



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΙΚΩΝ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ
ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΕ ΝΑΝΟΔΟΜΙΚΑ ΥΛΙΚΑ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ – ΜΙΧΑΕΛΑ ΠΑΤΗΛΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2016



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΙΚΩΝ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕΣΩ ΤΗΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ
ENZYMΩΝ ΣΕ ΝΑΝΟΔΟΜΙΚΑ ΥΛΙΚΑ**

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΒΑΣΙΛΙΚΗ – ΜΙΧΑΕΛΑ ΠΑΤΗΛΑ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2016

«Η έγκριση της διδακτορικής διατριβής από το Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών της Σχολής Επιστημών Υγείας, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνωμών του συγγραφέα Ν. 5343/32, άρθρο 202, παράγραφος 2»

Ημερομηνία αίτησης της κας. **Βασιλικής-Μιχαέλας Πατήλα:** - -

Ορισμός Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής από τη Γ.Σ.Ε.Σ.: **163/ 9-11-2010**

Μέλη Τριμελούς Συμβουλευτικής Επιτροπής:

Επιβλέπων:

Χαράλαμπος Σταμάτης

Μέλη:

Δημήτριος Γουρνής

Πέτρος Καταπόδης

Ημερομηνία ορισμού θέματος: **9-11-2010**

Θέμα: «**Ανάπτυξη νέων βιοκαταλυτικών συστημάτων μέσω της ακινητοποίησης ενζύμων σε νανοδομικά υλικά..**»

ΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ από τη Γ.Σ.Ε.Σ.:

233/03-06-2016

1. **Χαράλαμπος Σταμάτης**
2. **Δημήτριος Γουρνής**
3. **Πέτρος Καταπόδης**
4. **Θεώνη Τράγκα**
5. **Γεώργιος Παπαδόπουλος**
6. **Ειρήνη-Άννα Κούκκου**
7. **Ανδρέας Τζάκος**

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «**Άριστα**» στις **27-06-2016**

Η Πρόεδρος του Τμήματος Βιολογικών
Εφαρμογών και Τεχνολογιών
Τράγκα Θεώνη, Καθηγήτρια

Η Γραμματέας του Τμήματος Βιολογικών
Εφαρμογών και Τεχνολογιών
Άννα Υφαντή

Επταμελής εξεταστική επιτροπή

Χαράλαμπος Σταμάτης – Καθηγητής (Επιβλέπων)

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Δημήτριος Γουρλής – Καθηγητής

Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Πέτρος Καταπόδης – Επίκουρος Καθηγητής

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Θεώνη Τράγκα – Καθηγήτρια

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Γεώργιος Κ. Παπαδόπουλος – Καθηγητής

Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τ.Ε.Ι. Ηπείρου

Ειρήνη-Αννα Κούκκου – Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ανδρέας Τζάκος – Επίκουρος Καθηγητής

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Τριμελής συμβουλευτική επιτροπή

Χαράλαμπος Σταμάτης – Καθηγητής (Επιβλέπων)

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Δημήτριος Γουρλής – Καθηγητής

Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Πέτρος Καταπόδης – Επίκουρος Καθηγητής

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Ευχαριστίες

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της διατριβής, και συγκεκριμένα:

- Τον Καθηγητή Χαράλαμπο Σταμάτη, επιβλέποντα της παρούσας διατριβής, για τη στήριξη και την επιστημονική καθοδήγηση που μου παρείχε, αλλά και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπό μου όλα αυτά τα χρόνια. Ελπίζω να κατάφερα, έστω και λίγο, να σταθώ αντάξια των προσδοκιών του. Η συνεργασία μου μαζί του και η αγάπη του για τη Βιοτεχνολογία με έκανε να την αγαπήσω κι εγώ με τη σειρά μου κι έτσι να βάλω κι εγώ το «λιθαράκι» μου σε αυτό το πεδίο της έρευνας.
- Τον Καθηγητή Δημήτριο Γουρνή, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, τόσο για τη φιλοξενία του στο Εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου, όσο και για την τόσο όμορφη καθοδήγησή του στον κόσμο των νανοϋλικών, που είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη της αγάπης μου για αυτόν τον τομέα της επιστήμης.
- Τον Επίκουρο Καθηγητή Πέτρο Καταπόδη, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, για την επιστημονική καθοδήγησή του κατά τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής, αλλά και για τη φιλική στήριξη που μου παρείχε όλα αυτά τα χρόνια.
- Τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής για τις υποδείξεις και παρατηρήσεις τους.
- Την Αγγελική Πολύδερα, μέλος Ε.ΔΙ.Π. του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας, για τη βοήθεια που μου πρόσφερε απλόχερα όλα αυτά τα χρόνια, τη συμπαράστασή της, τις πάντα χρήσιμες συμβουλές της και τις καθημερινές συζητήσεις μας.
- Τον Κώστα Κονιδάρη, μέλος Ε.Τ.Ε.Π. του εργαστηρίου Βιοχημείας, για τη σημαντική βοήθειά του, για την απίστευτη διάθεσή του να βοηθήσει σε οτιδήποτε και όποτε και αν του το ζητούσα και κυρίως για τις συζητήσεις μας και τα πειράγματά μας που ομόρφυναν τις εργαστηριακές μου μέρες.
- Τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας από το 2010 έως και σήμερα: την Αλεξάνδρα Χατζηκωνσταντίνου, τον Γιώργο Ορφανάκη, τη Νικολίνα Βούρβου, την Ιωάννα Ευθυμίου, τον Ali Taha και όλους τους προπτυχιακούς φοιτητές που πέρασαν από το εργαστήριο, για τη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα του εργαστηρίου. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Γιάννη Παυλίδη και τη Μαρία Κατσούρα, όχι μόνο για την καθοδήγησή τους κατά τη διάρκεια των πρώτων μου βημάτων στην επιστήμη της Βιοτεχνολογίας, αλλά και για τη φιλία τους όλα αυτά τα χρόνια. Ένα ιδιαίτερα μεγάλο ευχαριστώ στη συνάδελφο και, πάνω από όλα φίλη μου, Αθηνά Παπαδοπούλου, η οποία όλα αυτά τα χρόνια υπήρξε τόσο επιστημονικό όσο και συναισθηματικό στήριγμα, δίνοντάς μου τόσο δύναμη όσο και συμβουλές όλα αυτά τα χρόνια στο εργαστήριο.
- Το Εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών για τη σύνθεση, τροποποίηση και χαρακτηρισμό των νανοϋλικών, καθώς και για τη φιλοξενία κατά τη λήψη φασμάτων

FTIR. Ιδιαίτερες ευχαριστίες σε όλα τα μέλη του Εργαστηρίου: Φούλη, Γιούλη, Κυριακή-Μαρίνα, Λένα, Δανάη, Χριστίνα, Μυρσίνη για τη σύνθεση των υλικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, καθώς και για τη βοήθειά τους στην χρήση τεχνικών χαρακτηρισμού βιοϋλικών. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Κώστα Δήμου και Κώστα Σπύρου για τη βοήθειά τους κατά τη λήψη και αποτίμηση των φασμάτων XPS, TGA/DTA, και τον Αντώνη Κουλουμπή για τη λήψη εικόνων AFM. Πέραν της επιστημονικής βοήθειας, τους ευχαριστώ όλους αυτούς για την άψογη συνεργασία και την όμορφη εργαστηριακή παρέα που αναπτύξαμε στην πορεία.

- Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αναστασία Σ. Πολίτου από το Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για τη φιλοξενία της κατά τη λήψη φασμάτων κυκλικού διχρωισμού.
- Την Επιτροπή Ερευνών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την υποτροφία που μου παρείχε το έτος 2012-2013 για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.
- Τους κολλητούς μου Ελίνα Στουρνάρα, Βιργινία Χουλιάρá, Θανάση Πουλή, Χρήστο Τσαμαδό, Χαρά Δημούλα για τη φιλία τους, την αγάπη και την πίστη τους σε μένα, καθώς και για όλες τις ευτυχισμένες στιγμές που μου χαρίζουν εδώ και 13 χρόνια.
- Τους αγαπημένους μου φίλους Αντώνη Αντωνόπουλο, Κατερίνα Ζαραλή, Αναστασία Σαραλιώτη, Αγγελική Γκέκα για τις όμορφες στιγμές που μου χαρίζουν συνεχώς.
- Τους συμφοιτητές και φίλους μου Σοφία-Ελισάβετ Φραδέλλου, Κωνσταντίνο Σιατή και Αλέξανδρο Δραΐνα για όλα τα όμορφα πράγματα που έχουμε περάσει κατά τη διάρκεια τόσο των φοιτητικών μας χρόνων όσο και έπειτα, και που θα θυμόμαστε για πάντα όσα χιλιόμετρα κι αν μας χωρίζουν.
- Το σύντροφό μου Βασίλη Λαγό για την ηθική υποστήριξη, την υπομονή του και την ενθάρρυνση που μου παρείχε όλα αυτά τα χρόνια.
- Τους γονείς μου, Κώστα και Μιράντα, για την αγάπη, την υποστήριξη και την υπομονή τους, καθώς και για τις θυσίες που έκαναν για να μπορέσω να φέρω εις πέρας την παρούσα διατριβή, τον αδερφό μου Δημήτρη για την αγάπη και την υποστήριξή του, τον θείο μου Σπύρο, τη γιαγιά μου Βασιλική και τον παππού μου Θόδωρα για την άνευ όρων αγάπη και εμπιστοσύνη τους.

Δημοσιεύσεις

Κατά τη διάρκεια της παρούσας διατριβής προέκυψαν:

Οι ακόλουθες δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά:

1. **M. Patila**, A. Kouloumpis, D. Gournis, P. Rudolf, H. Stamatis (2016) Laccase-functionalized graphene oxide assemblies as efficient nanobiocatalysts for oxidation reactions. *Sensors* 16 (3): 287-301.
2. **M. Patila**, I.V. Pavlidis, A. Kouloumpis, K. Dimou, K. Spyrou, P. Katapodis, D. Gournis, H. Stamatis (2016) Graphene oxide derivatives with variable alkyl chain length and terminal functional groups as supports for stabilization of cytochrome c. *International Journal of Biological Macromolecules* 84: 227-235.
3. A.A. Papadopoulou, E. Efstathiadou, **M. Patila**, A.C. Polydera, H. Stamatis (2016) Deep eutectic solvents as media for peroxidation reactions catalyzed by heme-dependent biocatalysts. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 55 (18): 5145-5551.
4. I.V. Pavlidis, **M. Patila**, U.T. Bornscheuer, D. Gournis, H. Stamatis (2014) Graphene-based nanobiocatalytic systems: recent advances and future prospects. *Trends in Biotechnology* 32: 312-320.
5. **M. Patila**, I.V. Pavlidis, E.K. Diamanti, D. Gournis, P. Katapodis, H. Stamatis (2013) Enhancement of cytochrome c catalytic behaviour by affecting the heme environment using functionalized carbon-based nanomaterials. *Process Biochemistry* 48: 1010-1017.

Οι ακόλουθες δημοσιευμένες περιλήψεις εργασιών συνεδρίων σε διεθνή περιοδικά:

1. **M. Patila**, A. Papadopoulou, M-V. Giannakopoulou, E. Chabla, D. Gournis, P. Katapodis, H. Stamatis (2012) Use of functionalized carbon-based nanomaterials for the development of effective nanobiocatalytic systems. *New Biotechnology* 29: S155.
2. Papadopoulou, M. Katsoura, **M. Patila**, E. Kyriakou, A.C. Polydera, A. Tzakos, H. Stamatis (2012) Enzymatic preparation of biologically active lipoic acid derivatives in ionic liquids-based media. *New Biotechnology* 29: S81.

Δύο κεφάλαια σε βιβλία διεθνών εκδοτικών οίκων:

1. **M. Patila**, G. Orfanakis, A. C. Polydera, I. V. Pavlidis, H. Stamatis (2016) Graphene-based nanobiocatalytic systems, in *Biocatalysis and Nanotechnology* (Ed. Peter Grunwald), Pan Stanford Pte. Ltd., Singapore, *In press*
2. I.V. Pavlidis, **M. Patila**, A.C. Polydera, D. Gournis, H. Stamatis (2014) Immobilization of enzymes and other biomolecules on graphene, in *Functionalization of graphene* (ed V. Georgakilas), Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.

Και 30 συμμετοχές σε συνέδρια, εκ των οποίων:

- 1 ομιλία και 20 αναρτημένες εργασίες σε διεθνή και ευρωπαϊκά συνέδρια
- 2 ομιλίες και 7 αναρτημένες εργασίες σε πανελλήνια συνέδρια

Περίληψη

Τα νανοδομικά υλικά με βάση τον άνθρακα παρουσιάζουν σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον στο πεδίο της νανοβιοκαταλυτικής και ενζυμικής βιοτεχνολογίας. Στόχος της παρούσας διατριβής είναι η ανάπτυξη νέων βιοκαταλυτικών συστημάτων μέσω της ακινητοποίησης ενζύμων σε νανοδομικά υλικά με βάση τον άνθρακα, μελετώντας και κατανοώντας τη σχέση δομής-λειτουργίας των ακινητοποιημένων ενζύμων με τα νανοϋλικά. Το αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον για τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα προκύπτει από τις ιδιαίτερες ιδιότητες που εμφανίζουν, όπως η αυξημένη ειδική επιφάνεια, η εξαιρετική μηχανική σταθερότητα, η ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα, και οι ειδικές οπτικές ιδιότητες ανάλογα με το είδος του νανοϋλικού.

Νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα, και πιο συγκεκριμένα νανοσωλήνες άνθρακα και οξειδίο του γραφενίου, χημικά τροποποιημένα για την εισαγωγή αλκυλικών αλυσίδων των οποίων τόσο το μήκος όσο και το είδος των τερματικών λειτουργικών ομάδων διαφέρει, χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη της επίδρασης της παρουσίας τους στα καταλυτικά και δομικά χαρακτηριστικά του κυτοχρώματος c. Η παρουσία των νανοϋλικών αυτών στο μέσο της αντίδρασης αυξάνει την καταλυτική ισχύ του κυτοχρώματος c έως και 78 φορές. Επιπλέον, τα νανοϋλικά σταθεροποιούν την πρωτεΐνη, προστατεύοντάς την από τη θερμική μετουσίωση και την απενεργοποίηση από υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το κυτόχρωμα c διατηρεί τη δευτεροταγή δομή του παρουσία των νανοϋλικών αυτών, ενώ παρατηρούνται αλλαγές στο μικροπεριβάλλον της αίμης, οι οποίες οδηγούν σε μια αναδιαμόρφωση του ενεργού κέντρου κάνοντάς το πιο προσβάσιμο, με αποτέλεσμα την αυξημένη καταλυτική δραστηριότητα της πρωτεΐνης.

Το κυτόχρωμα c ακινητοποιήθηκε σε διάφορα τροποποιημένα παράγωγα του οξειδίου του γραφενίου μέσω φυσικής προσρόφησης και ομοιοπολικής ακινητοποίησης. Η απόδοση της ακινητοποίησης και η καταλυτική συμπεριφορά της πρωτεΐνης επηρεάζονται από τη χημική σύσταση της επιφάνειας του νανοϋλικού, το μήκος της αλκυλικής αλυσίδας, τη λειτουργική ομάδα και τον τρόπο της ακινητοποίησης. Τα πειραματικά αποτελέσματα υποδεικνύουν ως κατάλληλους φορείς ακινητοποίησης τα τροποποιημένα παράγωγα του οξειδίου του γραφενίου. Η θερμική σταθερότητα του ακινητοποιημένου κυτοχρώματος c βελτιώνεται σε σχέση με την ελεύθερη πρωτεΐνη, ενώ ταυτόχρονα τα νανοϋλικά προστατεύουν το κυτόχρωμα c από αποδιατακτικούς παράγοντες όπως είναι η μεθανόλη και το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το ελεύθερο κυτόχρωμα c χάνει σχεδόν ολοκληρωτικά τη δραστηριότητα του μετά από επώαση (24 ώρες και 30 λεπτά αντίστοιχα) με τους παράγοντες αυτούς, ενώ το ακινητοποιημένο κυτόχρωμα c διατηρεί μέχρι και το 50% της αρχικής δραστηριότητάς του. Η ακινητοποίηση του κυτοχρώματος c έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της δευτεροταγούς δομής του. Διαπιστώθηκε μείωση της περιεκτικότητας σε α -έλικα με ταυτόχρονη αύξηση της περιεκτικότητας σε β -φύλλα, γεγονός που υποδηλώνει πως η πρωτεΐνη υιοθετεί μια πιο άκαμπτη διαμόρφωση που θα μπορούσε να εξηγήσει την αυξημένη σταθερότητα του ακινητοποιημένου cyt c.

Η δημιουργία πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών νανοϋλικού-ενζύμου, μέσω ομοιοπολικής ακινητοποίησης πολλαπλών σημείων, οδηγεί στη δημιουργία καινοτόμων βιοκαταλυτών με βελτιωμένες ιδιότητες που μπορούν να βρουν εφαρμογή σε πλήθος βιομηχανικών διεργασιών. Οι νανοβιοκαταλύτες που παρασκευάστηκαν αποτελούνται από εναλλασσόμενα στρώματα λακάσης και τροποποιημένου οξειδίου του γραφενίου, και παρουσιάζουν εξαιρετική σταθερότητα έναντι του ελεύθερου ενζύμου (διατήρηση έως και 40% της δραστηριότητας ύστερα από 24 ώρες επώαση στους 60 °C). Επιπλέον, παρουσιάζουν αυξημένη καταλυτική δραστηριότητα κατά την οξείδωση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων και χρωστικών, ενώ διατηρούν μέχρι και το 94% της αρχικής τους δραστηριότητας ύστερα από 5 διαδοχικούς κύκλους χρήσης (25 ώρες συνολικού λειτουργικού χρόνου).

Εν κατακλείδι, τα νανοδομικά υλικά με βάση τον άνθρακα βελτιώνουν σημαντικά την καταλυτική δράση των οξειδοναγωγικών πρωτεϊνών, οδηγώντας στη δημιουργία νέων βιοκαταλυτικών συστημάτων με ενδιαφέρουσες ιδιότητες. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής καταδεικνύουν τα σημαντικά πλεονεκτήματα που προκύπτουν από την εφαρμογή των νανοϋλικών ως φορείς για την ακινητοποίηση ενζύμων, και τα οποία αποτελούν τη βάση για την ανάπτυξη πλήθους εφαρμογών στο πεδίο της νανοβιοτεχνολογίας.

Abstract

Carbon-based nanomaterials have attracted the scientific interest in the field of nanobiocatalytic and enzyme biotechnology. The aim of this thesis is the development of novel nanobiocatalytic systems by means of immobilization of enzymes onto carbon-based nanostructured-supports, through the understanding of the correlation between structure and function of enzymes with these nanomaterials. The scientific interest of the carbon-based nanomaterials renders from their unique properties, such as high specific surface area, excellent mechanical stability, electrical and thermal conductivity, and special optical properties.

Carbon-based nanomaterials such as carbon nanotubes and graphene oxide, functionalized with different length of alkyl chains and functional groups, were used to study the effect of their presence on the catalytic and structural characteristics of cytochrome c. The presence of these functionalized nanomaterials in the reaction medium increases the catalytic efficiency of cytochrome c up to 78-fold. Furthermore, the nanomaterials stabilize the protein, as they protect it from thermal denaturation and hydrogen peroxide deactivation. Cytochrome c preserves its secondary structure in the presence of the functionalized nanomaterials, while the observed changes in the heme microenvironment suggest that the heme plane reorients in the active site pocket, possibly making the heme more accessible to the substrates and thus leading to higher peroxidase activity.

Cytochrome c was immobilized on functionalized derivatives of graphene oxide through physical adsorption and covalent binding. The immobilization efficiency and the catalytic behavior of the immobilized protein are affected by the surface chemistry, the alkyl chain length and the terminal functional group of the nanomaterials, as well as the immobilization procedure. The experimental results show that functionalized graphene oxide derivatives are excellent supports for protein immobilization. The thermostability of cytochrome c is improved upon immobilization, while the nanomaterials seem to offer a protective role against denaturing agents, such as methanol and hydrogen peroxide. Free cytochrome c is almost deactivated after incubation against those agents (24 h and 30 min respectively), while the immobilized protein retains up to 50% its initial activity. The immobilization of cytochrome c on the functionalized nanomaterials results in changes in the secondary structure of the protein. More specific, a loss in the α -helical content is observed, while the content of β -sheets is increased, indicating that the protein undergoes a conformational transition to a more rigid structure, which could explain the increased stability of the immobilized protein.

The development of multi-layer nanomaterial-enzyme nanoassemblies, through multi-point covalent immobilization, leads to the synthesis of novel biocatalysts with improved properties which can be used in numerous industrial applications. The prepared nanobiocatalysts consist of alternate layers of laccase and amino-functionalized graphene

oxide and present excellent thermal stability compared to the free enzyme (preservation up to 40% of their initial activity after 24 hours incubation at 60 °C). In addition, the multi-layer nanoassemblies present excellent oxidation activity against polycyclic aromatic hydrocarbons and dyes, while they are able to retain up to 94% of their initial activity after 5 uses (25 hours of total operation).

In conclusion, carbon-based nanomaterials improve the catalytic behavior of redox proteins, leading towards the development of novel biocatalytic systems with interesting properties. The results of this study demonstrate the significant benefits arising from the implementations of nanostructured materials as supports for enzyme immobilization, and form the basis for the development of numerous applications in the field of nanobiotechnology.

Συντμήσεις & Συμβολισμοί

ABTS	2,2-Δις αζινο-(3-αιθυλοβενζοθειαζολίνη-6-σουλφονικό οξύ)
AFM	Μικροσκόπιο ατομικών δυνάμεων
ATR	Εξασθένιση ολικής ανάκλασης
BCA	Δικιγχονινικό οξύ
CBNs	Νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα
CD	Κυκλικός διχρωισμός
CNDs	Οξειδωμένοι νανοδίσκοι άνθρακα
CNTs	Νανοςωλήνες άνθρακα
Cyt c	Κυτόχρωμα c
DTA	Διαφορική θερμική ανάλυση
EDC	Χλωρίδιο του 1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)καρβοδιιμιδίου
EPR	Ηλεκτρονικός παραμαγνητικός συντονισμός
FTIR	Φασματοσκοπία υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier
G	Γραφένιο
GO	Οξείδιο του γραφενίου
HBT	Υδροξυβενζοτριαζόλη
HEPES	4-(20υδροξυαιθυλ)πιπεραζινο-1-αιθανοσουλφονικό οξύ
HPLC	Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης
IP3	Τριφωσφορική ινοσιτόλη
K_m	Σταθερά Michaelis-Menten
LbL	Τεχνική εναπόθεσης layer-by-layer
MWCNTs	Νανοςωλήνες άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος
NHS	N-υδροξυσουκινιμίδιο
PAHs	Πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες
PCI	Χλωρίδιο της πινακυανόλης
rGO	Ανηγμένο οξείδιο του γραφενίου
SWCNTs	Νανοςωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος
$t_{1/2}$	Χρόνος ημίσειας ζωής
TGA	Θερμοβαρυντική ανάλυση
TvL	Λακάση από <i>Trametes versicolor</i>
Tween 20	Μονολαουρικός εστέρας της πολυοξυ-αικυλενο-σορβιτάνης
UV-vis	Υπεριώδες-ορατό
V_{max}	Μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης
XPS	Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X

Πίνακας περιεχομένων

Εισαγωγή	1
<u>ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ</u>	
1. Εφαρμογή ενζύμων σε βιοκαταλυτικές διεργασίες	7
1.1. Βιοκατάλυση	7
1.2. Εφαρμογή ενζύμων στη βιοτεχνολογία	8
2. Οξειδοαναγωγές	11
2.1. Κυτόχρωμα c	11
2.1.1. Δομή της αίμης	13
2.1.2. Μηχανισμός δράσης του κυτοχρώματος c	14
2.1.3. Ρόλος του κυτοχρώματος c στην απόπτωση	16
2.1.4. Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά του κυτοχρώματος c	16
2.2. Λακάσες	17
2.2.1. Μηχανισμός δράσης λακάσης	19
2.2.2. Το σύστημα λακάσης-διαμεσολαβητή	20
3. Νανοβιοτεχνολογία και νανοδομικά υλικά	25
3.1. Νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα	25
3.1.1. Γραφένιο και οξείδιο του γραφενίου	26
3.1.2. Νανοσωλήνες άνθρακα	30
3.2. Ακινητοποίηση ενζύμων σε νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα	32
3.2.1. Μη ομοιοπολική ακινητοποίηση – Φυσική προσρόφηση	32
3.2.2. Ομοιοπολική ακινητοποίηση	33
3.2.3. Ακινητοποίηση μέσω αντιδράσεων συγγένειας	36
4. Εφαρμογές ακινητοποιημένων ενζύμων σε νανοδομικά υλικά	39
4.1. Βιοτεχνολογικές εφαρμογές	39
4.2. Σχηματισμός πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών ενζύμου-νανοϋλικού	43
5. Δομή ακινητοποιημένων ενζύμων σε νανοδομικά υλικά	45
5.1. Δομή πρωτεϊνών	45
5.2. Τεχνικές χαρακτηρισμού νανοδομικών υλικών και ακινητοποιημένων ενζύμων σε νανοδομικά υλικά	46
5.2.1. Μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων (AFM)	46
5.2.2. Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS)	47
5.2.3. Θερμική ανάλυση (TGA/DTA)	48
5.2.4. Φασματοσκοπία Raman	49
5.3. Τεχνικές μελέτης δευτεροταγούς δομής ενζύμων	51
5.3.1. Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-vis)	51
5.3.2. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (CD)	52
5.3.3. Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)	54
5.4. Μελέτη της σχέσης δομής-λειτουργίας ακινητοποιημένων ενζύμων σε νανοδομικά υλικά με βάση τον άνθρακα	55
<u>ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ</u>	
6. Υλικά	61
6.1. Αντιδραστήρια	61

6.1.1.	<i>Βιοκαταλύτες</i>	61
6.1.2.	<i>Υποστρώματα</i>	61
6.1.3.	<i>Διαλύτες</i>	61
6.1.4.	<i>Αντιδραστήρια ακινητοποίησης</i>	62
6.1.5.	<i>Άλλα αντιδραστήρια</i>	62
6.2.	<i>Νανοϋλικά</i>	62
7.	Μεθοδολογία	65
7.1.	Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών	65
7.1.1.	<i>Πρωτόκολλο Bradford</i>	65
7.1.2.	<i>Πρωτόκολλο δικιγχονινικού οξέος (bicichoninic acid, BCA)</i>	65
7.2.	Ακινητοποίηση ενζύμων σε νανοδομικά υλικά	65
7.2.1.	<i>Μη ομοιοπολική ακινητοποίηση</i>	65
7.2.2.	<i>Ομοιοπολική ακινητοποίηση σε νανοϋλικά με τελικές καρβοξυλομάδες</i>	66
7.2.3.	<i>Ομοιοπολική ακινητοποίηση σε νανοϋλικά με τελικές αμινομάδες</i>	67
7.2.4.	<i>Σύνθεση πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών ενζύμου-νανοϋλικού</i>	68
7.3.	Μέθοδοι προσδιορισμού δραστηριότητας ενζύμων	69
7.3.1.	<i>Μέτρηση δραστηριότητας κυτοχρώματος c</i>	69
7.3.2.	<i>Μέτρηση δραστηριότητας λακάσης</i>	70
7.3.3.	<i>Χημειοενζυμική οξείδωση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων</i>	70
7.3.4.	<i>Ενζυμικά καταλυόμενος αποχρωματισμός χρωστικής</i>	70
7.4.	Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων του κυτοχρώματος c	70
7.5.	Μέθοδοι προσδιορισμού σταθερότητας ενζύμων	71
7.5.1.	<i>Προσδιορισμός σταθερότητας κυτοχρώματος c</i>	71
7.5.2.	<i>Προσδιορισμός σταθερότητας λακάσης</i>	72
7.5.3.	<i>Επαναχρησιμοποίηση πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών ενζύμου-νανοϋλικού</i>	72
7.6.	Αναλυτικές μέθοδοι – Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)	72
7.7.	Μέθοδοι χαρακτηρισμού των νανοβιοκαταλυτών	73
7.7.1.	<i>Μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων (AFM)</i>	73
7.7.2.	<i>Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS)</i>	73
7.7.3.	<i>Θερμική ανάλυση (TGA/DTA)</i>	73
7.7.4.	<i>Φασματοσκοπία Raman</i>	73
7.8.	Μέθοδοι μελέτης της δομής των ενζύμων	74
7.8.1.	<i>Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-vis)</i>	74
7.8.2.	<i>Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (CD)</i>	74
7.8.3.	<i>Φασματοσκοπία υπερύθρου (FTIR)</i>	74

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

8.	Αλληλεπίδραση του κυτοχρώματος c με νανοδομικά υλικά	79
8.1.	Δραστηριότητα του κυτοχρώματος c παρουσία νανοϋλικών	79
8.2.	Σταθερότητα του κυτοχρώματος c παρουσία νανοϋλικών	84
8.3.	Μελέτη της δομής του κυτοχρώματος c παρουσία νανοϋλικών	86
8.3.1.	<i>Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους</i>	86
8.3.2.	<i>Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού</i>	88
9.	Ακινητοποίηση του κυτοχρώματος c σε νανοδομικά υλικά	91
9.1.	Χαρακτηρισμός του ακινητοποιημένου κυτοχρώματος c με μικροσκοπικές και φασματοσκοπικές τεχνικές	91
9.1.1.	<i>Μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων</i>	91

9.1.2.	<i>Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X</i>	93
9.1.3.	<i>Θερμική ανάλυση</i>	95
9.2.	Επίδραση των νανοϋλικών στην αποτελεσματικότητα της ακινητοποίησης και στη δραστικότητα του ακινητοποιημένου κυτοχρώματος c	97
9.3.	Σταθερότητα του ακινητοποιημένου κυτοχρώματος c	99
9.4.	Μελέτη της δομής του ακινητοποιημένου κυτοχρώματος c με FTIR	103
10.	Σύνθεση πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών ενζύμου-νανοϋλικού	107
10.1.	Χαρακτηρισμός των πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών λακάσης-τροποποιημένου GO	107
10.1.1.	<i>Μικροσκοπία AFM</i>	107
10.1.2.	<i>Φασματοσκοπία FTIR</i>	109
10.1.3.	<i>Φασματοσκοπία Raman</i>	110
10.2.	Δραστικότητα των πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών λακάσης-τροποποιημένου GO	111
10.3.	Σταθερότητα των πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών λακάσης-τροποποιημένου GO	112
10.4.	Εφαρμογές των πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών λακάσης-τροποποιημένου GO	114
10.4.1.	<i>Οξείδωση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων</i>	114
10.4.2.	<i>Αποχρωματισμός χρωστικών</i>	115
10.4.3.	<i>Επαναχρησιμοποίηση των πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών λακάσης-τροποποιημένου GO</i>	117
11.	Συμπεράσματα	119
12.	Βιβλιογραφία	127
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ (I-III)	141

Εισαγωγή

Η νανοβιοτεχνολογία, η επιστήμη η οποία συνδυάζει τη βιολογία με τη νανοτεχνολογία, έχει προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια λόγω των σημαντικών εφαρμογών της σε διάφορους τομείς όπως στη δημιουργία βιοαισθητήρων και κυψελών βιοκαυσίμων, στη μεταφορά φαρμάκων και γονιδίων, στη μοριακή απεικόνιση, στη βιοαποκατάσταση και τη νανοβιοκατάλυση. Οι αλληλεπιδράσεις των βιομορίων με οργανωμένες νανοδομές όπως είναι τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των παραπάνω εφαρμογών.

Στόχος της παρούσας διατριβής είναι η ανάπτυξη νέων βιοκαταλυτικών συστημάτων μέσω της ακινητοποίησης ενζύμων σε νανοδομικά υλικά, μελετώντας και κατανοώντας τη σχέση δομής-λειτουργίας των ακινητοποιημένων ενζύμων με τα νανοϋλικά. Η μελέτη εστιάζεται στη χρήση νανοδομικών υλικών με βάση τον άνθρακα, τα οποία έχουν προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια και έχουν χρησιμοποιηθεί κυρίως ως φορείς ακινητοποίησης ενζύμων για πλήθος βιοτεχνολογικών εφαρμογών. Η καταλυτική δραστηριότητα των ενζύμων είναι άμεσα συνδεδεμένη με την ενεργή δομή τους, γεγονός που καθιστά αναγκαία την κατανόηση της καταλυτικής συμπεριφοράς των ενζύμων στα συστήματα νανοϋλικών. Έτσι, απώτερος σκοπός της παρούσας διατριβής είναι να μελετηθεί η επίδραση των μορφολογικών χαρακτηριστικών των νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα στη δομή και τα καταλυτικά χαρακτηριστικά βιοκαταλυτών, όπως της οξειδάσης λακάσης και της υπεροξειδάσης κυτόχρωμα c.

Η παρούσα διατριβή διαρθρώνεται σε τέσσερις βασικές ενότητες οι οποίες περιλαμβάνουν το θεωρητικό μέρος, τα υλικά και τις μεθόδους, μια εκτενή συζήτηση των αποτελεσμάτων και τέλος τα κύρια συμπεράσματα που προέκυψαν.

Στα κεφάλαια 1 έως 5 (θεωρητικό μέρος) επιχειρείται η θεωρητική και βιβλιογραφική προσέγγιση του θέματος, παραθέτοντας τις απαραίτητες πληροφορίες για την κατανόηση των εννοιών και των φαινομένων που παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή. Αναλυτικότερα, στο κεφάλαιο 1 γίνεται αναφορά στα πλεονεκτήματα που χαρακτηρίζουν τη «λευκή βιοτεχνολογία» μέσω της χρήσης ενζύμων. Στο κεφάλαιο 2 γίνεται μια εκτενής αναφορά στα οξειδοαναγωγικά ένζυμα, μια κατηγορία ενζύμων με πολυάριθμες εφαρμογές στη βιομηχανία, τα οποία αποτελούν τους βιοκαταλύτες ενδιαφέροντος στην παρούσα διατριβή. Επιπλέον, στο κεφάλαιο 3 επιχειρείται μια θεωρητική εισαγωγή στα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα, και ιδιαίτερα στις κατηγορίες των νανοςωλήνων άνθρακα και του γραφενίου, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Παρουσιάζονται τα πλεονεκτήματα και οι ιδιότητες των νανοδομικών υλικών με βάση τον άνθρακα, ενώ παρατίθεται και μια μικρή ανασκόπηση όσο αναφορά στις προσεγγίσεις που χρησιμοποιούνται ευρέως για την ακινητοποίηση ενζύμων στα νανοϋλικά αυτά. Επιπρόσθετα, στο κεφάλαιο 4 γίνεται μια βιβλιογραφική ανασκόπηση ως προς τις εφαρμογές που βρίσκουν τα ακινητοποιημένα ένζυμα στα νανοδομικά υλικά με βάση τον άνθρακα σε διάφορους τομείς βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος, ενώ παρατίθενται

πληροφορίες για μια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για τη δημιουργία νανοσυστοιχίων, την τεχνική layer-by-layer, η οποία αποτελεί βάση για την ανάπτυξη καινοτόμων πολυστρωματικών νανοβιοκαταλυτών. Τέλος, καθώς σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της σχέσης μεταξύ καταλυτικής συμπεριφοράς και δομής των ενζύμων, στο 5^ο κεφάλαιο γίνεται μια εισαγωγή στη δομή των πρωτεϊνών, και στις βασικές αρχές των μικροσκοπικών και φασματοσκοπικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται για το χαρακτηρισμό των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών και τη μελέτη της δομής τους. Στο τέλος του κεφαλαίου, γίνεται βιβλιογραφική ανασκόπηση σχετικά με τη σχέση δομής-λειτουργίας ενζύμων ακινητοποιημένα σε νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα.

Η δεύτερη ενότητα (κεφάλαια 6 και 7) αναφέρεται στα υλικά και τις μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, ενώ στην τρίτη ενότητα (κεφάλαια 8 έως και 10) παρατίθενται τα πειραματικά αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν από την παρούσα εργασία, τα οποία σχολιάζονται και συσχετίζονται με την υπάρχουσα βιβλιογραφία.

Πιο συγκεκριμένα, στο κεφάλαιο 8 παρατίθενται τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση των νανοδομικών υλικών με βάση τον άνθρακα με το κυτόχρωμα c από καρδιά αλόγου. Μελετήθηκε η καταλυτική δραστηριότητα του κυτοχρώματος c παρουσία αυξανόμενων συγκεντρώσεων διάφορων τροποποιημένων νανοϋλικών, με διαφορετικού μήκους ανθρακική αλυσίδα και τελικές ελεύθερες λειτουργικές ομάδες, όπως αμινομάδες, καρβοξυλομάδες ή μεθυλομάδες. Γίνεται αποτίμηση της επίδρασης των νανοϋλικών στην καταλυτική συμπεριφορά του κυτοχρώματος c (δραστηριότητα και σταθερότητα), ενώ ταυτόχρονα μελετάται η δομή της πρωτεΐνης παρουσία των νανοϋλικών, μέσω της τεχνικής του κυκλικού διχρωισμού (CD), με απώτερο σκοπό τη μελέτη δομής-λειτουργίας πρωτεϊνών σε συστήματα οργανωμένων νανοδομών.

Με βάση τις γνώσεις που αποκομίστηκαν από το κεφάλαιο 8 σχετικά με τις αλληλεπιδράσεις που διέπουν τις σχέσεις μεταξύ πρωτεϊνών και νανοϋλικών, στο κεφάλαιο 9 η μελέτη εστιάστηκε στην ακινητοποίηση του κυτοχρώματος c στα τροποποιημένα νανοϋλικά άνθρακα, και πιο συγκεκριμένα στα τροποποιημένα παράγωγα του οξειδίου του γραφενίου. Αναπτύχθηκαν πρωτόκολλα τόσο ομοιοπολικής όσο και μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης του κυτοχρώματος c στα νανοϋλικά αυτά, και διερευνήθηκε η καταλυτική συμπεριφορά της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης. Οι νανοβιοκαταλύτες που προέκυψαν χαρακτηρίστηκαν με τη μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων (AFM), με τη φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS) και μέσω θερμικής ανάλυσης, ενώ η καταλυτική τους δραστηριότητα και σταθερότητα συσχετίστηκε με τα δομικά χαρακτηριστικά του κυτοχρώματος c μετά την ακινητοποίηση, όπως αυτά προέκυψαν από την εφαρμογή της φασματοσκοπίας υπερύθρου (FTIR).

Στο κεφάλαιο 10, σχολιάζονται τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη δημιουργία πολυστρωματικών νανοσυστοιχίων λακάσης και τροποποιημένου οξειδίου του γραφενίου με τελικές ελεύθερες αμινομάδες και την εφαρμογή τους σε διάφορες αντιδράσεις ερευνητικού και βιομηχανικού ενδιαφέροντος. Ο χαρακτηρισμός των

νανοσυστοιχιών έγινε με τη χρήση μικροσκοπίας ατομικών δυνάμεων (AFM), φασματοσκοπίας FTIR και φασματοσκοπίας Raman. Μελετήθηκαν τα καταλυτικά χαρακτηριστικά (δραστικότητα και σταθερότητα) των πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών λακάσης-νανοϋλικού. Οι καινοτόμοι αυτοί νανοβιοκαταλύτες χρησιμοποιήθηκαν για την επιτυχή αποδόμηση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων και τον αποχρωματισμό βαφών, ενώ μελετήθηκε επιπλέον και η ικανότητα επαναχρησιμοποίησης τους.

Τέλος, στην τέταρτη ενότητα (κεφάλαιο 11) αναπτύσσονται συνοπτικά τα κύρια συμπεράσματα των πειραμάτων της παρούσας μελέτης.

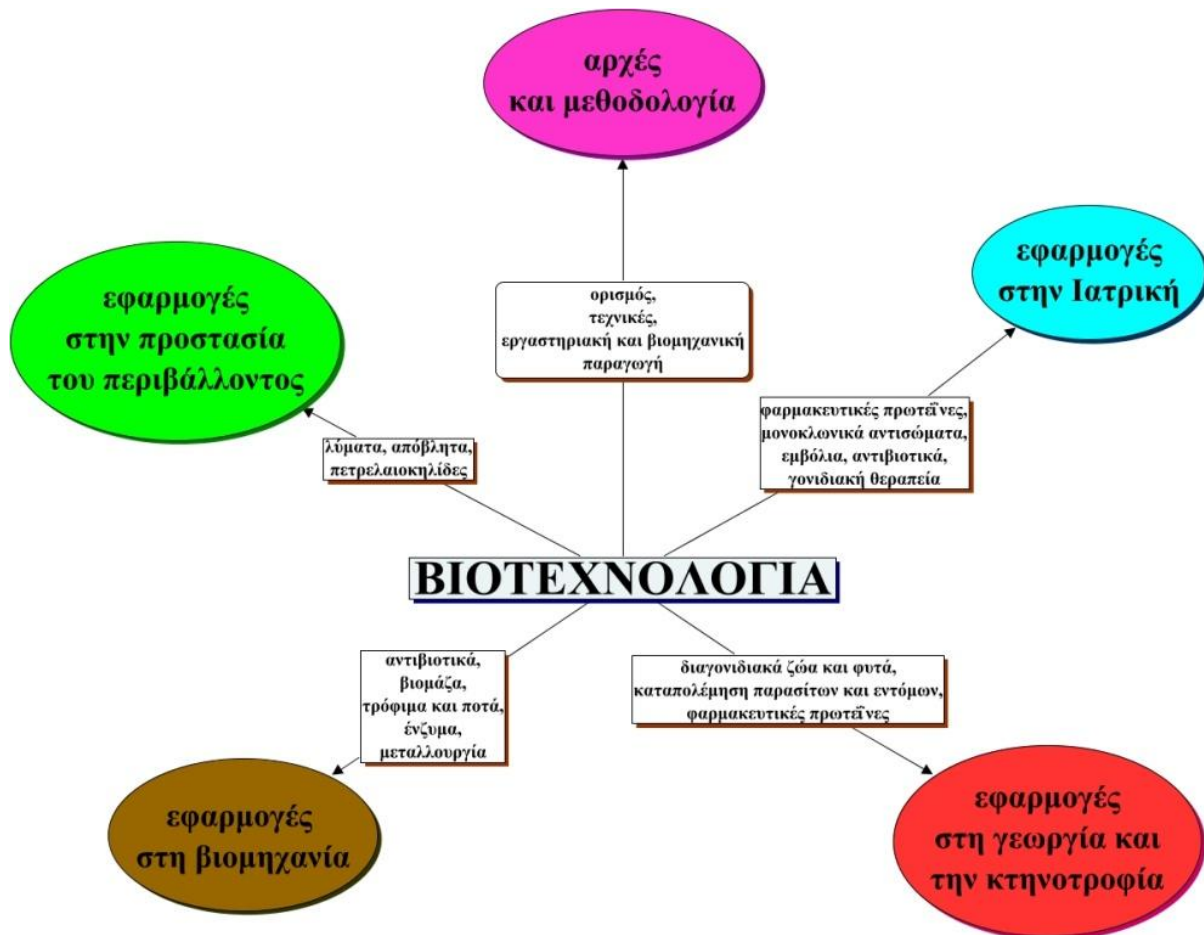
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ

ΜΕΡΟΣ

1. Εφαρμογή ενζύμων σε βιοκαταλυτικές διεργασίες

1.1. Βιοκατάλυση

Με τον όρο βιοτεχνολογία εννοούμε την εφαρμογή διάφορων βιολογικών λειτουργιών σε τεχνολογικό επίπεδο με στόχο τη βιομηχανική παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας (Εικόνα 1.1). Ειδικότερα, αξιοποιούνται αντιδράσεις που πραγματοποιούνται σε ζωντανά βακτήρια, φυτικά ή και ζωικά κύτταρα, ενζυμικές αντιδράσεις, αλλά και προϊόντα της βιομάζας από διάφορους μικροοργανισμούς. Οι βιοτεχνολογικές μετατροπές κατηγοριοποιούνται σε ποικίλες επιμέρους διεργασίες (ζύμωση, βιομετατροπές, ενζυμική κατάλυση), ανάλογα με τον αριθμό των απαραίτητων βημάτων και την πολυπλοκότητα των υποστρωμάτων. Οι βιομετατροπές και η ενζυμική κατάλυση συμπεριλαμβάνονται κάτω από τον γενικότερο όρο «βιοκατάλυση». Υπό αυτή την έννοια, βιοκαταλυτικές διεργασίες ορίζονται οι μετατροπές ενός ή περισσότερων υποστρωμάτων σε ένα ή περισσότερα προκαθορισμένα προϊόντα μέσω ενός ή περισσότερων ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων [Bommarius & Riebel 2004].



Εικόνα 1.1. Εφαρμογές της βιοτεχνολογίας σε διάφορους επιστημονικούς κλάδους.

Η βιοτεχνολογία χωρίζεται σε τέσσερις βασικούς κλάδους:

- πράσινη βιοτεχνολογία, που αναφέρεται στη βιοτεχνολογία εφαρμοζόμενη στον αγροτικό τομέα [Dove 1998]
- μπλε βιοτεχνολογία, η οποία αφορά στις εφαρμογές της βιοτεχνολογίας σε υδάτινα συστήματα και υδρόβιους οργανισμούς [Volckaert *et al.* 2008]
- κόκκινη βιοτεχνολογία, που αναφέρεται στη φαρμακευτική και ιατρική βιοτεχνολογία [Allgaier 2006]
- λευκή βιοτεχνολογία, που αναφέρεται στη βιομηχανική βιοτεχνολογία [Soetaert & Vandamme 2006]

Η βιομηχανική βιοτεχνολογία, γνωστή και ως «λευκή βιοτεχνολογία», αποτελεί τη σύγχρονη προσέγγιση για την επωφελή σύνθεση βιοχημικών, βιοϋλικών και βιοκαυσίμων από ανανεώσιμες πηγές, μέσω της χρήσης κυττάρων ή και απομονωμένων ενζύμων. Προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών μεθόδων καθώς επιτρέπει την παραγωγή προϊόντων υψηλής αξίας και ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές, με παράλληλο οικονομικό όφελος. Η εφαρμογή της οδηγεί σε διεργασίες που είναι περισσότερο φιλικές προς το περιβάλλον, με μικρότερη παραγωγή αποβλήτων και μικρότερη κατανάλωση ενέργειας, ενώ οι ήδη υπάρχουσες διεργασίες αποδεικνύουν τη άμεση σύνδεση των εφαρμογών της βιομηχανικής βιοτεχνολογίας με κοινωνικά, οικονομικά και περιβαλλοντικά οφέλη [Tang & Zhao 2009].

1.2. Εφαρμογή ενζύμων στη βιοτεχνολογία

Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες που λειτουργούν ως καταλύτες. Έχουν την ικανότητα να καταλύουν ποικίλες χημικές αντιδράσεις πολλές από τις οποίες είναι τόσο πολύπλοκες που είναι αδύνατον να επιτευχθούν με τη χρήση χημικών καταλυτών. Ωστόσο, τα ένζυμα δεν υπόκεινται σε διαφορετικές επιστημονικές αρχές από εκείνες που διέπουν τους χημικούς καταλύτες, καθώς δρουν μέσω της μείωσης της ενέργειας ενεργοποίησης που απαιτείται για το σχεδιασμό του μεταβατικού συμπλόκου, το οποίο οδηγεί στη σύνθεση του τελικού προϊόντος.

Η χρήση των ενζύμων σε σχέση με τους χημικούς καταλύτες παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα, με αποτέλεσμα οι ενζυμικές βιομετατροπές να είναι σε πολλές περιπτώσεις ο προτεινόμενος τρόπος παραγωγής προϊόντων υψηλής αξίας [Bommarius & Riebel 2004]. Παρ' όλα αυτά όμως η χρήση των ενζύμων περιλαμβάνει και κάποιους περιορισμούς. Στον Πίνακα 1.1 παρουσιάζονται τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της χρήσης των ενζύμων.

Λόγω της εκτενούς έρευνας πάνω στην ενζυμική βιοτεχνολογία, έχουν αναπτυχθεί τεχνικές με σκοπό τον περιορισμό των μειονεκτημάτων που προκύπτουν από τη χρήση ενζύμων και τη βελτιστοποίηση των καταλυτικών χαρακτηριστικών τους. Για παράδειγμα,

οι τεχνικές της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA καθιστούν εφικτή την παραγωγή ενζύμων από μικροοργανισμούς που είναι δύσκολο να καλλιεργηθούν σε εργαστηριακές συνθήκες, μέσω της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων σε κύτταρα-ξενιστές. Επιπλέον, ο ορθολογικός σχεδιασμός πρωτεϊνών και η κατευθυνόμενη εξέλιξη μπορούν να επέμβουν στη δομή του ενεργού κέντρου των ενζύμων και να δημιουργήσουν βιομόρια με επιθυμητές ιδιότητες, τόσο ως προς την εξειδίκευσή τους σε ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα όσο και ως προς το εύρος των ενώσεων που μπορούν να φιλοξενήσουν στο ενεργό τους κέντρο [Bornscheuer & Kazlauskas 2004]. Τέλος, η ακινητοποίηση ενζύμων σε διάφορους φορείς μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της σταθερότητάς τους έναντι μετουσιωτικών παραγόντων, όπως η υψηλή θερμοκρασία και πίεση, οι ακραίες τιμές pH και ο χρόνος παραμονής τους σε ένα διάλυμα [Kim *et al.* 2006].

Πίνακας 1.1. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της χρήσης ενζύμων.

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Μεγάλη δραστικότητα και ικανότητα επιτάχυνσης των αντιδράσεων ($10^6 - 10^{17}$ φορές υψηλότερη ταχύτητα)	Χαμηλή σταθερότητα σε ακραίες τιμές pH και θερμοκρασίας
Υψηλή εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα	Μειωμένη σταθερότητα, όταν απομακρυνθούν από την φυσική πηγή τους
Υψηλή τοπο- και στέreo-εκλεκτικότητα (διακρίνουν συγκεκριμένα τμήματα στα μόρια των υποστρωμάτων ή οπτικά ισομερή αντίστοιχα)	Μεγάλος χρόνος για ανάπτυξη νέων βιοκαταλυτών
Υψηλή εναντιοεκλεκτικότητα.	Χαμηλή ειδική ενεργότητα
Δεν αλλοιώνουν τα τελικά προϊόντα ή την ισορροπία μεταξύ αντιδρώντων και προϊόντων μιας αντίδρασης	Η καταλυτική τους δράση (αρκετές φορές) επηρεάζεται από την παρουσία συνενζύμου
Λειτουργούν σε ήπιες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και πίεσης	Αναστολή από το ίδιο το υπόστρωμα ή το προϊόν
Είναι φιλικό προς το περιβάλλον και βιοαποικοδομίσιμοι καταλύτες	Έχουν υψηλό κόστος παραγωγής

Κάθε ένζυμο έχει έναν κωδικό αριθμό που αποτελείται από το ακρωνύμιο E.C. (αρχικά της Enzyme Commission) συνοδευόμενο από τέσσερις αριθμούς που καθορίζουν κατά σειρά: τάξη, υποτάξη, υπο-υποτάξη, εξειδίκευση (υπόστρωμα), και εντάσσονται σε έξι μεγάλες κατηγορίες με βάση την αντίδραση που καταλύουν:

- E.C.1 Οξειδοαναγωγάσες: ένζυμα που καταλύουν την οξείδωση ή αναγωγή υποστρώματος, δηλαδή αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων (καμιά φορά συνοδεύεται και από μεταφορά πρωτονίων) από ένα υπόστρωμα δότη ηλεκτρονίων σε ένα άλλο υπόστρωμα δέκτη.
- E.C.2 Μεταφοράσες: ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις μεταφοράς χημικών ομάδων από μια ένωση (δότη) σε κάποια άλλη ένωση (δέκτη).

- E.C.3 Υδρολάσες: ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις υδρόλυσης χημικών δεσμών (αμιδικών $C\equiv N$, εστερικών $C=O$, γλυκοζιδικών $C-O-C$).
- E.C.4 Λυάσες: ένζυμα που καταλύουν τη διάσπαση δεσμών $C-C$, $C-O$, $C-N$, χωρίς την παρεμβολή νερού.
- E.C.5 Ισομεράσες: ένζυμα που καταλύουν γεωμετρικές και δομικές μεταβολές στο μόριο του υποστρώματος
- E.C.6 Λιγάσες ή συνθετάσες: ένζυμα που καταλύουν το σχηματισμό ενός δεσμού ($C-O$, $C-C$, $C-N$) μεταξύ δυο μορίων με την ταυτόχρονη υδρόλυση ενός πυροσταφυλικού δεσμού συνήθως στο μόριο του ATP.

Η βιομηχανία ενζύμων, που είναι το αποτέλεσμα της ταχείας ανάπτυξης της μοντέρνας βιοτεχνολογίας, παράγει ένζυμα για ένα ευρύ φάσμα εφαρμογών. Όπως ήδη αναφέρθηκε προηγουμένως, με την ανάπτυξη της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA και της γενετικής μηχανικής, η δυνατότητα παραγωγής σε μεγάλη κλίμακα των ενζύμων είναι σήμερα εφικτή, γεγονός που διευρύνει τη χρήση των ενζύμων σε πλήθος βιομηχανικών διεργασιών, όπως στη βιομηχανία απορρυπαντικών, την κλωστοϋφαντουργία, τη βιομηχανία αμύλου, την αρτοποιεία, τις ζωοτροφές, τη βιομηχανία τροφίμων και τη φαρμακοβιομηχανία. Στον Πίνακα 1.2. παρουσιάζονται ενδεικτικά εφαρμογές διάφορων ενζύμων στη βιομηχανία.

Πίνακας 1.2. Ενδεικτικές εφαρμογές ενζύμων σε διάφορους βιομηχανικούς τομείς.

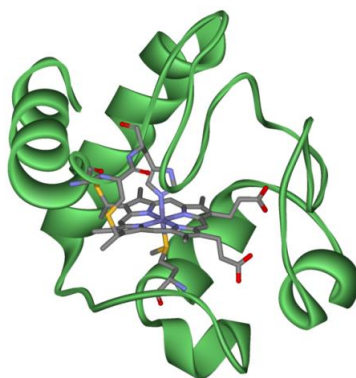
Ένζυμο	Βιομηχανία	Προϊόν - Εφαρμογή
Λιπάση	Αρτοποιία	Διόγκωση του ψωμιού
Λακάση	Υφαντουργία	Λεύκανση
Εστεράση	Γαλακτοκομικά προϊόντα	Ανάπτυξη παραγόντων βελτίωσης γεύσης
Γλυκοσιδάσες	Βιομηχανία καυσίμων	Βιοαιθανόλη
Αμυλάσες, Κυτταρινάσες	Υφαντουργία	Ξέπλυμα αμύλου
Πρωτεάση	Απορρυπαντικά	Αφαίρεση λεκέδων
Ξυλανάση	Ζωοτροφές	Ευπεψία τροφής
Πηκτινάσες	Ελαιουργείο	Μείωση του ιξώδους στο λάδι
Οξειδάση της γλυκόζης	Συντηρητικά	Περιορισμός της χημικής αμαύρωσης στα τρόφιμα
Υπεροξειδάση της λιγνίνης	Βιομηχανία ξύλου/χάρτου	Αποικοδόμηση λιγνίνης
Ινβερτάση	Ζαχαροπλαστική	Παραγωγή σιροπιού σοκολάτας
Καταλάση	Οπτικά είδη	Διαλύματα καθαρισμού φακών επαφής

2. Οξειδοαναγωγάσες

Οι οξειδοαναγωγάσες (E.C. 1) αποτελούν μια μεγάλη κατηγορία ενζύμων με σημαντικό ρόλο στη φύση και αξιόλογες βιοτεχνολογικές και βιομηχανικές εφαρμογές. Τα ένζυμα αυτά χαρακτηρίζονται από την ικανότητα να καταλύουν αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων από ένα μόριο, το αναγωγικό που συνήθως καλείται δότης ηλεκτρονίων, σε ένα άλλο μόριο, το οξειδωτικό, που καλείται και δέκτης ηλεκτρονίων. Η εξειδίκευση των ενζύμων αυτών στη χρήση συγκεκριμένων ομάδων ως δότες ηλεκτρονίων οδήγησε στην περαιτέρω κατηγοριοποίησή τους. Δύο από τις σημαντικότερες υποκατηγορίες των οξειδοαναγωγασών είναι οι υπεροξειδάσες, οι οποίες καταλύουν αντιδράσεις αφυδρογόνωσης διαφόρων υποστρωμάτων χρησιμοποιώντας το υπεροξειδίο του υδρογόνου (H_2O_2) ως δέκτη ηλεκτρονίων, και οι οξειδάσες οι οποίες καταλύουν αντιδράσεις οξείδωσης ή αναγωγής χρησιμοποιώντας το μοριακό οξυγόνο (O_2) ως δέκτη ηλεκτρονίων. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιήθηκε η πρωτεΐνη κυτόχρωμα c (cyt c) από την οικογένεια των υπεροξειδασών, και το ένζυμο λακάση από την οικογένεια των οξειδασών.

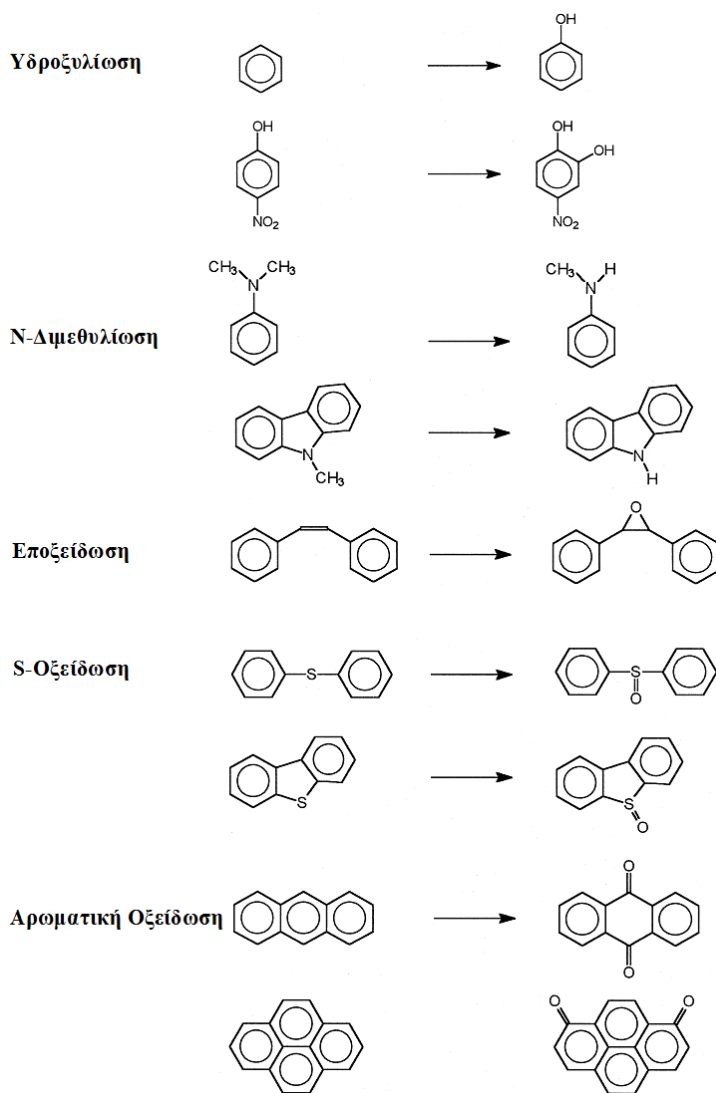
2.1. Κυτόχρωμα c

Το κυτόχρωμα c (EC 1.9.3.1, cyt c) είναι μια μικρή αιμοπρωτεΐνη μοριακού βάρους ~12 kDa (αποτελείται από 94-114 αμινοξέα, ανάλογα από την πηγή προέλευσης), που αποτελείται από μία πεπτιδική αλυσίδα, βρίσκεται στο διαμεμβρανικό χώρο μεταξύ της εξωτερικής και εσωτερικής μεμβράνης των μιτοχονδρίων, και ανήκει στην οικογένεια κυτοχρωμάτων c (Εικόνα 2.1). Το κυτόχρωμα c είναι ιδιαίτερα υδατοδιαλυτό, σε αντίθεση με άλλα κυτοχρώματα, και αποτελεί απαραίτητο συστατικό της αναπνευστικής αλυσίδας ως μεταφορέας ηλεκτρονίων μεταξύ του Συμπλόκου III (Συνένζυμο Q – cyt c αναγωγή) και του Συμπλόκου IV (οξειδάση του cyt c). Ανήκει στην οικογένεια των αιμοπρωτεϊνών, δηλαδή μεταλλοπρωτεϊνών που περιέχουν μια προσθετική ομάδα αίμης, και αποτελεί μια ιδιαίτερα συντηρημένη πρωτεΐνη μεταξύ των ειδών που μπορεί να βρεθεί σε φυτά, ζώα και πολλούς μονοκύτταρους οργανισμούς.



Εικόνα 2.1. Απεικόνιση του κυτοχρώματος c από καρδιά αλόγου [Πηγή: Protein Data Bank, 1HRC).

In vivo το κυτόχρωμα δεν παρουσιάζει κάποια καταλυτική ενζυμική δράση, ενώ αντίθετα *in vitro* έχει την ικανότητα να καταλύει αντιδράσεις οξείδωσης με ανάλογο τρόπο με αυτών των υπεροξειδασών, παρουσία κάποιου δέκτη ηλεκτρονίων, όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2). Κάποιες από τις βιομετατροπές που μπορεί να καταλύσει το *cyt c* παρουσία υπεροξειδίου παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.2.



Εικόνα 2.2. Βιομετατροπές καταλυόμενες από το κυτόχρωμα c.

Το κυτόχρωμα c είναι από τις καλύτερα χαρακτηρισμένες οξειδοαναγωγικές πρωτεΐνες, τόσο λόγω του σημαντικού του ρόλου στην αναπνευστική αλυσίδα, όσο και του γεγονότος ότι είναι μια πολύ σταθερή αιμοπρωτεΐνη μικρού μεγέθους που μπορεί εύκολα να αποκτηθεί σε καθαρή κατάσταση, και για αυτό αποτελεί πρωτεΐνη-μοντέλο για τη μελέτη και αξιολόγηση ποιοτικών και ποσοτικών δομικών διαταραχών, όπως για παράδειγμα κατά την αλληλεπίδρασή του με διάφορα νανοσωματίδια [Shang *et al.* 2009]. Επιπλέον, παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα που το καθιστούν ιδιαίτερα χρήσιμο ως βιοκαταλύτη [Vazquez-Duhalt 1999, Vazquez-Duhalt *et al.* 1993]:

- Η προσθετική ομάδα της αίμης είναι ομοιοπολικά προσδεμένη στην πρωτεΐνη, σε αντίθεση με τις περισσότερες αιμοπρωτεΐνες. Το χαρακτηριστικό αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό στην περίπτωση που η κατάλυση γίνεται σε οργανικούς διαλύτες, όπου το κυτόχρωμα c δεν χάνει την καταλυτική ομάδα της αίμης, εν αντιθέσει με τις υπόλοιπες υπεροξειδάσες.
- Διατηρεί τη δραστικότητά του σε μεγάλο εύρος pH, ενώ κανένα άλλο ένζυμο δεν είναι ενεργό σε τόσο ευρύ φάσμα.
- Η δραστικότητά του διατηρείται ακόμα και παρουσία μεγάλων συγκεντρώσεων οργανικών διαλυτών.
- Έχει την ικανότητα να εκτελεί βιοκαταλυτικές αντιδράσεις σε υψηλές θερμοκρασίες, ακόμα και άνω των 120 °C. Η χημική τροποποίηση της πρωτεΐνης αυξάνει ακόμα περισσότερο τη θερμοσταθερότητά της.
- Έχει χαμηλό κόστος.

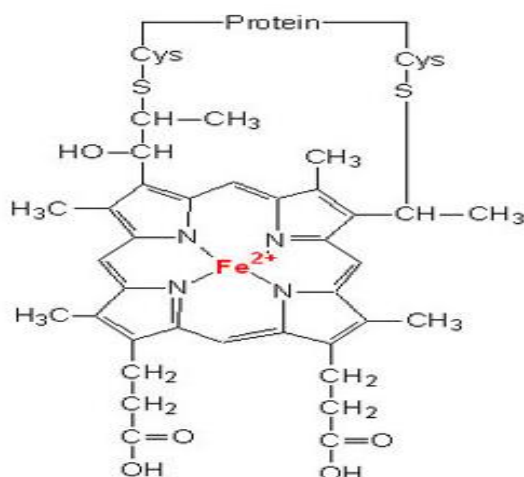
2.1.1. Δομή της αίμης

Τα κυτοχρώματα ανήκουν στην κατηγορία των αιμοπρωτεϊνών, δηλαδή των πρωτεϊνών που περιέχουν ως προσθετική ομάδα ένα μόριο αίμης. Η αίμη συνίσταται από ένα ιόν σιδήρου, το οποίο συνδέεται με 4 άτομα αζώτου πορφυρίνης, μιας τετρακυκλικής αρωματικής ένωσης. Το ιόν του σιδήρου αποτελεί το οξειδοαναγωγικό στοιχείο των κυτοχρωμάτων, αφού ταλαντεύεται μεταξύ της οξειδωμένης κατάστασης [Fe(III)], όπου ο σίδηρος έχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, και της αναγμένης [Fe(II)] κατάστασης, όπου δεν υπάρχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια. [Miller *et al.* 1996]. Ανάλογα με τον τύπο της αίμης, διακρίνονται τρεις κατηγορίες κυτοχρωμάτων: A, B και C. Το κυτόχρωμα c περιέχει μία ομάδα αίμης τύπου C (Εικόνα 2.3), η οποία είναι ομοιοπολικά προσδεμένη στην πολυπεπτιδική αλυσίδα μέσω δύο θειοαιθερικών δεσμών, από τα κατάλοιπα κυστεΐνης της πρωτεΐνης (Cys14 και Cys17). Οι δεσμοί αυτοί είναι τόσο ισχυροί που δεν επιτρέπουν στην αίμη να απομακρυνθεί από το πρωτεϊνικό μόριο. Επιπλέον των ομοιοπολικών αυτών δεσμών, ο σίδηρος της αίμης είναι συνήθως αξονικά συντονισμένος με τις πλευρικές αλυσίδες δύο αμινοξέων, της ιστιδίνης (His18) και της μεθειονίνης (Met80) [Yeh *et al.* 1998]. Επειδή ο σουλφονικός δεσμός μεταξύ του καταλοίπου Met80 και του αιμικού σιδήρου είναι ισχυρός, το ιόν σιδήρου της αίμης βρίσκεται σε μία κατάσταση χαμηλού σπιν. Ωστόσο, αλλαγές στο μικροπεριβάλλον της αίμης ή παρουσία ενός εναλλακτικού προσδέτη μπορεί να αποδυναμώσει ή να σπάσει το δεσμό αυτό αντίστοιχα (Farivar *et al.*, 2010).

Η Met80 διαδραματίζει ένα ιδιαίτερα σημαντικό λειτουργικό ρόλο για την πρωτεΐνη, καθώς είναι υπεύθυνη για την οξειδοαναγωγική δράση του κυτοχρώματος c [Raphael & Gray 1991, Senn & Wuthrich 1985]. Το άτομο θείου είναι καλός δέκτης ηλεκτρονίων, ενώ η His18 τείνει να σταθεροποιεί την οξειδωμένη κατάσταση της πρωτεΐνης, καθώς αποτελεί καλό δότη ηλεκτρονίων [Santucci & Ascoli 1997]. Η διαταραχή του δεσμού Fe(III)-Met80 σχετίζεται με μια αναδιάταξη στο εσωτερικό του

βιομορίου. Ο ισχυρός δεσμός με τη μεθειονίνη οδηγεί στη χαμηλού-σπιν φυσική μορφή του κυτοχρώματος. Όταν η μεθειονίνη αντικατασταθεί με H_2O , τότε το ιόν του $Fe(III)$ αποκτά υψηλό σπιν [Lee *et al.* 2005].

