

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΗΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



Πτυχιακή εργασία

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ ΜΕΣΩ
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ
ΟΞΕΟΣ ΚΑΙ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

Αλεξάνδρα Νεοφύτου

Λεμεσός 2016

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΗΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Πτυχιακή εργασία

ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ ΜΕΣΩ
ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ
ΟΞΕΟΣ ΚΑΙ ΑΙΘΑΝΟΛΗΣ

Αλεξάνδρα Νεοφύτου

Σύμβουλος καθηγητής
Δρ. Κουτίνας Μιχάλης

Λεμεσός 2016

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Αλεξάνδρα Νεοφύτου, 2016

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της πτυχιακής εργασίας από το Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέπον καθηγητή μου Δρ. Κουτίνα Μιχάλη για την επιστημονική και ηθική υποστήριξη που μου παρείχε κατά τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αυτής. Όπως επίσης και για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση του, αλλά και εμπιστοσύνη του που μου έδειξε τόσο για την επιλογή του θέματος της πτυχιακής εργασίας, όσο και για την εκπόνησή της.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στην διδακτορική φοιτήτρια Χρυσταλλένη Γιάγκου για την πολύτιμη προσοχή και καθοδήγηση της, που κατέστησαν δυνατή την πραγματοποίηση της πτυχιακής αυτής. Την προθυμία της να βοηθήσει και για τις υποδείξεις της και την πρακτική υποστήριξη της καθ' όλη την διάρκεια διεκπεραίωσης αυτής της μελέτης.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου και στους φίλους μου για την ανεκτίμητη ψυχική υποστήριξη, κατανόηση και στήριξη τους στις δύσκολες στιγμές.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η αναγκαιότητα αντικατάστασης των συμβατικών διαλυτών, λόγω του τοξικού και διαβρωτικού τους χαρακτήρα, με λιγότερο επιβλαβείς για την υγεία του ανθρώπου διαλύτες και περισσότερο φιλικούς προς το περιβάλλον έχει οδηγήσει στην μελέτη εναλλακτικών ενώσεων για την χρήση τους ως πράσινους διαλύτες. Κατά την διάρκεια αυτής της πτυχιακής εργασίας μελετήθηκε η ικανότητα παραγωγής ενός πράσινου διαλύτη, του γαλακτικού αιθυλεστέρα μέσω ενζυμικής και μη ενζυμικής αντίδραση εστεροποίησης μεταξύ γαλακτικού οξέος και αιθανόλης. Σκοπός της εργασίας ήταν η μέγιστη απόδοση παραγωγής του γαλακτικού αιθυλεστέρα με την προϋπόθεση του ότι, με την επίτευξη θετικών αποτελεσμάτων, να γίνουν οι περαιτέρω μελλοντικές και οικονομικές έρευνες για την πιθανή χρήση του ως διαλύτη στην θέση των συμβατικών διαλυτών, έτσι ώστε να αντιμετωπιστεί η αρνητική επίδραση που έχουν επιφέρει

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, χρησιμοποιούνται οι οργανικοί διαλύτες, εξάνιο και τολουόλιο, όπως επίσης και βιοδιαλύτες από αιθέρια έλαια εσπεριδοειδών, ως μέσα μεταφοράς της αντίδρασης. Εξετάστηκε επίσης η ικανότητα για την διεξαγωγή της συγκεκριμένης αντίδρασης, ακινητοποιημένων λιπάσεων από *Candida antarctica* και *Candida rugosa*. Επιπλέον, μελετήθηκε η αντίδραση εστεροποίησης μέσω 1, 0.5, 0.1 και 0.01 M γαλακτικού οξέος με 0.5 M αιθανόλης. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων έδειξαν να δίνεται η καλύτερη απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα από έλαιο λεμονιού με την χρήση του *Novozyme 435* με τιμή απόδοσης ίση με 82.48 %.

Λέξεις κλειδιά: Τυρόγαλο, βιοαιθανόλη (αιθανόλη), γαλακτικό οξύ, γαλακτικός αιθυλεστέρας, αντίδραση εστεροποίησης, λιπάσεις, βιοδιαλύτες, εξάνιο, τολουόλιο, *Candida Antarctica*, *Candida rugosa*

ABSTRACT

The need for replacement of conventional solvents because of the toxic and corrosive nature, with less harmful to human health solvents and more environmentally friendly has led to the study of alternative compounds for use as green solvents. During this thesis we studied the capacity of a green solvent, named ethyl lactate, by enzymatic and non-enzymatic esterification reaction between lactic acid and ethanol. The aim was the maximum production yield of ethyl lactate, in order to use him as a potential solvent despite the use of conventional solvents, so as to counter their negative effects.

Furthermore, the efficiency of organic solvents, hexane and toluene, as well biosolvents of citrus peel oils, for the esterification reaction was evaluated, employing immobilized lipases from *Candida antarctica* and *Candida rugosa*. Furthermore, the esterification reaction is studied by 1, 0.5, 0.1 and 0.01 M lactic acid in 0.5 M ethanol. The results obtained by studying different parameters attribute lemon peel as the most effective solvent to produce ethyl lactate, using an immobilized lipase from *Candida antarctica* (*Novozyme 435*) to yield a value equal to 82.48.

Keywords: whey, bioethanol (ethanol), lactic acid, ethyl lactate, esterification reaction, biosolvents, n-hexane, toluene, lipases, *Candida Antarctica*, *Candida rugosa*

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

| | |
|---|------|
| ΠΕΡΙΛΗΨΗ..... | v |
| ABSTRACT | vi |
| ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ | vii |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ | x |
| ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ | xi |
| ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ..... | xiii |
| ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ..... | xiv |
| ΕΙΣΑΓΩΓΗ..... | xv |
| 1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ..... | 1 |
| 1.1 Τυρόγαλο (ορός γάλακτος – σύνθεση)..... | 1 |
| 1.2 Το τυρόγαλο ως απόβλητο και η αξιοποίηση του | 1 |
| 1.3 Σημαντικότητα διαλυτών..... | 3 |
| 1.4 Πράσινοι διαλύτες – Γαλακτικός αιθυλεστέρας..... | 3 |
| 1.4.1 Εφαρμογές γαλακτικού αιθυλεστέρα | 5 |
| 1.4.2 Τρόποι παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα..... | 5 |
| 1.5 Αντίδραση εστεροποίησης γαλακτικού οξέος και αιθανόλης..... | 6 |
| 1.6 Γαλακτικό οξύ | 7 |
| 1.6.1 Παραγωγή γαλακτικού οξέος | 8 |
| 1.6.2 Εφαρμογές γαλακτικού οξέος..... | 9 |
| 1.7 Αιθανόλη | 9 |
| 1.7.1 Παραγωγή και εφαρμογές αιθανόλης..... | 10 |
| 1.8 Ένζυμα – Λιπάσες | 11 |
| 1.8.1 Δράση της λιπάσης | 11 |
| 1.8.2 Παραγωγή και εφαρμογές της λιπάσης | 12 |

| | | |
|---------|--|----|
| 1.9 | Λιπάσες στην σύνθεση εστέρων..... | 12 |
| 1.10 | Η ακινητοποίηση στις λιπάσες | 13 |
| 1.11 | Χρήση της λιπάσης από <i>Candida antarctica</i> και <i>Candida rugosa</i> | 14 |
| 1.11.1 | Ζυμομύκτης <i>Candida antarctica</i> | 14 |
| 1.11.2 | Ζυμομύκτης <i>Candida rugosa</i> | 14 |
| 2 | ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ | 15 |
| 2.1 | Προετοιμασία διαλυμάτων αέριας χρωματογραφίας | 15 |
| 2.1.1 | Ζύγιση ενζύμων | 15 |
| 2.1.2 | Προετοιμασία διαλυμάτων αέριας χρωματογραφίας σε βίο-διαλύτες και τολουόλιο..... | 16 |
| 2.1.3 | Προετοιμασία διαλυμάτων αέριας χρωματογραφίας σε εξάνιο | 16 |
| 2.1.3.1 | Συγκέντρωση 10 % w / w των υποστρωμάτων της λιπάσης..... | 16 |
| 2.1.3.2 | Συγκέντρωση 20 % w / w των υποστρωμάτων της λιπάσης..... | 16 |
| 2.1.3.3 | Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 0.1 M..... | 17 |
| 2.1.3.4 | Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 0.01 M..... | 17 |
| 2.1.3.5 | Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 1 M..... | 17 |
| 2.2 | Χρήση Αέριας Χρωματογραφίας (gas chromatography, GC) | 17 |
| 2.2.1 | Προσδιορισμός γαλακτικού αιθυλεστέρα με την χρήση διαλυτών από φλούδες εσπεριδοειδών (Citrus Peel Oils)..... | 18 |
| 2.2.2 | Προσδιορισμός γαλακτικού αιθυλεστέρα με την χρήση ελαίου από βελόνες πεύκου (Pine needle oil) | 20 |
| 2.2.3 | Προσδιορισμός γαλακτικού αιθυλεστέρα με την χρήση Δ – λιμονένιο (R -(+)-limonene) | 21 |
| 2.2.4 | Προσδιορισμός γαλακτικού αιθυλεστέρα με την χρήση εξανίου (hexane)..... | 22 |
| 2.2.5 | Προσδιορισμός γαλακτικού αιθυλεστέρα με την χρήση τολουολίου (toluene) ... | 23 |
| 3 | ΑΝΑΛΥΣΗ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ | 24 |

| | | |
|------|--|----|
| 3.1 | Σκοπός των πειραμάτων..... | 24 |
| 3.2 | Σύγκριση μεταξύ βιοδιαλυτών και τολουόλιο με απουσία σε σχέση με τον χρόνο (h) | 24 |
| 3.3 | Σύγκριση μεταξύ βιοδιαλυτών και τολουόλιο με παρουσία λιπάσης (<i>Novozyme 345</i>) σε σχέση με τον χρόνο (h)..... | 25 |
| 3.4 | Σύγκριση μεταξύ βιοδιαλυτών και τολουόλιο με παρουσία και απουσία λιπάσης. | 26 |
| 3.5 | Σύγκριση μεταξύ 10 και 20 % w/w των υποστρωμάτων της αντίδρασης σε εξάνιο | 28 |
| 3.6 | Σύγκριση της απόδοσης γαλακτικού αιθυλεστέρα σε σχέση με τον χρόνο με συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 0.1 M | 30 |
| 3.7 | Σύγκριση μεταξύ 0.5 και 0.1 M γαλακτικού οξέος σε εξάνιο..... | 31 |
| 3.8 | Σύγκριση μεταξύ 0.01 και 0.1 M γαλακτικού οξέος σε εξάνιο με την χρήση της λιπάσης από <i>Candida antarctica</i> (<i>Novozyme 435</i>)..... | 33 |
| 3.9 | Σύγκριση μεταξύ 1, 0.5, 0.1, και 0.01 M γαλακτικού οξέος σε εξάνιο..... | 35 |
| 3.10 | Σύγκριση μεταξύ 0.01, και 1 M γαλακτικού οξέος σε έλαιο λεμονιού με την χρήση λιπάσης (<i>Novozyme 435</i>) | 36 |
| 3.11 | Σύγκριση μεταξύ της χρήση 0.01 και 1 M γαλακτικού οξέος σε εξάνιο και έλαιο λεμονιού, με την χρήση και χωρίς χρήση του <i>Novozyme 435</i> | 37 |
| | ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ..... | 39 |
| 4 | ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ | 41 |
| | ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... | 42 |

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

| | |
|---|----|
| Πίνακας 1: Αποτελέσματα συγκέντρωσης / απόδοσης γαλακτικού αιθυλεστέρα ενζυμικής και μη ενζυμικής αντίδρασης για τον κάθε διαλύτη στις 553 ώρες | 26 |
| Πίνακας 2: Αποτελέσματα συγκέντρωσης / απόδοσης γαλακτικού αιθυλεστέρα 10 και 20 % w/w των υποστρωμάτων της αντίδρασης σε εξάνιο για τις 553 ώρες | 28 |
| Πίνακας 3: Αποτελέσματα συγκέντρωσης / απόδοσης γαλακτικού αιθυλεστέρα με 0.1 και 0.5 M γαλακτικού οξέος σε εξάνιο για τις 553 ώρες..... | 32 |
| Πίνακας 4: Αποτελέσματα συγκέντρωσης / απόδοσης γαλακτικού αιθυλεστέρα με 0.01 και 0.1 M γαλακτικού οξέος σε εξάνιο με χρήση και χωρίς χρήση του <i>Novozyme 435</i> για τις 553 ώρες | 34 |
| Πίνακας 5: Αποτελέσματα συγκέντρωσης / απόδοσης γαλακτικού αιθυλεστέρα με 0.01 και 1 M γαλακτικού οξέος σε έλαιο λεμονιού με χρήση και χωρίς χρήση του <i>Novozyme 435</i> για τις 553 ώρες | 36 |
| Πίνακας 6: αποτελέσματα απόδοσης γαλακτικού αιθυλεστέρα για 0.01 M γαλακτικό οξύ σε έλαιο λεμονιού και εξάνιο για τις 553,83 ώρες | 37 |

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

| | |
|--|----|
| Διάγραμμα 1: Δομή γαλακτικού αιθυλεστέρα (Pereira & Rodrigues 2014)..... | 5 |
| Διάγραμμα 2: Δομή γαλακτικού οξέος (Gurta & Kumar 2007)..... | 8 |
| Διάγραμμα 3: Δομή αιθανόλης..... | 10 |
| Διάγραμμα 4: Καμπύλη βαθμονόμησης σε έλαιο βαλέντσας (Valencia peel oil) με $t_{R \text{ ethyl lactic}} = 1.762$. Στο γράφημα φαίνεται η εξίσωση της καμπύλης και η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 , μέσω της οποίας φανείτε να είναι σχεδόν γραμμική. | 18 |
| Διάγραμμα 5: Καμπύλη βαθμονόμησης σε έλαιο μαντόρας (Mandora peel oil) με $t_{R \text{ ethyl lactic}} = 1.759$. Στο γράφημα φαίνεται η εξίσωση της καμπύλης και η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 , μέσω της οποίας φανείτε να είναι σχεδόν γραμμική. | 19 |
| Διάγραμμα 6: Καμπύλη βαθμονόμησης σε έλαιο κόκκινου γκρέιφρουτ (Red Grapefruit peel oil) με $t_{R \text{ ethyl lactic}} = 1.768$. Στο γράφημα φαίνεται η εξίσωση της καμπύλης και η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 , μέσω της οποίας φανείτε να είναι σχεδόν γραμμική..... | 19 |
| Διάγραμμα 7: Καμπύλη βαθμονόμησης σε έλαιο λεμονιού (Lemon peel oil) με $t_{R \text{ ethyl lactic}} = 1.766$. Στο γράφημα φαίνεται η εξίσωση της καμπύλης και η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 , μέσω της οποίας φανείτε να είναι σχεδόν γραμμική. | 20 |
| Διάγραμμα 8: Καμπύλη βαθμονόμησης σε έλαιο από βελόνες πεύκου (Pine needle oil) με $t_{R \text{ ethyl lactic}} = 1.607$. Στο γράφημα φαίνεται η εξίσωση της καμπύλης και η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 , μέσω της οποίας φανείτε να είναι σχεδόν γραμμική. | 21 |
| Διάγραμμα 9: Καμπύλη βαθμονόμησης σε Δ - λιμονένιο (R -(+)- limonene needle oil) με $t_{R \text{ ethyl lactic}} = 1.758$. Στο γράφημα φαίνεται η εξίσωση της καμπύλης και μια πάρα πολύ καλή τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 , μέσω της οποίας φανείτε η γραμμικότητας της καμπύλης. | 22 |
| Διάγραμμα 10: Καμπύλη βαθμονόμησης σε εξάνιο (hexane) με $t_{R \text{ ethyl lactic}} = 2.299467$. Στο γράφημα φαίνεται η εξίσωση της καμπύλης και μια πάρα πολύ καλή τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 , μέσω της οποίας φανείτε η γραμμικότητας της καμπύλης. | 23 |

| | |
|---|----|
| Διάγραμμα 11: Καμπύλη βαθμονόμησης σε τολουόλιο (toluene) με $t_{R \text{ ethyl lactic}} = 1.946$. Στο γράφημα φαίνεται η εξίσωση της καμπύλης και η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 , μέσω της οποίας φανεί να είναι σχεδόν γραμμική..... | 23 |
| Διάγραμμα 12: Απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα μέσω μη ενζυμικής εστεροποίησης με την χρήση βιοδιαλυτών και τολουολίου συναρτήσει του χρόνου | 24 |
| Διάγραμμα 13: Απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα μέσω ενζυμικής (<i>Novozyme 435</i>) εστεροποίησης με την χρήση βιοδιαλυτών και τολουολίου συναρτήσει του χρόνου..... | 26 |
| Διάγραμμα 14: Απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα μέσω ενζυμικής και μη ενζυμικής αντίδρασης, με την χρήση βιοδιαλυτών και τολουολίου σε σχέση με τον χρόνο..... | 27 |
| Διάγραμμα 15: Απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα για 10 και 20 % w / w των υποστρωμάτων της αντίδρασης σε εξάνιο | 29 |
| Διάγραμμα 16: Απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα συναρτήσει του χρόνου με συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 0.1 M..... | 31 |
| Διάγραμμα 17: Απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα με 0.1 και 0.5 M γαλακτικού οξέος σε εξάνιο..... | 32 |
| Διάγραμμα 18: Απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα με 0.1 και 0.5 M γαλακτικού οξέος σε εξάνιο..... | 34 |
| Διάγραμμα 19: Απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα με συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος 1, 0.5, 0.1, 0.01 με την χρήση και χωρίς την χρήση του <i>Novozyme 435</i> για τις 553 ώρες..... | 35 |
| Διάγραμμα 20: Απόδοση γαλακτικού οξέος με παρουσία και απουσία του <i>Novozyme 435</i> σε έλαιο λεμονιού για 0.01 και 1 M γαλακτικού οξέος | 37 |
| Διάγραμμα 21: Απόδοση γαλακτικού οξέος με παρουσία και απουσία του <i>Novozyme 435</i> σε έλαιο λεμονιού και εξάνιο για 0.01 M γαλακτικού οξέος..... | 38 |

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

BOD Βιολογικά Αιτούμενο Οξυγόνο (Biochemical Oxygen Demand)

COD Χημικά Απαιτούμενο Οξυγόνο (Chemical Oxygen Demand)

GC Αέρια Χρωματογραφία (Gas Chromatography)

ΔΟΤΓ Διεθνή Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας

ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

| | |
|------------------------------|---|
| h (hours) | Ώρες |
| Yield | Απόδοση |
| M (Molarity) | Μοριακότητα |
| mL (milliliter) | Χιλιόλιτρα |
| Kg (kilograms) | Κιλά |
| mg (milligram) | Χιλιοστόγραμμα |
| μL (microlitres) | Μικρόλιτρα |
| m ³ (cubic meter) | Κυβικά μέτρα |
| Ppm (parts per million) | Μέρη ανά εκατομμύριο |
| rpm (rounds per minute) | Στροφές ανά λεπτό |
| °C (Celsius) | Βαθμοί Κελσίου |
| Incubator | Επωαστήρας κλίβανος με ελεγχόμενη θερμοκρασία |
| P (phosphorus) | Φωσφόρος |
| N (nitrogen) | Άζωτο |
| w / w (weight per weight) | Βάρος κατά βάρος |
| w / v (weight per volume) | Βάρος κατά όγκο |
| D (Dipole moment) | Διπολική ροπή |

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

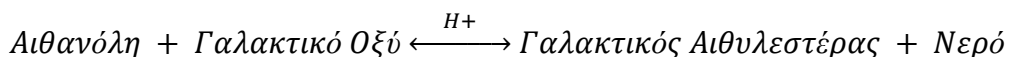
Οι διαλύτες παρουσιάζουν μεγάλη σημαντικότητα στις διάφορες βιομηχανίες, στις έρευνες και στην καθημερινή ζωή. Η χρήση τους απαντάται παντού. Παρ' όλα αυτά δεν παύουν να χαρακτηρίζονται από επικίνδυνες και τοξικές ιδιότητες, υψηλό κόστος και επιπλέον αποτελούν ένα μεγάλο μέρος του ποσού αποβλήτων σε υποπροϊόντα προερχόμενα από βιομηχανίες χημικών διεργασιών, έχοντας ως αποτέλεσμα μεγάλα περιβαλλοντικά προβλήματα (Chemistry & Organic n.d.). Οι πλείστοι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι αρκετά επικίνδυνοι τόσο για την υγεία του ανθρώπου όσο και για το περιβάλλον, είναι τοξικοί, εύφλεκτοι, διαβρωτικοί και καρκινογόνοι (Μαρούλης et al. n.d.).

Ως εκ τούτου η πίεση που ασκείται σε αυτό το θέμα για μείωση, ανακύκλωση και αντικατάσταση τους με λιγότερο επιβλαβείς για την υγεία του ανθρώπου διαλύτες και περισσότερο φιλικούς προς το περιβάλλον είναι μεγάλη. Το πρόβλημα με τη χρήση των διαλυτών είναι φανερό και ανεπιθύμητο για τις περισσότερες χημικές και σχετικές βιομηχανίες, διότι δεν είναι μόνο παρόν σε διεργασίες παραγωγής και καθαρισμού, αλλά παρουσιάζονται και στα τελικά προϊόντα, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται όλος ο κύκλος παραγωγής του προϊόντος (Aparicio & Alcalde 2009). Έχει συζητηθεί πολύ η αντικατάσταση των συμβατικών διαλυτών με πράσινους διαλύτες, οι οποίοι χαρακτηρίζονται από την χαμηλή τους τοξικότητα, την μικρότερη διαλυτότητα στο νερό (χαμηλή αναμειξιμότητα), είναι εύκολα βιοαποδομήσιμοι υπό περιβαλλοντικές συνθήκες, έχουν υψηλό σημείο βρασμού (όχι πολύ πτητικοί, χαμηλή οσμή) και η ανακύκλωση τους είναι πολύ πιο εύκολη μετά τη χρήση τους (Chemistry & Organic n.d.).

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η πιθανή παραγωγή ενός πράσινου διαλύτη, του γαλακτικού αιθυλεστερά, ο οποίος πληροί οκτώ από τις δώδεκα λεγόμενες αρχές της πράσινης χημείας (Lores et al. 2015). Η παραγωγή του επιτεύχθηκε μέσω ενζυμικής και μη ενζυμικής αντίδρασης εστεροποίησης μεταξύ του γαλακτικού οξέος και της αιθανόλης, όπου και τα δύο αντιδρώντα μπορούν να προέλθουν από βιοτεχνολογική επεξεργασία (ζύμωση) του τυρόγαλου, ενός αποβλήτου των γαλακτοκομικών βιομηχανιών αναγκαίο προς αξιοποίηση, αφού αποτελεί μείζον περιβαλλοντικό πρόβλημα αλλά και συνάμα μια πηγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας.

