

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



Πτυχιακή εργασία

ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ
ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕ ΑΙΘΑΝΟΛΗ ΓΙΑ
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ

Ελεάνα Παυλίδου

Λεμεσός 2016

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

Πτυχιακή εργασία

ΜΕΛΕΤΗ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ
ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΟΞΕΟΣ ΜΕ ΑΙΘΑΝΟΛΗ ΓΙΑ
ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΓΑΛΑΚΤΙΚΟΥ ΑΙΘΥΛΕΣΤΕΡΑ

Ελεάνα Παυλίδου

Σύμβουλος καθηγητής
Δρ.Μιχάλης Κουτίνας

Λεμεσός 2016

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright © Ελεάνα Παυλίδου, 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 ιδιαίτερα τον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Μιχάλη Κουτίνα για την καθοδήγηση και το αμείωτο ενδιαφέρον που μου παρείχε κατά την εκπόνησης της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Επίσης, θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη που μου αναθέτοντας μου ένα τόσο ενδιαφέρον θέμα.

Παράλληλα, οφείλω να ευχαριστώ την υποψήφια διδακτορική φοιτήτρια Χρυσταλλένη Γιάγκου, για την αδιάκοπη στήριξη και παρουσία της όλο αυτό το διάστημα καθώς και για τον χρόνο που μου έχει αφιερώσει. Οι γνώσεις της σε συνδυασμό με την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε, ήταν αναμφίβολα καθοριστικοί παράγοντες για την υλοποίηση αυτής της μελέτης.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω θερμά και να εκφράσω την ευγνωμοσύνη μου στη φιλόλογο Άντρη Βασιλείου για την γλωσσική επιμέλεια της μελέτης αλλά και στη οικογένεια μου για την συνεχή τους εμπύχωση που μου παρείχαν όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία αποσκοπεί στην πειραματική μελέτη της απόδοσης γαλακτικού αιθυλεστέρα, ο οποίος προκύπτει από την εστεροποίηση του γαλακτικού οξέος με την αιθανόλη. Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκαν λιπάσες των μικροοργανισμών *Candida antarctica* και *Candida rugosa*, με στόχο την επιτάχυνση της αντίδρασης και κατ' επέκταση την παραγωγή ψηλών αποδόσεων γαλακτικού αιθυλεστέρα. Τα αποτελέσματα που έχουν προκύψει από αυτή την έρευνα έχουν δείξει ότι η απόδοση σε γαλακτικό αιθυλεστέρα ήταν ικανοποιητική σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος. Επίσης, έχει καταδειχθεί πως το ιδανικότερο ένζυμο ήταν το Novozyme 435 ενώ ο καταλληλότερος διαλύτης ήταν το τολουόλιο ο οποίος είναι ένας άπολος διαλύτης.

Η εργασία αποτελείται από τρεις κύριες θεματικές ενότητες. Στην πρώτη ενότητα, αναπτύσσεται το θεωρητικό υπόβαθρο, όπου αρχικά αναφέρεται ο ρόλος των διαλυτών και αναλύεται η ανάγκη αντικατάστασης των συμβατικών διαλυτών με «πράσινους» διαλύτες. Στη συνέχεια, επεξηγείται η έννοια της εστεροποίησης και δίδεται ιδιαίτερη έμφαση στο γαλακτικό αιθυλεστέρα, αφού παρατίθενται τα γενικά χαρακτηριστικά του και γίνεται αναφορά στους τομείς στους οποίους εφαρμόζεται αλλά και στους τρόπος σύνθεσής του. Ακολούθως, γίνεται μια επισκόπηση των γενικών χαρακτηριστικών που διαθέτουν τα αντιδρώντα (γαλακτικό οξύ και αιθανόλη) της εστεροποίησης για το σχηματισμό γαλακτικού αιθυλεστέρα. Τέλος, παρουσιάζεται η ο ρόλος των ενζύμων στις χημικές αντιδράσεις και η ακινητοποίηση των ενζύμων, ενώ περιγράφονται βασικά χαρακτηριστικά των λιπασών και διασαφηνίζεται η σχέση τους με την εστεροποίηση.

Στη δεύτερη θεματική ενότητα που αφορά στο πειραματικό μέρος της εργασίας, περιγράφονται επακριβώς τα όργανα, τα υλικά και η πειραματική μεθοδολογία που ακολουθήθηκε. Στην τελευταία θεματική ενότητα καταγράφονται και παρουσιάζονται τα αποτελέσματα του πειράματος με την σειρά που διεξήχθησαν. Τέλος, πραγματοποιείται συγκριτική ανάλυση των αποτελεσμάτων με βάση διάφορους παράγοντες, ούτως ώστε να εξαχθούν οι σχετικές παρατηρήσεις και τα συμπεράσματα.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iv
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ	v
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ.....	ix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ	x
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ.....	xi
ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ.....	xii
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	xiv
1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1.1 Διαλύτες.....	1
1.1.1 Προβλήματα από την χρήση διαλυτών	1
1.1.2 Αναγκαιότητα αντικατάστασης συμβατικών διαλυτών	2
1.1.3 Πλεονεκτήματα των «πράσινων» διαλυτών - γαλακτικού αιθυλεστέρα.....	2
1.2 Εστεροποίηση.....	3
1.3 Γαλακτικός αιθυλεστέρας – Ethyl Lactate	4
1.3.1 Γενικά	4
1.3.2 Εφαρμογές του γαλακτικού αιθυλεστέρα:.....	5
1.3.3 Σύνθεση του γαλακτικού αιθυλεστέρα.....	5
1.4 Αντιδρώντα της εστεροποίησης	7
1.4.1 Γαλακτικό οξύ- Lactic acid	7
1.4.2 Αιθανόλη	11
1.5 Ένζυμα.....	12
1.5.1 Η δράση των ενζύμων στις χημικές αντιδράσεις	12
1.5.2 Ακινητοποίηση ενζύμων	13

1.5.3	Λιπάσες.....	14
1.5.4	Η σχέση των λιπασών με την εστεροποίηση.....	15
2	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	16
2.1	Όργανα – Υλικά – Μέθοδοι	16
2.1.1	Προετοιμασία διαλυμάτων	16
2.1.2	Ανάλυση διαλυμάτων με αέρια χρωματογραφία.....	18
3	ΑΝΑΛΥΣΗ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	21
3.1	Εστεροποίηση σε δεκάνιο	22
3.1.1	Πείραμα Α: Εστεροποίηση σε δεκάνιο με συγκέντρωση ενζύμων που αντιστοιχεί στο 10% w/w των αντιδρώντων.....	22
3.1.2	Πείραμα Β: Εστεροποίηση σε δεκάνιο με συγκέντρωση ενζύμων που αντιστοιχεί στο 20% w/w των αντιδρώντων.....	23
3.2	Εστεροποίηση σε σύστημα ελεύθερου διαλύτη	27
3.2.1	Πείραμα Γ: Εστεροποίηση σε σύστημα ελεύθερου διαλύτη με συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 0.5 M.....	27
3.2.2	Σύγκριση πειράματος Α και πειράματος Γ.....	28
3.2.3	Πείραμα Δ: Εστεροποίηση σε σύστημα ελεύθερου διαλύτη μόνο για το ένζυμο Novozyme 435 με συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 0.01 M και 1 M.....	30
3.3	Εστεροποίηση σε τολουόλιο	33
3.3.1	Πείραμα Ε: Εστεροποίηση σε τολουόλιο μόνο για το ένζυμο Novozyme 435, με συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 0.01 M και 1 M.....	33
3.3.2	Σύγκριση εστεροποίησης σε τολουόλιο – εστεροποίησης σε σύστημα ελεύθερου διαλύτη για το ένζυμο Novozyme 435, για συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος 0.01 M και 1 M	36
4	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	38
5	ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ.....	39

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1: Φυσικοχημικές ιδιότητες γαλακτικού αιθυλεστέρα	5
Πίνακας 2: Φυσικοχημικές ιδιότητες του γαλακτικού οξέος	8
Πίνακας 3: Συνθήκες διεξαγωγής πειράματος Α	22
Πίνακας 4: Συνθήκες διεξαγωγής πειράματος Β.....	24
Πίνακας 5: Συνθήκες διεξαγωγής πειράματος Γ	27
Πίνακας 6: Συνθήκες διεξαγωγής πειράματος Δ.....	30
Πίνακας 7: Συνθήκες διεξαγωγής πειράματος Ε.....	33

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΓΡΑΦΗΜΑΤΩΝ

Γράφημα 1: Καμπύλη βαθμονόμησης γαλακτικού αιθυλεστέρα σε δεκάνιο.....	19
Γράφημα 2: Καμπύλη βαθμονόμησης γαλακτικού αιθυλεστέρα σε αιθανόλη.....	20
Γράφημα 3: Καμπύλη βαθμονόμησης γαλακτικού αιθυλεστέρα σε τολουόλιο.....	21
Γράφημα 4: Παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα σε σχέση με τον χρόνο για το πείραμα Α.	23
Γράφημα 5: Παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα σε σχέση με τον χρόνο για το πείραμα Β.	24
Γράφημα 6: Σύγκριση πειράματος Α και πειράματος Β στις 553 h.....	25
Γράφημα 7: Παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα σε σχέση με τον χρόνο για το πείραμα Γ .	28
Γράφημα 8: Σύγκριση πειράματος Α και πειράματος Γ στις 161 h.....	29
Γράφημα 9 : Παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα σε σχέση με τον χρόνο για το πείραμα Δ	31
Γράφημα 10: Σύγκριση συγκεντρώσεων γαλακτικού οξέος για το ένζυμο Novozyme 435 σε σύστημα ελεύθερου διαλύτη στις 553.7 h.....	32
Γράφημα 11: Παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα σε σχέση με τον χρόνο για το πείραμα Ε	34
Γράφημα 12: Σύγκριση συγκεντρώσεων γαλακτικού οξέος (0.01 Μ και 1 Μ) για εστεροποίηση σε τολουόλιο μόνο για το ένζυμο Novozyme 435.....	35
Γράφημα 13: Σύγκριση εστεροποίησης σε τολουόλιο - εστεροποίησης σε σύστημα ελεύθερου διαλύτη για το ένζυμο Novozyme 435, για συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος 0.01 Μ και 1 Μ	36

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 3: Γενική μορφή αντίδρασης εστεροποίησης (πάνω), παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα μέσω αντίδρασης εστεροποίησης (κάτω).....	7
Εικόνα 1: Μοριακή δομή 2-υδροξυπροπανικό οξύ (αριστερά), οι δύο εναντιομερείς μορφές του γαλακτικού οξέος (δεξιά).....	9
Εικόνα 2: Τρισδιάστατη μοριακή δομή της αιθανόλης.....	11
Εικόνα 4: Διάταξη GC.....	18

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

CAL	Candida Antartica Lipase
CRLs	Candida Rugosa Lipases
PVMR	Pervaporation Membrane Reactor
SMBR	Simulated Moving Bed Reactor
GRAS	Generally recognized as safe - Γενικά αναγνωρισμένο ως ασφαλές
FDA	Food and Drug Administration Οργανισμός Ελέγχου Φαρμάκων και Τροφίμων
VOCs	Volatile Organic Compounds – Πτητικές Οργανικές Ενώσεις
FID	Flame Ionization Detector – Ανιχνευτής Ιοντισμού Φλόγας
IUPAC	Διεθνής Ένωσης Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας
M	Molarity- Μοριακότητα
mg	Mili- grams, Μιλι-γραμμάρια
μL	Micro-Liter, μικρόλιτρα
h	Hours-Ωρες
min	Minutes-Λεπτά
rpm	Routes per minute – Στροφές το λεπτό
GC	Gas Gromatography - Αέρια Χρωματογραφία

ΑΠΟΔΟΣΗ ΟΡΩΝ

Μικροοργανισμοί:	Μικροσκοπικοί μονοκύτταροι ή πολυκύτταροι οργανισμοί
Υδρόλυση:	Διάσπαση χημικών δεσμών μιας χημικής ένωσης υπό την επίδραση του νερού
Αλκοόλυση:	Αντίδραση ενός εστέρα με μια μονοϋδρική αλκοόλη όπως αιθανόλη, βουτανόλη ή μια πολυυδρική αλκοόλη όπως γλυκερόλη, προς παραγωγή ενός εστέρα με μια διαφορετική αλκυλομάδα
Οξέλυση:	Αντίδραση ενός εστέρα με ένα οξύ οδηγώντας σε ανταλλαγή των αλκυλομάδων
Αυτόλυση:	Διάσπαση του κυττάρου ενός μικροοργανισμού συνήθως μετά το θάνατό του, κάτω από την δράση των ίδιων του των ενζύμων.
Αμινόλυση:	Αντίδραση ενός εστέρα με μια αμίνη προς σχηματισμό αμίδιου
Εστεροποίηση:	Αντίδραση μεταξύ ενός καρβοξυλικού οξέος με μια αλκοόλη προς σχηματισμό εστέρα και νερού
Incubator:	Επωαστήρας κλίβανος με ελεγχόμενη θερμοκρασία

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τις τελευταίες δεκαετίες, η χρήση των διαλυτών στην καθημερινότητα του ανθρώπου είναι έκδηλη σε ποικίλους τομείς λόγω ακριβώς των σημαντικών ιδιοτήτων τους και κυρίως της ικανότητάς τους να διαλύουν πληθώρα ουσιών. Επιπλέον, η χρήση τους δύναται να καλύψει ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών που αφορούν κυρίως στον τομέα της φαρμακοβιομηχανίας, της τυπογραφίας και της βιομηχανίας χρωμάτων-βερνικιών (DeSimone 2002). Παρά όμως την ευρεία εφαρμογή τους, έχει αποδειχθεί επιστημονικώς ότι οι συμβατικοί διαλύτες προκαλούν πολλά προβλήματα στην υγεία των ζώντων οργανισμών και βλάπτουν ανεπανόρθωτα το περιβάλλον εν γένει. Ως εκ τούτου, η ανάγκη για αντικατάσταση των συμβατικών διαλυτών με άλλους λιγότερο επικίνδυνους για την υγεία του ανθρώπου και περισσότερο φιλικούς προς το περιβάλλον διαλύτες προβάλλει επιτακτικά όσο ποτέ άλλοτε.

Οι «πράσινοι» διαλύτες, θα μπορούσαν να αποτελέσουν ιδανική λύση προς αντικατάσταση, αφού εμφανίζουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών διαλυτών. Η χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών για την σύνθεσή τους, η εύκολη ανακύκλωσή τους, η μηδαμινή τοξικότητά τους, η ολοκληρωτική βιοδιάσπασή τους όπως και η χαμηλή πτητικότητά τους είναι μερικά από τα θετικά χαρακτηριστικά που διαθέτουν και τα οποία θα μπορούσαν αναντίλεκτα να αποτελέσουν ισχυρά επιχειρήματα για αντικατάσταση των συμβατικών διαλυτών.

Στην κατηγορία των «πράσινων» διαλυτών ανήκει ο γαλακτικός αιθυλεστέρας, που αποτελεί και αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας. Ο γαλακτικός αιθυλεστέρας θεωρείται οργανικός εστέρας και μπορεί να προκύψει μέσω χημικής ή βιοτεχνολογικής σύνθεσης.

Μεγάλο ενδιαφέρον αποτελεί η βιοτεχνολογική του σύνθεση, η οποία επιτυγχάνεται με αντίδραση εστεροποίησης του γαλακτικού οξέος με την αιθανόλη. Η εστεροποίηση, είναι η αντίδραση μεταξύ ενός οργανικού οξέος και μιας αλκοόλης προς το σχηματισμό εστέρα και νερού. Είναι αντιστρεπτή αντίδραση και πραγματοποιείται με ή χωρίς την χρήση καταλύτη.

Για την παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα σε αυτή την μελέτη χρησιμοποιήθηκαν, ως καταλύτες, ένζυμα και συγκεκριμένα λιπάσες των μικροοργανισμών *Candida antarctica* και *Candida rugosa*. Η βασική λειτουργία των ενζύμων και κατ' επέκταση των λιπάσων είναι η κατάλυση των βιοχημικών αντιδράσεων. Μπορούν δηλαδή οι καταλύτες αυτοί να

επιταχύνουν το ρυθμό επίτευξης των βιοχημικών αντιδράσεων μειώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης.

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η πειραματική μελέτη της απόδοσης γαλακτικού αιθυλεστέρα ο οποίος προκύπτει μέσω της αντίδρασης εστεροποίησης του γαλακτικού οξέος με την αιθανόλη. Με την πραγματοποίηση μιας σειράς πειραμάτων θα εξεταστούν διαφορετικοί παράμετροι στο κάθε πείραμα ούτως ώστε να διαπιστωθούν οι ευνοϊκότερες συνθήκες, για την μεγαλύτερη απόδοση του γαλακτικού αιθυλεστέρα. Σε όλα τα πειράματα θα χρησιμοποιηθούν λιπάσες των μικροοργανισμών *Candida antarctica* και *Candida rugosa*, με στόχο την επιτάχυνση της αντίδρασης.

Τα ευρήματα μιας τέτοιας μελέτης σε περίπτωση υψηλών αποδόσεων γαλακτικού αιθυλεστέρα θα μπορούσαν όπως προαναφέρθηκε να βρουν εφαρμογές κυρίως στην χημική βιομηχανία αλλά και στην φαρμακοβιομηχανία, χρησιμοποιώντας τον γαλακτικό αιθυλεστέρα ως ένα διαλύτη πολλών χημικών και βιολογικά δραστικών ουσιών, ο οποίος θα μπορούσε να αντικαταστήσει τους συμβατικούς. Μιας και η βιωσιμότητα των εναλλακτικών διαλυτών στον τεχνολογικό και οικονομικό τομέα και κατ' επέκταση στον τομέα της βιομηχανίας (μεγάλης κλίμακας), βρίσκεται ακόμα υπό εξέταση (Aparicio & Alcalde 2009), τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης θα μπορούσαν να γίνουν γνωστά στην επιστημονική κοινότητα, συμβάλλοντας έτσι στον εμπλουτισμό της έρευνας για τους εναλλακτικούς διαλύτες.

Καθίσταται λοιπόν σαφές, ότι η χρήση εναλλακτικών διαλυτών, θεωρείται ως μια οικολογικά αλλά και οικονομικά αποδεκτή λύση από τον επιστημονικό κόσμο, η οποία θα μπορούσε να προσφέρει στις βιομηχανίες παραγωγής και χρήσης διαλυτών κίνητρα για επένδυση σε αυτές τις εναλλακτικές λύσεις, εξασφαλίζοντας έτσι αφενός μακροπρόθεσμο κέρδος στις βιομηχανίες και παράλληλα την αποφυγή της επιβάρυνσης του περιβάλλοντος.

1 ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.1 Διαλύτες

Οι διαλύτες είναι ουσίες οι οποίες έχουν την ικανότητα να διαλύουν και να αναμειγνύουν άλλες χημικές ουσίες είτε για τη διευκόλυνσή της μεταφοράς μάζας είτε για την καθίζηση των στερεών συστατικών. Βασικός ανόργανος διαλύτης είναι το νερό ενώ μερικοί οργανικοί διαλύτες είναι το τολουόλιο, η αιθανόλη και το εξάνιο. Οι διαλύτες βρίσκουν ποικίλες εφαρμογές, που αφορούν στον τομέα της φαρμακοβιομηχανίας, της τυπογραφίας, της βιομηχανίας χρωμάτων-βερνικιών, της παρασκευής συγκολλητικών ουσιών και φυτοφαρμάκων, καθώς και τον καθαρισμό μετάλλων από γράσα, έλαια και άλλων παρόμοιων ουσιών (DeSimone 2002).

