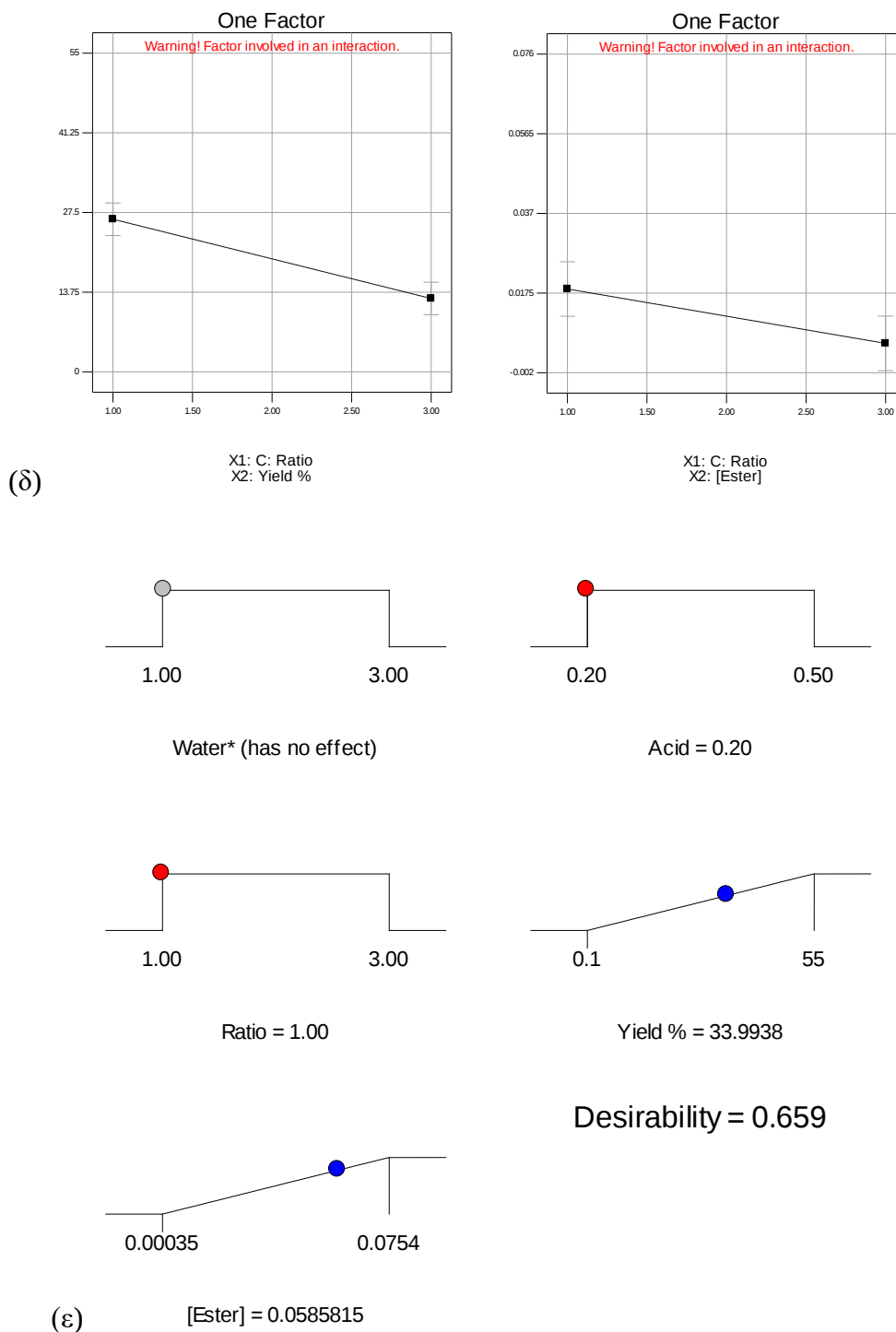
(α)



(β)

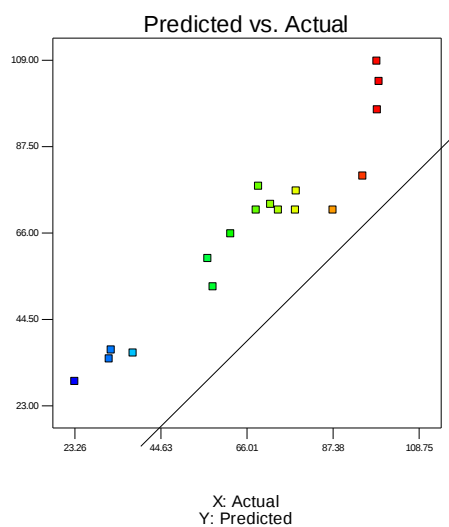


(γ)

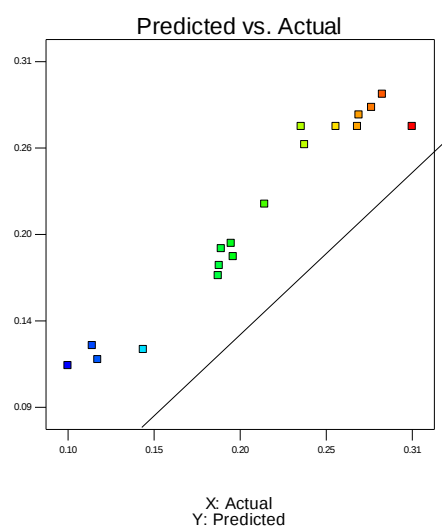


Διάγραμμα 34: Σημαντικά αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού (εστεροποίηση με αιθανόλη όπου το παραγόμενο H_2O παραμένει στον αντιδραστήρα): (α) προβλεπόμενων ως προς αυτά των πραγματικών τιμών, (β) έως (δ) περιγράμματα όπου απεικονίζονται οι πιο σημαντικές αλληλεπιδράσεις και (ε) ράμπες όπου απεικονίζεται γραφικά η λύση του πειραματικού σχεδιασμού όπως αυτή προκύπτει από την ανάλυση πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA).

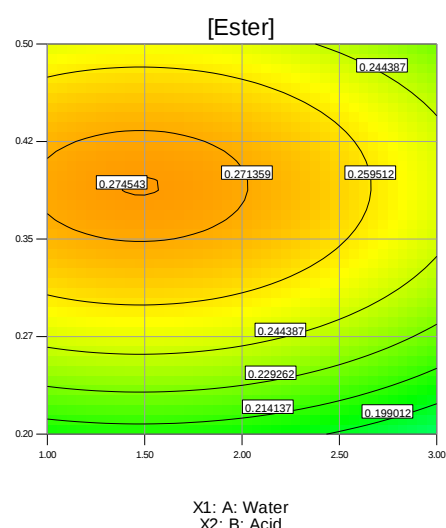
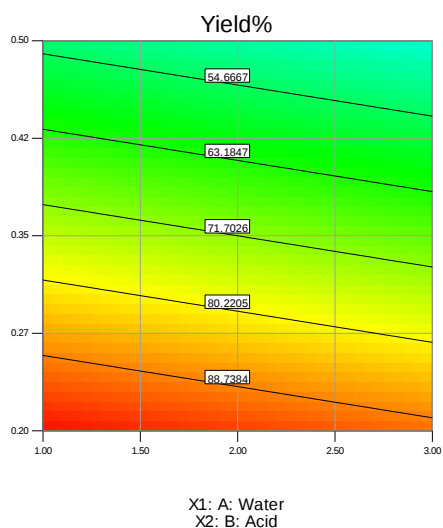
(% Yield)



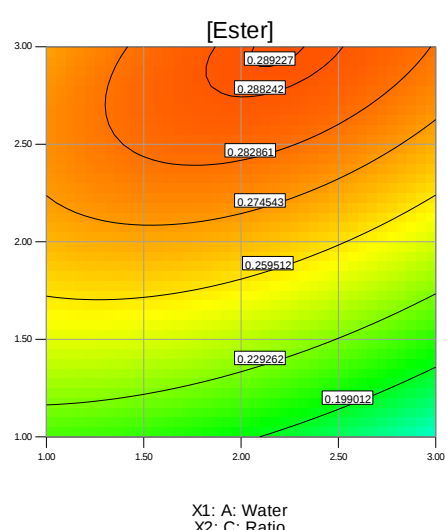
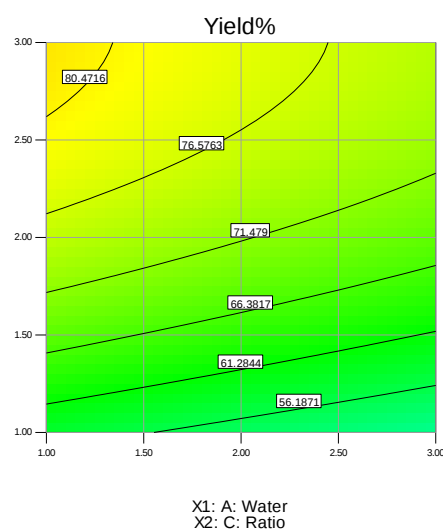
([Ester])



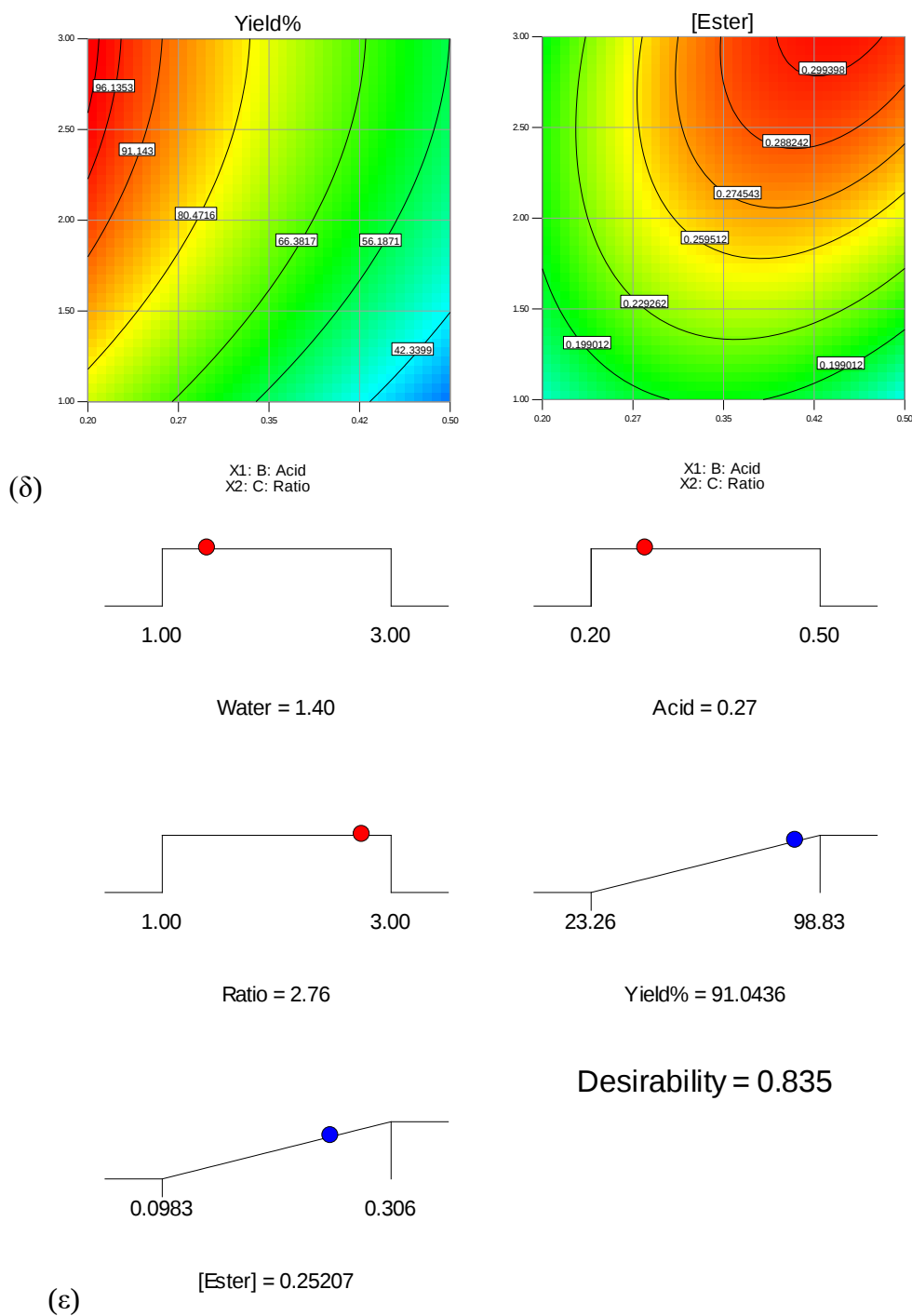
(α)



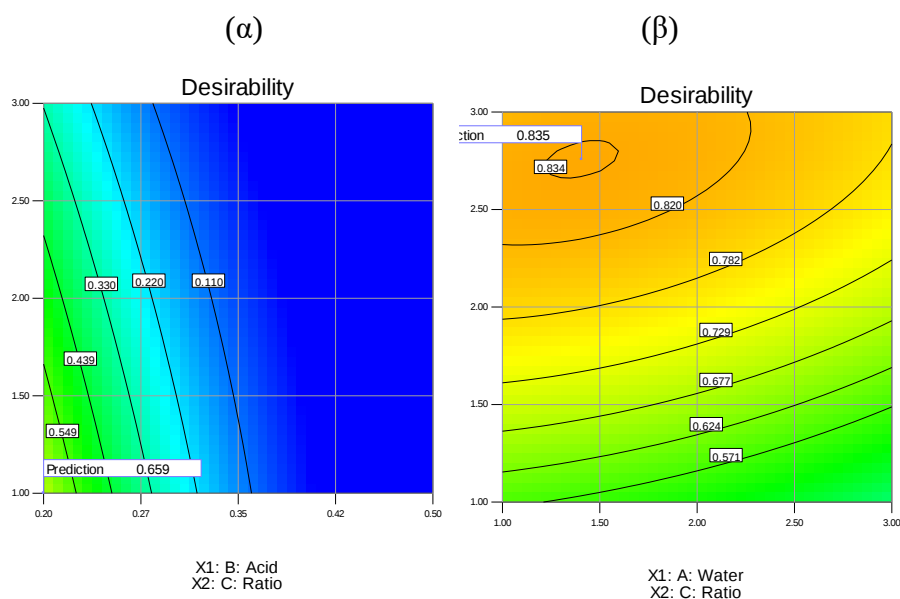
(β)



(γ)



Διάγραμμα 35: Σημαντικά αποτελέσματα του πειραματικού σχεδιασμού (εστεροποίηση με 1-βουτανόλη όπου το παραγόμενο H_2O παραμένει στον αντιδραστήρα): (α) προβλεπόμενων ως προς αυτά των πραγματικών τιμών, (β) έως (δ) περιγράμματα όπου απεικονίζονται οι πιο σημαντικές αλληλεπιδράσεις και (ε) ράμπες όπου απεικονίζεται γραφικά η λύση του πειραματικού σχεδιασμού όπως αυτή προκύπτει από την ανάλυση πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA).



