

ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ
ΜΕΤΑΠΤΥΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ «ΙΑΤΡΙΚΗ ΧΗΜΕΙΑ»
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ



Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία:

ΑΝΑΠΤΥΞΗ
ΝΑΝΟΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗ
ΔΕΣΜΕΥΣΗ ΤΟΥ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ
ΑΝΘΡΑΚΑ (CO₂)

ΚΑΡΑΪΣΚΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ

Επιβλέπων: Καθ. Χαράλαμπος Σταμάτης



UNIVERSITY OF IOANNINA
SCHOOL OF NATURAL SCIENCES
& SCHOOL OF HEALTH SCIENCES

DEPARTMENT OF CHEMISTRY &
DEPARTMENT OF BIOLOGICAL
APPLICATIONS AND TECHNOLOGY

INTERDISCIPLINARY POSTGRADUATE
PROGRAMME «MEDICINAL CHEMISTRY»

LABORATORY OF BIOTECHNOLOGY



Postgraduate Diploma Thesis:

**DEVELOPMENT OF
NANOBIOCATALYSTS FOR THE
CAPTURE OF CARBON DIOXIDE
(CO₂)**

KARAIKOU AIKATERINI

***Supervisor:* Prof. Haralambos Stamatis**

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σε συνεργασία με το Εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Πολυτεχνικής σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων κατά τα ακαδημαϊκά έτη 2022-2024.

Αρχικά θα ήθελα να εκφράσω τις βαθύτερες ευχαριστίες προς τον επιβλέποντα Καθηγητή μου, κ. Σταμάτη Χαράλαμπο, Καθηγητή του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Τον ευχαριστώ θερμά για την ανάθεση του θέματος, όλες τις διευκρινίσεις και τις επεξηγήσεις πάνω σε αυτό, την επιστημονική καθοδήγηση καθ' όλη τη διάρκεια της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής, η ολοκλήρωση της οποίας θα ήταν αδύνατη χωρίς τη βοήθεια και την υποστήριξή του.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Γουρνή Δημήτριο, Καθηγητή του Τμήματος Χημικών Μηχανικών και Μηχανικών Περιβάλλοντος του Πολυτεχνείου Κρήτης για την τιμή που μου έκανε να αποτελέσει μέλος της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής, αλλά και για την όλη βοήθεια και καθοδήγηση όλα αυτά τα χρόνια των προπτυχιακών και μεταπτυχιακών σπουδών μου.

Ευχαριστώ επίσης τον κ. Γκάρα Στυλιανό, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Χημικών Μηχανικών της Πολυτεχνικής σχολής του Πανεπιστημίου Δυτικής Μακεδονίας, για την τιμή που μου έκανε να αποτελέσει μέλος της τριμελούς εξεταστικής μου επιτροπής.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ την κα. Πολύδερα Αγγελική, μέλος Ε.ΔΙ.Π. του εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας, για την όλη βοήθεια και υποστήριξη της και τις μεταδιδασκαλικές ερευνήτριες Πατήλα Βάσω-Μιχαέλα και Φωτιάδου Ρένια για την αμέριστη βοήθεια και καθοδήγηση τους, για την φιλικότητα και την εμπιστοσύνη που μου έδειξαν, την εξαιρετική συνεργασία τους, καθώς και για την επιμέλεια του γραπτού κειμένου της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής. Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον μεταπτυχιακό φοιτητή Γάκη Χρήστο για την άψογη συνεργασία του καθ' όλη τη διάρκεια της διπλωματικής μου εργασίας, την φιλικότητα, την καθοδήγηση του και τις πάντα χρήσιμες συμβουλές και προθυμία να βοηθήσει σε οτιδήποτε χρειαστεί. Θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου και στα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου (τον διδάκτωρ Μπακρατσά Γεώργιο και τους υποψήφιους διδάκτορες Παπανικολάου Άγγελο, Αθανασίου Παναγιώτη, Αλατζόγλου Χριστίνα, Σπύρου Ματίνα, Μπέλλου Μυρτώ, Σκόντα Αναστασία, τους μεταπτυχιακούς φοιτητές Μπομποτσιάρη Θεοδώρα, Βάσιο Ανδρέα και Ζαμπάρα Στεφανία, καθώς και όλους τους προπτυχιακούς φοιτητές) για το άψογο κλίμα συνεργασίας, την φιλικότητα τους και όλες αυτές τις ευχάριστες στιγμές που μου χάρισαν.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες οφείλω στα μέλη του εργαστηρίου Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την φιλοξενία τους και την αμέριστη βοήθεια τους. Θα ήθελα να εκφράσω ένα τεράστιο ευχαριστώ στον Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών Σπύρου Κωνσταντίνο, την μεταδιδακτορική ερευνήτρια Ζυγούρη Παναγιώτα και την υποψήφια διδάκτωρ Καλούδη Αγγελική για την πολύτιμη βοήθεια και καθοδήγηση τους, τις επιστημονικές γνώσεις, τις συμβουλές, την διαρκή στήριξη και κατανόηση που μου έδειξαν. Για όλα αυτά καθώς και για την φιλικότητα, την καλοσύνη, την εμπιστοσύνη και τις όμορφες στιγμές που μου χάρισαν τους εκφράζω τις βαθιές μου ευχαριστίες. Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον Σπύρου Κωνσταντίνο για τις μετρήσεις φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS), ποροσιμετρίας N₂ - Μέθοδος Brunauer, Emmett και Teller (BET), τις εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) και την Ζυγούρη Παναγιώτα για τις μετρήσεις φασματοσκοπίας μέσου υπερύθρου (IR), καθώς και για τις όλες διορθώσεις, επιμέλεια του κειμένου και χρόνο που αφιέρωσαν.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, τις αδερφές μου Σοφία και Αθανασία και τους φίλους μου για τη βοήθεια, την αγάπη και την ηθική υποστήριξή τους και ιδίως τους γονείς μου, Δημήτρη και Σταυρούλα, στους οποίους και οφείλω όλη την πορεία των σπουδών μου μέχρι σήμερα.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η βιοτεχνολογία αποτελεί διεπιστημονικό κλάδο που βασίζεται στην αξιοποίηση ζωντανών οργανισμών ή συστατικών αυτών με στόχο την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας και την παροχή υπηρεσιών. Η βιοκατάλυση, ως κλάδος της βιοτεχνολογίας, αξιοποιεί τις καταλυτικές ιδιότητες των βιολογικών αυτών συστημάτων για την ανάπτυξη βιώσιμων εναλλακτικών λύσεων έναντι των χημικών διεργασιών. Στο πλαίσιο αυτό, σκοπός της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας είναι η ανάπτυξη καινοτόμων νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων για την αποτελεσματική δέσμευση του διοξειδίου του άνθρακα (CO_2). Για τον σκοπό αυτό, το ένζυμο καρβονική ανυδράση από ερυθροκύτταρα βοοειδών (bovine Carbonic Anhydrase, bCA), μεταλλοένζυμο που βρίσκεται σε όλα τα έμβια όντα και καταλύει την ενυδάτωση του διοξειδίου του άνθρακα, ακινητοποιήθηκε σε στερεούς φορείς ακινητοποίησης και ειδικότερα σε πορώδη νανοϋλικά άνθρακα. Τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα παρουσιάζουν ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον όσον αφορά τον τομέα της νανοβιοκατάλυσης και της ενζυμικής νανοβιοτεχνολογίας, εξαιτίας των ιδιοτήτων που παρουσιάζουν και συγκεκριμένα της εξαιρετικά υψηλής ειδικής επιφάνειας, της μηχανικής σταθερότητας, της πορώδους δομής, καθώς και της ηλεκτρικής και θερμικής αγωγιμότητας. Ειδικότερα, συντέθηκαν δύο νανοϋλικά πορώδους άνθρακα, οι ιεραρχημένοι πορώδεις άνθρακες (Hierarchical Porous Carbons, HPCs) και τα κυβοειδή πορώδους άνθρακα (Porous Carbon Cuboids, PCCs), τα οποία μεταξύ των άλλων χαρακτηριστικών ιδιοτήτων τους διακρίνονται για την υψηλή ειδική επιφάνεια, το ιεραρχημένο πορώδες, αλλά και την υψηλή ικανότητα προσρόφησης του διοξειδίου του άνθρακα. Τα HPCs και PCCs αποδείχτηκαν αποτελεσματικοί φορείς για την φυσική προσρόφηση και ομοιοπολική ακινητοποίηση της καρβονικής ανυδράσης από ερυθροκύτταρα βοοειδών (bCA), μέθοδοι μέσω των οποίων αυξάνεται η σταθερότητα του ενζύμου, διατηρείται η καταλυτική του δράση, ενώ υπάρχει η δυνατότητα ανάκτησης του νανοβιοκαταλύτη και η επαναχρησιμοποίηση του νανοβιοκαταλυτικού συστήματος.

Οι ακινητοποιημένοι νανοβιοκαταλύτες μελετήθηκαν ως προς τα καταλυτικά και κινητικά χαρακτηριστικά τους. Ειδικότερα, πραγματοποιήθηκε πλήρης χαρακτηρισμός των νανοϋλικών, μέσω ποροσιμετρίας N_2 - μέθοδος Brunauer, Emmett και Teller (BET), φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS) και ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM). Προσδιορίστηκε η απόδοση της ακινητοποίησης του ενζύμου στην επιφάνεια των νανοϋλικών, καθώς και η δραστηριότητα των νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων σε σύγκριση με τη δραστηριότητα του ελεύθερου ενζύμου. Οι νανοβιοκαταλύτες μελετήθηκαν ως προς την ικανότητα επαναχρησιμοποίησης τους, όπου τα αποτελέσματα έδειξαν τη δυνατότητα διατήρησης της δράσης τους για πολλαπλούς κύκλους αντιδράσεων, γεγονός που υποδεικνύει

την αυξημένη σταθερότητα τους σε σύγκριση με την ελεύθερη μορφή του ενζύμου. Τέλος, αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα της δέσμευσης διοξειδίου του άνθρακα των νανοβιοκαταλυτών μέσω του προσδιορισμού της παραγόμενης ποσότητας ανθρακικού ασβεστίου (CaCO_3) που σχηματίζεται κατά την αντίδραση του διοξειδίου του άνθρακα με τα ιόντα του ασβεστίου (Ca^{2+}). Η μελέτη έδειξε ότι η ακινητοποίηση της καρβονικής ανυδράσης (bCA) στα HPCs και PCCs ενισχύει την καταβύθιση του ανθρακικού άλατος, γεγονός που υποδεικνύει την αποτελεσματική δέσμευση του διοξειδίου του άνθρακα από τους νανοβιοκαταλύτες.

Συμπερασματικά, τα νανο-πορώδη υλικά με βάση τον άνθρακα συντελούν στη διατήρηση και τη βελτίωση της καταλυτικής δράσης του ενζύμου, οδηγώντας στην ανάπτυξη νέων βιοκαταλυτικών συστημάτων με ενδιαφέρουσες ιδιότητες για πλήθος εφαρμογών. Τα αποτελέσματα της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής επισημαίνουν τα πλεονεκτήματα που προκύπτουν από την αξιοποίηση των νανοϋλικών ως φορείς για την ακινητοποίηση ενζύμων, αλλά και τη χρήση των νανοβιοκαταλυτικών αυτών συστημάτων για πλήθος εφαρμογών στον τομέα της νανοβιοτεχνολογίας.

ABSTRACT

Biotechnology is an interdisciplinary field based on the use of living organisms or their components to produce high value-added products and services. Biocatalysis, as a branch of biotechnology, exploits the catalytic properties of these biological systems to develop sustainable alternatives to chemical processes. In this context, the aim of this master's thesis is to develop innovative nanobiocatalytic systems for the efficient capture of carbon dioxide (CO₂). For this purpose, the enzyme bovine carbonic anhydrase (CA), a metallo-enzyme found in all living things that catalyzes the hydration of carbon dioxide, was immobilized on solid immobilization carriers, in particular on porous carbon nanomaterials. Carbon-based nanomaterials are of particular research interest in the field of nanobiocatalysis and enzyme nanobiotechnology because of their properties, in particular their extremely high specific surface area, mechanical stability, porous structure, and electrical and thermal conductivity. In particular, two porous carbon nanomaterials, Hierarchical Porous Carbons (HPCs) and Porous Carbon Cuboids (PCCs), were synthesized, which among other characteristic properties are distinguished for their high specific surface area, hierarchical porosity, and high carbon dioxide adsorption capacity. HPCs and PCCs proved to be effective carriers for the physical adsorption and covalent immobilization of carbonic anhydrase (bCA), methods through which the stability of the enzyme is increased, its catalytic activity is maintained, and there is the possibility of nanobiocatalyst recovery and reuse of the nanobiocatalytic system.

The immobilized nanobiocatalysts were studied for their catalytic and kinetic characteristics. A complete characterization of the nanomaterials was performed by means of N₂ porosimetry - Brunauer, Emmett and Teller (BET) method, X-ray Photoelectron Spectroscopy (XPS) and Scanning Electron Microscopy (SEM). The efficiency of enzyme immobilization on the surface of the nanomaterials was determined, as well as the activity of the nanobiocatalytic systems compared to the activity of the free enzyme. The nanobiocatalysts were studied for their reusability, where the results showed the ability to retain their activity for reaction cycles, indicating their increased stability compared to the free form of the enzyme. Finally, the carbon dioxide capture efficiency of the nanobiocatalysts was evaluated by determining the amount of calcium carbonate (CaCO₃) produced by the reaction of the carbon dioxide with calcium ions (Ca²⁺). The study showed that the immobilization of the carbonic anhydrase (bCA) in HPCs and PCCs enhances the carbonate precipitation, indicating the efficient capture of carbon dioxide by the nanobiocatalysts.

In conclusion, carbon-based nano-porous materials contribute to maintaining and improving the catalytic activity of the enzyme, leading to the development of new biocatalytic systems with interesting properties for a multitude of applications. The results of this master's

thesis highlight the advantages of using nanomaterials as carriers for enzyme immobilization, and the use of these nanobiocatalytic systems for a multitude of applications in the field of nanobiotechnology.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΜΕΡΟΣ Α' - ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	12
1. Βιοτεχνολογία	13
2. Βιοκατάλυση	16
3. Ένζυμα και ενζυμική κατάλυση	18
3.1. Ένζυμα	18
3.2. Μηχανισμός ενζυμικής κατάλυσης.....	20
3.3. Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων	21
4. Ακινητοποίηση ενζύμων	24
4.1. Εισαγωγή.....	24
4.2. Μέθοδοι ακινητοποίησης	24
4.3. Πλεονεκτήματα ακινητοποίησης	26
4.4. Μειονεκτήματα - Προκλήσεις	27
4.5. Βιοϊατρικές εφαρμογές ακινητοποιημένων ενζύμων	28
5. Καρβονική Ανυδράση (Carbonic Anhydrase).....	36
5.1. Εισαγωγή.....	36
5.2. Δομή.....	38
5.3. Καταλυτικός μηχανισμός	39
5.4. Βιοϊατρικές εφαρμογές ακινητοποιημένης καρβονικής ανυδράσης	40
6. Νανοτεχνολογία	49
6.1. Ρόλος της νανοτεχνολογίας στην ακινητοποίηση ενζύμων.....	49
6.2. Πορώδη υλικά.....	50
6.3. Ιεραρχημένοι πορώδεις άνθρακες (HPCs)	52
6.4. Κυβοειδή πορώδους άνθρακα (PCCs)	56
7. Βασικές αρχές τεχνικών χαρακτηρισμού	58
7.1. Μετρήσεις ειδικής επιφάνειας – Ποροσιμετρία N ₂ (Μέθοδος Brunauer, Emmett και Teller, BET)	58
7.2. Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS).....	60
7.3. Φασματοσκοπία Μέσου Υπερύθρου (Infrared Spectroscopy, IR).....	61
7.4. Φασματοσκοπία Raman	63
7.5. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)	64
7.6. Φασματοσκοπία Υπεριώδους – Ορατού (UV-vis).....	64
ΜΕΡΟΣ Β' - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	66
8. Χημικά Αντιδραστήρια.....	67
9. Μέθοδοι	70

9.1.	Σύνθεση Ιεραρχημένων Πορώδων Ανθράκων (HPCs).....	70
9.2.	Σύνθεση Κυβοειδών Πορώδους Άνθρακα (PCC).....	72
9.3.	Μη ομοιοπολική ακινητοποίηση bCA στα HPCs.....	73
9.4.	Μη ομοιοπολική ακινητοποίηση bCA στα N-doped HPCs.....	74
9.5.	Μη ομοιοπολική ακινητοποίηση bCA στα PCCs.....	74
9.6.	Ομοιοπολική ακινητοποίηση bCA στα PCCs.....	75
9.7.	Μελέτη της ενζυμικής δραστηρότητας της ελεύθερης bCA	75
9.8.	Μελέτη της θερμικής σταθερότητας της ελεύθερης bCA	76
9.9.	Προσδιορισμός των κινητικών σταθερών K_m , V_{max} της ελεύθερης bCA	76
9.10.	Προσδιορισμός της απόδοσης της ακινητοποίησης της bCA.....	77
9.11.	Μελέτη δραστηρότητας της ακινητοποιημένης bCA.....	78
9.12.	Μελέτη θερμικής δραστηρότητας (Thermal activity) της ελεύθερης bCA	78
9.13.	Μελέτη θερμικής δραστηρότητας (Thermal activity) του νανοβιοκαταλύτη bCA-HPC και bCA-N-doped HPC.....	79
9.14.	Μελέτη δραστηρότητας του ακινητοποιημένου νανοβιοκαταλύτη bCA-HPC σε διαφορετικές τιμές pH	79
9.15.	Μελέτη επαναχρησιμοποίησης νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων.....	80
9.16.	Μελέτη δέσμευσης CO ₂ (CO ₂ Sequestration) από την ελεύθερη και ακινητοποιημένη bCA	80
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ		81
10.	Χαρακτηρισμός HPCs.....	82
10.1.	Ποροσιμετρία N ₂ - Μέθοδος Brunauer, Emmett και Teller (BET).....	82
10.2.	Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS).....	84
10.3.	Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)	85
11.	Χαρακτηρισμός N-doped HPCs	86
11.1.	Ποροσιμετρία N ₂ - Μέθοδος Brunauer, Emmett και Teller (BET).....	86
11.2.	Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS).....	88
11.3.	Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)	90
12.	Χαρακτηρισμός PCCs.....	91
12.1.	Ποροσιμετρία N ₂ - Μέθοδος Brunauer, Emmett και Teller (BET).....	91
12.2.	Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS).....	92
12.3.	Φασματοσκοπία Raman	94
12.4.	Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)	95
13.	Απόδοση μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης της bCA σε HPCs και N-doped HPCs	96
14.	Απόδοση μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης της bCA στα PCCs.....	97
15.	Απόδοση ομοιοπολικής ακινητοποίησης της bCA στα PCCs.....	97

16.	Φάσματα υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) των νανοβιοκαταλυτών .	98
16.1.	Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) του νανοβιοκαταλύτη bCA-HPC	98
16.2.	Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) του νανοβιοκαταλύτη bCA-N-doped HPC	99
16.3.	Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) νανοβιοκαταλύτη bCA-PCC	100
17.	Μελέτη ενζυμικής δραστηριότητας ελεύθερης και ακινητοποιημένης bCA	102
18.	Προσδιορισμός της θερμικής σταθερότητας της ελεύθερης bCA	104
19.	Μελέτη θερμικής δραστηριότητας (Thermal activity) της ελεύθερης bCA.....	105
20.	Μελέτη θερμικής δραστηριότητας (Thermal activity) του νανοβιοκαταλύτη bCA-HPC και bCA-N-doped HPC.....	105
21.	Μελέτη δραστηριότητας του νανοβιοκαταλύτη bCA-HPC σε διαφορετικές τιμές pH 107	
22.	Προσδιορισμός κινητικών σταθερών K_m , V_{max} του ελεύθερου ενζύμου	107
23.	Επαναχρησιμοποίηση των νανοβιοκαταλυτών.....	108
23.1.	Επαναχρησιμοποίηση του νανοβιοκαταλύτη bCA-HPC.....	108
23.2.	Επαναχρησιμοποίηση του νανοβιοκαταλύτη bCA-N-doped HPC	110
23.3.	Επαναχρησιμοποίηση του νανοβιοκαταλύτη bCA-PCC	111
24.	Αξιολόγηση της δέσμευσης CO ₂ (CO ₂ Sequestration) από την ελεύθερη και ακινητοποιημένη bCA.....	113
	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	117
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	120
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	121

ΜΕΡΟΣ Α' - ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. Βιοτεχνολογία

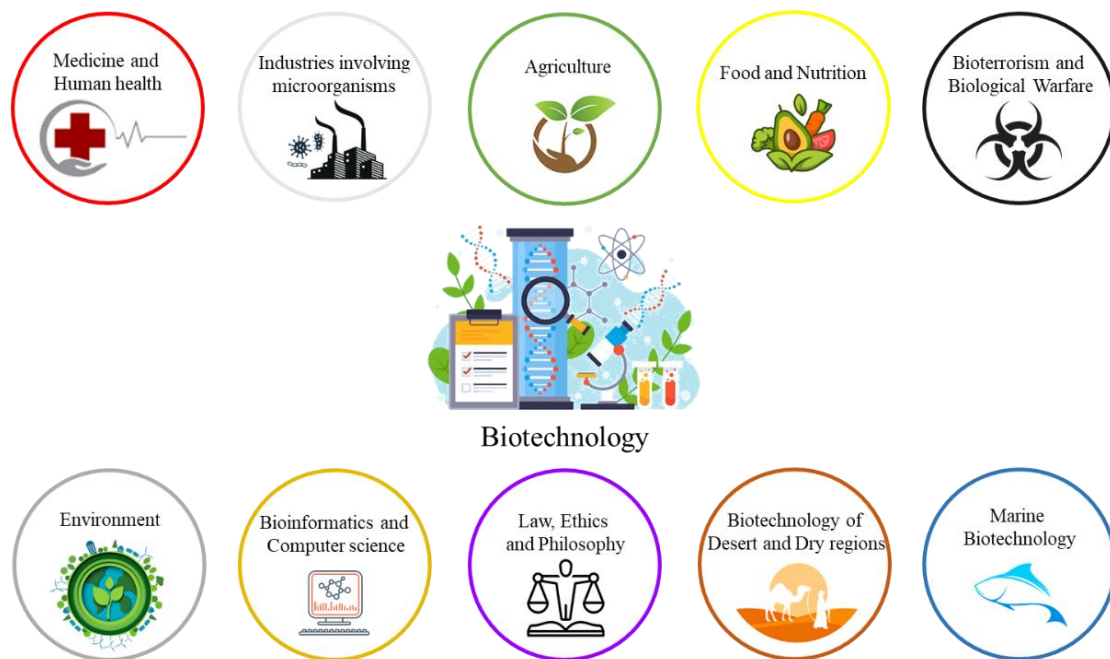
Με τον όρο βιοτεχνολογία αναφερόμαστε σε έναν σύνθετο διεπιστημονικό κλάδο όπου ζωντανοί οργανισμοί, όπως ιστοί, κύτταρα ή μοριακά συστατικά αυτών, χρησιμοποιούνται σε βιομηχανικές διεργασίες με στόχο την αξιοποίηση των βιολογικών αυτών παραγόντων στην παραγωγή αγαθών και παροχή υπηρεσιών (Bross et al., 1998). Για περισσότερο από 6000 χρόνια, οι βιολογικές διεργασίες των μικροοργανισμών χρησιμοποιήθηκαν στην παρασκευή χρήσιμων διατροφικών προϊόντων, όπως ψωμί και τυρί, στη ζυθοποιεία, αλλά και τη διατήρηση γαλακτοκομικών προϊόντων.

Ο όρος βιοτεχνολογία επινοήθηκε για πρώτη φορά το 1919 από τον Karl Ereky, σύμφωνα με τον οποίο νέα προϊόντα θα μπορούσαν να παραχθούν από πρώτες ύλες με τη χρήση ζωντανών οργανισμών (Fári & Kralonánszky, 2006). Κατά τη δεκαετία του 1990, η εφαρμογή της βιοτεχνολογίας στη βιομηχανία γνώρισε ταχεία ανάπτυξη, ιδίως με τη χρήση της αναλυτικής χημείας αλλά και νέων τεχνολογιών, όπως οι υπολογιστές. Ο Bud, το 1993, περιέγραψε τον όρο βιοτεχνολογία ως μια σχέση μεταξύ βιολογίας και μηχανικής, φύσης και κράτους (Lindee, 1994). Στις μέρες μας, η σύγχρονη βιοτεχνολογία αξιοποιεί ένα πλήθος τεχνικών, βασιζόμενων στη μοριακή και κυτταρική βιολογία, για την ανάλυση και τον χειρισμό των μοριακών δομικών στοιχείων της ζωής. Η ανάπτυξη νέων τεχνικών οδήγησε σε νέες εφαρμογές στη γεωργία, την κτηνοτροφία, τη διατροφή, το περιβάλλον, τη βιομηχανία, αλλά ιδίως την ιατρική, με τον όρο βιοτεχνολογία να δηλώνει συχνά φαρμακευτικά προϊόντα που δημιουργούνται μέσω των τεχνικών αυτών. Ειδικότερα, προσέφερε νέες οδούς στην αντιμετώπιση παγκοσμίων προκλήσεων, όπου έφερε την επανάσταση στη διάγνωση και τη θεραπεία, με την ανάπτυξη νέων φαρμάκων, εμβολίων και φαρμακευτικών ουσιών (Hilgartner, 2015).

Αν και στον πυρήνα της η βιοτεχνολογία περιλαμβάνει τη χρήση ζωντανών οργανισμών ή συστατικών τους, αναλόγως με τη χρήση και τις εφαρμογές της στους διάφορους διακρίνεται σε δέκα επιμέρους κατηγορίες:

- ο Πράσινη βιοτεχνολογία (green biotechnology) με εφαρμογές στη γεωργία και τον αγροτοβιομηχανικό τομέα. Εστιάζει στη χρήση της φυτικής βιοτεχνολογίας, βιο-λιπασμάτων και βιο-παρασιτοκτόνων, καθώς και της καλλιέργειας φυτικών ιστών *in vitro* προκειμένου να μειωθεί η εξάρτηση από τις συμβατικές και συνήθως χρονοβόρες μηχανικές ή χημικές τεχνικές.
- ο Κόκκινη ή ιατρική βιοτεχνολογία (red biotechnology), η οποία περιλαμβάνει τη θεραπεία ασθενειών και εφαρμόζεται για την παραγωγή εμβολίων, αντισωμάτων, αντιβιοτικών και φαρμάκων.

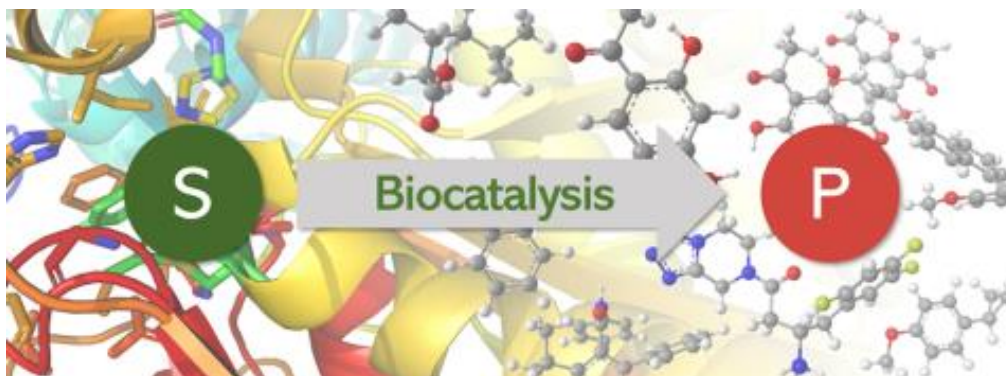
- Μπλε ή θαλάσσια βιοτεχνολογία (blue biotechnology), όπου τα βιοτεχνολογικά υλικά που χρησιμοποιούνται στις βιοτεχνολογικές διεργασίες προέρχονται από υδάτινα συστήματα και υδρόβιους οργανισμούς. Η θάλασσα, οι ωκεανοί και τα ποτάμια διαθέτουν πληθώρα βιολογικών πόρων και βιοποικιλότητας που μπορούν να αξιοποιηθούν για την ανάπτυξη νέων προϊόντων.
- Λευκή ή βιοτεχνολογία της βιομηχανίας/παραγωγής (white biotechnology), όπου βιοτεχνολογικά εργαλεία αξιοποιούνται για τη παραγωγή προϊόντων βιομηχανικής κλίμακας. Αποτελεί τον ταχύτερα αναπτυσσόμενο τομέα και επιτρέπει την παραγωγή προϊόντων υψηλής αξίας από ανανεώσιμες πηγές, με φιλικές προς το περιβάλλον αλλά και οικονομικά επωφελείς μεθόδους.
- Κίτρινη βιοτεχνολογία (yellow biotechnology), η οποία σχετίζεται με τα τρόφιμα και τη διατροφή. Συμβάλει στην διασφάλιση καλύτερης ποιότητας τροφίμων, αλλά και στην ανάπτυξη διατροφικών προϊόντων πλούσιων σε θρεπτικά συστατικά, γεγονός που επιτυγχάνεται μέσω ενζυμικής ή μικροβιακής γενετικής τροποποίησης. Κλασικό παράδειγμα αποτελεί το «χρυσό ρύζι» (golden rice), γενετικά τροποποιημένη ποικιλία ρυζιού, εμπλουτισμένη με βιταμίνη Α.
- Γκρι ή περιβαλλοντική βιοτεχνολογία (gray biotechnology). Εστιάζει στην επίλυση περιβαλλοντικών προβλημάτων όπως η διαχείριση απορριμμάτων, η επεξεργασία λυμάτων, η απομάκρυνση ρύπων κ.
- Χρυσή βιοτεχνολογία (gold biotechnology), η οποία σχετίζεται με την πληροφορική και την βιο-πληροφορική. Αποτελεί την πιο προηγμένη μορφή της βιοτεχνολογίας όπου υπολογιστικά εργαλεία και συστήματα χρησιμοποιούνται για την ανάλυση βιολογικών δεδομένων, τα οποία είναι διαθέσιμα από την αλληλουχία διαφόρων γονιδιωμάτων διαφορετικών οργανισμών.
- Καφέ βιοτεχνολογία (brown biotechnology). Ασχολείται με οικοσυστήματα ερήμων, άγονων και ξηρών εδαφών και επικεντρώνεται στη μελέτη οργανισμών που αναπτύσσονται φυσικά στις περιοχές αυτές ώστε να αναπτυχθούν ανθεκτικές στην ξηρασία καλλιέργειες.
- Βιολετί βιοτεχνολογία (violet biotechnology), η οποία διερευνά νομικά, ηθικά και φιλοσοφικά ζητήματα.
- Σκοτεινή βιοτεχνολογία (dark biotechnology). Ο κλάδος αυτός εφαρμόζει τις βιοτεχνολογικές εξελίξεις για τη διαχείριση μιας σειράς καταστάσεων έκτακτης ανάγκης, εστιάζοντας κυρίως σε ενέργειες όπως η βιο-τρομοκρατία και ο βιολογικός πόλεμος (ul-Islam, 2019), (Bentahar Soumia et al., 2023).



Εικόνα 1. Επιστημονικοί κλάδοι εφαρμογής της Βιοτεχνολογίας.

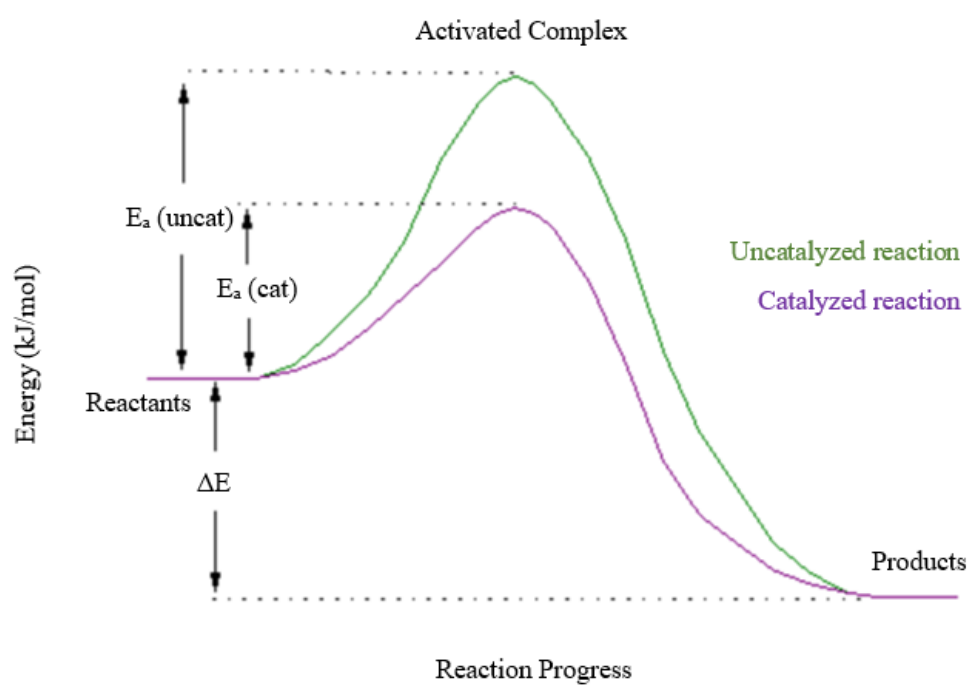
2. Βιοκατάλυση

Αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της βιοτεχνολογίας. Με τον όρο βιοκατάλυση αναφερόμαστε στην χρήση φυσικών ουσιών και βιολογικών συστημάτων για την επιτάχυνση χημικών αντιδράσεων (Paul et al., 2019).



Εικόνα 2. Η Βιοκατάλυση ως φυσική διαδικασία μετατροπής ενός υποστρώματος (Substrate, S) σε προϊόν (Product, P) μέσω ενζυμικών αντιδράσεων.(Winkler et al., 2021)

Ουσιαστικά πρόκειται για καταλύτες, μόρια που μειώνουν το μέγεθος του ενεργειακού φραγμού που θα πρέπει να ξεπεράσει μία ουσία, το αντιδρών, αναφερόμενο συχνά και ως υπόστρωμα, ώστε να μετατραπεί χημικά σε μία άλλη. Από την αλληλεπίδραση καταλύτη-υποστρώματος σχηματίζεται ένα ενεργοποιημένο μεταβατικό σύμπλοκο που αποδίδει το προϊόν και απελευθερώνει τον καταλύτη. Ο καταλύτης δεν καταναλώνεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και επομένως μπορεί να χρησιμοποιηθεί επ' αόριστον για τη βιομετατροπή του υποστρώματος σε προϊόν. Πρόκειται για φιλική προς το περιβάλλον τεχνολογία εφόσον πραγματοποιείται σε ήπιες συνθήκες πίεσης, θερμοκρασίας και pH, απουσίας συνήθως τοξικών διαλυτών. Συνεπώς, λόγω των δυνατοτήτων που προσφέρει για αποτελεσματικότερες και φιλικότερες προς το περιβάλλον εναλλακτικές λύσεις έναντι των παραδοσιακών χημικών διεργασιών, το ενδιαφέρον γύρω από το πεδίο αυτό να έχει ενταθεί ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια. Η βιοκατάλυση βρίσκει εφαρμογή σε διάφορους τομείς συμπεριλαμβανομένων του περιβάλλοντος, της ιατρικής, της φαρμακευτικής, των τροφίμων, των καλλυντικών κα. , με τις περισσότερες βιομηχανικές εφαρμογές της να οδηγούν συνήθως στην παραγωγή προϊόντων μικρού όγκου και υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως φάρμακα. Αξιοποιώντας τις καταλυτικές ιδιότητες των βιολογικών συστημάτων δύναται άρα να αναπτύξουμε καινοτόμες διεργασίες και να ανακαλύψουμε νέες οδούς για ένα αποδοτικότερο μέλλον (Illanes, 2008).



Εικόνα 3. Επίδραση καταλύτη στην ενέργεια ενεργοποίησης της αντίδρασης.

3. Ένζυμα και ενζυμική κατάλυση

3.1. Ένζυμα

Οι βιοχημικές αντιδράσεις, χημικές αντιδράσεις που εμπλέκονται με τον μεταβολισμό των ζωντανών κυττάρων, θα πρέπει να καταλυθούν ώστε να προχωρήσουν με κατάλληλο, για τη διατήρηση της ζωής, ρυθμό. Τα διάφορα βιολογικά συστήματα που χρησιμοποιούνται στη βιοκατάλυση, όπως βακτήρια, ζύμες και μύκητες, επιταχύνουν την επιτάχυνση των αντιδράσεων αυτών εξαιτίας της δράσης των ενζύμων που παράγουν. Τα ένζυμα αποτελούν τους απλούστερους φυσικούς καταλύτες, υπάρχουν σε όλα τα έμβια όντα, και κατέχουν κεντρικό ρόλο στην κατάλυση εκατοντάδων αντιδράσεων. Αποτελούν τους «βιολογικούς καταλύτες της ζωής».

Αν και η έννοια της ζύμωσης ήταν γνωστή από τις αρχές του 18^{ου} αιώνα, το τι συμβαίνει προσδιορίστηκε έναν αιώνα μετά από τον Louis Pasteur σε μια συζήτηση με τον Justus Freiherr von Liebig για τα αίτια της ζύμωσης. Το 1878, ο Γερμανός φυσιολόγος Wilhelm Kühne αναφερόμενος στην διόγκωση του ψωμιού λόγω της μαγιάς χρησιμοποίησε για πρώτη φορά τον όρο «ένζυμο», όρος προερχόμενος από την ελληνική λέξη «ένζυμος» (εν+ζύμη) (Tirard, 2015).

Σήμερα, με τον όρο ένζυμο αναφερόμαστε σε ειδικές πρωτεΐνες ή οργανικές ενώσεις πρωτεϊνικής φύσης που αποτελούνται από αμινοξέα και, όπως όλοι οι καταλύτες, μπορούν να ελαττώσουν την ενέργεια ενεργοποίησης των αντιδράσεων, επιταχύνοντας την αντίδραση έως και 17 τάξεις μεγέθους χωρίς να καταναλώνονται. Τα περισσότερα ένζυμα καταφέρνουν να ολοκληρώσουν μάλιστα τις αντιδράσεις εντός των κυττάρων σε ένα χιλιοστό του δευτερολέπτου, όσο περίπου και ο χρόνος που απαιτείται για τη διάχυση μικρών μορίων διαμέσου των κυττάρων. Επιπλέον, τα ένζυμα ως καταλύτες αυξάνουν τον ρυθμό της αντίδρασης χωρίς να μεταβάλουν την χημική ισορροπία μεταξύ αντιδρώντων και προϊόντων (Cooper Geoffrey M., 2000), (Agarwal, 2006). Έχουν καλή απόδοση στις ήπιες συνθήκες που απαιτούνται για τη διατήρηση της λειτουργικότητας των βιολογικών συστημάτων, ενώ διακρίνονται από τους υπόλοιπους βιοκαταλύτες ως προς το υπόστρωμα που επιλέγουν αλλά και ως προς την εξειδίκευσή τους, καθώς κάθε μία εκ των βιοχημικών αντιδράσεων καταλύεται από ένα συγκεκριμένο ένζυμο.

Τα ένζυμα δεν παύουν ωστόσο να αποτελούν πρωτεΐνες, με εξαίρεση τα ριβοένζυμα που αποτελούν είδος καταλυτικού RNA, και επομένως να φέρουν την πολύπλοκη τρισδιάστατη δομή και τις ιδιότητες των πρωτεϊνών. Μπορούν να λάβουν πρωτοταγείς, δευτεροταγείς, τριτοταγείς και τεταρτοταγείς δομικές διαμορφώσεις, με τη δομική ακεραιότητα να καθορίζει και τη καταλυτική τους δράση. Λόγω της πρωτεϊνικής αυτής δομής, τα ένζυμα λειτουργούν πιο

αποτελεσματικά υπό ήπιες συνθήκες, ενώ δύναται να έχουμε πλήρη απώλεια της καταλυτικής τους ισχύος σε ακραίες θερμοκρασίες ή ακραίες τιμές pH (Bhatia, 2018).

Ορισμένα ένζυμα απαιτούν την παρουσία μη πρωτεϊνικών μορίων για τη διατήρηση της καταλυτικής τους δράσης, μόρια που αναφέρονται συχνά και ως συμπαραγόντες. Οι συμπαραγόντες μπορούν να είναι είτε οργανικά μόρια χαμηλού μοριακού βάρους που συνδέονται ομοιοπολικά ή μη ομοιοπολικά, και συνήθως παροδικά, με το πρωτεϊνικό μέρος του ενεργού ενζύμου και είναι γνωστά ως συνένζυμα, είτε μόρια μόνιμα συνδεδεμένα με τα ένζυμα γνωστά και ως προσθετικές ομάδες. Μια πλήρης βιοχημικά ενεργή ένωση παρουσία του συμπαραγόντα ονομάζεται ολοένζυμο, ενώ απουσία αυτού έχουμε ουσιαστικά το πρωτεϊνικό μόνο τμήμα του ολοενζύμου και το ένζυμο ονομάζεται αποένζυμο (Bhatia, 2018).

Η χρήση συνεπώς των ενζύμων σε σύγκριση με τους χημικούς καταλύτες φαίνεται να παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις υπόκειται σε περιορισμούς κατά την εφαρμογή τους. Στον πίνακα που ακολουθεί συνοψίζονται ορισμένα εκ των σημαντικότερων πλεονεκτημάτων και μειονεκτημάτων της χρήσης των ενζύμων.

Πίνακας 1. Πλεονεκτήματα και Μειονεκτήματα της χρήσης ενζύμων.

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Υψηλή δραστικότητα – Επιτάχυνση των αντιδράσεων με αύξηση της ταχύτητας από 10^6 έως 10^{17} φορές	Απώλεια καταλυτικής ισχύος σε υψηλές θερμοκρασίες
Υψηλή εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα	Απώλεια καταλυτικής ισχύος σε ακραίες τιμές pH
Υψηλή στέρεο-εκλεκτικότητα και τοπο-εκλεκτικότητα	Μειωμένη σταθερότητα όταν μεταβάλλονται οι φυσικές και χημικές συνθήκες που τα περιβάλλουν
Υψηλή απόδοση σε ήπιες συνθήκες θερμοκρασίας, πίεσης και τιμές pH	Η καταλυτική τους δράση εξαρτάται σε ορισμένες περιπτώσεις από τη παρουσία συνενζύμου
Ελαχιστοποίηση ανεπιθύμητων αντιδράσεων και παραπροϊόντων	Υψηλό κόστος παραγωγής
Βιο-αποικοδομίσιοι και φιλικοί ως προς το περιβάλλον καταλύτες	-

Τα ένζυμα σύμφωνα με την Διεθνή Επιτροπή Ενζύμων ταξινομούνται σε επτά γενικές κατηγορίες με βάση τη φύση της αντίδρασης που καταλύουν. Μάλιστα έχει αναπτυχθεί μια κωδικοποίηση με τέσσερα ψηφία για τον ακριβή προσδιορισμό κάθε ενζύμου, όπου το πρώτο ψηφίο υποδεικνύει την τάξη, το δεύτερο και το τρίτο ψηφίο περιγράφουν τον τύπο της αντίδρασης που καταλύουν και το τέταρτο ψηφίο χρησιμοποιείται για την διάκριση τύπων ίδιας λειτουργίας με βάση το υπόστρωμα στην αντίδραση που καταλύεται (εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα). Ο κωδικός αυτός τετραψήφιος αριθμός αποτελείται σε όλες τις περιπτώσεις από το ακρωνύμιο E.C. (Enzyme Commission) (Liu, 2017).

Οι επτά κατηγορίες ταξινόμησης των ενζύμων παρουσιάζονται ακολούθως:

- ο E.C.1.: Οξειδοαναγωγάσες: ένζυμα που καταλύουν την οξείδωση ή την αναγωγή του υποστρώματος (αντιδράσεις οξειδοαναγωγής), μεταφέρουν δηλαδή άτομα οξυγόνου ή υδρογόνου από ένα υπόστρωμα σε ένα άλλο.
- ο E.C.2.: Τρανσφεράσες ή μεταφοράσες: καταλύουν τις αντιδράσεις μεταφοράς χημικών ομάδων από μία ένωση (δότης) σε μία άλλη ένωση (δέκτης).
- ο E.C.3.: Υδρολάσες: ένζυμα που καταλύουν αντιδράσεις υδρόλυσης.
- ο E.C.4.: Λυάσες: ένζυμα που καταλύουν την μη υδρολυτική αφαίρεση ομάδων από το υπόστρωμα, έχοντας συνεπώς τον σχηματισμό ενός διπλού δεσμού.
- ο E.C.5.: Ισομεράσες: καταλύουν δομικές ή γεωμετρικές αλλαγές εντός του μορίου του υποστρώματος.
- ο E.C.6.: Λιγάσες: καταλύουν την συμπύκνωση δύο μορίων με διάσπαση-υδρόλυση ενός πυροφωσφορικού δεσμού (συνήθως του ATP). (Lu et al., 2007).
- ο E.C.7.: Τρανσλοκάσες: καταλύουν τη μεταφορά ιόντων ή μορίων κατά μήκος των μεμβρανών, ή τον διαχωρισμό τους μέσα στις μεμβράνες.

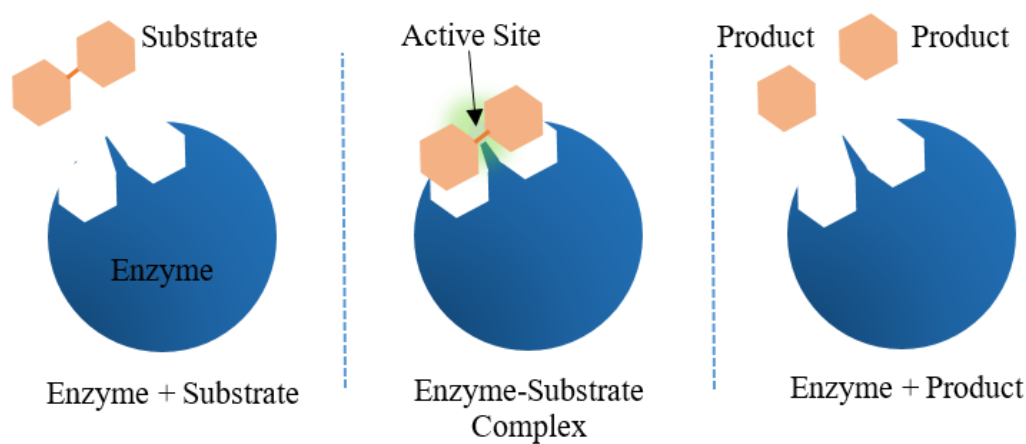
3.2. Μηχανισμός ενζυμικής κατάλυσης

Τα ένζυμα παρέχουν την επιφάνεια στην οποία οι αντιδράσεις μετατροπής των αντιδρώντων σε προϊόντα μπορούν να συμβούν πολύ πιο εύκολα. Ελλείψει των ενζύμων και της ενζυμικής κατάλυσης, οι περισσότερες διεργασίες και οι βιοχημικές αντιδράσεις είναι τόσο αργές που δεν θα συμβαίνανε υπό τις ήπιες συνθήκες πίεσης και θερμοκρασίας οι οποίες είναι συμβατές με τη ζωή. Με τον όρο ενζυμική κατάλυση αναφερόμαστε σε μια δυναμική διεργασία κατά την οποία η ατομική θέση των μορίων του ενζύμου μεταβάλλεται με χρονοεξαρτώμενο τρόπο. Τα ένζυμα υφίστανται δηλαδή αλλαγές στη διαμόρφωση κατά τη διάρκεια της καταλυτικής διεργασίας με σκοπό να επιτευχθεί η επιλεκτική δέσμευση του υποστρώματος και συνεπώς η κατάλυση (Kumar et al., 2020).

Η πρώτη θεωρία της ενζυμικής κατάλυσης αποτέλεσε το μοντέλο «κλειδαριάς-κλειδιού» («lock and key») που προτάθηκε από τον Emil Fischer, ο οποίος υποστήριξε ότι το υπόστρωμα χωράει στα ένζυμα όπως ένα κλειδί στην κλειδαριά (Kumar et al., 2020).

Η καταλυτική ισχύς των ενζύμων περιλαμβάνει γενικά την σύνδεση ενός, δύο ή περισσότερων υποστρωμάτων που συγκεντρώνονται και προσανατολίζονται κατάλληλα προκειμένου να σχηματιστεί ένα σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Ειδικότερα, το υπόστρωμα δεσμεύεται σε συγκεκριμένη περιοχή του ενζύμου, στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, όπου διαμορφώνεται ένας μικρός θύλακας, το υπόστρωμα μετατρέπεται στο προϊόν της αντίδρασης και το ένζυμο απελευθερώνεται. Η σύνδεση ωστόσο του υποστρώματος στο

ενεργό κέντρο του ενζύμου είναι πολύ συγκεκριμένη, καθώς οι θύλακες και οι αυλακώσεις που δημιουργούνται στην επιφάνεια του ενζύμου αποτελούνται από αμινοξέα από διαφορετικά τμήματα της πολυπεπτιδικής αλυσίδας που συγκεντρώνονται στην τριτοταγή δομή της αναδιπλωμένης πρωτεΐνης. Η σύνδεση του υποστρώματος γίνεται συνήθως μέσω δεσμών υδρογόνου, ιοντικών δεσμών και υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος οδηγούν στην ανακατανομή των ηλεκτρονίων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και ουσιαστικά ενεργοποιούν το ένζυμο, οδηγώντας στον σχηματισμό της μεταβατικής κατάστασης, στην μείωση της ενέργειας ενεργοποίησης και στη μετέπειτα αύξηση του ρυθμού της αντίδρασης (Cooper Geoffrey M., 2000), (Copeland Robert A., 2020).



Εικόνα 4. Μηχανισμός ενζυμικής κατάλυσης - Μοντέλο κλειδαριάς-κλειδιού.