1.1.1 Προβλήματα από την χρήση διαλυτών

Παρά όμως την ευρεία εφαρμογή τους, έχει αποδειχθεί ότι η χρήση των συμβατικών διαλυτών προκαλεί τεράστια ζημιά τόσο στον άνθρωπο όσο και στο περιβάλλον. Η επικινδυνότητα που προκαλείται στο περιβάλλον έγκειται κυρίως στην ανεξέλεγκτη χρήση των διαλυτών η οποία αφενός προκαλεί την σταδιακή μείωση των αποθεμάτων πετρελαίου και αφετέρου την παραγωγή και απόρριψη τεράστιου όγκου υγρών αποβλήτων. Ως εκ τούτου, η ανακύκλωση τόσο μεγάλων ποσοτήτων είναι αδύνατη αλλά και οικονομικά ζημιογόνα. Επιπλέον, η ικανότητα που έχουν οι διαλύτες να διαφεύγουν εύκολα στην ατμόσφαιρα, σε συνδυασμό με τον μεγάλο αριθμό απόρριψης υγρών αποβλήτων, επιδρούν αρνητικά στην καταστροφή της στοιβάδας του όζοντος. Κατ' επέκταση, η αναπόφευκτη ζημιά που προκαλούν οι πετροχημικοί διαλύτες σε έδαφος, νερό και ατμόσφαιρα συνιστούν μια από τις κυριότερες αιτίες περιβαλλοντικής ρύπανσης (Desset et al. 2009; DeSimone 2002)

Εκτός βέβαια από την περιβαλλοντική ζημιά που προκαλείται από την τοξικότητα των συμβατικών διαλυτών, τίθεται σε κίνδυνο και η ασφάλεια αλλά και η υγεία των ανθρώπων (Clark & Macquarrie 2008). Πιο συγκεκριμένα, οι περισσότεροι διαλύτες επειδή είναι εύφλεκτοι και διαβρωτικοί, σε περίπτωση ατυχημάτων, μπορούν να προκαλέσουν δερματικές παθήσεις ή εγκαύματα. Επίσης, η εισπνοή των ουσιών που εκπέμπονται λόγω της πτητικότητάς των διαλυτών, επηρεάζουν τα μάτια, τους πνεύμονες, το νευρικό σύστημα ενώ

πιο σπάνια μπορούν να προκύψουν σοβαρότερα προβλήματα (πχ. καρκίνος) (Sherman et al. 1998).

1.1.2 Αναγκαιότητα αντικατάστασης συμβατικών διαλυτών

Η ύπαρξη των παραπάνω προβλημάτων σε συνδυασμό με το πολύ ψηλό κόστος αγοράς και ανακύκλωσής τους, καταδεικνύουν την επιτακτική ανάγκη αναζήτησης εναλλακτικών λύσεων. Παράλληλα, οι αυστηρές απαιτήσεις σχετικών διατάξεων για την διαφύλαξη του περιβάλλοντος και της ανθρώπινης υγείας, όπως των πρωτοκόλλων του Κιότο και του Μόντρεαλ αλλά και του κανονισμού REACH, καθιστούν πλέον απαραίτητη την μείωση της χρήσης πετροχημικών προϊόντων όπως είναι οι οργανικοί διαλύτες (Sherman et al. 1998).

Σήμερα, το θέμα της εύρεσης εναλλακτικών λύσεων στην παραγωγή διαλυτών, απασχολεί πολλούς επιστήμονες οι οποίοι ερευνούν τρόπους αντικατάστασης των συμβατικών διαλυτών. Κύριος στόχος τους είναι η δημιουργία διαλυτών απόδοσης, κάνοντάς τους με αυτό τον τρόπο ανταγωνιστικότερους και φθηνότερους από τους συμβατικούς διαλύτες (Aparicio & Alcalde 2009).

1.1.3 Πλεονεκτήματα των «πράσινων» διαλυτών - γαλακτικού αιθυλεστέρα

Σύμφωνα με τους Clark and Macquarrie (2008) η αντικατάσταση των συμβατικών διαλυτών, με άλλους λιγότερο επικίνδυνους για την υγεία του ανθρώπου και περισσότερο φιλικούς προς το περιβάλλον διαλύτες, βασίζεται κατά κύριο λόγο στους «πράσινους» διαλύτες. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν τα ιοντικά υγρά, οι υπερκρίσιμοι διαλύτες (πχ. υπερκρίσιμο νερό ή υπερκρίσιμο CO₂) και οι διαλύτες από βιομάζα. Οι διαλύτες από βιομάζα είναι ο γαλακτικός αιθυλεστέρας, ο μεθυλεστέρας σόγιας, το δ-λιμονένιο, οι διαλύτες φυκώδους βιομάζας και οι βιοαιθανόλη.

Γενικά, οι «πράσινοι διαλύτες», όπως ο γαλακτικός αιθυλεστέρας, που αποτελεί και αντικείμενο μελέτης της παρούσας εργασίας, εμφανίζουν πολλά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών διαλυτών.

Βασικό στοιχείο του γαλακτικού αιθυλεστέρα, που τον κάνει να ξεχωρίζει, αποτελεί το γεγονός ότι πηγάζει από την χρήση ανανεώσιμων πρώτων υλών για την σύνθεσή του. Έτσι, ελαττώνει το κόστος παραγωγής του λόγω της μειωμένης ενέργειας που χρησιμοποιείται σε σχέση με την απαιτούμενη ενέργεια παραγωγής συμβατικών διαλυτών από πετροχημικές πηγές και ως εκ τούτου, επιβραδύνεται η περιβαλλοντική επιβάρυνση. Επιπρόσθετα, το

κόστος μειώνεται από την ικανότητα του γαλακτικού αιθυλεστέρα να ανακυκλώνεται με εύκολο τρόπο αλλά και να ανακτάται (Aparicio & Alcalde 2009).

Ακόμα, η πολύ χαμηλή οικοτοξικότητα που έχει ο γαλακτικός αιθυλεστέρας, δημιουργεί την ολοκληρωτική βιοδιάσπαση του σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Άξιο αναφοράς είναι και το ότι η τοξικότητα που προκαλείται στον άνθρωπο κατά τη χρήση του, είναι μηδαμινή σύμφωνα με τον FDA, ο οποίος έχει κατατάξει τον γαλακτικό αιθυλεστέρα ως ασφαλή για την υγεία (Pereira C.S.M. and Rodrigues A.E. 2014). Επιπλέον, θεωρείται και μια ουσία μη καρκινογόνος αλλά και μη διαβρωτική η οποία δεν ανήκει στην κατηγορία των VOCs διότι έχει χαμηλή τάση ατμών. Τέλος, η ελάχιστη πτητικότητα του γαλακτικού αιθυλεστέρα, συνεπάγεται την αμελητέα συνεισφορά του στις φωτοχημικές αντιδράσεις οι οποίες καταστρέφουν το στρώμα του όζοντος (Carla S. M. Pereira et al. 2009; Aparicio & Alcalde 2009).

Επομένως, ο γαλακτικός αιθυλεστέρας λόγω της αφθονία πλεονεκτημάτων του είναι ένας ιδανικός «πράσινος» διαλύτης ο οποίος θα μπορούσε να αντικαταστήσει τους συμβατικούς. Όμως, ο οικονομικός και τεχνολογικός περιορισμός που υπάρχει στην εφαρμογή του στις μεγάλης κλίμακας βιομηχανικές μονάδες, κάνει το γαλακτικό αιθυλεστέρα να βρίσκεται ακόμα υπό μελέτη (Aparicio&Alcalde 2009).

1.2 Εστεροποίηση

Η εστεροποίηση διαδραματίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην παρούσα μελέτη αφού μέσω αυτής της αντίδρασης παράγεται ο γαλακτικός αιθυλεστέρας.

Η εστεροποίηση είναι η αντίδραση μεταξύ ενός οργανικού οξέος και μιας αλκοόλης (πρωτοταγής ή δευτεροταγής), προς τον σχηματισμό εστέρα και νερού. Η συγκεκριμένη μοριακή αντίδραση συχνά καλείται και ως εστεροποίηση Fischer. Πρόκειται για μια αντιστρεπτή αντίδραση η οποία μπορεί να επιτευχθεί με ή χωρίς την παρουσία καταλύτη (Mc Murry 2012). Η μη καταλυόμενη αντίδραση εστεροποίησης είναι εξαιρετικά αργή και ως εκ τούτου φτάνει σε ισορροπία πολύ πιο αργότερα από την καταλυόμενη αντίδραση. Οπότε ένας τρόπος επιτάχυνσης του ρυθμού εστεροποίησης είναι η χρήση καταλύτη. Συνήθως, οι καταλύτες που χρησιμοποιούνται είναι ομοιογενής ανόργανα οξέα τα οποία δρουν ως δότες πρωτονίων προς το οργανικό οξύ της αντίδρασης. Το θειικό οξύ είναι ένας τυπικός

καταλύτης που χρησιμοποιείται για αυτού του είδους την αντίδραση. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ετερογενείς καταλύτες όπως είναι τα ένζυμα. Ένας άλλος τρόπος επιτάχυνσης της εστεροποίησης είναι η χρήση της αρχής του Le Chatelier, είτε με την αύξηση της συγκέντρωσης ενός εκ των δύο αντιδρώντων, είτε με την συνεχή απομάκρυνση του νερού με αζεοτροπική απόσταξη. Με αυτό τον τρόπο η ισορροπία θα μετατοπίζεται προς τα δεξιά με ταχύτερο ρυθμό, αυξάνοντας την απόδοση παραγωγής εστέρα (Bankole 2011).

1.3 Γαλακτικός αιθυλεστέρας – Ethyl Lactate

Κύριο θέμα της παρούσας μελέτης όπως προαναφέρθηκε είναι ο γαλακτικός αιθυλεστέρας ο οποίος αποτελεί το προϊόν της αντίδραση εστεροποίησης του γαλακτικού οξέος με την αιθανόλη. Πιο κάτω παρατίθενται τα γενικά χαρακτηριστικά του, οι τομείς στους οποίους μπορεί να εφαρμοστεί, καθώς και ο τρόπος σύνθεσής του.

1.3.1 Γενικά

Ο γαλακτικός αιθυλεστέρας ($C_5H_{10}O_3$) ή αλλιώς έθυλ-2- υδροπροπανοϊκό κατά IUPAC αποτελεί χημική ουσία που ανήκει στην κατηγορία των οργανικών εστέρων. Είναι ένα διαυγές έως κίτρινο υγρό, το οποίο όταν διαλύεται αποκτά οσμή καρύδας. Η ουσία αυτή εμφανίζει υψηλή διαλυτική ικανότητα τόσο στο νερό όσο και στους υδρογονάνθρακες. Επιπρόσθετα έχει υψηλό σημείο βρασμού, ενώ η τάση ατμών και η επιφανειακή του τάση είναι χαμηλή (Pereira C.S.M. and Rodrigues A.E. 2014). Με βάση τις συγκεκριμένες ιδιότητες ο γαλακτικός αιθυλεστέρας αποκτά την ιδιαιτερότητα χρήσης του ως διαλύτη στη βιομηχανία επιχρισμάτων (coatings). Μερικές από τις φυσικοχημικές ιδιότητες του γαλακτικού αιθυλεστέρα παρουσιάζονται στον πιο κάτω πίνακα:

Πίνακας 1: Φυσικοχημικές ιδιότητες γαλακτικού αιθυλεστέρα

Ιδιότητα	Τιμή
Μοριακό βάρος	118.133g/mol
Πυκνότητα	1.06g/cm ³ στους 25 °C
Σημείο βρασμού	154 °C
Σημείο τήξης	-40 °C
Σημείο ανάφλεξης	49 °C
Τάση ατμών	1.2 mm Hg στους 34°C
Ενθαλπία (ΔH)	6.17 · 10 ⁴ J/mol

1.3.2 Εφαρμογές του γαλακτικού αιθυλεστέρα:

Ο γαλακτικός αιθυλεστέρας αποκτά σημαντικό ενδιαφέρον για τη χημική βιομηχανία αφού υπάρχουν αρκετές εφαρμογές του σε διάφορους τομείς. Στον τομέα της φαρμακευτικής βιομηχανίας χρησιμοποιείται ως διαλύτης πολλών βιολογικών δραστικών ενώσεων, αφήνοντας τη φαρμακολογική δραστηριότητα των συστατικών, ανεπηρέαστη. Επιπλέον, υπάρχει η δυνατότητα χρήσης του ως πρόσθετο στα τρόφιμα αφού έχει καθοριστεί ασφαλές από τον FDA. Επιπρόσθετα, η εφαρμογή του ως καθαριστικό στον τομέα της βιομηχανίας πολυουρεθάνης και σε μεταλλικές επιφάνειες προσφέρει αποτελεσματική δράση λόγω της ικανότητας αφαίρεσης γράσων, λαδιών, κόλλων κπλ (Muse and Colvin 2005; Tanaka et al. 2001). Ένας άλλος τομέας στον οποίο βρίσκει εφαρμογή ο γαλακτικός αιθυλεστέρας είναι η γεωργία. Για παράδειγμα ο γαλακτικός αιθυλεστέρας μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την απομάκρυνση του χαλκού ή του καδμίου από μολυσμένα εδάφη. Ακόμα, η ουσία αυτή εφαρμόζεται σε επιχρίσματα (ξύλου, πολυστερενίου ή μετάλλου) και ως πρόσθετο αρωμάτων (Weissermel and Arpe, 1997).

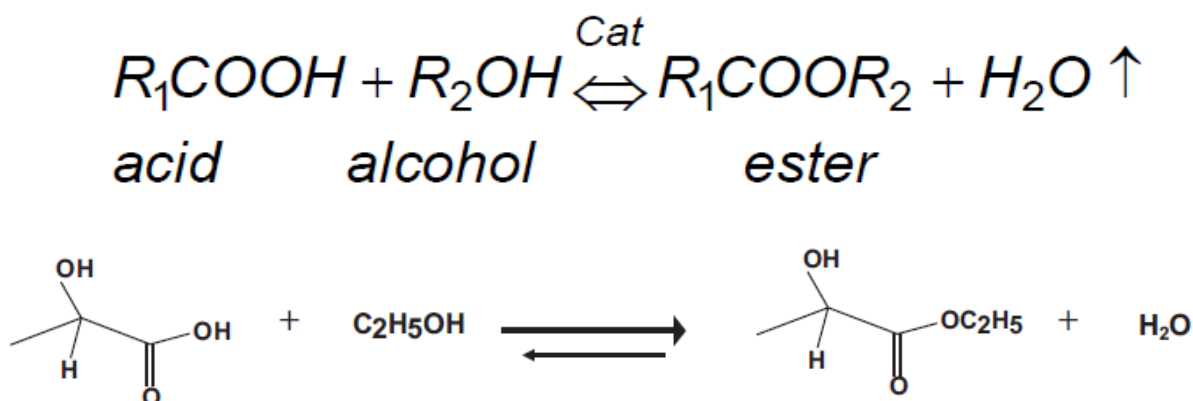
1.3.3 Σύνθεση του γαλακτικού αιθυλεστέρα

Ο γαλακτικός αιθυλεστέρας μπορεί να βρεθεί σε ελάχιστες ποσότητες στη φύση και ειδικότερα σε μερικά τρόφιμα όπως είναι το κοτόπουλο, τα φρούτα και το κρασί (Pereira C.S.M. and Rodrigues A.E. 2014). Ωστόσο, για την παραγωγή μεγαλύτερων

ποσοτήτων χρειάζεται να συντεθεί χημικά ή βιοτεχνολογικά. Η χημική σύνθεση του γαλακτικού αιθυλεστέρα πραγματοποιείται κάτω από δραστικές συνθήκες αντίδρασης με ομοιογενείς καταλύτες πχ. θειικό, υδροχλώριο και φωσφορικό οξύ και άλλα συμβατικά οξέα (Gao et al. 2011). Παρόλα αυτά, η μέθοδος της χημικής σύνθεσης έχει ένα σημαντικό μειονέκτημα το οποίο οφείλεται στον αυτο-πολυμερισμό (self-polymerization) των ομάδων υδροξυλίου και καρβοξυλίου του γαλακτικού οξέος (Hasegawa et al. 2008).

Ηβιοτεχνολογική παραγωγή του γαλακτικού αιθυλεστέρα επιτυγχάνεται με αντίδραση εστεροποίησης του γαλακτικού οξέος και της αιθανόλης εως ότου επέλθει ισορροπία (Carla S. M. Pereira et al. 2009). Στις περισσότερες περιπτώσεις η αντίδραση εστεροποίησης του γαλακτικού οξέος με την αιθανόλη πραγματοποιείται στο στάδιο καθαρισμού του γαλακτικού οξέος σε αντιδραστήρες όπως ο SMBR και ο PVMR (Zhang et al. 2004; Delgado et al. 2007). Γενικώς, η εστεροποίηση είναι η αντίδραση μεταξύ ενός οξέος με μια αλκοόλη (πχ. αιθανόλη, μεθανόλη, βουτανόλη) για τον σχηματισμό ενός εστέρα και νερού (Dhanuka R.V. 1977). Στην προκειμένη περίπτωση, η υδροξυλομάδα της αιθανόλης ενώνεται με την υδροξυλομάδα του γαλακτικού οξέος και αφού γίνει η διάσπαση, παράγεται νερό και γαλακτικός αιθυλεστέρας (Εικόνα 2).

Σημαντικό εμπόδιο της αντίδρασης αυτής αποτελεί ο περιορισμός που προκύπτει από τη θερμοδυναμική ισορροπία λόγω του ότι το αντίστροφο βήμα της αντίδρασης έχει ως αποτέλεσμα τον σχηματισμό νερού ως παραπροϊόν (Wasewar et al. 2009; Carla S M Pereira et al. 2009). Ο καλύτερος τρόπος αντιμετώπισης αυτού του προβλήματος είναι ο καθαρισμός του προϊόντος, παρόλο που το λειτουργικό κόστος αυξάνεται (Pereira C.S.M. and Rodrigues A.E. 2014). Ειδικότερα, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν διάφορες τεχνολογίες διαχωρισμού (πχ. απόσταξη, μεμβράνες) με σκοπό την απομάκρυνση του νερού, την ανάκτηση του γαλακτικού αιθυλεστέρα στην επιθυμητή καθαρότητα αλλά και την ανακύκλωση ποσοτήτων του γαλακτικού οξέος και της αιθανόλης που δεν αντέδρασαν, πίσω στο αντιδραστήρα. Ένας άλλος τρόπος είναι η χρήση του ενός εκ των δύο αντιδρώντων σε περίσσεια για μετατόπιση της ισορροπίας περισσότερο προς τα δεξιά ελαχιστοποιώντας το πρόβλημα. Εντούτοις, ο τρόπος αυτός δεν συνίσταται λόγω του μεγάλου όγκου αντιδραστήρα που απαιτείται (Carla S M Pereira et al. 2009; Wasewar et al. 2009).



Εικόνα 1: Γενική μορφή αντίδρασης εστεροποίησης (πάνω), παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα μέσω αντίδρασης εστεροποίησης (κάτω)

1.4 Αντιδρώντα της εστεροποίησης

Η ανάγκη προστασίας του περιβάλλοντος από κάθε τι που το βλάπτει είναι εκ των ων ουκ άνευ. Είναι λοιπόν επιβεβλημένη η επισταμένη μελέτη των «πράσινων» διαλυτών όπως ο γαλακτικός αιθυλεστέρας, ώστε ο επιστημονικός κόσμος να προβεί άμεσα στην αντικατάσταση των συμβατικών διαλυτών που δεν θεωρούνται και τόσο φιλικό προς το περιβάλλον. Ο γαλακτικός αιθυλεστέρας που προέρχεται από βιομάζα προκύπτει από την αντίδραση εστεροποίησης της αιθανόλης και του γαλακτικού οξέος τα οποία αποτελούν τα προϊόντα της ζύμωσης. Στις επόμενες παραγράφους γίνεται η περιγραφή των γενικών χαρακτηριστικών που διαθέτουν τα αντιδρώντα αυτά καθώς και η ανάλυση της σύνθεσής τους, προκειμένου να κατανοηθεί σε πρώτο στάδιο ο τρόπος δράσης τους και ως εκ τούτου να καταστεί εφικτή και η παρατήρησή τους κατά το πειραματικό στάδιο.