Η ομάδα της αίμης εντοπίζεται σε μία περιοχή πλούσια από κατάλοιπα λυσίνης τα οποία είναι θετικά φορτισμένα. Έτσι, η αίμη αναπτύσσει ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με αρνητικά φορτισμένες πρωτεΐνες ή άλλα μόρια.



Εικόνα 2.3. Δομή της αίμης c.

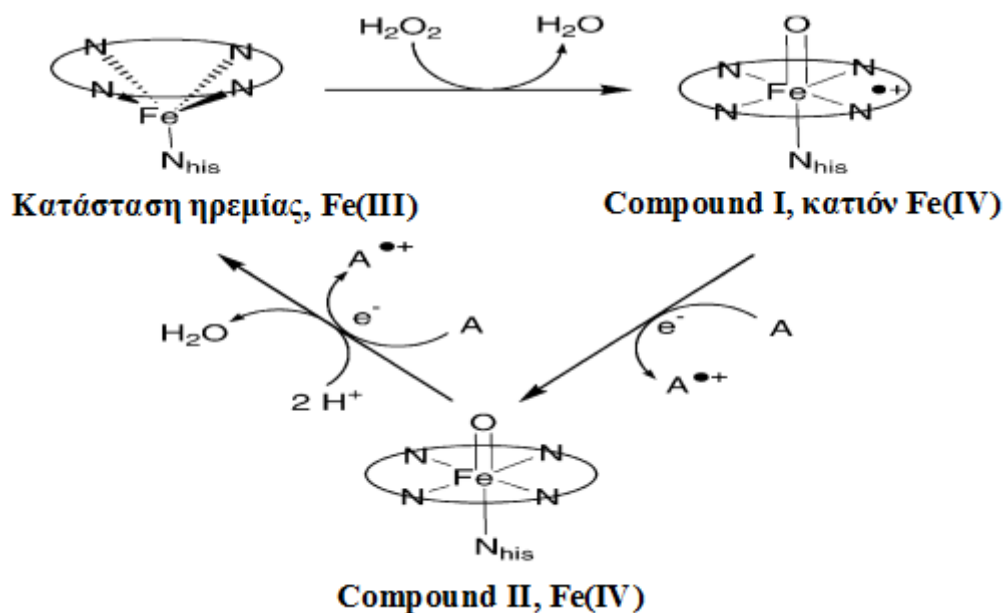
Όλα τα κυτοχρώματα τύπου c περιέχουν μια χαρακτηριστική αμινοξική αλληλουχία CXXCH (κυστεΐνη-αμινοξύ-αμινοξύ-κυστεΐνη-ιστιδίνη) στην πεπτιδική τους αλυσίδα με την οποία δεσμεύεται η αίμη. Παρόλα αυτά, υπάρχουν τέσσερις κατηγορίες κυτοχρώματος c [Ambler 1991]:

- **Τάξη I (Class I):** περιλαμβάνει τα χαμηλού-σπιν διαλυτά κυτοχρώματα c των μιτοχονδρίων και των βακτηρίων. Η θέση πρόσδεσης με την αίμη είναι κοντά στο N-τελικό άκρο της ιστιδίνης και ο 6^{ος} προσδέτης παρέχεται από ένα κατάλοιπο μεθειονίνης κοντά στο C-τελικό άκρο.
- **Τάξη II (Class II):** περιλαμβάνει τα υψηλού-σπιν κυτοχρώματα c και ένα μικρό αριθμό χαμηλού-σπιν κυτοχρώματα. Η θέση πρόσδεσης με την αίμη είναι κοντά στο N-τελικό άκρο της ιστιδίνης.
- **Τάξη III (Class III):** περιλαμβάνει τα κυτοχρώματα που περιλαμβάνουν πολλαπλές ομάδες αίμης και έχουν χαμηλή οξειδοαναγωγική ικανότητα. Οι ομάδες αίμης είναι μη ισοδύναμες, τόσο δομικά όσο και λειτουργικά.
- **Τάξη IV (Class IV):** περιλαμβάνει συμπλέγματα πρωτεϊνών που περιέχουν επιπλέον προσθετικές ομάδες πέραν της αίμης.

2.1.2. Μηχανισμός δράσης του κυτοχρώματος c

Η δράση του κυτοχρώματος c ως υπεροξειδάση περιλαμβάνει έναν μηχανισμό τριών σταδίων, στον οποίο συμπεριλαμβάνονται δύο ενδιάμεσες καταστάσεις του

βιοκαταλύτη: το στοιχείο I (compound I) και το στοιχείο II (compound II). Πιο αναλυτικά, παράγεται μια υψηλού-σθένους κατιονική ρίζα του οξοπορφυρινικού σιδήρου(IV) από το κυτόχρωμα c λόγω της δράσης ενός μορίου H_2O_2 . Η κατιονική αυτή ρίζα καλείται Compound I. Η παρουσία ενός 0.5-ισοδύναμου δι-ηλεκτρονιακού αναγωγικού υποστρώματος, όπως μια αρωματική ένωση, παράγει την ένωση γνωστή με τον όρο Compound II, που είναι ο όξο πορφυρινικός σίδηρος, χωρίς το κατιόν της πορφυρινικής π-ρίζας. Το Compound II οξειδώνει ένα δεύτερο μόριο υποστρώματος, για να σχηματίσει τον σίδηρο(III) («resting state», Εικόνα 2.4) [Vazquez-Duhalt *et al.* 1999].



Εικόνα 2.4. Κύκλος οξειδοαναγωγικής δράσης του σιδήρου του κυτοχρώματος c.

Όπως σε όλες τις περιπτώσεις των υπεροξειδασών, το κυτόχρωμα c απενεργοποιείται από την παρουσία περίσσειας υπεροξειδίου του υδρογόνου ή ενός οργανικού υδροπεροξειδίου. Αν και ο μηχανισμός απενεργοποίησης δεν έχει διασαφηνιστεί πλήρως [Rodriguez-López *et al.* 1997, Hiner *et al.* 1995], υπάρχουν δύο προτεινόμενες πορείες απενεργοποίησης [Villegas *et al.* 2000]. Ο πρώτος μηχανισμός στηρίζεται στην αντίδραση του H_2O_2 με το Compound II, απουσία αναγωγικού υποστρώματος, προς σχηματισμό του Compound III. Εάν το Compound III είναι μια ελεύθερη ρίζα υπεροξυπορφυρινικού σιδήρου(III), θα πρέπει να θεωρείται ως ένα πολύ αντιδραστικό ενδιάμεσο. Λόγω της εγγύτητας του ασύζευκτου ηλεκτρονίου στον πορφυρινικό δακτύλιο, οποιαδήποτε μεταφορά ηλεκτρονίου από την Fe^{2+} κατάσταση σε ένα μόριο H_2O_2 , δημιουργεί μια ρίζα υδροξυλίου ($\cdot\text{OH}$), που με τη σειρά της αντιδρά με την ομάδα της αίμης προς μη αναστρέψιμη απενεργοποίηση της πρωτεΐνης. Εναλλακτικά, ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει την αντίδραση του Compound I με περίσσεια H_2O_2 απουσία αναγωγικού υποστρώματος, προς τον μη αναστρέψιμο σχηματισμό μιας απενεργοποιημένης πράσινης-αιμοπρωτεΐνης (verdohemeprotein). Σε αυτόν το μηχανισμό, το Compound III έχει προταθεί να παίζει ένα προστατευτικό ρόλο ενάντια στην απενεργοποίηση, παράγοντας ανιόντα $\text{O}_2^{\cdot-}$.

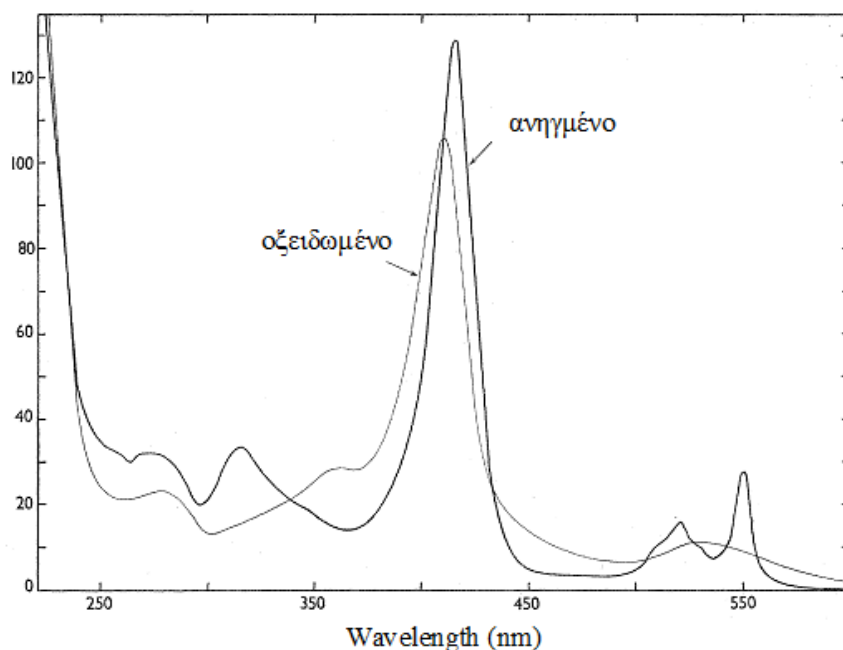
2.1.3. Ρόλος του κυτοχρώματος c στην απόπτωση

Το κυτόχρωμα c αποτελεί ένα ενδιάμεσο στην απόπτωση, μια διεργασία προγραμματισμένου κυτταρικού θανάτου που χρησιμοποιείται για τη θανάτωση κυττάρων κατά την διαδικασία ανάπτυξης, την απόκριση σε λοίμωξη ή τη ζημιά στο DNA [Liu *et al.* 1996]. Το κυτόχρωμα c δεσμεύεται στην καρδιολιπίνη που βρίσκεται στην εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων. Κατά τα αρχικά στάδια της απόπτωσης, διεγείρεται η παραγωγή ελεύθερων ριζών οξυγόνου (reactive oxygen species, ROS) από τα μιτοχόνδρια, και η καρδιολιπίνη οξειδώνεται από τη δράση υπεροξειδάσης του συμπλέγματος καρδιολιπίνης-κυτοχρώματος c. Στη συνέχεια η αιμοπρωτεΐνη αποκολλάται από την εσωτερική μεμβράνη των μιτοχονδρίων και περνάει στο κυτταρόπλασμα μέσω των πόρων της εξωτερικής μεμβράνης [Orrenius & Zhivotovsky 2005].

Η παρατεταμένη αύξηση των επιπέδων του ασβεστίου προηγείται της απελευθέρωσης του κυτοχρώματος c από τα μιτοχόνδρια. Η απελευθέρωση μικρών ποσοτήτων κυτοχρώματος c οδηγεί σε αλληλεπιδράσεις με τον υποδοχέα IP3 (IP3R) στο ενδοπλασματικό δίκτυο προκαλώντας αύξηση της απελευθέρωσης ασβεστίου από το ενδοπλασματικό δίκτυο. Η συνολική αύξηση του ασβεστίου πυροδοτεί μια μαζική απελευθέρωση του κυτοχρώματος c, γεγονός που αποτελεί θετική ανάδραση για τη διατήρηση της απελευθέρωσης του ασβεστίου από τους υποδοχείς IP3 [Boehning *et al.* 2003], αποφεύγοντας έτσι τη συσσώρευση ασβεστίου σε κυτταροτοξικά επίπεδα. Η απελευθέρωση του κυτοχρώματος c στο κυτταρόπλασμα έχει ως αποτέλεσμα τη δέσμευσή του στον υποδοχέα Araf1, ο οποίος με τη σειρά του πυροδοτεί την ενεργοποίηση ενός καταρράκτη κασπασών. Αρχικά ενεργοποιείται η κασπάση 9, μια κυστεϊνοπρωτεάση, η οποία με τη σειρά της ενεργοποιεί τις κασπάσες 3 και 7, οι οποίες είναι υπεύθυνες για την καταστροφή των κυττάρων εκ των έσω.

2.1.4. Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά του κυτοχρώματος c

Οι πρωτεΐνες που διαθέτουν ένα μόριο αίμης στη δομή τους, εμφανίζουν ένα χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης στην ορατή περιοχή, το οποίο δίνει πληροφορίες για το μικροπεριβάλλον της αίμης. Το φάσμα απορρόφησης των κυτοχρωμάτων αποτελείται από τρεις κύριες κορυφές, οι οποίες διαφέρουν αναλόγως με την οξειδωτική κατάσταση της πρωτεΐνης (Εικόνα 2.5): (α) την κύρια κορυφή Soret (350–490 nm), η οποία οφείλεται σε μεταβάσεις $\pi-\pi^*$ και αφορά στην οξειδωτική κατάσταση του σιδήρου της αίμης, και το spin του σιδήρου, (β) την κορυφή Q (520–550 nm), η οποία δίνει πληροφορίες για τον συντονισμό του σιδήρου της αίμης με τους προσδέτες του, και (γ) την κορυφή «μεταφοράς φορτίου» (charge transfer band) (695 nm), η οποία αντικατοπτρίζει τη σταθερότητα του δεσμού Fe-Met80. Αλλαγές σε αυτές τις κορυφές συνεπάγονται αλλαγές στο μικροπεριβάλλον της αίμης της πρωτεΐνης [Miller *et al.* 1996]. Για παράδειγμα, η εξασθένηση της κορυφής μεταφοράς φορτίου οφείλεται στη διάσπαση του δεσμού μεταξύ του σιδήρου και του θείου της Met80.



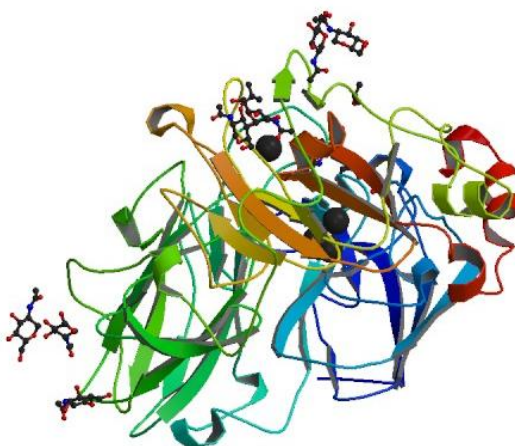
Εικόνα 2.5. Φάσμα απορρόφησης του οξειδωμένου και ανηγμένου κυτοχρώματος c.

Το κυτόχρωμα c παρουσιάζει χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησης και στην περίπτωση της φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού. Το φάσμα κυκλικού διχρωισμού στην περιοχή Soret (350-490 nm) δίνει πληροφορίες για την ακεραιότητα της αίμης. Η οπτική δραστηριότητα στην περιοχή αυτή παράγεται λόγω των αλληλεπιδράσεων που δημιουργούνται μεταξύ των ηλεκτρονιακών μεταβάσεων $\pi-\pi^*$ της αίμης και των ηλεκτρονιακών μεταβάσεων των γειτονικών αρωματικών αμινοξέων της πρωτεΐνης. Το φάσμα του κυτοχρώματος c στη φυσική του διαμόρφωση παρουσιάζει μια αρνητική κορυφή γύρω στα 415-420 nm και μια θετική κορυφή στα 400-410 nm λόγω του φαινομένου Cotton (όπου δημιουργούνται δύο CD γωνίες αντίθετου σήματος που διαχωρίζονται ελαφρώς σε ενέργεια) κυρίως ως αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων της αίμης με την πολυπεπτιδική αλυσίδα της πρωτεΐνης [Ahluwalia *et al.* 2011, Wei & Danielson 2011, Meyer 1985]. Τυχόν μετουσίωση της πρωτεΐνης, έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της αρνητικής κορυφής του φάσματος κυκλικού διχρωισμού, αποτέλεσμα που οφείλεται στη διαταραχή της τριτοταγούς δομής και απώλεια του δεσμού σιδήρου-Met80 [Ahluwalia *et al.* 2011].

2.2. Λακάσες

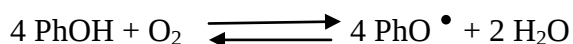
Οι λακάσες (E.C. 1.10.3.2), γνωστές και ως φαινολικές ή μπλε οξειδάσες, είναι τα πιο κοινά μέλη της οικογένειας οξειδασών που περιέχουν πολλαπλά μόρια χαλκού στο ενεργό τους κέντρο (Εικόνα 2.6). Η πρώτη αναφορά για τα ένζυμα αυτά έγινε από τον Yoshida το 1883, στα Ιαπωνικά ρητινοφόρα δέντρα *Rhus vernicifera* [Yoshida 1883] και χαρακτηρίστηκαν ως μεταλλο-οξειδάσες από τον Bertrand το 1985 [Giardina *et al.*, 2010].

Είναι γλυκοπρωτεΐνες που αποτελούνται από 520-550 αμινοξέα και έχουν μέσο μοριακό βάρος 60-70 kDa. Οι κύριες πηγές των ενζύμων αυτών είναι τα ανώτερα φυτά [Gregory & Bendall 1996, Dean & Eriksson 1994], οι μύκητες [Thurston 1994], μερικά βακτήρια [Claus 2003, Alexandre & Zhulin 2000] και κάποια έντομα [Arakane *et al.* 2010, 2005]. Οι βακτηριακές λακάσες παίζουν σημαντικό ρόλο στη μορφογένεση, στη βιοσύνθεση των καφέ χρωμάτων των σπορίων, και στην ομοιόσταση ιόντων χαλκού [Sharma *et al.* 2007, Roberts *et al.* 2002]. Οι περισσότερες βακτηριακές λακάσες απαντώνται ενδοκυττάρια και δεν περιέχουν υδατανθρακική περιοχή στο μόριό τους [Dwivedi *et al.* 2011]. Οι φυτικές λακάσες έχουν ένα πολύ σημαντικό ρόλο στη βιολογική διεργασία πολυμερισμού των συστατικών του κυτταρικού τοιχώματος παρουσία οξυγόνου [Gavnholt & Larsen 2002, Sato *et al.* 2001]. Όλες οι γνωστές φυτικές λακάσες είναι εξωκυττάρια γλυκοπρωτεΐνες. Η λειτουργία των μυκητιακών λακασών είναι η αποδόμηση της λιγνίνης, η μορφογένεση των μυκήτων, η σπορίωση και η παραγωγή χρωστικών ουσιών [Fang *et al.* 2010, Bourbonnais & Paice 1990].



Εικόνα 2.6. Δομή της λακάσης από το μύκητα *Trametes versicolor* (Πηγή: Protein Data Bank, 1GYC).

Οι λακάσες είναι ιδιαίτερα σημαντικές σε βιοτεχνολογικές διεργασίες κυρίως λόγω της ικανότητας βιοαποκατάστασης, χάρη στα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν, όπως η ικανότητα οξείδωσης ενός μεγάλου φάσματος υποστρωμάτων, μη απαίτηση για συμπράγοντες και μη χρήση του άμεσα διαθέσιμου οξυγόνου ως δέκτη ηλεκτρονίων. Οι λακάσες έχουν δραστηριότητα ως προς ορθο- και παρα- διφαινολικές ομάδες. Τα ένζυμα αυτά χαρακτηρίζονται από την ικανότητα να οξειδώνουν ένα μεγάλο εύρος υποστρωμάτων, συμπεριλαμβανομένων των μονο-, δι- και πολύ-φαινολών, αμινοφαινολών, μεθοξυφαινολών και των αρωματικών αμινών [Giardina *et al.*, 2010; Madhavi & Lele 2009]. Η οξείδωση των υδροξυλομάδων των φαινολικών υποστρωμάτων (Ph) προς φαινοξυ-ρίζες (οι οποίες με περεταίρω μη ενζυμικές διεργασίες συντελούν στην αποδόμηση της λιγνίνης) γίνεται σύμφωνα με τη γενική αντίδραση [Widsten & Kandelbayer 2008]:



Η ικανότητα των λακασών να οξειδώνουν ένα μεγάλο εύρος φαινολικών υποστρωμάτων έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση τη χρήσης τους σε διάφορους βιοτεχνολογικούς και βιομηχανικούς τομείς, όπως στη βιομηχανία υφασμάτων και χαρτιού [Morozova *et al.* 2007], στη διαχείριση υδατικών λυμάτων για τον αποχρωματισμό χρωστικών και την αποδόμηση ξενοβιοτικών ουσιών [Jungmanns *et al.* 2005], στη βιομηχανία τροφίμων [Morozova *et al.* 2007], στην ανάπτυξη κυψελών βιοκαυσίμων [Jensen *et al.* 2012] και το σχεδιασμό βιοαισθητήρων για την ανίχνευση φαινολικών και άλλων ενώσεων [Tang *et al.* 2008].

2.2.1. Μηχανισμός δράσης λακάσης

Οι λακάσες περιέχουν στο ενεργό τους κέντρο ένα σύμπλεγμα τεσσάρων ατόμων χαλκού (ένα άτομο χαλκού Τύπου I, ένα άτομο χαλκού Τύπου II και δύο άτομα χαλκού Τύπου III), τα οποία είναι απαραίτητα για την καταλυτική τους δράση [Piontek *et al.* 2002]. Τα άτομα χαλκού κατηγοριοποιούνται σε τρεις ομάδες, σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά που καταγράφηκαν από τη φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (ultraviolet-visible, UV-vis) και τη φασματοσκοπία ηλεκτρονικού παραμαγνητικού συντονισμού (electron paramagnetic resonance, EPR) [Madhavi & Lele 2009, Durán *et al.* 2002]:

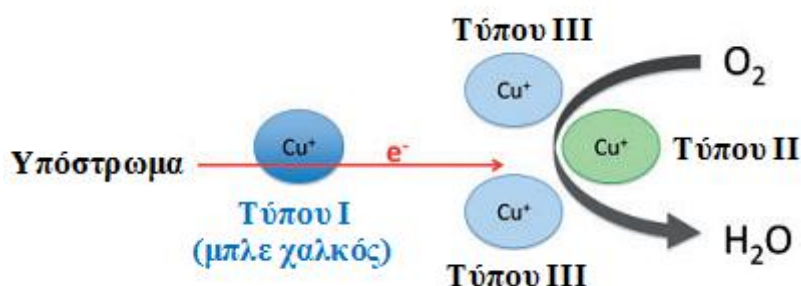
- Χαλκός Τύπου I (T1, συνδεδεμένος με τουλάχιστον ένα κατάλοιπο κυστεΐνης και δυο κατάλοιπα ιστιδίνης): είναι υπεύθυνος για το έντονο μπλε χρώμα που παρουσιάζεται κατά την οξείδωσή του, έχει μια ισχυρή ζώνη απορρόφησης στα ~600 nm, και είναι ανιχνεύσιμος μέσω EPR.
- Χαλκός Τύπου II (T2, προσδεμένος σε δύο κατάλοιπα ιστιδίνης): δεν απορροφά στο φάσμα του ορατού, αλλά έχει ιδιότητες ανιχνεύσιμες μέσω EPR.
- Χαλκός Τύπου III (T3, προσδεμένος σε τρία κατάλοιπα ιστιδίνης): αποτελείται από ένα ζεύγος συζευγμένων ατόμων χαλκού τα οποία χαρακτηρίζονται φασματοσκοπικά από την εμφάνιση μιας ασθενούς ζώνης στα 330 nm (οξειδωμένη μορφή) και από την έλλειψη σήματος EPR.

Ο χαλκός T1 είναι το σημείο όπου λαμβάνει χώρα η οξείδωση του υποστρώματος. Ο καταλυτικός μηχανισμός της λακάσης ξεκινά με τη συνεισφορά ενός ηλεκτρονίου από το μόριο χαλκού T1 στο υπόστρωμα, ακολουθούμενη από μια εσωτερική μεταφορά ηλεκτρονίων από τον ανηγμένο T1 στους χαλκούς T2 και T3. Ο χαλκός T3 λειτουργεί ως δέκτης δύο ηλεκτρονίων στη διεργασία της αερόβιας οξείδωσης, στην οποία είναι απαραίτητη η παρουσία του T2. Η πολυηλεκτρονιακή αναγωγή του οξυγόνου σε νερό λαμβάνει χώρα στο σύμπλεγμα των ατόμων χαλκού T2 και T3 και περνά μέσω ενός ενδιάμεσου υπεροξειδίου.

Περίληπτικά, ο μηχανισμός δράσης της λακάσης αποτελείται από τα εξής στάδια (Εικόνα 2.7):

- Στάδιο I: δέσμευση ενός ανηγμένου υποστρώματος στον T1, μεταφορά ηλεκτρονίου από το υπόστρωμα στον T1 και δημιουργία μιας ρίζας του υποστρώματος που συνδέεται με την αναγωγή του T1 {T1-Cu(II) → T1-Cu(I)}.
- Στάδιο 2: εσωτερική μεταφορά ηλεκτρονίων από τον T1 στο σύμπλεγμα T2/T3.
- Στάδιο 3: δέσμευση του μοριακού οξυγόνου στο σύμπλεγμα T2/T3, μεταφορά ηλεκτρονίων από το σύμπλεγμα T2/T3 στο οξυγόνο και αναγωγή του οξυγόνου σε νερό.

Κατά τη διάρκεια του κάθε καταλυτικού κύκλου, η λακάση συνδυάζει τα τέσσερα ηλεκτρόνια οξείδωσης του αναγωγικού υποστρώματος με τα τέσσερα ηλεκτρόνια της αναγωγικής διάσπασης του οξυγόνου.

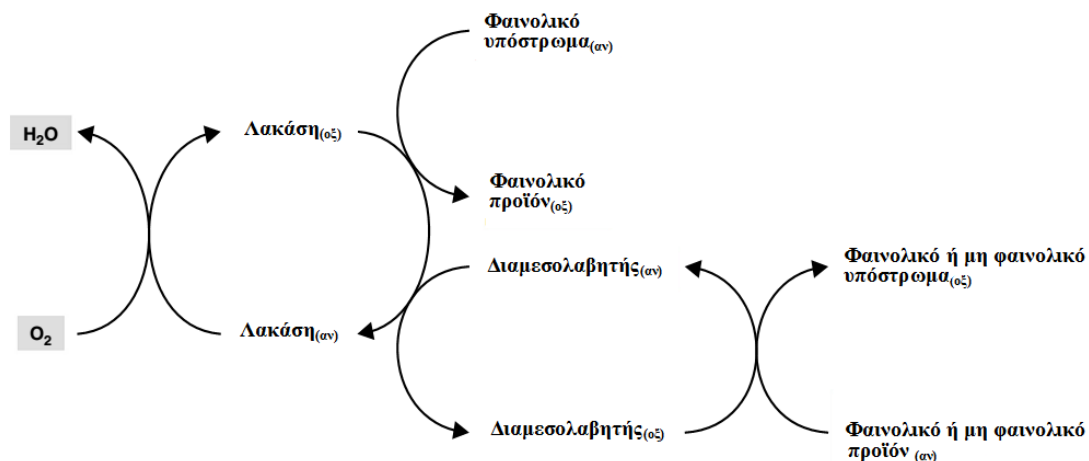


Εικόνα 2.7. Καταλυτικός μηχανισμός της λακάσης.

Έχει αναφερθεί η απομόνωση λακασών που στερούνται τον χαλκού Τύπου Ι, οι οποίες όμως παρουσιάζουν κάποια τυπικά χαρακτηριστικά λακασών, όπως σταθερότητα και βελτιωμένες οξειδωτικές ικανότητες [Litthauer *et al.* 2007, Mansur 2003, Min *et al.* 2001]. Αυτές οι λακάσες καλούνται «κίτρινες» λακάσες.

2.2.2. Το σύστημα λακάσης-διαμεσολαβητή

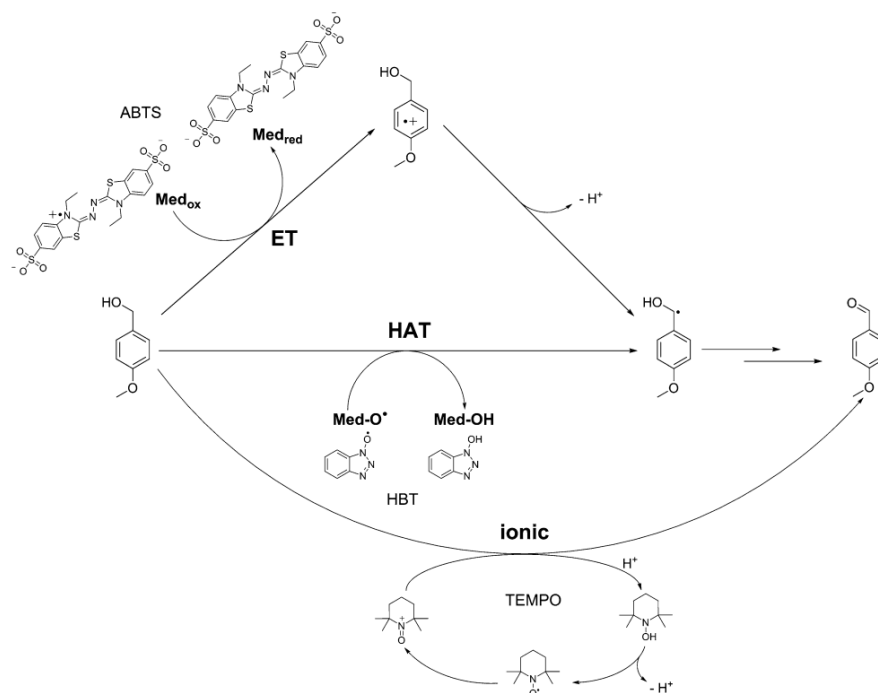
Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι λακάσες έχουν την ιδιότητα να δέχονται ως υποστρώματα ένα μεγάλο εύρος ενώσεων, γεγονός που τις καθιστά εύχρηστες σε πλήθος βιοτεχνολογικών εφαρμογών. Παρόλα αυτά, δεν μπορούν να οξειδώσουν άμεσα μη φαινολικά υποστρώματα ή μεγάλα μόρια με υψηλό οξειδοαναγωγικό δυναμικό [Giardina *et al.* 2010]. Κατάλληλες ενώσεις που καλούνται διαμεσολαβητές μπορούν να δράσουν ως ενδιάμεσα υποστρώματα για τις λακάσες επιτρέποντάς τους να οξειδώσουν έμμεσα μεγάλα βιομόρια και μη φαινολικά υποστρώματα [Bourbonnais *et al.* 1997, Bourbonnais & Paice 1990]. Οι διαμεσολαβητές είναι ενώσεις χαμηλού μοριακού βάρους που περιέχουν συγκεκριμένες λειτουργικές ομάδες (NO, NOH, HRNOH) και μεσολαβούν στη μεταφορά ηλεκτρονίων από το υπόστρωμα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου [Fernandez-Sanchez *et al.* 2002, Johannes & Majcherczyk 2000]. Ο μηχανισμός δράσης της λακάσης παρουσία διαμεσολαβητή συνίσταται στο ότι το ένζυμο οξειδώνει πρώτα το διαμεσολαβητή και στη συνέχεια ο οξειδωμένος διαμεσολαβητής οξειδώνει το υπόστρωμα. Στην Εικόνα 2.8 παρουσιάζεται ο μηχανισμός οξείδωσης διάφορων υποστρωμάτων παρουσία και απουσία διαμεσολαβητών.



Εικόνα 2.8. Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού οξειδωσης των λακασών παρουσία και απουσία διαμεσολαβητή.

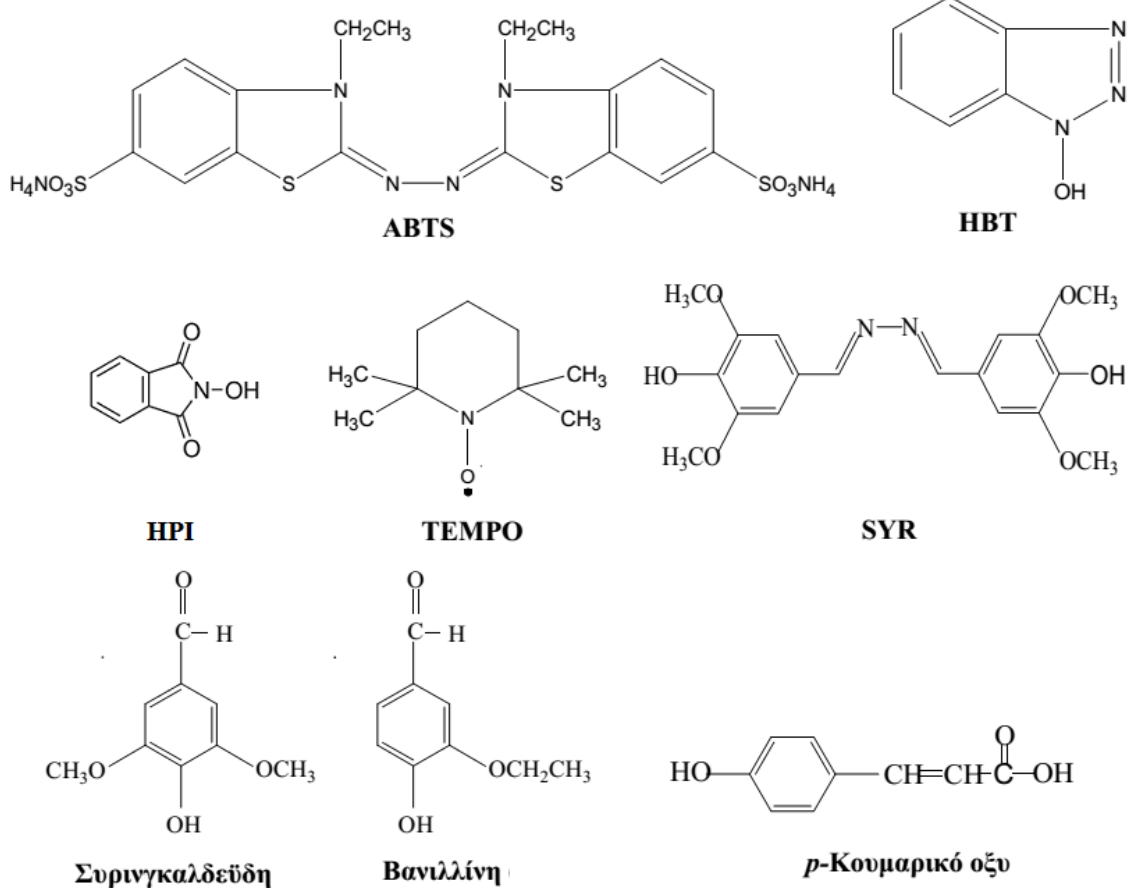
Η πρώτη ένωση που ταυτοποιήθηκε ως διαμεσολαβητής της λακάσης ήταν το ABTS {2,20-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)}. Το 1990 ο Bourbonnais και οι συνεργάτες του έδειξαν για πρώτη φορά ότι κατάλληλοι διαμεσολαβητές μπορούν να βοηθήσουν τη λακάση να οξειδώσει μη φαινολικές ενώσεις και να διασπούν τους δεσμούς C_α-C_β [Bourbonnais *et al.* 1990]. Έκτοτε, τα καλούμενα συστήματα λακάσης-διαμεσολαβητή αποτέλεσαν αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης. Ως διαμεσολαβητές χρησιμοποιούνται διάφορες συνθετικές ενώσεις (Εικόνα 2.9) όπως το ABTS, η υδροξυβενζοτριαζόλη (HBT), η 3,5-διμεθοξυ-4-υδροξυβενζαλδεϋδαζίνη (SYR), η ρίζα του N-οξειδίου της 2,2,6,6-τετραμεθυλοπιπεριδίνης (TEMPO) και το N-υδροξυφθαλιμίδιο (HPI).

Ένας ιδανικός διαμεσολαβητής πρέπει να είναι ένα καλό υπόστρωμα για τη λακάση, με σταθερές οξειδωμένες και ανηγμένες μορφές, και να μην αναστέλλει την ενζυμική της δράση. Επιπλέον, η χρήση διαφορετικών διαμεσολαβητών είναι πιθανό να οδηγήσει σε διαφορετικά τελικά προϊόντα, καθώς η οξείδωση του υποστρώματος λαμβάνει χώρα μέσω διαφορετικών μηχανισμών. Τρεις πιθανοί μηχανισμοί έχουν προταθεί για την οξείδωση μη φαινολικών υποστρώματων και χρησιμοποιούνται επιπλέον για την κατηγοριοποίηση των διαμεσολαβητών. Οι μηχανισμοί αυτοί είναι (Εικόνα 2.9): (α) μεταφορά ηλεκτρονίων (electron transfer, ET), (β) μεταφορά ατόμων υδρογόνου (hydrogen atom transfer, HAT), και (γ) ιοντικός μηχανισμός [Roth & Spiess 2015]. Στην περίπτωση του μηχανισμού μεταφοράς ηλεκτρονίων, ο οξειδωμένος διαμεσολαβητής (π.χ. το ABTS) οξειδώνει υποστρώματα με χαμηλότερο οξειδοαναγωγικό δυναμικό, ενώ στην περίπτωση μεταφοράς ατόμων υδρογόνου (π.χ. HBT) η παρουσία ασθενών δεσμών C-H στο υπόστρωμα είναι απαραίτητη [Giardina *et al.* 2010].



Εικόνα 2.9. Μηχανισμοί δράσης διάφορων διαμεσολαβητών της λακάσης [Roth & Spiess 2015].

Παρά τα πλεονεκτήματα χρήσης των συστημάτων λακάσης-διαμεσολαβητή, η χρήση συνθετικών διαμεσολαβητών, όπως οι παραπάνω, παρουσιάζει κάποια μειονεκτήματα, όπως υψηλό κόστος, οικολογική τοξικότητα, δημιουργία παραπροϊόντων, απομάκρυνση του υποστρώματος από την αντίδραση μέσω ομοιοπολικού δεσμού, και μερικές φορές απενεργοποίηση του ενζύμου [Roth & Spiess 2015]. Για τους λόγους αυτούς, τα τελευταία χρόνια γίνεται προσπάθεια για τη χρήση εναλλακτικών διαμεσολαβητών που θα έχουν χαμηλό κόστος και θα είναι πιο φιλικό προς το περιβάλλον, όπως για παράδειγμα διαμεσολαβητές που παράγονται από μύκητες ή φαινολικές ενώσεις που προέρχονται από την αποικοδόμηση της λιγνίνης. Στην Εικόνα 2.10 παρουσιάζονται διάφοροι συνθετικοί ή φυσικοί διαμεσολαβητές που χρησιμοποιούνται ευρέως.



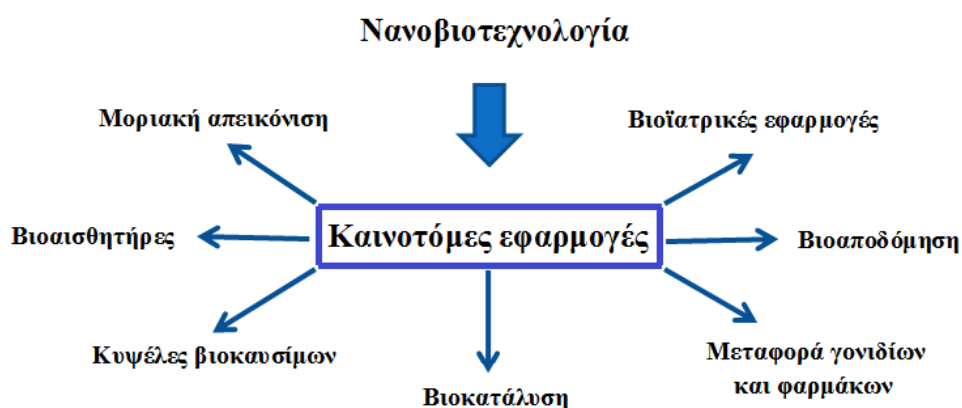
Εικόνα 2.10. Ενδεικτικές δομές συνθετικών (ABTS, HBT, HPI, TEMPO, SYR) και φυσικών (συρινγκαλδεΰδη, βανιλίνη, *p*-κουμαρικό οξύ) διαμεσολαβητών.

3. Νανοβιοτεχνολογία και νανοδομικά υλικά

Η νανοτεχνολογία είναι η επιστήμη που ασχολείται με τη μελέτη και την εφαρμογή υλικών μεγέθους από 1 έως 100 nm [Kuchibhatla *et al.* 2007], τα οποία γι αυτό το λόγο καλούνται και νανοϋλικά. Τα νανοδομικά υλικά μπορούν να ταξινομηθούν στις εξής ευρύτερες κατηγορίες [Ashby *et al.* 2009]:

- νανοσωματίδια (nanoparticles)
- νανοϊνες (nanofibres)
- νανοσωλήνες (nanotubes)
- νανοφίλμς (nanofilms)
- νανομπλοκς (nanoblocks)
- κράματα νανοκρυστάλλων (nanocrystalline alloys)
- νανοςύνθετα (nanocomposites)
- διαλύματα νανοκρυστάλλων (nanocrystalline solids)

Λόγω των εξαιρετικών ηλεκτρονικών, μηχανικών, οπτικών και μαγνητικών ιδιοτήτων που επιδεικνύουν τα νανοδομικά υλικά, έχουν προσελκύσει αυξημένο επιστημονικό ενδιαφέρον και βρίσκουν πολλές εφαρμογές σε διάφορα επιστημονικά πεδία. Τα τελευταία 10 χρόνια οι συνδυαστικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ της νανοτεχνολογίας και της βιοτεχνολογίας έχουν ως αποτέλεσμα τη δημιουργία καινοτόμων λειτουργικών βιολογικών νανοςυστημάτων με πλήθος εφαρμογών (Εικόνα 3.1). Η δημιουργία αποτελεσματικών βιοκαταλυτών μέσω της ακινητοποίησης ενζύμων σε νανοδομικά υλικά με επιθυμητές ιδιότητες, είναι ένα τυπικό παράδειγμα [Verma *et al.* 2013, Ansari & Husain 2012, Ge *et al.* 2012, Kim *et al.* 2008].

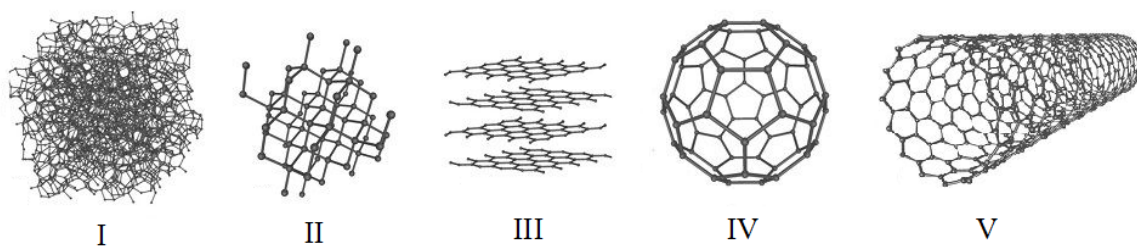


Εικόνα 3.1. Εφαρμογές της νανοβιοτεχνολογίας.

3.1. Νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα

Μία από τις ιδιαίτερες κατηγορίες νανοϋλικών που προσελκύουν σημαντικό ενδιαφέρον για επιστημονικές μελέτες είναι τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα (Carbon-

based nanomaterials, CBNs). Ο άνθρακας είναι από τα πιο μεταβλητά στοιχεία του περιοδικού πίνακα όσον αφορά στον αριθμό, τον τύπο και την ισχύ των δεσμών που μπορεί να συνάψει. Ο άνθρακας μπορεί να υπάρξει σε διάφορες αλλότροπες μορφές: άμορφος άνθρακας, διαμάντι, γραφίτης και φουλερένια [Mostofizadeh *et al.* 2011, Hennrich *et al.* 2006]. Η γεωμετρία των συγκεκριμένων υλικών είναι εντυπωσιακή, καθώς το ίδιο το άτομο μπορεί να δημιουργήσει υλικά που έχουν από 0 έως 3 διαστάσεις. Οι τυπικές δομές των υλικών αυτών παρουσιάζονται στην Εικόνα 3.2.



Εικόνα 3.2. Αλλότροπες μορφές του άνθρακα (I) άμορφος άνθρακας, (II) διαμάντι, (III) γραφίτης, (IV) φουλερένιο (C_{60}) και (V) νανοσωλήνας άνθρακα (ανήκει στα φουλερένια).

Το ενδιαφέρον προς τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα πηγάζει από τις μοναδικές ιδιότητες των συγκεκριμένων νανοϋλικών, καθώς και από το πλήθος εφαρμογών τους. Τα νανοϋλικά αυτά κατέχουν αυξημένη επιφάνεια ανά μονάδα όγκου που αξιοποιείται κατά την ακινητοποίηση βιομορίων στην επιφάνειά τους, εξαιρετική μηχανική σταθερότητα, λόγω των πολύ ισχυρών δεσμών άνθρακα-άνθρακα που σχηματίζουν, ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα, η οποία εξαρτάται από τον υβριδισμό των ατόμων άνθρακα του νανοϋλικού και από τη δομή του, και ιδιαίτερες οπτικές ιδιότητες, αναλόγως του είδους του νανοϋλικού [Cha *et al.* 2013].

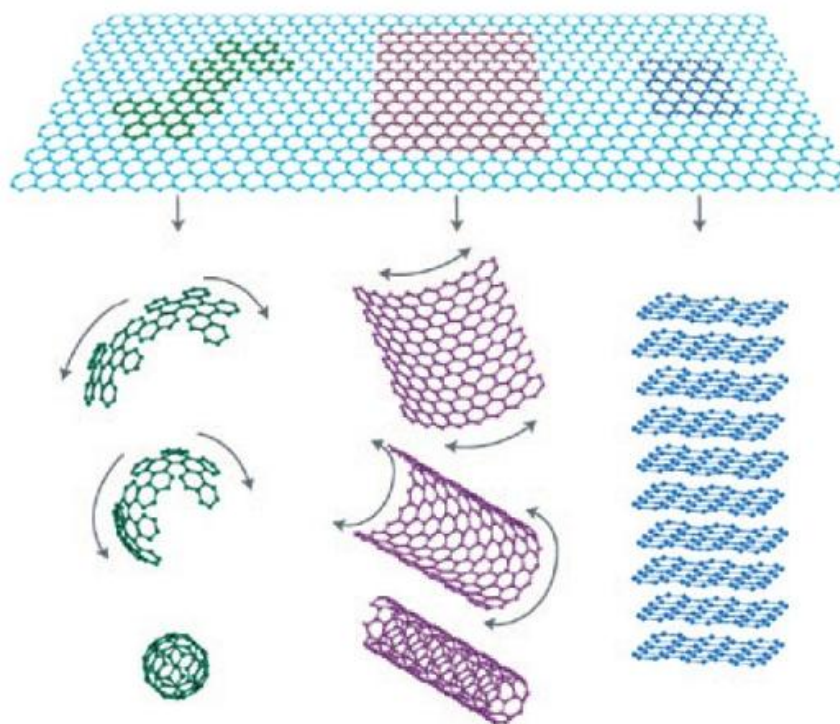
Στην παρούσα διατριβή, για τη μελέτη της κατανόησης των δυνάμεων μεταξύ νανοϋλικών και πρωτεϊνών χρησιμοποιήθηκαν παράγωγα του οξειδίου του γραφενίου και τροποποιημένοι νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος, και στο εξής, η αναφορά σε νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα γίνεται για τις δύο αυτές κατηγορίες νανοϋλικών.

3.1.1. Γραφένιο και οξείδιο του γραφενίου

Το γραφένιο (G) είναι ένα μονοατομικό φύλλο sp^2 -υβριδισμένων ατόμων άνθρακα με πάχος μικρότερο από 1 nm. Ουσιαστικά είναι ένα ενιαίο στρώμα ατόμων άνθρακα που τακτοποιούνται σε ένα εξαγωνικό δικτυωτό πλέγμα, σε μορφή κυψέλης. Η δομή αυτή δίνει την ιδιότητα στο γραφένιο να είναι το ανθεκτικότερο υλικό στη φύση καθώς και το αρχικό υλικό κάποιων αλλότροπων μορφών του άνθρακα, συμπεριλαμβανομένου του γραφίτη, των νανοσωλήνων άνθρακα και των φουλερενίων (Εικόνα 3.3) [Singh *et al.* 2011, Geim & Novoselov 2007].

Ο όρος «γραφένιο» επινοήθηκε το 1962 από τον Hans-Peter Boehm, ως συνδυασμός της ονομασίας του γραφίτη (graphite) με μία κατάληξη -ene, περιγράφοντας έτσι μονοστρωματικά φύλλα άνθρακα [Boehm *et al.* 1994]. Το γραφένιο είναι γνωστό εδώ

και αρκετές δεκαετίες, η δυσκολία όμως της απομόνωσής του δεν άφηνε περιθώρια για την μελέτη των εξαιρετικών του ιδιοτήτων καθώς και την χρήση του σε διάφορες εφαρμογές. Η επιτυχής απομόνωση του γραφενίου έγινε από τους A. Geim και K. Novoselov το 2004, η οποία τους απέφερε και το βραβείο Νόμπελ το 2010 [Geim & Novoselov 2007]. Θεωρητικά, το απομονωμένο φύλλο γραφενίου έχει μια μεγάλη και εύκολα τροποποιήσιμη επιφάνεια, πολύ καλή θερμική και μηχανική σταθερότητα, χημική αδράνεια, και εξαιρετικές ηλεκτρικές ιδιότητες. Γι αυτό το λόγω τα νανοϋλικά που βασίζονται στο γραφένιο αποτελούν ιδανικά συστήματα για εφαρμογές στη βιοτεχνολογία και την ιατρική [Goenka *et al.* 2014, Bitounis *et al.* 2013, Krishna *et al.* 2013, Du *et al.* 2012].

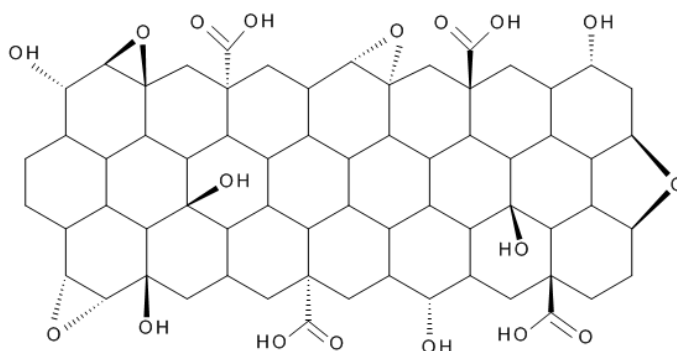


Εικόνα 3.3 Σχηματική απεικόνιση των διάφορων υπερδομών άνθρακα που σχηματίζονται από ένα φύλλο γραφενίου [Geim & Novoselov 2007].

Οι ιδιαίτερες ιδιότητες που παρουσιάζει το γραφένιο, σχετίζονται με το γεγονός ότι είναι μονοστρωματικό. Ωστόσο, η κατασκευή μονοστρωματικού γραφενίου είναι δύσκολη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος, καθώς τα φύλλα του γραφενίου τείνουν να σχηματίζουν συσσωματώματα ή ακόμα και να επανασυσσωρεύονται μέσω αλληλεπιδράσεων π - π και van der Waals για τη δημιουργία γραφίτη, στην περίπτωση που τα φύλλα δεν έχουν διαχωριστεί καλά μεταξύ τους [Shan *et al.* 2009, Li *et al.* 2008]. Αυτό το πρόβλημα μπορεί να ξεπεραστεί μέσω της χημικής τροποποίησης του νανοϋλικού. Η χημική τροποποίηση του γραφενίου είναι μια ευρέως καθιερωμένη τεχνική για την εισαγωγή κατάλληλων λειτουργικών ομάδων στην επιφάνειά του, ώστε να δημιουργηθούν παράγωγα με επιθυμητές ιδιότητες [Dai 2013, Loh *et al.* 2010]. Η χημική σύνθεση της επιφάνειας των τροποποιημένων νανοϋλικών μπορεί να επηρεάσει τη διασπορά τους και την αλληλεπίδρασή τους με άλλα υλικά ή μόρια [Georgakilas *et al.* 2013], ενώ διατηρεί απομονωμένα τα φύλλα του γραφενίου μεταξύ τους. Η τροποποίηση του ίδιου του

γραφενίου είναι γενικά δύσκολη, κυρίως λόγω της μικρής του διαλυτότητας. Ωστόσο έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι για την τροποποίηση της επιφάνειάς του μέσω μη ομοιοπολικών αλληλεπιδράσεων π - π ή μέσω ομοιοπολικών αντιδράσεων σύζευξης C-C [Dai 2013, Loh *et al.* 2010].

Το οξείδιο του γραφενίου (GO) είναι ένα φυλλόμορφο υλικό πλούσιο σε οξυγόνο το οποίο παράγεται από την ισχυρή οξείδωση του γραφίτη, και διακοσμείται με υδροξυλικές, καρβοξυλικές και εποξυ-ομάδες (Εικόνα 3.4) [Lerf *et al.* 1998]. Αυτές οι ομάδες πλούσιες σε οξυγόνο, διανέμονται τυχαία στο βασικό επίπεδο και στις άκρες των φύλλων του GO. Λόγω της παρουσίας αυτών των υδρόφιλων περιοχών, το GO διασπείρεται καλά στο νερό και σε άλλους πολικούς διαλύτες, ενώ κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, το GO μπορεί να αποφυλλοποιηθεί στο νερό σχηματίζοντας κολλοειδή εναιωρήματα μονών φύλλων [Bourlinos *et al.* 2003]. Το GO μπορεί να παραχθεί εύκολα και σε μεγάλες ποσότητες, ενώ ο αριθμός και το είδος των οξυγονούχων ομάδων εξαρτώνται από τη μέθοδο σύνθεσης που χρησιμοποιείται [Gengler *et al.* 2013, Dreyer *et al.* 2010].



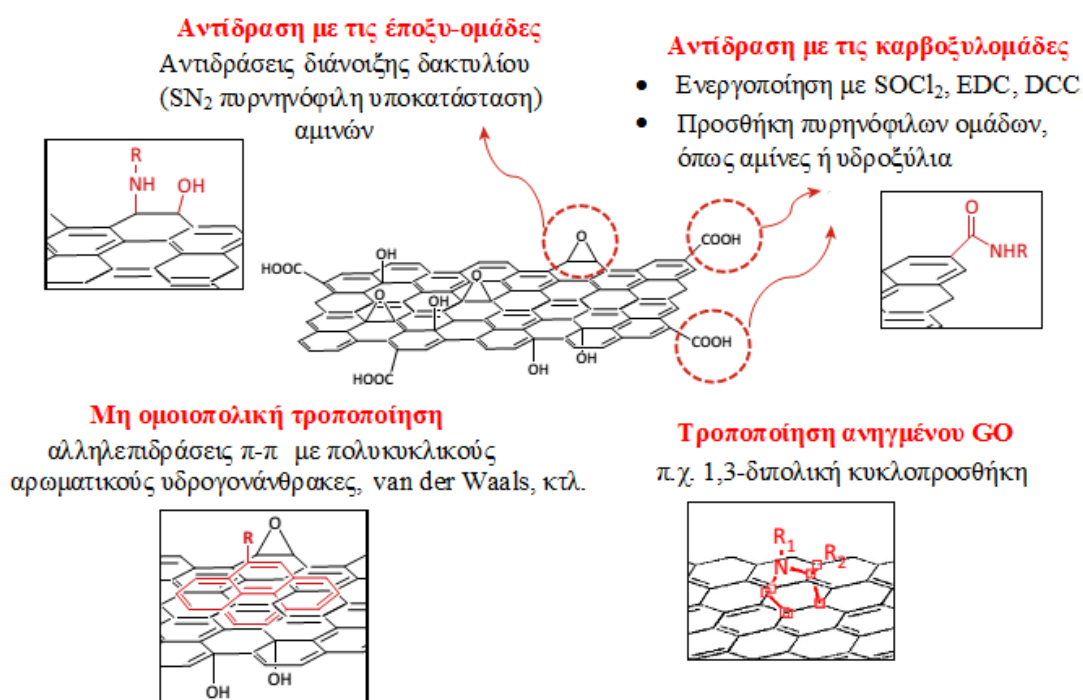
Εικόνα 3.4. Σχηματική αναπαράσταση του οξειδίου του γραφενίου (GO).

Το GO κάτω από αναγωγικές συνθήκες, όπως η θερμική κατεργασία με υψηλή θερμοκρασία και η χημική κατεργασία με αναγωγικούς παράγοντες, χάνει τις οξυγονούχες ομάδες του και μοιάζει με το γραφένιο (Εικόνα 3.5). Το ανηγμένο GO (rGO) επανακτά την αγωγιμότητά του, ενώ η περιεκτικότητά του σε οξυγόνο, το φορτίο της επιφάνειάς του και η διασπορά του στο νερό μειώνονται [Bagri *et al.* 2010]. Η αναγωγή του GO μπορεί να γίνει με διάφορες μεθόδους, όπως για παράδειγμα μέσω χημικής αναγωγής, όπου το GO εκτίθεται σε διάφορες χημικές ουσίες όπως η υδραζίνη. Ανάλογα με τη μέθοδο αναγωγής, καθώς και με το χρόνο επώασης του GO με τον αναγωγικό παράγοντα, μπορεί να επιτευχθεί από μερική έως και ολική απώλεια των ομάδων οξυγόνου που περιέχει το αρχικό νανοϋλικό.



Εικόνα 3.5. Σχηματική αναπαράσταση ενός φύλλου οξειδίου του γραφενίου (GO) πριν και μετά την αναγωγή (rGO).

Η χημική τροποποίηση των νανοϋλικών της οικογένειας του γραφενίου περιλαμβάνει τέσσερις διαφορετικούς τύπους αντιδράσεων (Εικόνα 3.6) [Dreyer *et al.* 2010]: (α) ομοιοπολική σύνδεση στις καρβοξυλικές ομάδες, οι οποίες εντοπίζονται συνήθως στις άκρες των φύλλων του νανοϋλικού, χρησιμοποιώντας πυρηνόφιλες ενώσεις όπως αμίνες ή υδροξυλ-ομάδες, (β) ομοιοπολική σύνδεση στις εποξυ- ομάδες στο κυρίως επίπεδο του φύλλου μέσω αντιδράσεων διένεξης δακτυλίου των αμινών, (γ) μη ομοιοπολική τροποποίηση που περιλαμβάνει αλληλεπιδράσεις van der Waals με πολυμερή, επιφανειοενεργά και άλλα μόρια, ή αλληλεπιδράσεις π-π με παράγωγα πολυαρωματικών υδρογονανθράκων, και (δ) τροποποίηση του ανηγμένου GO (πχ. κυκλοπροσθήκη, διαζωνιακές αντιδράσεις κλπ.).



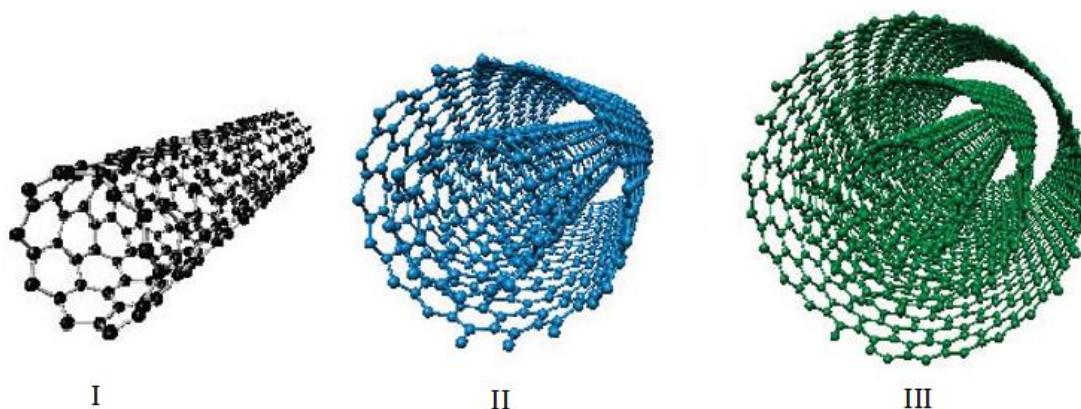
Εικόνα 3.6. Διάφορες προσεγγίσεις για τη χημική τροποποίηση του GO (Συντομογραφίες: DCC, *N,N*-δικυκλοεξυλκαρβοδιιμίδιο, EDC, 1-αιθυλ-3-{3-διμεθυλαμινοπροπυλ}-καρβοδιιμίδιο, SOCl₂, θειούχο διχλωρίδιο) [Pavlidis *et al.* 2014].

3.1.2. Νανοσωλήνες άνθρακα

Οι νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) αποτελούν μια κατηγορία νανοϋλικών που έχουν προσελκύσει σημαντικό ενδιαφέρον λόγω των ηλεκτρικών, μηχανικών, οπτικών και μαγνητικών ιδιοτήτων που παρουσιάζουν [Ajayan & Tour 2007]. Η δομή νανοσωλήνα προσδιορίστηκε για πρώτη φορά από τους Radushkevich και Lukyanovich το 1952, αλλά η ανακάλυψή τους πέρασε απαρατήρητη καθώς το άρθρο ήταν γραμμένο στη ρωσική γλώσσα και δεν υπήρχε δυνατότητα ανάκτησής του από τις περισσότερες χώρες. Λίγο αργότερα νέες εικόνες δομών νανοσωλήνα δημοσιεύτηκαν από τους Oberlin και Endo το 1976 [Oberlin *et al.* 1976]. Παρόλα αυτά, ο ενθουσιασμός για τα νανοϋλικά αυτά ξεκίνησε το 1991 με την ανακάλυψη των νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος από τον Iijima στην Ιαπωνία [Iijima 1991], ενώ λίγο αργότερα ανακαλύφθηκαν και οι νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος [Bethune *et al.* 1993, Iijima & Toshinari 1993].

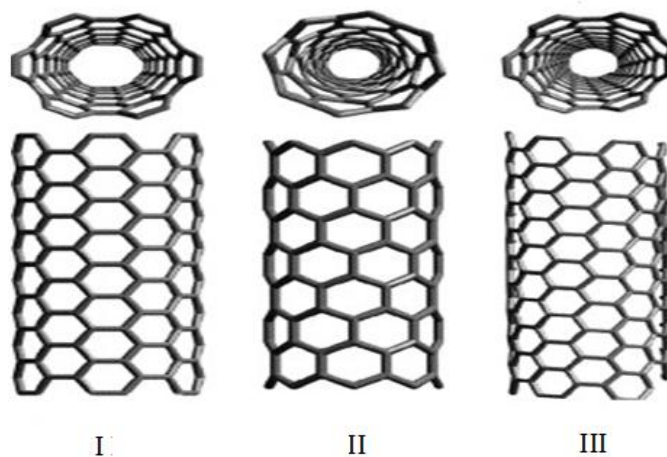
Η δομή των νανοσωλήνων είναι διακριτή σε σχέση με τις γνωστές μορφές ινών (fibers) και νημάτων (filaments) άνθρακα. Στους νανοσωλήνες άνθρακα η σύνδεση των ατόμων του άνθρακα είναι με υβριδοποιημένα τροχιακά sp^2 , με κάθε άτομο να συνδέεται ισοδύναμα με άλλα τρία γειτονικά άτομα όπως στον γραφίτη. Για τον λόγο αυτό οι νανοσωλήνες άνθρακα θα μπορούσαν να θεωρηθούν ως τυλιγμένα φύλλα γραφενίου. Οι CNTs παρασκευάζονται έχοντας διάμετρο έως 100 nm, ενώ μπορούν να επεκταθούν έως και μερικά εκατοστά σε μήκος [Capek 2009]. Οι άκρες τους μπορεί να είναι κλειστές από δομές που μοιάζουν με φουλερένια [Dyke & Tour 2006] ή να είναι ανοιχτές ώστε το εσωτερικό τους να είναι προσβάσιμο σε μικρότερα μόρια [Chamberlain *et al.* 2010, Tasis *et al.* 2006]. Οι νανοσωλήνες άνθρακα συναντώνται σε διάφορα μεγέθη και μορφές, με διαφορετικές ιδιότητες ανάλογα με την αρχιτεκτονική τους. Λαμβάνοντας υπόψη μόνο τον αριθμό των τοιχωμάτων, τους μπορούν να διακριθούν σε τρεις κατηγορίες (Εικόνα 3.7):

- Νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος (single-wall carbon nanotubes, SWCNTs): αποτελούνται από ένα φύλλο γραφενίου τυλιγμένο σε σχήμα κυλίνδρου με διάμετρο 1-3 nm και μήκος 3-50 μm .
- Νανοσωλήνες άνθρακα διπλού τοιχώματος (double-wall carbon nanotubes, DWCNTs): αποτελούνται από δύο ομοαξονικούς γραφιτικούς κυλίνδρους και η εξωτερική διάμετρός τους είναι περίπου 2-3 nm. Στους DWCNTs ο εσωτερικός δακτύλιος μπορεί να διατηρήσει στο ακέραιο τη δομή του, ανεξάρτητα από την χημική τροποποίηση που μπορεί αν υποστεί ο εξωτερικός κύλινδρος.
- Νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος (multi-wall carbon nanotubes, MWCNTs): αποτελούνται συνήθως από 3 έως 30 ομόκεντρα γραφιτικά φύλλα και έχουν εξωτερική διάμετρο 3-50 nm, ανάλογα με τον αριθμό των γραφιτικών φύλλων που διαθέτουν. Η απόσταση μεταξύ των γραφιτικών φύλλων είναι περίπου 0.34 nm. Η απόσταση αυτή ελαττώνεται καθώς αυξάνεται η διάμετρος του κάθε σωλήνα.



Εικόνα 3.7. Νανοσωλήνες άνθρακα (I) μονού, (II) διπλού, και (III) πολλαπλού τοιχώματος.

Στην περίπτωση των SWCNTs, η αναδίπλωση του γραφιτικού φύλλου μπορεί να γίνει με διάφορους τρόπους, όπως για παράδειγμα επάνω στον άξονα συμμετρίας προς παραγωγή δομών ανακλίντρου και ζιγκ-ζαγκ, ή με κατεύθυνση διαφορετική από αυτή του άξονα συμμετρίας προς παραγωγή χειρόμορφων νανοσωλήνων (Εικόνα 3.8) [Mercoci 2006]. Αντίθετα, οι MWCNTs λόγω της γεωμετρίας τους, απαντώνται μόνο σε δομή ανακλίντρου ή άλλη χειρόμορφη δομή [Kuchibhatla *et al.* 2007]. Το αποτέλεσμα της αναδίπλωσης του γραφιτικού φύλλου είναι ιδιαίτερα σημαντικό καθώς η διαφορετική αναδίπλωση μπορεί να κάνει τους παραγόμενους νανοσωλήνες να λειτουργούν ως μέταλλα ή ως ημιαγωγοί.



Εικόνα 3.8. Δομή (I) ανακλίντρου, (II) ζιγκ-ζαγκ, και (III) χειρόμορφοι νανοσωλήνες μονού τοιχώματος.

Οι CNTs, όπως ακριβώς αναφέρθηκε και στην περίπτωση του γραφενίου (Παράγραφος 3.1.1), είναι αρκετά υδρόφοβοι και δεν μπορούν να διαλυτοποιηθούν σε υδατικά συστήματα και σε αρκετά οργανικά μέσα. Η χημική οξείδωση των CNTs εισάγει άτομα οξυγόνου στην επιφάνειά τους με τη μορφή υδροξυλομάδων, καρβοξυλομάδων και εποξυ-ομάδων, τα οποία υποβοηθούν τη διασπορά τους σε υδατικά συστήματα [Asuri *et al.* 2007]. Η διασπορά των CNTs μπορεί επίσης να υποβοηθηθεί με την εισαγωγή

διάφορων υδρόφιλων ενώσεων, όπως για παράδειγμα φαινολικών ομάδων, ώστε να αυξηθεί η διαλυτότητά τους σε πολικούς διαλύτες [Georgakilas *et al.* 2008].

