



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

**ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ**



ΕΘΝΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΕΡΕΥΝΩΝ

ΙΝΣΤΙΤΟΥΤΟ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ, ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**Ετερόλογη έκφραση θερμοφίλης εστεράσης και μελέτη της
δράσης της σε υδατικά & μη υδατικά συστήματα**

Σοφία Ν. Δήμου

Επιβλέποντες: Δρ. Δ. Χατζηνικολάου, Αναπληρωτής καθηγητής (ΕΚΠΑ)
Δρ. Α. Ξενάκης, Ερευνητής Α (ΕΙΕ)
Δρ. Μ. Ζουμπανιώτη, Ειδικός Λειτουργικός Επιστήμονας Β'(ΕΙΕ)

ΑΘΗΝΑ

ΟΚΤΩΒΡΙΟΣ 2017

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Ετερόλογη έκφραση θερμόφιλης εστεράσης και μελέτη της δράσης της σε υδατικά & μη υδατικά συστήματα

Σοφία Ν. Δήμου

A.M.: 1113201200023

ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ: Δρ. Δ. Χατζηνικολάου, Αναπληρωτής καθηγητής (ΕΚΠΑ)
Δρ. Α. Ξενάκης, Ερευνητής Α (ΕΙΕ)
Δρ. Μ. Ζουμπανιώτη, Ειδικός Λειτουργικός Επιστήμονας Β'(ΕΙΕ)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν η μελέτη της δράσης της εστεράσης του θερμόφιλου βακτηριακού στελέχους *Geobacillus sp.* SP50 σε υδατικά και μη υδατικά συστήματα. Στα πρώτα μελετήθηκε η ικανότητα υδρόλυσης εστέρων, ενώ στα δεύτερα η κατάλυση αντιδράσεων εστεροποίησης και μετεστεροποίησης από το συγκεκριμένο ένζυμο.

Αρχικά, το γονίδιο του συγκεκριμένου στελέχους ενισχύθηκε με τη χρήση PCR και κλωνοποιήθηκε σε κύτταρα *E.coli* DH5α. Έπειτα η ανασυνδυασμένη EstGsT1 εστεράση απομονώθηκε από επιδεκτικά κύτταρα *E.coli* BL21. Η παραγωγή της πραγματοποιήθηκε σε υγρές βακτηριακές καλλιέργειες με την προσθήκη IPTG, ως επαγωγέα της έκφρασης. Ο καθαρισμός της πρωτεΐνης έγινε σε στήλη Χρωματογραφίας Συγγένειας Ακίνητοποιημένου Μετάλλου (IMAC), με ρητίνη ακίνητοποιημένων ιόντων νικελίου. Το μοριακό της βάρος προσδιορίστηκε μέσω ηλεκτροφόρησης πηκτής πολυακρυλαμίδιου (SDS-PAGE) στα 28 kDa.

Ακολούθησε προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης και της ενεργότητας της εστεράσης τόσο αμέσως μετά τον καθαρισμό όσο και μετά τις διαδικασίες της διαπίδωσης και της υπερδιήθησης με στόχο τη συμπύκνωση του ενζυμικού διαλύματος και τον καθαρισμό από περιεχόμενες ουσίες. Η τελική συγκέντρωση πρωτεΐνης στο πυκνό δείγμα ήταν ίση με 23 mg/mL, ενώ η ενεργότητα έναντι των ψευδοϋποστρωμάτων p-NPA και p-NPB ήταν 216 U/mL και 120 U/mL αντίστοιχα. Επιπλέον, διερευνήθηκε η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του ενζύμου, ελεύθερου και ακίνητοποιημένου σε χιτοζάνη, αποδεικνύοντας πως όντως πρόκειται για ένα θερμόφιλο ένζυμο.

Για τη μελέτη των αντιδράσεων σύνθεσης, χρησιμοποιήθηκαν διάφορα μη συμβατικά συστήματα, βασισμένα στη χρήση οργανικών διαλυτών. Αυτά ήταν τα συμβατικά μικρογαλακτώματα, τα μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό και το πήκτωμα χιτοζάνης, ως φορέας του ακίνητοποιημένου ενζύμου. Σε ό,τι αφορά στα συμβατικά μικρογαλακτώματα και την υδρογέλη, τα οξέα που δοκιμάστηκαν ήταν αλειφατικά, ενώ στο άλλο σύστημα μελετήθηκε και η εστεροποίηση αρωματικών οξέων. Ωστόσο σε κανένα από τα συστήματα αυτά δεν εμφανίστηκε προϊόν κατά την αεριοχρωματογραφική ανάλυση. Οι αντιδράσεις υδρόλυσης μελετήθηκαν αφενός με ελεύθερο ένζυμο και αφετέρου με ένζυμο ακίνητοποιημένο στο προαναφερθέν βιοπολυμερές. Στην πρώτη περίπτωση τα υποστρώματα ήταν εστέρες, η υδρόλυση των οποίων επιβεβαίωσε την καταλυτική δράση της εστεράσης. Το ένα εκ των δύο υποστρωμάτων, ο προπιονικός αιθυλεστέρας, λόγω της ταχύτατης υδρόλυσής του, χρησιμοποιήθηκε επίσης για την εύρεση του άριστου pH της εστεράσης. Στην περίπτωση όμως του ακίνητοποιημένου ενζύμου, όπου μελετήθηκε η πιθανότητα υδρόλυσης εστέρων με περισσότερα άτομα άνθρακα, τα αποτελέσματα δεν ήταν το ίδιο θετικά.

Όλες οι αντιδράσεις σύνθεσης αναλύθηκαν με τη βοήθεια αέριου χρωματογράφου, όπως επίσης και οι αντιδράσεις υδρόλυσης με ελεύθερο ένζυμο. Αναφορικά, με τις αντιδράσεις σε υδατικό διάλυμα με ακίνητοποιημένη την εστεράση, η ανάλυση πραγματοποιήθηκε με φωτομετρική μέθοδο.

ΘΕΜΑΤΙΚΗ ΠΕΡΙΟΧΗ: Αντιδράσεις καταλυόμενες από θερμόφιλη εστεράση

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: θερμόφιλη εστεράση, υδρόλυση, σύνθεση, μικρογαλακτώμα, χιτοζάνη

ABSTRACT

This dissertation focuses on the activity of the esterase of the thermophilic bacterial strain *Geobacillus sp.* SP50 in aqueous and non aqueous systems. In the first case, the hydrolytic activity of the enzyme was studied towards various esters and in the second case, the enzyme activity was studied towards esterification and transesterification reactions.

Initially, the gene of this specific strain was amplified using PCR and cloned into *E.coli* DH5a cells. The recombinant esterase EstGsT1 was isolated and purified from competent *E.coli* BL21 cells. The production was performed in liquid cell cultures, with IPTG acting as an expression inducer. The expressed protein was purified in an Immobilized Metal Affinity Chromatography (IMAC) column with immobilized nickel ion resin. The molecular weight was estimated by polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) to be equal to 28 kDa.

The next step included the determination of the protein concentration and the enzymatic activity both shortly after the purification and after the procedures of dialysis and ultrafiltration, which were performed in order to concentrate the enzymatic solution and get rid of any unwanted substances. The final protein concentration in the dense sample was equal to 23 mg/mL, while the activity towards the pseudosubstrates p-NPA and p-NPB was 216 U/mL and 120 U/mL respectively. Moreover, the optimal temperature was defined, using both free and immobilized on chitosan enzyme, verifying that the enzyme is thermophilic.

For the investigation of the enzymatic activity towards synthetic reactions, various non-conventional systems were tested, based on organic solvents. These included microemulsions, detergentless microemulsions and chitosan hydrogel, as a carrier of the immobilized enzyme. Concerning the conventional microemulsions and the hydrogel, the acids that were used as substrates were aliphatic, while in the case of detergentless microemulsions, esterification of aromatic acids was also tested. However none of the above systems exhibited any ester production, as detected by chromatographic analysis. The activity of the enzyme towards hydrolytic reactions was examined using free as well as immobilized enzyme, on the same biopolymer mentioned above. In the first case, the substrates, which were esters, were hydrolyzed efficiently, confirming the esterase's catalytic activity. One of the tested substrates, ethyl propionate, was also used for the determination of the optimal pH, due to its fast hydrolysis. Nevertheless, in the case of the immobilized enzyme, where esters with more carbon atoms in their chain were used as reagents, the results weren't so positive.

All of the synthetic reactions were analyzed by gas chromatography, as well as the hydrolysis based upon the free esterase. Regarding the reactions in aqueous solutions with the use of immobilized enzyme, the analysis was performed according to a photometric method.

SUBJECT AREA: Reactions catalyzed by thermophilic esterase

KEYWORDS: thermophilic esterase, hydrolysis, synthesis, microemulsion, chitosan

Περιεχόμενα

ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	13
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	14
1.1 ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ.....	14
1.1.1 ΑΚΡΑΙΟΦΙΛΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ	14
1.1.2 ΘΕΡΜΟΦΙΛΟΙ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ	14
1.1.2.1 ΜΟΡΙΑΚΕΣ ΠΡΟΣΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΘΕΡΜΟΦΙΛΙΑ	15
1.1.2.2 ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΘΕΡΜΟΦΙΛΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ	15
1.1.3 ΤΟ ΓΕΝΟΣ <i>ΓΕΟΒΑCΙLLUS</i>	15
1.1.3.1 ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΓΕΝΟΥΣ <i>ΓΕΟΒΑCΙLLUS</i>	16
1.1.3.2 ΕΝΖΥΜΙΚΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ.....	17
1.2 ΕΣΤΕΡΑΣΕΣ	17
1.2.1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΕΣΤΕΡΑΣΩΝ	18
1.2.1.1 ΥΔΡΟΛΥΣΗ	18
1.2.1.2 ΣΥΝΘΕΣΗ.....	19
1.2.2 ΟΜΑΔΟΠΟΙΗΣΗ ΕΣΤΕΡΑΣΩΝ.....	19
1.2.3 ΔΟΜΗ	19
1.2.4 ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΣ ΔΡΑΣΗΣ.....	21
1.2.5 ΠΗΓΕΣ ΕΣΤΕΡΑΣΩΝ	21
1.3 ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΣΗ ΣΕ ΜΗ ΣΥΜΒΑΤΙΚΑ ΜΕΣΑ	22
1.3.1 ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ	22
1.3.1.1 ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΕΝΕΡΓΕΣ ΟΥΣΙΕΣ	23
1.3.1.2 ΕΣΤΕΡΑΣΕΣ ΣΕ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ	24
1.3.2 ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ ΧΩΡΙΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΗ ΟΥΣΙΑ	25
1.3.3 ΠΗΚΤΩΜΑ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ	26
1.4 ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΕΣΤΕΡΑΣΩΝ	28
1.4.1 ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΤΡΟΦΙΜΩΝ & ΑΡΩΜΑΤΟΠΟΙΙΑ.....	28
1.4.2 ΦΑΡΜΑΚΟΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ.....	29
1.4.3 ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΧΑΡΤΙΟΥ.....	30
1.4.4 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗ ΓΕΩΡΓΙΑ ΚΑΙ ΤΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ	30
1.5 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	32
2. ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ.....	33

2.1	ΥΛΙΚΑ	33
2.1.1	ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΟΙ ΚΑΙ ΠΛΑΣΜΙΔΙΑΚΟΙ ΦΟΡΕΙΣ	33
2.1.2	ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ.....	34
2.1.3	ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ.....	34
2.1.3.1	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ.....	34
2.1.3.2	ΔΙΑΛΥΤΕΣ	36
2.1.3.3	ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΕΝΕΡΓΕΣ ΟΥΣΙΕΣ	36
2.1.3.4	ΦΟΡΕΙΣ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΠΟΙΗΣΗΣ	36
2.1.4	ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ	36
2.1.5	ΌΡΓΑΝΑ- ΣΥΣΚΕΥΕΣ.....	37
2.1.6	ΥΛΙΚΑ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑΣ	37
2.2	ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΝΑΛΥΣΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	38
2.2.1	ΚΛΩΝΟΠΟΙΗΣΗ	38
2.2.2	ΕΞΑΓΩΓΗ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΩΝ ΠΛΑΣΜΙΔΙΩΝ	38
2.2.3	ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑΚΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	39
2.2.4	ΥΠΕΡΕΚΦΡΑΣΗ ΤΗΣ ΑΝΑΣΥΝΔΥΑΣΜΕΝΗΣ ΕΣΤΕΡΑΣΗΣ	39
2.2.5	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΥ	39
2.2.6	ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΕΝΖΥΜΟΥ	39
2.2.7	ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΠΡΩΤΕΪΝΗΣ & ΠΟΣΟΤΙΚΟΠΟΙΗΣΗ.....	41
2.2.7.1	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ (SDS PAGE).....	41
2.2.7.1.1	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΩΜΑΤΟΣ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ.....	41
2.2.7.1.2	ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ – ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ	42
2.2.7.1.3	ΕΜΦΑΝΙΣΗ ΖΩΝΩΝ ΣΤΟ ΠΗΚΤΩΜΑ ΠΟΛΥΑΚΡΥΛΑΜΙΔΗΣ	42
2.2.7.2	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ	42
2.2.8	ΑΠΟΜΑΚΡΥΝΣΗ ΔΙΑΛΥΤΩΝ ΣΥΣΤΑΤΙΚΩΝ & ΣΥΜΠΥΚΝΩΣΗ ΕΝΖΥΜΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ	
	43	
2.2.8.1	ΔΙΑΠΙΔΥΣΗ.....	43
2.2.8.2	ΥΠΕΡΔΙΗΘΗΣΗ.....	43
2.2.9	ΜΕΛΕΤΗ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΟΥ.....	44
2.2.9.1	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΕΡΓΟΤΗΤΑΣ ΕΝΖΥΜΟΥ (ASSAY).....	44
2.2.9.2	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΔΡΑΣΗΣ.....	44
2.2.9.2.1	ΜΕ ΕΛΕΥΘΕΡΟ ΕΝΖΥΜΟ.....	45

2.2.9.2.2	ΜΕ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΕΝΖΥΜΟ.....	45
2.3	ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ	45
2.3.1	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ	45
2.3.1.1	ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ ΧΩΡΙΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΔΡΑΣΤΙΚΗ ΟΥΣΙΑ	45
2.3.1.2	ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ	46
2.3.1.3	ΠΗΚΤΩΜΑ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ	48
2.3.2	ΑΝΑΛΥΣΗ.....	49
2.4	ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ	50
2.4.1	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ	50
2.4.1.1	ΥΔΑΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ	50
2.4.1.1.1	ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕ ΕΛΕΥΘΕΡΟ ΕΝΖΥΜΟ	50
2.4.1.1.2	ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΜΕ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΕΝΖΥΜΟ	50
2.4.1.2	ΔΙΦΑΣΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ	51
2.4.2	ΑΝΑΛΥΣΗ.....	51
2.4.2.1	ΑΕΡΙΟΣ ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΙΑ	51
2.4.2.2	ΦΩΤΟΜΕΤΡΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	52
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ	54
3.1	ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΕΝΖΥΜΟΥ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ.....	54
3.1.1	SDS-PAGE ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ	54
3.1.2	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ	54
3.1.3	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΝΖΥΜΙΚΗΣ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ	55
3.1.4	ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΒΕΛΤΙΣΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ	57
3.1.4.1	ΕΛΕΥΘΕΡΟ ΕΝΖΥΜΟ.....	57
3.1.4.2	ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΕΝΖΥΜΟ.....	58
3.2	ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΣΥΝΘΕΣΗΣ	59
3.2.1	ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ ΧΩΡΙΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΟΕΝΕΡΓΟ ΟΥΣΙΑ.....	59
3.2.2	ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ	61
3.2.3	ΠΗΚΤΩΜΑ ΧΙΤΟΖΑΝΗΣ	63
3.3	ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΥΔΡΟΛΥΣΗΣ	63
3.3.1	ΥΔΑΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ	63
3.3.1.1	ΜΕ ΕΛΕΥΘΕΡΟ ΕΝΖΥΜΟ.....	63
3.3.1.2	ΜΕ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟ ΕΝΖΥΜΟ	67

3.3.2	ΔΙΦΑΣΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ.....	67
4.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	68
	ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ.....	70
5.	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	71
5.1	ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	71
5.2	ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	75

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 2.1 Πορεία παρασκευής μίγματος αντίδρασης.....	51
Διάγραμμα 3.1 Καμπύλη αναφοράς BSA.....	55
Διάγραμμα 3.2 Καμπύλη αναφοράς BSA.....	55
Διάγραμμα 3.3 Πρότυπη καμπύλη PNP	56
Διάγραμμα 3.4 Υδρόλυση ψευδοϋποστρωμάτων καταλυόμενη από την εστεράση συναρτήσκει της θερμοκρασίας. (◇)ο-NPB, (■)p-NPB, συγκεντρώσεις υποστρωμάτων 1,36 mM έκαστο, συγκέντρωση ενζύμου 1,15 μg/mL	57
Διάγραμμα 3.5 Υδρόλυση p-NPB από ακινητοποιημένη εστεράση ως συνάρτηση της θερμοκρασίας Συγκέντρωση υποστρώματος: 0,8 mM, ενζύμου: 1,73 μg/mL	58
Διάγραμμα 3.6 Πρότυπη καμπύλη προπιονικού αιθυλεστέρα.....	64
Διάγραμμα 3.7 Πρότυπη καμπύλη αιθανόλης.....	64
Διάγραμμα 3.8 Παραγωγή αιθανόλης ως συνάρτηση του χρόνου επώασης στους 60 °C. Συγκέντρωση υποστρώματος: 20 mM, ενζύμου: 0,46 mg/mL.....	65
Διάγραμμα 3.9 Υδρόλυση υποστρώματος συναρτήσκει του pH του μέσου αντίδρασης στους 60 °C. Συγκέντρωση υποστρώματος: 20mM, ενζύμου: 0,02 mg/mL.....	66

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1 Φυλογενετικό δέντρο βασισμένο σε ανάλυση της 16S rRNA αλληλουχίας [9].....	16
Εικόνα 1.2 Αντίδραση υδρόλυσης εστέρα.....	18
Εικόνα 1.3 Αντίδραση εστεροποίησης.....	19
Εικόνα 1.4 Τοπολογικό διάγραμμα της α/β δομής. Οι 6 α-έλικες και οι 8 β-πτυχωτές επιφάνειες παρουσιάζονται με κυλίνδρους και βέλη αντίστοιχα. Η καταλυτική τριάδα υποδεικνύεται με τελείες [41].	20
Εικόνα 1.5 a) Τρισδιάστατη δομή της καρβοξυλεστεράσης Est30. 6-α έλικες A-F (κόκκινο) και 7 β-πτυχωτές επιφάνειες 2-8 (πράσινο) με τις ενδείξεις που χρησιμοποιούνται για την ονοματολογία της κλασσικής δομής α/β υδρολάσης και 3 έλικες-καλύμματα (cap) με τις ενδείξεις B ['] ₁ , D ['] ₁ , και D ['] ₂ . Η καταλυτική τριάδα διακρίνεται με γαλάζιο χρώμα. b) Τοπολογικό διάγραμμα της Est30. Οι β-πτυχωτές επιφάνειες παρουσιάζονται ως βέλη, ενώ οι α-έλικες ως κύλινδροι. Το κάλυμμα (cap) αποτελείται από 3 έλικες. Η καταλυτική τριάδα Ser94, Asp193 και His223 υποδεικνύεται με μαύρα αστέρια [43].	20
Εικόνα 1.6 Μηχανισμός υδρόλυσης. Η υδρόλυση ενός βουτυλεστέρα περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός ακυλο-ενζύμου και δύο διαφορετικών τετραεδρικών ενδιάμεσων. Η δημιουργία του ακυλο-ενζύμου περιλαμβάνει το πρώτο ενδιάμεσο, το Td1. Η αλκοόλη απελευθερώνεται σε αυτό το στάδιο, το οποίο καθορίζει την εξειδίκευση του ενζύμου ως προς τις αλκοόλες. Η απελευθέρωση του ακυλο-ενζύμου περιλαμβάνει το δεύτερο ενδιάμεσο, το Td2 [44].	21
Εικόνα 1.7 Μορφολογία των τριών τύπων μικρογαλακτωμάτων [47]	23
Εικόνα 1.8 Διαγραμματική απεικόνιση της δομής μίας επιφανειοενεργούς ουσίας (University of Waikato)	23
Εικόνα 1.9 Κατηγορίες επιφανειοενεργών ουσιών με βάση την πολικότητα.....	24
Εικόνα 1.10. Σχηματική απεικόνιση εγκλωβισμού ενζύμου σε μικρογαλάκτωμα (w/o)	24
Εικόνα 1.11 Σχήμα ενζυμικής υδρόλυσης κετοπροοφένης σε δισυνεχές μικρογαλάκτωμα [52]	25
Εικόνα 1.12 Μοντέλο διάταξης πρωτεΐνης μέσα σε υδατικό θύλακα, με τα μόρια της προπανόλης να σχηματίζουν τη διεπιφάνεια νερού-ελαίου [55].	26
Εικόνα 1.13 Δομική σχέση μεταξύ χιτίνης (a) και χιτοζάνης (b) [65].....	27
Εικόνα 1.14 Μέθοδοι προετοιμασίας χιτοζάνης ως μέσο ακινητοποίησης [65]	28
Εικόνα 1.15 Υδρόλυση σημαντικών μεθυλεστέρων από εστεράσες [69].....	29
Εικόνα 1.16 Παραγωγή κετοπροοφένης με χρήση του <i>T.brassicae</i> CGMCC0574 [75]	29
Εικόνα 1.17 Σχηματική απεικόνιση παραγωγής ναπροξένης. Ο ρακεμικός ναπροξυμεθυλεστέρας επωάζεται με την εστεράση σε αναδευόμενο αντιδραστήρα. Η μη αντιδρώσα R-ναπροξένη απομακρύνεται με διήθηση από την S-ναπροξένη, και το πρώτο εναντιομερές υφίσταται ρακεμοποίηση και ανακυκλώνεται στην πορεία [76].	30

Εικόνα 1.18 Παραδείγματα πυρεθροειδών. Με βελάκια φαίνονται οι θέσεις υδρόλυσής τους [81]	31
Εικόνα 1.19 Θέσεις υδρόλυσης μαλαθείου [81]	31
Εικόνα 1.20 Ο κύκλος ζωής του PLA βασίζεται κυρίως στην ενζυμική του αποικοδόμηση [86]	32
Εικόνα 2.1 Χάρτης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου pet15b-EstGsT1	33
Εικόνα 2.2 Συντακτικός τύπος εστέρων της νιτροφαινόλης : i)p-NPA, ii)p-NPB, iii)o-NPB	34
Εικόνα 2.3 Συντακτικός τύπος των φαινολικών οξέων : i)p-HPP, ii)μ-κουμαρικό οξύ, iii)ibuprofen, iv)m-HPA, v)π-κουμαρικό οξύ, vi)p-HPA, vii)o-κουμαρικό οξύ, viii)o-HPA, ix)γαλλικό οξύ, x)κινναμωμικό οξύ, xi)φαινυλοξικό οξύ, xii)p-HBA, xiii)βενζοϊκό οξύ	35
Εικόνα 2.4 Συντακτικός τύπος εστέρων : i)οξικός αιθυλεστέρας, ii)προπιονικός αιθυλεστέρας, iii)κινναμωμικός αιθυλεστέρας, iv) p-HBA βουτυλεστέρας, v)λαυρικός βουτυλεστέρας	36
Εικόνα 2.5 Συντακτικός τύπος τριακετίνης (i) και τριβουτυρίνης (ii)	36
Εικόνα 2.6 Σχηματική απεικόνιση αλληλεπίδρασης αμινοξέων ιστιδίνης (6His-Tag) με μεταλλικά ιόντα Ni ²⁺ [88]	40
Εικόνα 2.7 Σχηματική απεικόνιση υδρόλυσης p-NPB [90]	44
Εικόνα 2.8 Σχηματική απεικόνιση θέσεων δειγμάτων και μαρτύρων στη μικροπλάκα	44
Εικόνα 2.9 Δομή AOT αριστερά (Neves et al. 2009) και σχηματικό διάγραμμα μικρογαλακτώματος παρουσία AOT με πρωτεΐνη στην υδατική φάση δεξιά [92]	47
Εικόνα 2.10 Συντακτικός τύπος της φωσφατιδυλοχολίνης	47
Εικόνα 2.11 Πήκτωμα χιτοζάνης	49
Εικόνα 2.12 Διαχωρισμός φάσεων	52
Εικόνα 3.1 SDS-PAGE της εστεράσης. Λωρίδες : (1) μάρτυρας πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Neb p7712), (2-11) κλάσματα καθαρισμού, (12) flow through : πρωτεΐνες που δεν δεσμεύτηκαν στη στήλη, (13) wash : πρωτεΐνες που δεσμεύτηκαν ελαφρά στα ιόντα νικελίου	54

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1 Τα κύρια πλεονεκτήματα της χρήσης θερμοσταθερών ενζύμων σε βιομηχανικές διεργασίες [4].....	15
Πίνακας 1.2. Χαρακτηριστικά εστερασών του γένους <i>Geobacillus</i>	17
Πίνακας 1.3 Διαφορές λιπασών – καρβοξυλεστερασών [33].....	18
Πίνακας 1.4 Εστεράσες σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό.....	26
Πίνακας 2.1 Σύσταση χρησιμοποιούμενων ρυθμιστικών διαλυμάτων.....	37
Πίνακας 2.2 Χαρακτηριστικά εκκινητών PCR.....	38
Πίνακας 2.3 Σύσταση πηκτωμάτων για SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση.....	41
Πίνακας 2.4 Επιλογή ιδανικής ποσότητας ακρυλαμίδης.....	41
Πίνακας 2.5 Σύσταση διαλύματος φόρτωσης.....	42
Πίνακας 2.6 Σύσταση μικρογαλακτώματος χωρίς επιφανειοενεργό ουσία και χρησιμοποιούμενα οξέα/ εστέρες ως υποστρώματα επιτέλεσης αντιδράσεων εστεροποίησης και μετεστεροποίησης.....	46
Πίνακας 2.7 Σύσταση μικρογαλακτωμάτων χωρίς επιφανειοενεργό για περαιτέρω μελέτη αντιδράσεων εστεροποίησης.....	46
Πίνακας 2.8 Σύσταση μικρογαλακτωμάτων.....	48
Πίνακας 2.9 Χαρακτηριστικά μεθόδων ανάλυσης.....	49
Πίνακας 2.10 Χαρακτηριστικά μεθόδου ανάλυσης.....	51
Πίνακας 3.1 Ενζυμική δραστικότητα.....	56
Πίνακας 3.2 Σύσταση μικρογαλακτωμάτων χωρίς επιφανειοενεργό ουσία.....	60

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Μικροβιολογίας, του Τομέα Βοτανικής, του τμήματος Βιολογίας του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών και στο εργαστήριο Βιομηχανικής και Νανοβιοτεχνολογίας, του Ινστιτούτου Βιολογίας, Φαρμακευτικής Χημείας και Βιοτεχνολογίας, του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών κατά το ακαδημαϊκό έτος 2016-2017.

Θα ήθελα αρχικά να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Δημήτριο Χατζηνικολάου όχι μόνο για την ανάθεση ενός τόσο ενδιαφέροντος θέματος αλλά και για τις πολύτιμες συμβουλές και την καθοδήγηση, τόσο στο πειραματικό όσο και στο συγγραφικό μέρος αυτής της εργασίας.

Παράλληλα ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Αριστοτέλη Ξενάκη, Διευθυντή Ερευνών στο Ινστιτούτο, ο οποίος μου επέτρεψε την εκπόνηση της εργασίας αυτής στο εργαστήριό του και ήταν πάντα πρόθυμος και διαθέσιμος να επιλύσει τυχόν απορίες και προβληματισμούς μου.

Επιπρόσθετα, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στη Δρ. Μαρία Ζουμπανιώτη, Ειδική Λειτουργική Επιστήμονα Β' του Ινστιτούτου, η οποία με καθοδήγησε καθ' όλη τη διάρκεια παραμονής μου στο εργαστήριο και μου προσέφερε τον πολύτιμο χρόνο της. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για τη διαρκή επίβλεψη και την υποστήριξή της.

Σε αυτό το σημείο δεν θα ήθελα να παραλείψω να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Αναστασία Γαλανοπούλου για την αμέριστή βοήθεια στο ξεκίνημα της πτυχιακής εργασίας και τις συμβουλές της για ως προς το σχεδιασμό των πειραμάτων και την εξέλιξη της πορείας τους.

Επιπλέον, θα επιθυμούσα να ευχαριστήσω όλη την ομάδα του εργαστηρίου Βιομηχανικής και Νανοβιοτεχνολογίας του Εθνικού Ιδρύματος Ερευνών και ιδιαίτερα τη Δρ. Μαρία Χατζηδάκη και τις υποψήφιες διδάκτορες Ευγενία Μήτσου και Ιωάννα Θεοχάρη για το ευχάριστο εργαστηριακό κλίμα, τη συμπαράσταση και την άψογη συνεργασία τους.

Τέλος, θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους τους προπτυχιακούς και μεταπτυχιακούς φοιτητές με τους οποίους συνεργάστηκα, για το φιλικό περιβάλλον που δημιουργήθηκε και την ανταλλαγή ιδεών και γνώσεων.

1. Εισαγωγή

1.1 Μικροοργανισμοί

1.1.1 Ακραιόφιλοι μικροοργανισμοί

Ακραιόφιλοι χαρακτηρίζονται οι μικροοργανισμοί που ζουν σε περιβάλλοντα στα οποία είναι δύσκολη η επιβίωση των κοινών κυττάρων, λόγω της ύπαρξης ακραίων θερμοκρασιών, τιμών pH, διαθεσιμότητας νερού ή οξυγόνου. Οι μικροοργανισμοί αυτοί είναι εξαιρετικά διαφοροποιημένοι και μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με την ακραία ιδιότητα η οποία κυριαρχεί στο περιβάλλον διαβίωσής τους [I], [II]. Οι βασικές κατηγορίες εξ αυτών είναι οι εξής:

- Θερμόφιλοι (thermophiles), που απαντώνται σε περιβάλλοντα με υψηλές θερμοκρασίες.
- Ψυχρόφιλοι (psychrophiles), που ζουν μόνιμα σε ενδιαιτήματα με χαμηλές θερμοκρασίες, συχνά κοντά στο σημείο πήξης του νερού.
- Μπαρόφιλοι (piezophiles), που αντέχουν πίεση έως και 1000 atm.
- Αλόφιλοι (halophiles), που επιβιώνουν σε υψηλές συγκεντρώσεις άλατος, πολλές φορές έως 300 g/L.
- Οξεόφιλοι (acidophiles), που αναπτύσσονται σε χαμηλές τιμές pH.
- Βασεόφιλοι (alkaliphiles), που αντιθέτως συναντώνται σε αλκαλικά περιβάλλοντα, με τιμές pH αρκετά υψηλότερες του 7.

Οι μικροοργανισμοί αυτοί, που είναι στην πλειοψηφία τους προκαρυωτικοί, τα τελευταία χρόνια έχουν συγκεντρώσει πάνω τους τεράστιο ενδιαφέρον, κυρίως λόγω των ενζύμων που παράγουν, τα οποία είναι προσαρμοσμένα να λειτουργούν σε ασυνήθιστες συνθήκες, που συχνά απαιτούνται στις διάφορες βιοτεχνολογικές διεργασίες [1].

1.1.2 Θερμόφιλοι μικροοργανισμοί

Ένας από τους κυριότερους περιβαλλοντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την αύξηση και την επιβίωση των μικροοργανισμών είναι η θερμοκρασία. Η μικροβιακή ζωή ανθεί σε περιβάλλοντα με υψηλές θερμοκρασίες, μέχρι και εκείνες που υπερβαίνουν το σημείο βρασμού του νερού. Πάνω από τους 65 °C όμως, επιζούν μόνο οι προκαρυωτικές μορφές ζωής, όπου και παρατηρείται μεγάλη ποικιλία Βακτηρίων και Αρχαίων [2].

Οι θερμόφιλοι μικροοργανισμοί, με άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης 45 °- 80 °C απαντούν τόσο σε θερμοπηγές όσο και σε άλλα θερμά περιβάλλοντα. Εδάφη που βρίσκονται διαρκώς εκτεθειμένα στην ηλιακή ακτινοβολία μπορεί να αναπτύξουν, κατά τις μεσημβρινές ώρες των θερινών μηνών, θερμοκρασίες άνω των 70 °C, αποτελώντας έτσι ιδανικό περιβάλλον για την ανάπτυξη θερμόφιλων μικροοργανισμών. Εκτεθειμένα σε ακραίες φυσικές συνθήκες είναι και τα ηφαιστειακά περιβάλλοντα, υποβρύχια ή ηπειρωτικά, από τα οποία έχει απομονωθεί πλήθος τέτοιων μικροοργανισμών [3].

Θερμόφιλοι προκαρυωτικοί μικροοργανισμοί έχουν βρεθεί εκτός των άλλων και σε τεχνητά περιβάλλοντα, όπως οι περιοχές κομποστοποίησης, η λάσπη ακατέργαστων αποβλήτων ή οι βιομηχανικές εγκαταστάσεις παραγωγής ηλεκτρικής ενέργειας [2]. Οι διεργασίες της βιομηχανίας, εν γένει, απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες, με αποτέλεσμα να δημιουργούν τις κατάλληλες συνθήκες για την ανάπτυξη αυτών των μικροοργανισμών.

1.1.2.1 Μοριακές προσαρμογές στη θερμοφιλία

Η παρουσία μικροοργανισμών σε θερμά περιβάλλοντα προϋποθέτει ένα πλήθος προσαρμογών σε σχέση με τους μεσόφιλους μικροοργανισμούς. Αυτές αφορούν διαφορές ως προς την αναδίπλωση των πρωτεϊνών τους, οι οποίες χαρακτηρίζονται από την παρουσία αυξημένου αριθμού ιοντικών δεσμών, την πυκνή διάταξη και τον έντονα υδρόφοβο χαρακτήρα του εσωτερικού τους. Παράλληλα, άλλα κυτταρικά συστατικά, όπως οι κυτταροπλασματικές μεμβράνες, επιδεικνύουν θερμοσταθερότητα, όντας πλούσιες σε κορεσμένα λιπαρά οξέα, αλλά και το DNA, που παραμένει ανέπαφο στις υψηλές θερμοκρασίες, με τη βοήθεια προστατευτικών πρωτεϊνών [2].

1.1.2.2 Βιοτεχνολογική σημασία θερμοφίλων μικροοργανισμών

Οι θερμοφιλοι μικροοργανισμοί και τα προϊόντα τους έχουν αρχίσει να αξιοποιούνται τα τελευταία χρόνια σε πολλές βιομηχανικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Κύριο πλεονέκτημά τους, μεταξύ άλλων (πίνακας 1.1), είναι η παραγωγή πρωτεϊνών με υψηλή θερμοσταθερότητα, οι οποίες παρουσιάζουν αυξημένη αντοχή στις υψηλές θερμοκρασίες που απαιτούνται σε διάφορες βιομηχανικές διεργασίες.