3.3. Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

Τα ένζυμα επιταχύνουν τις βιολογικές αντιδράσεις, αυξάνοντας την ταχύτητα της αντίδρασης έως και εκατομμύρια φορές. Η ταχύτητα αυτή της χημικής αντίδρασης που καταλύεται από κάποιο ένζυμο είναι συνήθως ανάλογη της συγκέντρωσης του ενζύμου, ενώ εξαρτάται επίσης από τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Επιπλέον, ο ρυθμός των ενζυμικών αντιδράσεων εξαρτάται από τη συγκέντρωση διαφόρων ουσιών που δύναται να ενεργοποιούν ή να παρεμποδίζουν την κατάλυση, καθώς και από φυσικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία και το pH. Ειδικότερα, όσον αφορά την εξάρτηση από τη συγκέντρωση του υποστρώματος, η σχέση μεταξύ ταχύτητας της ενζυμικής αντίδρασης και της συγκέντρωσης του υποστρώματος αποτυπώνεται μέσω της εξίσωσης Michaelis-Menten, εξίσωση που διατυπώθηκε πρώτη φορά το 1913 σε μια προσπάθεια να εξηγηθεί η συμπεριφορά των ενζύμων (Liu, 2017), (Cornish-Bowden, 2015).

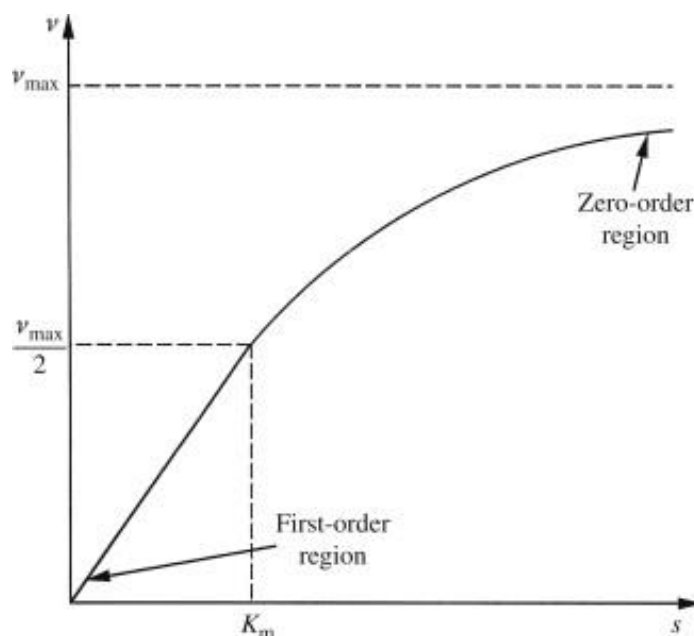
Η σύγχρονη μορφή του τύπου της εξίσωσης έχει ως εξής:

$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Όπου v_0 η αρχική ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, v_{max} η μέγιστη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, $[S]$ η συγκέντρωση του υποστρώματος και K_m η σταθερά ισορροπίας ή συχνά αναφερόμενη και ως σταθερά Michaelis-Menten.

Η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης (v_{max}) αποτελεί γινόμενο της σταθεράς k_2 και της συγκέντρωσης του ενζύμου, αυξάνεται συνεπώς όταν αυξηθεί η ολική συγκέντρωση του ενζύμου ενώ είναι ανεξάρτητη του υποστρώματος. Το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος δημιουργείται συνήθως αρκετά γρήγορα, συνεπώς η σταθερά k_2 είναι αυτή που καθορίζει την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης εφόσον η δημιουργία των προϊόντων είναι πολύ πιο αργή διαδικασία. Για τον λόγο αυτό η σταθερά k_2 αναφέρεται συχνά και ως καταλυτική σταθερά της αντίδρασης και συμβολίζεται με k_{cat} (Srinivasan, 2022).

Στο παρακάτω διάγραμμα αποτυπώνεται η καμπύλη κινητικής της εξίσωσης Michaelis-Menten. Σε χαμηλή συγκέντρωση υποστρώματος η ταχύτητα της αντίδρασης είναι πρώτης τάξεως, ανάλογη δηλαδή της συγκέντρωσης του υποστρώματος, ενώ σε υψηλή τιμή της συγκέντρωσης του υποστρώματος ο ρυθμός αντίδρασης είναι ανεξάρτητος της συγκέντρωσης και η κινητική της αντίδρασης μηδενικής τάξεως (Liu, 2017).



Εικόνα 5. Επίδραση της συγκέντρωσης υποστρώματος στον ρυθμό σχηματισμού προϊόντος για μια ενζυμικά καταλυόμενη αντίδραση (Liu, 2017).

Η σταθερά K_m είναι η σταθερά ισορροπίας του συμπλόκου ενζύμου-υποστρώματος, ενώ αντιστοιχεί στη συγκέντρωση του υποστρώματος στην οποία ο ρυθμός της αντίδρασης είναι το ήμισυ του μέγιστου ρυθμού της αντίδρασης. Η χαμηλή τιμή της σταθεράς K_m υποδηλώνει ότι το ένζυμο έχει υψηλή συγγένεια ως προς το υπόστρωμα. Όσο μεγαλύτερη η τιμή της K_m , τόσο μεγαλύτερη συγκέντρωση υποστρώματος απαιτείται για να επιτευχθεί το ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας, και συνεπώς τόσο μικρότερη η ικανότητα του υποστρώματος να αλληλεπιδράσει με το ένζυμο. Εφόσον γνωρίζουμε την τιμή της σταθεράς K_m είναι δυνατό να επιλέξουμε την κατάλληλη συγκέντρωση υποστρώματος κατά τον προσδιορισμό της δραστηριότητας του ενζύμου (Liu, 2017), (Srinivasan, 2022), (Johnson & Goody, 2011).

4. Ακίνητοποίηση ενζύμων

4.1. Εισαγωγή

Ακίνητοποιημένο ονομάζουμε ένα βιομόριο (πρωτεΐνη, ένζυμο, γονίδιο κλπ.) ή κύτταρο του οποίου η ελεύθερη κίνηση στον χώρο, είτε έχει αποτραπεί εντελώς ή έχει περιοριστεί. Η ακίνητοποίηση ενζύμων αναφέρεται δηλαδή στη διαδικασία περιορισμού των ενζύμων σε ένα στερεό υπόστρωμα (φορέας ακίνητοποίησης) που αλλάζει τη φυσική κατάσταση του εν λόγω βιοκαταλύτη, διατηρούνται όμως οι καταλυτικές ιδιότητες και το βιοκαταλυτικό σύστημα μπορεί να χρησιμοποιηθεί επαναλαμβανόμενα και συνεχώς. Κύριος στόχος, λοιπόν, είναι η σύνδεση του ενζύμου με μια αδιάλυτη μήτρα, η αλληλεπίδραση των οποίων μπορεί να οδηγήσει σε ένα ακίνητοποιημένο ένζυμο με συγκεκριμένες χημικές, κινητικές και μηχανικές ιδιότητες. Με το πέρας των χρόνων η ενζυμική ακίνητοποίηση έχει κεντρίσει το ερευνητικό ενδιαφέρον, με την ακίνητοποίηση των ενζύμων να θεωρείται πλέον αναπόσπαστο κομμάτι της βιοτεχνολογίας και της βιοκατάλυσης. Κύρια συστατικά ενός συστήματος ακίνητοποίησης αποτελούν το ένζυμο, ο φορέας ακίνητοποίησης, καθώς και ο τρόπος σύνδεσης ενζύμου-φορέα (Hassan et al., 2019), (Sheldon, 2007).

4.2. Μέθοδοι ακίνητοποίησης

Για την επιλογή της κατάλληλης μεθόδου ακίνητοποίησης, θα πρέπει να ληφθούν υπόψη οι πρωτογενείς ιδιότητες του ενζύμου, όπως η μοριακή μάζα, η σύσταση των πλευρικών λειτουργικών ομάδων των αμινοξέων καθώς και η αναγκαιότητα ύπαρξης συμπαραγόντα. Επιπλέον, η επιλογή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την τελική χρήση του ενζύμου και σχετίζεται με το βιομόριο αλλά και τον φορέα που έχει επιλεγεί. Βάση αυτών, οι μέθοδοι ακίνητοποίησης ενζύμων μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κατηγορίες αναφορικά με την ύπαρξη ή όχι στερεού φορέα-μήτρας.

❖ Ακίνητοποίηση ενζύμων μέσω της χρήσης στερεού φορέα:

Στην περίπτωση αυτή κατατάσσουμε τις μεθόδους σε επιμέρους κατηγορίες:

1. Σύνδεση του βιοκαταλύτη με τη μήτρα μέσω **φυσικής προσρόφησης (μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση)** που βασίζεται σε ασθενείς δεσμούς, όπως υδρόφοβες ή Van-der Waals αλληλεπιδράσεις, δεσμούς υδρογόνου ή ιοντικές αλληλεπιδράσεις. Διάφοροι τύποι υλικών μπορούν να αξιοποιηθούν ως φορείς, όπως ρητίνη ιοντοανταλλαγής, ανόργανη ή οργανική μήτρα, βιοπολυμερή, μικροσωματίδια ή μεμβράνες. Στην περίπτωση αυτή, ο βιοκαταλύτης εντοπίζεται συνήθως στην

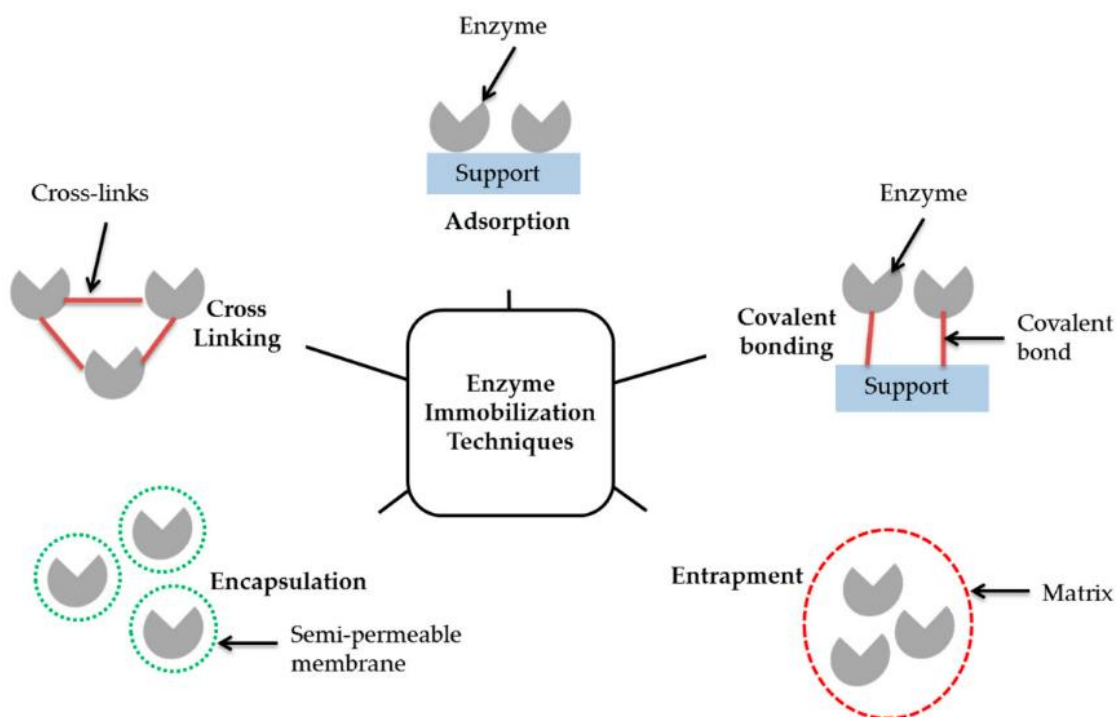
επιφάνεια του φορέα, χωρίς να τη διαταράσσει, και έχει προκύψει ύστερα από εμβάπτιση της στερεάς μήτρας σε διάλυμα ενζύμου. Συγκεκριμένα, ο φορέας διασπείρεται στο μέσο ακινητοποίησης, προστίθεται το ένζυμο, το μείγμα επωάζεται για καθορισμένο χρονικό διάστημα και ο βιοκαταλύτης λαμβάνεται ύστερα από διαδοχικές πλύσεις. Η μέθοδος αυτή διακρίνεται για την απλότητα και το χαμηλό κόστος.

2. **Ομοιοπολική ακινητοποίηση**, όπου έχουμε τον σχηματισμό ισχυρών δεσμών μεταξύ των λειτουργικών ομάδων των αμινοξέων στην επιφάνεια των ενζύμων (καρβοξυλομάδες, αμινομάδες, θειολομάδες, κλπ.) και των ομάδων στην επιφάνεια του υλικού, όπως αμινομάδες, καρβοξυλομάδες κλπ. Συχνά, η χημική τροποποίηση της επιφάνειας των φορέων μέσω της προσθήκης διαφόρων λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια τους, διευκολύνει τη δημιουργία δεσμών μεταξύ φορέα και ενζύμου. Η δημιουργία του ομοιοπολικού δεσμού μεταξύ φορέα και ενζύμου, συνήθως απαιτεί τη χρήση δι-λειτουργικών μορίων («μόρια γέφυρες») που διαμεσολαβούν στη σύνδεση μεταξύ των ομάδων των δύο μερών.
3. Το ένζυμο εντάσσεται στο εσωτερικό της μήτρας. Έχουμε **εγκαψυλίωση** (encapsulation) ή **εγκλωβισμό** (entrapment). Πρόκειται για φυσική ακινητοποίηση που επιτυγχάνεται με υδρόφοβες, ιοντικές, Van der Waals αλληλεπιδράσεις ή αλληλεπιδράσεις συγγένειας. Ως τέτοιου είδους μήτρες συναντάμε ανόργανα, οργανικά ή φυσικά μόρια, όπως βιοπολυμερή, το άγαρ, πολυακρυλαμίδιο (polyacrylamide) και το κολλαγόνο. Παρέχει καλύτερη σταθερότητα έναντι της μετουσίωσης που μπορεί να προέλθει από τους οργανικούς διαλύτες, τις υψηλές θερμοκρασίες ή τις ξαφνικές αλλαγές στην τιμή του pH. Μια ειδική μορφή εγκλωβισμού μεμβράνης είναι η μικρο-ενθυλάκωση (microencapsulation), τεχνική κατά την οποία σχηματίζονται μικροσκοπικές σφαίρες που περιέχουν το ενζυμικό διάλυμα, οι οποίες περικλείονται μέσα σε μια πορώδη μεμβράνη.

❖ **Αυτο-ακινητοποίηση ενζύμων:**

Στην περίπτωση αυτή, το ένζυμο μετατρέπεται σε μια αδιάλυτη μορφή μέσω της δημιουργίας σταυροδεσμών (cross-linking), προκύπτοντας ένα τρισδιάστατο σύνθετο μόριο. Η πρωτεΐνη συνδέεται χημικά με τον εαυτό της, γεγονός που οδηγεί στην παραγωγή ενζυμικών κρυστάλλων (CLECs) ή σχηματισμό άμορφων συσσωματωμάτων ενζύμων, γνωστά ως CLEAs ή Spherezymes. Λόγω της έλλειψης του φορέα δύναται να εφαρμοστεί ακινητοποίηση και καθαρισμός ταυτόχρονα σε ένα στάδιο, το ένζυμο συνδέεται απευθείας με το υπόστρωμα και δεν υπάρχει απώλεια δραστηριότητας, ενώ η ταυτόχρονη σύνδεση δύο ή περισσότερων ενζύμων με συμπληρωματικές λειτουργίες (combi-CLEAs ή CLECs) παρουσιάζει ιδιαίτερα

πλεονεκτήματα σε βιομηχανική κλίμακα (Liu, 2017), (Hassan et al., 2019), (Rossino et al., 2022).



Εικόνα 6. Μέθοδοι ακινητοποίησης ενζύμων (Mokhtar et al., 2020).

4.3. Πλεονεκτήματα ακινητοποίησης

Η ακινητοποίηση αποτελεί τρόπο, μέσω του οποίου μπορεί να εξασφαλιστεί η προστασία της διαμόρφωσης των ενζύμων και η ενίσχυση της απόδοσής τους κατά τη διάρκεια των βιοκαταλυτικών αντιδράσεων (Li et al., 2018).

Ειδικότερα, ο ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης παρουσιάζει υψηλή σταθερότητα, διατηρεί δηλαδή για μεγάλο χρονικό διάστημα τη δραστηριότητά του σε σχέση με την ελεύθερη μορφή του ενζύμου, εφόσον προστατεύεται από την πρωτεολυτική αποικοδόμηση και τις μη ευνοϊκές συνθήκες λειτουργίας, όπως υψηλές θερμοκρασίες, πιέσεις ή ακραίες τιμές pH, οι οποίες μπορεί να προκαλέσουν μετουσίωση και απώλεια της δραστηριότητας. Έχουμε συνεπώς καλύτερο έλεγχο των συνθηκών αντίδρασης, του περιβάλλοντος δηλαδή του βιοκαταλύτη, με αποτέλεσμα να αποτρέπονται ανεπιθύμητες αντιδράσεις και άρα να επιτυγχάνονται υψηλότερες αποδόσεις, ενώ ενισχύεται η εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα και η στόχευση σε συγκεκριμένα κύτταρα και ιστούς (Hassan et al., 2019), (Bosio et al., 2015).

Όσον αφορά τη θεραπευτική χρήση, τα ακινητοποιημένα ένζυμα παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντοχή σε λυτικές δράσεις, όπως για παράδειγμα αυτοδιάλυση που υφίσταται σε ορισμένες υδρολάσεις, αντίσταση σε επιδράσεις διάτμησης, παρατεταμένος χρόνος ημιζώης,

αλλά και χρόνος παραμονής του ενζύμου στην κυκλοφορία εντός του σώματος. Με τον τρόπο αυτό εξασφαλίζεται η συνεχής λειτουργία του.

Επιπλέον, εφόσον πρόκειται για σύστημα στερεάς φάσης, μπορούμε να διαχωρίσουμε εύκολα τα ακινητοποιημένα ένζυμα από το μέσο αντίδρασης με απλές φυσικές μεθόδους, όπως διήθηση ή φυγοκέντρωση, απλοποιώντας με τον τρόπο αυτό και την επακόλουθη επεξεργασία. Μπορούμε έτσι να ανακτήσουμε εύκολα τον βιοκαταλύτη στο τέλος της αντίδρασης και να τον επαναχρησιμοποιήσουμε για τη μετατροπή του υποστρώματος σε προϊόν, εφόσον δεν καταναλώνεται ούτε μεταβάλλεται κατά τη διάρκεια της αντίδρασης, μειώνοντας έτσι την παραγωγή αποβλήτων και το κόστος των διεργασιών (Hassan et al., 2019).

Τέλος, δύναται να χρησιμοποιηθούν πολυενzymικά συστήματα για την εφαρμογή κυρίως σε αλυσιδωτές αντιδράσεις, έχοντας έτσι την συν-ακινητοποίηση πολλών ενζύμων σε έναν ή περισσότερους φορείς, ενώ υπάρχει ευελιξία όσον αφορά την επιλογή του κατάλληλου στερεού φορέα με βάση το ένζυμο και την επιθυμητή εφαρμογή.

4.4. Μειονεκτήματα - Προκλήσεις

Ωστόσο, παρά τα οφέλη που πηγάζουν από την ακινητοποίηση των ενζύμων σε διάφορους στερεούς φορείς, υπάρχουν και εμπόδια που θα πρέπει να αντιμετωπιστούν προκειμένου να ελαχιστοποιήσουμε τις επιπτώσεις στη μείωση της απόδοσης των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών.

Θα πρέπει να ληφθεί υπόψη η πιθανή μείωση ή και πλήρης απώλεια της ενzymικής δραστηριότητας λόγω αλλαγής της διαμόρφωσης της δομής του ενζύμου κατά την ακινητοποίηση ή παρεμπόδισης πρόσδεσης του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο των ενζύμων, όπως εκφράζεται από τις κινητικές παραμέτρους (K_m , V_m). Ο βιοκαταλύτης εκτίθεται κατά την ακινητοποίηση σε χημικά αντιδραστήρια που πιθανώς επηρεάζουν την σταθερότητα, αναστέλλοντας ακόμη και τη δράση του, ενώ περιορίζεται από την ικανότητα να διατηρεί την ενεργή του δομή μέσα στον χρόνο στις συνθήκες αντίδρασης.

Σημαντική κρίνεται επίσης και η ομοιόμορφη κατανομή του ενζύμου στον φορέα, γεγονός που μπορεί να επηρεάσει την συνολική απόδοση του βιοκαταλυτικού συστήματος. Παρά το γεγονός ότι η ακινητοποίηση έχει μελετηθεί εκτενώς σε εργαστηριακή κλίμακα, για την εφαρμογή της σε βιομηχανική κλίμακα απαιτείται η αντιμετώπιση ζητημάτων, όπως της κατανομής του ενζύμου και ο σχεδιασμός του αντιδραστήρα. Επιπλέον, το κόστος παραγωγής των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών σε μεγάλη κλίμακα είναι ιδιαίτερα υψηλό, με αποτέλεσμα να υπάρχουν περιορισμοί ως προς τη χρήση τους στη βιομηχανία. Αντιμετωπίζοντας τις προκλήσεις αυτές, η ακινητοποίηση των ενζύμων δύναται να εφαρμοστεί σε πλήθος βιομηχανιών, εξασφαλίζοντας έτσι αποτελεσματικότερες ενzymικές διεργασίες. Για

τον λόγο αυτό, η επιλογή των τεχνικών ακινητοποίησης καθώς και των υλικών-στερεών φορέων κρίνεται υψίστης σημασίας για την ελαχιστοποίηση των επιδράσεων στις καταλυτικές ιδιότητες, τη διατήρηση ή ενίσχυση της λειτουργικότητας των ενζύμων και συνεπώς της αποτελεσματικότητας του βιοκαταλυτικού συστήματος (Hassan et al., 2019), (Bosio et al., 2015).

4.5. Βιοϊατρικές εφαρμογές ακινητοποιημένων ενζύμων

Σε σύγκριση με τις παραδοσιακές στρατηγικές, η ακινητοποίηση των ενζύμων σε φορείς και κυρίως σε νανο-φορείς, καθώς και ο συνδυασμός με άλλα μόρια (π.χ. αντιβιοτικά, πεπτίδια, ή μέταλλα) μπορεί να ενισχύσει τη θεραπευτική δράση και ειδικότερα τη δραστηριότητα, σταθερότητα και τη διάρκεια ζωής των ενζύμων. Παράλληλα με την εναντιοεκλεκτικότητα των ενζύμων, την ειδική στόχευση υποστρωμάτων που εμπλέκονται σε παθολογικές καταστάσεις, πλήθος δυνητικά διαθέσιμων ακινητοποιημένων ενζύμων και νανοσυστημάτων έχει αναπτυχθεί για ευρύ φάσμα εφαρμογών στην ιατρική. Η νανοτεχνολογία έδωσε τη δυνατότητα αξιοποίησης των βιοκαταλυτών στη θεραπευτική και διαγνωστική, όπου με την ελεγχόμενη απελευθέρωση θα επιτευχθεί ένας αποτελεσματικότερος τρόπος θεραπείας για πλήθος παθολογιών. Έχουν διερευνηθεί, επομένως, διάφορα συστήματα ακινητοποιημένων ενζύμων που είναι διαθέσιμα σήμερα για ενζυμική θεραπεία αλλά και εφαρμογής τους έναντι διαφόρων παθολογιών, που εξετάζονται παρακάτω ανάλογα με τον τρόπο χορήγησης τους.

❖ Παρεντερική χορήγηση νανοβιοκαταλυτών

Τα πιο σημαντικά παραδείγματα θεραπευτικής χορήγησης ενζύμων που σχετίζονται με αυτή την οδό είναι τα ακόλουθα:

Θεραπεία της νόσου Gaucher

Η νόσος Gaucher είναι μια λυσοσωμιακή διαταραχή αποθήκευσης γλυκολιπιδίων. Οφείλεται στην ανεπάρκεια της γλυκοσερεβροσιδάσης (Glucocerebrosidase), υδρολάσης στα λυσοσώματα των μακροφάγων, υπεύθυνης για τη διάσπαση του γλυκοσερεβροσιδίου σε γλυκόζη και σεραμίδιο, λόγω μετάλλαξης του γονιδίου GBA που κωδικοποιεί την όξινη β-γλυκοσιδάση. Με τον τρόπο αυτό έχουμε τη συσσώρευση γλυκοσερεβροσιδίου στο ενδοθηλιακό σύστημα κυττάρων του ήπατος, της σπλήνας και του μυελού των οστών. Για την αντιμετώπιση της νόσου θα μπορούσε να εφαρμοστεί κλινική θεραπεία μέσω ενδοφλέβιας χορήγησης του γονιδίου β-γλυκοσιδάσης σε λιποσώματα. Το ένζυμο έχει ακινητοποιηθεί επιτυχώς σε συνθετικά υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια μαγνητίτη (10 nm) και σε

μαγνητικά μη πορώδη, όπου στην πρώτη περίπτωση μάλιστα επιτεύχθηκε 98% διατήρηση της ενζυμικής δράσης (Bosio et al., 2015).

Θεραπεία από το αλκοόλ

Η αλκοολική οξειδάση (Alcohol oxidase), καταλύει τη μετατροπή της αιθανόλης σε ακεταλδεΰδη και υπεροξείδιο του υδρογόνου (H_2O_2), στην αποικοδόμηση του οποίου συντελεί η καταλάση προκειμένου να αποτραπεί ο σχηματισμός ριζών. Για την αντιμετώπιση της δηλητηρίασης από το αλκοόλ αναπτύχθηκε μια νανοδιάταξη που βασίζεται στον εγκλωβισμό του συστήματος αυτών των δύο ενζύμων, σε συνδυασμό με την τεχνολογία συναρμολόγησης του DNA. Συγκεκριμένα, σύμπλοκα DNA-ενζύμου εγκλωβίστηκαν σε γέλες πολυακρυλαμιδίου (polyacrylamide gels), όπου δοκιμάστηκαν σε ποντίκια και διαπιστώθηκε υψηλή σταθερότητα και υψηλός ρυθμός οξείδωσης της αλκοόλης (Bosio et al., 2015).

Αντιθρομβωτικές εφαρμογές και θεραπεία

Ο ενεργοποιητής πλασμινογόνου ιστού (tissue plasminogen activator, tPA) είναι μια πρωτεάση που υδρολύει το πλασμινογόνο σε πλασμίνη που διασπά τους σταυροδεσμούς στο ινώδες. Για τον λόγο αυτό αποτέλεσε ευρέως χρησιμοποιούμενο φάρμακο στην αντιθρομβωτική θεραπεία και κατά συνέπεια στην πρόληψη ισχαιμικού εγκεφαλικού επεισοδίου και καρδιακής ανακοπής. Ωστόσο, λόγω της αυτόλυσης έχει μικρό χρόνο ημιζωής (2-6 min). Η νατοκινάση (Nattokinase) είναι μια πρωτεάση σερίνης, ένζυμο με παρόμοια δραστηριότητα και ινωδολυτική ικανότητα με την tPA, και χρόνο ημιζωής πάνω από 3 ώρες. Άλλη μια πρωτεάση σερίνης, η ουροκινάση (urokinase), αποτελεί αντιθρομβωτικό ένζυμο με χρόνο ημιζωής 15 min. Επίσης η στρεπτοκινάση (streptokinase) χρησιμοποιείται ως αντιθρομβωτικό φάρμακο, παρουσιάζει όμως ανοσολογικές και πυρετογόνες αντιδράσεις. Και στις τέσσερις περιπτώσεις των πρωτεασών παρατηρούμε σύντομο χρόνο ημιζωής, για την παράταση του οποίου χρησιμοποιήθηκαν κατάλληλοι φορείς.

✓ Το tPA ακινητοποιήθηκε, για παράδειγμα, ομοιοπολικά σε μαγνητικά νανοσωματίδια και χρησιμοποιήθηκε αποτελεσματικά έναντι της θρόμβωσης που δημιουργείται κατά την αγγειακή ενδοαυλική πρόθεση (εμφύτευση stent), σοβαρή επιπλοκή που μπορεί να οδηγήσει σε οξεία απόφραξη της αρτηρίας ή και ακόμη έμφραγμα του μυοκαρδίου. Πειράματα *in vitro* έδειξαν ότι το σύστημα με μαγνητικά νανοσωματίδια tPA-NPs μπορεί να προσανατολιστεί και επομένως να κατευθυνθεί, παρουσία μαγνητικού πεδίου. Η πιθανότητα εμφάνισης θρόμβωσης μετά την τοποθέτηση της ενδοπρόθεσης (stent) σε αυτή τη περίπτωση είναι πολύ χαμηλή (1,0-1,5%), ενώ πειράματα σε μοντέλο χοίρου έδειξαν ότι δεν υπήρχαν βραχυπρόθεσμες

παρενέργειες, γεγονός που υποδεικνύει ότι τα tPA-NPs αποτελούν μια πολλά υποσχόμενη συσκευή για τη θεραπεία της θρόμβωσης.

✓ Ο ρυθμός απομάκρυνσης του tPA στο πλάσμα μειώνεται όταν οι φορείς ενθυλάκωσης είναι λιποσώματα επικαλυμμένα με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG), αδρανούς επικάλυψης σε σχέση με το ανοσοποιητικό σύστημα. Μάλιστα, ο χρόνος κάθαρσης είναι 9 ώρες, ενώ η απομάκρυνση του tPA από το κυκλοφορικό σύστημα συμβαίνει εντός 1 ώρας.

✓ Το tPA εγκλωβίστηκε, επίσης, σε νανοσωματίδια poly(lactide-co-glycolide, PLGA), νανοσωματίδια συμπολυμερούς με μεγάλη βιοδιασπασιμότητα και βιοσυμβατότητα, όπου κατά τον συνδυασμό με τον γραμμικό πολυσακχαρίτη χιτοζάνη (PLGA-Cs) είτε με το τριπεπτίδιο Arg-Gly-Asp (RGD) αυξήθηκε η θρομβόλυση *in vitro* λόγω της ηλεκτροστατικής αλληλεπίδρασης μεταξύ των νανοσωματιδίων και του πηγμένου αίματος.

✓ Η ουροκινάση (urokinase) ακινητοποιήθηκε σε βιοσυμβατά νανοσωματίδια πολυμερούς αποτελούμενα από 2-μεθοξυεθανολικούς ημι-εστέρες του poly(maleic anhydride-alt-butyl vinyl ether), συντιθέμενα με συγκαταβύθιση. Μετά την ακινητοποίηση, διατηρήθηκε το 83% της αρχικής ενζυμικής δραστηριότητας, ενώ πειράματα κυτταροτοξικότητας έδειξαν 100% βιωσιμότητα των κυττάρων.

✓ Μικροβιακές ναττοκινάσες (NK) και η λουμπροκινάση του γαιοσκώληκα (lumbrokinase *Lumbricus rubellus*, LK) ακινητοποιήθηκαν σε μαγνητικά νανοσωματίδια Fe₃O₄, όπου εμφάνισαν 90 και 200% θρομβολυτική δράση αντίστοιχα, συγκριτικά με την ελεύθερη μορφή τους (~80%) (Bosio et al., 2015).

❖ Από του στόματος χορήγηση

Αποτελεί μία εκ των προτιμότερων προσεγγίσεων, καθώς το φάρμακο απορροφάται στον γαστρεντερικό σωλήνα που διαθέτει προστατευτικούς μηχανισμούς έναντι δυνητικά τοξικών ουσιών, ωφέλιμο γεγονός κατά την σύνθεση νανοφορέων. Ακολουθούν ορισμένα παραδείγματα παρασκευασμάτων θεραπευτικών ενζύμων ή πρωτεϊνών.

Αλγινική λύαση (AL)

Η κυστική ίνωση (Cystic fibrosis, CF) αποτελεί αυτοσωμικά υπολειπόμενη νόσο που προκαλείται από μεταφορά ιόντων χλωρίου, συνοδευόμενη από αυξημένη επαναρρόφηση νατρίου, παρουσία κυρίως παθογόνων βακτηρίων (*Pseudomonas aeruginosa*) (Davis, 2006). Το βακτήριο αυτό παράγει μεγάλες ποσότητες του εξωπολυσακχαρίτη alginate (ALG) στο εσωτερικό των πνευμόνων και του εντέρου, σχηματίζοντας μια βιολογική μεμβράνη (biofilm) που επικαλύπτει τους ιστούς, εμποδίζοντας την πρόσληψη οξυγόνου, την αφομοίωση της τροφής, καθώς και την αποτελεσματικότητα της αντιβιοτικής θεραπείας.

Η αλγινική λυάση (AL) υδρολύει τις αλυσίδες ALG, μειώνοντας έτσι το ιξώδες της μεμβράνης. Προκειμένου να φτάσει η AL στο περιβάλλον-στόχο εγκλωβίστηκε σε σφαιρίδια ALG/pectin σε ποσοστό 90% σε όξινο pH (pH=4) και απελευθερώθηκε έπειτα στην ενεργή της μορφή όταν έφτασε σε περιβάλλον με φυσιολογικές συνθήκες (pH=7.4).

Λυάση της φαινυλαλανίνης-αμμωνίας (Phenylalanine-ammonia lyase, PAL)

Η φαινυλκετονουρία (PKU) αποτελεί επίσης αυτοσωμική υπολειπόμενη νόσος και οφείλεται σε ανεπάρκεια του ενζύμου υδροξυλάση της φαινυλαλανίνης (PHX), το οποίο είναι υπεύθυνο για τη μετατροπή της φαινυλαλανίνης σε τυροσίνη. Αυξημένα επίπεδα φαινυλαλανίνης έχουν τοξική δράση στο νευρικό σύστημα και ιδίως τον εγκέφαλο.

Έχει μελετηθεί η θεραπεία μέσω ενζυμικής υποκατάστασης με PAL, η οποία καταλύει τη μη οξειδωτική απαμίνωση της φαινυλαλανίνης σε trans-κινναμικό οξύ και αμμωνία. Προκειμένου να αποφευχθεί η ταχεία αποικοδόμηση της λυάσης λόγω υδρολυτικών ενζύμων, ακινητοποιήθηκε σε πλήθος υλικών, όπως για παράδειγμα η ζελατίνη. Πιο πρόσφατες μελέτες εστιάζουν στην χρήση της νανοτεχνολογίας και ειδικότερα στην ανάπτυξη ενζυμικών συσσωματωμάτων με σταυροδεσμούς (CLEAs), ώστε να επινοηθεί ένα αποτελεσματικό από του στόματος χορήγησης σκεύασμα PAL.. Το σύστημα PAL-CLEA παρουσίασε αυξημένη σταθερότητα του ενζύμου έναντι ακραίων περιβαλλοντικών συνθηκών (θερμοκρασίας, pH) ή παρουσίας οργανικών διαλυτών (Bosio et al., 2015).

Οξειδάση της χολερυθρίνης (Bilirubin oxidase, BOX)

Πρόκειται για οξειδοαναγωγή που καταλύει την οξείδωση της χολερυθρίνης σε χολοπρασίνη και H₂O. Αυξημένες τιμές χολερυθρίνης χαρακτηρίζουν ασθενείς με ίκτερο, ενώ μπορούν να προκαλέσουν εγκεφαλική βλάβη και ειδικότερα εγκεφαλική παράλυση, νοητική υστέρηση, κώφωση ή ακόμη και θάνατο.

Η BOX ακινητοποιήθηκε ομοιοπολικά σε σφαιρίδια αγαρόζης για την διάσπαση της χολερυθρίνης εξωσωματικά ως πιθανή θεραπεία του αίματος νεογέννητων. Η ακινητοποιημένη BOX χορηγήθηκε επίσης από του στόματος και οδήγησε στην οξείδωση της χολερυθρίνης στο έντερο (μείωση συγκέντρωσης έως 50%), παράγοντας προϊόντα με χαμηλότερη τοξικότητα. Για την ακινητοποίηση αξιοποιήθηκαν, επίσης, υβριδικές μεμβράνες νανοσωματίδιων διοξειδίου του πυριτίου με επικάλυψη ζirkονίας και χιτοζάνης, καθώς και νανοσωλήνες άνθρακα, που εφαρμόστηκαν όμως ως βιοαισθητήρες (Bosio et al., 2015).

Τυροσινάση (Tyrosinase, TYR)

Είναι ένζυμο που συμμετέχει στη σύνθεση της μελανίνης και καταλύει την οξείδωση φαινολών, όπως του αμινοξέος τυροσίνης και της ντοπαμίνης. Η TYR έχει ακινητοποιηθεί σε βιοπολυμερή, για παράδειγμα σε χιτοζάνη. Επίσης, έχουν μελετηθεί σύμπλοκα πολυαιμοσφαιρίνης-τυροσινάσης (polyHb-Tyr), τα οποία παρουσιάζουν βιοσυμβατότητα, ενώ δύναται μετά από δοκιμές σε πειραματόζωα να καταστείλουν την ανάπτυξη κυττάρων του μελανώματος B16F10. Το σύστημα αυτό ακινητοποιήθηκε σε νανοφορέα PEG-πολυ(γαλακτικού οξέος) (PEG-PLA), όπου παρουσιάζει εκτεταμένο χρόνο παραμονής στην κυκλοφορία.

Άλφα-χυμοθρυψίνη (α -CT)

Αποτελεί ένζυμο της εξωκρινής μοίρας του παγκρέατος και καταλύει την υδρόλυση των πρωτεϊνών στο λεπτό έντερο. Λόγω όμως της αυτόλυσης παρουσιάζει σύντομο χρόνο ημιζωής, γεγονός που επιλύθηκε μέσω σύνδεσης των υδροξυλομάδων με μαγνητικά σωματίδια Fe_3O_4 . Επίσης, παρατηρήθηκε ότι η ομοιοπολικά συνδεδεμένη α -CT με N-acryloyloxysuccinimide που προσδέθηκε σε μαγνητικά σωματίδια με ενσωματωμένα σφαιρίδια λατέξ, κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, παρουσίασε ταχύτερη καθίζηση παρουσία μαγνητικού πεδίου, αλλά και καλύτερη διατήρηση της ενζυμικής δραστηριότητας.

β -γαλακτοσιδάση (b-Galactosidase, b-gal)

Η β -γαλακτοσιδάση είναι γλυκοσιδική υδrolάση, ένζυμο που εμπλέκεται στην οξείδωση της λακτόζης. Για τη μεταφορά του ενζύμου στα κύτταρα χρησιμοποιήθηκαν νανοσωματίδια χρυσού (AuNPs), επικαλυμμένα με κατιοντικούς συνδέτες αλκανίων. Παρουσία γλουταθειόνης το ένζυμο απελευθερωνόταν, έχοντας διατηρήσει την ενζυμική του δράση (Bosio et al., 2015).

❖ Έγχυση στην εσωτερική καρωτίδα (Internal-carotid-artery injection)

Με τη μέθοδο αυτή είναι δυνατό να περιορίσουμε την ωφέλιμη δράση στον εγκέφαλο, αποφεύγοντας τοξικότητα σε υγιείς ιστούς.

Η δισμουτάση του υπεροξειδίου (SOD) εγκλωβίστηκε σε λιποσώματα και πολυμερή υλικά, όπως PLGA, και έπειτα εγχύθηκε στην καρωτίδα, σε μοντέλο ποντικών, μειώνοντας κατά 50-60% τους φλεγμονώδεις δείκτες, αλλά και την πιθανότητα εμφάνισης εμφράγματος και εγκεφαλικής ισχαιμίας.

❖ Τοπική Χορήγηση

- ✓ Ένζυμα αναγέννησης οστών

Η αλκαλική φωσφατάση (ALP) είναι ένζυμο που υδρολύει δεσμούς σε αλκαλικό περιβάλλον. Συγκεκριμένα, υδρολύει το πυροφωσφορικό (PPi) απελευθερώνοντας ανόργανο μονοφωσφορικό (Pi), που αναστέλλει και προωθεί την παραγωγή υδροξυαπατίτη αντίστοιχα, παίζοντας έτσι σημαντικό ρόλο στην οστική ανάπτυξη. Η ALP ακινητοποιήθηκε σε ένα υδρόφιλο πολυμερές, το poly (2-hydroxyethyl methacrylate), για την αντιμετώπιση της υποφωσφατασίας, κληρονομικής διαταραχής που επηρεάζει την ανάπτυξη των οστών. Επιπλέον χρησιμοποιήθηκαν ως μήτρα μικροπορώδη ικρίωματα ινώδους (FSs), όπου έπειτα από ομοιοπολική ακινητοποίηση του ενζύμου παρήχθη ένα νανοσύστημα κατάλληλο για την επιδιόρθωση των οστών. Στο πλαίσιο αυτό, για εφαρμογές βιοανίχνευσης έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα άλλα υλικά, όπως μαγνητικά σωματίδια και νανοπορώδεις μεμβράνες Ni-Ti (Bosio et al., 2015).

- ✓ Ένζυμα για τη θεραπεία τραυμάτων

Θρυψίνη

Η θρυψίνη είναι πρωτεάση σερίνης και διασπά τον πεπτιδικό δεσμό στην καρβοξυλική πλευρά σε κατάλοιπα αργινίνης και λυσίνης. Λόγω αυτόλυσης, παρουσιάζει μειωμένη δραστηριότητα και σταθερότητα. Για τον λόγο αυτό, ακινητοποιήθηκε σε βιοσυμβατό βαμβακερό νήμα οξειδωμένο με υπεριοξικό νάτριο και διατήρησε 14% της αρχικής δραστηριότητας, ενώ μετά το πέρας 60 ημερών διατήρησε 90% της δραστηριότητας σε σχέση με τη μη δεσμευμένη θρυψίνη που διατήρησε 14,5%.

Κερατινάση

Η κερατινάση αποτελεί και αυτή πρωτεάση που δύναται να εφαρμοστεί για την επούλωση πληγών. Εγκλωβισμένη σε μήτρα πολυβινυλικής αλκοόλης και πηκτίνης (PVA-pectin), κατάφερε να διατηρήσει 100% της ενζυμικής της δράσης, ενώ μέσω της συνακτινοποίησης της με το αντιβιοτικό ενροφλοξακίνη επιτεύχθηκε η ελεγχόμενη απελευθέρωση της. Το σύστημα αυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως επίθεμα δέρματος, προβαίνοντας σε ενζυμικό καθαρισμό νεκρών ιστών και χορηγώντας ταυτόχρονα και το αντιβιοτικό.

Λυσοζύμη (LSZ)

Η λυσοζύμη είναι υδρολάση και διασπά τον 1,4-β-γλυκοσιδικό δεσμό μεταξύ του N-ακετυλομουραμικού οξέος και του κατάλοιπου N-ακετυλογλυκοσαμίνης στην πεπτιδογλυκάνη, κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των θετικών κατά Gram βακτηρίων. Η LSZ ακινητοποιήθηκε σε πολλά υλικά, όπως κυτταρίνη ή κυτταρίνη διαλδεΰδης, PEG, σωματίδια πυριτίου, νανοσωλήνες άνθρακα και τιτανίου και άλλα υβριδικά υλικά, για αντιμικροβιακές εφαρμογές, όπως για παράδειγμα θεραπεία σε χειρουργικές επεμβάσεις που μπορεί να περιλαμβάνουν πυώδη τραύματα. Ειδικότερα νανοσωλήνες τιτανίας (TiO_2) αξιοποιήθηκαν ως μήτρα για την ακινητοποίηση λυσοζύμης (60-80%), η οποία ανάλογα με την ποσότητα που ακινητοποιήθηκε απελευθερώθηκε σε χρόνο 25-110 min. Σε ανάλογη περίπτωση, χρησιμοποιήθηκαν νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος (SWNTs) πάχους 1.6 nm και υψηλής ειδικής επιφάνειας, με το σύστημα να παρουσιάζει αντιμικροβιακές ιδιότητες. Εκτός αυτών, μεσοπορώδεις ράβδοι διοξειδίου του πυριτίου (SBA-15) μελετήθηκαν ως φορείς λυσοζύμης, όπου παρατηρήθηκε υψηλή ικανότητα προσρόφησης ενζύμων, ενώ δύναται να μεταβληθεί το μέγεθος πόρων και κατά συνέπεια η προσρόφηση του ενζύμου (αντιστρόφως ανάλογη σχέση).

Καταλάση (CAT)

Η καταλάση είναι οξειδοαναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου, καταλύει δηλαδή την διάσπαση του σε νερό και οξυγόνο, αποτρέποντας την παραγωγή ελευθέρων ριζών οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν οξειδωτικές βλάβες, γήρανση ή ακόμη και καρκίνο. Το ένζυμο αυτό ακινητοποιήθηκε, μέσω εγκαψυλίσωσης, σε κυστίδια σακχάρων-εστέρα (sugar-ester vesicles, SEVs) που παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα και υψηλή βιοσυμβατότητα. Το σύστημα παρουσίασε υψηλή σταθερότητα, 95% διατήρηση δραστηριότητας σε περίοδο 90 ημερών σε σύγκριση με την ελεύθερη μορφή όπου διατηρήθηκε το 7% στην ίδια περίοδο, καθώς και σημαντική επίδραση στην επούλωση πληγών (Bosio et al., 2015).

β-N-ακετυλο-D-εξοσαμινιδάση

Οι νόσοι Tay-Sachs και Sandhoff αποτελούν αυτοσωμικές υπολειπόμενες διαταραχές αποθήκευσης λυσοσωμάτων που προκαλούνται από το ένζυμο b-N-acetylhexosaminidase και την συσσώρευση γαγγλιοσιδίων GM2 στα λυσοσώματα των νευρικών κυττάρων, γεγονός που επιφέρει τη φθορά τους και συνεπώς τη μείωση νοητικών και σωματικών ικανοτήτων. Μέχρι σήμερα, δεν έχει αναφερθεί κάποια θεραπεία (Bosio et al., 2015), (Solovyeva et al., 2018).

Η θεραπεία ενζυμικής υποκατάστασης (ERT) θα μπορούσε να εφαρμοστεί εφόσον συνδυαστεί με νανοφορείς, προκειμένου να αντιμετωπιστούν προβλήματα αστάθειας του ενζύμου και σύντομου χρόνου ημιζωής, καθώς είναι δυνατόν τα ακινητοποιημένα ένζυμα να παρακάμψουν τις άμυνες του οργανισμού. Στο πλαίσιο αυτό, η β-N-ακετυλο-D-εξοσαμινιδάση (β-D-N-acetyl-hexosaminidase) ακινητοποιήθηκε σε βιοσυμβατά πολυμερή σωματίδια πολυγαλακτικού οξέος (PLA), διαμέτρου 40-150 nm, όπου μέσω μελέτης Bradford προσδιορίστηκε ποσοστό ακινητοποίησης 90%. Η δραστηριότητα του ενζύμου και η σταθερότητα του συστήματος δοκιμάστηκε έναντι του τεχνητού φθορίζον υποστρώματος MUGS για περισσότερες από 40 ημέρες, όπου διαπιστώθηκε υψηλή ενζυμική δράση κατά τους πρώτους κύκλους (45 mU/g) και έπειτα σταθερή δράση στα 20 mU/g (Calzoni et al., 2022).

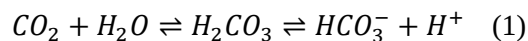
5. Καρβονική Ανυδράση (Carbonic Anhydrase)

5.1. Εισαγωγή

Η καρβονική ανυδράση (Carbonic Anhydrase, CA) αποτελεί μεταλλοένζυμο που συναντάται στον άνθρωπο και σε άλλους ζωντανούς οργανισμούς, ρυθμίζοντας σημαντικές βιολογικές διεργασίες όπως η ισορροπία οξέος-βάσεως στο ανθρώπινο αίμα, η μεταφορά διοξειδίου του άνθρακα από τους ιστούς στους πνεύμονες, η συμμετοχή στην παραγωγή γαστρικούς οξέος, η φωτοσύνθεση στα φυτά καθώς και ο μηχανισμός συγκέντρωσης άνθρακα στους διάφορους μικροοργανισμούς (Yong et al., 2015).

Ανακαλύφθηκε το 1933 από τους Meldrum και Roughton, αν και ουσιαστικά αποτελεί ευρέως διαδεδομένο ένζυμο που συναντάται από τα αρχαία χρόνια (Meldrum & Roughton, 1933). Ο τετραψήφιος κωδικός που αντιστοιχεί σύμφωνα με τη Διεθνή Επιτροπή Ενζύμων στην καρβονική ανυδράση είναι ο E.C. 4.2.1.1.

Αποτελείται από μια πολυπεπτιδική αλυσίδα που στο ενεργό της κέντρο βρίσκεται ένα ιόν ψευδαργύρου. Καταλύει την αντιστρεπτή ενυδάτωση του διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) και την αφυδάτωση του διττανθρακικού, το οποίο αναφέρεται συχνά και ως ανθρακικό οξύ (ασταθής ένωση, μετατρέπεται αυθόρμητα σε διττανθρακικά ιόντα και πρωτόνια), όπως υποδεικνύεται και στην εξίσωση 1. Η καταλυτική σταθερά της αντίδρασης (k_{cat}) αναφέρεται στον αριθμό κύκλου διεργασιών και παίρνει τιμές μεταξύ 10^4 και 10^6 s^{-1} (Ki et al., 2012).



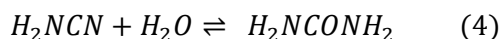
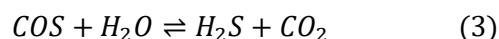
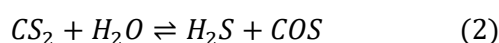
Η αντίδραση αυτή συμβαίνει ωστόσο και αυθόρμητα απουσία ενζύμου και σε φυσιολογικές για τους ιστούς και οργανισμούς τιμές pH με ρυθμό $6.2 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, μια διαδικασία ιδιαίτερα αργή για τιμές pH χαμηλότερες από 7.5, ενώ αυξάνεται για μεγαλύτερες τιμές (Zhu et al., 2016). Λόγω της υψηλής επομένως αποτελεσματικότητας μετατροπής του CO_2 , η καρβονική ανυδράση έχει θεωρηθεί ως ένας από τους σπουδαιότερους καταλύτες για την ανάπτυξη ενός βιολογικού συστήματος δέσμευσης του CO_2 (Kanth et al., 2013).

