



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ**  
**ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ**  
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

**ENZYMA ΣΕ ΙΟΝΤΙΚΟΥΣ ΔΙΑΛΥΤΕΣ ΤΡΙΤΗΣ ΓΕΝΙΑΣ:**  
**ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΤΟΥΣ –**  
**ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΠΡΑΣΙΝΩΝ ΒΙΟΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ**

**ΑΘΗΝΑ ΠΑΠΑΔΟΠΟΥΛΟΥ**  
ΒΙΟΛΟΓΟΣ, MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2017**



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



## **Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή**

---

**Χαράλαμπος Σταμάτης – Καθηγητής (Επιβλέπων)**

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**Πέτρος Καταπόδης – Επίκουρος Καθηγητής**

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**Επαμεινώνδας Βουτσάς – Αναπληρωτής Καθηγητής**

Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

**Αναστασία Δέτση – Επίκουρος Καθηγήτρια**

Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

**Ανδρέας Τζάκος – Επίκουρος Καθηγητής**

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**Δημήτριος Χατζηνικολάου – Επίκουρος Καθηγητής**

Τμήμα Βιολογίας, Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών

**Δημοσθένης Φωκάς – Αναπληρωτής Καθηγητής**

Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

## **Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή**

---

**Χαράλαμπος Σταμάτης – Καθηγητής (Επιβλέπων)**

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**Πέτρος Καταπόδης – Επίκουρος Καθηγητής**

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

**Επαμεινώνδας Βουτσάς – Αναπληρωτής Καθηγητής**

Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο



# Ευχαριστίες

---

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η ολοκλήρωσή της πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια, την καθοδήγηση και την στήριξη ορισμένων ανθρώπων τους οποίους θα ήθελα να ευχαριστήσω.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα και θερμά, τον επιβλέποντα της παρούσας διατριβής, Καθηγητή Χαράλαμπο Σταμάτη για την εμπιστοσύνη, την επιστημονική καθοδήγηση και την στήριξή του όλα αυτά τα χρόνια, καθώς επίσης και για τις υποδείξεις και παρατηρήσεις του στην συγγραφή αυτής της διατριβής. Έχω αποκομίσει πολλά από αυτήν την σχέση και η διαδρομή αυτή θα αποτελεί μία αξέχαστη περίοδο στη ζωή μου.

Ευχαριστώ βαθύτατα τα μέλη της συμβουλευτικής επιτροπής για τον χρόνο που διέθεσαν και την τιμή που μου έκαναν να συμμετάσχουν στην τριμελή συμβουλευτική επιτροπή της διατριβής μου:

Τον Επίκουρο Καθηγητή Πέτρο Καταπόδη, για τις πολύτιμες συμβουλές, την συνεισφορά του στην παρούσα διατριβή και την φιλική του στήριξη και αντιμετώπιση όλα αυτά τα χρόνια.

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Επαμεινώνδα Βουτσά, για τις συμβουλές και την δημιουργική συνεργασία μας, καθώς επίσης και για την συμβολή του στην ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αναστασία Δέτση, για την άριστη συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια, την επιστημονική της καθοδήγηση στο τομέα των ιοντικών υγρών και την πολύτιμη συμβολή της για την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της εξεταστικής επιτροπής για τις υποδείξεις και παρατηρήσεις τους.

Ευχαριστώ ιδιαίτερος την Αγγελική Πολύδερα, μέλος Ε.ΔΙ.Π. του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας για την βοήθειά της, την φιλική της στάση, την συμπαράστασή της και την άριστη συνεργασία μας όλα αυτά τα χρόνια.

Τον Κώστα Κονιδάρη, μέλος Ε.Τ.Ε.Π. του εργαστηρίου Βιοχημείας, ο οποίος μου προσέφερε πάντα με μεγάλη προθυμία την βοήθειά του και την στήριξή του όλα αυτά τα χρόνια.

Το Δημήτρη Αλίβερτη, μέλος του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας και Φυσικοχημείας, για την πολύτιμη βοήθειά του στην σύνθεση των ιοντικών υγρών και σε οποιαδήποτε απορία μου στον τομέα της Οργανικής Χημείας. Υπήρξε πολύτιμος συνεργάτης όλα αυτά τα χρόνια και τον ευχαριστώ πολύ.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την Ανδρομάχη Τζάνη, υποψήφια διδάκτωρ του εργαστηρίου Οργανικής Χημείας του Ε.Μ.Π. για την σύνθεση, την ταυτοποίηση και τον χαρακτηρισμό

των ιοντικών υγρών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή αλλά κυρίως για την πολύτιμη βοήθειά της όλα αυτά τα χρόνια και την φιλική της στάση.

Τον Γιάννη Παυλίδη, μέλος του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιοχημείας, του Πανεπιστημίου του Kassel για τις πολύτιμες συμβουλές και την αμέριστη βοήθειά του όλα αυτά τα χρόνια.

Όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας από τον 2013 έως και σήμερα: την Αλεξάνδρα Χατζηκωνσταντίνου, την Δήμητρα Καραγεώργου, την Ευδοξία Ευσταθιάδου, την Κων/να Τζιμοπούλου και όλους του προπτυχιακούς φοιτητές που πέρασαν από το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας για την συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα του εργαστηρίου. Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την καλή μου φίλη και συνοδοιπόρο όλα αυτά τα χρόνια Βασιλική Μιχαέλα Πατήλα που ήταν πάντα εκεί, σε όλες τις εύκολες αλλά και δύσκολες στιγμές, συμπαραστάτης σε κάθε πρόβλημα. Η συμβολή της για την ολοκλήρωση αυτής της διατριβής αλλά και η στήριξή της όλα αυτά τα χρόνια υπήρξε καταλυτική και ανεκτίμητη.

Τα μέλη του εργαστηρίου Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών για την φιλοξενία κατά την λήψη των φασμάτων ATR-IR. Τον Κώστα Δήμο για την λήψη των εικόνων SEM.

Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Αναστασία Σ. Πολίτου για τη φιλοξενία της στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Τους φίλους μου για την συμπαράσταση και την στήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια. Ιδιαίτερα ευχαριστώ την φίλη μου Ελένη Λεοντάρη για την επιμέλεια του παρόντος συγγράματος.

Τον σύντροφό μου για την στήριξη, την συμπαράσταση και την αμέριστη υπομονή του αυτά τα χρόνια.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την οικογένειά μου για την αγάπη, την υπομονή και την ενθάρρυνση τους όλα αυτά τα χρόνια. Αποτελούν το στήριγμά μου σε κάθε μου βήμα και με πολλές θυσίες με βοήθησαν να ξεκινήσω και να ολοκληρώσω την παρούσα διατριβή.



## Δημοσιεύσεις

---

Δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά:

- ❖ **Athena A. Papadopoulou**, Andromachi Tzani, Angeliki C. Polydera, Petros Katapodis, Anastasia Detsi, Epaminondas Voutsas, Haralambos Stamatis. Green biotransformations catalyzed by enzyme-inorganic hybrid nanoflowers in environmental friendly ionic solvents. *Environ. Sci Poll Res. Submitted*
- ❖ **Athena A. Papadopoulou**, Evdoxia Efstathiadou, Michaela Patila, Angeliki Polydera, Haralambos Stamatis. Deep eutectic solvents as media for peroxidation reactions catalyzed by hemedependent biocatalysts, *Industrial & Engineering Chemistry*, 55, pp 5145-5151, **2016**
- ❖ **Athena A. Papadopoulou**, Andromachi Tzani, Dimitrios Alivertis, Maria H. Katsoura, Angeliki C. Polydera, Anastasia Detsi and Haralambos Stamatis. Hydroxyl ammonium ionic liquids as green media for biocatalytic oxidations. *Green Chemistry.*, 18, pp. 1147-1158, **2016**
- ❖ Stelios Voulgaris, **Athina A. Papadopoulou**, Efthimia Alevizou, Haralambos Stamatis, Epaminondas Voutsas. Measurement and Prediction of Solvent Effect on Enzymatic Esterification Reactions, *Fluid Phase Equilibria*, 398, pp 51-62, **2015**
- ❖ **Athena A. Papadopoulou**, Maria H. Katsoura, Alexandra Chatzikonstantinou, Eleni Kyriakou, Aggeliki C. Polydera, Andreas G. Tzakos, Haralambos Stamatis. Enzymatic hybridization of  $\alpha$ -lipoic acid with bioactive compounds in ionic solvents. *Bioresource Technology*, 136, pp. 41-48, **2013**

Δημοσιευμένες περιλήψεις εργασιών συνεδρίων σε διεθνή περιοδικά:

- ❖ **Athena A Papadopoulou**, Maria. Katsoura, Michaela. Patila, Eleni. Kyriakou, Angeliki C. Polydera, Andreas. Tzakos, Haralambos Stamatis. Enzymatic preparation of biologically active lipoic acid derivatives in ionic liquids-based media. *New Biotechnology*, 29, S81. 2012
- ❖ Michaela Patila, **Athena A. Papadopoulou**, Marianna V. Giannakopoulou, Eftichia Chabla, Dimitrios Gournis, Petros Katapodis, Haralambos Stamatis. Effect of functionalized carbon-based nanomaterials on the catalytic behaviour of oxidoreductases. *New Biotechnology*, 29, S155, 2012

Κεφάλαιο σε βιβλίο του διεθνούς εκδοτικού οίκου Wiley:

- ❖ Maria H. Katsoura, **Athena A. Papadopoulou**, Angeliki C. Polydera and Haralampos Stamatis. Effect of ionic liquids on catalytic properties and structure of biocatalysts. In: B.K. Paul & S.P. Moulik (Eds), *Ionic Liquid-Based Surfactant Science: Formulation, Characterization, and Applications*. John Wiley & Sons, Inc. 2015

28 συμμετοχές σε διεθνή και πανελλήνια συνέδρια (Biocat, MESEAEP, Euromar, ECB)



# Περίληψη

---

Στόχο της παρούσας διατριβής αποτελεί η μελέτη της επίδρασης νέων μη συμβατικών μέσων όπως είναι τα ιοντικά υγρά  $3^{15}$  γενιάς και οι βαθείς ευτηκτικοί διαλύτες στην καταλυτική συμπεριφορά οξειδοαναγωγικών και υδρολυτικών ενζύμων με απώτερο σκοπό την ανάπτυξη περιβαλλοντικά φιλικών βιοκαταλυτικών διεργασιών. Το αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον για αυτή την κατηγορία μη συμβατικών μέσων, εντάσσεται στην διαρκώς αυξανόμενη ανάγκη εισαγωγής περιβαλλοντικά φιλικών διεργασιών σε βιομηχανικές διεργασίες.

Υδροξυαιθυλαμμωνικά ιοντικά υγρά  $3^{15}$  γενιάς, χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη της επίδρασης της παρουσίας τους στα καταλυτικά και δομικά χαρακτηριστικά του κυτοχρώματος c. Η παρουσία αυτών των διαλυτών στο μέσο της αντίδρασης αύξησε την καταλυτική δραστηριότητα του κυτοχρώματος c (έως 20 φορές), αλλά και την σταθερότητά του απέναντι σε αποδιατακτικούς παράγοντες ( $H_2O_2$ ) συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα. Η θετική επίδραση αυτών των μέσων εξαρτάται σημαντικά από την συγκέντρωσή τους στο μίγμα της αντίδρασης καθώς επίσης και την χαιοτροπικότητα του κατιόντος. Φασματοσκοπικές μελέτες ορατού υπεριώδους, κυκλικού διχρωισμού και υπερύθρου υγρών δειγμάτων έδειξαν ότι η επίδραση των ιοντικών υγρών συνδέεται με μικρές αλλαγές στην δομή του πρωτεϊνικού μορίου ή/και αλλαγές στο μικροπεριβάλλον της αίμης. Η εφαρμογή των ιοντικών υγρών ως μέσα για την πραγματοποίηση αντιδράσεων αποχρωματισμού οδήγησαν σε αύξηση της δραστηριότητας του κυτοχρώματος έως και 4 φορές συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα. Όλα τα ιοντικά υγρά που μελετήθηκαν επαναχρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς έως και τέσσερις φορές.

Η καταλυτική συμπεριφορά του κυτοχρώματος c μελετήθηκε περαιτέρω παρουσία βεθέων ευτηκτικών διαλυτών (DES) με οργανικά άλατα το χλωρίδιο της χολίνης ( $ChCl$ ) και το χλωρίδιο του αιθυλαμμωνίου (EAC) και δότες δεσμών υδρογόνου την ουρία (U), την γλυκερόλη (Gly) και την αιθυλενική γλυκόλη (EG). Η δραστηριότητα του κυτοχρώματος εξαρτάται σημαντικά, από την φύση του αμμωνιακού άλατος και του δότη δεσμών υδρογόνου του εκάστοτε DES καθώς επίσης και από την συγκέντρωσή του στο μίγμα της αντίδρασης. Η επίδραση των DES στην δραστηριότητα του κυτοχρώματος συνδέεται με αλλαγές στο μικροπεριβάλλον της αίμης. Επιπλέον, τα DES με βάση το EAC σταθεροποιούν

το πρωτεϊνικό μόριο και αυξάνουν την δραστικότητα αποχρωματισμού του, ενώ παράλληλα μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν έως και τέσσερις φορές.

Εν συνεχεία, παρασκευάστηκαν υβριδικά σκευάσματα νανοϋλικών αποτελούμενα από ιόντα χαλκού και λιπάση Β από *Candida antarctica* γνωστά με το όρο «nanoflowers». Η δραστικότητα αυτών των σκευασμάτων μελετήθηκε σε διάφορα υδροξυαιθυλαμμωνικά ιοντικά υγρά 3<sup>ns</sup> γενιάς και DES. Η φύση των ιοντικών διαλυτών (ιοντικά υγρά και DES) επιδρά σημαντικά στην υδρολυτική και συνθετική δραστικότητα της ακινητοποιημένης λιπάσης καθώς επίσης και στην σταθερότητα και επαναχρησιμοποίηση της. Στα DES με βάση το ChCl η δραστικότητα αλλά κυρίως η σταθερότητα του ενζύμου αυξάνεται σημαντικά, συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα. Η επαναχρησιμοποίηση των CALB-nanoflowers σε DES μπορεί να πραγματοποιηθεί αποτελεσματικά για 7 βιοκαταλυτικούς κύκλους διατηρώντας το 50 % της αρχικής τους δραστικότητας.

Τέλος, η μελέτη της επίδρασης ιοντικών διαλυτών (ιοντικών υγρών και DES) στην καταλυτική συμπεριφορά της τυροσινάσης από μανιτάρια *Agaricus bisporus* τόσο σε ελεύθερη μορφή όσο και ακινητοποιημένη (CLEAs) έδειξε ότι το ακινητοποιημένο ένζυμο παρουσίασε αυξημένη δραστικότητα παρουσία των ιοντικών υγρών και DES συγκριτικά με το ελεύθερο σκεύασμα. Η δραστικότητα του ενζύμου εξαρτάται σημαντικά από την φύση του εκάστοτε διαλύτη στο μίγμα της αντίδρασης. Η παρουσία τόσο των ιοντικών υγρών όσο και των DES σταθεροποιεί σημαντικά το ένζυμο μετά από 24 ώρες επώασης στους 40 °C. Οι διαμορφωτικές αλλαγές της πρωτεΐνης παρουσία των ιοντικών διαλυτών μελετήθηκαν μέσω της φασματοσκοπίας φθορισμού. Ο φθορισμός της πρωτεΐνης, και ως εκ τούτου τα δομικά χαρακτηριστικά, φαίνεται να επηρεάζονται σημαντικά από την φύση και την συγκέντρωση του εκάστοτε μέσου στο διάλυμα μέτρησης. Τόσο τα ιοντικά υγρά όσο και τα DES χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς ως μέσα, για την πραγματοποίηση αντιδράσεων σύνθεσης της υδροξυτυροσόλης οδηγώντας σε υψηλές αποδόσεις την αντίδραση (έως 85 %) καθώς επίσης και για την αποδόμηση της φαινόλης από την ακινητοποιημένη τυροσινάση σε συνεχούς λειτουργίας μικρο-βιοαντιδραστήρα φτάνοντας το ποσοστό αποδόμησης 95 %.

# Abstract

---

The aim of this study is to investigate the effect of neoteric non conventional media such as 3<sup>rd</sup> generation ionic liquids and deep eutectic solvents on the catalytic behavior of oxidoreductases and hydrolases, leading to the development of novel environmental friendly biocatalytic systems. The scientific interest for these non conventional media renders from the increased needs for environmental friendly technologies in industry.

The effect of 3<sup>rd</sup> generation hydroxyethylammonium ionic liquids (ILs) on the biocatalytic behavior and structure of solubilized enzymes was investigated using cytochrome c (cyt c) as a model protein. The use of IL-based media enhances the tolerance of cyt c against the denaturing effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and increases (up to 20 fold) its catalytic efficiency compared to that observed in buffer. This beneficial effect strongly correlates with the concentration of ILs used, as well as the chaotropicity of their cations. UV-vis, circular dichroism and Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopic studies indicated that, the effect of ILs on the catalytic behavior of cyt c could be correlated with slight structural changes on the protein molecule and/or perturbations of the heme microenvironment. The use of hydroxyethylammonium-based ILs as reaction media increased (up to 4-fold) the decolorization activity of cyt c. All ILs used were recycled and successfully reused up to three times.

The catalytic behavior of cyt c was further investigated in the presence of various choline chloride (ChCl) and ethylammonium chloride (EAC) based deep eutectic solvents (DES), formed with three biodegradable hydrogen bond donors (urea, glycerol, and ethylene glycol). The peroxidase activity of biocatalyst strongly depends on the nature of the ammonium salt and hydrogen bond donor used for the formation of DES, as well as on DES concentration in the reaction media. UV-vis and circular dichroism spectroscopic studies indicate that the effect of DES on the biocatalytic behavior of cyt c is correlated with heme microenvironment perturbations. Moreover, EAC based DES stabilize cyt c, enhance its activity for the biodegradation of an industrial dye and are successfully reused up to four times.

Enzyme-inorganic hybrid nanoflowers using copper (II) ions as the inorganic component and lipase B from *Candida antarctica* as the organic component were prepared. Various

hydroxyethylammonium ILs and DES were tested as media for hydrolytic and synthetic reactions catalysed by lipase-inorganic hybrid nanoflowers. The nature of ionic solvents used has a significant effect on the hydrolytic and synthetic activity of the immobilized lipase, as well as on its stability and reusability. DES have been proved to be better solvents than most hydroxyethylammonium-based ILs for esterification or hydrolytic reactions catalysed by lipase-nanoflowers. The use of DES as reaction media significantly enhances the thermal stability of the immobilized enzyme compared to that observed in buffer. Moreover, lipase-nanoflowers could be efficiently reused up to seven times in DES.

Finally, the effect of various hydroxyethylammonium ILs and DES on the catalytic behavior of tyrosinase from *Agaricus bisporus* (free or immobilized) was investigated. The immobilized preparation has been proved to be better biocatalyst with enhanced biocatalytic activity in the presence of these media compared with the free enzyme. The activity of the enzyme significantly depends on the nature of the IL or DES in the reaction media. The stability of the immobilized tyrosinase is improved in the presence of most of the ILs and DES tested. Fluorescence spectroscopy was employed in order to investigate conformational changes of the protein in the presence of these solvents. It was found that structural modifications imposed by ILs and DES strongly depend on the nature of the solvent tested. ILs and DES were successfully used as media for the enzymatic synthesis of hydroxytyrosol as well as for the phenol removal in continuous flow bioreactor.

# Πίνακας Περιεχομένων

---

Εισαγωγή	1
----------	---

## ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

---

### Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup> Βιοτεχνολογία και Εφαρμογές

1.1 Εισαγωγή	5
1.2. Ένζυμα στην Βιοτεχνολογία	7
1.3. Κατηγορίες Ενζύμων	9

### Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup> Οξειδοαναγωγικά Ένζυμα (E.C. 1)

2.1. Εισαγωγή	11
2.2. Κυτόχρωμα c	12
2.2.1. Διαμόρφωση του κυτοχρώματος c	12
2.2.2. Ο ρόλος του κυτοχρώματος c στην απόπτωση	14
2.2.3. Κυτόχρωμα c και βιοκατάλυση	16
2.2.4. Μηχανισμός κατάλυσης κυτοχρώματος c	17
2.3. Υπεροξειδάσες	19
2.3.1. Υπεροξειδάση χρένου (HRP) (E.C. 1.11.1.7)	20
2.3.1.1. Δομικά χαρακτηριστικά της HRP.	20
2.3.1.2. Η προσθετική ομάδα της αίμης στην HRP	21
2.3.1.3. Τα ιόντα ασβεστίου της HRP	23
2.3.1.4. Καταλυτικός μηχανισμός	23
2.3.1.5. Εφαρμογές υπεροξειδάσης φυτικής προέλευσης	24
2.4. Τυροσινάση (E.C. 1.14.18.1)	25
2.4.1. Δομικά χαρακτηριστικά της τυροσινάσης από <i>Agaricus bisporus</i>	27
2.4.2. Καταλυτικός μηχανισμός	28
2.4.3. Εφαρμογές της τυροσινάσης	30

### Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup> Υδρολυτικά ένζυμα (E.C. 3)

3.1. Εισαγωγή	31
3.1.1. Δομικά χαρακτηριστικά της λιπάσης	32
3.1.2. Καταλυτικός μηχανισμός	34
3.1.3. Εφαρμογές λιπασών	36

### Κεφάλαιο 4<sup>ο</sup> Βιοκατάλυση σε μη συμβατικά μέσα

4.1. Εισαγωγή	37
4.2. Κατηγορίες μη συμβατικών μέσων	39

### Κεφάλαιο 5<sup>ο</sup> Ιοντικά Υγρά

5.1. Εισαγωγή	43
5.2. Ιδιότητες των Ιοντικών υγρών	44
5.3. Ιστορία των Ιοντικών υγρών	46

5.4. Τοξικότητα –Βιοαποικοδομησιμότητα Ιοντικών υγρών	47
5.5. Εφαρμογές Ιοντικών υγρών	49
5.6. Βιοκατάλυση σε ιοντικά υγρά	50
5.6.1. Επίδραση της πολικότητας	51
5.6.2. Επίδραση του ιξώδους	51
5.6.3. Επίδραση της υδροφοβικότητας/υδροφιλικότητας	52
5.6.4. Επίδραση της φύσης των ιόντων	52
5.6.5. Επίδραση των ιοντικών υγρών στα δομικά χαρακτηριστικά ενζύμων	55
5.6.6. Ιοντικά υγρά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή	59
5.7. Βαθείς Ευτηκτικοί Διαλύτες	60
5.7.1. Εφαρμογές Βαθέων Ευτηκτικών Διαλυτών	62
5.7.2. Βαθείς Ευτηκτικοί Διαλύτες στην βιοκατάλυση	63
<b>Κεφάλαιο 6<sup>ο</sup> Ακίνητοποίηση Ενζύμων</b>	
6.1. Εισαγωγή	65
6.1.1. Διαμοριακή σύνδεση (Cross linking)	66
6.1.2. Ακίνητοποίηση ενζύμων σε δομές νανοάνθους (nanoflower)	67
6.1.2.1. Μηχανισμός σύνθεσης nanoflowers	69
6.1.2.2. Δομικά χαρακτηριστικά nanoflowers	70
<b>Κεφάλαιο 7<sup>ο</sup> Μικρο-Βιοαντιδραστήρες</b>	
7.1. Εισαγωγή	73
7.2. Ιοντικά υγρά στην εφαρμογή μικρο-βιοντιδραστήρων	74

---

## ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

<b>Κεφάλαιο 8<sup>ο</sup> Υλικά και Μέθοδοι</b>	
8.1. Υλικά	77
8.1.1. Ένζυμα-Πρωτεΐνες	77
8.1.2. Υποστρώματα	78
8.1.3. Διαλύτες	79
8.1.4. Ιοντικά υγρά και βαθείς ευτηκτικοί διαλύτες	79
8.1.5. Άλλα αντιδραστήρια	79
8.2. Μεθοδολογία	80
8.2.1. Σύνθεση Ιοντικών υγρών	80
8.2.2. Ταυτοποίηση της δομής Ιοντικών υγρών	80
8.2.3. Σύνθεση βαθέων ευτηκτικών διαλυτών	81
8.2.4. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών	84
8.2.5. Ακίνητοποίηση ενζύμων	84
8.2.5.1. Διαμοριακή Σύνδεση τυροσινάσης – Παρασκευή CLEAs	84
8.2.5.2. Ακίνητοποίηση λιπάσης σε δομές nanoflowers	85
8.2.6. Μέθοδοι προσδιορισμού δραστηριότητας οξειδοαναγωγικών ενζύμων	85
8.2.6.1. Μέτρηση δραστηριότητας κυτοχρώματος c	85
8.2.6.2. Μέτρηση δραστηριότητας υπεροξειδάσης HRP	85
8.2.6.3. Μέτρηση δραστηριότητας τυροσινάσης	86
8.2.6.4. Μέτρηση δραστηριότητας λακκάσης	86



8.2.6.5. Μέτρηση δραστηριότητας αλκοολικής αφυδρογονάσης ADH	87
8.2.7. Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων και ενέργειας ενεργοποίησης $E_a$ στο κυτόχρωμα c	87
8.2.8. Μέτρηση δραστηριότητας υδρολυτικών ενζύμων	89
8.2.8.1. Μέτρηση υδρολυτικής δραστηριότητας της ακινητοποιημένης λιπάσης CaLB-nanoflowers	89
8.2.8.2. Μετεστεροποίηση του αιθυλεστέρα του φερουλικού οξέος με 1-οκτανόλη	89
8.2.9. Ενζυμική σύνθεση υδροξυτυροσόλης	90
8.2.9.1. Ποσοτική και ποιοτική ανάλυση της πορείας των αντιδράσεων με υγρή χρωματογραφία	90
8.2.10. Μέθοδοι προσδιορισμού της σταθερότητας των ενζύμων	92
8.2.10.1. Προσδιορισμός σταθερότητας κυτοχρώματος c σε ιοντικά υγρά παρουσία $H_2O_2$	92
8.2.10.2. Προσδιορισμός σταθερότητας κυτοχρώματος c σε DES	92
8.2.10.3. Προσδιορισμός σταθερότητας ακινητοποιημένης λιπάσης CaLB-nanoflowers	93
8.2.10.4. Προσδιορισμός σταθερότητας CLEAs τυροσινάσης	93
8.2.11. Αποχρωματισμός χρωστικών	94
8.2.12. Επαναχρησιμοποίηση ιοντικών και DES	94
8.2.13. Επαναχρησιμοποίηση ακινητοποιημένων ενζύμων	95
8.2.14. Δομική μελέτη των πρωτεϊνών παρουσία ιοντικών και ευτηκτικών υγρών.	95
8.2.14.1. Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-vis)	95
8.2.14.2. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (CD)	95
8.2.14.3. Φασματοσκοπία υπερύθρου υγρών δειγμάτων (FTIR-ATR)	96
8.2.14.4. Φασματοσκοπία φθορισμού.	98
8.2.15. Έλεγχος της βιοαποικοδομησιμότητας των ιοντικών υγρών	98
8.2.16. Λειτουργία μικρο-βιοαντιδραστήρα	99

## ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

<b>Κεφάλαιο 9<sup>ο</sup> Επίδραση υδροξυλαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών 3<sup>ης</sup> γενιάς στην δράση μεταλλοενζύμων</b>	
9.1. Επίδραση υδροξυλαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών στην δραστηριότητα διαφόρων μεταλλοπρωτεϊνών	102
9.2. Επίδραση υδροξυλαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών στην δραστηριότητα του κυτοχρώματος c	103
9.3. Επίδραση των υδροξυλαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών στην σταθερότητα του κυτοχρώματος c	107
9.4. Μελέτη της διαμόρφωσης του κυτοχρώματος c σε υδατικά διαλύματα υδροξυλαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών	109
9.4.1. Φασματοσκοπία υπερύθρου (FTIR-ATR)	110
9.4.2. Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)	111
9.4.3. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (CD)	113
9.5. Εφαρμογή υδατικών διαλυμάτων υδροξυλαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών για τον αποχρωματισμό χρωστικών από το κυτόχρωμα c	114

9.6. Επαναχρησιμοποίηση των υδροξυαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών	116
9.7. Μελέτη της βιοαποικοδομησιμότητας των ιοντικών υγρών	117
<b>Κεφάλαιο 10° Επίδραση βαθέων ευτηκτικών διαλυτών σε αντιδράσεις οξείδωσης</b>	
10.1. Επίδραση των DES στην δραστικότητα οξειδωτικών ενζύμων	120
10.2. Επίδραση των συστατικών των DES στην δραστικότητα του κυτοχρώματος c	122
10.3. Επίδραση των DES στην σταθερότητα του κυτοχρώματος c	123
10.4. Δομικές μεταβολές του κυτοχρώματος c σε DES	124
10.5. Βιοκαταλυτικός αποχρωματισμός χρωστικών παρουσία DES	126
<b>Κεφάλαιο 11° Επίδραση ιοντικών υγρών 3ης γενιάς και DES σε δομές nanoflowers υδρολυτικών ενζύμων</b>	
11.1. Παρασκευή και χαρακτηρισμός των CalB-nanoflowers	130
11.2. Δραστικότητα των CalB-nanoflowers σε ιοντικούς διαλύτες	131
11.3. Μελέτη της σταθερότητας των CalB-nanoflowers σε DES	134
11.4. Επαναχρησιμοποίηση των CalB-nanoflowers σε DES	135
<b>Κεφάλαιο 12° Επίδραση ιοντικών υγρών 3ης γενιάς και DES στα καταλυτικά χαρακτηριστικά της τυροσινάσης</b>	
12.1. Επίδραση ιοντικών υγρών στην δραστικότητα της τυροσινάσης	138
12.2. Επίδραση των DES στην δραστικότητα της τυροσινάσης	139
12.3. Επίδραση της συγκέντρωσης ιοντικών υγρών και DES στην δραστικότητα της τυροσινάσης	141
12.4. Επίδραση των ιοντικών υγρών και DES στην σταθερότητα της τυροσινάσης	142
12.5. Μελέτη της επίδρασης των ιοντικών διαλυτών στην δομή της τυροσινάσης με φασματοσκοπία φθορισμού	144
12.6. Εφαρμογές ιοντικών υγρών και DES σε αντιδράσεις με CLEAs τυροσινάσης	147
12.6.1. Επίδραση ιοντικών υγρών και DES στην επαναχρησιμοποίηση των CLEAs τυροσινάσης	147
12.6.2. Αντιδράσεις σύνθεσης της υδροξυτυροσόλης	148
12.6.3. Αποικοδόμηση φαινολών σε λειτουργία μικρο-βιοαντιδραστήρα	150
<b>Συμπεράσματα</b>	153
<b>Βιβλιογραφία</b>	161
<b>ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ (I-V)</b>	181

# Εισαγωγή

---

Το αυξημένο ενδιαφέρον κατά την διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών για «πράσινες» τεχνολογίες σε βιομηχανικές διεργασίες, έχει δώσει ώθηση στην ανάπτυξη νέων περιβαλλοντικά φιλικών διαλυτών. Πρόσφατα, δύο νέες κατηγορίες διαλυτών, τα ιοντικά υγρά  $3^{ns}$  γενιάς και οι βαθείς ευτηκτικοί διαλύτες (DES) αναπτύχθηκαν και χαρακτηρίστηκαν ως «πράσινοι διαλύτες» εξ' αιτίας της αμελητέας τάσης ατμών, της χαμηλής τοξικότητας και της υψηλής βιοαποικοδομησιμότητας που εμφανίζουν. Η χρήση αυτών των μέσων συνοδεύεται από πλήθος πλεονεκτημάτων όπως αυξημένη διαλυτότητα υδρόφιλων/υδρόφοβων ενώσεων, δυνατότητα τροποποίησης των ιδιοτήτων τους ανάλογα με τις απαιτήσεις της εκάστοτε διεργασίας επιλέγοντας απλά τους κατάλληλους συνδυασμούς των συστατικών τους. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενζύμων και των ιοντικών υγρών ή των βαθέων ευτηκτικών διαλυτών συνιστούν ένα σύνθετο φαινόμενο, ενώ παράλληλα η μελέτη τους μπορεί να συμβάλει στην βαθύτερη κατανόηση των ιδιοτήτων των ενζύμων σε αυτά τα μέσα καθώς επίσης και στην ανάπτυξη μίας αποτελεσματικής βιοκαταλυτικής διεργασίας με βιομηχανική εφαρμογή.

Στόχος της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη και η κατανόηση της καταλυτικής συμπεριφοράς διαφόρων οξειδοαναγωγικών και υδρολυτικών ενζύμων παρουσία διαφόρων ιοντικών υγρών  $3^{ns}$  γενιάς και βαθέων ευτηκτικών διαλυτών. Τα ιοντικά υγρά τα οποία μελετήθηκαν ανήκουν στην κατηγορία των υδροξυαιθυλαμμωνικών ιοντικών υγρών, ενώ τα DES που χρησιμοποιήθηκαν έχουν σαν βάση το χλωρίδιο της χολίνης και το χλωρίδιο του αιθυλαμμωνίου. Τα μέσα αυτά έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον λόγω της ευκολίας στην παρασκευή τους, του χαμηλού τους κόστους, της χαμηλής τοξικότητας και της υψηλής βιοαποικοδομησιμότητας που εμφανίζουν. Απώτερος σκοπός της παρούσας διατριβής είναι, μέσω μελέτης των σχέσεων δομής και λειτουργίας των υπό μελέτη ενζύμων σε αυτά τα μέσα, η ανάπτυξη περιβαλλοντικά φιλικών βιοκαταλυτικών συστημάτων.

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

Στα Κεφάλαια 1 έως 7 (θεωρητικό μέρος) επιχειρείται η θεωρητική και η βιβλιογραφική προσέγγιση του θέματος παραθέτοντας τις απαραίτητες πληροφορίες για την κατανόηση των εννοιών και των φαινομένων που παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή.

Πιο αναλυτικά, στο κεφάλαιο 1 γίνεται αναφορά στην Βιοτεχνολογία με έμφαση στα πλεονεκτήματα χρήσης των ενζύμων. Στο κεφάλαιο 2 γίνεται μία εκτενής αναφορά σε οξειδοαναγωγικά ένζυμα, ενώ στο κεφάλαιο 3 αναλύονται τα υδρολυτικά ένζυμα με έμφαση στις λιπάσες. Στο κεφάλαιο 4 επιχειρείται μία θεωρητική εισαγωγή στην εφαρμογή των ενζύμων σε μη συμβατικά μέσα. Στο κεφάλαιο 5 γίνεται μία εκτενής αναφορά των ιδιοτήτων των ιοντικών υγρών και των βαθέων ευτηκτικών διαλυτών, καθώς επίσης και των αρχών που διέπουν την εφαρμογή των ενζύμων σε αυτά τα μέσα. Στο κεφάλαιο 6 παρουσιάζονται τα πλεονεκτήματα και οι μέθοδοι ακινητοποίησης των ενζύμων με έμφαση στην διαμοριακή σύνδεση (CLEAs) και την ακινητοποίηση ενζύμων σε δομές νανοάνθους (nanoflower). Στο 7<sup>ο</sup> και τελευταίο κεφάλαιο του θεωρητικού μέρους, γίνεται αναφορά στην τεχνολογία των μικρο-βιοαντιδραστήρων με έμφαση στην εφαρμογή τους με ιοντικά υγρά.

Στην δεύτερη ενότητα (κεφάλαιο 8) αναφέρονται τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, ενώ στην τρίτη ενότητα (κεφάλαια 9 έως 12), παρατίθενται τα αποτελέσματα, τα οποία σχολιάζονται και συσχετίζονται με τα μέχρι σήμερα βιβλιογραφικά δεδομένα.

Πιο αναλυτικά, στο κεφάλαιο 9 παρατίθενται τα αποτελέσματα μελέτης της επίδρασης τεσσάρων υδροξυαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών 3<sup>ης</sup> γενιάς στην δράση μεταλλοενζύμων. Η λεπτομερής διερεύνηση της επίδρασης αυτών των μέσων στην καταλυτική και δομική συμπεριφορά βιοκαταλυτών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το κυτόχρωμα c ως πρωτεΐνη-μοντέλο. Μέσω μελετών κινητικής και σταθερότητας καθώς επίσης και εφαρμογών φασματοσκοπικών τεχνικών όπως UV-Vis, ATR-FTIR και CD διερευνάται η επίδραση αυτών των μέσων στην καταλυτική συμπεριφορά και δομή του κυτοχρώματος c.

Στο κεφάλαιο 10, μελετήθηκε η επίδραση βαθέων ευτηκτικών υγρών (DES) με οργανικό άλας το  $\text{ChCl}$  και το EAC και δότες δεσμών υδρογόνου την ουρία (U), την γλυκερόλη (Gly) και την αιθυλενική γλυκόλη (EG) στην δραστηριότητα και σταθερότητα οξειδώσιμων ενζύμων όπως το κυτόχρωμα c και η υπεροξειδάση χρένου (HRP). Επιπλέον, μέσω φασματοσκοπικών τεχνικών όπως ο κυκλικός διχρωσμός και η φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους UV-Vis, μελετήθηκε η επίδραση των DES στα δομικά χαρακτηριστικά του κυτοχρώματος c.

Στο κεφάλαιο 11, μελετήθηκε η ανάπτυξη υβριδικών nanoflowers χρησιμοποιώντας για την ακινητοποίηση ιόντα χαλκού ως το ανόργανο συστατικό και λιπάση B από *Candida antarctica* ως το οργανικό συστατικό (CalB-nanoflowers). Η βιοκαταλυτική δραστηριότητα

των συντιθέμενων υβριδικών nanoflowers μελετήθηκε σε διάφορα υδροξυαιθυλαμμωνιακά ιοντικά υγρά 3<sup>ης</sup> γενιάς καθώς επίσης και σε διάφορα ChCl και EAC DES.

Στο 12<sup>ο</sup> και τελευταίο κεφάλαιο της ενότητας των αποτελεσμάτων, μελετήθηκε η επίδραση τόσο των υδροξυαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών 3<sup>ης</sup> γενιάς όσο και των DES, στα καταλυτικά χαρακτηριστικά της ακινητοποιημένης τυροσινάσης από μανιτάρια *Agaricus bisporus*. Η ακινητοποίηση του ενζύμου πραγματοποιήθηκε μέσω της μεθόδου της διαμοριακής σύνδεσης (CLEAs, Cross Linked Enzyme Aggregates). Αξιοποιώντας την φασματοσκοπία φθορισμού, μελετήθηκαν διάφορες διαμορφωτικές αλλαγές της πρωτεΐνης παρουσία των συγκεκριμένων διαλυτών. Τα συντιθέμενα CLEAs τυροσινάσης χρησιμοποιήθηκαν για την επιτυχή σύνθεση της υδροξυτυροσόλης καθώς επίσης και την ανάπτυξη μικρο-βιοαντιδραστήρων σε αντιδράσεις αποδόμησης φαινολών χρησιμοποιώντας ως μέσα ιοντικά υγρά και DES.

Τέλος, στην τέταρτη ενότητα αναπτύσσονται τα συμπεράσματα των πειραμάτων της παρούσας μελέτης.



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

## Βιοτεχνολογία και Εφαρμογές

---



### 1.1. Εισαγωγή

Η χρήση βιοτεχνολογικών διαδικασιών έχει μια μακροχρόνια παράδοση, η οποία ξεκινάει από αρχαιοτάτων χρόνων με την διαδικασία της ζύμωσης για την παραγωγή τυριού, μπίρας, κρασιού και ψωμιού. Ο όρος ‘βιοτεχνολογία’ καθιερώθηκε το 1919 από τον Ούγγρο μηχανικό Kark Ereky για την αναφορά σε, ευρείας κλίμακας, παραγωγή προϊόντων από μικροβιακές καλλιέργειες που αναπτύσσονταν σε μεγάλες ειδικές δεξαμενές. Σήμερα, με τον όρο βιοτεχνολογία, αναφερόμαστε στην χρήση βιολογικών συστημάτων ή συστατικών τους για την παραγωγή χρήσιμων ή εμπορικά αξιοποιήσιμων προϊόντων καθώς και για την παροχή υπηρεσιών. Πλέον, η βιοτεχνολογία, αποτελεί μία από τις τεχνολογίες αιχμής με πλήθος εφαρμογών σε τομείς όπως η φαρμακευτική, η ιατρική, η προστασία του περιβάλλοντος και η βιοαποκατάσταση.

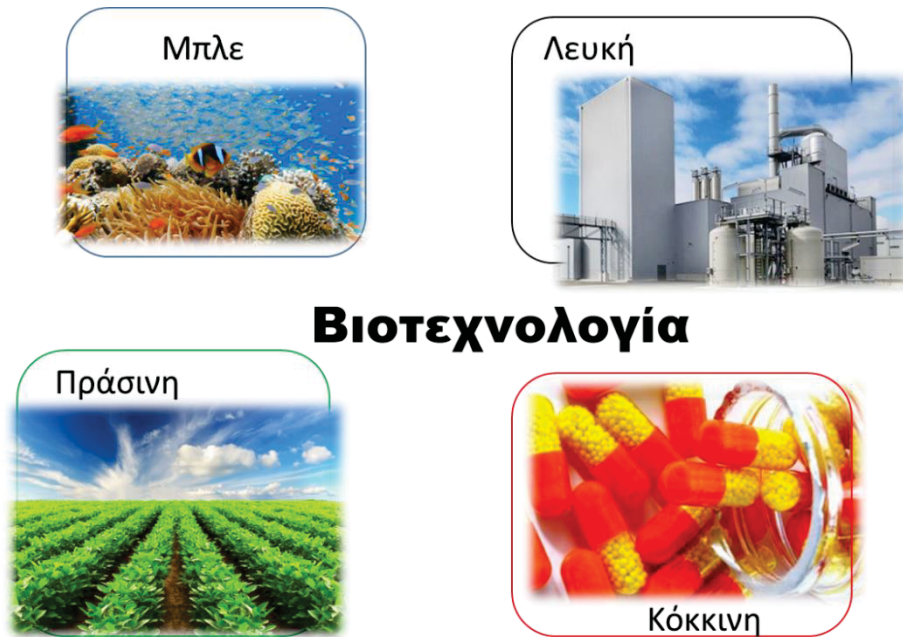
Η βιοτεχνολογία διακρίνεται σε τέσσερις βασικούς άξονες που χαρακτηρίζονται για λόγους συμβολικούς με ένα διαφορετικό χρώμα<sup>1</sup>: σε

- ✚ **Μπλε Βιοτεχνολογία:** αφορά στην εκμετάλλευση των υδάτινων οικοσυστημάτων για την παραγωγή προϊόντων και την ανάπτυξη εφαρμογών βιομηχανικού ενδιαφέροντος.

- ✚ **Πράσινη Βιοτεχνολογία:** αφορά στην εφαρμογή τεχνολογιών που επιτρέπουν την παραγωγή γονιμότερων και ανθεκτικότερων φυτών (σε σχέση με τους βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες) και διασφαλίζει την εφαρμογή περιβαλλοντικά φιλικών λιπασμάτων και βιολογικών παρασιτοκτόνων.
- ✚ **Κόκκινη Βιοτεχνολογία:** ή αλλιώς ιατρική ή φαρμακευτική βιοτεχνολογία, αφορά στην παραγωγή εμβολίων και αντιβιοτικών, στην ανακάλυψη νέων φαρμάκων και θεραπειών, στην κατασκευή τεχνητών οργάνων και νέων διαγνωστικών μεθόδων.
- ✚ **Λευκή Βιοτεχνολογία:** ή αλλιώς βιομηχανική βιοτεχνολογία αφορά κυρίως στην εφαρμογή της βιοκατάλυσης σε βιομηχανικές διεργασίες. Η Λευκή βιοτεχνολογία θεωρείται ο μεγαλύτερος κλάδος της βιοτεχνολογίας ο οποίος σχετίζεται με:
  - την αντικατάσταση των παραδοσιακών βιομηχανικών διεργασιών από βιοκαταλυτικές διεργασίες με σκοπό την παραγωγή φαρμακευτικών προϊόντων, καλλυντικών, χημικών προϊόντων και πρόσθετων τροφίμων.
  - την παραγωγή βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών
  - την παραγωγή καυσίμων και ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές ή μέσω φωτοσυνθετικών μικροοργανισμών

Η παγκόσμια αγορά της βιομηχανικής βιοτεχνολογίας άγγιξε τα 228 δις ευρώ το 2015 ενώ, το 2020, αναμένεται να φτάσει τα 515 δις ευρώ<sup>2,3</sup> αναδεικνύοντας την αναγκαιότητα στη σύγχρονη εποχή για ανάπτυξη περιβαλλοντικά φιλικότερων βιομηχανικών διεργασιών με παράλληλα κοινωνικά και οικονομικά οφέλη<sup>4</sup>.





**Εικόνα 1.1.** Τομείς της βιοτεχνολογίας

## 1.2. Ένζυμα στην Βιοτεχνολογία

Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες, οι οποίες παράγονται απ' τους οργανισμούς με σκοπό την κατάλυση βιοχημικών αντιδράσεων σε μεταβολικά μονοπάτια απαραίτητα, για την διατήρηση της λειτουργίας τους.<sup>5</sup> Χαρακτηριστικά των ενζύμων, όπως η τόπο-χημειο-διστερεο- και εναντιο-εκλεκτικότητα που εμφανίζουν καθώς επίσης και οι ήπιες συνθήκες κάτω από τις οποίες μπορεί να πραγματοποιηθούν οι βιοκαταλυτικές αντιδράσεις, αποτελούν σημαντικά πλεονεκτήματα συγκριτικά με την χρήση των χημικών καταλυτών.<sup>6</sup> Επιπλέον, σε ορισμένες περιπτώσεις, οι βιομετατροπές και η χρήση ενζύμων αποτελούν μονόδρομο για την πραγματοποίηση πολύπλοκων χημικών αντιδράσεων. Τα πλεονεκτήματα χρήσης των ενζύμων έναντι των χημικών καταλυτών συνοψίζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

**Πίνακας 1.1.** Πλεονεκτήματα χρήσης των ενζύμων

<b>Πλεονεκτήματα χρήσης των ενζύμων</b>
Αποτελεσματική κατάλυση των περισσότερων γνωστών χημικών αντιδράσεων
Υψηλή εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα, τόπο- και στέreo-εκλεκτικότητα
Χαμηλή κατανάλωση ενέργειας λόγω ήπιων συνθηκών αντίδρασης
Χαμηλή παραγωγή παραπροϊόντων
Φίλικοι προς το περιβάλλον, βιοαποικοδομήσιμοι καταλύτες
Δυνατότητα μετατροπής πολύπλοκων υποστρωμάτων

Τα πλεονεκτήματα αυτά αποτέλεσαν κίνητρο τα τελευταία χρόνια για την εφαρμογή της βιοκατάλυσης σε διάφορους τομείς για την σύνθεση χημικών ενώσεων, φαρμακευτικών προϊόντων, τροφίμων, καλλυντικών, βιοκαυσίμων, διαγνωστικών προϊόντων κ.α.<sup>7</sup>

Σημαντικά παραδείγματα εφαρμογής ενζύμων σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας φαίνονται στον Πίνακα 1.2.<sup>8</sup>

**Πίνακας 1.2.** Εφαρμογές ενζύμων στην Βιομηχανία

<b>Ένζυμο</b>	<b>Πηγή</b>	<b>Εφαρμογή</b>
α-Αμυλάση	Κριθάρι, <i>Bacillus</i> , <i>Aspergillus</i>	Ζυθοποιία
Κατάλαση	Συκώτι, <i>Aspergillus</i>	Τρόφιμα
Αμιδάση της Πενικιλίνης	<i>Bacillus</i>	Φαρμακευτική
Πηκτινάση	<i>Aspergillus</i>	Οινοποιία, Χυμοί φρούτων
Ιμβερτάση	<i>Saccharomyces</i>	Ζαχαροπλαστική
Κυτταρινάση	<i>Trichoderma</i>	Απόβλητα
Χυμοθριψίνη	Πάγκρεας	Βυρσοδεψία
Λιπάση	Πάγκρεας, <i>Rhizopus</i> , <i>Candida</i>	Τρόφιμα
Ασπαραγινάση	<i>Erwinia</i> , <i>Escherichia</i>	Υγεία
Πρωτεάση	<i>Bacillus</i>	Απορρυπαντικά
Αμινοακυλάση	<i>Aspergillus</i>	Φαρμακευτική
Λακτάση	<i>Aspergillus</i>	Γαλακτοβιομηχανία

Παρ' όλα τα σημαντικά πλεονεκτήματα των ενζύμων, η ευρεία εφαρμογή τους περιορίζεται λόγω ορισμένων μειονεκτημάτων που εμφανίζουν όπως:

- ❖ η απομόνωση και ο καθαρισμός τους μπορεί να είναι μία χρονοβόρα και υψηλού κόστους διαδικασία
- ❖ εμφανίζουν χαμηλή σταθερότητα σε ακραίες τιμές θερμοκρασίας και pH

- ❖ εμφανίζουν αναστολή από το ίδιο το υπόστρωμα ή το προϊόν
- ❖ η διαθεσιμότητά τους είναι περιορισμένη
- ❖ ορισμένα ένζυμα προϋποθέτουν την παρουσία συμπαράγοντα για να δράσουν

Οι παραπάνω περιορισμοί των ενζύμων οδήγησαν στην έρευνα και την ανάπτυξη νέων τεχνολογιών στον τομέα της ενζυμικής βιοτεχνολογίας. Σύγχρονα εργαλεία της μοριακής βιολογίας και της πρωτεϊνικής μηχανικής, όπως η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA και η τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγέννεση κατέστησαν δυνατή την βελτιστοποίηση των βιοκαταλυτικών ιδιοτήτων όσον αφορά στη δραστηριότητα, στην εκλεκτικότητα και στη σταθερότητα των ενζύμων.<sup>9,10</sup>

### 1.3. Κατηγορίες Ενζύμων

Τα ένζυμα ταξινομούνται ανάλογα με την φύση της αντίδρασης που καταλύουν (π.χ οξείδωση/αναγωγή, υδρόλυση, σύνθεση κλπ) και υπό-ταξινομούνται σύμφωνα με την ακριβή κατηγορία των υποστρωμάτων και των προϊόντων. Σύμφωνα με την “Enzyme Commission” (επιτροπή της Διεθνούς Ένωσης Βιοχημείας), όλα τα ένζυμα κατατάσσονται σε έξι μεγάλες κατηγορίες σύμφωνα με την αντίδραση την οποία καταλύουν:

Οξειδοαναγωγάσες E.C.1: καταλύουν αντιδράσεις οξείδωσης-αναγωγής δηλαδή την μεταφορά υδρογόνου, οξυγόνου ή ηλεκτρονίων από ένα υπόστρωμα δότη ηλεκτρονίων σε ένα άλλο υπόστρωμα που είναι ο δέκτης.

Τρανσφεράσες E.C.2: καταλύουν την μεταφορά μιας χημικής ομάδας (π.χ. ακετυλο-, αμινο- και φωσφόρο-) από ένα μόριο σε ένα άλλο με απαραίτητη τη συμμετοχή ενός συμπαράγοντα μεταφοράς.

Υδρολάσες E.C.3: καταλύουν αντιδράσεις υδρολυτικής διάσπασης δεσμών όπως: C-C, C-N, C-O, C-S ή O-P. Πρόκειται για αντιδράσεις μεταφοράς ομάδας με αποδέκτη πάντα το νερό.

Λυάσες E.C.4: καταλύουν τη μη υδρολυτική αφαίρεση ομάδων με δημιουργία διπλού δεσμού, ή την προσθήκη ομάδων σε διπλό δεσμό.

Ισομεράσες E.C.5: καταλύουν αντιδράσεις ενδομοριακών μεταθέσεων των υποστρωμάτων τους.

Λιγάσες ή Συνθετάσες E.C.6: καταλύουν αντιδράσεις δημιουργίας δεσμών μεταξύ ατόμων C, C και O, C και N με ταυτόχρονη διάσπαση πυροφωσφορικού δεσμού του ATP ή άλλου τριφωσφορικού νουκλεοζίτη.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν ένζυμα που ανήκουν στην κατηγορία των οξειδοαναγωγασών και υδρολασών, και θα αναλυθούν στην επόμενη παράγραφο.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>

## Οξειδοαναγωγικά ένζυμα (E.C. 1)

---



### 2.1. Εισαγωγή

Τα οξειδοαναγωγικά ένζυμα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο τόσο στον αερόβιο όσο και στον αναερόβιο μεταβολισμό. Συναντώνται στις αντιδράσεις γλυκόλυσης, στον κύκλο του κιτρικού οξέος, στην οξειδωτική φωσφορυλίωση και στον μεταβολισμό των αμινοξέων. Τα οξειδοαναγωγικά ένζυμα συνιστούν μία κατηγορία ενζύμων που καταλύουν αντιδράσεις οξειδοαναγωγής, δηλαδή την μεταφορά ηλεκτρονίων από ένα δότη (αναγωγικό μόριο) σε έναν αποδέκτη (οξειδωτικό μόριο) όπως φαίνεται στην ακόλουθη Αντίδραση 2.1. όπου A είναι το οξειδωτικό και B το αναγωγικό μόριο.



#### Αντίδραση 2.1.

Σημαντικές κατηγορίες οξειδοαναγωγασών είναι οι *οξειδάσες*, οι *αφυδρογονάσες*, οι *υπεροξειδάσες*, και *οξυγονάσες*. Οι *οξειδάσες* καταλύουν την οξείδωση υποστρωμάτων με αποδέκτη ηλεκτρονίων ή υδρογόνου το μοριακό οξυγόνο. Οι *αφυδρογονάσες* χρησιμοποιούν ως αποδέκτη κάποιο συνένζυμο, όπως το νικοτιναμίδιο (NAD<sup>+</sup>) ή το φωσφορικό παράγωγο του (NADP<sup>+</sup>), καθώς επίσης και φλαβινοσυνένζυμο όπως το φλαβινομονο-νουκλεοτιδίο (FMN) και το φλαβινοαδενινο-δινουκλεοτιδίο (FAD). Οι *υπεροξειδάσες* είναι αιμοπρωτεΐνες που χρησιμοποιούν το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) ως αποδέκτη

ηλεκτρονίων για την οξειδωση υποστρωμάτων. Οι οξυγονάσες καταλύουν την ενσωμάτωση ενός έως δύο ατόμων του μοριακού οξυγόνου στο υπόστρωμα.<sup>11</sup>

Οι βιομηχανικές εφαρμογές των οξειδοαναγωγικών ενζύμων περιλαμβάνουν τον μετασχηματισμό λιγνοκυτταρινούχων παραγώγων,<sup>12</sup> την τροποποίηση υδατανθράκων,<sup>11</sup> την λεύκανση φυσικών ινών όπως είναι το βαμβάκι,<sup>13</sup> χρησιμοποιούνται ως συστατικά απορρυπαντικών,<sup>14</sup> στον τομέα των τροφίμων,<sup>15</sup> στην βιοαποικοδόμηση ρύπων<sup>16,17</sup> καθώς επίσης και στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων.<sup>18</sup>

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν διάφορα οξειδοαναγωγικά ένζυμα όπως, το κυτόχρωμα c από καρδιά αλόγου, η υπεροξειδάση χρένου καθώς επίσης και η τυροσινάση από μανιτάρια, η δομή και ο μηχανισμός δράσης των οποίων αναλύεται στις παραγράφους που ακολουθούν.

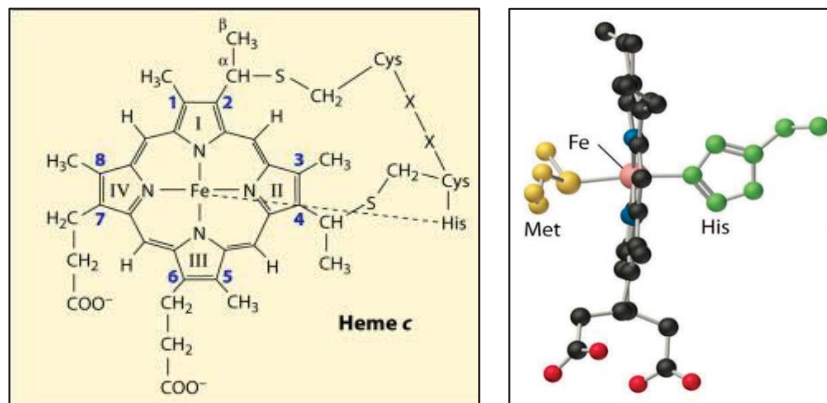
## **2.2. Κυτόχρωμα c**

Το κυτόχρωμα c είναι μια εκτενώς μελετημένη αιμοπρωτεΐνη, μοριακού βάρους ~12 kDa, που συναντάται στη μεμβράνη των μιτοχονδρίων των ευκαρυωτικών κυττάρων, ο βιολογικός ρόλος της οποίας σχετίζεται με την μεταφορά ηλεκτρονίων στην αναπνευστική αλυσίδα.<sup>19</sup> Αποτελεί αντικείμενο δομικών, φασματοσκοπικών και θερμοδυναμικών μελετών καθώς επίσης κινητικών μεταφοράς ηλεκτρονίων και μεταλλάξεων για πολλές δεκαετίες.<sup>20</sup> Το 1962 δημοσιεύτηκε η πρώτη κρυσταλλογραφική μελέτη της δομής του κυτοχρώματος c από καρδιά αλόγου.

### **2.2.1. Διαμόρφωση του κυτοχρώματος c.**

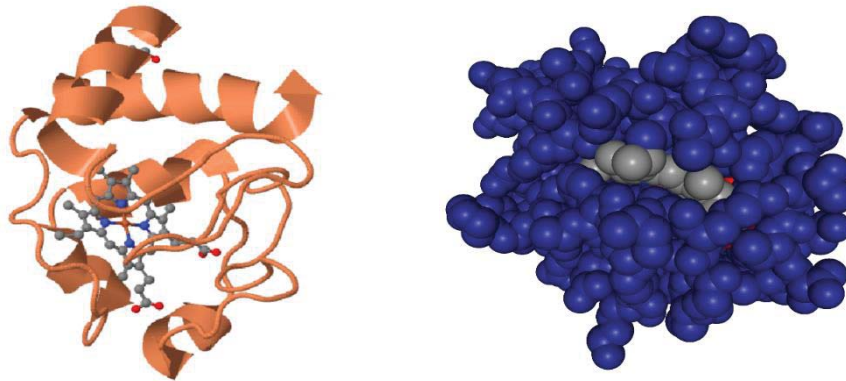
Τα κυτοχρώματα μπορούν να διακριθούν σε τέσσερις κατηγορίες a, b, c, και d ανάλογα με τον τύπο της ομάδας αίμης που διαθέτουν.<sup>21</sup> Το κυτόχρωμα c διαθέτει μια ομάδα αίμης τύπου c και διακρίνεται από τα υπόλοιπα λόγω του ομοιοπολικού δεσμού πρόσδεσης της αίμης στο πρωτεϊνικό μόριο το οποίο ακολουθεί το μοτίβο αμινοξικής αλληλουχίας CXXCH (κυστεΐνη-αμινοξύ-αμινοξύ-κυστεΐνη-ιστιδίνη).<sup>22</sup> Το κυτόχρωμα c από καρδιά αλόγου αποτελείται από μία πολυπεπτιδική αλυσίδα 104 αμινοξέων, στην οποία είναι ομοιοπολικά προσδεμένη μέσω θειοαιθερικών δεσμών στην κυστεΐνη 14 (Cys14) και 17 (Cys17) μία ομάδα αίμης. Στην αίμη εντοπίζεται ένα άτομο σιδήρου (Fe), το οποίο συνδέεται με 4 άτομα αζώτου στον πορφυρινικό δακτύλιο, ενώ παράλληλα συντονίζεται αξονικά με ένα άτομο θείου της Ιστιδίνης 18 (His18) και ένα άτομο αζώτου της Μεθειονίνης

80 (Met80) του πρωτεϊνικού μορίου (Εικόνα 2.1).<sup>23,24</sup> Το άτομο σιδήρου συναντάται τόσο στην οξειδωμένη κατάσταση [Fe(III)], όπου ο σίδηρος έχει ένα ασύζευκτο ηλεκτρόνιο, όσο και στη ανηγμένη [Fe(II)] κατάσταση, όπου δεν υπάρχουν ασύζευκτα ηλεκτρόνια. Ο συντονισμός του σιδήρου στους αζονικούς προσδέτες (His18 και Met80) διατηρεί την αίμη σε κατάσταση χαμηλού σπιν και στις δύο οξειδωτικές μορφές της (FeII, FeIII). Ωστόσο, ο σουλφονικός δεσμός του σιδήρου με το θείο της Met80 μπορεί εύκολα να διασπαστεί είτε αυξάνοντας την θερμοκρασία ή το pH είτε να αντικατασταθεί από άλλους προσδέτες όπως CN<sup>-</sup>, N<sub>3</sub><sup>-</sup>, προκαλώντας την εναλλαγή από χαμηλού σε υψηλού σπιν κατάσταση του σιδήρου της αίμης. Ως αποτέλεσμα της διαταραχής του δεσμού Fe-Met80, μία μικρή περιοχή του πρωτεϊνικού μορίου (κατάλοιπα 78-90) απομακρύνεται από την αίμη εκθέτοντας έτσι τον πορφυρινικό δακτύλιο και διευκολύνοντας την μεταφορά ηλεκτρονίων.<sup>25</sup>



**Εικόνα 2.1.** Δομή της αίμης.

Η δευτεροταγής δομή του μορίου αποτελείται κυρίως από α έλικες σε ποσοστό περίπου 40 %, ενώ η υπόλοιπη διαμόρφωση αποτελείται από στροφές και τυχαίο σπείραμα. Η αναδίπλωση του πρωτεϊνικού μορίου πραγματοποιείται με τέτοιον τρόπο ώστε ο δακτύλιος της αίμης να εντοπίζεται σε έναν εσωτερικό υδρόφοβο θύλακα (Εικόνα 2.2).<sup>26</sup> Εξ' αιτίας του υψηλού ποσοστού λυσινών στην πρωτεϊνική ακολουθία, το κυτόχρωμα c θεωρείται μία αλκαλική πρωτεΐνη με ισοηλεκτρικό σημείο pI 10.<sup>27</sup>



**Εικόνα 2.2.** Απεικόνιση του κυτοχρώματος c. Αριστερά: Αναδίπλωση της πρωτεϊνικής δομής γύρω από το μόριο της αίμης. Δεξιά: Απεικόνιση σε γκρι των εκτεθειμένων ατόμων της αίμης του πρωτεϊνικού μορίου (Protein Data Bank : 1HRC).

Το κυτόχρωμα c διακρίνεται σε τέσσερις κατηγορίες:<sup>21</sup>

**Class I:** περιλαμβάνει τα διαλυτά, χαμηλού σπιν κυτοχρώματα c, στα οποία ένα μόριο αίμης εντοπίζεται προσδεμένο κοντά στο N-τελικό άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας και ένα κατάλοιπο μεθειονίνης αποτελεί την έκτη θέση συντονισμού του σιδήρου της αίμης.

**Class II:** περιλαμβάνει υψηλού σπιν κυτοχρώματα c όπως το κυτόχρωμα c' στα οποία το μόριο της αίμης εντοπίζεται στο C-τελικό άκρο της αμινοξικής αλληλουχίας του μορίου.

**Class III:** περιλαμβάνει κυτοχρώματα c με πολλαπλές ομάδες αίμης. Η συγκεκριμένη κατηγορία εμφανίζει χαμηλότερη οξειδοαναγωγική ικανότητα σε σύγκριση με τις άλλες.

**Class IV:** αποτελείται από σύνθετα πρωτεϊνικά μόρια με υψηλότερα μοριακά βάρη, τα οποία εκτός από αίμη c διαθέτουν και άλλες προσθετικές ομάδες.

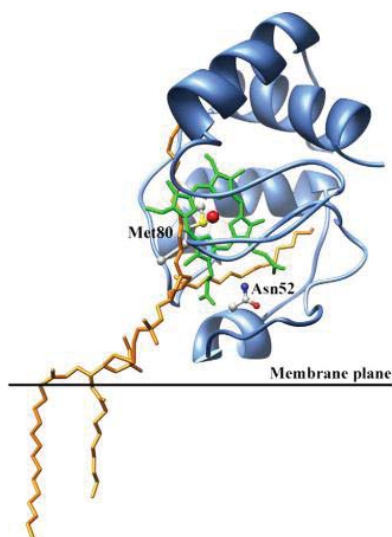
### 2.2.2. Ο ρόλος του κυτοχρώματος c στην απόπτωση.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί το κυτόχρωμα c είναι μία πρωτεΐνη-φορέας γνωστή για την συμμετοχή της στην αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια των ευκαρυωτικών κυττάρων.<sup>28</sup> Μελέτες των τελευταίων δεκαετιών εμπλέκουν την συγκεκριμένη πρωτεΐνη και σε μία άλλη βιολογική λειτουργία, την απόπτωση.<sup>29</sup> Η απόπτωση ή αλλιώς ο προγραμματισμένος κυτταρικός θάνατος, είναι μία κρίσιμη βιολογική λειτουργία των κυττάρων απαραίτητη για την εμβρυική ανάπτυξη, την ομοιοστάση και την ανοσολογική άμυνα του οργανισμού.<sup>30</sup> Στα αρχικά στάδια της απόπτωσης το κυτόχρωμα c αλληλεπιδρά με ένα μιτοχονδριακό φωσφολιπίδιο, την καρδιολιπίνη (CL) πριν την απελευθέρωσή του στο κυτταρόπλασμα. Η αλληλεπίδραση αυτή είναι καθοριστική για την εναλλαγή της λειτουργίας του από την μιτοχονδριακή αναπνοή στην απόπτωση.<sup>31</sup>



Πιο συγκεκριμένα, η δέσμευση της καρδιολιπίνης στο κυτόχρωμα c συνοδεύεται από:

i) αλλαγές στην διαμόρφωση του πρωτεϊνικού μορίου διαταράσσοντας τον δεσμό μεταξύ του σιδήρου της αίμης και της Met80 και σε ορισμένες περιπτώσεις μεταβάλλοντας και την κατάσταση σπιν του σιδήρου,<sup>32</sup> ii) μείωση του μέσου δυναμικού που απαιτείται για την συμμετοχή του στην αναπνευστική αλυσίδα,<sup>33</sup> iii) δέσμευση CO και NO με υψηλή συγγένεια<sup>34</sup> και iv) εμφάνιση δράσης υπεροξειδάσης.<sup>35</sup> Εξ' αιτίας της τελευταίας αλλαγής το κυτόχρωμα μέσω δράσης υπεροξειδάσης έχει την ικανότητα να οξειδώσει την καρδιολιπίνη. Τα προϊόντα αυτής της οξείδωσης είναι υπεύθυνα για την διαπερατότητα της μιτοχondριακής μεμβράνης και την απελευθέρωση του κυτοχρώματος στο κυτταρόπλασμα.<sup>36</sup> Η ικανότητα αυτή του κυτοχρώματος έχει συνδεθεί τα τελευταία χρόνια με την *in vitro* δράση του ως υπεροξειδάση (βλ. Κεφάλαιο 2.1.3).<sup>28</sup>

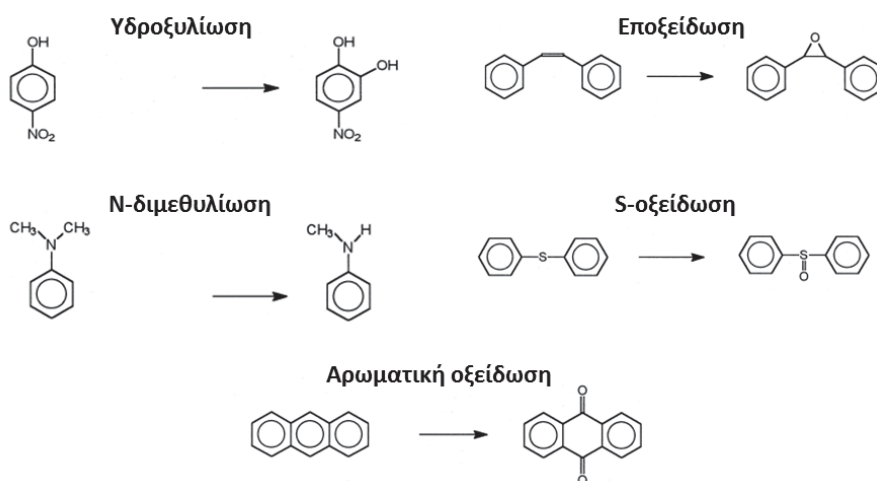


**Εικόνα 2.3.** Απεικόνιση του συμπλέγματος καρδιολιπίνης-κυτοχρώματος c. Η πρόσδεση των δύο εκ των τεσσάρων άκυλο αλυσίδων του μορίου της καρδιολιπίνης στο μόριο της πρωτεΐνης γίνεται στην περιοχή των καταλοίπων Asp52 και Met80. (Πηγή Ascenzi et al., 2010)<sup>37</sup>

Μόλις το κυτόχρωμα απελευθερωθεί στο κυτταρόπλασμα δεσμεύεται στην πρωτεΐνη Araf-1 ενεργοποιώντας την κασπάση 9, η οποία σηματοδοτεί την ενεργοποίηση ενός καταρράκτη κασπασών, που οδηγεί τελικά στον κυτταρικό θάνατο.<sup>38</sup>

### 2.2.3. Κυτόχρωμα c και βιοκατάλυση

Παρ' όλο που το κυτόχρωμα c δεν έχει χαρακτηριστεί *in vivo* ως ένζυμο, έχει βρεθεί ότι *in vitro* παρουσιάζει καταλυτική δράση τύπου υπεροξειδάσης παρουσία ενός δέκτη ηλεκτρονίων όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>).<sup>39</sup> Μερικές από τις αντιδράσεις που έχουν μελετηθεί ότι καταλύει το κυτόχρωμα c παρουσιάζονται στην Εικόνα 2.4.



Εικόνα 2.4. Καταλυόμενες αντιδράσεις από το κυτόχρωμα c

Η δράση του κυτοχρώματος c ως υπεροξειδάση έχει αναδειχθεί χρησιμοποιώντας διάφορα υποστρώματα παρουσία υπεροξειδίου<sup>40-42</sup> μερικά εκ των οποίων αναφέρονται στον Πίνακα 2.1. που ακολουθεί.

Πίνακας 2.1. Υποστρώματα και προϊόντα βιοκατάλυσης του κυτοχρώματος c

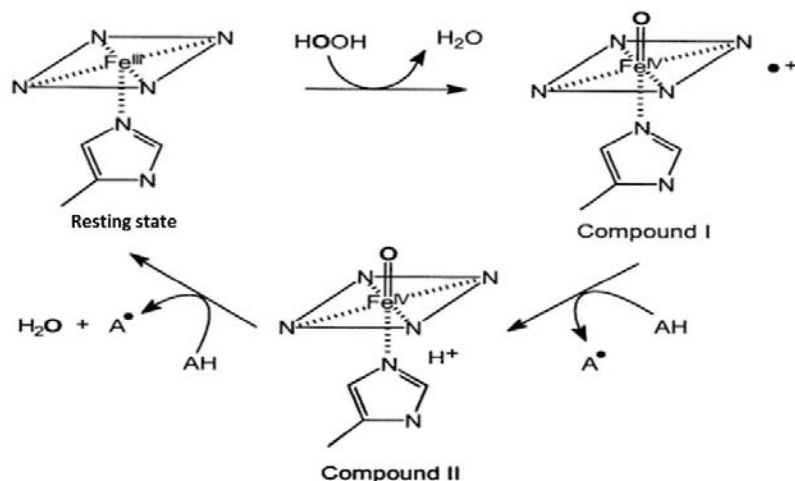
Υπόστρωμα	Προϊόν
<b>Αρωματικοί υδρογονάνθρακες</b>	
Ανθρακένιο	9,10-Ανθρακινόνη
Βενζόλιο	Φαινόλη
Βενζο(α)πυρένιο	1,6-Βενζο(α)πυρενοδιόνη
Πυρένιο	1,8-πυρενοδιόνη
<b>Οργανοθειϊκές και Ετεροκυκλικές ενώσεις</b>	
Βενζοθειοφαινίνο	Σουλφοξείδιο του βενζοθειοφαινίνου
Διβενζυλοσουλφίδιο	Διβενζυλοσουλφοξείδιο
N-μεθυλκαρβαζόλη	N-υδροξυμεθυλκαρβαζόλη
Θειοανισόλη	Μεθυλφαινυλοσουλφοξείδιο
<b>Άλλα υποστρώματα</b>	
ABTS	ABTS ρίζες κατιόντων
Γουαϊακόλη	Τετραγουαϊακόλη
Λινελαϊκό οξύ	Υπεροξείδιο του λινελαϊκού οξέος
Μεθειονίνη	Αιθυλένιο

Τα πλεονεκτήματα χρήσης του κυτοχρώματος c ως βιοκαταλύτη συνοψίζονται στα εξής σημεία:

- ❖ Η προσθετική ομάδα της αίμης είναι ομοιοπολικά προσδεμένη στο πρωτεϊνικό μόριο. Η ιδιότητα αυτή καθιστά τον δακτύλιο της αίμης πιο σταθερό παρουσία οργανικών διαλυτών στην αντίδραση, εν αντιθέσει με τις υπόλοιπες υπεροξειδάσες.
- ❖ Παραμένει ενεργό σε ένα μεγάλο εύρος τιμών pH.<sup>43</sup> Χαρακτηριστικό είναι ότι η οξείδωση του διβενζοθειοφαινίου μπορεί να πραγματοποιηθεί σε εύρος pH 2-11.
- ❖ Διατηρεί την καταλυτική του ενεργότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις μη συμβατικών μέσων όπως είναι οι οργανικοί διαλύτες και τα ιοντικά υγρά.<sup>44,45</sup>
- ❖ Μπορεί να πραγματοποιήσει βιοκαταλυτικές αντιδράσεις σε θερμοκρασίες υψηλότερες των 120 °C, ενώ μέσω χημικής τροποποίησης του μορίου η θερμοσταθερότητά του μπορεί να αυξηθεί περαιτέρω.
- ❖ Διαθέτει χαμηλό κόστος, γεγονός που επιτρέπει την χρήση του σε μεγάλης κλίμακας εφαρμογές.<sup>39</sup>

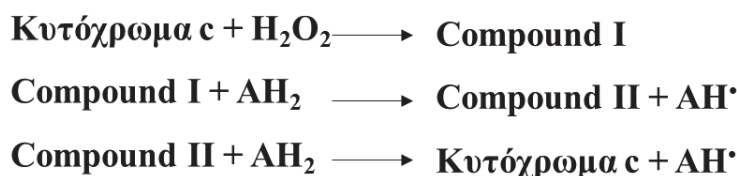
#### 2.2.4. Μηχανισμός κατάλυσης κυτοχρώματος c.

Παρ' όλες τις δομικές διαφορές των αιμοπρωτεϊνών τόσο στο μόριο της αίμης όσο και στο τμήμα του πολυπεπτιδικού κορμού, το πρώτο ενεργό ενδιάμεσο στον καταλυτικό κύκλο της συγκεκριμένης ομάδας πρωτεϊνών, αποτελεί μία υψηλού-σθένους κατιονική ρίζα του οξοπορφυρινικού σιδήρου (IV) προερχόμενη από την δράση ενός μορίου H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Το ενδιάμεσο αυτό ονομάζεται Compound I. Στην περίπτωση του κυτοχρώματος c έχει προταθεί ότι ακολουθεί τον καταλυτικό μηχανισμό τύπου υπεροξειδάσης, ο οποίος ξεκινά με την δημιουργία του Compound I και ακολουθεί ο σχηματισμός του Compound II.<sup>46</sup> Ο σχηματισμός του Compound I είναι σημαντικός καθώς η ταχύτητα των αντιδράσεων που καταλύονται από τις υπεροξειδάσες εξαρτάται από την ταχύτητα σχηματισμού του παρουσία του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Η δημιουργία του Compound II προέρχεται από την οξείδωση του αναγωγικού υποστρώματος (π.χ. αρωματική ένωση) από το Compound I μέσω μηχανισμού μεταφοράς 1e<sup>-</sup>. Το Compound II, το δεύτερο ενεργό ενδιάμεσο του καταλυτικού κύκλου, είναι μια οξοπορφυρίνη σιδήρου χωρίς την π-κατιονική ρίζα. Εν συνεχεία, το Compound II οξειδώνει ένα δεύτερο μόριο αναγωγικού υποστρώματος προκειμένου να σχηματιστεί μια οξοπορφυρίνη σιδήρου (III), ενώ το ίδιο ανάγεται έτσι ώστε να επανέλθει το ένζυμο στην αρχική του μορφή (*resting state*) (Εικόνα 2.5).



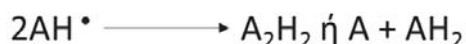
**Εικόνα 2.5.** Καταλυτικός μηχανισμός τύπου υπεροξειδάσης (Πηγή Azevedo et al 2003).<sup>47</sup>

Στον καταλυτικό κύκλο της οξειδοαναγωγικής δράσης του κυτοχρώματος c δυο μόρια του αναγωγικού υποστρώματος μετατρέπονται σε δυο δραστικές ρίζες όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.2.



**Σχήμα 2.2.** Καταλυτικός κύκλος κυτοχρώματος c.

Οι δυο αυτές ρίζες μπορούν να αντιδράσουν μη ενζυμικά μεταξύ τους, όπως φαίνεται στην παρακάτω αντίδραση:



**Αντίδραση 2.2.** Αντίδραση μεταξύ των ελευθέρων ριζών του αναγωγικού υποστρώματος.

Όπως συμβαίνει με τις περισσότερες υπεροξειδάσες, το κυτόχρωμα c απενεργοποιείται παρουσία περίσσειας H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> οδηγώντας σε αλλαγές στην προσθετική ομάδα της αίμης. Έχουν προταθεί δύο πιθανοί μηχανισμοί απενεργοποίησης.<sup>48</sup> Στον πρώτο μηχανισμό το Compound II αντιδρά με το H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> απουσία του αναγωγικού υποστρώματος σχηματίζοντας το Compound III. Το Compound III στην μορφή της υπερόξυ πορφυρινικής ελεύθερης ρίζας σιδήρου (III) θεωρείται ως ένα ισχυρά δραστικό ενδιάμεσο που οδηγεί στην δημιουργία ριζών υδροξυλίου που μπορεί να προκαλέσουν μη αντιστρεπτή απενεργοποίηση

αντιδρώντας με την δομή του δακτυλίου της αίμης. Ο δεύτερος μηχανισμός περιλαμβάνει την αντίδραση του Compound I με περίσσεια H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> απουσία αναγωγικού υποστρώματος οδηγώντας στον σχηματισμό μη αντιστρέψιμης απενεργοποιημένης μορφής της αιμοπρωτεΐνης γνωστή ως «verdohemeprotein». Σ' αυτόν τον μηχανισμό έχει προταθεί ότι το Compound III δρα ως σύστημα παραγωγής ανιόντων υπεροξειδίου έχοντας προστατευτική επίδραση ενάντια στην απενεργοποίηση.

### 2.3. Υπεροξειδάσες

Οι υπεροξειδάσες είναι αιμοπρωτεΐνες που καταλύουν αντιδράσεις οξείδωσης παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Βρίσκονται ευρέως στην φύση και μπορεί να απομονωθούν εύκολα από τα περισσότερα φυτικά κύτταρα αλλά και από ορισμένα όργανα και ιστούς ζώων. Συμπεριλαμβάνονται μεταξύ των πρώτων ενζύμων που ανακαλύφθηκαν με αναφορές που χρονολογούνται πίσω στον 19<sup>ο</sup> αιώνα. Το όνομα υπεροξειδάση πρωτοχρησιμοποιήθηκε από τον Linossier, ο οποίος την απομόνωσε από το φυτό αντράκλα ή αλλιώς γλιστρίδα το 1898. Οι υπεροξειδάσες διακρίνονται σε τρεις μεγάλες υπερ-οικογένειες: φυτικές και ζωικές υπεροξειδάσες και καταλάσες. Η υπερ-οικογένεια των φυτικών υπεροξειδασών μπορεί να διακριθεί σε τρεις κατηγορίες βάσει δομικής ομοιότητας και κοινής εξελικτικής πορείας ως εξής:<sup>49</sup>

#### **Class I:** Υπεροξειδάσες προκαρυωτικής προέλευσης

Στην κατηγορία αυτή ανήκουν υπεροξειδάσες προερχόμενες από οργανίδια προκαρυωτικών κυττάρων όπως πλαστίδια και μιτοχόνδρια. Κοινό χαρακτηριστικό των μελών αυτής της κατηγορίας είναι η απουσία δεσμευμένων υδατανθράκων, η έλλειψη δισουλφιδικών δεσμών και ιόντων ασβεστίου καθώς επίσης και σηματοδοτικών μορίων για την διαδικασία της έκκρισης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτής της κατηγορίας αποτελούν η υπεροξειδάση του κυτοχρώματος c ζύμης (CcP) και η ασκορβική υπεροξειδάση (AsP).<sup>50,51</sup>

#### **Class II:** Εκκρινόμενες υπεροξειδάσες μυκήτων.

Οι υπεροξειδάσες αυτής της κατηγορίας διαθέτουν μία σηματοδοτική πεπτιδική αλληλουχία υπεύθυνη για την έκκριση τους μέσω του ενδοπλασματικού δικτύου. Περιέχουν 5% υδατάνθρακες, δύο ιόντα ασβεστίου και τέσσερις συντηρημένους δισουλφιδικούς δεσμούς. Η υπεροξειδάση λιγνίνης (LiP) και η υπεροξειδάση μαγγανίου (MnP) από τους μύκητες

*Phanerchaete chrysosporium*, *Phlebia radiata* and *Lentinula edodes* είναι δύο χαρακτηριστικά παραδείγματα αυτής της κατηγορίας.<sup>52</sup>

**Class III:** Εκκρινόμενες υπεροξειδάσες φυτών

Τα μέλη αυτής της κατηγορίας διαθέτουν μία αμινοτελική σηματοδοτική αλληλουχία για την έκκριση, δύο συντηρημένα ιόντα ασβεστίου, τέσσερις συντηρημένες δισουλφιδικές γέφυρες σε διαφορετικές θέσεις από εκείνες τις Class II, μία επιπλέον ελικοειδή περιοχή που σχετίζεται με την πρόσβαση στην αίμη, ενώ το ποσοστό υδατανθράκων είναι 0-25 %. Μερικές από τις υπεροξειδάσες που ανήκουν σ' αυτήν την κατηγορία είναι η υπεροξειδάση χρένου (HRP), η υπεροξειδάση σόγιας (SoP), η υπεροξειδάση γογγυλιού (TuP), η υπεροξειδάση καπνού (TobP), η υπεροξειδάση τομάτας (TomP) και η υπεροξειδάση κριθαριού (BaP). Από τις πιο καλά μελετημένες υπεροξειδάσες αυτής της κατηγορίας είναι η HRP, η οποία αποτελεί αντικείμενο έρευνας στην παρούσα διατριβή και θα αναλυθεί περαιτέρω στις παραγράφους που ακολουθούν.<sup>53</sup>

Οι φυτικές υπεροξειδάσες συναντώνται κυρίως στο κυτταρικό τοίχωμα, στα κενοτόπια και στα οργανίδια μεταφοράς καθώς επίσης και στο αδρό ενδοπλασματικό δίκτυο. Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στις φυσιολογικές αποκρίσεις του κυττάρου όπως ο καταβολισμός της αυξητικής ορμόνης ινδολο-3-οξικού οξέος (IAA), η τροποποίηση του κυτταρικού τοιχώματος, η λιγνιτοποίηση, η άμυνα σε παθογόνους μικροοργανισμούς και η επούλωση τραυμάτων.<sup>54</sup>

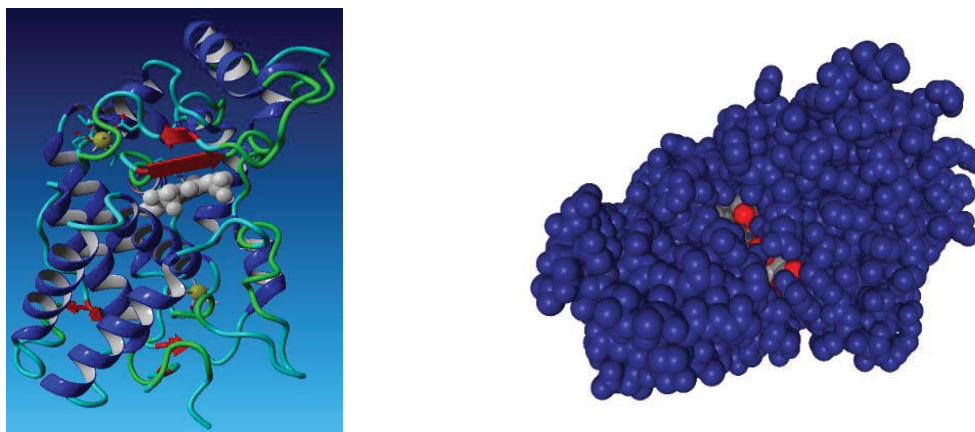
### **2.3.1. Υπεροξειδάση χρένου (HRP) (E.C. 1.11.1.7)**

Το χρένο ή αλλιώς *Armoracia rusticana*, είναι ένα ανθεκτικό πολυετές βότανο, οι ρίζες του οποίου είναι πλούσιες στο ένζυμο υπεροξειδάση. Παρ' όλο που ο όρος HRP χρησιμοποιείται γενικά, η ρίζα του φυτού έχει αποδειχθεί ότι περιέχει πολλά ισοένζυμα (διαφορετικές μορφές του ίδιου ενζύμου, που καταλύουν την ίδια βιοχημική αντίδραση, αλλά έχουν διακριτές φυσικές, χημικές και κινητικές ιδιότητες που προκύπτουν από τις μικρές διαφορές στην αμινοξική αλληλουχία). Το ισοένζυμο HRP C βρίσκεται σε αφθονία σε σχέση με τα υπόλοιπα γι' αυτό και αποτέλεσε το αντικείμενο εκτεταμένης μελέτης από πολλές ερευνητικές ομάδες.<sup>55</sup>

#### **2.3.1.1. Δομικά χαρακτηριστικά της HRP**

Η HRP είναι μία αιμοπρωτεΐνη 308 αμινοξέων, μοριακού βάρους 44 kDa και ισοηλεκτρικού σημείου pI 9. Η πολυπεπτιδική αλυσίδα του μορίου είναι N-γλυκοζυλιωμένη

σε οχτώ κατάλοιπα ασπαραγίνης (Asn13, Asn57, Asn158, Asn186, Asn198, Asn214, Asn255 και Asn268) ακολουθώντας το μοτίβο Asn-Αμινοξύ-Ser/Thr. Η συνολική περιεκτικότητα του μορίου σε υδατάνθρακες κυμαίνεται μεταξύ 18-22 % προστατεύοντας την πολυπεπτιδική αλυσίδα από πρωτεόλυση και τροποποίηση από τις ελεύθερες ρίζες που δημιουργούνται κατά την διάρκεια της αντίδρασης.<sup>56</sup> Επιπλέον, η δομή του ενζύμου διαθέτει τέσσερις δισουλφιδικές γέφυρες μεταξύ των καταλοίπων κυστεΐνης Cys11–Cys91, Cys44–Cys49, Cys97–Cys301 και Cys177–Cys209 και δύο ιόντα ασβεστίου, απαραίτητα για την διατήρηση της δομής και της λειτουργίας του. Όσον αφορά στην δευτεροταγή διαμόρφωση του μορίου έχει βρεθεί ότι αποτελείται από 13 α-έλικες και 3 β-φύλλα (Εικόνα 2.6). Η αναδίπλωση της πρωτεΐνης οδηγεί στον σχηματισμό δύο διακριτών περιοχών στο μόριο, την εγγύς ή αλλιώς «proximal» περιοχή και την περιφερική ή αλλιώς «distal» περιοχή. Μεταξύ των δύο αυτών περιοχών είναι τοποθετημένη η προσθετική ομάδα της αίμης. Οι περιοχές αυτές έχει προταθεί ότι είναι πιθανό αποτέλεσμα γονιδιακού διπλασιασμού.<sup>57</sup>

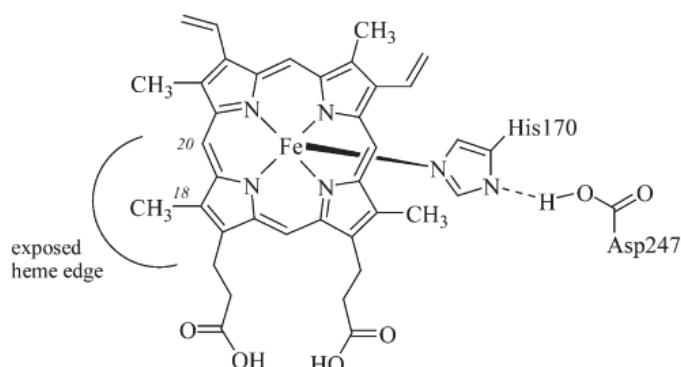


**Εικόνα 2.6.** Απεικόνιση της HRP. Αριστερά: Αναδίπλωση της πρωτεϊνικής δομής γύρω από το μόριο της αίμης. Το μόριο της αίμης (γκρι χρώμα) βρίσκεται ανάμεσα στην περιφερική ή αλλιώς «distal» περιοχή και στην εγγύς ή αλλιώς «proximal» περιοχή του μορίου. Κάθε περιοχή περιέχει από ένα ιόν ασβεστίου ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (Κίτρινο χρώμα). Οι α-έλικες και τα β-φύλλα φαίνονται με μπλε και κόκκινο χρώμα αντίστοιχα. Δεξιά: Απεικόνιση του μορίου της αίμης στο εσωτερικό του πρωτεϊνικού μορίου. Η αλληλουχία της πρωτεΐνης φαίνεται με μπλε χρώμα (Πηγή: Protein Data Bank 1ATJ).