1.4.1 Γαλακτικό οξύ- Lactic acid

1.4.1.1 Γενικά

Το γαλακτικό οξύ ($\text{CH}_3\text{CH}(\text{OH})\text{COOH}$) γνωστό και ως 2-υδροπροπανοϊκό οξύ θεωρείται από τα πιο ευρέως γνωστά καρβοξυλικά οξέα που υπάρχουν στη φύση. Η ομάδα καρβοξυλίου σε συνδυασμό με την ομάδα υδροξυλίου που διαθέτει, καθιστούν το γαλακτικό οξύ ένα πολύ ισχυρό πολικό μόριο. Η απομόνωσή του έγινε για πρώτη φορά το 1780 από τον

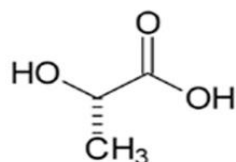
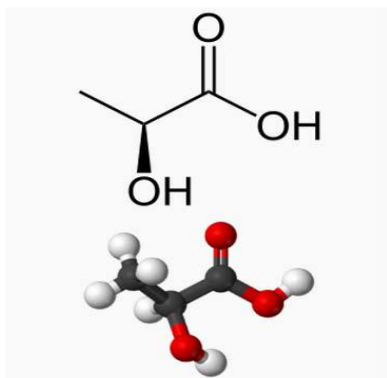
Σουηδό χημικό Carl Wilhelm Scheele, ο οποίος θεώρησε ότι το γαλακτικό οξύ είναι συστατικό του ξινόγαλου(Weeetal. 2006).Αργότερα (1881) παρήχθη και διατέθηκε στο εμπόριο από τον Charles E. Averyat Littleton, ενώ το 1887 ανακαλύφθηκε από τον Pasteurότι τελικά το γαλακτικό οξύ δεν είναι απλό συστατικό του γάλακτος αλλά παράγεται μέσα από την ζύμωση κάποιων μικροοργανισμών ως μεταβολίτης (Benninga 1990).

Γενικότερα, είναι ένα μη πτητικό, άοσμο, λευκό στερεό το οποίο μετατρέπεται πολύ εύκολα σε παχύρευστο υγρό λόγω της υψηλής του υγροσκοπικότητας. Στην υγρή του μορφή είναι διαυγές ή αποκτά ένα ελαφρύ κίτρινο χρώμα. Επίσης, είναι πολύ ευδιάλυτο στο νερό καθώς και σε ευδιάλυτους στο νερό οργανικούς διαλύτες πχ. αιθανόλη. Άλλες φυσικοχημικές ιδιότητες του γαλακτικού οξέος παρουσιάζονται στον πίνακα 1(Martinezetal. 2013; Ren 2010)

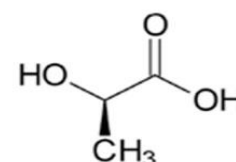
Πίνακας2: Φυσικοχημικές ιδιότητες του γαλακτικού οξέος

Ιδιότητα	Τιμή
Μοριακό βάρος	90.08 g/mol
Πυκνότητα	1.206g/mLστους 25 °C
Σημείο τήξεως	16.8 °C
Σημείο βρασμού	82 °C σε πίεση 0.5 mmHg
Σταθερά διαστάσεως, Ka (στους 25 °C)	1.37.10 ⁻⁴
Θερμότητα ή ενθαλπία καύσεως ΔHc	1361 KJ/mole
Ειδική θερμότητα c (στους 20 °C)	190 J/mole/°C

Όσον αφορά στη δομή του, το γαλακτικό οξύ είναι χειρόμορφο και έχει δύο οπτικά ισομερή. Συγκεκριμένα διαθέτει δύο εναντιομερή, το D(R)-εναντιομερές και το L(S)-εναντιομερές (Εικόνα 1) (Gurta&Kumar 2007). Το L-γαλακτικό οξύ εμφανίζεται σε βακτηριακά και βιολογικά συστήματα όπως για παράδειγμα στους μυς του ανθρώπου μέσω της διάσπασης του γλυκογόνου, σε αντίθεση με το D-γαλακτικό οξύ το οποίο παράγεται μόνο σε βακτηριακά συστήματα (Södergård&Stolt 2002).



(S) - γαλακτικό οξύ
L- (+) -γαλακτικό οξύ



(R) - γαλακτικό οξύ
D- (-) -γαλακτικό οξύ

Εικόνα 2: Μοριακή δομή 2-υδροξυπροπανικό οξύ (αριστερά), οι δύο εναντιομερείς μορφές του γαλακτικού οξέος (δεξιά)

Το γαλακτικό οξύ αποτελεί πλέον ένα ευρέως γνωστό χημικό το οποίο έχει αποκτήσει πληθώρα εφαρμογών. Η κύρια κατηγορία χρήσης του γαλακτικού οξέος είναι τα τρόφιμα. Έχοντας ταξινομηθεί ως GRAS, από τον αμερικάνικο οργανισμό Φαρμάκων και Τροφίμων (FDA), χρησιμοποιείται ως πρόσθετο στα τρόφιμα με σκοπό την παροχή προϊόντων με αυξημένη διάρκεια ζωής και βελτιωμένη γεύση, ως αρωματικό ακόμα και ως ρυθμιστικό του pH. Επιπλέον, το γαλακτικό οξύ εφαρμόζεται στον τομέα των φαρμάκων, των καλλυντικών και στη βιομηχανία χημικών ουσιών (Datta et al. 1995).

1.4.1.2 Σύνθεση γαλακτικού οξέος

Η εμπορική παραγωγή του γαλακτικού οξέος στηρίζεται σε δύο βασικές διεργασίες. Η μία μέθοδος αφορά στην παραγωγή γαλακτικού οξέος ως τελικό προϊόν της ζύμωσης ομοζυμωτικών βακτηρίων και η άλλη μέθοδος είναι χημική και έχει ως κύρια διεργασία της την παραγωγή μείγματος γαλακτικού οξέος μέσω υδρόλυσης του λακτονιτριλίου από ισχυρά οξέα.

1.4.1.3 Βιοτεχνολογική σύνθεση

Πιο συγκεκριμένα η βιοτεχνολογική μέθοδος αποτελείται από το στάδιο της προεπεξεργασίας και της ζύμωσης. Κατά την προεπεξεργασία των πρώτων υλών είτε μέσω όξινης υδρόλυσης είτε μέσω ενζυματικής σακχαροποίησης, οι δεσμοί διασπώνται, σχηματίζοντας απλούστερα σάκχαρα (Gaoetal. 2011; Okanoetal. 2010). Οι πρώτες ύλες που

χρησιμοποιούνται κατά την προεπεξεργασία είναι κατά κόρον ανανεώσιμα υλικά όπως η μελάσα, ο ορός γάλακτος, αμυλούχα υλικά (πατάτα, ρύζι, σίκαλη, κριθάρι, καλαμπόκι) και κυτταρινούχα υλικά (δηλαδή υλικά που περιέχουν κυτταρίνη όπως το χαρτί) (Gupta & Kumar 2007).

Κατά την διάρκεια της ζύμωσης, οι μικροοργανισμοί μεταβολίζουν με τη σειρά τους τα απλούστερα σάκχαρα (πχ.γλυκόζη, ξυλόζη) που προέκυψαν από την προεπεξεργασία, παράγοντας γαλακτικό οξύ το οποίο διαχωρίζεται από τον ζυμό που προκύπτει κατά τη διαδικασία της ζύμωσης (Södergård & Stolt 2002). Επίσης, ανάλογα με την επιλογή του κατάλληλου μικροοργανισμού παράγεται L-, D- ή DL- εναντιομερές γαλακτικό οξύ. Οι κύριες κατηγορίες μικροοργανισμών που χρησιμοποιούνται για τη διαδικασία αυτή είναι τα βακτήρια (πχ. *Lactobacillus amylophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*), και οι μύκητες (πχ.*Rhizopus oryzae*).

1.4.1.4 Χημική σύνθεση γαλακτικού οξέος

Το γαλακτικό οξύ είναι ένα ρακεμικό μίγμα των δύο ισομερών (D ισομερή και L-ισομερή) η σύνθεση του οποίου βασίζεται σε χημική διεργασία και κυρίως στην υδρόλυση του λακτονιτριλίου από ισχυρά οξέα(Holten 1971; John et al. 2007). Πιο συγκεκριμένα, η διαδικασία που λαμβάνει χώρα έχει ως πρωταρχικό βήμα την παραγωγή ακεταλδεΐδης από πετροχημικές πηγές (Lipinsky 1981; Weeetal. 2006). Στην συνέχεια, η ακεταλδεΐδη αντιδρά με μια βάση παράγοντας ακετονιτρίλιο. Έπειτα, ανακτάται το ακατέργαστο λακτονιτρίλιο το οποίο καθαρίζεται μέσω απόσταξης. Έτσι, το πλέον καθαρό λακτονιτρίλιο δρολύεται προς γαλακτικό οξύ είτε μέσω της προσθήκης πυκνού υδροχλωρικού (HCl), είτε μέσω του θειικού οξέος (H₂SO₄) με σκοπό την παραγωγή αμμωνιακού άλατος και γαλακτικού οξέος.

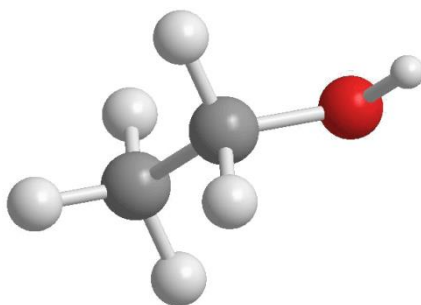
Στη συνέχεια, παράγεται γαλακτικό μεθύλιο μέσω εστεροποίησης του γαλακτικού οξέος με μεθανόλη το οποίο απομονώνεται και καθαρίζεται με απόσταξη. Με αυτό τον τρόπο, η διαδικασία φτάνει στο τελικό στάδιο όπου γίνεται η υδρόλυση του γαλακτικού μεθυλίου, με νερό και τη χρήση όξινου καταλύτη, με σκοπό την τελική παραγωγή του ρακεμικού μείγματος γαλακτικού οξέος και μεθανόλης, η οποία μπορεί να ανακυκλωθεί (Ren 2010).

1.4.2 Αιθανόλη

1.4.2.1 Γενικά

Η αιθανόλη($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) διαδραματίζει σημαίνοντα ρόλο στην παρούσα μελέτη αφού αποτελεί το ένα από τα δύο αντιδρώντα της εστεροποίησης για την παραγωγή του γαλακτικού αιθυλεστέρα. Είναι μια διαυγής, υγρή ουσία η οποία διακατέχεται από ευχάριστη χαρακτηριστική μυρωδιά και ανήκει στην κατηγορία των αλκοολών λόγω της ομάδας υδροξυλίου ($-\text{OH}$) που είναι ενωμένη σε ένα άτομο άνθρακα. Η παρουσία της υδροξυλομάδας στο μόριο της αιθανόλης, προσδίδει στην ουσία την ιδιότητα της πολικότητας (Demirbas 2005).

Η ουσία αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως διαλύτης (πχ. σε βερνίκια, σε αρώματα και σε καθαριστικά) αφού αναμιγνύεται εύκολα με το νερό καθώς και με τους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Επίσης, η αιθανόλη χρησιμοποιείται ως καύσιμο (αναμιγνυόμενο με την βενζίνη) για μηχανοκίνητα οχήματα λόγω της ιδιαιτερότητα που έχει αποκτήσει τα τελευταία χρόνια ως εναλλακτική πηγή ενέργειας. Η χρήση της σε αυτό τον τομέα συμβάλλει αφενός την μείωση της κατανάλωσης του αργού πετρελαίου και αφετέρου την μείωση της ρύπανσης του περιβάλλοντος. Ακόμα χρησιμοποιείται στην παραγωγή αλκοολούχων ποτών και στην παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων (Lang et al. 2001; Irvine 2003).



Εικόνα 3: Τρισδιάστατη μοριακή δομή της αιθανόλης

1.4.2.2 Παραγωγή αιθανόλης

Ο τρόπος παραγωγής της αιθανόλη μπορεί να επιτευχθεί τόσο με βιοτεχνολογικές όσο και μεχημικές μεθόδους. Η χημική σύνθεση της αιθανόλης δύναται να συντελεστεί σε τρία στάδια. Αρχικά οι πρώτες ύλες που περιέχουν αιθυλένιο, εκτίθενται σε θειικό οξύ. Στη συνέχεια η αιθανόλη διαχωρίζεται από το θειικό οξύ και τέλος το θειικό οξύ συμπυκνώνεται

και ανακυκλώνεται (Demirbas 2005). Σήμερα, η χημική μέθοδος χρησιμοποιείται πολύ συχνά, όμως τα περιβαλλοντικά προβλήματα που προκαλούνται οδήγησαν πολλές βιομηχανίες να ακολουθήσουν μεθόδους φιλικότερες προς το περιβάλλον. Η βιοτεχνολογική παραγωγή της αιθανόλης είναι επομένως μια καλή εναλλακτική μέθοδος, η οποία είναι γνωστή από αρχαιότατων χρόνων.

Η διαδικασία παραγωγής αιθανόλης μέσω της βιοτεχνολογικής μεθόδου, ακολουθεί κάποια στάδια. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται μια προεπεξεργασία των πρώτων υλών, όπου τα μεγάλα μοριακού βάρους σάκχαρα διασπώνται μέσω της υδρόλυσης, στα μονομερή τους διευκολύνοντας έτσι την βιολογική δραστηριότητα που επέρχεται στο επόμενο στάδιο (Demirbas 2005). Μερικά παραδείγματα πρώτων υλών που περιέχουν σάκχαρα είναι οι καλλιέργειες από ζαχαρότευτλα ή ζαχαροκάλαμο, οι καλλιέργειες καλαμποκιού ή μανιόκας και βιομάζα από κυτταρινικές πηγές όπως το ξύλο ή τα γεωργικά υπολείμματα (Lietal. 2005). Το δεύτερο κύριο στάδιο της βιοτεχνολογικής μεθόδου είναι η ζύμωση των σακχάρων από ζύμες, μετατρέποντας τα σε αιθανόλη ενώ τελευταίο στάδιο αποτελεί ο διαχωρισμός και η ανάκτηση του τελικού προϊόντος (αιθανόλης) μέσω της απόσταξης (Galbe&Zacchi 2002).

1.5 Ένζυμα

Τα ένζυμα διαδραμάτισαν πολύ σημαντικό ρόλο στην παρούσα εργασία αφού λειτούργησαν ως βιοκαταλύτες της αντίδρασης εστεροποίησης με σκοπό την επιτάχυνση της παραγωγής γαλακτικού αιθυλεστέρα. Η δράση των ενζύμων στις χημικές αντιδράσεις, η ακινητοποίηση των ενζύμων, οι λιπάσες αλλά και η σχέση των λιπασών με την εστεροποίηση είναι μερικά από τα θέματα που αφορούν την παρούσα πτυχιακή εργασία, τα οποία περιγράφονται με λεπτομέρεια στις επόμενες παραγράφους.

1.5.1 Η δράση των ενζύμων στις χημικές αντιδράσεις

Τα ένζυμα είναι βιομόρια πρωτεϊνικής φύσεως που αποτελούνται από μια ή περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Διαδραματίζουν πολύ σημαντικό ρόλο στις περισσότερες βιοχημικές αντιδράσεις αφού κύρια λειτουργία τους είναι η κατάλυση και γι' αυτό συχνά ονομάζονται και βιοκαταλύτες. Οι καταλύτες εξ ορισμού, είναι οι ουσίες που μεταβάλλουν την ταχύτητα διεξαγωγής μιας χημικής αντίδρασης, χωρίς να παρουσιάζονται στα τελικά

προϊόντα και χωρίς να αλλοιώνονται οι ίδιοι κατά την διάρκεια της αντίδρασης (Κλώνης 2010). Τα ένζυμα, ως βιοκαταλύτες, μπορούν να επιταχύνουν τον ρυθμό με τον οποίο επιτυγχάνεται μια αντίδραση, μειώνοντας έτσι την απαιτούμενη ενέργεια για την εκκίνηση της αντίδρασης (Illanes & Altamirano 2008). Με αυτό τον τρόπο, το σημείο ισορροπίας πραγματοποιείται σε συντομότερο χρονικό διάστημα σε σχέση με το σημείο ισορροπίας-αντίδρασης εν απουσία ενζύμου. Επίσης, ένα ένζυμο συνήθως εμφανίζει μεγάλο βαθμό εξειδίκευσης αφού μπορεί να καταλύσει μια μόνο χημική αντίδραση ή μια σειρά από πολύ συγγενικές αντιδράσεις (Kulcsar&Nagy 2009).

Ο τρόπος δράσης των ενζύμων έγκειται καταρχάς στην αντίδραση ενζύμου-υποστρώματος. Συγκεκριμένα, τα ένζυμα διαθέτουν μια περιοχή (ενεργό κέντρο), στην οποία μπορεί να συνδεθεί το υπόστρωμα και να σχηματίσει ένα σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Το σύμπλοκο αυτό στη συνέχεια διασπάται και παράγεται το προϊόν της αντίδρασης καθώς και το αμετάβλητο ένζυμο. Ωστόσο, πολλές φορές τα ένζυμα δεν μπορούν να δράσουν από μόνα τους και γι' αυτό είναι απαραίτητη η παρουσία συνενζύμων. Μειονέκτημα αποτελεί το ότι η ενζυμική δραστηριότητα επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες μεταξύ των οποίων το pH, η θερμοκρασία και η συγκέντρωση του υποστρώματος (Yan et al. 2002).

1.5.2 Ακίνητοποίηση ενζύμων

Η ακίνητοποίηση των ενζύμων είναι ένας τρόπος τεχνητού περιορισμού της κινητικότητάς τους αλλά και διατήρησης της καταλυτικής τους δράσης, μέσω διαφόρων τεχνικών (Waldmann & Gmbh 2002). Η ακίνητοποίηση των ενζύμων εστιάζεται σε τέσσερις κύριες μεθόδους:

1. Την φυσική προσρόφηση σε μια στερεή επιφάνεια.
2. Την παγίδευση-ενθυλάκωση σε πορώδη μήτρα/μεμβράνη/κάψουλα.
3. Την εγκάρσια σύνδεση του ενζύμου με ένα πολυλειτουργικό παράγοντα.
4. Την ομοιοπολική σύζευξη ενζύμου σε στερεό υπόστρωμα.

Οι φορείς ακίνητοποίησης ή αλλιώς υποστηρικτικά υλικά αποτελούν την στερεά φάση στην οποία πραγματοποιείται η καθήλωση των ενζύμων. Οι φορείς καλύπτουν ένα φάσμα από διαφορετικά είδη υλικών, μεταξύ αυτών φυσικές ή συνθετικές μήτρες πολυϋδροξυλίου, πορώδεις ανόργανους φορείς, μικροπορώδη μοριακά κόσκινα, ζεόλιθοι κλπ (Yan et al. 2002). Τα υλικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία ήταν το Macrospore

acrylic resin, το Polypropylene, το DVB-crosslinked methacrylate, το Macropose styrene, το DVB/ methacrylate και το Epoxy/Butyl methacrylate.