3.2. Ακίνητοποίηση ενζύμων σε νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα

Τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα (CBNs), και πιο συγκεκριμένα τα παράγωγα του γραφενίου και οι νανοσωλήνες άνθρακα, χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιοκατάλυση ως φορείς ακίνητοποίησης ενζύμων, καθώς παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι άλλων νανοϋλικών ή συμβατικών υλικών. Η αυξημένη ενεργή επιφάνειά τους επιτρέπει την ακίνητοποίηση περισσότερων ενζυμικών μορίων, και συνεπάγεται αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα ανά μονάδα βάρους σε σχέση με άλλα συμβατικά υλικά [Asuri *et al.* 2007]. Η χημική σύσταση της επιφάνειάς τους μπορεί να επηρεάσει τις αλληλεπιδράσεις με τα ένζυμα και να επιδράσει στην ακίνητοποίηση όπως και στη διαμόρφωση των ακίνητοποιημένων ενζύμων [Jin *et al.* 2012, Pavlidis *et al.* 2012b]. Τόσο τα παράγωγα του γραφενίου όσο και οι νανοσωλήνες άνθρακα, μπορούν να συντεθούν με τρόπο ώστε να φέρουν επιθυμητές ιδιότητες, όπως συγκεκριμένες διαστάσεις και ομάδες στην επιφάνειά τους (π.χ. μέσω οξείδωσης της επιφάνειας ή χημικής τροποποίησης των οξυγονούχων ομάδων) [Dai 2013, Wang *et al.* 2011]. Διάφορες μέθοδοι ακίνητοποίησης χρησιμοποιούνται για την ακίνητοποίηση ενζύμων σε παράγωγα του γραφενίου και νανοσωλήνες άνθρακα. Μια γενική κατηγοριοποίηση των μεθόδων ακίνητοποίησης μπορεί να γίνει σε τρεις ομάδες: (α) φυσική προσρόφηση (μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση), (β) ομοιοπολική ακίνητοποίηση και (γ) ακίνητοποίηση μέσω αντιδράσεων συγγένειας.

3.2.1. Μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση – Φυσική προσρόφηση

Η μη ειδική σύνδεση μέσω της φυσικής προσρόφησης αποτελεί μια εύκολη διεργασία που αυξάνει την αποτελεσματικότητα της ακίνητοποίησης χωρίς να διαταράσσει την επιφάνεια του νανοϋλικού [Li *et al.* 2013, Mesarič *et al.* 2013]. Η προσέγγιση που ακολουθείται είναι στις περισσότερες ίδια και περιλαμβάνει αρχικά τη διασπορά του νανοϋλικού στο μέσο ακίνητοποίησης (ή την εναπόθεσή του σε ηλεκτρόδιο στην περίπτωση σύνθεσης βιοαισθητήρων), στη συνέχεια την προσθήκη του ενζύμου και επώαση του μίγματος για συγκεκριμένη χρονική περίοδο, και τέλος την ανάκτηση του βιοκαταλύτη (ή του βιοαισθητήρα) μέσω διαδοχικών βημάτων ξεπλύματος. Η χημική σύσταση της επιφάνειας του νανοϋλικού όπως επίσης και η γεωμετρία του, μπορεί να επηρεάσει τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ αυτών και των ενζύμων κατά τη διαδικασία της ακίνητοποίησης. Τα ένζυμα αλληλεπιδρούν με τους νανοσωλήνες άνθρακα και τα παράγωγα του γραφενίου μέσω ηλεκτροστατικών ή van der Waals δυνάμεων, υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων ή αλληλεπιδράσεων π-π, ή το σχηματισμό δεσμών υδρογόνου [Zhang *et al.* 2012; Zhang *et al.* 2010; Gao & Kyrtzizis 2008].

Κατά τη φυσική προσρόφηση, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να αναπτυχθούν μεταξύ των φορτισμένων ομάδων των τροποποιημένων CBNs και του

πρωτεϊνικού μορίου. Σε αυτή την περίπτωση, η απόδοση της ακινητοποίησης εξαρτάται από το φορτίο που φέρουν τα αμινοξικά κατάλοιπα του ενζύμου στην επιφάνειά του, το οποίο εξαρτάται από την τιμή του pH και την ιοντική ισχύ του μέσου στο οποίο γίνεται η ακινητοποίηση. Επομένως, διαφορετικά ένζυμα μπορεί να παρουσιάζουν διαφορετική αποτελεσματικότητα ακινητοποίησης και διαφορετικές καταλυτικές ιδιότητες μετά από ακινητοποίηση στα CBNs [Zhang *et al.* 2013, Azamian *et al.* 2002].

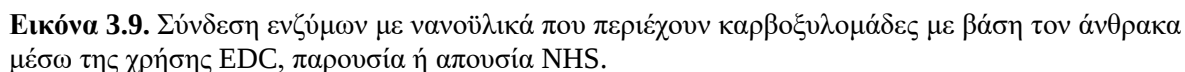
Από την άλλη μεριά, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μεταξύ της υδρόφοβης επιφάνειας του νανοϋλικού και των υδρόφοβων αμινοξέων στην επιφάνεια του ενζύμου, μπορούν επίσης να παίξουν σημαντικό ρόλο κατά τη διαδικασία της μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης (Zhang *et al.* 2012, Gao & Kyratzis 2008). Για παράδειγμα, ο Zhang και οι συνεργάτες του απέδειξαν πειραματικά ότι οι κύριες δυνάμεις που λαμβάνουν χώρα κατά την ακινητοποίηση της υπεροξειδάσης χρένου σε οξείδιο του γραφενίου (GO) και ανηγμένο οξείδιο του γραφενίου (rGO), είναι υδροφοβικής φύσης [Zhang *et al.* 2012]. Παρατηρήθηκε μεγαλύτερη απόδοση ακινητοποίησης (μέχρι και 10 φορές) στην περίπτωση του rGO, που σημαίνει ότι η παρουσία φορτισμένων ομάδων στην επιφάνεια του GO, και άρα η πιθανότητα ανάπτυξης ισχυρών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, δεν επηρεάζει την αποτελεσματικότητα της ακινητοποίησης.

Τέλος, δυνάμεις έλξης (αλληλεπιδράσεις π - π) μπορούν επίσης να δημιουργηθούν κατά τη διαδικασία της φυσικής προσρόφησης μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων της επιφάνειας των νανοϋλικών και των αρωματικών αμινοξέων που εκτίθενται στην επιφάνεια του ενζύμου. Οι τελευταίες εξελίξεις στον τομέα της μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης ενζύμων σε νανοϋλικά, επιζητούν την αύξηση της αποδοτικότητας της διαδικασίας μέσω της διακόσμησης των CBNs με χημικά μόρια, όπως ιόντα ασβεστίου (Cazorla *et al.* 2012), χωρίς να διαταράσσεται η επιφάνεια του νανοϋλικού.

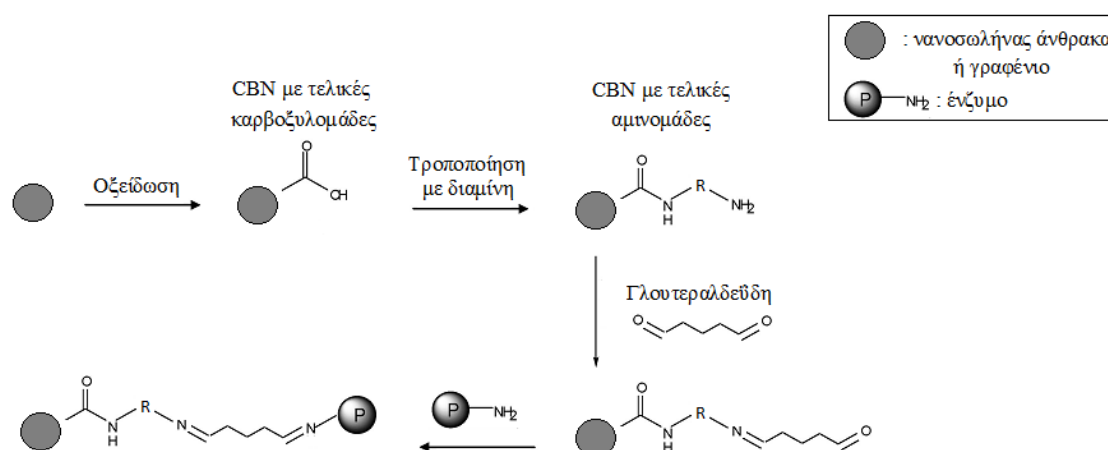
3.2.2. Ομοιοπολική ακινητοποίηση

Η φυσική προσρόφηση των ενζύμων αποτελεί μια ενδιαφέρουσα τεχνική, αλλά αντιπροσωπεύει ένα σχετικά τυχαίο και μη ελεγχόμενο τρόπο ακινητοποίησης. Επιπλέον, καθώς το ένζυμο βρίσκεται σε ισορροπία μεταξύ του φορέα και του διαλύματος, αυξάνεται η πιθανότητα σταδιακής αποκόλλησης των πρωτεϊνικών μορίων από την επιφάνεια του φορέα ακινητοποίησης, φαινόμενο το οποίο καλείται «πρωτεϊνική διαρροή» (protein leakage) [Gao & Kyratzis 2008]. Η ομοιοπολική ακινητοποίηση μπορεί να αποφύγει αυτό το μειονέκτημα μέσω της δημιουργίας ισχυρού ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ των νανοϋλικών και του ενζύμου, οδηγώντας στη δημιουργία ενός ισχυρού νανοβιοκαταλύτη και στην αποφυγή της πρωτεϊνικής διαρροής [Stavyiannoudaki *et al.*, 2009]. Η χημική τροποποίηση των νανοσωλήνων άνθρακα και των παραγώγων του γραφενίου μέσω της προσθήκης διάφορων λειτουργικών ομάδων στην επιφάνειά τους διευκολύνει τη δημιουργία δεσμών μεταξύ των νανοϋλικών και των ενζύμων. Η προσέγγιση αυτή απαιτεί την παρουσία ενός χημικού παράγοντα που δρα ως γέφυρα μεταξύ των τελικών λειτουργικών ομάδων του τροποποιημένου νανοϋλικού και των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων που βρίσκονται στην επιφάνεια του ενζύμου.

Η παραπάνω μέθοδος προϋποθέτει την ύπαρξη ελεύθερων καρβοξυλομάδων στην επιφάνεια του νανοϋλικού. Στην περίπτωση του οξειδίου του γραφενίου, υπάρχει πλήθος καρβοξυλικών ομάδων που δημιουργούνται κατά τη σύνθεση του νανοϋλικού. Αντίθετα, στην περίπτωση των νανοσωλήνων άνθρακα, οι ελεύθερες καρβοξυλομάδες μπορούν να προκύψουν είτε με τη χημική οξείδωση του νανοϋλικού είτε με την περαιτέρω χημική του τροποποίηση πάνω στις οξυγονούχες περιοχές με διάφορες ενώσεις. Ανάλογα, στην περίπτωση του ανηγμένου γραφενίου, αρχικά γίνεται η τροποποίηση του GO με ενώσεις που φέρουν ελεύθερες καρβοξυλομάδες και στη συνέχεια ακολουθεί η αναγωγή του.

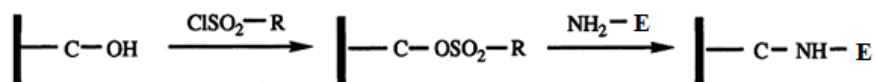


Μια εναλλακτική προσέγγιση στην ομοιοπολική ακινητοποίηση είναι η διασταυρούμενη σύνδεση των ελεύθερων αμινομάδων που υπάρχουν στην επιφάνεια των τροποποιημένων CBNs και των καταλοίπων λυσίνης που βρίσκονται στην επιφάνεια του ενζυμικού μορίου. Η πιο κοινή ένωση για τη διασύνδεση αμινομάδων είναι η γλουτεραλδεΐδη. Κατά τη διαδικασία της διασύνδεσης, οι ελεύθερες αμινομάδες του τροποποιημένου νανοϋλικού ενεργοποιούνται από τη γλουτεραλδεΐδη και στη συνέχεια οι ελεύθερες κετο-ομάδες διασυνδέονται με τις αμινομάδες του ενζύμου μέσω σχηματισμού μιας βάσης Schiff (Εικόνα 3.10). Η ομοιοπολική ακινητοποίηση με τη χρήση γλουτεραλδεΐδης, αν και δεν προτιμάται ιδιαίτερα, έχει εφαρμοστεί κατά την ακινητοποίηση της αλκαλικής πρωτεάσης σε οξείδιο του γραφενίου [Su *et al.* 2012] και της αιμοσφαιρίνης σε υβριδικά νανοϋλικά σιδήρου-οξειδίου του γραφενίου [Zhu *et al.* 2012]. Η εφαρμογή της μεθόδου αυτής προϋποθέτει την ύπαρξη αμινομάδων στην επιφάνεια του νανοϋλικού. Για το λόγο αυτό, τα ήδη οξειδωμένα νανοϋλικά τροποποιούνται με διάφορες διαμίνες ώστε να προκύψουν τροποποιημένα νανοϋλικά που φέρουν ελεύθερες αμινομάδες.



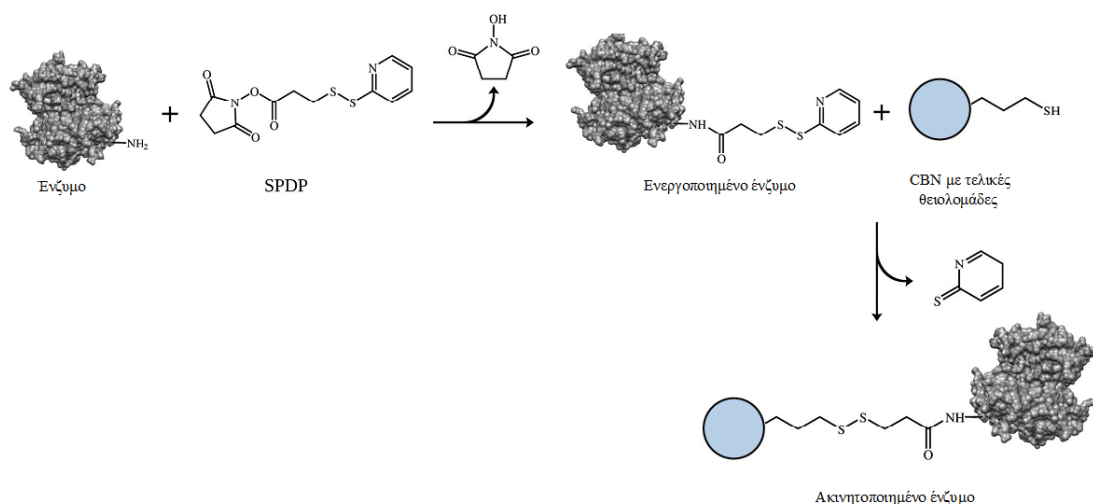
Εικόνα 3.10. Σύνδεση ενζύμων με νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα που περιέχουν αμινομάδες μέσω της χρήσης γλουτεραλδεΐδης.

Όπως στην περίπτωση νανοϋλικών με τελικές καρβοξυλομάδες και αμινομάδες, έτσι και σε άλλες περιπτώσεις νανοϋλικών με διαφορετικού είδους τελικές λειτουργικές ομάδες, έχουν αναπτυχθεί τεχνικές για την ακινητοποίηση πρωτεϊνών. Νανοϋλικά με τελικές υδροξυλομάδες στην επιφάνειά τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς ακινητοποίησης. Στην περίπτωση αυτή, οι υδροξυλομάδες μπορούν να ενεργοποιηθούν με διάφορες ενώσεις όπως για παράδειγμα σουλφονυλ-αλογονίδια, καρβονυλδιιμιδαζόλιο, εποξειδία κ.α. [Drumheller & Hubbell 2000]. Για παράδειγμα, κατά την αντίδραση των υδροξυλομάδων του νανοϋλικού με σουλφονυλ-αλογονίδιο, δημιουργούνται σουλφονικοί εστέρες οι οποίοι κάτω από ήπιες συνθήκες μπορούν να αντικατασταθούν από αμινομάδες ή θειολομάδες στην επιφάνεια του ενζύμου (Εικόνα 3.11).



Εικόνα 3.11. Σύνδεση ενζύμων με νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα που περιέχουν υδροξυλομάδες με τη χρήση σουλφονυλ-αλογονιδίων (E: ένζυμο) [Drumheller & Hubbell 2000].

Νανοϋλικά που περιέχουν στην επιφάνειά τους ελεύθερες θειολομάδες, μπορούν επίσης να χρησιμοποιούν ως φορείς για την ομοιοπολική ακινητοποίηση πρωτεϊνών. Οι θειολομάδες είναι πιο πυρηνόφιλες από τις αμίνες ή της αλκοόλες, και μπορούν να συζευχθούν εκλεκτικά σε βασικά pH. Μια από τις τεχνικές ακινητοποίησης ενζύμων σε νανοϋλικά με τελικές θειολομάδες που χρησιμοποιείται, περιλαμβάνει τη χρήση ομο- ή εταιρο-διλειτουργικών μαλεϊμιδικών «γεφυρών», όπως για παράδειγμα ο *N*-σουκινιμιδυλ 3-(2-πυριδυλθιο) προπιονικός εστέρας {*N*-succinimidyl 3-(2-pyridyldithio) propionate, SPDP}. Κατά τη διεργασία αυτή, οι ελεύθερες αμινομάδες των αμινοξέων της επιφάνειας του βιοκαταλύτη, ενεργοποιούνται αρχικά με ένα μαλεϊμίδιο προς σχηματισμό θειοαιθερικών δεσμών, και στη συνέχεια το ενεργοποιημένο ένζυμο προσδένεται στο νανοϋλικό μέσω του σχηματισμού S-S δεσμών (Εικόνα 3.12).



Εικόνα 3.12. Σύνδεση ενζύμων με νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα μέσω της χρήσης SPDP.

3.2.3. Ακίνητοποίηση μέσω αντιδράσεων συγγένειας

Η ακινητοποίηση μέσω αντιδράσεων συγγένειας, στηρίζεται στην αρχή της συμπληρωματικότητας μεταξύ των βιομορίων, η οποία αποτελεί και το βασικότερο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου [Brenda & Batista-Viera, 2006]. Η ακινητοποίηση μέσω συγγένειας, εκμεταλλεύεται την εκλεκτικότητα συγκεκριμένων αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα σε σχεδόν όλες τις βιολογικές διεργασίες των ζωντανών οργανισμών. Διάφοροι μέθοδοι βασισμένες στην ικανότητα διαφορετικών ενώσεων να δεσμεύονται επιλεκτικά μεταξύ τους έχουν ανακαλυφθεί και εφαρμόζονται σε μεθόδους ακινητοποίησης. Μερικά παραδείγματα τέτοιων περιπτώσεων είναι ένα ειδικό αντίσωμα με το αντιγόνο του, η λεκτίνη με τις ελεύθερες αλυσίδες σακχαριτών ή γλυκοζυλιωμένων

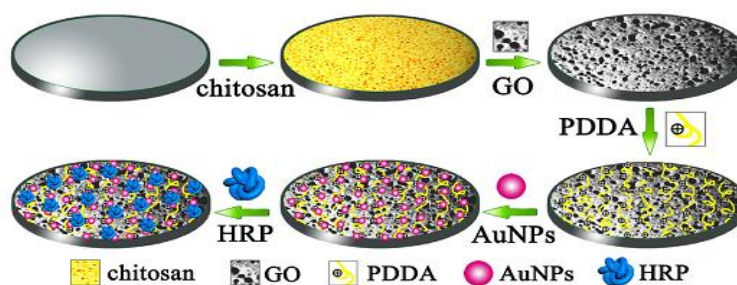
μορίων, τα νουκλεϊκά οξέα με τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν νουκλεϊκά οξέα, οι ορμόνες και οι υποδοχείς τους, η αβιδίνη με τη βιοτίνη και άλλα. Η χρήση της τεχνικής αυτής έχει αναφερθεί σε περιπτώσεις τροποποίησης του οξειδίου του γραφενίου με διάφορα αντισώματα ή πρωτεΐνες για την αναγνώρισή του από αντιγόνα ή νουκλεϊκά οξέα αντίστοιχα [Zhou *et al.* 2012, Wang *et al.* 2010].

4. Εφαρμογές ακινητοποιημένων ενζύμων σε νανοδομικά υλικά

4.1. Βιοτεχνολογικές εφαρμογές

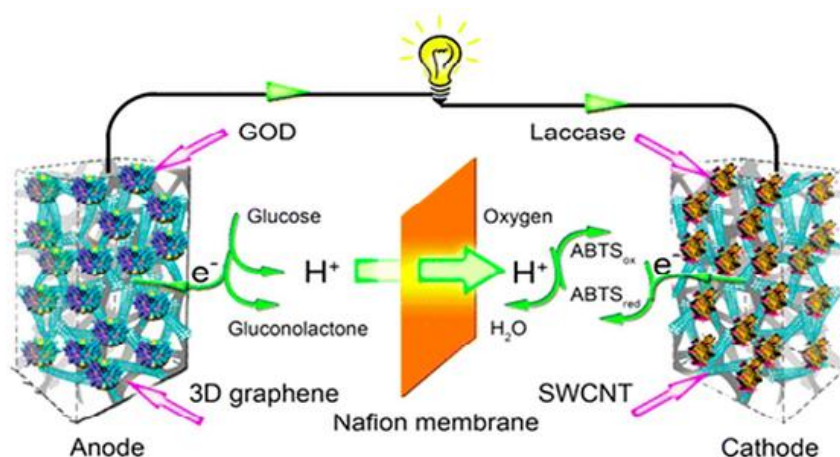
Η χρήση των νανοϋλικών με βάση των άνθρακα ως φορείς για την ακινητοποίηση ενζύμων προσφέρει τη δυνατότητα χειρισμού του μικροπεριβάλλοντος ενός ενζύμου, αυξάνοντας τη σταθερότητα και καταλυτική του ενεργότητα, ενισχύοντας τη φόρτωση του ενζύμου στο νανοϋλικό, βελτιώνοντας τη μεταφορά ηλεκτρονίων, και εισάγοντας λειτουργίες που ενισχύουν τη δράση των ακινητοποιημένων ενζύμων [Pavlidis *et al.* 2014]. Για αυτό το λόγο αναμένεται ότι η χρήση νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων με τη χρήση νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα, μπορεί να διευρύνει τις εφαρμογές των ακινητοποιημένων ενζύμων.

Η πιο συχνή εφαρμογή των ακινητοποιημένων ενζύμων σε νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα είναι η ανάπτυξη βιοαισθητήρων (biosensors). Ο βιοαισθητήρας μπορεί να περιγραφεί ως μια συσκευή που μετατρέπει βιολογικά σήματα σε αναλυτικά. Αποτελείται από ένα εξαιρετικά επιλεκτικό και ευαίσθητο βιολογικό στοιχείο, όπως το ένζυμο, στενά συνδεδεμένο με ένα φυσικοχημικό μετατροπέα ο οποίος μετατρέπει τη βιολογική διαδικασία αναγνώρισης μεταξύ του υποδοχέα και της αναλυόμενης ουσίας σε μετρήσιμο σήμα (Εικόνα 4.1) [Le Goff *et al.* 2011]. Λόγω της αγωγιμότητας και της καλής ηλεκτρονιακής συμπεριφοράς που παρουσιάζουν το οξείδιο του γραφενίου, οι νανοσωλήνες άνθρακα και τα παράγωγά τους, καθίσταται εφικτή η μεταφορά ηλεκτρονίων από ένα οξειδοαναγωγικό ένζυμο σε ένα ηλεκτρόδιο, ειδικά όταν το ενεργό κέντρο του ενζύμου βρίσκεται κοντά στην επιφάνεια του νανοϋλικού [Agúí *et al.* 2008]. Πολυάριθμοι βιοαισθητήρες με βάση τα CBNs έχουν αναπτυχθεί ευρέως, χρησιμοποιώντας διάφορα ένζυμα και πρωτεΐνες, όπως οξειδάση της γλυκόζης, υπεροξειδάση χρένου, ακετυλοχολινεστεράση, κυτόχρωμα c, τυροσινάση κ.ά. Οι βιοαισθητήρες αυτοί χρησιμοποιούνται για την ηλεκτροχημική ανίχνευση ποικίλων ενώσεων όπως γλυκόζη, H_2O_2 , O_2 , φαινολικών ρύπων, αιθανόλη, NADH κ.ά. Η σύνθεση βιοαισθητήρων με καλή λειτουργική σταθερότητα και αποθήκευση, όπως και υψηλή ευαισθησία, εκλεκτικότητα και επαναληψιμότητα, αποτελεί το αντικείμενο πολλών εργασιών ανασκόπησης που έχουν δημοσιευθεί τα τελευταία χρόνια [Tran & Mulchandani 2016, Yang *et al.* 2015, Walcarius *et al.* 2013, Zhu *et al.* 2012, Kuila *et al.* 2011].



Εικόνα 4.1. Σχηματική απεικόνιση για την κατασκευή ενός ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα (PDDA: πολύ-διαλλυδιμεθυλαμμόνιο χλωρίδιο, HRP: υπεροξειδάση χρένου, AuNPs: νανοσωματίδια χρυσού) [Yu *et al.* 2015].

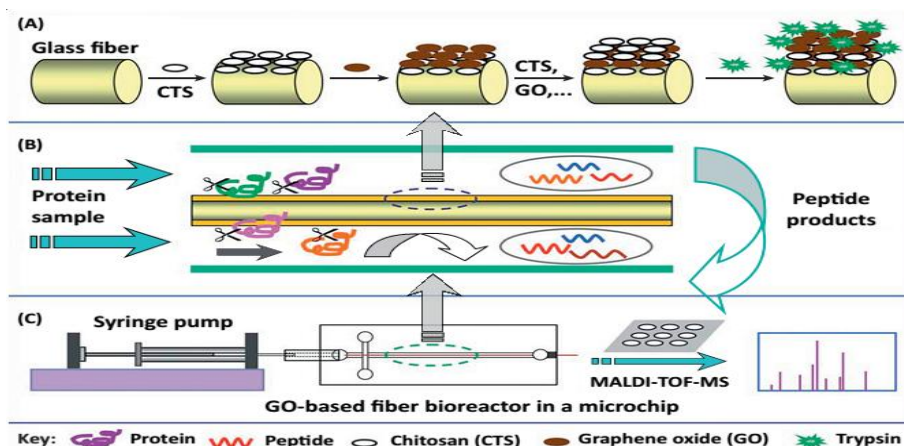
Μια ιδιαίτερη και πολλά υποσχόμενη εφαρμογή που βρίσκουν τα ακινητοποιημένα ένζυμα σε CBNs είναι η ανάπτυξη κυψελών βιοκαυσίμων (biofuel cells). Οι κυψέλες βιοκαυσίμων που βασίζονται σε ένζυμα (enzyme-based biofuel cells, EBFCs) είναι συσκευές ικανές να μετατρέπουν άμεσα τη χημική σε ηλεκτρική ενέργεια [Willner *et al.* 2009; Minteer *et al.* 2007]. Οι EBFCs χρησιμοποιούν φορείς ενέργειας που προέρχονται από βιομάζα, όπως η γλυκόζη, η φρουκτόζη, η αιθανόλη και το πετρέλαιο για την παραγωγή ηλεκτρικής ενέργειας μέσω ηλεκτροχημικών αντιδράσεων που καταλύονται από ένζυμα (Εικόνα 4.2). Διάφορα οξειδοαναγωγικά ένζυμα χρησιμοποιούνται για την οξείδωση των καυσίμων στην άνοδο μιας κυψέλης βιοκαυσίμου, ώστε να παραχθούν πρωτόνια και ηλεκτρόνια. Στην κάθοδο, οξειδάσες χρησιμοποιούνται για να καταλύσουν την αντίδραση οξείδωσης ενός μορίου (συνήθως οξυγόνου), χρησιμοποιώντας τα παραχθέντα πρωτόνια και ηλεκτρόνια, για την παραγωγή νερού. Η καλή αγωγιμότητα και η μεγάλη επιφάνεια των CNTs και GO, συμβάλλουν στην αύξηση της ισχύος των βιοκυψελών. Οξειδοαναγωγικά ένζυμα όπως η οξειδάση της γλυκόζης και η αλκοολική αφυδρογονάση, όσο και οξειδάσες, όπως η λακάση και η οξειδάση της χολερυθρίνης, ακινητοποιημένα σε νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα, χρησιμοποιούνται ευρέως για τη σύνθεση της ανόδου και της καθόδου, αντίστοιχα, των ενζυμικών κυψελών βιοκαυσίμων [Chen *et al.* 2015, Tepeli & Anik 2015, Cosnier *et al.* 2014, Minteer *et al.* 2012].



Εικόνα 4.2. Σχηματική αναπαράσταση της διαμόρφωσης μια κυψέλης βιοκαυσίμων όπου στην άνοδο είναι ακινητοποιημένη η οξειδάση της γλυκόζης (GOD) στο γραφένιο και στην κάθοδο είναι ακινητοποιημένη η λακάση στους νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος [Prasad *et al.* 2014].

Ένα από τα πιο σημαντικά καθήκοντα της «bottom-up» πρωτεωμικής ανάλυσης είναι η ανάπτυξη αποτελεσματικών, γρήγορων, ανακυκλώσιμων και αυτοματοποιημένων συστημάτων πέψης πρωτεϊνών [Kim *et al.* 2010]. Διάφορα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα έχουν χρησιμοποιηθεί για την *in situ* πέψη πρωτεϊνών με τη χρήση θρυψίνης, όπου η μετουσίωση και η ауτόλυση του ακινητοποιημένου ενζύμου ελαχιστοποιείται [Jiao *et al.* 2013, Jiang *et al.* 2012]. Επιπλέον, έχουν αναπτυχθεί αρκετοί μικροβιοαντιδραστήρες με βάση το γραφένιο για την πέψη και τη χαρτογράφηση πεπτιδίων [Jiao *et al.* 2013, Jiang *et al.* 2012, Bao *et al.* 2011]. Οι μικροβιοαντιδραστήρες αυτοί χρησιμοποιούνται για τη γρήγορη πέψη και ταυτοποίηση αρκετών πρότυπων

πρωτεϊνών (Εικόνα 4.3). Τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα, και ιδιαίτερα τα νανοϋλικά της οικογένειας του γραφενίου, λόγω της μεγάλης επιφάνειάς τους, την υψηλή υδροφιλικότητά τους και την εξαιρετική ικανότητά τους να απορροφούν μικροκύματα, αποτελούν υποσχόμενους φορείς για την ακινητοποίηση πρωτεασών και την περαιτέρω χρήση στην πρωτεόλυση.



Εικόνα 4.3. Σχηματική αναπαράσταση της ακινητοποίησης της θρυψίνης και τη χρήση της σε μικρής ροής πρωτεόλυση. (Α) πολυστρωματική διαμόρφωση οξειδίου του γραφενίου (GO)-χιτοζάνης (CTS) για την ακινητοποίηση της θρυψίνης. (Β) Ο μικροβιοαντιδραστήρας. (C) η διαδικασία της πρωτεϊνικής πέψης και χαρτογράφηση πεπτιδίων [Bao *et al.* 2011].

Όσον αφορά στον τομέα της βιοκατάλυσης, πλήθος ενζύμων έχουν ακινητοποιηθεί σε νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα και χρησιμοποιηθεί σε διάφορες βιοκαταλυτικές διεργασίες. Οι μοναδικές μηχανικές και ηλεκτροχημικές τους ιδιότητες, μαζί με την ποικιλία των λειτουργικών ομάδων που μπορούν να προστεθούν στην επιφάνειά τους, καθιστά τα νανοϋλικά αυτά κατάλληλους φορείς ακινητοποίησης. Λιπάσες απομονωμένες από διάφορους μικροοργανισμούς έχουν ακινητοποιηθεί επιτυχώς τόσο σε νανοσωλήνες άνθρακα όσο και σε παράγωγα οξειδίου του γραφενίου, και έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση εστέρων σε διάφορα μη συμβατικά μέσα [Marzuki *et al.* 2015, Mohamad *et al.* 2015, Vrutika & Datta 2015, Lau *et al.* 2014, Pavlidis *et al.* 2012b], καθώς και για την παραγωγή βιοκαυσίμων [Bencze *et al.* 2016]. Διάφορα άλλα ακινητοποιημένα υδρολυτικά ένζυμα, όπως η αλκαλική πρωτεάση και η κυτταρινάση, χρησιμοποιούνται στη διαχείριση υδατικών λυμάτων [Su *et al.* 2012] και την υδρόλυση της κυτταρίνης [Brinchi *et al.* 2013, Gokhale *et al.* 2013] με πολύ καλή αποδοτικότητα. Επιπλέον, πολλά είδη οξειδοαναγωγικών ενζύμων έχουν ακινητοποιηθεί σε νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα και βρίσκουν εφαρμογή κυρίως στην αποδόμηση ρύπων με περιβαλλοντολογικό ενδιαφέρον. Για παράδειγμα, η ακινητοποιημένη λακάση και υπεροξειδάση χρένου σε παράγωγα του GO, χρησιμοποιούνται για την απομάκρυνση φαινολικών ενώσεων, όπως η διφαινόλη και η κατεχόλη [Chang *et al.* 2015, Pang *et al.* 2015, Huang *et al.* 2014], ενώ η ακινητοποιημένη οξυγονάση σε CNTs έχει χρησιμοποιηθεί για την αποδόμηση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων [Suma *et al.* 2016].

Στον Πίνακα 4.1. παρουσιάζονται ενδεικτικά μερικές από τις πιο ενδιαφέρουσες εφαρμογές ενζύμων ακινητοποιημένων σε νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα.

Πίνακας 4.1. Εφαρμογές ενζύμων ακινητοποιημένων σε νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα.

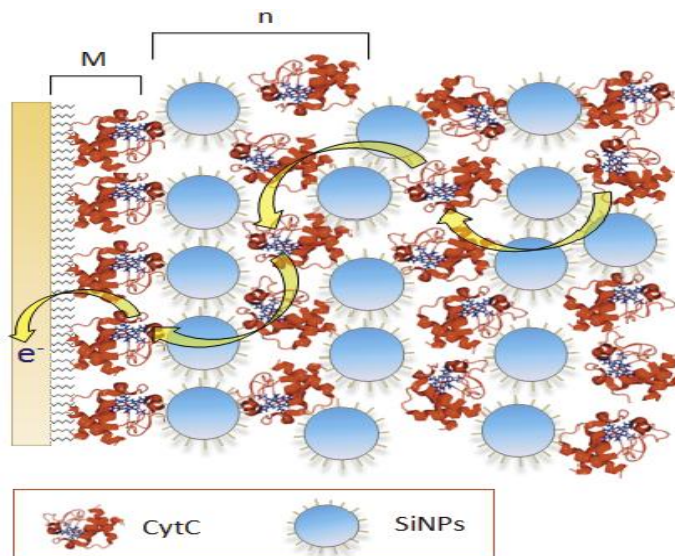
Ένζυμο	Νανοϋλικό	Εφαρμογή	Αναφορά
Ακετυλοχολινεστεράση	CNTs	Ανίχνευση οργανοφωσφορικών φυτοφαρμάκων	[Yu et al. 2015]
Λυσοζύμη	CNTs, GO	Επεξεργασία υδατικών λυμάτων	[Smith et al. 2014]
Λιπάση	CNTs, GO	Βιοκατάλυση	[Deep et al. 2015]
	CNTs	Παραγωγή βιοντίζελ	[Bencze et al. 2016]
Υπεροξειδάση χρένου	G	Ανίχνευση H ₂ O ₂	[Zhou et al. 2016]
Οξυγονάση	CNTs	Βιοκατάλυση	[Suma et al. 2016]
Αμυλάση	CNTs	Βιοκατάλυση	[Sekar et al. 2016]
Αλκοολική αφυδρογονάση	CNTs, GO	Ανίχνευση NADH	[Wang et al. 2013]
β-Γαλακτοσιδάση	GO	Βιοκατάλυση	[Kishore et al., 2012]
Οξειδάση της χοληστερόλης	G	Ανίχνευση χοληστερόλης	[Li et al. 2015]
Λακάση	CNTs	Απομάκρυνση φαρμάκων	[Xu et al. 2015]
	rGO	Ανίχνευση φαινολικών ενώσεων	[Mei et al. 2015]
	CNTs	Κυψέλες βιοκαυσίμων	[Prasad et al. 2014]
Λιποξυγονάση	GO	Ανίχνευση μη εστεροποιημένων λιπαρών οξέων	[Veerapandian et al. 2016]
Οξειδάση της γλυκόζης	G	Κυψέλες βιοκαυσίμων	[Song et al. 2015]
		Ανίχνευση γλυκόζης	[De et al. 2015]
Θρυψίνη	GO	Πρωτεόλυση	[Bao et al. 2013]
Λυάση	CNTs	Βιοκατάλυση	[Bartha-Vári et al. 2015]
Τυροσινάση	G, CNTs	Ανίχνευση φαινολικών ενώσεων	[Wu et al. 2012]
Κυτόχρωμα c	GO	Ανίχνευση γλυκοζίτη	[Bathinapatla et al. 2016]
Κυτταρινάση	GO	Υδρόλυση κυτταρίνης	[Li et al. 2015]

4.2. Σχηματισμός πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών ενζύμου-νανοϋλικού

Η σύνθεση νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων μέσω της ακινητοποίησης ενζύμων σε νανοδομικά υλικά αποτελεί ένα τομέα συνεχώς εξελισσόμενο, όπου η ανάπτυξη καινοτόμων μεθόδων για τον κατάλληλο σχεδιασμό βιοκαταλυτών με επιθυμητές ιδιότητες, κρίνεται απαραίτητη. Συνεχώς αναπτύσσονται νέες μέθοδοι ακινητοποίησης με σκοπό τη διατήρηση τόσο των καταλυτικών χαρακτηριστικών των ακινητοποιημένων ενζύμων, όσο και της δομής τους.

Μία ενδιαφέρουσα προσέγγιση προς αυτή τη σκοπιά, αποτελεί η ακινητοποίηση ενζύμων σε πολυστρωματικά συστήματα μέσω της τεχνικής εναπόθεσης «layer-by-layer» (LbL) [Lisdar *et al.* 2009, Dronov *et al.* 2007, Riklin & Willner 1995]. Η βασική αρχή της LbL μεθόδου είναι η αλληλοδιάδοχη εναπόθεση πολυκατιόντων και πολυανιόντων μέσω ελκτικών δυνάμεων, όπως μέσω ανάπτυξης ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων ή δεσμών υδρογόνου, για τη δημιουργία πολυστρωματικών φιλμς. Η κατασκευή πολυσύνθετων φιλμς μέσω της LbL τεχνικής σκοπεύει στη νανοσκοπική διάταξη μέχρι και εκατοντάδων διαφορετικών υλικών σε μία συσκευή, χρησιμοποιώντας τεχνικές φιλικές ως προς το περιβάλλον και με χαμηλό κόστος. Μέχρι πρόσφατα, οι LbL προσεγγίσεις έχουν τραβήξει ιδιαίτερη προσοχή λόγω της ευελιξίας της εύκολης προσαρμογής του μεγέθους, της σύστασης, του πάχους, της σταθερότητας και της τροποποίησης της επιφάνειας των νανοδομών που προκύπτουν [Lee *et al.* 2005].

Αρκετές μελέτες έχουν δημοσιευτεί σχετικά με τη χρήση της LbL μεθόδου για εφαρμογή σε βιοαισθητήρες, ανοσοαισθητήρες και άλλες ηλεκτροχημικές συσκευές [Crespilho *et al.* 2005]. Επιπλέον, έχει ήδη αναφερθεί η ακινητοποίηση διάφορων ενζύμων σε πολυστρωματικές δομές υποστρωμάτων [Zhang *et al.* 2015, Liu *et al.* 2013, Ariga *et al.* 2010, Gu *et al.* 2009, Crespilho *et al.* 2006, Zheng *et al.* 2004]. Σε όλες τις περιπτώσεις, τα ένζυμα ακινητοποιούνται μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων με τα συστατικά του φορέα ακινητοποίησης. Στις περισσότερες από τις παραπάνω περιπτώσεις, η πολυστρωματική διάταξη αναφέρεται μόνο στα συστατικά του φορέα ακινητοποίησης του ενζύμου, ο οποίος μπορεί να αποτελείται από αρκετά στρώματα διαφορετικών ουσιών, ενώ σε κάποιες περιπτώσεις, παρατηρείται διαδοχική προσθήκη φορέα-ενζύμου, ενώ κοινό στοιχείο όλων των περιπτώσεων είναι η αρχική εναπόθεση του φορέα σε μια στερεή επιφάνεια. Ένα παράδειγμα πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών πρωτεΐνης-νανοϋλικού με βάση την τεχνική LbL παρουσιάζεται στην Εικόνα 4.4.



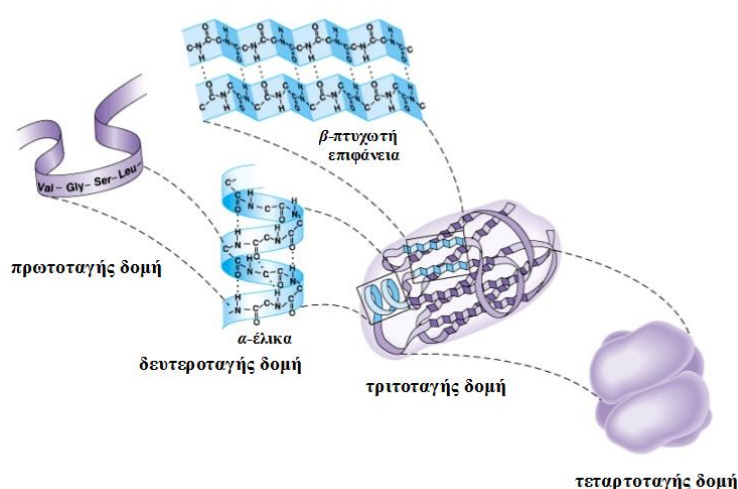
Εικόνα 4.4. Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών κυτοχρώματος c (CytC) – νανοσωματιδίων πυριτίου (SiNPs), σε ένα μονοστρωματικό ηλεκτρόδιο (M), με n διαδοχικά στρώματα. Τα βέλη απεικονίζουν την μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ του κυτοχρώματος c και του ηλεκτροδίου [Feifel & Lisdat 2011].

Με πρότυπο την τεχνική LbL, αναπτύχθηκε για πρώτη φορά, και παρουσιάζεται στην παρούσα διατριβή, η σύνθεση νανοβιοκαλυτών που προκύπτουν από την διαδοχική εναπόθεση νανοϋλικού-ενζύμου μέσω πολλαπλών βημάτων ομοιοπολικής ακινητοποίησης. Η συγκεκριμένη μέθοδος, διαφέρει από την κοινή LbL στο ότι δεν προϋποθέτει τη παρουσία κάποιου στερεού υλικού για την εναπόθεση των πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών, και στη μέθοδο ακινητοποίησης του ενζύμου. Η πειραματική πορεία της μεθόδου αυτής παρουσιάζεται στην Παράγραφο 7.2.4. Η τεχνική αυτή δίνει τη δυνατότητα ανάπτυξης νανοβιοκαταλυτών με επιθυμητό αριθμό εναλλασσόμενων στρωμάτων νανοϋλικού-ενζύμου, ενώ είναι δυνατή η χρησιμοποίηση διαφορετικών ή ίδιων νανοϋλικών με διαφορετικές λειτουργικές ομάδες κατά την εναπόθεση στρωμάτων νανοϋλικού. Τέλος, τέτοιες δομές μπορούν να προκύψουν μέσω της ακινητοποίησης διαφορετικών ενζύμων σε κάθε στρώμα, με αποτέλεσμα τη χρήση τους σε αλυσιδωτές αντιδράσεις, όπου το προϊόν του ενός ενζύμου αποτελεί υπόστρωμα για το δεύτερο ένζυμο (cascade reactions), ή όπου ο προσδιορισμός της δραστηρότητας του ενός ενζύμου προϋποθέτει την παρουσία του άλλου.

5. Δομή ακινητοποιημένων ενζύμων σε νανοδομικά υλικά

5.1. Δομή πρωτεϊνών

Τα ένζυμα είναι βιοπολυμερή, συνήθως πρωτεϊνικής φύσης, τα οποία επιδεικνύουν καταλυτική δράση λόγω της οργανωμένης δομής τους. Η διατήρηση της δομής του είναι εξαιρετικά σημαντική καθώς αλλαγές στη δομή των ενζύμων μπορούν να επιφέρουν αλλαγές στην καταλυτική τους συμπεριφορά μέχρι και την πλήρη απώλεια της ενεργότητάς τους. Για αυτό το λόγο, η σχέση δομής-λεοτουργίας των ενζύμων είναι ένας παράγοντας που απασχολεί ιδιαίτερα κατά το σχεδιασμό νέων βιοκαταλυτών. Τα ένζυμα ως πρωτεΐνες έχουν το χαρακτηριστικό ότι είναι γραμμικά πολυμερή δομούμενα από μονομερή L-αμινοξέων, και μπορούν να οργανωθούν σε διάφορα επίπεδα (Εικόνα 5.1).



Εικόνα 5.1. Οργάνωση της δομής των πρωτεϊνών.

Η αναδίπλωση και η τελική φυσική δομή των πρωτεϊνών εξαρτώνται και καθορίζονται αυτόνομα από την αμινοξική αλληλουχία μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης και από το φυσικό περιβάλλον στο οποίο είναι διαλυμένη. Όλες οι πρωτεΐνες οργανώνονται σε διάφορα επίπεδα. Η πρωτοταγής δομή των πρωτεϊνών ορίζεται από την αλληλουχία των αμινοξέων που αποτελούν την πολυπεπτιδική αλυσίδα. Η δευτεροταγής δομή περιλαμβάνει διάφορα στοιχεία όπως α -έλικα, β -πτυχωτή επιφάνεια (ή β -φύλλα), β -στροφή και Ω -στροφή, τα οποία προκύπτουν από τοπικές διευθετήσεις αμινοξέων στο χώρο οι οποίες σταθεροποιούνται από δεσμούς υδρογόνου μεταξύ γειτονικών αμινοξικών καταλοίπων. Η τριτοταγής δομή της πρωτεΐνης είναι το αποτέλεσμα της διαδρομής που ακολουθεί η πολυπεπτιδική αλυσίδα στο χώρο. Τέλος, στην περίπτωση πρωτεϊνών με περισσότερες από μια πολυπεπτιδικές αλυσίδες (υπομονάδες) παρατηρείται η τεταρτοταγής δομή, που αναφέρεται στη χωροδιάταξη των υπομονάδων και τα είδη των αλληλεπιδράσεων που εμφανίζονται.

5.2. Τεχνικές χαρακτηρισμού νανοδομικών υλικών και ακινητοποιημένων ενζύμων σε νανοδομικά υλικά

Η μελέτη της μορφολογίας και της χημικής σύστασης τόσο του νανοϋλικού όσο και του ακινητοποιημένου ενζύμου σε νανοϋλικά, προσδίδει μια πρώτη εικόνα για το αποτέλεσμα της ακινητοποίησης. Ο μορφολογικός χαρακτηρισμός του ακινητοποιημένου ενζύμου μπορεί να γίνει με τη χρήση διάφορων μεθόδων, όπως για παράδειγμα με τη χρήση μικροσκοπίας ατομικών δυνάμεων και της φασματοσκοπίας Raman, ενώ σημαντικές πληροφορίες για τη σύσταση του ακινητοποιημένου ενζύμου μπορούν να διεξαχθούν μέσω τεχνικών όπως η θερμική ανάλυση και η φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων Χ.

5.2.1. Μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων (AFM)

Το μικροσκόπιο ατομικών δυνάμεων (atomic force microscopy, AFM) ανήκει στην οικογένεια των μικροσκοπίων σάρωσης ακίδας. Σκοπός αυτών των μικροσκοπίων είναι η μελέτη της επιφάνειας των υλικών σε κλίμακα $\mu\text{m}-\text{\AA}$. Το AFM λειτουργεί στηριζόμενο στη σάρωση που εκτελεί μια μικρή κεραμική, ή από ημιαγώγιμο υλικό, ακίδα, με παρόμοιο τρόπο όπως η βελόνα του πικάπ που σαρώνει ένα δίσκο βινυλίου. Η αιχμή της ακίδας τοποθετείται στην άκρη ενός μοχλοβραχίονα (πρόβολος) που μπορεί να ταλαντεύεται ενώ είναι στερεωμένος στο άλλο άκρο. Οι κύριες τεχνικές σάρωσης που χρησιμοποιούνται είναι η στατική μέθοδος (συνεχούς επαφής), δυναμικές μέθοδοι (περιοδικής επαφής και μη επαφής) και η τεχνική ελαφρών χτυπημάτων.

Αρχικά η ακίδα σαρώνει το δείγμα, ενώ λόγω των ανωμαλιών στην επιφάνεια, ασκούνται διαφορετικές δυνάμεις (van der Waals, ηλεκτροστατικές, μαγνητικές κ.α.) που αναγκάζουν τον πρόβολο, που είναι φτιαγμένος από πυρίτιο ή νιτρίδιο του πυριτίου, να λυγίσει. Λόγω αυτής της κάμψης του προβόλου από το σύνολο των δυνάμεων που δέχεται η ακίδα, η δέσμη laser που προσπίπτει πάνω σε αυτόν, εκτρέπεται και η ανάκλασή της, ανιχνεύεται από τη φωτοδίοδο και καταγράφεται υπό τη μορφή τάσης. Με αυτόν τον τρόπο καταγράφεται η κίνηση της ακίδας η οποία είναι άμεσα σχετιζόμενη με τη μορφολογία της επιφάνειας που μελετάται. Καθώς η παραπάνω συλλεγόμενη τάση οδηγείται σε έναν ελεγκτή, αυτός επικοινωνεί με το σαρωτή ώστε να μετακινηθεί κάθετα και να αποκατασταθεί η δύναμη ακίδας – επιφάνειας. Τα δεδομένα της μετατόπισης κατά z για δεδομένη θέση x, y συλλέγονται από έναν H/Y και έτσι καταγράφεται η τοπολογία της εκάστοτε επιφάνειας.

Η χρήση της AFM παρουσιάζει πολύ σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως ο σχεδιασμός εικόνας τριών διαστάσεων, η μεγάλη ανάλυση στις εικόνες, η δυνατότητα μελέτης μη αγωγικών υλικών, και λειτουργεί σε υδάτινο περιβάλλον, ενώ κάποια από τα μειονεκτήματα αυτής της τεχνικής είναι η μικρή σε μέγεθος εικόνα ανάλυσης, η μικρή ταχύτητα σάρωσης, η ευαισθησία της διάταξης σε δονήσεις και η πιθανότητα καταστροφής του δείγματος κατά τη συνεχή σάρωση. Για αυτούς τους λόγους, η μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων αποτελεί μια από τις πιο διαδεδομένες τεχνικές για τη

μορφολογική μελέτη και χαρακτηρισμό τόσο νανοδομικών υλικών [Wang *et al.* 2014, Shao *et al.* 2013] όσο και ακινητοποιημένων ενζύμων σε αυτά [Pang *et al.* 2015, Zhang *et al.* 2014, Pattammattel *et al.* 2013, Yang *et al.* 2013].

5.2.2. Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS)

Η φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων-X (X-ray photoelectron spectroscopy, XPS) είναι μια μη καταστρεπτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τη χημική ανάλυση και την ταυτοποίηση της χημικής κατάστασης των στοιχείων που βρίσκονται στην επιφάνεια ενός στερεού δείγματος. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ενεργειακή ανάλυση των ηλεκτρονίων, που εξάγονται κυρίως από εσωτερικές ηλεκτρονιακές στάθμες των ατόμων του στερεού, όταν αυτό εκτίθεται σε ακτίνες-X συγκεκριμένης ενέργειας. Στη φασματοσκοπία XPS το δείγμα εκτίθεται, υπό συνθήκες υπερυψηλού κενού, σε μία μονοχρωματική δέσμη ακτίνων X που προκαλεί φωτοϊόντισμό και εκπομπή φωτοηλεκτρονίων. Το φάσμα XPS απεικονίζει το ενεργειακό φάσμα των εκπεμπόμενων φωτοηλεκτρονίων και αποτελείται από μία σειρά από διακριτές ταινίες που ανταποκρίνονται στις χαρακτηριστικές στοιβάδες της ηλεκτρονικής δομής του ατόμου. Η ενέργεια δέσμευσης των φωτοηλεκτρονίων προσδιορίζεται μέσω της εξίσωσης:

$$E_k = h\nu - E_b + \Delta\Phi$$

όπου E_k είναι η κινητική ενέργεια των φωτοηλεκτρονίων, h η σταθερά του Planck, ν η συχνότητα της ακτινοβολίας, E_b η ενέργεια δέσμευσης του φωτοηλεκτρονίου που προέρχεται από εσωτερική στοιβάδα, και $\Delta\Phi$ η διαφορά του έργου εξόδου ανάμεσα στο στερεό και τον ανιχνευτή.

Κάθε στοιχείο παρουσιάζει διαφορετική ενέργεια δέσμευσης, γεγονός που έχει ως αποτέλεσμα τη χρήση της XPS για την ανίχνευση διαφορετικών στοιχείων σε μια επιφάνεια. Στον Πίνακα 5.1 παρουσιάζονται οι ενέργειες δέσμευσης του πυρήνα διάφορων στοιχείων και των δεσμών που σχηματίζουν. Με την τεχνική αυτή είναι δυνατός ο ποσοτικός προσδιορισμός της συγκέντρωσης του κάθε στοιχείου στην επιφάνεια του δείγματος. Επιπλέον, οι μικρές μετατοπίσεις στην ενέργεια δέσμευσης (χημικές μετατοπίσεις) παρέχουν πληροφορίες για τη χημική σύνθεση του δείγματος.

Πίνακας 5.1. Ενέργεια δέσμευσης διάφορων στοιχείων.

Στοιχείο	Δεσμός	Ενέργεια δέσμευσης (eV)
C1s	C-C, C-H	284.8
	C-N	286.0
	C-OH	286.5
	C-O-C	286.5
	O-C=O	288.5
	C-Cl	286.5
	C-F	287.8
	C=O	288.0
	C-Si	282.9
N1s	N-H ₂ (αμίνη)	399.3
	N-C	399.5
	N-H, NH ₂ (αμίδιο)	399.7
O1s	O-Fe	530.4
	O=C	532.0
	O-Si	532.2

Η XPS χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό νανοδομικών υλικών, καθώς και για τον προσδιορισμό μορίων στην επιφάνεια στερεών φορέων (όπως νανοϋλικά) μετά την ακινητοποίηση κάποιου βιομορίου, π.χ. ενζύμου [Pavlidis *et al.* 2012b, Li *et al.* 2013, Serefoglou *et al.* 2008, Shi *et al.* 2007].

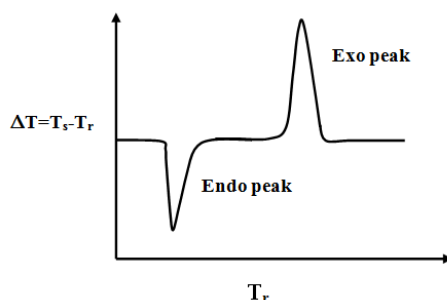
5.2.3. Θερμική ανάλυση (TGA/DTA)

Ο όρος «θερμική ανάλυση» είναι γενικός και αναφέρεται σε μία ομάδα τεχνικών με τις οποίες μετρείται κάποια φυσική ιδιότητα μιας ουσίας ή των προϊόντων αντίδρασης της ως συνάρτηση της θερμοκρασίας, όταν η τελευταία μεταβάλλεται κατά ένα προγραμματισμένο τρόπο. Υπάρχουν περισσότερες από δώδεκα θερμικές μέθοδοι, οι οποίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς τις παραμέτρους που μετράνε και τον τρόπο προγραμματισμού της θερμοκρασίας. Δύο από τις κύριες τεχνικές της θερμικής ανάλυσης είναι η θερμοβαρυτική ανάλυση (TGA) και η διαφορική θερμική ανάλυση (DTA).

Η θερμοβαρυτική ανάλυση (TGA) στηρίζεται στη μέτρηση της μάζας ενός δείγματος καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία σε ελεγχόμενο περιβάλλον. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται α) για την μελέτη της σταθερότητας και της θερμικής διάσπασης των υλικών, καθώς αυτά θερμαίνονται κάτω από διάφορες συνθήκες, και β) για την μελέτη της κινητικής των φυσικοχημικών δράσεων κατά την θερμική καταπόνηση ενός δείγματος. Με την τεχνική αυτή μπορεί να προκύψουν συμπεράσματα για την θερμοκρασία και τον χρόνο (σε ισοθερμοκρασιακή καταπόνηση) πραγματοποίησης μιας χημικής αντίδρασης (ποιοτική μελέτη) και τις ποσότητες των σωμάτων που αντέδρασαν (ποσοτικός προσδιορισμός).

Η διαφορική θερμική ανάλυση (DTA) στηρίζεται στην παρακολούθηση της διαφοράς θερμοκρασίας μεταξύ της ουσίας και ενός υλικού αναφοράς ως συνάρτηση της θερμοκρασίας, ενώ τόσο το δείγμα όσο και η ουσία υποβάλλονται σε ένα ελεγχόμενο θερμοκρασιακό πρόγραμμα. Πιο συγκεκριμένα, τόσο το εξεταζόμενο δείγμα όσο και το δείγμα αναφοράς υπόκεινται σε ένα ελεγχόμενο πρόγραμμα θέρμανσης ή ψύξης, το οποίο είναι συνήθως γραμμικό σε σχέση με το χρόνο. Αρχικά, υπάρχει μια μηδενική θερμοκρασιακή διαφορά μεταξύ δείγματος και υλικού αναφοράς, εφόσον το δείγμα δεν υπόκειται σε κάποια φυσική ή χημική μεταβολή. Εάν ωστόσο λαμβάνει χώρα οποιαδήποτε διεργασία, τότε ανάμεσα στο δείγμα και το υλικό αναφοράς αναπτύσσεται μια θερμοκρασιακή διαφορά (ΔT).

Κατά τη διάρκεια μίας ενδόθερμης μεταβολής, όταν δηλαδή το δείγμα τήκεται ή αφυδατώνεται, η θερμοκρασία του δείγματος είναι κατώτερη από αυτήν του υλικού αναφοράς. Αυτή η κατάσταση είναι μεταβατική, διότι με την ολοκλήρωση της διεργασίας το δείγμα αποκτά εκ νέου μηδενική θερμοκρασιακή διαφορά, συγκρινόμενο με το υλικό αναφοράς. Έστω ότι μία ενδόθερμη διεργασία λαμβάνει χώρα στον χώρο S (όπου ισχύει $\Delta H > 0$, όπως στην τήξη). Κατά την διάρκεια του φαινομένου αυτού, η θερμοκρασία του δείγματος T_s εμφανίζεται μικρότερη από αυτήν της αναφοράς T_r , η οποία ακολουθεί την προγραμματισμένη θέρμανση. Εάν η διαφορά θερμοκρασίας $\Delta T = T_s - T_r$ καταγραφεί συναρτήσει του T_r , λαμβάνεται καμπύλη όμοια με αυτή της Εικόνας 5.2.



Εικόνα 5.2. Τυπική καμπύλη του DTA.

Η θερμική ανάλυση έχει χρησιμοποιηθεί ως εργαλείο για τη μελέτη νανοδομικών υλικών όταν υφίστανται μεταβολή της κατάστασής τους, αλλά και για τον χαρακτηρισμό τους όταν σε αυτά έχουν ακινητοποιηθεί ένζυμα [Carja et al. 2009, Yapar et al. 2009, Serefoglou et al. 2008].

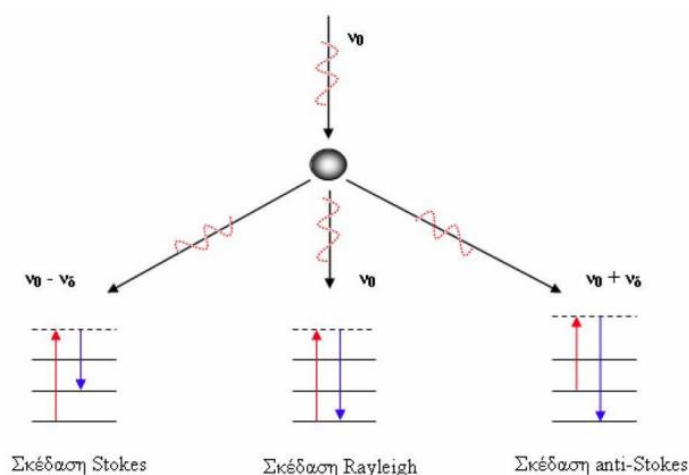
5.2.4. Φασματοσκοπία Raman

Η φασματοσκοπία Raman μελετά το φαινόμενο της μεταβολής της συχνότητας, όταν το φως σκεδάζεται από μόρια. Το μέγεθος της μεταβολής αυτής αναφέρεται ως συχνότητα Raman και το σύνολο των χαρακτηριστικών συχνοτήτων ενός σκεδάζοντος μορίου αποτελούν το φάσμα Raman του μορίου αυτού.

Τα άτομα ή τα μόρια εκπέμπουν φως το οποίο αναφέρεται ως πρωτογενής ακτινοβολία. Εάν φωτιστούν ισχυρά επάγουν ακτινοβολία που ονομάζεται δευτερογενής

και η οποία χωρίζεται σε δύο είδη, το φθορισμό και τη σκέδαση φωτός από μόρια ή άτομα. Όταν φωτόνια προσκρούουν σε άτομα ή μόρια, το μεγαλύτερο μέρος των φωτονίων δεν αλληλεπιδρά με τα σωματίδια, παρά μόνο ένα μικρό ποσοστό αλληλεπιδρά ελαστικά. Η συχνότητα της σκεδαζόμενης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας παραμένει αμετάβλητη. Η ελαστικώς σκεδαζόμενη ακτινοβολία δίνει τη σκέδαση Rayleigh. Ο μικρός αριθμός φωτονίων που σκεδάζεται κατά τρόπο μη ελαστικό και η ακτινοβολία αυτή δίνει τη σκέδαση Raman. Λόγω της μη ελαστικώς σκεδαζόμενης ακτινοβολίας το μόριο μεταβαίνει κβαντικά σε υψηλότερη ενεργειακή στάθμη. Όταν το μόριο υφίσταται κβαντισμένη μετάβαση σε κάποιο υψηλότερο ενεργειακό επίπεδο, το φωτόνιο χάνει ενέργεια και σκεδάζεται με χαμηλότερη συχνότητα ($\Delta\nu$ αρνητικό). Αν το μόριο βρίσκεται ήδη σε κάποια ενεργειακή κατάσταση υψηλότερη της θεμελιώδους, η συνάντησή με ένα φωτόνιο μπορεί να προκαλέσει την αποδιέγερσή του, οπότε το φωτόνιο σκεδάζεται με υψηλότερη συχνότητα ($\Delta\nu$ θετικό). Η μορφή του φάσματος στην πλευρά όπου η συχνότητα είναι χαμηλότερη από αυτή του διεγείροντος φωτός ($\Delta\nu$ αρνητικό – γραμμές Stokes) αποτελεί το κατοπτρικό είδωλο της μορφής του φάσματος που κείται στην άλλη πλευρά της γραμμής Rayleigh ($\Delta\nu$ θετικό – γραμμές anti-Stokes), με τη διαφορά ότι οι εντάσεις των λαμβανόμενων κορυφών για αρνητικό $\Delta\nu$ είναι μεγαλύτερες από ότι για θετικό (Εικόνα 5.3).

Οι μετατοπίσεις Raman είναι ισοδύναμες των ενεργειακών μεταβολών που συνοδεύουν τις μεταπτώσεις του σκεδαζόντος μορίου, ανεξάρτητες της συχνότητας της διεγείρουσας ακτινοβολίας και χαρακτηριστικές του μορίου που σκεδάζει. Έτσι, κάθε χημικό μόριο δίνει το δικό του χαρακτηριστικό φάσμα δονήσεων Raman, το οποίο μπορεί εύκολα να χρησιμοποιηθεί για τον ποιοτικό του προσδιορισμό, καθώς γενικά το φάσμα ενός μορίου επηρεάζεται ελάχιστα από την ανάμιξή του με άλλα μόρια. Λόγω του πλεονεκτήματος αυτού, η φασματοσκοπία Raman χρησιμοποιείται ευρέως για τον χαρακτηρισμό νανοϋλικών καθώς και ακινητοποιημένων ενζύμων σε νανοϋλικά [Gupta & Irihamye 2015].



Εικόνα 5.3. Σχηματική απεικόνιση του φαινομένου Raman.

5.3. Τεχνικές μελέτης δευτεροταγούς δομής ενζύμων

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται κατά κόρον για την ανάλυση της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών είναι η κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ, ενώ η δομή ορισμένων πρωτεϊνών έχει αναλυθεί με τη μέθοδο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Παρά το γεγονός ότι αυτές οι τεχνικές έχουν υψηλή ακρίβεια, δεν μπορούν να προσφέρουν αξιόλογες πληροφορίες στις περιπτώσεις όπου τα ένζυμα μπορεί να βρεθούν σε ένα περιβάλλον διαφορετικό του φυσικού τους (υδατικό διάλυμα), ή ακόμα και να ακινητοποιηθούν. Για αυτό το λόγο διάφορες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί για τη μελέτη της δομής πρωτεϊνών. Από τις πιο σημαντικές τεχνικές είναι αυτές που βασίζονται στην αλληλεπίδραση του φωτός με τις πρωτεΐνες. Η οπτική φασματοσκοπία περιλαμβάνει την ακτινοβολία του δείγματος με ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και μέτρηση κάποιας φασματικής ιδιότητας, π.χ. απορρόφηση, η οποία παρέχει πληροφορίες για τη δομή των πρωτεϊνών [van Mierlo *et al.* 2000]. Οι φασματοσκοπικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται ευρέως είναι η φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους, η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού και η φασματοσκοπία υπερύθρου, οι οποίες ανιχνεύουν αλλαγές στη δομή τόσο σε δευτεροταγές επίπεδο όσο και στο μικροπεριβάλλον συγκεκριμένων αμινοξέων, όπως τα αρωματικά αμινοξέα, ή ακόμα και προσθετικών ομάδων, όπως η αίμη.

5.3.1. Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-vis)

Η μέθοδος της φασματοσκοπίας βασίζεται στην ιδιότητα των μορίων να απορροφούν εκλεκτικά μέρος της ακτινοβολίας του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Η φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (Ultraviolet-visible, UV-vis) είναι η περισσότερο χρησιμοποιούμενη αναλυτική μέθοδος. Στο μήκος κύματος της υπεριώδους (200-380 nm) και της ορατής (388-750 nm) ακτινοβολίας η αλληλεπίδραση ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και ύλης έχει ως αποτέλεσμα τη διέγερση των ηλεκτρονίων των εξωτερικών στοιβάδων και την παροδική μετάπτωσή τους σε μοριακά τροχιακά υψηλότερων ενεργειών. Κατά την αποδιέγερσή τους τα μόρια αποδίδουν την απορροφούμενη ενέργεια είτε με τη μορφή θερμότητας είτε με τη μορφή φωσφορισμού ή φθορισμού.

Όταν μια μονοχρωματική ακτινοβολία (ακτινοβολία συγκεκριμένου μήκους κύματος) διέρχεται διαμέσου ενός διαλύματος το οποίο περιέχει μια ουσία που απορροφά, η ισχύς θα μειώνεται προοδευτικά εξαιτίας της απορρόφησής της. Η ισχύς της διερχόμενης ακτινοβολίας (I) θα είναι μικρότερη από αυτή της προσπίπτουσας (I_0). Η μείωση τα ισχύος της διερχόμενης ακτινοβολίας δίνεται από το νόμο Beer-Lambert και εξαρτάται κυρίως από τη συγκέντρωση της απορροφούμενης ουσίας και την απόσταση που διανύει η ακτινοβολία εντός του διαλύματος:

$$A = \log I/I_0 = \varepsilon l c$$

όπου A είναι η απορρόφηση του διαλύματος, ε είναι ο συντελεστής απορρόφησης μια ένωσης σε ένα συγκεκριμένο μήκος κύματος, l είναι το μήκος της διαδρομής που διασχίζει το δείγμα και c η συγκέντρωση της ουσίας στο διάλυμα.