Κατά την εστεροποίηση, μια αντιστρεπτή αντίδραση, ο γαλακτικός αιθυλεστεράς συντίθεται σε υγρή φάση μεταξύ γαλακτικού οξέος και αιθανόλης, όπου και τα δύο αντιδρώντα

προέρχονται από βιομάζα, που καταλύεται από έναν οξύ καταλύτη και έχει ως παραπροϊόν το νερό σύμφωνα με την αντίδραση (Sofia & Pereira 2009):



Με σκοπό την επιτάχυνση της αντίδρασης χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι διαλύτες (βιοδιαλύτες και οργανικοί), όπως επίσης και ακινητοποιημένες λιπάσες. Η ακινητοποίηση γενικά βελτιώνει την ικανότητα ανακύκλωσης των ακριβών λιπάσεων και μπορεί να βελτιώσει τη σταθερότητα του ενζύμου και τη δραστηκότητά του. Γενικά οι ακινητοποιημένες λιπάσες επιτρέπουν τόσο την ικανότητα να λειτουργούν σε μη υδατικά μέσα όπως επίσης και την κατάλυση της σύνθεσης εστέρων σε ποσοτικές αποδόσεις (Yield)

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής ήταν η μελέτη της παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα, μέσω μιας αντίδρασης εστεροποίησης μεταξύ του γαλακτικού οξέος και της αιθανόλης. Για την βέλτιστη παραγωγή του διαλύτη εξετάστηκαν διάφοροι παράγοντες, όπως διαφορετικές συγκεντρώσεις του γαλακτικού οξέος, των διαλυτών και των λιπάσεων που χρησιμοποιήθηκαν. Ο γαλακτικός αιθυλεστέρας κατατάσσεται στις κύριες ομάδες των Πράσινων διαλυτών, ο οποίος πλεονεκτεί στο γεγονός ότι είναι μη τοξικός, μη διαβρωτικός, εύκολα βιοδιασπώμενος και δεν είναι καρκινογόνος. Όπως επίσης στην περίπτωση απελευθέρωσης του στην ατμόσφαιρα δεν είναι ικανός να καταστρέψει το όζον και δεν αποτελεί επικίνδυνο ατμοσφαιρικό ρύπο (Μαρούλης et al. n.d.)

Σε περίπτωση που τα αποτελέσματα της έρευνας αυτής είναι αισιόδοξα και προσιτά, ο διαλύτης αυτός μπορεί να αντικαταστήσει τους ρυπογόνους, τοξικούς συμβατούς διαλύτες και να χρησιμοποιηθεί ευρέως στις διαδικασίες των διάφορων βιομηχανιών με το πλεονέκτημα του ότι αποτελεί έναν πράσινο διαλύτη, δηλαδή, φιλικό τόσο προς το περιβάλλον όσο και προς τον άνθρωπο. Όπως επίσης για περαιτέρω έρευνα οι ουσίες που χρησιμοποιούνται (γαλακτικό οξύ και αιθανόλη) προς παραγωγή του μπορούν να ανακτηθούν από την επεξεργασία του τυρόγαλου μέσω ζύμωσης, αντιμετωπίζοντας έτσι την διάθεση του ρυπογόνου αυτού απόβλητου στο περιβάλλον και αξιοποιώντας το προς την παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας.

1 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1.1 Τυρόγαλο (ορός γάλακτος – σύνθεση)

Το τυρόγαλο είναι το κύριο υποπροϊόν των γαλακτοβιομηχανιών (Ferchichi et al. 2005; Kisaalita et al. 1987), που σύμφωνα με τη Διεθνή Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας (ΔΟΤΓ) και με την απόφαση 97/80/ΕΚ, ως τυρόγαλο, ή αλλιώς ορός γάλακτος, ορίζεται το ρευστό γαλακτοκομικό υπολειμματικό προϊόν προερχόμενο κατά την παρασκευή κυρίως των τυριών ή καζεΐνης (Venetsaneas et al. 2009). Η παγκόσμια παραγωγή τυρογάλακτος ανά έτος ξεπερνά τους 160 εκατομμύρια τόνους, που σύμφωνα με τον Castillo (1990) οι $6 * 10^6$ τόνοι αντιστοιχούν στην λακτόζη (Castillo 1990; Kosikowski 1979). Έχουν γίνει παρατηρήσεις για τον ετήσιο ρυθμό παραγωγής του να αυξάνεται κατά 1-2 % (OECD-FAO 2008). Για να γίνει 1 kg τυριού, 9 kg τυρογάλακτος απαιτούνται (Kosikowski 1979; Guimarães et al. 2010).

Το τυρόγαλο αντιπροσωπεύει περίπου το 85-95 % του όγκου του γάλακτος και αποτελεί το 55% των θρεπτικών ουσιών του. Ανάλογα με το είδος του γάλακτος και το είδος του τυριού που παρασκευάζεται κυμαίνεται και η αναλογία των συστατικών του (Μάντης 2000). Επί των πλείστον μεταξύ αυτών των θρεπτικών συστατικών σε αφθονία βρίσκονται η λακτόζη (4,5-5 % w / v), οι διαλυτές πρωτεΐνες (0,6-0,8 % w / v), λιπίδια (0,4-0,5 % w / v) και ανόργανα άλατα (8-10% του αποξηραμένο εκχυλίσματος) κυρίως NaCl και KCl (πάνω από το 50 %), άλατα ασβεστίου (κυρίως φωσφορικό) και άλλα. Ο ορός γάλακτος περιέχει επίσης σημαντικές ποσότητες άλλων συστατικών, όπως είναι το γαλακτικό (0,05 % β / ο) και το κιτρικό οξύ, μη πρωτεϊνικό άζωτο (ουρία και ουρικό οξύ) και βιταμίνες της ομάδας Β (Siso 1996; Venetsaneas et al. 2009; Guimarães et al. 2010).

1.2 Το τυρόγαλο ως απόβλητο και η αξιοποίηση του

Χωρίς την κατάλληλη επεξεργασία, αυτά τα απόβλητα θέτουν σοβαρούς περιβαλλοντικούς κινδύνους (Rivas et al. 2011). Η διάθεση του τυρογάλου αποτελεί ένα μεγάλο πρόβλημα για τις γαλακτοκομικές βιομηχανίες σε όλο τον κόσμο (Cimino & Caristi 1990). Αποσύρονται μεγάλα ποσά μέσω σωληνώσεων, σε θάλασσες, ποτάμια, λίμνες, ωκεανούς, σε σπηλιές και σε συστήματα αποχέτευσης χωρίς καμία επεξεργασία (Moresi 1983). Αυτή η άμεση περιβαλλοντική διάθεση είναι απαράδεκτη ιδιαίτερα λόγω του υψηλού οργανικού φορτίου του τυρογάλου που οφείλεται κυρίως στην παρουσία των υδατανθράκων και των πρωτεϊνών

του γάλακτος, όπως είναι η λακτόζη και η καζεΐνη, αντίστοιχα. Επιπλέον, η περιεκτικότητα σε λίπος ($0.1 - 10.6 \text{ kg / m}^3$), αιωρούμενα στερεά ($0.1 - 22 \text{ kg / m}^3$) και θρεπτικά συστατικά (N και P) συμβάλλουν επίσης στα επίπεδα μόλυνσης (Prazeres et al. 2012). Η διάθεση του προκαλεί δραστικές μεταβολές στο περιβάλλον και στους διάφορους οργανισμούς που ζουν στο νερό, με αποτέλεσμα τον κίνδυνο εξαφάνισής τους, λόγω καταστροφής του διαλυμένου οξυγόνου. Το οργανικό φορτίο ελέγχεται από το BOD (βιολογικά απαιτούμενο οξυγόνο) και COD (χημικώς απαιτούμενο οξυγόνο), στο εύρος $0.1 - 100 \text{ kg/m}^3$ με δείκτη βιοδιασπασιμότητας (BOD5 / COD) τυπικά στο εύρος $0.4 - 0.8$. Το τυρόγαλα παρουσιάζει ένα BOD₅ = 30.000 έως 50 000 ppm και COD = 60000-80000ppm (Marawaha et al. 1988; Gardner 1989; Kemp; & Quickenden 1988; Mawson 1994).

Το υψηλό κόστος της διάθεσης του τυρόγαλου και η ανάγκη να μειωθεί η ρύπανση που προκαλεί στο περιβάλλον έχουν προκαλέσει σημαντικές προσπάθειες σε παγκόσμιο επίπεδο για την περαιτέρω χρήση του, αφού αποτελεί μια πηγή πολύτιμων συστατικών και όχι απλά ένα απόβλητο (Boumba et al. 2001). Περίπου, ήδη το 50% της συνολικής παγκόσμιας παραγωγής τυρόγαλου αντιμετωπίζεται και μετασχηματίζεται σε διάφορα προϊόντα τροφίμων (Siso 1996). Έχουν αναπτυχθεί διάφοροι βιοτεχνολογικοί τρόποι επεξεργασίας του, όπως είναι η αερόβια και αναερόβια επεξεργασία, επεξεργασία με μεμβράνες, κατασκευή κατάλληλων υγροτόπων, πήξη / ηλεκτροπήξη / κροκίδωση / καθίζηση και βιοαποκατάσταση (Καττή 2010). Μια ελπιδοφόρα αξιοποίηση του τυρόγαλου είναι η ζύμωση του, όπου πολλοί μικροοργανισμοί μπορούν να χρησιμοποιούν την λακτόζη ως την κύρια πηγή άνθρακα τους προς παραγωγή προϊόντων προστιθέμενης αξίας, όπως για παράδειγμα, κιτρικό οξύ, μονοκύτταρικές πρωτεΐνες, ποτά που έχουν υποστεί ζύμωση, βιταμίνες, βιοαέριο, βιοπολυμερή, αιθανόλη και γαλακτικό οξύ (Koutinas et al. 2014).

Η παρούσα μελέτη είναι μέρος της διδακτορικής διατριβής της Χρυσταλλένης Γιάγκου, όπου αξιοποιείται το τυρόγαλα ως υπόστρωμα για τους μικροοργανισμούς *K. marxianus* και *Picia kudriavzevii* προς παραγωγή αιθανόλης και ο *Lactobacillus Bulgaricus* προς παραγωγή γαλακτικού οξέος. Η μελέτη αυτή πιο συγκεκριμένα και πιο ειδικά μελετά την αντίδραση εστεροποίησης του γαλακτικού οξέος με αιθανόλη προς την παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα, ένας διαλύτης που έχει θεωρηθεί ως πράσινος διαλύτης.

1.3 Σημαντικότητα διαλυτών

Είναι γνωστή και συνάμα προφανής η χρήση των διάφορων διαλυτών στη βιομηχανία, στην έρευνα γενικά και στην καθημερινή ζωή. Διαλύτες χρησιμοποιούνται ευρέως σε φαρμακοβιομηχανίες, βιομηχανίες χρωμάτων, βερνικιών, σε μελάνια εκτυπωτών, σε κατασκευές ημιαγωγών, σε καθαρισμούς μετάλλων και σε άλλους πολλούς τομείς. Η πλειοψηφία των διαλυτών είναι οργανικά χημικά με επικίνδυνες και τοξικές ιδιότητες, υψηλού κόστους και αποτελούν σημαντικό μέρος του μεγάλου ποσού αποβλήτων σε υποπροϊόντα προερχόμενα από βιομηχανίες χημικών διεργασιών, έχοντας ως αποτέλεσμα μεγάλα περιβαλλοντικά προβλήματα (Chemistry & Organic n.d.). Οι πλείστοι διαλύτες που χρησιμοποιούνται είναι αρκετά επικίνδυνοι τόσο για την υγεία του ανθρώπου όσο και για το περιβάλλον, είναι τοξικοί και εύφλεκτοι, ανάλογα με την πτητικότητά τους. Μερικοί διαλύτες είναι ικανοί να προκαλέσουν τοξικότητα στο νευρικό σύστημα, την αναπαραγωγική βλάβη, τη βλάβη σε ήπαρ και νεφρά, αναπνευστικά προβλήματα, καρκίνο και δερματίτιδα. Επίσης μπορούν να προκαλέσουν διάβρωση στο έδαφος, μόλυνση στα υπόγεια και επιφανειακά ύδατα και καταστροφή της στοιβάδας του όζοντος (Μαρούλης et al. n.d.).

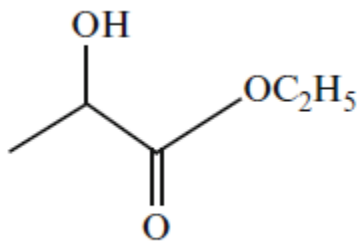
Η παγκόσμια ζήτηση για χρήση του διαλύτη πλησιάζει τα 20 εκατομμύρια μετρικούς τόνους ετησίως (Aparicio & Alcalde 2009). Ως εκ τούτου η πίεση που ασκείται σε αυτό το θέμα για μείωση, ανακύκλωση και αντικατάσταση τους με λιγότερο επιβλαβής για την υγεία του ανθρώπου διαλύτες και περισσότερο φιλικούς προς το περιβάλλον είναι μεγάλη. Από την αρχή του κινήματος της Πράσινης Χημείας πριν από 20 χρόνια, η ανάγκη για εναλλακτικούς διαλύτες υπήρξε ένα από τα σημαντικότερα ζητήματα που έχουν αντιμετωπιστεί (Clark & Tavener 2007). Το πρόβλημα με τη χρήση των διαλυτών είναι φανερό και ανεπιθύμητο για τις περισσότερες χημικές και σχετικές βιομηχανίες, διότι δεν είναι μόνο παρόν σε διεργασίες παραγωγής και καθαρισμού, αλλά παρουσιάζονται και στα τελικά προϊόντα, με αποτέλεσμα να επηρεάζεται όλος ο κύκλος του προϊόντος (Aparicio & Alcalde 2009). Στόχος είναι να αντικατασταθεί η χρήση των συνηθέστερων ενώσεων με πιο πράσινες εναλλακτικές λύσεις. Μια λύση είναι η αντικατάσταση των συμβατικών διαλυτών με πράσινους διαλύτες.

1.4 Πράσινοι διαλύτες – Γαλακτικός αιθυλεστέρας

Οι πράσινοι διαλύτες έχουν χαρακτηριστεί για την χαμηλή τους τοξικότητα, την μικρότερη διαλυτότητα στο νερό (χαμηλή αναμειξιμότητα), είναι εύκολα βιοαποδομήσιμοι υπό

περιβαλλοντικές συνθήκες, έχουν υψηλό σημείο βρασμού (όχι πολύ πτητικοί, χαμηλή οσμή) και η ανακύκλωση τους είναι πολύ πιο εύκολη μετά τη χρήση τους (Chemistry & Organic n.d.). Αποτελούν τους διαλύτες προερχόμενους από την βιομάζα, ιοντικούς διαλύτες και υπερκρίσιμους διαλύτες (κυρίως υπερκρίσιμο διοξείδιο του άνθρακα). Στην παρούσα έρευνα ασχοληθήκαμε με τον γαλακτικό αιθυλεστέρα, έναν διαλύτη προερχόμενο από βιομάζα, μια κατηγορία διαλυτών από τις κυριότερες ομάδες των Πράσινων διαλυτών, ο οποίος πλεονεκτεί στο γεγονός ότι είναι μη τοξικός, μη διαβρωτικός, είναι εύκολα βιοδιασπώμενος και δεν είναι καρκινογόνος. Επιπλέον στην περίπτωση απελευθέρωσης ατμών δεν καταστρέφει το όζον και δεν αποτελεί επικίνδυνο ατμοσφαιρικό ρύπο (Μαρούλης et al. n.d.). Αποτελεί ανανεώσιμη ουσία και μπορεί να ανακυκλωθεί, οπότεν δικαίως κατατάσσεται στους πράσινους διαλύτες, αφού επιπλέον πληροί οκτώ από τις δώδεκα λεγόμενες αρχές της πράσινης χημείας (Lores et al. 2015).

Ο γαλακτικός αιθυλεστέρας (CAS αριθ .: 97-64-3, ονομασία κατά IUPAC αιθυλεστέρας (Σ) - 2-υδροξυπροπανοϊκό) με μοριακό τύπο $C_5H_{10}O_3$ (Pereira & Rodrigues 2014), ένας υποσχόμενος διαλύτης με επαρκείς ιδιότητες αποτελεί το κύριο μέλος της οικογένειας των γαλακτικών εστέρων ο οποίος είναι και εμπορικά διαθέσιμος. Παρουσιάζεται ως ένα διαυγές, έως ελαφρώς κίτρινο υγρό με υψηλή τάση ατμών 1.2 mm Hg στους 34° C (1.6 mbar στους 20° C), έχει σημείο βρασμού στους 154 ° C και μπορεί να αναφλεγεί σε σημείο ανάφλεξης περίπου στους 49 ° C, παρουσιάζει επίσης υψηλή ισχύ φερεγγυότητας και χαμηλή επιφανειακή τάση (Μαρούλης et al. n.d.; Sofia & Pereira 2009). Βάση των θερμοφυσικών ιδιοτήτων του, ο γαλακτικός αιθυλεστέρας περιγράφεται ως ένα πυκνό ρευστό από μέτριο ιξώδες, όπου αυτό τον καθιστά κατάλληλο υποψήφιο για την εφαρμογή του σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας (Lores et al. 2015). Χαρακτηρίζεται για τις πολύ ευνοϊκές τοξικολογικές του ιδιότητες, δεν παρουσιάζει οποιονδήποτε κίνδυνο όσον αφορά την υγεία του ανθρώπου, δεν είναι τερατογόνος ούτε διαβρωτική ουσία και υφίσταται εύκολα σε μεταβολική υδρόλυση λόγω της ενζυμικής δραστηρότητας του εστέρα σε αιθυλική αλκοόλη και γαλακτικό οξύ, ένας φυσικός μεταβολίτης στον οργανισμό του ανθρώπου (Aparicio & Alcalde 2009)



Διάγραμμα 1: Δομή γαλακτικού αιθυλεστέρας (Pereira & Rodrigues 2014)

1.4.1 Εφαρμογές γαλακτικού αιθυλεστέρας

Λόγω της χαμηλής του τοξικότητας έχει εγκριθεί από τον οργανισμό U.S Food and Drug Administration (FDA) για να χρησιμοποιείται ως πρόσθετο βιοχημικών προϊόντων, στη φαρμακευτική βιομηχανία ως διαλυτικό για διάφορες βιολογικά δραστικές ενώσεις, χωρίς να καταστρέφει την φαρμακολογική δραστηριότητα του δραστικού συστατικού και καλλυντικών προϊόντων και σε προϊόντα διατροφής (Aparicio & Alcalde 2009; Bermejo et al. 2015). Ορισμένοι γαλακτικοί εστέρες έχουν χρησιμοποιηθεί για πολλά χρόνια σε βιομηχανικές εφαρμογές, για νίτρο και αιθυλική κυτταρίνη, κόμμεα, έλαια, βαφές, συνθετικά πολυμερή και χρώματα. Επίσης είναι μια επιθυμητή ουσία επίστρωσης ξύλου, πολυστερίνης και μετάλλων, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαβρωτική ουσία χρωμάτων και ως αφαιρετικό για γκράφιτι. Πληροί οκτώ από τις 12 λεγόμενες αρχές της πράσινης χημείας και είναι ικανός να αντικαταστήσει ένα φάσμα αλογονωμένων, τοξικών και καταστροφικών προς το περιβάλλον διαλυτών, συμπεριλαμβανομένων και διαλύτες καταστροφικούς προς το όζον όπως είναι οι χλωροφθοράνθρακες, καρκινογόνες ουσίες όπως το χλωριούχο μεθυλένιο, και τοξικούς αιθέρες όπως αιθυλενογλυκόλη και χλωροφόρμιο. Έχει ήδη αντικαταστήσει διάφορους διαλύτες όπως είναι η Ν-μεθυλο πυρρολιδόνη (NMP), το τολουόλιο, η ακετόνη και το ξυλένιο (Sofia & Pereira 2009).

1.4.2 Τρόποι παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρας

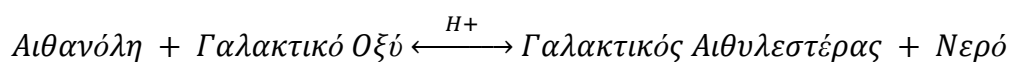
Σύμφωνα με τους Α. Ι. Μαρούλη, Κ. Χατζηαντωνίου και Γ. Τζελέπη ο γαλακτικός αιθυλεστέρας λαμβάνεται από, α) υδρόλυση της λιγνοκυτταρίνης και ταυτόχρονη ζύμωση των σακχάρων προερχόμενων από μίγμα ενζύμων και στην συνέχεια καθαρισμός του γαλακτικού οξέος μέσω ηλεκτροδιάλυσης με τελικό στάδιο την εστεροποίηση προς γαλακτικό αιθυλεστέρας, β) Ζύμωση σακχάρων και παραλαβή του γαλακτικού αιθυλεστέρας μέσω απόσταξης και γ) ζύμωση σακχάρων και συνάμα ταυτόχρονη απομάκρυνση του

γαλακτικού οξέος μέσω του αντιδραστήρα της ζύμωσης και εστεροποίηση αυτού παρουσία ενζύμου.

