



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΩΝ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ
ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ
ΟΡΓΑΝΩΜΕΝΩΝ ΝΑΝΟΔΟΜΩΝ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΗΣ Β. ΠΑΥΛΙΔΗΣ

ΒΙΟΛΟΓΟΣ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2011

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Χαράλαμπος Σταμάτης – Αναπληρωτής Καθηγητής (Επιβλέπων)

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Κωνσταντίνος Δραΐνας – Καθηγητής

Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Φραγκίσκος Κολίσης – Καθηγητής

Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Γεώργιος Κ. Παπαδόπουλος – Καθηγητής

Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τ.Ε.Ι. Ηπείρου

Δημήτριος Γουρνής – Αναπληρωτής Καθηγητής

Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Θεώνη Τράγκα – Αναπληρώτρια Καθηγήτρια

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Πέτρος Καταπόδης – Λέκτορας

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Χαράλαμπος Σταμάτης – Αναπληρωτής Καθηγητής (Επιβλέπων)

Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων

Φραγκίσκος Κολίσης – Καθηγητής

Σχολή Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο

Γεώργιος Κ. Παπαδόπουλος – Καθηγητής

Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας, Τ.Ε.Ι. Ηπείρου

Ευχαριστίες

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

- ❖ Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Χαράλαμπο Σταμάτη, επιβλέποντα της παρούσας διατριβής, για τη στήριξη και την επιστημονική καθοδήγηση που μου παρείχε, αλλά και για την εμπιστοσύνη που έδειξε στο πρόσωπο μου όλα αυτά τα χρόνια. Ελπίζω να κατάφερα, έστω και λίγο, να σταθώ αντάξιος των προσδοκιών του. Η συνεργασία μου μαζί του, μία συνεργασία που θα με ακολουθεί σε όλη μου την ζωή, με έκανε να αγαπήσω βιωματικά τον τομέα της Βιοκατάλυσης και, ευρύτερα, της Βιοτεχνολογίας.
- ❖ Τον Καθηγητή Γεώργιο Κ. Παπαδόπουλο, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για τη φιλοξενία στο εργαστήριο Βιοχημείας και Βιοφυσικής της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του Τ.Ε.Ι. Ηπείρου, για την καθοδήγηση του και για τη συνεισφορά του στην αποτίμηση των φασμάτων κυκλικού διχρωισμού. Η σχολαστικότητα του και η επιμονή του στη λεπτομέρεια είναι μάθημα ζωής για ένα νέο επιστήμονα.
- ❖ Τον Αναπληρωτή Καθηγητή Δημήτριο Γουρνή για τη φιλοξενία στο εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων για την καθοδήγηση του, ιδιαιτέρως όσον αφορά τα νανοϋλικά και τις τεχνικές χαρακτηρισμού. Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αποστόλη Ενωτιάδη, τη Φούλη Διαμαντή και τα υπόλοιπα μέλη του εργαστηρίου για τη συνεργασία.
- ❖ Το Λέκτορα Πέτρο Καταπόδη για τη συνεργασία, τη σημαντική συνεισφορά στην επιμέλεια της παρούσας διατριβής και τις υπέροχες συζητήσεις (επιστημονικές και μη).
- ❖ Τον Καθηγητή Φραγκίσκο Κολίση, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, για τη συμβολή του στην ολοκλήρωση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.
- ❖ Τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής για τις υποδείξεις και τις παρατηρήσεις τους.
- ❖ Τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας από το 2004 έως και σήμερα: Τον Μανόλη Καλογερά για την καθοδήγηση και την υποστήριξη που μου παρείχε όσο βρισκόταν στο εργαστήριο. Τις συναδέρφους Μαρία Κατσούρα, Κατερίνα Τζιάλλα, Βάσω Πατήλα και Αθηνά Παπαδοπούλου, τον Κώστα Κονιδάρη, την Αγγελική Πολύδερα, τον Ali Taha, την Ανθή Χατζηκυριακίδου και όλους τους προπτυχιακούς φοιτητές που πέρασαν από το εργαστήριο για τη συνεργασία και το ευχάριστο κλίμα του εργαστηρίου. Ιδιαιτέρως θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου Τάκη Καρρά και τον Κυριάκο Τζαφέστα, οι οποίοι εκπόνησαν την πτυχιακή τους εργασία στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας.
- ❖ Τον Καθηγητή Uwe Bornscheuer και τον Torge Vorhaben για τη φιλοξενία στο Ινστιτούτο Βιοχημείας του Πανεπιστημίου του Greifswald στη Γερμανία, καθώς και το IKY και το DAAD για την δυνατότητα που μου προσέφεραν να εργαστώ στο συγκεκριμένο εργαστήριο.

- ❖ Τον Enrico Maccallini, ερευνητή του Τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου της Calambria (Ιταλία) για την πολύτιμη βοήθεια του στην αποτίμηση της δευτεροταγούς δομής πρωτεϊνών από φάσματα FTIR.
- ❖ Την Καθηγήτρια Petra Rudolf και τον Θοδωρή Τσούφη από το Πανεπιστήμιο του Groningen (Ολλανδία) για τη λήψη και αποτίμηση των φασμάτων XPS.
- ❖ Την Επίκουρη Καθηγήτρια Αναστασία Σ. Πολίτου για τη φιλοξενία στο Εργαστήριο Βιολογικής Χημείας του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.
- ❖ Τον Δρ. Άγγελο Ντάντο για την συνεργασία του και τις υποδείξεις του για το κομμάτι της εκχύλισης, κλασμάτωσης και ανάλυσης των πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων.
- ❖ Το Ίδρυμα Μποδοσάκη για την οικονομική ενίσχυση για την εκπόνηση της παρούσας διδακτορικής διατριβής.
- ❖ Την Ελένη Θεοδοσίου και τη Δήμητρα Μάνθου για την πολύτιμη βοήθεια τους στην επιμέλεια του παρόντος συγγράμματος.
- ❖ Τον Ηλία Αυδίκο και τον Αλέξανδρο Δευτεραίο για την λειτουργική υποστήριξη σε θέματα ηλεκτρονικών υπολογιστών και όχι μόνο.
- ❖ Τους φίλους μου Δημήτρη Πανταζίδα, Κώστα Υψηλό, Κατερίνα Ζαραλή, Αντώνη Αντωνόπουλο για τις όμορφες στιγμές που μου χάρισαν, οι οποίες μου έδιναν δύναμη να συνεχίσω το έργο μου.
- ❖ Τη σύντροφο μου Βιργινία Χουλιάρá για τη υποστήριξη της και την Ιώβεια υπομονή της, ιδιαίτερα κατά τη διάρκεια της συγγραφής.
- ❖ Τους γονείς μου, Βασίλη και Ευρυδίκη, για την αγάπη, την υποστήριξη και την υπομονή τους, καθώς και για τις θυσίες που έκαναν για να μπορέσω να ολοκληρώσω απρόσκοπτα την παρούσα διατριβή, καθώς και τις αδερφές μου, Σταυρούλα και Στέλλα, που ομορφαίνουν τη ζωή μου.