Πίνακας 1.1 Τα κύρια πλεονεκτήματα της χρήσης θερμοσταθερών ενζύμων σε βιομηχανικές διεργασίες [4]

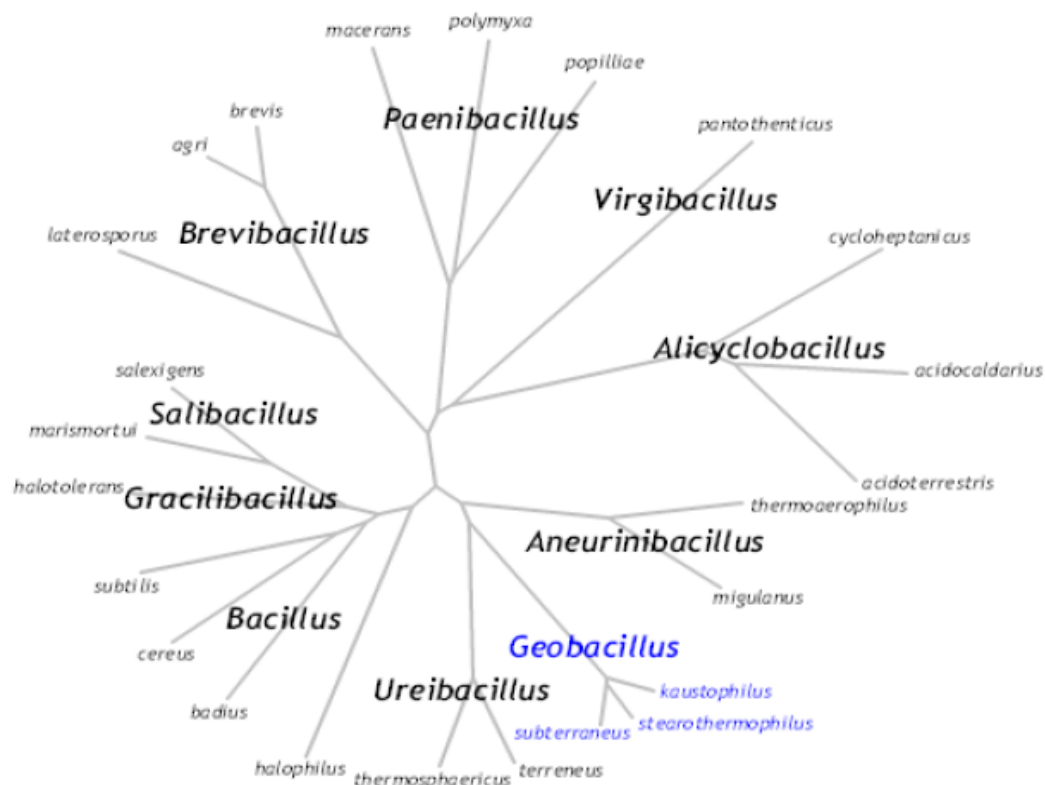
Ιδιότητα	Πλεονεκτήματα
Θερμοσταθερότητα	Αντοχή σε υψηλές θερμοκρασίες, αυξημένος χρόνος ημιζωής
Ανθεκτικότητα σε αποδιατακτικούς παράγοντες	Αντοχή σε οργανικούς διαλύτες, σε χαμηλές και υψηλές τιμές pH
Μεγαλύτερη ευρωστία	Αντοχή σε "σκληρές" βιομηχανικές διεργασίες, ευκολότερη διαδικασία καθαρισμού, καλύτερες αποδόσεις
Ρυθμός χημικών αντιδράσεων	Επιτάχυνση διάχυσης και άλλων χημικών διαδικασιών
Διαλυτότητα	Αύξηση συγκέντρωσης υποστρωμάτων, αύξηση διαλυτότητας οργανικών ουσιών
Ιξώδες	Επιτάχυνση ανάμειξης και ρυθμού άντλησης, αύξηση ρυθμού μεταφοράς μάζας
Μικροβιακή μόλυνση	Μείωση της πιθανότητας ανάπτυξης μεσόφιλων παθογόνων, μείωση της δράσης μη εξειδικευμένων ενζύμων

Παρ' όλες όμως τις αξιοποιήσιμες ιδιότητες που διαθέτουν τα θερμοφιλα ένζυμα, εμφανίζονται κάποιες φορές προβλήματα στην βιομηχανική εφαρμογή τους. Αυτά σχετίζονται με την έλλειψη σταθερότητας πολλών υποστρωμάτων σε υψηλές θερμοκρασίες, τη μειωμένη διαλυτότητα αερίων στις ίδιες συνθήκες αλλά και τη δυσκολία απενεργοποίησής των ενζύμων αυτών, όταν αυτό κριθεί αναγκαίο [4].

1.1.3 Το γένος *Geobacillus*

Το γένος *Geobacillus* αποτελεί ένα νέο τάξον, που εμφανίστηκε το 2001, και περιλαμβάνει θερμοφιλα βακτήρια που μέχρι τότε άνηκαν στο γένος *Bacillus* [5]. Η επαναταξινόμηση των ειδών *Bacillus stearothermophilus*, *B. kaustophilus* και *B. thermoglucosidasius* με τη βοήθεια των τεχνικών της μοριακής βιολογίας, οδήγησε στην ομαδοποίησή τους στο νέο αυτό γένος, δεδομένης της φαινοτυπικής και φυλογενετικής τους απόκλισης από τους υπόλοιπους βακίλους [6].

Η ταξινόμηση των μικροοργανισμών στο γένος αυτό πραγματοποιείται συνήθως με βάση τη σύγκριση της αλληλουχίας του 16S rRNA γονιδίου [7]. Ωστόσο, έχουν αναφερθεί και άλλα γονίδια-δείκτες (π.χ *recN*) που μπορούν εμφανίσουν καλύτερη διαφοροποίηση των στελεχών εντός του ίδιου γένους [8].



Εικόνα 1.1 Φυλογενετικό δέντρο βασισμένο σε ανάλυση της 16S rRNA αλληλουχίας [9]

Το γένος *Geobacillus* περιλαμβάνει ραβδόμορφα κύτταρα, μονά ή σε αλυσίδες τα οποία σχηματίζουν ενδοσπόρια και κινούνται με περίτριχο μαστίγιο. Το κυτταρικό τους τοίχωμά είναι θετικό κατά Gram και θεωρούνται χημειοργανότροφοι μικροοργανισμοί με αερόβια ή δυνητικά αναερόβια αύξηση [9].

1.1.3.1 Οικολογία γένους *Geobacillus*

Όπως όλοι οι θερμόφιλοι μικροοργανισμοί, έτσι και τα βακτήρια του γένους *Geobacillus* εμφανίζονται κυρίως σε ενδιαιτήματα υψηλής θερμοκρασίας. Η κατανομή τους είναι ευρεία και έχουν απομονωθεί επιτυχώς από περιοχές γεωθερμικών πηγών σε όλες τις ηπείρους. Είναι επίσης παρόντα σε ρηχές θαλάσσιες θερμοπηγές και βαθιά υδροθερμικά ρήγματα [10], θερμά κοιτάσματα πετρελαίου [5], ηφαιστειακές περιοχές [3] κ.ά.

Επιπρόσθετα, γεωβάκιλλοι έχουν απομονωθεί και από τεχνητά θερμά περιβάλλοντα, όπως συστήματα κεντρικής θέρμανσης [11], αγωγούς ζεστού νερού, μονάδες επεξεργασίας αποβλήτων και θέσεις καύσης απορριμμάτων [12].

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρουσία αντιπροσώπων του γένους, σε βιώσιμη μάλιστα κατάσταση, σε περιοχές με χαμηλή θερμοκρασία [13]. Υπάρχουν πολλές αναφορές σχετικά με τον εντοπισμό τους σε ψυχρά εδάφη [13], [8] και μονίμως παγωμένα ωκεάνια ιζήματα [7], [14]. Το περίεργο της υπόθεσης δεν είναι τόσο ο εντοπισμός τους σε αυτά τα αναπάντεχα μέρη όσο ο μεγάλος τους αριθμός εκεί. Η παγκόσμια εξάπλωσή τους οφείλεται πιθανώς, κατά μεγάλο μέρος, στα χαρακτηριστικά των σπορίων τους.

Πρώτον, η μορφολογία και οι ανθεκτικές τους ιδιότητες τους επιτρέπουν να μεταφέρονται μέσω της ατμόσφαιρας και να διανύουν μεγάλες αποστάσεις. Δεύτερον, η μακροβιότητά τους, τους επιτρέπει να παραμένουν σε ληθαργικές αλλά βιώσιμες καταστάσεις για μεγάλα χρονικά διαστήματα, οδηγώντας με την πάροδο του χρόνου σε πολύ υψηλές πληθυσμιακές πυκνότητες [15].

1.1.3.2 Ενζυμικό δυναμικό

Τα τελευταία χρόνια το βιοτεχνολογικό δυναμικό των γεωβακίλλων έχει συγκεντρώσει μεγάλο ενδιαφέρον. Βακτήρια του γένους αυτού χρησιμοποιούνται ευρέως ως πηγές θερμοσταθερών ενζύμων. Μεταξύ αυτών συμπεριλαμβάνονται πρωτεάσες [16], αμυλάσες [17], λιπάσες [18], εστεράσες [19], DNA πολυμεράσες [20] καθώς και κυτταρινολυτικά [21] και ξυλανολυτικά ένζυμα [22].

Πληθώρα εστερασών έχει απομονωθεί από διάφορα είδη του γένους, όπως φαίνεται στον πίνακα 1.2:

Πίνακας 1.2. Χαρακτηριστικά εστερασών του γένους *Geobacillus*

Esterase	Strain	optimal T (°C)	optimal pH	Article
EstL5	<i>G.thermodenitrificans</i> T2	60	8	[23]
CaesCCR11(CCR11 Carboxylesterase)	<i>G.thermoleovorans</i> CCR11	50	5-8	[24]
HBB-4 esterase	<i>Geobacillus</i> sp. HBB-4	65	6	[25]
JM6	<i>Geobacillus</i> sp. JM6	60	7,5	[26]
EstA	<i>G.thermoleovorans</i> YN	60-65	7,5-9,5	[27]
Est30 (carboxylesterase)	<i>G. stearothermophilus</i> ATCC7954	70	9	[19]
Est55 (carboxylesterase)	<i>G. stearothermophilus</i> ATCC12980,ATCC7954	60	8-9	[19]
Est1	<i>Geobacillus</i> sp. (mud,Balcova)	65	9,5	[28]
Est2	<i>Geobacillus</i> sp.(reinjection water, Balcova)	65	10	[28]
Est3	<i>Geobacillus</i> sp.(uncontrolled thermal leak, Balc, va)	65	9,5	[28]
Esterase	<i>Geobacillus</i> sp. TF17	50	7,5	[29]
GDSL Hydrolase/Acetylxytan Esterase	<i>G. stearothermophilus</i> T-6	50-60	8,5	[30]
CEGK(Carboxylesterase)	<i>G. kaustophilus</i> HTA426	60-65	8	[31]

1.2 Εστεράσες

Οι εστεράσες (EC 3.1.1.x) αποτελούν μία μεγάλη ομάδα ευρέως διαδεδομένων υδρολυτικών ενζύμων, που καταλύουν τη διάσπαση και τη δημιουργία εστερικών δεσμών. Ανάλογα με την προτίμησή τους προς το εκάστοτε υπόστρωμα, διακρίνονται σε διάφορες τάξεις, οι οποίες φτάνουν σε αριθμό τις 95, σύμφωνα με την Επιτροπή Ενζύμων (Enzyme Commission, EC) [32]. Εξ αυτών, δύο πολύ σημαντικές είναι οι

καρβοξυλεστεράσες ή πραγματικές εστεράσες (EC 3.1.1.1) και οι λιπάσες (EC 3.1.1.3) [33].

Ένα σύνολο χαρακτηριστικών διαχωρίζουν τις δύο αυτές τάξεις μεταξύ τους. Οι καρβοξυλεστεράσες υδρολύουν διαλυτά υποστρώματα ακολουθώντας την κλασική κινητική Michaelis-Menten. Εμφανίζουν χαμηλή υδρολυτική δράση έναντι μακράς αλυσίδας εστέρων (αδιάλυτα) και η μέγιστη ενζυμική ενεργότητα ανιχνεύεται λίγο πριν το σημείο κορεσμού του διαλυτού υποστρώματος. Αντιθέτως, οι λιπάσες εμφανίζουν ελάχιστη ενζυμική δράση σε διαλυτά υποστρώματα και η ενεργότητά τους εντοπίζεται έναντι εστέρων με μακριές ανθρακικές αλυσίδες [34]. Η αντίδραση λιπόλυσης πραγματοποιείται στη διεπιφάνεια μεταξύ νερού και λιπιδίων, γεγονός που σημαίνει πως το φαινόμενο δεν μπορεί να περιγραφεί με βάση την κινητική Michaelis-Menten [35]. Το μοναδικό αυτό χαρακτηριστικό των λιπασών, η διεπιφανειακή ενεργοποίηση, που οφείλεται στην παρουσία καλύμματος (lid) στο ενεργό τους κέντρο, απουσιάζει από τις εστεράσες [33].

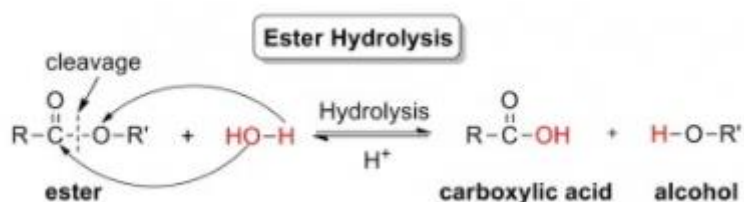
Πίνακας 1.3 Διαφορές λιπασών – καρβοξυλεστερασών [33]

Ιδιότητα	Λιπάση	Εστεράση
Προτιμώμενα υποστρώματα	Τριγλυκερίδια μακράς αλυσίδας	Εστέρες και τριγλυκερίδια βραχείας αλυσίδας
Διεπιφανειακή ενεργοποίηση/ κάλυμμα	Ναι	Όχι
Υδροφοβικότητα υποστρώματος	Υψηλή	Υψηλή έως χαμηλή
Εναντιομέρεια	Συνήθως υψηλή	Υψηλή έως χαμηλή
Σταθερότητα σε οργανικούς διαλύτες	Υψηλή	Υψηλή έως χαμηλή

1.2.1 Αντιδράσεις εστερασών

1.2.1.1 Υδρόλυση

Οι εστεράσες έχουν την ικανότητα να καταλύουν μία ποικιλία αντιδράσεων, βασικότερη εκ των οποίων είναι η υδρόλυση. Σε υδατικό μέσο, υδρολύουν τον εστερικό δεσμό, οδηγώντας στην παραγωγή μίας αλκοόλης και ενός καρβοξυλικού οξέος.

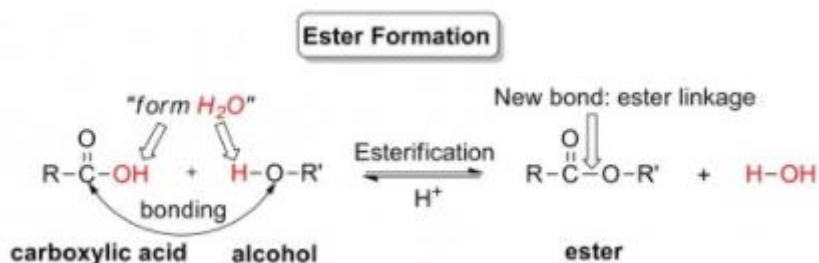


Εικόνα 1.2 Αντίδραση υδρόλυσης εστέρα

Ως υποστρώματα των αντιδράσεων αυτών δρουν συνήθως εστέρες μικρού μήκους ανθρακικής αλυσίδας.

1.2.1.2 Σύνθεση

Μία άλλη κατηγορία αντιδράσεων είναι οι συνθέσεις εστέρων, οι οποίες ευνοούνται σε περιβάλλον χαμηλής συγκέντρωσης νερού. Οι αντιδράσεις αυτές διακρίνονται στις εστεροποιήσεις, που πραγματοποιούνται μεταξύ μίας αλκοόλης και ενός καρβοξυλικού οξέος με προϊόν έναν εστέρα και στις μετεστεροποιήσεις που πραγματοποιούνται μεταξύ ενός εστέρα και μίας αλκοόλης με προϊόντα ένα νέο εστέρα και μία νέα αλκοόλη.



Εικόνα 1.3 Αντίδραση εστεροποίησης

Εστεράση του είδους *Bacillus licheniformis* έχει χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση οξικού ισοπεντυλεστέρα, ο οποίος κυριαρχεί ως ενισχυτικό γεύσης στη βιομηχανία τροφίμων [36]. Εστεράση του ίδιου είδους έχει μελετηθεί επίσης ως προς την ικανότητα σύνθεσης διαφόρων αιθυλεστέρων [37].

1.2.2 Ομαδοποίηση εστερασών

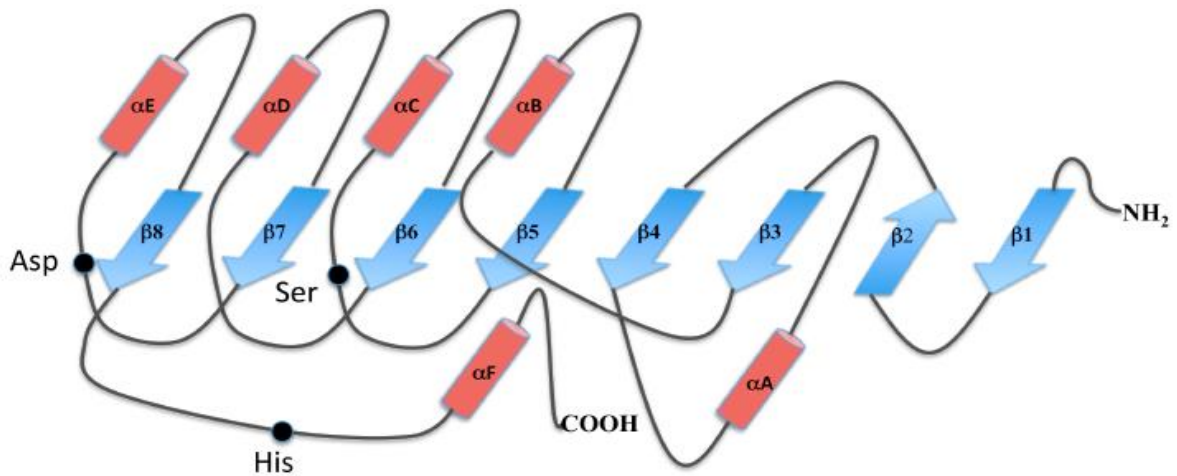
Η ταξινόμηση των εστερασών είναι πολύπλοκη και πολλές διαφορετικές ονοματολογίες έχουν δοθεί κατά καιρούς για να κατατάξουν τα ένζυμα αυτά σε μία ή περισσότερες, στενά συνδεδεμένες ομάδες [38]. Η ομαδοποίησή τους, που είναι σημαντική για τη συστηματική μελέτη τους, μπορεί να βασιστεί σε διάφορα κριτήρια. Αυτά μπορεί να είναι η εξειδίκευση τους προς το υπόστρωμα, τα μοτίβα αναστολής τους ή φυλογενετικά και άλλα κριτήρια, ανάλογα με τον εκάστοτε ερευνητή που αναλαμβάνει την ταξινόμηση [39].

Παρ' όλες τις προσπάθειες όμως ανάπτυξης ενός βελτιωμένου συστήματος ταξινόμησης των εστερασών μέχρι στιγμής δεν έχει καθιερωθεί μία παγκόσμια μέθοδος ταξινόμησης των ενζύμων αυτών [38].

1.2.3 Δομή

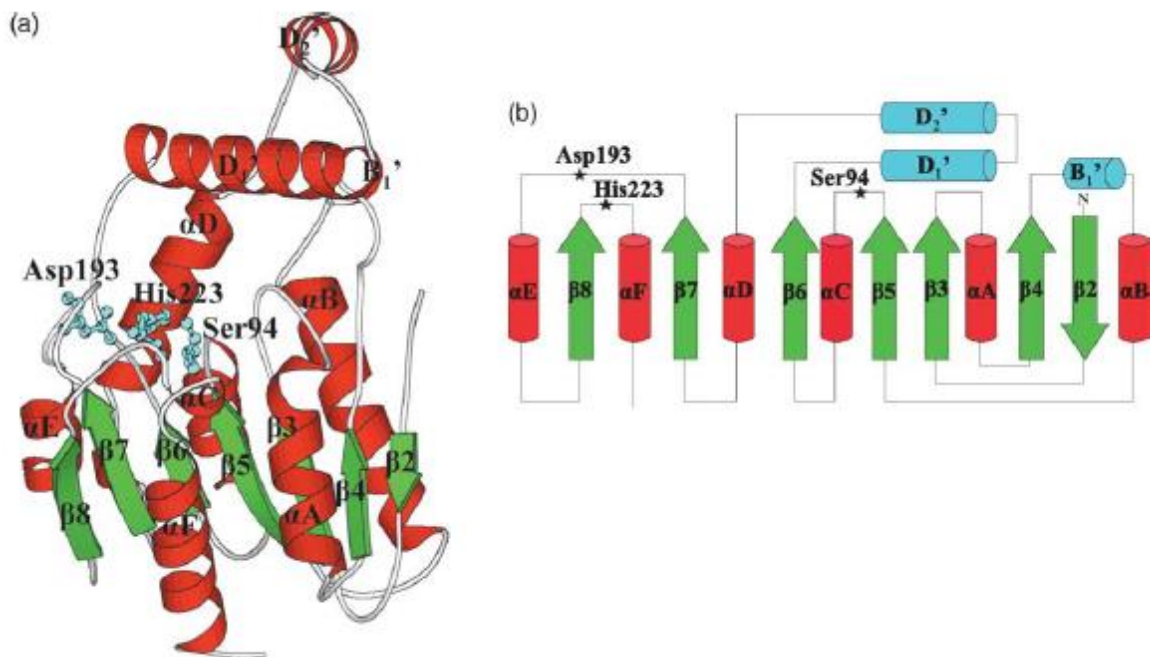
Οι εστεράσες ανήκουν στην υπεροικογένεια των α/β υδρολασών, όπως και πολλά άλλα υδρολυτικά ένζυμα με διαφορετική καταλυτική δράση αλλά πιθανή κοινή φυλογενετική προέλευση [40].

Η τυπική δομή μιας α/β υδρολάσης περιλαμβάνει 8 β-πτυχωτές επιφάνειες, παράλληλες μεταξύ τους, με τη δεύτερη να είναι συνήθως αντιπαράλληλη, συνδεδεμένες με 6 α-έλικες [41]. Η καταλυτική τριάδα αποτελείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα Ser, His, Asp [33]. Η σερίνη εντοπίζεται σε ένα συντηρημένο πενταπεπτιδίο (Gly-X-Ser-X-Gly) το οποίο σχηματίζει μία στροφή σχήματος γ, χαρακτηριστική της α/β δομής και γνωστής ως "πυρηνόφιλος αγκώνας" ("nucleophile elbow"). Στο σημείο αυτό, η σερίνη είναι εύκολα προσβάσιμη από το υπόστρωμα, όπως και από το μόριο του νερού, κατά την αντίδραση της υδρόλυσης [42].



Εικόνα 1.4 Τοπολογικό διάγραμμα της α/β δομής. Οι 6 α-έλικες και οι 8 β-πτυχωτές επιφάνειες παρουσιάζονται με κυλίνδρους και βέλη αντίστοιχα. Η καταλυτική τριάδα υποδεικνύεται με τελείες [41].

Οι αποκλίσεις από το συγκεκριμένο δομικό μοτίβο δεν είναι πολύ σπάνιες. Για παράδειγμα, η εστεράση Est30 του θερμοφιλικού βακτηρίου *G.stearotherophilus*, αποτελείται από 6 α-έλικες και 7 β-πτυχωτές επιφάνειες. Επιπλέον φέρει ένα μικρό κάλυμμα που συντίθεται από 3 έλικες, χαρακτηριστικό που δεν συναντάται στην τυπική δομή των καρβοξυλεστερασών [43].



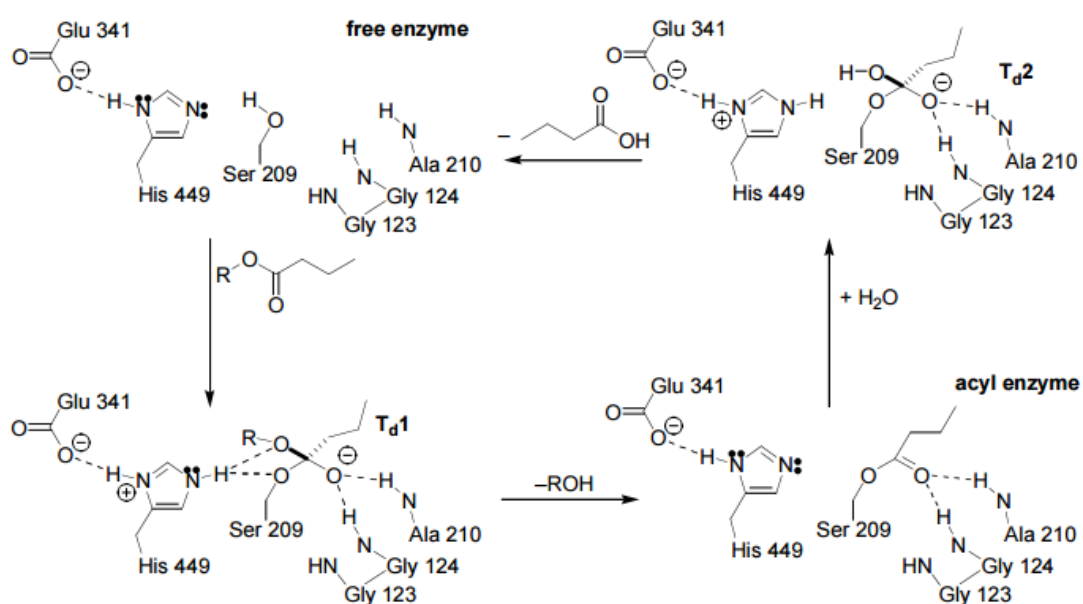
Εικόνα 1.5 a) Τρισδιάστατη δομή της καρβοξυλεστεράσης Est30. 6-α έλικες A-F (κόκκινο) και 7 β-πτυχωτές επιφάνειες 2-8 (πράσινο) με τις ενδείξεις που χρησιμοποιούνται για την ονοματολογία της κλασικής δομής α/β υδρολάσης και 3 έλικες-κάλυμματα (cap) με τις ενδείξεις B₁', D₁', και D₂'. Η καταλυτική τριάδα διακρίνεται με γαλάζιο χρώμα. **b)** Τοπολογικό διάγραμμα της Est30. Οι β-πτυχωτές επιφάνειες παρουσιάζονται ως βέλη, ενώ οι α-έλικες ως κύλινδροι. Το κάλυμμα (cap) αποτελείται από 3 έλικες. Η καταλυτική τριάδα Ser94, Asp193 και His223 υποδεικνύεται με μαύρα αστέρια [43].

1.2.4 Μηχανισμός δράσης

Ο μηχανισμός υδρόλυσης και σύνθεσης εστέρων είναι ο ίδιος τόσο για τις εστεράσες όσο και για τις λιπάσες και διακρίνεται σε τέσσερα στάδια [44]:

1. Το υπόστρωμα προσδένεται στη σερίνη του ενεργού κέντρου, σχηματίζοντας ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο, το οποίο σταθεροποιείται από τα άλλα δύο δραστικά αμινοξέα, την ιστιδίνη και το ασπαραγινικό οξύ.
2. Η αλκοόλη απελευθερώνεται και σχηματίζεται ένα ενδιάμεσο ακυλο-ένζυμο.
3. Πυρηνόφιλη προσβολή στο ακυλο-ένζυμο από το νερό οδηγεί ξανά στη δημιουργία ενός τετραεδρικού ενδιάμεσου.
4. Το οξύ απελευθερώνεται και πλέον το ένζυμο απελευθερώνεται.

Στην περίπτωση της αντίθετης αντίδρασης (εστεροποίησης), ως πυρηνόφιλο στο στάδιο 3 δρα η αλκοόλη και το τελικό προϊόν που απελευθερώνεται είναι ένας εστέρας.



Εικόνα 1.6 Μηχανισμός υδρόλυσης. Η υδρόλυση ενός βουτυλεστέρα περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός ακυλο-ενζύμου και δύο διαφορετικών τετραεδρικών ενδιάμεσων. Η δημιουργία του ακυλο-ενζύμου περιλαμβάνει το πρώτο ενδιάμεσο, το Td1. Η αλκοόλη απελευθερώνεται σε αυτό το στάδιο, το οποίο καθορίζει την εξειδίκευση του ενζύμου ως προς τις αλκοόλες. Η απελευθέρωση του ακυλο-ενζύμου περιλαμβάνει το δεύτερο ενδιάμεσο, το Td2 [44].

1.2.5 Πηγές εστερασών

Οι εστεράσες έχουν απομονωθεί από διάφορους οργανισμούς, συμπεριλαμβανομένων των οποίων βακτηρίων, μυκήτων, φυτών και ζώων. Μεγαλύτερο ενδιαφέρον, από βιομηχανικής σκοπιάς, παρουσιάζουν οι μικροβιακές εστεράσες, λόγω του χαμηλότερου κόστους παραγωγής, συντήρησης αλλά και ευκολίας χειρισμού των μικροβιακών στελεχών [45]. Γονίδια εστερασών έχουν απομονωθεί από μικροοργανισμούς ποικίλων ενδιαιτημάτων, από ψυχρόφιλα υδρόβια βακτήρια έως υπερθερμόφιλα Αρχαία [39]. Από αυτά, τα καταλληλότερα για βιομηχανικές διεργασίες είναι των θερμόφιλων μικροοργανισμών, για λόγους που προαναφέρθηκαν (πίνακας 1.1).

1.3 Βιοκατάλυση σε μη συμβατικά μέσα

Η ανάγκη επέκτασης του εύρους και της αποτελεσματικότητας των πρακτικών εφαρμογών της βιοκατάλυσης έχει οδηγήσει στην αναζήτηση νέων μη συμβατικών μέσων για την επιτέλεση αντιδράσεων. Τέτοια μέσα συμπεριλαμβάνουν τη χρήση οργανικών διαλυτών, η οποία φαίνεται να προσφέρει πολλαπλά πλεονεκτήματα σε πολυάριθμες εφαρμογές. Οι οργανικοί διαλύτες αυξάνουν τη διαλυτότητα των υδρόφοβων υποστρωμάτων, βελτιώνοντας έτσι την απόδοση της αντίδρασης. Στην περίπτωση που χρησιμοποιηθούν διαλύτες με χαμηλό σημείο ζέσης, απλοποιείται η διαδικασία ανάκτησης του προϊόντος και του βιοκαταλύτη. Ο δεύτερος δε διαλύεται στην οργανική φάση, με αποτέλεσμα να μπορεί εύκολα να ανακτηθεί από το μίγμα της αντίδρασης, ενώ το προϊόν μπορεί εύκολα να ληφθεί με εξάτμιση του διαλύτη, εφόσον η διαφορά στο σημείο ζέσης είναι επαρκής. Επιπλέον πλεονεκτήματα αφορούν στη μετατόπιση της θερμοδυναμικής ισορροπίας της αντίδρασης προς την πορεία της σύνθεσης και στη βελτίωση της θερμικής σταθερότητας του ενζύμου.

Παρ' όλα αυτά η χρήση οργανικών διαλυτών ενέχει κάποιους κινδύνους, καθώς δεν είναι σπάνιο σε τέτοια συστήματα να αναστέλλεται πλήρως ή μερικώς η δράση του ενζύμου.

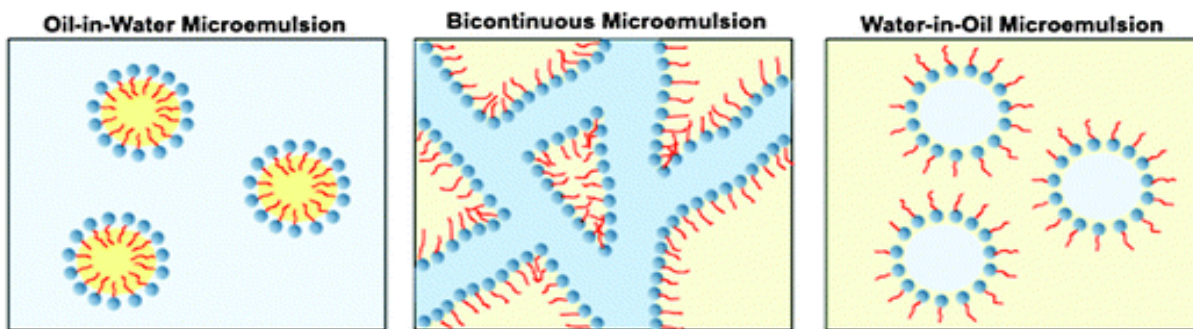
1.3.1 Μικρογαλακτώματα

Τα μικρογαλακτώματα αποτελούν συστήματα νερού, ελαίου και επιφανειοενεργών που σχηματίζουν ένα υγρό διάλυμα, οπτικά ισότροπο και θερμοδυναμικά σταθερό [46]. Χαρακτηρίζονται από χαμηλή διεπιφανειακή τάση, μεγάλο διεπιφανειακό εμβαδόν και χαμηλό ιξώδες. Ο σχηματισμός τους γίνεται αυθόρμητα ή με χαμηλή προσφορά ενέργειας, διατηρώντας ένας μέγεθος σωματιδίων στην εσωτερική διεσπαρμένη φάση της τάξης των 5-100 nm.

Λόγω αυτών των μοναδικών ιδιοτήτων, τα μικρογαλακτώματα διαφέρουν από τα συμβατικά γαλακτώματα και θεωρούνται τα πλέον κατάλληλα συστήματα για τον εγκλωβισμό ουσιών, αυξάνοντας μάλιστα τη βιοδραστικότητά τους.

Με βάση την αναλογία των επιμέρους συστατικών τους, τα μικρογαλακτώματα διακρίνονται στις εξής κατηγορίες:

- Μικρογαλάκτωμα ελαίου σε νερό (oil in water, O/W), όπου τα μικροσταγονίδια του ελαίου (εσωτερική, διεσπαρμένη φάση), που περιβάλλονται από μία μονοστιβάδα επιφανειοενεργών μορίων, διασπείρονται στην υδατική φάση (εξωτερική, συνεχής φάση). Τα επιφανειοενεργά μόρια είναι προσανατολισμένα με την υδρόφιλη κεφαλή στην εξωτερική υδατική φάση και τις υδρόφοβες ουρές προς την ελαιώδη φάση, σχηματίζοντας *μικκύλια*. Πρόκειται για ένα τύπο μικρογαλακτώματος πλούσιο σε νερό αλλά φτωχό σε έλαιο.
- Μικρογαλάκτωμα νερού σε έλαιο (water in oil, W/O), όπου τα σταγονίδια του νερού διασπείρονται στη μη πολική, συνεχή φάση του ελαίου. Οι επιφανειοενεργές ουσίες προσανατολίζονται με την υδρόφιλη κεφαλή προς την εσωτερική υδατική φάση και τις υδρόφοβες ουρές στην εξωτερική, συνεχή φάση, σχηματίζοντας *αντίστροφα μικκύλια*. Πρόκειται για ένα τύπο μικρογαλακτώματος πλούσιο σε έλαιο αλλά φτωχό σε νερό.
- Δισυνεχή μικρογαλακτώματα (bicontinuous), όπου οι ποσότητες νερού και ελαίου είναι συγκρίσιμες. Η δομή τους δεν είναι πλήρως αποσαφηνισμένη, αλλά θεωρείται ότι εδώ συνυπάρχουν οι δύο τύποι των παραπάνω μικρογαλακτωμάτων.

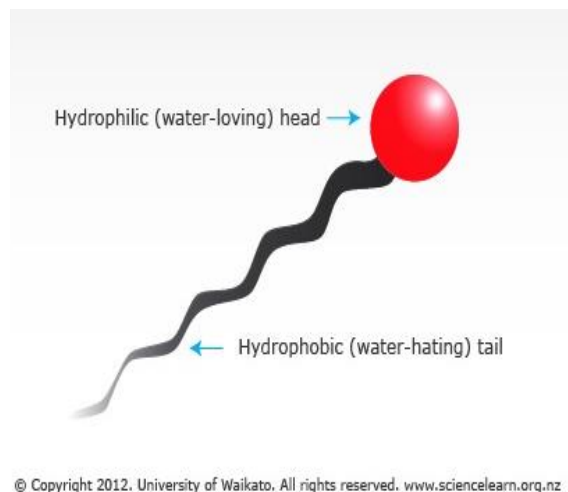


Εικόνα 1.7 Μορφολογία των τριών τύπων μικρογαλακτωμάτων [47]

1.3.1.1 Επιφανειοενεργές ουσίες

Εφόσον έλαιο και νερό αποτελούν δύο μη αναμίξιμες ουσίες, χρειάζεται μία ουσία η οποία πρέπει να αναλάβει το ρόλο της «ανάμιξης» ώστε να λάβει χώρα αυθόρμητη διασπορά σταγονιδίων και να δημιουργηθεί ένα θερμοδυναμικά σταθερό μικρογαλάκτωμα. Τέτοιες ουσίες είναι οι επιφανειοενεργές, η ονομασία των οποίων προέρχεται από την ιδιότητά τους να εντοπίζονται σε επιφάνειες ή μεσεπιφάνειες, επηρεάζοντας την επιφανειακή ή μεσεπιφανειακή τάση [III].

