

Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων - 2018

Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών &
Τεχνολογιών

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
<<ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ>>

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΑΝΟΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΙΚΩΝ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΗΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ
ΥΔΡΟΛΑΣΩΝ ΣΕ ΝΑΝΟΣΩΜΑΤΙΔΙΑ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ

ΟΡΦΑΝΑΚΗΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ ΤΟΥ ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟΥ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ <<ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ>>

*Die Eule der Minerva beginnt erst mit der
einbrechenden Dämmerung ihren Flug*

Friedrich Hegel

Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία αποτελεί διπλωματική εργασία στα πλαίσια του διατμηματικού μεταπτυχιακού προγράμματος «Βιοτεχνολογία» των τμημάτων Ιατρικής και Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών του πανεπιστημίου Ιωαννίνων και εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών & Τεχνολογιών.

Θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή της διπλωματικής εργασίας, Σταμάτη Χαράλαμπο για την καθοδήγηση του και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή Καταπόδη Πέτρο που με βοήθησε ιδιαίτερα με επιστημονικής και τεχνικής φύσεως θέματα κατά τη διάρκεια όσων χρόνων βρίσκομαι στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας. Τις ευχαριστίες μου εκφράζω και στην καθηγήτρια Αφένδρα Αμαλία και στον καθηγητή Τζαβάρα Θεόδωρο που δέχτηκαν να είναι μέλη της πενταμελούς επιτροπής αξιολόγησης της μεταπτυχιακής εργασίας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θέλω να απευθύνω στον διευθυντή του ΔΠΜΣ Φριλίγγο Ευστάθιο για την βοήθεια του και το συντονισμό που προσέφερε καθ'όλη τη διάρκεια του κύκλου του μεταπτυχιακού.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου και ειδικά την αδερφή μου, οι οποίοι μου πρόσφεραν την απαραίτητη οικονομική και ηθική συμπαράσταση για την ολοκλήρωση της μεταπτυχιακής μου εργασίας.

Περίληψη

Η παρούσα εργασία ασχολείται με την ανάπτυξη πρωτοκόλλων για την ακινητοποίηση ενζύμων της κατηγορίας των υδρολασών σε προηγμένα νανοϋλικά με απώτερο σκοπό την επεξεργασία αγροτοβιομηχανικών αποβλήτων και τη μετατροπή τους σε χρήσιμα προϊόντα. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η β-D-γλυκοζιδάση και η ιμπερτάση. Κύριο βάρος δόθηκε στο πρώτο ένζυμο που μέσα από καινοτόμα πρωτόκολλα που αναπτύχθηκαν με κύριο χαρακτηριστικό την χρήση της χημικής ένωσης APTEs οδηγηθήκαμε στην ανάπτυξη ιδιαίτερα σταθερών ενζυμικών βιοκαταλυτικών συστημάτων που διατηρούν υψηλά επίπεδα δραστηριότητας σε φυσιολογικά ακραίες συνθήκες. Ο χαρακτηρισμός των υλικών και των ακινητοποιημένων ενζύμων έγινε με χρήση τεχνολογιών όπως FT-IR, Raman φασματοσκοπία και AFM. Η τεχνογνωσία που αποκτήθηκε μέσα από την εφαρμογή αυτών των πρωτοκόλλων ακινητοποίησης και πειραματικής δοκιμής εφαρμόστηκε στη συνέχεια και για το ένζυμο ιμπερτάση. Στο τέλος μπορέσαμε να δημιουργήσουμε ένα βιοκαταλυτικό σύστημα που περιείχε και τα δυο ένζυμα ταυτόχρονα σε πολλά επίπεδα στοιβάδων με την εξώτερη στοιβάδα να περιέχει το ένζυμο ιμπερτάση. Αυτό το προϊόν αποδείχθηκε ιδιαίτερα αποτελεσματικό στην υδρόλυση ενός μίγματος που περιείχε κελλοβιόζη και σουκρόζη, τα οποία αποτελούν βιομηχανικά υποστρώματα. Μάλιστα μέρος των αποτελεσμάτων δημοσιεύθηκε στο διεθνές επιστημονικό περιοδικό "Frontiers in Materials" με τίτλο "Hybrid Nanomaterials of Magnetic Iron Nanoparticles and Graphene Oxide as Matrices for the Immobilization of β-Glucosidase: Synthesis, Characterization, and Biocatalytic Properties".

Abstract

This dissertation is about the development of novel protocols for enzyme immobilization on nanomaterials. The enzymes used were of the hydrolases category, specifically β -D-glucosidase and invertase, with the outermost aim being the use of the nanobiocatalytic systems in the conversion of industrial agriculture waste into useful products. The most used enzyme throughout this project was β -D-glucosidase which we managed to immobilize via novel methods that utilize the chemical compound APTES. This led to very stable nanobiocatalytic systems with enhanced level of activity in naturally perceived extreme conditions. The characterization of the materials as well as of the immobilized enzymes was achieved through the use of spectroscopic techniques such as FT-IR, raman and AFM. The knowhow acquired through the immobilization and experimental procedures was then used with success in the immobilization of the enzyme invertase. Finally, we managed to create a nanobiocatalytic system involving both enzymes simultaneously immobilized in many layers with the outer layer belonging to invertase. This final product proved itself extremely handful in hydrolyzing a mix of cellobiose and sucrose, both being industrial wastes. Part of the results has already been published in the international scientific magazine "Frontiers in Materials" under the title "Hybrid Nanomaterials of Magnetic Iron Nanoparticles and Graphene Oxide as Matrices for the Immobilization of β -Glucosidase: Synthesis, Characterization, and Biocatalytic Properties".

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες	3
Περίληψη	4
Abstract	5
1. Βιοτεχνολογία και ένζυμα	11
1.1 Βιοτεχνολογία	11
1.2 Στοιχεία ενζύμων	12
1.2.1. Δομικά χαρακτηριστικά ενζύμων	13
1.2.2. Βασικά χαρακτηριστικά δυνάμεων που αναπτύσσονται σε πρωτεΐνες	14
1.2.3.1 Βασικά χαρακτηριστικά διάταξης των πρωτεϊνών	15
1.2.3.2 Σταθερά αποδιάταξης/διάσπασης k_d	17
1.2.4. Ένζυμα και εφαρμογές τους	18
1.2.4.1 Χαρακτηριστικές εφαρμογές ενζύμων στη βιομηχανία	18
1.2.5.1 Η β -D-γλυκοζιδάση	19
Δομή	20
Μηχανισμός δράσης	21
1.2.5.2 Ιμβερτάση	22
Δομή	24
1.2.5.3 Ακίνητοποίηση-Φορείς ακίνητοποίησης	25
1.3 Στοιχεία ακίνητοποίησης	27
1.3.1 Πλεονεκτήματα ακίνητοποίησης ενζύμων	27
1.3.2 Μειονεκτήματα ακίνητοποίησης	28
1.3.3 Επίδραση του φορέα ακίνητοποίησης στο ένζυμο	29
1.3.4 Τεχνικές ακίνητοποίησης ενζύμων	29
1.3.5 Χημικές μέθοδοι ακίνητοποίησης βιοκαταλυτών	30
1.3.6 Λειτουργικοποίηση του φορέα ακίνητοποίησης	32
1.3.7 Χρήση APTES	33

1.3.8 Χρήση Γλουταραλδεΐδης	36
1.4. Νανοϋλικά-Γραφένιο	36
1.4.1 Νανοβιοτεχνολογία	36
1.4.2 Γραφένιο	39
1.4.2.1 Πλεονεκτήματα γραφενίου	39
1.4.2.2 Μειονεκτήματα γραφενίου	40
1.4.2.3 Χημικές και φυσικές ιδιότητες του γραφενίου	41
1.4.2.4 Το οξείδιο γραφενίου (GO)	41
1.4.2.5 Νανოსωματίδια οξειδίου του σιδήρου.....	42
1.4.2.6 Η περίπτωση του γ -Fe ₂ O ₃ (μαγγεμίτης)	43
1.4.2.7 Υβριδικά υλικά	43
Σκοπός εργασίας	45
2. Υλικά-Μέθοδοι	46
2.1. Υλικά.....	46
Ένζυμα-Πρωτεΐνες.....	46
Υποστρώματα	46
Διαλύτες	46
Υδατικά διαλύματα	46
Λοιπά αντίδραστήρια	46
2.2. Μέθοδοι	47
2.2.1. Μέθοδοι μέτρησης δραστηριότητας	47
Καθορισμός της απόδοσης ακινητοποίησης.....	47
Καθορισμός δραστηριότητας γλυκοζιδάσης.....	47
Διαδικασία επαναχρησιμοποίησης	48
Προσδιορισμός κινητικών σταθερών.....	48
Εφαρμογή στην υδρόλυση της κελλοβιόζης.....	48
Εφαρμογή στη υδρόλυση κελλοβιόζης/σουκρόζης	49

2.2.2. Φασματοσκοπικές μέθοδοι	49
Λήψη φασμάτων υπερύθρου στερεών δειγμάτων	49
Υπολογισμός στοιχείων δευτεροταγούς δομής με ανάλυση αμιδικών κορυφών	50
Μικροσκοπία Ατομικών Δυνάμεων (Atomic Force Microscopy-AFM).....	52
Φασματοσκοπία Raman.....	52
2.2.3 Ομοιοπολικές Μέθοδοι ακινητοποίησης	54
Ακινητοποίηση σε GO-C ₂ -NH ₂	54
Ακινητοποίηση σε GOγFe-ole	55
Ακινητοποίηση σε σιλανοποιημένο GOγFe και σιλανοποιημένο γFe	55
GOX (Layer-by-Layer ακινητοποίηση β-γλυκοζιδάσης)	56
Double (GO-bgl-inν, Layer-by-Layer ακινητοποίηση β-γλυκοζιδάσης και ιμβερτάσης).....	56
3. Αποτελέσματα.....	57
3.1 Βιοκαταλυτικά χαρακτηριστικά ακινητοποιημένης β-D-γλυκοζιδάσης.....	58
Μελέτη Δραστικότητας-Activity	58
Θερμοκρασιακό προφίλ-Temperature profiling	59
Επίδραση του pH στην δραστικότητα του ενζύμου-pH profile.....	62
Μελέτη θερμοσταθερότητας 60°C -Thermostability 60°C	64
Μελέτη θερμοσταθερότητας 70°C-Thermostability 70°C	65
Μελέτη ημίσειας ζωής/σταθεράς αποδιάταξης-kd, half life	67
Κινητική της αντίδρασης	68
Μελέτη επαναχρησιμοποίησης της ακινητοποιημένης γλυκοζιδάσης	70
Μελέτη της δευτεροταγούς δομής της β-γλυκοζιδάσης με χρήση FT-IR φάσματος-Secondary structure derived from FT-IR spectra	72
Ταυτοποίηση ακινητοποίησης με χρήση AFM.....	74
Ταυτοποίηση επίστρωσης γFe στο οξείδιο γραφενίου	75
Ενζυμικό σύστημα ακινητοποίησης GOX bgl.....	77
Θερμοκρασιακό προφίλ-Θερμοκρασία profiling.....	78

Επίδραση του pH στην δραστηριότητα του ενζύμου-pH profile.....	79
Υδρόλυση κελλοβιόζης-Immobilized beta-glucosidase application-Cellobiose hydrolysis.....	81
3.2 Βιοκαταλυτικά χαρακτηριστικά κινητοποιημένης ινβερτάσης (invertase)...	83
Θερμοκρασιακό προφίλ-Θερμοκρασία profiling.....	83
Επίδραση του pH στην δραστηριότητα του ενζύμου-pH profile.....	85
Μελέτη θερμοσταθερότητας 60°C-Thermostability 60°C.....	87
Μελέτη επαναχρησιμοποίησης της ακινητοποιημένης ινβερτάσης -Reusability	89
3.3 Πολλαπλή ακινητοποίηση ενζύμων.....	91
Υδρόλυση μίγματος κελλοβιόζης5%/σουκρόζης5% (cb5%/sucr5% w/v)	91
4. Συζήτηση.....	94
5. Βιβλιογραφία	98

Συντμήσεις

Ελεύθερο ένζυμο: ελεύθερο/μη-ακίνητοποιημένο ένζυμο

bgl: β-D-γλυκοζιδάση

inv: ιμπερτάση

GO-C₂-NH₂: οξείδιο γραφενίου με διτανθρακική αλυσίδα που καταλήγει σε ελεύθερες αμινομάδες διαμέσου των οποίων έχει ομοιοπολικά ακίνητοποιηθεί το ένζυμο.

GOγFe-ole: οξείδιο γραφενίου με υπερπαραμαγνητικά σωματίδια σιδήρου στο οποίο έχουν προστεθεί ελεύθερες αμινομάδες μέσω ολιλαμίνης διαμέσου των οποίων έχει ομοιοπολικά ακίνητοποιηθεί το ένζυμο.

γFe-sil: υπερπαραμαγνητικά σωματίδια σιδήρου στα οποία έχουν προστεθεί ελεύθερες αμινομάδες μέσω σιλανοποίησης με APTES διαμέσου των οποίων έχει ομοιοπολικά ακίνητοποιηθεί το ένζυμο.

GOγFe-sil: οξείδιο γραφενίου με υπερπαραμαγνητικά σωματίδια σιδήρου στο οποίο έχουν προστεθεί ελεύθερες αμινομάδες μέσω σιλανοποίησης με APTES διαμέσου των οποίων έχει ομοιοπολικά ακίνητοποιηθεί το ένζυμο.

GOX: οξείδιο γραφενίου στο οποίο έχουν προστεθεί ελεύθερες αμινομάδες μέσω σιλανοποίησης με APTES διαμέσου των οποίων έχει ομοιοπολικά ακίνητοποιηθεί το ένζυμο σε πολλαπλές στοιβάδες μέσω διαδοχικής επανάληψης της διαδικασίας σιλανοποίησης και ακίνητοποίησης.

double: οξείδιο γραφενίου στο οποίο έχουν προστεθεί ελεύθερες αμινομάδες μέσω σιλανοποίησης με APTES διαμέσου των οποίων έχει ομοιοπολικά ακίνητοποιηθεί το ένζυμο σε πολλαπλές στοιβάδες μέσω διαδοχικής επανάληψης της διαδικασίας σιλανοποίησης και ακίνητοποίησης με την εξωτερική στοιβάδα να περιέχει το ένζυμο ιμπερτάση και τις εσωτερικές το ένζυμο β-D-γλυκοζιδάση.

cb: κελλοβιόζη

sucr: σουκρόζη

1. Βιοτεχνολογία και ένζυμα

1.1 Βιοτεχνολογία

Η Βιοτεχνολογία αποτελεί ένα ραγδαία αναπτυσσόμενο σύνθετο επιστημονικό κλάδο ο οποίος στοχεύει στην αξιοποίηση της εντυπωσιακής προόδου που έχει πραγματοποιηθεί στις Βιολογικές και συναφείς επιστήμες, με σκοπό την ανάπτυξη νέων και προηγμένων προϊόντων και υπηρεσιών. Με τον όρο βιοτεχνολογία εννοούμε την εφαρμογή διαφόρων βιολογικών λειτουργιών σε τεχνολογικό επίπεδο με στόχο τη παραγωγή χρήσιμων προϊόντων και υπηρεσιών. Ειδικότερα, αξιοποιούνται αντιδράσεις που πραγματοποιούνται σε ζωντανά βακτήρια, φυτικά ή και ζωικά κύτταρα, ενζυμικές αντιδράσεις, αλλά και προϊόντα της βιομάζας από διάφορους μικροοργανισμούς.

Ένας από τους πιο σημαντικούς κλάδους της βιοτεχνολογίας είναι η βιοκατάλυση. Ορίζεται ως η χρήση βιοκαταλυτών με σκοπό την παραγωγή εμπορικά σημαντικών προϊόντων και την πραγματοποίηση πλήθους αντιδράσεων. Η βιοκατάλυση καλύπτει τομείς από την υγεία και την σύνθεση ειδικών χημικών ουσιών, έως την ενέργεια και το περιβάλλον. (Κυριακίδης-2000)

Η βιοτεχνολογία χωρίζεται σε τρεις βασικούς κλάδους:

- πράσινη βιοτεχνολογία που αναφέρεται στη βιοτεχνολογία εφαρμοζόμενη στη γεωργία,
- κόκκινη βιοτεχνολογία που αναφέρεται στη φαρμακευτική και ιατρική βιοτεχνολογία,
- λευκή βιοτεχνολογία που αναφέρεται στη βιομηχανική βιοτεχνολογία.

Η βιομηχανική βιοτεχνολογία, γνωστή και ως λευκή ή περιβαλλοντική βιοτεχνολογία, αποτελεί την σύγχρονη προσέγγιση για την επωφελή σύνθεση βιοχημικών, βιοϋλικών και βιοκαυσίμων από ανανεώσιμες πηγές, μέσω της χρήσης κυττάρων ή και απομονωμένων ενζύμων. Η εφαρμογή της οδηγεί σε περισσότερο φιλικές προς το περιβάλλον διεργασίες με μικρότερη παραγωγή αποβλήτων και μικρότερη κατανάλωση ενέργειας, ενώ οι ήδη υπάρχουσες διεργασίες αποδεικνύουν την στενή συσχέτιση των εφαρμογών της βιομηχανικής βιοτεχνολογίας με κοινωνικά, οικονομικά και περιβαλλοντικά οφέλη (Σταμάτης-2010).

Η συγκεκριμένη εργασία καταπιάνεται με δύο από τις πιο πολλά υποσχόμενες τεχνολογίες του 21^{ου} αιώνα την βιοτεχνολογία και τη νανοτεχνολογία. Η νανοτεχνολογία είναι η επιστήμη δομών νανοκλίμακας που ασχολείται με τη δημιουργία, διερεύνηση και χρήση συστημάτων που είναι χίλιες φορές μικρότερα από τα στοιχεία που χρησιμοποιούνται αυτή τη στιγμή στη μικροηλεκτρονική. Σύγκλιση αυτών των δύο τεχνολογιών καταλήγει στην ανάπτυξη της νανο-βιοτεχνολογίας. Αυτός ο διεπιστημονικός συνδυασμός μπορεί να δημιουργήσει πολλά καινοτόμα εργαλεία.

Η ακινητοποίηση είναι συχνά το κλειδί για την βελτιστοποίηση της λειτουργικής απόδοση ενός ενζύμου σε βιομηχανικές διεργασίες, ειδικά κατά την χρήση σε μη-υδατικά μέσα (Roger A. Sheldon-2007).

1.2 Στοιχεία ενζύμων

Η λειτουργία των καταλυτών είναι να επιταχύνουν τις αντιδράσεις, δίχως να γίνονται μέρος των προϊόντων της αντίδρασης. Το ένζυμο αποτελεί βιολογικό καταλύτη που επιταχύνει μια χημική αντίδραση χωρίς να αλλάζει την ισορροπία της (Pekka Mäntsälä, Jarmo Niemi-2016). Τα ένζυμα είναι πρωτεϊνικής φύσεως μόρια, που μπορεί να είναι ενωμένα και με άλλες μη πρωτεϊνικές ουσίες. Η δράση ενός ενζύμου είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με την πρωτεϊνική του φύση, αν και υπάρχουν καταλυτικά βιομόρια που δεν είναι πρωτεϊνικά, όπως τα ριβο-ένζυμα (καταλυτικά RNA) και τα δεοξυ-ριβοένζυμα (μονόκλιωνα DNA). (Χ Σταμάτης-2010). Ουσιαστικά τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες που λειτουργούν ως καταλύτες που επιταχύνουν τις αντιδράσεις μειώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησης. (Pekka Mäntsälä, Jarmo Niemi-2016).

Πίνακας 1 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα χρήσης ενζύμων σε βιοκαταλυτικές διεργασίες

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Δρουν κάτω από ήπιες συνθήκες (pH 5-8 και σε θερμοκρασίες γύρω στους 20-40°C) σε υδατικά διαλύματα	Χαμηλή σταθερότητα σε ακραίες τιμές pH και θερμοκρασίας
Δυνατότητα δράσης σε μη συμβατικά συστήματα	Μειωμένη σταθερότητα, όταν απομακρυνθούν από την φυσική πηγή τους
Αυξημένοι καταλυτικοί ρυθμοί (επιταχύνουν τις αντιδράσεις κατά 10^5 - 10^{12})	Μεγάλος χρόνος ανάπτυξης νέων βιοκαταλυτών
Υψηλή εναντιοεκλεκτικότητα	Χαμηλή ειδική ενεργότητα
Υψηλή τοπο- και στέρεο-εκλεκτικότητα (διακρίνουν συγκεκριμένα τμήματα στα μόρια των υποστρωμάτων ή χειρόμορφες ενώσεις αντίστοιχα)	Η καταλυτική τους δράση (αρκετές φορές) επηρεάζεται από την παρουσία συνενζύμου
Δεν αλλοιώνουν τα τελικά προϊόντα ή την ισορροπία μεταξύ αντιδρώντων και προϊόντων σωμάτων μιας αντίδρασης	Αναστολή από το ίδιο το υπόστρωμα ή το προϊόν
Είναι φιλικό προς το περιβάλλον και βιοαποικοδομίσσιμοι καταλύτες	Έχουν υψηλό κόστος παραγωγής

1.2.1. Δομικά χαρακτηριστικά ενζύμων

Τα ένζυμα ως πρωτεΐνες έχουν το χαρακτηριστικό ότι είναι γραμμικά πολυμερή δομούμενα από μονομερή αμινοξέων. Περιέχουν, επίσης, μεγάλη σειρά λειτουργικών ομάδων, ενώ μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους και με άλλα βιολογικά

μόρια, για να δημιουργήσουν πολύπλοκα συσσωματώματα. Το μεγαλύτερο μέρος της καταλυτικής ισχύος των ενζύμων πηγάζει από το ότι φέρνουν τα υποστρώματα τους κοντά σε ευνοϊκό προσανατολισμό, για να προαγάγουν τον σχηματισμό των μεταβατικών καταστάσεων μέσα σε σύμπλοκα ενζύμου-υποστρώματος (ES). Τα υποστρώματα προσδένονται σε μια ειδική περιοχή του ενζύμου που ονομάζεται ενεργό κέντρο (active site). Τα περισσότερα ένζυμα είναι πολύ επιλεκτικά με τα υποστρώματα που προσδένουν.

Τα ένζυμα, όπως και γενικότερα οι πρωτεΐνες δομούνται από ένα σύνολο είκοσι αμινοξέων, τα οποία έχουν πλευρικές αλυσίδες που διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το μέγεθος, το σχήμα, το φορτίο, τη δεσμευτική συγγένεια υδρογόνου, την υδροφοβικότητα και τη χημική αντιδραστικότητα.

Στο βασικό σύνολο των αμινοξέων περιλαμβάνονται και τρία αμινοξέα με απλές αρωματικές πλευρικές αλυσίδες: η φαινυλαλανίνη, η τυροσίνη και η θρυπτοφάνη. Η θρυπτοφάνη έχει μέγιστο απορρόφησης στα 280nm, η τυροσίνη στα 276nm, ενώ η φαινυλαλανίνη απορροφά φως λιγότερο έντονα και σε μικρότερα μήκη κύματος. Η απορρόφηση φωτός στα 280nm μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης μιας πρωτεΐνης στο διάλυμα, αν είναι γνωστός ο αριθμός των καταλοίπων τυροσίνης και θρυπτοφάνης στην πρωτεΐνη. (Βιοχημεία τόμος I, Berg, Tymoczko, Stryer-Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης)

1.2.2. Βασικά χαρακτηριστικά δυνάμεων που αναπτύσσονται σε πρωτεΐνες

Τα αμινοξέα συνδέονται με πεπτιδικούς δεσμούς για να σχηματίσουν πολυπεπτιδικές αλυσίδες. Συγκεκριμένα δεσμεύεται η α-καρβοξυλική ομάδα ενός αμινοξέος στην α-αμινική ομάδα ενός άλλου αμινοξέος με έναν πεπτιδικό δεσμό (λέγεται και αμιδικός δεσμός). Η δημιουργία ενός διπεπτιδίου από δυο αμινοξέα συνοδεύεται από την απώλεια ενός μορίου ύδατος και απαιτείται προσθήκη ελεύθερης ενέργειας για την βιοσύνθεση του πεπτιδικού δεσμού. Η πολυπεπτιδική αλυσίδα που σχηματίζεται έχει πολικότητα μιας και το ένα άκρο με την α-αμινική ομάδα είναι θετικά φορτισμένο και το άλλο άκρο με την α-καρβοξυλική ομάδα είναι αρνητικά φορτισμένο. Σε μερικές πρωτεΐνες υπάρχουν διασυνδέσεις στην γραμμική πολυπεπτιδική αλυσίδα. Οι πιο

κοινές διασυνδέσεις είναι οι δισουλφιδικοί δεσμοί που σχηματίζονται από την οξειδωση ενός ζεύγους καταλοίπων κυστεΐνης (Βιοχημεία τόμος I, Berg, Tymoczko, Stryer-Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης)

Η φυσική διαμόρφωση της πρωτεΐνης πρέπει να είναι ενεργειακά σταθερή. Από θερμοδυναμικής άποψης, η ελεύθερη ενέργεια ενός πρωτεϊνικού μορίου επηρεάζεται από τους παρακάτω κύριους παράγοντες: 1) το υδροφοβικό φαινόμενο, 2) την ενέργεια των δεσμών υδρογόνου, 3) την ενέργεια των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και 4) την εντροπία διαμόρφωσης, εξαιτίας του περιορισμού της κίνησης της κύριας αλυσίδας και των πλευρικών αλυσίδων (Szilágyi et al.-2007).

Σήμερα, το υδροφοβικό φαινόμενο αντιμετωπίζεται ως συνδυασμός επίδρασης της ενυδάτωσης (εντροπικό φαινόμενο) και των αλληλεπιδράσεων van der Waals μεταξύ πολυπληθών μορίων (ενθαλπικό φαινόμενο) (Makhatadze and Privalov -1995). Είναι δηλαδή εντροπικό σε χαμηλές θερμοκρασίες και ενθαλπικό σε υψηλές θερμοκρασίες, το οποίο οδηγεί σε μια πολύπλοκη εξάρτηση της αντοχής τους από τη θερμοκρασία (Schellman-1997). Παρολαυτά, η υδροφοβική δύναμη θεωρείται ως η κύρια δύναμη ώθησης της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης (Dill-1990), καθώς αφαίρεση της οδηγεί σε αστραπιαία κατάρρευση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Χωρίς αμφιβολία, η υδροφοβική αλληλεπίδραση είναι και η κύρια σταθεροποιητική δύναμη που συνεισφέρει στη θερμοδυναμική σταθερότητα της αναδιπλωμένης κατάστασης.

Αν και οι δεσμοί υδρογόνου και οι υδροφοβικές δυνάμεις είναι ουσιαστικά μη-ειδικές, οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις είναι σε μεγάλο βαθμό ειδικές και για αυτό παίζουν ένα σημαντικό ρόλο στον καθορισμό της πρωτεϊνικής αναδίπλωσης, καθώς και στην πρωτεϊνική ευελιξία και λειτουργία.

1.2.3.1 Βασικά χαρακτηριστικά διάταξης των πρωτεϊνών

Η λειτουργία μιας πρωτεΐνης μπορεί να προκύψει μόνο από τη δομή της. Κάποιες από αυτές έχουν ενζυμικές λειτουργίες, για να καταλύσουν χημικές διαδικασίες ιδιαίτερα σημαντικές για την λειτουργία. Η ποικίλη και πολύ στοχευμένη λειτουργία των

πρωτεϊνών είναι απόρροια της πολύπλοκης, εξατομικευμένης διάταξης τους σε ότι αφορά το σχήμα, το φορτίο και την υδροφοβικότητα. Η διάταξη της επιφάνειας είναι αποτέλεσμα της μοναδικής τρισδιάστατης δομής της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Οι πρωτεΐνες είναι γραμμικά πολυμερή με μη-επαναλαμβανόμενη συγκεκριμένη ομοιοπολική δομή. Η ομοιοπολική δομή καθορίζεται από την σειρά με την οποία τα αμινοξέα συνδέονται μεταξύ τους. Από τα διάσημα πειράματα του Anfinsen (1973) τη δεκαετία του '60, πιστεύεται και σήμερα είναι αποδεκτό ότι η αναδίπλωση και η τελική φυσική δομή των πρωτεϊνών εξαρτώνται και καθορίζονται αυτόνομα από την αμινοξική αλληλουχία μιας συγκεκριμένης πρωτεΐνης και από το φυσικό περιβάλλον στο οποίο είναι διαλυμένη (Szilágyi et al.-2007).

Δημιουργούνται, λοιπόν, κάποια επίπεδα οργάνωσης της πρωτεΐνης. Αυτά δεν είναι ανεξάρτητα, αλλά αποτελούν προέκταση το ένα του άλλου, έως ότου καθοριστεί πλήρως η τρισδιάστατη δομή ολόκληρης της πρωτεΐνης. Πέραν, λοιπόν, της αλληλουχίας των αμινοξέων που θεωρείται ως η πρωτοταγής δομή, τα τμήματα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας σχηματίζουν α -έλικες και β -πτυχωτά φύλλα που συνιστούν την δευτεροταγή δομή. Η πλήρης τρισδιάστατη διαμόρφωση που σχηματίζεται από ολόκληρη την πολυπεπτιδική αλυσίδα-συμπεριλαμβάνοντας τις α -έλικες, τα β -πτυχωτά φύλλα, τα τυχαία σπειράματα και όποιες άλλες αγκύλες και πτυχές σχηματίζονται ανάμεσα στο N- και στο C-άκρο αναφέρεται ως τριτοταγής δομή. Αν μια πρωτεΐνη σχηματίζεται ως σύμπλοκο δυο ή περισσότερων πολυπεπτιδίων, τότε η πλήρης δομή ορίζεται ως τεταρτοταγής δομή (Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας, Alberts).

Σε ό,τι αφορά την δευτεροταγή δομή, η πολυπεπτιδική αλυσίδα αναδιπλώνεται σε κανονικά επαναλαμβανόμενες δομές, όπως είναι η α -έλικα, η β -πτυχωτή επιφάνεια, η β -στροφή και η Ω -θηλιά. Η α -έλικα είναι ίσως το πιο γνωστό στοιχείο δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών. Η ύπαρξη της προβλέφθηκε από τον Linus Pauling το 1951. Ειδικά οι δομές της α -έλικας και β -πτυχωτής επιφάνειας εμφανίζονται ως λύσεις αναδίπλωσης σε υδρόφοβα περιβάλλοντα που όμως περιέχουν και πολικές ομάδες (NH και C=O) της κύριας αλυσίδας και οι οποίες πρέπει να αλληλοεξουδετερώνονται, μέσω του σχηματισμού δεσμών υδρογόνου. Όπως ακριβώς, δηλαδή, συμβαίνει στα ενεργά κέντρα των ενζύμων (Carl Branden, John Tooze-2006).

Επομένως, μια γραμμική πολυπεπτιδική αλυσίδα οργανώνεται αυτόνομα σε μια χωρική, συμπαγή, καλά καθορισμένη τρισδιάστατη δομή. Σε μια σφαιρική πρωτεΐνη ο εσωτερικός πυρήνας της διαμορφώνεται κυρίως από υδροφοβικά αμινοξικά κατάλοιπα, τα οποία συγκρατούνται μεταξύ τους από δυνάμεις van der Waals, ενώ η επιφάνεια της σφαίρας διαμορφώνεται κυρίως από φορτισμένες και πολικές πλευρικές αλυσίδες. Οι πρωτεΐνες βρίσκονται σε αυτή τη κατάσταση συμπτυκνωμένης ύλης, ενώ η συγκεκριμένη διαμόρφωση καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από την ευελιξία του σκελετού του πολυπεπτιδίου και από συγκεκριμένες, ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις των πλευρικών αλυσίδων (Szilágyi et al.-2007).

Μια πρωτεΐνη μπορεί, όμως, να μετουσιωθεί με την επίδραση ορισμένων διαλυτών που διασπούν τις μη-ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις, οι οποίες συγκρατούν τη δομή της διπλωμένης αλυσίδας. Η μετουσίωση μετατρέπει την πρωτεΐνη σε μια εύκαμπτη πολυπεπτιδική αλυσίδα που έχει χάσει το φυσικό της σχήμα. Όταν ο αποδιατακτικός διαλύτης απομακρυνθεί, η πρωτεΐνη συχνά αναδιπλώνεται πάλι αυτόματα ή αλλιώς αναδιατάσσεται και ανακτά την αρχική της διαμόρφωση. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει, ότι όλες οι πληροφορίες που είναι απαραίτητες για τον καθορισμό του τρισδιάστατου σχήματος μιας πρωτεΐνης περιέχονται στην αλληλουχία των αμινοξέων της (Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας, Alberts).