### 2.3.1.2. Η προσθετική ομάδα της αίμης στην HRP

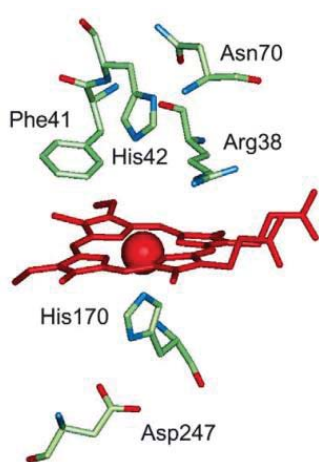
Η προσθετική ομάδα της αίμης στην HRP είναι μία σίδηρο πρωτοπορφυρίνη IX αποτελούμενη από τέσσερις πυρολικούς δακτυλίους ενωμένους μέσω γέφυρας μεθανίου, ενώ στο κέντρο του μορίου εντοπίζεται ένα άτομο σιδήρου. Τρία διαφορετικά είδη

υποκαταστατών συναντώνται στους πυρολικούς δακτυλίους: τέσσερις μεθυλ-, δύο βινυλ- και δύο πλευρικές αλυσίδες προπιονικού οξέος (Εικόνα 2.7).<sup>58</sup>



**Εικόνα 2.7.** Δομή της σίδηρο πρωτοπορφυρίνης IX. Η His170 συνδέεται ομοιοπολικά με το σίδηρο της αίμης. Το καρβοξυτελικό άκρο του Asp247 βοηθάει στη διατήρηση αυτού του δεσμού. Στο εκτεθειμένο άκρο της αίμης οξειδώνονται τα αρωματικά υποστρώματα χωρίς όμως να προσδένονται σ' αυτήν.

Ο σίδηρος συνδέεται με τον πορφυρινικό δακτύλιο μέσω των 4 πυρολικών ατόμων αζώτου, ενώ στη 5<sup>η</sup> θέση πρόσδεσης συνδέεται ομοιοπολικά με το πρωτεϊνικό μόριο μέσω του αζώτου της πλευρικής αλυσίδας της His170 (εγγύς ιστιδίνη). Ο δεσμός αυτός, μεταξύ πρωτεϊνικού μορίου και σιδήρου μπορεί να διασπαστεί όταν βρεθεί σε όξινο περιβάλλον. Η 6<sup>η</sup> θέση συντονισμού ή αλλιώς η περιφερική πλευρά του επιπέδου της αίμης παραμένει κενή στη φυσική κατάσταση του ενζύμου και διαθέσιμη στο H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> κατά τη διαδικασία της κατάλυσης. Επιπλέον, ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου μεταξύ των προπιονικών οξέων της αίμης και των καταλοίπων Gln176, Ser73, Ser35 και Arg31 ενισχύουν την πρόσδεση της αίμης με το πρωτεϊνικό μόριο.



**Εικόνα 2.8.** Η εγγύς His170 προσδένεται στην αίμη, ενώ τα κατάλοιπα στην περιφερική πλευρά της αίμης δεν προσδένονται. Σημαντικές λειτουργίες αυτών των καταλοίπων είναι **Phe41**: Εμποδίζει την πρόσβαση του υποστρώματος στο σίδηρο του Compound I, **Arg38, His42**: Διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον σχηματισμό του Compound I και στην σύνδεση και σταθεροποίηση προσδετών και αρωματικών υποστρωμάτων, **Asn70**: Διατηρεί την αλκαλικότητα της His42 μέσω σχηματισμού δεσμού υδρογόνου (Πηγή Veitch et al., 2004).<sup>59</sup>

Η πρόσδεση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> πραγματοποιείται στην περιφερική πλευρά της αίμης, η οποία αποτελείται από τα κατάλοιπα Arg38, Phe41 and His42.<sup>49,59</sup>

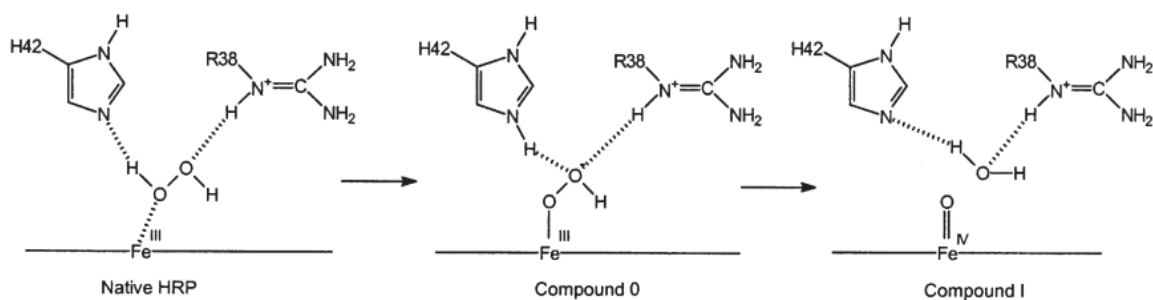


### 2.3.1.3. Τα ιόντα ασβεστίου της HRP

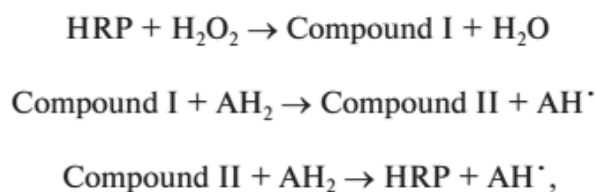
Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως η HRP περιέχει δύο κατιόντα ασβεστίου ( $\text{Ca}^{2+}$ ), τα οποία εντοπίζονται στην εγγύς και στην περιφερική περιοχή της αίμης. Η σύνδεση των κατιόντων στην περιοχή πρόσδεσης της αίμης πραγματοποιείται μέσω ενός δικτύου δεσμών υδρογόνου. Κάθε ιόν ασβεστίου μπορεί να προσδένεται με επτά άτομα οξυγόνου προερχόμενα από τα κατάλοιπα της πρωτεϊνικής ακολουθίας. Η δέσμευση των ιόντων ασβεστίου αποτελεί κρίσιμο στάδιο κατά την αναδίπλωση, και πραγματοποιείται πριν τον σχηματισμό των δισουλφιδικών δεσμών και την ενσωμάτωση της αίμης. Η απώλεια των ιόντων ασβεστίου οδηγεί σε αλλαγές τόσο στην ενζυμική δραστηριότητα όσο και στην θερμοσταθερότητα του πρωτεϊνικού μορίου.<sup>60</sup>

### 2.3.1.4. Καταλυτικός μηχανισμός

Η HRP ακολουθεί τον καταλυτικό μηχανισμό τύπου υπεροξειδάσης που περιγράφηκε στην παράγραφο 2.2.4. Ωστόσο στην περίπτωση αυτού του ενζύμου διάφοροι μηχανισμοί σύνθεσης του Compound I έχουν προταθεί με επικρατέστερο το μοντέλο που προτάθηκε από τους Roulos και Kraut το 1980.<sup>61</sup> Σύμφωνα με αυτόν τον μηχανισμό κρίσιμο ρόλο στην δημιουργία του Compound I αποτελούν τα συντηρημένα περιφερικά κατάλοιπα His42 και Arg38. Πιο συγκεκριμένα η πλευρική αλυσίδα της περιφερικής His42 δρα ως δέκτης πρωτονίων καθώς το  $\text{H}_2\text{O}_2$  προσδένεται στο σίδηρο σχηματίζοντας ένα ενδιάμεσο σύμπλοκο (Compound 0), ενώ η πλευρική αλυσίδα της περιφερικής Arg38 μετέχει στην ετερολυτική διάσπαση του δεσμού O-O σταθεροποιώντας το φορτίο κατά την διάρκεια σχηματισμού του Compound I (Εικόνα 2.9). Ακολουθεί η αναγωγή του Compound I από έναν δότη ηλεκτρονίων (αναγωγικό υποστρώμα) προς σχηματισμό του Compound II, το οποίο ανάγεται περαιτέρω από ένα δεύτερο μόριο αναγωγικού υποστρώματος με σκοπό την αναγέννηση του ενζύμου στην αρχική φυσική του κατάσταση (Σχήμα 2.4).<sup>54,62-64</sup>



**Εικόνα 2.9.** Μηχανισμός σχηματισμού του Compound I (Πηγή Azevedo et al., 2003).<sup>47</sup>



**Σχήμα 2.4.** Καταλυτικός κύκλος της HRP.

### 2.3.1.5. Εφαρμογές υπεροξειδάσης φυτικής προέλευσης.

Εξ' αιτίας των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους, οι υπεροξειδάσες μπορούν να βρουν εφαρμογή σε διάφορους τομείς. Ιδιαίτερα σημαντική είναι η χρήση τους σε τομείς όπως η αναλυτική διάγνωση, οι βιοαισθητήρες, η ανοσοανίχνευση και η βιοαποικοδόμηση και επεξεργασία λυμάτων.<sup>65-67</sup>

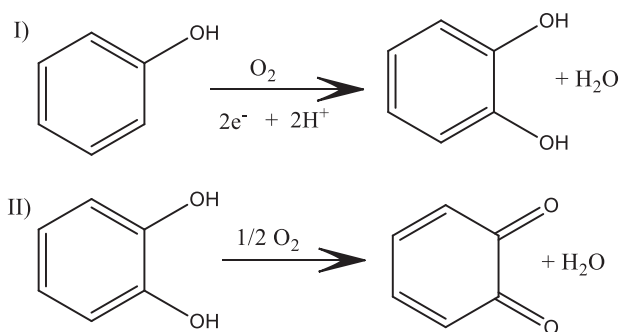
- Βιοαισθητήρες: η HRP είναι ίσως το πιο διαδεδομένο ένζυμο στις αναλυτικές εφαρμογές. Η παρακολούθηση μέσω ηλεκτροχημικών διαδικασιών των αντιδράσεων οξειδωσης/αναγωγής επιτρέπει την ανάπτυξη ηλεκτρονικών βιοαισθητήρων ενώ παράλληλα η ικανότητα της HRP να καταλύει αντιδράσεις οξειδωσης διαφόρων χρωμοφόρων υποστρωμάτων επιτρέπει την χρήση φασματοφωτομετρικών μεθόδων ανίχνευσης όπως η φθορισμομετρία. Η αρχή της ανίχνευσης του βιοαισθητήρα είναι απλή και βασίζεται στην τοποθέτηση ενός ηλεκτροδίου HRP-τροποποιημένου σε ένα διάλυμα που περιέχει υπεροξειδίο (ROOH). Το υπεροξειδίο οξειδώνει το ένζυμο και το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο το ανάγει στην φυσική του κατάσταση. HRP-βιοαισθητήρες μπορούν να βρουν εφαρμογή στην φαρμακευτική, στο περιβάλλον, στην βιομηχανία γαλακτοκομικών, στην κλωστοϋφαντουργία, στην βιομηχανία χαρτιού και στην βιομηχανία τροφίμων.<sup>68-70</sup>
- Ανοσοδοκιμασίες: ο όρος ανοσοδοκιμασία περιγράφει ένα ευρύ φάσμα αναλύσεων για την ανίχνευση και την ποσοτικοποίηση αντιγόνων και αντισωμάτων. Η HRP έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς σε ανοσοδοκιμασίες όπως σε enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA), Western-Blotting και ανοσο ιστοχημικές τεχνικές (IHC).<sup>71,72</sup>
- Βιοαποικοδόμηση και επεξεργασία λυμάτων: η ικανότητα της HRP να οξειδώνει διάφορους αρωματικούς ρύπους μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την βιοαποικοδόμηση και επεξεργασία λυμάτων. Διαφόρου τύπου φαινόλες όπως χλωροφαινόλες, μεθυλφαινόλες και αζίδια χρωστικών αποτελούν παραδείγματα επικίνδυνων ενώσεων που μπορούν να βρεθούν σε λύματα βιομηχανικής προέλευσης. Η χρήση της HRP με σκοπό την

απομάκρυνση των φαινολικών ενώσεων τόσο από συνθετικά όσο και από πραγματικά απόβλητα βιομηχανιών έχει μελετηθεί εκτενώς. Τα περισσότερα προϊόντα αποικοδόμησης που παράγονται είναι αδιάλυτα πολυμερή, τα οποία είναι λιγότερο επιβλαβή και μπορούν να απομακρυνθούν με μία απλή καταβύθιση.<sup>73-75</sup>

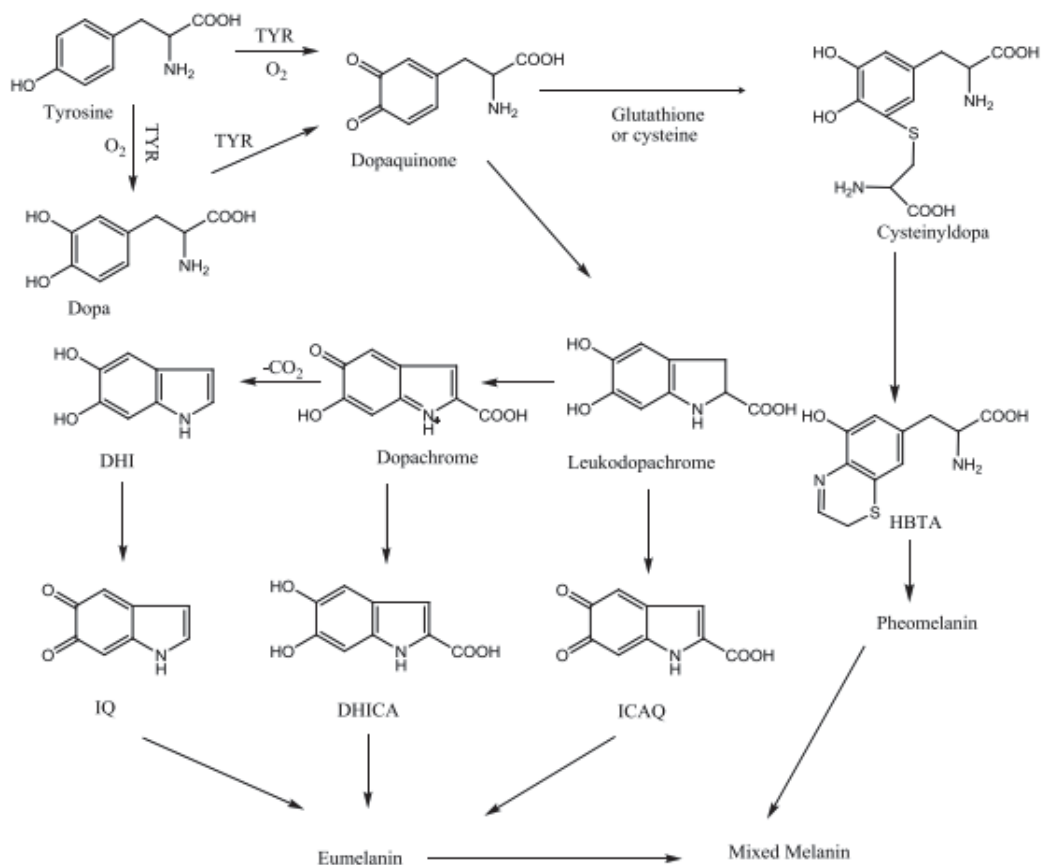
## 2.4 Τυροσινάση (E.C. 1.14.18.1)

Οι τυροσινάσες ανήκουν σε μία μεγαλύτερη κατηγορία πρωτεϊνών που ονομάζεται πρωτεΐνες χαλκού τύπου-3, συναντώνται σε βακτήρια, φυτά, έντομα, ασπόνδυλα, μύκητες και θηλαστικά και αποτελούν το βασικό ένζυμο στο μονοπάτι βιοσύνθεσης της μελανίνης. Καταλύουν την ορθο-υδροξυλίωση των μονοφαινολών σε ο-διφαινόλες (δράση μονοφαινολάσης) και την οξειδωση των ο-διφαινολών σε ο-κινόνες (δράση διφαινολάσης) χρησιμοποιώντας μοριακό οξυγόνο και στις δύο περιπτώσεις (Σχήμα 2.5).<sup>76</sup> Οι κινόνες είναι πολύ δραστικά μόρια τα οποία πολυμερίζονται δημιουργώντας μόρια υψηλού μοριακού βάρους ή καφέ χρωστικές ευμελανίνη, φαιομελανίνη, ή αντιδρούν με αμινοξέα και πρωτεΐνες που προάγουν την δημιουργία καφέ χρώματος (Σχήμα 2.6).<sup>77</sup>

Αρχικά ταυτοποιήθηκαν στα θηλαστικά για τον ρόλο τους στην ανάπτυξη των μελανωμάτων και για την εμπλοκή τους σε προβλήματα μελανογένεσης όπως ο αλμπινισμός και η λεύκη.<sup>78</sup> Επιπλέον, οι τυροσινάσες συνδέονται με την επούλωση τραυμάτων και την ανοσολογική απόκριση στα φυτά.<sup>79</sup> Στα περισσότερα φρούτα και λαχανικά είναι υπεύθυνες για την ενζυμική αμαύρωση που προκαλείται από χτύπημα, κόψιμο ή άλλη μηχανική ζημιά των κυττάρων. Στα έντομα, εμπλέκονται στην σκλήρυνση του εξωσκελετού και στην προστασία έναντι άλλων οργανισμών.

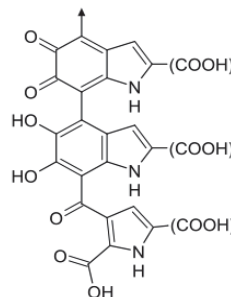


**Σχήμα 2.5.** Αντιδράσεις που καταλύονται από το ένζυμο τυροσινάση. I) Δράση Μονοφαινολάσης και II) δράση Διφαινολάσης.



**Σχήμα 2.6.** Πορεία μελανογένεσης. Tyr: τυροσινάση, Dopa: 3,4-dihydroxyphenylalanine, DHICA:5,6-dihydroxyindole-2-carboxylic acid, DHI:5,6-dihydroxyindole, ICAQ:indole-2-carboxylic acid-5,6-quinone, IQ:indole-5,6-quinone, HBTA:5-hydroxy-1,4-benzothiazinylalanine (Πηγή Chang, 2012).<sup>80</sup>

Τέλος, στους μύκητες η μελανίνη σχετίζεται με μηχανισμούς άμυνας ενάντια σε στρεσογόνους παράγοντες όπως, η UV ακτινοβολία, οι ελεύθερες ρίζες, η αφυδάτωση και οι ακραίες θερμοκρασίες καθώς επίσης και με την σταθερότητα των σπορίων. Χαρακτηριστικό της δράσης του ενζύμου στους μύκητες είναι η ανεπιθύμητη αμαύρωση των μανιταριών κατά την διάρκεια της ωρίμανσής τους ή του χειρισμού τους μετά την συγκομιδή. Οι μελανίνες στους μύκητες προέρχονται κυρίως από την οξείδωση της L-τυροσίνης και του γ-γλουταμινυλ-3,4-διυδροξυ βενζολίου (GDHB) ή της κατεχόλης στην περίπτωση του Βασιδιομύκητα.<sup>81</sup> Αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής αποτελεί η τυροσινάση από τον μύκητα *Agaricus bisporus*, οι ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά της οποίας αναλύονται στην συνέχεια.

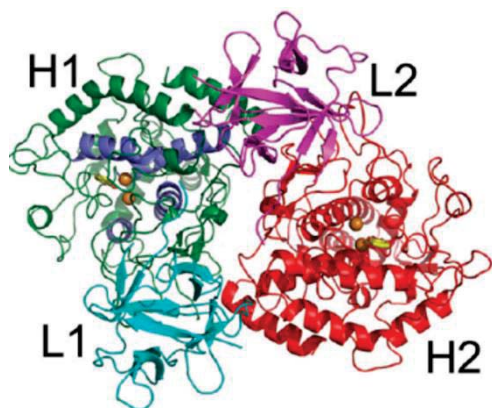


**Εικόνα 2.10.** Αριστερά: Μανιτάρια του είδους *Agaricus bisporus*. Χαρακτηριστικό η ανεπιθύμητη αμαύρωσή τους κατά τον χειρισμό μετά την συγκομιδή. Δεξιά : Δομή της μελανίνης. Η ομάδα -COOH μπορεί να είναι -H ή πιο σπάνια κάποιος άλλος υποκαταστάτης. Το βέλος υποδηλώνει την πορεία πολυμερισμού.

#### 2.4.1. Δομικά χαρακτηριστικά της τυροσινάσης από *Agaricus bisporus*

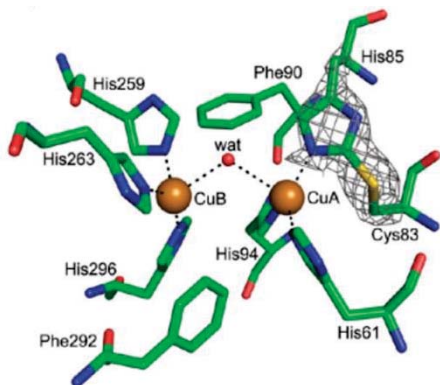
Οι τυροσινάσες έχουν απομονωθεί από διάφορους οργανισμούς φυτών, ζώων και μυκήτων. Στα διάφορα είδη όπου έχουν μελετηθεί έχει παρατηρηθεί ότι τα ένζυμα αυτά εμφανίζουν μεγάλη ανομοιογένεια όσον αφορά στα δομικά χαρακτηριστικά, στην κατανομή τους στους ιστούς και στην κυτταρική του θέση καθώς επίσης και στο μέγεθος, στην πρωτοταγή δομή, στο πρότυπο γλυκοζυλίωσης και στα χαρακτηριστικά ενεργοποίησης. Κοινό χαρακτηριστικό όλων αποτελεί το διπύρρηνο σημείο σύνδεσης χαλκού τύπου 3 στο ενεργό τους κέντρο.<sup>82</sup>

Η τυροσινάση από *Agaricus bisporus* είναι μία κυτταροπλασματική, τετραμερής πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 120 kDa. Αποτελείται από δύο **H** υπομονάδες μοριακού βάρους 43 kDa και δύο **L** υπομονάδες, μοριακού βάρους 14 kDa. Η υπομονάδα **H** αποτελείται από 392 αμινοξέα τα οποία αναδιπλώνονται σε 13 α-έλικες, 8 μικρές β-πτυχωτές επιφάνειες και πολλούς βρόγχους και σ' αυτήν την υπομονάδα εντοπίζεται το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Η υπομονάδα **L** αποτελείται από 150 αμινοξέα αναδιπλωμένα σε 12 αντιπαράλληλα β-φύλλα, τα οποία σχηματίζουν ένα κυλινδρικό βαρέλι από 6 ζευγάρια φύλλων. Βρίσκεται ~25 Å μακριά από το ενεργό κέντρο ενώ μέχρι στιγμής δεν είναι γνωστή η λειτουργία της, αλλά πιθανώς σχετίζεται με την αναδίπλωση, την πρόσδεση του χαλκού και τη σταθερότητα του ενζύμου *in vivo* (Εικόνα 2.11).<sup>83</sup>



**Εικόνα 2.11.** Διαμόρφωση του τετραμερούς (H2L2) της τυροσινάσης από *Agaricus bisporus*. Με καφέ φαίνονται τα ιόντα χαλκού (Πηγή Ismaya et al., 2011, PDB: 2Y9W).<sup>83</sup>

Στην υπομονάδα **H** βρίσκεται το διπύρρηνο σημείο σύνδεσης χαλκού. Κάθε ιόν χαλκού συντονίζεται με 3 κατάλοιπα ιστιδίνης. Πιο συγκεκριμένα, τα κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν με τον χαλκό CuA είναι: His61, His85 και His94, ενώ τα κατάλοιπα που αλληλεπιδρούν με τον χαλκό CuB είναι: His259, His263, His296. Ο προσανατολισμός αυτών των αμινοξέων ενισχύεται από αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται με τα γειτονικά κατάλοιπα όπως η Phe90 και η Phe292 (Εικόνα 2.12).<sup>83</sup>



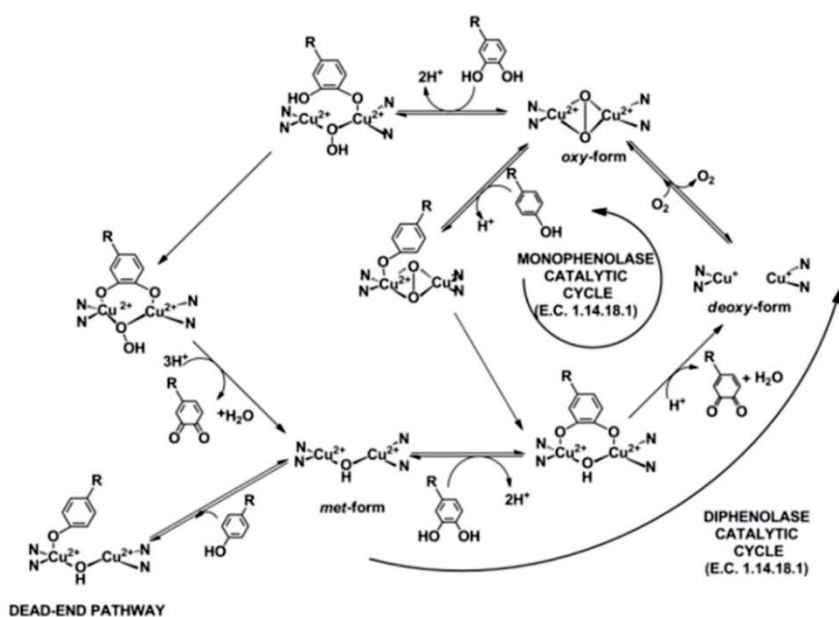
**Εικόνα 2.12.** Αλληλεπίδραση των ιόντων χαλκού (CuA και CuB) με τα κατάλοιπα του ενεργού κέντρου πρωτεϊνικού μορίου (Πηγή Ismaya et al., 2011).<sup>83</sup>

#### 2.4.2. Καταλυτικός μηχανισμός

Όπως αναφέρθηκε, η τυροσινάση καταλύει την ορθο-υδροξυλίωση των μονοφαινολών σε ο-διφαινόλες (δράση μονοφαινολάσης) και την οξείδωση των ο-διφαινολών σε ο-κινόνες (δράση διαφαινολάσης) χρησιμοποιώντας μοριακό οξυγόνο και στις δύο περιπτώσεις (Σχήμα 2.5). Ανάλογα με το σθένος του ιόντος του χαλκού και την πρόσδεση του οξυγόνου, το ενεργό κέντρο της μπορεί να βρίσκεται σε τρεις διαμορφώσεις: δύο οξειδωμένες *oxy* ( $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-O}_2\text{-Cu}^{\text{II}}$ ) και *met* ( $\text{Cu}^{\text{II}}\text{-OH-Cu}^{\text{II}}$ ) και μία ανηγμένη ασταθή *deoxy* ( $\text{Cu}^{\text{I}}\text{-Cu}^{\text{I}}$ ). Η δέσμευση οξυγόνου απ' την ασταθή *deoxy* διαμόρφωση οδηγεί στην δημιουργία της *oxy* διαμόρφωσης, ενώ η προσθήκη  $\text{H}_2\text{O}_2$  ή διθειοθρεϊτόλης μπορεί να οδηγήσει στην μετατροπή

της *met* σε *oxy* διαμόρφωση. Στην φυσική του διαμόρφωση το ένζυμο βρίσκεται στην *met* κατάσταση σε ποσοστό περίπου 85-90%. Τόσο η *met* όσο και η *oxy* διαμόρφωση του ενζύμου μπορούν να οξειδώσουν διφαινόλες, ενώ αντίθετα η οξείδωση των μονοφαινόλων απαιτεί την παρουσία του ενζύμου σε *oxy* διαμόρφωση, καθώς η δέσμευση μονοφαινόλης στην *met* μορφή οδηγεί στον σχηματισμό ενός ανενεργού συμπλόκου. Η αντίδραση οξείδωσης μονοφαινόλης ή διφαινόλης οδηγεί στον σχηματισμό μίας ο-κινόνης και στην μετατροπή του ενζύμου στην *deoxy* διαμόρφωση.

Ο ακριβής μηχανισμός κατάλυσης και ο τρόπος δέσμευσης των υποστρωμάτων παραμένει άγνωστος μέχρι και σήμερα. Ωστόσο σύμφωνα με υποθέσεις, το μόριο μονοφαινόλης προσανατολίζεται στο ενεργό κέντρο μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με την His263. Στην συνέχεια η ομάδα  $-OH$  του υποστρώματος έχει προταθεί ότι αποπρωτονιώνεται από τον ιόν υπεροξειδίου το οποίο δεσμεύεται μεταξύ του CuA και CuB κατά την έναρξη της αντίδρασης, το οποίο στην συνέχεια ολοκληρώνει την όρθο-υδροξυλίωση του υποστρώματος.<sup>84-86</sup>



**Σχήμα 2.7.** Καταλυτικός κύκλος δράσης μονοφαινόλασης και διφαινόλασης από την τυροσινάση (Πηγή Gasparetti, 2012).<sup>84</sup>

### 2.4.3. Εφαρμογές της τυροσινάσης

Τα τελευταία χρόνια τα καταλυτικά χαρακτηριστικά της τυροσινάσης έχουν προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον για μελέτες σχετικά με πιθανές εφαρμογές του συγκεκριμένου ενζύμου σε τομείς όπως η βιομηχανία φαρμάκων, τροφίμων, καλλυντικών κ.α.<sup>81</sup>

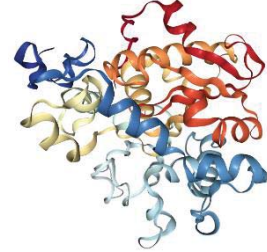
Η ικανότητάς της να οξειδώνει φαινόλες μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως βελτιωτικό γεύσης στην βιομηχανία τροφίμων καθώς επίσης στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων (π.χ. ποσοτικοποίηση φαινολών) και στην βιοαποικοδόμηση (απομάκρυνση φαινολών). Όσον αφορά στον τομέα των βιοαισθητήρων, η τυροσινάση από *Agaricus bisporus* χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη βιοαισθητήρα με σκοπό την ανίχνευση της δυσφαινόλης Α στις συσκευασίες τροφίμων και ποτών. Επιπλέον, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε εφαρμογές της ιατρικής όπως η ανάπτυξη φαρμάκων και η διάγνωση. Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι: η ανάπτυξη εμβολίων κατά του κακοήθους μελανώματος (κύτταρα στα οποία η τυροσινάση υπερεκφράζεται), τα οποία χρησιμοποιούν εξειδικευμένα αντισώματα για την τυροσινάση και η ανάπτυξη μίας καινοτόμου θεραπείας (melanocyte-directed enzyme prodrug therapy, MDEPT) με επιλεκτική κυτταροτοξική δράση χρησιμοποιώντας προ-φάρμακα που μοιάζουν με την τυροσίνη.<sup>84</sup>



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>

## Υδρολυτικά ένζυμα (E.C. 3)

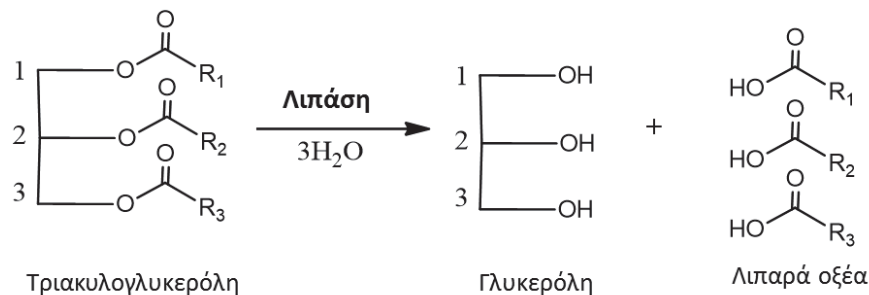
---



### 3.1. Εισαγωγή

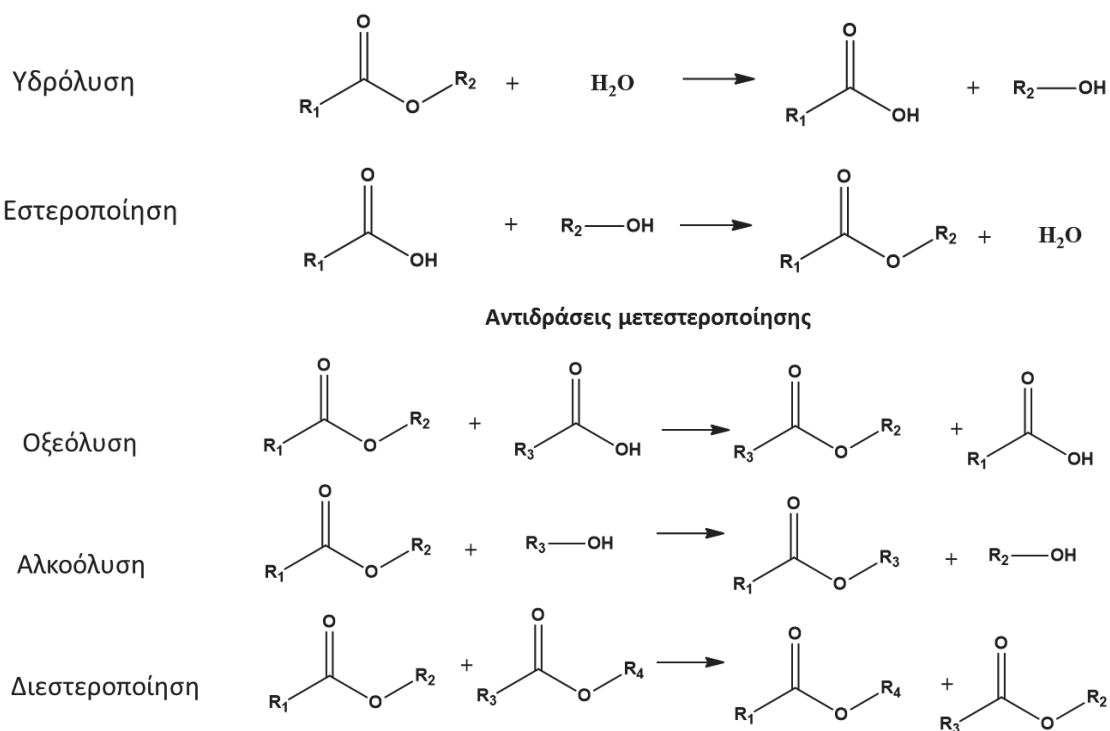
Οι υδρολάσες συνιστούν μία μεγάλη κατηγορία ενζύμων με ιδιαίτερο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Καταλύουν αντιδράσεις υδρόλυσης εστερικών, γλυκοζιτικών, πεπτιδικών και αμιδικών δεσμών. Ανάλογα με την υδρόλυση του δεσμού που καταλύουν μπορεί να διακριθούν περαιτέρω σε εστεράσες, γλυκοζιδάσες, πεπτιδάσες κ.α. Σημαντική κατηγορία υδρολασών, τόσο σε ερευνητικό όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο, αποτελούν οι λιπάσες (E.C. 3.1.1.3). Ο βιολογικός ρόλος των λιπασών συνδέεται με την διαδικασία της πέψης και συγκεκριμένα με την υδρόλυση των εστερικών δεσμών τριγλυκεριδίων μακράς αλυσίδας προς παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων και γλυκερόλης.<sup>87</sup> Όσον αφορά στην εκλεκτικότητα των λιπασών ως προς το υπόστρωμα τα ένζυμα αυτά διακρίνονται σε δύο κατηγορίες:

- ❖ Μη ειδικευμένες λιπάσες οι οποίες δεν παρουσιάζουν κάποια συγκεκριμένη εξειδίκευση ως προς τη θέση υδρόλυσης των εστερικών δεσμών των τριγλυκεριδίων
- ❖ 1,3 τόπο-ειδικευμένες λιπάσες, οι οποίες υδρολύουν τους εστερικούς δεσμούς των τριγλυκεριδίων στις θέσεις C1 και C3 αντίστοιχα<sup>88</sup> (Αντίδραση 3.1).



**Αντίδραση 3.1.** Ενζυμική αντίδραση υδρόλυσης της τριακυλογλυκερόλης προς παραγωγή γλυκερόλης και λιπαρών οξέων.

Πηγές προέλευσης των λιπασών αποτελούν διάφορα φυτά, ζώα και μικροοργανισμοί κυρίως βακτήρια και μύκητες ωστόσο οι μικροβιακής προέλευσης λιπάσες αντιπροσωπεύουν την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη κατηγορία ενζύμων σε βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Κάτω από συνθήκες χαμηλής περιεκτικότητας σε νερό οι λιπάσες έχουν την ικανότητα να καταλύσουν αντιδράσεις εστεροποίησης, αλκοόλυσης και οξείδωσης διαθέτοντας έτσι ένα ευρύ φάσμα υποστρωμάτων (Σχήμα 3.1).<sup>89</sup>



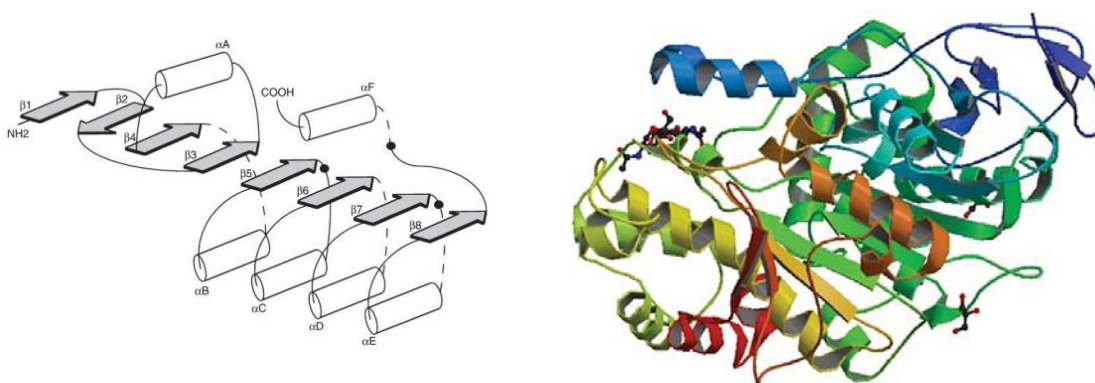
**Σχήμα 3.1.** Αντιδράσεις καταλυόμενες από λιπάσες

### 3.1.1. Δομικά χαρακτηριστικά της λιπάσης

Η ανάλυση της δομής των λιπασών αποκάλυψε ότι συνιστούν εξωκυτταρικές, όξινης γλυκοπρωτεΐνες με αριθμό αμινοξέων που κυμαίνεται από 270 έως 641 κατάλοιπα. Η τελική

σύσταση του ενζύμου συχνά περιέχει ένα υδατανθρακικό τμήμα σε ποσοστό περίπου 2 έως 15%.

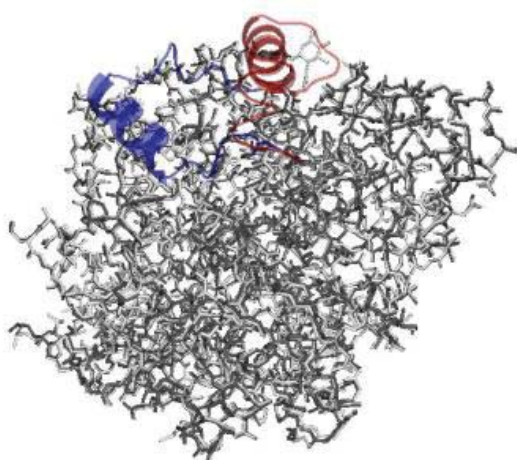
Η δομή της λιπάσης από *Rhizomucor miehei* ήταν η πρώτη λιπάση μικροβιακής προέλευσης που μελετήθηκε μέσω κρυσταλλογραφικής ανάλυσης με περίθλαση ακτίνων X.<sup>90</sup> Η ταυτοποίηση της τριτοταγούς δομής διαφόρων λιπασών μικροβιακής προέλευσης που ακολούθησε, οδήγησε στο συμπέρασμα ότι όλες οι λιπάσες μοιράζονται παρόμοια αναδίπλωση πάρα την έλλειψη ομοιότητας στην αλληλουχία. Αυτό το κοινό μοτίβο αναδίπλωσης ονομάζεται δομικό πρότυπο α/β υδρολασών.<sup>91</sup> Το δομικό αυτό πρότυπο αποτελείται από μία κεντρική υδρόφοβη παράλληλη β-πτυχωτή επιφάνεια με οχτώ β-πτυχές (β1-β8) και με την β2 πτυχή αντιπαράλληλη, οι οποίες συνδέονται με έξι α-έλικες (Εικόνα 3.1).



**Εικόνα 3.1.** Δομή α/β υδρολάσης. Αριστερά: Οι α-έλικες απεικονίζονται ως κύλινδροι και οι β-πτυχές ως βέλη. Δεξιά: Διαμόρφωση της λιπάσης από *Candida antarctica* (Protein Data Bank: 1TCA) (Πηγή Jaeger et al., 1999).<sup>92</sup>

Το ενεργό κέντρο των α/β υδρολασών αποτελείται από μία καταλυτική τριάδα αμινοξέων στην οποία συμμετέχουν μία σερίνη (Ser), μία ιστοιδίνη (His) και ένα ασπαραγινικό (Asp) ή γλουταμινικό οξύ (Glu). Η πυρηνόφιλη σερίνη βρίσκεται σε ένα υψηλά συντηρημένο πενταπετίδιο: Gly-X-Ser-X-Gly (Gly αντιστοιχεί σε γλυκίνη και το X μπορεί να είναι οποιοδήποτε αμινοξύ), το οποίο σχηματίζει μία γ-στροφή μεταξύ της β5-πτυχής και της αC έλικας. Αυτή η ιδιαίτερα συντηρημένη αλληλουχία ονομάζεται «πυρηνόφιλος αγκώνας» και βοηθάει στον προσανατολισμό της πλευρικής ομάδας της σερίνης κατά την αντίδραση.<sup>93</sup>

Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των λιπασών αποτελεί η αύξηση της ενεργότητάς τους όταν βρεθούν σε μεσεπιφάνειες νερού και ελαίου, ένα φαινόμενο γνωστό και ως μεσεπιφανειακή ενεργοποίηση. Κρυσταλλογραφικές μελέτες έχουν αποδείξει ότι αυτή η αύξηση της ενεργότητας των λιπασών προέρχεται από δομικές αναδιπλώσεις του ενεργού κέντρου του ενζύμου και συγκεκριμένα αναδιπλώσεις μίας εύκαμπτης αμφίφιλης δομής η οποία καλύπτει το ενεργό κέντρο και ονομάζεται «καπάκι». Πρόκειται για ένα ολιγοπεπτίδιο που αποτελείται από μία ή δύο α-έλικες ή από έναν βρόγχο. Όταν μία λιπάση βρεθεί σε μία μεσεπιφάνεια το «καπάκι» μετακινείται εκθέτοντας έτσι μία υδρόφοβη περιοχή γύρω από το ενεργό κέντρο, καθιστώντας το προσβάσιμο στα υποστρώματα (Εικόνα 3.2).<sup>94,95</sup>



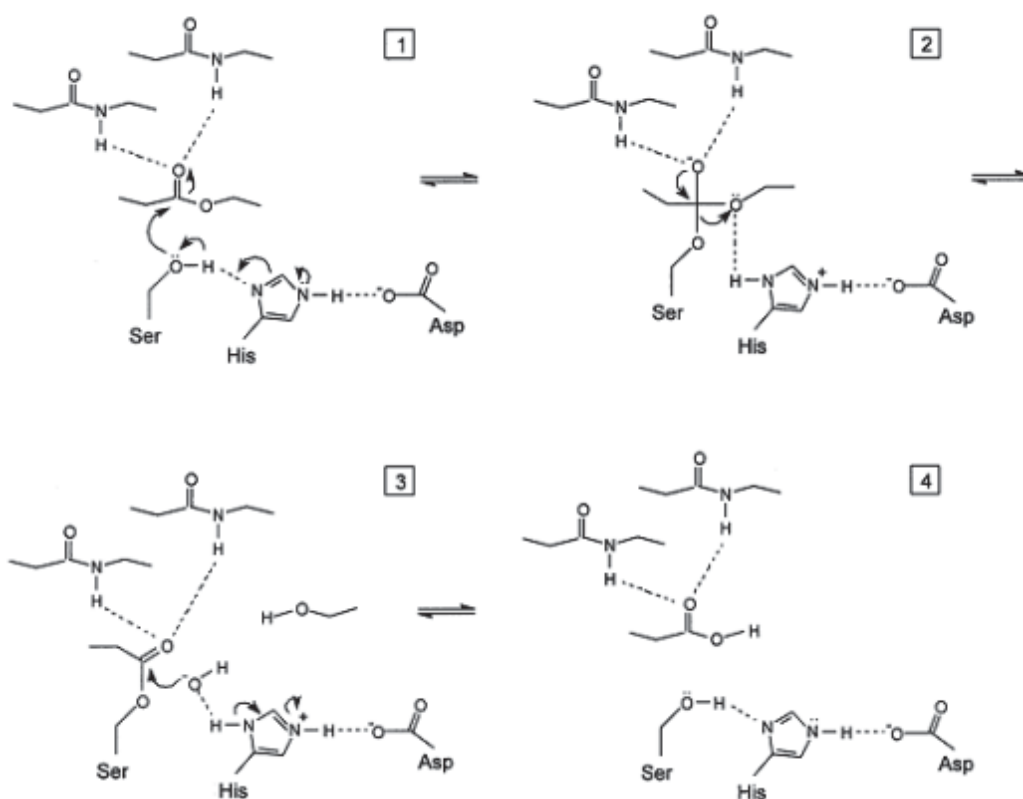
**Εικόνα 3.2.** Απεικόνιση της δομής της λιπάσης από *Candida rugosa* στην ανοιχτή διαμόρφωση (κόκκινο χρώμα) και στην κλειστή διαμόρφωση (μπλε χρώμα) (Protein Data Bank: 1CRL) (PyMol).

### 3.1.2. Καταλυτικός μηχανισμός

Οι λιπάσες είναι υδρολάσες που δρουν στους καρβοξυλεστερικούς δεσμούς που υπάρχουν στα ακυλογλυκερίδια προς παραγωγή λιπαρών οξέων και γλυκερόλης. Επιπλέον το ενεργό τους κέντρο αποτελείται από μία καταλυτική τριάδα (Ser-His-Asp/Glu), παρόμοια με αυτή των σερινοπρωτεασών και επομένως ο καταλυτικός τους μηχανισμός παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες. Ο μηχανισμός υδρόλυσης πραγματοποιείται σε δύο στάδια (Εικόνα 3.3).

Πιο συγκεκριμένα η υδρόλυση του υποστρώματος ξεκινά με μία πυρηνόφιλη προσβολή του οξυγόνου του υδροξυλίου της καταλυτικής σερίνης στον καρβονυλικό άνθρακα του εστερικού δεσμού του υποστρώματος. Σχηματίζεται έτσι ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο το οποίο χαρακτηρίζεται από αρνητικό φορτίο στο καρβονυλικό οξυγόνο του

εστέρα και τέσσερα άτομα συνδεδεμένα στον καρβονυλικό άνθρακα σε τετραεδρική διάταξη. Το υποστρώμα σταθεροποιείται στην μεταβατική αυτή κατάσταση μέσω δεσμών υδρογόνου μεταξύ του αρνητικά φορτισμένου οξυγόνου του τετραεδρικού ενδιάμεσου και αμινομάδων της κύριας αλυσίδας (οπή οξυανιόντος). Η σταθεροποίηση της τετραεδρικής δομής οδηγεί σε μείωση της ενέργειας που απαιτείται για την ενεργοποίηση της αντίδρασης. Η πυρηνόφιλη προσβολή από την σερίνη ενισχύεται από την καταλυτική ιστοιδίνη στην οποία μεταφέρεται ένα πρωτόνιο από το υδροξύλιο της σερίνης. Αυτή η μεταφορά πρωτονίου διευκολύνεται από το καταλυτικό οξύ, το οποίο προσανατολίζει με ακρίβεια τον ιμιδαζολικό δακτύλιο της ιστοιδίνης και εν μέρει εξουδετερώνει το φορτίο που αναπτύσσεται σ' αυτό.



**Εικόνα 3.3.** Καταλυτικός μηχανισμός της υδρολυτικής δράσης λιπασών (Πηγή Jaeger et al., 1999).<sup>92</sup>

Στην συνέχεια το πρωτόνιο μεταφέρεται στο εστερικό οξυγόνο με αποτέλεσμα την σχάση του εστερικού δεσμού. Σ' αυτό το σημείο το οξικό τμήμα του υποστρώματος και η πυρηνόφιλη σερίνη εστεροποιούνται δημιουργώντας έτσι ένα ομοιοπολικό ενδιάμεσο, ενώ το αλκοολικό τμήμα του υποστρώματος αποχωρεί. Το επόμενο στάδιο είναι το στάδιο της απο-ακυλίωσης, στο οποίο ένα μόριο νερού υδρολύει το ομοιοπολικό ενδιάμεσο. Η

καταλυτική ιστιδίνη ενεργοποιεί αυτό το μόριο νερού αποσπώντας του ένα πρωτόνιο. Το προκύπτον ιόν υδροξυλίου (OH-) προσβάλλει τον καρβονυλικό άνθρακα της ακυλομάδας που συνδέεται ομοιοπολικά με την σερίνη. Και πάλι σχηματίζεται ένα τετραεδρικό ενδιάμεσο, αρνητικά φορτισμένο το οποίο σταθεροποιείται από αλληλεπιδράσεις με την οπή οξυανιόντος. Έπειτα η ιστιδίνη δίνει ένα πρωτόνιο στο οξυγόνο της καταλυτικής σερίνης, η οποία στην συνέχεια απελευθερώνει το άκυλο συστατικό. Με την απελευθέρωση του άκυλο δότη το ένζυμο είναι έτοιμο για το επόμενο προς υδρόλυση υπόστρωμα.<sup>96</sup>

### **3.1.3. Εφαρμογές λιπασών**

Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των λιπασών όπως η σταθερότητα, η εκλεκτικότητα και η ευκολία στην μαζική τους παραγωγή, τις καθιστούν μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες ενζύμων που χρησιμοποιούνται στην βιομηχανία. Μια από τις σημαντικότερες εφαρμογές λιπασών στην βιομηχανία αποτελεί η τροποποίηση λιπών και ελαίων καθώς επίσης και η παραγωγή προϊόντων υψηλής διατροφικής αξίας, ενώ τα τελευταία χρόνια χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Επιπλέον βρίσκουν εφαρμογή στην βυρσοδεψία, στην κλωστοϋφαντουργία, στην βιομηχανία απορρυπαντικών, χαρτιού, σύνθεσης εξειδικευμένων χημικών, καλλυντικών, φαρμάκων καθώς επίσης και στην αποδόμηση αποβλήτων. Λιπάσες χρησιμοποιούνται επίσης και σε ιατρικές εφαρμογές ως διαγνωστικά εργαλεία για παθήσεις που σχετίζονται με το πάγκρεας και την καρδιά.<sup>88</sup>

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>

### Βιοκατάλυση σε μη συμβατικά μέσα

---



#### 4.1. Εισαγωγή

Για μεγάλο χρονικό διάστημα επικρατούσε η άποψη ότι τα ένζυμα παραμένουν καταλυτικά ενεργά σε συνθήκες παρόμοιες με αυτές του φυσικού τους περιβάλλοντος, δηλαδή σε υδατικά διαλύματα και κάτω από ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας και πίεσης. Ωστόσο στα τέλη της δεκαετίας του εβδομήντα ο Klibanon πραγματοποίησε την εστεροποίηση της Ν-ακετυλ-Ι-τρυπτοφάνης σε χλωροφόρμιο αποδεικνύοντας ότι τα ένζυμα παραμένουν καταλυτικά ενεργά ακόμη και σε οργανικούς διαλύτες.<sup>97</sup> Έτσι, αυτό που στην αρχή ακουγόταν αρκετά απρόσμενο τελικά αποδείχθηκε ότι σ' αυτές τις «μη φυσικές» συνθήκες τα ένζυμα λειτουργούν καλύτερα απ' ότι κάτω από τις φυσικές τους συνθήκες.<sup>98</sup>

Το μεγάλο ενδιαφέρον για την πραγματοποίηση βιοκαταλυτικών αντιδράσεων σε μη συμβατικά μέσα, προέρχεται από το γεγονός πως τα μέσα αυτά αποτελούσαν μία εναλλακτική που πλεονεκτεί της χρήσης ενζύμων στο νερό. Συγκεκριμένα η χρήση μη συμβατικών μέσων, δηλαδή μέσων με χαμηλή ή μηδενική περιεκτικότητα σε νερό σε ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις, οδηγεί σε αύξηση της σταθερότητας των ενζύμων και της διαλυτότητας υδρόφοβων υποστρωμάτων, περιορίζει τις ανεπιθύμητες παράπλευρες αντιδράσεις και τις μικροβιακές επιμολύνσεις, διευκολύνει την ανάκτηση των προϊόντων, ενώ παράλληλα μετατοπίζει την θερμοδυναμική ισορροπία υδρολυτικών αντιδράσεων προς την κατεύθυνση της σύνθεσης.<sup>99</sup>

Η συνεχώς αυξανόμενη χρήση των ενζύμων σε μη συμβατικά μέσα προσέφερε πολυάριθμες νέες εφαρμογές στην βιοτεχνολογική παραγωγή ενώσεων, οι οποίες δεν ήταν εφικτό να πραγματοποιηθούν σε υδατικά μέσα.<sup>100</sup> Αυτές οι αντιδράσεις περιλαμβάνουν : την σύνθεση ή τον διαχωρισμό χειρόμορφων ενώσεων,<sup>101</sup> την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας,<sup>102</sup> την τροποποίηση λιπών και ελαίων,<sup>103</sup> την σύνθεση αρωματικών εστέρων και πρόσθετων τροφίμων,<sup>104</sup> την παραγωγή βιοαποικοδομήσιμων πολυμερών<sup>105</sup> και την παραγωγή πεπτιδίων και πρωτεϊνών.<sup>106</sup>

Εκτός όμως από τα σημαντικά πλεονεκτήματα που παρουσιάζει η βιοκατάλυση σε μη συμβατικά μέσα δεν θα πρέπει να παραληφθούν και οι διάφορες δυσκολίες που προκύπτουν από την εφαρμογή τους, όπως η μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα και σταθερότητα σ' αυτά τα μέσα συγκριτικά με αυτή των υδατικών μέσων καθώς επίσης και η πολυπλοκότητα του βιοκαταλυτικού συστήματος. Διάφορες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί με σκοπό την επίλυση των προαναφερόμενων προβλημάτων οι οποίες περιλαμβάνουν τεχνικές τροποποίησης των ενζύμων (λυοφυλίωση, ακινητοποίηση)<sup>107,108</sup> καθώς επίσης και τεχνικές της πρωτεϊνικής μηχανικής (τοποκατευθυνόμενη μεταλλαξιγένεση).<sup>109</sup>

Έχει παρατηρηθεί ότι, οι καταλυτικές ιδιότητες των ενζύμων στα μη συμβατικά μέσα εξαρτώνται από ποικίλες παραμέτρους. Μία από τις σημαντικότερες αποτελεί η περιεκτικότητα του συστήματος σε νερό, το οποίο μπορεί να επηρεάσει την δραστηριότητα των ενζύμων με ποικίλους τρόπους: είτε τροποποιώντας την δομή του ενζύμου μέσω μη ομοιοπολικών δεσμών και διατάραξης των δεσμών υδρογόνου, είτε τροποποιώντας την διάχυση των υποστρωμάτων, ενώ παράλληλα μπορεί να επηρεάσει και την θερμοδυναμική ισορροπία της αντίδρασης. Η πολύ χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό γενικά μειώνει την ενζυμική δραστηριότητα, ενώ μία υψηλή περιεκτικότητα μπορεί επίσης να μειώσει την ταχύτητα της αντίδρασης προκαλώντας συσσωμάτωση των μορίων του ενζύμου και περιορισμούς στην διάχυση. Η βέλτιστη ποσότητα νερού στο σύστημα συχνά κυμαίνεται σε ένα μικρό εύρος. Συχνά παρατηρείται ένα μέγιστο στην ενζυμική δραστηριότητα κάθε ενζύμου για μια συγκεκριμένη ποσότητα νερού. Η ποσοτικοποίηση της περιεκτικότητας του νερού που υπάρχει σε μία αντίδραση πραγματοποιείται μέσω χρήσης της θερμοδυναμικής παραμέτρου της ενεργότητας του νερού ( $a_w$ ), η οποία ορίζεται ως ο λόγος της πίεσης ατμών του νερού σε διάλυμα ( $p$ ) προς την πίεση ατμών του καθαρού νερού ( $p^*$ ) στην ίδια θερμοκρασία ( $a_w=p/p^*$ ).<sup>110,111</sup> Η βέλτιστη ενεργότητα του νερού δεν είναι μόνο σημαντική για την διατήρηση της καταλυτικής δραστηριότητας ενός ενζύμου αλλά και για την επίτευξη υψηλών αποδόσεων και σταθερότητας του βιοκαταλύτη στην αντίδραση.



Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί για την ρύθμιση της ενεργότητας του νερού  $a_w$  σε ένα σύστημα βιοκατάλυσης, όπως η χρήση κορεσμένων διαλυμάτων αλάτων και,<sup>111</sup> η χρήση αισθητήρων<sup>112</sup> ή ενυδατωμένων αλάτων.<sup>113</sup> Ακόμα και στην περίπτωση των άνυδρων διαλυτών το νερό δεν απουσιάζει από το περιβάλλον του ενζύμου. Μόρια νερού είναι επιλεκτικά και ισχυρά προσδεδεμένα στην επιφάνεια του ενζύμου απαραίτητα για να διατηρεί την φυσική του διαμόρφωση και την καταλυτική του δράση. Αυτά τα μόρια νερού καλούνται bound water, ώστε να διαχωρίζονται από το bulk water, που αντιπροσωπεύει τα μόρια του νερού που υπάρχουν στο σύστημα.

Μία ακόμη παράμετρος που επιδρά στα καταλυτικά χαρακτηριστικά των ενζύμων σε μη συμβατικά μέσα είναι η φύση του διαλύτη, η οποία μπορεί να επιδρά τροποποιώντας τη δομή, τη σταθερότητα, και την εκλεκτικότητα των ενζύμων. Επιπλέον, τα μέσα αυτά μπορεί να τροποποιούν την αλληλεπίδραση ενζύμου-υποστρώματος καθώς η υψηλή διαλυτότητα των υποστρωμάτων στον διαλύτη οδηγεί σε μείωση της διαθεσιμότητάς τους προς το ενεργό κέντρο του ενζύμου.<sup>114</sup> Από τις διάφορες ιδιότητες μη συμβατικών μέσων που έχουν μελετηθεί, ο λογάριθμος του συντελεστή κατανομής  $\log P$  περιγράφει ικανοποιητικά τη σχέση επίδρασης μεταξύ της δραστηριότητας του ενζύμου και της φύσης του διαλύτη.<sup>115</sup> Ο συντελεστής κατανομής  $\log P$  αντιστοιχεί σε ένα πρότυπο κατανομής σε ένα σύστημα οκτανόλης/νερού και αποτελεί μέτρο της υδροφοβικότητας του διαλύτη. Έχει αναφερθεί ότι σε σχετικά μη πολικούς υδρόφοβους διαλύτες ( $\log P > 2$ ) τα ένζυμα εμφανίζουν υψηλή δραστηριότητα, ενώ αντίθετα, μειωμένη ενζυμική δραστηριότητα εμφανίζεται σε υδρόφιλους διαλύτες ( $\log P < 2$ ). Η εξήγηση αυτού του φαινομένου βασίζεται στην ικανότητα των υδρόφιλων οργανικών διαλυτών να αποσπών τα απαραίτητα μόρια νερού από την επιφάνεια του ενζύμου, τα οποία όπως αναφέρθηκε είναι κρίσιμα για την λειτουργία του.<sup>116,117</sup>

## 4.2. Κατηγορίες μη συμβατικών μέσων

Τα διάφορα μη συμβατικά συστήματα που χρησιμοποιούνται για την επίτευξη ενζυμικών αντιδράσεων διακρίνονται στις ακόλουθες κατηγορίες:

### Μονοφασικά συστήματα νερού-οργανικού διαλύτη (μη αναμίξιμου με το νερό) (water:water miscible)

Τα συστήματα αυτά προέρχονται από την ανάμιξη διαλυτών αναμίξιμων με το νερό όπως η μεθανόλη, η ακετόνη, η αιθανόλη κ.α. βελτιώνοντας την διαλυτότητα μη πολικών

υποστρώματων. Η αυξημένη διαλυτότητα των υδρόφοβων υποστρώματων μειώνει σημαντικά τους περιορισμούς μεταφοράς μάζας αυξάνοντας την ταχύτητα της αντίδρασης, ωστόσο, η παρουσία μεγάλης ποσότητας οργανικού διαλύτη >50 % (v/v) μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου.<sup>118</sup>

#### ✚ Διφασικά συστήματα νερού-οργανικού διαλύτη (water:water immiscible)

Τα συστήματα αυτά αποτελούνται από δύο φάσεις, μία υδατική στην οποία βρίσκεται το ένζυμο και μία φάση οργανικού διαλύτη μη αναμίξιμου με το νερό. Η ενζυμική αντίδραση πραγματοποιείται στην υδατική φάση, όπου περιέχεται το ένζυμο. Τα υδρόφοβα υποστρώματα και προϊόντα βρίσκονται κυρίως στην οργανική φάση και μερικώς στη υδατική. Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά αυτών των διφασικών συστημάτων είναι η εύκολη αναγέννηση του ενζύμου και ο εύκολος διαχωρισμός του από τα προϊόντα. Διφασικά συστήματα έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή εστέρων καθώς ευνοούν την μετατόπιση της θερμοδυναμικής ισορροπίας της αντίδρασης προς την κατεύθυνση της σύνθεσης πάρα της υδρόλυσης.<sup>119</sup>

#### ✚ Άνυδρα οργανικά συστήματα (anhydrous organic solvents)

Σε αυτά τα συστήματα το ελεύθερο νερό έχει απομακρυνθεί, ώστε η ποσότητά του στο σύστημα να βρίσκεται κάτω από το 0.01% w/v. Το ένζυμο βρίσκεται υπό μορφή λυοφιλιωμένης σκόνης ή ακινητοποιημένο σε κάποιο στερεό φορέα, ενώ έχει παρατηρηθεί ότι εμφανίζει υψηλότερη δραστηριότητα σε υδρόφοβους διαλύτες συγκριτικά με τους υδρόφιλους. Η διατήρηση των καταλυτικών του ιδιοτήτων οφείλεται στο γεγονός ότι η δομή του πρωτεϊνικού μορίου στα συστήματα αυτά παρουσιάζει μικρότερη ευκαμψία και κατά συνέπεια μικρότερη τάση για μετουσίωση σε σχέση με αυτή που παρατηρείται στα μίγματα νερού και οργανικού διαλύτη.<sup>120</sup>

#### ✚ Υπερκρίσιμα ρευστά (supercritical fluids)

Κύριο χαρακτηριστικό των υπερκρίσιμων ρευστών αποτελεί το γεγονός ότι ορισμένες φυσικοχημικές τους ιδιότητες βρίσκονται μεταξύ των αντίστοιχων ιδιοτήτων των αερίων και των υγρών ενώ εξαρτώνται σημαντικά από την εξωτερική πίεση. Σημαντικό πλεονέκτημα της εφαρμογής των υπερκρίσιμων ρευστών στις βιοκαταλυόμενες αντιδράσεις αποτελεί το γεγονός ότι η ταχύτητα διάχυσης των υποστρώματων στο μέσο αυτό γίνεται χωρίς περιορισμούς ενώ η ανάκτηση του προϊόντος γίνεται εύκολα καθώς ο διαλύτης απομακρύνεται με απλή εκτόνωση.<sup>121</sup>

### ✚ **Αέρια μέσα (gas phase)**

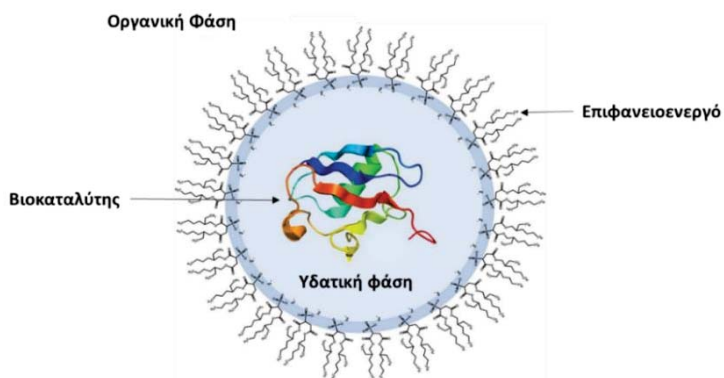
Σε αυτού του τύπου αντιδράσεις τα υποστρώματα βρίσκονται σε αέρια κατάσταση, ενώ ο βιοκαταλύτης σε στερεή (λυοφιλιωμένη σκόνη ή ακινητοποιημένος σε στερεό φορέα). Συχνά απαιτούνται υψηλές θερμοκρασίες ώστε να διατηρηθούν τα υποστρώματα στην αέρια κατάσταση γεγονός που προϋποθέτει ότι τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι θερμοσταθερά. Η ενζυμική αντίδραση είναι αποτέλεσμα της προσρόφησης των αερίων υποστρωμάτων στην στερεή επιφάνεια του ακινητοποιημένου βιοκαταλύτη.

### ✚ **Συστήματα ελεύθερα διαλυτών (solvent free system)**

Τα συστήματα αυτά αποτελούνται αποκλειστικά από τα αντιδρώντα και τον βιοκαταλύτη ο οποίος μπορεί να είναι ελεύθερος ή ακινητοποιημένος. Η αρχική ταχύτητα αυτών των συστημάτων εξαρτάται ιδιαίτερα από τον μοριακό λόγο των υποστρωμάτων και προϋποθέτει ότι τουλάχιστον ένα μέρος των υποστρωμάτων να είναι παρόν σε υγρή μορφή (ή αέρια, για αντιδράσεις αέριας φάσης). Η απουσία διαλύτη σ' αυτά τα συστήματα, διευκολύνει την βιοκατάλυση καθώς απλοποιείται η διαδικασία απομόνωσης των προϊόντων, μειώνοντας έτσι το κόστος της διαδικασίας. Επιπλέον τα συστήματα αυτά επιτρέπουν την χρήση υψηλών συγκεντρώσεων υποστρωμάτων οδηγώντας σε αύξηση της παραγωγικότητας.<sup>122,123</sup>

### ✚ **Αντίστροφα μικκύλια (reverse micelles)**

Τα αντίστροφα μικκύλια είναι μικρά συσσωματώματα μορίων μίας επιφανειοδραστικής ένωσης (π.χ. AOT), που περιβάλλουν μία πολική (κυρίως υδατική) φάση διεσπαρμένη σε μία μη πολική φάση (π.χ. μη πολικός οργανικός διαλύτης) (Εικόνα 5.1). Ο βιοκαταλύτης εντοπίζεται στο εσωτερικό του υδατικού πυρήνα προστατευμένος από τις ανεπιθύμητες επιδράσεις του οργανικού διαλύτη. Οι δυναμικές αυτές δομές μπορούν να ανταλλάσσουν τα συστατικά τους (βιοκαταλύτη, νερό, υποστρώματα, προϊόντα) μεταξύ τους αλλά και με τον οργανικό διαλύτη. Μία από τις σημαντικότερες εφαρμογές των αντίστροφων μικκυλίων είναι στην περίπτωση των λιπασών, όπου τα υποστρώματα είναι λιπόφιλα και η ποσότητα του νερού που απαιτείται για την ενζυμική αντίδραση είναι πολύ χαμηλή.<sup>124,125</sup>



**Εικόνα 4.1.** Σχηματική αναπαράσταση αντίστροφων μικκυλίων (Πηγή Nucci et al., 2011).<sup>126</sup>

### ✚ Ιοντικά υγρά (ionic liquids)

Κατά την διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον έχει προσελκύσει η αναζήτηση διαλυτών, φιλικών προς το περιβάλλον με σκοπό την βελτίωση των βιομηχανικών διεργασιών. Μία νέα κατηγορία διαλυτών, τα ιοντικά υγρά (άλατα που παραμένουν υγρά σε θερμοκρασία δωματίου) έχει αναπτυχθεί στα πλαίσια των αρχών της πράσινης χημείας.<sup>45,127,128</sup> Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά, οι ιδιότητες και οι εφαρμογές των ιοντικών υγρών θα αναλυθούν στο κεφάλαιο που ακολουθεί.



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5<sup>ο</sup>

## Ιοντικά Υγρά

---



### 5.1. Εισαγωγή

Μέσα στο πλαίσιο κάλυψης των αυξημένων αναγκών για πράσινες τεχνολογίες σε βιομηχανικές διεργασίες, μία νέα κατηγορία διαλυτών αναπτύχθηκε γνωστή με τον όρο ιοντικά υγρά.<sup>127,129</sup> Τα ιοντικά υγρά είναι οργανικά άλατα, αποτελούμενα μόνο από ιόντα, τα οποία βρίσκονται σε υγρή κατάσταση σε θερμοκρασία δωματίου. Το χαμηλό σημείο τήξεώς τους επιτυγχάνεται συνδυάζοντας ογκώδη ασύμμετρα κατιόντα με ασθενώς συντονισμένα ανιόντα. Εξ' αιτίας της αμελητέας τάσης ατμών που εμφανίζουν τα ιοντικά υγρά μπορούν να θεωρούνται ως η «πράσινη» εναλλακτική για την αντικατάσταση των τοξικών και εύφλεκτων οργανικών διαλυτών.<sup>130</sup> Το έντονο ενδιαφέρον για αυτούς τους διαλύτες προέρχεται από το γεγονός ότι οι ιδιότητές τους μπορούν να τροποποιηθούν και να προσαρμοστούν ανάλογα με τις απαιτήσεις της εκάστοτε διεργασίας επιλέγοντας απλά τους κατάλληλους συνδυασμούς κατιόντων και ανιόντων.<sup>129</sup> Οι φυσικές, χημικές και βιολογικές τους ιδιότητες εξαρτώνται κυρίως από την δομή του κατιόντος (η συμμετρία και το μήκος του αλκυλο υποκαταστάτη, η παρουσία υδρόφοβων ομάδων, κλπ) καθώς επίσης και από τον βαθμό απεντοπισμού του φορτίου του ανιόντος.<sup>131</sup>

Ένα από τα χαρακτηριστικά που συνοδεύει τα ιοντικά υγρά είναι η ποικιλία. Ποικιλία στον συνδυασμό ανιόντων και κατιόντων, στον τρόπο σύνθεσης και καθαρισμού, στην ποιότητα των προσμίξεων, στις ιδιότητες, στον τρόπο χρήσης και στις εφαρμογές. Εξ' αιτίας αυτής της ιδιαίτερης ποικιλίας των ιοντικών υγρών είναι δύσκολο να γίνουν

γενικεύσεις τόσο στις φυσικές τους ιδιότητες όσο και στην χρήση τους. Μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως διαλύτες, ως πολυλειτουργικές ενώσεις (διαλύτες και προσδέτες ή διαλύτες και καταλύτες) καθώς επίσης και ως σταθεροποιητές σε καταλύτες.

## 5.2. Ιδιότητες των Ιοντικών υγρών

Δεδομένου του μεγάλου εύρους των ιοντικών υγρών και των εφαρμογών τους είναι δύσκολες οι γενικεύσεις στις ιδιότητες τους, ενώ ορισμένες που είχαν περιγραφεί πριν χρόνια αποτελούν σήμερα αντικείμενο αμφισβήτησεων. Ωστόσο ιδιότητες όπως η ιοντική τους φύση και το χαμηλό σημείο τήξεως ( $<100^{\circ}\text{C}$ ) είναι αναμφισβήτητες και καθολικά αποδεκτές. Στην συνέχεια παρουσιάζονται μερικές από τις χαρακτηριστικές ιδιότητες των ιοντικών υγρών.

**Σημείο τήξεως:** Το σημείο τήξεως των ιοντικών υγρών έχει βρεθεί ότι επηρεάζεται σημαντικά από το φορτίο, το μέγεθος και την κατανομή του φορτίου σε κάθε ιόν. Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, η αύξηση της συμμετρίας των ιόντων οδηγεί σε αύξηση του σημείου τήξεως των ιοντικών υγρών. Επιπλέον, η αύξηση του μεγέθους των ιόντων οδηγεί σε αύξηση της διασποράς του φορτίου και επομένως λιγότερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιόντων με αποτέλεσμα των μείωση του σημείου τήξεως.<sup>132,133</sup>

**Θερμική σταθερότητα:** Τα περισσότερα ιοντικά υγρά εμφανίζουν υψηλή θερμική σταθερότητα, καθώς η θερμική αποδιάταξη μπορεί να πραγματοποιηθεί ακόμη και σε θερμοκρασίες πάνω από τους  $400^{\circ}\text{C}$ . Η θερμική αποδιάταξη εξαρτάται σημαντικά από την φύση του ανιόντος, καθώς η μείωση της υδροφιλικότητας του ανιόντος οδηγεί σε θερμικά πιο σταθερά ιοντικά υγρά. Η ιδιότητα αυτή των ιοντικών υγρών επιτρέπει την εφαρμογή τους σε διαδικασίες όπου απαιτούνται υψηλές θερμοκρασίες.<sup>134</sup>

**Ιξώδες:** Το ιξώδες ενός ιοντικού υγρού αποτελεί μία παράμετρο η οποία επηρεάζει φαινόμενα όπως τη διάχυση, την ανάμιξη, την ανάδευση και τις λειτουργίες άντλησης σε μία διεργασία. Το ιξώδες των ιοντικών υγρών είναι σημαντικά μεγαλύτερο από αυτό του νερού και των οργανικών διαλυτών καθώς κυμαίνεται μεταξύ 10 με 1110 cP για θερμοκρασίες  $20\text{-}25^{\circ}\text{C}$ . Η τιμή του ιξώδους φαίνεται να εξαρτάται τόσο από την επιλογή του ανιόντος όσο και του κατιόντος, καθώς επίσης και από την θερμοκρασία.<sup>135</sup> Η παρουσία προσμίξεων έχει επίσης μία σημαντική επίδραση στο ιξώδες των ιοντικών καθώς η

παρουσία νερού και οργανικών διαλυτών οδηγεί σε μείωση του ιξώδους ενώ η παρουσία ιόντων χλωριδίου οδηγεί σε αύξηση.<sup>136</sup>

**Πυκνότητα:** Η πυκνότητα είναι μία από τις ιδιότητες πιο χρησιμοποιείται πιο συχνά για τα ιοντικά υγρά. Γενικά τα ιοντικά υγρά έχουν μεγαλύτερη πυκνότητα από το νερό, η οποία κυμαίνεται από 1 έως 1.6 g cm<sup>-3</sup> σε θερμοκρασία δωματίου. Αύξηση της μάζας του ανιόντος οδηγεί σε αύξηση της πυκνότητας του ιοντικού υγρού, ενώ αντίθετα η αύξηση στην μάζα του κατιόντος οδηγεί σε μείωση.<sup>132,137</sup>

**Πολικότητα:** Μία από τις σημαντικές ιδιότητες ενός διαλύτη είναι ο τρόπος με τον οποίον αλληλεπιδρά με τις διαλυμένες ουσίες. Για τους μοριακούς διαλύτες η ιδιότητα αυτή αναφέρεται ως πολικότητα και εκφράζεται με την παράμετρο της διηλεκτρικής σταθεράς. Η διηλεκτρική σταθερά όμως δεν είναι αρκετή για τον χαρακτηρισμό της πολικότητας στα ιοντικά υγρά καθώς πρόκειται για μια πιο πολύπλοκη παράμετρο που λαμβάνει υπόψη όλες τις πιθανές αλληλεπιδράσεις μεταξύ διαλύτη και διαλυμένης ουσίας. Γι' αυτό το λόγο επιπλέον μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για τον προσδιορισμό της πολικότητας των ιοντικών υγρών οι οποίες περιλαμβάνουν την εμπειρική παράμετρο πολικότητας γνωστή ως Reichard's dye (E<sub>T</sub><sup>N</sup>), την παράμετρο της φθορίζουσας χρωστικής Nile Red, το φάσμα φθορισμού πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων κ.α. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν βάσει αυτών των μεθόδων κατατάσσουν τα ιοντικά υγρά στους πολικούς διαλύτες με πολικότητα παρόμοια με αυτή των μικρών αλκοολών και άλλων πολικών μη πρωτικών διαλυτών όπως το DMSO και το DMF.<sup>138,139</sup>

**Τάση ατμών:** Ενδιαφέρουσα ιδιότητα των ιοντικών υγρών αποτελεί η χαμηλή τάση ατμών που εμφανίζουν. Στην ιδιότητα αυτή βασίστηκε και το μεγάλο ενδιαφέρον για αυτή την κατηγορία των διαλυτών, ως η «πράσινη» εναλλακτική έναντι των έντονα πτητικών οργανικών διαλυτών. Έτσι με την χρήση ιοντικών υγρών αποφεύγεται η εκπομπή βλαβερών οργανικών συστατικών (VOCs) στην ατμόσφαιρα συμβάλλοντας θετικά στην μείωση της ατμοσφαιρικής ρύπανσης.<sup>140,141</sup>

**Διαλυτότητα – διαλυτική ικανότητα:** Τα ιοντικά υγρά έχουν την ικανότητα να διαλυτοποιούν ένα μεγάλο εύρος ενώσεων, οι οποίες είναι αδιάλυτες στο νερό και στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η κυτταρίνη και ορισμένες ενώσεις με φαρμακευτική δράση.<sup>142</sup> Σημαντική παράμετρο αποτελεί και η αναμιξιμότητα των ιοντικών υγρών με άλλους διαλύτες. Οργανικοί διαλύτες όπως το εξάνιο και οι αιθέρες δεν είναι αναμίξιμοι με τα ιοντικά υγρά σε αντίθεση με πολικούς διαλύτες όπως οι αλκοόλες, οι κετόνες, το διγλωρομεθάνιο κ.α. οι οποίοι είναι πλήρως

αναμιξίμοι.<sup>143,144</sup> Όσον αφορά στην αναμιξιμότητα των ιοντικών υγρών με το νερό, τα ιοντικά υγρά μπορούν να διαιρεθούν σε υδρόφοβα (water immiscible) και υδρόφιλα (water miscible).<sup>145</sup> Η διαλυτότητα του νερού εξαρτάται κυρίως από τα ανιόντα των ιοντικών υγρών. Η ικανότητα ανάπτυξης ισχυρών δεσμών υδρογόνου μεταξύ των μορίων του νερού και του ανιόντος μπορεί να καθορίσει την διαλυτότητα του νερού στο ιοντικό υγρό. Επιπλέον, η αναμιξιμότητα ή μη των ιοντικών υγρών με το νερό και τους οργανικούς διαλύτες επιτρέπει την εφαρμογή τους σε διαφασικά συστήματα.<sup>146</sup>

### 5.3. Ιστορία των Ιοντικών υγρών

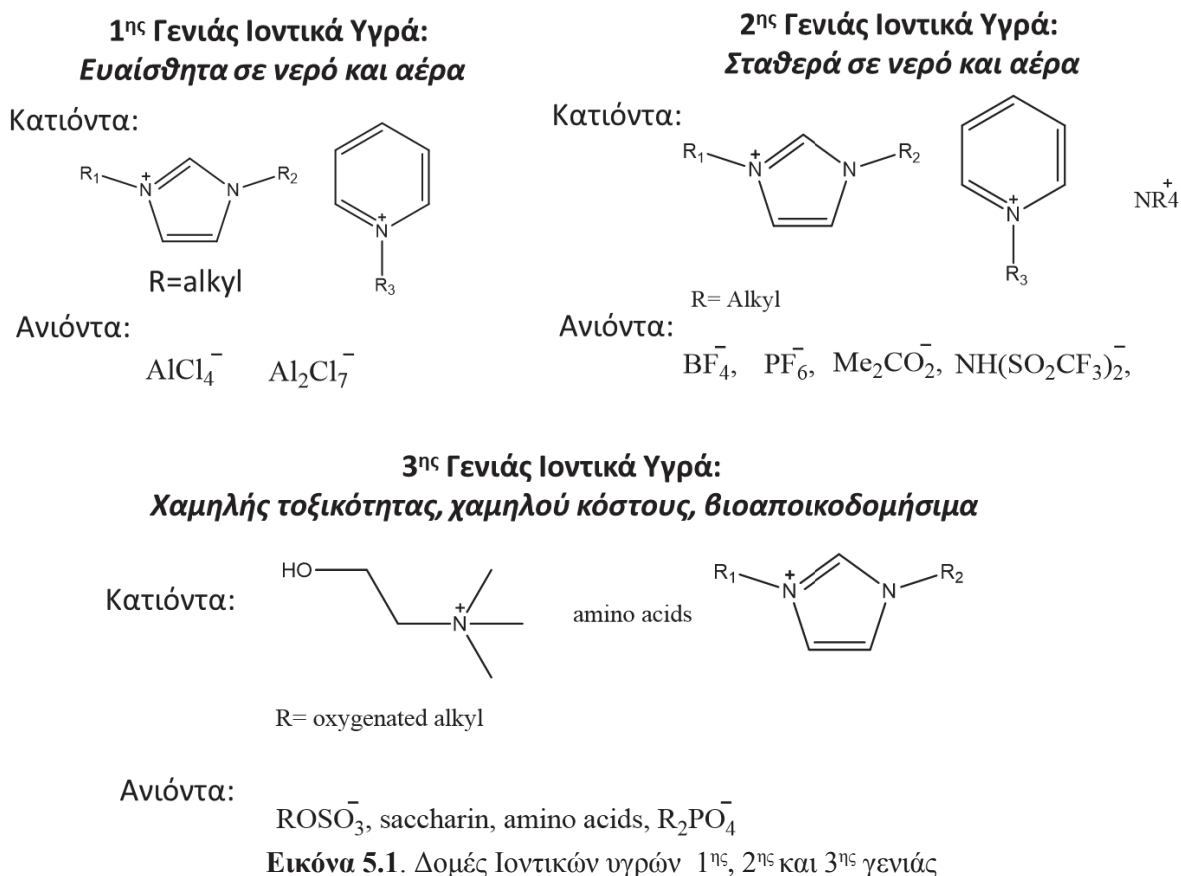
Παρά το γεγονός ότι τα ιοντικά υγρά συνιστούν ένα ταχέως αναπτυσσόμενο τομέα στην έρευνα, η ιστορία τους ξεκινά ήδη από το 1914 όταν περιγράφηκε το πρώτο ιοντικό υγρό (νιτρικό αιθυλαμμώνιο,  $[\text{EtNH}_3][\text{NO}_3]$ ) από τον Walten με σημείο τήξης  $12.5\text{ }^\circ\text{C}$ .<sup>147</sup> Επιπλέον, το 1934, ένα δίπλωμα ευρεσιτεχνίας αναφέρεται σε πυριδινικά ιοντικά υγρά, που μπορούσαν να διαλυτοποιήσουν ποσότητες κυτταρίνης.<sup>148</sup> Ωστόσο σε καμία από τις δύο περιπτώσεις δεν μελετήθηκαν εκτενέστερα οι δυνατότητες και η σπουδαιότητα των ευρημάτων, μέχρι την δεκαετία του 1960, όπου και ταυτοποιήθηκε η πρώτη γενιά των ιοντικών υγρών.

