ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Μελέτη της υδρολυτικής δράσης της νέας θερμοσταθερής εστεράσης EstDZ2 με αλειφατικούς εστέρες και κετο-εστέρες.

ΚΑΝΑΚΑΡΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

Hydrolytic activity studies of the new thermostable esterase EstDZ2 with aliphatic esters and ketoesters.

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ

ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΣΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΟΥΣΑ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΣΜΟΝΟΥ ΙΟΥΛΙΑ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2018

Περιεχόμενα

Περίληψη 4
Ενότητα 1: Εισαγωγή 5
1.1 Ανακάλυψη ενζύμων και σύστασης αυτών 6
1.2 Ταξινόμηση και ονοματολογία ενζύμων 6
1.3 Τρόπος δράσης ενζύμων 8
1.4 Πλεονεκτήματα χρήσης ενζύμων 9
1.4 Υδρολυτικά ένζυμα 10
1.5 Εστεράσες 12
1.6 Εστεράση EstDZ2 13
Ενότητα 2: Αποτελέσματα-Σχολιασμός αποτελεσμάτων 14
Ενότητα 3: Πειραματικό μέρος 18
Παράρτημα 22
Βιβλιογραφία 32

Περίληψη

Η συμβολή της βιοκατάλυσης στην οργανική σύνθεση, όπως επίσης και στη βιομηχανία αναμφισβήτητα είναι πολύ σημαντική, καθώς τις τελευταίες δύο δεκαετίες ολοένα και περισσότερες ενζυμικές μετατροπές υιοθετούνται σε βιομηχανικό επίπεδο. Για τους οργανικούς χημικούς, τα υδρολυτικά ένζυμα κατέχουν μία από τις πιο σημαντικές ομάδες ενζύμων, καθώς υδρολύουν ένα πολύ ευρύ φάσμα δεσμών και, επίσης δεν απαιτούν συμπαράγοντες για τη δράση τους.

Η παρούσα εργασία είχε ως κύριο στόχο τη μελέτη της υδρολυτικής δράσης της εστεράσης EstDZ2, ενός νεοανακαλυφθέντος ενζύμου, έναντι διαφόρων υποστρωμάτων. Η εργασία αποτελείται από τρία μέρη. Το πρώτο μέρος περιλαμβάνει εισαγωγικά στοιχεία για τη βιοκατάλυση και τα ένζυμα, στο δεύτερο μέρος παρουσιάζονται τα αποτελέσματα και στο τρίτο μέρος παρουσιάζονται οι πειραματικές διαδικασίες της σύνθεσης ορισμένων εστέρων και των ενζυμικών αντιδράσεων υδρόλυσης καθώς και ο τρόπος με τον οποίο γίνεται η ανάλυση αυτών. Τέλος, στο παράρτημα παρουσιάζονται όλα τα φάσματα ^{1}H NMR, ^{13}C NMR και τα χρωματογραφήματα από αέριο χρωματογράφο (GC).

Το ένζυμο EstDZ2 μελετήθηκε για την υδρολυτική του δράση ως προς δύο τύπους εστέρων. Στον πρώτο περιλαμβάνονται ορισμένοι μέθυλο και αίθυλο εστέρες μικρού μεγέθους και στον δεύτερο ορισμένοι β-κέτο εστέρες. Επίσης, συντέθηκαν και ορισμένοι εστέρες του βουτυρικού οξέος με υποκατεστημένα παράγωγα της φαινόλης, καθώς έχει αποδειχτεί ότι σε τέτοιου είδους υποστρώματα εμφανίζει έντονη δράση.

Ενότητα 1: Εισαγωγή

1.1 Ανακάλυψη ενζύμων και σύστασης αυτών

Η λέξη *ένζυμο* προκύπτει από τα συνθετικά *εν* και *ζύμη* και χρησιμοποιήθηκε, πράγματι, για να αποδώσει ακριβώς αυτό το οποίο περιγράφει η λέξη, δηλαδή την ουσία που υπάρχει μέσα στη ζύμη (εννοώντας τον μικροοργανισμό S. *Cerevisiae*). Ο γερμανός φυσιολόγος Wilhelm Friedrich Kühne, το 1876, χρησιμοποίησε πρώτος τον όρο «Enzym» ως συνώνυμο του, μέχρι τότε, «soluble ferments», στα ελληνικά «διαλυτά φυράματα», που συνήθιζαν να αποδίδουν οι επιστήμονες της εποχής για την ουσία που βρίσκεται σε εκχύλισμα ζύμης άνευ κυττάρων και η οποία είχε την ικανότητα να προκαλέσει βιομετασχηματισμούς, π.χ. τη μετατροπή της ζάχαρης σε αιθανόλη κατά την αλκοολική ζύμωση, διαδικασία που ήταν γνωστό ότι πραγματοποιείτο μόνο παρουσία ζύμης.[1]

Το 1926, ο James Batcheller Sumner (βραβείο Nobel χημείας 1946 για την κρυστάλλωση των ενζύμων) κατάφερε όχι μόνο να κρυσταλλώσει το ένζυμο ουρεάση (urease) αλλά και με περαιτέρω πειράματα να αποδείξει ότι είναι πρωτεϊνικής φύσεως.[2] Η άποψη, λοιπόν, πως τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες, δικαίως επικράτησε, ωστόσο, το 1986, η ερευνητική ομάδα του Thomas R. Cech (βραβείο Nobel χημείας 1989 για την ανακάλυψη των καταλυτικών ιδιοτήτων του RNA), μελετώντας το πρωτόζωο *Tetrahymena*, ανακάλυψε ορισμένα μόρια RNA τα οποία παρουσίαζαν καταλυτική δράση.[3] Πέραν του γνωστού, μέχρι τότε, ρόλου της αποθήκευσης γενετικών πληροφοριών και ως απαραίτητο στοιχείο για την πρωτεϊνοσύνθεση, με τη σημαντική αυτή ανακάλυψη, το RNA έχει ρόλο και ως καταλύτης. Πλέον, στους βιολογικούς καταλύτες δεν περιλαμβάνονται μόνο τα πρωτεϊνικά ένζυμα, αλλά και τα RNA ένζυμα, τα επονομαζόμενα ριβοένζυμα (ribozymes). Παρά ταύτα, τόσο στον τομέα της ενζυμολογίας, της ενζυμικής βιοτεχνολογίας όσο και στον τομέα της βιοκατάλυσης, ο όρος ένζυμα είναι συνυφασμένος με τα πρωτεϊνικά ένζυμα, για αυτό και στην παρούσα εργασία χρησιμοποιείται κατά αυτόν τον τρόπο.

1.2 Ταξινόμηση και ονοματολογία ενζύμων

Η ονομασία των ενζύμων μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο τρόπους, είτε χρησιμοποιώντας εμπειρικά ονόματα είτε συστηματικά ονόματα. Καθώς η χρήση των συστηματικών ονομάτων είναι δύσχρηστη, στην πράξη χρησιμοποιούνται μόνο τα εμπειρικά ονόματα, τα οποία, μάλιστα, βασίζονται σε ορισμένους (εμπειρικούς) κανόνες. Για παράδειγμα, πολλά υδρολυτικά ένζυμα ονομάζονται από το υπόστρωμα το οποίο υδρολύουν λαμβάνοντας στο τέλος την κατάληξη –άση, όπως αμυλάση, κυτταρινάση, λακτάση, φωσφατάση κ.α. Εξαίρεση αποτελούν τα πρωτεολυτικά ένζυμα, τα οποία συνήθως παίρνουν την κατάληξη –ίνη, επί παραδείγματι θρυψίνη, παπαΐνη, θρομβίνη. Επίσης, ένα εμπειρικό όνομα μπορεί να περιέχει πληροφορίες που να σχετίζονται τόσο με το υπόστρωμα του ενζύμου π.χ. νουκλεάση, τη χημική

ομάδα που εμπλέκεται άμεσα με την αντίδραση που καταλύει το ένζυμο π.χ. φωσφορυλάση, την προέλευση του ενζύμου π.χ. παπαΐνη, όσο και με την ιστορικότητα του ενζύμου π.χ. διαστάση, η αρχική ονομασία της αμυλασης.[4]

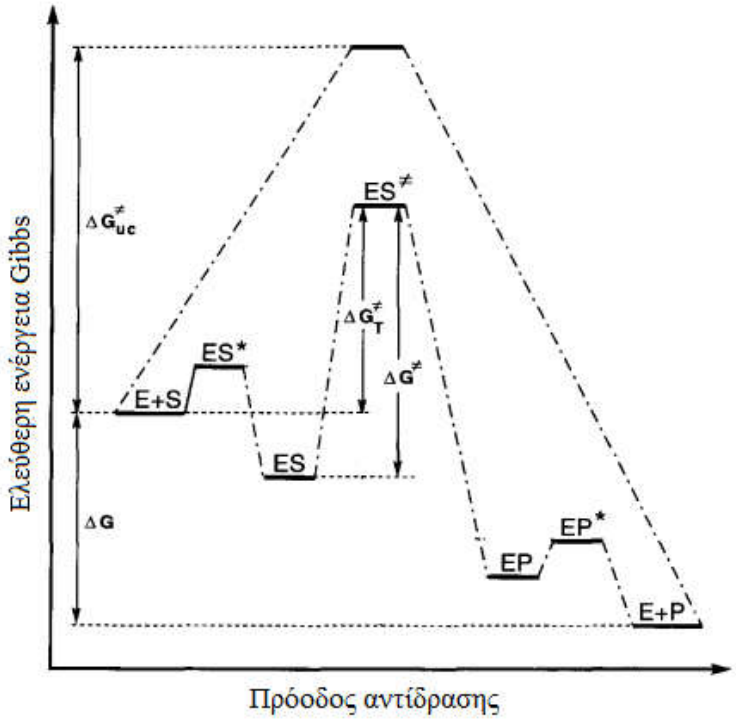
Λόγω της συνεχούς ανακάλυψης νέων ενζύμων, ο εμπειρικός τρόπος ονομασίας δεν μπορούσε να συνεχιστεί. Μπορεί τα εμπειρικά ονόματα να είναι εύχρηστα για την καθημερινότητα των επιστημόνων, ωστόσο πέρα από το γεγονός ότι παρέχουν ελάχιστες πληροφορίες σχετικά με τη δράση του ενζύμου, η μεγάλη χρήση τους οδήγησε και σε αρκετά λάθη, όπως π.χ. τη χρήση του ίδιου ονόματος για διαφορετικά ένζυμα αλλά και το αντίθετο, δηλαδή ένα ένζυμο να αναφέρεται με διαφορετικά ονόματα.[5] Έτσι, το 1956 ιδρύθηκε η Διεθνής Επιτροπή Ενζύμων (International Commission on Enzymes) της τότε Διεθνούς Ένωσης Βιοχημείας (International Union of Biochemistry) προκειμένου να διευθετηθεί το πρόβλημα της κατάταξης και της ονοματολογίας των ενζύμων. Ως προς την κατάταξη, τα ένζυμα ταξινομήθηκαν σε έξι κατηγορίες, ανάλογα με το είδος της αντίδρασης που κατέλυαν. Έτσι, προέκυψαν οι οξειδορεδουκτάσες (EC 1), οι τρανσφεράσες (EC 2), οι υδρολάσες (EC 3), οι λυάσες (EC 4), οι ισομεράσες (EC 5) και οι λιγάσες ή συνθετάσες (EC 6). Σε κάθε ένζυμο αποδίδεται ένας μοναδικός τετραψήφιος κωδικός ενζύμου (Enzyme Code, EC) EC A.B.C.D, του οποίου κατά σειρά τα ψηφία παρέχουν όλο και πιο εξειδικευμένες πληροφορίες για την αντίδραση που καταλύει το εκάστοτε ένζυμο.[4] Μέχρι πρότινος ίσχυαν οι παραπάνω έξι κατηγορίες. Ωστόσο, τον Αύγουστο του 2018, η Διεθνής Ένωση Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (International Union of Biochemistry and Molecular Biology, IUBMB) ανακοίνωσε τη δημιουργία μίας νέας κατηγορίας ενζύμων, τις τρανσλοκάσες (EC 7).[6] Στον Πίνακα 1 παρουσιάζονται συγκεντρωτικά οι παραπάνω πληροφορίες για την ταξινόμηση των ενζύμων, καθώς και οι βασικοί τύποι αντιδράσεων που καταλύουν. Ως προς την ονοματολογία, σε αυτά αποδίδονται τόσο κοινά όσο και συστηματικά ονόματα, τα οποία όμως υπόκεινται σε πολλούς κανόνες.

Πίνακας 1: Κατηγοριοποίηση ενζύμων ανάλογα με τη φύση της αντίδρασης που καταλύουν.

Κατηγορίες ενζύμων		
Πρώτο ψηφίο	**Ονομασία κατηγορίας**	**Είδος καταλυόμενης αντίδρασης**
1.	Οξειδορεδουκτάσες	Οξείδωση, αναγωγή
2.	Τρανσφεράσες	Μεταφορά ομάδας μεταξύ δύο μορίων
3.	Υδρολάσες	Διάσπαση ή σχηματισμός δεσμών με συμμετοχή νερού
4.	Λυάσες	Προσθήκη ή απόσπαση
5.	Ισομεράσες	Ισομερίωση
6.	Λιγάσες ή συνθετάσες	Σύζευξη δύο μορίων ωθούμενη από την υδρόλυση του ενός NTP
7.	Τρανσλοκάσες	Μεταφορά ή διαχωρισμός ιόντος ή μορίου διαμέσου μεμβρανών

1.3 Τρόπος δράσης ενζύμων

Τα ένζυμα είναι πραγματικοί καταλύτες. Η καταλυτική δράση, όπως και στους χημικούς καταλύτες, οφείλεται στη μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης, E_a της αντίδρασης, με αποτέλεσμα το αντιδρών να μετατρέπεται γρηγορότερα σε προϊόν. Η μείωση αυτή οφείλεται στη σταθεροποίηση της μεταβατικής κατάστασης, γεγονός που σημαίνει πως η αλληλεπίδραση ενζύμου-υποστρώματος είναι ισχυρότερη στη μεταβατική κατάσταση παρά στη βασική κατάσταση του αντιδρώντος (Εικόνα 1).



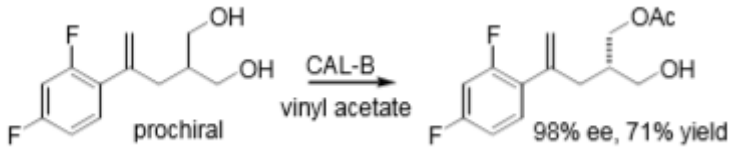
Εικόνα 1: Ενεργειακό διάγραμμα μίας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης που περιλαμβάνει ένα υπόστρωμα (S), ένα ένζυμο (E) και ένα προϊόν (P), συγκρινόμενο με αυτό μίας μη καταλυόμενης αντίδρασης. Το διάγραμμα έχει παρθεί από τη βιβλιογραφία [7] και έχει υποστεί τροποποιήσεις.

