



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ
ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ
«ΜΙΚΡΟΒΙΑΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ»

Βιοκαταλύτης ακινητοποιημένος σε σύστημα
συνεχούς ροής για τη σύνθεση προϊόντων
υψηλής προστιθέμενης αξίας

ΦΙΛΙΠΠΟΥ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΑ

A.M. 209005

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
Επιβλέπων
Χατζηνικολάου Δημήτριος
Επίκουρος καθηγητής

Αθήνα, 2014



NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
SCHOOL OF SCIENCE
FACULTY OF BIOLOGY, DEPARTMENT OF BOTANY
PROGRAM OF POSTGRADUATE STUDY IN
“MICROBIAL BIOTECHNOLOGY”

**Biocatalyst immobilized in a continuous flow
system for the synthesis of high added value
products**

Athens, 2014

Επιτροπή Αξιολόγησης

Δημήτριος Χατζηνικολάου

Επίκουρος Καθηγητής Μικροβιακής Βιοτεχνολογίας του Τμήματος
Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και
Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Κωνσταντίνος Βοργιάς

Καθηγητής Βιοχημείας του Τμήματος Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

Ανδρέας Ρούσσης

Επίκουρος Καθηγητής Μοριακής Φυσιολογίας Φυτών του Τμήματος
Βιολογίας της Σχολής Θετικών Επιστημών του Εθνικού και
Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία με θέμα «Βιοκαταλύτης ακινητοποιημένος σε σύστημα συνεχούς ροής για τη σύνθεση προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας» πραγματοποιήθηκε υπό την επίβλεψη του Επίκουρου καθηγητή κ. Δημητρίου Χατζηνικολάου τον οποίο ευχαριστώ για την ανάθεση του θέματος. Το πειραματικό μέρος της εργασίας αυτής πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών (ΕΙΕ) υπό την επίβλεψη του Διευθυντή Ερευνών Δρ. Άρη Ξενάκη.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Διευθυντή Ερευνών του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών Δρ. Άρη Ξενάκη για την υπόδειξη του θέματος, την αμέριστη υποστήριξη και τις πολύτιμες συμβουλές του για την ολοκλήρωση της παρούσας εργασίας. Έπειτα θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τη Δρ. Μαρία Ζουμπανιώτη και τον Γιώργο Σωτηρούδη για τη συνεχή καθοδήγηση, τις ουσιώδεις συμβουλές, καθώς και για τη συνολική ευχάριστη συνεργασία που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας αυτής.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω θερμά την οικογένεια μου και τους φίλους μου, που με την καθημερινή τους συμπαράσταση, την υπομονή τους και την θετική τους σκέψη, συνέβαλαν στην εκπλήρωση του στόχου μου.

Στον φίλο και αδελφό Μάνο

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών έχει εκδηλώσει εδώ και χρόνια το ενδιαφέρον της για τη χρήση συστατικών που δίνουν υψηλή προστιθέμενη αξία στα προϊόντα τους. Η σύνθεση τέτοιων ουσιών είναι συνήθως ακριβή και ενεργειοβόρος, οπότε δύο από τα κύρια προβλήματα που καλούνται να επιλύσουν οι βιομηχανίες για να διευκολύνουν την παραγωγή τους είναι η επιλογή βελτιωμένου καταλύτη και η απλούστευση και καλύτερη απόδοση των διεργασιών που ακολουθούνται.

Η εργασία αυτή προτείνει τη χρήση ενός αντιδραστήρα συνεχούς ροής ο οποίος πληρώνεται με βιοσυμβατό βιοκαταλύτη αποτελούμενο από ένζυμο ακινητοποιημένο σε φυσικό πολυμερές. Επομένως, προσφέρει τόσο τα πλεονεκτήματα ενός αντιδραστήρα συνεχούς ροής όπως η υψηλή απόδοση και η μετατροπή υποστρωμάτων χαμηλής διαλυτότητας, όσο και τα πλεονεκτήματα της βιοκατάλυσης όπως περιορισμένα παραπροϊόντα και ήπιες συνθήκες λειτουργίας, επομένως χαμηλό κόστος. Επίσης, ο βιοκαταλύτης που προτείνεται παρουσιάζει ένα ακόμα πλεονέκτημα. Αποτελείται από ένζυμο ακινητοποιημένο σε φορέα φυσικού πολυμερούς, επομένως είναι ένα σύστημα φιλικό προς το περιβάλλον και κυρίως βιοσυμβατό, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διεργασίες που έχουν ως τελικό σκοπό την παραγωγή ουσιών που θα χρησιμοποιηθούν σε σκευάσματα όπως τρόφιμα, φάρμακα ή καλλυντικά.

Το σύστημα συνεχούς ροής που προτείνεται αποτελείται από δύο όμοιες στήλες οι οποίες ενώνονται με σωληνώσεις και τη μεσολάβηση αντλίας. Η κάθε στήλη πληρώνεται με τον βιοκαταλύτη ο οποίος αποτελείται από πήκτωμα βασισμένο σε μικρογαλάκτωμα το οποίο περιέχει το ένζυμο. Το πήκτωμα αποτελείται από υδρόξυ-προπυλ-μεθυλο κυτταρίνη (HPMC). Το μικρογαλάκτωμα στο οποίο βασίζεται η παρασκευή του πηκτώματος αποτελείται από ισοοκτάνιο, λεκιθίνη, 1-προπανόλη και υδατική φάση (νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα) η οποία περιέχει το ένζυμο (λιπάση).

Στη συνέχεια για τη βελτιστοποίηση του σύστηματος συνεχούς ροής παρατηρείται η μεταβολή στην απόδοση της αντίδρασης σύνθεσης του λαυρικού προπυλεστέρα (πρότυπη αντίδραση) και στη δραστικότητα του ένζυμου μετά από επαναλαμβανόμενες χρήσεις του. Επίσης, προτείνεται μέθοδος για την διατήρηση της

αποδοτικότητας του συστήματος συνεχούς ροής ακόμα και μετά από επαναλαμβανόμενες χρήσεις.

Εκτός από την αντίδραση σύνθεσης του λαυρικού προπυλεστέρα, μελετώνται τρεις ακόμη αντιδράσεις που οδηγούν στην παραγωγή προϊόντων με βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Η αντίδραση εστεροποίησης της οκτανόλης με το π-υδροξυ-φαινυλοξικό οξύ και οι αντιδράσεις εστεροποίησης της γερανιόλης και της νερόλης με το λαυρικό οξύ. Τέλος, προς επιβεβαίωση της αποδοτικότητας του συστήματος έγινε η απομόνωση και ο διαχωρισμός των προϊόντων που παράχθηκαν από τις προηγούμενες αντιδράσεις, καθώς και η ταυτοποίηση του λαυρικού προπυλέστερα που παράχθηκε από την πρότυπη αντίδραση.

ABSTRACT

A continuous flow system is developed and proposed for the continuous synthesis of various high value added products that interest food, cosmetics and pharmaceutical industry. Such compounds can be esters of fatty acids or natural phenolic acids or terpene alcohol esters. Four different continuous flow systems were studied. The system that seemed to be more efficient was the one that consisted of two columns filled with the enzyme-containing organogel and a pump. For this purpose, hydroxypropylmethyl cellulose (HPMC) microemulsion-based organogels (MBGs) containing lecithin microemulsion is used as a matrix for the enzyme immobilization.

Further studies were carried out in order to optimize the reaction conditions. A model reaction was used in order to optimize the system - the esterification of lauric acid with 1-propanol. The reusability and storage (non-operational) stability of the immobilized lipase were also studied. An alternative method is proposed in order to minimize the reduction of enzymatic activity after three uses of the same continuous flow system.

After system optimization the possibility of producing high added value products in large scale using a continuous flow system has been investigated. Thus, three more reactions were studied. The esterification reaction of p-hydroxy phenyl acetic acid with 1-octanol, the esterification reaction of lauric acid with nerol and the esterification reaction of lauric acid with geraniol. Finally, the products of the reactions mentioned above were recovered from the reaction medium and propyl laurate has been identified by NMR spectroscopy.

Λέξεις Κλειδώματα: Βιομετατροπές, Λιπάσες, Εστεροποίηση, Οργανοπήκτωμα, Αντιδραστήρας.

Key Words: Biotransformations, Lipases, Esterification, Organogel, Reactor.

Περιεχόμενα

1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	12
1.1	Λιπάσες.....	13
1.1.1	Ακινητοποίηση ενζύμων.....	15
1.1.2	Ακινητοποίηση σε μη συμβατικά μέσα.....	16
1.2	Μικρογαλακτώματα.....	17
1.2.1	Λιπάσες ακινητοποιημένες σε αντίστροφα μικκύλια.....	21
1.2.2	Τεχνικές και εμπορικές εφαρμογές.....	22
1.2.3	Ανάκτηση προϊόντος και επαναχρησιμοποίηση ενζύμου.....	24
1.3	Πηκτώματα μικρογαλακτωμάτων.....	25
1.3.1	Ακινητοποίηση σε πηκτώματα μικρογαλακτωμάτων και ενζυμική κατάλυση.....	28
1.3.2	Αποθήκευση και επαναχρησιμοποίηση των MBGs.....	32
1.3.3	Φυσικά Βιοπολυμερή.....	34
1.3.4	Επίδραση της χημικής δομής του πολυμερούς στο οργανοπήκτωμα.....	36
1.3.5	Εφαρμογές.....	37
1.4	Εστεροποίηση.....	38
1.5	Λιπαρά Οξέα.....	39
1.6	Φαινολικά Οξέα.....	42
1.7	Τερπένια.....	44
1.8	Συστήματα συνεχούς ροής.....	45
1.8.1	Κατηγορίες αντιδραστήρων συνεχούς ροής.....	48
1.8.2	Προοπτικές για το μέλλον.....	51
1.9	Σκοπός της Εργασίας.....	52
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	53
2.1	Υλικά.....	54

2.1.1	Λιπάσες.....	54
2.1.2	Υλικά μικρογαλακτώματος, πηκτώματος και υποστρωμάτων.....	54
2.1.3	Υλικά για τον διαχωρισμό και απομόνωση των εστέρων.....	54
2.1.4	Όργανα.....	55
2.2	Μέθοδοι.....	55
2.2.1	Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος.....	55
2.2.2	Παρασκευή ενζυμικών διαλυμάτων.....	56
2.2.3	Παρασκευή μικρογαλακτώματος.....	56
2.2.4	Παρασκευή οργανοπηκτώματος (HPMC).....	56
2.2.5	Διεξαγωγή αντιδράσεων.....	56
2.2.6	Αναλυτικές Μέθοδοι.....	59
2.2.7	Διαχωρισμός των προϊόντων ενζυμικής εστεροποίησης με χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας.....	60
2.2.8	Διαχωρισμός των προϊόντων ενζυμικής εστεροποίησης με χρωματογραφία στήλης.....	60
2.2.9	Ταυτοποίηση λαυρικού προπυλεστέρα με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).....	61
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	63
3.1	Βελτιστοποίηση Συστήματος Συνεχούς ροής.....	65
3.1.1	Εύρεση κατάλληλης συνδεσμολογίας.....	65
3.1.2	Επαναχρησιμοποίηση στηλών	77
3.1.3	Αλλαγή μιας στήλης μετά από κάθε χρήση του ζεύγους στηλών.....	84
3.2	Μελέτη αντιδράσεων βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος.....	90
3.2.1	Αντίδραση εστεροποίησης φαινολικών οξέων.....	91
3.2.2	Αντιδράσεις εστεροποίησης τερπενικών αλκοολών.....	93
3.3	Απομόνωση, Διαχωρισμός και Ταυτοποίηση προϊόντων.....	95

4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	99
4.1	Ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης σε σύστημα συνεχούς ροής.....	101
4.2	Παραγώ προϊόντων βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος.....	102
4.3	Απομόνωση, Διαχωρισμός και Ταυτοποίηση.....	105
4.4	Γενικά Συμπεράσματα.....	105
5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	107
6	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	128
6.1	Πατέντα.....	129

Εισαγωγή

1.1 Λιπάσες

Η συστηματική έρευνα των ενζύμων αρχίζει πριν μερικές δεκάδες χρόνια, παρόλο που οι ενζυμικές διεργασίες είναι γνωστές από τους αρχαίους χρόνους. Οι διάφορες εφαρμογές τους αποτελούν σήμερα ίσως το μεγαλύτερο ενδιαφέρον των βιοτεχνολόγων. Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον της βιομηχανίας για τα ένζυμα και ιδιαίτερα για τις λιπάσες έχει αυξηθεί κατακόρυφα λόγω της εκτενούς εφαρμογής τους στην σύγχρονη βιομηχανία.

Οι λιπάσες είναι ευρέως διαδεδομένα ένζυμα. Παράγονται από διάφορους μικροοργανισμούς - κυρίως βακτήρια, μύκητες, αρχαία, ευκάρυα καθώς και από ανώτερα ζώα και φυτά. Καταλύουν τη διάσπαση λιπών και ελαίων ελευθερώνοντας λιπαρά οξέα, διακυλογλυκερόλες, μονο- ακυλογλυκερόλες και γλυκερόλη. Επιπλέον, είναι αποτελεσματικά έναντι ποικίλων αντιδράσεων όπως εστεροποίηση, μετεστεροποίηση και αμινόλυση όταν βρίσκονται σε οργανικούς διαλύτες (Villeneuve *et al.* 2000).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι μικροβιακές λιπάσες (Πίνακας 1.1) επειδή δεν απαιτούν την παρουσία συνενζύμου, είναι σταθερές στους οργανικούς διαλύτες, εμφανίζουν ευρεία εξειδίκευση ως προς τα υποστρώματα και έχουν υψηλή εναντιοεκλεκτικότητα. Οι εφαρμογές των λιπασών αυτών, στη βιομηχανία τροφίμων, είναι πολλές και ποικίλες (Πίνακας 1.2). Άλλωστε η σημερινή αγορά χρησιμοποιεί πληθώρα προϊόντων που προκύπτουν από βιοδιεργασίες ή υβριδικές χημικές/βιοκαταλυτικές διαδικασίες.

Η ολοένα αυξανόμενη εφαρμογή τους στη βιομηχανία τροφίμων, ιδιαίτερα τα τελευταία 40 χρόνια, είναι πολύ σημαντική και πολλά υποσχόμενη. Οι λιπάσες αξιοποιούνται επίσης σε ένα μεγάλο φάσμα εφαρμογών της βιομηχανίας πετροχημικών, απορρυπαντικών, βιολογικών προϊόντων, βυρσοδεψίας, διαχείρισης περιβάλλοντος, καλλυντικών και αρωμάτων, βιοϊατρικών εφαρμογών και βιοασθητήρων (Aravindan *et al.* 2007).

Ο λόγος που ανέδειξε και κατέστησε εμπορικά εκμεταλλεύσιμη την χρήση των λιπασών σχετίζεται κυρίως με την ικανότητα αυτών των ενζύμων να λειτουργούν αποτελεσματικά τόσο σε συμβατικά υδατικά διαλύματα όσο και σε μέσα χαμηλής περιεκτικότητας σε νερό. Η δυνατότητα διατήρησης της καταλυτικής τους ικανότητας σε συστήματα των οποίων η περιεκτικότητα σε νερό είναι περιορισμένη (μη

Πίνακας 1.1. Πηγές μικροβιακών λιπασών και οι εφαρμογές τους στην επεξεργασία τροφίμων (Aravindan *et al.* 2007).

Μικροοργανισμοί	Εφαρμογές στη βιομηχανία τροφίμων
<i>Aspergillusoryzae</i>	Σύνθεση κορεσμένων λιπαρών οξέων
<i>Bacillussubtilis</i>	Παρασκευή άρτου
<i>Candida rugosa</i>	Σύνθεση πρόσθετων γεύσης
<i>C. antarctica</i> ,* <i>Pseudomonas sp.</i>	Σύνθεση λιπόφιλων αντιοξειδωτικών
<i>C. parapsilosis</i>	Πρόσθετα τροφίμων
<i>C. rugosa</i>	Παραγωγή τυριού
<i>M. miehei</i> *	Σύνθεση εστέρων γερανιόλης
<i>M. miehei</i> * & <i>C. antarctica</i> *	Σύνθεση θειοεστέρων μικρής αλυσίδας
<i>R. miehei</i> *	Επιφανειονεργά στη βιομηχανία άρτου

*με έντονη γραμματοσειρά αναγράφονται οι λιπάσες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πειραματική διαδικασία.

Πίνακας 1.2 Εφαρμογές λιπασών στη βιομηχανία τροφίμων (Sharma *et al.* 2001).

Βιομηχανία τροφίμων	Λειτουργία	Προϊόν εφαρμογής
Γαλακτοκομικά	Υδρόλυση λιπών του γάλακτος, ωρίμανση τυριού, τροποποίηση λιπών βουτύρου	Ανάπτυξη αρωματικών παραγόντων σε γάλα, τυρί, βούτυρο
Αρτοποιεία	Ενίσχυση γεύσης	Αύξηση διάρκειας ζωής
Ποτά	Ενίσχυση αρώματος	Αλκοολούχα ποτά
Σάλτσες τροφίμων	Βελτίωση ποιότητας	Μαγιονέζα και σάλτσες
Υγιεινές Τροφές	Trans - εστεροποίηση	Υγιεινές Τροφές
Λίπη και έλαια	Trans-εστεροποίηση, υδρόλυση	Βούτυρο κακάο, μαργαρίνη, λιπαρά οξέα

συμβατικα συστήματα), επιτρέπει την κατάλυση αντιδράσεων προς τη κατεύθυνση της σύνθεσης και όχι της υδρόλυσης (Rees and Robinson 1995, Valivety *et al.* 1991).

Τέλος, η χρήση των λιπασών προσδίδει σημαντικά οφέλη όσον αφορά το χαμηλό κόστος παραγωγής και τη φθορά του εξοπλισμού. Στις περισσότερες εφαρμογές τους είναι αποτελεσματικοί βιοκαταλύτες υπό ήπιες συνθήκες, με αποτέλεσμα τη σημαντική εξοικονόμηση ενέργειας και τη φιλικότητα προς το περιβάλλον σε σχέση με τις πολύπλοκες χημικές διεργασίες. Σε έναν κόσμο με ραγδαία αυξανόμενο πληθυσμό και με τον κίνδυνο της εξάντλησης φυσικών πόρων, η τεχνολογία ενζύμων προσφέρει μια μεγάλη ευκαιρία στη σύγχρονη βιομηχανία να ανταποκριθεί στις προκλήσεις του μέλλοντος (Kirk *et al.* 2002).

1.1.1 Ακινητοποίηση ενζύμων

Η ακινητοποίηση ενζύμου ορίζεται ως η μετατροπή ενός ενζύμου σε μία μιορφή τεχνητά περιορισμένης κινητικότητας η οποία παρέχει σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως την επαναχρησιμοποίηση του ενζύμου και τη διευκόλυνση στις διαδικασίες ανάκτησης και καθαρισμού. Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις παρέχει ένα καλύτερο περιβάλλον για τη δράση του ενζύμου. Επειδή το κόστος των ενζύμων είναι υψηλό, η επαναχρησιμοποίηση τους είναι κρίσιμη σε ορισμένες διεργασίες. Τέλος, αξίζει να αναφερθεί ότι με την ακινητοποίηση των ενζύμων συνήθως βελτιώνεται η καθαρότητα των προϊόντων και ελαχιστοποιούνται τα προβλήματα χειρισμού του υγρού εκροής όταν οι αντιδράσεις πραγματοποιούνται σε μεγάλη κλίμακα μέσα σε βιοαντιδραστήρες. Η καταλληλότητα του υλικού και της μεθόδου ακινητοποίησης εξαρτάται από το ένζυμο που χρησιμοποιείται και από τη συγκεκριμένη εφαρμογή.

Η επιλογή του υλικού ακινητοποίησης γίνεται με βάση τα εξής 2 κριτήρια:

1. την ικανότητα πρόσδεσης του υλικού, που είναι συνάρτηση της πυκνότητας του φορτίου, των λειτουργικών ομάδων, του πορώδους και της υδροφοβικότητας της επιφάνειας του υλικού και
2. τη σταθερότητα και τη διατήρηση της ενζυμικής δραστικότητας, που είναι συνάρτηση των λειτουργικών ομάδων του υλικού ακινητοποίησης και των μικροπεριβαλλοντικών συνθηκών.

Αν η ακινητοποίηση προκαλεί αλλαγές στη διαμόρφωση του ενζύμου ή αν δραστικές ομάδες του ενεργού κέντρου παίρνουν μέρος στην πρόσδεση, μπορεί να

επέλθει μείωση της δραστικότητας του ενζύμου κατά την ακινητοποίηση. Συνήθως η ακινητοποίηση έχει ως αποτέλεσμα την ελάττωση της ενζυμικής δραστικότητας και σταθερότητας. Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις, μπορεί να προκαλέσει αύξηση της σταθερότητας και δραστικότητας του ενζύμου που οφείλεται στη δημιουργία περισσότερο ευνοϊκών μικροπεριβαλλοντικών συνθηκών. Επειδή τα ένζυμα έχουν συχνά περισσότερα από ένα λειτουργικά κέντρα που μπορούν να προσδεθούν στην επιφάνεια του υλικού στήριξης, ένα ακινητοποιημένο ενζυμικό παρασκεύασμα συχνά είναι πολύ ετερογενές. Ακόμα και όταν η πρόσδεση δεν αλλάζει την ενζυμική δομή, μερικά ένζυμα μπορούν να προσδεθούν με τέτοιο τρόπο ώστε το ενεργό τους κέντρο να είναι προσανατολισμένο μακριά από το διάλυμα του υποστρώματος και προς την επιφάνεια στήριξης, με αποτέλεσμα να μειώνεται η δυνατότητα πρόσβασης του υποστρώματος στο ένζυμο. Η διατήρηση της ενεργότητας διαφέρει ανάλογα με τη μέθοδο ακινητοποίησης που χρησιμοποιείται (Shuler *et al.* 2005).

Άλλοι περιορισμοί σχετίζονται με το υψηλό κόστος του φορέα, το οποίο πολλές φορές μπορεί να ξεπεράσει και το κόστος του ίδιου του ενζύμου. Παρά τους περιορισμούς, όμως, είναι αδιαμφισβήτητη η επιτυχής εφαρμογή των ακινητοποιημένων ενζύμων στα διαγνωστικά, στη φαρμακευτική, στα τρόφιμα και στις χημικές βιομηχανίες (Reis *et al.* 2008, Drauz and Waldmann 2002).

1.1.2 Ακινητοποίηση σε μη συμβατικά μέσα

Με τον όρο μη συμβατικά μέσα (non conventional media) αναφερόμαστε σε συστήματα χαμηλής περιεκτικότητας σε νερό στα οποία έχει αποδειχτεί ότι τα ένζυμα διατηρούν τις καταλυτικές τους ιδιότητες. Με τη βοήθεια των συστημάτων αυτών μπορούν να πραγματοποιηθούν ενζυμικές αντιδράσεις τεχνολογικού ενδιαφέροντος. Αυτό συμβαίνει γιατί τα ένζυμα δεν αντιλαμβάνονται όλα τα μόρια του νερού στο διάλυμα, αλλά μόνο αυτά που είναι πολύ κοντά τους. Έτσι τα ένζυμα μπορούν να καταλύσουν αντιδράσεις που είναι αδύνατον να λάβουν μέρος σε υδατικό περιβάλλον ενώ παράλληλα να διατηρούν η δραστικότητά τους.

Η παρουσία της οργανικής φάσης στο σύστημα βιοκατάλυσης συνοδεύεται από μία σειρά σημαντικών πλεονεκτημάτων τα οποία σχετίζονται με:

1. Την αύξηση διαλυτότητας των υδρόφοβων υποστρωμάτων.
2. Τη δυνατότητα μετατόπισης της χημικής ισορροπίας της αντίδρασης προς την επιθυμητή κατεύθυνση.

3. Τη δυνατότητα περιορισμού παράπλευρων αντιδράσεων όπως και περιορισμού της αναστολής από το υπόστρωμα ή το προϊόν, γεγονός που συνοδεύεται από αύξηση της απόδοσης της βιοκαταλυτικής διαδικασίας.
4. Την εύκολη ανάκτηση του βιοκαταλύτη από το μίγμα αντίδρασης και κατά συνέπεια τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του.
5. Τη δυνατότητα ελέγχου της τόπο- και στερεοεικλεκτικότητας των βιοκαταλυτών.
6. Την αυξημένη διαλυτότητα αέριων υποστρωμάτων στους οργανικούς διαλύτες σε σχέση με τα υδατικά διαλύματα.

Τα μη συμβατικά συστήματα διακρίνονται στις ακόλουθες κατηγορίες:

- Σε μονοφασικά ομογενή συστήματα.
- Σε διφασικά συστήματα αποτελούμενα από δύο υγρές φάσεις.
- Σε μικροετερογενή συστήματα
- Σε διφασικά συστήματα αποτελούμενα από μία υγρή και μία στερεή φάση
- Μονοφασικά ετερογενή συστήματα (Σταμάτης Χαράλαμπος, 2006)

Τα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο ή αντίστροφα μικκύλια, στα οποία θα αναφερθούμε παρακάτω, είναι μη συμβατικά συστήματα τα οποία ανήκουν στα μικροετερογενή συστήματα. Αποτελούν μια ειδική περίπτωση των διφασικών συστημάτων όπου η υδατική φάση που είναι διεσπαρμένη στην οργανική δεν είναι μακροσκοπικά διακριτή από την οργανική φάση του συστήματος, γεγονός που καθιστά το σύστημα οπτικά διαυγές (Σταμάτης και Καλογερής, 2006).

1.2 Μικρογαλακτώματα

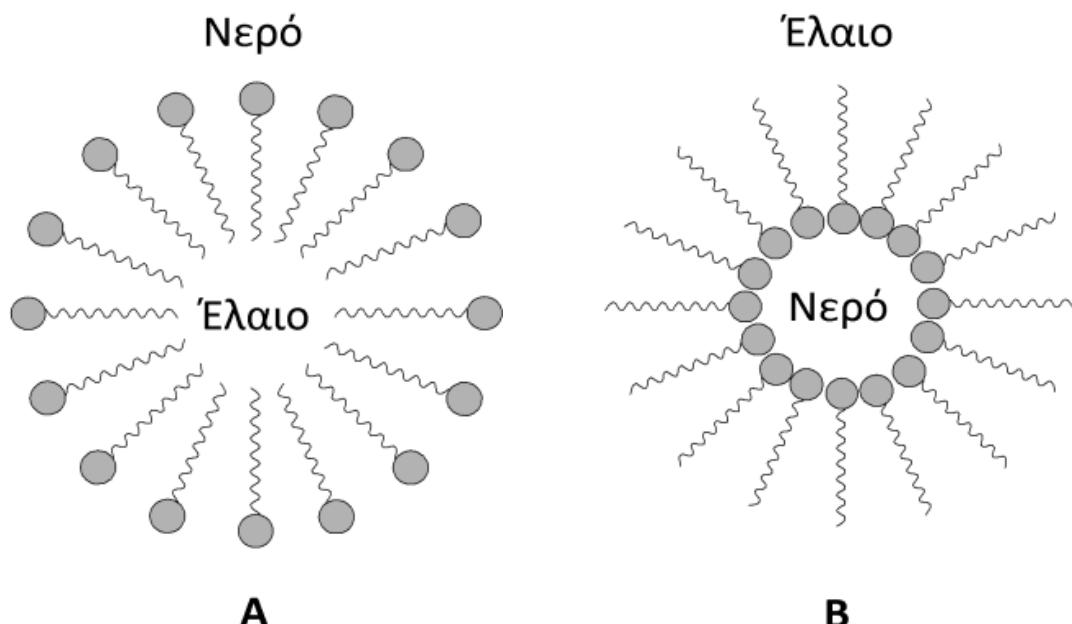
Μεγάλες ποσότητες διφασικών υγρών μπορούν να σχηματίσουν μία φάση (μακροσκοπικά ομογενή αλλά μικροσκοπικά ετερογενή) με την προσθήκη κάποιου επιφανειοενεργού ή μίγμα επιφανειοενεργών. Αυτό το οπτικά καθαρό, θερμοδυναμικά σταθερό και συνήθως σταθερού 1ξώδους διάλυμα ονομάζεται μικρογαλάκτωμα (Danielson and Lindman 1982). Τα μικρογαλακτώματα, έχουν ονομαστεί έτσι εξαιτίας του μικρού μεγέθους των διασπορών τους (5-100nm) Μπορούν να σχηματιστούν με την ανάμειξη ενός αλειφατικού υδρογονάθρακα

(έλαιο) με νερό ώστε να παράγουν διαυγή διαλύματα σχηματίζοντας διασπορές σε κλίμακα νανομέτρων, είτε νερού σε έλαιο (w/o), είτε ελαίου σε νερό (o/w).

Σημαντικό ρόλο στη δημιουργία της δομής των μικρογαλακτωμάτων παίζει το επιφανειοενεργό. Τα επιφανειοενεργά είναι αμφίφιλα μόρια που έχουν υδρόφιλα και υδρόφιβα τμήματα. Τα μόρια αυτά προσανατολίζονται κατάλληλα ώστε να έχουν τις υδρόφιλες κεφαλές στραμμένες προς το νερό και τις υδρόφιβες ουρές προς το έλαιο. Με τον τρόπο αυτό μειώνουν την επιφανειακή τάση μεταξύ ελαίου και νερού, ώστε να έχουμε τον αυθόρυμητο σχηματισμό των προαναφερθέντων μικροετερογενών συστημάτων. Η αναμειξιμότητα του ελαίου, του νερού και των αμφίφιλων (επιφανειοενεργά και συνεπιφανειοενεργά) εξαρτάται απ' την ολική σύσταση, η οποία είναι διαφορετική για κάθε σύστημα (Paul and Moulik 2001).

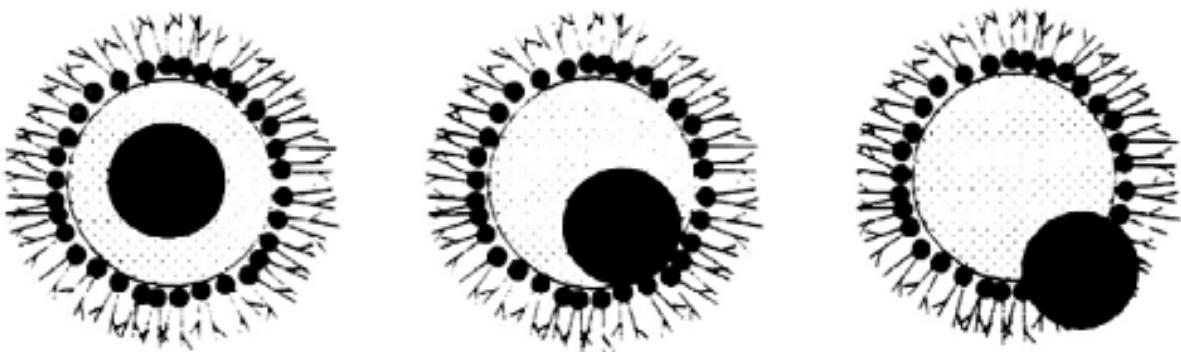
Όταν τα επιφανειοενεργά μόρια βρεθούν στο νερό σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από μια συγκεκριμένη τιμή που ονομάζεται κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση (critical micellar concentration – CMC), τότε δημιουργούν τέτοιες δομές ώστε να περιοριστούν οι υδρόφιβες περιοχές που έρχονται σε επαφή με το νερό. Οι δομές αυτές καλούνται μικκύλια. Οι υδρόφιβες ουρές συναθροίζονται στο εσωτερικό των μικκυλίων, ενώ οι υδρόφιλες κεφαλές παραμένουν στο εξωτερικό τους ώστε να αυξήσουν την επιφάνεια επαφής τους με το νερό. Έτσι προκύπτουν τα μικρογαλακτώματα ελαίου σε νερό o/w. (Εικόνα 1.1A). Σε αντίθετη περίπτωση, δηλαδή όταν βρεθούν σε περίσσεια «ελαίου», οι υδρόφιλες κεφαλές του επιφανειοενεργού προσανατολίζονται προς την κοιλότητα που περιέχει το νερό, ενώ οι υδρόφιβες ουρές του έρχονται σε επαφή με το διαλύτη (Εικόνα 1.1B). Έτσι προκύπτουν τα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο (w/o) ή αντίστροφα μικκύλια (Stamatis *et al.* 1999β).

Τα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο είναι ικανά να φιλοξενούν ένζυμα στην υδάτινη περιοχή (waterpool) που περικλείουν. Κατά συνέπεια, το παγιδευμένο ένζυμο δεν έρχεται σε άμεση επαφή με τον οργανικό διαλύτη, περιορίζοντας έτσι την μετουσίωση του πρώτου. Η βιοκατάλυση με τη χρήση αντίστροφων μικκυλίων, είναι μια από τις ευρέως μελετημένες προσπάθειες διαλυτοποίησης ένζυμων σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες (Luisi *et al.* 1979, Grandi *et al.* 1981, Fletcher *et al.* 1986, Luisi and Magid 1986, Martinek *et al.* 1986, Luisi *et al.* 1988, Martinek *et al.* 1989).



Εικόνα 1.1: Αναπαράσταση των συστημάτων μικρογαλακτωμάτων (A) ελαίου σε νερό και (B) νερού σε έλαιο.

Η διαλυτότητα των ενζύμων στα μικρογαλακτώματα εξαρτάται από αρκετούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων του pH και της ιοντικής ισχύος της υδατικής φάσης, του μεγέθους του ενζύμου και των αντίστροφων μικκυλίων, καθώς και της φύσης του επιφανειοενεργού (Luisi and Magid 1986, Matzke *et al.* 1992, Stamatis *et al.* 1999a). Ο εγκλωβισμός του ενζύμου στην υδάτινη περιοχή είναι μια πολύπλοκη διαδικασία. Έχει προταθεί ότι η υδροφοβικότητα του επιφανειοενεργού παίζει καθοριστικό ρόλο στην θέση που καταλαμβάνει το ένζυμο μέσα στο σύστημα. Με αυτόν τον τρόπο το υδρόφιλο ένζυμο αποφεύγει την άμεση επαφή με την οργανική φάση και παραμένει ακινητοποιημένο στην υδάτινη περιοχή (Εικόνα 1.2) (Martinek *et al.* 1986, Martinek *et al.* 1989, Matzke *et al.* 1992). Έτσι, καθίσταται εφικτή η κατάλυση υδροφοβών υποστρωμάτων λόγω της τεράστιας διεπιφάνειας που παρέχουν. Επιπλέον, η αύξηση της διεπιφάνειας οδηγεί και στην αύξηση των μορίων του υποστρώματος που μπορούν να αντιδράσουν.



Εικόνα 1.2: Αναπαράσταση των θέσεων που καταλαμβάνει το ένζυμο στα αντίστροφα μικκύλια (Martinek *et al.* 1986).

Τα w/o μικρογαλακτώματα προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα ως μέσο αντίδρασης για βιοκαταλυτικές μετατροπές.

- Τόσο υδρόφιλα όσο και υδρόφοβα υποστρώματα μπορούν να διαλυτοποιηθούν σε υψηλές συγκεντρώσεις (Stamatis *et al.* 1993γ & 1999β).
- Η ρύθμιση της περιεκτικότητας του συστήματος σε νερό μπορεί εύκολα να αλλάξει την θερμοδυναμική ισορροπία μεταξύ αντιδράσεων συμπύκνωσης και υδρόλυσης.
- Η ενεργότητα, η σταθερότητα, και η στερεοεικλεκτικότητα των ενζύμων μπορεί να ενισχυθεί ελέγχοντας την σύσταση των μικρογαλακτωμάτων (Martinek *et al.* 1989, Luisi and Magid 1986, Stamatis *et al.* 1999β, Carvalho and Cabral 2000, Orlich and Schomacker 2002, Garti 2003).

Μέσω των αντίστροφων μικκυλίων είναι εφικτό να πραγματοποιηθούν αντιδράσεις που απαιτούν τη χρήση πολλαπλών ενζύμων. (Pavlenko *et al.* 2002).

Πέραν των βιοκαταλυτικών εφαρμογών, αξίζει να σημειωθεί ότι, οι νανοδομές εντός του μικρογαλακτώματος αναγνωρίζονται ως πρότυπο σύστημα βιολογικών δομών που διευκολύνει την κατανόηση της σχέσης δομής-δραστικότητας πρωτεΐνης/ενζύμου, υπό συνθήκες που μιμούνται βιολογικά περιβάλλοντα σε οπτικά διαυγή διαλύματα.

1.2.1. Λιπάσες ακινητοποιημένες σε αντίστροφα μικκύλια

Οι λιπάσες, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, αντιπροσωπεύουν μια ομάδα ενζύμων που χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία για την υδρόλυση λιπών και ελαιών, ενώ συμμετέχουν και στη σύνθεση χρήσιμων ουσιών. Η δραστικότητα αυτών των υδρολυτικών ενζύμων αυξάνεται σημαντικά στη διεπιφάνεια ελαίου - νερού, ένα φαινόμενο γνωστό ως διεπιφανειακή ενεργοποίηση (Verger R. 1980, Derewenda and Sharp 1993). Ως εκ τούτου, τα αντίστροφα μικκύλια έχουν χρησιμοποιηθεί ως μέσα για την επίτευξη τέτοιων αντιδράσεων, λόγω της μεγάλης τους διεπιφάνειας η οποία ενεργοποιεί τη λιπάση και διευκολύνει την επαφή μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος. (Carvalho *et al.* 1999, Stamatis *et al.* 1999a)

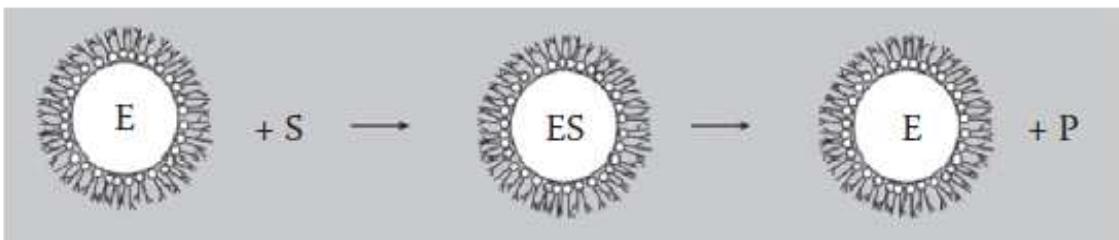
Η βιοκαταλυτική συμπεριφορά και η σταθερότητα των λιπασών έχουν μελετηθεί σε αντίστροφα μικκύλια που έχουν σχηματιστεί με τη χρήση ιοντικών (όπως ΑΟΤ και CTAB), μη-ιοντικών (Tween[®], TritonTM) ή φυσικών (λεκιθίνη) επιφανειοενεργών. Η καταλυτική δραστικότητα των εγκλωβισμένων λιπασών εξαρτάται από τη γραμμομοριακή συγκέντρωση του νερού και άλλων ιόντων που συνυπάρχουν στην περιοχή του ενζύμου (Carvalho *et al.* 1999, Stamatis *et al.* 1999β, Mitra *et al.* 2005), καθώς και από τη φύση και τη συγκέντρωση του επιφανειοενεργού που χρησιμοποιείται (Marangoni A.G. 1993, Tsai *et al.* 1995, Brown *et al.* 1993).

Υπάρχουν πολλές αναφορές στη βιβλιογραφία που μελετούν την κινητική ακινητοποιημένων λιπασών σε μικρογαλακτώματα, ειδικά όταν καταλύουν την υδρόλυση ή τη σύνθεση εστέρων. Συνήθως, η υδρόλυση των τριγλυκεριδίων ακολουθεί το απλό μοντέλο κινητικής Michaelis – Menten (Han and Rhee 1986, Han *et al.* 1987), ενώ η εστεροποίηση αλειφατικών αλκοολών με λιπαρά οξέα ακολουθεί το μηχανισμό ping-pong bi–bi (Stamatis *et al.* 1993β). Σύμφωνα με αυτό το μηχανισμό η λιπάση αντιδρά με το λιπαρό οξύ για να σχηματίσει ένα σύμπλοκο ενζύμου - λιπαρού οξέος το οποίο στη συνέχεια μετατρέπεται σε ένα ενδιάμεσο άκυλο-ενζύμο, ενώ απελευθερώνεται νερό· ακολουθεί αντίδραση με την αλκοόλη για να σχηματίσει ένα δεύτερο σύμπλοκο που παράγει τελικά τον εστέρα και το ελεύθερο ένζυμο. (Stamatis *et al.* 1993γ, 1993β, 1995α)

Τα δομικά χαρακτηριστικά των αντίστροφων μικκυλίων όπως είναι το μέγεθος, το σχήμα και η ικανότητα διαλυτοποίησης, επηρεάζουν σημαντικά την δραστικότητα του ενζύμου. Στις περισσότερες περιπτώσεις, οι καταλυόμενες από λιπάση υδρολυτικές αντιδράσεις διεξάγονται σε αντιδραστήρες διαλλείποντος έργου. Ο βαθμός ενυδάτωσης των μικρογαλακτωμάτων φαίνεται να είναι ο βασικότερος

παράγοντας που καθορίζει την ταχύτητα της αντίδρασης. Ο Han και οι συνεργάτες του έδειξαν ότι η αρχική περιεκτικότητα σε νερό επηρεάζει σημαντικά την ισορροπία των υδρολυτικών αντιδράσεων στα μικρογαλακτώματα (Han *et al.* 1987).

Οι μελέτες που σχετίζονται με την εφαρμογή των λιπασών στην κατάλυση υδρολυτικών αντιδράσεων είναι σημαντικές για να κατανοήσουμε τον τρόπο δράσης τους. Ωστόσο οι αντιδράσεις σύνθεσης είναι πιο σημαντικές για τη βιομηχανία. Τα αντίστροφα μικκύλια μπορούν να μετατοπίσουν τη θέση ισορροπίας των αντιδράσεων αυτών προς την κατεύθυνση της σύνθεσης. Επιπλέον, το μικρογαλάκτωμα ως μέσο, διευκολύνει την διαλυτοποίηση υλικών με διαφορετικές πολικότητες. Το λιπόφιλο υπόστρωμα (π.χ. λιπαρό οξύ) και τα προϊόντα μπορούν να διαλυτοποιηθούν σε μια συνεχή οργανική φάση, ενώ το υδρόφιλο υπόστρωμα όπως η γλυκερόλη ή μια μικρής αλυσίδας αλκοόλη μπορεί να ενσωματωθεί στα αντίστροφα μικκύλια (Εικόνα 1.3).



Εικόνα 1.3: Μοντέλο αναπαράστασης μιας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης λιπόφιλων υποστρωμάτων σε w/o μικρογαλάκτωμα. E: λιπόφιλο ένζυμο, S: λιπόφιλο υπόστρωμα και P: προϊόν (Xenakis *et al.* 2009).

1.2.2 Τεχνικές και εμπορικές εφαρμογές

Τόσο οι τεχνικές όσο και οι εμπορικές εφαρμογές των μικρογαλακτωμάτων σχετίζονται με τις μοναδικές ιδιότητες τους, όπως η θερμοδυναμική σταθερότητα, η οπτική διαύγεια, και η υψηλή ικανότητα διαλυτοποίησης. Ωστόσο, το βασικότερο πρόβλημα σχετικά με τη χρήση των μικρογαλακτωμάτων στα τρόφιμα, στα καλλυντικά και στα φάρμακα, είναι η τοξικότητα των επιμέρους συστατικών τους.

Για σχεδόν δύο δεκαετίες η μορφοποίηση και ο χαρακτηρισμός ασφαλών μικρογαλακτωμάτων έχει μελετηθεί εκτενώς. Η πρώτη προσπάθεια για χρήση φυσικών βιοαποικοδομήσιμων επιφανειοενεργών για το σχηματισμό ασφαλών

μικρογαλακτωμάτων έγινε από τον Shinoda και τους συνεργάτες του (Shinoda and Kaneko 1988, Shinoda *et al.* 1991). Από τότε, παρουσιάστηκαν πολλές μελέτες από διάφορες ερευνητικές ομάδες σχετικά με τον σχηματισμό μικρογαλακτωμάτων από ουσίες φιλικές προς το περιβάλλον (Peng and Luisi 1990, Kahlweit *et al.* 1995α, Kahlweit *et al.* 1995β, Avramiotis *et al.* 1996, Avramiotis *et al.* 1997).

Στα περισσότερα μικρογαλακτώματα που χρησιμοποιούνται για την πραγματοποίηση ενζυμικών αντιδράσεων με βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον, η συνεχής οργανική φάση αποτελείται συνήθως από κορεσμένους υδρογονάνθρακες όπως εξάνιο, οκτάνιο, ισοοκτάνιο, κυκλοεξάνιο και βενζόλιο. Το πιο σημαντικό πρόβλημα σχετικά με την εφαρμογή τους στη βιομηχανία φαρμάκων και τροφίμων είναι η δυσκολία αποδοχής των συστατικών τους. Για το λόγο αυτό, τα μικρογαλακτώματα θα πρέπει να σχηματίζονται από βιοσυμβατά συστατικά και επομένως νέοι «πράσινοι» διαλύτες είναι αναγκαίο να εισαχθούν στο πεδίο αυτό.

Το 2000 και το 2001 οι Ichikawa και συνεργάτες χρησιμοποίησαν φωσφολιπίδια ως γαλακτωματοποιητές και μίγμα λιπαρών οξέων και αιθυλεστέρων ως οργανικό διαλύτη για το σχηματισμό μικρογαλακτωμάτων (Ichikawa *et al.* 2000, Sugiura *et al.* 2001). Τα συστήματα αντίστροφων μικκυλίων που προέκυψαν από αυτές τις μελέτες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα διαλυτοποίησης διαφόρων υδρόφιλων λειτουργικών συστατικών στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων. Παρα το γεγονός ότι τριγλυκερίδια (μακριάς και μεσαίας αλυσίδας) και εστέρες λιπαρών οξέων χρησιμοποιούνται συχνά ως ελαιώδης φάση για την παρασκευή μικρογαλακτωμάτων (Malcolmson and Lawrence 1995, Warisnoicharoen *et al.* 2000, Podlogar *et al.* 2004), το μεγάλο μέγεθος και ο ελαφρώς αμφίφιλος και ημιπολικός χαρακτήρας τους καθιστά δύσκολο τον σχηματισμό αντίστροφων μικκυλίων. Ωστόσο, η αντικατάσταση των τριγλυκεριδίων από φθηνά και εμπορικά διαθέσιμα έλαια όπως το σογιέλαιο, το ηλιέλαιο ή το έλαιο τζοτζόμπα (jojobaoil) (Constantinides and Scalart 1997, Shevachman *et al.* 2004), είναι μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση για την προετοιμασία νέων, σταθερών και βιοσυμβατών σκευασμάτων. Πρόσφατα και το ελαιόλαδο (παρθένο ή εξευγενισμένο) προτάθηκε ως ένα φυσικό, μη τοξικό και φθηνό προϊόν για τη σύσταση βιοσυμβατών μικρογαλακτωμάτων (Papadimitriou *et al.* 2005, Papadimitriou *et al.* 2007). Τέλος, το 2008 έγινε εκτεταμένη μελέτη σχετικά με τη δομή w/ομικρογαλακτωμάτωναπό λεκιθίνη τα οποία σχηματίστηκαν με R(+) λιμονένιο και αλκοόλες (Papadimitriou *et*

al. 2008). Τα συστήματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς ως μικρο-αντιδραστήρες για τη διεξαγωγή εστεροποιήσεων καταλυόμενων από λιπάση.

1.2.3 Ανάκτηση προϊόντος και επαναχρησιμοποίηση ενζύμου

Όπως έχουμε προαναφέρει τα w/o μικρογαλακτώματα σχηματίζονται ανθόρμητα, είναι ισότροπα και θερμοδυναμικά σταθερά, υγρά μέσα, με μεγάλη επιφανειακή τάση, στην οποία τα αντιδρώντα μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα εγκλωβισμένα ένζυμα. Σε ένα τέτοιο σύστημα τα ένζυμα διατηρούν τη δραστικότητά τους καθώς είναι ικανά να καταλύσουν μετατροπές τόσο υδρόφιλων όσο και υδρόφιβων υποστρωμάτων. Ωστόσο, η παρουσία επιφανειοενεργών παρεμποδίζει την ανάκτηση του προϊόντος με συνήθεις μεθόδους όπως εκχύλιση και απόσταξη. Ως εκ τούτου, πρέπει να αναπτυχθούν εναλλακτικές μέθοδοι ακινητοποίησης και στρατηγικές διαχωρισμού του προϊόντος.