Για κάθε χημική ένωση υπάρχει ένα χαρακτηριστικό μήκος κύματος ($\lambda_{\max}$) στο οποίο εμφανίζει τη μέγιστη απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας. Στο φάσμα της υπεριώδους ακτινοβολίας οι πρωτεΐνες εμφανίζουν δύο κύριες κορυφές απορρόφησης. Τα αρωματικά αμινοξέα (τυροσίνη, τρυπτοφάνη και φαινυλαλανίνη) εμφανίζουν μέγιστη απορρόφηση στα 280 και 260 nm. Τα κατάλοιπα τυροσίνης και τρυπτοφάνης συνεισφέρουν στην απορρόφηση στα 280 nm, ενώ η φαινυλαλανίνη απορροφά στα 260 nm. Η δεύτερη κορυφή απορρόφησης είναι μεταξύ 215-230 nm και οφείλεται στους πεπτιδικούς δεσμούς της πρωτεΐνης. Σε κάποιες περιπτώσεις όπου η πρωτεΐνη περιέχει μια χαρακτηριστική ομάδα αίμης, όπως το κυτόχρωμα c, παρατηρείται μια επιπλέον περιοχή απορρόφησης στην περιοχή του ορατού, η λεγόμενη Soret με μέγιστο απορρόφησης στα 410 nm και δίνει πληροφορίες για την κατάσταση του σιδήρου της αίμης, όπως αναλύθηκε στην Παράγραφο 2.1.4.

5.3.2. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (CD)

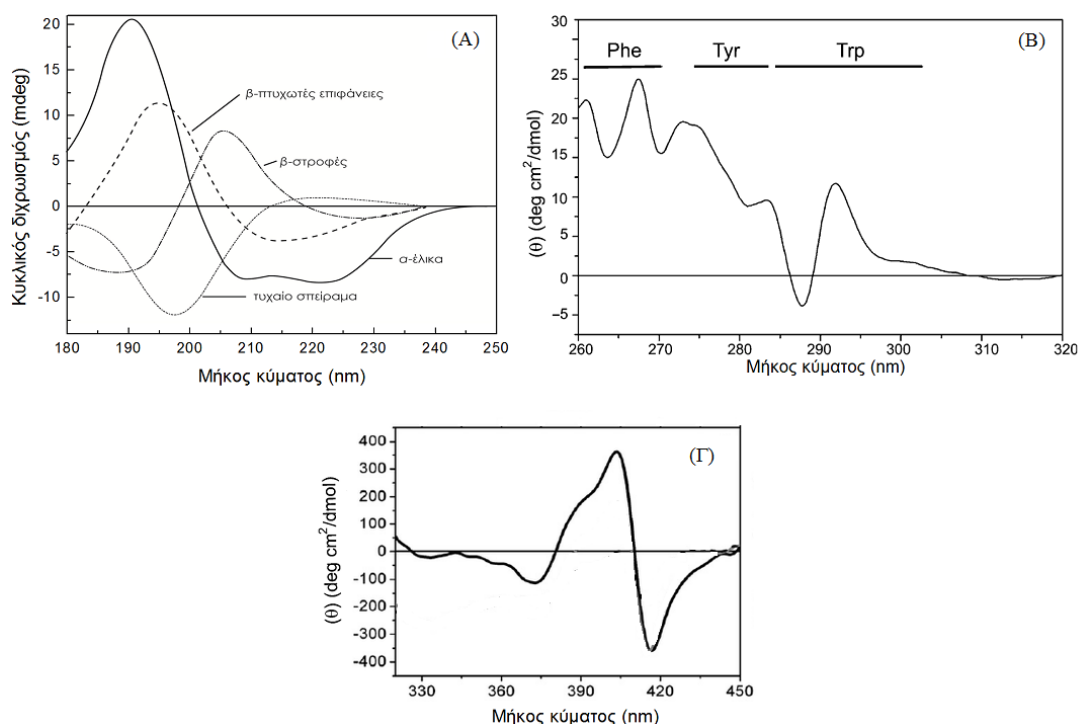
Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (Circular dichroism, CD) στηρίζεται στην ιδιότητα των χειρόμορφων ουσιών να απορροφούν σε διαφορετικό βαθμό το αριστερόστροφο και το δεξιόστροφο κυκλικά πολωμένο φως. Ο βαθμός της διαφοράς απορρόφησης εξαρτάται από το μήκος κύματος του φωτός. Η διαφορετική μοριακή απορροφητικότητα στις δύο συνιστώσες της επίπεδα πολωμένης ακτινοβολίας έχει ως αποτέλεσμα την ελλειπτική πόλωση της ακτινοβολίας, η οποία καταγράφεται στον ανιχνευτή ως ελλειπτικότητα (σε χιλιοστά της μοίρας) συναρτήσει του μήκους κύματος της ακτινοβολίας [Berova *et al.* 2007].

Η φασματοσκοπία CD είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση της δομής των πρωτεϊνών, τόσο ελεύθερων όσο και ακινητοποιημένων σε νανοδομικά υλικά [Silva *et al.* 2015, Wei & Ge 2013, Kishore *et al.* 2012, Pavlidis *et al.* 2012a, Shang *et al.* 2009]. Όλα τα αμινοξέα, εκτός από τη γλυκίνη, είναι οπτικώς ενεργά λόγω της ασυμμετρίας τους. Ο πεπτιδικός δεσμός της πρωτεΐνης, τα αρωματικά αμινοξέα της καθώς και προσθετικές ομάδες στη δομή τους, όπως η αίμη στο κυτόχρωμα c, δίνουν χαρακτηριστικά φάσματα κυκλικού διχρωισμού σε διάφορες περιοχές (Εικόνα 5.4):

- Πέραν-υπεριώδης περιοχή (far-UV): στην περιοχή αυτή (180-260 nm) η απορρόφηση οφείλεται κυρίως στο ασύμμετρο περιβάλλον του πεπτιδικού δεσμού, και κατ' επέκταση, στις διαμορφώσεις της δευτεροταγούς δομής. Κάθε στοιχείο δευτεροταγούς δομής παρουσιάζει χαρακτηριστικό φάσμα κυκλικού διχρωισμού στην περιοχή far-UV. Για παράδειγμα, η α -έλικα παρουσιάζει δύο αρνητικές κορυφές στα 208 και 220 nm και μια θετική κορυφή στα ~190 nm, ενώ τα β -φύλλα (β -πτυχωτή επιφάνεια) παρουσιάζει μια αρνητική κορυφή στα 218 nm και μια θετική κορυφή ~195 nm.
- Εγγύς-υπεριώδης περιοχή (near-UV): στην περιοχή αυτή (250-350 nm) η απορρόφηση οφείλεται στην παρουσία αρωματικών αμινοξέων στη δομή της πρωτεΐνης. Το φάσμα CD στην περιοχή near-UV είναι ευαίσθητο σε αλλαγές της τριτοταγούς δομής μιας πρωτεΐνης, καθώς ο μικρός αριθμός των αρωματικών

αμινοξέων σε σχέση με το σύνολο των αμινοξέων μιας πρωτεΐνης, τα καθιστά ιδανικούς δείκτες για αλλαγές στην τριτοταγή δομή.

- **Soret περιοχή:** στην περιοχή αυτή (350-450 nm) η απορρόφηση οφείλεται στην παρουσία της προσθετικής ομάδας της αίμης στην περίπτωση αιμοπρωτεϊνών. Η περιοχή αυτή είναι χαρακτηριστική για τη δομή της αίμης και την οξειδωτική κατάσταση του σιδήρου της αίμης, κι έτσι αλλαγές στις κορυφές της περιοχής αυτής είναι ενδεικτικές για την αλλαγή στην τρισδιάστατη δομή του μορίου. Για παράδειγμα, το φάσμα των κυτοχρωμάτων στη φυσική τους διαμόρφωση παρουσιάζει μια αρνητική κορυφή γύρω στα 415-420 nm και μια θετική κορυφή στα 400-410 nm λόγω του φαινομένου Cotton (όπου δημιουργούνται δύο CD κορυφές αντίθετου σήματος που διαχωρίζονται ελαφρώς σε ενέργεια) κυρίως ως αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων της αίμης με την πολυπεπτιδική αλυσίδα της πρωτεΐνης.



Εικόνα 5.4. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού στις περιοχές (Α) πέραν-υπεριώδους, (Β) εγγύς-υπεριώδους, και (Γ) Soret.

Ο προσδιορισμός της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών μπορεί να γίνει με τη χρήση αλγορίθμων, οι οποίοι χρησιμοποιούν τα δεδομένα των φασμάτων κυκλικού διχρωισμού στη πέραν-υπεριώδη περιοχή για να παράσχουν μια εκτίμηση της σύστασης της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών [Greenfield 2004, van Mierlo *et al.* 2000].

Η χρήση του κυκλικού διχρωισμού για την ανάλυση της δομής πρωτεϊνών παρουσιάζει σημαντικά πλεονεκτήματα όπως η γρήγορη καταγραφή φασμάτων, η

εφαρμογή σε μη υδατικά συστήματα και η ικανότητα ανάκτησης και επαναχρησιμοποίησης του δείγματος, καθώς ο CD δεν αποτελεί καταστροφική τεχνική.

5.3.3. Φασματοσκοπία υπερύθρου (IR)

Η φασματοσκοπία υπερύθρου (Fourier transform infrared, FTIR) θεωρείται σημαντική φασματοσκοπική τεχνική στην Οργανική Χημεία, λόγω της ευκολίας λήψης φασμάτων και της σύγκρισής τους με φάσματα γνωστών οργανικών ενώσεων. Χρησιμοποιείται ευρύτατα κατά τη σύνθεση χημικών ενώσεων και για την πιστοποίηση της καθαρότητάς τους.

Η απορροφημένη υπέρυθρη ακτινοβολία συνήθως διεγείρει τα μόρια σε υψηλότερες στάθμες δόνησης και περιστροφής που είναι κβαντισμένες. Αυτό παρατηρείται όταν η ενέργεια της ακτινοβολίας είναι ίση με τη διαφορά δύο ενεργειακών δονητικών σταθμών. Στην περιοχή υπερύθρου του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας παρατηρούνται απορροφήσεις που οφείλονται σε εκτάσεις και κάμψεις των δεσμών των μορίων.

Η FTIR αποτελεί μια από τις κλασικές μεθόδους για την ανάλυση της δομής των πρωτεϊνών, μέσω της οποίας εξάγονται πληροφορίες για τη δευτεροταγή δομή τους [Gallagher 2005, Hammes 2005]. Τα φάσματα υπερύθρου δεν εμπεριέχουν πληροφορίες για την τρισδιάστατη δομή μιας πρωτεΐνης, αλλά μπορούν να αναλυθούν και να χρησιμοποιηθούν για τη ανίχνευση αλλαγών στη δευτεροταγή δομή της. Η ανάλυση αυτή προκύπτει από το χαρακτηριστικό φάσμα που παρουσιάζουν οι πρωτεΐνες λόγω των δονήσεων των δεσμών της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Ο πεπτιδικός δεσμός εμφανίζει εννιά κορυφές στο φάσμα απορρόφησης υπερύθρου οι οποίες ονομάζονται αμιδικές (Amide) κορυφές (I-VII, A και B) και οφείλονται σε διαφορετικές δονητικές καταστάσεις και σε διαφορετικούς δεσμούς [Barth 2007]. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες για την ανάλυση της πρωτεϊνικής δομής είναι οι αμιδικές κορυφές I, II και III (Πίνακας 5.2).

Πίνακας 5.2. Οι κύριες αμιδικές κορυφές απορρόφησης που εντοπίζονται στο φάσμα υπερύθρου.

Κορυφή	Περιοχή (cm ⁻¹)	Δεσμοί
Amide I	1600-1700	Δονήσεις έκτασης C=O
Amide II	1500-1600	Δονήσεις κάμψης N-H Δονήσεις έκτασης C-N
Amide III	1200-1350	Δονήσεις κάμψης N-H Δονήσεις έκτασης C-N

Η περιοχή Amide I χρησιμοποιείται κυρίως για τη δομική μελέτη των πρωτεϊνών [Hermanová *et al.* 2015, Liu *et al.* 2014, Shao *et al.* 2013, Pavlidis *et al.* 2012a, Tziaila *et*

al. 2010], καθώς παρουσιάζει την ισχυρότερη τιμή μοριακής απορροφητικότητας σε σχέση με τις άλλες αμιδικές περιοχές. Επιπλέον έχουν ταυτοποιηθεί οι περιοχές απορρόφησης που αντιστοιχούν σε στοιχεία δευτεροταγούς δομής, κάτι το οποίο καθιστά ευαίσθητη τη μέθοδο ανάλυσης στις αλλαγές των στοιχείων δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών. Σημαντικό πλεονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι η δυνατότητα λήψης φασμάτων τόσο υγρών όσο και στερεών δειγμάτων.

5.4. Μελέτη της σχέσης δομής-λειτουργίας ακινητοποιημένων ενζύμων σε νανοδομικά υλικά με βάση τον άνθρακα

Κατά τη διαδικασία ακινητοποίησης ενζύμων σε νανοδομικά υλικά, είναι πολύ πιθανό να επέλθουν αλλαγές τόσο στη δευτεροταγή όσο και στην τριτοταγή διαμόρφωση των πρωτεϊνών, λόγω των ισχυρών αλληλεπιδράσεων που δημιουργούνται μεταξύ του νανοϋλικού και του ενζύμου. Τα νανοϋλικά μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα ένζυμα μέσω ηλεκτροστατικών και υδρόφοβων δυνάμεων, αλληλεπιδράσεων π - π , van der Waals δυνάμεων ή μέσω δημιουργίας δεσμών υδρογόνου. Οι δυνάμεις αυτές εξαρτώνται από τη δομή, την επιφάνεια, το φορτίο και την υδροφιλικότητα του νανοϋλικού [Mu *et al.* 2008]. Συνεπώς, η μέθοδος ακινητοποίησης, το είδος του νανοϋλικού, καθώς και η χημική σύνθεση της επιφάνειάς του, μπορεί να επηρεάσουν με διαφορετικό τρόπο (είτε αρνητικά ή θετικά) τη δομή των ενζύμων και συνεπώς να συντελέσουν στην αλλαγή των καταλυτικών τους χαρακτηριστικών, όπως στην ενεργότητα και σταθερότητά τους.

Η επίδραση των νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα στη δομή, και συνεπώς, στις καταλυτικές ιδιότητες των βιομορίων, και κυρίως των ενζύμων, μελετάται ευρέως. Πολλές φορές η ακινητοποίηση των ενζύμων σε νανοσωλήνες άνθρακα, οξείδιο του γραφενίου και τα παράγωγά τους, οδηγεί σε αλλαγές στη δευτεροταγή δομή τους, και πιο συγκεκριμένα, σε μείωση του ποσοστού α -έλικας με παράλληλη αύξηση του ποσοστού των β -φύλλων, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της οξειδάσης της γλυκόζης [Shao *et al.* 2013, της καταλάσης [Wei & Ge 2013], του κυτοχρώματος c [Zhao *et al.* 2012], και της εστεράσης από *Bacillus subtilis* [Pavlidis *et al.* 2012a]. Οι σημαντικές δομικές αλλαγές που επέρχονται, συχνά έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου [Shao *et al.* 2013, Wei & Ge 2013, Pavlidis *et al.* 2012a, Zhang *et al.* 2012]. Αντίθετα, σε άλλες περιπτώσεις, η ακινητοποίηση ενζύμων σε νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα μπορεί να μην προκαλέσει σημαντικές αλλαγές στη δομή των ενζύμων, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της ακετυλοχολινεστεράσης [Mesarič *et al.* 2013], με συνέπεια τη διατήρηση της καταλυτικής δραστηριότητας του ενζύμου. Η φύση του ενζύμου είναι ένας παράγοντας που θα πρέπει επίσης να λαμβάνεται υπ' όψιν για την αξιολόγηση της έκτασης των δομικών αλλαγών και της αλλαγής της καταλυτικής συμπεριφοράς.

Οι δομικές αλλαγές και η καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων μετά την ακινητοποίησή του σε CBNs, εξαρτάται ιδιαίτερα από τη χημική σύνθεση της επιφάνειας του νανοϋλικού. Σε μια πρόσφατη μελέτη, ο Zhang και οι συνεργάτες του ακινητοποίησαν

υπεροξειδάση χρένου σε γραφένιο, οξειδίο του γραφενίου και ανηγμένο οξειδίο του γραφενίου, και μελέτησαν τυχόν αλλαγές στη δομή και λειτουργία του ακινητοποιημένου ενζύμου [Zhang *et al.* 2015]. Κατά την ακινητοποίησή της στο γραφένιο, η υπεροξειδάση χρένου υπόκειται σε μεγάλες αλλαγές στη δευτεροταγή της δομή, ενώ μικρές αλλαγές παρατηρήθηκαν στην περίπτωση του GO και rGO. Κατά την ακινητοποίηση του ενζύμου στο γραφένιο, οι κύριες δυνάμεις αλληλεπίδρασης είναι οι υδροφοβικές, που έχουν ως αποτέλεσμα την αλλαγή της πρωτεϊνικής στερεοδιάταξης για την καλύτερη και ευκολότερη προσρόφηση στο νανοϋλικό. Αντίθετα, στην περίπτωση του GO και rGO, οι κύριες δυνάμεις που αναπτύσσονται είναι ηλεκτροστατικής φύσεως και είναι πιθανό να μειώνουν την αποδιάταξη που επάγεται από τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι η χημική σύσταση της επιφάνειας του νανοϋλικού επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ του νανοϋλικού και του ενζύμου κατά την ακινητοποίηση, και συνεπώς τη διαμόρφωσή του. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και στην περίπτωση άλλων ενζύμων, όπως για παράδειγμα, στην περίπτωση της οξειδάσης της χοληστερόλης και της λιπάσης [Silva *et al.* 2015].

Η δομή του νανοϋλικού είναι ένας από τους παράγοντες που επηρεάζουν τη διαμόρφωση ενός ακινητοποιημένου ενζύμου. Η διάμετρος του νανοϋλικού και συνεπώς η ακτίνα καμπυλότητάς τους, επιδρά σημαντικά στη λειτουργία ενός ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα έχει αναφερθεί πως τα ένζυμα που ακινητοποιούνται σε νανοϋλικά με μικρότερη διάμετρο και συνεπώς μεγαλύτερη ακτίνα καμπυλότητας τείνουν να διατηρούν την ενεργότητά τους [Dinu *et al.* 2010, Asuri *et al.* 2006a]. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ότι όταν οι υδρολάσες ακινητοποιούνται σε τροποποιημένους CNTs διατηρούν μεγάλο μέρος της δευτεροταγούς δομής τους και της δραστηότητάς τους, από ότι στη περίπτωση της ακινητοποίησής τους σε παράγωγα του GO [Pavlidis *et al.* 2012b]. Ανάλογα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και στην περίπτωση άλλων ενζύμων, όπως η υπεροξειδάση σόγιας, η οξειδάση της γλυκόζης και η χλωροϋπεροξειδάση [Campbell *et al.* 2015]. Οι νανοσωλήνες άνθρακα αποτελούν υλικά που εμφανίζουν μεγάλη καμπυλότητα στη δομή τους, σε αντίθεση με την επίπεδη επιφάνεια που παρουσιάζει το οξειδίο του γραφενίου. Η καμπυλότητα αυτή που χαρακτηρίζει τους CNTs ενδέχεται να μειώνει την ισχύ των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων που αναπτύσσονται κατά τη διαδικασία ακινητοποίησης των ενζύμων, διατηρώντας έτσι μεγαλύτερο μέρος της διαμόρφωσής τους. Επιπλέον, η μεγαλύτερη καμπυλότητα του νανοϋλικού εξασφαλίζει αυξημένη απόσταση μεταξύ δύο διπλανών ενζυμικών μορίων, η οποία θα μπορούσε ενδεχομένως να μειώσει τις ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις μεταξύ γειτονικών μορίων. Αντίθετα, οι αυξημένες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων του ακινητοποιημένου ενζύμου που μπορεί να προκληθούν από μια λιγότερο κυρτή επιφάνεια, θα μπορούσαν να έχουν ως αποτέλεσμα μια πιο δραματική απώλεια της δραστηότητάς του [Campbell *et al.* 2013, Grover *et al.* 2012, Asuri *et al.* 2006b].

Πέραν των αλλαγών που παρατηρούνται στη δευτεροταγή δομή των ενζύμων κατά την ακινητοποίησή τους σε CBNs, η αλληλεπίδραση των ενζύμων με τα νανοϋλικά κατά

την ακινητοποίηση μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στην τριτοταγή δομή της πρωτεΐνης, και πιο συγκεκριμένα στο ενεργό της κέντρο. Για παράδειγμα, στην περίπτωση του κυτοχρώματος c, υπάρχουν μελέτες που αναφέρουν ασήμαντες αλλαγές στη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης [Hu *et al.* 2015, Zuo *et al.* 2010], ενώ άλλες αναφέρουν απώλεια της δομής α -έλικας [Yang *et al.* 2013, Hua *et al.* 2012]. Παρόλα αυτά, όλες οι έρευνες αναφέρουν αλλαγές στο μικροπεριβάλλον της αίμης που οδηγούν σε μια πιο προσβάσιμη διαμόρφωση του ενεργού κέντρου, με αποτέλεσμα την αύξηση στην καταλυτική δράση του κυτοχρώματος [Gupta & Irihamye 2015, Yang *et al.* 2013, Hua *et al.* 2012]. Αντίστοιχα, στην περίπτωση της οξειδάσης της γλυκόζης, κατά την ακινητοποίησή της σε οξείδιο του γραφενίου, η περιοχή FAD του ενζύμου εκτίθεται με αποτέλεσμα την αύξηση στην ενεργότητάς της [Shao *et al.* 2012].

Με βάση όλα τα παραπάνω, μπορεί να αποφανθεί ότι, η ακινητοποίηση των πρωτεϊνών στην επιφάνεια των νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα, είναι μια σύνθετη διεργασία, που εξαρτάται από τη φύση της πρωτεΐνης και τις φυσικοχημικές ιδιότητες του νανοϋλικού, όπως η χημική σύσταση της επιφάνειάς του και η καμπυλότητά του. Για το λόγο αυτό είναι απαραίτητη η σε βάθος διερεύνηση της επίδρασης των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων και των νανοϋλικών, ώστε να γίνει κατανοητή η επίδραση τους στη δομή και λειτουργία των ενζύμων.

ΥΛΙΚΑ & ΜΕΘΟΔΟΙ

6. Υλικά

6.1. Αντιδραστήρια

6.1.1. Βιοκαταλύτες

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εμπορικά διαθέσιμοι βιοκαταλύτες:

- Κυτόχρωμα c από καρδιά αλόγου (cyt c), λυοφιλιωμένο σκεύασμα με καθαρότητα $\geq 98\%$ (Sigma).
- Λακάση από *Trametes versicolor* (TvL), λυοφιλιωμένο σκεύασμα με ενεργότητα 22.3 U/mg (Sigma).

Επίσης χρησιμοποιήθηκε η αλβουμίνη από ορό βοός (Sigma) ως πρότυπη πρωτεΐνη για τον καθορισμό της πρότυπης καμπύλης στα πρωτόκολλα ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών.

6.1.2. Υποστρώματα

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα υποστρώματα:

- Γουαϊακόλη (2-μεθοξυφαινόλη, Sigma), διαμμωνιακό άλας (2,2'-αζινο-δι(3-αιθυλοβενζοθιαζολινο-6-σουλφονικού οξέος) (ABTS, Sigma), και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) ως υποστρώματα σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις.
- 1-υδροξυβενζοτρίαζολη (HBT, Fluka) και ανθρακένιο, ως υποστρώματα σε αντιδράσεις οξείδωσης πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων (PAHs).
- Χλωρίδιο της πινακυανόλης (PCl, Sigma), ως υπόστρωμα σε αντιδράσεις αποδόμησης χρωστικών.

6.1.3. Διαλύτες

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων (οξέα, βάσεις) ήταν προϊόντα αναλυτικού βαθμού καθαρότητας των εταιρειών Fluka. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα εξής ρυθμιστικά διαλύματα:

- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7.0
- Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.2 mM, pH 7.0
- Ρυθμιστικό διάλυμα οξικών 100 mM, pH 4.58

Οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή ήταν καθαρότητας αναλυτικής βαθμίδας:

- Νερό υψηλής καθαρότητας (H_2O , HPLC grade-Fisher Chemicals)

- Γλουτεραλδεΰδη (25%, MERCK)
- Διμεθυσουλφοξείδιο (DMSO, Panreac)
- Μεθανόλη (Sigma)
- Ακετονιτρίλιο (Sigma)

6.1.4. Αντιδραστήρια ακινητοποίησης

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία των ακινητοποιήσεων ήταν τα εξής:

- Μονολαυρικός εστέρας της πολυοξυ-αιθυλενο-σορβιτάνης (Tween 20) της εταιρείας Fluka.
- 4-(20υδροξυαιθυλ)πιπεραζινο-1-αιθανοσουλφονικό οξύ (HEPES) της εταιρείας Sigma.
- N-υδροξυσουκινιμίδιο (NHS) της εταιρείας Sigma.
- Χλωρίδιο του 1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)καρβοδιιμιδίου (EDC) της εταιρείας Sigma.

6.1.5. Άλλα αντιδραστήρια

Στη παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma), καθώς και το PierceTM BCA Protein Assay Kit (κιτ δικιγχοονικού οξέος, Thermo Scientific) για τη μέτρηση του πρωτεϊνικού φορτίου κατά τη διαδικασία υπολογισμού της απόδοσης της ακινητοποίησης ενζύμων σε νανοϋλικά, και βρωμιούχο κάλιο (Merck) για τη φασματοσκοπία υπερύθρου.

6.2. Νανοϋλικά

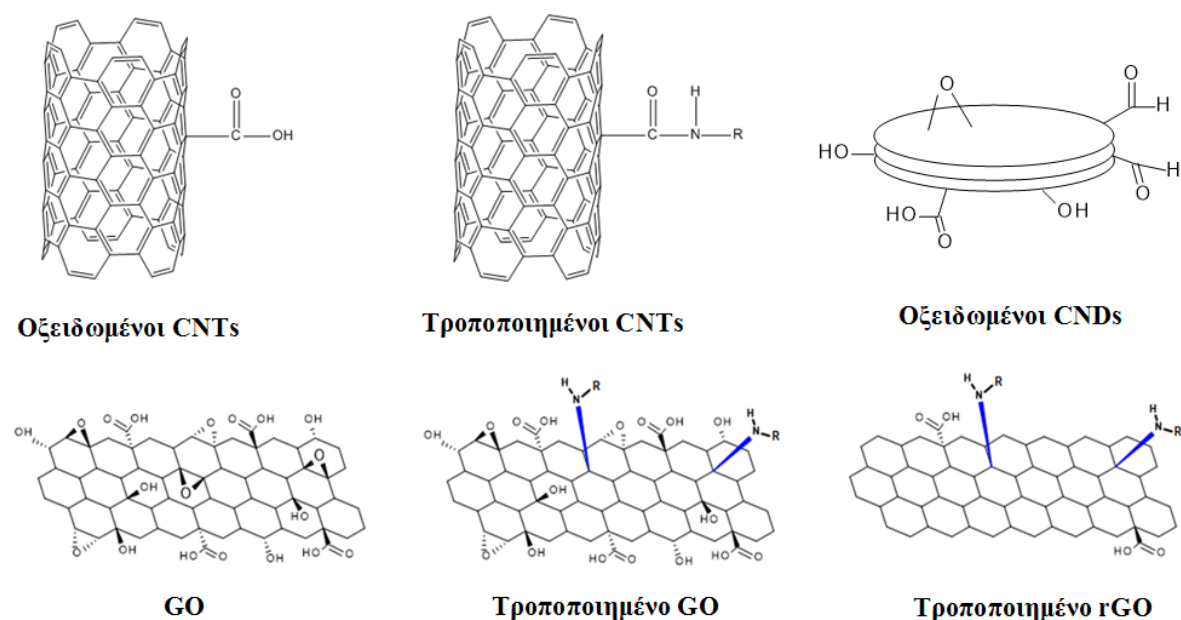
Νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν τόσο ως πρόσθετα σε αντιδράσεις όσο και ως φορείς ακινητοποίησης. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν πολλαπλού τοιχώματος νανοςωλήνες άνθρακα (Aldrich) με εσωτερική διάμετρο 2-6 nm, εξωτερική 10-15 nm και μήκος 0.1-10 μm , νανοδίσκοι άνθρακα (Carbon nanodiscs, CNDs, SCATEC, Norway), καθώς και οξείδιο του γραφενίου (Fluka). Η παρασκευή των νανοϋλικών έγινε στο Εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών του Τμήματος Μηχανικής της Επιστήμης των Υλικών [Tsoufis *et al.* 2008, Li *et al.* 2005, Bourlinos *et al.* 2003]. Οι CNTs και το GO τροποποιήθηκαν με διάφορες ενώσεις για την προσθήκη διάφορου μήκους αλκυλικών αλυσίδων και τελικών λειτουργικών ομάδων [Enotiadis *et al.* 2012, Gengler *et al.* 2010, Tsoufis *et al.* 2008, Li *et al.* 2005]. Στην περίπτωση των παραγώγων του GO ακολούθησε χημική αναγωγή για την παραγωγή των ανηγμένων

παραγώγων του GO [Stergiou *et al.* 2010]. Τα νανοϋλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή παρατίθενται στον Πίνακα 6.1 και απεικονίζονται στην Εικόνα 6.1.

Πίνακας 6.1. Τροποποιημένα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Νανοςωλήνες άνθρακα	Οξείδια του γραφενίου	Ανηγγμένα οξείδια του γραφενίου	Ένωση τροποποίησης
MWCNTs	GO	³ G	-
SWCNTs	² CNDs		-
¹ CNT-COOH			-
¹ CNT-C ₂ -COOH	GO-C ₂ -COOH		Αμινοπροπιονικό οξύ
¹ CNT-C ₄ -COOH	GO-C ₄ -COOH		Αμινοπεντανοϊκό οξύ
¹ CNT- ₁₀ -COOH	GO-C ₁₀ -COOH	rGO-C ₁₀ -COOH	Αμινοεντεκανοϊκό οξύ
¹ CNT-C ₂ -NH ₂	GO-C ₂ -NH ₂		Αιθυλενοδιαμίνη
¹ CNT-C ₄ -NH ₂	GO-C ₄ -NH ₂		Διαμινοβουτάνιο
¹ CNT-C ₆ -NH ₂	GO-C ₆ -NH ₂	rGO-C ₆ -NH ₂	Εξαμεθυλενοδιαμίνη
¹ CNT-C ₁₁ -CH ₃	GO-C ₁₁ -CH ₃		Δωδεκυλαμίνη

¹πολλαπλού τοιχώματος CNTs, ²οξειδωμένοι νανοδίσκοι άνθρακα, ³γραφένιο



Εικόνα 6.1. Σχηματική αναπαράσταση των νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα (R: αλκυλικές αλυσίδες με διαφορετικό μήκος και τελική λειτουργική ομάδα).

7. Μεθοδολογία

7.1. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν 2 πρωτόκολλα ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών. Όλα τα πειράματα έγιναν τουλάχιστον εις τριπλούν και υπολογίστηκε η μέση τιμή.

7.1.1. Πρωτόκολλο Bradford

Το πρωτόκολλο βασίζεται στην πρόσδεση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 στο πρωτεϊνικό μόριο [Bradford 1976]. Η πρόσδεση της χρωστικής στην πρωτεΐνη προκαλεί μετατόπιση του μεγίστου απορρόφησης της χρωστικής από τα 465 nm στα 595 nm. Μια τυπική διαδικασία μέτρησης απαιτεί την ανάμιξη 800 μ L διαλύματος Bradford και 200 μ L πρωτεϊνικού διαλύματος. Το διάλυμα αναδεύεται και επωάζεται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να ολοκληρωθεί η διαδικασία πρόσδεσης. Η απορρόφηση μετράται στα 595 nm. Η ποσοτικοποίηση των παρατηρούμενων απορροφήσεων επιτυγχάνεται μέσω της εφαρμογής πρότυπης καμπύλης αλβουμίνης (1-200 μ g/mL στο διάλυμα μέτρησης).

7.1.2. Πρωτόκολλο δικιγχονινικού οξέος (*bicinchoninic acid*, BCA)

Ο προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με εφαρμογή του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου απαιτεί δύο στάδια: (α) αντίδραση της πρωτεΐνης με θειικό χαλκό σε αλκαλικό περιβάλλον (αντίδραση διουρίας) και (β) δημιουργία συμπλόκου μεταξύ του δικιγχονινικού οξέος και του μονοσθενούς ιόντος χαλκού (Cu^{+1}) [Smith *et al.* 1985]. Για την εφαρμογή του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου χρησιμοποιείται το kit της Pierce. Αρχικά προστίθεται ένα μέρος αντιδραστήριου A (που περιέχει δικιγχονινικό οξύ και υδροξείδιο του νατρίου), σε 50 μέρη αντιδραστήριου B (που περιέχουν θειικό χαλκό). Στη συνέχεια, σε 250 μ L του μίγματος των αντιδραστηρίων προστίθενται 50 μ L πρωτεϊνικού διαλύματος. Τα δείγματα επωάζεται για 30 min στους 60 °C. Έπειτα τα δείγματα ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου και φωτομετρώνται στα 562 nm. Η ποσοτικοποίηση των παρατηρούμενων απορροφήσεων επιτυγχάνεται μέσω της εφαρμογής πρότυπης καμπύλης αλβουμίνης (1-200 μ g/mL στο διάλυμα μέτρησης).

7.2. Ακινητοποίηση ενζύμων σε νανοδομικά υλικά

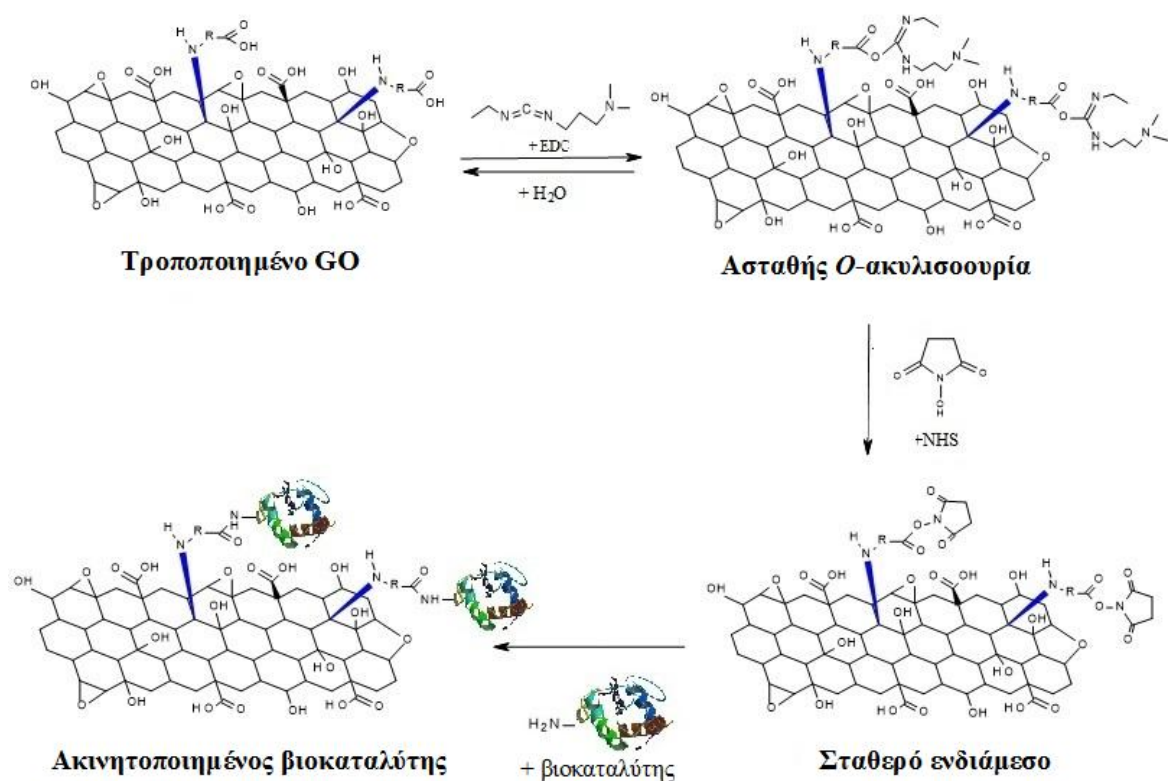
7.2.1. Μη ομοιοπολική ακινητοποίηση

Τρία mg νανοϋλικών διασπείρονται με τη βοήθεια υπερήχων (~30 min) σε 5.4 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (50 mM, pH 7.0). Έπειτα προστίθενται 1.3 mL πυκνού ενζυμικού διαλύματος (3 mg/mL), έτσι ώστε να έχουμε την κατάλληλη αναλογία ενζύμου-νανοϋλικού και τελικό όγκο 6.7 mL. Το μίγμα επωάζεται στους 30 °C για 1 ώρα έτσι ώστε να ακινητοποιηθεί το ένζυμο στην επιφάνεια του νανοϋλικού.

Ακολουθούν δύο φυγοκεντρήσεις στις 6000 rpm για 15 min με ενδιάμεση ψύξη του δείγματος για 5 λεπτά ώστε να μην απενεργοποιηθεί το ένζυμο. Το υπερκείμενο μετά τη δεύτερη φυγοκέντρηση φυλάσσεται για μέτρηση πρωτεϊνικού φορτίου και ενζυμικής δραστηριότητας. Το ίζημα μεταφέρεται σε σωληνάρια μικροφυγοκέντρου και φυγοκεντρείται για 5 min στις 12000 rpm. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ακινητοποιημένο ένζυμο ξεπλένεται 3 φορές. Η διαδικασία έκπλυσης έχει ως εξής: στο ίζημα προστίθεται 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος, γίνεται ανάδευση για 5 sec και έπειτα φυγοκεντρείται για 5 min στις 12000 rpm. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και η διαδικασία επαναλαμβάνεται άλλες 2 φορές. Μετά την τελευταία φυγοκέντρηση αφαιρείται όσο το δυνατόν μεγαλύτερη ποσότητα νερού και το υλικό αφήνεται σε ξηραντήρα με silica gel, είτε για δύο ημέρες στους 4 °C, είτε για 4 ώρες υπό κενό σε θερμοκρασία δωματίου. Το ακινητοποιημένο ένζυμο διατηρείται στους 4 °C έως τη χρησιμοποίησή του.

7.2.2. Ομοιοπολική ακινητοποίηση σε νανοϋλικά με τελικές καρβοξυλομάδες

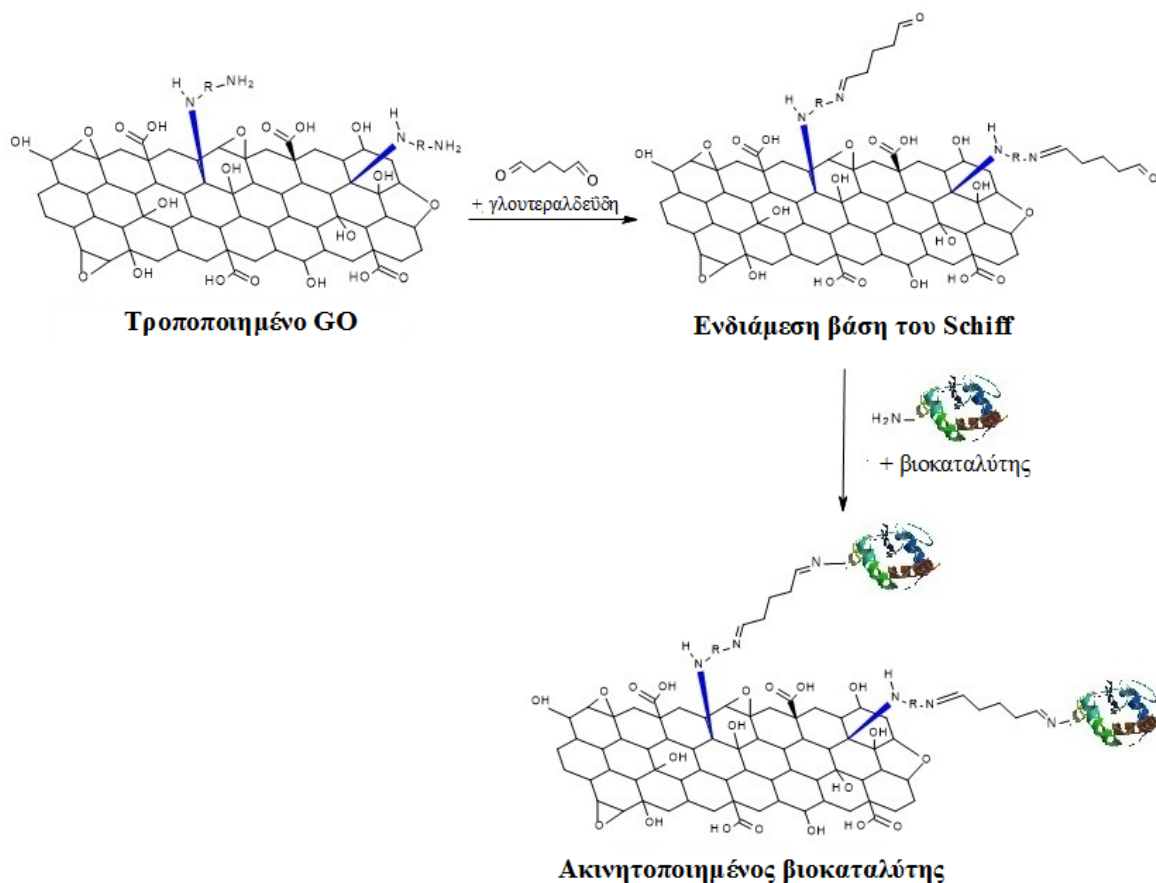
Δύο mg νανοϋλικών διασπείρονται με τη βοήθεια υπερήχων (~30 min) σε 5 mL απιονισμένου νερού. Έπειτα προστίθενται 1.2 mL EDC (από αρχικό διάλυμα 10 mg/mL) και 2.3 mL NHS (από αρχικό διάλυμα 50 mg/mL). Το μίγμα επωάζεται στους 30 °C για 1 ώρα έτσι ώστε να γίνει η ενεργοποίηση των τελικών καρβοξυλομάδων του υλικού. Ακολουθούν πλύσεις του νανοϋλικού με HEPES ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια EDC και NHS. Τα νανοϋλικά επαναδιασπείρονται σε 6 mL HEPES και στη συνέχεια, προστίθεται 1 mL πυκνού ενζυμικού διαλύματος (3 mg/mL), έτσι ώστε να έχουμε την κατάλληλη αναλογία ενζύμου-νανοϋλικού και τελικό όγκο 7 mL. Το μίγμα επωάζεται στους 30 °C για 1 ώρα έτσι ώστε να ακινητοποιηθεί το ένζυμο στην επιφάνεια του νανοϋλικού. Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία που περιγράφηκε για τη μη ομοιοπολική ακινητοποίηση. Η ακινητοποίηση μέσω της χρήσης EDC/NHS για ενεργοποίηση των καρβοξυλομάδων του νανοϋλικού απεικονίζεται στην Εικόνα 7.1.



Εικόνα 7.1. Σχηματική απεικόνιση της ακινητοποίησης με τη χρήση EDC/NHS σε νανοϋλικά με τελικές καρβοξυλομάδες.

7.2.3. Ομοιοπολική ακινητοποίηση σε νανοϋλικά με τελικές αμινομάδες

Τρία mg νανοϋλικών διασπείρονται με τη βοήθεια υπερήχων (~30 min) σε 9.13 mL απιονισμένου νερού. Έπειτα προστίθενται 0.110 mL Tween 20 και 1.76 mL γλουτεραλδεϋδη. Το μίγμα επωάζεται στους 30 °C για 1 ώρα έτσι ώστε να γίνει η ενεργοποίηση των τελικών αμινομάδων του υλικού. Ακολουθούν πλύσεις του νανοϋλικού με ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια γλουτεραλδεϋδης και Tween 20. Τα νανοϋλικά επαναδιασπείρονται σε 5 mL ρυθμιστικού διαλύματος και στη συνέχεια, προστίθεται 1 mL πυκνού ενζυμικού διαλύματος (3 mg/mL), έτσι ώστε να έχουμε την κατάλληλη αναλογία ενζύμου-νανοϋλικού και τελικό όγκο 6 mL. Το μίγμα επωάζεται στους 30 °C για 1 ώρα έτσι ώστε να ακινητοποιηθεί το ένζυμο στην επιφάνεια του νανοϋλικού. Στη συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία που περιγράφηκε για τη μη ομοιοπολική ακινητοποίηση. Η ακινητοποίηση μέσω της χρήσης γλουτεραλδεϋδης τη σύνδεση μεταξύ των αμινομάδων του νανοϋλικού και των αμινομάδων του ενζύμου απεικονίζεται στην Εικόνα 7.2.

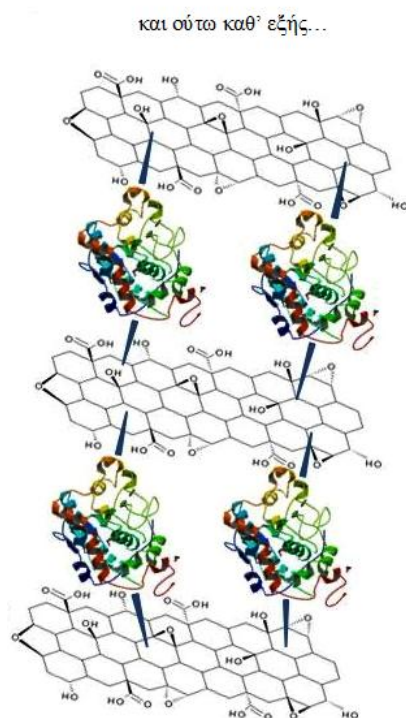


Εικόνα 7.2. Σχηματική απεικόνιση της ακινητοποίησης με τη χρήση γλουτεραλδεϋδης σε νανοϋλικά με τελικές αμινομάδες.

7.2.4. Σύνθεση πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών ενζύμου-νανοϋλικού

Η σύνθεση των πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών ενζύμου-νανοϋλικού βασίζεται στην ομοιοπολική ακινητοποίηση μέσω πολλαπλών σημείων. Η διαδικασία είναι παρόμοια με αυτή που περιγράφηκε παραπάνω για την ομοιοπολική ακινητοποίηση με τελικές αμινομάδες, με τη μόνη διαφορά ότι η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι το επιθυμητό αποτέλεσμα. Περιληπτικά, 3 mg νανοϋλικών ($\text{GO-C}_6\text{-NH}_2$) διασπείρονται με τη βοήθεια υπερήχων (~30 min) σε 9.13 mL ρυθμιστικού διαλύματος παρουσία 0.110 mL Tween 20 και 1.76 mL γλουτεραλδεϋδης. Το μίγμα επωάζεται στους 30 °C για 1 ώρα έτσι ώστε να γίνει η ενεργοποίηση των τελικών αμινομάδων του υλικού. Ακολουθούν πλύσεις του νανοϋλικού με ρυθμιστικό διάλυμα ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια γλουτεραλδεϋδης και Tween 20. Τα νανοϋλικά επαναδιασπείρονται σε 5 mL ρυθμιστικού διαλύματος και στη συνέχεια, προστίθεται 1 mL πυκνού ενζυμικού διαλύματος λακάσης (3 mg/mL), έτσι ώστε να έχουμε την κατάλληλη αναλογία ενζύμου-νανοϋλικού και τελικό όγκο 6 mL. Το μίγμα επωάζεται στους 30 °C για 1 ώρα (1^ο στρώμα). Στη συνέχεια 2 mg νανοϋλικού (που περιέχουν 3 mg) που έχουν ήδη ενεργοποιηθεί με γλουτεραλδεϋδη (όπως περιγράφηκε παραπάνω), προστίθεται στο μίγμα του 1^{ου} στρώματος και ακολουθεί επώαση στους 30 °C για 1 ώρα (2^ο στρώμα). Η διαδικασία επαναλαμβάνεται μέχρι να επιτευχθεί το επιθυμητό

νούμερο στρωμάτων ενζύμου-νανοϋλικού. Η σύνθεση πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών απεικονίζεται στην Εικόνα 7.3.



Εικόνα 7.3. Σύνθεση πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών λακάσης-νανοϋλικού.

7.3. Μέθοδοι προσδιορισμού δραστηριότητας ενζύμων

7.3.1. Μέτρηση δραστηριότητας κυτοχρώματος c

Για τη μελέτη της οξειδοαναγωγικής δραστηριότητας του κυτοχρώματος c χρησιμοποιήθηκαν τα πρωτόκολλα οξείδωσης της γουαϊακόλης και του διαμμωνιακού άλατος (2,2'-αζινο-δι(3-αιθυλοβενζοθιαζολινο-6-σουλφονικού οξέος), παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η δραστηριότητα τόσο του ελεύθερου όσο και του ακινητοποιημένου κυτοχρώματος c ελέγχθηκε σε υδατικό διάλυμα. Η πειραματική διαδικασία περιλαμβάνει αρχικά την ανάμιξη των κατάλληλων ποσοτήτων των διαλυτών με 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7.0. Στη συνέχεια προστίθεται η γουαϊακόλη ή το ABTS από πυκνό διάλυμα σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (25 mM ή 5 mM αντίστοιχα) και η πρωτεΐνη σε μορφή υδατικού διαλύματος (25 μg/mL). Τέλος, προστίθεται το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2) τελικής συγκέντρωσης 10 mM. Η αντίδραση παρακολουθείται φωτομετρικά στα 450 nm στην περίπτωση της οξείδωσης της γουαϊακόλης και στα 405 nm στην περίπτωση οξείδωσης του ABTS. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον εις τριπλούν.

Στην περίπτωση παρουσίας νανοϋλικών, η διαδικασία είναι ακριβώς η ίδια με μόνη διαφορά ότι στα μέσα προστίθενται διαφορετικές συγκεντρώσεις νανοϋλικών (0-25 $\mu\text{g/mL}$).

7.3.2. Μέτρηση δραστικότητας λακάσης

Η καταλυτική δραστικότητα της λακάσης από *Trametes versicolor* μελετήθηκε χρησιμοποιώντας ως πρότυπη αντίδραση την οξείδωση του ABTS. Ο προσδιορισμός της δραστικότητας της ελεύθερης και ακινητοποιημένης λακάσης έγινε σε 100 mM υδατικού διαλύματος οξικών pH 4.58. Στο διάλυμα προστίθεται 1 mM ABTS. Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη της λακάσης (0.84 $\mu\text{g/mL}$ στην περίπτωση του ελεύθερου ενζύμου και 25 $\mu\text{g/mL}$ στην περίπτωση του ακινητοποιημένου). Η παρακολούθηση της οξείδωσης του ABTS γίνεται στα 405 nm. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον εις τριπλούν.

7.3.3. Χημειοενζυμική οξείδωση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων

Η αποδόμηση του ανθρακενίου από τη λακάση έγινε σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών (0.1 M, pH 4.58) που περιείχε 1% κ.ό. Tween 20, 1 mM HBT (ως διαμεσολαβητής), ελεύθερη και ακινητοποιημένη λακάση τελικής συγκέντρωσης 1 mg/mL και 0.1 mM ανθρακένιο διαλυτοποιημένο σε ακετονιτρίλιο. Τα μίγματα επωάζονται στους 30° C υπό ανάδευση στις 800 rpm για 3 μέρες, υπό σκοτάδι.

7.3.4. Ενζυμικά καταλυόμενος αποχρωματισμός χρωστικής

Η δράση αποχρωματισμού των συντιθέμενων πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών λακάσης-νανοϋλικού μελετήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών (0.1 M, pH 4.58) χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το χλωρίδιο της πινακυανόλης. Το μίγμα της αντίδρασης που περιλαμβάνει 100 $\mu\text{g/mL}$ PCl και 500 $\mu\text{g/mL}$ ακινητοποιημένου ενζύμου, επωάζεται στους 30° C υπό ανάδευση στις 800 rpm. Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα λαμβάνονται 20 μL από το μίγμα αντίδρασης και τοποθετούνται σε μίγμα 1:1 κ.ό. μεθανόλης:ρυθμιστικού δ/τος οξικών. Η εναπομένουσα συγκέντρωση της χρωστικής παρακολουθείται μετρώντας την απορρόφηση στα 603 nm ($\epsilon = 82\,350\text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$) [Vazquez-Duhalt *et al.* 1995].

7.4. Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων του κυτοχρώματος c

Για τον προσδιορισμό των κινητικών σταθερών του κυτοχρώματος c απουσία και παρουσία διάφορων νανοϋλικών, η δραστικότητα του κυτοχρώματος c προσδιορίστηκε μέσω της οξείδωσης του ABTS, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 7.3.1. Αρχικά, σε μικροπηγάδακι πλακιδίου Elisa προστίθεται το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (50 mM, pH 7.0) και στη συνέχεια το ABTS (σε τελική συγκέντρωση 0.25 mM). Στη συνέχεια, προστίθεται το κυτόχρωμα c (σε τελική συγκέντρωση 6.25 $\mu\text{g/mL}$). Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη H_2O_2 (σε τελική συγκέντρωση 0.1-30 mM) και παρακολουθείται στα

405 nm. Στην περίπτωση παρουσίας νανοϋλικών, η τελική τους συγκέντρωση είναι 10 µg/mL. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων έγινε με τη βοήθεια του προγράμματος μη γραμμικής συσχέτισης Enz-Fit της εταιρείας Biosoft, UK.

7.5. Μέθοδοι προσδιορισμού σταθερότητας ενζύμων

7.5.1. Προσδιορισμός σταθερότητας κυτοχρώματος c

Η σταθερότητα του κυτοχρώματος (ελεύθερο, παρουσία νανοϋλικών και ακινητοποιημένο) σε διάφορα μέσα μελετήθηκε ακολουθώντας την αντίδραση οξειδωσης της γουαϊακόλης, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 7.3.1.

Σταθερότητα απουσία υποστρωμάτων: σε μια τυπική διαδικασία, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (50 mM, pH 7.0) προεπώάζεται στους 30-70 °C και στη συνέχεια προστίθεται η πρωτεΐνη υπό μορφή υδατικού διαλύματος (σε τελική συγκέντρωση 25 µg/mL). Μετά από 24 ώρες επώαση, γίνεται δειγματοληψία 198 µL και μεταφέρονται σε φωτόμετρο τύπου Elisa reader, σε μικροπλάκες πολυστυρενίου 96 θέσεων. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου και ξεκινάει με την προσθήκη 25 mM γουαϊακόλης και 10 mM H₂O₂. Η μέτρηση του παραγόμενου προϊόντος καταγράφεται στα 450 nm. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον εις τριπλούν.

Σταθερότητα παρουσία γουαϊακόλης: σε μια τυπική διαδικασία, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (50 mM, pH 7.0) ή ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με 50% κ.ό. μεθανόλη, προεπώάζεται στους 40 °C και στη συνέχεια προστίθεται η γουαϊακόλη (σε τελική συγκέντρωση 25 mM) και η πρωτεΐνη υπό μορφή υδατικού διαλύματος (σε τελική συγκέντρωση 25 µg/mL). Μετά από 24 ώρες επώαση, γίνεται δειγματοληψία 198 µL και μεταφέρονται σε φωτόμετρο τύπου Elisa reader, σε μικροπλάκες πολυστυρενίου 96 θέσεων. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου και ξεκινάει με την προσθήκη 10 mM H₂O₂. Η μέτρηση του παραγόμενου προϊόντος καταγράφεται στα 450 nm. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον εις τριπλούν.

Σταθερότητα παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου: σε μια τυπική διαδικασία, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (50 mM, pH 7.0) ή ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με 50% κ.ό. μεθανόλη, προεπώάζεται στους 40 °C και στη συνέχεια προστίθεται το H₂O₂ (σε τελική συγκέντρωση 10 mM) και η πρωτεΐνη υπό μορφή υδατικού διαλύματος (σε τελική συγκέντρωση 25 µg/mL). Μετά από 30 λεπτά επώαση, γίνεται δειγματοληψία 198 µL και μεταφέρονται σε φωτόμετρο τύπου Elisa reader, σε μικροπλάκες πολυστυρενίου 96 θέσεων. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου και ξεκινάει με την προσθήκη 25 mM γουαϊακόλης. Η μέτρηση του παραγόμενου προϊόντος καταγράφεται στα 450 nm. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον εις τριπλούν.

7.5.2. Προσδιορισμός σταθερότητας λακάσης

Η σταθερότητα της ελεύθερης λακάσης και των πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών λακάσης-νανοϋλικού μελετήθηκε ακολουθώντας την αντίδραση οξείδωσης του ABTS, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 7.3.2. Σε μια τυπική διαδικασία, ρυθμιστικό διάλυμα οξικού (100 mM, pH 4.58) προεπώζεται στους 60 °C και στη συνέχεια προστίθεται η πρωτεΐνη υπό μορφή υδατικού διαλύματος (σε τελική συγκέντρωση 0.84 µg/mL στην περίπτωση του ελεύθερου και 50 µg/mL στην περίπτωση των νανοσυστοιχιών). Σε τακτά χρονικά διαστήματα γίνεται δειγματοληψία 198 µL και μεταφέρονται σε φωτόμετρο τύπου Elisa reader σε μικροπλάκες πολυστυρενίου 96 θέσεων. Η αντίδραση πραγματοποιείται σε θερμοκρασία δωματίου και ξεκινάει με την προσθήκη του ABTS (σε τελική συγκέντρωση 1 mM). Η μέτρηση του παραγόμενου προϊόντος καταγράφεται στα 405 nm. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν τουλάχιστον εις τριπλούν.

7.5.3. Επαναχρησιμοποίηση πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών ενζύμου-νανοϋλικού

Η μελέτη ικανότητας επαναχρησιμοποίησης των νανοσυστοιχιών λακάσης-νανοϋλικού σε επαναλαμβανόμενους κύκλους αντίδρασης έλαβε χώρα μέσω του αποχρωματισμού του PCl, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 7.3.4. Μετά από κάθε κύκλο αντίδρασης, το ακινητοποιημένο ένζυμο διαχωρίζεται μέσω φυγοκέντρωσης στις 12000 rpm και ξεπλένεται τρεις φορές με ρυθμιστικό διάλυμα οξικού (0.1 M, pH 4.58). Η παρακάτω εξίσωση εφαρμόστηκε για τον υπολογισμό της απόδοσης του αποχρωματισμού μετά από κάθε κύκλο:

$$\text{Αποχρωματισμός (\%)} = (C_i - C_t) / C_i * 100$$

όπου C_i η αρχική συγκέντρωση και C_t η τελική συγκέντρωση.

7.6. Αναλυτικές μέθοδοι – Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Πίεσης (HPLC)

Για την ανάλυση των προϊόντων που προκύπτουν από την αποδόμηση του ανθρακενίου χρησιμοποιήθηκε συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης Shimadzu, με ανιχνευτή παράταξης φωτοδιοδίων και στήλη ανάστροφης φάσης SUPELCOSIL™ LC-C18-DB (25 cm x 4.6 mm x 5 µm). Η έκλουση γίνεται με βαθμίδωση από 75 έως 100% μεθανόλη σε νερό (που περιέχει οξικό οξύ 0.1%) για 20 min στους 30 °C, με ρυθμό ροής 1 mL/min. Ο προσδιορισμός της απόδοσης της αντίδρασης υπολογίζεται από τη μείωση της συγκέντρωσης του ανθρακενίου. Η ταυτοποίηση του προϊόντος της οξείδωσης του ανθρακενίου (9,10-ανθρακινόνη) επιβεβαιώθηκε μέσω της σύγκρισης των χρόνων έκλουσης καθώς και των φασμάτων του υποστρώματος και του προϊόντος (Παράρτημα Ι).

7.7. Μέθοδοι χαρακτηρισμού των νανοβιοκαταλυτών

7.7.1. Μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων (AFM)

Η λήψη εικόνων AFM έγινε με την τεχνική περιοδικής επαφής (Tapping Mode) με 3D Multimode Nanoscope της εταιρείας Bruker, με χρήση ακίδων πυριτίου Tap-300G συχνότητας <10 nm και σταθερά δύναμης $\sim 20\text{--}75 \text{ N m}^{-1}$, που στεγάζεται στο εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών του Τμήματος Μηχανικής της Επιστήμης των Υλικών. Τα δείγματα εναποτέθηκαν σε υποστρώματα πυριτίου υπό μορφή σταγόνας.

7.7.2. Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS)

Η λήψη φασμάτων XPS πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Φυσικής, κάτω από συνθήκες υψηλού κενού με βασική πίεση 5×10^{-10} mbar σε ένα φωτοηλεκτρονικό φασματοφωτόμετρο SPECS GmbH, εξοπλισμένο με μονοχρωματική πηγή ακτίνων X MgK α ($h\nu = 1253.6 \text{ eV}$) και ημισφαιρικό αναλυτή Phoibos-100. Η διασπορά των νανοϋλικών και του ακινητοποιημένου κυτοχρώματος c σε απιονισμένο νερό έγινε με τη βοήθεια υπερήχων, και στη συνέχεια μια σταγόνα της διασποράς αυτής εναποτίθεται πάνω σε υποστρώματα πυριτίου και αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου, πριν μεταφερθεί σε υψηλό κενό. Η ενέργεια ανάλυσης ορίστηκε στα 0.3 eV και η γωνία της αφετηρίας των ηλεκτρονίων στις 45°. Τα φάσματα που καταγράφηκαν ήταν το αποτέλεσμα του μέσου όρου τριών σαρώσεων με το βήμα ενέργειας (energy step) να ορίζεται στα 0.05 eV και χρόνο παραμονής (dwell time) 1 sec. Όλες οι ενέργειες δέσμευσης ήταν σε αναφορά με το C1s στα 284.6 eV. Η ανάλυση των φασμάτων έγινε με το λογισμικό WinSpec (Laboratoire Interdisciplinaire de Spectroscopie Electronique, University of Namur, Βέλγιο). Ο διαχωρισμός των κορυφών έγινε κατά Gauss, ενώ για την καλύτερη προσαρμογή (fitting) των κορυφών, έγινε χρήση της χαμηλότερης πιθανής τιμής του παράγοντα χ^2 .

7.7.3. Θερμική ανάλυση (TGA/DTA)

Για τις θερμοβαρυτικές και διαφορικές θερμικές αναλύσεις (TGA και DTA αντίστοιχα) χρησιμοποιήθηκε το όργανο PerkinElmer Pyris Diamond TGA/DTA του εργαστηρίου Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών του Τμήματος Μηχανικής της Επιστήμης των Υλικών. Κάθε δείγμα, βάρους περίπου 3-3.5 mg, θερμάνθηκε από τους 30 °C στους 800 °C, με ρυθμό 5 °C/min.

7.7.4. Φασματοσκοπία Raman

Τα φάσματα Raman λήφθηκαν σε ένα Micro-Raman σύστημα RM 1000 (RENISHAW, Old Town, Ηνωμένο Βασίλειο), το οποίο στεγάζεται στο εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών του Τμήματος Μηχανικής της Επιστήμης των Υλικών. Η διέγερση του δείγματος γίνεται από πηγή laser στα 532 nm (Nd-YAG) ενώ το φάσμα καταγράφεται στο εύρος 500-3500 cm^{-1} . Κατά τη λήψη των φασμάτων χρησιμοποιήθηκε

ισχύς 0.5 έως 1 mW με σημείο εστίασης 1 μm για να αποφευχθεί η φωτοαποσύνθεση των δειγμάτων.

7.8. Μέθοδοι μελέτης της δομής των ενζύμων

7.8.1. Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-vis)

Η λήψη φασμάτων ορατού-υπεριώδους του κυτοχρώματος c σε υδατικό διάλυμα απουσία και παρουσία νανοϋλικών (25 $\mu\text{g/mL}$) έγινε σε φασματοφωτόμετρο UV-1601 Shimadzu (Τόκυο, Ιαπωνία), με τη χρήση κυψελίδας χαλαζία με μήκος διαδρομής 1.0 cm, σε εύρος 300-700 nm.

Η καταστροφή της αίμης του κυτοχρώματος c παρουσία H_2O_2 , παρακολουθείται φωτομετρικά καταγράφοντας το φάσμα απορρόφησης στην περιοχή Soret. Το φάσμα του κυτοχρώματος (25 $\mu\text{g/mL}$) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (50 mM, pH 7.0) παρουσία διάφορων νανοϋλικών (25 $\mu\text{g/mL}$) και H_2O_2 (10 mM) καταγράφονται κάθε 2 min σε θερμοκρασία δωματίου. Η επίδραση του H_2O_2 στην αίμη υπολογίζεται από τις αλλαγές τη απορρόφηση της κορυφής Soret στα 409 nm, μετά από 10 λεπτά επώαση [Villegas *et al.* 2000].

7.8.2. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (CD)

Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού λήφθηκαν σε φασματοπολωσίμετρο τύπου Jasco J-815 που στεγάζεται στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Το φασματοπολωσίμετρο είναι εξοπλισμένο με σύστημα Peltier για ρύθμιση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια λήψης φασμάτων.

Για τη λήψη των φασμάτων του κυτοχρώματος c σε υδατικό σύστημα χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα χαλαζία με μήκος διαδρομής 1.0 cm. Τα φάσματα ελήφθησαν απουσία και παρουσία νανοϋλικών (2.5 $\mu\text{g/mL}$) τόσο στην περιοχή του πέραν-υπεριώδους (far-UV, 200-260 nm) όσο και στην περιοχή Soret (350-450 nm). Η ταχύτητα σάρωσης ορίστηκε σε 50 nm/min (2 σαρώσεις), η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 30 °C και το εύρος φάσματος (bandwidth) στα 2 nm. Στην περίπτωση παρουσίας νανοϋλικών, λήφθηκε ξεχωριστό φάσμα αναφοράς για το κάθε νανοϋλικό το οποίο αφαιρέθηκε από το φάσμα της πρωτεΐνης. Η συγκέντρωση του κυτοχρώματος c για τη λήψη φάσματος στην πέραν-υπεριώδη περιοχή ήταν 10 $\mu\text{g/mL}$, ενώ για τη λήψη φάσματος στην περιοχή Soret ήταν 200 $\mu\text{g/mL}$. Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.0 (0.2 mM). Σε κάθε περίπτωση η απορρόφηση των δειγμάτων δεν ξεπέρασε τις 1.5 μονάδες.

7.8.3. Φασματοσκοπία μέσου υπερύθρου (FTIR)

Τα φάσματα υπερύθρου λήφθηκαν σε φασματοφωτόμετρο υπερύθρου Perkin-Elmer Spectrum GX που στεγάζεται στο εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών

του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Το συγκεκριμένο φασματοφωτόμετρο FTIR είναι εξοπλισμένο με ανιχνευτή δευτεριωμένης θεϊκής τριγλυκίνης (DTGS), ενώ δέχεται υποδοχή για κρύσταλλο ψευδαργύρου-σεληνίου για μέτρηση υγρών δειγμάτων με την τεχνική εξασθένισης ολικής ανάκλασης (ATR).

Λήψη φασμάτων υπερύθρου υγρών δειγμάτων: Για τη μελέτη της πρωτεϊνικής δομής με την τεχνική της φασματοσκοπίας υπερύθρου είναι απαραίτητη αυξημένη συγκέντρωση πρωτεΐνης. Για τη λήψη των συγκεκριμένων φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν υδατικά συστήματα με περιεκτικότητα πρωτεΐνης 5 mg/mL, ενώ το υδατικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (50 mM, pH 7.0). Το διάλυμα τοποθετήθηκε στον κρύσταλλο ψευδαργύρου-σεληνιδίου έτσι ώστε να καλύψει όλη την επιφάνειά του. Τα φάσματα μετρήθηκαν σε εύρος $4000-400\text{ cm}^{-1}$ σε θερμοκρασία δωματίου. Για κάθε σύστημα που μελετήθηκε λήφθηκε ξεχωριστό φάσμα αναφοράς το οποίο αφαιρέθηκε από το φάσμα της πρωτεΐνης. Σε κάθε περίπτωση η απορρόφηση δεν ξεπέρασε τις 1.5 μονάδες.