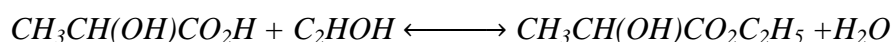
Για τον σχηματισμό του εστέρα μέσω της εστεροποίησης, μιας αντιστρεπτής αντίδρασης, για την παραγωγή αποδεκτών αποδόσεων του εστέρα, η ισορροπία της αντίδρασης θα πρέπει να μετατοπίζεται προς την παραγωγή εστέρα. Για την επίτευξη αυτή μπορούν να πραγματοποιηθούν διάφορες μέθοδοι όπως, η παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα από πολυλειτουργικούς αντιδραστήρες (Pereira & Rodrigues 2014), με αντιδραστήρες μεμβράνης, με μέθοδο βασιζόμενη σε αντιδραστήρες χρωματογραφίας και μέσω εξάλειψης του νερού με αζεοτροπική απόσταξη μεταξύ κάποιου διαλύτη και του νερού. (Sofia & Pereira 2009). Επιπλέον πολλοί επιστήμονες επικεντρώθηκαν στις έρευνές τους στην σύνθεση του γαλακτικού αιθυλεστέρα με την χρήση αντιδραστήρα μεμβράνης έκχυσης ή και ατμού – διαπερατότητας (Pereira & Rodrigues 2014)

1.5 Αντίδραση εστεροποίησης γαλακτικού οξέος και αιθανόλης

Η αντίδραση εστεροποίησης, αποτελεί την ικανότητα των καρβοξυλικών οξέων να αντιδρούν με αλκοόλες, όταν οι ενώσεις αυτές θερμαίνονται με παρουσία ενός ανόργανου οξέος προς παραγωγή εστέρα (Gammon n.d.). Ο γαλακτικός αιθυλεστέρας συντίθεται μέσω αντιστρεπτής αντίδρασης εστεροποίησης σε υγρή φάση μεταξύ γαλακτικού οξέος και αιθανόλης, όπου και τα δύο αντιδρώντα προέρχονται από βιομάζα, που καταλύεται από έναν οξύ καταλύτη και έχει ως παραπροϊόν το νερό σύμφωνα με την αντίδραση (Sofia & Pereira 2009):



Η στοιχειομετρική αντίδραση της μεθόδου μπορεί να γραφεί σύμφωνα με:



Η χρήση των αντιδρώντων αυτών (αιθανόλη και γαλακτικό οξύ) πλεονεκτεί στο γεγονός ότι μπορούν να παραχθούν από ανανεώσιμες πηγές (π.χ. με διεργασίες γλυκόζης ή ζύμωση ζάχαρης). Η εστεροποίηση καλείται ως αυτοκαταλυόμενη αντίδραση, δεδομένου του ότι το κατιόν υδρογόνου (H^+) που απελευθερώνεται από την μερική αποσύνθεση του καρβοξυλικού οξέος ένα από τα αντιδρώντα, καταλύει την αντίδραση. Ωστόσο, η χρήση του καταλύτη είναι επιθυμητή και ευνοϊκή για το ρυθμό της αντίδρασης αφού η κινητική της αυτοκαταλυόμενης

αντίδραση είναι εξαιρετικά αργή, λόγω του ότι το ποσοστό της εξαρτάται από την αυτοπρωτόλυση του καρβοξυλικού οξέος (Sofia & Pereira 2009).

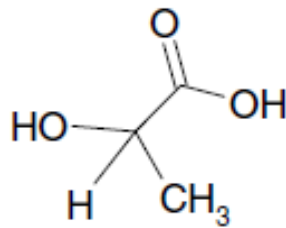
Από οικονομικής άποψη, η αντικατάσταση των παραδοσιακών διαλυτών από γαλακτικό αιθυλεστέρα σαφώς και ευνοείται δεδομένου ότι επιτρέπεται η παραγωγή του από πρώτες ύλες σε υδατάνθρακες σε πολύ χαμηλές και ανταγωνιστικές τιμές (βιομάζα). Η μείωση της χρήσης ενέργειας για την παραγωγή του μειώνει το κόστος του, αλλά και την επίδραση του στο περιβάλλον (Aparicio & Alcalde 2009). Όπως και στην παρούσα εργασία στόχος είναι η παραγωγή του γαλακτικού αιθυλεστέρα μέσω αντίδρασης εστεροποίησης. Καταλήγοντας ο γαλακτικός αιθυλεστέρας είναι μια πράσινη και οικονομική βιώσιμη εναλλακτική λύση έναντι της εκτεταμένης χρήσης των παραδοσιακών διαλυτών, όπου απαιτείται μια βαθιά και εξειδικευμένη γνώση των ιδιοτήτων του σε ευρύ φάσμα.

1.6 Γαλακτικό οξύ

Το γαλακτικό οξύ ανακαλύφθηκε από τον Carl Wilhelm Scheele το 1780 στο ξινό γάλα και το 1881 ο Fermi το παρήγαγε μέσω της ζύμωσης, έχοντας ως αποτέλεσμα την βιομηχανική παραγωγή του (Castillo Martinez et al. 2013). Το γαλακτικό οξύ, η αλλιώς 2-υδροξυπροπανοϊκό οξύ ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$), είναι μια οργανική ένωση που κατανέμεται ευρέως στην φύση (Lunelli et al., 2010). Είναι ένα λευκό, υδατοδιαλυτό στερεό ή διαυγές υγρό που παράγεται τόσο φυσικά όσο και συνθετικά. Αποτελεί το πιο απλό 2 – υδροξυ καρβοξυλικό οξύ και λόγω του ότι διαθέτει μια υδροξυλομάδα (OH) ενωμένη σε άτομο άνθρακα, η οποία βρίσκεται δίπλα στην καρβοξυλομάδα (COOH) (βλ. Εικόνα 2), κατατάσσεται σαν ένα α – υδροξύοξύ (AHA), και με τη μορφή της συζυγούς βάσης του, που ονομάζεται γαλακτική, έχει ένα μεγάλο ρόλο σε πολλές βιοχημικές διεργασίες. Αποτελεί μια σημαντική χημική ένωση για την βιοανανεώσιμη οικονομία (Pereira & Rodrigues 2014). Παρουσιάζεται ως το όξινο συστατικό στα ξινά γαλακτοκομικά προϊόντα, τα φρούτα και τα λαχανικά που έχουν υποστεί ζύμωση και τα λουκάνικα. Ως εκ τούτου η ανθρωπότητα έχει γνωρίσει και συνάμα χρησιμοποίηση το γαλακτικό οξύ από την προϊστορία (Benninga 1990). Είναι ένα α-υδροξυ οξύ που περιέχει μια ομάδα υδροξυλίου παραπλεύρως στην λειτουργική ομάδα καρβοξυλικού οξέος (Pereira & Rodrigues 2014).

Η χημική συμπεριφορά του γαλακτικού οξέος προσδιορίζεται από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του, μεταξύ των οποίων είναι α) ο όξινος χαρακτήρας του σε υδατικό βιομέσο β) η δυσλειτουργική φύση του που σχετίζεται με την παρουσία ενός καρβοξυλίου και μίας ομάδας

υδροξυλίου, η οποία δίνει μεγάλη ευελιξία στις αντιδράσεις και γ) η ασύμμετρη οπτική δραστηριότητα του C₂ (Castillo Martinez et al. 2013; Maeda et al. 1986).

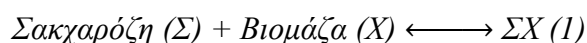


Διάγραμμα 2: Δομή γαλακτικού οξέος (Gupta & Kumar 2007)

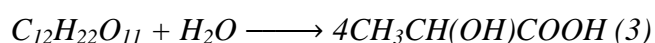
1.6.1 Παραγωγή γαλακτικού οξέος

Η παραγωγή γαλακτικού οξέος είναι περίπου 350.000 τόνους ετησίως. Κάποιοι παρατηρητές υποστηρίζουν ότι η παγκόσμια αύξηση του γαλακτικού οξέος είναι 12-15 % ετησίως (Wasewar et al., 2013). Όπως αναφέρθηκε το γαλακτικό οξύ μπορεί να παραχθεί με χημική σύνθεση ή ζύμωση. Η χημική σύνθεση του γαλακτικού οξέος αποτελεί κυρίως την αντίδραση της ακεταλδεϋδης σε υγρή μορφή σε συνθήκες υψηλής πίεσης με υδροκυάνιο στην παρουσία μιας βάσης προς παραγωγή γαλακτικού νιτριλίου. Περισσότερες πληροφορίες της χημικής σύνθεσης τους αναφέρονται στις βιβλιογραφίες (Dey et al. 2012; Narayanan et al. 2004; John et al. 2010).

Ένας υποσχόμενος τρόπος παραγωγής του είναι η ζύμωση διαφόρων υδατανθράκων (γλυκόζη, μαλτόζη, σακχαρόζη και λακτόζη) (Corma Canos et al. 2007). Η παραγωγή γαλακτικού οξέος από διαδικασία ζύμωσης μπορεί να αντιπροσωπευτεί από τις ακόλουθες αντιδράσεις:



Η στοιχειομετρική αντίδραση της μεθόδου μπορεί να γραφεί σύμφωνα με:



Η βιοτεχνολογική παραγωγή γαλακτικού οξέος έχει αρκετά πλεονεκτήματα, όπως χαμηλό κόστος των πρώτων υλών, ήπιες συνθήκες λειτουργίας (θερμοκρασία και πίεση), χαμηλή κατανάλωση ενέργειας, τη χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών, χαμηλή τοξικότητα των καταλυτών, εκτός από την ιδιαιτερότητα του προϊόντος διότι η διαδικασία ζύμωσης παράγει

οπτικώς καθαρά στερεοϊσομερή (L (+) ή D (-) γαλακτικό οξύ) (Lunelli et al. 2010.). Επιπλέον το γαλακτικό οξύ μπορεί να βιοσυντεθεί από ορισμένα βακτήρια και νηματοειδείς μύκητες.

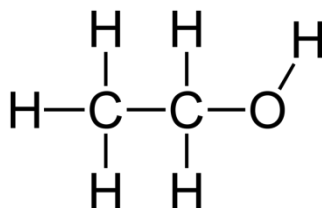
1.6.2 Εφαρμογές γαλακτικού οξέος

Το γαλακτικό οξύ αποτελεί μεγάλο ενδιαφέρον για τις βιομηχανίες λόγω των διάφορων πτυχών του, όπως για παράδειγμα την υψηλή προστιθέμενη αξία του ως προϊόν. Έχει αναγνωριστεί ως μια αβλαβής ουσία από τον οργανισμό στις Ηνωμένες Πολιτείες, Food and Drug Administration και έχει χαρακτηριστεί ως μια χημική ουσία GRAS (γενικά αναγνωρισμένη ως ασφαλή). Παραδοσιακά, έχει χρησιμοποιηθεί σε τρόφιμα, φαρμακευτικά προϊόντα και σε χημικές βιομηχανίες (Lunelli et al., 2010). Περίπου το 70% του γαλακτικού οξέος που παράγεται χρησιμοποιείται στη βιομηχανία (Salminen et al. 2004). Στη βιομηχανία καλλυντικών, το γαλακτικό οξύ χρησιμοποιείται στην παρασκευή των προϊόντων υγιεινής και αισθητικής. Τα παράγωγα του γαλακτικού οξέος (γαλακτικοί εστέρες) χρησιμοποιούνται ευρέως λόγω των ιδιοτήτων τους στην γαλακτωματοποίηση (Gao et al. 2011). Στη φαρμακευτική βιομηχανία χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα στη σύνθεση των δερματολογικών φαρμάκων και κατά της οστεοπόρωσης (Bai et al. 2004) Η αγορά του όμως διευρύνεται συνεχώς ως αποτέλεσμα της ανάπτυξης και της εμπορευματοποίησης των νέων εφαρμογών (Datta & Henry 2006), όπως για παράδειγμα, η σύνθεση της βιοαπορροφήσιμων και βιοαποδομήσιμων πολυμερών (πολυ-γαλακτικό οξύ) και οι πράσινοι διαλύτες (γαλακτικός αιθυλεστέρας) (Lunelli et al. 2010).

1.7 Αιθανόλη

Η αιθανόλη, $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ (αιθυλική αλκοόλη, οινόπνευμα) παρουσιάζεται ως μια διαυγές άχρωμη και εύφλεκτη ουσία με χαρακτηριστική, ευχάριστη οσμή. Σε αραιά υδατικά διαλύματα έχει μια σχετικά γλυκιά γεύση, αλλά σε πιο συμπυκνωμένα διαλύματα έχει μια καυτή γεύση (Shakhashiri 2009). Είναι μια αλκοόλη, μια ομάδα χημικών ενώσεων που τα μόριά της περιέχουν ομάδα υδροξυλίου (-OH), συνδεδεμένη με ένα άτομο άνθρακα. Η αιθανόλη είναι ένας υδατοδιαλυτός πολικός διαλύτης (1.69 D) με σημείο ανάφλεξης $12,7\text{ }^\circ\text{C}$ και πυκνότητα ατμών 1.59, βαρύτερη από τον αέρα. Το ειδικό βάρος της αιθανόλης είναι 0.79, πράγμα που δείχνει ότι είναι ελαφρύτερη από το νερό, αλλά δεδομένου του ότι έχει μεγάλη διαλυτότητα θα αναμειγνύεται καλά με το νερό. Η θερμοκρασία αυτοανάφλεξης της αιθανόλης είναι $422.78\text{ }^\circ\text{C}$ και το σημείο ζέσεως $78.5\text{ }^\circ\text{C}$. Ωστόσο η αιθανόλη παρουσιάζεται

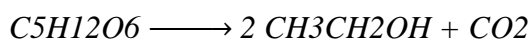
να είναι λιγότερο τοξική σε σχέση με την βενζίνη ή μεθανόλη, επιπλέον στην καθαρή αιθανόλη δεν περιέχονται καρκινογόνες ουσίες (Renewable Fuels Association 2014).



Διάγραμμα 3: Δομή αιθανόλης

1.7.1 Παραγωγή και εφαρμογές αιθανόλης

Η αιθανόλη είναι μια σημαντική πρώτη ύλη στη χημική βιομηχανία και είναι το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο βιοκαύσιμο για τις μεταφορές (Sofia & Pereira 2009). Σε αντίθεση με τα ορυκτά καύσιμα, η αιθανόλη είναι μια ανανεώσιμη πηγή ενέργειας που παράγεται μέσω της ζύμωσης των σακχάρων (Rass-Hansen et al. 2007; Tilman; et al. 2006) και χρησιμοποιείται ευρέως ως μερική αντικατάσταση της βενζίνης στις ΗΠΑ (Sun & Cheng 2002). Η αντίδραση ζύμωσης εκπροσωπείται από την πιο κάτω εξίσωση:



Η αιθανόλη όπως αναφέρθηκε τήκεται στους $-114,1^\circ \text{C}$, βράζει στους $78,5^\circ \text{C}$, και έχει μία πυκνότητα ίση με $0,789 \text{ g / mL}$ στους 20°C . Λόγω του χαμηλού σημείου πήξεως της έχει καταστηθεί ως ένα χρήσιμο υγρό για την χρήση της στα θερμομέτρα για θερμοκρασίες κάτω των -40°C , το σημείο πήξης του υδραργύρου, και για άλλους σκοπούς χαμηλής θερμοκρασίας, όπως για παράδειγμα σε καλοριφέρ αυτοκινήτων. Η παγκόσμια παραγωγή αιθανόλης αυξάνεται με τον χρόνο.

Στην αντίδραση εστεροποίησης γαλακτικού οξέος και αιθανόλης, που μελετήθηκε στην εργασία αυτή, χρησιμοποιήθηκαν ακινητοποιημένα ένζυμα, συγκεκριμένα λιπάσες. Οι λιπάσες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν από *Candida antarctica* ακινητοποιημένο σε ένα υπόστρωμα (*Novozyme 435*) και από *Candida rugosa* ακινητοποιημένα σε πέντε διαφορετικά υποστρώματα (*Accurel MP 1000*, *Lifetech AP1090M*, *Lifetech ECR1030M*, *Lifetech ECR8285M* και *Lewatit VP OC 1600*).

1.8 Ένζυμα – Λιπάσες

Τα ένζυμα αποτελούν μακρομοριακούς βιολογικούς καταλύτες, με ικανότητα να επιταχύνουν, ή να καταλύουν χημικές αντιδράσεις (Berg et al. 2002). Ως γνωστό τα ένζυμα καταλύουν περισσότερα από 5.000 είδη βιοχημικών αντιδράσεων (Schomburg et al. 2013). Περίπου το 60 % της συνολικής παγκόσμιας προσφοράς βιομηχανικών ενζύμων παράγονται στην Ευρώπη και τουλάχιστον το 75 % όλων των βιομηχανικών ενζύμων (συμπεριλαμβανομένων των λιπασών) έχουν υδρολυτική δράση (Sharma et al. 2001). Οι λιπάσες λόγω της ευρείας σημασίας τους αποτελούν ένα αντικείμενο εντατικής μελέτης. Είναι ένζυμα πολύ διαδεδομένα με μεγάλη φυσική σημασία και βιομηχανικό δυναμικό. Η έρευνα που γίνεται γύρω από τις λιπάσες επικεντρώνεται κυρίως στον χαρακτηρισμό της δομής τους, στην διαλεύκανση του μηχανισμού δράσης τους, την κινητική, αλληλουχία και κλωνοποίηση των γονιδίων τους και τον γενικό χαρακτηρισμό της απόδοσής τους (Alberghina et al. 1991.; Bornscheuer, 2000).

Η σταθερότητα, η εκλεκτικότητα, και η ευχρηστία είναι οι ιδιότητες που χαρακτηρίζουν αυτά τα ένζυμα, υπεύθυνες για την επιτυχία τους, στην οργανική χημεία (Danieli et al. 1997). Οι λιπάσες είναι ευρέως διαδεδομένα υδρολυτικά ένζυμα, τα οποία μπορούν να ληφθούν από τα ζώα, φυτά και μικροοργανισμούς, σε σχετικά μεγάλες ποσότητες, αλλά μεγάλη εμπορική σημαντικότητα εμφανίζουν μόνο οι μικροβιακές λιπάσες (Sharma et al. 2001). Οι λιπάσες μπορούν να υπάρχουν σε δύο διαφορετικές δομικές μορφές. Στην μια μορφή, η ενεργός θέση της λιπάσης απομονώνεται από το μέσο από μια ελικοειδές ολιγοπεπτιδική αλυσίδα που ονομάζεται "κάλυμμα" ή "πτερύγιο". Η άλλη δομή παρουσιάζει το καπάκι μετατοπισμένο και την ενεργή θέση εκτεθειμένη στην αντίδραση του μέσου, και θεωρείται ότι είναι η λιπάση σε ενεργή (ανοιχτή) μορφή. Σε ομογενή υδατικά μέσα, η λιπάση είναι σε ισορροπία μεταξύ αυτών των δύο δομών (Danieli et al. 1997).

1.8.1 Δράση της λιπάσης

Για τον λόγο του ότι είναι από τους πιο ευπροσάρμοστους βιοκαταλύτες και επιφέρουν μια σειρά αντιδράσεων βιομετατροπής όπως είναι η υδρόλυση, η εστεροποίηση και η αμινόλυση, κατέχουν ένα σημαντικό ρόλο όσον αφορά την ταχεία ανάπτυξη της σύγχρονης βιοτεχνολογίας (Τζάνου et al. 2005). Επομένως οι λιπάσες είναι υπεύθυνες για την κατάλυση της υδρόλυσης και της σύνθεσης των εστέρων που σχηματίζονται από γλυκερίνη και λιπαρά οξέα μακράς αλυσίδας. Κύριος ρόλος τους είναι η κατάλυση της υδρόλυσης των

τριγλυκεριδίων σε γλυκερόλη και ελεύθερα λιπαρά οξέα (Sharma et al. 2001). Σε αντίθεση με τις εστεράσες, οι λιπάσες ενεργοποιούνται μόνο όταν προσροφηθούν σε μια διεπιφάνεια ελαίου – νερού (Martinelle et al. 1995), και δεν υδρολύουν διαλυμένα υποστρώματα bulk fluid. Μια πραγματική λιπάση πρόκειται να διαχωρίσει γαλακτοποιημένους εστέρες από την γλυκερίνη και μεγάλης αλυσίδας λιπαρά οξέα όπως για παράδειγμα τριελαΐνη και τριπαλμιτίνη.

1.8.2 Παραγωγή και εφαρμογές της λιπάσης

Όπως αναφέρθηκε οι ποιο εμπορικά χρησιμοποιούμενες λιπάσες παράγονται συνήθως από μικροοργανισμούς. Ένα μεγάλο εύρος από αυτές είναι ενεργές σε οργανικούς διαλύτες οι οποίοι καταλύουν ένα μεγάλο αριθμό χρήσιμων αντιδράσεων, όπως είναι η εστεροποίηση (Chowdary et al. 2000; Hamsaveni et al. 2001; Kiran & Divakar 2001; Rao & Divakar 2001), η μετεστεροποίηση, τοποεκλεκτική αλκυλίωση της γλυκόλης και μινθόλης και σύνθεση πεπτιδίων (Ducret et al. 1998; Zhang et al. 2001), όπως επίσης και άλλων χημικών ουσιών (Therisod & Klibanov 1987; Weber et al. 1999; M. Rusch gen Klaas 2000b; Liese 2006; Azim et al. 2001)

Οι λιπάσες έχουν πολλές εφαρμογές, χρησιμοποιούνται ευρέως στην επεξεργασία των λιπών και ελαίων, σε συσκευασίες απορρυπαντικών και προϊόντων απολίπανσης, στην επεξεργασία τροφίμων, στη σύνθεση φαρμακευτικών προϊόντων, στην κατασκευή χαρτιού, και την παραγωγή των καλλυντικών (Kazlauskas & Bornscheuer 2008). Επιπρόσθετα, η λιπάση χρησιμοποιείται τόσο για την επιτάχυνση της αποδόμησης των αποβλήτων από λίπη με σκοπό την μείωση του ρυπαντικού φορτίου των υγρών βιομηχανικών αποβλήτων όσο και για την πολυουρεθάνη (Masse et al. 2001). Οι περισσότερες βιομηχανικές λιπάσες προέρχονται από μύκητες και βακτήρια (Sharma et al. 2001).

1.9 Λιπάσες στην σύνθεση εστέρων

Οι λιπάσες έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ως καταλύτες για τη σύνθεση των εστέρων. Από έρευνα των Weber et al. 1999 μελετήθηκε η εστεροποίηση του γαλακτικού οξέος και αλκοόλης με την χρήση της λιπάσης *C. antarctica* σε εξάνιο. Η εστεροποίηση πέντε ισομερών των ακετυλενικών λιπαρών οξέων (διαφορετικών μηκών αλυσίδας) με ν-βουτανόλη μελετήθηκε από Lie et al. 1998, χρησιμοποιώντας οκτώ διαφορετικές λιπάσες. Σύμφωνα με έρευνα των Arroyo et al. 1999, σημειώνεται ότι για την παροχή ενός υψηλού ποσοστού εστεροποίησης του (*R,S*)-*ibuprofen* ήταν αναγκαία μια βέλτιστη τιμή ενεργότητας

του νερού ακριβώς πριν την ισορροπία της αντίδρασης. Στο άρθρο Janssen et al. 1999 αναφέρετε σχετικά η εστεροποίηση των λιπαρών οξέων σε τολουόλιο, που καταλύονται από λιπάση *C. rugosa* (CRL). Από τους Krishnakant & Madamwar 2001, αναφέρεται η χρήση λιπάσης ακινητοποιημένης σε σίλικα και σε μικρογαλάκτωμένες οργανογέλες προς σχηματισμό εστέρα. Η καταλυτική αντίδραση μέσω λιπάσης για την σύνθεση εστερικών δεσμών παρουσιάζει μεγάλο εμπορικό ενδιαφέρον. Γενικά οι ακινητοποιημένες λιπάσες επιτρέπουν τόσο την ικανότητα να λειτουργούν σε μη υδατικά μέσα όπως επίσης και την κατάλυση της σύνθεσης εστέρων σε ποσοτικές αποδόσεις (Yield).