Πρόκειται για μόρια αμφίφιλα, που όπως προαναφέρθηκε, αποτελούνται από δύο περιοχές διαφορετικής πολικότητας. Η μία είναι η υδρόφιλη κεφαλή, η οποία ως πολική προσανατολίζεται προς την υδατική φάση του μικρογαλακτώματος και η άλλη είναι η υδρόφοβη ουρά (υδρογονοανθρακικό τμήμα του μορίου) που προσανατολίζεται προς την ελαιώδη φάση. Κύριος ρόλος όλων αυτών των μορίων είναι η μείωση της διεπιφανειακής τάσης των σταγονιδίων επαρκώς, ώστε να λάβει χώρα αυθόρμητη διασπορά τους και κατ' επέκταση δημιουργία ενός ανθεκτικού φράγματος στη διεπιφάνεια που να εμποδίζει τη συνένωση κατά τη σύγκρουση των σταγόνων [IV], [V].



Εικόνα 1.8 Διαγραμματική απεικόνιση της δομής μίας επιφανειοενεργούς ουσίας (University of Waikato)

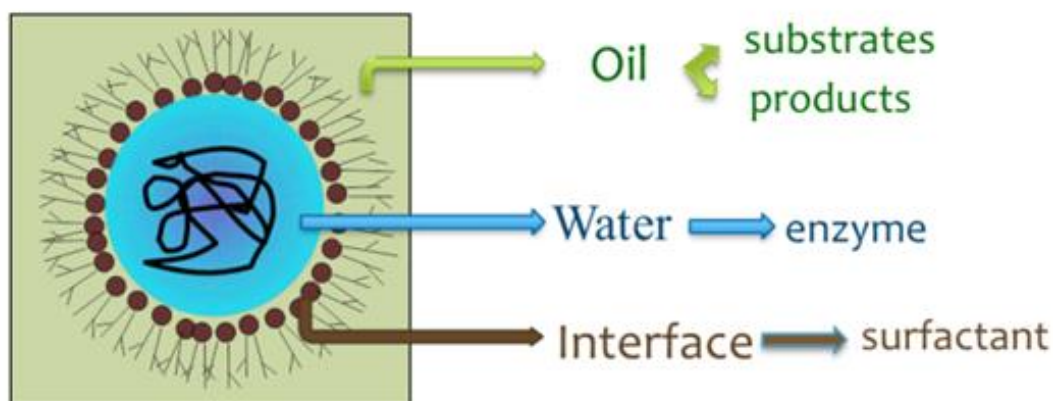
Όπως για τα απλά υδατικά συστήματα, έτσι και για τα μικρογαλακτώματα, ο σχηματισμός του μικρογαλακτώματος εξαρτάται από τη δομή και τον τύπο του επιφανειοενεργού. Ανάλογα με τη φύση τους, οι επιφανειοενεργές ουσίες διακρίνονται σε ιοντικές, μη ιοντικές και επαμφοτερίζουσες.



Εικόνα 1.9 Κατηγορίες επιφανειοενεργών ουσιών με βάση την πολικότητα

1.3.1.2 Εστεράσες σε μικρογαλακτώματα

Τα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο έχουν τη δυνατότητα να εγκλωβίσουν στον υδάτινο θύλακα τους ένζυμα, τα οποία με τον τρόπο αυτό αποφεύγουν την επαφή με τον οργανικό διαλύτη που αποτελεί τη συνεχή εξωτερική φάση, παραμένοντας ταυτόχρονα σε ένα ρυθμιζόμενο περιβάλλον [48]. Τα πλεονεκτήματα εφαρμογής τέτοιων συστημάτων είναι περισσότερα από αυτά της βιοκατάλυσης σε απλό οργανικό διαλύτη, καθώς το ένζυμο δε βρίσκεται σε άμεση επαφή με τη μη πολική φάση, αλλά περιβάλλεται από ένα στρώμα μορίων νερού, γεγονός που συντελεί στη διατήρηση της ενεργού του διαμόρφωσης.

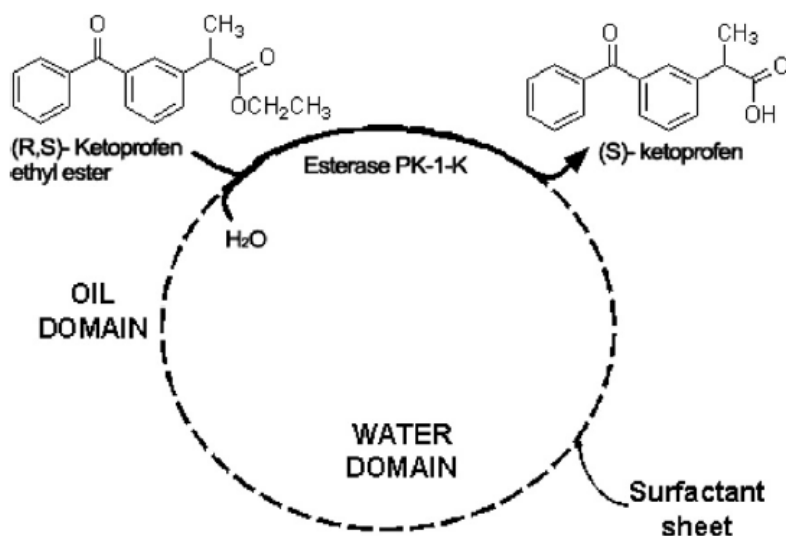


Εικόνα 1.10. Σχηματική απεικόνιση εγκλωβισμού ενζύμου σε μικρογαλακτώμα (w/o)

Μεγάλος αριθμός ενζύμων έχει μελετηθεί σε τέτοια συστήματα. Μεταξύ άλλων υπεροξειδάσες, πρωτεάσες και υδρολάσες με κύριο εκπρόσωπο της τελευταίας κατηγορίας τις λιπάσες, για τις οποίες τα μικρογαλακτώματα αποτελούν ιδανικούς φορείς. Σε όλες τις περιπτώσεις τα ένζυμα στο εσωτερικό των αντίστροφων μικκυλίων φαίνεται να διατηρούν την καταλυτική τους δραστηριότητα [49], [50].

Πολύ λιγότερες είναι οι βιβλιογραφικές αναφορές επί του θέματος για την ομάδα ενζύμων της εργασίας μας, τις εστεράσες. Μία από αυτές αφορά στη σύνθεση φερουλικού πεντυλεστέρα από την εστεράση του φερουλικού οξέος (EC 3.1.1.73) του μύκητα *Aspergillus niger* σε μικρογαλακτώμα νερού σε έλαιο. Στο μικρογαλακτώμα CTAB/εξάνιο/πεντανόλη παρήχθη εστέρας σε απόδοση 60% και το ένζυμο επέδειξε αυξημένη σταθερότητα σε σχέση με την αντίστοιχη σε απλό υδατικό διάλυμα [51]. Μία

άλλη περίπτωση είναι η υδρόλυση κετοπροφένης από την εστεράση PFK-1 του βακτηρίου *Pseudomonas sp.* σε δισυνεχές μικρογαλάκτωμα με ρυθμό μεγαλύτερο από αυτόν σε διφασικά συστήματα. Η αντίδραση αυτή, όπως διακρίνεται στην εικόνα που ακολουθεί, αναμένεται να συμβαίνει στη διεπιφάνεια νερού-ελαίου [52].

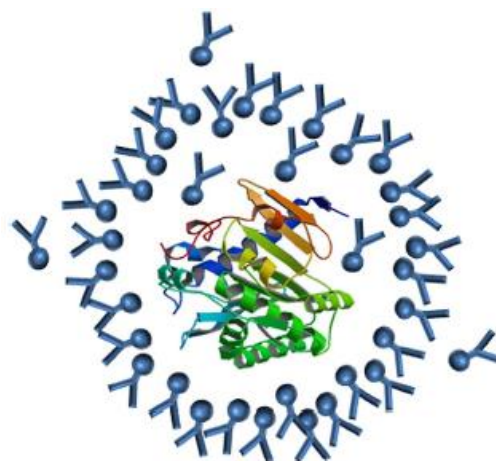


Εικόνα 1.11 Σχήμα ενζυμικής υδρόλυσης κετοπροφένης σε δισυνεχές μικρογαλάκτωμα [52]

1.3.2 Μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοδραστική ουσία

Ένα σημαντικό μειονέκτημα της χρήσης μικρογαλακτωμάτων σε βιομηχανική κλίμακα είναι η δυσκολία διαχωρισμού των προϊόντων της αντίδρασης και επανάκτησης του ενζύμου. Το πρόβλημα αυτό προκύπτει από την παρουσία επιφανειοενεργών ουσιών στα μικρογαλακτώματα, οι οποίες δυσχεραίνουν τις συνήθεις τεχνικές διαχωρισμού, κυρίως μέσω του αφρισμού που προκαλούν. Για την αποφυγή χρήσης επιφανειοενεργών μορίων αναπτύχθηκαν νέα συστήματα μικρογαλακτωμάτων, απουσία τέτοιων ουσιών [53].

Τα συστήματα αυτά είναι τριμερή και αποτελούνται από έναν υδρογονάνθρακα, ισοπροπυλική αλκοόλη (ή άλλη μικρής αλυσίδας αλκοόλη) και νερό και αποτελούν θερμοδυναμικά σταθερά και οπτικά διαπερατά αιωρήματα υδατικών μικροδομών σε οργανικό διαλύτη. Τα σωματίδια σταθεροποιούνται από τα μόρια των αλκοολών που προσροφώνται στην επιφάνειά. Αρκετά ένζυμα επιδεικνύουν σταθερότητα και διατηρούν την καταλυτική τους δραστηριότητα στα συστήματα αυτά, καθώς μέσα στους υδατινούς θύλακες αποφεύγεται η επαφή με την οργανική φάση [53], [54], [55].



Εικόνα 1.12 Μοντέλο διάταξης πρωτεΐνης μέσα σε υδατικό θύλακα, με τα μόρια της προπανόλης να σχηματίζουν τη διεπιφάνεια νερού-ελαίου [55].

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι εστεράσες του φερουλικού οξέος, οι οποίες έχουν μελετηθεί σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό ουσία σε διάφορες συνθετικές αντιδράσεις, όπως φαίνεται στον πίνακα 1.4.

Πίνακας 1.4 Εστεράσες σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό

Esterase	Microorganism	Reaction	Microemulsion composition	Article
Feruloyl esterase (FoFAE-I)	<i>Fusarium oxysporum</i> F3	transesterification of phenolic acid esters with 1-butanol	n-hexane/1-butanol/buffer MES-NaOH	[56]
Feruloyl esterase (FAE-II)	<i>Fusarium oxysporum</i> F3	esterification of phenolic acids with 1-propanol	n-hexane/1-propanol/buffer MES-NaOH	[57]
Feruloyl esterase	<i>Humicola</i> spp. (Depol 740L)	synthesis of feruloylated oligosaccharides	n-hexane/2-butanone/MES-NaOH buffer	[58]
Feruloyl esterase	multi species	synthesis of feruloylated glycosides	n-hexane/1-butanol or 2-butanone/MES – NaOH buffer	[59]
Feruloyl esterase	<i>Sporotrichum thermophile</i>	feruloylation of L-arabinobiose	n-hexane/2-methyl-2-propanol/water	[60]
Feruloyl esterase (StFaeC)	<i>Sporotrichum thermophile</i>	synthesis of phenolic butyl and sugar ester	n-hexane/1-butanol or t-butanol/water	[61]
type-C feruloyl esterase (TsFaeC)	<i>Talaromyces stipitatus</i>	transesterification of ferulic acid alkyl esters with l-arabinose	n-hexane/t-butanol/buffer MOPS-NaOH	[62]

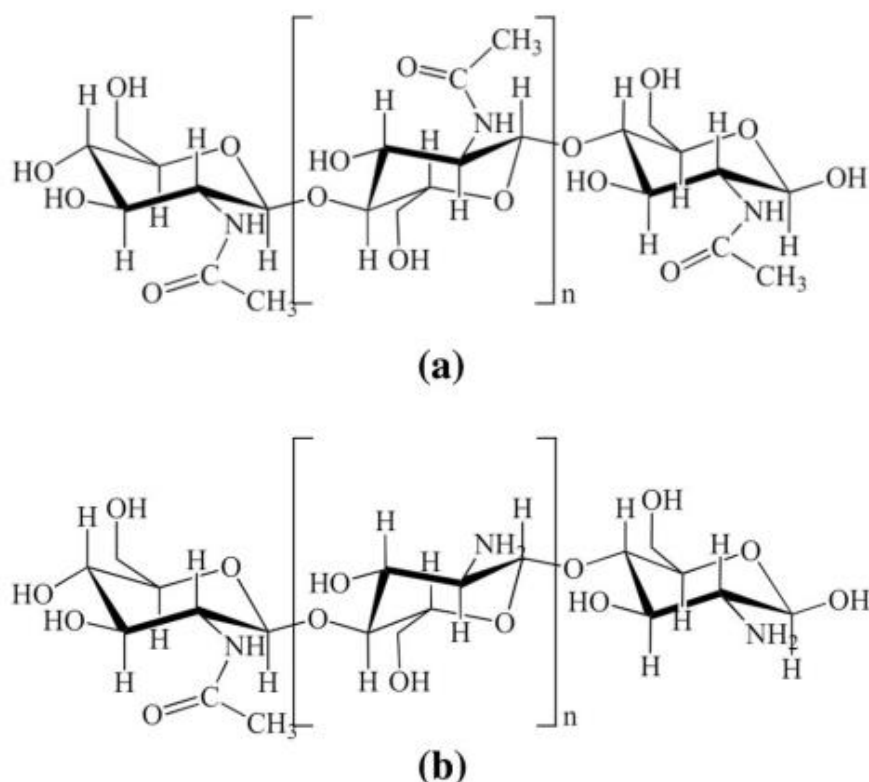
Αντίστοιχες μελέτες για καρβοξυλεστεράσες δεν έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά.

1.3.3 Πήκτωμα χιτοζάνης

Ένας άλλος τρόπος ενίσχυσης της βιοκατάλυσης σε μη συμβατικά συστήματα είναι η ακινητοποίηση του χρησιμοποιούμενου ενζύμου πάνω σε κάποιο φορέα (carrier). Με την ακινητοποίηση αυξάνεται η σταθερότητα του ενζύμου, βελτιώνεται η απόδοσή του,

διευκολύνεται η διαδικασία επανάκτησής του από το μίγμα της αντίδρασης και επιτελείται καλύτερος έλεγχος της πορείας της αντίδρασης [63]. Διάφοροι φορείς, φυσικοί ή τεχνητοί, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα ακινητοποίησης ανάλογα με τις απαιτήσεις του εκάστοτε συστήματος.

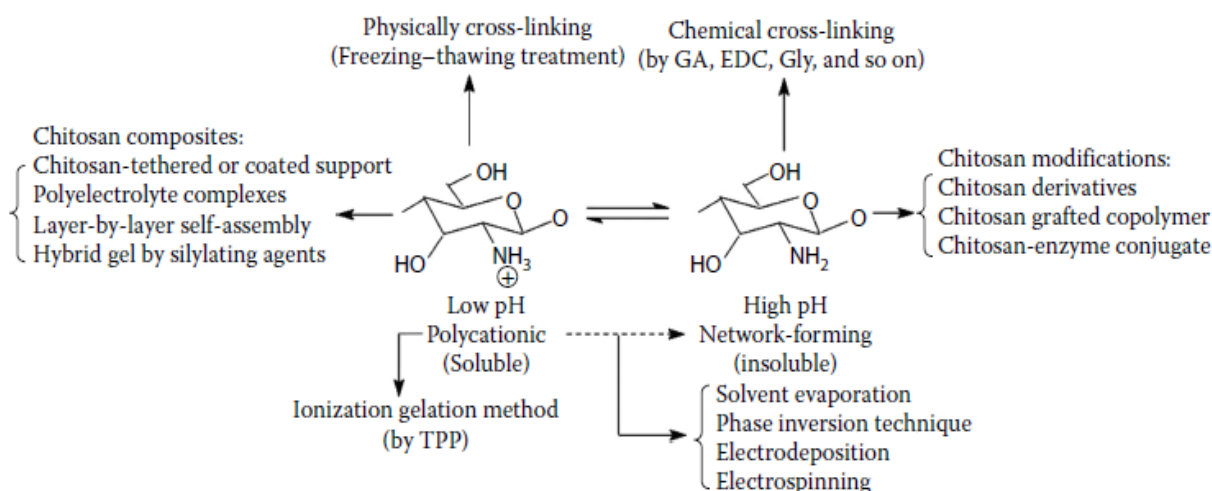
Ένας τέτοιος φορέας είναι η χιτοζάνη, η οποία αποτελεί μία N-αποακετυλιωμένη μορφή του δεύτερου πιο κοινού πολυσακχαρίτη στη φύση, της χιτίνης [64]. Η χημική δομή της χιτίνης και της χιτοζάνης μοιάζει πολύ με αυτή της κυτταρίνης, η οποία αποτελείται από χιλιάδες β-(1-4)-γλυκοζιτικούς δεσμούς, μόνο που στις πρώτες, το υδροξύλιο της θέσης C-2 έχει αντικατασταθεί από μία ομάδα ακεταμιδίου [65].



Εικόνα 1.13 Δομική σχέση μεταξύ χιτίνης (a) και χιτοζάνης (b) [65]

Η χρήση της χιτοζάνης παρουσιάζει ενδιαφέρον λόγω των πολυάριθμων πλεονεκτημάτων που προσφέρει, όπως είναι η μεγάλη συγγένεια με τις πρωτεΐνες, η διαθεσιμότητα πολλών δραστικών ομάδων (-OH και -NH₂) για αντιδράσεις με ένζυμα και χημικές τροποποιήσεις, η υδροφιλικότητα, η μηχανική σταθερότητα και η ευκολία στην παρασκευή σε διάφορες πιθανές γεωμετρικές διαμορφώσεις [63]. Παράλληλα, αποτελεί ένα βιοαπιοκοδομήσιμο, μη τοξικό και αρκετά οικονομικό υλικό, σε σχέση με άλλους φορείς, όπως οι φορείς-πυριτίου ή κάποια συνθετικά πολυμερή [64], [66].

Υπάρχουν πολλοί τρόποι για την προετοιμασία της, ανάλογα με τις απαιτήσεις του κάθε συστήματος (εικόνα 1.13). Μία από αυτές είναι η παρασκευή υδροπηκτώματος (hydrogel), με τη χιτοζάνη να αποτελεί τον παράγοντα πηκτωματοποίησης.



Εικόνα 1.14 Μέθοδοι προετοιμασίας χιτοζάνης ως μέσο ακινητοποίησης [65]

Η ακινητοποίηση εστερασών στο συγκεκριμένο βιοπολυμερές έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά, με διαφορετική μεθοδολογία για την προετοιμασία του κάθε φορά. Η ακινητοποίηση θερμόφιλης εστεράσης του *Geobacillus sp.* έχει πραγματοποιηθεί σε νανοσωματίδια χιτοζάνης, με διατήρηση της ενεργότητάς της κατά 88,5% [67]. Εστεράση του ίδιου μικροοργανισμού έχει ακινητοποιηθεί σε σφαιρίδια άλατος αλγινικού οξέος-χιτοζάνης/ CaCl_2 , επιδεικνύοντας αυξημένη σταθερότητα έναντι αλλαγών στο pH και τη θερμοκρασία [68].

1.4 Βιοτεχνολογικές εφαρμογές εστερασών

Οι εστεράσες διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στην αποικοδόμηση τόσο φυσικών συστατικών όσο και βιομηχανικών ρύπων, όπως απορρητών, πλαστικών και τοξικών ουσιών. Είναι παράλληλα χρήσιμες στη σύνθεση οπτικά καθαρών ουσιών, αρωμάτων και αντιοξειδωτικών. Οι εφαρμογές τους σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας είναι πολυάριθμες, γεγονός που πηγάζει από τα εξής χαρακτηριστικά τους: δεν απαιτούν συμπαραγόντες, είναι εύκολες στην απομόνωση, επιδεικνύουν υψηλή στερεοεκλεκτικότητα και εμφανίζουν αξιοσημείωτη σταθερότητα σε οργανικούς διαλύτες [69].

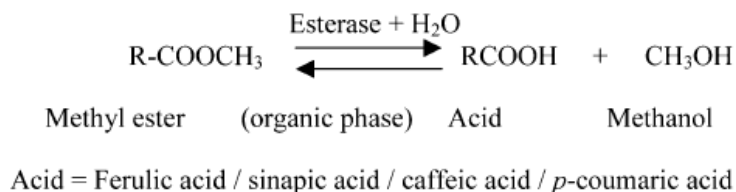
1.4.1 Βιομηχανία τροφίμων & αρωματοποιία

Ως πρόσθετα τροφίμων, οι εστεράσες δρουν ως μέσα για την ενίσχυση της γεύσης και της υφής των τροφίμων. Συνήθως χρησιμοποιούνται στην παραγωγή τυριών και άλλων γαλακτοκομικών προϊόντων καθώς βελτιώνουν τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά [39]. Σαν καταλύτες αντιδράσεων μετεστεροποίησης, μπορούν να μετασχηματίσουν λίπη και έλαια χαμηλής αξίας σε άλλα με πιο επιθυμητές ιδιότητες [69]. Για παράδειγμα, εστεράσες του στελέχους *Lactobacillus casei* CL96 χρησιμοποιούνται για την υδρόλυση λιπών στο γάλα με σκοπό την ενίσχυση της γεύσης κατά την παραγωγή τυροκομικών προϊόντων [70].

Οι εστέρες που συντίθενται από τα ένζυμα αυτά είναι επίσης σημαντικοί για το άρωμα διαφόρων αλκοολούχων ποτών αλλά και φρουτοχυμών. Ο πιο κοινός εξ αυτών στο κρασί είναι ο οξικός αιθυλεστέρας, ο οποίος παράγεται εύκολα από την αιθανόλη και το οξικό οξύ. Η πρώτη εστεράση που απομονώθηκε και κλωνοποιήθηκε μάλιστα από το κρασί ήταν αυτή του βακτηρίου *Oenococcus oeni* [39]. Σε ό,τι αφορά στην παραγωγή μπύρας, έχει αποδειχθεί ότι η εστεράση μίας ζύμης παίζει κύριο ρόλο στον

προσδιορισμό της τελικής συγκέντρωσης εστέρα σε φιλτραρισμένα και επαναζυμωμένα προϊόντα [71]. Μία εστεράση του *Saccharomyces cerevisiae* είναι επίσης σημαντική, με τη βοήθεια ακετυλοτρανσφεράσης, στην παραγωγή οξικού ισοαμυλεστέρα, ο οποίος καθορίζει σε σημαντικό βαθμό τη γεύση του σακε [72].

Οξέα όπως το φερουλικό, το σιναπικό, το κουμαρικό και το καφεϊκό χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων [69]. Οι εστέρες τους εντοπίζονται σε δημητριακά, υπολείμματα αγροτικών μονάδων αλλά και στη βιομάζα. Τα οξέα αυτά μπορούν να απελευθερωθούν με τη δράση των φερουλικών και κινναμωμικών εστερασών του *Aspergillus niger* από πίτουρο, ζαχαροκάλαμο και φύτερες μπαμπού, με τη βοήθεια άλλων ενζύμων, όπως κυτταρινασών, ξυλανασών και πηκτινασών.

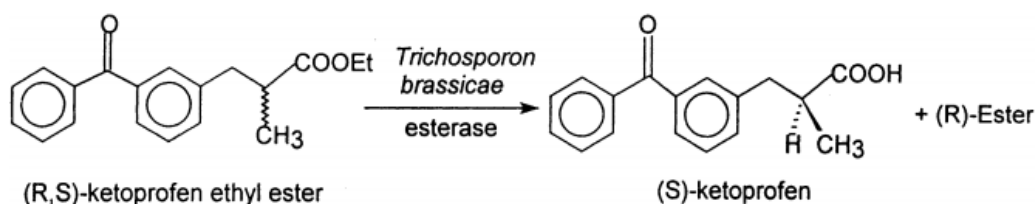


Εικόνα 1.15 Υδρόλυση σημαντικών μεθυλεστέρων από εστεράσες [69]

Μία ακόμη εστεράση, από το μύκητα *Fusarium oxysporum*, καταλύει την παραγωγή αρωματικών ενώσεων από γερανιόλη και λιπαρά οξέα [73]. Άλλες έρευνες, σχετικά με τη χρήση εστερασών στη βιομηχανία τροφίμων, προσανατολίζονται στη βελτίωση της γεύσης των αλλαντικών, όπως για παράδειγμα η εστεράση/λιπάση του στελέχους *Pedococcus pentosauces* SV61, η οποία χρησιμοποιείται για τη βελτίωση της γεύσης σε λουκάνικα [74].

1.4.2 Φαρμακοβιομηχανία

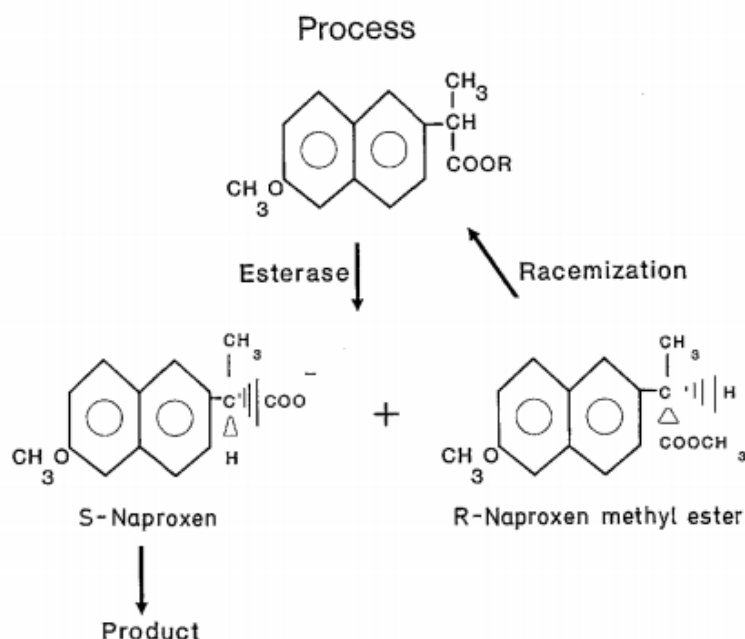
Οι εστεράσες καταλύουν μεγάλη ποικιλία στερεοειδικών αντιδράσεων, παρέχοντας έτσι εξαιρετικές ευκαιρίες στον τομέα της οργανικής σύνθεσης. Η ικανότητά τους να συνθέτουν χειρόμορφα φάρμακα είναι ιδιαίτερη χρήσιμη στην ίαση ορισμένων ασθενειών [33]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η εστεράση του *Trichosporon brassicae* που έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα για τη σύνθεση οπτικά καθαρής (S) και (R) κετοπροφένης, μιας ουσίας με αντιφλεγμονώδη και αναλγητική δράση [75].



Εικόνα 1.16 Παραγωγή κετοπροφένης με χρήση του *T.brassicae* CGMCC0574 [75]

Εστεράσες από τους μικροοργανισμούς *Trichosporon brassicae*, *Rhodococcus sp.*, *Bacillus circulans* και πολλούς ακόμη, μπορούν επίσης να παράγουν μεγάλο αριθμό χειρόμορφων ενώσεων. Εκτός από τα στελέχη αυτά, εστεράσες του *Pseudomonas sp.* έχουν τη δυνατότητα σύνθεσης εμπορικά διαθέσιμων αντιφλεγμονωδών φαρμάκων (NSAIDs), όπως το ibuprofen [69]. Ένα άλλο αντιφλεγμονώδες φάρμακο, η ναπροξένη, συντίθεται από την καρβοξυλεστεράση NP του *Bacillus subtilis*. Η ναπροξένη είναι ένα

μη-στεροειδές παυσίπονο, με το ένα μόνο από τα δύο εναντιομερή της να είναι δραστικό, το οποίο παράγεται από την εστεράση αυτή σε ποσοστό 99% [76].



Εικόνα 1.17 Σχηματική απεικόνιση παραγωγής ναπροξένης. Ο ρακεμικός ναπροξυμεθυλεστέρας επωάζεται με την εστεράση σε αναδευόμενο αντιδραστήρα. Η μη αντιδρώσα R-ναπροξένη απομακρύνεται με διήθηση από την S-ναπροξένη, και το πρώτο εναντιομερές υφίσταται ρακεμοποίηση και ανακυκλώνεται στην πορεία [76].

Η υδρόλυση πιο ογκωδών υποστρωμάτων, όπως του οξικού λιναλυλεστέρα, πραγματοποιείται από την εστεράση EstB (τυπική καρβοξυλεστεράση) του *Burkholderia gladioli*. Το χαρακτηριστικό αυτό έχει εφαρμογή στην παρασκευή ημι-συνθετικών παραγώγων της κεφαλοσπορίνης [77].

Τέλος, εστεράσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε στερεοειδικές μετατροπές κατά την παραγωγή φαρμακευτικών ενδιαμέσων, που περιλαμβάνουν αναστολείς της ακετυλοχολινεστεράσης, αντιμολυσματικά και αντι-ιικά φάρμακα, παράγοντες ανοίγματος καναλιών καλίου και παρεμπόδισης διαύλων ασβεστίου [78].

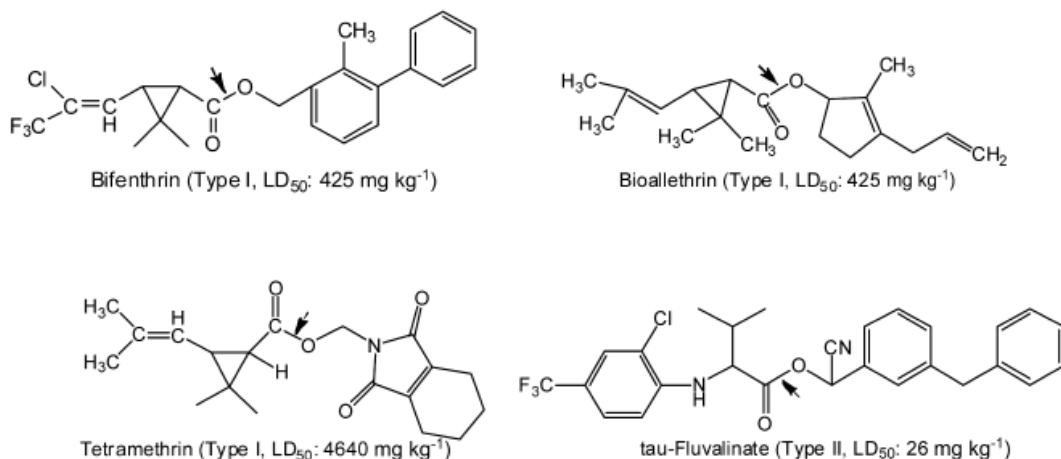
1.4.3 Βιομηχανία παραγωγής χαρτιού

Οι εστεράσες βρίσκουν εφαρμογή και σε βιομηχανίες επεξεργασίας χαρτιού. Μία τέτοια είναι η εστεράση του *Ophiostoma piceae* που χρησιμοποιείται στη χαρτοβιομηχανία, καθώς υδρολύει αποτελεσματικά τόσο τα τριγλυκερίδια, όσο και τους εστέρες στερολών. Εστεράσες χρησιμοποιούνται επίσης για την υδρόλυση του οξικού πολυβινυλεστέρα που είναι παρόν σε κόλλες, κατά τη διαδικασία επεξεργασίας ανακυκλωμένου χαρτιού [79]. Η χρήση των ενζύμων αυτών μειώνει την κατανάλωση ενέργειας και την ποσότητα των χημικών, ελαττώνοντας τις αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον [80].

1.4.4 Εφαρμογές στη γεωργία και το περιβάλλον

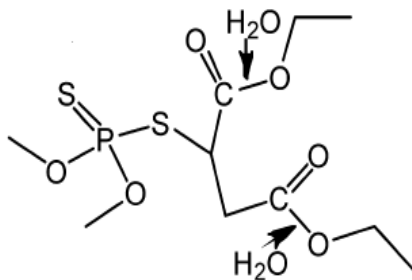
Τα εντομοκτόνα και το φυτοφάρμακα, που αποτελούν συχνά ενώσεις με εστερικό δεσμό, μπορούν να διασπαστούν τόσο από χημικά μέσα όσο και από μικροβιακές πηγές. Η μικροβιακή αποικοδόμηση ωστόσο είναι η πιο ασφαλής και φιλική προς το περιβάλλον μέθοδος, εκμεταλλευόμενη τη δράση των καρβοξυλεστερασών [39].

Τα πυρεθροειδή και το μαλαθείο είναι εντομοκτόνα με επιβλαβείς επιδράσεις σε ανθρώπους και άλλους ανώτερους οργανισμούς. Η τοξικότητα που προκαλούν τα εντομοκτόνα αυτά, οφείλεται στην αναστολή της ακετυλοχολινεστεράσης που έχει ως αποτέλεσμα τη διατάραξη του νευρικού συστήματος, εξαιτίας της υπερπαραγωγής ακετυλοχολίνης (νευροδιαβιβαστής). Οι καρβοξυλεστεράσες, οι οποίες μοιάζουν δομικά με τις ακετυλοχολινεστεράσες, έχουν την ικανότητα να αποτοξινώνουν τις ενώσεις αυτές [81].



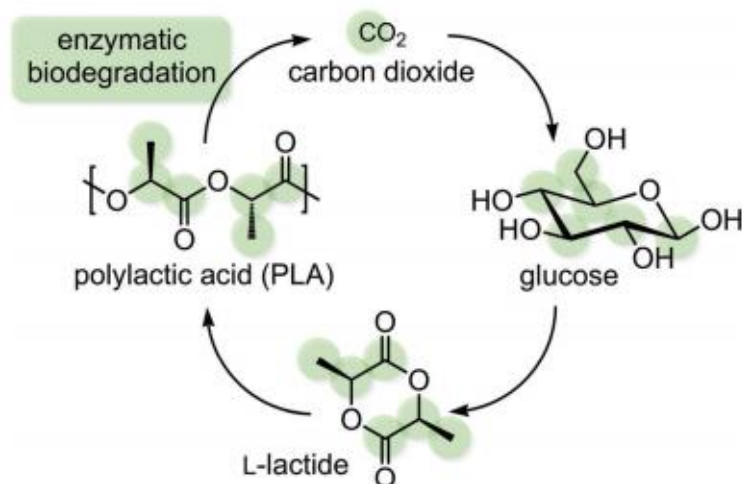
Εικόνα 1.18 Παραδείγματα πυρεθροειδών. Με βελάκια φαίνονται οι θέσεις υδρόλυσής τους [81]

Ένζυμα από το *Alicyclobacillus tengchogenesis* μπορούν να αποικοδομήσουν αρκετά αποτελεσματικά το μαλαθείο [82]. Η αποικοδόμησή του μπορεί να συμβεί και από το βακτήριο *Bacillus licheniformis*, όταν το μαλαθείο αποτελεί τη μόνη πηγή άνθρακα στο περιβάλλον ανάπτυξής του [83]. Η υδρόλυση του συγκεκριμένου εντομοκτόνου έχει παρατηρηθεί επίσης και από τα βακτήρια *Brevibacillus sp.* και *Bacillus cereus* [84].