Τα ένζυμα μπορεί να επιταχύνουν τις αντιδράσεις, ωστόσο δεν επηρεάζουν τη θέση της χημικής ισορροπίας της αντίδρασης. Η θέση της ισορροπίας καθορίζεται από θερμοδυναμικούς παράγοντες και μόνο. Τα ένζυμα αυξάνουν την ταχύτητα των αντιδράσεων καθώς συμβάλουν στη γρηγορότερη επίτευξη του σημείου ισορροπίας της αντίδρασης. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 1, το ένζυμο δεν επηρεάζει την ΔG της αντίδρασης, δηλαδή δεν μεταβάλει το ενεργειακό περιεχόμενο του αντιδρώντος ή του προϊόντος. Απαραίτητη προϋπόθεση για να πραγματοποιηθεί αυθόρμητα μία οποιαδήποτε αντίδραση είναι να έχει $\Delta G<0$, όπως φαίνεται και στην περίπτωση της Εικόνας 1. Σε διαφορετική περίπτωση, όση ποσότητα ενζύμου και να προστεθεί, η αντίδραση δεν θα πραγματοποιηθεί.

1.4 Πλεονεκτήματα χρήσης ενζύμων

Οι λόγοι για τους οποίους τα ένζυμα χρησιμοποιούνται όλο και περισσότερο τόσο σε ερευνητικό όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο είναι πολλοί και αξίζει να αναφερθούν.[9]

Αρχικά, τα ένζυμα λόγω της υψηλής εξειδίκευσης που εμφανίζουν σε κυτταρικό επίπεδο, θεωρήθηκε πως δεν θα δέχονται μη φυσικά υποστρώματα, αλλά ακόμα και αν δέχονται, η καταλυτική τους δράση θα είναι αρκετά μικρότερη. Στις βιοχημικές αντιδράσεις, τις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα εντός των ζώντων οργανισμών, ο υψηλός βαθμός εκλεκτικότητας και εξειδίκευσης είναι απαραίτητος προκειμένου να υπάρχει ρύθμιση/έλεγχος όλων των λειτουργιών του οργανισμού. Εν αντιθέσει, έξω από το φυσικό τους περιβάλλον, ο σκοπός της δημιουργίας τους παύει να ισχύει και υπό την χρήση του ερευνητή είναι δυνατόν να χρησιμοποιηθούν σε μία ευρεία πληθώρα υποστρωμάτων. Για παράδειγμα, ο φυσικός ρόλος της CAL-B (*Candida antarctica* Lipase B) είναι η υδρόλυση τριγλυκεριδίων, ωστόσο, μπορεί να προκαλέσει βιομετασχηματισχούς και σε μη φυσικά υποστρώματα (Εικόνα 2).



Εικόνα 2: Εναντιοεκλεκτική ακετυλίωση μίας προχειρόμορφης διόλης προς σχηματισμό οπτικά ενεργού προϊόντος.[16a]

Επίσης, μπορεί να βρεθεί συγκεκριμένο ένζυμο που να καταλύει σχεδόν οποιαδήποτε αντίδραση επιθυμεί να πραγματοποιήσει κάποιος. Αυτό γίνεται, ήδη, αντιληπτό από την κατηγοριοποίηση των ενζύμων στις επτά τάξεις, οι οποίες συγκεντρωτικά σχετίζονται με όλες σχεδόν τις οργανικές αντιδράσεις. Μάλιστα, έχουν βρεθεί ένζυμα που καταλύουν ακόμα και περικυκλικές αντιδράσεις, όπως η Diels-Alder αντίδραση.[8]

Η υψηλή καταλυτική τους ισχύ είναι ένα επιπρόσθετο πλεονέκτημα που εμφανίζουν. Η ταχύτητα των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων αυξάνεται κατά ένα παράγοντα της τάξεως του 10^8-10^{10}, συγκριτικά με τις μη καταλυόμενες.[10]

Επιπλέον, τα ένζυμα εμφανίζουν δύο πολύ σημαντικά πλεονεκτήματα για τη συνθετική οργανική χημεία. Πρώτον, λόγω του γεγονότος ότι απαιτούν παρόμοιες συνθήκες, τα ένζυμα μπορούν να συνδυαστούν μεταξύ τους δίνοντας αντιδράσεις cascade, στις οποίες το προϊόν της μίας ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης αποτελεί υπόστρωμα για μία άλλη αντίδραση που καταλύεται από κάποιο άλλο ένζυμο. Έτσι, μειώνεται ο χρόνος της όλης διαδικασίας και, επίσης, ελαχιστοποιείται η απώλεια ουσίας καθώς δεν πραγματοποιούνται διαδικασίες απομόνωσης και καθαρισμού των ενδιαμέσων. Δεύτερον, τα ένζυμα δύναται να εμφανίσουν έναν από τους παρακάτω τύπους εκλεκτικότητας, ή και συνδυασμό αυτών:

1. Χημειοεκλεκτικότητα

Η ικανότητα να δρουν εκλεκτικά μόνο σε μία δραστική ομάδα του υποστρώματος χωρίς την μετατροπή άλλων εξίσου δραστικών ομάδων, οι οποίες υπό συνθήκες χημικής κατάλυσης θα αντιδρούσαν.

2. Τοποεκλεκτικότητα

Η ικανότητα να διακρίνουν όμοιες λειτουργικές ομάδες του ίδιου μορίου και να δρουν εκλεκτικά μόνο σε μία.

3. Στερεοεκλεκτικότητα

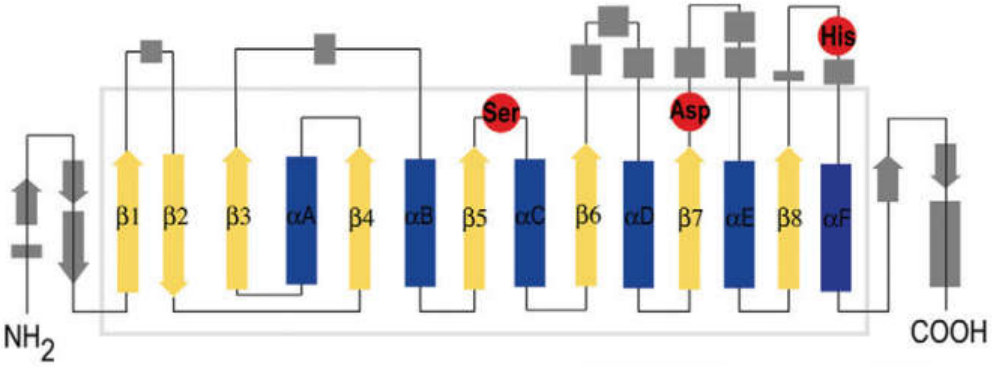
Η ικανότητα του ενζύμου να σχηματίσει το ένα στερεοϊσομερές έναντι των άλλων. Η στερεοεκλεκτικότητα διακρίνεται σε εναντιοεκλεκτικότητα και διαστερεοεκλεκτικότητα. Στην πρώτη, το ένζυμο διακρίνει το ένα εναντιομερές ενός ρακεμικού μίγματος ή μία από τις εναντιοτοπικές επιφάνειες ή ομάδες του μορίου, οδηγώντας σε οπτικά καθαρό προϊόν, ενώ στη δεύτερη, διακρίνει ένα από τα διαστερεομερή ενός μίγματος ή μία από τις διαστερεοτοπικές επιφάνειες ή ομάδες του μορίου.

1.4 Υδρολυτικά ένζυμα

Τα υδρολυτικά ένζυμα (EC 3) είναι από τα πιο χρήσιμα ένζυμα στην οργανική σύνθεση, καθώς υδρολύουν εστερικούς, πεπτιδικούς, εποξειδικούς, αμιδικούς και πολλούς άλλους δεσμούς. Το γεγονός ότι δεν απαιτούν συμπαράγοντες για τη δράση τους έχει συμβάλει ακόμη περισσότερο στην αυξημένη δημοτικότητά τους.

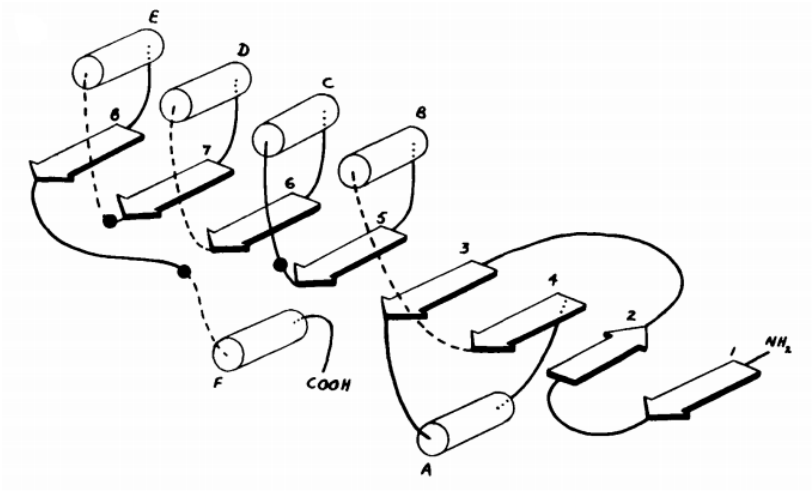
Ανάλογα με τον μηχανισμό κατάλυσης, οι υδρολάσες μπορούν να καταταχθούν σε διάφορες κατηγορίες, όπως καταλύτες σερίνης, κυστεΐνης, ασπαρτικού και μεταλλοπρωτεάσες. Σε κάθε τάξη από τις προηγούμενες, η στρατηγική κατάλυσης συνίσταται στη δημιουργία ενός πυρηνόφιλου το οποίο προσβάλει τον καρβονυλικό άνθρακα του εστερικού ή πεπτιδικού δεσμού.[11] Οι σέρινο-υδρολάσες είναι η μεγαλύτερη και καλύτερα μελετημένη τάξη υδρολασών και σε αυτές υπάγονται οι σέρινο-πρωτεάσες, διάφορες λιπάσες και εστεράσες, φωσφολιπάσες, θειοεστεράσες και αμιδάσες.[12]

Η πλειονότητα αυτών περιλαμβάνει στην τρισδιάστατη δομή τους μία συντηρημένη δομή, την α/β αναδίπλωση ή διαφορετικά α/β-συστραμένη ανοικτή β-πτυχωτή επιφάνεια (Εικόνα 3), κατηγορία πρωτεϊνικής δομής που ανήκει στις α/β επικράτειες, τις πιο συχνά απαντώμενες στις πρωτεΐνες.[13]



A)

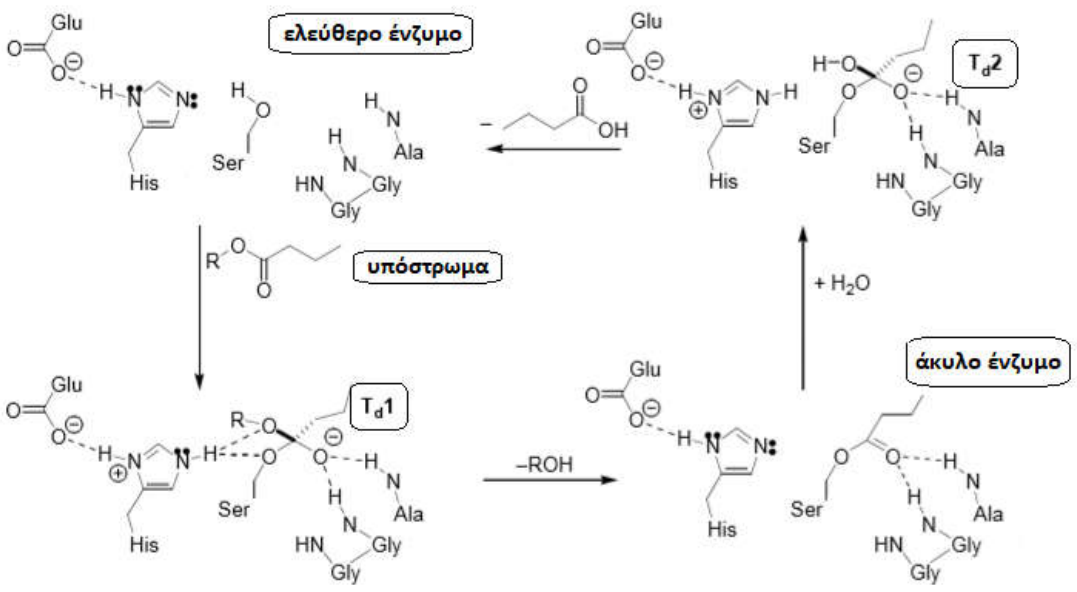
B)



Εικόνα 3: Α)Δισδιάστατο τοπολογικό διάγραμμα α/β-συστραμένης ανοικτής β-πτυχωτής επιφάνειας που περιλαμβάνει οκτώ β-κλώνους και έξι α-έλικες. Οι β-κλώνοι αναπαριστώνται από τα κίτρινα βέλη, ενώ οι α-έλικες από τα μπλε ορθογώνια. Η καταλυτική τριάδα σημειώνεται με τους κόκκινους κύκλους. Έχει παρθεί από τη βιβλιογραφία 14. Β) Τρισδιάστατο τοπολογικό διάγραμμα α/β-συστραμένης ανοικτής β-πτυχωτής επιφάνειας. Έχει παρθεί από τη βιβλιογραφία 15.

Η συγκεκριμένη δομή αποτελείται από μία ομάδα παράλληλων ή μεικτών β-πτυχωτών φύλλων η οποία περιβάλλεται από α-έλικες. Συγκεκριμένα, περιλαμβάνει οκτώ β-πτυχωτά φύλλα και έξι α-έλικες, οι οποίες μάλιστα βρίσκονται εκατέρωθεν της επιφάνειας των β-φύλλων. Οι περιοχές πρόσδεσης μεταξύ αυτών σχηματίζονται από πρωτεϊνικούς βρόγχους οι οποίοι κατέχουν σημαντικό ρόλο στην κατάλυση.[13] Πέραν του β2-κλώνου, όλοι οι υπόλοιποι β-κλώνοι είναι παράλληλοι μεταξύ τους. Το πυρηνόφιλο σερίνης βρίσκεται στο βρόγχο μεταξύ β5-κλώνου και αC-έλικας, το κατάλοιπο ασπαραγινικού μεταξύ β7-κλώνου και αE-έλικας και, τέλος, το κατάλοιπο ιστιδίνης βρίσκεται ανάμεσα στον β8-κλώνο και αF-έλικας.[14]

Ο μηχανισμός των σερινο-υδρολασών είναι ο καλύτερα μελετημένος και για αυτό παρατίθεται στην εικόνα 4. Η καταλυτική τριάδα του ενεργού κέντρου αποτελείται από το πυρηνόφιλο κατάλοιπο σερίνης, ένα κατάλοιπο ιστιδίνης και ένα κατάλοιπο ασπαρτικού ή γλουταμινικού. Η συνεισφορά των δύο τελευταίων καταλοίπων έγκειται στη δημιουργία ενός ισχυρότερου πυρηνόφιλου σερίνης, το οποίο επιτυγχάνεται με τη δημιουργία δεσμών υδρογόνου (Εικόνα 4).



Εικόνα 4: Συνοπτική παρουσίαση του μηχανισμού υδρόλυσης. Η εικόνα έχει παρθεί από τη βιβλιογραφία 16b και έχει τροποποιηθεί ελαφρώς.