1.10 Η ακινητοποίηση στις λιπάσες

Παρ' όλο που οι λιπάσες έχουν πολύ καλά εγγενή χαρακτηριστικά, απαιτούν συνήθως βελτιώσεις πριν την χρήση τους ως βιοκαταλύτες, λόγω κάποιων ανεπιθύμητων ιδιοτήτων τους όπως είναι η διαλυτότητα τους στο νερό που καθιστά δύσκολη την ανάκτηση τους, η μέτρια σταθερότητα του κ.α. μέσω της ακινητοποίησης λύνεται το θέμα ανάκτησης του ενζύμου και εάν σχεδιαστεί με σωστό τρόπο μπορεί να βελτιώσει πολλές άλλες ιδιότητες του ενζύμου, από τη σταθερότητα στην δραστηριότητα και την εξειδίκευση (Manoel et al. 2015).

Τα ακινητοποιημένα ένζυμα, ορίζονται ως «τα ένζυμα που περιορίζονται ή τοποθετούνται σε καθορισμένες περιοχές του χώρου με τη διατήρηση της καταλυτικής τους δραστηριότητας, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατ' επανάληψη και συνεχώς». Τόσο οι μητρικές όσο και οι ακινητοποιημένες λιπάσες είναι εμπορικά διαθέσιμες, ωστόσο, παρουσιάζεται ένας αυξανόμενος αριθμός εξειδικευμένων εφαρμογών των λιπάσεων στην σύνθεση και βιομετατροπή στις οποίες απαιτούν ακινητοποιημένους καταλύτες με σκοπό την αύξηση της αποδοτικότητας. Η ακινητοποίηση γενικά βελτιώνει την ικανότητα ανακύκλωσης των ακριβών λιπάσεων. Επίσης, η ακινητοποίηση μπορεί να βελτιώσει τη σταθερότητα του ενζύμου και τη δραστηριότητά του (Sharma et al. 2001).

Όσο αφορά την ακινητοποίηση των λιπάσεων έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές και διάφορες μέθοδοι, όπως για παράδειγμα η προσρόφηση ή κατακρήμνιση επάνω σε υδρόφοβα υλικά (Wisdom et al. 1985), σύνδεση σε λειτουργικές ομάδες μέσω ομοιοπολικών δεσμών (Shaw et al. 1990), παγίδευση σε πολυμερές τζελ (Telefoncu et al. 1990), προσρόφηση σε ρητίνες ανταλλαγής ανιόντων (Rizzi et al. 1992), μικροενθυλάκωση σε λιπιδικά κυστίδια (Balcão et al. 1996), και παγίδευση sol-gel (Reetz & Jaeger 1998; Krishnakant & Madamwar 2001).

1.11 Χρήση της λιπάσης από *Candida antarctica* και *Candida rugosa*

Οι λιπάσες του *C. rugosa* και *C. antarctica* έχουν μελετηθεί μαζί δεδομένου ότι παρουσιάζουν πολλές ομοιότητες σε πολλές πτυχές (Lotti et al. 1994). Κατέχουν διάφορα γονίδια που κωδικοποιούν τη λιπάση.

1.11.1 Ζυμομύκητας *Candida antarctica*

Ο ζυμομύκητας *Candida Antarctica* με εμπορική ονομασία *Novozyme 435* παράγει δύο διαφορετικές λιπάσες, την Α και Β (I, Michiya 1988; Høegh et al. 1995). Η λιπάση Β θεωρείται ο πιο ευέλικτος βιοκαταλύτης στην αγορά και χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία. Τα πλεονεκτήματα της κυμαίνονται από θερμοσταθερότητα, στερεοεκλεκτικότητα και δραστηριότητα σε οργανικούς διαλύτες, για την αποδοχή εκτός του νερού και των πυρηνόφιλων (Lifetech 2013). Το *Novozyme 435* αποτελείται από μακροπορώδες ακρυλική ρητίνη (Cabrera et al. 2009)

1.11.2 Ζυμομύκητας *Candida rugosa*

Ο *Candida rugosa* παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον και έχει μελετηθεί εκτεταμένα όσον αφορά την έκκριση της λιπάσης του. Αποτελεί μια ζύμη μη – σπορογονική, ψευδο νηματοειδή, μονοκυτταρική και μη παθογόνα. Συνθέτει και εκκρίνει ένα μίγμα ισοενζύμων λιπάσης, που έχουν μελετηθεί από διάφορους συγγραφείς με στόχο την κάθαρση και τον χαρακτηρισμό τους, προκειμένου να προωθηθεί η χρήση τους στην βιομηχανία.

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε λιπάση από *C. rugosa* ακινητοποιημένη σε 5 υποστρώματα. Τα υλικά ακινητοποίησης ήταν το *Accurel MP 1000*, ένα πολύ υδρόφοβο μικροπορώδες πολυμερές του προπυλενίου (Manoel et al. 2015), το *Lifetech ECR8285M*, πολυμερές εποξειδικού / μεθακρυλικού βουτυλίου το οποίο αποτελείται από μια υδρόφοβη μήτρα λόγω της παρουσίας των ομάδων του βουτυλίου. Επίσης, το *Lifetech AP1090M* με δομή πολυμερούς μακρόπορου στυρένιου, *Lifetech ECR1030M* ένα DVB / μεθακρυλικό πολυμερές, το οποίο είναι ένα DVB-διασυνδεδεμένο πολυμερές με μεθακρυλικούς εστέρες (Anon 2016b; Anon 2016a; Basso 2015) και το *Lewatit VP OC 1600* είναι ένα μακροπορώδες, DVB-διασυνδεδεμένο πολυμερές σε μορφή σφαιριδίων, ενωμένο σε μεθακρυλικούς εστέρες (βάση) (Rodrigues et al. 2016; Rev 2008)

2 ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΥΛΙΚΑ

Κατά την υλοποίηση της μελέτης αυτής χρησιμοποιήθηκαν το γαλακτικό οξύ και η αιθανόλη ως υποστρώματα σε μια αντίδραση εστεροποίησης χρησιμοποιώντας λιπάσες προς παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα. Παρόλα αυτά η αντίδραση αυτή μπορεί να καταλυθεί από μια ποικιλία υδροφοβικών και πολικών διαλυτών (Findrik et al. 2012). Επομένως χρησιμοποιήθηκαν οι φυσικής προέλευσης βίο-διαλύτες από φλούδες εσπεριδοειδών όπως αιθέριο έλαιο κόκκινου γκρέιπφρουτ (Red Grapefruit), Μαντόρας (Mandora), Βαλέντίας (Valencia) και Λεμονιού (Lemon), επίσης χρησιμοποιήθηκε έλαιο από βελόνες πεύκου (Pine needle oil), Δ - λιμονένιο (R –(+)- Limonene), εξάνιο (hexane) καθαρότητας 96 % και τολουόλιο (toluene) καθαρότητας ≥ 99.5 %, ως μέσα διεξαγωγής της αντίδρασης. Εξετάστηκαν διάφοροι παράμετροι με σκοπό να βρεθεί ο πιο αποδοτικός συνδυασμός για την αντίδραση, προς την μέγιστη παραγωγή του γαλακτικού αιθυλεστέρα.

2.1 Προετοιμασία διαλυμάτων αέριας χρωματογραφίας

Πραγματοποιήθηκε ενζυμική και μη ενζυμική αντίδραση εστεροποίησης σε φιαλίδια αέριας χρωματογραφίας μεταξύ γαλακτικού οξέος και αιθανόλης σε τελικό όγκο 1.8 mL. Από την βιβλιογραφία γνωρίζουμε ότι η ζύμωση του τυρόγαλου που περιέχει 55 g / L λακτόζη, μπορεί να αποδώσει μια συγκέντρωση περίπου 0.5 M των εκάστων προϊόντων (Koutinas et al. 2014). Επομένως αρχικά εξετάστηκε η απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα που μπορεί να δώσουν 0.5 M γαλακτικού οξέος και αιθανόλης και στην συνέχεια μελετήθηκαν και οι συγκεντρώσεις 1.0, 0.1 και 0.01 M γαλακτικού οξέος. Πραγματοποιήθηκε επίσης χρήση διάφορων διαλυτών και ενζύμων, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις τόσο των διαλυτών όσο και των ενζύμων. Τα διαλύματα τοποθετούνταν σε επωαστήρα μοντέλου *Stuart Orbital Incubator SH6000* στους 30 °C και 100 rpm για 24 ημέρες.

2.1.1 Ζύγιση ενζύμων

Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν λιπάσες από *Candida antarctica* ακινητοποιημένο σε ένα υπόστρωμα (*Novozyme 435*) και από *Candida rugosa* ακινητοποιημένα σε πέντε διαφορετικά υποστρώματα (*Accurel MP 1000*, *Lifetech AP1090M*, *Lifetech ECR1030M*, *Lifetech ECR8285M* και *Lewatit VP OC 1600*). Για τα ακόλουθα πειράματα χρειάστηκε να

ζυγιστούν με ηλεκτρονικό ζυγό ακριβείας, μοντέλου *KERN ABJ – NM/ABS – N*, 3 διαφορετικές ποσότητες ενζύμων, που αντιστοιχούν σε συγκεντρώσεις 10, 13.5 και 6.7 mg / mL.

2.1.2 . Προετοιμασία διαλυμάτων αέριας χρωματογραφίας σε βίο-διαλύτες και τολουόλιο

Στο πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε ενζυμική και μη ενζυμική αντίδραση εστεροποίησης με το ένζυμο *Novozyme 435*. Για τον κάθε διαλύτη (βίο-διαλύτες και τολουόλιο) παρασκευάστηκαν 3 διαλύματα σε φιαλίδια τελικού όγκου 1.8 mL. Στο πρώτο φιαλίδιο περιέχονταν 1.8 mL διαλύτη, στο δεύτερο φιαλίδιο (πείραμα ελέγχου) περιέχονταν 0.055 mL αιθανόλη, 0.065 mL γαλακτικό οξύ και το υπόλοιπο διαλύτη και το τρίτο φιαλίδιο περιείχε 10 mg / mL ενζύμου, 0.055 mL αιθανόλη, 0.065 mL γαλακτικό οξύ και 1.68 mL διαλύτη.

Από τους βίο-διαλύτες λόγω αποδοτικότητας, επιλέχθηκε το αιθέριο έλαιο λεμονιού (*Lemon*) για να εξεταστεί σε συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος 0.01 και 1 M. Στην πρώτη περίπτωση η ποσότητα γαλακτικού οξέος και η συγκέντρωση ενζύμου που προσθέτονταν ήταν 1.34×10^{-3} mL και 6.7 mg / mL αντίστοιχα, για το κάθε διάλυμα συμπληρώνονταν ο κατάλληλος όγκος αιθέριου ελαίου. Στην δεύτερη περίπτωση άλλαξε η ποσότητα προσθήκης γαλακτικού οξέος, όπου προσθέτονταν 0.134 mL γαλακτικό οξύ.

2.1.3 Προετοιμασία διαλυμάτων αέριας χρωματογραφίας σε εξάνιο

Όσο αφορά το εξάνιο πραγματοποιήθηκαν 5 πειράματα με ενζυμική και μη ενζυμική αντίδραση εστεροποίησης χρησιμοποιώντας τα πιο πάνω ένζυμα, διαφορετικών συγκεντρώσεων γαλακτικού οξέος και λιπάσης.

2.1.3.1 Συγκέντρωση 10 % w / w των υποστρωμάτων της λιπάσης

Στο πρώτο πείραμα πραγματοποιήθηκε ενζυμική και μη ενζυμική αντίδραση μεταξύ γαλακτικού οξέος και αιθανόλης συγκέντρωσης 0.5 M σε τελικό όγκο 1.8 mL. Η συγκέντρωση της λιπάσης αποτελούσε το 10 % w / w των υποστρωμάτων της. Επομένως η συγκέντρωση της στο διάλυμα ήταν 10 mg / mL.

2.1.3.2 Συγκέντρωση 20 % w / w των υποστρωμάτων της λιπάσης

Το δεύτερο πείραμα μελέτησε την επίδραση στην ενζυμική αντίδραση εστεροποίησης μεταβάλλοντας τον παράγοντα της συγκέντρωσης της λιπάσης. Η συγκέντρωση που προστίθετο στο διάλυμα ήταν 13.5 mg / mL.

2.1.3.3 Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 0.1 M

Για το τρίτο πείραμα μελετήθηκε η αντίδραση ενζυμικής και μη ενζυμικής εστεροποίησης αλλάζοντας τον παράγοντα της συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος σε 0.1 M. Η συγκέντρωση της λιπάσης ήταν 6.7 mg / mL και η ποσότητα γαλακτικού οξέος στα διαλύματα 1.8×10^{-4} mL γαλακτικό.

2.1.3.4 Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 0.01 M

Το τέταρτο πείραμα εξέταζε την αντίδραση ενζυμικής και μη ενζυμικής εστεροποίησης με 0.01 M γαλακτικό οξύ, επομένως τα διαλύματα περιείχαν 1.34×10^{-3} mL γαλακτικό οξύ. Λόγω του ότι η απόδοση της λιπάσης ακινητοποιημένης σε 5 υποστρώματα ήταν χαμηλή σε σχέση με το *Novozyme 435*, προχωρήσαμε μόνο με την χρήση του *Novozyme 435* με συγκέντρωση 6.7 mg / mL για την επιτάχυνση της αντίδρασης.

2.1.3.5 Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 1 M

Στο πέμπτο πείραμα μελετήθηκε η αντίδραση ενζυμικής και μη ενζυμικής εστεροποίησης αλλάζοντας πάλι την συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος σε 1.0 M. Δηλαδή σε αυτή την περίπτωση το κάθε διάλυμα περιείχε 0.134 mL γαλακτικό οξύ.

2.2 Χρήση Αέριας Χρωματογραφίας (gas chromatography, GC)

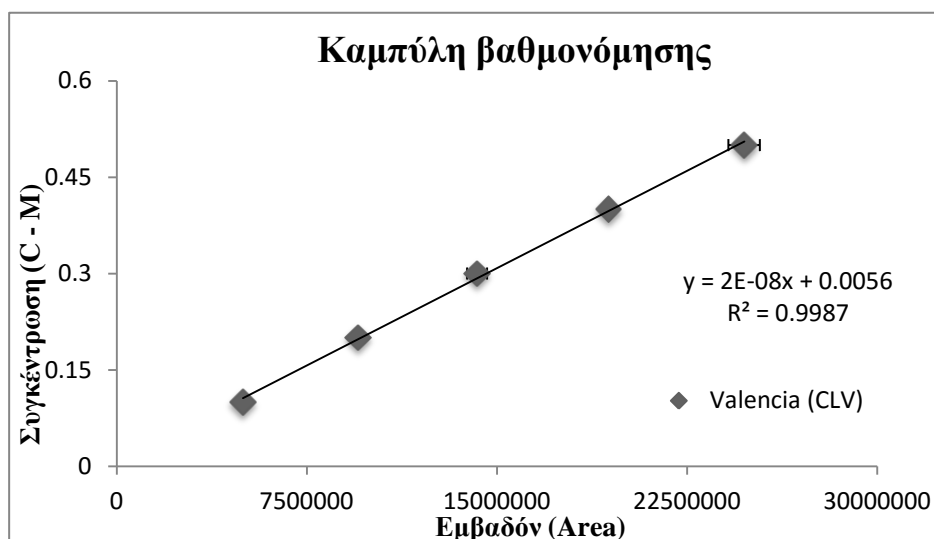
Μέσω της τεχνικής της αέριας χρωματογραφίας (gas chromatography, GC) πραγματοποιήθηκε η ανάλυση των δειγμάτων πτητικών οργανικών ενώσεων, ως η πλέον αρμόδια τεχνική για τον ποσοτικό και ποιοτικό προσδιορισμό τέτοιου είδους δειγμάτων. Στον αέριο χρωματογράφο με μοντέλο *GC 2014 SHIMADZU* ενωμένο με *ανιχνευτή ιονισμού φλόγας* (Flame Ionization Detector, FID), το δείγμα μετακινείται στον εισαγωγέα (AOC-20i), με όγκο έγχυσης 1 μ L, όπου εξατμίζεται και εγχέεται μέσω του εκάστοτε διαλύτη στην κεφαλή μιας χρωματογραφικής στήλης (στατική φάση) με μοντέλο *Zebtron ZB-5* και διαστάσεις 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m (μήκος x εσωτερική διάμετρος x πάχος φιλμ), καθώς μεταφέρεται από κινούμενο αδρανές αέριο (κινητή φάση), το άζωτο.

Η κάθε μέθοδος βαθμονομήθηκε με την προπαρασκευή και ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων γαλακτικού αιθυλεστέρα διαφόρων συγκεντρώσεων στον εκάστοτε διαλύτη. Από τα εμβαδά των κορυφών που προέκυψαν των αντίστοιχων συγκεντρώσεων στον χρόνο κατακράτησης

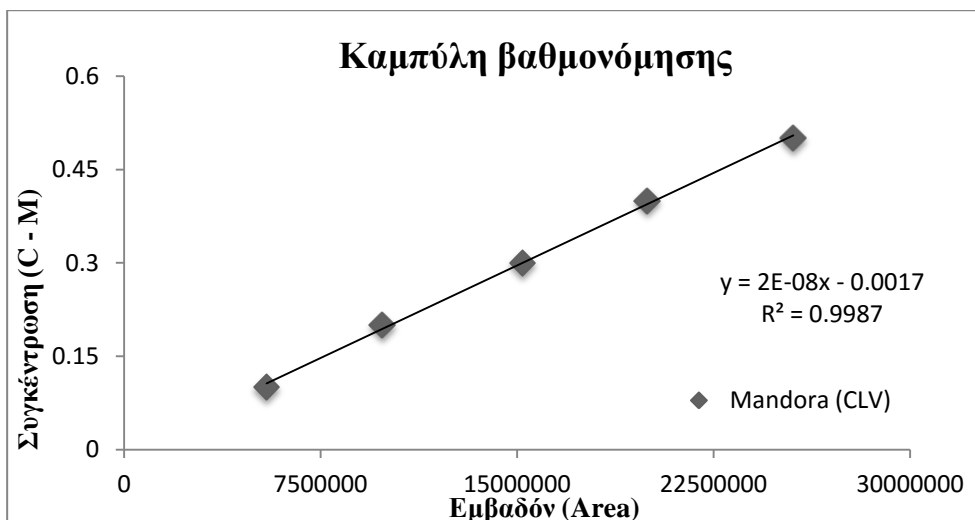
του γαλακτικού αιθυλεστέρα για τον κάθε διαλύτη κατασκευάστηκαν οι καμπύλες βαθμονόμησης

2.2.1 Προσδιορισμός γαλακτικού αιθυλεστέρα με την χρήση διαλυτών από φλούδες εσπεριδοειδών (Citrus Peel Oils)

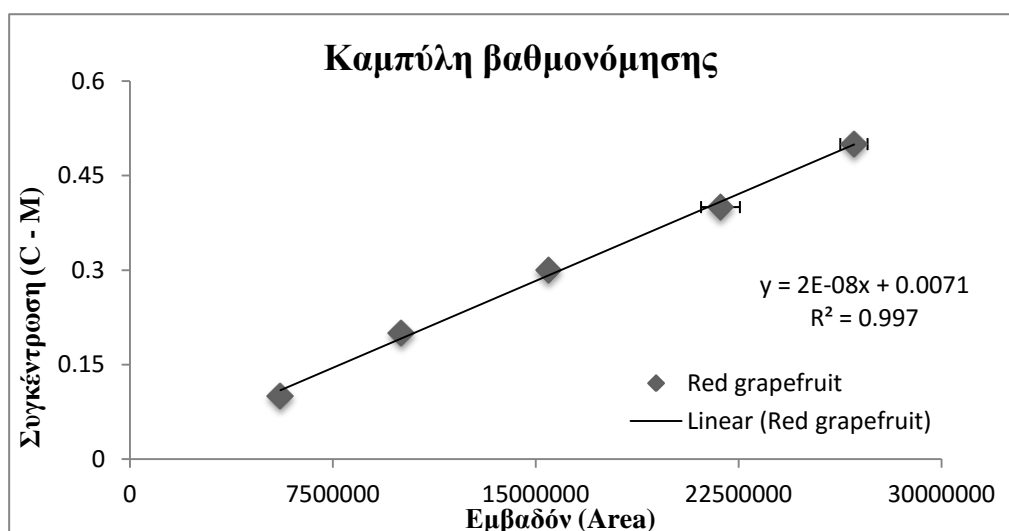
Στην συγκεκριμένη μέθοδο του αεριοχρωματογραφικού προσδιορισμού του γαλακτικού αιθυλεστέρα η συνολική ροή του φέρον αέριου ήταν 20 mL/min και η ροή στη στήλη 1.34 mL/min. Ως κατώτατα και ανώτατα θερμοκρασιακά όρια της μεθόδου επιλέχθηκαν οι 120.0 και 180.0 °C αντίστοιχα, ενώ ο ρυθμός ανόδου της θερμοκρασίας στο εύρος αυτό, ρυθμίστηκε στους 40 °C/min. Ο χρόνος παραμονής στους 120.0°C καθορίστηκε στα 2 min ενώ ο αντίστοιχος χρόνος παραμονής στους 180.0 °C καθορίστηκε στο 1 min. Η καμπύλες βαθμονόμησης για τον κάθε διαλύτη παρουσιάζονται πιο κάτω (Διάγραμμα 4, Διάγραμμα 5, Διάγραμμα 6 και Διάγραμμα 7).