Βέβαια έχουν γίνει προσπάθειες για το διαχωρισμού του ενζύμου και του προϊόντος από το μικρογαλάκτωμα. Συγκεκριμένα, ο Larsson και οι συνεργάτες του μελέτησαν αντιδράσεις σε δισυνεχή μικρογαλακτώματα. Κατάφεραν με μικρές αλλαγές στη θερμοκρασία να διαχωρίσουν το μικρογαλάκτωμα σε δύο φάσεις. Η μία φάση (οργανική) περιλάμβανε το προϊόν, ενώ η άλλη (υδατική) περιλάμβανε το ένζυμο μαζί με το επιφανειοενεργό. Έτσι κατάφερε να απομονώσει τη φάση που περιείχε το προϊόν και να την αντικαταστήσει με μια άλλη οργανική φάση που θα περιείχε νέο υπόστρωμα (Larsson *et al.* 1990).

Επίσης, έχουν γίνει προσπάθειες διαχωρισμού ενζύμου και προϊόντος σε μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο (w/o). Στη μελέτη αυτή, συνδυάστηκε η τεχνική του Larsson με μια άλλη μέθοδο απομόνωσης των πρωτεΐνων από το μικρογαλάκτωμα μέσω υγρής-υγρής εκχύλισης ανάμεσα στη φάση των μικκυλίων και υδατικό διάλυμα. Ο διαχωρισμός επιτεύχθηκε αλλά χάθηκε μεγάλο μέρος της δραστικότητας του ενζύμου (Stamatis *et al.* 1995β).

Άλλες μέθοδοι προτείνουν τους αντιδραστήρες μεμβράνης για να καταστεί δυνατή η ανάκτηση των προϊόντων από τα μικρογαλακτώματα και να επιτραπεί η επαναχρησιμοποίηση του βιοκαταλύτη σε διάφορες ενζυμικές διεργασίες, όπως η υδρόλυση των τριγλυκεριδίων (Nascimento *et al.* 1992, Backlund *et al.* 1995), η σύνθεση εστέρων (Rees *et al.* 1991, Rees *et al.* 1995) και η σύνθεση πεπτιδίων (Luisi and Laane 1986, Serralheiro *et al.* 1994, Serralheiro *et al.* 1999). Αυτοί οι

αντιδραστήρες επωφελούνται από τις δυνατότητες των συνθετικών ημιπερατών μεμβρανών να διατηρούν τα ένζυμα επί της μεμβράνης και να ανακτούν τα προϊόντα από την πλευρά του διηθήματος. Η παραγωγικότητα αυτής της μεθόδου καθώς και η σταθερότητα του ενζύμου σε τέτοιους αντιδραστήρες είναι συνήθως υψηλή. Το πρόβλημα αυτής της μεθόδου εντοπίζεται στο γεγονός ότι οι μεμβράνες είναι πολύ ευαίσθητες και παρουσιάζουν μικρή αντοχή σε ενζυμικούς αντιδραστήρες.

Οι Lüthi και Luisi χρησιμοποίησαν έναν μεμβρανικό αντιδραστήρα κοίλων ινών για τη σύνθεση πεπτιδίων καταλυόμενη από την α-χυμοτρυψίνη ακινητοποιημένη σε μικρογαλάκτωμα (Lüthi and Luisi 1984).

Μια άλλη προσέγγιση όμως, που απλοποιεί την ανάκτηση του προϊόντος και την ανακύκλωση του βιοκαταλύτη από το μικρογαλάκτωμα είναι **α)** είτε η χρήση συστημάτων χωρίς επιφανειοενεργό (Smith *et al.* 1977, Borys *et al.* 1979, Lara *et al.* 1981, Puig *et al.* 1987, Khmelnitsky *et al.* 1988, Zoumparnioti *et al.* 2006), **β)** είτε η πηκτωματωποίηση των w/o μικρογαλακτωμάτων προσθέτοντας βιοπολυμερή όπως ζελατίνη, άγαρ ή παράγωγα κυτταρίνης, σχηματίζοντας έτσι ένα φορέα κατάλληλο για την ακινητοποίηση ενζύμων (Rees *et al.* 1991, Backlund *et al.* 1995, Stamatis and Xenakis 1999, Delimitsou *et al.* 2002, Zoumparnioti *et al.* 2006, Blattner *et al.* 2006, Zoumparnioti *et al.* 2010β). Τα τελευταία ονομάζονται πηκτώματα μικρογαλακτωμάτων (οργανογέλες ή MBGs) και προσφέρουν αρκετά πλεονεκτήματα έναντι των συστημάτων μικρογαλακτωμάτων που περιέχουν ένζυμα, όπως η ικανότητά τους να ακινητοποιούντους βιοκαταλύτες σε μοριακό επίπεδο και να ενσωματώνουν συμπαράγοντες ενζύμων. Επιπλέον, αυτές οι οργανογέλες, σε μεγάλη έκταση, ξεπερνούν μείζονα προβλήματα, όπως η εύκολη ανάκτηση και επαναχρησιμοποίηση του βιοκαταλύτη, που πρέπει να αντιμετωπιστούν για τη χρήση τους σε βιομηχανικές διαδικασίες (Zoumparnioti *et al.* 2006).

1.3. Πηκτώματα μικρογαλακτωμάτων

Βιομετατροπές με τη χρήση ενζύμων σε μέσα χαμηλής περιεκτικότητας σε νερό όπως τα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο (w/o) έχουν μελετηθεί εκτενώς και έχουν αξιολογηθεί από πολλούς επιστήμονες (Ballesteros *et al.* 1995, Carrea and Riva, 2000, Klibanov, 2001, Garti, 2003, Xenakis *et al.* 2009). Είναι αξιοσημείωτο το γεγονός ότι πολλά w/o μικρογαλακτώματα μπορούν να μετατραπούν σε πηκτώματα

με την προσθήκη ενός παράγοντα πηκτωματοποίησης όπως π.χ. ζελατίνης, παραγώγων κυτταρίνης ή άγαρος, δημιουργώντας μια μήτρα κατάλληλη για την ακινητοποίηση ενζύμων. Ο όρος «πήκτωμα ή γέλη» χρησιμοποιείται για να χαρακτηρίσει στερεά ή ημι-στερεά συστήματα που αποτελούνται από τουλάχιστον δύο συστατικά. Πρόκειται για συμπυκνωμένα συστήματα που στο εσωτερικό τους μπορούν να μεταφερθούν οργανικά ή διαλυτά μόρια (π.χ. μέσω διάχυσης). Όταν το βασικό υγρό τους είναι νερό ονομάζονται υδρογέλεςενώ όταν είναι έλαιο ονομάζονται οργανογέλες.

Οι πρώτες αναφορές σχετικά με την παρασκευή πηκτωμάτων μικρογαλακτώματος (MBGs), ήταν το 1986 (Haering and Luisi 1986, Quellet and Eicke 1986). Οι γέλες που παρασκευάστηκαν ήταν μονοφασικά, οπτικά ισότροπα (επομένως διαυγή), άκαμπτα συστήματα, τα οποία προήλθαν από την πηκτωματοποίηση μικρογαλάκτωμάτων νερού σε έλαιο με επιφανειοενεργό ΑΟΤ μετά από ανάμιξή τους με υδατικό διάλυμα ζελατίνης σε θερμοκρασία μεγαλύτερη της θερμοκρασίας πηκτωματοποίησης. Η ψύξη σε θερμοκρασία δωματίου που ακολουθεί οδηγεί στο σχηματισμό ενός διαφανούς πηκτώματος με επαναλήψιμες φυσικές ιδιότητες.

Ο Robinson και οι συνεργάτες του κατάφεραν να αποδείξουν ότι τα MBGs που βασίζονται σε ζελατίνη και περιέχουν ένζυμα εγκλωβισμένα σε μικρογαλακτώματα ΑΟΤ μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως ένα καινούριο μέσο για την ακινητοποίηση ενζύμων (Rees *et al.* 1991, Jenta *et al.* 1997β). Συνεχείς μελέτες έδειξαν ότι τα MBGs που σχηματίζονται με ζελατίνη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση διαφόρων εστέρων και παρατηρήθηκε ότι τα ένζυμα που ακινητοποιούνται σε αυτά εμφανίζουν τόπο- και στερεο-εκλεκτικότητα.

Τα μικρογαλακτώματα που βασίζονται σε φυσικά επιφανειοενεργά όπως η λεκιθίνη έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί επιτυχώς (Hedström *et al.* 1997). Αυτά, παρουσιάζουν υψηλή συγκέντρωση νερού ($w_0 > 40$) και υψηλή συγκέντρωση πολυμερούς, περίπου 10-14 % w/v. Επιπλέον, κάτω από τις περισσότερες συνθήκες το πήκτωμα διατηρεί πλήρως τα συστατικά του (επιφανειοενεργό, ζελατίνη και ένζυμο) επιτρέποντας τη διάχυση μη πολικών υποστρωμάτων ή προϊόντων μεταξύ της μη πολικής φάσης και των τεμαχίων του πηκτώματος.

Εκτός από τη ζελατίνη, πολυμερή όπως το άγαρ, η καραγενάνη και η κυτταρίνη αναφέρθηκε ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το σχηματισμό MBGs που

θα χρησιμοποιηθούν ως μέσα ακινητοποίησης ενζύμων. Αυτού του είδους τα οργανοπηκτώματα, ξεπερνούν περιορισμούς που προκύπτουν από οργανοπηκτώματα που βασίζονται σε ζελατίνη, όπως η μη σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες και σε πολλούς διαλύτες. Επίσης εμφανίζουν πολλές βιοκαταλυτικές εφαρμογές, αφού παρέχουν καλή μηχανική και θερμική σταθερότητα, ενώ παράλληλα εμφανίζουν υψηλή σταθερότητα σε υδρόφιλα περιβάλλοντα (Delimitsou *et al.* 2002, Blattner 2006, Zoumpanioti *et al.* 2006, Zoumpanioti *et al.* 2008). Έχει αποδειχτεί ότι ακινητοποιημένα ένζυμα σε οργανοπηκτώματα υδροξυ-προπυλο-μεθυλο-κυτταρίνης (HPMC) διατηρούν την καταλυτική τους δραστικότητα ακόμη και στους 50 °C, καθώς και ότι το οργανοπήκτωμα είναι σταθερό ακόμα και σε υψηλότερες θερμοκρασίες (Zoumpanioti *et al.* 2008).

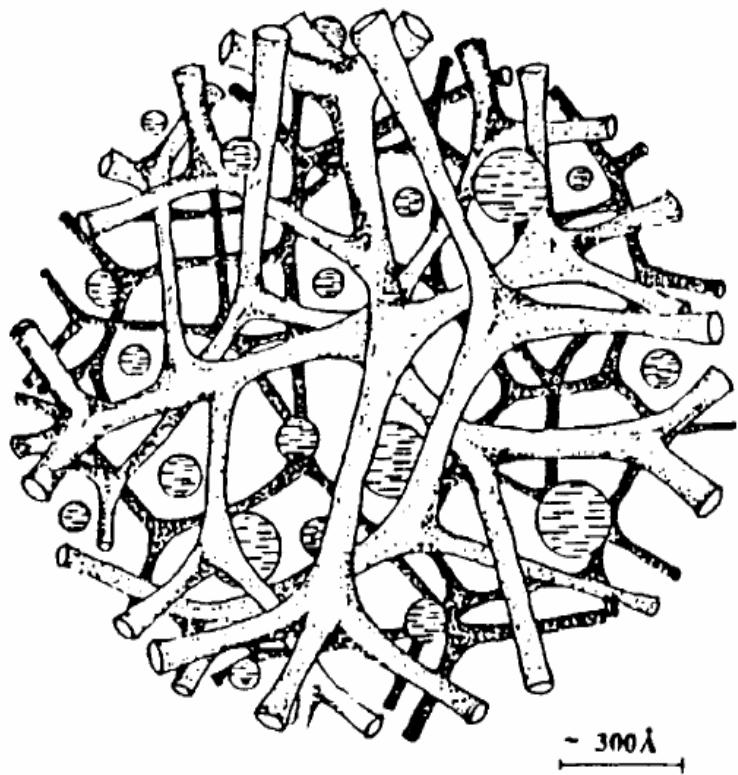
Τα δομικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των MBGs εξετάστηκαν διεξοδικά από διάφορους συγγραφείς (Atkinson *et al.* 1988, Buisson *et al.* 2003, Burova *et al.* 2007, Capitani *et al.* 1988, Haering and Luisi 1986, Quellet *et al.* 1991, John *et al.* 2006, Blattner *et al.* 2006) χρησιμοποιώντας διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές όπως σκέδαση φωτός (Quellet and Eicke 1986), NMR (Capitani *et al.* 1988), μετρήσεις ηλεκτρικής αγωγιμότητας (Quellet και Eicke, 1986), ή διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC) (Blattner *et al.* 2006). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τις παραπάνω μελέτες προτάθηκαν τρία διαφορετικά μοντέλα για τη μικροδομή αυτών των συστημάτων:

1. Συσσωματωμμένα μόρια ζελατίνης, που σχηματίζουν ένα άκαμπτο δίκτυο το οποίο περιβάλλεται από κανάλια νερού που διαπλέκονται με κανάλια ελαίου και διαχωρίζονται από τη ζώνη του επιφανειοενεργού (Capitani *et al.* 1988).

2. Δίκτυο ζελατίνης, όπως και στο πρώτο μοντέλο, που συνυπάρχει με σταγόνες νερού σε έλαιο, σταθεροποιημένες από το επιφανειοενεργό, για παράδειγμα AOT (Atkinson *et al.* 1989).

3. Αντίστροφα μικκύλια τα οποία περιέχουν νερό και ένα μέρος της συνολικής ζελατίνης. Τα μικκύλια συνδέονται με το υπόλοιπο μέρος της ζελατίνης και είναι διατεταγμένα σε έλικες (Petit *et al.* 1991).

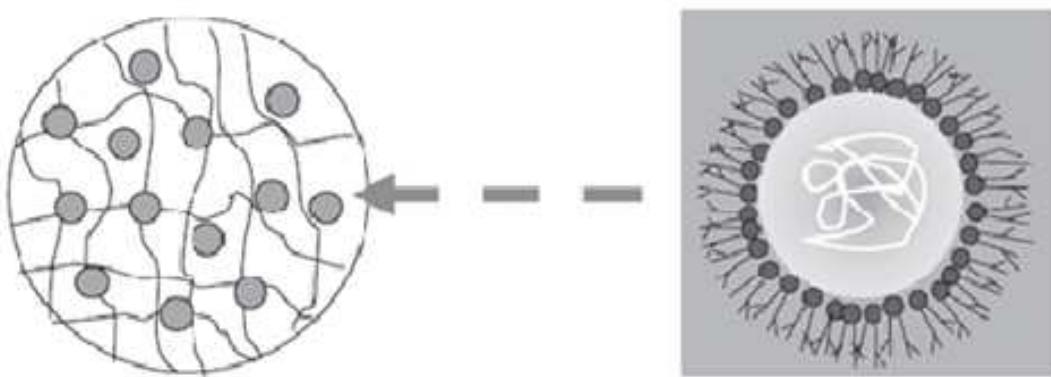
Στο σχήμα που ακολουθεί (Εικόνα 1.4) εμφανίζεται η προτεινόμενη δομή ενός πηκτώματος ζελατίνης από μικρογαλάκτωμα με επιφανειοενεργό AOT σε ισοοκτάνιο.



Εικόνα 1.4 Χαρακτηριστική προτεινόμενη δομή οργανοπηκτώματος που βασίζεται σε μικρογαλάκτωμα νερού σε έλαιο (Atkinson *et al.* 1988).

1.3.1 Ακινητοποίηση σε πηκτώματα μικρογαλακτωμάτων και ενζυμική κατάλυση

Τα MBGs από φυσικά βιοπολυμερή και w/o μικρογαλακτώματα χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς για την ακινητοποίηση ενζύμων με σκοπό την επίτευξη βιοκατάλυσης σε μη συμβατικά μέσα, καθώς φαίνεται να είναι άκαμπτα και σταθερά για μεγάλο χρονικό διάστημα, ακόμη και εντός του διαλύματος αντίδρασης (Zoumparnioti *et al.* 2010β). Η χρήση τους ως φορείς για την ακινητοποίηση ενζύμων προσφέρει το πλεονέκτημα της «διπλής» ακινητοποίησης, κατ' αρχήν μέσω των μικκυλίων του μικρογαλακτώματος και κατα δεύτερον μέσω του πλέγματος του πολυμερούς (Εικόνα 1.5).



Εικόνα 1.5 Η εικόνα δεξιά απεικονίζει το πλέγμα πολυμερούς που περικλείει μικρογαλάκτωμα με ακινητοποιημένο ένζυμο, ενώ αριστερά φαίνεται το ένζυμο εγκλωβισμένο εντός της υδάτινης περιοχής που έχει σχηματιστεί από τα αντίστροφα μικρύλια (Xenakis *et al.* 2009).

Μέχρι σήμερα έχουν δημοσιευθεί πολλές μελέτες με αντικείμενο τη χρήση ενζύμων ακινητοποιημένων σε πηκτώματα μικρογαλακτωμάτων για την πραγματοποίηση βιομετατροπών. Οι περισσότερες από αυτές αναφέρονται στην ακινητοποίηση λιπασών και ειδικότερα έχει μελετηθεί η αντίδραση εστεροποίησης. Στον παρακάτω πίνακα αναφέρονται τα περισσότερα ένζυμα που έχουν ακινητοποιηθεί σε οργανογέλες (Πίνακας 1.3).

Πίνακας 1.3. Ένζυμα ακινητοποιημένα σε οργανογέλες (Zoumpanioti *et al.* 2010β)

Enzyme	Polymer	Microemulsion	Reference
<i>cytochrome C</i>	Gelatin	AOT	Haering and Luisi, 1986
<i>Chromobacterium viscosum</i> lipase	Gelatin	Lecithin	Backlund <i>et al.</i> 1995
		AOT	Rees <i>et al.</i> 1991, Jenta <i>et al.</i> 1991, Jenta <i>et al.</i> 1996, Jenta <i>et al.</i> 1997a, Jenta <i>et al.</i> 1997b, Nascimento <i>et al.</i> 1992, Backlund <i>et al.</i> 1995, de Jesus <i>et al.</i> 1995, Rees <i>et al.</i> 1995, Backlund <i>et al.</i> 1996, Schuleit and Luisi, 2001
<i>Pseudomonas sp</i> lipase	Gelatin	AOT	Rees <i>et al.</i> 1991, Jesus <i>et al.</i> 1995, Rees <i>et al.</i> 1995
<i>Microbial</i> lipase	Gelatin	AOT	Rees <i>et al.</i> 1991, Rees <i>et al.</i> 1995

...συνέχεια του Πίνακα 1.3

Enzyme	Polymer	Microemulsion	Reference
<i>Candida SP 525</i> lipase	Gelatin	AOT	Backlund <i>et al.</i> 1996
		Lecithin	Backlund <i>et al.</i> 1996, Hedström <i>et al.</i> 1997
<i>Candida rugosa</i> lipase	Gelatin	AOT	Nagayama <i>et al.</i> 1998, Fadnavis and Koteswar 1999, Soni and Madamwar 2001
		Lecithin	Nagayama <i>et al.</i> 2002
		Triton-X100	Dave and Madamwar 2008
	Alginate beads	CTAC	Doumèche <i>et al.</i> 2002
		AOT	de María <i>et al.</i> 2004a
		Lecithin	de María <i>et al.</i> 2004a; de María <i>et al.</i> 2004b
<i>Candida antarctica</i> lipase	Agar	Lecithin	Pastou <i>et al.</i> 2000, Zoumpanioti <i>et al.</i> 2008
		AOT	Zoumpanioti <i>et al.</i> 2008
	HPMC	Lecithin	Pastou <i>et al.</i> 2000, Blattner <i>et al.</i> 2006, Zoumpanioti <i>et al.</i> 2008
		AOT	Blattner <i>et al.</i> 2006, Zoumpanioti <i>et al.</i> 2008
		surfactantless	Zoumpanioti <i>et al.</i> 2006
	Gelatin	AOT	Hedström <i>et al.</i> 2001, Blattner <i>et al.</i> 2006
		Lecithin	Blattner <i>et al.</i> 2006
<i>Candida lypolytica</i> lipase	Gelatin	AOT	Zhou <i>et al.</i> 2001
<i>Pseudomonas cepacia</i> lipase	Gelatin	AOT	Xenakis and Stamatis, 1999
		Lecithin	Stamatis and Xenakis, 1999
	Agar	AOT	Xenakis and Stamatis, 1999
		Lecithin	Stamatis and Xenakis, 1999
	κ-carrageenan	Lecithin	Stamatis and Xenakis, 1999
<i>alcohol dehydrogenase</i>	Gelatin	AOT	Fadnavis and Koteswar, 1999
<i>Sorghum bicolor</i>	Gelatin	AOT	Fadnavis and Koteswar, 1999
<i>horseradish peroxidase</i>	Gelatin	AOT	Fadnavis and Koteswar, 1999
<i>Rhizomucor miehei</i> lipase	Agar	Lecithin	Pastou <i>et al.</i> 2000, Zoumpanioti <i>et al.</i> 2008
		AOT	Zoumpanioti <i>et al.</i> 2008
	HPMC	Lecithin	Pastou <i>et al.</i> 2000, Zoumpanioti <i>et al.</i> 2008
		AOT	Zoumpanioti <i>et al.</i> 2008
		surfactantless	Zoumpanioti <i>et al.</i> 2006
<i>Mucor miehei</i> lipase	HPMC	Lecithin	Delimitsou <i>et al.</i> 2002, Blattner <i>et al.</i> 2006

...συνέχεια του Πίνακα 1.3

Enzyme	Polymer	Microemulsion	Reference
<i>Mucor miehei</i> lipase	HPMC	AOT	Delimitsou <i>et al.</i> 2002, Blattner <i>et al.</i> 2006
	Agar	Lecithin	Delimitsou <i>et al.</i> 2002
		AOT	Delimitsou <i>et al.</i> 2002
	Gelatin	AOT Lecithin	Blattner <i>et al.</i> 2006 Blattner <i>et al.</i> 2006
<i>Mucor javanicus</i> lipase	Gelatin	AOT	Nagayama and Imai, 2005
		Tween 85	Nagayama and Imai, 2005
<i>Rhizopus delemar</i> lipase	Gelatin	AOT	Nagayama <i>et al.</i> 2003

Συγκεκριμένα, οι μελέτες που έχουν γίνει με θέμα τη βιοκατάλυση σε οργανοπηκτώματα (Atkinson *et al.* 1989, Nascimento *et al.* 1992, Backlund *et al.* 1995, Rees *et al.* 1995, Jenta *et al.* 1997α,β, Stamatis and Xenakis 1999, Xenakis and Stamatis 1999, Pastou *et al.* 2000, Delimitsou *et al.* 2002, Blattner *et al.* 2006, Zoumpanioti *et al.* 2006, Zoumpanioti *et al.* 2008, Zoumpanioti *et al.* 2010β, Zoumpanioti *et al.* 2010α) συντελούν στα ακόλουθα συμπεράσματα:

1. Ο τεμαχισμός του πηκτώματος οδηγεί σε μεγαλύτερη αποτελεσματικότητα του καταλύτη (Jenta *et al.* 1997b, Stamatis and Xenakis 1999).
2. Η δραστικότητα του καταλύτη επηρεάζεται από τη φύση του χρησιμοποιούμενου οργανικού διαλύτη (Backlund *et al.* 1996, Stamatis and Xenakis 1999, Delimitsou *et al.* 2002). Με μείωση της υδροφοβικότητας του διαλύτη παρατηρείται μείωση της απόδοσης (Nascimento *et al.* 1992, Jenta *et al.* 1997β, Delimitsou *et al.* 2002, Blattner *et al.* 2006, Zoumpanioti *et al.* 2006).
3. Η απόδοση της αντίδρασης εξαρτάται από τη φύση του χρησιμοποιούμενου ενζύμου. Με λιπάσες από διαφορετικές πηγές επιτεύχθηκαν πολύ διαφορετικές μεταξύ τους αποδόσεις (από 90% - 0%) (Nascimento *et al.* 1992, Xenakis and Stamatis 1999, Pastou *et al.* 2000, Zoumpanioti *et al.* 2010β).
4. Η χαμηλή τιμή που έχει η ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης εστεροποίησης οδηγεί στο συμπέρασμα πως η διάχυση των αντιδρώντων και των προϊόντων ανάμεσα στις φάσεις και μέσω του πηκτώματος που περιέχει το ένζυμο δεν επηρεάζει τη διεργασία της αντίδρασης (Zoumpanioti *et al.* 2008). Στο συμπέρασμα αυτό συντείνει και το γεγονός πως η ενέργεια ενεργοποίησης και ο ρυθμός της αντίδρασης για την

εστεροποίηση παρουσιάζουν παρόμοιες τιμές τόσο στα μικρογαλακτώματα όσο και στα πηκτώματά τους (Jenta *et al.* 1997a).

5. Η σύσταση των οργανοπηκτωμάτων και κυρίως η περιεκτικότητα σε νερό, επιδρούν ουσιαστικά στη δραστικότητα της λιπάσης, με τις μεγαλύτερες αποδόσεις να παρατηρούνται για τις χαμηλότερες τιμές περιεκτικότητας νερού (Blattner *et al.* 2006) καθώς και για υψηλότερες τιμές κλάσματος μάζας του πολυμερούς (Delimitsou *et al.* 2002). Η μεγαλύτερη όμως φυσική σταθερότητα παρατηρείται για μεσαίες τιμές περιεκτικότητας νερού (Jenta *et al.* 1997β).

6. Η λιπάση που ακινητοποιείται σε οργανοπηκτώματα παρουσιάζει το φαινόμενο της εναντιοεκλεκτικότητας, το οποίο όμως φθίνει μετά από επαναχρησιμοποίηση του ενζύμου (Backlund *et al.* 1996). Η ιδιότητα αυτή ενισχύεται με διεξαγωγή της αντίδρασης σε θερμοκρασίες υπό του μηδενός. Σε τέτοιες θερμοκρασίες η φαινόμενη ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης είναι ιδιαίτερα χαμηλή (Rees *et al.* 1995).

7. Οι αποδόσεις και η εναντιοεκλεκτικότητα είναι ελαφρώς υψηλότερα όταν ως επιφανειονεργό χρησιμοποιείται ΑΟΤ, αντίθετα με ότι συμβαίνει όταν χρησιμοποιείται λεκιθίνη (Backlund *et al.* 1996).

1.3.2. Αποθήκευση και επαναχρησιμοποίηση των MBGs

Αποθήκευση των MBGs

Η δυνατότητα αποθήκευσης και η λειτουργική σταθερότητα μιας ακινητοποιημένης λιπάσης είναι οι σημαντικότεροι παράγοντες από τους οποίους καθορίζεται η οικονομική βιωσιμότητα μιας βιοδιεργασίας (Buchholz and Klein 1987). Η σταθερότητα που εμφανίζουν οι ακινητοποιημένες σε MBGs λιπάσες είναι ιδιαίτερα υψηλή συγκριτικά με εκείνη που παρατηρείται κατά την ακινητοποίησή τους σε άλλα συστήματα ακινητοποίησης. Για παράδειγμα, λιπάσες από *Humicola lanuginose* and *C. Viscosum* παραμένουν σταθερές μόνο για μερικές μέρες όταν βρίσκονται ακινητοποιημένες σε ΑΟΤ ή CTAB μικρογαλακτώματα, παρόλο που η λιπάση από *C. Viscosum* είναι πιο ανθεκτική σε υψηλές θερμοκρασίες όταν βρίσκεται ακινητοποιημένη σε μικρογαλάκτωμα παρά σε υδατικά συστήματα. Ωστόσο, λιπάσες από *C. rugosa*, *R. delemar*, *R. miehei* και *P. cepacia* εμφανίζουν μικρότερη σταθερότητα σε μικρογαλακτώματα απ' ότι σε υδατικά συστήματα (Stamatis *et al.* 1999β).

Επιπροσθέτως, ακινητοποιημένη λιπάση Β από *C. antarctica* σε πήκτωμα από HPMC και μικρογαλάκτωμα χωρίς επιφανειοενεργό δεν εμφανίζει σημαντική απώλεια στη δραστικότητα της μετά από ένα διάστημα αποθήκευσης 8 μηνών. Όμως, λιπάση από *R. miehei* στο ίδιο σύστημα ακινητοποίησης, εμφάνισε 50% μείωση στη δραστικότητα της για την ίδια περίοδο αποθήκευσης (Zoumparnioti *et al.* 2006). Σε προηγούμενη μελέτη που είχε γίνει από τους Delimitsou και συνεργάτες είχε δειχθεί ότι μετά το πέρας 120 h στους 25 °C και σε διαλύτη ισοοκτάνιο, η λιπάση από *R. miehei* διατήρησε καλύτερα την δραστικότητα της όταν ήταν ακινητοποιημένη σε πήκτωμα συγκριτικά με την περίπτωση ακινητοποίησής της σε μικρογαλάκτωμα (Delimitsou *et al.* 2002).

Επαναχρησιμοποίηση των MBGs

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η δυνατότητα αναγέννησης του βιοκαταλύτη και επομένως η επαναχρησιμοποίηση του είναι ιδιαίτερα σημαντική για την εφαρμογή του στη βιομηχανία. Για το λόγο αυτό, έχει μελετηθεί εκτενώς από πολλούς συγγραφείς, για λιπάσες προερχόμενες από διάφορους μικροοργανισμούς όπως: *C. viscosum* (Rees *et al.* 1991, Nascimento *et al.* 1992, Rees *et al.* 1995, Jenta *et al.* 1997a, Schuleit and Luisi 2001), *C. rugosa* (Nagayama *et al.* 1998, Soni and Madamwar, 2001), *C. antarctica* (Blattner *et al.* 2006), *C. lyopolytica* (Zhou *et al.* 2001), *R. miehei* (Queiroz and Nascimento 1999, Delimitsou *et al.* 2002). Από τις μελέτες αυτές προέκυψε ότι ακόμα και μετά από ένα μεγάλο χρονικό διάστημα (έως 7 μήνες (Schuleit and Luisi 2001), η τελική απόδοση της αντίδρασης της εστεροποίησης, στην οποία συμμετείχαν, παρέμεινε κοντά στο 90%. Ωστόσο, η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης μειώθηκε μετά από μερικές χρήσεις (Rees *et al.* 1995, Jenta *et al.* 1997a, Nagayama *et al.* 1998, Soni and Madamwar 2001, Zhou *et al.* 2001).

Σε μια άλλη εργασία, οι Zoumparnioti και συνεργάτες (Zoumparnioti *et al.* 2006) χρησιμοποίησαν πηκτώματα HPMC βασισμένα σε μικρογαλάκτωμα χωρίς επιφανειοενεργό ή μικρογαλάκτωμα AOT, για την κατάλυση αντιδράσεων εστεροποίησης λιπαρών και φαινολικών οξέων. Σε αυτή την εργασία παρατηρήθηκε μία μικρή μόνο μείωση του ρυθμού εστεροποίησης της τάξης του 10%, μετά από 7 χρήσεις του βιοκαταλύτη για πηκτώματα με μικρογαλάκτωμα χωρίς επιφανειοενεργό, ενώ στο πήκτωμα που περιείχε μικρογαλάκτωμα AOT η μείωση ήταν της τάξης 30-50%. Στην ίδια εργασία (Zoumparnioti *et al.* 2006) εξετάστηκαν δύο λιπάσες, από *C.*

antarctica και *R. miehei*, και διαπιστώθηκε ότι η ενζυμική δραστικότητα των λιπασών διατηρήθηκε σε μεγαλύτερο επίπεδο σε πηκτώματα HPMC που περιείχαν μικρογαλάκτωμα χωρίς επιφανειοενεργό παρά σε πηκτώματα HPMC με μικρογαλάκτωμα AOT. Και στις δύο περιπτώσεις υψηλότερη σταθερότητα παρατηρήθηκε για τη λιπάση από *C. antarctica*. Η χαμηλότερη σταθερότητα της λιπάσης από *R. miehei* αποδίδεται σε δυσμενείς αλληλεπιδράσεις των μορίων του ενζύμου με την υδρόφοβη μεσεπιφάνεια (Turner and Vulfson 2000, Palomo *et al.* 2003).

Εκτός από την σταθερότητα και τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του βιοκαταλύτη που μελετήθηκε σε όλες τις προαναφερθείσες εργασίες, παρατηρήθηκε ότι τα προϊόντα και τα υπολείμματα των υποστρωμάτων που δεν είχαν αντιδράσει μπορούσαν να διαχωριστούν επιτυχώς από το οργανοπήκτωμα. Αυτό σημαίνει, ότι τα ίδια MBGs που χρησιμοποιήθηκαν για τη συγκεκριμένη εστεροποίηση μπορούν να πραγματοποιήσουν περισσότερες από μια εστεροποίησης με τη χρήση διαφορετικών υποστρωμάτων (Rees *et al.* 1991).

Όλα τα παραπάνω συμβάλλουν στο χαρακτηρισμό των MBGs ως ένα απόλυτα βιώσιμο μέσο ακινητοποίησης των ενζύμων. Ωστόσο για την εμπορική αξιοποίηση αυτών των βιοσυνθετικών αντιδράσεων είναι σημαντική η ανάπτυξη ενός αντιδραστήρα για να είναι εφικτή η παραγωγή σε βιομηχανική κλίμακα.

1.3.3 Φυσικά Βιοπολυμερή:

Για την παρασκευή πηκτωμάτων σημαντικό ρόλοέχει το βιοπολυμερές. Τα βιοπολυμερή είναι ουσίες που χρησιμοποιούνται ευρέως σε φαρμακευτικά σκευάσματα και τρόφιμα καθώς χαρακτηρίζονται ως ασφαλείς, μη τοξικές, φιλικές προς το περιβάλλον και χαμηλού κόστους (Guo *et al.* 1998). Τα βιοπολυμερή αυτά μπορεί να είναι άγαρ, ζελατίνη, καραγενάνη ή παράγωγα κυτταρίνης και περιγράφονται πιο αναλυτικά στις παραγράφους που ακολουθούν.

Άγαρ

Το άγαρ είναι πολυσακχαρίτης και αποτελείται από διάφορα συστατικά, όπως αγαροπηκτίνη και αγαρόζη. Εξάγεται από διάφορα είδη και γένη μωβ – κόκκινων φυκιών της τάξης Rhodophyceae στα οποία βρίσκεται ως δομικός υδατάνθρακας των τοιχωμάτων των κυττάρων τους. Είναι διαλυτό στο βραστό νερό, ελαφρώς διαλυτό

στην αιθανολαμίνη, ενώ στο κρύο νερό εμφανίζεται αδιάλυτο (Selby and Whistler 1993).

Τα πηκτώματα που σχηματίζει το άγαρ έχουν ευρύτατες βιομηχανικές εφαρμογές, κυρίως στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων, λόγω της σταθερότητάς του και της αντοχής του στη θέρμανση. Χρησιμοποιείται επίσης για την ανάπτυξη αποικιών βακτηρίων και το διαχωρισμό των πρωτεΐνων, λιποπρωτεΐνων, ενζύμων και άλλων μεγαλομοριακών ουσιών.

Ζελατίνη

Η ζελατίνη είναι φυσική, διαλυτή πρωτεΐνη, η οποία παράγεται με μερική υδρόλυση του κολλαγόνου που απαντά στα οστά, το δέρμα, τους τένοντες και τα νεύρα ζώων. Αποτελεί άοσμη, άγευστη και σχεδόν άχρωμη ένωση. Είναι επίσης γνωστή και ως προσθετική ουσία E441. Η ζελατίνη τήκεται όταν θερμαίνεται και στερεοποιείται όταν ψύχεται, ενώ ανάμειξη της με νερό σχηματίζει ένα ημι-στερεό κολλοειδές ζελέ. Έχει σημείο τήξης κοντά στους 37 °C και αυτό συμβάλει στην απομίμηση της αίσθησης που προκαλεί στο στόμα η τήξη του λίπους. Έχει αναφερθεί ότι μέσω ενσωμάτωσης ζελατίνης παρασκευάστηκε επαλειφόμενο προϊόν με 5% λίπος.

Παράγωγα κυτταρίνης

Τα παράγωγα της κυτταρίνης έχουν τη μορφή λευκής ή υπόλευκης σκόνης, η οποία είναι διαλυτή στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες αλλά αδιάλυτη στο ζεστό νερό και την αιθανόλη. Αποσυντίθενται σε θερμοκρασίες κοντά στους 220 °C. Όταν διαλυθούν σε νερό διογκώνονται, δίνοντας ένα διάλυμα υψηλού ιξώδους. Η υδροξυ-προπυλ-μεθυλο κυτταρίνη (ανήκει στους αιθέρες κυτταρίνης) δεν εμφανίζει σημαντικά προβλήματα σταθερότητας όταν χρησιμοποιείται σε μορφή σκόνης, ενώ διαλύματα της ουσίας είναι σταθερά σε ένα μεγάλο εύρος pH (από 3 έως 11). Επιπλέον, εμφανίζει ικανοποιητικές ρεολογικές ιδιότητες, οι οποίες της επιτρέπει να χρησιμοποιείται σε συνθέσεις για άμεση δισκιοποίηση.

Επίσης οι εστέρες της κυτταρίνης με λιπαρά οξέα θεωρούνται ως μια ενδιαφέρουσα κατηγορία θερμοπλαστικών. Οι λόγοι που τους κατατάσουν σε αυτή τη θέση είναι ότι οι εστέρες αυτοί είναι δυνατόν να βιοαποκοδομηθούν και χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία ινών, μεμβρανών, πλαστικών, όπως επίσης βρίσκουν εφαρμογές στην ιατρική ως υλικά επικάλυψης φαρμάκων.

Τέλος, άλλες εφαρμογές των παραγώγων κυτταρίνης περιλαμβάνουν κόλλες και αυτοκόλλητα, γεωργικά προϊόντα, υλικά οικοδομής, καλλυντικά, επιφανειοενεργά, χρώματα, μελάνια εκτύπωσης, βερνίκια, φαρμακευτικά προϊόντα, τρόφιμα, προϊόντα πολυμερισμού και υφάσματα (Selby & Whistler 1993).

Καραγενάνη

Η καραγενάνη είναι ένας φυσικός υδατάνθρακας (πολυσακχαρίτης), που λαμβάνεται από ερυθροφύκη του είδους *Chondrus crispus* (της οικογένειας των *Rhodophyceace*). Υπάρχουν τρεις κύριες τύποι καραγενάνης η 1-, η κ- και λ-καραγενάνη. Για πηκτωματοποίηση προτιμάται η κ- καραγενάνη, καθώς η λ- και η 1- είναι περισσότερο υδρόφιλες και ως εκ τούτου δεν μπορούν να αποκτήσουν την κατάλληλη μορφή. Γενικότερα, η καραγενάνη χρησιμοποιείται ευρέως στον τομέα τροφίμων (κυρίως γαλακτοκομικά και κρεατικά) και φαρμάκων αλλά και σε τομείς όπως η πειραματική ιατρική, η σύνθεση φαρμάκων και η κοσμετολογία, εξαιτίας των ισχυρών δεσμών της με τις πρωτεΐνες. Επίσης έχει δειχθεί ότι εμφανίζει ανοσορυθμιστική, αντιθρομβωτική, αντικαρκινική δράση. (Prajati *et al.* 2014).

Αξίζει να αναφερθεί ότι παρά τις ποικίλες εφαρμογές της, η χαμηλού μοριακού βάρους καραγενάνη (10-20 kDa) ή διεσπασμένη καραγενάνη, έχει κατηγορηθεί για καρκινογένεση (International Agency for Research on Cancer (IARC), 1983) και επαγωγή φλεγμονώδους αντίδρασης του πεπτικού σύστηματος (Benford *et al.* 2008). Στην Ευρώπη έχει απαγορευτεί η χρήση της καραγενάνης σε προϊόντα που απευθύνονται σε βρέφη για προληπτικούς λόγους. Ωστόσο, λόγω έλλειψης επαρκών αποδείξεων η χρήση της σε προϊόντα που καταναλώνονται από μεγαλύτερες ηλικίες δεν έχει απαγορευτεί, έχει όμως περιοριστεί η χρήση καραγενάνης με μοριακή μάζα κάτω των 50 kDa (EC SCF, 2003). Τέλος, στις ΗΠΑ επιτρέπεται η χρήση της χωρίς κανένα περιορισμό, αφού θεωρείται ότι τα οφέλη που προσδίδει η χρήση της υπερνικούν το πιθανό ρίσκο για καρκινογένεση (Watson, 2008).

1.3.4 Επίδραση της χημικής δομής του πολυμερούς στο οργανοπήκτωμα.

Έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές μελέτες που αφορούν στην επίδραση της φύσης του πολυμερούς που χρησιμοποιείται για την παρασκευή του οργανοπήκτωματος στο ρυθμό της αντίδρασης που καταλύεται σε αυτό. Έχει

αποδειχθεί πως, κατά τη σύνθεση λαυρικού προπυλεστέρα καταλυόμενη από λιπάση είτε από *Rhizomucor miehei* είτε από *Candida antarctica*, η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης είναι υψηλότερη όταν χρησιμοποιούνται MBGs από HPMC από αυτή που παρατηρείται για τα MBGs από άγαρ (Pastou *et al.* 2000, Delimitsou *et al.* 2002). Για την ίδια αντίδραση, καταλυόμενη από λιπάση από *Pseudomonas cepacia*, για τις αντιδράσεις που πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση οργανοπηκτωμάτων από κκαραγενάνη ή άγαρ παρατηρήθηκε μεγαλύτερη ταχύτητα από αυτές που πραγματοποιήθηκαν σε πηκτώματα ζελατίνης (Xenakis and Stamatidis 1999, Pastou *et al.* 2000).

Σύμφωνα με την εργασία των Delimitsou *et al.* 2002, η συγκέντρωση του πολυμερούς επηρεάζει τη σταθερότητα των MBGs. Έτσι το άγαρ σχηματίζει MBGs με κλάσμα μάζας 0.07-0.14 ενώ το HPMC με κλάσμα μάζας πολυμερούς 0.15-0.35, με τα πηκτώματα που περιέχουν μικρότερο ποσοστό πολυμερούς να είναι πιο συνεκτικά. Επιπλέον, όταν αυξάνεται η συγκέντρωση του πολυμερούς (HPMC και άγαρ) αυξάνεται και ο ρυθμός εστεροποίησης κατά τη σύνθεση του λαυρικού εξυλεστέρα που καταλύεται από λιπάση από *Mucormiehei*, σε ισοοκτάνιο ή σε σύστημα χωρίς διαλύτη (Delimitsou *et al.* 2002, Blattner *et al.* 2006).

1.3.5. Εφαρμογές:

Τα οργανοπηκτώματα παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα, τα οποία αξιοποιούνται σε διάφορες εφαρμογές. Μέχρι σήμερα, έχουν χρησιμοποιηθεί συστήματα ζελατίνης βασισμένα σε μικρογαλάκτωμα ΑΟΤ, με σκοπό τη σύνθεση, σε ερευνητική κλίμακα, μεγάλου αριθμού εστέρων. Οι συνθέσεις αυτές έχουν πραγματοποιηθεί σε μικρούς αντιδραστήρες διαλείποντος έργου και σε αυλωτούς αντιδραστήρες, σε θερμοκρασίες της τάξης των 20 °C (Rees *et al.* 1991). Τα οργανοπηκτώματα έχει δειχθεί ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως βιοκαταλύτες σε στερεή φάση προσφέροντας συγκρίσιμα αποτελέσματα, και καμιά φορά υψηλότερη ενζυμική δραστικότητα από τα αντίστοιχα υγρά συστήματα μικρογαλακτώματος/ενζύμου (Jenta *et al.* 1997β, Xenakis and Stamatidis 1999, Pastou *et al.* 2000, Delimitsou *et al.* 2002, de Maria *et al.* 2004, Blattner *et al.* 2006, Zoumparnioti *et al.* 2006).

Εκτός των παραπάνω πλεονεκτημάτων, τα οργανοπηκτώματα από βιοπολυμερή όπως το HPMC και το HPC (υδόξυ-πρόπυλο-κυτταρίνη) που βασίζονται σε μικρογαλακτώματα λεκιθίνης μπορούν κάλλιστα να χρησιμεύσουν ως

υλικά διαδερμικής μεταφοράς φαρμάκων. Τα μικρογαλακτώματα λεκιθίνης σ' αυτή την περίπτωση δημιουργούνται προσθέτοντας τη κατάλληλη ποσότητα νερού σε διάλυμα λεκιθίνης και αιθανόλης σε έναν μη πολικό οργανικό διαλύτη. Το ιξώδες αυτών των μικρογαλακτωμάτων είναι ιδιαίτερα χαμηλό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παρασκευή οργανοπηκτωμάτων που αποτελούνται από βιοσυμβατά φυσικά πολυμερή και νερό ή αιθανόλη (Zoumpanioti *et al.* 2004).

Επιπλέον, αξίζει να αναφερθεί ότι συστήματα παραγώγων κυτταρίνης παρουσιάζουν τόσο μηχανική, όσο και θερμική σταθερότητα (Zoumpanioti *et al.* 2010β). Συγκεκριμένα, έχει διαπιστωθεί ότι ακινητοποιημένες λιπάσες σε πήκτωμα με HPMC διατηρούν την δραστικότητα τους ακόμα και στους 50°C, ενώ οι οργανογέλες είναι σταθερές ακόμα και σε υψηλότερες θερμοκρασίες (Zoumpanioti *et al.* 2008). Τέλος, τα πηκτώματα δίνουν λύση στο πρόβλημα ανάκτησης του προϊόντος αλλά και της αναγέννησης του βιοκαταλύτη (Delimitsou *et al.* 2002, Blattner *et al.* 2006, Zoumpanioti *et al.* 2006, Zoumpanioti *et al.* 2010β), γεγονός που τα καθιστά ιδανικά για την χρήση τους στη βιομηχανική παραγωγή.

1.4. Εστεροποίηση

Η εστεροποίηση είναι μια χημική αντίδραση κατά την οποία μια αλκοόλη και ένα οξύ σχηματίζουν εστέρα και νερό. Είναι μια αντιστρεπτή αντίδραση και μια από τις πιο απλές και ευρέως διαδεδομένες οργανικές μετατροπές. Οι εστέρες είναι κοινοί στην οργανική χημεία και στα βιολογικά υλικά, και συνήθως έχουν μια χαρακτηριστική, ευχάριστη, φρουτώδη οσμή. Αυτό οδηγεί στην εκτεταμένη χρήση τους στην βιομηχανία τροφίμων και αρωματοποιίας.

Οι λιπάσες παίζουν καταλυτικό ρόλο στην παραγωγή εστέρων από καρβοξυλικά οξέα και αλκοόλες. Τέτοιοι εστέρες εφαρμόζονται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων ως συστατικά που ενισχύουν το άρωμα και τη γεύση των τροφών. Η εστεροποίηση καταλυόμενη από λιπάσες, φαίνεται να είναι μια καλή εναλλακτική προσέγγιση για την επίτευξη χημικών αντιδράσεων. Για την ακρίβεια, η σύνθεση εστέρων με τη χρήση λιπασών μπορεί να πραγματοποιηθεί σε θερμοκρασία δωματίου και ατμοσφαιρικής πίεσης, αλλά και σε ουδέτερο pH, σε αντιδραστήρες διαλείποντος, ημιδιαλείποντος ή συνεχούς έργου. Τα προϊόντα που προκύπτουν με

αυτή τη μέθοδο έχουν λιγότερες προσμίξεις σε σύγκριση με τα προϊόντα που προκύπτουν με χημικές μεθόδους.

Η αξιοποίηση μη συμβατικών μέσων επέτρεψε την πραγματοποίηση ενός μεγάλου αριθμού αντιδράσεων εστεροποίησης μεταξύ λιπαρών οξέων και αλκοολών, εκτός από την εστεροποίηση γλυκερόλης με λιπαρά οξέα. Οι εστέρες, που αποτελούν τα προϊόντα των αντιδράσεων αυτών, έχουν μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον και μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη βιομηχανία απορρυπαντικών, τροφίμων, στη σύνθεση χρήσιμων χημικών και φαρμακευτικών προϊόντων, καθώς και στην παραγωγή χαρτιού και καλλυντικών.

Από την άλλη πλευρά, τα φαινολικά οξέα έχουν προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον καθώς αποτελούν φυσικά αντιοξειδωτικά που προκαλούν μείωση των ελευθέρων ριζών στον οργανισμό. Συνεπώς, έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες για τις αντιδράσεις των φαινολικών οξέων, με σκοπό την εφαρμογή τους σε τομείς, όπως η ιατρική και η φαρμακευτική. Γενικά, έχει διαπιστωθεί ότι τα φαινολικά οξέα και οι εστέρες των φαινολικών οξέων παρουσιάζουν αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση. Ωστόσο, η δυσκολία που έχουν τα φαινολικά οξέα ως προς τη διαλυτοποίησή τους σε διάφορα μέσα εμποδίζει την ευρεία χρήση των φαινολικών οξέων. Για το σκοπό αυτό, τα φαινολικά οξέα τροποποιούνται μέσω εστεροποίησης με αλκοόλες, ώστε να είναι διαλυτά σε μέσα που βασίζονται σε έλαια.

Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι ιδιαίτερο τεχνολογικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν και οι εστέρες των τερπενίων. Οι τερπενικοί εστέρες των λιπαρών οξέων είναι ευρέως διαδεδομένοι στην βιομηχανία τροφίμων, αρωματοποιίας και φαρμάκων. Στο παρελθόν χρησιμοποιούνταν μέθοδοι όπως η εκχύλιση από φυτικά αιθέρια έλαια και η άμεση βιοσύνθεση μέσω της ζύμωσης, για την παραγωγή γεύσης και αρώματος. Παρόλα αυτά, αυτές οι μέθοδοι παρουσίαζαν υψηλό κόστος επεξεργασίας και χαμηλή απόδοση παραγωγής του επιθυμητού προϊόντος. Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει ένα μεγάλο ενδιαφέρον για την χρήση της ενζυμικής μετατροπής αντί αυτών των παραδοσιακών μεθόδων για την παραγωγή φυσικών προϊόντων και αρωμάτων. Τα προϊόντα της ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης μπορούν να θεωρηθούν φυσικά και να προσδώσουν υψηλή προστιθέμενη αξία (Gilles *et al.* 1987, Armstrong *et al.* 1989).

1.5. Λιπαρά Οξέα

Είναι αλειφατικά μονοκαρβοξυλικά οξέα που περιέχονται σε ένα ζωικό ή φυτικό λίπος, έλαιο ή κερί. Τα φυσικά λιπαρά οξέα συνήθως αποτελούνται από μια ευθεία ανθρακική αλυσίδα, με ζυγό αριθμό ατόμων άνθρακα, τα οποία μπορεί να είναι κορεσμένα ή ακόρεστα. Τα διακρίνουμε στις παρακάτω κατηγορίες ανάλογα με τους διπλούς δεσμούς (*The Gold Book, 1997*).

- **Κορεσμένα:** Τα κορεσμένα λιπαρά οξέα δεν περιέχουν διπλούς δεσμούς ή άλλες χαρακτηριστικές ομάδες κατά μήκος της αλυσίδας. Ο όρος «κορεσμένα» αναφέρεται στο υδρογόνο που όλοι οι άνθρακες (εκτός από την καρβοξυλική ομάδα -COOH) περιέχουν σε όσο το δυνατόν μεγαλύτερο αριθμό. Σχηματίζουν, επίσης, ευθύγραμμες αλυσίδες με αποτέλεσμα να είναι ικανά να σχηματίσουν ισχυρούς δεσμούς επιτρέποντας στους ζωντανούς οργανισμούς να αποθηκεύουν χημική ενέργεια σε μεγάλη πυκνότητα. Τέλος οι ζωικοί λιπαροί ιστοί περιέχουν μεγάλες ποσότητες κορεσμένων λιπαρών οξέων με μεγάλου μήκους αλυσίδα.
- **Ακόρεστα:** Τα ακόρεστα λιπαρά οξέα είναι παρόμοιας μορφής με τα κορεσμένα, εκτός από το γεγονός ότι κατά μήκος της αλυσίδας τους υπάρχουν μία ή περισσότερες χαρακτηριστικές ομάδες αλκενίων, με κάθε αλκένιο να αντικαθιστά ένα τμήμα της αλυσίδας -CH₂-CH₂- με ένα τμήμα -CH=CH-. Τα δύο γειτονικά άτομα άνθρακα(C) στην αλυσίδα μπορούν να εμφανίσουν cis ή trans διαμόρφωση.
- **Βασικά λιπαρά οξέα:** Το ανθρώπινο σώμα μπορεί να παράγει όλα τα λιπαρά οξέα που χρειάζεται, εκτός από δύο: το λινολεϊκό και το α-λινολενικό οξύ, τα οποία είναι ευρέως διαδεδομένα στα φυτικά έλαια. Άρα, ο οργανισμός μας θα πρέπει να προμηθευτεί τα δύο προαναφερθέντα λιπαρά οξέα από την τροφή του, γι' αυτό το λόγο ονομάζονται βασικά. Τα βασικά λιπαρά οξέα είναι απαραίτητα για την λειτουργία πολλών συστημάτων του ανθρώπινου σώματος, συμπεριλαμβανομένου του ανοσοποιητικού και του κυκλοφορικού, καθώς χρησιμοποιούνται για την σύνθεση ουσιών όπως οι προσταγλαδίνες. Ο εγκέφαλος έχει ανάγκη από αυξημένες ποσότητες παραγώγων λινολεϊκών και α-λινολενικών οξέων. Αλλαγές στα επίπεδα και στην ισορροπία αυτών των

λιπαρών οξέων εξαιτίας μιας τυπικής δυτικής διατροφής, η οποία είναι πλούσια σε ω-6 και φτωχή σε ω-3 λιπαρά οξέα, πιστεύεται ότι σχετίζονται με την αλλαγή της συμπεριφοράς συμπεριλαμβανομένης της κατάθλιψης και της βίας. Βέβαια, η πραγματική σχέση, αν υπάρχει, βρίσκεται υπό διερεύνηση. Μέχρι στιγμής, τουλάχιστον 4 μελέτες σε ανθρώπους έχουν δείξει ότι υποστηρίζεται η παραπάνω άποψη (Honoré *et al.* 1994, Herbaut *et al.* 2006, Landmark *et al.* 2006, Reiffel and McDonald 2006).

- **Εφαρμογές:** Τα λιπαρά οξέα εμφανίζουν πληθώρα εφαρμογών σε:
 - Διατροφή: Τα λιπαρά οξέα DHA (Docosahexanoic acid) και EPA (Eicosapentaenoic acid) είναι βασικά πολυακόρεστα λιπαρά οξέα (PUFA) στην ανθρώπινη διατροφή. Αυτά τα PUFA μπορούν να μειώσουν τον κίνδυνο εμφάνισης της στεφανιαίας νόσου και να περιορίσουν φλεγμονώδεις ασθένειες.
 - Φάρμακα: Τα DHA και άλλα PUFA μπορούν να τροποποιηθούν χημικά, προσθέτοντας ή αλλάζοντας χαρακτηριστικές ομάδες στα διάφορα τμήματα του μορίου (συνδυαστική χημεία), έτσι ώστε να βελτιώσουν/αλλάξουν την βιοενεργότητα και να ανοίξουν δρόμο για τη σύνθεση νέων φαρμακευτικών προϊόντων.
 - Άλλες εφαρμογές: Σχετίζονται με αντιμικροβιακά, αγροχημικά, καλλυντικά και αντιμηκυτικά προϊόντα.

Εστέρες λιπαρών οξέων

Το βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον όμως στρέφεται κυρίως προς τους εστέρες των λιπαρών οξέων. Αυτοί οι εστέρες είναι χρήσιμες χημικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται στην κατασκευή καλλυντικών, απορρυπαντικών και επιφανειοενεργών. Παράγονται, συνήθως, σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου με ομοιογενή κατάλυση. Αυτός ο τρόπος παραγωγής όμως εμφανίζει κάποιους σημαντικούς περιορισμούς. Πρώτον, μια δαπανηρή διεργασία μέσω απόσταξης είναι απαραίτητη για την επαναχρησιμοποίηση της αλκοόλης και τον καθαρισμό του προϊόντος. Δεύτερον, οι καταλύτες χάνονται, προάγουν δευτερογενείς αντιδράσεις και δημιουργούν προβλήματα μόλυνσης.

Οργανικές όξινες ρητίνες ιοντο-ανταλλαγής μπορούν να εφαρμοστούν αλλά δεν είναι κατάλληλες σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 140°C. Εναλλακτικά, στερεοί

όξινοι καταλύτες, μας παρέχουν μια ικανοποιητική θερμοδυναμική σταθερότητα (Omota *et al.* 2003).

1.6 Φαινολικά Οξέα

Τα φαινολικά οξέα είναι προϊόντα μεταβολισμού των φυτών, ευρέως διαδεδομένα μέσα στο φυτικό βασίλειο. Συγκεκριμένα, ανήκουν στα φυσικά αντιοξειδωτικά που προκαλούν μείωση των ελευθέρων ριζών στον οργανισμό που προκύπτουν από το άγχος, την κακή διατροφή, την ρύπανση, το κάπνισμα και άλλους παράγοντες. Γίνεται λοιπόν προσπάθεια για την μείωση αυτών των ενώσεων στον οργανισμό και την αποφυγή των αρνητικών συνεπειών που έχουν στην υγεία του ανθρώπου. Έτσι, αρκετές ερευνητικές ομάδες μελετούν αντιδράσεις των φαινολικών οξέων, με σκοπό την εφαρμογή τους στον ιατροφαρμακευτικό τομέα. (Fry 1979).

Το επιστημονικό ενδιαφέρον για τα φαινολικά οξέα αφορά στον δυναμικό, προστατευτικό τους ρόλο μέσω της απορρόφησης τους από φρούτα και λαχανικα, εναντίον ασθενειών όπως η στεφανιαία νόσος, το έμφραγμα και διάφορες μορφές καρκίνου. Μείγματα φαινολικών οξέων είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη και την αναπαραγωγή των φυτών και είναι προϊόντα της άμυνας τραυματισμένων φυτών ενάντια στα παθογόνα (Paul and Moulik 2001). Λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων των φαινολικών οξέων και ιδιαίτερα των παραγώγων του κινναμωμικού οξέος (Shahidi *et al.* 1992), έχει μεγάλη σημασία η χρήση τους σε βιομηχανική κλίμακα. (Paul and Moulik 2001).

Η απορρόφηση και η βιοδιαθεσιμότητα των φαινολικών οξέων στον άνθρωπο είναι αμφισβητήσιμη. Τα δεδομένα στα παραπάνω θέματα, που σχετίζονται με τα φαινολικά οξέα, είναι ελάχιστα (Paul and Moulik 2001) και υφίσταται ανάγκη για εκτεταμένη έρευνα.

- **Εφαρμογές:**

- Τα φαινολικά οξέα και οι εστέρες των φαινολικών οξέων παρουσιάζουν αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση (Chimi *et al.* 1991, Liu *et al.* 1995).
- Σακχαρικοί εστέρες ποικίλων φαινολικών οξέων, απομονωμένοι από φυτά ως φαινολικοί γλυκοσιδιωμένοι εστέρες, είναι ενεργά φαρμακευτικά συστατικά και φαίνεται να έχουν αντιμικροβιακή δράση καθώς και δράση εναντίον των ιών (Tawata *et al.* 1996).

- Βοηθάνε στην αύξηση της αντίστασης της HDL χοληστερόλης στο παραγόμενο οξειδωτικό stress (Paul and Moulik 2001).
- Τέλος, μέχρι σήμερα, πολλά υδροξυκινναμωμικά οξέα, όπως το φερουλικό και το κουμαρικό οξύ έχουν βρει ευρεία βιομηχανική εφαρμογή.

Τα πιο σημαντικά φαινολικά οξέα είναι υδατοδιαλυτά, περιορίζοντας την χρησιμοποίησή τους σε ελαιώδη τρόφιμα, όπου προκύπτει πρόβλημα όταν συνυπάρχει μια υδατική φάση (Schuler 1990). Έτσι, η τροποποίηση των φυσικών φαινολικών οξέων (συμπεριλαμβανομένων των παραγώγων του κινναμωμικού οξέος) μέσω της εστεροποίησεώς τους με αλειφατικές αλκοόλες μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέσο για τη μεταβολή της διαλυτότητάς τους σε λίπη και έλαια διευρύνοντας τη χρησιμότητά τους ως αντιοξειδωτικά πρόσθετα των τροφίμων καθώς επίσης και την εφαρμογή τους στην κοσμητολογία (Stamatis *et al.* 1999a, Stamatis *et al.* 2001, Priya and Chada 2003, Figueiroa-Espinoza and Villeneuve 2005).

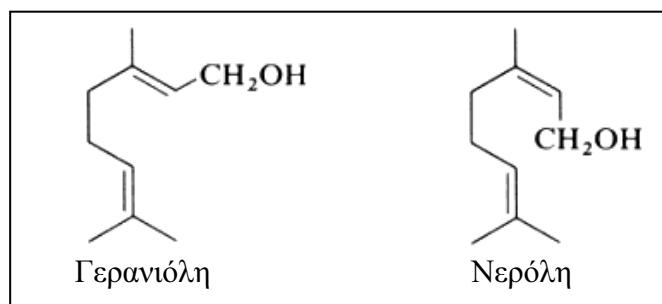
Διάφοροι οργανικοί διαλύτες έχουν δοκιμαστεί ως μέσο αντίδρασης για την εστεροποίηση των φαινολικών οξέων (Priya and Chada 2003, Widjaja *et al.* 2008). Η εστεροποίηση των φαινολικών οξέων με αλειφατικές αλκοόλες καταλυόμενη από λιπάσες σε άνυδρους διαλύτες (Compton *et al.* 2000, Stamatis *et al.* 2001) ή σε μέσα χωρίς διαλύτη (Stamatis *et al.* 1999a, Weitkamp *et al.* 2006), έχουν μελετηθεί εκτενώς και έχει αποδειχθεί ότι τόσο η ταχύτητα όσο και η απόδοση της εστεροποίησης ήταν σημαντικά χαμηλοί. Σε w/o μικρογαλακτώματα όμως, η εστεροποίηση έχει επιτευχθεί με μεγάλη απόδοση (Giuliani *et al.* 2001). Παρόλα αυτά, τα φαινολικά οξέα λόγω της πολικότητάς τους παρουσιάζουν χαμηλή διαλυτότητα μέσα σε αυτά, ενώ η εφαρμογή των μικρογαλακτωμάτων στη βιομηχανία παρεμποδίζεται από την παρουσία μεγάλης συγκέντρωσης επιφανειοενεργών. Ως εναλλακτική λύση έχουν προταθεί τα μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό (Topakas *et al.* 2003, Zoumparnioti *et al.* 2006) και ιοντικά υγρά (Katsoura *et al.* 2006, Ambika *et al.* 2008). Ωστόσο, τα ακινητοποιημένα ένζυμα παραμένουν μία καλή επιλογή για την πραγματοποίηση της εστεροποίησης των φαινολικών οξέων, εξαιτίας της δυνατότητας ανάκτησης του ένζυμου και του προϊόντος από την αντίδραση (Zoumparnioti *et al.* 2010a). Επιπλέον, το κόστος της διαδικασίας μπορεί να είναι χαμηλό εξαιτίας της μικρής ποσότητας του ένζυμου που απαιτείται για την επίτευξη της κατάλυσης, σε σύγκριση με τη χρήση ελεύθερου ένζυμου.

Το 2010, από τους Zoumpanioti και συνεργάτες (Zoumpanioti *et al.* 2010α) προτάθηκε η χρήση ακινητοποιημένων λιπασών, σε οργανοπήκτωμα από κυτταρίνη (HPMC) με μικρογαλάκτωμα χωρίς επιφανειοενεργό, ως μέσο για την ενζυμική εστεροποίηση σχετικά μεγάλων ποσοτήτων φαινολικών οξέων με 1-οκτανόλη μέσα σε ένα σύστημα χωρίς διαλύτη. Λιπάσες από στελέχη *R. miehei* και *C. antarctica* ακινητοποιημένες σε πήκτωμα από HPMC μπόρεσαν να καταλύσουν αποτελεσματικά την εστεροποίηση των φαινολικών οξέων. Τα υδροξυλιωμένα οξέα με μία κορεσμένη πλευρική αλυσίδα εστεροποιήθηκαν με υψηλό ρυθμό και μεγάλη απόδοση (έως και 94%).

1.7 Τερπένια

Τα φυτικά αιθέρα έλαια αποτελούνται κυρίως από τερπένια. Τα τερπένια είναι μικρά οργανικά μόρια που εμφανίζουν τεράστια ποικιλομορφία ως προς τη δομή τους. Σήμερα γνωρίζουμε τη δομή χιλιάδων τερπενίων, μερικά από τα οποία είναι υδρογονάνθρακες, άλλα περιέχουν άτομα οξυγόνου, άλλα είναι μόρια ανοιχτής αλυσίδας και άλλα περιέχουν δακτυλίους (Mc Murry John, 1999).

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι εστέρες των τερπενικών αλκοολών με λιπαρά οξέα μικρής αλυσίδας, καθώς είναι αιθέρια έλαια που χρησιμοποιούνται ευρέως στον τομέα των τροφίμων, των καλλυντικών και των φαρμάκων, ως συστατικά για την ενίσχυση της γεύσης και του αρώματος των προϊόντων. Μεταξύ αυτών, σημαντικότεροι είναι οι οξικοί, οι προπιονικοί και οι βουτυρικοί εστέρες των άκυκλων τερπενικών αλκοολών, όπως η γερανιόλη και η νερόλη. Η νερόλη και η γερανιόλη είναι cis και trans ισομερή (Εικόνα 1.6) με χημική ονομασία 3,7-διμέθυλο-οκτα-2,6-διεν-1-όλη, τα οποία έχουν γλυκιά οσμή.



Εικόνα 1.6: Χημικές δομές γερανιόλης και νερόλης

Παραδοσιακά αυτοί οι εστέρες παράγονται με διάφορες μεθόδους, όπως η χημική σύνθεση, η ζύμωση και η εκχύλιση από φυσικά προϊόντα (Croeteau *et al.* 1980, Welsh *et al.* 1989). Ωστόσο, οι παραπάνω μέθοδοι δεν εξασφαλίζουν υψηλές απδοδόσεις του επιθυμητού προϊόντος και το κόστος τους είναι απαγορευτικό για την εφαρμογή τους στην παραγωγική διαδικασία (Armstrong *et al.* 1989). Με το ενδιαφέρον να εστιάζει σε προϊόντα φυσικής προελεύσεως, η βιομηχανία στρέφεται προς τη βιοτεχνολογία με σκοπό την παραγωγή φυσικών αρωμάτων με τη χρήση ενζυμικών μεθόδων (Armstrong *et al.* 1989, Welsh *et al.* 1989).

Η σύνθεση τερπενικών εστέρων καταλυόμενη από λιπάσες, μέσω άμεσης εστεροποίησης (Langrand *et al.* 1988, Stamatis *et al.* 1993α, Claon and Akoh 1994α, Karra-Chaabouni *et al.* 1996) και μετεστεροποίησης (Langrand *et al.* 1988, Chulalaksananukul *et al.* 1992, Claon and Akoh 1994β, de Castro *et al.* 1997) σε μέσα χαμηλής περιεκτικότητας σε νερό έχει ήδη μελετηθεί. Δυστυχώς όμως η απόδοση της αντίδρασης για τη σύνθεση τερπενικών εστέρων μικρής αλυσίδας, στην περίπτωση της άμεσης εστεροποίησης, ήταν ιδιαίτερα χαμηλή. Σύμφωνα με τους επιστήμονες, αυτό οφειλόταν πιθανά στην παραγωγή του οξικού οξέος, το οποίο δρούσε ως αναστολέας του ενζύμου. Για το λόγο αυτό, προτιμάται η μέθοδος της μετεστεροποίησης κατα την οποία χρησιμοποιούνται διάφοροι ακυλο-δότες όπως ο οξικός προπυλεστέρας, ο οξικός ισοπροπυλεστέρας και οι ανυδρίτες των λιπαρών οξέων.

1.8 Συστήματα συνεχούς ροής

Είναι ευρέως γνωστό ότι από τα αρχαία χρόνια, ο άνθρωπος εκμεταλλευόταν τις διεργασίες ζύμωσης για την παραγωγή διαφόρων προϊόντων, όπως κρασί, μπύρα και ψωμί. Ωστόσο, μόνο τα τελευταία 200 χρόνια έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι και εργαλεία που επιτρέπουν στους επιστήμονες τη χρήση των βιοκαταλυτών στο εργαστήριο. (Halling and Kvittingen 1999, Wandrey *et al.* 2000). Ειδικότερα, τα τελευταία χρόνια, μέσω των εργαλείων και των δυνατοτήτων που προσφέρει η μοριακή βιολογία είναι εφικτό ένας βιοκαταλύτης να τροποποιηθεί ώστε να φέρει μόνο επιθυμητά χαρακτηριστικά. Τέτοια χαρακτηριστικά αφορούν: α. τη βέλτιστη δυνατή καταλυτική δραστικότητα, καθώς σε πολλές περιπτώσεις οι συνθήκες αντίδρασης (pH και θερμοκρασία) δεν είναι ευνοϊκές για το ένζυμο, με αποτέλεσμα

τη μείωση της δραστικότητας του ή ακόμα και στη μετουσίωση του, και β. την εξειδίκευση ως προς μια συγκεκριμένη αντίδραση (Nikolova and Ward 1993, Salter and Kelt 1995, Kragl *et al.* 1996, Ueda and Tanaka 2000, Chen R. 2007, Dambrosky and Brezovsky 2009), καθώς είναι γνωστό ότι υπάρχει σημαντικός περιορισμός στην επιλεκτικότητα των ενζύμων ως προς το υπόστρωμα και τον τύπο της αντίδρασης που καταλύουν.

Παρ' όλα αυτά τα επιτεύγματα, εξακολουθούν να υφίστανται ορισμένα προβλήματα όσον αφορά τη χρήση των βιοκαταλυτών σε εργαστηριακή κλίμακα. Τα εν λόγω προβλήματα σχετίζονται με την σταθερότητα, την καθαρότητα, τη διαθεσιμότητα και την ανάγκη του ενζύμου για συμπαράγοντες. Επιπλέον, σε πολλές περιπτώσεις, τα προϊόντα της αντίδρασης δρούν και ως αναστολείς για το ένζυμο (Kragl *et al.* 1996, Chartrain *et al.* 2001). Κάποιες από αυτές τις δυσκολίες μπορούν να ξεπεραστούν με τη χρήση ολόκληρων κυττάρων. Η βιωσιμότητα όμως των κυττάρων, η χαμηλή έκφραση του ενζύμου που μας ενδιαφέρει καθώς και η ύπαρξη παράπλευρων αντιδράσεων, είναι μερικά από τα προβλήματα που πρέπει να αντιμετωπιστούν σε ένα τέτοιο σύστημα βιοκατάλυσης (Ueda and Tanaka 2000, Chen R. 2007).

Από την άλλη πλευρά, για τη σύνθεση των επιθυμητών ουσιών σε επίπεδο βιομηχανίας, χρησιμοποιούνται ως καταλύτες ανόργανα οξέα, αλκαλικοί καταλύτες, ισχυρά οξέα και βάσεις. Ωστόσο, η χρήση τέτοιου τύπου καταλυτών συνοδεύεται από υψηλή κατανάλωση ενέργειας λόγω της απαίτησης για υψηλές θερμοκρασίες και/ή υψηλές πιέσεις, ενώ οι διαδικασίες που ακολουθούνται συνήθως μεταβάλουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων, οδηγούν σε χαμηλής ποιότητας προϊόντα, έχουν μικρές αποδόσεις, ενώ ευνοούν και την εμφάνιση πολλών παραπροϊόντων εμποδίζοντας την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος. Οι ακραίες συνθήκες που απαιτούνται μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε σοβαρή φθορά του χρησιμοποιούμενου εξοπλισμού.

Προς επίλυση αυτών των προβλημάτων, η χρήση των ενζύμων ως βιοκαταλυτών ελκύει όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον, αφού η βιοκατάλυση αποτελεί μη ενεργειοβόρο και φιλική προς το περιβάλλον διεργασία η οποία σε αντίθεση με την παραδοσιακή μεταλλο- και οργανική κατάλυση στη χημική σύνθεση είναι διαδικασία με υψηλότερη απόδοση η οποία περιορίζει ή και εμποδίζει τελείως την εμφάνιση παραπροϊόντων και δίνει αποτελέσματα υψηλής ποιότητας. Για το λόγο αυτό, δεν προκαλεί ιδιαίτερη εντύπωση το γεγονός ότι η χρήση των λιπασών για την

κατάλυση οργανικών αντιδράσεων κερδίζει συνεχώς έδαφος. Αυτό οφείλεται κυρίως στη σταθερότητα που εμφανίζουν οι λιπάσες μέσα σε οργανικούς διαλύτες όπως επίσης και στην υψηλή διαθεσιμότητα, το χαμηλό κόστος και τη μη απαίτηση για συμπαράγοντα. Ωστόσο, ακόμη και με τη χρήση ενός τόσο «εύκολου» βιοκαταλύτη, υπάρχουν διεργασίες που εξακολουθούν να έχουν μεγαλούς χρόνους αντίδρασης και χαμηλές αποδόσεις.

Σε εργαστηριακή κλίμακα, η παραγωγή χημικών ουσιών πραγματοποείται ασυνεχώς σε διαλείποντος έργου αντιδραστήρες, με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων ακινητοποιημένων ενζύμων ή με ένζυμα εγκλωβισμένα σε μικρογαλακτώματα (Giuliani *et al.* 2001, Zoumparnioti *et al.* 2006). Η παρουσία ωστόσο, του επιφανειοενεργού είναι και το μειονέκτημα αυτών των συστημάτων αφού καθιστά την απομόνωση των προϊόντων δύσκολη και δαπανηρή. Για βιομηχανικούς σκοπούς, συνήθως προτείνεται η χρήση των ελεύθερων λιπασών σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου, λόγω του υψηλού κόστους των ακινητοποιημένων ενζύμων και της ανάγκης για επαναχρησιμοποίηση του βιοκαταλύτη (Wandrey *et al.* 2000, Chartrain *et al.* 2001). Όμως, η χρήση ελεύθερων ενζύμων καθιστά ιδιαίτερα δύσκολη τόσο την απομόνωση του προϊόντος όσο και την αναγέννηση του βιοκαταλύτη από το διάλυμα αντίδρασης, με σκοπό την επαναχρησιμοποίηση του.

Για το λόγο αυτό, η χρήση των ακινητοποιημένων ενζύμων σε στερεά μέσα (π.χ. οργανοπηκτώματα) κερδίζει συνεχώς έδαφος. Η ακινητοποίηση του βιοκαταλύτη όχι μόνο διευκολύνει την απομόνωση του προϊόντος, αλλά και καθιστά ευκολότερη την πρόσβαση των αντιδρώντων στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Επιπλέον, ενισχύει την αντίστασή τους στην αδρανοποίηση από διάφορους μετουσιωτές (Chebil *et al.* 2006). Η χρήση, επομένως, ακινητοποιημένων ενζύμων προτείνεται ως λύση για ένα σημαντικό πρόβλημα της παραγωγής των συστατικών που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για πολλές βιομηχανίες.

Το δεύτερο πρόβλημα που καλείται να αντιμετωπίσει η βιομηχανία είναι η τεχνική και οικονομική βελτίωση των διεργασιών που ακολουθούνται για να επιτευχθούν οι επιθυμητές βιομετατροπές. Τις τελευταίες δεκαετίες η επιστημονική κοινότητα ενδιαφέρεται όλο και περισσότερο για την χρήση νέων τεχνολογιών με σκοπό να επιτύχουν το καλύτερο δυνατό αποτέλεσμα. Υπάρχουν πολλές καινοτόμες ιδέες και τεχνολογίες που αναφέρονται στη διεθνή βιβλιογραφία. Μερικές από αυτές αναφέρονται στη χρήση ακτινοβολίας μικροκυμάτων, ιοντικών υγρών και υπερκρίσιμων ρευστών (Nikolova and Ward 1993, Madeira Lau *et al.* 2000, Jain *et al.*

2005, Zhao *et al.* 2009, Zhao H. 2010). Επίσης, στο πεδίο των καινοτόμων τεχνολογιών έχουν εισέλθει και τα συστήματα συνεχούς ροής, παρά το γεγονός ότι είναι μια μεθοδολογία που υπάρχει από το παρελθόν. Τα συστήματα αυτά, θεωρούνται ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για την επίτευξη νέων αντιδράσεων. Επιπλέον, πολλές μελέτες έχουν αναφερθεί στα συστήματα συνεχούς ροής ως μία τεχνική που μπορεί να βελτιώσει της ενζυμικές αντιδράσεις (Rao *et al.* 2009).

Οι αντιδραστήρες συνεχούς ροής είναι οικονομικά πιο αποτελεσματικοί από τους συμβατικούς αντιδραστήρες διαλείποντος έργου και οδηγούν σε αντιδράσεις υψηλότερης απόδοσης (Watanabe *et al.* 2001). Ιδιαίτερα στην περίπτωση των βιοαντιδραστήρων, σε έναν αντιδραστήρα διαλείποντος έργου τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται μπορούν εύκολα να υποστούν μετουσίωση ή αποδέσμευση από το φορέα ακινητοποίησης λόγω της διατμητικής τάσης που προκαλείται από τη χρήση μηχανικής ανάδευσης. Ένα ακόμα πλεονέκτημα των αντιδραστήρων συνεχούς ροής είναι ότι καθιστά εφικτή την βιομετατροπή συστατικών με χαμηλή διαλυτότητα (όπως είναι τα φαινολικά οξέα), αφού επιτρέπει τη χρήση μεγάλων όγκων διαλυμάτων χαμηλής περιεκτικότητας στο εν λόγω υπόστρωμα. Έτσι, στις περισσότερες περιπτώσεις η χρήση του αντιδραστήρα συνεχούς ροής προτιμάται από τον αντιδραστήρα διαλείποντος έργου (Nie *et al.* 2006, Royon *et al.* 2007).

1.8.1 Κατηγορίες αντιδραστήρων συνεχούς ροής

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται αρκετά είδη συστημάτων συνεχούς ροής. Τα κυριότερα από αυτά είναι:

- **Οι αντιδραστήρες σταθερής κλίνης (Packed bed reactors ή Fixed bed reactors).** Οι αντιδραστήρες αυτοί είναι είτε συνεχούς λειτουργίας (δηλ. ανοικτό σύστημα με συνεχή εισαγωγή και εκροή αντιδρώντων/ προϊόντων), είτε ασυνεχούς λειτουργίας (δηλ. κλειστό σύστημα στο οποίο δεν υπάρχουν εισερχόμενες και εξερχόμενες ροές). Τα πρότυπα ανάμιξης και ροής στους αντιδραστήρες αυτούς είναι σύνθετα. Για το λόγο αυτό, ακόμα και η μαθηματική ανάλυση είναι αρκετά περίπλοκη. Οι καταλυτικοί αντιδραστήρες σταθερής κλίνης έχουν υψηλό κόστος κατασκευής, πράγμα που περιορίζει τη χρησιμοποίησή τους σε μεγάλης κλίμακας διεργασίες. Τα κύρια πλεονεκτήματα των αντιδραστήρων αυτού του τύπου είναι ότι: α. δεν υπάρχουν μεγάλες θερμοκρασιακές διαφορές στην κλίνη, δηλαδή επιτυγχάνουμε άριστο έλεγχο της θερμοκρασίας, και β. η απομάκρυνση και

αναγέννηση του καταλύτη μπορεί να γίνει χωρίς να σταματήσει η λειτουργία του αντιδραστήρα.

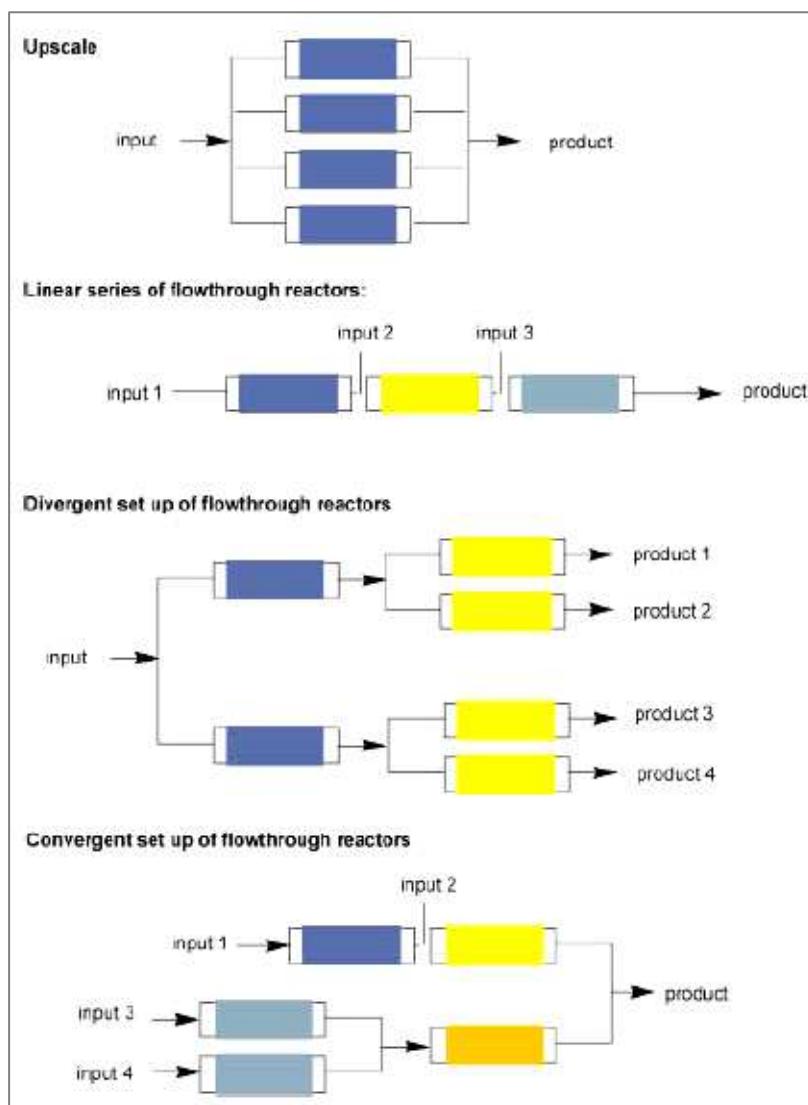
- **Οι αντιδραστήρες ροής πλήρους ανάμιξης (Continuous stirred tank reactor).** Οι αντιδραστήρες του τύπου αυτού λειτουργούν συνήθως σε μόνιμη κατάσταση που σημαίνει ότι η εισροή μάζας στον αντιδραστήρα είναι σταθερή και ίση με την εκροή μάζας από αυτόν. Οι συγκεντρώσεις των αντιδρώντων και των προϊόντων, όπως επίσης η θερμοκρασία του αντιδρώντος μίγματος, είναι ανεξάρτητες της θέσης τους στο χώρο του αντιδραστήρα. Το ιδανικό αυτό μοντέλο αντιδραστήρα είναι κατάλληλο για τη διεξαγωγή χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα σε υγρή φάση.
- **Οι αντιδραστήρες εμβολικής ροής (Plug flow reactor).** Οι αντιδραστήρες αυτοί ονομάζονται και αυλωτοί αντιδραστήρες εμβολικής ροής, λόγω της φυσικής τους διαμόρφωσης (αυλοί) και των συνθηκών ροής (εμβολικής ροής). Στους αντιδραστήρες εμβολικής ροής οι συγκεντρώσεις των αντιδραστηρίων και η θερμοκρασία μεταβάλλονται κατά την αξονική κατεύθυνση, αλλά είναι ανεξάρτητες της ακτινικής θέσης τους στον αντιδραστήρα (επικρατούν ομοιόμορφες συνθήκες σε μια διατομή του αντιδραστήρα). Το ιδανικό αυτό μοντέλο μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ανάλυση της λειτουργίας ενός αυλωτού ομοιογενούς αντιδραστήρα (ύπαρξη μίας μόνο φάσης) ή ενός αυλωτού ετερογενούς αντιδραστήρα (ύπαρξη δύο φάσεων: ενός καταλύτη και μιας υγρής ή αέριας φάσης) (Κυπαρισσίδης Κων/νος, 2008).

Στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιούνται οι αντιδραστήρες σταθερής κλίνης, όταν πρόκειται για βιοκατάλυση σε σύστημα συνεχούς ροής. Υπάρχουν πολλές αναφορές στη βιβλιογραφία σχετικά με τη χρήση τέτοιου συστήματος σε βιοδεργασίες καταλυόμενες από λιπάση. Λόγω της εύκολης ανάκτησης του βιοκαταλύτη και των υψηλών αποδόσεων που προκύπτουν, είναι εμφανές ότι πρόκειται για ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για την επίτευξη πολλών βιοδιεργασιών βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος (Itabaiana *et al.* 2013).

Γενικότερα, ένα πρωτόκολλο που περιλαμβάνει τη χρήση ενός συστήματος συνεχούς ροής, δίνει δυνατότητες που δύσκολα θα μπορούσαν να επιτευχθούν με αντιδραστήρες διαλείποντος έργου. Για παράδειγμα, μια διεργασία σε μεγάλη κλίμακα μπορεί να διεξαχθεί με τη χρήση παράλληλων αντιδραστήρων. Δηλαδή, συναρμολογώντας αντιδραστήρες σε σειρά, μπορούν να πραγματοποιηθούν συνθέσεις πολλαπλών σταδίων με ελάχιστη ή και καθόλου απαίτηση για καθαρισμό

των προϊόντων ανάμεσα σε δύο στάδια. Η ιδέα αυτή, μπορεί φυσικά να εμπλουτιστεί ενσωματώνοντας και άλλα στάδια, όπως είναι οι μέθοδοι διαχωρισμού ή καθαρισμού του προϊόντος (Εικόνα 1.7).

Επιπλέον, υπάρχουν περιπτώσεις αντιδράσεων για τις οποίες, ο χρόνος που απαιτείται για πλήρη μετατροπή των αντιδρώντων είναι αρκετά μεγάλος ώστε να επιτευχθεί με ένα μόνο πέρασμα από το σύστημα. Στις περιπτώσεις αυτές προτείνεται η κυκλική λειτουργία του συστήματος. Επομένως, είναι προφανές ότι για τη χρήση ενός συστήματος συνεχούς ροής, ακόμα και σε εργαστηριακή κλίμακα, είναι απαραίτητο να ληφθούν υπόψη όχι μόνο χημικοί αλλά και τεχνικοί παράγοντες για την βελτιστοποίηση της διαδικασίας (Jas and Kirschning 2003).



Εικόνα 1.7. Πιθανοί τρόποι συναρμολόγησης αντιδραστήρων συνεχούς ροής για διαφορετικές βιοσυνθετικές διεργασίες (Jas and Kirschning 2003).

1.8.2. Προοπτικές για το μέλλον

Η πληθώρα των χημικών μεθόδων που είναι διαθέσιμες στους επιστήμονες δημιουργεί την εντύπωση ότι μπορεί να παρασκευαστεί κάθε δυνατό μόριο ανεξαρτήτως από τη δομική του πολυπλοκότητα. Αυτή η εντύπωση, ωστόσο, απέχει πολύ από την πραγματικότητα, αφού δεν λαμβάνεται υπόψη το γεγονός ότι πολλές συνθετικές οδοί και χημικές μέθοδοι δεν μπορούν να θεωρηθούν αποδοτικές και οικονομικά βιώσιμες.

Δυστυχώς, υπάρχουν αρκετές δυσκολίες ακόμα που πρέπει να αντιμετωπιστούν για την εφαρμογή των συστημάτων συνεχούς ροής στη βιομηχανική παραγωγή. Αυτές περιλαμβάνουν:

- i. Τον περιορισμό ως προς το μέγιστο αριθμό σταδίων μιας αντίδρασης.
- ii. Τον απώλεια δραστικότητας του βιοκαταλύτη μετά από επαναλαμβανόμενη χρήση του.
- iii. Την απαίτηση για διαφορετικό βιοκαταλύτη αναλόγως το είδος αντίδρασης.
- iv. Την ανάγκη για αλλαγή των οργανικών διαλυτών αναλόγως την αντίδραση.
- v. Την απαίτηση για εγκαταστάσεις που αφορούν τον καθαρισμό των προϊόντων.

Παρ' όλα αυτά, η ζήτηση που υπάρχει από τις χημικές και φαρμακευτικές βιομηχανίες για υψηλής καθαρότητας προϊόντα εξακολουθεί να παρεμποδίζεται από την ανάγκη για μια απλή διαδικασία που θα μπορούσε να αναβαθμιστεί ώστε να εφαρμοστεί σε μεγάλη κλίμακα. Άλλοι ανασταλτικοί παράγοντες θεωρούνται η σταθερότητα και η δυνατότητα για επαναχρησιμοποίηση του καταλύτη (Jas and Kirschning 2003).

Το κλειδί της επιτυχίας για τα συστήματα συνεχούς ροής βρίσκεται στην αποτελεσματική ακινητοποίηση του βιοκαταλύτη, αφού ως γνωστόν οι ακινητοποιημένοι βιοκαταλύτες προσφέρουν πολλά πλεονεκτήματα όπως η εύκολη ανάκτησή τους από διάλυμα αντίδρασης, η αυξημένη σταθερότητα που παρουσιάζουν και η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης τους (Liese *et al.* 2000). Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητο να γίνει με ιδιαίτερη προσοχή η επιλογή του κατάλληλου μέσου ακινητοποίησης του ενζύμου με σκοπό την μέγιστη αξιοποίηση του σε ένα σύστημα συνεχούς ροής (Rosevear A. 1984, Malcata *et al.* 1990, Bornscheuer U.T. 2003).

1.9 Σκοπός της εργασίας

Η βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών έχει εκδηλώσει εδώ και χρόνια το ενδιαφέρον της για τη χρήση συστατικών που δίνουν υψηλή προστιθέμενη αξία στα προϊόντα τους. Τέτοια συστατικά μπορούν (και είναι επιθυμητό) να έχουν φυσική προέλευση, ωστόσο, η μετατροπή τους σε διαφορετική μορφή είναι συνήθως απαραίτητη καθώς όταν βρίσκονται στη φυσική τους μορφή δεν είναι πάντα εφικτή η ενσωμάτωσή τους στα εκάστοτε προϊόντα. Η μετατροπή αυτή των συστατικών σε διαφορετική μορφή (π.χ. μετατροπή των περιορισμένης διαλυτότητας φαινολικών οξέων σε εστέρες τους οι οποίοι παρουσιάζουν αυξημένη διαλυτότητα) είναι συνήθως ακριβή και ενεργειοβόρος. Δύο από τα κύρια προβλήματα που καλούνται να επιλύσουν οι βιομηχανίες για να διευκολύνουν την παραγωγή των προϊόντων αυτών είναι η επιλογή βελτιωμένου καταλύτη και η απλούστευση και καλύτερη απόδοση των διεργασιών που ακολουθούνται.

Η παρούσα εργασία σχετίζεται με την αντιμετώπιση και των δύο προβλημάτων που προαναφέρθηκαν. Προτείνει τη χρήση ενός αντιδραστήρα συνεχούς ροής ο οποίος πληρώνεται με βιοσυμβατό βιοκαταλύτη αποτελούμενο από ένζυμο ακινητοποιημένο σε φυσικό πολυμερές. Επομένως, προσφέρει τόσο τα πλεονεκτήματα ενός αντιδραστήρα συνεχούς ροής όπως η υψηλή απόδοση και η μετατροπή υποστρωμάτων χαμηλής διαλυτότητας, όσο και τα πλεονεκτήματα της βιοκατάλυσης όπως περιορισμένα παραπροϊόντα και ήπιες συνθήκες λειτουργίας, επομένως χαμηλό κόστος. Επίσης, ο βιοκαταλύτης που προτείνεται παρουσιάζει ένα ακόμα πλεονέκτημα. Αποτελείται από ένζυμο ακινητοποιημένο σε φορέα φυσικού πολυμερούς, επομένως είναι ένα σύστημα φιλικό προς το περιβάλλον και κυρίως βιοσυμβατό, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διεργασίες που έχουν ως τελικό σκοπό την παραγωγή ουσιών που θα χρησιμοποιηθούν σε σκευάσματα όπως τρόφιμα, φάρμακα ή καλλυντικά.

Υλικά και Μέθοδοι

2.1. Υλικά

2.1.1. Λιπάσες:

Χρησιμοποιήθηκαν δύο λιπάσες μικροβιακής προέλευσης:

- Λιπάση από *Rhizomucor miehei*, της εταιρείας Fluka προμηθευμένη ως λιπάση από *Mucormiehei*. Η ειδική ενζυμική ενεργότητα ήταν 146,92 U/mg πρωτεΐνης (1 U αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου η οποία απελευθερώνει 1 μμολ βουτυρικού οξέος ανά λεπτό σε pH 7,5 και θερμοκρασία 40 °C, χρησιμοποιώντας τριβουτυρίνη ως υπόστρωμα).
- Λιπάση Β από *Candida antarctica* της εταιρείας Fluka. Η ειδική ενζυμική ενεργότητα ήταν 10,8 U/mg πρωτεΐνης (1 U αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου η οποία απελευθερώνει 1 μμολ βουτυρικού οξέος ανά λεπτό σε pH 8 και θερμοκρασία 50 °C, χρησιμοποιώντας τριβουτυρίνη ως υπόστρωμα).

2.1.2. Υλικά μικρογαλακτώματος, πηκτώματος και υποστρωμάτων:

Η υδροξυ-προπυλ-μεθυλ-κυνταρίνη (HPMC) που χρησιμοποιήθηκε για την παρασκευή των πηκτωμάτων ήταν της εταιρείας Sigma (St.Louis, USA). Για τη παρασκευή του μικρογαλακτώματος, η λεκιθίνη σόγιας (40% περιεκτικότητα σε φωσφατίδυλο χολίνη) που χρησιμοποιήθηκε ήταν προϊόν της εταιρείας Sigma, επίσης. Η 1-προπανόλη και ο οργανικός διαλύτης ισοοκτάνιο ήταν της εταιρείας Merck (Frankfurt, Germany), ενώ η 1-οκτανόλη ήταν της εταιρείας FERAK. Το λαυρικό οξύ και το π-υδροξυ-φαινυλοξικό οξύ (*p*-HPA), που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα ήταν της εταιρείας Merck και Sigma αντίστοιχα. Τέλος, οι τερπενικές αλκοόλες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν της εταιρείας Aldrich–Chemie. Σημειώνεται ότι όλες οι ενώσεις και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψίστου βαθμού καθαρότητας.

2.1.3. Υλικά για τον διαχωρισμό και απομόνωση των εστέρων

- Για τη χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιήθηκε γυάλινη στήλη μήκους 25 cm και διαμέτρου 1 cm. Η στήλη πληρωθήκε με γέλη πυριτίου silica 60 (0,2-0,5 mm, 35-70 Mesh) της εταιρίας Merck.
- Για τη χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) χρησιμοποιήθηκαν πλαστικές πλάκες 20×20 cm, Silicagel 60 χωρίς φθορίζον δείκτη, 0,2 mm της εταιρίας Merck.

- Για την ανάπτυξη των πλακών TLC χρησιμοποιήθηκαν διαλύτες (εξάνιο, οξικός αιθυλεστέρας, διχλωρομεθάνιο) αναλύτικής καθαρότητας της εταιρίας BDH. Η εμφάνιση των πλακών έγινε με εμβάπτιση σε διάλυμα φωσφομολυβδαινικού οξέος (10% σε αιθανόλη) και κατόπιν θέρμανση με πιστολάκι.

2.1.4. Όργανα:

- Ο αεριοχρωματογραφικός προσδιορισμός των ελεύθερων λιπαρών οξέων και των εστέρων τους έγινε με τον αέριο χρωματογράφο HP 6890C της εταιρείας Hewlett Packard, ο οποίος ήταν εφοδιασμένος με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID). Οι σύριγγες, μέσω των οποίων γινόταν η εισαγωγή του δείγματος στον αέριο χρωματογράφο ήταν της εταιρείας Hamilton και ήταν όγκου 10 μL.
- Όλες οι ζυγίσεις πραγματοποιήθηκαν στον ηλεκτρονικό ζυγό ORMAMODELbc υψηλής ακρίβειας.
- Οι δύο στήλες που χρησιμοποιήθηκαν ως αντιδραστήρες ήταν μήκους 14cm και διαμέτρου 2cm, ενώ είχαν χωρητικότητα 30mL η κάθε μία.
- Η αντλία για τη μεταφορά του διαλύματος αντίδρασης στις στήλες ήταν η Minipuls 2 της εταιρίας Gilson.
- Για τις μετρήσεις του pH χρησιμοποιήθηκε το pH- μετρο 691 της εταιρείας METROHM (Switzerland).
- Οισωληνώσεις ήταν από υλικό TygonS3™ R-3603 της εταιρείας Saint-GobainPerformancePlastics διαμέτρου 8mm.
- Ο κλασματικός αποστακτήρας που χρησιμοποιήθηκε για την συμπύκνωση των διαλυμάτων αντίδρασης ήταν ο RotavaporR110 της εταιρείας BÜCHI.

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος

Παρασκευάστηκε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl συγκέντρωσης 200 mM. Σε 25 mL νερού προστέθηκε 0,6 gTris (2-άμινο-2-υδρόξυλο-προπανο-1,3-διόλη). Στην συνέχεια ρυθμίστηκε το pH του διαλύματος στο 7,5 με την στάγην προσθήκη HCl.

2.2.2. Παρασκευή ενζυμικών διαλυμάτων

α) Ενζυμικό διάλυμα λιπάσης από *R. miehei*: 10 mg λιπάσης από *Rhizomucormiehei* διαλυτοποιούνται σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl συγκέντρωσης 200 mM, pH 7,5.