Τα πρώτης γενιάς ιοντικά υγρά αποτελούνταν κυρίως από κατιόντα όπως διαλκυλιμιδαζολικά και αλκυλοπυριδινικά παράγωγα και ανιόντα όπως αργιλικά άλατα χλωρίου και άλλα αλογονίδια μετάλλων. Ωστόσο αυτά τα ιοντικά υγρά ήταν ασταθή παρουσία νερού και αέρα, οδηγώντας στην ανάπτυξη μίας δεύτερης γενιάς ιοντικών υγρών την δεκαετία του 1990. Τα δεύτερης γενιάς ιοντικά υγρά αποτελούνται κυρίως από ασθενώς συντονισμένα ανιόντα όπως το τετραφθοριούχο βόριο ( $\text{BF}_4$ ) και ο εξαφθοριούχος φώσφορος ( $\text{PF}_6$ ), τα οποία είναι πιο σταθερά τόσο στο νερό όσο και στον αέρα.<sup>149</sup> Τα περισσότερα από αυτά τα ιοντικά υγρά είναι υδρόφοβοι αδρανείς διαλύτες με ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των συστατικών τους. Ωστόσο, τόσο η τοξικότητα όσο και η βιοαποικοδομησιμότητα των ιοντικών υγρών αυτής της γενιάς τέθηκε υπό έντονη αμφισβήτηση, γι' αυτό και κρίθηκε αναγκαία η αντικατάστασή τους.

Πρόσφατα μία νέα, τρίτη γενιά ιοντικών υγρών εμφανίστηκε, η οποία αποτελείται από συστατικά πολύ διαφορετικά από τις προηγούμενες γενιές, προκειμένου να ικανοποιήσει την ανάγκη για περιβαλλοντικά φιλικές διεργασίες. Οι δομές των ιοντικών υγρών τρίτης γενιάς συντίθενται από βιοαποικοδομήσιμα και εύκολα διαθέσιμα ιόντα, όπως



φυσικές βάσεις (π.χ. χολίνη), αμινοξέα και φυσικώς απαντώμενα καρβοξυλικά οξέα<sup>150,151</sup>(Εικόνα 5.1).



## 5.4. Τοξικότητα –Βιοαποικοδομισιμότητα Ιοντικών υγρών

Μία από τις σημαντικότερες ιδιότητες των ιοντικών υγρών, η οποία αποτέλεσε καθοριστικό παράγοντα του «πράσινου» χαρακτήρα τους είναι η αμελητέα τάση ατμών τους. Ωστόσο, ο χαρακτηρισμός τους ως «πράσινοι» διαλύτες δεδομένης της αμελητέας τάσης ατμών τους κρίνεται επισφαλής και έχει αμφισβητηθεί από την επιστημονική κοινότητα. Η αυξανόμενη ανάπτυξη και χρήση των ιοντικών υγρών θα οδηγήσει αναπόφευκτα στην απόρριψή τους στο περιβάλλον, όπου εξ' αιτίας της υψηλής χημικής και θερμικής σταθερότητάς τους θα αποτελούν ανθεκτικούς ρυπαντές.<sup>152</sup> Κρίνεται, λοιπόν, αναγκαία η μελέτη της τοξικότητας τους, η οποία αποτελεί σημαντικό κριτήριο για την εφαρμογή τους στην βιομηχανία. Οι περισσότερες μελέτες μέχρι σήμερα αφορούν στις επιπτώσεις των 2<sup>ης</sup> γενιάς ιοντικών υγρών με ιμιδαζόλιο στο κατιόν τους σε οργανισμούς όπως φύκη, βακτήρια, μύκητες κ.α<sup>153</sup>

Τα αποτελέσματα αυτών των μελετών έδειξαν ότι η τοξικότητα των ιοντικών υγρών επηρεάζεται από 4 βασικούς παράγοντες: i) το μήκος της αλυσίδας του κατιόντος, ii) την παρουσία λειτουργικής ομάδας στο κατιόν (υδρόξυ-, -κυάνο-, φαίνυλ- ομάδα), iii) την φύση του ανιόντος και iv) την φύση του κατιόντος.<sup>154</sup>

Η αύξηση της τοξικότητας έχει βρεθεί ότι σχετίζεται σημαντικά με αύξηση της αλκυλικής αλυσίδας του κατιόντος τόσο για τα ιμιδαζολικά όσο και για τα πυριδινικά και τα αμμωνικά κατιόντα ιοντικών υγρών. Φαίνεται ότι οι μεγάλες και επομένως πιο λιπόφιλες πλευρικές αλυσίδες αλληλεπιδρούν σημαντικά με τις φωσφολιπιδικές μεμβράνες οδηγώντας σε αποδιοργάνωση προκαλώντας βλάβες στον υπό μελέτη οργανισμό.<sup>155,156</sup> Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί πως και η φύση του κατιόντος διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην τοξικότητα των ιοντικών υγρών. Έχει βρεθεί ότι τα φωσφορικά και τα τεταρτοταγή αμμωνιακά κατιόντα είναι λιγότερο τοξικά συγκριτικά με τα ιμιδαζολικά, ενώ σημαντικό παράγοντα για αυτές τις παρατηρήσεις φαίνεται να διαδραματίζει το είδος του οργανισμού και η κυτταρική σειρά που μελετάται.<sup>154</sup> Η παρουσία λειτουργικών ομάδων όπως π.χ. ομάδων  $-OH$  ή  $CH_3CH_2O-$  στο κατιόν φάνηκε να μειώνει την τοξικότητα των ιμιδαζολικών ιοντικών υγρών, ενώ όσον αφορά στην επίδραση του ανιόντος έχει βρεθεί ότι τα πιο λιπόφιλα και ασταθή ιόντα διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην τοξικότητα των ιοντικών υγρών κυρίως όταν συνδυάζονται με μικρής αλυσίδας κατιόντα.<sup>152,157</sup>

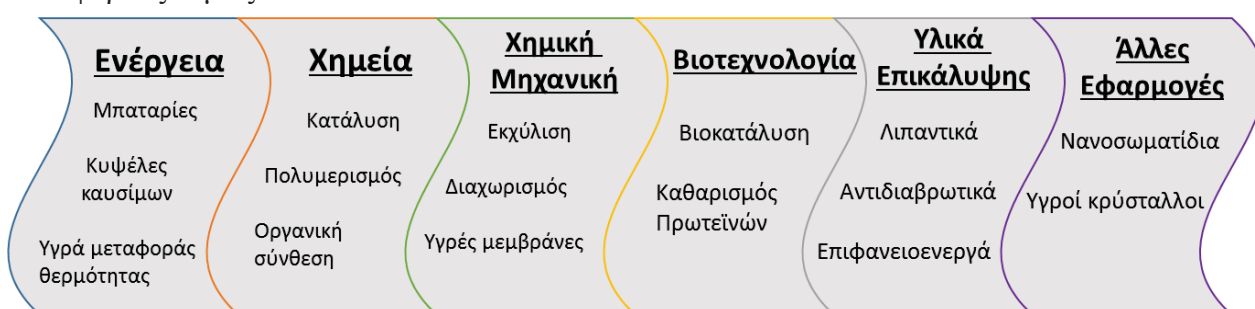
Μία ακόμα σημαντική παράμετρο που αποτελεί μέτρο της περιβαλλοντικής επιβάρυνσης χημικών ουσιών συνιστά η βιοαποικοδομησιμότητα τους. Έχει βρεθεί ότι το επίπεδο της βιοαποικοδομησιμότητας των ιοντικών υγρών εξαρτάται κυρίως από το κατιόν και λιγότερο από το ανιόν. Ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά με ανιόντα  $[BF_4]^-$  και  $[PF_6]^-$ , εμφανίζουν χαμηλά επίπεδα βιοαποικοδομησιμότητας, τα οποία αυξάνονται με την παρουσία εστέρα στην πλευρική αλυσίδα του κατιόντος, χωρίς όμως να μπορούν να χαρακτηριστούν ως άμεσα βιοαποικοδομήσιμα. Ο χαρακτηρισμός αυτός δόθηκε αργότερα σε ιοντικά υγρά με ανιόν το θειϊκό οκτύλιο.<sup>158,159</sup>

Ωστόσο τα αποτελέσματα τοξικότητας και βιοαποικοδομησιμότητας των 2<sup>ης</sup> γενιάς ιοντικών υγρών κατέδειξαν ότι ανάλογα με τα ιόντα απ' τα οποία αποτελούνται χαρακτηρίζονται από σχετικά έως αρκετά τοξικοί διαλύτες, με χαμηλά επίπεδα βιοαποικοδομησιμότητας. Για αυτό το λόγο και τα τελευταία χρόνια η έρευνα έχει στραφεί στην αναζήτηση ιοντικών υγρών που αποτελούνται από χαμηλής τοξικότητας, βιοαποικοδομήσιμα συστατικά όπως είναι τα αμινοξέα και φυσικές βάσεις όπως η χολίνη

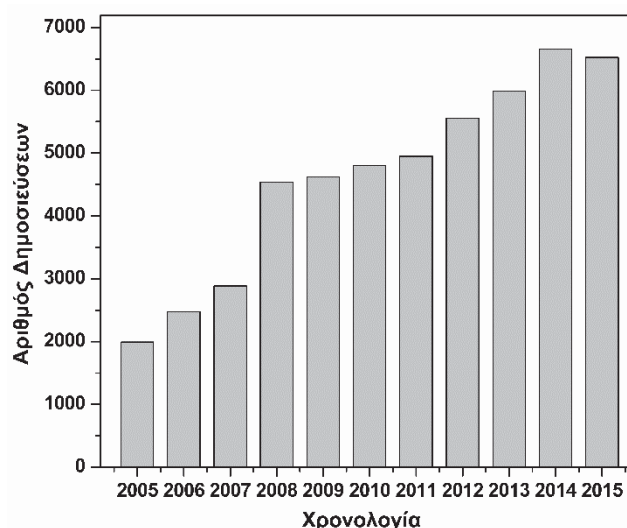
τα οποία αποτελούν μία πολλά υποσχόμενη κατηγορία συστατικών για την ανάπτυξη φιλικών προς το περιβάλλον διεργασιών.<sup>160</sup>

## 5.5. Εφαρμογές Ιοντικών υγρών

Παρ' όλο που η αρχική έρευνα των ιοντικών υγρών αφορούσε εφαρμογές ηλεκτροχημείας, τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά τους αποτέλεσαν κίνητρο και προσέλκυσαν το ερευνητικό ενδιαφέρον με σκοπό την διεύρυνση των εφαρμογών τους σε διάφορους τομείς. Στην Εικόνα 5.2. παρουσιάζονται συνοπτικά οι εφαρμογές των ιοντικών υγρών σε διάφορους τομείς.



Εικόνα 5.2. Εφαρμογές Ιοντικών Υγρών



Εικόνα 5.3. Αριθμός δημοσιεύσεων που αφορούν τα ιοντικά υγρά για την δεκαετία 2005-2015 (Πηγή [www.scopus.com](http://www.scopus.com)).

Η εκτεταμένη έρευνα που έχει γίνει στον τομέα των ιοντικών υγρών αποτυπώνεται στην ετήσια αύξηση του αριθμού των επιστημονικών άρθρων που δημοσιεύτηκαν την τελευταία δεκαετία (Εικόνα 5.3).

## 5.6. Βιοκατάλυση σε ιοντικά υγρά

Μία από τις σημαντικότερες εφαρμογές των ιοντικών υγρών, η οποία έχει προσελκύει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας και πραγματεύεται η παρούσα διατριβή, είναι η χρήση τους σε βιοκαταλυτικές διαδικασίες. Το πρώτο παράδειγμα εφαρμογής των ιοντικών υγρών στην βιοκατάλυση, αναφέρεται από τον Magnuson et al., το 1984 όπου μελετήθηκε η δραστικότητα και η σταθερότητα της αλκαλικής φασφατάσης σε υδατικά μίγματα του ιοντικού υγρού [EtNH<sub>3</sub>][NO<sub>3</sub>].<sup>161</sup> Ωστόσο λόγω της ελλιπούς γνώσης για τα ιοντικά υγρά την συγκεκριμένη χρονική περίοδο, η μελέτη αυτή δεν βρήκε επιστημονική ανταπόκριση για περαιτέρω διερεύνηση. Η αντιμετώπιση όμως αυτή άλλαξε 16 χρόνια αργότερα, καθώς όλο και περισσότεροι ερευνητές άρχισαν να ασχολούνται με ενζυμικές αντιδράσεις σε ιοντικά υγρά.

Σ' αυτές τις αρχικές μελέτες περιλαμβάνεται η εφαρμογή ενός διφασικού συστήματος νερού-ιοντικού υγρού [bmim][PF<sub>6</sub>] για τον βιομετασχηματισμό του 1,3-δικυανοβενζενίου από κύτταρα του μικροοργανισμού *Rhodococcus* R312. Η αντίδραση πραγματοποιείται στην υδατική φάση, όπου βρίσκονται τα κύτταρα του μικροοργανισμού, ενώ το ιοντικό υγρό λειτουργεί ως δεξαμενή για το υπόστρωμα και τα προϊόντα. Η ανάπτυξη αυτού του βιοκαταλυτικού συστήματος μείωσε τα προβλήματα τοξικότητας από την μέχρι τότε εφαρμογή οργανικών διαλυτών.<sup>162</sup> Παράλληλα την ίδια χρονιά, ο Russell και οι συνεργάτες του μελέτησαν την ενζυμικά καταλυόμενη από την θερμολυσίνη αντίδραση σύνθεσης της Ζ-ασπαρτάμης στο ιοντικό υγρό [bmim][PF<sub>6</sub>] παρουσία 5 % v/v νερού. Τόσο η δραστικότητα όσο και η απόδοση της αντίδρασης ήταν συγκρίσιμες με αυτές παρουσία μιγμάτων οργανικών διαλυτών με νερό, ενώ παράλληλα το ένζυμο επέδειξε και ιδιαίτερα υψηλή σταθερότητα.<sup>163</sup> Στα τέλη του 2000 πραγματοποιείται για πρώτη φορά η βιοκατάλυση αντιδράσεων (όπως αλκοόλυση, μετεστεροποίηση, αμιδίωση) από την λιπάση Β από *Candida antarctica* στα άνυδρα ιοντικά υγρά [bmim][PF<sub>6</sub>] και [bmim][BF<sub>4</sub>]. Τα αποτελέσματα ήταν ιδιαίτερα ενθαρρυντικά καθώς οι ταχύτητες των ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων ήταν συγκρίσιμες ή ακόμα και ελάχιστα υψηλότερες σε σχέση με τους συμβατικούς οργανικούς διαλύτες.<sup>164</sup>

Οι περιγραφόμενες μελέτες αλλά και όλες αυτές που ακολούθησαν κατέδειξαν την βιοκατάλυση ως ένα πολλά υποσχόμενο πεδίο εφαρμογής των ιοντικών υγρών ως μέσα για την πραγματοποίηση ποικίλων αντιδράσεων από ένζυμα όλων των κατηγοριών.<sup>165</sup> Τα ιοντικά υγρά χρησιμοποιήθηκαν είτε σε μονοφασικά υδατικά μίγματα, είτε σε διφασικά συστήματα νερού ή οργανικού διαλύτη/ ιοντικού υγρού, είτε ως μοναδικοί διαλύτες της

αντίδρασης<sup>166</sup> οδηγώντας στην πλειονότητα των περιπτώσεων σε αυξημένη δραστικότητα και σταθερότητα συγκριτικά με τους οργανικούς διαλύτες. Σημαντική επισήμανση των μελετών που αφορούν στη βιοκατάλυση σε ιοντικά υγρά συνιστά η επίδραση ποικίλων παραμέτρων όπως η πολικότητα, το ιξώδες, η ιοντική σύσταση κ.α στην καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων.

### 5.6.1. Επίδραση της πολικότητας

Η πολικότητα των ιοντικών υγρών, όπως έχει αναφερθεί, είναι παρόμοια μ' αυτήν των μικρών αλκοολών και του φορمامιδίου. Σύμφωνα με μελέτες η πολικότητα των διαλυτών φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην απόδοση και στην εκλεκτικότητα των αντιδράσεων καθώς έχει παρατηρηθεί ότι διαλύτες με υψηλή πολικότητα επάγουν την διαλυτότητα των πολικών υποστρωμάτων και οδηγούν σε αύξηση της ταχύτητας των αντιδράσεων.<sup>167</sup> Ωστόσο στην περίπτωση των ιοντικών υγρών δεν υπάρχει κάποια γενικευμένη συσχέτιση μεταξύ πολικότητας και δραστικότητας ή σταθερότητας εξ' αιτίας των πολύπλευρων αλληλεπιδράσεων μεταξύ ιοντικών υγρών και ενζύμων. Για παράδειγμα, στην περίπτωση της λιπάσης από *Pseudomonas cepacia* και της α-χυμοθρυψίνης η δραστικότητα αυξάνεται με την αύξηση της πολικότητας του ιοντικού υγρού.<sup>168,169</sup> Σε άλλες περιπτώσεις ωστόσο, όπως στην ακινητοποιημένη λιπάση Β από *Candida antarctica* (Novozyme 435) η απόδοση της αντίδρασης μειώθηκε με την αύξηση της πολικότητας των ιοντικών υγρών περιορίζοντας έτσι την καθιέρωση μιας γενικευμένης τάσης μεταξύ πολικότητας των ιοντικών υγρών και ενζυμικής δραστικότητας.

### 5.6.2. Επίδραση του ιξώδους

Επιπλέον της πολικότητας, η δραστικότητα και η σταθερότητα των ενζύμων σχετίζεται και με το ιξώδες του ιοντικού υγρού, καθώς έχει αναφερθεί ότι η αύξηση του ιξώδους οδηγεί σε αύξηση των περιορισμών μεταφοράς μάζας παρεμποδίζοντας την μεταφορά των υποστρωμάτων προς το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Μελέτες έχουν δείξει ότι σε ένζυμα όπως η α-χυμοθρυψίνη, η μείωση του ιξώδους του ιοντικού υγρού οδήγησε σε βελτίωση της καταλυτικής συμπεριφοράς του ενζύμου, αυξάνοντας την ταχύτητα των αντιδράσεων.<sup>170</sup> Το υψηλό ιξώδες των ιοντικών υγρών επιβραδύνει τις δομικές αλλαγές των ενζύμων με αποτέλεσμα να διατηρούν την φυσική τους διαμόρφωση και δραστικότητα. Ωστόσο, σε περιπτώσεις όπως η αμιδάση της πενικιλίνης και η Novozyme 435 το ιξώδες των ιοντικών υγρών δεν φάνηκε να επιδρά σημαντικά στην καταλυτική δραστικότητά τους.

Ως εκ τούτου, η παράμετρος αυτή φάνηκε να επιδρά στην καταλυτική δραστηριότητα των ενζύμων χωρίς ωστόσο να αποτελεί έναν καθοριστικό παράγοντα της καταλυτικής τους συμπεριφοράς.<sup>171,172</sup>

### 5.6.3. Επίδραση της υδροφοβικότητας/υδροφιλικότητας

Η υδροφιλικότητα των ιοντικών υγρών μπορεί να εκφραστεί μέσω της κλίμακας  $\log P$ , η οποία προέρχεται από τον λογάριθμο του συντελεστή κατανομής των ιοντικών υγρών μεταξύ 1-οκτανόλης και νερού και απ' όπου προκύπτει ότι όσο μεγαλύτερη η τιμή  $\log P$  τόσο πιο υδρόφοβοι οι διαλύτες. Διάφορες μελέτες, όπου συσχετίζεται η τιμή  $\log P$  με την δραστηριότητα των ενζύμων έχουν δείξει ότι τα ένζυμα είναι πιο σταθερά και πιο δραστικά σε υδρόφοβα ιοντικά υγρά συγκριτικά με τα υδρόφιλα.<sup>173</sup> Το φαινόμενο αυτό έχει συσχετιστεί με το γεγονός ότι τα υδρόφοβα ιοντικά υγρά δεν αφαιρούν τα μόρια νερού, τα οποία είναι ισχυρά προσδεδεμένα στην επιφάνεια του ενζύμου, απαραίτητα για την διατήρηση της φυσικής του διαμόρφωσης και καταλυτικής δραστηριότητας (bound water) σε αντίθεση με τα υδρόφιλα ιοντικά υγρά.<sup>174</sup>

### 5.6.4. Επίδραση της φύσης των ιόντων

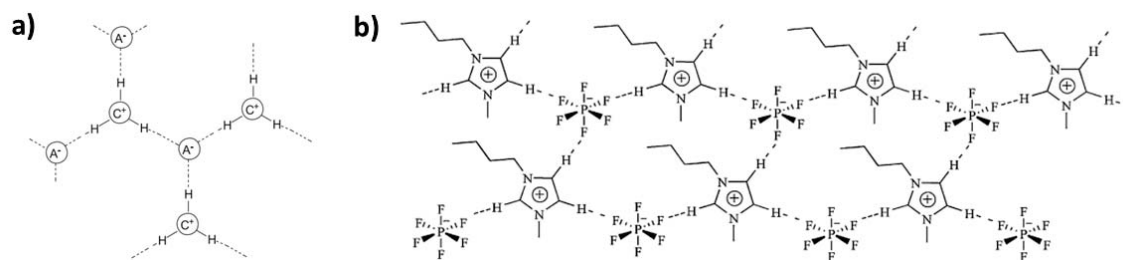
Διάφορες μελέτες έχουν επισημάνει ότι, η επίδραση των ιοντικών υγρών στην ενζυμική δραστηριότητα μπορεί να εξηγηθεί μέσω των επιμέρους αλληλεπιδράσεων των ιόντων των ιοντικών υγρών με το ενζυμικό μόριο.<sup>175</sup> Οι αλληλεπιδράσεις αυτές έχει βρεθεί ότι βασίζονται στην κοσμοτροπικότητα/χαοτροπικότητα των ιόντων (σειρά Hofmeister). Κοσμοτροπικά ιόντα χαρακτηρίζονται τα ισχυρά ενυδατωμένα ιόντα που έχουν την ικανότητα να αλληλεπιδρούν ισχυρά με τα μόρια του νερού επάγοντας την δομή του ενώ αντίθετα τα ασθενώς ενυδατωμένα ιόντα τα οποία δεν αλληλεπιδρούν ισχυρά με το νερό μειώνοντας την δομή του, καλούνται χαοτροπικά ιόντα. Τα κοσμοτροπικά ιόντα είναι συνήθως μικρά και υψηλά φορτισμένα, διασπών τους δεσμούς υδρογόνου του νερού καθώς τα ίδια αλληλοεπιδρούν ισχυρότερα με τα μόρια του νερού σε σχέση με τα μόρια του νερού μεταξύ τους. Αντίθετα, τα χαοτροπικά ιόντα είναι μεγάλα και ασθενώς φορτισμένα και χαρακτηρίζονται ως ιόντα με ικανότητα αποδιάταξης της δομής «structure-breakers».<sup>176,177</sup> Η ποσοτικοποίηση της κοσμοτροπικότητας των ιόντων έχει βρεθεί ότι περιγράφεται καλύτερα από τον  $\beta$ -συντελεστή ιξώδους όπου υψηλή θετική τιμή  $\beta$ -συντελεστή ιξώδους σημαίνει και υψηλή κοσμοτροπικότητα.<sup>178</sup>

Η ικανότητα των ιόντων να επεμβαίνουν στην δομή του νερού μπορεί να μεταβάλλει την ενυδάτωση του πρωτεϊνικού περιβάλλοντος και, σε συνδυασμό με την άμεση αλληλεπίδραση των ιόντων με την πρωτεΐνη, μπορεί να επιφέρει αλλαγές στην δομή του πρωτεϊνικού μορίου.<sup>177</sup> Μελέτες ενζύμων σε υδατικά διαλύματα ιοντικών υγρών έχουν δείξει ότι κοσμοτροπικά ανιόντα και χαοτροπικά κατιόντα σταθεροποιούν τα ένζυμα, ενώ κοσμοτροπικά κατιόντα και χαοτροπικά ανιόντα τα αποσταθεροποιούν (Εικόνα 5.4). Παρ' όλο που σε πολλές περιπτώσεις η καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων σε υδατικά διαλύματα ιοντικών υγρών συνδέεται με την σειρά Hofmeister των ιόντων,<sup>179-182</sup> ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις ενζύμων και ιδιαίτερα ιοντικών υγρών η σειρά αυτή δεν ακολουθείται.<sup>178,183-185</sup> Για παράδειγμα στην περίπτωση μελέτης της τυροσινάσης από μανιτάρια στα ιοντικά υγρά [Cholinium][OAc], [Cholinium][MeSO<sub>3</sub>], [Cholinium][NO<sub>3</sub>], [Bu<sub>4</sub>N][OAc] και [Bu<sub>4</sub>N][MeSO<sub>3</sub>] η δραστηριότητα δεν ακολουθεί την σειρά Hofmeister των ιόντων, καθώς οι αλληλεπιδράσεις των κοσμοτροπικών ανιόντων με τον Cu<sup>2+</sup> στο ενεργό κέντρο του ενζύμου φάνηκε να είναι πιο σημαντικές για την δραστηριότητα του.<sup>178</sup> Επιπλέον, η επίδραση της κοσμοτροπικότητας των ιόντων έχει παρατηρηθεί μόνο στην περίπτωση υδατικών διαλυμάτων ιοντικών υγρών σε αντίθεση με τα υδρόφοβα ή άνυδρα ιοντικά υγρά όπου η καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων δεν μπορεί να συσχετιστεί με την σειρά Hofmeister.<sup>174,186-188</sup>



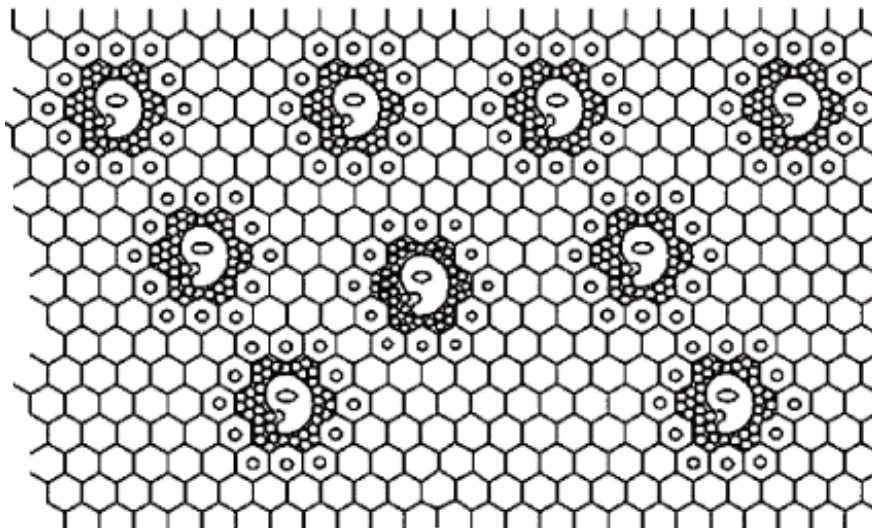
**Εικόνα 5.4.** Επίδραση ιόντων στην σταθερότητα των ενζύμων

Μελέτες της τρισδιάστατης δομής ιμιδαζολικών ιοντικών υγρών κατέδειξαν ότι τα μέσα αυτά σχηματίζουν ένα εκτεταμένο δίκτυο δεσμών υδρογόνου μεταξύ κατιόντων και ανιόντων. Κάθε κατιόν αλληλεπιδρά με τρία ανιόντα και κάθε ανιόν αντίστοιχα με τρία κατιόντα σχηματίζοντας ένα δίκτυο παρόμοιο με αυτό του νερού (Εικόνα 5.5).<sup>189,190</sup>



**Εικόνα 5.5.** a) Δυσδιάστατη απεικόνιση του εκτεταμένου δικτύου δεσμών υδρογόνου μεταξύ κατιόντων και ανιόντων ιμιδαζολικών ιοντικών υγρών (C): κατιόν (A): ανιόν (ένα κατιόν αλληλεπιδρά με τρία ανιόντα και το αντίθετο) b) Δυσδιάστατη απεικόνιση της δομής του άνυδρου ιοντικού υγρού [bmim][PF<sub>6</sub>] (Πηγή Dupont, 2004, Gao et al., 2015).<sup>177,189</sup>

Η προσθήκη μακρομορίων όπως είναι οι πρωτεΐνες, σε αυτό το δίκτυο οδηγεί στον σχηματισμό πολικών και μη πολικών περιοχών (Εικόνα 5.6), ενώ παράλληλα το δίκτυο δεσμών υδρογόνου του ιοντικού υγρού αποτρέπει το ξεδίπλωμα της πρωτεΐνης σταθεροποιώντας την δομή της.<sup>191</sup> Ωστόσο, η προσθήκη ενζύμων σε αυτό το εκτεταμένο δίκτυο δεσμών υδρογόνου των ιοντικών υγρών δεν επιφέρει πάντα θετικά αποτελέσματα στην σταθερότητα τους.<sup>192,193</sup>



**Εικόνα 5.6.** Αναπαράσταση των ενζύμων σε υδατικές περιοχές του δικτύου των ιοντικών υγρών.(Πηγή Fehér et al., 2007).<sup>194</sup>

Η βασικότητα των δεσμών υδρογόνου καθώς επίσης και η πυρηνοφιλία των ανιόντων έχει βρεθεί ότι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην δραστικότητα και σταθερότητα των ενζύμων.<sup>195,196</sup> Η πυρηνοφιλία των ιοντικών υγρών εξαρτάται αποκλειστικά από τις ιδιότητες των ανιόντων και έχει βρεθεί ότι η μείωση της οδηγεί σε



αύξηση της δραστηριότητας των ενζύμων. Τα ασθενώς πυρηνόφιλα ανιόντα εμφανίζουν μικρότερη τάση να αλληλεπιδρούν με τις θετικά φορτισμένες περιοχές του ενζύμου και άρα μικρότερη τάση διατάραξης της δομής τους.<sup>186,191,197</sup> Η παρατήρηση αυτή φαίνεται ότι εφαρμόζεται ικανοποιητικά στην περίπτωση ιοντικών υγρών με ανιόντα αλογονιδίων, νιτρικών, οξικών κ.α. ωστόσο στην περίπτωση ιοντικών υγρών με ανιόντα όπως τα  $[\text{BF}_4]^-$ ,  $[\text{PF}_6]^-$ , και  $[\text{NTf}_2]^-$  η δραστηριότητα των ενζύμων δεν συσχετίζεται πλήρως με την πυρηνοφιλία των ιόντων.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί η ακινητοποιημένη λιπάση CaLB, όπου εμφάνισε μεγαλύτερη δραστηριότητα σε ιοντικά υγρά με ανιόν το  $[\text{NTf}_2]^-$  συγκριτικά με τα  $[\text{BF}_4]^-$ ,  $[\text{PF}_6]^-$  ανεξάρτητα από την σειρά πυρηνοφιλίας τους  $[\text{PF}_6]^- < [\text{BF}_4]^- < [\text{NTf}_2]^-$ .<sup>172,198</sup> Η αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου φάνηκε να ακολουθεί περισσότερο την μείωση της βασικότητας των δεσμών υδρογόνου των ανιόντων επισημαίνοντας το γεγονός ότι η επίδραση των ιοντικών υγρών στην καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων είναι πολυπαραγοντική.<sup>199</sup> Σύμφωνα με μελέτες η αλληλεπίδραση των ανιόντων με τα υποστρώματα ή/και τα προϊόντα μιας αντίδρασης μέσω δεσμών υδρογόνου μπορεί να επηρεάσει την διαλυτότητά τους καθώς επίσης και την αλληλεπίδρασή τους με το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου και κατ' επέκταση την δραστηριότητα και εκλεκτικότητα των ενζύμων.<sup>200-202</sup>

### 5.6.5. Επίδραση των ιοντικών υγρών στα δομικά χαρακτηριστικά ενζύμων

Η επίδραση των ιοντικών υγρών στα καταλυτικά χαρακτηριστικά των ενζύμων σχετίζεται σημαντικά με αλλαγές στην διαμόρφωση του πρωτεϊνικού μορίου. Προκειμένου να σχεδιαστεί μία αποτελεσματική βιοκαταλυτική διαδικασία με την χρήση ιοντικών υγρών είναι σημαντικό να διερευνηθούν οι δομικές αλλαγές στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και στην θέση πρόσδεσης των υποστρωμάτων. Διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί με σκοπό την μελέτη αυτών των αλλαγών όπως η φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους, η φασματοσκοπία φθορισμού, ο κυκλικός διχρωισμός (CD), η φασματοσκοπία Raman και υπερύθρου (FT-IR).

Η φασματοσκοπία CD είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση της δομής των πρωτεϊνών και στηρίζεται στην ιδιότητα των χειρόμορφων ουσιών να απορροφούν σε διαφορετικό βαθμό το αριστερόστροφο και το δεξιόστροφο κυκλικά πολωμένο φως. Το φάσμα της πέραν-υπεριώδους περιοχής (far-UV) (190–240 nm) οφείλεται κυρίως στην απορρόφηση του πεπτιδικού δεσμού και δίνει πληροφορίες για την

περιεκτικότητα των πρωτεϊνών στα στοιχεία δευτεροταγούς δομής (όπως  $\alpha$ -έλικα,  $\beta$ -πτυχωτή επιφάνεια κ.α.). Το φάσμα της εγγύς- υπεριώδους περιοχής (near-UV) (250-350 nm) οφείλεται στην παρουσία αρωματικών αμινοξέων στη δομή της πρωτεΐνης και είναι ευαίσθητο σε αλλαγές της τριτοταγούς δομής. Μελέτη της CaLB σε ιοντικά υγρά μέσω κυκλικού διχρωισμού κατέδειξε ότι η αυξημένη σταθερότητα του ενζύμου σε αυτά τα μέσα οφείλεται στην διαμορφωτική μετάβαση στοιχείων της  $\alpha$ -έλικας σε  $\beta$ -πτυχωτή επιφάνεια ως αποτέλεσμα μιας πιο συμπαγούς διαμόρφωσης του ενζυμικού μορίου.<sup>203</sup>

Επιπλέον, μελέτες φασματοσκοπίας φθορισμού κατέδειξαν ότι η κυτταρινάση από *Trichoderma reesi* αδρανοποιείται παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων του ιοντικού υγρού [bmim][Cl] εξ' αιτίας μετουσίωσης της πρωτεΐνης.<sup>204</sup> Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στην περίπτωση της BSA παρουσία του ιοντικού υγρού [C<sub>14</sub>mim][Br].<sup>205</sup> Ωστόσο στην περίπτωση του κυτοχρώματος c, τα αποτελέσματα από την μελέτη μέσω φασματοσκοπίας φθορισμού και CD κατέδειξαν αυξημένη σταθερότητα της πρωτεΐνης ακόμα και σε υψηλές συγκεντρώσεις αλκυλαμμωνικών ιοντικών υγρών.<sup>206</sup>

Η φασματοσκοπία υπερύθρου FTIR αποτελεί μια κλασική μέθοδο για την ανάλυση της δομής των πρωτεϊνών, η οποία μπορεί να παρέχει πληροφορίες για τη δευτεροταγή δομή τους σε υδατικές συνθήκες αλλά και παρουσία οργανικών διαλυτών και ιοντικών υγρών. Δύο περιοχές του φάσματος χρησιμοποιούνται για την μελέτη των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών, η περιοχή Amide I (1600-1700 cm<sup>-1</sup>) και Amide II (1215-1335 cm<sup>-1</sup>). Ωστόσο έχει επικρατήσει περισσότερο η εφαρμογή της περιοχής Amide I, στην οποία εντοπίζονται οι C=O δονήσεις έκτασης του πεπτιδικού δεσμού, καθώς παρουσιάζει ισχυρότερη τιμή μοριακής απορροφητικότητας και επιπλέον οι περιοχές απορρόφησης της έχουν ταυτοποιηθεί αντίστοιχα σε στοιχεία δευτεροταγούς δομής.<sup>207</sup> Αποτελέσματα από δομικές μελέτες του κυτοχρώματος c μέσω φασματοσκοπίας FTIR και UV-Vis αποκάλυψαν ότι η διαμόρφωση της πρωτεΐνης διατηρείται σταθερή ακόμη και μετά από 18 μέρες επώασης στο [Choline][dhp] ιοντικό υγρό σε θερμοκρασία δωματίου.<sup>208,209</sup> Αντίθετα στην περίπτωση της CaLB, η παρουσία ιοντικών υγρών με ανιόντα [NO<sub>3</sub>] και [lactate] επέφερε σημαντικές αλλαγές στο φάσμα IR της πρωτεΐνης συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα, καταδεικνύοντας την μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου ως αποτέλεσμα έντονων αλλαγών στην δευτεροταγή δομή του μορίου.<sup>207</sup>

Επιπλέον τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για δομικές μελέτες ενζύμων σε ιοντικά υγρά συνιστούν η τεχνική της δυναμικής σκέδασης φωτός (DSL) και η σκέδαση νετρονίων σε μικρές γωνίες (SANS). Η ομάδα του Sale et al., μελέτησε την δραστηριότητα της CaLB

σε τρία ιοντικά υγρά [emim][EtOSO<sub>3</sub>], [emim][NO<sub>3</sub>] και [emim][N(CN)<sub>2</sub>] μέσω των τεχνικών DSL και SANS. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης υπέδειξαν ότι η παρουσία ορισμένων ιοντικών υγρών οδηγεί στην δημιουργία συσσωματωμάτων. Το μέγεθος των συσσωματωμάτων, το οποίο εξαρτάται από την ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου του ανιόντος του ιοντικού υγρού, φάνηκε να συνδέεται με την μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου.<sup>210</sup> Σε μεταγενέστερη μελέτη, η τεχνική SANS χρησιμοποιήθηκε για να περιγράψει την αποδιατακτική επίδραση του υδρόφιλου ιοντικού υγρού [bmim][Cl] στο κυτόχρωμα c και στην αλβουμίνη από ανθρώπινο ορό.<sup>211</sup>

Η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC) εφαρμόστηκε με σκοπό την διερεύνηση της δομικής σταθερότητας της λυσοζύμης μετά από αποθήκευση σε υδατικά διαλύματα των ιοντικών υγρών [Choline][dhp] και ethylammonium nitrate (EAN).<sup>212,213</sup> Με βάση τις θερμοδυναμικές παραμέτρους που προέκυψαν, διαπιστώθηκε ότι τόσο η παρουσία του ιοντικού υγρού [Choline][dhp] όσο και του EAN σταθεροποιούν την δομή της πρωτεΐνης. Στον Πίνακα 5.1. παρατίθενται οι τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την μελέτη της δομής πρωτεϊνών σε ιοντικά υγρά.

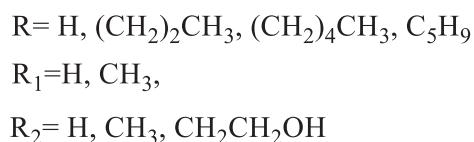
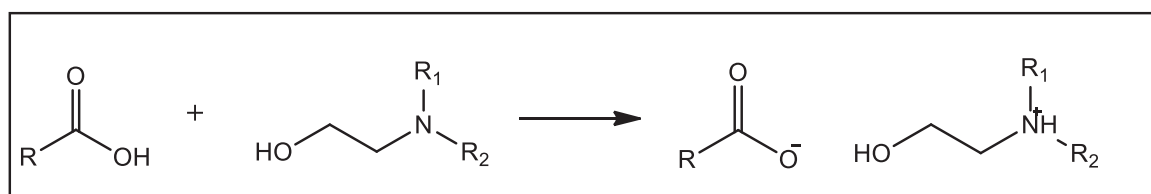
**Πίνακας 5.1.** Τεχνικές που χρησιμοποιούνται για δομικές μελέτης πρωτεϊνών σε ιοντικά υγρά.

Φασματοσκοπικές Τεχνικές	Χαρακτηριστικά που μελετά	Παρατηρήσεις	Αναφορές
UV-Vis	Φυσική διαμόρφωση και ξεδιπλωμένη διαμόρφωση, σχηματισμός συμπλόκων μεταξύ πρωτεΐνης και ιοντικού υγρού	Αλλαγές στον πολυπεπτιδικό κορμό και στα αρωματικά αμινοξέα	214
Far-UV CD	Δευτεροταγής διαμόρφωση	Αλλαγές στον πολυπεπτιδικό κορμό	215
FT-IR	Δευτεροταγής διαμόρφωση	Ανάλυση της Amide I περιοχής (αλλαγές στην πολυπεπτιδική αλυσίδα και στους δεσμούς υδρογόνου)	216
Raman	Δευτεροταγής διαμόρφωση	Αλλαγή στις κορυφές Amide I και Amide II παρουσία ιοντικών υγρών	217
	Τριτοταγής διαμόρφωση	Αλλαγές στο φάσμα δονήσεων του πολυπεπτιδικού κορμού (C-C-N δονήσεις) και των S-S και C-S δισουλφιδικών δεσμών	
Near-UV CD	Τριτοταγής διαμόρφωση	Αλλαγές στα αρωματικά αμινοξέα	218
Φθορισμός	Τριτοταγής διαμόρφωση και μηχανισμός αλληλεπίδρασης μεταξύ της πρωτεΐνης και των ιοντικών υγρών	Αλλαγές στο περιβάλλον των φθορίζοντων αμινοξέων (Try, Phe, Tyr) λόγω αλλαγών στην πρωτεϊνική διαμόρφωση ή πρόσδεσης των ιοντικών υγρών	219
DLS	Μέγεθος και διαμόρφωση των συσσωματωμάτων σε ιοντικά υγρά	Αλλαγές στην υδροδυναμική ακτίνα της πρωτεΐνης ως αποτέλεσμα αλληλεπίδρασης με ιοντικά υγρά	220
SANS	Μέγεθος, σχήμα και διαμόρφωση των συσσωματωμάτων σε ιοντικά υγρά	Χρησιμοποιεί δευτεριωμένη πρωτεΐνη ή δευτεριωμένα ιοντικά υγρά	210
Μικροθερμοδομετρία	Στοιχειομετρία των δεσμών	Ανάλυση των αλλαγών στην ενθαλπία του συστήματος δέσμωσης των ιοντικών υγρών σε πρωτεΐνες.	221

### 5.6.6. Ιοντικά υγρά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή

Τα ιοντικά υγρά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή ανήκουν στην κατηγορία των πρωτικών ιοντικών υγρών. Τα πρωτικά ιοντικά υγρά προέρχονται από την στοιχειομετρική αντίδραση ενός οξέος κατά Brønsted με μία βάση κατά Brønsted.<sup>222</sup> Σε αντίθεση με τα απρωτικά ιοντικά υγρά, η παρουσία πρωτονίων προάγει την εκτεταμένη ανάπτυξη δεσμών υδρογόνου.<sup>223</sup> Εμφανίζουν υψηλότερη αγωγιμότητα και ρευστότητα καθώς επίσης και χαμηλότερα σημεία τήξεως συγκριτικά με τα απρωτικά ιοντικά υγρά.<sup>224</sup> Το ενδιαφέρον για αυτήν την κατηγορία ιοντικών υγρών προέρχεται κυρίως από το γεγονός ότι διαθέτουν χαμηλό κόστος και ευκολία παρασκευής, καθώς δεν σχηματίζονται παραπροϊόντα κατά την διαδικασία σύνθεσης ελαχιστοποιώντας έτσι τις διαδικασίες καθαρισμού. Επιπλέον, έχουν χαρακτηριστεί ως περιβαλλοντικά φιλικά μέσα, λόγω της υψηλής βιοαποικοδομησιμότητας και δυνατότητας ανακύκλωσης που εμφανίζουν.<sup>225–227</sup>

Τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά αυτής της κατηγορίας ιοντικών υγρών οδήγησαν στην εφαρμογή τους σε διάφορες διεργασίες της «πράσινης» χημείας ως διαλύτες ή καταλύτες,<sup>228–230</sup> ενώ παράλληλα έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη περιβαλλοντικά φιλικών βιοδιεργασιών και την διατήρηση της φυσικής διαμόρφωσης των ενζύμων.<sup>45</sup> Στην παρούσα διατριβή, μελετήθηκαν διάφορα πρωτικά ιοντικά υγρά, τα οποία παρασκευάστηκαν μέσω αντιδράσεων εξουδετέρωσης υποκατεστημένων αιθανολ-αμινών με διάφορα καρβοξυλικά οξέα όπως φαίνεται στο Σχήμα 5.1.



**Σχήμα 5.1.** Σύνθεση υδροξυαιθυλαμμωνικών ιοντικών υγρών

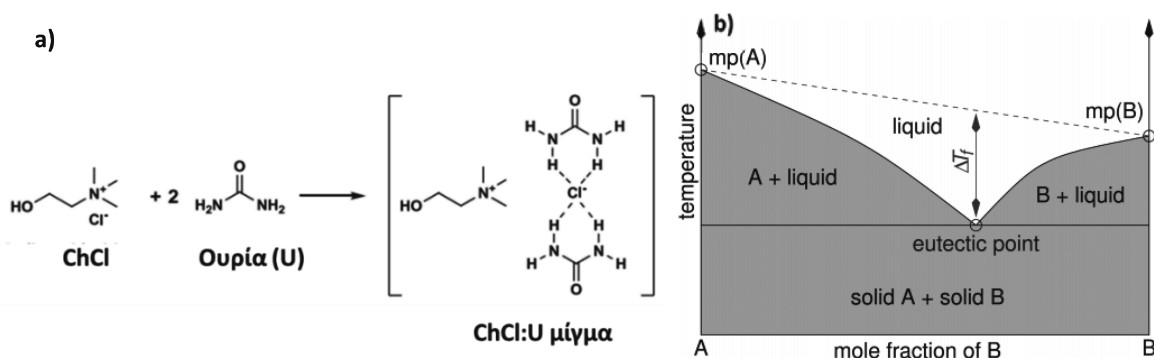
Η παρουσία ομάδων –OH στην δομή των αιθανολ-αμινών που χρησιμοποιήθηκαν μειώνει την τοξικότητα (έως 100 φορές συγκριτικά με τα ιμιδαζολικά ή πυριδινικά ιοντικά υγρά) και αυξάνει την βιοαποικοδομησιμότητα των αμινών οδηγώντας στην δημιουργία διαλυτών φιλικών προς το περιβάλλον. Τα ανιόντα που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση των ιοντικών υγρών ανήκουν στην κατηγορία των μονοκαρβοξυλικών οξέων εμφανίζοντας

υψηλά επίπεδα βιοαποικοδομισημότητας και περιλαμβάνουν το μυρμηκικό οξύ, το βουτυρικό οξύ, το εξανικό οξύ και το κυκλοπεντανοκαρβοξυλικό οξύ. Χαρακτηριστικό παράδειγμα το μυρμηκικό οξύ, το οποίο είναι γνωστό ότι συναντάται ευρέως στην φύση, διασπάται παρουσία οξυγόνου, διαθέτει χαμηλή τοξικότητα και χρησιμοποιείται ως πρόσθετο στα τρόφιμα και ως συντηρητικό και αντιβακτηριδιακό σε ζωοτροφές.

## 5.7. Βαθείς Ευτηκτικοί Διαλύτες

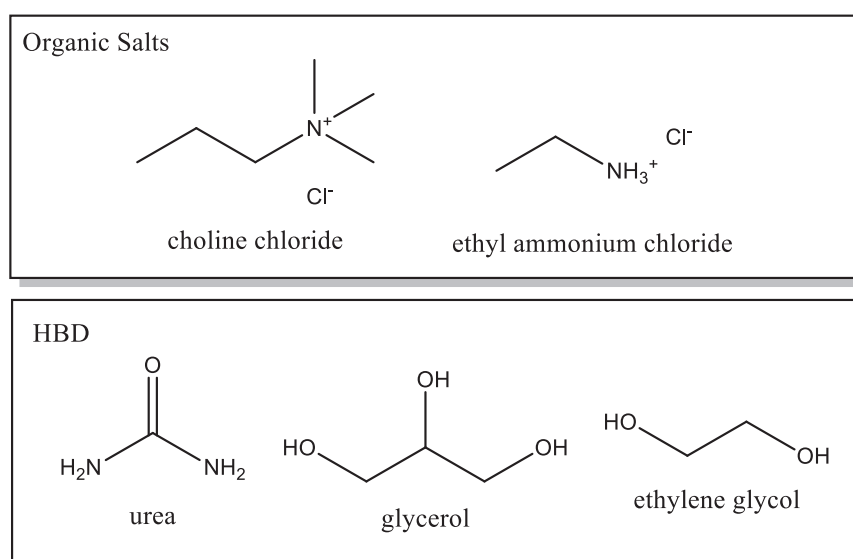
Τις τελευταίες δεκαετίες, ταυτόχρονα με την ανάπτυξη των ιοντικών υγρών 3<sup>ης</sup> γενιάς, μία επιπλέον κατηγορία διαλυτών έχει προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον γνωστή με τον όρο βαθείς ευτηκτικοί διαλύτες (DES). Τα DES, ως διαλύτες εμφανίζουν παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτά των ιοντικών υγρών. Το γεγονός όμως ότι διαθέτουν μη φορτισμένα συστατικά, σε αντίθεση με τα ιοντικά υγρά που αποτελούνται εξ' ολοκλήρου από ανιόντα και κατιόντα, τα διαφοροποιεί από αυτά.<sup>231</sup>

Τα DES προκύπτουν από την ανάμιξη ενός στερεού οργανικού άλατος με έναν δότη δεσμών υδρογόνου (HBD) όπως ουρία, καρβοξυλικά οξέα (π.χ. αμινοξέα) και πολυόλες (π.χ. γλυκερόλη) σε διάφορες αναλογίες. Η πρώτη αναφορά του όρου DES χρονολογείται το 2003 από την ομάδα του Abbott σε ένα μίγμα χλωριδίου της χολίνης (ChCl) με ουρία. Η ανάμιξη των δύο αυτών συστατικών με σημεία τήξεως 302 °C και 133 °C για το ChCl και την ουρία αντίστοιχα, οδηγεί στην δημιουργία ενός διαλύτη DES με σημείο τήξεως 12 °C. Η ισχυρή μείωση του σημείου τήξεως αποδόθηκε κυρίως στις αλληλεπιδράσεις των συστατικών και ειδικότερα στις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ατόμων υδρογόνου της ουρίας και των ιόντων χλωριδίου (Εικόνα 5.7).<sup>232</sup>



**Εικόνα 5.7.** a) Αλληλεπίδραση των συστατικών ChCl και U με αναλογία 1:2 για την δημιουργία του DES ChCl:U, b) Σχηματική αναπαράσταση του ευτηκτικού σημείου μεταξύ δύο συστατικών.

Το οργανικό άλας ChCl είναι ένα από τα πιο διαδεδομένα συστατικά για την σύνθεση DES. Πρόκειται για ένα πολύ φθινό, βιοδιασπώμενο, μη τοξικό τεταρτοταγές αμμωνιακό άλας, το οποίο μπορεί να προέρχεται είτε από βιομάζα είτε να συντίθενται από ορυκτά αποθέματα και χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα διατροφής στις ζωοτροφές. Ο συνδυασμός του με ασφαλείς HBD όπως ουρία ή ανανεώσιμα καρβοξυλικά οξέα (π.χ. οξαλικό οξύ, κιτρικό οξύ, αμινοξέα) ή ανανεώσιμες πολυόλες (π.χ. γλυκερόλη) οδηγεί στην δημιουργία ενός βιοσυμβατού μίγματος.<sup>233</sup> Στην Εικόνα 5.8 που ακολουθεί παρουσιάζονται ορισμένα από τα συστατικά για την σύνθεση των DES.



**Εικόνα 5.8.** Συστατικά (οργανικό άλας και HBD) για την σύνθεση των DES

Τα DES έχει βρεθεί ότι εμφανίζουν ασυνήθιστες διαλυτικές ικανότητες, οι οποίες εξαρτώνται σημαντικά από το δίκτυο δεσμών υδρογόνου του διαλύτη. Πρωτικοί διαλύτες όπως η μεθανόλη, η αιθανόλη και το νερό είναι αναμίξιμοι με τα DES, ενώ αντίθετα απρωτικοί διαλύτες όπως το ταλουόλιο, το εξάνιο, το ακετονιτρίλιο κ.α. είναι μη αναμίξιμοι και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την εκχύλιση ενώσεων χαμηλής ή μέσης πολικότητας επιτρέποντας έτσι την επαναχρησιμοποίηση των DES.<sup>234,235</sup>

Όπως στην περίπτωση των ιοντικών υγρών, το ιξώδες των DES συνιστά μία από τις χαρακτηριστικές ιδιότητές τους. Τα περισσότερα DES εμφανίζουν υψηλές τιμές ιξώδους, συχνά μεγαλύτερες από 100 cP σε θερμοκρασία δωματίου.<sup>236</sup> Το υψηλό ιξώδες των DES αποδίδεται κυρίως στην παρουσία ενός εκτεταμένου δικτύου δεσμών υδρογόνου μεταξύ των συστατικών του καθώς επίσης στην ανάπτυξη ηλεκτροστατικών δυνάμεων και van der

Waals αλληλεπιδράσεων. Η κατάλληλη επιλογή των συστατικών (η φύση και η αναλογία αμμωνιακού άλατος και HBD), η περιεκτικότητα του μέσου σε νερό και η θερμοκρασία είναι καθοριστικοί παράγοντες για την τιμή του ιξώδους των DES.<sup>237,238</sup> Χαρακτηριστικό παράδειγμα συνιστά η μείωση του ιξώδους του ChCl:Glycerol DES με την αύξηση ποσότητας του αμμωνιακού άλατος. Πιο συγκεκριμένα ενώ το ιξώδες της γλυκερόλης στους 20 °C είναι 1200 cP, το ιξώδες του αντίστοιχου DES (μοριακή αναλογία 1:2) είναι 400 cP. Αυτή η σημαντική μείωση του ιξώδους της γλυκερόλης με την προσθήκη του ChCl αποδόθηκε στην μερική διάσπαση των δεσμών υδρογόνου στο δίκτυο της γλυκερόλης καταλήγοντας σε ένα λιγότερο οργανωμένο σύστημα.<sup>239</sup>

Σημαντικά πλεονεκτήματα των ευτηκτικών υγρών συνιστούν α) το χαμηλό κόστος, β) η ευκολία παρασκευής τους, καθώς παρασκευάζονται από απλή ανάμιξη των συστατικών τους παρακάμπτοντας έτσι όλα τα προβλήματα καθαρισμού και γ) το γεγονός ότι είναι βιοαποικοδομήσιμα, βιοσυμβατά, και μη τοξικά και επομένως φιλικά προς το περιβάλλον μέσα. Εξ' αιτίας των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών και πλεονεκτημάτων τους καθώς επίσης και της δυνατότητας προσαρμογής των ιδιοτήτων τους με την κατάλληλη επιλογή των συστατικών τους, τα DES τα τελευταία χρόνια έχουν προσελκύσει το ερευνητικό ενδιαφέρον ως ιδανικά μέσα για την ανάπτυξη διαφόρων διεργασιών.<sup>233</sup>

### **5.7.1. Εφαρμογές Βαθέων Ευτηκτικών Διαλυτών**

Όπως έχει αναφερθεί τα DES είναι μία νέα κατηγορία περιβαλλοντικά φιλικών διαλυτών ικανά να διαλυτοποιούν ένα μεγάλο εύρος ενώσεων όπως άλατα, πρωτεΐνες, φάρμακα, αμινοξέα, επιφανειοενεργές ουσίες, σάκχαρα, πολυσακχαρίτες κ.α.<sup>240,241</sup> Εξ' αιτίας της ικανότητάς τους να διαλυτοποιούν οξείδια μετάλλων τα ευτηκτικά υγρά μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ηλεκτροχημικές διεργασίες όπως η ανάκτηση, το φινίρισμα και ο διαχωρισμός μετάλλων.<sup>242-244</sup> Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την διαλυτοποίηση CO<sub>2</sub><sup>245</sup> και την εκχύλιση της γλυκερόλης από βιοντίτζελ.<sup>246-248</sup> Πολυάριθμες είναι οι αναφορές για την εφαρμογή των DES σε ποικίλες αντιδράσεις, ανόργανης σύνθεσης και πολυμερισμού όπου μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως περιβαλλοντικά φιλικοί διαλύτες ή και ως καταλύτες.<sup>249-253</sup> Μία από τις ταχέως αναπτυσσόμενες εφαρμογές των DES συνιστά η χρήση τους στο τομέα της βιοκατάλυσης.<sup>231</sup> Τα DES έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς σε ενζυμικά καταλυόμενες διεργασίες, οι οποίες αναλύονται στην παράγραφο που ακολουθεί.



### 5.7.2. Βαθείς Ευτηκτικοί διαλύτες στην βιοκατάλυση

Το 2008, η ομάδα του Kazlauskas αναφέρει για πρώτη φορά την εφαρμογή DES ως μέσα σε ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις. Πιο συγκεκριμένα, αυτή η μελέτη ανέδειξε τα DES ως μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική των οργανικών διαλυτών, καθώς ένζυμα όπως υδρολάσες και εποξειδικές υδρολάσες παρουσίασαν καλύτερη δραστηριότητα σε αυτά τα μέσα συγκριτικά με τα 2<sup>ης</sup> γενιάς ιοντικά υγρά και τους οργανικούς διαλύτες.<sup>235</sup> Έκτοτε, διάφορες μελέτες εφαρμογής των DES σε ενζυμικά καταλυόμενες αντιδράσεις έχουν αναφερθεί. Το 2010, η ομάδα του Lindeberg et al., χρησιμοποίησε υδατικά διαλύματα DES με σκοπό την μελέτη της δραστηριότητας της εποξειδικής υδρολάσης StEH1 από πατάτα σε αυτά τα μέσα. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι παρουσία των DES (20 % v/v στο μίγμα της αντίδρασης) το ένζυμο διατηρεί την δραστηριότητά του, ενώ πιο σημαντική φάνηκε να ήταν η επίδραση τους στην σταθερά  $K_m$  (20 φορές αύξηση) καθώς επίσης και στην εκλεκτικότητα του ενζύμου.<sup>254</sup> Ένα χρόνο αργότερα, μία συγκριτική μελέτη διαφόρων DES με βάση το  $ChCl$  και το  $ChOAc$  σε αντιδράσεις μετεστεροποίησης από λιπάσες έδειξε ότι στο  $ChOAc:Glycerol$  DES, το ένζυμο εμφανίζει υψηλότερη δραστηριότητα, πιθανά λόγω του χαμηλότερου ιξώδους, συγκριτικά με DES με βάση το  $ChCl$ .<sup>255</sup> Ωστόσο, σε ορισμένες περιπτώσεις εφαρμογής των DES σε αντιδράσεις εστεροποίησης, τα συστατικά του μέσου μπορεί να ανταγωνιστούν τα υποστρώματα προσεγγίζοντας το ενεργό κέντρο του ενζύμου οδηγώντας στην παραγωγή μη επιθυμητών παρά-προϊόντων.<sup>256</sup>

Επιπρόσθετα, τα DES χρησιμοποιήθηκαν αποτελεσματικά σε αντιδράσεις καταλυόμενες από πρωτεάσες, όπου το ένζυμο εμφάνισε καλύτερη σταθερότητα και δραστηριότητα συγκριτικά με τους οργανικούς διαλύτες. Παρά το γεγονός ότι οι πρωτεάσες μπορεί να απενεργοποιηθούν από τα ανιόντα χλωρίου και οξικού, οι ισχυροί δεσμοί υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ των ανιόντων και του HBD στην δομή του DES, έχουν ως αποτέλεσμα την μείωση αυτή της αρνητικής επίδρασης στην πρωτεΐνη.<sup>255</sup> Πρόσφατα, τα DES χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς ως μέσα σε αντιδράσεις πεπτιδικής σύνθεσης από την  $\alpha$ -χυμοθρυψίνη, οδηγώντας σε υψηλότερη παραγωγικότητα και εκλεκτικότητα συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα.<sup>257</sup>

Σε μία προσπάθεια εισαγωγής των DES στην παραγωγή βιοντίζελ, μελετήθηκε η δυνατότητα ενζυμικής μετεστεροποίησης του ελαίου σόγιας από την Novozyme 435 σε DES με βάση το  $ChCl$ . Διαπιστώθηκε ότι υπό βέλτιστες συνθήκες (θερμοκρασία, ποσότητα ενζύμου, χρόνος επώασης κ.α) το DES  $ChCl:Glycerol$  μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για την μετατροπή των τριγλυκεριδίων οδηγώντας σε υψηλές αποδόσεις (88 %).<sup>258</sup> Τα

αποτελέσματα αυτών των μελετών αποτέλεσαν έναυσμα για την ανάπτυξη ενός νέου πεδίου εφαρμογής των DES ως μέσων για την πραγματοποίηση ποικίλων αντιδράσεων καταλυόμενων από ένζυμα όλων των κατηγοριών.

# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6<sup>ο</sup>

## Ακίνητοποίηση ενζύμων

---



### 6.1. Εισαγωγή

Παρά τις ευεργετικές επιδράσεις των ιοντικών διαλυτών στα καταλυτικά χαρακτηριστικά των ενζύμων, το υψηλό κόστος παραγωγής τους και η μειωμένη σταθερότητα που επιδεικνύουν σε ορισμένες περιπτώσεις αποτελούν αποτρεπτικούς παράγοντες για την εφαρμογή τους σε μεγάλης κλίμακας βιοδιεργασίες. Διάφορες τεχνικές έχουν αναπτυχθεί με σκοπό την εφαρμογή της ενζυμικής κατάλυσης σε μη συμβατικά μέσα σε βιομηχανική κλίμακα με σημαντικότερη αυτή της ενζυμικής ακίνητοποίησης.<sup>195</sup>

Ως ακίνητοποιημένα ένζυμα ορίζονται τα ένζυμα που είναι περιορισμένα ή τοποθετημένα σε μία καθορισμένη περιοχή/φάση, στην οποία διατηρούν τις καταλυτικές τους ιδιότητες και την σταθερότητα τους έτσι ώστε το βιοκαταλυτικό αυτό σύστημα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί επαναλαμβανόμενα και συνεχώς. Η ακίνητοποίηση γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε να επιτρέπεται η αμφίδρομη μεταφορά μάζας (υποστρώματος, προϊόντος, οξυγόνου κ.ά.) μεταξύ βιοκαταλυτικής φάσης και κύριας υγρής φάσης. Η ακίνητοποίηση των ενζύμων προσδίδει σημαντικά πλεονεκτήματα συγκριτικά με τα ελεύθερα ένζυμα όπως: α) αυξημένη σταθερότητα, β) άμεσο έλεγχο της αντίδρασης με απλή προσθήκη ή αφαίρεση του ενζύμου, γ) εύκολη απομόνωση των προϊόντων και διαχωρισμό τους από το ένζυμο και δ) δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του βιοκαταλύτη. Πρόκειται για ένα χρήσιμο εργαλείο στα χέρια των βιοτεχνολόγων που αποσκοπεί στην βελτίωση των καταλυτικών ιδιοτήτων των ενζύμων και την συνεχόμενη επέκτασή τους σε διάφορους τομείς της βιομηχανίας.<sup>259,260</sup>

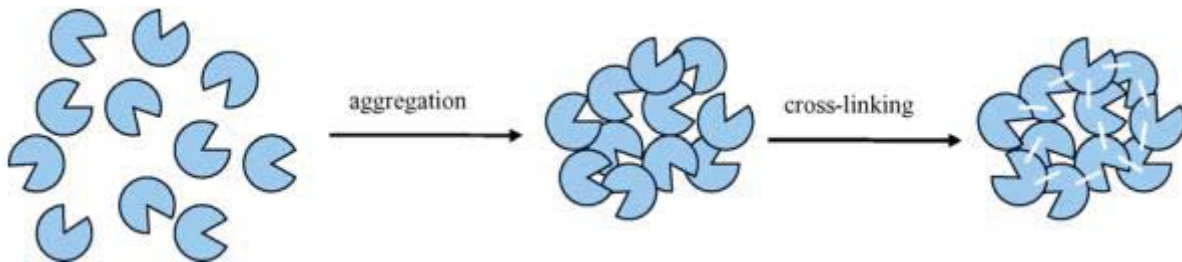
Οι κύριες συνιστώσες ενός ακινητοποιημένου ενζυμικού συστήματος είναι το πρωτεϊνικό μόριο, ο φορέας και η μέθοδος σύνδεσης. Οι μέθοδοι ακινητοποίησης εκμεταλλεύονται τα χαρακτηριστικά των αμινοξέων όπως τις λειτουργικές ομάδες των πλευρικών αλυσίδων με σκοπό την ανάπτυξη των κατάλληλων αλληλεπιδράσεων με τον φορέα. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορεί να είναι είτε αντιστρεπτές όπως η φυσική προσρόφηση και οι ιοντικοί δεσμοί, είτε μη αντιστρεπτές αλλά πιο σταθερές όπως οι ομοιοπολικοί δεσμοί. Η συνολική πορεία ακινητοποίησης μπορεί να προκαλέσει δομικές αλλαγές στο πρωτεϊνικό μόριο με αποτέλεσμα σημαντικές αλλαγές στην καταλυτική συμπεριφορά του ενζύμου.<sup>261</sup>

Η ακινητοποίηση των ενζύμων μπορεί να πραγματοποιηθεί τόσο με φυσικές όσο και με χημικές μεθόδους. Στις φυσικές μεθόδους περιλαμβάνονται η προσρόφηση σε φορέα και ο εγκλωβισμός σε πλέγμα πολυμερών, σε ημιπερατές μεμβράνες ή μικροκάψουλες, ενώ στις χημικές μεθόδους περιλαμβάνονται η διαμοριακή και η ομοιοπολική σύνδεση. Σε ορισμένες περιπτώσεις η ακινητοποίηση ενζύμου μπορεί να αποτελεί συνδυασμό διαφόρων μεθόδων ακινητοποίησης. Για παράδειγμα ένα ένζυμο μπορεί να ακινητοποιηθεί αρχικά σε σφαιρίδια με προσρόφηση ή ομοιοπολικά πριν από τον περαιτέρω εγκλωβισμό σε πορώδες πολυμερές. Επιπλέον σε περιπτώσεις όπου η παραγωγή ενός προϊόντος μπορεί να είναι αποτέλεσμα αλυσιδωτών αντιδράσεων στις οποίες συμμετέχουν διάφορα ενζυμικά μόρια τα οποία καταλύουν διαφορετικό τύπο αντιδράσεων μπορεί να εφαρμοστεί η τεχνική της ακινητοποίησης των διαφορετικών ενζυμικών μορίων στον ίδιο φορέα.<sup>259,262</sup>

### **6.1.1. Διαμοριακή σύνδεση (Cross linking)**

Η διαμοριακή σύνδεση (cross-linking) είναι μία μέθοδος που βασίζεται στην δημιουργία ενός τρισδιάστατου δικτύου μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης μεταξύ μορίων ενζύμου παρουσία λειτουργικών αντιδραστηρίων όπως η γλουταραλδεϋδη, η γλυοξάλη, η εξαμεθυλενοδιαμίνη κ.α.<sup>263</sup> Η ομάδα των ενζύμων που συμμετέχει κυρίως στην δημιουργία διαμοριακών συνδέσεων είναι η α-αμινομάδα των λυσινών, η οποία αντιδρά με το πλέον διαδεδομένο αντιδραστήριο σύνδεσης, την γλουταραλδεϋδη σχηματίζοντας την αντίστοιχη βάση Schiff. Άλλες λειτουργικές ομάδες αμινοξέων που συμμετέχουν στην δημιουργία διαμοριακών συνδέσεων είναι το ιμιδαζόλιο της ιστιδίνης, η φαινολική ομάδα της τυροσίνης, η σουλφιδριλομάδα της κυστεΐνης κ.α. Η απλότητα της μεθόδου και ο περιορισμός στην απώλεια του ενζύμου από το πλέγμα, εξ' αιτίας των ισχυρών χημικών δεσμών που αναπτύσσονται είναι δύο από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της

μεθόδου.<sup>259</sup> Η παρασκευή CLEAs (Cross-Linked Enzyme Aggregates) πρωτεϊνών πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Αρχικά δημιουργούνται συσσωματώματα μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων, μέσω καταβύθισης με την προσθήκη αλάτων, οργανικών διαλυτών ή μη ιοντικών πολυμερών σε υδατικά διαλύματα των πρωτεϊνών. Στην συνέχεια η διαμοριακή σύνδεση οδηγεί στην δημιουργία μη διαλυτών CLEAs στα οποία οι δομικές και οι καταλυτικές ιδιότητες των πρωτεϊνών διατηρούνται (Εικόνα 6.1).<sup>264</sup>



Εικόνα. 6.1. Σχηματισμός CLEAs ενζύμων.

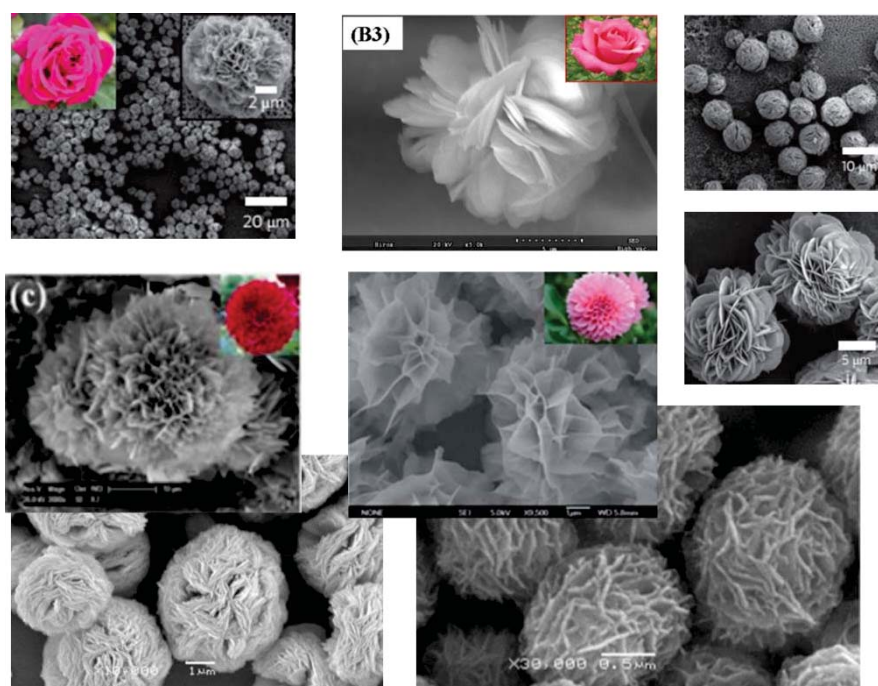
Σημαντικά πλεονεκτήματα των CLEAs είναι η ευκολία στην παρασκευή τους, το γεγονός ότι δεν απαιτείται υψηλής καθαρότητας ένζυμο, η υψηλή σταθερότητα και η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των ενζύμων καθώς επίσης και η συν-ακινητοποίηση περισσότερων ενζύμων στο ίδιο βιοκαταλυτικό σύστημα.<sup>195,265</sup> Η μέθοδος αυτή έχει εφαρμοστεί για την ακινητοποίηση διαφόρων ενζύμων όπως υδρολάσες (λιπάσες, εστεράσες, αμιδάσες, γλυκοζιδάσες), λυάσες (αλδολάσες) και οξειδοαναγωγάσες (οξειδάσες της γλυκόζης, λακκάσες).<sup>264</sup> Η εφαρμογή CLEAs ενζύμων όπως τυροσινάση, λακκάση, εστεράση και λιπάση από *Burkholderia cepacia* και *Candida antarctica* έχει πραγματοποιηθεί με επιτυχία σε ιοντικά υγρά οδηγώντας σε αύξηση της σταθερότητας και δραστηριότητας συγκριτικά με τα ελεύθερα σκευάσματα.<sup>266-268</sup>

### 6.1.2. Ακινητοποίηση ενζύμων σε δομές νανοάνθους (nanoflower)

Τα τελευταία χρόνια το επίκεντρο της τεχνολογίας ακινητοποίησης έχει μετατοπιστεί προς την χρήση νανοϋλικών ως φορείς ακινητοποίησης των ενζύμων.<sup>269</sup> Διάφορα νανοϋλικά έχουν χρησιμοποιηθεί όπως νανοπορώδη υλικά πυριτίου, νανοϊνες, μαγνητικά νανοσωματίδια, νανοσωλήνες άνθρακα, σφαιρίδια πολυμερών κ.α. ενώ η επιλογή του κατάλληλου φορέα εξαρτάται από χαρακτηριστικά όπως η μηχανική και χημική σταθερότητα, η ικανότητα διαχωρισμού και επαναχρησιμοποίησης, ο λόγος επιφάνειας προς όγκο κ.α.<sup>270-272</sup> Παρόλο που τα περισσότερα ακινητοποιημένα σε νανοϋλικά ένζυμα εμφανίζουν υψηλή σταθερότητα συγκριτικά με τα ελεύθερα ένζυμα, η δραστηριότητά τους

μετά την ακινητοποίηση μειώνεται εξ' αιτίας των ακραίων συνθηκών ακινητοποίησης (υψηλή θερμοκρασία και πίεση, χρήση οργανικών διαλυτών) καθώς επίσης και στερεοχημικών παρεμποδίσεων του υποστρώματος προς το ενεργό κέντρο του ακινητοποιημένου ενζύμου.<sup>273</sup> Επομένως, η ανάπτυξη μίας εύκολης, χαμηλού κόστους συνθετικής πορείας για την ακινητοποίηση των ενζύμων σε νανοϋλικά κρίθηκε ιδιαίτερα αναγκαία.

Το 2012, μία νέα τεχνική σύνθεσης ακινητοποιημένων ενζύμων σε νανοδομές, όπου δεν απαιτούνται τοξικοί διαλύτες και ακραίες συνθήκες παρουσιάστηκε από τον Zare και τους συνεργάτες του.<sup>274</sup> Η μέθοδος αυτή στηρίζεται στην ακινητοποίηση πρωτεϊνών σε ιόντα χαλκού οδηγώντας στην δημιουργία νανοδομών που μοιάζουν με άνθη (Εικόνα 6.2).

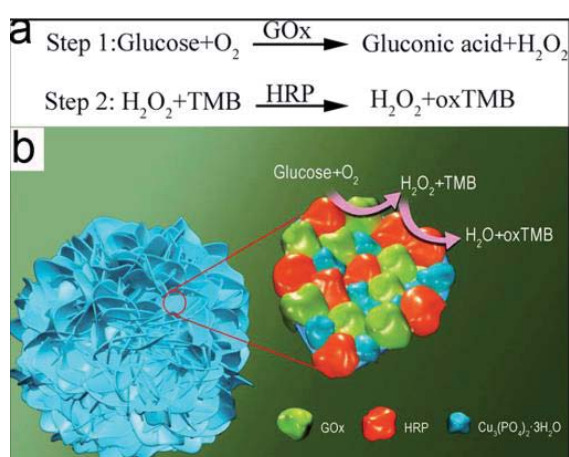


**Εικόνα 6.2.** Δομές nanoflowers διαφόρων ενζύμων σε ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM).

Ένζυμα όπως α-λακταλβουμίνη, λακκάση, καρβονυλική αφυδρογονάση και λιπάση χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση των δομών nanoflowers με σκοπό την ανίχνευση φαινολών και την οξείδωση κατεχολαμινών. Οι νανοδομές αυτές εμφάνισαν βελτιωμένη δραστηριότητα συγκριτικά με το ελεύθερο ένζυμο εξ' αιτίας του γεγονότος ότι η μέθοδος ακινητοποίησης είναι λιγότερο επεμβατική στην δομή του ενζύμου, της μεγάλης επιφάνειας των nanoflowers η οποία μειώνει τους περιορισμούς μεταφοράς μάζας, της συνεργατικής αλληλεπίδρασης των ακινητοποιημένων μορίων και της αλληλεπίδρασης των ενζύμων με

το μικροπεριβάλλον του φορέα (στην περίπτωση της λακκάσης τα ιόντα χαλκού του φορέα βρέθηκε ότι αυξάνει την δραστικότητα του ενζύμου).<sup>274</sup>

Έκτοτε, ακολούθησαν και άλλες μελέτες ακινητοποιημένων ενζύμων σε ιόντα χαλκού αλλά και σε ιόντα ασβεστίου. Το 2013, αναπτύχθηκαν υβριδικά nanoflowers  $\text{CaHPO}_4$ - $\alpha$ -αμυλάσης<sup>275</sup> και ένα χρόνο αργότερα παρασκευάστηκαν nanoflowers ιόντων χαλκού με HRP με σκοπό την ανίχνευση υπεροξειδίου του υδρογόνου και φαινόλης.<sup>276</sup> Μία ακόμα ενδιαφέρουσα εφαρμογή των nanoflowers πραγματοποιήθηκε από την ομάδα του Sun et al., όπου μελετήθηκε η ανάπτυξη ενός χρωμομετρικού αισθητήρα της γλυκόζης μέσω της συν-ακινητοποίησης ενζύμων όπως η οξειδάση της γλυκόζης (GOx) και η HRP. Η μελέτη αυτή στηρίχτηκε στον τύπο των αντιδράσεων των δύο ενζύμων: η οξείδωση της γλυκόζης οδηγεί στην παραγωγή  $\text{H}_2\text{O}_2$ , το οποίο στην συνέχεια αξιοποιείται από την HRP για την οξείδωση του 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB), μεταβάλλοντας το χρώμα του διαλύματος σε μπλε. Με αυτόν τον τρόπο περιορίζεται η διάχυση και η διάσπαση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  αυξάνοντας έτσι την ευαισθησία της μεθόδου (Εικόνα 6.3).<sup>269</sup>



**Εικόνα 6.3.** a) Μηχανισμός ανίχνευσης γλυκόζης, b) Χρωμομετρικός αισθητήρας μέσω συν-ακινητοποίησης GOx και HRP σε ιόντα χαλκού για την ανάπτυξη των υβριδικών nanoflowers (Πηγή Sun et al., 2014).<sup>269</sup>

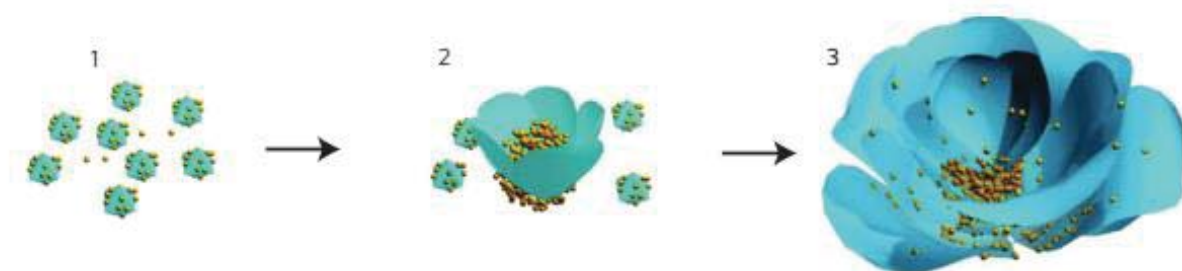
### 6.1.2.1. Μηχανισμός σύνθεσης nanoflowers

Έχει προταθεί ότι ο μηχανισμός σύνθεσης των nanoflowers ακολουθεί τρία στάδια (Εικόνα 6.4):<sup>274</sup>

**Στάδιο 1<sup>ο</sup>:** Αρχικά σχηματίζονται οι πρωτοταγείς κρύσταλλοι των φωσφορικών αλάτων του μετάλλου.  $[\text{M}_3(\text{PO}_4)_2]$ , (M: Cu, Ca). Σε αυτό το στάδιο οι πρωτεΐνες δημιουργούν συμπλέγματα με τα ιόντα μετάλλων ( $\text{Cu}^{+2}$ ,  $\text{Ca}^{+2}$ ) κυρίως μέσω αλληλεπιδράσεων των αμιδικών ομάδων του πρωτεϊνικού κορμού. Αυτά τα συμπλέγματα παρέχουν τις θέσεις για πυρηνοποίηση των πρωτογενών κρυστάλλων.

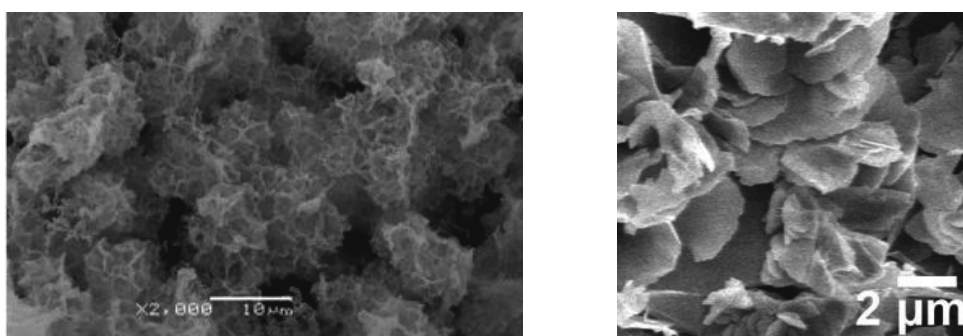
**Στάδιο 2°:** Στο 2<sup>ο</sup> στάδιο ανάπτυξης σχηματίζονται μεγάλα συσσωματώματα μεταξύ των πρωτεϊνικών μορίων και των πρωτογενών κρυστάλλων του μετάλλου. Η ύπαρξη επιμέρους  $\text{Cu}^{+2}$  θέσεων δέσμευσης στην επιφάνεια των συσσωματωμάτων επιτρέπει την κινητικά ελεγχόμενη ανάπτυξη των κρυστάλλων προκαλώντας την εμφάνιση ξεχωριστών πετάλων.

**Στάδιο 3°:** Στο τελευταία στάδιο η ανισότροπη ανάπτυξη οδηγεί στον πλήρη σχηματισμό μίας διακλαδισμένης δομής που μοιάζει με λουλούδι.