Δημοσιεύσεις

Από την παρούσα διατριβή προέκυψαν οι ακόλουθες δημοσιεύσεις σε διεθνή περιοδικά:

1. I.V. Pavlidis, T. Vorhaben, U.T. Bornscheuer, G. K. Papadopoulos, H. Stamatis. The influence of functionalized carbon based nanomaterials on catalytic behavior and structure of hydrolases. (2011) *Submitted*
2. I.V. Pavlidis, T. Vorhaben, T. Tsoufis, P. Rudolf, U.T. Bornscheuer, D. Gournis, H. Stamatis. Development of effective nanobiocatalytic systems through the immobilization of hydrolases on functionalized carbon-based nanomaterials. (2011) *Submitted*
3. I.V. Pavlidis, K. Tzafestas, H. Stamatis. Water-in-ionic liquid microemulsion-based organogels as novel matrices for enzyme immobilization. *Biotechnology Journal* 5 (2010) 805-812.
4. I.V. Pavlidis, T. Tsoufis, A. Enotiadis, D. Gournis, H. Stamatis. Functionalized multi-wall carbon nanotubes for lipase immobilization. *Advanced Engineering Materials* 10 (2010): B179-B183.
5. I.V. Pavlidis, D. Gournis, G.K. Papadopoulos, H. Stamatis. Lipases in water-in-ionic liquid microemulsions. Structural and activity studies. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 60 (2009): 50-56.

Οι ακόλουθες δημοσιευμένες περιλήψεις εργασιών συνεδρίων σε διεθνή περιοδικά:

1. I.V. Pavlidis, T. Tsoufis, D. Gournis, H. Stamatis. Enzyme immobilization on chemically functionalized multi-walled carbon nanotubes. *New Biotechnology* 25 (2009): S131
2. M. Katsoura, M. Patila, I.V. Pavlidis, H. Stamatis. Structural and stability studies of lipases in ionic liquids. *New biotechnology* 25 (2009): S131

Ένα κεφάλαιο σε βιβλίο του διεθνούς εκδοτικού οίκου Wiley:

I.V. Pavlidis, A.A. Tziaila, A. Enotiadis, H. Stamatis, D. Gournis. Chapter 2: Enzyme immobilization on layered and nanostructured materials (2010) *Biocatalysis in polymer chemistry* (K. Loos ed.), Wiley-VCH Verlag, pp.35-64 ISBN-10: 3-527-32618-9.

Και 17 συμμετοχές σε συνέδρια εκ των οποίων:

- ❖ 2 ομιλίες και 9 αναρτημένες εργασίες σε διεθνή συνέδρια
- ❖ 2 ομιλίες και 4 αναρτημένες εργασίες σε πανελλήνια συνέδρια

Περίληψη

Τα συστήματα οργανωμένων νανοδομών παρουσιάζουν σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον για το πεδίο ενζυμικής βιοτεχνολογίας. Στόχος της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη και η κατανόηση της σχέσης δομής και λειτουργίας υδρολυτικών ενζύμων σε συστήματα οργανωμένων νανοδομών, με απώτερο σκοπό τον ορθολογικό σχεδιασμό καινοτόμων νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων. Η μελέτη εστιάζεται σε δύο κατηγορίες νανοδομημένων συστημάτων: μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό και νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα.

Τα μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό είναι νέα συστήματα υδατικών νανοδιασπορών που συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα των συστημάτων μικρογαλακτωμάτων και των ιοντικών υγρών. Μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικά υγρά (όπως το [bmim]PF₆) μπορούν να σχηματιστούν με τη χρήση του επιφανειοενεργού Tween 20. Οι λιπάσες στα συγκεκριμένα μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού παρουσίασαν βελτιωμένα καταλυτικά χαρακτηριστικά σε σχέση με άλλα μικροετερογενή συστήματα, καταδεικνύοντας τη θετική επίδραση των οργανωμένων νανοδομών στην καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων. Η σύσταση των μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών επηρεάζει σημαντικά τα καταλυτικά χαρακτηριστικά και τη δομή των εγκλωβισμένων λιπασών. Οι λιπάσες στα μικρογαλακτώματα ιοντικών υγρών παρουσιάζουν μία συμπαγή δομή πλούσια σε β-πτυχώσεις, στην οποία οφείλεται η αυξημένη σταθερότητα ενώ παράλληλα διατηρούν την α-έλικα τους, η οποία σχετίζεται με την αυξημένη καταλυτική δραστικότητα τους. Σημαντικό πλεονέκτημα της χρήσης των μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών αποτελεί η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των εγκλωβισμένων ενζύμων, κάτι το οποίο δεν είναι δυνατό σε άλλα μικροετερογενή συστήματα.

Η ακινητοποίηση των εγκλωβισμένων σε μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού λιπασών σε πηκτώματα που παρασκευάζονται με τη χρήση της (υδροξυπροπυλο)μεθυλο κυτταρίνης (HPMC) καθιστά διαθέσιμα σε πλήθος μη συμβατικών μέσων τα βελτιωμένα καταλυτικά χαρακτηριστικά που παρουσιάζουν οι λιπάσες στα συγκεκριμένα μικρογαλακτώματα. Η ακινητοποίηση των λιπασών σε οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών οδήγησε σε αυξημένη συνθετική δραστικότητα ανεξαρτήτως του μέσου της διεργασίας. Επιπλέον, η σταθερότητα των ακινητοποιημένων λιπασών είναι αυξημένη σε σχέση με αυτή που επιδεικνύουν μη ακινητοποιημένες σε υδατικό διάλυμα (έως 200 φορές) ή σε μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού (έως 25 φορές). Η αυξημένη σταθερότητα των λιπασών στα οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων οφείλεται στην υιοθέτηση μίας περισσότερο συμπαγούς δομής, όπως και στην περίπτωση των μικρογαλακτωμάτων ιοντικού υγρού.