1.2.3.2 Σταθερά αποδιάταξης/διάσπασης k_d

Η σταθεροποίηση του ενζύμου ορίζεται ως η ικανότητα του να διατηρεί την καταλυτική του δραστηριότητα σε καθορισμένες συνθήκες. Ένα βασικό μοντέλο αδρανοποίησης για μια πρωτεΐνη/ένζυμο που αποτελείται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα περιλαμβάνει την αποδιάταξη και τη μετουσίωση της φυσικής τριτοταγούς δομής (N). Η αποδιαταγμένη πρωτεΐνη (U) μπορεί να αναδιαταχθεί και να επανέλθει στη φυσική της διαμόρφωση ή να υποστεί περεταίρω μεταβολές που μπορεί να οδηγήσουν σε μόνιμη αδρανόποιηση (I): $N \leftrightarrow U \leftrightarrow I$

Η αναδιάταξη/αποδιάταξη της πρωτεΐνης χαρακτηρίζεται από την τιμή T_m , η οποία συμβολίζει τη θερμοκρασία στην οποία το 50% των πρωτεϊνικών μορίων έχει αποδιαταχθεί. Βασικό στόχο για τη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών αποτελεί η μετατόπιση ισορροπίας $N \leftrightarrow U$ προς τα δεξιά. Η ταχύτητα μόνιμης αδρανοποίησης χαρακτηρίζεται ποσοτικά από την εξίσωση

$$\frac{A_t}{A_0} = e^{-k_d t},$$

όπου A_t και A_0 αντιστοιχούν στη δραστηριότητα του ενζύμου σε χρόνο t και μηδενικό, αντίστοιχα, ενώ k_d η σταθερά ταχύτητας αδρανοποίησης πρώτης τάξης. Στην περίπτωση όπου η αδρανοποίηση είναι διαδικασία πρώτης τάξης, τότε ένας δείκτης αδρανοποίησης είναι ο χρόνος ημιζωής $t_{1/2} = 0.693/k_d$ (X. Σταμάτης-2010)

1.2.4. Ένζυμα και εφαρμογές τους

1.2.4.1 Χαρακτηριστικές εφαρμογές ενζύμων στη βιομηχανία

Η εφαρμογή των ενζύμων στη βιομηχανία περιλαμβάνει την παραγωγή ενός ευρύτατου φάσματος προϊόντων, συμπεριλαμβανομένων των τροφίμων, ποτών, χημικών πρώτων υλών, καυσίμων, φαρμάκων, καθώς και τις καθαρές τεχνολογίες που χρησιμοποιούνται για την επεξεργασία των αποβλήτων και τον έλεγχο της ρύπανσης. Χαρακτηριστικά παραδείγματα βλέπει κανείς στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 2 Εφαρμογές ενζύμων στη βιομηχανία.

Ένζυμο	Βιομηχανία	Προϊόν ή εφαρμογή
Λιπάση	Γαλακτοκομικά προϊόντα	Ανάπτυξη παραγόντων βελτίωσης γεύσης
Λιπάση	Αρτοποιία	Αύξηση όγκου στο ψωμί
Υπεροξειδάση της λιγνίνης	Βιομηχανία ξύλου/χάρτου	Αποικοδόμηση λιγνίνης
Γλυκοζιδάσες	Βιομηχανία καυσίμων	Βιαιθανόλη
Αμυλάσες	Υφαντουργία	Απομάκρυνση αμύλου
Λακκάση	Υφαντουργία	Λεύκανση
Πρωτεάση	Απορρυπαντικά	Αφαίρεση λεκέ πρωτεΐνης
Ευλανάση	Ζωοτροφές	Ευπεψία τροφής
Νιτριλάση	Οργανική σύνθεση	Σύνθεση οπτικά ενεργών/καθαρών προϊόντων

1.2.5.1 Η β-D-γλυκοζιδάση

Οι β-γλυκοζιδάσες υδρολύουν τον Ο-γλυκοζυλο δεσμό των τελικών, μη-αναγωγικών β-D-γλυκόζυλο-καταλοίπων με την ταυτόχρονη απελευθέρωση β-D-γλυκόζης. Για παράδειγμα τον δεσμό στο μόριο της κελλοβιόζης. (Mette Lübeck et al-2013)

Παίζουν σημαντικό ρόλο στη φύση, συμπεριλαμβανομένων της αποσύνθεσης κυτταρινικής μάζας από μύκητες και βακτήρια, της διάσπασης γλυκολιπιδίων στα λυσοσώματα των θηλαστικών και της αποκοπής των γλυκοζυλιωμένων φλαβονοειδών των φυτών. (Krisch, J et al. -2010)

Η εφαρμογή τους στη μετατροπή βιομάζας με υψηλή συγκέντρωση κυτταρίνης σε ζυμωτικά σάκχαρα για την παραγωγή αιθανόλης έχει ιδιαίτερο ερευνητικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον. (Chen M. et al -2007).

Ειδικότερα, υδρολύουν την παραγόμενη κελλοβιόζη σε δυο μόρια γλυκόζης προστατεύοντας έτσι τις ενδογλυκανάσες και της κελλοβιοϋδρολάσες από την αναστολή από την κελλοβιόζη. (Krisch, J et al. -2010)

Πέραν της υδρολυτικής δραστηριότητας τους, ορισμένες περιπτώσεις αυτών των ενζύμων μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στην σύνθεση μέσω αντίστροφης υδρόλυσης ή trans-γλυκοζυλίωσης. (Bhatia Y, Mishra S, Bisaria VS.-2002)

Η β-γλυκοζιδάση από αμύγδαλα έχει αποτελέσει αντικείμενο περισσότερων κινητικών μελετών από οποιαδήποτε άλλη γλυκοζιδάση. Αυτό είναι αποτέλεσμα της ιστορίας της, της εύκολης απομόνωσης της από ένα ιδιαίτερα διαθέσιμο υλικό, της μεγάλης εμπορικής της διάθεσης της, αλλά και εξαιτίας της εύκολης διαπίστωσης της δράσης της με χρήση αρυλογλυκοζιδίων. Το ένζυμο είναι γνωστό ότι υπάρχει σε πλήθος ισο-μορφών οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν πρόβλημα στη εξήγηση των κινητικών μελετών.

Δομή

Με βάση την ακολουθία του πεπτιδίου που έχει εξαχθεί από ένα ενδιάμεσο γλυκοζυλο-ενζύμου, η β-γλυκοζιδάση από γλυκά αμύγδαλα κατατάσσεται στις γλυκοζιδάσες της Οικογένειας 1, με το πυρηνόφιλο του ενεργού της κέντρου να περιέχεται στην ακολουθία Ile-Thr-Glu-Asn-Gly. (Shouming He and Stephen G. Withers-1997)

Δεν έχει διερευνηθεί η κρυσταλλογραφική δομή της συγκεκριμένης β-γλυκοζιδάσης. Παρολαυτά, θεωρείται ότι υπάρχει μια διατήρηση μεταξύ των γλυκοζιδασών της Οικογένειας 1. Εδώ, λοιπόν, παρατίθενται κάποια βασικά στοιχεία της κρυσταλλογραφικής δομής μιας άλλης β-γλυκοζιδάσης της οικογένειας 1. Συγκεκριμένα, οι Barrett et al.-1995 διερεύνησαν την δομή της *cyanogenic beta-glucosidase from white clover* και κατέδειξαν από συγκρίσεις αλληλουχίας μεταξύ β-γλυκοζιδασών της ίδιας οικογένειας, ότι τα κατάλοιπα Glu183 και Glu397 διατηρούνται. Και τα δυο κατάλοιπα βρίσκονται στο τέλος μιας τσέπης στο καρβοξυτελικό άκρο ενός βαρελιού και τους έχει αποδοθεί ο ρόλος του δότη

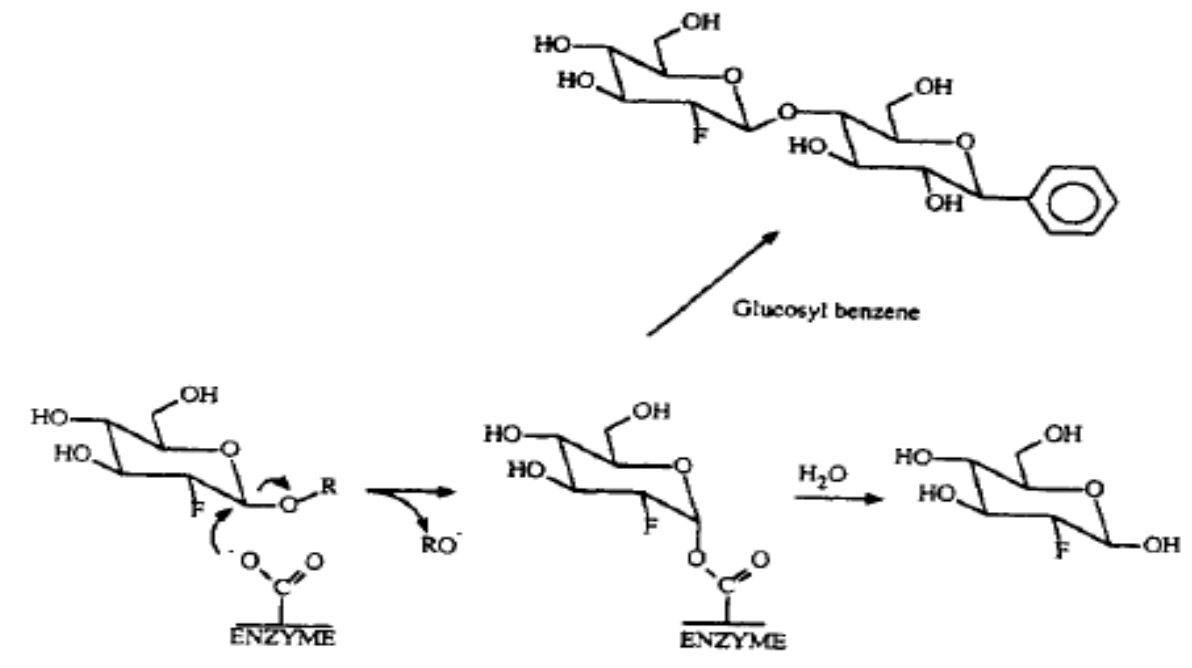
πρωτονίων και του πυρηνόφιλου, αντίστοιχα, με βάση πειράματα αναστολέων και μεταλλαξιγένεσης. Αυτοί οι ρόλοι είναι συνεπείς με τα περιβάλλοντα των δύο καταλοίπων. Η εν λόγω τσέπη είναι τυπικό χαρακτηριστικό θέσης πρόσδεσης σακχάρων καθώς περιέχει μια σειρά από φορτισμένες, αρωματικές και πολικές ομάδες. (Barrett T. et al. -1995)

Μηχανισμός δράσης

Ο μηχανισμός δράσης της β-γλυκοζιδάσης από γλυκά αμύγδαλα δεν έχει εξακριβωθεί, αλλά θεωρείται ότι είναι όμοιος με αυτόν της β-γλυκοζιδάσης από το *Agrobacterium*. Συγκεκριμένα:

Στο στάδιο της γλυκοζυλίωσης, το πυρηνόφιλο Glu-406 επιτίθεται στον ανωμερικό άνθρακα (C-1) του υποστρώματος και δημιουργεί ένα ομοιοπολικό ενδιάμεσο γλυκοζυ-ένζυμο με την επακόλουθη απελευθέρωση του άγλυκου αμέσως μετά την πρωτονίωση του γλυκοζιδικού οξυγόνου από τον όξινο καταλύτη Glu-191 (Withers et al. 1990). Στο επόμενο βήμα απογλυκοζιδίωσης, το Glu-191, λειτουργεί ως βάση και ένα μόριο νερού λειτουργεί ως πυρηνόφιλο και επιτίθεται στο ομοιοπολικό γλυκοζυλο-ένζυμο, απελευθερώνοντας την γλυκόζη και επαναδημιουργώντας το πυρηνόφιλο Glu-406. Withers GG et al. (1990)

Εικόνα 1 Μηχανισμός δράσης β-D-γλυκοζιδάσης από *Agrobacterium*



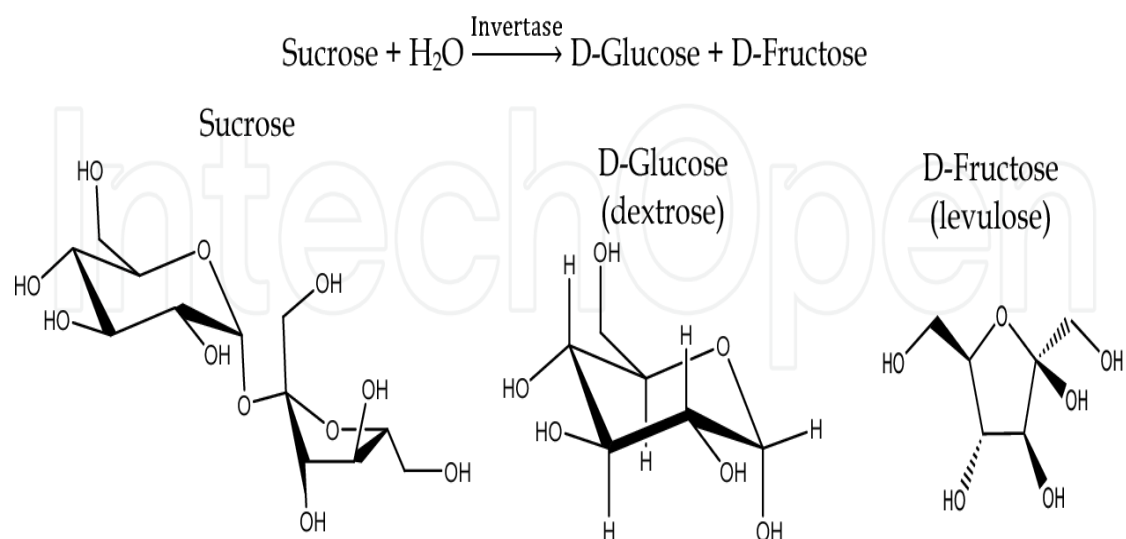
1.2.5.2 Ιμβερτάση

Η ιμβερτάση ή αλλιώς β-D-φρουκτοφουρανοσιδάση (E.C. 3.2.1.26) από τον *Saccharomyces cerevisiae* είναι ένα ένζυμο με μεγάλη εκλεκτικότητα προς την υδρόλυση της σουκρόζης. Το αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι ένα ισομοριακό μίγμα β-D-γλυκόζης και β-D-φρουκτόζης, γνωστό ως σιρόπι ιμβερτοποίησης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποφυγή του φαινομένου της κρυσταλλοποίησης και επειδή η φρουκτόζη είναι γλυκύτερη από την σουκρόζη, την αύξηση της γλυκύτητας του προϊόντος. Η αποφυγή της κρυσταλλοποίησης δικαιολογεί την κύρια εφαρμογή του ενζύμου στην βιομηχανία του φαγητού για την δημιουργία πληρώματος γλυκών και διατήρησης της μαλακότητας τους. Επίσης, η ιμβερτάση μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ζυμωτικές διαδικασίες, όταν το υπόστρωμα είναι σουκρόζη, για την παρασκευή τεχνητού μελιού, σαν υγροποιητικός παράγοντας σε γλυκά, καθώς και στην βιομηχανία φαρμάκου. (Kotwal, S. M., & Shankar, V. -2009).

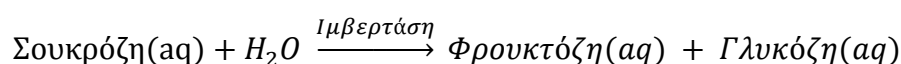
Η διαλυτότητα των ελεύθερων ενζύμων κάνει την χρήση τους σε διαδικασίες μεγάλης κλίμακας σχετικά ακριβή, μιας και σε ένα μίγμα που περιέχει το υπόστρωμα, τα προϊόντα και άλλα στοιχεία, η επανάκτηση είναι δύσκολη και οικονομικά επιβλαβής. (Kotwal & Shankar- 2009).

Στα κύτταρα ζύμης, η ιμπερτάση κατηγοριοποιείται ως εξωκυτταρική γλυκοπρωτεΐνη, η οποία βρίσκεται στο χώρο μεταξύ της πλασματικής μεμβράνης του μύκητα και του εξωτερικού κυτταρικού τοιχώματος (γνωστός και ως περιπλασματικός χώρος). Το ένζυμο χρησιμεύει στο να κόβει την σουκρόζη στο εξωτερικό του κυτταρικού σε μονοσακχαρίτες, οι οποίοι μπορούν να μεταφερθούν και κατ'επέκταση να μεταβολιστούν στο κυτταρόπλασμα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την δυσκολία χρήσης σακχάρων ως πηγή ενέργειας από τον μύκητα σε περίπτωση έλλειψης του ενζύμου. (William Ward et al. 2012).

Εικόνα 2 Αντίδραση ιμπερτάσης με υπόστρωμα σουκρόζη



Το ένζυμο, λοιπόν, ακολουθεί τον τρόπο δράσης που τονίζεται στην παρακάτω εξίσωση και φαίνεται και στην εικόνα_.



Το ένζυμο έχει 270kD μοριακό βάρος και αποτελείται από δύο ταυτόσημες υπομονάδες που έχουν υποστεί σε μεγάλο βαθμό γλυκοζυλίωση και μοριακό βάρος 135kD περίπου έκαστη. (Neumann & Lampen, 1967). (N.P. Neumann & J.O. Lampen-1967).

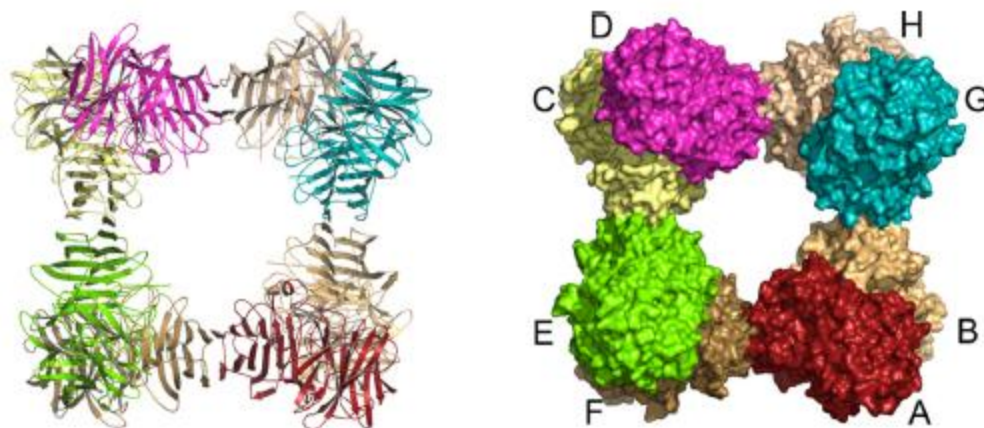
Δεν αποτελεί έκπληξη ότι η περιπλασματική μορφή της μυκητιακής ιμβερτάσης είναι γλυκοπρωτεΐνη, μιας και οι εξωκυτταρικές πρωτεΐνες είναι συχνά συνδεδεμένες με ολιγοσακχαριδικές αλυσίδες (πχ γλυκοζίδια) μέσω μετα-μεταφραστικής τροποποίησης προτού εκκριθούν από ευκαρυωτικά κύτταρα. (Lampen, 1971). (Lampen, J.O. - 1971)

Η παραγωγή ενός σύνθετου οκταμερούς υπεργλυκοζυλιωμένου ενζύμου αποκλείει την διάχυση του εκτός του περιπλασματικού χώρου. Η έκκριση της ιμβερτάσης που συμβαίνει σε πολλούς μικροοργανισμού αποτελεί εξελικτικό πλεονέκτημα εξάλειψης μηχανισμού εισαγωγής σουκρόζης. (Angela Sainz-Polo et al.-2013)

Δομή

Οι συγγραφείς διερεύνησαν την δομή της ανασυνδυασμένης SInv δείχνοντας, ότι το ένζυμο αναδιπλώνεται στους τομείς της καταλυτικής β-έλικας και β-σάντουιτς που είναι χαρακτηριστικοί των GH32 ενζύμων. Παρολαυτά, η συγκεκριμένη ιμβερτάση παρουσιάζει μια ασυνήθη τεταρτοταγή δομή. Μονομερή συγκροτούνται σε δυο ειδών διμερή που με την σειρά τους συγκροτούν ένα οκταμερές. Το συγκεκριμένο οκταμερές μπορεί πιο σωστά να χαρακτηριστεί ως τετραμερές διμερών. Ο διμερισμός παίζει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην εκλεκτικότητα υποστρώματος, γιατί αυτός ο σχηματισμός δημιουργεί στερικές παρεμποδίσεις που δεν επιτρέπουν σε ολιγοσακχαρίτες μεγαλύτερους των τεσσάρων υπομονάδων να έχουν πρόσβαση στο ενεργό κέντρο. Η συγκριτική ανάλυση των GH32 ενζύμων έδειξε, ότι ο σχηματισμός του οκταμερούς SInv πραγματοποιείται μέσω μιας επέκτασης β-φύλλου που φαίνεται να είναι μοναδική σε αυτό το ένζυμο. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των διμερών καθορίζεται από μια μικρή αμινοξική ακολουθία στην αρχή του τομέα β-σάντουιτς. Τα αποτελέσματα αυτά υπογραμμίζουν τον ρόλο του μη-καταλυτικού τομέα στην ρύθμιση της εκλεκτικότητας υποστρώματος συμπληρώνοντας έτσι τις υπάρχουσες γνώσεις για την δραστηριότητα της συγκεκριμένης οικογένειας ενζύμων. Επίσης, φωτίζουν τα δομικά χαρακτηριστικά που κυριαρχούν στη δομή και αναγνώριση μεταξύ πρωτεΐνης και υδατάνθρακα. (Angela Sainz-Polo et al.-2013)

Εικόνα 3 3D δομή οκταμερούς *Sin*. αριστερά σε μορφή κορδέλας και δεξιά η επιφάνεια πρόσβασης του διαλύτη, με την κάθε υπομονάδα σημειωμένη με διαφορετικό χρώμα.



Φαίνεται, ότι η καλύτερη περιγραφή της δομής είναι αυτή του τετραμερούς δύο διαφορετικών διμερών, των AB/CD και EF/GH

1.2.5.3 Ακίνητοποίηση-Φορείς ακίνητοποίησης

Η ακίνητοποίηση του ενζύμου β-γλυκοζιδάση είναι ένα σημαντικό εργαλείο για την ενίσχυση της δράσης της, μιας και γενικότερα, το ακίνητοποιημένο ένζυμο επιτρέπει την αποδοτική επανάκτηση και επαναχρησιμοποίηση του. Μειώνεται έτσι το κόστος της διαδικασίας, ενώ ταυτόχρονα τα ακίνητοποιημένα ένζυμα εμφανίζουν αυξημένη σταθερότητα σε μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών, pH και χρήσης οργανικών διαλυτών. (Planes A et al.-2008)

Ανάμεσα στους φορείς ακίνητοποίησης που έχουν χρησιμοποιηθεί ως σήμερα, τα νανοδομημένα στοιχεία και τα υβριδικά υλικά, συμπεριλαμβανομένων των νανοσωματιδίων, νανο-ινών και νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα αποτελούν αντικείμενα εκτεταμένης έρευνας και προσπάθειας ανάπτυξης εφαρμογών. (Kim, J. et

al. -2008, (Verma, M.L. et al.-2013), (Ge, J. et al. -2012), -(Ansari, S.A. and Husain, Q. -2012), (Rana, S. et al.-2010)

Ένα από τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά των νανοδομημένων υλικών είναι η δυνατότητα ελέγχου του περιβάλλοντος του βιομορίου και έτσι της βιολογικής λειτουργίας και σταθερότητας του. (Ansari, S.A. and Husain, Q. -2012), (Rana, S. et al. -2010)

Αποτέλεσμα αυτού είναι τα νέα νανοϋλικά να παρέχουν συναρπαστικές ευκαιρίες για βιοτεχνολογική ανάπτυξη εξαιτίας της μοναδικότητας της δομής τους, των στοιχείων τους και των ιδιοτήτων τους. (Martin, C.R. and Kohli, P. -2003)

Ιδιαίτερη μνεία αξίζει στο γραφένιο. Το γραφένιο είναι μια δομή 0D φουλερενίου, 1D νανοσωλήνων και 3D γραφίτη. Το γραφένιο έχει μοναδική επίπεδη δομή, καθώς και καινοτόμες ηλεκτρονιακές ιδιότητες, οι οποίες έχουν τραβήξει το ενδιαφέρον των επιστημόνων. (Martin, C.R. and Kohli, P. -2003)

Μεγάλη σημασία έχουν και τα υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια. Εξαιτίας των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών τους, αυτά τα σωματίδια παύουν να έχουν μαγνητικές ιδιότητες μετά την αφαίρεση του εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. (M. Mahmoudi et al.- 2011)

Ειδικότερα, τα υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ μπορούν να ενεργοποιηθούν με αμινοπροπυλτριεθοξυσιλάνη (APTES). Αυτή η διαδικασία χρησιμοποιείται για πρόσδεση νανοσωματιδίων σε άλλες μοριακές δομές. (J. Zhu, et al.-2012)

Ακινητοποιώντας ένζυμα σε γραφένιο και σε παράγωγα του, οι επιστήμονες προσπαθούν να εκμεταλλευτούν τα πλεονεκτήματα που προσφέρονται από αυτά τα υλικά, καθώς και από τις τεχνικές ακινητοποίησης που χρησιμοποιούνται.

Ανάμεσα στις πολλές μεθόδους ακινητοποίησης που χρησιμοποιούνται (πχ προσρόφηση, εγκλωβισμός, ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση και ομοιοπολική σύνδεση) η ομοιοπολική σύνδεση των ενζύμων σε μη-υδατοδιαλυτούς φορείς φαίνεται να είναι η πιο ελκυστική μέθοδος για να επιτευχθεί η ενζυμική σταθερότητα,

η επαναχρησιμοποίηση και η επανάκτηση του ενζύμου. (J. Bryjak, J. Liesiene, B.N. Kolarz,- 2008)

1.3 Στοιχεία ακινητοποίησης

Με τον όρο ακινητοποίηση ενζύμων ή κυττάρων αναφερόμαστε στον περιορισμό τους σε μια τεχνητή στερεά φάση (αδιάλυτο-υλικό υπόστρωμα στήριξης), στην οποία διατηρούνται οι καταλυτικές ιδιότητες και η σταθερότητα τους έτσι ώστε το βιοκαταλυτικό αυτό σύστημα να μπορεί να χρησιμοποιηθεί επαναλαμβανόμενα και συνεχώς. (Σταμάτης-2010). Η ακινητοποίηση (immobilization) γίνεται με τέτοιο τρόπο, ώστε να επιτρέπεται η αμφίδρομη μεταφορά μάζας (π.χ. υποστρώματος, προϊόντος, οξυγόνου κλπ) μεταξύ βιοκαταλυτικής φάσης και κύριας υγρής φάσης (Κλώνης-2010).

Ακινητοποιημένο ονομάζεται το μόριο εκείνο, του οποίου η κινητικότητα στο χώρο έχει απαγορευτεί ολοκληρωτικά ή μέχρις ένα βαθμό μέσω προσκόλλησης σε μια σταθερή δομή (Elnashar-2010).

Τα κύρια συστατικά ενός ακινητοποιημένου ενζύμου είναι (Abdelmajeed et al.-2012):

- το ένζυμο,
- η μήτρα ακινητοποίησης,
- ο τύπος διάδρασης μεταξύ ενζύμου και φορέα

1.3.1 Πλεονεκτήματα ακινητοποίησης ενζύμων

Πλεονεκτήματα ακινητοποίησης ενζύμων (Σταμάτης-2010; Κλώνης-2010):

- Αύξηση της σταθερότητας του ενζύμου
- Εύκολο και άμεσο έλεγχο της αντίδρασης, με απλή προσθήκη ή αφαίρεση ενζύμου
- Οικονομία, γιατί μετά το πέρας της αντίδραση χρησιμοποιείται το ίδιο ένζυμο πολλές φορές ακόμη

- Δυνατότητα συνεχούς λειτουργίας της βιοκαταλυτικής αντίδρασης
- Η δυνατότητα διατήρησης του βιοκαταλύτη στον βιοαντιδραστήρα. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατή η επαναχρησιμοποίηση του βιοκαταλύτη, ενώ αποφεύγεται η επιμόλυνση του προϊόντος της βιοκαταλυόμενης αντίδραση με μόρια ή κύτταρα του βιοκαταλύτη.
- Η επίτευξη υψηλών ενεργών συγκεντρώσεων του βιοκαταλύτη στο σύστημα της αντίδρασης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της παραγωγικότητας της βιοκαταλυτικής διεργασίας, την ταχεία μετατροπή ασταθών υποστρωμάτων και την ελαχιστοποίηση των ανεπιθύμητων παράπλευρων αντιδράσεων.
- Ο έλεγχος του μικρο-περιβάλλοντος του βιοκαταλύτη. Ο έλεγχος στο επίπεδο αυτό επιτρέπει τη διαχείριση της καταλυτικής δραστηριότητας και εξειδίκευσης καθώς και την αύξηση της σταθερότητας του βιοκαταλύτη.
- Ο εύκολος διαχωρισμός του βιοκαταλύτη από το προϊόν, γεγονός που επιτρέπει τον ακριβή έλεγχο του χρόνου της βιοκαταλυτικής διεργασίας, αλλά και την εύκολη και άμεση παραλαβή προϊόντος, εφόσον ένζυμο και προϊόν βρίσκονται σε διαφορετικές φάσεις (ετερογενές σύστημα)

Σε μια τέλεια ενζυμική ακινητοποίηση πρέπει οι πλευρικές ομάδες των αμινοξέων της ενεργού περιοχής να μένουν αναλλοίωτες, ενώ καθ'όλη τη διάρκεια της αντίδρασης το ένζυμο παίρνει την κατάλληλη στερεοδιάταξη ή διαμόρφωση (conformation) που του εξασφαλίζει την καταλυτική λειτουργικότητα. Αυτές οι δυο προϋποθέσεις μπορεί να μην ικανοποιούνται πάντα.

1.3.2 Μειονεκτήματα ακινητοποίησης

Πιθανά προβλήματα (Κλώνης-2010) :

- Τα χρησιμοποιούμενα κατά την ακινητοποίηση χημικά είναι δυνατόν να αντιδράσουν κατά τρόπο μη-αντιστρέψιμο και με ομάδες της ενεργού περιοχής, με αποτέλεσμα την αδρανοποίηση του ενζύμου.
- Το μόριο του ενζύμου συνήθως δεσμεύεται στον φορέα σε περισσότερα από ένα σημεία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του βαθμού ελευθερίας του

βιομορίου για στερεοδιατακτικές μεταβολές (conformational changes) κατά την καταλυτική αντίδραση. Το φαινόμενο παρατηρείται σε περιπτώσεις μηχανισμού επαγόμενης προσαρμογής για το ένζυμο και του μηχανισμού των αλλοστερικών ενζύμων.

1.3.3 Επίδραση του φορέα ακινητοποίησης στο ένζυμο

Η δομή του φορέα μπορεί να προκαλεί στερεοχημικούς περιορισμούς στο ένζυμο επειδή υποχρεωτικά βρίσκεται πολύ κοντά σε αυτό μετά την διαδικασία της ακινητοποίησης και το επηρεάζει ως εξής:

- Σταθεροποιώντας τη δομή του ενζύμου και αυξάνοντας τη λειτουργική του σταθερότητα.
- Επηρεάζοντας την φαινομενική ενζυμική δραστηριότητα. Αυτό είναι αποτέλεσμα περιορισμού της μεταφοράς υποστρώματος ή αναστολέα στο ένζυμο διαμέσου του φορέα.
- Ακινητοποιώντας το ένζυμο κατά τέτοιο προσανατολισμό ως προς τη δομή του φορέα, ώστε να παρεμποδίζεται η είσοδος υποστρώματος στην ενεργό περιοχή. Το ενεργό κέντρο μπορεί δηλαδή να είναι στραμμένο προς τον φορέα ακινητοποίησης.

1.3.4 Τεχνικές ακινητοποίησης ενζύμων

Οι τεχνικές ακινητοποίησης με χρήση βιομορίων και νανοβιοτεχνολογίας είναι ζήτημα που αγγίζει πολύπλευρα τη ζωή μας. Χρησιμοποιεί τις επιστήμες της βιολογίας, χημείας, φυσικής, υπολογιστών και μηχανικής υλικών για την ανάπτυξη οργάνων και προϊόντων τελευταίας τεχνολογίας με πολλά υποσχόμενα αποτελέσματα. Η ακινητοποίηση ενζύμων έχει αποδειχθεί ιδιαίτερα χρήσιμη, επειδή έχει επιτρέψει στα ένζυμα να χρησιμοποιούνται εύκολα και πολλαπλές φορές για την ίδια αντίδραση με μεγαλύτερη ημιζωή και λιγότερη πρωτεόλυση και έχει παρέχει μια μέθοδο για απευθείας έλεγχο του ρυθμού της αντίδρασης, όπως επίσης και του

χρόνου έναρξης και σταματήματος της αντίδρασης. Έχει επίσης βοηθήσει στη αποτροπή μόλυνσης του υποστρώματος με ένζυμο/πρωτεΐνη ή άλλο συστατικό, γεγονός που μειώνει το κόστος καθαρισμού. Αυτά τα πλεονεκτήματα των ακινητοποιημένων ενζύμων τα έχουν καταστήσει ιδιαίτερα εφαρμόσιμα σε πλήθος εξελισσόμενων βιοτεχνολογικών διεργασιών (Barabino et al.-1978). Άλλες εφαρμογές της ακινητοποίησης ενζύμων βρίσκει κανείς στη βιομηχανία πλαστικών και κλωστοϋφαντουργίας.