Προκειμένου να αντιμετωπίσουν τις υψηλές ποσότητες CO_2 που σχηματίζονται κατά τις μεταβολικές διεργασίες, αλλά και να ελέγξουν την ισορροπία οξέος-βάσεως, οι οργανισμοί ανέπτυξαν ξεχωριστές οικογένειες αυτής της κατηγορίας ενζύμων. Έτσι, η καρβονική ανυδράση ταξινομείται βάση δομής και προέλευσης σε επτά επιμέρους κατηγορίες (α, β, γ, δ, ζ, η και θ), με τις δύο τελευταίες να έχουν πρόσφατα ανακαλυφθεί (Capasso & Barboiu, 2019). Η α-οικογένεια απαντάται στα θηλαστικά με τη δραστηριότητα να προέρχεται από ιόντα ψευδαργύρου (Zn^{2+}) στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, αλλά και σε πρωτόζωα, μύκητες, ορισμένα βακτήρια, φύκη, καθώς και το κυτταρόπλασμα πράσινων φυτών. Στη φύση απαντώνται συνολικά 16 διαφορετικές ισομορφές (ισοένζυμα) της α-οικογένειας, με την

ανθρώπινη CA II ή hCA II να είναι καλά μελετημένη, με καταλυτική σταθερά $1.4 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$. Η β-οικογένεια συναντάται στα φυτά, τα φύκη και σε προκαρυώτες όπως βακτήρια και αρχαία, ενώ η γ-οικογένεια απαντάται κυρίως σε μονοκύτταρους οργανισμούς όπως τα αρχαία. Η δ-οικογένεια συναντάται στα θαλάσσια φυτοπλαγκτόν, καθώς υπάρχει σε απτόφυτα, σε δινοφύκη και διάτομα, ενώ η ζ-οικογένεια υπάρχει μόνο στα θαλάσσια διάτομα (Yong et al., 2015), (C. T. Supuran & De Simone, 2015).

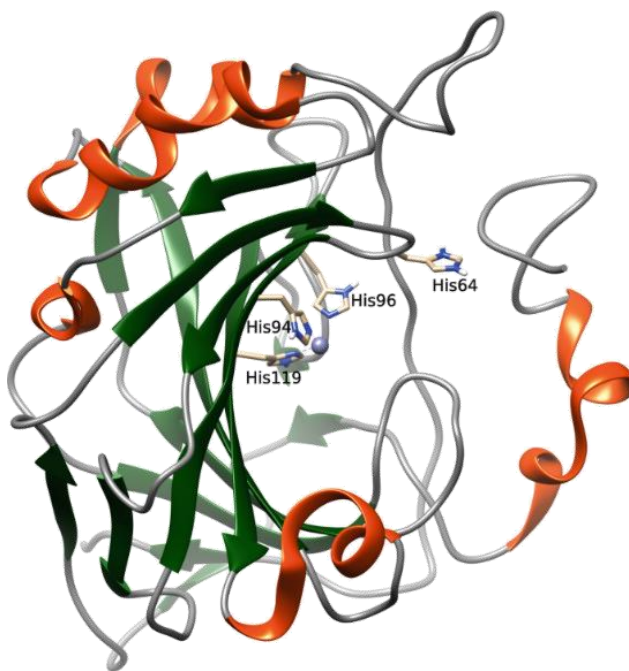
Σε όλες τις οικογένειες το μεταλλικό ιόν εντοπίζεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Για την α-, β-, δ- και πιθανώς την η- και θ- οικογένεια στο ενεργό κέντρο εντοπίζεται ένα ιόν ψευδαργύρου Zn(II), για την γ- οικογένεια συναντώνται συνήθως ιόντα σιδήρου Fe(II) και σε ορισμένες περιπτώσεις ιόντα ψευδαργύρου Zn(II) ή κοβαλτίου Co(II), ενώ για την ζ-οικογένεια απαντώνται ιόντα καδμίου Cd(II) ή ψευδαργύρου Zn(II) (Capasso & Barboiu, 2019).

Τα διάφορα μέλη της οικογένειας των καρβονικών ανυδράσεων καταλύουν και ποικιλία άλλων αντιδράσεων, εκτός από την ενυδάτωση του CO₂, αντίδραση η οποία καταλύεται από όλες τις οικογένειες των καρβονικών ανυδράσεων και διατυπώθηκε παραπάνω στην εξίσωση 1. Ορισμένες εκ των υδρολυτικών αυτών διεργασιών αποτελούν η ενυδάτωση του κυαναμιδίου (cyanamide, CH₂N₂) από τις α-CAs (εξίσωση 4), του καρβονυλοσουλφιδίου (carbonyl sulfide, COS) από τις β-CAs (εξίσωση 3) και του δισουλφιδίου του άνθρακα (carbon disulfide, CS₂) από τις β-CAs (εξίσωση 2), καθώς και η υδρόλυση αλδεϋδών και διαφόρων εστέρων όπως καρβοξυλ-, σουλφο-, θειο- και φωσφο-εστέρες. Ειδικότερα, στην εξίσωση 5 παρουσιάζεται η υδρόλυση εστέρων από τις α-Cas, ενώ στην εξίσωση 6 η υδρόλυση αλδεϋδων από τις α-Cas (C. T. Supuran & De Simone, 2015), (C. Supuran, 2008). Σε όλες αυτές τις καταλυτικές διεργασίες το ενεργοποιημένο υδροξείδιο του μετάλλου δρα ως πυρηνόφιλο (C. T. Supuran & De Simone, 2015).



5.2. Δομή

Το μήκος της ακολουθίας της καρβονικής ανυδράσης (πρωτοταγής δομή) κυμαίνεται από 260-459 κατάλοιπα αμινοξέων, με την καταλυτική περιοχή όλων των ισοενζύμων της καρβονικής ανυδράσης να διατηρεί μια τρισδιάστατη δομή. Οι περισσότερες καρβονικές ανυδράσεις που ανήκουν στην α -οικογένεια είναι μονομερή ένζυμα, αν και σε ορισμένες περιπτώσεις εντοπίζονται και διμερή. Η ανθρώπινη CA II, η πιο μελετημένη ισομορφή, αντιπροσωπεύει τα περισσότερα ένζυμα όλων των οικογενειών καθώς παρουσιάζει τη μεγαλύτερη αλληλουχία και ομοιότητα ως προς τη δομή με όλες τις καρβονικές ανυδράσεις. Η τυπική δομή του ενζύμου φαίνεται να είναι ελλειψοειδής, προσομοιάζοντας με σφαίρα στο κέντρο της οποίας εντοπίζονται οι β -πτυχωτές επιφάνειες (10 β -αλυσίδες, δύο ζεύγη εκ των οποίων είναι παράλληλες και οι υπόλοιπες αντιπαράλληλες), οι οποίες περιβάλλονται από 6 δεξιόστροφες α -έλικες στην επιφάνεια του μορίου αλλά και από άλλες β -επιφάνειες. Τα ιόντα ψευδαργύρου (Zn^{2+}) προσκολλώνται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, στο βάθος μιας κωνικής κοιλότητας (Imtaiyaz Hassan et al., 2013).



Εικόνα 7. Δομική αναπαράσταση της hCA II, με το συντονισμένο άτομο ψευδαργύρου να απεικονίζεται με σφαίρα στο κέντρο της δομής.

Ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του ενεργού κέντρου του ενζύμου της καρβονικής ανυδράσης είναι ότι αποτελείται από δύο διαφορετικά περιβάλλοντα, με την κοιλότητα του ενεργού κέντρου να χωρίζεται σε δύο μισά, καθώς στη μία μεριά έχουμε έναν σκελετό υδρόφοβων αμινοξέων (στο ανθρώπινο συνένζυμο CA II περιλαμβάνονται τα κατάλοιπα Val121, Val143 και Leu198), ενώ στο άλλο μισό απαντώνται υδρόφιλα αμινοξέα. Στην

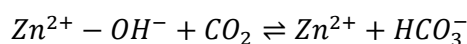
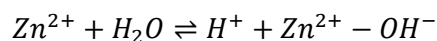
υδρόφοβη πλευρά συμβαίνει η δέσμευση του CO₂, ενώ το τα υδρόφιλα αμινοξέα ενισχύουν την κατάλυση, με το υδρόφιλο τμήμα να αποτελεί θέση δέσμευσης αλλά και απελευθέρωσης των προϊόντων από την κοιλότητα προς το περιβάλλον (Imtaiyaz Hassan et al., 2013), (C. T. Supuran & De Simone, 2015).

5.3. Καταλυτικός μηχανισμός

Το ιόν του μετάλλου σύμφωνα με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X εντοπίζεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου σε βάθος 15 Å και συντονίζεται από τρία κατάλοιπα ιστιδίνης (His94, His96 και His119) και ένα μόριο νερού, το οποίο αλληλοεπιδρά με δεσμούς υδρογόνου με το υδροξύλιο του αμινοξέος Thr199, το οποίο αλληλοεπιδρά αντίστοιχα με το καρβοξύλιο της Glu106. Έχουμε επομένως ένα δίκτυο δεσμών υδρογόνου υδροξειδίου του ψευδαργύρου (νερό)-Thr199-Glu106. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές ενισχύουν την πυρηνόφιλη δράση του δεσμευμένου σε ψευδάργυρο μορίου νερού, προσανατολίζοντας κατάλληλα το υπόστρωμα του CO₂, επιτρέποντας τη μέγιστη έκθεση ενός μοναδικού ζεύγους οξυγόνου υδροξειδίου στο άτομο άνθρακα του CO₂ και πυροδοτώντας συνεπώς ολόκληρο τον καταλυτικό μηχανισμό μέσω της πυρηνόφιλης προσβολής του ιόντος του υδροξειδίου του ψευδαργύρου στο υπόστρωμα CO₂ (Merz, 1990), (C. Supuran, 2008).

Ειδικότερα, η ενυδάτωση του διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) συμβαίνει καθώς το ιόν ψευδαργύρου (Zn²⁺) που εντοπίζεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου αφαιρεί ένα πρωτόνιο από ένα περιβάλλον μόριο νερού με τέτοιο τρόπο ώστε να σχηματίζεται ένα αρνητικά φορτισμένο ιόν υδροξειδίου (OH⁻), το οποίο μπορεί να προσβάλει το μερικώς θετικό άτομο άνθρακα ενός διαλυτοποιημένου μορίου CO₂, με αποτέλεσμα να δημιουργείται ένα ασταθές σύμπλοκο ψευδαργύρου-διττανθρακικού και τελικά να σχηματίζεται έτσι ένα διττανθρακικό ιόν (HCO₃⁻). Η καταλυτική σταθερά k_{cat} της αντίδρασης αναφέρεται στον αριθμό κύκλου διεργασιών και παίρνει τιμές μεταξύ 10⁴ και 10⁶ s⁻¹ (Yong et al., 2015).

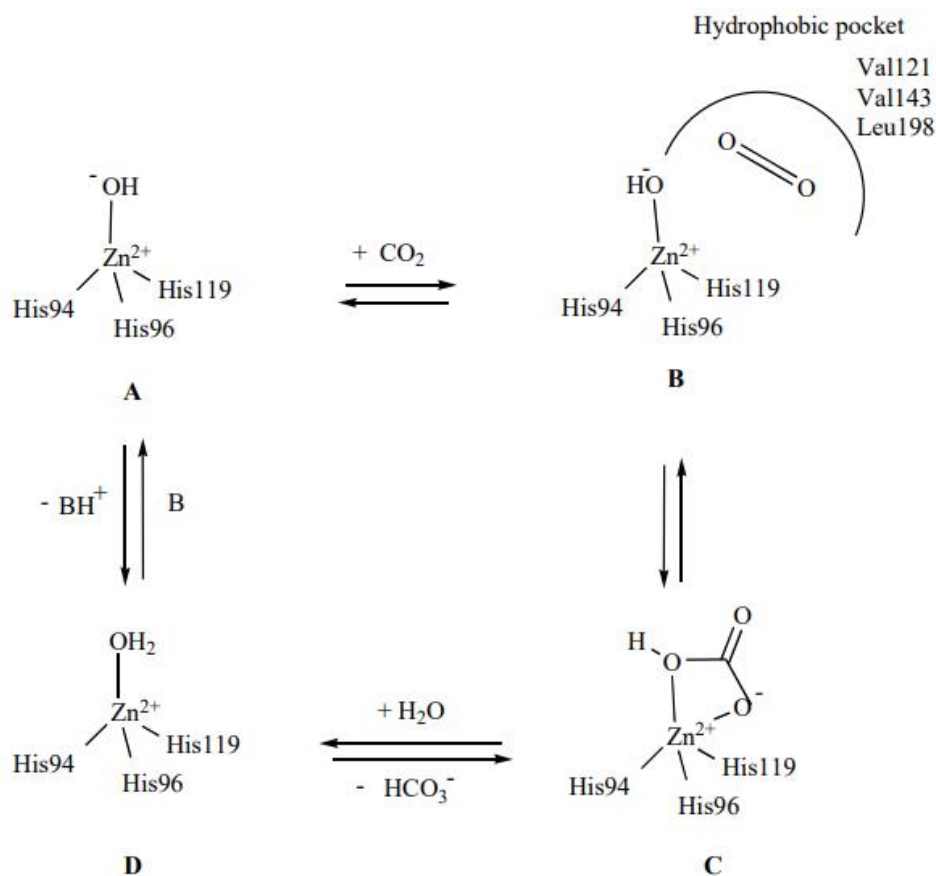
Ο μηχανισμός της αντίδρασης συνοψίζεται στις ακόλουθες εξισώσεις:



Η ενεργός μορφή του ενζύμου είναι η βασική, όπου ένα υδροξείδιο είναι συνδεδεμένο με τον Zn(II). Το πυρηνόφιλο δρα έναντι του δεσμευμένου υποστρώματος, με αποτέλεσμα να σχηματίζεται διττανθρακικό ανιόν, το οποίο συντονίζεται με τον Zn(II) και στη συνέχεια

απελευθερώνεται στο διάλυμα οδηγώντας στην όξινη και καταλυτική ανενεργή μορφή του ενζύμου (C. Supuran, 2008).

Στο δεύτερο συνεπώς στάδιο το ενεργό κέντρο αναγεννάται, μέσω μιας αντίδρασης μεταφοράς ενός πρωτονίου από το ενεργό κέντρο στο περιβάλλον του μορίου, η οποία υποβοηθείται από τα αμινοξικά κατάλοιπα του ενεργού κέντρου του ενζύμου (κατάλοιπα ιστιδίνης) ή από ρυθμιστικά διαλύματα που υπάρχουν στο μέσο της αντίδρασης (C. Supuran, 2008). Ο συνολικός μηχανισμός αναπαρίσταται στην εικόνα που ακολουθεί.



Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση του καταλυτικού μηχανισμού για την ενυδάτωση του CO_2 που καταλύουν οι καρβονικές ανυδράσες (CA).

5.4. Βιοϊατρικές εφαρμογές ακινητοποιημένης καρβονικής ανυδράσης

5.4.1. Εισαγωγή

Λόγω της καταλυτικής δράσης των καρβονικών ανυδράσεων έναντι διαφορετικών υποστρωμάτων, της υψηλής συγγένειάς τους με τους αναστολείς, και της υποκυτταρικής κατανομής τους, τα ένζυμα αυτά σχετίζονται με διάφορες παθολογίες. Στοιχεύοντας στην

αναστολή ή την ενεργοποίηση τους δύναται να προβούμε σε θεραπευτική αντιμετώπιση των παθολογικών αυτών καταστάσεων. Τα αντιβιοτικά σουλφοαμιδίου/σουλφαμικού (Sulfonamide/sulfamate) χρησιμοποιούνται, για παράδειγμα, κλινικά ως αναστολείς της δράσης των καρβονικών ανυδράσεων και συγκεκριμένα ως διουρητικά, ως αντικαρκινικοί παράγοντες, ενώ ενδείκνυνται για τη θεραπεία της παχυσαρκίας και του αντιγλαυκώματος (C. T. Supuran & De Simone, 2015). Με παρόμοιο τρόπο, ενεργοποιητές της δράσης των καρβονικών ανυδράσεων χρησιμοποιήθηκαν κλινικά ως φάρμακα για την αντιμετώπιση της γήρανσης και της νόσου του Αλτσχάιμερ, περιπτώσεις κατά τις οποίες παρατηρείται μειωμένη δράση της καρβονικής ανυδράσης στον εγκέφαλο. Τα τελευταία χρόνια, κυρίως λόγω της απότομης αύξησης της συγκέντρωσης του διοξειδίου του άνθρακα στην ατμόσφαιρα, το ενδιαφέρον στράφηκε στη βιοτεχνολογική αξιοποίηση των καρβονικών ανυδράσεων, στοχεύοντας στην χρήση της υψηλής καταλυτικής δράσης των ενζύμων αυτών για τη δέσμευση και την βιομετατροπή του CO₂ (C. T. Supuran & De Simone, 2015).

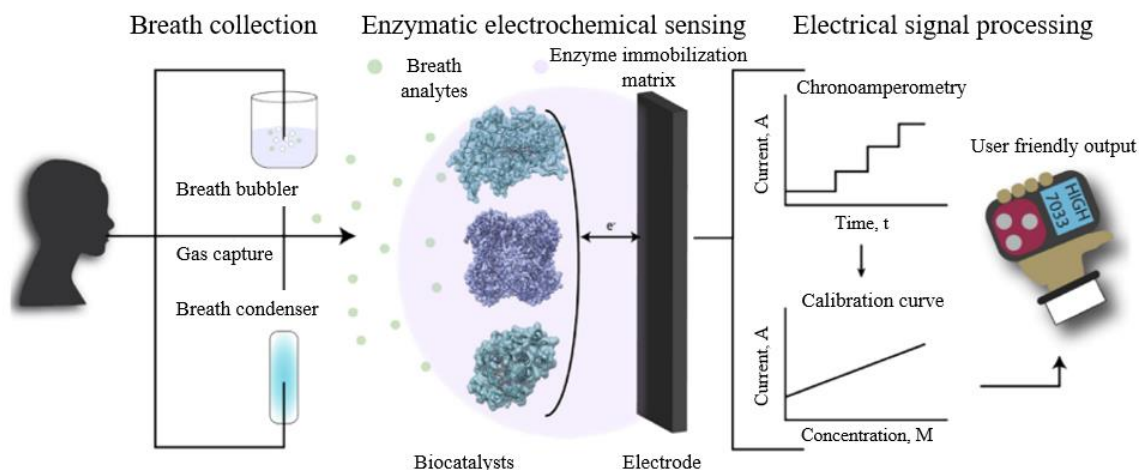
Στο πλαίσιο αυτό, σημαντική εξέλιξη αποτέλεσε η διερεύνηση και η διαρκώς αυξανόμενη μελέτη της ακινητοποίησης των καρβονικών ανυδράσεων σε στερεούς φορείς και νανοϋλικά, με άμεσο στόχο την ενίσχυση της σταθερότητας τους και την καλύτερη απόδοση τους σε βιοκαταλυτικές, βιοϊατρικές αλλά και σε εφαρμογές μεγάλης κλίμακας (βιομηχανία). Η ακινητοποιημένη CA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παράδειγμα ως διαγνωστικό εργαλείο ή ως μέρος μιας στοχευμένης θεραπείας. Η τεχνολογία της ακινητοποίησης και της ανάπτυξης νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων επέτρεψε συνεπώς την ανάπτυξη θεραπευτικών στρατηγικών με καλύτερη απόδοση, τη μεγαλύτερη ακρίβεια κατά τη στόχευση παθολογικών κυττάρων, καθώς και την αποφυγή ανεπιθύμητων παρενεργειών. Παρακάτω παρουσιάζονται ορισμένες εκ των σπουδαιότερων εφαρμογών της ακινητοποίησης της καρβονικής ανυδράσης σε διαφόρους στερεούς φορείς (φορείς ακινητοποίησης).

5.4.2. Βιοαισθητήρες αναπνοής

Τα τελευταία χρόνια το ενδιαφέρον γύρω από την ανάλυση της αναπνοής για την παρακολούθηση τυχόν μεταβολικών διαταραχών έχει ενταθεί, εφόσον η λήψη δείγματος αποτελεί μια μη επεμβατική μέθοδο, εντελώς ανώδυνη για τους ασθενείς, ενώ οι σύγχρονες συσκευές μπορούν να ανιχνεύσουν πλήθος ενώσεων που βρίσκονται στην αναπνοή σε φυσιολογικές ή μη συγκεντρώσεις και να παρέχουν πληροφορίες για τυχόν δυσλειτουργίες και παθολογικές καταστάσεις όπως για παράδειγμα ο καρκίνος του πνεύμονα, η φλεγμονώδης πνευμονοπάθεια κ.α. Μάλιστα, έχουν ταυτοποιηθεί διακόσιες περίπου διαφορετικές πτητικές οργανικές ενώσεις (VOCs) στην ανθρώπινη αναπνοή, γεγονός που υποδεικνύει ότι πρόκειται για αέριο εξαιρετικά σύνθετης σύστασης. Επιπλέον, το κόστος για τα αναλώσιμα είναι μικρό

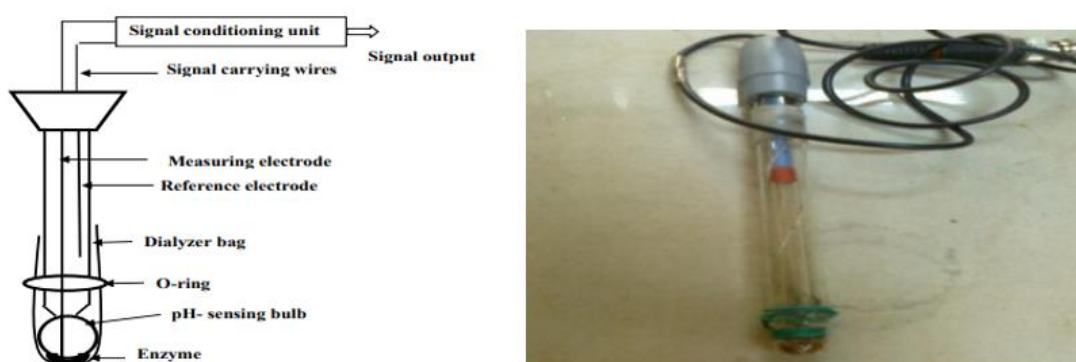
σε σχέση με αναλυτικές τεχνικές όπως η αέρια χρωματογραφία και η υπέρυθρη φασματοσκοπία, ενώ η προετοιμασία του δείγματος είναι μηδαμινή σε σχέση με άλλες τεχνικές ανάλυσης βιολογικών δειγμάτων όπως το αίμα και τα ούρα (Buszewski et al., 2007). Έτσι, έχουν παρασκευαστεί πλήθος βιοαισθητήρων, αναλυτικών συσκευών που ενσωματώνουν ένα βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης με έναν ηλεκτροχημικό μετατροπέα να παράγει ένα μετρήσιμο σήμα ανάλογο με τη συγκέντρωση της αναλυόμενης ουσίας προκειμένου να ανιχνευτεί η καθορισμένη χημική ουσία. Για την αποτελεσματική μετατροπή της αλληλοεπίδρασης αναλυτή και βιοϋποδοχέα σε ηλεκτρικό σήμα, ο βιοκαταλύτης πρέπει να βρίσκεται σε άμεση επαφή με τον ηλεκτροχημικό μετατροπέα, με αποτέλεσμα η μέθοδος ακινητοποίησης του βιοκαταλύτη στην επιφάνεια του μετατροπέα να είναι σημαντική κατά τον σχεδιασμό ενός βιοαισθητήρα (Chen et al., 2020).

Ειδικότερα, έχει κατασκευαστεί πλήθος βιοαισθητήρων που βασίζονται σε ένζυμα, με τους βιοαισθητήρες αυτούς να ανήκουν στους ηλεκτροχημικούς ενζυμικούς βιο-αισθητήρες (Electrochemical Enzymatic Biosensors, EEBs), όπου τα στοιχεία βιο-αναγνώρισης είναι ένζυμα. Το ένζυμο οξειδώνει ή ανάγει το υπόστρωμα και τα ηλεκτρόνια από την οξειδοαναγωγική αντίδραση ποσοτικοποιούνται μέσω του ηλεκτρονίου μεταφοράς στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, με τα ανιχνεύσιμα αυτά ηλεκτρικά σήματα να υποβάλλονται εύκολα σε επεξεργασία από τον χρήστη. Συγκεκριμένα έχουν παρασκευαστεί αρκετοί βιοαισθητήρες που βασίζονται στο ένζυμο καρβονική ανυδράση, όπου λόγω της υψηλής εκλεκτικότητας και της αποδοτικότητας του ενζύμου δύναται να μετρήσουμε με ακρίβεια τη συγκέντρωση του CO₂, τα επίπεδα ppm (parts per million) δηλαδή στην εκπνεόμενη αναπνοή, γεγονός που μπορεί να δώσει πληροφορίες για διάφορες αναπνευστικές διαταραχές του οργανισμού όπως η αναπνευστική οξέωση/ανεπάρκεια, το άσθμα, η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ), η πνευμονία κ.α. Οι ενζυμικοί ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες αναπνοής (Enzymatic electrochemical breath sensors, EEBBs) όπως ονομάστηκαν βασίζονται στη συλλογή του δείγματος μέσω ενός συμπυκνωτή αναπνοής (breath condenser) ή ενός αναπνευστήρα αναπνοής (breath bubbler), την ηλεκτρική επικοινωνία μεταξύ του ηλεκτροδίου και του ακινητοποιημένου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου ενζύμου, καθώς και σε μια ηλεκτροχημική τεχνική για την ανίχνευση του αναλύτη, όπως υποδεικνύεται και στο παρακάτω σχήμα (Gaffney et al., 2020).



Εικόνα 9. Σχηματική αναπαράσταση ενζυμικού ηλεκτροχημικού βιοαισθητήρα αναπνοής (Gaffney et al., 2020) .

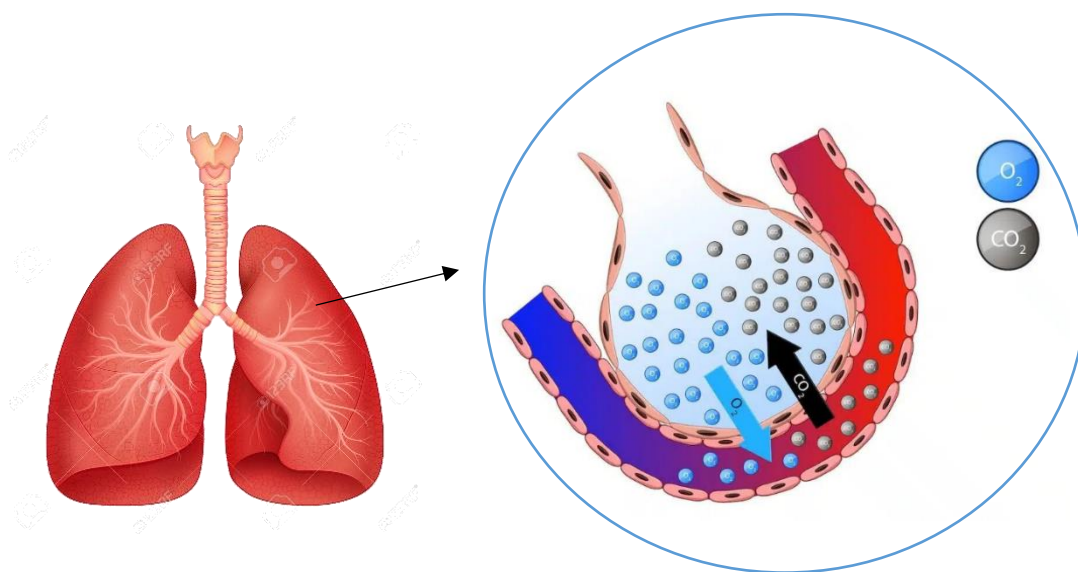
Οι Bagchi, Sengupta και Mandal ανέπτυξαν έναν ενζυμικό βιοαισθητήρα CO_2 χρησιμοποιώντας την εκπνεόμενη αναπνοή ως βιοδείγμα, όπου στη μελέτη που διεξάχθηκε η καρβονική ανυδράση ακινητοποιήθηκε σε μια διάταξη ηλεκτροδίων, η οποία μόλις ερχόταν σε επαφή με το υδατικό CO_2 δημιουργούνταν ένα μετρήσιμο ηλεκτρικό σήμα (mV) (Bagchi et al., 2017). Ο αισθητήρας χαρακτηρίστηκε από πολύ γρήγορη (εντός 12 s) και γραμμική απόκριση από 159-2677 ppm συγκέντρωσης CO_2 διαλυμένου στο νερό, με το κλινικό εύρος της συγκέντρωσης του CO_2 (785.4-1041 ppm) να ανήκει εντός του εύρους μέτρησης του αισθητήρα. Η καρβονική ανυδράση λόγω της εξαιρετικής εκλεκτικότητας αντιδρά με το αέριο CO_2 , παραμένοντας αναλλοίωτη σε άλλα πτητικά ή μη αέρια της αναπνοής. Επιπλέον ο βιοαισθητήρας που αναπτύχθηκε παρουσίασε καλή ευαισθησία, μεγάλη διάρκεια ζωής (~5 μήνες), ενώ μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί έως και 20 φορές.



Εικόνα 10. Διάταξη του βιοαισθητήρα CO_2 όπου στον σάκο αιμοκάθαρσης (Dialyzer bag) εμπεριέχεται η καρβονική ανυδράση (Bagchi et al., 2017).

5.4.3. Τεχνητοί πνεύμονες

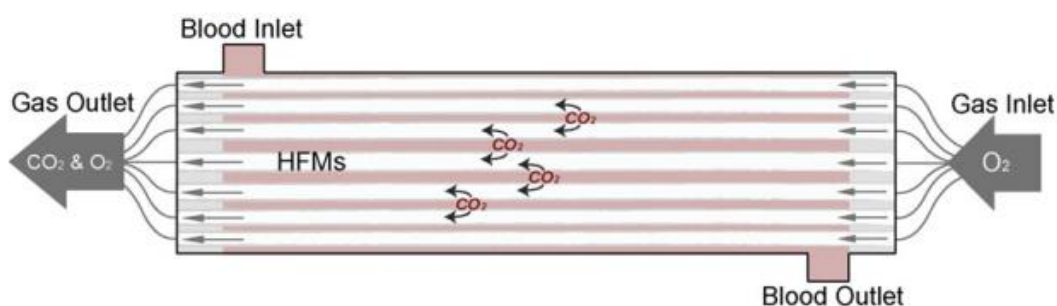
Η οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια (ARF) αναφέρεται στην ανεπάρκεια των πνευμόνων που έχει προέλθει από διαφορετικά αίτια, όπως η χρόνια αποφρακτική πνευμονοπάθεια (ΧΑΠ). Πρόκειται για διαταραχή της ανταλλαγής αερίων του αίματος, όπου το αναπνευστικό σύστημα δεν είναι ικανό να διατηρήσει την ομοιόσταση των μερικών πιέσεων του οξυγόνου (O_2) και του διοξειδίου του άνθρακα (CO_2) του αίματος των αρτηριών σε φυσιολογικά επίπεδα, με αποτέλεσμα ο οργανισμός να μην μπορεί να ανταποκριθεί στις απαιτήσεις των ιστών και των οργάνων για επαρκή επίπεδα οξυγόνου ενώ παράλληλα αδυνατεί να απομακρύνει το διοξείδιο του άνθρακα που παράγεται.



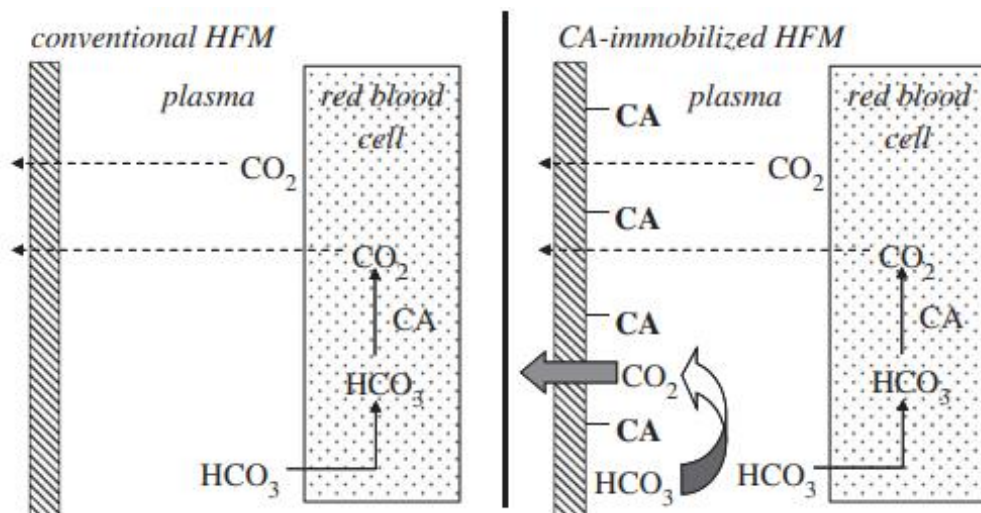
Εικόνα 11. Τμήμα των πνευμόνων (κυψελίδες) για την ανταλλαγή μορίων διοξειδίου του άνθρακα και οξυγόνου, από και προς την κυκλοφορία του αίματος.

Για την αντιμετώπιση και την επιβίωση των ασθενών που πάσχουν από οξεία αναπνευστική ανεπάρκεια έχει προταθεί ως θεραπεία ο μηχανικός αερισμός (mechanical ventilation, MV), η χρήση δηλαδή συσκευών υποβοήθησης της αναπνοής που έχουν σχεδιαστεί για την απομάκρυνση του CO_2 . Ωστόσο η απόδοση τους συχνά είναι περιορισμένη εξαιτίας της μικρής διαφοράς της μερικής πίεσης στις μεμβράνες ανταλλαγής των αερίων και συχνά επιδεινώνουν την πνευμονική βλάβη, αυξάνοντας παράλληλα τον κίνδυνο ιατρογενών επιπλοκών όπως λοιμώξεων του αναπνευστικού, μείωση της καρδιακής παροχής κα., οδηγώντας έτσι στην νοσηρότητα και τελικά την θνησιμότητα των ασθενών. Στο πλαίσιο αυτό αναπτύχθηκαν νέα συστήματα τεχνητής αναπνοής, με την ακινητοποίηση της ανθρώπινης καρβονικής ανυδράσης σε μια πολυμερική μεμβράνη κοίλων ινών (hollow fiber membrane, HFMs), που απομακρύνει το CO_2 , να αποτελεί την επόμενη γενιά εξαιρετικά αποδοτικών μεμβρανών για συσκευές υποστήριξης της αναπνοής. Πρόκειται για συσκευές εξωσωματικής

κυκλοφορίας του αίματος, που οξυγονώνουν, αφαιρούν το CO_2 και στην συνέχεια επιστρέφουν το αίμα πίσω στο σώμα, μιμούμενοι τη λειτουργία των πνευμόνων (τεχνητοί πνεύμονες). Οι μεμβράνες κοίλων ινών αποτελούν βασικό συστατικό των συσκευών αυτών, καθώς αναμειγνύουν την ροή του αίματος στην επιφάνεια τους και μέσω της πορώδους δομής τους γίνεται η ανταλλαγή αερίων μεταξύ του αίματος και ενός αέριου περιβάλλοντος. Ειδικότερα, το αίμα κυκλοφορεί μέσω των ινών, ενώ το αέριο οξυγόνο και διοξείδιο του άνθρακα μπορούν να περάσουν μέσω των πόρων των μεμβρανών, επιτρέποντας στο CO_2 να διαχυθεί μέσω της μεμβράνης και να απομακρυνθεί αποτελεσματικά. Ωστόσο η περιορισμένη διάχυση μέσω των ινών αποτελεί εμπόδιο στην ανάπτυξη τεχνητών πνευμόνων και συσκευών υποβοήθησης της αναπνοής, καθώς θα χρειαζόταν μεγάλες επιφάνειες μεμβρανών, γεγονός που αντιμετωπίστηκε με την ομοιοπολική ακινητοποίηση της καρβονικής ανυδράσης στην επιφάνεια των μεμβρανών. Η προσθήκη έτσι της καρβονικής ανυδράσης και η ακινητοποίηση της στην επιφάνεια των μεμβρανών επιταχύνει τη διαδικασία απομάκρυνσης του CO_2 , καθώς το ένζυμο καταλύει την βιομετατροπή του CO_2 σε διττανθρακικά και πρωτόνια. Οι συσκευές αυτές μπορούν να ανακουφίσουν από τη δύσπνοια, να μειώσουν την ανάγκη χρήσης μηχανικού αναπνευστήρα έως 50%, ενώ απαιτείται μικρός ρυθμός ροής αίματος (300-500 ml/min). Η δραστηριότητα της ακινητοποιημένης καρβονικής ανυδράσης έχει προσδιοριστεί 0.30 U και οδηγεί σε 35-40% αύξηση του ρυθμού απομάκρυνσης του CO_2 , ενώ ενδεχόμενη τροποποίηση της επιφάνειας των ινών (προσθήκη ομάδων υδροξειδίου) για καλύτερη ακινητοποίηση του ενζύμου (μονοστρωματική κάλυψη του ενζύμου σε ποσοστό 88%) δύναται να αυξήσει τη δραστηριότητα του ενζύμου έως και 3.3 φορές (0.99 U), με άμεση συνέπεια την έως και 95% αύξηση του ρυθμού απομάκρυνσης του CO_2 (Kaar et al., 2007), (Arazawa et al., 2012).



Εικόνα 12. Μοντέλο συσκευής υποβοήθησης αναπνοής. Το αίμα εγχέεται στο εξωτερικό των ινών, αέριο οξυγόνο παρέχεται προς την αντίθετη κατεύθυνση και στην επιφάνεια των τροποποιημένων με CA ινών γίνεται η ανταλλαγή αερίων μεταξύ αίματος και αέριου του περιβάλλοντος (Arazawa et al., 2012).



Εικόνα 13. Τυπική έναντι διευκολυνόμενη διάχυση με χρήση συμβατικών (αριστερά) και CA-ακίνητοποιημένων σε HFM (δεξιά), αντίστοιχα (Kaar et al., 2007).

5.4.4. Τεχνητό υποκατάστατο αίματος

Μια ακόμη εφαρμογή της ακίνητοποίησης της καρβονικής ανυδράσης αποτελεί η χρήση της για τη δημιουργία ενός υποκατάστατου τεχνητού αίματος τρίτης γενιάς. Τυχόν ελλείψεις λόγω του ότι οι άνθρωποι συχνά αδυνατούν ή διστάζουν να δώσουν αίμα, με τον αριθμό των δωρητών να μειώνεται διαρκώς, καθώς και το γεγονός ότι το ανθρώπινο αίμα από τον δότη απαιτεί έλεγχο για τυχόν λοιμώξεις ή ιούς (όπως η ηπατίτιδα ή ο HIV), οδήγησαν στην ανάγκη ανάπτυξης ενός υποκατάστατου αίματος. Το τεχνητό αυτό αίμα δεν απαιτεί έλεγχο για ιούς, καθώς δημιουργείται απαλλαγμένο από οποιαδήποτε μόλυνση, μειώνοντας με τον τρόπο αυτό τον κίνδυνο για τον παραλήπτη αλλά και το κόστος για την υπηρεσία υγείας. Αναπτύχθηκε έτσι ένα υποκατάστατο τεχνητού αίματος, ένα σύμπλοκο πολυ-αιμοσφαιρίνης και ενός πολυενζυμικού συστήματος, γνωστού ως «Polyhemoglobin-superoxide Dismutase-catalase-carbonic Anhydrase» (PolyHb-SOD-CAT-CA).

Η πολυ-αιμοσφαιρίνη (PolyHb) και ειδικότερα το σύμπλεγμα τεσσάρων με πέντε μορίων αιμοσφαιρίνης φαίνεται να αντικαθιστά αποτελεσματικά την απώλεια αίματος, διατηρώντας τα επίπεδα αιμοσφαιρίνης σε ασφαλές τιμές ενώ παράλληλα εκτελεί επαρκώς τη μεταφορά μορίων οξυγόνου κατά τη διάρκεια μιας χειρουργικής επέμβασης. Ωστόσο, εκτός από τη μεταφορά του οξυγόνου από τους πνεύμονες στους ιστούς μέσω των ερυθρών αιμοσφαιρίων, σημαντική είναι και η απομάκρυνση του διοξειδίου του άνθρακα από τους ιστούς, καθώς η αυξημένη περιεκτικότητα σε CO_2 μπορεί να οδηγήσει σε υψηλές συγκεντρώσεις πρωτονίων στο πλάσμα και κατά συνέπεια σε δυσλειτουργία του κεντρικού νευρικού συστήματος, σε κώμα ή ακόμη και θάνατο. Ειδικότερα, το CO_2 συνδέεται με την αιμοσφαιρίνη ή μετατρέπεται από το ένζυμο καρβονική ανυδράση σε ανιόντα ανθρακικού οξέος. Η ενσωμάτωση άρα του ενζύμου της καρβονικής ανυδράσης συνέβαλε σημαντικά στη μεταφορά του CO_2 , καταλύοντας την αντιστρεπτή ενυδάτωση του CO_2 σε ανθρακικό οξύ, ενώ παράλληλα συνέβαλε στην διατήρηση της οξεοβασικής ισορροπίας του σώματος. Τα ένζυμα δισμουτάση υπεροξειδίου (SOD) και καταλάση (CAT) συνδέονται με την αιμοσφαιρίνη για την παραγωγή φορέων οξυγόνου και την ανάπτυξη αντιοξειδωτικής δράσης. Έχουμε με τον τρόπο αυτόν τη δημιουργία ενός αποτελεσματικού υποκατάστατου αίματος, με ικανότητα μεταφοράς οξυγόνου και διοξειδίου του άνθρακα, ικανότητα αποθήκευσης για μεγάλα χρονικά διαστήματα αλλά αντιοξειδωτική δράση, ενώ δύναται να μην περιέχει αντιγόνα αίματος (Bian et al., 2011), (University of Essex, n.d.).



Εικόνα 14. Υποκατάστατο τεχνητού αίματος τρίτης γενιάς (University of Essex, n.d.).

5.4.5. Χορήγηση αντιδότη

Η υπερβολική δόση μορφίνης (ισχυρό αναλγητικό που ανακουφίζει από τον πόνο) δύναται να προκαλέσει υποαερισμό, ελάττωση του πνευμονικού αερισμού και επομένως μη αποτελεσματική πραγματοποίηση της ανταλλαγής αερίων, με άμεση συνέπεια την αυξημένη συγκέντρωση CO_2 και χαμηλά επίπεδα οξυγόνου στο αίμα. Προκειμένου λοιπόν να αντιμετωπίσουμε ενδεχόμενες επιβλαβείς παρενέργειες από την υπερβολική δόση αναλγητικών φαρμάκων, χωρίς όμως να χάσουμε τη θεραπευτική τους δράση, προβαίνουμε συχνά στην ελεγχόμενη χορήγηση ενός αντιδότη.

Η καρβονική ανυδράση ακινητοποιήθηκε σε κατιοντικές υδρογέλες (N,N-dimethylaminoethyl methacrylate, DMAEMA) για τη θεραπεία υπερδοσολογίας αναλγητικών φαρμάκων. Οι υδρογέλες ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα, όπως αλλαγές στο pH, στη θερμοκρασία, παρουσία φωτός ή άλλων βιομορίων, με τις κατιοντικές υδρογέλες DMAEMA να ανταποκρίνονται συγκεκριμένα σε αλλαγές του pH. Η καρβονική ανυδράση ακινητοποιήθηκε εντός της δομής των υδρογελών με στόχο να παρακολουθεί τις αλλαγές στα επίπεδα CO_2 στο περιβάλλον και στην περίπτωση που η συγκέντρωση του CO_2 ξεπερνά μια συγκεκριμένη τιμή, το ένζυμο ενεργοποιείται οδηγώντας στην απελευθέρωση του φαρμάκου-αντιδότη που είναι εγκλωβισμένο εντός της υδρογέλης (Satav et al., 2010).

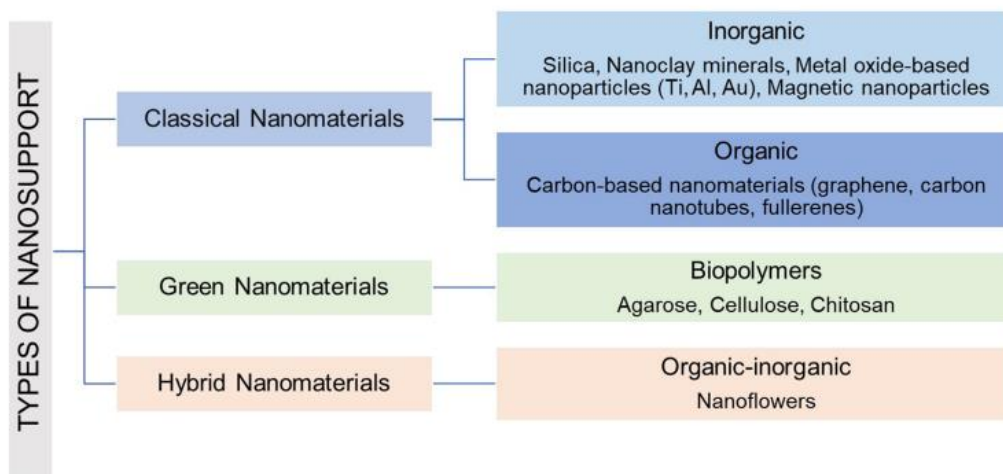
6. Νανοτεχνολογία

6.1. Ρόλος της νανοτεχνολογίας στην ακινητοποίηση εξύμων

Με τον όρο «νανοτεχνολογία» αναφερόμαστε σε έναν σύνθετο διεπιστημονικό κλάδο που ασχολείται με τη σύνθεση και τη χρήση υλικών για την παραγωγή προϊόντων της κλίμακας των νανομέτρων (10^{-9} m) (Demetzos, 2016). Σταδιακά θεωρήθηκε ως ένα πολυεπιστημονικό πεδίο, όπου η μελέτη των ηλεκτρικών, μαγνητικών, μηχανικών και οπτικών ιδιοτήτων των νανοδομών επέτρεψε την ανάπτυξη μιας πολλά υποσχόμενης γενιάς λειτουργικών υλικών για πλήθος εφαρμογών. Η χρήση των νανοϋλικών χρησιμοποιήθηκε σε εφαρμογές όπως οι βιοαισθητήρες και η βιοηλεκτρονική και ιδιαίτερα στον τομέα της διάγνωσης, της παρακολούθησης και της θεραπείας διαφόρων παθολογικών καταστάσεων, όπου σύμφωνα με το Εθνικό Ινστιτούτο Υγείας επικράτησε και ο όρος «νανοϊατρική».

Από βιομηχανική, αλλά κυρίως από θεραπευτική άποψη, αποτελεί πρόκληση η μετατροπή ενός φυσικού βιολογικού καταλύτη σε μια ισχυρή βιοκαταλυτική μηχανή. Βάση αυτών, η νανοτεχνολογία, αποτέλεσε αναδυόμενη καινοτομία, επιτρέποντας τη χρήση πληθώρας υποστρωμάτων με διαφορετικές ιδιότητες για διάφορες εφαρμογές, παρέχοντας έτσι τη δυνατότητα αύξησης της απόδοσης, της σταθερότητας και της δράσης των βιολογικών μορίων για χρήση τους εντός και εκτός του κυττάρου (Bosio et al., 2015). Ο όρος «νανοβιοτεχνολογία» προσδιορίζει τον τομέα που αναλαμβάνει τον σχεδιασμό, την ανάπτυξη και την εφαρμογή συστημάτων και διατάξεων βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος στις διαστάσεις της νανοκλίμακας, με στόχο τη μελέτη των βιολογικών συστημάτων και την ανάπτυξη καινοτόμων τεχνολογιών (Σταμάτης Χ., 2016).

Στο πλαίσιο αυτό, τα νανουλικά αποτελούν εξαιρετικούς φορείς για την ακινητοποίηση των ενζύμων, εξαιτίας των ιδιοτήτων τους και ιδίως λόγω του υψηλού λόγου της επιφάνειας προς τον όγκο. Ορισμένα εκ των νανοϋλικών που μελετήθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν ευρύτατα για την ακινητοποίηση θεραπευτικών ενζύμων παρουσιάζονται παρακάτω. Όπως φαίνεται μπορούν να κατηγοριοποιηθούν βάση τους είδους τους και έτσι έχουμε μεταλλικά υλικά, βιοπολυμερή, δένδρομερή, σύνθετα και νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα, στα οποία και θα εστιάσουμε στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή.



Εικόνα 15. Κατηγορίες υλικών που αξιοποιήθηκαν ως μήτρα για την ακινητοποίηση ενζύμων (Rossino et al., 2022).

Ο άνθρακας συγκαταλέγεται μεταξύ των πιο άφθονων στοιχείων στη Γη και εντοπίζεται στη φύση είτε ως άνθρακας είτε με τις αλλοτροπικές μορφές που σχηματίζει όπως ο γραφίτης και το διαμάντι (εξαιρετικά σταθερές χημικά). Το ενδιαφέρον έχει στραφεί γύρω από τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα εξαιτίας των μοναδικών ιδιοτήτων και της βιοσυμβατότητας που παρουσιάζουν, καθιστώντας τους κατάλληλους φορείς για την ακινητοποίηση βιομορίων, την μεταφορά φαρμάκων, ή ακόμη και για εφαρμογή σε ηλεκτρονικές συσκευές και κυψέλες καυσίμων.

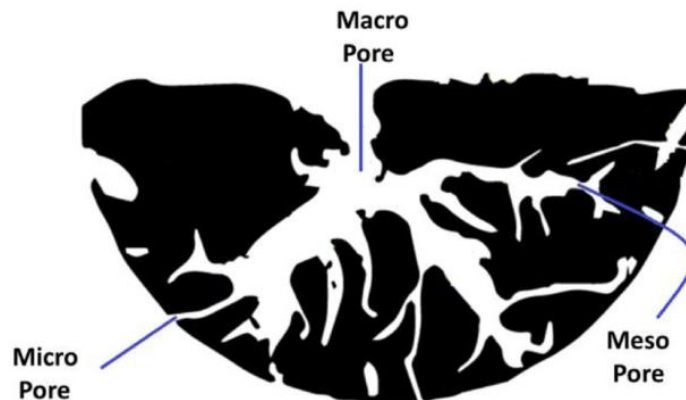
6.2. Πορώδη υλικά

Τα πορώδη υλικά ή πορώδη μέσα ορίζονται ως στερεά υλικά που περιέχουν κενά-πόρους. Αποτελούν μία εκ των σπουδαιότερων κατηγοριών των υλικών που παρουσιάζουν τεράστιο επιστημονικό ενδιαφέρον, κυρίως λόγω των αξιόλογων φυσικοχημικών και μηχανικών χαρακτηριστικών τους καθώς και των ελεγχόμενων διαστάσεων τους σε ατομική, μοριακή και νάνο- κλίμακα. Γενικά παρουσιάζουν πορώδες της τάξεως 0.2-0.95, όπου με τον όρο πορώδες αναφερόμαστε στον λόγο του όγκου των πόρων προς τον συνολικό όγκο. Οι πόροι ταξινομούνται σε δύο τύπους ανάλογα με την προσβασιμότητα των ρευστών (υγρών ή αερίων) στο εσωτερικό τους και έχουμε επομένως τους ανοιχτού τύπου (από το ένα ή και τα δύο άκρα) και τους κλειστού τύπου πόρους. Οι πόροι αυξάνουν τη διαθέσιμη προς τους βιοκαταλύτες επιφάνεια προκειμένου να λάβει χώρα μια αντίδραση, ενώ η πορώδης αυτή δομή επιτρέπει την κίνηση των αντιδρώντων και προϊόντων προς και από τις ενεργές θέσεις των ενζύμων.