Τροποποιημένοι νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος (CNTs) και παράγωγα του οξειδίου του γραφένιου τα οποία φέρουν στην επιφάνεια τους χημικές ομάδες (π.χ. καρβοξυλομάδες, υδροξυλομάδες, αμινομάδες) ή αλειφατικές αλυσίδες χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς ακινητοποίησης λιπασών και εστερασών. Τα ένζυμα ακινητοποιήθηκαν στα νανοϋλικά με

φυσική προσρόφηση και με ομοιοπολική πρόσδεση, παράγοντας βιοϋλικά που φέρουν έως και 1.65 mg ενζύμου ανά mg νανοϋλικού. Η απόδοση της ακινητοποίησης και η καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων επηρεάζονται από τη γεωμετρία και τις λειτουργικές ομάδες των νανοϋλικών και από το πρωτόκολλο ακινητοποίησης. Τα πειραματικά αποτελέσματα υποδεικνύουν ως καταλληλότερους φορείς ακινητοποίησης τους τροποποιημένους CNTs από τα αντίστοιχα παράγωγα του οξειδίου του γραφενίου. Όσον αφορά τις λειτουργικές ομάδες, οι καρβοξυλομάδες φαίνεται να αναγνωρίζονται από το ενεργό κέντρο των ενζύμων οδηγώντας σε μείωση της δραστηριότητας, ενώ η περαιτέρω τροποποίηση των νανοϋλικών με εξαμεθυλοδιαμίνη έχει θετική επίδραση στην καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων, πιθανώς λόγω του της αύξησης της υδροφοβικότητας. Η συνθετική δραστηριότητα που επιδεικνύουν οι υδρολάσες μετά την ακινητοποίηση είναι έως 75 φορές αυξημένη σε σχέση με αυτή του ελεύθερου ενζύμου. Η ομοιοπολική ακινητοποίηση των ενζύμων παράγει βιοκαταλυτικά υλικά συγκρίσιμης ενεργότητας με τη φυσική προσρόφηση και οδηγεί σε σημαντική σταθεροποίηση των ενζύμων.

Οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ ενζύμων και νανοϋλικών οδηγούν σε δομικές αλλαγές των ενζύμων, ιδιαιτέρως κατά τη μη ομοιοπολική ακινητοποίηση. Σε υδατικό διάλυμα η παρουσία νανοϋλικών οδηγεί σε μείωση της α -έλικας. Αυτή η μείωση δρα αρνητικά στην καταλυτική δραστηριότητα των εστερασών, ενώ στις λιπάσες οδήγησε σε ενεργοποίηση, κάτι το οποίο σχετίζεται με τη μεσεπιφανειακή ενεργοποίησή τους. Φαίνεται πως οι οργανωμένες νανοδομές (είτε ως μικρογαλακτώματα, είτε ως νανοϋλικά) προσομοιώνουν καλύτερα το φυσικό μικροπεριβάλλον αυτών των ενζύμων σε σχέση με το υδατικό διάλυμα, με συνέπεια η δομή του ενζύμου που παρατηρείται σε αυτά τα συστήματα να είναι πιο κοντά στην ενεργή δομή των λιπασών όταν αυτά δρουν στη φύση. Τα καινοτόμα αυτά νανοβιοκαταλυτικά συστήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη βιοκαταλυτικών διεργασιών, όπως η τροποποίηση φυσικών βιοδραστικών ενώσεων και η παραγωγή βιοντήζελ.

Εν κατακλείδι, τα συστήματα οργανωμένων νανοδομών βελτιώνουν σημαντικά την καταλυτική δράση των υδρολυτικών ενζύμων οδηγώντας σε νέα νανοβιοκαταλυτικά συστήματα με ενδιαφέρουσες ιδιότητες. Τα συστήματα που αναπτύχθηκαν στην παρούσα διατριβή συνάδουν με τις επιταγές της «πράσινης χημείας», καθώς τα δομικά συστατικά τους παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα και υψηλή βιοσυμβατότητα. Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής καταδεικνύουν τα σημαντικά πλεονεκτήματα που προκύπτουν από τον εγκλωβισμό και την ακινητοποίηση υδρολυτικών ενζύμων σε οργανωμένες νανοδομές για την ανάπτυξη καινοτόμων βιοκαταλυτικών συστημάτων, τα οποία αποτελούν τη βάση για την ανάπτυξη πλήθους εφαρμογών στο πεδίο της νανοβιοκατάλυσης και ευρύτερα της νανοβιοτεχνολογίας.

Abstract

Nanostructured systems are of considerable research interest in the field of enzyme biotechnology. The aim of this thesis is to study and understand the structure-function relationship of hydrolytic enzymes in nanostructured systems, leading to the rational design of novel nanobiocatalytic systems. The study focuses on two types of nanostructured systems: water in ionic liquid microemulsions and carbon-based nanomaterials.

Water in ionic liquid microemulsions are novel water-nanodispersion systems which combine the advantages of both microemulsions and ionic liquids (IL). Such microemulsions can be formed using the ionic liquid [bmim]PF₆ and the non-ionic surfactant Tween 20. Lipases entrapped in these IL microemulsions exhibited improved catalytic behaviour compared to other microheterogeneous systems, indicating the positive effect of the organized nanostructures on the catalytic behavior of enzymes. The composition of IL microemulsions affects significantly the catalytic characteristics and the structure of encapsulated lipases. Lipases in IL microemulsions adopt a rigid structure rich in β -sheets, which is responsible for the observed increase in thermostability. At the same time, lipases retain their α -helices, which are associated with their increased catalytic activity. A significant advantage of the use of IL microemulsions is the possibility of reuse of the entrapped enzymes, something that is not feasible in other microheterogeneous systems.

Immobilization of lipases which are entrapped in IL microemulsions in gels prepared with (hydroxypropyl)methyl cellulose (HPMC) confers the improved catalytic features that the lipases exhibit in these microemulsions available to various non-conventional media. The immobilized lipase in IL microemulsion-based organogels led to increased synthetic activity, independently of the reaction medium. Moreover, the stability of immobilized lipases is increased compared with that exhibited by non-immobilized enzymes in an aqueous solution (up to 200 times) or IL microemulsions (up to 25 times). The increased stability of lipases in microemulsion-based organogels is due to the adoption of a more rigid structure, as in the case of IL microemulsions.

Functionalized multi-walled carbon nanotubes (CNTs) and graphene oxide derivatives which bear chemical groups (such as carboxyl-, hydroxyl- and amino-groups) or aliphatic chains on their surface were used as immobilization carriers for lipases and esterases. Enzymes can be immobilized onto these nanomaterials with physical adsorption and covalent attachment, producing biomaterials that can be loaded with up to 1.65 mg enzyme per mg of nanomaterial. The immobilization yield and catalytic activity of enzymes is greatly affected by the geometry and the functional groups of the nanomaterials and the immobilization protocol. The experimental results suggest the functionalized CNTs as more appropriate immobilization carriers than the respective graphene oxide derivatives. Regarding the functional groups on the surface of the nanomaterials, carboxyl-groups seem to be recognized by the active site of hydrolytic enzymes, leading to reduced activity, while further modification of these nanomaterials with hexamethylenediamine have a positive effect on the catalytic activity of enzymes. The synthetic

activity of immobilized hydrolases is up to 75 times greater than that of free enzymes. The covalent immobilization of enzymes producing materials with comparable biocatalytic activity to the physical absorption protocol and leads to significant stabilization of enzymes.