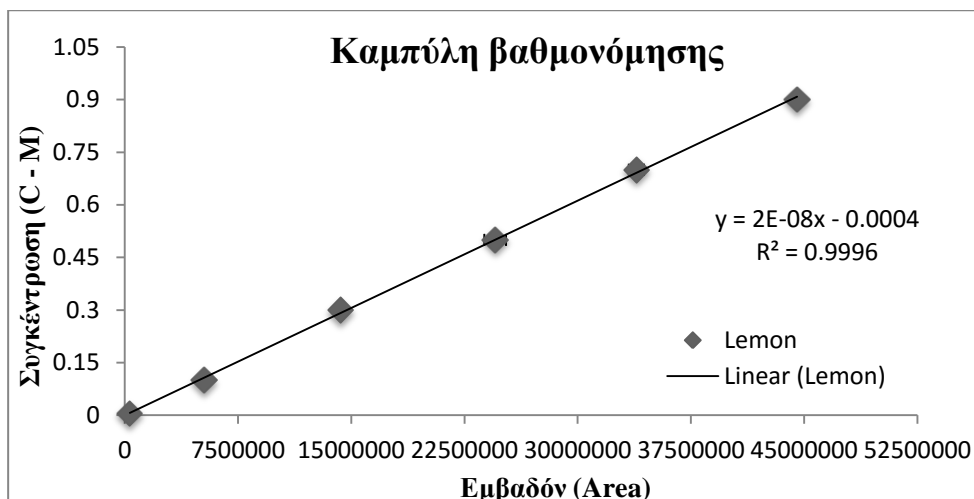
Διάγραμμα 4: Καμπύλη βαθμονόμησης σε έλαιο βαλέντσιας (Valencia peel oil) με $t_{R \text{ ethyl lactic}} = 1.762$. Στο γράφημα φαίνεται η εξίσωση της καμπύλης και η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 , μέσω της οποίας φανείτε να είναι σχεδόν γραμμική.



Διάγραμμα 5: Καμπύλη βαθμονόμησης σε έλαιο μαντόρας (Mandora peel oil) με $t_{R \text{ ethyl lactic}} = 1.759$. Στο γράφημα φαίνεται η εξίσωση της καμπύλης και η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 , μέσω της οποίας φανείτε να είναι σχεδόν γραμμική



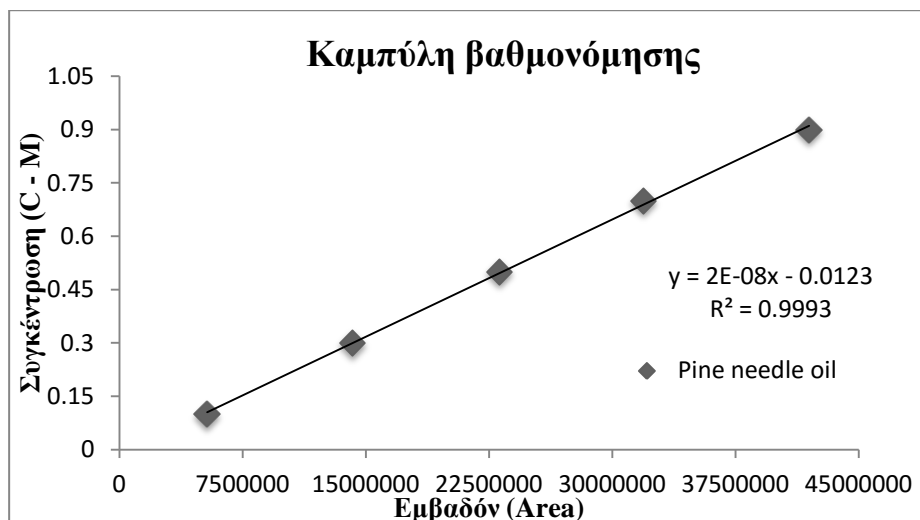
Διάγραμμα 6: Καμπύλη βαθμονόμησης σε έλαιο κόκκινου γκρέιπφρουτ (Red Grapefruit peel oil) με $t_{R \text{ ethyl lactic}} = 1.768$. Στο γράφημα φαίνεται η εξίσωση της καμπύλης και η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 , μέσω της οποίας φανείτε να είναι σχεδόν γραμμική



Διάγραμμα 7: Καμπύλη βαθμονόμησης σε έλαιο λεμονιού (Lemon peel oil) με $t_{R \text{ ethyl lactic}} = 1.766$. Στο γράφημα φαίνεται η εξίσωση της καμπύλης και η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 , μέσω της οποίας φανείτε να είναι σχεδόν γραμμική

2.2.2 Προσδιορισμός γαλακτικού αιθυλεστέρα με την χρήση ελαίου από βελόνες πεύκου (Pine needle oil)

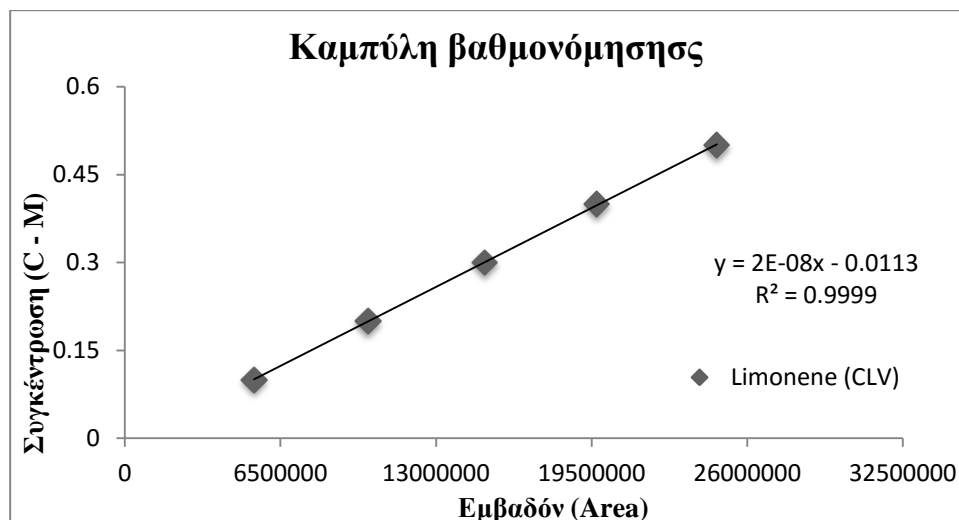
Σε αυτή την μέθοδο το φέρον αέριο είχε συνολική ροή 20 mL/min και ροή στη στήλη 1.30 mL/min. Ως κατώτατα και ανώτατα θερμοκρασιακά όρια της μεθόδου επιλέχθηκαν οι 140.0 και 220.0 °C αντίστοιχα, ενώ ο ρυθμός ανόδου της θερμοκρασίας στο εύρος αυτό, ρυθμίστηκε στους 30 °C/min. Ο χρόνος παραμονής στους 140.0°C καθορίστηκε στα 1 min ενώ δεν χρειάστηκε χρόνος παραμονής στους 220.0 °C. Η καμπύλη βαθμονόμησης δίνεται στο Διάγραμμα 8.



Διάγραμμα 8: Καμπύλη βαθμονόμησης σε έλαιο από βελόνες πεύκου (Pine needle oil) με $t_{R \text{ ethyl lactic}} = 1.607$. Στο γράφημα φαίνεται η εξίσωση της καμπύλης και η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 , μέσω της οποίας φανείτε να είναι σχεδόν γραμμική

2.2.3 Προσδιορισμός γαλακτικού αιθυλεστέρα με την χρήση Δ – λιμονένιο (R -(+)-limonene)

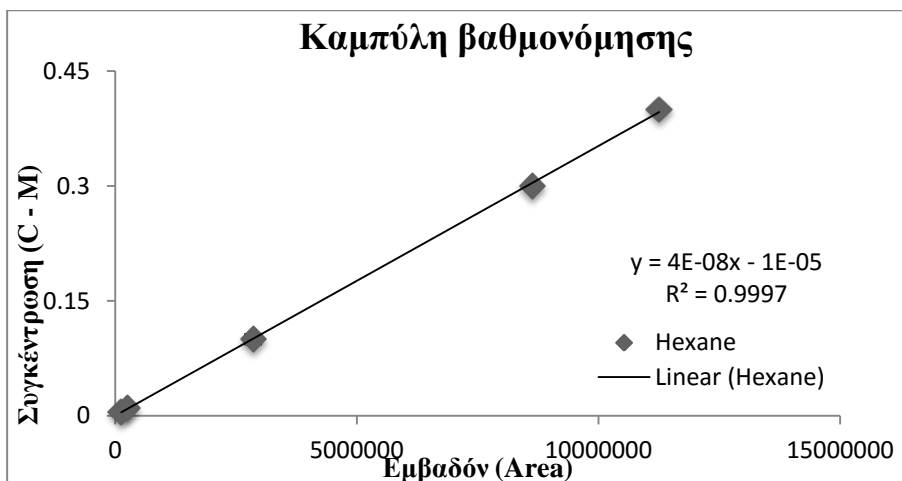
Κατά τον αεριοχρωματογραφικό προσδιορισμό γαλακτικού αιθυλεστέρα με την χρήση Δ – λιμονένιο το φέρον αέριο είχε συνολική ροή 20 mL/min και ροή στη στήλη 1.34 mL/min. Ως κατώτατα και ανώτατα θερμοκρασιακά όρια της μεθόδου επιλέχθηκαν οι 120.0 και 180.0 °C αντίστοιχα, ενώ ο ρυθμός ανόδου της θερμοκρασίας στο εύρος αυτό, ρυθμίστηκε στους 40 °C/min. Ο χρόνος παραμονής στους 120.0°C καθορίστηκε στα 2 min ενώ ο αντίστοιχος χρόνος παραμονής στους 180.0 °C καθορίστηκε στο 1 min.



Διάγραμμα 9: Καμπύλη βαθμονόμησης σε Δ - λιμονένιο (R –(+)- limonene needle oil) με $t_{R \text{ ethyl lactic}} = 1.758$. Στο γράφημα φαίνεται η εξίσωση της καμπύλης και μια πάρα πολύ καλή τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 , μέσω της οποίας φανείτε η γραμμικότητα της καμπύλης

2.2.4 Προσδιορισμός γαλακτικού αιθυλεστέρα με την χρήση εξανίου (hexane)

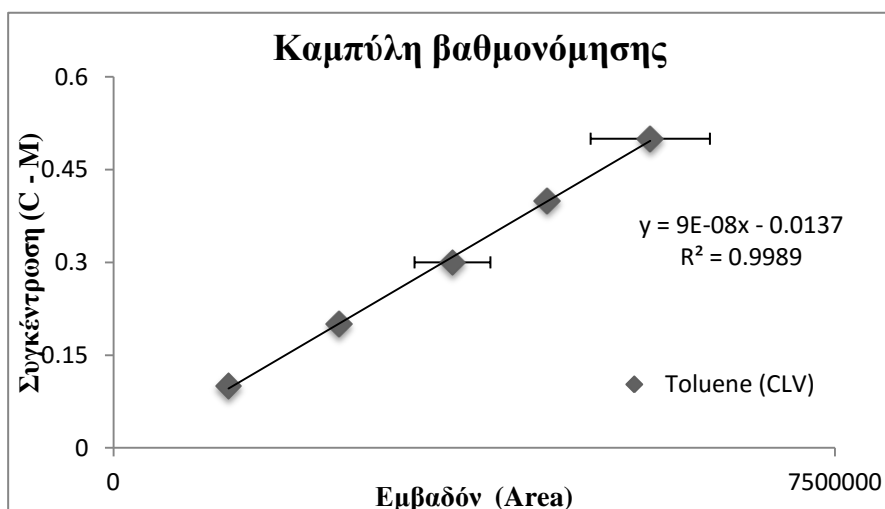
Στην μέθοδο με το εξάνιο, συνολική ροή του φέρον αέριου ήταν 44.6 mL/min και η ροή στη στήλη 1.66 mL/min. Ως κατώτατα και ανώτατα θερμοκρασιακά όρια της μεθόδου επιλέχθηκαν οι 50 και 160.0 °C αντίστοιχα, ενώ ο ρυθμός ανόδου της θερμοκρασίας στο εύρος αυτό, ρυθμίστηκε στους 30.00 °C/min. Ο χρόνος παραμονής στους και για τις δύο θερμοκρασίες καθορίστηκε στο 1 min. Στο Διάγραμμα 7 αποδίδεται η καμπύλη βαθμονόμησης του.



Διάγραμμα 10: Καμπύλη βαθμονόμησης σε εξάνιο (hexane) με $t_{R \text{ ethyl lactic}} = 2.299467$. Στο γράφημα φαίνεται η εξίσωση της καμπύλης και μια πάρα πολύ καλή τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 , μέσω της οποίας φανείτε η γραμμικότητα της καμπύλης

2.2.5 Προσδιορισμός γαλακτικού αιθυλεστέρα με την χρήση τολουολίου (toluene)

Το φέρον αέριο, σε αυτή την μέθοδο, είχε συνολική ροή 80.0 mL/min και ροή στη στήλη 1.54 mL/min. Ως κατώτατα και ανώτατα θερμοκρασιακά όρια της μεθόδου επιλέχθηκαν οι 90 και 160.0 °C αντίστοιχα, ενώ ο ρυθμός ανόδου της θερμοκρασίας στο εύρος αυτό, ρυθμίστηκε στους 30.00 °C/min. Δεν καθορίστηκε χρόνος παραμονής στους 50°C ενώ στους 160.0 °C ο χρόνος παραμονής καθορίστηκε στο 1 min.



Διάγραμμα 11: Καμπύλη βαθμονόμησης σε τολουόλιο (toluene) με $t_{R \text{ ethyl lactic}} = 1.946$. Στο γράφημα φαίνεται η εξίσωση της καμπύλης και η τιμή του συντελεστή προσδιορισμού R^2 , μέσω της οποίας φανείτε να είναι σχεδόν γραμμική

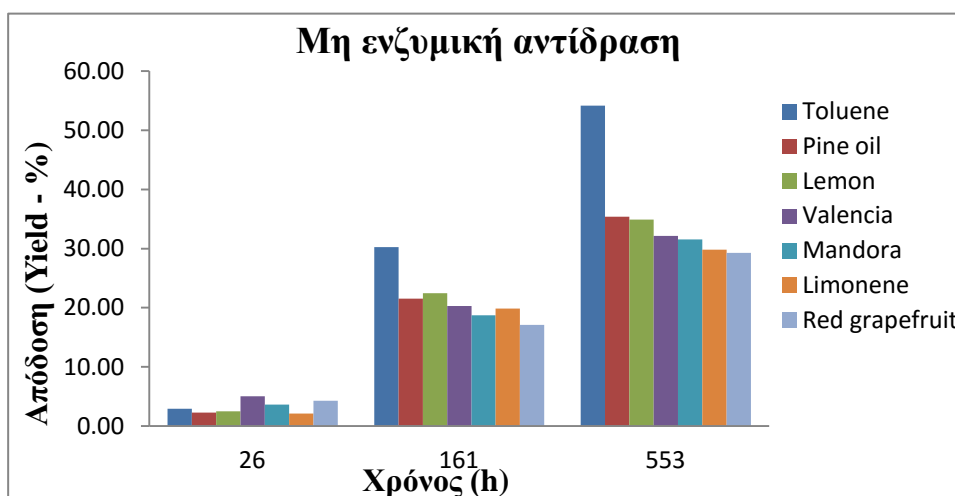
3 ΑΝΑΛΥΣΗ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

3.1 Σκοπός των πειραμάτων

Με το τέλος των πειραμάτων, αφού έχουν αναπτυχθεί οι κατάλληλες πειραματικές διατάξεις, σε αυτή τη Θεματική Ενότητα, μαζεύονται όλα τα πειραματικά δεδομένα και τα αποτελέσματα από το κάθε πείραμα. Παρουσιάζονται τα σχετικά διαγράμματα και πίνακες και γίνεται συζήτηση γύρω από τα παρατηρούμενα αποτελέσματα έτσι ώστε να καταλήξουμε σε λογικά συμπεράσματα. Σκοπός των συγκεκριμένων αυτών πειραμάτων, ήταν να μελετηθεί η μέγιστη απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα μέσω της αντίδρασης εστεροποίησης μεταξύ γαλακτικού οξέος και αιθανόλης, εξετάζοντας διάφορους παράγοντες.

3.2 Σύγκριση μεταξύ βιοδιαλυτών και τολουόλιο με απουσία σε σχέση με τον χρόνο (h)

Στο πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε μη ενζυμική αντίδραση εστεροποίησης του γαλακτικού οξέος και αιθανόλης 0.5 M, σε τελικό όγκο 1.8 mL. Πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις των διαλυμάτων στις 26, 161 και 553 ώρες. Μέσω των αποτελεσμάτων που συλλέχθηκαν πραγματοποιήθηκε διάγραμμα σύγκρισης της απόδοσης παραγωγής του γαλακτικού αιθυλεστέρα σε σχέση με τον χρόνο



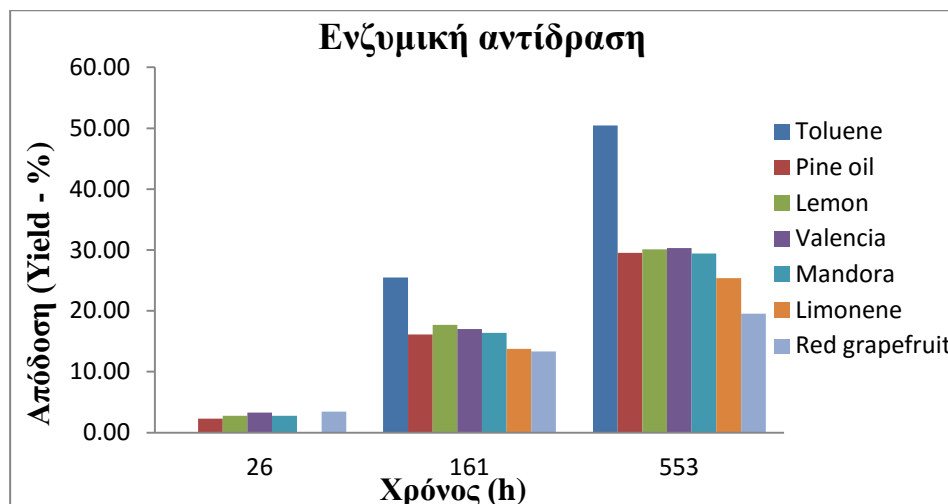
Διάγραμμα 12: Απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα μέσω μη ενζυμικής εστεροποίησης με την χρήση βιοδιαλυτών και τολουολίου συναρτήσει του χρόνου

Από το πιο πάνω διάγραμμα φαίνεται πως ο γαλακτικός αιθυλεστέρας συνεχίζεται να παράγεται και μέχρι τις 553 ώρες, όπου και η αντίδραση φτάνει στο σημείο ισορροπίας, με καλύτερη απόδοση να αποδίδεται από το τολουόλιο δίνοντας τιμή της συγκέντρωσης του γαλακτικού αιθυλεστέρα ίση με 0.271 M και απόδοση ίση με 54.2 %. Μετά ακολουθεί το έλαιο από βελόνες πεύκου με απόδοση 35.4 % και συγκέντρωση 0.177 M, το οποίο έχει μια σημαντική διαφορά από την απόδοση του τολουολίου. Γνωρίζουμε ότι έχουμε να κάνουμε με πολικά μόρια όσο αφορά τα αντιδρώντα μας (γαλακτικό οξύ και αιθανόλη). Τα αιθέρια έλαια, ως έλαια αποτελούνται από πολικές και μη πολικές ενώσεις, το μεγαλύτερο μέρος τους όμως είναι μη πολικό, που ίσως αυτό να μην βοηθά τόσο στην ενεργοποίηση της αντίδρασης εστεροποίησης και με το δεδομένο ότι είναι πτητικές ενώσεις μπορεί να εξατμίζονταν πριν προλάβουν να βοηθήσουν στην εξέλιξη της αντίδρασης.

Από την άλλη το τολουόλιο παρουσιάζει μια μικρή πολικότητα της τιμής 0.36 D, αυτό ίσως να βοηθά την ανάμειξη των αντιδρώντων με τον διαλύτη, επίσης, λόγω του ότι αποτελείται από δακτύλιο με διπλούς δεσμούς σχηματίζει μεγάλη ηλεκτρονιακή πυκνότητα, έχει ελεύθερα τροχιακά όπου μεταφέρονται τα ηλεκτρόνια, με πιθανό αποτέλεσμα να μπορεί να ενεργοποιήσει πιο εύκολα την αντίδραση.

3.3 Σύγκριση μεταξύ βιοδιαλυτών και τολουόλιο με παρουσία λιπάσης (Novozyme 345) σε σχέση με τον χρόνο (h)

Στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε η λιπάση *Novozyme 435* σε συγκέντρωση 10 mg / mL για την μελέτη ενζυμικής αντίδρασης εστεροποίησης του γαλακτικού οξέος και αιθανόλης διατηρώντας τις ίδιες συνθήκες με το πρώτο πείραμα. Στο διάγραμμα 13 παρουσιάζεται η πορεία απόδοσης της παραγωγής του γαλακτικού αιθυλεστέρα κατά τα χρονικά διαστήματα μέτρησης των διαλυμάτων.



Διάγραμμα 13: Απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα μέσω ενζυμικής (*Novozyme 435*) εστεροποίησης με την χρήση βιοδιαλυτών και τολουολίου συναρτήσεως του χρόνου

Το συγκεκριμένο ένζυμο χρησιμοποιήθηκε διότι στην βιβλιογραφικά αναφέρεται ευρέως για την χρήση του σε αντιδράσεις εστεροποίησης. Παρατηρείται παρόμοια συμπεριφορά με το πρώτο πείραμα, αφού ο γαλακτικός αιθυλεστέρας συνεχίζεται να παράγεται και μέχρι τις 553 ώρες. Το τολουόλιο εξακολουθεί να δίνει την μεγαλύτερη απόδοση με τιμή 50.4 % και συγκέντρωση γαλακτικού αιθυλεστέρα της τιμής 0.252 M και ακολουθεί το έλαιο από λεμόνι με τιμή απόδοσης 30.91 % και συγκέντρωση 0.151 M. πάλι η διαφορά μεταξύ του πρώτου και του δεύτερου φαίνεται να είναι μεγάλη.

3.4 Σύγκριση μεταξύ βιοδιαλυτών και τολουόλιο με παρουσία και απουσία λιπάσης.

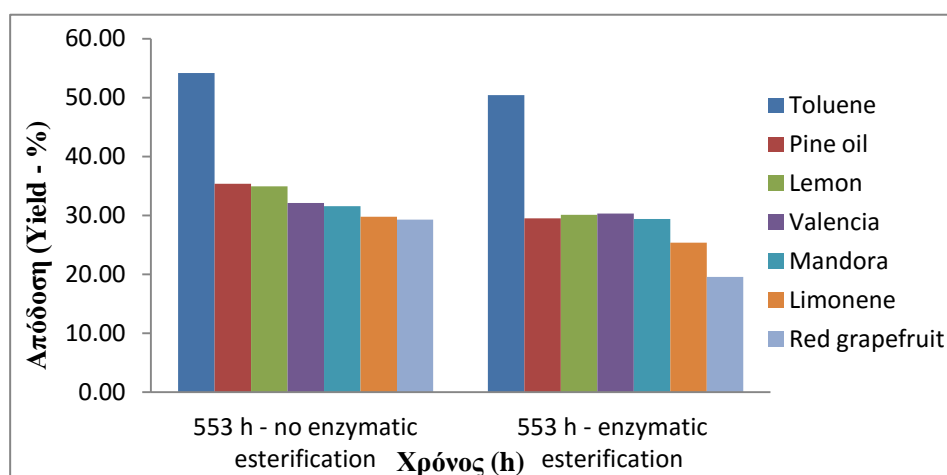
Από τα αποτελέσματα των δυο πειραμάτων έγινε σύγκριση της ενζυμικής και μη ενζυμικής αντίδρασης εστεροποίησης για την παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα για τις 553 ώρες. Ο πιο κάτω πίνακας αναγράφει τις αποδόσεις και συγκεντρώσεις του γαλακτικού αιθυλεστέρα οι οποίες αντιστοιχούν στις 553 ώρες.