Τα πορώδη υλικά διακρίνονται ανάλογα με το μέγεθος των πόρων τους σε τρεις επιμέρους κατηγορίες κατά IUPAC (International Union of Pure and Applied Chemistry). Έτσι έχουμε τα μικροπορώδη, τα μεσοπορώδη και τα μακροπορώδη υλικά, με διάμετρο πόρων <2 nm, 2-50 nm και >50 nm αντίστοιχα. Η γνώση του μεγέθους των πόρων των υλικών επιτρέπει την κατάλληλη για τη συγκεκριμένη εφαρμογή επιλογή του υλικού (Ishizaki K. et al., 2015), (Bennett et al., 2021).

Τα πορώδη υλικά με μέγεθος πόρων περίπου 100 nm ή μικρότερο ονομάζονται νανοπορώδη και αποτελούνται από ένα οργανικό ή ανόργανο πλαίσιο που υποστηρίζει μια πορώδη δομή.

Τα τελευταία χρόνια ωστόσο, το ενδιαφέρον έχει στραφεί γύρω από τα πορώδη υλικά άνθρακα (Porous Carbon Materials, PCMs) και τη χρήση τους σε πλήθος βιώσιμων εφαρμογών, λόγω των ιδιοτήτων και των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών που παρουσιάζουν σε σύγκριση με τα συμβατικά υλικά. Ειδικότερα, το χαμηλό κόστος, η υψηλή χημική σταθερότητα, η εξαιρετική ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα, η μηχανική αντοχή, το χαμηλό βάρος, η ποικιλομορφία ως προς τη δομή τους, η δυνατότητα ελέγχου του πορώδους τους, καθώς και η φιλικότητα προς το περιβάλλον αποτελούν ορισμένα εκ των χαρακτηριστικών αυτών (Sam et al., 2024).



Εικόνα 16. Διαφορετικά είδη πόρων σε ενεργοποιημένο άνθρακα (activated carbon)(Baby et al., 2019).

6.3. Ιεραρχημένοι πορώδεις άνθρακες (HPCs)

6.3.1. Εισαγωγή

Οι ιεραρχημένοι πορώδεις άνθρακες (Hierarchical Porous Carbons, HPCs) συγκαταλέγονται στους πορώδεις άνθρακες και έχουν προσελκύσει ιδιαίτερα το επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, καθώς διαθέτουν μια πολυτροπική κατανομή μεγέθους πόρων, μικρο-, μεσο-, ή/και μακρο-κλίμακας. Ειδικότερα, τα HPCs ορίζονται ως υλικά που περιλαμβάνουν διασυνδεδεμένους τουλάχιστον δύο ειδών πόρους μικρο-, μεσο- ή μακρο-διαστάσεων. Πρόκειται δηλαδή για υλικά που παρουσιάζουν οργανωμένη δομή που αποτελείται από πόρους διαφορετικής διαμέτρου, ο λειτουργικός συνδυασμός των οποίων επιτρέπει την υψηλή απόδοση για πλήθος εφαρμογών, συμβάλλοντας για παράδειγμα στη βελτίωση της δραστηριότητας ή του ρυθμού μιας αντίδρασης. Ειδικότερα, το μικροπορώδες των υλικών αυτών προσφέρει μια εξαιρετικά υψηλή ειδική και ηλεκτροχημικά προσβάσιμη επιφάνεια με ισχυρή ικανότητα προσρόφησης οι μεσοπόροι ενισχύουν τη μεταφορά μάζας εξαιτίας της μικρής αντίστασης στη μεταφορά μάζας-ιόντων, ενώ οι καλά καθορισμένοι μακροπόροι δρουν ως δραστικά μέσα αποθήκευσης, επισπεύδοντας τις διόδους μεταφοράς μάζας και μειώνοντας άρα τις αποστάσεις διάχυσης (FU et al., 2011). Ο λειτουργικός συνδυασμός των διαφορετικών ειδών πόρων καθιστά τα HPCs ως υλικά κατάλληλα για εφαρμογές προσρόφησης, κατάλυσης και αποθήκευσης ενέργειας (Zhou et al., 2021). Η έρευνα γύρω από τα υλικά αυτά έχει επικεντρωθεί στις διαφορετικές μεθόδους σύνθεσης τους, για την επίτευξη υψηλότερης ειδικής επιφάνειας και ρυθμιζόμενου πορώδους και την τροποποίηση της επιφάνειας τους με την προσθήκη λειτουργικών ομάδων για τη διεύρυνση της χρήσης και της αξιοποίησής τους σε πλήθος εφαρμογών.

Στο πλαίσιο αυτό, τα τελευταία χρόνια οι ιεραρχημένοι πορώδεις άνθρακες ενισχύονται με ετεροάτομα και ειδικότερα με ετεροάτομα αζώτου (Nitrogen doped, N-doped HPCs), προκειμένου να αλλάξουν οι φυσικοχημικές και οι ηλεκτρονιακές ιδιότητες και επομένως να βελτιωθεί η απόδοση και η εκλεκτικότητα τους. Πρόκειται για αντικατάσταση ή δημιουργία ομοιοπολικού δεσμού των ατόμων άνθρακα του πλέγματος με ξένα άτομα. Λόγω του πανομοιότυπου ατομικού μεγέθους και του αριθμού ηλεκτρονίων των ατόμων αζώτου και του ατόμου άνθρακα, το άζωτο είναι ευκολότερο να υποκαταστήσει το άτομο άνθρακα στο πλέγμα του πορώδους άνθρακα, ενώ εξαιτίας της μεγαλύτερης ηλεκτραρνητικότητας του ατόμου του αζώτου αλλάζει η επιφανειακή πόλωση και συνεπώς μπορεί να βελτιωθεί η απόδοση στην προσρόφηση, την κατάλυση ή την ηλεκτροχημεία (Zhou et al., 2021). Εισάγονται επιπλέον ενεργές θέσεις μέσω ψευδοχωρητικότητας και ενισχύεται η υδροφιλικότητα των HPCs (Qiang et al., 2023). Επιπλέον, η εισαγωγή του ατόμου του αζώτου φαίνεται να διευκολύνει τις αλληλεπιδράσεις δεσμών υδρογόνου μεταξύ της επιφάνειας του πορώδους άνθρακα και των

μορίων CO₂, βελτιώνοντας με τον τρόπο αυτό τη δέσμευση του διοξειδίου του άνθρακα (Sun et al., 2016).

6.3.2. Μέθοδοι σύνθεσης

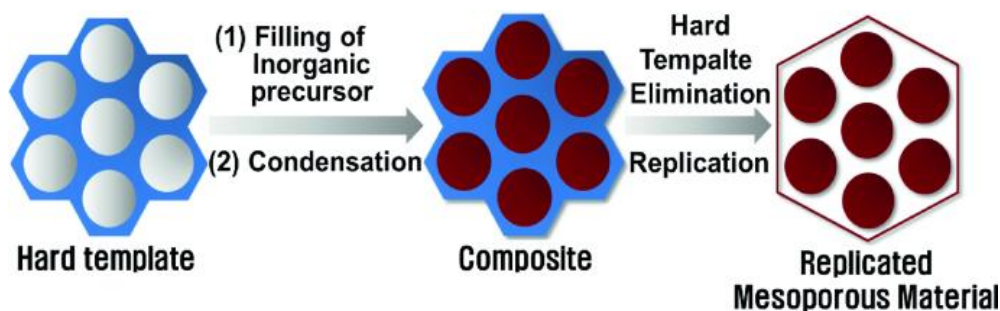
Οι ιεραρχημένοι πορώδεις άνθρακες (HPCs) μπορούν να συντεθούν με διαφορετικές μεθόδους, με τη μέθοδο χρήσης εκμαγείου, τη μέθοδο χωρίς τη χρήση εκμαγείου και τη μέθοδο συνδυασμού εκμαγείου-ενεργοποίησης να συμπεριλαμβάνονται μεταξύ αυτών (FU et al., 2011).

Στις περισσότερες περιπτώσεις συντίθενται με τη χρήση τριών διαφορετικών εκμαγείων, τα οποία προσφέρουν διαφορετικές ιδιότητες στη δομή του πορώδους τους. Ειδικότερα, έχουμε τη χρήση του σκληρού εκμαγείου, του μαλακού εκμαγείου και του εκμαγείου πάγου, συνδυασμός των οποίων χρησιμοποιήθηκε και στην παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή. Αντίστοιχα, οι ιεραρχημένοι πορώδεις άνθρακες με προσμίξεις ετεροατόμων παρασκευάζονται με τις ίδιες μεθόδους, με τη διαφορά ότι οι πρόδρομες ενώσεις που χρησιμοποιούνται εμπεριέχουν ετεροάτομα.

ο Μέθοδος Σκληρού Εκμαγείου (Hard Template Method)

Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται για τη δημιουργία πορώδων ανθράκων που εμφανίζουν οργανωμένη δομή, γεγονός που επιτυγχάνεται μέσω της εναπόθεσης μιας πρόδρομης ένωσης για την επίτευξη του επιθυμητού προϊόντος στον περιορισμένο χώρο του εκμαγείου και καταλήγοντας με τον τρόπο αυτό σε ένα αντίστροφο αντίγραφο του. Ως εκμαγεία χρησιμοποιούνται συνήθως στερεά σκληρά υλικά όπως μεσοπορώδες πυρίτιο (mesoporous silica) ή άνθρακας. Ως πρόδρομες ενώσεις χρησιμοποιούνται διάφορες πηγές άνθρακα, συνήθως ζάχαρη (sucrose). Ειδικότερα, η πηγή άνθρακα εισχωρεί στο εσωτερικό των πόρων του στερεού εκμαγείου, το οποίο στη συνέχεια απομακρύνεται ύστερα από θερμική κατεργασία. Οι ενδεχομένως υψηλές θερμοκρασίες που δύναται να αναπτυχθούν κατά το στάδιο της θερμικής κατεργασίας δεν επηρεάζουν τη δομή και τα υλικά που συντίθενται εμφανίζουν υψηλή κρυσταλλικότητα. Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται υψηλή πιστότητα όσον αφορά το μέγεθος και την ποιότητα των μικρο-, μεσο- και μακρο-πόρων, ωστόσο η χρήση σταθερών ανόργανων στερεών υλικών ως εκμαγεία απαιτεί την χρήση οξέων ή βάσεων για την απομάκρυνση τους, γεγονός που απαιτεί χρόνο και δυσχεραίνει τη χρήση τους σε παραγωγή μεγάλης κλίμακας. Επιπλέον, ενδεχόμενη ελαττωματική πλήρωση του εκμαγείου μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία ασυνεχειών στη δομή των πόρων, ενώ κατά την απομάκρυνση του

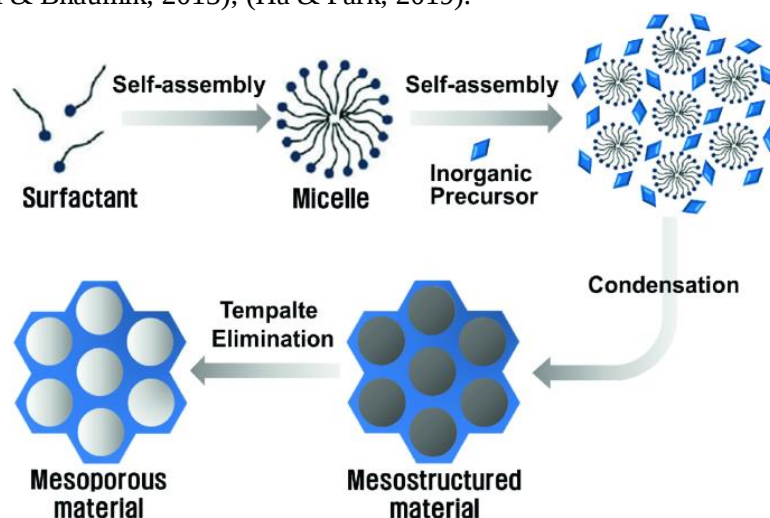
εκμαγείου ενδέχεται να προκύψει κατάρρευση μέρους της δομής των πόρων (Savic et al., 2018).



Εικόνα 17. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου του σκληρού εκμαγείου (Ha & Park, 2019).

ο Μέθοδος Μαλακού Εκμαγείου (Soft Template Method)

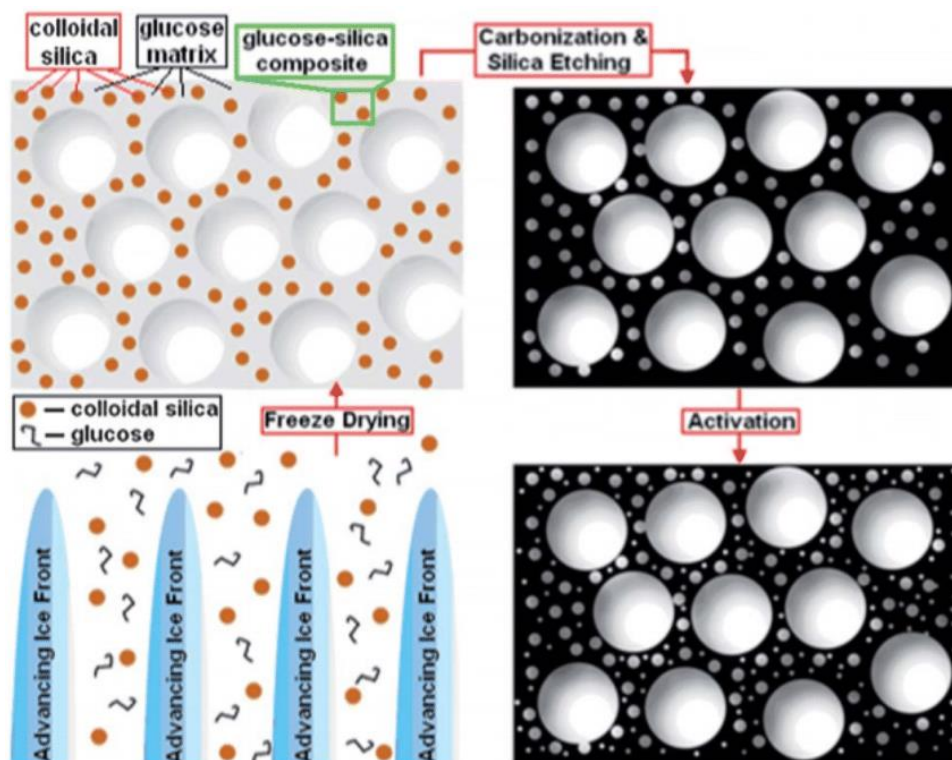
Αποτελεί εύκολη τεχνική, κύρια και άμεση μέθοδο για τη σύνθεση μεσοπορώδων υλικών με οργανωμένη δομή, μέσω χρήσης συμπολυμερών κατά συστάδες ή οργανικών τασιενεργών ενώσεων (επιφανειοδραστικοί παράγοντες) ως εκμαγεία που λειτουργούν ως δομικοί κατευθυντήριοι παράγοντες (Structure Directing Agents, SDAs), αλλά και προσθήκης πρόδρομων ουσιών προκειμένου να λάβουμε το επιθυμητό μεσοπορώδες νανοϋλικό μετά την απομάκρυνση του εκμαγείου. Βασική αρχή της μεθόδου αυτής αποτελεί η συνεργατική αυτοσυναρμολόγηση (Cooperative Self-Assembly, CSA) της τασιενεργής ένωσης και της πρόδρομης ουσίας. Τα μεσοπορώδη νανοϋλικά σχηματίζονται δηλαδή μέσω των ενδομοριακών και διαμοριακών αλληλεπιδράσεων των τασιενεργών ενώσεων και των πρόδρομων ουσιών. Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται η ζάχαρη (sucrose), ενώ ως εκμαγείο κάποια πολυμερική ένωση. Η απομάκρυνση του εκμαγείου συμβαίνει έπειτα από πυρόλυση σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες (έως 600 °C) ή μέσω κάποιας άλλης τεχνικής έκπλυσης (Savic et al., 2018), (Pal & Bhaumik, 2013), (Ha & Park, 2019).



Εικόνα 18. Σχηματική αναπαράσταση της μεθόδου του μαλακού εκμαγείου (Ha & Park, 2019).

ο Μέθοδος Εκμαγείου Πάγου (Ice Template Method)

Αποτελεί παραλλαγή της μεθόδου του σκληρού εκμαγείου και νέα μέθοδο που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση HPCs προκειμένου να επιτευχθεί μεγαλύτερη ειδική επιφάνεια και όγκος πόρων (έως και $2096 \text{ m}^2/\text{g}$ και $11.4 \text{ cm}^3/\text{g}$ αντίστοιχα). Κατά τη βύθιση του μίγματος σε υγρό άζωτο αναπτύσσονται κρύσταλλοι πάγου, οι οποίοι οδηγούν στην αποβολή των νανοσωματιδίων κολλοειδούς πυριτίας και των μορίων γλυκόζης. Κατά την απομάκρυνση των κρυστάλλων πάγου ύστερα από εξάχνωση που συμβαίνει κατά τη λυοφιλιωποίηση, έχουμε τη δημιουργία μακροπόρων μέσα στο σύνθετο ικρίωμα γλυκόζης-πυριτίου και στη συνέχεια τη δημιουργία ενός μακροπορώδους υλικού έπειτα από ανθρακοποίηση. Σε επόμενο βήμα, υδροξείδιο του νατρίου (NaOH) χρησιμοποιείται για τη χάραξη (etching) προκειμένου να απομακρυνθούν τα νανοσωματίδια πυριτίου και να δημιουργηθούν με τον τρόπο αυτό μεσοπόροι μέσα στο ικρίωμα. Οι μικροπόροι εισάγονται μέσω φυσικής ενεργοποίησης με διοξείδιο του άνθρακα, όπου αλλάζοντας τη διάρκεια της ενεργοποίησης και τον ρυθμό ροής του αερίου μπορεί να ελεγχθεί η κατανομή τους. Αντίστοιχα, η κατανομή του μεσοπορώδους ελέγχεται έπειτα από επιλογή διαφορετικού μεγέθους νανοσωματιδίων πυριτίου ή διαφορετικής αναλογίας πρόδρομης ενώσεως και πηγής άνθρακα (Estevez et al., 2013).



Εικόνα 19. Βασικά στάδια της μεθόδου εκμαγείου πάγου (Estevez et al., 2013) .

6.3.3. Ιεραρχημένοι πορώδεις άνθρακες και δέσμευση διοξειδίου του άνθρακα

Η διαρκώς αυξανόμενη εκπομπή αερίων του θερμοκηπίου όπως του διοξειδίου του άνθρακα έχει οδηγήσει στην έξαρση του φαινομένου του θερμοκηπίου, έχοντας ως άμεση συνέπεια την αύξηση της μέσης επιφανειακής θερμοκρασίας της Γης, την υπερθέρμανση του πλανήτη και την κλιματική αλλαγή. Η επιτακτική ανάγκη μετριασμού των εκπομπών του CO₂ έχει οδηγήσει στη διερεύνηση νέων προσεγγίσεων για την ανάπτυξη αποτελεσματικών τεχνολογιών δέσμευσης του CO₂. Η ακινητοποίηση ενζύμων σε πορώδη υλικά άνθρακα θεωρείται ως μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος για την δέσμευση του CO₂ ως συνέπεια της μεγάλης ειδικής επιφάνειας, της ρυθμιζόμενης πορώδους δομής, της υψηλής εκλεκτικότητας και της υψηλής βιοσυμβατότητας. Ειδικότερα η φυσική προσρόφηση ενός προσροφητικού μέσου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ειδική επιφάνεια, το μέγεθος των πόρων και τον όγκο που αυτοί καταλαμβάνουν. Η μεγάλη επομένως ειδική επιφάνεια και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των πόρων (μικρο-, μεσο- και μακρο- κλίμακας) των HPCs, καθώς και η ταχεία μεταφορά μάζας από τους μεσο- και μακρο-πόρους επιτρέπουν την υψηλή απόδοση και εφαρμογή τους για τη δέσμευση του CO₂ (Zhou et al., 2021).

Επιπλέον, τα πορώδη υλικά άνθρακα με προσμίξεις αζώτου αποτελούν πολλά υποσχόμενα υλικά για τη δέσμευση και τη προσρόφηση του CO₂. Εξαιτίας της υψηλής ικανότητας πόλωσης των μορίων του CO₂ ενοείται η επιλεκτική δέσμευση του κατά τη χημική προσρόφηση, η οποία μπορεί να επιτευχθεί μέσω ενίσχυσης των HPCs με ετεροάτομα αζώτου. Μέσω της τεχνικής αυτής εισάγονται αλκαλικές λειτουργικές ομάδες στα HPCs, οι οποίες μεταβάλλουν τις ιδιότητες των επιφανειοδραστικών φορτίων, αυξάνοντας με τον τρόπο αυτό και την ικανότητα προσρόφησης του CO₂ (Zhou et al., 2021), (Zhang et al., 2020).

6.4. Κυβοειδή πορώδους άνθρακα (PCCs)

Τα κυβοειδή πορώδους άνθρακα (Porous Carbon Cuboids, PCCs) συγκαταλέγονται στους πορώδεις άνθρακες, παρουσιάζουν ωστόσο εξαιρετικά υδρόφιλη συμπεριφορά, γεγονός που αυξάνει την ικανότητα τους να δεσμεύουν τους ατμοσφαιρικούς υδρατμούς. Διακρίνονται για την υψηλή σταθερότητα, το χαμηλό τους βάρος, την ετερογένεια της επιφάνειας τους, την υψηλή ειδική επιφάνεια (800-900 m²/g) καθώς και το ιεραρχημένο τους πορώδες. Η παρουσία του μικροπορώδους κατέχει σημαντικό ρόλο στην προσρόφηση, ενώ το μεσοπορώδες συμβάλει στη διαμόρφωση και τη δραστηριότητα των ακινητοποιημένων στην επιφάνεια των υλικών ενζύμων.

Η σύνθεση τους γίνεται μέσω πλήθους μεθόδων, με τη μέθοδο του σκληρού και του μαλακού εκμαγείου που αναλύθηκαν παραπάνω να συμπεριλαμβάνονται μεταξύ αυτών, όπου έχουμε τη χρήση ανόργανων σωματιδίων όπως NaCl , ZnO , MgO και CaCO_3 , αλλά και συμπολυμερών κατά συστάδες ως σκληρά και μαλακά εκμαγεία αντίστοιχα. Επίσης μπορούν να συντεθούν μέσω σύνθεσης ενός δοχείου (One-Pot Synthesis), μια απλή, εξαιρετικά επιλεκτική και αποτελεσματική μέθοδο. Ουσιαστικά έχουμε την ανάμιξη των πρόδρομων ουσιών άνθρακα και των δομικά κατευθυντήριων παραγόντων (SDAs) και έπειτα την πολλών σταδίων αντίδραση τους σε ένα δοχείο κάτω από καθορισμένες συνθήκες αντίδρασης, προκειμένου να ρυθμιστεί η πορώδης τους δομή (Yang et al., 2023).

Τα PCCs έχουν αξιοποιηθεί για πλήθος εφαρμογών και σε διαφορετικούς τομείς, όπως η κατάλυση, η αποθήκευση ενέργειας, ο καθαρισμός του νερού, οι πυκνωτές και η προσρόφηση αερίων. Είναι εφικτή η τροποποίηση της επιφάνειας των PCCs με λειτουργικές ομάδες προκειμένου να βελτιστοποιηθούν οι ιδιότητες τους αλλά και να τροποποιηθεί ο υδρόφιλος χαρακτήρας της επιφάνειας τους, ώστε να καταστούν κατάλληλοι προσροφητές ή καταλύτες. Μια ενδεχόμενη τροποποίηση της επιφάνειας καθιστά για παράδειγμα δυνατή την ομοιοπολική ακινητοποίηση πρωτεϊνών και ενζύμων και συνεπώς τη βελτίωση της απόδοσης ακινητοποίησης και της δραστηρότητας του ενζύμου (Hao et al., 2015), (Karageorgou et al., 2019).

7. Βασικές αρχές τεχνικών χαρακτηρισμού

Μελετώντας τη χημική σύσταση και τη δομή τόσο του νανοϋλικού όσο και του ακινητοποιημένου ενζύμου σε νανοϋλικά δύναται να εξάγουμε πληροφορίες όσον αφορά την ακινητοποίηση και το αποτέλεσμα της. Ο χαρακτηρισμός των υλικών και των ακινητοποιημένων σε αυτά ενζύμων μπορεί να γίνει μέσω πλήθους μεθόδων, μερικές εκ των οποίων αναλύονται παρακάτω.

7.1. Μετρήσεις ειδικής επιφάνειας – Ποροσιμετρία N_2 (Μέθοδος Brunauer, Emmett και Teller, BET)

Υπάρχουν υλικά φυσικά ή συνθετικά που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν (προσροφούν) επάνω στην επιφάνειά τους μόρια ή άτομα κάποιου αερίου ή υγρού, για αυτό και χαρακτηρίζονται ως προσροφητικά υλικά. Η δέσμευση αυτή όταν οφείλεται σε ασθενείς δυνάμεις Van der Waals (20 – 50 kJ/mol) ονομάζεται φυσική προσρόφηση, ενώ όταν δημιουργούνται ισχυροί χημικοί δεσμοί (200 – 400 kJ/mol) μεταξύ των προσροφούμενων μορίων και των ατόμων της επιφάνειας του προσροφητικού υλικού ονομάζεται χημική προσρόφηση. Το φαινόμενο της προσρόφησης είναι επιφανειακό και εξαρτάται επομένως άμεσα από την επιφάνεια του προσροφητικού. Όσο μεγαλύτερη είναι η επιφάνεια τόσο περισσότερη ποσότητα προσροφούμενου δεσμεύεται σε αυτή. Σαν επιφάνεια νοείται όχι τόσο η εξωτερική όσο η εσωτερική επιφάνεια των πόρων του υλικού. Η διάμετρος των πόρων καθορίζει αν θα επιτραπεί ή όχι σε δεδομένα μόρια η προσρόφηση μέσα στους πόρους του υλικού.

Η επιφάνεια και το μέγεθος των πόρων ενός υλικού προσδιορίζονται μέσω μιας διαδικασίας που βασίζεται στη φυσική προσρόφηση ενός αδρανούς αερίου από την επιφάνεια του υλικού. Τα μόρια του αερίου προσροφώνται στην επιφάνεια στρωματικά, όταν δηλαδή καλυφθεί η επιφάνεια από ένα στρώμα μορίων του αερίου, αρχίζει να δημιουργείται δεύτερο πάνω σε αυτό κ.ο.κ. Η επιφάνεια του υλικού εκτιμάται από το πρώτο στρώμα μορίων του αερίου που σχηματίζεται, μιας και το στρώμα αυτό είναι ανάλογο της εσωτερικής επιφάνειάς του, ενώ το μέγεθος των πόρων εκτιμάται από το συνολικό όγκο των μορίων που προσροφώνται. Κατά την προσρόφηση της αέριας ουσίας (αέρια φάση) από το προσροφητικό υλικό (στερεή φάση), υφίσταται δυναμική ισορροπία μεταξύ των δύο φάσεων, η οποία εξαρτάται από τη θερμοκρασία του συστήματος, τη συγκέντρωση (ή τη μερική πίεση των ατμών) της ουσίας που δεν έχει προσροφηθεί και από τον όγκο της ουσίας που έχει προσροφηθεί. Συνεπώς η ισορροπία μπορεί να δοθεί υπό μορφή διαφορετικών διαγραμμάτων ανάλογα με την παράμετρο που θεωρείται σταθερή, με το μεγαλύτερο ενδιαφέρον να παρουσιάζουν ωστόσο οι ισόθερμες καμπύλες οι οποίες δίνουν τον όγκο του προσροφημένου αερίου (ανά μονάδα μάζας προσροφητικού) συναρτήσει της πίεσης, υπό σταθερή

θερμοκρασία. Μάλιστα, υπάρχουν έξι διαφορετικοί τύποι ισόθερων κατά IUPAC. Στα πορώδη υλικά η ισόθερμος προσρόφησης-εκρόφησης εμφανίζει έναν βρόγχο υστέρησης, με τη μορφή του βρόγχου να εκφράζει την γεωμετρική μορφή των πόρων. Η φυσική εξήγηση του φαινομένου αυτού είναι ότι το προσροφούμενο εκροφάται σε μικρότερες τιμές P/P_0 από αυτές που απαιτούνται για την προσρόφησης του, δηλαδή οι πόροι γεμίζουν σε υψηλότερη σχετική πίεση από αυτή που αδειάζουν (Σδούκος Α. Θ. & Πομώνης Φ. Ι., 2008).

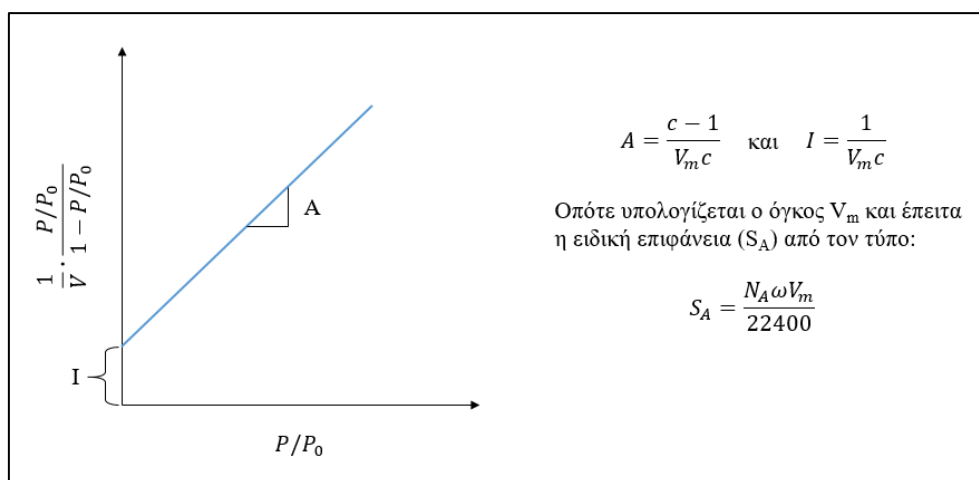
Η μέθοδος Brunauer, Emmett και Teller (BET) αποτελεί ένα εκ των θεωρητικών μοντέλων που αναπτύχθηκαν για τον προσδιορισμό της ειδικής επιφάνειας και το μέγεθος των πόρων των υλικών και εξηγεί σε ικανοποιητικό βαθμό πολλά πειραματικά αποτελέσματα, καλύπτοντας τον σχηματισμό περισσότερων του ενός μονομοριακών στρωμάτων στην επιφάνεια του προσροφητικού. Η θεωρία αυτή είναι επέκταση της θεωρίας του Langmuir, η οποία προβλέπει τον σχηματισμό ενός μόνο μονομοριακού στρώματος.

Εφόσον δεν υπάρχει περιορισμός στο πλήθος των μονοστρωμάτων, τα μονοστρώματα δεν αλληλοεπιδρούν μεταξύ τους και για κάθε μονόστρωμα ισχύει η εξίσωση του Langmuir

$$\left(\frac{1}{V} = \frac{1/P}{KV_m} + \frac{1}{V_m}\right), \text{ με αποτέλεσμα να προκύπτει η εξίσωση BET:}$$

$$\frac{P}{V(P_0 - P)} = \frac{1}{V_m c} + \frac{c - 1}{V_m c} \left(\frac{P}{P_0}\right)$$

Όπου P η μερική πίεση του προσροφούμενου, P_0 η πίεση κορεσμού, V ο όγκος του προσροφημένου αερίου, V_m ο απαιτούμενος όγκος του αερίου για τον σχηματισμό μονοστρώματος και c η σταθερά εκθετικά σχετιζόμενη με τη θερμότητα προσρόφησης και τη λανθάνουσα θερμότητα συμπύκνωσης. Η ειδική επιφάνεια υπολογίζεται μέσω της γραφικής παράστασης (Εικόνα 20, δεξιά) με βάση τη μέθοδο που περιγράφεται στην Εικόνα 20 (αριστερά) (Ambroz et al., 2018).



Εικόνα 20. Αριστερά ένα παράδειγμα ισόθερμου BET και δεξιά η μέθοδος προσδιορισμού της ειδικής επιφάνειας, όπου N_A ο αριθμός Avogadro και ω η έκταση της επιφάνειας που καταλαμβάνει ένα μόριο του προσροφούμενου αερίου.

7.2. Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS)

Η Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων-X (X-ray Photoelectron Spectroscopy, XPS) αποτελεί μη καταστρεπτική τεχνική και χρησιμοποιείται για τη χημική ανάλυση και την ταυτοποίηση της χημικής κατάστασης των στοιχείων που εντοπίζονται στην επιφάνεια ενός νανοδομημένου υλικού (Bubert et al., 2011).

Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ενεργειακή ανάλυση των ηλεκτρονίων που εξάγονται από τις εσωτερικές κυρίως ηλεκτρονιακές στάθμες των ατόμων του στερεού, όταν αυτό εκτίθεται σε ακτίνες-X συγκεκριμένης ενέργειας. Στη φασματοσκοπία XPS το δείγμα εκτίθεται, υπό συνθήκες υπερ-υψηλού κενού, σε μία μονοχρωματική δέσμη ακτίνων X (ενέργειας $h \cdot \nu$), η οποία προκαλεί φωτοϊονισμό και εκπομπή φωτοηλεκτρονίων. Το φάσμα XPS απεικονίζει το ενεργειακό φάσμα των εκπεμπόμενων φωτοηλεκτρονίων και αποτελείται από μία σειρά διακριτών ταινιών που ανταποκρίνονται στις χαρακτηριστικές στοιβάδες της ηλεκτρονικής δομής του ατόμου.

Η κινητική ενέργεια (E_k) των εκπεμπόμενων φωτοηλεκτρονίων δίνεται από τη σχέση:

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

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

Όταν η επιφάνεια ενός στερεού εκτεθεί σε ακτίνες-X κατάλληλης ενέργειας, το υλικό απορροφά διακριτά κβάντα ενέργειας με επακόλουθο την εκπομπή φωτοηλεκτρονίων. Η κατανομή της κινητικής ενέργειας του πλήθους των εκπεμπόμενων φωτοηλεκτρονίων δίνει πληροφορίες για το νανοδομημένο στερεό.

Αφού το φωτο-ηλεκτρόνιο δημιουργείται μέσα στο νανοϋλικό, η κυματοσυνάρτησή του φέρει πληροφορίες για το στερεό ακόμη και μετά την εκπομπή του στο κενό. Η χημική σύσταση της επιφάνειας προσδιορίζεται από τις σχετικές εντάσεις των κορυφών στο φάσμα XPS. Οι θέσεις και το σχήμα των γραμμών δίνει πληροφορίες για τη χημική κατάσταση των στοιχείων που ανιχνεύονται. Ειδικότερα, η ακριβής τιμή της ενέργειας σύνδεσης ενός ηλεκτρονίου εξαρτάται από την κατάσταση οξείδωσης του ατόμου και το φυσικό και χημικό περιβάλλον γύρω από το άτομο. Ηλεκτρόνια από άτομα σε υψηλή κατάσταση οξείδωσης έχουν μεγαλύτερη ενέργεια σύνδεσης λόγω της επιπλέον αλληλεπίδρασης Coulomb ανάμεσα στο ηλεκτρόνιο και το ιονισμένο άτομο από το οποίο εκπέμπεται, με αποτέλεσμα την εμφάνιση χημικής μετατόπισης.

Στην τεχνική αυτή, η πρωτεύουσα δέσμη δεν προκαλεί καταστροφή των δειγμάτων και μπορεί να χρησιμοποιηθεί και σε ευαίσθητα υλικά, δεν προκαλείται φόρτιση του δείγματος ενώ τα δεδομένα συλλέγονται εξαιρετικά γρήγορα. Στην περίπτωση χρήσης δειγμάτων αναφοράς,

οι ποσοτικές πληροφορίες έχουν καλύτερη ακρίβεια, της τάξεως του $\pm 10\%$. Η ευαισθησία δε μεταβάλλεται σημαντικά συναρτήσει του ατομικού αριθμού των στοιχείων (Watts J.F. & Wolstenholme J., 2005), (Mendoza S. M., 2007). Τέλος αν και υπάρχει υψηλή επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων και εκτεταμένη τεχνογνωσία, βιβλιογραφία και βάσεις δεδομένων, η φασματοσκοπία XPS δεν έχει υψηλή χωρική διακριτική ικανότητα και έχει πτωχή ανάλυση βάθους (επιφανειακή τεχνική).

7.3. Φασματοσκοπία Μέσου Υπερύθρου (Infrared Spectroscopy, IR)

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό των χαρακτηριστικών ομάδων που αποτελούν μέρος των διάφορων μορίων, την πιστοποίηση της καθαρότητας μιας χημικής ουσίας, ενώ μας δίνει πληροφορίες για τη μοριακή δομή και το περιβάλλον μιας ένωσης. Όταν η υπέρυθη ακτινοβολία προσπέσει σε ένα υλικό μπορεί να το διαπεράσει, να σκεδαστεί ή να απορροφηθεί από αυτό, διεγείροντας μόρια σε υψηλότερες ενεργειακές δονητικές καταστάσεις, εφόσον η συχνότητα της ενέργειας είναι ίση με τη διαφορά δύο ενεργειακών δονητικών σταθμών. Χρησιμοποιείται ευρέως λόγω της ευκολίας λήψης του φάσματος υπέρυθρου και της κατόπιν σύγκρισης του με φάσματα γνωστών οργανικών ενώσεων.

Το φάσμα υπέρυθρου λαμβάνεται ως ένα διάγραμμα της έντασης (Intensity) συναρτήσει της ενέργειας (E), της συχνότητας (ν), του μήκους κύματος (λ) ή κυματάριθμου ($\bar{\nu}$), με το τελευταίο να χρησιμοποιείται πιο συχνά. Οι μονάδες μέτρησης είναι $\text{ergs} \cdot \text{s}^{-1}$, μm και cm^{-1} , για την ενέργεια, τη συχνότητα, το μήκος κύματος και τον κυματάριθμο, αντίστοιχα.

Μεταξύ αυτών ισχύουν οι σχέσεις:

- $E = h \cdot \nu = h \cdot c / \lambda$

όπου E η ενέργεια, h η σταθερά Planck ($h = 6.63 \times 10^{-27} \text{ ergs} \cdot \text{s}$), ν η συχνότητα σε s^{-1} , λ το μήκος κύματος και c η ταχύτητα του φωτός ($c = 3 \times 10^{10} \text{ cm/s}$).

- $\nu = 1 / \lambda$

όπου ν η συχνότητα σε cm^{-1} .

Πιο συχνά παρουσιάζουμε την ένταση συναρτήσει του κυματάριθμου, που καλείται και ως συχνότητα. Το φάσμα υπέρυθρου εκτείνεται από $0.78 \mu\text{m}$ (12820 cm^{-1}) έως $1000 \mu\text{m}$ (10 cm^{-1}), αν και οι περισσότερες βασικές δονητικές μεταπτώσεις παρατηρούνται μεταξύ $2.5 \mu\text{m}$ (4000 cm^{-1}) και $25 \mu\text{m}$ (400 cm^{-1}).

Στην περιοχή υπέρυθρου ένα μόριο μπορεί να δονείται με περισσότερους από έναν τρόπους. Οι δονήσεις έκτασης αναφέρονται στη μεταβολή του μήκους των δεσμών, ενώ οι

δονήσεις κάμψης στη μεταβολή της γωνίας που σχηματίζουν τα άτομα. Ζώνες απορρόφησης μπορούν να προκύψουν και από άλλους τρόπους δόνησης, όπως είναι οι δονήσεις παραμόρφωσης, αιώρησης και συστροφής. Ένα γραμμικό μόριο, αποτελούμενο από N άτομα, δονείται με 3N-5 διαφορετικές βασικές δονήσεις, ενώ ένα μη γραμμικό μόριο με 3N-6 διαφορετικές δονήσεις.

Αν I_0 η ενέργεια της ακτινοβολίας που προσπίπτει στον ανιχνευτή υπερύθρου ενός φασματομέτρου IR χωρίς να παρεμβάλλεται κάποιο δείγμα, όταν βάλουμε το δείγμα ορισμένη ποσότητα της ενέργειας αυτής θα απορροφηθεί από το υλικό και ο ανιχνευτής θα μετρήσει διαφορετική ένταση I.

Ο λόγος της έντασης αυτής προς την ένταση της ακτινοβολίας πριν παρεμβάλλουμε το δείγμα ορίζεται ως τη διαπερατότητα (T).

$$T = I/I_0$$

Η απορρόφηση ορίζεται ως:

$$A = \log\left(\frac{1}{T}\right) = \log\left(\frac{I_0}{I}\right)$$

Η ποσοτική σχέση μεταξύ της έντασης του φωτός που διαπερνά το δείγμα και της συγκέντρωσης της στην πελέττα δίνεται από τον νόμο Lambert-Beer:

$$I = I_0 \cdot e^{-acl}$$

Όπου α ο συντελεστής απορρόφησης, c η συγκέντρωση, l το πάχος του δείγματος

Η απορρόφηση επομένως δίνεται από την σχέση:

$$A = \log\left(\frac{1}{T}\right) = \log\left(\frac{I_0}{I}\right) = e \cdot c \cdot l$$

Όπου ε καλείται συντελεστής απόσβεσης.

Από μετρήσεις διαπερατότητας σε στερεά δείγματα, με την χρήση KBr για την παρασκευή των πελέτων, μπορούμε να λάβουμε τον λόγο I/I_0 , δηλαδή την διαπερατότητα T και από την σχέση $A = -\ln T$ υπολογίζουμε την απορρόφηση. Ο συντελεστής απορρόφησης επομένως για κάθε υλικό μπορεί να μετρηθεί απ' ευθείας με την τεχνική της κατοπτρικής ανακλαστικότητας, εφόσον βέβαια το πάχος του δείγματος είναι τουλάχιστον 1 μm για να έχουμε μηδενική διαπερατότητα κατά τη μέτρηση (Γουρνής Δ. et al., 2018).

Τα περισσότερα φασματοφωτόμετρα σήμερα λειτουργούν με μετασχηματισμούς Fourier (FT-IR). Τα όργανα αυτά χρησιμοποιούν ένα συμβολόμετρο, μέσω του οποίου διαμορφώνεται η ένταση σε κάθε μήκος κύματος του φωτός σε διαφορετικές ραδιοσυχνότητες.

Αποτελεί κλασική μέθοδο ανάλυσης της δομής των πρωτεϊνών, μέσω της οποίας εξάγονται πληροφορίες για τη δευτεροταγή δομή τους, λόγω των δονήσεων των δεσμών της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Ο πεπτιδικός δεσμός για παράδειγμα εμφανίζει εννιά διαφορετικές κορυφές στο φάσμα απορρόφησης υπερύθρου (Amide I-VII, A και B), με πιο συχνές μεταξύ αυτών τις κορυφές I, II και III (Barth, 2007).

Πίνακας 2. Οι κύριες αμιδικές κορυφές απορρόφησης που εντοπίζονται στο φάσμα υπερύθρου.

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

7.4. Φασματοσκοπία Raman

Οι μοριακές δονήσεις συμβαίνουν με δύο διαφορετικούς μηχανισμούς. Συγκεκριμένα, όταν τα άτομα δονούνται με απορρόφηση κβάντων υπέρυθρης ακτινοβολίας, δημιουργείται το υπέρυθρο φάσμα (IR), όπως αναφέρεται παραπάνω. Ίδια αποτελέσματα εμφανίζονται και κατά την απορρόφηση κβάντων ορατού φωτός, δημιουργώντας το φάσμα Raman. Όταν ορατό φως σκεδάζεται από μόρια, μεταβάλλεται η συχνότητά του. Τα άτομα ή τα μόρια εκπέμπουν φως το οποίο αναφέρεται ως πρωτογενής ακτινοβολία. Εάν φωτιστούν ισχυρά επάγουν ακτινοβολία η οποία ονομάζεται δευτερογενής. Η δευτερογενής ακτινοβολία χωρίζεται σε δύο είδη, το φθορισμό και τη σκέδαση φωτός από μόρια ή άτομα. Θεωρώντας ότι φωτόνια προσκρούουν σε άτομα ή μόρια, το μεγαλύτερο μέρος των φωτονίων δεν αλληλοεπιδρά με τα σωματίδια, μόνο ένα μικρό ποσοστό αλληλοεπιδρά ελαστικά. Η συχνότητα της σκεδαζόμενης ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας παραμένει αμετάβλητη. Η ελαστικά σκεδαζόμενη ακτινοβολία δίνει τη σκέδαση Rayleigh. Υπάρχει όμως ένας μικρός αριθμός φωτονίων που σκεδάζεται κατά τρόπο μη ελαστικό και η ακτινοβολία αυτή δίνει τη σκέδαση Raman. Λόγω της μη ελαστικά σκεδαζόμενης ακτινοβολίας το μόριο μεταβαίνει κβαντικά σε υψηλότερη ενεργειακή στάθμη. Απαραίτητη προϋπόθεση για να παρατηρηθεί η σκέδαση Raman είναι η μεταβολή της πολωσιμότητας να έχει τιμή διάφορη του μηδενός, δηλαδή $\left(\frac{\theta_a}{\theta_{qi}}\right)_0 \neq 0$, όπου η σταθερά αναλογίας α ονομάζεται πολωσιμότητα και η συντεταγμένη δονήσεως q_i περιγράφει μια μερική δόνηση του μορίου.

7.5. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)

Με την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης λαμβάνονται πληροφορίες για τη μορφολογία και την τοπογραφία της επιφάνειας των στερεών. Πρόκειται για τεχνική μικροσκοπίας με εξαιρετική διακριτική ικανότητα σε σύγκριση με την οπτική μικροσκοπία, καθώς χρησιμοποιεί δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας. Η μεγέθυνση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης κυμαίνεται από 100 έως 100000 φορές ανάλογα με το δείγμα. Επιπλέον, το μικροσκόπιο συνήθως είναι εφοδιασμένο με ένα σύστημα ποσοτικής ανάλυσης (EDX) μιας καθορισμένης περιοχής του δείγματος. Έτσι υπάρχει η δυνατότητα προσδιορισμού της ετερογένειας των δειγμάτων.

Στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης, κατά τον χαρακτηρισμό του δείγματος γίνεται παλινδρομική σάρωση της επιφάνειας του από μια εξαιρετικά εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων και τα ηλεκτρόνια τα οποία σκεδάζονται από το δείγμα δίνουν τις πληροφορίες για τη μορφολογία του. Η δέσμη ηλεκτρονίων σαρώνει μια επιφάνεια σε ευθεία γραμμή, επιστρέφει αμέσως στην αρχική της θέση και μετατοπίζεται προς τα κάτω κατά ένα σταθερό διάστημα. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται έως ότου σαρωθεί η επιθυμητή περιοχή της επιφάνειας. Με τη διαδικασία αυτή λαμβάνονται από την επιφάνεια οπισθοσκεδαζόμενα και δευτερογενή ηλεκτρόνια, τα οποία ανιχνεύονται με τη βοήθεια ανιχνευτών, μετατρέπονται σε σήματα, με αποτέλεσμα κάθε σήμα που λαμβάνεται να αντιστοιχεί σε δεδομένο σημείο της επιφάνειας και να αποθηκεύεται στον υπολογιστή όπου τελικά μετατρέπεται σε εικόνα.

7.6. Φασματοσκοπία Υπεριώδους – Ορατού (UV-vis)

Η φασματοσκοπία απορρόφησης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας αποτελεί μια από τις χρησιμότερες αναλυτικές τεχνικές. Μάλιστα η φασματοσκοπία μοριακής απορρόφησης στις φασματικές περιοχές υπεριώδους και ορατού εφαρμόζεται ευρέως για τον ποσοτικό προσδιορισμό πλήθους ανόργανων, οργανικών και βιολογικών ουσιών, συσχετίζοντας το ποσοστό απορρόφησης της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με τη συγκέντρωση της υπεύθυνης για την απορρόφηση ουσίας. Η απορρόφηση στην περιοχή του ορατού και του υπεριώδους, προκαλεί αλλαγές στην ενέργεια των ηλεκτρονίων σθένους, η οποία, στα μόρια, συνοδεύεται και από αλλαγές περιστροφής-δόνησης.

Η απορρόφηση ορατής ή υπεριώδους ακτινοβολίας οφείλεται, συνήθως, στη διέγερση δεσμικών ηλεκτρονίων και κατά συνέπεια τα μήκη κύματος των απορροφήσεων μπορούν να συσχετισθούν με τους τύπους των δεσμών στα εξεταζόμενα σωματίδια. Για αυτό η φασματοσκοπία μοριακής απορρόφησης αποτελεί σπουδαίο εργαλείο για την ταυτοποίηση των

χαρακτηριστικών ομάδων σε ένα μόριο και ακόμη περισσότερο στον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων που περιέχουν τις ομάδες αυτές.

Η φασματοσκοπία μοριακής απορρόφησης στηρίζεται στη μέτρηση της διαπερατότητας T , ή της απορρόφησης A των διαλυμάτων, που τοποθετούνται σε διαφανείς κυψελίδες οπτικής διαδρομής b (cm). Η συγκέντρωση c ενός αναλυτή που απορροφά συνδέεται γραμμικά με την απορρόφηση, σύμφωνα με την εξίσωση:

$$A = -\log T = \log \left(\frac{P_0}{P} \right) = \varepsilon \cdot b \cdot c$$

Όπου:

A η απορρόφηση, T η διαπερατότητα, P_0 η ισχύς της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, P η ισχύς της εξερχόμενης ακτινοβολίας μετά τη διέλευση από το διάλυμα, ε ο συντελεστής απορρόφησης, b το μήκος της διαδρομής που διανύει η ακτίνα στην κυψελίδα και c η συγκέντρωση του διαλύματος. Η εξίσωση αυτή αποτελεί μαθηματική έκφραση του νόμου του Beer.