β) Ενζυμικό διάλυμα λιπάσης από *C. antarctica*: 30 mg λιπάσης από *Candida andarctica* διαλυτοποιούνται σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl συγκέντρωσης 200 mM, pH 7,5.

2.2.3. Παρασκευή μικρογαλακτώματος

Μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης: Παρασκευάζεται διάλυμα λεκιθίνης σε ισοοκτάνιο με περιεκτικότητα 3,5% κ.β. και το οποίο περιέχει 1-προπανόλη σε περιεκτικότητα 10% κ.ο.. Κατάλληλη ποσότητα υδατικού διαλύματος λιπάσης προστίθεται στο παραπάνω διάλυμα λεκιθίνης. Την υδατική φάση αποτελεί το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl με pH 7,5 και συγκέντρωση 200 mM το οποίο περιέχει το ένζυμο.

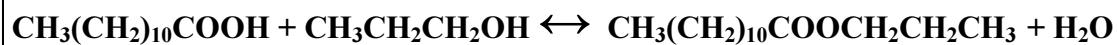
2.2.4. Παρασκευή οργανοπηκτώματος (HPMC)

Για την παρασκευή του οργανοπηκτώματος, 1 mL μικρογαλακτώματος το οποίο περιέχει λιπάση αναμιγνύεται με διάλυμα 1 g HPMC (παραγώγου κυτταρίνης) σε 2 mL νερού στους 25 °C. Ταυτόχρονα παρασκευάζεται 1 mL μικρογαλακτώματος που περιέχει το υδατικό διάλυμα ενζύμου. Το μικρογαλάκτωμα, με το ακινητοποιημένο ένζυμο, προστίθεται στην ενυδατωμένη HPMC και ακολουθεί έντονη ανάδευση του μίγματος. Οι οργανογέλες που προκύπτουν με αυτή τη μέθοδο μπορούν να χρησιμοποιηθούν άμεσα ή να διατηρηθούν υπό κατάψυξη (-20 °C) έως τη χρησιμοποίηση τους.

2.2.5. Διεξαγωγή αντιδράσεων

Πραγματοποιήθηκαν τέσσερις διαφορετικές αντιδράσεις κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Η πρώτη χρησιμοποιήθηκε ως μία πρότυπη αντίδραση για την εύρεση της βέλτιστης συνδεσμολογίας που θα χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή του επιθυμητού εστέρα, σε προβιομηχανική κλίμακα. Ενώ οι υπόλοιπες τρεις πραγματοποιήθηκαν για να παράγουμε το επιθυμητό προϊόν και στη συνέχεια να το διαχωρίσουμε και να το απομονώσουμε.

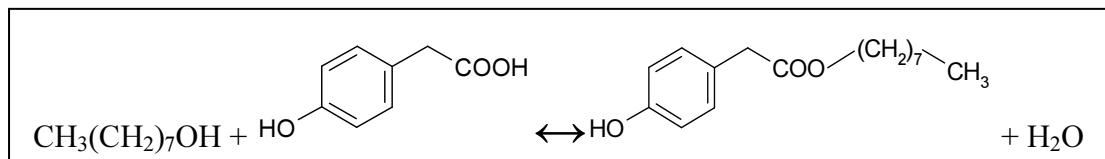
- 1^η αντίδραση: Το λαυρικό οξύ αντιδράει με 1-προπανόλη για το σχηματισμό λαυρικού προπυλεστέρα και νερό (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1. Αντίδραση εστεροποίησης της 1-προπανόλης με το λαυρικό οξύ.

Σε διαλύτη ισοοκτάνιο προστέθηκαν κατάλληλες ποσότητες λαυρικού οξέος της εταιρείας Merck και 1-προπανόλης έτσι ώστε η τελική τους συγκέντρωση στο διάλυμα να είναι 150 mMέκαστη. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση αυτή είναι η λιπάση από *R. miehei*. Η εκκίνηση της αντίδρασης επιτυγχάνεται με την προσθήκη του διαλύματος των υποστρωμάτων στη στήλη ή στις στήλες, ανάλογα με τη συνδεσμολογία που μελετάμε, που περιέχουν τα οργανοπηκτώματα. Σε όλες τις συνδεσμολογίες που εξετάσαμε, η στήλη ή οι στήλες με τα οργανοπηκτώματα βρίσκονται σε θερμοκρασία δωματίου. Λαμβάνονται δείγματα ανά τακτά χρονικά διαστήματα που στη συνέχεια αναλύονται με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε γυάλινες στήλες των 30 mL επαρκώς σφραγισμένες για την αποφυγή, όσο είναι δυνατόν, εξάτμισης του οργανικού διαλύτη.

- 2^η αντίδραση: Το π-υδροξυ-φαινυλοξικό οξύ αντιδράει με οκτανόλη για το σχηματισμό π-υδροξυ-φαινυλοξικού εστέρα της οκτανόλης και νερό (Εικόνα 2.2).

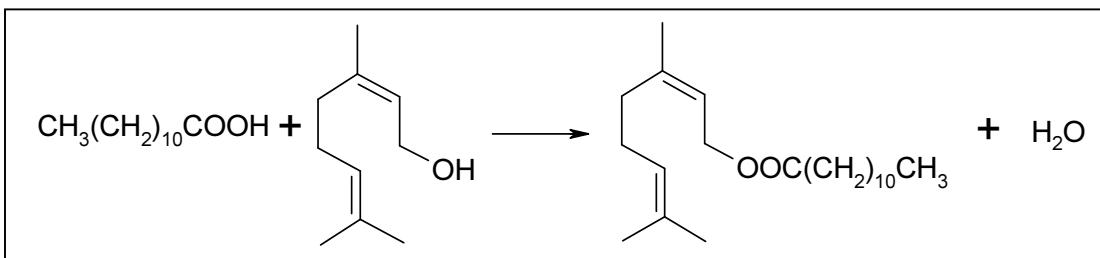


Εικόνα 2.2. Αντίδραση εστεροποίησης της οκτανόλης με το π-υδροξυ-φαινυλοξικό οξύ.

Σε διαλύτη οκτανόλη προστέθηκε συγκεκριμένη ποσότητα π-υδροξυ-φαινυλοξικού οξέος (pHPA) της εταιρείας Sigma έτσι ώστε η τελική συγκέντρωση να είναι 70 mM. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση αυτή είναι

η λιπάση από *C. Antarctica*. Η εκκίνηση γίνεται με την εισαγωγή του διαλύματος αντίδρασης και η διεξαγωγή της αντίδρασης πραγματοποιείται με τη βέλτιστη συνδεσμολογία που επιλέχθηκε και θα περιγραφεί λεπτομερώς στην επόμενη ενότητα.

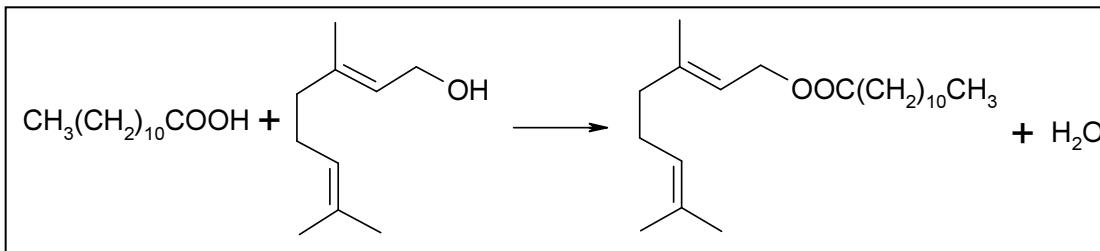
- **3^η αντίδραση:** Το λαυρικό οξύ αντιδράει με νερόλη για το σχηματισμό λαυρικού εστέρα της νερόλης και νερό (Εικόνα 2.3).



Εικόνα 2.3. Αντίδραση εστεροποίησης της νερόλης με το λαυρικό οξύ.

Σε διαλύτη ισοοκτάνιο προστέθηκαν κατάλληλες ποσότητες λαυρικού οξέος της εταιρείας Merck και νερόλης της εταιρείας Aldrich έτσι ώστε η τελική τους συγκέντρωση στο διάλυμα να είναι 100 mM έκαστη. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση αυτή είναι η λιπάση από *R. miehei*. Η εκκίνηση γίνεται με την εισαγωγή του διαλύματος αντίδρασης και η διεξαγωγή της αντίδρασης πραγματοποιείται με τη βέλτιστη συνδεσμολογία που επιλέχθηκε και θα περιγραφεί λεπτομερώς στην επόμενη ενότητα.

- **4η αντίδραση:** Το λαυρικό οξύ αντιδράει με γερανιόλη για το σχηματισμό λαυρικού εστέρα της γερανιόλης και νερό (Εικόνα 2.4).

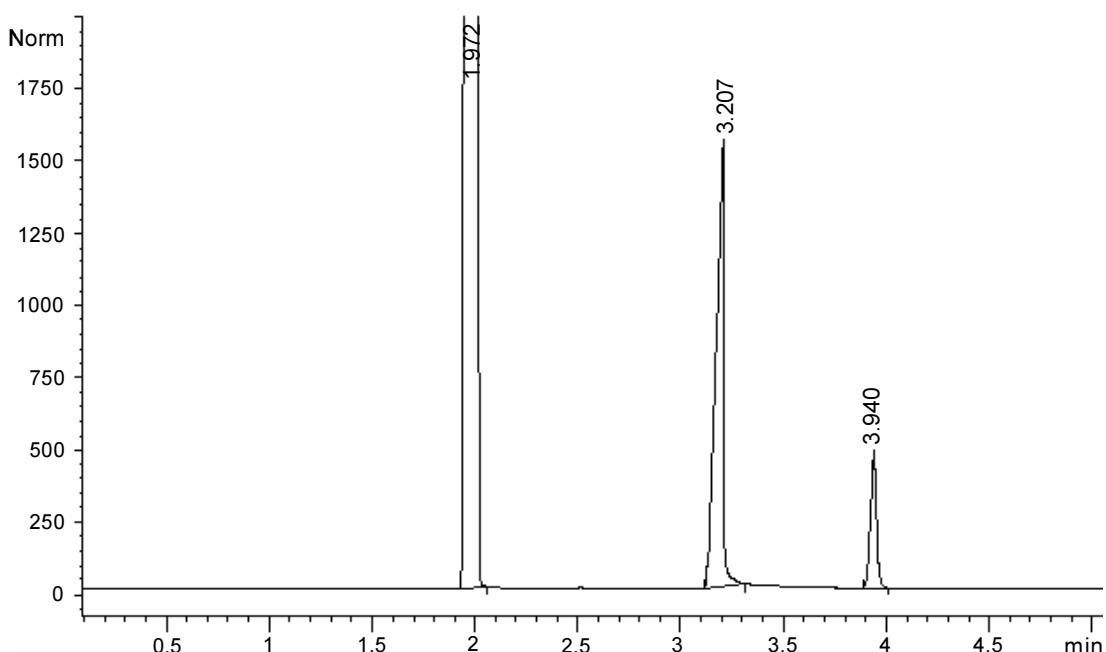


Εικόνα 2.4. Αντίδραση εστεροποίησης της γερανιόλης με το λαυρικό οξύ.

Σε διαλύτη ισοοκτάνιο προστέθηκαν κατάλληλες ποσότητες λαυρικού οξέος της εταιρείας Merck και γερανιόλης της εταιρείας Aldrich έτσι ώστε η τελική τους συγκέντρωση στο διάλυμα να είναι 100 mM έκαστη. Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση αυτή είναι η λιπάση από *R. miehei*. Η εκκίνηση της αντίδρασης επιτυγχάνεται με την προσθήκη του διαλύματος αντίδρασης και η διεξαγωγή της αντίδρασης πραγματοποιείται με τη βέλτιστη συνδεσμολογία που επιλέχθηκε και θα περιγραφεί λεπτομερώς στην επόμενη ενότητα.

2.2.6. Αναλυτικές Μέθοδοι

Η μέθοδος που εφαρμόστηκε για τηνανάλυση των δειγμάτων που συλλέχθηκαν κατα τη διεξαγωγή των αντιδράσεων ήταν η αέριος χρωματογραφία. Η τριχοειδής στήλη που χρησιμοποιήθηκε ήταν τύπου HP-5 (Agilent). Το φέρον αέριο ήταν άζωτο με ταχύτητα ροής 1 mL/min ενώ η θερμοκρασία του θαλάμου εισαγωγής ήταν 280 °C όπως και αυτή του ανιχνευτή φλόγας. Η θερμοκρασία του φούρνου διατηρήθηκε σταθερή στους 200 °C για 2 min και κατόπιν αυξανόταν γραμμικά με ρυθμό 10 °C/min ως τους 260 °C.



Εικόνα 2.5. Χρωματογράφημα του διαλύματος της αντίδρασης από τη στήλη HP-5 όπου διακρίνονται η κορυφή του οξέος σε χρόνο απόκρισης 3.2 min και του εστέρα στα 3.9 min.

Ο χρόνος απόκρισης της κάθε ουσίας εξαρτάται από το σημείο ζέσης της και από τη χημική της συγγένεια με τη στήλη. Τέλος, η συγκέντρωση του προϊόντος της αντίδρασης, σε κάθε δείγμα που αναλύεται, υπολογίζεται βάσει του εμβαδού της επιφάνειας που περικλείεται από την αντίστοιχη κορυφή του χρωματογραφήματος, το οποίο υπολογίζεται και καταγράφεται από αυτόματο ολοκληρωτή.

2.2.7. Διαχωρισμός των προϊόντων ενζυμικής εστεροποίησης με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας:

Ο διαχωρισμός των προϊόντων της ενζυμικής εστεροποίησης πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας. Για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκαν έτοιμες πλαστικές πλάκες με επίστρωση γέλης πυριτίου (silicagel 60). Οι πλάκες τοποθετούνται όρθιες σε κλειστά γυάλινα δοχεία κορεσμένα με τους ατμούς του συστήματος ανάπτυξης (κατάλληλο μείγμα διαλυτών).

Το διάλυμα του δείγματος τοποθετείται με τη βοήθεια λεπτού γυάλινου τριχοειδούς υπό μορφή κηλίδας κοντά στη βάση της πλάκας, ενώ παράλληλα τοποθετούνται και πρότυπες ενώσεις αναφοράς για την ταυτοποίηση των προϊόντων της ενζυμικής αντίδρασης. Τα επίπεδα του διαλύτη στο δοχείο ανάπτυξης είναι σε ύψος κάτω από αυτό των κηλίδων στη χρωματογραφική πλάκα. Ο διαλύτης αφήνεται να ανέλθει με τη βοήθεια τριχοειδών φαινομένων και οι ουσίες του προς εξέταση δείγματος ανεβαίνουν με διαφορετικές ταχύτητες με βάση την πολικότητά τους. Η πλάκα αποσύρεται όταν το μέτωπο του διαλύτη φτάσει κοντά στην κορυφή. Η εμφάνιση των ουσιών πάνω στις πλάκες έγινε με στιγμιαία εμβάπτιση σε διάλυμα 10% σε αιθανόλη του ειδικού αντιδραστηρίου φωσφομολυβδαινικού οξέος και στέγνωμα με θερμό αέρα (γενική μέθοδος εμφάνισης πλακών χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας).

2.2.8. Διαχωρισμός των προϊόντων ενζυμικής εστεροποίησης με χρωματογραφία στήλης:

Η εφαρμογή της μεθόδου έγινε με τη χρήση μιας γυάλινης στήλης ύψους 25cm και διαμέτρου 1cm. Η στήλη αυτή πληρώθηκε μέχρι το μέσο με γέλη πυριτίου (silicagel 60, 0,2-0,5 mm), (στατική φάση). Συγκεκριμένα έγινε αραίωση της γέλης πυριτίου (2,5 g) στο αρχικό σύστημα διαλύτη (50 mL) καιτο μίγμα προστέθηκε στη

στήλη και αφέθηκε η γέλη να καθιζήσει και να διαμορφώσει τη στιβάδα της στατικής φασης. Ακολούθησε έκπλυση με αρχικό σύστημα διαλύτη (100 mL). Ο αρχικός διαλύτης ήταν εξάνιο στην περίπτωση του λαυρικού προπυλεστέρα και διχλωρομεθάνιο για τον εστέρα της νερόλης και τον εστέρα της γερανιόλης. Στη συνέχεια όγκος 500 μ L διαλύματος 20% v/v προϊόντος της αντίδρασης στον αρχικό διαλύτη ποθετήθηκε στηναρχή της στήλης και έγινε έκλουση με τον διαλύτη που είχε επιλεγεί σε κάθε περίπτωση.

Το μίγμα διαλυτών με το οποίο γίνεται έκλουση αποτελεί την κινητή φάση της μεθόδου η οποία διέρχεται μέσω της στατικής φάσης, λόγω της βαρύτητας. Τα συστατικά του δείγματος μετακινούνται κατά μήκος της στήλης με διαφορετικές ταχύτητες εξαρτώμενες από τη συγγένεια των συστατικών ως προς τη στατική φάση. Χρησιμοποιούνται μίγματα διαλυτών αυξανόμενης πολικότητας και συλλέγονται κλάσματα. Στην προκειμένη περίπτωση το συστατικό που εξέρχεται πρώτα από τη στήλη είναι ο εστέρας δηλαδή το προϊόν της αντίδρασης που θέλουμε να απομονώσουμε (λόγω μικρότερης πολικότητας, συνεπώς μικρότερης συγγένειας με το πολικό υλικό πλήρωσης της στήλης).

Στην περίπτωση του λαυρικου προπυλεστέρα έγινε έκλουση της στήλης με 115 mL εξανίου και ακολούθως με 100 mL εξανίου/οξικού αιθυλεστέρα 95:5. Για τους εστέρες της γερανιόλης και της νερόλης έγινε έκλουση με 100 mL και 50 mL διχλωρομεθανίου αντίστοιχα. Συλλέγονταν κλάσματα των 5 mL (κατά προσέγγιση).

Η ταυτοποίηση και συνένωση των κλασμάτων που περιείχαν τον επιθυμητό εστέρα έγινε κατοπίν χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας μικρής ποσότητας δείγματος από κάθε κλάσμα. Η απομόνωση του εστέρα εγίνε με εξάτμιση του διαλύτη με ρεύμα αζώτου.

2.2.9. Ταυτοποίηση λαυρικού προπυλεστέρα με φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR):

Η μελέτη διαφόρων ουσιών με τη χρήση τεχνικών πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού στηρίζεται στη λήψη φασμάτων από τις ουσίες ύστερα από διέγερση του δείγματος. Η διέγερση γίνεται με τη χρήση ηλεκτρομαγνητικού πεδίου σε ένα εύρος συχνοτήτων που εξαρτάται από τα στοιχεία που αποτελούν το υλικό καθώς και σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες. Η μελέτη των φασμάτων πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού με τη βοήθεια ειδικών προγραμμάτων οδηγεί στην αποκάλυψη της σύστασης και της δομής του δείγματος.

Τα φάσματα πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού οφείλονται σε διεγέρσεις μαγνητικών πυρήνων που βρίσκονται σε ισχυρό ομογενές μαγνητικό πεδίο B_0 . Η συχνότητα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που προκαλεί τις διεγέρσεις αυτές βρίσκεται στην περιοχή των βραχέων ραδιοκυμάτων και είναι της τάξης 1000 – 10 MHz εξαρτώμενη από την ισχύ του πεδίου.

Αποτελέσματα

Στους αντιδραστήρες συνεχούς ροής, ο όγκος της υγρής φάσης του συστήματος παραμένει σταθερός δεδομένου ότι το διάλυμα αντίδρασης διαρρέει τον αντιδραστήρα με σταθερή ροή. Το ένζυμο που χρησιμοποιείται για την κατάλυση είναι ακινητοποιημένο σε οργανοπήκτωμα το οποίο χρησιμοποιείται για να πληρωθεί ο αντιδραστήρας. Σε όλη τη διάρκεια της διαδικασίας η συγκέντρωση του ενζύμου θεωρείται αμετάβλητη.

Στις παραγράφους που ακολουθούν περιγράφονται οι διαφορετικές συνδεσμολογίες που μελετήθηκαν με σκοπό να βρεθεί η βελτιστη δυνατή, δηλαδή η εύρεση του τρόπου σύνδεσης που θα δώσει υψηλή απόδοση με το μικρότερο κόστος, με σκοπό να εφαρμοστεί σε βιομηχανική κλίμακα. Η βελτιστοποίηση του συστήματος βιοκατάλυνσης πραγματοποιήθηκε με τη χρήση της πρότυπης αντίδρασης σύνθεσης του λαυρικού προπυλεστέρα. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με τη χρήση οργανοπήκτωμάτων, των οποίων η μέθοδος παρασκευής αναφέρεται αναλυτικά στο 2^o κεφάλαιο (Υλικά και Μέθοδοι). Το ένζυμο που καταλύει την αντίδραση αυτή είναι η λιπάση από *R. miehei*.

Στη συνέχεια, μελετήθηκαν τρεις ακόμη αντιδράσεις που οδηγούν στην παραγωγή προϊόντων με βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Αρχικά, η αντίδραση εστεροποίησης της οκτανόλης με το π-υδροξυ-φαινυλοξικό οξύ καταλυόμενη από λιπάση από *C. antarctica*. Έπειτα, μελετήθηκαν οι αντιδράσεις εστεροποίησης της γερανιόλης και της νερόλης με το λαυρικό οξύ καλυόμενες από λιπάση από *R. miehei*.

Σε όλες τις παραπάνω αντιδράσεις το ένζυμο ήταν ακινητοποιημένο σε οργανοπήκτωμα από HPMC βασισμένο σε μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης. Όλες οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση του συστήματος συνεχούς ροής που επιλέχθηκε ως το περισσότερο αποδοτικό μέσω της πειραματικής διαδικασίας. Τέλος, προς επιβεβαίωση της αποδοτικότητας του συστήματος έγινε η απομόνωση και ο διαχωρισμός των προϊόντων που παράχθηκαν από τις προηγούμενες αντιδράσεις, καθώς και η ταυτοποίηση του λαυρικού προπυλέστερα που παράχθηκε από την πρότυπη αντίδραση.

3.1 Βελτιστοποίηση Συστήματος Συνεχούς ροής

Συνοπτική περιγραφή του πειράματος:

Για τη βελτιστοποίηση του συστήματος μελετώνται συνολικά τέσσερις διατάξεις με μία ή δύο στήλες. Η κάθε στήλη πληρώνεται με τον βιοκαταλύτη ο οποίος αποτελείται από πήκτωμα βασισμένο σε μικρογαλάκτωμα το οποίο περιέχει το ένζυμο. Το πήκτωμα αποτελείται από υδροξυ-προπυλ-μεθυλο κυτταρίνη (HPMC). Το μικρογαλάκτωμα στο οποίο βασίζεται η παρασκευή του πηκτώματος αποτελείται από ισοοκτάνιο, λεκιθίνη, 1-προπανόλη και υδατική φάση (νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα) η οποία περιέχει το ένζυμο (λιπάση από *R. miehei*). Η ποσότητα του ενζύμου που περιέχεται στο οργανοπήκτωμα αντιστοιχεί σε 0,08 mg ανά g πηκτώματος. Για τη βελτιστοποίηση των συνδεσμολογιών που μελετήθηκαν, χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση του λαυρικού οξέος με 1- προπανόλη ως πρότυπη.

Αρχικά, η διάταξη που μελετείται αποτελείται από μια γυάλινη στήλη. Η στήλη έχει και τα δύο άκρα της ελεύθερα και το διάλυμα αντίδρασης διέρχεται μέσα απ' αυτή μία φορά. Στη συνέχεια το σύστημα τροποποιείται ώστε η στήλη να έχει ελεύθερο το άνω άκρο αλλά το κάτω άκρο της να συνδέεται απ' ευθείας ή μέσω συνδέσμου με σωληνώσεις. Οι σωληνώσεις ενώνουν το άνω με το κάτω άκρο μέσω αντλίας ή οδηγούν σε δεύτερη στήλη όμοια. Η τελευταία ενώνεται εκ νέου μέσω συνδέσμου με σωληνώσεις που καταλήγουν στο άνω άκρο της πρώτης στήλης.

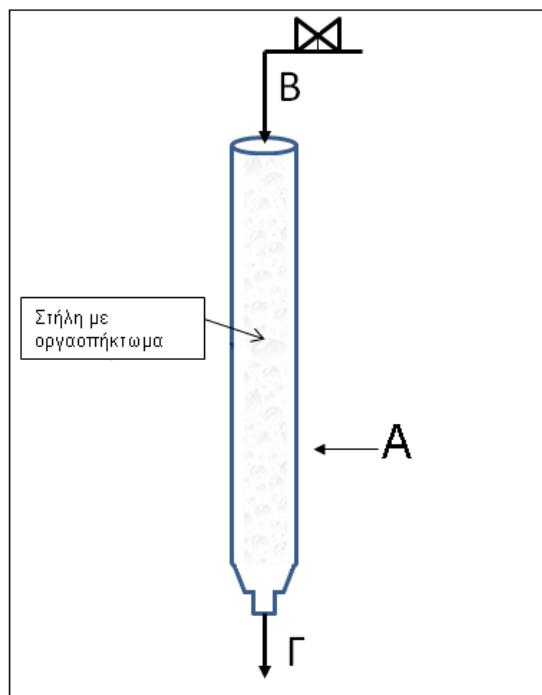
Στη συνέχεια παρατηρείται η μεταβολή της απόδοσης της πρότυπης αντίδρασης και της δραστικότητας του ένζυμου μετά από επαναλαμβανόμενες χρήσεις του συστήματος συνεχούς ροής που επιλέχθηκε ως βέλτιστο. Τέλος, προτείνεται μέθοδος για την διατήρηση της αποδοτικότητας του συστήματος συνεχούς ροής ακόμα και μετά από επαναλαμβανόμενες χρήσεις. Η διαδικασία περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

3.1.1 Εύρεση κατάλληλης συνδεσμολογίας

Συνδεσμολογία A:

Αντιδραστήρας συνεχούς ροής μιας στήλης – ανοιχτό κύκλωμα: Η διάταξη αυτή αποτελείται από μία στήλη η οποία έχει τόσο το άνω όσο και το κάτω άκρο της ελεύθερα ή συνδεδεμένα το μεν άνω άκρο με σύστημα παροχής του διαλύματος αντίδρασης, το δε κάτω άκρο με σύστημα συλλογής του διαλύματος αντίδρασης, ή αντίστροφα. Το διάλυμα αντίδρασης διέρχεται μόνο μια φορά από το εσωτερικό της

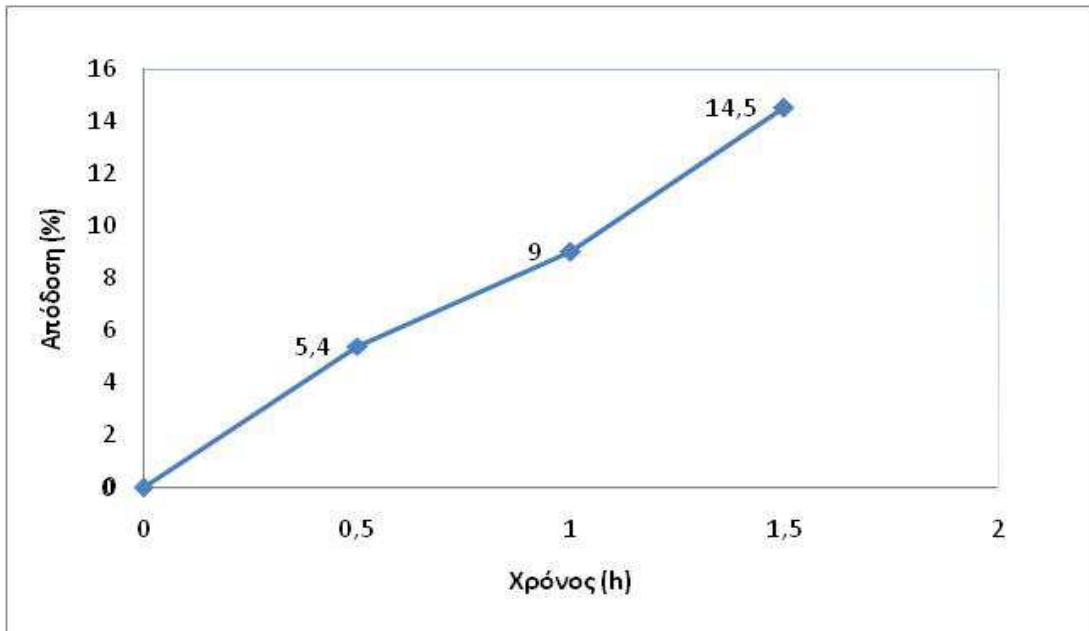
στήλης για να έρθει σε επαφή με τον βιοκαταλύτη. Η διάταξη φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3.1).



Εικόνα 3.1: Ανοιχτό κύκλωμα μιας στήλης όπου Α: η στήλη, Β: το σύστημα παροχής διαλύματος αντίδρασης και Γ: το σύστημα συλλογής του διαλύματος αντίδρασης.

Αρχικά, η στήλη πληρώνεται με 11 g οργανοπηκτώματος από HPMC βασισμένο σε μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης, μέσα στο οποίο βρίσκεται ακινητοποιημένο ένζυμο λιπάση από *R. miehei*. Η ποσότητα του ενζύμου που περιέχεται στο οργανοπήκτωμα αντιστοιχεί σε 0,08 mg ανά g πηκτώματος. Στη συνέχεια, παρασκευάζονται 30 mL διαλύματος αντίδρασης. Το διάλυμα αντίδρασης αποτελείται από 30 mL ισοοκτάνιο το οποίο περιέχει λαυρικό οξύ και 1-προπανόλη σε συγκέντρωση 150 mM, έκαστο. Η αντίδραση αρχίζει με την προσθήκη του διαλύματος αυτού στο άνω άκρο της στήλης. Με ελεγχόμενη ροή 0,4 mL/min το διάλυμα διέτρεξε τη στήλη. Πραγματοποιήθηκαν λήψεις δειγμάτων (20 µL) ανά 0,5 h. Τα δείγματα που λαμβάνονται αναλύονται με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας. Έτσι, υπολογίζεται η ποσότητα του εστέρα που έχει παραχθεί τη

δεδομένη χρονική στιγμή και επομένως η απόδοση της αντίδρασης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 3.2).

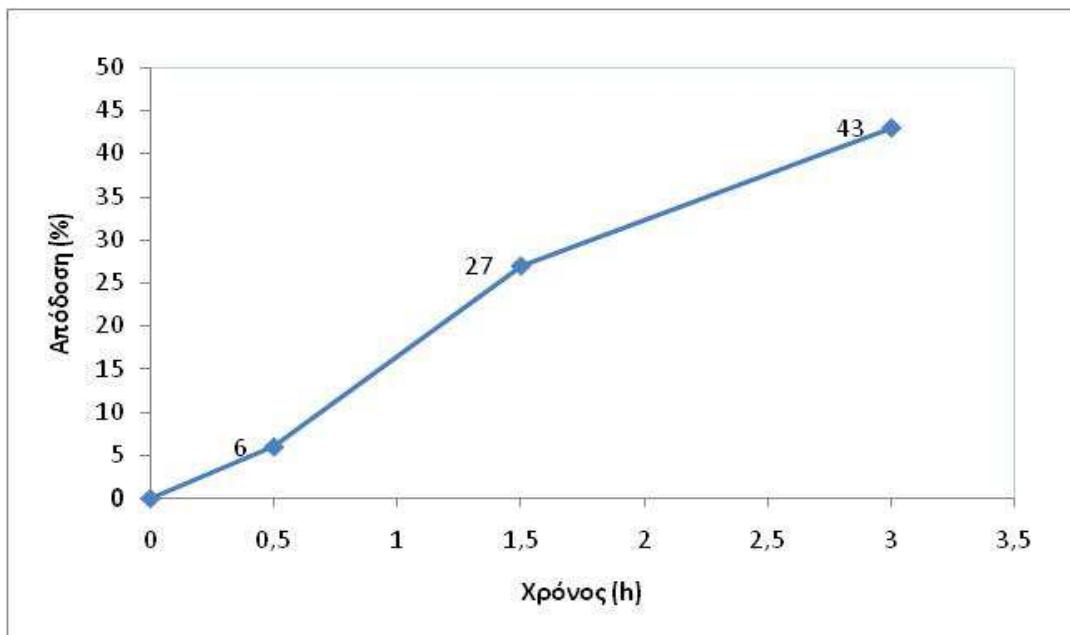


Εικόνα 3.2. Εξάρτηση από το χρόνο της απόδοσης της αντίδρασης εστεροποίησης του λαυρικού οξέος με την 1-προπανόλη, που καταλύεται από τη λιπάση από *R. miehei* ακινητοποιημένη σε οργανοπήκτωμα από HPMC με μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης. Αρχική συγκέντρωση λαυρικού οξέος και 1-προπανόλης 150 mM, έκαστο, διαλύτης ισοοκτάνιο, θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε ανοιχτό σύστημα συνεχούς ροής μιας στήλης.

Η απόδοση της αντίδρασης που επιτεύχθηκε στη 1,5 h ήταν 14,5%, η οποία αντιστοιχεί σε απόδοση 1,3% ανά g πηκτώματος. Η απόδοση αυτή επιτεύχθηκε με το διάλυμα αντίδρασης να έχει διέλθει μία φορά από τη στήλη. Στοχεύοντας στην επίτευξη μεγαλύτερης απόδοσης, προτάθηκε η αύξηση του χρόνου επαφής του διαλύματος αντίδρασης με τον βιοκαταλύτη. Για το λόγο αυτό, επαναλήφθηκε η ίδια διαδικασία με τη διαφορά ότι το διάλυμα αντίδρασης διέτρεξε τη στήλη δύο φορές.

Αρχικά μέσα στην ίδια στήλη τοποθετήθηκαν 29 g οργανοπήκτωματος. Στη συνέχεια παρασκευάστηκαν 80 mL νέου διαλύματος αντίδρασης λαυρικού οξέος με 1-προπανόλη και συγκέντρωση 150 mM, έκαστο. Το διάλυμα διέτρεξε τη στήλη με σταθερή ροή (0,5 mL/min) και διοχετεύτηκε και δεύτερη φορά στη στήλη. Η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε ανά 0,5 h και η ανάλυση έγινε με τη μέθοδο της

αέριας χρηματογραφίας. Ομοίως με πριν, υπολογίστηκε η ποσότητα του εστέρα που είχε παραχθεί τη δεδομένη χρονική στιγμή και επομένως η απόδοση της αντίδρασης. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 3.3).



Εικόνα 3.3. Εξάρτηση από το χρόνο της απόδοσης της αντίδρασης εστεροποίησης του λαυρικού οξέος με 1-προπανόλη, που καταλύεται από τη λιπάση από *R. miehei* ακινητοποιημένη σε οργανοπήκτωμα από HPMC με μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης. Αρχική συγκέντρωση λαυρικού οξέος και 1-προπανόλης 150 mM έκαστο, διαλύτης ισοοκτάνιο, θερμοκρασία δωματίου. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε ανοιχτό σύστημα συνεχούς ροής μιας στήλης.

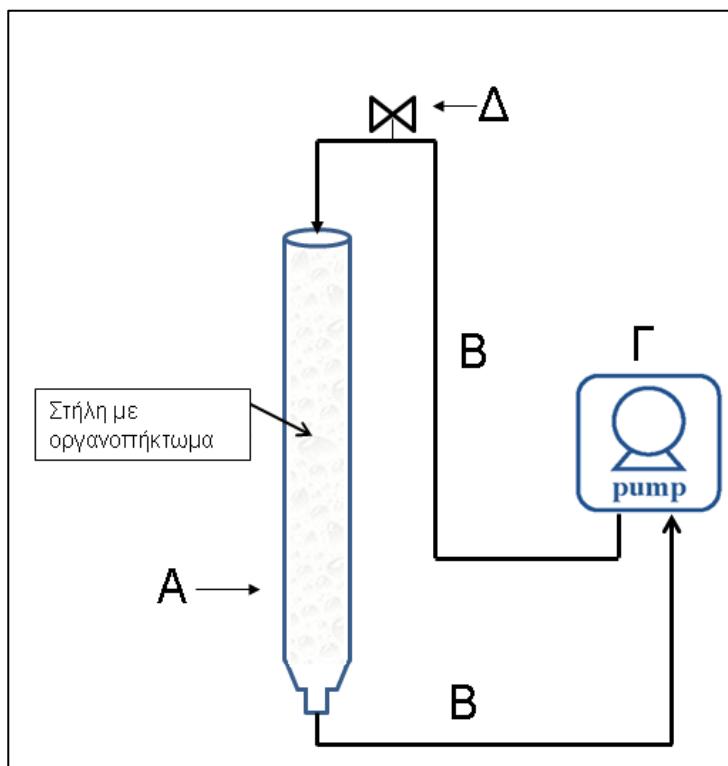
Η απόδοση που επιτεύχθηκε στη 1,5 h ήταν 27% η οποία αντιστοιχεί σε απόδοση 1% ανά g οργανοπηκτώματος, ενώ στις 3 h η απόδοση έφτασε το 43%. Συγκριτικά με το προηγούμενο πείραμα, η απόδοση (%) ανά g πηκτώματος που επιτεύχθηκε είναι σχεδόν ίδια. Όμως, η συνολική απόδοση σχεδόν διπλασιάζεται (27% συγκριτικά με 14,5%) για το ίδιο χρονικό διάστημα. Αυτό πιθανά οφείλεται στη διπλάσια ποσότητα του βιοκαταλύτη που προστέθηκε και στην παρατεταμένη επαφή του διαλύματος αντίδρασης με τον βιοκαταλύτη.

Ωστόσο, σε βιομηχανική κλίμακα η συλλογή του διαλύματος αντίδρασης και επανατοποιηθέτησή του στη στήλη δεν είναι εύκολα εφαρμόσιμη. Για το λόγο αυτό προτάθηκε η προσθήκη μιας αντλίας η οποία θα δημιουργεί μία συνεχόμενη κυκλική

ροή στην στήλη, μεταφέροντας το διάλυμα που εξέρχεται από το κάτω άκρο της στήλης και πάλι στο άνω άκρο της για να διέλθει εκ νέου από τη στήλη. Η διάταξη αυτή περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

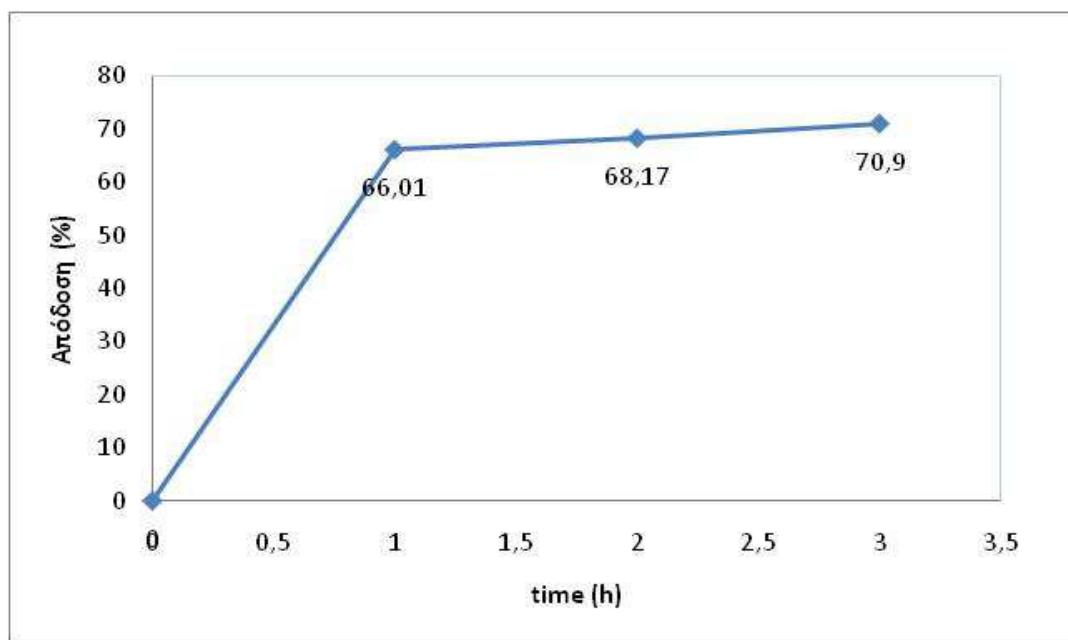
Συνδεσμολογία Β:

Αντιδραστήρας συνεχούς ροής μιας στήλης – κλειστό κύκλωμα: Στην περίπτωση αυτή η διάταξη αποτελείται από μια στήλη το ένα άκρο της οποίας συνδέεται με το άλλο άκρο της με σωληνώσεις οι οποίες διέρχονται μέσω αντλίας. Συγκεκριμένα, το διάλυμα που έχει αντιδράσει εξέρχεται από το κάτω άκρο της στήλης και στη συνέχεια μεταφέρεται εκ νέου στο άνω άκρο της στήλης. Με τον τρόπο αυτό δημιουργείται μια κυκλική ροή στη στήλη, κατα την οποία το διάλυμα διέρχεται μέσω αυτής επαναλαμβανόμενα. Στο κλειστό κύκλωμα που δημιουργείται παρεμβάλλεται σύστημα παροχής του αρχικού διαλύματος αντίδρασης και δειγματοληψίας. Η διάταξη φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3.4).



Εικόνα 3.4: Κλειστό κύκλωμα μιας στήλης, όπου Α: η στήλη, Β: οι σωληνώσεις, Γ: η αντλία και Δ: το σύστημα παροχής διαλύματος αντίδρασης και δειγματοληψίας.

Αρχικά τοποθετήθηκαν στη στήλη 29 g οργανοπηκτώματος από HPMC βασισμένο σε μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης, μέσα στο οποίο βρίσκεται το ακινητοποιημένο ένζυμο λιπάση από *R. miehei*. Η ποσότητα του ενζύμου που περιέχεται στο οργανοπήκτωμα αντιστοιχεί σε 0,08 mg ανά g πηκτώματος. Στη συνέχεια σε 80 mL ισοοκτάνιο προστίθενται τα υποστρώματα του λαυρικού οξέος και της 1- προπανόλης σε συγκέντρωση 150 mM έκαστο. Η αντίδραση εκκινεί με την προσθήκη του διαλύματος αυτού στη στήλη. Στη συνέχεια λαμβάνονται δείγματα (20 μL) ανά 1 h τα οποία αναλύονται μέσω της μεθόδου της αέριας χρωματογραφίας. Ομοίως με πριν, υπολογίστηκε η ποσότητα του εστέρα που είχε παραχθεί τη δεδομένη χρονική στιγμή και επομένως η απόδοση της αντίδρασης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 3.5).



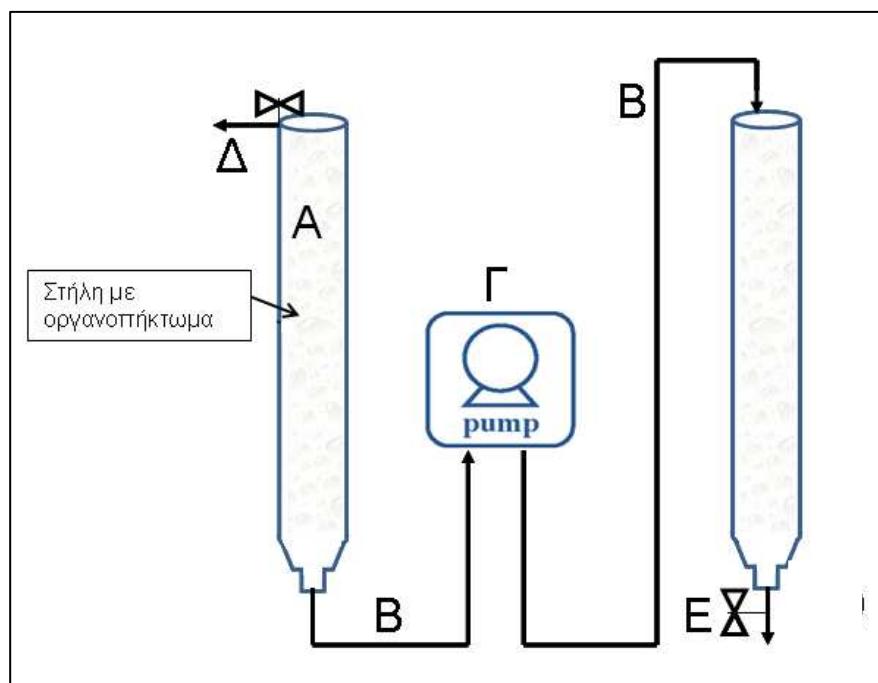
Εικόνα 3.5. Εξάρτηση της απόδοσης της αντίδρασης εστεροποίησης του λαυρικού οξέος με 1-προπανόλη από το χρόνο, που καταλύεται από τη λιπάση από *R. miehei*. Συνθήκες όπως δίνονται στην Εικόνα 3.3. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε κλειστό σύστημα συνεχούς ροής μιας στήλης.

Η απόδοση που επιτεύχθηκε στις 3 h ήταν 70,9 % και αντιστοιχεί σε 2,4% ανά g οργανοπηκτώματος. Παρατηρείται ότι είναι σημαντικά μεγαλύτερη από εκείνη που επιτεύχθηκε στην προηγούμενη συνδεσμολογία. Συγκεκριμένα, με τη συνδεσμολογία

Α επιτεύχθηκε σε 3 h απόδοση 43% (ή 1,5% απόδοση / g πηκτώματος) έναντι της συνδεσμολογίας B με την οποία επιτεύχθηκε απόδοση σχεδόν 71% (ή 2,4% / g πηκττώματος). Όμως, για να περιοριστεί η πιθανή φθορά που επέρχεται κατά την επαναχρησιμοποίηση μίας στήλης, ιδιαίτερα όταν στοχεύει στην εφαρμογή της σε βιομηχανική κλίμακα, προτείνεται μία νέα διάταξη που περιλαμβάνει τη χρήση δύο στηλών. Η συνδεσμολογία αυτή περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

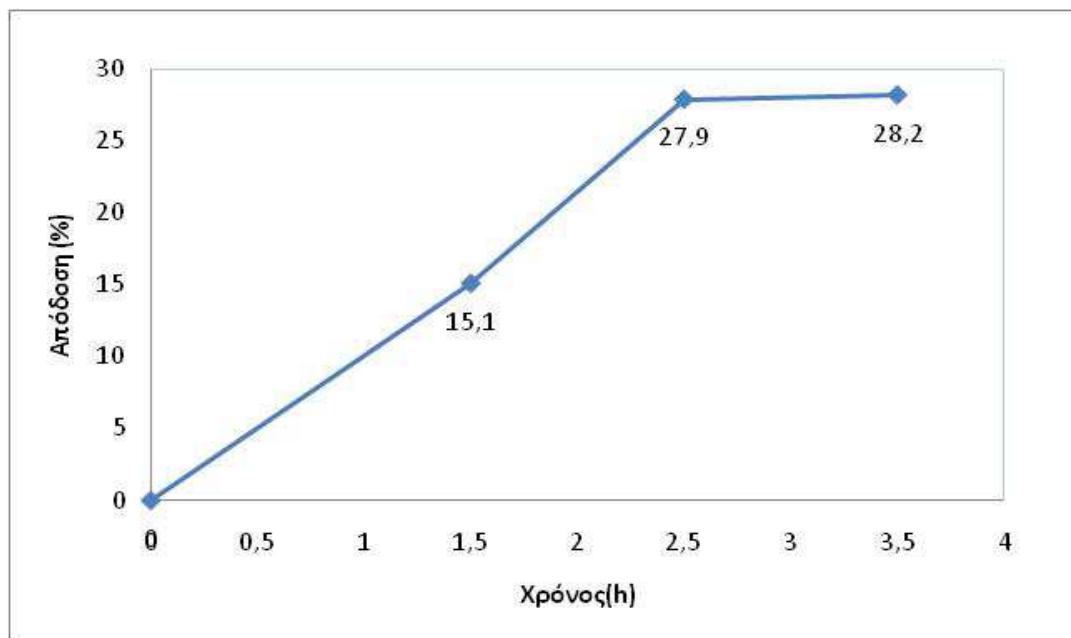
Γ Συνδεσμολογία:

Αντιδραστήρας συνεχούς ροής δύο στηλών – ανοιχτό κύκλωμα: στην περίπτωση αυτή η διάταξη αποτελείται από δύο στήλες, οι οποίες είναι σε σειρά και συνδέονται μεταξύ τους με σωληνώσεις και μία αντλία. Στην πρώτη στήλη το ελεύθερο άκρο συνδέεται με σύστημα διοχέτευσης του διαλύματος αντίδρασης και στην τελευταία στήλη το ελεύθερο άκρο συνδέεται με σύστημα παραλαβής του τελικού διαλύματος αντίδρασης. Η διάταξη φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3.6).