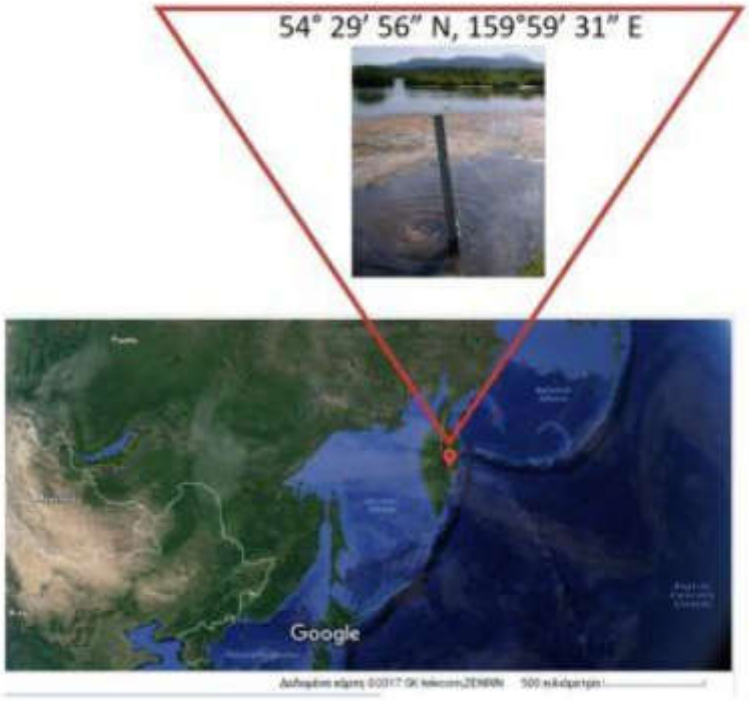
Συνοπτικά, ο μηχανισμός περιλαμβάνει, αρχικά, τη δημιουργία του ισχυρού πυρηνόφιλου σερίνης μέσω δεσμών υδρογόνου και την προσβολή στον καρβονυλικό άνθρακα του εστερικού ή πεπτιδικού δεσμού προς τη δημιουργία του πρώτου τετραεδρικού ενδιαμέσου, T_d1. Στη συνέχεια, με αποβολή της αποχωρούσας ομάδας (αλκοόλη ή αμίνη) δημιουργείται το άκυλο ένζυμο. Με πυρηνόφιλη προσβολή ενός μορίου ύδατος σηματίζεται το δεύτερο τετραεδρικό ενδιάμεσο, T_d2, όπου, τέλος, το ένζυμο απελευθερώνει το καρβοξυλικό οξύ.

1.5 Εστεράσες

Οι εστεράσες καταλύουν την αντίδραση υδρόλυσης εστερικών δεσμών, κυρίως εστέρων μικρού, σχετικά, μεγέθους, σε αντίθεση με τις λιπάσες που προτιμούν μεγαλύτερα μη υδατοδιαλυτά υποστρώματα. Συνήθως, με τον όρο εστεράση αναφερόμαστε στις καρβόξυλο εστεράσες (EC 3.1.1), οι οποίες δρουν σε καρβοξυλικούς εστερικούς δεσμούς. Ο φυσιολογικός ρόλος των καρβόξυλο εστερασών παραμένει αδιευκρίνιστος, εκτός από την περίπτωση της ακετυλο και βουτυρυλο χολινεστεράσης, οι οποίες υδρολύουν την ακετυλοχολίνη και βουτυρυλοχολίνη αντίστοιχα. Στην οργανική σύνθεση, ελάχιστες εστεράσες έχουν χρησιμοποιηθεί, όπως η εστεράση από ήπαρ χοίρου (PLE), αυτή από ήπαρ αλόγου (HLE) και η ακετυλοχολινεστεράση (ACE).[16b] Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι εστεράσες ανήκουν στις α/β υδρολάσες και ο μηχανισμός δράσης τους είναι αυτός που περιγράφεται στην Εικόνα 4.

1.6 Εστεράση EstDZ2

Η εστεράση EstDZ2 ανακαλύφθηκε το 2016 μέσω βιοπληροφορικής ανάλυσης του μεταγονιδιωματικού υλικού του ενδιαιτήματος της θερμοπηγής Solnechny στην Καμτσάτκα της Ρωσίας.[17]



Εικόνα 5: Σημείο δειγματοληψίας.[17]

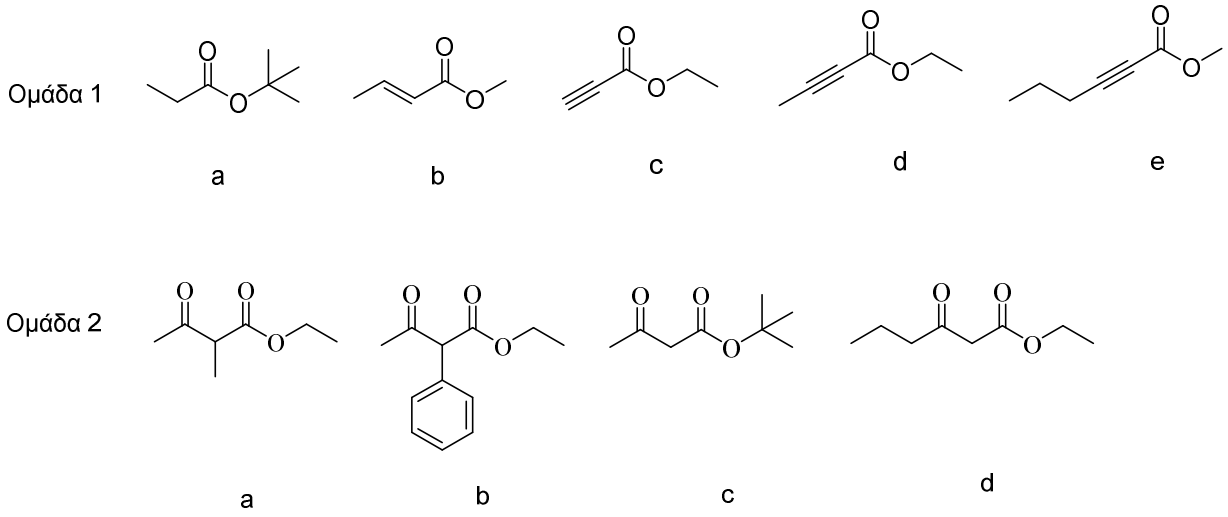
Συγκεκριμένα, αφού συλλέχθηκε το μεταγονιδιωματικό υλικό, αλληλουχήθηκε και μέσω σύγκρισης των διαφόρων πλαισίων ανάγνωσης με αυτά μίας βάσης δεδομένων για συντηρημένες περιοχές με εστερολυτική δράση, θεωρήθηκε ότι το ένζυμο ανήκει σε αυτήν την κατηγορία. Η συγκεκριμένη αλληλουχία απομονώθηκε με την τεχνική PCR, κλωνοποιήθηκε, δημιουργήθηκε ένα ανασυνδυασμένο πλασμίδιο και, τέλος, εισήχθη σε επιλεγμένα κύτταρα για την έκφρασή του.[17]

Η EstDZ2 είναι ένα μονομερές πρωτεϊνικό μόριο. Το εύρος τιμών pH στο οποίο το ένζυμο εμφανίζει βέλτιστη δράση είναι 7-8. Το ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του ενζύμου είναι η θερμοσταθερότητά του καθώς παρουσιάζει υψηλή ενεργότητα σε θερμοκρασιακό εύρος 25-60 ^{o}C, με τη μέγιστη να επιτυγχάνεται στους 55 ^{o}C. Μάλιστα, το ένζυμο διατηρεί την ενεργότητά του σε υψηλά επίπεδα στη συγκεκριμένη θερμοκρασία, ακόμα και μετά από επώαση 24 ωρών. Τέλος, παρουσιάζει ανθεκτικότητα και διατήρηση της καταλυτικής του δράσης σε διαλύματα έως και 30% v/v σε ορισμένους οργανικούς διαλύτες όπως μεθανόλη, αιθανόλη και ακετόνη.[17]

Ενότητα 2: Αποτελέσματα-Σχολιασμός αποτελεσμάτων

Σκοπός της εργασίας αυτής είναι η μελέτη της υδρολυτικής δράσης του νέου αυτού ενζύμου, της εστεράσης EstDZ2, έναντι διαφόρων τύπων υποστρωμάτων. Οι εστέρες που χρησιμοποιήθηκαν μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει απλούς μέθυλο και αίθυλο εστέρες μικρού μεγέθους, κυρίως ακόρεστους και η δεύτερη περιλαμβάνει β-κέτο-εστέρες. Επίσης, συντέθηκαν και ορισμένοι εστέρες του βουτυρικού οξέος με υποκατεστημένα παράγωγα της φαινόλης καθώς έχει αποδειχθεί πως σε τέτοιου είδους υποστρώματα το ένζυμο εμφανίζει εξαιρετικά ποσοστά μετατροπής. Στην παρούσα εργασία δεν παρουσιάζονται τα αποτελέσματα υδρόλυσης των συγκεκριμένων εστέρων, καθώς εντός του χρονικού πλαισίου δεν δόθηκε η δυνατότητα ολοκλήρωσης των πειραμάτων αυτών, λόγω της εμφάνισης ορισμένων πειραματικών εμποδίων. Ωστόσο, αξίζει να αναφερθεί ότι τα πειράματα συνεχίστηκαν από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου και, πράγματι το ένζυμο εμφανίζει εξαιρετικά ποσοστά μετατροπής.

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της υδρολυτικής δράσης της εστεράσης EstDZ2 στα πλαίσια της παρούσας Διπλωματικής εργασίας μπορούν να χωριστούν σε δύο κατηγορίες. Στην Εικόνα 7 παρουσιάζονται τα υποστρώματα των δύο κατηγοριών.

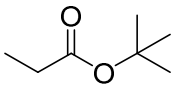
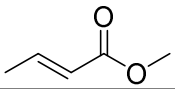
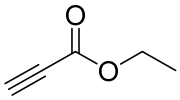
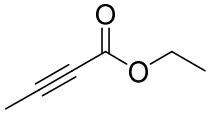
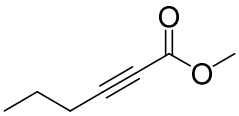
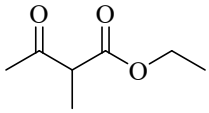
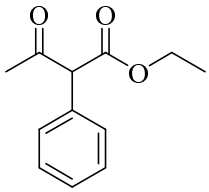
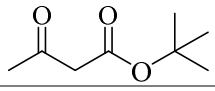
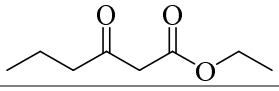
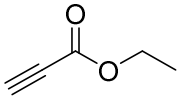


Εικόνα 7: Υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της υδρολυτικής δράσης της εστεράσης EstDZ2.

Από την υδρόλυση των παραπάνω υποστρωμάτων η αλκοόλη που προκύπτει είναι είτε μεθανόλη, είτε αιθανόλη, είτε *tert*-βουτανόλη, οι οποίες έχουν αυξημένη πολικότητα, με αποτέλεσμα, κατά τις μικροεκχυλίσεις που πραγματοποιούνται πριν την μελέτη της ενζυμικής αντίδρασης υδρόλυσης στον αέριο χρωματογράφο, να μην παραλαμβάνεται όλη η ποσότητα αυτών. Έτσι, δεν είναι δυνατόν να εξαχθούν συμπεράσματα για το πόσο έχει προσχωρήσει η αντίδραση και το ποσοστό μετατροπής. Για αυτόν το λόγο, προστίθεται στο κάθε δείγμα πριν γίνει η ένεση στο GC, συγκεκριμένη ποσότητα εσωτερικού προτύπου και το ποσοστό μετατροπής

υπολογίζεται από τα σχετικά ολοκληρώματα των κορυφών του εστέρα και του εσωτερικού προτύπου.

Τα αποτελέσματα των ενζυμικών υδρολύσεων παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

		Conversion %a				
		Blind	EstDZ2	Blind	EstDZ2	
	Υπόστρωμα	24h		19h		
1a		34	35	-	-	pH=8
1b		55	54	-	-	
1c		62	61	-	-	
1d		47	41	-	-	
1e		39	46	-	-	
2a		-	-	40	40	pH=7
2b		-	-	25	28	
2c		-	-	65	61	
2d		-	-	60	74	
1c		-	-	45	48	

[a] Τα ποσοστά μετατροπής έχουν προκύψει από ανάλυση στον αέριο χρωματογράφο από τη σχετική ολοκλήρωση των κορυφών του εστέρα και του εσωτερικού προτύπου.

Όπως φαίνεται από τις ενζυμικές υδρολύσεις της πρώτης ομάδας εστέρων, εντός των 24 ωρών οι εστέρες έχουν υδρολυθεί κατά το ίδιο ποσοστό τόσο στο blind όσο και στο δείγμα με το ένζυμο. Από αυτά τα αποτελέσματα προκύπτουν τα παρακάτω συμπεράσματα: α) η υδρόλυση στα blind οφείλεται στις βασικές συνθήκες των αντιδράσεων καθώς σε αυτά δεν υπάρχει ποσότητα ενζύμου, επομένως β) η υδρόλυση στα δείγματα με το ένζυμο οφείλεται, σίγουρα, σε ένα βαθμό στην βασική

υδρόλυση που λαμβάνει χώρα και γ) είτε οι συγκεκριμένοι εστέρες δεν αποτελούν υποστρώματα για το ένζυμο είτε πραγματοποιείται και σε ένα βαθμό υδρόλυση από το ένζυμο, ωστόσο το χρονικό εύρος των αντιδράσεων είναι αρκετά μεγάλο με αποτέλεσμα η αντίδραση να φτάνει σε ισορροπία και έτσι τα ποσοστά μετατροπής να είναι όμοια. Για την περίπτωση του εστέρα 1e παρατηρείται ένα επιπλέον 7% στο δείγμα με το ένζυμο το οποίο μπορεί να οφείλεται σε υδρόλυση από το ένζυμο, ωστόσο το ποσοστό παραμένει και πάλι αρκετά μικρό και άρα όχι ιδιαίτερα ελκυστικό για περαιτέρω πειράματα, όπως συμβαίνει και με τους περισσότερους εστέρες τις ομάδας 1. Εξαίρεση αποτελεί ο εστέρας 1c, όπου παρατηρείται ένα ικανοποιητικό ποσοστό μετατροπής >60%, το οποίο, ωστόσο, είναι ίδιο τόσο στο τυφλό διάλυμα όσο και στο διάλυμα με το ένζυμο. Ο συγκεκριμένος εστέρας χρησιμοποιήθηκε και στα πειράματα που ακολούθησαν για την ομάδα 2 των εστέρων όπου οι υδρολύσεις πραγματοποιούνταν σε pH=7, προκειμένου να αποφανθούμε για το αν η υδρόλυση οφείλεται στο βασικό περιβάλλον ή στο ένζυμο.