**Εικόνα 6.4.** Προτεινόμενος μηχανισμός σύνθεσης των nanoflowers σε τρία στάδια: (1) δημιουργία των πρωτογενών κρυστάλλων, (2) ανάπτυξη των κρυστάλλων, (3) σχηματισμός των nanoflowers. Τα κίτρινα σφαιρίδια απεικονίζουν τα πρωτεϊνικά μόρια (Πηγή Ge et al., 2012).<sup>274</sup>

Σε αυτόν τον προτεινόμενο μηχανισμό ανάπτυξης, η πρωτεΐνη επάγει την πυρηνοποίηση των κρυστάλλων του φωσφορικού μετάλλου για τον σχηματισμό της «βάσης» για τα πέταλα ενώ παράλληλα χρησιμεύει και ως «κόλλα» συγκρατώντας τα πέταλα μεταξύ τους. Αξίζει να σημειωθεί ότι απουσία πρωτεϊνών δημιουργούνται μεγάλοι κρύσταλλοι χωρίς όμως την δομή nanoflowers (Εικόνα 6.5).<sup>277</sup>



**Εικόνα 6.5.** Εικόνες SEM κρυστάλλων απουσία πρωτεϊνών.(Yu et al., 2015, Ge et al., 2012)<sup>273,274</sup>

#### 6.1.2.2. Δομικά χαρακτηριστικά nanoflowers

Τα nanoflowers πρωτεϊνών μπορούν να ταξινομηθούν ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους όπως για παράδειγμα το σχήμα, το μέγεθος, την αναλογία



πρωτεΐνης/συνολικό βάρος και την καταλυτική συμπεριφορά συγκριτικά με το ελεύθερο ένζυμο.

Όσον αφορά στο μέγεθος των nanoflowers, έχει βρεθεί ότι μπορεί να κυμαίνεται από 2 έως 30  $\mu\text{m}$ , ενώ το μέγεθος των πόρων (το οποίο αναφέρεται στο κενό μεταξύ των πετάλων) είναι 0.1  $\mu\text{m}$ . Παρόλο που το μέγεθος των περισσότερων δομών nanoflowers ανήκει στην κλίμακα των μικρό-μονάδων ( $\mu\text{m}$ ) και το δόκιμο θα ήταν οι δομές αυτές να ονομάζονται microflowers, ωστόσο έχει επικρατήσει ο όρος nanoflowers.<sup>277</sup>

Μελέτες θερμοβαρυντικής ανάλυσης (TGA) της αναλογίας βάρους της πρωτεΐνης προς το συνολικό βάρος του ακινητοποιημένου σκευάσματος, έδειξαν ότι η πρωτεΐνη αποτελεί το 10-66 % του συνολικού βάρους, ενώ όσο περισσότερη πρωτεΐνη χρησιμοποιείται το ποσοστό αυτό αυξάνεται. Επιπλέον, η αύξηση της συγκέντρωσης της πρωτεΐνης κατά την ακινητοποίηση, αυξάνει τις θέσεις πυρηνοποίησης με αποτέλεσμα να δημιουργούνται δομές nanoflowers με μικρότερο μέγεθος. Ωστόσο το ποσοστό ακινητοποίησης (ο λόγος της ποσότητας της πρωτεΐνης που ακινητοποιήθηκε προς την συνολική ποσότητα που χρησιμοποιήθηκε) ακολουθεί αντίθετη τάση, καθώς η προσθήκη υπερβολικής ποσότητας πρωτεΐνης σε μία σταθερή ποσότητα φορέα οδηγεί σε σημαντική μείωση του ποσοστού ακινητοποίησης. Κρίνεται, επομένως απαραίτητη η επιλογή της κατάλληλης ποσότητας της πρωτεΐνης έτσι ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή μορφολογία και το βέλτιστο ποσοστό ακινητοποίησης.<sup>276,278</sup>

Παρόλο που η συγκεκριμένη τεχνική της ακινητοποίησης ενζύμων σε δομές nanoflowers συνιστά μία αρκετά πρόσφατη διεργασία, έχει προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον διαφόρων μελετών. Η μελλοντική έρευνα σε αυτόν τον τομέα αναμένεται να οδηγήσει σε νέες αρχές σύνθεσης και νέους τύπους υβριδικών nanoflowers με δυνατότητες αξιοποίησης τους σε εφαρμογές της βιοκατάλυσης, στην μιμητική ενζύμων και στην ανάπτυξη υψηλής ευαισθησίας βιοαισθητήρων.<sup>277</sup>



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7<sup>ο</sup>

## Μικρο-βιοαντιδραστήρες

---



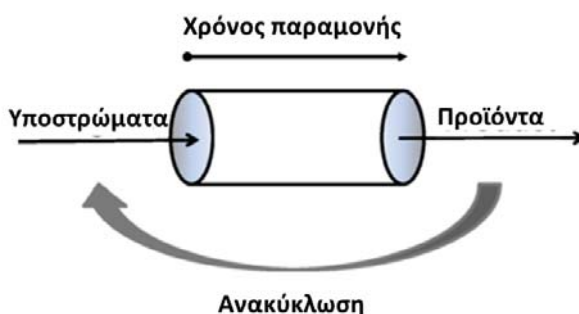
### 7.1. Εισαγωγή

Τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερο ενδιαφέρον στρέφεται προς τον τομέα της συνεχούς ροής καταλυόμενων αντιδράσεων. Η τεχνολογία των μικρο-αντιδραστήρων οδήγησε σε νέες επιστημονικές λύσεις και προκλήσεις σε ένα ευρύ φάσμα πεδίων όπως η βιομηχανία ηλεκτρονικών, η χημική βιομηχανία, η ιατρική τεχνολογία, η βιοτεχνολογία, η παραγωγή καυσίμων, η προστασία του περιβάλλοντος, κ.α.<sup>279</sup>

Ένας μικρο-αντιδραστήρας αποτελείται από κανάλια εσωτερικής διαμέτρου μικρότερης από 1 mm, τα οποία προέρχονται από σταθερά και αδρανή υλικά (γυαλί, πυρίτιο, ανοξείδωτο χάλυβα ή πολυμεροί) και είναι εξοπλισμένα με ένα ρυθμιζόμενο σύστημα άντλησης.<sup>280</sup> Τα πλεονεκτήματα αυτών των συστημάτων περιλαμβάνουν την αυξημένη μεταφορά μάζας και θερμότητας εξ' αιτίας της μεγαλύτερης αναλογίας επιφάνειας προς όγκο συγκριτικά με τα συμβατικά «κλειστού» τύπου συστήματα αντιδράσεων, ενώ παράλληλα προσφέρουν πιο εύκολη βελτιστοποίηση των συνθηκών αντίδρασης προσαρμόζοντας διάφορες παραμέτρους όπως ο ρυθμός ροής, η πίεση, η θερμοκρασία κ.α. Επιπλέον, η μετάβαση από εργαστηριακές σε μεγάλης κλίμακας διεργασίες πραγματοποιείται πιο εύκολα εφαρμόζοντας παράλληλες μονάδες μικρο-αντιδραστήρων χωρίς τους περιορισμούς που επιβάλλουν οι συμβατικές διεργασίες.<sup>281,282</sup> Τα πλεονεκτήματα αυτά αποτέλεσαν σημαντικό κίνητρο για την ανάπτυξη μικρο- αντιδραστήρων σε

βιοκαταλυόμενες αντιδράσεις και σε συνδυασμό με την τεχνολογία ακινητοποίησης αναμένεται να διευρύνουν τις εφαρμογές των ενζύμων σε βιομηχανική κλίμακα.<sup>283</sup>

Οι πιο συχνά απαντώμενοι μικρο-βιοαντιδραστήρες είναι αυτοί της «πακεταρισμένης στήλης» (packed bed reactors). Αυτού του τύπου οι αντιδραστήρες αποτελούνται από μία στήλη «πακεταρισμένη» με τον επιθυμητό βιοκαταλύτη στην οποία το μέσο της αντίδρασης, στο οποίο περιέχονται τα υποστρώματα, αντλείται με συγκεκριμένο ρυθμό ροής. Ο ρυθμός ροής καθορίζει τον χρόνο παραμονής των υποστρωμάτων στην στήλη και κατ' επέκταση τον χρόνο της αντίδρασης. Η βέλτιστη επιλογή διεργασίας συνιστά την μετατροπή των υποστρωμάτων σε ένα μοναδικό κύκλο αντίδρασης, αποφεύγοντας την επαναλαμβανόμενη άντληση τους μέσα από την στήλη για αρκετούς κύκλους αντίδρασης μέχρι την πλήρη μετατροπή τους (Εικόνα 7.1).<sup>284</sup>



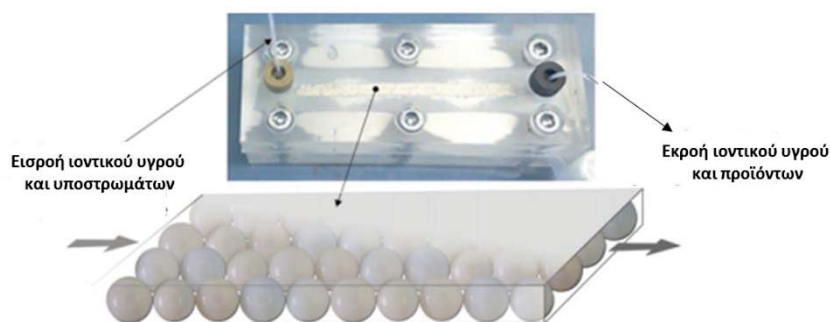
Εικόνα 7.1. Συνεχούς ροής βιοκατάλυση.

## 7.2. Ιοντικά υγρά στην εφαρμογή μικρο-βιοντιδραστήρων

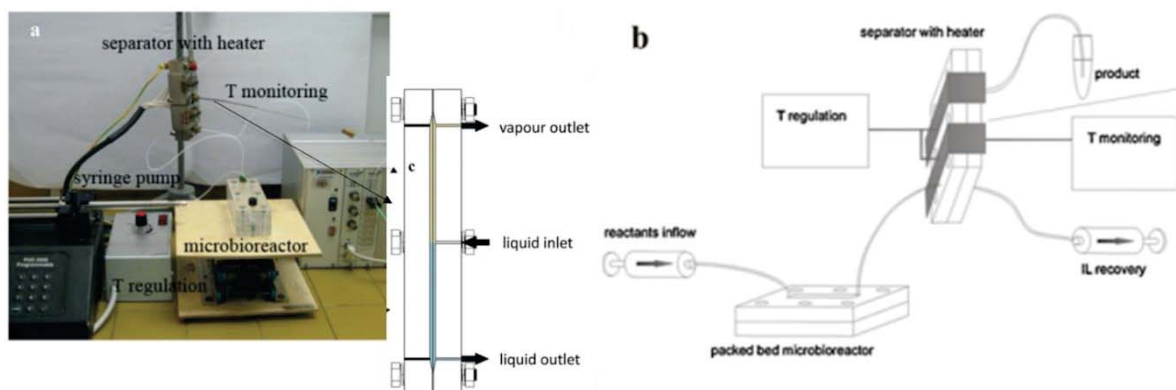
Ένα από τα μειονεκτήματα εφαρμογής των ιοντικών υγρών ως μέσα σε μεγάλης κλίμακας βιοκαταλυόμενες αντιδράσεις είναι ο περιορισμός μεταφοράς μάζας και θερμότητας εξ' αιτίας του υψηλού ιξώδους. Η εφαρμογή, ωστόσο, των ιοντικών υγρών σε συνεχούς λειτουργίας μικρο-βιοαντιδραστήρες προσφέρει την δυνατότητα ελαχιστοποίησης αυτών των περιορισμών διευρύνοντας έτσι την χρήση τους σε βιομηχανική κλίμακα. Διάφορες μελέτες ενζυμικών μετασχηματισμών σε συνεχούς λειτουργίας μικρο-βιοαντιδραστήρες χρησιμοποιώντας ιοντικά υγρά ως μέσα έχουν καταδείξει την πλεονεκτήματα εφαρμογής αυτού του συστήματος.<sup>285,286</sup>

Το 2012, η ομάδα του Plazl, μελέτησε την δυνατότητα σύνθεσης του βουτυλεστέρα του βουτυρικού οξέος από την ακινητοποιημένη λιπάση Novozyme 435 στο ιοντικό υγρό

[bmpry][NTf<sub>2</sub>] χρησιμοποιώντας συνεχούς λειτουργίας μικρο-βιοαντιδραστήρα. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι το σύστημα του μικρο-βιοαντιδραστήρα μπορεί να χρησιμοποιηθεί επιτυχώς, οδηγώντας σε πλήρη μετατροπή των υποστρωμάτων μετά από 5 λεπτά χρόνο παραμονής στην στήλη. Επιπλέον, το υψηλό σημείο βρασμού του ιοντικού υγρού επέτρεψε τον διαχωρισμό του επιθυμητού προϊόντος με ποσοστό ανάκτησης 90 % και την δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του ιοντικού υγρού.<sup>287</sup>



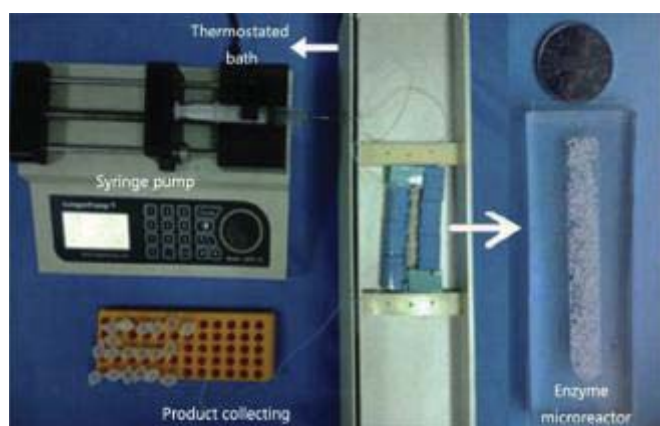
**Εικόνα 7.2.** Μικρο-βιοαντιδραστήρας «πακεταρισμένης στήλης» με Novozyme 435. Το υλικό που χρησιμοποιήθηκε για την κατασκευή του μικρο-αντιδραστήρα ήταν poly(methyl methacrylate) (PMMA) και οι διαστάσεις του ήταν 448 μm × 90 mm × 50 mm (Πηγή Pohar et al., 2012).<sup>287</sup>



**Εικόνα 7.3.** (a-c) Η πειραματική διάταξη για την σύνθεση και την απομόνωση του βουτυλεστέρα του βουτυρικού οξέος σε συνεχούς ροής μικρο-βιοαντιδραστήρα(Πηγή Pohar et al., 2012).<sup>287</sup>

Εν συνεχεία, μελετήθηκε η αντίδραση σύνθεσης αμυλεστέρα του οξικού οξέος χρησιμοποιώντας το ιοντικό υγρό [C<sub>7</sub>mim][NTf<sub>2</sub>] ως μέσο της αντίδρασης. Η απόδοση σύνθεσης του προϊόντος στον συνεχούς λειτουργίας μικρο-βιοαντιδραστήρα με Novozyme 435 έφτασε το 92 % μετά από βελτιστοποίηση των συνθηκών, ενώ το σύστημα χρησιμοποιήθηκε επαναλαμβανόμενα και συνεχώς για 14 μέρες χωρίς μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου.<sup>288</sup>

Μία ακόμα ενδιαφέρουσα εφαρμογή της βιοκατάλυσης σε ιοντικά υγρά σε συνεχούς λειτουργίας διεργασία πραγματοποιήθηκε από την ομάδα του Wu, για την αντίδραση σύνθεσης προπυλεστέρα του καφεϊκού οξέος από την Novozyme 435 στο ιοντικό υγρό [Bmim][CF<sub>3</sub>SO<sub>3</sub>]. Η εφαρμογή του μικρο-βιοαντιδραστήρα οδήγησε σε υψηλά ποσοστά απόδοσης της αντίδρασης (99.5 %), ενώ η συγκριτική μελέτη με την «κλειστού» τύπου αντίδραση κατέδειξε τα σημαντικά πλεονεκτήματα της μεθόδου. Πιο συγκεκριμένα, η συνεχούς λειτουργίας βιοδιεργασία μείωσε κατά 10 και 16 φορές τον χρόνο επώασης και την σταθερά  $K_m$  της αντίδρασης αντίστοιχα συγκριτικά με την «κλειστού» τύπου αντίδραση.<sup>289</sup>



**Εικόνα 7.4.** Διάταξη του συνεχούς λειτουργίας μικρο-βιοαντιδραστήρα για την αντίδραση σύνθεσης του προπυλεστέρα του καφεϊκού οξέος από την Novozyme 435 (Πηγή Wang et al., 2013).<sup>289</sup>

Παρόμοια βιοκαταλυτική διεργασία συνεχούς λειτουργίας, πραγματοποιήθηκε από την ίδια ομάδα για την σύνθεση βιοδραστικών φαινολικών εστέρων του καφεϊκού οξέος στο ιοντικό υγρό [Bmim][NTf<sub>2</sub>]. Τα αποτελέσματα και αυτή την φορά κατέδειξαν την επιτυχημένη εφαρμογή του μικρο-βιοαντιδραστήρα οδηγώντας σε υψηλά ποσοστά την απόδοση της αντίδρασης με δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του ενζύμου για 20 συνεχόμενους βιοκαταλυτικούς κύκλους.<sup>290</sup>

Οι μέχρι τώρα μελέτες μικρο-βιοαντιδραστήρα συνεχούς λειτουργίας αφορούν στην εφαρμογή των ιοντικών υγρών σε αντιδράσεις σύνθεσης εστέρων με την χρήση ακινητοποιημένων λιπασών. Η περαιτέρω διερεύνηση σε αυτόν το τομέα με την εφαρμογή τόσο διαφορετικών ενζυμικών κατηγοριών όσο και διαφόρων ιοντικών υγρών πιθανά να προσφέρει λύσεις σε περιορισμούς που έχει επιβάλει η εφαρμογή των συμβατικών μεθόδων μέσω βελτίωσης των αποδόσεων σε χρονικά μικρότερες επώσεις, αύξηση του ελέγχου της βιοδιεργασίας και δυνατότητα για scale-up των αντιδράσεων.<sup>289</sup>

# Κεφάλαιο 8<sup>ο</sup>

## Υλικά και Μέθοδοι

---



### 8.1. Υλικά

#### 8.1.1. Ένζυμα-Πρωτεΐνες

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα ένζυμα-πρωτεΐνες:

- ◆ Κυτόχρωμα c από καρδιά αλόγου, λυοφυλιωμένο σκεύασμα καθαρότητας >95% με ενεργότητα 552 U/mg στερεού σκευάσματος (1 Unit αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου που προκαλεί 0.01 αύξηση της απορρόφησης ανά λεπτό στα 407 nm στην αντίδραση οξειδωσης της γουαϊακόλης παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου σε pH 7.0 στους 25 °C) της εταιρίας Sigma Aldrich.
- ◆ HRP (E.C. 1.11.1.7) (type VI), λυοφυλιωμένο σκεύασμα καθαρότητας ~66 % με ενεργότητα 261 U/mg στερεού σκευάσματος. (1 Unit αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου που παράγει 1 mg purpurogallin από pyrogallol σε 20 s σε pH 6.0 στους 25°C) της εταιρίας Sigma Aldrich.
- ◆ Τυροσινάση από μανιτάρια *Agaricus bisporus* (E.C. 1.14.18.1),
  - Λυοφυλιωμένο σκεύασμα καθαρότητας ~22 % με ενεργότητα 3933 U/mg στερεού σκευάσματος (1 Unit αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου που προκαλεί αύξηση της απορρόφησης στα 280 nm κατά 0.001 ανά λεπτό σε pH 6.5 στους 25 °C σε μίγμα αντίδρασης 3 mL, το οποίο περιέχει L-τυροσίνη) της εταιρίας Sigma Aldrich.

- Υδατικό εκχύλισμα από μανιτάρια *Agaricus bisporus*, το οποίο απομονώθηκε εργαστηριακά
- ◆ Λακκάση από *Trametes versicolor* (E.C.1.10.3.2), λυοφιλιωμένο σκεύασμα καθαρότητας ~8.5 % με ενεργότητα 10 U/mg στερεού σκευάσματος (1 Unit αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου που οξειδώνει 1  $\mu\text{mol}$  κατεχόλης ανά λεπτό σε pH 4.5 στους 25 °C) της εταιρίας Sigma Aldrich.
- ◆ Αλκοολική αφυδρογονάση ADH από ζύμη αρτοποιίας (E.C. 1.1.1.1), λυοφιλιωμένο σκεύασμα καθαρότητας >90 % με ενεργότητα 440 U/mg στερεού σκευάσματος (1 Unit αντιστοιχεί στην ποσότητα του ενζύμου που μετατρέπει 1.0  $\mu\text{mole}$  αιθανόλης σε ακεταλδεύδη ανά λεπτό σε pH 8.8 στους 25 °C) της εταιρίας Sigma Aldrich.
- ◆ Λιπάση Β από *Candida antarctica* (E.C. 3.1.1.3), υδατικό διάλυμα περιεκτικότητας 25 mg/mL (Lipozyme CalB L, προσφορά της Novozymes).
- ◆ Αλβουμίνη από ορό βοός. Χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη πρωτεΐνη για τον καθορισμό της πρότυπης καμπύλης στα πρωτόκολλα ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών.

### 8.1.2. Υποστρώματα

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τα εξής εμπορικά διαθέσιμα υποστρώματα:

- ◆ Γουαϊακόλη (2-μεθοξυφαινόλη, Sigma), 4-μεθυλ-κατεχόλη (Sigma Aldrich), νικοτιναμίδιο αδενινο δινουκλεοτίδιο ( $\beta\text{-NAD}^+$ , >99%, Sigma Aldrich), αιθανόλη (Sigma Aldrich) χλωρίδιο της πινακυανόλης (Sigma Aldrich), διαμμωνιακό άλας (2,2'-αζινο-δι(3-αιθυλοβενζοθιαζολινο-6-σουλφονικού οξέος) (ABTS, AppliChem), 3,4-δωδροξυ-L-φαινυλαλανίνη (L-Dopa,  $\geq 98$  %, Sigma-Aldrich) και υπεροξείδιο του υδρογόνου ( $\text{H}_2\text{O}_2$ , Fluka), ως υποστρώματα σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις.
- ◆ Βουτυρικός εστέρας της 4-νιτροφαινόλης (pNPB, Sigma Aldrich) και αιθυλ εστέρας του φερουλικού οξέος (Sigma Aldrich) χρησιμοποιήθηκαν για αντιδράσεις υδρόλυσης και μετεστεροποίησης αντίστοιχα.
- ◆ 1-οκτανόλη χρησιμοποιήθηκε για αντιδράσεις μετεστεροποίησης (Sigma Aldrich).



### 8.1.3. Διαλύτες

Όλοι οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν καθαρότητας αναλυτικής βαθμίδας και προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Fluka, Sigma Aldrich και Merck.

### 8.1.4. Ιοντικά υγρά και βαθείς ευτηκτικοί διαλύτες

Τα συστατικά των ιοντικών και ευτηκτικών υγρών που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση ήταν υψηλής καθαρότητας (>99 %) και προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Alfa Aesar, Merck, Applichem και Sigma Aldrich:

- ◆ Αμίνες: 2-(μεθυλαμινο) αιθανόλη, 2-(διμεθυλαμινο) αιθανόλη, διαιθανολαμίνη και αιθανολαμίνη
- ◆ Οξέα: μυρμηκικό οξύ, βουτυρικό οξύ, εξανικό οξύ και κυκλοπεντανοκαρβοξυλικό οξύ.
- ◆ Αμμωνιακά άλατα: Χλωρίδιο χολίνης (ChCl) και χλωρίδιο αιθυλαμμωνίου (EAC)
- ◆ Δότες δεσμών υδρογόνου: Ουρία (U), γλυκερόλη (Gly) και αιθυλενική γλυκόλη (EG)

### 8.1.5. Άλλα αντιδραστήρια

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε ως διλειτουργικό αντιδραστήριο η γλουταραλδεύδη (25%, Merck) κατά την δημιουργία των CLEAs τυροσινάσης καθώς επίσης και θειικό αμμώνιο (Applichem) για την καταβύθιση της πρωτεΐνης. Για την ακινητοποίηση των ενζύμων χρησιμοποιήθηκε, ως φορέας, ένυδρος θειϊκός χαλκός ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ) (Sigma Aldrich). Για τον υπολογισμό του ποσοστού ακινητοποίησης των ενζύμων χρησιμοποιήθηκε η χρωστική Coomassie Brilliant Blue G-250 (Sigma). Για την αφυδάτωση των ιοντικών και ευτηκτικών υγρών χρησιμοποιήθηκαν μοριακά κόσκινα πόρων 4 Å από την εταιρεία Sigma Aldrich.

## 8.2. Μεθοδολογία

### 8.2.1. Σύνθεση Ιοντικών υγρών

Η σύνθεση των ιοντικών υγρών πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων και στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ. Η διαδικασία σύνθεσης των ιοντικών υγρών, βασίζεται στην αντίδραση εξουδετέρωσης ενός οξέος από μία αμίνη<sup>227</sup>. Τα συστατικά που χρησιμοποιήθηκαν για την σύνθεση των ιοντικών υγρών της παρούσας διπλωματικής εργασίας παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.1.

Η διαδικασία σύνθεσης ξεκινάει με την προσθήκη του οξέος (0.1 mol) στάγδην και υπό ανάδευση στην αμίνη (0.1 mol), η οποία βρίσκεται σε δίλαιμη σφαιρική φιάλη εμβαπτισμένη σε παγόλουτρο καθ' όλη την διάρκεια της προσθήκης, εξ' αιτίας της υψηλά εξώθερμης φύσης της αντίδρασης εξουδετέρωσης. Η διαδικασία της σύνθεσης πραγματοποιείται υπό αδρανείς συνθήκες (υπό ατμόσφαιρα αερίου N<sub>2</sub>) και η ανάδευση διαρκεί 24 ώρες. Μετά το πέρας των 24 ωρών, το ιοντικό υγρό οδηγείται σε αντλία κενού υπό θέρμανση στους 40 °C, με στόχο την απομάκρυνση της υγρασίας. Ο χρόνος παραμονής στην αντλία ελέγχεται μέσω της μέτρησης του βάρους του ιοντικού υγρού (~ 4 ώρες). Στη συνέχεια το ιοντικό υγρό αποθηκεύεται σε θερμοκρασία δωματίου σε κλειστό γυάλινο δοχείο παρουσία ξηραντήρα μέχρι την χρήση του.

### 8.2.2. Ταυτοποίηση της δομής Ιοντικών υγρών

Η ταυτοποίηση της δομής των ιοντικών υγρών πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ.

Η χημική δομή των συντιθέμενων ιοντικών υγρών ταυτοποιήθηκε μέσω:

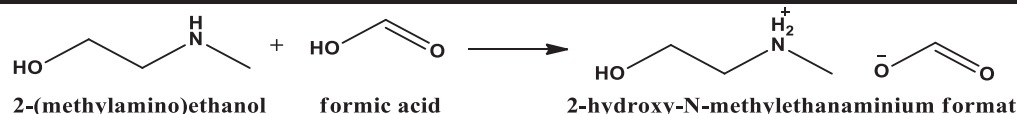

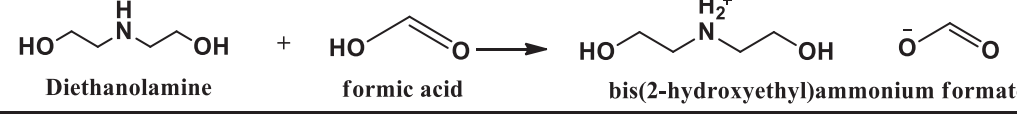
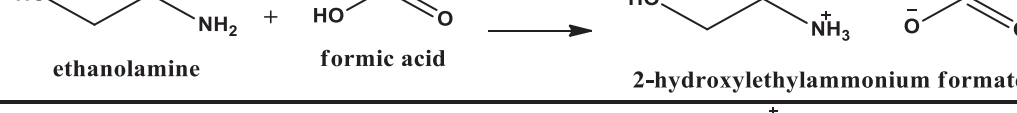

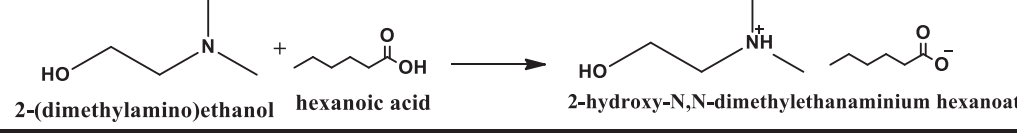
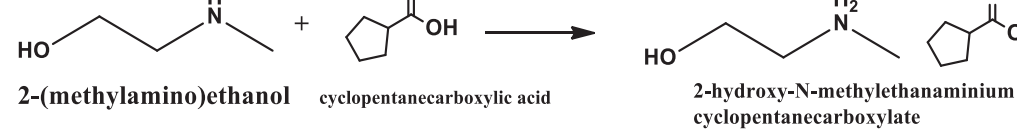
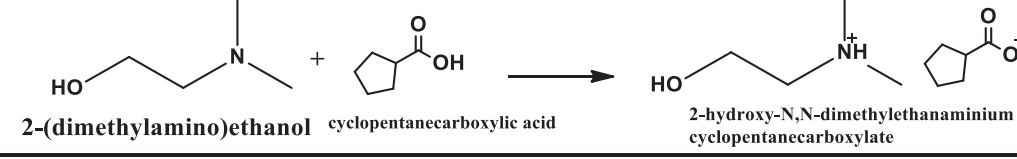
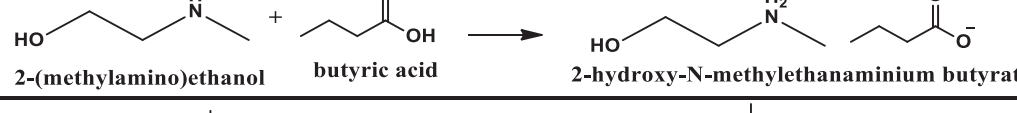
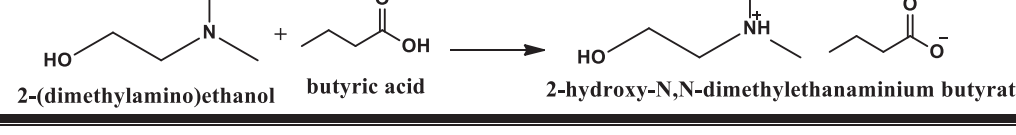
- ❖ Φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού <sup>1</sup>H-NMR και <sup>13</sup>C-NMR. Η λήψη φασμάτων <sup>1</sup>H-NMR (300MHz) και <sup>13</sup>C-NMR (75MHz) των ιοντικών υγρών πραγματοποιήθηκε στον φασματογράφο Varian Gemini 2000 (300 MHz). Τα ιοντικά υγρά διαλυτοποιήθηκαν σε DMSO και CDCl<sub>3</sub>.
- ❖ Φασματοσκοπία Μάζας. Η ανάλυση των δειγμάτων με φασματομετρία μάζας πραγματοποιήθηκε σε Varian 500 MS φασματογράφο μάζας με ανιχνευτή παγίδευσης ιόντων και τύπο ιονισμού με ηλεκτροψεκασμό.

- ❖ Φασματοσκοπία υπερύθρου (FT-IR). Η λήψη φασμάτων ATR (υγρών δειγμάτων) πραγματοποιήθηκε με φασματογράφο JASCO 4200.

### **8.2.3. Σύνθεση βαθέων ευτηκτικών διαλυτών**

Η παρασκευή των βαθέων ευτηκτικών διαλυτών (DES) πραγματοποιείται μέσω ανάμιξης των συστατικών τους στις επιθυμητές αναλογίες. Πιο συγκεκριμένα, το αμμωνιακό άλας (ChCl ή EAC) αναμιγνύεται με τον δότη δεσμών υδρογόνου (HBD) (U, Gly και EG) σε αναλογία 1:2 στην περίπτωση των DES με βάση το ChCl και 1:1.5 στην περίπτωση των DES με βάση το EAC. Στην συνέχεια το μίγμα των συστατικών επωάζεται στους 100 °C ή στους 80 °C (στην περίπτωση των DES με βάση την Gly) για 1 ώρα με ενδιάμεση ανάδευση έως ότου δημιουργηθεί ένα άχρωμο ομογενές διάλυμα. Το συντιθέμενο ευτηκτικό υγρό τοποθετείται για ξήρανση σε πεντοξείδιο φωσφόρου (P<sub>2</sub>O<sub>5</sub>) για 2 εβδομάδες πριν από την χρήση του. Τα DES που συντέθηκαν στην παρούσα διατριβή παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.3.

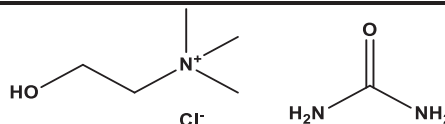
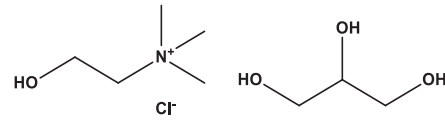
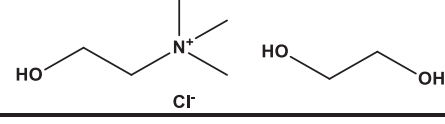
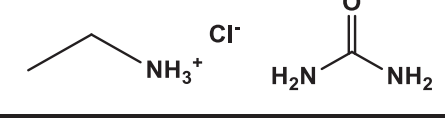
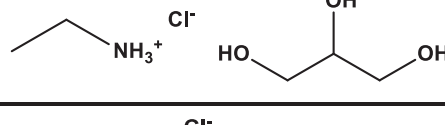
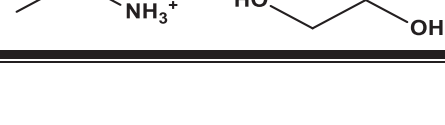
Πίνακας 8.1. Ονοματολογία και δομή των Ιοντικών υγρών.

Σύντμηση	Δομή/συστατικά Ιοντικού υγρού
HMEAF	 <p>2-(methylamino)ethanol + formic acid → 2-hydroxy-N-methylethanaminium formate</p>
HDMEAF	 <p>2-(dimethylamino)ethanol + formic acid → 2-hydroxy-N,N-dimethylethanaminium formate</p>
BHEAF	 <p>Diethanolamine + formic acid → bis(2-hydroxyethyl)ammonium formate</p>
HEAF	 <p>ethanolamine + formic acid → 2-hydroxyethylammonium formate</p>
HMEAH	 <p>2-(methylamino)ethanol + hexanoic acid → 2-hydroxy-N-methylethanaminium hexanoate</p>
HDMEAH	 <p>2-(dimethylamino)ethanol + hexanoic acid → 2-hydroxy-N,N-dimethylethanaminium hexanoate</p>
HMEAC	 <p>2-(methylamino)ethanol + cyclopentanecarboxylic acid → 2-hydroxy-N-methylethanaminium cyclopentanecarboxylate</p>
HDMEAC	 <p>2-(dimethylamino)ethanol + cyclopentanecarboxylic acid → 2-hydroxy-N,N-dimethylethanaminium cyclopentanecarboxylate</p>
HMEAB	 <p>2-(methylamino)ethanol + butyric acid → 2-hydroxy-N-methylethanaminium butyrate</p>
HDMEAB	 <p>2-(dimethylamino)ethanol + butyric acid → 2-hydroxy-N,N-dimethylethanaminium butyrate</p>

Πίνακας 8.2. Πυκνότητα των συντιθέμενων ιοντικών υγρών

Ιοντικό Υγρό	Πυκνότητα (g cm <sup>-3</sup> ) (20 °C)
HMEAF	1.1372
HDMEAF	1.0937
BHEAF	1.1587
HEAF	1.2059

Πίνακας 8.3. Ονοματολογία και δομή των βαθέων ευτηκτικών διαλυτών

Σύντμηση	Δομή Βαθέως Ευτηκτικού Υγρού	Μοριακή Αναλογία
ChCl:U		1:2
ChCl:Gly		1:2
ChCl:EG		1:2
EAC:U		1:1.5
EAC:Gly		1:1.5
EAC:EG		1:1.5

#### 8.2.4. Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών

Ο ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο Bradford<sup>291</sup>. Το πρωτόκολλο αυτό βασίζεται στην πρόσδεση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 στο πρωτεϊνικό μόριο. Η πρόσδεση της χρωστικής στην πρωτεΐνη προκαλεί μετατόπιση του μεγίστου απορρόφησης της χρωστικής από τα 465 nm στα 595 nm. Αρχικά 0.8 mL διαλύματος Bradford αναμιγνύονται με 0.2 mL πρωτεϊνικού διαλύματος (<0.2 mg/mL) για 10 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η διαδικασία πρόσδεσης. Στην συνέχεια η απορρόφηση μετράται στα 565nm και η ποσοτικοποίηση των μετρούμενων απορροφήσεων επιτυγχάνεται μέσω εφαρμογής πρότυπης καμπύλης αλβουμίνης (1-20μg στο διάλυμα μέτρησης).

#### 8.2.5. Ακίνητοποίηση ενζύμων

##### 8.2.5.1. Διαμοριακή Σύνδεση τυροσινάσης – Παρασκευή CLEAs

Στην παρούσα διατριβή παρασκευάστηκαν CLEAs τυροσινάσης χρησιμοποιώντας ως λειτουργικό αντιδραστήριο την γλουταραλδεΐδη. Αρχικά, σε 125 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 0.1 M pH 6.8 προστίθενται 100 gr τεμαχισμένα φρέσκα μανιτάρια από *Agaricus bisporus*. Το μίγμα ομογενοποιείται και στη συνέχεια φυγοκεντρείται στις 4000 rpm για 15 λεπτά. Στο υπερκείμενο του δείγματος εμπεριέχεται σε μεγαλύτερο ποσοστό το ένζυμο τυροσινάση. Το υπερκείμενο απομονώνεται και ογκομετρείται, έτσι ώστε να υπολογιστεί η ποσότητα του θειϊκού αμμωνίου  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  για την καταβύθιση του ενζύμου. Η καταβύθιση πραγματοποιείται σε βαθμό κορεσμού 60 % (δηλ. 36.1 gr  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  σε 100 mL διαλύματος). Η προσθήκη του  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  πραγματοποιείται σταδιακά με ταυτόχρονη ανάδευση του δείγματος σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανάδευση πραγματοποιείται για 5 λεπτά απ' την ολοκλήρωση της προσθήκης του  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  και στην συνέχεια προστίθεται στάγδην το λειτουργικό αντιδραστήριο, γλουταραλδεΐδη με τελική περιεκτικότητα 2% v/v. Το δείγμα επώάζεται για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου προκειμένου να πραγματοποιηθεί η διαμοριακή σύνδεση των πρωτεϊνικών μορίων. Μετά το πέρας των 3 ωρών το διάλυμα φυγοκεντρείται στις 4000 rpm για 10 λεπτά. Το υπερκείμενο απομακρύνεται και το ίζημα που προκύπτει, το οποίο συνιστά τα CLEAs του ενζύμου, επαναιωρείται σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.1M pH 6.8 και φυγοκεντρείται στις ίδιες συνθήκες. Η διαδικασία της πλύσης επαναλαμβάνεται έως ότου απομακρυνθεί η

γλουταραλδεϋδη και προκύψει ένα διαυγές υπερκείμενο. Μετά την τελευταία φυγοκέντρωση, η υγρασία του ιζήματος απομακρύνεται σε ξηραντήρα υπό κενό και το παρασκεύασμα των CLEAs τυροσινάσης φυλάσσεται στους -20 °C.

#### **8.2.5.2. Ακίνητοποίηση λιπάσης σε δομές nanoflowers**

1.4 mL υδατικού διαλύματος CuSO<sub>4</sub> (120 mM) προστέθηκαν σε 200 mL ρυθμιστικού διαλύματος saline (PBS)\* pH 7.4 (τελική συγκέντρωση CuSO<sub>4</sub> 0.8 mM), στο οποίο περιέχονται 0.1 mg/mL λιπάσης B από *Candida antarctica*. Το μίγμα επωάζεται σε θερμοκρασία δωματίου για 3 ημέρες. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης, το δείγμα φυγοκεντρείται στις 4000 rpm για 10 λεπτά, ακολουθούν 3 πλύσεις και το ίζημα που προκύπτει μεταφέρεται για ξήρανση υπό κενό. Το ακίνητοποιημένο ενζυμικό σκεύασμα αποθηκεύεται στους 4 °C. Το μέγεθος και η μορφολογία των nanoflowers λιπάσης που δημιουργήθηκαν μελετήθηκε με μικροσκόπιο ηλεκτρονικής σάρωσης JSM 6510 LV JOEL SEM, Tokyo, Japan, το οποίο λειτουργούσε με επιταχυνόμενη τάση 20 kV.

\* Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος saline (PBS) αναμιγνύονται 137 mM χλωριούχου νατρίου (NaCl), 2.7 mM χλωριούχου καλίου (KCl), 10 mM φωσφορικού νατρίου (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) και 1.8 mM φωσφορικού καλίου (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) σε 1 L H<sub>2</sub>O. Η ρύθμιση του pH στην τιμή 7.4 γίνεται μέσω της προσθήκης HCl.

### **8.2.6. Μέθοδοι προσδιορισμού δραστηριότητας οξειδοαναγωγικών ενζύμων**

#### **8.2.6.1. Μέτρηση δραστηριότητας κυτοχρώματος c**

Η δράση του κυτοχρώματος c ως υπεροξειδάση μελετήθηκε μέσω της αντίδρασης οξείδωσης της γουαϊακόλης παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Σε μία τυπική διαδικασία, 13.8 U/mL (25μg/mL) της πρωτεΐνης προστίθενται σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 7.0, στο οποίο περιέχονται 2 mM γουαϊακόλης. Η αντίδραση ξεκινάει με την προσθήκη 20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και παρακολουθείται φωτομετρικά στα 470 nm.

#### **8.2.6.2. Μέτρηση δραστηριότητας υπεροξειδάσης HRP**

Για την μελέτη της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης HRP χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο οξείδωσης της γουαϊακόλης παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> όπως στην παράγραφο 6.2.6.1. με ορισμένες τροποποιήσεις. 0.026 U/mL (0.1 μg/mL) ενζύμου προστίθενται σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 6.5 στο οποίο περιέχονται 20 mM γουαϊακόλης.

Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 0.2 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και παρακολουθείται φωτομετρικά στα 470 nm.

#### **8.2.6.3. Μέτρηση δραστηριότητας τυροσινάσης**

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν δύο σκευάσματα ελεύθερης τυροσινάσης, το εμπορικά διαθέσιμο σκευάσμα και το υδατικό εκχύλισμα από μανιτάρια *Agaricus bisporus* καθώς επίσης και η ακινητοποιημένη τυροσινάση CLEAs. Η μέτρηση της δραστηριότητας των τριών σκευασμάτων πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας τα πρωτόκολλα οξείδωσης της 4-μεθυλ κατεχόλης και της L-Dopa (L-3,4-διυδροξυφαινυλαλανίνη). Στην περίπτωση της 4 μεθυλ κατεχόλης, η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 6 μg/mL του ενζυμικού σκευάσματος σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 6.8 στο οποίο έχουν διαλυτοποιηθεί 10 mM υποστρώματος. Η οξείδωση της 4 μεθυλ κατεχόλης προς σχηματισμό της αντίστοιχης κινόνης παρακολουθείται φωτομετρικά. Για την μέτρηση της δραστηριότητας της ελεύθερης τυροσινάσης από το εκχύλισμα των μανιταριών *Agaricus bisporus*, προστέθηκαν 25 μL/mL εκχυλίσματος σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 6.8 στο οποίο είχαν διαλυτοποιηθεί 2 mM L-Dopa. Η αντίδραση παρακολουθείται φωτομετρικά για 5 λεπτά στα 492 nm. Για την μέτρηση της δραστηριότητας της ακινητοποιημένης τυροσινάσης (CLEAs) η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 10 mM L-Dopa σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 6.8 στο οποίο περιέχεται το ακινητοποιημένο ένζυμο σε συγκέντρωση 6 mg/mL. Το μίγμα της αντίδρασης επωάζεται στους 27 °C υπό ανάδευση στις 700 rpm. Ανά 2 λεπτά και για χρονικό διάστημα 12 λεπτών λαμβάνονται από το μίγμα της αντίδρασης 100 μL, τα οποία προστίθενται σε μικροπλάκα πολυστυρενίου 96 θέσεων. Η αντίδραση οξείδωσης της L-Dopa προς σχηματισμό της αντίστοιχης κινόνης παρακολουθείται φωτομετρικά στα 492 nm.

#### **8.2.6.4. Μέτρηση δραστηριότητας λακάσης**

Η καταλυτική δραστηριότητα της λακάσης από *Trametes versicolor* μελετήθηκε χρησιμοποιώντας το πρωτόκολλο οξείδωσης του ABTS. Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας του ενζύμου ξεκινά με την προσθήκη 0.0084 U/mL (0.84 μg/mL) σε 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος οξικών pH 4.6 στο οποίο περιέχεται 1 mM ABTS. Η παρακολούθηση της οξείδωσης του ABTS γίνεται στα 405 nm. Σε όλες τις αντιδράσεις οξείδωσης η ποσότητα του οξυγόνου έχει θεωρηθεί ότι βρίσκεται σε περίσσεια.



#### **8.2.6.5. Μέτρηση δραστηριότητας αλκοολικής αφυδρογονάσης ADH**

Η δραστηριότητα της ADH προσδιορίστηκε μελετώντας την αναγωγή του  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> από την αιθανόλη. Πιο συγκεκριμένα, 10 U/mL stock ενζυμικού διαλύματος παρασκευάστηκαν σε 10 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 7.5. Σε μία τυπική διαδικασία, 5 mM  $\beta$ -NAD<sup>+</sup> και αιθανόλης (3.2% v/v) προστίθενται σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 8.0. Η ενζυμική αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 8  $\mu$ L ενζυμικού διαλύματος (0.08 U/mL) στο μίγμα, το οποίο επωάζεται στους 25 °C. Η αύξηση της απορρόφησης λόγω σχηματισμού του  $\beta$ -NADH παρακολουθείται στα 340 nm.

Για την μελέτη της επίδρασης τόσο των ιοντικών υγρών όσο και των ευτηκτικών διαλυτών στην δραστηριότητα των οξειδοαναγωγικών ενζύμων, διάφορες συγκεντρώσεις του εκάστοτε διαλύτη (0-90 %) προστίθενται στο μίγμα της αντίδρασης. Προκειμένου να επαναφέρουμε την επιθυμητή τιμή του pH σε κάθε διάλυμα αντίδρασης μετά την προσθήκη ιοντικού υγρού ή ευτηκτικού διαλύτη, όλα τα υδατικά μίγματα ιοντικών υγρών και ευτηκτικών διαλυτών επαναρυθμίστηκαν με HCl ή NaOH πριν χρησιμοποιηθούν στις βιοκαταλυτικές αντιδράσεις. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν, ενώ παράλληλα μετρήθηκαν οι απορροφήσεις σε τυφλά δείγματα τα οποία δεν περιείχαν ένζυμο. Η δραστηριότητα του εκάστοτε ενζύμου προσδιορίζεται βάσει της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης, όπως αυτή υπολογίζεται από τη κλίση του γραμμικού τμήματος της καμπύλης απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου. Η σχετική δραστηριότητα εκφράζεται ως ο λόγος της δραστηριότητας παρουσία κάποιου ιοντικού υγρού ή ευτηκτικού διαλύτη προς την δραστηριότητα του ενζύμου σε υδατικό διάλυμα.

#### **8.2.7. Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων και ενέργειας ενεργοποίησης $E_a$ στο κυτόχρωμα c**

Για τον προσδιορισμό των κινητικών σταθερών του κυτοχρώματος c, τόσο σε υδατικό διάλυμα όσο και σε υδατικά μίγματα διαφόρων ιοντικών υγρών συγκέντρωσης 0-75 % v/v, χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση οξείδωσης της γουαϊακόλης παρουσία  $H_2O_2$ . Σε μία τυπική πειραματική διαδικασία, σε μικροπηγάδι πλακιδίου Eliza προστίθεται ο εκάστοτε διαλύτης της αντίδρασης (50 mM ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.0 ή υδατικά μίγματα ιοντικών υγρών 0-75 % v/v) και ακολουθεί η προσθήκη της γουαϊακόλης σε συγκέντρωση 2 mM και της πρωτεΐνης σε συγκέντρωση 25  $\mu$ g/mL. Στην συνέχεια προστίθεται το  $H_2O_2$  σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 0.05 έως 100 mM. Η οξείδωση της γουαϊακόλης

παρακολουθείται στα 470 nm και ο συντελεστής απόσβεσης του προϊόντος που χρησιμοποιήθηκε είναι  $\epsilon = 26.6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

Ο προσδιορισμός των φαινομενικών κινητικών παραμέτρων  $V_{\max}^{\text{app}}$  και  $K_m^{\text{app}}$  πραγματοποιήθηκε μέσω της εξίσωσης Michaelis-Menten, χρησιμοποιώντας την ανάλυση μη γραμμικής συσχέτισης στο πρόγραμμα Enz-Fit της εταιρείας Biosoft, UK. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν και τα αποτελέσματα δίνονται ως ο μέσος όρος των μετρήσεων.

Για τον προσδιορισμό της ενέργειας ενεργοποίησης  $E_a$  της αντίδρασης οξείδωσης της γουαϊακόλης παρουσία  $\text{H}_2\text{O}_2$  από το κυτόχρωμα c, παρασκευάστηκαν υδατικά διαλύματα ιοντικών υγρών 30 % v/v τελικού όγκου 1 mL τα οποία περιείχαν 2 mM γουαϊακόλης, 100 mM  $\text{H}_2\text{O}_2$  και 25  $\mu\text{g/mL}$  κυτοχρώματος c. Οι αντιδράσεις οξείδωσης πραγματοποιήθηκαν σε ένα θερμοκρασιακό εύρος από 20 έως 60 °C. Για τον υπολογισμό της ενέργειας ενεργοποίησης χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση Arrhenius:

$$\ln k = \ln A - \frac{E_a}{RT} \quad (1)$$

όπου,

A σταθερά Arrhenius,

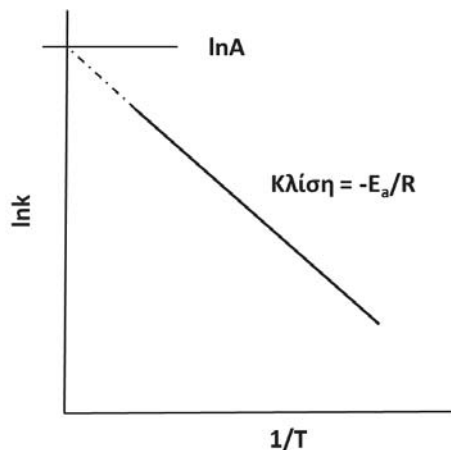
$E_a$  ενέργεια ενεργοποίησης

k σταθερά της ταχύτητας

R σταθερά αερίων

T απόλυτη θερμοκρασία

Με βάση την εξίσωση Arrhenius, η γραφική παράσταση του  $\ln k$  ως προς  $1/T$  είναι μία ευθεία, με το  $\ln A$  να δίνεται από την τεταγμένη του άξονα y (για  $1/T = 0$ ) και το  $E_a/R$  να προσδιορίζεται από την κλίση της ευθείας (Σχήμα 6.1). Επομένως βρίσκοντας την κλίση της ευθείας μπορεί να υπολογιστεί η ενέργεια ενεργοποίησης  $E_a$ .



**Σχήμα 6.1.** Εξάρτηση του  $\ln k$  από την  $1/T$  (διάγραμμα Arrhenius). Η κλίση της ευθείας αντιστοιχεί στον λόγο  $-E_a/R$  και η τομή στον άξονα  $y$  για  $1/T = 0$  αντιστοιχεί στο  $\ln A$ .

### 8.2.8. Μέτρηση δραστηριότητας υδρολυτικών ενζύμων

#### 8.2.8.1. Μέτρηση υδρολυτικής δραστηριότητας της ακινητοποιημένης λιπάσης CaLB-nanoflowers

Για την μελέτη της υδρολυτικής δραστηριότητας της λιπάσης χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο υδρόλυσης του βουτυλεστέρα της π-νιτροφαινόλης (pNPB). Η ενζυμική αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη διαλύματος pNPB (τελική συγκέντρωση στην αντίδραση 50 mM) σε ευτηκτικό υγρό (με συγκέντρωση 10 % v/v ρυθμιστικού διαλύματος 100 mM Tris-HCl pH 7.5), στο οποίο περιέχονται 15 mg/mL CALB-nanoflowers. Το μίγμα της αντίδρασης επωάζεται στους 40 °C υπό ανάδευση στις 700 rpm. Ανά 2 λεπτά και για χρονικό διάστημα 20 λεπτών λαμβάνονται από το μίγμα της αντίδρασης 5  $\mu$ L τα οποία προστίθενται σε 1:1 (v/v) μίγμα ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (25mM pH 7.5) και DMSO (τελικός όγκος 200  $\mu$ L) που περιέχεται σε μικροπλάκα πολυστυρενίου 96 θέσεων. Η αντίδραση υδρόλυσης του pNPB προς σχηματισμό π-νιτροφαινόλης παρακολουθείται φωτομετρικά στα 405 nm.

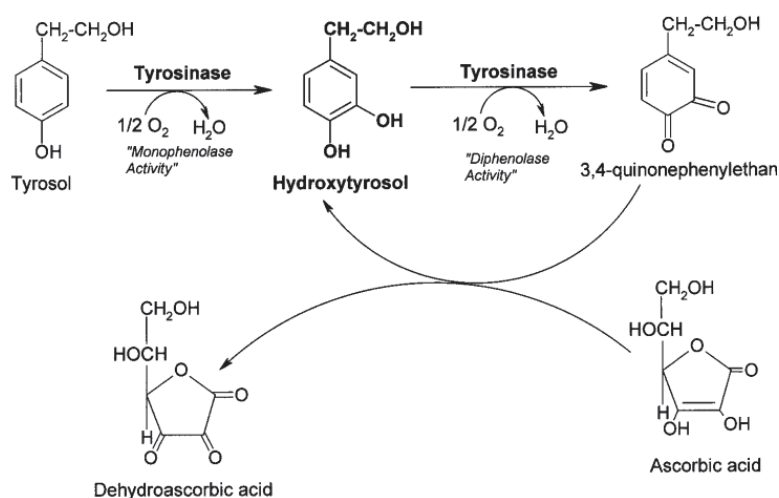
#### 8.2.8.2. Μετεστεροποίηση του αιθυλεστέρα του φερουλικού οξέος με 1-οκτανόλη

Η ικανότητα μετεστεροποίησης της ακινητοποιημένης λιπάσης, CaLB-nanoflowers μελετήθηκε στην αντίδραση του αιθυλεστέρα του φερουλικού οξέος με 1-οκτανόλη. Σε μία τυπική διαδικασία μετεστεροποίησης ο αιθυλεστέρας του φερουλικού οξέος (20 mM) και η 1-οκτανόλη (120 mM) προστίθεται σε όγκο 0.3 mL ιοντικού ή ευτηκτικού υγρού που έχει προηγουμένως αφυδατωθεί με την προσθήκη 4 Å μοριακών κοσκίων (για τουλάχιστον 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου). Οι αντιδράσεις πραγματοποιήθηκαν παρουσία 20 mg/mL

ακίνητοποιημένου ενζύμου CaLB-nanoflowers. Το μίγμα της αντίδρασης τοποθετείται σε κλειστά φιαλίδια και επωάζεται σε ανακινούμενο επωαστήρα σε θερμοκρασία 60 °C υπό ανάδευση (700rpm). Σε όλες τις περιπτώσεις παρασκευάζονται και τα αντίστοιχα τυφλά δείγματα, στα οποία δεν προστίθεται ένζυμο. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν και τα αποτελέσματα δίνονται ως ο μέσος όρος των μετρήσεων.

### 8.2.9. Ενζυμική σύνθεση υδροξυτυροσόλης

Η ικανότητα ενζυμικής σύνθεσης της υδροξυτυροσόλης (Σχήμα 6.2) από τα CLEAs τυροσινάσης μελετήθηκε σε 100 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6.8 και σε μίγματα με ιοντικούς και ευτηκτικούς διαλύτες διαφόρων συγκεντρώσεων. Συγκεκριμένα σε 1 mL τελικό όγκο αντίδρασης προστίθενται 100 mg/mL CLEAs τυροσινάσης και 20 mM τυροσόλης παρουσία 40 mM ασκορβικού οξέος. Παρουσία ασκορβικού οξέος η παραγόμενη κίνηση ανάγεται σε υδροξυτυροσόλη όπως φαίνεται στο Σχήμα 6.2.<sup>292</sup> Το μίγμα της αντίδρασης επωάζεται στους 27°C υπό ανάδευση στις 700 rpm για 48 ώρες. Σε όλες τις περιπτώσεις παρασκευάστηκαν και τα αντίστοιχα τυφλά δείγματα που δεν περιείχαν ένζυμο.



**Σχήμα 6.2.** Σχηματική απεικόνιση της αντίδρασης οξείδωσης της τυροσόλης προς υδροξυτυροσόλη από την τυροσινάση παρουσία ασκορβικού οξέος.

#### 8.2.9.1. Ποσοτική και ποιοτική ανάλυση της πορείας των αντιδράσεων με υγρή χρωματογραφία

Η ποσοτική και ποιοτική ανάλυση των αντιδρώντων και προϊόντων των αντιδράσεων μετεστεροποίησης του αιθυλεστέρα του φερουλικού οξέος με 1-οκτανόλη και οξείδωσης της τυροσόλης παρουσία ασκορβικού οξέος, πραγματοποιείται μέσω της υγρής

χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) σε υγρό χρωματογράφο της εταιρείας Shimadzu (Kyoto, Ιαπωνία), με ανιχνευτή πολλαπλών διόδων της Shimadzu (Ιαπωνία), ο οποίος ελέγχεται από το λογισμικό Shimadzu Class-vp, v.6.1. και σε στήλη Bondapack™ C18 ανάστροφης φάσης της εταιρείας Waters (Ιρλανδία) με διαστάσεις 3.9 x 300 mm, μέγεθος σωματιδίων 10 μm και μέγεθος πόρων 125 Å. Σε όλες τις περιπτώσεις, μετά την επώαση των δειγμάτων στις εκάστοτε συνθήκες και σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα, πραγματοποιείται ο τερματισμός της ενζυμικής αντίδρασης με την προσθήκη μεθανόλης (αναλογία 1:2). Στην συνέχεια τα δείγματα φιλτράρονται με την χρήση φίλτρων 0.45 μm, διαμέτρου 13 mm με σκοπό την απομάκρυνση του βιοκαταλύτη από το μίγμα της αντίδρασης. Η σύσταση του δείγματος αναλύεται μέσω της υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC), όπου ο διαχωρισμός των ουσιών πραγματοποιείται με βάση το μέγεθος και των βαθμό λιποφιλικότητάς τους.

Στην περίπτωση ανάλυσης των αντιδράσεων μετεστεροποίησης του αιθυλεστέρα του φερούλικού οξέος με 1-οκτανόλη οι διαλύτες που εφαρμόστηκαν για την ανάλυση των δειγμάτων με βαθμίδωση ήταν οι εξής:

Ακετονιτρίλιο – Νερό (0.1% οξικό οξύ)	40 %- 60 %	100 %- 0 %	100 %- 0 %	40 %- 60 %
Χρόνος (min)	11.00	15.00	25.00	30.00

Η έκλυση πραγματοποιήθηκε στους 35 °C, με σταθερή ροή και ίση με 1mL/min. Η ανίχνευση γίνεται στα 320 nm.

Στην περίπτωση ανάλυσης των αντιδράσεων οξείδωσης της τυροσόλης οι διαλύτες που εφαρμόστηκαν για την ανάλυση των δειγμάτων με βαθμίδωση ήταν οι εξής:

Μεθανόλη – Νερό (0.1% οξικό οξύ)	0 %- 100 %	50 %- 50 %	0 %- 100 %
Χρόνος (min)	3.00	20.00	25.00

Η έκλυση πραγματοποιήθηκε στους 35 °C, με σταθερή ροή και ίση με 1mL/min. Η ανίχνευση γίνεται στα 280 nm.

Σε όλες τις περιπτώσεις οι συνολικές αποδόσεις των ενζυμικών αντιδράσεων, οι οποίες εκφράζονται ως ποσοστό %, γίνεται βάσει του εμβαδού των κορυφών σύμφωνα με την εξίσωση 2.

$$\alpha (\%) = Pt / ( Pt + St ) * 100 \quad (2)$$

όπου  $a$  η συνολική απόδοση της αντίδρασης %,  $P_t$  το εμβαδόν της κορυφής του προϊόντος μετά από χρόνο αντίδρασης  $t$  και  $S_t$  το εμβαδόν της κορυφής του εναπομείναντος υποστρώματος μετά από χρόνο αντίδρασης  $t$ .

#### **8.2.10. Μέθοδοι προσδιορισμού της σταθερότητας των ενζύμων**

##### **8.2.10.1 Προσδιορισμός σταθερότητας κυτοχρώματος *c* σε ιοντικά υγρά παρουσία $H_2O$ .**

Η σταθερότητα του κυτοχρώματος *c* μελετήθηκε ακολουθώντας την αντίδραση οξείδωσης της γουαϊακόλης όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο 8.2.6.1. Πιο συγκεκριμένα, 25  $\mu\text{g/mL}$  (13.8 U/mL) κυτοχρώματος *c* επάζονται σε υδατικά διαλύματα ιοντικών υγρών (0-60% v/v) παρουσία 1 mM  $H_2O_2$  στους 30 °C. Μετά από 15 λεπτά επώαση, 200  $\mu\text{L}$  δείγματος μεταφέρονται σε μικροπλάκα πολυστυρενίου 96 θέσεων προκειμένου να προσδιοριστεί η εναπομείνασα δραστηριότητα του κυτοχρώματος *c* χρησιμοποιώντας 2 mM γουαϊακόλης. Η μέτρηση του παραγόμενου προϊόντος καταγράφεται στα 470 nm. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Η εναπομείνασα δραστηριότητα εκφράζεται ως ο λόγος της δραστηριότητας μετά από επώαση του ενζύμου στον εκάστοτε διαλύτη προς την αρχική δραστηριότητα του ενζύμου σε χρόνο  $t=0$  ώρες.

##### **8.2.10.2. Προσδιορισμός σταθερότητας κυτοχρώματος *c* σε DES**

Η σταθερότητα του κυτοχρώματος *c* σε DES μελετήθηκε ακολουθώντας την αντίδραση οξείδωσης της γουαϊακόλης όπως αυτή περιγράφεται στην παράγραφο 8.2.6.1. Πιο συγκεκριμένα, 25  $\mu\text{g/mL}$  (13.8 U/mL) κυτοχρώματος *c* επάζονται σε υδατικά διαλύματα ευτηκτικών υγρών (30 % v/v) στους 40 °C. Μετά από 24 ώρες επώαση, 200  $\mu\text{L}$  δείγματος μεταφέρονται σε μικροπλάκα πολυστυρενίου 96 θέσεων προκειμένου να προσδιοριστεί η εναπομείνασα δραστηριότητα του κυτοχρώματος *c* χρησιμοποιώντας 2 mM γουαϊακόλης και 20 mM  $H_2O_2$ . Η μέτρηση του παραγόμενου προϊόντος καταγράφεται στα 470 nm. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Η εναπομείνασα δραστηριότητα εκφράζεται ως ο λόγος της δραστηριότητας μετά από 24 ώρες επώαση του ενζύμου στο εκάστοτε ευτηκτικό υγρό προς την αρχική δραστηριότητα του ενζύμου σε χρόνο  $t=0$  ώρες.

### **8.2.10.3. Προσδιορισμός σταθερότητας ακινητοποιημένης λιπάσης CaLB-nanoflowers**

Για την μελέτη της θερμικής σταθερότητας της ακινητοποιημένης λιπάσης CaLB-nanoflowers, 3 mg ενζυμικού σκευάσματος αναμιγνύονται σε 200  $\mu$ L ευτηκτικού υγρού και επωάζονται στους 60°C για χρονικό διάστημα έως 24 h. Η εναπομείνασα ενζυμική δραστηριότητα προσδιορίζεται μέσω της αντίδρασης υδρόλυσης του pNPB σε 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl pH 7.5 όπως περιγράφεται στην παράγραφο 8.2.8.1. Συγκεκριμένα, μετά το πέρας του χρόνου επώασης, 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος προστίθεται στο ένζυμο και πραγματοποιούνται 3 πλύσεις προκειμένου να απομακρυνθεί η ποσότητα του ευτηκτικού υγρού. Η αντίδραση ξεκινά με την επαναιώρηση του ενζύμου σε 0.2 mL ρυθμιστικού διαλύματος το οποίο περιέχει 50 mM pNPB. Το μίγμα της αντίδρασης επωάζεται στους 40 °C υπό ανάδευση στις 700 rpm. Ανά 2 λεπτά και για χρονικό διάστημα 20 λεπτών λαμβάνονται από το μίγμα της αντίδρασης 5  $\mu$ L τα οποία προστίθενται σε 1:1 (v/v) μίγμα ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (25mM pH 7.5) και DMSO (τελικός όγκος 200  $\mu$ L) που περιέχεται σε μικροπλάκα πολυστυρενίου 96 θέσεων. Η αντίδραση παρακολουθείται φωτομετρικά στα 405 nm. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Η εναπομείνασα δραστηριότητα εκφράζεται ως ο λόγος της δραστηριότητας μετά από επώαση του ενζύμου για διάφορα χρονικά διαστήματα στο εκάστοτε ευτηκτικό υγρό προς την αρχική δραστηριότητα του ενζύμου σε χρόνο  $t=0$  ώρες.

### **8.2.10.4. Προσδιορισμός σταθερότητας CLEAs τυροσινάσης**

Για την μελέτη της θερμικής σταθερότητας της ακινητοποιημένης τυροσινάσης (CLEAs), 8 mg ενζυμικού σκευάσματος αναμιγνύονται σε 1 mL 10 % v/v υδατικού διαλύματος ιοντικού και ευτηκτικού υγρού και επωάζονται στους 40 °C για χρονικό διάστημα έως 24 ώρες. Η εναπομείνασα ενζυμική δραστηριότητα προσδιορίζεται μέσω της αντίδρασης οξειδωσης της L-Dopa σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 6.8 όπως περιγράφεται στην παράγραφο 6.2.6.3. Συγκεκριμένα, μετά το πέρας του χρόνου επώασης, 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος προστίθεται στο ένζυμο και πραγματοποιούνται 3 πλύσεις προκειμένου να απομακρυνθεί η ποσότητα του ιοντικού ή ευτηκτικού υγρού που χρησιμοποιήθηκε. Η αντίδραση ξεκινά με την επαναιώρηση του ενζύμου σε 1.4 mL ρυθμιστικού διαλύματος, το οποίο περιέχει 10 mM L-Dopa. Το μίγμα της αντίδρασης επωάζεται στους 27 °C υπό ανάδευση στις 700 rpm. Ανά 2 λεπτά και για χρονικό διάστημα 12 λεπτών λαμβάνονται από το μίγμα της αντίδρασης 100  $\mu$ L, τα οποία προστίθενται σε μικροπλάκα πολυστυρενίου 96 θέσεων. Η αντίδραση παρακολουθείται φωτομετρικά στα 492 nm και η εναπομείνασα

δραστηκότητα εκφράζεται ως ο λόγος της δραστηκότητας μετά από επώαση του ενζύμου για 24 ώρες στον εκάστοτε διαλύτη προς την αρχική δραστηκότητα του ενζύμου σε χρόνο  $t = 0$  ώρες. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν.

#### **8.2.11. Αποχρωματισμός χρωστικών**

Η δραστηκότητα αποχρωματισμού του κυτοχρώματος *c* μελετήθηκε σε 100 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.0 και παρουσία διάφορων συγκεντρώσεων ιοντικών και ευτηκτικών υγρών, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το χλωρίδιο της πινακυανόλης (1,1'-diethyl-2,2'-carbo-cyanine chloride) παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 130 μM χρωστικής και 80 μg/mL πρωτεΐνης προστίθενται σε 1 mL διαλύτη. Η αντίδραση ξεκινά με την προσθήκη 0.3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και επώάζεται στους 27 °C υπό ανάδευση (300 rpm). Σε προκαθορισμένα χρονικά διαστήματα λαμβάνονται από το μίγμα της αντίδρασης 30 μL δείγματος και προστίθενται σε 1:1 (v/v) μίγμα ρυθμιστικού διαλύματος (50 mM, pH 7.0) και μεθανόλης. Η εναπομένουσα συγκέντρωση της χρωστικής παρακολουθείται φωτομετρικά στα 603 nm χρησιμοποιώντας τον συντελεστή απόσβεσης  $\epsilon = 82,350 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ <sup>293</sup>

#### **8.2.12. Επαναχρησιμοποίηση ιοντικών υγρών και DES**

Η ικανότητα επαναχρησιμοποίησης τόσο των ιοντικών υγρών όσο και των DES μελετήθηκε μέσω της αντίδρασης αποχρωματισμού της χρωστικής χλωριδίου της πινακυανόλης από το ακινητοποιημένο κυτόχρωμα *c*. Η χρήση ακινητοποιημένου βιοκαταλύτη διευκολύνει την επανάκτηση του μέσου αντίδρασης. Αρχικά, πραγματοποιήθηκε η ακινητοποίηση της πρωτεΐνης σε σελίτη σύμφωνα με το πρωτόκολλο των Khare και Nakajima.<sup>294</sup> Στην συνέχεια, 30 mg/mL στερεού σκευάσματος, στο οποίο περιέχονται 2 μg πρωτεΐνης ανά 1 mg σελίτη προστίθενται σε 0.5 mL 50% v/v υδατικού διαλύματος ιοντικού υγρού ή ευτηκτικού διαλύτη, τα οποία περιέχουν 130 μM χρωστικής. Η οξείδωση της χρωστικής ξεκινά με την προσθήκη 0.3 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και το μίγμα της αντίδρασης επώάζεται στους 27 °C υπό ανάδευση (300 rpm) για 3 ώρες. Μετά από κάθε κύκλο αντίδρασης 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος προστίθεται στο μίγμα και το ακινητοποιημένο ένζυμο απομακρύνεται με φιλτράρισμα. Το φιλτραρισμένο δείγμα, το οποίο περιέχει την ποσότητα ιοντικού ή ευτηκτικού υγρού, ξεπλένεται με οξικό αιθυλεστέρα προκειμένου να απομακρυνθούν υπολείμματα αντιδρώντων και προϊόντων και μεταφέρεται σε αντλία κενού για την απομάκρυνση του ρυθμιστικού διαλύματος. Η καθαρότητα του ιοντικού υγρού ή του



ευτηκτικού διαλύτη ελέγχεται με  $^1\text{H-NMR}$  και η διαδικασία επαναχρησιμοποίησης επαναλαμβάνεται για 4 κύκλους.

### **8.2.13. Επαναχρησιμοποίηση ακινητοποιημένων ενζύμων**

**Επαναχρησιμοποίηση CLEAs τυροσινάσης:** Η ικανότητα επαναχρησιμοποίησης της ακινητοποιημένης τυροσινάσης CLEAs μελετήθηκε μέσω της αντίδρασης οξειδωσης της L-Dopa όπως αυτή περιγράφηκε στην παράγραφο 8.2.6.3. Μετά από κάθε κύκλο επώασης, το μίγμα της αντίδρασης φυγοκεντρείται στις 12000 rpm και το ακινητοποιημένο ένζυμο ξεπλένεται τρεις φορές με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (50 mM, pH 6.8) προκειμένου να χρησιμοποιηθεί στον επόμενο κύκλο της αντίδρασης

**Επαναχρησιμοποίηση ακινητοποιημένης λιπάσης CaLB-nanoflowers:** Η ικανότητα επαναχρησιμοποίησης της ακινητοποιημένης λιπάσης CaLB-nanoflowers μελετήθηκε μέσω της αντίδρασης μετεστεροποίησης του αιθυλεστέρα του φερουλικού οξέος από την 1-οκτανόλη, όπως αυτή περιγράφηκε στην παράγραφο 8.2.9. Μετά από κάθε κύκλο επώασης για 24 ώρες στους 60 °C το ακινητοποιημένο ένζυμο ξεπλένεται τρεις φορές με οξικό αιθυλεστέρα. Μετά την τελευταία πλύση, ο οξικός αιθυλεστέρας απομακρύνεται προκειμένου το ακινητοποιημένο ένζυμο να χρησιμοποιηθεί στον επόμενο κύκλο της αντίδρασης.

### **8.2.14. Δομική μελέτη των πρωτεϊνών παρουσία ιοντικών υγρών και DES**

#### **8.2.14.1. Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-vis)**

Η επίδραση της παρουσίας ιοντικών και ευτηκτικών υγρών στο φάσμα απορρόφησης ορατού υπεριώδους (UV-Vis) του κυτοχρώματος c (25  $\mu\text{g/mL}$ ), πραγματοποιήθηκε με την χρήση φασματοφωτομέτρου UV-1601 Shimadzu, Τόκιο, Ιαπωνία σε κυψελίδα χαλαζία με μήκος διαδρομής 1cm και εύρος 300-600 nm στους 30 °C.

#### **8.2.14.2. 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 και είναι εξοπλισμένο με σύστημα Peltier για ρύθμιση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια λήψης φασμάτων. Για την λήψη των φασμάτων του κυτοχρώματος c τόσο σε 0.5 mM ρυθμιστικού διαλύματος pH 7.0 όσο και παρουσία 30 % ή 60 % v/v υδατικού διαλύματος ιοντικού και ευτηκτικού υγρού, χρησιμοποιήθηκε

κυψελίδα χαλαζία με μήκος διαδρομής 1 cm. Η λήψη φασμάτων πραγματοποιήθηκε στην περιοχή Soret (350-450 nm) και η συγκέντρωση της πρωτεΐνης ήταν 200 µg/mL. Η θερμοκρασία λήψης ήταν 25 °C με ταχύτητα σάρωσης 10 nm/min και εύρος φάσματος (bandwidth) 2 nm. Για κάθε μέσο που μελετήθηκε, λήφθηκε ξεχωριστό φάσμα αναφοράς το οποίο αφαιρέθηκε από το φάσμα της πρωτεΐνης. Το αποτέλεσμα είναι η μέση τιμή από τουλάχιστον 2 μετρήσεις.

#### 8.2.14.3. Φασματοσκοπία υπερύθρου υγρών δειγμάτων (FTIR-ATR)

Η φασματοσκοπία υπερύθρου (Fourier Transform Infrared Spectroscopy, FTIR) αποτελεί ένα σημαντικό εργαλείο για την ανάλυση της δομής πρωτεϊνών και την εξαγωγή πληροφοριών για την δευτεροταγή τους δομής. Η αρχή λειτουργίας της μεθόδου βασίζεται στην ακτινοβολία ενός δείγματος με υπέρυθρη ακτινοβολία (μήκος κύματος 1-100 µm), η οποία προκαλεί ταλαντωτικές και περιστροφικές κινήσεις στα μόρια του δείγματος και την καταγραφή των μηκών κύματος και της έντασης της απορρόφησης. Στα φάσματα IR πρωτεϊνών εμφανίζονται τρεις χαρακτηριστικές ζώνες γνωστές και ως Amide I, II και III. Η πιο ευαίσθητη σε αλλαγές στην δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών είναι η περιοχή Amide I ( $1700-1600\text{ cm}^{-1}$ ), η οποία συνδέεται με την έκταση του δεσμού C=O των αμινοξέων. Από τα βιβλιογραφικά δεδομένα ανάλυσης της δομής πρωτεϊνών με φασματοσκοπία υπερύθρου προέκυψαν οι αναγωγές των κορυφών στην Amide I περιοχή σε στοιχεία δευτεροταγούς δομής, όπως παρατίθενται στον Πίνακα 6.3.

**Πίνακας 8.3.** Αναγωγή περιοχών του φάσματος υπερύθρου στην περιοχή Amide I σε στοιχεία δευτεροταγούς δομής.

Στοιχείο δευτεροταγούς δομής	Αμιδική κορυφή I ( $\text{cm}^{-1}$ )
<b><math>\alpha</math>-Έλικα</b>	1650-1665
<b><math>\beta</math>-Πτυχωτές επιφάνειες</b>	Παράλληλες 1620-1640 Αντιπαράλληλες 1610-1620 και 1685-1695
<b><math>\beta</math>-Στροφές</b>	1665-1685
<b>Τυχαίο σπείραμα</b>	1640-1650

Λήψη φασμάτων: Τα φάσματα υπερύθρου λήφθηκαν σε φασματοφωτόμετρο υπερύθρου PerkinElmer Spectrum GX εξοπλισμένο με ανιχνευτή δευτεριωμένης θειϊκής τριγλυκίνης (DTGS) που στεγάζεται στο εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Το συγκεκριμένο φασματοφωτόμετρο FTIR διαθέτει υποδοχή για κρύσταλλο ψευδαργύρου-σεληνίου για μέτρηση υγρών δειγμάτων με την τεχνική εξασθένισης ολικής ανάκλασης (ATR). Η μελέτη της πρωτεϊνικής δομής με την μέθοδο FTIR - ATR προϋποθέτει την χρήση αυξημένης

συγκέντρωσης πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, η συγκέντρωση κυτοχρώματος *c* που χρησιμοποιήθηκε ήταν 5 mg/mL στο υδατικό διάλυμα (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 50 mM, pH 7.0) και 9 mg/mL σε 30 % v/v υδατικό διάλυμα ιοντικών υγρών. Το δείγμα τοποθετείται στον κρύσταλλο του ATR με τέτοιο τρόπο ώστε να καλύψει όλη την επιφάνειά του. Τα φάσματα μετρήθηκαν σε εύρος 4000-400 cm<sup>-1</sup> σε θερμοκρασία δωματίου. Κάθε φάσμα αποτελεί την μέση τιμή 200 σαρώσεων με ανάλυση 2 cm<sup>-1</sup>. Για κάθε υδατικό μίγμα ιοντικού υγρού που μελετήθηκε λήφθηκε ξεχωριστό φάσμα αναφοράς το οποίο αφαιρέθηκε από το φάσμα της πρωτεΐνης.

Ανάλυση φασμάτων: Μόλις ολοκληρωθεί η λήψη των φασμάτων FTIR - ATR τόσο για το δείγμα αναφοράς όσο και για την πρωτεΐνη πραγματοποιείται η επεξεργασία τους μέσω του προγράμματος OriginLab. Αρχικά το φάσμα αναφοράς αφαιρείται από το φάσμα της πρωτεΐνης και η περιοχή Amide I (1700-1600 cm<sup>-1</sup>) απομονώνεται από το υπόλοιπο φάσμα με σκοπό την επεξεργασία και την εξαγωγή της δευτεροταγούς δομής. Το φάσμα της περιοχής Amide I εξομαλύνεται με την χρήση του φίλτρου Savitsky-Golay 11 σημείων<sup>295</sup> και στη συνέχεια ευθυγραμμίζεται με τον άξονα των κυματαριθμών. Ο βαθμός ομοιότητας δύο φασμάτων Amide I μπορεί να υπολογιστεί μέσω του συντελεστή συσχέτισης *r* σύμφωνα με την εξίσωση 3.

$$r = \frac{\sum x_i y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}} \quad (3)$$

όπου  $x_i$  και  $y_i$  οι τιμές απορρόφησης του φάσματος αναφοράς και του φάσματος του δείγματος για κάθε τιμή κυματαριθμού  $i$ . Για όμοια φάσματα ο συντελεστής είναι 1, ενώ για διαφορετικά η τιμή είναι <1.

Στην συνέχεια μέσω του λογισμικού Origin υπολογίζεται η δεύτερη παράγωγος της αμιδικής κορυφής. Οι αρνητικές κορυφές της δεύτερης παραγώγου που προκύπτουν συνθέτουν την αμιδική κορυφή.<sup>296</sup> Με την βοήθεια του λογισμικού WinSpec (LISE-Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix, Namur, Belgium) η αμιδική κορυφή αναλύεται στις επιμέρους κορυφές που την συνθέτουν, οι οποίες μέσω κύκλων προσαρμογής λαμβάνουν τις βέλτιστες τιμές έντασης, θέσης και πλάτους. Ο υπολογισμός της δευτεροταγούς δομής γίνεται ύστερα από αναγωγή των κορυφών σύμφωνα με τον Πίνακα 6.3. και υπολογισμού της ποσοστιαίας συνεισφοράς της κάθε κορυφής στην αμιδική κορυφή.

#### 8.2.14.4 Φασματοσκοπία φθορισμού.

Για την λήψη των φασμάτων φθορισμού χρησιμοποιήθηκε φασματοφθορισμόμετρο της εταιρείας Jasco FP 8300. 90  $\mu\text{g/mL}$  πρωτεΐνης (τυροσινάση από μανιτάρια *Agaricus bisporus*) διαλυτοποιήθηκαν σε 1 mL υδατικού διαλύματος (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.5 mM pH 6.8) και σε διάφορες συγκεντρώσεις ιοντικών και ευτηκτικών υγρών (0-50% v/v). Για την μέτρηση των φασμάτων φθορισμού χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα χαλαζία με μήκος διαδρομής 1 cm, η διέγερση πραγματοποιείται στα 280 nm και το φάσμα φθορισμού καταγράφεται σε εύρος 300 έως 450 nm. Το διάφραγμα διέγερσης και εκπομπής (slit) ήταν 5 nm και στις δύο περιπτώσεις, ενώ η ταχύτητα σάρωσης ήταν 100 nm/min. Για κάθε μέσο που μελετήθηκε, λήφθηκε ξεχωριστό φάσμα αναφοράς, το οποίο αφαιρέθηκε από το φάσμα της πρωτεΐνης. Στην περίπτωση που η αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με το ιοντικό ή ευτηκτικό υγρό οδηγεί σε φαινόμενα απόσβεσης φθορισμού υπολογίστηκε η σταθερά Stern-Volmer από την εξίσωση 4, η οποία αποτελεί μέτρο της ισχύος απόσβεσης του κάθε διαλύτη.

$$F_0/F_1 = 1 + K_{sv} [Q] \quad (4)$$

όπου  $F_0$  η αρχική ένταση φθορισμού,  $F_1$  η τελική ένταση φθορισμού,  $[Q]$  η συγκέντρωση του αποσβέστη (quencher) και  $K_{sv}$  η σταθερά Stern-Volmer.<sup>297</sup> Η εξίσωση 4 συσχετίζει την απόσβεση φθορισμού με την συγκέντρωση του αποσβέστη. Τα αποτελέσματα είναι η μέση τιμή από τρεις μετρήσεις.

#### 8.2.15. Έλεγχος της βιοαποικοδομησιμότητας των ιοντικών υγρών

Βιοαποικοδόμηση καλείται η φυσική μέθοδος για την απομάκρυνση οργανικών ουσιών από το περιβάλλον. Ο προσδιορισμός του επιπέδου βιοαποικοδομησιμότητας οργανικών ουσιών όπως των ιοντικών υγρών είναι απαραίτητη για την εκτίμηση των επιπτώσεων τους στο περιβάλλον. Μέτρο εκτίμησης του βιοαποικοδομήσιμου οργανικού φορτίου αποτελεί η παράμετρος του Βιοχημικά Απαιτούμενου Οξυγόνου (Biochemical Oxygen Demand-BOD). Ως BOD ορίζεται η ποσότητα οξυγόνου που καταναλώνεται από μικροοργανισμούς για την αποικοδόμηση μέσω οξείδωσης των οργανικών ενώσεων που περιέχονται στο δείγμα απουσία φωτός στους 20 °C. Στην παρούσα διατριβή η βιοαποικοδομησιμότητα των ιοντικών υγρών μελετήθηκε στο εργαστήριο Οργανικής Χημείας της Σχολής Χημικών Μηχανικών του ΕΜΠ χρησιμοποιώντας την VELP BOD μανομετρική συσκευή. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην μείωση της πίεσης σε ένα κλειστό σύστημα ως αποτέλεσμα της κατανάλωσης οξυγόνου. Το διοξείδιο του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ) το οποίο παράγεται, δεσμεύεται

από ένα ισχυρά αλκαλικό μέσο (πέλλετ KOH πάνω από το διάλυμα) προκειμένου να μην επηρεάζει τις μετρήσεις. Τα θρεπτικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη των μικροοργανισμών ήταν τα εξής:

- ❖ Διάλυμα ένυδρου τριχλωριούχου σιδήρου: 0.25 g  $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  σε 1 L  $\text{dH}_2\text{O}$
- ❖ Διάλυμα άνυδρου χλωριούχου ασβεστίου: 27.5 g  $\text{CaCl}_2$  σε τελικό όγκο 1 L  $\text{dH}_2\text{O}$
- ❖ Διάλυμα ένυδρου θειϊκού μαγνησίου: 22.5 g  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  σε τελικό όγκο 1 L  $\text{dH}_2\text{O}$
- ❖ Ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7.2): 8.5 g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 21.7 g  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 33.4 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  και 1.7 g  $\text{NH}_4\text{Cl}$  σε τελικό όγκο 1 L  $\text{dH}_2\text{O}$

Σε φιάλη επώασης BOD προστίθεται η κατάλληλη ποσότητα του εκάστοτε ιοντικού υγρού, 135 mL υδατικού διαλύματος θρεπτικών και 15 mL διαλύματος μικροοργανισμών. Οι μικροοργανισμοί συλλέχθηκαν από την μονάδα βιολογικής επεξεργασίας αστικών λυμάτων στην Ψυττάλεια. Επιπλέον παρασκευάστηκαν τυφλά δείγματα διαλύματος θρεπτικών συστατικών και μικροοργανισμών. Η παράμετρος BOD περιλαμβάνει την βιοαποικοδόμηση απλών οργανικών ενώσεων που περιέχουν μόνο (C, O, H) αλλά και αζωτούχων οργανικών ενώσεων. Στην παρούσα διατριβή περιγράφεται μόνο η βιοαποικοδόμηση των απλών οργανικών ενώσεων CBOD (Carbonaceous BOD). Η αναστολή των νιτροποιητικών μικροοργανισμών που υπάρχουν στο δείγμα που συλλέγεται από τις δεξαμενές επιτυγχάνεται με την προσθήκη διαλύματος θειουρίας (2 g θειουρίας σε 1 L) στις φιάλες επώασης BOD (0.5 mL σε κάθε φιάλη). Οι φιάλες επωάζονται στους  $20 \pm 1$  °C απουσία φωτός για χρονικό διάστημα 5 ημερών.