Πίνακας 1: Αποτελέσματα συγκέντρωσης / απόδοσης γαλακτικού αιθυλεστέρα ενζυμικής και μη ενζυμικής αντίδρασης για τον κάθε διαλύτη στις 553 ώρες

| <u>ΔΙΑΛΥΤΕΣ</u> | <u>Μη ενζυμική</u> | | <u>Ενζυμική</u> | |
|-----------------|------------------------|-------------------|------------------------|-------------------|
| | Συγκέντρωση γαλακτικού | Απόδοση (Yield %) | Συγκέντρωση γαλακτικού | Απόδοση (Yield %) |
| | | | | |

| | αιθυλεστέρα (M) | 553 ώρες | αιθυλεστέρα (M) | 553 ώρες |
|-----------------|-----------------|----------|-----------------|----------|
| Red grapefruit | 0.146 | 29.3 | 0.098 | 19.5 |
| Lemon | 0.175 | 34.9 | 0.151 | 30.91 |
| Mandora | 0.158 | 31.6 | 0.147 | 29.4 |
| Valencia | 0.161 | 32.1 | 0.152 | 30.3 |
| Pine needle oil | 0.177 | 35.4 | 0.148 | 29.5 |
| Limonene | 0.149 | 29.8 | 0.127 | 25.4 |
| Toluene | 0.271 | 54.2 | 0.252 | 50.4 |

Από τα αποτελέσματα του πίνακα πραγματοποιήθηκε διάγραμμα σύγκρισης του κάθε διαλύτη σε σχέση με την απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα και τον χρόνο. Το διάγραμμα αυτό παρουσιάζεται πιο κάτω



Διάγραμμα 14: Απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα μέσω ενζυμικής και μη ενζυμικής αντίδρασης, με την χρήση βιοδιαλυτών και τολουολίου σε σχέση με τον χρόνο

Όσο αφορά τους διαλύτες, παρατηρείται ξεκάθαρα πως το τολουόλιο αποδίδει την μεγαλύτερη συγκέντρωση γαλακτικού αιθυλεστέρα σε σχέση με τους βιοδιαλύτες, με τιμή 0.271 M (54.2 %) με απουσία της λιπάσης και 0.252 M (50.4 %) με λιπάση, λίγο πιο υψηλές αποδόσεις αναφέρονται και στο άρθρο (Koutinas et al. 2014). Οι λιπάσες χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό να επιταχυνθεί η αντίδραση, το γεγονός ότι, οι αποδόσεις μειώνονται ελαφρώς με την χρήση τους στα συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα μπορεί να σχετίζεται στην δυσκολία

εγκλιματισμού της λιπάση στο περιβάλλον που το εντάξαμε. Είναι επίσης πιθανόν οι συγκεκριμένοι διαλύτες να καταστέλλουν την δράση της λιπάσης

Ουσιαστικά βλέπουμε ότι οι αποδόσεις είναι χαμηλές, εκτός από το τολουόλιο. Από βιβλιογραφία όμως γνωρίζουμε ότι το τολουόλιο έχει την τάση από κάποιο σημείο και μετά, να μειώνει την δράση του ενζύμου, καθίσταται τοξικό για το ένζυμο (Yang et al. 1994; Kraai et al. 2008). Έτσι δημιουργήθηκε η ανάγκη να εξεταστεί και άλλος διαλύτης. Στην βιβλιογραφία (Kharrat et al. 2011) αναφέρεται η χρήση του εξάνιου σε αντίδραση εστεροποίησης μεταξύ βουτανόλης και ελαϊκού οξέος χρησιμοποιώντας ακινητοποιημένη λιπάση, έχοντας ως μέγιστη απόδοση 80 % ελαϊκού εστέρα βουτυλίου. Γι αυτό τον λόγο προχωρήσαμε προς την διεξαγωγή πειραμάτων χρησιμοποιώντας το εξάνιο ως μέσω διεξαγωγής της αντίδρασης, ο οποίος έχει αποδειχτεί να είναι ένας καλός διαλύτης για αντιδράσεις εστεροποίησης (From et al. 1997; Valivety et al. 1991).

3.5 Σύγκριση μεταξύ συγκέντρωσης βιοκαταλύτη 10 και 20 % w/w των υποστρωμάτων της αντίδρασης σε εξάνιο

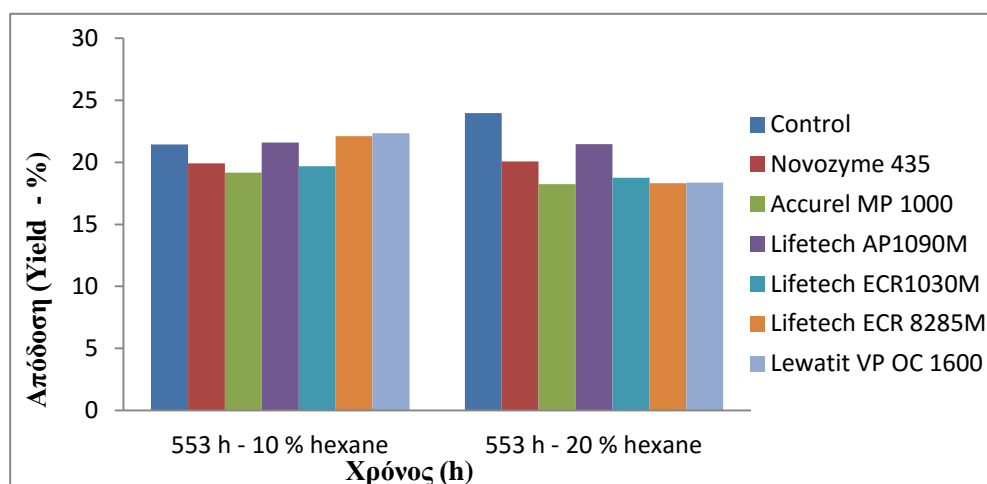
Σε αυτά τα πειράματα η ίδια αντίδραση πραγματοποιήθηκε εξετάζοντας όμως και την δράση της λιπάσης του ζυμομύκητα *C. rugosa* ακινητοποιημένη σε 5 διαφορετικά υποστρώματα (*Accurel MP 1000*, *Lifetech AP1090 M*, *Lifetech ECR1030 M*, *Lifetech ECR8285 M* και *Lewatit VP OC 1600*). Η διαφορά των δυο πειραμάτων ήταν η συγκέντρωση του ενζύμου, η οποία ήταν 6.7 και 13.5 mg / mL για το 10 και 20 %, αντίστοιχα. Και για τις δυο περιπτώσεις υπήρχε το πείραμα ελέγχου, δηλαδή, η μη ενζυμική αντίδραση, ώστε να φανεί αν τα ένζυμα λειτουργούν θετικά προς την αντίδραση. Η αντίδραση εστεροποίησης και στις δύο περιπτώσεις συνεχιζόταν μέχρι τις 553 ώρες. Τα αποτελέσματα της απόδοσής και της συγκέντρωσης γαλακτικού αιθυλεστέρα για 553 ώρες φαίνονται στον Πίνακα 2

Πίνακας 2: Αποτελέσματα συγκέντρωσης / απόδοσης γαλακτικού αιθυλεστέρα 10 και 20 % w/w των υποστρωμάτων της αντίδρασης σε εξάνιο για τις 553 ώρες

| | 20 % w/w υποστρωμάτων | | 10 % w/w υποστρωμάτων | |
|---------------------|--|------------------------------|--|------------------------------|
| | Συγκέντρωση γαλακτικού αιθυλεστέρα (M) | Απόδοση (Yield %) 553.0 ώρες | Συγκέντρωση γαλακτικού αιθυλεστέρα (M) | Απόδοση (Yield %) 553.0 ώρες |
| <i>ΛΙΠΑΣΕΣ</i> | | | | |
| <i>Novozyme 435</i> | 0.100 | 20.08 | 0.100 | 19.93 |

| | | | | |
|---------------------------|-------|-------|-------|-------|
| <i>Accurel MP 1000</i> | 0.091 | 18.24 | 0.096 | 19.17 |
| <i>Lifetech AP1090M</i> | 0.107 | 21.47 | 0.108 | 21.61 |
| <i>Lifetech ECR1030M</i> | 0.094 | 18.76 | 0.098 | 19.70 |
| <i>Lifetech ECR 8285M</i> | 0.092 | 18.33 | 0.111 | 22.12 |
| <i>Lewatit VP OC 1600</i> | 0.092 | 18.36 | 0.112 | 22.34 |
| Control | 0.120 | 23.96 | 0.107 | 21.43 |

Μέσω των αποδόσεων που βρήκαμε από το κάθε πείραμα πραγματοποιήθηκε διάγραμμα σύγκρισης της απόδοσης του γαλακτικού αιθυλεστέρα με τον χρόνο. Το διάγραμμα αυτό παρουσιάζεται πιο κάτω



Διάγραμμα 15: Απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα για 10 και 20 % w / w των υποστρωμάτων της αντίδρασης σε εξάνιο

Από την διεξαγωγή των πειραμάτων αυτών παρατηρούμε ότι γενικά με μικρότερη συγκέντρωση του ενζύμου, δηλ 6.7 mg / mL (10% w / w), η παραγωγή του γαλακτικού αιθυλεστέρα είναι σχετικά πιο μεγάλη στα πλείστα ένζυμα. Αυτό ίσως να οφείλεται στο ότι τα συγκεκριμένα ένζυμα δεν δρουν θετικά προς την επιτάχυνση της αντίδρασης, αυτό μπορεί να οφείλετε στο ότι το εξάνιο δεν αφήνει τα αντιδρώντα να φτάσουν στο ένζυμο, διότι πιθανότερα να μην αντιδρά καλά με τους φορείς ακινητοποίησης. Επιπλέον μπορεί ο διαλύτης αυτός να είναι τοξικός προς τα ένζυμα και να καταστέλλει την ενεργότητα τους.

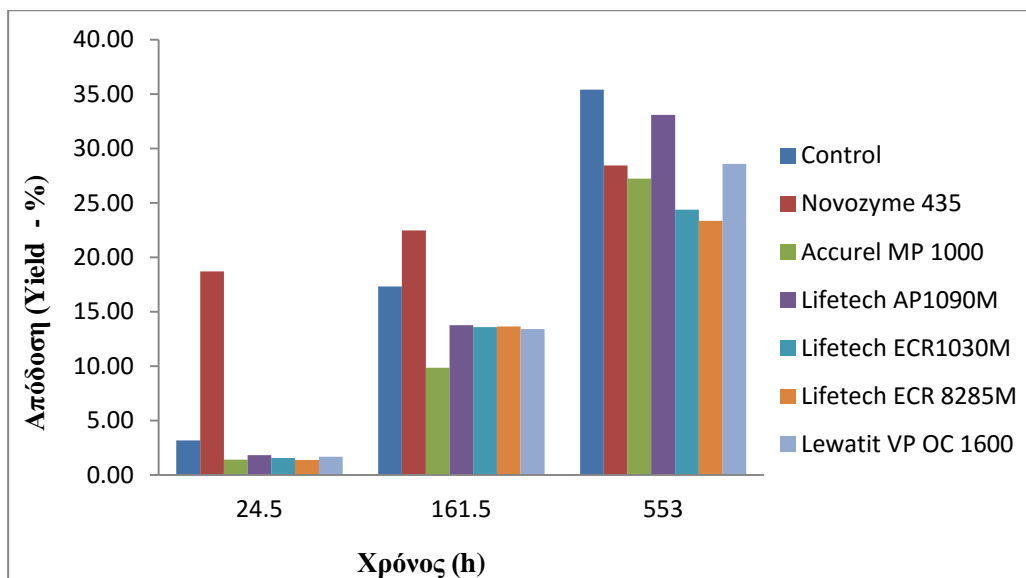
Ένας άλλος παράγοντας ο οποίος μπορεί να παίζει ρόλο είναι η φύση των αντιδρώντων μας όσο αφορά την φύση των λιπάσεων. Για παράδειγμα το γαλακτικό οξύ είναι ένα υδρόφιλο μόριο λόγω της ομάδας υδροξυλίου (OH^-), από την άλλη τα μέσα ακινητοποίησης της λιπάσης είναι υδρόφοβα. Επομένως στην διαδικασία ένωσης του υποστρώματος (γαλακτικό οξύ) με το ενεργό κέντρο της λιπάσης, η λιπάση απωθείται από το υπόστρωμα με αποτέλεσμα να μην ευνοείται η αντίδραση και να μην δρα ευεργετικά η λιπάση προς την διεξαγωγή της αντίδρασης. Και γι' αυτό τον λόγο παρατηρούμε μειωμένη απόδοση σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις της λιπάσης.

Γενικά την καλύτερη απόδοση για το 10 % w / w την δίνει η λιπάση *Lewatit VP OC 1600* με τιμή 22.34 %, ενώ για 20 % w / w μεγαλύτερη απόδοση παρατηρήθηκε στο πείραμα ελέγχου με τιμή 23.96 % και μετά ακολουθεί η λιπάση *Lifetech AP1090M* με τιμή απόδοσης 21.47 %.

Παρόλα αυτά οι αποδώσεις συνεχίζουν να είναι χαμηλές ακόμη και για το πείραμα ελέγχου. Επομένως πραγματοποιήθηκαν και άλλα πειράματα με την μεταβολή στις συγκεντρώσεις του γαλακτικού οξέος για να βεβαιωθούμε ότι όντως το γαλακτικό οξύ επηρεάζει την δράση της λιπάσης.

3.6 Σύγκριση της απόδοσης γαλακτικού αιθυλεστέρα σε σχέση με τον χρόνο με συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 0.1 M

Σε αυτό το πείραμα εξετάστηκε η ενζυμική και μη ενζυμική αντίδραση εστεροποίησης μεταξύ 0.1 M γαλακτικού οξέος και 0.5 M αιθανόλης. Χρησιμοποιήθηκαν οι ίδιες λιπάσεις στην ίδια συγκέντρωση (6.7 mg / mL). Στο διάγραμμα 16 αποδίδεται η απόδοση του γαλακτικού αιθυλεστέρα για 24,5, 161,5 και 553 ώρες.



Διάγραμμα 16: Απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα συναρτήσει του χρόνου με συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 0.1 M

Παρατηρείτε συνεχής αύξηση της απόδοσης του γαλακτικού αιθυλεστέρα μέχρι και τις 553 ώρες. Την υψηλότερη απόδοση την δίνει η λιπάση του *Candida antarctica* (*Novozyme 435*) μέχρι τις 161.5 ώρες, ενώ έως τις 553 ώρες η απόδοση που δίνει το πείραμα ελέγχου για την παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα είναι μεγαλύτερη με τιμή 35.42 % (0.035 M). Επίσης την απόδοση του *Novozyme 435* (28.45 %) ξεπερνά και η λιπάση από *Candida rugosa* ακινητοποιημένη σε υλικό *Lifetech AP1090M* με τιμή 33.10 %. Αυτό μας υποδεικνύει ότι με την μείωση του γαλακτικού οξέος τα υδρόφοβα ένζυμα δρουν καλύτερα κατά την διάρκεια του πειράματος.

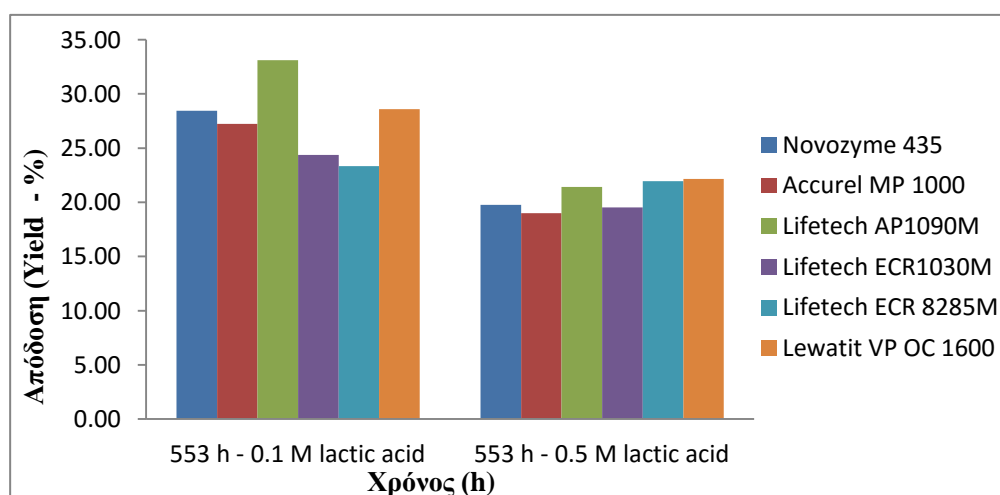
3.7 Σύγκριση μεταξύ 0.5 και 0.1 M γαλακτικού οξέος σε εξάνιο

Γίνεται σύγκριση μεταξύ της αντίδρασης που χρησιμοποιεί 0.5 M γαλακτικού οξέος με αυτή που χρησιμοποιεί 0.1 M γαλακτικό οξύ έτσι ώστε να φανεί εάν και κατά πόσο η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος επηρεάζει την απόδοση των λιπάσεων που χρησιμοποιούνται. Τα αποτελέσματα της απόδοσής και της συγκέντρωσης γαλακτικού αιθυλεστέρα για τις 553 ώρες, από τα δυο πειράματα, αποδίδονται στον Πίνακα 3.

Πίνακας 3: Αποτελέσματα συγκέντρωσης / απόδοσης γαλακτικού αιθυλεστέρα με 0.1 και 0.5 M γαλακτικού οξέος σε εξάνιο για τις 553 ώρες

| ΛΙΠΑΣΕΣ | Συγκέντρωση 0.1 M γαλακτικού οξέος | | Συγκέντρωση 0.5 M γαλακτικού οξέος | |
|---------------------------|--|------------------------------|--|------------------------------|
| | Συγκέντρωση γαλακτικού αιθυλεστέρα (M) | Απόδοση (Yield %) 553.0 ώρες | Συγκέντρωση γαλακτικού αιθυλεστέρα (M) | Απόδοση (Yield %) 553.0 ώρες |
| <i>Novozyme 435</i> | 0.028 | 28.45 | 0.100 | 19.93 |
| <i>Accurel MP 1000</i> | 0.027 | 27.24 | 0.096 | 19.17 |
| <i>Lifetech AP1090M</i> | 0.033 | 33.10 | 0.108 | 21.61 |
| <i>Lifetech ECR1030M</i> | 0.024 | 24.38 | 0.098 | 19.70 |
| <i>Lifetech ECR 8285M</i> | 0.023 | 23.35 | 0.111 | 22.12 |
| <i>Lewatit VP OC 1600</i> | 0.029 | 28.61 | 0.112 | 22.34 |

Από τα αποτελέσματα του πίνακα πραγματοποιήθηκε διάγραμμα σύγκρισης της κάθε λιπάσης σχέση με την απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα και τον χρόνο (553 ώρες) (Διάγραμμα 17)



Διάγραμμα 17: Απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα με 0.1 και 0.5 M γαλακτικού οξέος σε εξάνιο

Από το διάγραμμα 17 παρατηρούμε ότι με την μείωση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος η απόδοση του γαλακτικού αιθυλεστέρα αυξάνεται σημαντικά. Αυτό μας οδηγεί στο συμπέρασμα πως όντως το γαλακτικό οξύ εμποδίζει τις λιπάσες από το να καταλύσουν την αντίδραση. Το γαλακτικό οξύ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις είναι ικανό να καταστείλει την δράση των λιπάσεων, το πιο πιθανόν λόγω της καρβοξυλομάδας του που το καθιστά υδρόφιλο και απωθείται από τις υδρόφοβες λιπάσες. Για συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 0.1 M την καλύτερη απόδοση την δίνει η λιπάση από *Candida rugosa* (Lifetech AP1090M) με τιμή συγκέντρωσης γαλακτικού αιθυλεστέρα 0.033 M (33.10 %).

Οι αποδόσεις γενικά συνεχίζουν να είναι χαμηλές σε σχέση με αυτή του τολουολίου και με την αλλαγή της συγκέντρωσης του ενός αντιδρώντος. Ίσως το εξάνιο να έρχεται σε αντιπαράθεση με τα ένζυμα και να μην βοηθά στο να ενεργοποιήσουν και να επιταχύνουν την αντίδραση εστεροποίησης.

Παρόλα αυτά, αφού με την μείωση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος είδαμε πιο θετικά αποτελέσματα με την παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα να αυξάνεται, πραγματοποιήθηκαν περαιτέρω πειράματα με 0.01 και 1 M συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος τόσο στο εξάνιο όσο και στο έλαιο από λεμόνι έτσι ώστε να εξαγάγουμε καλύτερα αποτελέσματα και να δούμε εάν σε ακόμη μικρότερη συγκέντρωση η παραγωγή του διαλύτη είναι μεγαλύτερη και για να βεβαιωθούμε πως σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος η παραγωγή του ακόμη πιο μικρότερη.

Τα υπόλοιπα πειράματα συνεχίστηκαν μόνο με το *Novozyme 435* αφού αποτέλεσε το πιο αποτελεσματικό ένζυμο καθ' όλη την διάρκεια των πειραμάτων και είναι και η πιο διαδεδομένη λιπάση στην βιβλιογραφία για την διεξαγωγή αντιδράσεων εστεροποίησης.