Τα βασικά πλεονέκτημα που προσφέρει η ακινητοποίηση ενζύμων είναι ο έλεγχος της βακτηριακής μόλυνσης καθώς και η δυνατότητα ανάκτησης του ενζύμου λόγω του εύκολου διαχωρισμού από τα διαλυμένα προϊόντα της αντίδρασης(Waldmann &Gmbh 2002). Ακόμα η ακινητοποίηση ενισχύει την σταθερότητα και την καταλυτική δράση των ενζύμων ενώ ταυτόχρονα μπορεί να αναστέλλει ανεπιθύμητες διεργασίες όπως η αυτόλυση (Yan et al. 2002). Σημαντικό όμως μειονέκτημα της ακινητοποίησης ενζύμων είναι το κόστος του φορέα ακινητοποίησης το οποίο κάποιες φορές μπορεί να ξεπερνά το κόστος του ίδιου του ενζύμου (Waldmann & Gmbh 2002). Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ακινητοποιημένα ένζυμα, (λιπάσες) τα οποία ήταν ακινητοποιημένα πάνω σε έξι διαφορετικούς φορείς.

1.5.3 Λιπάσες

Οι λιπάσες είναι μια κατηγορία ενζύμων, οι οποίες στη φύση τους λειτουργούν σε βιολογικά συστήματα (μικροβιακό, φυτικό και ζωικό σύστημα) μέσω της υδρόλυσης τωντριγλυκεριδίων προς ελεύθερα λιπαρά οξέα και γλυκερόλη (de Zoeteetal. 1994). Πέραν όμως από τη φυσική δραστηριότητά τους, οι λιπάσες μπορούν να λειτουργήσουν ως βιοκαταλύτες σε πολλές βιομηχανικές διεργασίες κάτω από εξαιρετικά ήπιες συνθήκες όπως για παράδειγμα σε αντιδράσεις εστεροποίησης, οξέολυσης και αλκοόλυσης (Gunstone 1999). Το χαρακτηριστικό που τις κάνει να διαφέρουν από τις εστεράσες είναι η διεπιφανειακή τους δράση, δηλαδή έχουν την ικανότητα να δρουν στην επιφάνεια που βρίσκεται ανάμεσα στην υδατική και στην μη υδατική φάση (Kim et al. 1997).

Οι λιπάσες χρησιμοποιούνται ευρέως σε βιομηχανίες γαλακτοβιομηχανικών προϊόντων και τροφίμων, σε απορρυπαντικά, σε φαρμακευτικά προϊόντα και καλλυντικά, λόγω της εύκολης διαθεσιμότητάς τους, του χαμηλού τους κόστους, της σταθερότητάς τους κάτω από δυσμενείς συνθήκες αλλά κυρίως λόγω της εξαιρετικής στερεοεκλεκτικότητας που παρουσιάζουν (Gandhietal. 2000).

1.5.3.1 *Candida antartica* –*Candida rugosa*

Κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας, οι λιπάσεςπου χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από τους μικροοργανισμούς *Candida antartica* και *Candida rugosa*. Η λιπάση του ζυμομύκητα *Candida antartica* είναι ένα μονομερές το οποίο ανήκει στην οικογένεια της α/β

υδρολάσης αποτελούμενο από 317 αμινοξέα (Gotor-Fernándezetal. 2006). Η CALσε σχέση με άλλες λιπάσες έχει περιορισμένο διαθέσιμο χώρο στο δραστικό θύλακά της και γι' αυτό το λόγο εμφανίζει υψηλό βαθμό εκλεκτικότητας (Idris & Bukhari 2012). Η χρήση τους σε οργανικές συνθέσεις, έχει καταδειχθεί πολύ αποτελεσματική λόγω της υψηλής εκλεκτικότητας και καταλυτικής δράσης που παρουσιάζουν κυρίως σε αντιδράσεις εστεροποίησης που λαμβάνουν χώρα σε οργανικούς διαλύτες μετεστεροποίησης και αμινόλυσης (Paivaetal. 2002). Η ζύμη *Candida rugosa* είναι ένας μη-σπορογόνος, μη-παθογόνος, ψευδονηματώδης μικροοργανισμός ο οποίος μπορεί να παράγει πολλαπλά ισοένζυμα λιπάσης (Benjamin & Pandey 1998). Οι λιπάσες του μικροοργανισμού *Candida rugosa* (CRLs), διαθέτουν από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα με 543 αμινοξέα έχοντας διαφορετικές καταλυτικές ιδιότητες η κάθε μια. Γι' αυτόν τον λόγο οι CRL σέχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στον τομέα της βιοκατάλυσης διαφόρων αντιδράσεων όπως της υδρόλυσης, της εστεροποίησης και της μετεστεροποίησης (Schmitt et al. 2002).

1.5.4 Η σχέση των λιπάσων με την εστεροποίηση

Τα τελευταία χρόνια έχουν γίνει αρκετές προσπάθειες για την κατάλυση της αντίδρασης εστεροποίησης γαλακτικού οξέος από τα ένζυμα. Ελάχιστα όμως είναι τα ένζυμα τα οποία καταλύουν τις αντιδράσεις εστεροποίησης, μεταξύ οργανικών οξέων και αλκοολών, με μεγάλη επιτυχία. Μεταξύ αυτών των ενζύμων ανήκουν οι λιπάσες. Η υψηλή καταλυτική δράση που εμφανίζουν στις αντιδράσεις εστεροποίησης μεταξύ οργανικών οξέων και αλκοολών οφείλεται στο μεγάλο βαθμό εκλεκτικότητας που έχουν σε αυτού του είδους τις αντιδράσεις (Hasegawaetal. 2008). Παρ' όλα αυτά, συχνά υπάρχουν προβλήματα στην επίτευξη της καταλυόμενης εστεροποίησης του γαλακτικού οξέος από τις λιπάσες. Τα προβλήματα της υψηλής τοξικότητας του γαλακτικού οξέος καθώς και της ισχυρής του πολικότητάς, έχουν ως αποτέλεσμα την απενεργοποίηση των ενζύμων. Επίσης μπορούν να προκαλέσουν μείωση της αναμειξιμότητας των ενζύμων με τους οργανικούς διαλύτες, οι οποίοι χρησιμοποιούνται ως μέσα αντίδρασης σε μη υδατικά συστήματα και θεωρούνται ελάχιστα επιβλαβείς για τα ένζυμα λόγω του ότι οι περισσότεροι είναι υδρόφοβοι (Reetz 2002; Burke & Klibanov 1991).

2 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Όργανα – Υλικά – Μέθοδοι

Το πειραματικό μέρος έχει διαχωριστεί σε δύο κύριες ενότητες, στην προετοιμασία των δειγμάτων και την ανάλυση με αέρια χρωματογραφία, όπου περιγράφονται τα όργανα, τα υλικά και η πειραματική μεθοδολογία που ακολουθήθηκε. Στην ενότητα της προετοιμασίας των διαλυμάτων αναλύεται η μέθοδος με την οποία ζυγίστηκαν τα ένζυμα, παρασκευάστηκαν τα διαλύματα και τοποθετήθηκαν στο incubator. Στην επόμενη ενότητα που αφορά στην ανάλυση των διαλυμάτων στο GC, περιγράφεται η μέθοδος προσδιορισμού της συγκέντρωσης του γαλακτικού αιθυλεστέρα στους διάφορους διαλύτες (δεκάνιο, τολουόλιο, αιθανόλη) ανά τακτά χρονικά διαστήματα.

2.1.1 Προετοιμασία διαλυμάτων

2.1.1.1 Ζύγιση ενζύμων

Αρχικό στάδιο για την προετοιμασία των δειγμάτων ήταν η ζύγιση των ενζύμων. Το μοντέλο του αναλυτικού ζυγού που χρησιμοποιήθηκε για τη ζύγιση των ενζύμων ήταν το KERNABJ-NM/ABS-N. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν για την διεξαγωγή των πειραμάτων ήταν λιπάσες. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε λιπάση από *Candida antrartica*-τύπου A με την εμπορική ονομασία Novozyme 435. Επίσης χρησιμοποιήθηκε η λιπάση του μικροοργανισμού *Candida rugosa*, η οποία ήταν ακινητοποιημένη σε πέντε διαφορετικούς φορείς ακινητοποίησης (Accurel MP 1000, Lewatit VP OC 1600, Lifetech AP 1090, Lifetech ECR 1030, Lifetech ECR 8285).

2.1.1.2 Παρασκευή διαλυμάτων με την χρήση διαλυτών:

2.1.1.2.1 Πείραμα A: Εστεροποίηση σε δεκάνιο με συγκέντρωση ενζύμου που αντιστοιχεί στο 10 % w/wτων αντιδρώντων

Στο πείραμα αυτό μεταφέρθηκαν σε vialstou GC, ενζύμα συγκέντρωσης 6.8 mg/Lπου αντιστοιχεί στο 10 % w/wτων αντιδρώντων. Επίσης, μεταφέρθηκαν 67 μLγαλακτικού οξέος (0.5 M) και 52 μL αιθανόλης (0.5 M), ενώ το υπόλοιπο ήταν διαλύτης (δεκάνιο καθαρότητας

$\geq 95\%$). Ο συνολικός όγκος διαλύματος ήταν 1.8 mL. Τέλος, πραγματοποιήθηκε η παρασκευή ενός διαλύματος control, το οποίο δεν περιείχε ένζυμα.

2.1.1.2.2 Πείραμα Β: Εστεροποίηση σε δεκάνιο με συγκέντρωση ενζύμου που αντιστοιχεί στο 20 % w/w των αντιδρώντων

Στο πείραμα Β, μεταφέρθηκαν σε vials του GC, ένζυμα συγκέντρωσης 13.5mg/L που αντιστοιχεί στο 20%w/w των αντιδρώντων. Οι ποσότητες γαλακτικού οξέος, αιθανόλης και διαλύτη που μεταφέρθηκαν ήταν ίδιες με του πειράματος Α. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το δεκάνιο και ο συνολικός όγκος διαλύματος ήταν 1.8 mL. Επίσης, παρασκευάστηκε ένα διάλυμα control το οποίο δεν περιείχε ένζυμα.

2.1.1.2.3 Εστεροποίηση σε τολουόλιο

Στο πείραμα αυτό, ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε το τολουόλιο (καθαρότητας $\geq 99.5\%$). Αρχικά η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η τοποθέτηση ενζύμου Novozyme 435 συγκέντρωσης 6.8 mg/L που αντιστοιχεί στο 10 % w/w των αντιδρώντων, σε δύο vial του GC. Ο συνολικός όγκος των διαλυμάτων ήταν 1.8 mL. Έτσι, στο ένα από τα δύο vials μεταφέρθηκαν 1.34 μ L γαλακτικού οξέος (0.01 M), 52 μ L αιθανόλης και το υπόλοιπο ήταν διαλύτης, ενώ στο άλλο vial, μεταφέρθηκαν 134 μ L γαλακτικού οξέος (1 M), 52 μ L αιθανόλης και το υπόλοιπο ήταν διαλύτης. Επίσης παρασκευάστηκαν δύο διαλύματα control τα οποία περιείχαν μόνο γαλακτικό οξύ, αιθανόλη και διαλύτη.

2.1.1.3 Παρασκευή διαλυμάτων χωρίς την χρήση διαλυτών (solvent-free system)

Σε αυτό το πείραμα τοποθετήθηκαν σε vials του GC, ένζυμα συγκέντρωσης 6.8 mg/L που αντιστοιχεί στο 10 % w/w των αντιδρώντων. Ο συνολικός όγκος ήταν 1.8 mL, έτσι μεταφέρθηκαν 67 μ L γαλακτικού οξέος (0.5 M) και όλο το υπόλοιπο ήταν αιθανόλη (absolute). Ακόμα, παρασκευάστηκε ένα διάλυμα control, το οποίο περιείχε μόνο γαλακτικό οξύ και αιθανόλη.

Επίσης, πραγματοποιήθηκε η παρασκευή δύο διαλυμάτων συνολικού όγκου 1.8 mL, στα οποία τοποθετήθηκε ένζυμο Novozyme 453, συγκέντρωσης 6.8 mg/L που αντιστοιχεί στο 10 % w/w των αντιδρώντων. Ακολούθως, στο ένα διάλυμα μεταφέρθηκαν 1,34 μ L γαλακτικού οξέος (0.01 M) και στο άλλο 134 μ L γαλακτικού οξέος (1 M), ενώ η υπόλοιπη ποσότητα και στα δύο διαλύματα ήταν αιθανόλη (absolute). Τέλος, παρασκευάστηκαν δύο διαλύματα control τα οποία δεν περιείχαν ένζυμο αλλά μόνο γαλακτικό οξύ και αιθανόλη.

2.1.1.4 Τοποθέτηση διαλυμάτων σε επωαστήρα-κλίβανο (incubator)

Τελικό στάδιο της προετοιμασίας των δειγμάτων προτού αναλυθούν στον αέριο χρωματογράφο (GC) ήταν η τοποθέτηση τους στο incubator για ανάδευση στα 100 rpm και στους 30 °C. Το μοντέλο του incubator που χρησιμοποιήθηκε ήταν το Stuart orbital SI600 incubator.

2.1.2 Ανάλυση διαλυμάτων με αέρια χρωματογραφία

Ο προσδιορισμός της συγκέντρωσης του γαλακτικού αιθυλεστέρα ανά τακτά χρονικά διαστήματα, πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας την μέθοδο της αέριας χρωματογραφίας (GC). Η ανάλυση έγινε σε ένα GC-2014 SHIMADZU όργανο, συνδεδεμένο με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας FID (εικόνα 3). Ο εισαγωγέας δείγματος ήταν ένας AOC-20i με επιλεγμένο όγκο έγχυσης 1 μ L. Το μοντέλο της χρησιμοποιούμενης στήλης ήταν το Zebron ZB-5, με διαστάσεις 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m (μήκος x εσωτερική διάμετρος x πάχος φιλμ), ενώ ως φέρον αέριο (κινητή φάση) χρησιμοποιήθηκε το άζωτο (N_2).

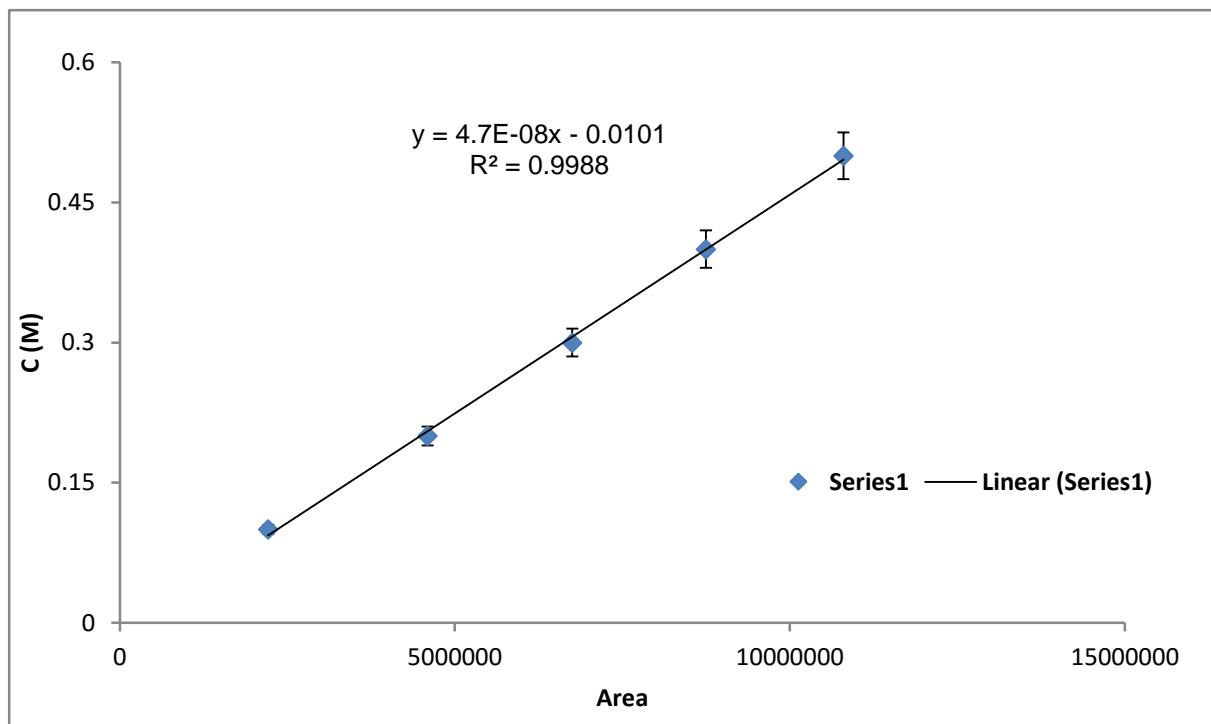


Εικόνα 4: Διάταξη GC

2.1.2.1 Μέθοδος προσδιορισμού γαλακτικού αιθυλεστέρα σε δεκάνιο:

Για την μέθοδο προσδιορισμού της συγκέντρωσης του γαλακτικού αιθυλεστέρα σε δεκάνιο, η συνολική ροή του δείγματος ήταν 40.8 mL/min και η ροή στη στήλη 1,51 mL/min. Η κατώτερη θερμοκρασία στη στήλη ρυθμίστηκε στους 100 °C. Ακολούθως η θερμοκρασία ανέβαινε σταδιακά με ρυθμό 30 °C / min μέχρι να φτάσει τους 200 °C όπου παρέμεινε για 1

min. Η μέθοδος βαθμονομήθηκε με την προπαρασκευή και ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων γαλακτικού αιθυλεστέρα σε δεκάτιο διαφόρων συγκεντρώσεων (γράφημα 1). Στο ακόλουθο γράφημα παρατίθενται οι συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων και τα αντίστοιχα εμβαδά των κορυφών τους στον χρόνο κατακράτησης του γαλακτικού αιθυλεστέρα ($t_{R\text{ethylactate}}=1.635$).