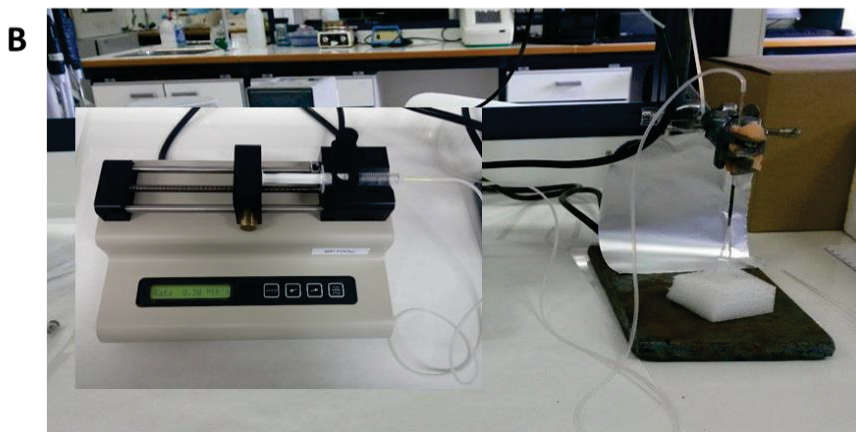
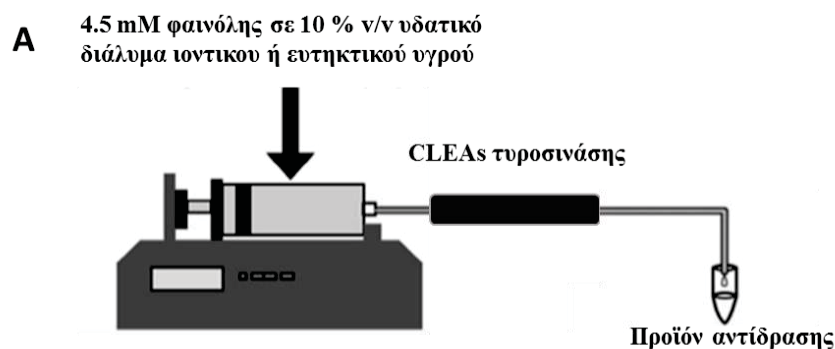
#### **8.2.16. Λειτουργία μικρο-βιοαντιδραστήρα**

Η δραστηρότητας της ακινητοποιημένης τυροσινάσης CLEAs παρουσία ιοντικών και ευτηκτικών διαλυτών μελετήθηκε σε συνεχόμενης λειτουργίας μικρο-βιοαντιδραστήρα, ο οποίος παρασκευάστηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας. Για την παρασκευή του χρησιμοποιήθηκαν 20 mg ακινητοποιημένου σκευάσματος τυροσινάσης CLEAs, τα οποία τοποθετήθηκαν σε γυάλινο σωληνάκι διαμέτρου 0.9 mm. Ο όγκος του μικρο-βιοαντιδραστήρα είναι περίπου 25  $\mu\text{L}$  (Εικόνα 6.3)



**Εικόνα 6.3.** Νάνο-βιοαντιδραστήρας CLEAs τυροσινάσης (40 mm μήκος, 0.9 mm διάμετρος)

Η δραστηριότητα των CLEAs μελετήθηκε μέσω της αντίδρασης οξείδωσης της φαινόλης. Πιο συγκεκριμένα, σε 10% v/v υδατικό διάλυμα ιοντικών και ευτηκτικών υγρών, παρασκευάστηκε διάλυμα φαινόλης 4.5 mM, το οποίο εισέρχεται στον μικρο-βιοαντιδραστήρα με συγκεκριμένη ροή (2μL/min-200μL/min) με την βοήθεια αντλίας σύριγγας όπως φαίνεται στην Εικόνα 6.4. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε θερμοκρασία δωματίου και η απόδοση της αντίδρασης μελετήθηκε με υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης. Η μέθοδος ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκε ήταν ισοκρατική: 70 % μεθανόλη – 30 % νερό (0.5 % οξικό οξύ) και η θερμοκρασία της στήλης ήταν 30 °C.

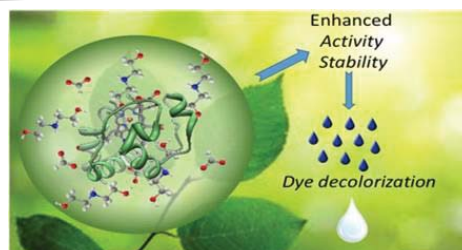


**Εικόνα 8.4.** Α. Διάγραμμα της πειραματικής πορείας του μικρο-βιοαντιδραστήρα. Β. Εικόνα του μικρο-βιοαντιδραστήρα.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 9<sup>ο</sup>

### Επίδραση υδροξυαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών 3<sup>ης</sup> γενιάς στην δράση μεταλλοενζύμων

---



Στο παρόν κεφάλαιο μελετάται η επίδραση τεσσάρων υδροξυαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών 3<sup>ης</sup> γενιάς (HEAF, HMEAF, HDMEAF και BHEAF) στην καταλυτική δραστηριότητα διαφόρων μεταλλοπρωτεϊνών όπως το κυτόχρωμα c, η HRP υπεροξειδάση, η τυροσινάση από μανιτάρια *Agaricus bisporus*, η λακκάση από *Trametes versicolor* και η αλκοολική αφυδρογονάση από ζύμη αρτοποιίας. Οι δομές των παραπάνω ιοντικών υγρών φαίνονται στον Πίνακα 8.1. Η λεπτομερής διερεύνηση της επίδρασης αυτών των μέσων στην καταλυτική και δομική συμπεριφορά βιοκαταλυτών πραγματοποιήθηκε χρησιμοποιώντας το κυτόχρωμα c ως πρωτεΐνη-μοντέλο, καθώς αποτελεί μία από τις καλύτερα χαρακτηρισμένες πρωτεΐνες με βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον (βλ. Παράγραφο 2.2). Σκοπός του παρόντος κεφαλαίου είναι, μέσω μελετών κινητικής και σταθερότητας καθώς επίσης και εφαρμογών φασματοσκοπικών τεχνικών όπως UV-Vis, ATR-FTIR και CD (Κυκλικού Διχρωισμού), να μελετηθεί η επίδραση των τεσσάρων υδροξυαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών 3<sup>ης</sup> γενιάς στην καταλυτική συμπεριφορά και δομή του κυτοχρώματος c.

### 9.1. Επίδραση υδροξυαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών στην δραστικότητα διάφορων μεταλλοπρωτεϊνών

Η καταλυτική δραστικότητα διαφόρων μεταλλοπρωτεϊνών όπως το κυτόχρωμα c, η HRP υπεροξειδάση, η τυροσινάση από μανιτάρια *Agaricus bisporus*, η λακάση από *Trametes versicolor* και η αλκοολική αφυδρογονάση από ζύμη αρτοποιίας μελετήθηκε παρουσία τεσσάρων υδροξυαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών 3<sup>ης</sup> γενιάς (HEAF, HMEAF, HDMEAF και BHEAF). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης παρουσιάζονται στον Πίνακα 9.1.

**Πίνακας 9.1.** Σχετική δραστικότητα διαφόρων μεταλλοπρωτεϊνών παρουσία 5% v/v υδατικού διαλύματος ιοντικών υγρών. Ως 1 ορίζεται η δραστικότητα των πρωτεϊνών απουσία ιοντικών υγρών. Η ταχύτητα των αντιδράσεων απουσία ιοντικών υγρών σε 100 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.0 ήταν: κυτόχρωμα c: 10 μMP/min, HRP υπεροξειδάση: 0.8 μMP/min, Τυροσινάση: 20.8 μMP/min, Λακκάση από *Trametes versicolor*: 3.8μMP/min, Αλκοολική Αφυδρογονάση: 26.7 μMP/min. (Τυπική απόκλιση <0.5 %).

Μεταλλοπρωτεΐνη	Σχετική δραστικότητα			
	HMEAF	HDMEAF	BHEAF	HEAF
Κυτόχρωμα c	1.2	2.6	1.8	3.4
HRP υπεροξειδάση	0.9	1.0	1.0	0.7
Τυροσινάση	1.3	0.9	1.1	0.4
Λακκάση από <i>Trametes versicolor</i>	<0.1	<0.1	0.2	<0.1
Αλκοολική Αφυδρογονάση	0.7	0.4	1.0	0.4

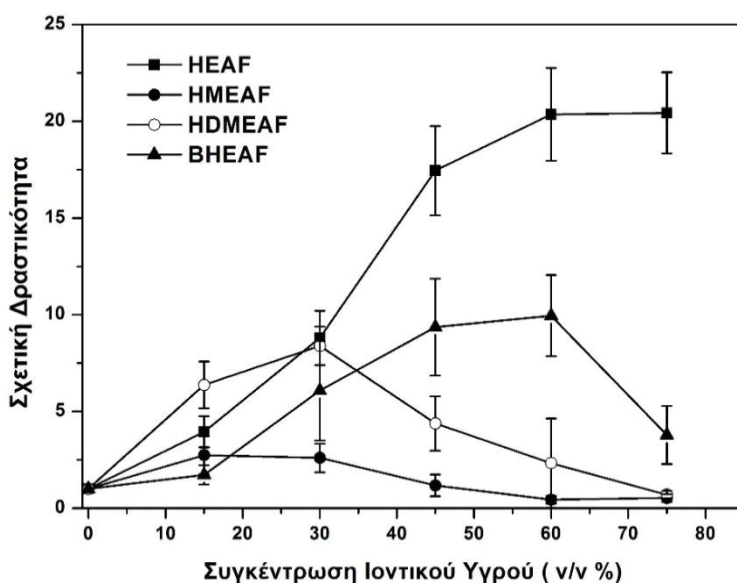
Στις περισσότερες περιπτώσεις που μελετήθηκαν, η παρουσία 5% v/v υδατικού διαλύματος ιοντικών υγρών φαίνεται να επιδρά σημαντικά στην καταλυτική δραστικότητα των μεταλλοπρωτεϊνών. Η επίδραση αυτή εξαρτάται τόσο από την εκάστοτε πρωτεΐνη που μελετάται όσο και από την φύση του ιοντικού υγρού που χρησιμοποιείται. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση της HRP υπεροξειδάσης και της αλκοολικής αφυδρογονάσης, η δραστικότητα διατηρείται σταθερή ή μειώνεται ανάλογα με το ιοντικό υγρό που χρησιμοποιείται. Στην περίπτωση της λακκάσης, η παρουσία όλων των ιοντικών υγρών φαίνεται να καταστέλλει σημαντικά την οξειδωτική της δράσης (<0.2). Η μείωση στην δραστικότητα της λακκάσης έχει παρατηρηθεί και στην περίπτωση παρουσίας στο μίγμα της αντίδρασης ιμιδαζολικών υδρόφιλων ιοντικών υγρών.<sup>298</sup> Ωστόσο, στην



περίπτωση του κυτοχρώματος c η παρουσία όλων των ιοντικών υγρών που μελετήθηκαν οδήγησε σε αύξηση της δραστηριότητας του έως και 3.4 φορές συγκριτικά με αυτή που παρατηρήθηκε απουσία ιοντικού υγρού. Θετική επίδραση στην δραστηριότητα, παρατηρήθηκε και στην τυροσινάση, όταν στην αντίδραση χρησιμοποιήθηκαν τα ιοντικά HMEAF και BHEAF.

## 9.2. Επίδραση υδροξυλ αμμωνιακών ιοντικών υγρών στην δραστηριότητα του κυτοχρώματος c

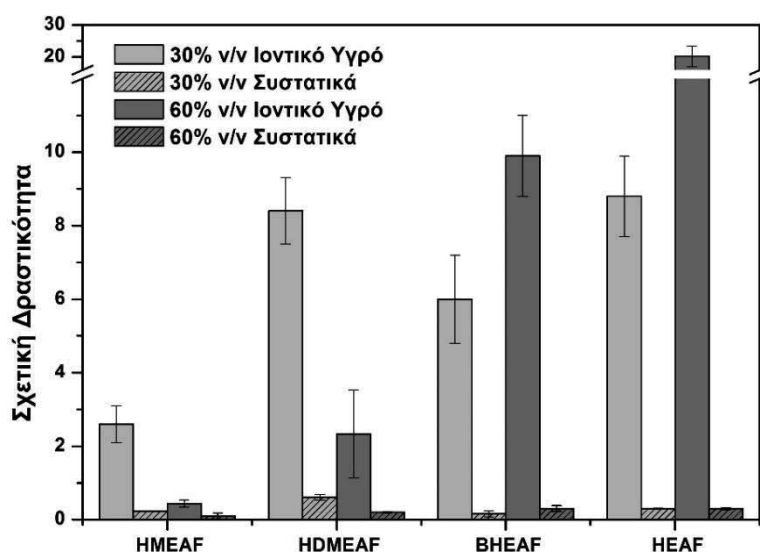
Με σκοπό την βαθύτερη κατανόηση της καταλυτικής συμπεριφοράς μεταλλοπρωτεϊνών στα 3<sup>η</sup>ς γενιάς υδροξυαιθυλαμμωνιακά ιοντικά υγρά, επιλέχθηκε το κυτόχρωμα c ως πρωτεΐνη μοντέλο. Η επίδραση της συγκέντρωσης αυτών των μέσων στην δραστηριότητα του κυτοχρώματος c ως υπεροξειδάση, μελετήθηκε μέσω της αντίδρασης οξείδωσης της γουαϊακόλης. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης παρουσιάζονται στην Εικόνα 9.1.



**Εικόνα 9.1.** Επίδραση της συγκέντρωσης τεσσάρων υδροξυλ αμμωνιακών ιοντικών υγρών στην οξειδοαναγωγική δράση του κυτοχρώματος c. Ως 1 ορίζεται η ταχύτητα της πρωτεΐνης σε 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.0. Η αρχική ταχύτητα του κυτοχρώματος c στο ρυθμιστικό διάλυμα είναι 10  $\mu$ MP/ min.

Σύμφωνα με τ' αποτελέσματα της Εικόνας 9.1., η δραστηριότητα του κυτοχρώματος c εξαρτάται τόσο από την φύση του εκάστοτε ιοντικού υγρού όσο και από την συγκέντρωσή του στο μίγμα της αντίδρασης, όπως έχει παρατηρηθεί και βιβλιογραφικά για ιοντικά υγρά με βάση το ιμιδαζόλιο και την χολίνη.<sup>206,208,299,300</sup> Στις περισσότερες περιπτώσεις, αύξηση

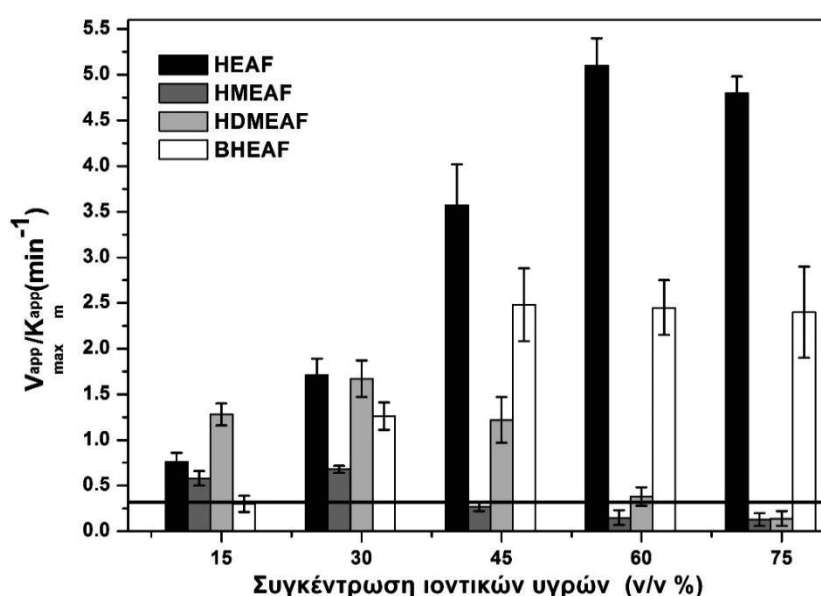
της συγκέντρωσης των ιοντικών υγρών οδηγεί σε αύξηση της καταλυτικής δραστηριότητας της πρωτεΐνης. Εντυπωσιακή είναι η αύξηση της δραστηριότητας του κυτοχρώματος c παρουσία 60 % v/v των ιοντικών υγρών BHEAF και HEAF, όπου παρατηρήθηκε 9 και 20 φορές αντίστοιχα αύξηση, συγκριτικά με το ρυθμιστικό διάλυμα. Παρόμοια καταλυτική συμπεριφορά παρουσία των ιοντικών υγρών παρατηρήθηκε και στην περίπτωση οξειδωσης του ABTS, συμπεραίνοντας έτσι ότι το φαινόμενο της ενεργοποίησης είναι ανεξάρτητο από το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται. Παρόλο που η δραστηριότητα του κυτοχρώματος c έχει μελετηθεί σε ιοντικά υγρά με βάση την χολίνη και αλκυλο αμμωνιακά ιοντικά υγρά, σε αυτές τις περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκε ενεργοποίηση στην δραστηριότητα της πρωτεΐνης, όπως αντίθετα παρατηρήθηκε στην παρούσα μελέτη.<sup>206,208</sup> Αξίζει να σημειωθεί ότι, παρουσία ισομοριακών ποσοτήτων των συστατικών των ιοντικών υγρών (υδροξυλικές αμίνες και μυρμηκικό οξύ) στο μίγμα της αντίδρασης, οδηγεί σε μείωση της δραστηριότητας του κυτοχρώματος (Εικόνα 9.2). Το γεγονός αυτό αποτελεί ένδειξη ότι η ευεργετική δράση των ιοντικών υγρών στην δραστηριότητα του κυτοχρώματος σχετίζεται με το συντιθέμενο ιοντικό υγρό και όχι με τα επιμέρους συστατικά του.



**Εικόνα 9.2.** Σχετική δραστηριότητα κυτοχρώματος c για την αντίδραση οξειδωσης της γουαϊακόλης παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων ιοντικών υγρών και των αντίστοιχων συστατικών τους. Ως 1 ορίζεται η ταχύτητα της πρωτεΐνης σε 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.0.

Με σκοπό να μελετηθεί περαιτέρω η επίδραση των 3<sup>ης</sup> γενιάς υδροξυαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών στη δραστηριότητα του κυτοχρώματος c, προσδιορίστηκαν οι φαινομενικές καταλυτικές σταθερές  $V_{max}^{app}$  και  $K_m^{app}$  της πρωτεΐνης

και μέσω αυτών υπολογίστηκε η φαινομενική καταλυτική ισχύς  $V_{\max}^{\text{app}}/K_m^{\text{app}}$  για την αντίδραση οξείδωσης της γουαϊακόλης παρουσία  $\text{H}_2\text{O}_2$ . (Η φαινομενική καταλυτική ισχύς υπολογίστηκε θεωρώντας την  $V_{\max}$  ανάλογη της  $k_{\text{cat}}$  για σταθερή συγκέντρωση ενζύμου). Η επίδραση της φύσης και της συγκέντρωσης των ιοντικών υγρών στην φαινομενική καταλυτική ισχύ  $V_{\max}^{\text{app}}/K_m^{\text{app}}$  (σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν η συγκέντρωση του κυτοχρώματος  $c$  ήταν σταθερή) παρουσιάζεται στην Εικόνα 9.3. Οι αντιδράσεις οξείδωσης ακολουθούν σε όλες τις περιπτώσεις κινητική τύπου Michaelis-Menten (Παράρτημα II).



**Εικόνα 9.3.** Επίδραση της συγκέντρωσης των ιοντικών υγρών στην φαινομενική καταλυτική ισχύ  $V_{\max}^{\text{app}}/K_m^{\text{app}}$  του κυτοχρώματος  $c$  για την αντίδραση οξείδωσης της γουαϊακόλης παρουσία  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί στην καταλυτική ισχύ του κυτοχρώματος  $c$  απουσία ιοντικών υγρών.

Σύμφωνα με την Εικόνα 9.3. η παρουσία των ιοντικών υγρών αυξάνει την φαινομενική καταλυτική ισχύ του κυτοχρώματος  $c$  στις περισσότερες περιπτώσεις συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα. Η υψηλότερη τιμή φαινομενικής καταλυτικής ισχύος παρατηρήθηκε στην περίπτωση του HEAF, όπου η παρουσία του ιοντικού υγρού σε συγκέντρωση  $> 60\%$  v/v, οδήγησε σε 20 φορές αύξηση συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα. Η αύξηση της  $V_{\max}^{\text{app}}/K_m^{\text{app}}$  σε υψηλές συγκεντρώσεις των ιοντικών υγρών HEAF και BHEAF είναι το αποτέλεσμα αύξησης της  $V_{\max}^{\text{app}}$  με παράλληλη μείωση της  $K_m^{\text{app}}$  συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα (Παράρτημα II). Οι χαμηλές  $K_m^{\text{app}}$  τιμές σε υψηλές συγκεντρώσεις των ιοντικών υγρών HEAF και BHEAF αποτελούν ένδειξη για αύξηση της

συγγένειας του κυτοχρώματος c ως προς το υπόστρωμα, γεγονός το οποίο πιθανά να συνδέεται με δομικές αλλαγές στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης και ως εκ τούτου αλλαγές στο μικροπεριβάλλον της αίμης.<sup>301</sup> Παρόμοια αποτελέσματα, αυξημένης καταλυτικής ισχύος παρουσία ιοντικών υγρών έχουν αναφερθεί και βιβλιογραφικά.<sup>302</sup> Σ' αυτές τις περιπτώσεις, η παρουσία των ιοντικών υγρών στο μέσο της αντίδρασης αυξάνει τη συγγένεια του ενζύμου προς το υπόστρωμα οδηγώντας σε υψηλότερη καταλυτική ισχύ συγκριτικά με άλλα μέσα όπως, οι οργανικοί διαλύτες και το υδατικό διάλυμα.<sup>303,304</sup>

Μελέτες έχουν δείξει ότι η δραστηριότητα των ενζύμων παρουσία υδρόφιλων ιοντικών υγρών, όπως τα ιοντικά υγρά που χρησιμοποιούνται στην παρούσα διατριβή, επηρεάζεται από τις κοσμοτροπικές/χαοτροπικές ιδιότητες των ιόντων των ιοντικών υγρών.<sup>178,182,305</sup> Ως κοσμοτροπικά ορίζονται τα ιόντα που έχουν την ικανότητα να αυξάνουν/επάγουν την δομή του νερού ενώ ως χαοτροπικά ορίζονται εκείνα που την μειώνουν/καταστέλλουν.<sup>175</sup> Στην παρούσα μελέτη, το ανιόν που χρησιμοποιήθηκε για την σύνθεση των ιοντικών υγρών είναι το μυρμηκικό οξύ, το οποίο θεωρείται ως ένα κοσμοτροπικό ανιόν.<sup>306</sup> Επιπλέον, όλα τα υδροξυλαμμωνιακά κατιόντα που χρησιμοποιήθηκαν, είναι περισσότερο υδρόφιλα από το χαοτροπικό κατιόν χολίνης και επομένως μπορούν να θεωρηθούν ως έντονα χαοτροπικά.

Η υδροφιλικότητα των ιόντων αποτελεί μέτρο των χαοτροπικών/κοσμοτροπικών τους ιδιοτήτων.<sup>307</sup> Σύμφωνα με άλλες ερευνητικές εργασίες, η παρουσία ενός κοσμοτροπικού ανιόντος και ενός χαοτροπικού κατιόντος οδηγούν σε αύξηση της καταλυτικής ισχύος των ενζύμων όπως παρόμοια προκύπτει και στα αποτελέσματα για το κυτοχρώμα c.<sup>178,182,305</sup> Πιο συγκεκριμένα, στα πιο υδρόφιλα και επομένως πιο χαοτροπικά κατιόντα των ιοντικών υγρών BHEAF και HEAF η καταλυτική δραστηριότητα ήταν υψηλότερη συγκριτικά με αυτή που παρατηρήθηκε στην περίπτωση των λιγότερο χαοτροπικών κατιόντων των ιοντικών υγρών HMEAF και HDMEAF.

Εν συνεχεία, μελετήθηκε η επίδραση των ιοντικών υγρών στην ενέργεια ενεργοποίησης ( $E_a$ ) του κυτοχρώματος c για την αντίδραση οξειδωσης της γουαϊακόλης. Η συγκέντρωση των ιοντικών υγρών που χρησιμοποιήθηκε ήταν 30 % v/v σε ένα θερμοκρασιακό εύρος από 20 έως 60 °C. Η ενέργεια ενεργοποίησης για κάθε μέσο, υπολογίστηκε από την κλίση της καμπύλης Arrhenius (Παράρτημα IV) και παρουσιάζεται στον Πίνακα 9.2. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 9.2, η παρουσία των ιοντικών υγρών στο μίγμα της αντίδρασης οδηγεί σε μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης συγκριτικά με αυτή που παρατηρείται σε υδατικό διάλυμα. Το φαινόμενο αυτό είναι πιο εμφανές όταν

στον μίγμα της αντίδρασης χρησιμοποιούνται τα ιοντικά υγρά HMEAF και HEAF. Έχει αναφερθεί ότι σε ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά η μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης πιθανόν να σχετίζεται με την επίδραση των ιοντικών υγρών στην δομή του πρωτεϊνικού μορίου καθώς επίσης και στη δημιουργία του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος.<sup>304</sup>

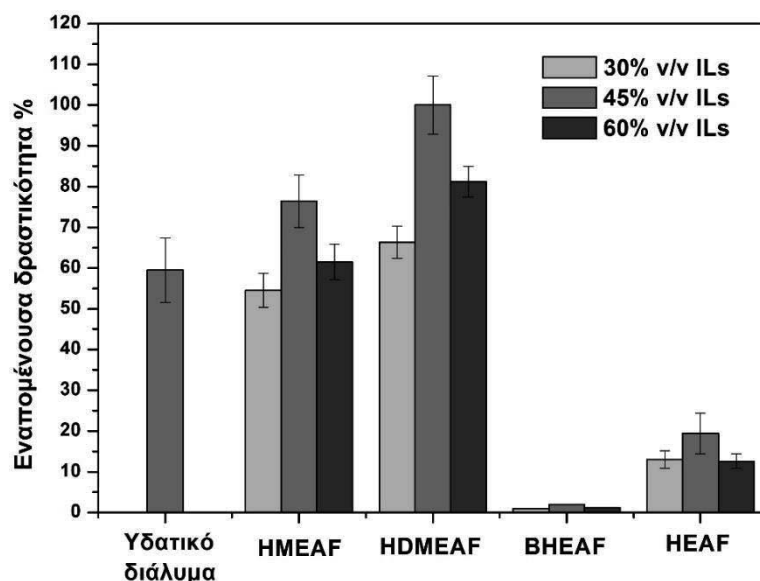
**Πίνακας 9.2.** Ενέργεια ενεργοποίησης  $E_a$  για την αντίδραση οξείδωσης της γουαϊακόλης από το κυτόχρωμα c παρουσία 30 % v/v διαφόρων ιοντικών υγρών.

Ενέργεια Ενεργοποίησης $E_a$ ( kcal/mol)				
Buffer	BHEAF	HDMEAF	HMEAF	HEAF
1.28	1.17	1.19	0.67	0.58

### 9.3. Επίδραση των υδροξυαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών στην σταθερότητα του κυτοχρώματος c

Η σταθερότητα των ενζύμων αποτελεί μία από τις σημαντικότερες παραμέτρους για την χρήση τους σε βιομηχανικές εφαρμογές. Διάφοροι παράγοντες μπορεί να οδηγήσουν στην αποδιάταξη πρωτεϊνών όπως οι υψηλές θερμοκρασίες και η παρουσία κάποιου αποδιατακτικού παράγοντα. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα ένζυμα διατηρούν και, σε ορισμένες περιπτώσεις, βελτιώνουν την σταθερότητά τους παρουσία ιοντικών υγρών.<sup>308</sup> Στο παρόν κεφάλαιο θα μελετηθεί η σταθερότητα του κυτοχρώματος c σε ιοντικά υγρά, παρουσία ενός αποδιατακτικού παράγοντα όπως είναι το  $H_2O_2$ . Έχει αποδειχθεί ότι, ένζυμα τα οποία διαθέτουν στο μόριό τους την προσθετική ομάδα της αίμης όπως είναι οι υπεροξειδάσες και το κυτόχρωμα c, απενεργοποιούνται παρουσία περίσσειας  $H_2O_2$  όταν απουσιάζει κάποιο αναγωγικό υπόστρωμα.<sup>307,309</sup> Αυτή η απενεργοποίηση συνδέεται με αλλαγές στο μόριο της αίμης που οδηγούν σε μία ανενεργή μορφή της (verdohemoprotein) καθώς επίσης και με την δημιουργία ελευθέρων ριζών που μπορεί να απενεργοποιήσουν το ενεργό κέντρο της αίμης.<sup>309,310</sup>

Η σταθερότητα του κυτοχρώματος c σε ιοντικά υγρά παρουσία  $H_2O_2$  μελετήθηκε επωάζοντας την πρωτεΐνη σε υδατικά διαλύματα ιοντικών υγρών (30 έως 60 % v/v) παρουσία 1 mM  $H_2O_2$  για 15 λεπτά στους 30 °C. Η εναπομένουσα δραστηριότητα υπολογίστηκε μέσω της οξείδωσης της γουαϊακόλης όπως φαίνεται στην Εικόνα 9.4.



**Εικόνα 9.4.** Σταθερότητα του κυτοχρώματος c σε υδατικό διάλυμα και σε 30, 45 και 60 % v/v υδατικό διάλυμα ιοντικών υγρών μετά από επώαση για 15 λεπτά παρουσία 1 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στους 30 °C. Ως 100 % ορίζεται η δραστηριότητα σε χρόνο t = 0 λεπτά.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 9.4, η δραστηριότητα του κυτοχρώματος c παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μειώθηκε κατά 40 % μετά από 15 λεπτά επώασης σε υδατικό διάλυμα. Στην περίπτωση των ιοντικών υγρών παρατηρείται μία έντονη εξάρτηση της σταθερότητας του κυτοχρώματος c από την φύση του εκάστοτε ιοντικού υγρού που χρησιμοποιείται ως μέσο επώασης. Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία των ιοντικών υγρών ΗΜΕΑF και κυρίως του ΗDΜΕΑF, σχεδόν σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, οδηγεί σε αύξηση της σταθερότητας της πρωτεΐνης συγκριτικά με αυτή που παρατηρείται στο υδατικό διάλυμα, καταδεικνύοντας τον προστατευτικό ρόλο τους έναντι του αποδιατακτικού παράγοντα. Το φαινόμενο αυτό δεν παρατηρήθηκε στην περίπτωση των ιοντικών υγρών ΗΕΑF και ΒΕΑF, όπου η εναπομένουσα δραστηριότητα του κυτοχρώματος μετά την επώαση παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> μειώθηκε σημαντικά συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα για όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν.

Βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί ότι η σταθερότητα του κυτοχρώματος c παρουσία διαφόρων υδρόφιλων ιοντικών υγρών εξαρτάται σημαντικά από την κοσμοτροπικότητα /χαοτροπικότητα των ιόντων τους.<sup>208</sup> Ωστόσο, στην παρούσα διατριβή η επίδραση των ιοντικών υγρών στην σταθερότητα του κυτοχρώματος δεν φαίνεται να ακολουθεί τις κοσμοτροπικές ιδιότητες των ιόντων που μελετήθηκαν επισημαίνοντας ότι οι ιδιότητες

αυτές δεν αποτελούν τον μοναδικό παράγοντα προσδιορισμού της συμπεριφοράς της πρωτεΐνης σε ιοντικά υγρά.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκαν ιοντικά υγρά τα οποία προέρχονται από υδροξυαιθυλαμμωνιακά κατιόντα. Έχει προταθεί ότι τα υδροξυαιθυλαμμωνιακά κατιόντα μπορούν να μιμηθούν την δομή του νερού διαθέτοντας ιδιότητες δότη και δέκτη δεσμών υδρογόνου και να δημιουργήσουν δεσμούς με την πολυπεπτιδική αλυσίδα της πρωτεΐνης, επεμβαίνοντας έτσι στην δομή και την λειτουργία της.<sup>178</sup> Οι αλληλεπιδράσεις αυτές, δεν θα πρέπει να είναι ιδιαίτερα ισχυρές. Οι ισχυρές αλληλεπιδράσεις της πρωτεΐνης με τα κατιόντα του ιοντικού υγρού θα μπορούσαν να οδηγήσουν στην διάσπαση των δεσμών υδρογόνου μεταξύ των αμινοξέων και επομένως σε διαταραχή της διαμόρφωσης της πρωτεΐνης.<sup>207</sup> Η ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου των κατιόντων των ιοντικών υγρών που χρησιμοποιήθηκαν στην συγκεκριμένη διατριβή ακολουθεί την εξής σειρά HDMEAF < HMEAF < HEAF < BHEAF, με βάση την αλκαλικότητα του αζώτου της εκάστοτε αμίνης.<sup>311</sup> Από τα αποτελέσματα της Εικόνας 9.4 παρατηρούμε ότι το κυτόχρωμα c είναι πιο σταθερό όταν επώαζεται στα υδατικά διαλύματα των ιοντικών υγρών HDMEAF και του HMEAF, το οποίο πιθανά να εξηγείται μέσω της μειωμένης ικανότητας των κατιόντων των συγκεκριμένων μέσων να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου και επομένως μικρότερη αλληλεπίδραση με το πρωτεϊνικό μόριο.

Επιπλέον, η αυξημένη σταθερότητα του κυτοχρώματος c παρουσία του ιοντικού υγρού HDMEAF, θα μπορούσε να οφείλεται στο λιγότερο υδρόφιλο περιβάλλον που δημιουργεί το συγκεκριμένο μέσο για την πρωτεΐνη συγκριτικά με τα υπόλοιπα. Αυτό το λιγότερο υδρόφιλο περιβάλλον που δημιουργείται, είναι πιθανό να εμποδίζει την διάχυση του υδρόφιλου H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης μειώνοντας έτσι την αποδιατακτική του επίδραση. Ο πιθανός περιορισμός διάχυσης του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> στο μικροπεριβάλλον του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης μπορεί να εξηγεί επιπλέον και την μειωμένη δραστηριότητα του κυτοχρώματος c σε υδατικά διαλύματα του συγκεκριμένου ιοντικού υγρού (Εικόνα 9.3).

#### **9.4. Μελέτη της διαμόρφωσης του κυτοχρώματος c σε υδατικά διαλύματα υδροξυαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών**

Η καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων στα ιοντικά υγρά πιθανά να οφείλεται σε δομικές αλλαγές στο πρωτεϊνικό μόριο. Με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση των ιοντικών υγρών στα δομικά χαρακτηριστικά του κυτοχρώματος c εφαρμόστηκαν διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές για την ανάλυση της δομής της πρωτεΐνης όπως η

φασματοσκοπία UV-Vis και η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού CD και η φασματοσκοπία υπερύθρου (FTIR-ATR).

#### 9.4.1. Φασματοσκοπία υπερύθρου (FTIR-ATR)

Οι δομικές αλλαγές του κυτοχρώματος *c* παρουσία των υδροξυαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών μελετήθηκαν μέσω φασματοσκοπίας υπερύθρου υγρών δειγμάτων (FTIR-ATR). Η ανάλυση του φάσματος στην Amide I περιοχή  $1600-1700\text{ cm}^{-1}$  (κυρίως λόγω της έκτασης του δεσμού C=O των αμινοξέων) παρέχει πληροφορίες για την επίδραση των ιοντικών υγρών στην δευτεροταγή δομή της πρωτεΐνης.<sup>312,313</sup> Ο βαθμός ομοιότητας των φασμάτων του κυτοχρώματος *c* σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 7.0 και σε 30 % υδατικό διάλυμα ιοντικών υγρών υπολογίστηκε με βάση τον συντελεστή συσχέτισης *r* σύμφωνα με την εξίσωση 3 (βλ. Παράγραφο 8.2.14.3). Στον Πίνακα 9.3 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης των FTIR-ATR φασμάτων.

**Πίνακας 9.3.** Συντελεστής συσχέτισης (*r*) μεταξύ των ATR-FTIR φασμάτων του κυτοχρώματος *c* σε 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7.0 και σε 30% v/v υδατικό διάλυμα ιοντικών υγρών. Δα-έλικας (%) είναι η διαφορά μεταξύ του ποσοστού α-έλικας σε 30 % v/v υδατικό διάλυμα ιοντικού υγρού συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα, όπως αυτή προκύπτει από την ανάλυση της Amide I περιοχής.

Ionic Liquid	<i>r</i>	Δα-έλικας (%)
HMEAF	0.97	+0.80
HDMEAF	0.93	+2.50
BHEAF	0.98	-0.68
HEAF	0.94	+1.72

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα 9.3, η διαμόρφωση της πρωτεΐνης παρουσία των ιοντικών υγρών δεν εμφανίζει σημαντική απόκλιση από αυτήν απουσία ιοντικού υγρού. Παρόμοια διατήρηση της δευτεροταγούς διαμόρφωσης του κυτοχρώματος *c* σε υδρόφιλα ιοντικά υγρά έχει αναφερθεί και βιβλιογραφικά.<sup>208,300</sup>

Δεδομένου ότι το σημαντικότερο στοιχείο στην δευτεροταγή δομή του κυτοχρώματος *c* αντιστοιχεί σε α-έλικες όπου φτάνει το 40 % της συνολικής διαμόρφωσης, μελετήθηκε η επίδραση των ιοντικών υγρών σε αυτό το στοιχείο (Πίνακας 9.3). Το περιεχόμενο της πρωτεΐνης σε α-έλικες υπολογίστηκε μέσω της δεύτερης παραγώγου του ATR-FTIR φάσματος, στο οποίο οι κορυφές στα  $1650-1665\text{ cm}^{-1}$  αποδίδονται σε α-



έλικα<sup>314,315</sup> (Πίνακας 8.3). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η παρουσία των ιοντικών υγρών HMEAF, HDMEAF και HEAF οδήγησε σε μικρή αύξηση του περιεχομένου σε α-έλικα, το οποίο πιθανά να συνδέεται με την μετάβαση της πρωτεΐνης σε μία πιο άκαμπτη διαμόρφωση.<sup>316</sup> Η μείωση της α-έλικας που παρατηρείται στην περίπτωση του ιοντικού υγρού BHEAF πιθανά να σχετίζεται με μία λιγότερο άκαμπτη δομή της πρωτεΐνης. Το γεγονός αυτό πιθανά να εξηγεί την χαμηλή σταθερότητα του πρωτεϊνικού μορίου στο συγκεκριμένο μέσο (Εικόνα 9.4).

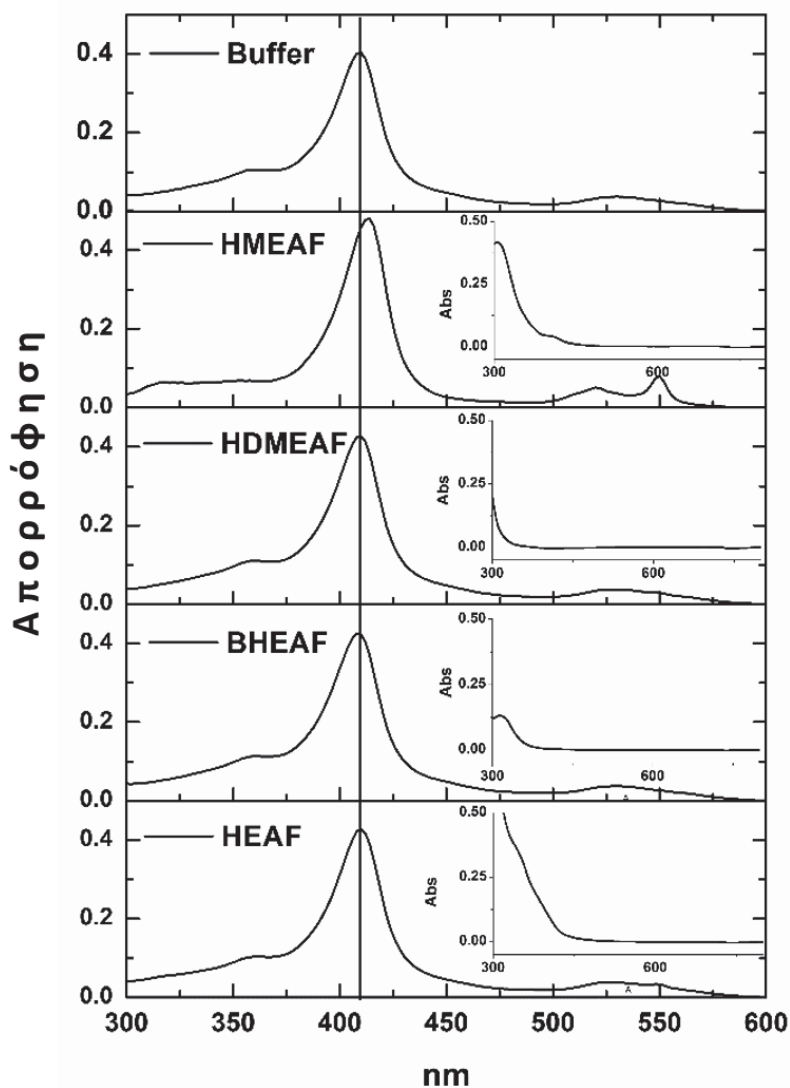
#### **9.4.2. Φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους (UV-Vis)**

Η φασματοσκοπία ορατού-υπεριώδους UV-Vis χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να μελετηθούν πιθανές αλλαγές στο μικροπεριβάλλον της αίμης παρουσία των ιοντικών υγρών. Σύμφωνα με τις Εικόνες 9.5 και 9.6 το φάσμα UV-Vis του οξειδωμένου κυτοχρώματος c (Fe(III)) σε υδατικό διάλυμα παρουσιάζει τρεις χαρακτηριστικές κορυφές: μία μεγάλη κυρίως κορυφή στα 409 nm, γνωστή ως κορυφή Soret, μία πιο μικρή διευρυμένη κορυφή στα 530 nm (Q-κορυφή) και μία πολύ ασθενή κορυφή στα 695 nm, η οποία προκύπτει από την αλληλεπίδραση του θείου στο κατάλοιπο της μεθειονίνης 80 (Met80) με το σίδηρο της αίμης, γνωστή ως κορυφή μεταφοράς φορτίου (CT κορυφή).<sup>317,318</sup>

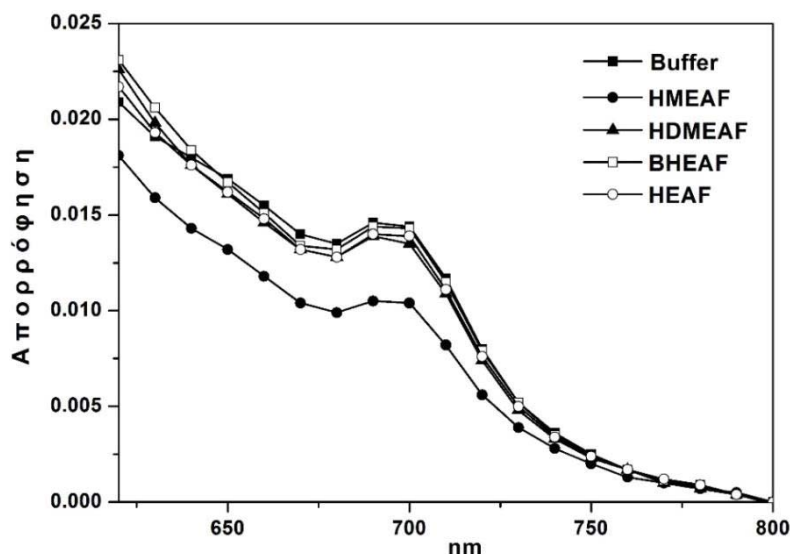
Όπως φαίνεται από την Εικόνα 9.5 η παρουσία 60 % v/v υδατικών διαλυμάτων των ιοντικών υγρών HDMEAF, BHEAF και HEAF δεν επηρεάζει το φάσμα απορρόφησης της πρωτεΐνης, γεγονός που υποδηλώνει ότι το μικροπεριβάλλον της αίμης διατηρείται ανέπαφο.<sup>319</sup> Ωστόσο, η παρουσία του ιοντικού υγρού HMEAF οδήγησε σε αλλαγές του φάσματος απορρόφησης της πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκε μία μετατόπιση στην κορυφή Soret στα 413 nm, ενώ παράλληλα στην περιοχή της Q-κορυφής εμφανίζονται μία α-κορυφή στα 550 nm και μία β-κορυφή στα 520 nm, υποδεικνύοντας της ύπαρξη του κυτοχρώματος c στην ανηγμένη του μορφή.<sup>320</sup>

Επιπλέον, στην περίπτωση του HMEAF ιοντικού υγρού παρατηρήθηκε μείωση στην απορρόφηση της CT κορυφής<sup>317,318</sup> στα 695 nm συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα (Εικόνα 9.6). Η αλλαγή αυτή συνδέεται με αλλαγές στο μικροπεριβάλλον της αίμης, οι οποίες προέρχονται από την μερική διατάραξη ή ακόμα και διάσπαση του συντονισμού μεταξύ του θείου της Met80 και του σιδήρου της αίμης.<sup>31</sup> Η διάσπαση αυτού του δεσμού έχει συνδεθεί με την σταδιακή διάσπαση των δεσμών υδρογόνου στο εσωτερικό της πρωτεΐνης συνοδευόμενη από έκθεση των αμινοξικών καταλοίπων και του δακτυλίου της αίμης στο

μέσο της αντίδρασης και ως εκ τούτου σε απώλεια του σιδήρου και της καταλυτικής δραστηρότητας του πρωτεϊνικού μορίου.<sup>26,319</sup>



**Εικόνα 9.5.** Φάσμα απορρόφησης ορατού υπεριώδους (300–600 nm) του κυτοχρώματος c σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH 7.0 και παρουσία 60% (v/v) ιοντικών υγρών. Στα ένθετα φαίνονται τα φάσματα απορρόφησης των ιοντικών υγρών (60% v/v ) απουσία ενζύμου.

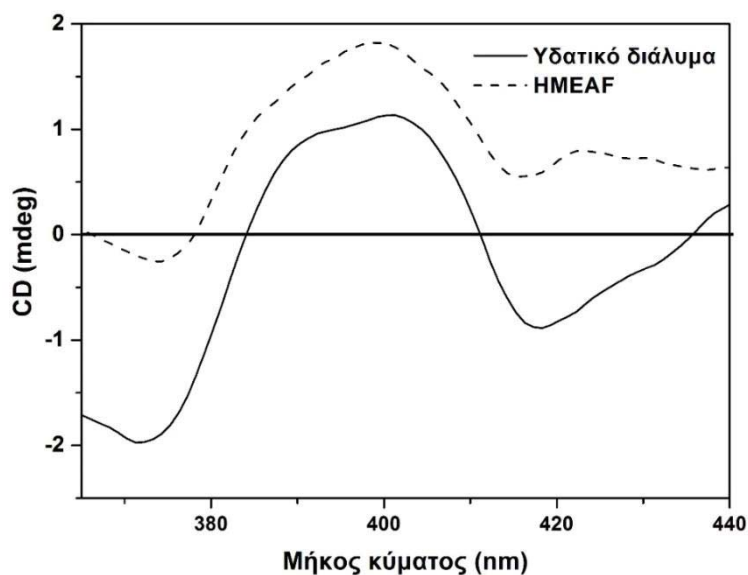


**Εικόνα 9.6.** Φάσμα απορρόφησης του κυτοχρώματος c στην κορυφή μεταφοράς φορτίου στα 695 nm σε 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα in phosphate buffer, pH 7.0 και παρουσία of 60% v/v ιοντικών υγρών.

#### 9.4.3. Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (CD)

Οι αλλαγές στο φάσμα απορρόφησης ορατού υπεριώδους του κυτοχρώματος c στο ιοντικό υγρό HMEAF, αποτέλεσαν κίνητρο για περαιτέρω δομική μελέτη της πρωτεΐνης σ' αυτό το μέσο εφαρμόζοντας την φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού. Εξ' αιτίας της υψηλής απορρόφησης του ιοντικού υγρού στο εγγύς και πέραν υπεριώδες, μόνο η περιοχή Soret (350–450 nm) του φάσματος κυκλικού διχρωισμού για το κυτόχρωμα c μπόρεσε να μελετηθεί. Το φάσμα στην περιοχή αυτή προέρχεται από τις ηλεκτρονιακές μεταπτώσεις της αίμης και τις αλληλεπιδράσεις της με γειτονικά αρωματικά αμινοξέα παρέχοντας πληροφορίες σχετικά με την ακεραιότητά της.<sup>301</sup>

Στην Εικόνα 9.7. παρατίθεται το φάσμα κυκλικού διχρωισμού του κυτοχρώματος c σε 0.5 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7.0 και παρουσία 60% v/v του ιοντικού υγρού HMEAF. Το φάσμα της πρωτεΐνης στη φυσική της διαμόρφωση παρουσιάζει μία αρνητική κορυφή στα 416 nm και μία θετική κορυφή στα 402 nm εξ' αιτίας του φαινομένου Cotton.<sup>206,321</sup> Η επώαση του κυτοχρώματος c σε υδατικό διάλυμα του ιοντικού υγρού HMEAF, οδήγησε σε αύξηση της θετικής κορυφής στα 402 nm ενώ παράλληλα η κορυφή στα 416 nm υπέστη σημαντική μείωση. Παρόμοιες αλλαγές στο φάσμα κυκλικού διχρωισμού έχουν αναφερθεί και βιβλιογραφικά σε περιπτώσεις επώασης των πρωτεϊνών σε ιοντικά υγρά και οργανικούς διαλύτες <sup>206,300,322,323</sup> καθώς επίσης και παρουσία μετουσιωτικών παραγόντων όπως η γουανιδίνη, το HCl και η ουρία.<sup>324</sup>



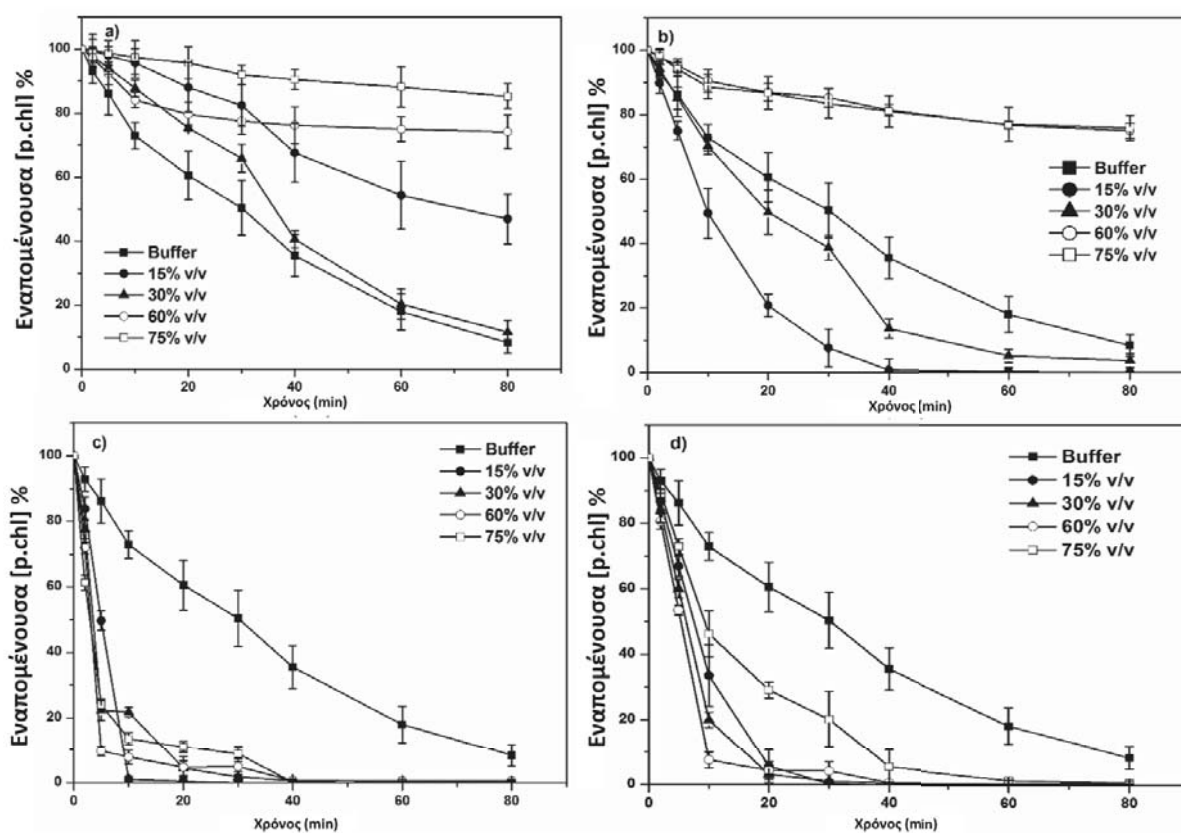
**Εικόνα 9.7.** Φάσμα κυκλικού διχρωισμού του κυτοχρώματος c στην περιοχή Soret σε 0.5 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7.0 και παρουσία 60% v/v υδατικού διαλύματος ιοντικού υγρού HMEAF.

Η αύξηση της κορυφής στα 416 nm με την παράλληλη σημαντική μείωση της αρνητικής κορυφής στα 402 nm που παρατηρήθηκε παρουσία του ιοντικού υγρού, πιθανά συνδέεται με την διατάραξη του προσανατολισμού και της απόστασης μεταξύ του μορίου της αίμης και των αρωματικών αμινοξέων Tyr59 και Phe82 που βρίσκονται στην πολυπεπτιδική αλυσίδα της πρωτεΐνης (περιοχή πρόσδεσης με την Met80).<sup>325</sup> Τα αποτελέσματα φασμάτων του κυκλικού διχρωισμού, τα οποία βρίσκονται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των φασμάτων UV-Vis πιθανά να εξηγούν την μειωμένη δραστηριότητα του κυτοχρώματος c στο συγκεκριμένο ιοντικό υγρό HMEAF, συγκριτικά με τα υπόλοιπα (Εικόνες 9.3, 9.5, 9.6).

### 9.5. Εφαρμογή υδατικών διαλυμάτων υδροξυαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών για τον αποχρωματισμό χρωστικών από το κυτόχρωμα c

Η συσσώρευση των βιομηχανικών χρωστικών σε υγρά απόβλητα έχει σημαντικές επιπτώσεις τόσο στο περιβάλλον όσο και στην υγεία και η απομάκρυνσή τους συνιστά πρόκληση για την επιστημονική αλλά και την βιομηχανική κοινότητα.<sup>326</sup> Ανάμεσα στα ένζυμα που έχουν χρησιμοποιηθεί για την βιο-αποδόμηση χρωστικών συμπεριλαμβάνονται το κυτόχρωμα c, οι λακκάσες, οι υπεροξειδάσες κ.α.<sup>327-331</sup> Με σκοπό να μελετήσουμε την επίδραση των υδροξυαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών στην ικανότητα αποχρωματισμού

του κυτοχρώματος c, το χλωρίδιο της πινακυανόλης (p.chl) χρησιμοποιήθηκε ως χρωστική-μοντέλο. Πρόκειται για μία συμμετρική χρωστική τριμεθυνοκυανίνης που χρησιμοποιείται ευρέως σε φωτογραφικές διεργασίες.<sup>332</sup> Η χρήση του H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> πραγματοποιήθηκε σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0.3 mM) προκειμένου να μειωθεί η αποδιατακτική του δράση στο πρωτεϊνικό μόριο. Η % εναπομένουσα συγκέντρωση του p.chl μετά από καθορισμένο χρόνο επώασης (0-80 λεπτά) της αντίδρασης αποχρωματισμού από το κυτόχρωμα c παρατίθενται στην Εικόνα 9.8., ενώ στον Πίνακα 9.4. παρουσιάζονται οι αρχικές ταχύτητες της αντίδρασης.



**Εικόνα 9.8.** Αποχρωματισμός του p.chl από το κυτόχρωμα c παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.0 και σε υδατικά διαλύματα των ιοντικών υγρών (a) HMEAF, (b) HDMEAF, (c) BHEAF and (d) HEAF σε συγκεντρώσεις 15 -75 % v/v.

**Πίνακας 9.4.** Αρχική ταχύτητα της αντίδρασης αποχρωματισμού του p.chl από το κυτόχρωμα c παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.0 και σε διάφορες συγκεντρώσεις υδατικών διαλυμάτων ιοντικών υγρών

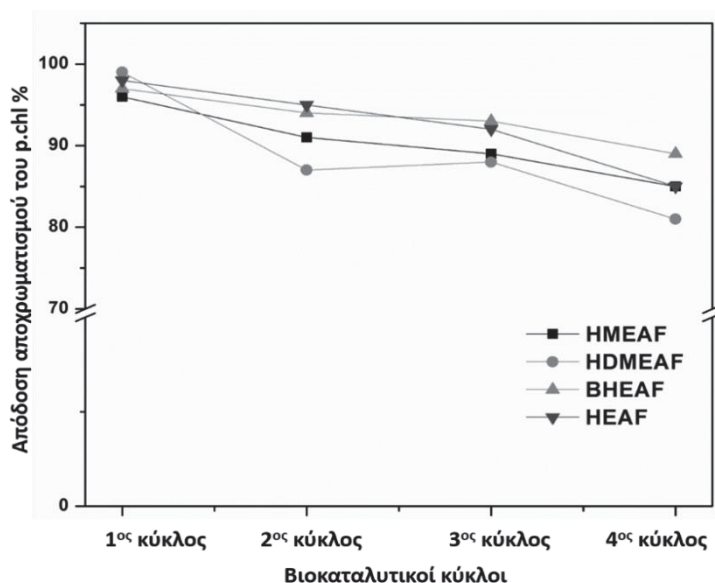
<b>Αρχική ταχύτητα αποχρωματισμού (μM min<sup>-1</sup>)</b>				
<b>% v/v ILs</b>	<b>HMEAF</b>	<b>HDMEAF</b>	<b>BHEAF</b>	<b>HEAF</b>
0	3.9 ± 0.2	3.9 ± 0.2	3.9 ± 0.2	3.9 ± 0.2
15	0.9 ± 0.09	7.8 ± 0.3	11.3 ± 0.4	9.9 ± 0.7
30	1.8 ± 0.1	4.0 ± 0.1	14.0 ± 0.3	12.5 ± 0.4
60	2.5 ± 0.2	1.5 ± 0.03	17.4 ± 0.4	14.5 ± 0.5
75	0.4 ± 0.08	1.3 ± 0.09	18.6 ± 0.7	8.0 ± 0.3

Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι, η ικανότητα αποχρωματισμού του κυτοχρώματος c εξαρτάται σημαντικά από την φύση του ιοντικού υγρού στο οποίο πραγματοποιείται η αντίδραση καθώς επίσης και από την συγκέντρωσή του στο μίγμα της αντίδρασης. Στην περίπτωση του ιοντικού υγρού HMEAF, η ικανότητα αποχρωματισμού του κυτοχρώματος c μειώνεται ενώ, αντίθετα, η παρουσία των ιοντικών υγρών BHEAF και HEAF οδηγεί σε αύξηση της δραστηριότητας της πρωτεΐνης συγκριτικά με αυτήν που παρατηρείται στο υδατικό διάλυμα. Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα του Πίνακα 9.4. η αρχική ταχύτητα αποχρωματισμού παρουσία των ιοντικών υγρών HEAF και BHEAF στο μίγμα της αντίδρασης είναι 4 και 5 φορές μεγαλύτερη αντίστοιχα, συγκριτικά με αυτήν απουσία των ιοντικών υγρών. Αξίζει να αναφερθεί ότι η απόδοση αποχρωματισμού ήταν περίπου 90 % μετά από 20 λεπτά επώασης στα ιοντικά υγρά HEAF and BHEAF (15–60% v/v) ενώ, αντίστοιχα, στο υδατικό διάλυμα η απόδοση ήταν περίπου 40%. Η θετική επίδραση αυτών των ιοντικών υγρών γίνεται πιο έντονη καθώς αυξάνεται η συγκέντρωσή τους στο μίγμα της αντίδρασης. Το φαινόμενο αυτό πιθανόν να εξηγείται από την αυξημένη οξειδωτική δραστηριότητα του κυτοχρώματος που παρατηρήθηκε σε αυτά τα μέσα (Εικόνα 9.3).

## **9.6. Επαναχρησιμοποίηση των υδροξυαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών**

Με σκοπό να αναδείξουμε περαιτέρω τον «πράσινο» χαρακτήρα των συντιθέμενων ιοντικών υγρών, επιχειρήθηκε η μελέτη της δυνατότητας ανακύκλωσης και επαναχρησιμοποίησής τους σε αντιδράσεις βιοκατάλυσης. Η αντίδραση που χρησιμοποιήθηκε για αυτή την μελέτη ήταν ο αποχρωματισμός της χρωστικής p.chl από ακινητοποιημένο κυτόχρωμα c. Η χρήση ακινητοποιημένου βιοκαταλύτη στην διεργασία

διευκολύνει την επανάκτηση του μέσου αντίδρασης. (βλ. Παράγραφο 6.1). Τα αποτελέσματα επαναχρησιμοποίησης των ιοντικών υγρών παρατίθενται στην Εικόνα 9.9.



**Εικόνα 9.9.** Επαναχρησιμοποίηση των ιοντικών υγρών στην αντίδραση αποχρωματισμού του p.chl από το ακινητοποιημένο κυτόχρωμα c μετά από 3 ώρες επώασης στους 27 °C.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 9.9. όλα τα ιοντικά υγρά επαναχρησιμοποιήθηκαν έως και 4 βιοκαταλυτικούς κύκλους. Το ποσοστό αποχρωματισμού μετά τους 4 βιοκαταλυτικούς κύκλους διατηρείται σε παρόμοια επίπεδα με την αρχική απόδοση σε όλες τις περιπτώσεις ιοντικών υγρών που μελετήθηκαν. Η ευεργετική δράση των υδροξυαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών στην ικανότητα αποχρωματισμού του κυτοχρώματος c καθώς επίσης και η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης τους σε βιοκαταλυόμενες αντιδράσεις τα καθιστούν ως πολλά υποσχόμενα περιβαλλοντικά φιλικά μέσα για την ανάπτυξη βιοκαταλυτικών διεργασιών αποχρωματισμού.

### 9.7. Μελέτη της βιοαποικοδομησιμότητας των ιοντικών υγρών

Με σκοπό να μελετηθεί το επίπεδο βιοαποικοδομησιμότητας των συντιθέμενων ιοντικών υγρών, προσδιορίστηκε το Βιολογικά Απαιτούμενου Οξυγόνου (Biological Oxygen Demand- BOD) για την βιοχημική αποικοδόμηση του εκάστοτε ιοντικού υγρού μετά από 5 μέρες. Κατά την διάρκεια του BOD τεστ υπολογίστηκε μόνο η βιοαποικοδόμηση των απλών οργανικών ενώσεων (αναφέρεται στην μετατροπή του άνθρακα σε διοξείδιο του

άνθρακα) και τα αποτελέσματα αναφέρονται ως CBOD.<sup>229</sup> Στον Πίνακα 9.5. παρατίθενται τα αποτελέσματα βιοαποικοδόμησης των ιοντικών υγρών.

**Πίνακας 9.5.** % Βιοαποικοδομησιμότητα των συντιθέμενων υδροξυλ αμμωνιακών ιοντικών υγρών

Ιοντικό υγρό	(%) Βιοαποικοδόμηση *
2-HEAF	58.9
HMEAF	55.0
HDMEAF	57.4
BHEAF	52.2

\* Το ποσοστό βιοαποικοδομησιμότητας αποτελεί τον λόγο μεταξύ του πειραματικού BOD (CBOD) και του θεωρητικού BOD (UBOD). Η παράμετρος **CBOD** εκφράζει το απαιτούμενο οξυγόνο από τους μικροοργανισμούς για την αποικοδόμηση των ιοντικών υγρών σε 5 μέρες. (βιοαποικοδόμηση μόνο απλών οργανικών ενώσεων)

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, όλα τα ιοντικά υγρά που μελετήθηκαν εμφανίζουν σημαντικό επίπεδο βιοαποικοδομησιμότητας καθώς πάνω από 50 % της οργανικής ένωσης αποδομήθηκε εντός 5 ημερών. Η υψηλή βιοαποικοδομησιμότητα των συντιθέμενων ιοντικών υγρών θα μπορούσε πιθανά σχετίζεται με την παρουσία ομάδων –OH στο κατιόν του μέσου. Βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί ότι το επίπεδο βιοαποικοδομησιμότητας ιοντικών υγρών με βάση την αιθανολαμίνη όπως αυτά της παρούσας διατριβής, εξαρτάται κυρίως από το κατιόν του ιοντικού υγρού καθώς επίσης και από ομάδες στο μόριο του ιοντικού που αποτελούν πιθανές θέσεις για ενζυμική υδρόλυση (κυρίως άτομα οξυγόνου) αυξάνοντας το ενδεχόμενο αποικοδόμησης.<sup>152,159,333,334</sup>



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 10<sup>ο</sup>

### Επίδραση Βαθέων Ευτηκτικών Διαλυτών σε αντιδράσεις οξείδωσης

---

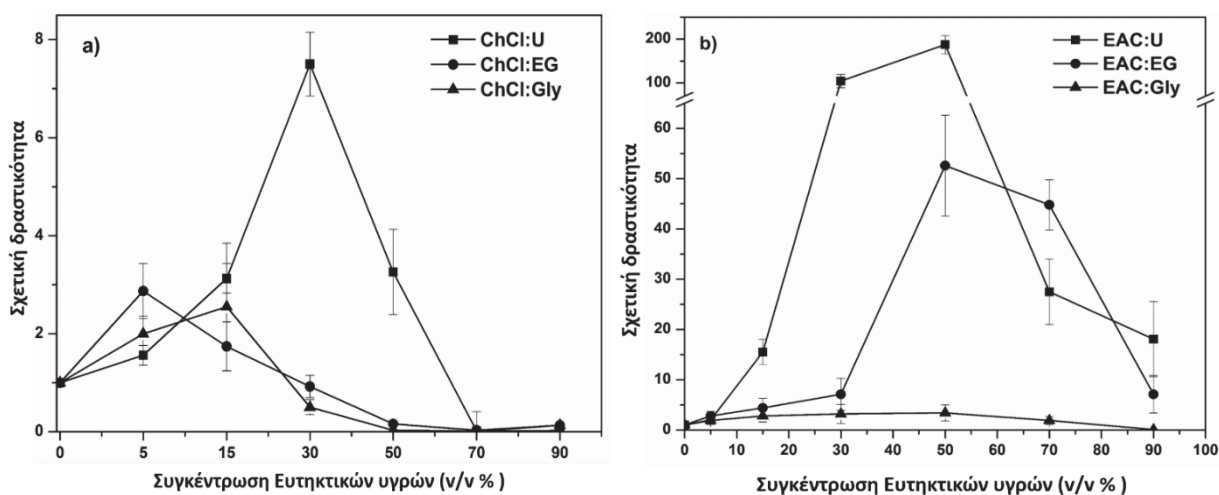


Οι βαθείς ευτηκτικοί διαλύτες (DES) αποτελούν μία πολλά υποσχόμενη γενιά διαλυτών, με χαμηλό κόστος παρασκευής και τοξικότητας για την πραγματοποίηση αντιδράσεων βιοκατάλυσης. Οι ευεργετικές τους επιδράσεις στη δραστηριότητα, εκλεκτικότητα και σταθερότητα ενζύμων όπως η λιπάση, η εποξική υδρολάση, η πρωτεάση και η υπεροξειδάση HRP έχουν αναδειχθεί βιβλιογραφικά. Η δυνατότητα τροποποίησης των φυσικοχημικών τους ιδιοτήτων μέσω κατάλληλης επιλογής των συστατικών τους αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα στη χρήση τους. Η κατανόηση της συμπεριφοράς των ενζύμων σε αυτά τα μέσα επιτρέπει τον σχεδιασμό και την σύνθεση DES κατάλληλων για την ανάπτυξη μίας αποτελεσματικής βιοκαταλυτικής διεργασίας.

Σε αυτό το κεφάλαιο μελετήθηκε η επίδραση των DES με οργανικό άλας το  $\text{ChCl}$  και το EAC και δότες δεσμών υδρογόνου την ουρία (U), την γλυκερόλη (Gly) και την αιθυλενική γλυκόλη (EG) στην δραστηριότητα και σταθερότητα οξειδωτικών ενζύμων όπως το κυτόχρωμα c και η υπεροξειδάση χρένου (HRP). Επιπλέον, μέσω φασματοσκοπικών τεχνικών όπως ο κυκλικός διχρωισμός και η φασματοσκοπία ορατού υπεριώδους UV-Vis, μελετήθηκε η επίδραση των DES στα δομικά χαρακτηριστικά του κυτοχρώματος c.

### 10.1. Επίδραση των DES στην δραστικότητα οξειδωτικών ενζύμων

Η υπεροξειδική δραστικότητα μέταλλο-πρωτεϊνών όπως είναι το κυτόχρωμα c και η υπεροξειδάση HRP, μελετήθηκε παρουσία διαφόρων DES με βάση το ChCl και το EAC (ChCl:U, ChCl:Gly, ChCl:EG, EAC:U, EAC:Gly, EAC:EG). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης παρουσιάζονται στην Εικόνα 10.1.



**Εικόνα 10.1.** Σχετική δραστικότητα του κυτοχρώματος c για την αντίδραση οξείδωσης της γουαϊακόλης παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων DES με βάση το a) ChCl και το b) EAC. Ως 1 ορίζεται η δραστικότητα της πρωτεΐνης σε 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.0.

Όπως προκύπτει από την Εικόνα 10.1., σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν, η παρουσία των DES στο μίγμα της αντίδρασης επιδρά στην δραστικότητα του κυτοχρώματος c, η οποία φαίνεται να διαφοροποιείται σημαντικά ανάλογα με την φύση του DES και την συγκέντρωσή του στο μίγμα της αντίδρασης. Πιο συγκεκριμένα, στις περισσότερες συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, η παρουσία DES οδήγησε σε αύξηση της δραστικότητας της πρωτεΐνης συγκριτικά με αυτή στο υδατικό διάλυμα.

Σημαντική παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι, η παρουσία των DES με βάση το EAC επέφερε σημαντικά υψηλότερη αύξηση στην δραστικότητα του κυτοχρώματος c, συγκριτικά με αυτά που έχουν ως βάση το ChCl. Ενδεικτικά, η προσθήκη 30 % v/v υδατικού διαλύματος ChCl:U στο μίγμα της αντίδρασης αύξησε την δραστικότητα της πρωτεΐνης 8 φορές, ενώ η αντίστοιχη ποσότητα υδατικού διαλύματος EAC:U οδήγησε σε 100 φορές αύξηση συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα. Η επίδραση της φύσης του αμμωνιακού άλατος των DES φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντική σύμφωνα με αυτά τα αποτελέσματα. Η αυξημένη δραστικότητα του κυτοχρώματος c στα DES με αμμωνιακό άλας το EAC

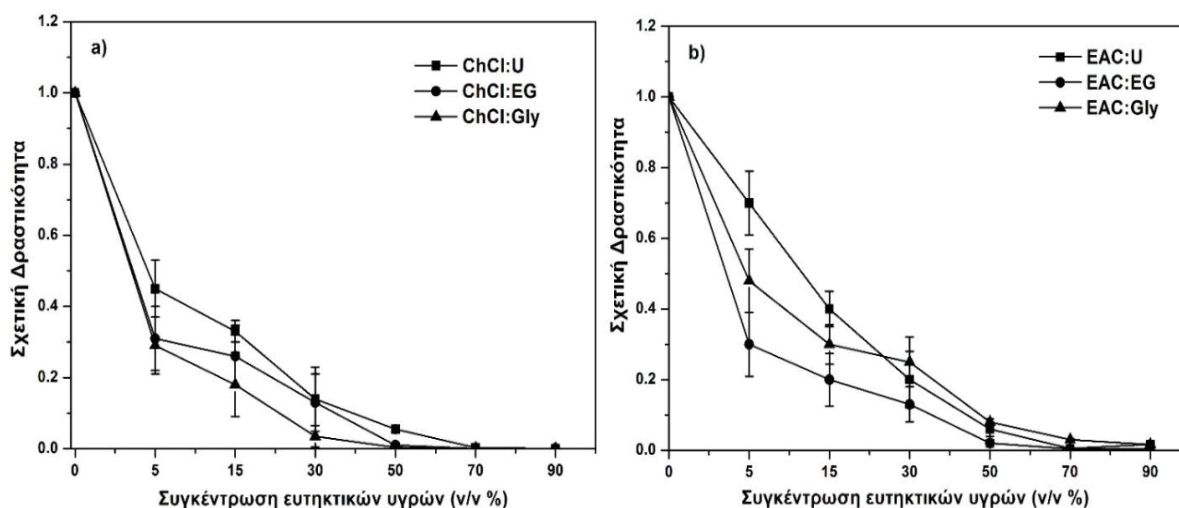
συγκριτικά με το  $\text{ChCl}$ , πιθανά να σχετίζεται με την ανάπτυξη διαφορετικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του DES και της πρωτεΐνης καθώς επίσης και με το ιξώδες του εκάστοτε DES.<sup>233</sup> Το υψηλότερο ιξώδες των DES με βάση το  $\text{ChCl}$  έναντι των EAC, πιθανά να οδηγεί σε μείωση της διάχυσης του υποστρώματος προς το ενεργό κέντρο του ενζύμου λόγω αύξησης των περιορισμών μεταφοράς μάζας, μειώνοντας έτσι την καταλυτική του δραστηριότητα.

Έναν επιπλέον παράγοντα που φαίνεται να επιδρά σημαντικά στην δραστηριότητα του κυτοχρώματος c, συνιστά η φύση του δότη δεσμών υδρογόνου. Τα DES με συστατικούς τους την U προκαλούν υψηλότερη αύξηση της δραστηριότητας συγκριτικά με την Gly και την EG, ανεξάρτητα από το αμμωνιακό άλας που χρησιμοποιείται. Αντίθετα, σε περιπτώσεις ενζύμων όπως η λιπάση και η εποξική υδρολάση, υψηλότερη δραστηριότητα παρατηρείται στην περίπτωση ευτηκτικών υγρών με δότη δεσμών υδρογόνου την Gly και την EG συγκριτικά με την U.<sup>335-337</sup>

Η θετική επίδραση των DES στην δραστηριότητα ως υπεροξειδάση του κυτοχρώματος c είναι πιο εμφανής σε συγκεντρώσεις έως 50 % v/v στο μίγμα της αντίδρασης, σε αντίθεση με τις υψηλές συγκεντρώσεις > 70 % v/v, όπου η δραστηριότητα της πρωτεΐνης μειώνεται. Βιβλιογραφικά έχει αναφερθεί ότι η παρουσία DES, κυρίως σε υψηλές συγκεντρώσεις στο μίγμα της αντίδρασης, καθορίζει τις ιδιότητες του μέσου όπως την πολικότητα και το ιξώδες και επομένως την καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων.<sup>256,335,338,339</sup> Η μειωμένη βιοκαταλυτική δραστηριότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις DES, πιθανόν να οφείλεται σε μειωμένη σταθερότητα ή αποδιάταξη του μορίου της πρωτεΐνης καθώς επίσης και σε αύξηση των περιορισμών μεταφοράς μάζας του υποστρώματος προς το ενεργό κέντρο του ενζύμου.<sup>336,337,340</sup> Μελέτες έχουν δείξει ότι ο «εγκλωβισμός» του υποστρώματος στο δίκτυο της δομής του DES (κυρίως σε υψηλές συγκεντρώσεις) μέσω δεσμών υδρογόνου, μπορεί να οδηγήσει σε μείωση της διαθεσιμότητας του υποστρώματος στο μικροπεριβάλλον της πρωτεΐνης και ως εκ τούτου στην μείωση της καταλυτικής δραστηριότητας του ενζύμου.<sup>341</sup>

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι, η παρουσία DES στο μίγμα της αντίδρασης οξειδωσης της γουαϊακόλης από μία άλλη αιμοπρωτεΐνη, την υπεροξειδάση HRP δεν οδήγησε σε ενεργοποίηση της δραστηριότητας του ενζύμου όπως παρατηρήθηκε με το κυτόχρωμα c (Εικόνα 10.2). Συγκεκριμένα, στην περίπτωση της HRP η παρουσία όλων των DES που μελετήθηκαν στο μίγμα της αντίδρασης, οδήγησε σε μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα. Η απενεργοποίηση του ενζύμου ήταν πιο

έντονη καθώς η συγκέντρωση του DES στο μίγμα της αντίδρασης αυξανόταν. Η διαφορετική επίδραση των DES στην καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων πιθανόν να σχετίζεται με ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των DES και των πρωτεϊνικών μορίων.

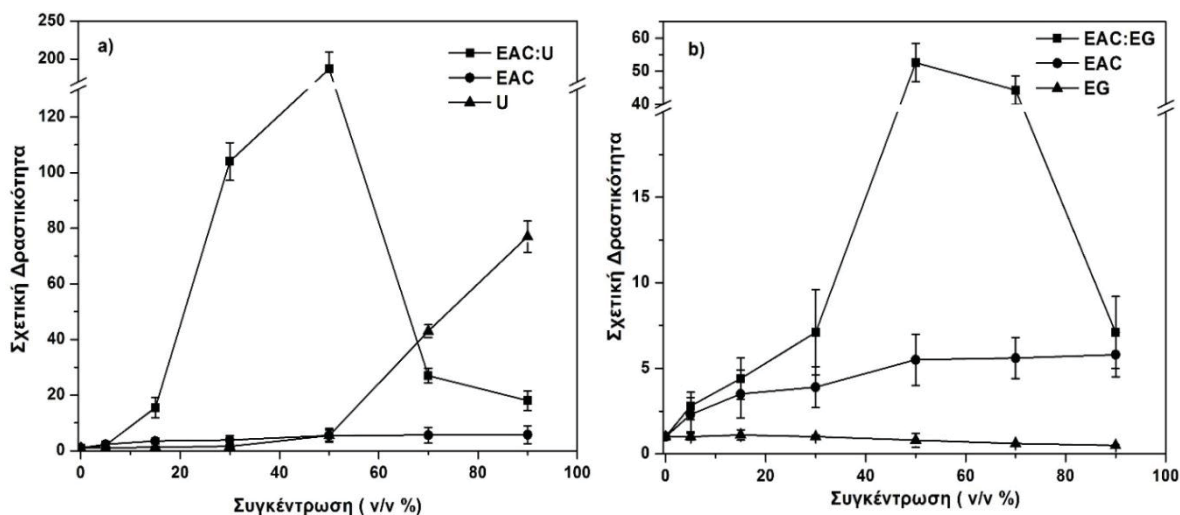


**Εικόνα 10.2.** Σχετική δραστηκότητα της υπεροξειδάσης HRP για την αντίδραση οξειδωσης της γουαϊακόλης παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων DES με βάση το a) ChCl και το b) EAC. Ως 1 ορίζεται η δραστηκότητα της πρωτεΐνης σε 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6.8.

## 10.2. Επίδραση των συστατικών των DES στην δραστηκότητα του κυτοχρώματος c

Δεδομένου ότι ένα DES παρασκευάζεται με την ανάμιξη δύο επιμέρους συστατικών (αμμωνιακό άλας και δότης δεσμών υδρογόνου), είναι ιδιαίτερα ενδιαφέρον να διερευνηθεί αν η επίδραση τους στην δραστηκότητα του κυτοχρώματος c που περιγράφηκε προηγουμένως, είναι αποτέλεσμα πιθανής διάστασης του DES στο νερό και συνεργιστικής δράσης των μεμονωμένων συστατικών του.

Σύμφωνα με την Εικόνα 10.3, η προσθήκη των αντίστοιχων με το DES, ποσοτήτων των επιμέρους συστατικών των EAC:U και EAC:EG στο μίγμα της αντίδρασης διαφέρει σημαντικά με αυτήν των συντιθέμενων DES. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν σε όλες τις περιπτώσεις συστατικών και των επιμέρους συστατικών τους που μελετήθηκαν. Τα αποτελέσματα αυτά, καταδεικνύουν εμφανώς την ευεργετική επίδραση των DES στην δραστηκότητα του κυτοχρώματος c ως αποτέλεσμα της παρουσίας του συντιθέμενου μέσου στο μίγμα της αντίδρασης και όχι των επιμέρους συστατικών του. Οι παρατηρήσεις αυτές υποστηρίζονται και βιβλιογραφικά στην περίπτωση άλλων ενζύμων σε DES με βάση το ChCl.<sup>336,342</sup>

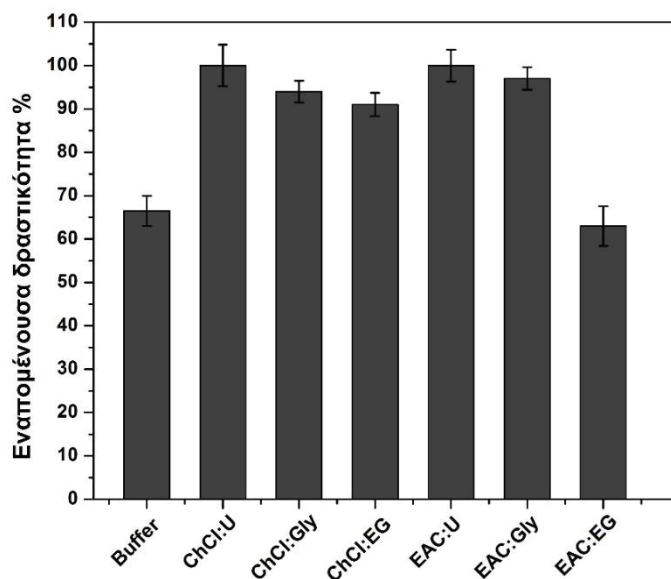


**Εικόνα 10.3.** Σχετική δραστηριότητα του κυτοχρώματος c για την αντίδραση οξείδωσης της γουαϊακόλης παρουσία διαφόρων συγκεντρώσεων των DES a) EAC:U και b) EAC:EG και των επιμέρους συστατικών τους. Ως 1 ορίζεται η δραστηριότητα της πρωτεΐνης σε 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.0.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η υψηλή δραστηριότητα του κυτοχρώματος c που παρατηρήθηκε παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων U. Η U είναι ένας ισχυρός αποδιατακτικός παράγοντας για τις πρωτεΐνες και η παρουσία της στο μίγμα της αντίδρασης πιθανόν να οδηγεί σε αναπροσανατολισμό της αίμης προς μία πιο εκτεθειμένη διαμόρφωση η οποία παραμένει καταλυτικά ενεργή.<sup>299</sup>

### 10.3. Επίδραση των DES στην σταθερότητα του κυτοχρώματος c.

Η επίδραση των DES στην σταθερότητα της πρωτεΐνης, μελετήθηκε μετά από επώαση του κυτοχρώματος c για 24 ώρες σε 30 % v/v υδατικά διαλύματα διαφόρων DES στους 40 °C. Μετά το πέρας της επώασης η εναπομένουσα δραστηριότητα του κυτοχρώματος c μελετήθηκε μέσω της αντίδρασης οξείδωσης της γουαϊακόλης παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης παρουσιάζονται στην Εικόνα 10.4.