Εικόνα 3.6. Ανοιχτό κύκλωμα στηλών, όπου Α: η στήλη, Β: οι σωληνώσεις, Γ: η αντλία, Δ: το σύστημα παροχής του αρχικού διαλύματος αντίδρασης και Ε: το σύστημα συλλογής του τελικού διαλύματος αντίδρασης και δειγματοληψίας.

Στη διάταξη της Εικόνας 3.6 η μία στήλη πληρώνεται με 29 g οργανοπηκτώματος ενώ η άλλη με 11 g οργανοπηκτώματος από HPMC βασισμένο σε μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης, μέσα στο οποίο βρίσκεται το ακινητοποιημένο ένζυμο λιπάση από *R. miehei*. Η ποσότητα του ενζύμου που περιέχεται στο οργανοπήκτωμα αντιστοιχεί σε 0,08 mg ανά g πηκτώματος. Στη συνέχεια παρασκευάζονται 50 mL διαλύματος αντίδρασης λαυρικού οξέος και 1- προπανόλης με συγκέντρωση 150 mM έκαστο, σε διαλύτη ισοοκτάνιο. Το διάλυμα αυτό διατρέχει την πρώτη στήλη και στη συνέχεια μεταφέρεται μέσω της αντλίας στη δεύτερη στήλη, από την οποία και εξέρχεται σε ένα δοχείο. Το διάλυμα που έχει ήδη αντιδράσει συλλέγεται κατά την έξοδο του από τη δεύτερη και επανατοποθετείται εκ νέου στην πρώτη στήλη. Η ροή ρυθμίζεται μέσω της αντλίας και λαμβάνεται δείγμα (20 μL) ανά 1,5 h. Ομοίως με πριν, η ανάλυση των δειγμάτων έγινε με τη μέθοδο της αέριας χρματογραφίας και στη συνέχεια υπολογίστηκε η ποσότητα του εστέρα που είχε παραχθεί τη δεδομένη χρονική στιγμή άρα και η απόδοση της αντίδρασης. Τα σποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 3.7).



Εικόνα 3.7. Εξάρτηση της απόδοσης της αντίδρασης εστεροποίησης του λαυρικού οξέος με 1-προπανόλη από το χρόνο, που καταλύεται από τη λιπάση από *R. Miehei*. Συνθήκες όπως δίνονται στην Εικόνα 3.3. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε ανοιχτό σύστημα συνεχούς ροής δύο στηλών.

Με τη συνδεσμολογία αυτή παρατηρήθηκε ότι σε χρόνο 1,5 h είχε εξέλθει όλο το διάλυμα από τις στήλες για πρώτη φορά. Η απόδοση που επιτευχθηκε εκείνη τη χρονική στιγμή ήταν 15,1%. Δηλαδή, σχεδόν ίση με την απόδοση που προέκυψε αρχικά, κατά τη χρήση της συνδεσμολογίας A για το ίδιο χρονικό διάστημα (14,5%). Η απόδοση που προέκυψε με τη συνδεσμολογία Γ δεν ήταν η αναμενόμενη, καθώς οι στήλες της συνδεσμολογίας αυτής περιείχαν μεγαλύτερη ποσότητα βιοκαταλύτη. Οπότε αναμενόταν στο ίδιο χρονικό διάστημα να είχαμε αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης. Αυτό καθίσταται πιο εμφανές αν συγκρίνουμε την απόδοση της αντίδρασης που επιτεύχθηκε σε κάθε συνδεσμολογία ανα g οργανοπηκτώματος. Συγκεκριμένα, στη συνδεσμολογία A επιτεύχθηκε 1,3% απόδοση ανα g πηκτώματος ενω στη συνδεσμολογία Γ επιτεύχθηκε 0,7% απόδοση ανα g πηκτώματος, δηλαδή, σχεδόν 50% μικρότερη. Επίσης, στη συνδεσμολογία Γ υπήρξε δυσκολία στη διατήρηση μιας σταθερής ροής καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος.

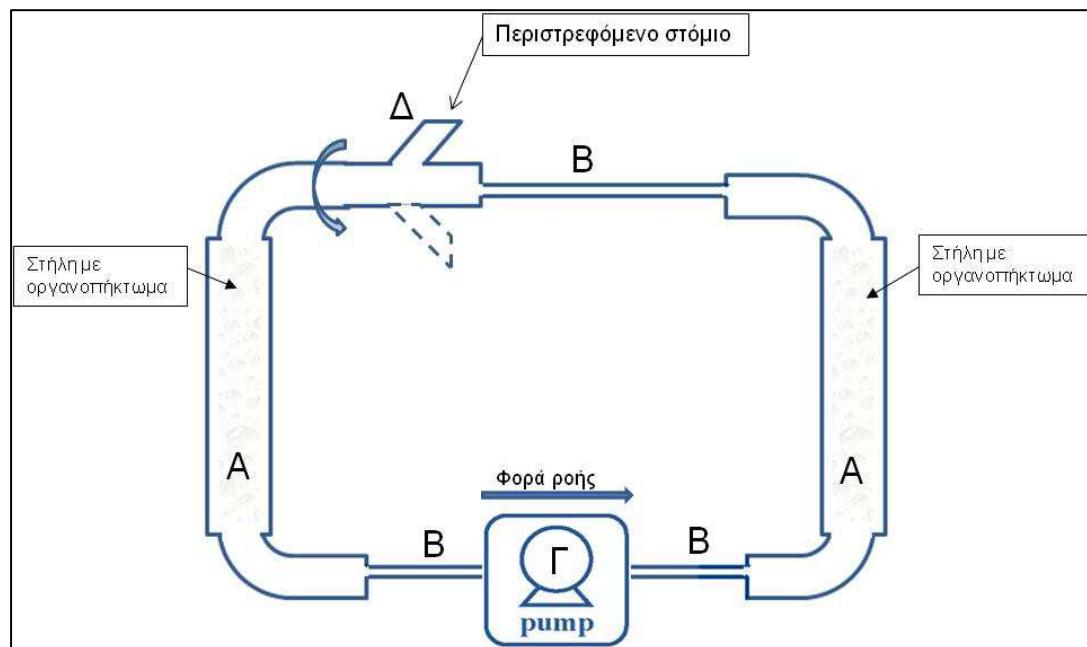
Τα προβλήματα που αναφέρθηκαν παραπάνω, οφείλονται πιθανά στο ότι οι δύο στήλες και οι σωληνώσεις περιείχαν φυσαλίδες αέρα οι οποίες παρεμπόδιζαν την ομαλή ροή του διαλύματος αντίδρασης διαμέσου της στήλης. Παράλληλα, η ύπαρξη του αέρα επηρέαζε και τη δομή του οργανοπηκτώματος το οποίο, με το πέρας του χρόνου, αφυδατωνόταν με αποτέλεσμα τη μείωση της καταλυτικής δραστικότητας του ενζύμου.

Λαμβάνοντας υπόψη τις παραπάνω υποθέσεις καθώς και την υψηλή απόδοση που παρατηρήθηκε κατά τη χρήση του κλειστού σύστημα συνεχούς ροής μιας στήλης (Συνδεσμολογία B), προτάθηκε μια νέα συνδεσμολογία που περιλαμβάνει τη χρήση δύο στηλών σε κλειστό κύκλωμα. Η διάταξη αυτή περιγράφεται αναλυτικά παρακάτω.

Δ Συνδεσμολογία:

Αντιδραστήρας συνεχούς ροής δύο στηλών – κλειστό κύκλωμα: στην περίπτωση αυτή η διάταξη αποτελείται από 2 στήλες, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με σωληνώσεις και μία αντλία. Το κάτω άκρο της πρώτης στήλης συνδέεται με το κάτω άκρο της δεύτερης στήλης, με την παρεμβολή μιας αντλίας. Ενώ το άνω άκρο της δεύτερης στήλης ενώνεται με το άνω άκρο της πρώτης στήλης με σωληνώσεις χωρίς την μεσολάβηση αντλίας. Στη διάταξη παρεμβάλλεται ένα περιστρεφόμενο στόμιο το οποίο λειτουργεί ως σύστημα διοχέτευσης του αρχικού διαλύματος αντίδρασης και

λήψης του τελικού διαλύματος αντίδρασης και δειγματοληψίας. Η διάταξη φαίνεται στην παρακάτω εικόνα (Εικόνα 3.8).

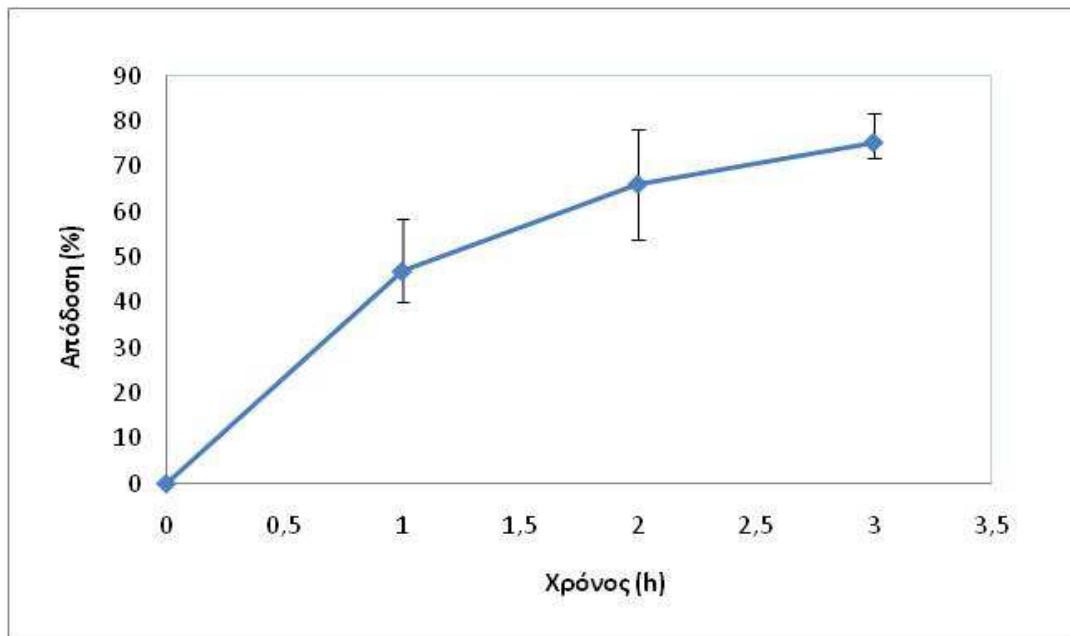


Εικόνα 3.8. Αντιδραστήρας συνεχούς ροής δύο στηλών – κλειστό κύκλωμα, όπου Α: η στήλη, Β: οι σωληνώσεις, Γ: η αντλία, Δ: το σύστημα παροχής του αρχικού διαλύματος αντίδρασης, συλλογής του τελικού διαλύματος αντίδρασης και δειγματοληψίας.

Η κάθε στήλη πληρώνεται με ίση ποσότητα οργανοπηκτώματος, 18 g έκαστη, από HPMC βασισμένο σε μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης, μέσα στο οποίο βρίσκεται το ακινητοποιημένο ένζυμο λιπάση από *R. miehei*. Η ποσότητα του ενζύμου που περιέχεται στο οργανοπηκτώμα αντιστοιχεί σε 0,08 mg ανά g πηκτώματος. Στη συνέχεια παρασκευάζονται 100 mL διαλύματος αντίδρασης λαυρικού οξέος και 1-προπανόλης με συγκέντρωση 150 mM έκαστο, σε διαλύτη ισοοκτάνιο. Η αντίδραση εκκινεί με την προσθήκη του διαλύματος αυτού στην πρώτη στήλη μέσω του συστήματος παροχής. Το διάλυμα με τη βοήθεια της αντλίας εισέρχεται στη δεύτερη στήλη από το κάτω άκρο της. Τέλος, καθώς το διάλυμα εξέρχεται από το άνω άκρο της δεύτερης στήλης, επιστρέφει μέσω σωληνώσεων και πάλι στην πρώτη στήλη.

Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται κυκλική σταθερή ροή (8 mL/min). Παράλληλα, επειδή πρόκειται για ένα κλειστό κύκλωμα, παρεμποδίζεται η δημιουργία φυσαλίδων, καθώς οι στήλες είναι πληρωμένες από το οργανοπηκτώμα

και το διάλυμα της αντίδρασης. Στη συνέχεια λαμβάνονται δείγματα ($20 \mu\text{L}$) ανά 1 h τα οποία αναλύονται μέσω της μεθόδου της αέριας χρωματογραφίας. Ομοίως με πριν, υπολογίστηκε η ποσότητα του εστέρα που είχε παραχθεί τη δεδομένη χρονική στιγμή και επομένως η απόδοση της αντίδρασης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στο παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 3.9).



Εικόνα 3.9. Εξάρτηση της απόδοσης της αντίδρασης εστεροποίησης του λαυρικού οξέος με 1-προπανόλη από το χρόνο, που καταλύνεται από τη λιπάση από *R. miehei*. Συνθήκες όπως δίνονται στην Εικόνα 3.3. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε κλειστό σύστημα συνεχούς ροής δύο στηλών.

Από τις μετρήσεις που έγιναν και οι οποίες φαίνονται αναλυτικά στην εικόνα 3.9, παρατηρήθηκε ότι η μέγιστη απόδοση που επιτεύχθηκε στις 3 h ήταν 82% ή 2,3% ανά g πηκτώματος. Η απόδοση αυτή είναι σημαντικά υψηλότερη συγκριτικά με τις αποδόσεις 1,5% και 0,7% ανά g πηκτώματος που είχαν επιτευχθεί με τις συνδεσμολογίες A και Γ αντίστοιχα, για το ίδιο χρονικό διάστημα. Συνολικά, οι υψηλότερες αποδόσεις επιτεύχθηκαν με την χρήση των κλειστών συστημάτων (συνδεσμολογίες B και Δ). Συγκεκριμένα, η απόδοση ανα g πηκτώματος που επιτεύχθηκε στη συνδεσμολογία B (2,4%) είναι σχεδόν ίδια με την απόδοση ανα g πηκτώματος της συνδεσμολογίας Δ για το ίδιο χρονικό διάστημα (Πίνακας 3.1).

Πίνακας 3.1 Μέγιστη απόδοση (%) ανά g οργανοπηκτώματος που επιτεύχθηκε σε χρονικό διάστημα 3 h. Με γκρί σκιαγράφηση διακρίνονται οι συνδεσμολογίες (κλειστά συστήματα) με τις οποίες επιτεύχθηκε η μεγαλύτερη απόδοση.

ΣΥΝΔΕΣΜΟΛΟΓΙΑ	Μέγιστη απόδοση (%) σε 3h / g gel
A	1,5 %
B	2,4 %
Γ	0,7 %
Δ	2,3 %

Ωστόσο, η συνδεσμολογία Δ υπερτερεί στο ότι αποτελείται από δύο στήλες και περιέχει μεγαλύτερη ποσότητα βιοκαταλύτη. Αυτό εξυπηρετεί με δύο τρόπους:

α. αυξάνει το χρόνο επαφής του διαλύματος με τον βιοκαταλύτη, γεγονός που συντελεί στην αύξηση της συνολικής απόδοσης της αντίδρασης συγκριτικά με τις υπόλοιπες συνδεσμολογίες, και

β. δίνει τη δυνατότητα αξιοποίησης μεγαλύτερης ποσότητας διαλύματος αντίδρασης προς παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος, το οποίο είναι επιθυμητό για την εφαρμογή της σε βιομηχανική κλίμακα.

Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα που πρέκυψαν κατα τη μελέτη των τεσσάρων συνδεσμολογίων κρίνεται σκόπιμο να χαρακτηριστεί η συνδεσμολογία Δ ως βέλτιστη συγκριτικά με τις υπόλοιπες τρεις. Όμως για να χαρακτηριστεί ένα σύστημα αποδοτικό και βιώσιμο ώστε να χρησιμοποιηθεί σε βιομηχανική κλίμακα θα πρέπει να ελεγχθούν και άλλες παράμετροι. Αυτές αφορούν την ανθεκτικότητα του συστήματος συνεχούς ροής και τη διατήρηση της δραστικότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου που περιέχεται μέσα σε αυτό, μετά από επαναλαμβανόμενες χρήσεις. Τέλος, θα πρέπει να μελετηθούν εναλλακτικοί τρόποι που θα περιορίσουν τη φθορά που επέρχεται μετά από επαναλαμβανόμενες χρήσεις του ίδιου ενζύμου αλλά και του κόστους που αυτό συνεπάγεται.

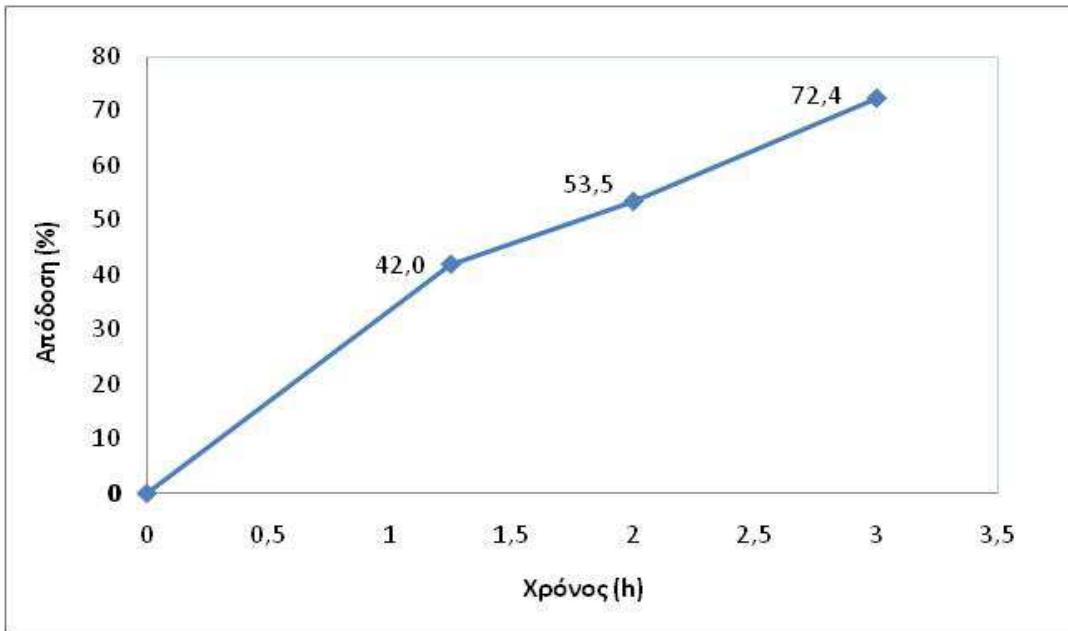
3.1.2 Επαναχρησιμοποίηση στηλών

Κατά την προηγούμενη πειραματική διαδικασία, επιλέχτηκε η συνδεσμολογία Δ ως βέλτιστη, συγκριτικά με τις υπόλοιπες τρεις. Στις παραγράφους που ακολουθούν γίνεται μελέτη της αποδοτικότητας της διάταξης αυτή μετά από τρεις επαναλαμβανόμενες χρήσεις των στηλών που την αποτελούν. Οι στήλες έχουν πληρωθεί με ίση ποσότητα οργανοπηκτώματος, 18 g έκαστη, από HPMC βασισμένο σε μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης, μέσα στο οποίο βρίσκεται το ακινητοποιημένο ένζυμο λιπάση από *R. miehei*. Η ποσότητα του ενζύμου που περιέχεται στο οργανοπήκτωμα αντιστοιχεί σε 0,08 mg ανά g πηκτώματος.

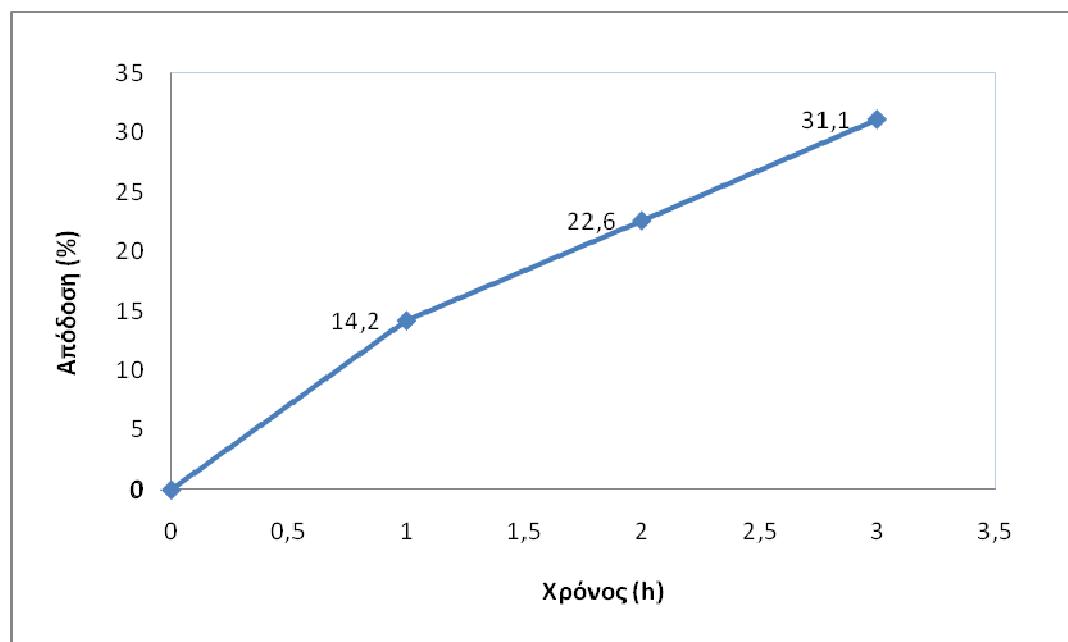
Η μελέτη της αποδοτικότητας του συνδεσμολογίας Δ βασίζεται στη μεταβολή της απόδοσης της αντίδρασης εστεροποίησης του λαυρικού οξέος με την 1-προπανόλη, μετά από κάθε χρήση της συνδεσμολογίας. Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος ο βιοκαταλύτης που περιέχεται στις στήλες δεν ανανεώνεται και παραμένει ίδιος και στις τρεις χρήσεις των στηλών. Αντιθέτως σε κάθε επανάληψη του πειράματος χρησιμοποιείται νέο διάλυμα αντίδρασης το οποίο αποτελείται από 100 mL ισοοκτάνιο στον οποίο έχουν προστεθεί τα υποστρώματα της αντίδρασης, δηλαδή του λαυρικού οξέος και της 1- προπανόλης σε συγκέντρωση 150 mM έκαστο. Η αντίδραση εκκινεί με την προσθήκη του διαλύματος αυτού στην πρώτη στήλη και στη συνέχεια γίνεται δειγματοληψία (20 μL) ανά 1 h.

Μετά το πέρας τριών ωρών, το διάλυμα που έχει αντιδράσει απομακρύνεται από τις στήλες και συλλέγεται σε ένα ξεχωριστό δοχείο. Οι στήλες, που περιέχουν πλέον μόνο το βιοκαταλύτη, φυλάσσονται για δύο ημέρες στους 2- 6 °C πριν την επόμενη χρήση τους. Τα δείγματα που έχουν ληφθεί αναλύονται μέσω της μεθόδου της αέριας χρωματογραφίας. Τέλος, υπολογίζεται η ποσότητα του εστέρα που είχε παραχθεί τη δεδομένη χρονική στιγμή και επομένως η απόδοση της αντίδρασης. Τα αποτελέσματα φαίνονται στα παρακάτω διάγραμμα (Εικόνα 3.10).

Η απόδοση που επιτεύχθηκε σε 3 h κατά την πρώτη χρήση των στηλών ήταν 72,4% ή 2,2% ανά g οργανοπηκτώματος. Ο λόγος για τον οποίο οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν μέχρι τρεις ώρες, οφείλεται στο ότι το χρονικό διάστημα αυτό είναι αρκετό ώστε η αντίδραση φτάνει σχεδόν στο μέγιστο της απόδοσης της.

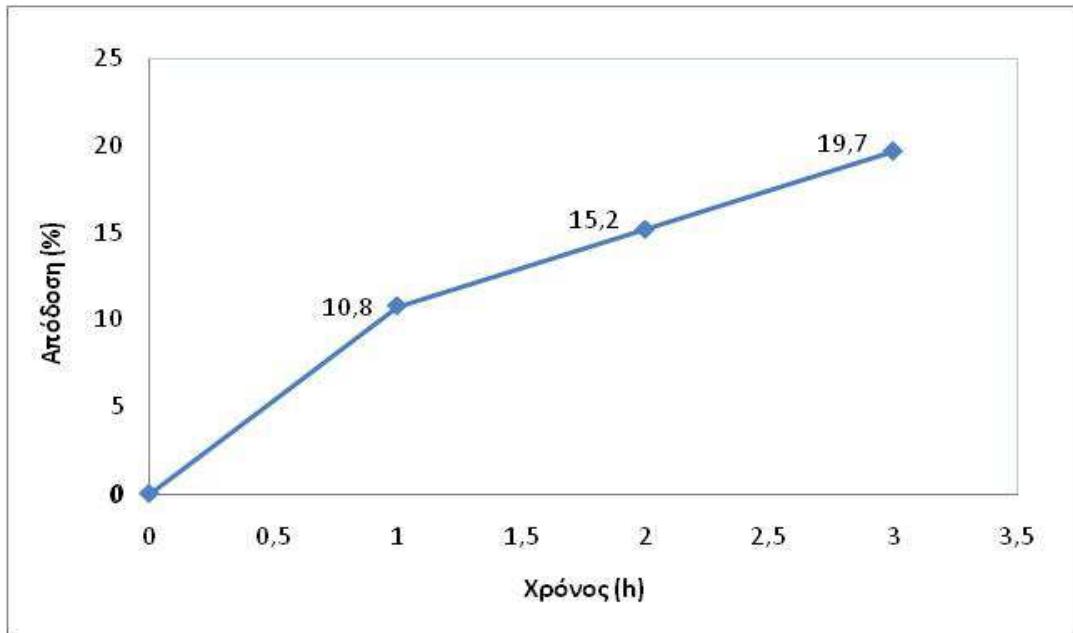


Εικόνα 3.10. Εξάρτηση της απόδοσης της αντίδρασης εστεροποίησης του λαυρικού οξέος με 1-προπανόλη από το χρόνο, που καταλύεται από τη λιπάση από *R. miehei*. Συνθήκες όπως δίνονται στην Εικόνα 3.3. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε κλειστό σύστημα συνεχούς ροής δύο στηλών. Ο βιοκαταλύτης με τον οποίο έχουν πληρωθεί οι στήλες χρησιμοποιείται για 1^η φορά.



Εικόνα 3.11. Εξάρτηση της απόδοσης της αντίδρασης εστεροποίησης του λαυρικού οξέος με 1-προπανόλη από το χρόνο, που καταλύεται από τη λιπάση από *R. miehei*. Συνθήκες όπως δίνονται στην Εικόνα 3.3. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε κλειστό σύστημα συνεχούς ροής δύο στηλών. Ο βιοκαταλύτης με τον οποίο έχουν πληρωθεί οι στήλες χρησιμοποιείται για 2^η φορά.

Η ίδια διαδικασία επαναλήφθηκε ακόμα δύο φορές (Εικόνα 3.11 και Εικόνα 3.12), δηλαδή έως ότου οι στήλες να χρησιμοποιηθούν τρεις συνεχόμενες φορές. Με τον τρόπο αυτό επιτυγχάνεται η παρακολούθηση της μεταβολής τόσο της απόδοσης της αντίδρασης όσο και της δραστικότητας του ενζύμου μετά από τρεις επαναλαμβανόμενες χρήσεις των ίδιων στηλών. Τα αποτελέσματα φαίνονται αναλυτικά στα διαγράμματα που ακολουθούν.

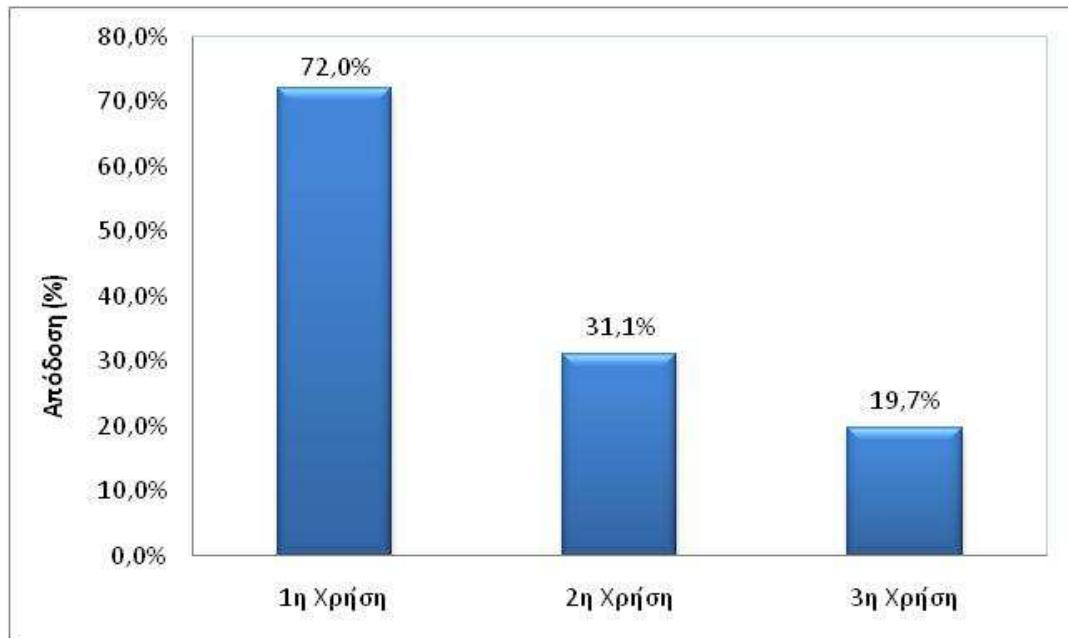


Εικόνα 3.12. Εξάρτηση της απόδοσης της αντίδρασης εστεροποίησης του λαυρικού οξέος με 1-προπανόλη από το χρόνο, που καταλύεται από τη λιπάση από *R. miehei*. Συνθήκες όπως δίνονται στην Εικόνα 3.3. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε κλειστό σύστημα συνεχούς ροής δύο στηλών. Ο βιοκαταλύτης με τον οποίο έχουν πληρωθεί οι στήλες χρησιμοποιείται για 3^η φορά.

Κατά τη δεύτερη και την τρίτη χρήση των στηλών παρατηρείται μια κατακόρυφη μείωση στην απόδοσης της αντίδρασης σύνθεσης του λαυρικού προπυλεστέρα. Συγκεκριμένα κατά τη δεύτερη χρήση των ίδιων στηλών η απόδοση μετά από τρεις ώρες μειώνεται στο 31%, η οποία αντιστοιχεί σε απόδοση 0,9% ανά g πηκτώματος. Δηλαδή, η μείωση που υφίσταται η απόδοση της αντίδρασης ξεπερνάει το 50%. Κατά την τρίτη χρήση των στηλών, η κατακόρυφη πτώση στην απόδοση της αντίδρασης συνεχίζεται. Συγκεκριμένα η απόδοση δεν καταφέρνει να ξεπεράσει ούτε

το 20% μετά το πέρας τριών ωρών ενώ η μέγιστη απόδοση που επιτυχάνεται ανα γ πηκτώματος για το ίδιο χρονικό διάστημα, αντιστοιχεί στο 0,5%.

Στο παρακάτω ραβδόγραμμα παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι αποδόσεις της αντίδρασης που επιτεύχθηκαν ανά χρήση του συστήματος συνεχούς ροής σε χρονικό διάστημα τριών ωρών (Εικόνα 3.13).

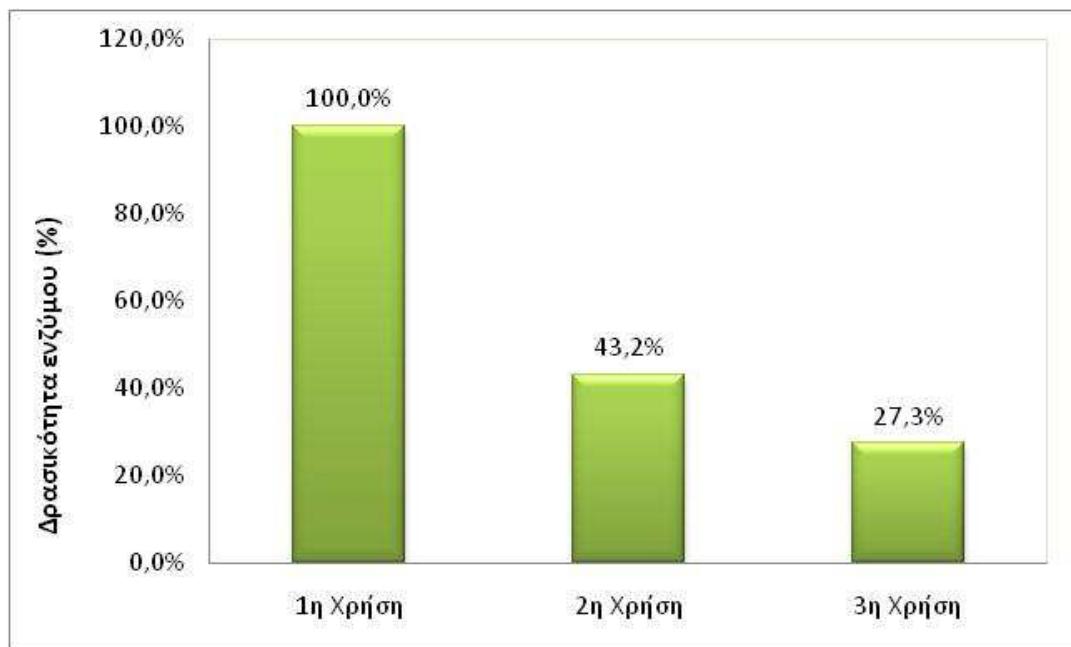


Εικόνα 3.13. Απεικόνιση της απόδοσης που επιτεύχθηκε σε 3h για την αντίδραση εστεροποίησης του λαυρικού οξέος με 1-προπανόλη, για κάθε χρήση του ίδιου συστήματος, όταν αυτό φυλάσσεται στους 2-6 °C.

Ωστόσο, η μείωση της απόδοσης της αντίδρασης σχετίζεται κατά κύριο λόγο με τη μείωση της δραστικότητας του ενζύμου λόγω των επαναλαμβανόμενων χρήσεων. Για το λόγο αυτό υπολογίστηκε η εναπομένουσα δραστικότητα του ενζύμου μετά από κάθε χρήση των στηλών του συστήματος συνεχούς ροής (Εικόνα 3.14). Όπως φαίνεται και στο ραβδόγραμμα που ακολουθεί, η δραστικότητα του ενζύμου έχει μειωθεί κάτω από το 50% μετά την πρώτη χρήση στηλών. Ενώ μετά τη δεύτερη χρήση τους, η εναπομένουσα δραστικότητα αντιστοιχεί στο 27% .

Η μείωση που υφίσταται η δραστικότητα του ενζύμου οφείλεται πιθανά σε δύο παράγοντες. Ο πρώτος σχετίζεται με την επαναλαμβανόμενη χρήση του ενζύμου

ενώ ο δεύτερος σχετίζεται με τη συνεχή ψύξη και απόψυξη του βιοκαταλύτη που περιέχεται μέσα στις στήλες. Ως εκ τούτου, το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε με τη διαφορά ότι οι επαναλαμβανόμενες χρήσεις των στηλών έγιναν την ίδια ημέρα χωρίς ενδιάμεση αποθήκευση στο ψυγείο.



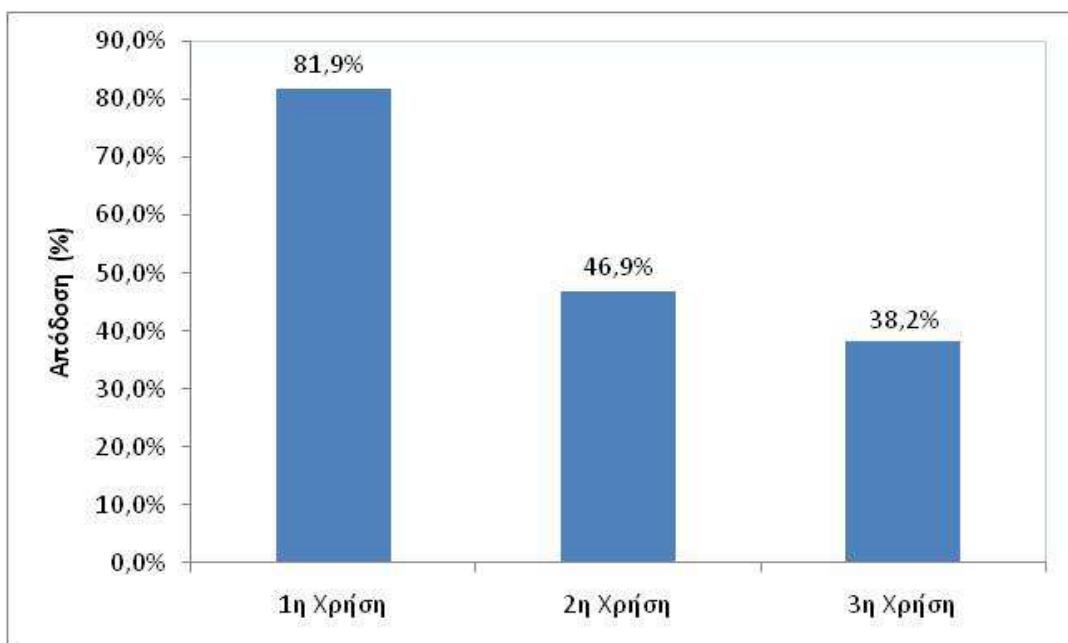
Εικόνα 3.14. Απεικόνιση της εναπομένουσας δραστικότητα ενζύμου μετά από κάθε χρήση των ίδιων στηλών του συστήματος συνεχούς ροής, όταν αυτό φυλάσσεται στους 2-6 °C.

Συγκεκριμένα οι στήλες πληρώνονται με νέα ποσότητα οργανοπηκτώματος από HPMC βασισμένο σε μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης, μέσα στο οποίο βρίσκεται το ακινητοποιημένο ένζυμο λιπάση από *R. miehei*. Η ποσότητα του ενζύμου που περιέχεται στο οργανοπηκτώμα αντιστοιχεί σε 0,08 mg ανά g πηκτώματος. Η κάθε στήλη περιέχει 18 g οργανοπηκτώματος. Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος ο βιοκαταλύτης που περιέχεται στις στήλες δεν ανανεώνεται και παραμένει ίδιος κατά τις τρεις χρήσεις των στηλών. Η αντίδραση εκκινεί με την προσθήκη του διαλύματος αντίδρασης το οποίο περιέχει 100 mL ισοοκτάνιο και τα υποστρώματα της αντίδρασης, δηλαδή το λαυρικό οξύ και την 1-προπανόλη σε συγκέντρωση 150 mM έκαστο. Στη συνέχεια λαμβάνεται δείγμα (20 μL) ανά 1 h.

Ανά 3h, το διάλυμα που έχει αντιδράσει απομακρύνεται από τις στήλες και προστίθεται νέο διάλυμα αντίδρασης. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται συνολικά

τρεις φορές. Τα δείγματα που έχουν ληφθεί αναλύονται μέσω της μεθόδου της αέριας χρωματογραφίας. Τέλος, υπολογίζεται η ποσότητα του εστέρα που είχε παραχθεί τη δεδομένη χρονική στιγμή και επομένως η απόδοση της αντίδρασης.

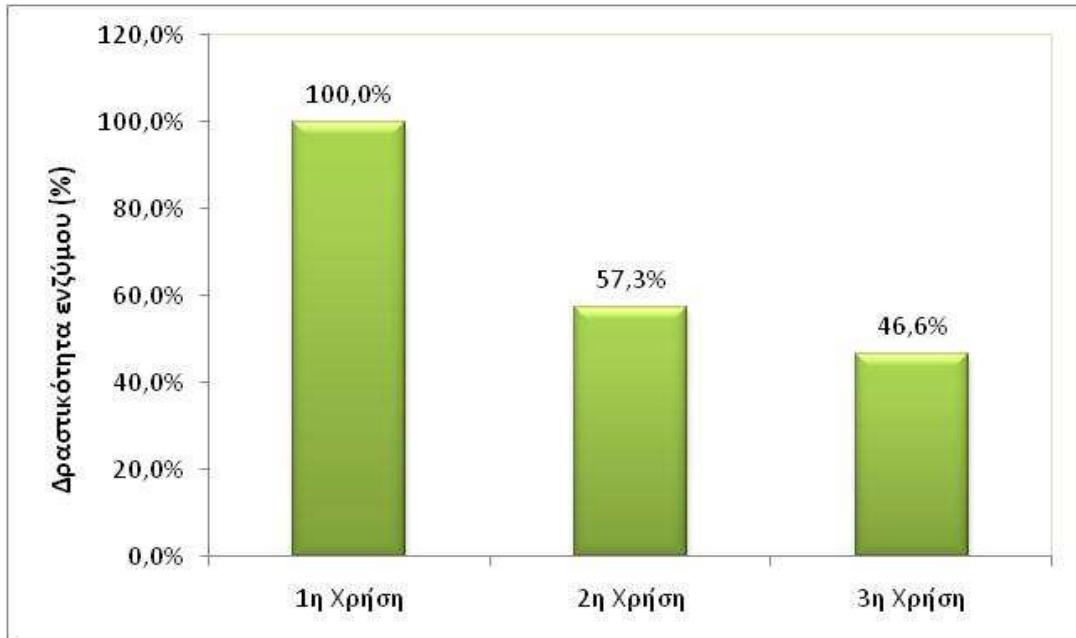
Στο ραβδόγραμμα που ακολουθεί φαίνονται συνολικά οι τελικές αποδόσεις της αντίδρασης, που επιτεύχθηκαν σε 3 h, μετά από κάθε χρήση των στηλών (Εικόνα 3.15). Παρατηρείται και πάλι μείωση στην απόδοση της αντίδρασης κατά τη δεύτερη και τρίτη χρήση των στηλών. Συγκεκριμένα η απόδοση της αντίδρασης που επιτυγχάνεται κατά τη πρώτη χρήση των στηλών αντιστοιχεί σε 82% ή 2,3% ανά g πηκτώματος. Στη συνέχεια η απόδοση της αντίδρασης μειώνεται στο 47% (ή 1,3% / g πηκτώματος) και στο 38% (ή 1% / g πηκτώματος) κατά τη δεύτερη και τρίτη χρήση αντίστοιχα.



Εικόνα 3.15. Απεικόνιση της απόδοσης που επιτεύχθηκε σε 3 h για την αντίδραση εστεροποίησης του λαυρικού οξέος με 1-προπανόλη, για κάθε χρήση του ίδιου συστήματος την ίδια ημέρα.

Η μείωση στην απόδοση της αντίδρασης οφείλεται στην επαναλαμβανόμενη χρήση του ίδιου βιοκαταλύτη με τον οποίο έχουν πληρωθεί οι στήλες. Στο ραβδόγραμμα που ακολουθεί φαίνεται η εναπομένουσα δραστικότητα του ενζύμου μετά από κάθε χρήση των στηλών του συστήματος συνεχούς ροής (Εικόνα 3.16).

Συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι η δραστικότητα του ενζύμου έχει μειωθεί σχεδόν 50% μετά την πρώτη χρήση στηλών. Ενώ μετά τη δεύτερη χρήση τους, η εναπομένουσα δραστικότητα του ενζύμου αντιστοιχεί στο 38%.

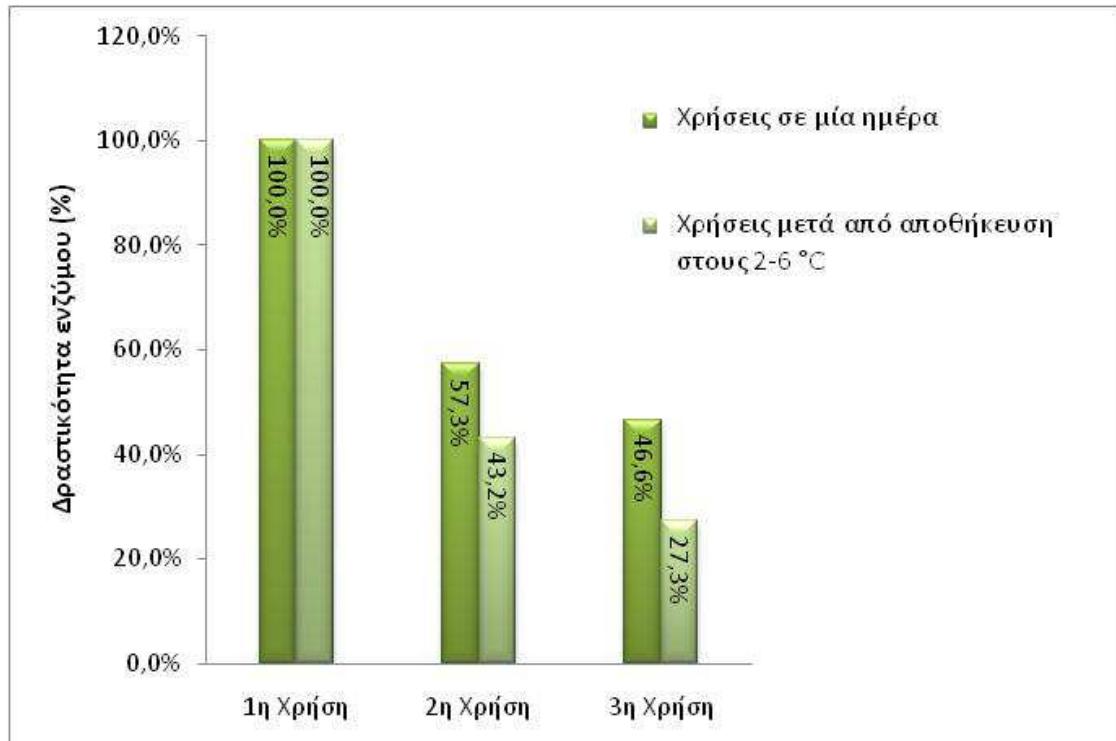


Εικόνα 3.16. Απεικόνιση της εναπομένουσας δραστικότητα ενζύμου μετά από κάθε χρήση του ίδιου συστήματος την ίδια ημέρα.

Από τα παραπάνω γίνεται αντιληπτό ότι όταν οι στήλες χρησιμοποιούνται επαναλαμβανόμενα επέρχεται σημαντική μείωση στην καταλυτική δραστικότητα του ενζύμου είτε μεσολαβεί αποθήκευση στους 2-6 °C, είτε όχι. Ωστόσο στη δεύτερη περίπτωση η μείωση αυτή είναι σημαντικά μικρότερη (Εικόνα 3.17).

Σε βιομηχανική κλίμακα, η μείωση της δραστικότητας του ενζύμου συνεπάγεται τη μείωση της παραγωγής του επιθυμητού προϊόντος. Το ιδανικό θα ήταν να παραμένει σταθερή η απόδοση της εκάστοτε αντίδρασης, καθ' όλη τη διάρκεια λειτουργίας του συστήματος συνεχούς ροής που χρησιμοποιείται. Αυτό θα ήταν εφικτό αν σε κάθε κύκλο λειτουργίας του συστήματος αυτού μπορούσε να χρησιμοποιηθεί νέος βιοκαταλύτης. Όμως κάτι τέτοιο δεν θα ήταν οικονομικά βιώσιμο. Ένας τρόπος μείωσης του κόστους είναι η αλλαγή μόνο της μίας εκ των δύο στηλών που αποτελούν το σύστημα συνεχούς ροής, μετά από κάθε χρήση της.

Στο πείραμα που ακολουθεί, μελετήθηκαν οι διακυμάνσεις στην απόδοση της αντίδρασης σύνθεσης του λαυρικού προπυλεστέρα όταν στο σύστημα συνεχούς ροής, η μία εκ των δύο στηλών αντικαθιστάται με μία νέα στήλη που περιέχει νέο βιοκαταλύτη μετά από κάθε χρήση του.



Εικόνα 3.17. Απεικόνιση της εναπομένουσας δραστικότητα ενζύμου μετά από κάθε χρήση του ίδιου συστήματος, όταν το σύστημα χρησιμοποιείται την ίδια ημέρα και όταν αυτό φυλάσσεται στους 2-6 °C μετά από κάθε χρήση.

3.1.3 Αλλαγή μιας στήλης μετά από κάθε χρήση του ζεύγους στηλών

Συνολικά μελετήθηκαν τρεις διαφορετικές περιπτώσεις: **α.** όταν γίνεται αλλαγή μόνο της 1^{ης} στήλης, **β.** όταν γίνεται αλλαγή μόνο της 2^{ης} στήλης, και **γ.** όταν γίνεται εναλλάξ αλλαγή στηλών, μετά από κάθε χρήση του ζεύγους στηλών που αποτελούν το σύστημα συνεχούς ροής. Στόχος των πειραμάτων αυτών ήταν να επιλεγεί η καλύτερη μέθοδος με την οποία το σύστημα συνεχούς ροής θα διατηρεί καλύτερα την αποδότικότητα του.