The enzyme - nanomaterial interactions lead to structural changes of enzymes, particularly during non-covalent immobilization. The presence of nanomaterials in aqueous solution leads to reduction of enzyme's α -helical content. This reduction has a negative impact on the catalytic activity of esterases and while for lipases it led to activation. This can be related to the interfacial activation of lipases. It seems that organized nanostructures (either microemulsions or nanomaterials) simulate in a better way the natural microenvironment of these enzymes compared with the aqueous solution, resulting in a structure of the enzyme observed in these systems which is closer to the active structure of lipases when they act in nature. These novel nanobiocatalytic systems can be used to develop biocatalytic processes, such as modification of bioactive natural compounds and the production of biodiesel.

Conclusively, organized nanostructured systems significantly improve the catalytic activity of hydrolytic enzymes, leading to novel nanobiocatalytic systems with interesting properties. The systems developed in the present study are consistent with the requirements of 'green chemistry', as their structural components exhibit low toxicity and high biocompatibility. The results of this study demonstrate the significant benefits arising from the implementation of organized nanostructures to entrapment and immobilization of hydrolytic enzymes for the development of novel innovative biocatalytic systems, which constitute the basis for the development of numerous applications in the field of nanobiocatalysis and, in a more wide perspective, in the field of nanobiotechnology.

Συντμήσεις & Συμβολισμοί

Συντμήσεις και συμβολισμοί στην Αγγλική:

- ❖ **[Bdmim]BF₄** 1,3-διβουτυλο-3-μεθυλιμιδαζόλιο τετραφθοριούχο βόριο
- ❖ **[Bmim]BF₄** 1-βουτυλο-3-μεθυλιμιδαζόλιο τετραφθοριούχο βόριο
- ❖ **[Bmim]PF₆** 1-βουτυλο-3-μεθυλιμιδαζόλιο εξαφθοριούχος φωσφόρος
- ❖ **AOT** Δις-(2-αιθυλεξυλ)σουλφοηλεκτρικό νάτριο
- ❖ **ATR** Εξασθένηση ολικής ανάκλασης
- ❖ **Bs2** Εστεράση από *Bacillus subtilis*
- ❖ **CalA** Λιπάση A από *Pseudozyma* (πρώην *Candida*) *antarctica*
- ❖ **CalB** Λιπάση B από *Pseudozyma* (πρώην *Candida*) *antarctica*
- ❖ **CI** Ομοιοπολική ακινητοποίηση
- ❖ **CNT** Νανοςωλήνες άνθρακα (πολλαπλού τοιχώματος)
- ❖ **CNT-COOH** Οξειδωμένοι νανοςωλήνες άνθρακα
- ❖ **CNT-NH** Νανοςωλήνες άνθρακα με ελεύθερες αμινομάδες στην επιφάνεια τους
- ❖ **CNT-R** Νανοςωλήνες άνθρακα με αλκυλομάδες στην επιφάνεια τους
- ❖ **CrI** Λιπάση από *Candida rugosa*
- ❖ **CTAB** Βρωμιούχο εξαδεκυλο-τριμεθυλαμμώνιο
- ❖ **Cvl** Λιπάση από *Chromobacterium viscosum*
- ❖ **F** Ένταση φθορισμού
- ❖ **FTIR** Φασματοσκοπία υπερέυθρου με μετασχηματισμό Fourier
- ❖ **F_o** Ένταση φθορισμού απουσία του αποσβέστη
- ❖ **GC** Αέριος χρωματογράφος, αέρια χρωματογραφία
- ❖ **Gr-COOH** Οξείδιο του γραφενίου
- ❖ **Gr-NH** Γραφίτης με ελεύθερες αμινομάδες στην επιφάνεια του
- ❖ **Gtl** Λιπάση από *Geobacillum thermoleovorans*
- ❖ **HPLC** Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης
- ❖ **HPMC** (Υδροξυπροπυλο)μεθυλο κυτταρίνη
- ❖ **IL** Ιοντικό υγρό
- ❖ **NCI** Μη ομοιοπολική ακινητοποίηση
- ❖ **PestE** Εστεράση από *Pyrobaculum calidifontis*
- ❖ **Pfe I** Εστεράση από *Pseudomonas fluorescens*
- ❖ **pNPB** Βουτυρικός εστέρας της 4-νιτροφαινόλης
- ❖ **pNPP** Παλμιτικός (C16) εστέρας της 4-νιτροφαινόλης
- ❖ **r** Συντελεστής συσχέτισης
- ❖ **r²** Συντελεστής προσδιορισμού
- ❖ **RM** Μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο που σχηματίζονται παρουσία AOT

❖ Rml	Λιπάση από <i>Rhizomucor miehei</i>
❖ RMSD	μέση τετραγωνική ρίζα της απόκλισης
❖ SDS	Δωδεκυλοθειικό νάτριο
❖ SLM	Μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο χωρίς επιφανειενεργό
❖ $t_{1/2}$	Χρόνος ημίσειας ζωής
❖ TEOS	Τετρααιθοξυ σιλάνιο
❖ TII	Λιπάση από <i>Thermomyces lanuginosa</i>
❖ TMMS	Τριμεθοξυ(μεθυλο) σιλάνιο
❖ TMOS	Τετραμεθοξυ σιλάνιο
❖ TMPS	Τριμεθοξυ(προπυλο) σιλάνιο
❖ Tris	2-Αμινο-2-(υδροξυμεθυλο)-1,3-προπανοδιόλη
❖ Triton X-100	ρ -(1,1,3,3-τετραμεθυλοβουτυλο) φαινυλαιθέρας της πολυαιθυλενογλυκόλης
❖ Tween 20	Μονολαουρικός εστέρας της πολυοξυ-αιθυλενο-σορβιτάνης
❖ w_o	Βαθμός ενυδάτωσης
❖ XPS	Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X

Συντμήσεις και συμβολισμοί στην Ελληνική:

❖ λ_{\max}	Μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης (ή μέγιστης έντασης φθορισμού)
❖ MME	Μέση μοριακή ελλειπτικότητα (ανά αμινοξύ)

Εμπορικές ονομασίες:

❖ Ισοοκτάνιο	2,2,4-Τριμεθυλοπεντάνιο
❖ Καπρυλικό οξύ	Οκτανοϊκό οξύ
❖ Λαυρικό οξύ	Δωδεκανοϊκό οξύ
❖ Παλμιτικό οξύ	Εξαδεκανοϊκό οξύ
❖ Ελαϊκό οξύ	<i>cis</i> -9-Οκταδεκενοϊκό οξύ
❖ Τριλαυρίνη	1,2,3-τριδωδεκανοϊκός εστέρας της γλυκερόλης
❖ Novozyme 435	Εμπορικό σκεύασμα λιπάσης Β από <i>Pseudozyma antarctica</i> ακινητοποιημένης σε ακρυλική ρητίνη