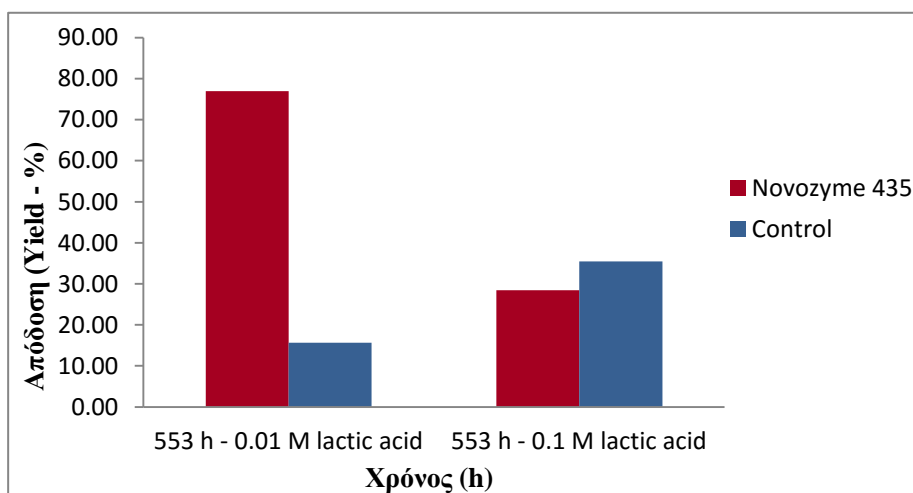
3.8 Σύγκριση μεταξύ 0.01 και 0.1 M γαλακτικού οξέος σε εξάνιο με την χρήση της λιπάσης από *Candida antarctica* (Novozyme 435)

Πραγματοποιήθηκε πείραμα στο οποίο χρησιμοποιήθηκε μόνο το *Novozyme 435* (6.7 mg / mL), στις ίδιες συνθήκες με τα προηγούμενα πειράματα με την διαφοροποίηση στην συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος. Επομένως χρησιμοποιήθηκε 0,01 M γαλακτικό οξύ σε ενζυμική και μη ενζυμική αντίδραση. Στον πιο κάτω πίνακα φαίνεται η σύγκριση της απόδοσης και συγκέντρωσης γαλακτικού αιθυλεστέρα με την χρήση 0.01 και 0.1 M γαλακτικού οξέος τόσο με την χρήση της λιπάσης όσο και χωρίς.

Πίνακας 4: Αποτελέσματα συγκέντρωσης / απόδοσης γαλακτικού αιθυλεστέρα με 0.01 και 0.1 M γαλακτικού οξέος σε εξάνιο με χρήση και χωρίς χρήση του *Novozyme 435* για τις 553 ώρες

| | Συγκέντρωση 0.01 M γαλακτικού οξέος | | Συγκέντρωση 0.1 M γαλακτικού οξέος | |
|---------------------|--|------------------------------|--|------------------------------|
| | Συγκέντρωση γαλακτικού αιθυλεστέρα (M) | Απόδοση (Yield %) 553.0 ώρες | Συγκέντρωση γαλακτικού αιθυλεστέρα (M) | Απόδοση (Yield %) 553.0 ώρες |
| <i>Novozyme 435</i> | 0.008 | 76.92 | 0.028 | 28.45 |
| <i>Control</i> | 0.002 | 15.68 | 0.035 | 35.42 |

Μέσω των αποτελεσμάτων που καταγράφονται στον πίνακα 4 πραγματοποιήθηκε διάγραμμα σύγκρισης της απόδοσης γαλακτικού αιθυλεστέρα για 0.01 και 0.1 M γαλακτικού οξέος (Διάγραμμα 18)



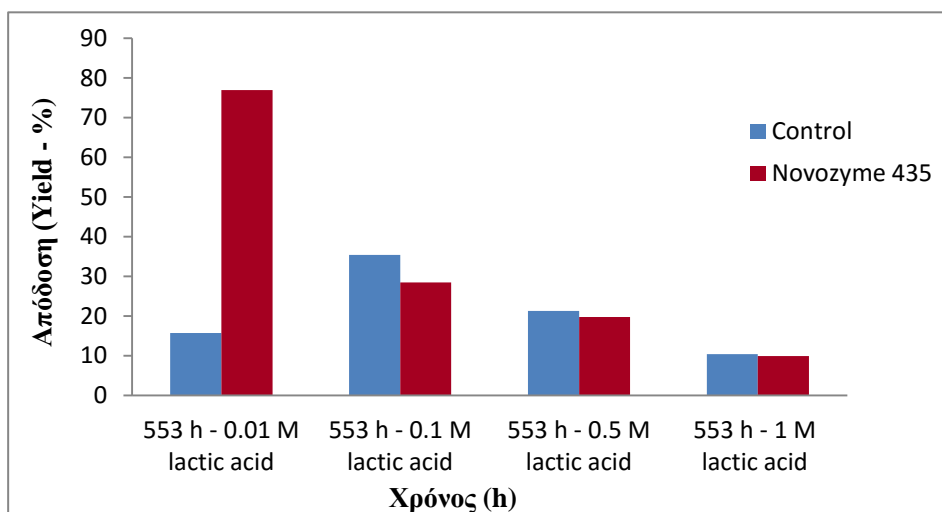
Διάγραμμα 18: Απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα με 0.1 και 0.5 M γαλακτικού οξέος σε εξάνιο

Εδώ φαίνεται ξεκάθαρα η μεγάλη διαφορά μεταξύ των δυο παραμέτρων. Στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε για την αντίδραση 0.01 M γαλακτικό οξύ, η απόδοση που αποδίδει το *Novozyme 435* είναι η υψηλότερη από όλες τις περιπτώσεις με τιμή απόδοσης ίση με 76.92 % ενώ ξεπερνά σημαντικά την παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα στο πείραμα ελέγχου. Τα αποτελέσματα αυτά διαπιστώνουν πως βασικό ρόλο στην μειωμένη απόδοση του γαλακτικού

αιθυλεστέρα στα προηγούμενα πειράματα έπαιξε η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος, αφού με μια σημαντική μείωση του φτάνουμε τις αποδόσεις στο 76.96 %.

3.9 Σύγκριση μεταξύ 1, 0.5, 0.1, και 0.01 M γαλακτικού οξέος σε εξάνιο

Πραγματοποιήθηκε ακόμα ένα τελευταίο πείραμα όσο αφορά το εξάνιο, με συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 1 M και χρήση της λιπάσης από *Candida antarctica* (*Novozyme 435*). Από τα αποτελέσματα που διεξαγάγαμε μέσω των πειραμάτων αυτών πραγματοποιήθηκε διάγραμμα στο οποίο συγκρίνεται η απόδοση του γαλακτικού αιθυλεστέρα που παράχθηκε τόσο για τις περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκε 1, 0.5, 0.1, 0.01 M γαλακτικό οξύ με χρήση και χωρίς χρήση του ενζύμου.



Διάγραμμα 19: Απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα με συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος 1, 0.5, 0.1, 0.01 με την χρήση και χωρίς την χρήση του *Novozyme 435* για τις 553 ώρες

Με την αύξηση της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος σε 1 M παρατηρείτε μείωση της παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα με τιμή απόδοσης ίση με 9.92 % για ενζυμική αντίδραση και 10.40 % για μη ενζυμική αντίδραση. Τόσο χωρίς αλλά τόσο και με το ένζυμο η απόδοση του γαλακτικού αιθυλεστέρα είναι η πιο μικρή από όλες τις μετρήσεις που συλλέχθηκαν για τις 553 ώρες σε όλα τα πειράματα. Παρατηρούμε και στο διάγραμμα πως όσο μειώνεται η συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος η απόδοση αυξάνεται. Αυτό οδηγεί στο συμπέρασμα τελικά πως σημαντικό ρόλο παίζει το γαλακτικό οξύ το οποίο δεν επιτρέπει στη λιπάση να πραγματοποιήσει την αντίδραση.

Το εξάνιο παρόλο που φάνηκε να δίνει θετικά αποτελέσματα για μικρές τιμές συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος δεν παύει να είναι οργανικός διαλύτης. Έτσι πραγματοποιήθηκαν πειράματα χρησιμοποιώντας ως μέσο διεξαγωγής της αντίδρασης το έλαιο από λεμόνι αφού φάνηκε να είναι ο πιο αποδοτικός διαλύτης χρησιμοποιώντας το *Novozyme 435*.

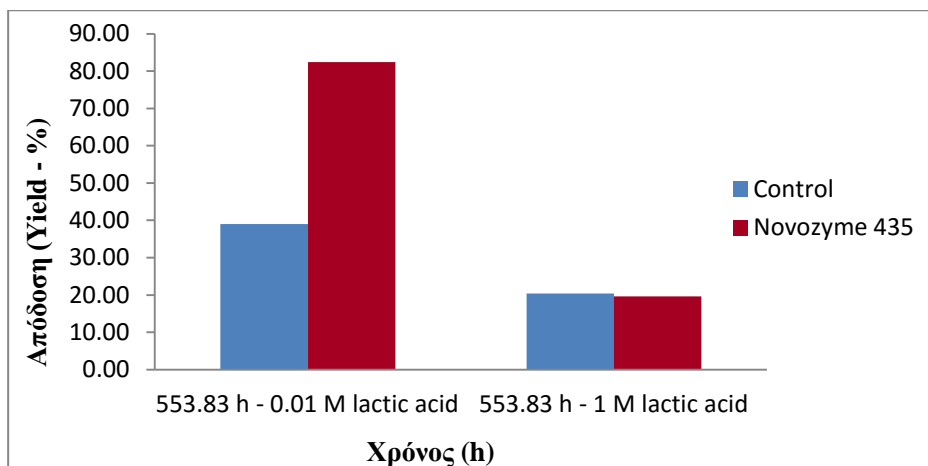
3.10 Σύγκριση μεταξύ 0.01, και 1 M γαλακτικού οξέος σε έλαιο λεμονιού με την χρήση λιπάσης (*Novozyme 435*)

Πραγματοποιήθηκαν ακριβώς τα ίδια πειράματα με τις ίδιες συνθήκες όπως τα προηγούμενα για 0.01 και 1 M γαλακτικού οξέος, με την μόνη διαφορά του μέσου διεξαγωγής της αντίδρασης αντί για εξάνιο χρησιμοποιήθηκε έλαιο από λεμόνι. Τα αποτελέσματα των αποδόσεων γαλακτικού αιθυλεστέρα σε αυτά τα πειράματα αποδίδονται στον πιο κάτω πίνακα.

Πίνακας 5: Αποτελέσματα συγκέντρωσης / απόδοσης γαλακτικού αιθυλεστέρα με 0.01 και 1 M γαλακτικού οξέος σε έλαιο λεμονιού με χρήση και χωρίς χρήση του *Novozyme 435* για τις 553 ώρες

| | Συγκέντρωση 0.01 M γαλακτικού οξέος | | Συγκέντρωση 1 M γαλακτικού οξέος | |
|---------------------|--|------------------------------|--|------------------------------|
| | Συγκέντρωση γαλακτικού αιθυλεστέρα (M) | Απόδοση (Yield %) 553.0 ώρες | Συγκέντρωση γαλακτικού αιθυλεστέρα (M) | Απόδοση (Yield %) 553.0 ώρες |
| <i>Novozyme 435</i> | 0.008 | 82.48 | 0.196 | 19.58 |
| <i>Control</i> | 0.004 | 39.02 | 0.204 | 20.39 |

Από αυτά τα αποτελέσματα πραγματοποιήθηκε διάγραμμα σύγκρισης της απόδοσης γαλακτικού αιθυλεστέρα για 0.01 και 0.1 M γαλακτικού οξέος σε έλαιο λεμονιού (Διάγραμμα 20)



Διάγραμμα 20: Απόδοση γαλακτικού οξέος με παρουσία και απουσία του *Novozyme 435* σε έλαιο λεμονιού για 0.01 και 1 M γαλακτικού οξέος

Στο γράφημα αποδίδεται η μεγαλύτερη απόδοση του γαλακτικού οξέος από έλαιο λεμονιού χρησιμοποιώντας στην αντίδραση 0.01 M γαλακτικού οξέ, δίνοντας τιμή ίση με 82.48 %, η οποία ξεπερνά ακόμα και την απόδοση στο πείραμα ελέγχου. Ενώ με 1 M γαλακτικού οξέος η απόδοση μειώνεται δημιουργώντας μεγάλη διαφορά μεταξύ των δυο πειραμάτων.

Αυτό το πείραμα επέδειξε σημαντικά αποτελέσματα για την διεξαγωγή της αντίδρασης προς παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα, αφού με την χρήση βιοδιαλύτη έχουμε υψηλή απόδοση και με μικρή συγκέντρωση γαλακτικού οξέος.

3.11 Σύγκριση μεταξύ χρήσης 0.01 και 1 M γαλακτικού οξέος σε εξάνιο και έλαιο λεμονιού, με την χρήση και χωρίς χρήση του *Novozyme 435*.

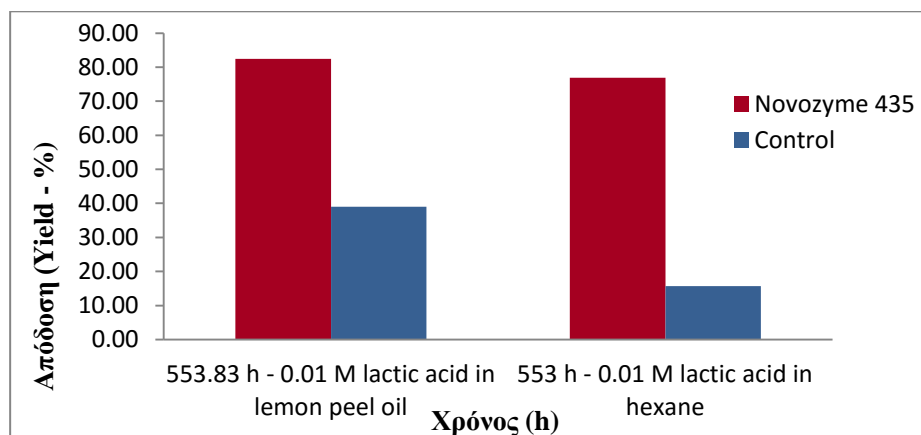
Ο πιο κάτω πίνακας αποδίδει τις αποδόσεις της παραγωγής του γαλακτικού οξέος χρησιμοποιώντας 0.01 και 1 M γαλακτικό οξύ τόσο σε εξάνιο όσο σε έλαιο λεμονιού, με την χρήση και χωρίς χρήση του *Novozyme 435*.

Πίνακας 6: αποτελέσματα απόδοσης γαλακτικού αιθυλεστέρα για 0.01 M γαλακτικό οξύ σε έλαιο λεμονιού και εξάνιο για τις 553,83 ώρες

| | <u>Για 0.01 M γαλακτικού οξέος σε έλαιο λεμονιού</u> | <u>Για 1 M γαλακτικού οξέος σε εξάνιο</u> |
|--|--|---|
| | Απόδοση (Yield %) 553.83 ώρες | Απόδοση (Yield %) 553.83 ώρες |

| | | |
|---------------------|-------|-------|
| <i>Novozyme 435</i> | 82.48 | 76.92 |
| <i>Control</i> | 39.02 | 15.68 |

Κατασκευάστηκε διάγραμμα σύγκρισης μεταξύ των πειραμάτων αυτών το οποίο φαίνεται πιο κάτω (Διάγραμμα 21)



Διάγραμμα 21: Απόδοση γαλακτικού οξέος με παρουσία και απουσία του *Novozyme 435* σε έλαιο λεμονιού και εξάνιο για 0.01 M γαλακτικού οξέος

Παρατηρούμε ότι η μεγαλύτερη απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα δίνεται από το έλαιο λεμονιού ως μέσο διεξαγωγής της αντίδρασης, με την χρήση του ενζύμου με τιμή 82.48 %. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι το έλαιο από λεμόνι έχει σημαντική περιεκτικότητα από μη πολικές ενώσεις πράγμα που το καθιστά μια υδρόφοβη ουσία, επομένως ελκύει περισσότερο την λιπάση μας με αποτέλεσμα να βοηθά στην πραγματοποίηση της αντίδρασης με υψηλότερες αποδόσεις και καλύτερα αποτελέσματα.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας ήταν να μελετηθεί η αντίδραση εστεροποίησης μεταξύ του γαλακτικού οξέος και της αιθανόλης με την χρήση διαφόρων διαλυτών (οργανικών και βιοδιαλυτών) μα συνδυασμό την χρήση λιπάσεων, προς την μέγιστη απόδοση παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα. Το γαλακτικό οξύ και η αιθανόλη χρησιμοποιήθηκαν ως υποστρώματα σε μια αντίδραση εστεροποίησης όπου ως μέσα διεξαγωγής της αντίδρασης αποτέλεσαν η φυσικής προέλευσης βίο-διαλύτες από φλούδες εσπεριδοειδών όπως αιθέριο έλαιο κόκκινου γκρέιπφρουτ (Red Grapefruit), Μαντόρας (Mandora), Βαλέντίας (Valencia) και Λεμονιού (Lemon), επίσης χρησιμοποιήθηκε έλαιο από βελόνες πεύκου (Pine needle oil), Δ - λιμονένιο (R –(+)- Limonene) και οι οργανικοί διαλύτες όπως, εξάνιο (hexane) καθαρότητας 96 % και τολουόλιο (toluene) καθαρότητας \geq 99.5 %. Οι λιπάσεις οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν με σκοπό την επιτάχυνση της αντίδρασης μας ήταν λιπάσεις από *Candida antarctica* ακινητοποιημένο σε ένα υπόστρωμα (*Novozyme 435*) και από *Candida rugosa* ακινητοποιημένα σε πέντε διαφορετικά υποστρώματα (*Accurel MP 1000*, *Lifetech AP1090M*, *Lifetech ECR1030M*, *Lifetech ECR8285M* και *Lewatit VP OC 1600*). Εξετάστηκαν διάφοροι παράμετροι με σκοπό να βρεθεί ο πιο αποδοτικός συνδυασμός για την αντίδραση, προς την μέγιστη παραγωγή του γαλακτικού αιθυλεστέρα.

Τα αρχικά πειράματα με την χρήση βιοδιαλυτών και τολουολίου και της λιπάσης *Novozyme 435* έδειξαν πως μεγαλύτερη απόδοση δίνει το τολουόλιο με τιμή 54.19 % και 50.45 % σε μη ενζυμική και ενζυμική αντίδραση αντίστοιχα. Για τον λόγο του ότι από βιβλιογραφία ξέρουμε πως το τολουόλιο από κάποια φάση και μετά καθίσταται τοξικός για το ένζυμο προχωρήσαμε με νέα πειράματα χρησιμοποιώντας το εξάνιο αφού βιβλιογραφικά φάνηκε να είναι ένας καλός διαλύτης για αντιδράσεις εστεροποίησης. Στα συγκεκριμένα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν τόσο η λιπάση από *Candida antarctica* όσο και από *Candida rugosa* σε διαφορετικές συγκεντρώσεις (10 και 20 % w / w των υποστρωμάτων). Τα αποτελέσματα έδειξαν πως το *Novozyme 435* ήταν γενικά καλύτερο σε σχέση με τα άλλα και η παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα ήταν μεγαλύτερη σε μικρότερες συγκεντρώσεις των ενζύμων. Γενικά καλύτερες αποδώσεις είχαμε στις μη ενζυμικές αντιδράσεις.

Αυτό μας οδήγησε στο να κάνουμε νέα πειράματα αλλάζοντας την συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος για να δούμε εάν επηρεάζει την δράση των λιπάσεων. Πραγματοποιήθηκαν πειράματα με πιο μικρές συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος από 0.5 σε

0.1 M και παρατηρήσαμε πως οι λιπάσες αποδίδουν καλύτερες τιμές απόδοσης. Αφού είδαμε πως με την μείωση του γαλακτικού οξέος είχαμε πιο θετικά αποτελέσματα προχωρήσαμε σε νέα πειράματα με ακόμη πιο μικρές συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος, χρησιμοποιώντας όμως μόνο το *Novozyme 435* αφού αποτέλεσε το πιο αποτελεσματικό ένζυμο γενικά και είναι πιο διαδεδομένο βιβλιογραφικά για την απόδοση του σε αντιδράσεις εστεροποίησης. Μειώνοντας την συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος από 0.1 σε 0.01 παρατηρήσαμε πολύ πιο διαφορετικά αποτελέσματα με το *Novozyme 435* να αποδίδει γαλακτικό αιθυλεστέρα της τιμής 76.92 %.

Θέλοντας να ανεξαρτητοποιηθούμε από έναν οργανικό διαλύτη όπως το εξάνιο, χρησιμοποιήσαμε έλαιο από λεμόνι το οποίο φάνηκε να είναι το πιο αποδοτικό από τα πειράματα με τους βιοδιαλύτες, για να πραγματοποιήσουμε αντίδραση εστεροποίηση μεταξύ γαλακτικού οξέος 0.01 και 1 M με 0.5 M αιθανόλη, με την χρήση του *Novozyme 435*. Τα αποτελέσματα φάνηκαν να είναι ακόμη πιο θετικά αφού είχαμε αποδώσεις της τιμής 82.48 % σε 0.01 M γαλακτικού οξέος, ενώ πιο χαμηλές αποδώσεις είχαμε σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του υποστρώματος (1 M).

Τα τελικά συμπεράσματα είναι πως το γαλακτικό οξύ λόγω χημικής του σύστασης η οποία το αποτελεί υδρόφιλο απωθείται από τα ένζυμα τα οποία είναι υδρόφοβα και δεν ενώνεται στο ενεργό κέντρο τους έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί σωστά και πιο γρήγορα η αντίδραση. Επομένως σε μεγάλες συγκεντρώσεις παρατηρείται μεγάλη καταστολή των λιπάσεων ενώ σε πολύ πιο μικρές η δράση των λιπάσεων αυξάνεται κατά πολύ. Επίσης το έλαιο από λεμόνι φάνηκε να είναι καλύτερο μέσω διεξαγωγής της αντίδραση σε μικρότερες συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος (0.01 M), το πιο πιθανόν λόγω του ότι και το ίδιο καθίσταται περισσότερο ως υδρόφοβη ένωση η οποία βοηθά στην δράση των λιπάσεων προς καλύτερη απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα

4 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Η μελέτη αντίδρασης εστεροποίησης γαλακτικού οξέος με αιθανόλη προς παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα, αποτελεί μια πολύ υποσχόμενη διαδικασία παραγωγής ενός πράσινου διαλύτη ικανού να αντικαταστήσει συμβατούς διαλύτες επιβλαβής τόσο για το περιβάλλον όσο και για τον άνθρωπο.