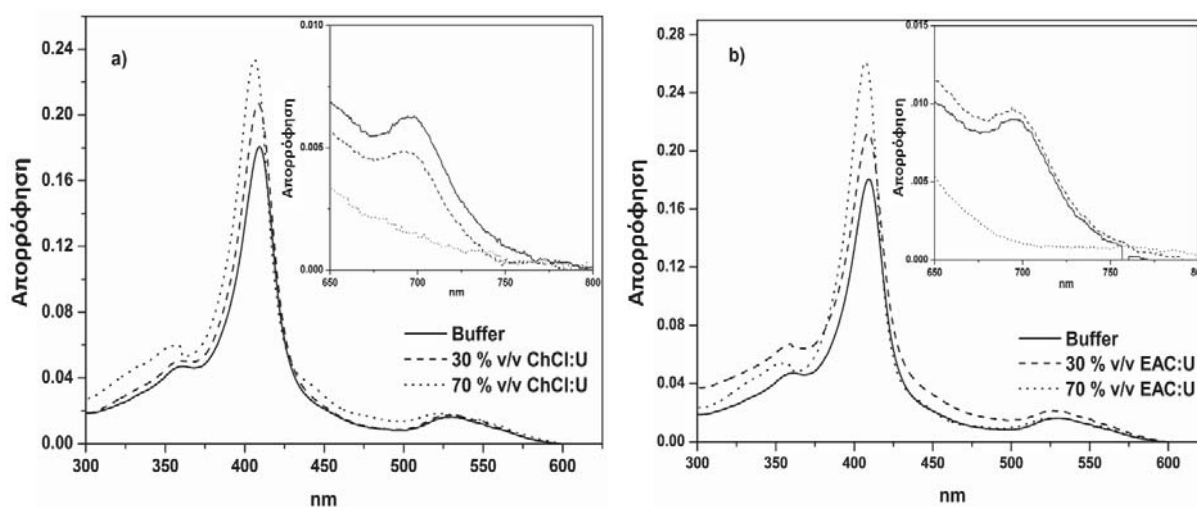
**Εικόνα 10.4.** Σταθερότητα του κυτοχρώματος c σε 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.0 και σε 30% v/v υδατικά διαλύματα DES με βάση το ChCl και το EAC μετά από επώαση της πρωτεΐνης στους 40 °C για 24 h. Ως 100% ορίζεται η δραστηριότητα σε χρόνο t = 0 λεπτά.

Όπως παρατηρείται στην Εικόνα 10.4, μετά από 24 ώρες επώασης στο υδατικό διάλυμα το κυτόχρωμα c χάνει περίπου το 35 % της αρχικής του δραστηριότητας ενώ, αντίθετα, η παρουσία των DES στο μέσο επώασης οδηγεί σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν σε αύξηση της εναπομένουσας δραστηριότητας και επομένως της σταθερότητας της πρωτεΐνης συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι και στις δύο περιπτώσεις, ChCl και EAC, η σταθερότητα του κυτοχρώματος αυξάνεται με την ακόλουθη σειρά δότη δεσμών υδρογόνου U > Gly > EG. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και σε μελέτες άλλων αιμοπρωτεϊνών, όπου συνδέουν την χαμηλή σταθερότητα της πρωτεΐνης παρουσία των ChCl:Gly και ChCl:EG συγκριτικά με το ChCl:U με μεταβολές στην διαμόρφωση της προσθετικής ομάδας της αίμης στο πρωτεϊνικό μόριο.<sup>342</sup>

#### 10.4. Δομικές μεταβολές του κυτοχρώματος c σε DES

Με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση των DES στα δομικά χαρακτηριστικά του κυτοχρώματος c λήφθηκαν φάσματα της πρωτεΐνης μέσω της φασματοσκοπίας ορατού υπεριώδους UV-Vis καθώς επίσης και της φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού CD.

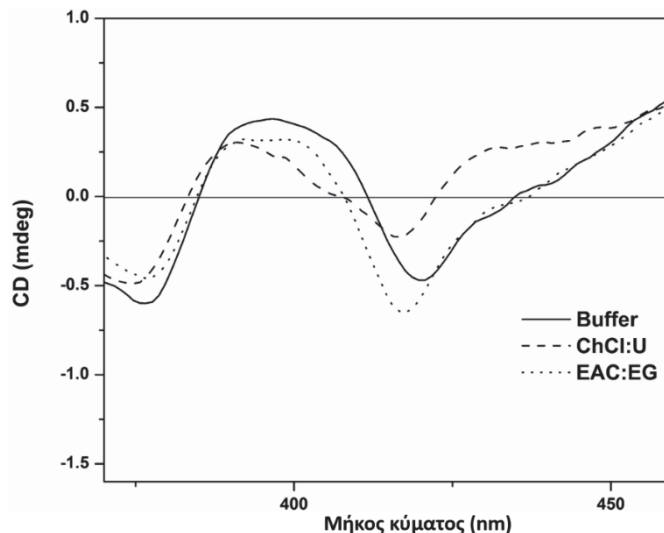
Στην Εικόνα 10.5. παρατίθενται τα φάσματα UV-Vis για το κυτόχρωμα σε υδατικό διάλυμα και παρουσία των ευτηκτικών υγρών ChCl:U και EAC:U.



**Εικόνα 10.5.** Φάσμα απορρόφησης ορατού υπεριώδους (300–600 nm) του κυτοχρώματος c σε 50 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH 7.0 και παρουσία 30% και 70% (v/v) υδατικών διαλυμάτων των DES ChCl:U και EAC:U. Στα ένθετα φαίνονται τα φάσματα απορρόφησης του κυτοχρώματος c στην κορυφή μεταφοράς φορτίου στα 695 nm στις ίδιες συνθήκες.

Η παρουσία των DES ChCl:U και EAC:U οδήγησε σε σημαντικές αλλαγές στο φάσμα UV-Vis της πρωτεΐνης, οι οποίες φαίνεται να εξαρτώνται από την συγκέντρωση του εκάστοτε DES στο μίγμα. Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία και των δύο DES που μελετήθηκαν οδήγησε σε αύξηση της απορρόφησης της κορυφής Soret με παράλληλη μετατόπιση του μέγιστου απορρόφησης σε χαμηλότερα μήκη κύματος (έως 3 nm). Επιπλέον, η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων των DES οδήγησε σε πλήρη εξαφάνιση της κορυφής μεταφοράς φορτίου στα 695 nm. Οι φασματοσκοπικές αλλαγές που παρατηρήθηκαν πιθανά να συνδέονται με αλλαγές στο μικροπεριβάλλον της αίμης του πρωτεϊνικού μορίου εξ' αιτίας της διατάραξης ή/και της πλήρης διάσπασης του δεσμού συντονισμού μεταξύ της Met80 και του σιδήρου της αίμης.<sup>301,343</sup>

Εν συνεχεία, οι αλλαγές στο μικροπεριβάλλον της αίμης που παρατηρήθηκαν μέσω της φασματοσκοπίας UV-Vis παρουσία των DES, μελετήθηκαν περαιτέρω με την λήψη φασμάτων κυκλικού διχρωισμού CD.



**Εικόνα 10.6.** Φάσμα κυκλικού διχρωισμού του κυτοχρώματος *c* στην περιοχή Soret σε 0.5 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, pH 7.0 και παρουσία 30% v/v υδατικού διαλύματος DES ChCl:U και EAC:EG.

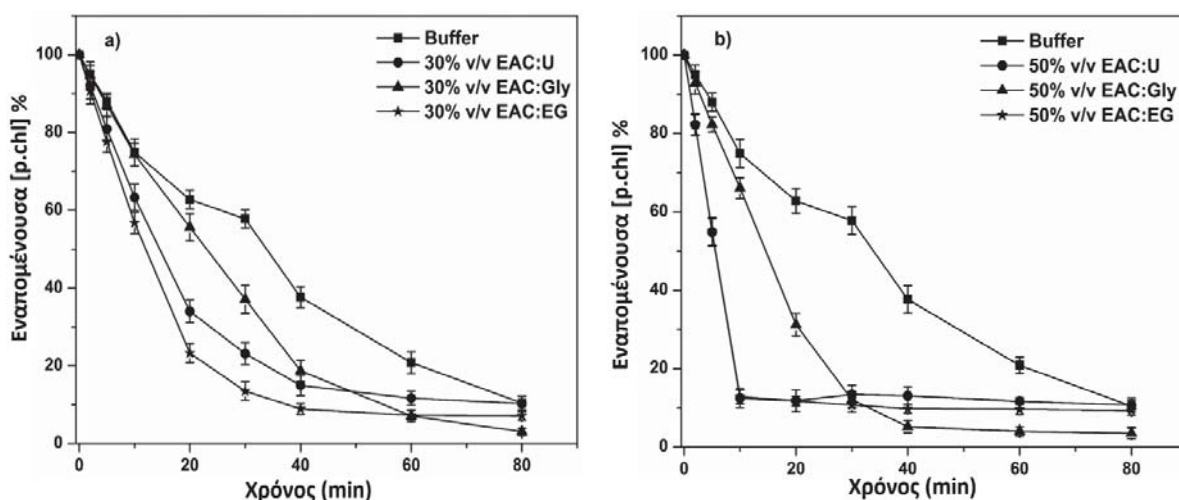
Όπως προκύπτει από τα φάσματα της Εικόνας 10.6, η παρουσία 30% v/v υδατικών διαλυμάτων ChCl και EAC DES οδήγησε σε αλλαγές στο φάσμα κυκλικού διχρωισμού του κυτοχρώματος *c*, οι οποίες πιθανά να συνδέονται με αναπροσανατολισμό της αίμης στο ενεργό κέντρο του πρωτεϊνικού μορίου όπως έχει αναφερθεί και βιβλιογραφικά.<sup>206,323</sup> Ο αναπροσανατολισμός αυτός της αίμης, πιθανά να την καθιστά πιο προσβάσιμη στο υπόστρωμα, προκαλώντας έτσι την αυξημένη δραστηριότητα του κυτοχρώματος *c* παρουσία των DES συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα<sup>301,344,345</sup> που περιγράφηκε στην παράγραφο 10.1. Επιπλέον, η πλήρης εξαφάνιση της κορυφής μεταφοράς φορτίου στα 695 nm στο φάσμα απορρόφησης UV-vis στις υψηλές συγκεντρώσεις των ευτηκτικών διαλυτών (70% v/v) υποδηλώνει πιο έντονες δομικές αλλαγές στο μικροπεριβάλλον της αίμης, οι οποίες πιθανά να σχετίζονται με την πλήρη αποδιάταξη του πρωτεϊνικού μορίου<sup>346,347</sup> και ως εκ τούτου με την μειωμένη δραστηριότητα σε αυτήν την περίπτωση (Εικόνα 10.1).

### 10.5. Βιοκαταλυτικός αποχρωματισμός χρωστικών παρουσία ευτηκτικών υγρών

Προκειμένου να αξιοποιηθεί η ευεργετική δράση των DES σε βιοκαταλυτικές διεργασίες βιομηχανικού ενδιαφέροντος, μελετήθηκε η επίδρασή τους στην ικανότητα αποχρωματισμού χρωστικών και συγκεκριμένα του χλωριδίου της πινακυανόλης (p.chl) από το κυτόχρωμα *c*. Το p.chl, όπως έχει αναφερθεί, είναι μία συμμετρική χρωστική που χρησιμοποιείται ευρέως σε διεργασίες φωτογραφίας.<sup>332</sup> Η μελέτη αποχρωματισμού από το



κυτόχρωμα c παρουσία 30 % και 50 % v/v υδατικών διαλυμάτων DES παρουσιάζεται στην Εικόνα 10.7, ενώ οι αρχικές ταχύτητες της οξειδωσης παρατίθενται στον Πίνακα 10.1.



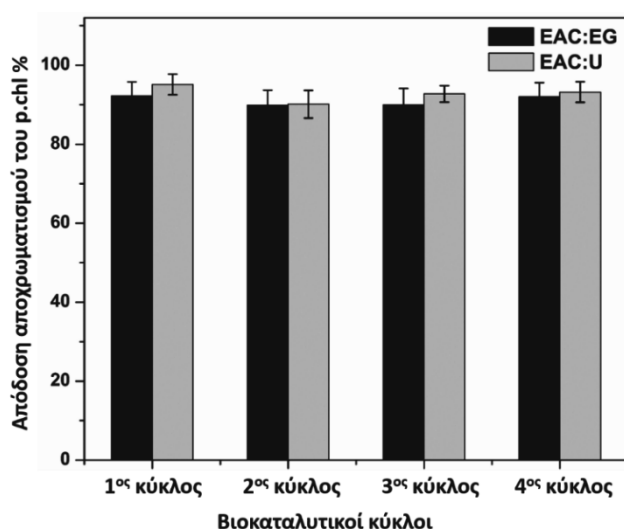
**Εικόνα 10.7.** Αποχρωματισμός του p.chl από το κυτόχρωμα c παρουσία  $H_2O_2$  σε 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.0 και σε a) 30 % v/v και b) 50 % v/v υδατικά διαλύματα EAC DES.

Σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν, η παρουσία DES στο μίγμα της αντίδρασης οδήγησε σε αύξηση της δραστηριότητας αποχρωματισμού του κυτοχρώματος c συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα. Η παρατήρηση αυτή ήταν πιο εμφανής παρουσία 50 % v/v DES στην αντίδραση. Πιο συγκεκριμένα, η ταχύτητα αποχρωματισμού παρουσία 50% v/v των EAC:U και EAC:EG αύξησε κατά 3.3 φορές και στις δύο περιπτώσεις την καταλυτική δραστηριότητα της πρωτεΐνης συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζονται και από προηγούμενα πειράματα αναφορικά με την μελέτη της δραστηριότητας του κυτοχρώματος σε αυτά τα μέσα (Εικόνα 10.1).

**Πίνακας 10.1.** Αρχική ταχύτητα της αντίδρασης αποχρωματισμού του p.chl από το κυτόχρωμα c παρουσία  $H_2O_2$  σε 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.0 και σε 30 % και 50 % v/v υδατικών διαλυμάτων DES.

<b>Αρχική ταχύτητα αποχρωματισμού (<math>\mu M \text{ min}^{-1}</math>)</b>			
<b>% v/v DES</b>	<b>EAC:U</b>	<b>EAC:Gly</b>	<b>EAC:EG</b>
0	$3.9 \pm 0.2$	$3.9 \pm 0.2$	$3.9 \pm 0.2$
30	$4.3 \pm 0.3$	$3.2 \pm 0.1$	$5.4 \pm 0.6$
50	$11.1 \pm 0.5$	$4.2 \pm 0.2$	$11.3 \pm 0.7$

Σε συνέχεια της μελέτης, η αντίδραση αποχρωματισμού του p.chl χρησιμοποιήθηκε ως αντίδραση-πρότυπο με σκοπό να διερευνηθεί η επαναχρησιμοποίηση των DES ως μέσων για την πραγματοποίηση αντιδράσεων βιοκατάλυσης. Η διαδικασία επαναχρησιμοποίησης των DES EAC:U και EAC:EG περιγράφεται στην παράγραφο (8.2.12). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης (Εικόνα 10.8) και οι δύο περιπτώσεις DES μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά μέχρι και τέσσερις φορές διατηρώντας το ποσοστό αποχρωματισμού σε παρόμοια επίπεδα με το αρχικό. Η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των DES σε αντιδράσεις αποχρωματισμού, τα καθιστά πολλά υποσχόμενα περιβαλλοντικά φιλικά μέσα για την ανάπτυξη βιοκαταλυτικών διεργασιών με βιομηχανικό ενδιαφέρον.

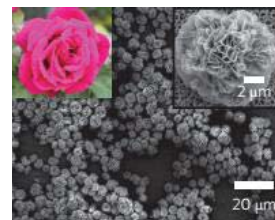


**Εικόνα 10.8.** Επαναχρησιμοποίηση των DES EAC:EG και EAC:U (50 % v/v) στην αντίδραση αποχρωματισμού του p.chl από το ακινητοποιημένο κυτόχρωμα c μετά από 3 ώρες επώασης στους 27 °C.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 11<sup>ο</sup>

### Επίδραση ιοντικών υγρών 3<sup>ης</sup> γενιάς και DES σε δομές nanoflowers υδρολυτικών ενζύμων

---



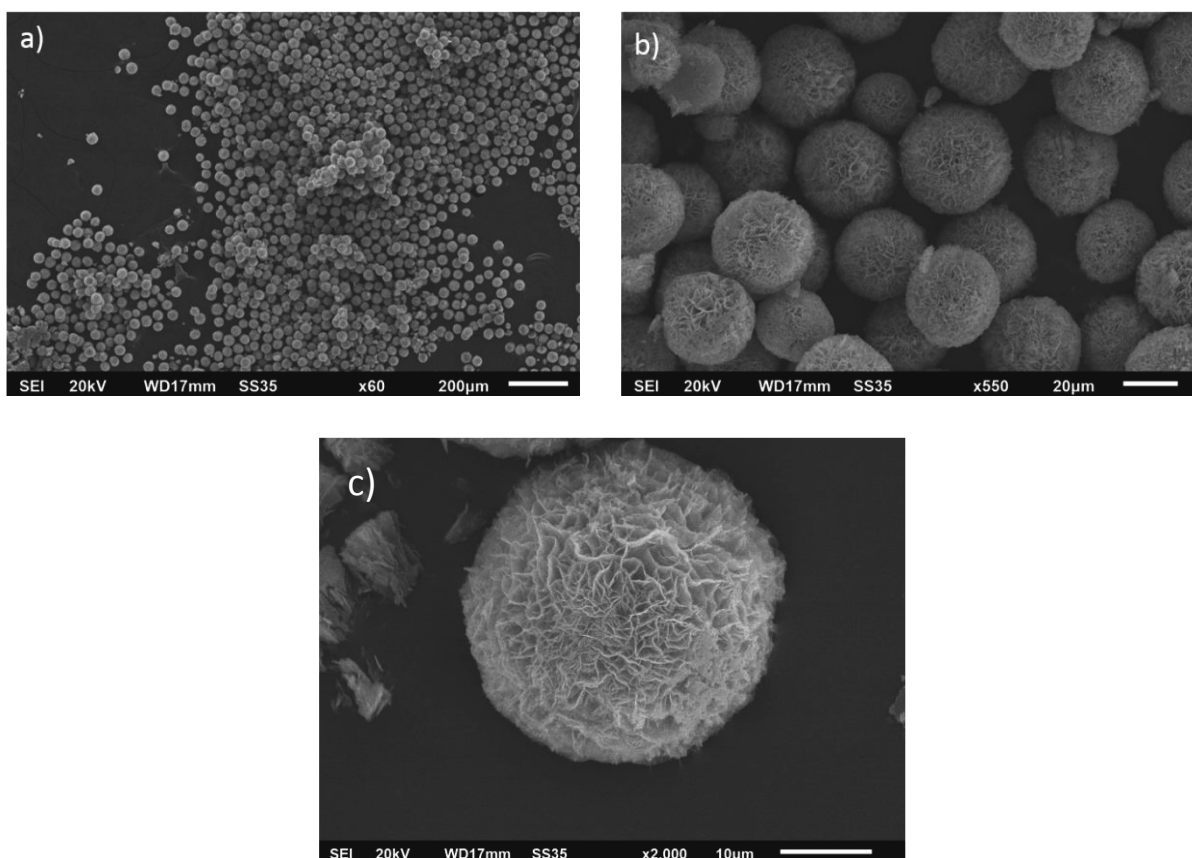
Τα πλεονεκτήματα ακινητοποίησης των ενζύμων σε νανοδομημένα υλικά έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας τις τελευταίες δεκαετίες, αποτελώντας κίνητρο για την εφαρμογή τους σε βιομηχανικές βιοδιεργασίες.<sup>348</sup> Πρόσφατα, μία νέα μέθοδος αναπτύχθηκε και αφορά στη δημιουργία υβριδικών οργανικών-ανόργανων νανοϋλικών τα οποία αποτελούνται από ιόντα χαλκού και πρωτεΐνη. Οι δεσμοί συντονισμού μεταξύ των ατόμων αζώτου των αμιδικών ομάδων των ενζυμικών μορίων και των ιόντων χαλκού, οδηγεί στην δημιουργία δομών που μοιάζουν με λουλούδι. Αυτές οι νανοδομές, σύμφωνα με μελέτες οδηγούν σε αύξηση της δραστηριότητας και της σταθερότητας των ακινητοποιημένων ενζύμων.<sup>349</sup>

Στην παρούσα διατριβή, μελετήθηκε η ανάπτυξη υβριδικών nanoflowers χρησιμοποιώντας για την ακινητοποίηση ιόντα χαλκού ως το ανόργανο συστατικό και λιπάση B από *Candida antarctica* ως το οργανικό συστατικό (CalB-nanoflowers). Οι λιπάσες, όπως αναπτύχθηκε στο Κεφάλαιο 3 αποτελούν μία κατηγορία υδρολυτικών ενζύμων με πλήθος βιομηχανικών εφαρμογών. Επιπλέον, πέραν της υδρολυτικής τους δράσης, μπορούν να πραγματοποιήσουν αντιδράσεις εστεροποίησης, και μετεστεροποίησης σε συστήματα χαμηλής περιεκτικότητας σε νερό όπως είναι τα ιοντικά και τα DES.<sup>350,351</sup> Η βιοκαταλυτική δραστηριότητα των συντιθέμενων υβριδικών nanoflowers μελετήθηκε σε

διάφορα υδροξυαιθυλαμμωνιακών ιοντικά υγρά  $3^{15}$  γενιάς καθώς επίσης και σε διάφορα  $\text{ChCl}$  και EAC DES.

### 11.1. Παρασκευή και χαρακτηρισμός των CalB-nanoflowers

Η επώαση  $\text{CuSO}_4$  με ρυθμιστικό διάλυμα PBS, το οποίο περιείχε την λιπάση B σε θερμοκρασία δωματίου για 3 μέρες οδήγησε στην δημιουργία ομοιόμορφων σφαιρικών δομών με μορφή λουλουδιού και μέση διάμετρο 20  $\mu\text{m}$  όπως φαίνεται από τις εικόνες ηλεκτρονικές μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) (Εικόνα 11.1).



**Εικόνα 11.1.** Εικόνες Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας Σάρωσης (SEM) των υβριδικών νανοδομών CalB-nanoflowers σε a) χαμηλή και b),c) υψηλή ανάλυση.

Οι εικόνες υψηλής ανάλυσης από την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης έδειξαν ότι η μορφολογία των σφαιριδίων είναι παρόμοια με αυτή ενός λουλουδιού ντάλιας. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι, απουσία της πρωτεΐνης, δεν παρατηρήθηκε η δημιουργία τέτοιας διαμόρφωσης. Όπως έχει αναφερθεί η δημιουργία των nanoflowers ακολουθεί ορισμένα στάδια, τα οποία ξεκινούν από τον σχηματισμό πρωτογενών κρυστάλλων φωσφορικού

χαλκού. Σε αυτό το σημείο, δημιουργούνται συσσωματώματα μέσω δεσμών συντονισμού μεταξύ των αμιδικών ομάδων των πρωτεϊνικών μορίων και των ιόντων  $\text{Cu}^{+2}$ . Τα συσσωματώματα αυτά αποτελούν θέση πυρηνοποίησης για τους πρωτογενείς κρυστάλλους. Οι δομές λουλουδιού σχηματίζονται σταδιακά από τις θέσεις πυρηνοποίησης, επαγόμενες από τα πρωτεϊνικά μόρια, τα οποία λειτουργούν και ως «κολλά» για να συγκρατούν τα «πέταλα» μεταξύ τους.<sup>349</sup>

## 11.2. Δραστικότητα των CalB-nanoflowers σε ιοντικούς διαλύτες

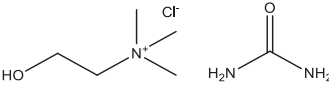
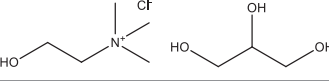
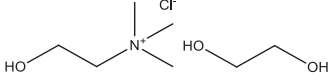
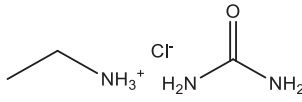
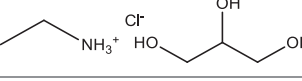
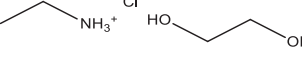
Η καταλυτική δραστικότητα των συντιθέμενων CalB-nanoflowers μελετήθηκε σε διάφορα DES (ChCl:U, ChCl:Gly, ChCl:EG, EAC:U, EAC:Gly, EAC:EG) και ιοντικά υγρά 3<sup>ης</sup> γενιάς (HMEAF, HDMEAF, BHEAF, HEAF, HMEAH, HDMEAH, HDMEAC, HMEAC, HMEAB, HDMEAB). Παρόλο που τα DES έχουν χρησιμοποιηθεί ως μέσα για την πραγματοποίηση αντιδράσεων με λιπάσες,<sup>235,336</sup> ωστόσο, η εφαρμογή των CaLB nanoflowers σε αυτούς τους διαλύτες πραγματοποιείται για πρώτη φορά. Η επίδραση των ιοντικών διαλυτών στην καταλυτική δραστικότητα των CaLB nanoflowers μελετήθηκε μέσω της αντίδρασης μετεστεροποίησης του αιθυλεστέρα του φερουλικού οξέος από την 1-οκτανόλη στους 60 °C. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης παρουσιάζονται στους Πίνακες 1 και 2.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, τα CaLB-nanoflowers μπορούν να πραγματοποιήσουν την αντίδραση μετεστεροποίησης του αιθυλεστέρα του φερουλικού οξέος από την 1-οκτανόλη, η απόδοση της οποίας εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την φύση του εκάστοτε διαλύτη που χρησιμοποιείται. Πιο συγκεκριμένα, στην περίπτωση των DES, η εφαρμογή των EAC DES ως μέσων της αντίδρασης οδήγησε σε υψηλότερες αποδόσεις συγκριτικά με τα ChCl DES επισημαίνοντας την σπουδαιότητα της φύσης του οργανικού άλατος στην δραστικότητα των ενζύμων.

Η αυξημένη δραστικότητα των CalB-nanoflowers που παρατηρήθηκε στα EAC DES, πιθανόν να σχετίζεται με το χαμηλότερο ιξώδες των συγκεκριμένων διαλυτών συγκριτικά με τα ChCl DES. Το χαμηλότερο ιξώδες συνεπάγεται και μείωση του φαινομένου περιορισμού μεταφοράς μάζας των υποστρωμάτων προς το ενεργό κέντρο του ενζύμου με αποτέλεσμα την αύξηση της καταλυτικής δραστικότητας.<sup>340</sup> Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι, στην περίπτωση της Gly ως δότη δεσμών υδρογόνου, παρατηρήθηκε η δημιουργία του εστέρα της γλυκερόλης, η οποία λειτούργησε ως υπόστρωμα για το ένζυμο.

Το φαινόμενο αυτό ήταν πιο έντονο στην περίπτωση των ChCl ευτηκτικών υγρών, όπως φαίνεται στον Πίνακα 11.1.

**Πίνακας 11.1.** % Απόδοση της αντίδρασης μετεστεροποίησης του αιθυλεστέρα του φερούλικού οξέος (20 mM) από την 1-οκτανόλη (120 mM), η οποία καταλύεται από CaLB-nanoflowers (120 U mL<sup>-1</sup>) σε διάφορα DES στους 60 °C μετά από 72 ώρες επώασης.

Μέσο Αντίδρασης	Χημική Δομή	Απόδοση (%)
<b>ChCl:U</b> Choline Chloride urea		<b>24.6 ± 2.4</b>
<b>ChCl:Gly</b> Choline Chloride glycerol		<b>13.0 (1.4)* ± 1.3</b>
<b>ChCl:EG</b> Choline Chloride ethylene glycol		<b>4.0 ± 0.9</b>
<b>EAC:U</b> Ethylammonium chloride urea		<b>42.5 ± 3.1</b>
<b>EAC:Gly</b> Ethylammonium chloride glycerol		<b>14.0 (&lt;1)* ± 2.2</b>
<b>EAC:EG</b> Ethylammonium chloride ethylene glycol		<b>61.4 ± 3.8</b>

\*Ο αριθμός στην παρένθεση αντιστοιχεί στην απόδοση της παράπλευρης αντίδρασης με υπόστρωμα την γλυκερόλη του DES.

Στην περίπτωση χρήσης των υδροξυαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών ως μέσων για την πραγματοποίηση αντιδράσεων (Πίνακας 11.2) παρατηρήθηκαν χαμηλές αποδόσεις της αντίδρασης σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν. Οι παρατηρήσεις αυτές πιθανά να οφείλονται σε απενεργοποίηση του ενζύμου, ως αποτέλεσμα απομάκρυνσης των κρίσιμων μορίων νερού από το ενζυμικό μόριο (απαραίτητων για την λειτουργία του), όπως έχει αναφερθεί στην περίπτωση των υδρόφιλων ιμιδαζολικών ιοντικών υγρών.<sup>352</sup> Επιπλέον, έχει παρατηρηθεί ότι τα καρβοξυλικά οξέα των ιοντικών υγρών μπορεί να αναπτύξουν ισχυρούς δεσμούς υδρογόνου με την πολυπεπτιδική αλυσίδα της πρωτεΐνης, οι οποίοι να οδηγήσουν σε αποδιάταξη των δεσμών υδρογόνου που διατηρούν την δομική ακεραιότητα προκαλώντας μερικό ή/και ολικό ξεδίπλωμα της πρωτεΐνης.<sup>353</sup>

**Πίνακας 11.2.** % Απόδοση της αντίδρασης μετεστεροποίησης του αιθυλεστέρα του φεουλικού οξέος (20 mM) από την 1-οκτανόλη (120 mM), η οποία καταλύεται από CaLB-nanoflowers (120 U mL<sup>-1</sup>) σε διάφορα ιοντικά υγρά στους 60 °C μετά από 72 ώρες επώασης.

Μέσο Αντίδρασης	Χημική Δομή	Απόδοση (%)
<b>HMEAF</b> 2-hydroxy-N-methylethanaminium formate		0.8 ± 0.3
<b>HDMEAF</b> 2-hydroxy-N,N-dimethylethanaminium formate		4.7 ± 1.2
<b>BHEAF</b> Bis(2-hydroxyethyl)ammonium formate		0.7 ± 0.2
<b>HEAF</b> 2-hydroxyethyl ammonium formate		7.1 ± 1.1
<b>HMEAH</b> 2-hydroxy-N-methylethanaminium hexanoate		12.4 ± 2.7
<b>HDMEAH</b> 2-hydroxy-N,N-dimethylethanaminium hexanoate		6.4 ± 2.1
<b>HDMEAC</b> 2-hydroxy-N,N-dimethylethanaminium cyclopentanecarboxylate		6.5 ± 1.7
<b>HMEAC</b> 2-hydroxy-N-methylethanaminium cyclopentanecarboxylate		8.1 ± 1.3
<b>HMEAB</b> 2-hydroxy-N-methylethanaminium butyrate		15.8 ± 2.7
<b>HDMEAB</b> 2-hydroxy-N,N-dimethylethanaminium butyrate		15.8 ± 3.6

Εν συνεχεία, μελετήθηκε η επίδραση των DES στην υδρολυτική δραστηριότητα των CaLB-nanoflowers χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα τον βουτυρεστέρα της π-νιτροφαινόλης (p-NPB). Η αρχική ταχύτητα των αντιδράσεων υδρόλυσης σε διάφορα DES παρατίθενται στον Πίνακα 11.3.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, σε ορισμένες περιπτώσεις, η χρήση DES ως μέσων αντίδρασης, οδήγησαν σε αύξηση της υδρολυτικής δραστηριότητας των CaLB-nanoflowers συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα. Πιο συγκεκριμένα, η αρχική ταχύτητα στην περίπτωση των EG DES σχεδόν διπλασιάστηκε συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα καταδεικνύοντας την θετική επίδραση των DES στην υδρολυτική δραστηριότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων.

**Πίνακας 11.3.** Αρχικές ταχύτητες ( $\text{mM h}^{-1}$ ) των αντιδράσεων υδρόλυσης του p-NPB από τα CaLB nanoflowers ( $44 \text{ U mL}^{-1}$ ) σε 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών pH 7.5 και σε διάφορα ευτηκτικά υγρά (90 % v/v) στους 40°C.

Ευτηκτικά Υγρά	Αρχική ταχύτητα ( $\text{mM h}^{-1}$ )
Υδατικό διάλυμα	7.8
ChCl:U	4.0
ChCl:Gly	5.1
ChCl:EG	15.8
EAC:U	8.4
EACl:Gly	4.9
EAC:EG	11.2

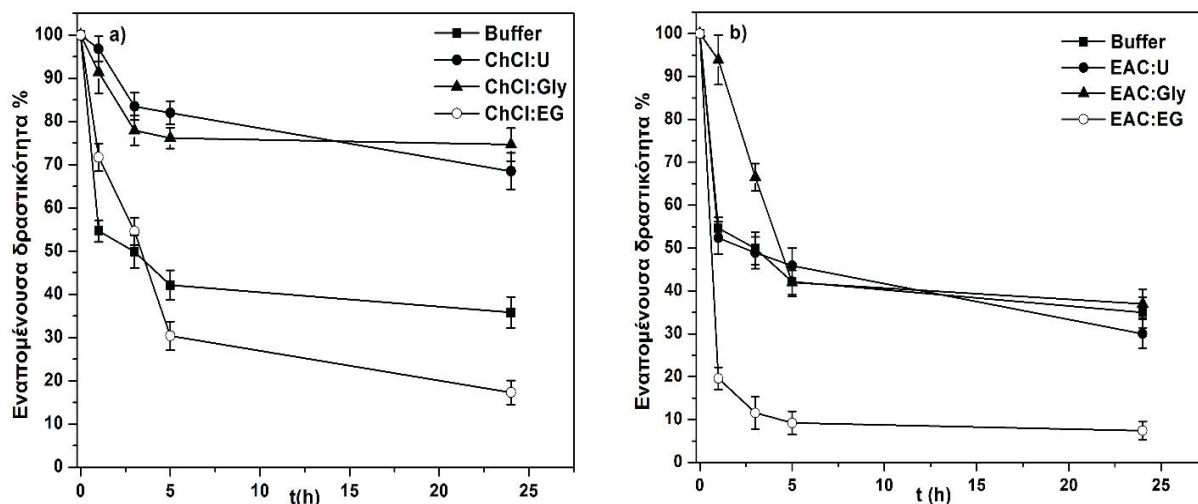
### 11.3. Μελέτη της σταθερότητας των CaLB-nanoflowers σε DES

Με σκοπό την περαιτέρω διερεύνηση της επίδρασης των DES στην καταλυτική συμπεριφορά των CaLB-nanoflowers μελετήθηκε η σταθερότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων στους συγκεκριμένους διαλύτες. Η εναπομένουσα δραστηριότητα των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών μετά από 24 ώρες επώασης σε υδατικό διάλυμα ή/και σε διάφορα DES στους 40 °C προσδιορίστηκε μέσω της αντίδρασης υδρόλυσης του p-NPB. Σύμφωνα με το προφίλ σταθερότητας (Εικόνα 11.2), τα CaLB-nanoflowers εμφανίζουν μεγαλύτερη σταθερότητα στα περισσότερα DES που μελετήθηκαν.

Αξίζει να σημειωθεί ότι η % εναπομένουσα δραστηριότητα των CaLB-nanoflowers μετά από 24 ώρες επώασης διπλασιάστηκε στα ChCl:Gly και ChCl:U DES, συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα. Όσον αφορά στην επίδραση του δότη δεσμών υδρογόνου, η σταθερότητα της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης αυξάνεται με την ακόλουθη σειρά  $\text{EG} < \text{U} < \text{Gly}$  και στις δύο περιπτώσεις αμμωνιακών αλάτων που μελετήθηκαν (ChCl και EAC). Η υψηλή σταθερότητα της CaLB σε DES με δότη δεσμών υδρογόνου την Gly έχει αναφερθεί και βιβλιογραφικά.<sup>354</sup>

Τα αποτελέσματα αυτά, καταδεικνύουν ότι η παρουσία των DES σταθεροποιεί το πρωτεϊνικό μόριο το οποίο διατηρεί την καταλυτική του δραστηριότητα για μεγαλύτερο διάστημα συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα.



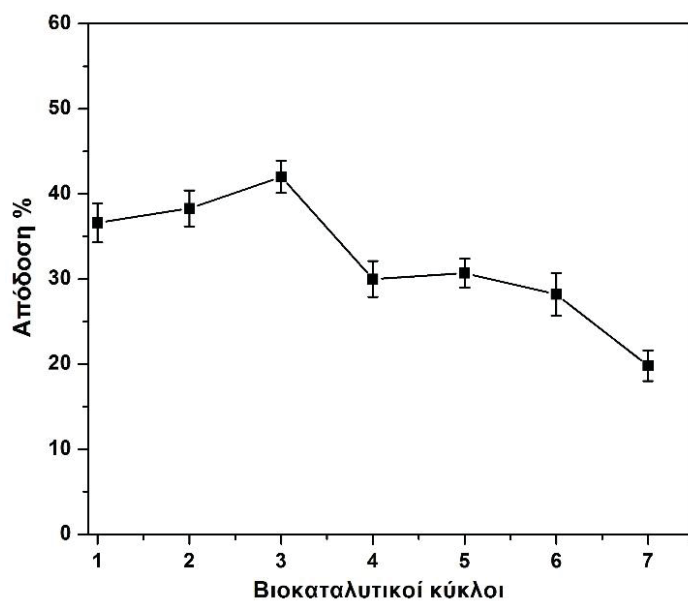


**Εικόνα 11.2.** Προφίλ σταθερότητας των CaLB-nanoflowers σε υδατικό διάλυμα και σε a) ChCl και b) EAC DES στους 40 °C μετά από 24 ώρες επώασης.

#### 11.4. Επαναχρησιμοποίηση των CalB-nanoflowers σε DES

Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των ακινητοποιημένων ενζύμων που διευκολύνει την εφαρμογή τους στην βιομηχανία είναι η ικανότητα ανάκτησης και επαναχρησιμοποίησής τους σε βιοκαταλυτικές αντιδράσεις. Στο παρόν κεφάλαιο μελετήθηκε η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των CaLB-nanoflowers σε DES μέσω της αντίδρασης μετεστεροποίησης του αιθυλεστέρα του φερουλικού οξέος από την 1-οκτανόλη στο EAC-EG DES.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 11.3, μετά την ολοκλήρωση 7 βιοκαταλυτικών κύκλων (168 ώρες συνολικής διεργασίας) διατηρήθηκε το 50 % της αρχικής δραστηριότητας της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης στο EAC-EG. Ως εκ τούτου, το ακινητοποιημένο σκεύασμα CaLB-nanoflowers μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί αποτελεσματικά έως και επτά φορές στο EAC-EG DES, αναδεικνύοντας αυτή την κατηγορία διαλυτών ως πολλά υποσχόμενων περιβαλλοντικά φιλικών μέσων για την ανάπτυξη βιοκαταλυτικών διεργασιών βιομηχανικού ενδιαφέροντος.



**Εικόνα 11.3.** Δραστηριότητα των CaLB-nanoflowers μετά από 7 βιοκαταλυτικούς κύκλους για την αντίδραση μετεστεροποίησης του αιθυλεστέρα του φερουλικού οξέος (20 mM) από την 1-οκτανόλη (120 mM) στο EAC:EG στους 60 °C μετά από 24 h επώασης.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 12<sup>ο</sup>

### Επίδραση ιοντικών υγρών 3<sup>ης</sup> γενιάς και DES στα καταλυτικά χαρακτηριστικά της τυροσινάσης

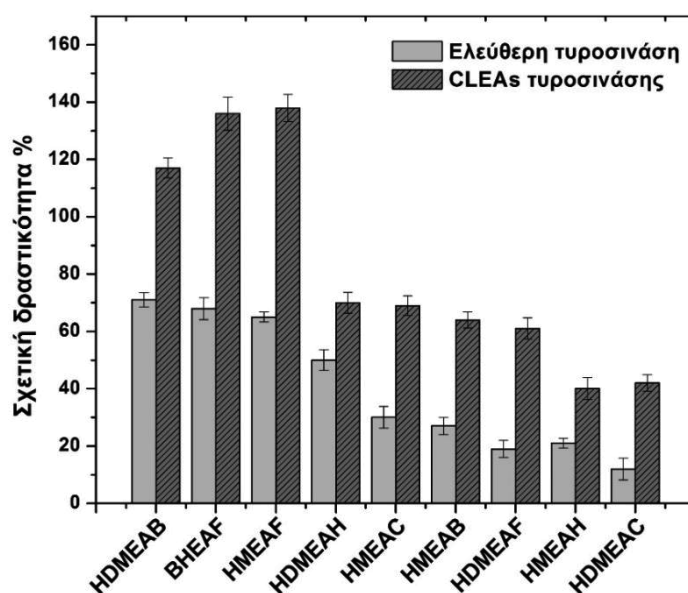
---



Μία από τις μεθόδους ακινητοποίησης που χρησιμοποιείται συχνά στα ένζυμα, είναι η μέθοδος της διαμοριακής σύνδεσης (CLEAs, Cross Linked Enzyme Aggregates). Η μέθοδος αυτή, όπως έχει αναφερθεί (Παράγραφος 6.1.1) βασίζεται στην δημιουργία ενός τρισδιάστατου δικτύου μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης μεταξύ μορίων ενζύμου παρουσία λειτουργικών αντιδραστηρίων όπως η γλουταραλδεΐδη. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η επίδραση τόσο των υδροξυαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών 3<sup>ης</sup> γενιάς όσο και των DES, στα καταλυτικά χαρακτηριστικά της ακινητοποιημένης τυροσινάσης από μανιτάρια *Agaricus bisporus*. Η τυροσινάση, λόγω της τοποεκλεκτικότητάς της, αποτελεί ένα συνθετικά χρήσιμο οξειδοαναγωγικό ένζυμο συμμετέχοντας στην παραγωγή διαφόρων προϊόντων με εφαρμογή στην φαρμακευτική και στην χημική βιομηχανία.<sup>355,356</sup> Η διαδικασία ακινητοποίησης της τυροσινάσης για την δημιουργία των CLEAs περιγράφεται αναλυτικά στην παράγραφο 8.2.5.1. Τα συντιθέμενα CLEAs τυροσινάσης χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη μικροβιοαντιδραστήρων σε αντιδράσεις με μεγάλο βιομηχανικό ενδιαφέρον.

### 12.1. Επίδραση ιοντικών υγρών στη δραστικότητα της τυροσινάσης.

Η καταλυτική δραστικότητα της τυροσινάσης τόσο σε ελεύθερη όσο και σε ακινητοποιημένη μορφή μελετήθηκε παρουσία διαφόρων ιοντικών υγρών 3<sup>ης</sup> γενιάς. Αρχικά, σε 10 % v/v υδατικά διαλύματα των ιοντικών υγρών (HMEAF, HDMEAF, BHEAF, HMEAH, HDMEAH, HDMEAC, HMEAC, HMEAB, HDMEAB) μελετήθηκε η δραστικότητα του ενζύμου μέσω της αντίδρασης οξείδωσης της L-DOPA. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης παρατίθενται στην Εικόνα 12.1.



**Εικόνα 12.1.** % Σχετική δραστικότητα της τυροσινάσης από μανιτάρια *Agaricus bisporus* σε ελεύθερη και σε ακινητοποιημένη μορφή (CLEAs) για την αντίδραση οξείδωσης της L-DOPA παρουσία 10 % v/v υδατικών διαλυμάτων ιοντικών υγρών. Ως 100 % ορίζεται η δραστικότητα του ενζύμου σε 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6.8.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της μελέτης, η παρουσία των ιοντικών υγρών στο μίγμα της αντίδρασης οδήγησε σε όλες τις περιπτώσεις σε μείωση της δραστικότητας του ελεύθερου ενζύμου συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά στην περίπτωση υδρόφιλων ιοντικών υγρών 2<sup>ης</sup> γενιάς όπως το [bmim][BF<sub>4</sub>] και το [bmim][MeSO<sub>4</sub>]. Ο εξαιρετικά υδρόφιλος χαρακτήρας των συγκεκριμένων μέσων, επιτρέπει την αλληλεπίδρασή τους με το υδατικό μικροπεριβάλλον που περιβάλλει τα μόρια του ενζύμου με αποτέλεσμα να το απενεργοποιούν.<sup>357</sup>

Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι η δραστικότητα του ενζύμου εξαρτάται σημαντικά από την φύση και επομένως την σύσταση κατιόντος-ανιόντος του εκάστοτε ιοντικού υγρού στο μίγμα της αντίδρασης. Όπως έχει αναφερθεί σε προηγούμενη

παράγραφο, η παρουσία ενός χαοτροπικού κατιόντος και ενός κοσμοτροπικού ανιόντος οδηγούν σε αύξηση της καταλυτικής δραστηριότητας των ενζύμων. Το φαινόμενο αυτό φαίνεται να ισχύει και στην περίπτωση των κατιόντων των ιοντικών υγρών που μελετήθηκαν, καθώς παρουσία ιοντικών υγρών με το ίδιο ανιόν αλλά διαφορετικό κατιόν, η δραστηριότητα της τυροσινάσης μειώνεται με την εξής σειρά: BHEAF > HMEAF > HDMEAF, HMEAC > HDMEAC, σύμφωνα με την σειρά χαοτροπικότητας των κατιόντων. Η χαοτροπικότητα υπολογίστηκε με βάση τον βαθμό υδροφιλικότητας του εκάστοτε κατιόντος.<sup>180</sup> Ωστόσο, στην περίπτωση επίδρασης του ανιόντος το φαινόμενο αυτό φάνηκε να μην ισχύει καθώς η αύξηση της κοσμοτροπικότητας του ανιόντος δεν ακολουθεί την αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου.

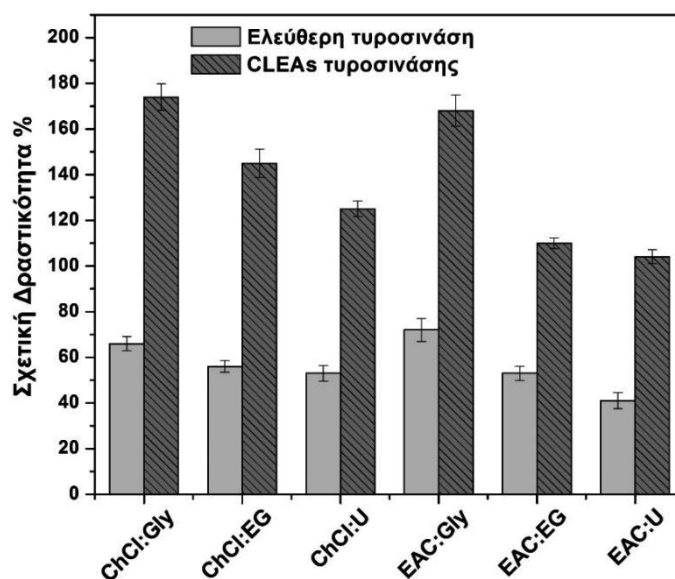
Μελέτες έχουν αναφέρει ότι για την κατανόηση της επίδρασης των ιοντικών υγρών στα καταλυτικά χαρακτηριστικά των ενζύμων, απαιτείται η κατανόηση της επίδρασης στο ενεργό τους κέντρο. Στην περίπτωση της τυροσινάσης, στο ενεργό κέντρο του ενζύμου βρίσκονται δύο ισχυρά κοσμοτροπικά ιόντα  $\text{Cu}^{+2}$ <sup>358</sup> όπως έχει αναλυθεί και στην Παράγραφο 2.4. Σύμφωνα με τον «νόμο αλληλεπίδρασης ιόντων»<sup>359</sup> ένα κοσμοτροπικό ανιόν μπορεί να αλληλεπιδράσει ισχυρά με τα κατιόντα του μετάλλου σταθεροποιώντας την κατάσταση ηρεμίας του ενζύμου και μειώνοντας έτσι την ικανότητα να δεχτεί τα μόρια του υποστρώματος με αποτέλεσμα τη μείωση της δραστηριότητας του. Το φαινόμενο αυτό, πιθανά να εξηγεί την επίδραση του ανιόντος στην δραστηριότητα της τυροσινάσης, καθώς η κοσμοτροπικότητα των ανιόντων των ιοντικών υγρών με ίδιο κατιόν αυξάνεται με την εξής σειρά: HMEAF < HMEAB ~ HMEAC < HMEAH.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η ακινητοποίηση του ενζύμου οδήγησε σε σημαντική αύξηση της δραστηριότητας παρουσία όλων των ιοντικών υγρών που μελετήθηκαν συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα. Έχει αποδειχθεί ότι η χρήση ακινητοποιημένων ενζύμων παρουσία ιοντικών υγρών βελτιώνει τα καταλυτικά τους χαρακτηριστικά συγκριτικά με τα ελεύθερα σκευάσματα.<sup>360</sup>

## 12.2. Επίδραση των DES στην δραστηριότητα της τυροσινάσης

Εν συνεχεία, η καταλυτική δραστηριότητα της τυροσινάσης τόσο σε ελεύθερη όσο και σε ακινητοποιημένη μορφή μελετήθηκε παρουσία διαφόρων DES. Η δραστηριότητα του ενζύμου υπολογίστηκε μέσω της αντίδρασης οξείδωσης της L-DOPA τόσο σε  $\text{ChCl}$  όσο και

σε EAC DES (ChCl:Gly, ChCl:EG, ChCl:U, EAC:Gly, EAC:EG, EAC:U). Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης παρουσιάζονται στην Εικόνα 12.2.



**Εικόνα 12.2.** % Σχετική δραστηριότητα της τυροσινάσης από μανιτάρια *Agaricus bisporus* σε ελεύθερη και σε ακινητοποιημένη μορφή (CLEAs) για την αντίδραση οξείδωσης της L-DOPA παρουσία 10 % v/v υδατικών διαλυμάτων DES. Ως 100 % ορίζεται η δραστηριότητα του ενζύμου σε 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6.8.

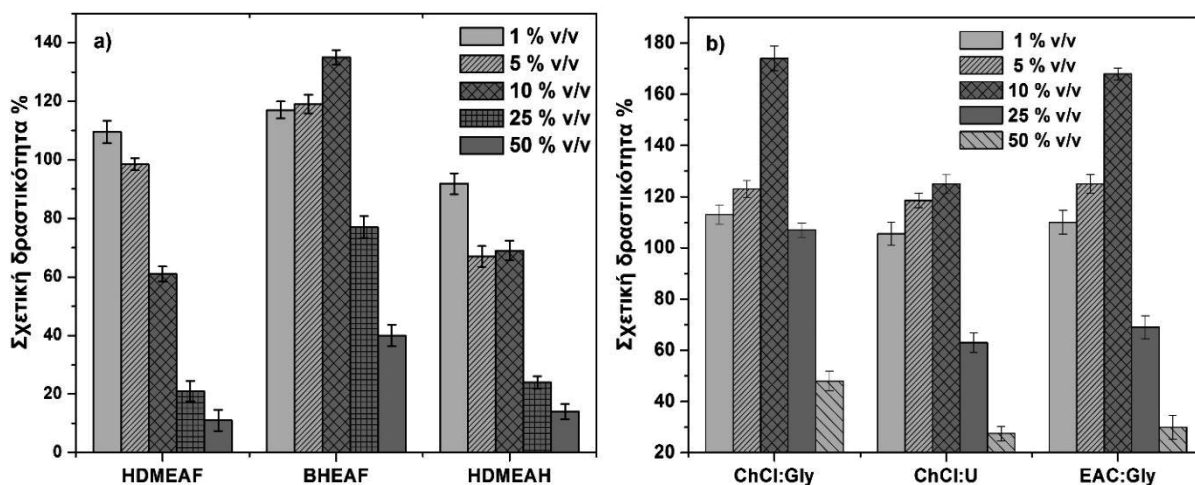
Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, η παρουσία όλων των DES στο μίγμα της αντίδρασης επιδρά σημαντικά στην καταλυτική δραστηριότητα της τυροσινάσης. Σε όλες τις περιπτώσεις, η παρουσία 10 % v/v υδατικού διαλύματος DES οδήγησε σε μείωση της δραστηριότητας του ελεύθερου ενζύμου. Σημαντική παρατήρηση αποτελεί το γεγονός ότι και στην περίπτωση των DES, όπως αντίστοιχα παρατηρήθηκε και για τα ιοντικά υγρά, η ακινητοποίηση του ενζύμου βελτίωσε την καταλυτική συμπεριφορά του ενζύμου, καθώς σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε αύξηση της δραστηριότητας παρουσία των υδατικών διαλυμάτων DES συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα.

Επιπλέον και στις δύο περιπτώσεις φάνηκε πως η δραστηριότητα του ενζύμου εξαρτάται σημαντικά από την φύση του δότη δεσμών υδρογόνου του DES. Πιο συγκεκριμένα, ανεξάρτητα από το αμμωνιακό άλας του DES που χρησιμοποιήθηκε, η αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου ανάλογα με τον δότη δεσμών υδρογόνου φαίνεται να ακολουθεί την εξής σειρά  $U < EG < Gly$ . Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά στην περίπτωση υδρολυτικών ενζύμων όπως η λιπάση B από *Candida antarctica*,<sup>254,337,361</sup> καταδεικνύοντας ότι η φύση των DES (π.χ. ο τύπος του δότη δεσμών

υδρογόνου) επηρεάζει σημαντικά τις ιδιότητες του διαλύτη όπως είναι η πολικότητα, το ιξώδες και η επιφανειακή τάση και κατ' επέκταση την δραστικότητα του ενζύμου.

### 12.3. Επίδραση της συγκέντρωσης ιοντικών υγρών και DES στην δραστικότητα της τυροσινάσης

Η επίδραση της συγκέντρωσης τόσο των ιοντικών υγρών όσο και των DES στην δραστικότητα των ενζύμων αποτελεί σημαντικό παράγοντα στην μελέτη της καταλυτικής τους συμπεριφοράς σε αυτά τα μέσα. Γι' αυτό το λόγο, σε συνέχεια της μελέτης, διερευνήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης διαφόρων ιοντικών υγρών και DES στην ικανότητα οξειδωσης της L-DOPA από την ακινητοποιημένη τυροσινάση (CLEAs).



**Εικόνα 12.3.** Επίδραση της συγκέντρωσης α) ιοντικών υγρών και β) DES στην % σχετική δραστικότητα της ακινητοποιημένης τυροσινάσης απόμανιτάρια *Agaricus bisporus* (CLEAs) στην αντίδραση οξειδωσης της L-DOPA. Ως 100 % ορίζεται η δραστικότητα του ενζύμου σε 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 6.8.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Εικόνας 12.3, η συγκέντρωση του εκάστοτε διαλύτη στο μίγμα της αντίδρασης φαίνεται να επιδρά σημαντικά στην δραστικότητα του ενζύμου. Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων (έως 10 % v/v) οδήγησε σε αύξηση της δραστικότητας του ενζύμου συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα, στις περισσότερες περιπτώσεις που μελετήθηκαν. Ωστόσο, περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης τόσο των ιοντικών υγρών όσο και των DES > 10% v/v στο μίγμα της αντίδρασης οδήγησε σε μείωση της δραστικότητας της τυροσινάσης συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με βιβλιογραφικές μελέτες της τυροσινάσης σε υδρόφιλα ιοντικά υγρά 2<sup>ης</sup> γενιάς όπως το [bmim][BF<sub>4</sub>] και το

[emim][EtSO<sub>4</sub>], καθώς επίσης και σε περιπτώσεις άλλων ενζύμων όπως η υπεροξειδάση HRP και η εποξική υδρολάση σε DES.<sup>188,254,362,363</sup> Η μειωμένη δραστηριότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις ιοντικών υγρών και DES, πιθανόν να οφείλεται σε μειωμένη σταθερότητα ή αποδιάταξη του μορίου της πρωτεΐνης καθώς επίσης και σε αύξηση των περιορισμών μεταφοράς μάζας του υποστρώματος προς το ενεργό κέντρο του ενζύμου.<sup>337,340,361</sup>

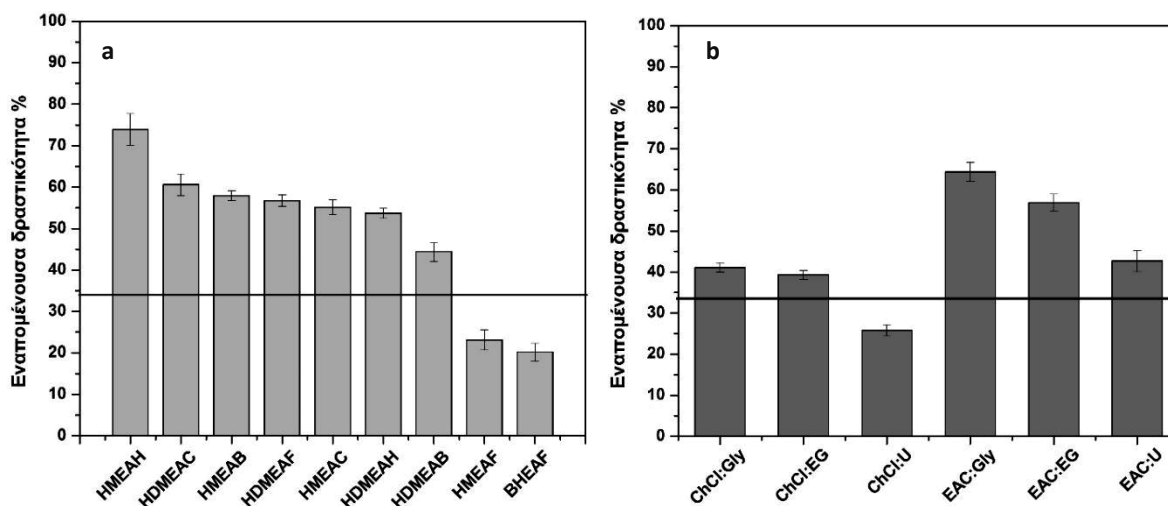
Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι παρουσία ισομοριακών ποσοτήτων των συστατικών τόσο των ιοντικών υγρών όσο και των DES στο μίγμα της αντίδρασης, η τυροσινάση εμφανίζει διαφορετική καταλυτική συμπεριφορά σε σχέση με συντιθέμενο μέσο. Για παράδειγμα, η % σχετική δραστηριότητα του ενζύμου παρουσία των συστατικών του ιοντικού υγρού HMEAF ήταν 48 % συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα, σε αντίθεση με την παρουσία του αντίστοιχου συντιθέμενου ιοντικού υγρού που ήταν 138 % συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα. Παρόμοιες διαφοροποιήσεις παρατηρήθηκαν και στην περίπτωση των DES. Οι παρατηρήσεις αυτές καταδεικνύουν ότι οι καταλυτικές ιδιότητες του ενζύμου επηρεάζονται από το συντιθέμενο ιοντικό διαλύτη (ιοντικό υγρό ή DES) παρά από τα επιμέρους συστατικά τους.<sup>45,361,364</sup>

#### **12.4. Επίδραση των ιοντικών υγρών και των DES στην σταθερότητα της τυροσινάσης**

Η σταθερότητα της ακινητοποιημένης τυροσινάσης CLEAs μελετήθηκε παρουσία 10 % v/v υδατικών διαλυμάτων ιοντικών υγρών και DES στους 40 °C. Η πρωτεΐνη επώαστηκε για 24 ώρες και η εναπομένουσα δραστηριότητα υπολογίστηκε μέσω της αντίδρασης οξείδωσης της L-DOPA.

Σύμφωνα με την Εικόνα 12.4.a. η παρουσία σχεδόν όλων των ιοντικών υγρών που μελετήθηκαν οδήγησε σε αύξηση της σταθερότητας του ενζύμου μετά από 24 ώρες επώασης στους 40 °C. Είναι φανερό ότι η σταθερότητα εξαρτάται από την φύση του εκάστοτε ιοντικού υγρού που χρησιμοποιείται ως μέσο επώασης. Αξίζει να σημειωθεί ότι η επίδραση των ιοντικών υγρών στη σταθερότητα του ενζύμου ακολουθεί μία αντίστροφη τάση συγκριτικά με την επίδραση που παρατηρήθηκε στην δραστηριότητα. Πιο συγκεκριμένα, η ακινητοποιημένη τυροσινάση παρουσιάζει την υψηλότερη δραστηριότητα παρουσία του ιοντικού υγρού BHEAF, ωστόσο η σταθερότητα της στο συγκεκριμένο μέσο είναι η χαμηλότερη. Παρόμοια φαινόμενα έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά. Η αλληλεπίδραση του ενζύμου με το εκάστοτε ιοντικό υγρό φαίνεται να οδηγεί σε μία πιο δραστική αλλά λιγότερο σταθερή διαμόρφωση.<sup>365</sup>



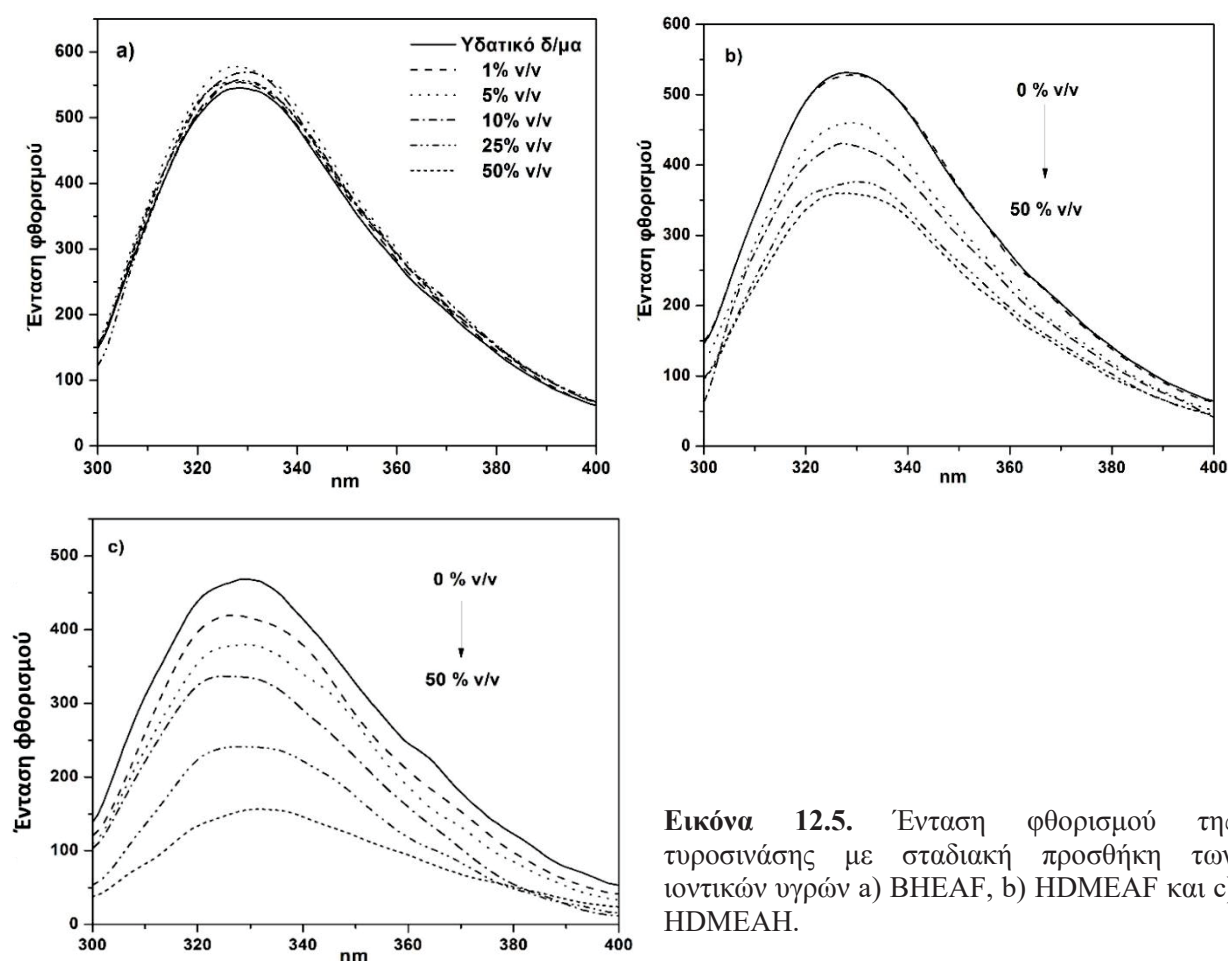


**Εικόνα 12.4.** Σταθερότητα της ακινητοποιημένης τυροσινάσης CLEAs σε υδατικό διάλυμα και παρουσία 10% v/v υδατικών διαλυμάτων α) ιοντικών υγρών και β) DES μετά από επώαση στους 40 °C για 24 ώρες. Η εναπομένουσα δραστηριότητα υπολογίστηκε μέσω της αντίδρασης οξειδωσης της L-DOPA σε υδατικό διάλυμα στους 27 °C. Ως 100% ορίζεται η δραστηριότητα του ενζύμου σε χρόνο  $t = 0$  ώρες. Η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί στην εναπομένουσα δραστηριότητα % του ενζύμου σε υδατικό διάλυμα.

Στην περίπτωση των DES (Εικόνα 12.4.b) φάνηκε ότι στις περισσότερες περιπτώσεις η σταθερότητα του ενζύμου, παρουσία των συγκεκριμένων διαλυτών, είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ανεξάρτητα του αμμωνιακού άλατος που χρησιμοποιείται, η σταθερότητα της τυροσινάσης αυξάνεται με την ακόλουθη σειρά δότη δεσμών υδρογόνου:  $U < EG < Gly$ . Μελέτες έχουν δείξει ότι η ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου της Gly και της EG με 3 και 2 υδροξυλομάδες στο μόριό τους αντίστοιχα είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με την U. Επομένως, τα συστατικά αυτά αλληλεπιδρούν πιο ισχυρά με το ανιόν του αμμωνιακού άλατος στο δίκτυο του DES παρά με το μόριο της πρωτεΐνης. Το φαινόμενο αυτό, πιθανόν να εξηγεί την αυξημένη σταθερότητα της τυροσινάσης, παρουσία των DES<sup>361,366</sup> με δότη δεσμών υδρογόνου την Gly και την EG συγκριτικά με την U.

## 12.5. Μελέτη της επίδρασης των ιοντικών διαλυτών στη δομή της τυροσινάσης με φασματοσκοπία φθορισμού

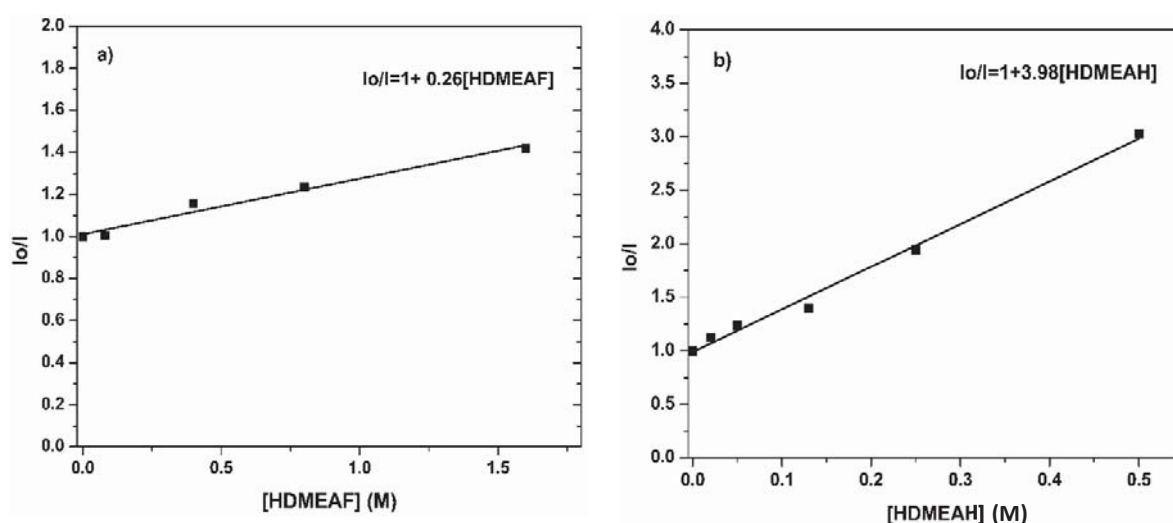
Η φασματοσκοπία φθορισμού αποτελεί μία πολύ χρήσιμη τεχνική για την μελέτη διαμορφωτικών αλλαγών στις πρωτεΐνες. Η εκπομπή φθορισμού των πρωτεϊνών είναι αποτέλεσμα της παρουσίας φθοροφόρων καταλοίπων στο πρωτεϊνικό μόριο όπως Trp, Tyr και Phe. Η μέγιστη ένταση φθορισμού ( $I_{max}$ ) και το μέγιστο μήκος κύματος εκπομπής ( $\lambda_{max}$ ) αντανακλούν τις αλλαγές στη διαμόρφωση των πρωτεϊνών, παρουσία των ιοντικών υγρών. Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε ο φθορισμός της τυροσινάσης παρουσία ιοντικών υγρών και DES συγκεντρώσεων 0, 1, 5, 10, 25 και 50 % v/v στο μέσο της επώασης.



**Εικόνα 12.5.** Ένταση φθορισμού της τυροσινάσης με σταδιακή προσθήκη των ιοντικών υγρών a) BHEAF, b) HDMEAF και c) HDMEAΗ.

Τα φάσματα φθορισμού της τυροσινάσης παρουσία διαφόρων ιοντικών υγρών παρατίθενται στην Εικόνα 12.5. ενώ ο βαθμός απόσβεσης των ιοντικών υγρών περιγράφεται από τα διαγράμματα Stern-Volmer (Εικόνα 12.6).

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Εικόνας 12.5, το φάσμα φθορισμού της τυροσινάσης φαίνεται να εξαρτάται σημαντικά από την φύση του ιοντικού υγρού και την συγκέντρωσή του στο μέσο επώασης. Πιο συγκεκριμένα, η παρουσία του ιοντικού υγρού BHEAF στο μέσο επώασης σε όλες τις συγκεντρώσεις που μελετήθηκαν, δεν επέφερε σημαντικές αλλαγές στο φάσμα φθορισμού της πρωτεΐνης. Αντίθετα, η παρουσία των ιοντικών υγρών HDMEAF και HDMEAH οδήγησε σε μείωση της έντασης φθορισμού αυξανόμενης της συγκέντρωσής, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική μετατόπιση του  $\lambda_{\max}$ . Ο βαθμός απόσβεσης των δύο ιοντικών υγρών περιγράφεται από την σταθερά Stern-Volmer, η οποία προκύπτει από τα διαγράμματα της Εικόνας 12.6.

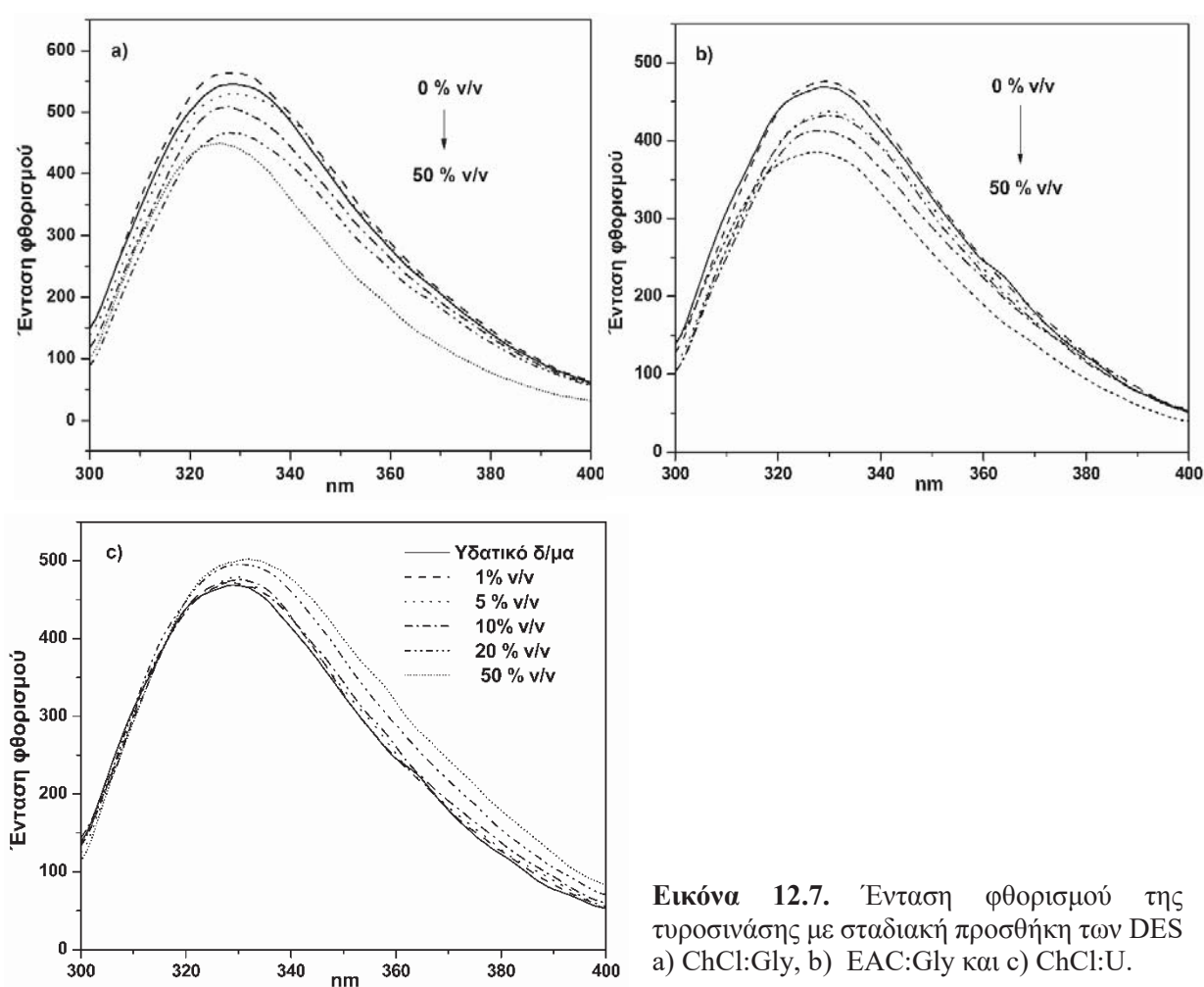


**Εικόνα 12.6.** Διαγράμματα Stern-Volmer της τυροσινάσης για την απόσβεση φθορισμού από τα ιοντικά υγρά a) HDMEAF και b) HDMEAH. Οι σταθερές Stern-Volmer  $K_{SV}$  είναι 0.26 και 3.98  $L \text{ mol}^{-1}$  αντίστοιχα.

Τα ιοντικά υγρά BHEAF και HDMEAF διαθέτουν το ίδιο ανιόν στο μόριό τους. Η διατήρηση του φάσματος φθορισμού στην φυσική του διαμόρφωση στην περίπτωση του BHEAF ιοντικού υγρού πιθανά να συνδέεται με την αυξημένη χαοτροπικότητα του κατιόντος του συγκριτικά με το κατιόν του HDMEAF. Το φαινόμενο αυτό πιθανόν να οδηγεί την πρωτεΐνη σε μία πιο συμπαγή διαμόρφωση παρουσία του ιοντικού υγρού BHEAF, όπως έχει αναφερθεί και βιβλιογραφικά στην περίπτωση μελέτης των φασμάτων φθορισμού της λακκάσης παρουσία ιοντικών υγρών.<sup>367</sup> Επιπλέον της επίδρασης του κατιόντος, σημαντική φαίνεται να είναι η επίδραση του ανιόντος στο φάσμα φθορισμού της πρωτεΐνης. Αξίζει να σημειωθεί ότι, σε ιοντικά υγρά με ίδιο κατιόν, το HDMEAH προκαλεί μεγαλύτερη απόσβεση φθορισμού ( $K_{SV}$  20 φορές μεγαλύτερη) στην πρωτεΐνη συγκριτικά με

του HDMEAF ιοντικό υγρό. Στην περίπτωση αυτή, η κοσμοτροπικότητα των ανιόντων πιθανόν να συνδέεται με τα αποτελέσματα φθορισμού καθώς οι ισχυρές αλληλεπιδράσεις του πιο κοσμοτροπικού ανιόντος (HDMEA<sup>H</sup>) με τα ιόντα Cu<sup>+2</sup> του ενεργού κέντρου ίσως να οδηγούν σε σημαντικές αλλαγές στην δομή του πρωτεϊνικού μορίου εκθέτοντας τα φθοροφόρα κατάλοιπα που βρίσκονται στο εσωτερικό του μορίου στην επιφάνεια.<sup>368,369</sup>

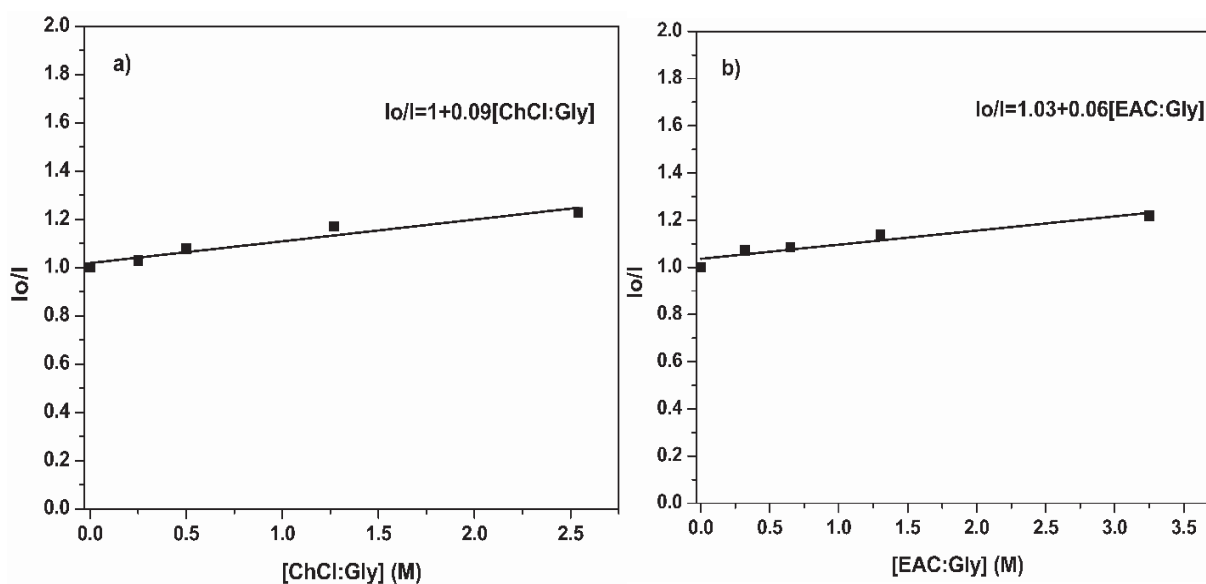
Εν συνεχεία, μελετήθηκε το φάσμα φθορισμού της πρωτεΐνης παρουσία DES στο μέσο επώασης. Τα φάσματα φθορισμού της τυροσινάσης παρουσία διαφόρων DES παρατίθενται στην Εικόνα 12.7 ενώ ο βαθμός απόσβεσης τους περιγράφεται από τα διαγράμματα Stern-Volmer (Εικόνα 12.8).



**Εικόνα 12.7.** Ένταση φθορισμού της τυροσινάσης με σταδιακή προσθήκη των DES a) ChCl:Gly, b) EAC:Gly και c) ChCl:U.

Αντίστοιχα και στην περίπτωση των DES ο φθορισμός της πρωτεΐνης φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά από την φύση και την συγκέντρωση του ευτηκτικού υγρού στο μέσο επώασης. Η παρουσία των ευτηκτικών υγρών ChCl:Gly και EAC:Gly οδήγησε σε παρόμοια

απόσβεση φθορισμού  $K_{SV}$  0.09 και 0.06  $L mol^{-1}$  αντίστοιχα. Ωστόσο, στην περίπτωση του DES ChCl:U δεν παρατηρήθηκε απόσβεση στον φθορισμό της πρωτεΐνης. Το γεγονός αυτό καταδεικνύει την σημαντική επίδραση του δότη δεσμών υδρογόνου στο φάσμα φθορισμού της πρωτεΐνης και επομένως την ισχυρότερη αλληλεπίδραση του ενζύμου με τα συγκεκριμένα μέσα. Οι αλλαγές αυτές στο μικροπεριβάλλον των αρωματικών αμινοξέων πιθανά να οδηγούν σε μία ελαφρώς πιο χαλαρή διαμόρφωση της πρωτεΐνης η οποία συνεπάγεται με αύξηση της καταλυτικής δραστηριότητας στα μέσα αυτά.



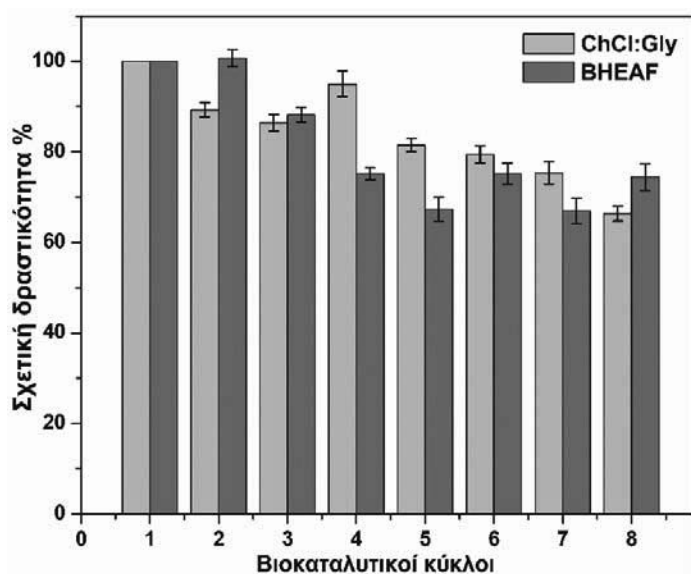
**Εικόνα 12.8.** Διαγράμματα Stern-Volmer της τυροσινάσης για την απόσβεση φθορισμού από τα DES a) ChCl:Gly και b) EAC:Gly. Οι σταθερές Stern-Volmer  $K_{SV}$  είναι 0.09 και 0.06  $L mol^{-1}$  αντίστοιχα.

## 12.6. Εφαρμογές ιοντικών υγρών και DES σε αντιδράσεις με CLEAs τυροσινάσης

### 12.6.1. Επίδραση ιοντικών υγρών και DES στην επαναχρησιμοποίηση των CLEAs τυροσινάσης

Όπως αναφέρθηκε σε προηγούμενη παράγραφο, ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των ακινητοποιημένων ενζύμων που διευκολύνει την εφαρμογή τους στην βιομηχανία είναι η ικανότητα ανάκτησης και επαναχρησιμοποίησής τους σε βιοκαταλυτικές αντιδράσεις. Η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των CLEAs τυροσινάσης παρουσία του ιοντικού υγρού BHEAF και του DES ChCl:Gly μελετήθηκε μέσω της αντίδρασης οξείδωσης της L-DOPA. Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, το ακινητοποιημένο ένζυμο ανακτάται με φυγοκέντρηση, ξεπλένεται με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (100 mM, pH 6.8) και ακολουθεί η εκ νέου προσθήκη 10 v/v % υδατικού διαλύματος ιοντικού

υγρού ή DES, το οποίο περιέχει το υπόστρωμα. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται 7 φορές και τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στην Εικόνα 12.9.



**Εικόνα 12.9.** Επαναχρησιμοποίηση των CLEAs τυροσινάσης παρουσία 10 % v/v υδατικού διαλύματος του ιοντικού υγρού BHEAF και του DES ChCl:Gly μέσω της αντίδρασης οξείδωσης της L-DOPA. Ως 100% ορίζεται η δραστηριότητα του ενζύμου στον 1<sup>ο</sup> κύκλο της αντίδρασης.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης, η αντίδραση οξείδωσης της L-DOPA μπορεί να πραγματοποιηθεί ικανοποιητικά μετά από 8 συνεχόμενους βιοκαταλυτικούς κύκλους και στις δύο περιπτώσεις διαλυτών που δοκιμάστηκαν ChCl:Gly και BHEAF. Πιο συγκεκριμένα, μετά από 8 βιοκαταλυτικούς κύκλους, η δραστηριότητα των CLEAs τυροσινάσης διατηρείται μέχρι και 66 % στην περίπτωση του ChCl:Gly και 74 % στην περίπτωση του BHEAF συγκριτικά με την αρχική. Τα αποτελέσματα αυτά καταδεικνύουν την δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης της ακινητοποιημένης τυροσινάσης παρουσία τόσο ιοντικών υγρών όσο και DES σε αντιδράσεις οξείδωσης, προσφέροντας έτσι ένα σημαντικό πλεονέκτημα εφαρμογής τους σε διεργασίες βιομηχανικού ενδιαφέροντος.