Λήψη φασμάτων υπερύθρου στερεών δειγμάτων: Τα δείγματα που μελετήθηκαν με αυτή την τεχνική περιλαμβάνουν λυοφιλιωμένες και ακινητοποιημένες πρωτεΐνες, καθώς και τους φορείς ακινητοποίησης. Τα στερεά δείγματα προετοιμάζονται ως δισκία KBr. Ποσότητα KBr αφήνεται για 24 ώρες στους $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ ώστε να εξατμιστεί η υγρασία, καθώς το άλας είναι υγροσκοπικό. Έπειτα ζυγίζονται περίπου 200 mg του άλατος μαζί με 2-3 mg του δείγματος και το μίγμα λειοτριβείται σε γουδί. Το μείγμα εισάγεται σε ειδική θήκη και με τη βοήθεια υδραυλικής πρέσας ασκείται πίεση 7000 kg/cm^2 για 10 sec ώστε να σχηματιστεί το δισκίο. Η παρασκευή των δισκίων δεν επηρεάζει τη δομή της πρωτεΐνης, όπως αναφέρεται βιβλιογραφικά [Prestrelski *et al.* 1993]. Τα φάσματα των δισκίων καταγράφονται σε εύρος $4000-400\text{ cm}^{-1}$ σε θερμοκρασία δωματίου παρουσία silica gel για την αφύγρανση της ατμόσφαιρας του θαλάμου στο οποίο βρίσκεται το δείγμα. Κάθε φάσμα προκύπτει από τη μέση τιμή 32 σαρώσεων με ανάλυση 2 cm^{-1} . Για κάθε σύστημα που μελετήθηκε λήφθηκε ξεχωριστό φάσμα αναφοράς το οποίο αφαιρέθηκε από το φάσμα της πρωτεΐνης. Στην περίπτωση των λυοφιλιωμένων σκευασμάτων το φάσμα αναφοράς ορίστηκε το KBr ενώ στην περίπτωση των ακινητοποιημένων πρωτεϊνών ορίστηκε ο φορέας ακινητοποίησης. Σε κάθε περίπτωση η απορρόφηση δεν ξεπέρασε τις 1.5 μονάδες.

Υπολογισμός στοιχείων δευτεροταγούς δομής με ανάλυση αμιδικών κορυφών: Το φάσμα της πρωτεΐνης μετά από την αφαίρεση του φάσματος αναφοράς θα πρέπει να παρουσιάζει τις χαρακτηριστικές αμιδικές κορυφές. Η αμιδική περιοχή I (Amide I, $1700-1600\text{ cm}^{-1}$) απομονώνεται από το φάσμα και εισάγεται στο λογισμικό Origin 8.0 (OriginLab). Ο πιθανός θόρυβος των φασμάτων αφαιρείται ύστερα από εξομάλυνση των φασμάτων με το φίλτρο εξομάλυνσης Savitsky-Golay 11 σημείων [Serefoglou *et al.* 2008], ενώ χρησιμοποιείται γραμμή αναφοράς μεταξύ των ακραίων σημείων ώστε η κορυφή να ευθυγραμμιστεί με τον άξονα των κυματάριθμων.

Μέσω του λογισμικού Origin 8.0 υπολογίζεται η δεύτερη παράγωγος της περιοχής Amide I. Οι αρνητικές κορυφές τις δεύτερης παραγώγου προσδιορίζουν τη θέση των

κορυφών που συνθέτουν την αμιδική περιοχή (Dong *et al.* 1990, Susi & Byler 1983). Η κορυφή προς ανάλυση εισάγεται στο λογισμικό WinSpec. Στο λογισμικό ορίζεται ο αριθμός των κορυφών που αποτελούν την αμιδική περιοχή καθώς και η θέση τους σύμφωνα με τα δεδομένα της δεύτερης παραγωγού, καθώς και ό,τι κορυφές ακολουθούν κατανομή Gauss. Το αρχικό πλάτος των κορυφών στο μισό της έντασής τους ορίζεται 7-16 cm^{-1} ανάλογα με το πλήθος και την απόσταση των κορυφών. Το λογισμικό μέσα από ένα κύκλο βελτίωσης της προσαρμογής των κορυφών στο αρχικό φάσμα, καθορίζει τις βέλτιστες τιμές έντασης, θέσης και πλάτους της κάθε κορυφής. Για την επίτευξη βέλτιστης προσαρμογής οι παράμετροι απελευθερώνονται σταδιακά.

Συγκεκριμένες περιοχές των αμιδικών κορυφών ανάγονται σε στοιχεία δευτεροταγούς δομής. Ο υπολογισμός των στοιχείων δευτεροταγούς δομής γίνεται ύστερα από αναγωγή των κορυφών, σύμφωνα με τη θέση τους, σε στοιχεία δευτεροταγούς δομής. Ο υπολογισμός της δομής της πρωτεΐνης βασίζεται στην ποσοστιαία συνεισφορά της κάθε κορυφής στην αμιδική κορυφή. Η αναγωγή των κορυφών που υπολογίζονται σε στοιχεία δευτεροταγούς δομής γίνεται σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Natalello *et al.* 2005) και παρατίθεται στον Πίνακα 7.1.

Πίνακας 7.1. Αναγωγή περιοχών του φάσματος υπερύθρου σε στοιχεία δευτεροταγούς δομής.

Στοιχείο δευτεροταγούς δομής	Αμιδική κορυφή I (cm^{-1})
α -έλικα	1650-1665
β -φύλλα	1620-1640 (Παράλληλα) 1610-1620 & 1685-1695 (Αντιπαράλληλα)
β -στροφές	1665-1685
Τυχαίο σπείραμα	1640-1650

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ & ΣΥΖΗΤΗΣΗ

8. Αλληλεπίδραση του κυτοχρώματος c με νανοδομικά υλικά

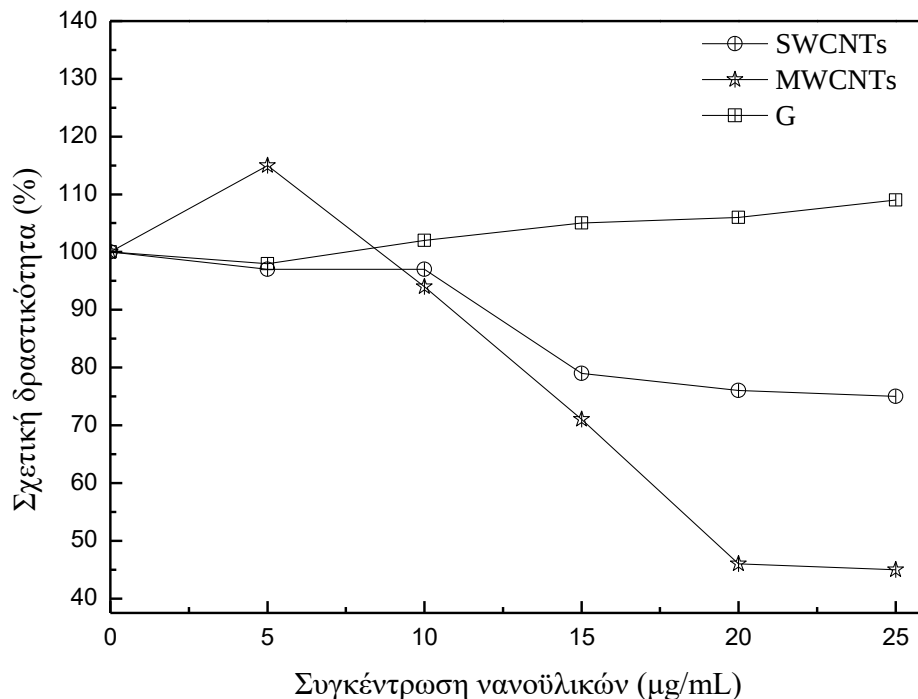
Η νανοβιοτεχνολογία αποτελεί ένα επιστημονικό τομέα με ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς μπορεί να χρησιμοποιηθεί για πλήθος εφαρμογών όπως η δημιουργία βιοαισθητήρων, η μεταφορά φαρμάκων και η βιοκατάλυση. Πλήθος ενζύμων έχουν ακινητοποιηθεί επιτυχώς σε διάφορα νανοϋλικά, όπως σε αυτά με βάση τον άνθρακα (νανοσωλήνες άνθρακα, γραφένιο), και χρησιμοποιηθεί σε διάφορες βιοκαταλυτικές εφαρμογές [Wang *et al.* 2016, Deep *et al.* 2015, Mei *et al.* 2015, Yu *et al.* 2015, Ke *et al.* 2014]. Η αλληλεπίδραση των νανοϋλικών με τα πρωτεϊνικά μόρια χρήζει ιδιαίτερης σημασίας, καθώς η κατανόηση των αλληλεπιδράσεων αυτών θα μπορούσε να οδηγήσει στο σχεδιασμό ακινητοποιημένων μορίων με επιθυμητές ιδιότητες ή ακόμα και να προβλέψει την καταλυτική συμπεριφορά των ακινητοποιημένων βιομορίων.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η καταλυτική συμπεριφορά του κυτοχρώματος c σε υδατικά συστήματα νανοδιασπορών τροποποιημένων νανοϋλικών, καθώς και η επίδραση που έχει η παρουσία τους στη δομή της πρωτεΐνης. Το κυτόχρωμα c (cyt c) είναι μια από τις καλύτερα χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες με οξειδοαναγωγική δράση, και για αυτό το λόγο αποτελεί πρωτεΐνη-μοντέλο για την μελέτη επίδρασης με διάφορες νανοδομές [Shang *et al.* 2009]. Για τη μελέτη αυτή χρησιμοποιήθηκαν νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος και παράγωγα του οξειδίου του γραφενίου, τα οποία τροποποιήθηκαν κατάλληλα ώστε να προκύψουν νανοϋλικά με διάφορου μήκους αλκυλική αλυσίδα και τελική ελεύθερη λειτουργική ομάδα. Οι δομές των νανοϋλικών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται στην Εικόνα 6.1 της παραγράφου 6.2.

Ο σκοπός του παρόντος κεφαλαίου είναι η κατανόηση, μέσω κινητικών και δομικών μελετών, της επίδρασης της φύσης και της τροποποίησης των νανοϋλικών στα καταλυτικά χαρακτηριστικά και τη δομή του κυτοχρώματος.

8.1. Δραστικότητα του κυτοχρώματος c παρουσία νανοϋλικών

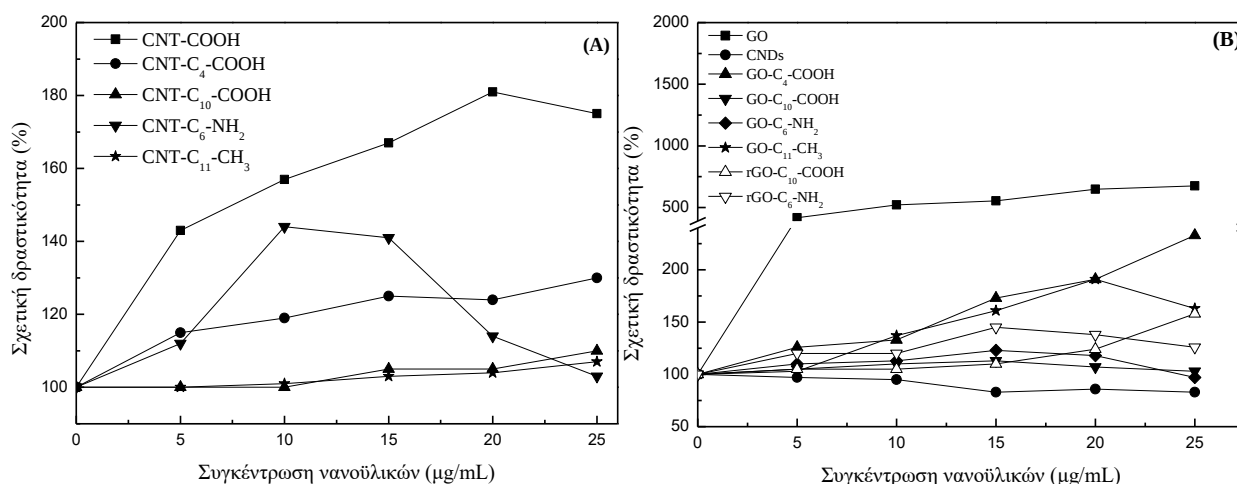
Η δραστικότητα του cyt c παρουσία μη τροποποιημένων νανοσωλήνων άνθρακα και γραφενίου μελετήθηκε στην αντίδραση οξειδωσης της γουϊακόλης (25 mM) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (50 mM, pH 7.0) σε θερμοκρασία δωματίου. Η δραστικότητα του cyt c προσδιορίστηκε απουσία και παρουσία 5-25 μg/mL νανοϋλικών και παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.1.



Σχήμα 8.1. Επίδραση της συγκέντρωσης των μη τροποποιημένων νανοσωλήνων άνθρακα (μονού και πολλαπλού τοιχώματος) και γραφενίου στην οξειδοαναγωγική δράση του cyt c. Ως 100% ορίζεται η ταχύτητα της πρωτεΐνης απουσία νανοϋλικών (Τυπική απόκλιση < 5%).

Όπως παρατηρείται από το Σχήμα 8.1, η παρουσία των νανοϋλικών φαίνεται να μην επιδρά θετικά στη δραστηριότητα της πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία μονού ή πολλαπλού τοιχώματος νανοσωλήνων άνθρακα (SWCNTs και MWCNTs αντίστοιχα) σε συγκεντρώσεις άνω των 10 µg/mL φαίνεται να καταστέλλει την οξειδοαναγωγική δράση του cyt c, καθώς η δραστηριότητά του μειώνεται μέχρι και 60%. Η αύξηση της συγκέντρωσης των CNTs συνεπάγεται μείωση της δραστηριότητας του cyt c. Στην περίπτωση του γραφενίου (G), η επίδραση του νανοϋλικού φαίνεται να είναι ουδέτερη, καθώς ούτε αυξάνει αλλά ούτε και μειώνει τη δραστηριότητα του cyt c. Η διαφορά μεταξύ G και CNTs έγκειται στη γεωμετρία των νανοϋλικών, καθώς το γραφένιο είναι ένα επίπεδο φυλλόμορφο υλικό, ενώ οι νανοσωλήνες παρουσιάζουν καμπυλότητα ανάλογη με τη διάμετρό τους. Όταν η καμπυλότητα του νανοϋλικού είναι μικρή, μεγαλύτερο μέρος της επιφάνειάς του έρχεται σε επαφή με το περιβάλλον της πρωτεΐνης, οδηγώντας σε ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις και σημαντικότερες αλλαγές στη δομή της [Mu *et al.* 2008]. Η επίπεδη επιφάνεια του γραφενίου είναι πιο προσβάσιμη σε μια πρωτεΐνη σε σχέση με την επιφάνεια των νανοσωλήνων, κάτι που πιθανώς οδηγεί σε μεγαλύτερες αλλαγές στη δομή του cyt c, καθιστώντας το πιο προσβάσιμο στο υπόστρωμα. Παρόλα αυτά, η παρουσία και των τριών νανοϋλικών δεν έχει κάποια θετική επίδραση στη δραστηριότητα της πρωτεΐνης. Καθώς τα νανοϋλικά αυτά δεν είναι τροποποιημένα, δεν περιλαμβάνουν δηλαδή κάποια ομάδα που να τους προσδίδει θετικό ή αρνητικό φορτίο, οι κύριες αλληλεπιδράσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ αυτών και του cyt c πιθανώς είναι π-π δυνάμεις ή δεσμοί υδρογόνου, οι οποίες αναμένεται να είναι ιδιαίτερα ισχυρές σε υδατικά μέσα.

Στη συνέχεια, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης των τροποποιημένων νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος, οξειδωμένων νανοδίσκων άνθρακα και παραγώγων του οξειδίου του γραφενίου (ανηγμένο ή μη) στη δραστηριότητα του cyt c κατά την αντίδραση οξείδωσης της γουαϊακόλης, και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 8.2.



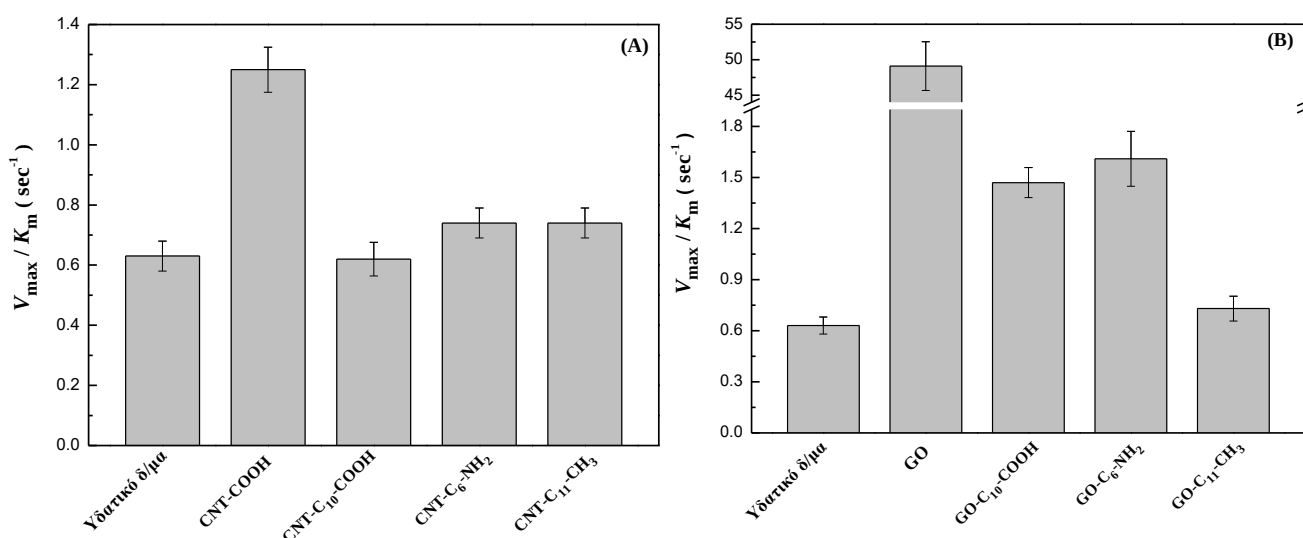
Σχήμα 8.2. Επίδραση της συγκέντρωσης των τροποποιημένων (Α) νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος και (Β) οξειδίων του γραφενίου (ανηγμένων ή μη) και οξειδωμένων νανοδίσκων άνθρακα, στην οξειδοαναγωγική δράση του cyt c. Ως 100% θεωρείται η ταχύτητα του ενζύμου απουσία νανοϋλικών (Τυπική απόκλιση < 5%).

Η παρουσία των τροποποιημένων νανοϋλικών επιδρά σημαντικά στην καταλυτική δραστηριότητα του cyt c, αυξάνοντάς την σε όλες τις περιπτώσεις. Η ενεργοποίηση που παρατηρείται εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωση των νανοϋλικών όσο και από τα δομικά χαρακτηριστικά τους. Παρόμοια καταλυτική συμπεριφορά του cyt c παρουσία των τροποποιημένων νανοϋλικών παρατηρήθηκε και στην περίπτωση όπου ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το ABTS (Παράρτημα II), συμπεραίνοντας έτσι ότι η ενεργοποίηση που λαμβάνει χώρα δεν εξαρτάται από το υπόστρωμα. Ένα αξιοσημείωτο αποτέλεσμα που προκύπτει είναι το γεγονός ότι τα ανηγμένα φύλλα του γραφενίου (rGO-C₁₀-COOH και rGO-C₆-NH₂) αυξάνουν τη δραστηριότητα του cyt c με παρόμοιο τρόπο όπως και τα μη ανηγμένα φύλλα (GO-C₁₀-COOH και GO-C₆-NH₂), γεγονός που υποδεικνύει ότι η ενεργοποίηση που παρατηρείται σχετίζεται περισσότερο με την τροποποίηση των νανοϋλικών παρά με τις ομάδες οξυγόνου που περιέχουν τα οξείδια του γραφενίου. Το συμπέρασμα αυτό ενισχύει το αποτέλεσμα ότι τα μη τροποποιημένα νανοϋλικά δεν φαίνεται να επιδρούν θετικά στη δραστηριότητα του cyt c (Σχήμα 8.1).

Σημαντική επίδραση φαίνεται να παίζει επίσης το μέγεθος του νανοϋλικού. Συγκρίνοντας την επίδραση του οξειδίου του γραφενίου (GO), το οποίο έχει μέγεθος ~20 nm, με τους οξειδωμένους νανοδίσκους άνθρακα (CNDs), μεγέθους ~2 nm, φαίνεται πως οι CNDs δεν επιδρούν θετικά στην οξειδοαναγωγική δράση του cyt c, ενώ αντίθετα το GO ενεργοποιεί το cyt c μέχρι και 8 φορές. Καθώς αυξάνεται το μέγεθος του νανοϋλικού, αυξάνονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της επιφάνειά τους και του cyt c, με αποτέλεσμα

μεγαλύτερες αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης [Shang *et al.* 2009, 2007], που πιθανώς να οδηγούν σε πιο εκτεταμένη έκθεση του ενεργού κέντρου της αίμης και συνεπώς σε μεγαλύτερη δραστικότητα. Όλες οι παραπάνω παρατηρήσεις οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η τροποποίηση και των δύο τύπων νανοϋλικών (νανοσωλήνες άνθρακα και φύλλα γραφενίου) αποτελεί ένα σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών και του cyt c, το οποίο έρχεται σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες που έχουν γίνει για τις αλληλεπιδράσεις πρωτεϊνών με διαφόρου τύπου νανοϋλικά [Pavlidis *et al.* 2012a,b, Mu *et al.* 2008, Shi *et al.* 2007, Gómez *et al.* 2005].

Με σκοπό την καλύτερη κατανόηση της επίδρασης των παραπάνω νανοϋλικών στα καταλυτικά χαρακτηριστικά του cyt c, προσδιορίστηκαν οι καταλυτικές σταθερές ($V_{\max}$ και K_m) της πρωτεΐνης, και μέσω αυτών υπολογίστηκε η καταλυτική ισχύς ($V_{\max}/K_m$) του cyt c παρουσία νανοϋλικών, μέσω της οξείδωσης του ABTS παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων H_2O_2 , η οποία παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.3. Οι αντιδράσεις οξείδωσης ακολουθούν σε όλες τις περιπτώσεις κινητική τύπου Michaelis-Menten. Η παρουσία των νανοϋλικών στο μέσο αντίδρασης επηρεάζει σημαντικά την καταλυτική συμπεριφορά του cyt c, έχοντας ως αποτέλεσμα τη μείωση των κινητικών σταθερών $V_{\max}$ και K_m στις περισσότερες περιπτώσεις, ενώ αντίθετα στην περίπτωση των GO και CNT-COOH, παρατηρήθηκε αύξηση της $V_{\max}$.



Σχήμα 8.3. Καταλυτική ισχύς του cyt c απουσία και παρουσία 10 µg/mL τροποποιημένων (Α) νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος και (Β) παραγώγων οξειδίου του γραφενίου, κατά την οξείδωση του ABTS παρουσία H_2O_2

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 8.3, η παρουσία των νανοϋλικών αυξάνει την καταλυτική ισχύ του cyt c στις περισσότερες περιπτώσεις. Παρόμοιο αποτέλεσμα έχει αναφερθεί και στην περίπτωση της επίδρασης κάποιων από τα παραπάνω νανοϋλικά (CNT-COOH, CNT-C₆-NH₂, GO, GO-C₆-NH₂) στην καταλυτική συμπεριφορά διάφορων υδρολυτικών ενζύμων [Pavlidis *et al.* 2012a]. Η αύξηση αυτή στην καταλυτική ισχύ του

κυτοχρώματος μπορεί να οφείλεται τόσο σε ηλεκτροστατικές όσο και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της πρωτεΐνης και των νανοϋλικών [Zuo *et al.* 2010].

Οι τελικές ομάδες των νανοϋλικών φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μεταξύ του cyt c και των νανοϋλικών. Για παράδειγμα, στην περίπτωση των παραγώγων του GO, η εισαγωγή της τελικής καρβοξυλομάδας (GO-C₁₀-COOH) μπορεί να οδηγήσει σε ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του θετικά φορτισμένου cyt c (pI 10.5) και της αρνητικά φορτισμένης καρβοξυλομάδας, γεγονός που φαίνεται να επιδρά θετικά στην καταλυτική δράση της πρωτεΐνης. Η θετική αυτή επίδραση, δεν παρατηρείται στην περίπτωση του GO-C₁₁-CH₃, το οποίο έχει παραπλήσιου μήκους αλκυλική αλυσίδα, αλλά διαφορετική τελική ομάδα. Ωστόσο, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις δεν είναι ο μοναδικός παράγοντας που επηρεάζει τη δραστηριότητα, καθώς η παραπάνω επίδραση δεν φαίνεται να ισχύει στις αντίστοιχες περιπτώσεις των νανοσωλήνων άνθρακα (CNT-C₁₀-COOH και CNT-C₁₁-CH₃), που υποδεικνύει ότι υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τις αλληλεπιδράσεις νανοϋλικού-πρωτεΐνης, όπως για παράδειγμα η γεωμετρία του νανοϋλικού.

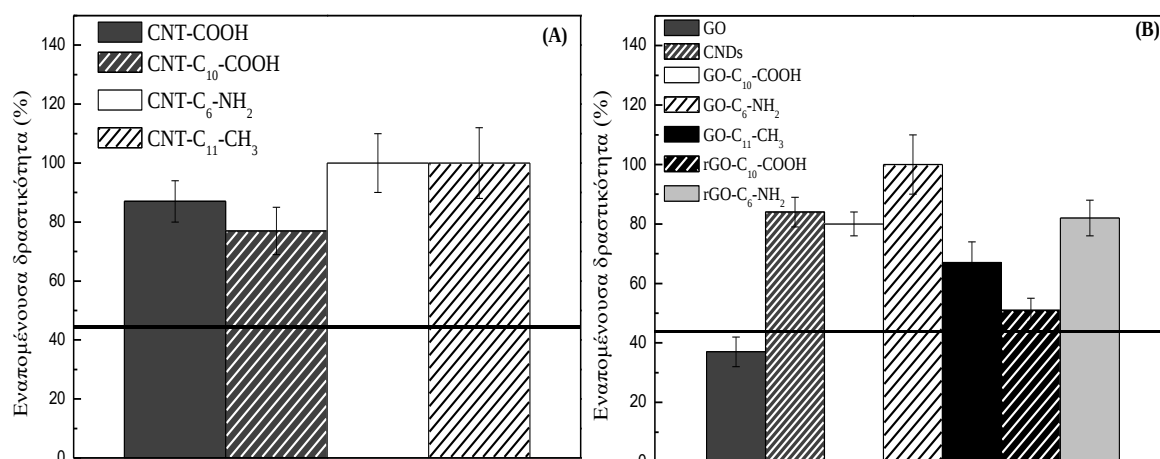
Μεταξύ των παραγώγων των νανοσωλήνων άνθρακα, η μεγαλύτερη καταλυτική ισχύς του cyt c παρατηρείται παρουσία του CNT-COOH, ενώ μεταξύ των παραγώγων του οξειδίου του γραφενίου, παρουσία του GO. Είναι εμφανές ότι η εισαγωγή αλκυλικών αλυσίδων στην επιφάνεια των νανοϋλικών μειώνει την καταλυτική ισχύ του cyt c, ανεξάρτητα από την τελική ομάδα τροποποίησης. Τα CNT-COOH και GO είναι πιο υδρόφιλα από τα τροποποιημένα παράγωγά τους, με αποτέλεσμα να αλληλεπιδρούν καλύτερα με το υδρόφιλο cyt c, αυξάνοντας έτσι την καταλυτική ισχύ του. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται από το γεγονός ότι όταν αυξάνεται η παρεμβαλλόμενη αλκυλική αλυσίδα σε νανοϋλικά με την ίδια τελική ομάδα, η δραστηριότητα του cyt c μειώνεται. Για παράδειγμα, η δραστηριότητα του cyt c είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση των GO-C₄-COOH και CNT-C₄-COOH από ότι στα GO-C₁₀-COOH και CNT-C₁₀-COOH αντίστοιχα (Σχήμα 8.2), το οποίο δείχνει την επίδραση που έχει η υδροφοβικότητα του νανοϋλικού στην καταλυτική ισχύ του cyt c.

Τέλος, η καταλυτική ισχύς του cyt c φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά από τη γεωμετρία του νανοϋλικού. Η αύξηση που παρατηρείται στην περίπτωση των παραγώγων του GO σε σχέση με τους τροποποιημένους CNTs, πιθανώς να οφείλεται σε πολύ ειδικές αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μεταξύ του πρωτεϊνικού μορίου και των νανοϋλικών, οδηγώντας πιθανώς σε αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης με περαιτέρω αποτέλεσμα την αυξημένη δραστηριότητα. Η επίπεδη επιφάνεια των παραγώγων του GO είναι πιο προσβάσιμη στο cyt c από ότι η κυλινδρική επιφάνεια των CNTs [Shang *et al.* 2007, Lundqvist *et al.* 2005], γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε πιο ισχυρές αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη κι έτσι να επηρεάσει περισσότερο την καταλυτική ισχύ του cyt c, όπως επίσης και τη δομή του [Pavlidis *et al.* 2012a, Mu *et al.* 2008].

8.2. Σταθερότητα του κυτοχρώματος c παρουσία νανοϋλικών

Η σταθερότητα των ενζύμων είναι πολύ σημαντική σε πλήθος εφαρμογών. Τα ένζυμα χρησιμοποιούνται σε διάφορους τομείς όπως στη βιοκατάλυση, στην αναλυτική χημεία, στην επεξεργασία τροφίμων, στη διαχείριση του περιβάλλοντος, στη σύνθεση βιοαισθητήρων, εφαρμογές που απαιτούν ακραίες συνθήκες όπως υψηλή θερμοκρασία, ακραίες τιμές pH, παρουσία αλάτων, αλκαλίων και επιφανειοενεργών [Iyer & Ananthanarayan 2008, Drago & Gibson 2001]. Είναι λοιπόν ιδιαίτερα σημαντική η διατήρηση της βιολογικής δράσης του ενζύμου κάτω από μη φυσιολογικές συνθήκες.

Η σταθερότητα του cyt c μελετήθηκε παρουσία 25 $\mu\text{g/mL}$ τροποποιημένων νανοϋλικών στους 40 °C και παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.4. Η πρωτεΐνη επώαστηκε για προκαθορισμένο χρονικό διάστημα παρουσία του υποστρώματος γουαϊακόλη και έπειτα η εναπομένουσα δραστηριότητα υπολογίστηκε παρακολουθώντας την οξείδωσή της παρουσία H_2O_2 .

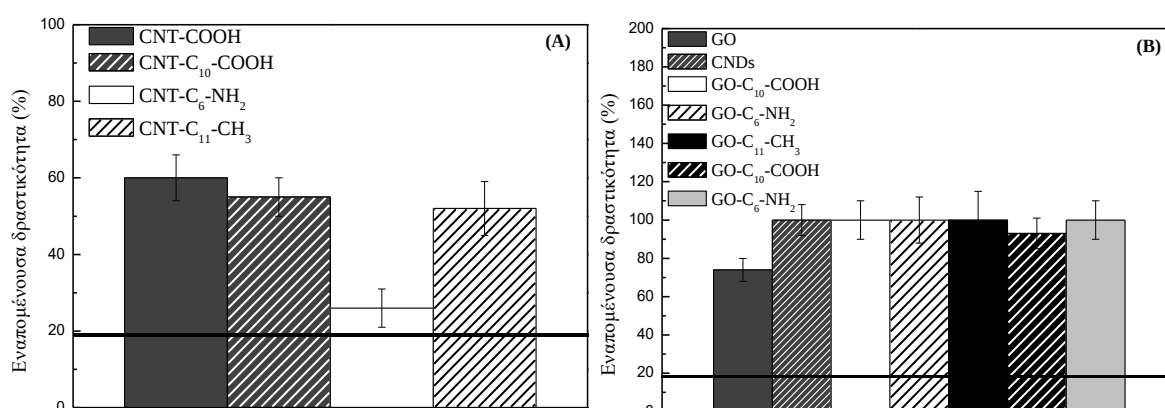


Σχήμα 8.4. Σταθερότητα του cyt c σε υδατικό διάλυμα παρουσία 25 $\mu\text{g/mL}$ τροποποιημένων (A) νανοςωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος και (B) οξειδίων του γραφενίου (ανηγμένων και μη) και νανοδίσκων άνθρακα, μετά από επώαση για 24 h στους 40 °C, παρουσία γουαϊακόλης. Ως 100% ορίζεται η δραστηριότητα του cyt c σε $t=0$ min. Η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί στην εναπομένουσα δραστηριότητα του ελεύθερου cyt c, απουσία νανοϋλικών.

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 8.4, στο υδατικό διάλυμα η παρουσία νανοϋλικών αυξάνει τη σταθερότητα του cyt c. Σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις, η σταθερότητα της πρωτεΐνης μετά από 24 ώρες επώαση στους 40 °C είναι πολύ μεγαλύτερη όταν στο μέσο παρίστανται νανοϋλικά, εν συγκρίσει με τη σταθερότητα του ελεύθερου cyt c, απουσία νανοϋλικών. Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι η επίδραση των νανοϋλικών στη θερμική σταθερότητα του cyt c είναι αντίστροφη από την επίδραση που παρατηρήθηκε στη δραστηριότητά του. Πιο συγκεκριμένα, όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το cyt c παρουσιάζει τη μεγαλύτερη ενεργοποίηση παρουσία του GO (Σχήμα 8.2B και 8.3B). Παρόλα αυτά, παρουσία του συγκεκριμένου νανοϋλικού, το cyt c παρουσιάζει τη χαμηλότερη σταθερότητα (Σχήμα 8.4B). Παρόμοιο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί σε ανάλογη μελέτες σταθερότητας υδρολυτικών ενζύμων, όπως λιπάσες και εστεράσες [Pavlidis *et al.* 2010],

το οποίο οφειλόταν σε δομικές αλλαγές των ενζύμων αυτών μετά από αλληλεπίδραση με νανοϋλικά. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές φαίνεται να καταστούν την πρωτεΐνη πιο δραστική αλλά λιγότερο σταθερή.

Η επίδραση της παρουσίας των τροποποιημένων νανοσωλήνων άνθρακα και των παραγώγων του οξειδίου του γραφενίου μελετήθηκε επίσης στην περίπτωση επώασης του cyt c με το υπεροξείδιο του υδρογόνου, και παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.5. Είναι γνωστό ότι το cyt c απενεργοποιείται παρουσία περίσσειας υπεροξειδίου του υδρογόνου και απουσίας κάποιου ανηγμένου υποστρώματος [Villegas *et al.* 2000], φαινόμενο που χαρακτηρίζει όλες τις υπεροξειδάσες όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 2.1.2.



Σχήμα 8.5. Σταθερότητα του cyt c σε υδατικό διάλυμα παρουσία 25μg/ml τροποποιημένων (A) νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος και (B) οξειδίων του γραφενίου και νανοδίσκων άνθρακα, μετά από επώαση για 24 h στους 40 °C, παρουσία H₂O₂. Ως 100% ορίζεται η δραστικότητα του cyt c σε t=0 min. Η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί στην εναπομένουσα δραστικότητα του ελεύθερου cyt c, απουσία νανοϋλικών.

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 8.5, το ελεύθερο cyt c χάνει σχεδόν το 80% της αρχικής δραστικότητάς του παρουσία του H₂O₂, ενώ η σταθερότητά του παρουσία των νανοϋλικών παραμένει πολύ υψηλή, επισημαίνοντας έτσι την προστατευτική ιδιότητα των νανοϋλικών αυτών έναντι του αποδιατακτικού παράγοντα H₂O₂. Όπως φαίνεται, η χρήση τροποποιημένων παραγώγων του GO, ανεξάρτητα από τη φύση της τελικής ομάδας, αυξάνει τη σταθερότητα του cyt c σε σχέση με το μη τροποποιημένο GO. Επιπλέον, η χρήση των παραγώγων του GO (είτε οξειδωμένα ή ανηγμένα) προστατεύει περισσότερο το cyt c από την αποδιάταξη, σε σύγκριση με τα παράγωγα των CNTs. Η σταθεροποιητική αυτή επίδραση των GO-παραγώγων πιθανώς να οφείλεται στη μεγάλη επιφάνεια των φύλλων του γραφενίου που οδηγεί σε πιο ισχυρές υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, όπως έχει περιγραφεί νωρίτερα, σταθεροποιώντας με αυτόν τον τρόπο τα πρωτεϊνικά μόρια. Όπως έχει ήδη αναφερθεί βιβλιογραφικά, η χρήση του GO ως φορέα ακινητοποίησης για την αιμίνη αποτρέπει την «επίθεση» του H₂O₂ στον πορφυρινικό δακτύλιο του πρωτεϊνικού μορίου [Xue *et al.* 2012]. Στην περίπτωση των παραγώγων του GO, η αυξημένη σταθερότητα του cyt c θα μπορούσε ακόμα να οφείλεται στο υδρόφοβο περιβάλλον που δημιουργούν τα νανοϋλικά αυτά λόγω των αλκυλικών τους αλυσίδων. Το

υδρόφοβο αυτό περιβάλλον μπορεί να εμποδίζει τη μεταφορά του υδρόφιλου H_2O_2 στο ενεργό κέντρο του cyt c, αυξάνοντας κατά αυτόν τον τρόπο τη σταθερότητά του.

Το μέγεθος του νανοϋλικού φαίνεται και εδώ πως επιδρά σημαντικά στη σταθερότητα του cyt c. Η σταθερότητα του cyt c παρουσία των μικρού μεγέθους νανοδίσκων είναι μεγαλύτερη από αυτή παρουσία των ιδιαίτερα μεγαλύτερων φύλλων του οξειδίου του γραφενίου. Αυτοί οι μικρού μεγέθους νανοδίσκοι φαίνεται να αλληλεπιδρούν ισχυρά με τα μόρια του κυτοχρώματος και αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορεί να οδηγούν σε μια πιο συμπαγή δομή του πρωτεϊνικού μορίου και συνεπώς σε αυξημένη σταθερότητα.

8.3. Μελέτη της δομής του κυτοχρώματος c παρουσία νανοϋλικών

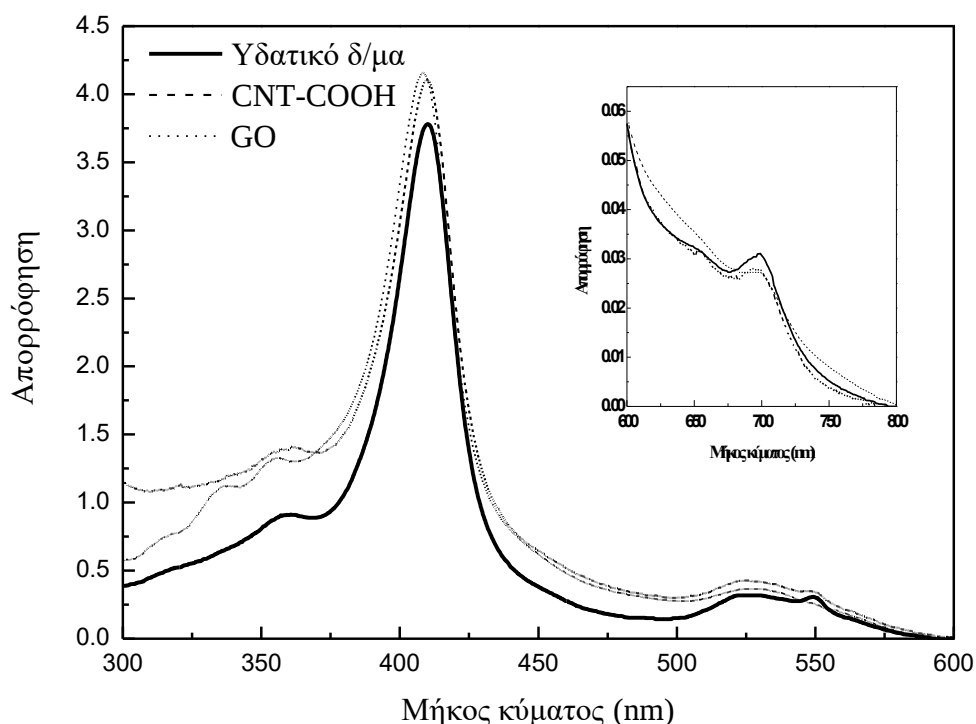
Με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση των νανοϋλικών με βάση των άνθρακα στα δομικά χαρακτηριστικά του cyt c, τόσο στη δευτεροταγή δομή όσο και στο μικροπεριβάλλον της αίμης, χρησιμοποιήθηκαν διάφορες τεχνικές φασματοσκοπίας, όπως η φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους και η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού.

8.3.1. Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους

Η φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης του cyt c με τους οξειδωμένους νανοσωλήνες άνθρακα και το οξείδιο του γραφενίου, καθώς δίνει πληροφορίες για αλλαγές που συμβαίνουν στο μικροπεριβάλλον της αίμης του πρωτεϊνικού μορίου. Η σάρωση του ορατού φάσματος του cyt c δίνει τρεις κυρίως κορυφές, όπως αυτές φαίνονται στο Σχήμα 8.6: μια μεγάλη κυρίως κορυφή στα 409 nm (Soret band), μια πιο μικρή κορυφή στα 527 nm (Q band) και μια πολύ ασθενή κορυφή στα 695 nm (charge transfer band).

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 8.6, η παρουσία των οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος και του οξειδίου του γραφενίου οδηγεί σε αλλαγές του φάσματος απορρόφησης της πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, η απορρόφηση της κορυφής Soret αυξάνεται και ταυτόχρονα παρατηρείται μια μετατόπιση (μέχρι και 3 nm) προς το υπεριώδες, ενώ επιπλέον παρατηρείται ~10% μείωση στην κορυφή στα 695 nm παρουσία των νανοϋλικών. Παρόμοιες φασματοσκοπικές αλλαγές έχουν περιγραφεί και στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης του cyt c με διάφορα λιπίδια και υδρόφοβες ενώσεις [Farivar *et al.* 2010, Ono & Goto 2006, Shimojo *et al.* 2006, Prasad *et al.* 2002], όπως επίσης και με νανοδιαμάντια [Huang & Chang 2004]. Αυτές οι αλλαγές στο φάσμα υποδεικνύουν αλλαγές στο μικροπεριβάλλον της αίμης του cyt c οι οποίες οφείλονται στη διάσπαση του δεσμού μεταξύ του θείου της Met80 του πρωτεϊνικού μορίου και του σιδήρου της αίμης. Η διάσπαση αυτού του δεσμού επάγει δομικές αλλαγές, συμπεριλαμβανομένου την αντικατάσταση των αμινοξέων που συντονίζονται με τον σίδηρο που οδηγεί στην έκθεση της αίμης στο μέσο αντίδρασης και συνεπώς στην διευκόλυνση της μεταφοράς ηλεκτρονίων [Williams 1989] και άρα στην αύξηση της καταλυτικής δραστηριότητας της πρωτεΐνης [Farivar *et al.* 2010, Ono *et al.* 2006, Prasad *et*

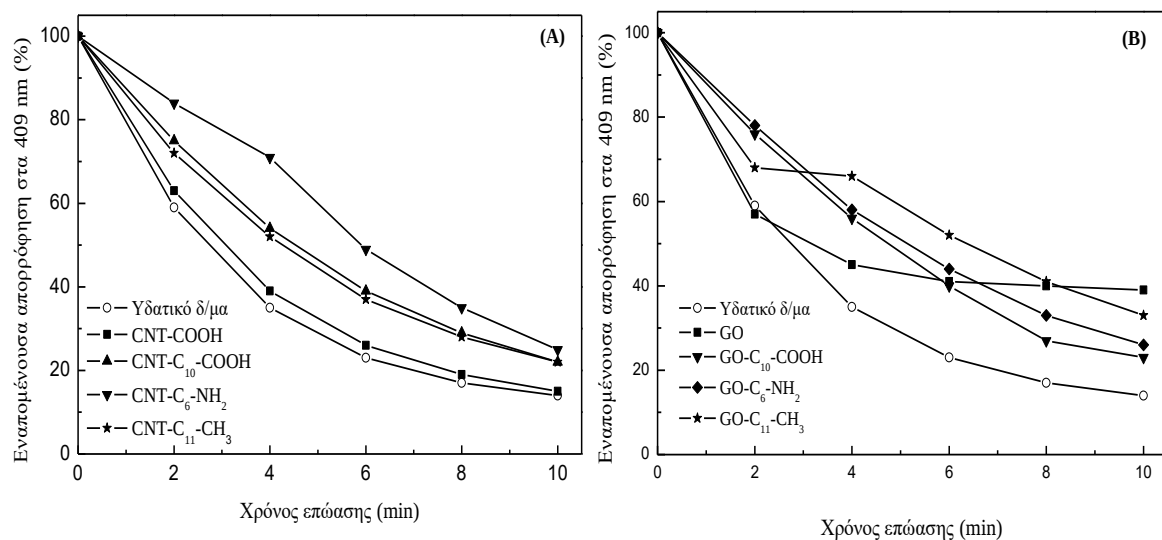
al. 2002]. Τα αποτελέσματα αυτά ερμηνεύουν την αυξημένη δραστηριότητα του cyt c παρουσία των νανοϋλικών που παρατηρήθηκε και συζητήθηκε προηγουμένως στην παράγραφο 8.1.



Σχήμα 8.6. Φάσμα απορρόφησης ορατού-υπεριώδους του cyt c απουσία και παρουσία 25 µg/mL οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος και οξειδίου του γραφενίου.

Όπως ήδη έχει σχολιαστεί στην παράγραφο 8.2, η παρουσία των τροποποιημένων νανοϋλικών με βάση των άνθρακα σταθεροποιεί το cyt c, ιδιαίτερα κατά την επώαση παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου. Για την περαιτέρω διερεύνηση αυτής της ευεργετικής επίδρασης των νανοϋλικών, έγινε λήψη φασμάτων στη Soret περιοχή του κυτοχρώματος κατά την επώαση του με H_2O_2 , τόσο παρουσία όσο και απουσία τροποποιημένων νανοσωλήνων άνθρακα και οξειδίων του γραφενίου. Η αλλαγή της απορρόφησης στην κορυφή Soret παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.7.

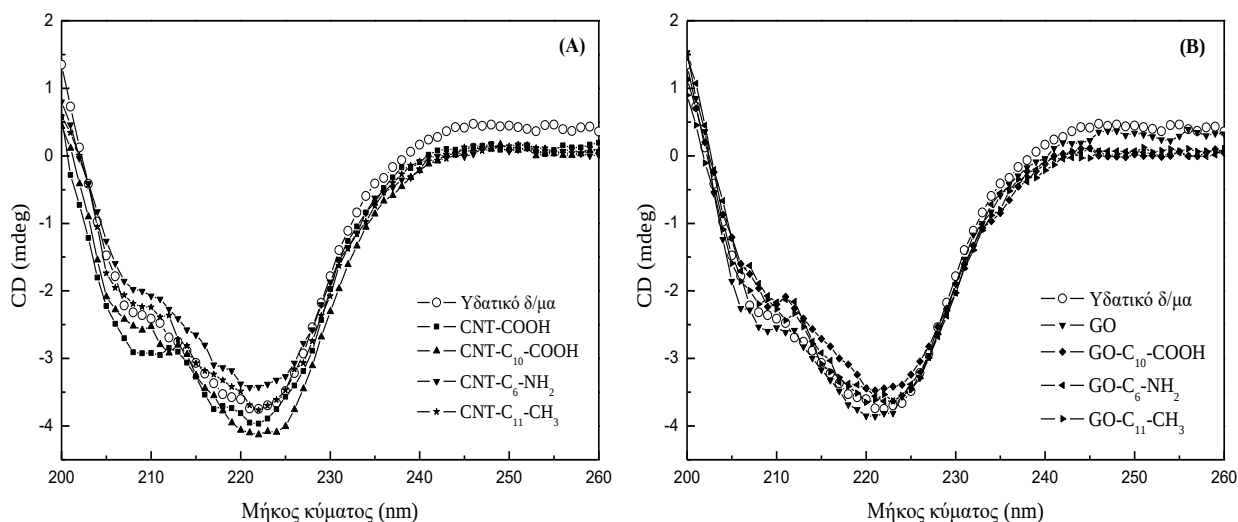
Από το Σχήμα 8.7 φαίνεται ότι μετά από 10 λεπτά επώασης παρουσία H_2O_2 , η απορρόφηση της κορυφής Soret του cyt c μειώνεται δραματικά (μέχρι και 80%) απουσία νανοϋλικών, γεγονός που αντανάκλα την αποδιάταξη της αίμης της πρωτεΐνης [Wang *et al.* 2011, Liu *et al.* 2006, Villegas *et al.* 2000, Florence 1985]. Η παρουσία σχεδόν όλων των νανοϋλικών, μειώνει τον ρυθμό αποδόμησης της αίμης από το H_2O_2 , αποτέλεσμα που αποτελεί ισχυρή ένδειξη για την ικανότητα των νανοϋλικών να σταθεροποιούν το cyt c παρουσία του αποδιατακτικού H_2O_2 .



Σχήμα 8.7. % Εναπομένονσα απορρόφηση του cyt c στα 409 nm παρουσία 10 $\mu\text{g/mL}$ τροποποιημένων (Α) νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος CNTs και (Β) οξειδίων του γραφενίου (ανηγμένον ή μη), μετά από επώαση για 10 λεπτά παρουσία 10 mM H_2O_2 (Τυπική απόκλιση < 4%)

8.3.2. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού

Οι δομικές αλλαγές στην πολυπεπτιδική αλυσίδα του cyt c μέσω των αλληλεπιδράσεων του με νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα μελετήθηκαν περαιτέρω με τη φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού. Παρόλο που τα νανοϋλικά δεν εμφανίζουν κυκλικό διχρωισμό, κατά τις δομικές μελέτες χρησιμοποιήθηκαν χαμηλές συγκεντρώσεις ώστε να μειωθεί η πιθανότητα εμφάνισης οπτικών φαινομένων που θα μπορούσαν να οδηγήσουν σε αύξηση του θορύβου στο φάσμα. Στο Σχήμα 8.8 παρατίθενται τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού στην πέραν-υπεριώδη περιοχή του cyt c παρουσία 2.5 $\mu\text{g/mL}$ τροποποιημένων νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος και παραγώγων οξειδίου του γραφενίου.



Σχήμα 8.8. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού στο πέραν υπεριώδες του cyt c (10 $\mu\text{g/mL}$) παρουσία 2.5 $\mu\text{g/mL}$ τροποποιημένων (Α) νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος και (Β) οξειδίων του γραφενίου.

Όπως φαίνεται, το πέραν υπεριώδες φάσμα κυκλικού διχρωισμού του cyt c εμφανίζει δύο αρνητικές κορυφές γύρω στα 220 και 208 nm οι οποίες σχετίζονται με τη δομή α -έλικας, η οποία είναι το επικρατές στοιχείο δευτεροταγούς δομής της συγκεκριμένης πρωτεΐνης (41% σύμφωνα με την κρυσταλλική δομή της πρωτεΐνης). Το φάσμα κυκλικού διχρωισμού του cyt c παρουσία νανοϋλικών δε φαίνεται να αλλάζει ιδιαίτερα, γεγονός που δείχνει ότι η δευτεροταγής δομή της πρωτεΐνης παραμένει άθικτη.

Στον Πίνακα 8.1 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της αλλαγής της δομής α -έλικας του cyt c παρουσία νανοϋλικών, μετά από ανάλυση των φασμάτων κυκλικού διχρωισμού στην πέραν-υπεριώδη περιοχή. Όπως μπορεί να παρατηρηθεί, το cyt c διατηρεί το μεγαλύτερο μέρος της δευτεροταγούς του δομής όταν αλληλεπιδρά με τα τροποποιημένα νανοϋλικά. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η δομή της πρωτεΐνης παραμένει άθικτη, ενώ πολύ μικρές αλλαγές, της τάξης του 10%, παρατηρούνται στην περίπτωση τροποποιημένων CNTs με καρβοξυλομάδα και αμινομάδα (CNT-C₁₀-COOH και CNT-C₆-NH₂ αντίστοιχα). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί στην περίπτωση της αλληλεπίδρασης του cyt c με νανοσωματίδια πυριτίου [Shang *et al.* 2009], ενώ αντίθετα σε περιπτώσεις μελέτης νανοϋλικών με άλλα ένζυμα, όπως η αμυλογλυκοσιδάση [Cang-Rong & Pastorin 2009], παρατηρούνται μεγάλες αλλαγές στη δευτεροταγή δομή, γεγονός που σημαίνει ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ νανοϋλικών και ενζύμων εξαρτώνται από την ίδια τη φύση της πρωτεΐνης και του νανοϋλικού.

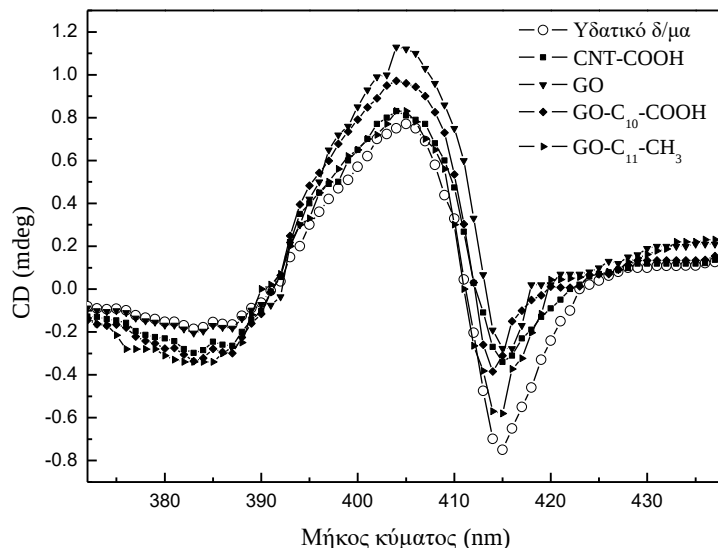
Πίνακας 8.1. Σχετική δομή του κυτοχρώματος c σε υδατικό διάλυμα και παρουσία τροποποιημένων νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος και οξειδίων του γραφενίου (2.5 μg/mL), ως αποτέλεσμα ανάλυσης των φασμάτων κυκλικού διχρωισμού στην πέραν υπεριώδη περιοχή.

Σύστημα	Σχετική δομή ^a (%)
Υδατικό δ/μα	100
CNT-COOH	99
CNT-C ₁₀ -COOH	90
CNT-C ₆ -NH ₂	90
CNT-C ₁₁ -CH ₃	100
GO	98
GO-C ₁₀ -COOH	92
GO-C ₆ -NH ₂	97
GO-C ₁₁ -CH ₃	94

^a)το ποσοστό της σχετικής δομής υπολογίστηκε ως $(\theta_{222} \text{ για το cyt c παρουσία νανοϋλικών} / \theta_{222} \text{ για το ελεύθερο cyt c}) \times 100$ [Cang-Rong & Pastorin 2009, Asuri *et al.* 2007].

Για την εκτενέστερη μελέτη της επίδρασης των νανοϋλικών στα δομικά χαρακτηριστικά του cyt c, μελετήθηκαν τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού της πρωτεΐνης στην περιοχή Soret. Τα φάσμα κυκλικού διχρωισμού στην περιοχή αυτή, είναι αποτέλεσμα των ηλεκτρονιακών μεταπτώσεων της αίμης και των αλληλεπιδράσεών της με τα γειτονικά αρωματικά αμινοξέα, και παρέχει περαιτέρω πληροφορίες σχετικά με την ακεραιότητα της αίμης [Woody & Hsu 1971, Meyer 1968]. Το φάσμα του cyt c στη φυσική του

διαμόρφωση παρουσιάζει μια αρνητική κορυφή γύρω στα 416 nm και μια θετική κορυφή στα 406 nm λόγω του φαινομένου Cotton, όπως φαίνεται στο Σχήμα 8.9, κυρίως ως αποτέλεσμα των αλληλεπιδράσεων της αίμης και της πολυπεπτιδικής αλυσίδας της πρωτεΐνης [Ahluwalia *et al.* 2011, Wei & Danielson 2011, Meyer 1985].



Σχήμα 8.9. Φάσματα κυκλικού διχρωισμού του cyt c (200 µg/mL) στη Soret περιοχή παρουσία 2.5 µg/mL οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος και τροποποιημένων οξειδίων του γραφενίου.

Η επώαση του cyt c με κάποια από τα νανοϋλικά που μελετήθηκαν, και πιο ειδικά με τα παράγωγα του GO, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της θετικής κορυφής στα 406 nm και την ταυτόχρονη μείωση της αρνητικής κορυφής στα 416 nm. Παρόμοιες αλλαγές έχουν αναφερθεί κατά τις αλληλεπιδράσεις του cyt c με οργανικούς διαλύτες και ιοντικά υγρά [Wei & Danielson 2011], καθώς και μετά από πρόσδεση της πρωτεΐνης σε νανοσωματίδια πυριτίου [Woody & Hsu 1971]. Οι αλλαγές αυτές στο φάσμα κυκλικού διχρωισμού του cyt c στην περιοχή Soret, όπως και αυτές που παρατηρήθηκαν παραπάνω στην ανάλυση του φάσματος ορατού-υπεριώδους, υποδεικνύουν ότι παρουσία των συγκεκριμένων νανοϋλικών, η αίμη αναπροσανατολίζεται στη θέση της στο ενεργό κέντρο [Wei & Danielson 2011, Thomas *et al.* 2000], καθιστώντας την πιο προσβάσιμη στα υποστρώματα, αποτέλεσμα που οδηγεί στην αυξημένη δράση υπεροξειδάσης που έχει παρατηρηθεί και περιγραφεί εκτενώς στην παράγραφο 8.1.

9. Ακίνητοποίηση του κυτοχρώματος c σε νανοδομικά υλικά

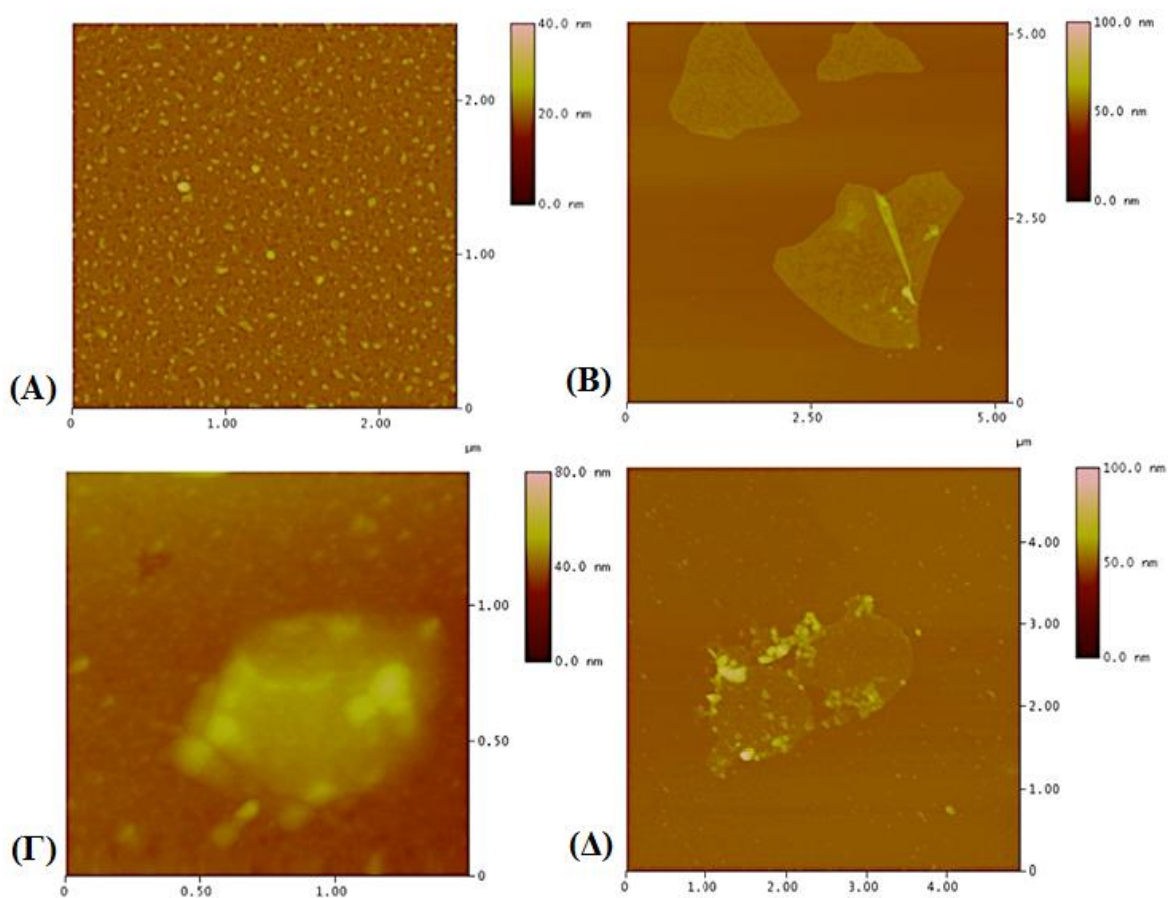
Τα πλεονεκτήματα της χρήσης νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα, και πιο συγκεκριμένα των παραγώγων της οικογένειας του γραφενίου, ως φορέων ακίνητοποίησης για διάφορα ένζυμα αναπτύχθηκαν εκτενώς στο Κεφάλαιο 3. Τα ένζυμα που ακίνητοποιούνται στα νανοϋλικά αυτά συνήθως διατηρούν τις καταλυτικές τους ιδιότητες και βρίσκουν εφαρμογή σε πλήθος βιοδιεργασιών [Su *et al.* 2012, Xu *et al.* 2012, Huang *et al.* 2011, Zhang *et al.* 2010], αλλά ορισμένες φορές οι αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μεταξύ αυτών και των νανοϋλικών κατά τη διαδικασία ακίνητοποίησης επηρεάζει τα καταλυτικά και δομικά χαρακτηριστικά τους. Για το λόγο αυτό, η κατανόηση της επίδρασης τόσο της φύσης και γεωμετρίας του νανοϋλικού όσο και της μεθόδου ακίνητοποίησης στην καταλυτική συμπεριφορά και δομή των ενζύμων, αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για τον σχεδιασμό και τη σύνθεση νανοβιοκαταλυτών με ενισχυμένες ιδιότητες για ευρεία χρήση τόσο σε εργαστηριακή όσο και σε βιομηχανική κλίμακα.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η ακίνητοποίηση του κυτοχρώματος c σε διάφορα τροποποιημένα παράγωγα του οξειδίου του γραφενίου, χρησιμοποιώντας τόσο φυσικές όσο και χημικές μεθόδους ακίνητοποίησης. Ως φορείς ακίνητοποίησης χρησιμοποιήθηκαν παράγωγα του GO, πριν και μετά από χημική αναγωγή της επιφάνειάς τους, τροποποιημένα με αλκυλικές αλυσίδες αυξανόμενου μήκους, με τελικές ελεύθερες καρβοξυλομάδες ή αμινομάδες. Το cyt c ακίνητοποιήθηκε ομοιοπολικά στα νανοϋλικά με τελικές αμινομάδες με τη χρήση της γλουτεράλδεϋδης ως μόριο διαμεσολαβητή, ενώ στην περίπτωση των νανοϋλικών με τελικές καρβοξυλομάδες, η διασύνδεση της πρωτεΐνης με το νανοϋλικό έγινε μέσω της αντίδρασης με EDC/NHS όπως περιγράφεται στις παραγράφους 7.2.3 και 7.2.2. αντίστοιχα. Σε όλες τις περιπτώσεις η ακίνητοποίηση έλαβε χώρα κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (pH 7.0, 30 °C), ενώ χρησιμοποιήθηκε λόγος βάρους (weight ratio) νανοϋλικού:πρωτεΐνης ίσος με 1:1. Τα νανοβιοκαταλυτικά συστήματα που παρασκευάστηκαν χαρακτηρίστηκαν μορφολογικά και δομικά με διάφορες μεθόδους μικροσκοπίας, ανάλυσης και φασματοσκοπίας.

9.1. Χαρακτηρισμός του ακίνητοποιημένου κυτοχρώματος c με μικροσκοπικές και φασματοσκοπικές τεχνικές

9.1.1. Μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων

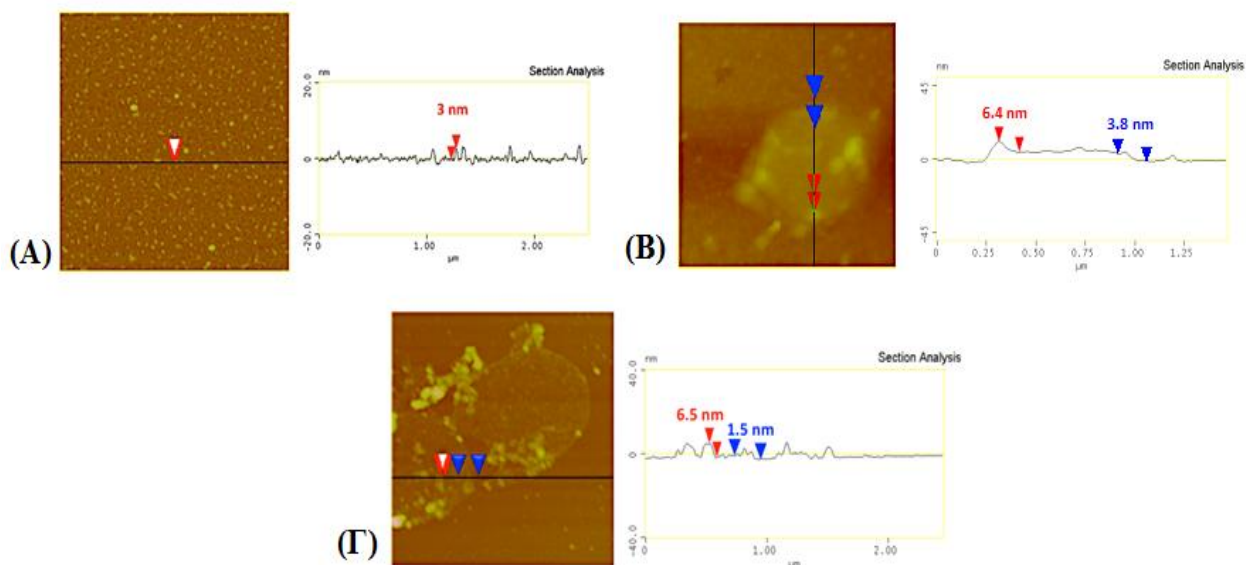
Η μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων (AFM) είναι τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για το χαρακτηρισμό νανοϋλικών όπως επίσης και σε ορισμένες περιπτώσεις βιομορίων [Zhao *et al.* 2014, Yang *et al.* 2013] καθώς μπορεί να δώσει πληροφορίες για τις αλλαγές στη μορφολογία τόσο του νανοϋλικού όσο και μετά την πρόσδεση μιας πρωτεΐνης σε αυτό. Στην Εικόνα 9.1 παρουσιάζονται οι εικόνες ύψους που προκύπτουν από το AFM, και αντιστοιχούν στο ομοιοπολικά ακίνητοποιημένο cyt c σε GO και GO-C₆-NH₂, εν συγκρίσει με την ελεύθερη πρωτεΐνη και το GO χωρίς το cyt c.



Εικόνα 9.1. AFM εικόνες ύψους (Α) του cyt c, (Β) του GO, (Γ) του ομοιοπολικά ακινητοποιημένου cyt c στο GO, και (Δ) του ομοιοπολικά ακινητοποιημένου cyt c στο GO-C₆-NH₂.

Τα αποτελέσματα επιβεβαιώνουν την επιτυχή ακινητοποίηση του cyt c στα παράγωγα του οξειδίου του γραφενίου. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρούνται σχετικά ομοιόμορφα σωματίδια οργανωμένα σε κυκλικούς τομείς και προσκολλημένα στην επιφάνεια των φύλλων των νανοϋλικών (Εικόνα 9.1Γ και 9.1Δ). Επιπλέον, παρατηρείται ότι μερικά πρωτεϊνικά μόρια παραμένουν στην επιφάνεια του cyt c που φέρει το δείγμα, γεγονός που αποδεικνύει ότι ένα μικρό μέρος του cyt c έχει αποκολληθεί από το νανοϋλικό.