Εικόνα 1.19 Θέσεις υδρόλυσης μαλαθείου [81]

Πέρα των εντομοκτόνων, οι μικροβιακές εστεράσες μπορούν να υδρολύσουν αποτελεσματικά διάφορους πολυεστέρες και παίζουν σημαντικό ρόλο στον αποπολυμερισμό του πλαστικού. Εστεράσες από μεταγενωμικές πηγές έχει αποδειχθεί πως μπορούν να αποικοδομήσουν πολλά πολυεστερικά υποστρώματα, συμπεριλαμβανομένου του πολυγαλακτικού οξέος (PLA), το οποίο αποτελεί το πιο δημοφιλές βιοπολυμερές παγκοσμίως [85].



Εικόνα 1.20 Ο κύκλος ζωής του PLA βασίζεται κυρίως στην ενζυμική του αποικοδόμηση [86]

1.5 Σκοπός της εργασίας

Η παρούσα εργασία εντάσσεται στο πλαίσιο των ερευνητικών δραστηριοτήτων δύο εργαστηρίων. Της Ομάδας Μικροβιολογίας του ΕΚΠΑ από τη μία, που μελετά το ενζυμικό δυναμικό θερμόφιλων βακτηριακών στελεχών που έχουν συλλεχθεί από το ηφαιστειακό σύμπλεγμα της Σαντορίνης [3] και της ομάδας Βιομηχανικής & Νανοβιοτεχνολογίας του ΕΙΕ από την άλλη, που δραστηριοποιείται, μεταξύ άλλων, στη βιοκατάλυση σε μικρογαλακτώματα και γέλες βασισμένες σε φυσικά πολυμερή.

Το ένζυμο που επιλέχθηκε, η καρβοξυλεστεράση του θερμόφιλου στελέχους *Geobacillus sp.* SP50, δεν έχει μελετηθεί στο παρελθόν ως προς την ικανότητα κατάλυσης αντιδράσεων σε υδατικά και μη υδατικά μέσα. Το γεγονός αυτό, σε συνδυασμό με τις περιορισμένες αναφορές που υπάρχουν για τη δράση εστερασών θερμόφιλης βακτηριακής προέλευσης σε μη συμβατικά συστήματα καθιστά το θέμα σαν μία πρώτη προσπάθεια αξιολόγησης της υδρολυτικής και συνθετικής της ικανότητας.

2. Υλικά & Μέθοδοι

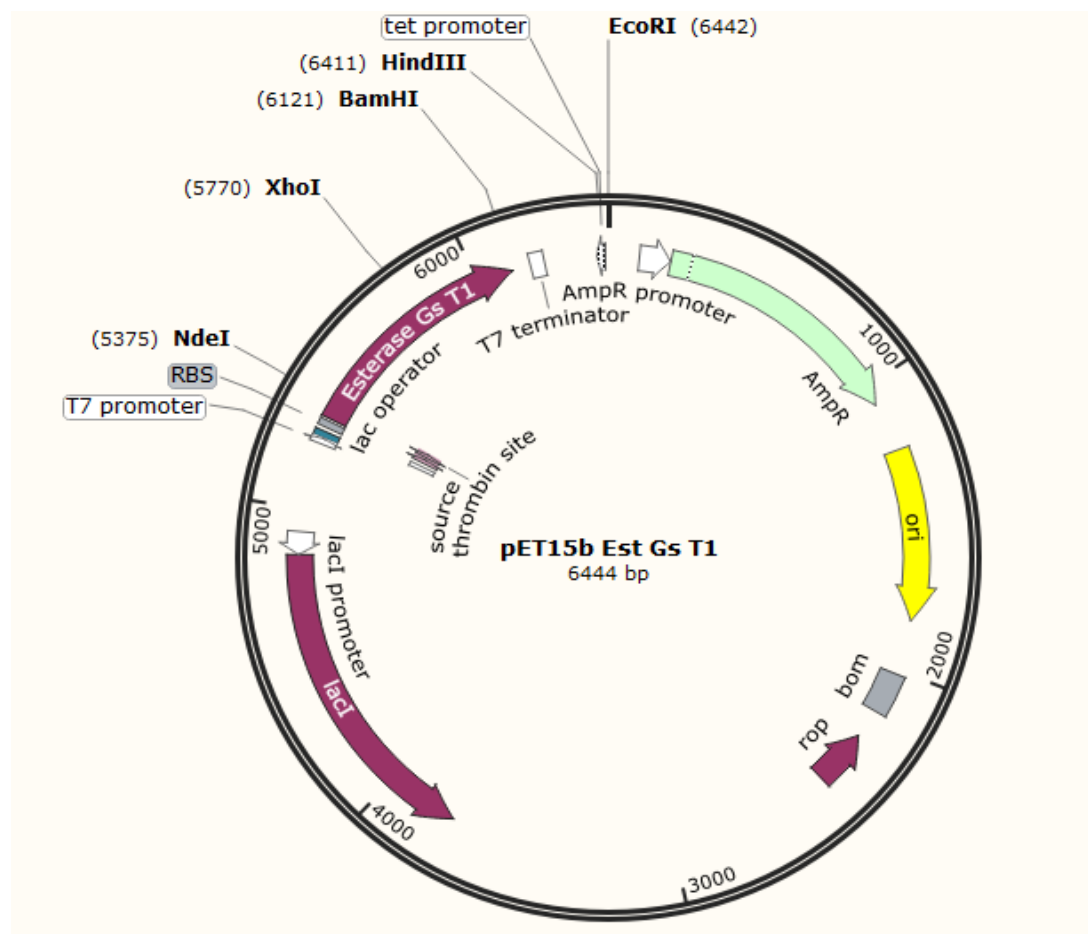
2.1 Υλικά

2.1.1 Μικροοργανισμοί και πλασμιδιακοί φορείς

Το βακτηριακό στέλεχος από το οποίο απομονώθηκε το γονίδιο της εστεράσης ήταν το *Geobacillus* sp. SP50, το οποίο προέρχεται από την τράπεζα βακτηριακών στελεχών του Εργαστηρίου Μικροβιολογίας (Τμήμα Βιολογίας-ΕΚΠΑ). Η τράπεζα αυτή, αποτελείται από μικροοργανισμούς που συλλέχθηκαν από επιλεγμένες οικοθέσεις του ηφαιστειακού συμπλέγματος της Σαντορίνης και έχουν την ικανότητα ανάπτυξης σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 60 °C σε διάφορα θρεπτικά μέσα [3]. Τα στελέχη της τράπεζας, συντηρούνται σε διάλυμα γλυκερόλης 30% (w/v) σε θερμοκρασία -20 °C.

Το συγκεκριμένο στέλεχος που ανήκει στο γένος *Geobacillus* και στον κλάδο *G.kaustophilus*, εμφανίζει μεγαλύτερη ομοιότητα (>96%) με το είδος *G.thermoleovorans*, με βάση συγκρίσεις 16S rRNA αλληλουχιών.

Το γονίδιο αυτό κλωνοποιήθηκε στο στέλεχος *E.coli* DH5a, μέσω του πλασμιδίου *ret-15b*. Ο πλασμιδιακός φορέας *ret-15b* (5708bp) που χρησιμοποιήθηκε, διαθέτει έναν πολυσυνδέτη (polylinker) που φέρει θέσεις κοπής για διάφορα περιοριστικά ένζυμα, όπως τα *Bam*HI και *Nde*I, που αναγνωρίζουν αντίστοιχες θέσεις και στο γονίδιο της εστεράσης.



Εικόνα 2.1 Χάρτης του ανασυνδυασμένου πλασμιδίου *ret15b-EstGsT1*

Πριν από το σημείο ένθεσης του γονιδίου βρίσκεται ο χειριστής του οπερονίου της λακτόζης και έτσι η έκφρασή του πραγματοποιείται με την παρουσία του ισοπροπυλο-β-

D-θειογαλακτοπυρανοζιδίου (IPTG). Το IPTG, ως μοριακό ανάλογο της λακτόζης, προσδένεται στον καταστολέα του σπερονίου, επιτρέποντας την έκφραση του γονιδίου ενδιαφέροντος από τον T7 υποκινητή της RNA πολυμεράσης. Επιπλέον, επειδή το IPTG δεν μπορεί να μεταβολιστεί από τα ένζυμα καταβολισμού της λακτόζης (β-γαλακτοσιδάση), διατηρείται στο κύτταρο με αποτέλεσμα ο ρυθμός παραγωγής της εστεράσης να παραμένει σταθερός. Μια άλλη σημαντική αλληλουχία του πλασμιδιακού φορέα είναι αυτή που κωδικοποιεί 6 αμινοξέα ιστιδίνης (His-Tag) και αποτελεί τη βάση για τον καθαρισμό της ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης. Τέλος, το πλασμίδιο φέρει ένα γονίδιο ανθεκτικότητας στην αμπικιλίνη και έτσι η επιλογή των μετασχηματισμένων κυττάρων βασίζεται στην ικανότητα ανάπτυξης παρουσία του συγκεκριμένου αντιβιοτικού.

Για την υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης εστεράσης χρησιμοποιήθηκε το στέλεχος *E.coli* BL21.

2.1.2 Θρεπτικά μέσα

Για την ανάπτυξη των μετασχηματισμένων κυττάρων *E.coli* χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό υπόστρωμα Luria-Bertani (LB) με σύσταση:

- 0,5% Yeast Extract
- 1% Tryptone
- 1% NaCl

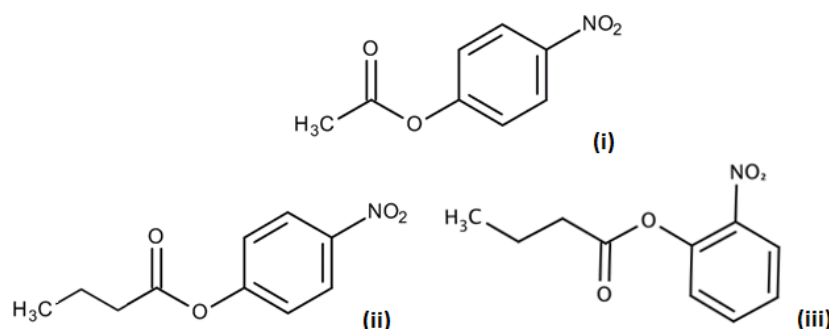
Το θρεπτικό αυτό μέσο εμπλουτίστηκε με το αντιβιοτικό αμπικιλίνη σε συγκέντρωση 1%.

Πριν τον εμβολιασμό έγινε αποστείρωση του μέσου σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκαυστο) στους 121 °C για 20 min υπό πίεση 0,1 MPa.

2.1.3 Χημικά αντιδραστήρια

2.1.3.1 Υποστρώματα

Οι βουτυρικοί εστέρες της ο,π-νιτροφαινόλης (ο-,p-NPB) και ο οξικός εστέρας της π-νιτροφαινόλης (p-NPA) που χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας προμηθεύτηκαν από την εταιρεία Sigma. Η καθαρότητά τους ήταν αναλυτικού βαθμού.



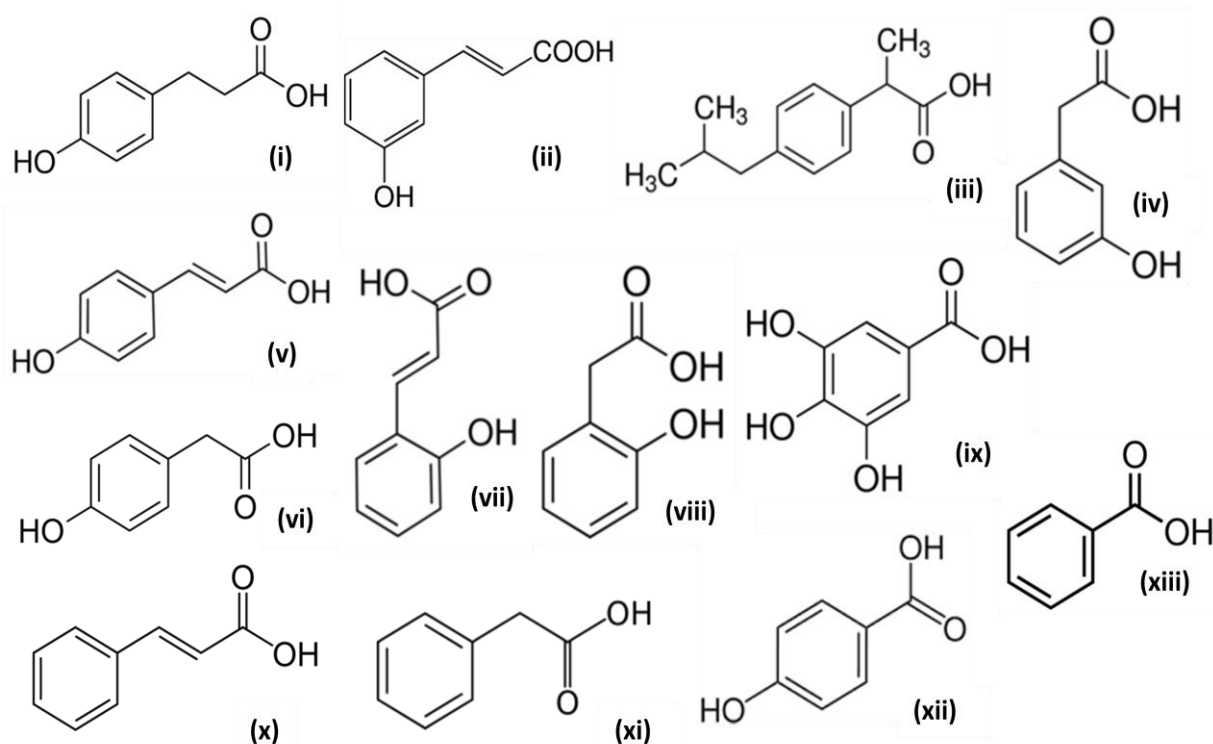
Εικόνα 2.2 Συντακτικός τύπος εστέρων της νιτροφαινόλης : i)p-NPA, ii)p-NPB, iii)o-NPB

Οι πρωτοταγείς αλκοόλες 1-προπανόλη, 1-βουτανόλη και 1-οκτανόλη ήταν από τις εταιρείες Merck, Ferak Berlin και Alfa Aesar αντίστοιχα, καθαρότητας ≥99%. Η 2-προπανόλη ήταν της εταιρείας BDH, ανάλογου βαθμού καθαρότητας με τις πρωτοταγείς

αλκοόλες. Οι αλκοόλες νερόλη (3,7-διμεθυλ-2,6-οκταδιεν-1-όλη) και γερανιόλη προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες TCI και Acros organics με καθαρότητα >98% και για και 99% αντίστοιχα.

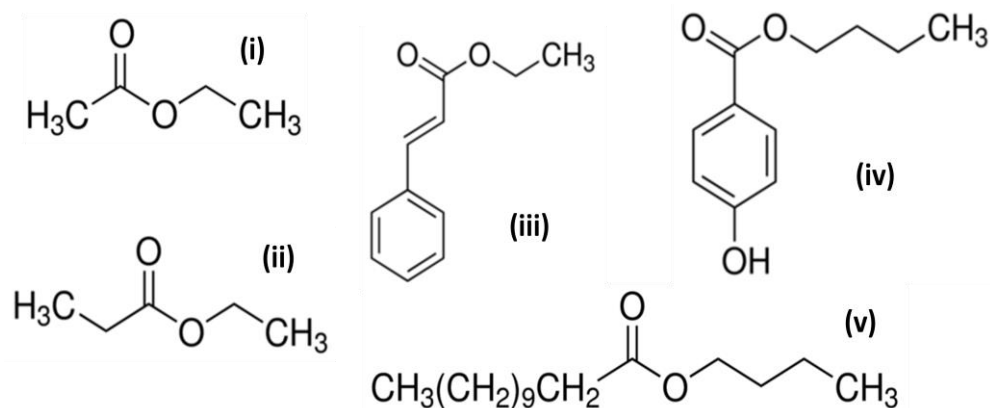
Τα αλειφατικά οξέα οξικό, βουτυρικό, εξανοϊκό και λαυρικό οξύ ήταν των εταιρειών Merck, ICN Biomedicals, Alfa Aesar και Merck, αντίστοιχα, όλα καθαρότητας αναλυτικού βαθμού.

Τα φαινολικά οξέα π-υδροξυφαινυλοπροπιονικό οξύ (p-HPP), ο, μ, π-κουμαρικά οξέα, π-υδρόξυβενζοϊκό οξύ (p-HBA) ήταν από την εταιρεία Sigma, τα ο, μ, π-υδροξυφαινυλοξικά οξέα (HPA) ήταν από τις εταιρείες Fluka, Aldrich και Sigma αντίστοιχα, ενώ το 2-(4-ισοβουτυλο-φαινυλο)-προπιονικό οξύ (ibuprofen) και το κινναμωμικό οξύ από την Fluka. Το φαινυλοξικό οξύ ήταν της εταιρείας Fluka, το βενζοϊκό οξύ της εταιρείας Bacacos, ενώ το 3,4,5-τριυδροξυβενζοϊκό οξύ (γαλλικό οξύ) της εταιρείας Sigma.



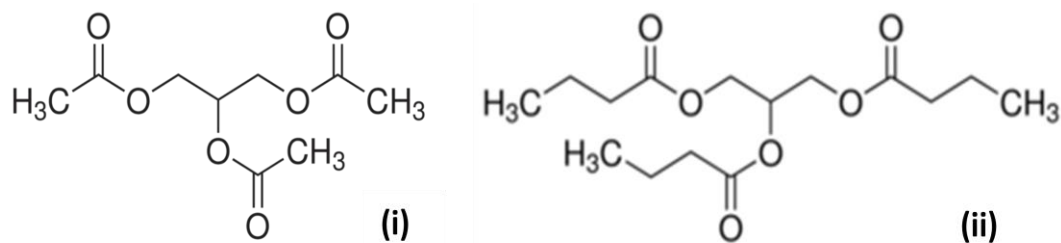
Εικόνα 2.3 Συντακτικός τύπος των φαινολικών οξέων : i) p-HPP, ii) μ-κουμαρικό οξύ, iii) ibuprofen, iv) m-HPA, v) π-κουμαρικό οξύ, vi) p-HPA, vii) ο-κουμαρικό οξύ, viii) ο-HPA, ix) γαλλικό οξύ, x) κινναμωμικό οξύ, xi) φαινυλοξικό οξύ, xii) p-HBA, xiii) βενζοϊκό οξύ

Ο οξικός αιθυλεστέρας, καθαρότητας $\geq 99,8\%$ ήταν προϊόν της εταιρείας Carlo Erba Reagents, ενώ ο προπιονικός αιθυλεστέρας, ο λαυρικός (δωδεκανοϊκός) βουτυλεστέρας, ο κινναμωμικός αιθυλεστέρας όπως και ο π-υδροξυβενζοϊκός βουτυλεστέρας (p-HBA n-butyl ester), καθαρότητας $\geq 99\%$, ήταν της εταιρείας Sigma.



Εικόνα 2.4 Συντακτικός τύπος εστέρων : i)οξικός αιθυλεστέρας, ii)προπιονικός αιθυλεστέρας, iii)κινναμωμικός αιθυλεστέρας, iv) p-HBA βουτυλεστέρας, v)λαυρικός βουτυλεστέρας

Τα τριγλυκερίδια τριβουτυρίνη και τριακετίνη, καθαρότητας αναλυτικού βαθμού, προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Fluka και Vioeryl αντίστοιχα.



Εικόνα 2.5 Συντακτικός τύπος τριακετίνης (i) και τριβουτυρίνης (ii)

2.1.3.2 Διαλύτες

Οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν, ισοοκτάνιο (2,2,4-τριμέθυλοπεντάνιο), εξάνιο και ακετόνη, υψίστου βαθμού καθαρότητας, ήταν της εταιρείας Merck .

2.1.3.3 Επιφανειοενεργές ουσίες

Η ανιονική επιφανειοδραστική ουσία AOT (Dioctyl sodium sulfosuccinate), καθαρότητας 96%, προμηθεύτηκε από την εταιρεία Alfa Aesar, ενώ η λεκιθίνη (L-α-phosphatidylcholine) από την εταιρεία Sigma.

2.1.3.4 Φορείς πηκτωματοποίησης

Η χιτοζάνη (200-600 mPas, 0,5% in 0,5% acetic acid at 20 degC) ήταν προϊόν της εταιρείας TCI, με ποσοστό αποακετυλίωσης 80%.

2.1.4 Ρυθμιστικά διαλύματα

Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται στον πίνακα 2.1.

Πίνακας 2.1 Σύσταση χρησιμοποιούμενων ρυθμιστικών διαλυμάτων

Ρυθμιστικά διαλύματα	Σύσταση
Γενικής χρήσης	
Διάλυμα K_2HPO_4/KH_2PO_4	0,25 M K_2HPO_4 , 0,25 M KH_2PO_4 pH=8-8,5
Tris-HCl	0,01-0,1 M Tris base, HCl pH=7-9
Διάλυμα $NaHCO_3/Na_2CO_3$	0,1 M $NaHCO_3$, 0,1 M Na_2CO_3 , pH=10
Καθαρισμού πρωτεϊνών	
NPI-10 (διάλυμα λύσης και εξισορρόπησης στήλης)	50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM imidazole
NPI-20 (διάλυμα έκπλυσης στήλης)	50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 20 mM imidazole
NPI-250 (διάλυμα έκλουσης πρωτεϊνών)	50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 250 mM imidazole

2.1.5 Όργανα- Συσκευές

- Συσκευή μέτρησης pH της εταιρείας Metrohm (691 pHMeter)
- Αυτόκαυστο
- Θερμοστατούμενο υδατόλουτρο
- Thermoshaker TS-100 της εταιρείας Boeco
- Συσκευή παραγωγής υπέρηχων Vibra Cell, 400W της εταιρείας Sonics & Materials
- Φυγόκεντροι Hettisch EBA III, Sigma 4K15
- Μονάδα ηλεκτροφόρησης για διαχωρισμό πρωτεϊνών της εταιρείας Biorad
- Φωτόμετρο (Multiscan™ Go, Thermo Scientific)
- Φασματοφωτόμετρο Varian Cary 1E UV/Vis
- Θερμοστατούμενο φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης Hitachi U-2000
- Σύστημα παραγωγής υπερκαθαρού νερού Direct-Q, Millipore (H.Π.Α.)
- Αέριος χρωματογράφος HP 6890 Series, εφοδιασμένος με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID)
- Αέριος χρωματογράφος Perkin Elmer Autosystem XL , εφοδιασμένος με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID)

2.1.6 Υλικά χρωματογραφίας

Για τον προσδιορισμό των καρβοξυλικών οξέων και των εστέρων τους, στη μελέτη των αντιδράσεων σύνθεσης, αλλά και κάποιων αντιδράσεων υδρόλυσης χρησιμοποιήθηκε ο αέριος χρωματογράφος HP 6890 Series. Η τριχοειδής στήλη που έφερε ήταν η HP-5 με υλικό πλήρωσης φαινυλομεθυλοσιλοξάνιο και διαστάσεις 30 m x 0,25 μm x 0,32 mm από την εταιρεία Hewlett-Packard. Η σύριγγα μέσω της οποίας γινόταν η εισαγωγή του δείγματος στον αέριο χρωματογράφο ήταν όγκου 10 μL από την εταιρεία Hamilton. Ως εσωτερικό πρότυπο χρησιμοποιήθηκε δωδεκάνιο, το οποίο ήταν προϊόν της εταιρείας Merck.

Στην περίπτωση των αντιδράσεων υδρόλυσης με ελεύθερο ένζυμο, ο προσδιορισμός των οξέων και των εστέρων πραγματοποιήθηκε στον αέριο χρωματογράφο Perkin Elmer Autosystem XL με στήλη την Supelco-wax 10 της εταιρείας Sigma. Για την εισαγωγή του δείγματος στον χρωματογράφο χρησιμοποιήθηκε σύριγγα όγκου 1 μL, της εταιρείας SGE.

2.2 Μέθοδοι Παραγωγής και Ανάλυσης πρωτεϊνών

2.2.1 Κλωνοποίηση

Το γονίδιο της εστεράσης ενισχύθηκε χρησιμοποιώντας ως μήτρα DNA από το βακτήριο *Geobacillus* sp. SP50 και εκκινητές, η αλληλουχία των οποίων διακρίνεται στον πίνακα 2.2.

Πίνακας 2.2 Χαρακτηριστικά εκκινητών PCR

Εκκινητής	Αλληλουχία (5' → 3')	Μήκος	GC%	Tm
Πρόσθιος	GTAcATGATGAAAATTGTTCCGCCGAAG	30	40	58,1
Ανάστροφος	GTAaggatccTTACCAATCTAACGATTCAAGAAAT	35	37,1	58,1

Το γονίδιο αυτό κλωνοποιήθηκε σε φορέα *ret-15b* με τη βοήθεια των περιοριστικών ενζύμων *NdeI* και *BamHI*, ο οποίος πολλαπλασιάστηκε έπειτα σε κύτταρα *E.coli* DH5a.

2.2.2 Εξαγωγή ανασυνδυασμένων πλασμιδίων

Η εξαγωγή των ανασυνδυασμένων πλασμιδίων *ret-15b* από τα DH5a κύτταρα έγινε με βάση το πρωτόκολλο: *Nucleospin Plasmid/Plasmid (NoLid) protocols*, *Isolation of high copy plasmid DNA from E.coli* (Macherey-Nagel). Η ακριβής διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

Καλλιέργεια και συλλογή βακτηριακών κυττάρων:

5 mL καλλιέργειας *E.coli* DH5a φυγοκεντρήθηκαν για 30s στις 11000 x g και απορρίφθηκε το υπερκείμενο.

Λύση κυττάρων

Στο ίζημα προστέθηκαν 250 μL ρυθμιστικού διαλύματος επαναιώρησης A1 και αυτό επαναδιαλύθηκε με έντονη ανάδευση στο vortex. Έπειτα προστέθηκαν 250 μL διαλύματος λύσης A2 και ακολούθησε ήπια ανάδευση με απλή ανακίνηση του *erpendorf*. Το δείγμα επωάστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Στη συνέχεια προστέθηκαν 300 μL ρυθμιστικού διαλύματος εξουδετέρωσης A3 και το δείγμα αναδεύτηκε ελαφρά έως ότου το μπλε χρώμα εξαφανίστηκε τελείως. Ακολούθησε μία ακόμα φυγοκέντρηση στις 11000 x g για 5 min.

Δέσμευση DNA

Σε σωλήνα συλλογής (2 mL) τοποθετήθηκε μία στήλη *NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid)* όπου και μεταγγίστηκε το υπερκείμενο της τελευταίας φυγοκέντρησης. Εν συνεχεία το δείγμα φυγοκεντρήθηκε για 1 min στις 11000 x g. Ό,τι εκλούσθηκε απορρίφθηκε και η στήλη επανατοποθετήθηκε στο σωλήνα συλλογής.

Πλύση & ξήρανση της μεμβράνης σιλικόνης

Στο σωλήνα προστέθηκαν 600μL διαλύματος έκπλυσης A4 και ακολούθησε φυγοκέντρηση για 1 min στις 11000 x g. Ό,τι εκλούσθηκε απορρίφθηκε και η στήλη τοποθετήθηκε στον άδειο σωλήνα συλλογής. Το επόμενο βήμα ήταν μία ακόμη φυγοκέντρηση για 2 min στις 11000 x g και η επακόλουθη απόρριψη του σωλήνα συλλογής.

Έκλυση του DNA

Η στήλη *NucleoSpin® Plasmid/Plasmid (NoLid)* τοποθετήθηκε σε ένα σωλήνα μικροφυγοκέντρησης όπου και προστέθηκαν 50 μL ρυθμιστικού διαλύματος έκλυσης

ΑΕ. Το δείγμα επωάστηκε για 1 min σε θερμοκρασία δωματίου και φυγοκεντρήθηκε για τον ίδιο χρόνο στις 11000 x g.

2.2.3 Μετασχηματισμός και καλλιέργεια βακτηριακών κυττάρων

Για το μετασχηματισμό χρησιμοποιήθηκαν τα επιδεκτικά στελέχη *E.coli* BL21 και το ανασυνδυασμένο πλασμίδιο *ret-15b* που απομονώθηκε από τα DH5a κύτταρα.

Η μέθοδος που ακολουθήθηκε βασίστηκε στο πρωτόκολλο του Sambrook [87]. Συγκεκριμένα, 10 μL από το πλασμιδιακό DNA προστέθηκαν σε 200 μL επιδεκτικών κυττάρων και το μείγμα, αφού αναδεύτηκε ήπια, επωάστηκε στον πάγο για 30 min. Στη συνέχεια ακολούθησε θερμικό σοκ στους 42 °C σε προθερμασμένο υδατόλουτρο για 90 s. Αμέσως μετά, το δείγμα τοποθετήθηκε και πάλι στον πάγο, όπου και αφέθηκε 1-2 min για να κρυώσει. Έπειτα προστέθηκαν σε αυτό 800 μL θρεπτικού υλικού LB και η καλλιέργεια επωάστηκε στους 37 °C για 1 h. Τέλος, 0,8 mL από τα μετασχηματισμένα κύτταρα μεταφέρθηκαν σε 5 mL υγρού θρεπτικού LB εμπλουτισμένου με αμπικιλίνη, ώστε να εξασφαλιστεί η ανάπτυξη μόνο των ανασυνδυασμένων βακτηρίων, και η καλλιέργεια αφέθηκε όλο το βράδυ για επώαση στους 37 °C.

Από την καλλιέργεια αυτή, 10 μL χρησιμοποιήθηκαν για τον εμβολιασμό 5 mL νέου θρεπτικού υλικού LB που περιείχε 5 μL αμπικιλίνης. Η καλλιέργεια αφέθηκε να επωαστεί υπό αργή ανάδευση για 20-24 h στους 37 °C.

Ύστερα, όλη η ποσότητα της προκαλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε για τον εμβολιασμό 100 mL θρεπτικού υλικού LB, εμπλουτισμένου με 100 μL αμπικιλίνης και η κωνική φιάλη τοποθετήθηκε υπό αργή ανάδευση για 2 h στους 37 °C. Όταν η καλλιέργεια έφτασε στην εκθετική φάση (OD = 0,6) τότε εμβολιάστηκε με αυτήν 1 L θρεπτικού LB με συγκέντρωση αμπικιλίνης 1‰ και η αποστειρωμένη κωνική φιάλη επωάστηκε στους 37 °C για 2-3 h έως ότου η οπτική πυκνότητα να φτάσει στην τιμή απορρόφησης 0,6.

2.2.4 Υπερέκφραση της ανασυνδυασμένης εστεράσης

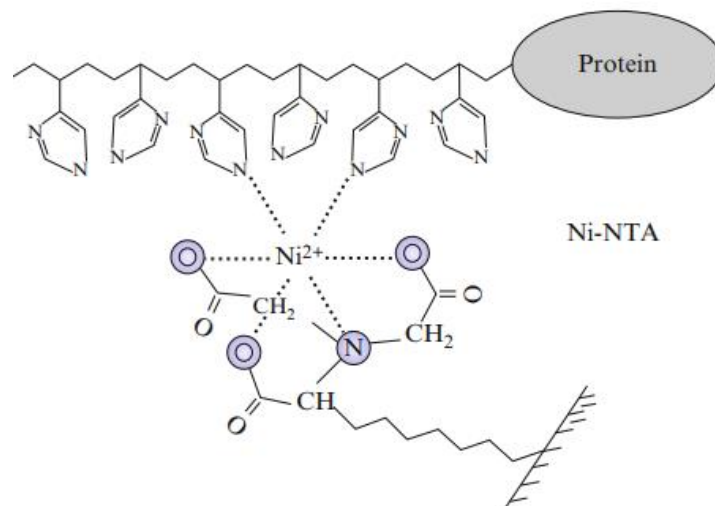
Για την έκφραση της εστεράσης προστέθηκε κατά την εκθετική φάση (OD = 0,6-0,8) της καλλιέργειας διάλυμα IPTG τελικής συγκέντρωσης 0,1 M. Το IPTG, όπως προαναφέρθηκε, πυροδοτεί την έκφραση γονιδίων που βρίσκονται κάτω από τον έλεγχο του *lac* χειριστή. Έπειτα η καλλιέργεια τοποθετήθηκε προς επώαση στους 18 °C υπό ανάδευση για 20-24 h.

2.2.5 Προετοιμασία καθαρισμού

Αρχικά η καλλιέργεια φυγοκεντρήθηκε για 2 h στις 4000 x g και συλλέχθηκε το ίζημα, το οποίο επαναδιαλύθηκε σε 20 mL ρυθμιστικού διαλύματος NPI-10. Για τη διάρρηξη των κυττάρων χρησιμοποιήθηκε συσκευή υπερήχων με ρύθμιση 3 s ON και 9 s OFF σε συνολικό χρόνο διαδικασίας τα 20 min (amplitude 95%). Έπειτα το δείγμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο στους 60 °C με σκοπό την αποδιάταξη των μεσόφιλων πρωτεϊνών του *E.coli*. Τέλος, το δείγμα φυγοκεντρήθηκε στις 20000 x g για 20 min και διατηρήθηκε το υπερκείμενο, το οποίο περιείχε το σύνολο των υδατοδιαλυτών πρωτεϊνών των κυττάρων.

2.2.6 Καθαρισμός ενζύμου

Η απομόνωση της εστεράσης από το πρωτεϊνικό εκχύλισμα πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της Χρωματογραφίας Συγγένειας Ακίνητοποιημένου Μετάλλου (IMAC). Η τεχνική αυτή στηρίζεται στη χημική συγγένεια δέσμευσης που παρουσιάζουν ορισμένα αμινοξέα με κατιόντα μετάλλου (Ni²⁺, Co²⁺, Zn²⁺, Cu²⁺).



Εικόνα 2.6 Σχηματική απεικόνιση αλληλεπίδρασης αμινοξέων ιστοιδίνης (6His-Tag) με μεταλλικά ιόντα Ni^{2+} [88]

Η επιλογή της συγκεκριμένης μεθόδου βασίστηκε στην παρουσία 6 καταλοίπων ιστοιδίνης στο καρβοξυτελικό άκρο της εστεράσης, τα οποία προστέθηκαν κατά τη διαδικασία κλωνοποίησης του ενζύμου. Τα κατάλοιπα αυτά, έχοντας την ικανότητα σχηματισμού δοτικών μη ομοιοπολικών δεσμών με μεταλλικά κατιόντα, μπορούν να δεσμευτούν πάνω σε στήλη η οποία φέρει ακινητοποιημένα τέτοια ιόντα. Η έκλυση της δεσμευμένης πρωτεΐνης από τη στήλη πραγματοποιείται με προσθήκη διαλυμάτων αυξημένης συγκέντρωσης ιμιδαζολίου, το οποίο ανταγωνίζεται τους ιμιδαζολικούς δακτυλίους της ιστοιδίνης για πρόσδεση στα κατιόντα Ni^{2+} . Με τον τρόπο αυτό το ιμιδαζόλιο αντικαθιστά την πρωτεΐνη στο δεσμό υψηλής συγγένειας με τα χημικά σύμπλοκα των σφαιριδίων της ρητίνης της στήλης, απελευθερώνοντάς την τελικά.

Τα βήματα που ακολουθήθηκαν κατά τον καθαρισμό ήταν τα εξής:

1. Πλήρωση της στήλης με τη ρητίνη Protino® Ni-NTA Agarose. Η ρητίνη αυτή αποτελείται από το χημικό παράγοντα NTA, ακινητοποιημένο σε 6% cross linked σφαιρίδια αγαρόζης και είναι προπληρωμένη με κατιόντα Ni^{2+} .
2. Εξισορρόπηση της μήτρας της στήλης με 50 mL ρυθμιστικού διαλύματος NPI-10.
3. Φόρτωση της στήλης με το υπερκείμενο της τελευταίας φυγοκέντρησης, το οποίο περιείχε το πρωτεϊνικό εκχύλισμα.
4. Κλείσιμο στήλης με πώμα και ανακίνηση ρητίνης-δείγματος. Μεταφορά του μείγματος σε falcon και τοποθέτηση σε αργή ανάδευση στους 4 °C για 20 h.
5. Επαναφορά στη στήλη και συλλογή του flow-through το οποίο περιείχε τις πρωτεΐνες που δεν προσδέθηκαν στη ρητίνη.
6. Προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος NPI-20.
7. Κλείσιμο στήλης με πώμα και ανακίνηση ρητίνης-δείγματος. Μεταφορά του μείγματος σε falcon και τοποθέτηση σε αργή ανάδευση στους 4 °C για 30 min.
8. Επαναφορά στη στήλη και συλλογή του wash, το οποίο περιείχε τις πρωτεΐνες που δεσμεύτηκαν ελαφρά στα ιόντα Ni^{2+} .
9. Έκλυση ανασυνδυασμένης πρωτεΐνης με έκπλυση της στήλης με ρυθμιστικό διάλυμα NPI-250 και συλλογή σε 10 erpendorfs (1 mL στο καθένα).