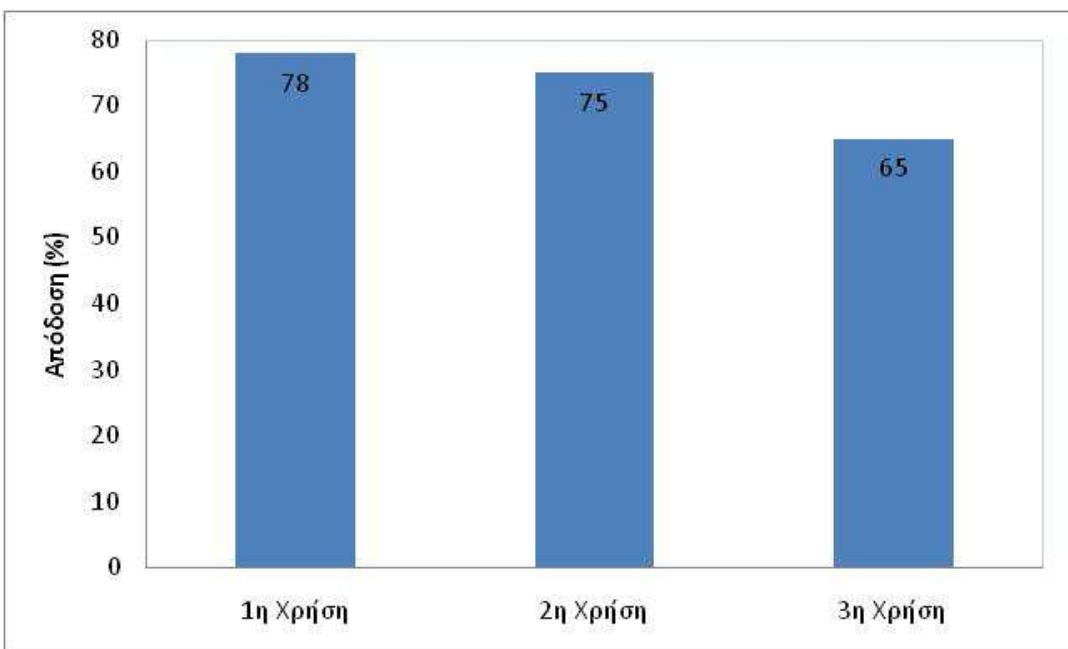
Σε όλες τις περιπτώσεις, οι στήλες πληρώθηκαν εξ' αρχής με νέα ποσότητα οργανοπηκτώματος, 18 g έκαστη, από HPMC βασισμένο σε μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης, μέσα στο οποίο βρίσκεται το ακινητοποιημένο ένζυμο λιπάση από *R. miehei*. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο βιοκαταλύτης δεν παρέμεινε ο ίδιος και στις τρεις χρήσεις των στηλών, καθώς κατά τη δεύτερη και τρίτη χρήση τους η μία εκ των δύο στηλών αντικαταστάθηκε με μία νέα που περιείχε νέα ποσότητα οργανοπηκτώματος, 18 g.

Σε κάθε χρήση, προστέθηκε νέο διαλύμα αντίδρασης το οποίο περιείχε 100 mL ισοοκτάνιο και τα υποστρώματα της αντίδρασης, δηλαδή το λαυρικό οξύ και την 1-προπανόλη σε συγκέντρωση 150 mM έκαστο. Στη συνέχεια, λήφθηκαν δείγματα (20 µL) ανά 1 h, τα οποία αναλύθηκαν με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας και παρατηρήθηκε η μεταβολή στην απόδοση της αντίδρασης σύνθεσης του λαυρικού προπυλεστέρα. Η αντίδραση, ανά χρήση στηλών, διήρκησε συνολικά 3 h, καθώς έχει δειχθεί ότι το χρονικό διάστημα αυτό θεωρείται επαρκές ώστε η αντίδραση να φτάσει σχεδόν στο μέγιστο της απόδοσης της. Τέλος, πρέπει να σημειωθεί ότι οι αλλαγές σε κάθε περίπτωση πραγματοποιήθηκαν την ίδια ημέρα χωρίς ενδιάμεση αποθήκευση των στηλών. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν σε κάθε πρίπτωση παρουσιάζονται αναλυτικά παρακάτω.

A' Περίπτωση: όταν γίνεται αλλαγή μόνο 1^{ης} στήλης.

Στην περίπτωση αυτή, μετά την πρώτη χρήση των στηλών το διάλυμα αντίδρασης απομακρύνεται από τις στήλες και η πρώτη στήλη αντικαθίσταται με μία άλλη που περιέχει νέο και ίσης ποσότητας βιοκαταλύτη, ενώ η δεύτερη στήλη παραμένει η ίδια. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται και κατά την τρίτη χρήση. Έτσι, σε κάθε χρήση του ζεύγους στηλών η πρώτη στήλη χρησιμοποιείται μόνο μία φορά ενώ η δεύτερη παραμένει ίδια και στις τρεις επαναλήψεις. Με τον τρόπο αυτό, το διάλυμα αντίδρασης έρχεται πρώτα σε επαφή με φρέσκο βιοκαταλύτη και στη συνέχεια διέρχεται από την ήδη χρησιμοποιημένη στήλη.

Στο ραβδόγραμα που ακολουθεί φαίνονται οι τελικές αποδόσεις της αντίδρασης, που επιτεύχθηκαν σε 3 h, ανά χρήση στηλών (Εικόνα 3.18). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι η απόδοση της αντίδρασης κατά τη δεύτερη χρήση στηλών παρέμεινε σχετικά σταθερή ενώ κατά την τρίτη χρήση στηλών παρουσιάστηκε μία μείωση της τάξης του 13%.

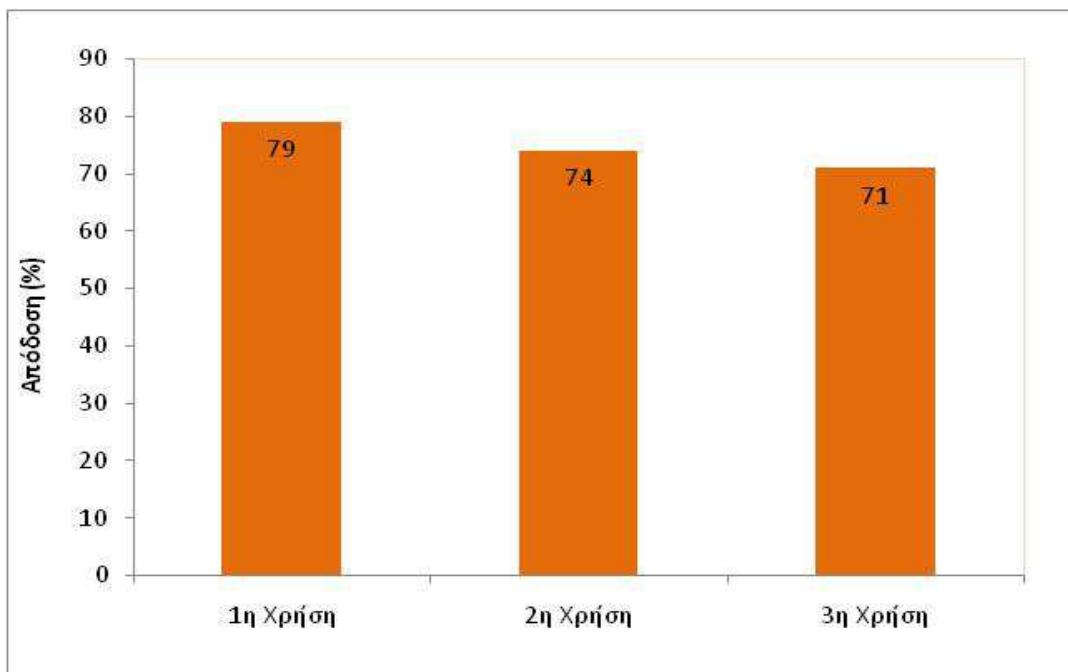


Εικόνα 3.18. Απεικόνιση της απόδοσης που επιτεύχθηκε σε 3h για την αντίδραση εστεροποίησης του λαυρικού οξέος με 1-προπανόλη. Σε κάθε χρήση του συστήματος η πρώτη στήλη αντικαθίσταται με μία νέα ενώ η δεύτερη παραμένει ίδια και στις τρεις χρήσεις.

Β' Περίπτωση: όταν γίνεται αλλαγή μόνο 2^{ης} στήλης.

Στην περίπτωση αυτή, μετά την πρώτη χρήση των στηλών το διάλυμα αντίδρασης απομακρύνεται από τις στήλες και η δευτέρη στήλη αντικαθίσταται με μία άλλη που περιέχει νέο και ίσης ποσότητας βιοκαταλύτη, ενώ η πρώτη στήλη παραμένει η ίδια. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται και κατά την τρίτη χρήση. Έτσι, σε κάθε χρήση του ζεύγους στηλών, η πρώτη στήλη παραμένει ίδια και στις τρεις επαναλήψεις, ενώ η δεύτερη χρησιμοποιείται μόνο μία φορά. Με τον τρόπο αυτό το διάλυμα αντίδρασης έρχεται πρώτα σε επαφή με την ήδη χρησιμοποιημένη στήλη και στη συνέχεια διέρχεται από τη δεύτερη στήλη η οποία περιέχει νέο βιοκαταλύτη.

Στο ραβδόγραμα που ακολουθεί φαίνονται οι τελικές αποδόσεις της αντίδρασης, που επιτεύχθηκαν σε 3 h, ανά χρήση στηλών (Εικόνα 3.19). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι κατά τη δεύτερη και κατά τη τρίτη χρήση των στηλών η απόδοση της αντίδρασης παρέμεινε πάνω από το 70%. Συνολικά, η μείωση που παρατηρήθηκε στην απόδοση της αντίδρασης αντιστοιχούσε σε ποσοστό 8%.

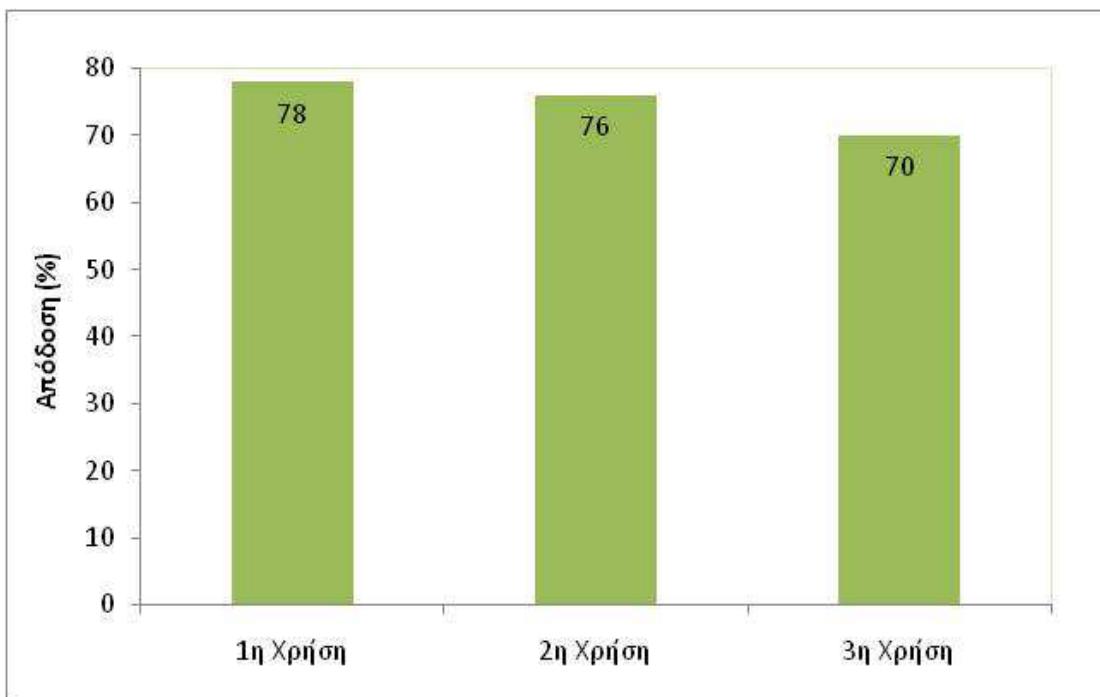


Εικόνα 3.19. Απεικόνιση της απόδοσης που επιτεύχθηκε σε 3h για την αντίδραση εστεροποίησης του λαυρικού οξέος με 1-προπανόλη. Σε κάθε χρήση του συστήματος η δεύτερη στήλη αντικαθίσταται με μία νέα ενώ η πρώτη παραμένει ίδια και στις τρεις χρήσεις.

Γ' Περίπτωση: όταν γίνεται εναλλάξ αλλαγή στηλών.

Στην περίπτωση αυτή, μετά την πρώτη χρήση των στηλών το διάλυμα αντίδρασης απομακρύνεται από τις στήλες και η πρώτη στήλη αντικαθίσταται με μία νέα που περιέχει νέο και ίσης ποσότητας βιοκαταλύτη. Στη συνέχεια, μετα τη δεύτερη χρήση του ζευγούς στηλών, το διάλυμα αντίδρασης απομακρύνεται και η δευτέρη στήλη αντικαθίσταται με μία άλλη που περιέχει νέο και ίσης ποσότητας βιοκαταλύτη. Με τη μέθοδο αυτή η κάθε στήλη δεν χρησιμοποιείται πάνω από δύο φορές συνεχόμενα.

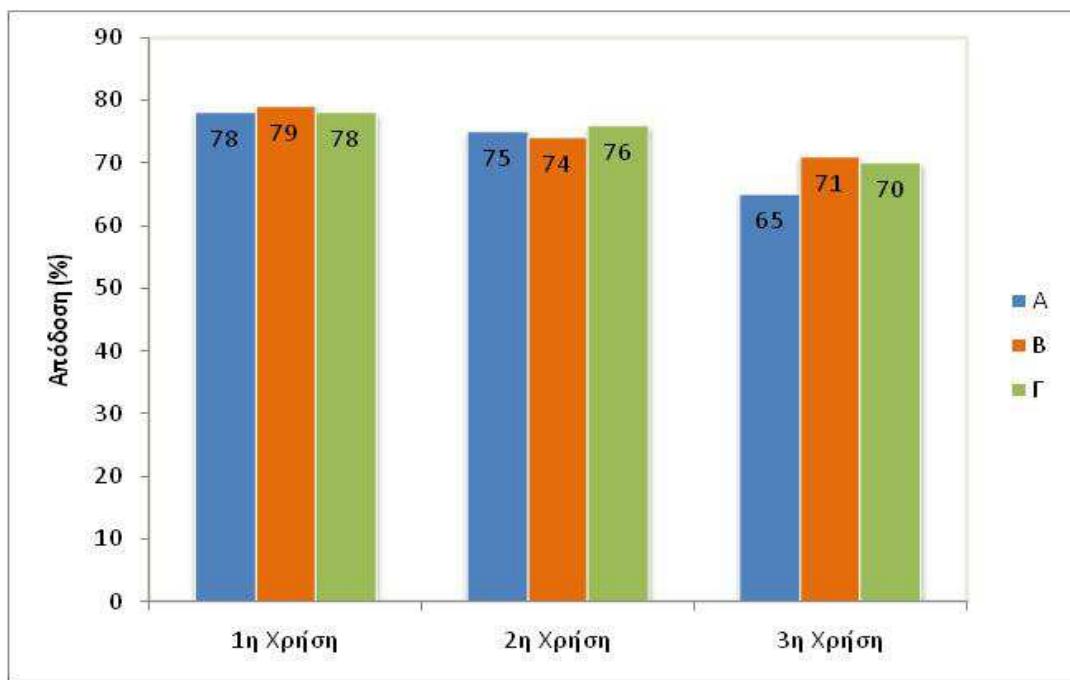
Στο ραβδόγραμα που ακολουθεί φαίνονται οι τελικές αποδόσεις της αντίδρασης, που επιτεύχθηκαν σε 3 h, ανά χρήση στηλών (Εικόνα 3.20). Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε ότι κατά τη δεύτερη χρήση στηλών η απόδοση της αντίδρασης παρέμεινε σχεδόν σταθερή (76% συγκριτικά με 78% που επιτεύχθηκε κατα την πρώτη χρήση). Ενώ κατά τη τρίτη χρήση των στηλών η απόδοση της αντίδρασης μειώθηκε στο 70%.



Εικόνα 3.20. Απεικόνιση της απόδοσης που επιτεύχθηκε σε 3 h για την αντίδραση εστεροποίησης του λαυρικού οξέος με 1-προπανόλη. Σε κάθε χρήση του συστήματος αντικαθίσταται η μία στήλη με μία νέα, εναλλάξ.

Συγκρίνοντας και τις τρεις περιπτώσεις που εξετάστηκαν, δεν παρατηρείται ιδιαίτερη διακύμανση στην απόδοση του συστήματος, σε καμία από τις παραπάνω περιπτώσεις (Εικόνα 3.21). Ίσως θα μπορούσε να αναφερθεί η Α' περίπτωση ως λιγότερο αποδοτική καθώς είναι η μοναδική που κατά τη 3^η χρήση του συστήματος έδωσε τελική απόδοση κάτω από 70%.

Ακόμη κι αν συγκριθούν οι απόδοσεις που επιτεύχθηκαν ανα g πηκτώματος (Πίνακας 3.3), παρατηρείται ότι σε όλες τις περιπτώσεις το σύστημα συνεχούς ροής φαίνεται να παραμένει αποδοτικό ακόμα και μετά από τρεις επαναλαμβανόμενες χρήσεις. Αυτό φαίνεται και από τη εναπομένουσα δραστικότητα του ενζύμου μετά από κάθε χρήση (Πίνακας 3.3). Ιδιαίτερα στη Β και Γ περίπτωση η μείωση που που υφίσταται η δραστικότητα του ενζύμου (της τάξης του 9%) κατά την τρίτη χρήση του συστήματος συνεχούς ροής, δεν θεωρείται τόσο σημαντική ώστε να θεωρηθεί ανασταλτικός παράγων για την επαρκή παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος.



Εικόνα 3.21. Απεικόνιση της τελικής απόδοσης που επιτεύχθηκε σε 3hγια την αντίδραση εστεροποίησης του λαυρικού οξέος με 1-προπανόλη. Σε κάθε χρήση του συστήματος αντιστοιχούν οι τρεις διαφορετικές περιπτώσεις που εξετάστηκαν, αλλάζοντας τη μία εκ των δύο στηλών ανά χρήση.

Πίνακας 3.3. Απόδοση ανά γ πηκτώματος που επιτεύχθηκε σε 3 ώρες μετά από κάθε χρήση του συστήματος συνεχούς ροής όταν γίνεται: (Α) αλλαγή μόνο της 1^{ης} στήλης, (Β) αλλαγή μόνο της 2^{ης} στήλης, και (Γ) εναλλάξ αλλαγή στηλών. Σε παρένθεση αναφέρεται η εναπομένουσα δραστικότητα μετά από κάθε χρήση του ζεύγους στηλών σε κάθε περίπτωση.

Χρήσεις	Απόδοση (%) / γ πηκτώματος που επιτεύχθηκε σε 3h ανα χρήση σε κάθε περίπτωση (εναπομένουσα δραστικότητα ενζύμου)		
	A	B	Γ
1 ^η Χρήση	2,2 (100%)	2,2 (100%)	2,2 (100%)
2 ^η Χρήση	2,1 (95,5%)	2,1 (95,5%)	2,1 (95,5 %)
3 ^η Χρήση	1,8 (82%)	2 (91%)	2 (91 %)

Συνεπώς, καθίσταται σαφές ότι χρησιμοποιώντας μία τέτοια μεθοδολογία μειώνεται σημαντικά η φθορά που υφίσταται ο βιοκαταλύτης μετά από

επαναλαμβανόμενες χρήσεις. Αξίζει να αναφερθεί ότι σε προηγούμενο πείραμα κατά την τρίτη χρήση του ίδιου συστήματος συνεχούς ροής, στο οποίο δεν πραγματοποιήθηκε αντικατάσταση σε καμία από τις δύο στήλες που το αποτελούσαν, η απόδοση της αντίδρασης ανά g πηκτώματος μειώθηκε περίπου στο μισό της αρχικής. Δηλαδή από το 2,3% μειώθηκε στο 1% (Πίνακας 3.4). Αντίθετα, όταν έγινε αντικατάσταση μιας στήλης με μία άλλη που περιείχε νέα ποσότητα βιοκατλύτη, η απόδοση της αντίδρασης ανά g πηκτώματος παρέμεινε σχετικά σταθερή (από το 2,3% έφτασε στο 2%) ακόμα και μετά από τρεις επαναλαμβανόμενες χρήσεις (Πίνακας 3.4).

Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι η δραστικότητα του ενζύμου μειώθηκε κατά 53% μετά από τρεις επαναλαμβανόμενες χρήσεις του ίδιου συστήματος συνεχούς ροής όταν δεν πραγματοποιήθηκε αντικατάσταση σε καμία από τις δύο στήλες. Αντίθετα στην περίπτωση που έγινε αντικατάσταση της μιας εκ των δύο στηλών που αποτελούν το σύστημα συνεχούς ροής με μία άλλη που περιείχε νέα ποσότητα βιοκατλύτη, η μείωση στη δραστικότητα του ενζύμου μετά από τρεις επαναλαμβανόμενες χρήσεις αντιστοιχούσε σε ποσοστό μόλις 9%.

Πίνακας 3.4. Απόδοση ανά g πηκτώματος που επιτεύχθηκε σε 3 ώρες ανα χρήση στηλών, όταν σε κάθε χρήση χρησιμοποιείται το ίδιο σύστημα και όταν μετά από κάθε χρήση αντικαθίσταται η μία εκ των δύο στηλών.

Χρήσεις	Απόδοση (%)/ g πηκτώματος που επιτεύχθηκε σε 3h ανα χρήση (εναπομένουσα δραστικότητα ενζύμου)	
	Χωρίς αλλαγή στηλών (Χρήσεις την ίδια ημέρα)	Με αλλαγή της μια στήλης (Β ή Γ περίπτωση)
1^η Χρήση	2,3 (100%)	2,2 (100%)
2^η Χρήση	1,3 (57,3 %)	2,1 (95,5%)
3^η Χρήση	1 (46,6%)	2 (91%)

3.2 Μελέτη αντιδράσεων βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος.

Μετά τη βελτιστοποίηση του συστήματος, είναι σημαντικό να ελεγχθεί αν η συνδεσμολογία Δ μπορεί να εφαρμοστεί επιτυχώς για την παραγωγή προϊόντων

υψηλής προστιθέμενης αξίας βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος. Στα πειράματα που ακολουθούν έγινε μελέτη αντιδράσεων που αφορούν στην παραγωγή φαινολικών και τερπενικών εστέρων. Για την πρώτη κατηγορία αντιδράσεων μελετήθηκε η αντίδραση του π-υδρόξυ-φαινυλοξικού οξέος με την οκτανόλη προς την παραγωγή του π-υδρόξυ-φαινυλοξικού εστέρα της οκτανόλης. Ενώ, για τη δεύτερη κατηγορία αντιδράσεων μελετήθηκε η αντίδραση του λαυρικού οξέος με την νερόλη και του λαυρικού οξέος με τη γερανιόλη για το σχηματιμό του λαυρικού εστέρα της νερόλης και της γερανιόλης αντίστοιχα.

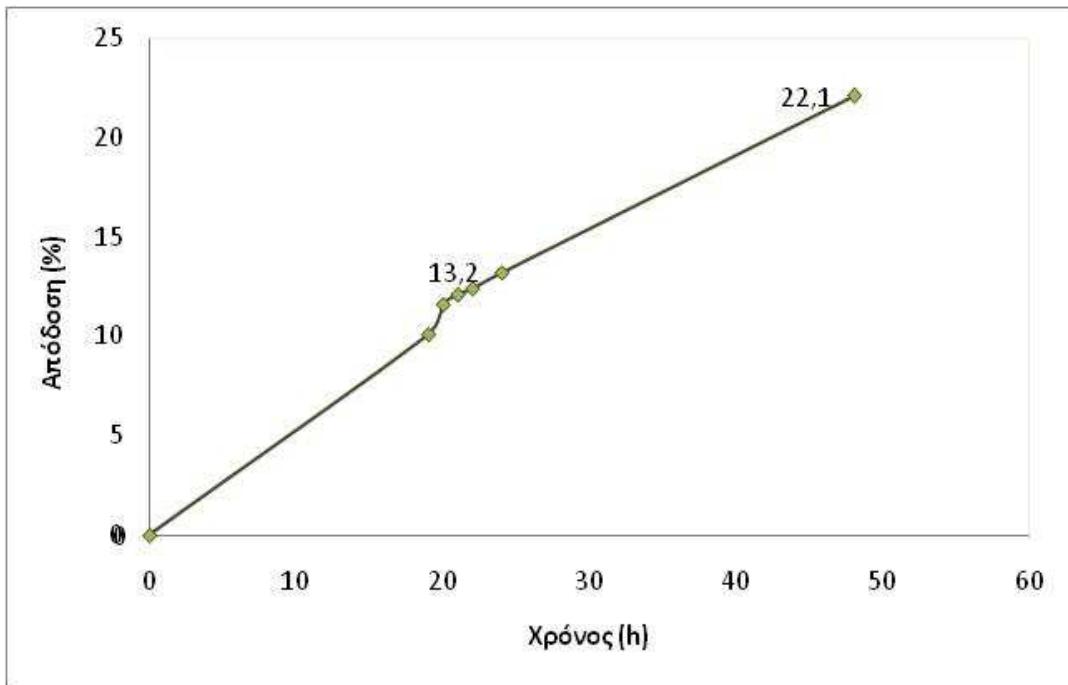
3.2.1 Αντίδραση εστεροποίησης φαινολικών όξεων

Για τη αντίδραση αυτή παρασκευάστηκαν 100 mL διαλύματος π-υδροξυ-φαινυλοξικού οξέος, συγκέντρωσης 70 mM σε οκτανόλη, η οποία συμμετέχει στην αντίδραση και ως αντιδρόν και ως διαλύτης (σύστημα αντίδρασης χωρίς διαλύτη).

Οι στήλες που αποτελούν τη συνδεσμολογία Δ πληρώθηκαν με νέα ποσότητα οργανοπηκτώματος από HPMC βασισμένο σε μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης, μέσα στο οποίο βρίσκεται το ακινητοποιημένο ένζυμο λιπάση από *C. antarctica*. Στην κάθε στήλη προστέθηκαν 18 g οργανοπηκτώματος. Η ποσότητα του ενζύμου που περιείχε το οργανοπήκτωμα αντιστοιχεί σε 0,25 mg ανά g πηκτώματος. Σε όλη τη διάρκεια του πειράματος ο βιοκαταλύτης με τον οποίον είχαν πληρωθεί οι στήλες δεν ανανεώθηκε.

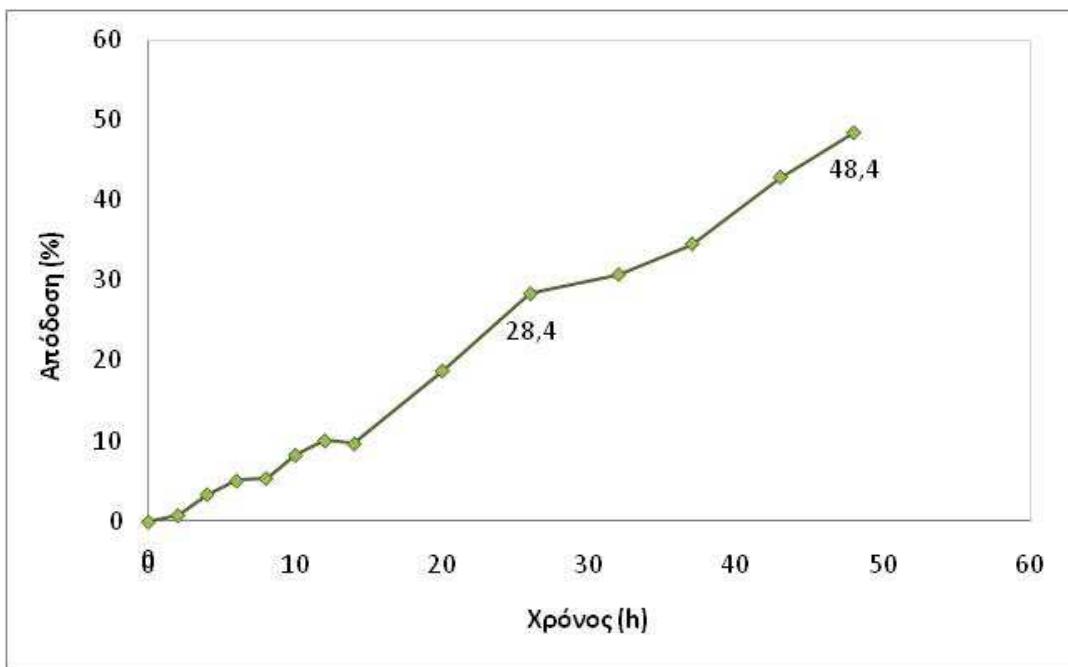
Το διάλυμα αντίδρασης διέτρεξε τις στήλες συνολικά για 48 ώρες και στη συνέχεια έγινε δειγματοληψία (20 µL) ανά 24h καθώς έχει δειχθεί σε προηγούμενες μελέτες (Zoumparnioti *et al.* 2010a) ότι πρόκειται για μία αντίδραση που απαιτείται χρόνος για την παραγωγή του προϊόντος. Τα δείγματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας. Τέλος, υπολογίστηκε η ποσότητα του εστέρα που είχε παραχθεί τη δεδομένη χρονική στιγμή και επομένως η απόδοση της αντίδρασης.

Από τα αποτελέσματα που προέκυψαν (Εικόνα 3.22), παρατηρήθηκε ότι η απόδοση που επιτεύχθηκε σε 48 h ήταν 22,1% ή 0,6% ανά g πηκτώματος. Ωστόσο, για την αξιοποίηση μιας τέτοιας αντίδρασης και την παραγωγή προϊόντος σε βιομηχανική κλίμακα είναι απαραίτητο να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή απόδοση στο συντομότερο δυνατό χρονικό διάστημα.



Εικόνα 3.22. Εξάρτηση από το χρόνο της απόδοσης της αντίδρασης εστεροποίησης της οκτανόλης με το π-υδροξυ-φαινυλοξικό οξύ, που καταλύεται από τη λιπάση από *C.antarctica* ακινητοποιημένη σε οργανοπήκτωμα από HPMC με μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης. Η κάθε στήλη περιέχει 18 g πηκτώματος. Αρχική συγκέντρωση οξέος 70 mM, η οκτανόλη είναι σε περίσσεια, θερμοκρασία δωματίου.

Για τη επίτευξη της μεγαλύτερης δυνατής απόδοσης στο ίδιο χρονικό διάστημα, το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε δεύτερη φορά με τη διαφορά ότι οι στήλες είχαν πληρωθεί με διπλάσια ποσότητα πηκτώματος, δηλαδή με 36 g πηκτώματος έκαστη. Η ποσότητα του ενζύμου που περιείχε το οργανοπήκτωμα αντιστοιχεί σε 0,25 mg ανά g πηκτώματος. Η αύξηση του βιοκαταλύτη που περιέχεται στις στήλες στοχεύει στο να παρατείνει την επαφή του διαλύματος αντίδρασης με τον ένζυμο και επομένως στην αύξηση της απόδοσης της αντίδρασης. Στο διάγραμμα που ακολουθεί (Εικόνα 3.23) παρατηρείται ότι απόδοση της αντίδρασης που επιτεύχθηκε σε 48 h ήταν 48,4% ή 0,7% ανά g πηκτώματος. Είναι σαφές λοιπόν, ότι διπλασιάζοντας την ποσότητα του βιοκαταλύτη, η απόδοση ανα g πηκτώματος παρέμεινε σχεδόν σταθερή (0,6% συγκριτικά με 0,7%). Ωστόσο, η απόδοση της αντίδρασης σχεδόν διπλασιάστηκε (22,1% συγκριτικά με 48,4%).

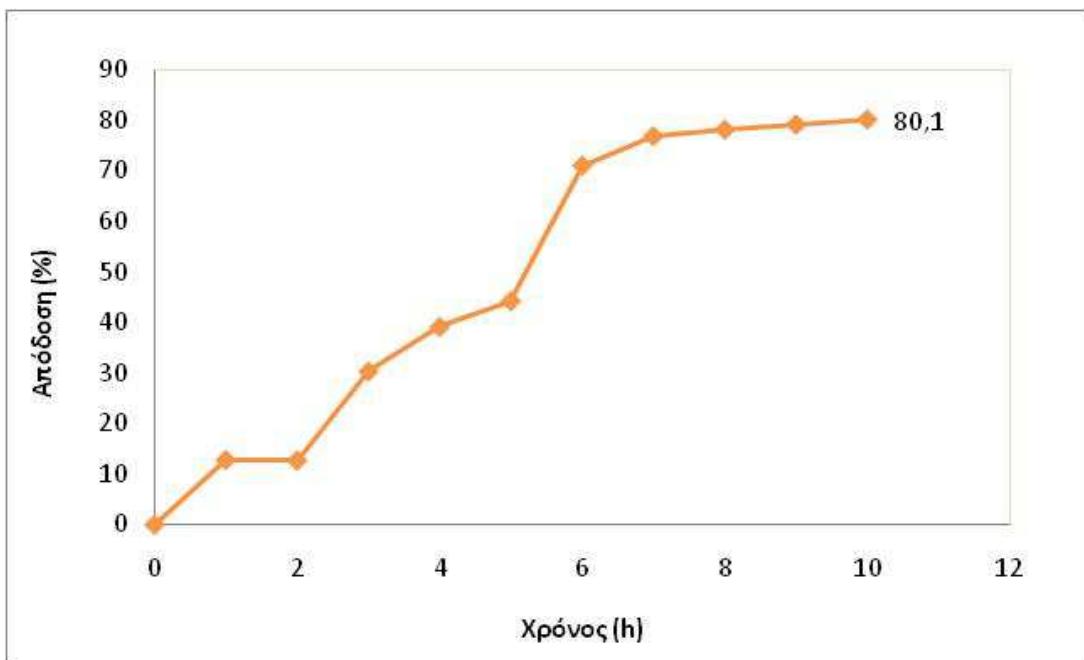


Εικόνα 3.23. Εξάρτηση της απόδοσης της αντίδρασης εστεροποίησης της οκτανόλης με το π-υδροξυ-φαινυλοξικό οξύ από το χρόνο, που καταλύεται από τη λιπάση από *C. antarctica*. Η κάθε στήλη περιέχει 36 g πηκτώματος. Υπόλοιπες συνθήκες όπως δίνονται στη εικόνα 3.22.

3.2.2 Αντιδράσεις εστεροποίησης τερπενικών αλκοολών

Εστεροποίηση λαυρικού οξέος με νερόλη

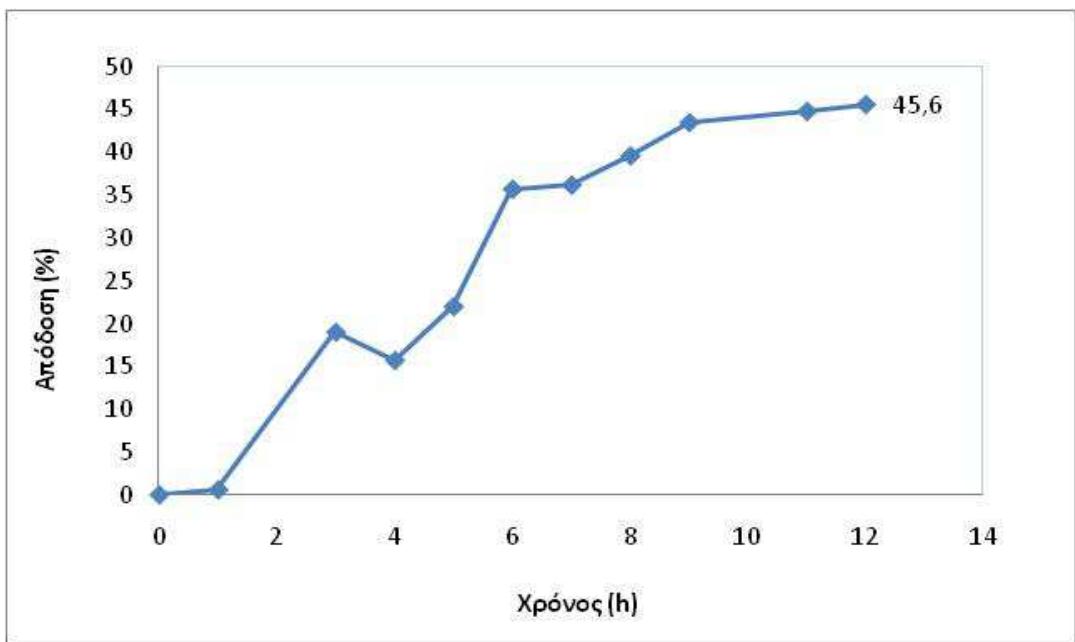
Για τη αντίδραση αυτή παρασκευάστηκε διάλυμα αντίδρασης με 100 mL ισοοκτάνιο και τα υποστρώματα της αντίδρασης, δηλαδή το λαυρικό οξύ και τη νερόλη σε συγκέντρωση 100 mM έκαστο. Στη συνέχεια, η κάθε στήλη πληρώθηκε με 18 g οργανοπηκτώματος από HPMC βασισμένο σε μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης, μέσα στο οποίο βρίσκεται το ακινητοποιημένο ένζυμο λιπάση από *R. miehei*. Η ποσότητα του ενζύμου που περιείχε το οργανοπήκτωμα αντιστοιχεί σε 0,08 mg ανά g πηκτώματος. Τέλος, το διάλυμα διέτρεξε τις στήλες για 10 h και λήφθηκαν δείγματα (20 μ L) ανά 1 h. Τα δείγματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας και υπολογίστηκε η ποσότητα του εστέρα που είχε παραχθεί τη δεδομένη χρονική στιγμή, επομένως και η απόδοση της αντίδρασης. Η απόδοση που επιτεύχθηκε μετά από 10 ώρες ήταν 80% και τα αποτελέσματα που προέκυψαν φαίνονται στο διάγραμμα που ακολουθεί (Εικόνα 3.24).



Εικόνα 3.24. Εξάρτηση από το χρόνο της απόδοσης της αντίδρασης εστεροποίησης της νερόλης με το λαυρικό οξύ, που καταλύεται από τη λιπάση από *R. miehei* ακινητοποιημένη σε οργανοπήκτωμα από HPMC με μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης. Συγκέντρωση λαυρικού οξέος και νερόλης 100 mM έκαστο, διαλύτης ισοοκτάνιο και θερμοκρασία δωματίου.

Εστεροποίηση λαυρικού οξέος με γερανιόλη

Για τη αντίδραση αυτή παρασκευάστηκε διάλυμα αντίδρασης 100 mL ισοοκτανίου και λαυρικό οξύ και γερανιόλη σε συγκέντρωση 100 mM έκαστο. Η κάθε στήλη πληρώθηκε με 18 g οργανοπήκτωματος από HPMC βασισμένο σε μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης, μέσα στο οποίο βρίσκεται το ακινητοποιημένο ένζυμο, λιπάση από *R. miehei*. Η ποσότητα του ενζύμου που περιείχε το οργανοπήκτωμα αντιστοιχεί σε 0,08 mg ανά g πηκτώματος. Τέλος, το διάλυμα διέτρεξε τις στήλες για 12 h και λήφθηκαν δείγματα (20 μL) ανά 1 h. Τα δείγματα αναλύθηκαν με τη μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας και υπολογίστηκε η ποσότητα του εστέρα που είχε παραχθεί τη δεδομένη χρονική στιγμή, επομένως και η απόδοση της αντίδρασης. Στο διάγραμμα που ακολουθεί (Εικόνα 3.25) παρατηρείται ότι η απόδοση που επιτεύχθηκε μετά από 10 ώρες ήταν 45,6%.



Εικόνα 3.25. Εξάρτηση από το χρόνοτης απόδοσης της αντίδρασης εστεροποίησης της γερανιόλης με το λαυρικό οξύ, που καταλύεται από τη λιπάση από *R. miehei* ακινητοποιημένη σε οργανοπήκτωμα από HPMC με μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης. Αρχική συγκέντρωση λαυρικού οξέος και γερανιόλης 100 mM έκαστο, διαλύτης ισοοκτάνιο και θερμοκρασία δωματίου.

3.3 Απομόνωση, Διαχωρισμός και Ταυτοποίηση προϊόντων:

Το τελευταίο στάδιο των πειραμάτων αφορά τον διαχωρισμό και την απομόνωση των προϊόντων που παράχθηκαν τόσο από τις παραπάνω αντιδράσεις, όσο και από την πρότυπη αντίδραση του λαυρικού οξέος με την 1-προπανόλη.

Αρχικά για την απομόνωση των προϊόντων χρησιμοποιήθηκε περιστροφικός αποστακτήρας για την εξάτμιση του διαλύτη και τη συμπύκνωση του διαλύματος. Στη συνέχεια, έγινε χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) με στόχο να επιλεγεί κατάλληλο διάλυμα ανάπτυξης που θα χρησιμοποιηθεί στη χρωματογραφία στήλης που θα ακολουθήσει, για το διαχωρισμό των εστέρων από το διάλυμα αντίδρασης. Για τον διαχωρισμό χρησιμοποιήθηκαν έτοιμες πλάκες γέλης πυριτίου (silica gel-60). Το δείγμα τοποθετήθηκε υπό μορφή κηλίδας κοντά στη βάση της πλάκας, ενώ παράλληλα τοποθετήθηκαν και πρότυπες ενώσεις αναφοράς για την ταυτοποίηση των προϊόντων της ενζυμικής αντίδρασης. Οι πλάκες αναπτύχθηκαν σε κλειστούς θαλάμους κορεσμένους με το διάλυμα ανάπτυξης. Ύστερα από αρκετές δοκιμές τα

συστήματα που επιλέχθηκαν ως καταλληλότερα για το διαχωρισμό των εστέρων φαίνονται στον Πίνακα 3.5.

Πίνακας 3.5. Διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν για το διαχωρισμό του κάθε εστέρα με τη μέθοδο TLC.

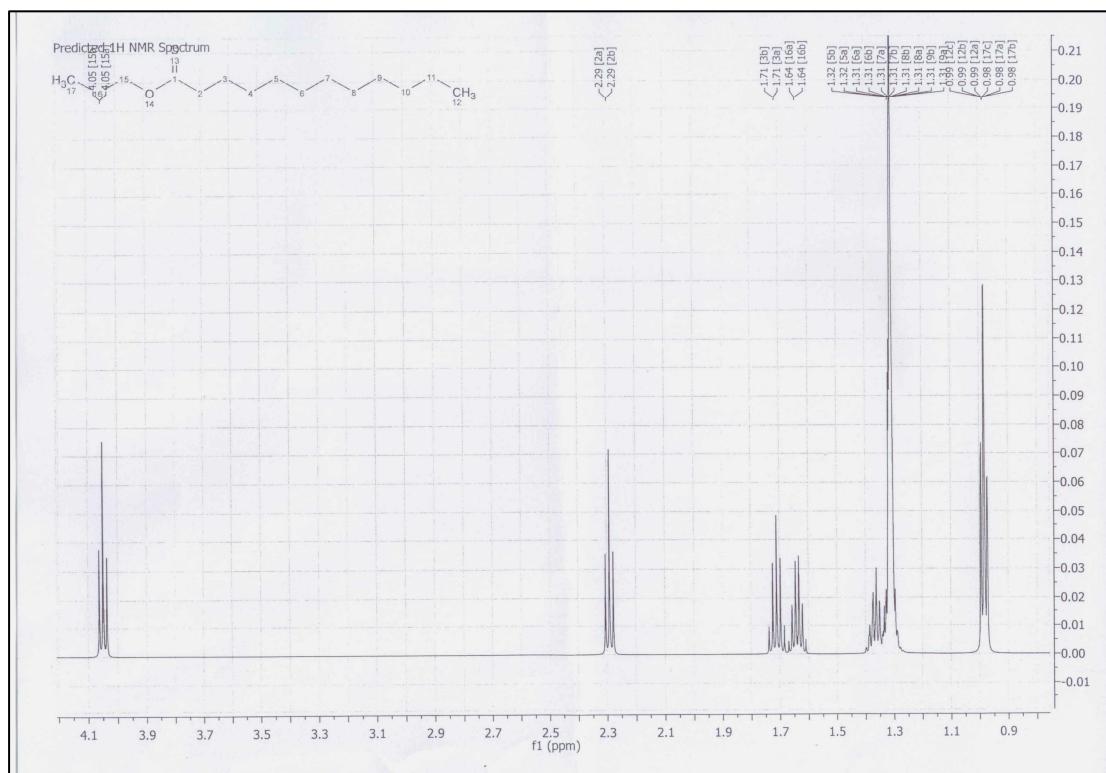
Προϊόν προς διαχωρισμό	Καταλληλότερς διαλύτης (έπειτα από TLC)
Λαυρικός Προπυλεστέρας	Εξάνιο/οξικός αιθυλεστέρας
Εστέρας νερόλης	Διγλωρομεθάνιο
Εστέρα γερανιόλης	Διγλωρομεθάνιο
Εστέρας φαινολικού οξέος	Εξανιο/οξικός αιθυλεστέρας

Έχοντας επιλέξει την κατάλληλη αναλογία διαλυτών με την μέθοδο TLC, ακολούθησε ο διαχωρισμός του προϊόντος με χρωματογραφία στήλης. Για τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιήθηκε μία γυάλινη στήλη. Στη στήλη αυτή τοποθετήθηκε μέχρι το μέσο πυριτική πηκτή, η οποία αποτελεί τη στατική φάση της μεθόδου. Το δείγμα τοποθετήθηκε στην αρχή της στήλης και στη συνέχεια έγινε έκλουση με το διάλυμα που είχε επιλεγεί σε κάθε περίπτωση. Το διάλυμα με το οποίο γίνεται έκλουση αποτελεί την κινητή φάση της μεθόδου η οποία διέρχεται μέσω στατικής φάσης, λόγω της βαρύτητας. Τα συστατικά του δείγματος μετακινούνται κατά μήκος της στήλης με διαφορετικές ταχύτητες εξαρτώμενες από τη συγγένεια των συστατικών ως προς τη στατική φάση. Στην προκειμένη περίπτωση το συστατικό που εξέρχεται πρώτα από τη στήλη είναι ο εστέρας, δηλαδή το προϊόν της αντίδρασης που επιθυμούμε να απομονώσουμε. Συνολικά, διαχωρίστηκαν-απομονώθηκαν 37,5 g λαυρικού προπυλεστέρα, 15,3 g λαυρικού εστέρα της γερανιόλης και 33,4 g λαυρικού εστέρα της νερόλης. Απομόνωση του π -υδρόξυ φαινυλοξικού εστέρα της οκτανόλης δεν πραγματοποιήθηκε γιατί η ποσότητα του διαλύματος που συλλέχθηκε δεν θεωρήθηκε αρκετή συγκριτικά με την απόδοση που επιτεύχθηκε για τον αποτελεσματικό διαχωρισμό του.