Πίνακας περιεχομένων

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
1 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΥΔΡΟΛΑΣΩΝ ΣΕ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΙΚΕΣ ΔΙΕΡΓΑΣΙΕΣ	7
1.1 ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΣΗ	7
1.2 ΥΔΡΟΛΑΣΕΣ ΚΑΡΒΟΕΥΛΕΣΤΕΡΩΝ	11
1.2.1 Δομή	13
1.2.2 Καταλυτικός μηχανισμός	14
1.2.3 Μεσεπιφανειακή ενεργοποίηση λιπασών	16
2 ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΣΗ ΣΕ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ	18
2.1 ΥΔΑΤΙΚΕΣ ΝΑΝΟΔΙΑΣΠΟΡΕΣ - ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ	18
2.2 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ	21
2.2.1 Μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο παρουσία επιφανειενεργού	21
2.2.2 Μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο απουσία επιφανειενεργών ενώσεων	23
2.2.3 Μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικά υγρά	24
2.3 ΈΝΖΥΜΑ ΣΕ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ	25
2.4 ΝΑΝΟΒΙΟΚΑΤΑΛΥΣΗ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ	28
3 ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΣΗ ΣΕ ΠΗΚΤΩΜΑΤΑ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ	30
3.1 ΠΗΚΤΩΜΑΤΑ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ - ΟΡΓΑΝΟΠΗΚΤΩΜΑΤΑ	30
3.2 ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΕ ΟΡΓΑΝΟΠΗΚΤΩΜΑΤΑ	32
4 ΝΑΝΟΔΟΜΗΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ	35
4.1 ΝΑΝΟΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΝΑΝΟΔΟΜΗΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ	35
4.2 ΝΑΝΟΎΛΙΚΑ ΒΑΣΙΣΜΕΝΑ ΣΤΟΝ ΑΝΘΡΑΚΑ	36
4.3 ΟΜΟΙΟΠΟΛΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΝΑΝΟΔΟΜΗΜΕΝΩΝ ΥΛΙΚΩΝ	39
4.4 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΝΑΝΟΎΛΙΚΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΤΟΝ ΑΝΘΡΑΚΑ	41
4.5 ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΕ ΝΑΝΟΎΛΙΚΑ ΒΑΣΙΣΜΕΝΑ ΣΕ ΑΝΘΡΑΚΑ	42
4.5.1 Προσεγγίσεις ακινητοποίησης	42
4.5.2 Εφαρμογές ενζύμων ακινητοποιημένων σε νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα	45
5 ΔΟΜΗ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΕ ΟΡΓΑΝΩΜΕΝΕΣ ΝΑΝΟΔΟΜΕΣ	48
5.1 ΔΟΜΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	48
5.2 ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΚΑΙ ΔΟΜΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	50
5.2.1 Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού	51
5.2.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου	55
5.2.3 Φασματοσκοπία φθορισμού	57
5.3 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΣΧΕΣΗΣ ΔΟΜΗΣ-ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΟΡΓΑΝΩΜΕΝΩΝ ΝΑΝΟΔΟΜΩΝ	58

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6	ΥΛΙΚΑ	63
6.1	ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	63
6.1.1	Ένζυμα	63
6.1.2	Υποστρώματα	64
6.1.3	Διαλύτες	64
6.1.4	Φορείς ακινητοποίησης	65
6.1.5	Άλλα αντιδραστήρια / υλικά	65
7	ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	66
7.1	ΠΟΣΟΤΙΚΟΣ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	66
7.2	ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ	67
7.2.1	Θερμική κατεργασία πρωτεϊνών	67
7.2.2	Χρωματογραφία συγγένειας	67
7.3	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ ΠΡΩΤΕΪΝΩΝ ΥΠΟ ΑΠΟΔΙΑΤΑΚΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ	67
7.4	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΝΑΝΟΔΙΑΣΠΟΡΑΣ	69
7.4.1	Παρασκευή μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο	69
7.4.2	Παρασκευή μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό	70
7.4.3	Προσδιορισμός πολικότητας συστημάτων νανοδιασποράς	71
7.5	ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΥΔΡΟΛΑΣΩΝ	72
7.5.1	Ακινητοποίηση λιπασών σε οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων	72
7.5.2	Ακινητοποίηση υδρολασών σε νανοδομημένα υλικά	72
7.6	ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΕΝΖΥΜΩΝ	74
7.6.1	Υδρόλυση βουτυλεστέρα της 4-νιτροφαινόλης	74
7.6.2	Εστεροποίηση λιπαρών οξέων με αλκοόλες	74
7.6.3	Μετεστεροποίηση βινυλ-οξικού οξέος με την (±)1-φαινυλαιθανόλη	75
7.6.4	Ενζυμική τροποποίηση βιοδραστικών ενώσεων	75
7.6.5	Αλκοόλυση τριλαυρίνης από μεθανόλη	76
7.6.6	Χημειοενζυμική οξειδωση πολυαρωματικών υδρογονανθράκων	77
7.7	ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΘΕΡΜΟΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ ΕΝΖΥΜΩΝ	77
7.7.1	Προσδιορισμός σταθερότητας λιπασών σε υδατικά συστήματα	77
7.7.2	Προσδιορισμός σταθερότητας λιπασών σε μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο	78
7.7.3	Προσδιορισμός σταθερότητας λιπασών σε μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό	78
7.7.4	Προσδιορισμός σταθερότητας λιπασών ακινητοποιημένων σε οργανοπηκτώματα	79
7.7.5	Προσδιορισμός σταθερότητας υδρολασών παρουσία νανοϋλικών	79
7.7.6	Προσδιορισμός κινητικών σταθερών απενεργοποίησης	79
7.8	ΑΝΑΛΥΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ	81
7.8.1	Αέριος χρωματογραφία (GC)	81
7.8.2	Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)	82
7.9	ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΛΕΤΗΣ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΕΝΖΥΜΩΝ	82
7.9.1	Φασματοσκοπία φθορισμού	82
7.9.2	Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (CD)	83
	7.9.2.1 Λήψη φασμάτων σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων	83
	7.9.2.2 Λήψη φασμάτων σε υδατικά συστήματα παρουσία νανοϋλικών	83
	7.9.2.3 Υπολογισμός στοιχείων δευτεροταγούς δομής με τη χρήση αλγορίθμων	84
7.9.3	Φασματοσκοπία υπερύθρου (FTIR)	84

7.9.3.1	Λήψη φασμάτων υπερύθρου υγρών δειγμάτων	84
7.9.3.2	Λήψη φασμάτων υπερύθρου στερεών δειγμάτων	85
7.9.3.3	Υπολογισμός στοιχείων δευτεροταγούς δομής με ανάλυση αμιδικών κορυφών	85
7.10	ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗΣ & ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ ΝΑΝΟΔΟΜΗΜΕΝΩΝ ΥΛΙΚΩΝ	87
7.10.1	Χημική τροποποίηση νανοδομημένων υλικών	87
7.10.1.1	Τροποποίηση νανοσωλήνων άνθρακα	87
7.10.1.2	Τροποποίηση γραφίτη	89
7.10.2	Χαρακτηρισμός νανοδομημένων υλικών	89
7.10.2.1	Φασματοσκοπία υπερύθρου (FTIR)	89
7.10.2.2	Φασματοσκοπία Raman	89
7.10.2.3	Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS)	90
7.11	ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΑΠΟΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΡΥΠΑΣΜΕΝΩΝ ΜΕ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΕΙΔΗ ΕΔΑΦΩΝ	90
7.11.1	Εκχύλιση	90
7.11.2	Καθαρισμός - Κλασματοποίηση	90