Η συγκεκριμένη αντίδραση μπορεί να διεκπεραιωθεί μεταβάλλοντας πολλές παραμέτρους, είτε χρησιμοποιώντας διαφορετικούς διαλύτες, τόσο οργανικούς όσο και βιοδιαλύτες, αλλά και με την χρήση διαφορετικών λιπάσεων ικανών να πραγματοποιήσουν μια αντίδραση εστεροποίησης. Οι συγκεκριμένες λιπάσεις για τον λόγο του ότι είναι υδρόφοβες απωθούνται από το υπόστρωμα (γαλακτικό οξύ και αιθανόλη), υδρόφιλες ουσίες, πράγμα που οδηγεί στην ανάγκη να χρησιμοποιηθούν άλλες λιπάσεις οι οποίες να ενώνονται πιο εύκολα με τα συγκεκριμένα υποστρώματα. Επιπλέον μπορεί να μελετηθεί η συμπεριφορά άλλων διαλυτών ως μέσα διεξαγωγής της αντίδρασης τα οποία με τις συγκεκριμένες συνθήκες να ευνοούν την αντίδραση εστεροποίησης προς μεγαλύτερη απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα. Λόγω του μειωμένου χρόνου διεκπεραίωσης του πειραματικού μέρους της παρούσας εργασίας, ήταν αδύνατον να μελετηθούν όλες οι πιθανές αναλύσεις για την εξαγωγή καλύτερων αποτελεσμάτων.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alberghina, L., Schmid, R.D. & Verger, R., Lipases : structure, mechanism and genetic engineering : contributions to the CEC-GBF international workshop, September 13 to 15, 1990, Braunschweig, Germany | Clc. 1991. Available at: <http://library.wur.nl/sci-hub.io/WebQuery/clc/558289> [Accessed April 24, 2016].

Anon, 2016a. Lifetech ECR1030M. , p.229334.

Anon, 2016b. Lifetech ECR8285M. , p.229334.

Aparicio, S. & Alcalde, R., 2009. The green solvent ethyl lactate : an experimental and theoretical characterization †. , pp.65–78.

Arroyo, M., S??nchez-Montero, J.M. & Sinisterra, J.V., 1999. Thermal stabilization of immobilized lipase B from *Candida antarctica* on different supports: Effect of water activity on enzymatic activity in organic media. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(1-2), pp.3–12.

Azim, A. et al., 2001. Lipase catalysed synthesis of optically enriched α -haloamides. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 9(5), pp.1345–1348.

Bai, D.M. et al., 2004. Strain improvement of *Rhizopus oryzae* for over-production of L(+)-lactic acid and metabolic flux analysis of mutants. *Biochemical Engineering Journal*, 18(1), pp.41–48.

Balcão, V.M., Paiva, A.L. & Malcata, F.X., 1996. Bioreactors with immobilized lipases: State of the art. *Enzyme and Microbial Technology*, 18(6), pp.392–416.

Basso, A., 2015. Immobilization of lipases with optimal performances for the application in industry. , (September).

- Benjamin, S. & Pandey, A., 1998. *Candida rugosa* lipases: Molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast*, 14(12), pp.1069–1087.
- Benninga, H., 1990. *A History of Lactic Acid Making: A Chapter in the History of Biotechnology*, Springer Science & Business Media. Available at: https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=fdBMcYg_xGYC&pgis=1 [Accessed April 15, 2016].
- Berg, J.M., Tymoczko, J.L. & Stryer, L., 2002. *Biochemistry*. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21154/> [Accessed April 24, 2016].
- Bermejo, D.V. et al., 2015. Food and Bioproducts Processing Pressurized liquid extraction of caffeine and catechins from green tea leaves using ethyl lactate , water and ethyl lactate + water mixtures. , 6, pp.106–112.
- Boumba, V. a, Voutsinas, L.P. & Philippopoulos, C.D., 2001. Composition and nutritional value of commercial dried whey products from feta cheese manufacture. *International Journal of Dairy Technology*, 54(4), pp.141–145. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1046/j.1364-727x.2001.00026.x>.
- Cabrera, Z. et al., 2009. Novozym 435 displays very different selectivity compared to lipase from *Candida antarctica* B adsorbed on other hydrophobic supports. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 57(1-4), pp.171–176.
- Castillo Martinez, F.A. et al., 2013. Lactic acid properties, applications and production: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 30(1), pp.70–83.
- Castillo, F., 1990. Lactose metabolism by yeasts. *Yeast biotechnology and biocatalysis*. Available at: https://scholar.google.com/scholar?hl=en&as_sdt=0,5&q=Lactose+metabolism+by+yeast.+In+Yeast+Biotechnology+and+Biocatalysis#0#0 [Accessed April 26, 2016].

- Chemistry, G. & Organic, T., 5 . Green Chemistry and Hazardous Organic Solvents . Green Solvents , Replacement and Alternative Techniques.
- Chowdary, G. V, Ramesh, M.N. & Prapulla, S.G., 2000. Enzymic synthesis of isoamyl isovalerate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*: a multivariate analysis. *Process Biochemistry*, 36(4), pp.331–339.
- Cimino, G. & Caristi, C., 1990. Acute toxicity of heavy metals to aerobic digestion of waste cheese whey. *Biological Wastes*, 33(3), pp.201–210.
- Clark, J.H. & Tavener, S.J., 2007. Alternative solvents: Shades of green. *Organic Process Research and Development*, 11(1), pp.149–155.
- Corma Canos, A., Iborra, S. & Velty, A., 2007. Chemical routes for the transformation of biomass into chemicals. *Chemical Reviews*, 107(6), pp.2411–2502.
- Danieli, B. et al., 1997. Regioselective acylation of polyhydroxylated natural compounds catalyzed by *Candida antarctica* lipase B (Novozym 435) in organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic*, 3(1-4), pp.193–201.
- Datta, R. & Henry, M., 2006. Lactic acid: recent advances in products, processes and technologies — a review. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 81(7), pp.1119–1129. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1486> [Accessed January 4, 2016].
- Dey, P. et al., 2012. Fermentative lactic acid production from a renewable carbon source under response surface optimized conditions without alkali addition: A membrane-based green approach. *Clean Technologies and Environmental Policy*, 14(5), pp.827–835.
- Ducret, A., Trani, M. & Lortie, R., 1998. Lipase-catalyzed enantioselective esterification of ibuprofen in organic solvents under controlled water activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 22(4), pp.212–216.

- Ferchichi, M. et al., 2005. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. *Journal of Biotechnology*, 120(4), pp.402–409.
- Findrik, Z. et al., 2012. Evaluation of factors influencing the enantioselective enzymatic esterification of lactic acid in ionic liquid. *Bioprocess and biosystems engineering*, 35(4), pp.625–35. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22020865> [Accessed May 7, 2016].
- From, M., Adlercreutz, P. & Mattiasson, B., 1997. Lipase catalyzed esterification of lactic acid. *Biotechnol lett*, 19(4), pp.315–317.
- Gammon, E., *General Chemistry, 6th Edition by Ebbing, Darrell; Gammon, Steven D.: Houghton Mifflin College Div, Boston, MA 9780395902226 Hardcover, 6th Edition - a2zbooks*, Available at: <http://www.abebooks.com/General-Chemistry-6th-Edition-Ebbing-Darrell/719149024/bd> [Accessed May 5, 2016].
- Gao, C., Ma, C. & Xu, P., 2011. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. *Biotechnology Advances*, 29(6), pp.930–939. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2011.07.022>.
- Gardner, D., 1989. New technologies in the conversion of whey to high protein products. *Modern Dairy*. Available at: https://scholar.google.com/scholar?hl=en&q=New+technologies+in+the+conversion+of+whey+to+high+protein+products&btnG=&as_sdt=1%2C5&as_sdtp=#0 [Accessed April 26, 2016].
- Guimarães, P.M.R., Teixeira, J.A. & Domingues, L., 2010. Fermentation of lactose to bio-ethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorisation of cheese whey. *Biotechnology Advances*, 28(3), pp.375–384. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2010.02.002>.
- Gupta, A.P. & Kumar, V., 2007. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers -

- Poly lactide: A critique. *European Polymer Journal*, 43(10), pp.4053–4074.
- Hamsaveni, D.R., Prapulla, S.G. & Divakar, S., 2001. Response surface methodological approach for the synthesis of isobutyl isobutyrate. *Process Biochemistry*, 36(11), pp.1103–1109.
- Høegh, I. et al., 1995. Two lipases from *Candida antarctica*: cloning and expression in *Aspergillus oryzae*. *Canadian Journal of Botany*, 73(S1), pp.869–875. Available at: <http://www.nrcresearchpress.com/doi/abs/10.1139/b95-333#.VyFIbzB97IU> [Accessed April 27, 2016].
- I, M., 1988. Positionally non-specific lipase from *Candida* sp, a method for producing it, its use and a recombinant dna process for producing it. Available at: <http://www.google.com.na/patents/EP0287634A1?cl=zh> [Accessed April 27, 2016].
- Janssen, A.E.M. et al., 1999. Kinetics of lipase-catalyzed esterification in organic media: Correct model and solvent effects on parameters. *Enzyme and Microbial Technology*, 24(8-9), pp.463–470.
- John, R.P., Nampoothiri, K.M. & Pandey, A., 2010. Acid Recovery from Cassava Bagasse Based Fermented Medium Using Anion Exchange Resins. , 51(December 2008), pp.1241–1248.
- Kazlauskas, R.J. & Bornscheuer, U.T., 2008. Biotransformations with Lipases. *Biotechnology: Second, Completely Revised Edition*, 8 a, pp.36–191.
- Kemp, D.L. & Quickenden, J., 1988. *Resources and Applications of Biotechnology* R. Greenshields, ed., London: Palgrave Macmillan UK. Available at: <http://link.springer.com/10.1007/978-1-349-09574-2> [Accessed April 26, 2016].
- Kharrat, N. et al., 2011. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. *Process Biochemistry*, 46(5), pp.1083–

1089. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2011.01.029>.
- Kiran, K.R. & Divakar, S., 2001. Lipase catalyzed synthesis of organic acid esters of lactic acid in non-aqueous media. *Journal of Biotechnology*, 87(2), pp.109–121.
- Kisaalita, W., Pinder, K. & Lo, K., 1987. Acidogenic fermentation of lactose. *Biotechnology and ...*, 30(1), pp.88–95. Available at: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/bit.260300113/abstract>.
- Kosikowski, F., 1979. Whey utilization and whey products. *Journal of Dairy Science*. Available at: https://scholar.google.com/scholar?q=Kosikowski+FV%2C+1979.+Whey+utilization+and+whey+products.+Journal+of+Dairy+Science+62%2C+p.+1149-1160&btnG=&hl=en&as_sdt=0%2C5#0 [Accessed April 26, 2016].
- Koutinas, M., Menelaou, M. & Nicolaou, E.N., 2014. Development of a hybrid fermentation-enzymatic bioprocess for the production of ethyl lactate from dairy waste. *Bioresource Technology*, 165(C), pp.343–349. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2014.03.053>.
- Kraai, G.N. et al., 2008. Kinetic studies on the *Rhizomucor miehei* lipase catalyzed esterification reaction of oleic acid with 1-butanol in a biphasic system. *Biochemical Engineering Journal*, 41(1), pp.87–94.
- Lie Ken Jie, M.S.F. & Xun, F., 1998. Studies of lipase-catalyzed esterification reactions of some acetylenic fatty acids. *Lipids*, 33(1), pp.71–75.
- Liese, 2006. *Industrial Biotransformations*, John Wiley & Sons. Available at: <https://books.google.com/books?hl=en&lr=&id=IVmUd6v59PoC&pgis=1> [Accessed April 20, 2016].
- Lifetech, P., 2013. Purolite ECR Enzyme Immobilization Resins. Available at:

www.porulite.com.

Lores, M. et al., 2015. Talanta Use of ethyl lactate to extract bioactive compounds from *Cytisus scoparius* : Comparison of pressurized liquid extraction and medium scale ambient temperature systems. *Talanta*, 140, pp.134–142. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2015.03.034>.

Lotti, M. et al., 1994. Variability within the *Candida rugosa* lipases family. *Protein engineering*, 7(4), pp.531–535.

Lunelli, B.H. et al., Process Intensification for Ethyl Lactate Production Using Reactive Distillation.

M. Rusch gen Klaas, S.W., 2000a. *Enzymes in Lipid Modification* B. UT, ed., Available at: [http://scholar.google.com.secure.sci-hub.io/scholar?q=M.+Rusch+gen+Klaas,+S.+Warwell,+in:+U.T.+Bornscheuer+\(Ed.\),+Enzymes+in+Lipid+Modification,+Wiley-VCH,+2000,+pp.+116-127&btnG=&hl=en&as_sdt=0,5#0](http://scholar.google.com.secure.sci-hub.io/scholar?q=M.+Rusch+gen+Klaas,+S.+Warwell,+in:+U.T.+Bornscheuer+(Ed.),+Enzymes+in+Lipid+Modification,+Wiley-VCH,+2000,+pp.+116-127&btnG=&hl=en&as_sdt=0,5#0).

M. Rusch gen Klaas, S.W., 2000b. *Enzymes in Lipid Modification*, Available at: [http://scholar.google.com.secure.sci-hub.io/scholar?q=M.+Rusch+gen+Klaas,+S.+Warwell,+in:+U.T.+Bornscheuer+\(Ed.\),+Enzymes+in+Lipid+Modification,+Wiley-VCH,+2000,+pp.+116-127&btnG=&hl=en&as_sdt=0,5#0](http://scholar.google.com.secure.sci-hub.io/scholar?q=M.+Rusch+gen+Klaas,+S.+Warwell,+in:+U.T.+Bornscheuer+(Ed.),+Enzymes+in+Lipid+Modification,+Wiley-VCH,+2000,+pp.+116-127&btnG=&hl=en&as_sdt=0,5#0).

Maeda, K. et al., 1986. Detection of lactyl lactate in the urine of patients receiving Hicaliq infusion. *Clinica Chimica Acta*, 154(3), pp.227–232.

Manoel, E.A. et al., 2015. Accurel MP 1000 as a support for the immobilization of lipase from *Burkholderia cepacia*: Application to the kinetic resolution of myo-inositol derivatives. *Process Biochemistry*, 50(10), pp.1557–1564. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2015.06.023>.

- Martinelle, M., Holmquist, M. & Hult, K., 1995. On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)/Lipids and Lipid Metabolism*, 1258(3), pp.272–276.
- MARWAHA, S.S., AND & KENNEDY, J.F., 1988. Review: Whey-pollution problem and potential utilization. Available at: <http://sci-hub.io/10.1111/j.1365-2621.1988.tb00586.x> [Accessed April 26, 2016].
- Masse, L., Kennedy, K. & Chou, S., 2001. The effect of an enzymatic pretreatment on the hydrolysis and size reduction of fat particles in slaughterhouse wastewater. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 76(6), pp.629–635. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.428> [Accessed April 20, 2016].
- Mawson, A.J., 1994. Bioconversions for whey utilization and waste abatement. *Bioresource Technology*, 47(3), pp.195–203.
- Moresi, M., 1983. SCP production from whey: scale-up of a process. *Production and feeding of single cell protein / edited by M.P. Ferranti and A. Fiechter*. Available at: <http://agris.fao.org.sci-hub.io/agris-search/search.do?recordID=US201302206354> [Accessed April 26, 2016].
- Narayanan, N., Roychoudhury, P.K. & Srivastava, A., 2004. L (+) lactic acid fermentation and its product polymerization. *Electronic Journal of Biotechnology*, 7(2), pp.0–0. Available at: <http://www.ejbiotechnology.info/index.php/ejbiotechnology/article/view/v7n2-7/520> [Accessed April 17, 2016].
- OECD-FAO (Organisation for Economic Co-operation and Development- Food and Agriculture Organisation), 2008. ., *OECD-FAO Agricultural Outlook 2008-2017 Highlights*. Available at: <http://www.agrioutlook.org/dataoecd/54/15/40715381.pdf>.
- Pereira, C.S.M. & Rodrigues, A.E., 2014. Ethyl Lactate Main Properties , Production

Processes , and Applications. , pp.107–125.

Prazeres, A.R., Carvalho, F. & Rivas, J., 2012. Cheese whey management: A review. *Journal of Environmental Management*, 110, pp.48–68. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jenvman.2012.05.018>.

Rao, P. & Divakar, S., 2001. Lipase catalyzed esterification of α -terpineol with various organic acids: Application of the Plackett-Burman design. *Process Biochemistry*, 36(11), pp.1125–1128.

Rass-Hansen, J. et al., 2007. Bioethanol: fuel or feedstock? *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 82(4), pp.329–333. Available at: <http://doi.wiley.com/10.1002/jctb.1665> [Accessed March 29, 2016].

Reetz, M.T. & Jaeger, K.E., 1998. Overexpression, immobilization and biotechnological application of *Pseudomonas* lipases. *Chemistry and Physics of Lipids*, 93(1-2), pp.3–14.

Renewable Fuels Association, 2014. Chemical and Physical Characteristics of Ethanol and Hydrocarbon Fuels. *Module 2*, pp.1–17.

Rev, D.S., 2008. Product Information Lewatit VP OC 1600. *Technology*, 44(0), pp.1–15.

Rivas, J., Prazeres, A.R. & Carvalho, F., 2011. Aerobic biodegradation of pre-coagulated cheese whey wastewater. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), pp.2511–2517.

Rizzi, M. et al., 1992. Catalysing the Synthesis of Isoamyl. *Enzyme and Microbial Technology*, 14(July 1991), pp.709–714.

Rodrigues, J. et al., 2016. Biodiesel production from crude *Jatropha* oil catalyzed by non-commercial immobilized heterologous *Rhizopus oryzae* and *Carica papaya* lipases.

- Bioresource Technology*. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852416302966>.
- Salminen, S. et al., 2004. Future aspects of research and product development of lactic acid bacteria. , (Ed.3), pp.611–615. Available at: <http://www.cabdirect.org/sci-hub.io/abstracts/20053043843.html;jsessionid=83E325B57E89F49859C01E26210FBC0F;jsessionid=A064E0EECA586F50872EFA49992F83F8> [Accessed April 17, 2016].
- Schomburg, I. et al., 2013. BRENDA in 2013: Integrated reactions, kinetic data, enzyme function data, improved disease classification: New options and contents in BRENDA. *Nucleic Acids Research*, 41(D1), pp.764–772.
- Shakhashiri, 2009. Prof. Shakhashiri. , pp.2–3.
- Sharma, R., Chisti, Y. & Chand, U., 2001. Production, Purification, Characterization, and Applications of Lipases. *Biotechnology advances*, 19, pp.627–662.
- Shaw, J.F. et al., 1990. Lipolytic activities of a lipase immobilized on six selected supporting materials. *Biotechnology and bioengineering*, 35(2), pp.132–137.
- Siso, M.I.G., 1996. The biotechnological utilization of cheese whey: A review. *Bioresource Technology*, 57(1), pp.1–11. Available at: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0960852496000363> [Accessed December 2, 2015].
- Sofia, C. & Pereira, M., 2009. Process Intensification for the Green Solvent Ethyl Lactate Production based on Simulated Moving Bed and Pervaporation Membrane Reactors. , (October).
- Soni, K. & Madamwar, D., 2001. Ester synthesis by lipase immobilized on silica and microemulsion based organogels (MBGs). *Process Biochemistry*, 36(7), pp.607–611.

- Sun, Y. & Cheng, J., 2002. Hydrolysis of lignocellulosic materials for ethanol production: a review. Available at: http://ac.els-cdn.com/S0960852401002127/1-s2.0-S0960852401002127-main.pdf?_tid=8e098c80-0582-11e6-a114-00000aacb361&acdnat=1460997077_abdfb40694348ba48036a09771108844 [Accessed April 18, 2016].
- Telefoncu, A. et al., 1990. Preparation and Characterization of Pancreatic Lipase Immobilized in Eudragit-Matrix.
- Therisod, M. & Klibanov, A.M., 1987. Regioselective acylation of secondary hydroxyl groups in sugars catalyzed by lipases in organic solvents. *Journal of the American Chemical Society*, 109(13), pp.3977–3981. Available at: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00247a024>.
- Tilman, D., Hill, J. & Lehman, C., 2006. Carbon-Negative Biofuels from Low-Input High-Diversity Grassland Biomass. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/sci/314/5805/1598.full.pdf> [Accessed April 18, 2016].
- Valivety, R.H. et al., 1991. Solvent effects on biocatalysis in organic systems: Equilibrium position and rates of lipase catalyzed esterification. *Biotechnology and Bioengineering*, 38(10), pp.1137–1143.
- Venetsaneas, N. et al., 2009. Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. *Bioresource Technology*, 100(15), pp.3713–3717. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2009.01.025>.
- Wasewar, 2013. *Separation and Purification Technologies in Biorefineries*, John Wiley & Sons. Available at: <https://books.google.com/books?id=Bz6EaVlsEfkC&pgis=1> [Accessed April 17, 2016].

- Weber, N., Klein, E. & Mukherjee, K.D., 1999. Long-chain acyl thioesters prepared by solvent-free thioesterification and transthioesterification catalysed by microbial lipases. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 51(3), pp.401–404.
- Wisdom, R.A., Dunnill, P. & Lilly, M.D., 1985. Enzymic interesterification of fats: The effect of non-lipase material on immobilized enzyme activity. *Enzyme and Microbial Technology*, 7(11), pp.567–572.
- Yang, B. et al., 1994. Solvent suitability for lipase-mediated acyl-transfer and esterification reactions in microaqueous milieu is related to substrate and product polarities. *Enzyme and Microbial Technology*, 16(7), pp.577–583.
- Zhang, L.Q. et al., 2001. Lipase-catalyzed synthesis of RGD diamide in aqueous water-miscible organic solvents. *Enzyme and Microbial Technology*, 29(2-3), pp.129–135.
- Καττή, Π.Π., 2010. Πειραματική διερεύνηση παραγωγής βιοαερίου από μίγματα τυρογάλακτος με υγρά μηχανικού διαχωρισμού αποβλήτων χοιροστασίου διαφορετικής πυκνότητας στη μεσόφιλη περιοχή. Available at: <http://dspace.aua.gr/xmlui/handle/10329/90> [Accessed April 27, 2016].
- Μάντης, Α., 2000. Υγιεινή και τεχνολογία του γάλακτος και των προϊόντων του - γεωπονικά βιβλία - εκδόσεις έμβρυο. 2005, p.424. Available at: http://embryopub.gr/index.php?target=products&product_id=1778 [Accessed April 26, 2016].
- Μαρούλης, Α.Ι., Χατζηαντωνίου, Κ. & Τζελέπης, Γ., Εναλλακτικοί Διαλύτες . Διαλύτες απο βιομαζα. , pp.1–7.
- Τζάνου, Ε., Οικονόμου, Ε. & Γείτονας, Α., 2005. ΧΡΗΣΗ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΚΑΙ ΔΡΑΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΤΗΝ ΕΠΕΞΕΡΓΑΣΙΑ ΒΙΟΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΑΠΟΒΛΗΤΩΝ. , pp.3–6.