2.2.7 Εκτίμηση καθαρότητας πρωτεΐνης & ποσοτικοποίηση

2.2.7.1 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης υπό αποδιατακτικές συνθήκες (SDS PAGE)

Η ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα πολυακρυλαμίδης παρουσία του αποδιατακτικού παράγοντα SDS αποτελεί μία ευρέως διαδεδομένη τεχνική ταυτοποίησης πρωτεϊνών κατά τον καθαρισμό και εφαρμόζεται για την εκτίμηση της ομοιογένειας των καθαρισμένων κλασμάτων.

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών που τίθενται προς ανάλυση βασίζεται στη μοριακή τους μάζα. Το μίγμα των πρωτεϊνών πρώτα διαλύεται σε διάλυμα δωδεκακυλοθειικού νατρίου (SDS), ενός ανιονικού απορρυπαντικού που αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες και τις φορτίζει αρνητικά. Τα ανιόντα του SDS δεσμεύονται στις πρωτεΐνες δίνοντας τους ισχυρό φορτίο, περίπου ανάλογο της μάζας τους, καθιστώντας το αρχικό φορτίο τους αμελητέο. Επιπλέον προστίθεται μερκαπτοαιθανόλη ή διθειοθρεϊτόλη, που ανάγουν τους δισουλφιδικούς δεσμούς, οι οποίοι αναπτύσσονται ανάμεσα σε δύο ομάδες κυστεϊνών και η αποδιάταξη ολοκληρώνεται με θέρμανση.

Με τον τρόπο αυτό οι αρνητικά πλέον φορτισμένες πρωτεΐνες κατευθύνονται από την κάθοδο προς την άνοδο του πηκτώματος με μοναδικό κριτήριο τη μάζα τους. Οι μικρές πρωτεΐνες μετακινούνται εύκολα διαμέσου του πηκτώματος ενώ οι μεγάλες μένουν στην κορυφή κοντά στο σημείο εκκίνησης.

2.2.7.1.1 Παρασκευή πηκτώματος πολυακρυλαμίδης

Το πήκτωμα πολυακρυλαμίδης αποτελείται από δύο επιμέρους πηκτώματα : το πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel) στο οποίο τοποθετούνται τα δείγματα και το πήκτωμα διαχωρισμού (separating gel). Το πρώτο δε διαχωρίζει τις πρωτεΐνες αλλά τις «συμπυκνώνει» εξασφαλίζοντας ότι θα φτάσουν ταυτόχρονα στο κυρίως πήκτωμα διαχωρισμού.

Πίνακας 2.3 Σύσταση πηκτωμάτων για SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση

Πήκτωμα πακεταρίσματος (stacking gel)		Πήκτωμα διαχωρισμού(separating gel) 12%	
dH ₂ O	3,45 mL	dH ₂ O	6,8 mL
Acrylamide	0,83 mL	Acrylamide	8 mL
1 M Tris pH= 6.8	0,63 mL	1 M Tris pH= 6.8	5 mL
APS 10%	0,05 mL	APS 10%	0,2 mL
TEMED	0,005 mL	TEMED	0,008 mL

Πίνακας 2.4 Επιλογή ιδανικής ποσότητας ακρυλαμίδης

Το ποσοστό της ακρυλαμίδης (12%) στο πήκτωμα διαχωρισμού εξαρτάται από το μέγεθος της πρωτεΐνης στόχου.

Η επιλογή μας βασίστηκε στη θεωρητικά αναμενόμενη μοριακή μάζα της ανασυνδυασμένης εστεράσης.

Ακρυλαμίδη(%)	Εύρος M.B.(kDa)
7	50-500
10	20-300
12	10-200
15	3-100

Πρώτο ανάμεσα στις δύο γυάλινες πλάκες της συσκευής ηλεκτροφόρησης τοποθετήθηκε το πήκτωμα διαχωρισμού και από πάνω του προστέθηκε μικρή ποσότητα ισοπροπανόλης για ευθυγράμμιση. Το πήκτωμα αφέθηκε για 30 λεπτά μέχρι να πολυμεριστεί και αφού αφαιρέθηκε η ισοπροπανόλη, προστέθηκε από πάνω του το πήκτωμα επιστοίβαξης το οποίο αφέθηκε για τον ίδιο χρόνο μέχρι να πήξει. Ο λόγος των όγκων των δύο πηκτών ήταν περίπου 2:1.

2.2.7.1.2 Προετοιμασία δειγμάτων – Ηλεκτροφόρηση

Στα προς ανάλυση δείγματα, όγκου 14 μL , προστέθηκαν 7 μL διαλύματος φόρτωσης και ακολούθησε βρασμός για 5 min.

Πίνακας 2.5 Σύσταση διαλύματος φόρτωσης

Διάλυμα φόρτωσης (Laemmli sample)
4,4% SDS
0,02% Μπλε της βρομοφαινόλης
50 mM διθειοθρεϊτόλη (DTT)

Στο πήκτωμα εκτός από τα δείγματα τοποθετήθηκε και ο ιχνηθέτης (7 μL πρότυπου διαλύματος πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους με 7 μL dH_2O) προκειμένου να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος των πρωτεϊνών του δείγματος.

Μετά την έγχυση των δειγμάτων στις ειδικές υποδοχές του πηκτώματος πακεταρίσματος, η συσκευή πληρώθηκε με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης. Τότε τα ηλεκτρόδια συνδέθηκαν με τη συσκευή τροφοδότησης και εφαρμόστηκε τάση 100 V. Όταν τα δείγματα έφτασαν στο πήκτωμα διαχωρισμού η τάση αυξήθηκε στα 120 V.

2.2.7.1.3 Εμφάνιση ζωνών στο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης

Μετά την ολοκλήρωση της ηλεκτροφόρησης, οι ζώνες δεν ήταν ορατές. Για το λόγο αυτό το πήγμα απομακρύνθηκε από τις πλάκες και εμβαπτίστηκε σε διάλυμα χρωστικής Coomassie Brilliant Blue R-250 για 30 min υπό ήπια ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε αποχρωματισμός του πηγματος, με επώασή του σε διάλυμα αποχρωματισμού για μία ημέρα

Τα διαλύματα χρώσης και αποχρωματισμού παρασκευάστηκαν σύμφωνα με πρωτόκολλα του εργαστηρίου.

2.2.7.2 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό της πρωτεΐνης στο δείγμα ακολουθήθηκε η μέθοδος Bradford, η οποία βασίζεται στο γεγονός πως η μέγιστη απορρόφηση όξινου διαλύματος της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 μεταβάλλεται από τα 465 nm στα 595 nm όταν παρατηρηθεί αλληλεπίδραση με πρωτεΐνες. Η χρωστική προσδέεται κυρίως σε βασικά και αρωματικά αμινοξικά κατάλοιπα, και ιδιαίτερα στην αργινίνη, σχηματίζοντας σύμπλοκο μπλε χρώματος [89].

Ο υπολογισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης έγινε με βάση πρότυπη καμπύλη αναφοράς, η οποία κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας γνωστές συγκεντρώσεις αλβουμίνης ορού βοδιού (Bovine Serum Albumin-BSA).

2.2.8 Απομάκρυνση διαλυτών συστατικών & συμπύκνωση ενζυμικού διαλύματος

2.2.8.1 Διαπίδυση

Μετά το τέλος του καθαρισμού, η ανασυνδυασμένη πρωτεΐνη κατέληξε να βρίσκεται στο ρυθμιστικό διάλυμα NPI-250. Η απομάκρυνση της ιμιδαζόλης και του NaCl από αυτό βασίστηκε στη μέθοδο της διαπίδυσης, κατά την οποία ουσίες μικρού μοριακού βάρους μπορούν να απομακρυνθούν από το πρωτεϊνικό διάλυμα με τη χρήση ημιπερατών μεμβρανών. Το μέγεθος των πόρων της μεμβράνης επιτρέπει τη διάχυση προς χαμηλότερες συγκεντρώσεις μόνο των μορίων που έχουν μικρότερο μέγεθος από αυτούς (ιμιδαζόλη, NaCl) και τη συγκράτηση αυτών με μεγαλύτερο μέγεθος (εστεράση).

Η συνεχής ανάδευση του διαλύματος διαπίδυσης είναι απαραίτητη για τη διατήρηση μιας κλίσης συγκέντρωσης, που αποτελεί και την κινητήρια δύναμη της διαδικασίας. Ένα ακόμη σημαντικό στοιχείο της διαδικασίας είναι ο όγκος του διαλύματος διαπίδυσης. Όσο μεγαλύτερος είναι αυτός σε σχέση με το δείγμα, τόσο αποδοτικότερη είναι η διαπίδυση, καθώς εξασφαλίζεται ότι οι διαλυτές ουσίες που διαπερνούν τη μεμβράνη αραιώνονται αρκετά και η κινητήρια διαφορά συγκέντρωσης παραμένει σχετικά σταθερή.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Δημιουργία σφιχτού κόμπου στον ένα άκρο ημιπερατής μεμβράνης από κυτταρίνη (Sigma D-0405).
2. Διανομή ενζυμικού διαλύματος (~4 mL) στον θάλαμο της μεμβράνης και δημιουργία κόμπου στο άλλο άκρο του μεμβρανικού σωλήνα.
3. Τοποθέτηση κλειστής μεμβράνης μέσα σε ποτήρι ζέσεως που περιείχε 1,5 L ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών συγκέντρωσης 20 mM και pH=8.
4. Ανάδευση ρυθμιστικού διαλύματος με τη χρήση αυτόματου μαγνητικού αναδευτήρα για 3 h στους 4 °C.

2.2.8.2 Υπερδιήθηση

Για τη συμπύκνωση του δείγματος και την αλλαγή του ρυθμιστικού διαλύματος ακολουθήθηκε η διαδικασία της υπερδιήθησης. Η μέθοδος αυτή λειτουργεί με μηχανισμό αντίστοιχο με αυτόν της διαπίδυσης διαχωρίζοντας το δείγμα από το διάλυμα με ημιπερατή μεμβράνη. Ωστόσο κινητήρια δύναμη της υπερδιήθησης είναι η εφαρμογή πίεσης και όχι απλά η διαφορά συγκέντρωσης. Για το λόγο αυτό άλλωστε οι μεμβράνες που χρησιμοποιούνται σε αυτή τη διαδικασία είναι πολύ πιο ανθεκτικές ώστε να αντέχουν αυξημένες πιέσεις.

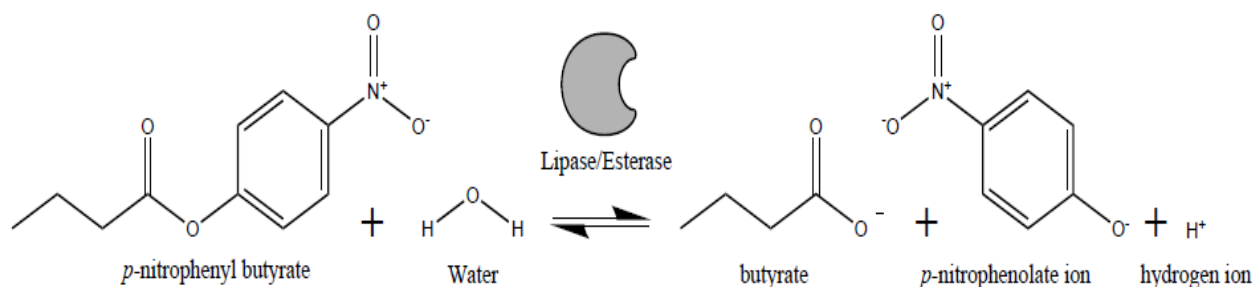
Για την εξισορρόπηση/συμπύκνωση του ενζυμικού εκχυλίσματος ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Προσθήκη ενζυμικού εκχυλίσματος σε μονάδα υπερδιήθησης (Amicon unit, 10000 MW cut-off)
2. Φυγοκέντρηση στις 3000 x g για 10 min και απόρριψη του διηθήματος.
3. Προσθήκη ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (10 mM, pH=7,5)
4. Φυγοκέντρηση στις 3000 x g για 10 min και απόρριψη του διηθήματος.
5. Επανάληψη βημάτων 3-4 ακόμα δύο φορές.
6. Συλλογή του δείγματος που έχει κατακρατηθεί από τη μεμβράνη και μεταφορά του σε αποστειρωμένο erpendorf.

2.2.9 Μελέτη χαρακτηριστικών ενζύμου

2.2.9.1 Προσδιορισμός ενεργότητας ενζύμου (assay)

Ο προσδιορισμός της ενζυμικής ενεργότητας της εστεράσης βασίστηκε στην ικανότητά της να υδρολύει εστέρες της πάρα-νιτροφαινόλης με λιπαρά οξέα βραχείας αλυσίδας. Το προϊόν της υδρόλυσης, η παρανιτροφαινόλη, σε αλκαλικό περιβάλλον αποπρωτονιώνεται προς νιτροφαινοξείδιο, μια ένωση με έντονο κίτρινο χρώμα, που μπορεί να προσδιοριστεί φωτομετρικά στα 410 nm. Η ένταση της απορρόφησης είναι ανάλογη προς τη συγκέντρωση της παρα-νιτροφαινόλης.

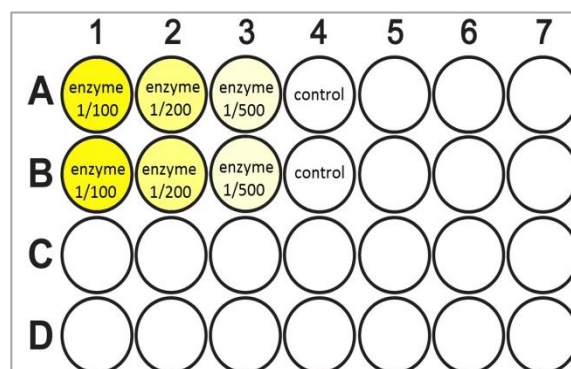


Εικόνα 2.7 Σχηματική απεικόνιση υδρόλυσης *p*-NPB [90]

Οι εστέρες που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα της αντίδρασης ήταν ο οξικός π-νιτροφαινυλεστέρας (*p*-nitrophenyl acetate) και ο βουτυρικός π-νιτροφαινυλεστέρας (*p*-nitrophenyl butyrate).

Η μέτρηση της απορρόφησης πραγματοποιήθηκε σε Φωτόμετρο Multiscan™ Go, Thermo Scientific και η ακριβής διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι η εξής:

1. Διάλυση υποστρώματος σε DMSO με τελική συγκέντρωση 1 mM.
2. Τοποθέτηση σε μία θέση μικροπλάκας 216 μ L ρυθμιστικού διαλύματος K_2HPO_4/KH_2PO_4 pH 8,5 και 12 μ L αραιωμένου ενζυμικού εκχυλίσματος (x2 για κάθε αντίδραση και x2 για το αντίστοιχο τυφλό διάλυμα).
3. Εισαγωγή μικροπλάκας για 1-2 min στο φωτόμετρο με προρυθμισμένη θερμοκρασία τους 40 °C.
4. Προσθήκη στην ίδια θέση 12 μ L υποστρώματος.
5. Φωτομέτρηση για 5min στα 410nm.



Εικόνα 2.8 Σχηματική απεικόνιση θέσεων δειγμάτων και μαρτύρων στη μικροπλάκα.

2.2.9.2 Προσδιορισμός βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της εστεράσης σε διάφορες θερμοκρασίες χρησιμοποιήθηκε και πάλι η φωτομετρική μέθοδος προσδιορισμού της π-νιτροφαινόλης, αλλά λίγο τροποποιημένη ως προς τη σύσταση του μίγματος της αντίδρασης [91].

Αρχικά παρασκευάστηκαν τα εξής διαλύματα:

- 1) 90 mg p-NPB διαλύθηκαν σε 30 mL 2-προπανόλη.
- 2) Σε 135 mL ρυθμιστικού διαλύματος (Tris-HCl 50 mM, pH=8) διαλύθηκαν 0.5 g Triton X-100.

Από τα παραπάνω διαλύματα αναμίχθηκαν 1 mL από το πρώτο και 9 mL από το δεύτερο, σχηματίζοντας μετά από ανάδευση ένα γαλάκτωμα το οποίο μπορεί να παραμείνει σταθερό για 1-2 ώρες.

2.2.9.2.1 Με ελεύθερο ένζυμο

Για τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκε μίγμα αντίδρασης αποτελούμενο από 950 μ L γαλακτώματος και 50 μ L διαλύματος ενζύμου ($c=0.023$ mg/mL). Ως δείγμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε διάλυμα ίδιας σύστασης απουσία ενζύμου. Ο φωτομετρικός προσδιορισμός της π-νιτροφαινόλης που απελευθερώθηκε ως προϊόν της ενζυμικής δράσης πραγματοποιήθηκε στα 410 nm σε φασματοφωτόμετρο Varian Cary 1E UV/Vis, συνδεδεμένο με υδατόλουτρο ώστε να παρακολουθηθεί η πορεία της αντίδρασης σε διάφορες θερμοκρασίες (28° - 70 °C).

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τον βουτυρικό ο-νιτροφαινυλεστέρα.

2.2.9.2.2 Με ακινητοποιημένο ένζυμο

0,05 g χιτοζάνης ζυγίστηκαν και αναμείχθηκαν με 0,25 mL οξινισμένου απιονισμένου νερού (pH=3) μέχρι την ενυδάτωση του πολυμερούς. Εν συνεχεία προστέθηκαν 15 μ L ($c=0.023$ mg/mL) ενζυμικού διαλύματος και επαναλήφθηκε η ανάμιξη ώστε να επιτευχθεί η προσρόφηση της εστεράσης πάνω στη χιτοζάνη. Η χιτοζάνη με το ακινητοποιημένο πλέον ένζυμο μεταφέρθηκε έπειτα σε διηθητικό χαρτί και ξεπλύθηκε με μικρή ποσότητα (1 mL) ισοοκτανίου ώστε να απομακρυνθεί οποιαδήποτε ποσότητα ελεύθερου ενζύμου.

Σε κυψελίδα, όγκου 3 mL, προστέθηκαν 2 mL γαλακτώματος και το σύμπλοκο φορέα-ενζύμου. Ακολούθησε φωτομέτρηση στα 410 nm έναντι του αντίστοιχου μάρτυρα σε φωτόμετρο Hitachi U-2000, συνδεδεμένο με υδατόλουτρο, σε διάφορες θερμοκρασίες (40° -70 °C).

2.3 Αντιδράσεις σύνθεσης

2.3.1 Παρασκευή συστημάτων

2.3.1.1 Μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοδραστική ουσία

Για την παρασκευή των μικρογαλακτωμάτων χωρίς επιφανειοενεργό ουσία αναμίχθηκαν αρχικά σε κατάλληλες αναλογίες εξάνιο και πρωτοταγής ή δευτεροταγής αλκοόλη. Στο μίγμα αυτό διαλυτοποιήθηκε καθορισμένη ποσότητα οξέος ή εστέρα και προστέθηκε έπειτα η απαιτούμενη ποσότητα ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl buffer 50 mM, pH 7,5. Ακολούθησε αμέσως έντονη ανάδευση για 30 s περίπου, μέχρι να προκύψει ένα σταθερό και διαυγές διάλυμα, το οποίο προεπωάστηκε στην επιθυμητή θερμοκρασία. Τελευταίο βήμα ήταν η προσθήκη καθορισμένης ποσότητας από το ενζυμικό διάλυμα της εστεράσης, η οποία και σηματοδότησε την έναρξη της αντίδρασης.

Η τυπική σύσταση ενός τέτοιου μικρογαλακτώματος χωρίς επιφανειοενεργό ουσία, διακρίνεται στον πίνακα 2.6 :

Πίνακας 2.6 Σύσταση μικρογαλακτώματος χωρίς επιφανειοενεργό ουσία και χρησιμοποιούμενα οξέα/ εστέρες ως υποστρώματα επιτέλεσης αντιδράσεων εστεροποίησης και μετεστεροποίησης

Εξάνιο	472 μL
1-προπανόλη	508 μL
Tris-HCl 50mM, pH=7,5	15 μL
Ενζυμικό διάλυμα (0,023mg/mL)	5 μL
Οξύ/εστέρας	0,1 M

- **Οξέα:** οξικό, βουτυρικό, εξανοϊκό, λαυρικό, κινναμωμικό, βενζοϊκό, φαινυλοξικό οξύ, ο-, μ-, π-κουμαρικό οξύ, p-HBA, ο-, m-, p-HPA, p-HPP, ibuprofen.
- **Εστέρες:** προπιονικός αιθυλεστέρας, κινναμωμικός αιθυλεστέρας, λαυρικός βουτυλεστέρας, p-HBA butyl ester

Η συγκεκριμένη σύσταση υπέστη στη συνέχεια κάποιες τροποποιήσεις προκειμένου να μελετηθεί η επιτέλεση αντιδράσεων σύνθεσης σε λίγο διαφορετικές συνθήκες. Οι τροποποιήσεις αυτές περιλάμβαναν την αλλαγή της χρησιμοποιούμενης αλκοόλης, την αύξηση της συγκέντρωσης του ενζυμικού διαλύματος αλλά και την αλλαγή της αναλογίας οργανικού διαλύτη/αλκοόλης. Στον πίνακα 2.7, οι αλλαγές που υιοθετήθηκαν περιγράφονται αναλυτικά, όπως και τα οξέα που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε περίπτωση.

Πίνακας 2.7 Σύσταση μικρογαλακτωμάτων χωρίς επιφανειοενεργό για περαιτέρω μελέτη αντιδράσεων εστεροποίησης

Τροποποιήσεις συστήματος				
Αντικατάσταση 1-προπανόλης από 1-βουτανόλη	Αντικατάσταση 1-προπανόλης από 2-προπανόλη/νερόλη	Αντικατάσταση 1-προπανόλης από 2-προπανόλη/γερανιόλη	Αύξηση ποσότητας ενζύμου (5 μL → 20 μL)	Αλλαγή αναλογίας εξανίου/ 1-προπανόλης (472/508 → 644/334) & αύξηση ποσότητας ενζύμου (5 μL → 10 μL)
Οξέα : οξικό, εξανοϊκό οξύ	Οξέα : λαυρικό οξύ	Οξέα : εξανοϊκό οξύ	Οξέα : φαινυλοξικό οξύ, m-HPA, p-HPP, ibuprofen	Οξέα : οξικό οξύ

Σε κάθε σύστημα προστέθηκε καθορισμένη ποσότητα δωδεκανίου (5 μL) ως εσωτερικό πρότυπο για την ποσοτικοποίηση του παραγόμενου εστέρα.

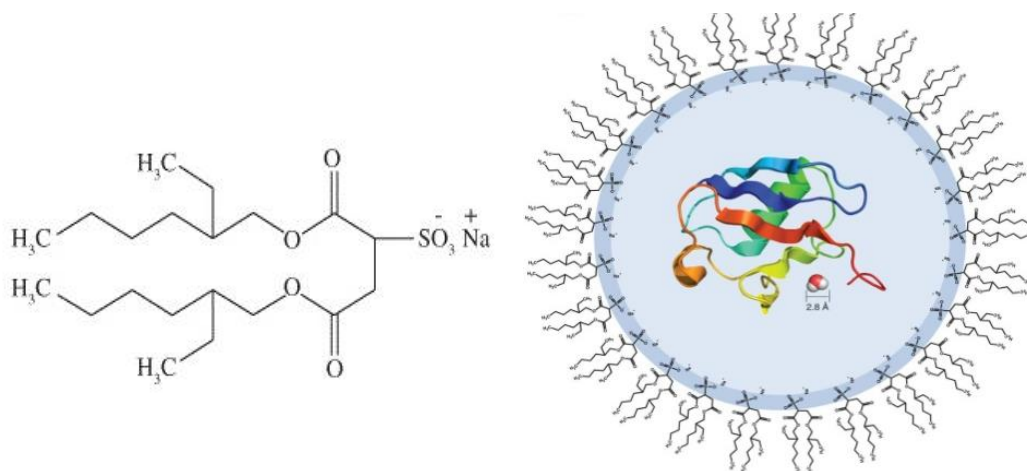
Όλα τα δείγματα επωάστηκαν στους 45 °C και σε κάθε περίπτωση παρασκευάστηκαν τα αντίστοιχα συστήματα απουσία ενζύμου (μάρτυρες). Τα vials, στα οποία πραγματοποιήθηκαν οι αντιδράσεις, «σφραγίστηκαν» με parafilm, ώστε να αποφευχθεί η πιθανότητα εξάτμισης του εξανίου, το οποίο είναι πτητικό.

2.3.1.2 Μικρογαλακτώματα

Στην περίπτωση αυτή χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικές επιφανειοενεργές ουσίες για την παρασκευή δύο τύπων μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο ως εξής:

Μικρογαλάκτωμα AOT/ισοοκτανίου/νερού:

Αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα του ανιονικού επιφανειοενεργού AOT σε ισοοκτάνιο, συγκέντρωσης 0,1 M. Η μεγάλη διαλυτότητα που παρουσιάζει το AOT σε οργανικούς διαλύτες, σε συνδυασμό με την ύπαρξη δύο διπλών υδρόφοβων αλυσίδων στο μόριό του, επιτρέπει τη δημιουργία αντίστροφων μικκυλίων, χωρίς να είναι απαραίτητη η προσθήκη συνεπιφανειοενεργού ουσίας.

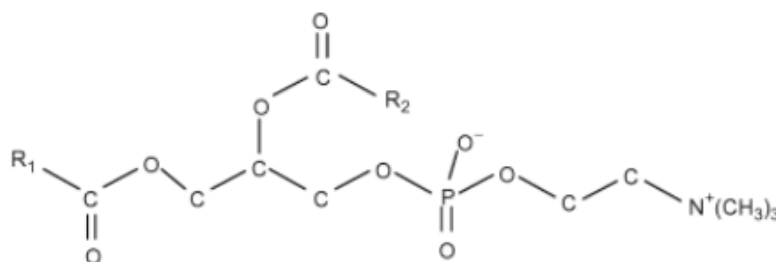


Εικόνα 2.9 Δομή AOT αριστερά (Neves et al. 2009) και σχηματικό διάγραμμα μικρογαλακτώματος παρουσία AOT με πρωτεΐνη στην υδατική φάση δεξιά [92]

Στο διάλυμα του AOT διαλυτοποιήθηκαν ύστερα καθορισμένες ποσότητες αλκοόλης και οξέος. Το σύστημα προεπιτάχθηκε στην επιθυμητή θερμοκρασία και προστέθηκε το ενζυμικό διάλυμα της εστεράσης που αποτέλεσε και την υδατική φάση για το σχηματισμό του μικρογαλακτώματος.

Μικρογαλάκτωμα λεκιθίνης/αλκοόλης/ισοοκτανίου/νερού:

Παρασκευάστηκε αρχικά διάλυμα λεκιθίνης σε ισοοκτάνιο 3,5% (w/w). Η λεκιθίνη αποτελεί ένα μίγμα φωσφολιπιδίων που λαμβάνεται από διάφορες φυσικές πηγές (π.χ. αυγό, σόγια), με κυριότερο εξ αυτών τη φωσφατιδυλοχολίνη.



Εικόνα 2.10 Συντακτικός τύπος της φωσφατιδυλοχολίνης

Λόγω του αμφίφιλου χαρακτήρα της, καθώς διαθέτει μία ισχυρά υδρόφιλη και μία ισχυρά λιπόφιλη περιοχή οι οποίες είναι σχεδόν ισοσταθμισμένες, η λεκιθίνη δεν μπορεί να σχηματίσει μόνη της μικρογαλακτώματα, αφού το μόριό της τείνει να έχει κυλινδρικό σχήμα, δίνοντας σχεδόν μηδενική καμπυλότητα του μεσεπιφανειακού υμένα, οπότε είναι απαραίτητη η παρουσία συνεπιφανειοενεργών ουσιών. Τέτοιες ουσίες είναι οι αλκοόλες μικρού μήκους αλειφατικής αλυσίδας, οι οποίες καθιστούν την υδατική μικρόφαση λιγότερο υδρόφιλη, επιτρέποντας τη δημιουργία αντίστροφων μικκυλίων.

Για το λόγο αυτό προστέθηκε στο διάλυμα της λεκιθίνης η κατάλληλη ποσότητα αλκοόλης ώστε να προκύψει διάλυμα 5% w/v σε αλκοόλη. Στο διάλυμα αυτό

διαλυτοποιήθηκαν έπειτα καθορισμένες ποσότητες υποστρωμάτων. Το σύστημα προεπώαστηκε στην επιθυμητή θερμοκρασία και προστέθηκε το ενζυμικό διάλυμα της εστεράσης που αποτέλεσε και την υδατική φάση για το σχηματισμό του μικρογαλακτώματος.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζεται η ακριβής σύσταση των παραχθέντων μικρογαλακτωμάτων.

Πίνακας 2.8 Σύσταση μικρογαλακτωμάτων

ΑΟΤ	Λεκιθίνη/Προπανόλη																
<table border="1"><tr><td>ΑΟΤ/Ισοοκτάνιο</td><td>1 mL</td></tr><tr><td>1-προπανόλη</td><td>0,1 M</td></tr><tr><td>ενζυμικό διάλυμα (0,23 mg/mL)</td><td>20 μL</td></tr><tr><td>οξικό οξύ</td><td>0,1 M</td></tr></table>	ΑΟΤ/Ισοοκτάνιο	1 mL	1-προπανόλη	0,1 M	ενζυμικό διάλυμα (0,23 mg/mL)	20 μL	οξικό οξύ	0,1 M	<table border="1"><tr><td>Λεκιθίνη/προπανόλη-2/Ισοοκτάνιο</td><td>1 mL</td></tr><tr><td>1-προπανόλη</td><td>0,1 M</td></tr><tr><td>ενζυμικό διάλυμα (0,23mg/mL)</td><td>20 μL</td></tr><tr><td>οξικό οξύ</td><td>0,1 M</td></tr></table>	Λεκιθίνη/προπανόλη-2/Ισοοκτάνιο	1 mL	1-προπανόλη	0,1 M	ενζυμικό διάλυμα (0,23mg/mL)	20 μL	οξικό οξύ	0,1 M
ΑΟΤ/Ισοοκτάνιο	1 mL																
1-προπανόλη	0,1 M																
ενζυμικό διάλυμα (0,23 mg/mL)	20 μL																
οξικό οξύ	0,1 M																
Λεκιθίνη/προπανόλη-2/Ισοοκτάνιο	1 mL																
1-προπανόλη	0,1 M																
ενζυμικό διάλυμα (0,23mg/mL)	20 μL																
οξικό οξύ	0,1 M																
<table border="1"><tr><td>ΑΟΤ/Ισοοκτάνιο</td><td>1 mL</td></tr><tr><td>1-προπανόλη</td><td>0,1 M</td></tr><tr><td>ενζυμικό διάλυμα (0,23 mg/mL)</td><td>20 μL</td></tr><tr><td>βουτυρικό οξύ</td><td>0,1 M</td></tr></table>	ΑΟΤ/Ισοοκτάνιο	1 mL	1-προπανόλη	0,1 M	ενζυμικό διάλυμα (0,23 mg/mL)	20 μL	βουτυρικό οξύ	0,1 M	<table border="1"><tr><td>Λεκιθίνη/προπανόλη-2/Ισοοκτάνιο</td><td>1 mL</td></tr><tr><td>1-προπανόλη</td><td>0,1 M</td></tr><tr><td>ενζυμικό διάλυμα (0,23mg/mL)</td><td>20 μL</td></tr><tr><td>βουτυρικό οξύ</td><td>0,1 M</td></tr></table>	Λεκιθίνη/προπανόλη-2/Ισοοκτάνιο	1 mL	1-προπανόλη	0,1 M	ενζυμικό διάλυμα (0,23mg/mL)	20 μL	βουτυρικό οξύ	0,1 M
ΑΟΤ/Ισοοκτάνιο	1 mL																
1-προπανόλη	0,1 M																
ενζυμικό διάλυμα (0,23 mg/mL)	20 μL																
βουτυρικό οξύ	0,1 M																
Λεκιθίνη/προπανόλη-2/Ισοοκτάνιο	1 mL																
1-προπανόλη	0,1 M																
ενζυμικό διάλυμα (0,23mg/mL)	20 μL																
βουτυρικό οξύ	0,1 M																

Όλα τα συστήματα επώαστηκαν στους 45 °C και σε κάθε περίπτωση παρασκευάστηκαν τα αντίστοιχα συστήματα απουσία ενζύμου (μάρτυρες).

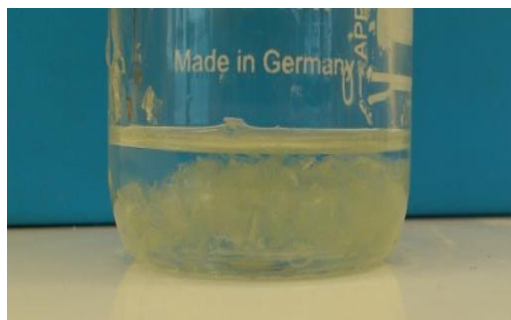
2.3.1.3 Πήκτωμα χιτοζάνης

Το επόμενο σύστημα που δοκιμάστηκε για την μελέτη των αντιδράσεων εστεροποίησης δεν περιλάμβανε τον εγκλωβισμό της εστεράσης μέσα σε υδατική φάση, όπως στην περίπτωση των μικρογαλακτωμάτων, αλλά την ακινητοποίησή της σε στερεό φορέα και συγκεκριμένα στο πολυμερές της χιτοζάνης.

Για την προετοιμασία του πηκτώματος, εφαρμόστηκε πρωτόκολλο του εργαστηρίου. Αρχικά ζυγίστηκαν 0,25 g χιτοζάνης και τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικό σωλήνα με 0,25 mL οξινισμένου απιονισμένου νερού (pH 3). Ακολούθησε ανάδευση με τη βοήθεια μεταλλικής σπάτουλας έως ότου ενυδατωθεί πλήρως το πολυμερές. Εν συνεχεία προστέθηκαν 30 μL από το ενζυμικό διάλυμα (1,38 μg/mL) και επαναλήφθηκε η ανάμειξη ώστε να επιτευχθεί η προσρόφηση της εστεράσης πάνω στη χιτοζάνη. Η χιτοζάνη με το ακινητοποιημένο πλέον ένζυμο μεταφέρθηκε έπειτα σε διηθητικό χαρτί και ξεπλύθηκε με μικρή ποσότητα (5 mL) ισοοκτανίου ώστε να απομακρυνθεί οποιαδήποτε ποσότητα ελεύθερου ενζύμου.

Παράλληλα παρασκευάστηκε το μίγμα της αντίδρασης το οποίο αποτελούνταν από 5 mL ισοοκτάνιο, 0,1 M 1-προπανόλης και 0,1 M του εκάστοτε οξέος, το οποίο και προεπώαστηκε στη θερμοκρασία των 45 °C.

Την έναρξη της αντίδρασης σηματοδότησε η μεταφορά του ακινητοποιημένου ενζύμου μέσα στο μίγμα της αντίδρασης, σχηματίζοντας ένα πήκτωμα όπως αυτό που φαίνεται στην εικόνα 2.10. Το σύστημα επωάστηκε στους 45 °C για την πραγματοποίηση της αντίδρασης, όπως επίσης και το αντίστοιχο σύστημα απουσία ενζύμου (μάρτυρας).



Εικόνα 2.11 Πήκτωμα χιτοζάνης

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στη μέθοδο αυτή ήταν τα αλειφατικά οξέα : οξικό, βουτυρικό, εξανοϊκό και λαυρικό οξύ.