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

8	ΕΓΚΛΩΒΙΣΜΟΣ ΛΙΠΑΣΩΝ ΣΕ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ ΙΟΝΤΙΚΩΝ ΥΓΡΩΝ	95
8.1	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ ΙΟΝΤΙΚΩΝ ΥΓΡΩΝ	96
8.1.1	Διάγραμμα φάσης	96
8.1.2	Προσδιορισμός της πολικότητας του νερού στα συστήματα νανο-διασποράς	98
8.2	ΥΔΡΟΛΥΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΛΙΠΑΣΩΝ ΣΕ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ ΣΕ ΕΛΑΙΟ	99
8.2.1	Επίδραση του βαθμού ενυδάτωσης των μικρογαλακτωμάτων με ΑΟΤ	99
8.2.2	Επίδραση της σύστασης των μικρογαλακτωμάτων χωρίς επιφανειενεργό στην ενζυμική δραστηριότητα	101
8.3	ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΛΙΠΑΣΩΝ ΣΕ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ ΝΕΡΟΥ ΣΕ ΙΟΝΤΙΚΟ ΥΓΡΟ	103
8.3.1	Δραστηριότητα λιπασών σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων ιοντικού υγρού	104
8.3.2	Εκλεκτικότητα των λιπασών στα μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού	107
8.3.3	Επίδραση ιοντικών υγρών στην υδρολυτική δραστηριότητα λιπασών	109
8.3.4	Επίδραση του βαθμού ενυδάτωσης σε μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού	111
8.3.5	Επίδραση της συγκέντρωσης του επιφανειενεργού	113
8.4	ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΛΙΠΑΣΩΝ ΣΕ ΜΙΚΡΟΕΤΕΡΟΓΕΝΗ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ	114
8.4.1	Σταθερότητα σε υδατικό σύστημα	114
8.4.2	Σταθερότητα σε μικροετερογενή συστήματα	117
8.4.3	Επαναχρησιμοποίηση λιπασών που έχουν εγκλωβιστεί σε μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού	120
8.5	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΛΙΠΑΣΩΝ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ	121
8.5.1	Μελέτη της δομής σε μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο	122
8.5.2	Μελέτη της δομής των ενζύμων σε μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό	126
8.6	ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΛΙΠΑΣΩΝ ΕΓΚΛΩΒΙΣΜΕΝΩΝ ΣΕ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΑ ΙΟΝΤΙΚΟΥ ΥΓΡΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΕΣΤΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΔΡΑΣΤΙΚΩΝ ΕΝΩΣΕΩΝ	128
9	ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΛΙΠΑΣΩΝ ΣΕ ΟΡΓΑΝΟΠΗΚΤΩΜΑΤΑ ΜΙΚΡΟΓΑΛΑΚΤΩΜΑΤΩΝ ΙΟΝΤΙΚΩΝ ΥΓΡΩΝ	132
9.1	ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΟΡΓΑΝΟΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ	133
9.1.1	Επίδραση της περιεκτικότητας σε ΗΡΜC	134
9.1.2	Αναγκαιότητα της χρήσης συστημάτων νανοδιασποράς	135
9.1.3	Επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου	136

9.2	ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΛΙΠΑΣΩΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΣΕ ΟΡΓΑΝΟΠΗΚΤΩΜΑΤΑ	137
9.2.1	Επίδραση της σύστασης του μικρογαλακτώματος	138
9.2.2	Επίδραση του μέσου αντίδρασης	139
9.2.3	Επίδραση της θερμοκρασίας	142
9.2.4	Εκλεκτικότητα των λιπασών	143
9.3	ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΛΙΠΑΣΩΝ	144
9.3.1	Θερμοσταθερότητα ακινητοποιημένων λιπασών	144
9.3.2	Επαναχρησιμοποίηση ακινητοποιημένων λιπασών	147
9.4	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΛΙΠΑΣΩΝ	148
9.5	ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΟΠΗΚΤΩΜΑΤΩΝ ΗΡΜC ΜΕ ΧΡΗΣΗ ΣΙΛΑΝΙΩΝ	149
9.5.1	Επίδραση στην ενεργότητα των ακινητοποιημένων λιπασών	149
9.5.2	Επίδραση στη σταθερότητα των ακινητοποιημένων λιπασών	151
9.6	ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΛΙΠΑΣΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΝΤΗΖΕΛ	153
10	ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΥΔΡΟΛΑΣΩΝ ΜΕ ΝΑΝΟΔΟΜΗΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ	156
10.1	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΤΩΝ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΝΑΝΟΔΟΜΗΜΕΝΩΝ ΥΛΙΚΩΝ	157
10.1.1	Φασματοσκοπία υπερύθρου	157
10.1.2	Φασματοσκοπία Raman	159
10.2	ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΥΔΡΟΛΑΣΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΝΑΝΟΎΛΙΚΩΝ	161
10.3	ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ ΥΔΡΟΛΑΣΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΝΑΝΟΎΛΙΚΩΝ	164
10.4	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΟΜΗΣ ΤΩΝ ΥΔΡΟΛΑΣΩΝ ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΝΑΝΟΎΛΙΚΩΝ	167
10.4.1	Φασματοσκοπία φθορισμού	167
10.4.2	Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού	171
11	ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΥΔΡΟΛΑΣΩΝ ΣΕ ΝΑΝΟΔΟΜΗΜΕΝΑ ΥΛΙΚΑ	175
11.1	ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΩΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ	175
11.1.1	Διερεύνηση των δυνάμεων που διέπουν τη μη ομοιοπολική ακινητοποίηση	175
11.1.2	Βελτιστοποίηση της ενεργοποίησης των νανοϋλικών με γλουταραλδεϋδη για την ομοιοπολική ακινητοποίηση υδρολασών	177
11.1.3	Βελτιστοποίηση του χρόνου επώασης του ενζύμου με τα νανοϋλικά	178
11.1.4	Επίδραση του μέσου στο οποίο γίνεται η ακινητοποίηση	179
11.2	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΩΝ ΤΩΝ ΒΙΟΎΛΙΚΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΧΡS	181
11.3	ΑΠΟΔΟΣΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ	183
11.4	ΣΥΝΘΕΤΙΚΗ ΔΡΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑ ΥΔΡΟΛΑΣΩΝ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΣΕ ΝΑΝΟΎΛΙΚΑ	186
11.4.1	Επίδραση των λειτουργικών ομάδων της επιφάνειας των CNTs	186
11.4.2	Επίδραση της αναλογίας ενζύμου – νανοϋλικού	187
11.4.3	Συνθετική δραστικότητα υδρολασών	189
11.5	ΕΠΑΝΑΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗΣ ΛΙΠΑΣΗΣ CALB	190
11.6	ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΔΕΥΤΕΡΟΤΑΓΟΥΣ ΔΟΜΗΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΥΔΡΟΛΑΣΩΝ	193
11.7	ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΩΝ ΛΙΠΑΣΩΝ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΒΙΟΝΤΗΖΕΛ	195
12	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	197
13	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	205
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ (I-IV)	231