Διάγραμμα 36: Περιγράμματα των εκτιμώμενων τιμών της συνάρτησης επιθυμητού, στις περιπτώσεις εστεροποίησης με: (α) Αιθανόλη, ενώ το παραγόμενο H_2O διατηρούνταν στον αντιδραστήρα, (β) 1-βουτανόλη ενώ το παραγόμενο H_2O διατηρούνταν στον αντιδραστήρα.

III.Γ.2.1. Εστεροποιήσεις για την παραγωγή βιοκαυσίμου νέας γενιάς

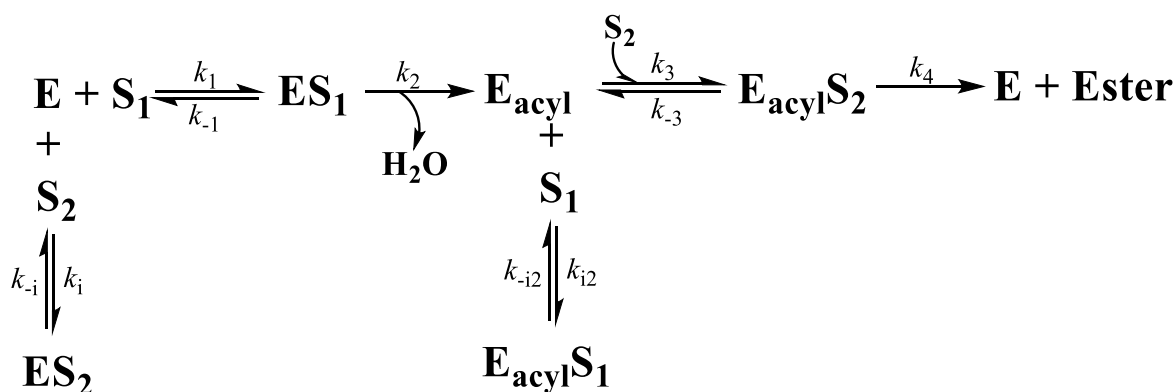
Από πειράματα προ-πειραματικού σχεδιασμού βρέθηκε ότι η LipA για αρχικό $H_2O < 1 \%$ αδρανοποιούνταν πλήρως, επομένως δεν έχει νόημα η απομάκρυνση του παραγόμενου H_2O κατά την διάρκεια της αντίδρασης όπως γίνονταν στην περίπτωση της CALB. Τα αποτελέσματα, τα οποία απεικονίζονται στον Πίνακα 28, δείχνουν ότι με την χρήση της αιθανόλης ως αλκοόλης εστεροποίησης στο μελετηθέν εύρος, το H_2O δεν έχει επίδραση στις μετρούμενες αποκρίσεις. Εδώ ο παράγοντας που κυριαρχεί είναι η ισχυρά αρνητική επίπτωση της αύξησης της συγκέντρωσης του οξέος, αποτρέποντας τόσο την % απόδοση να φτάσει σε τιμές μεγαλύτερες του 34 % όσο και την τελική συγκέντρωση των συντιθέμενων εστέρων να φτάσει σε τιμές μεγαλύτερες από 0.06 M. Από την άλλη, η εστεροποίηση του Μίγματος A με 1-βουτανόλη μέσω της LipA επηρεάζεται από το ποσοστό του H_2O στο μίγμα της αντίδρασης και η βέλτιστη τιμή του βρίσκεται στο 1.4 %. Όπως και στην περίπτωση της αιθανόλης ο κυρίαρχος παράγοντας είναι και εδώ η συγκέντρωση του οξέος, που όμως εδώ η 1-βουτανόλη και ο αυξημένος λόγος της, ίσως με 2.75 (θετική επίδραση σε σχέση με την αρνητική που έχει η αιθανόλη), επιτρέπουν σε [Μίγματος A] ίση με 0.27 M να επιτευχθεί απόδοση 91 %.

Η LipA, σε αντίθεση με την CALB, είναι μέσω πολλαπλών ομοιοπολικών δεσμών ακινητοποιημένη στην υδρόφιλη μήτρα με αποτέλεσμα να είναι πολύ πιο άκαμπτη (λιγότερο flexible). Παράλληλα το καταλυτικό της κέντρο σε αντίθεση πάλι με αυτό της CALB είναι πλήρως εκτεθειμένο στο διαλύτη, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να συγκρατήσει τα απαραίτητα μόρια H_2O για την διατήρηση της ενζυμικής της δραστηριότητας. Λόγω αυτών των συνθηκών η LipA απαιτεί αυξημένα ποσοστά H_2O για να είναι λειτουργική. Η 1-βουτανόλη η οποία είναι λιγότερο πολική (άρα παρουσιάζει μειωμένη ικανότητα απομακρύνσεις μορίων H_2O) και έχει μεγαλύτερο $\log P$ (Μέτρο της υδροφοβικότητας των διαλυτών, P είναι ο συντελεστής κατανομής μιας ένωσης μεταξύ οκτανόλης και H_2O) σε σχέση με την αιθανόλη, βοηθάει την LipA στην δημιουργία και διατήρηση των απαραίτητων συμπλεγμάτων H_2O στην επιφάνειά της, αλλά και των πιο κρίσιμων κρυσταλλογραφικών H_2O . Βέβαια το γεγονός ότι είναι απαραίτητο το H_2O , σε αντίθεση πάλι με την CALB που δρούσε κάτω από σχεδόν άνυδρες συνθήκες, την κάνει να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητη στις υψηλές συγκεντρώσεις οξέος λόγω της μείωσης της τιμής pH στο μικροπεριβάλλον του ενζύμου, όπως αναλύθηκε και στην Ενότητα III.C.1.2..

III.Γ.3. Κινητική αντιδράσεων εστεροποίησης με δύο υποστρώματα

III.Γ.3.1. Πορεία της αντίδρασης και το Κ.Ι.Ε. σε σύστημα τύπου ring-pong bi-bi με αναστολή δύο υποστρωμάτων

Στην ενότητα I.7.2.4.2. περιγράφηκε η ανταγωνιστική αναστολή του υποστρώματος που προκύπτει από το συνδυασμό του S_2 με το E για την παραγωγή ενός συμπλόκου αδιεξόδου ES_2 . Στην περίπτωση της εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με αιθανόλη τα πράγματα περιπλέκονται περεταίρω από την δράση των δύο υποστρωμάτων (όπου S_1 είναι το οξύ και S_2 είναι η αλκοόλη) και ως αναστολείς. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα εκτός από το σύμπλοκο αδιεξόδου ES_2 να υπάρχει ακόμα ένα, το $E_{acyl}S_1$ (Σχήμα 21). Έτσι η πορεία της αντίδρασης για σύστημα τύπου ring-pong bi-bi με αναστολή και από τα δύο υποστρώματα γίνεται:



Σχήμα 21: Πορεία αντίδρασης για σύστημα τύπου ring-pong bi-bi με αναστολή και από τα δύο υποστρώματα

Η εξίσωση ταχύτητας που περιγράφει τέτοια συστήματα απουσία προϊόντων παράγεται με την μέθοδο King-Altman, όπως αυτή αναλύθηκε στην ενότητα I.7.2.1. και είναι η εξής:

$$\frac{V}{[E]_0} = \frac{k_{cat} [S_1] [S_2]}{K_{mS_1} [S_2] \left(1 + \frac{[S_2]}{K_{iS_2}} \right) + K_{mS_2} [S_1] \left(1 + \frac{[S_1]}{K_{iS_1}} \right) + [S_1] [S_2]} \quad (54)$$

Οι παράμετροι της εξίσωσης ταχύτητας για πορείες αντίδρασης σε σύστημα τύπου ring-pong bi-bi με αναστολή υποστρώματος τόσο από το S_1 όσο και από το S_2 αναλύονται στις περισσότερες πολύπλοκες σχέσεις. Αποδεικνύεται, λοιπόν, ότι ισχύουν οι ακόλουθες σχέσεις:

$$\begin{aligned}
k_{\text{cat}} &= \frac{k_2 k_4}{k_2 + k_4}, K_{\text{mS}_1} = \frac{k_4(k_{-1} + k_2)}{k_1(k_2 + k_4)}, \\
K_{\text{mS}_2} &= \frac{k_2(k_3 + k_4)}{k_3(k_2 + k_4)}, K_{\text{iS}_2} = \frac{k_{-i}}{k_i}, K_{\text{iS}_1} = \frac{k_{-i2}}{k_{i2}} \\
\frac{k_{\text{cat}}}{K_{\text{mS}_1}} &= \frac{k_1 k_2}{k_{-1} + k_2}, \frac{k_{\text{cat}}}{K_{\text{mS}_2}} = \frac{k_3 k_4}{k_{-3} + k_4}
\end{aligned} \tag{55}$$

Η εξίσωση ταχύτητας σταθερής κατάστασης καθώς και οι παράμετροι της προήλθαν από την εφαρμογή της μεθόδου Cornish-Bowden [86].

Στην ενότητα I.9.6. παρουσιάστηκε για το απλούστερο μοντέλο ενζυμικής αντίδρασης για σύστημα τύπου ring-rong bi-bi, το κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο. Με παρόμοιο τρόπο υπολογίζεται για ένα πιο πολύπλοκο σχήμα αντίδρασης όπως αυτό απεικονίζεται παραπάνω, το κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο των παραμέτρων που αναλύθηκαν. Για τον μηχανισμό του Σχήματος 21 οι σταθερές ταχύτητας k_3 και k_{-3} είναι οι ευαίσθητες στην ισοτοπική υποκατάσταση διότι σε αυτό το σημείο διασπάται ο δεσμός O-D της αιθανόλης, έτσι το κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο των παραμέτρων της εξίσωσης ταχύτητας θα δίνεται από τις εξισώσεις (Northrop nomenclature):

$$\begin{aligned}
{}^D k_{\text{cat}} &= 1, \quad {}^D \left(\frac{k_{\text{cat}}}{K_{\text{mS}_1}} \right) = 1 \\
{}^D \left(\frac{k_{\text{cat}}}{K_{\text{mS}_2}} \right) &= \frac{{}^D k_3 + \frac{k_{-3}}{k_4} \times \text{EIE}}{1 + \frac{k_{-3}}{k_4}}, \quad \text{EIE} = {}^D \left(\frac{k_3}{k_{-3}} \right)
\end{aligned} \tag{56}$$

Το ισοτοπικό φαινόμενο των ${}^D k_{\text{cat}}$ και ${}^D \left(\frac{k_{\text{cat}}}{K_{\text{mS}_1}} \right)$ είναι ίσο με 1, λόγω της έλλειψης ενός

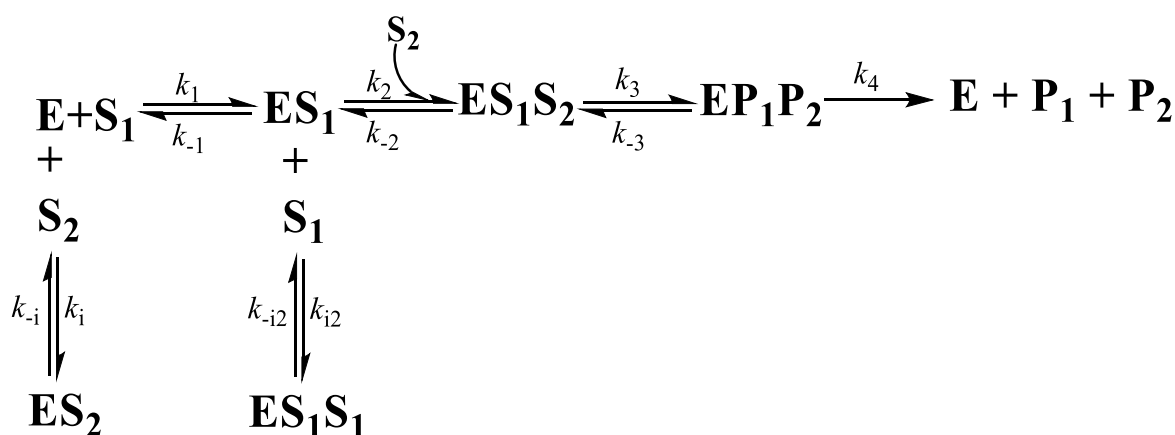
ισοτοπικά ευαίσθητου βήματος στις εν λόγω σταθερές. Το παρατηρούμενο K.I.E._{obs} για την

${}^D \left(\frac{k_{\text{cat}}}{K_{\text{mS}_2}} \right)$ θα καλύπτεται (masked) λόγω της κινητικής πολυπλοκότητας της αντίδρασης,

έτσι η τιμή του θα εμφανίζεται μειωμένη σε σχέση με το εσωτερικό K.I.E._{int} [82], [98].

III.Γ.3.2. Πορεία της αντίδρασης και το Κ.Ι.Ε. σε σύστημα διατεταγμένο bi-bi με αναστολή δύο υποστρώματων

Στην ενότητα I.7.2.4.1. περιγράφηκε η αναστολή υποστρώματος που προκύπτει από το συνδυασμό του S_2 με το E για την παραγωγή ενός συμπλόκου αδιεξόδου ES_2 . Στην περίπτωση της εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με αιθανόλη τα πράγματα περιπλέκονται περεταίρω από την δράση των δύο υποστρώματων (όπου S_1 είναι το οξύ και S_2 είναι η αλκοόλη) και ως αναστολείς. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα εκτός από το σύμπλοκο αδιεξόδου ES_2 να υπάρχει ακόμα ένα, το ES_1S_1 (Σχήμα 22). Έτσι η πορεία της αντίδρασης ενός διατεταγμένου συστήματος bi-bi με αναστολή και από τα δύο υποστρώματα γίνεται:



Σχήμα 22: Σύστημα τύπου διατεταγμένο bi-bi με αναστολή και από τα δύο υποστρώματα

Η εξίσωση ταχύτητας που περιγράφει τέτοια συστήματα απουσία προϊόντων παράγεται με την μέθοδο King-Altman όπως αυτή αναλύθηκε στην ενότητα I.7.2.1. και είναι η εξής:

$$\frac{V}{[E]_0} = \frac{k_{cat} [S_1][S_2]}{K_{ii}K_{ms_2} + K_{ms_1}[S_2]\left(1 + \frac{[S_2]}{K_{is_2}}\right) + K_{ms_2}[S_1]\left(1 + \frac{[S_2]}{K_{is_2}}\right) + [S_1][S_2]} \quad (57)$$

Οι παράμετροι της εξίσωσης ταχύτητας αναλύονται στις περισσότερες πολύπλοκες σχέσεις:

$$\begin{aligned}
k_{\text{cat}} &= \frac{k_3 k_4}{k_4 + k_{-3} + k_3}, \\
K_{\text{mS}_1} &= \frac{k_2 k_3 k_{-i} k_4 + k_{-1} k_3 k_i k_4 + k_{-1} k_2 k_i k_{-3} + k_{-1} k_2 k_i k_4}{k_1 k_2 k_{-i} (k_4 + k_{-3} + k_3)}, K_{\text{mS}_2} = \frac{k_{-2} k_4 + k_{-2} k_{-3} + k_3 k_4}{k_2 (k_4 + k_{-3} + k_3)} \\
K_{\text{is}_1} &= \frac{k_{-i2}}{k_{i2}}, K_{\text{ii}} = \frac{k_{-1}}{k_1}, K_{\text{is}_2} = \frac{k_2 k_3 k_{-i} k_4 + k_{-1} k_3 k_i k_4 + k_{-1} k_2 k_i k_{-3} + k_{-1} k_2 k_i k_4}{k_2 k_3 k_4 k_i} \\
\frac{k_{\text{cat}}}{K_{\text{mS}_1}} &= \frac{k_3 k_4 k_1 k_2 k_{-i}}{k_2 k_3 k_{-i} k_4 + k_{-1} k_3 k_i k_4 + k_{-1} k_2 k_i k_{-3} + k_{-1} k_2 k_i k_4}, \frac{k_{\text{cat}}}{K_{\text{mS}_2}} = \frac{k_3 k_4 k_2}{(k_{-2} k_4 + k_{-2} k_{-3} + k_3 k_4)}
\end{aligned} \tag{58}$$

Η παραπάνω εξίσωση ταχύτητας σταθερής κατάστασης καθώς και οι παράμετροι της προήλθαν με την εφαρμογή της μεθόδου Cornish-Bowden [86]. Τέλος υπολογίζεται για ένα πιο πολύπλοκο σχήμα αντίδρασης όπως αυτό απεικονίστηκε παραπάνω, το κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο των παραμέτρων.