Η απεικόνιση της απορρόφησης (Abs) ή της διαπερατότητας (T_a) συναρτήσει του μήκους κύματος λ παρέχει το φάσμα απορρόφησης, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη διαπίστωση της ύπαρξης χαρακτηριστικών ομάδων, για τη διευκρίνιση της δομής μιας ουσίας καθώς και για την ταυτοποίηση μιας ουσίας.

Σε πολλές περιπτώσεις παρατηρείται απόκλιση από τη γραμμική σχέση μεταξύ A και c σε υψηλές συγκεντρώσεις. Οι αποκλίσεις μπορεί να είναι θετικές ή αρνητικές και περιορίζουν τη δυναμική περιοχή συγκεντρώσεων για την οποία “ισχύει” ο νόμος των Beer-Lambert. Ο νόμος ωστόσο των Beer-Lambert δεν ισχύει για πυκνά διαλύματα ($c > 0.01$ M) διότι σε αυτά τα διαλύματα οι αποστάσεις μεταξύ των σωματιδίων που απορροφούν είναι τόσο μικρές ώστε το καθένα να επηρεάζει τη συμπεριφορά των γειτονικών του, όσον αφορά στην απορρόφηση ακτινοβολίας.

Το όργανο που χρησιμοποιείται στη φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού, ονομάζεται φασματοφωτόμετρο UV/Vis. Βασικά μέρη ενός φασματοφωτόμετρου αποτελούν η φωτεινή πηγή, η διάταξη συγκράτησης του δείγματος, το διάφραγμα περίθλασης ή μονοχρωματική συσκευή για τον διαχωρισμό των διαφορετικών μηκών κύματος του φωτός και ένας ανιχνευτής. Η πηγή της ακτινοβολίας είναι συνήθως ένα νήμα βολφραμίου (300-2500 nm), λάμπα τόξου δευτερίου, η οποία βρίσκεται συνεχώς πάνω από την υπεριώδη περιοχή (190-400nm). Ο ανιχνευτής είναι συνήθως μία φωτοδίοδος ή μία διάταξη συζευγμένου φορτίου.

ΜΕΡΟΣ Β' - ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

8. Χημικά Αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια, τα ένζυμα, τα υποστρώματα, οι διαλύτες, καθώς και τα ρυθμιστικά διαλύματα που παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων παρατίθενται στους πίνακες που ακολουθούν.

Πίνακας 3. Κατάλογος ενζύμων.

Ένζυμα		
Ονομασία	Ειδική δραστηριότητα – ενζυμική ενεργότητα (U/mg protein)	Προέλευση
Καρβονική Ανυδράση από ερυθροκύτταρα βοοειδών – λυοφιλιωποιημένη σκόνη (Carbonic Anhydrase from bovine erythrocytes, bCA)	>2000	Sigma-Aldrich

Πίνακας 4. Κατάλογος υποστρωμάτων.

Υποστρώματα			
Ονομασία	Χημικός τύπος	Καθαρότητα	Προέλευση
Οξικός π-νιτροφαινυλεστέρας (4-Nitrophenyl acetate, p-NPA)	$\text{CH}_3\text{CO}_2\text{C}_6\text{H}_4\text{NO}_2$	99%	Sigma-Aldrich

Πίνακας 5. Κατάλογος διαλυτών.

Διαλύτες			
Ονομασία	Χημικός τύπος	Καθαρότητα	Προέλευση
Ακετονιτρίλιο (Acetonitrile, HPLC Gradient grade)	$\text{C}_2\text{H}_3\text{N}$	>99.9 %	Fisher Scientific
Νερό υψηλής καθαρότητας δισαπεσταγμένο (Water HPLC Gradient grade)	H_2O	-	Fisher Scientific
Απεσταγμένο νερό (Distilled Water)	H_2O	-	-
Αιθανόλη (Ethanol)	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	99.5 % (Absolute for Analysis)	Merck

Πίνακας 6. Κατάλογος ρυθμιστικών διαλυμάτων.

Ρυθμιστικά Διαλύματα		
Ονομασία	Συγκέντρωση (M)	pH
Υδατικό διάλυμα φωσφορικού νατρίου (Phosphate Buffer)	0.05	7.5
Υδατικό διάλυμα τρις (υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιο υδροχλωρικό οξύ (Tris-HCl)	0.1	7.5
Υδατικό διάλυμα τρις (υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιο υδροχλωρικό οξύ (Tris-HCl)	0.05	7.5
Υδατικό διάλυμα τρις (υδροξυμεθυλο)αμινομεθάνιο υδροχλωρικό οξύ (Tris-HCl)	0.025	7.5
Υδατικό διάλυμα 4-(20υδροξυαιθυλ)πιπεραζινο-1-αιθανοσουλφονικό οξύ (HEPES Buffer)	0.05	7.5

Πίνακας 7. Κατάλογος λοιπών χημικών αντιδραστηρίων.

Υπόλοιπα χημικά αντιδραστήρια		
Ονομασία	Χημικός τύπος	Προέλευση
Δι-ένυδρο χλωριούχο ασβέστιο (Calcium chloride dihydrate)	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Merck
N-υδροξυσουκινιμίδιο (NHS)	$\text{C}_4\text{H}_5\text{NO}_3$	Sigma-Aldrich
Χλωρίδιο του 1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)καρβοδιιμίδιο (EDC)	$\text{C}_8\text{H}_{17}\text{N}_3$	Sigma-Aldrich
Σουκρόζη (Sucrose)	$\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$	Sigma-Aldrich
Κολλοειδής σίλικα SM30 (Colloidal Silica SM30-Ludox SM30) 30% w/w suspension in H ₂ O	-	Sigma-Aldrich
Κολλοειδής σίλικα AS40 (Colloidal Silica AS40-Ludox AS40) 40% w/w suspension in H ₂ O	-	Sigma-Aldrich
Ουρία (Urea)	$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$	Merck
Υδροξείδιο του νατρίου (Sodium hydroxide)	NaOH	Merck
4,4'-διπυριδίνη (4,4'-bipyridine)	$\text{C}_{10}\text{H}_8\text{N}_2$	Sigma-Aldrich
Pluronic- F127	$(\text{C}_3\text{H}_6\text{O} \cdot \text{C}_2\text{H}_4\text{O})_x$	Sigma-Aldrich
Χλωριούχος χαλκός (II) (Copper (II) Chloride)	$\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Sigma-Aldrich
Νιτρικό οξύ (Nitric acid)	HNO_3	Sigma-Aldrich
Βρωμιούχο κάλιο (Potassium bromide)	KBr	Sigma-Aldrich
Φιάλη διοξειδίου του άνθρακα	CO_2	-

(Carbon dioxide)		
Φιάλη αζώτου (Nitrogen)	N ₂	-
Φιάλη αργού (Argon)	Ar	-

9. Μέθοδοι

9.1. Σύνθεση Ιεραρχημένων Πορωδών Ανθράκων (HPCs)

9.1.1. Σύνθεση Ιεραρχημένων Πορωδών Ανθράκων αναλογίας (1:1) wt% (LUDOX SM30, AS40)

- 1^ο Στάδιο: Λυοφιλιωποίηση

Αρχικά, 6 g σουκρόζης (sucrose) διαλύθηκαν πλήρως σε 60 ml απεσταγμένο νερό (H₂O) με τη χρήση λουτρού υπερήχων (sonicator) μέχρις ότου το διάλυμα γίνει διαυγές. Στη συνέχεια, 20 g διοξειδίου του πυριτίου Ludox (SM30, AS40) προστέθηκαν σε 10 ml απεσταγμένο νερό (H₂O) και ακολούθησε ανάδευση. Το υδατικό διάλυμα σουκρόζης προστέθηκε σταγόνην στο διάλυμα του διοξειδίου του πυριτίου και το μίγμα αναδεύτηκε για μία ημέρα. Μετά το πέρας της ανάδευσης, το μίγμα βυθίστηκε σε υγρό άζωτο για 10 min και ακολούθησε λυοφιλιωποίηση (freeze drying) για 48 ώρες.

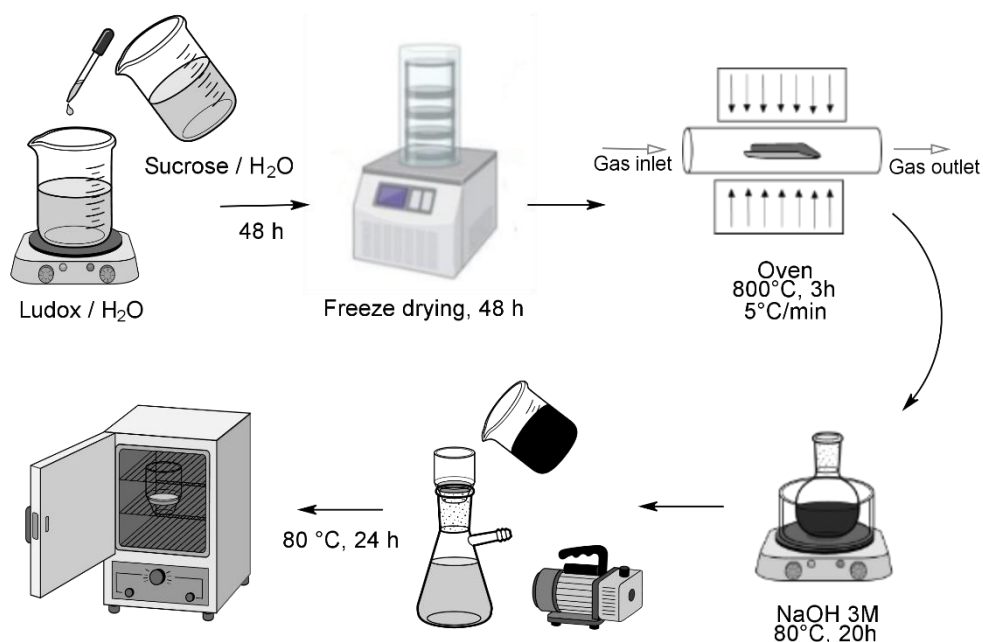
- 2^ο Στάδιο: Ανθρακοποίηση

Μετά το πέρας των 48 ωρών το δείγμα τοποθετήθηκε σε καψάκι οξειδίου του αργιλίου (alumina combustion boat) προκειμένου να πυρολυθεί σε σωληνωτό φούρνο CVD στους 800°C για 3 ώρες, υπό αδρανή ατμόσφαιρα (ατμόσφαιρα αργού Ar), με ρυθμό θέρμανσης 5°C/min.

- 3^ο Στάδιο: Απομάκρυνση διοξειδίου του πυριτίου

Το ανθρακοποιημένο δείγμα που λήφθηκε μετά τον φούρνο προστέθηκε σε διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH, 3 M), τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο και ακολούθησε ανάδευση στους 80°C για 20 ώρες. Στη συνέχεια ακολούθησε διήθηση του διαλύματος (με διηθητικό φίλτρο No 4) με τη χρήση αντλίας κενού και εκπλύσεις με απεσταγμένο νερό, μέχρις ότου η τιμή pH του διηθήματος προσεγγίσει εκείνη του απεσταγμένου νερού. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ξήρανση στους 80°C για 24 ώρες.

Στην περίπτωση που χρησιμοποιήθηκε διοξείδιο του πυριτίου Ludox AS40 ακολούθησε περεταίρω ενεργοποίηση για 8 ώρες, με τη χρήση διοξειδίου του άνθρακα ως παράγοντα ενεργοποίησης για τη βελτίωση του πορώδους (μικροπορώδους), την αύξηση της ειδικής επιφάνειας και της ικανότητας προσρόφησης (Michaelis et al., 2023).



Εικόνα 21. Σχηματική αναπαράσταση πειραματικής πορείας σύνθεσης των HPCs.

9.1.2. Σύνθεση Ιεραρχημένων Πορωδών Ανθράκων ενισχυμένων με ετεροάτομα αζώτου (N-doped HPCs) αναλογίας (0.5:1:0.5) wt% (LUDOX SM30)

○ 1^ο Στάδιο: Λυοφιλιωποίηση

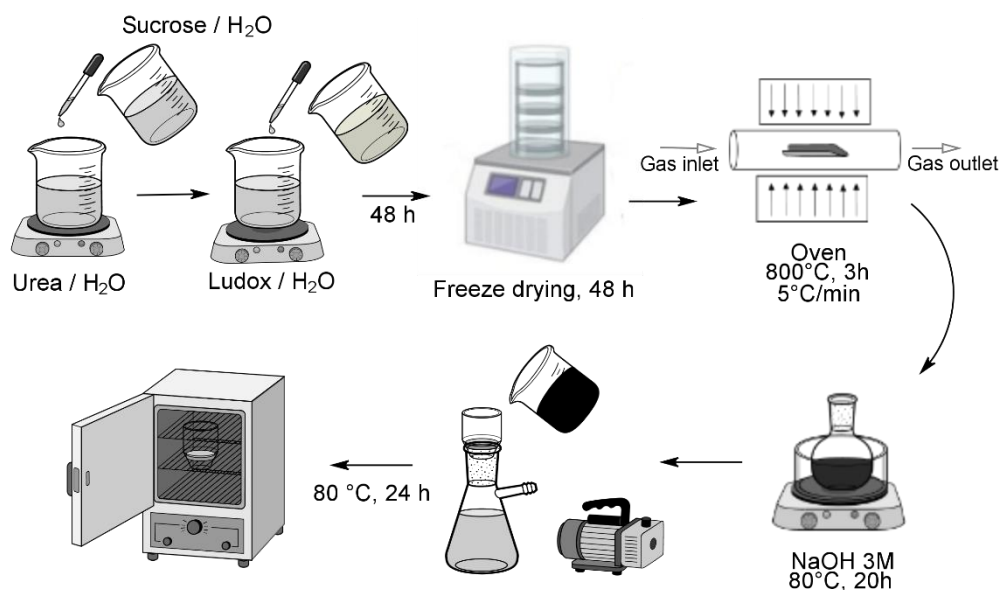
Σε 30 ml απεσταγμένο νερό (H₂O) διαλύθηκαν με τη χρήση λουτρού υπερήχων (sonicator) 3 g σουκρόζης (sucrose) μέχρις ότου το διάλυμα γίνει διαυγές. Σε 10 ml απεσταγμένο νερό (H₂O) προστέθηκαν 20 g διοξειδίου του πυριτίου Ludox (SM30) και ακολούθησε ανάδευση. Έπειτα, 3 g ουρίας (urea) προστέθηκαν σε 30 ml απεσταγμένο νερό. Το υδατικό διάλυμα σουκρόζης προστέθηκε στάγδην στο διάλυμα της ουρίας, όπου αναδεύτηκε για λίγα λεπτά και το μίγμα προστέθηκε έπειτα στο διάλυμα του διοξειδίου του πυριτίου στάγδην, όπου αναδεύτηκε για μία ημέρα. Μετά το πέρας της ανάδευσης, το μίγμα βυθίστηκε σε υγρό άζωτο για 10 min και ακολούθησε λυοφιλιωποίηση (freeze drying) για 48 ώρες.

○ 2^ο Στάδιο: Ανθρακοποίηση

Μετά το πέρας των 48 ωρών το δείγμα τοποθετήθηκε σε καψάκι οξειδίου του αργιλίου (alumina combustion boat) προκειμένου να πυρολυθεί σε σωληνωτό φούρνο CVD στους 800°C για 3 ώρες, υπό αδρανή ατμόσφαιρα (ατμόσφαιρα αργού Ar), με ρυθμό θέρμανσης 5°C/min.

ο 3^ο Στάδιο: Απομάκρυνση διοξειδίου του πυριτίου

Το ανθρακοποιημένο δείγμα που λήφθηκε μετά τον φούρνο προστέθηκε σε διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH, 3 M), τοποθετήθηκε σε ελαιόλουτρο και ακολούθησε ανάδευση στους 80°C για 20 ώρες. Στη συνέχεια ακολούθησε διήθηση του διαλύματος (με διηθητικό φίλτρο No 4) με τη χρήση αντλίας κενού και εκπλύσεις με απεσταγμένο νερό, μέχρις ότου η τιμή pH του διηθήματος προσεγγίσει εκείνη του απεσταγμένου νερού. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ξήρανση στους 80°C για 24 ώρες.



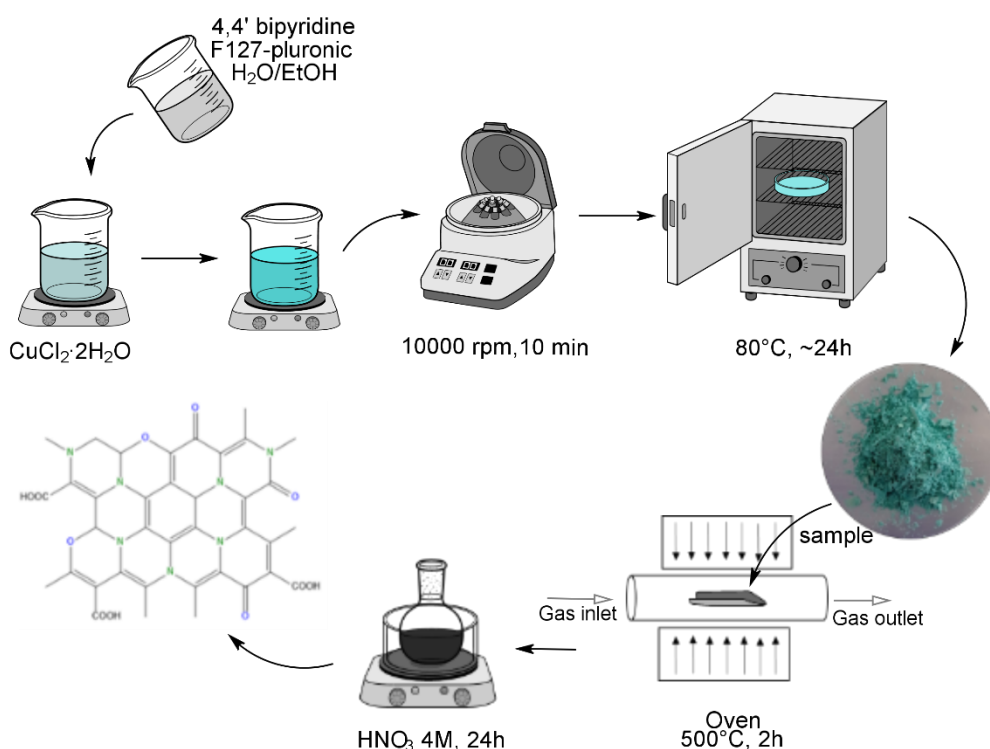
Εικόνα 22. Σχηματική αναπαράσταση πειραματικής πορείας σύνθεσης των N-doped HPCs.

9.2. Σύνθεση Κυβοειδών Πορώδους Άνθρακα (PCC)

Παρασκευάστηκε διάλυμα νερού/αιθανόλης αναλογίας (1: 17) αναμειγνύοντας 37.6 ml αιθανόλης (ethanol absolute, EtOH) και 2.2 ml απεσταγμένο νερό (H₂O). Στη συνέχεια παρασκευάστηκε διάλυμα A προσθέτοντας 0.624 g 4,4'- bipyridine και 0.4 g F127-pluronic στο διάλυμα EtOH/H₂O και ακολούθησε ανάδευση για 20 min. Παρασκευάστηκε διάλυμα B (5.6 mM CuCl₂·2H₂O), προσθέτοντας 0.344 g CuCl₂·2H₂O σε 360 ml απεσταγμένο νερό, το οποίο αναδεύτηκε για 20 min. Έπειτα προστέθηκε το διάλυμα A στο διάλυμα B υπό έντονη ανάδευση, όπου μέσα σε 30 s παρατηρήθηκε ο αποχρωματισμός και παρέμεινε υπό ανάδευση για 24 ώρες. Μετά το πέρας των ωρών έγινε φυγοκέντρηση (10000 rpm, 10 min), ακολούθησαν 3 εκπλύσεις με απεσταγμένο νερό (8500 rpm, 10 min) και ξήρανση στους 80°C για 24 ώρες.

Μετά την ξήρανση το δείγμα τοποθετήθηκε σε καψάκι οξειδίου του αργιλίου (alumina combustion boat) προκειμένου να πυρολυθεί σε σωληνωτό φούρνο CVD στους 500°C για 2 ώρες, υπό αδρανή ατμόσφαιρα (ατμόσφαιρα αργού Ar), με ρυθμό θέρμανσης 1°C/min.

Το δείγμα που λήφθηκε μετά τον φούρνο προστέθηκε σε διάλυμα νιτρικού οξέος (HNO_3 , 4 M) και ακολούθησε ανάδευση για 24 ώρες. Στη συνέχεια ακολούθησε διήθηση του διαλύματος (με διηθητικό φίλτρο No 4) με τη χρήση αντλίας κενού και εκπλύσεις με απεσταγμένο νερό, μέχρις ότου η τιμή pH του διηθήματος να προσεγγίσει εκείνη του απεσταγμένου νερού. Τέλος, πραγματοποιήθηκε ξήρανση σε θερμοκρασία δωματίου για 24 ώρες.



Εικόνα 23. Σχηματική αναπαράσταση πειραματικής πορείας σύνθεσης των PCCs.

9.3. Μη ομοιοπολική ακινητοποίηση bCA στα HPCs

Για τη μη ομοιοπολική ακινητοποίηση της bCA στα HPCs ζυγίζονται αρχικά 1 mg HPCs (φορέα ακινητοποίησης), προστίθενται σε 4 ml phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) και διασπείρονται σε λουτρό υπερήχων για 30 min. Στη συνέχεια προστίθεται 1 ml phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) που εμπεριέχει 0.5, 1 ή 2 mg καθαρού ενζύμου bCA (bovine Carbonic Anhydrase) (μελετήθηκαν τρεις διαφορετικές αναλογίες) και το μίγμα επώαζεται στους 30°C για 1 h υπό ανάδευση (180 rpm). Μετά το πέρας της επώασης ακολουθεί φυγοκέντρηση σε

4000 rpm για 10 min. Από το σχηματιζόμενο υπερκείμενο φυλάσσεται 1 ml για τον προσδιορισμό της απόδοσης ακινητοποίησης. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις με 1 ml phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) σε 12000 rpm στους 4°C για 5 min, ξήρανση του δείγματος υπό κενό σε Speedvac σε θερμοκρασία δωματίου και αποθήκευση σε silica gel στους 4°C.

9.4. Μη ομοιοπολική ακινητοποίηση bCA στα N-doped HPCs

Για τη μη ομοιοπολική ακινητοποίηση της bCA στα N-doped HPCs ζυγίζονται αρχικά 1 mg N-doped HPCs, προσθέτονται σε 4 ml phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) και διασπείρονται σε λουτρό υπερήχων για 30 min. Στη συνέχεια προστίθεται 1 ml phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) που εμπεριέχει 0.5, 1 ή 2 mg καθαρού ενζύμου bCA (bovine Carbonic Anhydrase) (μελετήθηκαν τρεις διαφορετικές αναλογίες) και το μίγμα επωάζεται στους 30°C για 1 h υπό ανάδευση (180 rpm). Μετά το πέρας της επώασης ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 4000 rpm για 10 min. Από το σχηματιζόμενο υπερκείμενο φυλάσσεται 1 ml για τον προσδιορισμό του ποσοστού της ακινητοποίησης. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις με 1 ml phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) σε 12000 rpm στους 4°C για 5 min, ξήρανση του δείγματος υπό κενό σε Speedvac σε θερμοκρασία δωματίου και αποθήκευση σε silica gel στους 4°C.

9.5. Μη ομοιοπολική ακινητοποίηση bCA στα PCCs

Για τη μη ομοιοπολική ακινητοποίηση της bCA στα PCCs ζυγίζονται αρχικά 4 mg PCCs (φορέα ακινητοποίησης), διασπείρονται σε 4 ml phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) σε λουτρό υπερήχων για 30 min. Στη συνέχεια προστίθεται 1 ml phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) που εμπεριέχει 0.3, 0.4 ή 0.6 mg καθαρού ενζύμου bCA (bovine Carbonic Anhydrase) (μελετήθηκαν τρεις διαφορετικές αναλογίες) και το μίγμα επωάζεται στους 30°C για 1 h υπό ανάδευση (180 rpm). Μετά το πέρας της επώασης ακολουθεί φυγοκέντρηση σε 4000 rpm για 10 min. Από το σχηματιζόμενο υπερκείμενο φυλάσσεται 1 ml για τον προσδιορισμό του ποσοστού της ακινητοποίησης. Ακολουθούν δύο εκπλύσεις με 1 ml phosphate buffer (50 mM, pH 7.5) σε 12000 rpm στους 4°C για 5 min, ξήρανση του δείγματος υπό κενό σε Speedvac σε θερμοκρασία δωματίου και αποθήκευση σε silica gel στους 4°C.

9.6. Ομοιοπολική ακινητοποίηση bCA στα PCCs

Η bCA ακινητοποιήθηκε στα PCCs με τη βοήθεια παραγόντων σύζευξης όπως είναι το EDS και το NHS, παράγοντες που δύναται να συνδέσουν τις ελεύθερες υδροξυλομάδες ή καρβοξυλομάδες του νανοϋλικού με τις ελεύθερες αμινομάδες του ενζύμου (Lau et al., 2014). Για την ομοιοπολική ακινητοποίηση της bCA στα PCCs ζυγίζονται αρχικά 4 mg PCCs (φορέα ακινητοποίησης) και διασπείρονται σε 6 ml διαλύματος HEPES (50 mM, pH 7.5) σε λουτρό υπερήχων για 30 min. Μετά τη διασπορά των PCCs ακολούθησε η προσθήκη 1.2 ml υδατικού διαλύματος EDC (από αρχικό διάλυμα $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) και 2.3 ml υδατικού διαλύματος NHS (από αρχικό διάλυμα $50 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) και έπειτα επώαση στους 30°C για 30 min υπό ανάδευση. Προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια των παραγόντων σύζευξης EDC και NHS, ακολούθησε φυγοκέντρωση στις 4.000 rpm για 10 min για την απομάκρυνση του νανοϋλικού και έπειτα τρεις εκπλύσεις με διάλυμα HEPES 50 mM, pH 7.5. Πραγματοποιήθηκε επαναδιασπορά των ενεργοποιημένων νανοϋλικών σε 4 ml διαλύματος HEPES 50 mM, pH 7.5. Στη συνέχεια προστίθεται 1 ml διαλύματος HEPES (50 mM, pH 7.5) που εμπεριέχει 0.3 ή 0.5 mg καθαρού ενζύμου bCA (bovine Carbonic Anhydrase) (μελετήθηκαν δύο διαφορετικές αναλογίες) και το μίγμα επωάζεται στους 30°C για 1 h υπό ανάδευση (180 rpm). Οι νανοβιοκαταλύτες που σχηματίστηκαν συλλέχθηκαν με φυγοκέντρωση στις 4.000 rpm για 10 min. Το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε για προσδιορισμό της απόδοσης της ακινητοποίησης και ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις με διάλυμα HEPES (50 mM, pH 7.5) σε 12000 rpm στους 4°C για 5 min, ξήρανση του δείγματος υπό κενό σε Speedvac σε θερμοκρασία δωματίου και αποθήκευση σε silica gel στους 4°C .

9.7. Μελέτη της ενζυμικής δραστηρότητας της ελεύθερης bCA

Η δραστηρότητα του ελεύθερου ενζύμου προσδιορίστηκε μέσω της υδρόλυσης ενός υποστρώματος και συγκεκριμένα του οξικού π-νιτροφαινυλεστέρα (p-NPA). Η υδρόλυση του συγκεκριμένου υποστρώματος οδηγεί στον σχηματισμό οξικού οξέος (acetic acid, CH_3COOH) και π-νιτροφαινόλης (p-Nitrophenol, pNP). Η παραγωγή του προϊόντος της π-νιτροφαινόλης δύναται να προσδιοριστεί φωτομετρικά μέσω της αύξησης της απορρόφησης σε μήκος κύματος 405 nm. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση φασματοφωτόμετρου Cary 60 UV-Vis Spectrophotometer της εταιρείας Agilent Technologies, το οποίο είναι συνδεδεμένο με σύστημα ελέγχου της θερμοκρασίας μονής κυψέλης (Cary single cell peltier accessory) καθώς και με εξωτερικό ανακυκλοφορητή νερού (PCB 1500 Peltier System-Cryobath) της ίδιας εταιρείας. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 30°C και οι τιμές των απορροφήσεων λήφθηκαν

στα 405 nm, κάθε 5 s για συνολικό χρονικό διάστημα 3 min. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε κυψελίδα χαλαζία, με τις μετρήσεις να έχουν επαναληφθεί συνολικά τρεις φορές. Στην κυψελίδα προστέθηκαν 5 µg/ml ενζύμου και 4.5 mM p-NPA, που συμπληρώθηκε με Tris-HCL buffer 0.05 M, pH 7.5 μέχρι τελικό όγκο 1 ml. Η ενζυμική δραστηριότητα προσδιορίστηκε βάσει της αρχικής ταχύτητας παραγωγής της π-νιτροφαινόλης μέσω των καμπυλών απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου. Ως ένα Unit (U) ορίζεται η ποσότητα της καρβονικής ανυδράσης που απαιτείται για την απελευθέρωση ενός µmole p-NP ανά λεπτό στις παραπάνω συνθήκες αντίδρασης. Ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης της π-νιτροφαινόλης ήταν ίσος με 17189 M⁻¹cm⁻¹ (Xiao et al., 2022).

9.8. Μελέτη της θερμικής σταθερότητας της ελεύθερης bCA

Η μελέτη της θερμικής σταθερότητας της ελεύθερης bCA υλοποιήθηκε στους 30, 40 και 50°C μέσω της μέτρησης της εναπομένουσας δραστηριότητας ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (0, 1, 3, 5 και 24 h). Ειδικότερα, η μελέτη της θερμικής σταθερότητας διεξάχθηκε παρουσία του p-NPA σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0.025 M, pH 7.5. Σε χρόνο μηδέν δημιουργήθηκε stock ενζύμου 0.5 mg/mL το οποίο επώαστηκε σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες (30, 40, 50 °C) υπό ανάδευση (750 rpm). Σε χρόνο μηδέν και μετά από 1, 3, 5 και 24 h λήφθηκαν δείγματα από το stock του ενζύμου όπου ψύχονταν απευθείας σε πάγο για 1 min. Ακολουθούσε δοκιμή της ενζυμικής δραστηριότητας μέσω χρήσης του p-NPA. Οι αντιδράσεις έγιναν σε κυψελίδα χαλαζία και η δραστηριότητα του ενζύμου προσδιορίστηκε κατά ανάλογο τρόπο που περιεγράφηκε στην προηγούμενη υποενότητα.

Η εναπομένουσα δραστηριότητα υπολογίστηκε σύμφωνα με τον ακόλουθο τύπο:

$$\text{Εναπομένουσα δραστηριότητα (\%)} = 100\% \cdot \frac{\text{Ταχύτητα παραγωγής προϊόντος μετά την επώαση}}{\text{Ταχύτητα παραγωγής προϊόντος σε χρόνο } t_0}$$

9.9. Προσδιορισμός των κινητικών σταθερών K_m, V_{max} της ελεύθερης bCA

Ο προσδιορισμός των κινητικών σταθερών της ελεύθερης καρβονικής ανυδράσης βασίζεται στον προσδιορισμό της αρχικής ταχύτητας της σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το p-NPA. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν σε φωτόμετρο Shimadju (UV-1601-, UV-visible), το οποίο είναι συνδεδεμένο σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 30 °C. Οι μετρήσεις απορρόφησης λήφθηκαν κάθε 1 s για συνολικό χρόνο 5

min και μετρήθηκε η αύξηση της απορρόφησης του p-NP στα 405 nm. Ο προσδιορισμός της αρχικής ταχύτητας των ενζυμικών αντιδράσεων για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος πραγματοποιήθηκε μέσω της εύρεσης της κλίσης του γραμμικού τμήματος που προκύπτει από την καμπύλη αύξησης της απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου για την εκάστοτε αντίδραση. Ειδικότερα, προστέθηκαν σε κυψελίδα χαλαζία 5 µg/ml ενζύμου, p-NPA με εύρος τελικής συγκέντρωσης 0-4.5 mM και ο υπόλοιπος όγκος συμπληρώθηκε με Tris-HCl 0.05 M pH 7.5 μέχρι τελικό όγκο 1 ml. Οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν. Ως ένα unit (U) της bCA ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση ενός µmole p-NP ανά λεπτό στις παραπάνω συνθήκες αντίδρασης. Ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης της π-νιτροφαινόλης ήταν ίσος με $17189 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Xiao et al., 2022). Τέλος, ακολουθήσε ο προσδιορισμός των φαινόμενων K_m , V_{max} .

9.10. Προσδιορισμός της απόδοσης της ακινητοποίησης της bCA

Ο προσδιορισμός του ποσοστού ακινητοποίησης της bCA στους φορείς ακινητοποίησης (HPCs, N-doped HPCs και PCCs) πραγματοποιήθηκε μέσω του προσδιορισμού της ενζυμικής δραστηριότητας του υπερκειμένου ακινητοποίησης που προέκυψε μετά την επώαση, μέσω προσδιορισμού δηλαδή της πρωτεΐνης που δεν έχει ακινητοποιηθεί, καθιστώντας εφικτό με τον τρόπο αυτό τον προσδιορισμό του ποσοστού του ακινητοποιημένου ενζύμου. Ο προσδιορισμός της πρωτεΐνης έγινε με τη μέθοδο BCA (Bicinchoninic Acid Assay), μέθοδο που προτάθηκε από τον Smith και τους συναδέλφους του το 1985 και βασίζεται στην αναγωγή των ιόντων Cu^{2+} σε Cu^+ από την πρωτεΐνη παρουσία των πεπτιδικών δεσμών και τον προσδιορισμό του Cu^+ μέσω του σχηματισμού ενός συμπλόκου μεταξύ των ιόντων Cu^+ και του bicinchoninic acid (BCA), το οποίο απορροφά στα 562 nm (Cortés-Ríos et al., 2020). Η ποσοτικοποίηση της πρωτεΐνης γίνεται με χρήση καμπύλης αναφοράς που δημιουργήθηκε με την BSA (Bovine Serum Albumin) ως πρότυπο. Η απόδοση υπολογίζεται από τον τύπο:

$$a(\%) = 100 \cdot \left(1 - \frac{\text{Συγκέντρωση πρωτεΐνης στο υπερκείμενο ακινητοποίησης}}{\text{Αρχική συγκέντρωση πρωτεΐνης}}\right)$$

Σε μια τυπική μέτρηση αναμιγνύονται 200 µL του αντιδραστηρίου BCA (αναλογία μερών A προς B 50:1) και 25 µl πρωτεϊνικού διαλύματος. Το διάλυμα επώαζεται για 30 min στους 37°C. Η απορρόφηση μετρείται στα 562 nm. Η ποσοτικοποίηση των απορροφήσεων που καταγράφηκαν επιτυγχάνεται μέσω εφαρμογής της πρότυπης καμπύλης που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό του ενζυμικού φορτίου, με την εξίσωση αυτής να είναι:

$$y = 0,0011 \cdot x + 0.1084$$

Όπου y η απορρόφηση του δείγματος στα 562 nm και x η συγκέντρωση της πρωτεΐνης σε $\mu\text{g/ml}$.

9.11. Μελέτη δραστηριότητας της ακινητοποιημένης bCA

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας της ακινητοποιημένης bCA στους στερεούς φορείς ακινητοποίησης (HPCs, N-doped HPCs και PCCs) πραγματοποιήθηκε με τη χρήση του υποστρώματος p-NPA, παρατηρώντας την απορρόφηση του χρωμογόνου προϊόντος p-NP. Αρχικά, ορισμένη ποσότητα ακινητοποιημένου νανοβιοκαταλύτη (1 mg για την περίπτωση bCA-HPC και bCA-N-doped HPC καθώς και 2 mg για τη περίπτωση του νανοβιοκαταλύτη bCA-PCC) διασπείρεται σε buffer Tris-HCl 0.05 M pH 7.5 με τη βοήθεια λουτρού υπερήχων και ακολουθεί η προσθήκη του p-NPA με τελική συγκέντρωση 4.5 mM σε τελικό όγκο 1 mL. Το μίγμα επωάζεται στους 30 °C, στις 750 rpm με συνολικό χρόνο αντίδρασης 1 min και στη συνέχεια φυγοκεντρείται για 2 min στις 15000 rpm. Φωτομετρούνται 200 μl του υπερκείμενου της αντίδρασης στα 405 nm σε πηγαδάκια μικροπλάκας στην ELISA, με τις μετρήσεις να επαναλαμβάνονται τρεις φορές. Πραγματοποιήθηκαν επίσης και οι μετρήσεις των τυφλών δειγμάτων (blanks), τα οποία περιείχαν HPCs, N-doped HPCs και PCCs χωρίς ένζυμο. Ως ένα unit (U) του νανοβιοκαταλυτικού συστήματος ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση ενός μmol p-NP ανά λεπτό στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες. Ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης της π-νιτροφαινόλης ήταν ίσος με $17189 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Xiao et al., 2022).

9.12. Μελέτη θερμικής δραστηριότητας (Thermal activity) της ελεύθερης bCA

Η μελέτη της θερμικής δραστηριότητας της ελεύθερης καρβονικής ανυδράσης (bCA) πραγματοποιείται σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το p-NPA. Αρχικά, κατάλληλη ποσότητα ελεύθερου ενζύμου (10 $\mu\text{g/mL}$) διαλύεται στο ρυθμιστικό διάλυμα και το μίγμα επωάζεται σε διαφορετικές θερμοκρασίες (25-70°C) για 1 λεπτό. Το υπόστρωμα p-NPA προστίθεται στο ενζυμικό διάλυμα σε συνολικό όγκο αντίδρασης 1 mL. Η αντίδραση διεξάγεται υπό ελεγχόμενες θερμοκρασιακές συνθήκες. Μετά το πέρας του χρόνου αντίδρασης το μίγμα φυγοκεντρείται και 200 μl από το υπερκείμενο μετρούνται φωτομετρικά στα 405 nm σε μικροπλάκα ELISA. Οι μετρήσεις επαναλαμβάνονται

τρεις φορές για κάθε θερμοκρασία, ενώ πραγματοποιούνται και τυφλές μετρήσεις (blanks) χωρίς την παρουσία ενζύμου. Ως ένα Unit (U) ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την παραγωγή 1 μmole p-NP ανά λεπτό στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες. Ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης του p-NP είναι ίσος με $17189 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

9.13. Μελέτη θερμικής δραστηριότητας (Thermal activity) του νανοβιοκαταλύτη bCA-HPC και bCA-N-doped HPC

Η μελέτη της θερμικής δραστηριότητας των νανοβιοκαταλυτών συστημάτων bCA-HPC και bCA-N-doped HPC πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0.05 M pH 7.5, με τη χρήση του υποστρώματος p-NPA. Για τον νανοβιοκαταλύτη bCA-HPC, η αναλογία μάζας ενζύμου προς υλικό ακινητοποίησης ήταν 0.5:1, ενώ για τον bCA-N-doped HPC 0.5:2, και η διαδικασία ακινητοποίησης περιλάμβανε χρόνο επώασης 1 ώρα. Σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκε η κατάλληλη ποσότητα νανοβιοκαταλύτη σε συνολικό όγκο αντίδρασης 1 ml. Το μίγμα επώαστηκε σε διαφορετικές θερμοκρασίες (30, 40, 50 και 60°C) για 1 λεπτό. Μετά το πέρας της αντίδρασης, το μίγμα φυγοκεντρήθηκε και 200 μL από το υπερκείμενο αναλύθηκαν φωτομετρικά στα 405 nm σε μικροπλάκα ELISA. Οι μετρήσεις επαναλήφθηκαν τρεις φορές για κάθε θερμοκρασία, ενώ πραγματοποιήθηκαν και τυφλές μετρήσεις (blanks) χωρίς ένζυμο. Ως ένα Unit (U) ορίστηκε η ποσότητα ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1 μmole p-NP ανά λεπτό στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες. Ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης του p-NP ήταν ίσος με $17189 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

9.14. Μελέτη δραστηριότητας του ακινητοποιημένου νανοβιοκαταλύτη bCA-HPC σε διαφορετικές τιμές pH

Η μελέτη της δραστηριότητας του ακινητοποιημένου νανοβιοκαταλύτη bCA-HPC πραγματοποιήθηκε σε διαφορετικές τιμές pH προκειμένου να αξιολογηθεί η καταλυτική του απόδοση υπό μεταβαλλόμενες συνθήκες. Το νανοβιοκαταλυτικό σύστημα εξετάστηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0.05 M σε θερμοκρασία 30°C , χρησιμοποιώντας ως υπόστρωμα το p-NPA. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε σε συνολικό όγκο 1 ml, με τις μετρήσεις να λαμβάνονται φωτομετρικά στα 405 nm ύστερα από φυγοκέντρωση. Οι τιμές pH του ρυθμιστικού διαλύματος που μελετήθηκαν ήταν 7.0, 7.5, 8.0 και 8.5.

9.15. Μελέτη επαναχρησιμοποίησης νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων

Μελετήθηκε η ικανότητα επαναχρησιμοποίησης των ακινητοποιημένων νανοβιοκαταλυτών σε συνεχόμενους κύκλους αντιδράσεων, καθώς ο νανοβιοκαταλύτης είναι δυνατό να ληφθεί μετά το πέρας της αντίδρασης μέσω φυγοκέντρωσης και να προσδιοριστεί η εναπομένουσα δραστηριότητα μετά από κάθε κύκλο αντίδρασης. Για τον προσδιορισμό της ικανότητας επαναχρησιμοποίησης των νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων μελετήθηκε η υδρόλυση του οξικού π-νιτροφαινυλεστέρα (p-NPA) στους 30°C σε ELISA plate στα 405 nm. Ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε Tris-HCl 0.05 M pH 7.5. Η εναπομένουσα δραστηριότητα των νανοβιοκαταλυτών προσδιορίστηκε μέσω της απορρόφησης της π-νιτροφαινόλης που παράγεται από την αντίδραση και μετρείται στα 405 nm σε φασματοφωτόμετρο μικροπλακών (ELISA). Μετά το πέρας κάθε κύκλου το δείγμα φυγοκεντρείται και το ίζημα που περιέχει το ακινητοποιημένο ένζυμο ξεπλένεται τρεις φορές με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα προκειμένου να απομακρυνθούν τα προϊόντα της αντίδρασης. Στη συνέχεια, ο νανοβιοκαταλύτης χρησιμοποιείται εκ νέου σε νέο διάλυμα υποστρώματος για τον επόμενο κύκλο αντίδρασης.

9.16. Μελέτη δέσμευσης CO₂ (CO₂ Sequestration) από την ελεύθερη και ακινητοποιημένη bCA

Η μελέτη δέσμευσης του CO₂ πραγματοποιήθηκε μέσω της καταλυτικής δράσης της καρβονικής ανυδράσης (bCA) για τη μετατροπή του CO₂ σε διττανθρακικά ανιόντα (HCO³⁻), τα οποία στη συνέχεια αντιδρούν με τα ιόντα ασβεστίου (Ca²⁺) για τον σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου (CaCO₃). Η ποσότητα ανθρακικού ασβεστίου που καθιζάνει χρησιμοποιείται ως δείκτης αξιολόγησης της αποτελεσματικότητας της δράσης του ενζύμου. Στα πειράματα περιλήφθηκαν τόσο η ελεύθερη όσο και η ακινητοποιημένη μορφή της bCA, με την τελευταία να έχει ενσωματωθεί στους φορείς PCCs και HPCs μέσω μη ομοιοπολικών μεθόδων ακινητοποίησης. Ειδικότερα, το ελεύθερο ένζυμο και ο νανοβιοκαταλύτης διαλυτοποιούνται σε 30 ml ρυθμιστικού διαλύματος Tris-HCl (0.2 M) CaCl₂ (0.1M) pH 10.5. Το σύστημα φτάνει σε κορεσμό έπειτα από παροχή CO₂ με ροή 150 ml/min για 1 λεπτό και στην συνέχεια φυγοκεντρείται στις 4000 rpm για 5 min. Ακολουθεί ξήρανση στους 80°C και ζύγιση του ιζήματος.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

10. Χαρακτηρισμός HPCs

10.1. Ποροσιμετρία N₂ - Μέθοδος Brunauer, Emmett και Teller (BET)

Οι τιμές της ειδικής επιφάνειας, της διαμέτρου και του όγκου των πόρων των HPCs, που παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί, προσδιορίστηκαν μέσω της ποροσιμετρίας αζώτου. Πρόκειται για νανοπορώδη υλικά που παρουσιάζουν εξαιρετικά υψηλή ειδική επιφάνεια (τουλάχιστον 1000 m²/g) και συνολικό όγκο πόρων (TPV) 2.2-5.8 cc/g, ενώ διαθέτουν μικρο-, μεσο- και μακρο-πορώδεις περιοχές.

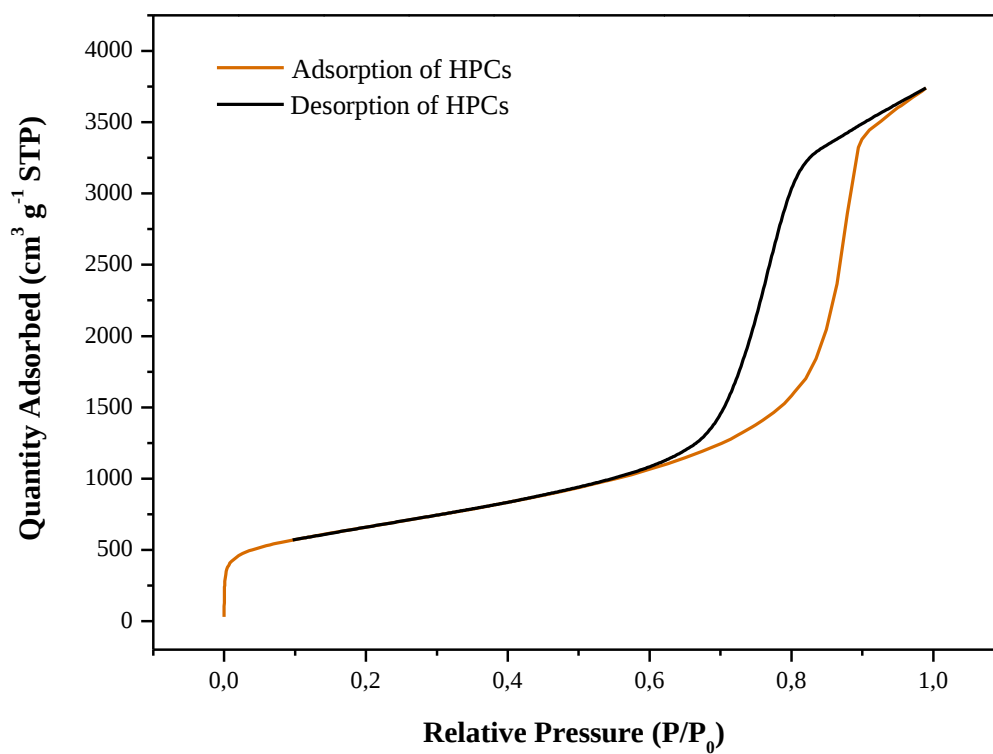
Συντέθηκαν δύο διαφορετικά είδη HPCs, με πηγή άνθρακα τη σουκρόζη και δύο διαφορετικά είδη διοξειδίου του πυριτίου (Ludox Colloidal Silica SM30 με μέγεθος σωματιδίων 7 nm και Ludox Colloidal Silica AS40 με μέγεθος σωματιδίων 22 nm). Για την περίπτωση των HPCs που συντέθηκαν με διοξείδιο του πυριτίου Ludox AS40 ακολούθησε περαιτέρω ενεργοποίηση για 8 ώρες με διοξείδιο του άνθρακα για την βελτίωση του πορώδους, την αύξηση της ειδικής επιφάνειας και της ικανότητας προσρόφησης.

Εξαιτίας της υψηλότερης ειδικής επιφάνειας (~2344 m²/g) και της βελτιωμένης ικανότητας προσρόφησης διοξειδίου, τα ενεργοποιημένα με διοξείδιο του άνθρακα HPCs επιλέχθηκαν για την ακινητοποίηση του ενζύμου bCA και μελετήθηκαν περαιτέρω. Επομένως στην παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία η αναφορά σε HPCs αφορά τα HPCs που έχουν ενεργοποιηθεί με CO₂.

Πίνακας 8. Τιμές της ειδικής επιφάνειας (S_{BET}), του συνολικού όγκου πόρων (TPV), του όγκου του μικροπορώδους (V_{micro}), του όγκου του μεσοπορώδους (V_{meso}) και του πλάτους των πόρων (pore width).

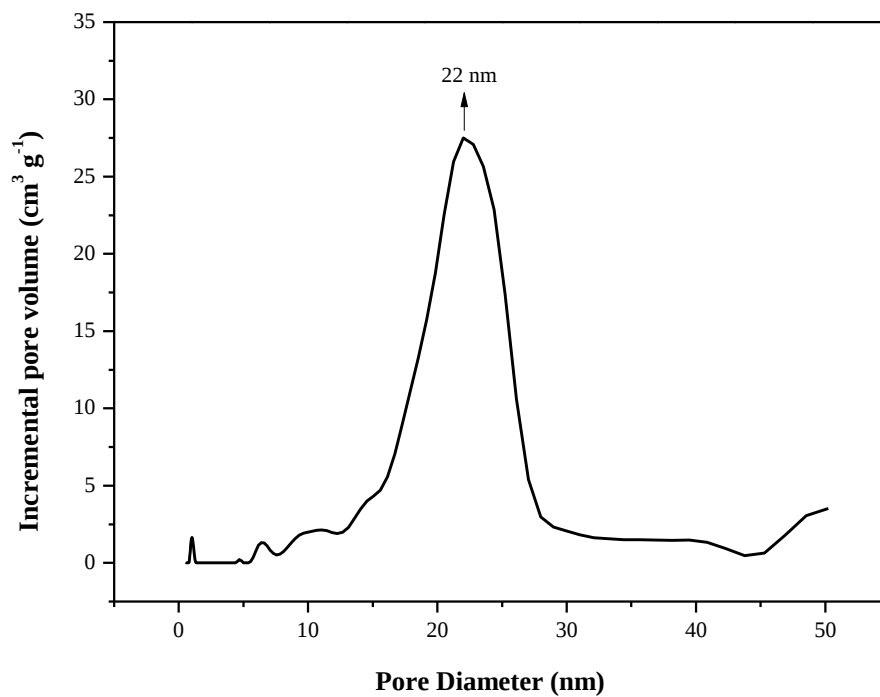
Material	S_{BET} (m ² /g)	TPV (cc/g)	V_{micro} (cc/g)	V_{meso} (cc/g)	Pore width (nm)
HPCs (Ludox SM30)	1088.3	2.2	0.2	2.0	11.1
HPCs (Ludox AS40)	1012.5	3.2	0.2	3.0	29.0
HPCs (Activated with CO ₂ HPC)	2343.8	5.8	0.6	5.2	22.0

Η ισόθερμος προσρόφησης-εκρόφησης για τα HPCs παρουσιάζεται στο παρακάτω γράφημα. Η απότομη αύξηση του όγκου του προσροφημένου αζώτου από το υλικό (sharp knee) σε εύρος χαμηλών πιέσεων ($P/P_0 < 0.1$) υποδηλώνει την παρουσία μικροπορώδους. Αντίστοιχα, η απότομη αύξηση σε πολύ υψηλές πιέσεις ($P/P_0 > 0.9$) υποδηλώνει την παρουσία μακροπορώδους.