Λεπτομερής ανάλυση του τοπογραφικού προφίλ πραγματοποιήθηκε στις άκρες των νανοϋλικών, καθώς και του ακινητοποιημένου cyt c, και παρουσιάζεται στην Εικόνα 9.2.



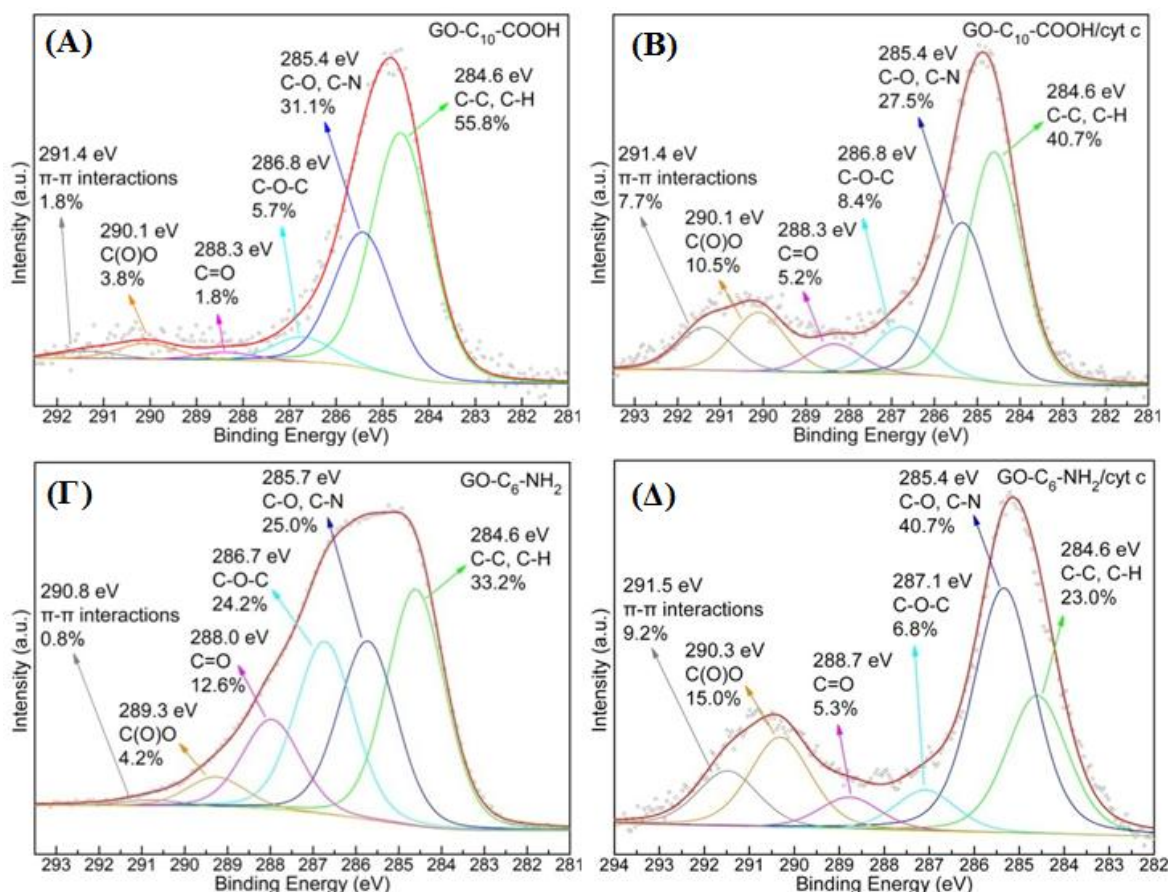
Εικόνα 9.2. Ανάλυση του τοπογραφικού προφίλ (Α) του cyt c, (Β) του ομοιοπολικά ακινητοποιημένου cyt c στο GO, και (Γ) του ομοιοπολικά ακινητοποιημένου cyt c στο GO-C₆-NH₂.

Ο μέσος όρος του πάχους των φύλλων του GO υπολογίστηκε περίπου 1.5–3.8 nm, τιμή που είναι σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες [Georgakilas *et al.* 2010]. Το μέγεθος της πρωτεΐνης που έχει προσκολληθεί στα νανοϋλικά είναι περίπου 6–8 nm, μεγαλύτερο σε σχέση με το μέγεθος του ελεύθερου cyt c [Shang *et al.* 2009], αποτέλεσμα που δείχνει ότι πιθανώς σε κάποια σημεία κατά την ακινητοποίηση, δημιουργούνται συσσωματώματα πρωτεΐνης.

9.1.2. Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X

Η φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS) αποτελεί μια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για το χαρακτηρισμό των ακινητοποιημένων ενζύμων [Du *et al.* 2015, Pavlidis *et al.* 2012b, Tzialla *et al.* 2010]. Η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό διαφορετικών στοιχείων σε μια επιφάνεια.

Μετρήσεις XPS έλαβαν χώρα για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό του ακινητοποιημένου cyt c. Η ανάλυση των XPS φασμάτων του C1s για το ακινητοποιημένο κυτόχρωμα σε παράγωγα του γραφενίου, καθώς και των ίδιων των νανοϋλικών παρουσιάζονται στο Σχήμα 9.1.



Σχήμα 9.1. Φωτοηλεκτρονικά φάσματα ακτίνων X για το C1s (A) του GO-C₁₀-COOH, (B) του ομοιοπολικά ακινητοποιημένου cyt c στο GO-C₁₀-COOH, (Γ) του GO-C₆-NH₂, (B) του ομοιοπολικά ακινητοποιημένου cyt c στο GO-C₆-NH₂.

Μελετώντας το Σχήμα 9.1A, το νανοϋλικό GO-C₁₀-COOH εμφανίζει μια κυρίως κορυφή στα 284.6 eV (55.8% της ολικής έντασης του C1s), η οποία αποδίδεται στους δεσμούς C-C και C-H. Το δεύτερο συστατικό, το οποίο συνεισφέρει με ένα ποσοστό 31.1% στην ολική ένταση του C1s, καταγράφεται σε ενέργεια πρόσδεσης ίση με 285.4 eV και προέρχεται από τους δεσμούς C-O των υδροξυλομάδων, όπως επίσης και από τους δεσμούς C-N. Η τρίτη κορυφή στα 286.8 eV (5.7% της ολικής έντασης του C1s) αποδίδεται στους δεσμούς C-O-C των αιθερικών ή/και εποξυ- ομάδων. Οι καρβονυλικές ομάδες (C=O) σχετίζονται με την κορυφή στα 288.3 eV (1.8% της ολικής έντασης του C1s), ενώ η κορυφή στα 290.1 eV (3.8% της ολικής έντασης του C1s) αντιστοιχεί στις καρβοξυλικές ομάδες (O-C=O). Τέλος, το συστατικό ισχυρής ενέργειας πρόσδεσης στα 291.4 eV (1.8% της ολικής έντασης του C1s) συνδέεται με τις αλληλεπιδράσεις π-π [Gengler *et al.* 2013].

Η συνεισφορά των συστατικών διαφέρει στην περίπτωση του ακινητοποιημένου cyt c στο GO-C₁₀-COOH, με ταυτόχρονη αλλαγή του φάσματος και μια χημική μετατόπιση σε υψηλότερη ενέργεια πρόσδεσης (Εικόνα 9.1B). Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση του ακινητοποιημένου cyt c, εμφανίζονται νέες κορυφές στο φάσμα, στα ~400 και ~165 eV, οι οποίες αποδίδονται στο N1s (1.3%) και S2p (1.7%) αντίστοιχα και

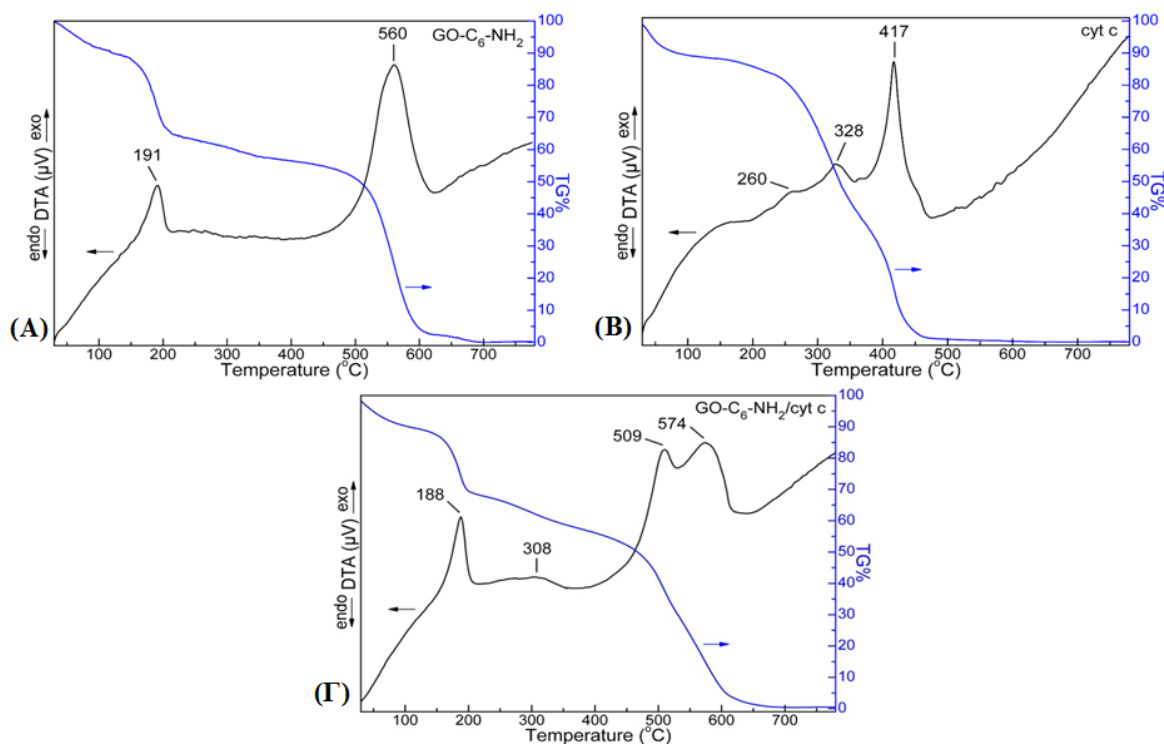
προέρχονται από το ομοιοπολικά ακινητοποιημένο cyt c. Παρόλο που οι κορυφές που αντιστοιχούν στους δεσμούς C-C και C-H εξακολουθούν να κυριαρχούν στο φάσμα, η συνεισφορά τους στην ολική ένταση μειώνεται σημαντικά. Οι αλλαγές στη συνεισφορά των ομάδων C-O/C-N και C-O-C είναι ασήμαντες και δεν υποδεικνύουν κάποια ιδιαίτερη τάση. Ωστόσο, είναι εμφανές από τη συνολική εικόνα του φάσματος, ότι οι συνεισφορές των καρβονυλικών και καρβοξυλικών ομάδων αυξάνονται μετά από την ακινητοποίηση της πρωτεΐνης, και μάλιστα τα ποσοστά τους είναι σχεδόν τριπλάσια εν συγκρίσει με αυτά του νανοϋλικού. Το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία της πρωτεΐνης, η οποία περιέχει ένα αξιοσημείωτο αριθμό ομάδων C=O στους πεπτιδικούς δεσμούς, καθώς και ομάδες O-C=O που ανήκουν σε διάφορα αμινοξέα, όπως το ασπαραγινικό και το γλουταμινικό οξύ. Τέλος, οι κορυφές που αντιστοιχούν στις δυνάμεις π-π αυξάνονται, αποκαλύπτοντας έτσι αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μεταξύ των αρωματικών αμινοξέων του cyt c και των ηλεκτρονίων π του νανοϋλικού, κατά την ακινητοποίηση. Παρ' όλα αυτά, καθώς η πρωτεΐνη περιλαμβάνει όλων των ειδών τους δεσμούς που έχουν αναφερθεί, είναι ριψοκίνδυνο να γίνουν επιπλέον υποθέσεις βασισμένες στα ποσοστά των κορυφών που συνεισφέρουν στο φάσμα του άνθρακα.

Στην περίπτωση του νανοϋλικού GO-C₆-NH₂ καθώς και του ακινητοποιημένου σε αυτό cyt c (Εικόνα 9.1Γ και Δ), παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στα φάσματα κατά την εναπόθεση της πρωτεΐνης στο νανοϋλικό, υποδεικνύοντας έτσι την επιτυχή ακινητοποίησή της. Το φάσμα του ακινητοποιημένου cyt c στο GO-C₆-NH₂ επιδεικνύει αυξημένο ποσοστό των ομάδων O-C=O (πάνω από το τριπλάσιο συγκριτικά με το νανοϋλικό), λόγω της παρουσίας του γλουταμινικού και ασπαραγινικού οξέος των πλευρικών αλυσίδων της πρωτεΐνης. Επιπλέον, οι αλληλεπιδράσεις π-π αυξάνονται και σε αυτή την περίπτωση.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη μελέτη με τη χρήση της φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X καταδεικνύουν την επιτυχή ακινητοποίηση του cyt c στην επιφάνεια των παραγώγων του οξειδίου του γραφενίου και στις δύο περιπτώσεις, όχι μόνο από την ποιοτική αλλαγή του συνολικού φάσματος, εκφραζόμενη κυρίως ως αύξηση των καρβοξυλικών ομάδων, αλλά και από την ανίχνευση αζώτου και θείου που προέρχονται από τα αμινοξέα της πρωτεΐνης.

9.1.3. Θερμική ανάλυση

Η θερμοβαρυτική ανάλυση (TGA) και η διαφορική θερμική ανάλυση (DTA), αποτελούν δύο από τις πιο σημαντικές τεχνικές θερμικής ανάλυσης που χρησιμοποιούνται για την μελέτη των νανοϋλικών όταν αυτά υφίστανται μεταβολή της κατάστασής τους, αλλά και για τον χαρακτηρισμό των νανοϋλικών όταν σε αυτά έχουν ακινητοποιηθεί ένζυμα [Prlainović *et al.* 2016, Serefoglou *et al.* 2008]. Στο Σχήμα 9.2 παρατίθενται τα φάσματα της ανάλυσης TG/DT για το ελεύθερο cyt c, το νανοϋλικό GO-C₆-NH₂, καθώς και το ομοιοπολικά ακινητοποιημένο cyt c στο νανοϋλικό αυτό.



Σχήμα 9.2. Ανάλυση TG/DT για (A) το GO-C₆-NH₂, (B) το cyt c, και (Γ) το ομοιοπολικά ακινητοποιημένο cyt c στο GO-C₆-NH₂.

Η σύγκριση των σημάτων DTA αποκαλύπτει ξεκάθαρα την επιτυχή ακινητοποίηση της πρωτεΐνης στο GO-C₆-NH₂. Οι εξώθερμες κορυφές που εμφανίζει το ακινητοποιημένο cyt c στους 188 και 574 °C αποδίδονται στην αποσύνθεση και καύση του GO (Σχήμα 9.2Γ). Από την άλλη, η κορυφή στους 308 °C, καθώς και η νέα εξώθερμη κορυφή στους 509 °C παράγονται από το cyt c. Επιπλέον, συγκριτικά με το νανοϋλικό GO-C₆-NH₂, η ακινητοποιημένη πρωτεΐνη χάνει περισσότερο βάρος στη θερμοκρασιακή περιοχή ~250–500 °C (μεταξύ των προαναφερθέντων εξώθερμων κορυφών), γεγονός που σχετίζεται με την παρουσία της πρωτεΐνης στο δείγμα. Το περιεχόμενο σε πρωτεΐνη δεν μπορεί να υπολογιστεί ακριβώς, καθώς δεν υπάρχει μια καθοριστική περιοχή και συγκεκριμένη απώλεια βάρους που να οφείλεται αποκλειστικά στο cyt c, αφού για παράδειγμα οι κορυφές καύσεις της πρωτεΐνης και του νανοϋλικού στους 509 και 574 °C αλληλεπικαλύπτονται. Παρ' όλα αυτά, από το σήμα TG%, μπορεί να εκτιμηθεί η παρουσία ~30% κατά βάρος πρωτεΐνης στο δείγμα. Τέλος, η καύση της πρωτεΐνης μετατοπίζεται από τους 417 °C στους 509 °C στην περίπτωση του ακινητοποιημένου cyt c, το οποίο αποτελεί περαιτέρω απόδειξη για την επιτυχή ομοιοπολική ακινητοποίηση στο GO-C₆-NH₂, καθώς οι διάφορες ομάδες της πρωτεΐνης γίνονται πιο σταθερές.

9.2. Επίδραση των νανοϋλικών στην αποτελεσματικότητα της ακινητοποίησης και στη δραστικότητα του ακινητοποιημένου κυτοχρώματος c

Η αυξημένη επιφάνεια στη μονάδα του όγκου που παρουσιάζει το οξείδιο του γραφενίου και τα παράγωγά του λόγω της δομής τους, αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα που επιτρέπει την ακινητοποίηση μεγάλων ποσοτήτων ενζύμου στην επιφάνεια τους [Cang-Rong & Pastorin 2009, Asuri *et al.* 2007]. Ο υπολογισμός της ποσότητας της πρωτεΐνης που ακινητοποιείται στην επιφάνεια του νανοϋλικού αποτελεί κρίσιμο παράγοντα για την αξιολόγηση της ακινητοποίησης. Η απόδοση της ακινητοποίησης υπολογίζεται από τις μετρήσεις πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στα πρωτεϊνικά διαλύματα πριν και μετά την ακινητοποίηση αντίστοιχα.

Η απόδοση της ομοιοπολικής και μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης του cyt c στα τροποποιημένα παράγωγα του GO (ανηγμένα και μη), όπως και η δραστικότητα του ακινητοποιημένου cyt c, παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.1.

Πίνακας 9.1. Απόδοση ομοιοπολικής και μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης (%) του cyt c σε τροποποιημένα παράγωγα του οξειδίου του γραφενίου (ανηγμένα και μη) και σχετική δραστικότητα του ακινητοποιημένου cyt c (Τυπική απόκλιση < 3%).

Νανοϋλικό ως φορέας ακινητοποίησης	Μη ομοιοπολική ακινητοποίηση		Ομοιοπολική ακινητοποίηση	
	Απόδοση ακινητοποίησης (%)	Σχετική δραστικότητα ^{a)}	Απόδοση ακινητοποίησης (%)	Σχετική δραστικότητα ^{a)}
GO	89	1.00	38	0.43
GO-C ₂ -COOH	40	0.08	34	0.09
GO-C ₄ -COOH	50	0.14	24	0.20
GO-C ₁₀ -COOH	47	0.54	50	0.58
GO-C ₂ -NH ₂	38	0.05	30	0.05
GO-C ₄ -NH ₂	37	0.07	40	0.06
GO-C ₆ -NH ₂	62	0.55	46	0.16
rGO-C ₁₀ -COOH	35	0.08	62	0.13
rGO-C ₆ -NH ₂	25	0.05	47	0.17

^{a)} σχετική δραστικότητα ανά μg ακινητοποιημένης πρωτεΐνης. Ως τιμή 1.00 ορίζεται η δραστικότητα του ακινητοποιημένου cyt c στο GO.

Όπως παρατηρείται από τον παραπάνω πίνακα, τόσο η απόδοση της ακινητοποίησης όσο και η δραστικότητα του cyt c εξαρτώνται από τη μέθοδο ακινητοποίησης που χρησιμοποιήθηκε, καθώς και από το είδος της τροποποίησης που υπέστησαν τα νανοϋλικά. Η απόδοση της ακινητοποίησης του cyt c στα συγκεκριμένα νανοϋλικά είναι στις περισσότερες περιπτώσεις υψηλότερη σε σχέση με άλλα νανοϋλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί ως φορείς ακινητοποίησης για το cyt c, όπως για παράδειγμα το κέλυφος φιστικιών [Li *et al.* 2012], ή τα μεσοπορώδη νανοσωματίδια πυριτίου [Cheng *et al.* 2011, Lee *et al.* 2005, Deere *et al.* 2003]. Η απόδοση της ακινητοποίησης είναι μεγαλύτερη στην περίπτωση της χρήσης μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης. Το

αποτέλεσμα αυτό πιθανώς να οφείλεται στο γεγονός ότι κατά τη φυσική προσρόφηση, το cyt c μπορεί να ακινητοποιηθεί σε οποιοδήποτε μέρος της επιφάνειας του νανοϋλικού, ενώ κατά την ομοιοπολική ακινητοποίηση, οι θέσεις δέσμευσης της πρωτεΐνης είναι περιορισμένες, γεγονός που δικαιολογεί τη χαμηλότερη αποτελεσματικότητα της ακινητοποίησης.

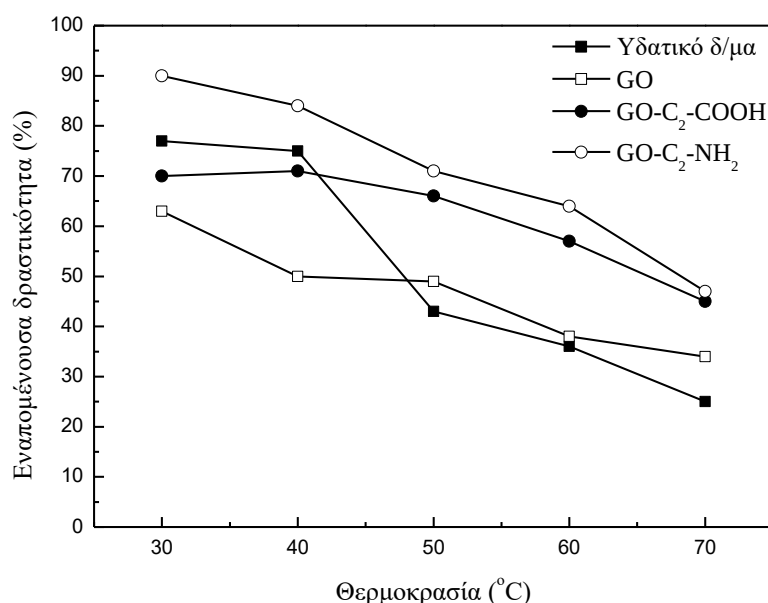
Όσον αφορά στα μη ανηγμένα παράγωγα του οξειδίου του γραφενίου, η απόδοση της ακινητοποίησης είναι μεγαλύτερη κατά τη διαδικασία της μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στο υψηλό ποσοστό ομάδων πλούσιων σε οξυγόνο (καρβοξυλ-, υδροξύλ- και εποξυ- ομάδες) που υπάρχουν στην επιφάνεια των φύλλων των νανοϋλικών αυτών, οι οποίες διευκολύνουν τη φυσική προσρόφηση της πρωτεΐνης μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και σχηματισμού δεσμών υδρογόνου μεταξύ του cyt c και των νανοϋλικών. Αναμένεται ότι αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορούν να οδηγήσουν σε μεγαλύτερη φόρτωση της πρωτεΐνης στο νανοϋλικό με παρόμοιο τρόπο όπως έχει αναφερθεί και στην περίπτωση της υπεροξειδάσης χρένου [Zhang *et al.* 2010]. Όταν το μεγαλύτερο μέρος των ομάδων πλούσιων σε οξυγόνο απομακρύνεται μέσω της χημικής αναγωγής, όπως στην περίπτωση των rGO-C₁₀-COOH και rGO-C₆-NH₂, η απόδοση της ακινητοποίησης μειώνεται δραματικά, συγκριτικά με τα αντίστοιχα μη ανηγμένα παράγωγα, αποτέλεσμα που ενισχύει την υπόθεση ότι οι κύριες δυνάμεις που λαμβάνουν χώρα κατά τη μη ομοιοπολική ακινητοποίηση είναι ηλεκτροστατικής φύσεως [Yang *et al.* 2013]. Επιπρόσθετα, η παρουσία αυτών των ομάδων στην επιφάνεια του νανοϋλικού επηρεάζουν και τη δραστηριότητα του ακινητοποιημένου cyt c, καθώς φαίνεται ότι η σχετική δραστηριότητά του μειώνεται όταν είναι ακινητοποιημένο στα ανηγμένα παράγωγα σε σχέση με τα μη ανηγμένα παράγωγα του GO. Έτσι, το cyt c πιθανώς να αλληλεπιδρά ισχυρότερα με την υδρόφοβη επιφάνεια των ανηγμένων παραγώγων του GO, μέσω σχηματισμού υδρόφοβων ή π-π αλληλεπιδράσεων [Xue *et al.* 2012], επηρεάζοντας με αυτόν τον τρόπο περισσότερο την πρωτεϊνική διαμόρφωση του cyt c, και άρα και την καταλυτική του δράση.

Η δραστηριότητα του cyt c μειώνεται δραστικά μετά την ακινητοποίηση (μέχρι και 50%), αποτέλεσμα που έρχεται σε συμφωνία με ανάλογες περιπτώσεις νανοϋλικών που έχουν χρησιμοποιηθεί ως φορείς ακινητοποίησης [Xu *et al.* 2010]. Η μειωμένη αυτή δραστηριότητα του ακινητοποιημένου cyt c είναι πιθανό να οφείλεται σε δομικές αλλαγές του πρωτεϊνικού μορίου λόγω των ισχυρών αλληλεπιδράσεων με τα νανοϋλικά. Η δραστηριότητα του ακινητοποιημένου cyt c εξαρτάται τόσο από το μήκος της αλκυλικής αλυσίδας όσο και από την τελική λειτουργική ομάδα του νανοϋλικού. Ανεξαρτήτως της τελικής ομάδας, η δραστηριότητα του cyt c αυξάνεται με την αύξηση του μήκους της αλκυλικής αλυσίδας του νανοϋλικού, αποτέλεσμα, αντίστροφο από αυτό που παρατηρήθηκε παρουσία των ίδιων νανοϋλικών και σχολιάστηκε στην παράγραφο 8.1, όπου η αύξηση της αλκυλικής αλυσίδας οδηγούσε σε μείωση της δραστηριότητας. Όταν το cyt c ακινητοποιείται στα παράγωγα του GO, ειδικά στην περίπτωση της ομοιοπολικής ακινητοποίησης, η παρουσία μακρύτερων αλκυλικών αλυσίδων αναμένεται να αυξάνει την απόσταση μεταξύ της πρωτεΐνης και του νανοϋλικού, κι έτσι να μειώνει τις ανεπιθύμητες

αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, και ταυτόχρονα να εμποδίζει τους περιορισμούς μεταφοράς υποστρώματος που προκαλούνται από την κοντινή απόσταση μεταξύ της πρωτεΐνης και του νανοϋλικού.

9.3. Σταθερότητα του ακινητοποιημένου κυτοχρώματος c

Η επίδραση των παραγώγων του GO στη θερμική σταθερότητα του cyt c μελετήθηκε μέσω του υπολογισμού της εναπομένουσας δραστηριότητας μετά από 24 ώρες επώαση σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών σε διάφορες θερμοκρασίες και παρουσιάζεται στο Σχήμα 9.3.

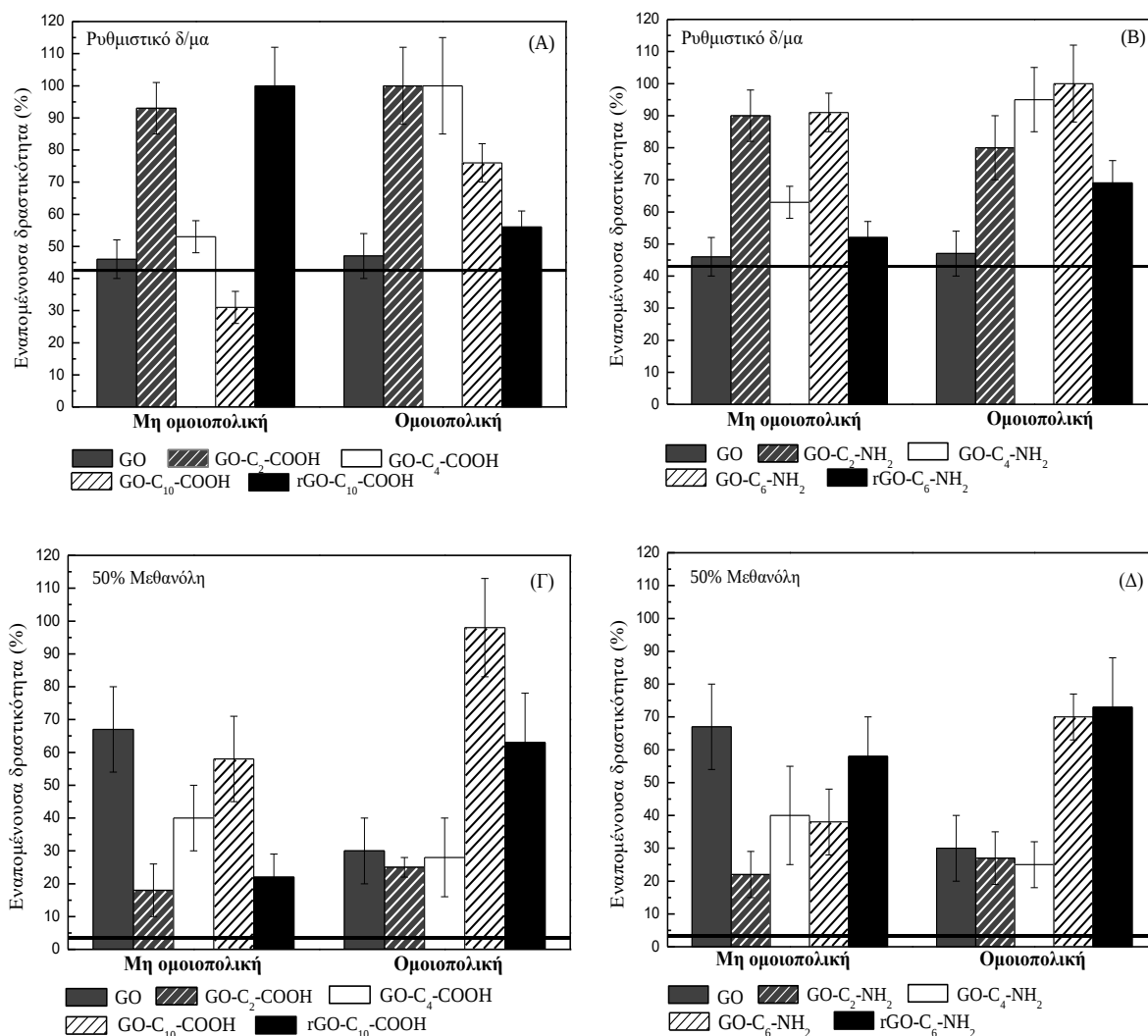


Σχήμα 9.3. Θερμοσταθερότητα του ελεύθερου και του ομοιοπολικά ακινητοποιημένου cyt c σε τροποποιημένα παράγωγα του οξειδίου του γραφενίου, μετά από 24 ώρες επώασης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών. Ως 100% ορίζεται η δράση του cyt c σε $t=0$ min (Τυπική απόκλιση < 7%).

Όπως προκύπτει από το Σχήμα 9.3, στις περισσότερες περιπτώσεις η θερμική σταθερότητα του ομοιοπολικά ακινητοποιημένου cyt c είναι σημαντικά υψηλότερη από αυτή της ελεύθερης πρωτεΐνης, και ιδιαίτερα σε υψηλότερες θερμοκρασίες. Για παράδειγμα, μετά από 24 ώρες επώαση στους 50 °C, το ομοιοπολικά ακινητοποιημένο cyt c στα νανοϋλικά GO-C₂-COOH και GO-C₂-NH₂ διατηρεί περίπου το 80% της αρχικής του δραστηριότητας, ενώ η εναπομένουσα δραστηριότητα του ελεύθερου cyt c είναι λιγότερη από 45%, γεγονός που αποδεικνύει ότι τα παράγωγα του GO αυξάνουν τη θερμική σταθερότητα του cyt c, όταν χρησιμοποιούνται ως φορείς ακινητοποίησης, όπως έχει ήδη αναφερθεί και στην περίπτωση άλλων ενζύμων [Lee *et al.* 2013, Su *et al.* 2012].

Η σταθερότητα του ακινητοποιημένου cyt c σε διάφορα παράγωγα του οξειδίου του γραφενίου (ανηγμένα και μη) τόσο ομοιοπολικά όσο και μη ομοιοπολικά, μελετήθηκε επιπλέον μετά από 24 ώρες επώαση στους 40 °C παρουσία γουαϊακόλης σε ρυθμιστικό

διάλυμα φωσφορικών και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών που περιέχει 50% κ.ό. μεθανόλη, ενός διαλύτη που οδηγεί σε αποσταθεροποίηση της δομής του cyt c και συνεπώς σε μείωση της δράσης του [Konermann & Douglas 1997]. Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στο Σχήμα 9.4.



Σχήμα 9.4. Σταθερότητα του μη ομοιοπολικά και ομοιοπολικά ακινητοποιημένου cyt c σε παράγωγα του GO (ανηγμένα και μη ανηγμένα) με (Α,Γ) τελική ελεύθερη καρβοξυλομάδα και (Β,Δ) τελική ελεύθερη αμινομάδα, μετά από 24 ώρες επώαση παρουσία γουαϊακόλης, σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Α,Β) και σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με 50% κ.ό. μεθανόλης (Γ,Δ). Ως 100% ορίζεται η δράση του cyt c σε $t=0$ min. Η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί στη σταθερότητα του ελεύθερου cyt c.

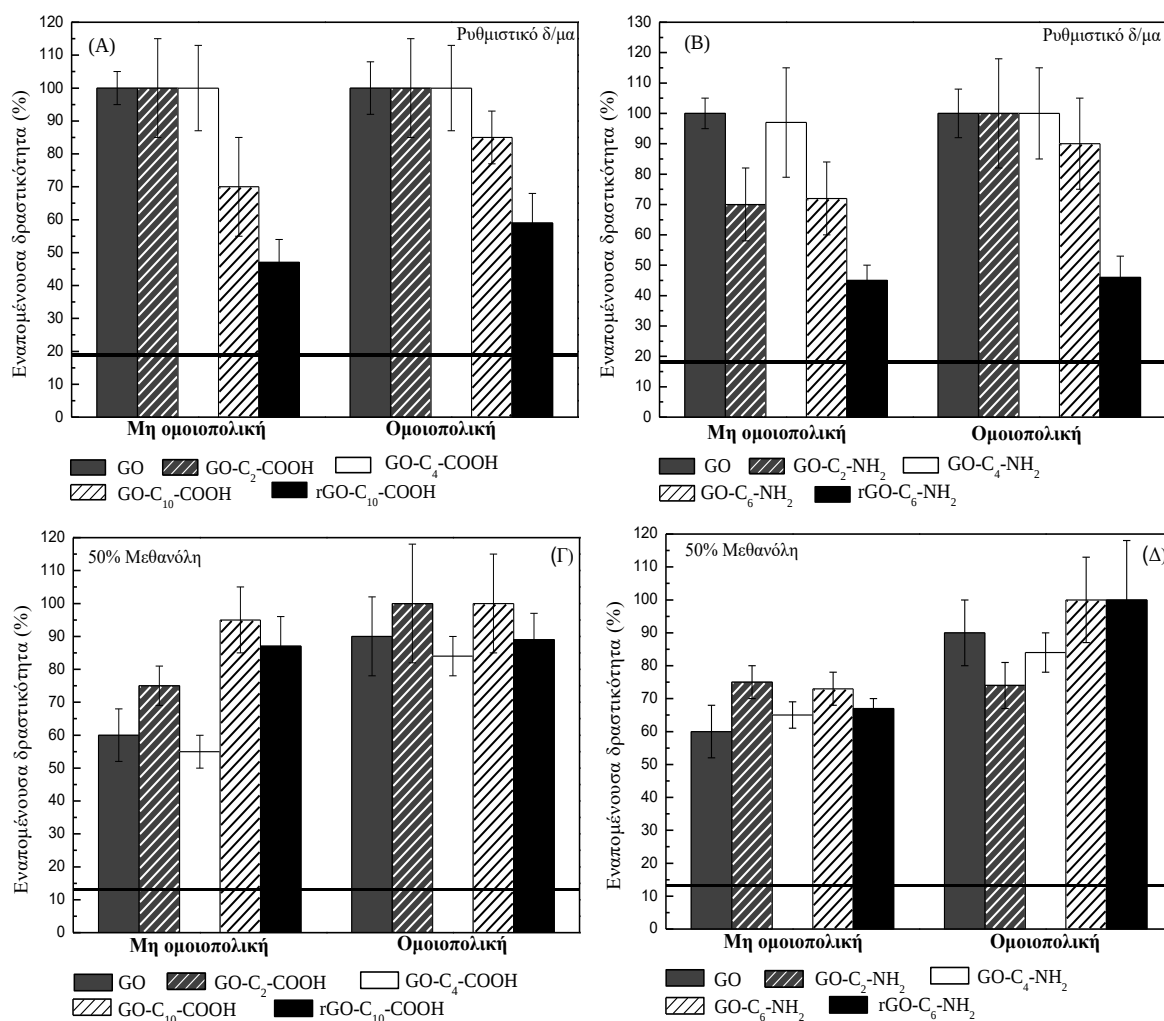
Όπως παρατηρείται από το Σχήμα 9.4, το ακινητοποιημένο cyt c είναι πιο σταθερό μετά από 24 ώρες επώαση παρουσία γουαϊακόλης, από το ελεύθερο, ανεξάρτητα από τον τρόπο ακινητοποίησης και το μέσο στο οποίο επωάζεται. Στην περίπτωση που το μέσο επώασης είναι το ρυθμιστικό διάλυμα (Εικόνα 9.4Α και Β), τα τροποποιημένα παράγωγα του GO (ανηγμένα ή όχι) φαίνεται να προσφέρουν μεγαλύτερη σταθερότητα στο cyt c σε σχέση με το μη τροποποιημένο οξείδιο του γραφενίου, υποδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο το πλεονέκτημα της τροποποίησης των νανοϋλικών. Το μήκος της αλκυλικής αλυσίδας

του νανοϋλικού, όπως επίσης και η χρήση των ανηγμένων GOs (rGOs) φαίνεται να επηρεάζουν τη σταθερότητα του cyt c, αλλά αυτή η επίδραση εξαρτάται τόσο από το μέσο επώασης όσο και από την διαδικασία ακινητοποίησης που ακολουθείται. Ωστόσο, η φύση της ελεύθερης λειτουργικής ομάδας του νανοϋλικού δε φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης, καθώς η εναπομένουσα δραστικότητα είναι σχεδόν ίδια για τα νανοϋλικά με την ίδια μήκους αλκυλική αλυσίδα, αλλά διαφορετική τελική ομάδα (GO-C_n-COOH και GO-C_n-NH₂, n = 2,4).

Η ικανότητα των νανοϋλικών να σταθεροποιούν το cyt c είναι πιο εμφανής κατά την επώασή του παρουσία 50% κ.ό. μεθανόλης. Από το Σχήμα 9.4Γ και Δ φαίνεται ξεκάθαρα ότι το ελεύθερο cyt c σχεδόν απενεργοποιείται μετά από 24 ώρες επώαση, ενώ η ακινητοποιημένη πρωτεΐνη διατηρεί την καταλυτική της ενεργότητα πάνω από 50% στις περισσότερες περιπτώσεις, υποδεικνύοντας ότι η χρήση των παραγώγων του GO ως φορέων ακινητοποίησης προσφέρουν μια προστατευτική επίδραση, οδηγώντας σε υψηλότερη σταθερότητα του cyt c. Καθώς το μήκος της αλκυλικής αλυσίδας αυξάνεται, και συνεπώς η υδροφοβικότητα του νανοϋλικού, η σταθερότητα της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης, επίσης αυξάνεται. Φαίνεται ότι το υδρόφοβο περιβάλλον που δημιουργούν τα συγκεκριμένα νανοϋλικά προστατεύει σε μεγάλο βαθμό το cyt c από τη μετουσίωση που προκαλεί η υδρόφιλη μεθανόλη, η οποία αναμένεται να διαταράσσει την κατάσταση ενυδάτωσης του πρωτεϊνικού μορίου και συνεπώς την καταλυτικά ενεργή του στερεοδιάταξη [Khmel'nitsky *et al.* 1988].

Η επίδραση των νανοϋλικών ως φορέων ακινητοποίησης στη σταθερότητα του cyt c μελετήθηκε και στην περίπτωση επώασής του με υπεροξείδιο του υδρογόνου. Το ακινητοποιημένο cyt c επώαστηκε για 30 λεπτά στους 40 °C παρουσία 10 mM H₂O₂, και προσδιορίστηκε η εναπομένουσα δραστικότητά του. Στο Σχήμα 9.5 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που προκύπτουν από αυτή τη μελέτη. Όπως παρατηρείται, στην περίπτωση του ρυθμιστικού διαλύματος (Εικόνα 9.5Α και Β), το ακινητοποιημένο cyt c, ιδιαίτερα στην περίπτωση της ομοιοπολικής ακινητοποίησης, παρουσιάζει σημαντικά υψηλότερη σταθερότητα ενάντια στο H₂O₂ εν συγκρίσει με την ελεύθερη πρωτεΐνη. Το ελεύθερο cyt c διατηρεί λιγότερο από το 20% της αρχικής του δραστικότητας μετά από 30 λεπτά επώαση παρουσία H₂O₂, ενώ το ακινητοποιημένο cyt c στις περισσότερες περιπτώσεις διατηρεί μέχρι και πλήρως την αρχική του δραστικότητα. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται και στην περίπτωση όπου ως μέσο επώασης χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα με 50% κ.ό. μεθανόλη (Εικόνα 9.5Γ και Δ). Τα αποτελέσματα αυτά ενισχύουν τη σταθεροποιητική ικανότητα των νανοϋλικών που συζητήθηκε στην παράγραφο 8.2. Παρόμοια συμπεριφορά έχει αναφερθεί και στη περίπτωση που το γραφένιο χρησιμοποιήθηκε ως φορέας ακινητοποίησης για την αιμίνη, όπου το νανοϋλικό απέτρεπε την άμεση επαφή με το H₂O₂, και συνεπώς την μετουσίωση της πρωτεΐνης [Xue *et al.* 2012]. Η σταθερότητα του ακινητοποιημένου cyt c στα παράγωγα του GO είναι υψηλότερη εν συγκρίσει με τη σταθερότητα του ακινητοποιημένου cyt c σε νανοσωματίδια πυριτίου παρουσία διάφορων αποδιατακτικών παραγόντων [Shang *et al.* 2009], υποδεικνύοντας ότι η φύση και η γεωμετρία των νανοϋλικών αυτών προσφέρει ένα πιο φιλικό περιβάλλον για το cyt c.

Το μήκος της αλκυλικής αλυσίδας και η τελική λειτουργική ομάδα των τροποποιημένων παραγώγων του GO, δε φαίνεται να παίζουν σημαντικό ρόλο στη σταθερότητα του cyt c ενάντια στο H_2O_2 . Ωστόσο, η χρήση μη ανηγμένων παραγώγων του GO ως φορείς ακινητοποίησης αυξάνει σημαντικά τη σταθερότητα του cyt c εν συγκρίσει με τα ανηγμένα παράγωγα του GO, ανεξαρτήτου του μήκους της αλκυλικής αλυσίδας που παρεμβάλλεται και της μεθόδου ακινητοποίησης που χρησιμοποιείται, γεγονός που ενισχύει την επίδραση της επιφάνειας του νανοϋλικού. Όπως ήδη έχει σχολιαστεί στην παράγραφο 8.1, τα μη ανηγμένα παράγωγα του GO περιλαμβάνουν στην επιφάνειά τους πληθώρα ομάδων πλούσιων σε οξυγόνο, οι οποίες μπορεί να αλληλεπιδρούν ισχυρά μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων ή σχηματισμού δεσμών υδρογόνου με το πρωτεϊνικό μόριο, και να συνεισφέρουν με αυτό τον τρόπο στη διατήρηση της σταθερότητάς του.

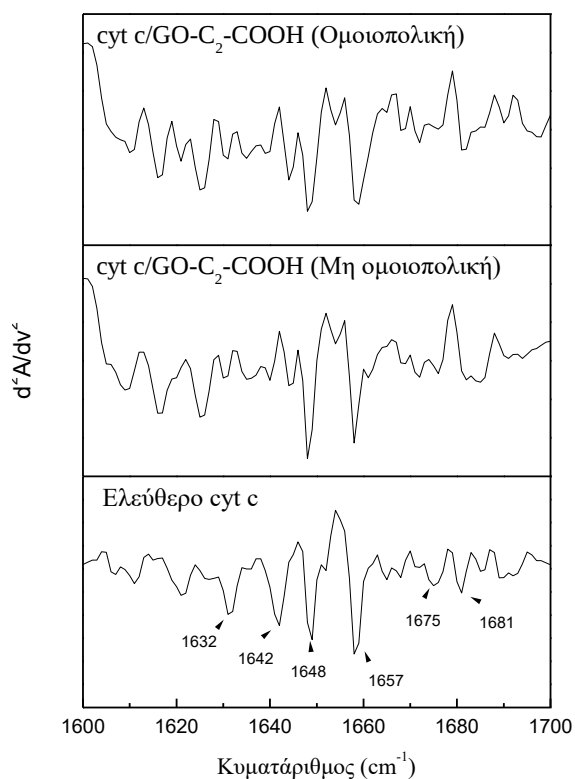


Σχήμα 9.5. Σταθερότητα του μη ομοιοπολικά και ομοιοπολικά ακινητοποιημένου cyt c σε παράγωγα του GO (ανηγμένα και μη ανηγμένα) με (Α,Γ) τελική ελεύθερη καρβοξυλομάδα και (Β,Δ) τελική ελεύθερη αμινομάδα, μετά από 24 ώρες επώαση παρουσία H_2O_2 , σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Α,Β) και σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών με 50% κ.ό. μεθανόλης (Γ,Δ). Ως 100% ορίζεται η δράση του cyt c σε $t=0$ min. Η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί στη σταθερότητα του ελεύθερου cyt c.

9.4. Μελέτη της δομής του ακινητοποιημένου κυτοχρώματος c με FTIR

Για τη μελέτη της δευτεροταγούς δομής του ακινητοποιημένου cyt c σε διάφορα παράγωγα του GO (ανηγμένα και μη), χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπία υπερύθρων. Η ανάλυση του φάσματος στην περιοχή Amide I ($1700\text{--}1600\text{ cm}^{-1}$) μπορεί να δώσει πληροφορίες για την επίδραση της ακινητοποίησης στη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης [Tzialla *et al.* 2010]. Η περιοχή Amide I αποτελείται από αρκετά επικαλυπτόμενα συστατικά που αντιστοιχούν σε διάφορα στοιχεία δευτεροταγούς δομής (α -έλικα, β -φύλλα, β -στροφές, τυχαίο σπείραμα), τα οποία μπορούν να εξακριβωθούν μέσω ταυτοποίησης και προσαρμογής του φάσματος της δεύτερης παραγώγου [Zhao *et al.* 2012, Natalello *et al.* 2005]. Η ανάλυση των κορυφών της περιοχής Amide I του cyt c πριν και μετά την ακινητοποίησή του στα παράγωγα του GO, ακολουθούμενη από διαχωρισμό των κορυφών κατά Gauss αποδίδει αρκετές ευδιάκριτες βασικές ζώνες απορρόφησης οι οποίες χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό των δομικών στοιχείων της πρωτεΐνης.

Στο Σχήμα 9.6 παρατίθενται τα φάσματα της δεύτερης παραγώγου για το ελεύθερο και το ακινητοποιημένο (ομοιοπολικά και μη ομοιοπολικά) cyt c στο νανοϋλικό GO-C₂-COOH. Παρόμοια εικόνα παρουσιάζει το ακινητοποιημένο cyt c και στα υπόλοιπα νανοϋλικά, τα φάσματα των οποίων παρατίθενται στο Παράρτημα III. Οι αλλαγές στη δευτεροταγή δομή του cyt c που προκύπτουν μετά από ανάλυση της περιοχής Amide I, παρατίθενται στον Πίνακα 9.2.



Σχήμα 9.6. Φάσμα της 2^{ης} παραγώγου του ελεύθερου και του ακινητοποιημένου cyt c στο GO-C₂-COOH, στην περιοχή Amide I.

Πίνακας 9.2. Προσδιορισμός (%) της δευτεροταγούς δομής του ελεύθερου και ακινητοποιημένου cyt c, ύστερα από ανάλυση της περιοχής Amide I, από φάσματα υπερύθρου.

Φορέας ακινητοποίησης	Είδος ακινητοποίησης	α -έλικα (%)	β -φύλλα (%)
Ελεύθερο cyt c	-	34.0	17.5
GO	Μη ομοιοπολική	33.4	22.8
	Ομοιοπολική	31.0	20.9
GO-C ₂ -COOH	Μη ομοιοπολική	26.3	30.0
	Ομοιοπολική	28.5	32.2
GO-C ₄ -COOH	Μη ομοιοπολική	24.1	33.8
	Ομοιοπολική	26.9	31.7
GO-C ₁₀ -COOH	Μη ομοιοπολική	29.2	36.7
	Ομοιοπολική	26.1	30.7
rGO-C ₁₀ -COOH	Μη ομοιοπολική	22.3	39.5
	Ομοιοπολική	20.0	31.4
GO-C ₂ -NH ₂	Μη ομοιοπολική	23.6	36.0
	Ομοιοπολική	22.1	34.6
GO-C ₄ -NH ₂	Μη ομοιοπολική	21.8	30.2
	Ομοιοπολική	25.7	27.7
GO-C ₆ -NH ₂	Μη ομοιοπολική	30.0	22.1
	Ομοιοπολική	28.4	24.0
rGO-C ₆ -NH ₂	Μη ομοιοπολική	25.1	25.9
	Ομοιοπολική	25.4	28.1

Η ανάλυση των κορυφών του φάσματος του ελεύθερου cyt c αποκαλύπτει δύο κορυφές στα 1631 cm^{-1} και 1642 cm^{-1} (Σχήμα 9.6) οι οποίες αποδίδονται στα β -φύλλα και αντιστοιχούν στο 17.5% του συνολικού εμβαδού της περιοχής Amide I (Πίνακας 9.2). Τα δευτεροταγή στοιχεία που αντιστοιχούν στην α -έλικα χαρακτηρίζονται από την ύπαρξη μιας κορυφής στα 1657 cm^{-1} και αντιστοιχεί στο 34% της συνολικής περιοχής. Η ανάλυση των κορυφών του φάσματος του ακινητοποιημένου cyt c σε διάφορα παράγωγα του GO εμφανίζει σημαντικές αλλαγές. Το περιεχόμενο σε α -έλικα μειώνεται μέχρι 26% και 28.5% για το μη ομοιοπολικά και ομοιοπολικά ακινητοποιημένο cyt c αντίστοιχα, ενώ το ποσοστό των β -φύλλων αυξάνεται από 17.5% μέχρι 30 και 32% για το μη ομοιοπολικά και ομοιοπολικά ακινητοποιημένο cyt c αντίστοιχα. Παρόμοιες δομικές αλλαγές έχουν αναφερθεί και στην περίπτωση όπου το cyt c ήταν ακινητοποιημένο σε πολλαπλού τοιχώματος νανοσωλήνες άνθρακα [Zhao *et al.* 2012], νανοσωματίδια οξειδίου του πυριτίου [Xu *et al.* 2010] ή νανοσωλήνες τιτανίου [Ray *et al.* 2011]. Ωστόσο, τα παράγωγα του GO που χρησιμοποιούνται ως φορείς ακινητοποίησης στην παρούσα διατριβή προστατεύουν σε μεγαλύτερο βαθμό τη δευτεροταγή δομή του cyt c σε σχέση με άλλα νανοϋλικά, όπως οι πορώδεις νανοζεόλιθοι [Wu *et al.* 2013], υποδεικνύοντας έτσι την

ισχυρή επίδραση που έχει η φύση του νανοϋλικού στα δομικά χαρακτηριστικά μιας πρωτεΐνης.

Ο τύπος της τελικής λειτουργικής ομάδας του νανοϋλικού (και συνεπώς ο τρόπος σύνδεσης με την πρωτεΐνη κατά την ομοιοπολική ακινητοποίηση) επηρεάζει τη δομή του cyt c, καθώς στην περίπτωση όπου τα παράγωγα του GO με τελική καρβοξυλομάδα χρησιμοποιούνται ως φορείς ακινητοποίησης, το ποσοστό της α -έλικας είναι υψηλότερο από ότι στην περίπτωση που ως φορείς ακινητοποίησης χρησιμοποιούνται παράγωγα του GO με τελική αμινομάδα και ίδιου μήκους αλκυλική αλυσίδα. Το αποτέλεσμα αυτό σχετίζεται άμεσα με το γεγονός ότι το ακινητοποιημένο cyt c στα νανοϋλικά με τελική καρβοξυλομάδα διατηρεί τη δραστηριότητά του σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι όταν είναι ακινητοποιημένο σε νανοϋλικά με τελική αμινομάδα, καθώς το περιεχόμενο σε α -έλικα φαίνεται να είναι σημαντικό για τη διατήρηση της δραστηριότητας. Ωστόσο, η μείωση του περιεχομένου σε α -έλικα με την ταυτόχρονη αύξηση του ποσοστού των β -φύλλων, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα στη μετάβαση σε μια πιο άκαμπτη διαμόρφωση της πρωτεΐνης [Vecchio *et al.* 1999] που θα μπορούσε να εξηγήσει την αυξημένη σταθερότητα του ακινητοποιημένου cyt c που περιγράφηκε προηγουμένως στην παράγραφο 9.3.

Τέλος, η μείωση του ποσοστού της α -έλικας στην περίπτωση των ανηγμένων παραγώγων του GO (rGO-C₁₀-COOH και rGO-C₆-NH₂) είναι μεγαλύτερη από αυτή που παρατηρήθηκε για τα αντίστοιχα μη ανηγμένα παράγωγα, υποδεικνύοντας πως η χημική σύνθεση της επιφάνειας του νανοϋλικού επηρεάζει σημαντικά τη δευτεροταγή δομή του cyt c. Οι εκτεταμένες αλλαγές που παρατηρούνται στην περίπτωση των rGO έρχονται σε συμφωνία με τη χαμηλή δραστηριότητα που παρουσιάζει το ακινητοποιημένο κυτόχρωμα στα νανοϋλικά αυτά, όπως σχολιάστηκε στην παράγραφο 9.2, ενισχύοντας την υπόθεση ότι το cyt c αλληλεπιδρά με διαφορετικό τρόπο με το κυρίως επίπεδο των rGO επηρεάζοντας έτσι τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης και συνεπώς την καταλυτική της συμπεριφορά.

10. Σύνθεση πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών ενζύμου-νανοϋλικού

Η μελέτη που προηγήθηκε, είχε ως αποτέλεσμα την καλύτερη κατανόηση των αλληλεπιδράσεων που δημιουργούνται μεταξύ ενζύμων και νανοϋλικών, κυρίως κατά τη διαδικασία της ακινητοποίησης. Η κατανόηση των αλληλεπιδράσεων αυτών μπορεί να οδηγήσει στο σχεδιασμό ακινητοποιημένων ενζύμων με επιθυμητές ιδιότητες. Στο παρόν κεφάλαιο, όλες οι προηγούμενες γνώσεις αξιοποιούνται για τον σχεδιασμό και σύνθεση νέων βιοκαταλυτών με συγκεκριμένα χαρακτηριστικά οι οποίοι θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν τόσο σε ερευνητική όσο και σε βιομηχανική κλίμακα σε πλήθος εφαρμογών με βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον.

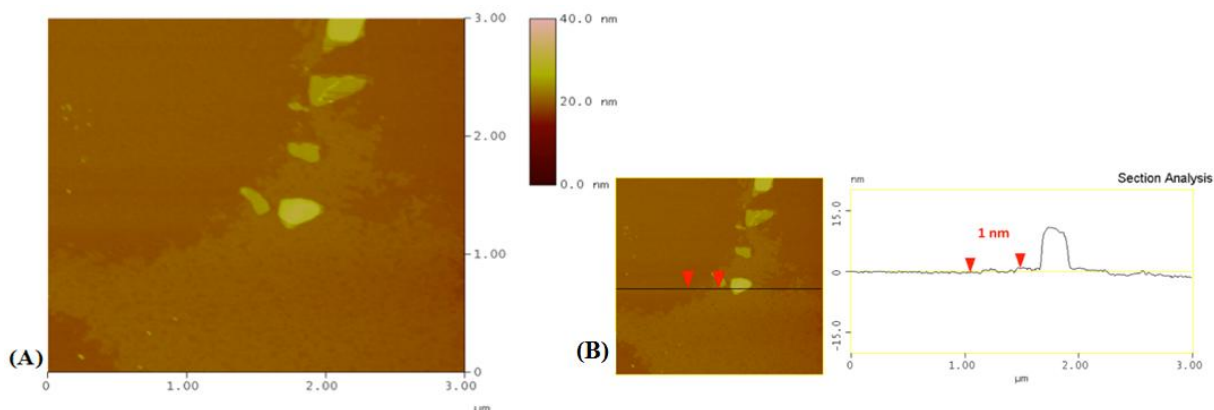
Η τεχνική Layer-by-layer (LbL) αποτελεί μια ευπροσάρμοστη μέθοδο για τη δημιουργία πολυστρωματικών λεπτών φιλμ με ελεγχόμενες ιδιότητες [Decher 1997]. Η βασική αρχή της μεθόδου LbL είναι η αλληλοδιάδοχη εναπόθεση πολυκατιόντων και πολyanιόντων μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Η τεχνική LbL αποτελεί μια επωφελή τεχνική για την ακινητοποίηση βιοδραστικών μορίων όπως είναι τα ένζυμα πάνω ή ανάμεσα στα φιλμ των πολυηλεκτρολυτών, λόγω της πιθανότητας διατήρησης των καταλυτικών χαρακτηριστικών των ενζύμων [Schwinte *et al.* 2002].

Στην παρούσα εργασία, αναπτύχθηκε για πρώτη φορά μια παρόμοια μέθοδος δημιουργίας πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών μέσω της αλυσιδωτών ομοιοπολικών ακινητοποιήσεων μεταξύ ενζύμου και νανοϋλικού. Πιο συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν νανοβιοκαταλύτες που αποτελούνται από εναλλασσόμενα στρώματα τροποποιημένου οξειδίου του γραφενίου με τελικές αμινομάδες (για λόγους συντομίας και ευκολίας θα χρησιμοποιείται ο όρος fGO από εδώ και έπειτα) και λακάσης από το μύκητα *Trametes versicolor* (για λόγους συντομίας και ευκολίας θα χρησιμοποιείται ο όρος TvL από εδώ και έπειτα). Η διαδικασία σύνθεσης των νανοβιοκαταλυτών περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 7.2.4. Οι νεοσυντιθέμενοι νανοβιοκαταλύτες χαρακτηρίστηκαν με τη βοήθεια διαφόρων τεχνικών φασματοσκοπίας και μικροσκοπίας και χρησιμοποιήθηκαν σε ένα εύρος καταλυτικών αντιδράσεων οι οποίες βρίσκουν μεγάλη εφαρμογή σε βιομηχανική κλίμακα.

10.1. Χαρακτηρισμός των πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών λακάσης-τροποποιημένου GO

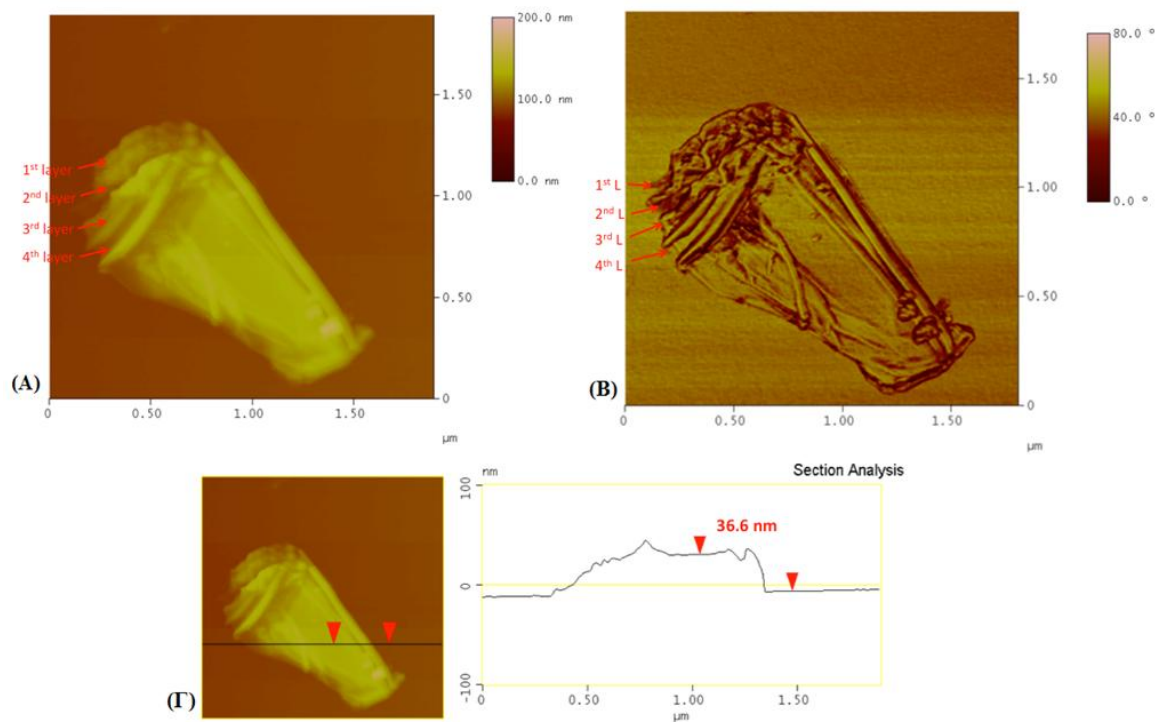
10.1.1. Μικροσκοπία AFM

Ο μορφολογικός χαρακτηρισμός των συντιθέμενων νανοσυστοιχιών ενζύμου-νανοϋλικού έγινε με τη χρήση μικροσκοπίας ατομικών δυνάμεων και τα αποτελέσματα της ανάλυσης παρουσιάζονται στην Εικόνα 10.1.



Εικόνα 10.1. (Α) Εικόνα ύψους και (Β) ανάλυση τοπογραφικού προφίλ του fGO-TvL (ένα στρώμα).

Στην παραπάνω εικόνα παρατίθενται οι εικόνες AFM που αντιστοιχούν στη μορφολογία του 1^{ου} στρώματος της νανοσυστοιχίας (fGO-TvL). Οι προεξοχές που παρατηρούνται στην κορυφή του φύλλου του τροποποιημένου GO υποδηλώνουν ότι η TvL έχει ακινητοποιηθεί επιτυχώς στην επιφάνεια του νανοϋλικού. Η ανάλυση του τοπογραφικού προφίλ ύψους (Εικόνα 10.1B) δίνει ένα μέσο πάχος για το fGO περίπου στο 1 nm και για την TvL περίπου 11 nm.



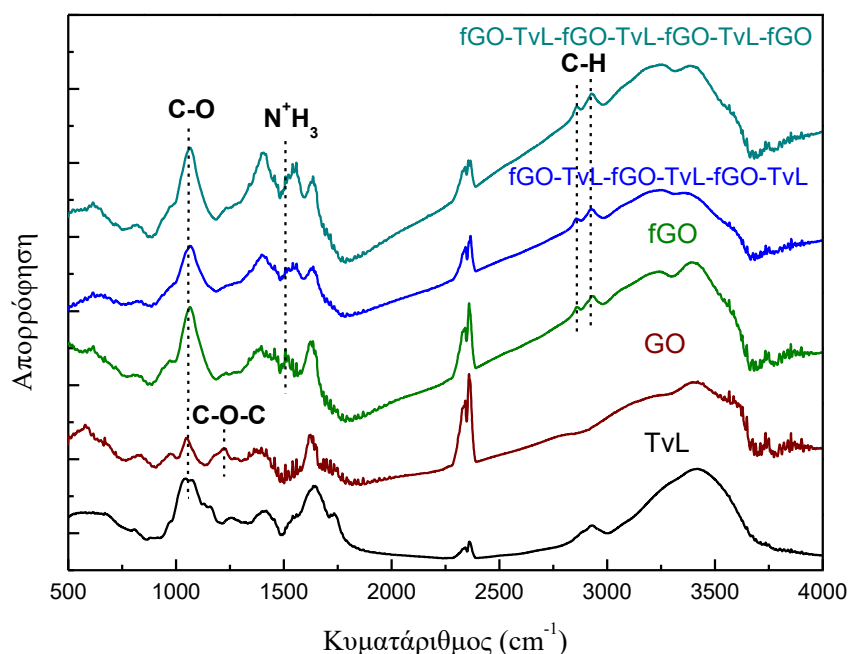
Εικόνα 10.2. (Α) Εικόνα ύψους, (Β) εικόνα φάσης, και (Γ) ανάλυση τοπογραφικού προφίλ του fGO-TvL-fGO-TvL-fGO-TvL-fGO.

Στην Εικόνα 10.2 παρατίθενται οι εικόνες AFM των πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών (fGO-TvL-fGO-TvL-fGO-TvL-fGO). Η πολυστρωματική αυτή δομή, που αποτελείται από 4 φύλλα τροποποιημένου οξειδίου του γραφενίου, είναι ορατή τόσο στην

εικόνα ύψους όσο και στην εικόνα φάσης. Η δομή αυτή επιβεβαιώνεται περαιτέρω και από το τοπογραφικό προφίλ ύψους. Συγκρίνοντας το ολικό πάχος του μονοστρωματικού fGO-TvL, το οποίο υπολογίζεται περίπου 12 nm, με το μέσο πάχος της πολυστρωματικής νανοσυστοιχίας, το οποίο είναι περίπου 37 nm, επιβεβαιώνεται ότι η πολυστρωματική νανοσυστοιχία αποτελείται από 3 στρώματα εναλλασσόμενου ενζύμου και νανοϋλικού ($3 \times 12 = 36$ nm) και από ένα εξωτερικό φύλλο νανοϋλικού (1 nm).

10.1.2. Φασματοσκοπία FTIR

Τα FTIR φάσματα του τροποποιημένου GO και των πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών (fGO-TvL-fGO-TvL-fGO-TvL και fGO-TvL-fGO-TvL-fGO-TvL-fGO) ελήφθησαν για τον περαιτέρω χαρακτηρισμό των νανοσυνθέσεων και συγκρίθηκαν με αυτά του αρχικού μη τροποποιημένου GO και της ελεύθερης λακάσης και παρουσιάζονται στο Σχήμα 10.1.



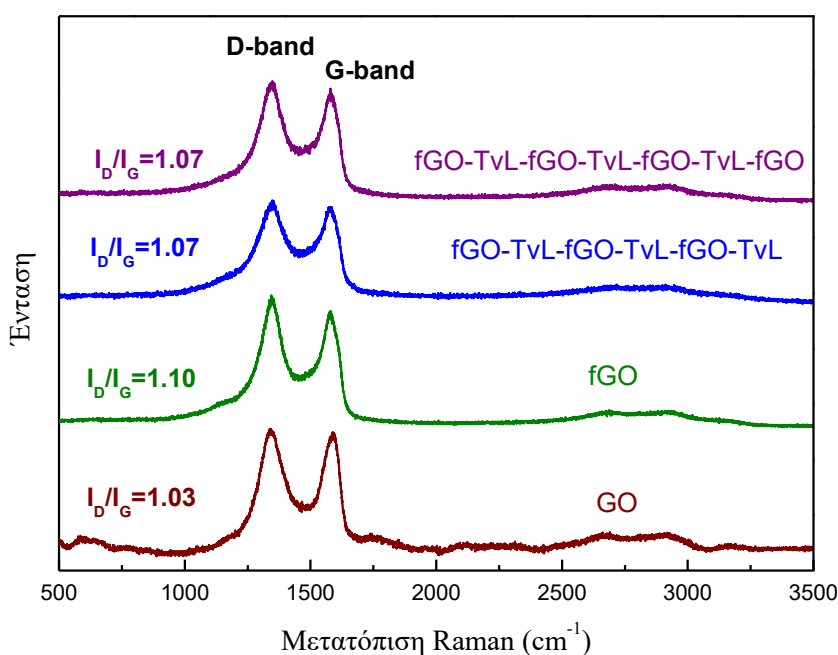
Σχήμα 10.1. Φάσματα υπεράυθρου του fGO και των πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών, εν συγκρίσει με το GO και την ελεύθερη TvL.