Εισαγωγή

Η νανοβιοτεχνολογία, το πεδίο το οποίο έχει ως αντικείμενο τον συγκερασμό της βιολογίας με την νανοτεχνολογία, έχει προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια λόγω των σημαντικών εφαρμογών που έχουν προκύψει σε τομείς όπως η μεταφορά και χορήγηση φαρμάκων, η μοριακή απεικόνιση, η βιοαποκατάσταση και η νανοβιοκατάλυση, αλλά και από την ανάπτυξη βιοαισθητήρων και κυψελών βιοκαυσίμων. Σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη όλων αυτών των εφαρμογών διαδραματίζει η αλληλεπίδραση των βιομορίων με τις οργανωμένες νανοδομές, πεδίο το οποίο δεν έχει μελετηθεί εκτενώς έως και σήμερα. Η κατανόηση των παραγόντων που επιδρούν στην αποτελεσματικότητα τέτοιων υβριδικών συστημάτων βιομορίων - οργανωμένων νανοδομών είναι μείζονος σημασίας για τον ορθολογικό σχεδιασμό τους και την επακόλουθη επιτυχή εφαρμογή τους.

Λαμβάνοντας υπόψη τα προρρηθέντα, στόχος της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη και κατανόηση της καταλυτικής συμπεριφοράς υδρολυτικών ενζύμων, ενζύμων με τις περισσότερες πρακτικές εφαρμογές, σε συστήματα οργανωμένων νανοδομών. Η μελέτη εστιάζεται σε νανοδομημένα συστήματα όπως τα μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό τα οποία παρουσιάζουν υδατικές νανοδιασπορές και σε νανοδομημένα υλικά με βάση τον άνθρακα, υλικά τα οποία έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια και με τα οποία έχουν αναπτυχθεί αρκετές βιοκαταλυτικές εφαρμογές. Τα μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό είναι μία νέα κατηγορία μικροετερογενών συστημάτων τα οποία συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα των μικρογαλακτωμάτων και των ιοντικών υγρών. Παράλληλα, αν και τα νανοδομημένα υλικά με βάση τον άνθρακα ανακαλύφθηκαν μόλις εδώ και λίγα χρόνια, οι εφαρμογές που έχουν προκύψει αυξάνονται χρόνο με το χρόνο με ραγδαίο ρυθμό. Καθώς η καταλυτική δραστηριότητα των ενζύμων συσχετίζεται με την ενεργή τους δομή, γίνεται σαφές ότι η κατανόηση της καταλυτικής συμπεριφοράς των ενζύμων σε αυτά τα συστήματα δεν είναι εφικτή δίχως τη μελέτη της δομής τους. Έτσι, απώτερος σκοπός της παρούσας διατριβής είναι να γίνει μία συσχέτιση της δομής και της λειτουργίας των υδρολυτικών ενζύμων σε αυτά τα συστήματα οργανωμένων νανοδομών.

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

Στα κεφάλαια 1 έως 5 (θεωρητικό μέρος) επιχειρείται η θεωρητική προσέγγιση του θέματος μέσα από τη βιβλιογραφική ανασκόπηση, παραθέτοντας τις απαραίτητες πληροφορίες για την κατανόηση των εννοιών και των φαινομένων που παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή. Παράλληλα, αυτή η ανασκόπηση θα διευκολύνει τη σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα βιβλιογραφικά δεδομένα. Αναλυτικότερα, στο κεφάλαιο 1 γίνεται εκτενής αναφορά στο ρόλο των βιοκαταλυτικών διεργασιών και στις εφαρμογές που έχουν προκύψει από το επιστημονικό πεδίο της βιοκατάλυσης. Καθώς οι υδρολάσες αποτελούν έως και σήμερα την κατηγορία

ενζύμων που παρουσιάζει τις περισσότερες εφαρμογές στη βιομηχανία, γίνεται εκτενής αναφορά στα συγκεκριμένα ένζυμα, τα οποία είναι και οι βιοκαταλύτες ενδιαφέροντος στην παρούσα διατριβή. Στο κεφάλαιο 2 αναπτύσσονται οι βασικές αρχές του σχηματισμού νανοδομημένων μικροετερογενών συστημάτων όπως τα μικρογαλακτώματα, ο εγκλωβισμός των ενζύμων σε αυτά τα συστήματα και οι νανοβιοκαταλυτικές εφαρμογές που προκύπτουν. Επιπλέον, στο 3^ο κεφάλαιο αναπτύσσεται η μεθοδολογία της πηκτωματοποίησης τέτοιων μικροετερογενών συστημάτων με τη χρήση βιοπολυμερών, καθώς και περιπτώσεις ακινητοποίησης ενζύμων σε τέτοια συστήματα. Στο 4^ο κεφάλαιο επιχειρείται μία θεωρητική εισαγωγή στα νανοδομημένα υλικά, με έμφαση στα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα, τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στη παρούσα εργασία. Παρουσιάζονται τα πλεονεκτήματα και οι ιδιότητες των νανοδομημένων υλικών, εστιάζοντας σε αυτά που αφορούν την ακινητοποίηση ενζύμων πάνω στα νανοϋλικά. Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο γίνεται μία μικρή ανασκόπηση της βιβλιογραφίας όσον αφορά τις προσεγγίσεις που χρησιμοποιήθηκαν για την ακινητοποίηση ενζύμων σε νανοϋλικά, καθώς και εφαρμογές που αναπτύχθηκαν με τη χρήση των βιοϋλικών που προέκυψαν. Τέλος, καθώς σκοπός της παρούσας διατριβής είναι η μελέτη της σχέσης μεταξύ καταλυτικής συμπεριφοράς και δομής των ενζύμων, στο 5^ο κεφάλαιο γίνεται μία εισαγωγή στη δομή των πρωτεϊνών, καθώς και στις βασικές αρχές των φασματοσκοπικών τεχνικών που χρησιμοποιούνται συνήθως για τη μελέτη της δομής των ενζύμων *in situ*. Στο τέλος του κεφαλαίου γίνεται ανασκόπηση της βιβλιογραφίας σχετικά με τις σχέσεις δομής – λειτουργίας ενζύμων σε συστήματα οργανωμένων νανοδομών, όπως τα μικρογαλακτώματα ή τα νανοϋλικά.