Για τον μηχανισμό του Σχήματος 22 οι σταθερές ταχύτητας k_3 και k_{-3} είναι οι ευαίσθητες στην ισοτοπική υποκατάσταση διότι σε αυτό το σημείο διασπάται ο δεσμός O-D της αιθανόλης, έτσι το κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο των παραμέτρων της εξίσωσης ταχύτητας θα δίνονται από τις εξισώσεις (Northrop nomenclature):

$$\begin{aligned}
{}^D k_{\text{cat}} &= \frac{{}^D k_3 + \frac{k_{-3}}{k_4} \times \text{EIE} + \frac{k_3}{k_4}}{1 + \frac{k_{-3}}{k_4} + \frac{k_3}{k_4}}, \text{EIE} = {}^D \left(\frac{k_3}{k_{-3}} \right) \\
{}^D \left(\frac{k_{\text{cat}}}{K_{\text{mS}_1}} \right) &= \frac{{}^D k_3 + \frac{k_{-3}}{k_4} \times \text{EIE} + \frac{k_3}{k_2} \left(1 + \frac{k_2 k_{-i}}{k_{-1} k_i} \right)}{1 + \frac{k_{-3}}{k_4} + \frac{k_3}{k_2} \left(1 + \frac{k_2 k_{-i}}{k_{-1} k_i} \right)} \\
{}^D \left(\frac{k_{\text{cat}}}{K_{\text{mS}_2}} \right) &= \frac{{}^D k_3 + \frac{k_{-3}}{k_4} \times \text{EIE} + \frac{k_3}{k_{-2}}}{1 + \frac{k_{-3}}{k_4} + \frac{k_3}{k_{-2}}}
\end{aligned} \tag{59}$$

Το ισοτοπικό φαινόμενο των ${}^D k_{\text{cat}}$, ${}^D \left(\frac{k_{\text{cat}}}{K_{\text{mS}_1}} \right)$ και ${}^D \left(\frac{k_{\text{cat}}}{K_{\text{mS}_2}} \right)$ είναι της γενικής μορφής

$${}^D(K) = \frac{{}^D k_3 + C_f + C_r \times \text{EIE}}{1 + C_f + C_r}, \text{ όπου } C_f \text{ αντιπροσωπεύει την προς τα προϊόντα κατεύθυνση}$$

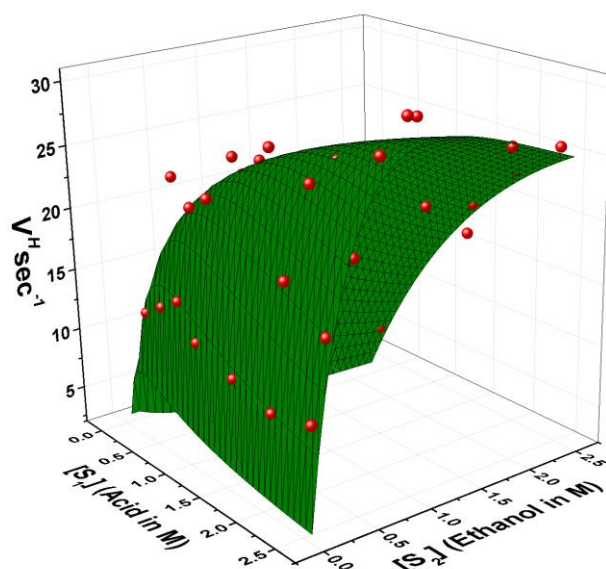
πορείας της κατάλυσης, ενώ C_r αντιπροσωπεύει την προς τα αντιδρώντα κατεύθυνση πορείας της κατάλυσης και φυσικά το ${}^D k_3$ αντιπροσωπεύει το εσωτερικό K.I.E._{int} το οποίο και θα καλύπτεται λόγω της κινητικής πολυπλοκότητας της αντίδρασης [82], [98].

III.Γ.3.3. Προσδιορισμός των παραμέτρων της αντίδρασης εστεροποίησης βουτυρικού οξέος με αιθανόλη, σε διαλύτη κ-εξάνιο και με καταλύτη την CALB, με προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων σε εξίσωση επιφάνειας (surface fitting)

Στην Ενότητα II.C.2.1. και II.C.2.2. μελετήθηκαν οι μεταβολές των παραμέτρων για τις αντιδράσεις εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με απλή και δευτεριωμένη αιθανόλη, σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB [169]. Οι Εξισώσεις 54, 57 για συστήματα τύπου ping-pong bi-bi και διαταγμένο bi-bi με αναστολή και από το οξύ και από την αιθανόλη προσαρμόστηκαν στα πειραματικά δεδομένα των κινητικών μετρήσεων $z_m^H = f(x_i, y_j)$ ή $z_m^D = f(x_i, y_j)$ και υπολογίστηκαν οι παράμετροι τους $\{k_{cat}, K_{mS1}, K_{mS2}, K_{iS1}, K_{iS2}, k_{cat}/K_{mS1}, k_{cat}/K_{mS2}$ είτε και $K_{ii}\}$ ή $\{k_{cat}^D, K_{mS1}^D, K_{mS2}^D, K_{iS1}^D, K_{iS2}^D, (k_{cat}/K_{mS1})^D, (k_{cat}/K_{mS2})^D$ είτε και $K_{ii}^D\}$, αντίστοιχα. Η προσαρμογή των εξισώσεων στα πειραματικά δεδομένα αλλά και η σύγκριση των δυο μοντέλων έγινε με τη χρήση του προγράμματος OriginPro 2016. Ως κριτήριο σύγκλησης χρησιμοποιήθηκε αυτό των ελαχίστων τετραγώνων. Τα αποτελέσματα της προσαρμογής παρουσιάζονται στους Πίνακες 29, 30, 31 και 32 και στα Διαγράμματα 37, 38, 39 και 40.

Πίνακας 29: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων $z_m^H = f(x_i, y_j)$ από την Εξίσωση τύπου ping-pong bi-bi για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB.

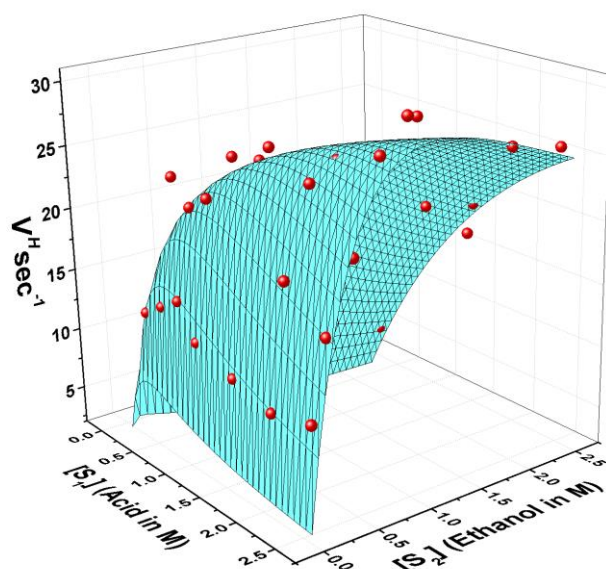
Model	τύπου ping-pong bi-bi	
Equation	54	
Adj.R-Square	0.970	
V^H	Value	Standard Error
$k_{cat}^H \text{ sec}^{-1}$	70.164	± 9.310
$K_{mS1}^H \text{ M}^{-1}$	0.498	± 0.167
$K_{mS2}^H \text{ M}^{-1}$	0.128	± 0.058
K_{iS1}^H	0.523	± 0.319
K_{iS2}^H	0.374	± 0.118
$k_{cat}/K_{mS1} \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$	140.738	-
$k_{cat}/K_{mS2} \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$	547.830	-



Διάγραμμα 37: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $V^H = f(S_1, S_2)$ για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB. Το πράσινο πλέγμα-επιφάνεια αντιστοιχεί στην προσαρμοσμένη εξίσωση συστήματος τύπου ring-pong bi-bi (54) στα πειραματικά δεδομένα.

Πίνακας 30: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων $z_m^H = f(x_i, y_j)$ από την Εξίσωση τύπου διατεταγμένου bi-bi για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB.

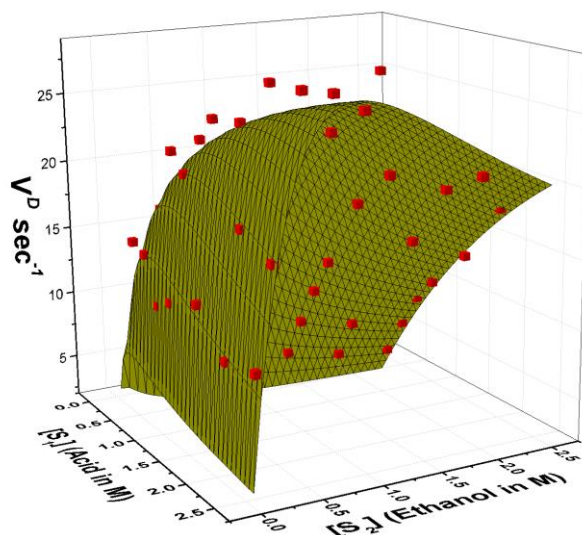
Model	τύπου διατεταγμένο bi-bi	
Equation	57	
Adj.R-Square	0.97043032	
V^H	Value	Standard Error
$k_{cat}^H \text{ sec}^{-1}$	69.674	± 9.417
$K_{mS1}^H \text{ M}^{-1}$	0.472	± 0.178
$K_{mS2}^H \text{ M}^{-1}$	0.096	± 0.091
K_{iS1}^H	0.378	± 0.420
K_{iS2}^H	0.354	± 0.125
K_{ii}^H	0.155	± 0.484
$k_{cat}/K_{mS1} \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$	147.480	-
$k_{cat}/K_{mS2} \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$	720.992	-



Διάγραμμα 38: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $V^H = f(S_1, S_2)$ για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB. Το τουρκουάζ πλέγμα-επιφάνεια αντιστοιχεί στην προσαρμοσμένη εξίσωση συστήματος τύπου διατεταγμένου bi-bi (57) στα πειραματικά δεδομένα.

Πίνακας 31: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων $z_m^D = f(x_i, y_j)$ από την Εξίσωση τύπου ping-pong bi-bi για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με δευτεριομένη αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB.

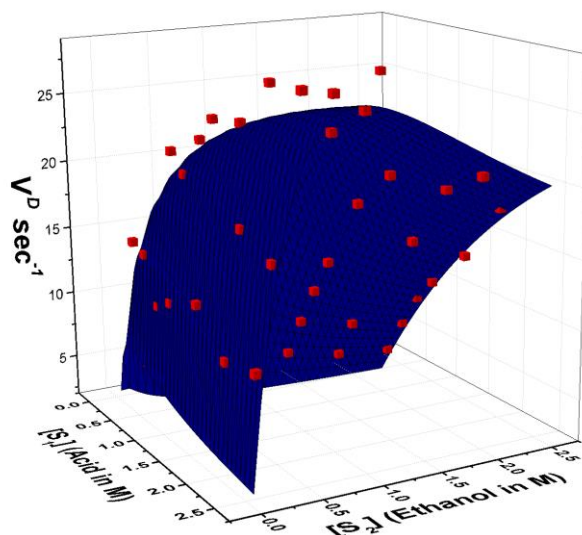
Model	τύπου ping-pong bi-bi	
Equation	54	
Adj.R-Square	0.933	
V^D	Value	Standard Error
$k_{cat}^D \text{ sec}^{-1}$	79.867	± 23.681
$K_{mS1}^D \text{ M}^{-1}$	0.500	± 0.384
$K_{mS2}^D \text{ M}^{-1}$	0.223	± 0.125
K_{iS1}^D	1.025	± 0.887
K_{iS2}^D	0.202	± 0.138
$k_{cat}/K_{mS1} \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$	159.535	-
$k_{cat}/K_{mS2} \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$	357.101	-



Διάγραμμα 39: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $V^D = f(S_1, S_2)$ για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με δευτεριομένη αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB. Το πράσινο πλέγμα-επιφάνεια αντιστοιχεί στην προσαρμοσμένη εξίσωση συστήματος τύπου ring-pong bi-bi (54) στα πειραματικά δεδομένα.

Πίνακας 32: Αποτελέσματα της προσαρμογής των πειραματικών δεδομένων $z_m^D = f(x_i, y_j)$ από την Εξίσωση τύπου διατεταγμένου bi-bi για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με δευτεριομένη αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB.

Model	τύπου διατεταγμένο bi-bi	
Equation	57	
Adj.R-Square	0.933	
V^D	Value	Standard Error
$k_{cat}^D \text{ sec}^{-1}$	78.473	± 23.993
$K_{mS1}^D \text{ M}^{-1}$	0.504	± 0.435
$K_{mS2}^D \text{ M}^{-1}$	0.174	± 0.172
K_{iS1}^D	0.732	± 0.925
K_{iS2}^D	0.209	± 0.160
K_{ii}^D	0.013	± 0.402
$k_{cat}/K_{mS1} \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$	155.482	-
$k_{cat}/K_{mS2} \text{ M}^{-1}\text{sec}^{-1}$	450.904	-



Διάγραμμα 40: Γραφική παράσταση της συνάρτησης $V^D = f(S_1, S_2)$ για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με δευτεριομένη αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB. Το μπλε πλέγμα-επιφάνεια αντιστοιχεί στην προσαρμοσμένη εξίσωση συστήματος τύπου διατεταγμένου bi-bi (57) στα πειραματικά δεδομένα.

Από την προσαρμογή και των δύο εξισώσεων στα πειραματικά δεδομένα, παρατηρούνται κάποια κοινά σημεία, όπως ότι η K_{mS1} είναι πάντοτε μεγαλύτερη από την K_{mS2} δηλαδή η CALB έχει μικρότερη συγγένεια για το βουτυρικό οξύ από ότι για την αιθανόλη, καθώς και ότι η αναστολή υποστρώματος από την αιθανόλη (K_{iS2}) είναι πάντοτε πιο ισχυρή από αυτήν του βουτυρικού οξέος (K_{iS1}).