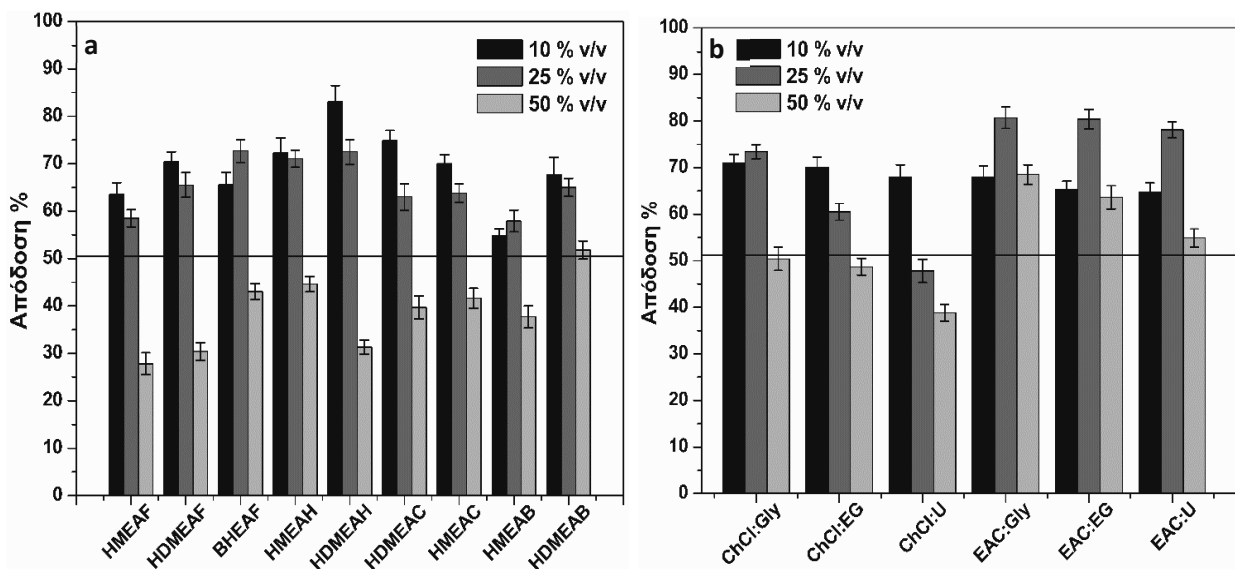
### 12.6.2. Αντιδράσεις σύνθεσης της υδροξυτυροσόλης

Η υδροξυτυροσόλη ή αλλιώς 3,4-διυδροξυφαινυλαιθανόλη, συνιστά ένα από τα σημαντικότερα φυσικά φαινολικά συστατικά που εμπεριέχονται στο ελαιόλαδο και συναντάται είτε σε ελεύθερη μορφή είτε ως τμήμα άλλων ενώσεων όπως είναι η ελευρωπαΐνη.<sup>370,371</sup> Το ενδιαφέρον για αυτήν την ένωση προέρχεται από τις ποικίλες βιολογικές της δράσεις όπως: αντιβακτηριακή,<sup>372</sup> μειώνει τις ελεύθερες ρίζες,<sup>373</sup> προστατεύει το DNA από οξειδωτικές βλάβες,<sup>374</sup> αναστέλλει την συγκόλληση των

αιμοπεταλίων,<sup>375</sup> βελτιώνει την ποιότητα ζωής σε ασθενείς με οστεοπόρωση,<sup>376</sup> έχει θεραπευτική επίδραση στο καρδιαγγειακό σύστημα,<sup>377</sup> συντελεί στην υγιή λειτουργία των μιτοχονδρίων και αυξάνει σημαντικά τα επίπεδα του ATP.<sup>378</sup>

Ωστόσο, η εμπορική διαθεσιμότητα της υδροξυτυροσόλης είναι περιορισμένη, γεγονός που οδηγεί στην διερεύνηση νέων τρόπων για την απομόνωσή της από φυσικές πηγές όπως είναι τα απόβλητα ελαιουργείων ή την παραγωγή της από πρόδρομες ενώσεις όπως είναι η τυροσόλη. Σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα, η τυροσινάση από μανιτάρια έχει την ικανότητα να καταλύει την όρθο-υδροξυλίωση της τυροσόλης, προς παραγωγή υδροξυτυροσόλης, ενώ η περαιτέρω οξείδωση οδηγεί στο σχηματισμό της αντίστοιχης κινόνης (Σχήμα 6.2). Προκειμένου να αποφευχθεί η περαιτέρω οξείδωση της υδροξυτυροσόλης, προστίθεται ασκορβικό οξύ στο μίγμα της αντίδρασης. Οι αναγωγικές συνθήκες που δημιουργούνται από την παρουσία περίσσειας ασκορβικού οξέος, οδηγούν σε αναγωγή της κινόνης προς την αντίστοιχη πρόδρομη ένωσή της, την υδροξυτυροσόλη.<sup>371</sup>

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η επίδραση διαφόρων ιοντικών υγρών και DES στην απόδοση της αντίδρασης οξείδωσης της τυροσόλης προς παραγωγή υδροξυτυροσόλης από τα CLEAs τυροσινάσης. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης παρατίθενται στην Εικόνα 12.9.



**Εικόνα 12.10.** % Απόδοση της αντίδρασης οξείδωσης της τυροσόλης προς παραγωγή υδροξυτυροσόλης, η οποία καταλύεται από την ακινητοποιημένη τυροσινάση CLEAs σε 0-50 % v/v υδατικά διαλύματα ιοντικών υγρών και DES στους 27 °C μετά από 48 ώρες επώασης.

Σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν η ενζυμική σύνθεση της υδροξυτυροσόλης πραγματοποιείται επιτυχώς, παρουσία των διαφόρων ιοντικών υγρών και DES, ενώ στις

περισσότερες περιπτώσεις η απόδοση μετατροπής είναι μεγαλύτερη, παρουσία ιοντικών διαλυτών συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα. Αξίζει να σημειωθεί ότι και στις δύο κατηγορίες διαλυτών, η απόδοση της αντίδρασης μειώνεται καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του ιοντικού υγρού ή DES στο μίγμα της αντίδρασης. Τα αποτελέσματα αυτά πιθανά να συνδέονται με την μειωμένη δραστηριότητα της ακινητοποιημένης τυροσινάσης σε υψηλές συγκεντρώσεις ιοντικών διαλυτών (ιοντικών υγρών ή DES) στο μίγμα της αντίδρασης, όπως περιγράφηκε στην Παράγραφο 12.3. Η μειωμένη σταθερότητα ή αποδιάταξη του μορίου της πρωτεΐνης καθώς επίσης και η αύξηση των περιορισμών μεταφοράς μάζας του υποστρώματος προς το ενεργό κέντρο του ενζύμου<sup>336,337,379</sup> σε υψηλές συγκεντρώσεις ιοντικών διαλυτών πιθανόν να σχετίζονται με τις χαμηλές αποδόσεις της αντίδρασης.

### ***12.6.3. Αποικοδόμηση φαινολών σε λειτουργία μικρο-βιοαντιδραστήρα***

Οι φαινολικές ενώσεις (όπως η φαινόλη, οι αλκυλο υποκατεστημένες και αλογονωμένες φαινόλες και τα παράγωγά τους όπως η δισφαινόλη Α) αποτελούν περιβαλλοντικούς ρύπους που προκύπτουν από την παραγωγή πολλών βιομηχανικών προϊόντων, όπως χαρτιού, μετάλλων, ρητινών, πλαστικών, φυτοφαρμάκων και φαρμακευτικών προϊόντων.<sup>380</sup> Η αλόγιστη απόρριψη τους από τις βιομηχανίες στα υδάτινα οικοσυστήματα (λίμνες, ποτάμια, θάλασσες) επηρεάζει αρνητικά τόσο το περιβάλλον και την οικολογία όσο και την ανθρώπινη υγεία. Ως εκ τούτου, η απομάκρυνσή τους από τους βιομηχανικούς ρύπους κρίνεται αναγκαία.<sup>381</sup> Ανάμεσα στις διάφορες μεθόδους απομάκρυνσης που έχουν αναπτυχθεί (π.χ. προσρόφιση σε ενεργό άνθρακα, χημική οξειδωση) η τεχνολογία της βιοκατάλυσης φάνηκε να έχει προσελκύσει σημαντικά το ενδιαφέρον. Διάφορα οξειδοαναγωγικά ένζυμα όπως λακκάση, υπεροξειδάση και τυροσινάση έχουν χρησιμοποιηθεί για την αποκατάσταση φαινολικών ρύπων.<sup>382</sup>

Στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η εφαρμογή της ακινητοποιημένης τυροσινάσης στην αντίδραση αποικοδόμησης της φαινόλης. Η διαδικασία της αποδόμησης βασίζεται στην ικανότητα του ενζύμου να καταλύει αντιδράσεις υδροξυλίωσης μονοφαινολών σε όρθο-διφαινόλες με επακόλουθη οξειδωση σε όρθο-κινόνες. Εν συνεχεία, οι όρθο-κινόνες πολυμερίζονται μη ενζυμικά, προκειμένου να δημιουργηθούν μη διαλυτά συσσωματώματα τα οποία απομακρύνονται με καθίζηση ή διήθηση. Σημαντικό πλεονέκτημα εφαρμογής της τυροσινάσης αποτελεί το γεγονός ότι δεν απαιτείται η παρουσία κάποιου επιπλέον

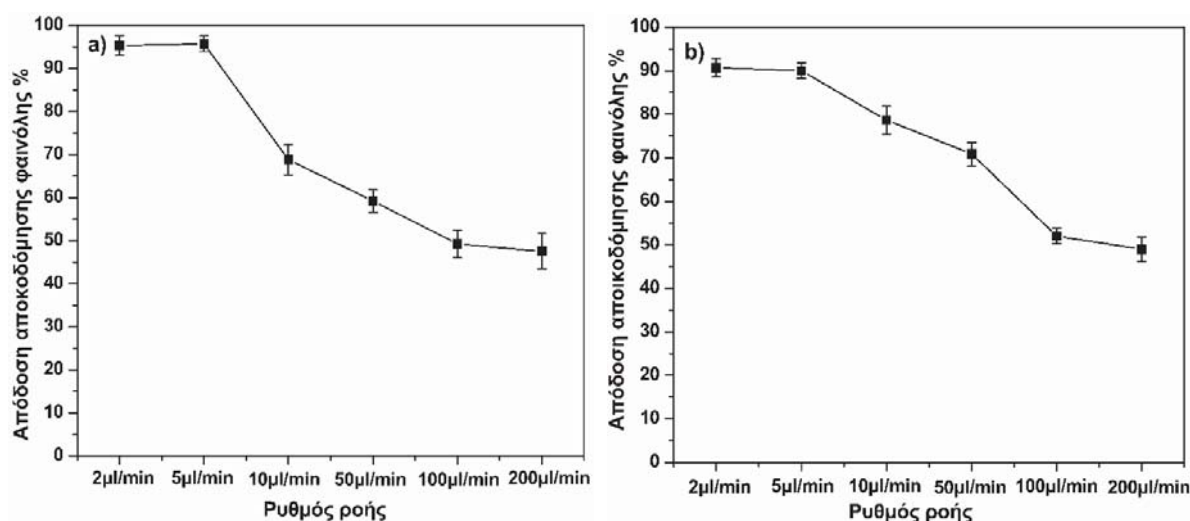


αντιδραστηρίου πλην του μοριακού οξυγόνου που χρησιμοποιείται ως οξειδωτικό μέσο στην αντίδραση, μειώνοντας έτσι το κόστος της διεργασίας.<sup>383,384</sup>

Τα τελευταία χρόνια η χρήση μικρο-αντιδραστήρων αποτελεί μία πολλά υποσχόμενη τεχνολογία στον τομέα της βιοκατάλυσης. Η εφαρμογή των ιοντικών υγρών σε συνεχούς λειτουργίας μικρο-βιοαντιδραστήρες έχει βρεθεί ότι μειώνει τους περιορισμούς μεταφοράς μάζας και θερμότητας λόγω του υψηλού ιξώδους ενώ, παράλληλα, μπορεί να οδηγήσει σε βελτιωμένες αποδόσεις των αντιδράσεων, σε αύξηση του ελέγχου της βιοδιεργασίας και δυνατότητα μετάβασης σε μεγάλης κλίμακας διεργασίες.

Αξιοποιώντας τα πλεονεκτήματα εφαρμογής των ιοντικών υγρών και ευτηκτικών διαλυτών ως μέσων σε βιοκαταλυτικές αντιδράσεις, μελετήθηκε η ανάπτυξη μιας περιβαλλοντικά φιλικής, βιοκαταλυόμενης διεργασίας για την αποδόμηση της φαινόλης από την ακινητοποιημένη τυροσινάση σε συνεχούς λειτουργίας μικρο-βιοαντιδραστήρα.

Στην Εικόνα 12.11. παρατίθεται η επίδραση του ρυθμού ροής ( $\mu\text{L}/\text{min}$ ) στην αντίδραση αποικοδόμησης της φαινόλης από τα CLEAs τυροσινάσης παρουσία 10 % v/v υδατικών διαλυμάτων του ιοντικού υγρού BHEAF και του DES ChCl:Gly. Η συνεχής λειτουργία του μικρο-βιοαντιδραστήρα πραγματοποιήθηκε σε ένα εύρος ρυθμού ροής 2 - 200  $\mu\text{L}/\text{min}$ , ενώ μετά την ολοκλήρωση της διεργασίας η εναπομένουσα συγκέντρωση της φαινόλης υπολογίστηκε με υγρή χρωματογραφία HPLC.



**Εικόνα 12.11.** Επίδραση του ρυθμού ροής στην % απόδοση αποδόμησης της φαινόλης (4.5 mM) σε συνεχούς ροής μικρο-βιοαντιδραστήρα παρουσία 10 % v/v υδατικού διαλύματος a) ChCl:Gly και b) BHEAF.

Και στις δύο περιπτώσεις διαλυτών που μελετήθηκαν (BHEAF, ChCl:Gly) η ακινητοποιημένη τυροσινάση (CLEAs) καταλύει επιτυχώς την αντίδραση αποδόμησης της φαινόλης. Όπως ήταν αναμενόμενο, η αύξηση του ρυθμού ροής και επομένως η μείωση του χρόνου παραμονής του υποστρώματος στο μικρο-βιοαντιδραστήρα οδήγησε και στις δύο περιπτώσεις σε μείωση της % απόδοσης αποδόμησης της φαινόλης. Αντίθετα, σε χαμηλούς ρυθμούς ροής, 2 και 5 μL/min η % απόδοση της αντίδρασης είναι > 90%. Τα αποτελέσματα αυτά, καταδεικνύουν την δυνατότητα ανάπτυξης ενός φιλικού προς το περιβάλλον βιοκαταλυτικού συστήματος συνεχούς λειτουργίας. Το βιοκαταλυτικό αυτό σύστημα, συνδυάζει τα πλεονεκτήματα εφαρμογής τόσο των ιοντικών διαλυτών όσο και των μικρο-βιοαντιδραστήρων όπως την δυνατότητα ελέγχου των συνθηκών της αντίδρασης, εύκολης ανάκτησης των προϊόντων, αύξησης της ταχύτητας μεταφοράς μάζας και επαναχρησιμοποίησης του βιοκαταλύτη με αποτέλεσμα την ανάπτυξη μιας αποδοτικότερης διαδικασίας αποδόμησης φαινολών.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η επίδραση μη συμβατικών μέσων όπως των ιοντικών υγρών  $3^{ns}$  γενιάς και των βαθέων ευτηκτικών διαλυτών στην καταλυτική συμπεριφορά οξειδοαναγωγικών και υδρολυτικών ενζύμων καθώς επίσης και στη σχέση δομής και λειτουργίας των ενζύμων σε αυτά τα μέσα. Το αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον για αυτή την κατηγορία μη συμβατικών μέσων, εντάσσεται στο πλαίσιο κάλυψης των αυξημένων αναγκών για περιβαλλοντικά φιλικές τεχνολογίες σε βιομηχανικές διεργασίες. Τόσο τα ιοντικά υγρά  $3^{ns}$  γενιάς όσο και οι βαθείς ευτηκτικοί διαλύτες (DES) χαρακτηρίζονται ως «πράσινοι διαλύτες» εξ' αιτίας της αμελητέας τάσης ατμών της χαμηλής τοξικότητας και της υψηλής βιοαποικοδομησιμότητας που εμφανίζουν. Η χρήση αυτών των μέσων συνοδεύεται από πλήθος πλεονεκτημάτων όπως αυξημένη διαλυτότητα υδρόφιλων/υδρόφοβων ενώσεων, δυνατότητα τροποποίησης των ιδιοτήτων τους ανάλογα με τις απαιτήσεις της εκάστοτε διεργασίας επιλέγοντας απλά τους κατάλληλους συνδυασμούς των συστατικών τους. Επιπλέον, η εφαρμογή τους ως μέσα σε βιοκαταλυόμενες διεργασίες οδήγησε στην πλειονότητα των περιπτώσεων σε αυξημένη δραστηριότητα και σταθερότητα των ενζύμων. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενζύμων και των ιοντικών υγρών ή των βαθέων ευτηκτικών διαλυτών συνιστούν ένα σύνθετο φαινόμενο, το οποίο εξαρτάται από πολλούς παράγοντες. Η κατανόηση αυτών των αλληλεπιδράσεων μπορεί να συμβάλει τόσο στην βαθύτερη κατανόηση των καταλυτικών ιδιοτήτων των ενζύμων σε αυτά τα μέσα, όσο και στην ανάπτυξη αποτελεσματικών καινοτόμων βιοκαταλυτικών διεργασιών.

Με βάση τα παραπάνω, στην συγκεκριμένη διατριβή αρχικά παρασκευάστηκαν τέσσερα ιοντικά υγρά που ανήκουν στην κατηγορία των υδροξυαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών  $3^{ns}$  γενιάς (HEAF, HMEAF, HDMEAF και BHEAF). Τα μέσα αυτά αποδείχθηκε ότι εμφανίζουν σημαντικό επίπεδο βιοαποικοδομησιμότητας, το οποίο πιθανά να σχετίζεται με την παρουσία ομάδων  $-OH$  στο κατιόν του ιοντικού υγρού. Στη συνέχεια ακολούθησε η μελέτη της καταλυτικής συμπεριφοράς μίας ευρέως μελετημένης πρωτεΐνης-μοντέλο, του κυτοχρώματος c από καρδιά αλόγου σε αυτά τα μέσα. Η παρουσία των ιοντικών υγρών φάνηκε ότι επιδρά σημαντικά στην δραστηριότητα της πρωτεΐνης, η οποία εξαρτάται τόσο από την φύση του εκάστοτε ιοντικού υγρού όσο και από την συγκέντρωσή του στο μίγμα

της αντίδρασης. Αύξηση της συγκέντρωσης των συντιθέμενων ιοντικών υγρών οδηγεί σε αύξηση της καταλυτικής δραστηριότητας του κυτοχρώματος c έως και 20 φορές (στο ιοντικό υγρό HEAF) συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα. Η ευεργετική δράση των ιοντικών υγρών στην δραστηριότητα του κυτοχρώματος αποδίδεται στο συντιθέμενο ιοντικό υγρό και όχι στα επιμέρους συστατικά του. Όσον αφορά την επίδραση της φύσης των ιοντικών υγρών, φάνηκε ότι ακολουθεί την σειρά Hofmeister, καθώς στα πιο υδρόφιλα και επομένως πιο χαοτροπικά κατιόντα των ιοντικών υγρών BHEAF και HEAF η καταλυτική δραστηριότητα είναι υψηλότερη συγκριτικά με αυτή που παρατηρείται στην περίπτωση των λιγότερο χαοτροπικών κατιόντων των ιοντικών υγρών HMEAF και HDMEAF. Επιπλέον, η μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης σε αντίδραση οξειδωσης που παρατηρείται παρουσία των τεσσάρων ιοντικών υγρών πιθανόν να σχετίζεται με την επίδραση αυτών των μέσων στην δομή του πρωτεϊνικού μορίου και στη δημιουργία του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος.

Το κυτόχρωμα c παρουσίασε αυξημένη σταθερότητα παρουσία των ιοντικών υγρών HMEAF και HDMEAF, καταδεικνύοντας τον προστατευτικό τους ρόλο ενάντια σε αποδιατακτικούς παράγοντες όπως είναι το υπεροξείδιο του υδρογόνου. Η επίδραση των ιοντικών υγρών στην σταθερότητα του κυτοχρώματος c δεν φαίνεται να ακολουθεί τις κοσμοτροπικές ιδιότητες των ιόντων που μελετήθηκαν αλλά την ικανότητα των κατιόντων να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου. Η μειωμένη ικανότητα των κατιόντων των ιοντικών υγρών HDMEAF και HMEAF να σχηματίζουν δεσμούς υδρογόνου αλληλοεπιδρώντας λιγότερο με το πρωτεϊνικό μόριο πιθανά να εξηγεί την αυξημένη σταθερότητα του κυτοχρώματος c σε αυτά τα μέσα. Επιπλέον, το λιγότερο υδρόφιλο περιβάλλον που δημιουργεί το ιοντικό υγρό HDMEAF είναι πιθανό να εμποδίζει την διάχυση του υδρόφιλου  $H_2O_2$  στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης μειώνοντας έτσι την αποδιατακτική του επίδραση. Ο πιθανός περιορισμός διάχυσης του  $H_2O_2$  στο μικροπεριβάλλον του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης μπορεί να εξηγεί επιπλέον και την μειωμένη δραστηριότητα του κυτοχρώματος c σε υδατικά διαλύματα του συγκεκριμένου ιοντικού υγρού.

Η δευτεροταγής διαμόρφωση της πρωτεΐνης παρουσία των συντιθέμενων ιοντικών υγρών δεν εμφάνισε σημαντικές αποκλίσεις από την φυσική διαμόρφωση του πρωτεϊνικού μορίου σε υδατικό διάλυμα, σύμφωνα με συγκριτική μελέτη του συντελεστή συσχέτισης των φασμάτων υπερύθρου υγρών δειγμάτων (FTIR-ATR). Στις περισσότερες περιπτώσεις η παρουσία των ιοντικών υγρών οδήγησε σε μικρή αύξηση της  $\alpha$ -έλικας, το οποίο πιθανά να συνδέεται με την μετάβαση της πρωτεΐνης σε μία πιο άκαμπτη διαμόρφωση. Μείωση της  $\alpha$ -έλικας παρατηρείται στην περίπτωση του ιοντικού υγρού BHEAF, το οποίο πιθανά να

εξηγεί την χαμηλή σταθερότητα του πρωτεϊνικού μορίου στο συγκεκριμένο μέσο, λόγω υιοθέτησης μίας λιγότερο άκαμπτης δομής της πρωτεΐνης. Επιπλέον, μέσω της φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV-Vis), διαπιστώθηκε ότι στις περισσότερες περιπτώσεις το μικροπεριβάλλον της αίμης διατηρείται ανέπαφο, με μοναδική εξαίρεση το ιοντικό υγρό HMEAF στο οποίο παρατηρήθηκαν αλλαγές, πιθανά λόγω μερικής διατάραξης ή ακόμα και διάσπασης του συντονισμού μεταξύ του θείου της Met80 και του σιδήρου της αίμης. Οι αλλαγές στο μικροπεριβάλλον της αίμης παρουσία του ιοντικού υγρού HMEAF παρατηρήθηκαν και μέσω φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού και πιθανά να εξηγούν την μειωμένη δραστικότητα του κυτοχρώματος c στο συγκεκριμένο ιοντικό υγρό HMEAF, συγκριτικά με τα υπόλοιπα.

Ακολούθησε η μελέτη της επίδρασης βαθέων ευτηκτικών διαλυτών (DES) στην καταλυτική συμπεριφορά του κυτοχρώματος c. Τα DES που μελετήθηκαν συντέθηκαν μέσω ανάμιξης των οργανικών αλάτων ChCl και EAC με τους δότες δεσμών υδρογόνου ουρία (U), γλυκερόλη (Gly) και αιθυλενική γλυκόλη (EG). Η παρουσία των DES στις αντιδράσεις οξείδωσης από το κυτόχρωμα c οδήγησε στην πλειονότητα των περιπτώσεων σε αύξηση της καταλυτικής δραστικότητας του ενζύμου. Η καταλυτική συμπεριφορά του κυτοχρώματος c φάνηκε ότι εξαρτάται σημαντικά τόσο από την φύση του εκάστοτε DES όσο και από την συγκέντρωσή του στο μίγμα της αντίδρασης. Η παρουσία των DES με βάση το EAC επέφερε σημαντικά υψηλότερη αύξηση στην δραστικότητα του ενζύμου, συγκριτικά με αυτά που έχουν ως βάση το ChCl γεγονός το οποίο πιθανά να σχετίζεται με την ανάπτυξη διαφορετικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του DES και της πρωτεΐνης καθώς επίσης και με το ιξώδες του εκάστοτε DES. Όσον αφορά την φύση του δότη δεσμών υδρογόνου, φάνηκε ότι τα DES με συστατικό τους την U προκαλούν υψηλότερη αύξηση της δραστικότητας συγκριτικά με την Gly και την EG, ανεξάρτητα από το αμμωνιακό άλας που χρησιμοποιείται. Η θετική επίδραση των DES στην δραστικότητα του κυτοχρώματος c είναι πιο εμφανής σε συγκεντρώσεις έως 50 % v/v στο μίγμα της αντίδρασης, σε αντίθεση με τις υψηλές συγκεντρώσεις > 70 % v/v, όπου η δραστικότητα της πρωτεΐνης μειώνεται, πιθανά λόγω μείωσης της σταθερότητας ή αποδιάταξης του μορίου της πρωτεΐνης ή/και αύξησης των περιορισμών μεταφοράς μάζας του υποστρώματος προς το ενεργό κέντρο του ενζύμου. Και στην περίπτωση των DES, όπως και των ιοντικών υγρών, η ευεργετική επίδραση αυτών των μέσων στην δραστικότητα του κυτοχρώματος c είναι αποτέλεσμα της παρουσίας του συντιθέμενου μέσου στο μίγμα της αντίδρασης και όχι των επιμέρους συστατικών του. Σημαντική επίδραση των DES παρατηρείται και στην σταθερότητα του κυτοχρώματος c,

καθώς στις περισσότερες περιπτώσεις που μελετήθηκαν η παρουσία των DES στο μέσο επώασης οδήγησε σε αύξηση της σταθερότητας της πρωτεΐνης συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα.

Μέσω της φασματοσκοπίας ορατού υπεριώδους και της φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού, αποδείχθηκε ότι η παρουσία των DES οδήγησε σε σημαντικές αλλαγές στα φάσματα της πρωτεΐνης, οι οποίες φαίνεται να εξαρτώνται από την συγκέντρωση του εκάστοτε DES στο μίγμα. Οι φασματοσκοπικές αλλαγές που παρατηρήθηκαν πιθανά να συνδέονται με αλλαγές στο μικροπεριβάλλον της αίμης και αναπροσανατολισμό της στο ενεργό κέντρο του πρωτεϊνικού μορίου. Ο αναπροσανατολισμός αυτός της αίμης, πιθανά να την καθιστά πιο προσβάσιμη στο υπόστρωμα, προκαλώντας έτσι την αυξημένη δραστηριότητα του κυτοχρώματος c παρουσία των DES συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα. Η πλήρης εξαφάνιση της κορυφής μεταφοράς φορτίου στα 695 nm στο φάσμα απορρόφησης UV-vis στις υψηλές συγκεντρώσεις των ευτηκτικών υγρών (70% v/v) υποδηλώνει πιο έντονες δομικές αλλαγές στο μικροπεριβάλλον της αίμης, οι οποίες πιθανά να σχετίζονται με την πλήρη αποδιάταξη του πρωτεϊνικού μορίου και ως εκ τούτου με την μειωμένη δραστηριότητα που παρατηρείται σε αυτήν την περίπτωση.

Τα νέα βιοκαταλυτικά συστήματα που αναπτύχθηκαν, τόσο σε ιοντικά υγρά όσο και σε DES, εφαρμόστηκαν επιτυχώς στον αποχρωματισμό του χλωριδίου της πινακυανόλης, μία εφαρμογή με βιομηχανικό ενδιαφέρον. Επιπλέον, τα αποτελέσματα επαναχρησιμοποίησης τόσο των ιοντικών υγρών όσο και των DES στην αντίδραση αποχρωματισμού έδειξαν ότι το ποσοστό της αντίδρασης μετά από 4 βιοκαταλυτικούς κύκλους διατηρείται σε παρόμοια επίπεδα με την αρχική απόδοση σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν.

Αξιοποιώντας τα πλεονεκτήματα ακινητοποίησης των ενζύμων σε νανοδομημένα υλικά συντέθηκαν υβριδικά σκευάσματα νανοϋλικών αποτελούμενα από ιόντα χαλκού και πρωτεΐνη. Οι δεσμοί συντονισμού μεταξύ των ατόμων αζώτου των αμιδικών ομάδων των ενζυμικών μορίων και των ιόντων χαλκού, οδηγεί στην δημιουργία δομών που μοιάζουν με άνθος γνωστές με τον όρο «nanoflowers». Στην παρούσα διατριβή, μελετήθηκε η ανάπτυξη υβριδικών nanoflowers χρησιμοποιώντας για την ακινητοποίηση ιόντα χαλκού ως το ανόργανο συστατικό και λιπάση B από *Candida antarctica* ως το οργανικό συστατικό. Η ανάλυση της δομής τους με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) έδειξε ότι μορφολογία τους είναι παρόμοια με αυτή ενός λουλουδιού ντάλιας διαμέτρου 20 μm. Η καταλυτική δραστηριότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου σε αντιδράσεις

μετεστεροποίησης χρησιμοποιώντας ως μέσα διάφορα ιοντικά υγρά 3<sup>ns</sup> γενιάς και DES εξαρτάται σημαντικά από την φύση του εκάστοτε διαλύτη. Αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου παρατηρήθηκε στην περίπτωση των DES με βάση το EAC συγκριτικά με τα ChCl DES, πιθανά λόγω του χαμηλότερου ιξώδους των συγκεκριμένων διαλυτών. Αντίθετα στην περίπτωση των ιοντικών υγρών 3<sup>ns</sup> γενιάς παρατηρήθηκαν χαμηλές οι αποδόσεις (έως ~16 %) οι οποίες πιθανά να οφείλονται σε απενεργοποίηση του ενζύμου ως αποτέλεσμα απομάκρυνσης των κρίσιμων μορίων νερού από το ενζυμικό μόριο (απαραίτητων για την λειτουργία του) καθώς επίσης και ανάπτυξης ισχυρών δεσμών υδρογόνου μεταξύ των καρβοξυλικών οξέων των ιοντικών υγρών με την πολυπεπτιδική αλυσίδα της πρωτεΐνης, οι οποίοι μπορεί να οδηγήσουν σε αποδιάταξη των δεσμών υδρογόνου που διατηρούν την δομική ακεραιότητα προκαλώντας μερικό ή/και ολικό ξεδίπλωμα της πρωτεΐνης. Επιπλέον, η παρουσία των DES οδήγησε σε αύξηση τόσο της υδρολυτικής δραστηριότητας όσο και της σταθερότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα. Η επαναχρησιμοποίηση των CALB-nanoflowers σε DES μπορεί να πραγματοποιηθεί αποτελεσματικά για 7 βιοκαταλυτικούς κύκλους διατηρώντας το 50 % της αρχικής τους δραστηριότητας.

Η αλληλεπίδραση μεταξύ ιοντικών διαλυτών (ιοντικών υγρών και DES) και ενζύμων με σκοπό την ανάπτυξη ενός αποτελεσματικού βιοκαταλυτικού συστήματος, διερευνήθηκε περαιτέρω χρησιμοποιώντας ένα συνθετικά χρήσιμο οξειδοαναγωγικό ένζυμο με εφαρμογές στην φαρμακευτική και στην χημική βιομηχανία, την τυροσινάση από μανιτάρια *Agaricus bisporus*. Η επίδραση των υδροξυαιθυλαμμωνιακών ιοντικών υγρών 3<sup>ns</sup> γενιάς και των DES στην δραστηριότητα του ενζύμου μελετήθηκε τόσο στην ελεύθερη μορφή του όσο και στην ακινητοποιημένη. Η ακινητοποίηση του ενζύμου πραγματοποιήθηκε αξιοποιώντας μία ευρέως αναπτυγμένη μέθοδο ακινητοποίησης, την διαμοριακή σύνδεση CLEAs (Cross Linked Enzyme Aggregates). Η συγκριτική μελέτη παρουσία διαφόρων ιοντικών υγρών 3<sup>ns</sup> γενιάς (HMEAF, HDMEAF, BHEAF, HMEAH, HDMEAH, HDMEAC, HMEAC, HMEAB, HDMEAB) στο μέσω της αντίδρασης κατέδειξε την ευεργετική δράση της ακινητοποίησης στην δραστηριότητα του ενζύμου. Σε όλες τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν το ακινητοποιημένο ένζυμο παρουσίασε αυξημένη δραστηριότητα παρουσία των ιοντικών υγρών συγκριτικά με το ελεύθερο σκεύασμα. Επιπλέον στην περίπτωση των ιοντικών υγρών HDMEAB, BHEAF και HMEAF, τα CLEAs τυροσινάσης εμφάνισαν υψηλότερη δραστηριότητα συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα. Το είδος του κατιόντος-ανιόντος του εκάστοτε ιοντικού υγρού στο μίγμα της αντίδρασης φάνηκε να επιδρά σημαντικά στην

δραστηριότητα του ενζύμου ακολουθώντας την σειρά χαοτροπικότητας στην περίπτωση των κατιόντων (αύξηση χαοτροπικότητας οδηγεί σε αύξηση δραστηριότητας), ενώ στην περίπτωση του ανιόντος το φαινόμενο αυτό φάνηκε να μην ισχύει. Η επίδραση του ανιόντος στην δραστηριότητα της τυροσινάσης πιθανά να ακολουθεί τον «νόμο αλληλεπίδρασης ιόντων», όπου τα κοσμοτροπικά ανιόντα των ιοντικών υγρών μπορεί να αλληλεπιδρούν ισχυρά με τα κοσμοτροπικά κατιόντα  $\text{Cu}^{+2}$  του ενεργού κέντρου του ενζύμου σταθεροποιώντας την κατάσταση ηρεμίας του και μειώνοντας έτσι την ικανότητα να δεχτεί τα μόρια του υποστρώματος. Η μείωση της δραστηριότητας του ελεύθερου ενζύμου παρατηρήθηκε και στην περίπτωση της παρουσίας των DES στο μίγμα της αντίδρασης σε αντίθεση με το ακινητοποιημένο ένζυμο, το οποίο εμφάνισε αυξημένη δραστηριότητα σε όλες τις περιπτώσεις συγκριτικά με το υδατικό διάλυμα. Η δραστηριότητα του ενζύμου εξαρτάται σημαντικά από την φύση του δότη δεσμών υδρογόνου του DES καθώς ανεξάρτητα από το αμμωνιακό άλας του DES που χρησιμοποιήθηκε, η αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου φάνηκε να ακολουθεί την εξής σειρά  $U < EG < Gly$ . Όσον αφορά την συγκέντρωση των ιοντικών διαλυτών στο μίγμα της αντίδρασης, φάνηκε ότι η παρουσία χαμηλών συγκεντρώσεων (έως 10 % v/v) έχει θετική επίδραση στην δραστηριότητα του ενζύμου, ενώ η περαιτέρω αύξηση οδηγεί σε μείωση της δραστηριότητας. Η μειωμένη δραστηριότητα σε υψηλές συγκεντρώσεις ιοντικών υγρών και DES, πιθανόν να οφείλεται σε μειωμένη σταθερότητα ή αποδιάταξη του μορίου της πρωτεΐνης καθώς επίσης και σε αύξηση των περιορισμών μεταφοράς μάζας του υποστρώματος προς το ενεργό κέντρο του ενζύμου.

Η παρουσία τόσο των ιοντικών υγρών όσο και των DES σταθεροποιεί σημαντικά το ένζυμο μετά από 24 ώρες επώασης στους 40 °C. Η προστατευτική δράση εξαρτάται σημαντικά από την φύση του εκάστοτε ιοντικού υγρού ή DES που χρησιμοποιείται ως μέσο επώασης. Στην περίπτωση των ιοντικών υγρών η αλληλεπίδραση του ενζύμου με τον εκάστοτε διαλύτη φαίνεται να οδηγεί σε μία πιο δραστική αλλά λιγότερο σταθερή διαμόρφωση. Αντίθετα, στην περίπτωση των DES, η αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου συνδέεται με την αύξηση της σταθερότητας του. Η ικανότητα σχηματισμού δεσμών υδρογόνου της Gly και της EG με 3 και 2 υδροξυλομάδες στο μόριό τους αντίστοιχα είναι μεγαλύτερη συγκριτικά με την U. Επομένως, τα συστατικά αυτά αλληλεπιδρούν πιο ισχυρά με το ανιόν του αμμωνιακού άλατος στο δίκτυο του DES παρά με το μόριο της πρωτεΐνης, το οποίο πιθανά να εξηγεί την αυξημένη σταθερότητα του ενζύμου σε αυτά τα μέσα συγκριτικά με την U. Η ικανότητα επαναχρησιμοποίησης του ακινητοποιημένου ενζύμου



μπορεί να πραγματοποιηθεί ικανοποιητικά μετά από 8 συνεχόμενους βιοκαταλυτικούς κύκλους διατηρώντας μέχρι και το 74 % της αρχικής του δραστηριότητας.

Οι διαμορφωτικές αλλαγές της πρωτεΐνης παρουσία των ιοντικών διαλυτών μελετήθηκαν μέσω της φασματοσκοπίας φθορισμού. Τόσο η φύση όσο και η συγκέντρωση των ιοντικών υγρών στο διάλυμα φάνηκε να επιδρούν σημαντικά στο φάσμα φθορισμού της πρωτεΐνης. Στο ισχυρά χαοτροπικό κατιόν του ιοντικού υγρού BHEAF δεν παρατηρούνται αλλαγές στο φάσμα φθορισμού της πρωτεΐνης πιθανά λόγω μίας πιο συμπαγούς διαμόρφωσης του μορίου, εν αντιθέσει με το λιγότερο χαοτροπικό κατιόν του ιοντικού υγρού HDMEAF στο οποίο η ένταση φθορισμού της πρωτεΐνης μειώνεται αυξανόμενης της συγκέντρωσής του στο διάλυμα. Όσον αφορά το ανιόν, η μείωση της έντασης φθορισμού του ισχυρά κοσμοτροπικού ανιόντος του ιοντικού υγρού HDMEAΗ πιθανά να οφείλεται σε ισχυρές αλληλεπιδράσεις του με τα ιόντα  $\text{Cu}^{+2}$  του ενεργού κέντρου οι οποίες οδηγούν σε σημαντικές αλλαγές στην δομή του πρωτεϊνικού μορίου εκθέτοντας τα φθοροφόρα κατάλοιπα που βρίσκονται στο εσωτερικό του μορίου στην επιφάνεια. Αντίστοιχα και στην περίπτωση των DES ο φθορισμός της πρωτεΐνης φαίνεται να επηρεάζεται σημαντικά από την φύση και την συγκέντρωση του ευτηκτικού υγρού στο μέσο επώασης. Οι αλλαγές στο μικροπεριβάλλον των αρωματικών αμινοξέων που παρατηρούνται στην περίπτωση των DES με δότη δεσμών υδρογόνου την Gly, πιθανά να οδηγούν σε μία ελαφρώς πιο χαλαρή διαμόρφωση της πρωτεΐνης, η οποία συνεπάγεται με αύξηση της καταλυτικής δραστηριότητας που παρατηρήθηκε σε αυτά τα μέσα.

Η μελέτη των αλληλεπιδράσεων μεταξύ της τυροσινάσης και των ιοντικών διαλυτών (ιοντικά υγρά και DES) αξιοποιήθηκε για την ανάπτυξη βιοκαταλυτικών συστημάτων με βιομηχανικό ενδιαφέρον. Τόσο τα ιοντικά υγρά όσο και τα DES χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς για την πραγματοποίηση αντιδράσεων σύνθεσης της υδροξυτυροσόλης από την ακινητοποιημένη τυροσινάση οδηγώντας σε υψηλές αποδόσεις την αντίδραση (έως 85 %). Επιπλέον, η ανάπτυξη μιας περιβαλλοντικά φιλικής, βιοκαταλυόμενης διεργασίας για την αποδόμηση της φαινόλης από την ακινητοποιημένη τυροσινάση σε συνεχούς λειτουργίας μικρο-βιοαντιδραστήρα πραγματοποιήθηκε με επιτυχία με ποσοστό αποδόμησης της φαινόλης 95 %.

Από τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης καταδεικνύεται η σημασία της εφαρμογής τόσο των ιοντικών υγρών 3<sup>ης</sup> γενιάς όσο και των DES στον τομέα της βιοκατάλυσης. Οι βιοκαταλυτικές διεργασίες που αναπτύχθηκαν ακολουθούν τις αρχές της πράσινης χημείας με την εφαρμογή περιβαλλοντικά φιλικών διαλυτών, χαμηλής

τοξικότητας και υψηλής βιοαποικοδομησιμότητας. Επιπλέον, η εφαρμογή τους σε βιοκαταλυόμενες διεργασίες βελτίωσε σημαντικά την καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων προσφέροντας έτσι ένα σημαντικό πλεονέκτημα σε διεργασίες βιομηχανικού ενδιαφέροντος, όπως είναι η ενζυμική σύνθεση βιοδραστικών μορίων, η αποικοδόμηση ρύπων, η παραγωγή βιοντίζελ κ.α. Περαιτέρω μελέτη των σχέσεων της δομής-καταλυτικής δράσης διαφόρων ενζύμων στα συγκεκριμένα μέσα θα επιτρέψει τον σχεδιασμό νέων βιοκαταλυτικών συστημάτων διευρύνοντας έτσι το πεδίο εφαρμογών τους.

1. Paweł KAFARSKI. Rainbow code of biotechnology. **66**, 811–816 (2012).
2. Festel, G., Detzel, C. & Maas, R. Industrial biotechnology – Markets and industry structure. *J. Commer. Biotechnol.* **18**, (2012).
3. Ribeiro, B. D., Coelho, M. A. Z. & Machado de Castro, A. Principles of green chemistry and white biotechnology in White Biotechnology for Sustainable Chemistry, pp.1-8, (Royal Society of Chemistry, 2015).
4. Weng Lin Tang and Huimin Zhao. Industrial biotechnology: Tools and applications. *Biotechnol. J* **4**, 1725–1739 (2009).
5. de Carvalho, C. C. Enzymatic and whole cell catalysis: Finding new strategies for old processes. *Biotechnol. Adv.* **29**, 75–83 (2011).
6. Sheldon, R. A. Characteristic features and biotechnological applications of cross-linked enzyme aggregates (CLEAs). *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **92**, 467–477 (2011).
7. Tao, J. & Kazlauskas, R. J. *Biocatalysis for green chemistry and chemical process development*. (John Wiley & Sons, 2011).
8. Kotzia, G. A. *et al.* Biocatalysis , Enzyme Engineering and Biotechnology in Food Biochemistry and Food Processing, pp. 125–166 (John Wiley & Sons, 2012).
9. Turner, N. J. Directed evolution drives the next generation of biocatalysts. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 567–573 (2009).
10. Luetz, S., Giver, L. & Lalonde, J. Engineered enzymes for chemical production. *Biotechnol. Bioeng.* **101**, 647–653 (2008).
11. Xu, F. Applications of oxidoreductases: Recent progress. *Ind. Biotechnol.* **1**, 38–50 (2005).
12. Shleev, S. V., Khan, I. G., Gazaryan, I. G., Morozova, O. V. & Yaropolov, A. I. Novel Laccase Redox Mediators: Spectral, Electrochemical, and Kinetic Properties. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **111**, 167–184 (2003).
13. Xu F. Fermentation, Biocatalysis, and Bioseparation in The Encyclopedia of Bioprocessing Technology., eds. Flickinger MC, and Drew SW. 1545-1554 (John Wiley & Sons, New York, 1999).
14. Yves M Galante and Cristina Formantici. Enzyme Applications in Detergency and in Manufacturing Industries. *Curr. Org. Chem.* **7**, 1399–1422 (2003).
15. Minussi, R. C., Pastore, G. M. & Durán, N. Potential applications of laccase in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* **13**, 205–216 (2002).
16. Zhang, X., Eigendorf, G., Stebbing, D., Mansfield, S. . & Saddler, J. . Degradation of trilinolein by laccase enzymes. *Arch. Biochem. Biophys.* **405**, 44–54 (2002).
17. Karlsson, S., Holmbom, B., Spetz, P., Mustranta, A. & Buchert, J. Reactivity of Trametes laccases with fatty and resin acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**, 317–320 (2001).
18. Laurinavicius, V., Razumiene, J., Ramanavicius, A. & Ryabov, A. D. Wiring of PQQ–dehydrogenases. *Biosens. Bioelectron.* **20**, 1217–1222 (2004).
19. Ivano Bertini, Gabriele Cavallaro, and Antonio Rosato, Cytochrome c: Occurrence and Functions. (2005). doi:10.1021/CR050241V
20. Katsumi Niki, *et al.* Coupling to Lysine-13 Promotes Electron Tunneling through Carboxylate-Terminated Alkanethiol Self-Assembled Monolayers to Cytochrome c. (2003).

21. Ambler, R. P. Sequence variability in bacterial cytochromes c. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1058**, 42–47 (1991).
22. Stelter, M. *et al.* A Novel Type of Monoheme Cytochrome c: Biochemical and Structural Characterization at 1.23 Å Resolution of *Rhodothermus marinus* Cytochrome c. *Biochemistry* **47**, 11953–11963 (2008).
23. Moore, G. R. & Pettigrew, G. W. *Cytochromes c: Evolutionary, Structural and Physicochemical Aspects.* (Springer Berlin Heidelberg, 1990).
24. Lucia Banci *et al.* Solution Structure of Oxidized Horse Heart Cytochrome c. *Biochemistry* **36**, 9867–9877 (1997).
25. Pinheiro, T. J. The interaction of horse heart cytochrome c with phospholipid bilayers. Structural and dynamic effects. *Biochimie* **76**, 489–500 (1994).
26. Scott, R. A. & Mauk, A. G. Arthur G. *Cytochrome C: a multidisciplinary approach.* (University Science Books, 1996).
27. Bushnell, G. W., Louie, G. V & Brayer, G. D. High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome c. *J. Mol. Biol.* **214**, 585–95 (1990).
28. Patriarca, A. *et al.* Conversion of cytochrome c into a peroxidase: Inhibitory mechanisms and implication for neurodegenerative diseases. *Arch. Biochem. Biophys.* **522**, 62–69 (2012).
29. Li, P. *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell* **91**, 479–89 (1997).
30. Schagger, H., Cramer, W. A. & Vonjagow, G. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Anal. Biochem.* **217**, 220–230 (1994).
31. Sinibaldi, F. *et al.* Anion concentration modulates the conformation and stability of the molten globule of cytochrome c. *J. Biol. Inorg. Chem.* **8**, 663–70 (2003).
32. Kalanxhi, E. & Wallace, C. J. A. Cytochrome c impaled: investigation of the extended lipid anchorage of a soluble protein to mitochondrial membrane models. *Biochem. J.* **407**, 179–187 (2007).
33. Basova, L. V. *et al.* Cardiolipin Switch in Mitochondria: Shutting off the Reduction of Cytochrome c and Turning on the Peroxidase Activity. *Biochemistry* **46**, 3423–3434 (2007).
34. Kapetanaki, S. M. *et al.* Interaction of Carbon Monoxide with the Apoptosis-Inducing Cytochrome c–Cardiolipin Complex. *Biochemistry* **48**, 1613–1619 (2009).
35. Patriarca, A. *et al.* ATP Acts as a Regulatory Effector in Modulating Structural Transitions of Cytochrome c: Implications for Apoptotic Activity. *Biochemistry* **48**, 3279–3287 (2009).
36. Orrenius, S., Gogvadze, V. & Zhivotovsky, B. Mitochondrial Oxidative Stress: Implications for Cell Death. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **47**, 143–83 (2007).
37. Ascenzi, P., Santucci, R., Coletta, M. & Polticelli, F. Cytochromes: Reactivity of the ‘dark side’ of the heme. *Biophys. Chem.* **152**, 21–7 (2010).
38. Garrido, C. *et al.* Mechanisms of cytochrome c release from mitochondria. *Cell Death Differ.* **13**, 1423–1433 (2006).
39. Vazquez-Duhalt, R. Cytochrome c as a biocatalyst. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **7**, 241–249 (1999).
40. Torres, E., Victor Sandoval, J., Rosell, F. I., Grant Mauk, A. & Vazquez-Duhalt, R. Site-directed mutagenesis improves the biocatalytic activity of iso-1-cytochrome c in polycyclic hydrocarbon oxidation. *Enzyme Microb. Technol.* **17**, 1014–1020 (1995).
41. Tinoco, R. & Vazquez-Duhalt, R. Chemical modification of cytochrome C improves their catalytic properties in oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *Enzyme Microb. Technol.* **22**, 8–12 (1998).

42. Akasaka, R. *et al.* Hydroxylation of benzene by immobilized cytochrome c in an organic solvent. *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1* **17**, 1817 (1994).
43. Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D. W. S. & Fedorak, P. M. Cytochrome c as a biocatalyst for the oxidation of thiophenes and organosulfides. *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 494–499 (1993).
44. Vazquez-Duhalt, R., Semple, K. M., Westlake, D. W. S. & Fedorak, P. M. Effect of water-miscible organic solvents on the catalytic activity of cytochrome c. *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 936–943 (1993).
45. Papadopoulou, A. A. *et al.* Hydroxyl ammonium ionic liquids as media for biocatalytic oxidations. *Green Chem.* **18**, 1147–1158, (2016).
46. Vazquez-Duhalt, R. Hemoproteins as Biocatalysts for the Oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in *Advances in Bioprocess Engineering* pp. 183–207 (Springer Netherlands, 1998).
47. Azevedo, A. M., Cabral, J. M. S. & Fonseca, L. P. Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. *Biotechnol. Annu Review* **9**, 199–247, (2003).
48. Mylrajan, M., Valli, K., Wariishi, H., Gold, M. H. & Loehr, T. M. Resonance Raman spectroscopic characterization of compound III of lignin peroxidase. *Biochemistry* **29**, 9617–9623 (1990).
49. Azevedo, A. M. *et al.* Horseradish peroxidase: A valuable tool in biotechnology. *Biotechnol. Annu. Rev.* **9**, 199–247 (2003).
50. Patterson, W. R. & Poulos, T. L. Crystal structure of recombinant pea cytosolic ascorbate peroxidase. *Biochemistry* **34**, 4331–4341 (1995).
51. Regelsberger, G. *et al.* The role of distal tryptophan in the bifunctional activity of catalase-peroxidases. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 99–105, (2001).
52. Kunishima, N. *et al.* Crystal structure of the fungal peroxidase from *Arthromyces ramosus* at 1.9 Å resolution. Structural comparisons with the lignin and cytochrome c peroxidases. *J. Mol. Biol.* **235**, 331–44 (1994).
53. Smith, A. T. & Veitch, N. C. Substrate binding and catalysis in heme peroxidases. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **2**, 269–78 (1998).
54. Veitch, N. C. & Smith, A. T. Horse Radish Peroxidase in *Advances in inorganic Chemistry* Vol 51. pp. 108–152, (Academic Press 2001).
55. Veitch, N. C. Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochem. Rev.*, **3**, 3–18 (2004).
56. Wuhrer, M., Balog, C. I. A., Koeleman, C. A. M., Deelder, A. M. & Hokke, C. H. New features of site-specific horseradish peroxidase (HRP) glycosylation uncovered by nano-LC-MS with repeated ion-isolation/fragmentation cycles. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* **1723**, 229–239 (2005).
57. Zakharova, G. S., Uporov, I. V. & Tishkov, V. I. Horseradish peroxidase: Modulation of properties by chemical modification of protein and heme. *Biochem.* **76**, 1391–1401 (2011).
58. Gajhede, M., Schuller, D. J., Henriksen, a, Smith, a T. & Poulos, T. L. Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution. *Nat. Struct. Biol.* **4**, 1032–1038 (1997).
59. Veitch, N. C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* **65**, 249–259 (2004).
60. Howes, B. D., Feis, A., Raimondi, L., Indiani, C. & Smulevich, G. The critical role of the proximal calcium ion in the structural properties of horseradish peroxidase. *J. Biol. Chem.* **276**, 40704–11 (2001).
61. Poulos, T. L. & Kraut, J. The Stereochemistry of Peroxidase Catalysis. *J. Biol. Chem.*, **255**, 8199–8205, (1980).
62. Baek, H. K. & Van Wart, H. E. Elementary steps in the reaction of horseradish peroxidase with several peroxides: kinetics and thermodynamics of formation of compound 0 and compound I. *J. Am. Chem. Soc.* **114**, 718–725 (1992).

63. Jose Neptuno Rodriguez-Lopez, Andrew T. Smith, and Roger. N. F. Thorneley. Role of Argininr 38 in Horseradish Peroxidase. *J. Biol. Chem.* **271**, 4023–4030, (1996).
64. Veitch, N. C. Structural determinants of plant peroxidase function. *Phytochem. Rev.* **3**, 3–18 (2004).
65. Krieg, R. & Halbhuber, K. J. Recent advances in catalytic peroxidase histochemistry. *Cell. Mol. Biol.*, **49**, 547–63 (2003).
66. Krainer, F. W. & Glieder, A. An updated view on horseradish peroxidases: recombinant production and biotechnological applications. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **99**, 1611–1625 (2015).
67. Regalado, C., García-Almendárez, B. E. & Duarte -Vázquez, M. A. Biotechnological applications of peroxidases. *Phytochem. Rev.* **3**, 243–256 (2004).
68. Somasundrum, M., Kirtikara, K. & Tanticharoen, M. Amperometric determination of hydrogen peroxide by direct and catalytic reduction at a copper electrode. *Anal. Chim. Acta* **319**, 59–70 (1996).
69. Gündoğan-Paul, M., Celebi, S. S., Ozyörük, H. & Yildiz, A. Amperometric enzyme electrode for organic peroxides determination prepared from horseradish peroxidase immobilized in poly(vinylferrocenium) film. *Biosens. Bioelectron.* **17**, 875–81 (2002).
70. Mulchandani, A. & Rudolph, D. C. Amperometric Determination of Lipid Hydroperoxides. *Anal. Biochem.* **225**, 277–282 (1995).
71. Micheli, L. *et al.* Production of antibodies and development of highly sensitive formats of enzyme immunoassay for saxitoxin analysis. *Anal. Bioanal. Chem.* **373**, 678–684 (2002).
72. Kawatsu, K., Hamano, Y., Sugiyama, A., Hashizume, K. & Noguchi, T. Development and application of an enzyme immunoassay based on a monoclonal antibody against gonyautoxin components of paralytic shellfish poisoning toxins. *J. Food Prot.* **65**, 1304–8 (2002).
73. Wagner, M. & Nicell, J. A. Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Res.* **36**, 4041–4052 (2002).
74. Zhang, G. & Nicell, J. A. Treatment of aqueous pentachlorophenol by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Res.* **34**, 1629–1637 (2000).
75. Wagner, M. & Nicell, J. A. Treatment of a foul condensate from kraft pulping with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Res.* **35**, 485–495 (2001).
76. Decker H, Dillinger R & Tuzcek F. How Does Tyrosinase Work? Recent Insights from Model Chemistry and Structural Biology. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **39**, 1591–1595 (2000).
77. Soler-Rivas, C., Jolivet, S., Arpin, N., Olivier, J. M. & Wichers, H. J. Biochemical and physiological aspects of brown blotch disease of *Agaricus bisporus*. *Microbiol. Rev.* **23**, 591–614 (1999).
78. Riley, P. A. Melanin. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **29**, 1235–1239 (1997).
79. Cerenius, L. & Söderhäll, K. The prophenoloxidase-activating system in invertebrates. *Immunol. Rev.* **198**, 116–26 (2004).
80. Chang, T.-S. & Te-Sheng. Natural Melanogenesis Inhibitors Acting Through the Down-Regulation of Tyrosinase Activity. *Materials.* **5**, 1661–1685 (2012).
81. Halaouli, S., Asther, M., Sigoillot, J.-C., Hamdi, M. & Lomascolo, A. Fungal tyrosinases: new prospects in molecular characteristics, bioengineering and biotechnological applications. *J. Appl. Microbiol.* **100**, 219–232 (2006).
82. van Gelder, C. W. G., Flurkey, W. H. & Wichers, H. J. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases. *Phytochemistry* **45**, 1309–1323 (1997).
83. Ismaya, W. T. *et al.* Crystal Structure of *Agaricus bisporus* Mushroom Tyrosinase: Identity of the Tetramer Subunits and Interaction with Tropolone. *Biochemistry* **50**, 5477–5486 (2011).
84. Gasparetti, C. Biochemical and structural characterisation of the copper containing oxidoreductases

- catechol oxidase, tyrosinase, and laccase from ascomycete fungi. *Science* **16**, 16-46, (2012).
85. Solomon, E. I., Sundaram, U. M. & Machonkin, T. E. Multicopper Oxidases and Oxygenases. *Chem. Rev.* **96**, 2563–2606 (1996).
  86. Fontecave, M. & Pierre, J.-L. Oxidations by copper metalloenzymes and some biomimetic approaches. *Coord. Chem. Rev.* **170**, 125–140 (1998).
  87. Angkawidjaja, C. & Kanaya, S. Family I.3 lipase: bacterial lipases secreted by the type I secretion system. *Cell. Mol. Life Sci.* **63**, 2804–2817 (2006).
  88. Singh, A. K. & Mukhopadhyay, M. Overview of fungal lipase: a review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **166**, 486–520 (2012).
  89. Hernández-Rodríguez, B., Córdova, J., Bárzana, E. & Favela-Torres, E. Effects of organic solvents on activity and stability of lipases produced by thermotolerant fungi in solid-state fermentation. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **61**, 136–142 (2009).
  90. Derewenda, Z. S., Derewenda, U. & Dodson, G. G. The crystal and molecular structure of the *Rhizomucor miehei* triacylglyceride lipase at 1.9 Å resolution. *J. Mol. Biol.* **227**, 818–39 (1992).
  91. Gupta, R., Gupta, N. & Rathi, P. Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **64**, 763–81 (2004).
  92. Jaeger, K.-E., Dijkstra, B. W. & Reetz, M. T. Bacterial Biocatalysts: Molecular Biology, Three-Dimensional Structures, and Biotechnological Applications of Lipases. *Annu. Rev. Microbiol.* **53**, 315–351 (1999).
  93. Ollis, D. L. *et al.* The alpha/beta hydrolase fold. *Protein Eng.* **5**, 197–211 (1992).
  94. Schmid, R. D. & Verger, R. Lipases: Interfacial Enzymes with Attractive Applications. *Angew. Chemie Int. Ed.* **37**, 1608–1633 (1998).
  95. Pleiss, J., Fischer, M. & Schmid, R. D. Anatomy of lipase binding sites: the scissile fatty acid binding site. *Chem. Phys. Lipids* **93**, 67–80 (1998).
  96. Bornscheuer, U. T. & Kazlauskas, R. J. Catalytic Promiscuity in Biocatalysis: Using Old Enzymes to Form New Bonds and Follow New Pathways. *Angew. Chemie Int. Ed.* **43**, 6032–6040 (2004).
  97. Klibanov, A. Enzymatic catalysis in anhydrous organic solvents. *Trends Biochem. Sci.* **14**, 141–144 (1989).
  98. Bornscheuer, U. T. & Kazlauskas, R. J. Hydrolases in organic synthesis: regio- and stereoselective biotransformations. (Wiley-VCH, 2006).
  99. Klibanov, A. M. Improving enzymes by using them in organic solvents. *Nature* **409**, 241–246 (2001).
  100. Thomas, S. M., DiCosimo, R. & Nagarajan, V. Biocatalysis: applications and potentials for the chemical industry. *Trends Biotechnol.* **20**, 238–242 (2002).
  101. Stinson, S. C. Chiral Drugs. *Chem. Eng. News* **73**, 44–546274 (1995).
  102. Rasor, J. P. & Voss, E. Enzyme-catalyzed processes in pharmaceutical industry. *Appl. Catal. A Gen.* **221**, 145–158 (2001).
  103. Liese, A., Seelbach, K., Wandrey, C. Industrial biotransformations. (Wiley-VCH, 2008).
  104. Hari Krishna, S. & Karanth, N. G. Lipases And Lipase-Catalysed esterification reactions in non aqueous media. *Catal. Rev.* **44**, 499–591 (2002).
  105. Kobayashi, S. Enzymatic polymerization: A new method of polymer synthesis. *J. Polym. Sci. Part A Polym. Chem.* **37**, 3041–3056 (1999).
  106. Holmberg, K. Novel surfactants: preparation, applications, and biodegradability. (M. Dekker, 2003).
  107. Persson, M., Wehtje, E. & Adlercreutz, P. Factors Governing the Activity of Lyophilised and

- Immobilised Lipase Preparations in Organic Solvents. *ChemBioChem* **3**, 566-571 (2002).
108. Roy, I. & Gupta, M. N. Freeze-drying of proteins: some emerging concerns. *Biotechnol. Appl. Biochem.* **39**, 165-177 (2004).
  109. Cirino, P. C. & Arnold, F. H. Protein engineering of oxygenases for biocatalysis. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **6**, 130-135 (2002).
  110. Krishna, S. H. Developments and trends in enzyme catalysis in nonconventional media. *Biotechnol. Adv.* **20**, 239-267 (2002).
  111. Bell, G. *et al.* Methods for Measurement and Control of Water in Nonaqueous Biocatalysis in Enzymes in Nonaqueous Solvents 105-126 (Humana Press 2001).
  112. Petersson, A. E. V., Adlercreutz, P. & Mattiasson, B. A water activity control system for enzymatic reactions in organic media. *Biotechnol. Bioeng.* **97**, 235-241 (2007).
  113. Zacharis, E., Omar, I. C., Partridge, J., Robb, D. A. & Halling, P. J. Selection of salt hydrate pairs for use in water control in enzyme catalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **55**, 367-374 (1997).
  114. Guo, Z. & Xu, X. Lipase-catalyzed glycerolysis of fats and oils in ionic liquids: a further study on the reaction system. *Green Chem.* **8**, 54 (2006).
  115. Laane, C., Boeren, S., Vos, K. & Veeger, C. Rules for optimization of biocatalysis in organic solvents. *Biotechnol. Bioeng.* **30**, 81-87 (1987).
  116. Azevedo, A. M., Prazeres, D. M. ., Cabral, J. M. . & Fonseca, L. P. Stability of free and immobilised peroxidase in aqueous-organic solvents mixtures. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **15**, 147-153 (2001).
  117. Hazarika, S., Goswami, P., Dutta, N. N. & Hazarika, A. K. Ethyl oleate synthesis by Porcine pancreatic lipase in organic solvents. *Chem. Eng. J.* **85**, 61-68 (2002).
  118. Doukyu, N. & Ogino, H. Organic solvent-tolerant enzymes. *Biochem. Eng. J.* **48**, 270-282 (2010).
  119. Martinek, K., Semenov, A. N. & Berezin, I. V. Enzymatic synthesis in biphasic aqueous-organic systems. I. Chemical equilibrium shift. *Biochim. Biophys. Acta* **658**, 76-89 (1981).
  120. Ohya, Y., Miyaoka, J. & Ouchi, T. Recruitment of enzyme activity in albumin by molecular imprinting. *Macromol. Rapid Commun.* **17**, 871-874 (1996).
  121. Lozano, P., deDiego, T., Gmouh, S., Vaultier, M. & Iborra, J. L. Criteria to Design Green Enzymatic Processes in Ionic Liquid/Supercritical Carbon Dioxide Systems. *Biotechnol. Prog.* **20**, 661-669 (2004).
  122. Réjasse, B. *et al.* Influence of microwave radiation on free *Candida antarctica* lipase B activity and stability. *Org. Biomol. Chem.* **4**, 3703-3707 (2006).
  123. Chang, S.-W., Shaw, J.-F., Shieh, C.-H. & Shieh, C.-J. Optimal Formation of Hexyl Laurate by Lipozyme IM-77 in Solvent-free System. *J. Agric. Food Chem.* **54**, 7125-7129 (2006).
  124. Alves, J. R. S., Fonseca, L. P., Ramalho, M. T. & Cabral, J. M. S. Optimisation of penicillin acylase extraction by AOT/isooctane reversed micellar systems. *Biochem. Eng. J.* **15**, 81-86 (2003).
  125. Pavlidis, I. V., Tzafestas, K. & Stamatis, H. Water-in-ionic liquid microemulsion-based organogels as novel matrices for enzyme immobilization. *Biotechnol. J.* **5**, 805-812 (2010).
  126. Nucci, N. V, Pometun, M. S. & Wand, A. J. Site-resolved measurement of water-protein interactions by solution NMR. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 245-249 (2011).
  127. Sheldon, R. *et al.* Catalytic reactions in ionic liquids. *Chem. Commun.* **3**, 2399-2407 (2001).
  128. Katsoura, M. H., Polydera, A. C., Tsironis, L. D. & Petraki, M. P. Efficient enzymatic preparation of hydroxycinnamates in ionic liquids enhances their antioxidant effect on lipoproteins oxidative modification. **26**, (2009).



129. Cantone, S. *et al.* Biocatalysis in non-conventional media—ionic liquids, supercritical fluids and the gas phase. *Green Chem.* **9**, 954 (2007).
130. Imperato, G., König, B. & Chiappe, C. Ionic Green Solvents from Renewable Resources. *European J. Org. Chem.* **2007**, 1049–1058 (2007).
131. Seddon, K. R. Ionic Liquids for Clean Technology. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **68**, 351–356 (1997).
132. Chiappe, C. & Pieraccini, D. Ionic liquids: solvent properties and organic reactivity. *J. Phys. Org. Chem.* **18**, 275–297 (2005).
133. Kölle, P. & Dronskowski, R. Hydrogen Bonding in the Crystal Structures of the Ionic Liquid Compounds Butyldimethylimidazolium Hydrogen Sulfate, Chloride, and Chloroferrate (II,III). *Inorg. Chem.* **43**, 2803–2809 (2004).
134. Ngo, H. L., LeCompte, K., Hargens, L. & McEwen, A. B. Thermal properties of imidazolium ionic liquids. *Thermochim. Acta* **357**, 97–102 (2000).
135. Okoturo, O. O. & VanderNoot, T. J. Temperature dependence of viscosity for room temperature ionic liquids. *J. Electroanal. Chem.* **568**, 167–181 (2004).
136. Carda-Broch, S., Berthod, A. & Armstrong, D. W. Solvent properties of the 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate ionic liquid. *Anal. Bioanal. Chem.* **375**, 191–199 (2003).
137. Wilkes, J. Properties of ionic liquid solvents for catalysis. *J. Mol. Catal. A Chem.* **214**, 11–17 (2004).
138. Reichardt, C. *et al.* Polarity of ionic liquids determined empirically by means of solvatochromic pyridinium N-phenolate betaine dyes. *Green Chem.* **7**, 339–351 (2005).
139. Wakai, C. Oleinikova A, Ott M, Weingärtner H. How Polar Are Ionic Liquids? Determination of the Static Dielectric Constant of an Imidazolium-based Ionic Liquid by Microwave Dielectric Spectroscopy. *J. Phys. Chem.* **109**, 17028–17030 (2005).
140. Hiroyuki Tokuda, Seiji Tsuzuki, Md. Abu Bin Hasan Susan, Kikuko Hayamizu and Masayoshi Watanabe, How Ionic Are Room-Temperature Ionic Liquids? An Indicator of the Physicochemical Properties. *J. Phys. Chem.* **110**, 19593–19600 (2006).
141. Smiglak, M. *et al.* Combustible ionic liquids by design: is laboratory safety another ionic liquid myth? *Chem. Commun.* **5**, 2554 (2006).
142. Fukaya, Y., Iizuka, Y., Sekikawa, K. & Ohno, H. Bio ionic liquids: room temperature ionic liquids composed wholly of biomaterials. *Green Chem.* **9**, 1155 (2007).
143. Park, S. & Kazlauskas, R. J. Biocatalysis in ionic liquids – advantages beyond green technology. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 432–437 (2003).
144. Bonhôte, P., Dias, A.-P., Papageorgiou, N., Kalyanasundaram, K. & Grätzel, M. Hydrophobic, Highly Conductive Ambient-Temperature Molten Salts. *Inorg. Chem.* **35**, 1168–1178 (1996).
145. Cammarata, L. *et al.* Molecular states of water in room temperature ionic liquids *Phys. Chem. Chem. Phys.* **3**, 5192–5200 (2001).
146. Lynnette A. Blanchard, Zhiyong Gu, & Brennecke, J. F. High-Pressure Phase Behavior of Ionic Liquid/CO<sub>2</sub> Systems. *J. Phys. Chem.* **105**, 2437–2444 (2001).
147. Walden P. Molecular Weights and Electrical Conductivity of Several Fused Salts. *Bull. Russ. Acad. Sci.* 405–422 (1914).
148. Charles Graenacher. Cellulose solution US 1943176 A. (1931).
149. Wilkes, J. S. *et al.* Air and water stable 1-ethyl-3-methylimidazolium based ionic liquids. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* **98**, 965 (1992).
150. Wilkes, J. S. A short history of ionic liquids—from molten salts to neoteric solvents. *Green Chem.* **4**, 73–80 (2002).

151. Gorke, J., Srienc, F. & Kazlauskas, R. Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **15**, 40–53 (2010).
152. Pham, T. P. T., Cho, C.W. & Yun, Y.S. Environmental fate and toxicity of ionic liquids: a review. *Water Res.* **44**, 352–72 (2010).
153. Frade, R. F. & Afonso, C. A. Impact of ionic liquids in environment and humans: An overview. *Hum. Exp. Toxicol.* **29**, 1038–1054 (2010).
154. Egorova, K. S. & Ananikov, V. P. Toxicity of Ionic Liquids: Eco(cyto)activity as Complicated, but Unavoidable Parameter for Task-Specific Optimization. *ChemSusChem* **7**, 336–360 (2014).
155. Stock, F. *et al.* Effects of ionic liquids on the acetylcholinesterase – a structure–activity relationship consideration. *Green Chem.* **6**, 286–290 (2004).
156. Matzke, M. *et al.* The influence of anion species on the toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium ionic liquids observed in an (eco)toxicological test battery. *Green Chem.* **9**, 1198 (2007).
157. Stolte, S. *et al.* Anion effects on the cytotoxicity of ionic liquids. *Green Chem.* **8**, 621 (2006).
158. Gathergood, N., Garcia, M. T. & Scammells, P. J. Biodegradable ionic liquids: Part I. Concept, preliminary targets and evaluation. *Green Chem.* **6**, 166-175 (2004).
159. Garcia, M. T., Gathergood, N. & Scammells, P. J. Biodegradable ionic liquids : Part II. Effect of the anion and toxicology. *Green Chem.* **7**, 9-14 (2005).
160. Gouveia, W. *et al.* Toxicity of ionic liquids prepared from biomaterials. *Chemosphere* **104**, 51–56 (2014).
161. Magnuson, D. K., Bodley, J. W. & Evans, D. F. The activity and stability of alkaline phosphatase in solutions of water and the fused salt ethylammonium nitrate. *J. Solution Chem.* **13**, 583–587 (1984).
162. Cull, S. G., Holbrey, J. D., Vargas-Mora, V., Seddon, K. R. & Lye, G. J. Room-temperature ionic liquids as replacements for organic solvents in multiphase bioprocess operations. *Biotechnol. Bioeng.* **69**, 227–233 (2000).
163. Erbedinger, M., Mesiano, A. J. & Russell, A. J. Enzymatic Catalysis of Formation of Z-Aspartame in Ionic Liquid - An Alternative to Enzymatic Catalysis in Organic Solvents. *Biotechnol. Prog.* **16**, 1129–1131 (2000).
164. Madeira Lau, R., van Rantwijk, F., Seddon, K. R. & Sheldon, R. Lipase-catalyzed reactions in ionic liquids. *Org. Lett.* **2**, 4189–91 (2000).
165. Sheldon, R. A. Biocatalysis and Biomass Conversion in Alternative Reaction Media. *Chem. - A Eur. J.* **1**–17 (2016).
166. Kragl, U., Eckstein, M. & Kaftzik, N. Enzyme catalysis in ionic liquids. *Curr. Opin. Biotechnol.* **13**, 565–571 (2002).
167. Bica, K., Deetlefs, M., Schröder, C. & Seddon, K. R. Polarisabilities of alkylimidazolium ionic liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 2703-2711 (2013).
168. Park, S. & Kazlauskas, R. J. Improved Preparation and Use of Room-Temperature Ionic Liquids in Lipase-Catalyzed Enantio-and Regioselective Acylations. *J. Org.Chem.* **66**, 8395-8401 (2001).
169. Mutschler, J. *et al.* Ionic liquid-coated immobilized lipase for the synthesis of methylglucose fatty acid esters. *Green Chem.* **11**, 1793-1800 (2009).
170. Lozano, P., de Diego, T., Guegan, J. P., Vaultier, M. & Iborra, J. L. Stabilization of alpha-chymotrypsin by ionic liquids in transesterification reactions. *Biotechnol. Bioeng.* **75**, 563–569 (2001).
171. Basso, A., Cantone, S., Linda, P. & Ebert, C. Stability and activity of immobilised penicillin G amidase in ionic liquids at controlled  $a_w$ . *Green Chem.* **7**, 671-676 (2005).
172. Zhao, H. *et al.* Effect of ionic liquid properties on lipase stabilization under microwave irradiation. *J.*

- Mol. Catal. B Enzym.* **57**, 149–157 (2009).
173. Flieger, J., Czajkowska-Żelazko, A., Rządowska, M., Szacoń, E. & Matusiuk, D. Usefulness of reversed-phase HPLC enriched with room temperature imidazolium based ionic liquids for lipophilicity determination of the newly synthesized analgesic active urea derivatives. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **66**, 58–67 (2012).
  174. Zhao, H. Effect of ions and other compatible solutes on enzyme activity and its implication for biocatalysis using ionic liquids. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **37**, 16–25 (2005).
  175. Constantinescu, D., Weingärtner, H. & Herrmann, C. Protein denaturation by ionic liquids and the Hofmeister series: a case study of aqueous solutions of ribonuclease A. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **46**, 8887–8889 (2007).
  176. Zhao, H. *et al.* Effect of kosmotropicity of ionic liquids on the enzyme stability in aqueous solutions. *Bioorg. Chem.* **34**, 15–25 (2006).
  177. Gao, W.-W., Zhang, F.-X., Zhang, G.-X. & Zhou, C.-H. Key factors affecting the activity and stability of enzymes in ionic liquids and novel applications in biocatalysis. *Biochem. Eng. J.* **99**, 67–84 (2015).
  178. Lai, J.-Q. *et al.* Specific ion effects of ionic liquids on enzyme activity and stability. *Green Chem.* **13**, 1860–1868 (2011).
  179. Zhao, H. & Song, Z. Nuclear magnetic relaxation of water in ionic-liquid solutions: determining the kosmotropicity of ionic liquids and its relationship with the enzyme enantioselectivity. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **82**, 304–312 (2007).
  180. Zhao, H. Are ionic liquids kosmotropic or chaotropic? An evaluation of available thermodynamic parameters for quantifying the ion kosmotropicity of ionic liquids. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **81**, 877–891 (2006).
  181. Zhao, H. Viscosity B-coefficients and standard partial molar volumes of amino acids, and their roles in interpreting the protein (enzyme) stabilization. *Biophys. Chem.* **122**, 157–183 (2006).
  182. Zhao, H., Campbell, S., Solomon, J., Song, Z.-Y. & Olubajo, O. Improving the Enzyme Catalytic Efficiency Using Ionic Liquids with Kosmotropic Anions. *Chinese J. Chem.* **24**, 580–584 (2006).
  183. Curto, V. F. *et al.* Probing the specific ion effects of biocompatible hydrated choline ionic liquids on lactate oxidase biofunctionality in sensor applications. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **16**, 1841–1849 (2014).
  184. Baker, S. N. *et al.* Fluorescence energy transfer efficiency in labeled yeast cytochrome c: a rapid screen for ion biocompatibility in aqueous ionic liquids. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 3642–3644 (2011).
  185. Kumar, A. & Venkatesu, P. A comparative study of myoglobin stability in the presence of Hofmeister anions of ionic liquids and ionic salts. *Process Biochem.* **49**, 2158–2169 (2014).
  186. Li, N., Du, W., Huang, Z., Zhao, W. & Wang, S. Effect of imidazolium ionic liquids on the hydrolytic activity of lipase. *Chinese J. Catal.* **34**, 769–780 (2013).
  187. Shipovskov, S., Gunaratne, H. Q. N., Seddon, K. R. & Stephens, G. Catalytic activity of laccases in aqueous solutions of ionic liquids. *Green Chem.* **10**, 806–810 (2008).
  188. Goldfeder, M., Egozy, M., Shuster Ben-Yosef, V., Adir, N. & Fishman, A. Changes in tyrosinase specificity by ionic liquids and sodium dodecyl sulfate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **97**, 1953–1961 (2013).
  189. Dupont, J. On the solid, liquid and solution structural organization of imidazolium ionic liquids. *J. Braz. Chem. Soc.* **15**, 341–350 (2004).
  190. Schröder, U. *et al.* Water-induced accelerated ion diffusion: voltammetric studies in 1-methyl-3-[2,6-(S)-dimethylocten-2-yl]imidazolium tetrafluoroborate, 1-butyl-3-methylimidazolium tetrafluoroborate and hexafluorophosphate ionic liquids. *New J. Chem.* **24**, 1009–1015 (2000).

191. Lozano, P., De Diego, T., Gmouh, S., Vaultier, M. & Iborra, J. L. Dynamic structure–function relationships in enzyme stabilization by ionic liquids. *Biocatal. Biotransformation* **23**, 169–176 (2005).
192. Irimescu, R. & Kato, K. Investigation of ionic liquids as reaction media for enzymatic enantioselective acylation of amines. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **30**, 189–194 (2004).
193. Lee, S. H., Koo, Y.-M. & Ha, S. H. Influence of ionic liquids under controlled water activity and low halide content on lipase activity. *Korean J. Chem. Eng.* **25**, 1456–1462 (2008).
194. Fehér, E., Major, B., Bélafi-Bakó, K. & Gubicza, L. On the background of enhanced stability and reusability of enzymes in ionic liquids. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 1624–1627 (2007).
195. Zhao, H. Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids—a review. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **85**, 891–907 (2010).
196. Jared L. Anderson, Jie Ding, Thomas Welton & Daniel W. Armstrong. Characterizing Ionic Liquids On the Basis of Multiple Solvation Interactions. *J. Am. Chem. Soc.* **124**, 14247–14254 (2002).
197. Lou, W.Y., Zong, M.H., Smith, T. J., Wu, H. & Wang, J.-F. Impact of ionic liquids on papain: an investigation of structure-function relationships. *Green Chem.* **8**, 509–512 (2006).
198. Katsoura, M. H., Polydera, A. C., Katapodis, P., Kolisis, F. N. & Stamatis, H. Effect of different reaction parameters on the lipase-catalyzed selective acylation of polyhydroxylated natural compounds in ionic liquids. *Process Biochem.* **42**, 1326–1334 (2007).
199. Patel, R., Kumari, M. & Khan, A. B. Recent advances in the applications of ionic liquids in protein stability and activity: A review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **172**, 3701–3720 (2014).
200. Galonde, N. *et al.* Use of ionic liquids for biocatalytic synthesis of sugar derivatives. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **87**, 451–471 (2012).
201. Wang, J., Sun, G.X., Yu, L., Wu, F.A. & Guo, X.J. Enhancement of the selective enzymatic biotransformation of rutin to isoquercitrin using an ionic liquid as a co-solvent. *Bioresour. Technol.* **128**, 156–163 (2013).
202. Yang, Z. *et al.* Importance of the ionic nature of ionic liquids in affecting enzyme performance. *J. Biochem.* **145**, 355–64 (2009).
203. De Diego, T., Lozano, P., Gmouh, S., Vaultier, M. & Iborra, J. L. Understanding structure-stability relationships of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *Biomacromolecules* **6**, 1457–1464 (2005).
204. Turner, M. B., Spear, S. K., Huddleston, J. G., Holbrey, J. D. & Rogers, R. D. Ionic liquid salt-induced inactivation and unfolding of cellulase from *Trichoderma reesei*. *Green Chem.* **5**, 443–447 (2003).
205. Shu, Y., Liu, M., Chen, S., Chen, X. & Wang, J. New Insight into Molecular Interactions of Imidazolium Ionic Liquids with Bovine Serum Albumin. *J. Phys. Chem. B* **115**, 12306–12314 (2011).
206. Wei, W. & Danielson, N. D. Fluorescence and circular dichroism spectroscopy of cytochrome c in alkylammonium formate ionic liquids. *Biomacromolecules* **12**, 290–297 (2011).
207. Lau, R. M. *et al.* Dissolution of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids : effects on structure and activity. *Green Chem.* **6**, 483–487 (2004).
208. Fujita, K. *et al.* Solubility and stability of cytochrome c in hydrated ionic liquids: effect of oxo acid residues and kosmotropicity. *Biomacromolecules* **8**, 2080–2086 (2007).
209. Fujita, K., MacFarlane, D. R. & Forsyth, M. Protein solubilising and stabilising ionic liquids. *Chem. Commun.* **70**, 4804–4806 (2005).
210. Sate, D. *et al.* Enzyme aggregation in ionic liquids studied by dynamic light scattering and small angle neutron scattering. *Green Chem.* **9**, 859–867 (2007).
211. Baker, G. a. & Heller, W. T. Small-angle neutron scattering studies of model protein denaturation in aqueous solutions of the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium chloride. *Chem. Eng. J.* **147**, 6–12 (2009).