2.3.2 Ανάλυση

Για τη μελέτη της πορείας των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων χρησιμοποιήθηκε η αεριοχρωματογραφική μέθοδος προσδιορισμού της συγκέντρωσης των σχηματιζόμενων εστέρων.

Από κάθε διάλυμα στο οποίο εξελισσόταν η αντίδραση (μετ)εστεροποίησης λαμβανόταν σε καθορισμένους χρόνους δείγμα όγκου 1μL προς ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο HP 6890, εφοδιασμένο με τριχοειδή στήλη τύπου HP-5. Το φέρον αέριο ήταν άζωτο, με σταθερή ταχύτητα ροής 1 mL/min. Η θερμοκρασία του ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID) όπως και του θαλάμου εισαγωγής δείγματος (injector) ήταν 280°C. Η θερμοκρασία της στήλης ποίκιλε ανάλογα με τα διάφορα συστήματα, όπως φαίνεται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 2.9 Χαρακτηριστικά μεθόδων ανάλυσης

Σύστημα	Θερμοκρασία στήλης		
	Rate(°C/min)	Set(°C)	Hold(min)
Μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό		180	1,9
	10	200	4,9
Συμβατικό μικρογαλάκτωμα		160	2
	10	220	6,5
Πήκτωμα χιτοζάνης		180	1,9
	10	200	4,9

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του παραγόμενου εστέρα έγινε με τη βοήθεια καμπύλης αναφοράς, η οποία κατασκευάστηκε με βάση γνωστές ποσότητες του βουτυλεστέρα του π- υδροξυβενζοϊκού οξέος. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τον υπολογισμό του εμβαδού της επιφάνειας των κορυφών των χρωματογραφημάτων ήταν το HP ChemStation.

2.4 Αντιδράσεις υδρόλυσης

2.4.1 Παρασκευή συστημάτων

2.4.1.1 Υδατικά συστήματα

2.4.1.1.1 Αντιδράσεις με ελεύθερο ένζυμο

Ως υποστρώματα για τις αντιδράσεις υδρόλυσης χρησιμοποιήθηκαν δύο εστέρες μικρού μήκους ανθρακικής αλυσίδας, ο οξικός και ο προπιονικός αιθυλεστέρας.

Αρχικά παρασκευάστηκαν διαλύματα τελικού όγκου 50 μL τα οποία περιείχαν 0,1 M από τον εκάστοτε εστέρα, 1 μL από το πυκνό ενζυμικό διάλυμα (23 mg/mL) και ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 10 mM, pH 7,5. Τα συστήματα αυτά, όπως και τα αντίστοιχα τυφλά διαλύματα επωάστηκαν στους 60 °C για 24 h υπό ήπια ανάδευση.

Επόμενο βήμα ήταν η περαιτέρω διερεύνηση της υδρόλυσης του προπιονικού αιθυλεστέρα. Για το σκοπό αυτό παρασκευάστηκε διάλυμα με μικρότερη συγκέντρωση τόσο ενζύμου όσο και υποστρώματος. Το διάλυμα αυτό, τελικού όγκου 1 mL, περιείχε 20 mM προπιονικού αιθυλεστέρα, 1 μL πυκνού ενζυμικού διαλύματος (23 mg/mL) και ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 100 mM, pH 8. Το σύστημα, που παρασκευάστηκε εις διπλούν, μαζί με τον αντίστοιχο μάρτυρα, επωάστηκαν στους 60 °C υπό ήπια ανάδευση. Ανά 1 h λαμβάνονταν δείγματα όγκου 50 μL και αναλύονταν στον αέριο χρωματογράφο ώστε να παρακολουθηθεί η πορεία της ενζυμικής αντίδρασης,

Για την περαιτέρω διαλεύκανση των συνθηκών υδρόλυσης του συγκεκριμένου εστέρα, κρίθηκε αναγκαία η εύρεση του άριστου pH για την επιτέλεση της αντίδρασης υδρόλυσης:

Μελέτη άριστου pH δράσης

Λαμβάνοντας υπόψιν τις βιβλιογραφικές αναφορές για το άριστο pH δράσης μίας εκ των πιο συγγενικών πρωτεϊνών ως προς την εστεράση, αποφασίστηκε να μελετηθεί η υδρόλυση του εστέρα σε ένα εύρος τιμών pH 7-10, με βήμα 0,5 (Ewis et al.2004). Έτσι λοιπόν παρασκευάστηκαν συστήματα τελικού όγκου 120 μL με την προσθήκη 2 μL αραιωμένου ενζυμικού διαλύματος (1,15 mg/mL), 20 mM προπιονικού αιθυλεστέρα και ρυθμιστικού διαλύματος με την εκάστοτε τιμή pH. Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν τελική συγκέντρωση 0,1 M και ήταν τα ακόλουθα :

- $\text{K}_2\text{HPO}_4/\text{KH}_2\text{PO}_4$ για pH 7 έως 8
- Tris για pH 8 έως 9
- $\text{NaHCO}_3/\text{Na}_2\text{CO}_3$ για pH 9,5 έως 10

Όλα τα δείγματα επωάστηκαν στους 60 °C για 2 h, μαζί με τους αντίστοιχους μάρτυρες, και μελετήθηκαν έπειτα στον αέριο χρωματογράφο.

2.4.1.1.2 Αντιδράσεις με ακινητοποιημένο ένζυμο

Ως υποστρώματα για τις αντιδράσεις υδρόλυσης χρησιμοποιήθηκαν ο λαυρικός βουτυλεστέρας και ο π-υδροξυβενζοϊκός βουτυλεστέρας.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την προσρόφηση της εστεράσης πάνω στη χιτοζάνη, ήταν ίδια με αυτήν που περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.1.3. Ωστόσο για την παρασκευή του μίγματος της αντίδρασης, στην περίπτωση, αυτή ακολουθήθηκε ο σχηματισμός ενός γαλακτώματος όπως αναγράφεται στο παρακάτω σχήμα:

α) 135 mL Tris-HCl 50mM, pH 8 + 0,5 g Triton X-100
β) 111,11 mM εστέρα σε 5 mL 2-τροπανόλης

Ανάμειξη 0,5 mL από το α) και 4,5 mL από το β)

Διάγραμμα 2.1 Πορεία παρασκευής μίγματος αντίδρασης

Στο μίγμα αυτό, με τελική συγκέντρωση εστέρα 100 mM, προστέθηκε το ακινητοποιημένο στο βιοπολυμερές ένζυμο και το σύστημα επωάστηκε στους 45 °C.

Με υπόστρωμα τον λαυρικό βουτυλεστέρα η πορεία αυτή επαναλήφθηκε με διπλάσια ποσότητα ενζύμου.

2.4.1.2 Διφασικά συστήματα

Πέραν των κλασικών υδατικών συστημάτων για τη μελέτη των αντιδράσεων υδρόλυσης αποφασίστηκε η διεξαγωγή τους σε διφασικά συστήματα οργανικού διαλύτη-νερού. Το πλεονέκτημα που προσφέρει η μέθοδος αυτή είναι ότι διευρύνει το εύρος των χρησιμοποιούμενων υποστρωμάτων, καθώς η πλειοψηφία εξ αυτών δεν διαλύεται σε αμιγώς υδατικό περιβάλλον.

Στα συστήματα αυτά μελετήθηκαν οι αντιδράσεις υδρόλυσης δύο τριγλυκεριδίων, της τριακετίνης και της τριβουτυρίνης, με την εστεράση ακινητοποιημένη στο πήκτωμα χιτοζάνης, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.1.3. Το μίγμα της αντίδρασης περιείχε 5 mL ισοοκτάνιο, 0,1 M από το εκάστοτε τριγλυκερίδιο και 200 μL απιονισμένο νερό. Στο μίγμα αυτό προστέθηκε το ακινητοποιημένο ένζυμο και το πήκτωμα που σχηματίστηκε τοποθετήθηκε σε ανάδευση, πάντα μαζί με τα αντίστοιχα τυφλά διαλύματα.

2.4.2 Ανάλυση

2.4.2.1 Αέριος χρωματογραφία

Υδατικά συστήματα

Στην περίπτωση των αντιδράσεων υδρόλυσης σε υδατικά συστήματα, ο προσδιορισμός των παραγόμενων προϊόντων έγινε στον αέριο χρωματογράφο Perkin Elmer Autosystem XL, εφοδιασμένο με τη στήλη Supelcowax-10, η οποία επιτρέπει την ανάλυση υδατικών διαλυμάτων.

Από κάθε δείγμα λαμβανόταν ποσότητα όγκου 0,8 μL η οποία και εισαγόταν στον αέριο χρωματογράφο. Η θερμοκρασία του ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID) ήταν 240 °C, ενώ η θερμοκρασία του θαλάμου εισαγωγής δείγματος ήταν 220 °C. Η θερμοκρασία της στήλης για κάθε ανάλυση ρυθμίστηκε με το εξής θερμοκρασιακό πρόγραμμα:

Πίνακας 2.10 Χαρακτηριστικά μεθόδου ανάλυσης

Θερμοκρασία στήλης		
Rate(°C/min)	Set(°C)	Hold(min)
	60	10
20	220	12

Ο υπολογισμός του εμβαδού της επιφάνειας των κορυφών των χρωματογραφημάτων έγινε με τη βοήθεια του αυτόματου ολοκληρωτή του προγράμματος TurbochromNavigator. Για τον προσδιορισμό της συγκέντρωσης των παραγόμενων προϊόντων κατασκευάστηκαν οι αντίστοιχες πρότυπες καμπύλες.

Διφασικά συστήματα

Η μελέτη των παραγόμενων προϊόντων στις αντιδράσεις υδρόλυσης σε διφασικά συστήματα πραγματοποιήθηκε στον αέριο χρωματογράφο HP 6890, με τον τρόπο που περιγράφεται στην παράγραφο 2.3.2. με το ίδιο θερμοκρασιακό πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη αντιδράσεων εστεροποίησης σε πήκτωμα χιτοζάνης.

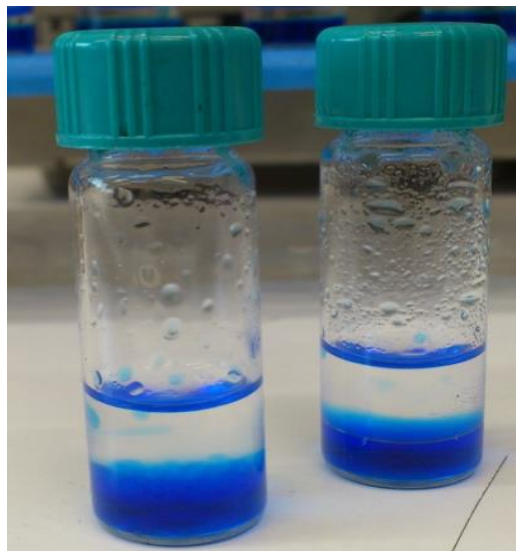
2.4.2.2 Φωτομετρικές μέθοδοι

Για την ανάλυση των παραγόμενων προϊόντων στα υδατικά συστήματα με το ακινητοποιημένο ένζυμο ακολουθήθηκε η φωτομετρική μέθοδος προσδιορισμού των ελεύθερων λιπαρών οξέων [93], [94]. Η μέθοδος βασίζεται στη δημιουργία αλάτων χαλκού, που προκύπτουν από την αντίδραση οξικού χαλκού με τα λιπαρά οξέα που απελευθερώνονται κατά την υδρόλυση των εστέρων. Τα άλατα αυτά μπορούν να προσδιοριστούν φωτομετρικά καθώς εμφανίζουν μέγιστο απορρόφησης στα 715 nm.

Πρώτα παρασκευάστηκε διάλυμα οξικού-χαλκού 5% (w/v), το pH του οποίου ρυθμίστηκε στο 6,1 με την προσθήκη πυριδίνης.

Κατασκευή πρότυπων καμπυλών

Δείγματα με 2-50 μmol λαυρικού οξέος προετοιμάστηκαν με διάλυση της εκάστοτε ποσότητας οξέος σε δοκιμαστικούς σωλήνες με 5mL ισοοκτανίου. Έπειτα προστέθηκε 1 mL του αντιδραστήριου οξικού χαλκού-πυριδίνης και οι δύο φάσεις που δημιουργήθηκαν αναμίχθηκαν έντονα για 90 s στο vortex. Το μίγμα αφέθηκε 0-20 s έως ότου οι δύο φάσεις διαχωριστούν και πάλι. Μικρή ποσότητα (2 mL) από την υπερκείμενη φάση (λαυρικό οξύ σε ισοοκτανίου) μεταφέρθηκε σε κυψελίδα και η απορρόφηση στα 715 nm μετρήθηκε έναντι οργανικής φάσης τυφλού διαλύματος χωρίς λαυρικό οξύ.



Εικόνα 2.12 Διαχωρισμός φάσεων

Η αντίστοιχη διαδικασία ακολουθήθηκε για την περίπτωση του p-HBA, με αντικατάσταση όμως του ισοοκτανίου με 1-οκτανόλη, λόγω της αδιαλυτότητας του οξέος στον πρώτο διαλύτη.

Προσδιορισμός ελεύθερων οξέων στα δείγματα

0,3 mL από το μίγμα της αντίδρασης μεταφέρθηκαν σε vial μαζί με 1 mL οργανικού διαλύτη (ισοοκτανίου ή 1-οκτανόλης ανάλογα με το οξύ) και 0,3 mL διαλύματος οξικού χαλκού-πυριδίνης. Το μίγμα αναδεύτηκε έντονα για 90 s και αφού αφέθηκε έως ότου οι

δύο φάσεις διαχωριστούν, ποσότητα όγκου 0,8 mL μεταφέρθηκε σε κυψελίδα προς μέτρηση της απορρόφησης έναντι του αντίστοιχου τυφλού διαλύματος.

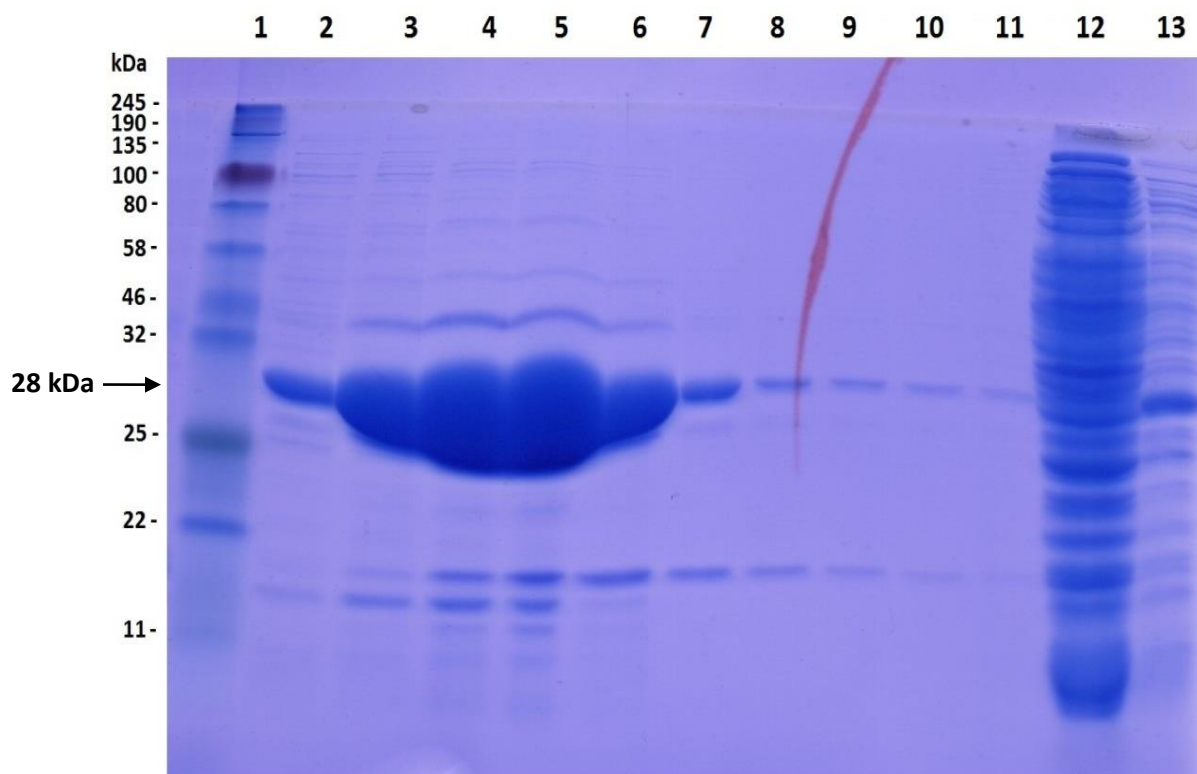
Δείγματα λαμβάνονταν από το μίγμα της αντίδρασης αρχικά κάθε 1 h.

3. Αποτελέσματα & Συζήτηση

3.1 Καθαρισμός ενζύμου και χαρακτηριστικά

3.1.1 SDS-PAGE ηλεκτροφόρηση

Το ένζυμο που παράχθηκε ετερόλογα, απομονώθηκε και καθαρίστηκε με επιτυχία σε στήλη συγγένειας ιόντων νικελίου (IMAC). Το μοριακό του βάρος προσδιορίστηκε στα 28 kDa με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδης (SDS-PAGE), όπως φαίνεται από την εικόνα του πήκτωματος που ακολουθεί:



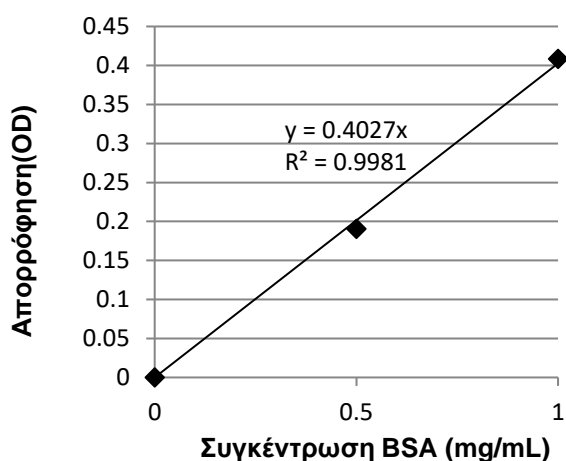
Εικόνα 3.1 SDS-PAGE της εστεράσης. Λωρίδες : (1) μάρτυρας πρωτεϊνών γνωστού μοριακού βάρους (Neb p7712), (2-11) κλάσματα καθαρισμού, (12) flow through : πρωτεΐνες που δεν δεσμεύτηκαν στη στήλη, (13) wash : πρωτεΐνες που δεσμεύτηκαν ελαφρά στα ιόντα νικελίου

Με βάση την εικόνα αυτή επιλέχθηκαν τα κλάσματα 3-6 για περαιτέρω ανάλυση, λόγω της μεγαλύτερης ποσότητας ενζύμου που περιείχαν. Στα κλάσματα αυτά εντοπίζονται και κάποιες άλλες αχνές ζώνες, οι οποίες αντιστοιχούν σε άλλες πρωτεΐνες, πολύ μικρότερης όμως συγκέντρωσης από το υπό μελέτη ένζυμο. Από το πήκτωμα είναι εμφανές πως μία μικρή ποσότητα εστεράσης πέρασε μέσω της στήλης κατά τη διάρκεια της έκλουσης των ελαφρώς προσδεδμεμένων στα ιόντα νικελίου πρωτεϊνών (λωρίδα 13).

3.1.2 Προσδιορισμός πρωτεϊνικής συγκέντρωσης

Η πρωτεϊνική συγκέντρωση στο δείγμα προσδιορίστηκε τόσο αμέσως μετά τον καθαρισμό όσο και μετά τη συμπύκνωση του ενζυμικού διαλύματος με βάση καμπύλες αναφοράς γνωστών συγκεντρώσεων BSA που κατασκευάστηκαν εις διπλούν.

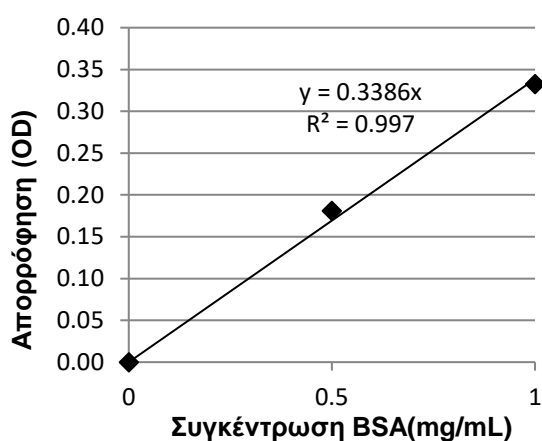
Πριν τη συμπύκνωση



Διάγραμμα 3.1 Καμπύλη αναφοράς BSA

Με βάση τις τιμές απορρόφησης στο δείγμα και την πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων BSA, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο ενζυμικό διάλυμα προσδιορίστηκε ίση με **2 mg/mL**.

Μετά τη συμπύκνωση



Διάγραμμα 3.2 Καμπύλη αναφοράς BSA

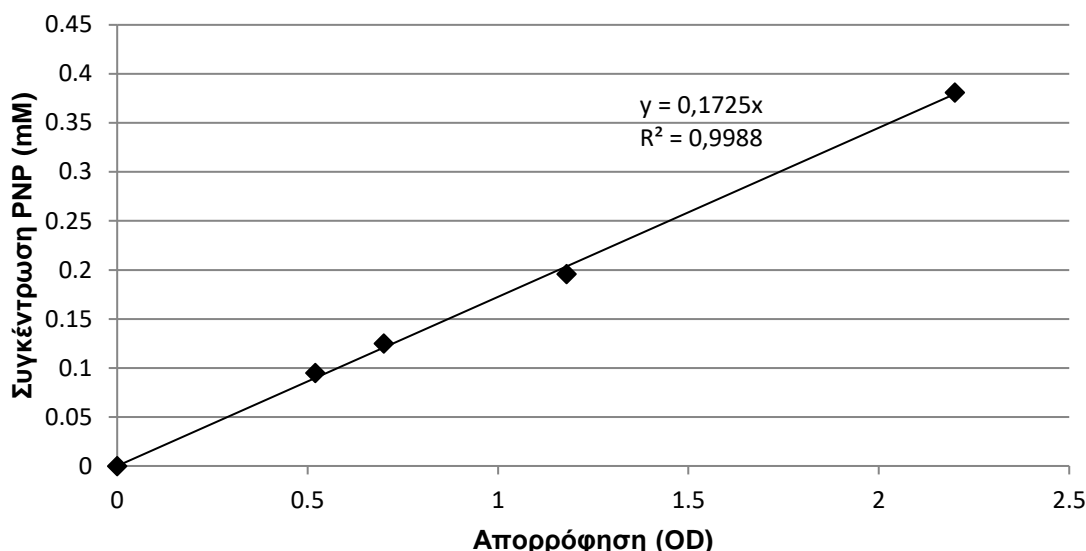
Με βάση τις τιμές απορρόφησης στο δείγμα και την πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων BSA, η συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο ενζυμικό διάλυμα προσδιορίστηκε ίση με **23 mg/mL**.

Πραγματοποιήθηκε δηλαδή μία δεκαπλάσια σχεδόν συμπύκνωση του ενζυμικού διαλύματος μετά τη διαδικασία της υπερδιήθησης.

3.1.3 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας

Όπως η πρωτεϊνική συγκέντρωση έτσι και η δραστηριότητα της εστεράσης προσδιορίστηκε πριν και μετά τη διαδικασία της συμπύκνωσης χρησιμοποιώντας δύο διαφορετικά υποστρώματα. Τα υποστρώματα αυτά ήταν ο οξικός (p-NPA) και ο βουτυρικός π-νιτροφαινυλεστέρας (p-NPB), που αποτελούν και τους συχνότερα χρησιμοποιούμενους εστέρες για τον προσδιορισμό της ενεργότητας των εστερασών.

Για τον υπολογισμό της δραστηριότητας χρησιμοποιήθηκε πρότυπη καμπύλη γνωστών συγκεντρώσεων παρα-νιτροφαινόλης (διάγραμμα 3.3), η οποία αποτελεί προϊόν των ενζυμικών υδρολύσεων.



Διάγραμμα 3.3 Πρότυπη καμπύλη PNP

Συνοπτικά, η δραστικότητα της εστεράσης σε κάθε υπόστρωμα παρουσιάζεται στον πίνακα 3.1:

Πίνακας 3.1 Ενζυμική δραστικότητα

Ενεργότητα εστεράσης (units/mL)			
Πριν τη συμπύκνωση		Μετά τη συμπύκνωση	
p-NPA	p-NPB	p-NPA	p-NPB
59	19,3	216	120

Από τον πίνακα 3.1 είναι εμφανής η αύξηση της ενζυμικής δραστικότητας και ως προς τα δύο υποστρώματα μετά τη συμπύκνωση του ενζυμικού διαλύματος. Η αύξηση αυτή είναι πιο έντονη στην περίπτωση του p-NPB, παρόλο που η δραστικότητα της εστεράσης έναντι του συγκεκριμένου υποστρώματος είναι χαμηλότερη από ότι στο p-NPA.

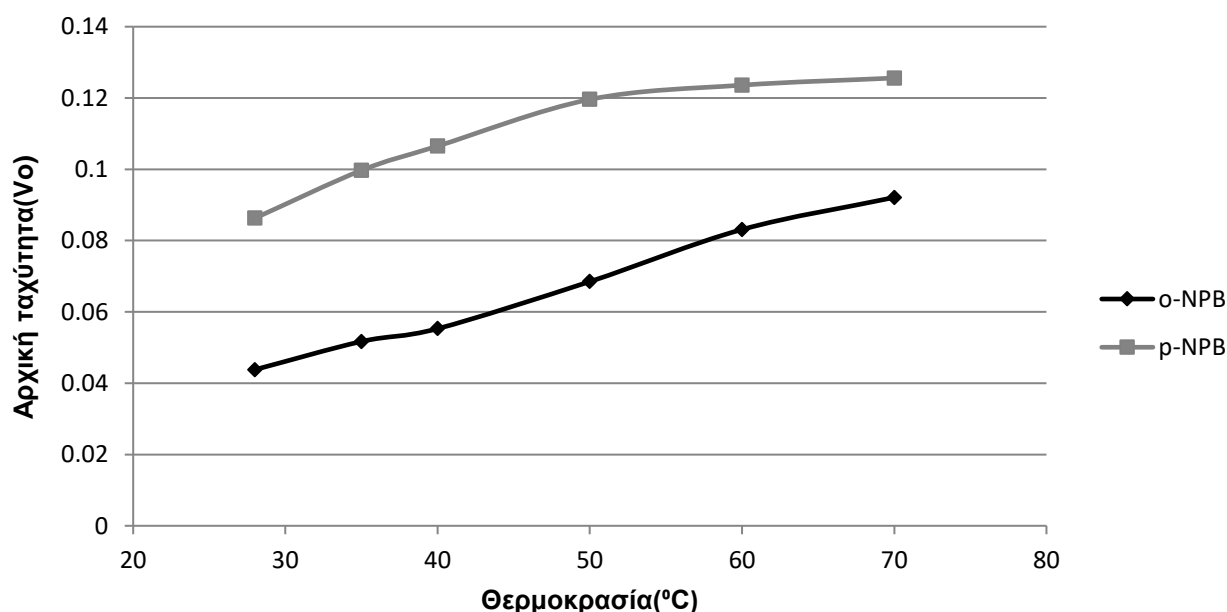
Ωστόσο, λαμβάνοντας υπ' όψιν την πρωτεϊνική συγκέντρωση πριν και μετά τη συμπύκνωση, η ειδική δραστικότητα της εστεράσης εμφανίζεται μειωμένη και προς τα δύο υποστρώματα. Με υπόστρωμα το p-NPA, η ειδική δραστικότητα μετά τις διαδικασίες της διαπίδυσης και της υπερδιήθησης μεταβλήθηκε από τα 29,5 units/mg πρωτεΐνης στα 9,4 units/mg πρωτεΐνης, ενώ με υπόστρωμα το p-NPB, η ειδική δραστικότητα μειώθηκε από τα 9,7 units/mg πρωτεΐνης στα 5,2 units/mg. Η μείωση αυτή υποδηλώνει μία απώλεια κάποιων ποσοτήτων του ενζύμου. Παρ' όλο που το μέγεθος των πόρων των μεμβρανών που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαπίδυση και την υπερδιήθηση ήταν 12,4 kDa και 10 kDa, αρκετά μικρότερο από το μοριακό βάρος της εστεράσης, που προσδιορίστηκε ίσο με 28 kDa, φαίνεται πως κάποια ποσότητα ενζύμου πέρασε μέσα από αυτούς. Αυτό είναι μάλιστα πιθανότερο να συνέβη κατά τη διαδικασία της υπερδιήθησης, κατά την οποία εφαρμόστηκε πίεση στο ενζυμικό εκχύλισμα. Ακόμα όμως και να κατακρατήθηκε η εστεράση από τους πόρους της μεμβράνης, υπάρχει πιθανότητα να προσροφήθηκε κάποια ποσότητά της πάνω στην επιφάνεια της μεμβράνης του διηθητικού φίλτρου (centrifugal filter), οδηγώντας στην παρατηρούμενη μείωση της ειδικής δραστικότητας [95].

Κρίνοντας την εξειδίκευση της εστεράσης προς τα χρησιμοποιηθέντα υποστρώματα, το ένζυμο έδειξε υψηλότερη ενεργότητα έναντι του οξικού π-νιτροφαινυλεστέρα (p-NPA). Ο συγκεκριμένος εστέρας, που αποτελεί μάλιστα το πιο κοινό υπόστρωμα για τον προσδιορισμό της ενεργότητας των εστερασών, φέρει όμως κάποιες δυσμενείς ιδιότητες, που θέτουν προβληματισμούς σχετικά με την αξιοπιστία των αποτελεσμάτων. Οι ιδιότητες αυτές συμπεριλαμβάνουν την ευαισθησία των χρωμοφόρων χαρακτηριστικών του σε αλλαγές των τιμών pH και τη μεγάλη χημική του αστάθεια [96]. Άλλωστε, κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων παρατηρήθηκε αρκετή δυσκολία ως προς τον χειρισμό του υποστρώματος αυτού, καθώς η αυθόρμητη υδρόλυσή του ήταν ένα μείζον ζήτημα που έπρεπε να ξεπεραστεί. Για το λόγο αυτό, η εύρεση της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης (παράγραφος 3.1.4) βασίστηκε στην υδρόλυση του άλλου ψευδοϋποστρώματος, του βουτυρικού π-νιτροφαινυλεστέρα, ο οποίος επέδειξε μεγαλύτερη σταθερότητα.

3.1.4 Προσδιορισμός βέλτιστης θερμοκρασίας

Η άριστη θερμοκρασία δράσης της εστεράσης προσδιορίστηκε τόσο χρησιμοποιώντας την ελεύθερη σε υδατικό διάλυμα, όσο και ακινητοποιημένη στη χιτοζάνη, ώστε να διερευνηθεί το θερμοκρασιακό βέλτιστο για τη διεξαγωγή των αντιδράσεων σύνθεσης και υδρόλυσης και στις δύο καταστάσεις.

3.1.4.1 Ελεύθερο ένζυμο



Διάγραμμα 3.4 Υδρόλυση ψευδοϋποστρωμάτων καταλυόμενη από την εστεράση συναρτήσει της θερμοκρασίας. (◊)ο-NPB, (■)p-NPB, συγκεντρώσεις υποστρωμάτων 1,36 mM έκαστο, συγκέντρωση ενζύμου 1,15 μg/mL

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα υδρόλυσης των βουτυρικών νιτροφαινυλεστέρων μελετήθηκε σε ένα θερμοκρασιακό εύρος 28°-70°C, με την εστεράση ελεύθερη σε υδατικό διάλυμα.

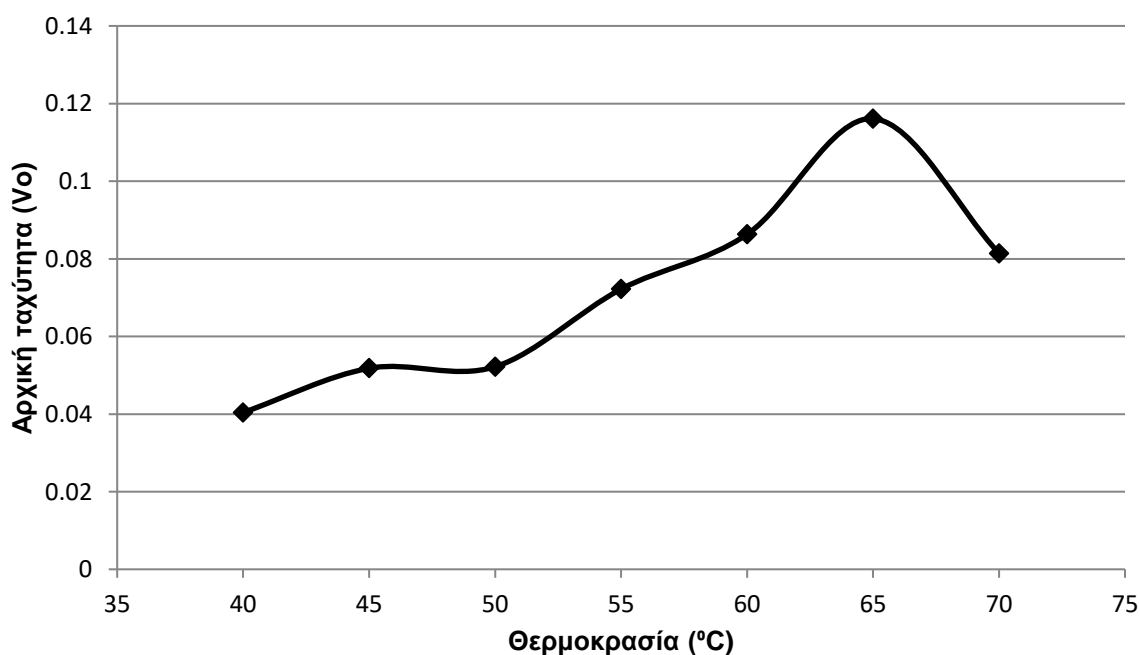
Στο διάγραμμα 3.4 παρουσιάζεται η ταχύτητα υδρόλυσης των δύο υποστρωμάτων, των p-NPB και ο-NPB, σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Από το διάγραμμα, είναι φανερό πως το ένζυμο εμφανίζει μία προτίμηση προς το p-NPB, καθώς η υδρόλυση του

πραγματοποιείται ταχύτερα από αυτήν του ο-NPB. Άλλωστε ένας από τους λόγους που το p-NPB είναι το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται ευρέως για τη μελέτη της δράσης των εστερασών είναι το ότι οι περισσότερες εστεράσες, όπως προκύπτει και για την εστεράση που μελετούμε, εμφανίζουν αυξημένη εκλεκτικότητα ως προς το παρα-ισομερές, στο οποίο το υδροξύλιο προκαλεί μικρότερη στερεοχημική παρεμπόδιση. Σε ό,τι αφορά τη θερμοκρασία, η αύξησή της προκαλεί αύξηση της ταχύτητας υδρόλυσης. Η άριστη θερμοκρασία δράσης φαίνεται πως είναι οι 70 °C, γεγονός που συμφωνεί με τις θερμοκρασιακά άριστες τιμές που έχουν προσδιοριστεί για τις εστεράσες άλλων αντιπροσώπων του γένους, οι οποίες κυμαίνονται από 50° - 70 °C (πίνακας 1.2).