Στην συνέχεια παρατίθεται η σύγκριση των δύο μοντέλων, για απλή και για δευτεριομένη αιθανόλη με το πληροφοριακό κριτήριο βέλτιστης προσαρμογής κατά Akaike (Akaike's Information criterion, A.I.C.), όπως αυτό περιγράφηκε στην ενότητα I.10.1. Τα αποτελέσματα των τεστ παρουσιάζονται στους Πίνακες 33 και 34.

Πίνακας 33: Πληροφοριακό κριτήριο κατά Akaike για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB

V^H	RSS	Params	A.I.C.	Akaike Weight
ping-pong	156.3216051	5	71.20185658	0.76887702
διαταγμένο	155.72235484	6	73.60581877	0.23112298
Το σύστημα τύπου ping-pong bi-bi έχει χαμηλότερη τιμή A.I.C. και έτσι είναι 3.35 φορές πιο πιθανό να είναι το σωστό μοντέλο.				

Πίνακας 34: Πληροφοριακό κριτήριο κατά Akaike για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με δευτεριομένη αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB

V^D	RSS	Params	A.I.C.	Akaike Weight
ping-pong	383.34423366	5	120.53801005	0.81545548
διαταγμένο	385.71245577	6	123.50972226	0.18454452
Το σύστημα τύπου ping-pong bi-bi έχει χαμηλότερη τιμή A.I.C. και έτσι είναι 4.45 φορές πιο πιθανό να είναι το σωστό μοντέλο.				

Το σύστημα τύπου ping-pong bi-bi έχει χαμηλότερη τιμή A.I.C. και για την αντίδραση με απλή και με δευτεριομένη αιθανόλη, αυτό μας δίνει ισχυρές ενδείξεις ότι το προτιμώμενο μοντέλο για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB είναι το σύστημα τύπου ping-pong bi-bi.

III.Γ.3.4. Το πρωτοταγές κινητικό ισοτοπικό φαινόμενο των παραμέτρων της αντίδρασης εστεροποίησης βουτυρικού οξέος με αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο και με καταλύτη την CALB

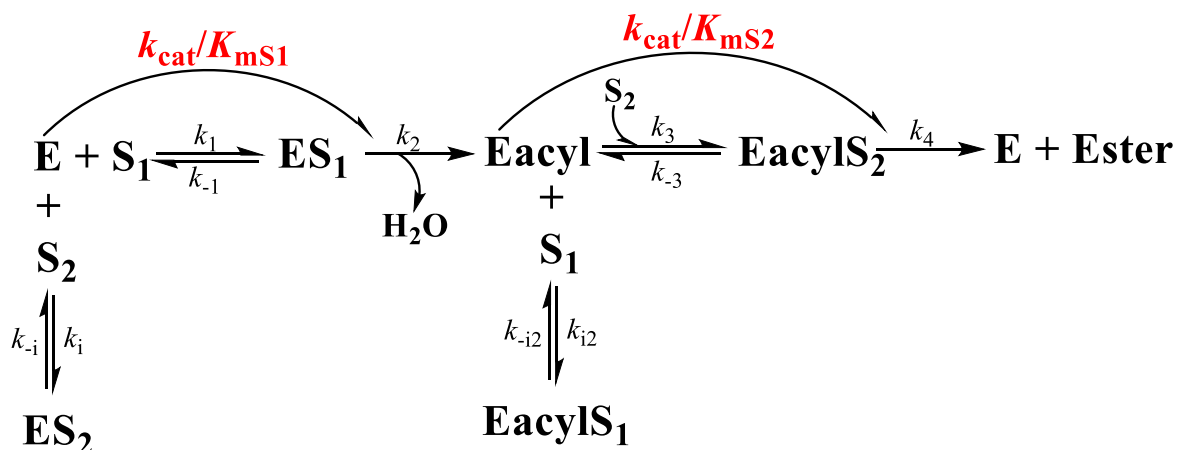
Ο υπολογισμός του πρωτοταγούς κινητικού ισοτοπικού φαινομένου των κινητικών σταθερών για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB έγινε αλγεβρικά και βασίζεται στον υπολογισμό των παραμέτρων από την προσαρμογή επιφάνειας της εξίσωσης τύπου ping-pong bi-bi στα

πειραματικά δεδομένα όπως αυτά παρουσιάστηκαν στην ενότητα III.C.3.3. Το K.I.E. θα ισούται με το πηλίκο των παραμέτρων για απλή αιθανόλη προς αυτών με δευτεριομένη αιθανόλη ($K.I.E. = {}^D K = K^H/K^D$). Η τιμή του K.I.E. για κάθε παράμετρο παρουσιάζεται στον Πίνακα 35.

Πίνακας 35: Το K.I.E. για κάθε παράμετρο του συστήματος τύπου ping-pong bi-bi για την αντίδραση εστεροποίησης του βουτυρικού οξέος με απλή και δευτεριομένη αιθανόλη σε διαλύτη κ-εξάνιο με καταλύτη την CALB.

${}^D K = K^H/K^D$	ping-pong bi-bi
${}^D k_{cat}$	0.878
${}^D(k_{cat}/K_{mS1})$	0.885
${}^D(k_{cat}/K_{mS2})$	1.534

Οι παράμετροι k_{cat}/K_{mS1} , k_{cat}/K_{mS2} αντιπροσωπεύουν το τμήμα της πορείας της αντίδρασης, από την πρόσδεση του υποστρώματος S_1 και S_2 μέχρι το πρώτο μη αντιστρεπτό βήμα, αντίστοιχα, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 23. Οι τιμές του πρωτοταγούς κινητικού ισοτοπικού φαινομένου για τις παραμέτρους ${}^D k_{cat} \approx 1$, ${}^D(k_{cat}/K_{mS1}) \approx 1$, ${}^D(k_{cat}/K_{mS2}) \approx 1.5$ αποδεικνύουν πλέον ότι το προτιμώμενο μοντέλο είναι το σύστημα τύπου ping-pong bi-bi [82], γιατί όπως αναλύθηκε στην ενότητα I.9.6, μόνο τότε η τιμή του ${}^D k_{cat}$, ${}^D(k_{cat}/K_{mS1})$ θα πρέπει να είναι ίση με μονάδα, διότι οι παράμετροι αυτοί δεν εμπεριέχουν το βήμα που διασπάται ο δεσμός (k_3 και k_{-3}) κάτι βέβαια που δεν ισχύει για την σταθερά ${}^D(k_{cat}/K_{mS2})$ η οποία θα πρέπει να έχει τιμή διαφορετική της μονάδας. Οι περισσότερες μελέτες ενζυμικής κινητικής με την χρήση του κινητικού ισοτοπικού φαινομένου έχουν γίνει σε συστήματα που ως διαλύτη περιέχουν H_2O . Το H_2O διαθέτει δύο ανταλλάξιμα πρωτόνια, έτσι είναι εφικτό να γίνει η προσέγγιση $C_r \rightarrow 0$ (τείνει στο μηδέν), αφού είναι πολύ πιο πιθανό στην αντίστροφη πορεία να χρησιμοποιηθούν τα υδρογόνα του H_2O που βρίσκονται σε περίσσια παρά του δευτερίου που είναι σε ίχνη. Δυστυχώς στο σύστημα που χρησιμοποιήθηκε (κ-εξάνιο) δεν μπορεί να γίνει αυτή η προσέγγιση, έτσι το $C_r \neq 0$. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η τιμή της ${}^D(k_{cat}/K_{mS2})$ να -καλύπτεται από το $C_r = k_{-3}/k_4$ εμποδίζοντας την παρατήρηση της ${}^D k_3$ που αντιπροσωπεύει το εσωτερικό $K.I.E._{int} \approx 7$ [170], [169].



Σχήμα 23: Σύνδεση των $k_{\text{cat}}/K_{\text{mS1}}$ και $k_{\text{cat}}/K_{\text{mS2}}$ με συγκριμένο τμήμα της αντίδρασης για την πορεία του συστήματος τύπου ring-pong bi-bi με αναστολή και από τα δύο υποστρώματα

Ακόμα, από τις τιμές του Κ.Ι.Ε. μπορεί με βεβαιότητα να απορριφθεί ότι ακολουθείται μηχανισμός random bi-bi (παρόλο που δεν αναφέρεται στην βιβλιογραφία ως ένας από τους υποψήφιους μηχανισμούς εστεροποίησης), διότι το χαρακτηριστικό αυτού του μηχανισμού είναι ότι καμία εκ των παραμέτρων $D(k_{\text{cat}}/K_{\text{mS1}})$, $D(k_{\text{cat}}/K_{\text{mS2}})$, δεν μπορεί να είναι ίση με μονάδα λόγω της ύπαρξης ενός ακόμα εναλλακτικού μονοπατιού που οδηγεί σε προϊόν.

Αξίζει να σημειωθεί ότι είναι η πρώτη φορά που χρησιμοποιήθηκε η τεχνική του κινητικού ισοτοπικού φαινομένου για ένα τόσο δύσκολο σύστημα, το οποίο λόγω της ύπαρξης της αναστολής και από τα δύο υποστρώματα διαθέτει έξι παραμέτρους, οι οποίες θα ήταν αδύνατον να προσδιοριστούν αξιόπιστα χωρίς την προσαρμογή εξισώσεων επιφάνειας (surface fitting).

IV. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Από την χρήση της πρωτεάσης KM-IFO-0288-A

Από την πλήρη και καινοτόμα κινητική μελέτη που πραγματοποιήθηκε με την πρωτεάση KM-IFO-0288-A, αναπτύχθηκε μία νέα μεθοδολογία που επιτρέπει τον προσδιορισμό της προέλευσης των πρωτονίων στα οποία αναφέρεται ο Φ^T , δηλαδή αποδείχτηκε για πρώτη φορά ότι ο Φ^T αναφέρεται στα πρωτόνια που μεταφέρονται (εν πτήση) μεταξύ των καταλυτικών καταλοίπων στην μεταβατική κατάσταση (T.S.), ξεπερνώντας έτσι έναν από τους δύο κύριους περιορισμούς της τεχνικής καταμέτρησης πρωτονίων.

Επίσης από την μεθοδολογία αυτή έγινε δυνατός ο υπολογισμός της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας Gibbs των δεσμών υδρογόνου στην μεταβατική κατάσταση (T.S.), όπου βρέθηκε ότι η μετατροπή τους σε LBHB, η οποία εξαρτάται από την τιμή pH, έχει ως αποτέλεσμα η καταλυτική S να γίνεται πολύ καλύτερο πυρηνόφιλο διευκολύνοντας την πυρηνόφιλη προσβολή του καρβονυλικού άνθρακα του υπό διάσπαση πεπτιδικού δεσμού. Τέλος έγινε προσδιορισμός της εξαρτώμενης από την τιμή pH, αλλά και από την ιονική ισχύ, μετατροπή περιοχών της πρωτεάσης σε IDPRs μορφή, δηλαδή ότι αναπτύσσονται στην KM-IFO-0288-A περιοχές αυξημένης ευπλασίας. Η IDPRs συμπεριφορά μπορεί να προσφέρει στην πρωτεάση σημαντικά πλεονεκτήματα κατά την δράση της σε οργανικούς διαλύτες, όπως: α) αύξηση της ευπλασίας του ενζύμου, β) μείωση της εξειδίκευσης υποστρώματος, που έχει ως αποτέλεσμα να μπορεί να δεχτεί και να προσαρμοστεί σε πολύ μεγαλύτερα υποστρώματα και γ) αύξηση της πυρηνοφιλίας της καταλυτικής S.

Η αλληλουχία αυτών των πειραμάτων, δηλαδή η εφαρμογή της μεθοδολογίας κατάμετρησης πρωτονίων, pH-profile και T-profile σε αυξανόμενη ιονική ισχύ, αλλά και η εφαρμογή της μεθοδολογίας κατάμετρησης πρωτονίων στο πλήρες εύρος τιμών pH λειτουργίας/σταθερότητας του ενζύμου, ακολουθήθηκε για πρώτη φορά, ανοίγοντας νέους ορίζοντες στην μελέτη της δυναμικής συμπεριφοράς κατά την διάρκεια της κατάλυσης με ένζυμα που δεν διαθέτουν μία σαφώς καθορισμένη άκαμπτη δομή, τμήμα των οποίων αποτελούν τα ένζυμα IDPRs.

Ωστόσο παρά τα σημαντικά πλεονεκτήματα της, η πρωτεάση KM-IFO-0288-A δεν κατάφερε να εκπληρώσει τους στόχους για παραγωγή βιοκαυσίμου σε υψηλές % αποδόσεις και συγκεντρώσεις εστέρα ώστε μια τέτοια παραγωγή να καταστεί οικονομικά συμφέρουσα και βιώσιμη.

2. Από την χρήση της λιπάσης CALB

Με την χρήση της μεθοδολογίας των αποκριτικών επιφανειών μελετήθηκαν με τα ελάχιστα απαιτούμενα πειράματα (μείωση εξόδων και χρόνου) όλες οι σημαντικές αλληλεπιδράσεις των παραγόντων για κάθε απόκριση και βρέθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες της κάθε διεργασίας. Τα εμπειρικά μοντέλα που δημιουργήθηκαν, ύστερα από την ταυτόχρονη βελτιστοποίησή τους, μέσω της ανάλυσης πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA), συνέβαλαν στην παραγωγή βιοκαυσίμου σε υψηλές συγκεντρώσεις εστέρα (3.35 M), υψηλές αποδόσεις (97.4 %) και με την χρησιμοποίηση όλων των διαθέσιμων ποσοτήτων του Μίγματος.

Συγκρίνοντας τα βελτιστοποιημένα αποτελέσματα της εστεροποίησης με 1-βουτανόλη ως προς αυτά με αιθανόλη, με και χωρίς απομάκρυνση H_2O , παρατηρήθηκε ότι με χρήση της 1-βουτανόλη επιδείχτηκε μια εντυπωσιακή αύξηση στην συγκέντρωση του παραγόμενου εστέρα, ενώ ταυτόχρονα έγινε μείωση των αντιδραστηρίων από την σχεδόν ισομοριακή αντίδραση εστεροποίησης.

Στην εστεροποίηση με αιθανόλη, χωρίς απομάκρυνσή H_2O δημιουργείται ένα περιβάλλον αυξημένης πολικότητας στο οποίο η CALB απενεργοποιείται σε χαμηλότερες (συγκεντρώσεις) [Μίγμα A] παρουσία υψηλότερων (συγκεντρώσεων) [αλκοόλης]. Αντίθετα όταν το H_2O απομακρύνεται από το μίγμα της αντίδρασης, επιτυγχάνεται μείωση της πολικότητας με αποτέλεσμα η CALB να απενεργοποιείται σε υψηλότερες [Μίγμα A] παρουσία χαμηλότερων [αλκοόλης].

Στην εστεροποίηση με 1-βουτανόλη η οποία είναι λιγότερο πολική και δεν αναμιγνύεται καλά με το H_2O , η σταθερότητα της CALB εξαρτάται πολύ λιγότερο από την σύσταση του μέσου αντίδρασης (περιεχόμενου μίγματος) στο εύρος της μελέτης μας.

Από όλα αυτά γίνεται σαφής η ευεργετική συμβολή της απομάκρυνσης του παραγόμενου H_2O από το μίγμα της αντίδρασης, όπου τελικά έπειτα από την βελτιστοποίηση παράγεται με την αιθανόλη 2.47 M εστέρα και με την 1-βουτανόλη 3.35 M εστέρα.