1.3.5 Χημικές μέθοδοι ακινητοποίησης βιοκαταλυτών

Η ακινητοποίηση των βιοκαταλυτών σε φορείς αδιάλυτους στο νερό επιτυγχάνεται τόσο με χημικές όσο και με φυσικές μεθόδους, οι οποίες περιλαμβάνουν διάφορες τεχνικές.

Χημικές τεχνικές ακινητοποίησης:

- Ομοιοπολική σύνδεση σε ενεργοποιημένο φορέα
- Διαμοριακή σύνδεση

Η μέθοδος της ομοιοπολικής σύνδεσης του βιοκαταλύτη (ένζυμο) με τον φορέα βασίζεται στο σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ των υπολειμμάτων των αμινοξέων του ενζύμου και δραστικών χημικών ομάδων του φορέα. Από μέρους του πρωτεϊνικού μορίου συμμετέχουν οι εξής ομάδες στο σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών με το φορέα ακινητοποίησης: ϵ -αμινομάδα ($-\text{NH}_2$) της Lys, α -αμινομάδα του αμινοτελικού άκρου του πρωτεϊνικού μορίου, η σουλφυδρολομάδα ($-\text{SH}$) της Cys, οι υδροξυλομάδες ($-\text{OH}$) των Tyr, Ser και Thr, οι καρβοξυλομάδες ($-\text{COOH}$) των Asp και Glu, καθώς και η γουανιδινομάδα της Arg (Σταμάτης- 2010).

Οι παράγοντες που καθορίζουν την καταλληλότητα των αμινοξικών καταλοίπων ενός ενζύμου για την ακινητοποίηση με ανάπτυξη ομοιοπολικού δεσμού είναι (Κλώνης- 2010):

- Το μέσο ποσοστό συμμετοχής των αμινοξικών καταλοίπων στην πρωτοταγή δομή των πρωτεϊνών. Στην περίπτωση αυτή, τα αμινοξικά κατάλοιπα

κατατάσσονται με μειούμενη συμμετοχή ως εξής: Ser, Lys, Thr, Asp, Glu, Arg, Tyr, Cys, His, Met, Trp.

- Η σχετική υδροφοβικότητα των αμινοξικών καταλοίπων
- Η χημική δραστηριότητα των αμινοξικών καταλοίπων ($\theta < 35^{\circ}\text{C}$, $4 < \text{pH} < 9$, λόγω της ευαισθησίας των ενζύμων)


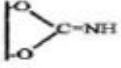

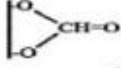


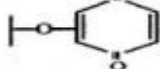




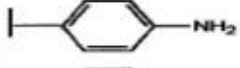
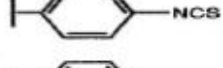
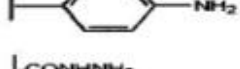
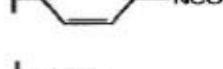


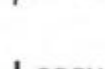


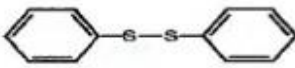
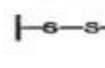
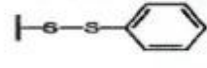
Εικόνα 4 Ενεργά κατάλοιπα πρωτεϊνών (Abdelmajeed et al.- 2012).

Reaction	Support - enzyme linkage
Diazotization	Support--N=N---enzyme
Alkylation and arylation	Support--CH ₂ -NH---enzyme
	Support--CH ₂ -S---enzyme
Schiff's base formation	Support---CH=N---enzyme
Amide bond formation	Support---CO-NH---enzyme
Amidation reaction	Support---CNH-NH---enzyme
Thiol-disulfide interchange	Support---S-S---enzyme
Carrier binding with bifunctional reagents	Support---O(CH ₂) ₂ N=CH(CH ₂) ₃ CH=N---enzyme

1.3.6 Λειτουργικοποίηση του φορέα ακινητοποίησης

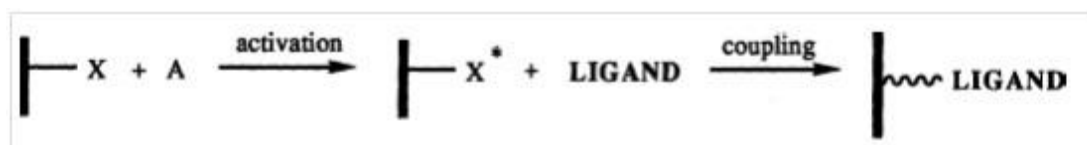
Απαιτείται πολλές φορές να λειτουργικοποιηθεί πρώτα ο φορέας ακινητοποίησης του ενζύμου. Ο παρακάτω πίνακας παραθέτει πιθανούς τρόπους.

Εικόνα 5 Ενεργοποιημένα υποστρώματα για πρωτεϊνική ακινητοποίηση (Abdelmajeed et al. -2012).

Nucleophilic group of support	Activating reagent	Active derivative
	CNBr	
	ClO ₂ C ₂ H ₅	
		
	IO ₄ ⁻	
	Cl ₂ CS	
	Cl ₂ CS	
	Cl ₂ CO	
	NaNO ₂	
	R-N+C+N-R', H ⁺	
	CH ₃ OH, NH ₂ NH ₂ , HNO ₂ 	 

Γενικότερα, ακολουθείται το εξής χημικό σχέδιο για την προσθήκη ενός προσδέτη στην επιφάνεια του φορέα ακινητοποίησης:

Εικόνα 6 Γενικό σχέδιο σύνδεσης προσδέτη σε επιφάνεια (Drumheller-2000).



Δυο από τους βασικότερους προσδέτες σε επιφάνεια ακινητοποίησης που χρησιμοποιούνται είναι εκείνοι, οι οποίοι μετά την πρόσδεση στον φορέα έχουν ελεύθερη για πρόσδεση με το ένζυμο μια καρβοξυλική (-COOH) ή μια αμινική (-NH₂) ομάδα. Δύο τρόποι παραγωγής αμινικών φορέων είναι η λειτουργικοποίηση με χρήση ολεϋλαμίνης και η λειτουργικοποίηση με χρήση οργανοσιλανών.

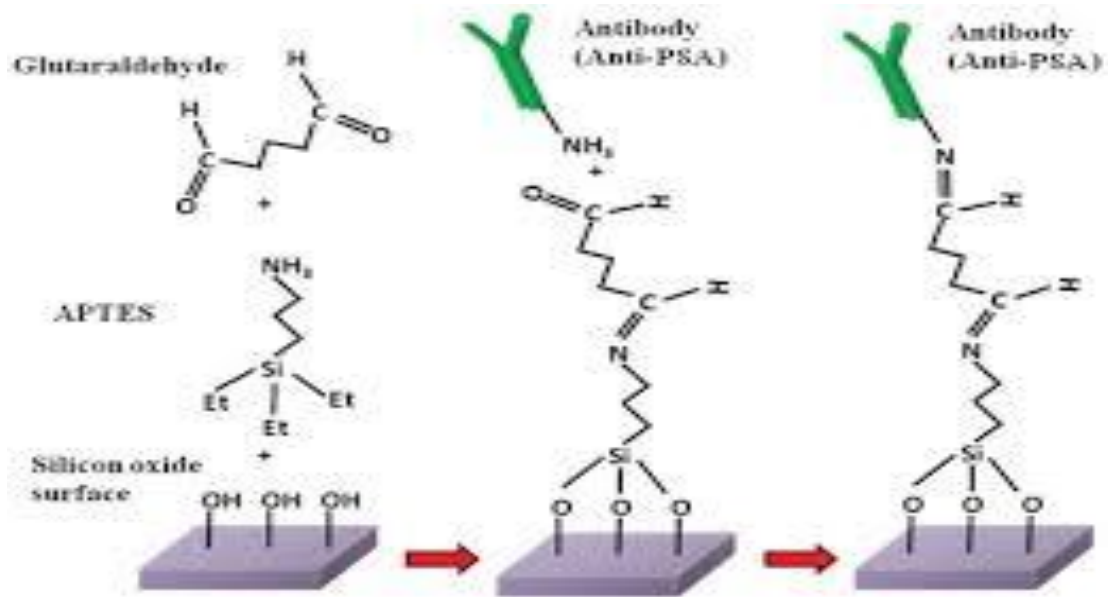
Παράδειγμα χρήσης της ολεϋλαμίνης είναι η διαδικασία ανάπτυξης νανοσωματιδίων που περιέχουν σίδηρο με την διαδικασία της θερμόλυσης και που ως αποτέλεσμα έχει την παραμονή της ολεϋλαμίνης στην επιφάνεια των σωματιδίων που οδηγεί και στην υδρόφοβη συμπεριφορά τους.

1.3.7 Χρήση APTES

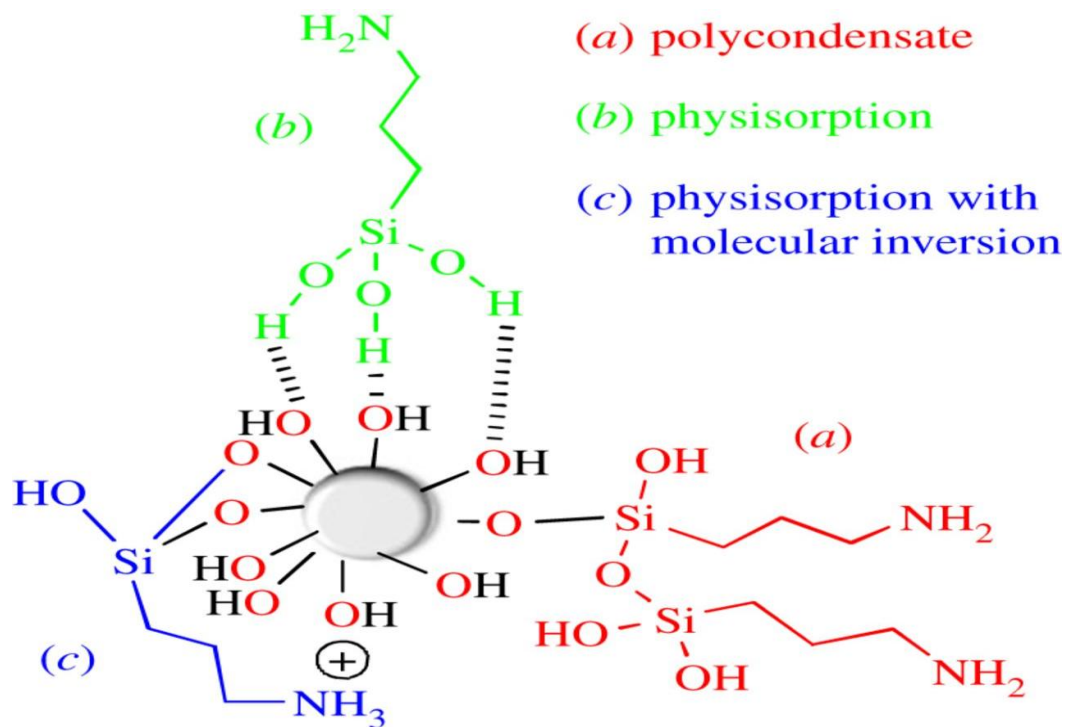
Ιδιαίτερα σημαντική είναι και η λειτουργικοποίηση επιφανειών μέσω οργανοσιλανών όπως το APTES. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι αυτό των (Hossein Roghani-Mamaqani και Vahid Haddadi-Asl-2014) συνέδεσαν το APTES με τις υδροξυλομάδες του GO.

Το APTES είναι ουσιαστικά μια σιλάνη που αξιοποιεί υδροξυλομάδες (-OH) μιας επιφάνειας και συνδέεται με αυτές. Κατόπιν χάρη και στη βοήθεια της γλουταραλδεΐδης δημιουργείται μια ομοιοπολική ένωση με την αμινομάδα του εκάστοτε μορίου, με την γλουταραλδεΐδη ουσιαστικά να λειτουργεί ως γέφυρα ανάμεσα στο μόριο προς ακινητοποίηση και το APTES..

Εικόνα 7 Ενδεικτικός τρόπος ακινητοποίησης με χρήση APTES και γλουταραλδεΐδης



Εικόνα 8 Μόριο APTES και χημικοί δεσμοί μεταξύ των υδροξυλομάδων του και άλλων υλικών



Παρολ αυτά δεν σημαίνει ότι κάθε -OH του πυριτίου του APTES θα συνδεθεί με υδροξυλομάδα της επιφάνειας του υλικού, ούτε ότι όλα τα μόρια APTES που θα

1.3.8 Χρήση Γλουταραλδεΐδης

Διλειτουργικές αλδεΐδες, όπως η γλουταραλδεΐδη και η φορμαλδεΐδη, χρησιμοποιούνται κλασικά ως διαμοριακοί συνδέτες για μελέτες ανοσοϊστοχημείας και υπερδομής. Έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την σύζευξη συνδέσμων σε υποστρώματα που φέρουν αμίνες. Η υδρόλυση των αλδεϋδών συνήθως δεν αποτελεί πρόβλημα, καθώς το προϊόν της υδρόλυσης, alkyl hydrate, είναι μετατρέψιμο πάλι σε καρβονύλιο. Οι αμίνες προσδένονται στις αλδεΐδες για την παραγωγή ιμινικών δεσμών σε μεγάλο εύρος pH (6-10). Αυτές οι βάσεις Schiff είναι υδρολυτικά ασταθείς. Η αναγωγική αμίνωση μπορεί να πραγματοποιηθεί με ηπίως αναγόμενα αντιδραστήρια, όπως το κυανοβοροϋδρίδιο του νατρίου, pH 8-9, χωρίς σημαντικές απώλειες στη βιοδραστικότητα του συνδέτη.

1.4. Νανοϋλικά-Γραφένιο

1.4.1 Νανοβιοτεχνολογία

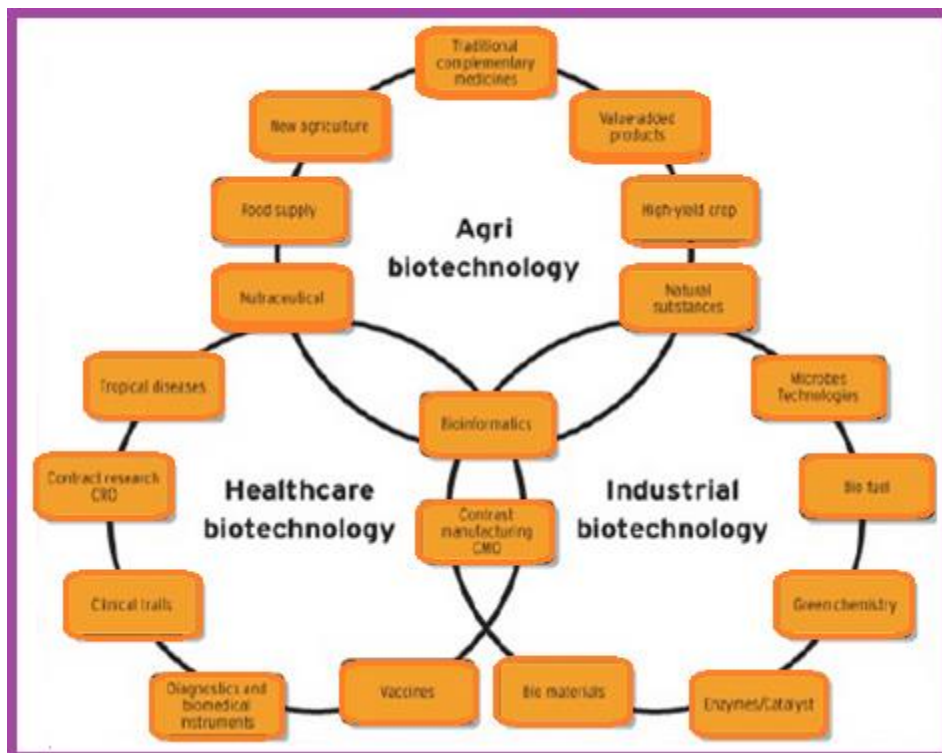
Η νανοβιοτεχνολογία είναι η ενοποίηση της βιοτεχνολογίας και της νανοτεχνολογίας. Αυτός ο υβριδικός επιστημονικός κλάδος μπορεί να σημαίνει και τη δημιουργία μηχανών ατομικής κλίμακας μέσω μίμησης ή ενσωματώνοντας βιολογικά συστήματα σε μοριακό επίπεδο, ή κατασκευάζοντας μικρά εργαλεία για τη μελέτη ή αλλαγή των ιδιοτήτων των φυσικών δομών άτομο το άτομο.

Είναι ένας νέος κλάδος της επιστήμης που συμπεριλαμβάνει την χρήση υλικών και συσκευών που είναι σε επίπεδο νανοκλίμακας. Ένα νανόμετρο είναι το ένα δισεκατομμυριοστό του μέτρου (10^{-9}). Αυτό αντιστοιχεί στο 1/80000 της διαμέτρου μιας ανθρώπινης τρίχας, η δέκα φορές τη διάμετρο του ατόμου του υδρογόνου. Αξιοποιεί τις χημικές και φυσικές ιδιότητες μιας ύλης σε μοριακό επίπεδο.

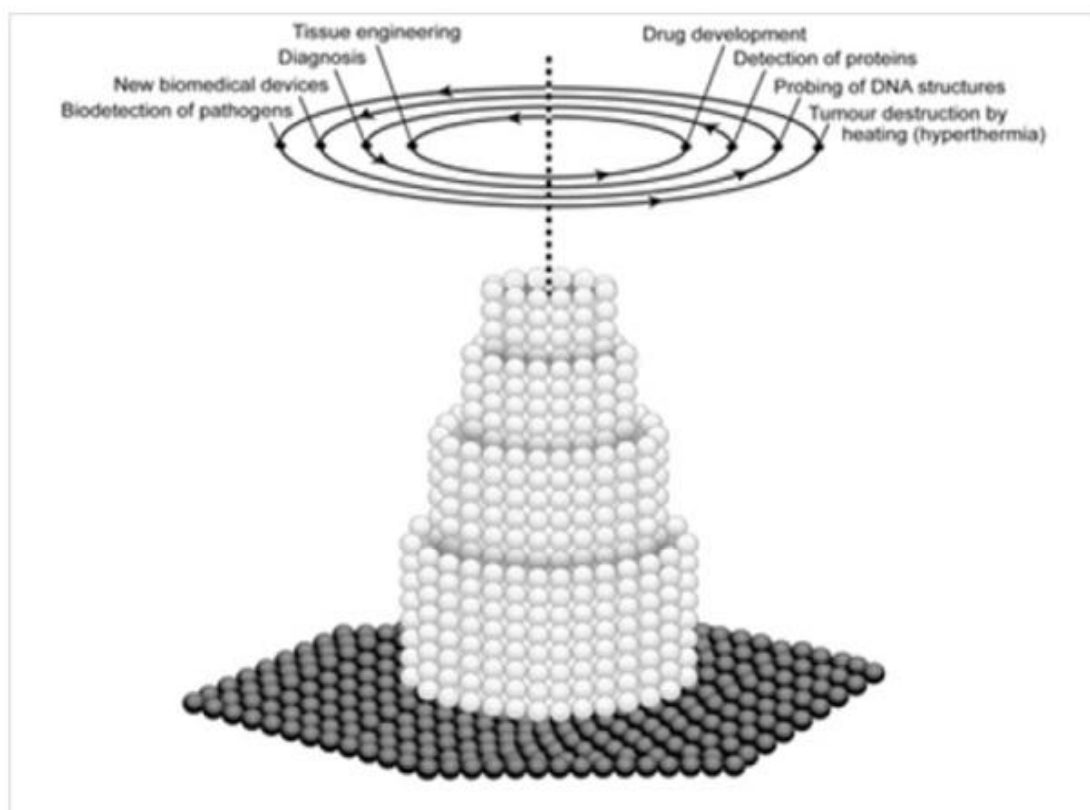
Η νανοβιοτεχνολογία μπορεί να δώσει ένα συνδυασμό της κλασικής μικροτεχνολογίας με προσέγγιση μοριακής βιολογίας. Η βιοτεχνολογία χρησιμοποιεί τη γνώση και τις τεχνικές της βιολογίας για να χειριστεί μοριακές, γενετικές και κυτταρικές διεργασίες για να αναπτύξει προϊόντα και υπηρεσίες και χρησιμοποιείται σε διάφορους κλάδους από την ιατρική μέχρι τις καλλιέργειες.

Αυτή η τεχνολογία αναμένεται να δημιουργήσει καινοτομίες και να παίξει ζωτικό ρόλο σε πολλές βιοϊατρικές εφαρμογές (Εικόνα 11), όχι μόνο στην μεταφορά φαρμάκων και τη γονιδιακή θεραπεία, αλλά και στην μοριακή απεικόνιση, στους βιοδείκτες και τους βιοαισθητήρες. Η στοχοειδική φαρμακευτική θεραπεία και οι μέθοδοι για την πρόωρη διάγνωση παθολογικών συμπτωμάτων είναι οι ερευνητικοί τομείς που προέχουν και στους οποίους η νανοτεχνολογία θα παίξει σημαντικό ρόλο.

Εικόνα 11 Σύγκλιση τομέων βιοτεχνολογίας



Εικόνα 12 Αναπαράσταση τομέων της βιοτεχνολογίας



Η νανοβιοτεχνολογία είναι ένας ταχύτατα αναδύομενος κλάδος με επιστημονική και τεχνολογική ικανότητα που εφαρμόζει τα εργαλεία και τις διαδικασίες της νανοκατασκευής για την ανάπτυξη προηγμένων και συχνά επαναστατικών εφαρμογών σε τομείς όπως οι βιοαισθητήρες (Ramoni et al. 2008), η μεταφορά φαρμάκων (Foldvari and Bagonluri 2008) και η νανο-βιοκατάλυση (Pavlidis et al. 2010). Ανάμεσα στο πλήθος των νανοϋλικών που χρησιμοποιούνται για αυτόν τον σκοπό, τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα (CBNs), όπως οι νανοσωλήνες άνθρακα (CNTs) και τα παράγωγα του οξειδίου του γραφενίου (GO), έχουν συγκεντρώσει το περισσότερο ενδιαφέρον για τις μοναδικές μηχανικές, θερμικές και ηλεκτρικές ιδιότητές τους, καθώς και για την βιοσυμβατότητά τους (Kuchibhatla et al. 2007). Μετά την ακινητοποίηση τα ένζυμα εμφανίζουν υψηλή σταθερότητα και σε ορισμένες περιπτώσεις αυξημένη καταλυτική δραστηριότητα (Sheldon et al.-2007; Bornscheuer et al.-2003), ενώ η επαναχρησιμοποίηση των ακινητοποιημένων

ενζύμων διευκολύνει την επανάκτηση των βιοκαταλυτών και χαμηλώνει το κόστος μιας βιομηχανικής διεργασίας. Η μεγάλη επιφάνεια των CBNs και η ευκολία της λειτουργικοποίησης τους (Mi et al. 2009; Kim et al. 2008) επιτρέπουν υψηλά επίπεδα φόρτωσης πρωτεΐνης, αυξάνουν την βιοσυμβατότητα τους και τα καθιστούν ικανά για την χρησιμοποίηση διαφόρων μεθόδων ενζυμικής ακινητοποίησης. Διάφορα ένζυμα (λιπάσες, λακκάσες, HRP, κυτόχρωμα c κτλ) έχουν ακινητοποιηθεί επιτυχώς σε CBNs (Zhang et al.-2010, Pavlidis et al.-2010, Stolarczyk et al.-2008). Κατά την αλληλεπίδραση, τα χαρακτηριστικά των νανοϋλικών, όπως η δομή, η χημεία της επιφάνειας τους, η φόρτιση και η υδροφοβικότητα, επηρεάζουν σημαντικά την καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων (Mu et al.-2008).

1.4.2 Γραφένιο

Ο φυσικά προκύπτων γραφίτης είναι γνωστό ορυκτό στον άνθρωπο εδώ και περίπου 500 χρόνια. Μέχρι τη δεκαετία του 1980 η οικογένεια του άνθρακα περιοριζόταν στα γνωστά υλικά γραφίτη και διαμάντι. Αυτό άλλαξε ολοκληρωτικά με την ανακάλυψη των μοριακών αλλοτρόπων άνθρακα: φουλερένια, νανοσωλήνες άνθρακα (CNT) και τελευταία του δισδιάστατου γραφενίου.

Το γραφένιο είναι ένα μονοατομικό επίπεδο φύλλο sp^2 συνδεδεμένων ανθράκων πυκνά πακεταρισμένων σε ένα κρυστάλλινο δίκτυο με μορφή κηρήθρας. Είναι το μητρικό στοιχείο αρκετών αλλοτρόπων άνθρακα συμπεριλαμβανομένων του γραφίτη, των νανοσωλήνων άνθρακα και των φουλερενίων (Singh V et al-2007). Ο Geim και οι συνεργάτες του στο πανεπιστήμιο του Manchester ταυτοποίησαν επιτυχώς μονοστιβάδες γραφενίου σε πείραμα το 2004. Αυτή η επαναστατική ανακάλυψη προσέθεσε νέες ερευνητικές διαστάσεις στα επιστημονικά πεδία της φυσικής, της χημείας, της βιοτεχνολογίας και της επιστήμης των υλικών.

1.4.2.1 Πλεονεκτήματα γραφενίου

Το λεπτότερο γνωστό υλικό, γραφένιο, επιδεικνύει εξαιρετική ηλεκτρική αγωγιμότητα, μηχανική ευελιξία, οπτική διαφάνεια, θερμική αγωγιμότητα και χαμηλό

συντελεστή συμπεριφοράς θερμικής επέκτασης (CTE). (Novoselov et al.-2004, Dreyer et al.-2010, Wang G et al.-2008, Wang G et al.-2009, Li X et al.-2008, Blake P, et al.-2008). Τα μοναδικά χαρακτηριστικά του γραφενίου έχουν προσελκύσει τεράστιο ενδιαφέρον τόσο σε ακαδημαϊκό, όσο και σε βιομηχανικό επίπεδο. Επιπλέον, το κόστος παραγωγής του γραφενίου είναι πολύ χαμηλό σε σύγκριση με άλλα υλικά με βάση τον άνθρακα. Για αυτό το λόγο, υπάρχει αυξανόμενο ενδιαφέρον στην επιστημονική κοινότητα για την διερεύνηση διαφόρων πλευρών, ιδιαίτερα για την τροποποίηση της επιφάνειας του γραφενίου. Η λειτουργικοποίηση και διασπορά των φύλλων γραφενίου είναι μεγάλης σημασίας για τις εφαρμογές τους. Το χημικά λειτουργικοποιημένο γραφένιο μπορεί να επεξεργασθεί παραπέρα με τεχνικές υποβοηθούμενες από διαλύτες, όπως layer-by-layer συγκρότηση, spin-coating και φιλτράρισμα. Η ορθή χημική λειτουργικοποίηση του γραφενίου αποτρέπει επίσης τη συσσωμάτωση της μονοστιβάδας γραφενίου κατά τη διάρκεια της αναγωγής στη φάση του διαλύτη και βοηθάει στη διατήρηση των εγγενών ιδιοτήτων του γραφενίου.

1.4.2.2 Μειονεκτήματα γραφενίου

Είναι αποδεκτό πλέον ότι οι ανώτερες ιδιότητες του γραφενίου σχετίζονται με την ύπαρξη της μονοστιβάδας. Παρολαυτά, η κατασκευή μονοστιβάδων γραφενίου είναι δύσκολη σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Φύλλα γραφενίου με μεγάλη επιφανειο-ειδική περιοχή τείνουν να σχηματίζουν μη-αντιστρεπτά συσσωματώματα ή ακόμα και να επανακολλούνται, έτσι ώστε να σχηματίζουν γραφίτη μέσα από π-π δεσμούς και van der Waals αλληλεπιδράσεις, εφόσον τα φύλλα δεν είναι καλά διαχωρισμένα μεταξύ τους (Li D et al.-2008, Shan C et al.-2009).

Η συσσωμάτωση μπορεί να μειωθεί με την προσκόλληση ειδικών μορίων ή πολυμερών στα φύλλα γραφενίου. Η παρουσία υδρόφιλων ή υδρόφοβων ομάδων αποτρέπει την συσσωμάτωση των φύλλων γραφενίου μέσω ισχυρών πολικών αλληλεπιδράσεων ή λόγω του μεγάλου μεγέθους τους (Shan C et al.-2009). Η προσκόλληση λειτουργικών ομάδων στο γραφένιο βοηθάει επίσης στη διασπορά σε υδρόφιλο ή υδρόφοβο μέσο, καθώς και σε οργανικό πολυμερές.

1.4.2.3 Χημικές και φυσικές ιδιότητες του γραφενίου

Το δισδιάστατο γραφένιο είναι ένα αλλότροπο άνθρακα στο οποίο κάθε άτομο άνθρακα συνδέεται με το άλλο με sp^2 δεσμούς. Τα άτομα άνθρακα είναι πυκνά πακεταρισμένα σε κρυστάλλινο δίκτυο με μορφή κηρήθρας με μήκος δεσμού 0,141 nm. Διάφορες ερευνητικές ομάδες έχουν μετρήσει το πάχος του γραφενίου από 0,35-1 nm (Nemes-Incze P et al.- 2008). Ο Novoselov και οι συνεργάτες του έχουν καθορίσει το πάχος σε 1-1,60 nm. Ο Gupta και οι συνεργάτες του έχουν μετρήσει το πάχος του φιλμ της μονοστιβάδας γραφενίου με AFM σε 0,33 nm. Η αντοχή στο σπάσιμο του γραφενίου είναι 200 φορές υψηλότερη από ότι στο ατσάλι, καθιστώντας το, το πιο δυνατό υλικό που μελετήθηκε.

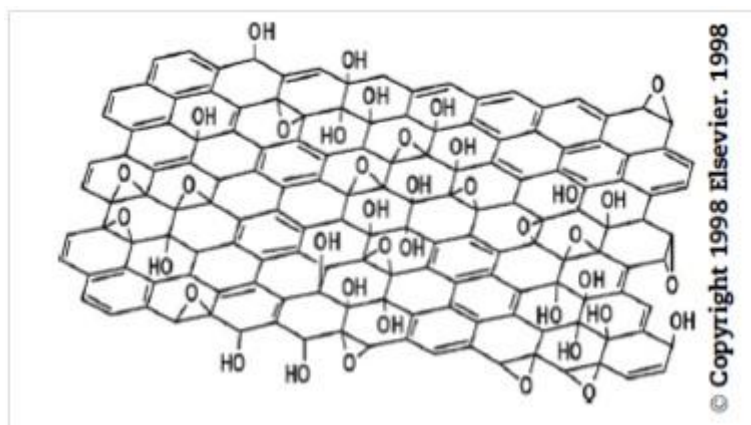
1.4.2.4 Το οξείδιο γραφενίου (GO)

Ένα ιδανικό φύλλο γραφενίου αποτελείται μόνο από τριγωνικά συνδεδεμένα sp^2 άτομα άνθρακα και είναι απολύτως επίπεδο (Liu CH et al.- 2009). Με εξαίρεση μικροσκοπικούς κυματισμούς (Stolyarova E, Rim KT, Ryu S, Maultzsch J, Kim P, Brus LE, et al. -2007).

Τα φύλλα οξειδίου του γραφενίου (GO) αποτελούνται μερικώς από τετραεδρικά συνδεδεμένα sp^3 άτομα άνθρακα, τα οποία τοποθετούνται ελαφρώς ψηλότερα ή χαμηλότερα του επιπέδου του γραφενίου (Schniepp HC et al.- 2006).

Εξαιτίας της διαφοροποίησης της δομής και της παρουσίας ομοιοπολικά συνδεδεμένων λειτουργικών ομάδων, τα φύλλα του GO εμφανίζουν τραχεία δομή σε ατομικό επίπεδο. Μια παρατήρηση δείχνει, ότι το ομοιάζον σε γραφένιο πλέγμα κηρήθρας διατηρείται στα GOs, αν και με διαταραχές, γιατί τα άτομα άνθρακα που συνδέονται με λειτουργικές μονάδες είναι ελαφρώς εκτός θέσης, αλλά η συνολική εμφάνιση του GO παραμένει παρόμοια με αυτήν του γραφενίου (Pandey, D et al.- 2008).

Εικόνα 13 Μοντέλο οξειδίου του γραφενίου με οξυγονούχες ομάδες στην επιφάνεια του (Lerf A et al.- 1998).



1.4.2.5 Νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου

Τα νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου είναι τα πιο δημοφιλή μαγνητικά νανοσωματίδια που χρησιμοποιούνται στις βιοϊατρικές εφαρμογές εξαιτίας του χαμηλού κόστους, της χαμηλής τοξικότητας και των μοναδικών μαγνητικών τους ιδιοτήτων. Τα μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου, συμπεριλαμβανομένων του μαγνητίτη (Fe_3O_4) και του μαγγελίτη ($\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$), συνήθως εμφανίζουν υπερπαραμαγνητικές ιδιότητες όταν το μέγεθος του γίνεται μικρότερο των 20nm, γνωστά σε αυτές τις περιπτώσεις και ως SPIONs (super paramagnetic iron oxide nanoparticles) και χρησιμοποιούνται στην μεταφορά φαρμάκων, στην διάγνωση, στην θεραπεία κτλ. Οι υπερπαραμαγνητικές ιδιότητες περιλαμβάνουν υψηλό μαγνητικό κορεσμό και σχεδόν μηδενική δύναμη απομαγνητισμού σε θερμοκρασία δωματίου. Το εξωτερικό μαγνητικό πεδίο μπορεί να επάγει τα μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου προς μαγνητικό συντονισμό, αυτοθέρμανση και κίνηση κατά την φορά του πεδίου. Αυτές οι ιδιότητες εξαρτώνται σε σημαντικό βαθμό από την ποιότητα των SPIONs, όπως η κρυσταλλοποίηση, το μέγεθος και το σχήμα. (Sun Sheng-Nan et al.-2014)

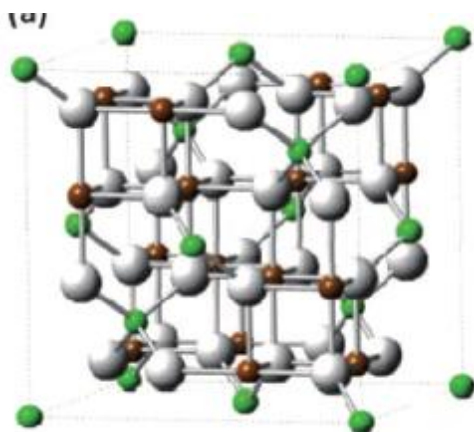
Χαρακτηριστικοί τομείς εφαρμογής είναι τύποι μπαταριών λιθίου batteries (Koo B, Xiong H, et al. 2012), υπερσυσσωρευτές (Du X et al.-2009), η κατάλυση (Lin Set al.-2013), ιστο-ειδική απελευθέρωση θεραπευτικών παραγόντων (Fukushima T et al.-1993) , σήμανση και διαλογή κυττάρων Ugelstad J, Berge A, Ellingsen T, Schmid R,

Nilsen T N, Mork P C, Stenstad P, διαχωρισμός βιοχημικών προϊόντων Liu Y, Gao Y and Xu C 2013).

1.4.2.6 Η περίπτωση του γ - Fe_2O_3 (μαγγελμίτης)

Η διαφορά ανάμεσα στο γ - Fe_2O_3 (μαγγελμίτης) και στο Fe_3O_4 (μαγνητίτης) βρίσκεται στο ότι όλοι ή οι περισσότεροι Fe στο γ - Fe_2O_3 βρίσκονται στην Fe^{3+} κατάσταση και η οξείδωση του Fe^{2+} διαμεσολαβήται από κατιονικά κενά. Η κύρια κατάσταση συμπεριλαμβάνει 32 O^{2-} ιόντα, 64/3 Fe^{3+} ιόντα και 7/3 κενά. Κάθε κατιόν καταλαμβάνει τη τετραεδρική θέση και τα κατιόντα που περισσεύουν κατανέμονται τυχαία μεταξύ των οκταεδρικών θέσεων. Τα κενά συνήθως περιορίζονται στις οκταεδρικές θέσεις. (Sun Sheng-Nan et al. -2014)

Εικόνα 14 Μαγγελμίτης



1.4.2.7 Υβριδικά υλικά

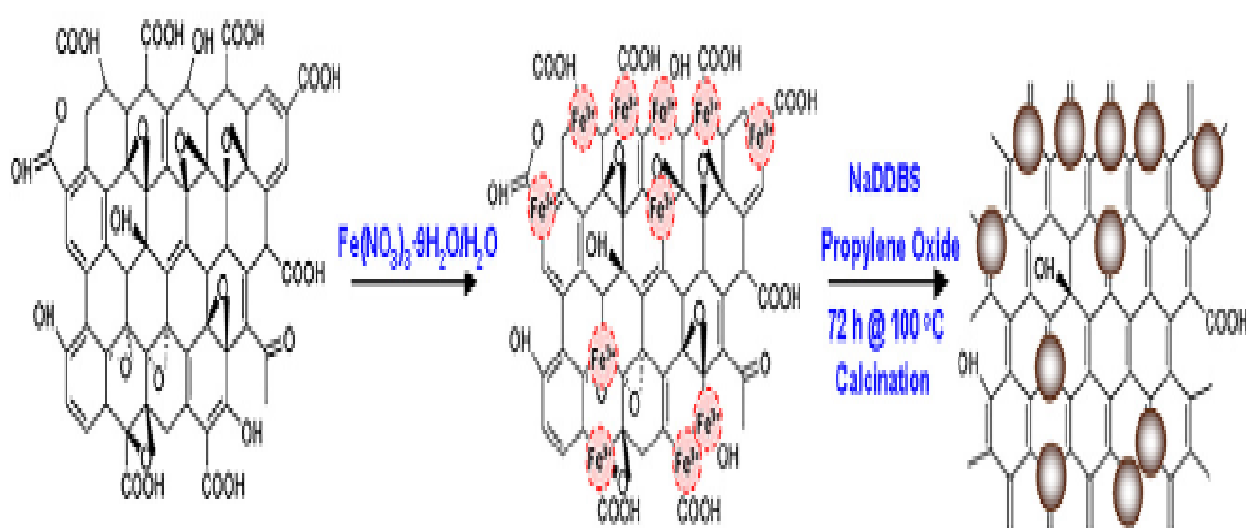
Σημαντικό μέρος της έρευνας των υλικών εντοπίζεται αυτή τη στιγμή στα νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου (IONPS) που προστατεύονται από άνθρακα εξαιτίας της χημικής και θερμικής σταθερότητας, και της υψηλής ηλεκτρικής αγωγιμότητας. Το κάλυμμα με άνθρακα λειτουργεί σαν φράγμα απέναντι στην οξείδωση και αποτρέπει την διάβρωση των μαγνητικών υλικών. Η δημιουργία υδρόφιλου ανθρακικού καλύμματος στα νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου, τους

προσδίδει καλύτερη διασπορά και σταθερότητα σε σχέση με τα γυμνά IONPS. (Bae H, et al.-2012)

Τελευταία, έχει δοθεί μεγάλη προσοχή στη σύνθεση Fe_3O_4 /γραφενίου ως νέου υβριδικού υλικού, εξαιτίας του εύρους των εφαρμογών του σε μπαταρίες λιθίου, στην αφαίρεση ιόντων, σε αισθητήρες, στην κατάλυση κτλ. (Chen D Y et al.-2011),(Chandra V et al.-2010), (Liang J J et al.-2011)

Οι μοναδικές ιδιότητες των υβριδίων Fe_3O_4 /γραφενίου, ουσιαστικά αποτελούν σύζευξη των ιδιοτήτων των δύο υλικών. Από το γραφένιο η ισχυρή αγωγιμότητα και ο μεγάλος λόγος επιφάνειας προς όγκο και από το νανοσωματίδιο, ο ισχυρός μαγνητισμός του, το χαμηλό κόστος και προσφιλή περιβαλλοντική του φύση έχουν ανοίξει το δρόμο για την δημιουργία υψηλής σταθερότητας πολυλειτουργικών νανοϋλικών. (Li X Y et al.-2012) Ομοίως ο Il Tae Kim et al. δημιούργησαν υβριδικό υλικό που αποτελείται από ανηγμένο οξείδιο του γραφενίου και μαγγεμίτη στην προσπάθεια τους να προχωρήσουν σε περαιτέρω εμβάθυνση στον τομέα των υβριδικών υλικών και αξιοποίηση των ιδιοτήτων των παραγώγων γραφενίου και των οξειδίων σιδήρου. (Il Tae Kim et al.-2013)

Εικόνα 15 Αναπαράσταση της συνολικής στρατηγικής που χρησιμοποιήσαν για την παραγωγή των υβριδίων ανηγμένου οξειδίου του γραφενίου/μαγγεμίτη.



Σκοπός εργασίας

Ο σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η ανάπτυξη καινοτόμων πρωτοκόλλων ακινητοποίησης για τη δημιουργία βιοκαταλυτικών συστημάτων επιπέδου νανοκλίμακας που θα επιτρέπουν στα ένζυμα να διατηρούν τις εκ φύσεως βιοκαταλυτικές ιδιότητες τους σε συνθήκες που φυσιολογικά δεν θα μπορούσαν να δράσουν ή θα μετουσιώνονταν πολύ γρήγορα. Ειδικότερα η χρήση των ενζύμων β-D-γλυκοζιδάση και ιμπερτάση, της κατηγορίας των υδρολασών, δίνει τη δυνατότητα επεξεργασίας προς χρήσιμα προϊόντα υποστρωμάτων υδρόλυσης αγροτοβιομηχανικής φύσης που φυσιολογικά θα αποτελούσαν περιβαλλοντικούς ρύπους.

2. Υλικά-Μέθοδοι

2.1. Υλικά

Ενζυμα-Πρωτεΐνες

- β-Glucosidase from almonds, Sigma–Aldrich (lyophilized powder, St. Louis, MO)
- Invertase *S. cerevisiae* Grade V, Sigma–Aldrich (lyophilized powder, St. Louis, MO)

Υποστρώματα

- P-Nitrophenyl β-D-glucopyranoside (PNPG), Sigma–Aldrich (St. Louis, MO)
- D-Cellobiose, Fluka(≥99%, HPLC)
- Sucrose

Διαλύτες

- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO, Panreac)
- Νερό υψηλής καθαρότητας διασπασταγμένο (dH₂O-Fisher Chemicals)
- Μεθανόλη (Sigma)
- Γλουταραλδεϋδη (25%, MERCK KGaA Darmstadt, Germany)

Υδατικά διαλύματα

- Υδατικό διάλυμα κιτρικού οξέος, 0.1 M, pH 4.58 (Acetate Buffer)
- Υδατικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων, 50 mM και pH 7.0 (Phosphate Buffer)
- Υδατικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών (citrate-phosphate buffer) pH5.0, 100mM

Λοιπά αντίδραστήρια

- Glucose Oxidase (GO) Assay Kit, Sigma–Aldrich (St. Louis, MO)
- Διάλυμα Bradford
- (3-Aminopropyl)triethoxysilane (APTES), Sigma–Aldrich (St. Louis, MO)

Όργανα

Φυγόκεντρος (6000 rpm)

Μικροφυγόκεντρος (15000 rpm)

ELISA READER

Thermomixer (Eppendorf)

Φασματοφωτόμετρο (SHIMADZU UV-1601)

Λουτρό υπερήχων (TRANSSONIC 460/H)

JASCO FT/IR-6200typeA (φωτόμετρο FT-IR)

PerkinElmer Pyris Diamond TG/DTA

Tap-300G 3D Multimode Nanoscope (AFM)

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Μέθοδοι μέτρησης δραστηρότητας

Καθορισμός της απόδοσης ακινητοποίησης

Η ποσότητα ακινητοποιημένου ενζύμου καθορίστηκε, υπολογίζοντας την πρωτεϊνική συγκέντρωση στο υπερκείμενο ακινητοποίησης μετά το πέρας της ακινητοποίησης, χρησιμοποιώντας την μέθοδο Bradford. Η ποσότητα ακινητοποιημένου ενζύμου ορίστηκε ως η διαφορά στην ποσότητα που μπήκε προς ακινητοποίηση και την ποσότητα ενζύμου στο υπερκείμενο.

Καθορισμός δραστηρότητας γλυκοζιδάσης

Η ενζυμική αντίδραση πραγματοποιήθηκε στους 40°C σε citrate-phosphate buffer 100mM pH 5.0 με χρόνο αντίδρασης 10min. Ο χρόνος αντίδρασης ήταν 10min, το υπόστρωμα 2mM PNPG. Η αντίδραση διακόπτεται με προσθήκη 500μl Na₂CO₃ 10%. Η απορρόφηση μετρήθηκε στα 410nm.

Η μονάδα ενζυμικής ενεργότητας (Unit) ορίστηκε ως τα mmol ισοδύναμων γλυκόζης παραγόμενα στην παραπάνω αντίδραση.

Διαδικασία επαναχρησιμοποίησης

Η επαναχρησιμοποίηση πραγματοποιήθηκε στους 50°C σε 12 κύκλους των 24h έκαστος, με χρήση 2mM PNPG citrate-phosphate buffer, pH5.0, 100mM. Ο όγκος αντίδρασης ήταν 1ml, που περιείχε 2mM PNPG. Μετά από κάθε κύκλο γινόταν συλλογή του υπερκειμένου και το εναπομένον νανοϋλικό χρησιμοποιούταν σε καινούργια αντίδραση με την ίδια ποσότητα υποστρώματος και συνθηκών. Στην περίπτωση των υπερπαραμαγνητικών νανοϋλικών, τα νανοϋλικά συλλέγονταν με μαγνήτη. Σε όλα τα δείγματα υποστρώματος μπήκαν 500μl Na₂CO₃ 10% πριν τη μέτρηση στα 410nm. Η δραστηκότητα του πρώτου κύκλου θεωρήθηκε ως κοντρόλ (100%) για τον υπολογισμό της παραμένουσας δραστηκότητας στους επόμενους κύκλους.

Προσδιορισμός κινητικών σταθερών

Οι κινητικές μελέτες των ελεύθερων και ακινητοποιημένων ενζύμων μελετήθηκαν. Οι κινητικές παράμετροι K_m , V_{max} ελεύθερου και ακινητοποιημένου ενζύμου καθορίστηκαν μετρώντας την αρχική ταχύτητα της αντίδρασης σε κυμαινόμενες συγκεντρώσεις υποστρώματος pNPG(0.05 mM -14 mM) σε citrate-phosphate buffer, pH5.0, 100mM.

Εφαρμογή στην υδρόλυση της κελλοβιόζης

Το ένζυμο που ακινητοποιήθηκε ομοιοπολικά σε GO_γFe-sil χρησιμοποιήθηκε σε εφαρμογή υδρόλυσης κελλοβιόζης 2%. Το πείραμα εξελίχθηκε σε 8 κύκλους των 24h στους 50°C citrate-phosphate buffer, pH5.0, 100mM. Μετά από κάθε κύκλο το νανοβιοκαταλυτικό σύστημα συλλέχθηκε μαγνητικά σε νέα αντίδραση με την ίδια ποσότητα υποστρώματος σε ίδιες συνθήκες. Στο τέλος του πειράματος σε όλα τα δείγματα προσδιορίστηκε η παραγωγή γλυκόζης με χρήση GOx kit.

Εφαρμογή στη υδρόλυση κελλοβιόζης/σουκρόζης

Οι μετρήσεις έχουν πραγματοποιηθεί με χρήση του GOxkit το οποίο μετράει την γλυκόζη στο δείγμα. Δεδομένου ότι στα αρχικά δείγματα υπήρχε μίγμα κελλοβιόζης σουκρόζης (cb/sucr), η γλυκόζη προέρχεται από την υδρόλυση και των δύο υποστρωμάτων μιας και τα ενζυμικά σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν περιέχουν και bgl και inv. Το μίγμα σακχάρων περιέχει 5% κελλοβιόζη_(cb5%) και 5% σουκρόζη(sucr5%). Η επώαση πραγματοποιείται στους 60oC και στις 220rpm. Τα υπό μελέτη δείγματα είναι: ιμβερτάση ακινητοποιημένη σε σιλιανοποιημένο GOγFe παρουσία β-γλυκοζιδάσης ακινητοποιημένης σε GOX (GOγFe(inv)/GOX(bgl)), ελεύθερη ιμβερτάση (Free(inv)) παρουσία β-γλυκοζιδάσης ακινητοποιημένης σε GOX (Free(inv)/GOX(bgl)), διπλή πολυστοιβαδική ακινητοποίηση ιμβερτάσης και β-γλυκοζιδάσης (double).

Πραγματοποιήθηκε επώαση για 3 μέρες του ίδιου διαλύματος cb/sucr με την ίδια αρχική ποσότητα ενζυμικού προϊόντος για κάθε δείγμα. Αρχικά προστίθενται στο κάθε διάλυμα 100μl free(inv) και 100μl GOX(bgl), 100μl GOγFe sil (inv) και 100μl GOX(bgl), 100μl double. Κάθε μέρα συλλέγονται -100μl που αναλύονται με χρήση GOxkit.

2.2.2. Φασματοσκοπικές μέθοδοι

Λήψη φασμάτων υπερύθρου στερεών δειγμάτων

Η φασματοσκοπία υπερύθρου παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι καθιστά εφικτή τη μελέτη της δομής των ακινητοποιημένων πρωτεϊνών. Τα δείγματα που μελετήθηκαν με αυτή την τεχνική περιλαμβάνουν λυοφυλιωμένα και ακινητοποιημένα ένζυμα, καθώς και τους φορείς_ακινητοποίησης. Τα στερεά δείγματα προετοιμάζονται ως δισκία KBr. Ποσότητα KBr αφήνεται για 24 ώρες στους 100°C ώστε να εξατμιστεί η υγρασία, καθώς το άλας είναι υγροσκοπικό. Έπειτα ζυγίζονται περίπου 200 mg του άλατος μαζί με 1 - 5 mg του δείγματος και το μείγμα λειοτριβείται σε ένα γουδί από αχάτη. Το μείγμα εισάγεται σε ειδική θήκη και με τη βοήθεια υδραυλικής πρέσας

ασκείται πίεση 7000 kg/cm² για 10 sec ώστε να σχηματιστεί το δισκίο (εικόνα 26). Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία πως η διαδικασία παρασκευής των δισκίων δεν επηρεάζει τη δομή της πρωτεΐνης (Prestrelski et al. 1993).

Τα φάσματα των δισκίων καταγράφονται σε εύρος 4000 – 400 cm⁻¹ σε θερμοκρασία δωματίου παρουσία silica gel για την αφαίρεση της υγρασίας του δείγματος. Κάθε φάσμα προκύπτει από τη μέση τιμή 32 σαρώσεων με ανάλυση 2 cm⁻¹. Για κάθε φάσμα που μελετήθηκε λήφθηκε ξεχωριστό φάσμα αναφοράς, το οποίο αφαιρέθηκε από το φάσμα της πρωτεΐνης. Το φάσμα αναφοράς για τα λυοφυλιωμένα είναι το φάσμα ενός δισκίου KBr ενώ για τα ακινητοποιημένα ένζυμα περιλαμβάνει το φάσμα ακινητοποίησης. Η σωστή αφαίρεση του φάσματος αναφοράς ελέγχεται από την ύπαρξη μίας επίπεδης γραμμής αναφοράς στην περιοχή 2200-1800 cm⁻¹. Σε καμία περίπτωση η απορρόφηση των δειγμάτων δεν ξεπέρασε την τιμή 1.5.

Υπολογισμός στοιχείων δευτεροταγούς δομής με ανάλυση αμιδικών κορυφών

Το φάσμα της πρωτεΐνης μετά από την αφαίρεση του φάσματος αναφοράς κα πρέπει να παρουσιάζει τις χαρακτηριστικές αμιδικές κορυφές. Οι αμιδικές περιοχές I (1700-1600 cm⁻¹) και III (1200-1350 cm⁻¹) απομονώνονται από το φάσμα και εισάγονται στο λογισμικό Origin 7.0 (OriginLab). Ο πιθανός θόρυβος των φασμάτων αφαιρείται ύστερα από εξομάλυνση των φασμάτων με το φίλτρο εξομάλυνσης Savitsky-Golay 11 σημείων (Serefoglou et al. 2008), ενώ χρησιμοποιείται γραμμή αναφοράς μεταξύ των ακραίων σημείων ώστε θ κορυφή να ευθυγραμμιστεί με τον άξονα των κυματαριθμών.

Σε αυτό το στάδιο μπορεί να ποσοτικοποιηθεί ο βαθμός ομοιότητας των φασμάτων, μέσω του συντελεστή συσχέτισης r (Prestrelski et al. 1993, Secundo and Carrea 2005), ο οποίος παρουσιάζεται στην εξίσωση:

$$r = \frac{\sum x_i y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}}$$

όπου x_i και y_i οι τιμές απορρόφησης του φάσματος αναφοράς και του φάσματος του δείγματος για κάθε τιμή κυματαριθμού i . Σε περίπτωση όμοιων φασμάτων ο συντελεστής r ισούται με ένα ενώ για διαφορετικά φάσματα η τιμή του συντελεστή μειώνεται.

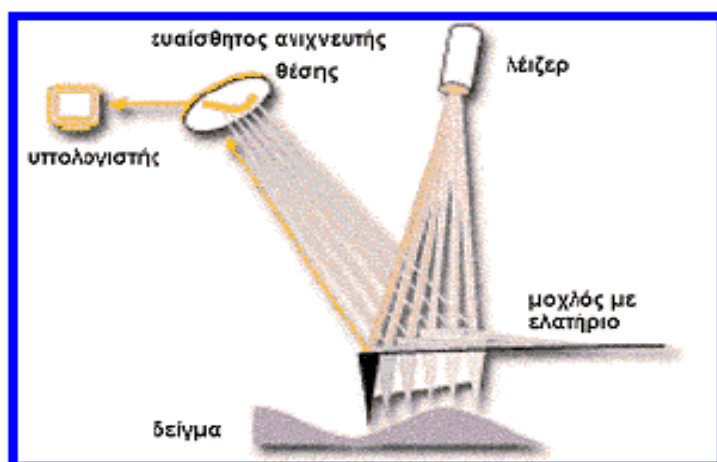
Μέσω του λογισμικού Origin 7.0 υπολογίζεται η δεύτερη παράγωγος της αμιδικής κορυφής. Οι αρνητικές κορυφές της δεύτερης παραγώγου προσδιορίζουν η θέση των κορυφών που συνθέτουν την αμιδική κορυφή (Dong et al. 1990, Susi and Byler 1983). Η κορυφή προς ανάλυση εισάγεται στο λογισμικό WinSpec (LISE – Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix, Namur, Belgium). Στο λογισμικό ορίζεται ο αριθμός των κορυφών που αποτελούν την αμιδική κορυφή και η θέση τους σύμφωνα με τα δεδομένα της δεύτερης παραγώγου, καθώς και ότι οι κορυφές ακολουθούν κατανομή Gauss. Το αρχικό πλάτος των κορυφών στο μισό της έντασης τους ορίζεται από 7 ως 16 cm^{-1} ανάλογα με το πλάτος και την απόσταση των κορυφών. Το λογισμικό μέσα από ένα κύκλο βελτίωσης της προσαρμογής των κορυφών στο αρχικό φάσμα καθορίζει τις βέλτιστες τιμές έντασης, θέσης και πλάτους για την κάθε κορυφή. Για την επίτευξη βέλτιστης προσαρμογής οι παράμετροι απελευθερώνονται σταδιακά.

Συγκεκριμένες περιοχές των αμιδικών κορυφών ανάγονται στα στοιχεία δευτεροταγούς δομής. Ο υπολογισμός των στοιχείων δευτεροταγούς δομής γίνεται ύστερα από αναγωγή των κορυφών, σύμφωνα με τη θέση τους, σε στοιχεία δευτεροταγούς δομής. Ο υπολογισμός της δομής του ενζύμου βασίζεται στην ποσοστιαία συνεισφορά της κάθε κορυφής στην αμιδική κορυφή, όσον αφορά την περιοχή. Η αναγωγή των κορυφών που υπολογίζονται σε στοιχεία δευτεροταγούς δομής γίνεται σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Halverson et al.-1991, Kreilgaard et al.-1999, Natalello et al.-2005) και παρατίθεται στον πίνακα 12. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στην αμιδική κορυφή I μπορούν να διαχωριστούν οι παράλληλες και οι αντιπαράλληλες β -πτυχωτές επιφάνειες.

Μικροσκοπία Ατομικών Δυνάμεων (Atomic Force Microscopy-AFM)

Το μικροσκόπιο ατομικών δυνάμεων (Atomic Force Microscope-AFM) αναπτύχθηκε από τους Binnig et al. το 1985 για τη μελέτη επιφανειών σε ατομική κλίμακα. Το AFM στηρίζεται σε μια τεχνική σάρωσης για να παράγει τρισδιάστατες εικόνες των επιφανειών πολύ υψηλής ανάλυσης. Μετρά πολύ μικρές δυνάμεις (<1 nN) μεταξύ της επιφάνειας της ακίδας του AFM που βρίσκεται τοποθετημένη σε ένα εύκαμπτο βραχίονα (cantilever) και της μελετούμενης επιφάνειας δείγματος (Σχήμα 16). Αυτές οι μικρές δυνάμεις καθορίζονται με τη μέτρηση της κίνησης ενός πολύ εύκαμπτου βραχίονα με εξαιρετικά-μικρή μάζα, με διάφορες τεχνικές μέτρησης, όπως οπτική εκτροπή και φαινόμενο σύρραγγας. Η εκτροπή μπορεί να μετρηθεί για 0.02 nm, έτσι για έναν βραχίονα με σταθερά ελατηρίου 10Nm^{-1} , μπορεί να ανιχνευθεί δύναμη 0.2 nN.

Εικόνα 16 Διάταξη AFM



Φασματοσκοπία Raman

Η φασματοσκοπία Raman είναι η ανελαστική σκέδαση του φωτός που σχετίζεται συνήθως με την εκπομπή (Stokes διαδικασία) ή απορρόφηση (anti-Stokes διαδικασία) των phonons (M. Cardona and G. Güntherodt-1982). Γνωρίζοντας τη διαφορά ενέργειας ανάμεσα στο σκεδαζόμενο και το προσπίπτον φως, η οποία δίνει το Raman φάσμα σε cm^{-1} , μπορούμε να πάρουμε την συχνότητα των phonons που είναι χρήσιμη

για την ταυτοποίηση του τύπου μιας άγνωστης δομής ενός μορίου ή υλικού. (D. Haberer et al-(2010)

Η φασματομετρία Raman έχει γίνει σήμερα μια από τις πλέον δημοφιλείς τεχνικές για τον χαρακτηρισμό άμορφων ανθράκων, φουλερενίων, νανοσωλήνων, διαμαντιών, αλυσίδων άνθρακα και πολυ-συζευγμένων μορίων.

Οι τεχνικές Raman είναι ιδιαίτερα χρήσιμες για το γραφένιο.. Η απουσία κενής μπάντας κάνει όλα τα μήκη κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας να συντονίζονται και έτσι στο Raman φάσμα περιέχονται πληροφορίες τόσο για την ατομική δομή, όσο και για τις ηλεκτρονικές ιδιότητες. (Andrea C. Ferrari, Denis M. Basko-2013).

Το Raman φάσμα του γραφενίου αποτελείται από μια σειρά κορυφών που είναι καλά χαρακτηρισμένες:

Η G μπάντα

Το κύριο φασματικό χαρακτηριστικό του γραφενίου εξάγεται από την εντός πεδίου κίνηση των ατόμων άνθρακα και εμφανίζεται περίπου στα 1580cm^{-1} και ονομάζεται G μπάντα. Αποτελεί καλό δείκτη του αριθμού των στιβάδων γραφενίου. (A. C. Ferrari et al-2006, M.S. Dresselhaus, Phil. Trans-2008)

Η D μπάντα

Για ιστορικούς λόγους είναι γνωστή ως Μπάντα διαταραχής. Οφείλεται στην κίνηση του πλέγματος μακριά από το κέντρο της ζώνης Brillouin και συναντάται μεταξύ των $1270-1450\text{cm}^{-1}$, εξαρτώμενη από το μήκος κύματος διέγερσης. (Y.Wang et al. -1990)

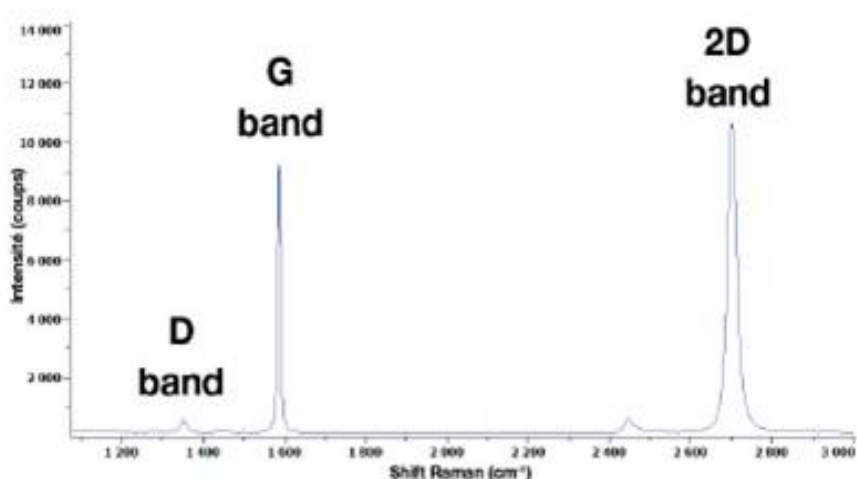
Η μπάντα 2D ή G

Είναι διαδικασία δεύτερης τάξης δύο phonons. Η συχνότητα της εμφανίζει ασυνήθιστα υψηλή εξάρτηση από το προσπίπτον laser διέγερσης. Εμφανίζεται περίπου στα 2700cm^{-1} για laser διέγερσης στα 514nm . (Y.Wang et al. -1990)

Μια συνήθης διαδικασία για το χαρακτηρισμό της ελαττωματικής πυκνότητας σε ένα υλικό είναι ο λόγος των συχνοτήτων της D και G μπάντας (I_D/I_G). (F. Tuinstra and

J.L. Koenig-1970). Αποτελεί ουσιαστικά ένα πολύ ευαίσθητο τρόπο μέτρησης της διαταραχής των sp² υβριδισμένων ανθράκων ενός υλικού. (R. Saito et al-2011)

Εικόνα 17 Χαρακτηριστικές μπάντες γραφενίου σε raman φασματοσκοπία



2.2.3 Ομοιοπολικές Μέθοδοι ακινητοποίησης

Ακινητοποίηση σε GO-C₂-NH₂

Σε μια τυπική διαδικασία 15,1 mg ζυγίστηκαν και μπήκαν σε υδατόλουτρο υπερήχων για 30min σε κατάλληλο όγκο, pH5.0, 100mM ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών. Προστέθηκε γλουταραλδεΐδη στο διάλυμα σε συγκέντρωση 0,1M. Το διάλυμα επώαστηκε για 1,5ώρα στους 30°C υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθησαν επαναλαμβανόμενες φυγοκεντρήσεις στις 5000rpm με το υπερκείμενο να απομακρύνεται μετά από κάθε φυγοκέντρηση, ώστε να καθαριστεί το προϊόν από τη γλουταραλδεΐδη. Το υλικό τοποθετήθηκε σε pH5.0, 100mM ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών και ακολούθησε υδατόλουτρο υπερήχων για 15min. Στη συνέχεια στο διάλυμα προστέθηκαν 7,5mg ενζύμου και ακολούθησε επώαση για 1,5 ώρα στους 30°C. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε, ακολούθως, τέσσερις συνεχόμενες φορές στις 5000rpm για 15min. Μεταξύ κάθε φυγοκέντρωσης το μίγμα τοποθετούνταν στον πάγο για 5min και το υπερκείμενο απομακρυνόταν με 2ml pH5.0, 100mM citrate-phosphate buffer διαλύματος να προστίθενται κάθε φορά.

Μετά την πρώτη φυγοκέντρηση συλλέχτηκαν 2ml υπερκείμενου για υπολογισμό της ακινητοποίηση με τη μέθοδο Bradford.

Ακινητοποίηση σε GOγFe-ole

Σε μια τυπική διαδικασία 8 mg ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε υδατόλουτρο υπερήχων για 30min σε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών., pH5.0, 100mM. Προστέθηκε γλουταραλδεΐδη στο διάλυμα σε συγκέντρωση 0,5M. Το διάλυμα επώαστηκε για 1,5ώρα στους 30°C υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθησαν επαναλαμβανόμενες φυγοκεντρήσεις στις 5000rpm με το υπερκείμενο να απομακρύνεται μετά από κάθε φυγοκέντρηση, ώστε να καθαριστεί το προϊόν από τη γλουταραλδεΐδη. Το υλικό τοποθετήθηκε σε 6ml pH5.0, 100mM ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών και ακολούθησε υδατόλουτρο υπερήχων για 10min. Στη συνέχεια στο διάλυμα προστέθηκαν 2,5mg ενζύμου και ακολούθησε επώαση για 1,5 ώρα στους 30°C. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε, ακολούθως, τέσσερις συνεχόμενες φορές στις 5000rpm για 15min. Μεταξύ κάθε φυγοκέντρωσης το μίγμα τοποθετούνταν στον πάγο για 5min και το υπερκείμενο απομακρυνόταν με 2ml pH5.0, 100mM citrate-phosphate buffer διαλύματος να προστίθενται κάθε φορά. Μετά την πρώτη φυγοκέντρηση συλλέχτηκαν 2ml υπερκείμενου για υπολογισμό της ακινητοποίηση με τη μέθοδο Bradford.

Ακινητοποίηση σε σιλανοποιημένο GOγFe και σιλανοποιημένο γFe

Σε μια τυπική διαδικασία 7,9mg υλικού ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν σε 1,5ml αιθανόλης. Ακολούθησε υδατόλουτρο υπερήχων για 30min. 300μl APTES μπήκαν στο διάλυμα και ακολούθησε επώαση στους 25°C για 24h. Ακολούθησαν επαναλαμβανόμενες φυγοκεντρήσεις στις 5000rpm για 15min με το υπερκείμενο να απομακρύνεται μετά από κάθε φυγοκέντρηση, ώστε να καθαριστεί το προϊόν. Ακολούθησε προσθήκη γλουταραλδεΐδης σε συγκέντρωση 0,5M σε τελικό όγκο 6ml. Ακολούθησε επώαση στους 25°C για 24h. Ακολούθησαν επαναλαμβανόμενες φυγοκεντρήσεις στις 5000rpm για 15min με το υπερκείμενο να απομακρύνεται μετά από κάθε φυγοκέντρηση. Το τελικό προϊόν διαλύθηκε σε 6ml pH5.0, 100mM ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικών-φωσφορικών και προστέθηκαν 8,6mg ενζύμου.

Ακολούθησε επώαση στους 25°C για 24h. Το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε, ακολούθως, τέσσερις συνεχόμενες φορές στις 5000rpm για 15min. Μεταξύ κάθε φυγοκέντρησης το μίγμα τοποθετούνταν στον πάγο για 5min και το υπερκείμενο απομακρυνόταν με 2ml pH5.0, 100mM citrate-phosphate buffer διαλύματος να προστίθενται κάθε φορά. Μετά την πρώτη φυγοκέντρηση συλλέχτηκαν 2ml υπερκείμενου για υπολογισμό της ακινητοποίηση με τη μέθοδο Bradford.

Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και για την ακινητοποίηση β-γλυκοζιδάσης σε σιλανοποιημένο μαγγεμίτη οπότε και χρησιμοποιήθηκαν 7,2mg ενζύμου και 15mg μαγγεμίτη.

GOX (Layer-by-Layer ακινητοποίηση β-γλυκοζιδάσης)

Διάλυση 5mg GO σε 1ml καθαρής αιθανόλης με 15min χρήση υπερήχων. Προσθήκη 0,3 ml APTES για σιλανοποίηση. Επώαση 30°C για 1h. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 5000rpm, απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 2ml dH₂O. Γίνεται και 2η φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Το δείγμα διαλύεται σε τελικό όγκο 6ml με 1M συγκέντρωση γλουταραλδεϋδης. Ακολουθεί επώαση για 1h. Ακολουθεί φυγοκέντρηση στις 5000rpm, απομάκρυνση του υπερκείμενου και προσθήκη 2ml dH₂O. Γίνεται και 2η φυγοκέντρηση και απομάκρυνση του υπερκείμενου. Το δείγμα διαλύεται σε 6ml dH₂O, όπου προστίθενται 5mg ενζύμου. Ακολουθεί επώαση στους 30°C για 1h. Κατόπιν γίνεται φυγοκέντρηση στις 5000rpm, απομάκρυνση του υπερκείμενου (κρατείται ολόκληρη η ποσότητα για χρήση σε επόμενους κύκλους) και διάλυση του ιζήματος σε 1ml dH₂O. Ακολουθεί η ίδια διαδικασία για άλλους δυο κύκλους με χρήση του υπερκείμενου ενζύμου που απομονώνεται κάθε φορά.

Double (GO-bgl-*inv*, Layer-by-Layer ακινητοποίηση β-γλυκοζιδάσης και ιμβεργτάσης)

Ακολουθείται η ίδια διαδικασία με το GOX με την διαφορά ότι στον τρίτο κύκλο γίνεται προσθήκη 5mg ιμβεργτάσης.

3. Αποτελέσματα

Παρακάτω ακολουθεί η παρουσίαση των αποτελεσμάτων που προέκυψαν από τη μελέτη στα προϊόντα ακινητοποίησης και η αντιπαράθεση τους ως προς τα αντίστοιχα αποτελέσματα της μελέτης του ελεύθερου ενζύμου. Αρχικά μελετήθηκε η περίπτωση της ακινητοποιημένης και ελεύθερης β-D-γλυκοζιδάσης. Συγκεκριμένα, μελετήθηκε η δραστικότητα της, το θερμοκρασιακό προφίλ δράσης της, η επίδραση του pH στην δραστικότητα του ενζύμου, καθώς και η σταθερότητα που παρουσίασε για ορισμένα χρονικά διαστήματα στους 60 και 70°C μέσα και από τη σταθερά αποδιάταξη της. Τέλος μελετήθηκε η ικανότητα των προϊόντων ακινητοποίησης να επαναχρησιμοποιηθούν. Μετά από αυτή την ολοκληρωμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν τα πιο πολλά υποσχόμενα προϊόντα ακινητοποίησης για την υδρόλυση ενός βιομηχανικού υποστρώματος, της κελλοβιόζης μέσα από ένα πεπερασμένο αριθμό φορών επαναχρησιμοποίησης τους. Παράλληλα έγινε και μελέτη της 2ο-ταγους δομής του ενζύμου ως ελεύθερο και ακινητοποιημένο προϊόν.

Στη συνέχεια μέσα από την αντίληψη που είχε δημιουργηθεί για το πως επιδρούν στη συμπεριφορά του ενζύμου οι διάφορες μέθοδοι ακινητοποίησης προχωρήσαμε στη δημιουργία και μελέτη ενός νέου προϊόντος ακινητοποίησης στο οποίο η γλυκοζιδάση είναι ακινητοποιημένη σε πολλά στρώματα πάνω από το υλικό που χρησιμοποιείται ως βάση ακινητοποίησης, το οξειδίο γραφενίου. Το προϊόν ακινητοποίησης ονομάστηκε GOX. Ακολουθήθηκε η ίδια σειρά πειραμάτων μελέτης για αυτό το προϊόν ώστε να μπορεί να υπάρξει σύγκριση με τα προηγούμενα, οπότε και φάνηκε η ανωτερότητα του σε όλες τις περιπτώσεις.

Κατόπιν, προχωρήσαμε στη μελέτη του ενζύμου ιμβερτάση με τον ίδιο τύπο πειραμάτων όπως και στη περίπτωση της γλυκοζιδάσης με εξαίρεση τη μελέτη με κελλοβιόζη και αυτή της 2ο-ταγους δομής.

Συσσωρεύοντας τη γνώση από όλα τα πειράματα προχωρήσαμε στην ανάπτυξη ενός προϊόντος ακινητοποίησης με υπόστρωμα το οξειδίο γραφενίου και πάνω στο οποίο δημιουργήθηκαν στοιβάδες από β-γλυκοζιδάση και ιμβερτάση. Η εξώτερη στοιβάδα ήταν αυτή της ιμβερτάσης. Το παραγόμενο προϊόν με την επωνυμία double χρησιμοποιήθηκε για την υδρόλυση ενός μίγματος βιομηχανικού υποστρώματος αποτελούμενο από κελλοβιόζη και σουκρόζη. Υπήρξε συγκριτική μελέτη ως προς

προϊόντα ακινητοποίησης που είχαν ξεχωριστά το κάθε ένα ένζυμο, ώστε να φανεί η ανωτερότητα του προϊόντος της ταυτόχρονης διπλής ακινητοποίησης.

3.1 Βιοκαταλυτικά χαρακτηριστικά ακινητοποιημένης β-D-γλυκοζιδάσης

Μελέτη Δραστικότητας-Activity

Μελετήθηκε η δραστικότητα και ο βαθμός ακινητοποίησης όλων των δειγμάτων.

Πίνακας 3 1η στήλη-προϊόντα ακινητοποίησης, 2η στήλη-δραστικότητα ανά mg ακινητοποιημένου ενζύμου, 3η στήλη -βαθμός ακινητοποίησης.

Δείγμα	Unit(μmol glucose/mg enz/min)	Απόδοση ακινητοποίησης%
Ελεύθερο ένζυμο	5,7	-
GO-C ₂ -NH ₂	0,1	32.4
GOγFe-ole	2,1	37.7
γFe-sil	1,8	65.0
GOγFe-sil	2,8	69.5

Ο Πίνακας 3 δείχνει ότι η περίπτωση του ομοιοπολικά ακινητοποιημένου ενζύμου στο σιλανοποιημένο GOγFe ξεχωρίζει ανάμεσα σε όλες τις άλλες περιπτώσεις διατηρώντας την μισή δραστικότητα του ελεύθερου ενζύμου.

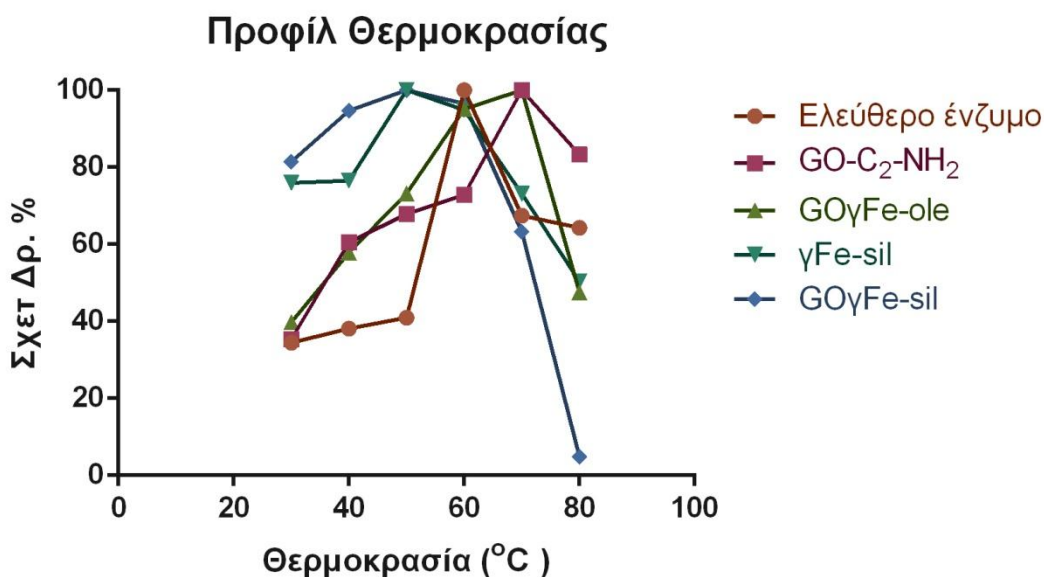
Θερμοκρασιακό προφίλ-Temperature profiling

Μελετήθηκε η δραστηριότητα των δειγμάτων σε ορισμένες θερμοκρασίες και εκφράστηκε η επί τοις εκατό συσχέτιση τους ως προς τη μέγιστη δραστηριότητα που παρουσίασε το κάθε δείγμα.

Πίνακας 4 1η στήλη-θερμοκρασία επώασης, 2η-5η στήλη % σχετική δραστηριότητα του κάθε προϊόντος ακινητοποίησης για την κάθε θερμοκρασία επώασης ως προς την εκάστοτε παρατηρούμενη μέγιστη δραστηριότητα.

Θερμοκρασία (°C)	Ελεύθερο ένζυμο	GO- C ₂ - NH ₂	GOγFe- ole	γFe-sil	GOγFe- sil
		% σχετική δραστηριότητα			
30	34,5	35,4	39,8	76	81,4
40	38,2	60,5	57,9	76,6	94,7
50	41	67,9	73,2	100	100
60	100	72,9	95,1	94,9	96,5
70	67,4	100	100	73,1	63,3
80	64,3	83,3	47,5	50,4	4,9
Θερμοκρασία (°C)			STDEV		
30	0,7	0,5	1,4	0,2	2,0
40	0,9	0,4	0,7	3,0	1,1
50	3,9	0,4	2,1	0,0	1,2
60	0,2	0,3	2,8	0,5	1,1
70	1,6	0,1	2,1	0,2	2,2
80	4,2	1,8	3,5	2,0	1,7

Εικόνα 18 θερμοκρασιακό προφίλ -%σχετική δραστηριότητα δείγματος ως προς τη θερμοκρασία(°C)



Η βέλτιστη θερμοκρασία αντίδρασης για το ελεύθερο ένζυμο βρέθηκε ότι ήταν στους 60°C. Όπως δείχνει ο πίνακας 4 το ένζυμο παρουσιάζει μια μετατόπιση της βέλτιστης θερμοκρασίας από 60°C στους 70°C για τα σκευάσματα GO-C₂-NH₂ και GOγFe-ole. Αντίθετα οι δυο περιπτώσεις σιλανοποιημένου προϊόντος, γFe-sil και GOγFe-sil, παρουσιάζουν μετατόπιση προς τα κάτω της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης στους 50°C. Σημαντικό είναι επίσης το ότι στους 80°C το ομοιοπολικά ακινητοποιημένο ένζυμο σε GO-C₂-NH₂ παρουσιάζει καλύτερη διατήρηση της δραστηριότητας του από το ελεύθερο ένζυμο.

Αλλαγές στο θερμοκρασιακό βέλτιστο που οφείλονται στην ακινητοποίηση του ενζύμου έχουν καταγραφεί και από άλλους ερευνητές. Οι Zhou et al. ακινητοποίησαν την bgl σε μαγνητικά νανοσωματίδια και παρατήρησαν μια αύξηση της βέλτιστης θερμοκρασίας αντίδρασης του ακινητοποιημένου ενζύμου από τους 60°C στους 70°C σε σύγκριση με το ελεύθερο ένζυμο. (Zhou et al. 2013)

Οι Johan Alfrén & Timothy John Hogley παρατήρησαν μια μικρή αύξηση στην βέλτιστη θερμοκρασία αντίδρασης για την ακινητοποιημένη β-γλυκοζιδάση από τους 65°C για το ελεύθερο ένζυμο στους 70°C για την ακινητοποιημένη σε μαγνητικά νανοσωματίδια γλυκοζιδάση. Johan Alfrén & Timothy John Hogley (2013) Οι J.

Yan et al. ακινητοποίησαν β-γλυκοζιδάση σε διαφορετικά κολλοειδή εδάφους μέσω φυσική προσρόφησης και παρατήρησαν ότι τόσο η ελεύθερη όσο και η ακινητοποιημένη β-γλυκοζιδάση είχαν βέλτιστη θερμοκρασία αντίδρασης τους 57°C J. Yan et al.-(2010) . Οι Ahmed, N. M. A. El-Shayeb, A. M. Hashem, S. A. Saleh and A. F. Abdel-Fattah ακινητοποίησαν β-γλυκοζιδάση σε σφουγγάρι χρησιμοποιώντας γλουταραλδεϋδη και παρατήρησαν ότι το ακινητοποιημένο και το ελεύθερο ένζυμο εμφάνισαν διαφορά της τάξης των 10°C στην βέλτιστη θερμοκρασία δράσης τους. Περαιτέρω, παρατήρησαν ότι το ελεύθερο ένζυμο έχασε το 64% της μέγιστης δραστηριότητας του στους 70°C. ενώ στην ίδια θερμοκρασία, το ακινητοποιημένο ένζυμο διατήρησε το 53% της μέγιστης δραστηριότητας του. (S. A. Ahmed, et al.-2013)

Παρόμοια αποτελέσματα έχουν παρατηρηθεί και για ένζυμα παραπλήσια ενζυμική δραστηριότητα όπως η κυτταρινάση από τους K. Khoshnevisan et al (K. Khoshnevisan et al-2011) που ακινητοποίησαν το ένζυμο σε υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια και αν και το ελεύθερο ένζυμο επέδειξε μεγαλύτερη δραστηριότητα, εντούτοις στους 80°C το ακινητοποιημένο ένζυμο έδειξε ελαφρώς μεγαλύτερη δραστηριότητα από το ελεύθερο. Ενώ οι Οι Yue Li J et al. ακινητοποίησαν κυτταρινάση σε οξειδίο του γραφενίου επιστρωμένο με $Fe_3O_4@SiO_2$ και ανακάλυψαν ότι η βέλτιστη θερμοκρασία αντίδρασης για την κυτταρινάση ήταν οι 50°C, θερμοκρασία ταυτόσημη με αυτή της ελεύθερης κυτταρινάσης (Yue Li et al-2015) Οι A.A. Gokhale et al ακινητοποίησαν κυτταρινάση σε ανταποκρινόμενα σε μαγνητισμό νανοϋλικά και είδαν διαφοροποίηση της βέλτιστης θερμοκρασίας αντίδρασης των δύο περιπτώσεων ακινητοποιημένων ενζύμων (A. Gokhale et al.-2013) .Οι Garima Srivastava et al ακινητοποίησαν Fenugreek β-αμυλάση σε ενεργοποιημένα φύλλα γραφενίου και βρήκαν ότι το ακινητοποιημένο ένζυμο έδειξε σημαντική ενίσχυση στην ανοχή της υψηλής θερμοκρασίας (Srivastava G, Singh K, Talat M, Srivastava ON, Kayastha AM-2014).

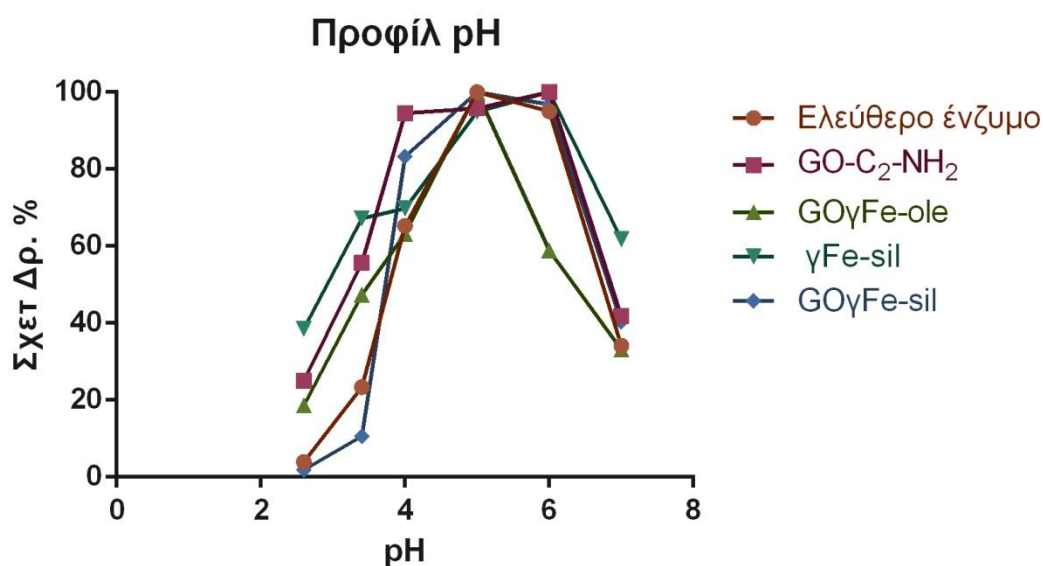
Επίδραση του pH στην δραστικότητα του ενζύμου-pH profile

Μελετήθηκε η δραστικότητα των δειγμάτων σε ορισμένες τιμές pH και εκφράστηκε η επί τοις εκατό συσχέτιση τους ως προς τη μέγιστη δραστικότητα που παρουσίασε το κάθε δείγμα. Όλα τα δείγματα εξετάστηκαν σε ένα εύρος pH από 2.6-7, όπως φαίνεται στον πίνακα 3.

Πίνακας 5 1η στήλη-pH επώασης, 2η-5η στήλη % σχετική δραστικότητα του κάθε προϊόντος ακινητοποίησης για το pH επώασης ως προς την εκάστοτε παρατηρούμενη μέγιστη δραστικότητα.

pH	Ελεύθερο ένζυμο	GO- C ₂ - NH ₂	GOγFe- ole	γFe-sil	GOγFe- sil
% σχετική δραστικότητα					
2,6	3,9	25,1	18,6	38,5	1,8
3,4	23,4	55,6	47,4	67,2	10,6
4	65,3	94,5	63,2	69,8	83,3
5	100	95,8	100	94,9	100
6	95	100	58,9	100	96,8
7	34,1	41,8	33,2	61,8	40,4
pH	STDEV				
2,6	0,1	0,4	0,0	1,7	1,4
3,4	0,2	1,7	1,1	1,4	1,3
4	1,6	1,4	1,6	0,4	2,5
5	4,0	0,4	2,0	0,4	0,6
6	3,0	1,1	1,7	1,1	1,8
7	2,3	3,0	1,6	3,0	3,7

Εικόνα 19 προφίλ pH-σχετική δραστηριότητα δείγματος ως προς το pH



Το βέλτιστο pH δράσης του ελεύθερου ενζύμου ήταν σε pH 5.0. Υπάρχουν δυο περιπτώσεις ακινητοποιημένου ενζύμου που το βέλτιστο pH δράσης παραμένει ίδιο με του ελεύθερου ενζύμου. Πρόκειται για τις περιπτώσεις ομοιοπολικής ακινητοποίησης σε σιλανοποιημένο γFe και $\text{GO}\gamma\text{Fe}$. Μια μετατόπιση προς το πιο αλκαλικό pH 6.0 παρατηρείται για το ένζυμο που ακινητοποιήθηκε ομοιοπολικά σε $\text{GO-C}_2\text{-NH}_2$. Επίσης, οι περιπτώσεις ομοιοπολικής ακινητοποίησης σε σιλανοποιημένο γFe , ομοιοπολικής ακινητοποίησης σε σιλανοποιημένο $\text{GO}\gamma\text{Fe}$ και ομοιοπολικής ακινητοποίησης σε $\text{GO-C}_2\text{-NH}_2$, παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντίσταση στη μείωση της δραστηριότητας τους σε pH 7.0 σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο.

Οι Zhou et al. ακινητοποίησαν την β -γλυκοζιδάση σε μαγνητικά νανοσωματίδια και παρατήρησαν ότι εμφάνισε βέλτιστο pH δράσης 4.0, αντίθετα με την ελεύθερη που είχε αντίστοιχο pH 5.0. Σε pH 7.0 οι ερευνητές παρατήρησαν ότι το ακινητοποιημένο ένζυμο διατήρησε 30% της δραστηριότητας του, ενώ το ελεύθερο ένζυμο διατήρησε μόνο το 15% αυτής (Zhou et al. -2013). Οι M.L. Verma et al. βρήκαν ότι το βέλτιστο pH δράσης της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης β -γλυκοζιδάσης σε μαγνητικά νανοσωματίδια ήταν 4.0 και 5.0, αντίστοιχα (M.L. Verma et al. -2013). Οι J. Yan et al. αν και δεν παρατήρησαν αλλαγές στο βέλτιστο pH δράσης της β -γλυκοζιδάσης, κατέγραψαν πολύ πιο απότομη μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου κατά την έκθεση του σε μεγαλύτερο και μικρότερο pH για το ελεύθερο ένζυμο σε σχέση με το

ακίνητοποιημένο σε κολλοειδή εδάφους (J. Yan et al.- 2010). Παρατηρεί, λοιπόν, κανείς ότι στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν αντίθετα με τους πιο πάνω ερευνητές υπάρχει μια τάση ανόδου του βέλτιστου pH δράσης του ενζύμου για τις περιπτώσεις ακινητοποίησης σε GO-C₂-NH₂, γFe-sil, που πιθανόν εξηγεί και γιατί σε pH 7.0 το ένζυμο παρουσιάζει καλύτερη ενζυμική ικανότητα σε σχέση με τα αποτελέσματα που εκείνοι παρατήρησαν.

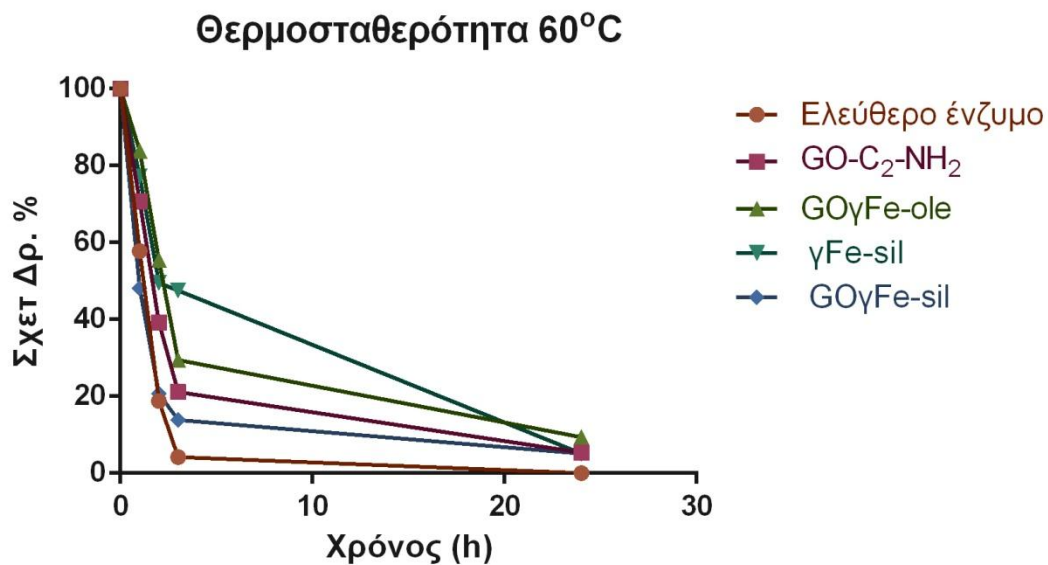
Μελέτη θερμοσταθερότητας 60°C -Thermostability 60°C

Μελετήθηκε η σταθερότητα των δειγμάτων κατά την επώαση τους σε ορισμένη θερμοκρασία. Η δραστηριότητα σε χρόνο επώασης 0 h θεωρείται ως το 100% κάθε δείγματος. Η εξέταση της θερμοσταθερότητας για όλα τα δείγματα έγινε με δειγματοληψία σε 0, 1, 2, 3 και 24h στους 60°C.

Πίνακας 6 1η στήλη-χρόνος επώασης στους 60oC, 2η-5η στήλη % σχετική δραστηριότητα του κάθε προϊόντος ακινητοποίησης σε κάθε χρονικό διάστημα επώασης ως προς την παρατηρούμενη δραστηριότητα σε χρόνο 0.

Χρόνος (h)	Ελεύθερο ένζυμο	GO-C ₂ -NH ₂	GOγFe-ole	γFe-sil	GOγFe-sil
% σχετική δραστηριότητα					
0	100	100	100	100	100
1	57,8	70,7	83,9	77,2	48,1
2	18,8	39,2	55,5	49,5	20,7
3	4,2	21,1	29,4	47,5	14
24	0	5,4	9,4	5,1	5,1
Χρόνος (h)	STDEV				
0	2,3	0,9	1,1	0,9	0,6
1	0,4	0,6	1,6	0,6	3,3
2	0,6	1,1	1,8	1,1	2,4
3	0,4	1,1	1,9	1,1	1,3
24	0,5	1,4	0,0	1,4	0,8

Εικόνα 20 θερμοσταθερότητα- %σχετική δραστηριότητα δείγματος ως προς τον χρόνο(h) στους 60°C



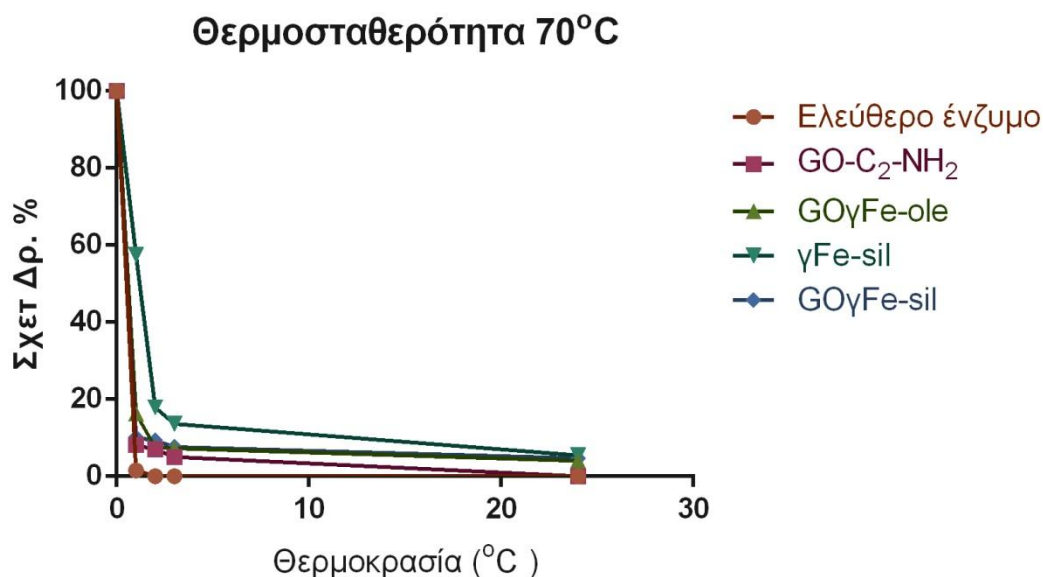
Μελέτη θερμοσταθερότητας 70°C-Thermostability 70°C

Μελετήθηκε η σταθερότητα των δειγμάτων κατά την επώαση τους σε ορισμένη θερμοκρασία. Η δραστηριότητα σε χρόνο επώασης 0 h θεωρείται ως το 100% κάθε δείγματος. Η εξέταση της θερμοσταθερότητας για όλα τα δείγματα έγινε με δειγματοληψία σε 0, 1, 2, 3 και 24h στους 70°C

Πίνακας 7 1η στήλη-χρόνος επώασης στους 70oC, 2η-5η στήλη % σχετική δραστηριότητα του κάθε προϊόντος ακινητοποίησης σε κάθε χρονικό διάστημα επώασης ως προς την παρατηρούμενη δραστηριότητα σε χρόνο 0.

Χρόνος (h)	Ελεύθερο ένζυμο	GO-C ₂ -NH ₂	GOγFe-ole	γFe-sil	GOγFe-sil
% σχετική δραστηριότητα					
0	100	100	100	100	100
1	1,6	8,2	16,3	57,4	10,1
2	0	6,9	7,5	17,9	9,3
3	0	5,1	7,3	13,6	7,7
24	0	0	4	5,5	4,7
Χρόνος (h) STDEV					
0	2,3	1,8	0,9	0,8	1,8
1	0,1	0,8	0,1	1,6	0,8
2	0,0	0,3	0,2	0,8	0,3
3	0,0	0,6	0,8	1,4	0,6
24	0,0	0,1	0,3	0,4	0,1

Εικόνα 21 θερμοσταθερότητα-%σχετική δραστηριότητα δείγματος ως προς τον χρόνο(h) στους 70°C



Όπως φαίνεται στον πίνακα 6 το ελεύθερο ένζυμο απώλεσε ταχύτατα τη δραστηριότητά του στους 60°C μετά από επώαση για 2h συγκρινόμενο με όλες τις

άλλες περιπτώσεις όπου το ένζυμο ήταν ακινητοποιημένο. Μετά από επώαση τόσο για 2 όσο και για 3 ώρες, το ακινητοποιημένο σε σιλιανοποιημένο μαγγεμίτη ένζυμο, εμφανίζει με διαφορά υψηλότερη θερμοσταθερότητα, διατηρώντας το 75,0% και 49,2% της αρχικής του δραστηριότητας, αντίστοιχα. Μετά από 24h το ελεύθερο ένζυμο χάνει κάθε δραστηριότητα.

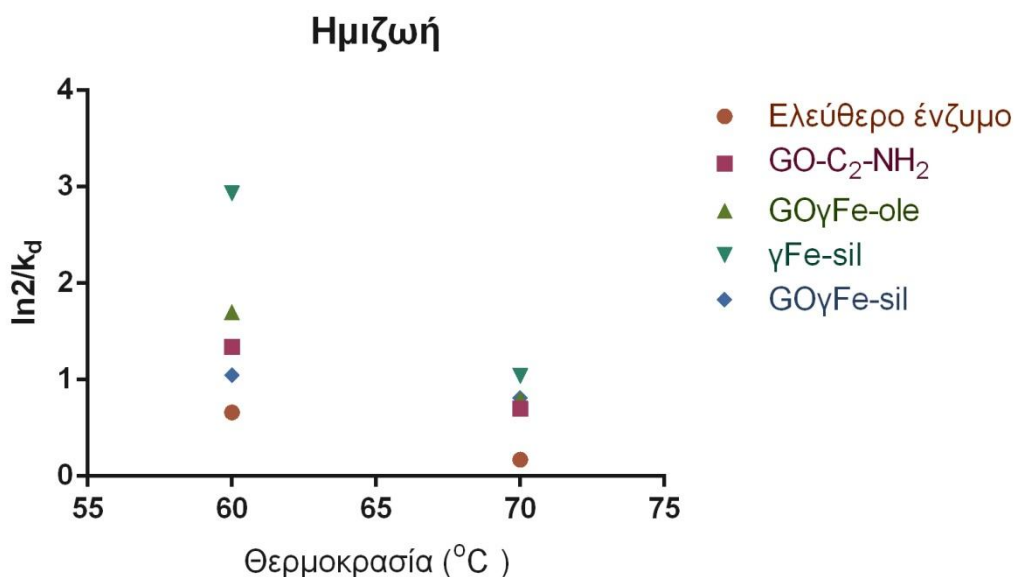
Μελέτη ημίσειας ζωή/σταθεράς αποδιάταξης-kd, half life

Πραγματοποιήθηκε περαιτέρω εξέταση των δεδομένων προκειμένου να χαρακτηριστούν η σταθερά αποδιάταξης και ο χρόνος ημιζωής των δειγμάτων.

Πίνακας 8 1η στήλη-παράθεση προϊόντων ακινητοποίησης, 2η-4η στήλη σταθερά αποδιάταξης στους 60 και 70°C, αντίστοιχα, 3η-5η στήλη χρόνος ημιζωής στους 60 και 70°C, αντίστοιχα.

Δείγμα	k_d 60°C	ημιζωή 60°C	k_d 70°C	ημιζωή 70°C
Ελεύθερο ένζυμο	1,1	0,7	4,2	0,2
GO-C ₂ -NH ₂	0,5	1,3	1,0	0,7
GOγFe-ole	0,4	1,7	0,9	0,8
γFe-sil	0,2	2,9	0,7	1,0
GOγFe-sil	0,7	1,1	0,9	0,8

Εικόνα 22 ημίσεια ζωή ως προς τη θερμοκρασία (°C)



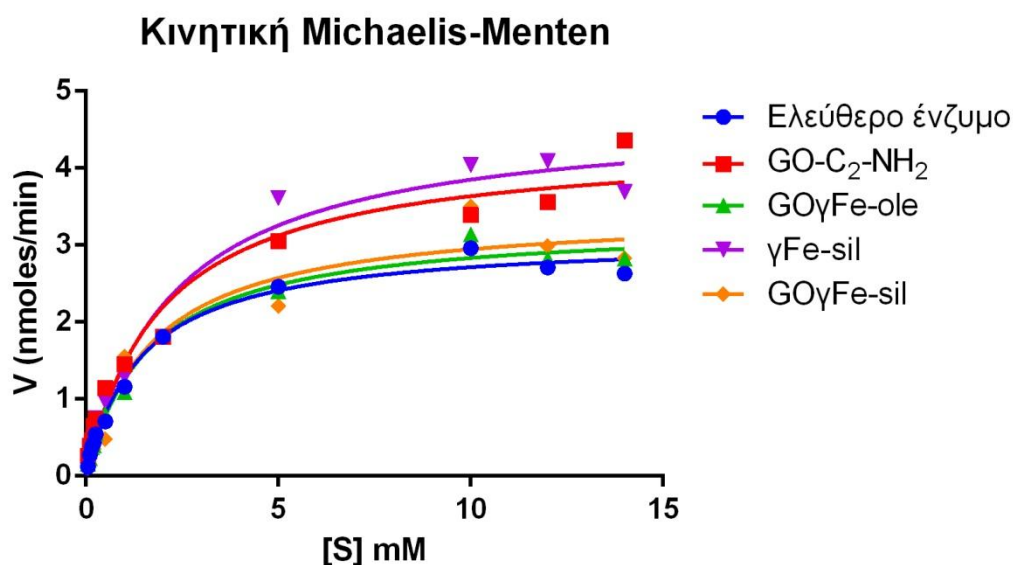
Ο πίνακας 8 δείχνει καθαρά ότι όλες οι περιπτώσεις ακινητοποίησης επιτυγχάνουν κατά πολύ ανώτερα επίπεδα ενζυμικής ημιζωής σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο τόσο στους 60°C όσο και στους 70°C. Η ακινητοποίηση του ενζύμου φαίνεται, επίσης να επιδρά θετικά στην τιμή k_d ειδικά στους 70°C, οπότε και το ελεύθερο ένζυμο απενεργοποιείται 4 φορές ευκολότερα από ότι σε κάθε περίπτωση ακινητοποίησης.

Κινητική της αντίδρασης

Πίνακας 9 Στοιχεία κινητικής μελέτης δειγμάτων, V_{max} , K_m , Std. Error V_{max} , Std. Error K_m

Δείγμα	V_{max}	K_m	(%) Std. Error	(%) Std. Error
			V_{max}	K_m
Ελεύθερο ένζυμο	3,1	1,4	0,5	0,9
GO-C ₂ -NH ₂	4,4	2,0	1,5	2,4
GOγFe-ole	3,3	1,6	0,6	1,2
γFe-sil	4,7	2,2	1,5	0,2
GOγFe-sil	3,5	1,7	1,3	0,2

Εικόνα 23 Κινητική κατά Michaelis-Menten (nmoles/min) προς τη συγκέντρωση υποστρώματος [S] (mM)



Παρατηρεί κανείς εύκολα ότι η τιμή K_m τείνει να είναι υψηλότερη για όλες τις περιπτώσεις ακινητοποίησης σε σύγκριση με το ελεύθερο ένζυμο. Το ακινητοποιημένο ένζυμο στις δυο περιπτώσεις της χρήσης του GOγFe ως υποστρώματος εμφανίζει τη μικρότερη αύξηση τις τιμές K_m το οποίο αντιστοιχεί σε μικρή μείωση της βιολογικής συγγένειας του ακινητοποιημένου ενζύμου προς το υπόστρωμα υδρόλυσης. Αυτή η παρατηρούμενη μείωση πιθανόν να οφείλεται σε μείωση της πιθανότητας δημιουργίας του συμπλόκου ενζυμο-υπόστρωμα εξαιτίας αλλαγών της δομής του ενζύμου που οφείλονται στην ακινητοποίηση του. Ένας ακόμη λόγος που συμβαίνει αυτό πιθανόν να είναι η αρνητική επίδραση της ακινητοποίησης στη διάχυση του υποστρώματος υδρόλυσης προς το ενεργό κέντρο του ενζύμου (Li et al. 2007b). Αντίστοιχο φαινόμενο παρατήρησαν και οι Johan Alfrén και Timothy John Hobley κατά την ακινητοποίηση της β-D-γλυκοζιδάσης σε μαγνητικά σωματίδια. Συγκεκριμένα είδαν μείωση της V_{max} και αύξηση της K_m που απέδωσαν σε μειωμένη ικανότητα πρόσβασης του υποστρώματος υδρόλυσης στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (Johan Alfrén & Timothy John Hoble-2013). το αντίθετο φαινόμενο, μείωση της K_m για το ακινητοποιημένο ένζυμο σε σχέση με το ελεύθερο, παρατήρησαν οι Zhou et al. κατά την ακινητοποίηση της β-γλυκοζιδάσης σε μαγνητικά νανοϋλικά (Zhou et al. -2013). Κατά γενική ομολογία όμως έχει

παρατηρηθεί αύξηση της K_m κατά την ακινητοποίηση της β-D-γλυκοζιδάσης σε νανοϋλικά (M.L. Verma et al.-2013, M. Zhang et al.-2006)

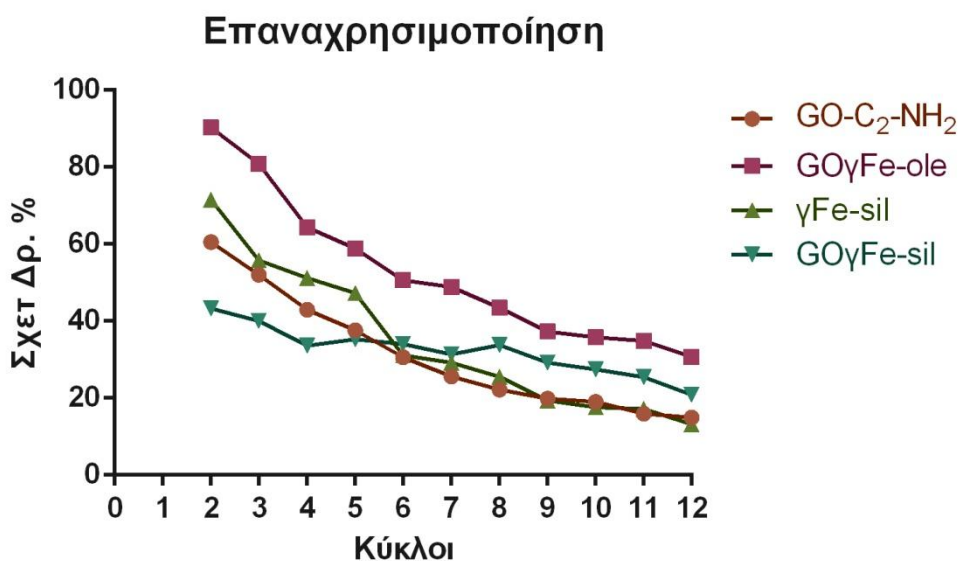
Μελέτη επαναχρησιμοποίησης της ακινητοποιημένης γλυκοζιδάσης -Reusability

Πραγματοποιήθηκε μελέτη της επαναχρησιμοποίησης των ακινητοποιημένων δειγμάτων σε ένα πείραμα διάρκειας 12 κύκλων.

Πίνακας 10 1η στήλη κύκλοι επώασης δειγμάτων, 2η-3η-4η-5η στήλη % σχετική δραστηριότητα προϊόντων ακινητοποίησης για κάθε κύκλο επώασης. Ως 100% θεωρείται η μέτρηση στον 1ο κύκλο του κάθε δείγματος.

Κύκλοι	GO-C ₂ -NH ₂	GOγFe-ole	γFe-sil	GOγFe-sil
	% σχετική δραστηριότητα			
2	60,5	90,3	71,6	43,3
3	52,1	80,9	55,8	40,1
4	43	64,4	51,2	33,6
5	37,6	58,9	47,3	35,3
6	30,6	50,6	31,1	34
7	25,6	48,8	29,2	31,3
8	22,2	43,4	25,6	33,8
9	19,9	37,3	19,4	29,2
10	19	35,8	17,6	27,4
11	16	34,9	17,2	25,5
12	14,9	30,7	13,2	20,9
Κύκλοι	STDEV			
2	0,3	1,0	4,5	0,9
3	0,1	0,6	4,7	0,8
4	0,7	0,5	4,8	1,1
5	0,4	1,1	4,5	0,5
6	0,6	0,4	4,4	1,3
7	0,9	1,2	2,2	1,1
8	0,4	1,6	0,6	1,0
9	0,7	2,1	1,1	1,7
10	0,6	1,5	4,5	1,6
11	0,5	0,6	2,5	0,9
12	0,6	0,8	0,8	1,6

Εικόνα 24 επαναχρησιμοποίηση ακινητοποιημένου ενζύμου-%σχετική δραστηριότητα σε κάθε κύκλο επαναχρησιμοποίησης



Πιθανά η κύρια χρηστική διαφοροποίηση μεταξύ ελεύθερου ενζύμου και ακινητοποιημένου ενζύμου είναι η δυνατότητα ανακύκλωσης και επαναχρησιμοποίησης του δεύτερου τουλάχιστον κατά ένα πολύ εύκολο τρόπο. Σε ένα πείραμα, λοιπόν, 12 κύκλων τα ακινητοποιημένα δείγματα με τη βέλτιστη δραστηριότητα ήταν κατά φθίνουσα σειρά: ομοιοπολικά ακινητοποιημένη β-γλυκοζιδάση σε GOγFe-ole, ομοιοπολικά ακινητοποιημένη β-γλυκοζιδάση σε σιλανοποιημένο GOγFe, ομοιοπολικά ακινητοποιημένη β-γλυκοζιδάση σε GO-C₂-NH₂, ομοιοπολικά ακινητοποιημένη β-γλυκοζιδάση σε σιλανοποιημένο γFe. Η ευεργετική επίδραση της ακινητοποίησης της β-γλυκοζιδάσης φαίνεται σε αρκετές έρευνες που έχουν δημοσιευτεί. Για παράδειγμα Οι Zhou et al. κατέγραψαν ότι η ακινητοποιημένη β-γλυκοζιδάση σε μαγνητικά νανοϋλικά διατήρησε το 86% της δραστηριότητας της μετά από 10 κύκλους (Zhou et al. -2013). Επίσης, Οι M.L. Verma et al. χρησιμοποίησαν β-γλυκοζιδάση ακινητοποιημένη σε μαγνητικά νανοσωματίδια στους 60°C πραγματοποιώντας υδρόλυση του pNPG. Οι ερευνητές κατέγραψαν το ακινητοποιημένο ένζυμο να διατηρεί την αρχική δραστηριότητα του σε βαθμό άνω του 80% μέχρι και τον 8ο κύκλο, ενώ ήταν σταθερό μέχρι και τον 16ο κύκλο σε αντιδράσεις των 10 λεπτών στους 60°C (M.L. Verma et al.-2013). Οι Ahmed, N. M. A. El-Shayeb, A. M. Hashem, S. A. Saleh και A. F. Abdel-Fattah πραγματοποίησαν τεστ επαναχρησιμοποίησης ακινητοποιημένης β-γλυκοζιδάσης σε συνθήκες (pH 4.0),

55°C για 10 min και παρατήρησαν ότι το ακινητοποιημένο ένζυμο διατήρησε το 59,5% και 51,0% της αρχικής δραστικότητας του μετά από 6 και 8 επαναχρησιμοποιήσεις αντίστοιχα. (S. A. Ahmed et al. -2013) Οι R. Valenzuela et al. επαναχρησιμοποίησαν την ακινητοποιημένη β-γλυκοζιδάση δυο φορές, με το ένζυμο να διατηρεί την απόδοση υδρόλυσης δίχως να χάνει την ενζυμική του δραστικότητα (R.Valenzuela et al.-2014) Παρατηρεί, όμως κανείς ότι κανείς από αυτούς τους ερευνητές δεν προχώρησε τη μελέτη μέχρι τους 12 κύκλους επαναχρησιμοποίησης. γεγονός που καταδεικνύει ότι η ακινητοποίηση σε υπερπαραμαγνητικά νανοϋλικά βελτιώνει σημαντικά τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του ενζύμου σε σχέση με άλλους φορείς ακινητοποίησης. Ακόμη, όπως φαίνεται και από την έρευνα των Yue Li J et al. αποδεικνύεται γενικότερα ότι η χρήση APTES οδηγεί σε ένα βελτιωμένο βιοκαταλυτικό σκεύασμα. Συγκεκριμένα, οι Yue Li J et al. δείχνουν ότι η ενεργοποίηση με APTES βελτιώνει τη συμπεριφορά της ακινητοποιημένης σε $Fe_3O_4@SiO_2-GO$ β-γλυκοζιδάσης σε σχέση με τη συμπεριφορά του ενζύμου όταν δεν έχει χρησιμοποιηθεί APTES. Όχι μόνο αυξήθηκε ο βαθμός ακινητοποίησης ποσοστιαία και ποσοτικά κατά την χρήση APTES, αλλά και η επαναχρησιμοποίηση του ενζύμου στην περίπτωση ενεργοποίησης με APTES του υποστρώματος ακινητοποίησης οδηγεί σε σχετική ενζυμική δραστικότητα της τάξης του 86,7%, αντίθετα με την περίπτωση μη χρήσης APTES, οπότε και μετά από 5 κύκλους η σχετική δραστικότητα έχει μηδενιστεί (Yue Li et al. -2015)

Μελέτη της δευτεροταγούς δομής της β-γλυκοζιδάσης με χρήση FT-IR φάσματος-Secondary structure derived from FT-IR spectra

Μελετήθηκαν οι αλλαγές που προκαλούν στη δευτεροταγή δομή των ενζύμων οι διαφορετικοί τρόποι ακινητοποίησης τους στα προς μελέτη υλικά μέσα από τη χρήση τους φάσματος FT-IR. Ταυτόχρονα γίνεται σύγκριση προς τη δομή του ελεύθερου ενζύμου.

Πίνακας 11 1-στήλη είδη 2οταγούς δομής, 2-3-4-5-6-στήλη ποσοστά της εκάστοτε 2οταγούς δομής για το κάθε προϊόν ακινητοποίησης.

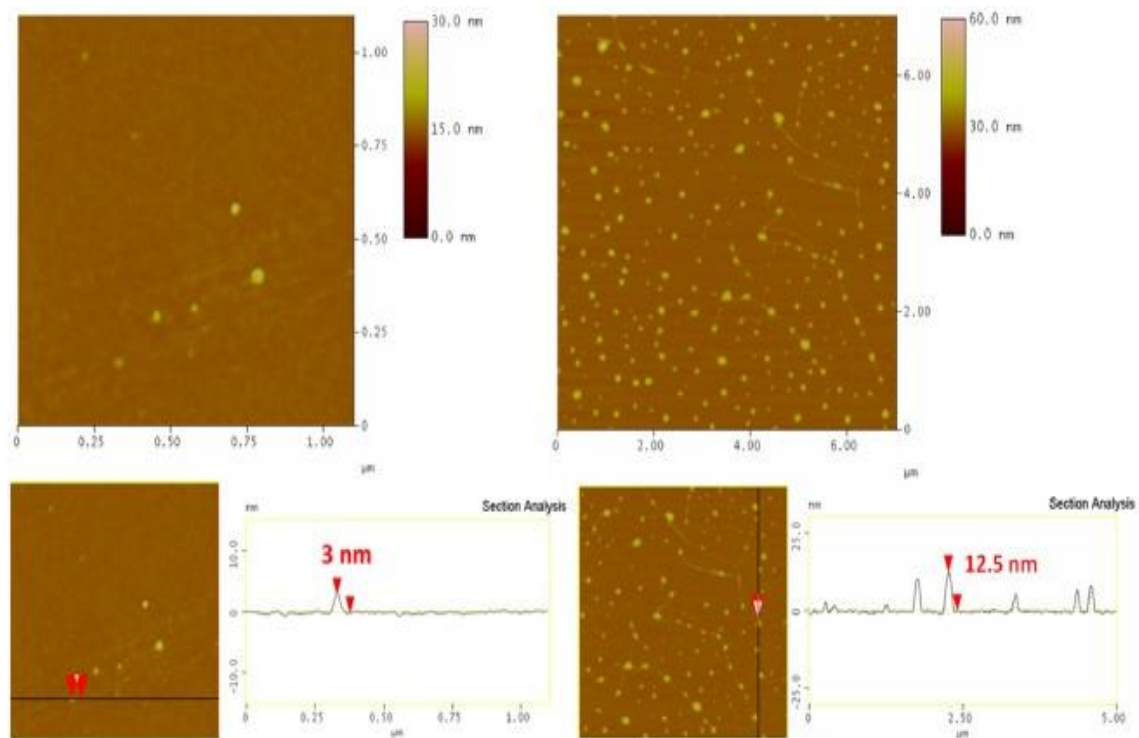
2ndary structure	Ελεύθερο ένζυμο	GO-C ₂ -NH ₂	GOγFe-ole	γFe-sil	GOγFe-sil
	% ως μέρος της συνολικής 2ο-ταγούς δομής				
Ant_par β-sheets	12,4	28,5	9,0	5,6	5,5
par β-sheets	32,0	43,6	36,1	37,1	37,8
Random coil	14,4	12,9	15,3	13,3	23,3
α-helix	13,8	10,2	27,7	19,5	15,3
β-turns	25,4	3,8	8,8	23,3	15,9
unknown	2,0	1,1	3,1	1,3	2,2

Τα αποτελέσματα στον πίνακα 11 δείχνουν ξεκάθαρα διαφορές μεταξύ των δευτεροταγών δομών του ελεύθερου ενζύμου και των περιπτώσεων ακινητοποίησης. Για παράδειγμα, το στοιχείο των β-στροφών διέρχεται σημαντικών αλλαγών μειούμενο κατά 10% σε όλες τις περιπτώσεις ακινητοποίησης με εξαίρεση αυτή του σιλανοποιημένου μαγγεμίτη. Επιπλέον, όλες οι περιπτώσεις ακινητοποίησης σε υπερπαραμαγνητικά νανοϋλικά εμφανίζουν αύξηση του στοιχείου α-έλικας με τις περιπτώσεις GOγFe-ole και γFe-sil να έχουν αύξηση κατά 14 και 6%, αντίστοιχα. Η αύξηση των δομών α-έλικας έχει παρατηρηθεί και από τους Szilágyi και Zánodszky για την περίπτωση των μέτρια θερμοφίλων πρωτεϊνών (*András Szilágyi, Péter Zánodszky-2000*). Πιθανά, λοιπόν αυτό να εξηγεί την αυξημένη θερμοανθεκτικότητα όλων της ακινητοποιημένης β-γλυκοζιδάσης σε υπερπαραμαγνητικά νανοϋλικά σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο, κατά τη βάση ότι η ακινητοποίηση των ενζύμων αυτών προκαλεί δομικές αλλαγές που τα κάνουν πιο θερμοσταθερά. Όλες οι περιπτώσεις ακινητοποίησης σε υπερπαραμαγνητικά νανοϋλικά, διατηρούν περίπου το ίδιο ποσοστό παράλληλων β-φύλλων (37%). Περαιτέρω, το στοιχείο του τυχαίου σπειράματος του για την περίπτωση GOγFe-sil υπόκειται σε αλλαγή της τάξης του +9% σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο.

Ταυτοποίηση ακινητοποίησης με χρήση AFM

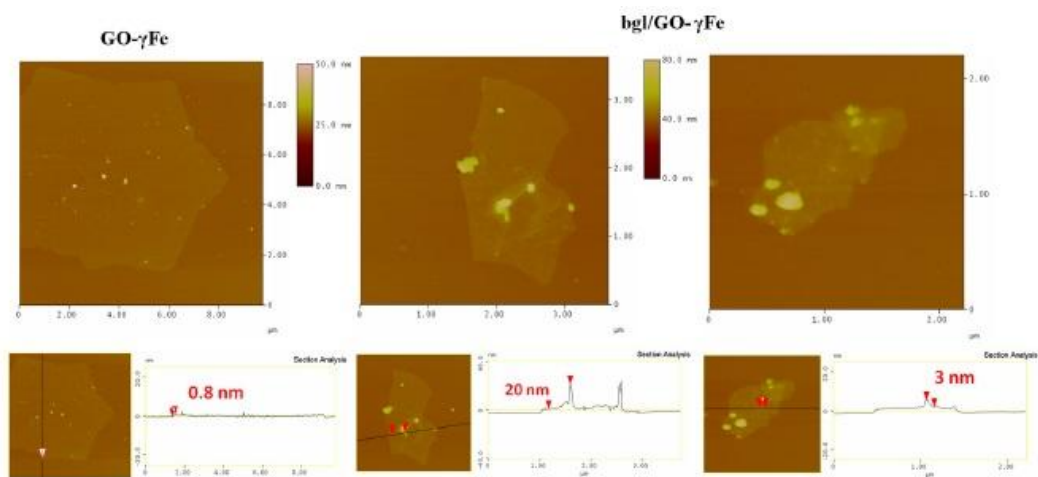
Χρησιμοποιήθηκε η τεχνική AFM για την ταυτοποίηση της ακινητοποίησης του ενζύμου στα νανοϋλικά γFe και $\text{GO}\gamma\text{Fe}$.

Εικόνα 25 AFM height images (Πάνω), cross section analysis (Κάτω) των γFe νανοσωματιδίων (αριστερά) και $\text{bgl}/\gamma\text{Fe}$ (δεξιά).



Η αλλαγή που παρατηρείται στο ύψος από 3nm σε 12.5nm ουσιαστικά αποτελεί απόδειξη της επιτυχούς ακινητοποίησης της β -γλυκοζιδάσης στο νανοσωματίδιο.

Εικόνα 26 AFM height images (πάνω) και cross section analysis (κάτω) των GOγFe νανοσωματιδίων (αριστερά) και bgl/GOγFe (κάτω και δεξιά).

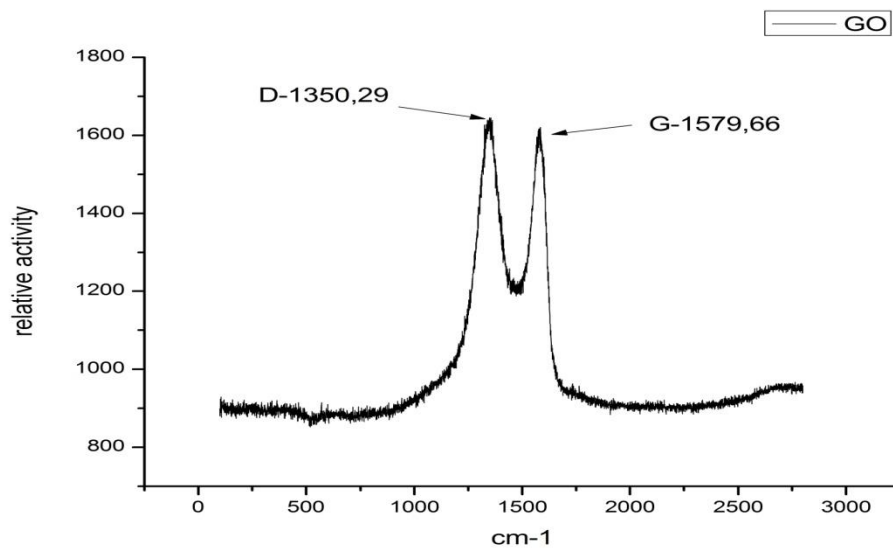


Ομοίως, η αλλαγή στο ύψος από 0,8nm σε 3nm αποτελεί ταυτοποίηση της επίστρωσης γFe σε οξείδιο γραφενίου, ενώ η αλλαγή στο ύψος από 3nm σε 20nm αποτελεί ταυτοποίηση της ακινητοποίησης της β-γλυκοζιδάσης σε GO-γFe.

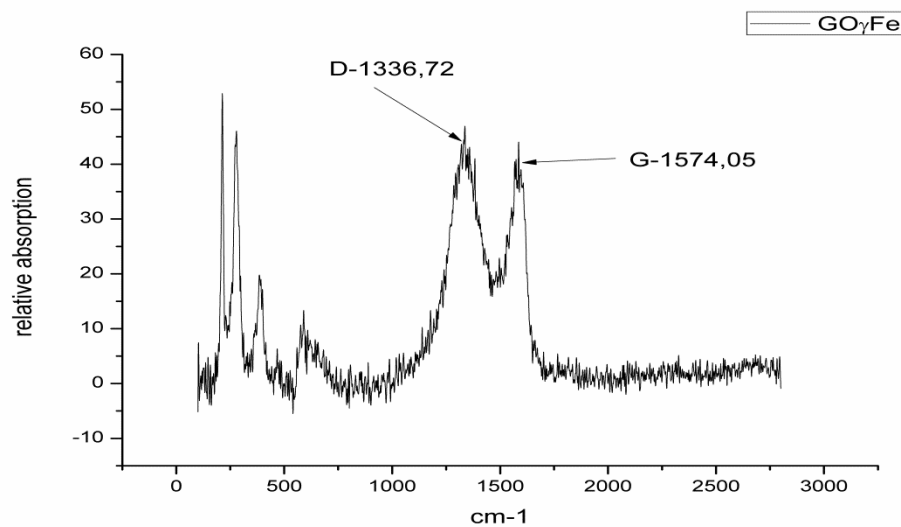
Ταυτοποίηση επίστρωσης γFe στο οξείδιο γραφενίου

Χρησιμοποιήθηκε η φασματοσκοπική τεχνική raman προκειμένου να καταγραφούν και να ταυτοποιηθούν οι χαρακτηριστικές κορυφές των υλικών και έτσι να διαπιστωθεί και η ύπαρξη γFe στην επιφάνεια του GOγFe.

Εικόνα 27 Χαρακτηρισμός D και G μάντας με χρήση raman φασματοσκοπίας σε GO



Εικόνα 28 Χαρακτηρισμός D και G μάντας με χρήση raman φασματοσκοπίας σε GO_γFe



Οι μάντες D και G αποτελούν χαρακτηριστικές του οξειδίου του γραφενίου (GO). Οι μάντες στα ~400nm αποτελούν χαρακτηριστικές του σιδήρου Fe. Μέσα από τη σύγκριση λοιπόν των εικόνων 3 και 4 φαίνεται πράγματι η μεγάλη διαφορά ανάμεσα στα δυο υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την ακινητοποίηση των ενζύμων.

Ενζυμικό σύστημα ακινητοποίησης GOX bgl

Τα ιδιαίτερα θετικά αποτελέσματα του δείγματος GOγFe-sil μαζί με τις δυνατότητες που προσφέρει η συγκεκριμένη μεθοδολογία ακινητοποίησης οδήγησαν στην ανάπτυξη πρωτοκόλλου για τη δημιουργία προϊόντος πολυστοιβαδικής ακινητοποίησης του ενζύμου β-γλυκοζιδάση (GOX). Το GOX, λοιπόν, είναι ένα προϊόν που αποτελείται από πολλές διαδοχικές στοιβάδες β-γλυκοζιδάσης που έχουν προκύψει από την διαδοχική και επαναλαμβανόμενη επώαση του προϊόντος με APTES-γλουταραλδεϋδη-ένζυμο, όπως εξηγείται στις μεθόδους ακινητοποίησης. Ακολουθήθηκε, λοιπόν η ίδια πορεία πειραμάτων προκειμένου να υπάρξει σύγκριση του νέου αυτού προϊόντος ακινητοποίησης με τα ήδη μελετημένα.

Πίνακας 12 1η στήλη-προϊόντα ακινητοποίησης, 2η στήλη-ποσοστό ακινητοποίησης, 3η στήλη-δραστικότητα ανά mg ακινητοποιημένου ενζύμου.

Δείγμα	Απόδοση ακινητοποίησης %	Unit(μmol glucose/mg enz/min)
Ελεύθερο ένζυμο -	-	5,7
γFe-sil	65,0	1,8
GOγFe-ole	31,2	2,1
GOγFe-sil	69,5	2,8
GOX	64,9	3,1

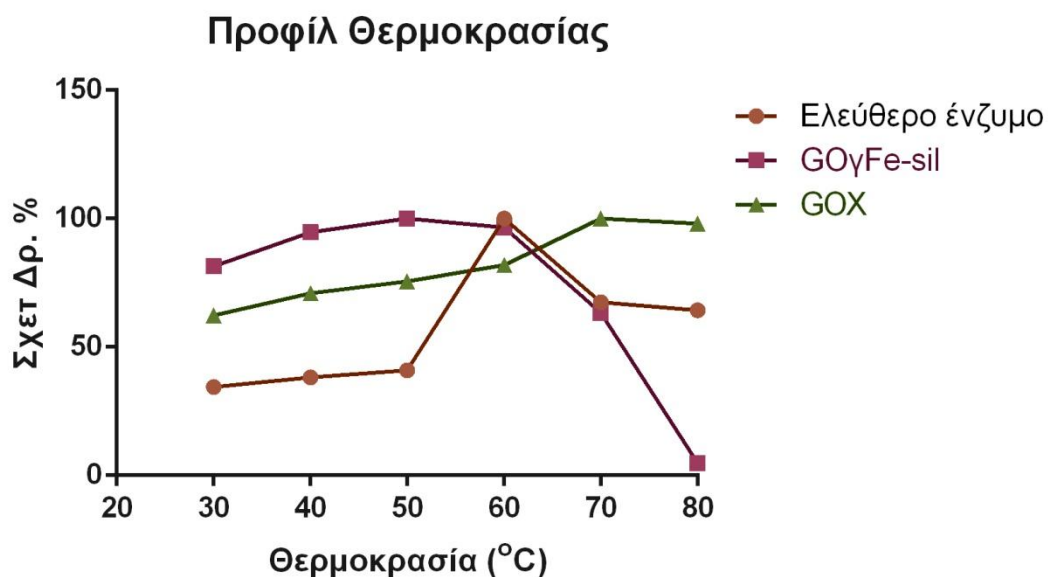
Παρατηρείται πως το σκεύασμα GOX εμφανίζει τη βέλτιστη δραστικότητα σε σχέση με όλα τα άλλα σκευάσματα ενώ ακινητοποιείται το 64,9% του χρησιμοποιούμενο ενζύμου.

Θερμοκρασιακό προφίλ-Θερμοκρασία profiling

Πίνακας 13 1η στήλη-θερμοκρασία επώασης, 2η-4η-6η στήλη % σχετική δραστηκότητα του κάθε προϊόντος ακινητοποίησης για την κάθε θερμοκρασία επώασης ως προς την εκάστοτε παρατηρούμενη μέγιστη δραστηκότητα

Θερμοκρασία (°C)	Ελεύθερο ένζυμο	GOγFe-sil	GOX
	% σχετική δραστηκότητα		
30	34,5	81,4	62,3
40	38,2	94,7	70,9
50	41,0	100	75,6
60	100	96,5	81,9
70	67,4	63,3	100
80	64,3	4,9	98
Θερμοκρασία (°C)	STDEV		
30	0,7	1,3	0,4
40	0,9	1,3	0,6
50	6,7	1,7	0,9
60	0,2	1,4	1,0
70	1,6	2,2	2,2
80	4,2	1,8	4,9

Εικόνα 29 θερμοκρασιακό προφίλ -%σχετική δραστηκότητα δείγματος ως προς τη θερμοκρασία(°C)



Παρατηρείται ότι η περίπτωση της πολυστοιβαδικής ακινητοποίησης της β-γλυκοζιδάσης (GOX) παρουσιάζει την καλύτερη συμπεριφορά σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο αλλά και με το ακινητοποιημένο σε GOγFe-sil σε υψηλές θερμοκρασίες. Μάλιστα η βέλτιστη θερμοκρασία δράσης του GOX σκευάσματος είναι στους 70°C, ενώ ελεύθερο και ακινητοποιημένο σε GOγFe-sil εμφανίζουν βέλτιστη δράση στους 60 και 50°C, αντιστοίχως. Στους 80°C τα δύο αυτά σκευάσματα διατηρούν το 64% και 1,8% της βέλτιστης δραστηκότητας τους αντιστοίχως, ενώ το ακινητοποιημένο σε GOX ένζυμο διατηρεί το 98%. Φαίνεται ξεκάθαρα ότι το GOX ως φορέας ακινητοποίησης αυξάνει σημαντικά τη θερμοσταθερότητα του ενζύμου

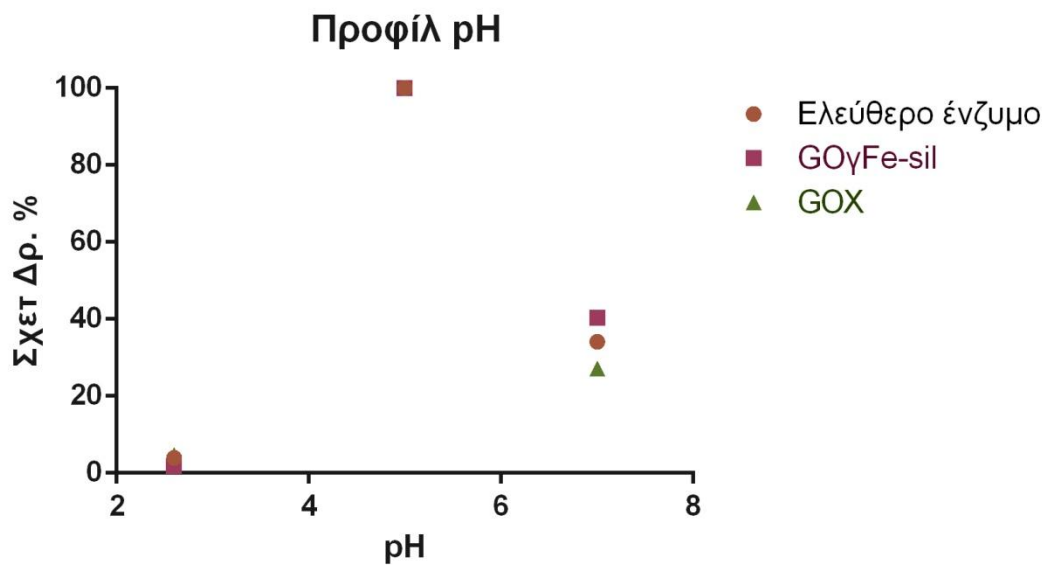
Επίδραση του pH στην δραστηκότητα του ενζύμου-pH profile

Μελετήθηκε η δραστηκότητα των δειγμάτων σε ορισμένες τιμές pH και εκφράστηκε η επί τοις εκατό συσχέτιση τους ως προς τη μέγιστη δραστηκότητα που παρουσίασε το κάθε δείγμα.

Πίνακας 14 1η στήλη-pH επώασης, 2η-3η-4η στήλη % σχετική δραστηκότητα του κάθε προϊόντος ακινητοποίησης για το pH επώασης ως προς την εκάστοτε παρατηρούμενη μέγιστη δραστηκότητα.

pH	Ελεύθερο ένζυμο	GOγFe- sil	GOX
% σχετική δραστηκότητα			
2,6	3,9	1,8	4,6
5	100,0	100,0	100,0
7	34,1	40,4	27,1
pH	STDEV		
2,6	0,1	1,4	2,1
5	4,0	0,6	0,6
7	2,3	3,8	0,9

Εικόνα 30 προφίλ pH-σχετική δραστηκότητα δείγματος ως προς το pH



Παρατηρείται πως και τα τρία σκευάσματα εμφανίζουν βέλτιστη δραστηκότητα σε pH 5.0, ενώ η δραστηκότητα τους πρακτικά εξαφανίζεται σε pH 2.6. Σε ουδέτερο pH 7.0 βέλτιστη συμπεριφορά εμφανίζει το σκευάσμα GOγFe-sil(40.4%), ακολουθούμενο από το ελεύθερο ένζυμο(34.09%) και το σκευάσμα GOX(27.1%).

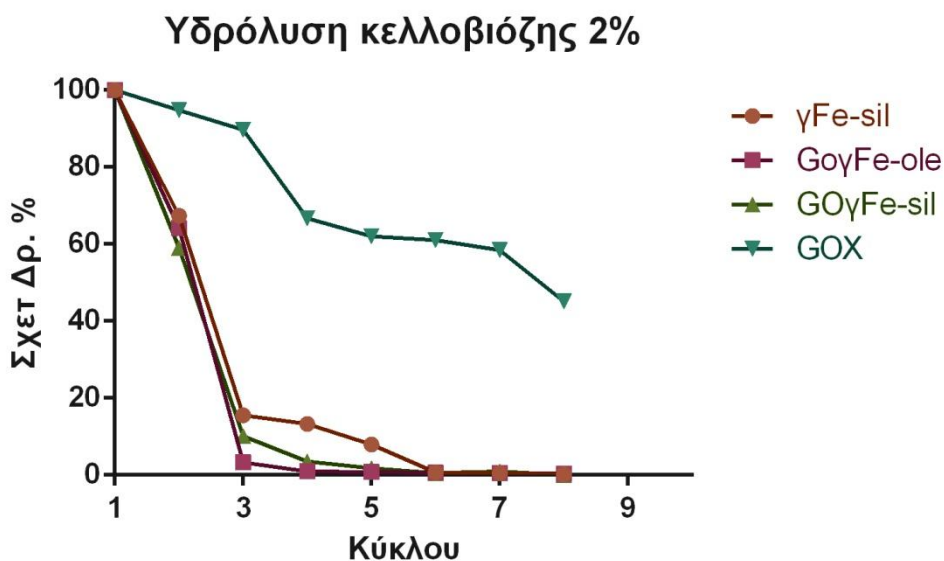
Υδρόλυση κελλοβιόζης-Immobilized beta-glucosidase application-Cellobiose hydrolysis

Μελετήθηκε η ικανότητα υδρόλυσης του βιομηχανικού υποστρώματος κελλοβιόζη στους 40°C από τα ακινητοποιημένα δείγματα σε ένα πείραμα διάρκειας 8 κύκλων.

Πίνακας 15 1η στήλη-κύκλοι επώασης δειγμάτων, 2η-3η-4η-5η στήλη-% σχετική δραστηριότητα των προϊόντων ακινητοποίησης με τον 1ο κύκλο επώασης ως 100%.

Cycles	γFe-sil	GOγFe-ole	GOγFe-sil	GOX
% σχετική δραστηριότητα				
1	100	100	100	100
2	67,3	64,1	59,1	94,8
3	15,5	3,3	10,1	89,7
4	13,3	0,9	3,6	66,7
5	7,9	0,8	1,8	62,1
6	0,7	0,6	0,5	61,0
7	0,6	0,5	1,0	58,5
8	0,2	0,4	0,0	45,2
Cycles	STDEV			
1	0,6	1,1	0,4	0,6
2	1,0	0,1	0,6	0,7
3	4,3	1,1	2,0	0,6
4	0,6	0,1	0,2	0,2
5	1,1	0,1	0,8	0,5
6	0,1	0,6	0,8	0,4
7	0,4	0,2	0,9	0,4
8	0,6	0,4	0,7	3,0

Εικόνα 31 υδρόλυση κελλοβιόζης 2%--% απόδοση της αντίδρασης υδρόλυσης της κελλοβιόζης σε κάθε κύκλο αντίδρασης



Κατά την υδρόλυση της κελλοβιόζης 2% σε πείραμα επαναχρησιμοποίησης του σκευάσματος για 8 κύκλους στους 40°C βέλτιστη συμπεριφορά παρουσιάζει το σκευάσμα GOX διατηρώντας τη δραστηριότητα του στο 45,2% της αρχικής του έπειτα από 8 κύκλους. Αντίθετα έπειτα από 8 κύκλους όλα τα άλλα σκευάσματα έχουν χάσει την καταλυτική τους ικανότητα. Φαίνεται ξεκάθαρα ότι η διατήρηση της καταλυτικής ικανότητας του σκευάσματος GOX έπειτα από 8 κύκλους στη εφαρμογή υδρόλυσης της κελλοβιόζης ξεπερνά όλα τα άλλα σκευάσματα ακινητοποίησης. Επίσης, παρατηρείται ήδη από το 3ο κύκλο αισθητή μείωση της σχετικής δραστηριότητας του GOγFe-ole του μοναδικού μη-σιλανοποιημένου δείγματος, το οποίο είναι ενδεικτικό της πολύ καλύτερης πρόσβασης που προσφέρει στο υπόστρωμα η ακινητοποίηση μέσω APTES.

Παρατηρείται, λοιπόν, ξεκάθαρα η υπεροχή του νέου αυτού ακινητοποιημένου προϊόντος (GOX) σε σχέση με όλα τα προηγουμένως μελετημένα προϊόντα ακινητοποίησης.

3.2 Βιοκαταλυτικά χαρακτηριστικά κινητοποιημένης ιμβερτάσης (invertase)

Ακολουθήθηκε παρόμοια πειραματική μεθοδολογία για την μελέτη της ακινητοποίησης της ιμβερτάσης. Συγκεκριμένα έχουμε μια αντίδραση 1ml σε c-ph buffer 100mM pH5.0, 60°C, 15min, 1% w/v σουκρόζης.

Πίνακας 16 1η στήλη-προϊόν ακινητοποίησης, 2η στήλη-δραστικότητα σε μmol παραγόμενης γλυκόζης ανά mg ενζύμου ανά λεπτό αντίδρασης.

Δείγμα	Unit (μmol glucose/mg enz/min)
inv	7,8
γ -Fe-sil	2,7
GO- γ -Fe-sil	2,1

Παρατηρείται μείωση της δραστικότητας των περιπτώσεων ακινητοποιημένου ενζύμου σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο, ενώ η επιτυχία της ακινητοποίησης της ιμβερτάσης και για τις δυο περιπτώσεις ακινητοποίησης ανέρχεται στο 100%.

Θερμοκρασιακό προφίλ-Θερμοκρασία profiling

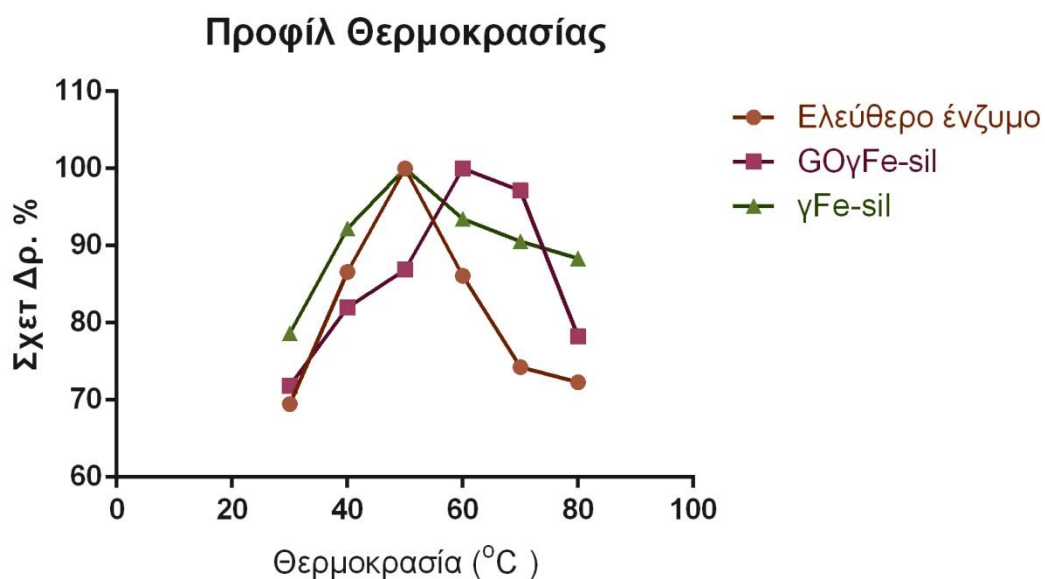
Μελετήθηκε η δραστικότητα των δειγμάτων σε ορισμένες θερμοκρασίες και εκφράστηκε η επί τοις εκατό συσχέτιση τους ως προς τη μέγιστη δραστικότητα που παρουσίασε το κάθε δείγμα.

:

Πίνακας 17 1η στήλη-θερμοκρασία επώασης, 2η-3η-4η στήλη % σχετική δραστηριότητα του κάθε προϊόντος ακινητοποίησης για την κάθε θερμοκρασία επώασης ως προς την εκάστοτε παρατηρούμενη μέγιστη δραστηριότητα.

Θερμοκρασία (°C)	Ελεύθερο ένζυμο	GOγ-Fe-sil	γFe-sil
% σχετική δραστηριότητα			
30	69,5	71,9	78,6
40	86,6	82	92,2
50	100	86,9	100
60	86,1	100	93,5
70	74,3	97,2	90,6
80	72,3	78,2	88,4
Θερμοκρασία (°C)	STDEV		
30	1,0	0,5	0,8
40	1,9	1,1	4,7
50	3,1	0,5	1,5
60	2,3	1,1	0,8
70	1,3	1,2	1,0
80	1,0	0,3	1,2

Εικόνα 32 θερμοκρασιακό προφίλ -%σχετική δραστηριότητα δείγματος ως προς τη θερμοκρασία(°C)



Φαίνεται ξεκάθαρα ότι η ακινητοποίηση του ενζύμου βελτιώνει τη δραστικότητα του σε διαφορετικές θερμοκρασίες σε σχέση με το ελεύθερο. Ειδικότερα στην ακραία θερμοκρασία των 30°C η ακινητοποίηση του ενζύμου σε γ -Fe-sil οδηγεί το ένζυμο να διατηρήσει το 78,64% της βέλτιστης δραστικότητας του, αντίθετα με το ελεύθερο ένζυμο που αυτό το ποσοστό πέφτει στο 69,5%, περίπου δηλαδή 10% διαφοροποίηση. Ακόμα εντυπωσιακότερο είναι ότι στην ακραία θερμοκρασία των 80°C και οι δυο περιπτώσεις ακινητοποίησης παρουσιάζουν πάλι σημαντικά βελτιωμένη συμπεριφορά σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο, με την ομοιοπολική ακινητοποίηση σε γ -Fe-sil να οδηγεί το ένζυμο να διατηρήσει το 88,4% της μέγιστης δραστικότητας του, ενώ για το ελεύθερο το αντίστοιχο ποσοστό είναι 72,3%. Χαρακτηριστική της επίδρασης της ακινητοποίησης στη συμπεριφορά του ενζύμου είναι η μετατόπιση της βέλτιστης θερμοκρασίας δράσης του σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο από τους 50°C στους 60°C για την περίπτωση ομοιοπολικής ακινητοποίησης σε GO- γ -Fe-sil.

Ο Waleed A. Mahmood παρατήρησε επίσης ότι η ακινητοποιημένη ιμπερτάση εμφάνισε μεγαλύτερο θερμοκρασιακό εύρος υψηλής δραστικότητας με αυξημένη σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο (Waleed A. Mahmood et al.- 2010). Η μείωση της δραστικότητας του ελεύθερου ενζύμου πιθανόν οφείλεται σε δραματικές αλλαγές στη δομή του που δημιουργεί πρόβλημα στη διαθεσιμότητα των ενεργών κέντρων που οδηγεί σε απενεργοποίηση του ενζύμου. (Kouassi et al.-2005). Η βελτιωμένη συμπεριφορά του ακινητοποιημένου ενζύμου σε σχέση με το ελεύθερο σε υψηλές θερμοκρασίες παρατηρήθηκε και από τους P.P. Waifalkar et al. (P.P. Waifalkar et al.-2016). Οι S.G. Valerio et al. δεν παρατήρησαν κάποια διαφοροποίηση στη συμπεριφορά του ακινητοποιημένου ενζύμου σε νανοσωματίδια χιτοζάνης σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο (Sheila G. Valerioa, et al.- 2013).

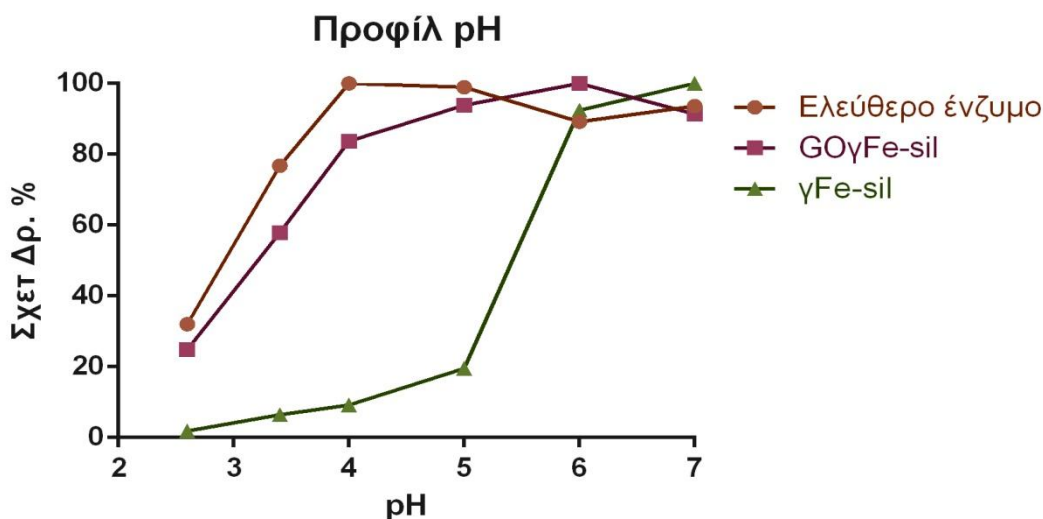
Επίδραση του pH στην δραστικότητα του ενζύμου-pH profile

Μελετήθηκε η δραστικότητα των δειγμάτων σε ορισμένες τιμές pH και εκφράστηκε η επί τοις εκατό συσχέτιση τους ως προς τη μέγιστη δραστικότητα που παρουσίασε το κάθε δείγμα.

Πίνακας 18 1η στήλη-pH επώασης, 2η-3η-4η στήλη % σχετική δραστηριότητα του κάθε προϊόντος ακινητοποίησης για το pH επώασης ως προς την εκάστοτε παρατηρούμενη μέγιστη δραστηριότητα

pH	Ελεύθερο	GOγ-Fe-	γFe-sil
	ένζυμο	sil	
% σχετική δραστηριότητα			
2,6	32,1	24,9	1,9
3,4	76,8	57,9	6,5
4	100	83,7	9,2
5	98,9	93,9	19,6
6	89,2	100	92,4
7	93,7	91,4	100
pH	STDEV		
2,6	1,3	0,9	0,4
3,4	1,8	0,4	0,4
4	1,0	0,8	0,9
5	1,1	0,4	0,7
6	0,8	0,9	0,9
7	0,7	0,6	1,7

Εικόνα 33 προφίλ pH-σχετική δραστηριότητα δείγματος ως προς το pH



Και οι δύο περιπτώσεις ακινητοποίησης του ενζύμου οδηγούν σε ολοφάνερη διαφοροποίηση του pH δράσης του ενζύμου. Συγκεκριμένα, η ιμβερτάση ακινητοποιημένη σε GO-γ-Fe-sil παρουσιάζει βέλτιστο pH δράσης σε pH6.0, ενώ η ακινητοποιημένη σε γ-Fe-sil σε pH7.0, αντίθετα με το ελεύθερο ένζυμο που παρουσιάζει βέλτιστη δράση σε pH4.0. Αντίθετα με τους P.P. Waifalkar et al. οι

οποίοι δεν παρατήρησαν αλλαγή του βέλτιστου pH δράσης της ιμπερτάσης κατά την ακινητοποίηση της σε παρεμφερές υλικό (νανοσωματίδια $\gamma\text{-Fe}_2\text{O}_3$ επικαλυμμένα με χιτοζάνη) (P.P. Waifalkar et al.- 2016). Χαρακτηριστική είναι, επίσης, η επίδραση που έχει η ακινητοποίηση σε $\gamma\text{-Fe-sil}$, οπότε όπως φαίνεται το ένζυμο δυσκολεύεται πάρα πολύ να δράσει κάτω από pH5.0.

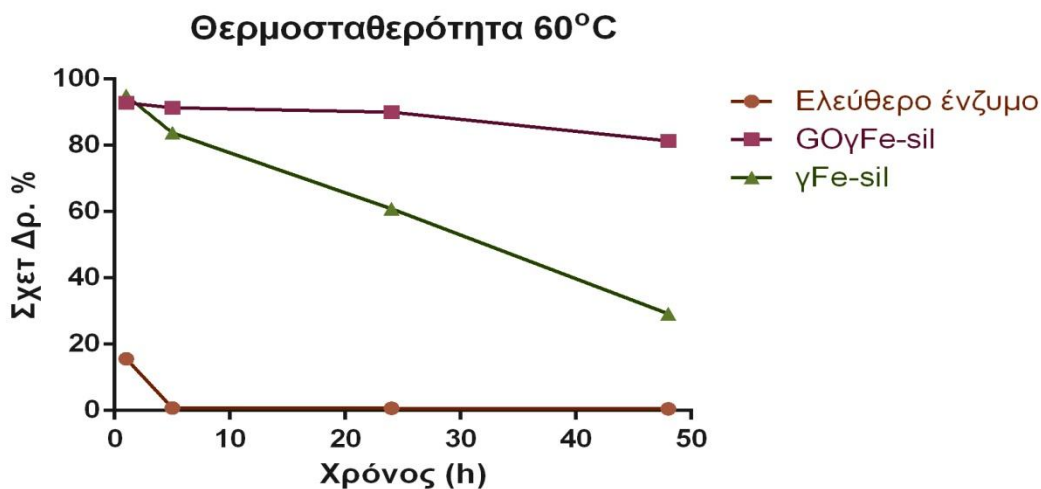
Μελέτη θερμοσταθερότητας 60°C-Thermostability 60°C

Μελετήθηκε η σταθερότητα των δειγμάτων κατά την επώαση τους στους 60°C. Η δραστηριότητα σε χρόνο επώασης 0 h θεωρείται ως το 100% κάθε δείγματος. Η εξέταση της θερμοσταθερότητας για όλα τα δείγματα έγινε με δειγματοληψία σε 0, 1, 5, 24 και 48h.

Πίνακας 19 1η στήλη-χρόνος επώασης στους 60°C, 2η-4η στήλη % σχετική δραστηριότητα του κάθε προϊόντος ακινητοποίησης σε κάθε χρονικό διάστημα επώασης ως προς την παρατηρούμενη δραστηριότητα σε χρόνο 0.

Χρόνος (h)	Ελεύθερο ένζυμο	GO $\gamma\text{Fe-sil}$	$\gamma\text{Fe-sil}$
% σχετική δραστηριότητα			
1	15,6	92,9	95
5	0,8	91,4	83,8
24	0,7	90	60,9
48	0,5	81,3	29,2
Χρόνος (h)	STDEV		
1	3,8	0,8	1,8
5	0,7	0,6	0,6
24	0,2	0,7	1,3
48	0,1	4,4	2,6

Εικόνα 34 θερμοσταθερότητα-%σχετική δραστηριότητα δείγματος ως προς τον χρόνο(h) στους 60°C



Η αξιολόγηση της θερμοσταθερότητας του ενζύμου δείχνει ξεκάθαρα τα πλεονεκτήματα που προσφέρει η ακινητοποίηση του. Ειδικότερα μετά από 1h επώασης η δραστηριότητα του ελεύθερου ενζύμου έχει μειωθεί στο 15,64% της αρχικής, ενώ κατά την περαιτέρω επώαση του ουσιαστικά μηδενίζεται η ικανότητα υδρόλυσης. Αντίθετα, η ακινητοποίηση του και στις δύο υπό μελέτη περιπτώσεις οδηγεί σε διατήρηση άνω του 90% της δραστηριότητας του ενζύμου μετά από 1h επώασης, ενώ μετά από 48h επώαση η ακινητοποίηση σε γFe-sil οδηγεί σε διατήρηση του 29,2% της αρχικής δραστηριότητας και η ακινητοποίηση σε GOγFe-sil οδηγεί σε διατήρηση του 81,34% της αρχικής δραστηριότητας.

Οι S.G. Valerio et al. παρατήρησαν ότι η στους 55°C τόσο το ελεύθερο όσο και το ακινητοποιημένο σε νανοσωματίδια χιτοζάνης ένζυμο εμφάνισαν παρόμοια συμπεριφορά, οι οποίοι όμως χρησιμοποίησαν πρωτόκολλο ακινητοποίησης ενός σημείου (Sheila G. Valerio, et al-2013).

Φαίνεται λοιπόν ξεκάθαρα ότι η χρήση στρώματος σιλάνης βελτιώνει κατά πολύ τη σταθερότητα του ενζύμου φαινόμενο που πολλαπλασιάζεται στη περίπτωση της χρήσης γραφενίου.

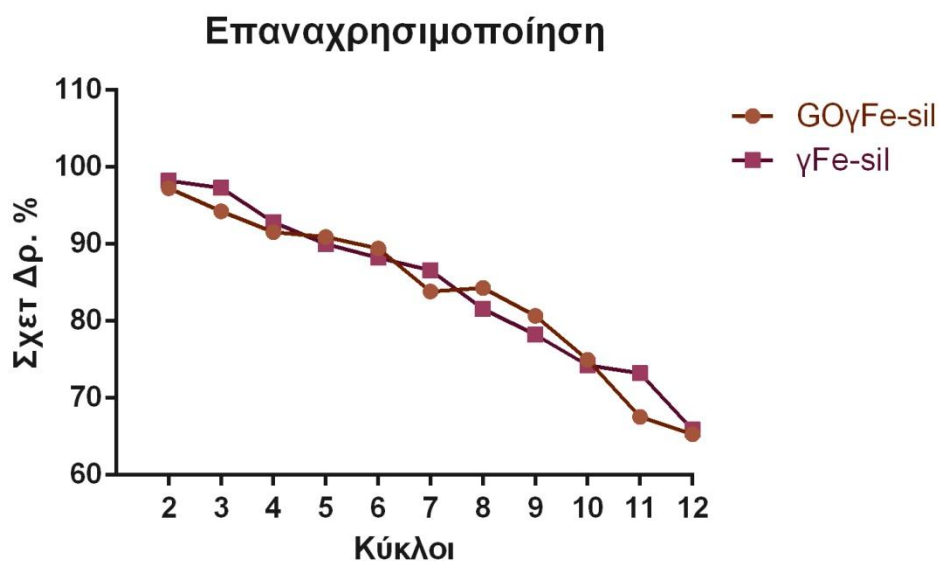
Μελέτη επαναχρησιμοποίησης της ακινητοποιημένης ινβερτάσης -Reusability

Πραγματοποιήθηκε μελέτη της επαναχρησιμοποίησης των ακινητοποιημένων δειγμάτων σε ένα πείραμα διάρκειας 12 κύκλων στους 50°C.

Πίνακας 20 1η στήλη-κύκλοι επώασης δειγμάτων, 2η-3η στήλη-% σχετική δραστηριότητα των προϊόντων ακινητοποίησης με τον 1ο κύκλο επώασης ως 100%.

Κύκλοι	GOγ-Fe-sil	γFe-sil
	% σχετική δραστηριότητα	
2	97,3	98,2
3	94,3	97,3
4	91,6	92,9
5	91	90
6	89,4	88,2
7	83,9	86,6
8	84,3	81,6
9	80,7	78,2
10	75	74,3
11	67,6	73,2
12	65,3	65,9
Κύκλοι	STDEV	
2	4,7	1,3
3	4,7	0,9
4	4,6	3,7
5	4,6	4,7
6	0,2	3,7
7	2,8	2,9
8	4,6	1,3
9	4,7	2,5
10	4,5	1,1
11	4,9	2,1
12	1,5	3,8

Εικόνα 35 επαναχρησιμοποίηση ακινητοποιημένου ενζύμου-%σχετική δραστηριότητα σε κάθε κύκλο επαναχρησιμοποίησης



Το χαρακτηριστικό πλεονέκτημα της ακινητοποίησης, η ικανότητα για επαναχρησιμοποίηση του ενζύμου, μελετήθηκε και για τις δυο περιπτώσεις ακινητοποίησης. Το ένζυμο επέδειξε παρόμοια συμπεριφορά και για τις δυο περιπτώσεις ακινητοποίησης φτάνοντας μετά από 12 κύκλους επώασης στους 65°C να διατηρεί και για τις δυο περιπτώσεις ακινητοποίησης το 65% περίπου της αρχικής δραστηριότητας.

3.3 Πολλαπλή ακινητοποίηση ενζύμων

Πραγματοποιήθηκε πολλαπλή ακινητοποίηση των ενζύμων β-γλυκοζιδάση και ιμπερτάση σε GO και μετρήθηκε ο βαθμός ακινητοποίησης των ενζύμων.

Πίνακας 21 1η στήλη-ένζυμο που ακινητοποιήθηκε στο υλικό, 2η στήλη-% ακινητοποίηση του ενζύμου στο υλικό.

Δείγμα	Απόδοση
double	ακινητοποίησης %
bgl	48,2
inv	100

Η ακινητοποίηση της β-γλυκοζιδάσης πραγματοποιήθηκε με χρήση της μεθόδου Bradford επί του υπερκείμενου που συλλεγόταν στο τέλος κάθε κύκλου ακινητοποίησης της.

Η ακινητοποίηση της ιμπερτάσης δεν μπορεί να μετρηθεί με την μέθοδο Bradford ή κάποια άλλη ποσοτική μέθοδο προσδιορισμού πρωτεϊνών, επειδή στο υπερκείμενο που απομακρύνεται και από το οποίο γίνονται οι σχετικές μετρήσεις πολύ πιθανό να υπάρχει ποσότητα β-γλυκοζιδάσης. Οπότε ο προσδιορισμός γίνεται με βάση την δραστηριότητα του απομακρυσμένου υπερκείμενου σε σουκρόζη 1% και συσχέτιση αυτής της δραστηριότητας με εκείνη της ελεύθερης ιμπερτάσης. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το υπερκείμενο είχε μηδενική δραστηριότητα, το οποίο εκλαμβάνεται ως 100% ακινητοποίηση της inv.

Υδρόλυση μίγματος κελλοβιόζης 5%/σουκρόζης 5% (cb5%/sucr5% w/v)

Μετρήθηκε η μεταβολή στην παραγωγή σακχάρων κατά την επώαση με διάλυμα 5% σουκρόζης/5% κελλοβιόζης ως προς την παραγωγή σακχάρων που υπήρξε κατά την πρώτη μέρα επώασης. Αυτός είναι ένας τρόπος για να φανεί τυχόν αδρανοποίηση των ενζύμων. Τα ένζυμα που επώαστηκαν είναι συνδυασμός ελεύθερης ιμπερτάσης με

GOX bgl, ακινητοποιημένη ιμβερτάση σε σιλανοποιημένο GOγFe με GOX bgl και το δείγμα κοινής ακινητοποίησης β-γλυκοζιδάσης και ιμβερτάσης.

Οι μετρήσεις έχουν πραγματοποιηθεί με χρήση του GOXkit το οποίο προσδιορίζει τη γλυκόζη στο δείγμα. Δεδομένου ότι στα αρχικά δείγματα υπήρχε μίγμα κελλοβιόζης σουκρόζης (cb/sucr), η γλυκόζη προέρχεται από την υδρόλυση και των δύο υποστρωμάτων μιας και τα ενζυμικά σκευάσματα που χρησιμοποιήθηκαν περιέχουν και β-γλυκοζιδάση και ιμβερτάση. Μετρήθηκε, λοιπόν, η σχετική δραστηριότητα μεταξύ των δειγμάτων κατά την πρώτη μέρα του πειράματος υδρόλυσης. Ως 100% υδρόλυση λαμβάνεται αυτή που έχει επιτευχθεί από το δείγμα double.

Πίνακας 22 1η σειρά προϊόντα ακινητοποίησης, 2η σειρά % σχετική δραστηριότητα με το δείγμα double να θεωρείται ως 100%, 3η σειρά τυπικό σφάλμα.

Δείγμα	Free(inv)/GOX(bgl)	GOγFe(inv)/GOX(bgl)	double
Σχ. Δρ.%	83,2	96,0	100
		STDEV	
	1,8	0,9	0,8

Το πείραμα συνεχίστηκε με τη μέτρηση της μεταβολής στην παραγωγή σακχάρων κατά την επώαση με διάλυμα 5% σουκρόζης/5% κελλοβιόζης ως προς την παραγωγή σακχάρων που υπήρξε κατά την πρώτη μέρα επώασης για το κάθε δείγμα. Αυτός είναι ένας τρόπος για να φανεί τυχόν αδρανοποίηση των ενζύμων.

Πίνακας 23 1η στήλη χρόνος δειγματοληψίας, 2η-3η-4η στήλη % σχετική δραστηριότητα του κάθε δείγματος ως προς τη 1η μέρα δειγματοληψίας.

Χρόνος (μέρες)	Free(inv)/GOX(bgl)	GOγFe(inv)/GOX(bgl)	double
	% επιπλέον παραγωγή γλυκόζης		
2	1,8	16,8	17,8
3	0	12,6	93,5
Χρόνος (μέρες)		STDEV	
2	0,9	1,1	0,2
3	1,2	1,3	1,0

Με βάση τον πίνακα παρατηρούμε, ότι

- Η ειδοποιός διαφορά ανάμεσα στα δείγματα Free(inv)/GOX(bgl) και GOγFe(inv)/GOX(bgl) είναι ότι στο 2ο δείγμα η ιμβερτάση είναι ακινητοποιημένη. Άρα η όποια διαφορά παρατηρηθεί στην παραγωγή

σακχάρων θα οφείλεται λογικά στη ακινητοποιημένη ιμβερτάση, μιας και η β-D-γλυκοζιδάση είναι ακινητοποιημένη κατά τον ίδιο τρόπο και στα δυο δείγματα.

- Το δείγμα Free(inv)/GOX(bgl) παρουσιάζει μια ελάχιστη αύξηση της υδρόλυσης κατά την 2η μέρα της τάξης του 1,8%. Αυτό δείχνει ότι και τα δυο ένζυμα, ελεύθερη ιμβερτάση και ακινητοποιημένη γλυκοζιδάση έχουν χάσει τη δραστηριότητά τους.
- Το δείγμα GOγFe(inv)/GOX(bgl) παρουσιάζει αύξηση της παραγωγής γλυκόζης κατά τη δεύτερη μέρα της τάξης του 16,8%. Αφού, λοιπόν, η γλυκοζιδάση είναι ακινητοποιημένη και στα δυο δείγματα σε GOX η παραγωγή σακχάρων οφείλεται στην ακινητοποιημένη ιμβερτάση.
- Το δείγμα double παρουσιάζει αύξηση της υδρόλυσης κατά τη δεύτερη μέρα της τάξης του 17,8%. Παρόμοια με του δεύτερου δείγματος. Μιας και εδώ πρόκειται για ένα σκεύασμα GOX που απλά στην εξωτερική στοιβάδα έχει ακινητοποιημένη β-D-γλυκοζιδάση, καταλήγουμε ότι η β-D-γλυκοζιδάση δεν μπορεί να παράγει γλυκόζη μετά τη δεύτερη μέρα και η ακινητοποιημένη ιμβερτάση στο 2ο και 3ο δείγμα είναι αυτή που αναλαμβάνει μόνη της την παραγωγή σακχάρων από τη 2η μέρα και έπειτα.
- Το δείγμα double παρουσιάζει αύξηση της υδρόλυσης κατά τη τρίτη μέρα της τάξης του 93,5%. Αυτό δείχνει την αυξημένη σταθερότητα που προσδίδει στην ιμβερτάση ο συγκεκριμένος τρόπος ακινητοποίησης. Τη τρίτη μέρα δηλαδή έχει παραχθεί 93,5% περισσότερη γλυκόζη σε σχέση με την πρώτη μέρα. Στο 1ο δείγμα η παραγωγή επιπλέον γλυκόζης έχει ουσιαστικά σταματήσει, ενώ στο 2ο δείγμα η παραγωγή γλυκόζης είναι συγκριτικά υποδεέστερη φτάνοντας στο 12,6%.
- Επομένως, φαίνεται ξεκάθαρα ότι η διπλή ακινητοποίηση που πραγματοποιήθηκε με το συγκεκριμένο πρωτόκολλο ήταν όχι μόνο επιτυχής, αλλά έφερε πολύ καλύτερα αποτελέσματα κατά την εφαρμογή της σε υδρόλυση βιομηχανικού υποστρώματος σε σχέση με τους συνδυασμούς ελεύθερης και ακινητοποιημένης μορφής των δυο ενζύμων.

4. Συζήτηση

Η μελέτη που πραγματοποιήθηκε ξεκίνησε από την ακινητοποίηση της β-D-γλυκοζιδάσης σε μια σειρά υλικών ναοκλίμακας και τη σύγκριση των παραγόμενων σκευασμάτων για την εύρεση του καλύτερου ναοβιοκαταλυτικού σκευάσματος.

Μονάχα δυο σκευάσματα διατηρούσαν σε φυσιολογικές συνθήκες επαρκή δραστικότητα συγκρίσιμη με το ελεύθερο ένζυμο, τα $\gamma\text{Fe-sil}$ και $\text{GO}\gamma\text{Fe-sil}$. Ουσιαστικά πρόκειται για τις δυο περιπτώσεις που ακολουθήθηκε το πρωτόκολλο ακινητοποίησης μέσω σιλανοποίησης. Κατά αυτό το πρωτόκολλο γίνεται εκμετάλλευση της ύπαρξης ομάδων $-\text{OH}$ στην επιφάνεια του υλικού και με χρήση του αντιδραστηρίου APTES δημιουργείται ένα πλέγμα σιλάνης γύρω από το υλικό που επιτρέπει στη συνέχεια την ομοιοπολική σύνδεση με το ένζυμο με χρήση γλουταραλδεύδης, εκμεταλλευόμενοι τις δημιουργημένες $-\text{NH}_2$ επί του υλικού. Αυτή η πολυ-σημειακή ακινητοποίηση επιτρέπει στο ακινητοποιημένο ένζυμο να διατηρήσει εξαιρετική συμπεριφορά σε ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας και pH, ειδικά κατά τη σύγκριση του με το ελεύθερο ένζυμο. Καλή συμπεριφορά φαίνεται να παρουσιάζει και η περίπτωση της ακινητοποίησης σε $\text{GO}\gamma\text{Fe-ole}$. Είναι μια περίπτωση σημειακής ακινητοποίησης κατά την οποία εκμεταλλευόμαστε την ύπαρξη αμινομάδων στην επιφάνεια του υλικού για ακινητοποίηση του ενζύμου με χρήση γλουταραλδεύδης. Μάλιστα κατά τη μελέτη της επαναχρησιμοποίησης φαίνεται να παρουσιάζει την καλύτερη συμπεριφορά μετά από 12 κύκλους, ελαφρώς καλύτερη από την περίπτωση του $\text{GO}\gamma\text{Fe-sil}$. Τέλος, κατά το πείραμα με χρήση του βιομηχανικού υποστρώματος κελλοβιόζης 2%, τη βέλτιστη συμπεριφορά κατά τη μετατροπή κελλοβιόζης σε γλυκόζη εμφάνισε το σκεύασμα $\text{GO}\gamma\text{Fe-sil}$ ακολουθούμενο από τα $\gamma\text{Fe-sil}$ και $\text{GO}\gamma\text{Fe-ole}$.

Παρατηρώντας τα εξαιρετικά πλεονεκτήματα που προσφέρει για την ακινητοποίηση ενζύμων η ταυτόχρονη χρήση οξειδίου του γραφενίου και σιλάνης, θεωρήθηκε σημαντικό να διερευνηθεί ακόμη παραπέρα το ζήτημα. Έτσι έγινε μια προσπάθεια δημιουργίας ενός πολυστρωματικού σκευάσματος. Ένα δίκτυο σιλάνης δημιουργήθηκε επί του οξειδίου του γραφενίου και πριν από την επικάλυψη με επιπλέον σιλάνη πραγματοποιούνταν επιστρώσεις από το ένζυμο με χρήση γλουταραλδεύδης.

Το προϊόν που παρήχθη, GOX, είχε τα υψηλότερα επίπεδα δραστηριότητας σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα σκευάσματα ακινητοποίησης και συγκρίσιμα με αυτά του ελεύθερου ενζύμου. Η ικανότητα δράσης του σε όλο το εύρος θερμοκρασίας και ακόμη περισσότερο στους 70 και 80°C ξεπερνούσε εκείνη όλων των άλλων σκευασμάτων, ενώ καλές επιδόσεις επέδειξε και σε διάφορα pH.

Κρίθηκε, λοιπόν σκόπιμο να χρησιμοποιηθεί κατά την εφαρμογή υδρόλυσης του βιομηχανικού υποστρώματος κελλοβιόζης 2%, οπότε και ξεπέρασε κάθε προσδοκία. Συγκεκριμένα, διατηρεί το 45% της αρχικής του δραστηριότητας έπειτα από 8 κύκλους τη στιγμή που τα υπόλοιπα σκευάσματα έχουν σχεδόν απενεργοποιηθεί ήδη από τον 5ο κύκλο.

Ακολούθησε μελέτη του ενζύμου ιμπερτάση κατά παρόμοιο τρόπο με αυτόν της β-γλυκοζιδάσης. Η ακινητοποίηση του ενζύμου σε GOγFe-sil και γFe-sil είχε θετική επίδραση στο ένζυμο ειδικά σε σύγκριση με το ελεύθερο ένζυμο τόσο σε ότι έχει να κάνει με το θερμοκρασιακό εύρος δράσης, όσο και με το pH δράσης του ενζύμου. Η εξαιρετική επίδραση της ακινητοποίησης στο ένζυμο φάνηκε κατά τη μελέτη της θερμοσταθερότητας. οπότε και η μείωση της ευκαμψίας που προσφέρει η ακινητοποίηση έδρασε κόντρα στην προκαλούμενη από τις συνθήκες του περιβάλλοντος μετουσίωση του ενζύμου. Ειδικότερα, το ελεύθερο ένζυμο χάνει πρακτικά την καταλυτική του ικανότητα μετά από την πρώτη κιόλας ώρα επώασης του, ενώ τα ακινητοποιημένα σκευάσματα διατηρούν την δραστηριότητα τους μετά από 48 ώρες. Το GOγFe-sil μάλιστα διατηρεί το 85% της αρχικής του δραστηριότητας. Έτσι τα σκευάσματα ακινητοποίησης χρησιμοποιήθηκαν σε ένα πείραμα επαναχρησιμοποίησης 12 κύκλων στους 50°C, οπότε και εμφάνισαν σχεδόν ταυτόσημη συμπεριφορά σε όλο το πείραμα, διατηρώντας μετά από 12 κύκλους το 65% της αρχικής τους δραστηριότητας. Αυτό δείχνει την εξαιρετική επίδραση των πρωτοκόλλων ακινητοποίησης που ακολουθήθηκαν στη συμπεριφορά των ενζύμων.

Με βάση το σύνολο αυτών των αποτελεσμάτων έγινε μια προσπάθεια να δημιουργηθεί ένα σύστημα δράσης των δύο χρησιμοποιημένων ακινητοποιημένων ενζύμων β-γλυκοζιδάση και ιμπερτάση, καθώς και μια προσπάθεια χρησιμοποίησης των πρωτοκόλλων σιλιανοποίησης προς δημιουργία συστήματος διπλής ενζυμικής ακινητοποίησης.

Έτσι αξιολογήθηκαν τα συστήματα Free(inv)/GOX(bgl) και GOγFe(inv)/GOX(bgl) και double, με το τελευταίο να είναι ουσιαστικά η διπλή πολυστοιβαδική ακινητοποίηση. Στο πείραμα εισήχθησαν ορισμένες αρχικές ποσότητες των δειγμάτων σε διάλυμα 5% σουκρόζης/5% κελλοβιόζης. Στο τέλος κάθε μέρας μετριόταν η ποσότητα παραγόμενης γλυκόζης μέσω του GOxkit, ώστε να υπάρχει ιδιαίτερα μεγάλη ακρίβεια στη μέτρηση. Σε όλα τα σκευάσματα παρατηρήθηκε πάυση δράσης της β-D-γλυκοζιδάσης μετά την 1η μέρα. Ειδικότερα, η περίπτωση του Free(inv)/GOX(bgl) ουσιαστικά σταμάτησε να παράγει γλυκόζη μετά την 1η μέρα, κάτι που δείχνει την απενεργοποίηση της ελεύθερης ιμπερτάσης ως αποτέλεσμα της μετουσίωσης της. Αντίθετα, το σύστημα GOγFe(inv)/GOX(bgl) συνέχισε να παράγει γλυκόζη έστω και σε χαμηλά επίπεδα και τη 3η μέρα επώασης. Το εντυπωσιακότερο αποτέλεσμα όλων είναι αυτό της πολυστοιβαδικής διπλής ακινητοποίησης που και μετά τη 3η μέρα έχει παράξει σχεδόν τη διπλάσια ποσότητα γλυκόζης σε σχέση με την 1η μέρα, επιτρέποντας τη συνεχή παραγωγή γλυκόζης από ένα βιομηχανικό υπόστρωμα.

Τέτοιο σύστημα υδρολυτικής διάσπασης σακχάρων μέσω πολυστοιβαδικής διπλής ακινητοποίησης σε σιλιανοποιημένο οξειδίο γραφενίου δεν έχει ξαναδημιουργηθεί. Το ιδιαίτερα σημαντικό στοιχείο του πολυενζυμικού προϊόντος που δημιουργήθηκε είναι ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί όπως αποδείχτηκε επί βιομηχανικών υποστρωμάτων (κελλοβιόζη, σουκρόζη) προς παραγωγή προϊόντων βιομηχανικού ενδιαφέροντος, μιας και στην ουσία το προϊόν είναι ένα μίγμα γλυκόζης/φρουκτόζης. Το εξαιρετικό αποτέλεσμα που διαπιστώθηκε δείχνει την επιτακτική ανάγκη διερεύνησης της δυνατότητας εφαρμογής τέτοιων συστημάτων σε μεγαλύτερη κλίμακα (scale-up) με μια πρώτη προσπάθεια να ήταν η μείωση της συγκέντρωσης της κελλοβιόζης από 5%w/v σε 2%w/v, που από προηγούμενα πειράματα φάνηκε ότι υδρολύεται εξαιρετικά από την ακινητοποιημένη β-D-γλυκοζιδάση. Σημαντικό επίσης είναι να πραγματοποιηθεί περαιτέρω μελέτη της περίπτωσης διπλής ακινητοποίησης για τον δομικό χαρακτηρισμό του σκευάσματος μέσω τεχνικών FT-IR, AFM, raman φασματοσκοπίας, TG/DTA κα, ώστε να υπάρχει η καλύτερη δυνατή αντίληψη περί του τι αλλαγές έχουν συμβεί δομικά στα ένζυμα καθώς και στο υπόστρωμα ακινητοποίησης τους. Η περαιτέρω μελέτη θα επέτρεπε την βελτίωση της αντίληψης του τι ακριβώς συμβαίνει επί του υλικού όταν ακινητοποιούνται δυο διαφορετικά ένζυμα ταυτόχρονα, έτσι ώστε να γίνει μια προσπάθεια να

ακίνητοποιηθούν ένζυμα που θα είχαν συνδυαστικό τρόπο δράση επί ενός σύνθετου προϊόντος. Για παράδειγμα μια ταυτόχρονη ακίνητοποίηση ενζύμων όπως ξυλανάσες, πικτινάσες, γαλακτοζιδάσες και γλυκοζιδάσες διαφόρων τύπων θα μπορούσαν να επιτρέψουν την διάσπαση σύνθετων κυτταρινικών υποστρωμάτων με πιο οικονομικό, αποδοτικό και πολύ πιο φιλικό προς το περιβάλλον τρόπο οδηγώντας στην παραγωγή χρήσιμων προϊόντων που σήμερα προκύπτουν με ιδιαίτερα κοστοβόρους και μη αποδοτικούς τρόπους από τη βιομηχανία ξύλου. Επίσης, μεγάλο μέρος των σημερινών τροφικών αποβλήτων από καθημερινή χρήση (πχ φλούδες) θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ώστε να παράγονται αποδοτικά σακχαρινικά προϊόντα και τα παραγόμενα σάκχαρα να χρησιμοποιούνται μέσω ζύμωσης για την παραγωγή βιοκαυσίμων. Η ταυτόχρονη ακίνητοποίηση ενζύμων θα μπορούσε πιθανά να έχει και ιατρική εφαρμογή μέσω της ακίνητοποίησης ενζύμων που θα δρουν σε καταστροφή φλεγμονών εντός του σώματος.

5. Βιβλιογραφία

A. C. Ferrari, J. C. Meyer, V. Scardaci, C. Casiraghi, M. Lazzeri, F. Mauri, S. Piscanec, D. Jiang, K. S. Novoselov, S. Roth, and A. K. Geim, *Phys. Rev. Lett.* 97, 187401 Raman Spectrum of Graphene and Graphene Layers, (2006),

A. Gokhale et al. / *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 90 (2013) 76– 86

A. Soozanipour et al. / *Chemical Engineering Journal* 270 (2015) 235–243

Abdelmajeed et al. Immobilization technology for enhancing bio-products industry *African Journal of Biotechnology* Vol. 11(71), pp. 13528-13539, 4 September, 2012

Alberts, Βασικές αρχές κυτταρικής βιολογίας ΙΑΤΡΙΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ Π. Χ. ΠΑΣΧΑΛΙΔΗΣ-2018

Angela Sainz-Polo†1,2, Mercedes Ramírez-Escudero‡1, Alvaro Lafraya§3, Beatriz González†, Julia Marín-Navarro§, Julio Polaina§, and Julia Sanz-Aparicio‡4 Three-dimensional Structure of Saccharomyces Invertase ROLE OF A NON-CATALYTIC DOMAIN IN OLIGOMERIZATION AND SUBSTRATESPECIFICITYM. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY VOL. 288, NO. 14, pp. 9755–9766, April 5, 2013

Annette Sørensen 1,2, Mette Lübeck 1 , Peter S. Lübeck 1 and Birgitte K. Ahring 1,2Fungal Beta-Glucosidases: A Bottleneck in Industrial Use of Lignocellulosic Materials, **Biomolecules* 2013, 3, 612-631; doi:10.3390/biom3030612

Ansari, S.A. and Husain, Q. (2012) Potential applications of enzymes immobilized on/in nano materials: a review. *Biotechnol. Adv.* 30, 512– 523,

Bae H, Ahmad T, Rhee I, Chang Y, Jin S-U and Hong S 2012 Carbon-coated iron oxide nanoparticles as contrast agents inmagnetic resonance imaging *Nanoscale Res. Lett.* 7 44

Barabino RC, Gray DN, Keyes MH, Coupled reactions of immobilized enzymes and immobilized substrates. Clinical application as exemplified by amylase assay *Clin. Chem.* 1978, 24(8), 1393-1398

Barrett T1, Suresh CG, Tolley SP, Dodson EJ, Hughes MA The crystal structure of a cyanogenic beta-glucosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase.. Structure. 1995 Sep 15;3(9):951-60.

Berg, Tymoczko, Stryer Βιοχημεία τόμος Ι, -Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης)

Bhatia Y, Mishra S, Bisaria VS. Microbial β -glucosidases: cloning, properties, and applications. Critical Reviews in Biotechnology. 2002; 22:375-407

Blake P, Brimicombe PD, Nair RR, Booth TJ, Jiang D, Schedin F, et al. Graphene-based liquid crystal device. Nano Lett 2008;8:1704–8

Carl Branden, John Tooze, Εισαγωγή στη δομή των πρωτεϊνών-2006

Chandra V, Park J, Chun Y, Lee J W, Hwang I-C and Kim K S 2010 Water-dispersible magnetite reduced graphene oxide composites for arsenic removal ACS Nano 4 3979

Chen D Y, Ji G, Ma Y, Lee J Y and Lu J M 2011 Graphene encapsulated hollow Fe₃O₄ nanoparticle aggregates as a high-performance anode material for lithium ion batteries ACS Appl. Mater. Interfaces 3 3078,

Chen M, Xiaa L, Xue P. Enzymatic hydrolysis of corncob and ethanol production from cellulosic hydrolysate. International Biodeterioration and Biodegradation 2007; 59:85–89

D. Haberer, D.V. Vyalikh, S. Taioli, B. Dora, M. Farjam, J. Fink, D. Marchenko, T. Pichler, K. Ziegler, S. Simonucci, M.S. Dresselhaus, M. Knupfer, B. Büchner, and A. Grüneis, Nano Lett. 10 (2010), pp. 3360–3366)

Dreyer D.R., Park, S. Bielavski, C. W., Ruoff, R.S. , The chemistry of graphene oxide, Chem. Soc. Rev. 2010, 39, 228-240

Drumheller, P. D., Hubbell, J. A. “Surface Immobilization of Adhesion Ligands for Investigations of Cell-Substrate Interactions.” 2000 The Biomedical Engineering Handbook: Second Edition. Ed. Joseph D. Bronzino Boca Raton: CRC Press LLC

Du X, Wang C, Chen M, Jiao Y and Wang J 2009 J. Phys. Chem. C 113 2643,

Enzyme Kinetics and Stability Studies. PLoS ONE 9(11): e113408

F. Tuinstra and J.L. Koenig, J. Raman Spectrum of Graphite, Chem. Phys. 53(3) p. 1126-1970

Fukushima T, Sekizawa K, Jin Y, Yamaya M, Sasaki H and Takishima T Am. J. Physiol. 265 L67-1993

Ge, J. et al Nanobiocatalysis in organic media: opportunities for enzymes in nanostructures. Top. Catal. 55, 1070–1080-2012

Hossein Roghani-Mamaqani, Vahid Haddadi-Asl, In-Plane Functionalizing Graphene Nanolayers with Polystyrene by Atom Transfer Radical Polymerization: Grafting from Hydroxyl Groups POLYMER COMPOSITES-2014

Il Tae Kim a , Alexandre Magasinski a , Karl Jacob a , Gleb Yushin a, * , Rina Tannenbaum b, Synthesis and electrochemical performance of reduced graphene oxide/magnetite composite anode for lithium ion batteries * CARBON 52 56 – 64-2013

Illanes A Enzyme Biocatalysis: Principles and Applications, Springer Science, New York, NY, USA-2008

J. Bryjak, J. Liesiene, B.N. Kolarz, Colloids Surf. B: Biointerfaces 61 66-2008

J. Yan et al. / Journal of Colloid and Interface Science 348 565–570-2010

J. Zhu, S. Wei, I.Y. Lee, S. Park, J. Willis, N. Haldolaarachchige, D.P. Young, Z. Luo, Z. Guo, RSC Adv. 2 1136e1143-2012

Johan Alfrén & Timothy John Hobley Covalent Immobilization of β -Glucosidase on Magnetic Particles for Lignocellulose Hydrolysis Appl Biochem Biotechnol 169:2076–208-2013

K. Khoshnevisan et al. Immobilization of cellulase enzyme on superparamagnetic nanoparticles and determination of its activity and stability, Chemical Engineering Journal 171 669– 673-2011

Kim, J. et al. Nanobiocatalysis and its potential applications. Trends Biotechnol. 26, 639–646-2008

Koo B, Xiong H, Slater M D, Prakapenka V B, Balasubramanian M, Podsiadlo P, Johnson C S, Rajh T and Shevchenko E V 2012 Nano. Lett. 12 2429,

Kotwal, S. M., & Shankar, V. Immobilized invertase. *Biotechnology Advances*, 27, 311–322-2009

Krisch, J., Takó, M., Papp, T., Vágvölgyi, Cs. Characteristics and potential use of β -glucosidases from Zygomycetes. In: Vilas, A. M. (ed.) *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Formatex Research Center, pp. 891-896-2010

Kuchibhatle, S.V.N.T.; Karakoti, A.S.; Bera, D. & Seal, S One dimensional nanostructured materials. *Prog. Mater. Sci.*, Vol. 52, No. 5, pp. 699-913, ISSN: 0079-6425-2007

Lajtha A, Banik N (eds.): *Handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology*, Volume 7, Chapter 10. pp. 303-344. Springer, 2007

Lampen, J.O. Yeast and Neurospora Invertases, In *The Enzymes*, Boyer, P.D., Ed; pp 291-305, Academic Press, ISBN 0121227022 New York-1971

Li D, Muller MB, Gijle S, Kaner RB, Wallace GG. Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets. *Nat Nanotechnol* 2008;3:101–5

Li X Y, Wang X, Song S Y, Liu D P and Zhang H J Selectively deposited noble metal nanoparticles on Fe₃O₄/ graphene composites: stable, recyclable, and magnetically separable catalysts *Chem. Eur. J.* 18 7601-2012

Liang J J, Huang Y, Oh J Y, Kozlov M, Sui D, Fang S L, Baughman R H, Ma Y F and Chen Y S 2011 Electromechanical actuators based on graphene and graphene/Fe₃O₄ hybrid paper *Adv. Funct. Mater.* 21 3778

Lin S, Shen C, Lu D, Wang C and Gao H J Preparation of Carbon Dots and Their Application in Food Analysis as Signal Probe *Carbon* 53 112-2013

Liu Y, Gao Y and Xu C Using magnetic nanoparticles to manipulate biological objects *Chin. Phys. B* 22 097503-2013

M. Cardona, in *Light Scattering in Solids II*, M. Cardona and G. Güntherodt, eds., Vol. 50, Springer, Berlin, 1982, pp. 19–176

M. Mahmoudi et al. / *Advanced Drug Delivery Reviews* 63 (2011) 24–46

M.L. Verma et al. / Immobilization of β -glucosidase on a magnetic nanoparticle improves thermostability: application in cellobiose hydrolysis *Bioresource Technology* 135 2–6-2013

M.S. Dresselhaus, “Raman Spectroscopy as a Probe of Graphene and Carbon Nano-tubes”, *Phil. Trans. R. Soc. A* 28 vol. 366 no. 1863, 2008

Magdy M. M. Elnashar Immobilized Molecules Using Biomaterials and Nanobiotechnology *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, 2010, 1, 61-77

Makhatadze G.I. and Privalov P.L. Energetics of protein structure, (1995). *Adv. Protein Chem.*, 47, 307-425

Makhatadze, G.I. and Privalov, P.L. (1996). On the entropy of protein folding. *Protein Sci.* 5, 507-510

Martin, C.R. and Kohli, P. (2003) The emerging field of nanotubebio-technology. *Nat. Rev. Drug Discov.* 2, 29–37

N.P. Neumann & J.O. Lampen, (1967). Purification and Properties of Yeast Invertase, *Biochemistry*, Vol. 6, No. 2 (February 1967), pp 468-475, ISSN 0006-2960

Nemes-Incze P, Osvatha Z, Kamarasb K, Biro LP. Anomalies in thickness measurements of graphene and few layer graphite crystals by tapping mode atomic force microscopy. *Carbon* 2008;46:1435–42

Novoselov KS, Geim AK, Morozov SV, Jiang D, Zhang Y, Dubonos SV, et al. Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science* 2004;306:666–9.

P.P. Waifalkar, S.B. Parit, A.D. Chougale, Subasa C. Sahoo, P.S. Patil, P.B. Patil Immobilization of invertase on chitosan coated γ -Fe₂O₃ magnetic nanoparticles to facilitate magnetic separation *Journal of Colloid and Interface Science* 2016

Pandey, D; Reifengerger, R.; and Piner, R, "Scanning probe microscopy study of exfoliated oxidized graphene sheets" (2008).Birck and NCN Publications.Paper 178.

Pavlidis, P., Jensen, J. D., Stephan, W., 2010. Searching for footprints of positive selection in whole-genome snp data from non-equilibrium populations. *Genetics*

Pekka Mäntsälä, Jarno Niemi, *Physiology and Maintenance Vol II-Enzymes: the biological catalysts of life*

R. Saito a , M. Hofmann b , G. Dresselhaus c , A. Jorio d & M. S. Dresselhaus Raman spectroscopy of graphene and carbon nanotubes 2011

R.Valenzuela et al. (2014) β -Glucosidase immobilisation on synthetic superparamagnetic magnetite nanoparticles and their application in saccharification of wheatstraw and Eucalyptus globulus pulps, *Journal of Experimental Nanoscience*, 9:2, 177-185

Rana, S. et al. (2010) Engineering the nanoparticle–protein interface: applications and possibilities. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 14, 828–834

Roger A. Sheldon (2007) Enzyme Immobilization: The Quest for Optimum Performance, *Adv. Synth. Catal* Special Issue: Biocatalysis- 2007

S. A. Ahmed, N. M. A. El-Shayeb, A. M. Hashem, S. A. Saleh and A. F. Abdel-Fattah *Biochemical Studies on Immobilized Fungal β -Glucosidase* *Brazilian Journal of Chemical Engineering* Vol. 30, No. 04, pp. 747 - 758, October - December, 2013

S. Shan, H. F. Yang, J. F. Song, D. X. Han, A. Ivaska, L. Niu, *Direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose based on graphene* *Anal. Chem.*-2009

Schniepp HC, Li J-L, McAllister MJ, Sai H, Herrera-Alonso M, Adamson DH, et al. Functionalized single graphene sheets derived from splitting graphite oxide. *J Phys Chem B* 2006;110(17):8535–9

Schwartz S, Zelger J (1979) IgE antibodies for the evaluation of hypersensitivity against penicillin . *Allergy* 34;405

Sheila G. Valerioa, Joana S. Alvesa, Manuela P. Kleina, Rafael C. Rodriguesb, Plinho F. Hertz High operational stability of invertase from *Saccharomyces cerevisiae* immobilized on chitosan nanoparticles, *Carbohydrate Polymers* 92 (2013) 462– 468

Shouming He and Stephen G. Withers Assignment of Sweet Almond b-Glucosidase as a Family 1 Glycosidase and Identification of Its Active Site Nucleophile THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY Vol. 272, No. 40, Issue of October 3, pp. 24864–24867, 1997

Singh V, Joung D, Zhai L, Das S, Khondaker SI, Seal S. Graphene based materials: past, present and future. Prog Mater Sci 2011;56:1178–271

Srivastava G, Singh K, Talat M, Srivastava ON, Kayastha AM (2014) Functionalized Graphene Sheets As Immobilization Matrix for Fenugreek b-Amylase:

Stolyarova E, Rim KT, Ryu S, Maultzsch J, Kim P, Brus LE, et al. High-resolution scanning tunneling microscopy imaging of mesoscopic graphene sheets on an insulating surface. Proc Natl Acad Sci USA 2007;104(22): 9209–12)

Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey András Szilágyi^{1,2} and Péter Závodszky^{1,2} Structure 2000, Vol 8 No 5

Superparamagnetic iron oxide nanoparticles (SPIONs): Development, surface modification and applications in chemotherapy Morteza Mahmoudi a,b, *, Shilpa Sant c,d , Ben Wang c,d , Sophie Laurent e , Tapas Sen f

Szilágyi A, Kardos J, Osvath Sz, Barna L, Závodszky P (2007): Protein folding. handbook of Neurochemistry and Molecular Neurobiology, Volume 7, Chapter 10. pp. 303-344. Springer-2007

Szilágyi^{1,2} and Péter Závodszky^{1,2} Structural differences between mesophilic, moderately thermophilic and extremely thermophilic protein subunits: results of a comprehensive survey András, Structure 2000, Vol 8 No 5

Ugelstad J, Berge A, Ellingsen T, Schmid R, Nilsen T N, Mork P C, Stenstad P,

Uwe T. Bornscheuer Immobilizing Enzymes: How to Create More Suitable Biocatalysts Angewandte Chemie International Edition Volume 42, Issue 29, pages 3336–3337, July 28, 2003

Verma, M.L. et al. (2013) Nanobiotechnology as a novel paradigm for enzyme immobilisation and stabilisation with potential applications in biodiesel production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 23–39 3

Waleed A. Mahmood HYDROLYSIS OF SUCROSE BY IMMOBILIZED *Saccharomyces cerevisiae* INVERTASE, *Mesopotamia J. of Agric.* (ISSN 1815-316X) Vol.(38) No.(1)-2010

Wang G, Shen X, Wang B, Yao J, Park J. Synthesis and characterization of hydrophilic and organophilic graphene nanosheets. *Carbon* 2009;47:1359–64

Wang G, Yang J, Park J, Gou X, Wang B, Liu H, et al. Facile synthesis and characterization of graphene nanosheets. *J Phys Chem C* 2008;112:8192–5

Wei Chao a), Zhu Zan-Zan b), Hou Yang-Long c), Subbu S Venkatramana)†, and Xu Zhi-Chuan Magnetic iron oxide nanoparticles: Synthesis and surface coating techniques for biomedical applications *Sun Sheng-Nan Chin. Phys. B* Vol. 23, No. 3 (2014) 037503

William Ward (2012). The Isolation of Invertase from Baker's Yeast – An Introduction to Protein Purification Strategies, *Protein Purification*, Dr. Rizwan Ahmad (Ed.), ISBN: 978-953-307-831-1, InTech

Withers GG, Warren RAJ, Street IP, Rupitz K, Kempton JB, Abersold R (1990) Unequivocal demonstration of the involvement in the mechanism of a retaining glycosidase. *J Am Chem Soc* 112:5887–5889

Y.Wang, D.C Alsmeyer and R. McCreery, Raman Spectroscopy of Carbon Materials: Structural Basis Of Observed Spectra”, *Chem.Matter*, 2, 1990

Ying Wang^{1,2}, Zhaohui Li², Jun Wang², Jinghong Li¹ and Yuehe Lin² Graphene and graphene oxide: biofunctionalization and applications in biotechnology *Trends in Biotechnology* May 2011, Vol. 29, No. 5

Yue Li • Xiang-Yu Wang • Xiao-Ping Jiang •Jing-Jing Ye • Ye-Wang Zhang • Xiao-Yun Zhang Fabrication of graphene oxide decorated with Fe₃O₄@SiO₂ for immobilization of cellulase *J Nanopart Res* (2015) 17:8

Zhang et al. Graphene Oxide as a Matrix for Enzyme Immobilization Langmuir 2010, 26(9), 6083–6085

Zhang et al. Horseradish Peroxidase Immobilized on Graphene Oxide: Physical Properties and Applications in Phenolic Compound Removal J. Phys. Chem. C, Vol. 114, No. 18, 2010

Zhang, Y.-H.; Zhou, K.-G.; Xie, K.-F.; Zeng, J.; Zhang, H.-L. & Peng, Y. (2010) Tuning the electronic structure and transport properties of graphene by noncovalent functionalization: effects of organic donor, acceptor and metal atoms. Nanotechnology Vol. 21, No. 6, (January 2010), pp. 065201-065207, ISSN 0957-4484

Zhou et al. (2013) "Immobilized glucosidase" BioResources 8(2), 2605-2619

Zhou H, Mu Q, Gao N et al. (2008) A nano-combinatorial library strategy for the discovery of nanotubes with reduced protein-binding, cytotoxicity, and immune response. Nano Lett 8:859-865

X. Σταμάτης, Ενζυμική Βιοτεχνολογία και Νανοβιοτεχνολογία, ΠΙ-2012

Κλώνης-ENZYMΙΚΗ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ, 3η αναθεωρημένη έκδοση, ΠΕΚ-2010

Κυριακίδης, Βιοτεχνολογία, ΖΗΤΗ-2000