Γράφημα 1. Ισόθερμος προσρόφησης-εκρόφησης για τα HPCs.

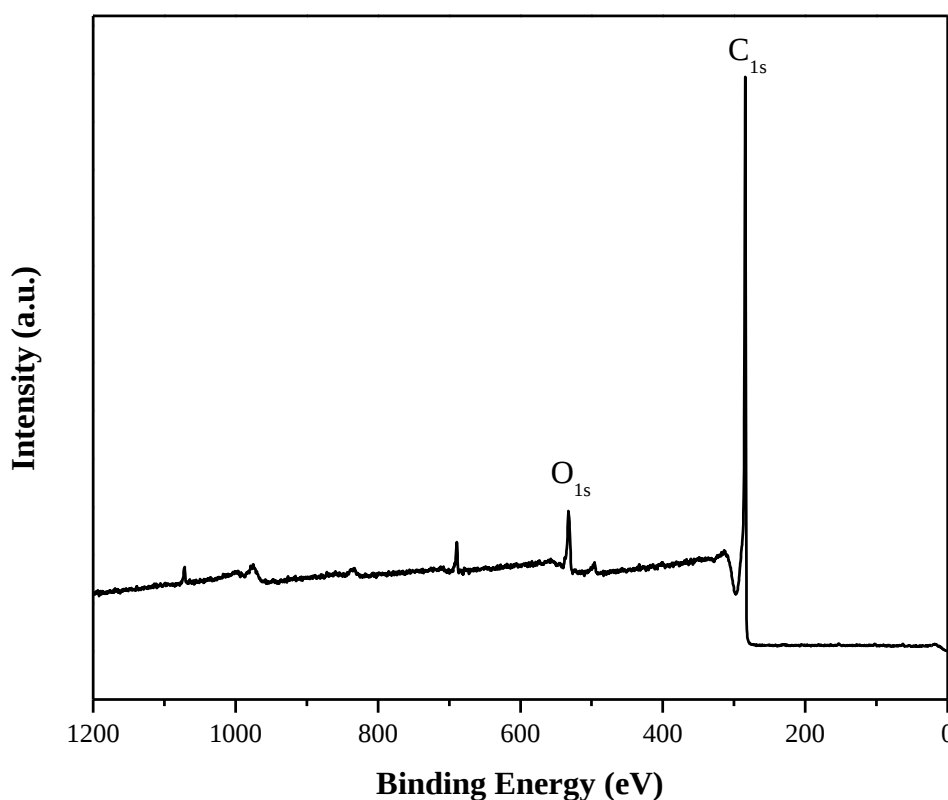
Η κατανομή του όγκου των πόρων παρουσιάζεται στο γράφημα που ακολουθεί, με τη διάμετρο των πόρων να κυμαίνεται στην περιοχή των 22 nm.



Γράφημα 2. Κατανομή του όγκου των πόρων για τα HPCs.

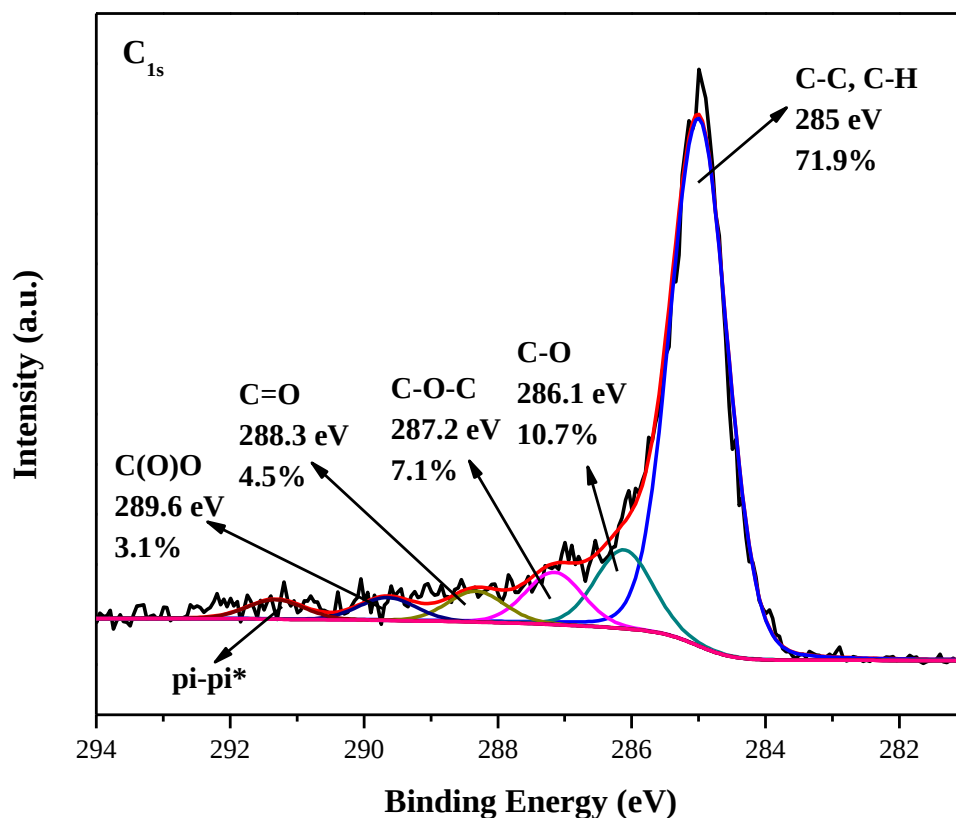
10.2. Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS)

Από το φάσμα ευρείας σάρωσης XPS δίνονται πληροφορίες για την στοιχειακή ανάλυση αλλά και την χημική κατάσταση της επιφάνειας των HPCs. Οι κορυφές που παρουσιάζονται στα 532 eV και στα 284 eV αντιστοιχούν στις χαρακτηριστικές κορυφές του οξυγόνου (O_2) και του άνθρακα (C) αντίστοιχα, με τη περιεκτικότητα κατά άτομο (% κ.α.) του O_2 και C να υπολογίζονται 5.7% και 94.3% αντίστοιχα.



Γράφημα 3. Φάσμα ευρείας σάρωσης XPS για τα HPCs.

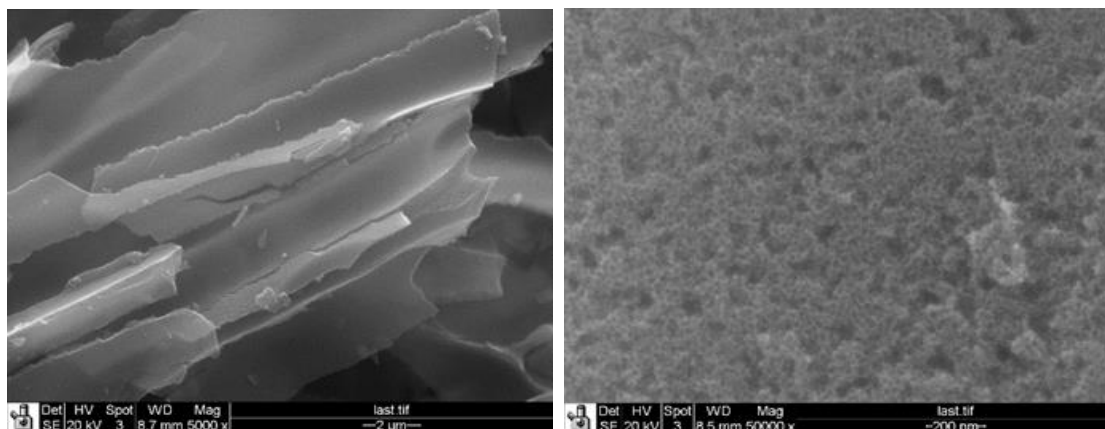
Για κάθε κορυφή στο ευρύ φάσμα ανάλυσης γίνεται περεταίρω ανάλυση. Ειδικότερα, το φάσμα του άνθρακα αποτελείται από έξι συνιστώσες, με την πρώτη στα 285 eV και ποσοστό 71.9% να αποδίδεται στους δεσμούς C-C και C-H, τη δεύτερη στα 286.1 eV να αντιστοιχεί σε δεσμούς C-O με ποσοστό 10.7%, τη τρίτη στα 287.2 eV σε δεσμούς C-O-C με ποσοστό 7.1%, τη τέταρτη στα 288.3 eV να αποδίδεται σε δεσμούς C=O με ποσοστό 4.5% και την πέμπτη κορυφή στα 289.6 eV να αποδίδεται στους δεσμούς C(O)O με ποσοστό 3.1%. Η έκτη κορυφή, σε υψηλές ενέργειες, οφείλεται σε μοριακές ηλεκτρονιακές μεταβάσεις $\pi-\pi^*$.



Γράφημα 4. Φάσμα του άνθρακα στα HPCs.

10.3. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)

Οι εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) που ακολουθούν παρέχουν σημαντικές πληροφορίες για τη μορφολογία και τη δομή των HPCs. Ειδικότερα, διακρίνουμε την πορώδη δομή τους με συνδεδεμένους πόρους μικρο-, μεσο και μακρο-κλίμακας, γεγονός που επιβεβαιώνει την ιεραρχημένη δομή τους. Η επιφάνεια φαίνεται σχετικά ανομοιόμορφη και τραχιά με αποτέλεσμα να αυξάνεται η ενεργή επιφάνεια του υλικού, ενώ διακρίνονται οι μεγάλοι μακροπόροι που παρουσιάζονται ως ανοίγματα και ρωγμές που διευκολύνουν την πρόσβαση σε βαθύτερες στρώσεις του υλικού. Στην εικόνα δεξιά είναι εμφανές το μεσοπορώδες του υλικού, το οποίο παρέχει αυξημένη επιφάνεια για την αλληλεπίδραση με τον βιοκαταλύτη και τη μετέπειτα βιοκαταλυτική διεργασία.



Εικόνα 24. Εικόνες SEM για τα HPCs.

11. Χαρακτηρισμός N-doped HPCs

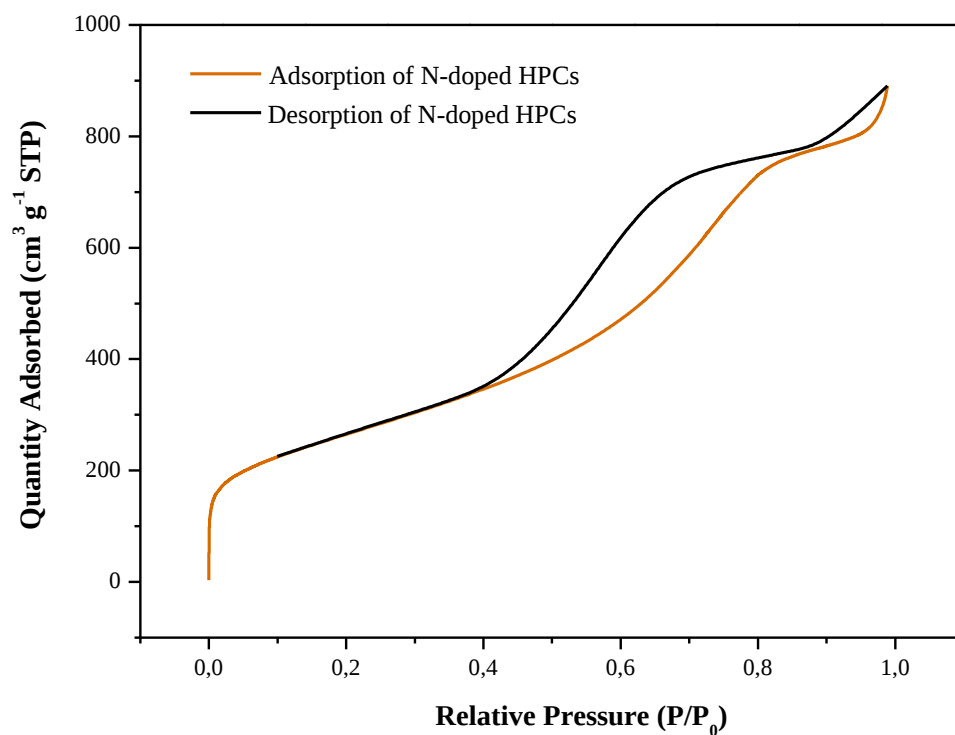
11.1. Ποροσιμετρία N₂ - Μέθοδος Brunauer, Emmett και Teller (BET)

Οι τιμές της ειδικής επιφάνειας, της διαμέτρου και του όγκου των πόρων των ενισχυμένων με ετεροάτομα αζώτου HPCs ή N-doped HPCs, που παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί, προσδιορίστηκαν μέσω της ποροσιμετρίας αζώτου. Πρόκειται για νανοπορώδη υλικά που παρουσιάζουν υψηλή ειδική επιφάνεια ($\sim 956 \text{ m}^2/\text{g}$) και συνολικό όγκο πόρων (TPV) 1.4 cc/g , ενώ διαθέτουν μικρο-, μεσο- και μακρο-πορώδεις περιοχές.

Πίνακας 9. Τιμές της ειδικής επιφάνειας (S_{BET}), του συνολικού όγκου πόρων (TPV), του όγκου του μικροπορώδους (V_{micro}), του όγκου του μεσοπορώδους (V_{meso}) και του πλάτους των πόρων (pore width) για τα N-doped HPCs.

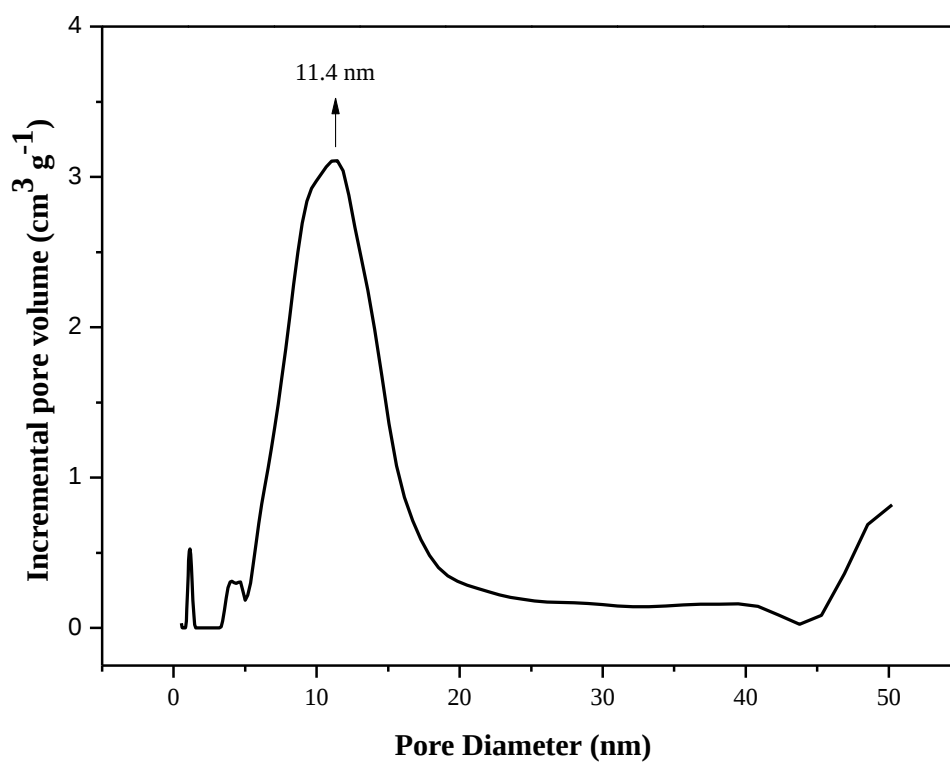
Material	$S_{\text{BET}} (\text{m}^2/\text{g})$	TPV (cc/g)	$V_{\text{micro}} (\text{cc/g})$	$V_{\text{meso}} (\text{cc/g})$	Pore width (nm)
N-doped HPCs	955.5	1.4	0.2	1.2	11.4

Η ισόθερμος προσρόφησης-εκρόφησης για τα N-doped HPCs παρουσιάζεται στο παρακάτω γράφημα. Η απότομη αύξηση του όγκου του προσροφημένου αζώτου από το υλικό (sharp knee) σε εύρος χαμηλών πιέσεων ($P/P_0 < 0.1$) υποδηλώνει την παρουσία μικροπορώδους. Αντίστοιχα, η απότομη αύξηση σε πολύ υψηλές πιέσεις ($P/P_0 > 0.9$) υποδηλώνει την παρουσία μακροπορώδους.



Γράφημα 5. Ισόθερμος προσρόφησης-εκρόφησης για τα *N*-doped HPCs.

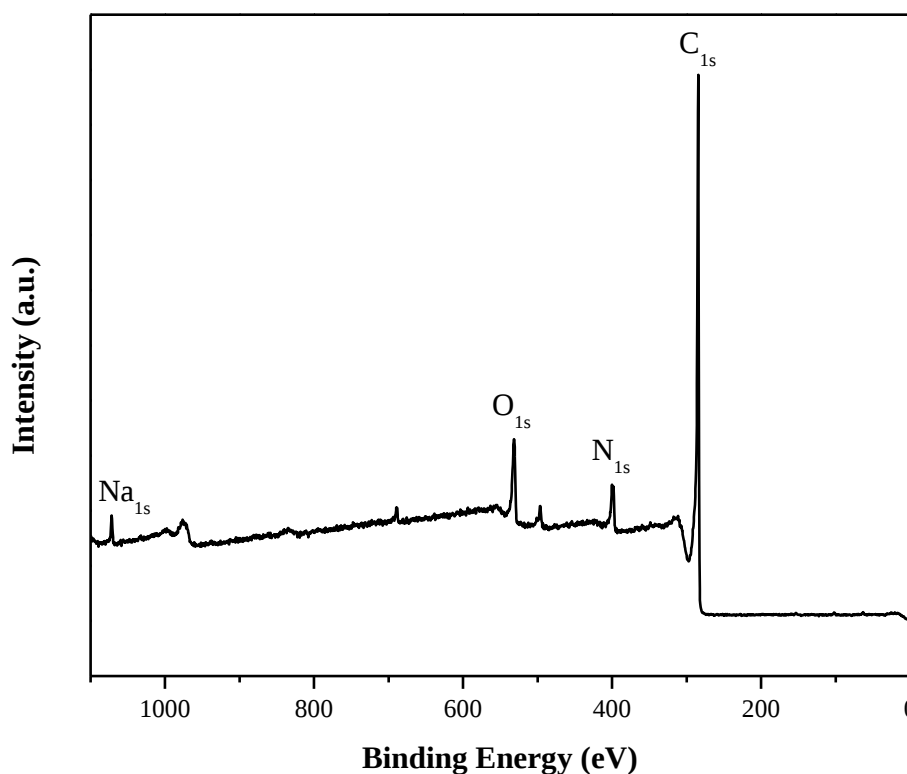
Η κατανομή του όγκου των πόρων παρουσιάζεται στο γράφημα που ακολουθεί, με τη διάμετρο των πόρων να κυμαίνεται στην περιοχή των 11.4 nm.



Γράφημα 6. Κατανομή όγκου πόρων για τα *N*-doped HPCs.

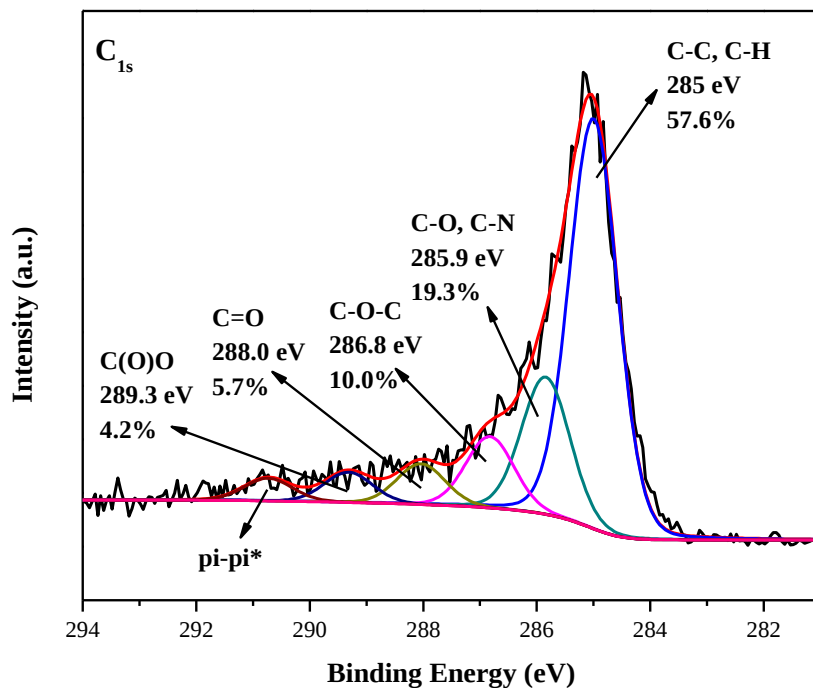
11.2. Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS)

Από το φάσμα ευρείας σάρωσης XPS δίνονται πληροφορίες για την στοιχειακή ανάλυση αλλά και τη χημική κατάσταση της επιφάνειας των N-doped HPCs. Οι κορυφές που παρουσιάζονται στα 284 eV, στα 400 eV και στα 532 eV αντιστοιχούν στις χαρακτηριστικές κορυφές του άνθρακα (C), του αζώτου (N) και του οξυγόνου (O₂) αντίστοιχα, με την περιεκτικότητα κατά άτομο (% κ.α.) του C, του N και του O₂ να υπολογίζονται 86.2%, 6.3% και 7.5% αντίστοιχα.



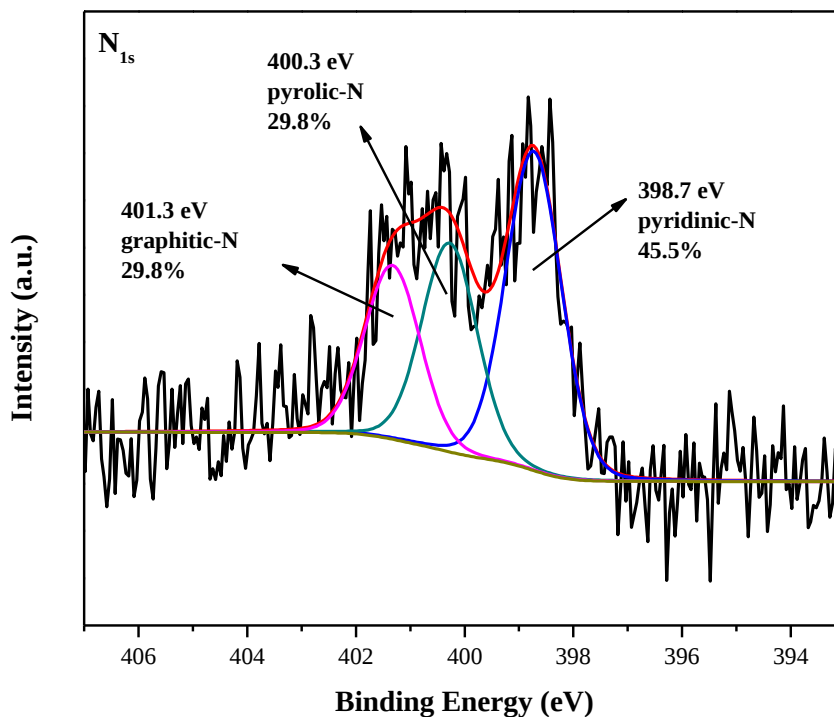
Γράφημα 7. Φάσμα ευρείας σάρωσης XPS για τα N-doped HPCs.

Για κάθε κορυφή στο ευρύ φάσμα ανάλυσης γίνεται περεταίρω ανάλυση. Ειδικότερα, το φάσμα του άνθρακα αποτελείται από έξι συνιστώσες, με την πρώτη στα 285 eV και ποσοστό 57.6% να αποδίδεται στους δεσμούς C-C και δεσμούς C-H, τη δεύτερη στα 285.9 eV να αντιστοιχεί σε δεσμούς C-O και δεσμούς C-N με ποσοστό 19.3%, τη τρίτη στα 286.8 eV σε δεσμούς C-O-C με ποσοστό 10.0%, τη τέταρτη στα 288 eV να αποδίδεται σε δεσμούς C=O με ποσοστό 5.7% και την πέμπτη κορυφή στα 289.3 eV να αποδίδεται στους δεσμούς C(O)O με ποσοστό 4.2%. Η έκτη κορυφή, σε υψηλές ενέργειες, οφείλεται σε μοριακές ηλεκτρονιακές μεταβάσεις π-π*.



Γράφημα 8. Φάσμα άνθρακα στα N-doped HPCs.

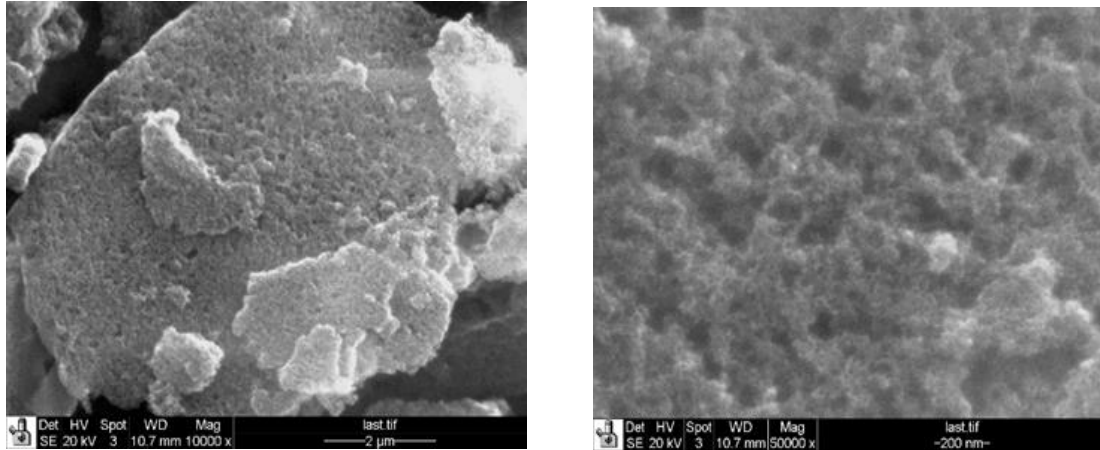
Αντίστοιχα, το φάσμα του αζώτου αποτελείται από τρεις συνιστώσες, με την πρώτη κορυφή στα 398.7 eV και ποσοστό 45.5% να αποδίδεται σε πυριδινικό άζωτο (pyridinic-N), τη δεύτερη στα 400.3 eV να αντιστοιχεί σε πυρολιτικό άζωτο (pyrolic-N) με ποσοστό 29.8% και τη τρίτη στα 401.3 eV να οφείλεται στο γραφιτικό άζωτο (graphitic-N) με ποσοστό 29.8%.



Γράφημα 9. Φάσμα αζώτου στα N-doped HPCs.

11.3. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)

Στις εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) που ακολουθούν παρουσιάζονται τα HPCs που έχουν ενισχυθεί με ετεροάτομα αζώτου (N-doped HPCs). Συγκεκριμένα παρατηρούμε την ιεραρχημένη πορώδη δομή του υλικού, με πόρους μικρο-, μεσο- και μακρο-διαστάσεων.



Εικόνα 25. Εικόνες SEM για τα N-doped HPCs.

12. Χαρακτηρισμός PCCs

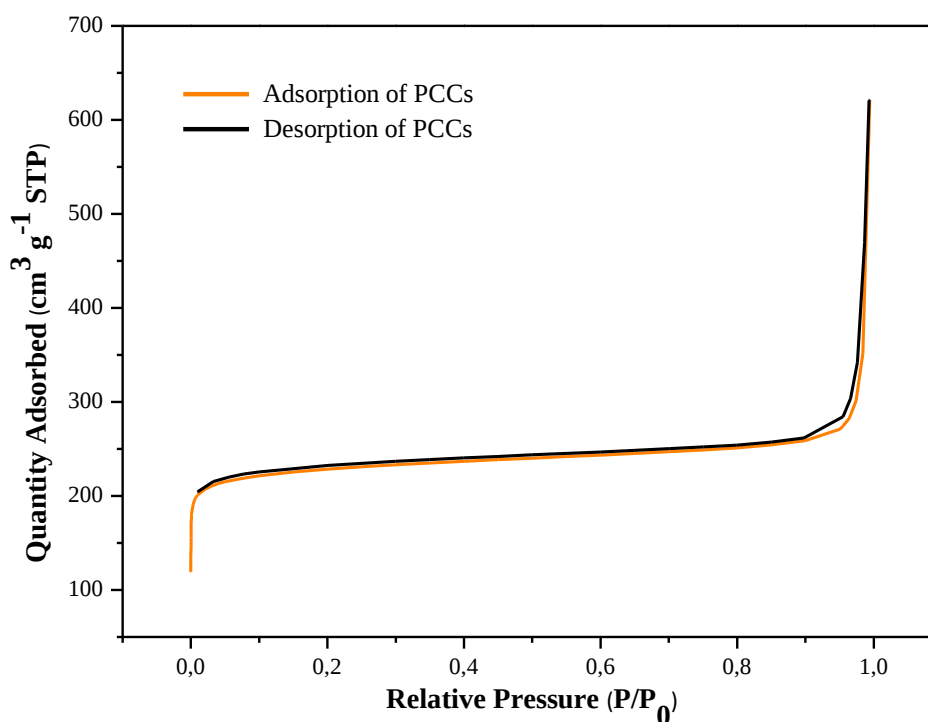
12.1. Ποροσιμετρία N₂ - Μέθοδος Brunauer, Emmett και Teller (BET)

Οι τιμές της ειδικής επιφάνειας, της διαμέτρου και του όγκου των πόρων των PCCs, που παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί, προσδιορίστηκαν μέσω της ποροσιμετρίας αζώτου. Τα PCCs παρουσιάζουν υψηλή ειδική επιφάνεια (898 m²/g) και συνολικό όγκο πόρων (TPV) 1.0 cc/g, ενώ διαθέτουν μικρο-, μεσο- και μακρο-πορώδεις περιοχές.

Πίνακας 10. Τιμές της ειδικής επιφάνειας (S_{BET}), του συνολικού όγκου πόρων (TPV), του όγκου του μικροπορώδους (V_{micro}), του όγκου του μεσοπορώδους (V_{meso}) και του πλάτους των πόρων (pore width) για τα PCCs.

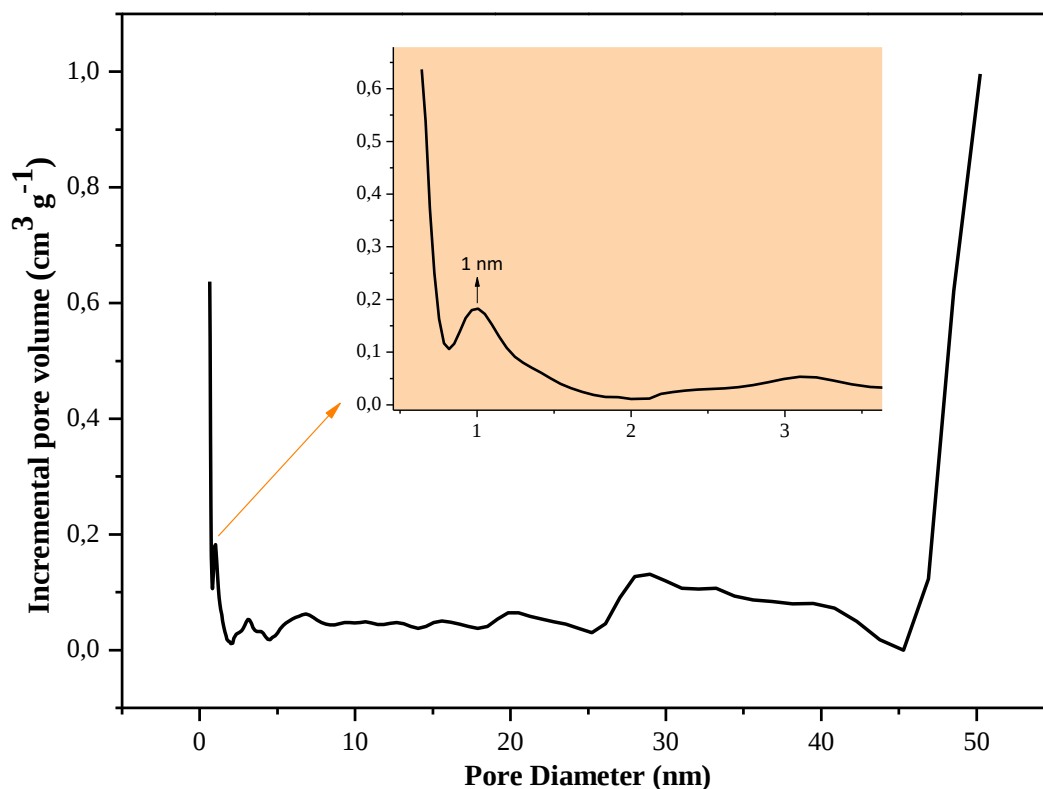
Material	S_{BET} (m ² /g)	TPV (cc/g)	V_{micro} (cc/g)	V_{meso} (cc/g)	Pore width (nm)
PCCs	898.0	1.0	0.3	0.7	1.0

Η ισόθερμος προσρόφησης-εκρόφησης για τα PCCs παρουσιάζεται στο παρακάτω γράφημα. Η απότομη αύξηση του όγκου του προσροφημένου αζώτου από το υλικό (sharp knee) σε εύρος χαμηλών πιέσεων ($P/P_0 < 0.1$) υποδηλώνει την παρουσία μικροπορώδους. Αντίστοιχα, η απότομη αύξηση σε πολύ υψηλές πιέσεις ($P/P_0 > 0.9$) υποδηλώνει την παρουσία μακροπορώδους.



Γράφημα 10. Ισόθερμος προσρόφησης-εκρόφησης για τα PCCs.

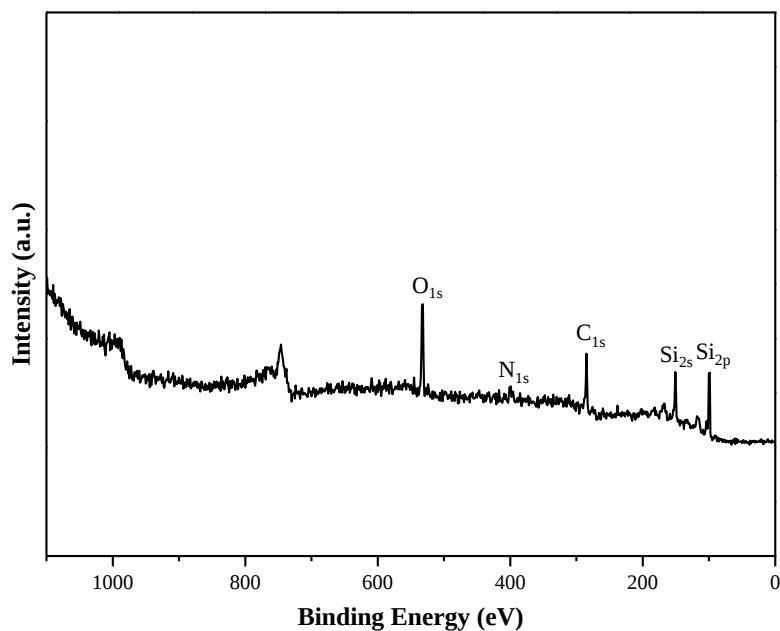
Η κατανομή του όγκου των πόρων παρουσιάζεται στο γράφημα που ακολουθεί, με τη διάμετρο των πόρων να κυμαίνεται στην περιοχή του 1 nm.



Γράφημα 11. Κατανομή όγκου πόρων για τα PCCs.

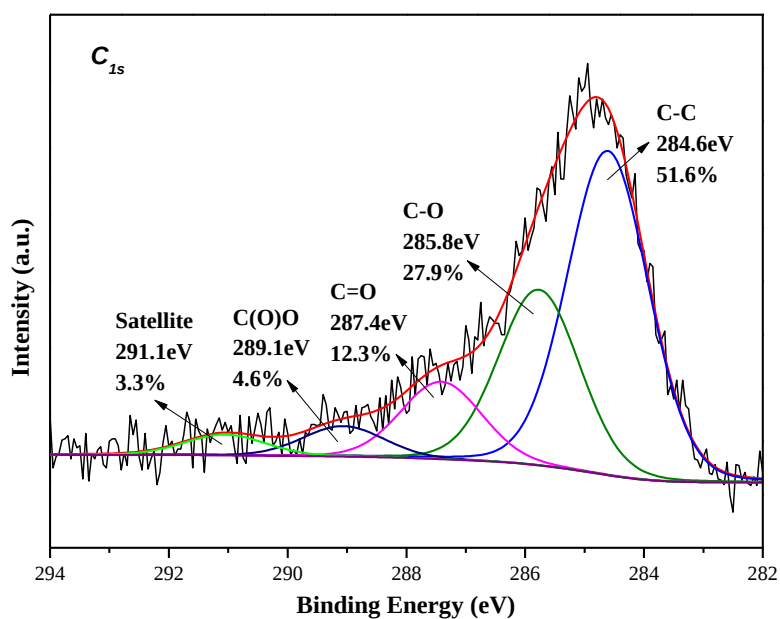
12.2. Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS)

Από το φάσμα ευρείας σάρωσης XPS δίνονται πληροφορίες για την στοιχειακή ανάλυση αλλά και τη χημική κατάσταση της επιφάνειας των PCCs. Οι κορυφές που παρουσιάζονται στα 532 eV, στα 399 eV και στα 285 eV αντιστοιχούν στις χαρακτηριστικές κορυφές του οξυγόνου (O₂), του αζώτου (N) και του άνθρακα (C) αντίστοιχα, με την περιεκτικότητα κατά άτομο (% κ.α.) του O₂, N και C να υπολογίζεται 33.4%, 8.2% και 58.4% αντίστοιχα. Οι κορυφές στα 151 eV και 100 eV αντιστοιχούν στο πυρίτιο (Si), που δεν υπάρχει στα νανοσωματίδια αλλά προέρχεται από το υπόστρωμα πυριτίου που χρησιμοποιείται κατά τη μέτρηση.



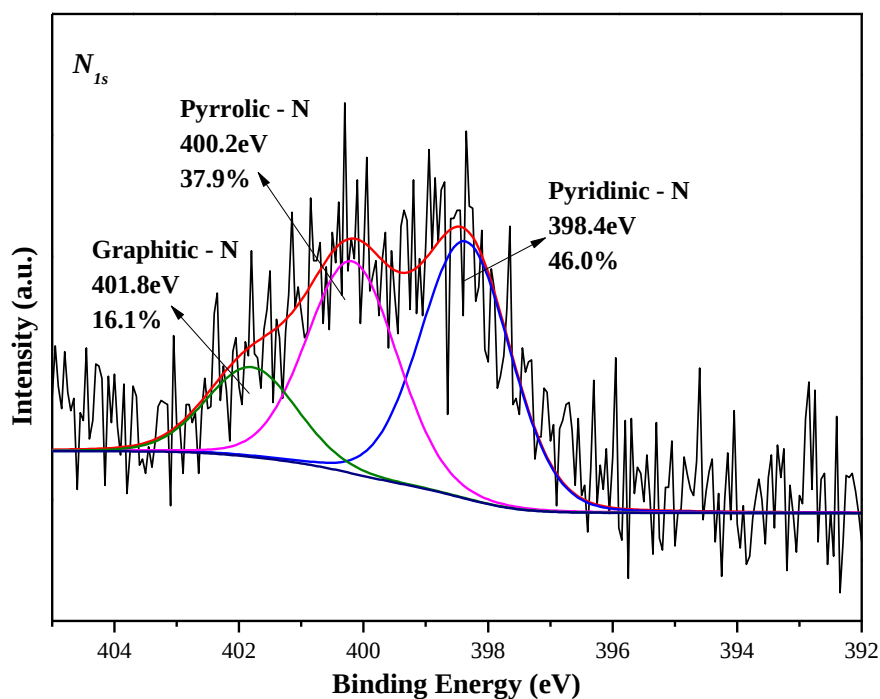
Γράφημα 12. Φάσμα ευρείας σάρωσης XPS για τα PCCs.

Για κάθε κορυφή στο ευρύ φάσμα ανάλυσης γίνεται περεταίρω ανάλυση. Ειδικότερα, το φάσμα του άνθρακα αποτελείται από πέντε συνιστώσες, με την πρώτη στα 284.6 eV και ποσοστό 51.6% να αποδίδεται στους δεσμούς C-C, τη δεύτερη στα 285.8 eV να αντιστοιχεί σε δεσμούς C-O με ποσοστό 27.9%, τη τρίτη στα 287.4 eV σε δεσμούς C=O με ποσοστό 12.3%, τη τέταρτη στα 289.1 eV να αποδίδεται σε δεσμούς C(O)O με ποσοστό 4.6% και την πέμπτη κορυφή στα 291.1 eV να αποδίδεται στην δομή satellite, η οποία είναι χαρακτηριστική για τη δομή των κύβων, με ποσοστό 3.3%.



Γράφημα 13. Φάσμα του άνθρακα για τα PCCs.

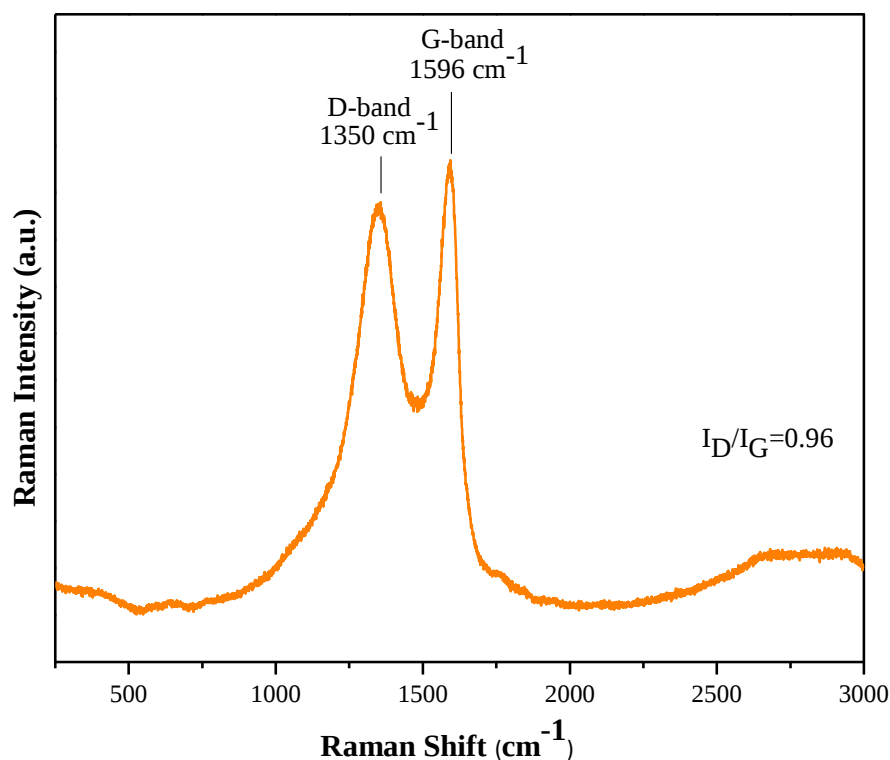
Αντίστοιχα, το φάσμα του αζώτου αποτελείται από τρεις συνιστώσες, με την πρώτη κορυφή στα 398.4 eV και ποσοστό 46.0% να αποδίδεται σε πυριδινικό άζωτο (pyridinic-N), τη δεύτερη στα 400.2 eV να αντιστοιχεί σε πυρολιτικό άζωτο (pyrrolic-N) με ποσοστό 37.9% και τέλος τη τρίτη στα 401.8 eV να οφείλεται στο γραφитικό άζωτο (graphitic-N) με ποσοστό 16.1%.



Γράφημα 14. Φάσμα του αζώτου για τα PCCs.

12.3. Φασματοσκοπία Raman

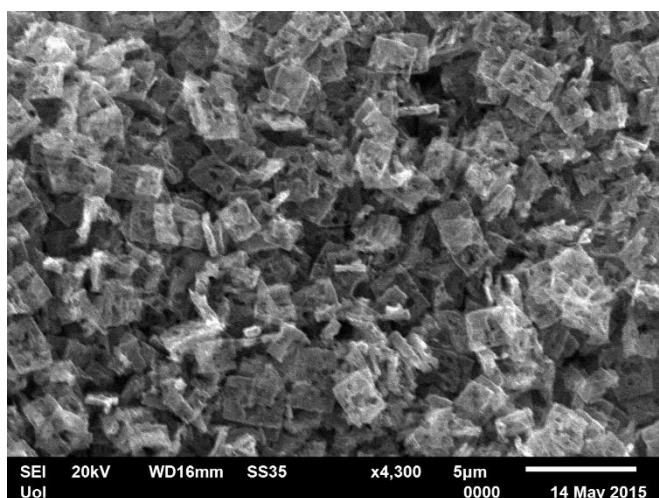
Στο φάσμα Raman των PCCs εντοπίζονται δύο κορυφές στους 1596 και 1350 cm^{-1} , ζώνες G και D, αντίστοιχα. Η ζώνη G αποδίδεται σε συμμετρική έκταση των δεσμών των ατόμων άνθρακα με sp^2 υβριδισμό. Η ζώνη D οφείλεται σε ατέλειες που σπάνε τη βασική συμμετρία του φύλλου γραφενίου. Ο λόγος των εντάσεων $I_D/I_G = 0.96$ δηλώνει τον βαθμό αταξίας του πλέγματος άνθρακα, λόγω της ύπαρξης ατόμων αζώτου και άνθρακα που υπάρχουν στη δομή.



Γράφημα 15. Φάσμα Raman για τα PCCs.

12.4. Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)

Η εικόνα SEM δείχνει τα PCCs, τα οποία συσσωματώνονται τυχαία μεταξύ τους, με αποτέλεσμα να αλληλοεπικαλύπτονται το ένα με το άλλο σχηματίζοντας με τον τρόπο αυτό μια τραχιά επιφάνεια, με ομοιόμορφα κατανεμημένες μακροπορώδεις οπές σε όλα τα νανοσωματίδια.



Εικόνα 26. Εικόνα SEM για τα PCCs.

13. Απόδοση μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης της bCA σε HPCs και N-doped HPCs

Το ένζυμο καρβονική ανυδράση από ερυθροκύτταρα βοοειδών (bCA) ακινητοποιήθηκε μέσω μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης σε δύο διαφορετικά είδη HPCs, όπου στην μία εκ των δύο περιπτώσεων τα HPCs είχαν ενισχυθεί με ετεροάτομα αζώτου κατά τη σύνθεση (Nitrogen doped, N-doped HPCs). Η μη ομοιοπολική ακινητοποίηση πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0.05 M pH 7.5 και το μίγμα της ακινητοποίησης επωάστηκε υπό συνεχή ανάδευση για 1 ή 2 h στους 30°C. Η απόδοση της ακινητοποίησης για κάθε υλικό και για τις διαφορετικές αναλογίες συγκεντρώσεως ενζύμου και φορέα ακινητοποίησης παρουσιάζεται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 11. Ποσοστά ακινητοποίησης για κάθε νανοβιοκαταλύτη, καθώς και για διαφορετικές αναλογίες μάζας ενζύμου-υλικού και χρόνου επώασης.

Νανοβιοκαταλύτης	Χρόνος επώασης (h)	Αναλογία μάζας (ενζύμου: υλικού)	Απόδοση ακινητοποίησης (%)
bCA-HPC	1	0.5: 1	58 ± 2.0
		1: 1	45 ± 0.5
		2: 1	39 ± 1.0
	2	0.5: 1	80 ± 4.6
bCA- N-doped HPC	1	0.5: 1	18 ± 1.6
		0.5: 2	31 ± 4.5
		1: 1	16 ± 4.9

Οι αποδόσεις ακινητοποίησης που σημειώθηκαν ήταν αρκετά υψηλές, γεγονός που αποδίδεται στην εξαιρετικά υψηλή ειδική επιφάνεια των HPCs και την ιεραρχημένη δομή των μικρο-, μεσο- και μακρο-πόρων που διαθέτουν. Ειδικότερα, η μέση απόδοση της ακινητοποίησης της bCA στα HPCs για αναλογία μάζας ενζύμου-φορέα ακινητοποίησης 0.5:1, 1:1 και 2:1 ήταν 58%, 45% και 39% αντίστοιχα. Φάνηκε ότι η βέλτιστη απόδοση παρατηρήθηκε στη μικρότερη αναλογία μάζας bCA-HPCs, με το ποσοστό αυτό να αυξάνεται με διπλασιασμό του χρόνου επώασης (80%).

Κατά ανάλογο τρόπο, για την περίπτωση των N-doped HPCs και για αναλογία μάζας ενζύμου-φορέα ακινητοποίησης 0.5:1, 0.5:2 και 1:1, η μέση απόδοση ακινητοποίησης υπολογίστηκε 18, 31 και 16%, αντίστοιχα. Η βέλτιστη απόδοση παρατηρήθηκε στη μικρότερη αναλογία μάζας bCA - N-doped HPCs (0.5:2).

14. Απόδοση μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης της bCA στα PCCs

Το ένζυμο καρβονική ανυδράση από ερυθροκύτταρα βοοειδών (bCA) ακινητοποιήθηκε μέσω μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης στα PCCs. Η μη ομοιοπολική ακινητοποίηση πραγματοποιήθηκε σε διάλυμα φωσφορικού νατρίου 0.05 M pH 7.5 και το μίγμα της ακινητοποίησης επώαστηκε υπό συνεχή ανάδευση για 1, 2, ή 3 h στους 30°C, είτε για 24 h στους 4°C. Η απόδοση της ακινητοποίησης για τις διαφορετικές αναλογίες συγκέντρωσης ενζύμου και φορέα ακινητοποίησης, καθώς και για τον διαφορετικό χρόνο επώασης παρουσιάζεται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 12. Ποσοστά μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης για τον νανοβιοκαταλύτη bCA-PCC, για διαφορετικές αναλογίες μάζας ενζύμου-υλικού και χρόνου επώασης.