Προκειμένου να περιορίσουμε την βασική υδρόλυση, διεξήχθησαν για άλλη μία φορά πειράματα υδρολύσεων σε μία άλλη ομάδα εστέρων, καθώς η ομάδα 1 παρουσίασε, ούτως ή άλλως, πολύ μικρά ποσοστά μετατροπής. Στους εστέρες της ομάδας 2 προστέθηκε και ο εστέρας 1c. Οι αντιδράσεις αυτές διήρκησαν 19 ώρες και όχι 24. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2 και πάλι τα ποσοστά μετατροπής είναι ίδια τόσο στο blind δείγμα όσο και σε αυτό που περιέχει ένζυμο, κάτι το οποίο σημαίνει ότι και αυτού του τύπου οι εστέρες δεν αποτελούν υποστρώματα για το ένζυμο. Ο λόγος που πραγματοποιείται υδρόλυση αυτή τη φορά δεν οφείλεται στο pH αλλά στην υψηλή θερμοκρασία που λαμβάνει χώρα η αντίδραση (και στην προηγούμενη περίπτωση η αυξημένη θερμοκρασία συνέβαλε στην αυτοϋδρόλυση των εστέρων). Ο εστέρας 2d εμφάνισε τα υψηλότερα ποσοστά μετατροπής και στο διάλυμα με το ένζυμο εμφάνισε ποσοστό μετατροπής κατά 14% μεγαλύτερο. Στην περίπτωση αυτή μπορούμε να πούμε με μεγαλύτερη σιγουριά ότι αυτή η επιπλέον υδρόλυση οφείλεται στο ένζυμο (και όχι σε κάποιο σφάλμα), ωστόσο, ξανά, συγκριτικά με το blind εμφανίζει μικρή διαφορά. Σε χαμηλότερη θερμοκρασία πιθανότατα θα μπορεί να εξαχθεί ένα πιο ολοκληρωμένο συμπέρασμα για τον συγκεκριμένο εστέρα.

Ενότητα 3: Πειραματικό μέρος

Από όλους τους παραπάνω εστέρες που αναφέρθηκαν στη Συζήτηση, μόνο αυτοί της τρίτης κατηγορίας χρειάστηκε να συντεθούν, καθώς οι υπόλοιποι ήταν διαθέσιμοι. Για το λόγο αυτό, παρακάτω παρουσιάζεται η διαδικασία σύνθεσης μόνο αυτών των εστέρων.

Όργανα-Αντιδραστήρια

Η πορεία των αντιδράσεων σύνθεσης των εστέρων ελεγχόταν με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας χρησιμοποιώντας πλάκες TLC Silica gel 60 F254 της εταιρείας Merck, και η ανάπτυξή τους πραγματοποιούνταν σε διάφορες αναλογίες διαλυτών πετρελαϊκού αιθέρα, PE/οξικού αιθυλεστέρα, EtOAc.

Η καταγραφή των φασμάτων ^{1}H και ^{13}C NMR έγινε με τη χρήση φασματομέτρου 300 MHz της Bruker σε διαλύτη δευτεριωμένο χλωροφόρμιο, $CDCl_3$ και ως σήμα αναφοράς χρησιμοποιήθηκε το τετραμεθυλοσιλάνιο, TMS.

Η μελέτη της πορείας των ενζυμικών υδρολύσεων πραγματοποιήθηκε στον αέριο χρωματογράφο της Shimadzu 2014, με ανιχνευτή FID και με την απλή κολώνα αέριας χρωματογραφίας Hewlett-Packard high performance capillary column HP-5 (Crosslinked 5% PH ME Siloxane) διαστάσεων 30m x 0.32mm x 0.25μm.

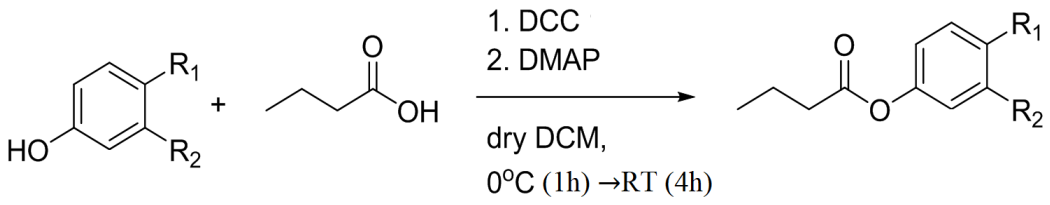
Σύνθεση βουτυρικού οξέος από βουτανόλη με οξείδωση Jones και απομόνωση βουτυρικού οξέος.

Σε μονόλαιμη σφαιρική φιάλη με μαγνητικό αναδευτήρα τοποθετούνται 4 mL ακετόνης και διαλύονται 620 μL (6,77 mmol) βουτανόλης. Η φιάλη τοποθετείται σε παγόλουτρο υπό ανάδευση και κατόπιν προστίθεται στάγδην περίσσεια αντιδραστηρίου Jones (2,5 mL), αφού πρώτα διαλυθεί και αυτό σε μικρή ποσότητα ακετόνης. Το μείγμα αφήνεται υπό αυτές τις συνθήκες για 2 ώρες και κατόπιν ακολουθεί η διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού του βουτυρικού οξέος

Για την απομόνωση του προϊόντος, αρχικά, απομακρύνεται το παγόλουτρο και το μείγμα της αντίδρασης αραιώνεται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 8,03 έως ότου διαλυθούν τυχόν στερεά. Στην συνέχεια, το διάλυμα εκχυλίζεται 5 φορές με διαλύτη διαιθυλαιθέρα, Et_2O, συλλέγεται η οργανική φάση και σε αυτήν προστίθεται ξηραντικό θειϊκό μαγνήσιο, $MgSO_4$. Ακολουθεί διήθηση υπό κενό και ο διαλύτης απομακρύνεται υπό ελαττωμένη πίεση. Τέλος, για την παραλαβή καθαρού βουτυρικού οξέος, πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης χρησιμοποιώντας σύστημα διαλυτών P.E/EtOAc 20/1. Συλλέγονται τα επιθυμητά κλάσματα, γίνεται συμπύκνωση του διαλύματος για την απομάκρυνση των διαλυτών, μεταφορά σε φιαλίδια με χλωροφόρμιο, δεύτερη συμπύκνωση και καταγράφεται το φάσμα NMR.

Σύνθεση εστέρων του βουτυρικού οξέος με υποκατεστημένα παράγωγα της φαινόλης με εστεροποίηση Steglich και απομόνωση των εστέρων.

Το γενικό σχήμα της αντίδρασης παρουσιάζεται με την παρακάτω χημική εξίσωση:



Εικόνα 6: Σύνθεση των εστέρων του βουτυρικού οξέος με υποκατεστημένα παράγωγα της φαινόλης με εστεροποίηση Steglich.

Οι εστέρες που συντέθηκαν είναι ο εστέρας του βουτυρικού οξέος με την 3-βρώμο φαινόλη, την 4–βρώμο φαινόλη, την 4-φθόρο φαινόλη καθώς και με την 4-νίτρο φαινόλη. Η αντίδραση εστεροποίησης έγινε με τη μέθοδο κατά Steglich και είχε ως εξής: σε ξηρή δίλαιμη σφαιρική φιάλη με μαγνητικό αναδευτήρα που βρίσκεται σε παγόλουτρο τοποθετούνται 4 mL ξηρού διχλωρομεθανίου, DCM, το βουτυρικό οξύ, ένας κόκκος *4*-(N,N-*διμεθυλαμινο*)*πυριδίνη*, DMAP, και N,N'-δικυκλοεξυλοκαρβο-διιμίδιο, DCC. Υπό ατμόσφαιρα αζώτου, το σύστημα αφήνεται σε αυτές τις συνθήκες για 1 ώρα, κατόπιν απομακρύνεται το παγόλουτρο και αφήνεται υπό ανάδευση για ακόμα 4 ώρες. Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία απομόνωσης και καθαρισμού του προϊόντος.

Για την απομόνωση του προϊόντος, αρχικά πραγματοποιείται διήθηση υπό κενό. Πραγματοποιούνται εκπλύσεις με κρύο DCM. Συμπυκνώνεται το διήθημα απομακρύνοντας τον διαλύτη υπό ελαττωμένη πίεση. Τέλος, για την απομόνωση καθαρού προϊόντος πραγματοποιείται χρωματογραφία στήλης σε σύστημα διαλυτών PE/EtOAc 25/1. Τέλος, καταγράφονται τα φάσματα ^{1H} NMR, ^{13}C NMR.

<u>Σημείωση</u>: Για τη σύνθεση του εκάστοτε εστέρα χρησιμοποιήθηκαν 1,2 ισοδύναμα DCC. Για τη σύνθεση των εστέρων με την 4-νιτροφαινόλη, την 4-βρωμοφαινόλη και την 4-φθοροφαινόλη χρησιμοποιήθηκαν 3 ισοδύναμα της εκάστοτε φαινόλης, ενώ για τον εστέρα με την 3-βρωμοφαινόλη χρησιμοποιήθηκαν 0,3 ισοδύναμα ως προς το βουτυρικό οξύ. Μόνο στην παρασκευή του τελευταίου εστέρα χρησιμοποιήθηκε ως διαλύτης EtOAc. Οι αντιδράσεις είχαν αποδόσεις: βουτυρικός 4-νιτροφαινολικός εστέρας 3,3%, βουτυρικός 4-βρωμοφαινολικός εστέρας 54,7%, βουτυρικός 3-βρωμοφαινολικός εστέρας 100%, βουτυρικός 4-φθοροφαινολικός εστέρας 70%.