Ωστόσο μετά τους 50 °C, στην περίπτωση του p-NPB, η αύξηση αυτή δεν είναι τόσο έντονη, καθώς παρατηρείται ένα πλατό στο διάγραμμα στο θερμοκρασιακό εύρος των 50° - 70 °C. Το πλατό αυτό δεν οφείλεται σε αδρανοποίηση του ενζύμου λόγω θερμοκρασίας, καθώς στην περίπτωση του άλλου υποστρώματος η δραστηριότητα συνεχίζει να αυξάνεται και σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν καταγραφεί για αντίστοιχες εστεράσες άλλων αντιπροσώπων του γένους, οι οποίες φαίνεται να διατηρούν υψηλή δραστηριότητα έναντι του p-NPB σε μεγάλο θερμοκρασιακό εύρος γύρω από τη βέλτιστη θερμοκρασία δράσης. Συγκεκριμένα, η εστεράση του στελέχους *Geobacillus sp.* DF20, με άριστη θερμοκρασία δράσης τους 50 °C, διατήρησε τουλάχιστον το 70% της μέγιστης δραστηριότητάς της σε θερμοκρασίες από 30 °C έως 70 °C [97], όπως επίσης και η εστεράση του βακτηρίου *Geobacillus sp.* JM6, που παρουσίασε ενεργότητα ίση με το 75% της μέγιστης στο ίδιο εύρος θερμοκρασιών, έχοντας άριστη θερμοκρασία δράσης τους 65 °C [26].

Οδηγούμεστε συνεπώς στο συμπέρασμα πως μπορούμε να μελετήσουμε τις αντιδράσεις μας σε θερμοκρασίες 45° - 50 °C, που παρ' όλο που δεν είναι οι βέλτιστες για τη δράση του ενζύμου, προσφέρουν ένα σημαντικό ενεργειακό κέρδος στις πειραματικές διαδικασίες.

3.1.4.2 Ακίνητοποιημένο ένζυμο



Διάγραμμα 3.5 Υδρόλυση p-NPB από ακίνητοποιημένη εστεράση ως συνάρτηση της θερμοκρασίας Συγκέντρωση υποστρώματος: 0,8 mM, ενζύμου: 1,73 μg/mL

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην ταχύτητα υδρόλυσης του p-NPB από την ακινητοποιημένη στη χιτοζάνη εστεράση διερευνήθηκε σε ένα θερμοκρασιακό εύρος 40° - 70 °C.

Στο διάγραμμα 3.5 παρουσιάζεται η ταχύτητα υδρόλυσης του συγκεκριμένου εστέρα σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία. Και στην περίπτωση του ακινητοποιημένου ενζύμου, παρατηρείται αύξηση της ταχύτητας υδρόλυσης του υποστρώματος με την αύξηση της θερμοκρασίας.

Μετά τους 65 °C όμως η καμπύλη εμφανίζει πτωτική τάση. Το γεγονός αυτό δεν οφείλεται στην αποσύνθεση της χιτοζάνης, αλλά πιθανότερα στην αφυδάτωση της, καθώς όσο η θερμοκρασία πλησιάζει τους 100 °C παρατηρείται μία απώλεια, λόγω εξάτμισης, του δεσμευμένου στη χιτοζάνη νερού [98], [99], [100]. Η αποσύνθεσή της εξάλλου πραγματοποιείται σε πολύ υψηλότερες θερμοκρασίες, γύρω στους 300 °C, όπως έχει διαπιστωθεί με δυναμική θερμοβαρυμετρική ανάλυση (TGA) και διαφορική θερμοδομετρία σάρωσης (DSC) [100], [101]. Συγκρίνοντας τα διαγράμματα 3.4 και 3.5, αναφορικά με την υδρόλυση του p-NPB, παρατηρείται μία πιο έντονη αύξηση της αρχικής ταχύτητας στην περίπτωση που το ένζυμο είναι ακινητοποιημένο σε όλο το μελετώμενο θερμοκρασιακό εύρος. Όμως, η μέγιστη ταχύτητα στη βέλτιστη θερμοκρασία για το ακινητοποιημένο ένζυμο είναι ίση με το 72,8% της αντίστοιχης για το ελεύθερο ένζυμο, στους 65 °C και 70 °C αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα από μελέτη ακινητοποίησης σε χιτοζάνη μίας άλλης εστεράσης του *Geobacillus sp.* έδειξαν ότι οι βέλτιστες συνθήκες ακινητοποίησης ήταν οι εξής : 1 mg/mL εστεράσης σε 0,5 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7 με 1,5 mg νανοσωματίδια χιτοζάνης στους 60 °C. Υπό αυτές τις συνθήκες, η δραστηριότητα της ακινητοποιημένης εστεράσης προέκυψε ίση με το 88,5% σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο [67].

Συνεπώς, η μικρή μόνο μείωση της δραστηριότητας και στις δύο περιπτώσεις επιβεβαιώνει το γεγονός πως η διαδικασία της ακινητοποίησης δεν επηρεάζει το ενεργό κέντρο του ενζύμου.

3.2 Αντιδράσεις σύνθεσης

3.2.1 Μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό ουσία

Για τη μελέτη της συνθετικής ικανότητας της εστεράσης σε μικρογαλακτώμα χωρίς επιφανειοενεργό ουσία παρασκευάστηκαν τα συστήματα που αναγράφονται στον πίνακα 3.2 :

Πίνακας 3.2 Σύσταση μικρογαλακτωμάτων χωρίς επιφανειοενεργό ουσία

1	Εξάνιο 472 μ L 1-προπανόλη 508 μ L Tris-HCl 50mM, pH 7,5 15 μ L ενζυμικό διάλυμα(0,023mg/mL) 5 μ L οξύ/εστέρας 0,1 M	<ul style="list-style-type: none">• Τα οξέα/εστέρες που μελετήθηκαν στο σύστημα αυτό ήταν:• οξικό, βουτυρικό, εξανοϊκό, λαυρικό, κινναμωμικό, βενζοϊκό, φαινυλοξικό οξύ, ο-, μ-, π-κουμαρικό οξύ, p-HBA, ο-, m-, p-HPA, p-HPP, ibuprofen.• προπιονικός αιθυλεστέρας, κινναμωμικός αιθυλεστέρας, λαυρικός βουτυλεστέρας, p-HBA butyl ester
2	Εξάνιο 472 μ L 1-βουτανόλη 508 μ L Tris-HCl 50mM, pH 7,5 15 μ L ενζυμικό διάλυμα(0,023mg/mL) 5 μ L οξύ 0,1 M	<ul style="list-style-type: none">• Με τη σύσταση αυτή μελετήθηκε το οξικό και το εξανοϊκό οξύ.
3	Εξάνιο 472 μ L 2-προπανόλη/νερόλη 508 μ L Tris-HCl 50mM, pH 7,5 15 μ L ενζυμικό διάλυμα(0,023mg/mL) 5 μ L οξύ 0,1 M	<ul style="list-style-type: none">• Με τη σύσταση αυτή μελετήθηκε το λαυρικό οξύ.
4	Εξάνιο 472 μ L 2-προπανόλη/γερανιόλη 508 μ L Tris-HCl 50mM, pH 7,5 15 μ L ενζυμικό διάλυμα(0,023mg/mL) 5 μ L οξύ 0,1 M	<ul style="list-style-type: none">• Με τη σύσταση αυτή μελετήθηκε το εξανοϊκό οξύ.
5	Εξάνιο 472 μ L 1-προπανόλη 508 μ L ενζυμικό διάλυμα(0,23mg/mL) 20 μ L οξύ 0,1 M	<ul style="list-style-type: none">• Τα οξέα που μελετήθηκαν ήταν:• φαινυλοξικό οξύ, m-HPA, p-HPP, ibuprofen
6	Εξάνιο 644 μ L 1-προπανόλη 334 μ L Tris-HCl 50mM, pH 7,5 12 μ L ενζυμικό διάλυμα(0,023mg/mL) 10 μ L οξύ 0,1M	<ul style="list-style-type: none">• Με τη σύσταση αυτή μελετήθηκε το οξικό οξύ.

Τα συστήματα μελετήθηκαν με αέρια χρωματογραφία για ανίχνευση εμφάνισης προϊόντος για 20 ημέρες. Ωστόσο στο χρονικό αυτό διάστημα, δεν παρατηρήθηκε παραγωγή εστέρα σε κανένα από αυτά. Ελπιδοφόρα φάνηκαν αρχικά τα συστήματα στα οποία η ποσότητα του ενζύμου ήταν περισσότερη (πίνακας 3.2, σύστημα 5), καθώς εμφανίστηκαν νέες κορυφές κατά την ανάλυση. Ωστόσο, κατά την ανάλυση των αντίστοιχων τυφλών διαλυμάτων εμφανίστηκαν οι ίδιες κορυφές, με αποτέλεσμα να εγκαταλειφθεί κάθε προσπάθεια για την πραγματοποίηση συνθετικών αντιδράσεων με τη μέθοδο αυτή.

Μελέτες αντιδράσεων εστεροποίησης και μετεστεροποίησης σε μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό έχουν πραγματοποιηθεί με καταλύτη άλλες τάξεις εστερασών,

τις εστεράσες του φερουλικού οξέος (EC 3.1.1.73) (πίνακας 1.4) και τις λιπάσες (EC 3.1.1.3) [54], [102]. Δεδομένης της έλλειψης πειραματικών δεδομένων σε τέτοια συστήματα για την τάξη που ανήκει το υπό μελέτη ένζυμο, τις καρβοξυλεστεράσες (EC 3.1.1.1) ο σχεδιασμός των πειραμάτων βασίστηκε στα συστήματα που παρασκευάστηκαν για τις άλλες δύο τάξεις εστερασών. Σε όλες τις περιπτώσεις, για το σχηματισμό του μικρογαλακτώματος ως συνεχής φάση χρησιμοποιήθηκε το εξάνιο ενώ τα υποστρώματα εμφάνισαν μεγαλύτερη ποικιλία, καθώς χρησιμοποιήθηκαν διάφορα φαινολικά και αλειφατικά οξέα καθώς και πρωτοταγείς ή δευτεροταγείς αλκοόλες. Όλες οι αντιδράσεις που αναφέρονται στη βιβλιογραφία πραγματοποιήθηκαν με επιτυχία, οδηγώντας στο σχηματισμό εστέρα.

Στη δική μας περίπτωση, η σύσταση του μικρογαλακτώματος που μελετήθηκε εκτενέστερα, με δοκιμές περισσότερων υποστρωμάτων (πίνακας 3.2, σύστημα 1) βασίστηκε σε αντίστοιχο σύστημα που παρασκευάστηκε για τη μελέτη της συνθετικής ικανότητας των λιπασών των μυκήτων *C.antartica* και *R.miehei* [54]. Ωστόσο, η εστεράση δεν επέδειξε ανάλογη συμπεριφορά με τη λιπάση. Μία πιθανή εξήγηση της αδυναμίας επιτέλεσης των συνθετικών αντιδράσεων είναι η επιλογή του οργανικού διαλύτη. Μελέτες σταθερότητας έναντι οργανικών διαλυτών δεν πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία, αλλά έχουν αναφερθεί για θερμοφιλες εστεράσες διαφόρων βακτηρίων του γένους *Geobacillus*. Από αυτές, η εστεράση CaesCCR11 του *G.thermoleovorans* CCR11 διατήρησε κατά 59% την ενεργότητά της μετά από ωριαία επώαση σε διάλυμα εξανίου [24]. Παρόμοια επίδραση είχε το εξάνιο στις εστεράσες Est1, Est2 και Est3 του *Geobacillus* sp. όπου η ενεργότητα τους μετά από επώαση 15min κυμάνθηκε από 50-67% [28].

Η παρουσία του οργανικού αυτού διαλύτη, σε συνδυασμό με την χαμηλή ποσότητα του περιεχόμενου νερού στο σύστημα, που αγγίζει το 2%, αποτελούν την πιθανότερη αιτία της δυσκολίας επιτέλεσης των αντιδράσεων. Πιθανώς σε τόσο χαμηλές υδατικές συγκεντρώσεις το ένζυμο δεν περιβάλλεται επαρκώς από το υδάτινο φράγμα, με αποτέλεσμα να έρχεται άμεσα σε επαφή με το εξάνιο και να μετουσιώνεται.

Μία άλλη εξήγηση θα μπορούσε να είναι η ίδια η φύση του μικρογαλακτώματος, που περιλαμβάνει πολύ υψηλές συγκεντρώσεις αλκοόλης, η οποία μπορεί να δρα εξίσου ανασταλτικά για την εστεράση. Στηριζόμενοι και πάλι σε βιβλιογραφικές αναφορές, παρατηρούμε αυτή τη δράση των αλκοολών σε εστεράσες του γένους *Geobacillus*. Ωριαία επώαση της εστεράσης CaesCCR11 του *G.thermoleovorans* CCR11 σε διάλυμα προπανόλης οδήγησε σε μείωση της ενεργότητάς της κατά 80% [24]. Αξιοσημείωτη μείωση εντοπίστηκε και μετά από επώαση σε διάλυμα ισοπροπανόλης, με την εστεράση του *Geobacillus* sp. DF20 να διατηρεί το 56% της ενεργότητάς της μετά την επώαση σε διάλυμα ισοπροπανόλης 10% (v/v) [97], την εστεράση EstL5 του *G.thermodenitrificans* να εμφανίζει 36% ενεργότητα μετά από επώαση 30min σε διάλυμα ισοπροπανόλης 99% (v/v) [103] και την εστεράση CE_{GK} του *G.kaustophilus* HTA426 να χάνει το 65% και το 75% της ενεργότητάς της μετά από επώαση 30 min σε διάλυμα ισοπροπανόλης 40% (v/v) και 90% (v/v) αντίστοιχα [31].

Οι τροποποιήσεις που έγιναν στη συγκεκριμένη σύσταση, δείχνουν πως η αντικατάσταση της 1-προπανόλης από άλλες αλκοόλες (πίνακας 3.2, συστήματα 2,3,4), η αύξηση της ενζυμικής συγκέντρωσης (πίνακας 3.2, συστήματα 5,6) και η αλλαγή της αναλογίας εξανίου/αλκοόλης (πίνακας 3.2, σύστημα 6) δεν συνετέλεσαν στην εκδήλωση της συνθετικής δράσης της εστεράσης.

3.2.2 Μικρογαλακτώματα

Για τη μελέτη της συνθετικής ικανότητας της εστεράσης παρασκευάστηκαν επιπλέον συμβατικά μικρογαλακτώματα. Κάποια από αυτά σχηματίστηκαν με τη βοήθεια ενός

ανιονικού επιφανειοενεργού, του AOT και τα υπόλοιπα με το συνδυασμό μίας αμφίφιλης επιφανειοδραστικής ουσίας, της λεκιθίνης με τη συνεπιφανειοενεργό 2-προπανόλη. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα οξέα που χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα των αντιδράσεων εστεροποίησης ήταν το οξικό και το βουτυρικό οξύ, σε συγκέντρωση 0,1 M και η τελική ενζυμική συγκέντρωση στο μικρογαλάκτωμα ήταν ίση με 0,005 mg/mL.

Και στην περίπτωση των συστημάτων αυτών, τα αποτελέσματα δεν ήταν θετικά. Δείγματα από κάθε σύστημα ελήφθησαν έως και την 7^η μέρα επώασης στους 45 °C, χωρίς όμως να ανιχνευτεί οξικός ή βουτυρικός προπυλεστέρας, ανάλογα με το χρησιμοποιηθέν οξύ, σε κανένα από αυτά.

Η σύγκριση με αντίστοιχα συστήματα καθίσταται και πάλι δύσκολη, λόγω της απουσίας τέτοιων μελετών από τη βιβλιογραφία για την ομάδα των καρβοξυλεστερασών. Για το λόγο αυτό, όπως και στην προηγούμενη περίπτωση για την παρασκευή των συμβατικών μικρογαλακτωμάτων βασιστήκαμε σε αντίστοιχα συστήματα με καταλύτη των αντιδράσεων εστεροποίησης τις λιπάσες [49], [104], [III]. Λιπάση του μύκητα *P.simplicissimum*, σε τελική συγκέντρωση 0,05 mg/mL, κατέλυσε την εστεροποίηση λαυρικού οξέος με μενθόλη σε μικρογαλάκτωμα AOT/ισοοκτανίου/νερού [104]. Πολλές ακόμα λιπάσες από διάφορους μικροοργανισμούς (*R.delemar*, *R.arrhizus*) έχουν χρησιμοποιηθεί για συνθετικές αντιδράσεις σε μικρογαλακτώματα AOT/ισοοκτανίου/νερού με αρκετά καλές αποδόσεις παραγόμενου προϊόντος [49]. Και στην περίπτωση μικρογαλακτωμάτων με επιφανειοενεργό ουσία τη λεκιθίνη υπάρχουν πολλές αναφορές για τη συνθετική δράση των λιπασών σε μικρογαλακτώματα [49], [III]. Εκτός των λιπασών, και μία άλλη τάξη εστερασών, οι κουτινάσες (EC 3.1.1.74) έχουν εγκλωβιστεί σε μικρογαλακτώματα AOT/ισοοκτανίου/νερού καταλύοντας επιτυχώς την εστεροποίηση λαυρικού οξέος με πεντανόλη [105]. Οι κουτινάσες αποτελούν το συνδετικό κρίκο ανάμεσα στις λιπάσες και τις εστεράσες, καθώς έχουν τη δυνατότητα να υδρολύουν εστέρες λιπαρών οξέων και τριγλυκερίδια τόσο αποτελεσματικά όσο οι λιπάσες, χωρίς όμως να επιδεικνύουν το φαινόμενο της μεσεπιφανειακής ενεργοποίησης [106].

Τα μικρογαλακτώματα συνεπώς που παρασκευάστηκαν φαίνεται πως μπορούν να εγκλωβίσουν στον υδάτινο θύλακά τους κάποιες κατηγορίες εστερασών, με ταυτόχρονη διατήρηση της καταλυτικής τους δράσης. Ωστόσο αυτό δε συνέβη στην περίπτωση της υπό μελέτη εστεράσης.

Ένας πιθανός λόγος είναι η επιλογή του οργανικού διαλύτη. Από μελέτες σταθερότητας εστερασών σε ισοοκτανίο, η εστεράση EstL5 του *G.thermodenitrificans* εμφάνισε αρκετά μειωμένη δράση, μετά από επώαση 30 min σε διάλυμα ισοοκτανίου (99% v/v) [23]. Αν η στερεοδιάταξη της εστεράσης απαιτεί περισσότερα μόρια νερού, από ότι οι λιπάσες και οι κουτινάσες, προκειμένου να σχηματιστεί γύρω της ένα φράγμα νερού που θα αποτρέψει την επαφή της με τον οργανικό διαλύτη, τότε πιθανόν το περιεχόμενο 2% νερό στα συστήματα που παρασκευάστηκαν να μην ήταν αρκετό.

Η συγκέντρωση του ενζύμου στα συστήματα αυτά ήταν μεγαλύτερη από αυτή που χρησιμοποιήθηκε στα περισσότερα μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό, με εξαιρέσεις κάποια από αυτά, στα οποία δοκιμάστηκαν ίσες συγκεντρώσεις (πίνακας 3.2 σύστημα 5). Θα μπορούσαμε να θεωρήσουμε λοιπόν πως αν η συγγένεια της εστεράσης προς τα υποστρώματά της ήταν χαμηλή, θα έπρεπε να προστεθεί σε όλα τα μικρογαλακτώματα, συμβατικά και χωρίς επιφανειοενεργό ουσία, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

3.2.3 Πήκτωμα χιτοζάνης

Η μελέτη της αντίδρασης εστεροποίησης με ακινητοποιημένο σε στερεό καταλύτη ένζυμο πραγματοποιήθηκε με την εστεράση ακινητοποιημένη σε φορέα χιτοζάνης, με υποστρώματα την 1-προπανόλη και διάφορα αλειφατικά οξέα με αριθμό ατόμων άνθρακα ≤ 12 . Ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν το ισοοκτάνιο και όλα τα συστήματα επωάστηκαν σε θερμοκρασία 45 °C.

Η χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων, έδειξε την απουσία παραγόμενου εστέρα σε όλα τα συστήματα, ακόμα και μετά από 7 ημέρες επώασης στην προαναφερθείσα θερμοκρασία. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει την αδυναμία της ακινητοποιημένης εστεράσης να συνθέσει οξικό, βουτυρικό, εξανοϊκό και λαυρικό προπυλεστέρα έχοντας ως υποστρώματα την 1-προπανόλη και τα αντίστοιχα οξέα υπό τις παρούσες συνθήκες.

Αναφορές για σύνθεση εστέρα από ακινητοποιημένο σε χιτοζάνη ένζυμο δεν υπάρχουν για την ομάδα των υπό μελέτη ενζύμων, τις καρβοξυλεστεράσες, αλλά περιορίζονται στις λιπάσες. Λιπάση από το μύκητα *C.rugosa* ακινητοποιήθηκε σε χιτοζάνη μέσω φυσικής προσρόφησης και χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση βουτυρικού βουτυλεστέρα με οργανικό μέσο το επτάνιο. Η μέγιστη απόδοση παραγόμενου εστέρα επετεύχθη σε θερμοκρασία 37 °C, με τη μεγαλύτερη δυνατή συγκέντρωση λιπάσης (0,5 g) και με αρχική αναλογία οξέος/αλκοόλης ίση με 1,5/1 [107].

Για την αδυναμία κατάλυσης των αντιδράσεων εστεροποίησης από την εστεράση του *Geobacillus sp.* SP50 τέθηκε αρχικά το ερώτημα περί επιτυχούς ακινητοποίησής της στο συγκεκριμένο φορέα. Εστεράση του ίδιου γένους έχει ακινητοποιηθεί επιτυχώς, μέσω φυσικής προσρόφησης σε νανοσωματίδια χιτοζάνης, που παρασκευάστηκαν με μια τεχνική βασισμένη στη χρήση τριπολυφωσφορικού νατρίου (TPP) ως παράγοντα διασταυρούμενης σύνδεσης [67]. Η διαδικασία που ακολουθήσαμε στο εργαστήριο ήταν διαφορετική (παράγραφος 2.3.1.3), αλλά η υδρόλυση του p-NPB από την ακινητοποιημένη με αυτή τη μέθοδο εστεράση επιβεβαίωσε ότι ήταν εξίσου αποτελεσματική (παράγραφος 3.1.4.2). Ανασταλτικό παράγοντα μπορεί να αποτέλεσε ο οργανικός διαλύτης, αφού στο συγκεκριμένο σύστημα το ένζυμο βρισκόταν σε άμεση επαφή μαζί του.

3.3 Αντιδράσεις υδρόλυσης

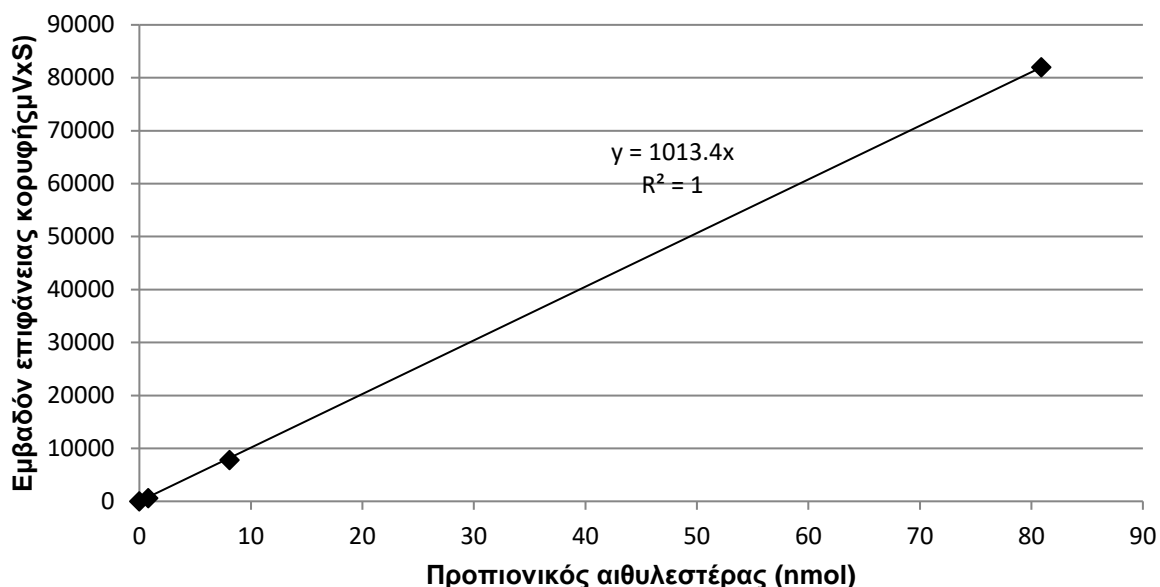
3.3.1 Υδατικά συστήματα

3.3.1.1 Με ελεύθερο ένζυμο

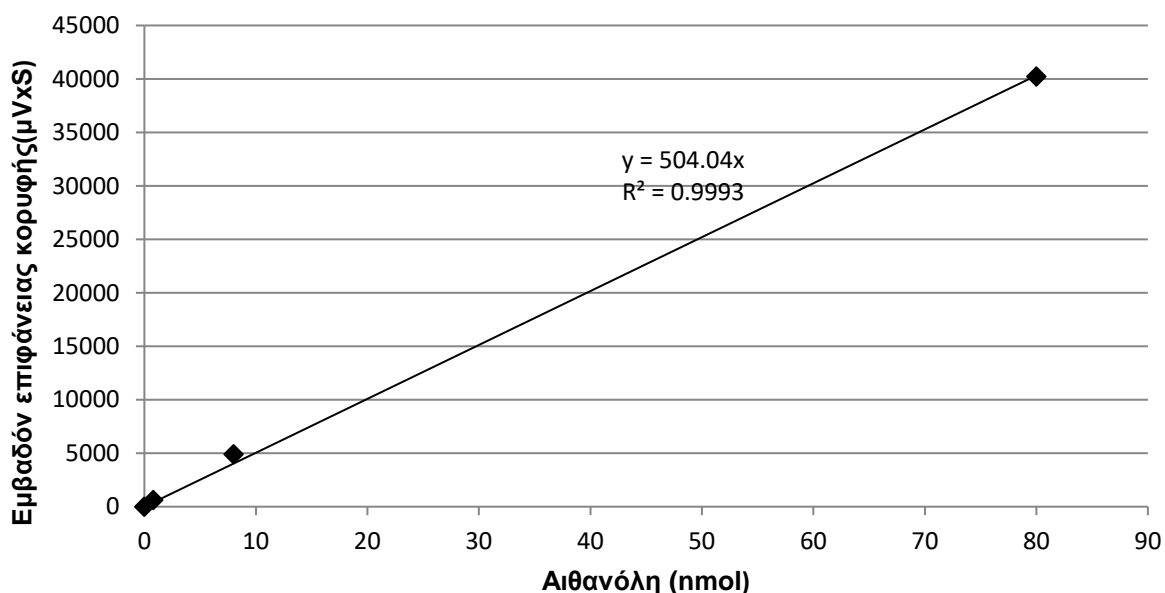
Η διερεύνηση της υδρολυτικής ικανότητας της εστεράσης, έναντι φυσικών υποστρωμάτων, πραγματοποιήθηκε σε υδατικό διάλυμα σε θερμοκρασία 60 °C. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν, ο οξικός και ο προπιονικός αιθυλεστέρας, αποτελούν εστέρες μικρού αριθμού ατόμων άνθρακα, ιδανικούς για αναγνώριση από το συγκεκριμένο ένζυμο.

➤ Πρότυπες καμπύλες

Στα διαγράμματα 3.6 και 3.7 διακρίνονται οι πρότυπες καμπύλες αναφοράς που πραγματοποιήθηκαν για το ένα υπόστρωμα (προπιονικός αιθυλεστέρας) και το ένα εκ των δύο προϊόντων της αντίδρασης αντίστοιχα, όπως εκφράζονται ως σχέση μεταξύ εμβαδού επιφάνειας κορυφών χρωματογραφημάτων και συγκέντρωσης. Οι καμπύλες αυτές χρησιμοποιήθηκαν για τον ποσοτικό προσδιορισμό των παραγόμενων από τις υδρολύσεις προϊόντων.



Διάγραμμα 3.6 Πρότυπη καμπύλη προπιονικού αιθυλεστέρα



Διάγραμμα 3.7 Πρότυπη καμπύλη αιθανόλης

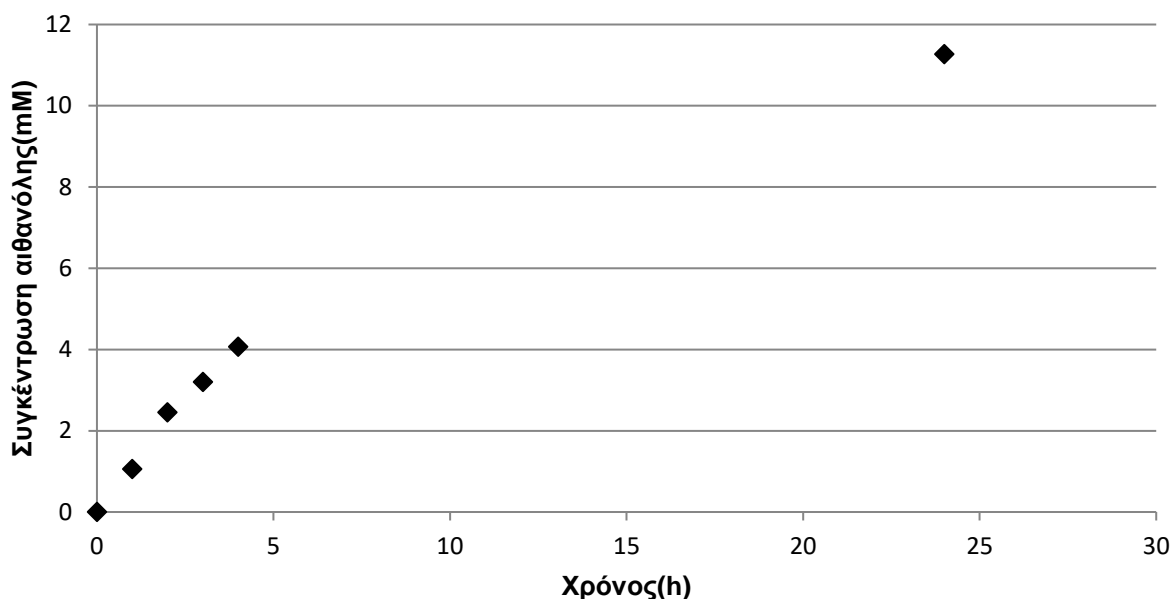
➤ Αντιδράσεις

Από τις αρχικές μελέτες δυνατότητας υδρόλυσης των απλών εστέρων σε αντιδράσεις διάρκειας 24 h στους 60 °C, το ένζυμο κατάφερε να υδρολύσει τόσο τον οξικό όσο και τον προπιονικό αιθυλεστέρα. Συγκεκριμένα, κατά την υδρόλυση του οξικού αιθυλεστέρα η απόδοση της αντίδρασης έφτασε το 6% ενώ από την υδρόλυση του προπιονικού αιθυλεστέρα έφτασε το 11%. Για το σκοπό αυτό άλλωστε αποφασίστηκε η συνέχιση των πειραμάτων με το δεύτερο υπόστρωμα, λόγω της παραγωγής περισσότερου προϊόντος στον ίδιο χρόνο και υπό τις ίδιες συνθήκες.

Η αντίδραση της υδρόλυσης του προπιονικού αιθυλεστέρα, που παρακολουθήθηκε για 24h στη θερμοκρασία των 60 °C, με αρχικές μετρήσεις ανά 1 h, πραγματοποιήθηκε και πάλι επιτυχώς, με τον προπιονικό αιθυλεστέρα να υδρολύεται σε ποσοστό μεγαλύτερο

του 50%, παρ' όλο που στο σύστημα η αρχική συγκέντρωση τόσο του ίδιου όσο και του ενζυμικού διαλύματος ήταν αρκετά μικρότερη. Συγκεκριμένα, κατά την έναρξη της αντίδρασης η συγκέντρωση του εστέρα ήταν 20 mM και της εστεράσης 0,023 mg/mL, ενώ στις αρχικές μελέτες προστέθηκε στο μίγμα της αντίδρασης εστεράς συγκέντρωσης 100 mM και ένζυμο συγκέντρωσης 0,46 mg/mL.

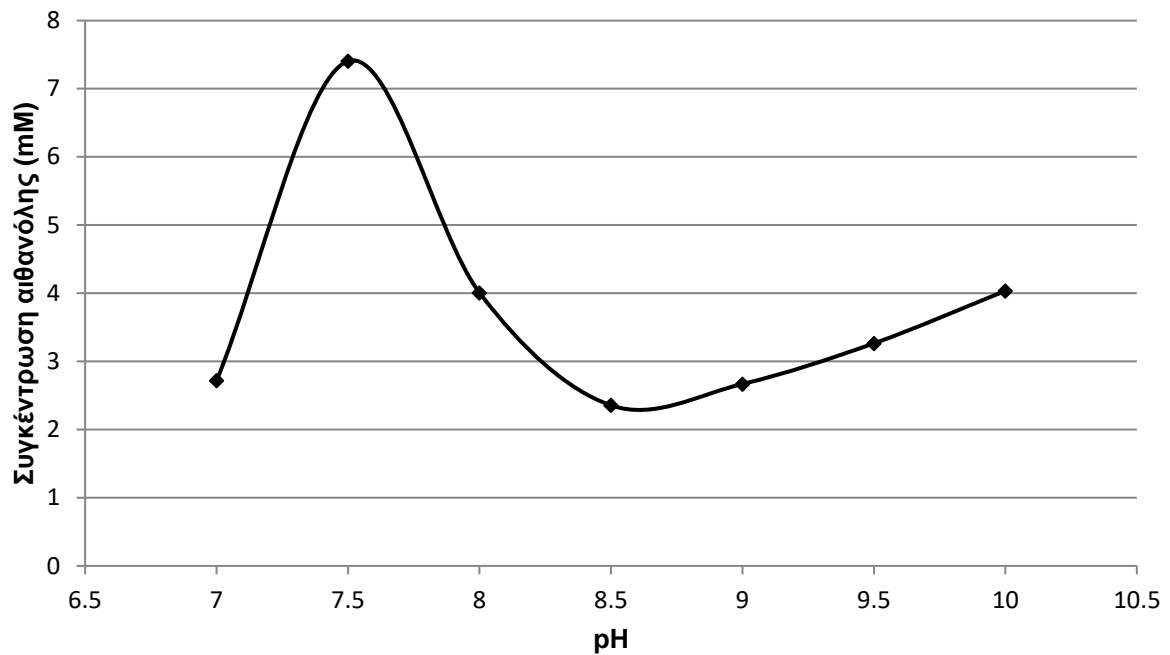
Όπως φαίνεται από το διάγραμμα 3.8, η παραγωγή της αιθανόλης τις πρώτες 5 ώρες επώασης ήταν σχεδόν γραμμική, ενώ κατά την τελευταία μέτρηση, που πραγματοποιήθηκε μία ημέρα αργότερα, άρχισε να εμφανίζεται κορεσμός όταν η αντίδραση έφτασε στο 56%.



Διάγραμμα 3.8 Παραγωγή αιθανόλης ως συνάρτηση του χρόνου επώασης στους 60 °C.
Συγκέντρωση υποστρώματος: 20 mM, ενζύμου: 0,46 mg/mL

Άριστο pH δράσης

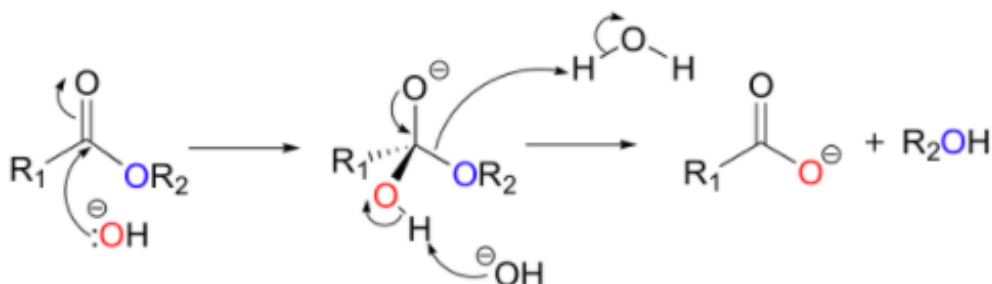
Από τη μελέτη της υδρόλυσης του προπιονικού αιθυλεστέρα σε διαφορετικές τιμές pH, προέκυψε το διάγραμμα 3.9, στο οποίο παρουσιάζεται η συγκέντρωση της παραγόμενης αιθανόλης σε ένα εύρος pH από 7 έως 10.