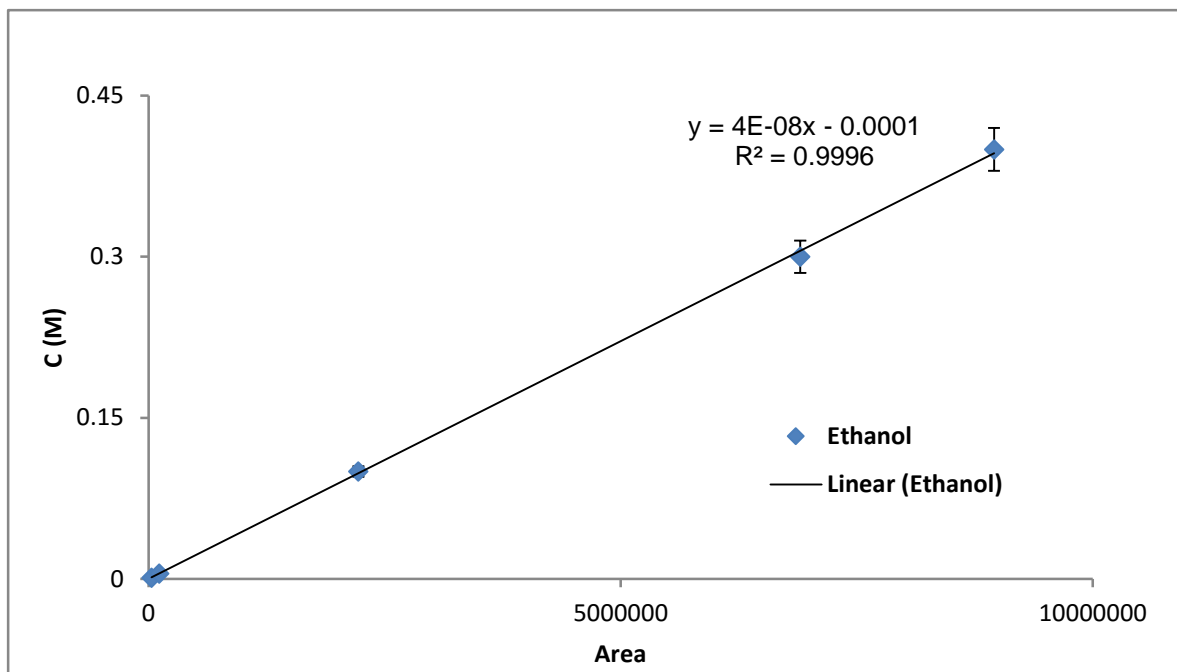
Γράφημα 1: Καμπύλη βαθμονόμησης γαλακτικού αιθυλεστέρα σε δεκάτιο

Σε αυτό το γράφημα παρουσιάζεται η εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης καθώς και η τιμή R^2 . Η καμπύλη βαθμονόμησης είναι σχεδόν γραμμική αφού ο συντελεστής R^2 πλησιάζει αρκετά την μονάδα.

2.1.2.2 Μέθοδος προσδιορισμού γαλακτικού αιθυλεστέρα σε αιθανόλη (solvent-free system)

Για τη μέθοδο προσδιορισμού της συγκέντρωσης του γαλακτικού αιθυλεστέρα σε αιθανόλη, η συνολική ροή του δείγματος ήταν 43 mL/min και η ροή στη στήλη 1,60mL/min. Ως κατώτατα και ανώτατα θερμοκρασιακά όρια της μεθόδου ορίστηκαν οι 70 και 160 °C αντίστοιχα, ενώ ο ρυθμός με τον οποίο ανέβαινε σταδιακά η θερμοκρασία μέσα σε αυτό το εύρος, ρυθμίστηκε στους 40 °C/min. Ο χρόνος παραμονής στους 160 °C ήταν 1 min. Η

μέθοδος βαθμονομήθηκε με την προπαρασκευή και ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων γαλακτικού αιθυλεστέρα σε αιθανόλη διαφόρων συγκεντρώσεων (γράφημα 2). Στο ακόλουθο γράφημα παρατίθενται οι συγκεντρώσεις των πρότυπων διαλυμάτων και τα αντίστοιχα εμβαδά των κορυφών τους στον χρόνο κατακράτησης του γαλακτικού αιθυλεστέρα ($t_{R\text{ethylactate}}=1.852$).



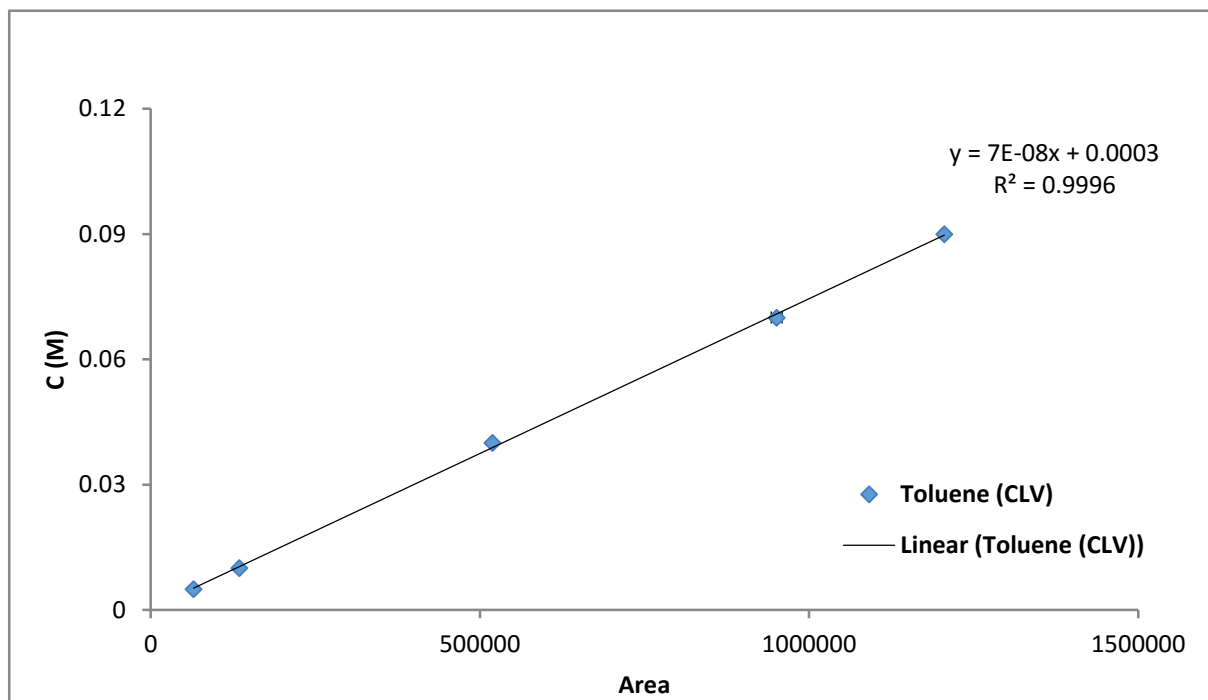
Γράφημα 2: Καμπύλη βαθμονόμησης γαλακτικού αιθυλεστέρα σε αιθανόλη

Στο γράφημα παρουσιάζεται η εξίσωση της καμπύλης βαθμονόμησης καθώς και η τιμή R^2 . Η καμπύλη βαθμονόμησης είναι σχεδόν γραμμική αφού ο συντελεστής R^2 πλησιάζει αρκετά την μονάδα.

2.1.2.3 Μέθοδος προσδιορισμού γαλακτικού αιθυλεστέρα σε τολουόλιο

Για τη μέθοδο προσδιορισμού της συγκέντρωσης του γαλακτικού αιθυλεστέρα σε τολουόλιο, η συνολική ροή του δείγματος ήταν 80mL/min και η ροή στη στήλη 1,54mL/min. Κατώτατο θερμοκρασιακό όριο της μεθόδου ήταν οι 90 °C, ενώ ως ανώτατο θερμοκρασιακό όριο της μεθόδου ορίστηκαν οι 160 °C. Τόσο στο κατώτατο, όσο και στο ανώτατο θερμοκρασιακό όριο, ο χρόνος παραμονής ήταν 1 min. Η μέθοδος βαθμονομήθηκε με την παρασκευή και ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων γαλακτικού αιθυλεστέρα σε τολουόλιο. Χρησιμοποιώντας τα εμβαδά των κορυφών των αντίστοιχων πρότυπων διαλυμάτων που προέκυψαν στον χρόνο

κατακράτησης του γαλακτικού αιθυλεστέρα ($t_{\text{Rethyllactate}}=1.945$). παρασκευάστηκε η καμπύλη βαθμονόμησης (γράφημα 3).



Γράφημα 3: Καμπύλη βαθμονόμησης γαλακτικού αιθυλεστέρα σε τολουόλιο. Σε αυτό το γράφημα φαίνεται η εξίσωση της καμπύλης και η τιμή R^2 , από την οποία συμπεραίνουμε ότι είναι σχεδόν γραμμική.

3 ΑΝΑΛΥΣΗ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Στόχος του παρόντος κεφαλαίου είναι η καταγραφή και λεπτομερής παρουσίαση των αποτελεσμάτων του εκάστοτε πειράματος κατά σειρά εκτέλεσής του. Σε πρώτο στάδιο, παρουσιάζεται η απόδοση του γαλακτικού αιθυλεστέρα σε σχέση με το χρόνο για όλα τα πειράματα, ενώ στη συνέχεια γίνεται συγκριτική ανάλυση και συσχέτιση των πειραμάτων με βάση διάφορους παράγοντες. Ακόμα, παρατίθενται σε πίνακες οι συνθήκες διεξαγωγής του κάθε πειράματος και τα σχετικά διαγράμματα των αποτελεσμάτων. Τέλος, καταγράφονται

σχετικές παρατηρήσεις επί του θέματος και αναλύονται τα αποτελέσματα ούτως ώστε να εξαχθούν τα συμπεράσματα.

3.1 Εστεροποίηση σε δεκάνιο

3.1.1 Πείραμα Α: Εστεροποίηση σε δεκάνιο με συγκέντρωση ενζύμων που αντιστοιχεί στο 10% w/w των αντιδρώντων

Στο πλαίσιο της παρούσας πτυχιακής εργασία πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων, στο καθένα από τα οποία εξετάστηκαν διαφορετικοί παράμετροι.

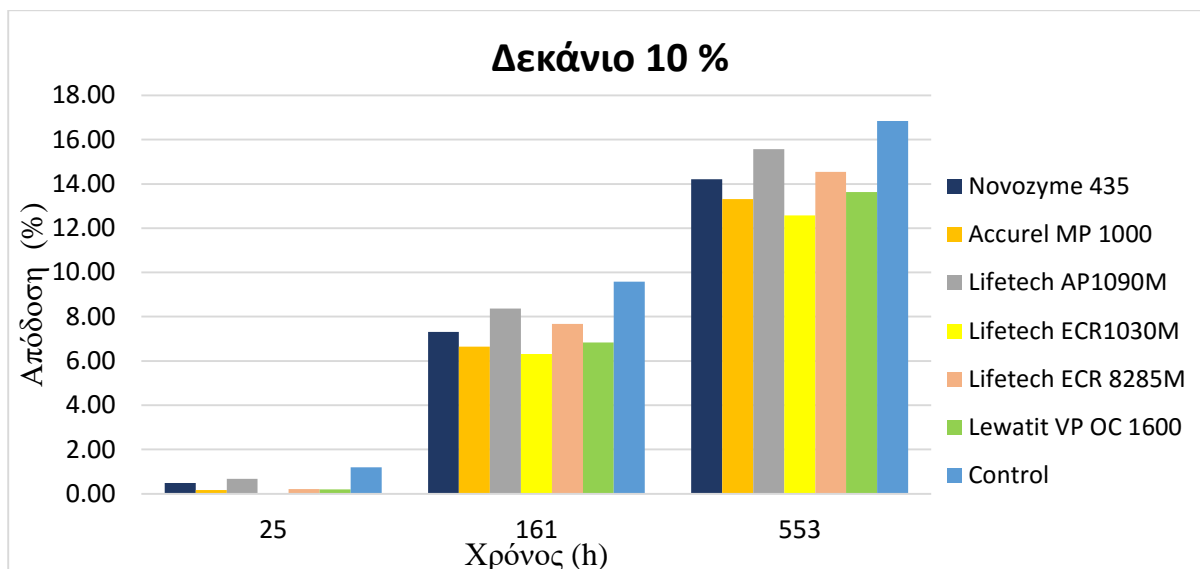
Οι παράμετροι που εξετάστηκαν στο πείραμα Α φαίνονται στον πιο κάτω πίνακα:

Πίνακας3:Συνθήκες διεξαγωγής πειράματος Α

Διαλύτης	Δεκάνιο
Ένζυμα	Novozyme 435, Accurel MP 1000, Lewatit VP OC 1600, Lifetech AP 1090, Lifetech ECR 1030, Lifetech ECR 8285
Συγκέντρωση ενζύμων	6.8 mg/L (αντιστοιχεί στο 10 % w/w των αντιδρώντων)
Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος	0.5 M
Συγκέντρωση αιθανόλης	0.5 M
Θερμοκρασία	30 °C
rpm	100

3.1.1.1 Απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα σε σχέση με τον χρόνο

Η μελέτη της απόδοσης του γαλακτικού αιθυλεστέρα με το πέρασμα του χρόνου είναι πολύ σημαντική. Στο πιο κάτω γράφημα παρουσιάζεται η χρονική πορεία της απόδοσης του γαλακτικού αιθυλεστέρα για το πείραμα 1.



Γράφημα 4: Παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα σε σχέση με το χρόνο για το πείραμα A

Στο γράφημα 4, καθίσταται σαφές ότι η απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα αυξάνεται με το πέρασμα του χρόνου. Στις 25h η αντίδραση δεν φτάνει σε ισορροπία γι' αυτό παρατηρείται ελάχιστη έως και καθόλου απόδοση. Επίσης, με το πέρασμα του χρόνου, η απόδοση σε γαλακτικό αιθυλεστέρα στο διάλυμα control είναι μεγαλύτερη από τις αποδόσεις των διαλυμάτων με ένζυμα λόγω του ότι τα ένζυμα δεν έδρασαν σε αυτές τις συνθήκες. Γενικά, όμως η απόδοση σε γαλακτικό αιθυλεστέρα υπό αυτές τις συνθήκες είναι πολύ χαμηλή.

3.1.2 Πείραμα B: Εστεροποίηση σε δεκάνιο με συγκέντρωση ενζύμων που αντιστοιχεί στο 20% w/w των αντιδρώντων

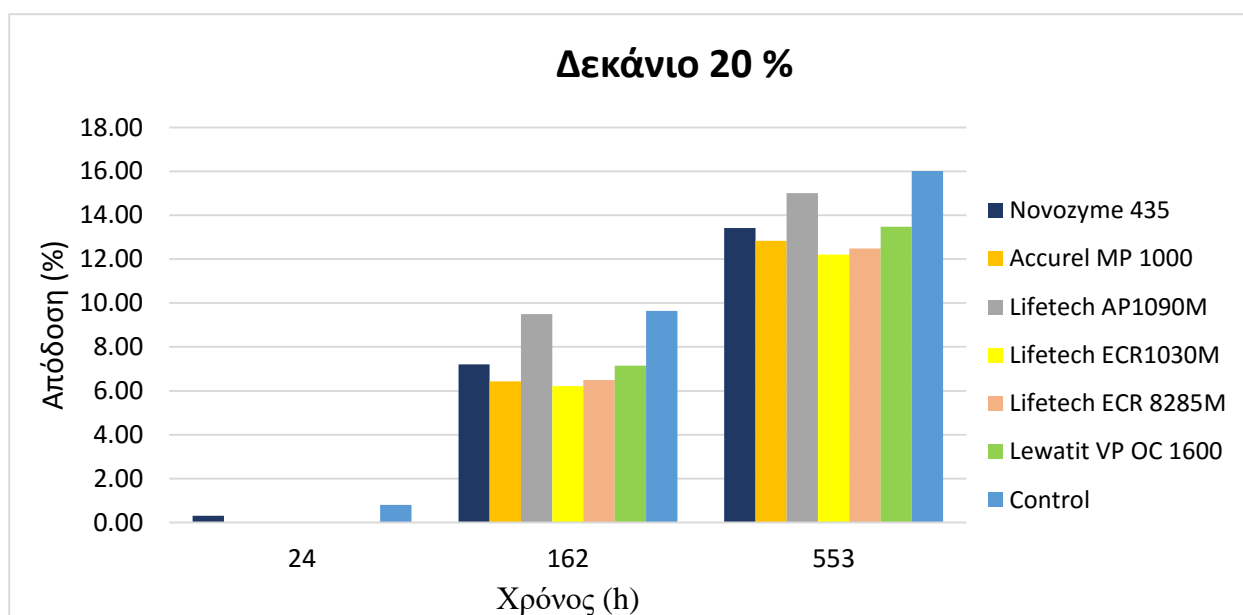
Εφόσον το πείραμα A δεν είχε πολύ καλά αποτελέσματα, δοκιμάστηκε το πείραμα B, χρησιμοποιώντας διπλάσια ποσότητα βιοκαταλύτη, όπως φαίνεται στον πιο κάτω πίνακα, προκειμένου να διαπιστωθεί αν η αύξηση του βιοκαταλύτη θα αυξήσει την απόδοση σε γαλακτικό αιθυλεστέρα.

Πίνακας 4: Συνθήκες διεξαγωγής πειράματος Β

Διαλύτης	Δεκάνιο
Ένζυμα	Novozyme 435, Accurel MP 1000, Lewatit VP OC 1600, Lifetech AP 1090, Lifetech ECR 1030, Lifetech ECR 8285
Συγκέντρωση ενζύμων	13.5mg/L (αντιστοιχεί στο 20 % w/w των αντιδρώντων)
Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος	0.5 M
Συγκέντρωση αιθανόλης	0.5 M
Θερμοκρασία	30 ° C
rpm	100

3.1.2.1 Απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα σε σχέση με το χρόνο

Στο ακόλουθο γράφημα, παρουσιάζεται η διαφοροποίηση της απόδοσης γαλακτικού αιθυλεστέρα με την πάροδο του χρόνου για το πείραμα Β.

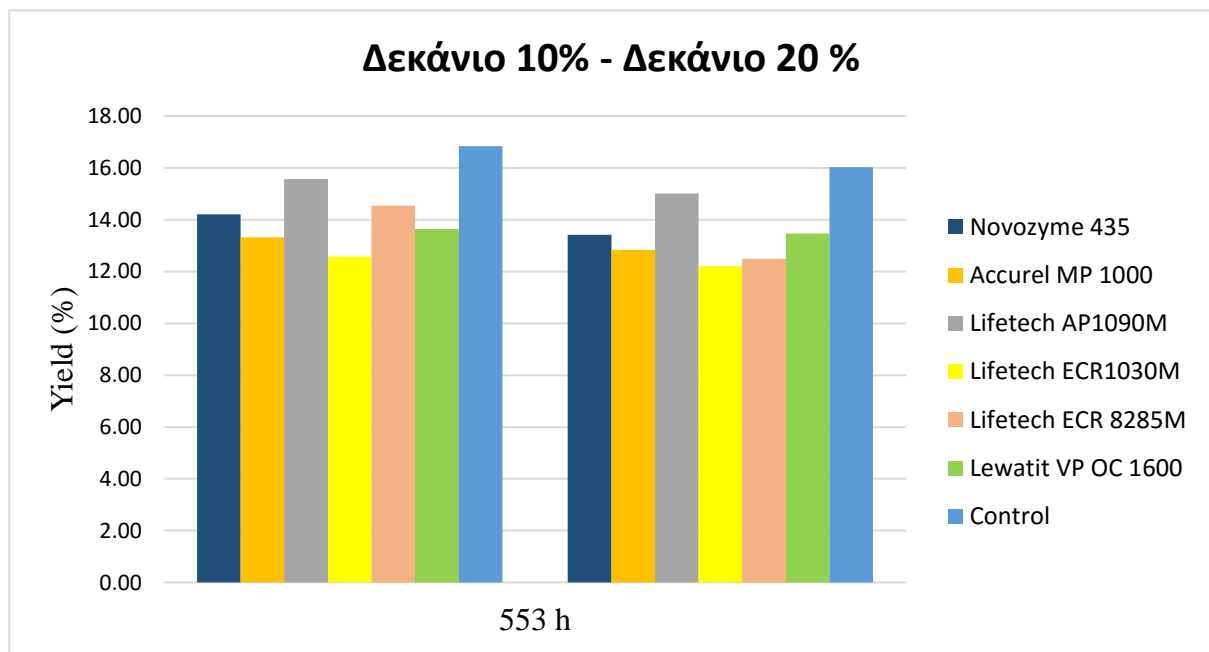


Γράφημα 5: Παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα σε σχέση με το χρόνο για το πείραμα Β

Όπως φαίνεται στο γράφημα 5, τα αποτελέσματα είναι παρόμοια με αυτά του πειράματος Α. Δηλαδή, με το πέρασμα του χρόνου η απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα αυξάνεται. Στις 24 h, φαίνεται ότι η απόδοση είναι ελάχιστη έως και μηδαμινή. Αυτό σημαίνει πως η αντίδραση δεν έχει φτάσει σε ισορροπία. Επιπρόσθετα, με το πέρασμα του χρόνου παρατηρείται ότι η απόδοση του διαλύματος control είναι μεγαλύτερη από τις αποδόσεις των διαλυμάτων με ένζυμα. Οπότε, συνάγεται και πάλι το συμπέρασμα ότι τα ένζυμα δεν έδρασαν σε αυτές τις συνθήκες και ότι γενικά η απόδοση σε γαλακτικό αιθυλεστέρα ήταν χαμηλή.