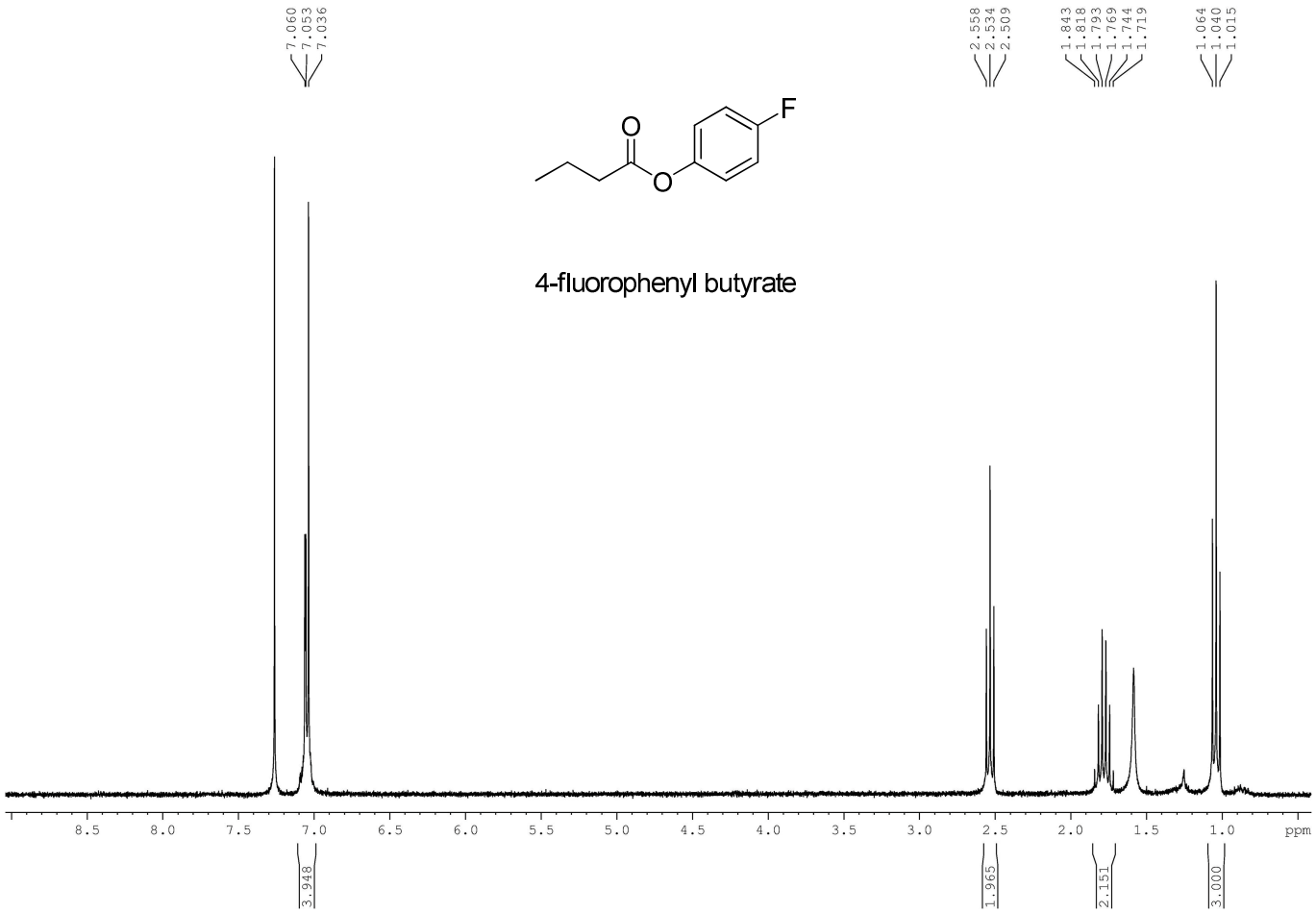
<u>Ενζυμική υδρόλυση</u>

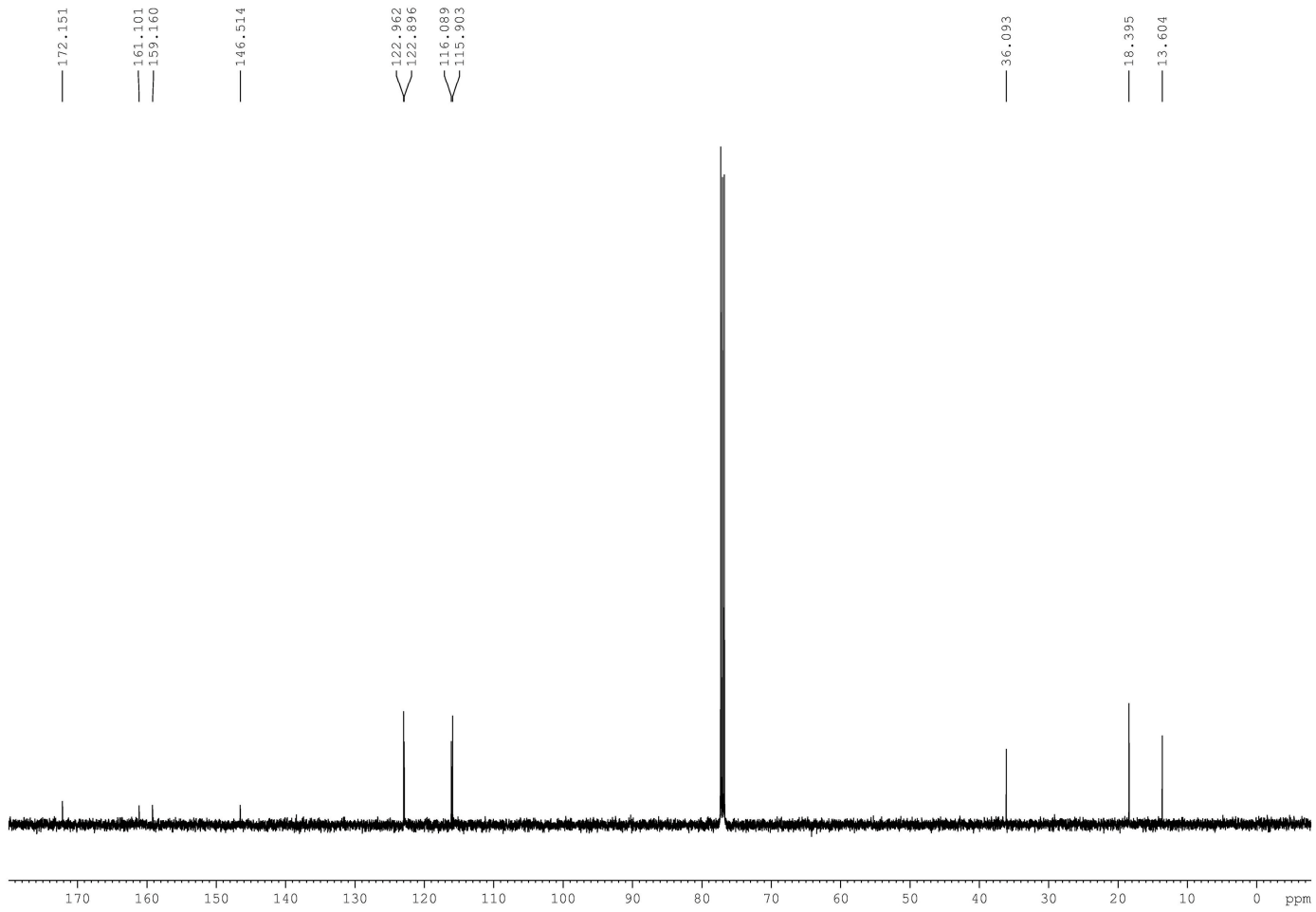
Το ένζυμο ήταν διαθέσιμο σε λυοφιλιοποιημένη μορφή, επομένως χρειάστηκε να παρασκευαστεί ρυθμιστικό διάλυμα για την διάλυση του ενζύμου. Συγκεκριμένα, παρασκευάστηκαν δύο ρυθμιστικά διαλύματα 25 mM Tris-HCl, όγκου 160 mL, με 0,05% v/v Triton-X-100, ένα με pH 8 και ένα με pH 7. Τα διαλύματα θερμάνθηκαν στους 50 ^{o}C και κατόπιν διαλύθηκε ποσότητα ενζύμου ίση με 1,6 mg. Επίσης, παρασκευάστηκαν τα ίδια διαλύματα χωρίς ένζυμο ώστε να χρησιμοποιηθούν ως τυφλά δείγματα κατά τις υδρολύσεις. Η αντίδραση υδρόλυσης γινόταν σε φιαλίδια των 4 mL και οι πειραματική της πορεία είχε ως εξής:

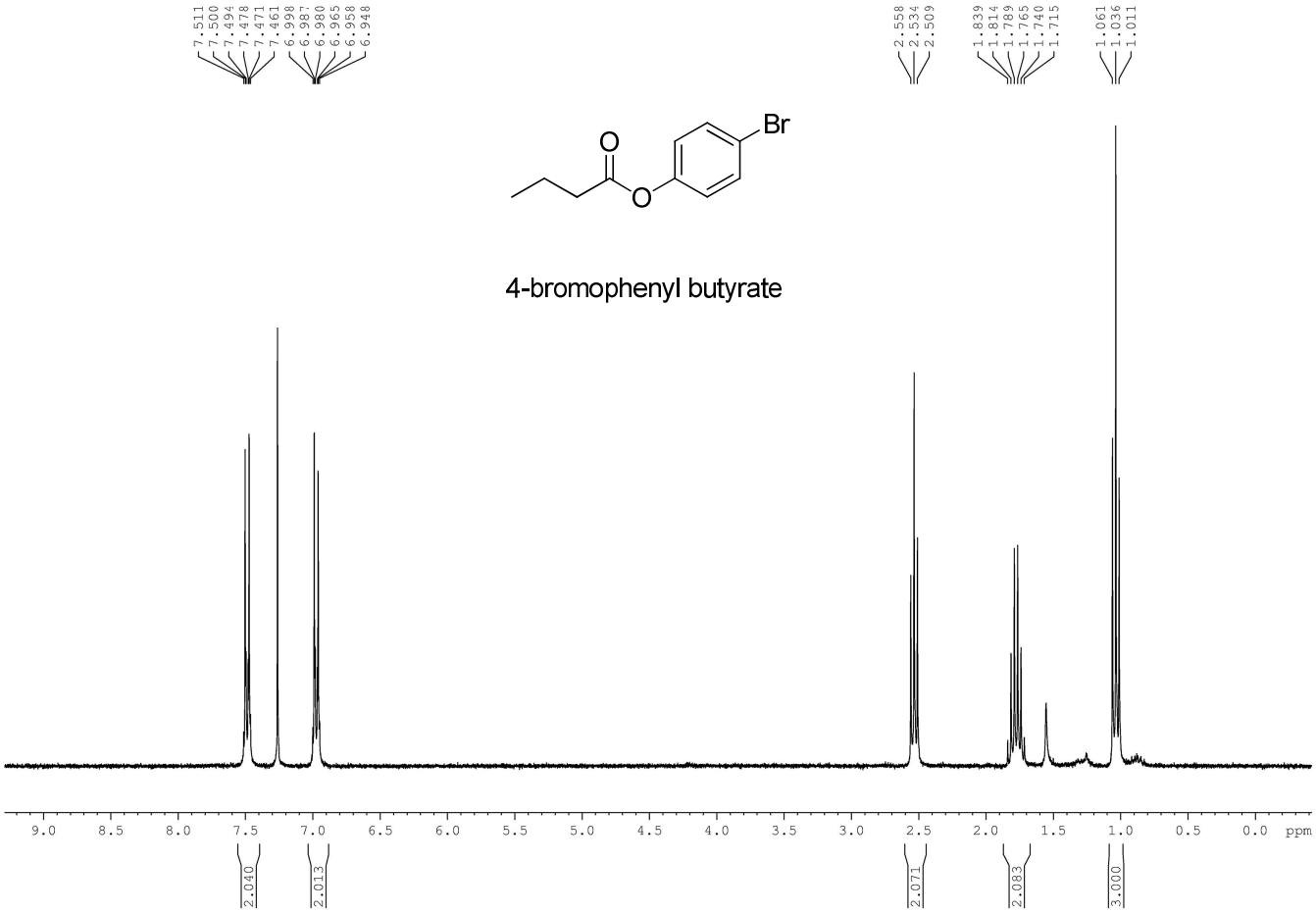
Για τον κάθε εστέρα παρασκευάζονται δύο διαλύματα, ένα που περιλαμβάνει 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος και τον εστέρα και ένα που περιλαμβάνει 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος με το ένζυμο και τον εστέρα. Προστίθεται ποσότητα υποστρώματος τέτοια που να αντιστοιχεί σε συγκέντρωση υποστρώματος 12 mM για τα 2 mL του όγκου της αντίδρασης. Τα φιαλίδια επωάζονται στους 50 ^{o}C υπό ανάδευση για συγκεκριμένο κάθε φορά χρονικό διάστημα. Με το πέρας του χρόνου, πραγματοποιούνται 4 μικροεκχυλίσεις σε κάθε φιαλίδιο με μικρή ποσότητα Et_2O και οι οργανικές φάσεις του κάθε φιαλιδίου συλλέγονται σε διαφορετικό. Τέλος, γίνεται προσθήκη 0,5 ισοδύναμου εσωτερικού προτύπου σε κάθε οργανική φάση και ακολουθούσε ένεση 1 μL στον αέριο χρωματογράφο. Από την ολοκλήρωση των κορυφών του εστέρα και του εσωτερικού προτύπου, προσδιορίζεται για το ποσοστό υδρόλυσης. Το εσωτερικό πρότυπο που χρησιμοποιήθηκε ήταν το diglyme.

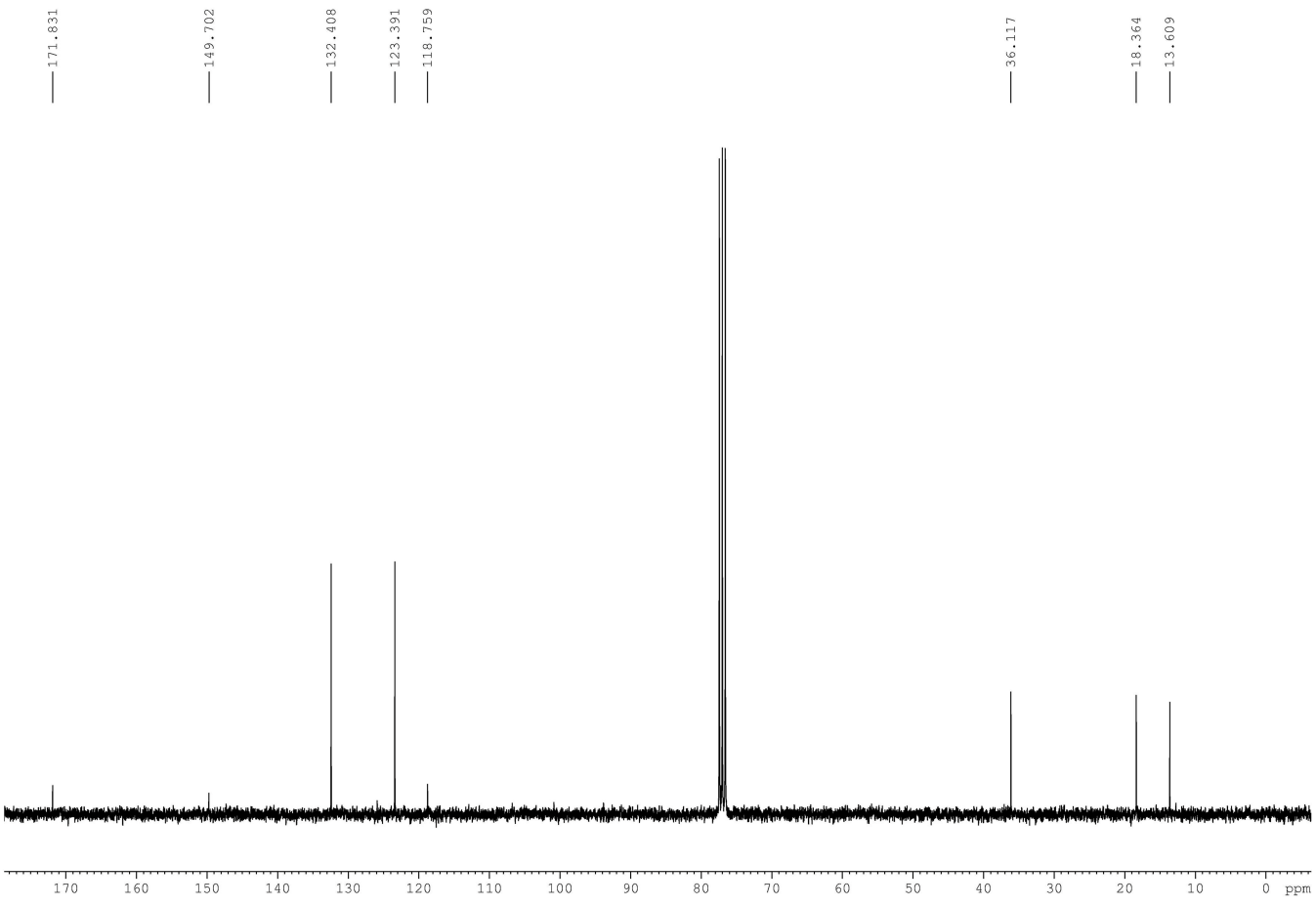
Παράρτημα

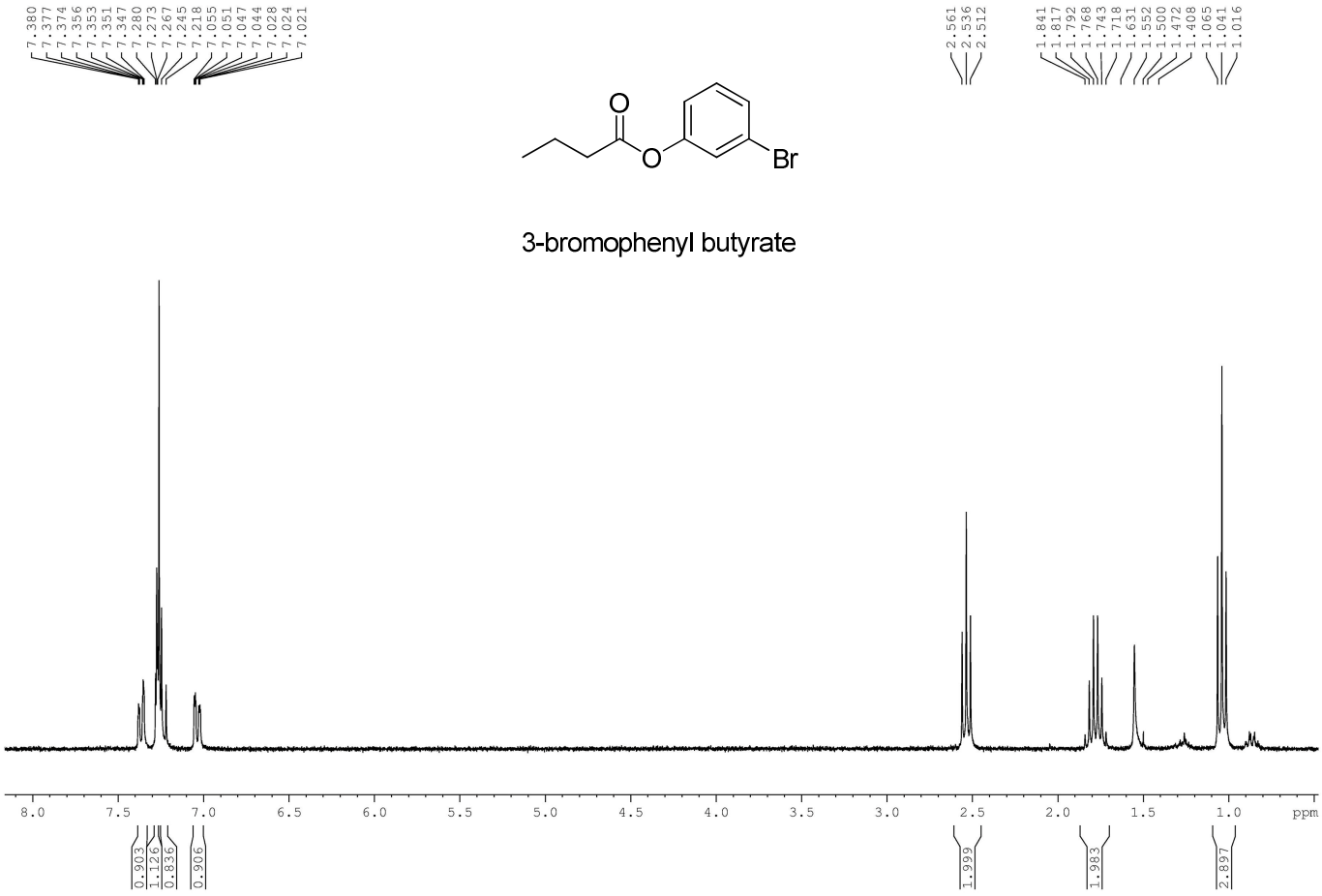
ΦΑΣΜΑΤΑ ^{1}H NMR, ^{13}C NMR και ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ GC