212. Vrikkis, R. M., Fraser, K. J., Fujita, K., MacFarlane, D. R. & Elliott, G. D. Biocompatible Ionic Liquids: A New Approach for Stabilizing Proteins in Liquid Formulation. *J. Biomech. Eng.* **131**, 074514 (2009).
213. Summers, C. A. & Flowers, R. A. Protein renaturation by the liquid organic salt ethylammonium nitrate. *Protein Sci.* **9**, 2001–2008 (2000).
214. Attri, P., Venkatesu, P. & Kumar, A. Activity and stability of  $\alpha$ -chymotrypsin in biocompatible ionic liquids: enzyme refolding by triethyl ammonium acetate. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 2788–2796 (2011).
215. Gelamo, E. L. & Tabak, M. Spectroscopic studies on the interaction of bovine (BSA) and human (HSA) serum albumins with ionic surfactants. *Spectrochim. Acta Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* **56**, 2255–2271 (2000).
216. Dang, L.P. *et al.* Ionic Liquid-Induced Structural and Activity Changes in Hen Egg White Lysozyme. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **169**, 290–300 (2013).
217. Nakul C. Maiti, Mihaela M. Apetri, Michael G. Zagorski, Paul R. Carey & Vernon E. Anderson. Raman Spectroscopic Characterization of Secondary Structure in Natively Unfolded Proteins:  $\alpha$ -synuclein. *J Am Chem Soc.* **126**, 2399-2408 (2004).
218. Weaver, K. D. *et al.* Structure and function of proteins in hydrated choline dihydrogen phosphate ionic liquid. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **14**, 790-801 (2012).
219. Attri, P., Venkatesu, P. & Kumar, A. Activity and stability of  $\alpha$ -chymotrypsin in biocompatible ionic liquids: enzyme refolding by triethyl ammonium acetate. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **13**, 2788–2796 (2011).
220. W. A. Bowman, M. Rubinstein & Tan, J. S. Polyelectrolyte–Gelatin Complexation: Light-Scattering Study. *Macromolecules* **30**, 3262–3270 (1997).
221. Yamamoto, E., Yamaguchi, S. & Nagamune, T. Protein Refolding by N-Alkylpyridinium and N-Alkyl-N-methylpyrrolidinium Ionic Liquids. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **164**, 957–967 (2011).
222. Ghandi, K. A Review of Ionic Liquids , Their Limits and Applications. *Green Sustain. Chem.* **4**, 44–53 (2014).
223. Moriel, P. *et al.* Synthesis, characterization, and catalytic activity of ionic liquids based on biosources. *Tetrahedron Lett.* **51**, 4877–4881 (2010).
224. Markusson, H. *et al.* Prediction of macroscopic properties of protic ionic liquids by ab initio calculations. *J. Phys. Chem. A* **111**, 8717–8723 (2007).
225. Greaves, T. L. & Drummond, C. J. Protic ionic liquids: Properties and applications. *Chem. Rev.* **108**, 206–237 (2008).
226. Pretti, C. *et al.* Acute toxicity of ionic liquids for three freshwater organisms: Pseudokirchneriella subcapitata, Daphnia magna and Danio rerio. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* **72**, 1170–1176 (2009).
227. Tzani, A. *et al.* Synthesis and structure-properties relationship studies of biodegradable hydroxylammonium-based protic ionic liquids. *J. Mol. Liq.* **224**, 366–376 (2016).
228. Khurana, J. M. & Kumar, S. Ionic liquid: an efficient and recyclable medium for the synthesis of octahydroquinazolinone and biscoumarin derivatives. *Monatshefte für Chemie - Chem. Mon.* **141**, 561–564 (2010).
229. Tzani, A. *et al.* Synthesis of biscoumarins using recyclable and biodegradable task-specific ionic liquids. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **1**, 1180–1185 (2013).
230. Yue, C., Fang, D., Liu, L. & Yi, T.-F. Synthesis and application of task-specific ionic liquids used as catalysts and/or solvents in organic unit reactions. *J. Mol. Liq.* **163**, 99–121 (2011).
231. Durand, E., Lecomte, J. & Villeneuve, P. Deep eutectic solvents : Synthesis , application , and focus

- on lipase-catalyzed reactions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **115**, 379–385 (2013).
232. Abbott, A. P., Capper, G., Davies, D. L., Rasheed, R. K. & Tambyrajah, V. Novel solvent properties of choline chloride/urea mixtures. *Chem. Commun.* **1**, 70–71 (2003).
  233. Zhang, Q., De Oliveira Vigier, K., Royer, S. & Jérôme, F. Deep eutectic solvents: syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rev.* **41**, 7108–46 (2012).
  234. Durand, E., Lecomte, J. & Villeneuve, P. Deep eutectic solvents: Synthesis, application, and focus on lipase-catalyzed reactions. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **115**, 379–385 (2013).
  235. Gorke, J. T., Srienc, F. & Kazlauskas, R. J. Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. *Chem. Commun.* **10**, 1235–1237 (2008).
  236. Abbott, A. P., Capper, G. & Gray, S. Design of Improved Deep Eutectic Solvents Using Hole Theory. *ChemPhysChem.* **7**, 803–806 (2006).
  237. Abbott, A. P., Boothby, D., Capper, G., Davies, D. L. & Rasheed, R. K. Deep eutectic solvents formed between choline chloride and carboxylic acids: versatile alternatives to ionic liquids. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 9142–9147 (2004).
  238. Maugeri, Z. & Domínguez de María, P. Novel choline-chloride-based deep-eutectic-solvents with renewable hydrogen bond donors: levulinic acid and sugar-based polyols. *RSC Adv.* **2**, 421–425 (2012).
  239. Abbott, A. P. *et al.* Glycerol eutectics as sustainable solvent systems. *Green Chem.* **13**, 82–90 (2011).
  240. Morrison, H. G., Sun, C. C. & Neervannan, S. Characterization of thermal behavior of deep eutectic solvents and their potential as drug solubilization vehicles. *Int. J. Pharm.* **378**, 136–139 (2009).
  241. Mamajanov, I., Engelhart, A. E., Bean, H. D. & Hud, N. V. DNA and RNA in anhydrous media: duplex, triplex, and G-quadruplex secondary structures in a deep eutectic solvent. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **49**, 6310–6314 (2010).
  242. Popescu, A. M., Constantin, V., Cojocaru, A. & Olteanu, M. Electrochemical Behaviour of Copper (II) Chloride in Choline Chloride-urea Deep Eutectic Solvent. *Rev. Chim.* **62**, 206–211 (2011).
  243. Gómez, E., Cojocaru, P., Magagnin, L. & Valles, E. Electrodeposition of Co, Sm and SmCo from a Deep Eutectic Solvent. *J. Electroanal. Chem.* **658**, 18–24 (2011).
  244. Abbott, A. P., Capper, G., McKenzie, K. J. & Ryder, K. S. Electrodeposition of zinc-tin alloys from deep eutectic solvents based on choline chloride. *J. Electroanal. Chem.* **599**, 288–294 (2007).
  245. Li, X., Hou, M., Han, B., Wang, X. & Zou, L. Solubility of CO<sub>2</sub> in a Choline Chloride + Urea Eutectic Mixture. *J. Chem. Eng. Data* **53**, 548–550 (2008).
  246. Shahbaz, K., Mjalli, F. S., Hashim, M. A. & AlNashef, I. M. Using deep eutectic solvents based on methyl triphenyl phosphonium bromide for the removal of glycerol from palm-oil-based biodiesel. *Energy and Fuels* **25**, 2671–2678 (2011).
  247. Abbott, A. P. *et al.* Extraction of glycerol from biodiesel into a eutectic based ionic liquid. *Green Chem.* **9**, 868–872 (2007).
  248. Shahbaz, K., Mjalli, F. S., Hashim, M. A. & Alnashef, I. M. Eutectic solvents for the removal of residual palm oil-based biodiesel catalyst. *Sep. Purif. Technol.* **81**, 216–222 (2011).
  249. Phadtare, S. B. *et al.* Halogenation reactions in biodegradable solvent: Efficient bromination of substituted 1-aminoanthra-9,10-quinone in deep eutectic solvent (choline chloride : urea). *Green Chem.* **12**, 458–462 (2010).
  250. Singh, B., Lobo, H. & Shankarling, G. Selective N-alkylation of aromatic primary amines catalyzed by bio-catalyst or deep eutectic solvent. *Catal. Letters* **141**, 178–182 (2011).
  251. Imperato, G. *et al.* Low melting sugar–urea–salt mixtures as solvents for organic reactions—estimation of polarity and use in catalysis. *Green Chem.* **8**, 1051–1055 (2006).

252. Ilgen, F. & König, B. Organic reactions in low melting mixtures based on carbohydrates and l-carnitine—a comparison. *Green Chem.* **11**, 848-854 (2009).
253. Azizi, N. & Gholibeglo, E. A highly efficient synthesis of dithiocarbamates in green reaction media. *RSC Adv.* **2**, 7413-7416 (2012).
254. Lindberg, D., de la Fuente Revenga, M. & Widersten, M. Deep eutectic solvents (DESs) are viable cosolvents for enzyme-catalyzed epoxide hydrolysis. *J. Biotechnol.* **147**, 169–171 (2010).
255. Zhao, H., Baker, A. & Holmes, S. New eutectic ionic liquids for lipase activation and enzymatic preparation of biodiesel. *Org. Biomol. Chem.* **9**, 1908–1916 (2011).
256. Durand, E. *et al.* Evaluation of deep eutectic solvent–water binary mixtures for lipase-catalyzed lipophilization of phenolic acids. *Green Chem.* **15**, 2275-2282 (2013).
257. Maugeri, Z., Leitner, W. & Domínguez De María, P. Chymotrypsin-catalyzed peptide synthesis in deep eutectic solvents. *European J. Org. Chem.* **2013**, 4223–4228 (2013).
258. Zhao, H., Zhang, C. & Crittle, T. D. Choline-based deep eutectic solvents for enzymatic preparation of biodiesel from soybean oil. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **85-86**, 243–247 (2013).
259. Datta, S., Christena, L. R. & Rajaram, Y. R. S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech* **3**, 1–9 (2013).
260. Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F. & Wahab, R. A. An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnol. Biotechnol. Equip.* **29**, 205–220 (2015).
261. Brena, B. M. & Batista-Viera, F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey in: Immobilization of Enzymes and Cells, pp. 15–30 (Springer Protocols 2006).
262. Liese, A. & Hilterhaus, L. Evaluation of immobilized enzymes for industrial applications. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 6236-6249 (2013).
263. Hanefeld, U., Gardossi, L. & Magner, E. Understanding enzyme immobilisation. *Chem. Soc. Rev.* **38**, 453–468 (2009).
264. Sheldon, R. A & van Pelt, S. Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 6223–6235 (2013).
265. Sheldon, R. A. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs): stable and recyclable biocatalysts. *Biochem. Soc. Trans.* **35**, 1583–1587 (2007).
266. Vafiadi, C., Topakas, E., Nahmias, V. R., Faulds, C. B. & Christakopoulos, P. Feruloyl esterase-catalysed synthesis of glycerol sinapate using ionic liquids mixtures. *J. Biotechnol.* **139**, 124–129 (2009).
267. van Rantwijk, F., Secundo, F. & Sheldon, R. A. Structure and activity of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *Green Chem.* **8**, 282–286 (2006).
268. Xu, D.Y., Yang, Y. & Yang, Z. Activity and stability of cross-linked tyrosinase aggregates in aqueous and non aqueous media. *J. Biotechnol.* **152**, 30–36 (2011).
269. Sun, J. *et al.* Multi-enzyme co-embedded organic-inorganic hybrid nanoflowers: synthesis and application as a colorimetric sensor. *Nanoscale* **6**, 255–62 (2014).
270. Wang, R., Tian, Z. & Chen, L. Nano-encapsulations liberated from barley protein microparticles for oral delivery of bioactive compounds. *Int. J. Pharm.* **406**, 153–162 (2011).
271. Prakasham, R. S. *et al.* Nickel-Impregnated Silica Nanoparticle Synthesis and Their Evaluation for Biocatalyst Immobilization. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **160**, 1888–1895 (2010).
272. Patila, M. *et al.* Graphene oxide derivatives with variable alkyl chain length and terminal functional groups as supports for stabilization of cytochrome c. *Int. J. Biol. Macromol.* **84**, 227–235 (2016).

273. Yu, Y. *et al.* Self-assembled enzyme-inorganic hybrid nanoflowers and their application to enzyme purification. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* **130**, 299–304 (2014).
274. Ge, J., Lei, J. & Zare, R. N. Protein–inorganic hybrid nanoflowers. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 428–432 (2012).
275. Wang, L.-B. *et al.* A New Nanobiocatalytic System Based on Allosteric Effect with Dramatically Enhanced Enzymatic Performance. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 1272–1275 (2013).
276. Lin, Z. *et al.* Facile Synthesis of Enzyme-Inorganic Hybrid Nanoflowers and Its Application as a Colorimetric Platform for Visual Detection of Hydrogen Peroxide and Phenol. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **6**, 10775–10782 (2014).
277. Lee, S. W., Cheon, S. A., Kim, M. II & Park, T. J. Organic–inorganic hybrid nanoflowers: types, characteristics, and future prospects. *J. Nanobiotechnology* **13**, 54 (2015).
278. Shi, J. F., Zhang, S. H., Wang, X. L., Yang, C. & Jiang, Z. Y. Preparation and enzymatic application of flower-like hybrid microcapsules through a biomimetic mineralization approach. *J. Mater. Chem. B* **2**, 4289–4296 (2014).
279. Ehrfeld, W., Hessel, V. & Löwe, H. *Microreactors*. (Wiley-VCH Verlag GmbH 2000).
280. Laurenti, E. & dos Santos Vianna Jr., A. Enzymatic microreactors in biocatalysis: history, features, and future perspectives. *Biocatalysis* **1**, 148–165 (2016).
281. Wohlgemuth, R., Plazl, I., Žnidaršič-Plazl, P., Gernaey, K. V. & Woodley, J. M. Microscale technology and biocatalytic processes: opportunities and challenges for synthesis. *Trends Biotechnol.* **33**, 302–314 (2015).
282. Hessel, V., Kralisch, D., Kockmann, N., Noël, T. & Wang, Q. Novel Process Windows for Enabling, Accelerating, and Uplifting Flow Chemistry. *ChemSusChem* **6**, 746–789 (2013).
283. Rao, N. N., Lütz, S., Würges, K. & Minör, D. Continuous Biocatalytic Processes. *Org. Process Res. Dev.* **13**, 607–616 (2009).
284. Itabaiana, I., De Mariz E Miranda, L. S. & De Souza, R. O. M. A. Towards a continuous flow environment for lipase-catalyzed reactions. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **85-86**, 1–9 (2013).
285. García-Verdugo, E., Altava, B., Burguete, M. I., Lozano, P. & Luis, S. V. Ionic liquids and continuous flow processes: a good marriage to design sustainable processes. *Green Chem.* **17**, 2693–2713 (2015).
286. Cvjetko, M. & Žnidaršič-Plazl P. Ionic Liquids: Theory, Properties, New Approaches in: Ionic Liquids: Theory, Properties, New Approaches pp.681-700 (InTech, 2011).
287. Pohar, A., Žnidaršič-Plazl, P. & Plazl, I. Integrated system of a microbioreactor and a miniaturized continuous separator for enzyme catalyzed reactions. *Chem. Eng. J.* **189**, 376–382 (2012).
288. Cvjetko, M., Vorkapić-Furač, J. & Žnidaršič-Plazl, P. Isoamyl acetate synthesis in imidazolium-based ionic liquids using packed bed enzyme microreactor. *Process Biochem.* **47**, 1344–1350 (2012).
289. Wang, J., Gu, S. S., Cui, H. S., Yang, L. Q. & Wu, X. Y. Rapid synthesis of propyl caffeate in ionic liquid using a packed bed enzyme microreactor under continuous-flow conditions. *Bioresour. Technol.* **149**, 367–374 (2013).
290. Wang, J., Gu, S. S., Cui, H. S., Wu, X. Y. & Wu, F. A. A novel continuous flow biosynthesis of caffeic acid phenethyl ester from alkyl caffeate and phenethanol in a packed bed microreactor. *Bioresour. Technol.* **158**, 39–47 (2014).
291. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
292. Espín, J. C., Soler-Rivas, C., Cantos, E., Tomás-Barberán, F. a & Wichers, H. J. Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1187–1193 (2001).



293. Vazquez-Duhalt, R., Westlake, D. W. S. & Fedorak, P. M. Kinetics of chemically modified lignin peroxidase and enzymatic oxidation of aromatic nitrogen-containing compounds. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42**, 675–681 (1995).
294. Khare, S. K. & Nakajima, M. Immobilization of *Rhizopus japonicus* lipase on celite and its application for enrichment of docosahexaenoic acid in soybean oil. *Food Chem.* **68**, 153–157 (2000).
295. Serefoglou, E. *et al.* Smectite Clays as Solid Supports for Immobilization of  $\beta$ -Glucosidase: Synthesis, Characterization, and Biochemical Properties. *Chem. Mater.* **20**, 4106–4115 (2008).
296. Dong, A., Huang, P. & Caughey, W. S. Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry* **29**, 3303–3308 (1990).
297. Schlamadinger, D. E., Kats, D. I., Kim, J. E. & Jolla, L. Quenching of Tryptophan Fluorescence in Unfolded Physical Chemistry Students. *J. Chem. Educ.* **87**, 961–964 (2010).
298. Rehmann, L. *et al.* Measuring the effect of ionic liquids on laccase activity using a simple, parallel method. *Green Chem.* **14**, 725–733 (2012).
299. Laszlo, J. A & Compton, D. L. Comparison of peroxidase activities of hemin, cytochrome c and microperoxidase-11 in molecular solvents and imidazolium-based ionic liquids. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **18**, 109–120 (2002).
300. Bihari, M., Russell, T. P. & Hoagland, D. A. Dissolution and dissolved state of cytochrome c in a neat, hydrophilic ionic liquid. *Biomacromolecules* **11**, 2944–2948 (2010).
301. Patila, M. *et al.* Enhancement of cytochrome c catalytic behaviour by affecting the heme environment using functionalized carbon-based nanomaterials. *Process Biochem.* **48**, 1010–1017 (2013).
302. Tavares, A. P. M., Rodríguez, O. & Macedo, E. A. New Generations of Ionic Liquids Applied to Enzymatic Biocatalysis in: Ionic Liquids-New aspects for the future. pp 538-556 (InTech 2013).
303. López-Pastor, M., Domínguez-Vidal, A., Ayora-Cañada, M. J., Lendl, B. & Valcárcel, M. Enzyme kinetics assay in ionic liquid-based reaction media by means of Raman spectroscopy and multivariate curve resolution. *Microchem. J.* **87**, 93–98 (2007).
304. Lou, W.-Y., Zong, M.-H., Liu, Y.-Y. & Wang, J.-F. Efficient enantioselective hydrolysis of D,L-phenylglycine methyl ester catalyzed by immobilized *Candida antarctica* lipase B in ionic liquid containing systems. *J. Biotechnol.* **125**, 64–74 (2006).
305. Yang, Z. Hofmeister effects: an explanation for the impact of ionic liquids on biocatalysis. *J. Biotechnol.* **144**, 12–22 (2009).
306. Collins, K. D. Ions from the Hofmeister series and osmolytes: effects on proteins in solution and in the crystallization process. *Methods* **34**, 300–311 (2004).
307. Villegas, J. A., Mauk, A. G. & Vazquez-Duhalt, R. A cytochrome c variant resistant to heme degradation by hydrogen peroxide. *Chem. Biol.* **7**, 237–244 (2000).
308. De Diego, T. *et al.* On the nature of ionic liquids and their effects on lipases that catalyze ester synthesis. *J. Biotechnol.* **140**, 234–241 (2009).
309. Hernandez, K., Berenguer-Murcia, A., C. Rodrigues, R. & Fernandez-Lafuente, R. Hydrogen Peroxide in Biocatalysis. A Dangerous Liaison. *Curr. Org. Chem.* **16**, 2652–2672 (2012).
310. Mao, L., Luo, S., Huang, Q. & Lu, J. Horseradish peroxidase inactivation: heme destruction and influence of polyethylene glycol. *Sci. Rep.* **3**, 1-7 (2013).
311. McMurry, J. *Organic chemistry*. pp 921-924 (2008).
312. Secundo, F. *et al.* Can an Inactivating Agent Increase Enzyme Activity in Organic Solvent ? Effects of 18-Crown-6 on Lipase Activity , Enantioselectivity , and Conformation. *Biotechnol. Bioeng.* **97**, 12–18 (2007).
313. Tziaila, A. a *et al.* Lipase immobilization on smectite nanoclays: characterization and application to

- the epoxidation of alpha-pinene. *Bioresour. Technol.* **101**, 1587–1594 (2010).
314. Natalello, A., Ami, D., Brocca, S., Lotti, M. & Doglia, S. M. Secondary structure, conformational stability and glycosylation of a recombinant *Candida rugosa* lipase studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochem. J.* **385**, 511-517 (2005).
  315. Mena, B., Herrero, M., Rives, V., Lavrenko, M. & Eggers, D. K. Favourable influence of hydrophobic surfaces on protein structure in porous organically-modified silica glasses. *Biomaterials* **29**, 2710–2718 (2008).
  316. Pavlidis, I. V. *et al.* Regulation of catalytic behaviour of hydrolases through interactions with functionalized carbon-based nanomaterials. *J. Nanoparticle Res.* **14**, 842 (2012).
  317. Oellerich, S., Wackerbarth, H. & Hildebrandt, P. Conformational equilibria and dynamics of cytochrome c induced by binding of sodium dodecyl sulfate monomers and micelles. *Eur. Biophys. J.* **32**, 599–613 (2003).
  318. Kohno, Y., Nakamura, N. & Ohno, H. Selective Transport of Water-Soluble Proteins from Aqueous to Ionic Liquid Phase via a Temperature-Sensitive Phase Change of These Mixtures. *Aust. J. Chem.* **65**, 1548 (2012).
  319. Fujita, K. *et al.* Unexpected Improvement in Stability and Utility of Cytochrome c by Solution in Biocompatible Ionic Liquids. *Biotechnol Bioeng.* **94**, 1209-1213 (2006).
  320. Hulko, M., Hospach, I., Krasteva, N. & Nelles, G. Cytochrome C Biosensor—A Model for Gas Sensing. *Sensors* **11**, 5968–5980 (2011).
  321. Woody, R. W. & Hsu, M.-C. Origin of the heme Cotton effects in myoglobin and hemoglobin. *J. Am. Chem. Soc.* **93**, 3515–3525 (1971).
  322. Baker, G. A. & Heller, W. T. Small-angle neutron scattering studies of model protein denaturation in aqueous solutions of the ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium chloride. *Chem. Eng. J.* **147**, 6–12 (2009).
  323. Fujita, K. & Ohno, H. Enzymatic activity and thermal stability of metallo proteins in hydrated ionic liquids. *Biopolymers* **93**, 1093–1099 (2010).
  324. Jie Gong, Ping Yao, Hongwei Duan, M. J., Shaohua Gu and & Chunyu, L. Structural Transformation of Cytochrome c and Apo Cytochrome c Induced by Sulfonated Polystyrene. *Biomacromolecules* **4**, 1293-300 (2003).
  325. Thomas, Y. G., Goldbeck, R. a. & Kligler, D. S. Characterization of equilibrium intermediates in denaturant-induced unfolding of ferrous and ferric cytochromes c using magnetic circular dichroism, circular dichroism, and optical absorption spectroscopies. *Biopolym. - Biospectroscopy Sect.* **57**, 29–36 (2000).
  326. Chahbane, N., Lenoir, D., Souabi, S., Collins, T. J. & Schramm, K.-W. Fe<sup>III</sup>-TAML-Catalyzed Green Oxidative Decolorization of Textile Dyes in Wastewater. *CLEAN – Soil, Air, Water* **35**, 459–464 (2007).
  327. Vazquez-Duhalt, R., Semple, K. M., Westlake, D. W. S. & Fedorak, P. M. Effect of water-miscible organic solvents on the catalytic activity of cytochrome c. *Enzyme Microb. Technol.* **15**, 936–943 (1993).
  328. Abadulla, E. *et al.* Decolorization and Detoxification of Textile Dyes with a Laccase from *Trametes hirsuta*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3357–3362 (2000).
  329. Zille, A., Tzanov, T., Gübitz, G. M. & Cavaco-Paulo, A. Immobilized laccase for decolourization of Reactive Black 5 dyeing effluent. *Biotechnol. Lett.* **25**, 1473–1477 (2003).
  330. Christian, V., Shrivastava, R., Shukla, D., Modi, H. & Vyas, B. R. M. Mediator role of veratryl alcohol in the lignin peroxidase-catalyzed oxidative decolorization of Remazol Brilliant Blue R. *Enzyme Microb. Technol.* **36**, 327–332 (2005).

331. Salvachúa, D., Prieto, A., Martínez, Á. T. & Martínez, M. J. Characterization of a novel dye-decolorizing peroxidase (DyP)-type enzyme from *Irpex lacteus* and its application in enzymatic hydrolysis of wheat straw. *Appl. Environ. Microbiol.* **79**, 4316–4324 (2013).
332. Lanzafame, J. M., Muentner, A. A. & Brumbaugh, D. V. The effect of J-aggregate size on photoinduced charge transfer processes for dye-sensitized silver halides. *Chem. Phys.* **210**, 79–89 (1996).
333. Andrew S. Wells, and & Coombe, V. T. On the Freshwater Ecotoxicity and Biodegradation Properties of Some Common Ionic Liquids. *Org. Process Res. Dev.*, **10**, 794–798 (2006).
334. Quijano, G. *et al.* Toxicity and biodegradability of ionic liquids: New perspectives towards whole-cell biotechnological applications. *Chem. Eng. J.* **174**, 27–32 (2011).
335. Lindberg, D., de la Fuente Revenga, M. & Widersten, M. Deep eutectic solvents (DESs) are viable cosolvents for enzyme-catalyzed epoxide hydrolysis. *J. Biotechnol.* **147**, 169–71 (2010).
336. Huang, Z. L., Wu, B. P., Wen, Q., Yang, T. X. & Yang, Z. Deep eutectic solvents can be viable enzyme activators and stabilizers. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **89**, 1975–1981 (2014).
337. Cvjetko Bubalo, M. *et al.* Cholinium-based deep eutectic solvents and ionic liquids for lipase-catalyzed synthesis of butyl acetate. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **122**, 188–198 (2015).
338. Durand, E., Lecomte, J., Baréa, B. & Villeneuve, P. Towards a better understanding of how to improve lipase-catalyzed reactions using deep eutectic solvents based on choline chloride. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **116**, 16–23 (2014).
339. Choi, Y. H. *et al.* Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiol.* **156**, 1701–5 (2011).
340. Durand, E. *et al.* Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida antarctica* B lipase catalyzed reactions. *Process Biochem.* **47**, 2081–2089 (2012).
341. Zhao, H., Baker, G. a & Holmes, S. Protease activation in glycerol-based deep eutectic solvents. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **72**, 163–167 (2011).
342. Wu, B.P., Wen, Q., Xu, H. & Yang, Z. Insights into the impact of deep eutectic solvents on horseradish peroxidase: Activity, stability and structure. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **101**, 101–107 (2014).
343. Shimojo, K. *et al.* Extractive solubilization, structural change, and functional conversion of cytochrome c in ionic liquids via crown ether complexation. *Anal. Chem.* **78**, 7735–7742 (2006).
344. Valusová, E., Svec, P. & Antalík, M. Structural and thermodynamic behavior of cytochrome c assembled with glutathione-covered gold nanoparticles. *J. Biol. Inorg. Chem.* **14**, 621–30 (2009).
345. Ahluwalia, U., Nayeem, S. M. & Deep, S. The non-native conformations of cytochrome c in sodium dodecyl sulfate and their modulation by ATP. *Eur. Biophys. J.* **40**, 259–71 (2011).
346. Ahmad, A., Madhusudanan, K. P. & Bhakuni, V. Trichloroacetic acid and trifluoroacetic acid-induced unfolding of cytochrome c: Stabilization of a native-like folded intermediate. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* **1480**, 201–210 (2000).
347. Das, T. K., Mazumdar, S. & Mitra, S. Characterization of a partially unfolded structure of cytochrome c induced by sodium dodecyl sulphate and the kinetics of its refolding. *Eur. J. Biochem.* **254**, 662–670 (1998).
348. Pavlidis, I. V., Patila, M., Bornscheuer, U. T., Gournis, D. & Stamatis, H. Graphene-based nanobiocatalytic systems: recent advances and future prospects. *Trends Biotechnol.* **32**, 312–20 (2014).
349. Ge, J., Lei, J. & Zare, R. N. Protein–inorganic hybrid nanoflowers. *Nat. Nanotechnol.* **7**, 428–432 (2012).
350. Singh, A. K. & Mukhopadhyay, M. Overview of Fungal Lipase: A Review. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **166**, 486–520 (2012).
351. Papadopoulou, A. a *et al.* Enzymatic hybridization of  $\alpha$ -lipoic acid with bioactive compounds in ionic

- solvents. *Bioresour. Technol.* **136**, 41–48 (2013).
352. de los Ríos, A. P., Hernández-Fernández, F. J., Tomás-Alonso, F., Gómez, D. & Villora, G. Synthesis of flavour esters using free *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *Flavour Fragr. J.* **23**, 319–322 (2008).
  353. van Rantwijk, F., Secundo, F. & Sheldon, R. A. Structure and activity of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *Green Chem.* **8**, 282–286 (2006).
  354. Kleiner, B. & Schörken, U. Native lipase dissolved in hydrophilic green solvents: A versatile 2-phase reaction system for high yield ester synthesis. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* **117**, 167–177 (2015).
  355. Klibanov, A. M. Asymmetric enzymatic oxidoreductions in organic solvents. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**, 427–431 (2003).
  356. Müller, G. H., Lang, A., Seithel, D. R. & Waldmann, H. An Enzyme-Initiated Hydroxylation-Oxidation Carbo Diels-Alder Domino Reaction. *Chem. - A Eur. J.* **4**, 2513–2522 (1998).
  357. Yang, Z., Yue, Y.-J. & Xing, M. Tyrosinase activity in ionic liquids. *Biotechnol. Lett.* **30**, 153–158 (2008).
  358. Jenkins, H. D. B. & Marcus, Y. Viscosity B-Coefficients of Ions in Solution. *Chem. Rev.* **95**, 2695–2724 (1995).
  359. Collins, K. D. Ions from the Hofmeister series and osmolytes: Effects on proteins in solution and in the crystallization process. *Methods* **34**, 300–311 (2004).
  360. Xu, D.-Y., Yang, Y. & Yang, Z. Activity and stability of cross-linked tyrosinase aggregates in aqueous and nonaqueous media. *J. Biotechnol.* **152**, 30–36 (2011).
  361. Huang, Z.-L., Wu, B.-P., Wen, Q., Yang, T.-X. & Yang, Z. Deep eutectic solvents can be viable enzyme activators and stabilizers. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **89**, 1975–1981 (2014).
  362. Wu, B.-P., Wen, Q., Xu, H. & Yang, Z. Insights into the impact of deep eutectic solvents on horseradish peroxidase: Activity, stability and structure. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **101**, 101–107 (2014).
  363. Yang, Z. *et al.* Importance of the ionic nature of ionic liquids in affecting enzyme performance. *J. Biochem.* **145**, 355–364 (2009).
  364. Papadopoulou, A. A., Efstathiadou, E., Patila, M., Polydera, A. C. & Stamatis, H. Deep Eutectic Solvents as Media for Peroxidation Reactions Catalyzed by Heme-Dependent Biocatalysts. *Ind. Eng. Chem. Res.* **55**, 5145–5151 (2016).
  365. Pavlidis, I. V *et al.* Development of effective nanobiocatalytic systems through the immobilization of hydrolases on functionalized carbon-based nanomaterials. *Bioresour. Technol.* **115**, 164–171 (2012).
  366. Gorke, J. T., Srienc, F. & Kazlauskas, R. J. Hydrolase-catalyzed biotransformations in deep eutectic solvents. *Chem. Commun.* **10**, 1235–1237 (2008).
  367. Yu, X. *et al.* Effect of three trifluoromethanesulfonate ionic liquids on the activity, stability and conformation of laccase. *Int. J. Biol. Macromol.* **56**, 62–68 (2013).
  368. Li, X., Zhang, C., Li, S., Huang, H. & Hu, Y. Improving catalytic performance of *Candida rugosa* lipase by chemical modification with polyethylene glycol functional ionic liquids. *Ind. Eng. Chem. Res.* **54**, 8072–8079 (2015).
  369. Daneshjoo, S. *et al.* Imidazolium chloride-based ionic liquid-assisted improvement of lipase activity in organic solvents. *Eng. Life Sci.* **11**, 259–263 (2011).
  370. Manuel Brenes, Aranzazu García, Pedro García, José J. Rios & Garrido, A. Phenolic Compounds in Spanish Olive Oils. *J. Agric. Food Chem.* **47**, 3535–3540 (1999).
  371. Espín, J. C., Soler-Rivas, C., Cantos, E., Tomás-Barberán, F. A. & Wichers, H. J. Synthesis of the antioxidant hydroxytyrosol using tyrosinase as biocatalyst. *J. Agric. Food Chem.* **49**, 1187–1193 (2001).

372. Capasso, R. *et al.* Antibacterial polyphenols from olive oil mill waste waters. *J. Appl. Bacteriol.* **79**, 393–398 (1995).
373. Juan Carlos Espín, Cristina Soler-Rivas, and & Wichers, H. J. Characterization of the Total Free Radical Scavenger Capacity of Vegetable Oils and Oil Fractions Using 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl Radical. *J. Agric. Food Chem.* **48**, 648–656 (2000).
374. Okezie I. Aruoma *et al.* Effect of Hydroxytyrosol Found in Extra Virgin Olive Oil on Oxidative DNA Damage and on Low-Density Lipoprotein Oxidation. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 5181–5187 (1998).
375. Petroni, A. *et al.* Inhibition of platelet aggregation and eicosanoid production by phenolic components of olive oil. *Thromb. Res.* **78**, 151–60 (1995).
376. Hagiwara, K., Goto, T., Araki, M., Miyazaki, H. & Hagiwara, H. Olive polyphenol hydroxytyrosol prevents bone loss. *Eur. J. Pharmacol.* **662**, 78–84 (2011).
377. Vázquez-Velasco, M. *et al.* Effects of hydroxytyrosol-enriched sunflower oil consumption on CVD risk factors. *Br. J. Nutr.* **105**, 1448–1452 (2011).
378. Hao, J. *et al.* Hydroxytyrosol promotes mitochondrial biogenesis and mitochondrial function in 3T3-L1 adipocytes. *J. Nutr. Biochem.* **21**, 634–644 (2010).
379. Durand, E. *et al.* Evaluation of deep eutectic solvents as new media for *Candida antarctica*. *Process Biochem.* **47**, 2081–2089 (2012).
380. Huang, Q., Tang, J. & Weber, W. J. Precipitation of enzyme-catalyzed phenol oxidative coupling products: Background ion and pH effects. *Water Res.* **39**, 3021–3027 (2005).
381. Liu, N. *et al.* Stabilized magnetic enzyme aggregates on graphene oxide for high performance phenol and bisphenol A removal. *Chem. Eng. J.* **306**, 1026–1034 (2016).
382. Busca, G., Berardinelli, S., Resini, C. & Arrighi, L. Technologies for the removal of phenol from fluid streams: A short review of recent developments. *J. Hazard. Mater.* **160**, 265–288 (2008).
383. Bevilaqua, J. V., Cammarota, M. C., Freire, D. M. G. & Sant’Anna Jr., G. L. Phenol removal through combined biological and enzymatic treatments. *Brazilian J. Chem. Eng.* **19**, 151–158 (2002).
384. Seetharam, G. B. & Saville, B. A. Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports. *Water Res.* **37**, 436–40 (2003).

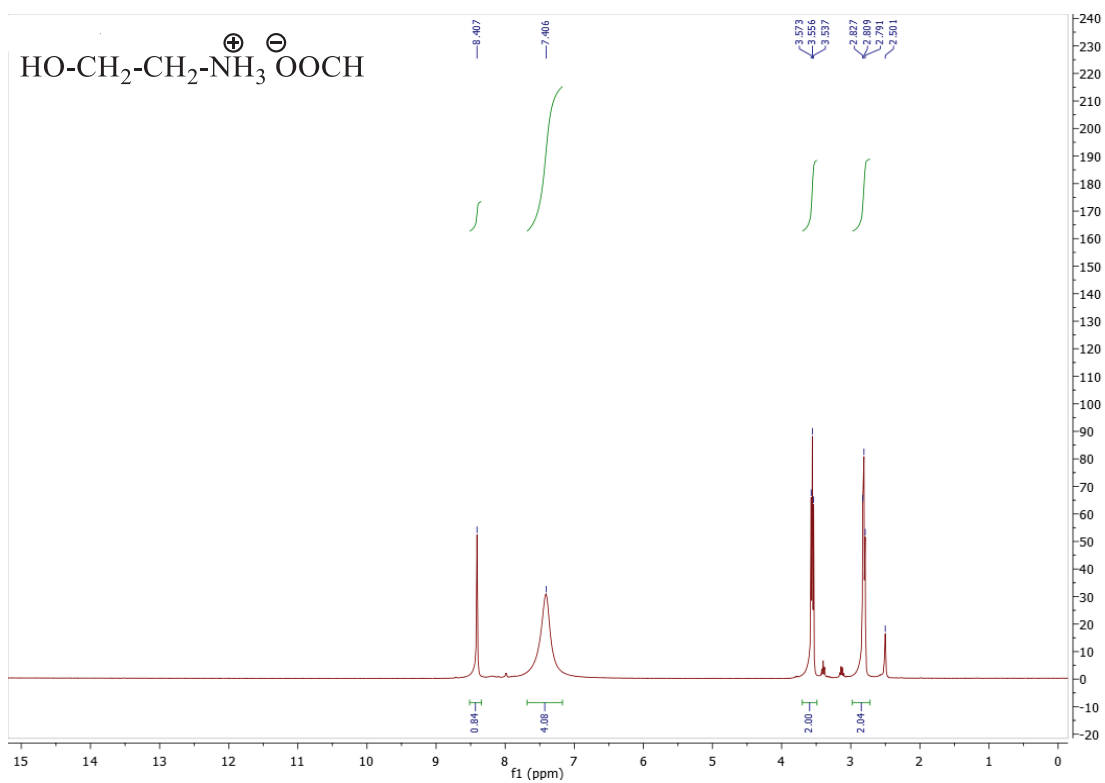


# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

## Φασματοσκοπική μελέτη των υδροξυαιθυλαμμωνικών ιοντικών υγρών

---

Στις επόμενες σελίδες παρατίθενται Φάσματα Πυρηνικού Μαγνητικού Συντονισμού (NMR) Φάσματα Υπερύθρου (ATR-IR), Φάσματα Μάζας (MS), Φάσματα Ορατού-Υπεριώδους (UV-Vis) των ιοντικών υγρών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή

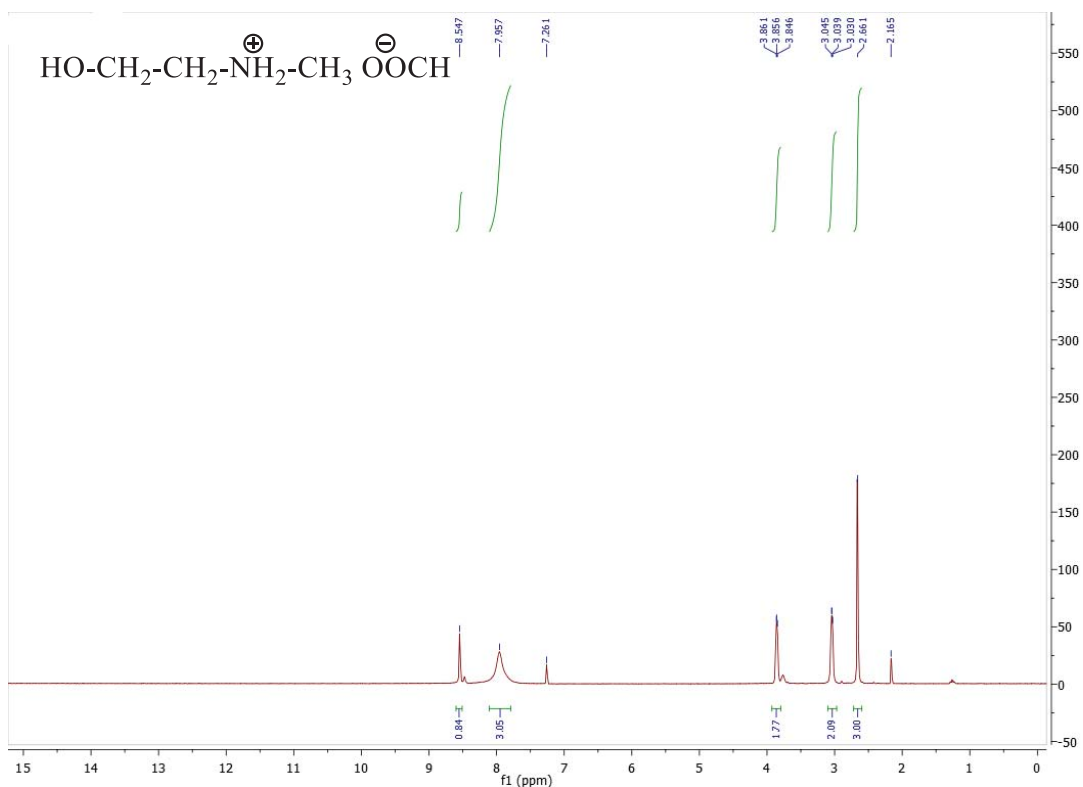


$^1\text{H}$  NMR φάσμα του *2-hydroxyethylammonium formate* (HEAF).

**Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR** (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) 2.81 (2H, t,  $J$  5.2 Hz,  $-\text{O}-\text{CH}_2$ ), 3.56 (2H, t,  $J$  5.2 Hz,  $-\text{CH}_2-\text{N}$ ), 7.41 (4H, br s,  $-\text{NH}_3^+$  & OH), 8.41 (1H, s,  $\text{H}-\text{COO}^-$ ).

**Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 49.70, 57.38, 166.61

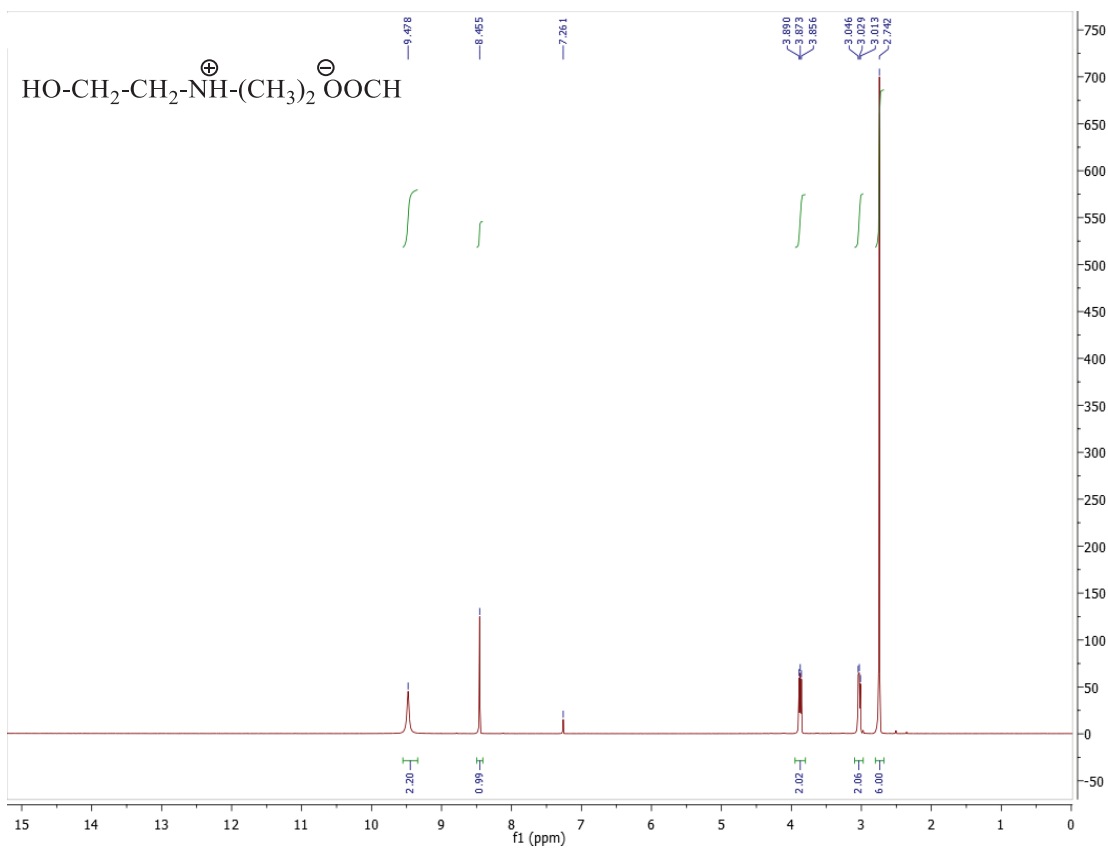




$^1\text{H NMR}$  φάσμα του 2-hydroxy-N-methylethanaminium formate (HMEAF).

**Φάσμα  $^1\text{H NMR}$**  (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 2.66 (3H, s,  $\text{CH}_3^-$ ), 3.03 (2H, t,  $J$  2.7 Hz,  $-\text{O}-\text{CH}_2$ ), 3.86 (2H, t,  $J$  3.0 Hz,  $-\text{CH}_2-\text{N}$ ), 7.98 (3H, br s,  $-\text{NH}_2^+$  & OH), 8.55 (1H, s,  $\text{H}-\text{COO}$ ).

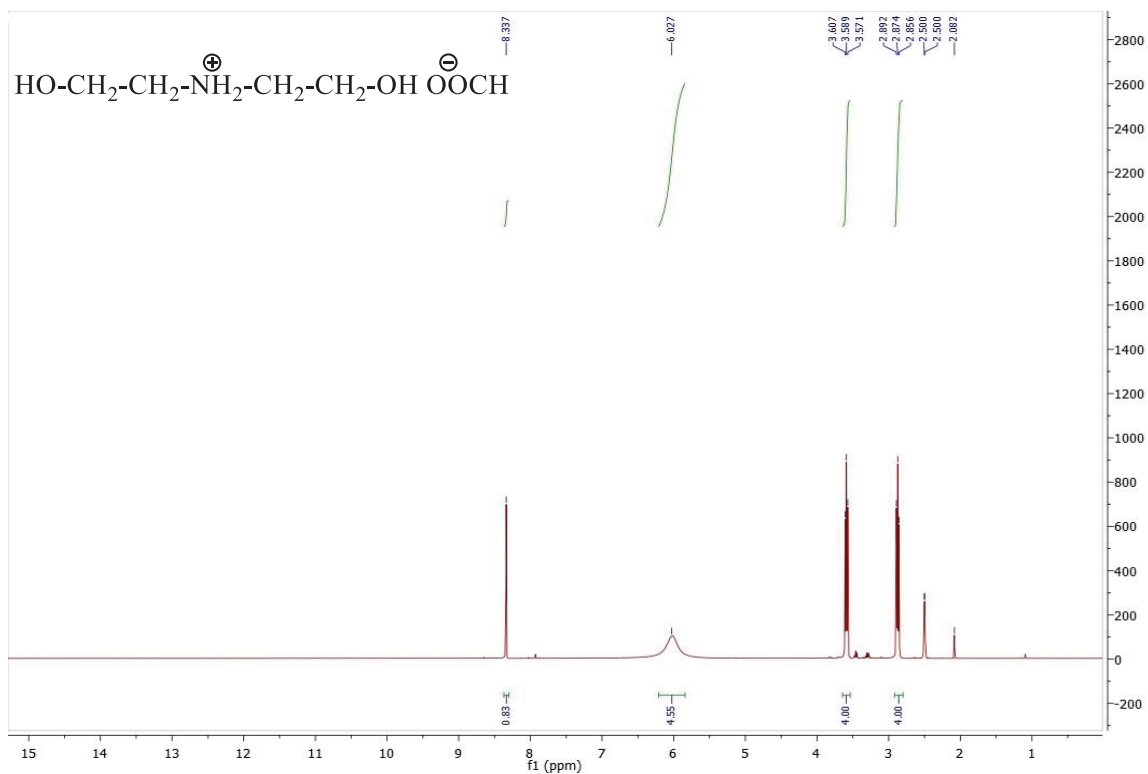
**Φάσμα  $^{13}\text{C NMR}$**  (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 32.67, 50, 79, 56.74, 166.74



$^1\text{H}$  NMR φάσμα του 2-hydroxy-N,N-dimethylethanaminium formate (HDMEAF).

**Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR** (300 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 2.74 (6H, s,  $\text{CH}_3^-$ ), 3.03 (2H, t,  $J$  6.0 Hz,  $-\text{O}-\text{CH}_2$ ), 3.87 (2H, t,  $J$  5.0 Hz,  $-\text{CH}_2-\text{N}$ ), 8.58 (2H, s,  $-\text{NH}^+$  & OH), 9.48 (1H, s,  $\text{H}-\text{COO}^-$ ).

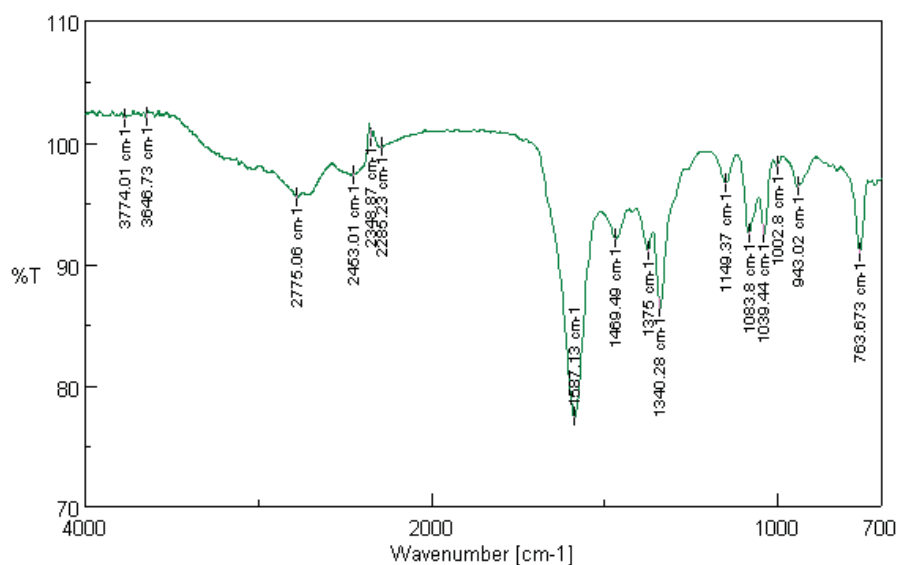
**Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 43.52, 56.42, 60.46, 168.99.



$^1\text{H}$  NMR spectrum of *bis(2-hydroxyethyl)ammonium formate* (BHEAF).

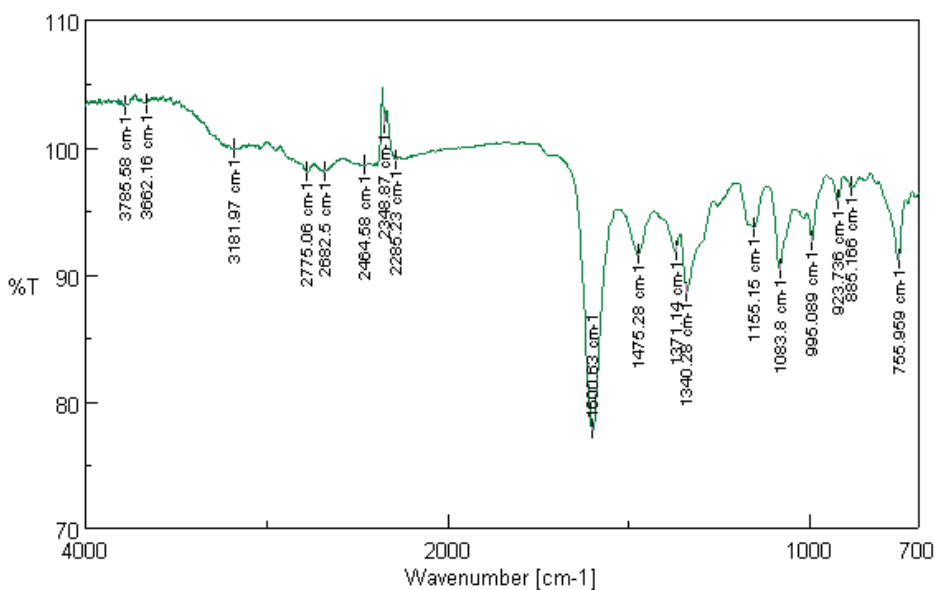
**Φάσμα  $^1\text{H}$  NMR** (300 MHz,  $\text{DMSO-d}_6$ ):  $\delta$  (ppm) 2.87 (4H, t,  $-\text{O}-\text{CH}_2$ ), 3.59 (4H, t,  $-\text{CH}_2-\text{N}$ ), 6.03 (4H, br s,  $-\text{NH}_2^+$  & OH), 8.34 (1H, s,  $\text{H}-\text{COO}-$ ).

**Φάσμα  $^{13}\text{C}$  NMR** (75 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ):  $\delta$  (ppm) 49.70, 57.38, 166.61.



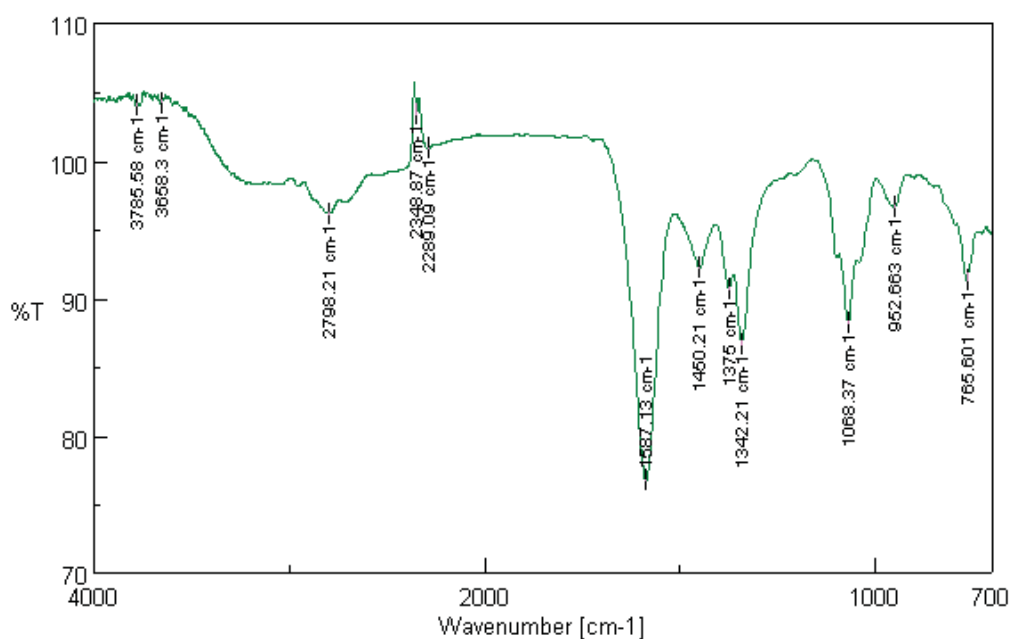
ATR φάσμα του 2-hydroxy-N-methylethanaminium formate (HMEAF).

**Φάσμα FT-IR (ATR)**  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 1340  $\nu$  (CN), 1469  $\nu_{\text{sym}}$  (COO<sup>-</sup>), 1587  $\nu_{\text{asym}}$  (COO<sup>-</sup>) &  $\delta$ (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 2775  $\nu$  (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 3646  $\nu$  (OH).



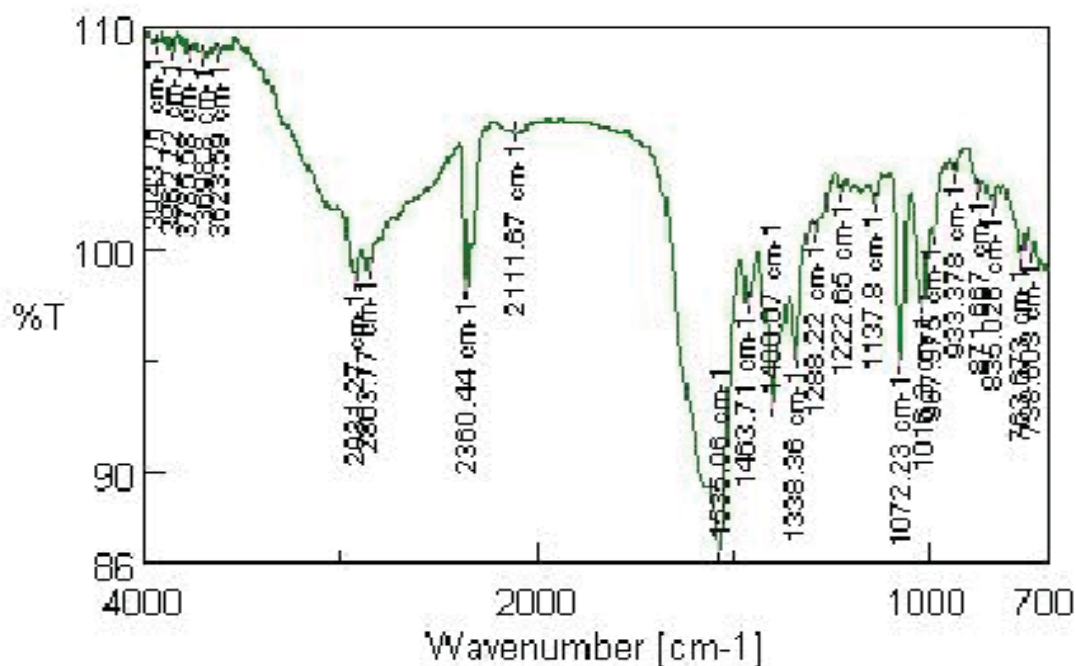
ATR φάσμα του 2-hydroxy-N,N-dimethylethanaminium formate (HDMEAF).

**Φάσμα FT-IR (ATR)**  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ : 1340  $\nu$  (CN), 1475  $\nu_{\text{sym}}$  (COO<sup>-</sup>), 1600  $\nu_{\text{asym}}$  (COO<sup>-</sup>), 2775  $\nu$  (NH<sup>+</sup>), 3632  $\nu$  (OH).



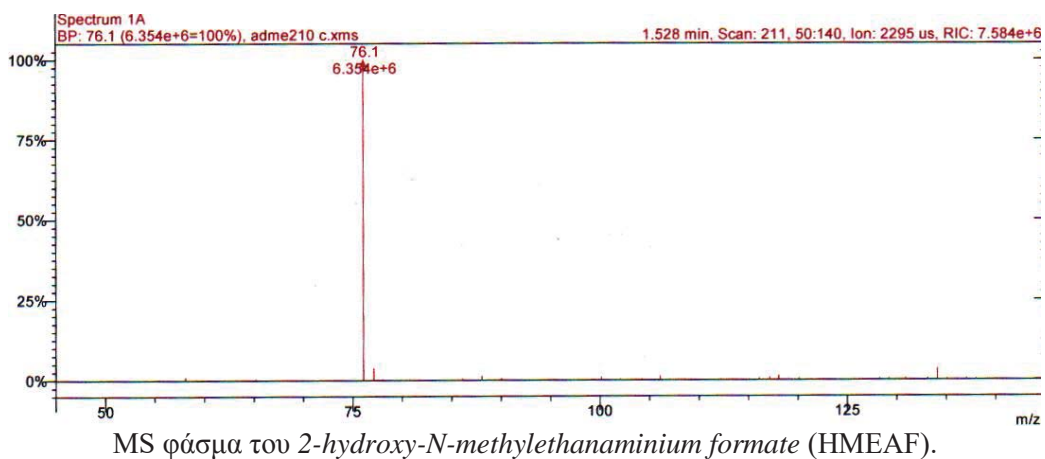
ATR φάσμα του *bis(2-hydroxyethyl)ammonium formate* (BHEAF)

**Φάσμα FT-IR (ATR)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ :** 1342  $\nu$  (CN), 1450  $\nu_{\text{sym}}$  (COO<sup>-</sup>), 1587  $\nu_{\text{asym}}$  (COO<sup>-</sup>) &  $\delta$ (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 2798  $\nu$  (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 3658  $\nu$  (OH).

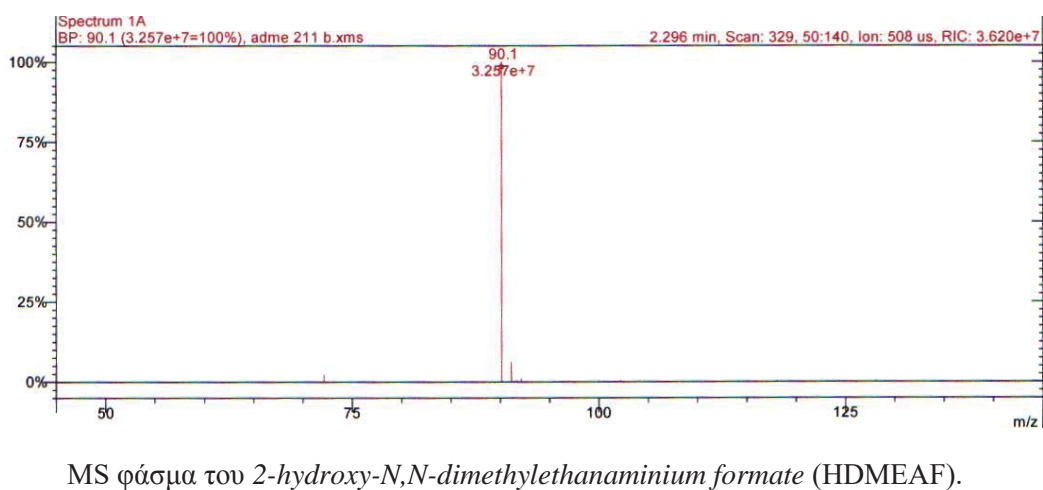


ATR φάσμα του 2-hydroxyethylammonium formate (HEAF).

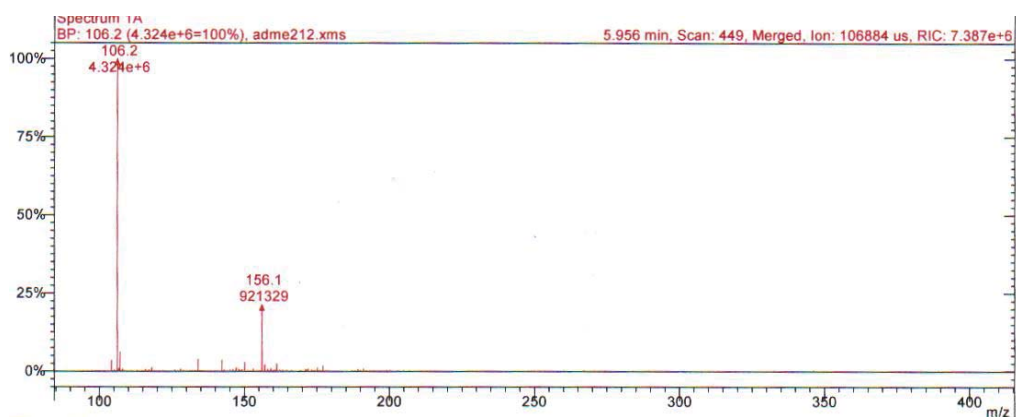
**Φάσμα FT-IR (ATR)  $\nu_{\max}/\text{cm}^{-1}$ :** 1338  $\nu$  (CN), 1400  $\nu_{\text{sym}}$  (COO<sup>-</sup>),  $\delta$ (NH<sub>2</sub><sup>+</sup>), 1535  $\nu_{\text{asym}}$  (COO<sup>-</sup>) &  $\delta$ (NH<sub>3</sub><sup>+</sup>), 2931–2863  $\nu$  (N<sup>+</sup>H<sub>3</sub>), 3623  $\nu$  (OH).



**Φάσμα MS (ESI):** ES<sup>+</sup> *m/z*: 76.1 (OHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub><sup>+</sup>CH<sub>3</sub>, 100%).

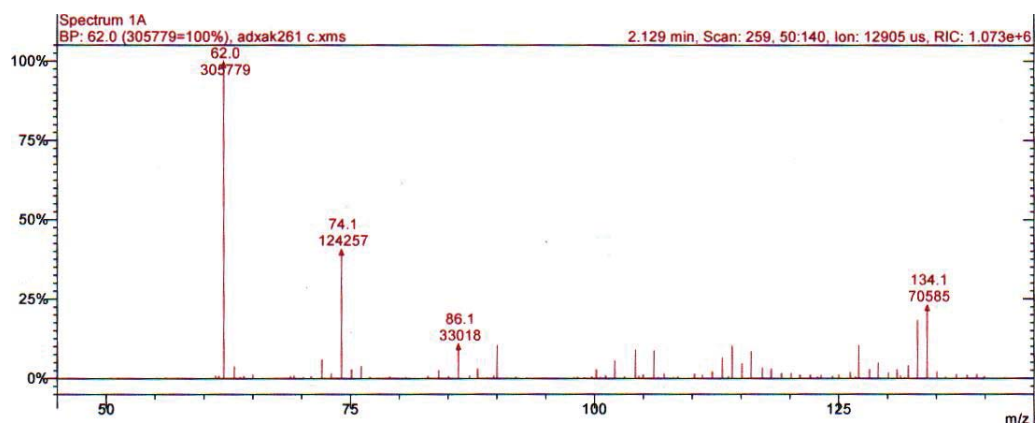


**Φάσμα MS (ESI):** ES<sup>+</sup> *m/z*: 90.1 (OHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH<sub>2</sub><sup>+</sup>(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub>, 100%).



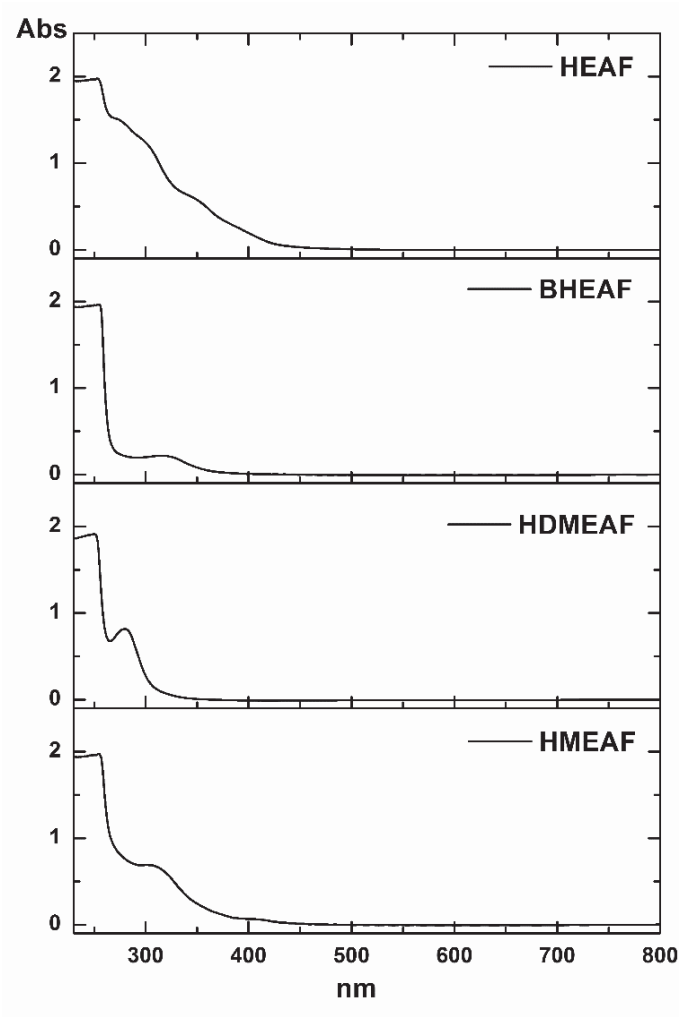
MS φάσμα του *bis(2-hydroxyethyl)ammonium formate* (BHEAF).

**Φάσμα MS (ESI):**  $ES^+$   $m/z$ : 106.2  $(OHCH_2CH_2)_2NH_2^+$ , 100%.



MS φάσμα του *2-hydroxyethylammonium formate* (HEAF).

**Φάσμα MS (ESI):**  $ES^+$   $m/z$ : 62.0  $(OHCH_2CH_2)_2NH_3^+$ , 100%.



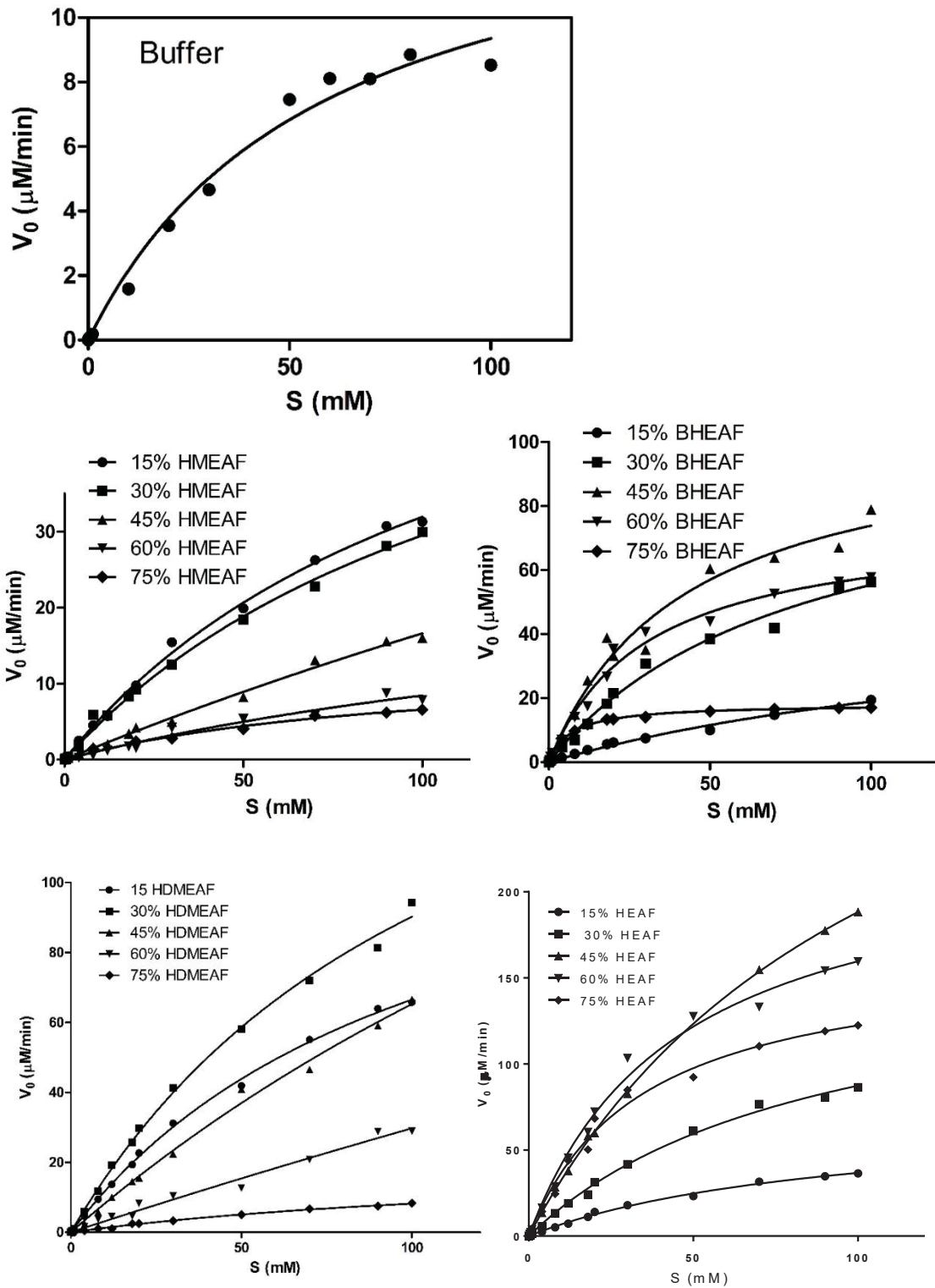
UV-vis φάσματα (230-800 nm) των ιοντικών υγρών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

### Κινητική Μελέτη του κυτοχρώματος c σε ιοντικά υγρά

Στις επόμενες σελίδες παρουσιάζονται τα διαγράμματα Michaelis Menten και οι φαινομενικές κινητικές σταθερές  $K^{app}_m$  και  $V^{app}_{max}$  της αντίδρασης οξείδωσης της γουαϊακόλης από το κυτόχρωμα c παρουσία  $H_2O_2$  σε υδατικό διάλυμα και σε διάφορες συγκεντρώσεις υδατικών διαλυμάτων των ιοντικών υγρών.



Διαγράμματα Michaelis Mented σε υδατικό διάλυμα και διάφορες συγκεντρώσεις ιοντικών υγρών

Φαινομενικές κινητικές σταθερές  $K^{app}_m$  ( $\mu\text{M}$ ) and  $V^{app}_{max}$  ( $\mu\text{M min}^{-1}$ )

% ιοντικού υγρού στο (v/v)	HEAF		HMEAF		HDMEAF		BHEAF	
	$K^{app}_m$	$V^{app}_{max}$	$K^{app}_m$	$V^{app}_{max}$	$K^{app}_m$	$V^{app}_{max}$	$K^{app}_m$	$V^{app}_{max}$
0	58.6 ±1.1	18.8 ±2.5	58.6 ±1.1	18.8 ±2.5	58.6 ±1.1	18.8 ±2.5	58.6 ±1.1	18.8 ±2.5
15	93.3 ±2.2	70.96 ±2.9	120.3 ±5.3	70.3 ±4.2	107.2 ±5.4	137.9 ±5.9	173.2 ±10.9	51.6 ±3.5
30	110 ±1.2	188.7 ±8.5	63.3 ±3.1	43.5 ±3.6	117.2 ±6.8	196.0 ±9.8	77.5 ±5.6	98.2 ±6.8
45	111.1 ±1.4	397.4 ±10.8	118.2 ±6.8	32.1 ±3.9	88.7 ±4.3	108.7 ±7.3	42.2 ±3.6	105.1 ±12.1
60	45.2 ±2.5	231.8 ±12.8	113.5 ±7.2	16.8 ±2.8	281.2 ±8.6	107.8 ±6.4	30.8 ±6.8	75.6 ±9.8
75	34.3 ±1.6	164.4 ±19.3	99.3 ±7.1	13.1 ±1.2	143.2 ±5.9	20.2 ±3.6	7.6 ±4.3	18.4 ±2.3

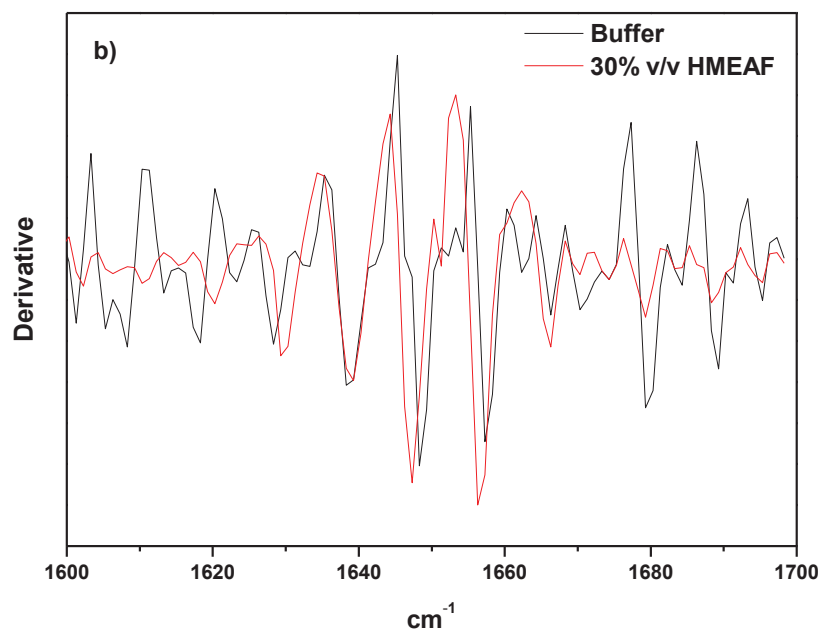
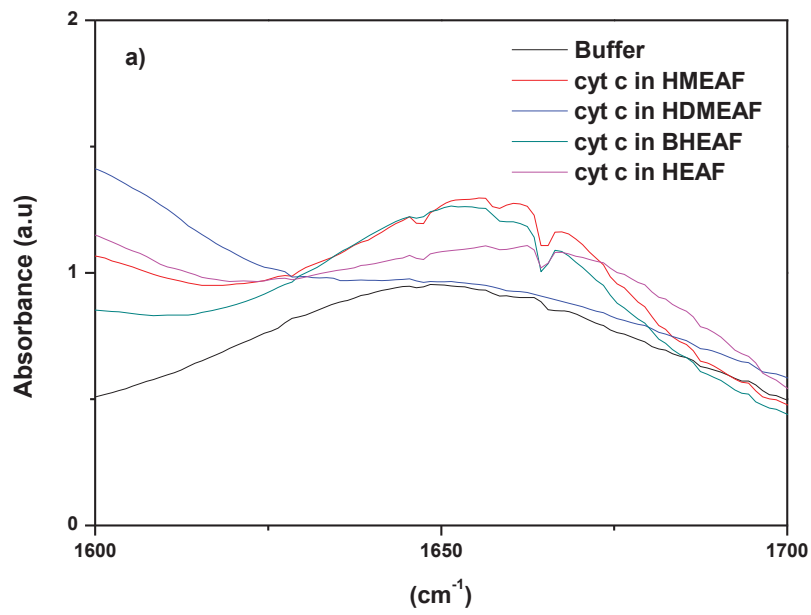


## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

### Φάσματα υπερύθρου του κυτοχρώματος c παρουσία ιοντικών υγρών

---

Στην επόμενη σελίδα παρατίθενται τα φάσματα ATR και τα φάσματα 2<sup>ης</sup> παραγώγου του κυτοχρώματος c παρουσία των ιοντικών υγρών στην περιοχή Amide I.



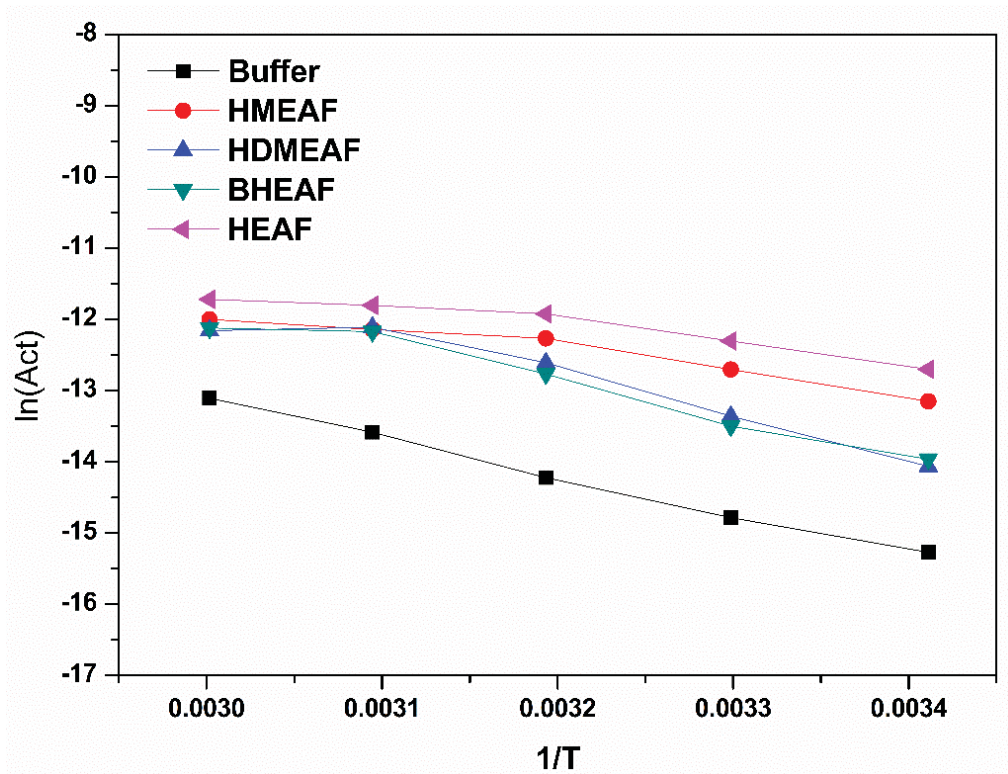
ATR φάσματα της Amide I περιοχής του κυτοχρώματος c σε 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.0 και σε 30 % v/v ιοντικών υγρών, b) Φάσμα 2<sup>ης</sup> παραγώγου της Amide I περιοχής του κυτοχρώματος c σε 50 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.0 και σε 30% v/v HMEAF ιοντικό υγρό.

# ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

## Διάγραμμα Arrhenius

---

Στην σελίδα που ακολουθεί παρατίθεται το διάγραμμα Arrhenius για τον υπολογισμό της ενέργειας ενεργοποίησης της  $E_a$  για την αντίδραση οξείδωσης της γουαϊακόλης από το κυτόχρωμα c παρουσία 30 % v/v διαφόρων ιοντικών υγρών.



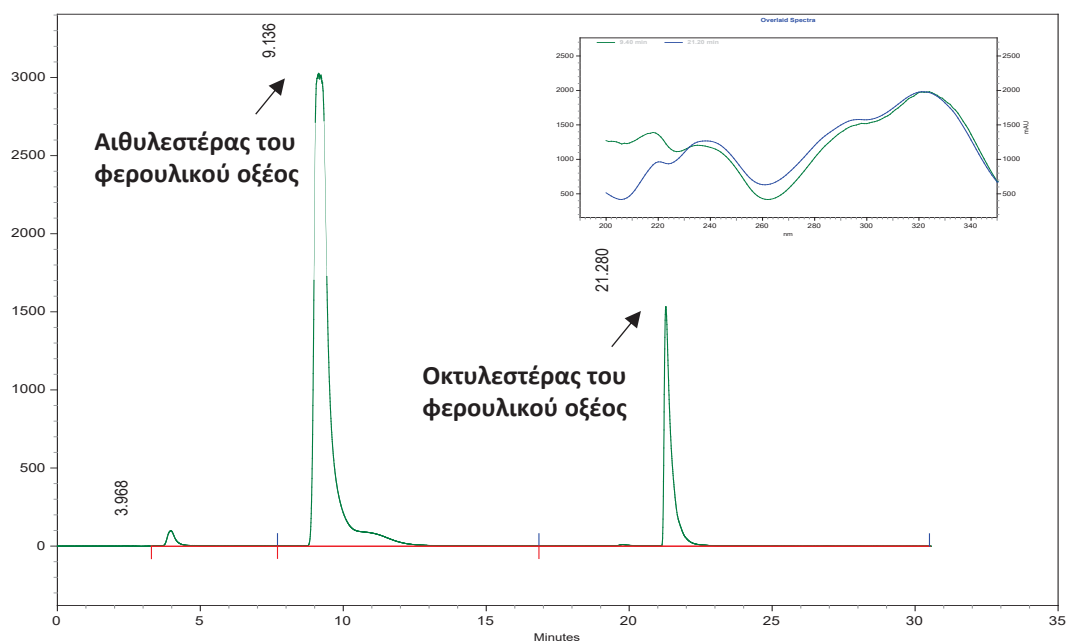
Διάγραμμα Arrhenious για την δραστηκότητα του κυτοχρώματος c σε υδατικό διάλυμα και σε διάφορα ιοντικά υγρά.



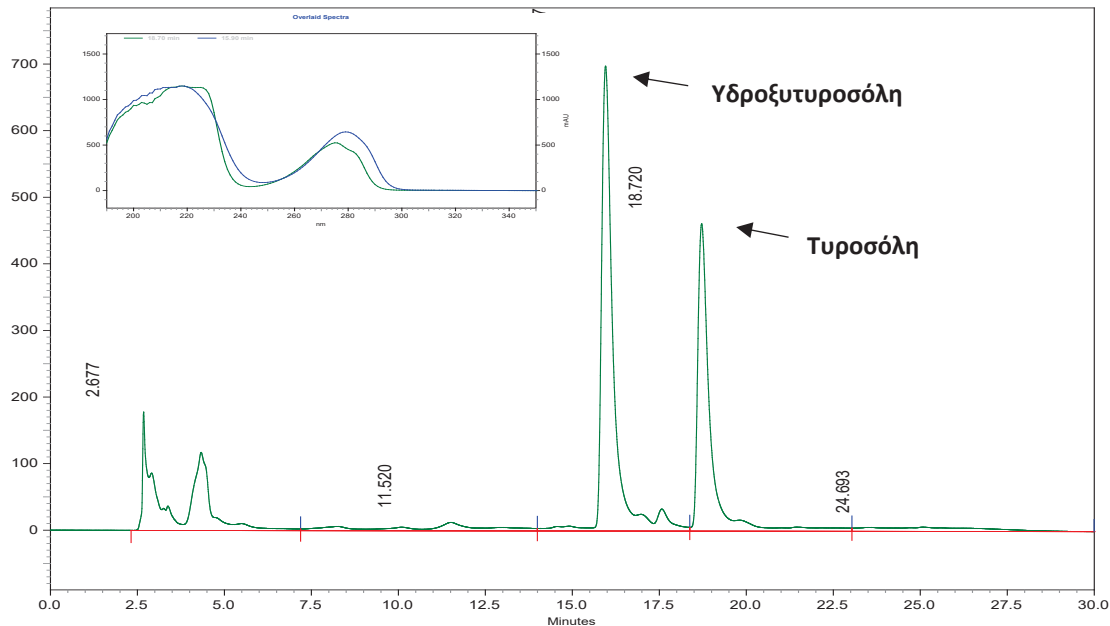
## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ V

### **Χρωματογραφήματα HPLC - Φάσματα UV των ενώσεων των αντιδράσεων**

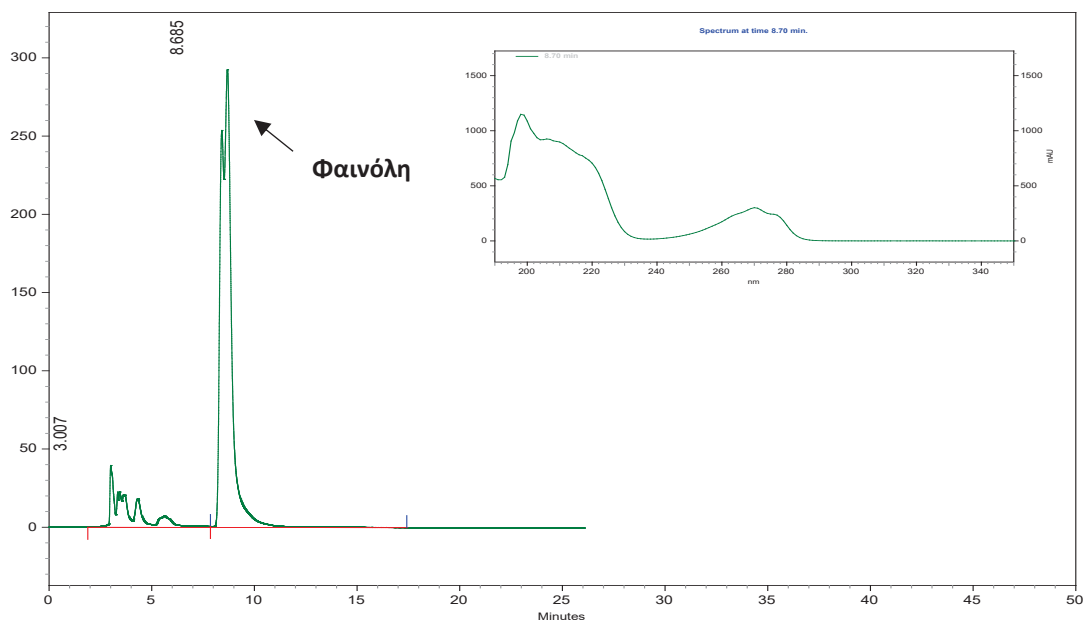
Στις σελίδες που ακολουθούν παρουσιάζονται τα χρωματογραφήματα HPLC και τα φάσματα UV των ενώσεων των αντιδράσεων που πραγματοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.



Χρωματογράφημα εκλουσης της αντίδρασης εστεροποίησης του αιθυλεστέρα του φερουλικού οξέος από την 1-οκτανόλη. Ένθετο: Φάσμα UV των ενώσεων.



Χρωματογράφημα εκλουσης της αντίδρασης οξείδωσης της τυροσώλης προς παραγωγή υδροξυτυροσώλης από την τυροσινάση. Ένθετο: Φάσμα UV των ενώσεων.



Χρωματογράφημα εκλουσης της αντίδρασης οξείδωσης της φαινόλης από την τυροσινάση. Ένθετο: Φάσμα UV των ενώσεων.