3. Από την χρήση της Λιπάσης-A από *B. subtilis* (LipA)

Το καταλυτικό κέντρο της LipA είναι πλήρως εκτιθέμενο στον διαλυτή, με αποτέλεσμα αυτή να μην μπορεί να συγκρατήσει τα απαραίτητα για την δραστικότητά της μόρια H_2O σε αυξημένες συγκεντρώσεις πολικών οργανικών αντιδραστηρίων. Το αποτέλεσμα είναι ότι όταν υπάρχει αιθανόλη στο μίγμα της αντίδρασης, ακριβώς λόγω της ικανότητάς της να απομακρύνει τα απαραίτητα μόρια H_2O από το καταλυτικό κέντρο, η LipA παρουσιάζει εξαιρετικά μειωμένη δραστικότητα. Με σκοπό να παρέλθει αυτό το πρόβλημα χρησιμοποιούνται αυξημένα ποσοστά H_2O , κάτι που όμως προκαλεί μείωση της τιμής pH του μικροπεριβάλλοντος σε υψηλές συγκεντρώσεις Μίγματος A (η τιμή pH όπως αναφέρθηκε έχει νόημα μόνο σε συστήματα πλούσια σε H_2O), έτσι με χρήση της 1-βουτανόλης επέρχεται μειωμένη δραστικότητα σε υψηλές [Μίγμα A].

Όλα αυτά έχουν ως αποτέλεσμα οι συγκεντρώσεις του εστέρα που παράγονται να είναι ιδιαίτερα χαμηλές, οπότε η εστεροποίηση του Μίγματος A με χρήση της LipA δεν αποτελεί μια οικονομικά αποδοτική διεργασία για την παραγωγή βιοκαυσίμου, που είναι και ο στόχος της παρούσης διατριβής.

Αξίζει να σημειωθεί ότι και η LipA αλλά και η πρωτεάση KM-IFO-0288-A διέθεταν εκτεθειμένο στον διαλυτή το καταλυτικό τους κέντρο, αποτέλεσμα της παντελούς απουσίας ενός καπακιού (lid), σε αντίθεση με την CALB στην οποία το καταλυτικό κέντρο βρίσκεται στον πυθμένα ενός βαθιού τούνελ πλήρως προστατευμένου από τον διαλυτή. Αυτή η δομική διαφορά είναι πιθανότατα και ένας από του κύριους λόγους στην ανοχή της CALB αλλά όχι και των LipA, KM-IFO-0288-A σε υψηλές συγκεντρώσεις οξέος.

4. Παραγωγή βιοκαυσίμου νέας γενιάς σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις μέσω της CALB

Αναπτύχθηκε μια ολοκληρωμένη και οικονομικά αποδοτική διεργασία μέσω της οποίας σε αντιδραστήρα με μεμβράνη υπερεξάτμισης (permeaporation) παράχθηκε βιοκαύσιμο νέας γενιάς σε συγκέντρωση εστέρα 3.35 M και % απόδοση 97.4 % σε 16 ώρες, κάτι που συνιστά αύξηση της απόδοσης κατά 500 % σε σχέση με προηγούμενες αναφορές.

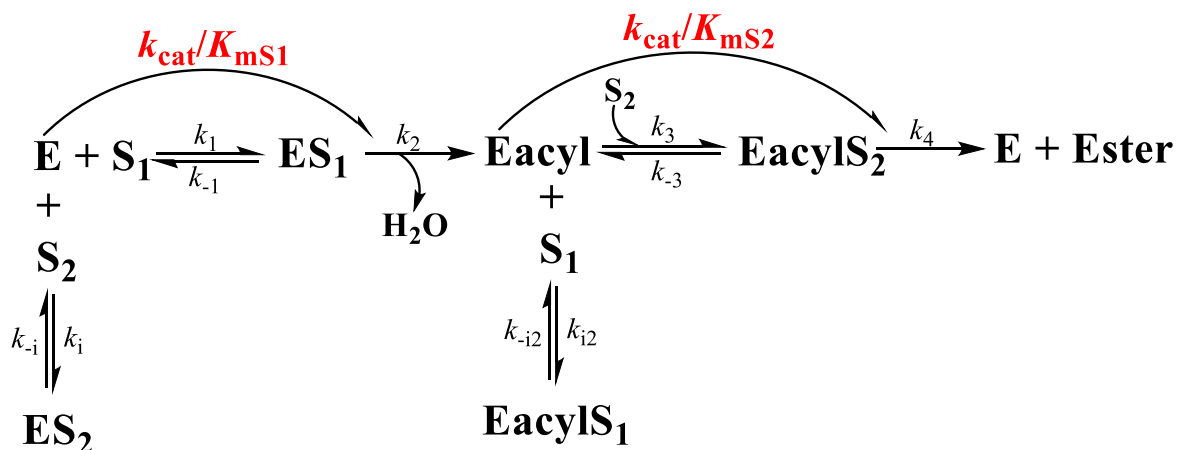
Τα στάδια της διαδικασίας παραγωγής βιοκαυσίμου νέας γενιάς είναι: Σε υπολείμματα βιομηχανιών ποτοποιίας και συγκεκριμένα της υγρής βινάσσας, τα οποία έχουν μηδενικό κόστος ενώ ταυτόχρονα η χρήση τους συμβάλει στην μείωση της περιβαλλοντολογικής ρύπανσης, εφαρμόζεται η διαδικασία της οξυγένεσης από όπου και παράγεται το μίγμα των οργανικών οξέων (Μίγμα Α) το οποίο εστεροποιήθηκε με 1-βουτανόλη κάτω από τις βέλτιστες συνθήκες με ελάχιστη ποσότητα 1.6 mg/ml CALB η οποία μπορεί και ανακυκλώνεται περισσότερο από 10 φορές παρουσιάζοντας στον δέκατο κύκλο % απόδοση μεγαλύτερη του 90 %.

5. Μηχανισμός δράσης της CALB σε αντιδράσεις εστεροποίησης λιπαρών οξέων με EtOH και με συνεχή απομάκρυνση του παραγόμενου H₂O

Πρώτη φορά χρησιμοποιήθηκε σε μελέτες ενζυμικής κινητικής, η προσαρμογή εξισώσεων επιφάνειας (surface fitting) σε κινητικά δεδομένα με σκοπό τον προσδιορισμό των παραμέτρων του ισχύοντος μηχανισμού ανεξάρτητα από τις συγκεντρώσεις των χρησιμοποιούμενων υποστρωμάτων, καθώς και την δυνατότητα εφαρμογής της τεχνικής του κινητικού ισοτοπικού φαινομένου (K.I.E.) για τον εντοπισμό του ισχύοντος μηχανισμού δράσης.

Έτσι αποδείχτηκε ότι ακολουθείται το σύστημα τύπου ring-pong bi-bi με αναστολή και από τα δύο υποστρώματα όπου το καθοριστικό βήμα της ταχύτητας αντίδρασης φαίνεται να είναι η προσθήκη της αλκοόλης (k_3 , k_{-3} , αφού $K.I.E. > 1$, το σύστημα εμφανίζει κινητική πολυπλοκότητα).

Η εργασία αυτή αποτελεί οδηγό για το πώς θα πρέπει πλέον να αντιμετωπίζονται όλες οι αντιδράσεις με δυο υποστρώματα. Έστερα από την εξέλιξη των μεθόδων προσαρμογής, από γραμμικές μετατροπές μη γραμμικών εξισώσεων (Lineweaver-Burk κ.α.) σε μη γραμμικές μεθόδους προσαρμογής, ακολουθεί η εξέλιξη σε προσαρμογές με εξισώσεις επιφάνειας (surface fitting), για συστήματα με δύο υποστρώματα.



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

- [1] M. Bodanszky, "Peptide Synthesis". New York: John Wiley & Sons, 1976.
- [2] D. Koshland, "Protein Shape and Biological Control". Scientific American, 1973.
- [3] X. S. Puente, L. M. Sánchez, C. M. Overall & C. López-Otín, "Human and mouse proteases: a comparative genomic approach". *Nat Rev Genet.*, 544-558, 2003.
- [4] N. D. Rawlings & A. J. Barrett, "Families of cysteine peptidases". 461-486, 1994.
- [5] R. L. Stein, A. M. Strimpler, P. D. Edwards, J. J. Lewis, R. C. Mauger & M. A. Zottola, "Mechanism of Slow-Binding Inhibition of Human Leukocyte Elastase by Trifluoromethyl Ketones". *Biochemistry*, 2682-2689, 1987.
- [6] L. Polgár, "Cysteine Proteinases and their inhibitors". New York, Walter De Gruyter and Co, 1986.
- [7] R. L. STEIN, "Catalysis by Human Leukocyte Elastase: Substrate Structural Dependence of Rate-Limiting Protolytic Catalysis and Operation of the Charge Relay System". *J. Am. Chem. Soc.*, 5111-5116, 1983.
- [8] D. M. BLOW, J. J. BIRKTOFT & B. S. HARTLEY, "Role of a buried acid group in the mechanism of action of chymotrypsin". *Nature*, 337-340, 1969.
- [9] M. Hunkapiller. *Biochemistry*, 5581-5588, 1976.
- [10] R. MENARD & A. C. STORER, "Oxyanion hole interactions in serine and cysteine proteases". *Biol Chem Hoppe Seyler*, 393-400, 1992.
- [11] K. S. VENKATASUBBAN & R. L. SCHOWEN, "THE PROTON INVENTORY TECHNIQUE". *CRC Critical Reviews in Biochemistry*, 1-44, 1984.
- [12] A. Foukis, "ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ, ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ & ΚΙΝΗΤΙΚΟΣ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΙΑΣ ΝΕΑΣ ΕΞΩΚΥΤΤΑΡΙΑΣ ΣΕΡΙΝΟΠΡΩΤΕΑΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΖΥΜΗ *Kluyveromyces marxianus*-IFO-0288". Τμήμα Χημείας

Πανεπιστημίου Ιωαννίνων: Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στην Κλινική Βιοχημεία & Ανοσοχημεία-Μικροβιακή Βιοτεχνολογία, 2012.

- [13] A. K. BADR, "STUDIES ON ENZYMATIC SYNTHESIS OF NATURAL ETHYL ACETATE IN NON-CONVENTIONAL MEDIA". Veszprém: PhD Thesis. University of Veszprém, 2005.
- [14] J. L. ARPIGNY & K. E. JAEGER, "Bacterial lipolytic enzymes: classification and properties". *Biochemical Journal*, 177-183, 1999.
- [15] K. E. JAEGER, B. W. DIJKSTRA & M. T. REETZ, "Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases". *Annual Review of Microbiology*, 315-351, 1999.
- [16] C. D. Anobom, A. S. Pinheiro, R. A. De-Andrade, E. C. Aguiéiras, G. C. Andrade, M. V. Moura & D. M. Freire, "From Structure to Catalysis: Recent Developments in the Biotechnological Applications of Lipases". *BioMed Research International*, 2014.
- [17] L. E. S. BRINK & J. TRAMPER, "Optimisation of organic solvent in multiphase biocatalysis". *Biotechnol. Bioeng*, 1258–1269, 1985.
- [18] R. J. KAZLAUSKAS & U. T. BORNSCHEUER, "Biotransformations with Lipases". Weinheim: Wiley-VCH, 37–119, 2008.
- [19] A. L. PAIVA, V. M. BALCAO & F. X. MALCATA, "Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases". *Enzyme Microb Technol*, 187-204, 2000.
- [20] M. NARDINI & B. W. DIJKSTRA, " α/β Hydrolase fold enzymes: the family keeps growing". *Current Opinion in Structural Biology*, 732–737, 1999.
- [21] D. Ollis, "The alpha/beta hydrolase fold". *Protein Eng.*, 197-211, 1992.
- [22] J. Schrag & M. Cygler, "Lipases and alpha/beta hydrolase fold". *Methods Enzymol.*, 85-107, 1997.
- [23] P. Heikinheimo, A. Goldman, C. Jeffries & D. L. Ollis, "Of barn owls and bankers: a lush variety of α/β hydrolases". *Structure*, 141–146, 1999.
- [24] M. Cygler, P. Grochulski, R. J. Kazlauskas, J. D. Schrag, F. Bouthillier, B. Rubin & A. K. Gupta, "A Structural Basis for the Chiral Preferences of Lipases". *J. Am. Chem. Soc.*, 3180–3186, 1994.

- [25] S. Ranaldi, V. Belle, M. Woudstra, R. Bourgeas, B. Guigliarelli, P. Roche & A. Fournel, "Amplitude of pancreatic lipase lid opening in solution and identification of spin label conformational subensembles by combining continuous wave and pulsed EPR spectroscopy and molecular dynamics". *Biochemistry*, 2140-2150, 2010.
- [26] S. REHM, P. TRODLER & J. PLEISS, "Solvent-induced lid opening in lipases: a molecular dynamics study". *Protein Sci.*, 2122-2130, 2010.
- [27] J. Uppenberg, S. Patkar, T. Bergfors & T. A. Jones, "Crystallization and Preliminary X-ray Studies of Lipase B from *Candida antarctica*". *Journal of Molecular Biology*, 790-792, 1994.
- [28] A. IDRIS & A. BUKHARI, "Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis". *Biotechnology Advances*, 550–563, 2012.
- [29] P. TRODLER & J. PLEISS, "Modeling structure and flexibility of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents". *BMC Structural Biology*, 2008.
- [30] M. Skjöt, L. De Maria, R. Chatterjee, A. Svendsen, S. A. Patkar, P. R. Østergaard & J. Brask, "Understanding the plasticity of the alpha/beta hydrolase fold: lid swapping on the *Candida antarctica* lipase B results in chimeras with interesting biocatalytic properties". *ChemBioChem.*, 520 – 527, 2009.
- [31] B. STAUCH, S. J. FISHER & M. CIANCI, "Open and closed states of *Candida antarctica* lipase B: protonation and the mechanism of interfacial activation". *Journal of Lipid Research*, 2348–2358, 2015.
- [32] G. Van Pouderoyen, T. Eggert, K. E. Jaeger & B. W. Dijkstra, "The Crystal Structure of *Bacillus subtilis* Lipase: A Minimal a/b Hydrolase Fold Enzyme". *Journal of Molecular Biology*, 215-226, 2001.
- [33] D. S. CLARK, "Characteristics of nearly dry enzymes in organic solvents: implications for biocatalysis in the absence of water". *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B*, 1299-1307, 2004.
- [34] A. M. KLIBANOV, "Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents". *Trends Biochem Sci*, 141-144, 1989.