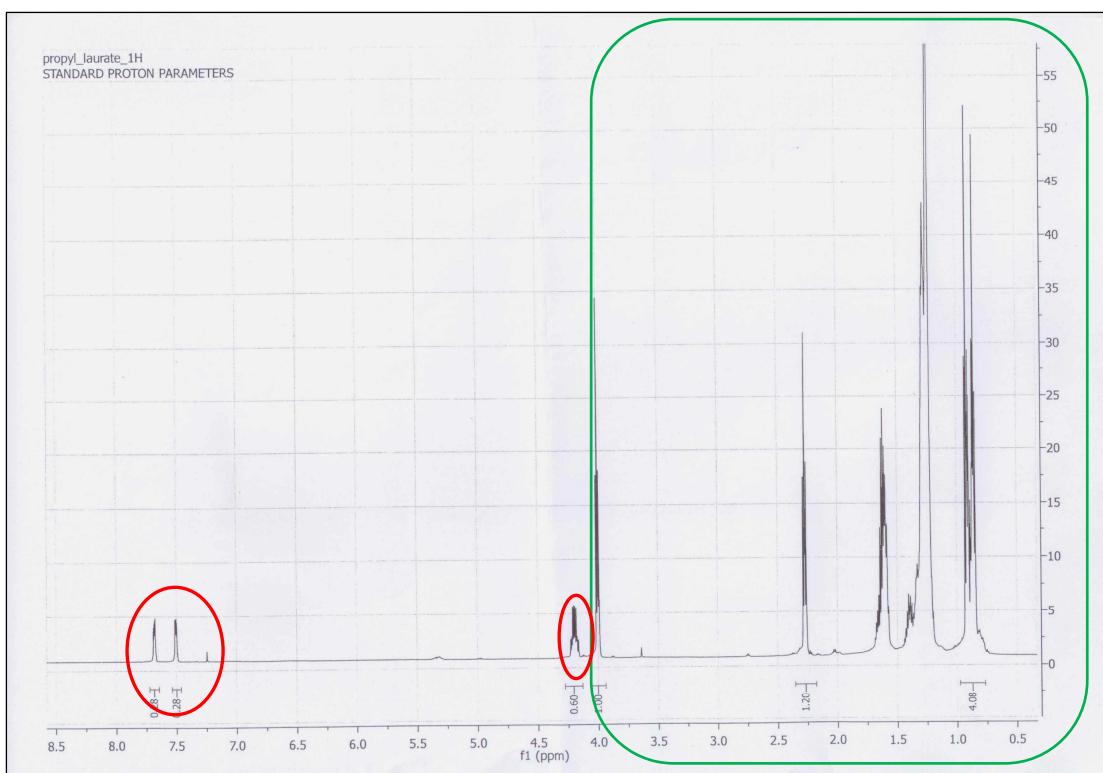
Τέλος, ο λαυρικός προπυλεστέρας που απομονώθηκε με τις παραπάνω μεθόδους ταυτοποιήθηκε με τη φασματοσκοπική μέθοδο πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR). Στις εικόνες που ακολουθούν φαίνεται το αναμενόμενο φάσμα

για τη δομή του λαυρικού προπυλεστέρα (Εικόνα 3.26) και το φάσμα που προέκυψε από την ταυτοποίηση του δείγματος του λαυρικού προπυλεστέρα που απομονώθηκε (Εικόνα 3.27).

Οι φθαλικοί εστέρες που ανιχνεύτηκαν ως προσμίξεις στον λαυρικό προπυλεστέρα που απομονώθηκε είναι μία κατηγορία χημικών ενώσεων που χρησιμοποιούνται κυρίως ως πλαστικοποιητές (ουσίες που προστίθενται στα πλαστικά για την αύξηση της ευλυγισίας τους). Στην παρούσα περίπτωση πιθανολογείται ότι προήλθαν από τις σωληνώσεις μέσω των οποίων μεταφερόταν το διάλυμα της αντίδρασης στο σύστημα συνεχούς ροής, παρά το γεγονός ότι είχαν ελεγχθεί για την ανθεκτικότητα τους σε οργανικούς διαλύτες.



Εικόνα 3.26 Αναμενόμενο φάσμα για τη δομή του λαυρικού προπυλεστέρα.



Εικόνα 3.27. Πειραματικό φάσμα του λαυρικού προπυλεστέρα. Με πράσινο περίγραμμα περικλείονται οι κορυφές που αντιστοιχούν στην ένωση του λαυρικού προπυλεστέρα και με κόκκινο περίγραμμα περικλείονται κορυφές που αντιστοιχούν σε φθαλικούς εστέρες

*Συζήτηση &
Συμπεράσματα*

Τα τελευταία χρόνια, η βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών έχει αυξήσει το ενδιαφέρον της για τη χρήση συστατικών που δίνουν υψηλή προστιθέμενη αξία στα προϊόντα της. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν τα φαινολικά οξέα τα οποία δρουν ως αντιοξειδωτικά πρόσθετα σε τρόφιμα, καθώς και οι εστέρες τερπενικών αλκοολών οι οποίοι χρησιμοποιούνται ευρέως στον τομέα των τροφίμων, των καλλυντικών και των φαρμάκων, ως συστατικά για την ενίσχυση της γεύσης και του αρώματος των προϊόντων. Τέτοια συστατικά είναι επιθυμητό να έχουν φυσική προέλευση. Σε πολλές περιπτώσεις όμως, η μετατροπή τους σε διαφορετική μορφή είναι συνήθως απαραίτητη καθώς όταν βρίσκονται στη φυσική τους μορφή, η ενσωμάτωσή τους στα εκάστοτε προϊόντα δεν είναι πάντα εφικτή.

Παραδοσιακά, για τη σύνθεση αυτών των ουσιών στη βιομηχανία χρησιμοποιούνται ως καταλύτες ανόργανα οξέα, αλκαλικοί καταλύτες, ισχυρά οξέα και βάσεις. Ωστόσο, η χρήση τέτοιου τύπου καταλυτών συνοδεύεται από υψηλή κατανάλωση ενέργειας λόγω της απαίτησης για υψηλές θερμοκρασίες και/ή υψηλές πιέσεις, ενώ ευνοούν και την εμφάνιση πολλών παραπροϊόντων εμποδίζοντας την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος. Οι ακραίες συνθήκες που απαιτούνται μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε σοβαρή φθορά του χρησιμοποιούμενου εξοπλισμού και αρα σε αύξηση του κόστους παραγωγής. Για το λόγο αυτό, η χρήση των ενζύμων ως βιοκαταλυτών ελκύει όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον, αφού η βιοκατάλυση αποτελεί μη ενεργειοβόρο και φιλική προς το περιβάλλον διεργασία. Επιπλέον, η μέθοδος της βιοκατάλυσης είναι διαδικασία, η οποία περιορίζει ή και εμποδίζει τελείως την εμφάνιση παραπροϊόντων ενώ παράλληλα επιτυγχάνονται υψηλές αποδόσεις.

Σε εργαστηριακή κλίμακα, η διαλείποντος έργου παραγωγή των παραπάνω αναφερόμενων συστατικών έχει ήδη επιτευχθεί ενζυμικά, με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων ακινητοποιημένων ενζύμων ή με ένζυμα εγκλωβισμένα σε μικρογαλακτώματα (Giuliani *et al.* 2001, Zoumparnioti *et al.* 2006). Η παρουσία ωστόσο, του επιφανειοενεργού καθιστά την απομόνωση των προϊόντων δύσκολη και δαπανηρή. Για το λόγο αυτό η ακινητοποίηση των ενζύμων σε στερεά μέσα (π.χ. οργανοπήκτωμα) κερδίζει συνεχώς έδαφος (Meher *et al.* 2006, Šabeder *et al.* 2006, Schneider *et al.* 2009). Αυτή η μέθοδος ακινητοποίησης όχι μόνο διευκολύνει την απομόνωση του προϊόντος, αλλά και καθιστά ευκολότερη την πρόσβαση των αντιδρώντων στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου.

Ένα άλλο πρόβλημα που καλείται να αντιμετωπίσει η βιομηχανία είναι η τεχνική και οικονομική βελτίωση των διεργασιών που ακολουθούνται. Αυτό, συνεπάγεται την απλούστευση και βελτίωση της απόδοσης των διεργασιών η οποία ανάμεσα σε άλλα σχετίζεται και με την επιλογή του τύπου του αντιδραστήρα που θα χρησιμοποιηθεί. Έτσι, στις περισσότερες περιπτώσεις η χρήση του αντιδραστήρα συνεχούς ροής προτιμάται από τον αντιδραστήρα διαλείποντος έργου (Nie *et al.* 2006, Royon *et al.* 2007).

Οι αντιδραστήρες συνεχούς ροής είναι οικονομικά πιο αποτελεσματικοί από τους συμβατικούς αντιδραστήρες διαλείποντος έργου και οδηγούν σε αντιδράσεις υψηλότερης απόδοσης (Watanabe *et al.* 2001, Itabaiana *et al.* 2013). Ένα ακόμα πλεονέκτημα των αντιδραστήρων συνεχούς ροής είναι ότι καθιστά εφικτή την βιομετατροπή συστατικών με χαμηλή διαλυτότητα (όπως είναι τα φαινολικά οξέα), αφού επιτρέπει τη χρήση μεγάλων όγκων διαλυμάτων χαμηλής περιεκτικότητας στο εν λόγω υπόστρωμα.

4.1 Ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης σε σύστημα συνεχούς ροής

Για έναν αντιδραστήρα συνεχούς ροής είναι καθοριστικής σημασίας η μέθοδος που θα επιλεγεί για την ακινητοποίηση του ενζύμου. Στην παρούσα εργασία ο βιοκαταλύτης που χρησιμοποιήθηκε αποτελείται από ένζυμο ακινητοποιημένο σε φορέα φυσικού πολυμερούς, γεγονός που το καθιστά φιλικό προς το περιβάλλον και κυρίως βιοσυμβατό. Επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διεργασίες που έχουν ως τελικό σκοπό την παραγωγή ουσιών που θα χρησιμοποιηθούν σε σκευάσματα όπως τρόφιμα, φάρμακα ή καλλυντικά. Τέλος, η μέθοδος ακινητοποίησης που επιλέχθηκε επιτρέπει την αποτελεσματική χρήση του ενζύμου κάτω από ήπιες συνθήκες, ενώ παράλληλα δίνει τη δυνατότητα ανάκτησης και επαναχρησιμοποίησης του βιοκαταλύτη (Delimitsou *et al.* 2002, Zoumpanioti *et al.* 2006, Zoumpanioti *et al.* 2010β).

Ο αντιδραστήρας συνεχούς ροής που προτείνεται έχει πληρωθεί με βιοσυμβατό βιοκαταλύτη (οργανοπήκτωμα) αποτελούμενο από ένζυμο ακινητοποιημένο σε φυσικό πολυμερές. Επομένως, προσφέρει τόσο τα πλεονεκτήματα ενός αντιδραστήρα συνεχούς ροής (υψηλή απόδοση και μετατροπή υποστρωμάτων χαμηλής διαλυτότητας), όσο και τα πλεονεκτήματα της βιοκατάλυσης (περιορισμένα παραπροϊόντα, ήπιες συνθήκες λειτουργίας, χαμηλό κόστος). Αξίζει να

σημειωθεί ότι είναι η πρώτη φορά που μελετάται σύστημα συνεχούς ροής μέσα στο οποίο βρίσκεται ένζυμο ακινητοποιημένο σε οργανοπήκτωμα. Για το λόγο αυτό κατοχυρώθηκε με δίπλωμα ευρεσιτεχνίας (Φιλίππου και συνεργάτες, 2013).

Ένας άλλος παράγοντας που έπρεπε να ληφθεί υπόψη για την αξιοποίηση του προτεινόμενου συστήματος είναι η μεταβολή της αποδοτικότητας του συστήματος μετά από επαναλαμβανόμενες χρήσεις. Από τα πειράματα που έγιναν, παρατηρήθηκε ότι η απόδοση του συστήματος μειώνεται κατά 50% μετά από τρεις επαναλαμβανόμενες χρήσεις, γεγονός που οφείλεται στη μείωση της καταλυτικής δραστικότητας του ενζύμου. Ωστόσο, σε βιομηχανική κλίμακα η μείωση στην απόδοση του συστήματος συνεπάγεται και μείωση της παραγωγής του επιθυμητού προϊόντος. Για το λόγο αυτό προτάθηκε η αντικατάσταση της μιας εκ των δύο στηλών με μια άλλη που θα περιέχει νέα ποσότητα βιοκαταλύτη, μετά από κάθε χρήση του συστήματος. Στην περίπτωση αυτή η απόδοση του συστήματος διατηρείται σε υψηλά επίπεδα ακόμα και μετά από τρείς παναλαμβανόμενες χρήσεις.

Τέλος, θα πρέπει να αναφερθεί ότι ο αντιδραστήρας συνεχούς ροής που προτείνεται συνδέεται με την ενζυμική σύνθεση οργανικών ενώσεων σε βιομηχανική κλίμακα. Επομένως το σύστημα αυτό μπορεί να απαρτίζεται από πολλαπλές στήλες ίδιου ή διαφορετικού όγκου για τη μεγαλύτερη παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος. Επίσης, οι στήλες αυτές μπορούν να συνδέονται μεταξύ τους με σωληνώσεις και τη μεσολάβηση ή μη αντλίας.

4.2 Παραγωγή προϊόντων βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος

Για να ελεγχθεί αν η προτεινόμενη συνδεσμολογία μπορεί να αξιοποιηθεί από τη βιομηχανία για τη παραγωγή προϊόντων βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος έγινε μελέτη αντιδράσεων που αφορούν στην παραγωγή εστέρων των φαινολικών οξέων και εστέρων των τερπενικών αλκοολών.

Εστεροποίηση Φαινολικών Οξέων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί τα φαινολικά οξέα έχουν προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον καθώς αποτελούν φυσικά αντιοξειδωτικά που προκαλούν μείωση των ελευθέρων ριζών στον οργανισμό. Όμως, η μειομένη διαλυτότητά τους τόσο σε υδατικά όσο και σε οργανικά μέσα, εμποδίζει την ευρεία χρήση τους. Η μετάτροπή τους μέσω της εστεροποίησης του καρβοξυλικού τους οξέος με μεσαίου

και μεγάλου μήκους ανθρακικής αλυσίδας αλκοόλες προς μόρια πιο αμφίφιλου χαρακτήρα μπορεί να βελτιώσει τη διαλυτότητά τους σε λίπη και έλαια (Figueroa-Espinoza & Villeneuve 2005) διευρύνοντας τη χρήση τους ως αντιοξειδωτικά πρόσθετα τροφίμων αλλά και την εφαρμογή τους στην κοσμητολογία.

Η μετατροπή αυτή έχει ήδη επιτευχθεί ενζυμικά σε διάφορους οργανικούς διαλύτες (Priya & Chada 2003, Widjaja *et al.* 2008), όπως και η απ' ευθείας μετατροπή τους με αλειφατικές αλκοόλες καταλυόμενη από λιπάσες σε άνυδρους διαλύτες (Compton *et al.* 2000, Stamatis *et al.* 2001) ή ακόμα και σε συστήματα χωρίς διαλύτη (Stamatis *et al.* 1999a, Weitkamp *et al.* 2006). Σε όλες όμως αυτές τις περιπτώσεις τόσο η ταχύτητα των αντιδράσεων όσο και το ποσοστό μετατροπής ήταν εξαιρετικά χαμηλά. Η εστεροποίηση των φαινολικών οξέων σε μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο έχει επίσης επιτευχθεί με υψηλότερη απόδοση (Giuliani *et al.* 2001), ωστόσο, η διαλυτότητα των φαινολικών οξέων στα συστήματα αυτά είναι πολύ περιορισμένη και η εφαρμογή τους στη βιομηχανία περιορίζεται σημαντικά από την παρουσία μεγάλων ποσοτήτων επιφανειοενεργών ουσιών.

Σε εργαστηριακή κλίμακα, σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου, έχουν ήδη επιτευχθεί εστεροποιήσεις φαινολικών οξέων με υψηλές αποδόσεις όμως απαιτούν πολύ χρόνο και αφορούν την παραγωγή τους σε πολύ μικρότερες ποσότητες (Zoumparnioti *et al.* 2010a). Στην παρούσα εργασία, είναι η πρώτη φορά που μελετάται η σύνθεση εστέρων των φαινολικών οξέων σε μεγάλη κλίμακα, με τη χρήση ενός αντιδραστήρα συνεχούς ροής που περιέχει ένζυμο ακινητοποιημένο σε οργανοπήκτωμα.

Στην περίπτωση των φαινολικών οξέων μελετήθηκε η αντίδραση του π-υδρόξυ-φαινυλοξικού οξέος με την οκτανόλη προς την παραγωγή του π-υδρόξυ-φαινυλοξικού εστέρα της οκτανόλης. Το ένζυμο που επιλέχθηκε για την κατάλυση της αντίδρασης αυτής είναι η λιπάση από *C. antarctica* με το οποίο έχει δειχθεί ότι επιτυγχάνονται υψηλότερες αποδόσεις (Zoumparnioti *et al.* 2010a), ενώ η ποσότητα του ενζύμου που περιείχε το οργανοπήκτωμα αντιστοιχούσε σε 0,08 mg ανά g πηκτώματος. Το πείραμα επαναλήφθηκε 2 φορές και αξίζει να σημειωθεί ότι και στις δύο περιπτώσεις επιτεύχθηκαν αρκετά υψηλές αποδόσεις.

Κατά την πρώτη εκτέλεση του πειράματος επιτεύχθηκε απόδοση 22,1% σε χρονικό διάστημα 48 h. Η απόδοση αυτή θεωρείται αρκετά υψηλή, καθώς σε πορηγούμενη μελέτη η ίδια αντίδραση είχε πραγματοποιηθεί σε αντιδραστήρα διαλείποντος έργου και είχε επιτευχθεί απόδοση 5% για το ίδιο χρονικό διάστημα

(Zoumpanioti *et al.* 2010a). Ωστόσο, για τη παραγωγή του επιθυμητού προϊόντος σε βιομηχανική κλίμακα είναι απαραίτητο να επιτευχθεί όσο το δυνατόν μεγαλύτερη απόδοση στο μικρότερο δυνατό χρονικό διάστημα. Για το λόγο αυτό το ίδιο πείραμα επαναλήφθηκε χρησιμοποιώντας διπλάσια ποσότητα βιοκαταλύτη.

Κατά τη δεύτερη επανάληψη του πειράματος η απόδοση που επιτεύχθηκε ήταν 48,4% για το ίδιο χρονικό διάστημα (48 h). Παρ'όλα αυτά θα πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι στη δεύτερη περίπτωση η χρήση διπλάσιας ποσότητας καταλύτη συνεπάγεται και αύξηση του κόστους παραγωγής.

Εστεροποίηση Τερπενικών αλκοολών

Μια άλλη κατηγορία προϊόντων που εμφανίζουν ιδιαίτερο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον είναι οι εστέρες των τερπενίων. Οι τερπενικοί εστέρες των λιπαρών οξέων είναι ευρέως διαδεδομένοι στην βιομηχανία τροφίμων, αρωματοποιίας και φαρμάκων. Στο παρελθόν είχαν χρησιμοποιηθεί μέθοδοι όπως η εκχύλιση από φυτικά αιθέρια έλαια και η άμεση βιοσύνθεση μέσω της ζύμωσης, για την παραγωγή γεύσης και αρώματος. Παρόλα αυτά, αυτές οι μέθοδοι παρουσίαζαν υψηλό κόστος επεξεργασίας και χαμηλή απόδοση παραγωγής του επιθυμητού προϊόντος. Επιπλέον, είχε μελετηθεί και η παραγωγή τερπενικών εστέρων μέσω χημικής σύνθεσης η οποία στις περισσότερες περιπτώσεις οδηγούσε στην παραγωγή παραπροϊόντων τα οποία αλλοίωναν τη φυσική, χαρακτηριστική οσμή των τερπενίων.

Τα τελευταία χρόνια, υπάρχει ένα μεγάλο ενδιαφέρον για την χρήση της ενζυμικής μετατροπής αντί αυτών των παραδοσιακών μεθόδων για την παραγωγή φυσικών προϊόντων και αρωμάτων χρησιμοποιώντας τερπενικές αλκοόλες. Αλκοόλες όπως η γερανιόλη, η νερόλη και η κιτρονελλόλη είναι χαμηλού κόστους αιθέρια έλαια, τα οποία μπορούν εύκολα να μετατραπούν σε εστέρες (Gatfield 1995). Η μετατροπή αυτή μπορεί να γίνει μέσω άμεσης εστεροποίησης ή μετεστεροποίησης και τη χρήση λιπασών ως βιοκαταλύτες (Akoh and Yee 1998, Gandhi and Mukherjee 2000, Athawale *et al.* 2003, Olsen *et al.* 2006, Serri *et al.* 2006, You *et al.* 2011).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν οι αντιδράσεις εστεροποίησης της γερανιόλης και της νερόλης με το λαυρικό οξύ καλυόμενες από λιπάση από *R. miehei* και η ποσότητα του ενζύμου που περιείχε το οργανοπήκτωμα και στις δύο αντιδράσεις αντιστοιχούσε σε 0,08 mg ανά g πηκτώματος. Η απόδοση που επιτεύχθηκε κατά την αντίδραση του λαυρικού οξέος με τη νερόλη ήταν 80% μετά από χρονικό διάστημα 10 h. Σε προηγούμενη μελέτη που είχε γίνει από de María και

συνεργάτες, η ίδια αντίδραση είχε πραγματοποιηθεί με τη χρήση λιπάσης UAB-II από *C. Rugosa* (0,25 mg/g πηκτώματος) σε διαλείποντος έργου αντιδραστήρα και είχε επιτευχθεί απόδοση 68% για το ίδιο χρονικό διάστημα (de María *et al.* 2004). Επομένως, μπορεί να θεωρηθεί ότι η απόδοση που επιτεύχθηκε με το παρόν σύστημα συνεχούς ροής είναι αρκετά υψηλότερη.

Όσον αφορά την αντίδραση του λαυρικού οξέος με τη νερόλη, η απόδοση που επιτεύχθηκε ήταν 45,6 % σε χρονικό διάστημα 12 h. Σε προηγούμενη μελέτη η ίδια αντίδραση είχε πραγματοποιηθεί με τη χρήση λιπάσης UAB-II από *C. Rugosa* (0,25 mg/g πηκτώματος) σε διαλείποντος έργου αντιδραστήρα και είχε επιτευχθεί απόδοση 75% για το ίδιο χρονικό διάστημα (de María *et al.* 2004). Η απόδοση που επιτεύχθηκε με το παρόν σύστημα συνεχούς ροής είναι αρκετά μικρότερη σε σχέση με εκείνη που αναφέρθηκε από de María και συνεργάτες. Αυτή η διαφορά μπρεί να οφείλεται σε διάφορους παράγοντες. Μία εξ αυτών σχετίζεται πιθανά και με το διαφορετικό ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε στις δύο αυτές περιπτώσεις.

4.3. Απομόνωση, Διαχωρισμός και Ταυτοποίηση

Η εύκολη απομόνωση και ο διαχωρισμός των επιθυμητών προϊόντων είναι καθοριστικής σημασίας για τη βιομηχανία. Στις περισσότερες περιπτώσεις τα υψηλό κόστος παραγωγής οφείλεται στις πολύπλοκες και χρονοβόρες διεργασίες που ακολουθούνται για τον καθαρισμό του προϊόντος (Gerhart 1992). Στην παρούσα εργασία, η χρήση στερεού βιοκαταλύτη διευκόλυνε την ανάκτηση του καταλύτη από το διάλυμα αντίδρασης ενώ παράλληλα ο διαχωρισμός και η απομόνωση των παραγόμενων εστέρων πραγματοποιήθηκε με τη χρήση απλών μεθόδων (χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας και υγρη χρωματογραφία στήλης). Τέλος, προς επιβεβαίωση των αποτελεσμάτων μας έγινε και ταυτοποίηση στον εστέρα που παράχθηκε κατά τη διεξαγωγή της πρότυπης αντίδρασης.

4.4 Γενικά Συμπεράσματα

- ✓ Σε όλες τις συνδεσμολογίες που χρησιμοποιήθηκαν επιτεύχθηκε η παραγωγή προϊόντος στο ίδιο χρονικό διάστημα.

- ✓ Ως βέλτιστο σύστημα χαρακτηρίστηκε ο αντιδραστήρας συνεχούς ροής κλειστού τύπου, ο οποίος αποτελείται από δύο στήλες. Στο σύστημα αυτό παρατηρήθηκε η μέγιστη απόδοση στο ίδιο χρονικό διάστημα σε σχέση με τις υπόλοιπες συνδεσμολογίες.
- ✓ Κατά την επαναχρησιμοποίηση του κλειστού συστήματος συνεχούς ροής δύο στήλων έως και τρεις φορές, παρατηρήθηκε ότι μειώνεται μερικώς η απόδοση της αντίδρασης αλλά δεν μηδενίζεται.
- ✓ Το ένζυμο που είναι ακινητοποιημένο στο οργανοπήκτωμα διατηρεί μερικώς την καταλυτική του δραστικότητα ακόμα και μετά από αρκετές επαναλήψεις.
- ✓ Η μείωση στη καταλυτική δραστικότητα του ενζύμου που βρίσκεται ακινητοποιημένο στο οργανοπήκτωμα είναι μικρότερη όταν η επαναχρησιμοποίηση γίνεται επαναλαμβανόμενα χωρίς ενδιάμεση αποθήκευση στους 2-6 °C.
- ✓ Κατά την αλλαγή της μιας εκ των δύο στήλων μετά από κάθε χρήση του συστήματος συνεχούς ροής, παρατηρήθηκε ότι το σύστημα διατηρούσε την αποδοτικότητά του σε υψηλά επίπεδα ακόμα και μετά από τρεις χρήσεις.
- ✓ Το προτεινόμενο σύστημα συνεχούς ροής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή εστέρων τόσο των φαινολικών οξέων όσο και των λιπαρών οξέων με τερπενικές αλκοόλες,
- ✓ Το προτεινόμενο σύστημα συνεχούς ροής, αποδείχτηκε ότι ήταν περισσότερο αποδοτικό σε σύγκριση με έναν αντιδραστήρα διαλείποντος έργου για τις αντιδράσεις εστεροποίησης του του π-υδρόξυ-φαινυλοξικού οξέος με την οκτανόλη και του λαυρικού οξέος με την νερόλη.
- ✓ Επιτεύχθηκε ο διαχωρισμός και η απομόνωση όλων των προϊόντων. Ενώ έγινε και ταυτοποίηση του λαυρικού προπυλεστέρα με NMR.

Βιβλιογραφία

1. Akoh, C.C., Yee L.N., (1998), Lipase-catalyzed transesterification of primary terpene alcohols with vinyl esters in organic media, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **4**, 149.
2. Ambika, P., Singh, P., Chauhan, S.M.S., (2008), Chemoselective esterification of phenolic acids in the presence of sodium bicarbonate in ionic liquids, *Synth. Commun.*, **38**, 928.
3. Aravindan, R., Anbumathi, P., Viruthagiri, T., (2007), Lipase applications in food industry, *Indian Journal of Biotechnology*, **6**, 141.
4. Armstrong, D.W., Gillies, B., Yamazaki, H., (1989), in: G. Charalambous Ed., Flavor Chemistry, Trends and Development, Elsevier Science Publishers, New York, 104.
5. Athawale, V., Manjrekar, N., Athawale, M., (2003), Effect of reaction parameters on synthesis of citronellyl methacrylate, *Biotechnol Prog.*, **19**, 298.
6. Atkinson, P.J., Grimson, M.J., Heenan, R.K., Howe, A.M., Mackie, A.R., Robinson, B.H., (1988), Microemulsion-based gels: a small-angle neutron scattering study, *Chem. Phys. Lett.*, **151**, 494.
7. Atkinson, P.J., Grimson, M.J., Heenan, R.K., Howe, A.M., Robinson, B.H., (1989), Structure of microemulsion-based organo-gels. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, **23**, 1807.
8. Avramiotis, S., Bekiari, V., Lianos, P., Xenakis, A., (1997), Structural and dynamic properties of lecithin-alcohol based (w/o) microemulsions, A luminescence quenching study, *J. Colloid Interface Sci* , **194**, 326.
9. Avramiotis, S., Stamatis, H., Kolisis, F.N., Lianos, P., Xenakis, A., (1996), Structural studies of lecithin- and AOT-based water-in-oil microemulsions, in the presence of lipase, *Langmuir*, **12**, 6320.

10. Backlund, S., Eriksson, F., Kanerva, L.T., Rantala, M., (1995), Selective enzymatic reactions using microemulsion-based gels, *Colloid Surfaces B: Biointerfaces*, **4**, 121.
11. Backlund, S., Eriksson, F., Hedström, G., Laine, A., Rantala, M., (1996), Lipase-catalyzed enantioselective esterifications using different microemulsion-based gels, *Colloid Polym. Sci.*, **274**, 540.
12. Ballesteros, A., Bornscheuer, U., Capewell, A., Combes, D., Condoret, J., Koenig, K., (1995) et al. Review article: enzymes in non-conventional phases. *Biocatal. Biotransform.*, **13**, 1.
13. Benford, D.J., Harrison, R.A., Strobel, S., Schlatter, J., & Verger, P., (2008), Carrageenan and processed Eucheuma seaweed (addendum), In WHO Food Additive Series: 59. Safety evaluation of certain food additives and contaminants. Geneva: Prepared by the Sixty-eighth meeting of the Joint FAO/WHO expert committee on food additives (JECFA), World Health Organization.
14. Blattner, C., Zoumpanioti, M., Kröner, J., Schmeer, G., Xenakis A., Kunz W., (2006), Biocatalysis using lipase encapsulated in microemulsion-based organogels in supercritical carbon dioxide, *The Journal of Supercritical Fluids*, **36**, 182.
15. Bornscheuer, U.T., (2003), Immobilizing Enzymes: How to Create More Suitable Biocatalysts, *Angewandte Chemie International Edition*, **42**, 3336.
16. Borys, N.F., Holt, S.L., Barden, R.E., (1979), Detergentless water/oil microemulsions. III. Effect of KOH on phase diagram and effect of solvent composition on base hydrolysis of esters, *J Colloid Interf Sci*, **71**, 526.
17. Brown, E.D., Yada, R.Y., Marangoni, A.G., (1993), The dependence of the lipolytic activity of *R. arrhizus* lipase on surfactant concentration in Aerosol-OT/isooctane reverse micelles and its relationship to enzyme structure, *Biochim. Biophys. Acta*, **1161**, 66.

18. Buchholz, K., Klein, J., (1987), Characterization of immobilized biocatalysts, in: “Immobilized enzymes and cells Part B, Methods in enzymology”, Ed. Mosbach K., Academic Press, London, **135**, 3.
19. Buisson, P., Rassy, H.E.L., Maury, S., Pierr, A.C, (2003), Biocatalytic gelation of silica in the presence of a lipase, *J Sol-Gel Sci Techn*, **27**, 373.
20. Burova, T.V., Grinberg, N.V., Grinberg, V.Y., Usov, A.I., Tolstoguzov, V.B., de Kruijff, C.G., (2007), Conformational changes in i- and k-carrageenan induced by complex formation with bovine β -casein, *Biomacromolecules*, **8**, 368.
21. Capitani, D., Segre, A.L., Haering, G., Luisi, P.L., (1988), Mobility measurements in microemulsion gels, *J. Phys. Chem.*, **92**, 3500.
22. Carrea, G., Riva, S., (2000), Properties and synthetic applications of enzymes in organic solvents. *Angew Chem. Int. Ed.*, **39**, 2226.
23. Carvalho, C..M..L., Cabral, J.M.S., (2000), Reverse micelles as reaction media for lipases, *Biochimie*, **82**, 1063.
24. Chartrain M., Greasham R., Moore J., Reider P., Robinson D., Buckland B., (2001), Asymmetric bioreductions: application to the synthesis of pharmaceuticals, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **11**, 503.
25. Chebil L., Humeau C., Falcimaigne A., Engasser J.M., Ghoul M., (2006), Enzymatic acylation of flavonoids, *Process Biochemistry*, **41**, 2237.
26. Chen R., (2007), Permeability issues in whole-cell bioprocesses and cellular membrane engineering, *Applied Microbiology and Biotechnology*, **74**, 730.
27. Chimi, H., Cillard, J., Cillard, P., Rahmani, M., (1991), Peroxyl and hydroxyl radical scavenging activity of some natural phenolic antioxidants, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **68**, 307.

28. Chulalaksananukul, W., Condoret, J.S., Combes, D., (1992), Kinetics of geranyl acetate synthesis by lipase-catalyzed transesterification in normal heane., *Enzyme Microb. Technol.*, **14**, 293.
29. Claon, P.A., Akoh, C.C., (1994 α), Effect of reaction parameters of SP435 lipase-catalysed synthesis of citronellyl acetate in organic solvent, *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 835.
30. Claon, P.A., Akoh C.C., (1994 β), Lipase catalyzed synthesis of terpene esters by trans esterification in n-hexane, *Biotechnol. Lett.*, **16**, 235.
31. Compton, D.L., Laszlo, J.A., Berhow, M.A., (2000), Lipase-catalyzed synthesis of ferulate esters, *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **77**, 513.
32. Constantinides, P.P., Scalart, J.P., (1997), Formulation and physical characterization of water-in-oil microemulsions containing long versus medium chain glycerides, *Int. J. Pharm.*, **158**, 57.
33. Croteau R., in: R. Croteau Ed., (1980), Fragrance and Flavor Substances, *DPS Verlag*, Germany, 13.
34. Damborsky, J., Brezovsky, J., (2009), Computational Tools for Designing and Engineering Biocatalysts, *Current Opinion in Chemical Biology*, **13**, 26.
35. de Castro H.F., de Oliveira P.C., Pereira E.B., (1997), Evaluation of different approaches for lipase catalysed synthesis of citronellyl acetate, *Biotechnol. Lett.*, **19**, 229.
36. de María, D.P., Xenakis, A., Stamatis, H., Sinisterra, J.V, (2004), Lipase factor (LF) as a characterization parameter to explain the catalytic activity of crude lipases from *Candida rugosa*, free or immobilized in microemulsions-based organogels, *Enzyme and Mikrobiol Technology*, **35**, 277.

37. Delimitsou, C., Zoumpanioti, M., Xenakis, A., Stamatis, H., (2002), Activity and stability studies of *Mucor miehei* lipase immobilized in novel microemulsion-based organogels, *Biocat. Biotrans.*, **20**, 319.
38. Derewenda, Z.S., Sharp, A.M., (1993), News from the interface: The molecular structures of triacylglyceride lipases. *Trends Biochem. Sci.*, **205**, 20.
39. Drauz K. and Waldmann H. (Eds.), (2002), Enzyme Catalysis in Organic Synthesis, Volume I, WILEY-VCH.
40. EC SCF (European Commission Scientific Committee on Food), (2003), Opinion of the Scientific Committee on Food on carrageenan. SCF/CS/ADD/EMU/199 Final.
41. Fadnavis NW, Koteswar K., (1999), An unusual reversible sol-gel transition phenomenon in organogels and its application for enzyme immobilization in gelatin membranes. *Biotechnol. Prog.* **15**, 98
42. Flanagan, J., Singh, H., (2006), Microemulsions: A Potential Delivery System for Bioactives in Food, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **46**, 221.
43. Figueroa-Espinoza, M.C., Villeneuve, P. (2005), Phenolic acids enzymatic lipophilization, *J Agric Food Chem*, **53**, 2779.
44. Fletcher, P.D.I., Rees, G.D., Robinson, B.H., Freedman, R.B., (1985), Kinetic properties of α-chymotrypsin in water-in-oil microemulsions: Studies with a variety of substrates and microemulsion systems. *Biochem. Biophys. Acta*, **832**, 204.
45. Fry, S.C., (1979), Phenolic components of the primary-cell wall and their possible role in the hormonal-regulation of growth, *Planta*, **146**, 343.

46. Φιλίππου Κ., Ζονμπανιώτη, Μ., Ξενάκης, Α., (2013), Ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης σε σύστημα συνεχούς ροής για τη σύνθεση προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, Ελληνική πατέντα, , OBI: 20130100305.
47. Gandhi, N.N., Mukherjee, K.D., (2000), Specificity of papaya lipase in esterification with respect to the chemical structure of substrates, *Agric Food Chem.*, **48**, 566.
48. Garti, N., (2003), Microemulsions as microreactors for food applications, *Curr. Opinion Colloid Interface Sci.*, **8**, 197.
49. Gatfield, I., (1995), Enzymatic and microbial generation of flavors, *Perfum. Flavor*, **20**, 5.
50. Gerhard J. and Kirschning A., (2003), Continuous Flow Techniques in Organic Synthesis, *Chem. Eur. J.*, **9**, 5708.
51. Gerhart E., (1992), Fixed-Bed Reactors in: “Principles of chemical reaction engineering and plant design”, Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry, Ed.: Elvers, B., VCH Publishers, **B4**, 199.
52. Gilles B., Yamazaki H., Armstrong D.W., (1987), Production of Flavor Esters by Immobilized Lipase, *Biotechnol. Lett.*, **9**, 709.
53. Giuliani S., Piana C., Setti L., Hochkoeppler A., Pifferi P.G., Williamson G., Faulds, C.B, (2001), Synthesis of pentylerferulate by a feruloyl esterase from *Aspergillus niger* using water-in-oil microemulsions, *Biotechnology Letters*, **23**, 325.
54. Grandi, C., Smith, R.E., Luisi, P.L., (1981), Micellar solubilization of biopolymers in organic solvents. Activity and conformation of lysozymes in isoctane reverse micelles, *J. Biol. Chem.*, **256**, 837.

55. Guo, J.H., Skinner, G.W., Harcum, W.W., & Barnum, P.E. (1998), Pharmaceutical application of naturally occurring water soluble polymers. *PSTT*, **1**, 254.
56. Haering, G., Luisi, P.L., (1986), Hydrocarbon gels from water-in-oil microemulsions, *J. Phys. Chem.*, **90**, 5892.
57. Halling P., Kvittingen L., (1999), Why did biocatalysis in organic media not take off in the 1930s?, *Trends in Biotechnology*, **17**, 343.
58. Han, D., Rhee, J.S., (1986), Characteristics of lipase-catalyzed hydrolysis of olive oil in AOT–isooctane reversed micelles, *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 1250.
59. Han, D., Rhee, J.S., Lee, S.B., (1987), Lipase reaction in AOT–isooctane reversed micelles: Effect of water on equilibria, *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 381.
60. Hedström, G., Backlund, S., Eriksson, F., (1997), Stereoselectivity and competing reactions as studied by lipase catalyzed esterifications in aqueous lecithin-based gelatin gels, *Colloid Polym. Sci.*, **275**, 146.
61. Honoré, E., Barhanin, J., Attali, B., Lesage, F., Lazdunski, M., (1994), External blockade of the major cardiac delayed-rectifier K⁺ channel (Kv1.5) by polyunsaturated fatty acids, *Proc Natl Acad Sci USA*, **91**, 1937.
62. Herbaut, C., (2006), Omega-3 and health (in French), *Rev Med Brux*, **27**, 355.
63. International Agency for Research on Cancer (IARC), (1983), Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans (Vol. 31) World Health Organization.
64. Ichikawa, S., Sugiura, S., Nakajima, M., Sano, Y., Minoru Seki, M., Furusaki, S., (2000), Formation of biocompatible reversed micellar systems using phospholipids, *Biochem. Engin. J.*, **6**, 193.

65. Itabaiana Jr. I. de Mariz e Miranda L.S., de Souza R.O.M.A., (2013), Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **85 - 86**, 1
66. Jain, N., Kumar A., Chauhan S., Chauhan S.M.S., (2005), Chemical and biochemical transformations in ionic liquids, *Tetrahedron*, **61**, 1015.
67. Jas, G., Kirschning, A., (2003), Continuous Flow Techniques in Organic Synthesis, *Chem. Eur. J.*, **9**, 5708
68. Jenta, T.R.J., Batts, G., Rees, G.D., Robinson, B.H., (1997 α), Kinetic studies of Chromobacterium viscosum lipase in AOT water in oil microemulsions and gelatin microemulsion-based organogels, *Biotechnol. Bioeng.*, **54**, 416.
69. Jenta, T.R.J., Batts, G., Rees, G.D., Robinson, B.H., (1997 β), Biocatalysis using gelatin microemulsionbased organogels containing immobilized Chromobacterium viscosum lipase, *Biotechnol. Bioeng.*, **53**, 121.
70. John, G., Zhu, G., Li J., Dordick, J.S., (2006), Enzymatically derived sugar-containing self-assembled organogels with nanostructured morphologies. *Angew Chem. Int. Ed.*, **45**, 4772.
71. Kahlweit, M., Busse, G., Faulhaber, B., (1995 α), Preparing microemulsions with lecithins, *Langmuir*, **11**, 1576.
72. Kahlweit, M., Busse, G., Faulhaber, B., Eibl, H. (1995 β), Preparing nontoxic microemulsions, *Langmuir* **11**, 4185.
73. Karra-Chaabouni, M., Pulvin, S., Touraud, D., Thomas, D., (1996), Enzymatic synthesis of geraniol esters in a solvent-free system by lipases, *Biotechnol Lett.* **18**, 1083.

74. Katsoura, M.H., Polydera, A.C., Tsironis, L., Tselepis, A.D., Stamatis, H., (2006), Use of ionic liquids as media for the biocatalytic preparation of flavonoid derivatives with antioxidant potency, *J. Biotechnol.*, **123**, 491.
75. Khmelnitsky, Y.L., Hilhorst, R., Veeger, C., (1988), Detergentless microemulsions as media for enzymatic reactions – cholesterol oxidation catalyzed by cholesterol oxidase, *Eur. J. Biochem.*, **176**, 265.
76. Kirk O., Torben Vedel Borchert, Claus Crone Fuglsang, (2002), Industrial enzyme applications, *Current Opinion in Biotechnology*, **13**, 345.
77. Klibanov, A.M., (2001), Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature*, **409**, 241.
78. Kragl, U., Kruse, W., Hummel, W., Wandrey, C., (1996), Enzyme engineering aspects of biocatalysis: Cofactor regeneration as example, *Biotechnology and Bioengineering*, **52**, 309.
79. Κυπαρισσίδης Κων/νος, (2008), Σχεδιασμός αντιδραστήρων τομος I
80. Landmark, K., Alm, C.S., (2006), Alpha-linolenic acid, cardiovascular disease and sudden death (in Norwegian), *Tidsskr. Nor. Laegeforen.* **126**, 2792.
81. Langrand, G., Triantaphylides, C., Baratti, J., (1988) Lipase catalyzed formation of flavour esters, *Biotechnol. Lett.*, **10**, 549.
82. Lara, J., Avedikian, L., Perron, G., Desnoyers, J.E., (1981), Microheterogeneity in aqueous-organic mixtures: thermodynamic transfer functions for benzene from water to 2-propanol aqueous systems at 25 °C, *J. Sol. Chem.*, **10**, 301.
83. Larsson K. M., Adlercreutz, P., Mattiasson B., (1990), Enzymatic catalysis in microemulsions: Enzyme reuse and product Recovery, *Biotechnology and Bioengineering*, **36**, 135.

84. Liese, A., Seelbach, K., Wandrey C., (2000), Review: Industrial Biotransformations, Wiley VCH.
85. Liu, L., Hudgins, W.R., Shack, S., Yin, M.Q., Samid, D., (1995), Cinnamic acid: a natural product with potential use in cancer intervention, *Int. J. Cancer*, **62**, 345.
86. Luisi, P.L., Bonner, F.J., Pellegrini, A., Wiget, P., Wolf, R., (1979), Micellar solubilization of proteins in aprotic solvents and their spectroscopic characterization, *Helv. Chim. Acta*, **62**, 740.
87. Luisi, P.L., Giomini, M., Pileni, M.P., Robinson, B.H., (1988), Reverse micelles as hosts for proteins and small molecules, *Biochim. Biophys. Acta*, **947**, 9.
88. Luisi, P.L., Laane, C., (1986), Solubilization of enzymes in apolar solvents via reverse micelles, *Trends Biotechnol.*, **4**, 153.
89. Luisi, P.L., Magid, L., (1986), Solubilization of enzymes and nucleic acids in hydrocarbon micellar solutions, *CRC Crit. Rev. Biochem.*, **20**, 409.
90. Lüthi, P., Luisi, P.L., (1984), Enzymatic synthesis of hydrocarbon-soluble peptides with reverse micelles, *J. Am. Chem. Soc.*, **106**, 7285.
91. Madeira Lau R., Van Rantwijk F., Seddon K.R., Sheldon R.A., (2000), Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids, *Organic Letters*, **2**, 4189.
92. Malcolmson, C., Lawrence, M.J., (1995), Three-component non-ionic oil-in-water microemulsions using polyethylene ether surfactants. *Colloids Surf. B: Biointerfaces*, **4**, 97.
93. Marangoni, A.G., (1993), Effects of the interaction of porcine pancreatic lipase with AOT/isooctane reversed micelles on enzyme structure and function follow predictable patterns, *Enzyme Microb. Technol.*, **15**, 944.

94. Martinek, K., Klyachko, N.L., Kabanov, A.V., Khmelnitsky, Y.L., Levashov, A.V., (1989). Micellar enzymology: Its relation to membranology, *Biochim. Biophys. Acta*, **981**, 161.
95. Martinek, K., Levashov, A.V., Klyachko, N.L., Khmelnitsky, Y.L., Berezin, I.V. (1986), Micellar enzymology, *Eur. J. Biochem.*, **155**, 453.
96. Matzke, S.F., Creagh, A.L., Haynes, C.A., Blanch, H.W., Prausnitz, J.M., (1992), Mechanisms of protein solubilization in reverse micelles, *Biotechnol. Bioeng.*, **40**, 91.
97. Mc Murry John, (1999), Οργανική Χημεία, τόμος ΙΙ, Ηράκλειο
98. Meher, L.C., Vidya Sagar, D., Nail, S.N., (2006), Technical aspects of biodiesel production by transesterification - a review, *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **10**, 248.
99. Mitra, R.N., Dasgupta, A., Das, D., Roy, S., Debnath, S., Das, P.K., (2005), Geometric constraints at the surfactant headgroup: Effect on lipase activity in cationic reverse micelles, *Langmuir* , **21**, 12115.
100. Nagayama K, Karaiwa K, Doi T., (1998), Esterification activity and stability of *Candida rugosa* lipase in AOT microemulsion-based organogels, *Biochem. Eng. J.*, **2**, 121.
101. Nascimento, M.G., Rezende, M.C., Vecchia, R.D., (1992), Enzyme-catalyzed esterifications in microemulsion-based organo gels, *Tetrahedron. Lett.*, **33**, 5891.
102. Nie K., Xie F., Wang F., Tan T., (2006), Lipase catalyzed methanolysis to produce biodiesel: Optimization of the biodiesel production, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **43**, 142.

103. Nikolova P., Ward O.P., (1993), Whole - cell Biocatalysis in non conventional media, *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, **12**, 76.
104. Olsen, T., Kerton, F., Marriott, R., Grogan, G., (2006), Biocatalytic esterification of lavandulol in supercritical carbon dioxide using acetic acid as the acyl donor, *Enzyme and microbial technology* **39**, 621.
105. Omota, F., Dimian, A.C., Bliek, A., (2003), Fatty acid esterification by reactive distillation. Part 1: equilibrium-based design, *Chemical Engineering Science*, **5**, 3159.
106. Orlich, B., Schomacker, R., (2002), Enzyme catalysis in reverse micelle, in: Advances in Biochemical Engineering/ Biotechnology, Ed. Scheper. T., Berlin Heidelberg, **75**, 185,
107. Palomo, J.M., Fuentes, M., Fernandez-Lorente, G., Mateo, C., Guisan, J.M., Fernandez-Lafuente, R., (2003), General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality, *Biomacromolecules*, **4**, 1.
108. Papadimitriou, V., Pispas, S., Syriou, S., Pournara, A., Zoumpanioti, M., Sotiroudis, T.G., Xenakis, A., (2008), Biocompatible microemulsions based on limonene: Formulation, structure and applications, *Langmuir*, **24**, 3380.
109. Papadimitriou, V., Sotiroudis, T.G., Xenakis, A., (2005). Olive oil microemulsions as a biomimetic medium for enzymatic studies. Oxidation of oleuropein, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **82**, 1.
110. Papadimitriou, V., Sotiroudis, T.G., Xenakis, A., (2007), Olive oil microemulsions: Enzymatic activities and structural characteristics, *Langmuir*, **23**, 2071.
111. Pastou, A., Stamatis, H., Xenakis, A., (2000), Microemulsion-based organogels containing lipase: Application in the synthesis of esters, *Progress in Colloid and Polymer Science*, **115**, 192.

112. Paul, B.K., Moulik, S.P., (2001), Uses and applications of microemulsions, *Current Science*, **80**, 990.
113. Pavlenko, I.M., Kuptsova, O.S., Klyachko, N.L., Levashov, A.V., (2002), The lipase / lipoxygenase bienzyme system in AOT reversed micelles in octane, *Russ. J. Bioorg. Chem.*, **28**, 44.
114. Petit, C., Zemp, T., Pilani, M.P., (1991), Structural study of microemulsion-based gels at thesaturation point, *Langmuir*, **7**, 223.
115. Podlogar, F., Gasperlin, M., Tomsic, M., Jamnik, A., Rogac, M.B., (2004). Structural characterization of water–Tween 40/Imwitor 308–isopropyl myristate microemulsions using different experimental methods. *Int. J. Pharm.*, **276**, 115.
116. Prajapati, V.D., Maheriya P.M., Jani G.K., Solanki H.K., (2014), Carrageenan: A natural seaweed polysaccharide and its applications, *Carbohydrate Polymers*, **105**, 97.
117. Priya, K., Chada, A., (2003), Synthesis of hydrocinnamic esters by *Pseudomonas cepacia* lipase, *Enzyme Microb. Technol.*, **32**, 485.
118. Puig, J.E., Hemker, D.L., Gupta, A., Davis, H.T., Scriven, L.E., (1987), Interfacial tensions and phase behavior of alcohol–hydrocarbon–water–sodium chloride systems, *J. Phys. Chem.*, **91**, 1137.
119. Queiroz, N., Nascimento, M.D., (1999), Organo-gel de heptano: Diagrama de fases e aplicações sintéticas, *Quim Nova*, **22**, 335.
120. Quellet, C., Eicke, H.F., (1986), Mutual gelation of gelatin and water-in-oil microemulsions, *Chimia*, **40**, 233.
121. Quellet C., Eicke H.F, Sager W., (1991), Formation of microemulsion-based gelatin gels, *J. Phys. Chem.*, **95**, 5642.