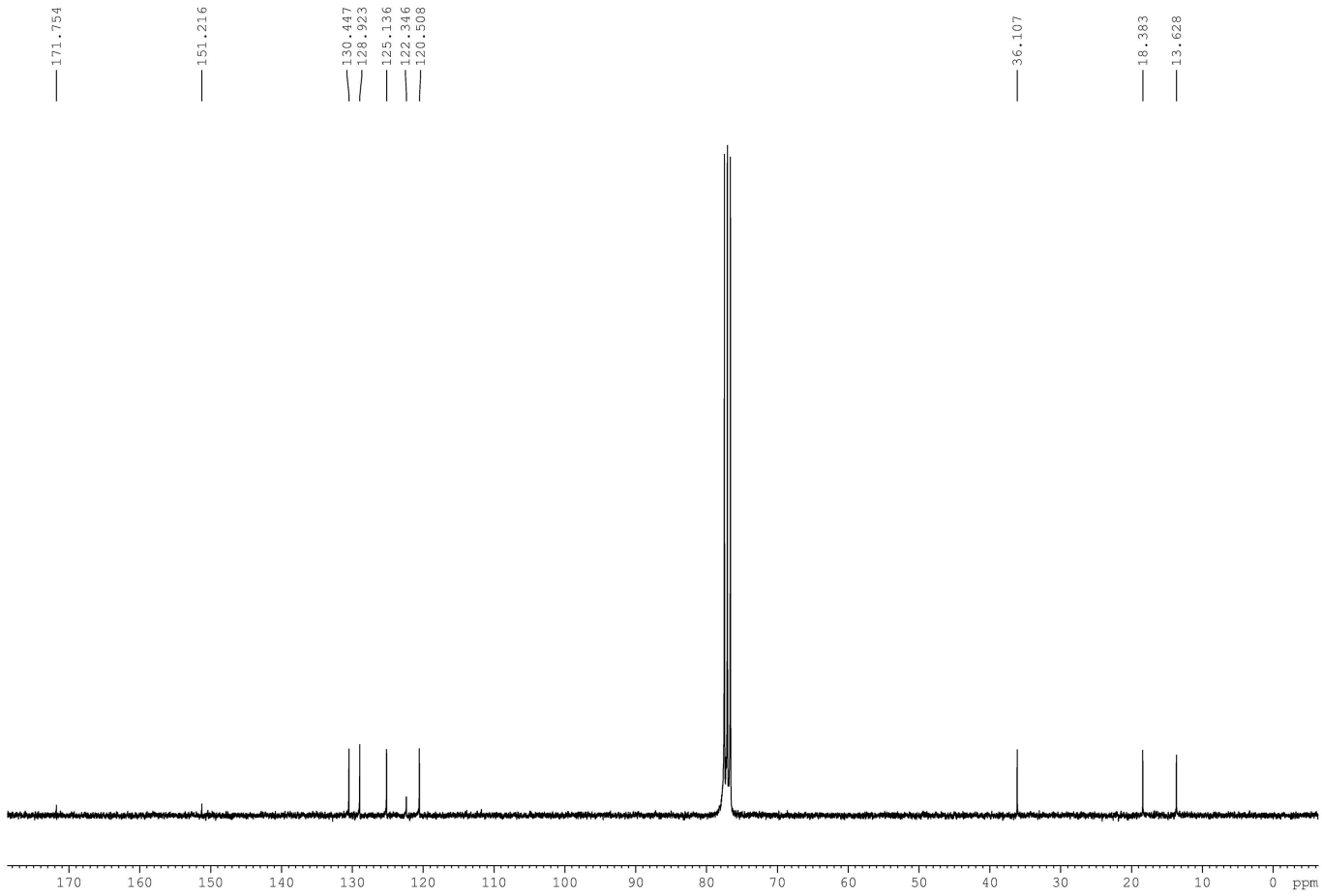

7.060
7.053
7.036
2.558
2.534
2.509
1.843
1.818
1.793
1.769
1.744
1.719
1.064
1.040
1.015
O
O
F
4-fluorophenyl butyrate
8.5
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
ppm
3.948
1.965
2.151
3.000

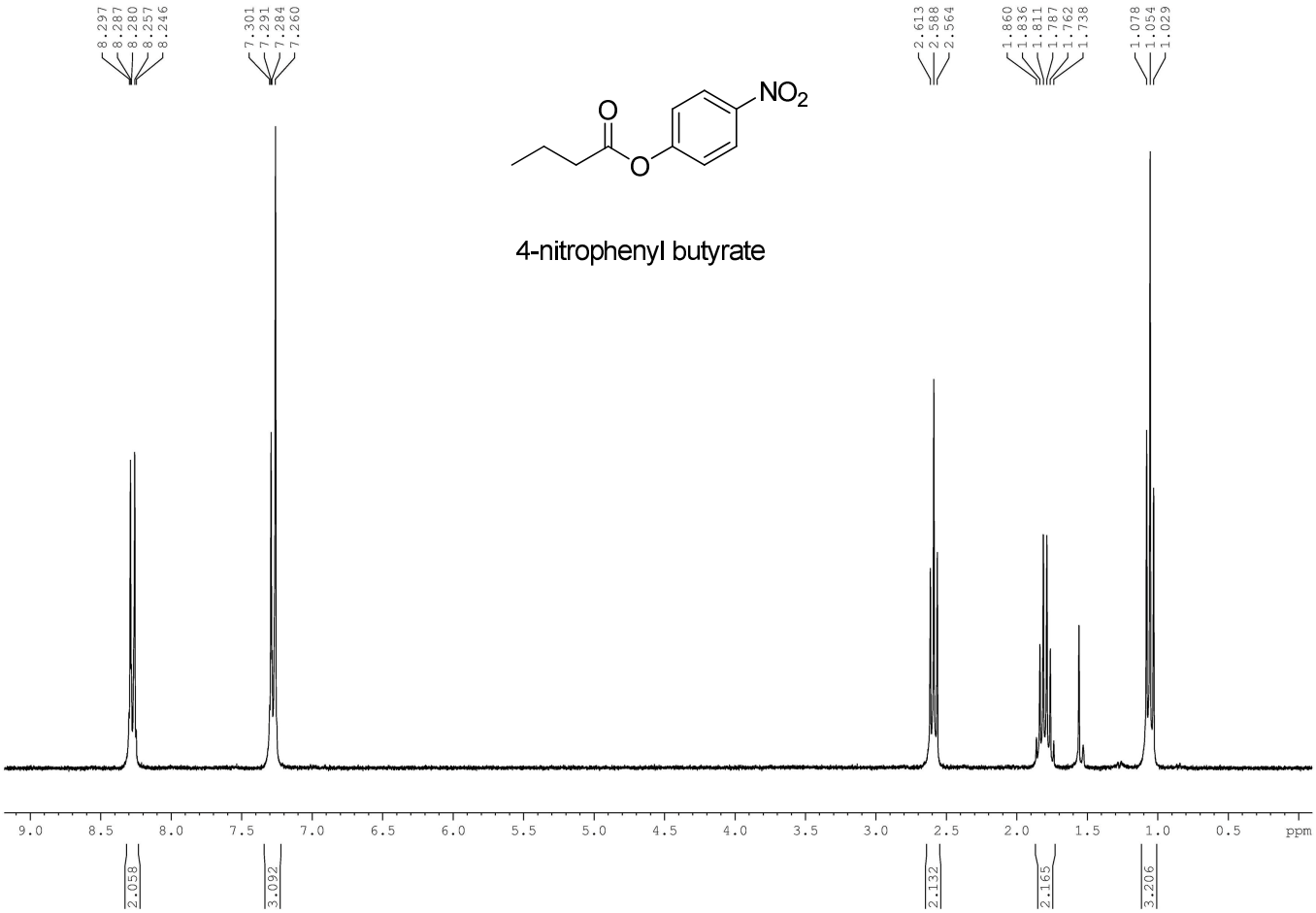

172.151
161.101
159.160
146.514
122.962
122.896
116.089
115.903
36.093
18.395
13.604
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
ppm

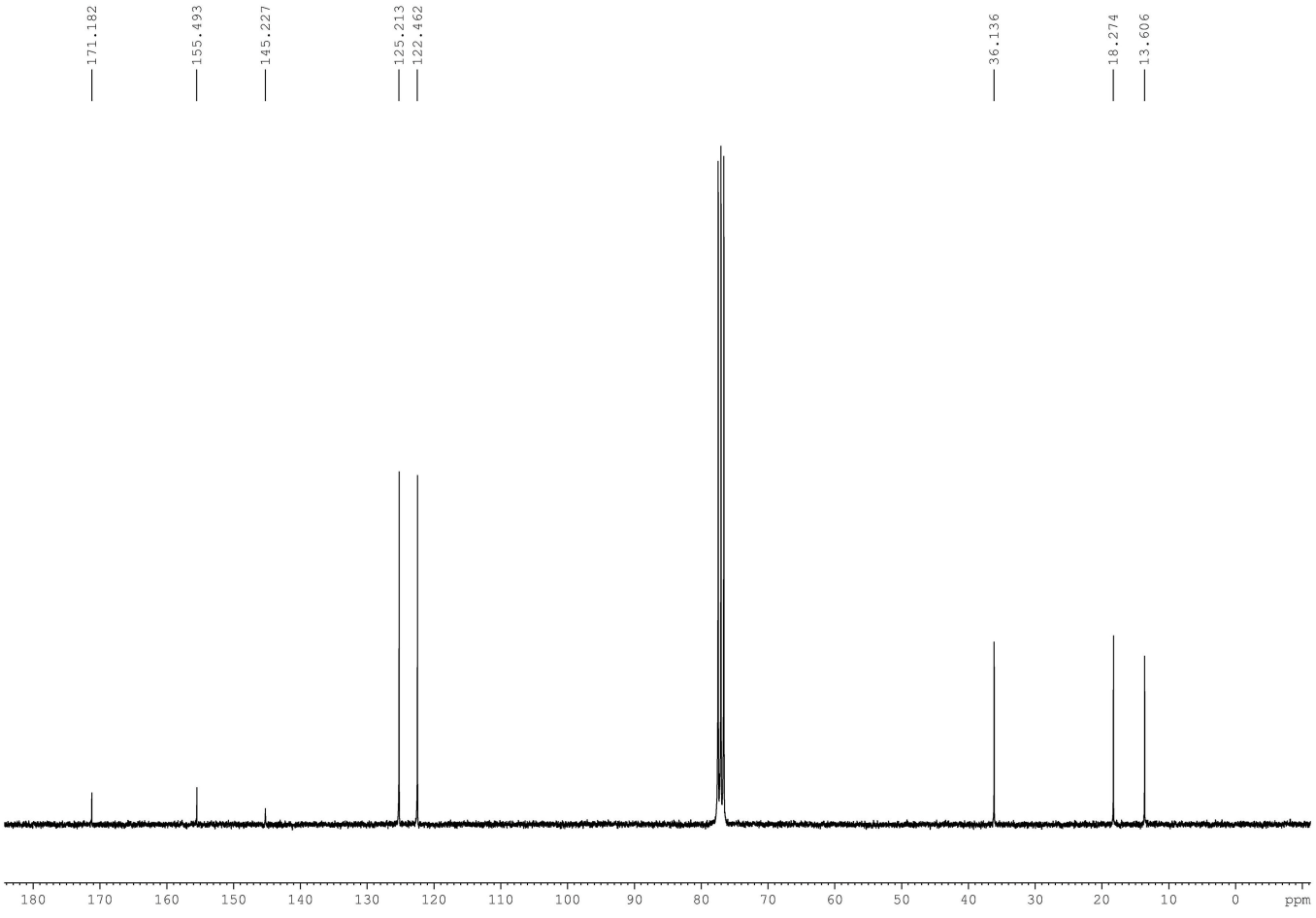

7.511
7.500
7.494
7.478
7.471
7.461
6.998
6.987
6.980
6.965
6.958
6.948
2.558
2.534
2.509
1.839
1.814
1.789
1.765
1.740
1.715
1.061
1.036
1.011
Br
O
O
4-bromophenyl butyrate
9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 0.0 ppm
2.040
2.013
2.071
2.083
3.000


171.831
149.702
132.408
123.391
118.759
36.117
18.364
13.609
170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 ppm


7.380
7.377
7.374
7.356
7.353
7.351
7.347
7.280
7.273
7.267
7.245
7.218
7.055
7.051
7.047
7.044
7.028
7.024
7.021
2.561
2.536
2.512
1.841
1.817
1.792
1.768
1.743
1.718
1.631
1.552
1.500
1.472
1.408
1.065
1.041
1.016
O
O
Br
3-bromophenyl butyrate
8.0
7.5
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.5
4.0
3.5
3.0
2.5
2.0
1.5
1.0
ppm
0.903
1.126
0.836
0.906
1.999
1.983
2.897

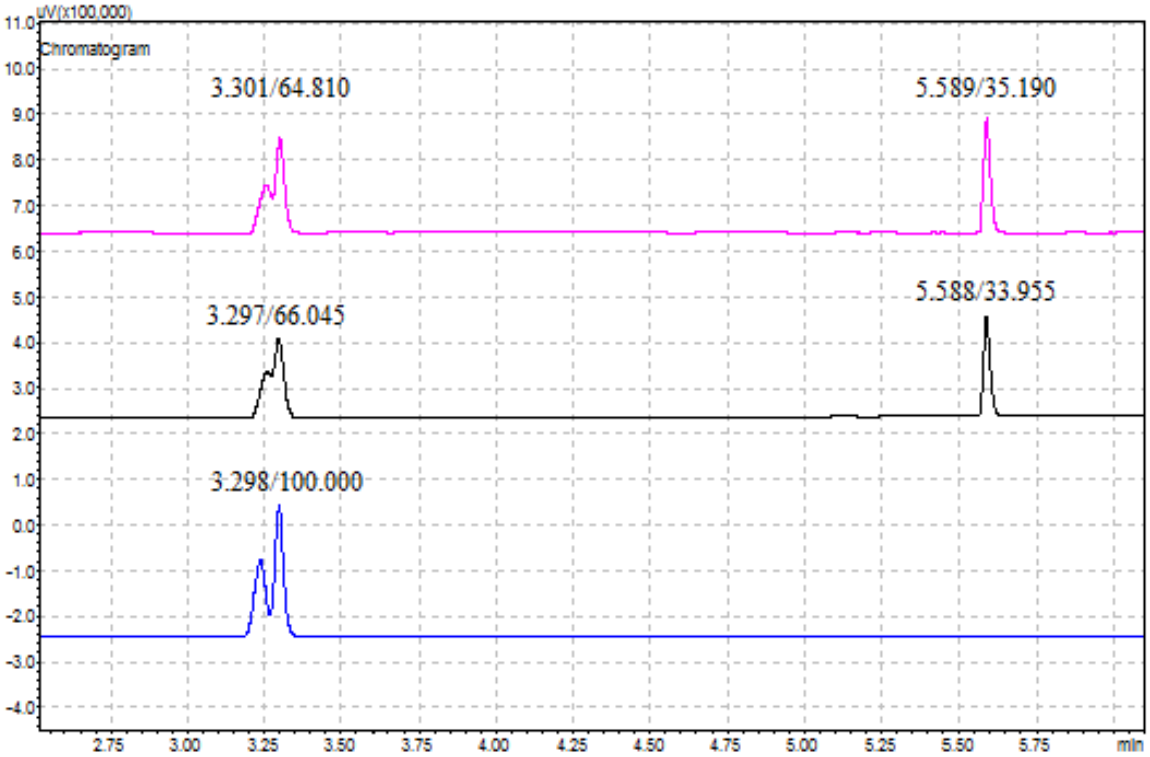

171.754
151.216
130.447
128.923
125.136
122.346
120.508
36.107
18.383
13.628
170
160
150
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
ppm