- [35] H. J. Park, J. C. Joo, K. Park & Y. J. Yoo, "Stabilization of *Candida antarctica* lipase B in hydrophilic organic solvent by rational design of hydrogen bond". *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 722–728, 2012.
- [36] N. M. MICAELLO & C. M. SOARES, "Modeling hydration mechanisms of enzymes in nonpolar and polar organic solvents". *FEBS J*, 2424-2436, 2007.
- [37] C. Li, T. Tan, H. Zhang & W. Feng, "Analysis of the conformational stability and activity of *Candida antarctica* lipase B in organic solvents: insight from molecular dynamics and quantum mechanics/simulations". *J Biol Chem*, 28434-28441, 2010.
- [38] I. ROY & M. N. GUPTA, "Non-thermal effects of microwaves on protease-catalyzed esterification and transesterification". *Tetrahedron*, 5431–5436, 2003.
- [39] N. R. Pedersen, P. J. Halling, L. H. Pedersen, R. Wimmer, R. Matthiesen & O. R. Veltman, "Efficient transesterification of sucrose catalysed by the metalloprotease thermolysin in dimethylsulfoxide". *FEBS Letters*, 181–184, 2002.
- [40] A. ZAKS & A. M. KLIBANOV, "The Effect of Water on Enzyme Action in Organic Media". *J. Biol. Chem.*, 8017-8021, 1988.
- [41] S. Riva, J. Chopineau, A. P. G. Kieboom & A. M. Klibanov, "Protease-Catalyzed Regioselective Esterification of Sugars and Related Compounds in Anhydrous Dimethylformamide". *J. Am. Chem. Soc.*, 584-589, 1988.
- [42] N. R. Pedersen, J. B. Kristensen, G. Bauw, B. J. Ravoo, R. Darcy, K. L. Larsen & L. H. Pedersen, "Thermolysin catalyses the synthesis of cyclodextrin esters in DMSO". *Tetrahedron*, 615–622, 2005.
- [43] I. PÉREZ-VICTORIA & J. C. MORALES, "Complementary regioselective esterification of non-reducing oligosaccharides catalyzed by different hydrolases". *Tetrahedron*, 878–886, 2006.
- [44] J. O. Rich, V. V. Mozhaev, J. S. Dordick, D. S. Clark & Y. L. Khmelnitsky, "Molecular Imprinting of Enzymes with Water-Insoluble Ligands for Nonaqueous Biocatalysis". *J. AM. CHEM. SOC.*, 5254-5255, 2002.
- [45] A. L. SERDAKOWSKI & J. S. DORDICK, "Enzyme activation for organic solvents made easy". *TRENDS in Biotechnology*, 48-54, 2007.

- [46] N. Munawar & P. Enge, "Halophilic Enzymes: Characteristics, Structural Adaptation and Potential Applications for Biocatalysis". *Current Biotechnology*, 334-344, 2013.
- [47] R. Sinha & S. K. Khare, "Effect of organic solvents on the structure and activity of moderately halophilic *Bacillus* sp. EMB9 protease". *Extremophiles*, 1057–1066, 2014.
- [48] M. T. Ru, J. S. Dordick, J. A. Reimer & D. S. Clark, "Optimizing the Salt-Induced Activation of Enzymes in Organic Solvents: Effects of Lyophilization Time and Water Content". *Inc. Biotechnol Bioeng.*, 233–241, 1999.
- [49] H. R. Costantino, K. Griebenow, R. Langer & A. M. Klivanov, "On the pH memory of lyophilized compounds containing protein functional groups". *Biotechnol Bioeng*, 345-348, 1997.
- [50] D. Himmel, S. K. Goll, I. Leito & I. Krossing, "A Unified pH Scale for All Phases". *Angewandte Chemie International Edition*, 6885–6888, 2010.
- [51] P. Y. Stergiou, A. Foukis, M. Filippou, M. Koukouritaki, M. Parapouli, L. G. Theodorou & E. M. Papamichael, "Advances in lipase-catalyzed esterification reactions". *Biotechnol Adv*, 1846-1859, 2013.
- [52] G. Bremers, G. Birzietis, A. Blija, A. Danilevics & A. Skele, "SCHEME OF TECHNOLOGY FOR CONGRUENT DEHYDRATION OF BIOETHANOL IN SEMI-DRY WAY". *ENGINEERING FOR RURAL DEVELOPMENT*, 2011.
- [53] N. Patil, "Molecular Sieve Dehydration Technology for Ethanol Dehydration". *Chemical Industry Digest*, 2012.
- [54] X. FENG & R. Y. HUANG, "Liquid Separation by Membrane Pervaporation: A Review". *Ind. Eng. Chem. Res.*, 1048–1066, 1997.
- [55] F. Lipnizki, S. Hausmanns, G. Laufenberg, R. Field & B. Kunz, "Use of Pervaporation-Bioreactor Hybrid Processes in Biotechnology". *Chemical Engineering & Technology*, 569–577, 2000.
- [56] Z. Findrik, G. Németh, Đ. Vasić-Rački, K. Bélafi-Bakó, Z. Csanádi & L. Gubicza, "Pervaporation-aided enzymatic esterifications in non-conventional media". *Process Biochemistry*, 1715–1722, 2012.

- [57] J. C. Escobar, E. S. Lora, O. J. Venturini, E. E. Yáñez, E. F. Castillo & O. Almazan, "Biofuels: environment, technology and food security. Renew". *Sustain. Energy Rev.*, 1275-1287, 2009.
- [58] P. S. NIGAM & A. SINGH, "Production of liquid biofuels from renewable resources". *Progress in Energy and Combustion Science*, 52-68, 2011.
- [59] A. F. TURHOLLOW & E. O. HEADY, "Large-scale ethanol production from corn and grain sorghum and improving conversion technology". *Energy Agric*, 309-316, 1996.
- [60] G. W. Silva, A. A. Gomes, P. da Silva, G. B. Costa, D. D. S. Fernandes, M. M. Fontes & G. Veras, "Biodiesel/Diesel Blends Classification with Respect to Base Oil Using NIR Spectrometry and Chemometrics Tools". *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 1165–1171, 2012.
- [61] K. Limratana, S. Pichetpinyo, T. Aroonsrisopon & S. Jai-in, "Impact of using B100 Biodiesel in Engines". *Kasetsart J.*, 1191 - 1200, 2010.
- [62] B. Ghobadian, H. Rahimi, A. M. Nikbakht, G. Najafi & T. F. Yusaf, "Diesel engine performance and exhaust emission analysis using waste cooking biodiesel fuel with an artificial neural network". *Renewable Energy*, 976-982, 2009.
- [63] A. E. Atabani, A. S. Silitonga, I. A. Badruddin, T. M. I. Mahlia, H. H. Masjuki & S. Mekhilef, "A comprehensive review on biodiesel as an alternative energy resource and its characteristics". *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2070-2093, 2012.
- [64] B. Motskalidis, "Η ΧΡΗΣΗ ΒΙΟΚΑΥΣΙΜΩΝ ΣΤΗΝ ΝΑΥΤΙΑΙΑ ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ-MΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ". 2015.
- [65] R. M. BALABIN & R. Z. SAFIEVA, "Biodiesel classification by base stock type (vegetable oil) using near infrared spectroscopy data". *Anal Chim Acta*, 190-197, 2011.
- [66] M. H. HASSAN & M. A. KALAM, "An overview of biofuel as a renewable energy source: development and challenges". *Procedia Engineering*, 39–53, 2013.
- [67] J. A. BRYANT, S. HUGHES & J. LOVE, "Biofuels and Bioenergy–Ethical Aspects". *Biofuels and Bioenergy*, 273-283, 2017.
- [68] M. Dixon, "ENZYMES 2nd Edition". London: LONGMAN, 1971.

- [69] K. Brocklehurst, "Cysteine proteinases and their inhibitors". New York, Walter De Gruyter and Co, 1986.
- [70] M. L. BENDER, F. J. KEZDY & F. C. WEDLER, "Alpha-chymotrypsin: enzyme concentration and kinetics". *J. Chem. Educ.*, 84-88, 1967.
- [71] L. PELLER & R. A. ALBERTY, "Multiple intermediates in steady state enzyme kinetics I. The mechanism involving a single substrate and product". *J. Am. Chem. Soc.*, 5907–5914, 1959.
- [72] A. FERSHT, "STRUCTURE AND MECHANISM IN PROTEIN SCIENCE". W. H. Freeman and Company, Second printing, 1999.
- [73] W. W. CLELAND, "Determining the chemical mechanisms of enzyme-catalyzed reactions by kinetic studies". *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 273-387, 1977.
- [74] L. G. Theodorou, K. Lymperopoulos, J. G. Bieth & E. M. Papamichael, "Insight into the catalysis of hydrolysis of four newly synthesized substrates by papain: a proton inventory study". *Biochemistry*, 3996–4004, 2001.
- [75] K. BROCKLEHURST, J. P. G. MALTHOUSE & M. SHIPTON, "KINETICS OF THE REACTION OF PAPAIN WITH A TWO-PROTONIC-STATE REACTIVITY PROBE CONTAINING A HYDROPHOBIC SIDE CHAIN". *Biochem. J.*, 223-231, 1979.
- [76] H. B. DIXON, "pH-activity curves for enzyme-catalysed reactions in which the hydron is a product or reactant". *Biochem. J.*, 573-578, 1987.
- [77] K. Brocklehurst, D. Kowlessur, G. Patel, W. Templeton, K. Quigley, E. W. Thomas & R. J. Szawelski, "Consequences of molecular recognition in the S1-S2 intersubsite region of papain for catalytic-site chemistry". *Biochem. J.*, 761-772, 1988.
- [78] A. VINDIGNI & E. DI CERA, "Release of Fibrinopeptides by the Slow and Fast Forms of Thrombin". *Biochemistry*, 4417–4426, 1996.
- [79] Z. SÁRKÁNY & L. POLGÁR, "The Unusual Catalytic Triad of Poliovirus Protease 3C". *Biochemistry*, 516–522, 2003.
- [80] K. Laidler, "Physical Chemistry". Massachusetts, U.S.A: Houghton Mifflin, 2002.

- [81] E. Papamichael, "Experimental and theoretical approaches in investigating enzymatic mechanisms: Applications on the thermo-stable extracellular Protease-A-17N-1 from *Bacillus* sp., with possible biotechnological interest". *Current Topics on Bioprocesses in Food Industry*, New Delhi, Asiatech Publishers, 130-139, 2010.
- [82] V. Leskovac, "Comprehensive Enzyme Kinetics". Springer US, 2005.
- [83] H. Fromm, "Initial Rate Enzyme Kinetics". Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1975.
- [84] K.-C. CHOU, "Applications of graph theory to enzyme kinetics and protein folding kinetics. Steady and non-steady-state systems". *Biophys Chem.*, 1-24, 1990.
- [85] A. R. Schulz, "Enzyme Kinetics". Cambridge University Press, 1995.
- [86] A. CORNISH-BOWDEN, "An automatic method for deriving steady-state rate equations". *Biochem J.*, 55–59, 1977.
- [87] C. Walsh, "Enzymatic reaction mechanisms". W.H. Freeman, New York, 1998.
- [88] W. W. CLELAND, "An analysis of haldane relationships". *Methods in Enzymology*, 366-369, 1982.
- [89] W. Cleland, "Determining the Chemical Mechanisms of Enzyme-Catalyzed Reactions by Kinetic Studies". John Wiley & Sons, 2006.
- [90] B. SCHOWEN & R. SCHOWEN, "ISOTOPES AS MECHANISTIC PROBES". *METHODS IN ENZYMOLOGY*, 551-607, 1982.
- [91] E. POLLOCK, J. L. HOGG & R. L. SCHOWEN, "One-proton catalysis in the deacetylation of acety 1- α -chymotrypsin". *Journal of the American Chemical Society*, 968-999, 1973.
- [92] R. L. SCHOWEN, "The use of solvent isotope effects in the pursuit of enzyme mechanism". *Journal of Labelled Compounds and Radiopharmaceuticals*, 1052–1062, 2007.
- [93] F. Alvarez, "Isotopes in Organic Chemistry". 1987.
- [94] T. ABEYSINGHE & A. KOHEN, "Role of Long-Range Protein Dynamics in Different Thymidylate Synthase Catalyzed Reactions". *Int. J. Mol. Sci.*, 7304-7319, 2015.

- [95] R. L. Stein, A. M. Strimpler, H. Hori & J. C. Powers, "Catalysis by Human Leukocyte Elastase: Proton Inventory as a Mechanistic Probe". *Biochemistry*, 1305-1314, 1987.
- [96] T. M. HUANG, H. U. N. G. Hui-Chih, T. C. CHANG & G. G. CHANG, "Solvent kinetic isotope effects of human placental alkaline phosphatase in reverse micelles". *Biochem. J.*, 267–275, 1998.
- [97] J. P. KLINMAN, "Kinetic isotope effects in enzymology". *Adv Enzymol Relat Areas Mol Biol*, 415–494, 1978.
- [98] J. P. KLINMAN, "The power of integrating kinetic isotope effects into the formalism of the Michaelis–Menten equation". *FEBS Journ*, 489–497, 2014.
- [99] F. H. WESTHEIMER, "The Magnitude of the Primary Kinetic Isotope Effect for Compounds of Hydrogen and Deuterium". *Chem. Rev.*, 265–273, 1961.
- [100] L. Melander, "Reaction Rates of Isotopic Molecules". New York: Wiley, 1980.
- [101] B. A. Carpenter, "Quantum Tunneling in Enzyme-Catalyzed Reactions". Royal Society of Chemistry, Cambridge, 2008.
- [102] A. SEN & A. KOHEN, "Enzymatic tunneling and kinetic isotope effects: chemistry at the crossroads". *J. Phys. Org. Chem.*, 613–619, 2010.
- [103] J. Suhnel, "Enzyme Mechanism from Isotope E". Florida: CRC Press, 1991.
- [104] P. M. Kiefer, "Isotope Effects in Chemistry and Biology". Florida: CRC Press, 2006.
- [105] D. B. NORTHROP, "The expression of isotope effects on enzyme-catalyzed reactions". *Annu Rev Biochem*, 103-131, 1981.
- [106] P. F. Cook, "Enzyme Kinetics and Mechanism". New York: Taylor and Francis group, 2007.
- [107] J. D. Hermes, C. A. Roeske, M. H. O'Leary & W. W. Cleland, "Use of multiple isotope effects to determine enzyme mechanisms and intrinsic isotope effects. Malic enzyme and glucose 6-phosphate dehydrogenase". *Biochemistry*, 5106–5114, 1982.
- [108] W. W. Cleland, "Isotope Effects in Chemistry and Biology". Ch. 37, Florida: Taylor & Francis, 2006.

- [109] P. F. Cook, "Enzyme mechanism from isotope effects". Florida: CRC Press, 1991.
- [110] A. Cornish-Bowden, "A simple graphical method for determining the inhibition constants of mixed, uncompetitive and non-competitive inhibitors". *Bioch. J.*, 143-144, 1974.
- [111] B. MANNERVIK, "Regression-analysis, experimental error, and statistical criteria in the design and analysis of experiments for discrimination between rival kinetic-models". *Methods Enzymol.*, 370-390, 1982.
- [112] G. N. WILKINSON, "Statistical estimations in enzyme kinetics". *Biochemical Journal*, 324-332, 1961.
- [113] C. Daniel, "Fitting Equations to Data". New York: Wiley, 1971.
- [114] M. Abramowitz, "HANDBOOK OF MATHEMATICAL FUNCTIONS WITH FORMULA GRAPH AND MATHEMATICAL TABLES". New York: Dover Publications, 1974.
- [115] C. Rao, "Linear Statistical Inference and its Applications". New York: Wiley, 1973.
- [116] H. Akaike, "Canonical correlation analysis of time series and the use of an information criterion". New York: Academic Press, 1976.
- [117] K. YAMAOKA, T. NAKAGAWA & T. UNO, "Application of Akaike's information criterion (AIC) in the evaluation of linear pharmacokinetic equations". *T. Journal of Pharmacokinetics and Biopharmaceutics*, 165–175, 1978.
- [118] Π. Υψηλάντης & Χ. Κουκουβίνος, "Μεθοδολογία Αποκριτικών Επιφανειών-Σχεδιασμοί Υποσυνόλου". 2012.
- [119] D. Montgomery, "Design and Analysis of Experiments". NJ, USA: J. Wiley & Sons, 2005.
- [120] G. Box, "Statistics for Experimenters: An introduction to design, data analysis and model building". NJ, USA: J. Wiley & Sons Inc., 1978.
- [121] Δ. ΚΟΜΙΛΗΣ, "πειραματικός σχεδιασμός & στατιστική ανάλυση". 2006.
- [122] G. Ziogas, "statistical quality control and parameter designs: robust parameter designs". 2012.
- [123] R. E. Kirk, "Experimental Design". Los Angeles: SAGE Publication, 2013.