Νανοβιοκαταλύτης	Χρόνος επώασης (h)	Αναλογία μάζας (ενζύμου:PCCs)	Απόδοση ακινητοποίησης (%)
bCA-PCC	1	0.3: 4	77 ± 4.5
	2		64 ± 1.8
	3		55 ± 3.1
	24		83 ± 4.2
	2	0.4: 4	54 ± 4.0
	2	0.6: 4	40 ± 2.7

Οι αποδόσεις ακινητοποίησης που σημειώθηκαν ήταν αρκετά υψηλές, γεγονός που αποδίδεται στην υψηλή ειδική επιφάνεια των PCCs και την ιεραρχημένη δομή των πόρων που διαθέτουν. Η μέση απόδοση της ακινητοποίησης της bCA στα PCCs για αναλογία μάζας ενζύμου-φορέα ακινητοποίησης 0.3:4, 0.4:4 και 0.6:4 και για χρόνο επώασης 2 h ήταν 64, 54 και 40%, αντίστοιχα. Η βέλτιστη απόδοση παρατηρήθηκε στη μικρότερη αναλογία μάζας bCA-PCCs, για αυτό και μελετήθηκε περαιτέρω για διαφορετικούς χρόνους επώασης, προκειμένου να έχουμε τη βέλτιστη απόδοση (επίτευξη έως και 83% σε 24 h στους 4°C).

15. Απόδοση ομοιοπολικής ακινητοποίησης της bCA στα PCCs

Λόγω της παρουσίας των λειτουργικών ομάδων, η καρβονική ανυδράση από ερυθροκύτταρα βοοειδών (bCA) ακινητοποιήθηκε στα PCCs και μέσω ομοιοπολικής ακινητοποίησης με τη χρήση υδατικού διαλύματος HEPES 0.05 M pH 7.5, καθώς και χρήση EDC/NHS. Η ακινητοποίηση πραγματοποιήθηκε για δύο διαφορετικές αναλογίες και για χρόνο επώασης 1 και 2 h, με τα αποτελέσματα να συνοψίζονται στον πίνακα που ακολουθεί:

Πίνακας 13. Ποσοστά ομοιοπολικής ακινητοποίησης για τον νανοβιοκαταλύτη bCA-PCC, για διαφορετικές αναλογίες μάζας ενζύμου-υλικού και χρόνου επώασης.

Νανοβιοκαταλύτης	Χρόνος επώασης (h)	Αναλογία μάζας (ενζύμου:PCCs)	Απόδοση ακινητοποίησης (%)
bCA-PCC	1	0.3: 4	63 ± 3.2
	2		46 ± 11.4
	1	0.5: 4	42 ± 3.2

Οι αποδόσεις ακινητοποίησης που σημειώθηκαν ήταν εξίσου υψηλές με τη μέθοδο της μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης, με τη μέση απόδοση της ακινητοποίησης της bCA στα PCCs για αναλογία μάζας ενζύμου-φορέα ακινητοποίησης 0.3:4 και 0.5:4 και για χρόνο επώασης 1 h να είναι 63 και 42%, αντίστοιχα. Η βέλτιστη απόδοση παρατηρήθηκε στη μικρότερη αναλογία μάζας bCA-PCCs, για αυτό και μελετήθηκε και σε διπλάσιο χρόνο επώασης, όπου σημειώθηκε μέση απόδοση 46%.

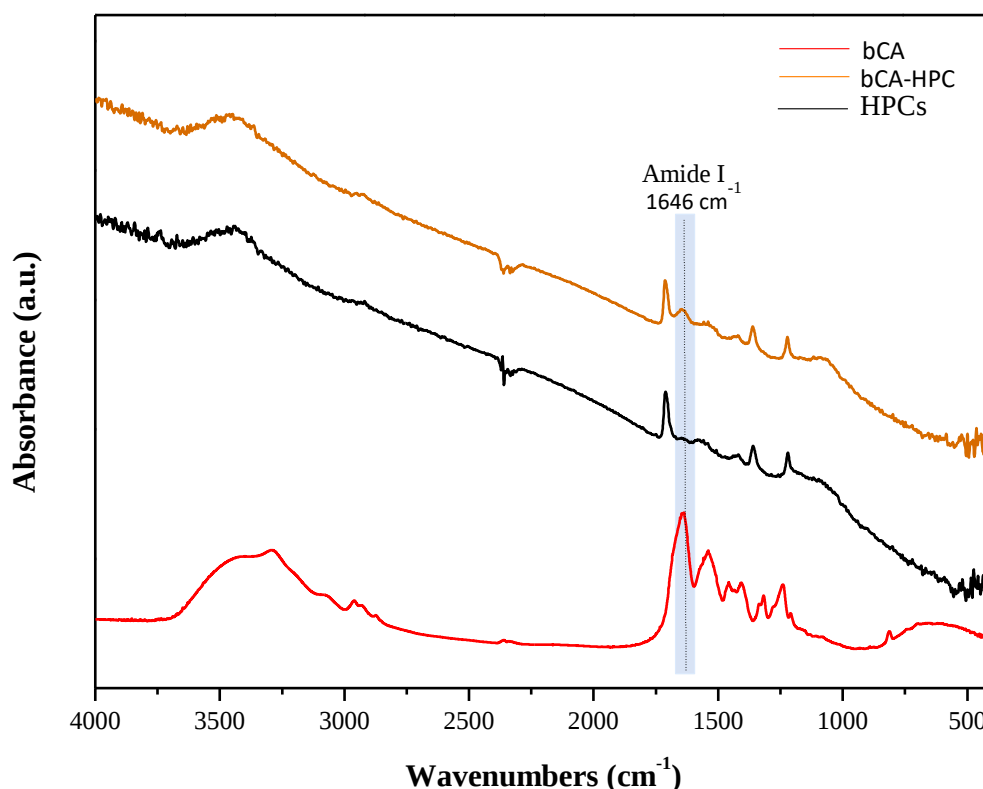
16. Φάσματα υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) των νανοβιοκαταλυτών

16.1. Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) του νανοβιοκαταλύτη bCA-HPC

Η επιτυχής ακινητοποίηση του ενζύμου bCA στα HPCs επιβεβαιώθηκε με τη λήψη των φασμάτων FT-IR του ελεύθερου ενζύμου, του φορέα ακινητοποίησης και του νανοβιοκαταλύτη (ακινητοποιημένου ενζύμου bCA σε HPCs μέσω μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης). Παρασκευάστηκαν πελέτες των δειγμάτων με τη χρήση βρωμιούχου καλίου (KBr) και τα φάσματα λήφθηκαν στην περιοχή των 400-4000 cm^{-1} .

Ειδικότερα, στο φάσμα του ελεύθερου ενζύμου, η ζώνη στους 1638 cm^{-1} αντιστοιχεί στην αμιδική περιοχή Amide I (απορροφά κοντά στους 1650 cm^{-1}) και σχετίζεται με τις δονήσεις έκτασης των διπλών δεσμών και των δεσμών C=O του ενζύμου, ενώ η ζώνη στους 1539 cm^{-1} αντιστοιχεί σε δεσμούς Amide II (απορροφά κοντά στους 1550 cm^{-1}) και αποδίδεται σε συνδυασμό δονήσεων στρέψης του δεσμού N-H και έκτασης του δεσμού C-N (Barth, 2007), (Asadi et al., 2019), (Sahoo et al., 2012). Η ζώνη στους 1405 cm^{-1} προκύπτουν λόγω των δονήσεων κάμψης N-H και των δονήσεων έκτασης C-N στην κύρια αλυσίδα του πεπτιδίου και αντιστοιχούν σε δεσμούς Amide III (~1200-1400 cm^{-1}) (Camacho et al., 2001), (Barth, 2007).

Στο φάσμα του νανοβιοκαταλύτη είναι ορατή η κορυφή στους 1646 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται σε Amide I δεσμούς και παρουσιάζεται ελαφρώς μετατοπισμένη σε σχέση με την κορυφή του ελεύθερου ενζύμου (1638 cm^{-1}), αποδεικνύοντας την παρουσία bCA στα HPCs καθώς τα HPCs δεν παρουσιάζουν κορυφή στη συγκεκριμένη περιοχή, εξασφαλίζοντας με τον τρόπο αυτό την επιτυχή ακινητοποίηση της bCA στα HPCs.



Γράφημα 16. Φάσμα υπεράυθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) για το ελεύθερο ένζυμο (bCA), τα HPCs και τον νανοβιοκαταλύτη bCA-HPC.

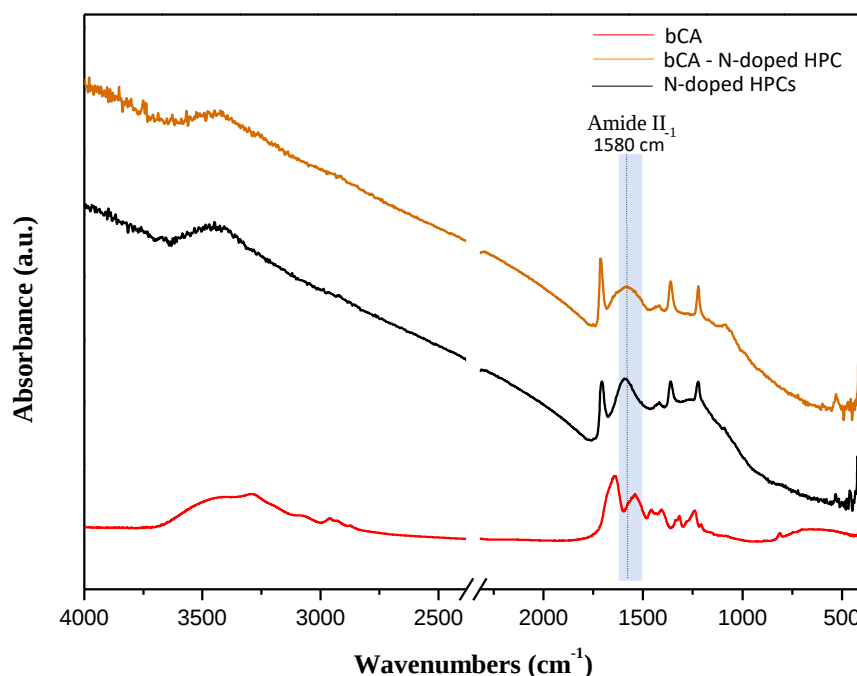
16.2. Φασματοσκοπία υπεράυθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) του νανοβιοκαταλύτη bCA-N-doped HPC

Η επιτυχής ακινητοποίηση του ενζύμου bCA στα ενισχυμένα με ετεροάτομα αζώτου HPCs επαληθεύτηκε μέσω της λήψης των φασμάτων FT-IR του ελεύθερου ενζύμου, του φορέα ακινητοποίησης και του νανοβιοκαταλύτη (ακινητοποιημένου ενζύμου bCA σε N-doped HPCs μέσω μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης). Παρασκευάστηκαν πελέτες των δειγμάτων με τη χρήση βρωμιούχου καλίου (KBr) και τα φάσματα λήφθηκαν στην περιοχή των $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$.

Ειδικότερα, στο φάσμα του ελεύθερου ενζύμου, η ζώνη στους 1638 cm^{-1} αντιστοιχεί στην αμιδική περιοχή Amide I (απορροφά κοντά στους 1650 cm^{-1}) και σχετίζεται με τις δονήσεις έκτασης των διπλών δεσμών και των δεσμών C=O του ενζύμου, ενώ η ζώνη στους

1539 cm^{-1} αντιστοιχεί σε δεσμούς Amide II (απορροφά κοντά στους 1550 cm^{-1}) και αποδίδεται σε συνδυασμό δονήσεων στρέψης του δεσμού N-H και έκτασης του δεσμού C-N (Barth, 2007), (Sahoo et al., 2012), (Asadi et al., 2019). Η ζώνη στους 1405 cm^{-1} προκύπτουν λόγω των δονήσεων κάμψης N-H και των δονήσεων έκτασης C-N στην κύρια αλυσίδα του πεπτιδίου και αντιστοιχούν στην κορυφή Amide III ($\sim 1200\text{-}1400 \text{ cm}^{-1}$) (Barth, 2007).

Στο φάσμα του νανοβιοκαταλύτη είναι ορατή η κορυφή στους 1580 cm^{-1} , η οποία αποδίδεται στην Amide II και είναι αποτέλεσμα των δονήσεων κάμψης N-H και των δονήσεων έκτασης C-N των αμινοξέων της πολυπετιδικής αλυσίδας του ενζύμου και παρουσιάζεται ελαφρώς μετατοπισμένη σε σχέση με την κορυφή του ελεύθερου ενζύμου (1550 cm^{-1}). Η παρουσία της χαρακτηριστικής αυτής κορυφής στο φάσμα του νανοβιοκαταλύτη επιβεβαιώνει την επιτυχή ακινητοποίηση του ενζύμου στα N-doped HPCs.



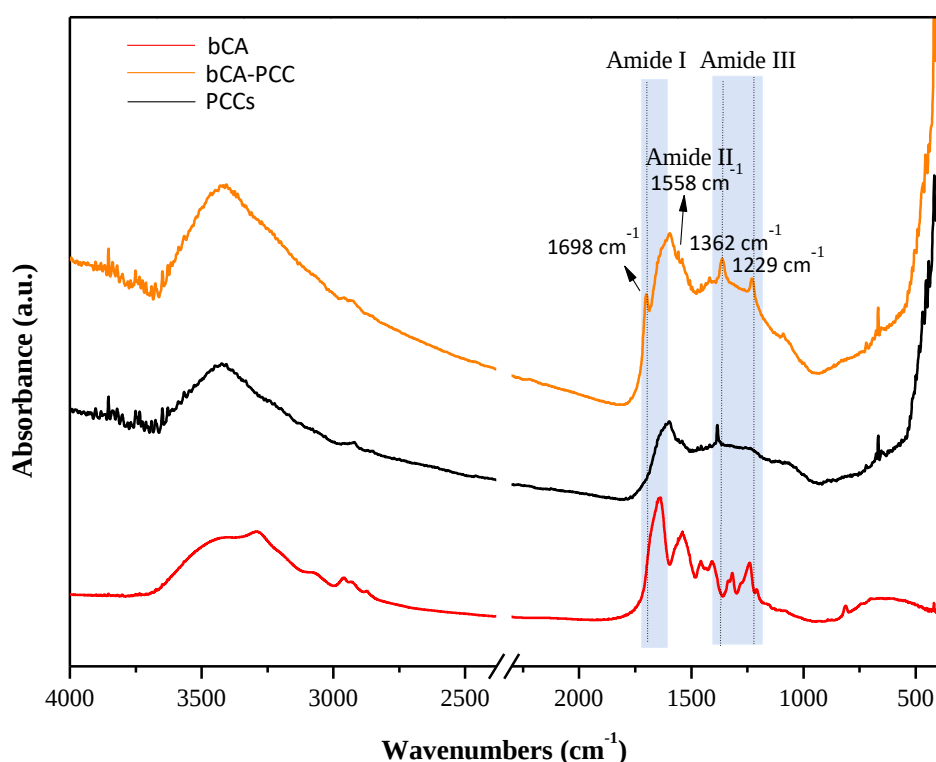
Γράφημα 17. Φάσμα υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) για το ελεύθερο ένζυμο (bCA), τα N-doped HPCs και τον νανοβιοκαταλύτη bCA- N-doped HPC.

16.3. Φασματοσκοπία υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) νανοβιοκαταλύτη bCA-PCC

Για τη επιβεβαίωση της επιτυχούς ακινητοποίησης του ενζύμου bCA στα PCCs λήφθηκαν τα φάσματα FT-IR του ελεύθερου ενζύμου, του φορέα ακινητοποίησης και του νανοβιοκαταλύτη (ακινητοποιημένου ενζύμου bCA σε PCCs μέσω μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης). Παρασκευάστηκαν πελέτες των δειγμάτων με τη χρήση βρωμιούχου καλίου (KBr) και τα φάσματα λήφθηκαν στην περιοχή των 400-4000 cm^{-1} .

Ειδικότερα, στο φάσμα του ελεύθερου ενζύμου, η ζώνη στους 1638 cm^{-1} αντιστοιχεί στην αμιδική περιοχή Amide I (απορροφά κοντά στους 1650 cm^{-1}) και σχετίζεται με τις δονήσεις έκτασης των διπλών δεσμών και των δεσμών C=O του ενζύμου, ενώ η ζώνη στους 1539 cm^{-1} αντιστοιχεί σε δεσμούς Amide II (απορροφά κοντά στους 1550 cm^{-1}) και αποδίδεται σε συνδυασμό δονήσεων στρέψης του δεσμού N-H και έκτασης του δεσμού C-N (Barth, 2007), (Sahoo et al., 2012), (Asadi et al., 2019). Η ζώνη στους 1405 cm^{-1} προκύπτουν λόγω των δονήσεων κάμψης N-H και των δονήσεων έκτασης C-N στην κύρια αλυσίδα του πεπτιδίου και αντιστοιχούν σε δεσμούς Amide III ($\sim 1200\text{-}1400\text{ cm}^{-1}$) (Camacho et al., 2001), (Barth, 2007).

Στο φάσμα του νανοβιοκαταλύτη είναι ορατές οι κορυφές στους 1698 cm^{-1} , 1558 cm^{-1} , 1362 cm^{-1} και 1229 cm^{-1} . Η κορυφή στους 1698 cm^{-1} αποδίδεται στην κορυφή Amide I και παρουσιάζεται ελαφρώς μετατοπισμένη σε σχέση με την κορυφή του ελεύθερου ενζύμου (1638 cm^{-1}). Στους 1558 cm^{-1} παρατηρείται μια μικρότερη κορυφή που αποδίδεται στην Amide II, υποδεικνύοντας με τον τρόπο αυτό την παρουσία bCA στα PCCs καθώς τα PCCs δεν παρουσιάζουν κορυφές στις συγκεκριμένες περιοχές. Η ύπαρξη επομένως των χαρακτηριστικών κορυφών του ενζύμου bCA (Amide I, II και III) στο φάσμα του ακινητοποιημένου νανοβιοκαταλύτη επαληθεύει την παρουσία και επιβεβαιώνει την επιτυχή ακινητοποίηση της bCA στα PCCs.



Γράφημα 18. Φάσμα υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-IR) για το ελεύθερο ένζυμο (bCA), τα PCCs και τον νανοβιοκαταλύτη bCA-PCC.

17. Μελέτη ενζυμικής δραστηριότητας ελεύθερης και ακινητοποιημένης bCA

Η μελέτη της δραστηριότητας της ελεύθερης bCA αλλά και του ακινητοποιημένου στα υλικά (HPCs, N-doped HPCs και PCCs) βιοκαταλύτη πραγματοποιήθηκε στις πρότυπες για το ένζυμο συνθήκες, δηλαδή σε θερμοκρασία 30°C, σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0.05 M pH 7.5, ενώ ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το p-NPA. Ως ένα Unit (U) ορίζεται η ποσότητα της bCA που απαιτείται για την απελευθέρωση ενός μmole προϊόντος (p-NP) ανά λεπτό στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στους πίνακες που ακολουθούν.

Πίνακας 14. Δραστηριότητα του ελεύθερου ενζύμου.

Ένζυμο	Units ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$)
bCA	3.05

Πίνακας 15. Ειδική ενεργότητα των νανοβιοκαταλυτών.

Νανοβιοκαταλύτης	Αναλογία μάζας (ενζύμου:υλικού)	Χρόνος επώασης ακινητοποίησης (h)	Specific Activity (Units per mg protein on nanobiocatalyst) ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$)
bCA-HPC	0.5:1	1	0.10
	1:1	1	0.09
	2:1	1	0.04
	0.5:1	2	0.09
bCA- N-doped HPC	0.5:1	1	0.14
	0.5:2	1	0.18
	1:1	1	0.06

Πίνακας 16. Ειδική ενεργότητα του νανοβιοκαταλύτη bCA-PCC.

Νανοβιοκαταλύτης	Αναλογία μάζας (ενζύμου:PCC)	Χρόνος επώασης ακινητοποίησης (h)	Specific Activity (Units per mg protein on nanobiocatalyst) ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$)
Μη ομοιοπολική ακινητοποίηση (non-covalent)			
bCA-PCC	0.3:4	2	0.13
		24	0.03
	0.4:4	2	0.10
	0.6:4	2	0.09
Ομοιοπολική ακινητοποίηση (covalent)			
bCA-PCC	0.3:4	1	0.08
		2	0.10
	0.5:4	1	0.14

Η ενζυμική δραστηριότητα της ελεύθερης bCA στις πρότυπες συνθήκες αντίδρασης προσδιορίστηκε ως $3.05 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$ ανά μg σκευάσματος του ενζύμου. Η τιμή αυτή αποτελεί τη συνολική δραστηριότητα του ελεύθερου ενζύμου, δηλαδή πόσο γρήγορα μπορεί να μετατρέψει το υπόστρωμα (p-NPA) και να έχουμε την απελευθέρωση ενός μμole προϊόντος (p-NP) ανά λεπτό στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες. Η τιμή αυτή δίνει μια πρώτη εκτίμηση για την ταχύτητα της καταλυτικής αντίδρασης, ενώ φαίνεται ότι πρόκειται για εξαιρετικά υψηλή δραστηριότητα.

Οι δραστηριότητες των ακινητοποιημένων bCA ανά mg νανοβιοκαταλύτη και έπειτα η ειδική δραστηριότητα (Specific activity), τα Units δηλαδή ανά μg πρωτεΐνης στον νανοβιοκαταλύτη, προσδιορίστηκαν για κάθε νανοβιοκαταλύτη και για διαφορετικές αναλογίες μάζας ενζύμου-υλικού αλλά και χρόνους επώασης κατά την ακινητοποίηση.

Ειδικότερα για το ακινητοποιημένο ένζυμο σε HPCs μελετήθηκαν τρεις διαφορετικές αναλογίες μάζας ενζύμου-υλικού (0.5:1, 1:1 και 2:1) για χρόνο επώασης μία ώρα, με τις τιμές της ειδικής δραστηριότητας (specific activity) να υπολογίζονται 0.10 , 0.09 και $0.04 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ αντίστοιχα (~ 31 , 34 και 76 φορές χαμηλότερη δραστηριότητα σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο). Φάνηκε ότι όσο αυξανόταν η αναλογία μάζας bCA-HPC μειωνόταν και η τιμή της δραστηριότητας. Η ακινητοποίηση με αναλογία μάζας ενζύμου-HPC 0.5:1 επαναλήφθηκε για χρόνο επώασης 2 ώρες, με την τιμή της ειδικής δραστηριότητας να μην παρουσιάζει ιδιαίτερη απόκλιση ($0.09 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$).

Για τον ακινητοποιημένο βιοκαταλύτη σε ενισχυμένα με ετεροάτομα αζώτου N-doped HPCs μελετήθηκαν τρεις διαφορετικές αναλογίες μάζας ενζύμου-υλικού (0.5:1, 0.5:2 και 1:1) για χρόνο επώασης μία ώρα, με τις τιμές της ειδικής δραστηριότητας (specific activity) να υπολογίζονται 0.14 , 0.18 και $0.06 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$, αντίστοιχα (~ 22 , 17 και 51 φορές χαμηλότερη δραστηριότητα σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο). Η καλύτερη δραστηριότητα παρατηρήθηκε για τη μικρότερη αναλογία μάζας ενζύμου-υλικού. Επιπλέον παρατηρείται ότι τα ενεργοποιημένα με ετεροάτομα αζώτου N-doped HPCs παρουσιάζουν υψηλότερη δραστηριότητα και καλύτερη καταλυτική απόδοση σε σύγκριση με τα HPCs που έχουν ενεργοποιηθεί με διοξείδιο του άνθρακα ως παράγοντα ενεργοποίησης, παρότι μάλιστα παρουσιάζουν τη μισή περίπου ειδική επιφάνεια ($956 \text{ m}^2/\text{g}$ έναντι $2344 \text{ m}^2/\text{g}$) και αρκετά χαμηλότερη απόδοση ακινητοποίησης.

Η bCA ακινητοποιήθηκε στα PCCs μέσω μη ομοιοπολικής και ομοιοπολικής ακινητοποίησης και μελετήθηκε η δραστηριότητα των ακινητοποιημένων νανοβιοκαταλυτών. Συγκεκριμένα για την περίπτωση της μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης μελετήθηκαν τρεις διαφορετικές αναλογίες μάζας ενζύμου-υλικού (0.3:4, 0.4:4 και 0.6:4) για χρόνο επώασης μία ώρα, με τις τιμές της ειδικής δραστηριότητας να βρίσκονται 0.13 , 0.10 και $0.09 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ αντίστοιχα (~ 23 , 31 και 34 φορές χαμηλότερη δραστηριότητα σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο). Παρατηρήθηκε συνεπώς ότι όσο αυξανόταν η αναλογία μάζας bCA-PCC, μειωνόταν η τιμή

της δραστηριότητας. Η ακινητοποίηση με τη χαμηλότερη αναλογία μάζας ενζύμου-HPC 0.3:4 επαναλήφθηκε για χρόνο επώασης 24 ώρες στους 4°C, με την τιμή της ειδικής δραστηριότητας να βρίσκεται αρκετά χαμηλή ($0.03 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$).

Στην περίπτωση των ομοιοπολικά ακινητοποιημένων σε PCCs βιοκαταλυτών μελετήθηκαν δύο διαφορετικές αναλογίες μάζας ενζύμου-υλικού (0.3:4 και 0.5:4) για χρόνο επώασης μία ώρα, ενώ η αναλογία 0.3:4 μελετήθηκε και για χρόνο επώασης δύο ώρες. Οι τιμές της ειδικής δραστηριότητας (specific activity) βρέθηκαν 0.08, 0.14 και $0.10 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \mu\text{g}^{-1}$ αντίστοιχα, περίπου 38, 22 και 31 φορές χαμηλότερη δραστηριότητα σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο. Παρατηρήθηκε ότι και για τις δύο περιπτώσεις, μη ομοιοπολικής και ομοιοπολικής ακινητοποίησης σημειώθηκαν πανομοιότυπα αποτελέσματα, τιμές δηλαδή δραστηριότητας με μικρή απόκλιση μεταξύ τους και συνεπώς παρόμοια καταλυτική απόδοση.

Σε όλες τις περιπτώσεις των ακινητοποιημένων βιοκαταλυτών σε στερεούς φορείς ακινητοποίησης (HPCs, N-doped HPCs και PCCs) η δραστηριότητα που παρατηρήθηκε ήταν χαμηλότερη αυτής του ελεύθερου ενζύμου στις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Το ένζυμο χάνει άρα μεγάλο μέρος της καταλυτικής του δραστηριότητας του μετά την ακινητοποίηση, γεγονός ωστόσο εξαιρετικά σύνηθες καθώς μπορεί να οφείλεται σε παρεμποδίσσεις που δημιουργούνται με αποτέλεσμα το ενεργό κέντρο του ενζύμου να μην είναι εύκολα προσβάσιμο από το υπόστρωμα.

18. Προσδιορισμός της θερμικής σταθερότητας της ελεύθερης bCA

Βάση βιβλιογραφίας, ο χρόνος ημιζωής της ελεύθερης CA II από ερυθροκύτταρα βοοειδών (bCA) είναι 6 μέρες στους 40 °C και λιγότερο από 24 ώρες στους 70 °C (Di Fiore et al., 2015).

Στην παρούσα διπλωματική η σταθερότητα του ελεύθερου ενζύμου δεν επηρεάστηκε στις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν. Ειδικότερα, η μελέτη της θερμικής σταθερότητας της ελεύθερης bCA από ερυθροκύτταρα βοοειδών πραγματοποιήθηκε στους 30, 40°C και 50 °C, με τις μετρήσεις να έχουν ληφθεί σε συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (0, 1, 3, 5 και 24 h). Η σταθερότητα του ενζύμου δε μεταβάλλεται στις παραπάνω θερμοκρασίες ακόμα και μετά το πέρας 24 ωρών συνεχόμενης επώασης.

19. Μελέτη θερμικής δραστηριότητας (Thermal activity) της ελεύθερης bCA

Το ελεύθερο ένζυμο μελετήθηκε ως προς την διατήρηση της δραστηριότητας του στους 25-70°C. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0.1 M pH 7.5, ενώ ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το p-NPA. Ως ένα Unit (U) ορίζεται η ποσότητα της bCA που απαιτείται για την απελευθέρωση ενός μmole προϊόντος (p-NP) ανά λεπτό στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 17. Τιμές θερμικής δραστηριότητας του ελεύθερου ενζύμου.

Ένζυμο	Θερμοκρασία αντίδρασης (°C)	Units ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)
bCA	25	1.34
	30	1.54
	40	1.66
	50	1.94
	60	2.06
	70	1.34

Το ένζυμο φαίνεται να διατηρεί τη δραστηριότητα του ακόμη και στη θερμοκρασία των 70°C, με τη μέγιστη δραστηριότητα να παρατηρείται στους 50-60°C. Συγκεκριμένα οι τιμές των Units για συνθήκες αντίδρασης 25, 30, 40, 50, 60 και 70°C προσδιορίστηκαν ως 1.34, 1.54, 1.66, 1.94, 2.06 και 1.34 $\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ αντίστοιχα.

20. Μελέτη θερμικής δραστηριότητας (Thermal activity) του νανοβιοκαταλύτη bCA-HPC και bCA-N-doped HPC

Το νανοβιοκαταλυτικό σύστημα bCA-HPC με αναλογία μάζας ενζύμου-υλικού 0.5:1 και χρόνο επώασης 1 ώρα κατά την ακινητοποίηση μελετήθηκε ως προς την διατήρηση της δραστηριότητας του στους 30, 40, 50 και 60°C. Η μελέτη του νανοβιοκαταλυτικού συστήματος πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0.05 M pH 7.5, ενώ ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το p-NPA. Ως ένα Unit (U) ορίζεται η ποσότητα της bCA που απαιτείται για την απελευθέρωση ενός μmole προϊόντος (p-NP) ανά λεπτό στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 18. Τιμές θερμικής δραστηριότητας του νανοβιοκαταλύτη bCA-HPC.

Νανοβιοκαταλύτης	Αναλογία μάζας (ενζύμου:υλικού)	Θερμοκρασία αντίδρασης (°C)	Specific Activity (Units per mg protein on nanobiocatalyst) ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$)
bCA-HPC	0.5:1	30	0.15
		40	0.23
		50	0.22
		60	0.08

Η ακινητοποίηση εξασφαλίζει την προστασία της διαμόρφωσης των ενζύμων και την ενίσχυση της απόδοσής τους κατά τη διάρκεια των βιοκαταλυτικών αντιδράσεων, με τον βιοκαταλύτη να διατηρεί τη δραστηριότητα του ακόμη και σε υψηλές θερμοκρασίες (Li et al., 2018). Φαίνεται ότι η ακινητοποιημένη στα HPCs bCA διατηρεί τη δραστηριότητα της ακόμη και στην θερμοκρασία των 50°C, με τη μέγιστη δραστηριότητα να παρατηρείται στους 40-50°C. Το ακινητοποιημένο σύστημα διατηρεί τη δραστηριότητα του μέχρι και τους 50°C, ενώ στους 60°C η δραστηριότητα είναι πολύ χαμηλή και συνεπώς έχουμε απώλεια της δραστηριότητας του.

Κατά ανάλογο τρόπο προσδιορίστηκε η δραστηριότητα για το νανοβιοκαταλυτικό σύστημα bCA-Ndoped HPC με αναλογία μάζας ενζύμου-υλικού 0.5:2 και χρόνο επώασης 1 ώρα κατά την ακινητοποίηση σε θερμοκρασίες 30°C, 40°C, 50°C και 60°C. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0.05 M pH 7.5, ενώ ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το p-NPA. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον ακόλουθο πίνακα.

Πίνακας 19. Τιμές θερμικής δραστηριότητας του νανοβιοκαταλύτη bCA-N-doped HPC.

Νανοβιοκαταλύτης	Αναλογία μάζας (ενζύμου:υλικού)	Θερμοκρασία αντίδρασης (°C)	Specific Activity (Units per mg protein on nanobiocatalyst) ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$)
bCA-N-doped HPC	0.5:2	30	0.06
		40	0.13
		50	0.12
		60	0.02

Από τα παραπάνω δεδομένα διαπιστώνεται ότι η ακινητοποιημένη στα N-doped HPCs bCA διατηρεί τη δραστηριότητα της ακόμη και στην θερμοκρασία των 50°C, με τη μέγιστη δραστηριότητα να παρατηρείται και σε αυτή την περίπτωση στους 40-50°C. Το ακινητοποιημένο σύστημα διατηρεί τη δραστηριότητα του μέχρι και τους 50°C, ενώ στους 60°C φαίνεται να έχουμε απώλεια της δραστηριότητας του.

21. Μελέτη δραστηριότητας του νανοβιοκαταλύτη bCA-HPC σε διαφορετικές τιμές pH

Το νανοβιοκαταλυτικό σύστημα bCA-HPC με αναλογία μάζας ενζύμου-υλικού 0.5:1 και χρόνο επώασης 1 ώρα κατά την ακινητοποίηση μελετήθηκε περαιτέρω ως προς την διατήρηση της δραστηριότητας του σε διαφορετικές τιμές pH. Η μελέτη του νανοβιοκαταλυτικού συστήματος πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0.05 M και θερμοκρασία 30°C, ενώ ως υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε το p-NPA. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 20. Δραστηριότητα του νανοβιοκαταλύτη bCA-HPC για διαφορετικές τιμές pH.

Νανοβιοκαταλύτης	Αναλογία μάζας (ενζύμου:υλικού)	pH	Specific Activity (Units per mg protein on nanobiocatalyst) ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$)
bCA-HPC	0.5:1	7.0	0.04
		7.5	0.15
		8.0	0.21
		8.5	0.19

Η μέγιστη δραστηριότητα παρατηρήθηκε για pH 8.0-8.5, με την ακινητοποίηση του ενζύμου στα HPCs να εξασφαλίζει την ενίσχυση της καταλυτικής απόδοσης του ενζύμου ακόμη και σε μη ευνοϊκές συνθήκες όπως υψηλότερες τιμές pH. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την ικανότητα του ακινητοποιημένου συστήματος να προσαρμόζεται σε ευρύ φάσμα συνθηκών, καθιστώντας το ιδανικό για εφαρμογές σε βιοκαταλυτικές διεργασίες.

22. Προσδιορισμός κινητικών σταθερών K_m , V_{max} του ελεύθερου ενζύμου

Οι κινητικές σταθερές της ελεύθερης bCA προσδιορίστηκαν από τις αρχικές ταχύτητες παραγωγής της π-νιτροφαινόλης (p-NP), σε διαφορετικές συγκεντρώσεις p-NPA. Οι κινητικές σταθερές της bCA προσδιορίστηκαν στους 30 °C, ενώ από τη μελέτη των πειραματικών δεδομένων συμπεραίνεται ότι η ταχύτητα της ελεύθερης bCA ακολουθεί την κινητική Michaelis-Menten. Οι κινητικές σταθερές παρουσιάζονται στον πίνακα που ακολουθεί και αναφέρονται σε 1 μg ενζυμικού σκευάσματος, ενώ στο παράρτημα παρατίθεται το διάγραμμα Michaelis-Menten.

Πίνακας 21. Τιμές κινητικών σταθερών K_m , V_{max} του ελεύθερου ενζύμου

Ένζυμο και Συνθήκη	K_m (mM)	V_{max} ($\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$)	V_{max}/K_m
bCA προς p-NPA	5.76	2.59	0.45

Η σταθερά K_m αποτελεί το μέτρο της συγγένειας ενός ενζύμου για ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα, ενώ ο λόγος V_{max}/K_m αποδίδεται στην αποτελεσματικότητα τροποποίησης των συγκεκριμένων υποστρωμάτων από το ένζυμο (Σταμάτης Χ., 2016).

Οι σταθερές K_m και V_{max} της bCA από ερυθροκύτταρα βοοειδών προσδιορίστηκαν 5.76 mM και $2.59 \mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}$ ως προς την υδρόλυση του p-NPA, αντίστοιχα.

Βιβλιογραφικά η τιμή της σταθεράς K_m της bCA από ερυθροκύτταρα βοοειδών έχει προσδιοριστεί 11.7 mM ως προς την υδρόλυση του p-NPA (Shamna et al., 2021). Σε άλλη μελέτη, η σταθερά K_m του ίδιου ενζύμου έχει προσδιοριστεί 6.091 mM, ενώ η ταχύτητα V_{max} $0.091 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{ml}^{-1}$ (Jing et al., 2015), ενώ σε πιο πρόσφατη μελέτη η τιμή της K_m προσδιορίστηκε 7.628 mM και η V_{max} $1.601 \text{ mM}\cdot\text{min}^{-1}$ (Chang et al., 2021).

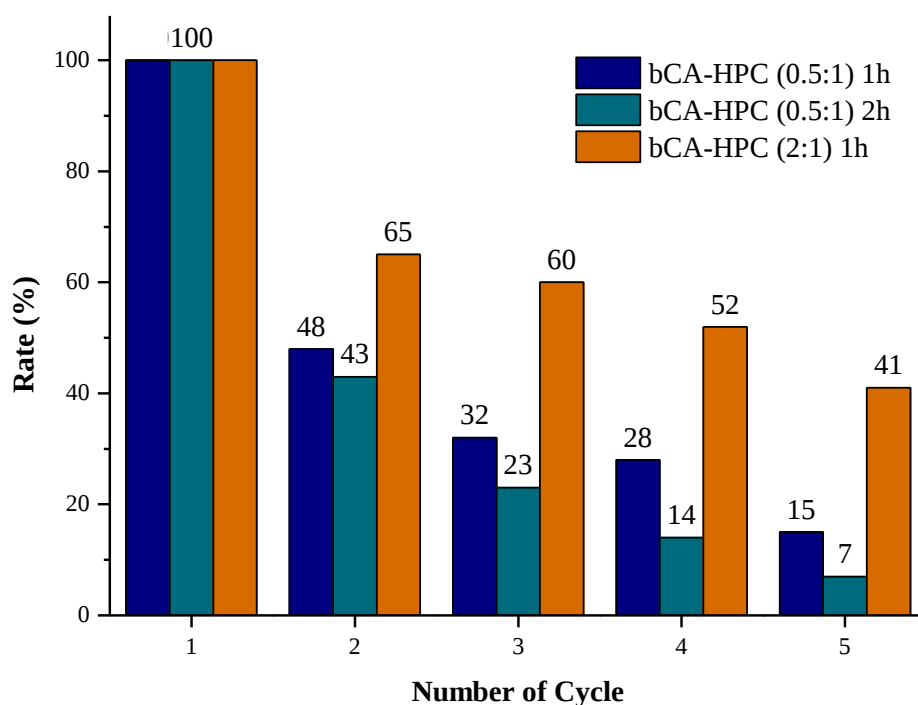
Οι τυχόν αποκλείσεις στις τιμές που παρουσιάζονται συγκριτικά με τη βιβλιογραφία οφείλονται ενδεχομένως στις διαφορετικές συνθήκες (θερμοκρασίας και pH) και των αντιδραστηρίων. Επίσης, σε αρκετές βιβλιογραφικές μελέτες κατά τον προσδιορισμό των κινητικών σταθερών συνήθως επιλέγεται η ετερόλογη έκφραση συγκεκριμένων ισοενζύμων, ενώ στη δική μας περίπτωση χρησιμοποιήθηκε εμπορικό ενζυμικό σκεύασμα.

23. Επαναχρησιμοποίηση των νανοβιοκαταλυτών

23.1. Επαναχρησιμοποίηση του νανοβιοκαταλύτη bCA-HPC

Η ακινητοποίηση αποτελεί βασική μέθοδο για τη βελτίωση της σταθερότητας των ενζύμων, αλλά και την ανάκτηση και επαναχρησιμοποίηση του βιοκαταλύτη. Στο πλαίσιο αυτό, η ακινητοποιημένη στα HPCs με μη ομοιοπολική ακινητοποίηση bCA μελετήθηκε ως προς την ικανότητα επαναχρησιμοποίησης της για τη κατάλυση του υποστρώματος σε συνεχόμενους κύκλους. Ειδικότερα η εναπομένουσα δραστητικότητα προσδιορίστηκε για πέντε συνεχόμενους κύκλους, με την εναπομένουσα δραστητικότητα στον πρώτο κύκλο αντίδρασης να θεωρείται 100%. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0.05 M pH 7.5 και η εναπομένουσα δραστητικότητα προσδιορίστηκε μέσω της υδρόλυσης του οξικού π-νιτροφαινυλεστέρα (p-NPA) στους 30°C. Οι μετρήσεις απορρόφησης του προϊόντος (π-νιτροφαινόλης) λήφθηκαν σε μήκος κύματος 405 nm και πραγματοποιήθηκαν με την χρήση

ELISA σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της αντίδρασης το δείγμα φυγοκεντρήθηκε και ο ακινητοποιημένος καταλύτης που πέφτει ως ίζημα ξεπλύθηκε τρεις φορές με το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0.05 M pH 7.5, όπου και προστέθηκε εκ νέου σε νέο διάλυμα αντίδρασης.

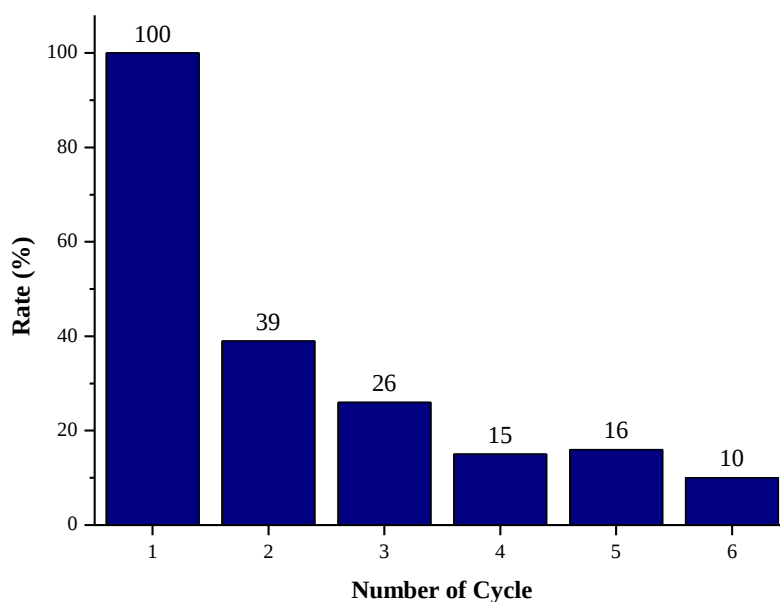


Γράφημα 19. Μελέτη επαναχρησιμοποίησης του νανοβιοκαταλύτη bCA-HPC για πέντε συνεχόμενους κύκλους αντίδρασης.

Η εναπομένουσα δραστηριότητα στον νανοβιοκαταλύτη bCA-HPC προσδιορίστηκε για τρεις διαφορετικές περιπτώσεις (διαφορετικές συνθήκες ακινητοποίησης). Συγκεκριμένα μελετήθηκαν δύο διαφορετικές περιπτώσεις ακινητοποίησης, με αναλογίες μάζας ενζύμου-HPC (0.5:1 και 2:1) για χρόνο επώασης 1 ώρα, με την πρώτη εκ των οποίων να εξετάζεται και για χρόνο επώασης 2 ώρες. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η δραστηριότητα του νανοβιοκαταλύτη μειώνεται αισθητά μετά το πέρας του πρώτου κύκλου, περίπου κατά το ήμισυ, ωστόσο εξακολουθεί να διατηρεί τη δραστηριότητα του για έξι συνολικά κύκλους με μετέπειτα σταδιακή μείωση της δραστηριότητας. Για την περίπτωση του νανοβιοκαταλύτη με τη μεγαλύτερη αναλογία μάζας ενζύμου-υλικού (2:1) η εναπομένουσα δραστηριότητα διατηρήθηκε σε ικανοποιητικά επίπεδα (~41%) ύστερα από τον πέμπτο κύκλο χρησιμοποίησής του. Η σταδιακή μείωση της δραστηριότητας του νανοβιοκαταλυτικού συστήματος είναι αναμενόμενη, πιθανόν λόγω των επιπτώσεων της μη ομοιοπολικής προσρόφησης αλλά και των εκπλύσεων του νανοβιοκαταλύτη μεταξύ των καταλυτικών κύκλων που οδηγούν στην απώλεια της δραστηριότητας του.

23.2. Επαναχρησιμοποίηση του νανοβιοκαταλύτη bCA-N-doped HPC

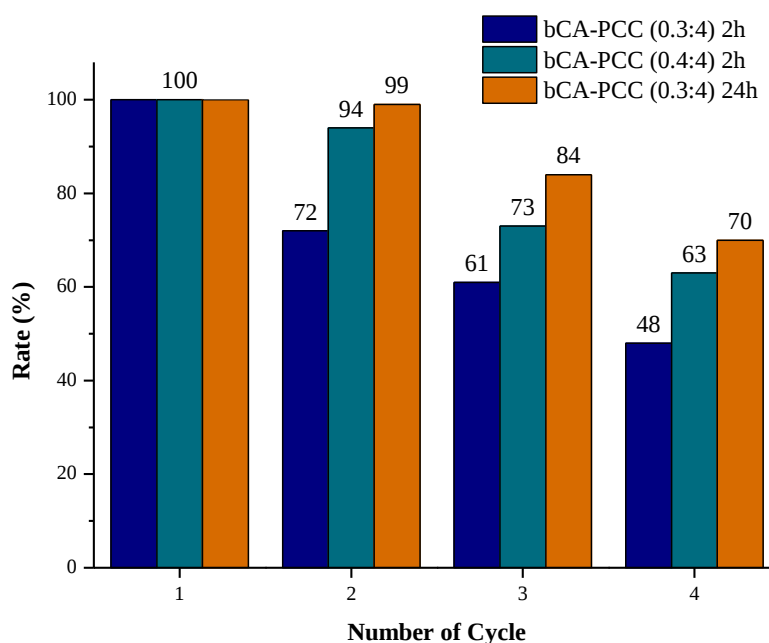
Κατά ανάλογο τρόπο μελετήθηκε και η ακινητοποιημένη bCA σε ενισχυμένα με ετεροάτομα αζώτου N-doped HPCs. Ο μη ομοιοπολικά ακινητοποιημένος βιοκαταλύτης μελετήθηκε ως προς την ικανότητα επαναχρησιμοποίησης του για έξι συνεχόμενους κύκλους, με την εναπομένουσα δραστικότητα στον πρώτο κύκλο αντίδρασης να θεωρείται 100%. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0.05 M pH 7.5 και η εναπομένουσα δραστικότητα προσδιορίστηκε μέσω της υδρόλυσης του οξικού π-νιτροφαινυλεστέρα (p-NPA) στους 30°C. Οι μετρήσεις απορρόφησης του προϊόντος (π-νιτροφαινόλης) λήφθηκαν σε μήκος κύματος 405 nm και πραγματοποιήθηκαν με την χρήση ELISA σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της αντίδρασης το δείγμα φυγοκεντρήθηκε και ο ακινητοποιημένος καταλύτης που πέφτει ως ίζημα ξεπλύθηκε τρεις φορές με το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0.05 M pH 7.5, όπου και προστέθηκε εκ νέου σε νέο διάλυμα αντίδρασης. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η εναπομένουσα δραστικότητα μειώνεται αισθητά μετά τον πρώτο κύκλο (~39%), μετά το πέρας του δεύτερου κύκλου πέφτει στο 26%, ενώ για τον τέταρτο, πέμπτο και έκτο καταλυτικό κύκλο αντίδρασης το ποσοστό της εναπομένουσας δραστικότητας φαίνεται να μην παρατηρείται σημαντική μείωση και να κυμαίνεται γύρω στο 15%.



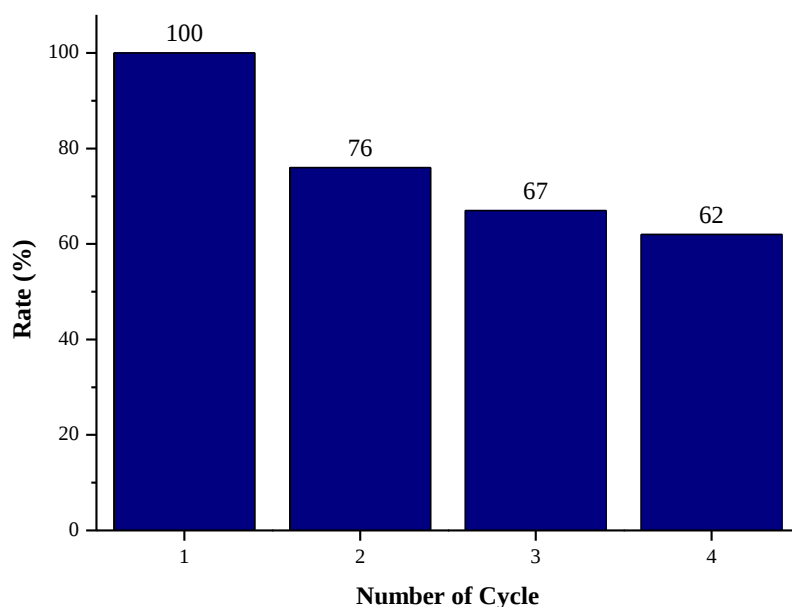
Γράφημα 20. Μελέτη επαναχρησιμοποίησης του νανοβιοκαταλύτη bCA-N-doped HPC για έξι συνεχόμενους κύκλους αντίδρασης.