8.297
8.287
8.280
8.257
8.246
7.301
7.291
7.284
7.260
2.613
2.588
2.564
1.860
1.836
1.811
1.787
1.762
1.738
1.078
1.054
1.029
NO2
O
O
4-nitrophenyl butyrate
9.0 8.5 8.0 7.5 7.0 6.5 6.0 5.5 5.0 4.5 4.0 3.5 3.0 2.5 2.0 1.5 1.0 0.5 ppm
2.058
3.092
2.132
2.165
3.206

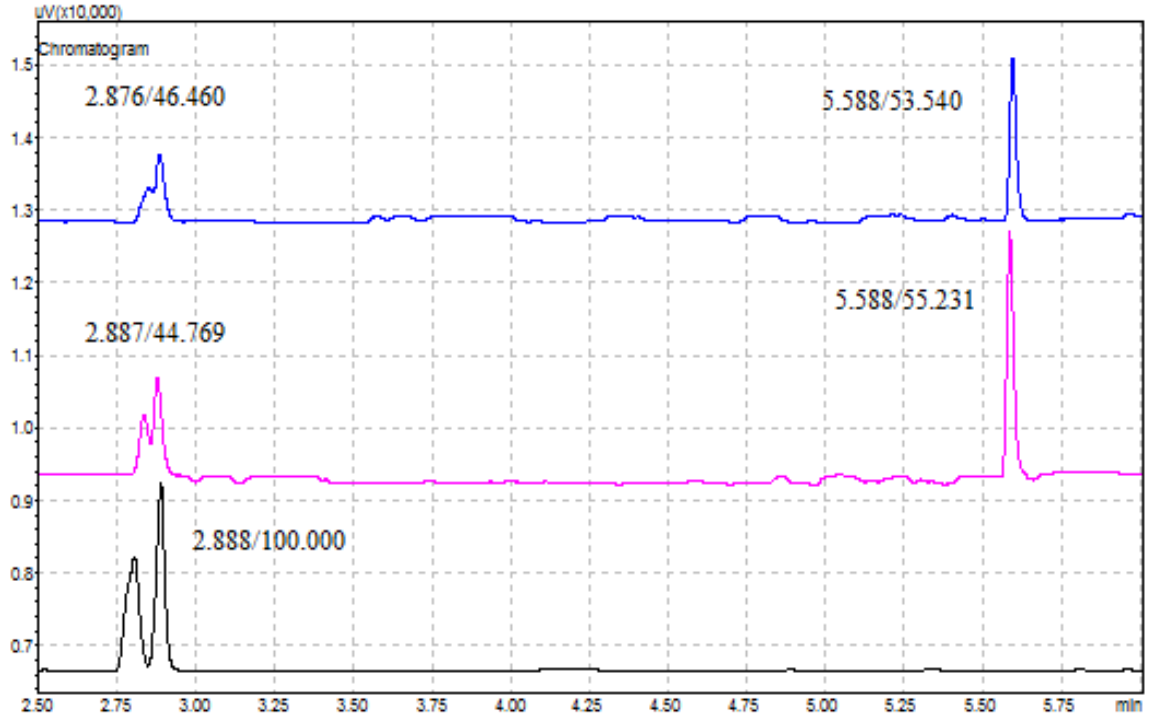

171.182
155.493
145.227
125.213
122.462
36.136
18.274
13.606
180 170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 10 0 ppm

Χρωματογραφήματα εστέρων ομάδας 1

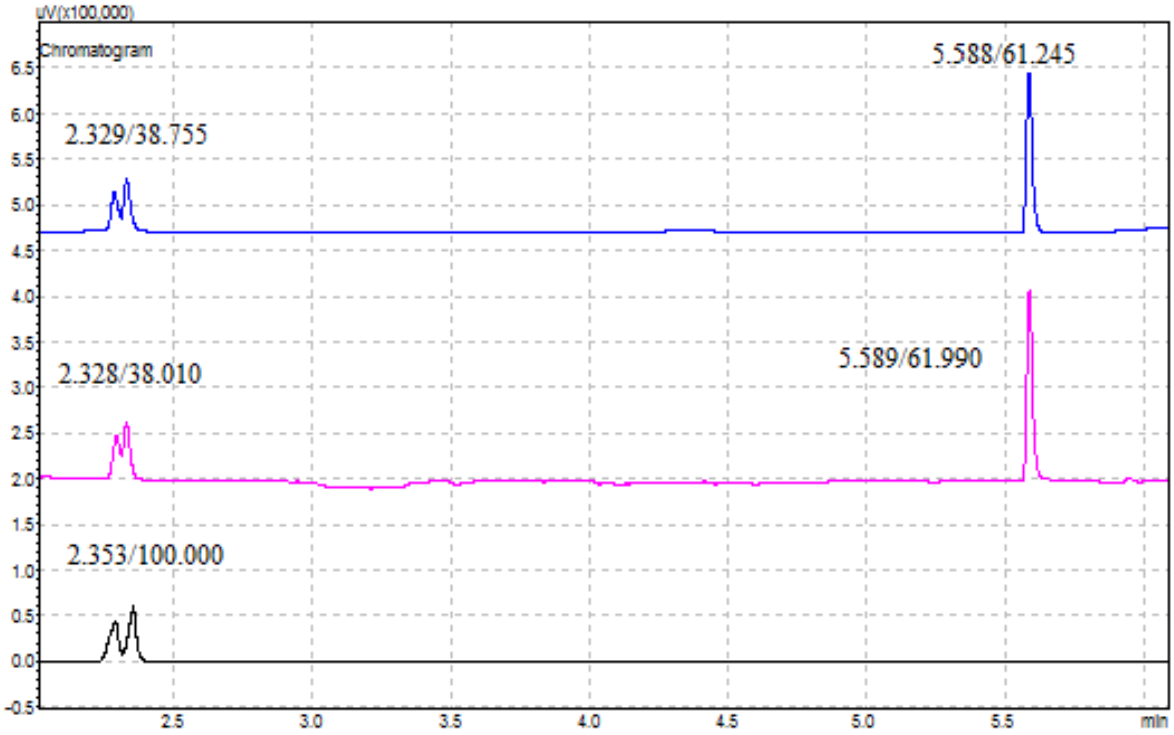
Εστέρας 1a (▬ εστέρας, ▬ blind, ▬ δείγμα με estDZ2)



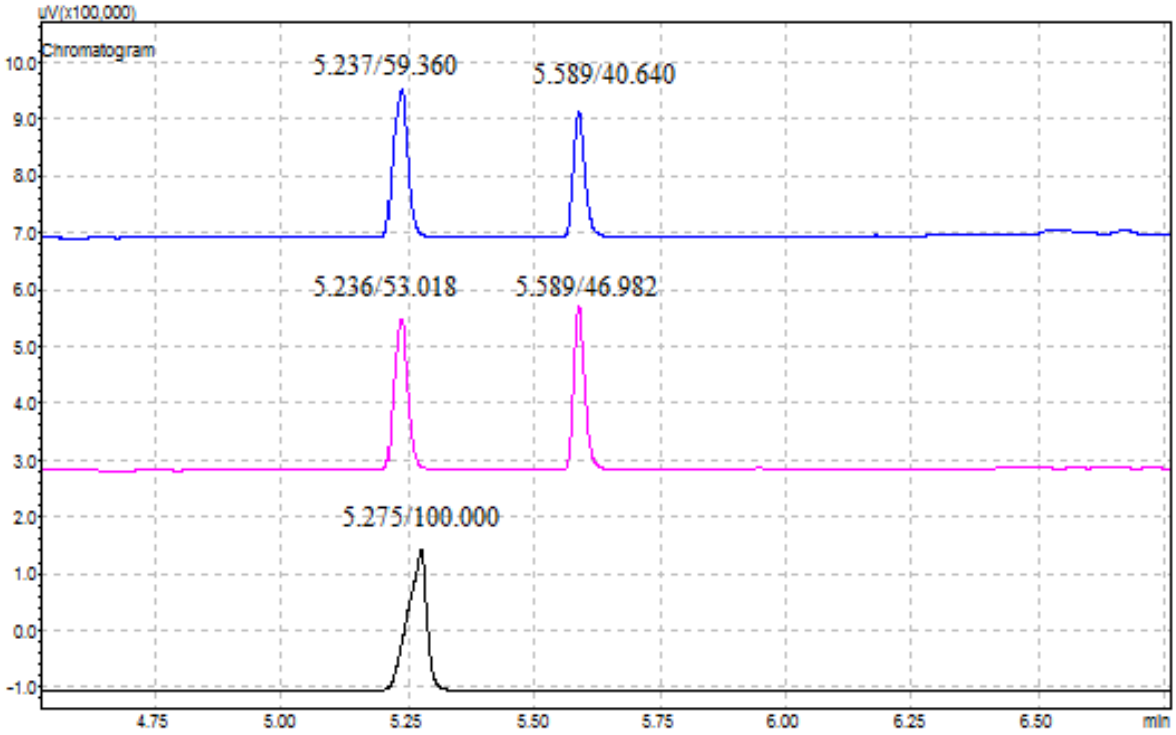
Εστέρας 1b (▬ εστέρας, ▬ blind, ▬ δείγμα με estDZ2)



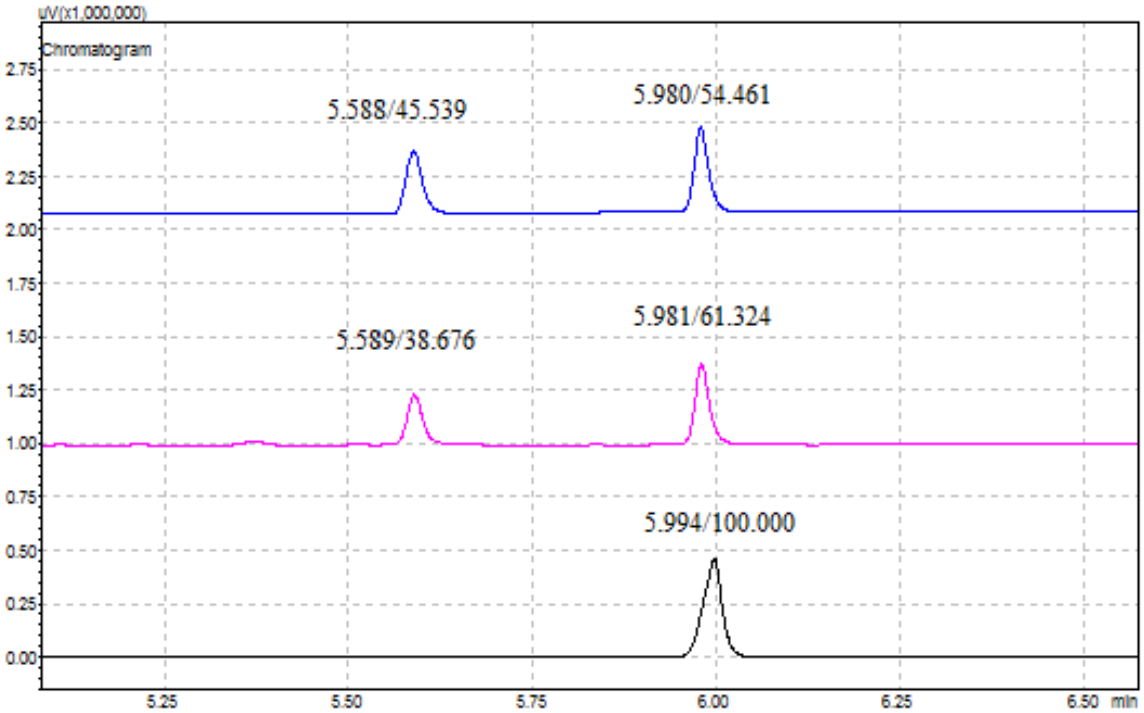
Εστέρας 1c (▬ εστέρας, ▬ blind, ▬ δείγμα με estDZ2)



Εστέρας 1d (▬ εστέρας, ▬ blind, ▬ δείγμα με estDZ2)

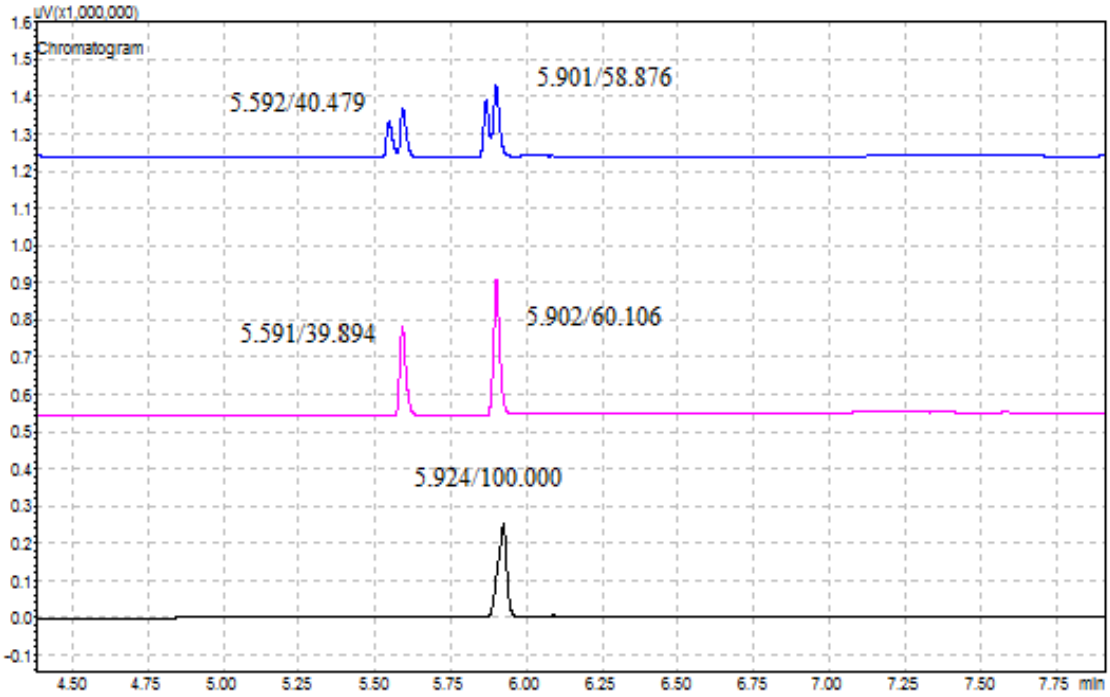


Εστέρας 1e (▬ εστέρας, ▬ blind, ▬ δείγμα με estDZ2)