Τα φάσματα όλων των δειγμάτων που αναλύθηκαν, επιδεικνύουν όλες τις χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν στο GO και την TvL. Πιο συγκεκριμένα, το GO παρουσιάζει μια ασθενή κορυφή στα 1620 cm^{-1} που απονέμεται στις C=O δονήσεις έκτασης των καρβοξυλικών ομάδων, μια ισχυρή κορυφή στα 1396 cm^{-1} λόγω των παραμορφώσεων O-H των ομάδων C-OH, μια ακόμα ισχυρή κορυφή στα 1062 cm^{-1} που αποδίδεται στις δονήσεις έκτασης C-O, και τέλος μια ασθενή κορυφή στα 1230 cm^{-1} που αντιστοιχεί στις ασύμμετρες δονήσεις των τομέων C-O-C των εποξιομαδών και/ή στις δονήσεις παραμόρφωσης O-H των καρβοξυλικών ομάδων [Enotiadis *et al.* 2012]. Οι ίδιες κορυφές εμφανίζονται και στην περίπτωση του τροποποιημένου νανοϋλικού (fGO), όπως και των fGO-TvL πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών, ενώ η ένταση της κορυφής στα

1230 cm^{-1} μειώνεται λόγω αντιδράσεων πυρηνόφιλης υποκατάστασης μεταξύ των αμινομάδων των οργανικών μορίων και των εποξυ- ομάδων του GO [Spyrou *et al.* 2015, 2014], επιβεβαιώνοντας την επιτυχή τροποποίηση και ακινητοποίηση του GO και του ενζύμου αντίστοιχα. Τέλος, η παρουσία δύο επιπλέον μπαντών στα 2927 και 2856 cm^{-1} , λόγω των ασύμμετρων και συμμετρικών δονήσεων των ομάδων CH_2 , επιβεβαιώνει την παρουσία των αμινοπαραγώγων στις fGO-TvL πολυστρωματικές νανοσυστοιχίες.

10.1.3. Φασματοσκοπία Raman

Η φασματοσκοπία Raman αποτελεί μια τεχνική που χρησιμοποιείται για την παρατήρηση παλμικών, περιστροφικών, και άλλων χαμηλής συχνότητας λειτουργιών ενός συστήματος [Gardiner & Graves 1989], και χρησιμοποιείται ευρέως για τον χαρακτηρισμό διάφορων νανοϋλικών καθώς και ακινητοποιημένων βιομορίων σε αυτά [Sekar *et al.* 2015, Tavares *et al.* 2015]. Τα φάσματα Raman του GO, του τροποποιημένου GO και των πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών (fGO-TvL-fGO-TvL-fGO-TvL και fGO-TvL-fGO-TvL-fGO-TvL-fGO) παρατίθενται στο Σχήμα 10.2.



Σχήμα 10.2. Φάσματα Raman του fGO και των πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών, εν συγκρίσει με το GO.

Όπως παρατηρείται, όλα τα φάσματα είναι παρόμοια και χαρακτηριστικά για νανοϋλικά με βάση το γραφένιο, χωρίς ιδιαίτερες διαφορές. Συγκεκριμένα, τα φάσματα εμφανίζουν τη χαρακτηριστική κορυφή G στα 1580 cm^{-1} λόγω του υβριδισμού sp^2 των ατόμων άνθρακα, και την κορυφή D στα 1349 cm^{-1} που προκαλείται από διαταραχή των sp^2 -υβριδισμένων ατόμων άνθρακα και είναι χαρακτηριστική στην περίπτωση αλλοίωσης του πλέγματος των φύλλων του γραφενίου, λόγω της εκτενούς οξείδωσής τους [Kudin *et al.* 2008]. Η κορυφή D δε σχετίζεται με τον αριθμό των στρωμάτων του γραφενίου, παρά μόνο με το βαθμό αλλοίωσης. Η σχετική ένταση της κορυφής D προς την κορυφή G

(I_D/I_G) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να δώσει πληροφορίες για το βαθμό τροποποίησης των νανοϋλικών, πολιτικοποιώντας σε ένα βαθμό τη διατάραξη του πλέγματος των ατόμων άνθρακα [Casiraghi *et al.* 2009]. Ο λόγος I_D/I_G στην περίπτωση του GO είναι 1.03, ενώ οι λόγοι και των δύο νανοδομημένων είναι ίσοι με 1.07, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ακινητοποίηση της TvL στο τροποποιημένο GO δεν προκαλεί αλλαγή στο πλέγμα του νανοϋλικού, αφήνοντας την επιφάνειά του ανέπαφη.

10.2. Δραστικότητα των πολυστρωματικών νανοδομημένων λακάσης-τροποποιημένου GO

Η καταλυτική δράση των πολυστρωματικών νανοδομημένων λακάσης-fGO μελετήθηκε στην αντίδραση οξείδωσης του ABTS (1 mM) σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών pH 4.58 (0.1 M) σε θερμοκρασία δωματίου, και παρουσιάζεται στον Πίνακα 10.1.

Πίνακας 10.1. Δραστικότητα των πολυστρωματικών νανοδομημένων μέσω της οξείδωσης ABTS.

Ακτινοποιημένη TvL	Δραστικότητα (U/mg*)
fGO-TvL	0.55 ± 0.07
fGO-TvL-fGO	1.00 ± 0.13
fGO-TvL-fGO-TvL	1.63 ± 0.15
fGO-TvL-fGO-TvL-fGO	0.97 ± 0.10
fGO-TvL-fGO-TvL-fGO-TvL	4.89 ± 0.63
fGO-TvL-fGO-TvL-fGO-TvL-fGO	1.05 ± 0.17

*U ανά mg καθαρής TvL που έχει ακτινοποιηθεί.

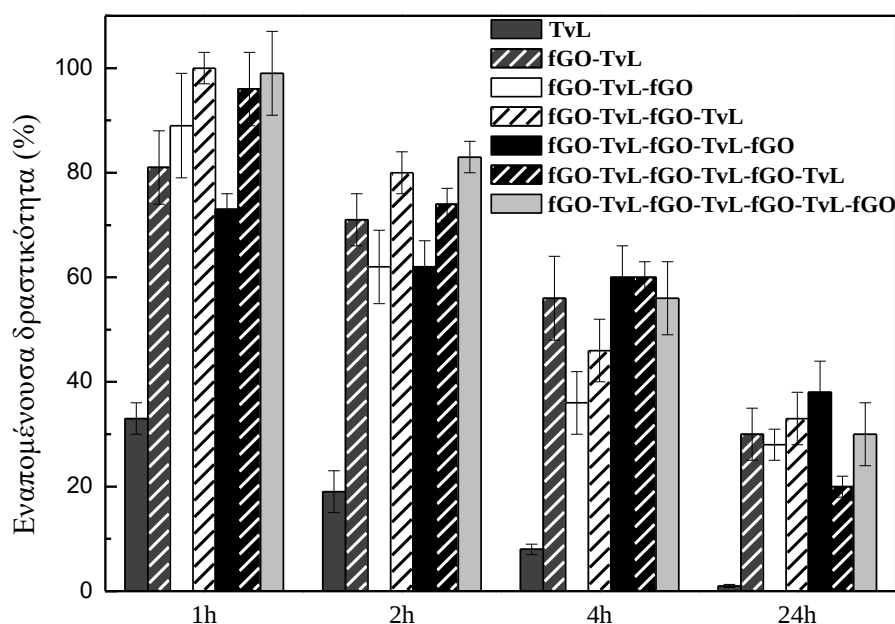
Η δραστικότητα της ελεύθερης TvL πριν την ακινητοποίηση υπολογίστηκε στα 13.6 U/mg, ενώ στην περίπτωση της ομοιοπολικά ακινητοποιημένης λακάσης η δραστικότητα μειώθηκε στα 0.55 U/mg (Πίνακας 10.2). Η μείωση της δραστικότητας του ενζύμου που παρατηρείται μετά από ομοιοπολική ακινητοποίηση της TvL στο τροποποιημένο παράγωγο του οξειδίου του γραφενίου, έχει παρατηρηθεί και στην περίπτωση άλλων πρωτεϊνών, όπως του cyt c που σχολιάστηκε στην παράγραφο 9.2, και μπορεί να οφείλεται είτε στη μερική αποδιάταξη των πρωτεϊνικών μορίων κατά τη διαδικασία της ακινητοποίησης ή σε φαινόμενα μεταφοράς μάζας τα οποία μπορεί να οδηγούν σε μειωμένη καταλυτική δραστικότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων σε σύγκριση με τα υδατοδιαλυτά ένζυμα [Wei & Ge 2013, Zhang *et al.* 2012].

Η καταλυτική δραστηριότητα των νανοσυστοιχιών αυξάνεται καθώς προστίθενται επιπλέον στρώματα νανοϋλικού και ενζύμου. Η αύξηση της δραστηριότητας με την προσθήκη ενός δεύτερου στρώματος νανοϋλικού είναι πιθανό να οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μεταξύ του fGO και της TvL, οι οποίες οδηγούν σε μια πιο ενεργή διαμόρφωση του ενζύμου. Η προσθήκη ενζυμικού στρώματος στην εξωτερική στιβάδα της νανοσυστοιχίας, όπως στην περίπτωση των fGO-TvL-fGO-TvL και fGO-TvL-fGO-TvL-fGO-TvL, αυξάνει τη δραστηριότητα, αποτέλεσμα που σχετίζεται με την πιο εύκολη πρόσβαση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Παρόμοιο αποτέλεσμα έχει αναφερθεί στην περίπτωση της LbL νανοσύνθεσης λακάσης-χλωριδίου του πολύ(διμεθυλδιαλκυλαμμωνίου) [Xing *et al.* 2007], καθώς και της ακινητοποίησης σε MWCNTs με τη χρήση LbL [Piccinino *et al.* 2015], όπου η ενζυμική δραστηριότητα αυξάνονταν με την προσθήκη ενζυμικών στρωμάτων. Αντίθετα, όταν το εξωτερικό επίπεδο της νανοσυστοιχίας αποτελείται από στρώμα νανοϋλικού, όπως στην περίπτωση των fGO-TvL-fGO-TvL-fGO και fGO-TvL-fGO-TvL-fGO-TvL-fGO, η δραστηριότητα των νανοβιοκαταλυτών μειώνεται. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει ότι καθώς αυξάνεται ο αριθμός των στρωμάτων στη νανοσυστοιχία, και συνεπώς το πάχος της, γίνεται πιο δύσκολη η πρόσβαση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο της TvL, παρόλο που ακόμα και σε αυτή την περίπτωση η δραστηριότητα παραμένει υψηλή. Είναι επίσης σημαντικό να σημειωθεί πως καθώς αυξάνονται τα στρώματα ενζύμου-νανοϋλικού που προστίθενται στη συστοιχία, οι συντιθέμενοι νανοβιοκαταλύτες διασπείρονται πιο δύσκολα στα υδατικά μέσα όπου γίνονται οι αντιδράσεις και συνεπώς η αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα είναι μειωμένη, με αποτέλεσμα τη μείωση στη δραστηριότητα, όπως στην περίπτωση του fGO-TvL-fGO-TvL-fGO-TvL-fGO.

10.3. Σταθερότητα των πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών λακάσης-τροποποιημένου GO

Η σταθερότητα των παραχθέντων πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών fGO-TvL μελετήθηκε μετά από επώαση των νανοβιοκαταλυτών μέχρι και 24 ώρες σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών (0.1 M, pH 4.58) στους 60 °C. Η σταθερότητα των διαφορετικών νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων παρουσιάζεται στο Σχήμα 10.3, ενώ ο χρόνος ημίσειας ζωής τους στον Πίνακα 10.2. Όπως ξεκάθαρα μπορεί να παρατηρηθεί από το Σχήμα 10.3, όλοι οι νανοβιοκαταλύτες που ετοιμάστηκαν παρουσιάζουν εξαιρετικά μεγαλύτερη σταθερότητα εν συγκρίσει με την ελεύθερη TvL. Η ελεύθερη TvL χάνει το 90% της αρχικής της δραστηριότητας μετά από 4 ώρες επώαση στους 60 °C, ενώ σχεδόν απενεργοποιείται πλήρως μετά από 24 ώρες επώαση. Αντιθέτως, οι πολυστρωματικοί νανοβιοκαταλύτες διατηρούν μέχρι και 40% την αρχική τους δραστηριότητα μετά από 24 ώρες επώαση, υποδεικνύοντας ότι η ομοιοπολική ακινητοποίηση της TvL στα φύλλα του fGO έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία πολύ πιο σταθερών βιοκαταλυτών σε σχέση με την υδατοδιαλυτή πρωτεΐνη, όπως ήδη έχει αναφερθεί και σε άλλες περιπτώσεις [Nair *et*

al. 2013, Qiu *et al.* 2008, Camarero *et al.* 2002], όπως σε αυτή του cyt c που ήδη αναλύθηκε εκτενώς στην παράγραφο 9.3.



Σχήμα 10.3. Σταθερότητα της ελεύθερης TvL καθώς και των πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών μετά από επώαση τους 60 °C. Ως 100% ορίζεται η δράση της TvL c σε $t=0$ min.

Πίνακας 10.2. Χρόνος ημίσειας ζωής των πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών.

Ένζυμο	$t_{1/2}$ (h)
TvL	0.9 ± 0.1
fGO-TvL	3.7 ± 0.4
fGO-TvL-fGO	2.9 ± 0.2
fGO-TvL-fGO-TvL	2.3 ± 0.1
fGO-TvL-fGO-TvL-fGO	4.1 ± 0.5
fGO-TvL-fGO-TvL-fGO-TvL	4.3 ± 0.4
fGO-TvL-fGO-TvL-fGO-TvL-fGO	4.1 ± 0.5

Η παρατηρούμενη βελτίωση στη σταθερότητα της TvL πιθανώς να οφείλεται στη συνδυαστική δράση μειωμένης μοριακής κινητικότητας και ενισχυμένης ενζυμικής διαμόρφωσης που προκύπτει από την ακινητοποίηση μέσω πολλαπλών σημείων στα φύλλα του τροποποιημένου οξειδίου του γραφενίου. Με άλλα λόγια, η μεγάλη επιφάνεια των fGO φύλλων, όπως επίσης και η δημιουργία σταθερών ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ του νανοϋλικού και της TvL φαίνεται να προστατεύει τη δομή του ενζύμου, και συνεπώς να σταθεροποιεί τα πρωτεϊνικά μόρια ενάντια στη θερμική μετουσίωση. Η ευεργετική

αυτή επίδραση του fGO αυξάνεται με την προσθήκη επιπλέον φύλλων νανοϋλικού, γεγονός που αποδεικνύει ότι οι πολυστρωματικές νανοσυστοιχίες ενζύμου-νανοϋλικού μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιτυχώς σε δυσμενείς συνθήκες.

10.4. Εφαρμογές των πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών λακάσης-τροποποιημένου GO

10.4.1. Οξείδωση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων

Οι πολυκυκλικοί αρωματικοί υδρογονάνθρακες (PAHs) είναι ιδιαίτερα τοξικοί βιομηχανικοί ρύποι που προέρχονται από την ατελή καύση υλικών κατά τη διάρκεια πυρκαγιών ή εκρήξεων ηφαιστειών, την επεξεργασία τροφίμων, τα καυσαέρια των αυτοκινήτων, τις βιομηχανικές εκπομπές και άλλες ανθρωπογενείς δραστηριότητες [Arca-Ramos *et al.* 2012, Hwang *et al.* 2007]. Λόγω των τοξικών επιπτώσεών τους, οι PAHs αποτελούν μεγάλο ρίσκο για όλες τις μορφές ζωής, συμπεριλαμβανομένου των ανθρώπων, και κάποιοι από αυτούς είναι ιδιαίτερα μεταλλαξιογόνοι και καρκινογόνοι, και γι' αυτό το λόγο η αποδόμησή του είναι σημαντική [Dodor *et al.* 2004].

Για την αξιολόγηση των πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών λακάσης-fGO στη χρήση τους ως καταλύτες για την επιτυχή αποδόμηση των PAHs, χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα-μοντέλο το ανθρακένιο και μελετήθηκε η βιοαποικοδόμησή του παρουσία 1 mM HBT. Το HBT δρα ως διαμεσολαβητής μεταξύ του ενζύμου και του υποστρώματος. Αφού οξειδωθεί από την TvL, ο διαμεσολαβητής διαχέεται μακριά από την περιοχή του ενεργού κέντρου του ενζύμου και με τη σειρά του οξειδώνει άλλα μόρια, επεκτείνοντας κατά αυτόν τον τρόπο το εύρος των δεκτικών υποστρωμάτων για μια ενζυμική δράση, και αυξάνοντας την καταλυτική ικανότητα των ενζύμων [Majcherczyk *et al.* 2016, Han *et al.* 2004]. Η αποδόμηση του ανθρακενίου από τους συντιθέμενους νανοβιοκαταλύτες fGO-TvL παρουσιάζεται στο Πίνακα 10.3.

Σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν, οι ενζυμικές νανοσυστοιχίες καταλύουν επιτυχώς την αποδόμηση του ανθρακενίου, και σε πολλές περιπτώσεις η απόδοση είναι μεγαλύτερη από αυτή της ελεύθερης TvL. Η 9,10-ανθρακινόνη ταυτοποιήθηκε ως το κύριο ενδιάμεσο προϊόν οξείδωσης, σε συμφωνία και με προηγούμενες μελέτες [Hu *et al.* 2009, Johannes *et al.* 1996]. Είναι σημαντικό να τονιστεί πως η αποτελεσματικότητα της αποδόμησης του ανθρακενίου από τους fGO-TvL νανοβιοκαταλύτες αυξάνεται με την προσθήκη επιπλέον στρωμάτων ενζύμου και νανοϋλικού. Για παράδειγμα, η απόδοση του fGO-TvL (ένα στρώμα, απλή ομοιοπολική ακινητοποίηση) μετά από 3 μέρες επώαση στους 30 °C βρέθηκε να είναι περίπου 37%, ενώ η απόδοση των πολυστρωματικών καταλυτών κάτω από τις ίδιες συνθήκες φτάνει ακόμα και το 98%. Αυτό το αποτέλεσμα πιθανώς να συνδέεται με την αυξημένη σταθερότητα που παρουσιάζουν οι ενζυμικές νανοσυστοιχίες με περισσότερα στρώματα νανοϋλικού-ενζύμου, όπως περιγράφηκε προηγουμένως στην παράγραφο 10.3, υποδεικνύοντας ότι τα συγκεκριμένα

νανοβιοκαταλυτικά συστήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν επιτυχώς σε διάφορες εφαρμογές για την ανίχνευση και αποδόμηση πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων.

Πίνακας 10.3. Αποδόμηση ανθρακενίου από τις πολυστρωματικές νανοσυστοιχίες (Τυπική απόκλιση < 4%) .

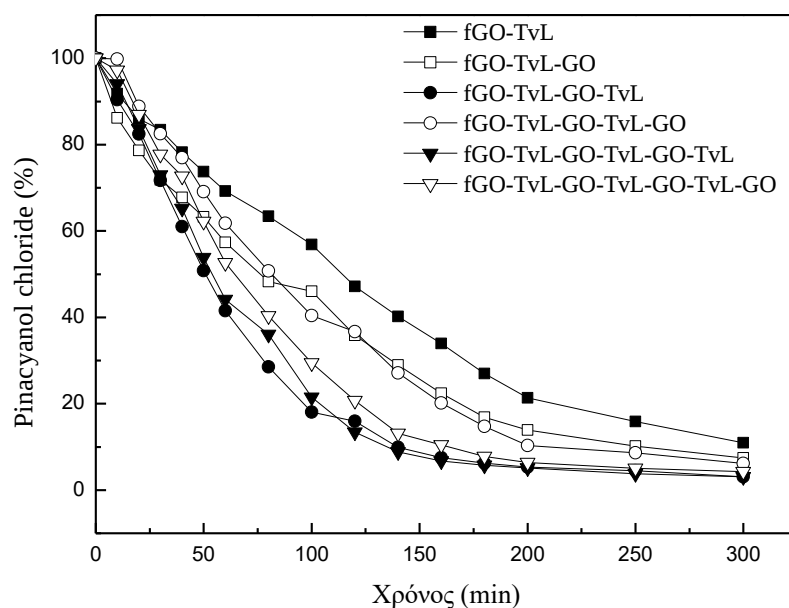
Ένζυμο	Αποδόμηση ανθρακενίου (%)
TvL	96.5
fGO-TvL	37.2
fGO-TvL-fGO	89.3
fGO-TvL-fGO-TvL	98.6
fGO-TvL-fGO-TvL-fGO	93.8
fGO-TvL-fGO-TvL-fGO-TvL	97.4
fGO-TvL-fGO-TvL-fGO-TvL-fGO	97.8

10.4.2. Αποχρωματισμός χρωστικών

Οι συνθετικές χρωστικές προέρχονται κυρίως από τις βιομηχανίες υφασμάτων και χαρτιού και δεν αποδομούνται από το περιβάλλον, γεγονός που τις καθιστά επιβλαβείς για τον άνθρωπο και τα ζώα. Είναι ευρέως γνωστό ότι οι λακάσες μπορούν να καταλύσουν την οξείδωση χρωστικών και γι' αυτό το λόγο βρίσκουν εφαρμογή τόσο στην ανίχνευση όσο και στην αποδόμηση βιομηχανικών λυμάτων που περιέχουν μεγάλο ποσοστό χρωστικών [Munteanu & Cavaco-Paulo 2010, Asgher *et al.* 2008]. Για τη διερεύνηση της ικανότητας των πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών να οξειδώνουν χρωστικές, το χλωρίδιο της πινακυανόλης (PCl) χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα-μοντέλο. Το PCl είναι μια συμμετρική χρωστική που χρησιμοποιείται ευρέως σε φωτογραφικές διεργασίες [Lanzafame *et al.* 1996].

Ο αποχρωματισμός του PCl από τα νεοσυντιθέμενα ενζυμικά σκευάσματα παρουσιάζεται στο Σχήμα 10.4, ενώ οι αρχικές ταχύτητες της οξείδωσης παρατίθενται στον Πίνακα 10.4. Σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν, η ακινητοποιημένη TvL μπορεί να αποχρωματίσει επιτυχώς τη χρωστική. Η αρχική ταχύτητα αντίδρασης για την ελεύθερη TvL ήταν 20 φορές μεγαλύτερη από αυτή που παρατηρήθηκε σε όλες τις περιπτώσεις των νανοβιοκαταλυτών. Παρόλα αυτά, είναι σημαντικό να τονισθεί ότι λόγω της πολύ χαμηλής (έως μηδενικής) σταθερότητας της ελεύθερης λακάσης που παρουσιάστηκε στην παράγραφο 10.3, όπως και του γεγονότος ότι η ελεύθερη TvL δεν

μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί, καθιστά την εφαρμογή του υδατοδιαλυτού ενζύμου αναποτελεσματική για τη χρήση του σε ευρείας κλίμακα βιομηχανίες.



Εικόνα 10.4. Αποχρωματισμός του PCI από τις πολυστρωματικές νανοσυστοιχίες (Τυπική απόκλιση < 3%).

Πίνακας 10.4. Αρχική ταχύτητα των πολυστρωματικών συστοιχιών κατά τον αποχρωματισμό του PCI.

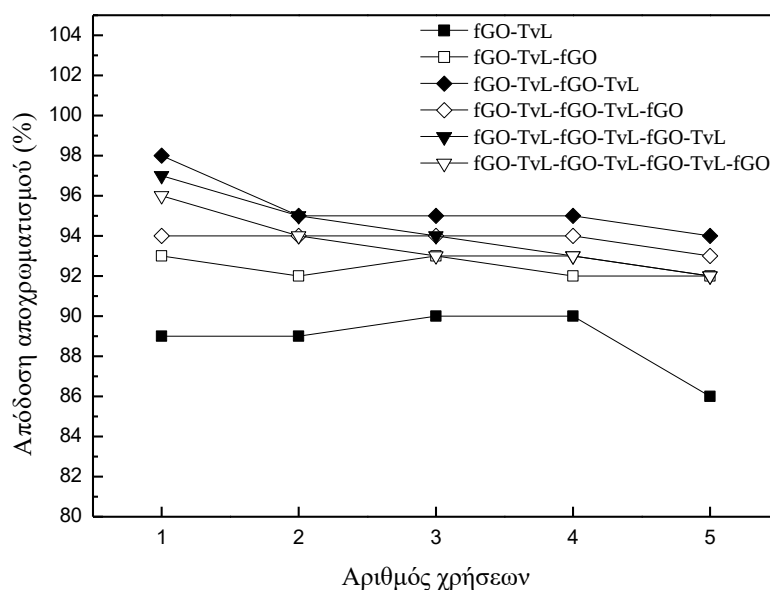
Ακίνητοποιημένη TvL	Αρχική ταχύτητα ($\mu\text{M min}^{-1}\mu\text{g}^{-1}$ ενζύμου)
fGO-TvL	0.20 ± 0.03
fGO-TvL-fGO	0.36 ± 0.05
fGO-TvL-fGO-TvL	0.45 ± 0.07
fGO-TvL-fGO-TvL-fGO	0.38 ± 0.06
fGO-TvL-fGO-TvL-fGO-TvL	0.46 ± 0.08
fGO-TvL-fGO-TvL-fGO-TvL-fGO	0.43 ± 0.08

Όπως παρατηρείται από τα αποτελέσματα του Πίνακα 10.4, η αρχική ταχύτητα για τον αποχρωματισμό του PCI που καταλύεται από τους πολυστρωματικούς νανοβιοκαταλύτες, όπως στην περίπτωση του fGO-TvL-fGO-TvL-fGO-TvL, είναι μέχρι και 2.2 φορές μεγαλύτερη από αυτή που παρατηρείται για το μονοστρωματικό ακίνητοποιημένο ένζυμο. Ο ρυθμός αντίδρασης των νανοσυστοιχιών μειώνεται ελαφρώς

όταν στην εξωτερική επιφάνεια περιλαμβάνεται στρώμα νανοϋλικού (π.χ. fGO-TvL-fGO-TvL-fGO και fGO-TvL-fGO-TvL-fGO-TvL-fGO), το οποίο πιθανώς σχετίζεται με μειωμένη διαθεσιμότητα του υποστρώματος, όπως συζητήθηκε προηγουμένως στην παράγραφο 10.2 στην περίπτωση που το ABTS χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα.

10.4.3. Επαναχρησιμοποίηση των πολυστρωματικών νανοσυτοιχιών λακάσης-τροποποιημένου GO

Ορισμένα από τα πλεονεκτήματα της ακινητοποίησης ενζύμων είναι η ανάκτηση του βιοκαταλύτη και η ικανότητα επαναχρησιμοποίησής του, πλεονεκτήματα τα οποία καθιστούν πρακτικά εφικτή τη χρήση των ενζύμων στη βιομηχανία. Η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των νεοσυντιθέμενων βιοκαταλυτών μελετήθηκε μέσω της οξείδωσης του PCI στους 30 °C. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το δείγμα φυγοκεντρείται και το ακινητοποιημένο ένζυμο που πέφτει ως ίζημα, ξεπλένεται 3 φορές με ρυθμιστικό διάλυμα οξικών για την αφαίρεση των αντιδρώντων και προστίθεται σε νέο διάλυμα αντίδρασης. Τα αποτελέσματα της επαναχρησιμοποίησης των νεοσυντιθέμενων νανοβιοκαταλυτών παρουσιάζονται στο Σχήμα 10.5.



Εικόνα 10.5. Επαναχρησιμοποίηση των πολυστρωματικών νανοσυτοιχιών (Τυπική απόκλιση < 5%).

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 10.5, η ικανότητα των πολυστρωματικών νανοβιοκαταλυτών να αποχρωματίζουν το PCI διατηρείται μέχρι και 94% μετά από 5 συνεχόμενους κύκλους χρήσης (25 ώρες συνολικής διεργασίας). Η απόδοση του αποχρωματισμού είναι μεγαλύτερη στις περιπτώσεις όπου υπάρχουν πολλαπλά στρώματα ενζύμου-νανοϋλικού, γεγονός που υποδεικνύει ότι η προσθήκη επιπλέον στρωμάτων όχι μόνο ωφελεί τη θερμική σταθερότητα και την απόδοση του ενζύμου, αλλά δίνει τη δυνατότητα παρασκευής επαναχρησιμοποιούμενων νανοβιοκαταλυτών.

11. Συμπεράσματα

Στην παρούσα διδακτορική διατριβή μελετήθηκε η σχέση δομής και λειτουργίας οξειδωαναγωγικών πρωτεϊνών κατά την επίδρασή τους με νανοϋλικά, τόσο ως μέσων αντίδρασης όσο και ως φορέων ακινητοποίησης, καθώς και η περαιτέρω ανάπτυξη καινοτόμων νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων. Τα νανοϋλικά που επιλέχθηκαν ανήκουν στην κατηγορία των νανοδομικών υλικών με βάση τον άνθρακα. Οι πρωτεΐνες μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα νανοϋλικά και να επιδείξουν αλλαγές στα καταλυτικά και δομικά χαρακτηριστικά τους. Η κατανόηση της σχέσης δομής και λειτουργίας των οξειδωαναγωγικών ενζύμων με τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα μπορεί να οδηγήσει στον ορθολογικό σχεδιασμό βιοκαταλυτικών διεργασιών, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην ανάπτυξη αποτελεσματικών νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων.

Το αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον για τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα προκύπτει από τις ιδιαίτερες ιδιότητες που εμφανίζουν, όπως η αυξημένη ειδική επιφάνεια, η εξαιρετική μηχανική σταθερότητα, η ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα, και οι ειδικές οπτικές ιδιότητες ανάλογα με το είδος του νανοϋλικού. Λόγω των ιδιοτήτων τους, τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα χρησιμοποιούνται ευρέως για την ακινητοποίηση βιομορίων, και ιδιαίτερα ενζύμων, οδηγώντας στη δημιουργία καινοτόμων νανοςυστημάτων με εφαρμογή σε πλήθος τομέων, όπως στη βιοϊατρική, τη σύνθεση βιοαισθητήρων και κυψελών βιοκαυσίμων και στη βιοκατάλυση. Παρόλα αυτά, οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των νανοϋλικών και των ενζύμων αποτελούν ένα σύνθετο φαινόμενο που εξαρτάται από διάφορες παράγοντες, και για αυτό το λόγο η μελέτη των αλληλεπιδράσεων αυτών θεωρείται θεμελιώδους σημασίας για τη σύνθεση καινοτόμων νανοβιοκαταλυτών για χρήση τόσο σε ερευνητική όσο και βιομηχανική κλίμακα.

Στη συγκεκριμένη διατριβή, από την κατηγορία νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα, χρησιμοποιήθηκαν νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs), οξειδίο του γραφενίου (GO), καθώς και μια σειρά τροποποιημένων παραγώγων τους. Τα νανοϋλικά αυτά υπέστησαν χημική τροποποίηση ώστε να προκύψουν παράγωγά τους με κορεσμένες αλειφατικές αλυσίδες διάφορου μήκους, και με διάφορες ελεύθερες λειτουργικές ομάδες (αμινομάδες, καρβοξυλομάδες, μεθυλομάδες). Αρχικά, μελετήθηκε η επίδραση της τροποποίησης των νανοϋλικών στην καταλυτική δράση του κυτοχρώματος c (cyt c) από καρδιά αλόγου, μιας μικρής αιμοπρωτεΐνης που αποτελεί πρωτεΐνη-μοντέλο για μελέτες αλληλεπιδράσεων με νανοσωματίδια [Vazquez-Duhalt *et al.* 1999]. Η παρουσία του γραφενίου και των μη τροποποιημένων νανοσωλήνων άνθρακα δεν επηρεάζει θετικά την καταλυτική δράση του cyt c, ενώ αντίθετα η παρουσία τροποποιημένων παραγώγων των CNTs και του GO (πριν και μετά από χημική αναγωγή) έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της καταλυτικής δράσης της πρωτεΐνης.

Η δράση του cyt c επηρεάζεται σημαντικά από τη γεωμετρία του νανοϋλικού. Η αύξηση που παρατηρείται στην περίπτωση των παραγώγων του GO σε σχέση με τους τροποποιημένους CNTs (έως και 6 φορές περίπου μεγαλύτερη), πιθανώς να οφείλεται σε πολύ ειδικές αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μεταξύ του πρωτεϊνικού μορίου και

των νανοϋλικών, οδηγώντας σε αλλαγές στη διαμόρφωση της πρωτεΐνης, με περαιτέρω αποτέλεσμα την αυξημένη δραστηριότητα. Οι νανοσωλήνες άνθρακα αποτελούν υλικά που εμφανίζουν μεγάλη καμπυλότητα στη δομή τους, σε αντίθεση με την επίπεδη επιφάνεια που παρουσιάζει το οξείδιο του γραφενίου. Η επίπεδη επιφάνεια των παραγώγων του GO είναι πιο προσβάσιμη στο cyt c από ότι η κυλινδρική επιφάνεια των CNTs, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε πιο ισχυρές αλληλεπιδράσεις με την πρωτεΐνη κι έτσι να επηρεάσει περισσότερο την καταλυτική ικανότητα του cyt c, όπως επίσης και τη δομή του [Pavlidis *et al.* 2012a, Mu *et al.* 2008]. Η χημική σύσταση της επιφάνειας του νανοϋλικού, δηλαδή η ύπαρξη ομάδων πλούσιων σε οξυγόνο όπως στην περίπτωση του GO, δεν επηρεάζει τη δραστηριότητα του cyt c. Τα ανηγμένα φύλλα του γραφενίου αυξάνουν τη δραστηριότητα του cyt c με παρόμοιο τρόπο όπως και τα μη ανηγμένα φύλλα, γεγονός που υποδεικνύει ότι η ενεργοποίηση που παρατηρείται σχετίζεται περισσότερο με την τροποποίηση των νανοϋλικών παρά με τις ομάδες οξυγόνου που περιέχουν.

Η χημική τροποποίηση των νανοϋλικών, τόσο η οξείδωσή τους όσο και η περαιτέρω τροποποίηση με αλκυλικές αλυσίδες, αυξάνει τη δραστηριότητα του cyt c σε σύγκριση με τα μητρικά, μη τροποποιημένα νανοϋλικά. Το μέγεθος της αλκυλικής αλυσίδας με την οποία τροποποιείται το νανοϋλικό, επιδρά σημαντικά στη δραστηριότητα του cyt c. Πιο συγκεκριμένα, η εισαγωγή αλκυλικών αλυσίδων στην επιφάνεια των νανοϋλικών μειώνει την καταλυτική ισχύ του cyt c, ανεξάρτητα με την τελική ομάδα τροποποίησης. Η αύξηση της αλκυλικής αλυσίδας συνεπάγεται την αύξηση της υδροφοβικότητας του νανοϋλικού, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ισχυρών αλληλεπιδράσεων υδροφοβικής/υδρόφιλης φύσεως. Τα νανοϋλικά CNT-COOH και GO είναι πιο υδρόφιλα από τα τροποποιημένα παράγωγά τους, με αποτέλεσμα να αλληλεπιδρούν καλύτερα με το υδρόφιλο cyt c, αυξάνοντας έτσι την καταλυτική ισχύ του. Το φαινόμενο αυτό είναι καλύτερα κατανοητό στις περιπτώσεις όπου χρησιμοποιούνται νανοϋλικά με ίδια τελική ομάδα αλλά διαφορετικού μήκους αλκυλική αλυσίδα, όπως στην περίπτωση των GO-C_n-COOH και CNT-C_n-COOH, όπου η δραστηριότητα του cyt c είναι υψηλότερη στην περίπτωση που η αλκυλική αλυσίδα αποτελείται από 4 άτομα άνθρακα σε από ότι από 10. Τέλος, η δραστηριότητα του cyt c επηρεάζεται, υπό περιπτώσεις, από την τελική ομάδα του νανοϋλικού. Για παράδειγμα, στην περίπτωση των παραγώγων του GO, η εισαγωγή μιας αρνητικά φορτισμένης τελικής καρβοξυλομάδας μπορεί να οδηγήσει σε ισχυρές ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με το θετικά φορτισμένο cyt c αυξάνοντας τη δράση του.

Το cyt c παρουσιάζει σημαντικά αυξημένη θερμική σταθερότητα παρουσία των τροποποιημένων νανοϋλικών. Η θετική επίδραση της παρουσίας των νανοϋλικών προστατεύει το cyt c από την απενεργοποίηση που προκαλείται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η χρήση τροποποιημένων παραγώγων του GO, ανεξάρτητα από την τελική ομάδα, αυξάνει τη σταθερότητα του cyt c σε σχέση με το μη τροποποιημένο GO. Επιπλέον, η χρήση των παραγώγων του GO (οξειδωμένων ή ανηγμένων) προστατεύει περισσότερο το cyt c από την αποδιάταξη, σε σύγκριση με τα παράγωγα των CNTs. Η σταθεροποιητική αυτή επίδραση των GO-παραγώγων πιθανώς να οφείλεται στη μεγάλη

επιφάνεια των φύλλων του γραφενίου που οδηγεί σε πιο ισχυρές υδρόφοβες και ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, σταθεροποιώντας με αυτόν τον τρόπο τα πρωτεϊνικά μόρια και αποτρέποντας την «επίθεση» του H_2O_2 στον πορφυρινικό δακτύλιο του πρωτεϊνικού μορίου, όπως ακριβώς έχει περιγραφεί και στην περίπτωση της αιμίνης [Xue *et al.* 2012]. Επιπλέον, το υδρόφοβο περιβάλλον που δημιουργούν τα νανοϋλικά λόγω του μήκος των αλκυλικών τους αλυσίδων, μπορεί να εμποδίζει τη μεταφορά του υδρόφιλου H_2O_2 στο ενεργό κέντρο του cyt c, αυξάνοντας κατά αυτόν τον τρόπο τη σταθερότητά του. Το μέγεθος του νανοϋλικού επιδρά επίσης σημαντικά στη σταθερότητα του cyt c. Η σταθερότητα της πρωτεΐνης παρουσία των μικρού μεγέθους νανοδίσκων είναι μεγαλύτερη από αυτή παρουσία των ιδιαίτερα μεγαλύτερων φύλλων του οξειδίου του γραφενίου. Καθώς αυξάνεται το μέγεθος του νανοϋλικού, αυξάνονται οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ της επιφάνειάς τους και των πρωτεϊνών, με αποτέλεσμα μεγαλύτερες αλλαγές στη δομή τους που πιθανώς οδηγούν σε χαμηλότερη σταθερότητα [Shang *et al.* 2009, 2007]. Οι μικρού μεγέθους νανοδίσκοι φαίνεται να μην αλληλεπιδρούν ισχυρά με τα μόρια του κυτοχρώματος και αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορεί να οδηγούν σε μια πιο συμπαγή δομή του πρωτεϊνικού μορίου και συνεπώς σε αυξημένη σταθερότητα.

Η ενδιαφέρουσα καταλυτική συμπεριφορά του cyt c παρουσία τροποποιημένων νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα, συσχετίζεται με ορισμένες αλλαγές στο μικροπεριβάλλον του ενεργού κέντρου της αίμης. Χρησιμοποιώντας τη φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους αποδείχθηκε ότι η παρουσία των οξειδωμένων νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος και του οξειδίου του γραφενίου οδηγεί σε αλλαγές του φάσματος απορρόφησης της πρωτεΐνης, όπως μείωση της κορυφής Soret με ταυτόχρονη μετατόπιση προς το υπεριώδες, ενώ επιπλέον παρατηρείται μεγάλη μείωση στην κορυφή μεταφοράς φορτίου. Αυτές οι αλλαγές στο φάσμα απορρόφησης υποδεικνύουν αλλαγές στο μικροπεριβάλλον της αίμης του cyt c, οι οποίες οφείλονται στη διάσπαση του δεσμού μεταξύ του θείου της Met80 του πρωτεϊνικού μορίου και του σιδήρου της αίμης, που έχει ως αποτέλεσμα την έκθεση της αίμης στο μέσο αντίδρασης και συνεπώς στην διευκόλυνση της μεταφοράς ηλεκτρονίων και άρα στην αύξηση της καταλυτικής δραστηριότητας της πρωτεΐνης. Επιπλέον, μέσω της φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού, διαπιστώθηκε ότι το cyt c διατηρεί το μεγαλύτερο μέρος της δευτεροταγούς του δομής όταν αλληλεπιδρά με τα τροποποιημένα νανοϋλικά. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η δομή της πρωτεΐνης παραμένει άθικτη, ενώ μια μικρή μείωση της περιεκτικότητας των α -ελίκων παρατηρείται στην περίπτωση τροποποιημένων CNTs με καρβοξυλομάδα και αμινομάδα. Αντίθετα, στην περιοχή Soret, υπήρξαν πιο έντονες αλλαγές στο φάσμα του κυκλικού διχρωισμού που υποδεικνύουν τον αναπροσανατολισμό της αίμης σε μια πιο προσβάσιμη μορφή, έχοντας ως αποτέλεσμα την αυξημένη ενεργοποίηση της πρωτεΐνης.

Το cyt c ακινητοποιήθηκε στη συνέχεια, στα παράγωγα του GO μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης και φυσικής προσρόφησης. Κατά τη φυσική προσρόφηση (μη ομοιοπολική ακινητοποίηση) των ενζύμων στα νανοϋλικά, σημαντικό ρόλο διαδραματίζουν τόσο οι υδρόφοβες όσο και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, καθώς και οι δυνάμεις π - π . Η ομοιοπολική ακινητοποίηση βασίζεται στη διασύνδεση των

ελεύθερων αμινομάδων που υπάρχουν στο νανοϋλικό και στην επιφάνεια του ενζύμου μέσω ενός μορίου «γέφυρας», όπως είναι η γλουτεράλδεϋδη και το 1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)καρβοδιμίδιο. Για την αποφυγή φυσικής προσρόφησης ενζύμων στην επιφάνεια των νανοϋλικών κατά την ομοιοπολική ακινητοποίηση χρησιμοποιείται το επιφανειοενεργό Tween 20, το οποίο μειώνει τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Η επιτυχής ακινητοποίηση του cyt c στα τροποποιημένα παράγωγα του GO (ανηγμένα και μη) επιβεβαιώθηκε με μετρήσεις πρωτεϊνικής συγκέντρωσης, με μικροσκοπία ατομικών δυνάμεων (AFM), με θερμική ανάλυση (TG/DTA) και μέσω της φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS). Οι αποδόσεις της ακινητοποίησης που παρατηρήθηκαν (έως και ~90% σε ορισμένες περιπτώσεις) είναι μεγαλύτερες από ότι έχει αναφερθεί έως σήμερα στη βιβλιογραφία για το cyt c σε διάφορα νανοϋλικά, και αναδεικνύει ένα από τα πλεονεκτήματα της ακινητοποίησης πρωτεϊνών στα συγκεκριμένα νανοϋλικά.

Η απόδοση της ακινητοποίησης εξαρτάται τόσο από την τροποποίηση του νανοϋλικού όσο και από το είδος της ακινητοποίησης. Στις περισσότερες περιπτώσεις, μεγαλύτερη απόδοση ακινητοποίησης παρατηρείται κατά τη φυσική προσρόφηση. Οι κύριες δυνάμεις που αναπτύσσονται κατά τη διαδικασία αυτή φαίνεται να είναι ηλεκτροστατικής φύσεως. Οι ομάδες πλούσιες σε οξυγόνο που περιέχουν να παράγωγα του GO (αρνητικό φορτίο) αλληλεπιδρούν μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων με το cyt c (θετικό φορτίο) οδηγώντας σε αποτελεσματικότερη ακινητοποίηση της πρωτεΐνης στο νανοϋλικό, συγκριτικά με την περίπτωση των ανηγμένων παραγώγων του GO, όπου η απόδοση της ακινητοποίησης μειώνεται δραματικά [Yang *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2010]. Η δραστηριότητα του cyt c μειώνεται μετά την ακινητοποίηση (μέχρι και 50%), και πιθανόν να οφείλεται σε δομικές αλλαγές του πρωτεϊνικού μορίου λόγω των ισχυρών αλληλεπιδράσεων με τα νανοϋλικά. Ανεξαρτήτως της τελικής ομάδας, η δραστηριότητα του cyt c αυξάνεται με την αύξηση του μήκους της αλκυλικής αλυσίδας του νανοϋλικού. Η παρουσία μακρύτερων αλκυλικών αλυσίδων αναμένεται να αυξάνει την απόσταση μεταξύ της πρωτεΐνης και του νανοϋλικού, κι έτσι να μειώνει τις ανεπιθύμητες αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους, και ταυτόχρονα να εμποδίζει τους περιορισμούς μεταφοράς υποστρώματος που προκαλούνται από την κοντινή απόσταση μεταξύ της πρωτεΐνης και του νανοϋλικού.

Η ακινητοποίηση του cyt c σταθεροποιεί σημαντικά το ένζυμο, έναντι τόσο της θερμοκρασίας, όσο και παρουσία αποδιατακτικών παραγόντων, όπως η μεθανόλη και το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Κατά την επώαση σε υδατικό διάλυμα, το ακινητοποιημένο cyt c διατηρεί τη σταθερότητα του μέχρι και 100%, ενώ η ελεύθερη πρωτεΐνη διατηρεί ~40%. Η προστατευτική δράση των παραγώγων του GO ως φορείς ακινητοποίησης ήταν πιο ξεκάθαρη κατά την επώαση του ακινητοποιημένου cyt c σε 50% κ.ό. μεθανόλη. Η ακινητοποιημένη πρωτεΐνη διατηρεί την καταλυτική της δραστηριότητα πάνω από 50% στις περισσότερες περιπτώσεις, ενώ καθώς το μήκος της αλκυλικής αλυσίδας, και συνεπώς η υδροφοβικότητα, του νανοϋλικού αυξάνεται, η σταθερότητα της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης, επίσης αυξάνεται. Το υδρόφοβο περιβάλλον που δημιουργούν τα συγκεκριμένα νανοϋλικά προστατεύει σε μεγάλο βαθμό το cyt c από τη μετουσίωση που προκαλεί η

υδρόφιλη μεθανόλη, η οποία αναμένεται να διαταράσσει την κατάσταση ενυδάτωσης του πρωτεϊνικού μορίου και συνεπώς την καταλυτικά ενεργή του διαμόρφωση. Σε κάθε περίπτωση, η σταθερότητα του κυτοχρώματος φαίνεται να εξαρτάται τόσο από τα χαρακτηριστικά της επιφάνειας του νανοϋλικού (οξυγονούχες ομάδες, μήκος της αλκυλικής αλυσίδας, ελεύθερες λειτουργικές ομάδες) όσο και από τον τρόπο ακινητοποίησης και το μέσο επώασης.

Οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται σε μοριακό επίπεδο μεταξύ των ενζύμων και των νανοϋλικών, κατά τη διαδικασία ακινητοποίησης, διαταράσσουν τη δομή των πρωτεϊνικών μορίων. Οι αλλαγές στη δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης προσδιορίστηκαν μέσω της φασματοσκοπίας υπερύθρου (FTIR). Παρατηρείται μείωση του περιεχομένου σε α -έλικα από 34% μέχρι 23.6% και 22.1% για το μη ομοιοπολικά και ομοιοπολικά ακινητοποιημένο cyt c αντίστοιχα, ενώ η περιεκτικότητα των β -φύλλων αυξάνεται από 17.5% μέχρι 39.5 και 34.6% για το μη ομοιοπολικά και ομοιοπολικά ακινητοποιημένο cyt c αντίστοιχα. Η τελική λειτουργική ομάδα του νανοϋλικού (και συνεπώς ο τρόπος σύνδεσης με την πρωτεΐνη κατά την ομοιοπολική ακινητοποίηση) επηρεάζει τη δομή του cyt c, καθώς στην περίπτωση όπου τα παράγωγα του GO με τελική καρβοξυλομάδα χρησιμοποιούνται ως φορείς ακινητοποίησης, η περιεκτικότητα σε α -έλικα είναι υψηλότερη από ότι στην περίπτωση που ως φορείς ακινητοποίησης χρησιμοποιούνται παράγωγα του GO με τελική αμινομάδα και ίδιου μήκους αλκυλική αλυσίδα. Το αποτέλεσμα αυτό σχετίζεται άμεσα με το γεγονός ότι το ακινητοποιημένο cyt c στα νανοϋλικά με τελική καρβοξυλομάδα διατηρεί τη δραστικότητά του σε μεγαλύτερο βαθμό από ότι όταν είναι ακινητοποιημένο σε νανοϋλικά με τελική αμινομάδα, καθώς το περιεχόμενο σε α -έλικα φαίνεται να είναι σημαντικό για τη διατήρηση της δραστικότητας. Η μείωση του περιεχομένου σε α -έλικα με την ταυτόχρονη αύξηση της περιεκτικότητας σε β -φύλλων, μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα στη μετάβαση σε μια πιο άκαμπτη διαμόρφωση της πρωτεΐνης [Vecchio *et al.* 1999] που θα μπορούσε να εξηγήσει την αυξημένη σταθερότητα του ακινητοποιημένου cyt c που έχει παρατηρηθεί. Επιπλέον, στην περίπτωση των rGO οι εκτεταμένες αλλαγές στη δευτεροταγή δομή που παρατηρήθηκαν μπορούν να ερμηνεύσουν τη χαμηλή δραστικότητα που παρουσιάζει το ακινητοποιημένο cyt c στα νανοϋλικά αυτά, ενισχύοντας την υπόθεση ότι το cyt c αλληλεπιδρά μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με την επιφάνεια των rGO, επηρεάζοντας έτσι τη διαμόρφωση της πρωτεΐνης και συνεπώς την καταλυτική της συμπεριφορά.

Η μελέτη και κατανόηση των αλληλεπιδράσεων που δημιουργούνται μεταξύ ενζύμων και νανοϋλικών κατά τη διαδικασία της ακινητοποίησης αξιοποιήθηκε για τον σχεδιασμό και σύνθεση νέων βιοκαταλυτών. Για πρώτη φορά, δημιουργήθηκαν πολυστρωματικές νανοδιατάξεις ενζύμου-νανοϋλικού μέσω ομοιοπολικής ακινητοποίησης πολλαπλών σημείων. Πιο συγκεκριμένα, δημιουργήθηκαν νανοβιοκαταλύτες που αποτελούνται από εναλλασσόμενα στρώματα τροποποιημένου οξειδίου του γραφενίου με τελικές αμινομάδες και λακάσης από *Trametes versicolor* (TvL). Οι καινοτόμοι νανοβιοκαταλύτες χαρακτηρίστηκαν με τη βοήθεια AFM, Raman και FTIR. Η μείωση της δραστικότητας της ακινητοποιημένης TvL που παρατηρήθηκε, πιθανώς να οφείλεται είτε

στη μερική αποδιάταξη των πρωτεϊνικών μορίων κατά τη διαδικασία της ακινητοποίησης ή σε φαινόμενα μεταφοράς μάζας τα οποία μπορεί να οδηγούν σε μειωμένη καταλυτική δραστηριότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων σε σύγκριση με τα υδατοδιαλυτά ένζυμα [Wei & Ge 2013, Zhang *et al.* 2012]. Η καταλυτική δραστηριότητα των ενζυμικών νανοσυστοιχιών αυξάνεται με την προσθήκη επιπλέον στρωμάτων νανοϋλικού και ενζύμου. Η αύξηση της δραστηριότητας με την προσθήκη ενός δεύτερου στρώματος νανοϋλικού είναι πιθανό να οφείλεται στις αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μεταξύ του fGO και της TvL, οι οποίες οδηγούν σε μια πιο ενεργή διαμόρφωση του ενζύμου. Η προσθήκη ενζυμικών στρωμάτων στην εξωτερική στιβάδα της νανοσυστοιχίας, αυξάνει τη δραστηριότητα, αποτέλεσμα που σχετίζεται με την πιο εύκολη πρόσβαση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Αντίθετα, η προσθήκη στρωμάτων νανοϋλικού στην εξωτερική στιβάδα της νανοσυστοιχίας, μειώνει τη δραστηριότητα, καθώς γίνεται πιο δύσκολη η πρόσβαση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο της TvL. Επιπλέον, με την συνεχή προσθήκη στρωμάτων ενζύμου-νανοϋλικού, οι πολυστρωματικοί νανοβιοκαταλύτες διασπείρονται πιο δύσκολα στα υδατικά μέσα όπου γίνονται οι αντιδράσεις, και συνεπώς η αλληλεπίδραση με το υπόστρωμα είναι μειωμένη, με αποτέλεσμα τη μείωση στη δραστηριότητα.

Η οξειδωτική δράση των πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών έναντι του ανθρακενίου, ενός πολυκυκλικού αρωματικού υδρογονάνθρακα, παραμένει υψηλή μετά τη ακινητοποίηση, μέχρι και 98.6% μετά από τρεις μέρες επώασης, και εξαρτάται από τον αριθμό εναλλασσόμενων στρωμάτων ενζύμου-νανοϋλικού, καθώς και από τη σύσταση της εξωτερικής στιβάδας. Επιπλέον, οι καινοτόμες ενζυμικές νανοσυστοιχίες μπορούν να αποχρωματίσουν επιτυχώς το χλωρίδιο της πινακινόλης, μια αντίδραση που βρίσκει ευρέως εφαρμογή στις βιομηχανίες χρωστικών. Η ομοιοπολική ακινητοποίηση μέσω πολλαπλών σημείων της TvL στο νανοϋλικό για τη δημιουργία των πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών, έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του ενζύμου. Η ακινητοποιημένη TvL διατηρεί έως και το 40% την αρχική της δραστηριότητας μετά από 24 ώρες επώαση στους 60 °C, ενώ το ελεύθερο ένζυμο χάνει σχεδόν πλήρως τη δραστηριότητά του. Η μεγάλη επιφάνεια του νανοϋλικού όπως και η δημιουργία σταθερών ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ του ενζύμου και του νανοϋλικού, φαίνεται να προστατεύουν τη διαμόρφωση της λακάσης, έχοντας ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση των πρωτεϊνικών μορίων ενάντια στη θερμική αποδιάταξη. Επιπρόσθετα, οι νανοβιοκαταλύτες που παρήχθησαν μέσω αυτής της διαδικασίας, μπορούν να απομονωθούν από το μέσο της αντίδρασης με φυγοκέντρηση και να επαναχρησιμοποιηθούν. Η ικανότητα επαναχρησιμοποίησης των πολυστρωματικών νανοσυστοιχιών είναι εξαιρετική, αφού διατηρούν μέχρι και το 94% της αρχικής τους δραστηριότητας ύστερα από 5 διαδοχικούς κύκλους χρήσης (25 ώρες συνολικού λειτουργικού χρόνου).

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής καταδεικνύουν τη σημασία της νανοτεχνολογίας στη βιοκατάλυση και ιδιαίτερα στο νέο πεδίο της νανοβιοκατάλυσης. Τα συστήματα πρωτεΐνης-νανοϋλικών, ενισχύουν τα καταλυτικά χαρακτηριστικά των οξειδοαναγωγικών ενζύμων, οδηγώντας στη δημιουργία νέων βιοκαταλυτικών

συστημάτων με ενδιαφέρουσες ιδιότητες. Τα νανοβιοκαταλυτικά συστήματα που αναπτύχθηκαν, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες βιοκαταλυτικές διεργασίες, όπως η παραγωγή βιοντίζελ, η βιοαποικοδόμηση ρύπων και ο αποχρωματισμός χρωστικών. Η δυνατότητα αλλαγής των ιδιοτήτων των νανοϋλικών, μέσω της τροποποίησης της επιφάνειάς τους, επιτρέπει τον ορθολογικό έλεγχο του μικροπεριβάλλοντος των ενζύμων και συνεπώς τον έλεγχο και τη βελτιστοποίηση των καταλυτικών ιδιοτήτων τους.

12. Βιβλιογραφία

- Agúí L., Yáñez-Sedeño P., Pingarrón J.M. (2008) Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry: A review. *Anal. Chim. Acta* 622(1-2): 11-47.
- Ajayan P.M., Tour J.M. (2007) Materials science: nanotube composites. *Nature* 447(7148): 1066-1068.
- Ahluwalia U., Nayeem S.M., Deep S. (2011) The non-native conformations of cytochrome c in sodium dodecyl sulfate and their modulation by ATP. *Eur. Biophys. J.* 40: 259-271.
- Alexandre G., Zhulin I.B. (2000) Laccases are widespread in bacteria. *Trends Biotechnol.* 18: 41-42.
- Allgaier C. (2006) Red biotechnology in the 21st century. *Pharm. Ind.* 68(2): 157-169.
- Ambler R.P. (1991) Sequence variability in bacterial cytochromes c. *Biochim. Biophys. Acta* 1058(1): 42-47.
- Ansari S.A., Husain, Q. (2012) Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review. *Biotechnol. Adv.* 30: 512-523.
- Arakane Y., Lomakin J., Beeman R.W., Muthukrishnan S., Gehrke S.H., Kanost M.R., Kramer K.J. (2010) Molecular and functional analyses of amino acid decarboxylases involved in cuticle tanning in *Tribolium castaneum*. *J. Biol. Chem.* 284: 16584-16594.
- Arakane Y., Muthukrishnan S., Beeman R.W., Kanost M.R., Kramer K.J. (2005) Laccase 2 is the phenoloxidase gene required for beetle cuticle tanning. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102:11337-11342.
- Arca-Ramos A., Eibes G., Moreira M.T., Feijoo G., Lema J.M. (2012) Surfactant-assisted two phase partitioning bioreactors for laccase-catalyzed degradation of anthracene. *Proc. Biochem.* 47: 1115-1121.
- Ariga K., Ji Q., Hill J.P. (2010) Enzyme-encapsulated layer-by-layer assembly: current status and challenges toward ultimate nanodevices. *Adv. Polym. Sci.* 229: 51-87.
- Asgher M., Bhatti H.N., Ashraf M., Legge R.L. (2008) Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation* 19: 771-783.
- Ashby M.F., Ferreira P.J.S.G., Schodek D.L. (2009) Nanomaterials, nanotechnologies and design: an introduction for engineers and architects. Butterworth-Heinemann publications.
- Asuri P., Bale S.S., Pangule R.C., Shah D.A., Kane R.S., Dordick J.S. (2007) Structure, function, and stability of enzymes covalently attached to single-walled carbon nanotubes. *Langmuir* 23(24): 12318-12321.
- Asuri P., Bale S.S., Karajanagi S.S., Kane R.S. (2006a) The protein-nanomaterial interface. *Curr. Opin. Biotech.* 17: 562-568.
- Asuri P., Karajanagi S.S., Yang H.C., Yim T.J., Kane R.S., Dordick J.S. (2006b) Increasing protein stability through control of the nanoscale environment. *Langmuir* 22: 5833-5836.
- Azamian B.R., Davis J.J., Coleman K.S., Bagshaw C.B., Green M.L.H. (2002) Bioelectrochemical single-walled carbon nanotubes. *J. Am. Chem. Soc.* 124(43): 12664-12665.
- Bagri A., Mattevi C., Acik M., Chabal Y.J., Chhowalla M., Shenoy V.B. (2010) Structural evolution during the reduction of chemically derived graphene oxide. *Nat. Chem.* 2: 581-587.
- Bao H., Zhang L., Chen G. (2013) Immobilization of trypsin via graphene oxide-silica composite for efficient microchip proteolysis. *J. Chromatogr. A* 1310: 74-81.
- Bao H., Chen Q., Zhang L., Chen G. (2011) Immobilization of trypsin in the layer-by-layer coating of graphene oxide and chitosan on in-channel glass fiber for microfluidic proteolysis. *Analyst* 136: 5190-5196.
- Barth A. (2007) Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta: Bioenerg.* 1767(9): 1073-1101.
- Bartha-Vári J.H., Tosa M.I., Irimie F.D., Weiser D., Boros Z., Vértessy B.G., Paizs C., Poppe L. (2015) Immobilization of phenylalanine ammonia-lyase on single-walled carbon nanotubes for stereoselective biotransformations in batch and continuous-flow modes. *Chem. Cat. Chem* 7: 1122-1128.

- Bathinapatla A., Kanchi S., Singh P., Sabela M.I., Bisetty K.** (2016) An ultrasensitive performance enhanced novel cytochrome c biosensor for the detection of rebaudioside A. *Biosens. Bioelectron.* 77: 116–123.
- Bencze L.C., Bartha-Vári J.H., Katona G., Toşa M.I., Paizs C., Irimie F.D.** (2016) Nanobioconjugates of *Candida antarctica* lipase B and single-walled carbon nanotubes in biodiesel production. *Bioresour. Technol.* 200: 853–860.
- Berova N., Nakanishi K., Woody R.** editors (2007) Circular dichroism: principles and applications. Second ed. New York, USA, Wiley-VCH.
- Bethune D.S., Kiang C.H., De Vries M.S., Gorman G., Savoy R., Vazquez J., Beyers R.** (1993) Cobalt-catalyzed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls. *Nature* 363(6430): 605–607.
- Bitounis D., Ali-Boucetta H., Hong B.H., Min D.H., Kostarelos K.** (2013) Prospects and challenges of graphene in biomedical applications. *Adv. Mater.* 25: 2258–2268.
- Boehning D., Patterson R.L., Sedaghat L., Glebova N.O., Kurosaki T., Snyder S.H.** (2003). Cytochrome c binds to inositol (1,4,5) triphosphate receptors, amplifying calcium-dependent apoptosis. *Nat. Cell Biol.* 5(12): 1051–1061.
- Boehm H.P., Setton R., Stumpp E.** (1994) Nomenclature and terminology of graphite intercalation compounds. *Pure Appl. Chem.* 66(9): 1893–1901.
- Bommarius A.S., Riebel B.R.** (2004) Biocatalysis: Fundamental and applications. Weinheim: Wiley-VCH Verlag.
- Bornscheuer U.T., Kazlauskas R.J.** (2004) Catalytic promiscuity in biocatalysis: Using old enzymes to form new bonds and follow new pathways. *Angew. Chem. Int. Ed.* 43(45): 6032–6040.
- Bourbonnais R., Paice M.G., Freiermuth B., Bodie E., Borneman S.** (1997) Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 63: 4627–4632.
- Bourbonnais R., Paice M.G.** (1990) Oxidation of nonphenolic substrates—an expanded role for laccase in lignin degradation. *FEBS Lett.* 267: 99–102.
- Bourlinos A.B., Gournis D., Petridis D., Szabó T., Szeri A., Dékány I.** (2003) Graphite oxide: chemical reduction to graphite and surface modification with primary aliphatic amines and amino acids. *Langmuir* 19: 6050–6055.
- Bradford M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 72(1-2): 248–254.
- Brena B.M., Batista-Viera F.** (2006) Immobilization of enzymes: A literature survey, in *Methods in Biotechnology: Immobilization of Enzymes and Cells*. Second Edition (Ed. J.M. Guisan), Humana Press Inc., Totowa, NJ.
- Brinchi L., Cotana F., Fortunati E., Kenny J.M.** (2013) Production of nanocrystalline cellulose from lignocellulosic biomass: Technology and applications. *Carbohydr. Polym.* 94: 154–169.
- Camarero S., García O., Vida T., Colom J., del Río J.C., Gutiérrez A., Martínez M.J., Martínez A.T.** (2002) Flax pulp bleaching and residual lignin modification by laccase-mediator systems. *Prog. Biotechnol.* 21: 213–222.
- Campbell A.S., Dong C., Meng F., Hardinger J., Perhinschi G., Wu N., Dinu C.Z.** (2015) Enzyme catalytic efficiency: A function of bio–nano interface reactions. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6: 5393–5403.
- Campbell A.S., Dong C., Dordick J.S., Dinu C. Z.** (2013) Bionano engineered hybrids for hypochlorous acid generation. *Process Biochem.* 48: 1355–1360.
- Cang-Rong J.T., Pastorin G.** The influence of carbon nanotubes on enzyme activity and structure: investigation of different immobilization procedures through enzyme kinetics and circular dichroism studies. *Nanotechnology* 20: 25102–25122.
- Capek I.** (2009) Dispersions, novel nanomaterial sensors and nanoconjugates based on carbon nanotubes. *Adv. Colloid Interface Sci.* 150(2): 63–89.
- Carjia G., Ciobanu G., Apostolescu G., Dranca S., Apostolescu N.** (2009) Hydrotalcite-like anionic clays substituted with iron/laccase composites for biosensors applications. *Proc. SPIE* 7297: 15.
- Casiraghi C., Hartschuh A., Qian H., Piscanec S., Georgi C., Fasoli A., Novoselov K.S., Basko D.M., Ferrari A.C.** (2009) Raman spectroscopy of graphene edges. *Nano Lett.* 9: 1433–1441.

- Cazorla C., Rojas-Cervellera V., Rovira C.** (2012) Calcium-based functionalization of carbon nanostructures for peptide immobilization in aqueous media. *J. Mater. Chem.* 22: 19684–19693.
- Cha C., Shin S.R., Annabi N., Dokmeci M.R., Khademhosseini A.** (2013) Carbon-based nanomaterials: Multifunctional materials for biomedical engineering. *ACS Nano* 7(4): 2891–2897.
- Chamberlain T.W., del Carmen Gimenez-Lopez M., Khlobystov A.N.** (2010) Carbon nanotubes as containers. In: Guldi DM, Martin N, editors. Carbon nanotubes and related structures: synthesis, characterization, functionalization and applications. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag, 349–384.
- Chang Q., Jiang G., Tang H., Li N., Huang J., Wu L.** (2015) Enzymatic removal of chlorophenols using horseradish peroxidase on superparamagnetic Fe₃O₄/graphene oxide nanocomposite. *Chin. J. Cat.* 36: 961–968.
- Chen Y., Gai P., Zhang J., Zhu J.J.** (2015) Design of an enzymatic biofuel cell with large power output. *J. Mater. Chem. A* 3: 11511–11516.
- Cheng S.H., Kao K.C., Liao W.N., Chen L.M., Mou C.Y., Lee C.H.** (2011) Site-specific immobilization of cytochrome c on mesoporous silica through metal affinity adsorption to enhance activity and stability. *New J. Chem.* 35: 1809–1816.
- Claus H.** (2003) Laccases and their occurrence in prokaryotes. *Arch. Microbiol.* 179:145–150.
- Cosnier S., Holzinger M., Le Goff A.** (2014) Recent advances in carbon nanotube-based enzymatic fuel cells. *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2: 45–51.
- Crespilho F.N., Ghica M.E., Florescu M., Nart F.C., Oliveira Jr.O.N., Brett C.M.A.** (2006) A strategy for enzyme immobilization on layer-by-layer dendrimer-gold nanoparticle electrocatalytic membrane incorporating redox mediator. *Electrochem. Commun.* 8: 1665–1670.
- Dai L.** (2013) Functionalization of graphene for efficient energy conversion and storage. *Acc. Chem. Res.* 46: 31–42.
- De S., Mohanty S., Nayak S.K.** (2015) A green biosensing matrix based on chitosan and graphene nanohybrid for the immobilization of glucose oxidase: Synthesis and property evaluation. *J. Inorg. Organomet. Polym.* 25: 1332–1344.
- Dean J.F.D., Eriksson K-E.L.** (1994) Laccase and the deposition of lignin in vascular plants. *Holzforschung* 48: 21–33.
- Decher G.** (1997) Fuzzy Nanoassemblies: Toward Layered Polymeric Multicomposites. *Science* 277: 1232–1237.
- Deep A., Sharma A., Kumar P.** (2015) Lipase immobilized carbon nanotubes for conversion of Jatropha oil to fatty acid methyl esters. *Biomass Bioenerg.* 81: 83–87.
- Deere J., Magner E., Wall J.G., Hodnett B.K.** (2003) Oxidation of ABTS by silicate-immobilized cytochrome c in nonaqueous solutions. *Biotechnol. Progr.* 19: 1238–1243.
- Dinu C.Z., Zhu G., Bale S.S., Anand G., Reeder P.J., Sanford K., Whited G., Kane R.S., Dordick J.S.** (2010) Enzyme-based nanoscale composites for use as active decontamination surfaces. *Adv. Funct. Mater.* 20: 392–398.
- Dodor D.E., Hwang H.M., Ekwunwe S.I.N.** (2004) Oxidation of anthracene and benzo(a)pyrene by immobilization laccase from *Trametes versicolor*. *Enzym. Microb. Technol.* 35: 210–217.
- Dong A., Huang P., Caughey W.S.** (1990) Protein secondary structures in water from second derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry* 29(13): 3303–3308.
- Dove A.** (1998) Pulling green biotechnology out of the red. *Nat. Biotechnol.* 16: 1022–1024.
- Drago G.A., Gibson T.D.** (2001) Enzyme stability and stabilization: applications and case studies, in Engineering and Manufacturing for Biotechnology (ed.: M. Hofman & P. Thonart), Volume 4 of the series Focus on Biotechnology, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, 361–376.
- Dreyer D.R., Park S., Bielawski C.W., Ruoff R.S.** (2010) The chemistry of graphene oxide. *Chem. Soc. Rev.* 39: 228–240.
- Dronov R., Kurth D.G., Möhwald H., Scheller F.W., Lisdat F.** (2007) A self-assembled cytochrome c/xanthine oxidase multilayer arrangement on gold. *Electrochim. Acta* 53: 1107–1113.