- [124] J. A. Cornell, "Experiments with Mixtures: Designs, Models, and the Analysis of Mixture Data". New York: John Wiley & Sons, 2002.
- [125] R. E. Bruns, "Statistical Design—Chemometrics". Amsterdam: Elsevier, 2006.
- [126] M. D. MORRIS, "A Class of Three-Level Experimental Designs for Response Surface Modeling". *Technometrics*, 111-121, 2000.
- [127] D. Massart, "Handbook of Chemometrics and Qualimetrics: Part A". Amsterdam: Elsevier, 1997.
- [128] G. E. BOX & D. W. BEHNKEN, "Some New Three Level Designs for the Study of Quantitative Variables". *Technometrics* 2, 455-475, 1960.
- [129] M. Otto, "Statistics and Computer Application in Analytical Chemistry". Weinheim: Wiley–VCH, 1999.
- [130] S. C. B. R. E. Ferreira, H. S. Ferreira, G. D. Matos, J. M. David, G. C. Brandao & W. N. L. Dos Santos, "Box-Behnken design: an alternative for the optimization of analytical methods". *Anal Chim Acta.*, 179-186, 2007.
- [131] M. A. Bezerra, R. E. Santelli, E. P. Oliveira, L. S. Villar & L. A. Escaleira, "Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry". *Talanta*, 965–977, 2008.
- [132] T. E. MURPHY, K. L. TSUI & J. K. ALLEN, "A review of robust design methods for multiple responses". *Research in Engineering Design*, 118-132, 2005.
- [133] Z. Knežević-Jugović, D. Bezbradica, Ž. Jakovljević, S. Branković-Dimitrijević & D. Mijin, "Lipase catalyzed synthesis of flavor esters in non-aqueous media: Optimization of the yield of pentyl 2-methylpropanoate by statistical analysis". *J. Serb. Chem. Soc.*, 1139-1151, 2008.
- [134] A. Foukis, P. Y. Stergiou, L. G. Theodorou, M. Papagianni & E. M. Papamichael, "Purification, kinetic characterization and properties of a novel thermo-tolerant extracellular protease from *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288 with potential biotechnological interest". *Bioresource Technology*, 214–220, 2013.
- [135] A. Deng, J. Wu, Y. Zhang, G. Zhang & T. Wen, "Purification and characterization of a surfactant-stable high-alkaline protease from *Bacillus* sp. B001". *Bioresour. Technol.*, 7100–7106, 2010.

- [136] J. Bieth, "Elastases: Structure, function, and pathological role". *Front Matrix Biol*, 1-82, 1978.
- [137] E. M. PAPAMICHAEL, L. G. THEODOROU & J. G. BIETH, "Insight into catalytic mechanism of papain-like cysteine proteinases". *Applied Biochemistry & Biotechnology*, 171-175, 2004.
- [138] P. SHEEHAN & A. I. LIAPIS, "Modeling of the primary and secondary drying stages of the freeze drying of pharmaceutical products in vials: numerical results obtained from the solution of a dynamic and spatially multi-dimensional lyophilization model for different operational policies". *Biotechnol. Bioeng.*, 712–728, 1998.
- [139] A. Ö. Triantafyllou, E. Wehtje, P. Adlercreutz & B. Mattiasson, "Effects of sorbitol addition on the action of free and immobilized hydrolytic enzymes in organic media". *Biotechnol. Bioeng.*, 406–414, 1995.
- [140] K. DEBULIS & A. M. KLIBANOV, "Dramatic enhancement of enzymatic activity in organic solvents by lyoprotectants". *Biotechnol. Bioeng.*, 566–571, 1992.
- [141] A. Foukis, O. A. Gkini, P. Y. Stergiou, V. A. Sakkas, A. Dima, K. Boura, A. Koutinas & E. M. Papamichael, "Sustainable production of a new generation biofuel by lipase-catalyzed esterification of fatty acids from liquid industrial waste biomass". *Bioresource Technology*, 122-128, 2017.
- [142] K. Syngiridis, A. Bekatorou, P. Kandyliis, C. Larroche, M. Kanellaki & A. Koutinas, "Favouring butyrate production for a new generation biofuel by acidogenic glucose fermentation using cells immobilised on g-alumina". *Bioresour. Technol.*, 118-123, 2014.
- [143] K. Lappa, P. Kandyliis, N. Bastas, S. Klaoudatos, N. Athanasopoulos, A. Bekatorou & A. Koutinas, "New generation biofuel: continuous acidogenesis of sucrose-raffinose mixture simulating vinasse is promoted by g-alumina pellets". *Biotechnology for Biofuels*, art. no. 74, 2015.
- [144] A. Dima, K. Boura, A. Bekatorou, P. Y. Stergiou, A. Foukis, O. A. Gkini, P. Kandyliis, K. Pissaridia, M. Kanellakia, E. M. Papamichael & A. Koutinas, "Scale-up for esters production from straw whiskers for biofuel applications". *Bioresource Technology*, 109-112, 2017.

- [145] D. Shrestha & J. V. Gerpen, "Biodiesel from oilseed crops". *Industrial Crops and Uses*, 140-156, 2010.
- [146] J. P. GLUSKER, "Structural aspects of metal liganding to functional groups in proteins". *Adv. Protein Chem.*, 1-76, 1991.
- [147] E. M. Papamichael, L. G. Theodorou, A. Perisynakis & C. Drinas, "Purification and Characterization of a novel extracellular protease from a halo-alkalophilic *Bacillus* sp., active in polar organic solvents". *Environmental Technol.*, 1073-1082, 2010.
- [148] Y. K. Kim, J. H. Bae, B. K. Oh, W. H. Lee & J. W. Choi, "Enhancement of proteolytic enzyme activity excreted of proteolytic enzyme activity excreted from *Bacillus stearothermophilus* for a thermophilic aerobic digestion process". *Bioresource Technology*, 157–164, 2002.
- [149] V. Fülöp, Z. Szeltner, V. Renner & L. Polgár, "Structures of Prolyl Oligopeptidase Substrate/Inhibitor Complexes: use of inhibitor binding for titration of the catalytic histidine residue". *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 1262–1266, 2001.
- [150] L. POLGÁR, "Oligopeptidase B: A New Type of Serine Peptidase with a Unique Substrate-Dependent Temperature Sensitivity". *Biochemistry*, 15548-15555, 1999.
- [151] P. A. FREY, "Characterization of a low barrier hydrogen bond in the active site of chymotrypsin". *Journal of Molecular Structure*, 153–161, 2002.
- [152] T. K. Harris & G. J. Turner, "Structural Basis of Perturbed pKa Values of Catalytic Groups in Enzyme Active Sites". *IUBMB LIFE*, 85–98, 2002.
- [153] E. Y. Lau & T. C. Bruice, "Consequences of Breaking the Asp-His Hydrogen Bond of the Catalytic Triad: Effects on the Structure and Dynamics of the Serine Esterase Cutinase". *Biophysical Journal*, 85–98, 1999.
- [154] Z. Szeltner, D. Rea, T. Juhász, V. Renner, Z. Mucsi, G. Orosz & L. Polgár, "Substrate-dependent Competency of the Catalytic Triad of Prolyl Oligopeptidase". *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 44597–44605, 2002.

- [155] J. C. ALEDO, C. LOBO & A. E. DEL VALLE, "Energy diagrams for enzyme-catalyzed reactions: Concepts and misconcepts.". *Biochemistry and molecular biology education*, 234–236, 2003.
- [156] W. W. CLELAND & D. B. NORTHROP, "METHODS IN ENZYMOLOGY". VOL. 308, Academic Press, 1999.
- [157] M. OLIVEBERG & A. R. FERSHT, "Negative activation enthalpies in the kinetics of protein folding". *PNAS*, 8926-8929, 1995.
- [158] S. Lindman, W. F. Xue, O. Szczepankiewicz, M. C. Bauer, H. Nilsson & S. Linse, "Salting the Charged Surface: pH and Salt Dependence of Protein G B1 Stability". *Biophysical Journal*, 2911–2921, 2006.
- [159] Y.-J. MAO, X.-R. SHENG & X.-M. PAN, "The effects of NaCl concentration and pH on the stability of hyperthermophilic protein Ssh10b". *BMC Biochemistry*, 1-8, 2007.
- [160] J. Singh & J. B. Udgaonkar, "Unraveling the Molecular Mechanism of pH-Induced Misfolding and Oligomerization of the Prion Protein". *J. Mol. Biol.*, 2016.
- [161] A. H. ELCOCK & J. A. MCCAMMON, "Electrostatic contributions to the stability of halophilic proteins". *J. Mol. Biol.*, 731–748, 1998.
- [162] J. M. RAO & P. ARGOS, "Structural stability of halophilic proteins". *Biochemistry*, 6536–6543, 1981.
- [163] S. Lindman, W. F. Xue, O. Szczepankiewicz, M. C. Bauer, H. Nilsson & S. Linse, "Salting the Charged Surface: pH and Salt Dependence of Protein G B1 Stability". *Biophysical Journal*, 2911–2921, 2006.
- [164] V. N. UVERSKY, "Unusual biophysics of intrinsically disordered proteins". *Biochimica et Biophysica Acta*, 932–951, 2013.
- [165] S. Wallin, "Intrinsically disordered proteins: structural and functional dynamics". *Research and Reports in Biology*, 7–16, 2017.
- [166] P. SARAVANAN & R. MUTHUVELAYUDHAM, "Enhancing the Bioproduction of Cellulas by *Aspergillus nidulan* via Medium Optimization, in: Prasanna". *Biotechnology and Biochemical Engineering*, Singapore, Springer Science & Business, 65-72, 2016.

- [167] A. B. Martins, J. L. Friedrich, J. C. Cavaleiro, C. Garcia-Galan, O. Barbosa, M. A. Ayub & R. C. Rodrigues, "Improved production of butyl butyrate with lipase from *Thermomyces lanuginosus* immobilized on styrene–divinylbenzene beads". *Bioresour. Technol.*, 417-422, 2013a.
- [168] J. L. Friedrich, F. P. Peña, C. Garcia-Galan, R. Fernandez-Lafuente, M. A. Ayub & R. C. Rodrigues, "Effect of immobilization protocol on optimal conditions of ethyl butyrate synthesis catalyzed by lipase B from *Candida antarctica*". *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 1089-1095, 2013.
- [169] K. A. ADAMS, S. H. CHUNG & A. M. KLIBANOV, "Kinetic Isotope Effect Investigation of Enzyme". *J. Am. Chem. SOC*, 9418-9419, 1990.
- [170] M. M. PALCIC & J. P. KLINMAN, "Isotopic Probes Yield Microscopic Constants: Separation of Binding Energy from Catalytic Efficiency in the Bovine Plasma Amine Oxidase Reaction". *Biochemistry*, 5957-5966, 1983.
- [171] B. Juhl, "Modelling substrate specificity and enantioselectivity for lipases". *BMC Structural Biology*, 9-39, 2009.
- [172] J. Hogg, "Transition-state properties and rate-limiting processes in the acetylation of acetylcholine by natural and unnatural substrates". *J. Am. Chem. Soc.*, 2082-2086, 1980.
- [173] K. BÉLAFI-BAKÓ, "Kinetics of Ethyl Acetate Formation by Lipase in Organic Solvent and Solvent-Free System". *Chem. Pap.*, 278—281, 2003.
- [174] J. Tian, "The role of the medium in solvent isotope effects on serine protease action". *Can. J. Chem.*, 781–786, 1999.
- [175] W. W. Cleland, "Low-Barrier Hydrogen Bonds and Low Fractionation Factor Bases in Enzymatic Reactions". *Biochemistry*, 317-319, 1992.
- [176] D. Ericsson, "X-ray Structure of *Candida antarctica* Lipase A Shows a Novel Lid Structure and a Likely Mode of Interfacial Activation". *J. Mol. Biol.*, 109–119, 2008.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΦΟΥΚΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΟΣ

ΧΗΜΙΚΟΣ Μ. Sc.

ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΕΠΙΚΟΙΝΩΝΙΑΣ

Τηλέφωνο επικοινωνίας: 6930786281

Ηλεκτρονικό ταχυδρομείο (email): afouk717@gmail.com, afoukis@cc.uoi.gr

ΣΠΟΥΔΕΣ

- **Υποψήφιος Διδάκτωρ** του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, 2011-2017.
- **Μεταπτυχιακό Δίπλωμα** Ειδίκευσης στην Κλινική Βιοχημεία και Ανοσοχημεία-Μικροβιακή Βιοτεχνολογία, Τμήμα Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, 2011.
- **Πτυχίο Χημείας** (Τμήμα Χημείας Πανεπιστημίου Ιωαννίνων), 2008.

ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝΤΑ

Τα ερευνητικά μου ενδιαφέροντα εστιάζονται σε δύο κύριους άξονες:

Μηχανιστική Ενζυμολογία

- Μελέτη της κινητικής ενζυμικών και ετερογενών αντιδράσεων σε συμβατικά και μη μέσα, των οποίων διερευνάται ο μηχανισμός δράσης τους (S.I.E., K.I.E.) και αναπτύσσεται το βέλτιστο μαθηματικό μοντέλο, που τις περιγράφει.
- Ανάπτυξη νέων μεθοδολογιών για την διερεύνηση των μηχανισμών δράσης και της δυναμικής συμπεριφοράς ενζύμων
- Απομόνωση, καθαρισμός και χαρακτηρισμός νέων ενζύμων (εξειδίκευση σε πρωτεολυτικά και λιπολυτικά ένζυμα)
- Πειράματα προσομοίωσης (*in silico*) μοριακής πρόσδεσης (Docking) και δυναμικής (MD), για την διερεύνηση νέων υποστρωμάτων και αναστολέων ενζυμικών αντιδράσεων

Ενζυμική Βιοτεχνολογία

- Ενζυμικές αντιδράσεις σε μη συμβατικά μέσα (μη υδατικά μέσα, οργανικοί διαλύτες) για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας (π.χ. παραγωγή βιοκαυσίμου, πρόσθετα τροφίμων κ.α.)
- Βελτιστοποίηση πολλαπλών αποκρίσεων χρησιμοποιώντας την μεθοδολογία των αποκριτικών επιφανειών και την ανάλυση πολλαπλών κριτηρίων λήψης αποφάσεων (MCDA)
- Εφαρμοσμένη Βιοκατάλυση (Applied Biocatalysis)

ΣΥΜΜΕΤΟΧΗ ΣΕ ΕΡΕΥΝΗΤΙΚΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ

- ΕΣΠΑ 2007-2013: **ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ 2011, Κωδ. Έργου:** 11ΣΥΝ_8_839
«Αγροτοβιομηχανικά υγρά και στερεά απόβλητα ως πρώτες ύλες για την παραγωγή μιας νέας γενιάς βιοκαυσίμου» («Agroindustrial liquid and solid wastes as raw materials for the production of a new generation biofuel»).
- ΕΣΠΑ 2007-2013: **ΣΥΝΕΡΓΑΣΙΑ 2011, Κωδ. Έργου:** 11ΣΥΝ_2_1374 «Νανο- και Μικρο- βιοτεχνολογία κυτταρίνης: Εφαρμογές σε Βιομηχανίες Τροφίμων» («Cellulose Nano- and Micro- biotechnology: Applications in Food Industries»).

ΑΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ ΣΕ ΔΙΕΘΝΗ ΠΕΡΙΟΔΙΚΑ

1. A. Foukis, P-Y. Stergiou, L. G. Theodorou, M. Papagiannin and E. M. Papamichael, **“Purification, kinetic characterization and properties of a novel thermo-tolerant extracellular protease from *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288 with potential biotechnological interest”**, *Bioresource Technology*, 123 (2012) 214–220.
2. E. M. Papamichael, P-Y. Stergiou, A. Foukis, Marina Kokkinou and L. G. Theodorou, **“Effective Kinetic Methods and Tools in Investigating the Mechanism of Action of Specific Hydrolases”**, an invited contribution to *Medicinal Chemistry and Drug Design*, Chapter 12 (2012), Ed. D. Ekinici, INTECH open science (Open Access publisher of Scientific Books and Journals) publishers, University Capmus STeP Ri, Slavska Krautzeka 83/A, 51000 Rijeka, Croatia (ISBN 979-953-307-678-1 – <http://www.intechopen.com/books/medicinal-chemistry-and-drug-design>).
3. P-Y. Stergiou, A. Foukis, H. Sklivaniti, P. Zacharaki, M. Papagianni and E. M. Papamichael, **“Experimental investigation and optimization of process variables affecting the production of extracellular lipase by *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288”**, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, Online First™, 27 July 2012.
4. P-Y. Stergiou, A. Foukis, L. G. Theodorou, M. Papagianni and E. M. Papamichael, **“Optimization of Process Variables Affecting the Production of Extracellular Protease by *Kluyveromyces marxianus*”**, *Current Biotechnology*, 2 (2013) 23-29.
5. P-Y. Stergiou, A. Foukis, M. Filippou, M. Koukouritaki, M. Parapouli, L. G. Theodorou, E. Hatziloukas, A. Afendra, A. Pandey, and E. M. Papamichael, **“Advances in lipase-catalysed esterification reactions”**, *Biotechnology Advances*, 31 (2013) 1846-1859.
6. P-Y. Stergiou, A. Foukis, L. G. Theodorou, M. Papagianni and E. M. Papamichael, **“Production of Extracellular α -Amylase by *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288 optimized by response surface methodology”**, *BRAZ. ARCH. BIOL. TECHNOL.*, 57, (2014) 421-426.
7. A. Foukis, P-Y. Stergiou, M. Filippou, M. Koukouritaki, M. Parapouli, L. G. Theodorou, E. Hatziloukas, A. Afendra, A. Pandey, and E. M. Papamichael, **“Kinetic constraints and features imposed by the immobilization of enzymes onto solid**

- matrices: a key to advanced biotransformations**", *Ind. J. Experim.Biology* 52, (2014) 1045-1052.
8. A. Koutinas, M. Kanellaki, A. Bekatorou, P. Kandyli, K. Pissaridi, A. Dima, K. Boura, K. Lappa, P. Tsafrakidou, P.-Y. Stergiou, A. Foukis, O. A. Gkini, E. M. Papamichael, **"Economic evaluation of technology for a new generation biofuel production using wastes"**, *Bioresource Technology* 200, (2016) 178-185.
 9. P-Y. Stergiou, A. Foukis, O. A. Gkini, J. G. Bieth, & E. M. Papamichael, **"Kinetic and computational analysis of the reversible inhibition of porcine pancreatic elastase: a structural and mechanistic approach"**, *J Enzyme Inhib Med Chem*, 31(S3) (2016) 131-139.
 10. Athanasios Foukis, Olga A. Gkini, Panagiota-Yiolanda Stergiou, Vasilios A. Sakkas, Agapi Dima, Konstantina Boura, Athanasios Koutinas, Emmanuel M. Papamichael. **Sustainable production of a new generation biofuel by lipase-catalyzed esterification of fatty acids from liquid industrial waste biomass. *Bioresource Technology*. (2017), 238, 122–128.**
 11. Agapi Dima, Konstantina Boura, Argyro Bekatorou, Panagiota-Yiolanda Stergiou, Athanasios Foukis, Olga A. Gkini, Panagiotis Kandyli, Katerina Pissaridi, Maria Kanellaki, Emmanuel M. Papamichael, Athanasios A. Koutinas. **Scale-up for esters production from straw whiskers for biofuel applications. *Bioresource Technology*. (2017), 242, 109-112.**

ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΑ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

1. P-Y. Stergiou, A. Foukis, L.G. Theodorou, & E.M. Papamichael, **“PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF PROTEASES FROM *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288”**, INTERNATIONAL CONGRESS ON BIOPROCESSES IN FOOD INDUSTRIES, (2010), October 5-8, Curitiba – BRAZIL.
2. E. M. Papamichael, A. Foukis, M. Kokkinou, P-Y Stergiou, & L. G. Theodorou, **"Investigation of the mechanism of action of proteases and lipases: biotechnological aspects and applications"**, International Conference on New Horizons in Biotechnology, (2011), November 21-24, Trivandrum – India.
3. E. M. Papamichael, A. Foukis, M. Kokkinou, H. Sklivaniti, P-Y. Stergiou, L. G. Theodorou, **"Induction and optimization of culture conditions of yeast *Kluyveromyces marxianus* - IFO-0288: Production of extracellular Hydrolases"**, International Conference on New Horizons in Biotechnology, (2011), November 21-24, Trivandrum - India: **[POSTER Presentation]**.
4. P-Y. Stergiou, A. Foukis, H. Sklivaniti, P. Zacharaki, L. G. Theodorou, M. Papagianni, E. M. Papamichael, **“Experimental investigation and optimization of process variables affecting the production of extracellular hydrolases with protease, lipase and α -amylase activities by *Kluyveromyces marxianus* IFO 0288”**, IFIB-2012, 5th International Conference on Industrial Bioprocesses (2012), October 7-11, Taipei, Taiwan: **[ORAL Presentation]**.
5. P-Y. Stergiou, A. Foukis, M. Filippou, M. Koukouritaki, M. Parapouli, L. G. Theodorou, E. Hatziloukas, A. Afendra, A. Pandey, & E. M. Papamichael, **“The nature of pH-value in multiphasic reaction media: its influence in enzyme nanotechnology”**, Bio-Sangam-2013, (2013), International Conference on Environment, Health and Industrial Biotechnology, November 21-23, Allahabad, India: **[ORAL Presentation]**.
6. P-Y. Stergiou, A. Foukis, M. Filippou, M. Koukouritaki, M. Parapouli, L. G. Theodorou, E. Hatziloukas, A. Afendra, A. Pandey, & E. M. Papamichael, **“Analysis of immobilized enzymes kinetic data”**, Bio-Sangam-2013, (2013), International

Conference on Environment, Health and Industrial Biotechnology, November 21-23, Allahabad, India: **[POSTER Presentation]**.

7. A. Foukis, P-Y. Stergiou, M. Filippou, M. Koukouritaki, M. Parapouli, L. G. Theodorou, E. Hatziloukas, A. Afendra, A. Pandey, & E. M. Papamichael, “**Effective Concepts in Lipase-Catalyzed Esterification Reactions**”, ICABB-2013, (2013), International Conference on Advances in Biotechnology and Bioinformatics, & X Convention of the BRSI, November 25-27, PUNE, India: **[ORAL Presentation]**.
8. P-Y. Stergiou, A. Foukis, M. Filippou, M. Koukouritaki, M. Parapouli, L. G. Theodorou, E. Hatziloukas, A. Afendra, A. Pandey, & E. M. Papamichael, “**Kinetic constraints and features imposed by the immobilization of enzymes onto solid matrices: a key to advanced biotransformations**”, ICABB-2013, (2013), International Conference on Advances in Biotechnology and Bioinformatics, & X Convention of the BRSI, November 25-27, PUNE, India: **[POSTER Presentation]**.
9. A. Foukis, P-Y. Stergiou, M. Filippou, D. Noutsopoulos, E. Hatziloukas, A. Afendra, A. Pandey, and E. M. Papamichael, “**Synthesis of novel rennin substrates and development of innovative enzymatic assay methods**”, IFIBiop-2014, (2014), International Forum on Industrial Bioprocesses, September 7-10, LILLE, France: **[ORAL Presentation]**.
10. E. Karabika, M. Filippou, A. Foukis, P-Y. Stergiou, D. Noutsopoulos, M. Parapouli, A. Afendra, E. Hatziloukas, E. M. Papamichael, “ **Immobilization of grapevine indigenous strains in cellulose nano-tubes, for the production of high quality wines**”, IFIBiop-2014, (2014), International Forum on Industrial Bioprocesses, September 7-10, LILLE, France: **[POSTER Presentation]**.
11. O. Gkini, A. Foukis, P-Y. Stergiou, P. V. Ioannou. E. M. Papamichael, “**Specific hydrolysis effects of porcine pancreatic lipase on di-, tri- and tetra-acyl erythritols**”, IFIBiop-2014, (2014), International Forum on Industrial Bioprocesses, September 7-10, LILLE, France: **[POSTER Presentation]**.
12. M. Parapouli, M. Koukouritaki, A. Foukis, P-Y. Stergiou, E. Karabika, E. M. Papamichael, A. Afendra, E. Hatziloukas “**Partial characterization of bacterial strains possessing lipase activity isolated from waste treatment facilities of Volos**

- and Psittaleia (Greece)”, IFIBiop-2014, (2014), International Forum on Industrial Bioprocesses, September 7-10, LILLE, France: [POSTER Presentation].**
13. E. M. Papamichael, M. Koukouritaki, A. Foukis, P-Y. Stergiou, M. Parapouli, A. Afendra, E. Hatziloukas, “**Aspects in the catalytic synthesis of fatty acid esters, as biofuel alternatives, by native and/or genetically improved microbial lipases**”, ICETB 2014, International Conference on Emerging Trends in Biotechnology (2014), November 6-9, New Delhi, India: **[ORAL Presentation]**.
 14. M. Parapouli, A. Foukis, P-Y. Stergiou, M. Koukouritaki, E. Karabika, E. M. Papamichael, A. Afendra, E. Hatziloukas, “**Cloning and overexpression of a new lip gene from *Stenotrophomonas maltophilia* Psi-1 - purification and partial characterization of the recombinant lipase**”, 6th Congress on European Microbiologists (2015), June 7-11, Maastricht, The Netherlands: **[POSTER Presentation]**.
 15. M. Filippou, E. Karabika, M. Kallis, E. Troianou, M. Parapouli, P-Y. Stergiou, A. Foukis, D. Noutsopoulos, A. Afendra, E. M. Papamichael, E. Hatziloukas, “**Comparative study of fermentation processes by free and immobilized grapevine indigenous strains for the production of high quality wines**”, 6th Congress on European Microbiologists (2015), June 7-11, Maastricht, The Netherlands: **[POSTER Presentation]**.
 16. A. Foukis, P-Y. Stergiou, O. Gkini, V. A. Sakkas, M. Parapouli, M. Koukouritaki, A. Afendra, E. Hatziloukas, A. Pandey, & E. M. Papamichael, “**PRODUCTION OF A NEW GENERATION BIOFUEL FROM AGROINDUSTRIAL LIQUID AND SOLID WASTES**”, BIOTRANS 2015, (2015), July 26-30, Vienna, Austria: **[POSTER Presentation]**.
 17. A. Foukis, P-Y. Stergiou, O. Gkini, V. A. Sakkas, A. Pandey, & E. M. Papamichael, “**THE AMBIGUOUS KINETICS IN THE CASE OF LIPASE-CATALYZED ESTERIFICATION REACTIONS: A KEY TO THE ADVANCED BIOTRANSFORMATIONS**”, BIOTRANS 2015, (2015), July 26-30, Vienna, Austria: **[POSTER Presentation]**.

18. P-Y. Stergiou, A. Foukis, O.A. Gkini, and E. M. Papamichael, **“Biotechnological applications of proteolytic enzymes: Mechanism of the reversible inhibition of porcine pancreatic Elastase”**, New Horizons in Biotechnology, November 22-25, 2015 Trivandrum, India: **[Poster Presentation]**.
19. P-Y. Stergiou, A. Foukis, O. Gkini, T. Petsi, E. Hatziloukas, A. Afendra, A. Pandey, A. Koutinas, E. M. Papamichael (2015) **“Development of innovative assay methods for rennin, in free and in immobilized form on cellulose nanotubes: Synthesis of novel peptide substrates”**, New Horizons in Biotechnology, November 22-25, 2015 Trivandrum, India: **[Oral Presentation]**.
20. E. M. Papamichael, A. Foukis, O. A. Gkini, P-Y. Stergiou, V. A. Sakkas, A. Koutinas & A. Pandey, **“Lipase Catalyzed Esterification of Fatty acids from Industrial Wastes for Biofuel Production”**, BPI-2016, (2016), December 15-17, CIAB-Mohali, India: **[Oral Presentation]**.
21. E. M. Papamichael, P-Y. Stergiou, A. Foukis, O. A. Gkini, & A. Pandey, **“Advances of Enzyme Immobilization on cellulose nanoparticles”**, ICSEPM-2016, (2016), December 11-13, JNU-Jawaharlal Nehru University, New Delhi, India: **[Oral Presentation]**.
22. E. M. Papamichael, A. Foukis, O. A. Gkini, P-Y. Stergiou, V. A. Sakkas, A. Koutinas and A. Pandey, **“Lipase- assisted production of Biofuel from Industrial wastes from ethanol distilleries”**, ICCB-2016, (2016), December 8-10, Vellore, VIT-University, Vellore, TN- India: **[Oral Presentation]**.

ΞΕΝΕΣ ΓΛΩΣΣΕΣ

Γερμανικά

Αγγλικά

ΓΝΩΣΕΙΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΩΝ ΥΠΟΛΟΓΙΣΤΩΝ

Schrödinger Software Suite, OriginPro, Design-Expert, UNICORN, TIAMO, Wolfram Mathematica, DynaFit., Windows/Linux, Microsoft Office.

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Ιούλιος-Αύγουστος 2004: Πρακτική άσκηση στην ΑΓΡΟΤΙΚΗ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΓΑΛΑΚΤΟΣ ΗΠΕΙΡΟΥ ΔΩΔΩΝΗ Α.Ε.

ΜΕΛΟΣ ΕΠΙΣΤΗΜΟΝΙΚΩΝ ΣΥΛΛΟΓΩΝ

1. Μέλος της ένωσης Ελλήνων χημικών
2. Μέλος της ελληνικής εταιρίας βιοχημείας και μοριακής βιολογίας