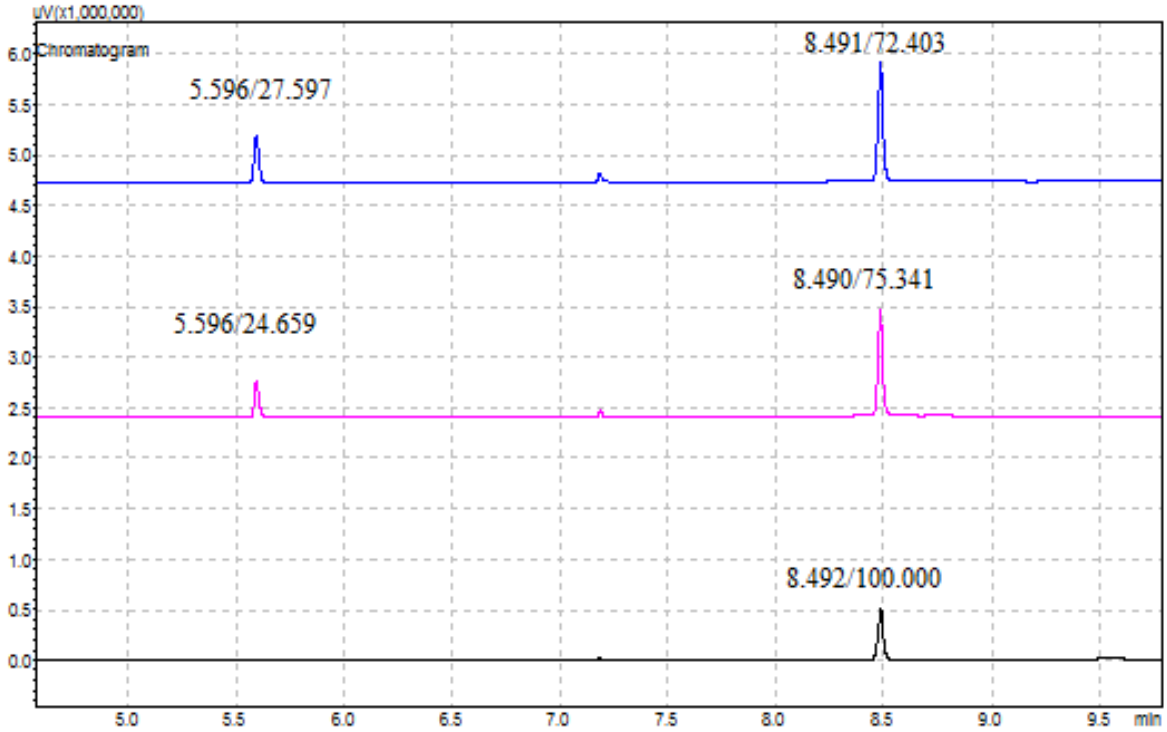


<u>Χρωματογραφήματα εστέρων ομάδας 2</u>

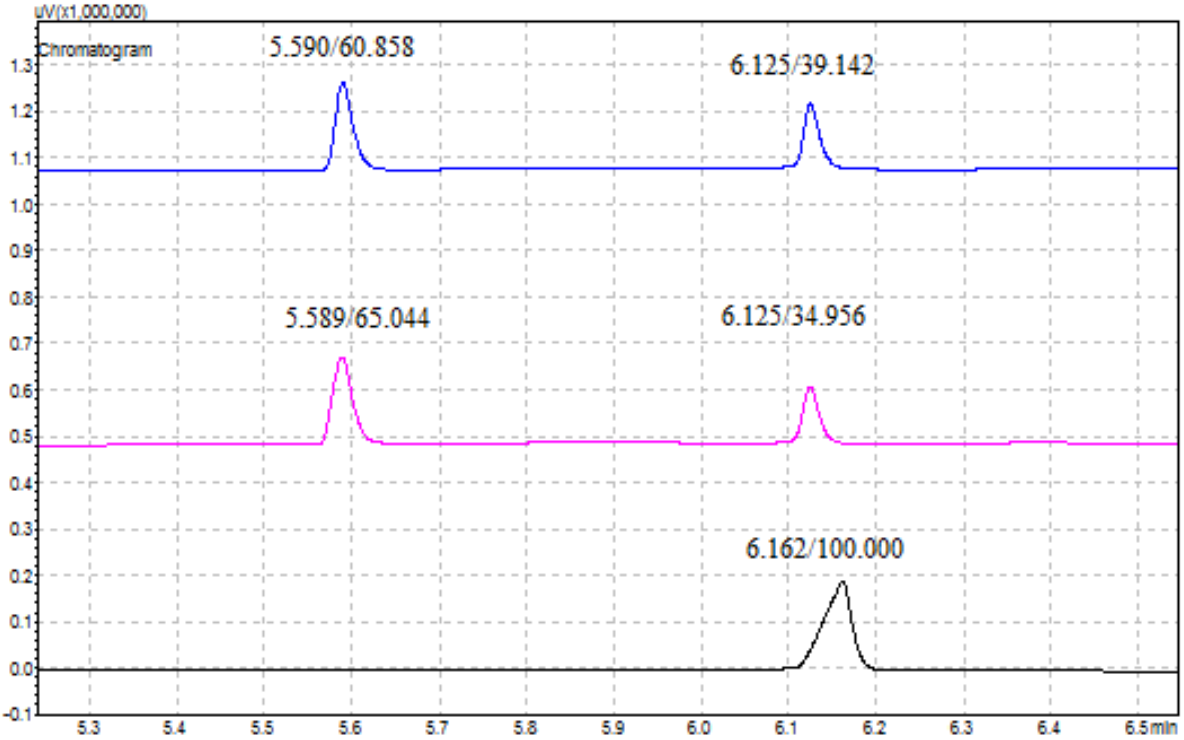
Εστέρας 2a (▬ εστέρας, ▬ blind, ▬ δείγμα με estDZ2)



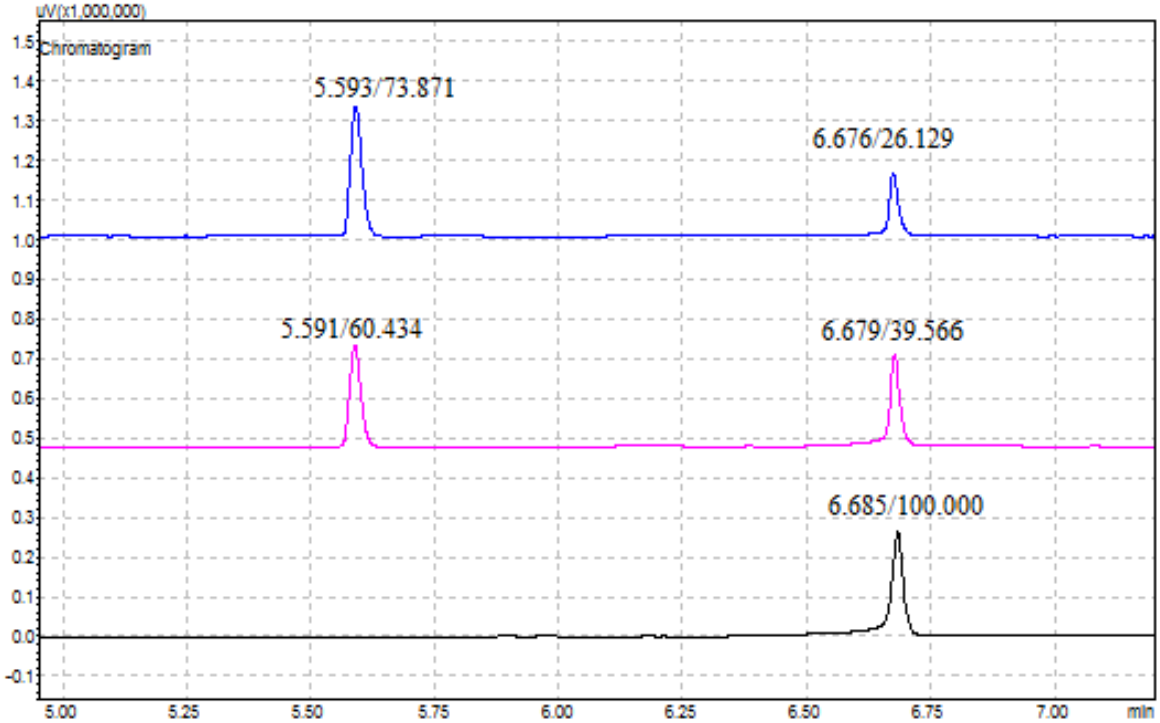
Εστέρας 2b (▬ εστέρας, ▬ blind, ▬ δείγμα με estDZ2)



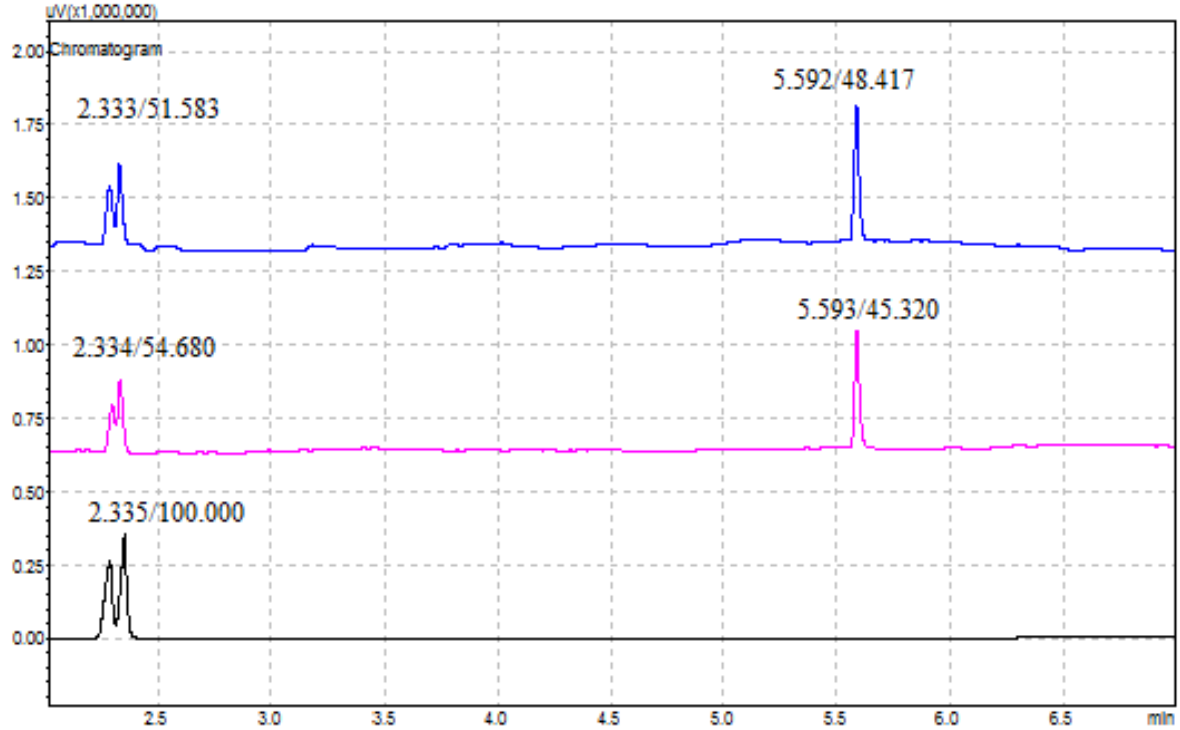
Εστέρας 2c (▬ εστέρας, ▬ blind, ▬ δείγμα με estDZ2)



Εστέρας 2d (▬ εστέρας, ▬ blind, ▬ δείγμα με estDZ2)



Εστέρας 1c (▬ εστέρας, ▬ blind, ▬ δείγμα με estDZ2)



Βιβλιογραφία

1. Roberts, S. M., Turner, N. J., Willetts A.J., Turner M.K. *Introduction to Biocatalysis Using Enzymes and Micro-organisms,* Cambridge University Press: Cambridge, 1995; p.1-28
2. Simoni, R.D.; Hill R.H.; Vaughan M. Urease, the first crystalline enzyme and the proof that enzymes are proteins: the work of James B. Sumner. *J. Biol. Chem.* **2002,** 277:23e.
3. Kruger, K.; Grabowski, P. J.; Zaug, A. J.; Sands, J.; Gottschling, D. E.; Cech, T. R. Self-splicing RNA: Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of tetrahymena. *Cell*. **1982,** *31*, 147–157.
4. Κλώνης, Ι. *Ενζυμική Βιοτεχνολογία*, 3η αναθεωρημένη έκδοση; Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης: Ηράκλειο, 2014; σελ. 1-3.
5. Webb, E.C. *Enzyme Nomenclature. Recommendations of the Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology on the Nomenclature and Classification of Enzymes*, Academic Press, Inc: California, 1992; σελ. 1-4.
6. ExplorEnz — The Enzyme Database http://www.enzyme-database.org/news.php (τελευταία πρόσβαση 26. 10. 2018)
7. De Castro, I. N.; Alonso, F. J. Energy diagrams for enzyme catalysed reactions: a confusing point in the textbooks. *Biochemical Education*. **1997,** *25*, 87–89.
8. Klas, K.; Tsukamoto, S.; Sherman, D. H.; Williams, R. M. Natural Diels–Alderases: Elusive and Irresistable. *J. Org. Chem*. **2015**, *80*, 11672–11685.
9. Faber, K. *Biotransformation in Organic Chemistry,* 7th ed.; Springer: Graz, 2017; p. 3-7
10. Wolfenden, R.; Snider, M. J. The Depth of Chemical Time and the Power of Enzymes as Catalysts. *Accounts of Chemical Research*. 2001, *34*, 938–945.
11. Stryer, L., Tymoczko, L.J., Berg, M.J. *Βιοχημεία*, 7η έκδοση; Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης: Ηράκλειο, 2015; σελ. 267-268
12. Simon, G. M.; Cravatt, B. F. Activity-based Proteomics of Enzyme Superfamilies: Serine Hydrolases as a Case Study. *J. Biol. Chem.* 2010, *285*, 11051–11055.
13. Branden, C.I.; Tooze, T. *Εισαγωγή στη Δομή των Πρωτεϊνών*, 2η έκδοση; Ακαδημαϊκές Εκδόσεις Ι. Μπάσδρα & ΣΙΑ Ο.Ε.: Αλεξανδρούπολη, 2016; σελ. 52, 63-65.
14. Montella, I. R.; Schama, R.; Valle, D. The classification of esterases: an important gene family involved in insecticide resistance - A review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. **2012**, *107*, 437–449.
15. Ollis, D. L. et al. The α/β hydrolase fold. *Protein Engineering*. **1992,** *5*, 197–211.

16. Bornscheuer, U.T., Kazlauskas, R.J. *Hydrolases in Organic Synthesis: Regio- and Stereoselective Biotransformations*, 2nd ed.; Wiley-VCH: Weinheim, 2006; a) p. 1-2 b) p.68-69
17. Zarafeta, D. et al. Metagenomic mining for thermostable esterolytic enzymes uncovers a new family of bacterial esterases. *Scientific Reports*, **2016**, 6.