122. Rao N.N., Lótz S., Wórges K., Minör D., (2009), Continuous biocatalytic processes, *Organic Process Research & Development*, **13**, 607.
123. Rees, G.D., Nascimento, M.G., Jenta, T.R.J., Robinson, B.H., (1991), Reverse enzyme-synthesis in microemulsion-based organo-gels, *Biochim. Biophys. Acta.*, **1073**, 493.
124. Rees, G.D. and Robinson, B.H., (1995), Esterification reactions catalyzed by *Chromobacterium viscosum* lipase in CTAB-based microemulsion systems, *Biotechnol. Bioeng.*, **45**, 344.
125. Rees, G.D., Robinson, B.H., Stephenson, G.R., (1995), Preparative-scale kinetic resolutions catalyzed by microbial lipases immobilized in AOT-stabilized microemulsion-based organo-gels: Cryoenzymology as a tool for improving enantioselectivity, *Biochim. Biophys. Acta*, **1259**, 73.
126. Reiffel, J.A., McDonald, A., (2006), Antiarrhythmic effects of omega-3 fatty acids, *Am. J. Cardiol.*, **98**, 50i.
127. Reis, P., Witula, T., Holmberg, K., (2008), Mesoporous materials as host for an entrapped enzyme, *Microporous and Mesoporous Materials*, **110**, 355.
128. Rosevear, A., (1984), Immobilised biocatalysts - a critical review, *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* , **34**, 127.
129. Royon D., Daz M., Ellenrieder G., Locatelli, (2007), Enzymatic production of biodiesel from cotton seed oil using t-butanol as a solvent, *Bioresource Technology*, **98**, 648.
130. Šabeder, S., Habulin M., Željko [K.](#), (2006), Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters, *J Food Engineer*, **77**, 880.

131. Salter, G.J., Kelt, D.B., (1995), Solvent Selection for Whole Cell biotransformations in Organic Media, *Critical Reviews in Biotechnology*, **15**, 139.
132. Schneider, R.C.S., Lara, L.R.S., Bitencourt, T.B., Nascimento, M.G., Nunes, M.R.S., (2009), Chemo-Enzymatic Epoxidation of Sunflower Oil Methyl Esters, *J. Braz. Chem. Soc.* **2**, 1473.
133. Schuleit, M., Luisi, P.L., (2001), Enzyme immobilization in silica-hardened organogels, *Biotechnol. Bioeng.* **72**, 249.
134. Schuler, P., (1990), In: “Food antioxidants”, Elsevier Publishers, London, 113.
135. Selby, H.H., Whistler, R.L., (1993), Polysaccharides and their derivatives, in: “Industrial gums”, Ed. Whistler, R.L., BeMiller, J.N., Academic Press, USA.
136. Serralheiro, M.L.M., Prazeres, D.M.F., Cabral, J.M.S., (1994), Dipeptide synthesis and separation in a reversed micellar membrane reactor, *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 1064.
137. Serralheiro, M.L.M., Prazeres, D.M.F., Cabral, J.M.S., (1999), Continuous production and simultaneous precipitation of a dipeptide in a reversed micellar membrane reactor, *Enzyme Microb. Technol.*, **24**, 507.
138. Serri, N.A., Kamaruddin, A.H., Long, W.S., (2006), Studies of reaction parameters on synthesis of citronellyl laurate easter via immobilized Candila rugosa lipase in organic media, *Bioprocess Biosyst Eng*, **29**, 253.
139. Shahidi, F., Janitha, P.K., Wanasundara, P.D., (1992), Phenolic antioxidants, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*, **32**, 67.
140. Sharma, R., Chisti, Y., Banerjee, U.C., (2001), Production, purification, characterization and applications of lipases, *Biotechnol Adv*, **19** 627.

141. Shevachman, M., Shani, A., Garti, N., (2004), Formation and investigation of microemulsions based on jojoba oil and nonionic surfactants, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **81**, 1143.
142. Shinoda, K., Araki, M., Sadaghiani, A., Khan, A., Lindman, B., (1991), Lecithin-based microemulsions: Phase behavior and microstructure, *J. Phys. Chem.*, **95**, 989.
143. Shinoda, K., Kaneko, T.J., (1988), Characteristic properties of lecithin as a surfactant, *J. Dispers. Sci. Technol.*, **9**, 555.
144. Shuler L.M., Kargi F., (2005), Συστήματα ακινητοποιημένων ενζύμων In: Μηχανική Βιοδιεργασιών, βασικές έννοιες, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Ε.Μ.Π, Αθήνα, 102 - 106,
145. Smith, G.D., Donelan, C.E., Barden, R.E., (1977), Oil-continuous microemulsions composed of hexane, water and 2-propanol, *J. Colloid Interface Sci.*, **60**, 488.
146. Soni, K, Madamwar D., (2001), Ester synthesis by lipase immobilized on silica and microemulsion based organogels (MBGs), *Process. Biochem.*, **36**, 607.
147. Stamatis, H., Sereti, V., Kolisis, F.N., (2001), Enzymatic synthesis of hydrophilic and hydrophobic derivatives of natural phenolic acids in organic media, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **11**, 323.
148. Stamatis, H., Xenakis, A., (1999), Biocatalysis using microemulsion-based polymer gels containing lipase, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **6**, 399.
149. Stamatis, H., Xenakis, A., Kolisis F.N., (1993 α), Enantiomeric specificity of a lipase from *Penicillium simplicissimum* in the esterification of menthol in microemulsions, *Biotechnol. Lett.* **15**, 471.

150. Stamatis, H., Xenakis, A., Menge, U., Kolisis, F.N., (1993 β), Kinetic study of lipase catalyzed esterification reactions in microemulsions, *Biotechnol. Bioeng.* **42**, 931.
151. Stamatis, H., Xenakis, A., Provelegiou, M., Kolisis, F.N., (1993 γ), Esterification reactions catalyzed by lipases in microemulsions. The role of enzyme localization in relation to its selectivity. *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 103.
152. Stamatis, H., Xenakis, A., Dimitriadis, E., Kolisis, F.N., (1995 α), Catalytic behavior of *Pseudomonas cepacia* lipase in w/o microemulsions, *Biotechnol. Bioeng.* **45**, 33.
153. Stamatis, H., Xenakis, A., Kolisis, F.N., (1995 β), Studies on enzyme reuse and product recovery in lipase-catalyzed reactions in microemulsions, *An. NY Acad. Sci.*, **750**, 237.
154. Stamatis, H., Sereti, V., Kolisis, F.N., (1999 α), Studies on the enzymatic synthesis of lipophilic derivatives of natural antioxidants, *J. Am. Oil Chem. Soc.*, **76**, 1505.
155. Stamatis, H., Xenakis, A., Kolisis, F.N., (1999 β), Bioorganic reactions in microemulsions: The case of lipases, *Biotechnol. Adv.*, **17**, 293.
156. Σταμάτης Χαράλαμπος, (2006), Στοιχεία ενζυμικής βιοτεχνολογίας και παραγωγής βιοτεχνολογικών προϊόντων, Εκδόσεις πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
157. Σταμάτης Χαράλαμπος και Καλογερής Μανόλης, (2006), Στοιχεία ενζυμικής και μικροβιακής τεχνολογίας, Εκδόσεις πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
158. Sugiura, S., Ichikawa, S., Sano, Y., Nakajima, M., Liu, X.Q., Seki, M., Furusaki, S., (2001), Formation and characterization of reversed micelles composed of phospholipids and fatty acids., *J. Colloid. Interface Sci.*, **240**, 566.

159. Tawata, S., Taira, S., Kobamoto, N., Zhu, J., Ishihara, M., Toyama, S., (1996), Synthesis and antifungal activity of cinnamic acid esters, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **60**, 909.
160. The Gold Book, (1997), 2nd, IUPAC Compendium of Chemical Terminology, International Union of Pure and Applied Chemistry.
161. Topakas, E., Stamatis, H., Biely, P., Kekos, D., Macris, B.J., Christakopoulos, P., (2003), Purification and characterization of a feruloyl esterase from *Fusarium oxysporum* catalyzing esterification of phenolic acids in ternary water-organic solvent mixtures, *J. Biotechnol.*, **102**, 33
162. Tsai, S.W., Lee, K.P., Chiang, C.L., (1995), Surfactant effects on lipase catalyzed hydrolysis of olive oil in AOT/isoctane reverse micelles, *Biocatal. Biotrans.*, **13**, 89.
163. Turner, N.A., Vulfson, E.N., (2000), At what temperature can enzymes maintain their catalytic activity? *Enzyme Microb. Technol.*, **27**, 108.
164. Ueda, M., Tanaka, A., (2000), Cell surface engineering of yeast: Construction of arming yeast with biocatalyst, *Journal of Bioscience and Bioengineering*, **90**, 125.
165. Valivety, R.H., Johnston, G.A., Suckling, C.J., Halling, P.J., (1991), Solvent effects on biocatalysis in organic systems: Equilibrium position and rates of lipase esterification, *Biotechnol. Bioeng.*, **38**, 1137.
166. Verger, R. (1980) Enzyme kinetics of lipolysis. In: “Methods in Enzymology” Ed. Colowick S.P., Kaplan N.O., New York: Academic Press., **64B**, 340.
167. Villeneuve, P., Muderhwa, J.M., Graille J., Haas, M.J., (2000), Customizing lipases for biocatalysis: a survey of chemical, physical and molecular biological approaches, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **9**, 113.

168. Wandrey, C., Liese, A., Kihumbu, D., (2000), Industrial Biocatalysis: Past, Present, and Future, *Organic Process Research & Development*, **4**, 286.
169. Warisnoicharoen, W., Lansley, A.B., Lawrence, M.J., (2000), Nonionic oil-in-water microemulsions: The effect of oil type on phase behavior, *Int. J. Pharm.*, **198**, 7.
170. Watanabe, Y., Shimada, Y., Sugihara, A., Tominaga, Y., (2001), Enzymatic conversion of waste edible oil to biodiesel fuel in a fixed-bed bioreactor, *JAACS*, **78**, 703.
171. Watson, D.B., (2008), Public health and carrageenan regulation: A review and analysis, *Journal of Applied Phycology*, **20(5)**, 505.
172. Weitkamp, P., Vosmann, K., Weber, N., (2006), Highly efficient preparation of lipophilic hydroxycinnamates by solvent-free lipase-catalyzed transesterification, *J. Agric. Food Chem.*, **54**, 7062.
173. Welsh, W. W., Murray, W. D., Williams, R. E., (1989), Microbiological and Enzymatic Production of Flavor and Fragrance Chemicals, *Crit. Rev. Biotechnol.*, **9**, 105.
174. Widjaja, A., Yeh, T.H., Ju, Y.H., (2008), Enzymatic synthesis of caffeic acid phenethyl ester, *J. Chinese Inst. Chem. Eng.*, **39**, 413.
175. Xenakis, A., Papadimitriou, V., Stamatis, H., Kolisis, F.N., (2009), Biocatalysis in microemulsions, in: “Microemulsions: properties and applications”, *Surfactant Sci. Ser.*, Ed. Fanun. M., CRC Press, Jerusalem, Israel, **144**, 349.
176. Xenakis, A., Stamatis, H., (1999), Lipase immobilization on microemulsion-based polymer gels, *Prog. Colloid Polym. Sci.*, **112**, 132.
177. You, P., Sua, E., Yangb, X., Maob, D., Wei, D., (2011), Carica papaya lipase-catalyzed synthesis of terpene esters, *J. Mol. Catal. B: Enzym.*, **71**, 152.

178. Zhao, H., (2010), Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids - a review, *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, **85**, 891.
179. Zhao, H., Baker, G.A., Song, Z., Olubajo, O., Zanders, L., Campbell S.M., (2009), Effect of ionic liquid properties on lipase stabilization under microwave irradiation, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **57**, 149.
180. Zhou, G.W., Li, G.Z., Xu, J., Sheng, Q., (2001), Kinetic studies of lipase-catalyzed esterification in water-in-oil microemulsions and the catalytic behavior of immobilized lipase in MBGs. *Colloids Surf. A: Physicochem. Eng. Asp.*, **194**, 41.
181. Zoumpanioti, M., Karali, M., Xenakis, A., Stamati, H., (2006), Lipase biocatalytic processes in surfactant free microemulsions-like ternary systems and related organogels, *Enz. Microb. Technol.*, **39**, 531.
182. Zoumpanioti, M., Karavas, E., Skopelitis, C., Stamatis, H., Xenakis, A., (2004), Lecithin organogels as model carriers of pharmaceuticals, *Progress in Colloid and Polymer Science*, **123**, 199.
183. Zoumpanioti, M., Merianou, E., Karandreas, T., Stamatis, H., Xenakis, A., (2010α), Esterification of phenolic acids catalyzed by lipases immobilized in organogels, *Biotechnol. Lett.*, **32**, 1457.
184. Zoumpanioti M , Stamatis H , Xenakis A (2010β) Microemulsion-based organogels as matrices for lipase immobilization, *Biotechnology Advances*, **28**: 395.
185. Zoumpanioti, M., Parmaklis, P., de Maria D.P., Stamatis, H., Sinisterra, J.V., Xenakis, A., (2008), Esterification reactions catalyzed by lipases immobilized in organogels, Effect of temperature and substrate diffusion, *Biotechnol. Lett.*, **30**, 1627.

Παράρτημα

6.1 Πατέντα (OBI: 20130100305)

Καταθέτες: Φιλίππου Κωνσταντίνα, Ζουμπανιώτη Μαρία, Ξενάκης Άρης

Ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης σε σύστημα συνεχούς ροής για τη σύνθεση προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας

Εισαγωγή

Η παρούσα εφεύρεση αφορά στην κατασκευή ενός συστήματος συνεχούς ροής που στοχεύει στη σύνθεση προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας με ενδιαφέρον για τη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών. Ο προτεινόμενος αντιδραστήρας αποτελείται από μία ή περισσότερες στήλες που πληρώνονται με βιοκαταλύτη και από τις οποίες διέρχεται με τη βοήθεια αντλίας το διάλυμα αντίδρασης. Ο βιοκαταλύτης αποτελείται από πήκτωμα βιοπολυμερούς που περιέχει μικρογαλάκτωμα και στο οποίο έχει εγκλωβιστεί ένζυμο.

Πεδίο εφεύρεσης

Η παρούσα εφεύρεση συνδέεται με την ενζυμική σύνθεση οργανικών ενώσεων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τη βιομηχανία ως κύρια συστατικά αλλά και ως προσθετικά στα προϊόντα της. Αφορά κυρίως στη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών. Πιο συγκεκριμένα, η παρούσα εφεύρεση είναι ένα σύστημα που αποτελείται από μία ή περισσότερες στήλες με υλικό πλήρωσης τον βιοκαταλύτη, που συνδέονται με αντλία η οποία διασφαλίζει τη συνεχή ροή του διαλύματος αντίδρασης. Κατά την ροή του μέσα από την/τις στήλη/ες επιτρέπει την επαφή των αντιδρώντων με το βιοκαταλύτη και κατά συνέπεια την βιομετατροπή τους.

Υπόβαθρο της εφεύρεσης

Η βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών έχει εκδηλώσει εδώ και χρόνια το ενδιαφέρον της για τη χρήση συστατικών που δίνουν υψηλή προστιθέμενη αξία στα προϊόντα τους. Σαν παράδειγμα θα μπορούσαν να αναφερθούν τα φαινολικά οξέα τα οποία δρουν ως αντιοξειδωτικά πρόσθετα σε τρόφιμα, οι εστέρες σαικάρων οι οποίοι χρησιμοποιούνται ως μη ιοντικά επιφανειοενεργά σε τρόφιμα και προϊόντα προσωπικής υγιεινής και άλλα. Τέτοια συστατικά μπορούν (και είναι επιθυμητό) να έχουν φυσική προέλευση, ωστόσο, η μετατροπή τους σε διαφορετική μορφή είναι συνήθως απαραίτητη καθώς όταν βρίσκονται στη φυσική τους μορφή δεν είναι πάντα εφικτή η ενσωμάτωσή τους στα εκάστοτε προϊόντα. Η μετατροπή αυτή των συστατικών σε διαφορετική μορφή (π.χ. μετατροπή των περιορισμένης διαλυτότητας φαινολικών οξέων σε εστέρες τους οι οποίοι παρουσιάζουν αυξημένη διαλυτότητα) είναι συνήθως ακριβή και ενεργειοβόρος. Δύο από τα κύρια προβλήματα που καλούνται να επιλύσουν οι βιομηχανίες για να διευκολύνουν την παραγωγή των προϊόντων αυτών είναι η επιλογή βελτιωμένου καταλύτη και η απλούστευση και καλύτερη απόδοση των διεργασιών που ακολουθούνται.

Παραδοσιακά, για τη σύνθεση αυτών των ουσιών στη βιομηχανία χρησιμοποιούνται ως καταλύτες ανόργανα οξέα, αλκαλικοί καταλύτες, ισχυρά οξέα και βάσεις. Ωστόσο, η χρήση τέτοιου τύπου καταλυτών συνοδεύεται από υψηλή κατανάλωση ενέργειας λόγω της απαίτησης για υψηλές θερμοκρασίες και/ή υψηλές πιέσεις, ενώ οι διαδικασίες που ακολουθούνται συνήθως μεταβάλουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά των προϊόντων, οδηγούν σε χαμηλής ποιότητας προϊόντα, έχουν μικρές αποδόσεις, ενώ ευνοούν και την εμφάνιση πολλών παραπροϊόντων εμποδίζοντας την απομόνωση του επιθυμητού προϊόντος. Οι ακραίες συνθήκες που

απαιτούνται μπορούν επίσης να οδηγήσουν σε σοβαρή φθορά του χρησιμοποιούμενου εξοπλισμού.

Προς επίλυση αυτών των προβλημάτων, η χρήση των ενζύμων ως βιοκαταλυτών ελκύει όλο και περισσότερο το ενδιαφέρον, αφού η βιοκατάλυση αποτελεί μη ενεργειοβόρο και φιλική προς το περιβάλλον διεργασία η οποία σε αντίθεση με την παραδοσιακή μεταλλο- και οργανική κατάλυση στη χημική σύνθεση είναι διαδικασία με υψηλότερη απόδοση η οποία περιορίζει ή και εμποδίζει τελείως την εμφάνιση παραπροϊόντων και δίνει αποτελέσματα υψηλής ποιότητας.

Σε εργαστηριακή κλίμακα, η διαλείποντος έργου παραγωγή των παραπάνω αναφερόμενων συστατικών έχει ήδη επιτευχθεί ενζυμικά, με τη χρήση εμπορικά διαθέσιμων ακινητοποιημένων ενζύμων ή με ένζυμα εγκλωβισμένα σε μικρογαλακτώματα [Giuliani *et al.* 2001, Zoumpanioti *et al.* 2006]. Στην περίπτωση των μικρογαλακτώματων, τα ένζυμα βρίσκονται εγκλωβισμένα σε ένα μακροσκοπικά ομοιογενές σύστημα το οποίο αποτελείται από μια υδατική και μια ελαιώδη φάση οι οποίες σταθεροποιούνται από επιφανειοενεργό. Η παρουσία ωστόσο, του επιφανειοενεργού είναι και το μειονέκτημα αυτών των συστημάτων αφού καθιστά την απομόνωση των προϊόντων δύσκολη και δαπανηρή. Για το λόγο αυτό, η χρήση των ακινητοποιημένων ενζύμων για τέτοιου είδους μετατροπές κερδίζει συνεχώς έδαφος [Schneider *et al.* 2009, Šabeder *et al.* 2006, Meher *et al.* 2006]. Η ακινητοποίηση του βιοκαταλύτη όχι μόνο διευκολύνει την απομόνωση του προϊόντος, αλλά και καθιστά ευκολότερη την πρόσβαση των αντιδρώντων στο καταλυτικό κέντρο του ενζύμου. Επιπλέον, η ακινητοποίηση των ενζύμων ενισχύει την αντίστασή τους στην αδρανοποίηση από διάφορους μετουσιωτές [Chebil *et al.* 2006]. Η χρήση, επομένως, ακινητοποιημένων ενζύμων προτείνεται ως λύση για ένα σημαντικό πρόβλημα της παραγωγής των συστατικών που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για πολλές βιομηχανίες.

Τα φαινολικά οξέα, φυσικά αντιοξειδωτικά, έχουν πολύ μικρή διαλυτότητα τόσο στο νερό όσο και στα έλαια με αποτέλεσμα μεγάλους περιορισμούς στη χρήση τους ως πρόσθετα σε πολλά μέσα. Η μετάτροπή τους μέσω της εστεροποίησης του καρβοξυλικού τους οξέος με μεσαίου και μεγάλου μήκους ανθρακικής αλυσίδας αλκοόλες προς μόρια πιο αμφίφιλου χαρακτήρα μπορεί να βελτιώσει τη διαλυτότητά τους σε λίπη και έλαια [Figueroa-Espinoza & Villeneuve 2005] διευρύνοντας τη χρήση τους ως αντιοξειδωτικά πρόσθετα τροφίμων αλλά και την εφαρμογή τους στην κοσμητολογία. Η μετάτροπή αυτή έχει ήδη επιτευχθεί ενζυμικά σε διάφορους οργανικούς διαλύτες [Priya & Chada 2003, Widjaja *et. al.* 2008], όπως και η απ' ευθείας μετάτροπή τους με αλειφατικές αλκοόλες καταλυόμενη από λιπάσες σε άνυδρους διαλύτες [Compton *et. al.* 2000, Stamatis *et. al.* 2001] ή ακόμα και σε συστήματα χωρίς διαλύτη [Stamatis *et. al.* 1999, Weitkamp *et. al.* 2006]. Σε όλες όμως αυτές τις περιπτώσεις τόσο η ταχύτητα των αντιδράσεων όσο και το ποσοστό μετατροπής ήταν εξαιρετικά χαμηλά. Η εστεροποίηση των φαινολικών οξέων σε μικρογαλακτώματα νερού-σε-έλαιο έχει επίσης επιτευχθεί με υψηλότερη απόδοση [Giuliani *et. al.* 2001], ωστόσο, η διαλυτότητα των φαινολικών οξέων στα συστήματα αυτά είναι πολύ περιορισμένη και η εφαρμογή τους στη βιομηχανία περιορίζεται σημαντικά από την παρουσία μεγάλων ποσοτήτων επιφανειοενεργών ουσιών. Σε εργαστηριακή κλίμακα, σε αντιδραστήρες διαλείποντος έργου, έχουν ήδη επιτευχθεί εστεροποιήσεις φαινολικών οξέων με υψηλές αποδόσεις που σε κάποιες περιπτώσεις έφτασαν και το 94% [Zoumpanioti *et. al.* 2010]. Στα συστήματα αυτά χρησιμοποιήθηκε λιπάση ακινητοποιημένη σε φυσικό πολυμερές, την υδρόξυ πρόπυλο μέθυλο κυτταρίνη, που όχι μόνο οδηγεί σε υψηλά ποσοστά μετατροπής

αλλά και διευκολύνει τον διαχωρισμό των προϊόντων, ενώ μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν υλικό πλήρωσης αντιδραστήρα συνεχούς ροής.

Το δεύτερο πρόβλημα που καλείται να αντιμετωπίσει η βιομηχανία, η τεχνική και οικονομική βελτίωση των διεργασιών που ακολουθούνται για να επιτευχθεί η μετατροπή των συστατικών, συνεπάγεται την απλούστευση και τη βελτιωμένη απόδοσή των διεργασιών η οποία ανάμεσα σε άλλα σχετίζεται και με την επιλογή του τύπου του αντιδραστήρα που θα χρησιμοποιηθεί. Έτσι, στις περισσότερες περιπτώσεις η χρήση του αντιδραστήρα συνεχούς ροής προτιμάται από τον αντιδραστήρα διαλείποντος έργου [Nie *et al.* 2006, Royon *et al.* 2007]. Γενικά, οι αντιδραστήρες συνεχούς ροής είναι οικονομικά πιο αποτελεσματικοί από τους συμβατικούς αντιδραστήρες διαλείποντος έργου και οδηγούν σε αντιδράσεις υψηλότερης απόδοσης [Watanabe *et al.* 2001]. Ιδιαίτερα στην περίπτωση των βιοαντιδραστήρων, σε έναν αντιδραστήρα διαλείποντος έργου τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται μπορούν εύκολα να υποστούν μετουσίωση ή αποδέσμευση από το φορέα ακινητοποίησης λόγω της διατμητικής τάσης που προκαλείται από τη χρήση μηχανικής ανάδευσης. Ένα ακόμα πλεονέκτημα των αντιδραστήρων συνεχούς ροής είναι ότι καθιστά εφικτή την βιομετατροπή συστατικών με χαμηλή διαλυτότητα (όπως είναι τα φαινολικά οξέα), αφού επιτρέπει τη χρήση μεγάλων όγκων διαλυμάτων χαμηλής περιεκτικότητας στο εν λόγω υπόστρωμα.

Πλεονεκτήματα της εφεύρεσης

Η παρούσα εφεύρεση σχετίζεται με την αντιμετώπιση και των δύο προβλημάτων που καλούνται να επιλύσουν οι βιομηχανίες για να διευκολύνουν την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας: η επιλογή βελτιωμένου καταλύτη και η απλούστευση και καλύτερη απόδοση των διεργασιών που ακολουθούνται. Προτείνει τη χρήση ενός αντιδραστήρα συνεχούς ροής ο οποίος πληρώνεται με βιοσυμβατό βιοκαταλύτη αποτελούμενο από ένζυμο ακινητοποιημένο σε φυσικό πολυμερές. Επομένως, προσφέρει τόσο τα πλεονεκτήματα ενός αντιδραστήρα συνεχούς ροής όπως η υψηλή απόδοση και η μετατροπή υποστρωμάτων χαμηλής διαλυτότητας, όσο και τα πλεονεκτήματα της βιοκατάλυσης όπως περιορισμένα παραπροϊόντα και ήπιες συνθήκες λειτουργίας, επομένως χαμηλό κόστος. Επίσης, ο βιοκαταλύτης που προτείνεται παρουσιάζει ένα ακόμα πλεονέκτημα. Αποτελείται από ένζυμο ακινητοποιημένο σε φορέα φυσικού πολυμερούς, επομένως είναι ένα σύστημα φιλικό προς το περιβάλλον και κυρίως βιοσυμβατό, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε διεργασίες που έχουν ως τελικό σκοπό την παραγωγή ουσιών που θα χρησιμοποιηθούν σε σκευάσματα όπως τρόφιμα, φάρμακα ή καλλυντικά.

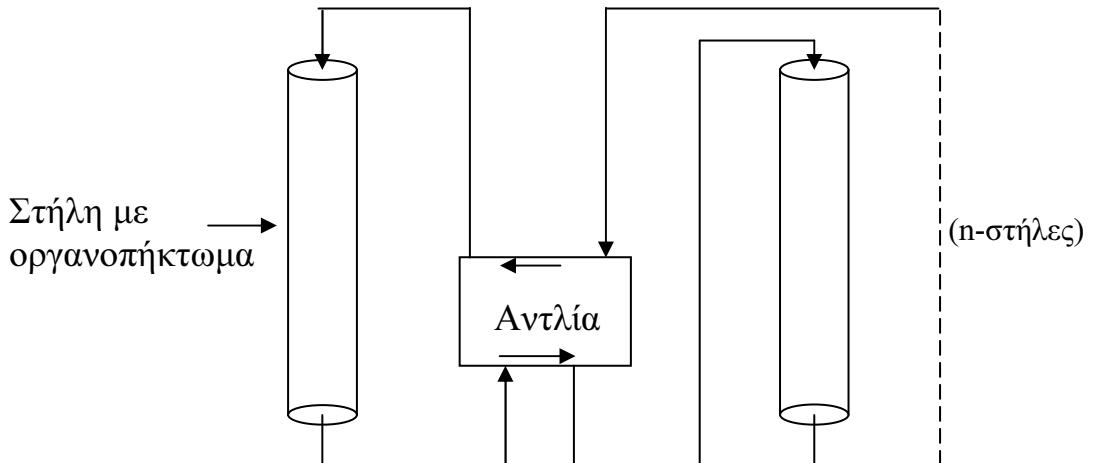
Συνοπτική περιγραφή της εφεύρεσης

Η εφεύρεση αποτελείται σε πρώτη βάση από στήλη γυάλινη ή μεταλλική. Η στήλη μπορεί να έχει και τα δύο άκρα της ελεύθερα για ένα μόνο πέρασμα του διαλύματος αντίδρασης. Μπορεί επίσης να έχει ελεύθερο το άνω άκρο αλλά το κάτω άκρο της να συνδέεται απ' ευθείας ή μέσω συνδέσμου με σωλήνα. Ο σωλήνας μπορεί να ενώνει το άνω με το κάτω άκρο απ' ευθείας ή μέσω αντλίας. Επίσης μπορεί να οδηγεί σε δεύτερη στήλη όμοια ή διαφορετική η οποία μπορεί επίσης να ακολουθεί οποιαδήποτε απ' τις προαναφερθείσες διατάξεις. Ο αριθμός των στηλών μπορεί να είναι μεγαλύτερος του δύο. Οι στήλες αυτές μπορεί να συνδέονται μέσω αντλίας ή και χωρίς τη μεσολάβηση αντλίας.

Η κάθε στήλη πληρώνεται με τον βιοκαταλύτη ο οποίος αποτελείται από πήκτωμα βασισμένο σε μικρογαλάκτωμα το οποίο περιέχει το ένζυμο. Το πήκτωμα αποτελείται από υδροξυ-προπυλ-μεθυλο κυτταρίνη ή άλλο παράγωγο της κυτταρίνης ή άλλο

φυσικό πολυμερές (π.χ. άγαρ, ζελατίνη, καραγενάνη). Το μικρογαλάκτωμα στο οποίο βασίζεται η παρασκευή του πηκτώματος αποτελείται από ισοοκτάνιο λεκιθίνη, μικρού μήκους αλκοόλη και υδατική φάση (νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα) η οποία περιέχει το ένζυμο (λιπάση ή άλλο ένζυμο).

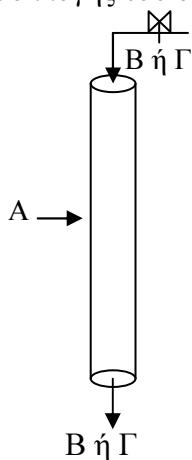
Το σχήμα 1 δείχνει μια παράσταση της διάταξης.



Τα βέλη δείχνουν τη φορά της ροής του διαλύματος αντίδρασης. Η ροή θα μπορούσε να είναι και αντίστροφη. Η συνδεσμολογία μπορεί να επεκταθεί για n αριθμό στηλών όπου $n \geq 1$.

Λεπτομερής περιγραφή της εφεύρεσης

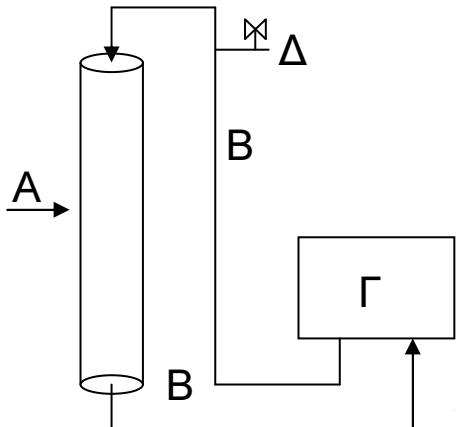
Αντιδραστήρας συνεχούς ροής μιας στήλης – ανοιχτό κύκλωμα: Στην περίπτωση αυτή η διάταξη αποτελείται από μία στήλη η οποία έχει τόσο το άνω όσο και το κάτω άκρο της ελεύθερα ή συνδεδεμένα το μεν άνω άκρο με σύστημα παροχής του διαλύματος αντίδρασης το δε κάτω άκρο με σύστημα συλλογής του διαλύματος αντίδρασης, ή αντίστροφα. Το διάλυμα αντίδρασης περνάει μόνο μια φορά από το εσωτερικό της στήλης για να έρθει σε επαφή με τον βιοκαταλύτη. Η διάταξη φαίνεται στο σχήμα 2, όπου A η στήλη, B το σύστημα παροχής διαλύματος αντίδρασης και Γ το σύστημα συλλογής του διαλύματος αντίδρασης.



Σχήμα 2. Ανοιχτό κύκλωμα μίας στήλης

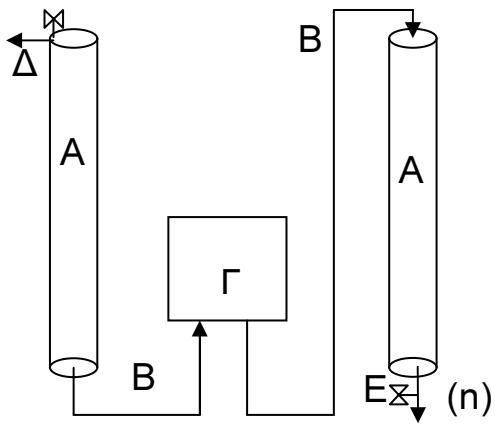
Αντιδραστήρας συνεχούς ροής μιας στήλης – κλειστό κύκλωμα: Στην περίπτωση αυτή η διάταξη αποτελείται από μια στήλη ένα άκρο της οποίας συνδέεται με το άλλο άκρο της με σωλήνα που περνάει από αντλία. Στο κλειστό κύκλωμα που δημιουργείται μπορεί να παρεμβάλλεται σύστημα παροχής του αρχικού διαλύματος αντίδρασης και δειγματοληψίας. Η διάταξη φαίνεται στο σχήμα 3, όπου A η στήλη με

το βιοκαταλύτη, Β σωληνώσεις, Γ αντλία και Δ σύστημα παροχής διαλύματος αντίδρασης και δειγματοληψίας.



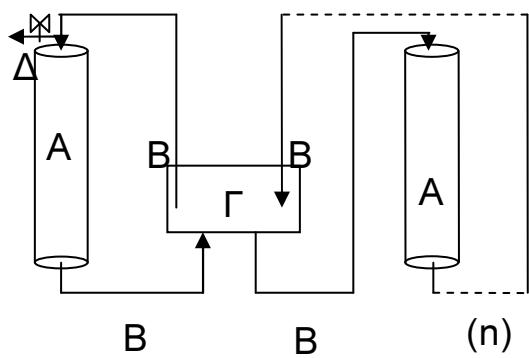
Σχήμα 3. Κλειστό κύκλωμα μίας στήλης.

Αντιδραστήρας συνεχούς ροής πολλαπλών στηλών – ανοιχτό κύκλωμα: στην περίπτωση αυτή η διάταξη αποτελείται από n στήλες, όπου $n \geq 2$, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με σωληνώσεις και μία ή περισσότερες αντλίες. Στην πρώτη στήλη το ελεύθερο άκρο συνδέεται με σύστημα διοχέτευσης του διαλύματος αντίδρασης και στην τελευταία στήλη το ελεύθερο άκρο συνδέεται με σύστημα παραλαβής του τελικού διαλύματος αντίδρασης. Η διάταξη φαίνεται στο σχήμα 4, όπου Α στήλη η οποία έχει πληρωθεί με τον βιοκαταλύτη, Β σωληνώσεις, Γ αντλία, Δ σύστημα παροχής του αρχικού διαλύματος αντίδρασης και Ε σύστημα συλλογής του τελικού διαλύματος αντίδρασης και δειγματοληψίας.



Σχήμα 4. Ανοιχτό κύκλωμα n στηλών

Αντιδραστήρας συνεχούς ροής πολλαπλών στηλών – κλειστό κύκλωμα: στην περίπτωση αυτή η διάταξη αποτελείται από n στήλες, όπου $n \geq 2$, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με σωληνώσεις και μία ή περισσότερες αντλίες. Το ελεύθερο άκρο της πρώτης στήλης συνδέεται με το ελεύθερο άκρο της τελευταίας στήλης, με ή χωρίς την παρεμβολή αντλίας. Στη διάταξη παρεμβάλλεται σύστημα διοχέτευσης του αρχικού διαλύματος αντίδρασης και λήψης του τελικού διαλύματος αντίδρασης. Η διάταξη φαίνεται στο σχήμα 5, όπου Α στήλη η οποία έχει πληρωθεί με τον βιοκαταλύτη, Β σωληνώσεις, Γ αντλία, Δ σύστημα παροχής του αρχικού διαλύματος αντίδρασης και συλλογής του τελικού διαλύματος αντίδρασης και δειγματοληψίας.



Σχήμα 5. Κλειστό κύκλωμα η στηλών.

Βιβλιογραφικές παραπομπές

- Chebil L. et al. (2006) *Process Biochemistry*, **41**, 2237-2251
 Giuliani S. et al. (2001) *Biotechnol Lett*, **23**, 325-330
 Meher LC. et al. (2006) *Renewable and Sustainable Energy Reviews* **10**, 248-268
 Nie K. et al. (2006) *J Mol Catal B: Enzymatic*, **43**, 142-147
 Royon D. et al. (2007) *Bioresour Technol*, **98**, 648-653
 Schneider RCS. et al. (2009) *J Braz Chem Soc*, **20**, 1473-1477
 Šabeder S. et al. (2006) *J Food Engineer*, **77**, 880-886
 Watanabe Y. et al. (2001) *JAOCs*, **78**, 7-11
 Zoumpanioti M. et al. (2006) *Enzyme Microb Technol*, **39**, 531-539

ΑΞΙΩΣΕΙΣ

1. Αντιδραστήρας συνεχούς ροής ως φορέας βιοκαταλύτη που αποτελείται από πήκτωμα βιοπολυμερούς και περιέχει μικρογαλάκτωμα στο οποίο έχει εγκλωβιστεί ένζυμο. Το σύστημα στοχεύει στην συνεχή σύνθεση προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας με ενδιαφέρον για τη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών.
2. Αντιδραστήρας συνεχούς ροής σύμφωνα με την αξίωση 1, που χαρακτηρίζεται από το ότι λειτουργεί σε ανοικτό κύκλωμα και αποτελείται από μία στήλη, η οποία έχει τόσο το άνω όσο και το κάτω άκρο της ελεύθερα ή συνδεδεμένα το μεν άνω άκρο με σύστημα παροχής του διαλύματος αντίδρασης το δε κάτω άκρο με σύστημα συλλογής του διαλύματος αντίδρασης, ή αντίστροφα. Το διάλυμα αντίδρασης περνάει μόνο μια φορά από το εσωτερικό της στήλης για να έρθει σε επαφή με τον βιοκαταλύτη.
3. Αντιδραστήρας συνεχούς ροής σύμφωνα με την αξίωση 1, που χαρακτηρίζεται από το ότι λειτουργεί σε κλειστό κύκλωμα και αποτελείται από μια στήλη ένα άκρο της οποίας συνδέεται με το άλλο άκρο της με σωλήνα που περνάει από αντλία. Στο κλειστό κύκλωμα που δημιουργείται μπορεί να παρεμβάλλεται σύστημα παροχής του αρχικού διαλύματος αντίδρασης και δειγματοληψίας.
4. Αντιδραστήρας συνεχούς ροής ανοικτού κυκλώματος σύμφωνα με την αξίωση 2, που χαρακτηρίζεται από το ότι αποτελείται από n στήλες, όπου $n \geq 2$, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με σωληνώσεις και μία ή περισσότερες αντλίες. Στην πρώτη στήλη το ελεύθερο άκρο συνδέεται με σύστημα διοχέτευσης του διαλύματος αντίδρασης και στην τελευταία στήλη το ελεύθερο άκρο συνδέεται με σύστημα παραλαβής του τελικού διαλύματος αντίδρασης.
5. Αντιδραστήρας συνεχούς ροής κλειστού κυκλώματος σύμφωνα με την αξίωση 3, που χαρακτηρίζεται από το ότι αποτελείται από n στήλες, όπου $n \geq 2$, οι οποίες συνδέονται μεταξύ τους με σωληνώσεις και μία ή περισσότερες αντλίες. Το ελεύθερο άκρο της πρώτης στήλης συνδέεται με το ελεύθερο άκρο της τελευταίας στήλης, με ή χωρίς την παρεμβολή αντλίας. Στη διάταξη παρεμβάλλεται σύστημα διοχέτευσης του αρχικού διαλύματος αντίδρασης και λήψης του τελικού διαλύματος αντίδρασης.
6. Μέθοδος παρασκευής προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας με ενδιαφέρον για τη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών, όπως ειδικότερα εστέρες λιπαρών οξέων, με χρήση αντιδραστήρων συνεχούς ροής όπως οι των αξιώσεων 2-5.
7. Μέθοδος παρασκευής προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας με ενδιαφέρον για τη βιομηχανία τροφίμων, φαρμάκων και καλλυντικών, όπως ειδικότερα εστέρες φαινολικών οξέων, με χρήση αντιδραστήρων συνεχούς ροής όπως οι των αξιώσεων 2-5.

8. Μέθοδος παρασκευής προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως οι των αξιώσεων 6-7, με χρήση αντιδραστήρων συνεχούς ροής όπως οι των αξιώσεων 2-5, που ειδικότερα φέρουν βιοκαταλύτη αποτελούμενο από λιπάση εγκλωβισμένη σε μικρογαλάκτωμα αποτελούμενο από μη πολικό διαλύτη, λεκιθίνη, μικρού μήκους αλκοόλη και υδατική φάση (νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα), το οποίο έχει μετατραπεί σε πήκτωμα με την προσθήκη υδροξυ-προπυλ-μεθυλο κυτταρίνης.
9. Μέθοδος παρασκευής προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως η της αξιώσεως 8, όπου η υδροξυ-προπυλ-μεθυλο κυτταρίνη έχει αντικατασταθεί με άγαρ, ή ζελατίνη, ή καραγενάνη.
10. Μέθοδος παρασκευής προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως οι των αξιώσεων 6-7, με χρήση αντιδραστήρων συνεχούς ροής όπως οι των αξιώσεων 2-5, που ειδικότερα φέρουν βιοκαταλύτη αποτελούμενο από λιπάση εγκλωβισμένη σε μικρογαλάκτωμα αποτελούμενο από μη πολικό διαλύτη, ΑΟΤ (2-οκτυλ-αιθυλ-σουλφοηλεκτρικό νάτριο) και υδατική φάση (νερό ή ρυθμιστικό διάλυμα), το οποίο έχει μετατραπεί σε πήκτωμα με την προσθήκη βιοπολυμερών όπως των αξιώσεων 8-9.

Claims

1. Continuous flow reactor packed with a biocatalyst consisting of a biopolymer gel which is based on an enzyme-containing microemulsion. The system aims in continuous synthesis of high added value products which is of interest to food, pharmaceutical and cosmetics industry.
2. Continuous flow reactor according to claim 1, which constitutes an open circuit consisting of a single column which may have both upper and lower ends free, or connected to a reaction solution injector and reaction solution collector. Reaction solution runs once through the column to get in contact with the biocatalyst.
3. Continuous flow reactor according to claim 1, which constitutes a closed circuit consisting of a single column which has its both ends connected via tubing through a pump. To this closed circuit a reaction solution injector and reaction solution collector may interfere.
4. Continuous flow reactor according to claim 2, which constitutes an open circuit, consisted of n columns, with $n \geq 2$, connected to each other via tubing and one or more pumps. The free end of the first column is connected to a reaction solution injector and the free end of the last column is connected to a reaction solution collector.
5. Continuous flow reactor according to claim 3, which constitutes a closed circuit, consisted of n columns, with $n \geq 2$, connected to each other via tubing and one or more pumps. The free end of the first column is connected to the free end of the last column with or without a pump. A reaction solution injector and a reaction solution collector are attached to the circuit.
6. A method to produce high added value products which interest food, pharmaceutical and cosmetics industry, especially fatty acid esters, by using continuous flow bioreactors as described in claims 2-5.
7. A method to produce high added value products which interest food, pharmaceutical and cosmetics industry, especially phenolic acid esters, by using continuous flow bioreactors as described in claims 2-5.
8. A method to produce high added value products as described in claims 6-7, using bioreactors as described in claims 2-5, which are packed with a biocatalyst consisting of lipase immobilized in a microemulsion which consists of a non polar solvent, lecithin, a short chain length alcohol and an aqueous phase (water or buffer), which has been gelled by the addition of hydroxyl-propyl-methyl cellulose.
9. A method to produce high added value products as described in claim 8, where hydroxyl-propyl-methyl cellulose is replaced by agar, or gelatin, or carrageenan.

10. A method to produce high added value products as described in claims 6-7, using bioreactors as described in claims 2-5, which are packed with a biocatalyst consisting of lipase immobilized in microemulsion which consists of a non polar solvent, AOT (sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate) and an aqueous phase (water or buffer), which has been gelled by the addition of biopolymers as described in claims 8-9.

Περίληψη

Ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης σε σύστημα συνεχούς ροής για τη σύνθεση προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας

Η εφεύρεση αφορά σε αντιδραστήρα συνεχούς ροής που περιέχει βιοκαταλύτη από ένζυμο ακινητοποιημένο σε φυσικό πολυμερές και χρησιμοποιείται για τη σύνθεση προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας.

Η εφεύρεση προσφέρει τα πλεονεκτήματα αντιδραστήρα συνεχούς ροής (υψηλή απόδοση και μετατροπή υποστρωμάτων χαμηλής διαλυτότητας) και τα πλεονεκτήματα της βιοκατάλυσης (περιορισμένα παραπροϊόντα, ήπιες συνθήκες λειτουργίας, χαμηλό κόστος). Ο βιοκαταλύτης αποτελείται από ένζυμο ακινητοποιημένο σε φορέα φυσικού πολυμερούς, είναι σύστημα φιλικό προς το περιβάλλον και βιοσυμβατό που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή ουσιών που προορίζονται για τρόφιμα, φάρμακα, καλλυντικά.

Η εφεύρεση αποτελείται είτε από μια στήλη που μπορεί να έχει τα δύο άκρα της ελεύθερα είτε από περισσότερες στήλες που μέσω σωληνώσεων ενώνονται με ή και χωρίς τη μεσολάβηση αντλίας. Η κάθε στήλη πληρώνεται με βιοκαταλύτη ο οποίος αποτελείται από πήκτωμα μικρογαλακτώματος που περιέχει ένζυμο. Το πήκτωμα αποτελείται από φυσικό πολυμερές (π.χ. παράγωγο κυτταρίνης, άγαρ, ζελατίνη, καραγενάνη). Το μικρογαλάκτωμα αποτελείται από άπολο διαλύτη, επιφανειοενεργό, μικρού μήκους αλκοόλη και υδατική φάση η οποία περιέχει το ένζυμο (λιπάση ή άλλο ένζυμο).

The patent concerns a continuous flow packed bed reactor packed with a biocatalyst consisted of enzyme immobilized on a natural polymer to be used for the synthesis of high added value products is usually costly.

This patent offers the advantages of a continuous flow reactor (high conversions and use of reactants of low solubility) and the advantages of the use of biocatalysts (low production of byproducts, low cost due to mild operation conditions). The biocatalyst is an enzyme immobilized on a natural polymer matrix; it is a system environmentally friendly and biocompatible which can be used in procedures dealing with food, cosmetics and pharmaceuticals.

This patent consists of either one column having both ends free, or many connected columns, with or without the use of pumps. Each column is packed with the biocatalyst consisted of a microemulsion-based gel that contains the enzyme. The gel is made of a natural polymer (e.g. cellulose derivatives, agar, gelatin or carrageenan). The microemulsion is consisted of a non polar solvent, surfactant, a short chain length alcohol and aqueous phase which contains the enzyme.

Abstract

Immobilized catalyst in a continuous flow system for the synthesis of high added value products

The patent concerns synthesis of high added value products is usually costly. The solution can be the use of enzyme as biocatalysts and the use of a continuous flow reactor which is economically more feasible than the conventional batch reactors.

This patent suggests the use of a continuous flow packed bed reactor, packed with a biocompatible biocatalyst consisted of enzyme immobilized on a natural polymer. It offers the advantages of a continuous flow reactor (high conversions and the use of reactants of low solubility) and the advantages of the use of biocatalysts (low production of byproducts, low cost due to mild operation conditions). The biocatalyst is an enzyme immobilized on a natural polymer matrix, therefore, is a system environmentally friendly and biocompatible which can be used in procedures dealing with food, cosmetics and pharmaceuticals.

This patent consists of a column which can have both its ends free or connected via tubing to more columns, with or without the use of pumps. Each column is packed with the biocatalyst which consists of a microemulsion-based gel that contains the enzyme. The gel is made of a natural polymer (e.g. cellulose derivatives, agar, gelatin or carrageenan). The microemulsion is consisted of a non polar solvent, surfactant, a short chain length alcohol and aqueous phase (water or buffer) which contains the enzyme.