- Drumheller P.D., Hubbell J.A.** (2000) Surface immobilization of adhesion ligands for investigations of cell-substrate interactions, in *Tissue engineering* (Ed. J.D. Bronzino), CRC Press LLC.
- Dwivedi U., Singh P., Pandey V., Kumar A.** (2011) Structure–function relationship among bacterial, fungal and plant laccases. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 68: 117–128.
- Du D., Yang Y., Lin Y.** (2012) Graphene-based materials for biosensing and bioimaging. *MRS Bull.* 37: 1290–1296.
- Du K., Sun J., Zhou X., Feng W., Jiang X., Ji P.** (2015) A two-enzyme immobilization approach using carbon nanotubes/silica as support. *Biotechnol. Prog.* 31(1): 42–47.
- Durán N., Rosa M.A., D’Annibale A., Gianfreda L.** (2002) Applications of laccases and tyrosinases (phenoloxidas) immobilized on different supports: A review. *Enzyme Microb. Technol.* 31: 907–931.
- Dyke C.A., Tour J.M.** (2006) Functionalized carbon nanotubes in composites. In: O’Connell MJ, editor. *Carbon nanotubes: Properties and applications*. Boca Raton, USA: CRC Press - Taylor & Francis group, 275–294.
- Enotiadis A., Angeli K., Baldino N., Nicotera I., Gournis D.** (2012) Graphene-based nafion nanocomposite membranes: enhanced proton transport and water retention by novel organo-functionalized graphene oxide nanosheets. *Small* 8: 3338–3349.
- Fang W., Fernandes E.K., Roberts D.W., Bidochka M.J., St Leger R.J.** (2010) A laccase exclusively expressed by *Metarhizium anisopliae* during isotropic growth is involved in pigmentation, tolerance to abiotic stresses and virulence. *Fungal Genet. Biol.* 47:602–607.
- Farivar F., Moosavi-Movahedi A.A., Sefidbakht Y., Nazari K., Hong J., Sheibani N.** (2010) Cytochrome c in sodium dodecyl sulfate reverse micelle nanocage: From a classic electron carrier protein to an artificial peroxidase enzyme. *Biochem. Eng. J.* 49: 89–94.
- Feifel S.C., Lisdat F.** (2011) Silica nanoparticles for the layer-by-layer assembly of fully electro-active cytochrome c multilayers. *J. Nanobiotechnol.* 9: 59.
- Fernandez-Sanchez C., Tzanov T., Gubitz G.M., Cavaco-Paulo A.** (2002) Voltammetric monitoring of laccase-catalysed mediated reactions. *Bioelectrochemistry* 58: 149–56.
- Florence T.M.** (1985) The degradation of cytochrome c by hydrogen peroxide. *J. Inorg. Biochem.* 23: 131–141.
- Gallagher W.** (2005) FTIR analysis of protein structure. Source: http://www.chem.uwec.edu/Chem455_S05/Pages/Manuals/FTIR_of_proteins.pdf.
- Gao Y., Kyratzis I.** (2008) Covalent immobilization of proteins on carbon nanotubes using the cross-linker 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide: A critical assessment. *Bioconjug. Chem.* 19: 1945–1950.
- Gardiner D.J., Graves P.R.** (eds.) (1989) *Practical Raman spectroscopy*. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- Gavnholt B., Larsen K.** (2002) Molecular biology of plant laccases in relation to lignin formation. *Physiol. Plant.* 116: 273–280.
- Ge, J., Yang C., Zhu J., Lu D., Liu Z.** (2012) Nanobiocatalysis in organic media: opportunities for enzymes in nanostructures. *Top. Catal.* 55: 1070–1080.
- Geim A.K., Novoselov A.K.** (2007) The rise of graphene. *Nat. Mater.* 6: 183–191.
- Gengler R.Y.N., Badali D.S., Zhang D., Dimos K., Spyrou K., Gournis D., Miller R.J.D.** (2013) Revealing the ultrafast process behind the photoreduction of graphene oxide. *Nat. Commun.* 4: 2560–2565.
- Gengler R.Y.N., Veligura A., Enotiadis A., Diamanti E.K., Gournis D., Józsa C., van Wees B.J., Rudolf P.** (2010) Large-yield preparation of high-electronic-quality graphene by a Langmuir–Schaefer approach. *Small* 6: 35–39.
- Georgakilas V., Kouloumpis A., Gournis D., Bourlinos A., Trapalis C., Zboril R.** (2013) Tuning the dispersibility of carbon nanostructures from organophilic to hydrophilic: towards the preparation of new multipurpose carbon-based hybrids. *Chem. Eur. J.* 19: 12884–12891.

- Georgakilas V., Bourlinos A., Gournis D., Tsoufis T., Trapalis C., Mateo-Alonso A., Prato M.** (2008) Multipurpose organically modified carbon nanotubes: From functionalization to nanotube composites. *J. Am. Chem. Soc.* 130(27): 8733-8740.
- Giardina, P., Faraco, V., Pezzella, C., Piscitelli, A., Vanhulle, S., Sannia, G.** (2010). Laccases: A never-ending story. *Cell. Mol. Life Sci.* 67: 369-385.
- Goenka S., Santa V., Sant S.** (2014) Graphene-based nanomaterials for drug delivery and tissue engineering. *J. Control. Release* 173: 75–88.
- Gokhale A.A., Lu J., Lee I.** (2013) Immobilization of cellulase on magnetoresponsive graphene nano-supports. *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 90: 76–86.
- Gómez J.M., Romero M.D., Fernández T.M.** (2005) Immobilization of β -glucosidase on carbon nanotubes. *Catal. Lett.* 101: 275–278.
- Greenfield N.J.** (2004) Analysis of circular dichroism data, in Numerical Computer Methods, Part D: Pt D. (Methods in enzymology) p282-317.
- Gregory R.P., Bendall D.S.** (1996) The purification and some properties of the polyphenol oxidase from tea (*Camellia sinensis* L.). *Biochem. J.* 1001: 569–581.
- Grover N., Borkar I.V., Dinu C.Z., Kane R.S., Dordick J.S.** (2012) Laccase- and chloroperoxidase-nanotube paint composites with bactericidal and sporicidal activity. *Enzyme Microb. Technol.* 50: 271–279.
- Gu B.X., Xu C.X., Zhu G.P., Liu S.Q., Chen L.Y., Wang M.L., Zhu J.J.** (2009) Layer by layer immobilized horseradish peroxidase on zinc oxide nanorods for biosensing. *J. Phys. Chem. B* 113: 6553-6557.
- Gupta S., Irihamve A.** (2015) Probing the nature of electron transfer in metalloproteins on graphene-family materials as nanobiocatalytic scaffold using electrochemistry. *AIP Adv.* 5: 037106.
- Hammes G.G.** (ed.) (2005) Vibrations in macromolecules, in Spectroscopy for the biological sciences, John Wiley & Sons, Inc, 89-102.
- Han M.J., Choi H.T., Song H.G.** (2004) Degradation of phenanthrene by *Trametes versicolor* and its laccase. *J. Microbiol.* 42: 94–98.
- Hennrich F., Chan C., Moore V., Rolandi M., O'Connell M.J.** (2006) The element carbon. In: O'Connell MJ, editor. Carbon nanotubes - Properties and applications. Boca Raton, USA: CRC Press- Taylor & Francis group. p 1-18.
- Hermanová S., Zarevucká M., Bouša D., Sofer Z., Pumera M.** (2015) Graphene oxide immobilized enzymes show high thermal and solvent stability. *Nanoscale* 7: 5852-5858.
- Hiner A.N.P., Hernández-Ruiz J., García- Cánovas F., Smith A.T., Arnao M.B., Acosta M.** (1995) A comparative study of the inactivation of wild-type, recombinant and two mutant horseradish peroxidase isoenzymes C by hydrogen peroxide and *m*-chloroperoxybenzoic acid. *Eur. J. Biochem.* 234: 506-512.
- Hu B., Ge Z., Li X.** (2015) Interface adsorption taking the most advantageous conformation for electron transfer between graphene and cytochrome c. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 15: 4863-4869.
- Hu X., Wang P. Hwang H.** (2009) Oxidation of anthracene by immobilized laccase from *Trametes versicolor*. *Bioresour. Technol.* 100: 4963–4968.
- Hua B.Y., Wang J., Wang K., Li L., Zhua X.J., Xia X.H.** (2012) Greatly improved catalytic activity and direct electron transfer rate of cytochrome c due to the confinement effect in a layered self-assembly structure. *Chem. Commun.* 48: 2316–2318.
- Huang C., Bai H., Li C., Shi G.** (2011) A graphene oxide/hemoglobin composite hydrogel for enzymatic catalysis in organic solvents. *Chem. Commun.* 47: 4962–4964.
- Huang J., Chang Q., Ding Y., Han X., Tang H.** (2014) Catalytic oxidative removal of 2,4-dichlorophenol by simultaneous use of horseradish peroxidase and graphene oxide/Fe₃O₄ as catalyst. *Chem, Eng. J.* 254: 434-442.
- Huang L.C.L., Chang H.C.** (2004) Adsorption and immobilization of cytochrome c on nanodiamonds. *Langmuir* 20: 5879–5884.

- Hwan H.M., Hu X., Zhao X.** (2007) Enhanced bioremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons by environmentally friendly techniques. *J. Env. Sci Health Part C* 25: 313-352.
- Iijima S. Ichihashi T.** (1993) Single-shell carbon nanotubes of 1-nm diameter. *Nature* 363(6430): 603–605.
- Iijima S.** (1991) Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354(6348): 56–58.
- Jensen U.B., Lörcher S., Vagin M., Chevallier J., Shipovskov S., Koroleva O., Besenbachera F., Ferapontovaa E.E.** (2012) A 1.76V hybrid Zn-O₂ biofuel cell with a fungal laccase-carbon cloth biocathode. *Electrochim. Acta* 62: 218–226.
- Jiang B., Yang K., Zhao Q., Wu Q., Liang Z., Zhang L., Peng X., Zhang Y.** (2012) Hydrophilic immobilized trypsin reactor with magnetic graphene oxide as support for high efficient proteome digestion. *J. Chromatogr. A* 1254: 8–13.
- Jiao J., Miao A., Zhang X., Cai Y., Lu Y., Zhang Y., Lu H.** (2013) Realization of on-tissue protein identification by highly efficient in situ digestion with graphene-immobilized trypsin for MALDI imaging analysis. *Analyst* 138: 1645–1648.
- Jin, L., Yang K., Yao K., Zhang S., Tao H., Lee S.T., Liu Z., Peng R.** (2012) Functionalized graphene oxide in enzyme engineering: a selective modulator for enzyme activity and thermostability. *ACS Nano* 6: 4864–4875.
- Johannes C., Majcherczyk A.** (2000) Natural mediators in the oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons by laccase mediator systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 66: 524–8.
- Johannes C., Majcherczyk A., Hüttermann A.** (1996) Degradation of anthracene by laccase of *Trametes versicolor* in the presence of different mediator compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 46: 313–317.
- Junghanns C., Moeder M., Krauss G., Martin C., Schlosser D.** (2005) Degradation of the xenoestrogen nonylphenol by aquatic fungi and their laccases. *Microbiology* 151: 45–57.
- Iyer P.V., Ananthanarayan L.** (2008) Enzyme stability and stabilization: Aqueous and non-aqueous environment. *Proc. Biochem.* 43: 1019-1032.
- Ke C., Li X., Huang S., Xu L., Yan Y.** (2014) Enhancing enzyme activity and enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase via immobilization on modified multi-walled carbon nanotubes. *RSC Adv.* 4: 57810-57818.
- Khmelnitsky Y.L., Levashov A.V., Klyachko N.L., Martinek K.** (1988) Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. *Enzyme Microb. Technol.* 10: 710–724.
- Kim J., Kim B.C., Lopez-Ferrer D., Petritis K., Smith R.D.** (2010) Nanobiocatalysis for protein digestion in proteomic analysis. *Proteomics* 10: 687–699.
- Kim J., Grate J.W., Wang P.** (2008) Nanobiocatalysis and its potential applications. *Trends Biotechnol.* 26: 639–646.
- Kim J., Grate J.W., Wang P.** (2006) Nanostructures for enzyme stabilization. *Chem. Eng. Sci.* 61(3): 1017-1026.
- Kishore D., Talat M., Srivastava O.N., Kayastha A.M.** (2012) Immobilization of β -galactosidase onto functionalized graphene nano-sheets using response surface methodology and its analytical applications. *PLoS ONE*, 7: e40708.
- Konermann L., Douglas D.J.** (1997) Acid-Induced Unfolding of Cytochrome c at Different Methanol Concentrations: Electrospray Ionization Mass Spectrometry Specifically Monitors Changes in the Tertiary Structure. *Biochemistry* 36: 12296–12302.
- Krishna K.V., Ménard-Moyon C., Verma S., Bianco A.** (2013) Graphene-based nanomaterials for nanobiotechnology and biomedical applications. *Nanomedicine* 8: 1669–1688.
- Kuchibhatla S.V.N.T., Karakoti A.S., Bera D., Seal S.** (2007) One dimensional nanostructured materials. *Prog. Mater. Sci.* 52(5): 699-913.
- Kudin K.N., Ozbas B., Schniepp H.C., Prud'homme R.K., Aksay I.A., Car R.** (2008) Raman spectra of graphite oxide and functionalized graphene sheets. *Nano Lett.* 8: 36–41.
- Kuila T., Bose S., Khanra P., Mishra A.K., Kim N.H., Lee J.H.** (2011) Recent advances in graphene-based biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 26: 4637–4648.
- Lanzafame J.M., Muentner A.A., Brumbaugh D.V.** (1996) The effect of J-aggregate size on photoinduced charge transfer processes for dye-sensitized silver halides. *Chem. Phys.* 210: 79–89.

- Lau S.C., Lim H.N., Basri M., Masoumi H.R.F., Tajudin A.A., Huang N.M., Pandikumar A., Chia C.H., Andou Y.** (2014) Enhanced biocatalytic esterification with lipase-immobilized chitosan/graphene oxide beads. *PLoS ONE* 9: e104695.
- Le Goff A., Holzinger M., Cosnier S.** (2011) Enzymatic biosensors based on SWCNT-conducting polymer electrodes. *Analyst* 136(7): 1279–1287.
- Lee C., Lang J., Yen C., Shih P., Lin T.S., Mou C.Y.** (2005) Enhancing stability and oxidation activity of cytochrome c by immobilization in the nanochannels of mesoporous aluminosilicates. *J. Phys. Chem. B* 109: 12277–12286.
- Lee H., Jeong H.K., Han J., Chung H.S., Jang S.H., Lee C.W.** (2013) Increased thermal stability of cold-adapted esterase at ambient temperatures by immobilization on graphene oxide *Bioresour. Technol.* 148: 620–623.
- Lee T., Min S.H., Gu M., Jung Y.K., Lee W., Lee J.U., Song D.G., Kim B.S.** (2005) Layer-by-layer-assembly for graphene-based multilayer nanocomposites: Synthesis and applications. *Chem. Mater.* 27(11): 3785–3796.
- Lerf A., He H., Forster M., Klinowski J.** (1998) Structure of graphite oxide revisited. *J. Phys. Chem. B* 102: 4477–4482.
- Li D., Muller M.B., Gilje S., Kaner R.B., Wallace G.G.** (2008) Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets. *Nat. Nanotechnol.* 3: 101–105.
- Li L., Sun X., Li B.** (2012) Adsorption of cytochrome c by succinic anhydride-modified peanut shells. *Adv. Biosci. Biotechnol.* 3(1): 14–19.
- Li Q., Fan F., Wang Y., Feng W., Ji P.** (2013) Enzyme immobilization on carboxyl-functionalized graphene oxide for catalysis in organic solvent. *Ind. Eng. Chem. Res.* 52: 6343–6348.
- Li S.P., Qin Y.J., Shi J.H., Guo Z.X., Yongfang L., Zhu D.B.** (2005) Electrical Properties of Soluble Carbon Nanotube/Polymer Composite Films. *Chem. Mater.* 17: 130–135.
- Li Y., Wang X.Y., Jiang X.P., Ye J.J., Zhang Y.W. Zhang X.Y.** (2015) Fabrication of graphene oxide decorated with Fe₃O₄@SiO₂ for immobilization of cellulase. *J. Nanopart. Res.* 17: 8.
- Li Z., Xie C., Wang J., Meng A., Zhang F.** (2015) Direct electrochemistry of cholesterol oxidase immobilized on chitosan-graphene and cholesterol sensing. *Sens. Actuators B* 208: 505–511.
- Lisdat F., Dronov R., Möhwald H., Scheller F.W. Kurth D.** (2009) Self-assembly of electro-active protein architectures on electrodes for the construction of biomimetic signal chains. *Chem. Commun.* 3: 277–283.
- Litthauer D., Vuuren M.J.V., Tonder A.V., Wolfardt F.W.** (2007) Purification and kinetics of a thermostable laccase from *Pycnoporus sanguineus* (SCC 108). *Enzyme Microb. Technol.* 40: 563–568.
- Liu J., Wang Q., Fan X.R., Sun X.J., Huang P.H.** (2013) Layer-by-layer self-assembly immobilization of catalases on wool fabrics. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169: 2212–2222.
- Liu X., Kim C.N., Yang J., Jemmerson R., Wang X.** (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c. *Cell* 86(1): 147–157.
- Liu Y., Li Q., Feng Y.Y., Ji C.S., Li T.C., Tu J., Gu X.D.** (2014) Immobilization of acid pectinase on graphene oxide nanosheets. *Chem. Pap.* 68(6): 732–738.
- Liu Y., Yu D., Zeng C., Miao Z., Dai L.** (2010) Biocompatible Graphene Oxide-Based Glucose Biosensors. *Langmuir* 26: 6158–6160.
- Liu Z., Lin H., Ye S., Liu Q.Y., Meng Z., Zhang C.M., Xia Y., Margoliash E., Rao Z., Liu X.J.** (2006) Remarkably high activities of testicular cytochrome c in destroying reactive oxygen species and in triggering apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103: 8965–70.
- Loh K.P., Bao Q., Anq P.K., Yang J.** (2010) The chemistry of graphene. *J. Mater. Chem.* 20: 2277–2289.
- Lundqvist M., Sethson I., Jonsson B.H.** (2004) Protein adsorption onto silica nanoparticles: conformational changes on the particles' curvature and the protein stability. *Langmuir* 20: 10639–10647.
- Madhavi V., Lele S.S.** (2009) Laccase: properties and applications *Bioresources* 4: 1694–1717.

- Mansur M.** (2003) The white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* secretes laccase isoenzymes with different substrate specificities. *Mycologia* 95: 1013-1020.
- Majcherczyk A, Johannes C., Hüttermann A.** (1998) Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH) by laccase of *Trametes versicolor*. *Enzym. Microb. Technol.* 22: 335–341.
- Marzuki N.H.C., Mahat N.A., Huyop F., Buang N.A., Wahab R.A.** (2015) *Candida rugosa* lipase immobilized onto acid-functionalized multi-walled carbon nanotubes for sustainable production of methyl oleate. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 177: 967-984.
- Mei L.P., Feng J.J., Wu L., Zhou J.Y., Chen J.R., Wang A.J.** (2015) Novel phenol biosensor based on laccase immobilized on reduced graphene oxide supported palladium-copper alloyed nanocages. *Biosens. Bioelectron.* 74: 347-352.
- Meyer Y.P.** (1985) Circular dichroism studies of electron-transport components. *Curr. Top Bioenerg.* 14: 149–188.
- Meyer Y.P.** (1968) Far ultraviolet circular dichroism spectra of cytochrome c. *Biochim. Biophys. Acta* 154: 84–90.
- Minteer S.D., Atanassov P., Luckarift H.R., Johnson G.R.** (2012) New materials for biological fuel cells. *Mater. Today* 15(4): 166-173.
- Minteer S.D., Liaw B.Y., Cooney, M.J.** (2007) Enzyme-based biofuel cells. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18(3): 228–234.
- Merkoçi A.** (2006) Carbon nanotubes in analytical sciences. *Microchim Acta* 152: 157–174.
- Mesarič T., Baweja L., Drašler B., Drobne D., Makovec D., Dušak P., Dhawan A., Sepčić K.** (2013) Effects of surface curvature and surface characteristics of carbon-based nanomaterials on the adsorption and activity of acetylcholinesterase. *Carbon* 62: 222–232.
- Meyer Y.P.** (1985) Circular dichroism studies of electron-transport components. *Curr. Top. Bioenerg.* 14: 149-188.
- Miller M.J., Dunn B., Valentine S.J., Zink I.J.** (1996) Synthesis conditions for encapsulating cytochrome c and catalase in SiO₂ sol-gel materials. *J. Non-Cryst. Solids* 202: 279-289.
- Min K.L., Kim Y.H., Kim Y.W., Jung H.S., Hah Y.C.** (2001) Characterization of a novel laccase produced by the wood-rotting fungus *Phellinus ribis*. *Arch. Biochem. Biophys.* 392: 286-297.
- Mohamad N.R., Buang N.A., Mahat N.A., Lok Y.Y., Huyop F., Aboul-Enein H.Y., Wahab R.A.** (2015) A facile enzymatic synthesis of geranyl propionate by physically adsorbed *Candida rugosa* lipase onto multi-walled carbon nanotubes. *Enzyme Microb. Technol.* 72: 49-55.
- Morozova O.V., Shumakovich G.P., Shleev S.V., Yaropolov Y.I.** (2007) Laccase-mediator systems and their applications: A review. *Appl. Biochem. Microbiol.* 43: 523–535.
- Mostofizadeh A., Li Y., Song B., Huang Y.** (2011) Synthesis, properties, and applications of low-dimensional carbon-related nanomaterials. *J. Nanomater.* 2011, Article ID 685081.
- Mu Q., Liu W., Xing Y., Zhou H., Li Z., Zhang Y., Ji L., Wang F., Si Z., Zhang B., Yan B.** (2008) Protein binding by functionalized multiwalled carbon nanotubes is governed by the surface chemistry of both parties and the nanotube diameter. *J. Phys. Chem. C* 112(9): 3300-3307.
- Munteanu F.D. Cavaco-Paulo A.** (2010) Biosensors based on laccase for detection of commercially reactive dyes. *Anal. Lett.* 43: 1126–1131.
- Nair R.R., Demarche P., Agathos S.N.** (2013) Formulation and characterization of an immobilized laccase biocatalyst and its application to eliminate organic micropollutants in wastewater. *New Biotechnol.* 30: 814–823.
- Natalello A., Ami D., Brocca S., Lotti M., Doglia S.M.** (2005) Secondary structure, conformational stability and glycosylation of a recombinant *Candida rugosa* lipase studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochem. J.* 385(2): 511-517.
- Oberlin A., Endo M., Koyama T.** (1976) Filamentous growth of carbon through decomposition of benzene. *J. Cryst. Growth* 32: 335–349.
- Ono T., Goto M.** (2006) Peroxidative catalytic behaviour of cytochrome c solubilised in reverse micelles. *Biochem. Eng. J.* 28: 156–160.

- Orrenius S., Zhivotovsky B.** (2005) Cardiolipin oxidation sets cytochrome c free. *Nature Chem. Biol.* 1(4): 188–9.
- Pang R., Li M., Zhang C.** (2015) Degradation of phenolic compounds by laccase immobilized on carbon nanomaterials: Diffusional limitation investigation. *Talanta* 131: 38–45.
- Pattammattel A., Puglia M., Chakraborty S., Deshapriya I.K., Dutta P.K., Kumar C.V.** (2013) Tuning the activities and structures of enzymes bound to graphene oxide with a protein glue. *Langmuir* 29: 15643–15654.
- Pavlidis I.V., Patila M., Bornscheuer U.T., Gournis D., Stamatis H.** (2014) Graphene-based nanobiocatalytic systems: recent advances and future prospects. *Trends Biotechnol.* 32(6): 312–320.
- Pavlidis I.V., Vorhaben T., Gournis D., Papadopoulos G.K., Bornscheuer U.T., Stamatis H.** (2012a) Regulation of catalytic behaviour of hydrolases through interactions with functionalized carbon-based nanomaterials. *J. Nanopart. Res.* 14: 842–852.
- Pavlidis I.V., Vorhaben T., Tsoufis T., Rudolf P., Bornscheuer U.T., Gournis D., Stamatis H.** (2012b) Development of effective nanobiocatalytic systems through the immobilization of hydrolases on functionalized carbon-based nanomaterials. *Bioresour. Technol.* 115: 164–171.
- Piccino D., Delfino M., Botta G., Crucianelli M., Grossi V., Passacantando M., Antiochio R., Favero G., Saladino R.** (2015) Highly efficient synthesis of aldehydes by layer by layer multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) laccase mediator systems. *Appl. Catal. A* 499: 77–88.
- Piontek T., Antorini K., Choinowski M.** (2002) Crystal structure of a laccase from the fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å resolution containing a full complement of coppers. *J. Biol. Chem.* 277: 37663–37669.
- Prasad K.P., Chen Y., Chen P.** (2014) Three-dimensional graphene-carbon nanotube hybrid for high-performance enzymatic biofuel cells. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 6: 3387–3393.
- Prasad S., Maiti N.C., Mazumdar S., Mitra S.** (2002) Reaction of hydrogen peroxide and peroxidase activity in carboxymethylated cytochrome c: spectroscopic and kinetic studies. *Biochim Biophys Acta* 1596: 63–75.
- Prestrelski S.J., Tedeschi N., Arakawa T., Carpenter J.F.** (1993) Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophys. J.* 65(2): 661–671.
- Prlainović N.Z., Bezbradica D.I., Rogan J.R., Uskoković P.S., Mijin D.Z., Marinković A.D.** (2016) Surface functionalization of oxidized multi-walled carbon nanotubes: *Candida rugosa* lipase immobilization. *Comptes Rendus Chimie* 19: 363–370.
- Qiu H., Xu C., Huang X., Ding Y., Qu Y., Gao P.** (2008) Adsorption of laccase on the surface of nanoporous gold and the direct electron transfer between them. *J. Phys. Chem. C* 2008, 112, 14781–14785.
- Ray M., Chatterjee S., Das T., Bhattacharyya S., Ayyub P., Mazumdar S.** (2011) Conjugation of cytochrome c with hydrogen titanate nanotubes: novel conformational state with implications for apoptosis. *Nanotechnology* 22: 415705.
- Raphael A.L., Gray H.B.** (1991) Semisynthesis of axial-ligand (position 80) mutants of cytochrome c. *J. Amer. Chem. Soc.* 113: 1038–1040.
- Riklin A., Willner I.** (1995) Glucose and acetylcholine sensing multilayer enzyme electrodes of controlled enzyme layer thickness. *Anal. Chem.* 67: 4118–4126.
- Roberts S.A., Weichsel A., Grass G., Thokoli K., Huzzard J.T., Tollin G., Rensing C., Montfort W.R.** (2002) Crystal structure and electron transfer kinetics of CueO, a multicopper oxidase required for copper homeostasis in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 2766–2771.
- Rodriguez-López J.N., Hernández-Ruiz J., García- Cánovas F., Thorneley R.N.F., Acosta M., Arnao M.B.** (1997) The inactivation and catalytic pathways of horseradish peroxidase with *m*-chloroperoxybenzoic acid *J. Biol. Chem.* 272: 5469–5476.
- Roth S., Spiess A.C.** (2015) Laccases for biorefinery applications: a critical review on challenges and perspectives. *Bioprocess Biosyst Eng.* 38(12): 2285–313.
- Santucci R., Ascoli F.** (1997) The Soret circular dichroism spectrum as a probe for the heme Fe(III)-Met(80) axial bond in horse cytochrome c. *J. Inorg. Biochem.* 68: 211–214.

- Sato Y., Wuli B., Sederoff R., Whetten R.** (2001) Molecular cloning and expression of eight cDNAs in loblolly pine (*Pinus taeda*). *J. Plant Res.* 114: 147–155.
- Schwinte P., Ball V., Szalontai B., Haikel Y., Voegel J., Schaaf P.** (2002) Secondary structure of proteins adsorbed onto or embedded in polyelectrolyte multilayers. *Biomacromolecules* 3: 1135–1143.
- Sehgal D., Vijay I.K.** (1994) A method for the high efficiency of water-soluble carbodiimide-mediated amidation. *Anal. Biochem.* 218: 87–91.
- Sekar G., Sivakumar A., Mukherjee A., Chandrasekaran N.** (2016) Existence of hydroxylated MWCNTs demotes the catalysis effect of amylases against starch degradation. *Int. J. Biol. Macromol.* 86: 250–261.
- Senn H., Wuthrich K.** (1985) Amino acid sequence, haem-iron co-ordination geometry and functional properties of mitochondrial and bacterial c-type cytochromes. *Quart. Rev. Biophys.* 18, 111–134.
- Serefoglou E., Litina K., Gournis D., Kalogeris E., Tzialla A.A., Pavlidis I.V., Stamatis H., Maccallini E., Lubomska M., Rudolf P.** (2008). Smectite clays as solid supports for immobilization of b-glucosidase: synthesis, characterization, and biochemical properties. *Chem. Mater.* 20: 4106–4115.
- Silva R.A., Souza M.L., Bloisi G.D., Corio P., Petri D.F.S.** (2015) Bioconjugation of lipase and cholesterol oxidase with graphene or graphene oxide. *J. Nanopart. Res.* 17: 187–199.
- Shan C., Yang H., Han D., Zhang Q., Ivaska A., Niu L.** (2009) Water-soluble graphene covalently functionalized by biocompatible poly-L-lysine. *Langmuir* 25: 12030–12033.
- Shang W., Nuffer J.H., Muñiz-Papandrea V.A., Colón W., Siegel R.W., Dordick J.S.** (2009) Cytochrome c on silica nanoparticles: influence of nanoparticles size on protein structure, stability and activity. *Small* 5: 470–476.
- Shang W., Nuffer J.H., Dordick J.S., Siegel R.W.** (2007) Unfolding of ribonuclease A on silica nanoparticle surfaces. *Nano Lett.* 7: 1991–1995.
- Shao Q., Qian Y., Wu P., Zhang H., Cai C.** (2013) Graphene oxide-induced conformation changes of glucose oxidase studied by infrared spectroscopy. *Colloids Surf. B Biointerfaces* 109: 115–120.
- Shao Q., Wu P., Xu X., Zhang H., Cai C.** (2012) Insight into the effects of graphene oxide sheets on the conformation and activity of glucose oxidase: towards developing a nanomaterial-based protein conformation assay. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14: 9076–9085.
- Sharma P., Goel R., Capalasin N.** (2007) Bacterial laccases. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 23: 823–832.
- Shi Q., Yang D., Su Y., Li J., Jiang Z., Jiang Y., Yuan W.** (2007) Covalent functionalization of multi-walled carbon nanotubes by lipase. *J. Nanopart. Res.* 9: 1205–1210.
- Shimojo K., Kamiya N., Tani F., Nagarama H., Naruta Y., Goto M.** (2006) Extractive solubilization, structural change, and functional conversion of cytochrome c in ionic liquids via crown ether complexation. *Anal. Chem.* 78: 7735–42.
- Singh V., Joung D., Zhai L., Das S., Khondaker S.I., Seal S.** (2011) Graphene based materials: past, present and future. *Prog. Mater. Sci.* 56: 1178–271.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T.** (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* 150(1): 76–85.
- Smith S.C., Ahmed F., Gutierrez K.M., Rodrigues D.F.** (2014) A comparative study of lysozyme adsorption with graphene, graphene oxide and single-walled carbon nanotubes: Potential environmental applications. *Chem. Eng. J.* 240: 147–154.
- Soetaert W., Vandamme E.** (2006) The impact of industrial technology. *Biotechnol. J.* 1(7-8): 756–769.
- Song Y., Chen C., Wang C.** (2015) Graphene/enzyme-encrusted three-dimensional carbon micropillar arrays for mediatorless micro-biofuel cells. *Nanoscale* 7: 7084–7090.
- Spyrou K., Calvaresi M., Diamanti E.K., Tsoufis T., Gournis D., Rudolf P.; Zerbetto F.** (2015) Graphite oxide and aromatic amines: Size matters. *Adv. Funct. Mater.* 25: 263–269.

- Spyrou K., Potsi G., Diamanti E.K., Ke X., Serestatidou E., Verginadis I.I., Velalopoulou A.P., Evangelou A.M., Deligiannakis Y., van Tendeloo G., Gournis D., Rudolf P. (2014) Towards novel multifunctional pillared nanostructures: Effective intercalation of adamantylamine in graphene oxide and smectite clays. *Adv. Funct. Mater.* 24: 5841–5850.
- Staros J.V., Wright R.W., Swingle D.M. (1986) Enhancement by *N*-hydroxysulfosuccinimide of water-soluble carbodiimide-mediated coupling reactions. *Anal. Biochem.* 156: 220–222.
- Stavyiannoudaki V., Vamvakaki V., Chaniotakis N. (2009) Comparison of protein immobilisation methods onto oxidised and native carbon nanofibers for optimum biosensor development. *Anal. Bioanal. Chem.* 395: 429–435.
- Stergiou D.V., Diamanti E.K., Gournis D., Prodromidis M.I. (2010) Comparative study of different types of graphene as electrocatalysts for ascorbic acid. *Electrochem. Commun.* 12: 1307–1309.
- Su R., Shi P., Zhu M., Hong F., Li D. (2012) Studies on the properties of graphene oxide–alkaline protease bio-composites. *Bioresour. Technol.* 115: 136–140.
- Suma Y., Kang C.S., Kim H.S. (2016) Noncovalent and covalent immobilization of oxygenase on single-walled carbon nanotube for enzymatic decomposition of aromatic hydrocarbon intermediates. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 23: 1015–1024.
- Susi H., Byler D.M. (1983) Protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy: Second derivative spectra. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 115(1): 391–397.
- Tang L., Zeng G., Liu J., Xu X., Zhang Y., Shen G., Li Y., Liu C. (2008) Catechol determination in compost bioremediation using a laccase sensor and artificial neural networks. *Anal. Bioanal. Chem.* 391: 679–685.
- Tang W.L., Zhao H. (2009) Industrial biotechnology: Tools and applications. *Biotechnol. J.* 4(12): 1725–1739.
- Tasis D., Tagmatarchis N., Bianco A., Prato M. (2006) Chemistry of carbon nanotubes. *Chem. Rev.* 106(3): 1105–1136.
- Tavares A.P.M., Silva C.G., Dražić G., Silva A.M.T., Loureiro J.M., Faria J.L. (2015) Laccase immobilization over multi-walled carbon nanotubes: Kinetic, thermodynamic and stability studies. *J. Colloid Int. Sci.* 454: 52–60.
- Tepeli Y., Anik U. (2015) Comparison of performances of bioanodes modified with graphene oxide and graphene-platinum hybrid nanoparticles. *Electrochem. Commun.* 57: 31–34.
- Thomas Y.G., Goldbeck R.A., Kliger D.S. (2000) Characterization of equilibrium intermediates in denaturant-induced unfolding of ferrous and ferric cytochromes c using magnetic circular dichroism, circular dichroism, and optical absorption spectroscopies. *Biopolymers* 57: 29–36.
- Thurston C.F. (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* 140: 19–26.
- Tran T.T., Mulchandani A. (2016) Carbon nanotubes and graphene nano field-effect transistor-based biosensors. *Trends Anal. Chem.* 79: 222–232.
- Tsoufis T., Tomou A., Gournis D., Douvalis A.P., Panagiotopoulos I., Kooi B., Georgakilas V., Arfaoui I., Bakas T. (2008) Novel nanohybrids derived from the attachment of FePt nanoparticles on carbon nanotubes. *J. Nanosci. Nanotechnol.* 8(11): 5942–5951.
- Tziaila A.A., Pavlidis I.V., Felicissimo M.O., Rudolf P., Gournis D., Stamatis H. (2010) Lipase immobilization on smectite nanoclays: characterization and application to the epoxidation of α -pinene. *Bioresour. Technol.* 101: 1587–1594.
- van Mierlo C.P.M., de Jongh H.H.J., Visser A.J.W.G. (2000) Circular dichroism of proteins in solution and at interfaces. *Appl. Spectrosc. Rev.* 35(4): 277–313.
- Vazquez-Duhalt R. (1999) Cytochrome c as a biocatalyst. *J. Mol. Catal. B: Enzym* 7: 241–249.
- Vazquez-Duhalt R., Westlake D.W.S., Fedorak M.P. (1995) Kinetics of chemically modified lignin peroxidase and enzymatic oxidation of aromatic nitrogen-containing compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42: 675–681.
- Vazquez-Duhalt R., Westlake D.W.S., Fedorak P.M. (1993) Cytochrome c as a biocatalyst for the oxidation of thiophenes and organosulfides. *Enzyme Microb. Technol.* 15(6): 494–499.

- Vecchio G., Zambianchi F., Zacchetti P., Secundo F., Carrea G.** (1999) Fourier-transform infrared spectroscopy study of dehydrated lipases from *Candida antarctica* B and *Pseudomonas cepacia*. *Biotechnol. Bioeng.* 64(5): 545-551.
- Veerapandian M., Hunter R., Neethirajan S.** (2016) Lipoygenase-modified Ru-bpy/graphene oxide: Electrochemical biosensor for on-farm monitoring of non-esterified fatty acid. *Biosens. Bioelectron.* 75: 253-258.
- Verma M.L., Barrow C.J., Puri M.** (2013) Nanobiotechnology as a novel paradigm for enzyme immobilisation and stabilisation with potential applications in biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97: 23-39.
- Villegas J.A., Mauk A.G., Vazquez-Duhalt R.** (2000) A cytochrome c variant resistant to heme degradation by hydrogen peroxide. *Chem. Biol.* 7:237-44.
- Volckaert F.A.M.J., Barbier M., Canário A.V.M., Olsen J.L., Wesnigk J., Clark M., Boyen C.** (2008) Empowering marine science through genomics. *Mar. Genomics* 1(1): 33-35.
- Vrutika P., Datta M.** (2015) Lipase from solvent-tolerant *Pseudomonas* sp. DMVR46 strain adsorb on multiwalled carbon nanotubes: application for enzymatic biotransformation in organic solvents. *Appl. Chem. Biotechnol.* 177: 1313-1326.
- Walcarius A., Minter S.D., Wang J., Lin Y., Merkoçi A.** (2013) Nanomaterials for bio-functionalized electrodes: recent trends. *J. Mater. Chem. B* 1: 4878-4908.
- Wang G., Huang H., Zhang G., Zhang X., Fang B., Wang L.** (2010) Gold nanoparticles/L-cysteine/graphene composite based immobilization strategy for an electrochemical immunosensor. *Anal. Methods* 2(11): 1692-1697.
- Wang L., Gong W., Wang F., Yu Z., Chen Z.** (2016) Efficient nanocomposite film for chiral recognition of L-tryptophan, L-phenylalanine and L-tyrosine. *Anal. Methods* 8: 3481-3487.
- Wang Q., Cui J., Li G., Zhang J., Dawei L., Huang F., Wei Q.** (2014) Laccase immobilized on a PAN/adsorbents composite nanofibrous membrane for catechol treatment by a biocatalysis/adsorption process. *Molecules* 19: 3376-3388.
- Wang X., Li L., Wang Y., Xu C., Zhao B., Yang X.** (2013) Application of reduced graphene oxide and carbon nanotube modified electrodes for measuring the enzymatic activity of alcohol dehydrogenase. *Food Chem.* 138: 2195-2200.
- Wang Y., Li Z., Wang J., Li J., Lin Y.** (2011) Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology. *Trends Biotechnol.* 29: 205-212.
- Wang Z., Matsuo T., Nagao S., Hirota S.** (2011) Peroxidase activity enhancement of horse cytochrome c by dimerization. *Org. Biomol. Chem.* 9: 4766-4769.
- Wei W., Danielson N.D.** (2011) Fluorescence and circular dichroism spectroscopy of cytochrome c in alkylammonium formate ionic liquids. *Biomacromolecules* 12: 290-297.
- Wei X.L., Ge Z.Q.** (2013) Effect of graphene oxide on conformation and activity of catalase. *Carbon* 60: 401-409.
- Widsten P., Kandelbauer A.** (2008) Laccase applications in the forest products industry: A review. *Enzyme Microb. Technol.* 42: 293-307.
- Williams R.J.P.** (1989) NMR studies of mobility within protein structure. *Eur. J. Biochem.* 183: 479-497.
- Willner I., Yan Y.M., Willner B., Tel-Vered R.** (2009) Integrated enzyme-based biofuel Cells: A Review. *Fuel Cells* 9: 7-24.
- Woody R.W., Hsu M.C.** (1971) Origin of the heme Cotton effects in myoglobin and hemoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* 93: 3515-3525.
- Wu J., Li X., Yan Y., Hu Y., Zhang Y., Tang Y.** (2013) Protein adsorption onto nanozeolite: Effect of micropore openings. *J. Colloid Interf. Sci.* 406: 130-138.
- Wu L., Deng D., Jin J., Lu X., Chen J.** (2012) Nanographene-based tyrosinase biosensor for rapid detection of bisphenol A. *Biosens. Bioelectron.* 35: 193-199.
- Xing Q., Eadula S.R., Lvov Y.M.** (2007) Cellulose fiber-enzyme composites fabricated through layer-by-layer nanoassembly. *Biomacromolecules* 8: 1987-1991.

- Xu G., Chen X, Hu J, Yang P, Yang D, Wei L.** (2012) Immobilization of trypsin on graphene oxide for microwave-assisted on-plate proteolysis combined with MALDI-MS analysis. *Analyst* 137: 2757–2761.
- Xu R, Tang R., Zhou Q., Li F., Zhang B.** (2015) Enhancement of catalytic activity of immobilized laccase for diclofenac biodegradation by carbon nanotubes. *Chem Eng. J.* 262: 88-95.
- Xu Z., Wang S.L., Gao H.W.** (2010) Effects of nano-sized silicon dioxide on the structures and activities of three functional proteins. *J. Hazard. Mater.* 180: 375–383.
- Xue T., Jiang S., Qu Y., Su Q., Cheng R., Dubin S., Chiu C.Y., Kaner R., Huang Y., Duan X.** (2012) Graphene-supported hemin as a highly active biomimetic oxidation catalyst. *Angew. Chem. Int. Ed.* 51: 3822–3825.
- Yang N., Chen X., Ren T., Zhang P., Yang D.** (2015) Carbon nanotube based biosensors. *Sens. Actuators B: Chem.* 207: 690-715.
- Yang X., Zhao C., Ju E., Ren J., Qu X.** (2013) Contrasting modulation of enzyme activity exhibited by graphene oxide and reduced graphene oxide. *Chem. Commun.* 49: 8611-8613.
- Yapar E., Kayahan E., Bozkurt A., Toppare L.** (2009) Immobilizing cholesterol oxidase in chitosan-alginate network. *Carbohydr. Polym.* 76(3): 430-436.
- Yeh S.R., Han S., Rousseau D.L.** (1998). Cytochrome c folding and unfolding. *Accounts Chem. Res.* 31(11): 727–735.
- Yoshida H.** (1883) LXIII.—Chemistry of lacquer (Urushi). Part I. Communication from the Chemical Society of Tokio. *J. Chem. Soc. Trans.* 43, 472–486.
- Yu C., Wang L., Li W., Zhu C, Bao N., Gu H.** (2015) Detection of cellular H₂O₂ in living cells based on horseradish peroxidase at the interface of Au nanoparticles decorated graphene oxide. *Sens. Actuators B: Chem* 211: 17-24.
- Yu G., Wu W., Zhao Q., Wei X., Lu Q.** (2015) Efficient immobilization of acetylcholinesterase onto amino functionalized carbon nanotubes for the fabrication of high sensitive organophosphorus pesticides biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 68: 288-294.
- Zhang C., Chen S., Alvarez P.J.J., Chen W.** (2015) Reduced graphene oxide enhances horseradish peroxidase stability by serving as radical scavenger and redox mediator. *Carbon* 94: 531–538.
- Zhang, F., Zheng, B., Zhang, J., Huang, X., Liu, H., Guo, S., Zhang, J.** (2010) Horseradish peroxidase immobilized on graphene oxide: Physical properties and applications in phenolic compound removal. *J. Phys. Chem. C* 114: 8469–8473.
- Zhang G., Ma J., Wang J., Li Y., Zhang G., Zhang F., Fan X.** (2014) Lipase immobilized on graphene oxide as reusable biocatalyst. *Ind. Eng. Chem. Res.* 53(51): 19878-19883.
- Zhang Y., Arugula M.A., Kirsch J.S., Yang X., Olsen E., Simonian A.L.** (2015) Layer-by-layer assembled carbon nanotube-acetylcholinesterase/biopolymer renewable interfaces: SPR and electrochemical characterization. *Langmuir* 31(4): 1462-1468.
- Zhang Y., Wu C., Guo S., Zhang J.** (2013) Interactions of graphene and graphene oxide with proteins and peptides. *Nanotechnol. Rev.* 2: 27–45.
- Zhang Y., Zhang J., Huang X., Zhou X., Wu H., Guo S.** (2012) Assembly of graphene oxide–enzyme conjugates through hydrophobic interaction. *Small* 8: 154–159.
- Zhao F., Li H., Jiang Y., Wang X., Mu X.** (2014) Co-immobilization of multi-enzyme on control-reduced graphene oxide by non-covalent bonds: an artificial biocatalytic system for the one-pot production of gluconic acid from starch. *Green Chem.* 16: 2558-2565.
- Zhao H.Z., Du Q., Li Z.S., Yang Q.Z.** (2012) Mechanisms for the direct electron transfer of cytochrome c induced by multi-walled carbon nanotubes. *Sensors* 12: 10450-10462.
- Zheng H., Okada H., Nojima S., Suye S.I., Hori T.** (2004) Layer-by-layer assembly of enzymes and polymerized mediator on electrode surface by electrostatic adsorption. *Sci. Technol. Adv. Mater.* 5: 371-376.
- Zhou L., Jiang Y., Gao J., Zhao X., Ma L., Zhou Q.** (2012) Oriented immobilization of glucose oxidase on graphene oxide. *Biochem. Eng. J.* 69: 28–31.

Zhou X., Jiang Y., Li Z., Gu Z., Wang G. (2016) Improved activity and thermo-stability of the horseradish peroxidase with graphene quantum dots and its application in fluorometric detection of hydrogen peroxide. *Spectrochim. Acta Part A* 165: 106-113.

Zhu J., Xu M., Meng X., Shang K., Fan H., Ai S. (2012) Electro-enzymatic degradation of carbofuran with the graphene oxide-Fe₃O₄-hemoglobin composite in an electrochemical reactor. *Proc. Biochem.* 47: 2480–2486.

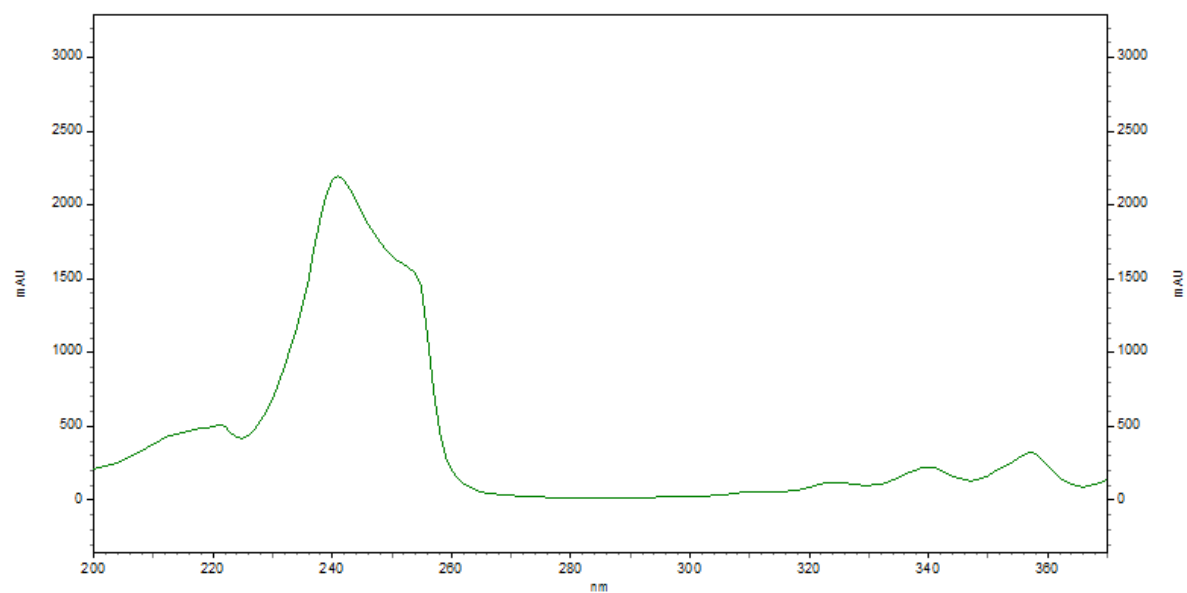
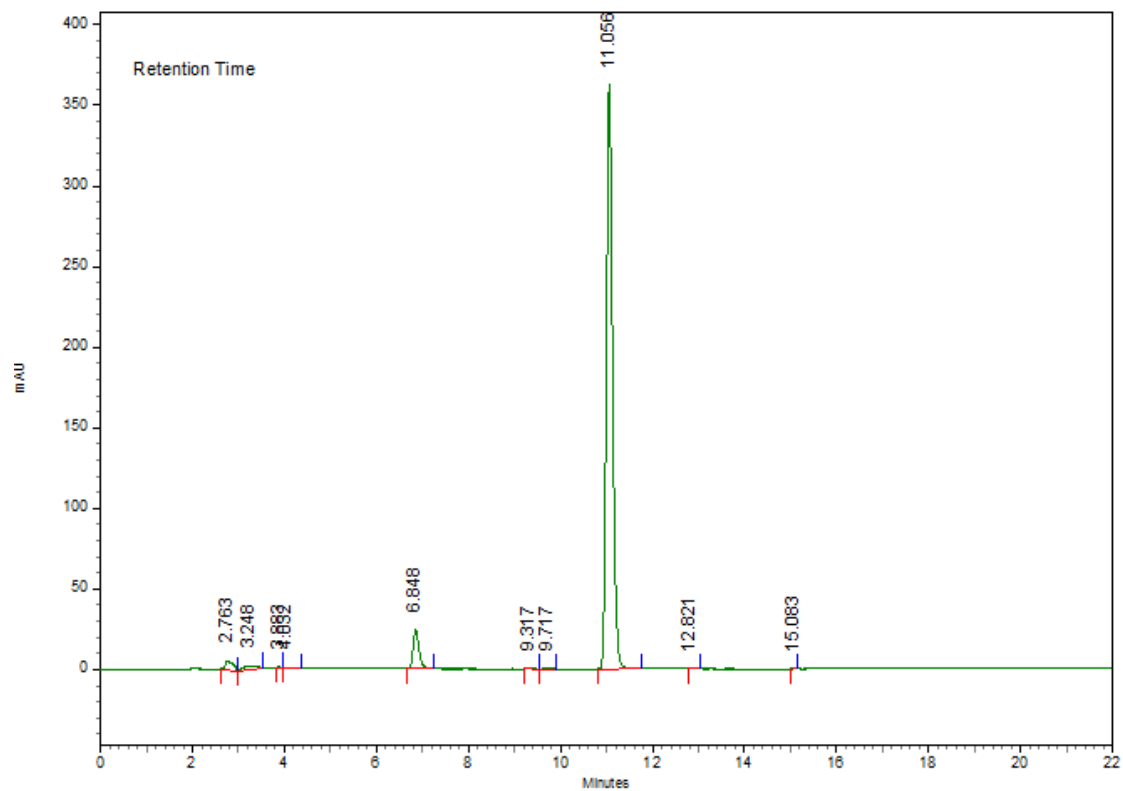
Zhu Z., Garcia-Gancedo L., Flewitt A.J., Xie H., Moussy F., Milne W.I. (2012) A critical review of glucose biosensors based on carbon nanomaterials: Carbon nanotubes and graphene. *Sensors* 12: 5996-6022.

Zuo X., He S., Li D., Peng C., Huang Q., Song S., Fan C. (2010) Graphene oxide-facilitated electron transfer of metalloproteins at electrode surfaces. *Langmuir* 26, 1936–1939.

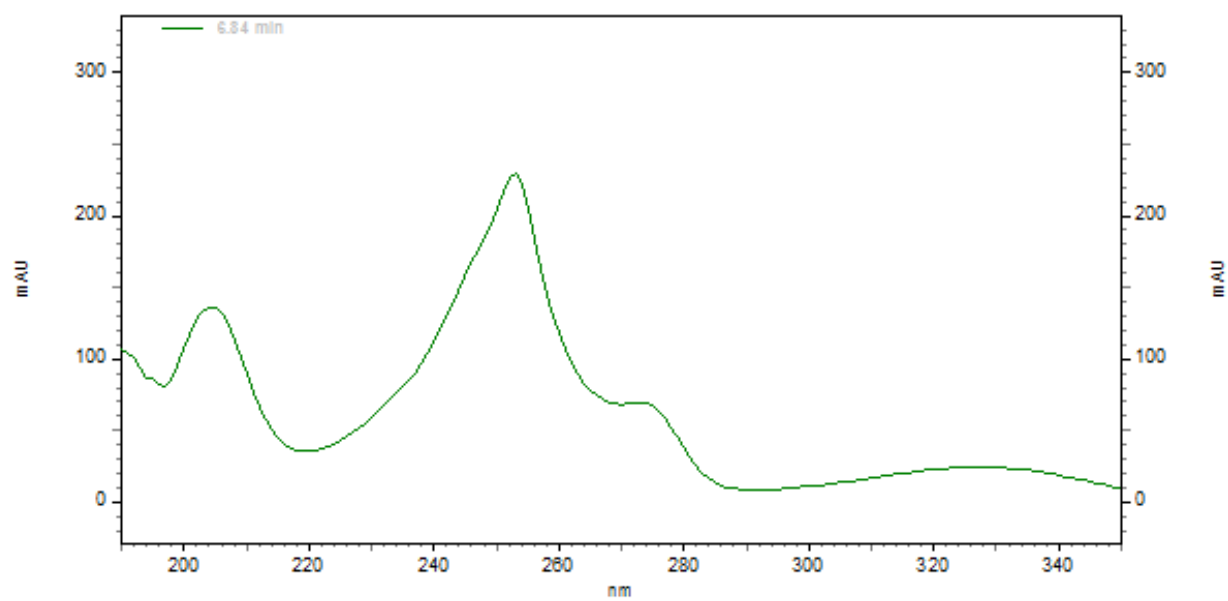
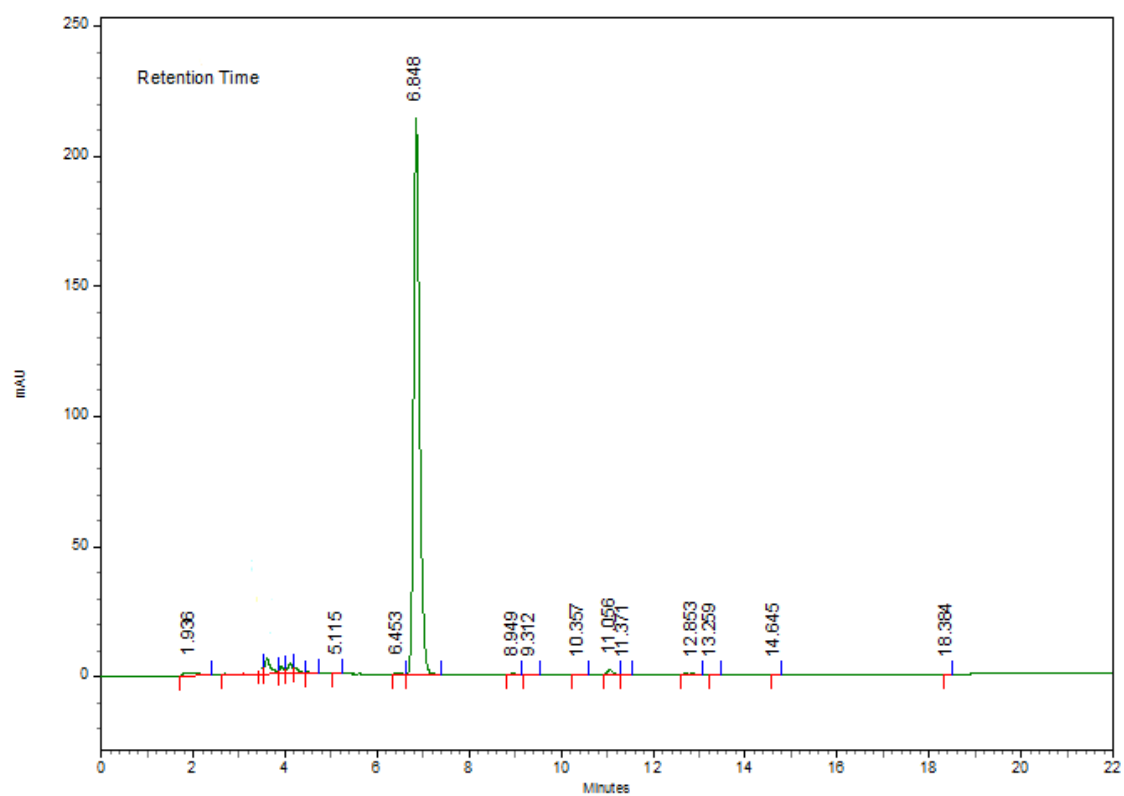
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΦΑΣΜΑΤΑ ΤΟΥ ΑΝΘΡΑΚΕΝΙΟΥ ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΝΑΘΡΑΚΙΝΟΝΗΣ

Στις επόμενες σελίδες παρατίθενται τα χρωματογραφήματα και τα φάσματα του ανθρακενίου και της ανθρακινόνης, όπως προκύπτουν μετά από ανάλυση με HPLC



Χρωματογράφημα έκλουσης (πάνω) και φάσμα (κάτω) του ανθρακενίου.

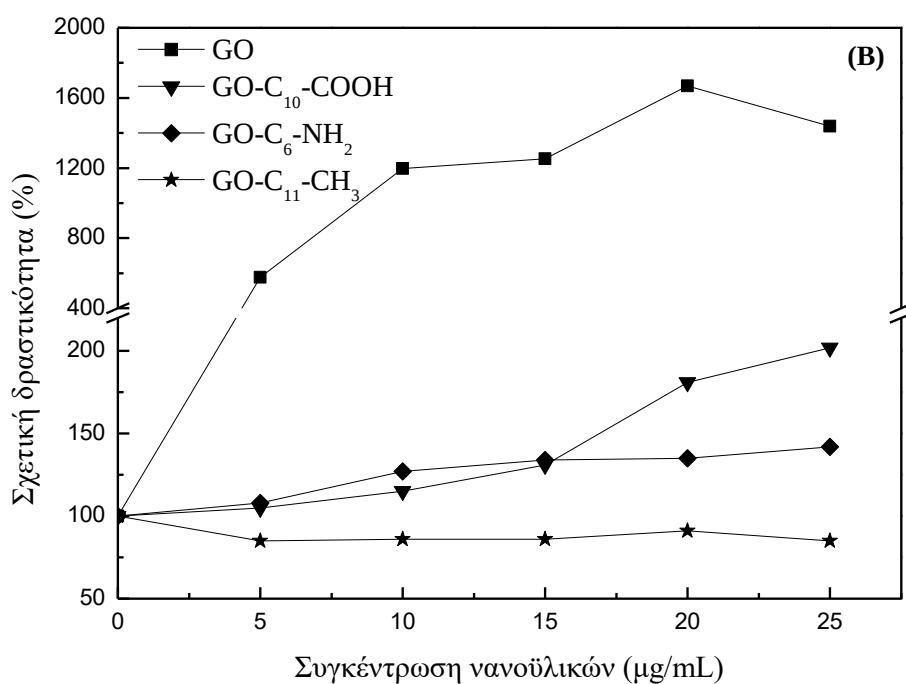
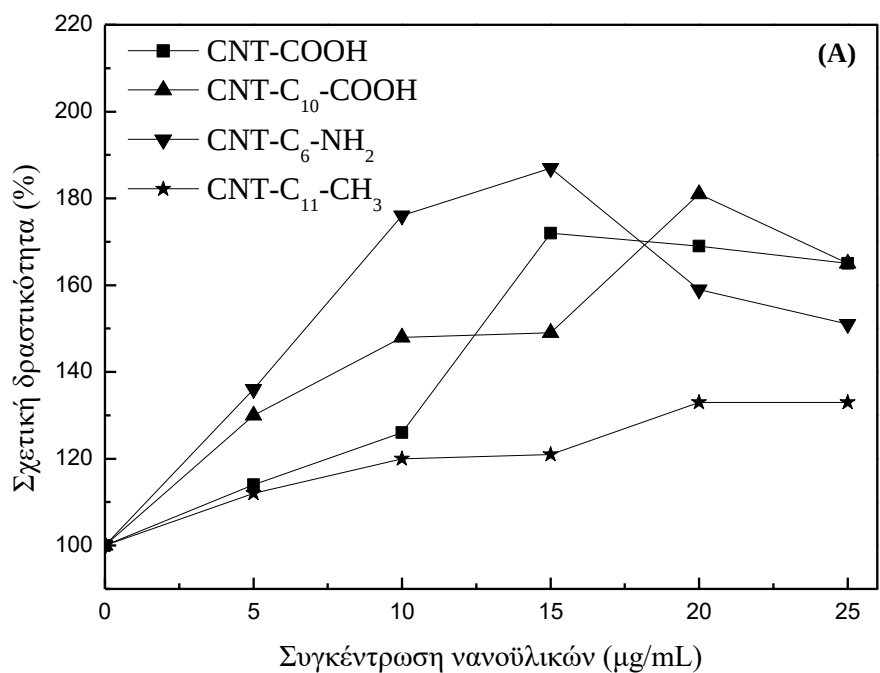


Χρωματογράφημα έκλουσης (πάνω) και φάσμα (κάτω) της ανθρακινόνης.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΩΣ C ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΝΑΝΟΎΛΙΚΩΝ

Στην επόμενη σελίδα παρουσιάζονται τα αποτελέσματα επίδρασης συγκέντρωσης τροποποιημένων νανοϋλικών στη δραστικότητα του κυτοχρώματος c κατά την οξείδωση του ABTS

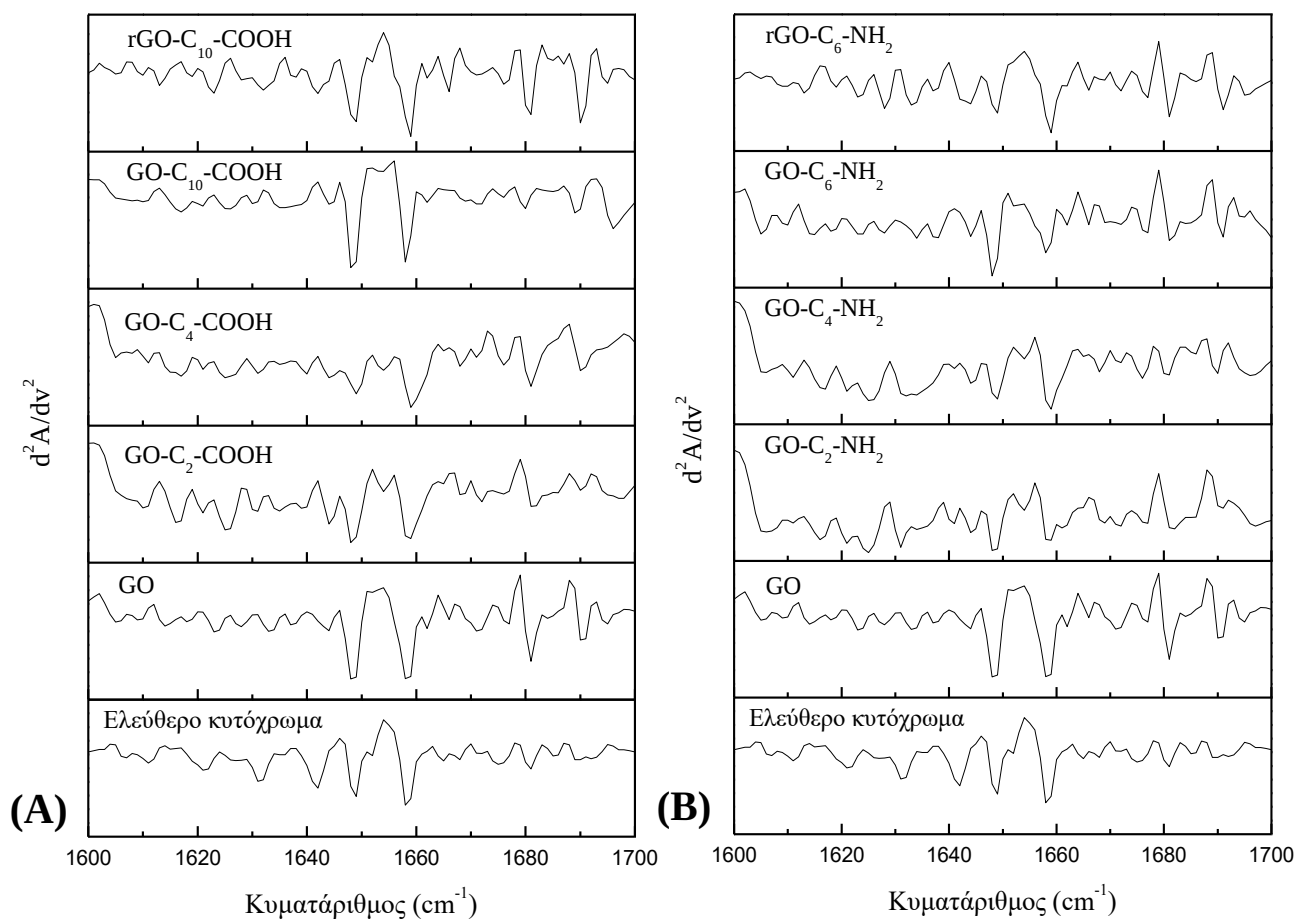


Επίδραση της συγκέντρωσης των τροποποιημένων (Α) νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος και (Β) οξειδίων του γραφενίου (ανηγμένων ή μη) και νανοδίσκων άνθρακα, στην οξειδοαναγωγική δράση του cyt c. Ως 100% θεωρείται η ταχύτητα του της πρωτεΐνης απουσία νανοϋλικών.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

ΦΑΣΜΑΤΑ 2^{ΗΣ} ΠΑΡΑΓΩΓΟΥ ΤΟΥ ΑΚΙΝΟΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΚΥΤΟΧΡΩΜΑΤΟΣ C

Στην επόμενη σελίδα παρατίθενται τα φάσματα της 2ης παραγώγου του ακινητοποιημένου cyt c στα τροποποιημένα παράγωγα του γραφενίου στην περιοχή Amide I, όπως προκύπτουν από την ανάλυση με φασματοσκοπία FTIR.



Φάσματα της 2ης παραγώγου του ακινητοποιημένου cyt c στα τροποποιημένα παράγωγα του γραφενίου (α) με τελικές καρβοξυλομάδες και (β) με τελικές αμινομάδες, στην περιοχή Amide I (NCI: μη ομοιοπολική ακινητοποίηση, CI: ομοιοπολική ακινητοποίηση).