3.1.2.2 Σύγκριση πειράματος Α και πειράματος Β

Σε αυτό το σημείο γίνεται η σύγκριση μεταξύ των πειραμάτων Α και Β στις 553h, ούτως ώστε να διαφανεί σε πιο από τα δύο υπήρξε καλύτερη απόδοση.



Γράφημα 6: Σύγκριση πειράματος Α και πειράματος Β στις 553h

Βλέποντας τα δύο πειράματα στο γράφημα 6, διαπιστώνεται κάποια σύγκλιση κοινών στοιχείων. Αρχικά, μπορεί να παρατηρηθεί ότι η μεγαλύτερη απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα παρουσιάστηκε στο control τόσο στο πείραμα Α, όσο και στο πείραμα Β. Επιπρόσθετα, φαίνεται ότι η απόδοση στο control του πειράματος Α, ήταν πολύ κοντά με την απόδοση του πειράματος Β, το οποίο ήταν αναμενόμενο, αφού τα διαλύματα ήταν παρόμοιου τύπου. Σε ότι αφορά στις ενζυμικές αντιδράσεις, η μεγαλύτερη απόδοση και στα δύο

πειράματα υπήρξε στο ένζυμο Lifetech AP 1090 M, με λίγο μεγαλύτερη απόδοση στο πείραμα Β σε σχέση με το πείραμα Α.

Η συγκριτική ανάλυση των δύο πειραμάτων καταδεικνύει πως η απόδοση του γαλακτικού αιθυλεστέρα ήταν χαμηλή τόσο στην περίπτωση της μη ενζυμικής αντίδρασης όσο και της ενζυμικής, στην οποία η ποσότητα του βιοκαταλύτη ήταν αυξημένη και επομένως αναμενόταν και επακόλουθη αύξηση της απόδοσης σε γαλακτικό αιθυλεστέρα. Μια πιθανή εξήγηση για τη χαμηλή απόδοση και στις δύο περιπτώσεις ίσως να είναι η επίδραση του οργανικού διαλύτη στην ενζυμική δραστηριότητα, αφού το δεκάνιο ως ένας τοξικός διαλύτης, έχει την δυνατότητα να προκαλέσει αναστολή της δραστηριότητας των ενζύμων (Reetz 2002).

Μια εξήγηση της χαμηλής απόδοσης που παρατηρήθηκε γενικά, μπορεί να είναι η μη αναμειξιμότητα των αντιδρώντων (γαλακτικού οξέος και αιθανόλης), σε αυτού του είδους τον διαλύτη. Τόσο το γαλακτικό οξύ όσο και η αιθανόλη διαθέτουν στο μόριο τους μια υδροξυλομάδα, η οποία προσδίδει ισχυρή πολικότητα στα μόρια. Έτσι, η χρήση ενός άπολου, οργανικού διαλύτη όπως το δεκάνιο, πιθανόν να δυσχεραίνει την ανάμειξη των αντιδρώντων σε αυτόν και κατ' επέκταση να επιβραδύνει τον ρυθμό επίτευξης της εστεροποίησης (Hasegawa et al. 2008).

Επίσης, ένας άλλος λόγος που πιθανόν να συνέβαλε στη χαμηλή απόδοση που παρατηρήθηκε και στα δύο πειράματα είναι η χρήση ισομοριακών ποσοτήτων αντιδρώντων (γαλακτικού οξέος και αιθανόλης). Αυτό μπορεί να ερμηνευθεί ως αδυναμία μετατόπισης της χημικής ισορροπίας με αποτέλεσμα η αντίδραση εστεροποίησης να επιτυγχάνεται με αργό ρυθμό δίνοντας έτσι χαμηλές αποδόσεις.

Όσο αφορά στη συγκριτικά υψηλή απόδοση που παρατηρήθηκε στις μη ενζυμικές αντιδράσεις (control) σε σχέση με τις ενζυμικές αντιδράσεις, μάλλον ευθύνεται η υψηλή συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε (0.5 M), αφού το γαλακτικό οξύ μπορεί να προκαλέσει όξινη απενεργοποίηση των ενζύμων.

Παρατηρώντας λοιπόν ότι η απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα και στα δύο πειράματα δεν ήταν ικανοποιητική οδηγηθήκαμε στην διεξαγωγή ενός νέου πειράματος σε σύστημα ελεύθερου διαλύτη (πείραμα 3).

3.2 Εστεροποίηση σε σύστημα ελεύθερου διαλύτη

3.2.1 Πείραμα Γ: Εστεροποίηση σε σύστημα ελεύθερου διαλύτη με συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 0.5 M

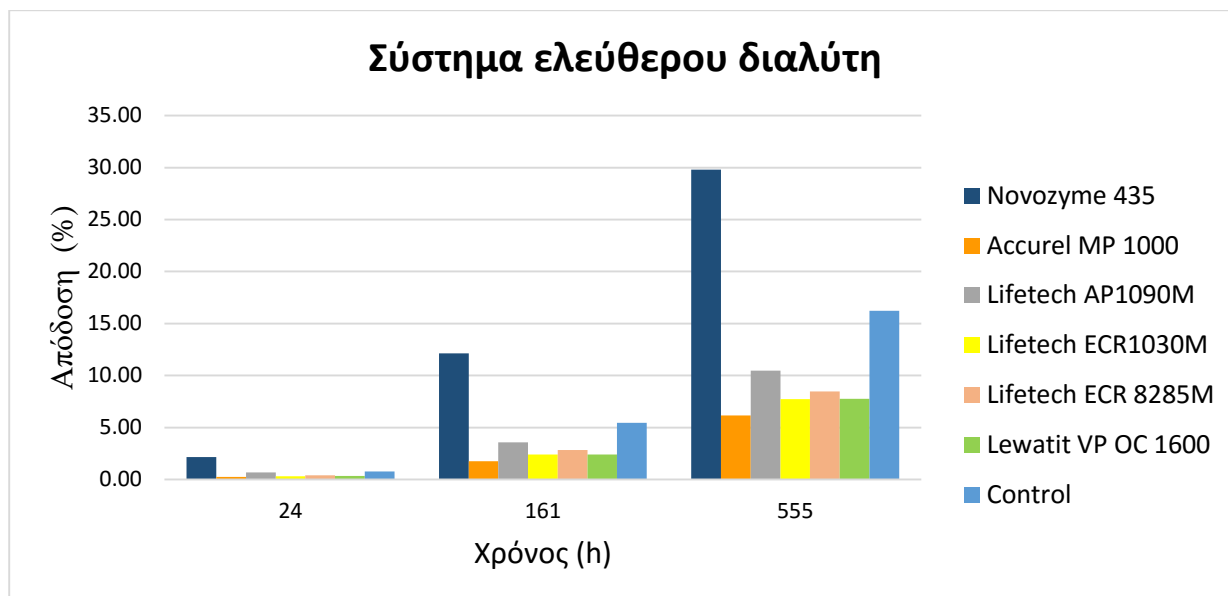
Σε αυτό το πείραμα η αντίδραση εστεροποίησης πραγματοποιήθηκε εν απουσία διαλύτη, ενώ η συγκέντρωση γαλακτικού οξέος παρέμεινε η ίδια με αυτή των πειραμάτων Α και Β. Στον πιο κάτω πίνακα φαίνονται ακριβώς οι παράμετροι :

Πίνακας 5: Συνθήκες διεξαγωγής πειράματος Γ

Διαλύτης	Σύστημα ελεύθερου διαλύτη
Ένζυμα	Novozyme 435, Accurel MP 1000, Lewatit VP OC 1600, Lifetech AP 1090, Lifetech ECR 1030, Lifetech ECR 8285
Συγκέντρωση ενζύμων	6.8 mg/L (αντιστοιχεί στο 10 % w/w των αντιδρώντων)
Συγκέντρωση γαλακτικού οξέος	0.5 M
Θερμοκρασία	30 ° C
rpm	100

3.2.1.1 Απόδοση γαλακτικού αιθυλεστέρα σε σχέση με το χρόνο

Στο ακόλουθο γράφημα, παρουσιάζεται η απόδοση του γαλακτικού αιθυλεστέρα σε σχέση με το χρόνο.



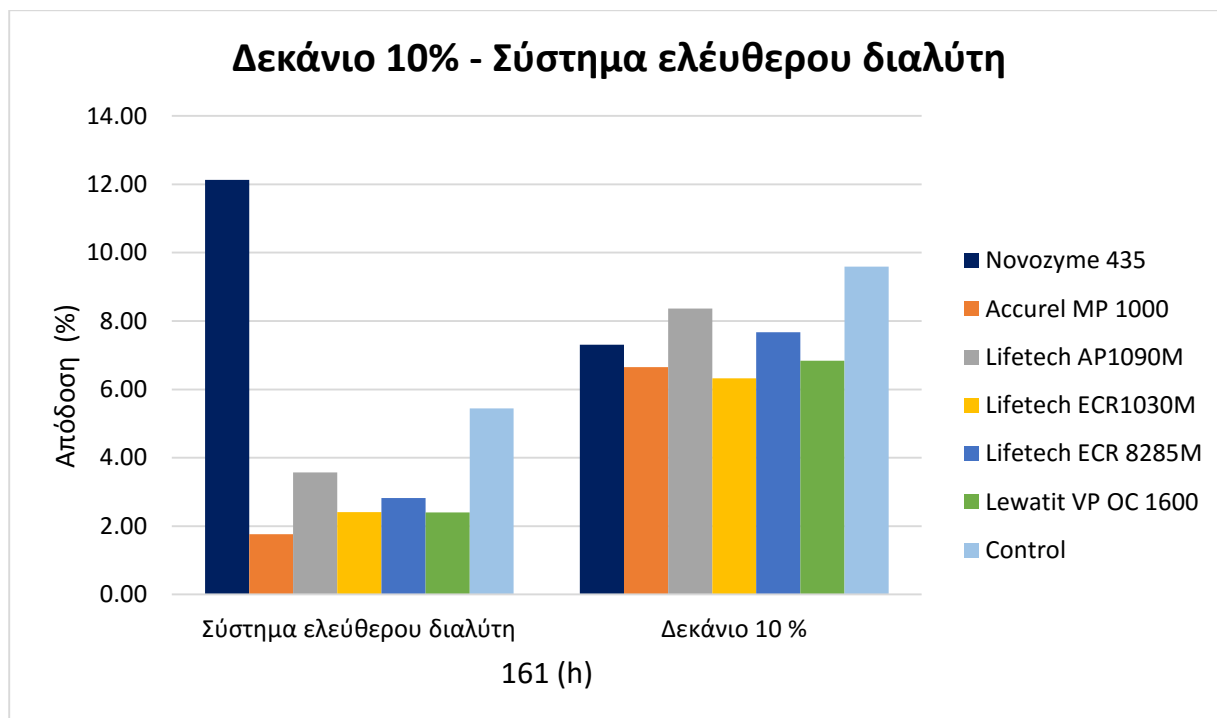
Γράφημα 7: Παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα σε σχέση με το χρόνο για το πείραμα Γ

Στο γράφημα 7 φαίνεται ότι στις 24 h η απόδοση ήταν μηδαμινή εκτός από το διάλυμα που περιείχε το ένζυμο Novozyme 435 όπου παρατηρήθηκε πολύ μικρή απόδοση. Αυτό σημαίνει ότι στις 24 h η αντίδραση δεν φτάνει σε ισορροπία. Στις 161 h, η απόδοση σε γαλακτικό αιθυλεστέρα με τη χρήση ενζύμου Novozyme 435, παρουσίασε πολύ μεγαλύτερη απόδοση (12.13 %) συγκριτικά με τα υπόλοιπα διαλύματα τα οποία είχαν απόδοση κάτω από 6 %, ενώ το ίδιο παρατηρήθηκε και στις 555 h. Δηλαδή, το ένζυμο Novozyme 435 εμφάνισε την πιο μεγάλη απόδοση (29.8 %) σε σχέση με τα υπόλοιπα ένζυμα. Επομένως, οι συνθήκες αυτού του πειράματος φαίνεται ότι ήταν ευνοϊκές μόνο για το διάλυμα ενζύμου Novozyme 435.

3.2.2 Σύγκριση πειράματος Α και πειράματος Γ

Σε αυτό το σημείο θεωρήθηκε καλό να γίνει και σύγκριση των πειραμάτων Α-Γ, λαμβάνοντας υπόψη ότι η παράμετρος της συγκέντρωσης του γαλακτικού οξέος είναι ίδια (0.5 M) και στα δύο πειράματα. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιήθηκαν και στα δύο πειράματα οι ίδιες συγκεντρώσεις ενζύμων (6.68 mg/L που αντιστοιχεί στο 10 % w/w των αντιδρώντων).

Βασική διαφορά τους είναι ότι στο πείραμα Α η αντίδραση επιτυγχάνεται σε διαλύτη και συγκεκριμένα σε δεκάνιο, ενώ στο πείραμα Γ, η αντίδραση επιτυγχάνεται απουσία διαλύτη. Έτσι, απώτερος σκοπός της σύγκρισης αυτής είναι η διαπίστωση της καλύτερης απόδοσης γαλακτικού αιθυλεστέρα στα δύο πειράματα.



Γράφημα 8: Σύγκριση πειράματος Α και πειράματος Γ στις 161 h

Παρατηρώντας τα δύο πειράματα στο γράφημα 8, είναι φανερό πως δεν υπάρχουν κοινά στοιχεία μεταξύ τους. Αρχικά, μπορεί να παρατηρηθεί ότι στην περίπτωση της ενζυμικής δραστηριότητας υπήρχαν μεγαλύτερες αποδόσεις στο πείραμα Α, συγκριτικά με το πείραμα Γ, εκτός της περίπτωσης του ενζύμου Novozyme 435, όπου σημειώθηκε πολύ μεγάλη απόδοση στο πείραμα Γ. Επιπροσθέτως, στην περίπτωση της ενζυμικής δραστηριότητας, οι αποδόσεις ήταν μικρότερες από την περίπτωση μη ενζυμικής δραστηριότητας τόσο στο πείραμα Α όσο και στο Γ. Εξαιρέση αποτελεί και πάλι το ένζυμο Novozyme 435, στο πείραμα Γ, αφού η απόδοση του ήταν πολύ μεγαλύτερη από το διάλυμα control.

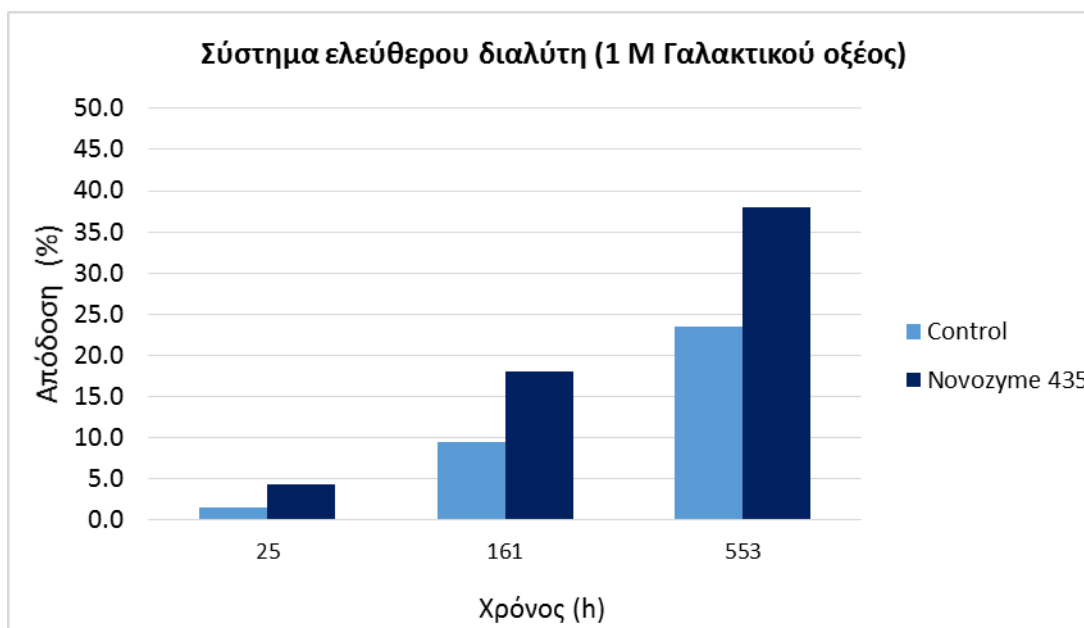
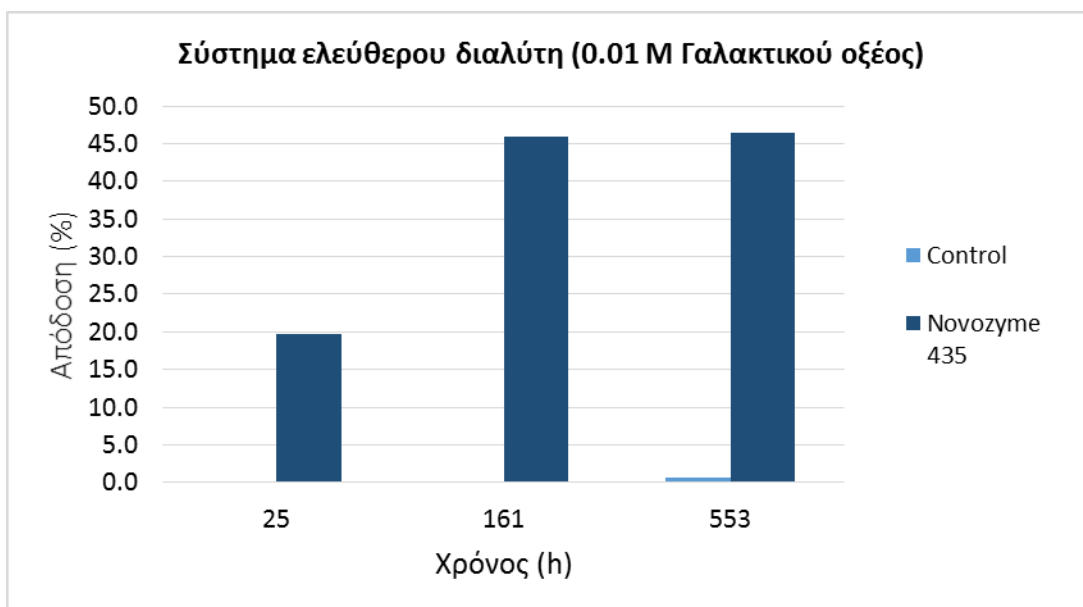
Συμπερασματικά, η απόδοση σε γαλακτικό αιθυλεστέρα, δεν ήταν καλή ούτε στο πείραμα Α, όπου η εστεροποίηση πραγματοποιήθηκε σε διαλύτη, αλλά ούτε στο πείραμα Γ όπου η εστεροποίηση πραγματοποιήθηκε σε σύστημα ελεύθερου διαλύτη. Η απουσία διαλύτη αποδείχτηκε αρκετά ευνοϊκός παράγοντας μόνο για το ένζυμο Novozyme 435. Το γεγονός αυτό ίσως να οφείλεται στο φορέα ακινητοποίησης του συγκεκριμένου ενζύμου, ο οποίος ήταν ο λιγότερο υδρόφοβος συγκριτικά με τους υπόλοιπους φορείς των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν. Επομένως, αφού τα αντιδρώντα (υπόστρωμα) ήταν υδρόφιλα, υπήρξε καλύτερη επαφή του ενζύμου με αυτά και για τον λόγο αυτό παρατηρήθηκε ελαφρά αυξημένη απόδοση σε γαλακτικό αιθυλεστέρα από το ένζυμο Novozyme 435.