Διάγραμμα 3.9 Υδρόλυση υποστρώματος συναρτήσει του pH του μέσου αντίδρασης στους 60 °C.
 Συγκέντρωση υποστρώματος: 20mM, ενζύμου: 0,02 mg/mL

Είναι εμφανές πως το άριστο pH δράσης για το συγκεκριμένο ένζυμο είναι το 7,5. Το γεγονός αυτό βρίσκεται και πάλι σε αντιστοιχία με τις βιβλιογραφικές αναφορές, σύμφωνα με τις οποίες η δράση των εστερασών φαίνεται να ευνοείται σε ουδέτερα ή αλκαλικά περιβάλλοντα (πίνακας 1.2). Μετά την τιμή pH=8,5 παρατηρείται ξανά μία σταδιακή και μικρότερη αύξηση της παραγόμενης αιθανόλης. Ωστόσο αυτή η αύξηση είναι πλασματική, καθώς σε βασικό περιβάλλον το υπόστρωμα υφίσταται αυθόρμητη υδρόλυση.

Γενικότερα, σε αλκαλικό περιβάλλον, οι εστέρες υδρολύονται μέσω μίας τυπικής διαδικασίας άκυλο υποκατάστασης, κατά την οποία το ιόν του υδροξειδίου αποτελεί το πυρηνόφιλο που προστίθεται στην καρβονυλομάδα του εστέρα προς σχηματισμό ενός τετραεδρικού ενδιάμεσου. Με απώλεια ιόντος αλκοξειδίου στη συνέχεια σχηματίζεται καρβοξυλικό οξύ, το οποίο αποπρωτονιώνεται προς σχηματισμό καρβοξυλικού ιόντος.



Εικόνα 3.2. Υδρόλυση εστέρα σε διάλυμα βάσης.

Στο σημείο αυτό αξίζει να γίνει μία αναφορά στα προβλήματα που προέκυψαν κατά το χειρισμό των δύο συγκεκριμένων εστέρων, λόγω της μεγάλης πτητικότητάς τους. Παρ'

όλο που τα δείγματα ήταν τοποθετημένα σε καλά κλεισμένα δοχεία, κατά την επώαση στους 60 °C, κάποια ποσότητα εξατμιζόταν, με αποτέλεσμα να μην μπορεί να χρησιμοποιηθεί η μείωσή της συγκέντρωσης του εστέρα ως μέσο αξιολόγησης της δράσης του ενζύμου. Αυτό διαπιστώθηκε κατά την αεριοχρωματογραφική ανάλυση των τυφλών διαλυμάτων, όπου μετά την πάροδο του διαστήματος επώασης, η συγκέντρωση των εστέρων ήταν μικρότερη από την αρχική, χωρίς όμως να υπάρχει παραγόμενο προϊόν.

Η πτητικότητα των εστέρων αυτών οφείλεται στις φυσικοχημικές τους ιδιότητες και συγκεκριμένα στο χαμηλό σημείο βρασμού τους. Ο οξικός και ο προπιονικός αιθυλεστέρας, με σημείο ζέσεως τους 77 °C και 99 °C αντίστοιχα, έχουν υψηλούς ρυθμούς εξατμησης. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιούνται άλλωστε ως προσθετικά βερνικιών, ώστε να συντελούν στο γρήγορο στέγνωμα των τελευταίων [108].

3.3.1.2 Με ακινητοποιημένο ένζυμο

Η μελέτη των αντιδράσεων υδρόλυσης εστέρων μεγαλύτερου μήκους ανθρακικής αλυσίδας πραγματοποιήθηκε από την ακινητοποιημένη σε στερεό καταλύτη εστεράση, στη θερμοκρασία των 45 °C. Οι εστέρες που δοκιμάστηκαν ως πιθανά υποστρώματα ήταν ο λαυρικός βουτυλεστέρας και ο βουτυλεστέρας του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος. Η μέθοδος που ακολουθήθηκε για την παρακολούθηση της υδρόλυσης ήταν φωτομετρική και βασιζόταν στο σχηματισμό έγχρωμων αλάτων κατά την αντίδραση των προϊόντων της υδρόλυσης (οξέων) με διάλυμα οξικού χαλκού-πυριδίνης.

Σε κανένα από τα συστήματα αυτά δε μετρήθηκε ελεύθερο οξύ, γεγονός που υποδηλώνει την αδυναμία υδρόλυσης τόσο του αλειφατικού όσο και του αρωματικού εστέρα στις συγκεκριμένες συνθήκες. Δείγματα από το μίγμα της αντίδρασης ελήφθησαν έως και την 3^η μέρα, χωρίς όμως να μετρηθεί κάποια αλλαγή στην απορρόφηση σε σχέση με το μάρτυρα. Πιθανόν οι εστέρες αυτοί δεν αποτελούν υποστρώματα της εστεράσης, λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους τους, που εμποδίζει την πρόσδεση του ενζύμου σε αυτά. Αντίστοιχη συμπεριφορά παρουσίασε η εστεράση EstA του θερμοφίλου στελέχους *G. thermoleovorans* YN, η δραστηριότητα της οποίας έναντι μεθυλεστέρων μειώθηκε με την αύξηση του μήκους της ανθρακικής τους αλυσίδας (C₄-C₁₀) και ήταν επίσης αρκετά χαμηλή έναντι διαφόρων μεθυλεστέρων [27].

3.3.2 Διφασικά συστήματα

Στα διφασικά συστήματα ισοοκτανίου-νερού, με υπερέχων τον οργανικό διαλύτη, μελετήθηκαν οι αντιδράσεις υδρόλυσης της τριακετίνης και της τριβουτυρίνης από την ακινητοποιημένη στη χιτοζάνη εστεράση.

Κατά την αεριοχρωματογραφική ανάλυση δεν εντοπίστηκαν ελεύθερα οξέα σε κανένα από τα δείγματα. Κατά συνέπεια η εστεράση δεν κατάφερε να υδρολύσει τα τριγλυκερίδια υπό τις παρούσες συνθήκες.

Δεδομένου πως η τριακετίνη και η τριβουτυρίνη αποτελούν, ως τριγλυκερίδια μικρού μήκους ανθρακικής αλυσίδας, φυσικά υποστρώματα του ενζύμου, η αδυναμία υδρόλυσής τους δεν οφείλεται στην ικανότητα αναγνώρισής τους από την εστεράση, αλλά στο μέσο πραγματοποίησης των αντιδράσεων, που ήταν στο μεγαλύτερο ποσοστό ένας μη πολικός διαλύτης, το ισοοκτανίο, με πιθανόν ανασταλτική, όπως προαναφέρθηκε, δράση πάνω στο ένζυμο. Σε υδατικό μέσο, η εστεράση EstA του βακτηρίου *G. thermoleovorans* YN εμφάνισε σχετική ενεργότητα ίση με 100% και 46,4% έναντι της τριακετίνης και της τριβουτυρίνης αντίστοιχα, υποδηλώνοντας πως και στη δική μας περίπτωση δεν είναι η επιλογή του υποστρώματος υπαίτια για την αδυναμία κατάλυσης των αντιδράσεων [27].

4. Συμπεράσματα

Σκοπός της εργασίας αυτής ήταν η απομόνωση της θερμοφίλης εστεράσης από το βακτήριο *Geobacillus sp.* SP50 και η μελέτη της δράσης σε μη υδατικά αλλά και υδατικά συστήματα.

Το πρώτο τμήμα της εργασίας, που περιλάμβανε την κλωνοποίηση, την απομόνωση και τον καθαρισμό του ενζύμου, πραγματοποιήθηκε επιτυχώς. Το μοριακό βάρος της παραγόμενης εστεράσης, της τάξης των 28 kDa, βρέθηκε σε συμφωνία με το αντίστοιχο της εστεράσης Est30, με την οποία μοιράζεται σε επίπεδο αμινοξικής αλληλουχίας ομοιότητα κατά 98% [19], [109].

Από τη μελέτη των χαρακτηριστικών της εστεράσης η άριστη θερμοκρασία προέκυψε ίση με 70 °C με το ένζυμο ελεύθερο, ενώ με το ένζυμο ακινητοποιημένο σε χιτοζάνη ήταν λίγο χαμηλότερη, στους 65 °C, πιθανόν εξαιτίας της αφυδάτωσης του φορέα. Για τη μελέτη των αντιδράσεων σύνθεσης, η θερμοκρασία που επιλέχθηκε εντούτοις για την επώαση του ενζύμου ήταν χαμηλότερη, για λόγους που θα αναλυθούν λίγο αργότερα.

Αναφορικά με τα φυσικά υποστρώματα, η εστεράση έδειξε πως μπορεί να υδρολύσει τόσο τον οξικό όσο και τον προπιονικό αιθυλεστέρα, επιβεβαιώνοντας πως αποτελεί μία πραγματική εστεράση. Με υπόστρωμα τον προπιονικό αιθυλεστέρα, το άριστο pH δράσης του ενζύμου προσδιορίστηκε ίσο με 7,5.

Υδρόλυση δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση της επώασης του ενζύμου με το λαυρικό βουτυλεστέρα και τον βουτυλεστέρα του π-υδροξυβενζοϊκού οξέος σε υδατικό διάλυμα, όπως επίσης και στην περίπτωση της επώασης σε διφασικά συστήματα, όπου δεν παρατηρήθηκε υδρόλυση των τριγλυκεριδίων, πιθανότερα λόγω της επιλογής των υποστρωμάτων και του οργανικού διαλύτη αντίστοιχα.

Σχετικά με τις αντιδράσεις σύνθεσης, η εστεράση έδειξε πλήρη αδυναμία ως προς την πραγματοποίησή τους. Οι πιθανές αιτίες ποικίλουν και χρειάζονται περαιτέρω πειράματα προκειμένου να διευκρινιστούν.

Κατ' αρχάς, ένας προφανής λόγος είναι η επιλογή του οργανικού διαλύτη. Στα μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό χρησιμοποιήθηκε ως συνεχής φάση το εξάνιο, ενώ στα κλασσικά μικρογαλακτώματα και στην υδρογέλη, την οργανική φάση αποτέλεσε το ισοοκτάνιο. Και οι δύο αυτοί διαλύτες έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε αντίστοιχα συστήματα για την επιτέλεση εστεροποιήσεων, με καταλύτη όμως λιπάσες και άλλα υδρολυτικά ένζυμα [III]. Λόγω της απουσίας από τη βιβλιογραφία αντίστοιχων αναφορών για τις καρβοξυλεστεράσες, είναι πολύ πιθανόν σε τέτοια συστήματα οι οργανικοί αυτοί διαλύτες να αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου.

Ένας ακόμη λόγος μπορεί να είναι η επώαση των δειγμάτων στους 45 °C, θερμοκρασία αρκετά χαμηλότερη της άριστης. Η επιλογή της συγκεκριμένης θερμοκρασίας βασίστηκε σε δύο παρατηρήσεις. Αφενός η αρχική ταχύτητα της αντίδρασης υδρόλυσης δεν είχε μεγάλες διαφορές στο θερμοκρασιακό εύρος των 45° - 70 °C, οπότε η επιλογή της χαμηλότερης δυνατής θερμοκρασίας ήταν ενεργειακά πιο σύμφωρη. Αφετέρου οι χρησιμοποιούμενοι διαλύτες, και ιδιαίτερα το εξάνιο, εξατμίζονται αρκετά εύκολα σε θερμοκρασίες άνω των 50 °C, γεγονός που θα οδηγούσε σε απώλεια όγκου και μεταβολή των συγκεντρώσεων των διαλυμάτων. Έτσι, καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως η επιλογή χαμηλότερης θερμοκρασίας δεν αποτελεί, αυτή καθ' αυτή μία σοβαρή αιτία, καθώς αν η εστεράση διέθετε ικανότητα σύνθεσης στις παρούσες συνθήκες, θα παρήγαγε προϊόν αλλά σε μικρότερη συγκέντρωση απ' ότι στη βέλτιστη θερμοκρασία.

Λαμβάνοντας υπ' όψιν τα προβλήματα που προέκυψαν κατά τη διάρκεια διεξαγωγής των πειραμάτων, πολλά είναι ακόμη αυτά που πρέπει να γίνουν προκειμένου να

χαρακτηριστεί βιοχημικά το ένζυμο αλλά και να διερευνηθεί το εύρος δράσης του. Η μελέτη της υδρολυτικής του δράσης σε περισσότερα υποστρώματα είναι ένα από αυτά, λόγω της θετικής έκβασης των αντιδράσεων σε υδατικό μέσο. Επιπλέον, η σταθερότητά του σε διάφορους οργανικούς διαλύτες είναι ένα θέμα που χρήζει μελέτης, προκειμένου να βρεθεί ο κατάλληλος διαλύτης για την επιτέλεση συνθετικών αντιδράσεων.

ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ-ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ-ΑΚΡΩΝΥΜΙΑ

AOT	Dioctyl sodium sulfosuccinate
BSA	Bovine Serum Albumin
CTAB	Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide
DSC	Differential Scanning Calorimetry
IMAC	Immobilized Metal ion Affinity Chromatography
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
FID	Flame Ionization Detector
LB	Luria Bertani
o-,m-,p-HPA	o-,m-,p-hydroxyphenylacetic acid
p-HBA	p-hydroxybenzoic acid
p-HPP	p-hydroxyphenylpropionic acid
p-NPA	p-nitrophenyl acetate
p-NPB	p-nitrophenyl butyrate
PLA	Polylactic acid
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis
TGA	Thermogravimetric analysis
TPP	Triphosphate

5. Βιβλιογραφία

5.1 Ξενόγλωσση βιβλιογραφία

- [1] Berlemont, R. and C. Gerday (2011). 1.18 - Extremophiles A2 - Moo-Young, Murray. Comprehensive Biotechnology (Second Edition). Burlington, Academic Press: 229-242.
- [2] Madigan, M. T., et al. (2003). Brock Biology of Microorganisms, Prentice Hall/Pearson Education.
- [3] Meintanis, C., et al. (2006). "Biodegradation of crude oil by thermophilic bacteria isolated from a volcano island." Biodegradation **17**(2): 105-111.
- [4] Kristjansson, J. K. "Thermophilic organisms as sources of thermostable enzymes." Trends in Biotechnology **7**(12): 349-353.
- [5] Nazina, T. N., et al. (2001). "Taxonomic study of aerobic thermophilic bacilli: descriptions of *Geobacillus subterraneus* gen. nov., sp. nov. and *Geobacillus uzonensis* sp. nov. from petroleum reservoirs and transfer of *Bacillus stearothermophilus*, *Bacillus thermocatenulatus*, *Bacillus thermoleovorans*, *Bacillus kaustophilus*, *Bacillus thermodenitrificans* to *Geobacillus* as the new combinations *G. stearothermophilus*, *G. th.*" Int J Syst Evol Microbiol **51**(Pt 2): 433-446.
- [6] Ash, C., et al. (1991). "Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences." Letters in Applied Microbiology **13**(4): 202-206.
- [7] Takami, H., et al. (2004). "Thermoadaptation trait revealed by the genome sequence of thermophilic *Geobacillus kaustophilus*." Nucleic Acids Res **32**(21): 6292-6303.
- [8] Zeigler, D. R. (2005). "Application of a *recN* sequence similarity analysis to the identification of species within the bacterial genus *Geobacillus*." Int J Syst Evol Microbiol **55**(Pt 3): 1171-1179.
- [9] Zeigler, D. (2001). The Genus *Geobacillus* - Introduction and strain catalog.
- [10] Maugeri, T. L., et al. (2002). "Three novel halotolerant and thermophilic *Geobacillus* strains from shallow marine vents." Syst Appl Microbiol **25**(3): 450-455.
- [11] Obojska, A., et al. (2002). "Organophosphonate utilization by the thermophile *Geobacillus caldoxylosilyticus* T20." Appl Environ Microbiol **68**(4): 2081-2084.
- [12] McMullan, G., et al. (2004). "Habitat, applications and genomics of the aerobic, thermophilic genus *Geobacillus*." Biochem Soc Trans **32**(Pt 2): 214-217.
- [13] Marchant, R., et al. "What are high-temperature bacteria doing in cold environments?" Trends in Microbiology **10**(3): 120-121.
- [14] Bartholomew, J. W. and G. Paik (1966). "Isolation and identification of obligate thermophilic sporeforming bacilli from ocean basin cores." J Bacteriol **92**(3): 635-638.
- [15] Zeigler, D. R. (2014). "The *Geobacillus* paradox: why is a thermophilic bacterial genus so prevalent on a mesophilic planet?" Microbiology **160**(Pt 1): 1-11.
- [16] Zhu, W., et al. (2007). "Purification and characterization of a thermostable protease from a newly isolated *Geobacillus* sp. YMTC 1049." Enzyme and Microbial Technology **40**(6): 1592-1597.
- [17] Solimam, N. A. (2008). "Coproducts of thermostable amylase and beta-galactosidase enzymes by *Geobacillus stearothermophilus* SAB-40: application of Plackett-Burman design to evaluate culture requirements affecting enzyme production." J Microbiol Biotechnol **18**(4): 695-703.
- [18] Leow, T. C., et al. (2007). "A thermoalkaliphilic lipase of *Geobacillus* sp. T1." Extremophiles **11**(3): 527-535.
- [19] Ewis, H. E., et al. (2004). "Molecular cloning and characterization of two thermostable carboxyl esterases from *Geobacillus stearothermophilus*." Gene **329**(1-2): 187-195.
- [20] Sandalli, C., et al. (2009). "A new DNA polymerase I from *Geobacillus caldoxylosilyticus* TK4: cloning, characterization, and mutational analysis of two aromatic residues." Appl Microbiol Biotechnol **84**(1): 105-117.
- [21] Tai, S.-K., et al. (2004). "Isolation and characterization of a cellulolytic *Geobacillus thermoleovorans* T4 strain from sugar refinery wastewater." Extremophiles **8**(5): 345-349.
- [22] Wu, S., et al. (2006). "Characterization of a recombinant thermostable xylanase from deep-sea thermophilic *Geobacillus* sp. MT-1 in East Pacific." Appl Microbiol Biotechnol **72**(6): 1210-1216.

- [23] Yang, Z., et al. (2013). "Cloning, expression and biochemical characterization of a novel, moderately thermostable GDSE family esterase from *Geobacillus thermodenitrificans* T2." Journal of Bioscience and Bioengineering **115**(2): 133-137.
- [24] Espinosa-Luna, G., et al. (2016). "Gene Cloning and Characterization of the *Geobacillus thermoleovorans* CCR11 Carboxylesterase CaesCCR11, a New Member of Family XV." Mol Biotechnol **58**(1): 37-46.
- [25] Metin, K., et al. (2006). "Characterization of esterase activity in *Geobacillus* sp. HBB-4." J Basic Microbiol **46**(5): 400-409.
- [26] Zhu, Y., et al. (2015). "Molecular cloning and characterization of a new and highly thermostable esterase from *Geobacillus* sp. JM6." J Basic Microbiol **55**(10): 1219-1231.
- [27] Soliman, N. A., et al. (2007). "Molecular cloning and characterization of thermostable esterase and lipase from *Geobacillus thermoleovorans* YN isolated from desert soil in Egypt." Process Biochemistry **42**(7): 1090-1100.
- [28] Tekedar, H. C. and G. Sanli-Mohamed (2011). "Molecular cloning, over expression and characterization of thermoalkalophilic esterases isolated from *Geobacillus* sp." Extremophiles **15**(2): 203-211.
- [29] Ayna, C., et al. (2013). "Purification and characterization of a pH and heat stable esterase from *Geobacillus* sp. TF17." Turkish Journal of Biochemistry **38**(3): 329-3
- [30] Alalouf, O., et al. (2011). "A new family of carbohydrate esterases is represented by a GDSE hydrolase/acetylxyloxy esterase from *Geobacillus stearothermophilus*." J Biol Chem **286**(49): 41993-42001.
- [31] Montoro-Garcia, S., et al. (2009). "Characterization of a novel thermostable carboxylesterase from *Geobacillus kaustophilus* HTA426 shows the existence of a new carboxylesterase family." J Bacteriol **191**(9): 3076-3085.
- [32] McDonald, A. G., et al. (2009). "ExplorEnz: the primary source of the IUBMB enzyme list." Nucleic Acids Res **37**(Database issue): D593-597.
- [33] Bornscheuer, U. T. (2002). "Microbial carboxyl esterases: classification, properties and application in biocatalysis." FEMS Microbiol Rev **26**(1): 73-81.
- [34] Brockerhoff, H. (2012). Lipolytic Enzymes, Elsevier Science.
- [35] Ferrato, F., et al. (1997). "A critical reevaluation of the phenomenon of interfacial activation." Methods Enzymol **286**: 327-347.
- [36] Torres, S., et al. (2009). "Enzymatic synthesis of banana flavour (isoamyl acetate) by *Bacillus licheniformis* S-86 esterase." Food Research International **42**(4): 454-460.
- [37] Alvarez-Macarie, E. and J. Baratti (2000). "Short chain flavour ester synthesis by a new esterase from *Bacillus licheniformis*." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **10**(4): 377-383.
- [38] Montella, I. R., et al. (2012). "The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance--a review." Mem Inst Oswaldo Cruz **107**(4): 437-449.
- [39] Sood, S., et al. (2016). "Carboxylesterases: Sources, Characterization and Broader Applications." Insights in Enzyme Research **1**
- [40] Ollis, D. L., et al. (1992). "The alpha/beta hydrolase fold." Protein Eng **5**(3): 197-211.
- [41] Wang L. (2009). "Discovery and Characterization of Microbial Esterases for Fiber Modification" University of Toronto (Master Thesis)
- [42] Nardini, M. and B. W. Dijkstra (1999). "Alpha/beta hydrolase fold enzymes: the family keeps growing." Curr Opin Struct Biol **9**(6): 732-737.
- [43] Liu, P., et al. (2003). "Crystallization and preliminary X-ray diffraction data for the carboxylesterase Est30 from *Bacillus stearothermophilus*." Acta Crystallogr D Biol Crystallogr **59**(Pt 8): 1472-1473.
- [44] Bornscheuer, U. T. and R. J. Kazlauskas (2006a). Lipases and Esterases: Sections 5.1 - 5.2. Hydrolases in Organic Synthesis, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA: 61-140.
- [45] Kulkarni, S., et al. (2013). Microbial esterases: An overview.

- [46] Danielsson, I. and B. Lindman (1981). "The definition of microemulsion." Colloids and Surfaces **3**(4): 391-392.
- [47] O'Donnell, J. M. (2012). "Reversible addition-fragmentation chain transfer polymerization in microemulsion." Chemical Society Reviews **41**(8): 3061-3076.
- [48] Martinek, K., et al. (1981). "The principles of enzyme stabilization. VI. Catalysis by water-soluble enzymes entrapped into reversed micelles of surfactants in organic solvents." Biochim Biophys Acta **657**(1): 277-294.
- [49] Stamatis, H., et al. (1999). "Bioorganic reactions in microemulsions: the case of lipases." Biotechnology Advances **17**(4): 293-318.
- [50] Mitsou, E., et al. (2017), "Oxidation catalysis by enzymes in microemulsions". Catalysts **7**, 52.
- [51] Giuliani, S., et al. (2001). "Synthesis of pentyferulate by a feruloyl esterase from *Aspergillus niger* using water-in-oil microemulsions." Biotechnology Letters **23**(4): 325-330.
- [52] Sathishkumar, M., et al. (2010). "Role of bicontinuous microemulsion in the rapid enzymatic hydrolysis of (R,S)-ketoprofen ethyl ester in a micro-reactor." Bioresource Technology **101**(20): 7834-7840.
- [53] Khmel'nitsky, Y. L., et al. (1987). "Detergentless Microemulsions." Annals of the New York Academy of Sciences **501**(1): 161-164.
- [54] Zoumpantioti, M., et al. (2006b). "Lipase biocatalytic processes in surfactant free microemulsion-like ternary systems and related organogels." Enzyme and Microbial Technology **39**(4): 531-539.
- [55] Xenakis, A., et al. (2016). "Enzymatic reactions in structured surfactant-free microemulsions." Current Opinion in Colloid & Interface Science **22**: 41-45.
- [56] Topakas, E., et al. (2003). "Purification and characterization of a *Fusarium oxysporum* feruloyl esterase (FoFAE-I) catalysing transesterification of phenolic acid esters." Enzyme and Microbial Technology **33**(5): 729-737
- [57] Topakas, E., et al. (2003). "Purification and characterization of a feruloyl esterase from *Fusarium oxysporum* catalyzing esterification of phenolic acids in ternary water–organic solvent mixtures." Journal of Biotechnology **102**(1): 33-44.
- [58] Couto, J., et al. (2011). "Optimization of feruloyl esterase-catalyzed synthesis of feruloylated oligosaccharides by response surface methodology." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **73**(1): 53-62.
- [59] Couto, J., et al. (2010). "Regioselective synthesis of feruloylated glycosides using the feruloyl esterases expressed in selected commercial multi-enzymatic preparations as biocatalysts." Biocatalysis and Biotransformation **28**(4): 235-244.
- [60] Vafiadi, C., et al. (2006). "Regioselective esterase-catalyzed feruloylation of l-arabinobiose." Carbohydrate Research **341**(12): 1992-1997.
- [61] Topakas, E., et al. (2005). "*Sporotrichum thermophile* type C feruloyl esterase (StFaeC): purification, characterization, and its use for phenolic acid (sugar) ester synthesis." Enzyme and Microbial Technology **36**(5): 729-736.
- [62] Vafiadi, C., et al. (2006). "The feruloyl esterase system of *Talaromyces stipitatus*: Determining the hydrolytic and synthetic specificity of TsFaeC." Journal of Biotechnology **125**(2): 210-221.
- [63] Wang, K. (2011). Enzyme Immobilization on Chitosan-Based Supports. Chitosan-Based Hydrogels, CRC Press: 339-406.
- [64] Biro, E., et al. (2008). "Preparation of chitosan particles suitable for enzyme immobilization." J Biochem Biophys Methods **70**(6): 1240-1246.
- [65] Islam, S., et al. (2016). "Chitin and Chitosan: Structure, Properties and Applications in Biomedical Engineering." Journal of Polymers and the Environment **25**(3): 854-866.
- [66] Ahmadi, F., et al. (2015). "Chitosan based hydrogels: characteristics and pharmaceutical applications." Res Pharm Sci **10**(1): 1-16.
- [67] İlgü, H., et al. (2011). "Preparation, Characterization and Optimization of Chitosan Nanoparticles as Carrier for Immobilization of Thermophilic Recombinant Esterase." Journal of Macromolecular Science, Part A **48**(9): 713-721.

- [68] Terkan, C. (2011). "Immobilization of thermophilic recombinant esterase enzyme by microencapsulation in alginate-chitosan/CaCl₂ polyelectrolyte beads", School of Engineering and Sciences of Izmir Institute of Technology. (Master thesis)
- [69] Panda, T. and B. S. Gowrishankar (2005). "Production and applications of esterases." Appl Microbiol Biotechnol **67**(2): 160-169.
- [70] Choi, Y.-J. and B. Lee (2001). "Culture conditions for the production of esterase from *Lactobacillus casei* CL96." Bioprocess and Biosystems Engineering **24**(1): 59-63.
- [71] Dufour JP, Bing Y (2001) "Influence of yeast strain and fermentation conditions on yeast esterase activities." Brew Dig 76:44
- [72] Fukuda, K., et al. (1998). "Balance of activities of alcohol acetyltransferase and esterase in *Saccharomyces cerevisiae* is important for production of isoamyl acetate." Appl Environ Microbiol **64**(10): 4076-4078.
- [73] Christakopoulos, P., et al. (1998). "Production of an esterase from *Fusarium oxysporum* catalysing transesterification reactions in organic solvents." Process Biochemistry **33**(7): 729-733.
- [74] Østdal, H., et al. (1996). "Production, Isolation and Partial Characterization of a Lipase–Esterase from *Pediococcus pentosaceus* SV61." LWT - Food Science and Technology **29**(5): 542-546.
- [75] Shen, D., et al. (2002). "Significantly improved esterase activity of *Trichosporon brassicae* cells for ketoprofen resolution by 2-propanol treatment." Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic **18**(4): 219-224.
- [76] Quax, W. J. and C. P. Broekhuizen (1994). "Development of a new *Bacillus carboxyl* esterase for use in the resolution of chiral drugs." Appl Microbiol Biotechnol **41**(4): 425-431.
- [77] Petersen, E. I., et al. (2001). "A novel esterase from *Burkholderia gladioli* which shows high deacetylation activity on cephalosporins is related to beta-lactamases and DD-peptidases." J Biotechnol **89**(1): 11-25.
- [78] Patel, R. N. (2000). Stereoselective Biocatalysis, Taylor & Francis.
- [79] Jegannathan, K. R. and P. H. Nielsen (2013). "Environmental assessment of enzyme use in industrial production – a literature review." Journal of Cleaner Production **42**: 228-240.
- [80] Skals, P. B., et al. (2007). "Environmental assessment of enzyme assisted processing in pulp and paper industry." The International Journal of Life Cycle Assessment **13**(2): 124.
- [81] Yan, B. (2014). "Carboxylesterases." 695-698.
- [82] Xie, Z., et al. (2013). "Heterologous expression and characterization of a malathion-hydrolyzing carboxylesterase from a thermophilic bacterium, *Alicyclobacillus tengchongensis*." Biotechnology Letters **35**(8): 1283-1289.
- [83] Khan S, Zaffar H, Irshad U, Ahmad R, Khan AR, et al. (2016). " Biodegradation of Malathion by *Bacillus licheniformis* strain ML-1." Arch Biol Sci Belgrade 68: 51-59.
- [84] Singh, B., et al. (2012). "Biodegradation of malathion by *Brevibacillus* sp. strain KB2 and *Bacillus cereus* strain PU." World J Microbiol Biotechnol **28**(3): 1133-1141.
- [85] Tchigvintsev, A., et al. (2015). "The environment shapes microbial enzymes: five cold-active and salt-resistant carboxylesterases from marine metagenomes." Appl Microbiol Biotechnol **99**(5): 2165-2178
- [86] Martin, R. T., et al. (2014). "Marine-degradable polylactic acid." Green Chem. **16**(4): 1768-1773.
- [87] Sambrook, J. (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- [88] Block, H., et al. (2009). "Chapter 27 Immobilized-Metal Affinity Chromatography (IMAC)." Methods Enzymol **463**: 439-473.
- [89] Bradford, M. M. (1976). "A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding." Anal Biochem **72**: 248-254.
- [90] Pliego, J., et al. (2015). "Monitoring lipase/esterase activity by stopped flow in a sequential injection analysis system using p-nitrophenyl butyrate." Sensors (Basel) **15**(2): 2798-2811.
- [91] Vorderwülbecke, T., et al. (1992). "Comparison of lipases by different assays." Enzyme and Microbial Technology **14**(8): 631-639.

- [92] Nucci, N. V., et al. (2011). "Site-resolved measurement of water-protein interactions by solution NMR." Nat Struct Mol Biol **18**(2): 245-249.
- [93] Lowry, R. R. and I. J. Tinsley (1976). "Rapid colorimetric determination of free fatty acids." Journal of the American Oil Chemists Society **53**(7): 470-472.
- [94] Kwon, D. Y. and J. S. Rhee (1986). "A simple and rapid colorimetric method for determination of free fatty acids for lipase assay." Journal of the American Oil Chemists' Society **63**(1): 89-92.
- [95] Schratte, P. (2004). Purification and Concentration by Ultrafiltration. Protein Purification Protocols. P. Cutler. Totowa, NJ, Humana Press: 101-116.
- [96] Levine, M. N., et al. (2008). "Trimethyl Lock: A Stable Chromogenic Substrate for Esterases." Molecules (Basel, Switzerland) **13**(2): 204-211.
- [97] Özbek, E., et al. (2014). "Partial purification and biochemical characterization of an extremely thermo- and pH-stable esterase with great substrate affinity." Turkish Journal of Chemistry **38**: 538-546.
- [98] Georgieva, V., et al. (2012). "Non-isothermal kinetics of thermal degradation of chitosan." Chemistry Central Journal **6**(1): 81.
- [99] Szymańska, E. and K. Winnicka (2015). "Stability of Chitosan—A Challenge for Pharmaceutical and Biomedical Applications." Marine Drugs **13**(4): 1819-1846.
- [100] Zakaria, Z., et al. (2012). Effect of degree of deacetylation of chitosan on thermal stability and compatibility of chitosan-polyamide blend.
- [101] Pieróg, M., et al. (2012). Thermal degradation of double crosslinked hydrogel chitosan membranes.
- [102] Zoumpantioti, M., et al. (2006a). "Spectroscopic and catalytic studies of lipases in ternary hexane–1-propanol–water surfactantless microemulsion systems." Colloids and Surfaces B: Biointerfaces **47**(1): 1-9.
- [103] Yang, Z., et al. (2013). "Cloning, expression and biochemical characterization of a novel, moderately thermostable GDSL family esterase from *Geobacillus thermodenitrificans* T2." Journal of Bioscience and Bioengineering **115**(2): 133-137.
- [104] Stamatis, H., et al. (1993). "Kinetic study of lipase catalyzed esterification reactions in water-in-oil microemulsions." Biotechnol Bioeng **42**(8): 931-937.
- [105] Papadimitriou, V., et al. (1997). "Structural and catalytic aspects of cutinase in w/o microemulsions." Colloid and Polymer Science **275**(7): 609-616.
- [106] Martinez, C., et al. (1993). "Engineering cysteine mutants to obtain crystallographic phases with a cutinase from *Fusarium solani* pisi." Protein Eng **6**(2): 157-165.
- [107] Pereira, E. B., et al. (2003). "Immobilization and catalytic properties of lipase on chitosan for hydrolysis and esterification reactions." Brazilian Journal of Chemical Engineering **20**: 343-355.
- [108] Materials, A. S. f. T. (1935). Symposium on Paint and Paint Materials: Philadelphia Regional Meeting, The Society.
- [109] Liu, P., et al. (2004). "Covalent reaction intermediate revealed in crystal structure of the *Geobacillus stearothermophilus* carboxylesterase Est30." J Mol Biol **342**(2): 551-561.

5.2 Ελληνική βιβλιογραφία

- [I] Γαλανοπούλου Α. (2012) "Καθαρισμός, βιοχημικός και κινητικός χαρακτηρισμός μίας β-ξυλοζιδάσης από ένα θερμόφιλο βακτηριακό στέλεχος *Geobacillus* sp. απομονωμένο από το ηφαιστειακό σύμπλεγμα της Σαντορίνης", Μεταπτυχιακή μελέτη, Πανεπιστήμιο Αθηνών
- [II] Γκλέκας Π.Δ. (2015) "Υπερέκφραση, καθαρισμός και βιοχημικός χαρακτηρισμός μιας θερμοσταθερής β-φωσφογλυκοζιδάσης του θερμόφιλου βακτηριακού στελέχους *Geobacillus* sp. SP24", Διπλωματική Εργασία, Πανεπιστήμιο Αθηνών
- [III] Ζουμπανιώτη Μ. (2007) "Μελέτη ακινητοποιημένων βιολογικά ενεργών μορίων σε μη υδατικά συστήματα: μικρογαλακτώματα- οργανογέλες" Διδακτορική διατριβή, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

- [IV] Μπαλκίζα Φ.Δ (2016) "Βελτιστοποίηση μικρογαλακτωμάτων εμπλουτισμένων με αιθέριο έλαιο και Νισίνη. Έλεγχος της αντιμικροβιακής τους δράσης" Μεταπτυχιακή μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εθνικό Ίδρυμα Ερευνών
- [V] Παπαβδής Φ. (2014) "Μικρογαλακτώματα : Παρασκευή και μελέτη φυσικών ιδιοτήτων" Διπλωματική εργασία, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
- [VI] Μακρής Γ. (2015) "Ακίνητοποίηση μιας ανασυνδυασμένης κουτινάσης του μύκητα *F.oxysporum* και χρήση της για τη σύνθεση αλειφατικών εστέρων μικρής αλυσίδας", Διπλωματική Εργασία, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο