

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Εφαρμογή της τρισδιάστατης εκτύπωσης για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων.»

> Ανδρέας- Γεώργιος Βάσιος ΑΜ:286

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΣΤΑΜΑΤΗΣ ΧΑΡΑΛΑΜΠΟΣ Καθηγητής τμήματος Β.Ε.Τ.

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2024

Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στα πλαίσια του μεταπτυχιακού προγράμματος «Ιατρική χημεία» του τμήματος χημείας του πανεπιστήμιου Ιωάννινων στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογικών εφαρμογών και τεχνολογιών του πανεπιστήμιου Ιωάννινων.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή κ Σταμάτη Χαράλαμπο που είναι ο επιβλέπων καθηγητής γι' αυτήν την διπλωματική εργασία και μου έδωσε την ευκαιρία να εργαστώ στο εργαστήριο του. Τον ευχαριστώ για την άψογη συνεργασία καθώς και την υποστήριξη και την καθοδήγηση του. Καθ' όλη την διάρκεια της διπλωματικής εργασίας ο κ Σταμάτης ήταν πάντα διαθέσιμος να μου παρέχει καθοδήγηση και ανοικτός σε νέες ιδέες και προσεγγίσεις πάνω στο αντικείμενο της διπλωματικής εργασίας. Τέλος θα ήθελα να τον ευχαριστήσω για την εμπιστοσύνη και την υπομονή του στις δύσκολες φάσεις της ερευνητικής φάσης της διπλωματικής εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τα αλλά δυο μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον κύριο Πέτρο Καταπόδη και την κυριά Δήμητρα Χούχουλα για την συνεισφορά τους στην τριμελή επιτροπή.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Μιχαέλα Πατήλα για την καθοδήγηση της και τον συμβουλευτικό της ρόλο κατά την διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας. Την ευχαριστώ ιδιαίτερα για την επιμονή και την κατανόηση της στην επεξήγηση θεωρητικών εννοιών τα οποία δυσκολευόμουν να κατανοήσω καθώς και για την επιμέλεια αυτής της διπλωματικής εργασίας η οποία ήταν απαραίτητη λόγω της ήπιας μορφής δυσλεξίας μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω την υποψήφια διδάκτορα Αναστασία Σκόντα και την συμβουλευτική της υποστήριξη σε θέματα της μικρορευστομηχανικής και της τρισδιάστατης εκτύπωσης.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του εργαστήριου που έκαναν την παραμονή μου στο εργαστήριο μια ευχάριστη και εποικοδομητική εμπειρία. Το κλίμα καθ' όλη την διάρκειά της διπλωματικής μου εργασίας παρέμεινε ευχάριστο και επαγγελματικό ενώ υπήρξαν πολλές ευκαιρίες για καταιγισμό ιδεών και συζήτηση πάνω σε επιστημονικά και μη θέματα.

Περίληψη

Στα πλαίσια της παρούσας πτυχιακής σχεδιάστηκαν και κατασκευάστηκαν τέσσερα διαφορετικά μοντέλα τρισδιάστατα εκτυπωμένων συσκευών. Η κάθε συσκευή σχεδιάστηκε με σκοπό τη διευκόλυνση της διαδικασίας κατασκευής βιοαισθητήρων που βασίζονται σε καταρράκτες αντιδράσεων για την αναγνώριση του αναλύτη και την μετατροπή του χημικού σήματος σε ηλεκτρικό. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη αντίδραση μελέτης ο καταρράκτης αντιδράσεων που πραγματοποιείται από τα ένζυμα β-γλυκοσιδάση από τον οργανισμό *Thermotoga maritima*, οξειδάση της γλυκόζης από τον μικροοργανισμό *Aspergillus niger* και υπεροξειδάση του χρένου.

Στο πρώτο βήμα της μεταπτυχιακής εργασίας έγινε ομοιοπολική ακινητοποίηση των ενζύμων ξεχωριστά σε τρισδιάστατα εκτυπωμένους μικροαντιδραστήρες που έχουν υποστεί επιφανειακή τροποποίηση με χιτοζάνη και έγινε βελτιστοποίηση της ακινητοποίησης. Από τα πειράματα αυτά διαπιστώθηκε ότι η βέλτιστη συγκέντρωση γλουταραλδεΰδης για όλα τα ένζυμα είναι 1% *ν/ν* και η βέλτιστη συγκέντρωση των ενζύμων είναι 1 μl/ml, 0.1 mg/ml και 2.075 units/ml για τη β-γλυκοσιδάση, την οξειδάση της γλυκόζης και την υπεροξειδάση, αντίστοιχα. Στη συνέχεια, αξιολογήθηκε η σταθερότητα των τριών ακινητοποιημένων ενζύμων όσων αφορά την επαναχρησιμοποίηση και τη θερμοσταθερότητα, ενώ προσδιορίστηκε ότι η βέλτιστη τιμή pH δραστικότητας για όλα τα ένζυμα είναι ίση με 7. Συνεχίζοντας, πραγματοποιήθηκε κινητική μελέτη για τα τρία ένζυμα τόσο σε ελεύθερη όσο και ακινητοποιημένη μορφή απουσία ροής σε στατικές συνθήκες και παρουσία ροής χρησιμοποιώντας την εξίσωση Lily-Hornby.

Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ακινητοποίηση των τριών ενζύμων σε ειδική πολυενζυμική συσκευή με τη μέθοδο της διαμερισματοποίησης και αξιολογήθηκε η ενεργότητα του καταρράκτη αντιδράσεων. Παράλληλα, έγινε και σύγκριση με ανάλογη συσκευή όπου το ένζυμο είχε συν-ακινητοποιηθεί με τυχαίο τρόπο όπου παρατηρήθηκε ότι με τη μέθοδο της διαμερισματοποίησης παρατηρήθηκε αύξηση της δραστικότητας του συστήματος κατά 245%. Τέλος, έγινε μια προσπάθεια κλιμάκωσης των αντιδράσεων χρησιμοποιώντας μια πολυκάναλη συσκευή που περιέχει 36 κανάλια. Η ροή του διαλύματος αξιολογήθηκε με τη βοήθεια λογισμικού προσομοίωσης και αξιολογήθηκε η παραγωγικότητα του συστήματος. Από την προσομοίωση παρατηρήθηκε ότι η ροή είναι ομοιόμορφη για όλα τα κανάλια μέχρι ταχύτητα ροής 150 μl/min, ενώ η παραγωγικότητα του αντιδραστήρα

Abstract

In the present study, four distinct 3D models were designed and printed. Each model was properly designed to facilitate the development of biosensors which are based on cascade reactions for the analyte recognition and the further transformation of the chemical signal to an electric signal. In our case, we used a model cascade reaction consisting of three enzymes, namely β -glucosidase from *Thermotoga maritima*, glucose oxidase *from Aspergillus niger*, and horseradish peroxidase.

In the first step, the enzymes were immobilized separately in 3D-printed microreactors that had previously undergone surface modification with chitosan, using a covalent immobilization procedure, using glutaraldehyde as the cross-linker. An optimization of the immobilization procedure took place. The results of these experiments showed that the optimal concentration of glutaraldehyde for all enzymes was 1% v/v and the optimal enzyme concentration was $1 \mu l/ml$, 0.1 mg/ml, and 2.075 units/ml for β -glucosidase, glucose oxidase, and horseradish peroxidase, respectively. In the next step, the thermostability, pH activity, and reusability were evaluated for each immobilized enzyme. The optimal pH for all enzymes was 7. Continuing, we also evaluated the kinetic constant of the immobilized enzyme in batch and flow conditions. For the flow conditions, the Lily- Hornby model was used to estimate the Km^{app} of the enzymes.

In the last step of this work, we immobilized all enzymes in a 3D-printed multienzymatic device. The immobilization was done through the compartmentalization method, and the activity of the system was evaluated and compared to the single enzyme reactors and the randomly co-immobilized equivalent of the device. The compartmentalized device was observed to have 245% more enzymatic activity than the randomly co-immobilized equivalent. Lastly, we tried to scale up the process by using a multichannel 3D-printed microreactor that contained 36 channels. The flow homogeneity was evaluated using simulation software the results of which revealed that the flow is homogenous up to a flow of 150 μ l/min. the productivity of this system was found to be 0.074 μ mol/min pNP and 0.0348 μ mol/min ABTS⁺.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ7		
4.4 T-		-
1.1 ιρι	σοιαστατη εκτυπωση (3D Printing)	
1.1.1	Εισαγωγή στην Τρισοιαστάτη εκτυπώση (3D Printing)	
1.1.2	Ιστορικά στοιχεία	
1.1.3	Τεχνικές τρισδιάστατης εκτύπωσης	
1.1.4	Υλικά εκτύπωσης	
1.1.5	Πλεονεκτήματα της τρισδιάστατης εκτύπωσης	
1.1.6	Εφαρμογές της τρισδιάστατης εκτύπωσης	
1.2 Aĸ	νητοποίηση ενζύμων	14
1.2.1	Πλεονεκτήματα ακινητοποίησης	14
1.2.2	Μέθοδοι ακινητοποίησης	15
1.2.3	Καταρράκτες αντιδράσεων	
1.2.4	Εφαρμογές των ακινητοποιημένων ενζύμων	
1.3 PE	ιστομηχανική (fluidics)	
1.3.1	Εισανωνή στη ρεμστομηγανική	
1.3.2	-ισα το τίδρα στήρες	
133	Πλεονεκτήματα μικοραντιδραστήρων	21
134	Εφαριονές μικοραντιδραστήρων	21
1.3.4	Εφαρμογες μαροαντισραστηρων	
1.4 Bic	αισθητήρες	22
1.4.1	Τύποι βιοαισθητήρων	23
1.4.2	Εφαρμογές βιοαισθητήρων	24
4 F - F		20
1.5 280	πος ΜΕΙΑΙΤΙΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΙΑΣΙΑΣ	
2 VA 11/		20
2 Y/\IK/		
2.1 Yλ	κά	
2.1.1	Ένζυμα	
2.1.2	Ρυθμιστικά διαλύματα	
2.1.3	Υποστρώματα	
2.1.4	Λοιπά αντιδραστήρια	
2.1.5	Διαλύτες	
2.1.6	Υλικά 3D printer	
2.1.7	Τεχνολονικός εξοπλισμός	
2.1.8		
	Προγράμματα (software)	
22 Má	Προγράμματα (software)	
2.2 Má	Προγράμματα (software) θοδοι Σχεδιασμός μουτέλων	
2.2 Má 2.2.1	Προγράμματα (software) Θοδοι Σχεδιασμός μοντέλων Εκτύπωση μουτέλων	
2.2 Má 2.2.1 2.2.2	Προγράμματα (software) Θοδοι Σχεδιασμός μοντέλων Εκτύπωση μοντέλων Παρασσσοιά διαλιμιάτι γι	
2.2 Má 2.2.1 2.2.2 2.2.3	Προγράμματα (software) Θοδοι Σχεδιασμός μοντέλων Εκτύπωση μοντέλων Παρασκευή διαλυμάτων	
2.2 Má 2.2.1 2.2.2 2.2.3 2.2.4 2.2.5	Προγράμματα (software) Θοδοι Σχεδιασμός μοντέλων Εκτύπωση μοντέλων Παρασκευή διαλυμάτων Απομόνωση και καθαρισμός υπεροξειδάσης από ραπανάκι	
2.2 Má 2.2.1 2.2.2 2.2.3 2.2.4 2.2.5 2.2.5	Προγράμματα (software) Θοδοι Σχεδιασμός μοντέλων Εκτύπωση μοντέλων Παρασκευή διαλυμάτων Απομόνωση και καθαρισμός υπεροξειδάσης από ραπανάκι Ακινητοποίηση ενζύμων	28
2.2 Má 2.2.1 2.2.2 2.2.3 2.2.4 2.2.5 2.2.6 2.2.6	Προγράμματα (software) Θοδοι Σχεδιασμός μοντέλων Εκτύπωση μοντέλων Παρασκευή διαλυμάτων Απομόνωση και καθαρισμός υπεροξειδάσης από ραπανάκι Ακινητοποίηση ενζύμων Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης γλουταραλδεΰδης Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης γλουταραλδεΰδης	28
2.2.1 2.2.2 2.2.3 2.2.4 2.2.5 2.2.6 2.2.7 2.2.6	Προγράμματα (software) θοδοι Σχεδιασμός μοντέλων Εκτύπωση μοντέλων Παρασκευή διαλυμάτων Απομόνωση και καθαρισμός υπεροξειδάσης από ραπανάκι Ακινητοποίηση ενζύμων Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης γλουταραλδεΰδης Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης ενζύμου	28 28 29 31 31 31 31 32 34 34
2.2.1 2.2.2 2.2.3 2.2.4 2.2.5 2.2.6 2.2.7 2.2.8 2.2.8	Προγράμματα (software) Θοδοι Σχεδιασμός μοντέλων Εκτύπωση μοντέλων Παρασκευή διαλυμάτων Απομόνωση και καθαρισμός υπεροξειδάσης από ραπανάκι Απομόνωση και καθαρισμός υπεροξειδάσης από ραπανάκι Βελτιστοποίηση ενζύμων Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης γλουταραλδεΰδης Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης ενζύμου Δραστικότητα σε διαφορετικές τιμές pH	28 28 29 31 31 31 31 32 34 34 34

2	.2.10	Σταθερότητα παραμονής σε θερμοκρασίες 30,40,50 ºC	34
2	.2.11	Κινητικές μελέτες	34
2	.2.12	Μέτρηση δραστικότητας	35
3	ΑΠΟΤ	ΈΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1	Δημ	ιιουργία τρισδιάστατα εκτυπωμένων συσκευών	
3	.1.1	Μικροαντιδραστήρας 30 μl	
3	.1.2	Rings	39
3	.1.3	Τριενζυμική συσκευή	39
3	.1.4	Scale up μικροαντιδραστήρας	39
3.2	Βελ	τιστοποίηση ακινητοποίησης στους μικροαντιδραστηρεσ	40
3	.2.1	Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης γλουταραλδεΰδης στους μικροαντιδραστήρες	30 µl40
3	.2.2	Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης ενζύμου στους μικροαντιδραστήρες 30 μΙ	42
3.3	Βιο	καταλυτικές μελέτες σε μικροαντιδραστήρες	
3	.3.1	Μελέτη επαναχορισιμοποίησης μικροαντιδραστήρων 30 μl	43
3	.3.2	Μελέτη θερμοσταθερότητας στους μικροαντιδραστήρες 30 μl	45
3	.3.3	Μελέτη ενεργότητας σε διαφορετικά pH στους μικροαντιδραστήρες 30 μl	46
3.4	Πρα	οσδιορισμός κινητικών παραμέτρων σε μικροαντιδραστηρεσ	49
3	.4.1	Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων β gluc σε μικροαντιδραστήρες 30 μl	49
3	.4.2	Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων GOx σε μικροαντιδραστήρες 30 μl	51
3	.4.3	Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων HRP σε μικροαντιδραστήρες 30 μl	52
3.5	Προ	οσδιορισμός κινητικών παραμέτρων σε rings	54
3.6	Κατ	αρράκτες αντιδράσεων σε διαμερισματοποιημενους μικροαντιδραστήρες	55
37	Scal		57
З .,	7 1	Ποοσομοιώσεις ορής	57
2	72	Απόδοση scale μη αντιδοαστήρα	
2	73	Επαναχοραμιοποίηση scale μη αντιδοαστήρα	
5	.7.5		
4	ΣΥΜΓ	ΙΕΡΑΣΜΑΤΑ	60
5	ΒΙΒΛΙ	ογραφια	62
6	ПАРА	РТНМА	

1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΗ ΕΚΤΥΠΩΣΗ (3D PRINTING)

1.1.1 Εισαγωγή στην Τρισδιάστατη εκτύπωση (3D Printing)

Τα τελευταία χρόνια η τρισδιάστατη εκτύπωση (3D printing) έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον της παγκόσμιας τεχνολογικής σκηνής. Με εφαρμογές που εκτείνονται από τα χόμπι και τη βιομηχανία έως την επιστημονική κοινότητα η τεχνολογία αυτή βρίσκει εφαρμογή σε όλο και περισσοτέρους κλάδους και πεδία. Η τεχνολογία αυτή βασίζεται στη μέθοδο layer-by-layer για να παράγει τρισδιάστατα μοντέλα υψηλής ακρίβειας και ευκρίνειας σε μικρό χρόνο και χαμηλό κόστος. Αναλυτικότερα, η αρχή της λειτουργίας της τρισδιάστατης εκτύπωσης είναι η εναπόθεση μιας λεπτής στρώσης υλικού πάνω σε μια επιφάνεια στήριξης με τη χρήση μια πηγής ενέργειας η οποία αλλάζει τις ιδιότητες του υλικού που εναποτίθεται, με σκοπό αυτό να διατηρεί τη μορφή και το σχήμα του. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται για πολλαπλά επίπεδα του υλικού έως ότου τελικά να παραχθεί ένα ολοκληρωμένο τρισδιάστατο δόμημα. Η διαδικασία αυτή στη νεότερη έκδοση των εκτυπωτών είναι αυτοματοποιημένη, ο σχεδιασμός του αντικειμένου γίνεται σε εξειδικευμένα περιβάλλοντα τρισδιάστατης σχεδίασης (3D modeling environment), ενώ στη συνέχεια κατάλληλα προγράμματα μετατρέπουν το τρισδιάστατο μοντέλο σε κατάλληλη μορφή για την ανάγνωση του από τον εκτυπωτή, ενώ παράλληλα εισάγει πολλαπλές τομές στο μοντέλο δημιουργώντας επίπεδα τα οποία θα εκτυπωθούν σε διαδοχικούς κύκλους εναπόθεσης του υλικού εκτύπωσης.[1]





The CAD model of the desired part is generated

The CAD model is converted into an STL file. The STL file is transferred to the computer controlling the printer



The printer settings are defined before the final part is fabricated

Εικόνα 1. Γενικευμένη διαδικασία σχεδίασης επεξεργασίας και εκτύπωσης τρισδιάστατων μοντέλων κατά την τρισδιάστατη εκτύπωση[2]

1.1.2 Ιστορικά στοιχεία

Τα πρώτα βήματα στην έρευνα για την τρισδιάστατη εκτύπωση ξεκίνησε τη δεκαετία του '60 όπου έγινε για πρώτη φορά προσπάθεια φωτοπολυμερισμού ακριβείας μέσω συνδυασμού δυο ακτινών λέιζερ διαφορετικού μήκους κύματος. Ο όρος της ταχείας πρωτοτυποποίησης (rapid prototyping) ή αλλιώς τρισδιάστατη εκτύπωση (3D printing) άρχισε να εμφανίζεται στις αρχές της δεκαετίας του '80 με την πρώτη πατέντα που περιείχε αυτόν τον όρο να εγκρίνεται το 1986. Η πατέντα αυτή αφορούσε την τεχνική της στερεολιθογραφίας (SLA) η οποία επινοήθηκε από τον κ. Charles Hull και χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα. Ο πρώτος εμπορικός τρισδιάστατος εκτυπωτής κατασκευάστηκε το 1988 από την εταιρία που ίδρυσε ο κ. Charles Hull, την 3D Systems. Στη συνέχεια ακολουθήσαν και άλλες τεχνικές όπως η επιλεκτική πυροσυσσωμάτωση με λέιζερ (SLS) και τη μοντελοποίηση συντηγμένης εναπόθεσης (FDM). Καθώς η παραγωγή και η εμπορευματοποίηση των τρισδιάστατων εκτυπωτών περιοριζόταν από τις υπάρχουσες πατέντες, η αγορά των τρισδιάστατων εκτυπωτών αναπτυσσόταν με αργούς ρυθμούς. Μετά το 2005 που έληξε η πατέντα των εκτυπωτών FDM, η αγορά των τρισδιάστατων εκτυπωτών αναπτύχθηκε εκθετικά με πολλά καινοτόμα προγράμματα και τεχνικές να έρχονται στο φως ενισχύοντας το ενδιαφέρον γι' αυτή την ανερχομένη τεχνολογία. [3]

1.1.3 Τεχνικές τρισδιάστατης εκτύπωσης

Τη στιγμή την συγγραφής αυτής της εργασίας υπάρχουν 8 διακριτές τεχνικές 3D εκτύπωσης οι οποίες μοιράζονται την παραπάνω κοινή μέθοδο λειτουργίας, παρόλα αυτά τα υλικά εκτύπωσης και οι μέθοδοι συγκόλλησης τους μπορεί να διαφέρουν. Για παράδειγμα, υπάρχουν τεχνικές που χρησιμοποιούν ετερογενή υλικά όπως η binder jetting ενώ άλλες τεχνικές χρησιμοποιούν ομογενή υλικά όπως η VAT photopolymerization. Από την άλλη, η συγκόλληση του πολυμερούς μπορεί να επιτυγχάνεται με διαφορετικά μέσα όπως το λέιζερ, στην περίπτωση της direct energy deposition, ή τη θερμότητα στην περίπτωση της FDM. Τέλος, τα υλικά που χρησιμοποιούνται κατά την εκτύπωση μπορεί να διαφέρουν είναι τα θερμοπλαστικά υλικά, τα κεραμικά, οι ρητίνες, τα φυσικά πολυμερή και τα μέταλλα. [1,4–7]

Material jetting

Η τεχνική material jetting βασίζεται στην εναπόθεση σταγονιδίων σε μια συμπαγή πλατφόρμα. Η τεχνική αυτή έχει εμπνευστεί από του εκτυπωτές τύπου inkjet και μπορεί να επιτευχθεί με ομοιογενή ή ετερογενή υλικά. Τα ομοιογενή υλικά μπορούν να είναι φωτοευαίσθητες ρητίνες, ελαστομερή και θερμοσκληραινόμενα υλικά το οποία ψεκάζονται κάνω στην πλατφόρμα και σταθεροποιούνται μέσω θέρμανσης η φωτεινής ακτινοβολίας σε επίπεδα έτσι ώστε να σχηματιστή μια τρισδιάστατη δομή.[8] Στην περίπτωση του ετερογενούς υλικού η μια φάση είναι συνήθως στερεή και αποτελείται από κεραμικά ή μεταλλικά σφαιρίδια ενώ η δεύτερη φάση που είναι πάντα υγρή αποτελεί τον συνδέτη και έχει σκοπό τη συνένωση και σταθεροποίηση του υλικού. Κύριες προκλήσεις που πρέπει να αντιμετωπιστούν για την εφαρμογή της τεχνικής αυτής είναι ο σχηματισμός των σταγονιδίων καθώς και η προβλέψιμη εναπόθεση τους στην πλατφόρμα ενώ για τα ετερογενή υλικά πρόκληση αποτελεί και η εν αιώρηση (διασπορά) της στέρεης φάσης μέσα στην υγρή φάση κατά την διάρκεια της εκτύπωσης.[1]

Binder jetting

Η τεχνική binder jetting είναι συγγενική της τεχνικής material jetting καθώς βασίζεται στην ίδια μέθοδο. Η διαφορά τους είναι ότι αντί η στερεή φάση να βρίσκεται μέσα στην υγρή φάση και να τυπώνονται ταυτόχρονα, στην τεχνική binder jetting η στερεή φάση βρίσκεται πάνω στην πλατφόρμα εκτύπωσης και η υγρή φάση ψεκάζεται με προκαθορισμένο τρόπο από πάνω, με αποτέλεσμα να διασυνδέεται το υλικό της στέρεης φάσης. Στη συνέχεια, δημιουργείται νέα στρώση στέρεης φάσης πάνω από την προηγουμένη και ακολουθεί ψεκασμός. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται μέχρι να ολοκληρωθεί η διαδικασία εκτύπωσης. Η τεχνική αυτή υπερτερεί της material jetting όσον αφορά τον σχηματισμό και τη μορφή των σταγονιδίων καθώς δε χρειάζεται να είναι πλέον ετερογενή κατά την εξώθηση. Επιπλέον, είναι πιο γρήγορη χάρη στη μικρότερη ποσότητα υλικού που πρέπει να εκτυπωθεί. Από την άλλη μεριά, η ακρίβεια εκτύπωσης είναι μικρότερη γι΄ αυτή την τεχνική ενώ σε κάποιες περιπτώσεις χρειάζεται και μεταεπεξεργασία του εκτυπώματος ανεβάζοντας το κόστος της τεχνικής. [1,6]

Sheet lamination

Η τεχνική sheet lamination είναι μια αρκετά απλή τεχνική. Στην τεχνική αυτή, φύλλα, κυρίως μετάλλων αλλά και χαρτιού σε κάποιες περιπτώσεις, μπορούν να κοπούν με ακρίβεια με χρήση λέιζερ και να κολληθούν το ένα πάνω από το άλλο έτσι ώστε να παραχθεί ένα τρισδιάστατο μοντέλο. Η τεχνική αυτή είναι ιδανική για κατασκευή περίπλοκων εσωτερικών δομών και δομών που θα φιλοξενήσουν λειτουργικές προσθήκες όπως οπτικές ίνες ή ηλεκτρονικές πλακέτες. Τα μειονεκτήματα αυτής της τεχνικής είναι η μικρή αντοχή στην καταπόνηση καθώς και οι δυσκολίες αφαίρεσης της περίσσιας υλικού. Επιπλέον, κάποιες γεωμετρίες δεν είναι δυνατό να εκτυπωθούν με αυτή την τεχνική. [1,4,6]

Direct energy deposition

Η τεχνική Direct energy deposition αναφέρεται κυρίως σε μέταλλα και βασίζεται στην τήξη των μετάλλων μέσω θέρμανσης με ακτίνα λέιζερ. Ουσιαστικά κατά τη διάρκεια αυτή της τεχνικής το λέιζερ λιώνει επιλεκτικά τμήματα του προϋπάρχοντος υλικού, ενώ παράλληλα προστίθεται και επιπλέον υλικό. Το επιπλέον υλικό είναι σε μορφή σκόνης. Η τεχνική αυτή έχει αρκετά πλεονεκτήματα όσον αφορά τον έλεγχο της δομής του υλικού, αλλά η διαδικασία είναι αργή και η ακρίβεια της είναι μικρή. [1,4,6]

Powder bed fusion

Η τεχνική αυτή μοιάζει αρκετά με την τεχνική binder jetting με τη διαφορά ότι σε αυτή την τεχνική η ενοποίηση της στερεής φάσης γίνεται μέσω θέρμανσης και συνεπώς δεν υπάρχει υγρή φάση. Η θέρμανση γίνεται με ακτίνα λέιζερ η οποία λιώνει επιλεκτικά τα σφαιρίδια της στερεής φάση τα οποία ενοποιούνται δημιουργώντας μια συμπαγή δομή. Στην συνέχεια γίνεται επικάλυψη με νέα σφαιρίδια και επαναλαμβάνεται η διαδικασία.[1,4,6]

VAT photopolymerization

Ο όρος VAT polymerization είναι στην πραγματικότητα μια ομάδα τεχνικών που βασίζονται στον φωτοπολυμερισμό ρητινών μέσω ακτινοβολίας. Στην τεχνική αυτή, φωτοπολυμερική ρητίνη τοποθετείται σε δοχείο το οποίο είναι μέρος του εκτυπωτή και στο οποίο εμπεριέχεται και η πλατφόρμα εκτύπωσης. Στο πρώτο στάδιο της εκτύπωσης η πλατφόρμα βυθίζεται στη ρητίνη τόσο όσο και το ύψος του πρώτου επιπέδου εκτύπωσης. Στη συνέχεια, πραγματοποιείται επιλεκτικός πολυμερισμός της ρητίνης πάνω στην πλατφόρμα και η πλατφόρμα βυθίζεται εκ νέου. Υπάρχουν τρεις τεχνικές με τις οποίες μπορεί να γίνει η ακτινοβόληση της ρητίνης. Η πρώτη τεχνική ονομάζεται Vector Scan (VS) η οποία απαντάται πιο συχνά σε εμπορικούς εκτυπωτές και χρησιμοποιεί μια δέσμη φωτός η οποία ακτινοβολεί την επιφάνεια σημείο προς σημείο. Η δεύτερη τεχνική ονομάζεται Mask Projection (MP) και βασίζεται στη χρήση προβολών του επιπέδου προς εκτύπωση για να ακτινοβολήσει το σύνολο του επιπέδου εκτύπωσης και να πολυμερίσει το αρνητικό της προβολής. Η τελευταία τεχνική ονομάζεται Two Photon Approach (TPA) και χρησιμοποιεί δυο λέιζερ διαφορετικού μήκους κύματος. Σε αυτή την τεχνική, ο πολυμερισμός της ρητίνης επιτυγχάνεται όταν οι δυο ακτίνες διασταυρώνονται παρέχοντας την απαιτούμενη ενέργεια για τον πολυμερισμό. Όσον αφορά την σύγκριση των τριών αυτών τεχνικών, η ταχύτερη τεχνική είναι η ΜΡ καθώς επιτυγχάνει πολυμερισμό ολοκλήρων επίπεδων σε ένα βήμα και ακολουθεί η ΤΡΑ καθώς ο πολυμερισμός μπορεί να γίνει σε οποιοδήποτε σημείο της δεξαμενής ρητίνης χωρίς να χρειάζεται να υπάρχει κινητή πλατφόρμα εκτύπωσης. Βέβαια, σε αντάλλαγμα της ταχύτητας, η ΜΡ έχει χαμηλή ευκρίνεια σε σχέση με τις άλλες δυο τεχνικές ενώ η ΤΡΑ έχει αρκετά μεγαλύτερο κόστος. Η VAT photopolymerization μπορεί να συνδυάσει την ταχύτητα, την ευκρίνεια και το χαμηλό κόστος κάνοντας την μια προσιτή τεχνική για εμπορικές και ερευνητικές εφαρμογές. Το μειονέκτημα της τεχνικής αυτής είναι τα υλικά τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν. Μέχρι στιγμής καλή εφαρμογή στην τεχνική αυτή έχουν βρει μόνο τα εποξείδια και τα ακρυλικά τα οποία παρουσιάζουν μικρή μηχανική αντοχή και μεγάλη φθορά από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως ακτινοβολία μέσα σε μικρό χρόνο. [1,6]

Material extrusion

Η τεχνική material extrusion βασίζεται στην αλλαγή της φάσης του υλικού που εκτυπώνεται μετά την εναπόθεση του. Η αλλαγή φάσης μπορεί να επιτευχθεί με πολλούς τρόπους όπως αλλαγή pH σε επαφή με κάποια συγκεκριμένη ένωση, όπως το οξυγόνο της ατμοσφαίρας ή ακόμα και ακτινοβόληση, αλλά η πιο συνηθισμένη τεχνική είναι η θέρμανση. Σε αυτή τη μορφή της τεχνικής, θερμοπλαστικά υλικά θερμαίνονται έτσι ώστε να μετατραπούν σε ρευστά. Αφού γίνει η εναπόθεση τους στην πλατφόρμα εκτύπωσης, ψύχονται ώστε να επανέλθουν στη στερεή μορφή τους. Η εναπόθεση επιτυγχάνεται μέσω ενός κινητού εξωθητή ο οποίος έχει τη δυνατότητα ακριβούς κίνησης στο επίπεδο (X,Y). Όταν ο εξωθητής ολοκληρώσει την εναπόθεση υλικού ενός επιπέδου η πλατφόρμα (1,4,6,7,9]

Bioprinting

Μια παραλλαγή της τεχνικής material extrusion είναι η τεχνική bioprinting η οποία βασίζεται στον τρόπο λειτουργίας της τεχνικής material extrusion για να εκτυπώσει κύτταρα ή μέρη αυτών με οργανωμένο τρόπο πάνω σε μια πλατφόρμα. Λόγω της ευαισθησίας των κυττάρων η εκτύπωση δεν μπορεί να επιτευχθεί με συμβατικές τεχνικές. Συνεπώς για της ανάγκες του bioprinting σχεδιάστηκαν ειδικά υλικά εκτύπωσης τα λεγόμενα βιομελάνια (bioinks). Τα υλικά αυτά είναι ικανά να πραγματοποιήσουν την αλλαγή φάσης που απαιτείται σε ήπιες συνθήκες επιτρέποντας στα κύτταρα να διατηρήσουν της μορφή τους. Τα βιομελάνια είναι επίσης βιοσυμβατά, ενώ αρκετές φορές παρουσιάζουν και βιοενεργότητα. Τέλος, πρέπει να αναφερθεί ότι και οι τεχνικές inkjet (binder jetting, material jetting) έχουν παραλλαγές τύπου bioprinting. [5]



Εικόνα 2. Σχηματική αναπαράσταση των τεχνικών τρισδιάστατης εκτύπωσης. A) Binder jetting, B) Direct energy deposition, C) Material extrusion, D) Sheet lamination, E) Material jetting, F) Stereolithography, G) Powder bed fusion, H) Bioprinting [10]

1.1.4 Υλικά εκτύπωσης

Τα υλικά εκτύπωσης που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για 3D εκτυπώσεις χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες: τα ρευστά υλικά, τα σφαιρίδια, και τα στερεά υλικά. Αυτός ο διαχωρισμός γίνεται σύμφωνα με τη μορφή με την οποία το υλικό εισάγεται στον τρισδιάστατο εκτυπωτή. Τα ρευστά υλικά μπορούν να είναι φωτοπολυμερικές ρητίνες, κεριά ή μέταλλα τα οποία έχουν περάσει το σημείο τήξεως τους. Τα σφαιρίδια μπορούν να αποτελούνται από μέταλλα, πολυμερή και κεραμικά. Τα στερεά υλικά περιλαμβάνουν πολυμερή σε ίνες, και μέταλλα ή κεραμικά στην μορφή καλωδίων η λεπτής ταινίας.



Εικόνα 3.Σχηματική αναπαράσταση των υλικών που χρησιμοποιούνται στην τρισδιάστατη εκτύπωσης καθώς και σε ποια τεχνική μπορούν να εφαρμοστούν.[1]

Τα πολυμερή μπορούν να συμμετέχουν στις περισσότερες τεχνικές τρισδιάστατης εκτύπωσης ενώ έχουν και μεγάλο ενδιαφέρον σε βιοϊατρικές εφαρμογές. Τα πολυμερή χωρίζονται σε θερμοπλαστικά και θερμοσκληραινόμενα υλικά. Τα θερμοπλαστικά υλικά έχουν την ικανότητα να αλλάζουν κατάσταση όταν θερμαίνονται και να επανέρχονται στην αρχική τους κατάσταση αφού χάσουν την περίσσεια θερμότητα. Τέτοια υλικά είναι όλα τα στερεά πολυμερή υλικά όπως το πολυγαλακτικό οξύ και το πολυανθρακικό. Κάποια τέτοια υλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και στην υγρή τους μορφή και συνεπώς ανήκουν στα ρευστά υλικά. Αυτά τα υλικά συνήθως έχουν πολύ χαμηλό σημείο τήξεως όπως κάποια κεριά. Τα θερμοσκληρυνόμενα υλικά από την άλλη μεριά δεν μπορούν να επιστρέψουν στην υγρή μορφή τους μέρα από θέρμανση, με άλλα λόγια, η σκλήρυνση τους είναι μη αντιστρεπτή. Τέτοια υλικά είναι οι φωτοπολυμερικές ρητίνες οι οποίες αρχικά βρίσκονται σε μορφή μονομερών η ολιγομερών αλλά μετά από ακτινοβόληση κυρίως με UV ακτινοβολία γίνεται εκκίνηση του πολυμερισμού τους. Ο πολυμερισμός γίνεται μέσω ενεργών ρίζων των μονομερών.[1]

1.1.5 Πλεονεκτήματα της τρισδιάστατης εκτύπωσης

Μέσα από την ποικιλία τεχνικών και την εύκολη προσβασιμότητα που έχει κανείς σε αυτή την τεχνολογία σήμερα, έχουν αρχίσει να έρχονται στο φως άγνωστα μέχρι τώρα πλεονεκτήματα των τεχνικών αυτών. Ιδιαίτερα στον ερευνητικό τομέα τα τελευταία χρόνια όλο και περισσότερα εργαστήρια παγκοσμίως ασχολούνται αμιγώς με την έρευνα στην τρισδιάστατη εκτύπωση ή έχουν ενσωματώσει στις ήδη υπάρχουσες τεχνικές τους την τεχνολογία αυτή. Η τρισδιάστατη εκτύπωση προσφέρει ασύγκριτη ευελιξία όσον αφορά την ανάπτυξη πολύπλοκων ερευνητικών μοντέλων. Η κατασκευή πολύπλοκων μοντέλων είναι μια διαδικασία η οποία απαιτεί υπό άλλες συνθήκες χρονοβόρες διαδικασίες και συντονισμό πολλών διαφορετικών ομάδων για την υλοποίηση τους. Επιπροσθέτως εάν προκύψει σφάλμα κατά τα πρώτα στάδια του σχεδιασμού όλη η διαδικασία πρέπει να επαναληφθεί. Αντιθέτως η τρισδιάστατη εκτύπωση μπορεί να ικανοποιήσει την ανάπτυξη όσο και το σχεδιαστικό κομμάτι της διαδικασίας μόνο με τη χρήση ενός υπολογιστή μεσαίας κατηγορίας και ενός 3D εκτυπωτή μέσα σε διάστημα ωρών. Επιπλέον, η διόρθωση των σφαλμάτων είναι άμεση και εύκολη καθώς τα προγράμματα σχεδίασης επιτρέπουν την τροποποίηση του υπάρχοντος σχεδίου και την απευθείας εκτύπωση του. Όσον αφορά το κόστος των συσκευών αυτών, η αγορά των τρισδιάστατων εκτυπωτών έχει γίνει τόσο προσιτή μέσα στα τελευταία χρονιά ώστε κάποιος μπορεί να προμηθευτεί ένα εκτυπωτή τύπου FDM ή VAT photopolymerization με έως 200 ευρώ. [11]

1.1.6 Εφαρμογές της τρισδιάστατης εκτύπωσης

Η τρισδιάστατη εκτύπωση όπως ειπώθηκε και νωρίτερα έχει κεντρίσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας ως ένα καινοτόμο και εύκολα προσβάσιμο εργαλείο. Η τρισδιάστατη εκτύπωση έχει ήδη βρει εφαρμογές σε πεδία, όπως σε εφαρμογές που αφορούν το αεροδιάστημα όπου μέχρι στιγμής χρησιμοποιείται για την κατασκευή πολύπλοκων εξαρτημάτων. Στη βιομηχανία των οικοδομών έχουν ήδη κατασκευαστεί τα πρώτα οικοδομήματα με την χρήση macro 3D εκτυπωτών που έχουν τη

δυνατότητα να χτίσουν ολόκληρα σπίτια χωρίς την βοήθεια εξωτερικών μηχανήματων. [4,6]

Εκτός από τη χρήση της στην βιομηχανία, η τρισδιάστατη εκτύπωση έχει θεμελιωθεί ως βοηθητικό εργαλείο για την εκπαίδευση και την έρευνα. Με τη βοήθεια του εκτυπωτή μπορούν να κατασκευαστούν βοηθήματα έτσι ώστε η εκπαίδευση να γίνει πιο διαδραστική δίνοντας έτσι τη δυνατότητα στους διδάσκοντες και στους μαθητές να λαμβάνουν ενεργά μέρος στην εκπαιδευτική διαδικασία. Η χρήση ενός 3D εκτυπωτή μπορεί να κινήσει και να εκτονώσει την καλλιτεχνική φύση των μαθητών κάτι που συχνά παραβλέπεται στα σύγχρονα εκπαιδευτικά συστήματα. [12]

Όσον αφορά τις εφαρμογές της τρισδιάστατης εκτύπωσης στην έρευνα, ιδιαίτερη κινητικότητα παρατηρείται στα πεδία της βιοτεχνολογίας και της ιατρικής. Η εξατομικευμένη ιατρική η οποία κερδίζει όλο και περισσότερο έδαφος ως προς τις συμβατικές μεθόδους θεραπείας και πρόληψης, βρίσκεται στο επίκεντρο της έρευνας των εφαρμογών της τρισδιάστατης εκτύπωσης. Παραδείγματα τέτοιων εφαρμογών είναι η κατασκευή φαρμάκων με ειδικά προσαρμοσμένη ποσότητα ενεργής ουσίας ανάλογα με τις ανάγκες της θεραπείας και τα προσαρμοσμένα επιθέματα. Τα επιθέματα αυτά δημιουργούνται σύμφωνα με το ακριβές ανάγλυφο της περιοχής που πρέπει να καλύψουν μέσω laser scanning και κατασκευάζονται με ακρίβεια χιλιοστών από ένα τρισδιάστατο εκτυπωτή. Τα επιθέματα αυτά είναι ιδιαίτερης σημασίας για τραύματα όπως εγκαύματα και μεγάλες πληγές καθώς τα συμβατικά επιθέματα δημιουργούν θύλακες αέρα και αναδιπλώσεις σε μεγάλες επιφάνειες παρέχοντας έτσι ατελή προστασία. Εκτός από πληρωτικό ρόλο, τρισδιάστατα αντικείμενα μπορούν να παρέχουν και λειτουργικό έργο ως και στηρικτικό. Χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιων δομών και με τις δυο λειτουργίες είναι τα εμφυτεύματα που παράγονται από την τρισδιάστατη εκτύπωση τα οποία μπορούν να παρέχουν ικανοποιητική στήριξη και σε ορισμένες περιπτώσεις τροποποιούνται έτσι ώστε να έχουν και θεραπευτική ή αντιφλεγμονώδη δράση. [10]

Ένας άλλος τομέας στον οποίο έχει ενταχθεί πλέον η τρισδιάστατη εκτύπωση είναι το πεδίο το βιοαισθητήρων. Η τρισδιάστατη εκτύπωση έχει επιτρέψει την κατασκευή πολύπλοκων συστοιχιών που έχουν τη δυνατότητα να ενσωματώνουν και ηλεκτρονικά μέρη ή οπτικές ίνες. Συγκεκριμένα στους εμφυτεύσιμους βιοαισθητήρες μπόρεσαν να σχεδιαστούν βιοαισθητήρες που είναι εξατομικευμένοι ανάλογα με την περιοχή και το άτομο για το οποίο προορίζεται το εμφύτευμα έτσι ώστε να μην υπάρχει μηχανική καταπόνηση ούτε του βιοαισθητήρα κατά την κίνηση του ατόμου ούτε δυσφορία από τον υπό παρακολούθηση ασθενή. [9]

Το αισθητήριο όργανο των βιοαισθητήρων αρκετές φορές αποτελείται από ένζυμα τα οποία είναι ακινητοποιημένα πάνω σε τρισδιάστατα εκτυπωμένα μέρη. Αλλά η ακινητοποίηση ενζύμων πάνω σε βιοαισθητήρες δεν είναι η μόνη εφαρμογή που βρίσκει η τρισδιάστατη εκτύπωση στην έρευνα. Πλέον με τη χρήση των 3D εκτυπωτών υπάρχει η δυνατότητα κατασκευής πολύπλοκων και λεπτομερών μοντέλων μέσα σε λίγο χρόνο και με οικονομικά μέσα. Δημιουργώντας πολύπλοκα μοντέλα είναι δυνατόν να διερευνηθούν σε βάθος και με μεγαλύτερη ακρίβεια πολύπλοκα ζητήματα της βιολογίας και όχι μόνο. Η κατασκευή αντιδραστήρων με χρήση της μικρορευστομηχανικής έχει επίσης επιτευχθεί μέσω της τρισδιάστατης εκτύπωσης. Συγκεκριμένα είναι δυνατό να κατασκευαστούν συστήματα micro-meso-milli-fluidics. Επιπλέον έγινε δυνατή η ενσωμάτωση σε αυτά τα συστήματα βοηθητικού εξοπλισμού όπως βαλβίδες και δοχεία συλλογής. Ενώ όλα αυτά μπορούν να τροποποιηθούν ελεύθερα και να κατασκευαστούν μέσα σε λίγα λεπτά κάνοντας την ερευνητική διαδικασία πιο άμεση και με μικρότερες χρονικές δαπάνες. [9,13]

1.2 ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ

Τα ένζυμα αποτελούν πολύτιμο εργαλείο για τη σύγχρονη βιομηχανία. Τα ένζυμα έχουν την ικανότητα να δρουν ως καταλύτες σε ποικίλες αντιδράσεις. Αυτό σημαίνει ότι δεν επηρεάζουν τη στοιχειομετρία της αντίδρασης, απλά επιταχύνουν την επίτευξη της ισορροπίας. Σε σύγκριση με τους συμβατικούς καταλύτες όπως η πλατίνα ή το παλλάδιο, τα ένζυμα παρέχουν πολύ σημαντικά πλεονεκτήματα. Συγκεκριμένα τα ένζυμα επιδεικνύουν ειδικότητα στο είδος της αντίδρασης που θα καταλύσουν και υπάρχει δυνατότητα αυστηρής εκλεκτικότητας υποστρωμάτων, συνεπώς μειώνονται οι πιθανότητες δημιουργίας δευτερευόντων προϊόντων. Τα ένζυμα επίσης έχουν τη δυνατότητα να δρουν σε ήπιες συνθήκες κάτι που μπορεί να μειώσει δραστικά το οικονομικό κόστος μιας διαδικασίας. Τα ένζυμα είναι κατασκευασμένα από τα ίδια μόρια από τα οποία αποτελείται όλη η ζωή στον πλανήτη συνεπώς επιδεικνύουν μια προφανή συμβατότητα με τους οργανισμούς και εν συνέχεια δεν είναι τοξικά για τον οργανισμό όπως ενδεχομένως άλλες ενώσεις που δρουν σαν καταλύτες. Μέχρι πολύ πρόσφατα όμως η χρήση των ενζύμων στην βιομηχανία ήταν περιορισμένη. Αυτό συνέβαινε καθώς τα ένζυμα είναι δύσκολο να απομονωθούν, δεν έχουν δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης και το εύρος των συνθήκων στο οποίο μπορούν να δράσουν είναι περιορισμένο. Όμως η λύση σε αυτά τα προβλήματα ήρθε με την ακινητοποίηση τους σε μήτρες.[14]

1.2.1 Πλεονεκτήματα ακινητοποίησης

Η ακινητοποίηση ενζύμων είναι μια διαδικασία κατά την οποία ποσότητα ενζύμου συνδέεται ομοιοπολικά ή με ασθενείς αλληλεπιδράσεις, πάνω σε μια μήτρα. Η μήτρα έχει συνήθως ιδιότητες που μας επιτρέπουν να την διαχωρίσουμε από υδατικά ή μη διαλύματα αναλόγως τη φύση της μήτρας. Έτσι γίνεται δυνατή η επαναχρησιμοποίηση του ενζύμου για πολλούς κύκλους αντιδράσεων, συνεπώς η συγκέντρωση του ενζύμου που απαιτείται για την πραγματοποίηση μιας αντίδρασης ελαττώνεται σημαντικά ενώ παράλληλα μειώνεται το κόστος της κάθε αντίδρασης στην οποία γίνεται κατάλυση με τη χρήση ενζύμου. Κατά την ακινητοποίηση το ένζυμο δεσμεύεται στην επιφάνεια της μήτρας. Σε κάποιες περιπτώσεις οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ τους είναι αρκετές για να σταθεροποιήσουν το ένζυμο και να αποτρέψουν τη μετουσίωση του ενώ παράλληλα δεν περιορίζουν σημαντικά τη δράση του. Σε τέτοιες περιπτώσεις παρατηρείται αύξηση του εύρους συνθήκων στις οποίες μπορεί να δράσει το ένζυμο. [14,15] Πλέον είναι δυνατή η αξιοποίηση των γνώσεων στην ακινητοποίηση των ενζύμων έτσι ώστε να μεταβάλλονται οι ιδιότητες ενός ενζύμου προς την επιθυμητή κατεύθυνση. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η χρήση πολυηλεκτρολυτών οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να αλλάζουν το εύρος δράσης ενός ενζύμου όσον αφορά το pH. Οι πολυηλεκτρολύτες είναι πολλαπλά φορτισμένα μόρια τα οποία μπορούν να αλλάξουν το μικροπεριβάλλον ενός ενζύμου απελευθερώνοντας ή δεσμεύοντας πρωτόνια. [16]

1.2.2 Μέθοδοι ακινητοποίησης

Οι μέθοδοι ακινητοποίησης μπορούν να χωριστούν σε δυο μεγάλες κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία αφορά μεθόδους οι οποίες έχουν σκοπό τη διατήρηση της δομής του ενζύμου έτσι ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη καταλυτική ισχύς. Αυτές οι μέθοδοι δεν επιδιώκουν την δημιουργία ισχυρών δεσμών ή αλληλεπιδράσεων με τα ένζυμα και συνήθως η συγκράτηση τους είναι ασθενής και ονομάζεται φυσική ακινητοποίηση. Η δεύτερη κατηγορία αφορά τη χημική σύνδεση και είναι πιο επεμβατική προς το ένζυμο. Ανάλογα την μέθοδο μπορεί να δημιουργηθεί ομοιοπολικός δεσμός, ετεροπολικός δεσμός αλλά και πιο ασθενείς αλληλεπιδράσεις όπως υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ή δεσμοί υδρογόνου.

<u>Α. Φυσική ακινητοποίηση</u>

Η φυσική ακινητοποίηση έχει ως στόχο τον περιορισμό του ενζύμου μέσα σε δομές που το προστατεύουν από αλλαγές του περιβάλλοντος του. Αυτό μπορεί να γίνει με την μέθοδο του εγκλωβισμού στην οποία τα ένζυμα είναι άτακτα κατανεμημένα. Μια πιο ομοιόμορφη κατανομή μπορεί να επιτευχθεί μέσω την μεθόδου της ενθυλάκωσης.

<u>Εγκλωβισμός</u>

Για τον εγκλωβισμό, ως μήτρες χρησιμοποιούνται ενώσεις οι οποίες μπορούν να πολυμεριστούν. Το ένζυμο προστίθεται κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού με αποτέλεσμα να εγκλωβιστεί μέσα στο πλέγμα πολυμερούς το οποίο δημιουργείται. Κοινά πολυμερή που χρησιμοποιούνται σε αυτή την μέθοδο είναι το ακρυλαμίδιο, η χιτίνη και το αλγινικό οξύ. Πλεονέκτημα αυτής μεθόδου είναι ότι επιτρέπει τη φόρτωση μεγάλης ποσότητας ενζύμου, ενώ πρόκληση αποτελεί η συγκράτηση του ενζύμου μέσα στο πλέγμα του πολυμερούς το ενεργό κέντρο του ενζύμου.

<u>Ενθυλάκωση</u>

Η ενθυλάκωση είναι μια μέθοδος στην οποία το ένζυμο περιορίζεται με έναν οργανωμένο τρόπο στο εσωτερικό μιας ημιπερατής μεμβράνης από την οποία δεν μπορεί να περάσει το ένζυμο αλλά τα υποστρώματα μπορούν να την διαπεράσουν ελεύθερα. Για την τεχνική αυτή έχουν χρησιμοποιηθεί φωσφολιπίδια, νανοσωματίδια και κάποια πολυμερή. Η ενθυλάκωση μπορεί να βελτιώσει την σταθερότητα των ενζύμων ενώ έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για εφαρμογές που απαιτούν την χρήση ενζύμων σε μη συμβατικά συστήματα ή συστήματα στα οποία το υπόστρωμα περιέχεται μέσα σε κάποιον οργανικό διαλύτη. Μειονέκτημα της μεθόδου είναι η ευαισθησία των δομών που δημιουργούνται.

<u>Προσρόφηση</u>

Η προσρόφηση είναι μια μέθοδος ακινητοποίησης η οποία βασίζεται σε αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις. Τέτοιες αλληλεπιδράσεις μπορεί να είναι αλληλεπιδράσεις ανταλλαγής ιόντος ή υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Κατά τη μέθοδο αυτή, απλή ανάμειξη του ενζύμου και της μήτρας υπό κατάλληλες συνθήκες είναι ικανή για την πραγματοποίηση της ακινητοποίησης. Γι' αυτό και αυτή η μέθοδος χαρακτηρίζεται και ως η πιο εύκολη. Η τεχνική αυτή χαρακτηρίζεται ως οικονομική ενώ δε δημιουργεί χημικές αλλαγές στο ένζυμο ή στη μήτρα, επομένως η μήτρα μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί και το ένζυμο δεν χάνει την δραστικότητα του. Παρόλα αυτά η τεχνική αυτή έχει αρκετά μειονεκτήματα. Λόγω των ασθενών αλληλεπιδράσεων στις οποίες βασίζεται η τεχνική, το ένζυμο τείνει να αποκολλάται από τη μήτρα οπότε χάνεται η καταλυτική ιδιότητα του σκευάσματος. Παράλληλα, μπορεί να γίνει μόλυνση του προϊόντος με ένζυμο καθώς αυτό αποκολλάται από τη μήτρα. Αν και δε γίνεται κάποια αλλαγή στη δομή του ενζύμου, είναι πιθανό να δημιουργείται στερεοχημική παρεμπόδιση της κίνησης του ενζύμου και συνεπώς η δραστικότητα του να μειωθεί.

<u>B) Χημική ακινητοποίηση</u>

Η χημική ακινητοποίηση βασίζεται σε χημικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ενζύμου και της μήτρας ακινητοποίησης. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μπορούν να είναι αντιστρεπτές ή μη αντιστρεπτές. Αντιστρεπτές αντιδράσεις θεωρούνται αυτές που υπό συγκεκριμένες περιβαλλοντικές συνθήκες το ένζυμο μπορεί να αποκολληθεί από τη μήτρα ενώ μη αντιστρεπτές αυτές που η σύνδεση είναι τόσο ισχυρή ώστε αυτό καθίσταται αδύνατο με απλή αλλαγή των συνθήκων του περιβάλλοντος.

Ομοιοπολική ακινητοποίηση

Η ομοιοπολική ακινητοποίηση περιλαμβάνει τη δημιουργία ενός ομοιοπολικού δεσμού αναμεσά στο ένζυμο και τη μήτρα ή αλλά ένζυμα. Ενώ η συγκεκριμένη τεχνική δεν έχει σημαντικές διαρροές ενζύμου, είναι πιθανό η αλλαγή που επέρχεται στη δομή του ενζύμου να μειώσει την καταλυτική του ικανότητα. Η ομοιοπολική σύνδεση του ενζύμου φαίνεται να παρέχει μεγάλη σταθερότητα έναντι της μετουσίωσης λόγω θερμότητας και συνήθως η διευθέτηση με την οποία θα ακινητοποιηθεί το ένζυμο είναι προβλέψιμη. Μειονέκτημα αυτή της τεχνικής είναι το μεγάλο κόστος για τη χρήση της λόγω των αντιδραστηρίων που απαιτούνται για τη δημιουργία του δεσμού.[14,15]



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση της κατηγοριοποίησης των τεχνικών ακινητοποίησης.[17]

1.2.3 Καταρράκτες αντιδράσεων

Κατά την παρασκευή πολλών προϊόντων στη βιομηχανία απαιτούνται στις περισσότερες περιπτώσεις παραπάνω από μια αντιδράσεις για να μεταβούμε από την πρώτη ύλη στο τελικό προϊόν. Αυτό συνεπάγεται τη χρήση πολλών αντιδραστηρίων και μεγάλη δαπάνη χώρου και χρόνου, καθώς για να επιτευχθεί η κάθε αντίδραση απαιτούνται ακριβώς καθορισμένες συνθήκες οι οποίες μπορεί να διαφέρουν για κάθε μια από αυτές. Επιπλέον, μετά από κάθε στάδιο είναι απαραίτητη η απομόνωση των ενδιάμεσων προϊόντων και ο διαχωρισμός τους έτσι ώστε να μπορέσει να συνεχίσει η διαδικασία. Γι' αυτόν τον λόγο, σε περιπτώσεις όπου είναι απαραίτητη η χρήση πολλών ενζύμων έχουν αναπτυχθεί τεχνικές όπου όλα τα βήματα της αντίδρασης πραγματοποιούνται σε ένα στάδιο. Αυτό επιτρέπει την ελάττωση του χώρου αλλά και του χρόνου που απαιτείται για να ολοκληρωθεί η διαδικασία καθώς ελαττώνεται η ποσότητα αντιδραστηρίων που απαιτούνται για την ολοκλήρωση της αφού όλα τα στάδια πραγματοποιούνται σε μια πειραματική διαδικασία. Οι τεχνικές αυτές μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες σύμφωνα με τον τρόπο οργάνωσης των ακινητοποιημένων ενζύμων πάνω στον φορέα τους. Η πιο απλή εξ αυτών είναι η τυχαία συνακινητοποίηση η οποία χαρακτηρίζεται από τυχαία ακινητοποίηση των ενζύμων πάνω στον φορέα. Η δεύτερη τεχνική είναι η κατευθυνόμενη συνακινητοποίηση όπου τα ένζυμα ακινητοποιούνται πάνω στον φορέα με συγκεκριμένη σειρά ή διευθέτηση και αποσκοπεί στην αποτελεσματικότερη διοχέτευση των ενδιάμεσων προϊόντων από το ένα ένζυμο στο επόμενο. Τέλος η τρίτη τεχνική ονομάζεται διαμερισματοποίηση. Το χαρακτηριστικό αυτής της τεχνικής είναι ο διαχωρισμός των ακινητοποιημένων ενζύμων σε διακριτούς χώρους όπως ακριβώς γίνεται και μέσα στα κύτταρα. [18,19]

Κάθε μια από τις τεχνικές αυτές έχει τα πλεονεκτήματα της καθώς και τα μειονεκτήματα της. Η τεχνική της τυχαίας συνακινητοποίησης όπως αναφέρθηκε νωρίτερα έχει το πλεονέκτημα της απλότητας κάνοντας πιο εύκολη τη διαδικασία ακινητοποίησης. Όμως ο προσδιορισμός των κατάλληλων συνθήκων και της βέλτιστης αναλογίας των ενζύμων είναι δύσκολος και χρονοβόρος ενώ υπάρχει ο κίνδυνος μη θεμιτών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των ενζύμων καθώς και φαινόμενα περιορισμού της διάχυσης και εγκλωβισμού των μικρών ενζύμων στο εσωτερικό της μήτρας από μεγαλύτερα σε μέγεθος ένζυμα. Τα δυο τελευταία μειονεκτήματα έρχεται να διορθώσει η τεχνική της κατευθυνόμενης ακινητοποίησης η οποία καθιστά δυνατή την τοποθέτηση των ενζύμων με συγκεκριμένη διευθέτηση. Έτσι αποφεύγεται ο εγκλωβισμός των μικρών ενζύμων. Παράλληλα, ακινητοποιώντας τα ένζυμα με συγκεκριμένη σειρά δημιουργείται μια νοητή ροή ενδιάμεσων προϊόντων από το προηγούμενο ένζυμο στο επόμενο, με λογική σειρά ανάλογη της πειραματικής διάταξης που χρησιμοποιείται. Από την άλλη μεριά, η κατευθυνόμενη συνακινητοποίηση είναι μια χρονοβόρα, πολύπλοκη και ακριβή διαδικασία ενώ παράλληλα παραμένει το ζήτημα του προσδιορισμού κατάλληλων συνθήκων για όλα τα ένζυμα.[18,20–22] Η διαμερισματοποίηση μας επιτρέπει να εφαρμόζουμε τις κατάλληλες συνθήκες για κάθε ένζυμο ευκολότερα καθώς τα ένζυμα είναι ακινητοποιημένα σε διακριτά χωρικά σύνολα. Η μεταφορά των προϊόντων γίνεται με την βοήθεια ροής και συνεπώς αποτρέπονται φαινόμενα περιορισμού της διάχυσης και ελαττώνονται τα φαινόμενα απενεργοποίησης των ενζύμων από τα προϊόντα τους καθώς αυτά απομακρύνονται μέσω της ροής. [19]

1.2.4 Εφαρμογές των ακινητοποιημένων ενζύμων

Τα ένζυμα είναι πλέον ένα ευρέως διαδεδομένο εργαλείο στη βιομηχανία το οποίο παρέχει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις αντίστοιχες χημικές μεθόδους. Παρόλα αυτά τα ένζυμα δεν είναι από μόνα τους αρκετά σταθερά για να αντέξουν πολλαπλούς κύκλους αντίδρασης. Η συνεχής αντικατάσταση τους ανεβάζει το κόστος παραγωγής και συνεπώς η τεχνική αυτή γίνεται λιγότερο ανταγωνιστική. Τα ακινητοποιημένα ένζυμα από την άλλη παρουσιάζουν μεγαλύτερη σταθερότητα κατά την επαναχρησιμοποίηση και σε ορισμένες περιπτώσεις κάνουν δυνατή την χρήση των ενζύμων σε συνθήκες που δεν θα ήταν δυνατό εάν βρισκόντουσαν στην ελεύθερη μορφή τους. Επομένως στις βιομηχανίες που είναι δυνατή η αντικατάσταση των ελεύθερων ενζύμων με τα αντίστοιχα ακινητοποιημένα ένζυμα, τα τελευταία προτιμώνται.[15,23-25] Συγκεκριμένα, πεδία τα οποία εφαρμόζουν την χρήση των ακινητοποιημένων ενζύμων σε μεγάλο βαθμό για τη βελτίωση των προϊόντων τους, είναι η βιομηχανία τροφίμων, καθαριστικών, η υφασματοβιομηχανία.[23,24,26] Ειδικότερα η βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιεί τα ακινητοποιημένα ένζυμα για να απομακρύνει ανεπιθύμητες ενώσεις από τα τρόφιμα ή να ενισχύσει την γεύση και την οσμή τους. Στην υφασματοβιομηχανία γίνεται κατεργασία με ένζυμα για να βελτιωθεί η ποιότητα των υφασμάτων και να αποφευχθεί η συρρίκνωση τους. [26]

Εκτός από την βελτίωση της ποιότητας των προϊόντων τα ακινητοποιημένα ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να μειωθεί η ρύπανση που προκαλείται από τα απορρίμματα των βιομηχανιών. Συγκεκριμένα ακινητοποιημένα ένζυμα έχουν χρησιμοποιηθεί για την αφαίρεση φαινικών ενώσεων και βαφών από υδατικά διαλύματα. [24]

Σημαντική είναι η συνεισφορά των ακινητοποιημένων ενζύμων στην ιατρική και την έρευνα. Τα ένζυμα πολλές φορές αποτελούν το λειτουργικό στοιχείο των βιοαισθητήρων. Η ακινητοποίηση τους είναι τόσο σημαντική για τη λειτουργία του όσο και για τη διατήρηση της καθώς τα ένζυμα πρέπει να παραμένουν ακινητοποιημένα σε συγκεκριμένες θέσεις ή με συγκεκριμένη σειρά ενώ η κατάσταση τους πρέπει να παραμένει όσο το δυνατόν πιο άρτια για μεγάλα χρονικά διαστήματα. Στην έρευνα τα ακινητοποιημένα ένζυμα μας επιτρέπουν να κατασκευάζουμε με ασφάλεια ενώσεις ενδιαφέροντος.[25]

1.3 ΡΕΥΣΤΟΜΗΧΑΝΙΚΗ (FLUIDICS)

1.3.1 Εισαγωγή στη ρευστομηχανική

Η μικρορευστομηχανική αναφέρεται στη διαχείριση μικρών ποσοτήτων ρευστών όγκου τυπικά μικρότερου του 1 μl. Η διαχείριση αυτή συνήθως γίνεται με σωλήνες διαμέτρου από ενός χιλιοστού του μέτρου έως μερικών μικρομέτρων.[27] Ανάλογα με τη διάμετρο, ο αντιδραστήρας που παράγεται κατατάσσεται σε μια από τρεις κατηγορίες: οι αντιδραστήρες με διάμετρο μεγαλύτερη του 1 mm ανήκουν στην κατηγορία των millifluidics, με διάμετρο από 1-0.5 mm ανήκουν στα mesofluidics, και με διάμετρο μικρότερη του 0.5 mm ανήκουν στο microfluidics. Κάθε κατηγορία συνοδεύεται από αλλαγές στις ιδιότητες των ρευστών και αλλαγή στη συμπεριφορά τους όσον αφορά τα φαινόμενα διάχυσης, τη ροή, και τη διαβάθμιση των προϊόντων. [28]

1.3.2 Μικροαντιδραστήρες

Ανάλογα τον σκοπό τους, οι μικροαντιδραστήρες μπορούν να απαντηθούν σε πολλές μορφές. Συγκεκριμένα, η συσκευή μπορεί να είναι κατασκευασμένη από ποικιλία υλικών αναμεσά σε αυτά είναι το γυαλί, η σιλικόνη, μέταλλα, πολυμερή και κεραμικά. Κάθε ένα υλικό από αυτά παρουσιάζει διαφορετικά πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα. Για παράδειγμα τα πολυμερή ενώ έχουν το πλεονέκτημα του μικρού κόστους και της ποικιλίας τεχνικών για τη δημιουργία τους, υστερούν στον έλεγχο της θερμοκρασίας και την ανθεκτικότητα τους σε οργανικούς διαλυτές. Από την άλλη μεριά οι μικροαντιδραστήρες κεραμικών ενώ αντιμετωπίζουν καλά τα μειονεκτήματα των μικροαντιδραστήρων πολυμερών υστερούν στο γεγονός ότι η κατασκευή τους είναι κοστοβόρα και η διαδικασία κρατάει για μεγάλο χρονικό διάστημα[27,29,30]. Αναλυτικά στοιχεία για όλα τα υλικά παρατίθενται στον Πίνακα 1.

Υλικό	Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Μέταλλα	Ευκολία κατασκευής μικροαντιδραστήρων	Έλλειψη διαυγείας
	Καλά μηχανικά χαρακτηριστικά	Μη Βιοσυμβατά
	Χαμηλό κόστος	
Σιλικόνη	Καλή αντοχή στην θερμοκρασία και σε χημικά	Έλλειψη διαυγείας
	Βιοσυμβατά	Εύθραυστη
	Εύκολη αποστείρωση	Υψηλό κόστος
Γυαλί	Βιοσυμβατό	Δυσκολία κατασκευής μικροαντιδραστήρων
	Καλή αντοχή στην θερμοκρασία και σε χημικά	
	Διαύγεια	
	Χαμηλή τιμή	
Κεραμικά	Καλή αντοχή στην θερμοκρασία και σε χημικά	Χρονοβόρα διαδικασία παραγωγής
		Εύθραυστα
Πολυμερή	Χαμηλό κόστος	Κακή συμβατότητα με οργανικούς διαλυτές
	Ευκολία κατασκευής μικροαντιδραστήρων	Κακή μεταφορά θερμότητας
	Καλά μηχανικά χαρακτηριστικά	

Πίνακας 1. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα υλικών στην δημιουργία μικροαντιδραστήρων

Εκτός από το υλικό, οι μικροαντιδραστήρες μπορούν να διαφέρουν και στην αρχιτεκτονική τους. Το σχήμα του καναλιού μπορεί να έχει πολυάριθμες διαμορφώσεις αλλά οι πιο συχνά συναντώμενες είναι η γραμμική, η ελικοειδής και η στροβιλοειδής.[31] Η γραμμική διαμόρφωση είναι η πιο εύκολη ως προς την κατασκευή της και συνήθως χρησιμοποιείται με δύσκολα ως προς την επεξεργασία τους υλικά. Από την άλλη, σε υλικά τα οποία επιτρέπουν πολύπλοκες διατάξεις η ελικοειδής διαμόρφωση εξυπηρετεί στην εξοικονόμηση χώρου, ενώ η στροβιλοειδής στην ανάδευση του διαλύματος στο εσωτερικό του καναλιού. Υψίστης σημασίας είναι η διαμόρφωση του εσωτερικού του καναλιού. Το εσωτερικό των καναλιών μπορεί να είναι γυμνό, με επιφανειακές τροποποιήσεις, πακτωμένο και μονολιθικό. Τα γυμνά κανάλια δεν έχουν καμία παρέμβαση στην δομή τους και επί το πλείστων αποτελούνται από το υλικό το οποίο κατασκευάστηκε ο μικροαντιδραστήρας. Τα ένζυμα μπορούν να βρίσκονται σε ελεύθερη μορφή, ενκαψυλιωμένα ή ακινητοποιημένα στα τοιχώματα του καναλιού. Τα κανάλια με επιφανειακές τροποποιήσεις είναι μια απευθείας εξέλιξη των γυμνών καναλιών και με σκοπό την αύξηση της επιφανείας του καναλιού σε σχέση με τον όγκο του διαλείμματος που διαρρέει, εισήχθησαν μοτίβα όπως κυματισμοί ή στύλοι στη δομή του καναλιού. Αυτή η διαμόρφωση, αν και επιτυγχάνει την αύξηση της επιφάνειας, είναι μια ακριβή και περίπλοκη μέθοδος. Ακόμα μεγαλύτερο λόγο επιφάνειας όγκου παρουσιάζουν τα πακτωμένα κανάλια τα οποία βασίζονται στην ακινητοποίηση ενζύμων σε φυσικούς φορείς ενώ παράλληλα μειώνεται η κρίσιμη απόσταση διάχυσης των ενώσεων και διευκολύνουν την μεταφορά μάζας. Παρόλα αυτά, αυξάνουν σημαντικά τις αντιστάσεις των ρευστών μέσα στον μικροαντιδραστήρα. Το μειονέκτημα αυτό αντιμετωπίζουν οι μονολιθικοί αντιδραστήρες οπού το εσωτερικό των καναλιών αποτελείται από πορώδες υλικό το οποίο αυξάνει τον λόγο επιφάνειας προς όγκο ενώ αποτρέπει έως έναν βαθμό την αύξηση της πίεσης του μικροαντιδραστήρα.

Είναι σημαντικό να αναφερθεί ότι το σύστημα ροής μπορεί να αποτελείται από δυο η παραπάνω φάσεις. Οι φάσεις αυτές μπορεί να είναι αέρια-υγρή και υγρή-υγρή με οργανικούς ή μη διαλύτες. Τέλος οι μικροαντιδραστήρες μπορεί να περιέχουν αισθητήρες συσκευές ανάμειξης ή βαλβίδες ή άλλα λειτουργικά στοιχεία που προσφέρουν ευελιξία στον σχεδιασμό τους.[32]

1.3.3 Πλεονεκτήματα μικροαντιδραστήρων

Οι μικροαντιδραστήρες είναι ένα σημαντικό εργαλείο για την έρευνα αλλά και για την βιομηχανία. Τα πλεονεκτήματα που προσφέρει σε σχέση με τις μάκρο-τεχνικές είναι καίριας σημασίας για πολλές διεργασίες που αλλιώς θα ήταν ασύμφορες ή αδύνατες. Συγκεκριμένα οι μικροαντιδραστήρες έχουν εξαιρετική ευελιξία όσον αφορά τον πειραματικό μηχανισμό. Έχουν μικρές διαστάσεις και βάρος γεγονός που κάνει εύκολη τη μετακίνηση και την τοποθέτηση. Ο εξοπλισμός που απαιτείται για τη χρήση των μικροαντιδραστήρων είναι επίσης ευέλικτος και οικονομικός. Επιπροσθέτως οι μικροαντιδραστήρες έχουν τη δυνατότητα σύνδεσης με διαφορετικές συστοιχίες και όργανα που επιτρέπουν πιο ελεύθερο και ολοκληρωμένο σχεδιασμό της αντίδρασης.

Ένα άλλο πλεονέκτημα των μικροαντιδραστήρων είναι ο υψηλός λόγος επιφάνειας προς όγκο ο οποίος κάνει δυνατή την αποτελεσματικότερη μεταφορά ενέργειας και μάζας στο εσωτερικό του αντιδραστήρα. Σε συνδυασμό με τη στρωτή ροή που επικρατεί τις περισσότερες φορές στους μικροαντιδραστήρες μπορεί να επιτευχθούν υψηλά ποσοστά απόδοσης της αντίδρασης σε μικρό χρόνο παραμονής μέσα στον αντιδραστήρα. Τέλος λόγο των παραπάνω η ποσότητα αντιδραστηρίων η οποία απαιτείται για την λειτουργία των μικροαντιδραστήρων είναι πολύ μικρή με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται εξοικονόμηση υλικών και οικονομικών πόρων. Μειονέκτημα των μικροαντιδραστήρων αποτελεί η δύσκολη διαδικασία κλιμάκωσης των αντιδράσεων καθώς και το μεγάλο κόστος παραγωγής των μικροαντιδραστήρων. [30,33,34]

1.3.4 Εφαρμογές μικροαντιδραστήρων

Η μικρορευστομηχανική και συνεπώς και οι αντιδραστήρες που εκμεταλλεύονται τις ιδιότητες της έχουν ήδη βρει αρκετές εφαρμογές τόσο στον τομέα της έρευνας όσο και στην βιομηχανία, ιατρική και την φαρμακευτική. Στον ερευνητικό τομέα οι πιο αξιόλογες και διαδεδομένες εφαρμογές είναι αυτές που ασχολούνται με τον έλεγχο υψηλής απόδοσης (high throughput screening) οι οποίες αξιοποιούν τις ιδιότητες της μικρορευστομηχανικής για να ταυτοποιήσουν με ακρίβεια βιομόρια στόχους.[35] Ένα μεγάλο πρόβλημα που αντιμετωπίζει η βιοτεχνολογία είναι η απομόνωση μορίων. Η μικρορευστομηχανική έχει βρει εφαρμογή και πάνω σε αυτό το πεδίο καθώς μπορεί να επιτευχθεί απομόνωση μορίων με συστήματα δυο διαλυτών ή μικροδιήθηση.[30]

Στη φαρμακοβιομηχανία, συστήματα μικρορευστομηχανικής προτιμώνται για την διεξαγωγή αντιδράσεων καθώς σε τέτοια συστήματα έχει παρατηρηθεί μεγαλύτερη απόδοση, εκλεκτικότητα και καθαρότητα στα παραγόμενα διαλύματα. Το γεγονός αυτό καθιστά τα συστήματα ρευστομηχανικής ένα πολύ σημαντικό εργαλείο για την ανακάλυψη

φαρμάκων.[29,30] Η δοκιμή των φαρμάκων επίσης επωφελείται από τα συστήματα αυτά και με την κατάλληλη συστοιχία μπορεί να προσομοιωθεί με μεγάλη ακρίβεια η αλληλεπίδραση ενός φαρμάκου με ζωντανά ή νεκρά κύτταρα. Παρόμοιες τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη μελέτη της ανάπτυξης και της αλληλεπίδρασης με το περιβάλλον τους, μεμονωμένων κυττάρων, δίνοντας τους συγκεκριμένα ερεθίσματα και υποβάλλοντας τα σε διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες.[33,35] Στον τομέα της ιατρικής τα συστήματα αυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν για διαγνωστικούς αλλά και θεραπευτικούς σκοπούς. Μεγάλος όγκος βιοαισθητήρων έχει σχεδιαστεί με κύριο δομικό τους στοιχείο τέτοια συστήματα. Οι βιοαισθητήρες αυτοί μπορούν να είναι οπτικοί ή αμπερομετρικοί ενώ έχουν τη δυνατότητα να εκμεταλλεύονται τις ιδιότητες ποικίλων βιομορίων για να επιτύχουν την ανίχνευση και τη σηματοδότηση του βιοαισθητήρα. Στο θεραπευτικό μέρος της ιατρικής, η μικρορευστομηχανική χρησιμοποιείται για τη χορήγηση φαρμάκων με ελεγχόμενο τρόπο. Τα συστήματα μικρορευστομηχανικής επιτρέπουν τον έλεγχο της ροής αλλά και τη διάρκεια της, εξασφαλίζοντας συνεχή και ακριβή χορήγηση του φαρμάκου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση των ανεπιθύμητων ενεργειών.[27] Τέλος τα συστήματα της ρευστομηχανικής έχουν χρησιμοποιηθεί με ποικίλους τρόπους και μεθοδολογίες για την παραγωγή νανοϋλικών. [36]

1.4 ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

Οι βιοαισθητήρες είναι συσκευές που έχουν σκοπό την ανίχνευση ενός μορίου σε βιολογικά υγρά και αέρια. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την μετατροπή του βιολογικού σήματος σε οπτικό ή ηλεκτρικό σήμα. Ένας βιοαισθητήρας αποτελείται κυρίως από έναν διαλογέα, ένα μετατροπέα, ένα ανιχνευτή και μια μέθοδο αλληλεπίδρασης με τον χρήστη.[37] Η μετατροπή του σήματος συμβαίνει με τη βοήθεια του μετατροπέα της συσκευής το οποίο μπορεί να είναι ένα ένζυμο, ένα απταμερές νουκλεοτίδιο, αντισώματα ή ακόμα και ολόκληρα κύτταρα[38]. Το σήμα που παράγεται από το βιοδραστικό στοιχείο συλλέγεται από έναν αναλύτη ο οποίος μετράει το σήμα και το τροφοδοτεί μέσω της μεθόδου αλληλεπίδρασης στον χρήστη. Για να μπορέσει να λειτουργήσει ένας βιοαισθητήρας σωστά πρέπει να είναι εκλεκτικός και ευαίσθητος. Αυτό κυρίως εξαρτάται από τον διαλογέα ο οποίος επιλέγει ποια σήματα θα διαβιβάσει στον μετατροπέα. Σε κάποιες περιπτώσεις ο μετατροπέας μπορεί να λειτουργήσει και ως διαλογέας, όπως στην περίπτωση των ενζύμων που έχουν την δυνατότητα και εκλεκτικής αλληλεπίδρασης με συγκεκριμένα μόρια και μπορούν να μετατρέψουν το χημικό σήμα που λαμβάνουν σε άλλες μορφές μέσω χημικών αντιδράσεων. Για να μπορέσει να εξυπηρετήσει τον σκοπό του ένας βιοαισθητήρας πρέπει να πληροί κάποιες προϋποθέσεις. Οι προϋποθέσεις αυτές αναφέρονται στη λειτουργικότητα του βιοαισθητήρα και την εκάστοτε εφαρμογή, αλλά συνήθως αναφερόμαστε σε αυτές με 4 χαρακτηριστικά. Το πιο σημαντικό εξ αυτών είναι η εκλεκτικότητα δηλαδή η ικανότητα του βιοαισθητήρα να ξεχωρίζει ανάμεσα σε άλλες πανομοιότυπες ενώσεις το μόριο το οποίο θέλουμε να ανιχνεύσουμε χωρίς να παράγει σφάλματα. Παρόλα αυτά, σε πολύ μεγάλες ή μικρές συγκεντρώσεις αναλύτη είναι πιθανό να υπάρχουν σφάλματα, οπότε πρέπει πάντα να προσδιορίζεται το δεύτερο σημαντικό χαρακτηριστικό που είναι η ευαισθησία του βιοαισθητήρα, δηλαδή το εύρος στο οποίο ο βιοαισθητήρας είναι ικανός να αναγνωρίζει την παρουσία του αναλύτη χωρίς να κάνει σφάλματα. Σε πολλές περιπτώσεις, οι βιοαισθητήρες καλούνται να ποσοτικοποιήσουν τον αναλύτη. Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι ιδιαίτερα σημαντικό το κατά πόσο ο βιοαισθητήρας παράγει το ίδιο σήμα για την ίδια ποσότητα αναλύτη. Αυτό το χαρακτηριστικό ονομάζεται επαναληψιμότητα. Τέλος, είναι επίσης σημαντικό να αναφερθεί ότι οι βιοαισθητήρες περιέχουν μόρια τα οποία μπορούν να υποστούν αλλοίωση και συνεπώς να χάσουν την λειτουργικότητα τους. Η ικανότητα του βιοαισθητήρα να παραμένει λειτουργικός και αξιόπιστος σε συγκεκριμένες συνθήκες χρήσης ή αποθήκευσης χαρακτηρίζεται από τη σταθερότητα του. [39]

1.4.1 Τύποι βιοαισθητήρων

Αν και όλοι οι βιοαισθητήρες μοιράζονται τα παραπάνω χαρακτηριστικά, η λογική της λειτουργίας τους μπορεί να διαφέρει πολύ. Από τον διαλογέα έως και τη διεπαφή με τον χρήστη μπορούν να εφαρμοστούν πληθώρα τεχνικών δημιουργώντας έτσι μια μεγάλη ποικιλία βιοαισθητήρων που διαφέρουν μεταξύ τους αλλά μοιράζονται και αρκετά κοινά σημεία. Ο κύριος τρόπος κατηγοριοποίησης των βιοαισθητήρων είναι με βάση τον τύπο του μετατροπέα, και πιο συγκεκριμένα, σε ποια μορφή μετατρέπει το χημικό σήμα που λαμβάνει από τον διαλογέα. Συνεπώς οι βιοαισθητηρες χωρίζονται σε 3 κύριες κατηγορίες: τους ηλεκτροχημικούς, τους οπτικούς και τους βιοαισθητήρες μάζας.

<u>Οπτικοί βιοαισθητήρες</u>

Οι οπτικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στη μετατροπή του χημικού σήματος σε οπτικό. Ένας τυπικός αισθητήρας αυτού του τύπου συμπεριλαμβάνει μια πηγή φωτός, έναν διαλογέα, έναν μετατροπέα, έναν μεταφορέα οπτικού σήματος, έναν ανιχνευτή οπτικού σήματος και ένα σύστημα διεπαφής. Ανάλογα με τον τύπο του μεταφορέα, οι οπτικοί βιοαισθητήρες χωρίζονται σε οπτικών ινών, επιφανειακού πλασμονικού συντονισμού και Raman. Οι οπτικοί βιοαισθητήρες έχουν το πλεονέκτημα ότι μπορούν να περιγράψουν και ασθενείς αλληλεπιδράσεις, όπως την πρόσδεση ενός μορίου πάνω σε ένα άλλο, ενώ παράλληλα δεν επηρεάζονται από ηλεκτρομαγνητικές παρεμποδίσεις καθώς δεν υπάρχουν ροές φορτίων κατά τη διάρκεια της ανίχνευσης του σήματος.

Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες

Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες λειτουργούν μετατρέποντας το χημικό σήμα σε ηλεκτρικό. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με την κατάλυση οξειδαναγωγικών αντιδράσεων από ένζυμα. Τα αποτέλεσμα της αντίδρασης είναι η δημιουργία ηλεκτρικού ρεύματος το οποίο ανιχνεύεται από ένα ηλεκτρόδιο και ερμηνεύεται από ένα σύνολο ηλεκτρικών κυκλωμάτων και στην συνέχεια παρουσιάζεται μέσω διεπαφής στον χρήστη. Για τη λειτουργία τους απαιτείται επίσης ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς για να μπορεί το δυναμικό να κρατείται σταθερό καθώς και ένα βοηθητικό ηλεκτρόδιο που κλείνει το κύκλωμα και επιτρέπει να περάσει το ηλεκτρικό ρεύμα μέσα σε ένα διάλυμα. Τα πλεονεκτήματα αυτού του τύπου βιοαισθητήρα είναι η γρήγορη απόκριση και το γεγονός ότι δεν περιορίζονται σε διαλύματα που δεν είναι οπτικά ενεργά, όπως οι οπτικοί βιοαισθητήρες.

<u>Βιοαισθητήρες μάζας</u>

Οι βιοαισθητήρες μάζας βασίζονται στην αλλαγή της μάζας του στοιχείου που δρα ως μετατροπέας. Τέτοιου τύπου βιοαισθητήρες είναι οι πιεζοηλεκτρικοί, οι ακουστικοί, οι μαγνητοελαστικοί και οι βιοαισθητήρες μικροστηριγμάτων (Micro cantilever). Το πιο χαρακτηριστικό παράδειγμα τέτοιου τύπου βιοαισθητήρα είναι οι πιεζοηλεκτρικοί βιοαισθητήρες, οι οποίοι αποκρίνονται στην αλλαγή του ρεύματος που περνάει από μέσα τους, παράγοντας μηχανικό στρες και το ανάποδο. Οι πιεζοηλεκτρικοί βιοαισθητήρες μπορούν να συνδυαστούν με αντισώματα και να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές όπου απαιτείται μεγάλη ακρίβεια στην ανίχνευση, όπως στην ανίχνευση σημάτων που σχετίζονται με τον καρκίνο. [39,40]



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση της δομής ενός βιοαισθητήρα [41]

1.4.2 Εφαρμογές βιοαισθητήρων

Εξίσου πολυάριθμες, όπως και οι διαφορετικοί τύποι βιοαισθητήρων, είναι οι εφαρμογές τους. Η ευελιξία στην κατασκευή τους δίνει την δυνατότητα να προσπεραστούν

πολλά εμπόδια στην εφαρμογή τους. Επομένως τα πεδία στα οποία βρίσκουν εφαρμογές οι βιοαισθητήρες είναι πολυάριθμα. [39]



Εικόνα 6 Σχηματική αναπαράσταση εφαρμογών των βιοαισθητήρων [39]

<u>Α. Ιατρική και ανακάλυψη φαρμάκων</u>

Το ενδιαφέρον της έρευνας στην ιατρική έχει κινήσει τον τελευταίο καιρό η δημιουργία φθηνών και εύκολα αντικαταστάσιμων συσκευών τόσο για την διάγνωση όσο και την παρακολούθηση ασθενών. Οι βιοαισθητήρες είναι ένα μεγάλο μέρος αυτής της έρευνας καθώς μπορούν ευκολά να προσαρμοστούν και για τους δυο σκοπούς. Ειδικότερα για το πεδίο της διάγνωσης, οι βιοαισθητήρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη διάγνωση ασθενειών που έχουν ιολογική αιτία ενώ μπορούν να μελετηθεί πλήθος μεταβολιτών που έχουν συσχετιστεί με ασθένεια ή την εμφάνιση της. Επιπλέον, είναι δυνατή η παρακολούθηση μιας σε εξέλιξη ασθένειας με τη μέτρηση της θερμοκρασίας, της αρτηριακής πίεσης και του σφυγμού ενός ασθενούς, αλλά και μεταβολικές όπως γλυκόζη κάλιο, νάτριο κ.α. Οι βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούνται κυρίως για τον σκοπό αυτό είναι βιοαπορροφήσιμοι και μπορούν να εμφυτευθούν στο σώμα του ασθενούς ή να χρησιμοποιηθούν ως φορητοί βιοαισθητήρες. Μια άλλη χρήση των βιοαισθητήρων είναι η δοκιμή φαρμάκων. Γι' αυτή την εφαρμογή χρησιμοποιούνται κατάλληλοι βιοαισθητήρες ώστε να εξακριβωθούν οι στόχοι ενός φαρμάκου δηλαδή με ποια ένζυμα αλληλοεπιδρά έτσι ώστε να μπορέσει να αξιολογηθεί η δράση τους αλλά και ο κίνδυνος για ανεπιθύμητες ενέργειες. [42,43]

<u>Β. Περιβαλλοντική εποπτεία</u>

Καθώς η τεχνολογική εξέλιξη του ανθρώπου προοδεύει, τόσο σημαντικότερος γίνεται ο κίνδυνος της ρύπανσης του περιβάλλοντος από τη μη κατάλληλη επεξεργασία των λυμάτων ή την αλόγιστη χρήση λιπασμάτων και εντομοκτόνων. Αυτό μπορεί να προκαλέσει την αλλοίωση του οικοσυστήματος, γεγονός το οποίο έχει έμμεσες επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Παράλληλα, σε κάποιες περιπτώσεις όπου βαρέα μέταλλα και τοξίνες μολύνουν τον υδροφόρο ορίζοντα, οι επιπτώσεις έχουν και άμεσο χαρακτήρα. Γι αυτό είναι σημαντική η επιτήρηση του περιβάλλοντος, κάτι το οποίο συμβατικά γίνεται με μεθόδους χρωματογραφίας ή άλλες χρονοβόρες και κοστοβόρες τεχνικές. Επομένως, έγινε καίριας σημασίας η ανάπτυξη συστημάτων που μπορούν να εκπληρώσουν αυτό τον σκοπό με ακρίβεια, μικρό κόστος και μαζικό τρόπο. Σε αυτό το σημείο γίνεται εμφανής η συμβολή των βιοαισθητήρων που είναι ικανοί να αναγνωρίσουν, και σε κάποιες περιπτώσεις να ποσοτικοποιήσουν, πληθώρα ρυπογόνων ουσιών στο περιβάλλον. Εδώ θα πρέπει να αναφερθεί και η ικανότητα των βιοαισθητήρων να προσφέρουν δεδομένα για την αξιολόγηση της καταλληλόλητας των καλλιεργήσιμων εδαφών έτσι ώστε να μπορέσει να γίνει κατάλληλη επέμβαση και ρύθμιση των συνθήκων που είναι κρίσιμες για την σωστή καλλιέργεια τροφίμων. [44]

Γ. Ασφάλεια

Όπως μας έδειξε η πανδημία Covid 19, είναι υψίστης σημασίας η αναγνώριση και ο έλεγχος λοιμωδών νοσημάτων πριν αυτά μπορέσουν να εξαπλωθούν. Ο τρόπος μετάδοσης αλλά και ο αριθμός των διαφορετικών επικίνδυνων νοσημάτων που έχουν κάνει την εμφάνιση τους τα τελευταία χρόνια, είναι τα μεγαλύτερα εμπόδια σε αυτό το εγχείρημα. Παρόλα αυτά, οι βιοαισθητήρες μπορούν να δώσουν λύση καθώς μπορούν να προσαρμοστούν έτσι ώστε να είναι αποτελεσματικοί και ακριβείς σε πληθώρα συνθηκών. Για παράδειγμα, είναι δυνατή η χρήση τους σε υδατικά αποθέματα σε συσκευασμένο και μη φαγητό και πόσιμα σκευάσματα. Παράλληλα, οι συσκευές αυτές μπορούν να παραχθούν μαζικά και σε χαμηλό κόστος επιτρέποντας την ευρεία τους χρήση. [39,40]

1.5 Σκοπος ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σε αυτή την εργασία, σκοπός είναι η δημιουργία τρισδιάστατα εκτυπωμένων ενζυμικών μικροαντιδραστήρων μέσω της τεχνικής Material extrusion. Στους μικροαντιδραστήρες αυτούς ακινητοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν οξειδοαναγωγικά και υδρολυτικά ένζυμα με σκοπό την εφαρμογή τους ως βιοαισθητήρες ή ως μοντέλα βιοκατάλυσης. Συγκεκριμένα, το υλικό που θα χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή των συσκευών αυτών είναι το πολυγαλακτικό οξύ, ένας πολυεστέρας του γαλακτικού οξέος ο οποίος κατατάσσεται στα θερμοπλαστικά υλικά και είναι βιοσυμβατός, βιοδιασπώμενος και προέρχεται από ανανεώσιμες πήγες ενέργειας. Για την ενεργοποίηση της επιφάνειας του πολυγαλακτικού οξέος θα γίνει επικάλυψη των εσωτερικών τοιχωμάτων του μικροαντιδραστήρα με χιτοζάνη η οποία θα ακινητοποιηθεί μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων, καθώς μας παρέχει πληθώρα δραστικών ομάδων οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ομοιοπολική ακινητοποίηση των ενζύμων. Η χιτοζάνη είναι είναι από ανογερεται από την χιτίνη μέσω αποακετυλίωσης της ανθρακικής

αλυσίδας. Η ομοιοπολική ακινητοποίηση θα γίνει με την χρήση γλουταραλδεΰδης η οποία θα σχηματίσει ανάμεσα στην χιτοζάνη και στο ένζυμο δεσμούς μέσω βάσεων Schiff. Τα ένζυμα που επιλέχθηκαν να ακινητοποιηθούν στους βιοαντιδραστήρες είναι η βγλυκοσιδάση από τον οργανισμό *Thermotoga maritima*, η οξειδάση της γλυκόζης από τον μύκητα *Aspergillus niger* και η υπεροξειδάση του χρένου. Στην συνέχεια θα πραγματοποιηθεί βελτιστοποίηση της ακινητοποίησης του κάθε ενζύμου καθώς και βιοκαταλυτικές μελέτες. Με τον συνδυασμό αυτών των ενζύμων θα σχεδιαστεί καταρράκτης αντιδράσεων με τη μέθοδο της διαμερισματοποίησης σε ειδικά διαμορφωμένη συσκευή. Θα αξιολογηθεί η καταλυτική ικανότητα του καταρράκτη και θα συγκριθεί με ανάλογη συσκευή όπου τα ένζυμα έχουν ακινητοποιηθεί με τη μέθοδο της τυχαίας συνακινητοποίησης. Τέλος θα γίνει προσπάθεια κλιμάκωσης των μικροαντιδραστήρων με την χρήση πολυκάναλης συσκευής και σύγκριση της παραγωγικότητας της με την αρχική μονοκάναλη συσκευή.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 YAIKA

2.1.1 Ένζυμα

- Οξειδάση της γλυκόζης (GOx) από τον μύκητα Aspergillus niger, SIGMA (135,000 U/g)
- Υπεροξειδάση χρένου (HRP) από ραπανάκια (8,3 units/ml)
- Υπεροξειδάση χρένου, SIGMA (150 U/mg)
- β-Γλυκοζιδάση από τον οργανισμό *Thermotoga maritima* (β-gluc), SIGMA (50 U/mg)

2.1.2 Ρυθμιστικά διαλύματα

- Υδατικό διάλυμα φωσφορικών, 0.05 M, pH 7 (Phosphate Buffer)
- Υδατικό διάλυμα φωσφορικών, 0.1 M, pH 6.5 (Phosphate Buffer)

2.1.3 Υποστρώματα

- Διαμμωνιακό άλας 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid), (ABTS, Sigma)
- D-(+)-Γλυκόζη (Sigma)
- Υπεροξείδιο του υδρογόνου 30% (Fluka)
- p-Νιτροφαινυλο-β-D-γλυκοπυρανοζύδιο (pNPG, SIGMA)

2.1.4 Λοιπά αντιδραστήρια

- Υδροξείδιο του νατρίου (NaOH),
- Χιτοζάνη, 85% αποακετυλιωμένη (SIGMA)
- Γλουταραλδεΰδη 25% (MERCK)

2.1.5 Διαλύτες

- Υπερκάθαρο νερό (ddH₂O)
- Οξικό οξύ (Riedel)

2.1.6 Υλικά 3D printer

• Πολυγαλακτικό οξύ (PLA) (PrimaValue™)

2.1.7 Τεχνολογικός εξοπλισμός

- Ηλεκτρονικός υπολογιστής
- 3D printer Creality ender 5
- Eliza reader Tecan M200pro
- Eliza reader Multiskan SkyHigh Microplate Spectrophotometer (Thermo Fisher Scientific Inc.)
- Αντλία ακρίβειας SP200 Series Syringe Pumps (World Precision Instruments)
- Αντλία ακρίβειας SP100 Series Syringe Pumps (World Precision Instruments)
- Περισταλτική αντλία BT100-1L Multi-channels Peristaltic Pump (Longer Precision Pump Co.

Ltd)

2.1.8 Προγράμματα (software)

- Autodesk Fusion 360
- Cura slicing software.

2.2 Μεθοδοι

2.2.1 Σχεδιασμός μοντέλων

2.2.1.1 Μικροαντιδραστήρες 30 μΙ

Οι μικροαντιδραστήρες 30 μl έχουν διαστάσεις 15 x 16.8 x 2.5 mm. Έχουν μια είσοδο και μια έξοδο των οποίων τα στόμια έχουν ύψος 5 mm. Ο εσωτερικός σωλήνας έχει μήκος 48 mm, είναι κυλινδρικού σχήματος και έχει διάμετρο 0.9 mm. Η συνολική χωρητικότητα του μικροαντιδραστήρα είναι 37 μl, ενώ η λειτουργική χωρητικότητα του είναι 30 μl (Εικόνα 7).



Εικόνα 7. Ψηφιακή απεικόνιση τρισδιάστατων μοντέλων μικροαντιδραστήρων με ένα, δυο και τρία διαμερίσματα. Στο πάνω μέρος εξεικονίζεται βάση 6 θέσεων για τους μικροαντιδραστήρες ενός διαμερίσματος.

2.2.1.2 Rings

Τα rings, τα οποία σχεδιάστηκαν για να εφαρμόζουν περιμετρικά ενός κελιού Elisa plate 96 κελίων, αποτελούνται από έναν δακτύλιο με εξωτερική διάμετρο 6.1 mm, ενώ η εσωτερική του διάμετρος είναι 5.3 mm. Ο δακτύλιος έχει ύψος 5 mm και αποτελείται από δυο στρώσεις πολυγαλακτικού οξέος πάχους 0.4 mm (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Ψηφιακή απεικόνιση του μοντέλου rings.

2.2.1.3 Τριενζυμική συσκευή

Η τριενζυμική συσκευή αποτελείται από 3 διαδοχικούς μικροαντιδραστήρες 30 μ οι οποίοι είναι ενσωματωμένοι στο ίδιο επίπεδο και ενώνονται μεταξύ τους μέσω 2 βαλβίδων. Η συσκευή αυτή έχει 6 κύριες εισόδους/εξόδους και δυο βοηθητικές (Εικόνα 9).



Εικόνα 9. Ψηφιακή απεικόνιση του μοντέλου Τριενζυμικη συσκευή

2.2.1.4 Μικροαντιδραστήρες SCALE UP 1.2 ml

Ο μικροαντιδραστήρας SCALE UP έχει διαστάσεις 14X23X16 mm έχει μια είσοδο και μια έξοδο όμοια με αυτή του μικροαντιδραστήρα των 30 μl. Το εσωτερικό του αποτελείται από δυο θόλους, έναν σε κάθε άκρο, ενώ στο κέντρο υπάρχει παράλληλη συστοιχία 36 μικροαντιδραστήρων μήκους 10 mm, διαμέτρου 1 mm, και τετραγωνικού σχήματος (Εικόνα 10). Η συνολική χωρητικότητα της συσκευής είναι 1,2 ml ενώ η λειτουργική χωρητικότητα του είναι 360 μl.

Η κατασκευή των μοντέλων έγινε με τη βοήθεια του λογισμικού τρισδιάστατης σχεδίασης Fusion 360 (Autodesk) από οπού εξάχθηκε κατάλληλο αρχείο μορφής .stl, το οποίο στη συνέχεια εισάχθηκε στο λογισμικό slicing Cura, όπου επιλέχθηκαν οι κατάλληλες παράμετροι εκτύπωσης και εξάχθηκε αρχείο μορφής .gcode, το οποίο περιέχει τις οδηγίες εκτύπωσης.



Εικόνα 10 Ψηφιακή απεικόνιση του μοντέλου SCALE UP

2.2.2 Εκτύπωση μοντέλων

Η εκτύπωση των μοντέλων πραγματοποιήθηκε στον εκτυπωτή Ender 5 (Creality) και χρησιμοποιήθηκε νήμα φυσικού πολυγαλακτικό οξέος. Το πολυγαλακτικό οξύ τήχθηκε σε θερμοκρασία 200 °C και εναποτέθηκε μέσω στομίου 0.4 mm στην επιφάνια εκτύπωσης, η οποία διατηρήθηκε στους 50 °C καθ' όλη την διάρκεια της εκτύπωσης. Η ταχύτητα εκτύπωσης ρυθμίστηκε στα 60 mm/s και το περιβάλλον του εκτυπωτή διατηρήθηκε σε θερμοκρασία 25°C και σε στατικές συνθήκες ανέμου.

2.2.3 Παρασκευή διαλυμάτων

• Διάλυμα GOx συγκέντρωσης 1 mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικού οξέος (Phosphate Buffer: 0.05 M, pH 7)

 Διάλυμα β gluc συγκέντρωσης 0.2 μl/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer: 0.1 M, pH 6,5)

Διάλυμα ABTS συγκέντρωσης 20 mM, με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος
 φωσφορικών (Phosphate Buffer: 0.05 M, pH 7)

Υδατικό διάλυμα pNPG συγκέντρωσης 20 mM (Phosphate Buffer: 0.05 M, pH 7)

• Υδατικό διάλυμα γλυκόζης συγκέντρωσης 250 mM σε νερό υψηλής καθαρότητας (ddH₂O)

- Υδατικό διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου 1Μ
- Υδατικό διάλυμα χιτοζάνης 0.2 % w/v με περιεκτικότητα 1 % v/v σε οξικό οξύ
- Υδατικό διάλυμα γλουταραλδεΰδης 1 % v/v
- Υδατικό διάλυμα υπεροξειδίου του υδρογόνου 5 mM
- Υδατικό διάλυμα μέτρησης δραστικότητας:
 - Οξειδάση της γλυκόζης (3 mM ABTS, 25 mM γλυκόζη, 20 μg/ml υπεροξειδάση του χρένου(SIGMA), Phosphate buffer 0,05M,pH 7)
 - Β γλυκοζιδάση (1 mM pNPG, Phosphate buffer 0,1M,pH 6,5)
 - Υπεροξειδάση του χρένου (3 mM ABTS, 0.1mM υπεροξείδιο, Phosphate buffer 0.05M, pH 7)
 - Τριενζυμικό σύστημα (1 mM pNPG, 3 mM ABTS, Phosphate buffer 0.05M, pH 7)

2.2.4 Απομόνωση και καθαρισμός υπεροξειδάσης από ραπανάκι

2.2.4.1 Απομόνωση υπεροξειδάσης από ραπανάκι

Αρχικά ζυγίστηκαν 115 g ραπανάκι από τα οποία προηγουμένως έχει αφαιρεθεί η φύτρα και οι χτυπημένες περιοχές. Στη συνέχεια γίνεται πλύση με νερό βρύσης. Τα ραπανάκια ομογενοποιούνται σε μηχανικό ομογενοποιητή σταδιακά και με μικρή ταχύτητα. Το μείγμα που παράγεται από την ομογενοποίηση διατηρείται σε παγόλουτρο υπό ήπια μαγνητική ανάδευση για 20 λεπτά. Μετά το πέρας των 20 λεπτών γίνεται φιλτράρισμα του μείγματος με διηθητικό χαρτί και στη συνέχεια γίνεται φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στις 9500 rpm στους 4⁰C. Μετά τη φυγοκέντρηση απορρίπτεται το ίζημα, το υπερκείμενο χωρίζεται ανά 20 ml, τοποθετείται σε σωλήνες τύπου falcon 25 ml και φυλάσσεται σε βαθιά κατάψυξη (-20⁰C).

2.2.4.2 Καθαρισμός εκχυλίσματος μέσω καταβύθισης με θειικό αμμώνιο

Αρχικά, ζυγίστηκαν 11,22 g θειικού αμμωνίου. Παράλληλα, τοποθετήθηκε σε δοχείο με νερό ένα δοχείο falcon 25ml που περιέχει το εκχύλισμα από ραπανακια έτσι ώστε να ξεπαγώσει ομοιόμορφα και γρήγορα. Το εκχύλισμα τοποθετείται σε ποτήρι ζέσεως 50 ml το οποίο στη συνέχεια τοποθετείται σε παγόλουτρο. Προστίθεται σταδιακά το θειικό αμμώνιο υπό μαγνητική ανάδευση. Όταν διαλυθεί όλο το θειικό αμμώνιο, το ποτήρι ζέσεως απομακρύνεται από το παγόλουτρο και το εκχύλισμα επωάζεται over night, στους 4^oC. Τέλος, γίνεται φυγοκέντρηση για 10 λεπτά στα 9500 rpm στους 4^oC. Απορρίπτεται το υπερκείμενο και το ίζημα επαναδιαλυτοποιείται σε 1 ml phosphate buffer pH 7, 50 mM.

2.2.4.3 Καθαρισμός εκχυλίσματος μέσω στήλης αφαλάτωσης

Αρχικά γίνεται απόρριψη του υπερκείμενου της στήλης. Στη συνέχεια γίνεται ενεργοποίηση της στήλης μέσω έκλυσης 20 ml phosphate buffer pH 7, 50 mM. Έπειτα προστίθεται το δείγμα (1 ml), και αφού το δείγμα περάσει μέσα στη στήλη, τότε προστίθεται 1.5 ml buffer. Τέλος προστίθενται 3.5 ml buffer και συλλέγεται ίδια ποσότητα από τη στήλη όπου περιέχεται το καθαρισμένο προϊόν.

2.2.5 Ακινητοποίηση ενζύμων

2.2.5.1 Ακινητοποίηση ενζύμων σε μικροαντιδραστήρες

Αρχικά 30 μl διαλύματος καυστικού νατρίου εισάχθηκαν μέσω σύριγγας σε κάθε μικροαντιδραστήρα και έγινε επώαση για 2 ώρες στους 25 °C. Στη συνέχεια απορρίφθηκε το διάλυμα καυστικού νατρίου και έγινε πλύση με υπερκάθαρο νερό δυο φορές και στεγνώνεται το εσωτερικό του μικροαντιδραστήρα με αέριο άζωτο για 10 δευτερόλεπτα. Σε επόμενο βήμα, εισάχθηκαν στον μικροαντιδραστήρα 30 μl διαλύματος χιτοζάνης με καθαρή σύριγγα και γίνεται επώαση για 1 λεπτό στους 25 °C. Ακολούθως, γίνεται απόρριψη του διαλύματος χιτοζάνης και εισάγεται νέα ποσότητα (30 μl) διαλύματος καυστικού νατρίου για 1 λεπτό. Στη συνέχεια, γίνονται 2 πλύσεις με υπερκάθαρο νερό και στεγνώνεται το εσωτερικό του μικροαντιδραστήρα με αέριο άζωτο για 10 δευτερόλεπτα. Σε επόμενο βήμα εισάγονται 30 μl διαλύματος γλουταραλδεΰδης σε κάθε μικροαντιδραστήρα και γίνεται επώαση στους 30 °C. Γίνεται έκπλυση 3 φορές με buffer φωσφορικών pH 7, 50 mM και στέγνωμα με άζωτο για 10 δευτερόλεπτα. Τέλος, γίνεται εισαγωγή του διαλύματος του ένζυμου και γίνεται επώαση στους 30 °C για 1 ώρα. γίνεται πλύση 3 φορές με κατάλληλο buffer για κάθε ένζυμο και στέγνωμα για 10 δευτερόλεπτα υπό αέριο άζωτο.

2.2.5.2 Ακινητοποίηση ενζύμων σε rings

Αρχικά, 3 rings εμβαπτίζονται πλήρως σε 2 ml διαλύματος καυστικού νατρίου και στη συνέχεια έγινε επώαση για 2 ώρες στους 25 °C. Στη συνέχεια απορρίφθηκε το διάλυμα καυστικού νατρίου και έγινε πλύση με υπερκάθαρο νερό δυο φορές υπό ανάδευση και στεγνώνονται με απλή επαφή σε διηθητικό χαρτί. Σε επόμενο βήμα, εισάχθηκαν 2 ml διαλύματος χιτοζάνης σε καθαρό Eppendorf, στο οποίο εμβαπτίζονται τα rings και γίνεται επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία 25 C. Ακολούθως γίνεται απόρριψη του διαλύματος χιτοζάνης και εισάγεται νέα ποσότητα (2 ml) διαλύματος καυστικού νατρίου για 1 λεπτό. Στη συνέχεια, γίνονται 2 πλύσεις με υπερκάθαρο νερό και στεγνώνονται τα rings. Σε επόμενο βήμα, εισάγονται 2 ml διαλύματος γλουταραλδεΰδης σε καθαρό Eppendorf, προστίθενται τα rings και γίνεται επώαση στους 30 °C για 1 ώρα. Γίνεται έκπλυση 3 φορές με Buffer φωσφορικών pH 7, 50 mM και στέγνωμα. Τέλος, γίνεται εισαγωγή 2 ml ενζυμικού διαλύματος σε καθαρό Eppendorf, προστίθενται τα rings και γίνεται επώαση στους 30 °C για 1 ώρα. Πραγματοποιούνται 3 φορές πλύσεις με κατάλληλο Buffer για κάθε ένζυμο και στέγνωμα.

2.2.5.3 Ακινητοποίηση ενζύμων σε μικροαντιδραστήρες scale up

Αρχικά 1.2 ml διαλύματος καυστικού νατρίου εισάχθηκαν μέσω σύριγγας 1 ml σε κάθε μικροαντιδραστήρα και έγινε επώαση για 2 ώρες στους 25 C. Στη συνέχεια απορρίφθηκε το διάλυμα καυστικού νατρίου και έγινε πλύση με υπερκάθαρο νερό δυο φορές και στεγνώνεται το εσωτερικό του μικροαντιδραστήρα με αέριο άζωτο για 30 δευτερόλεπτα. Σε επόμενο βήμα εισήχθησαν στον μικροαντιδραστήρα 1.2ml διαλύματος χιτοζάνης και γίνεται επώαση για 1 λεπτό σε θερμοκρασία 25 C. Ακολούθως γίνεται απόρριψη του διαλύματος χιτοζάνης και εισάγεται νέα ποσότητα 1.2 ml διαλύματος καυστικού νατρίου για 1 λεπτό. Στην συνέχεια γίνονται 2 πλύσεις με υπερκάθαρο νερό και στεγνώνεται το εσωτερικό του μικροαντιδραστήρα με αέριο άζωτο για 30 δευτερόλεπτα. Σε επόμενο βήμα εισάγονται 1.2 ml διαλύματος γλουταραλδεΰδης σε κάθε μικροαντιδραστήρα και γίνεται επώαση στους 30 °C. Γίνεται έκλυση 3 φορές με Buffer φωσφορικών pH 7, 50 mM και στέγνωμα με άζωτο για 30 δευτερόλεπτα. Τέλος γίνεται εισαγωγή 1.2 ml του ενζυμικού διαλύματος και γίνεται επώαση στους 30 °C για 1 ώρα. Γίνεται πλύση 3 φορές με κατάλληλο Buffer για κάθε ένζυμο και στέγνωμα για 30 δευτερόλεπτα υπό αέριο άζωτο.

2.2.5.4 Ακινητοποίηση ενζύμων σε τριενζυμική συσκευή με την τεχνική της διαμερισματοποίησης

Ως πρώτο βήμα για την ακινητοποίηση των ενζύμων στην τριενζυμική συσκευή κλείνουμε τις βαλβίδες έτσι ώστε να μην υπάρχουν διαρροές διαλυμάτων από το ένα διαμέρισμα στο άλλο. Η δοκιμή γίνεται με την εισαγωγή περίσσειας υπερκάθαρου νερού από κάθε είσοδο. Εάν το νερό ρέει μόνο από την ενδεδειγμένη έξοδο, τότε συνεχίζεται κανονικά η μέθοδος ακινητοποίησης όπως περιεγράφηκε στην παράγραφο 2.2.5.1, για κάθε διαμέρισμα της συσκευής. Στο πρώτο διαμέρισμα, στο τελευταίο βήμα της ακινητοποίησης, εισάγεται το διάλυμα της β γλυκοζιδάσης, στο δεύτερο διαμέρισμα εισάγεται το διάλυμα της οξειδάσης της γλυκόζης και στο τρίτο διαμέρισμα εισάγεται το διάλυμα της ωπεροξειδάσης. Εάν το νερό διαρρέει από άλλη πορεία εκτός της ενδεδειγμένης εξόδου γίνεται αφαίρεση της βαλβίδας και επανατοποθέτηση της όπως αναφέρεται στην παράγραφο 2.2.1.3

2.2.5.5 Συν-ακινητοποίηση ενζύμων σε τριενζυμική συσκευή

Για τη συν-ακινητοποίηση των ενζύμων σε τριενζυμική συσκευή ακολουθείται η πορεία της παραγράφου 2.2.5.4 και 2.2.5.1, με τη διαφορά ότι στο τελευταίο βήμα εισάγεται διάλυμα μείγματος ενζύμων, αντί των μεμονωμένων ενζυμικών διαλυμάτων.

2.2.6 Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης γλουταραλδεΰδης

Για τη βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης γλουταραλδεΰδης έγινε ακινητοποίηση σύμφωνα με την παράγραφο 2.2.5.1. Οι συγκεντρώσεις γλουταραλδεΰδης που μελετήθηκαν ήταν 0.1, 0.5, 1, 2.5, και 5 %.

2.2.7 Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης ενζύμου

Για τη βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης ενζύμου έγινε ακινητοποίηση σύμφωνα με την παράγραφο 2.2.5.1. Οι συγκεντρώσεις της β-γλυκοσιδάσης που μελετήθηκαν ήταν 0.25, 0.5, 1, 2, και 4 μl/ml, της GOx ήταν 0.1, 0.25, 0.5, 1, και 2 mg/ml, και της υπεροξειδάσης ήταν διαδοχικές αραιώσεις του εκχυλίσματος 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16.

2.2.8 Δραστικότητα σε διαφορετικές τιμές pH

Για τη μελέτη ενεργότητας σε διαφορετικές τιμές pH έγινε ακινητοποίηση του κάθε ενζύμου σε 15 μικροαντιδραστήρες σύμφωνα με την παράγραφο 2.2.5.1 και στη συνέχεια έγινε μέτρηση της δραστικότητας των ενζύμων σύμφωνα με τις παραγράφους 2.2.13.1/2/3 για τα κινητοποιημένα ένζυμα σε μικροαντιδραστήρες με buffer φωσφορικών και κιτρικού για τα pH 5 και 6, με buffer φωσφορικών για τα pH 6 και 7 και με buffer TrisHCl για τα pH 7 και 8.

2.2.9 Σταθερότητα κατά την επαναχρησιμοποίηση

Για τη δοκιμασία σταθερότητας κατά την επαναχρησιμοποίηση έγινε ακινητοποίηση σε 3 μικροαντιδραστήρες για κάθε ένζυμο σύμφωνα με την παράγραφο 2.2.5.1 και στην συνέχεια έγινε μέτρηση της δραστικότητας των ενζύμων σύμφωνα με τις παραγράφους 2.2.13.1/2/3. Η διαδικασία επαναλήφθηκε για 50 κύκλους αντίδρασης.

2.2.10 Σταθερότητα παραμονής σε θερμοκρασίες 30,40,50 °C

Για τη δοκιμασία σταθερότητας παραμονής σε θερμοκρασία έγινε ακινητοποίηση σε 9 μικροαντιδραστήρες για κάθε ένζυμο σύμφωνα με την παράγραφο 2.2.5.1 και συνέχεια έγινε μέτρηση της δραστικότητας των ενζύμων σύμφωνα με τις παραγράφους 2.2.13.1/2/3 για 15 κύκλους αντίδρασης. Στην συνέχεια έγινε πλύση των μικροαντιδραστήρων με buffer αντίδρασης 3 φορές και έγινε επώαση τριών μικροαντιδραστήρων για κάθε ένζυμο σε θερμοκρασίες 30, 40 και 50 °C για 24 ώρες.

2.2.11 Κινητικές μελέτες

2.2.11.1 Κινητικές μελέτες σε microreactors

Για τις κινητικές μελέτες έγινε ακινητοποίηση των ενζύμων, σύμφωνα με την παράγραφο 2.2.5.1, σε 15 μικροαντιδραστήρες για κάθε ένζυμο, και στη συνέχεια έγινε μέτρηση της δραστικότητας των ενζύμων όπως περιγράφεται στις παραγράφους 2.2.13.1/2/3, χρησιμοποιώντας διαλύματα αντιδράσεων με 0.25, 0.5, 1, 2, και 4 mM pNPG για τη β-γλυκοζιδάση, 1, 5, 10, 15, 20, και 25 mM γλυκόζης για την υπεροξειδάση και 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, και 0.025 mM υπεροξειδίου του υδρογόνου για την οξειδάση της γλυκόζης.

Για κάθε ένα από αυτά τα διαλύματα έγινε μέτρηση της ενεργότητας του κάθε ενζύμου σε ταχύτητες ροής 10, 20, 30, 40, και 50 μl/min.

2.2.11.2 Κινητικές μελέτες σε ελεύθερα ένζυμα

Για τις κινητικές μελέτες σε ελευθέρα ένζυμα έγινε μέτρηση της δραστικότητας των ενζύμων όπως αναφέρεται στις παραγράφους 2.2.13.4/5/6, με 0.25, 0.5, 1, 2, και 4 mM pNPG για τη β-γλυκοζιδάση 1, 5, 10, 15, 20, και 25 mM γλυκόζης για την οξειδάση της γλυκόζης, και 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, και 0.025 mM υπεροξειδίου του υδρογόνου για την υπεροξειδάση.

2.2.11.3 Κινητικές μελέτες σε ακινητοποιημένα ένζυμα σε rings

Για τις κινητικές μελέτες σε ακινητοποιημένα ένζυμα σε rings έγινε ακινητοποίηση των ενζύμων, σύμφωνα με την παράγραφο 2.2.5.2, σε 3 rings για κάθε ένζυμο. Στη συνέχεια, έγινε μέτρηση της δραστικότητας των κινητοποιημένων ενζύμων σύμφωνα με 0.25, 0.5, 1, 2, και 4 mM pNPG για την β-γλυκοζιδάση, 1, 5, 10, 15, 20, και 25 mM γλυκόζης για την οξειδάσης της γλυκόζης και 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, και 0.025 mM υπεροξειδίου του υδρογόνου για την υπεροξειδάση.

2.2.11.4 Ανάλυση κινητικής μελέτης μέσω της εξίσωσης Lily-Hornby

Για τον προσδιορισμό της τιμής της σταθεράς κινητικής Michaelis (Km) στα ακινητοποιημένα ένζυμα σε μικροαντιδραστήρες χρησιμοποιήθηκε η εξίσωση Lily-Hornby (Εξίσωση 1)

$$F \times [A]_0 = Km(app) \times ln(1 - F) + C/Q(1)$$

Όπου το F είναι το ποσό του αντιδρώντος που μετατράπηκε σε τελικό προϊόν κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, Q είναι η ταχύτητα ροής στον μικροαντιδραστήρα, [A]₀ είναι η αρχική συγκέντρωση του αντιδρώντος, C είναι η χωρητικότητα του μικροαντιδραστήρα και Km(app) είναι η φαινομενική σταθερά Michaelis (Km). Το μοντέλο Lilly-Hornby είναι μια παραλλαγή του μοντέλου Michaelis-Menden που είχε αρχικά σχεδιαστεί για τη χρήση του σε πακτωμένες στήλες.[45] Αργότερα η ίδια εξίσωση βρέθηκε ότι μπορεί να εφαρμοστεί σε μικροαντιδραστηρες.[46]

2.2.12 Μέτρηση δραστικότητας

2.2.12.1 Μέτρηση δραστικότητας ακινητοποιημένης β-γλυκοζιδάσης

Σε Eppendorf των 2 ml εισάγονται 2ml διαλύματος μέτρησης δραστικότητας βγλυκοζιδάσης (1 mM pNPG, Phosphate buffer 0.1 M, pH 6.5). Στην συνέχεια, γίνεται εισαγωγή του διαλύματος σε σύριγγα 2.5 ml στην οποία έχει τοποθετηθεί ειδικό στόμιο για σύνδεση με σωλήνες μικρορευστομηχανικής. Στη συνέχεια, με χρήση αντλίας ακρίβειας γίνεται ώθηση του διαλύματος μέσα στον μικροαντιδραστήρα, ο οποίος βρίσκεται μέσα σε επωαστήρα σε θερμοκρασία 40°C, με ταχύτητα 30 μl/min. Στη συνέχεια, γίνεται συλλογή 150 μl δείγματος από την έξοδο του μικροαντιδραστήρα και μεταφέρεται σε πλακά Elisa 96 κελίων. Τέλος, γίνεται μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος σε μηχάνημα Elisa reader στα 405nm.

2.2.12.2 Μέτρηση δραστικότητας ακινητοποιημένης οξειδάσης της γλυκόζης

Σε Eppendorf των 2 ml εισάγονται 2ml διαλύματος μέτρησης δραστικότητας οξειδάσης της γλυκόζης (3 mM ABTS, 25 mM γλυκόζη, 20 μg/ml υπεροξειδάση(sigma), Phosphate buffer 0.05 M, pH 7). Στη συνέχεια, γίνεται εισαγωγή του διαλύματος σε σύριγγα 2.5ml στην οποία έχει τοποθετηθεί ειδικό στόμιο για σύνδεση με σωλήνες μικρορευστομηχανικής. Στη συνέχεια, με χρήση αντλίας ακρίβειας γίνεται ώθηση του διαλύματος μέσα στον μικροαντιδραστήρα ο οποίος βρίσκεται μέσα σε επωαστήρα σε θερμοκρασία 30⁰C,με ταχύτητα 30 μl/min. Στην συνέχεια γίνεται συλλογή 150 μl δείγματος από την έξοδο του μικροαντιδραστήρα και μεταφέρεται σε πλακά Elisa 96 κελίων. Τέλος γίνεται μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος σε μηχάνημα Elisa reader στα 405nm.

2.2.12.3 Μέτρηση δραστικότητας ακινητοποιημένης υπεροξειδάσης από ραπανάκια

Σε Eppendorf των 2 ml εισάγονται 2 ml διαλύματος μέτρησης δραστικότητας υπεροξειδάσης (3 mM ABTS, 0.1 mM υπεροξείδιο, Phosphate buffer 0.05 M, pH 7). Στη συνέχεια, γίνεται εισαγωγή του διαλύματος με σύριγγα 2.5 ml στην οποία έχει τοποθετηθεί ειδικό στόμιο για σύνδεση με σωλήνες μικρορευστομηχανικής. Στη συνέχεια, με χρήση αντλίας ακρίβειας γίνεται ώθηση του διαλύματος μέσα στον μικροαντιδραστήρα ο οποίος βρίσκεται μέσα σε επωαστήρα σε θερμοκρασία 30⁰C, με ταχύτητα 30 μl/min. Στην συνέχεια γίνεται συλλογή 150 μl δείγματος από την έξοδο του μικροαντιδραστήρα και μεταφέρεται σε πλακά Elisa 96 κελίων. Τέλος γίνεται μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος σε μηχάνημα Elisa reader στα 405nm.

2.2.12.4 Μέτρηση δραστικότητας ελεύθερης β-γλυκοζιδάσης

Σε Eppendorf των 2ml εισάγονται 2ml διαλύματος μέτρησης δραστικότητας βγλυκοζιδάσης (1 mM pNPG, Phosphate buffer 0.1 M, pH 6.5). Στη συνέχεια, 190 μl μεταφέρονται σε πλακά Elisa 96 κελίων και προστίθενται 10 μl ενζύμου β-γλυκοζιδάσης (από stock ενζύμου 2 μl/ml) και γίνεται μέτρηση σε μηχάνημα Elisa reader ανά 30 δευτερόλεπτα για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 40 °C.

2.2.12.5 Μέτρηση δραστικότητας ελεύθερης οξειδάσης της γλυκόζης

Σε Eppendorf των 2 ml εισάγονται 2ml διαλύματος μέτρησης δραστικότητας οξειδάσης της γλυκόζης (3 mM ABTS, 25 mM γλυκόζη, 20 μg/ml υπεροξειδάση του χρένου(sigma), Phosphate buffer 0.05M, pH 7). Στη, συνέχεια 190 μl μεταφέρονται σε πλακά Elisa 96 κελίων και προστίθενται 10 μl ενζύμου οξειδάσης της γλυκόζης (0.01 mg/ml) και γίνεται μέτρηση σε μηχάνημα Elisa reader ανά 15 δευτερόλεπτα για 2 λεπτά σε θερμοκρασία 30 ⁰C

2.2.12.6 Μέτρηση Δραστικότητας ελεύθερης υπεροξειδάσης από ραπανάκια

Σε Eppendorf των 2 ml εισάγονται 2 ml διαλύματος μέτρησης δραστικότητας υπεροξειδάσης (3 mM ABTS, 0.1 mM υπεροξείδιο, Phosphate buffer 0.05 M, pH 7). Στη συνέχεια, 195 μl μεταφέρονται σε πλακά Eliza 96 κελίων και προστίθενται 0,25 μl ενζύμου υπεροξειδάσης (0,5 units(μmol/min*ml)) και γίνεται μέτρηση σε μηχάνημα Eliza reader ανά 30 δευτερόλεπτα για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 30 $^{\circ}$ C

2.2.12.7 Μέτρηση δραστικότητας τριενζυμικού συστήματος

Σε Eppendorf των 2 ml εισάγονται 2ml διαλύματος μέτρησης δραστικότητας του τριενζυμικού συστήματος. Στη, συνέχεια γίνεται εισαγωγή του διαλύματος σε σύριγγα 2.5 ml στην οποία έχει τοποθετηθεί ειδικό στόμιο για σύνδεση με σωλήνες μικρορευστομηχανικής. Στη συνέχεια, και αφού έχουν ανοιχθεί οι βαλβίδες σηκώνοντας τες 4 mm με χρήση αντλίας ακρίβειας, γίνεται ώθηση του διαλύματος μέσα στον μικροαντιδραστήρα ο οποίος βρίσκεται μέσα σε επωαστήρα σε θερμοκρασία 40°C, με ταχύτητα 30μl/min. Στη συνέχεια, γίνεται συλλογή 150 μl δείγματος από την έξοδο του μικροαντιδραστήρα και μεταφέρεται σε πλακά Elisa 96 κελίων. Τέλος γίνεται μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος σε μηχάνημα Elisa reader στα 405nm.

2.2.12.8 Μέτρηση δραστικότητας ακινητοποιημένης β γλυκοζιδάσης σε rings

Σε Eppendorf των 2 ml εισάγονται 2ml διαλύματος μέτρησης δραστικότητας βγλυκοζιδάσης (1 mM pNPG, Phosphate buffer 0.1 M, pH 6.5). Ακολούθως εισάγεται το ring μέσα σε ένα κελί της πλάκας Elisa. Στη συνέχεια, 150 μl μεταφέρονται στο ίδιο κελί και γίνεται μέτρηση σε μηχάνημα Elisa reader ανά 30 δευτερόλεπτα για 10 λεπτά σε θερμοκρασία 40 °C.

2.2.12.9 Μέτρηση δραστικότητας ακινητοποιημένης οξειδάσης της γλυκόζης σε rings

Σε Eppendorf των 2 ml εισάγονται 2ml διαλύματος μέτρησης δραστικότητας οξειδάσης της γλυκόζης (3 mM ABTS, 25 mM γλυκόζη, 20 μg/ml υπεροξειδάση του χρένου(sigma), Phosphate buffer 0.05 M,pH 7). Ακολούθως εισάγεται το ring μέσα σε ένα κελί της πλάκας Elisa. Στη συνέχεια, 150 μl μεταφέρονται στο ίδιο κελί και γίνεται μέτρηση σε μηχάνημα Elisa reader ανά 15 δευτερόλεπτα για 2 λεπτά σε θερμοκρασία 30 ⁰C

2.2.12.10 Μέτρηση δραστικότητας ακινητοποιημένης υπεροξειδάσης από ραπανάκια σε rings

Σε Eppendorf των 2 ml εισάγονται 2 ml διαλύματος μέτρησης δραστικότητας υπεροξειδάσης (3 mM ABTS, 0.1 mM υπεροξείδιο, Phosphate buffer 0.05 M, pH 7). Ακολούθως εισάγεται το ring μέσα σε ένα κελί της πλάκας Elisa. Στη συνέχεια, 150 μl μεταφέρονται στο ίδιο κελί και γίνεται μέτρηση σε μηχάνημα Elisa reader ανά 30 δευτερόλεπτα για 5 λεπτά σε θερμοκρασία 30 ⁰C

2.2.12.11 Μέτρηση δραστικότητας ακινητοποιημένης β-γλυκοζιδάσης σε μικροαντιδραστήρες scale up

Σε γυάλινο δοχείο με καπάκι 10 ml εισάγονται 6 ml διαλύματος μέτρησης δραστικότητας β-γλυκοζιδάσης (1 mM pNPG, Phosphate buffer 0.1 M, pH 6.5). Στη συνέχεια, με χρήση περισταλτικής αντλίας ακρίβειας και αφού τοποθετηθεί το κατάλληλο σωληνάκι στον πάτο του δοχείου γίνεται ώθηση του διαλύματος μέσα στον μικροαντιδραστήρα, ο οποίος βρίσκεται μέσα σε επωαστήρα σε θερμοκρασία 40°C, με ταχύτητα 150 μl/min. Στη συνέχεια, γίνεται συλλογή 150 μl δείγματος από την έξοδο του μικροαντιδραστήρα και μεταφέρεται σε πλακά Elisa 96 κελίων. Τέλος γίνεται μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος σε μηχάνημα Elisa reader στα 405nm.

2.2.12.12 Μέτρηση δραστικότητας ακινητοποιημένης οξειδάσης της γλυκόζης σε μικροαντιδραστήρες scale up

Σε γυάλινο δοχείο με καπάκι 10 ml εισάγονται 6 ml διαλύματος μέτρησης δραστικότητας οξειδάσης της γλυκόζης (3 mM ABTS, 25 mM γλυκόζη, 20 μg/ml υπεροξειδάση του χρένου (sigma), Phosphate buffer 0.05M, pH 7). Στη συνέχεια, με χρήση περισταλτικής αντλίας ακρίβειας και αφού τοποθετηθεί το κατάλληλο σωληνάκι στον πάτο του δοχείου γίνεται ώθηση του διαλύματος μέσα στον μικροαντιδραστήρα, ο οποίος βρίσκεται μέσα σε επωαστήρα σε θερμοκρασία 30°C, με ταχύτητα 150 μl/min. Στην συνέχεια γίνεται συλλογή 150μl δείγματος από την έξοδο του μικροαντιδραστήρα και μεταφέρεται σε πλακά Elisa 96 κελίων. Τέλος γίνεται μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος σε μηχάνημα Elisa reader στα 405nm.

2.2.12.13 Μέτρηση δραστικότητας ακινητοποιημένης υπεροξειδάσης από ραπανάκια σε μικροαντιδραστήρες scale up

Σε γυάλινο δοχείο με καπάκι 10 ml εισάγονται 6 ml διαλύματος μέτρησης δραστικότητας υπεροξειδάσης (3 mM ABTS, 0.1 mM υπεροξείδιο, Phosphate buffer 0.05 M, pH 7). Στη συνέχεια, με χρήση περισταλτικής αντλίας ακρίβειας και αφού τοποθετηθεί το κατάλληλο σωληνάκι στον πάτο του δοχείου γίνεται ώθηση του διαλύματος μέσα στον μικροαντιδραστήρα ο οποίος βρίσκεται μέσα σε επωαστήρα σε θερμοκρασία 30⁰C, με ταχύτητα 150 μl/min. Στην συνέχεια γίνεται συλλογή 150 μl δείγματος από την έξοδο του μικροαντιδραστήρα και μεταφέρεται σε πλακά Elisa 96 κελίων. Τέλος γίνεται μέτρηση της απορρόφησης του διαλύματος σε μηχάνημα Elisa reader στα 405 nm.

3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΤΡΙΣΔΙΑΣΤΑΤΑ ΕΚΤΥΠΩΜΕΝΩΝ ΣΥΣΚΕΥΩΝ

Ένα από τα μεγαλύτερα πλεονεκτήματα που μας προσφέρει η τρισδιάστατη εκτύπωση είναι η δυνατότητα κατασκευής λεπτομερών και εξατομικευμένων μοντέλων για ερευνητικούς σκοπούς με μικρό κόστος και σύντομους χρόνους κατασκευής. Στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας εκμεταλλευτήκαμε αυτές τις δυνατότητες που μας προσφέρει η τεχνική της τρισδιάστατης εκτύπωσης και καταφέραμε να κατασκευάσουμε 4 ειδών συσκευές με ξεχωριστή αρχιτεκτονική και χρηστικότητα.

3.1.1 Μικροαντιδραστήρας 30 μΙ

Ο μικροαντιδραστήρας 30 μl έχει μικρή χωρητικότητα συνεπώς μας εξασφαλίζει τη χρήση μικρών ποσοτήτων αντιδραστηρίων, χαμηλώνοντας σημαντικά το κόστος ανά πείραμα. Παράλληλα, το μικρό του μέγεθος μας επιτρέπει να εκτυπώσουμε μεγάλη ποσότητα μικροαντιδραστήρων σε μια εκτύπωση, ελαχιστοποιώντας τους χρόνους κατασκευής των μικροαντιδραστήρων. Τα παραπάνω, σε συνδυασμό, καθιστούν τη συσκευή αυτή ιδανική για πειράματα που απαιτούν μεγάλο αριθμό δειγμάτων και ποσότητα κοστοβόρων αντιδραστηρίων. Στην παρούσα πτυχιακή, οι μικροαντιδραστήρες 30 μl χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα βελτιστοποίησης συγκεντρώσεων γλουταραλδεΰδης και ενζύμου, καθώς και στις βιοκαταλυτικές μελέτες, και πιο συγκεκριμένα, στη δοκιμασία επαναχρησιμοποίησης, θερμοσταθερότητας και της ενεργότητας σε διαφορετικά pH. Τέλος οι αντιδραστήρες αυτοί χρησιμοποιήθηκαν για του μοντέλου Lily-Hornby.

3.1.2 Rings

Τα rings σχεδιάστηκαν έτσι ώστε να μπορούν να εφαρμόσουν στα τοιχώματα των Elisa plates 96 κελιών. Έτσι μπορεί να γίνει μελέτη των ακινητοποιημένων ενζύμων σε πραγματικό χρόνο. Αυτή δε θα μπορούσε να γίνει διαφορετικά καθώς η απορρόφηση της ακτινοβολίας από το PLA θα καθιστούσε τέτοιες μετρήσεις αδύνατες. Τα rings χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της σταθερά Km^{app} σε ακινητοποιημένα ένζυμα σε PLA απουσία ροής.

3.1.3 Τριενζυμική συσκευή

Η τριενζυμική συσκευή αποτελείται από τρεις διαδοχικούς μικροαντιδραστήρες τύπου αντιδραστήρα 30 μl στους οποίους παρεμβάλλονται δυο βαλβίδες ελέγχου ροής οι οποίες απομονώνουν το κάθε τμήμα της συσκευής. Επιπλέον παρέχονται και 3 βοηθητικές δίοδοι οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για δειγματοληψία ή μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως είσοδοι δευτερευόντων υποστρωμάτων. Αυτές οι ιδιότητες κάνουν αυτή τη συσκευή την πλέον ευέλικτη για τη μελέτη και βελτιστοποίηση καταρρακτών αντιδράσεων. Η πολυενζυμική αυτή συσκευή χρησιμοποιήθηκε κατά την ακινητοποίηση των ενζύμων σε σειρά με τις μεθόδους της διαμερισματοποίησης και της τυχαίας συνακινητοποίησης.

3.1.4 Scale up μικροαντιδραστήρας

Ένα από τα μεγαλύτερα μειονεκτήματα των τεχνικών που βασίζονται στη μικρορευστομηχανική είναι ότι η ποσοτική παραγωγικότητα τους είναι πολύ μικρή εμποδίζοντας την εφαρμογή τους σε βιομηχανική κλίμακα[47]. Η συσκευή scale up, η οποία είναι σχεδιασμένη σύμφωνα με τη λογική των παράλληλων βιοαντιδραστήρων, είναι ικανή να συνδυάσει 36 μικροαντιδραστήρες σε πολύ μικρό χώρο επιτυγχάνοντας την αύξηση της παραγωγικότητας. Η συσκευή αυτή χρησιμοποιήθηκε για την ακινητοποίηση και των τριών ενζύμων και την αξιολόγηση της παραγωγικότητας του συστήματος σε σειρά. Επιπλέον και σε αυτή τη συσκευή πραγματοποιήθηκε δοκιμασία επαναχρησιμοποίησης για τη β gluc.

3.2 ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΟΥΣ ΜΙΚΡΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ

3.2.1 Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης γλουταραλδεΰδης στους μικροαντιδραστήρες 30 μl

Η συγκέντρωση της γλουταραλδεΰδης είναι μια σημαντική παράμετρος κατά την ομοιοπολική ακινητοποίηση ενός ενζύμου, καθώς μικρότερη ποσότητα οδηγεί σε ανεπάρκεια θέσεων πρόσδεσης του ενζύμου με αποτέλεσμα να μην ακινητοποιείται ικανοποιητική ποσότητα ενζύμου[48], ενώ αντίθετα υπερβολική ποσότητα γλουταραλδεΰδης μπορεί να οδηγήσει σε περίσσεια συνδέσεων οδηγώντας στον περιορισμό της λειτουργικότητας του adενζύμου [49]. Για όλα τα ένζυμα έγινε δοκιμή εύρους συγκέντρωσης γλουταραλδεΰδης από 0.25-5 % ν/ν, και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Γραφήματα 1,2 και 3.



Γράφημα 1. Εξάρτηση της ενεργότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου GOx από τη συγκέντρωση γλουταραλδεΰδης κατά την ακινητοποίηση σε μικροαντιδραστήρες 30 μl.



Γράφημα 2. Εξάρτηση της ενεργότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου HRP από τη συγκέντρωση γλουταραλδεϋδης κατά την ακινητοποίηση σε μικροαντιδραστήρες 30 μl.



Γράφημα 3.Εξαρτηση της ενεργότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου β gluc από τη συγκέντρωση γλουταραλδεϋδης κατά την ακινητοποίηση σε μικροαντιδραστήρες 30 μl.

Σε όλες της περιπτώσεις ενζύμων που μελετήθηκαν, η μέγιστη ενζυμική ενεργότητα παρατηρείται σε τελική συγκέντρωση γλουταραλδεΰδης 1% v/v, ενώ μικρότερες ή μεγαλύτερες συγκεντρώσεις οδηγούν σε μείωση της ενεργότητας των ενζύμων. Το φαινόμενο αυτό είναι ιδιαίτερα εμφανές στην περίπτωση της ΗRP, όπου υπάρχει μεγάλη μείωση της ενεργότητας σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις γλουταραλδεΰδης. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η HRP είναι ένα ένζυμο με απλή δομή του οποίου το ενεργό κέντρο είναι σχετικά εκτεθειμένο σε εξωτερικές παρεμβολές. Αυτό, σε συνδυασμό με τη δυνατότητα της γλουταραλδεΰδης να αλληλοεπιδρά με διαφορετικά αμινοξέα με διαφορετικό τρόπο ανάλογα το περιβάλλον της μπορεί να επηρεάσει το ενεργό κέντρο του ενζύμου οδηγώντας σε μείωση της ενεργότητας [50]. Αντίθετα, η β gluc η οποία είναι θερμοανθεκτικό ένζυμο και διαθέτει ισχυρότερους μηχανισμούς διατήρησης της δομής του, φαίνεται να μην επηρεάζεται σημαντικά από μεγαλύτερη συγκέντρωση γλουταραλδεΰδης.[51]

3.2.2 Βελτιστοποίηση συγκέντρωσης ενζύμου στους μικροαντιδραστήρες 30 μl

Η συγκέντρωση του ενζύμου αποτελεί πολύ σημαντική παράμετρο κατά την ομοιοπολική ακινητοποίηση καθώς έχει άμεση σχέση με την ενεργότητα του μικροαντιδραστήρα. Καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του ενζύμου αυξάνεται και η απόδοση του αντιδραστήρα μέχρι το σημείο κορεσμού, όπου είτε δεν ακινητοποιείται μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμου κατά την αύξηση της συγκέντρωσης, είτε η περίσσια ενζύμου που έχει ακινητοποιηθεί δεν είναι βιοκαταλυτικά ενεργή[52]. Καθώς τα ένζυμα αποτελούν μεγάλη δαπάνη για τις ερευνητικές αλλά και βιομηχανικές εφαρμογές των βιοαντιδραστήρων που τα αξιοποιούν, είναι υψίστης σημασία ο καθορισμός του σημείου κορεσμού έτσι ώστε να επιτυγχάνεται η μέγιστη δυνατή απόδοση με τη μικρότερη δαπάνη ενζύμου. [53]. Τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης παρουσιάζονται στα Γραφήματα 4, 5 και 6.





Για τη β gluc έγινε δοκιμή την ενεργότητας των μικροαντιδραστήρων με συγκεντρώσεις ενζύμου κατά την ακινητοποίηση από 0.25-4 μl/ml. Από τις δοκιμές αυτές προέκυψε ότι το σημείο κορεσμού για το συγκεκριμένο ένζυμο βρίσκεται στο 1 μl/ml και περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης δεν οδηγεί σε σημαντική αύξηση της ενεργότητας του μικροαντιδραστήρα.



Γράφημα 5. Εξάρτηση της ενεργότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου GOx από την αρχική συγκέντρωση του ενζύμου κατά την ακινητοποίηση σε μικροαντιδραστήρες 30 μl.



Για την GOx έγινε αντίστοιχα δοκιμή για συγκεντρώσεις από 0.1-1 mg/ml ενζύμου και προσδιορίστηκε ότι το σημείο κορεσμού βρίσκεται στα 0.1 mg/ml.

Γράφημα 6. Εξάρτηση της ενεργότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου HRP από την αρχική συγκέντρωση του ενζύμου κατά την ακινητοποίηση σε μικροαντιδραστήρες 30 μl.

Για την HRP έγινε δοκιμή με διαδοχικές αραιώσεις του αρχικού εκχυλίσματος που είχε ενεργότητας 8.3 units/ml. Σε αυτή την περίπτωση το σημείο κορεσμού φαίνεται να βρίσκεται στα 2.075 units/ml.

3.3 ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΕΣ ΣΕ ΜΙΚΡΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ

3.3.1 Μελέτη επαναχρησιμοποίησης μικροαντιδραστήρων 30 μl

Η μελέτη επαναχρησιμοποίησης των μικροαντιδραστήρων αποτελεί δείκτη της απώλειας της ενεργότητας του μικροαντιδραστήρα μετά από συνεχομένους κύκλους αντίδρασης. Η απώλεια ενεργότητας του μικροαντιδραστήρα μπορεί να οφείλεται σε μετουσίωση των ενζύμων στο εσωτερικό του λόγω μηχανικής καταπόνησης, αποδιάταξης

λόγω θερμικής καταπόνησης ή ιοντικών φαινομένων καθώς και από ενδεχομένη αποβολή ενζύμου λόγω αποκόλλησης από τον φορέα ακινητοποίησης[54]. Συνεπώς μια τέτοια μελέτη αποτελεί σημαντικό εργαλείο αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας της ακινητοποίησης αλλά και της ανθεκτικότητας και αξιοπιστίας του μικροαντιδραστήρα κατά την επαναλαμβανομένη χρήση του. Για όλα τα ένζυμα έγινε μελέτη επαναχρησιμοποίησης έως τον πεντηκοστό κύκλο αντίδρασης και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Γραφήματα 7, 8 και 9.



Γράφημα 7. Επαναχρησιμοποίηση του ακινητοποιημένου ενζύμου β gluc σε μικροαντιδραστήρες 30 μl. Η μελέτη επαναχρησιμοποίησης διήρκησε για 50 κύκλους αντίδρασης (1 λεπτό ανά κύκλο) σε θερμοκρασία 40 °C και pH 6.5.

Οι μικροαντιδραστήρες με ακινητοποιημένη β gluc μπορούσαν να διατηρήσουν πάνω από το 80% της δραστικότητας τους έως το τεσσαρακοστό πέμπτο κύκλο αντίδρασης ενώ η εναπομένουσα δραστικότητα τους έπεσε στο 62% στον πεντηκοστό κύκλο αντίδρασης.[55–57]



Γράφημα 8. Επαναχρησιμοποίηση του ακινητοποιημένου ενζύμου GOx σε μικροαντιδραστήρες 30 μl. Η μελέτη επαναχρησιμοποίησης διήρκησε για 50 κύκλους αντίδρασης (1 λεπτό ανά κύκλο) σε θερμοκρασία 30°C και pH 7.

Παρόμοια εικόνα βλέπουμε και για τους μικροαντιδραστήρες με ακινητοποιημένη GOx που διατήρησε επίσης την δραστικότητα του πάνω από 80% μέχρι τον τεσσαρακοστό πέμπτο κύκλο αντίδρασης ενώ η εναπομένουσα δραστικότητα τους έπεσε στο 76% μέχρι τον πεντηκοστό κύκλο αντίδρασης. Αντίστοιχη εικόνα παρουσιάζεται και κατά την ακινητοποίηση GOx σε σφαιρίδια κυτταρίνης - χιτοζάνης με την ενεργότητα να παραμένει πάνω από 80% για 15 κύκλους αντίδρασης [58]. Αντίθετα, σε άλλες μελέτες με σφαιρίδια η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης ήταν αρκετά μικρότερη. [59]



Γράφημα 9 Επαναχρησιμοποίηση του ακινητοποιημένου ενζύμου HRP σε μικροαντιδραστήρες 30 μl. Η μελέτη επαναχρησιμοποίησης διήρκησε για 50 κύκλους αντίδρασης (1 λεπτό ανά κύκλο) σε θερμοκρασία 30 °C και pH 7.

Στους μικροαντιδραστήρες με ακινητοποιημένη HRP η δραστικότητα παρέμεινε πάνω από 80% μέχρι τον εικοστό πέμπτο κύκλο αντίδρασης ενώ στην συνέχεια η δραστικότητα του έπεσε μέχρι το 65% στον τελευταίο κύκλο αντίδρασης. Σε αντίστοιχες μελέτες αξιολόγησης της ικανότητας επαναχρησιμοποίησης της HRP ακινητοποιημένης σε χιτοζάνη η εναπομένουσα δραστικότητα δεν ξεπερνούσε το 65% της αρχικής στον 10° κύκλο αντίδρασης.[60–62]

3.3.2 Μελέτη θερμοσταθερότητας στους μικροαντιδραστήρες 30 μl

Η μελέτη θερμοσταθερότητας είναι μια πολύ βασική δοκιμή όσον αφορά τα βιοκαταλυτικά χαρακτηριστικά των ακινητοποιημένων αλλά και των ελευθέρων ενζύμων καθώς μας επιτρέπει να αξιολογήσουμε την αποτελεσματικότητα της μεθόδου ακινητοποίησης καθώς και το εύρος θερμοκρασιών στο οποίο τα ένζυμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν στις εκάστοτε εφαρμογές τους. Η ακινητοποίηση ενζύμων έχει σημαντική επίπτωση στη σταθερότητα του ενζύμου κατά τη θερμική καταπόνηση, συνεπώς είναι σημαντικό να προσδιοριστούν οι παράμετροι που παίζουν ρόλο στη σταθερότητα του ενζύμου [54]. Γι' αυτόν τον λόγο, δοκιμάστηκε η κλασσική μέθοδος όπου ο μικροαντιδραστήρας γεμίζεται με buffer συντήρησης και επωάζεται σε συγκεκριμένη θερμοκρασία μέσα σε επωαστήρα για 24 ώρες. Τα αποτελέσματα της μελέτης παρουσιάζονται στο Γράφημα 10.



Γράφημα 10. Θερμοσταθερότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων στους μικροαντιδραστήρες 30 μl για 24 ώρες σε θερμοκρασίες 30,40 και 50 ºC.

Η β gluc διατήρησε την ενεργότητα της κοντά 90% σε όλες τις θερμοκρασίες, αποτέλεσμα το οποίο είναι αναμενόμενο καθώς η β gluc είναι ένα θερμοανθεκτικό ένζυμο οπότε η απώλεια λειτουργικότητας του ενζύμου σε θερμοκρασίες κάτω από 80°C είναι μικρή. Στη βιβλιογραφία παρατηρούνται αρκετά παραδείγματα όπου η ακινητοποιημενη β gluc διατηρεί σημαντικό ποσοστό της ενεργότητας της για αρκετές ώρες. [63–65]

Η GOx κατάφερε να διατηρήσει την ενεργότητα της για 24 ώρες πάνω από 80% της αρχικής ενεργότητας σε θερμοκρασίες 30 °C και 40 °C όμως σε μεγαλύτερη θερμοκρασία υπήρξε μεγάλη πτώση της ενεργότητας. Παρόμοια στην εργασία των Alatzoglou et al. βλέπουμε ότι η GOx έχασε το μεγαλύτερο ποσοστό της δραστικότητας της μετά από 24 ώρες επώαση στους 60°C.[66] Η ίδια εικόνα παρατηρείται και σε άλλες μελέτες όπου η σταθερότητα του ενζύμου μειώνεται σε θερμοκρασίες άνω των 50 °C. [67–70]

Η HRP έδειξε παρόμοια εικόνα με την GOx, πρέπει να αναφερθεί όμως ότι η πρώτη της εναπομένουσας δραστικότητας ήταν σημαντικά μεγαλύτερη. Ίδια εικόνα παρατηρείται και σε αρκετές πηγές στην βιβλιογραφία. [71–73] Παρόλα αυτά πρέπει να σημειωθεί ότι οι περισσότερες μελέτες θερμοσταθερότητας που αφορούν την HRP διεξάγονται σε μικρούς χρόνους συνήθως μικρότεροι των 4 ωρών. Στις εργασίες των Keshta et al.[74] και El-Nahass et al.[72] που διερευνήσαν την μείωση της δραστικότητας της HRP για 4 ώρες σε θερμοκρασίες 30°C και 40°C αντίστοιχα η ενεργότητα του ενζύμου παρουσιάζει πτώση περίπου 90%. Στην περίπτωση μας βλέπουμε εναπομένουσα δραστικότητα της τάξεως του 80% μετά από 24 ώρες πράγμα που δείχνει σημαντική βελτίωση της θερμοσταθερότητας της HRP.

3.3.3 Μελέτη ενεργότητας σε διαφορετικά pH στους μικροαντιδραστήρες 30 μl

Το pH είναι μια πολύ σημαντική παράμετρος για τη λειτουργία των ενζύμων καθώς έκθεση σε ακραίες τιμές pH μπορεί να προκαλέσει μετουσίωση των ενζύμων καθιστώντας τα ανίκανα να πραγματοποιήσουν τις λειτουργίες τους. Ακόμα και μικρές μεταβολές του pH μπορούν να έχουν σημαντική επιρροή στην ικανότητα ενός ενζύμου να καταλύσει μια αντίδραση καθώς είναι πιθανό να αλλάξει η συμβατότητα του ενζύμου με ένα ή πολλά υποστρώματα της αντίδρασης [54]. Η χιτοζάνη η οποία χρησιμοποιείται κατά την ακινητοποίηση ανήκει σε μια κατηγορία πολυμερών που ονομάζονται πολυηλεκτρολητες. Οι πολυηλεκτρολύτες φέρουν στον σκελετό τους ομάδες οι οποίες μέσω δέσμευσης ή αποβολής ιόντος υδρογόνου μπορούν να επηρεάσουν το pH τοπικά και συνεπώς αλλάζοντας την συμπεριφορά των ενζύμων σε διαφορετικά pH [75]. Επομένως είναι σημαντικό να επαναπροσδιοριστούν τα βέλτιστα pH για κάθε ένζυμο καθώς και το εύρος λειτουργίας τους μια τέτοια μελέτη μπορεί να μας βοηθήσει να προσδιορίσουμε τα παραπάνω. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Γραφήματα 13,14 και 15.



Γράφημα 11. Επίδραση του pH στην ενεργότητα της ελεύθερης και ακινητοποιημένης β gluc σε μικροαντιδραστήρες.

Στην περίπτωση της β gluc βλέπουμε ότι η μέγιστη δραστικότητα για το ελεύθερο και το ακινητοποιημένο ένζυμο καταγράφεται στο pH 7.0 όπως έχει αναφερθεί και προηγουμένως στην βιβλιογραφία [55,56,76–79]. Σε πιο όξινα pH (6.0), το ελεύθερο ένζυμο εμφανίζει μια ελαφρώς υψηλότερη δραστικότητα από το ακινητοποιημένο ένζυμο. Αντίθετα, σε βασικά pH παρατηρείται ότι το ακινητοποιημένο ένζυμο εμφανίζει υψηλότερη δραστικότητα από το ελεύθερο, υποδεικνύοντας ότι η και ακινητοποίηση συμβάλει στη διατήρηση της ενεργότητας σε πιο βασικά περιβάλλοντα.[55,79] Παρόμοια συμπεριφορά του ενζύμου παρατηρήθηκε για τη β-γλυκοσιδάση ακινητοποιημένο εμφάνισε μεγαλύτερη σταθερότητα σε βασικά pH.[78]



Γράφημα 12 Επίδραση του pH στην ενεργότητα της ελεύθερης και ακινητοποιημένης GOx σε μικροαντιδραστήρες

Στην περίπτωση της GOx παρατηρείται ότι η μέγιστη δραστικότητα για το ελεύθερο και το ακινητοποιημένο ένζυμο καταγράφεται στο pH 7.0. Και για τις δύο μορφές του ενζύμου, φαίνεται ότι στις όξινες τιμές pH τα ένζυμα διατηρούν μεγάλο μέρος της ενεργότητάς τους, ενώ αντίθετα, όταν το pH λαμβάνει βασικές τιμές, η ενεργότητα των ενζύμων μειώνεται δραστικά. Τα αποτελέσματα μας φαίνεται να συμφωνούν με τα αποτελέσματα των Gu, Y. et al. Ενώ στην βιβλιογραφία αναφέρονται μετακινήσεις της μέγιστης δραστικότητας προς πιο όξινα και βασικά pH. [80,81]



Γράφημα 13 Επίδραση του pH στην ενεργότητα της ελεύθερης και ακινητοποιημένης HRP σε μικροαντιδραστήρες.

Στην περίπτωση της HRP, η μέγιστη δραστικότητα για το ελεύθερο και το ακινητοποιημένο ένζυμο καταγράφεται στο pH 7.0. Και οι δύο μορφές του ενζύμου παραμένουν δραστικές τόσο σε όξινα όσο και σε βασικά pH. Στη βιβλιογραφία παρατηρείται το ίδιο φαινόμενο [60,82,83] αλλά σε μερικές περιπτώσεις παρατηρείται μια μικρή μετατόπιση προς πιο βασικά pH [61,62].

3.4 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΕ ΜΙΚΡΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ

Ο προσδιορισμός των κινητικών παραμέτρων των ακινητοποιημένων ενζύμων σε σχέση με τα αντίστοιχα ελεύθερα μπορεί να μας βοηθήσει στην κατανόηση της επίδρασης της μήτρας ακινητοποίησης στο ένζυμο το οποίο ακινητοποιείται. Έχει δειχθεί ότι διαφορετικά ένζυμα έχουν διαφορετική συμπεριφορά σε διαφορετικές μήτρες. Είτε η κατάλυση σε συγκεκριμένες συνθήκες ευνοείται είτε εμποδίζεται. Αυτή η αλλαγή στη συμπεριφορά του ενζύμου μπορεί να οφείλεται σε στερεοχημική παρεμπόδιση είτε σε αλλαγή του μικροπεριβάλλοντος του ενζύμου. Για να μπορέσουμε να κατανοήσουμε αυτές τις αλλαγές συνήθως προσδιορίζονται δυο πολύ βασικές παράμετροί των ενζύμων, η Km και η Vmax. Στα δικά μας πειράματα αν και υπολογίστηκαν και οι δυο μεταβλητές λόγω των διαφορετικών ποσών ενζύμων σε κάθε περίπτωση δεν ήταν δυνατή η σύγκριση και εξαγωγή συμπερασμάτων από την Vmax.[84]

Στη μικρορευστομηχανική, πολλές από τις ιδιότητες τόσο των ενζύμων όσο και των υπολοίπων συστατικών των μικροαντιδραστήρων παρουσιάζουν νέες ιδιότητες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δραστική μεταβολή των κινητικών παραμέτρων των ενζύμων. Συγκεκριμένα, οι παράμετροι αυτές μεταβάλλονται με την αύξηση ή μείωση της ταχύτητας ροής του μικροαντιδραστήρα. Για να μπορέσουμε να μελετήσουμε αυτές τις μεταβολές ήταν αναγκαία η χρήση του μοντέλου Lilly-Hornby το οποίο δημιουργήθηκε αρχικά για να περιγράψει τη συμπεριφορά των ενζύμων μέσα σε πακτωμένες στήλες[45], αλλά βρίσκει πλέον και μεγάλες εφαρμογές στην μικρορευστομηχανική. [85] Παρόλα αυτά, οι συνθήκες που διαφοροποιούνται κατά την ακινητοποίηση των ενζύμων σε μικροαντιδραστήρες είναι πολύπλοκες, πράγμα που καθιστά την κατανόηση του ενζύμου που αλλάζουν λόγω της ακινητοποίησης του ενζύμου που αλλάζουν λόγω της ακινητοποίησης του μικροαντιδραστήρα.[86]

Κατά τη χρήση του μοντέλου Lilly-Hornby είναι απαραίτητη η συλλογή δεδομένων σε διαφορετικές ταχύτητες ροής και με διαφορετική αρχική συγκέντρωση υποστρώματος. Στη συνέχεια, τα δεδομένα αυτά προβάλλονται σε διάγραμμα με άξονες F[A₀] και -ln(1-F), όπου η κλίση των ευθείων που σχηματίζονται αντιστοιχεί στην Kmapp. Η Kmapp σχετίζεται με φαινόμενα μεταφοράς μάζας. Αύξηση της Km^{app} σχετίζεται με την παρουσία περιορισμών μεταφοράς μάζας[87] ενώ η μείωση της σχετίζεται με την απουσία αυτών. [88]

3.4.1 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων β gluc σε μικροαντιδραστήρες 30 μl

Για την β gluc έγινε κινητική μελέτη σε στατικές συνθήκες για συγκεντρώσεις από 0.25-4 mM pNPG. Τα αποτελέσματα της κινητικής μελέτης παρουσιάζονται στα Γραφήματα 14, 15 και στον Πίνακα 2.



Γράφημα 14. Επίδραση της ταχύτητας ροής στην μετατροπή του προϊόντος για διαφορετικές συγκέντρωσης του υποστρώματος της β gluc ακινητοποιημένης σε μικροαντιδραστήρα.



Γράφημα 15. Γράφημα που προέρχεται από την εφαρμογή του μοντέλου Lily- Hornby για τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από τις αντιδράσεις σε διαφορετικές ταχύτητες ροής και αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος για το ένζυμο β gluc ακινητοποιημένο σε μικροαντιδραστήρα.

Ταχύτητα ροής (μl/min)	Km ^{app} (mM)
20	0.854
30	0.585
40	0.551
50	0.486

Πίνακας 2. Επίδραση της ταχύτητας ροής στην Kmapp του ενζύμου β γλυκοσιδάση

Το Γράφημα 14 δείχνει την επίδραση του ρυθμού ροής στη μετατροπή του υποστρώματος για αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος 0.25–4.0 mM. Μπορεί να παρατηρηθεί ότι η παρουσία χαμηλότερων ρυθμών ροής έχει ως αποτέλεσμα υψηλότερη

ενζυμική δράση και συνεπώς υψηλότερη μετατροπή υποστρώματος. Αυτό θα μπορούσε να εξηγηθεί από τον χρόνο παραμονής μεταξύ του ενζύμου και του υποστρώματος. Καθώς ο ρυθμός ροής μειώνεται, το ένζυμο και το υπόστρωμα έχουν περισσότερο χρόνο να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους, οδηγώντας σε υψηλότερες αποδόσεις μετατροπής.[89]

Στο επόμενο βήμα, οι φαινομενικές τιμές Km εκτιμήθηκαν χρησιμοποιώντας τα κινητικά δεδομένα που ελήφθησαν σε διαφορετικές αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος και ρυθμούς ροής. Τα γραμμικά διαγράμματα του $F^*[A]_0$ προς το -ln(1 - F)παρουσιάζονται στο Γράφημα 15, όπου η κλίση αντιστοιχεί στην Km^{app}. Στον Πίνακα 2 παρουσιάζονται οι τιμές των Km^{app} για τις διάφορες συνθήκες. Μπορεί να παρατηρηθεί ότι η αύξηση του ρυθμού ροής στον μικροαντιδραστήρα έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της τιμής της Km^{app}, υποδεικνύοντας κατάλληλη συγγένεια μεταξύ του ενζύμου και του υποστρώματος και περιορισμό των φαινομένων μεταφοράς μάζας. Αυτό το αποτέλεσμα αποδεικνύει την αποτελεσματικότητα του μικροαντιδραστήρα για την προώθηση της διάχυσης του υποστρώματος προς το ενεργό κέντρο του ακινητοποιημένου ενζύμου. Μια παρόμοια μείωση της Km^{app} με την αύξηση της ταχύτητας ροής αναφέρθηκε και στην εργασία των Bellou et al.[90] και των Carvalho et al.[88] όπου η Km^{app} της ακινητοποιημένης λιπάσης και ινβερτάσης, αντίστοιχα, φαίνεται να μειώνεται ελαφρώς καθώς αυξάνεται η ταχύτητα ροής.

3.4.2 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων GOx σε μικροαντιδραστήρες 30 μl

Για την GOx έγινε κινητική μελέτη σε στατικές συνθήκες για συγκεντρώσεις από 2.5-25 mM γλυκόζης. Τα αποτελέσματα της κινητικής μελέτης παρουσιάζονται στα Γραφήματα 16, 17 και στον Πίνακα 3.



Γράφημα 16 Επίδραση της ταχύτητας ροής στην μετατροπή του προϊόντος για διαφορετικές συγκέντρωσης του υποστρώματος της GOx



Γράφημα 17. Γράφημα που προέρχεται από την εφαρμογή του μοντέλου Lily- Hornby για τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από τις αντιδράσεις σε διαφορετικές ταχύτητες ροής και αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος για το ένζυμο GOx

Ταχύτητα ροής (μl/min)	Km ^{app} (mM)
5	1.844
10	1.921
20	2.435
30	2.926
40	3.331

Πίνακας 3. Επίδραση της ταχύτητας ροής στην Kmapp του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης

Μετά την εφαρμογή της εξίσωσης Lilly Hornsby για την GOx παρατηρήθηκε αύξηση της Km^{app} όσο αυξάνεται η ταχύτητα ροής. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρουν οι Gong et al.[87] όπου η Km^{app} της ακινητοποιημένης ναρινγκινάσης φαίνεται να αυξάνεται όσο αυξάνεται η ταχύτητα ροής. Παρόμοια φαινόμενα παρατηρήθηκαν και στην εργασία των Wang et al. με ακινητοποιημένη λιπάση.[91] Η αύξηση της Km^{app} ενδέχεται να οφείλεται σε φαινόμενα περιορισμού μάζας.

3.4.3 Προσδιορισμός κινητικών παραμέτρων HRP σε μικροαντιδραστήρες 30 μl

Για την GOx έγινε κινητική μελέτη σε στατικές συνθήκες για συγκεντρώσεις από 0.1-0.175 mM υπεροξειδίου του υδρογόνου. Τα αποτελέσματα της κινητικής μελέτης παρουσιάζονται στα Γραφήματα 18, 19 και στον Πίνακα 4.



Γράφημα 18 Επίδραση της ταχύτητας ροής στην μετατροπή του προϊόντος για διαφορετικές συγκέντρωσης του υποστρώματος της HRP



Γράφημα 19. Γράφημα που προέρχεται από την εφαρμογή του μοντέλου Lilly- Hornby για τα δεδομένα που συλλέχθηκαν από τις αντιδράσεις σε διαφορετικές ταχύτητες ροής και αρχικές συγκεντρώσεις υποστρώματος για το ένζυμο HRP

Πίνακας 4 Επίδραση της ταχύτητας ροής στην Kmapp του ενζύμου υπεροξειδάση του χρένου

Ταχύτητα ροής (μl/min)	Km ^{app} (mM)
5	0.069
10	0.062
20	0.122
30	0.195
40	0.335

Μετά την εφαρμογή της εξίσωσης Lilly Hornsby για την HRP παρατηρήθηκε αύξηση της Km^{app} όσο αυξάνεται η ταχύτητα ροής. Το αποτέλεσμα αυτό, όπως και στην περίπτωση της GOx, πιθανώς να σχετίζεται με αύξηση των φαινομένων μεταφοράς μάζας.

3.5 ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΚΙΝΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΜΕΤΡΩΝ ΣΕ RINGS

Για να μπορέσουμε να κατανοήσουμε καλυτέρα τον ρόλο της μικρορευστομηχανικής στην Km και να μπορέσουμε να την διαχωρίσουμε από την επίδραση της ακινητοποίησης στη σταθερά αυτή, κρίναμε απαραίτητο τον προσδιορισμό των κινητικών παραμέτρων του ακινητοποιημένο ενζύμου εκτός μικροαντιδραστήρα με την μορφή των rings όπου το ένζυμο ακινητοποιείται με τον ίδιο τρόπο αλλά οι συνθήκες κατάλυσης παραμένουν στατικές, δηλαδή δεν υπάρχει ροή και η αντίδραση δε γίνεται σε μικρές διαστάσεις. Παράλληλα έγινε και αξιολόγηση της σταθερά Κm στο ελεύθερο ένζυμο υπό τις ιδίες συνθήκες αντίδρασης. Ως αποτέλεσμα είδαμε για το ένζυμο β-gluc και για συγκεντρώσεις pNP από 0.25 mM έως 4 mM ότι η Km του ελεύθερου ενζύμου είναι 0.4602 mM και του ακινητοποιημένου σε rings 1.807 mM. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο γράφημα 20. Παρόμοια αύξηση στο ένζυμο b gluc παράτησαν και οι alnadari et al [55,92] ενώ το ίδιο παρατηρήθηκε και σε άλλα ένζυμα του τύπου βγλυκοσιδάσης ακινητοποιημένης σε χιτοζάνη ή χιτίνη στη βιβλιογραφία.[93,94]



Γράφημα 20 Κινητική μελέτη για το ένζυμο β-γλυκοσιδάση σε ελεύθερη μορφή (Δεξιά) και ακινητοποιημένο σε rings (Αριστερά)

Για την GOx η κινητική μελέτη πραγματοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις από 25-25 mM γλυκόζης σε στατικές συνθήκες. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι η Km είναι 17.97 mM για το ελεύθερο ένζυμο και 26.55 mM για το ακινητοποιημένο ένζυμο σε rings. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο γράφημα 21. Τα αποτελέσματα αυτά για το συγκεκριμένο ένζυμο είναι σύμφωνα με την βιβλιογραφία. [80,95,96]



Γράφημα 21 Κινητική μελέτη για το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης σε ελεύθερη μορφή (Δεξιά) και ακινητοποιημένο σε rings (Αριστερά)

Για την HRP η κινητική μελέτη πραγματοποιήθηκε σε συγκεντρώσεις από 0.1-0.175 mM υπεροξειδίου του υδρογόνου σε στατικές συνθήκες ενώ παρατηρήθηκε αύξηση της Km από 0.2029 mM στο ελεύθερο ένζυμο σε 0.4677 mM στο ακινητοποιημένο ένζυμο. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Γράφημα 22. Αύξηση της Km μετά από ακινητοποίηση σε χιτοζάνη αναφέρεται επίσης στη βιβλιογραφία [61,83,97,98]



Γράφημα 22 Κινητική μελέτη για το ένζυμο υπεροξειδάση του χρένου σε ελεύθερη μορφή (Δεξιά) και ακινητοποιημένο σε rings (Αριστερά)

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα από το ελεύθερο ένζυμο το ακινητοποιημένο ένζυμο σε rings και το ακινητοποιημένο ένζυμο σε μικροαντιδραστήρες, παρατηρείται αύξηση της Km κατά την ακινητοποίηση πιθανώς λόγο φαινομένων περιορισμού μεταφοράς μάζας. Παράλληλα, βλέπουμε δραματική μείωση της Km κατά την ακινητοποίηση των ενζύμων σε μικροαντιδραστήρες σε σχέση με το ακινητοποιημένο ένζυμο σε rings σε όλα τα ένζυμα, αλλά και με το ελεύθερο ένζυμο στην περίπτωση της GOx. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί από τη μείωση των φαινομένων περιορισμού μεταφοράς την μάζας λόγο της μικροκλίμακας, ενώ θα μπορούσε να συνεισφέρει και η συνεχομένη απομάκρυνση του προϊόντων της αντίδρασης από το εγγύς μικροπεριβάλλον του ενζύμου λόγω της ροής που θα μπορούσαν να λειτουργήσουν ανασταλτικά στη λειτουργία του.[32,99–101]

3.6 ΚΑΤΑΡΡΑΚΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΩΝ ΣΕ ΔΙΑΜΕΡΙΣΜΑΤΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥΣ ΜΙΚΡΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΕΣ

Οι καταρράκτες αντιδράσεων είναι μια από τις σημαντικότερες τεχνικές στη βιοκατάλυση καθώς μας παρέχει μεγάλα πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τις κλασσικές μεθόδους step by step αντιδράσεων Συγκεκριμένα, με τον σχεδιασμό ενός καταρράκτη αντιδράσεων μειώνεται δραματικά ο χρόνος αντίδρασης καθώς και ο όγκος αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται κατά την αντίδραση[102]. Επιπλέον, σε συνδυασμό με τις μοναδικές ιδιότητες που μας παρέχουν οι τεχνικές της μικρορευστομηχανικής τα πλεονεκτήματα αυτά εντείνονται. Παρόλα αυτά οι γνώμες διίστανται όσον αφορά τον τρόπο ακινητοποίησης των ενζύμων που συμμετέχουν στην αντίδραση. Αυτές οι μέθοδοι είναι δυο, η συν-ακινητοποίηση και η διαμερισματοποίηση [103]. Στη συν-ακινητοποίηση, όλα τα ένζυμα ακινητοποιούνται στην ίδια δομή χωρις χωρικά όρια ή διευθέτηση, ενώ στη διαμερισματοποίηση τα ένζυμα διαχωρίζονται χωρικά. Γι΄ αυτόν τον λόγο, προχωρήσαμε στην ακινητοποίηση, σε πανομοιότυπους μικροαντιδραστήρες, των τριών προαναφερθέντων ενζύμων (β gluc, GOx, HRP) και με τις δυο μεθόδους με σκοπό τη σύγκριση τους.



Γράφημα 23 Σύγκριση δραστικότητας ακινητοποιημένων ενζύμων ακινητοποιημένα ξεχωριστά και σε καταρράκτη αντίδρασης



Γράφημα 24 Σύγκριση δραστικότητας ακινητοποιημένων ενζύμων με την μέθοδο της διαμερισματοποιησης (Compartment) και την μέθοδο της συνακινητοποιησης (Co-immobilization)

Στα αποτελέσματα της δοκιμασίας αυτής παρατηρείται ότι το περιοριστικό ένζυμα για τον καταρράκτη αντιδράσεων είναι η GOx. Όσον αφορά την σύγκριση του συνακινητοποιημένου συστήματος με το διαμερισματοποιημένο παρατηρήθηκε ότι το διαμερισματοποιημένο σύστημα είχε σαφώς μεγαλύτερη ενεργότητα κατά 245%. Αυτά τα αποτελέσματα συμφωνούν με τη βιβλιογραφία. [104,105] Αυτό μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι κατά τη διαμερισματοποίηση οι συγκεντρώσεις των προϊόντων που χρησιμοποιούνται από κάθε ένζυμο φτάνουν σε μεγαλύτερες τιμές από ότι στο συνακινητοποιημένο σύστημα με αποτέλεσμα το επόμενο ένζυμο να μπορεί να δουλέψει για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα σε υψηλές ταχύτητες και συνεπώς μεγαλύτερη συγκέντρωση προϊόντων.[106] Επιπλέον, αποφεύγονται τα φαινόμενα απενεργοποίησης από τα προϊόντα των αντιδράσεων.[104–106]

3.7 Scale up Μικροαντιδραστήρες

Πάρα τα πολλά ευνοϊκά χαρακτηριστικά των μικροαντιδραστήρων η εφαρμογή τους στην βιομηχανία παραμένει περιορισμένη. Κύριος λόγος γι' αυτό το φαινόμενο είναι η χαμηλή παραγωγικότητα τους σε σχέση με το χρόνο όπως και προβλήματα στην μεταφορά θερμότητας και την διάχυση των αντιδρώντων. Αυτά τα μειονεκτήματα αν και μπορούν να αντιμετωπιστούν για εργαστηριακές και ερευνητικές εφαρμογές δεν πληρούν τις προδιάγραφες της βιομηχανικής παραγωγής[107]. Έχουν γίνει προσπάθειες για την κλιμάκωση τέτοιων μικροαντιδραστήρων με πολλούς τρόπους όμως για τους μικροαντιδραστήρες που παράγονται μέσω τρισδιάστατης εκτύπωσης η έρευνα είναι ακόμα σε αρχικά στάδια. Στο βέλτιστο της γνώσης μας δεν έχει ξαναγίνει προσπάθεια κλιμάκωσης των μικροαντιδραστήρων μέσω παράλληλης συστοιχίας εκτυπωμένης εξολοκλήρου με 3D εκτύπωση. Η παράλληλη συστοιχία είναι η κατεξοχήν μέθοδος για την κλιμάκωση μικροαντιδραστήρων γι' αυτόν τον λόγο σχεδιάστηκε και εκτυπώθηκε μια συσκευή η οποία περιέχει μικροαντιδραστήρες σε παράλληλη συστοιχία.

3.7.1 Προσομοιώσεις ροής

Για να βεβαιωθούμε ότι εξασφαλίζεται η ομαλή και ομοιόμορφη ροή του διαλύματος μέσα στον μικροαντιδραστήρα θεωρήσαμε αναγκαία τη χρήση λογισμικού προσομοίωσης κίνησης των ρευστών. Οι προσομοιώσεις πραγματοποιήθηκαν μέσω του προγράμματος CFD (Autodesk) το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί στο παρελθόν εκτενώς για την μελέτη ροών σε μικροαντιδραστήρες. [108–110]



Εικόνα 11. Προσομοιώσεις ροής ρευστών μέσα σε scale up μικροαντιδραστηρα. Α. 50μl/min B. 150μl/min Γ. 250μl/min

Η ροή του υγρού προσομοιώθηκε για 125 διαφορετικούς ρυθμούς ροής που κυμαίνονται από 2 έως 250 μL/min. Η προσομοίωση για τρεις ρυθμούς ροής παρουσιάζεται στη Εικόνα 11. Η ροή του υγρού είχε τυρβώδη χαρακτηριστικά, κάτι που είναι σύνηθες για μικρορευστονικές συσκευές με κανάλια μεγαλύτερου πλάτους από 500 μm. Από τις προσομοιώσεις, παρατηρήθηκε ότι μέχρι την ταχύτητα 150 μl/min οι διαφορές στην ταχύτητα ροής του ρευστού σε κάθε τμήμα του αντιδραστήρα ήταν μικρές, ενώ μετά την ταχύτητα αυτή, οι επιμέρους ταχύτητες διαφοροποιούνται. Τα κανάλια στο κέντρο του μικροαντιδραστήρα έχουν αυξημένη ταχύτητα σε σχέση με τα ακραία.

3.7.2 Απόδοση scale up αντιδραστήρα

Στο επόμενο βήμα, χρησιμοποιήσαμε την παραπάνω διαμόρφωση για την ομοιοπολική ακινητοποίηση της β-γλυκοσιδάσης. Ο πολυκάναλος μικροαντιδραστήρας εφαρμόστηκε για την υδρόλυση του pNPG προς την παραγωγή του p-NP. Με αυτόν τον ενζυμικό πολυκάναλο μικροαντιδραστήρα, επετεύχθη παραγωγή p-NP ίση με 0.074 μmol/min, που είναι 4.6 φορές υψηλότερη από αυτή που παρατηρήθηκε στον μικροαντιδραστήρα μονού καναλιού (0.016 μmol/min). Η αύξηση αυτή φαίνεται να είναι σύμφωνη με τη διαφορά της διαθέσιμης λειτουργικής επιφάνειας του κάθε μικροαντιδραστήρα με τον αντιδραστήρα scale up να επιδεικνύει 87% σχετική δραστικότητα σε σχέση με τον αντιδραστήρων 30 μl. Από την άλλη όταν συγκριθεί η παραγωγικότητα με την ποσότητα ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε κατά την ακινητοποίηση του αντιδραστήρα scale up υστερεί σημαντικά. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη μεγάλη ποσότητα διαλύματος που απαιτείται για να καλύψει όλους τους χώρους του αντιδραστήρα και η οποία βρίσκεται επί το πλείστων στις κοιλότητες αμφότερα του μικροαντιδραστήρα και έχουν ως σκοπό την ομαλή διέλευση του ρευστού προς όλους τους μικροαντιδραστήρες. Αυτός ο περιορισμός μπορεί να περιοριστεί εφόσον οι μικροαντιδραστήρες επιμηκυνθούν έτσι ώστε να παρέχουν μεγαλύτερη λειτουργική επιφάνεια και παράλληλα να αυξηθεί η χωρητικότητα του μικροαντιδραστήρα με αποτέλεσμα ο όγκος των δυο κοιλοτήτων να είναι αμελητέος ως προς τον συνολικό όγκο της συσκευής. Αξίζει να σημειωθεί ότι η περαιτέρω βελτιστοποίηση της απόδοσης του ενζυμικού μικροαντιδραστήρα θα μπορούσε να επιτευχθεί μέσω προσομοιώσεων CFD όπως υποδεικνύεται στην εργασία των Venezia et al. όσον αφορά τη β-γλυκοσιδάση.[11]

3.7.3 Επαναχρησιμοποίηση scale up αντιδραστήρα

Τέλος, ο scale up πολυκάναλος μικροαντιδραστήρας μελετήθηκε ως προς τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του σε πολλαπλούς διαδοχικούς καταλυτικούς κύκλους.





Όπως φαίνεται από το Γράφημα 25, ο πολυκάναλος μικροαντιδραστήρας χρησιμοποιήθηκε για έξι διαδοχικούς καταλυτικούς κύκλους. Η ακινητοποιημένη β gluc διατήρησε πάνω από 85% της αρχικής της δράσης στο τέλος του πέμπτου κύκλο αντίδρασης, υποδεικνύοντας ότι αυτού του είδους η διάταξη μπορεί να εφαρμοστεί αποτελεσματικά για πολλαπλούς βιοκαταλυτικούς κύκλους.

4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία σχεδιάστηκαν και κατασκευάστηκαν τέσσερεις διαφορετικές συσκευές και κατασκευάστηκαν με τη χρήση τρισδιάστατου εκτύπωση τύπου FDM ενώ το υλικό που χρησιμοποιήθηκε για όλες τις συσκευές ήταν το PLA. Συγκεκριμένα, σχεδιάστηκε ένας μικροαντιδραστήρας μικρού όγκου (30 μl), ένας δακτύλιος (ring), μια πολυενζυμική συσκευή και ένας μικροαντιδραστήρας μεγάλης χωρητικότητάς (scale up). Οι αντιδραστήρες αυτοί χρησιμοποιήθηκαν για την ομοιοπολική ακινητοποίηση τριών ενζύμων: της β-γλυκοσιδάσης από τον οργανισμό Thermotoga maritima, της οξειδάσης της γλυκόζης από Aspergillus niger και της υπεροξειδάσης από ραπανάκια. Με τη χρήση του μικροαντιδραστήρα μικρού όγκου προσδιορίστηκε η βέλτιστη συγκέντρωση γλουταραλδεΰδης κατά την ακινητοποίηση η οποία για όλα τα προαναφερθέντα ένζυμα προσδιορίστηκε στο 1% ν/ν. Στη συνέχεια, έγινε προσδιορισμός της βέλτιστης ποσότητας ενζύμου ο οποίος καθορίστηκε για τη βγλυκοσιδάση στο 1 μl/ml, για την οξειδάση της γλυκόζης 0.1 mg/ml και για την υπεροξειδάση στα 2.075 units/ml. Κατόπιν αυτών, έγιναν μελέτες για τον προσδιορισμό της σταθερότητας των ενζύμων όσον αφορά αντοχή στη θερμότητα, σε διαφορετικά pH και την επαναχρησιμοποίηση. Όσον αφορά τη σταθερότητα έναντι της; θερμότητας έγινε προσδιορισμός της ενεργότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου σε θερμοκρασίες 30,40, και 50 °C για 24 ώρες σε μικροαντιδραστήρες γεμάτους με ρυθμιστικό διάλυμα και απουσία αυτού καθώς και σύγκριση με το ελεύθερο ένζυμο. Επιπλέον έγινε παρατήρηση της σταθερότητας των ενζύμων στην θερμότητα σε συνδυασμό με επαναχρησιμοποίηση. Από την μελέτη αυτή παρατηρήθηκε ότι η ακινητοποιημένη β γλυκοσιδάσης είχε βελτιωμένη σταθερότητα σε όλες της θερμοκρασίες στους γεμάτους με ρυθμιστικό διάλυμα αντιδραστήρες έναντι του ελευθέρου ενζύμου. Στην περίπτωση της οξειδάσης της γλυκόζης παρατηρήθηκε βελτίωση της σταθερότητας του ενζύμου σε θερμοκρασία 40 °C. Τέλος για την υπεροξειδάση παρατηρήθηκε μείωση της σταθερότητας σε θερμοκρασία 50 °C. Επιπλέον πραγματοποιήθηκε μελέτη επαναχρησιμοποίησης των ενζύμων οπου δείχθηκε ότι μετά από 50 κύκλους αντίδρασης η β γλυκοσιδάσης διατήρησε 62% της δραστικότητας της, η οξειδάση της γλυκόζης 76% και η υπεροξειδάση του χρένου 65%. Από την μελέτη ενεργότητας σε διαφορετικά pH παρατηρήθηκε ότι η βέλτιστη τιμή pH για όλα τα ένζυμα είναι 7.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν κινητικές μελέτες με χρήση του ελεύθερου ενζύμου, ακινητοποιημένου ενζύμου σε rings σε στατικές συνθήκες και σε μικροαντιδραστήρες υπό ροή. Η οξειδάση της γλυκόζης παρουσίασε μείωση της Vmax και αύξηση της Km απουσία ροής ενώ παρατηρήθηκε μείωση της Km υπό ροή σε επίπεδα ακόμα χαμηλότερα και από το ελεύθερο ένζυμο. Στην περίπτωση της υπεροξειδάσης παρατηρήθηκε αύξηση της Vmax με παράλληλη αύξηση της Km σε συνθήκες απουσίας ροής ενώ υπό ροή παρατηρήθηκε δραματική μείωση της Km. Στην κινητική μελέτη της β γλυκοσιδάσης παρατηρήθηκε αύξηση της Vmax και της Km σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο σε συνθήκες

Σε επόμενο στάδιο πραγματοποιήθηκε ακινητοποίηση των τριών ενζύμων με τη χρήση της πολυενζυμική συσκευής για την δημιουργία καταρράκτη αντίδρασης. Στα πλαίσια αυτής της μελέτης έγινε μέτρηση της δραστικότητας κάθε ενζύμου ξεχωριστά καθώς και η παραγωγικότητα του καταρράκτη όταν τα ένζυμα είναι ακινητοποιημένα σε σειρά και συνακινητοποιημένα. Από τη μελέτη αυτή προέκυψε ότι το περιοριστικό ένζυμο για αυτή της αντίδραση είναι οξειδάσης της γλυκόζης ενώ παρατηρήθηκε ότι ο καταρράκτης αντίδρασης σε σειρά είχε μεγαλύτερά ενεργότητα κατά 245% από το συν-ακινητοποιημένο ανάλογο του. Τέλος, έγινε προσπάθεια κλιμάκωσης της αντίδρασης με χρήση του μικροαντιδραστήρα scale up όπου όλα τα ένζυμα ακινητοποιήθηκαν σε σειρά και αξιολογήθηκε η παραγωγικότητα του καταρράκτη αντίδρασης. Με την μέθοδο αυτή επιτεύχθηκε πενταπλάσια παραγωγή προϊόντος σε σχέση με τον μικροαντιδραστήρα 30 μl.

Μεγάλο μέρος των αποτελεσμάτων αυτής της πτυχιακής εργασίας δημοσιεύτηκε στο διεθνές επιστημονικό περιοδικό *Micromachines* (MDPI) με τίτλο "Biocatalytic Performance of β-Glucosidase Immobilized on 3D-Printed Single- and Multi-Channel Polylactic Acid Microreactors". Συγκεκριμένα η δημοσίευση περιείχε τα περισσότερα πειράματα τα οποία έγιναν χρησιμοποιώντας την ακινητοποιημένη β-γλυκοσιδάση σε αντιδραστήρες 30μl και στον πολυκάναλο βιοαντιδραστήρα (scale up).[112]

5 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- 1. Gibson, I.; Rosen, D.; Stucker, B.; Khorasani, M. Additive Manufacturing Technologies;
- 2. Capel, A.J.; Rimington, R.P.; Lewis, M.P.; Christie, S.D.R. 3D Printing for Chemical, Pharmaceutical and Biological Applications. *Nat Rev Chem* 2018, *2*, 422–436.
- 3. Su, A.; Al'Aref, S.J. History of 3D Printing. In *3D Printing Applications in Cardiovascular Medicine*; Elsevier, 2018; pp. 1–10 ISBN 9780128039175.
- Ngo, T.D.; Kashani, A.; Imbalzano, G.; Nguyen, K.T.Q.; Hui, D. Additive Manufacturing (3D Printing): A Review of Materials, Methods, Applications and Challenges. *Compos B Eng* 2018, *143*, 172–196.
- 5. Vanaei, S.; Parizi, M.S.; Vanaei, S.; Salemizadehparizi, F.; Vanaei, H.R. An Overview on Materials and Techniques in 3D Bioprinting Toward Biomedical Application. *Engineered Regeneration* 2021, *2*, 1–18.
- Shahrubudin, N.; Lee, T.C.; Ramlan, R. An Overview on 3D Printing Technology: Technological, Materials, and Applications. In Proceedings of the Procedia Manufacturing; Elsevier B.V., 2019; Vol. 35, pp. 1286–1296.
- 7. Gokhare, V.G.; Raut, D.N.; Shinde, D.K. A Review Paper on 3D-Printing Aspects and Various Processes Used in the 3D-Printing;
- 8. Gülcan, O.; Günaydın, K.; Tamer, A. The State of the Art of Material Jetting—a Critical Review. *Polymers (Basel)* 2021, *13*.
- 9. Palmara, G.; Frascella, F.; Roppolo, I.; Chiappone, A.; Chiadò, A. Functional 3D Printing: Approaches and Bioapplications. *Biosens Bioelectron* 2021, *175*.
- 10. Ahangar, P.; Cooke, M.E.; Weber, M.H.; Rosenzweig, D.H. Current Biomedical Applications of 3D Printing and Additive Manufacturing. *Applied Sciences (Switzerland)* 2019, *9*.
- 11. Attaran, M. The Rise of 3-D Printing: The Advantages of Additive Manufacturing over Traditional Manufacturing. *Bus Horiz* **2017**, *60*, 677–688, doi:10.1016/j.bushor.2017.05.011.
- 12. Ford and Minshall 3DP and Education Literature Review.
- 13. Chen, C.; Mehl, B.T.; Munshi, A.S.; Townsend, A.D.; Spence, D.M.; Martin, R.S. 3D-Printed Microfluidic Devices: Fabrication, Advantages and Limitations - a Mini Review. *Analytical Methods* 2016, *8*, 6005–6012.
- 14. M. M. Elnashar, M. Review Article: Immobilized Molecules Using Biomaterials and Nanobiotechnology. *J Biomater Nanobiotechnol* **2010**, *01*, 61–77, doi:10.4236/jbnb.2010.11008.
- 15. Romero-Fernández, M.; Paradisi, F. 2 *General Overview on Immobilization Techniques* of Enzymes for Biocatalysis; 2020;

- 16. Muronetz, V.I.; Pozdyshev, D. V.; Semenyuk, P.I. Polyelectrolytes for Enzyme Immobilization and the Regulation of Their Properties. *Polymers (Basel)* 2022, *14*.
- 17. Romero-Fernández, M.; Paradisi, F. General Overview on Immobilization Techniques of Enzymes for Biocatalysis. *Catalyst Immobilization* **2020**, 409–435, doi:10.1002/9783527817290.ch12.
- 18. Bié, J.; Sepodes, B.; Fernandes, P.C.B.; Ribeiro, M.H.L. Enzyme Immobilization and Co-Immobilization: Main Framework, Advances and Some Applications. *Processes* 2022, *10*.
- 19. Rabe, K.S.; Müller, J.; Skoupi, M.; Niemeyer, C.M. Kaskaden in Kompartimenten: Auf Dem Weg Zu Maschinengestützter Biotechnologie. *Angewandte Chemie* **2017**, *129*, 13760–13777, doi:10.1002/ange.201703806.
- 20. Fornera, S.; Kuhn, P.; Lombardi, D.; Schlüter, A.D.; Dittrich, P.S.; Walde, P. Sequential Immobilization of Enzymes in Microfluidic Channels for Cascade Reactions. *Chempluschem* **2012**, *77*, 98–101, doi:10.1002/cplu.201100068.
- 21. Ricca, E.; Brucher, B.; Schrittwieser, J.H. Multi-Enzymatic Cascade Reactions: Overview and Perspectives. *Adv Synth Catal* 2011, *353*, 2239–2262.
- 22. Arana-Peña, S.; Carballares, D.; Morellon-Sterlling, R.; Berenguer-Murcia, Á.; Alcántara, A.R.; Rodrigues, R.C.; Fernandez-Lafuente, R. Enzyme Co-Immobilization: Always the Biocatalyst Designers' Choice...or Not? *Biotechnol Adv* 2021, *51*.
- 23. Basso, A.; Serban, S. Industrial Applications of Immobilized Enzymes—A Review. *Molecular Catalysis* 2019, *479*.
- 24. Sirisha, V.L.; Jain, A.; Jain, A. Enzyme Immobilization: An Overview on Methods, Support Material, and Applications of Immobilized Enzymes. In *Advances in Food and Nutrition Research*; Academic Press Inc., 2016; Vol. 79, pp. 179–211.
- 25. D'souza, S.F. Immobilization and Stabilization of Biomaterials for Biosensor Applications; 2001; Vol. 96;.
- 26. Soares, J.C.; Moreira, P.R.; Queiroga, A.C.; Morgado, J.; Malcata, F.X.; Pintado, M.E. Application of Immobilized Enzyme Technologies for the Textile Industry: A Review. *Biocatal Biotransformation* 2011, *29*, 223–237.
- 27. Niculescu, A.G.; Chircov, C.; Bîrcă, A.C.; Grumezescu, A.M. Fabrication and Applications of Microfluidic Devices: A Review. *Int J Mol Sci* 2021, *22*, 1–26.
- 28. Tamborini, L.; Fernandes, P.; Paradisi, F.; Molinari, F. Flow Bioreactors as Complementary Tools for Biocatalytic Process Intensification. *Trends Biotechnol* 2018, *36*, 73–88.
- 29. Bojang, A.A.; Wu, H.S. Design, Fundamental Principles of Fabrication and Applications of Microreactors. *Processes* 2020, *8*.
- 30. Šalić, A.; Tušek, A.; Zelić, B. Application of Microreactors in Medicine and Biomedicine. *J Appl Biomed* 2012, *10*, 137–153.

- Zhang, J.; Yan, S.; Yuan, D.; Alici, G.; Nguyen, N.T.; Ebrahimi Warkiani, M.; Li, W. Fundamentals and Applications of Inertial Microfluidics: A Review. *Lab Chip* 2016, *16*, 10–34.
- 32. Bras, E.J.S.; Chu, V.; Conde, J.P.; Fernandes, P. Recent Developments in Microreactor Technology for Biocatalysis Applications. *React Chem Eng* 2021, *6*, 815–827.
- 33. Ortseifen, V.; Viefhues, M.; Wobbe, L.; Grünberger, A. Microfluidics for Biotechnology: Bridging Gaps to Foster Microfluidic Applications. *Front Bioeng Biotechnol* 2020, *8*.
- 34. Oliveira, A.F.; Pessoa, A.C.S.N.; Bastos, R.G.; de la Torre, L.G. Microfluidic Tools toward Industrial Biotechnology. *Biotechnol Prog* 2016, *32*, 1372–1389.
- 35. Yang, Y.; Chen, Y.; Tang, H.; Zong, N.; Jiang, X. Microfluidics for Biomedical Analysis. *Small Methods* 2020, *4*.
- 36. Yao, X.; Zhang, Y.; Du, L.; Liu, J.; Yao, J. Review of the Applications of Microreactors. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 2015, *47*, 519–539.
- 37. Song, M.; Lin, X.; Peng, Z.; Xu, S.; Jin, L.; Zheng, X.; Luo, H. Materials and Methods of Biosensor Interfaces With Stability. *Front Mater* 2021, *7*.
- Ma, Z.; Meliana, C.; Munawaroh, H.S.H.; Karaman, C.; Karimi-Maleh, H.; Low, S.S.; Show,
 P.L. Recent Advances in the Analytical Strategies of Microbial Biosensor for Detection of Pollutants. *Chemosphere* 2022, *306*, doi:10.1016/j.chemosphere.2022.135515.
- Chadha, U.; Bhardwaj, P.; Agarwal, R.; Rawat, P.; Agarwal, R.; Gupta, I.; Panjwani, M.; Singh, S.; Ahuja, C.; Selvaraj, S.K.; et al. Recent Progress and Growth in Biosensors Technology: A Critical Review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry* 2022, 109, 21–51.
- 40. Gundogdu, A.; Gazoglu, G.; Kahraman, E.; Yildiz, E.; Candir, G.; Yalcin, D.; Koc, A.; Sen, F. BIOSENSORS: TYPES, APPLICATIONS, AND FUTURE ADVANTAGES;
- 41. Singh, S. Nanofiber Electrodes for Biosensors. In *Handbook of Nanofibers*; Springer International Publishing, 2019; pp. 869–885.
- 42. Reder-Christ, K.; Bendas, G. Biosensor Applications in the Field of Antibiotic Researcha Review of Recent Developments. *Sensors* 2011, *11*, 9450–9466.
- 43. Haleem, A.; Javaid, M.; Singh, R.P.; Suman, R.; Rab, S. Biosensors Applications in Medical Field: A Brief Review. *Sensors International* 2021, *2*.
- 44. Wang, X.; Lu, X.; Chen, J. Development of Biosensor Technologies for Analysis of Environmental Contaminants. *Trends in Environmental Analytical Chemistry* 2014, *2*, 25–32.
- 45. Lilly, M.D.; Hornby, W.E.; Crook, E.M. *The Kinetics of Carboxymethylcellulose-Ficin in Packed Beds*; 1966; Vol. 100;.
- 46. Seong, G.H.; Heo, J.; Crooks, R.M. Measurement of Enzyme Kinetics Using a Continuous-Flow Microfluidic System. *Anal Chem* **2003**, *75*, 3161–3167, doi:10.1021/ac034155b.

- 47. Wohlgemuth, R.; Plazl, I.; Nidarš Ič-Plazl, P.Z.^{*}; Gernaey, K. V; Woodley, J.M. Microscale Technology and Biocatalytic Processes: Opportunities and Challenges for Synthesis. *Trends Biotechnol* **2015**, doi:10.1016/j.tib.
- 48. Singh, A.N.; Singh, S.; Suthar, N.; Dubey, V.K. Glutaraldehyde-Activated Chitosan Matrix for Immobilization of a Novel Cysteine Protease, Procerain B. *J Agric Food Chem* **2011**, *59*, 6256–6262, doi:10.1021/jf200472x.
- 49. Adriano, W.S.; Filho, E.H.C.; Silva, J.A.; Giordano, R.L.C.; Gonçalves, L.R.B. STABILIZATION OF PENICILLIN G ACYLASE BY IMMOBILIZATION ON GLUTARALDEHYDE-ACTIVATED CHITOSAN. *22*, 529–538.
- 50. Barbosa, O.; Ortiz, C.; Berenguer-Murcia, Á.; Torres, R.; Rodrigues, R.C.; Fernandez-Lafuente, R. Glutaraldehyde in Bio-Catalysts Design: A Useful Crosslinker and a Versatile Tool in Enzyme Immobilization. *RSC Adv* 2014, *4*, 1583–1600.
- 51. Sharma, S.; Vaid, S.; Bhat, B.; Singh, S.; Bajaj, B.K. Thermostable Enzymes for Industrial Biotechnology. In *Advances in Enzyme Technology, First Edition*; Elsevier, 2019; pp. 469– 495 ISBN 9780444641144.
- 52. Zhang, D.H.; Yuwen, L.X.; Peng, L.J. Parameters Affecting the Performance of Immobilized Enzyme. *J Chem* 2013.
- 53. Perez, C.L.; Casciatori, F.P.; Thoméo, J.C. Improving Enzyme Production by Solid-State Cultivation in Packed-Bed Bioreactors by Changing Bed Porosity and Airflow Distribution. *Bioprocess Biosyst Eng* **2021**, *44*, 537–548, doi:10.1007/s00449-020-02466-7.
- 54. Homaei, A.A.; Sariri, R.; Vianello, F.; Stevanato, R. Enzyme Immobilization: An Update. *J Chem Biol* 2013, *6*, 185–205.
- 55. Alnadari, F.; Xue, Y.; Zhou, L.; Hamed, Y.S.; Taha, M.; Foda, M.F. Immobilization of β-Glucosidase from Thermatoga Maritima on Chitin-Functionalized Magnetic Nanoparticle via a Novel Thermostable Chitin-Binding Domain. *Sci Rep* **2020**, *10*, doi:10.1038/s41598-019-57165-5.
- 56. Alnadari, F.; Xue, Y.; Alsubhi, N.H.; Alamoudi, S.A.; Alwabli, A.S.; Al-Quwaie, D.A.; Saud Hamed, Y.; Muhammad Nasiru, M.; Ebrahim, A.A.M.; El-Saadony, M.T.; et al. Reusability of Immobilized β-Glucosidase on Sodium Alginate-Coated Magnetic Nanoparticles and High Productivity Applications. *Journal of Saudi Chemical Society* **2022**, *26*, doi:10.1016/j.jscs.2022.101517.
- 57. Khan, S.; Lindahl, S.; Turner, C.; Karlsson, E.N. Immobilization of Thermostable β-Glucosidase Variants on Acrylic Supports for Biocatalytic Processes in Hot Water. *J Mol Catal B Enzym* **2012**, *80*, 28–38, doi:10.1016/j.molcatb.2012.01.004.
- Liu, Z.; Wang, H.; Li, B.; Liu, C.; Jiang, Y.; Yu, G.; Mu, X. Biocompatible Magnetic Cellulose-Chitosan Hybrid Gel Microspheres Reconstituted from Ionic Liquids for Enzyme Immobilization. J Mater Chem 2012, 22, 15085–15091, doi:10.1039/c2jm33033d.
- 59. Gu, Y.; Yuan, L.; Li, M.; Wang, X.; Rao, D.; Bai, X.; Shi, K.; Xu, H.; Hou, S.; Yao, H. Co-Immobilized Bienzyme of Horseradish Peroxidase and Glucose Oxidase on Dopamine-

Modified Cellulose-Chitosan Composite Beads as a High-Efficiency Biocatalyst for Degradation of Acridine. *RSC Adv* **2022**, *12*, 23006–23016, doi:10.1039/d2ra04091c.

- 60. Mohamed, S.A.; Aly, A.S.; Mohamed, T.M.; Salah, H.A. Immobilization of Horseradish Peroxidase on Nonwoven Polyester Fabric Coated with Chitosan. *Appl Biochem Biotechnol* **2008**, *144*, 169–179, doi:10.1007/s12010-007-8026-x.
- 61. Mohamed, S.A.; Al-Malki, A.L.; Kumosani, T.A.; El-Shishtawy, R.M. Horseradish Peroxidase and Chitosan: Activation, Immobilization and Comparative Results. *Int J Biol Macromol* **2013**, *60*, 295–300, doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.06.003.
- 62. Bilal, M.; Iqbal, H.M.N.; Hu, H.; Wang, W.; Zhang, X. Enhanced Bio-Catalytic Performance and Dye Degradation Potential of Chitosan-Encapsulated Horseradish Peroxidase in a Packed Bed Reactor System. *Science of the Total Environment* **2017**, *575*, 1352–1360, doi:10.1016/j.scitotenv.2016.09.215.
- Chatzikonstantinou, A. V.; Gkantzou, E.; Thomou, E.; Chalmpes, N.; Lyra, K.M.; Kontogianni, V.G.; Spyrou, K.; Patila, M.; Gournis, D.; Stamatis, H. Enzymatic Conversion of Oleuropein to Hydroxytyrosol Using Immobilized β-Glucosidase on Porous Carbon Cuboids. *Nanomaterials* **2019**, *9*, doi:10.3390/nano9081166.
- 64. Shi, X.; Zhao, L.; Pei, J.; Ge, L.; Wan, P.; Wang, Z.; Xiao, W. Highly Enhancing the Characteristics of Immobilized Thermostable β-Glucosidase by Zn2+. *Process Biochemistry* **2018**, *66*, 89–96, doi:10.1016/j.procbio.2018.01.004.
- 65. Hu, S.; Wang, D.; Hong, J. A Simple Method for Beta-Glucosidase Immobilization and Its Application in Soybean Isoflavone Glycosides Hydrolysis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* **2018**, *23*, 39–48, doi:10.1007/s12257-017-0434-3.
- Alatzoglou, C.; Patila, M.; Giannakopoulou, A.; Spyrou, K.; Yan, F.; Li, W.; Chalmpes, N.; Polydera, A.C.; Rudolf, P.; Gournis, D.; et al. Development of a Multi-Enzymatic Biocatalytic System through Immobilization on High Quality Few-Layer Bio-Graphene. Nanomaterials 2023, 13, doi:10.3390/nano13010127.
- 67. Zhou, L.; Jiang, Y.; Gao, J.; Zhao, X.; Ma, L.; Zhou, Q. Oriented Immobilization of Glucose Oxidase on Graphene Oxide. *Biochem Eng J* **2012**, *69*, 28–31, doi:10.1016/j.bej.2012.07.025.
- Balistreri, N.; Gaboriau, D.; Jolivalt, C.; Launay, F. Covalent Immobilization of Glucose Oxidase on Mesocellular Silica Foams: Characterization and Stability towards Temperature and Organic Solvents. J Mol Catal B Enzym 2016, 127, 26–33, doi:10.1016/j.molcatb.2016.02.003.
- Abbasi, M.; Amiri, R.; Bordbar, A.K.; Ranjbakhsh, E.; Khosropour, A.R. Improvement of the Stability and Activity of Immobilized Glucose Oxidase on Modified Iron Oxide Magnetic Nanoparticles. *Appl Surf Sci* 2016, 364, 752–757, doi:10.1016/j.apsusc.2015.12.120.
- 70. Ma, Z.; Ding, T. Bioconjugates of Glucose Oxidase and Gold Nanorods Based on Electrostatic Interaction with Enhanced Thermostability. *Nanoscale Res Lett* **2009**, *4*, 1236–1240, doi:10.1007/s11671-009-9385-8.

- 71. Mohamed, S.A.; Aly, A.S.; Mohamed, T.M.; Salah, H.A. Immobilization of Horseradish Peroxidase on Nonwoven Polyester Fabric Coated with Chitosan. *Appl Biochem Biotechnol* **2008**, *144*, 169–179, doi:10.1007/s12010-007-8026-x.
- 72. El-Nahass, M.N.; El-keiy, M.M.; Ali, E.M.M. Immobilization of Horseradish Peroxidase into Cubic Mesoporous Silicate, SBA-16 with High Activity and Enhanced Stability. *Int J Biol Macromol* **2018**, *116*, 1304–1309, doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.05.025.
- 73. Mohamed, S.A.; Al-Malki, A.L.; Kumosani, T.A.; El-Shishtawy, R.M. Horseradish Peroxidase and Chitosan: Activation, Immobilization and Comparative Results. *Int J Biol Macromol* **2013**, *60*, 295–300, doi:10.1016/j.ijbiomac.2013.06.003.
- 74. Keshta, B.E.; Gemeay, A.H.; Khamis, A.A. Impacts of Horseradish Peroxidase Immobilization onto Functionalized Superparamagnetic Iron Oxide Nanoparticles as a Biocatalyst for Dye Degradation., doi:10.1007/s11356-021-16119-z/Published.
- 75. Muronetz, V.I.; Pozdyshev, D. V.; Semenyuk, P.I. Polyelectrolytes for Enzyme Immobilization and the Regulation of Their Properties. *Polymers (Basel)* 2022, *14*.
- 76. Sun, H.; Xue, Y.; Lin, Y. Enhanced Catalytic Efficiency in Quercetin-4'-Glucoside Hydrolysis of Thermotoga Maritima #-Glucosidase A by Site-Directed Mutagenesis; 2014;
- 77. Vasios, A.G.; Skonta, A.; Patila, M.; Stamatis, H. Biocatalytic Performance of β-Glucosidase Immobilized on 3D-Printed Single- and Multi-Channel Polylactic Acid Microreactors. *Micromachines (Basel)* **2024**, *15*, doi:10.3390/mi15020288.
- 78. Wei, C.; Zhou, Y.; Zhuang, W.; Li, G.; Jiang, M.; Zhang, H. Improving the Performance of Immobilized β-Glucosidase Using a Microreactor. *J Biosci Bioeng* **2018**, *125*, 377–384, doi:10.1016/j.jbiosc.2017.09.011.
- 79. Goyal, K.; Selvakumar, P.; Hayashi, K. *Characterization of a Thermostable-Glucosidase* (*BglB*) from Thermotoga Maritima Showing Transglycosylation Activity; 2001; Vol. 15;.
- 80. Yang, Y.M.; Wang, J.W.; Tan, R.X. Immobilization of Glucose Oxidase on Chitosan-SiO2 Gel. *Enzyme Microb Technol* **2004**, *34*, 126–131, doi:10.1016/j.enzmictec.2003.09.007.
- Afjeh, M.E.A.; Pourahmad, R.; Akbari-Adergani, B.; Azin, M. Characteristics of Glucose Oxidase Immobilized on Magnetic Chitosan Nanoparticles. *Food Science and Technology (Brazil)* 2020, 40, 68–75, doi:10.1590/fst.32618.
- Zhai, R.; Zhang, B.; Wan, Y.; Li, C.; Wang, J.; Liu, J. Chitosan-Halloysite Hybrid-Nanotubes: Horseradish Peroxidase Immobilization and Applications in Phenol Removal. *Chemical Engineering Journal* **2013**, *214*, 304–309, doi:10.1016/j.cej.2012.10.073.
- Melo, M.N.; Pereira, F.M.; Rocha, M.A.; Ribeiro, J.G.; Diz, F.M.; Monteiro, W.F.; Ligabue, R.A.; Severino, P.; Fricks, A.T. Immobilization and Characterization of Horseradish Peroxidase into Chitosan and Chitosan/PEG Nanoparticles: A Comparative Study. *Process Biochemistry* 2020, *98*, 160–171, doi:10.1016/j.procbio.2020.08.007.
- 84. Μ.Λιακοπούλου Κυριακίδου Βιοτεχνολογία Με Στοιχεία Βιοχημικής Μηχανικής; 2nd ed.; Εκδόσεις Ζήτη: Θεσσαλονίκη, 2017;

- 85. Carvalho, F.; Marques, M.P.C.; Fernandes, P. Sucrose Hydrolysis in a Bespoke Capillary Wall-Coated Microreactor. *Catalysts* **2017**, *7*, doi:10.3390/catal7020042.
- 86. Nguyen, H.H.; Kim, M. An Overview of Techniques in Enzyme Immobilization. *Applied Science and Convergence Technology* **2017**, *26*, 157–163, doi:10.5757/asct.2017.26.6.157.
- Gong, A.; Zhu, C.T.; Xu, Y.; Wang, F.Q.; Tsabing, D.K.; Wu, F.A.; Wang, J. Moving and Unsinkable Graphene Sheets Immobilized Enzyme for Microfluidic Biocatalysis. *Sci Rep* 2017, 7, doi:10.1038/s41598-017-04216-4.
- 88. Carvalho, F.; Fernandes, P. Packed Bed Enzyme Microreactor: Application in Sucrose Hydrolysis as Proof-of-Concept. *Biochem Eng J* **2015**, *104*, 74–81, doi:10.1016/j.bej.2015.04.023.
- Sokač Cvetnić, T.; Šalić, A.; Benković, M.; Jurina, T.; Valinger, D.; Gajdoš Kljusurić, J.; Zelić,
 B.; Jurinjak Tušek, A. A Systematic Review of Enzymatic Kinetics in Microreactors. *Catalysts* 2023, *13*.
- Bellou, M.G.; Gkantzou, E.; Skonta, A.; Moschovas, D.; Spyrou, K.; Avgeropoulos, A.; Gournis, D.; Stamatis, H. Development of 3D Printed Enzymatic Microreactors for Lipase-Catalyzed Reactions in Deep Eutectic Solvent-Based Media. *Micromachines* (*Basel*) 2022, 13, doi:10.3390/mi13111954.
- 91. Wang, J.; Liu, X.; Wang, X.D.; Dong, T.; Zhao, X.Y.; Zhu, D.; Mei, Y.Y.; Wu, G.H. Selective Synthesis of Human Milk Fat-Style Structured Triglycerides from Microalgal Oil in a Microfluidic Reactor Packed with Immobilized Lipase. *Bioresour Technol* **2016**, *220*, 132–141, doi:10.1016/j.biortech.2016.08.023.
- 92. Alnadari, F.; Xue, Y.; Almakas, A.; Mohedein, A.; Samie, A.; Abdel-Shafi, M.; Abdin, M. Large Batch Production of Galactooligosaccharides Using β-Glucosidase Immobilized on Chitosan-Functionalized Magnetic Nanoparticle. *J Food Biochem* **2021**, *45*, doi:10.1111/jfbc.13589.
- 93. Iqbal, M.; Deng, Y.; Chen, Q.; Yang, C.; Zhu, Y.; Chen, Z.; Wang, J.; Hu, K.; He, G.; Li, D. The Effect of Nano-Calcium Carbonate on β-Glucosidase Immobilized by Alginate and Chitosan. *Green Synthesis and Catalysis* 2022, 3, 265–271, doi:10.1016/j.gresc.2022.03.006.
- 94. Zeyadi, M.; Almulaiky, Y.Q. Chitosan-Based Metal-Organic Framework for Stabilization of β-Glucosidase: Reusability and Storage Stability. *Heliyon* 2023, 9, doi:10.1016/j.heliyon.2023.e21169.
- 95. Kalay, Ş. Determining the Kinetic and Optimum Characteristics of Glucose Oxidase Immobilized on Polyurethane. *Turkish Journal of Biochemistry* **2024**, doi:10.1515/tjb-2023-0214.
- 96. Dong, L.C.; Wang, G.; Xiao, Y.; Xu, Y.; Zhou, X.; Jiang, H.; Luo, Q. *Immobilization of Glucose Oxidase on a Novel Crosslinked Chitosan Support Grafted with L-Lysine Spacers*;
- 97. Mohamed, S.A.; Al-Harbi, M.H.; Almulaiky, Y.Q.; Ibrahim, I.H.; El-Shishtawy, R.M. Immobilization of Horseradish Peroxidase on Fe3O4 Magnetic Nanoparticles. *Electronic Journal of Biotechnology* **2017**, *27*, 84–90, doi:10.1016/j.ejbt.2017.03.010.

- Monier, M.; Ayad, D.M.; Wei, Y.; Sarhan, A.A. Immobilization of Horseradish Peroxidase on Modified Chitosan Beads. *Int J Biol Macromol* 2010, 46, 324–330, doi:10.1016/j.ijbiomac.2009.12.018.
- 99. De Santis, P.; Meyer, L.E.; Kara, S. The Rise of Continuous Flow Biocatalysis-Fundamentals, Very Recent Developments and Future Perspectives. *React Chem Eng* 2020, *5*, 2155–2184.
- 100. Zhu, Y.; Chen, Q.; Shao, L.; Jia, Y.; Zhang, X. Microfluidic Immobilized Enzyme Reactors for Continuous Biocatalysis. *React Chem Eng* **2020**, *5*, 9–32, doi:10.1039/c9re00217k.
- 101. Marques, M.P.C.; Fernandes, P. Microfluidic Devices: Useful Tools for Bioprocess Intensification. *Molecules* 2011, *16*, 8368–8401.
- 102. Ricca, E.; Brucher, B.; Schrittwieser, J.H. Multi-Enzymatic Cascade Reactions: Overview and Perspectives. *Adv Synth Catal* 2011, *353*, 2239–2262.
- 103. Gruber, P.; Marques, M.P.C.; O'Sullivan, B.; Baganz, F.; Wohlgemuth, R.; Szita, N. Conscious Coupling: The Challenges and Opportunities of Cascading Enzymatic Microreactors. *Biotechnol J* 2017, *12*.
- Diamanti, E.; Andrés-Sanz, D.; Orrego, A.H.; Carregal-Romero, S.; López-Gallego, F. Surpassing Substrate-Enzyme Competition by Compartmentalization. ACS Catal 2023, 13, 11441–11454, doi:10.1021/acscatal.3c01965.
- 105. Jankowska, K.; Sigurdardóttir, S.B.; Zdarta, J.; Pinelo, M. Co-Immobilization and Compartmentalization of Cholesterol Oxidase, Glucose Oxidase and Horseradish Peroxidase for Improved Thermal and H2O2 Stability. *J Memb Sci* **2022**, *662*, doi:10.1016/j.memsci.2022.121007.
- 106. Ichihashi, N.; Yomo, T. Positive Roles of Compartmentalization in Internal Reactions. *Curr Opin Chem Biol* 2014, *22*, 12–17.
- 107. Tamborini, L.; Fernandes, P.; Paradisi, F.; Molinari, F. Flow Bioreactors as Complementary Tools for Biocatalytic Process Intensification. *Trends Biotechnol* 2018, *36*, 73–88.
- Goldstein, Y.; Spitz, S.; Turjeman, K.; Selinger, F.; Barenholz, Y.; Ertl, P.; Benny, O.; Bavli, D. Breaking the Third Wall: Implementing 3d-Printing Technics to Expand the Complexity and Abilities of Multi-Organ-on-a-Chip Devices. *Micromachines (Basel)* 2021, *12*, doi:10.3390/mi12060627.
- 109. Ong, L.J.Y.; Islam, A.; Dasgupta, R.; Iyer, N.G.; Leo, H.L.; Toh, Y.C. A 3D Printed Microfluidic Perfusion Device for Multicellular Spheroid Cultures. *Biofabrication* 2017, 9, doi:10.1088/1758-5090/aa8858.
- 110. Perez, C.L.; Casciatori, F.P.; Thoméo, J.C. Improving Enzyme Production by Solid-State Cultivation in Packed-Bed Bioreactors by Changing Bed Porosity and Airflow Distribution. *Bioprocess Biosyst Eng* **2021**, *44*, 537–548, doi:10.1007/s00449-020-02466-7.
- 111. Venezia, V.; Califano, V.; Pota, G.; Costantini, A.; Landi, G.; Di Benedetto, A. CFD Simulations of Microreactors for the Hydrolysis of Cellobiose to Glucose by β-Glucosidase Enzyme. *Micromachines (Basel)* **2020**, *11*, doi:10.3390/MI11090790.

112. Vasios, A.G.; Skonta, A.; Patila, M.; Stamatis, H. Biocatalytic Performance of β-Glucosidase Immobilized on 3D-Printed Single- and Multi-Channel Polylactic Acid Microreactors. *Micromachines (Basel)* **2024**, *15*, doi:10.3390/mi15020288.

6 ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