3.2.3 Πείραμα Δ: Εστεροποίηση σε σύστημα ελεύθερου διαλύτη μόνο για το ένζυμο Novozyme 435 με συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 0.01 M και 1 M

Εφόσον οι συνθήκες του πειράματος Γ, φάνηκαν ευνοϊκές μόνο για το ένζυμο Novozyme 435, πραγματοποιήθηκαν ακόμα δύο πειράματα για αυτό το ένζυμο σε σύστημα ελεύθερου διαλύτη, χρησιμοποιώντας συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 0.01 M και 1 M αντίστοιχα. Στον πιο κάτω πίνακα παρουσιάζονται οι παράμετροι που εξετάστηκαν:

Πίνακας6: Συνθήκες διεξαγωγής πειράματος Δ

Διαλύτης	Σύστημα ελεύθερου διαλύτη
Ένζυμα	Novozyme 435
Συγκέντρωση ενζύμων	6.8 mg/L (αντιστοιχεί στο 10 % w/w των αντιδρώντων)
Συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος	0.01, 0.5 M
Θερμοκρασία	30 ° C
rpm	100



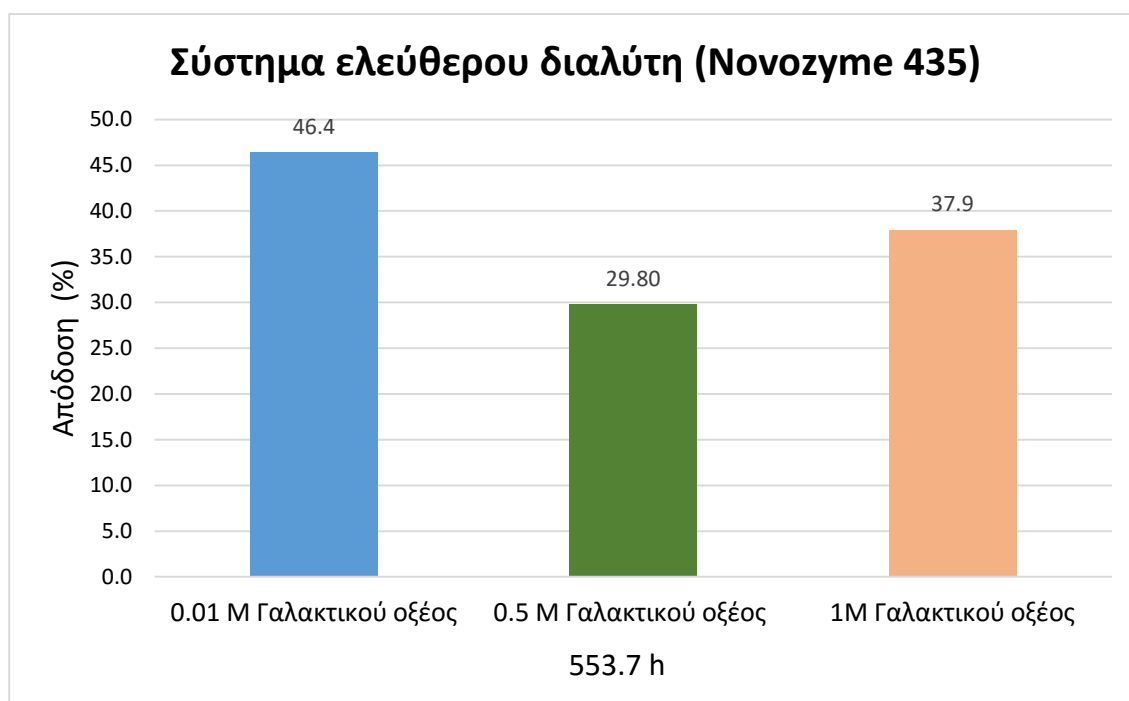
Γράφημα 9 : Παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα σε σχέση με το χρόνο για το πείραμα Δ

Στο γράφημα 9, παρουσιάζεται η απόδοση σε σχέση με το χρόνο για το πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκε 0.01 M γαλακτικού οξέος (πάνω) και για το πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκε 1 M γαλακτικού οξέος (κάτω). Στο πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκε 0.01 M γαλακτικού οξέος, φαίνεται ότι η απόδοση σε γαλακτικό αιθυλεστέρα φτάνει στο μέγιστο γύρω στις 161 h για την ενζυμική αντίδραση (Novozyme 435). Αντίθετα, στο control η απόδοση με το πέρασμα του χρόνου είναι μηδαμινή. Ο λόγος γι' αυτό το αποτέλεσμα είναι η χαμηλή συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε. Το γαλακτικό οξύ

γενικώς μπορεί να προκαλέσει αυτοκατάλυση, όμως η χαμηλή συγκέντρωση γαλακτικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με την επίτευξη της εστεροποίησης εν απουσία ενζύμων (καταλύτη), εμφάνισε μηδαμινή απόδοση σε γαλακτικό αιθυλεστέρα.

Όσο αφορά στην απόδοση σε γαλακτικό αιθυλεστέρα από το ένζυμο Novozyme 435, στο πείραμα με 1 M γαλακτικό οξύ (κάτω), παρατηρείται αύξηση σε σχέση με τον χρόνο. Όμως, τα ποσοστά της απόδοσης αυτού του πειράματος ήταν μικρότερα συγκριτικά με το πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκε 0.01 M γαλακτικό οξύ. Η εξήγηση για το γεγονός αυτό, είναι η όξινη ενζυμική απενεργοποίηση που προκαλεί το γαλακτικό οξύ αφού για μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος είναι μεγαλύτερη και η επίδραση που προκαλείται στα ένζυμα. Στο control η απόδοση αυξάνεται με την πάροδο του χρόνου, λόγω της μεγαλύτερης συγκέντρωσης γαλακτικού οξέος που χρησιμοποιήθηκε, το οποίο προκαλεί αυτοκατάλυση.

3.2.3.1 Σύγκριση συγκεντρώσεων γαλακτικού οξέος για το ένζυμο Novozyme 435 σε σύστημα ελεύθερου διαλύτη



Γράφημα 10: Σύγκριση συγκεντρώσεων γαλακτικού οξέος για το ένζυμο Novozyme 435 σε σύστημα ελεύθερου διαλύτη στις 553.7 h

Στο γράφημα 10, παρουσιάζονται οι αποδόσεις σε γαλακτικό αιθυλεστέρα για τις τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος (0.01 M, 0.5 M και 1 M) που χρησιμοποιήθηκαν σε σύστημα ελεύθερου διαλύτη μόνο για το ένζυμο Novozyme 435. Είναι φανερό πως για μικρότερη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος, η απόδοση σε γαλακτικό αιθυλεστέρα είναι μεγαλύτερη (46.4 %), συγκριτικά με τις άλλες δύο συγκεντρώσεις (0.5 M και 1 M). Δηλαδή για 50 και 100 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση αντίστοιχα, τα ποσοστά των αποδόσεων ήταν πιο χαμηλά. Συνεπώς, φαίνεται πως ο παράγοντας της παρεμπόδισης των ενζύμων από το γαλακτικό οξύ επηρέασε περισσότερο την απόδοση σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις του γαλακτικού οξέος.

3.3 Εστεροποίηση σε τολουόλιο

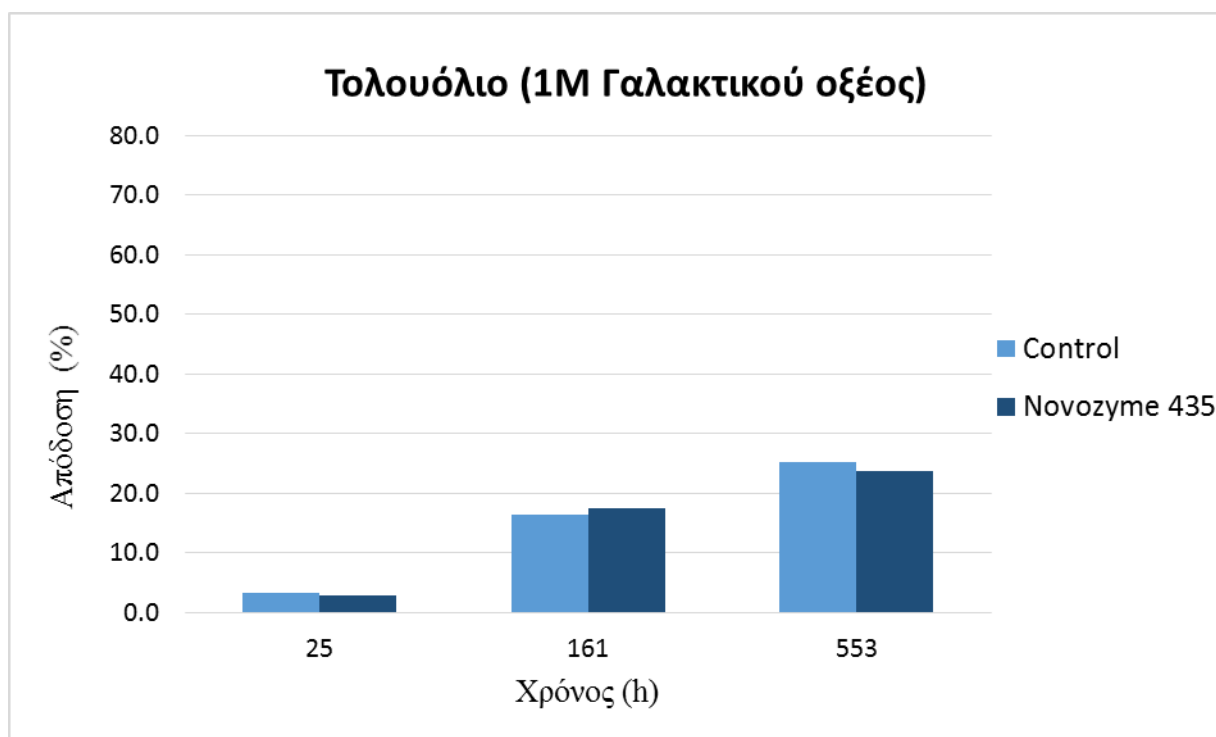
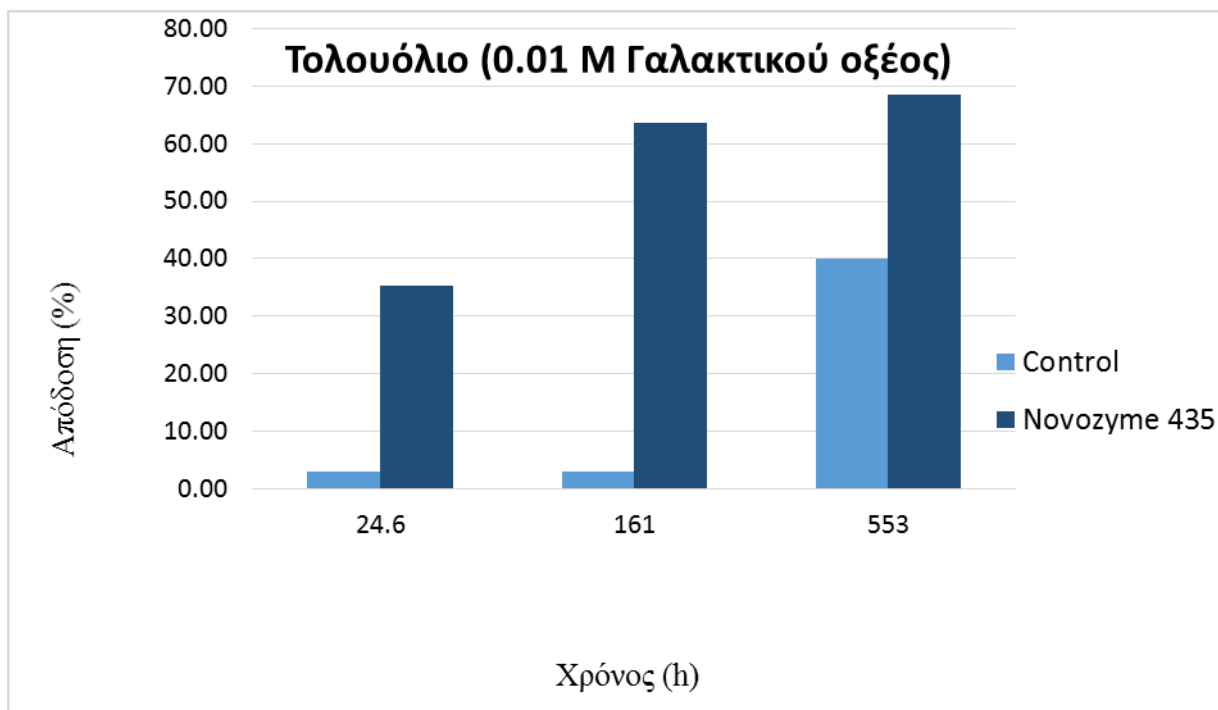
3.3.1 Πείραμα E: Εστεροποίηση σε τολουόλιο μόνο για το ένζυμο Novozyme 435, με συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 0.01 M και 1 M

Στο πλαίσιο της παρούσας πτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκαν ακόμα δύο πειράματα μόνο για το ένζυμο Novozyme 435. Πιο συγκεκριμένα πραγματοποιήθηκε εστεροποίηση σε τολουόλιο με συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 0.01 M για το ένα πείραμα ενώ για το άλλο πείραμα χρησιμοποιήθηκε συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 1 M.

Οι παράμετροι για το πείραμα E παρουσιάζονται στον πιο κάτω πίνακα:

Πίνακας 7: Συνθήκες διεξαγωγής πειράματος E

Διαλύτης	Τολουόλιο
Ένζυμο	Novozyme 435
Συγκέντρωση ενζύμων	6.8 mg/L (αντιστοιχεί στο 10 % w/w των αντιδρώντων)
Συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος	0.01 M, 1 M
Θερμοκρασία	30 °C
rpm	100



Γράφημα 11: Παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα σε σχέση με το χρόνο για το πείραμα Ε

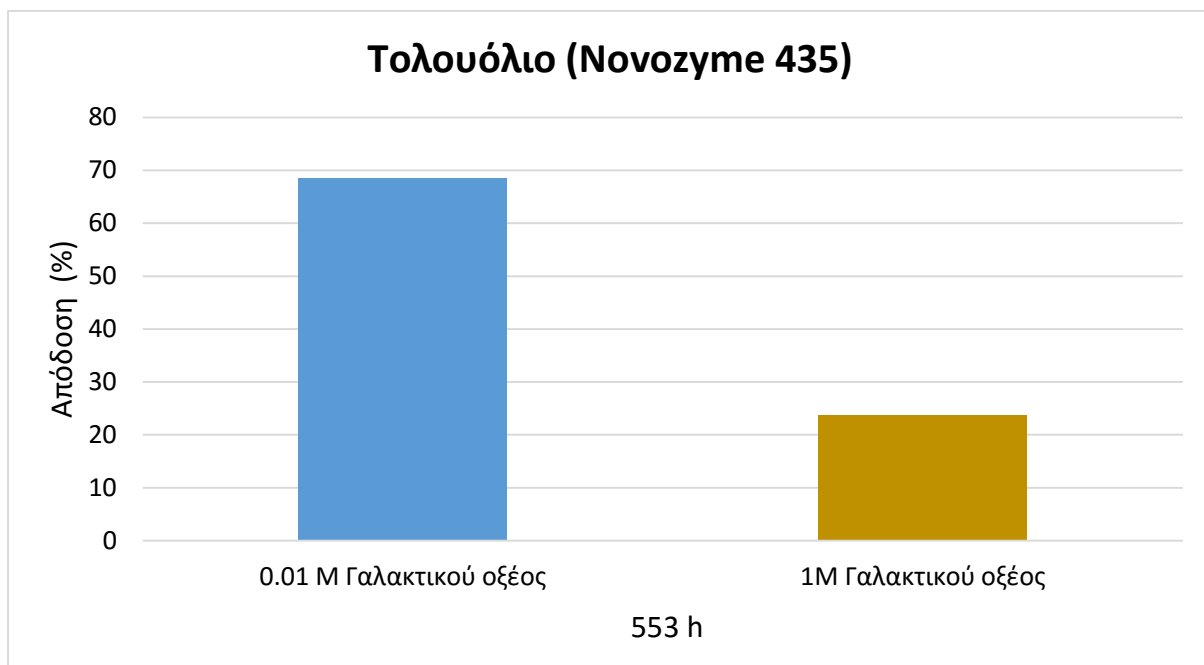
Στο γράφημα 11, παρουσιάζεται η απόδοση σε σχέση με το χρόνο. Στο πείραμα με συγκέντρωση γαλακτικού οξέος 0.01 Μ (πάνω), φαίνεται ότι η απόδοση που δίνει το ένζυμο

Novozyme σε αυτές τις συνθήκες είναι πολύ υψηλή και αρκετά ικανοποιητική. Επιπλέον, περίπου στις 161h η απόδοση σε γαλακτικό αιθυλεστέρα είναι μέγιστη, φτάνοντας μέχρι και το 68.4 %.

Στο πείραμα με συγκέντρωση γαλακτικού αιθυλεστέρα 1 M (κάτω), φαίνεται πως οι απόδοση σε γαλακτικό αιθυλεστέρα αυξάνεται με αργό ρυθμό τόσο στην ενζυμική όσο και στην μη ενζυμική αντίδραση. Επιπρόσθετα, παρατηρείται πως οι αποδόσεις της ενζυμικής αντίδρασης ισούνται με αυτές της ενζυμικής αντίδρασης και γενικώς οι αποδόσεις είναι αρκετά χαμηλές.

3.3.1.1 Σύγκριση συγκεντρώσεων γαλακτικού οξέος (0.01M και 1 M) για εστεροποίηση σε τολουόλιο μόνο για το ένζυμο Novozyme 435

Σε αυτό το σημείο θεωρήθηκε καλό να γίνει η σύγκριση των δύο συγκεντρώσεων γαλακτικού οξέος που χρησιμοποιήθηκαν στις 553 h, ούτως ώστε να διαφανεί περισσότερο η διαφορά στην απόδοση.