23.3. Επαναχρησιμοποίηση του νανοβιοκαταλύτη bCA-PCC

Ένα από τα πλεονεκτήματα της ακινητοποίησης των ενζύμων αποτελεί η ανάκτηση του νανοβιοκαταλύτη και η επαναχρησιμοποίησή του. Η ακινητοποίηση αποτελεί συνεπώς μέθοδο που χρησιμοποιείται για τη βελτίωση της σταθερότητας των ενζύμων, εξασφαλίζοντας την ανάκτηση και την επαναχρησιμοποίηση των νανοβιοκαταλυτικών αυτών συστημάτων. Η ακινητοποιημένη bCA σε PCCs μέσω μη ομοιοπολικής και ομοιοπολικής ακινητοποίησης μελετήθηκε ως προς την ικανότητα επαναχρησιμοποίησης της σε συνεχόμενους καταλυτικούς κύκλους αντίδρασης ύστερα από ανάκτηση της. Η εναπομένουσα δραστηριότητα της bCA προσδιορίστηκε για τέσσερις κύκλους αντίδρασης για τη περίπτωση της μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης και ομοιοπολικής ακινητοποίησης όπως υποδεικνύεται και στα διαγράμματα που ακολουθούν, με την εναπομένουσα δραστηριότητα στον πρώτο κύκλο αντίδρασης να θεωρείται 100%. Η μελέτη πραγματοποιήθηκε σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0.05 M pH 7.5 και η εναπομένουσα δραστηριότητα προσδιορίστηκε μέσω της υδρόλυσης του οξικού π-νιτροφαινυλεστέρα (p-NPA) στους 30°C. Οι μετρήσεις απορρόφησης του προϊόντος (π-νιτροφαινόλης) λήφθηκαν σε μήκος κύματος 405 nm και πραγματοποιήθηκαν με την χρήση ELISA σε θερμοκρασία δωματίου. Μετά το πέρας της αντίδρασης το δείγμα φυγοκεντρήθηκε και ο ακινητοποιημένος καταλύτης που πέφτει ως ίζημα ξεπλύθηκε τρεις φορές με το ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl 0.05 M pH 7.5, όπου και προστέθηκε εκ νέου σε νέο διάλυμα αντίδρασης.



Γράφημα 21. Μελέτη επαναχρησιμοποίησης του νανοβιοκαταλύτη bCA-PCC για τέσσερις συνεχόμενους κύκλους αντίδρασης, που λήφθηκε μέσω μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης και για τρεις διαφορετικές συνθήκες ακινητοποίησης.



Γράφημα 22. Μελέτη επαναχρησιμοποίησης του νανοβιοκαταλύτη bCA-PCC για τέσσερις συνεχόμενους κύκλους αντίδρασης, που λήφθηκε μέσω ομοιοπολικής ακινητοποίησης για αναλογία μάζας bCA-PCC 0.3:4 και χρόνο επώασης 1h.

Όπως υποδεικνύεται στα παραπάνω σχήματα, η ικανότητα του ενζύμου να υδρολύει το υπόστρωμα του οξικού π-νιτροφαινυλεστέρα (p-NPA) διατηρείται έως ~60% μετά από τέσσερις συνεχόμενους κύκλους χρήσης. Το νανοβιοκαταλυτικό σύστημα διατηρεί συνεπώς μεγάλο μέρος της αρχικής του δραστηριότητας για αρκετούς κύκλους, με την εναπομένουσα δραστηριότητα να ελαττώνεται σταδιακά. Η σταδιακή αυτή μείωση της δραστηριότητας οφείλεται ενδεχομένως στη σταδιακή απενεργοποίηση του ενζύμου λόγω μηχανικής καταπόνησης ή αναστολής από τα προϊόντα της αντίδρασης (Muley et al., 2018).

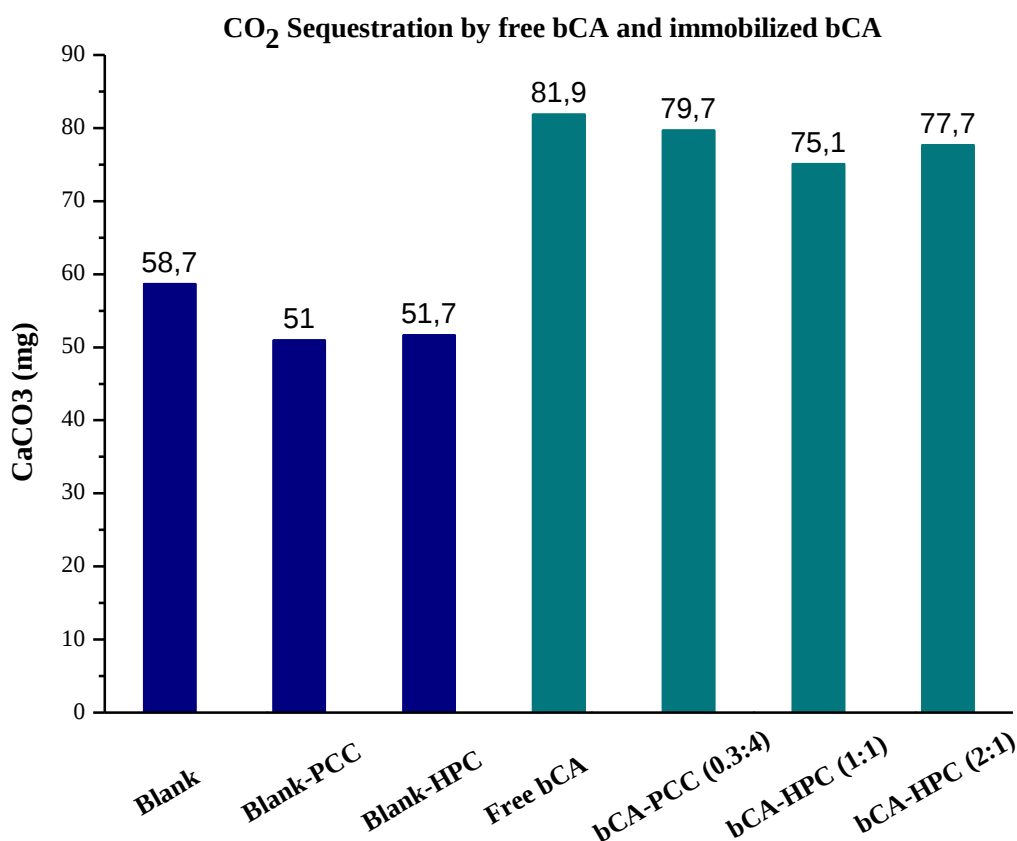
Για την περίπτωση της μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης η εναπομένουσα δραστηριότητα της bCA προσδιορίστηκε για δύο διαφορετικές αναλογίες ενζύμου-φορέα ακινητοποίησης (0.3:4 και 0.4:4), αλλά και για δύο διαφορετικές συνθήκες ακινητοποίησης (επώαση για 2 h στους 30°C και επώαση για 24 h στους 4°C). Για τη περίπτωση της ομοιοπολικής ακινητοποίησης, η εναπομένουσα δραστηριότητα μελετήθηκε για αναλογία μάζας ενζύμου-φορέα ακινητοποίησης 0.3:4 και χρόνο επώασης 1 h στους 30°C. Η δραστηριότητα των νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων πιθανολογείται να διατηρείται και για περισσότερους από τέσσερις κύκλους, με τον ακριβή προσδιορισμό τους να βρίσκεται υπό μελέτη.

24. Αξιολόγηση της δέσμευσης CO₂ (CO₂ Sequestration) από την ελεύθερη και ακινητοποιημένη bCA

Η καρβονική ανυδράση, όπως αναφέρθηκε, αποτελεί ένζυμο που καταλύει την αντίδραση μετατροπής του διοξειδίου του άνθρακα. Η ακινητοποίηση της bCA σε στερεούς φορείς ακινητοποίησης επιτρέπει τη διατήρηση της σταθερότητας, την ενίσχυση της καταλυτικής δράσης αλλά και τη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του νανοβιοκαταλυτικού συστήματος. Στο πλαίσιο αυτό αξιολογήθηκε η δέσμευση και η μετατροπή του φυσικού υποστρώματος (CO₂) του ενζύμου μέσω της μέτρησης της παραγόμενης ποσότητας ανθρακικού ασβεστίου. Ειδικότερα, η μέθοδος αυτή βασίζεται στη καταλυτική δράση της bCA για τη μετατροπή του CO₂ σε διαττανθρακικά ιόντα (HCO₃⁻). Η αντίδραση μεταξύ CO₂ και νερού προς τον σχηματισμό των ανθρακικών ανιόντων συμβαίνει και αυθόρμητα απουσία ενζύμου, ωστόσο η bCA επιταχύνει την αντίδραση έχοντας με τον τρόπο αυτό μεγαλύτερη απόδοση σε χαμηλότερης ενέργειας συνθήκες. Η προσθήκη ιόντων ασβεστίου (Ca²⁺) στο διάλυμα επιτρέπει την άμεση αντίδρασή τους με τα διττανθρακικά ανιόντα προς τον σχηματισμό ανθρακικού ασβεστίου (CaCO₃), το οποίο καθιζάνει ως ίζημα. Η μέτρηση της ποσότητας του ιζήματος αποτελεί έναν άμεσο και ποσοτικό δείκτη της απόδοσης του νανοβιοκαταλυτικού συστήματος (Oniya et al., 2012). Τα αποτελέσματα από τις μετρήσεις των ιζημάτων CaCO₃ απουσία και παρουσία ενζύμου, καθώς και παρουσία της ακινητοποιημένης σε HPCs και PCCs καρβονικής ανυδράσης (bCA) παρατίθενται στον πίνακα που ακολουθεί.

Πίνακας 22. Μετρούμενη ποσότητα ιζήματος του ανθρακικού άλατος.

Assay	Carbonate Deposition (mg)
Blank	58.7
Blank - PCC	51.0
Blank - HPC	51.7
Free bCA	81.9
Immobilized bCA-PCC (0.3:4)	79.7
Immobilized bCA-HPC (1:1)	75.1
Immobilized bCA-HPC (2:1)	77.7



Γράφημα 23. Σχηματική αναπαράσταση της μετρούμενης ποσότητας ιζήματος των ληφθέντων ανθρακικών αλάτων.

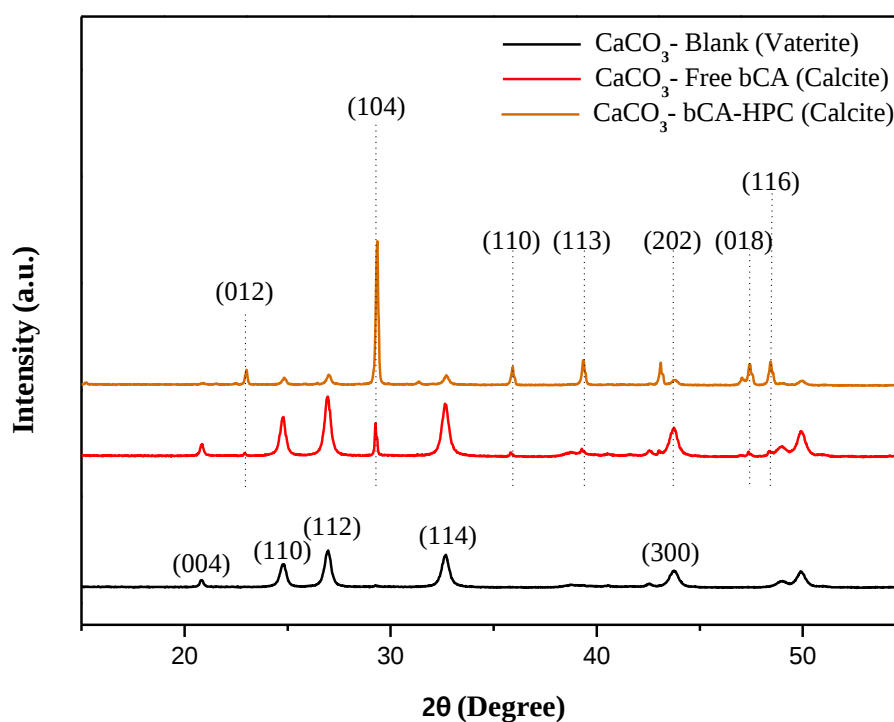
Στην παρούσα μελέτη μελετήθηκε η αποτελεσματικότητα της δέσμευσης του CO₂ για έναν κύκλο καταβύθισης. Ειδικότερα, απουσία του ενζύμου, η αντίδραση συμβαίνει αυθόρμητα και καθιζάνουν 58.7 mg CaCO₃, ενώ παρουσία των PCCs στο διάλυμα της αντίδρασης εξακολουθούμε να έχουμε παρόμοια ποσότητα καταβύθισης (51.0 mg).

Με την προσθήκη της ελεύθερης μορφής της bCA στο μίγμα, η αντίδραση επιταχύνεται και στον ίδιο χρόνο και τις ίδιες συνθήκες έχουμε τη καταβύθιση μεγαλύτερης ποσότητας ανθρακικού άλατος (81.9 mg). Όσον αφορά την ακινητοποιημένη με μη ομοιοπολική ακινητοποίηση bCA στα PCCs, η ποσότητα του άλατος που μετρήθηκε (79.7 mg) ήταν παρόμοια αυτής της ελεύθερης μορφής του ενζύμου, γεγονός που επιβεβαιώνει την σπουδαιότητα της ακινητοποίησης των βιοκαταλυτών σε στερεούς φορείς για τη διατήρηση της σταθερότητας και της δραστηρότητας τους. Αντίστοιχα για την περίπτωση των HPCs, η προσθήκη του υλικού στο μίγμα της αντίδρασης δεν επηρέασε τη ποσότητα του παραγόμενου άλατος (51.7 mg), ενώ η αποτελεσματικότητα της δέσμευσης και μετατροπής CO₂ του νανοβιοκαταλύτη bCA-HPC αξιολογήθηκε για δύο διαφορετικές συνθήκες ακινητοποίησης. Για τον νανοβιοκαταλύτη με αναλογία μάζας ενζύμου-HPC 1:1 και για νανοβιοκαταλύτη με

αναλογία μάζας 2:1 οι ποσότητες του ανθρακικού άλατος που μετρήθηκαν ήταν 75.1 mg και 77.7 mg αντίστοιχα.

Η υψηλότερη καταβύθιση (81.9 mg) καταγράφηκε με το ελεύθερο ένζυμο, χωρίς ωστόσο οι τιμές που λήφθηκαν παρουσία των νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων να παρουσιάζουν σημαντική απόκλιση. Παρατηρούμε ότι η προσθήκη της bCA ή του ακινητοποιημένου νανοβιοκαταλύτη στο μίγμα της αντίδρασης που περιείχε χλωριούχο ασβέστιο και κορεσμένο υδατικό διάλυμα CO₂ ενίσχυσε την καταβύθιση ανθρακικών και διττανθρακικών αλάτων. Το γεγονός αυτό επιβεβαιώνει ότι το διοξείδιο του άνθρακα μπορεί να δεσμευτεί με τη χρήση bCA, ενώ η ικανότητα δέσμευσης μπορεί να ενισχυθεί σημαντικά με την ακινητοποίηση του ενζύμου.

Επιπλέον, αξίζει να σημειωθεί ότι η δομή του παραγόμενου ανθρακικού άλατος CaCO₃ είναι διαφορετική στην περίπτωση του τυφλού δείγματος (Blank) από τις περιπτώσεις όπου είχαμε την παρουσία του ελεύθερου ή του ακινητοποιημένου ενζύμου, παρουσιάζοντας διαφορετικές κρυσταλλικές πολυμορφές (Donnelly et al., 2017), (Zhao et al., 2020). Στην περίπτωση του τυφλού δείγματος είχαμε τη δομή του βατερίτη (vaterite), ενώ για τη περίπτωση του ελεύθερου ενζύμου και της ακινητοποιημένης bCA σε HPCs είχαμε τη δομή του ασβεστίτη (calcite), γεγονός που γίνεται εύκολα αντιληπτό και διαπιστώνεται από τις διαφορετικές εντάσεις αλλά και τις θέσεις των κορυφών στα ληφθέντα διαγράμματα περίθλασης ακτίνων-X (XRD) που παρουσιάζονται παρακάτω.



Γράφημα 24. Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X (XRD) των ανθρακικών αλάτων που λήφθηκαν.

Στο διάγραμμα περίθλασης του ανθρακικού άλατος που λήφθηκε για τη περίπτωση του τυφλού δείγματος (Blank) οι κορυφές περίθλασης που εμφανίζονται σε γωνίες 2θ 20.82° , 24.77° , 26.96° , 32.68° και 43.76° αντιστοιχούν στα κρυσταλλικά επίπεδα (004), (110), (112), (114) και (300) του βατερίτη, με χαρακτηριστικότερη κορυφή για τον βατερίτη αυτήν στις 26.96° .

Για τη περίπτωση του CaCO_3 που καθιζάνει παρουσία του ελεύθερου ενζύμου, οι κορυφές περίθλασης που εμφανίζονται σε γωνίες 2θ 22.93° , 29.27° , 35.81° , 39.26° , 43.76° , 47.32° και 48.37° αντιστοιχούν στα κρυσταλλικά επίπεδα (012), (104), (110), (113), (202), (018) και (116) του ασβεστίτη, με χαρακτηριστικότερη κορυφή για τον ασβεστίτη αυτήν στις 29.27° .

Αντίστοιχα και στο διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X, που λήφθηκε για το δείγμα CaCO_3 που καταβυθίστηκε παρουσία του νανοβιοκαταλύτικού συστήματος bCA-HPC, παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές κορυφές του ασβεστίτη. Συγκεκριμένα οι κορυφές στις 2θ 23.00° , 29.35° , 35.91° , 39.36° , 43.79° , 47.43° και 48.45° αντιστοιχούν στα κρυσταλλικά επίπεδα (012), (104), (110), (113), (202), (018) και (116) του ασβεστίτη, με χαρακτηριστικότερη κορυφή για τον ασβεστίτη αυτήν στις 29.35° .

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η παρούσα διπλωματική εργασία επικεντρώνεται στην ανάπτυξη καινοτόμων νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων για την αποτελεσματική δέσμευση του διοξειδίου του άνθρακα. Ειδικότερα, γίνεται μελέτη της ακινητοποίησης του ενζύμου της καρβονικής ανυδράσης από ερυθροκύτταρα βοοειδών (bCA) σε διαφόρους στερεούς νανο-φορείς ακινητοποίησης με στόχο τη δημιουργία ικανών νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων για την δέσμευση και τη μετατροπή του διοξειδίου του άνθρακα. Αναπτύχθηκαν και χαρακτηρίστηκαν *in vitro* νανοβιοκαταλυτικά συστήματα, η ανάπτυξη των οποίων υλοποιήθηκε μέσω της φυσικής προσρόφησης και μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης του ενζύμου της καρβονικής ανυδράσης (bCA) σε πορώδη νανοϋλικά άνθρακα. Η ακινητοποίηση του ενζύμου πραγματοποιήθηκε σε τρεις διαφορετικούς τύπους υλικών, σε ιεραρχημένους πορώδεις άνθρακες (HPCs), ιεραρχημένους πορώδεις άνθρακες ενισχυμένους με ετεροάτομα αζώτου (N-doped HPCs) και κυβοειδείς πορώδεις άνθρακες (PCCs). Η επιλογή των συγκεκριμένων υλικών βασίστηκε στις εξαιρετικές ιδιότητες που παρουσιάζουν, την υψηλή ειδική επιφάνεια, την υψηλή ικανότητα προσρόφησης του διοξειδίου του άνθρακα, το ρυθμιζόμενο πορώδες, την ιεραρχημένη κατανομή των πόρων, καθώς και τη βιοσυμβατότητα. Πραγματοποιήθηκε πλήρης χαρακτηρισμός των υλικών, όπου η ειδική επιφάνεια και τα χαρακτηριστικά των πόρων των νανοϋλικών άνθρακα προσδιορίστηκαν μέσω της ποροσιμετρίας N_2 - μέθοδος Brunauer, Emmett και Teller (BET). Επίσης λήφθηκαν τα φάσματα φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων ακτίων X (XPS) για την στοιχειακή ανάλυση και τον προσδιορισμό της χημικής κατάστασης των υλικών, ενώ χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) για την απεικόνιση της μορφολογίας της δομής των υλικών.

Αρχικά μελετήθηκε η ελεύθερη μορφή του ενζύμου ως προς τη δραστηρότητα και τα φαινόμενα κινητικά χαρακτηριστικά (K_m και V_{max}). Στην συνέχεια μελετήθηκε η δυνατότητα ακινητοποίησης της bCA σε κάθε έναν από τους στερεούς φορείς ακινητοποίησης HPCs, N-doped HPCs και PCCs, μέσω μη ομοιοπολικής και ομοιοπολικής ακινητοποίησης. Διαπιστώθηκε ότι η bCA μπορεί να ακινητοποιηθεί αποτελεσματικά και στα τρία είδη νανοϋλικών άνθρακα, παρουσιάζοντας μάλιστα υψηλά ποσοστά ακινητοποίησης και για τις τρεις περιπτώσεις. Η υψηλή αυτή απόδοση ακινητοποίησης, που μπορεί να προσεγγίσει έως και 83%, οφείλεται ενδεχομένως στα χαρακτηριστικά, την υψηλή δηλαδή ειδική επιφάνεια των υλικών και την ιεραρχημένη δομή των πόρων, που επιτρέπει την επίτευξη υψηλού ενζυμικού φορτίου σε μικρούς μάλιστα χρόνους επώασης κατά την ακινητοποίηση. Η επιτυχής ακινητοποίηση του ενζύμου bCA στην επιφάνεια των νανοϋλικών επιβεβαιώθηκε μάλιστα μέσω της λήψης φασμάτων φασματοσκοπίας μέσου υπερύθρου μετασχηματισμού Fourier (FT-

IR) και ειδικότερα μέσω της παρουσίας των χαρακτηριστικών κορυφών Amide I, Amide II και Amide III του ενζύμου στα φάσματα των νανοβιοκαταλυτών.

Οι ακινητοποιημένοι νανοβιοκαταλύτες αξιολογήθηκαν ως προς την δραστικότητα τους σε σύγκριση με τη δραστικότητα του ελεύθερου ενζύμου. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η δραστικότητα της ακινητοποιημένης bCA σε κάθε έναν από τους στερεούς φορείς ακινητοποίησης (HPCs, N-doped HPCs και PCCs) ήταν χαμηλότερη αυτής του ελεύθερου ενζύμου του ελεύθερου ενζύμου στις ίδιες πειραματικές συνθήκες. Το ένζυμο χάνει επομένως μεγάλο μέρος της καταλυτικής του δράσης μετά την ακινητοποίηση, γεγονός ωστόσο εξαιρετικά σύνηθες καθώς μπορεί να οφείλεται σε παρεμποδίσεις που δημιουργούνται με αποτέλεσμα το ενεργό κέντρο του ενζύμου να μην είναι εύκολα προσβάσιμο από το υπόστρωμα. Ωστόσο, η θερμική σταθερότητα της ακινητοποιημένης bCA βελτιώθηκε σημαντικά. Επίσης, η ακινητοποιημένη bCA παρουσίασε αυξημένη σταθερότητα, γεγονός που παρατηρήθηκε μέσω της μελέτης των νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων ως προς την ικανότητα επαναχρησιμοποίησης τους. Τα αποτελέσματα έδειξαν την δυνατότητα διατήρησης της δράσης τους για κύκλους αντιδράσεων και συγκεκριμένα τη διατήρηση μεγάλου μέρους της δραστικότητας τους για τουλάχιστον τέσσερις κύκλους αντίδρασης, γεγονός που υποδεικνύει την αυξημένη σταθερότητα τους σε σύγκριση με την ελεύθερη μορφή του ενζύμου.

Στην συνέχεια αξιολογήθηκε η αποτελεσματικότητα δέσμευσης διοξειδίου του άνθρακα από τα νανοβιοκαταλυτικά συστήματα μέσω του προσδιορισμού της παραγόμενης ποσότητας ανθρακικού ασβεστίου (CaCO_3) που σχηματίζεται από την αντίδραση του διοξειδίου με τα ιόντα του ασβεστίου (Ca^{2+}). Η αύξηση της καταβύθισης του ανθρακικού άλατος στην περίπτωση της ακινητοποιημένης καρβονικής ανυδράσης (bCA) σε HPCs και PCCs, σε σχέση με την περίπτωση απουσίας ενζύμου, υποδεικνύει την αποτελεσματική δέσμευση του διοξειδίου του άνθρακα από τους νανοβιοκαταλύτες. Η υψηλότερη καταβύθιση (81.9 mg) καταγράφηκε με το ελεύθερο ένζυμο, χωρίς ωστόσο οι τιμές που λήφθηκαν παρουσία των νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων να παρουσιάζουν σημαντική απόκλιση.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μεταπτυχιακής διπλωματικής εργασίας υποδεικνύουν ότι τα νανο-πορώδη υλικά με βάση των άνθρακα, όπως οι ιεραρχημένοι πορώδεις άνθρακες (HPCs), οι ιεραρχημένοι πορώδεις άνθρακες ενισχυμένοι με ετεροάτομα αζώτου (Ndoped-HPCs) και οι κυβοειδείς πορώδεις άνθρακες (PCCs) αποτελούν κατάλληλους φορείς για την ακινητοποίηση της καρβονικής ανυδράσης bCA, καθώς δύναται να προσεγγίσουμε υψηλά ποσοστά ακινητοποίησης σε μικρούς μάλιστα χρόνους επώασης είτε πρόκειται για φυσική προσρόφηση του ενζύμου είτε για μη ομοιοπολική ακινητοποίηση του ενζύμου στην επιφάνεια του υλικού, ενώ καταφέρνουμε να διατηρήσουμε μεγάλο μέρος της δραστικότητας του ενζύμου για κύκλους αντιδράσεων. Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία κατέδειξε ότι η ακινητοποίηση της bCA σε νανοϋλικά με βάση των άνθρακα αποτελεί μια ελπιδοφόρα

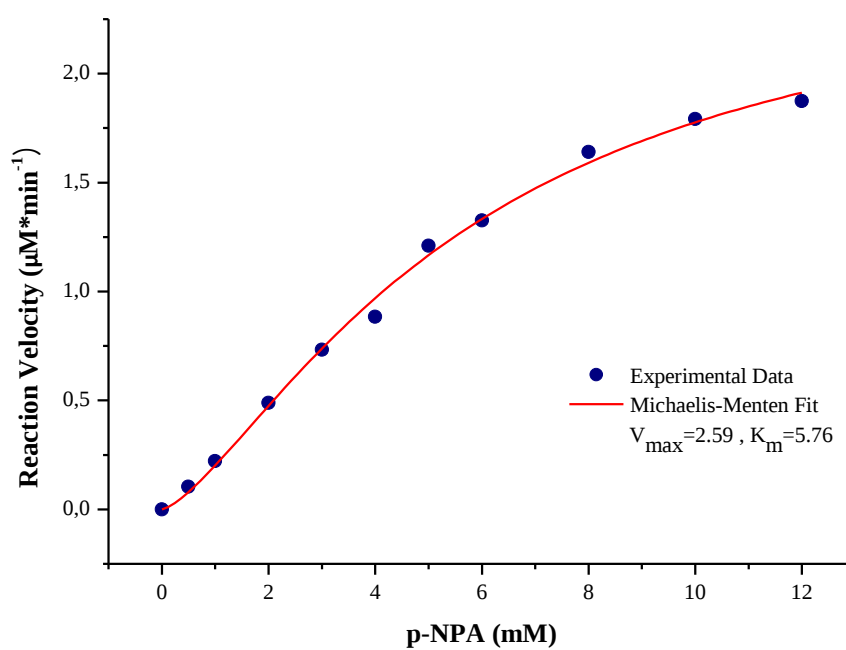
στρατηγική για την ανάπτυξη αποτελεσματικών συστημάτων δέσμευσης διοξειδίου του άνθρακα. Τα νανοβιοκαταλυτικά αυτά συστήματα που αναπτύχθηκαν φαίνεται να αποτελούν εξαιρετικά υποσχόμενα συστήματα για πλήθος εφαρμογών στον τομέα της νανοβιοτεχνολογίας και της ιατρικής. Η παρούσα εργασία ανοίγει τον δρόμο για περαιτέρω έρευνες όσον αφορά τη βελτιστοποίηση των τεχνικών ακινητοποίησης, περεταίρω βελτιστοποίηση των νανοϋλικών, προσαρμογή για βιομηχανική κλίμακα, αλλά και δημιουργία πολυενζυμικών συστημάτων.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παρατίθεται το διάγραμμα Michaelis-Menten από τη κινητική μελέτη του ελεύθερου ενζύμου (Carbonic Anhydrase from bovine erythrocytes, bCA).

Γράφημα Michaelis-Menten της ελεύθερης bCA

Michaelis-Menten for 1 μg free bCA



ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Agarwal, P. K. (2006). Enzymes: An integrated view of structure, dynamics and function. *Microbial Cell Factories*, 5(1), 2. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-5-2>
- Ambroz, F., Macdonald, T. J., Martis, V., & Parkin, I. P. (2018). Evaluation of the BET Theory for the Characterization of Meso and Microporous MOFs. *Small Methods*, 2(11). <https://doi.org/10.1002/smt.201800173>
- Arazawa, D. T., Oh, H.-I., Ye, S.-H., Johnson, C. A., Woolley, J. R., Wagner, W. R., & Federspiel, W. J. (2012). Immobilized carbonic anhydrase on hollow fiber membranes accelerates CO₂ removal from blood. *Journal of Membrane Science*, 403–404, 25–31. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2012.02.006>
- Asadi, V., Kardanpour, R., Tangestaninejad, S., Moghadam, M., Mirkhani, V., & Mohammadpoor-Baltork, I. (2019). Novel bovine carbonic anhydrase encapsulated in a metal–organic framework: a new platform for biomimetic sequestration of CO₂. *RSC Advances*, 9(49), 28460–28469. <https://doi.org/10.1039/C9RA04603H>
- Baby, R., Saifullah, B., & Hussein, M. Z. (2019). Carbon Nanomaterials for the Treatment of Heavy Metal-Contaminated Water and Environmental Remediation. *Nanoscale Research Letters*, 14(1), 341. <https://doi.org/10.1186/s11671-019-3167-8>
- Bagchi, S., SenGupta, S., & Mondal, S. (2017). Development and Characterization of Carbonic Anhydrase-Based CO₂ Biosensor for Primary Diagnosis of Respiratory Health. *IEEE Sensors Journal*, 17(5), 1384–1390. <https://doi.org/10.1109/JSEN.2017.2649686>
- Barth, A. (2007). Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1767(9), 1073–1101. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2007.06.004>
- Bennett, T. D., Coudert, F.-X., James, S. L., & Cooper, A. I. (2021). The changing state of porous materials. *Nature Materials*, 20(9), 1179–1187. <https://doi.org/10.1038/s41563-021-00957-w>
- Bentahar Soumia, Abada Rofia, & Ykhlef Nadia. (2023). Biotechnology: Definitions, types and main applications. *YMER Digital*, 22(1).
- Bhatia, S. (2018). Introduction to enzymes and their applications. In *Introduction to Pharmaceutical Biotechnology, Volume 2* (pp. 1-1-1–29). IOP Publishing. <https://doi.org/10.1088/978-0-7503-1302-5ch1>
- Bian, Y., Rong, Z., & Chang, T. M. S. (2011). Polyhemoglobin-superoxide Dismutase-catalase-carbonic Anhydrase: A Novel Biotechnology-based Blood Substitute that Transports both Oxygen and Carbon Dioxide and also Acts as an Antioxidant. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 39(3), 127–136. <https://doi.org/10.3109/10731199.2011.581052>
- Bosio, V. E., Islan, G. A., Martínez, Y. N., Durán, N., & Castro, G. R. (2015). Nanodevices for the immobilization of therapeutic enzymes. *Critical Reviews in Biotechnology*, 1–18. <https://doi.org/10.3109/07388551.2014.990414>
- Bross, U., Inzelt, A., & Reiß, T. (1998). International Development of Biotechnology. In *Biotechnology Audit in Hungary* (pp. 83–109). Physica-Verlag HD. https://doi.org/10.1007/978-3-642-52472-1_8

- Bubert, H., Rivière, J. C., & Werner, W. S. M. (2011). X-Ray Photoelectron Spectroscopy (XPS). In *Surface and Thin Film Analysis* (pp. 7–41). Wiley.
<https://doi.org/10.1002/9783527636921.ch2>
- Buszewski, B., Kęsy, M., Ligor, T., & Amann, A. (2007). Human exhaled air analytics: biomarkers of diseases. *Biomedical Chromatography*, 21(6), 553–566.
<https://doi.org/10.1002/bmc.835>
- Calzoni, E., Cesaretti, A., Montegiove, N., Di Michele, A., Pellegrino, R. M., & Emiliani, C. (2022). HexA-Enzyme Coated Polymer Nanoparticles for the Development of a Drug-Delivery System in the Treatment of Sandhoff Lysosomal Storage Disease. *Journal of Functional Biomaterials*, 13(2), 37. <https://doi.org/10.3390/jfb13020037>
- Camacho, N. P., West, P., Torzilli, P. A., & Mendelsohn, R. (2001). FTIR microscopic imaging of collagen and proteoglycan in bovine cartilage. *Biopolymers*, 62(1), 1–8.
[https://doi.org/10.1002/1097-0282\(2001\)62:1<1::AID-BIP10>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/1097-0282(2001)62:1<1::AID-BIP10>3.0.CO;2-O)
- Capasso, C., & Barboiu, M. (2019). Biotechnologic applications of carbonic anhydrases from extremophiles. In *Carbonic Anhydrases* (pp. 495–514). Elsevier.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816476-1.00022-8>
- Chang, S., He, Y., Li, Y., & Cui, X. (2021). Study on the immobilization of carbonic anhydrases on geopolymer microspheres for CO₂ capture. *Journal of Cleaner Production*, 316, 128163. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2021.128163>
- Chen, H., Simoska, O., Lim, K., Grattieri, M., Yuan, M., Dong, F., Lee, Y. S., Beaver, K., Weliwatte, S., Gaffney, E. M., & Minter, S. D. (2020). Fundamentals, Applications, and Future Directions of Bioelectrocatalysis. *Chemical Reviews*, 120(23), 12903–12993.
<https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00472>
- Cooper Geoffrey M. (2000). *The Cell: a molecular approach* (2nd ed.). Sinauer Associates, Inc.
- Copeland Robert A. (2020). *Enzymes: A Practical Introduction to Structure, Mechanism, and Data Analysis* (2nd ed.). Wiley.
- Cornish-Bowden, A. (2015). One hundred years of Michaelis–Menten kinetics. *Perspectives in Science*, 4, 3–9. <https://doi.org/10.1016/j.pisc.2014.12.002>
- Cortés-Ríos, J., Zárate, A. M., Figueroa, J. D., Medina, J., Fuentes-Lemus, E., Rodríguez-Fernández, M., Aliaga, M., & López-Alarcón, C. (2020). Protein quantification by bicinchoninic acid (BCA) assay follows complex kinetics and can be performed at short incubation times. *Analytical Biochemistry*, 608, 113904.
<https://doi.org/10.1016/j.ab.2020.113904>
- Davis, P. B. (2006). Cystic Fibrosis Since 1938. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 173(5), 475–482. <https://doi.org/10.1164/rccm.200505-840OE>
- Demetzos, C. (2016). Introduction to Nanotechnology. In *Pharmaceutical Nanotechnology* (pp. 3–15). Springer Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-10-0791-0_1
- Di Fiore, A., Alterio, V., Monti, S., De Simone, G., & D'Ambrosio, K. (2015). Thermostable Carbonic Anhydrases in Biotechnological Applications. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(7), 15456–15480. <https://doi.org/10.3390/ijms160715456>

- Donnelly, F. C., Purcell-Milton, F., Framont, V., Cleary, O., Dunne, P. W., & Gun'ko, Y. K. (2017). Synthesis of CaCO₃ nano- and micro-particles by dry ice carbonation. *Chemical Communications*, 53(49), 6657–6660. <https://doi.org/10.1039/C7CC01420A>
- Estevez, L., Dua, R., Bhandari, N., Ramanujapuram, A., Wang, P., & Giannelis, E. P. (2013). A facile approach for the synthesis of monolithic hierarchical porous carbons – high performance materials for amine based CO₂ capture and supercapacitor electrode. *Energy & Environmental Science*, 6(6), 1785. <https://doi.org/10.1039/c3ee40549d>
- Fári, M. G., & Kralovánszky, U. P. (2006). The founding father of biotechnology: Károly (Karl) Ereky. *International Journal of Horticultural Science*, 12(1). <https://doi.org/10.31421/IJHS/12/1/615>
- FU, R., LI, Z., LIANG, Y., LI, F., XU, F., & WU, D. (2011). Hierarchical porous carbons: design, preparation, and performance in energy storage. *New Carbon Materials*, 26(3), 171–179. [https://doi.org/10.1016/S1872-5805\(11\)60074-7](https://doi.org/10.1016/S1872-5805(11)60074-7)
- Gaffney, E. M., Lim, K., & Minter, S. D. (2020). Breath biosensing: using electrochemical enzymatic sensors for detection of biomarkers in human breath. *Current Opinion in Electrochemistry*, 23, 26–30. <https://doi.org/10.1016/j.coelec.2020.02.014>
- Ha, C.-S., & Park, S. S. (2019). *General Synthesis and Physico-chemical Properties of Mesoporous Materials* (pp. 15–85). https://doi.org/10.1007/978-981-13-2959-3_2
- Hao, G., Mondin, G., Zheng, Z., Biemelt, T., Klosz, S., Schubel, R., Eychmüller, A., & Kaskel, S. (2015). Unusual Ultra-Hydrophilic, Porous Carbon Cuboids for Atmospheric-Water Capture. *Angewandte Chemie International Edition*, 54(6), 1941–1945. <https://doi.org/10.1002/anie.201409439>
- Hassan, M. E., Yang, Q., Xiao, Z., Liu, L., Wang, N., Cui, X., & Yang, L. (2019). Impact of immobilization technology in industrial and pharmaceutical applications. *3 Biotech*, 9(12), 440. <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1969-0>
- Hilgartner, S. (2015). Biotechnology. In *International Encyclopedia of the Social & Behavioral Sciences* (pp. 676–682). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-097086-8.85046-1>
- Illanes, A. (Ed.). (2008). *Enzyme Biocatalysis*. Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-1-4020-8361-7>
- Imtaiyaz Hassan, Md., Shajee, B., Waheed, A., Ahmad, F., & Sly, W. S. (2013). Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 21(6), 1570–1582. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2012.04.044>
- Ishizaki K., Komarneni S., & Nanko M. (2015). *Porous Materials: Process technology and applications*. Elsevier.
- Jing, G., Pan, F., Lv, B., & Zhou, Z. (2015). Immobilization of carbonic anhydrase on epoxy-functionalized magnetic polymer microspheres for CO₂ capture. *Process Biochemistry*, 50(12), 2234–2241. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2015.09.015>
- Johnson, K. A., & Goody, R. S. (2011). The Original Michaelis Constant: Translation of the 1913 Michaelis–Menten Paper. *Biochemistry*, 50(39), 8264–8269. <https://doi.org/10.1021/bi201284u>

- Kaar, J. L., Oh, H.-I., Russell, A. J., & Federspiel, W. J. (2007). Towards improved artificial lungs through biocatalysis. *Biomaterials*, 28(20), 3131–3139. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.03.021>
- Kanth, B. K., Lee, J., & Pack, S. P. (2013). Carbonic anhydrase: Its biocatalytic mechanisms and functional properties for efficient CO₂ capture process development. *Engineering in Life Sciences*, 13(5), 422–431. <https://doi.org/10.1002/elsc.201200157>
- Karageorgou, D., Thomou, E., Vourvou, N. T., Lyra, K.-M., Chalmpes, N., Enotiadis, A., Spyrou, K., Katapodis, P., Gournis, D., & Stamatis, H. (2019). Antibacterial and Algicidal Effects of Porous Carbon Cuboid Nanoparticles. *ACS Omega*, 4(3), 4991–5001. <https://doi.org/10.1021/acsomega.8b02018>
- Ki, M.-R., Kanth, B. K., Min, K. H., Lee, J., & Pack, S. P. (2012). Increased expression level and catalytic activity of internally-duplicated carbonic anhydrase from *Dunaliella* species by reconstitution of two separate domains. *Process Biochemistry*, 47(9), 1423–1427. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2012.05.005>
- Kumar, J., Pandey, A., & Singh, S. P. (2020). An introduction to enzyme structure dynamics and enzyme catalysis. In *Biomass, Biofuels, Biochemicals* (pp. 3–10). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819820-9.00001-6>
- Lau, S. C., Lim, H. N., Basri, M., Fard Masoumi, H. R., Ahmad Tajudin, A., Huang, N. M., Pandikumar, A., Chia, C. H., & Andou, Y. (2014). Enhanced Biocatalytic Esterification with Lipase-Immobilized Chitosan/Graphene Oxide Beads. *PLoS ONE*, 9(8), e104695. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104695>
- Li, K., Wang, J., He, Y., Abdulrazaq, M. A., & Yan, Y. (2018). Carbon nanotube-lipase hybrid nanoflowers with enhanced enzyme activity and enantioselectivity. *Journal of Biotechnology*, 281, 87–98. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2018.06.344>
- Lindee, S. (1994). Robert Bud, The uses of life: a history of biotechnology, Cambridge University Press, 1993, pp. xiii, 299, illus., £30.00, \$49.95 (0-521-38240-8). *Medical History*, 38(3), 342–342. <https://doi.org/10.1017/S002572730003670X>
- Liu, S. (2017). Enzymes. In *Bioprocess Engineering* (pp. 297–373). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63783-3.00007-1>
- Lu, L., Qian, Z., Cai, Y.-D., & Li, Y. (2007). ECS: An automatic enzyme classifier based on functional domain composition. *Computational Biology and Chemistry*, 31(3), 226–232. <https://doi.org/10.1016/j.compbiolchem.2007.03.008>
- Meldrum, N. U., & Roughton, F. J. W. (1933). Carbonic anhydrase. Its preparation and properties. *The Journal of Physiology*, 80(2), 113–142. <https://doi.org/10.1113/jphysiol.1933.sp003077>
- Mendoza S. M. (2007). *Exploiting molecular machines on surfaces*.
- Merz, K. M. (1990). Insights into the function of the zinc hydroxide-Thr199-Glu106 hydrogen bonding network in carbonic anhydrases. *Journal of Molecular Biology*, 214(4), 799–802. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(90\)90333-H](https://doi.org/10.1016/0022-2836(90)90333-H)
- Michaelis, E., Nie, R., Austin, D., & Yue, Y. (2023). High surface area biocarbon monoliths for methane storage. *Green Energy & Environment*, 8(5), 1308–1324. <https://doi.org/10.1016/j.gee.2022.07.005>

- Mokhtar, N. F., Abd. Rahman, R. N. Z. R., Muhd Noor, N. D., Mohd Shariff, F., & Mohamad Ali, M. S. (2020). The Immobilization of Lipases on Porous Support by Adsorption and Hydrophobic Interaction Method. *Catalysts*, 10(7), 744. <https://doi.org/10.3390/catal10070744>
- Muley, A. B., Thorat, A. S., Singhal, R. S., & Harinath Babu, K. (2018). A tri-enzyme co-immobilized magnetic complex: Process details, kinetics, thermodynamics and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*, 118, 1781–1795. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.07.022>
- Oviya, M., Giri, S. S., Sukumaran, V., & Natarajan, P. (2012). IMMOBILIZATION OF CARBONIC ANHYDRASE ENZYME PURIFIED FROM *Bacillus subtilis* VSG-4 AND ITS APPLICATION AS CO₂ SEQUESTERER. *Preparative Biochemistry and Biotechnology*, 42(5), 462–475. <https://doi.org/10.1080/10826068.2012.654571>
- Pal, N., & Bhaumik, A. (2013). Soft templating strategies for the synthesis of mesoporous materials: Inorganic, organic–inorganic hybrid and purely organic solids. *Advances in Colloid and Interface Science*, 189–190, 21–41. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2012.12.002>
- Paul, P. E. V., Sangeetha, V., & Deepika, R. G. (2019). Emerging Trends in the Industrial Production of Chemical Products by Microorganisms. In *Recent Developments in Applied Microbiology and Biochemistry* (pp. 107–125). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816328-3.00009-X>
- Qiang, H., Shi, M., Wang, F., & Xia, M. (2023). Green synthesis of high N-doped hierarchical porous carbon nanogranules with ultra-high specific surface area and porosity for capacitive deionization. *Separation and Purification Technology*, 308, 122918. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2022.122918>
- Rossino, G., Robescu, M. S., Licastro, E., Tedesco, C., Martello, I., Maffei, L., Vincenti, G., Bavaro, T., & Collina, S. (2022). Biocatalysis: A smart and green tool for the preparation of chiral drugs. *Chirality*, 34(11), 1403–1418. <https://doi.org/10.1002/chir.23498>
- Sahoo, P. C., Jang, Y.-N., & Lee, S.-W. (2012). Immobilization of carbonic anhydrase and an artificial Zn(II) complex on a magnetic support for biomimetic carbon dioxide sequestration. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 82, 37–45. <https://doi.org/10.1016/j.molcatb.2012.05.020>
- Sam, D. K., Li, H., Xu, Y.-T., & Cao, Y. (2024). Advances in porous carbon materials for a sustainable future: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*, 333, 103279. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2024.103279>
- Satav, S. S., Bhat, S., & Thayumanavan, S. (2010). Feedback Regulated Drug Delivery Vehicles: Carbon Dioxide Responsive Cationic Hydrogels for Antidote Release. *Biomacromolecules*, 11(7), 1735–1740. <https://doi.org/10.1021/bm1005454>
- Savic, S., Vojisavljevic, K., Počuča-Nešić, M., Zivojevic, K., Mladenovic, M., & Knezevic, N. (2018). Hard Template Synthesis of Nanomaterials Based on Mesoporous Silica. *Metallurgical and Materials Engineering*, 24(4). <https://doi.org/10.30544/400>
- Shamna, I., Kwan Jeong, S., & Margandan, B. (2021). Covalent immobilization of carbonic anhydrase on amine functionalized alumino-Siloxane aerogel beads for biomimetic

- sequestration of CO₂. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 100, 288–295. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2021.05.010>
- Sheldon, R. A. (2007). Cross-linked enzyme aggregates (CLEA®s): stable and recyclable biocatalysts. *Biochemical Society Transactions*, 35(6), 1583–1587. <https://doi.org/10.1042/BST0351583>
- Solovyeva, V. V., Shaimardanova, A. A., Chulpanova, D. S., Kitaeva, K. V., Chakrabarti, L., & Rizvanov, A. A. (2018). New Approaches to Tay-Sachs Disease Therapy. *Frontiers in Physiology*, 9. <https://doi.org/10.3389/fphys.2018.01663>
- Srinivasan, B. (2022). A guide to the Michaelis–Menten equation: steady state and beyond. *The FEBS Journal*, 289(20), 6086–6098. <https://doi.org/10.1111/febs.16124>
- Sun, F., Liu, X., Gao, J., Pi, X., Wang, L., Qu, Z., & Qin, Y. (2016). Highlighting the role of nitrogen doping in enhancing CO₂ uptake onto carbon surfaces: a combined experimental and computational analysis. *Journal of Materials Chemistry A*, 4(47), 18248–18252. <https://doi.org/10.1039/C6TA08262A>
- Supuran, C. (2008). Carbonic Anhydrases An Overview. *Current Pharmaceutical Design*, 14(7), 603–614. <https://doi.org/10.2174/138161208783877884>
- Supuran, C. T., & De Simone, G. (2015). Carbonic Anhydrases: An Overview. In *Carbonic Anhydrases as Biocatalysts* (pp. 3–13). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63258-6.00001-9>
- Tirard, S. (2015). Enzymology: History of. In *Encyclopedia of Astrobiology* (pp. 742–742). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-662-44185-5_5261
- ul-Islam, S. (Ed.). (2019). *Integrating Green Chemistry and Sustainable Engineering*. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9781119509868>
- University of Essex. (n.d.). *HAEMO2: The effect of oxygen on the function of haemoglobin, Creating a safe blood substitute for the 21st Century*. University of Essex .
- Watts J.F., & Wolstenholme J. (2005). *An Introduction to Surface Analysis by XPS and AES*. John Wiley & Sons.
- Winkler, C. K., Schrittwieser, J. H., & Kroutil, W. (2021). Power of Biocatalysis for Organic Synthesis. *ACS Central Science*, 7(1), 55–71. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c01496>
- Xiao, L., Liu, G., Gong, F., Zhu, H., Zhang, Y., Cai, Z., & Li, Y. (2022). A Minimized Synthetic Carbon Fixation Cycle. *ACS Catalysis*, 12(1), 799–808. <https://doi.org/10.1021/acscatal.1c04151>
- Yang, Q., Jiang, Y., Zhuo, H., Mitchell, E. M., & Yu, Q. (2023). Recent progress of metal single-atom catalysts for energy applications. *Nano Energy*, 111, 108404. <https://doi.org/10.1016/j.nanoen.2023.108404>
- Yong, J. K. J., Stevens, G. W., Caruso, F., & Kentish, S. E. (2015). The use of carbonic anhydrase to accelerate carbon dioxide capture processes. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 90(1), 3–10. <https://doi.org/10.1002/jctb.4502>
- Zhang, W., Bao, Y., & Bao, A. (2020). Preparation of nitrogen-doped hierarchical porous carbon materials by a template-free method and application to CO₂ capture. *Journal of*

Environmental Chemical Engineering, 8(3), 103732.
<https://doi.org/10.1016/j.jece.2020.103732>

Zhao, T., Xu, C., Ma, Y., Zeng, Y., & Wang, N. (2020). Study on preparation and structure of chrysanthemum-shaped micron calcium carbonate based on inverse microemulsion. *Micro & Nano Letters*, 15(15), 1151–1155. <https://doi.org/10.1049/mnl.2020.0349>

Zhou, X.-L., Zhang, H., Shao, L.-M., Lü, F., & He, P.-J. (2021). Preparation and Application of Hierarchical Porous Carbon Materials from Waste and Biomass: A Review. *Waste and Biomass Valorization*, 12(4), 1699–1724. <https://doi.org/10.1007/s12649-020-01109-y>

Zhu, Y., Li, W., Sun, G., Tang, Q., & Bian, H. (2016). Enzymatic properties of immobilized carbonic anhydrase and the biocatalyst for promoting CO₂ capture in vertical reactor. *International Journal of Greenhouse Gas Control*, 49, 290–296.
<https://doi.org/10.1016/j.ijggc.2016.03.016>

Γουρνής Δ., Αναγνωστόπουλος Δ., Καρακασίδης Μ. Α., & Παπαγιάννης Δ. (2018). *Εργαστηριακές Ασκήσεις για το μάθημα Εργαστήριο Υλικών Ι: «Τεχνικές Χαρακτηρισμού Υλικών»*. .

Σδούκος Α. Θ., & Πομώνης Φ. Ι. (2008). *Χημικές διεργασίες της χημικής τεχνολογίας*.

Σταμάτης Χ. (2016). *Ενζυμική Βιοτεχνολογία και Νανοβιοτεχνολογία*.