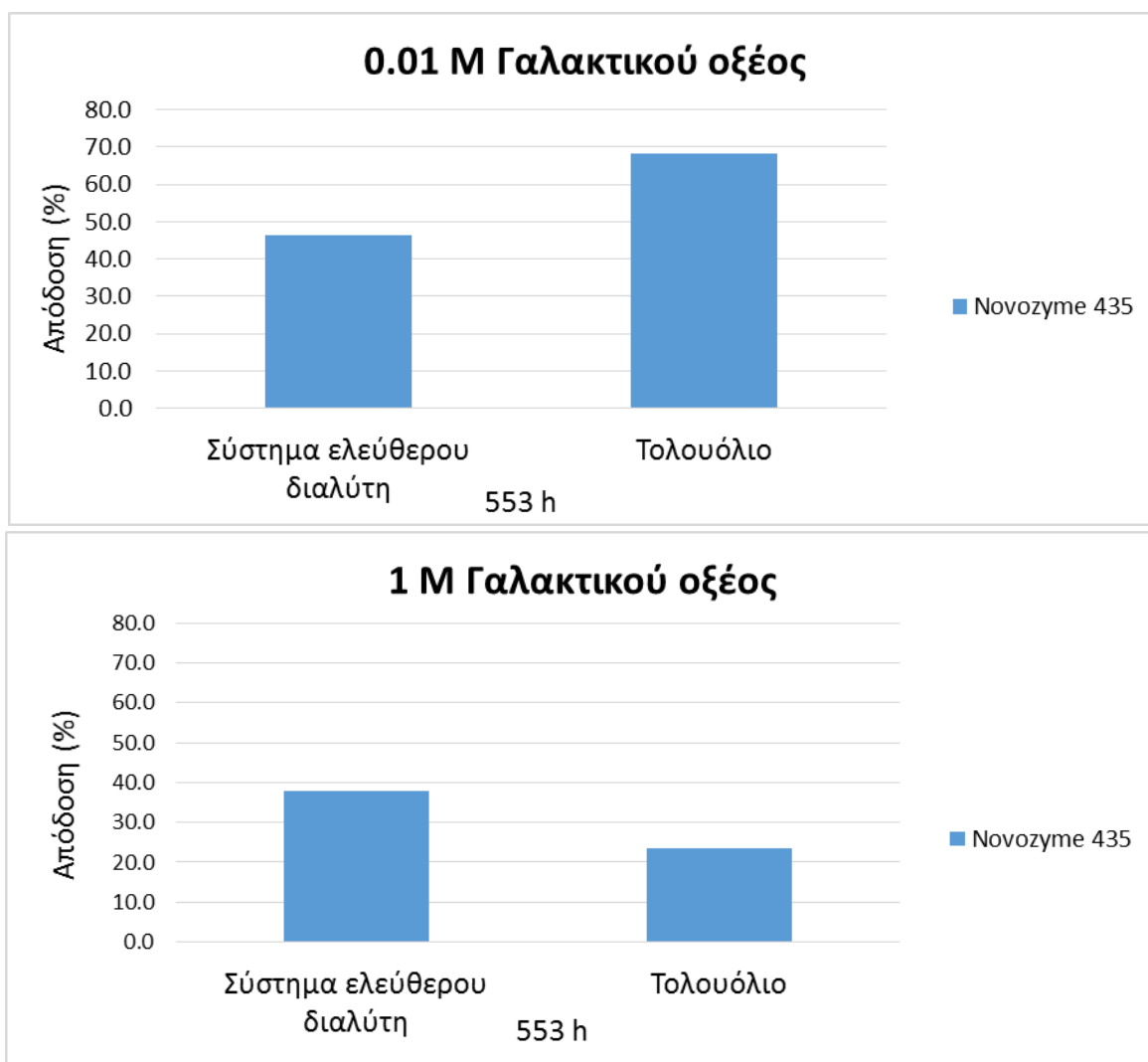


Γράφημα 12: Σύγκριση συγκεντρώσεων γαλακτικού οξέος (0.01 M και 1 M) για εστεροποίηση σε τολουόλιο μόνο για το ένζυμο Novozyme 435

Συγκρίνοντας τις αποδόσεις που αποδίδει το ένζυμο Novozyme 435 στην αντίδραση εστεροποίησης σε τολουόλιο στο πιο πάνω γράφημα, φαίνεται πως σε συγκέντρωση

γαλακτικού οξέος 1 M, η απόδοση σε γαλακτικό αιθυλεστέρα είναι σχετικά χαμηλή, ενώ για 100 φορές μικρότερη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος, η απόδοση εκτοξεύεται φτάνοντας περίπου στο 70 %. Ο λόγος είναι φυσικά η παρεμποδιστική δράση του γαλακτικού οξέος προς τα ένζυμα. Δηλαδή, δηλαδή η απενεργοποίηση που δύναται να προκληθεί στα ένζυμα από το γαλακτικό οξύ, είναι πιο αισθητή σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος.

3.3.2 Σύγκριση εστεροποίησης σε τολουόλιο – εστεροποίησης σε σύστημα ελεύθερου διαλύτη για το ένζυμο Novozyme 435, για συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος 0.01 M και 1 M



Γράφημα 13: Σύγκριση εστεροποίησης σε τολουόλιο - εστεροποίησης σε σύστημα ελεύθερου διαλύτη για το ένζυμο Novozyme 435, για συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος 0.01 M και 1 M

Σε αυτό το γράφημα πραγματοποιείται σύγκριση μεταξύ της εστεροποίησης σε τολουόλιο και της εστεροποίησης σε σύστημα ελεύθερου διαλύτη για το ένζυμο Novozyme 435, σε συγκεντρώσεις γαλακτικού οξέος 0.01 M και 1 M.

Στο με 1 M γαλακτικού οξέος (κάτω), μπορεί να παρατηρηθεί πως στο σύστημα ελεύθερου διαλύτη υπάρχει ελαφρώς πιο υψηλή απόδοση σε σχέση με το τολουόλιο, όμως και στα δύο πειράματα η απόδοση δεν ήταν πολύ υψηλή, γεγονός που οφείλεται στην αυξημένη ενζυμική απενεργοποίηση που προκαλεί το γαλακτικό οξύ.

Στο 0.01 M γαλακτικού οξέος (κάτω), καταδεικνύεται ότι η απόδοση στο σύστημα ελεύθερου διαλύτη είναι σχεδόν ίδια με την απόδοση σε σύστημα ελεύθερου διαλύτη στο πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκε 1 M. Αντιθέτως, στο πείραμα με 0.01 M γαλακτικού οξέος, η απόδοση στο τολουόλιο είναι αισθητά πιο μεγάλη και πιο ικανοποιητική. Επομένως, το συμπέρασμα που μπορεί να εξαχθεί από την σύγκριση που επιτυγχάνεται στο γράφημα 13, είναι ότι η χρήση ενός άπολου διαλύτη, όπως του τολουολίου ευνοεί τις αντιδράσεις εστεροποίησης (Hari Krishna et al. 2001).

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο πλαίσιο της παρούσας πτυχιακής εργασίας πραγματοποιήθηκε η διεξαγωγή κάποιων πειραμάτων με σκοπό την μελέτη της αντίδρασης εστεροποίησης του γαλακτικού οξέος με την αιθανόλη για την παραγωγή γαλακτικού αιθυλεστέρα, υψηλής απόδοσης. Σε όλα τα πειράματα, παρασκευάστηκαν διαλύματα με ένζυμο και διαλύματα χωρίς ένζυμο, (control) ενώ στο κάθε πείραμα ελέγχθηκαν διαφορετικοί παράγοντες ούτως ώστε να γίνουν οι ανάλογες παρατηρήσεις και να εξαχθούν τα σχετικά συμπεράσματα.

Εξετάζοντας λοιπόν συνολικά τα αποτελέσματα από τα διάφορα πειράματα της μελέτης θα μπορούσε να διατυπωθεί αρχικά το συμπέρασμα ότι το ένζυμο Novozyme 435 έχει δώσει καλύτερες αποδόσεις σε γαλακτικό αιθυλεστέρα σε σχέση με τα άλλα ένζυμα, γεγονός που οφείλεται στο φορέα ακινητοποίησης του. Ο φορέας του συγκεκριμένου ενζύμου ήταν ο λιγότερο υδρόφοβος από τους υπόλοιπους φορείς ακινητοποίησης των ενζύμων. Έτσι προκύπτει καλύτερη επαφή του ενζύμου με τα πολικά αντιδρώντα, δίνοντας με αυτό τον τρόπο καλύτερες αποδόσεις.

Ακόμα, όσον αφορά στην συγκέντρωση, το συμπέρασμα το οποίο μπορεί να εξαχθεί είναι ότι η ιδανικότερη συγκέντρωση γαλακτικού οξέος ήταν το 0.01 M αφού σε αυτή την συγκέντρωση η παρεμπόδιση των ενζύμων από το γαλακτικό οξύ ήταν μηδαμινή και ως εκ τούτου να επιτευχθούν καλύτερες αποδόσεις.

Τέλος, με βάση τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα πτυχιακή εργασία, φαίνεται πως ο καταλληλότερος διαλύτης είναι το τολουόλιο, αφού στο σχετικό πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης το τολουόλιο σε συνδυασμό με τη χαμηλή συγκέντρωση του γαλακτικού οξέος, η απόδοση σε γαλακτικό αιθυλεστέρα ήταν αρκετά ψηλή. Συνάγεται επομένως το συμπέρασμα πως η εστεροποίηση γαλακτικού οξέος με την αιθανόλη ευνοείται σε άπολους διαλύτες.

5 ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΗ ΕΡΕΥΝΑ

Η μελέτη της απόδοσης γαλακτικού αιθυλεστέρα ο οποίος προκύπτει από αντίδραση εστεροποίησης του γαλακτικού οξέος με την αιθανόλη, θα μπορούσε να συνεχιστεί στο μέλλον εξετάζοντας νέους παράγοντες.

Ένας από αυτούς τους παράγοντες που θα ήταν καλό να εξεταστεί, είναι η συγκέντρωση 0.01 M του γαλακτικού οξέος για το πείραμα Α, δηλαδή για την εστεροποίηση σε δεκάνιο. Με αυτό τον τρόπο θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί σύγκριση του δεκανίου και του τολουολίου σε αυτή την συγκέντρωση, ούτως ώστε να διαφανεί αν πραγματικά οι εστεροποιήσεις ευνοούνται σε άπολους διαλύτες. Επίσης, θα μπορούσε να σχηματιστεί μια πιο ολοκληρωμένη εικόνα για την επίδραση των διαλυτών στην εστεροποίηση.

Ένα ακόμα σημαντικό στοιχείο το οποίο θα ήταν καλό να πραγματοποιηθεί στο μέλλον είναι η μια σειρά πειραμάτων αλλάζοντας κάθε φορά τις συγκεντρώσεις των αντιδρώντων και κρατώντας όλες τις άλλες παραμέτρους σταθερούς. Με αυτό τον τρόπο θα μπορούσε να βρεθεί το όριο διαλυτότητας των αντιδρώντων στον ανάλογο διαλύτη χρήσης των συγκεκριμένων πειραμάτων και κατ' επέκταση θα μπορούσε να διαπιστωθεί η βέλτιστη αναλογία συγκέντρωσης των αντιδρώντων που θα δίνει ψηλότερες αποδόσεις σε γαλακτικό αιθυλεστέρα.

Τέλος, σε μελλοντικά πειράματα θα μπορούσε να εξεταστούν διαφορετικοί φορείς ακινητοποίησης, περισσότερο υδρόφιλοι από τους φορείς ακινητοποίησης των ενζύμων που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα της παρούσας πτυχιακής εργασίας. Άλλωστε, όπως αποδείχθηκε στο πλαίσιο των πειραμάτων που επιτεύχθηκαν, η απόδοση σε γαλακτικό αιθυλεστέρα ήταν πιο ψηλή για λιγότερο υδροφοβους φορείς ακινητοποίησης. Άρα, με την χρήση φορέων περισσότερο υδρόφιλων, ίσως επιτευχθούν ακόμα πιο ψηλές αποδόσεις.

Βιβλιογραφία

- Aparicio, S. & Alcalde, R., 2009. The green solvent ethyl lactate: an experimental and theoretical characterization. *Green Chemistry*, 11(1), p.65.
- Bankole, K.S., 2011. Uncatalyzed esterification of biomass-derived carboxylic acids. , pp.1–154.
- Benjamin, S. & Pandey, A., 1998. *Candida rugosa* lipases: Molecular biology and versatility in biotechnology. *Yeast*, 14(12), pp.1069–1087.
- Burke, P.A. & Klibanov, A.M., 1991. Enzymatic catalysis in organic solvents. *Reactive Polymers*, 15, p.228.
- Clark, J. & Macquarrie, D., 2008. *Handbook of green chemistry and technology* J. C. and M. Duncan, ed., Blackwell.
- Delgado, P., Sanz, M.T. & Beltran, S., 2007. Kinetic study for esterification of lactic acid with ethanol and hydrolysis of ethyl lactate using an ion-exchange resin catalyst. *Chemical Engineering Journal*, 126(2-3), pp.111–118.
- Demirbas, A., 2005. Bioethanol from Cellulosic Materials: A Renewable Motor Fuel from Biomass. *Energy Sources*, 27(4), pp.327–337.
- DeSimone, J.M., 2002. Practical approaches to green solvents. *Science (New York, N.Y.)*, 297(5582), pp.799–803.
- Desset, S.L., Reader, S.W. & Cole-Hamilton, D.J., 2009. Green Solvents–Progress in science and application. *Green Chemistry*, 11, p.603.
- Dhanuka R.V., M.V.C. and C.S.B., 1977. Kinetics of the Liquid phase esterification of carboxylic acids with alcohols in the re-interpretation of published data. , 32, pp.551–556.
- Galbe, M. & Zacchi, G., 2002. A review of the production of ethanol from softwood. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(6), pp.618–628.
- Gandhi, N.N. et al., 2000. Lipase-Catalyzed Esterification. *Catalysis Reviews*, 42(4), pp.439–480.
- Gao, C., Ma, C. & Xu, P., 2011. Biotechnological routes based on lactic acid production from biomass. *Biotechnology Advances*, 29(6), pp.930–939.
- Gotor-Fernández, V., Busto, E. & Gotor, V., 2006. *Candida antarctica* lipase B: An ideal biocatalyst for the preparation of nitrogenated organic compounds. *Advanced Synthesis and Catalysis*, 348(7-8), pp.797–812.
- Gunstone, F.D., 1999. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 79(12), pp.1535–1549.
- Gupta, A.P. & Kumar, V., 2007. New emerging trends in synthetic biodegradable polymers - Polylactide: A critique. *European Polymer Journal*, 43(10), pp.4053–4074.
- Hari Krishna, S. et al., 2001. Enzymatic synthesis of isoamyl acetate using immobilized lipase from *Rhizomucor miehei*. *Journal of Biotechnology*, 87(3), pp.193–201.
- Hasegawa, S., Azuma, M. & Takahashi, K., 2008. Stabilization of enzyme activity during the esterification of lactic acid in hydrophobic ethers and ketones as reaction media that are

- miscible with lactic acid despite their high hydrophobicity. *Enzyme and Microbial Technology*, 43(3), pp.309–316.
- Holten, C., 1971. *Lactic acid. Properties and chemistry of lactic acid and derivatives.*, Weinheim, Germany: Verlag Chemie.
- Idris, A. & Bukhari, A., 2012. Immobilized *Candida antarctica* lipase B: Hydration, stripping off and application in ring opening polyester synthesis. *Biotechnology Advances*, 30(3), pp.550–563.
- Illanes, A. & Altamirano, C., 2008. *Enzyme reactors* A. Illanes, ed.,
- Irvine, L.F.H., 2003. Relevance of the developmental toxicity of ethanol in the occupational setting: A review. *Journal of Applied Toxicology*, 23(5), pp.289–299.
- John, R., Nampoothiri, K. & Pandey, A., 2007. Fermentative production of lactic acid from biomass: an overview on process developments and future perspectives. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 74, pp.524–534.
- Kim, K.K. et al., 1997. The crystal structure of a triacylglycerol lipase from *Pseudomonas cepacia* reveals a highly open conformation in the absence of a bound inhibitor. *Structure (London, England : 1993)*, 5(2), pp.173–185.
- Kulcsar, E. & Nagy, E., 2009. Enzyme Facilitated Enantioselective Transport of (L) - Lactic Acid Through Membranes. , 37(2), pp.77–81.
- Lang, X., Hill, G.A. & Douglas, G., 2001. Recycle Bioreactor for Bioethanol Production from Wheat Starch I. Cold Enzyme Hydrolysis. *Energy Sources*, 23(5), pp.417–425.
- Li, D. et al., 2005. Physico-chemical properties of ethanol-diesel blend fuel and its effect on performance and emissions of diesel engines. *Renewable Energy*, 30(6), pp.967–976.
- Lipinsky, E., 1981. Chemicals from biomass: petrochemical substitution options. *Science*, 212(4502), pp.1465–1471.
- Martinez, F.A.C. et al., 2013. Lactic acid properties, applications and production: a review. *Trends in food science & Technology*.
- McMurry, J., 2012. *Οργανική Χημεία* 4η ed., Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εδόσεις Κρήτης.
- Okano, K., Tanaka, T. & Ogino, C., 2010. Biotechnological production of enantiomeric pure lactic acid from renewable resources: recent achievements, perspectives, and limits. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 85(3), pp.413–423.
- Paiva, a L., van Rossum, D. & Malcata, F.X., 2002. Kinetics of lipase-mediated synthesis of butyl butyrate in n-hexane. *Biocatalysis and Biotransformation*, 20(1), pp.43–51..
- Pereira, C.S.M. et al., 2009. A novel process for the ethyl lactate synthesis in a simulated moving bed reactor (SMBR). *Chemical Engineering Science*, 64(14), pp.3301–3310.
- Pereira C.S.M. and Rodrigues A.E., 2014. Ethyl Lactate Main Properties, Production Processes, and Applications. In *Green Chemistry and Sustainable Technology*. Porto, Portugal: Springer, pp. 107–122.
- Pereira, C.S.M., Silva, V.M.T.M. & Rodrigues, A.E., 2009. Fixed Bed Adsorptive Reactor for Ethyl Lactate Synthesis: Experiments, Modelling, and Simulation. *Separation Science and Technology*, 44(12), pp.2721–2749.
- Reetz, M.T., 2002. Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology*,

- 6(2), pp.145–150.
- Ren, J., 2010. Lactic Acid. *Biodegradable Poly (Lactic Acid): Synthesis, Modification, Processing and Applications*, pp.4–14.
- Schmitt, J. et al., 2002. Blocking the tunnel: engineering of *Candida rugosa* lipase mutants with short chain length specificity. *Protein engineering*, 15(7), pp.595–601.
- Sherman, J. et al., 1998. Solvent replacement for green processing. *Environmental Health Perspectives*, 106(SUPPL. 1), pp.253–271.
- Södergård, A. & Stolt, M., 2002. Properties of lactic acid based polymers and their correlation with composition. *Progress in Polymer Science (Oxford)*, 27(6), pp.1123–1163.
- Waldmann, H. & Gmbh, W.V., 2002. Immobilization. In *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH, pp. 163–181.
- Wasewar, K., Patidar, S. & Agarwal, V.K., 2009. Esterification of lactic acid with ethanol in a pervaporation reactor: modeling and performance study. *Desalination*, 243(1-3), pp.305–313. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.desal.2008.04.030>.
- Wee, Y., Kim, J. & Ryu, H., 2006. Biotechnological production of lactic acid and its recent applications. *Food Technology and Biotechnology*, 44(2), pp.163–172.
- Yan, A.-X., Li, X.-W. & Ye, Y.-H., 2002. Recent progress on immobilization of enzymes on molecular sieves for reactions in organic solvents. *Applied biochemistry and biotechnology*, 101(2), pp.113–129.
- Zhang, Y., Ma, L. & Yang, J., 2004. Kinetics of esterification of lactic acid with ethanol catalyzed by cation-exchange resins. *Reactive and Functional Polymers*, 61(1), pp.101–114.
- de Zoete, M.C., van Rantwijk, F. & Sheldon, R.A., 1994. Lipase-catalyzed transformations with unnatural acyl acceptors. *Catalysis Today*, 22(3), pp.563–590.
- Κλώνης, Ι., 2010. *Ενζυμική Βιοτεχνολογία* 2η έκδοση., Ηράκλειο: Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.