Στη δεύτερη ενότητα (κεφάλαια 6 και 7) αναφέρονται τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, ενώ στην τρίτη ενότητα (κεφάλαια 8 έως 11) παρατίθενται τα πειραματικά αποτελέσματα τα οποία προέκυψαν από την παρούσα εργασία, τα οποία σχολιάζονται και συσχετίζονται με την υπάρχουσα βιβλιογραφία.

Στο 8^ο κεφάλαιο παρατίθενται τα αποτελέσματα του εγκλωβισμού των μικροβιακών λιπασών από *Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum*, *Rhizomucor miehei*, *Thermomyces lanuginosa* και της λιπάσης Β από *Pseudozyma antarctica* σε συστήματα που παρουσιάζουν υδατικές νανοδιασπορές. Πιο συγκεκριμένα, αναπτύχθηκαν δύο νέα συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ με τη χρήση μη ιοντικών επιφανειοενεργών και μελετήθηκε η ικανότητα χρησιμοποίησης τους ως μέσο για βιοκαταλυτικές διεργασίες σε σύγκριση με ευρέως χρησιμοποιούμενα μικροετερογενή συστήματα όπως τα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο. Η καταλυτική συμπεριφορά των λιπασών μελετήθηκε στα συγκεκριμένα μέσα όσον αφορά τη δραστικότητα, την εκλεκτικότητα και τη σταθερότητα, ενώ μελετήθηκε η επίδραση της σύστασης των συστημάτων και του μεγέθους των υδατικών νανο-διασπορών στα καταλυτικά χαρακτηριστικά των λιπασών που εγκλωβίζονται σε αυτές. Η δομή των λιπασών σε αυτά τα συστήματα μελετήθηκε με διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές, όπως η φασματοσκοπία υπεριώθρου, φθορισμού και κυκλικού διχρωισμού, και συσχετίστηκε με την καταλυτική τους δραστικότητα. Ενδεικτικά, ως εφαρμογή προτείνεται η χρήση λιπασών σε τέτοια

συστήματα για την παραγωγή λιπόφιλων παραγώγων φυσικών βιοδραστικών ενώσεων, μέσω της εστεροποίησής τους με αλειφατικές αλκοόλες.

Στο 9^ο κεφάλαιο παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της ακινητοποίησης των λιπασών σε οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών, η οποία καθιστά διαθέσιμα σε πλήθος διαλυτών τα ενδιαφέροντα καταλυτικά χαρακτηριστικά που επιδεικνύουν οι λιπάσες στα συγκεκριμένα συστήματα οργανωμένων νανοδομών, σύμφωνα με το κεφάλαιο 8. Η διαδικασία της ακινητοποίησης βελτιστοποιήθηκε, ενώ έγινε αποτίμηση της επίδρασης διάφορων παραγόντων στη καταλυτική συμπεριφορά των ακινητοποιημένων ενζύμων. Η δομή των ακινητοποιημένων ενζύμων στα οργανοπηκτώματα αυτά μελετήθηκε με φασματοσκοπία υπερύθρου και συσχετίστηκε με την καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων. Επιπλέον, στο παρόν κεφάλαιο διερευνάται η τροποποίηση των οργανοπηκτωμάτων με τη χρήση σιλανίων για τη βελτίωση των καταλυτικών ιδιοτήτων των ακινητοποιημένων ενζύμων, ενώ ως εφαρμογή αυτών των συστημάτων προτείνεται η παραγωγή βιοντήζελ, μελετώντας την καταλληλότητα αυτών των συστημάτων σε μία πρότυπη αντίδραση, την αντίδραση μετεστεροποίησης της τριλαυρίνης με μεθανόλη.

Καθώς οι αλληλεπιδράσεις των ενζυμικών μορίων με το μικροπεριβάλλον τους είναι σημαντικές, στο 10^ο κεφάλαιο μελετήθηκε η αλληλεπίδραση διάφορων υδρολασών με τροποποιημένα νανοϋλικά. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η καταλυτική συμπεριφορά των λιπασών από *Pseudozyma antarctica*, από *Candida rugosa* και από *Geobacillus thermoleovorans* και των ανασυνδυασμένων εστερασών από *Bacillus subtilis*, από *Pyrobaculum calidifontis* και από *Pseudomonas fluorescens*, παρουσία νανοσωλήνων άνθρακα και γραφίτη που έχουν υποστεί χημική τροποποίηση ώστε στην επιφάνειά τους να φέρουν καρβοξυλομάδες, εστερομάδες ή αμινομάδες. Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται η χημική τροποποίηση και ο χαρακτηρισμός νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα μέσω δονητικών φασματοσκοπικών τεχνικών, όπως η φασματοσκοπία υπερύθρου και Raman. Γίνεται αποτίμηση της επίδρασης των νανοϋλικών στην καταλυτική συμπεριφορά των υδρολυτικών ενζύμων (δραστηριότητα και σταθερότητα), ενώ ταυτόχρονα μελετάται η δομή των ενζύμων παρουσία των νανοϋλικών, με απώτερο σκοπό τη μελέτη της σχέσης δομής – λειτουργίας των ενζύμων σε συστήματα με οργανωμένες νανοδομές.

Οι γνώσεις που αποκομίστηκαν από το κεφάλαιο 10 περί των αλληλεπιδράσεων που διέπουν τις σχέσεις μεταξύ ενζύμων και νανοϋλικών συνετέλεσαν στον ορθολογικό σχεδιασμό ακινητοποιημένων βιοκαταλυτικών συστημάτων, τα χαρακτηριστικά των οποίων παρουσιάζονται στο κεφάλαιο 11. Αναπτύχθηκαν πρωτόκολλα τόσο ομοιοπολικής όσο και μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης των υδρολασών στα νανοϋλικά και διερευνήθηκε η καταλυτική συμπεριφορά των ακινητοποιημένων ενζύμων. Τα βιοϋλικά τα οποία προέκυψαν χαρακτηρίστηκαν με εφαρμογή της φασματοφωτομετρίας φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS), ενώ η καταλυτική δραστηριότητά τους συσχετίστηκε με τα δομικά χαρακτηριστικά των υδρολασών μετά την ακινητοποίηση, όπως αυτά προέκυψαν από την εφαρμογή της φασματοσκοπίας υπερύθρου. Η δυνατότητα εφαρμογής των ακινητοποιημένων λιπασών σε νανοϋλικά για τη παραγωγή

βιοντήζελ μελετάται σε μία πρότυπη αντίδραση, την αντίδραση αλκοόλυσης της τριλαυρίνης από τη μεθανόλη.

Τέλος, στην τέταρτη ενότητα (κεφάλαιο 12) αναπτύσσονται συνοπτικά τα κύρια συμπεράσματα των πειραμάτων της παρούσας μελέτης, γίνεται σύγκριση με την υπάρχουσα βιβλιογραφία και προτείνονται μελλοντικοί στόχοι.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ
ΜΕΡΟΣ

1 Εφαρμογή υδρολασών σε βιοκαταλυτικές διεργασίες

1.1 Βιοκατάλυση

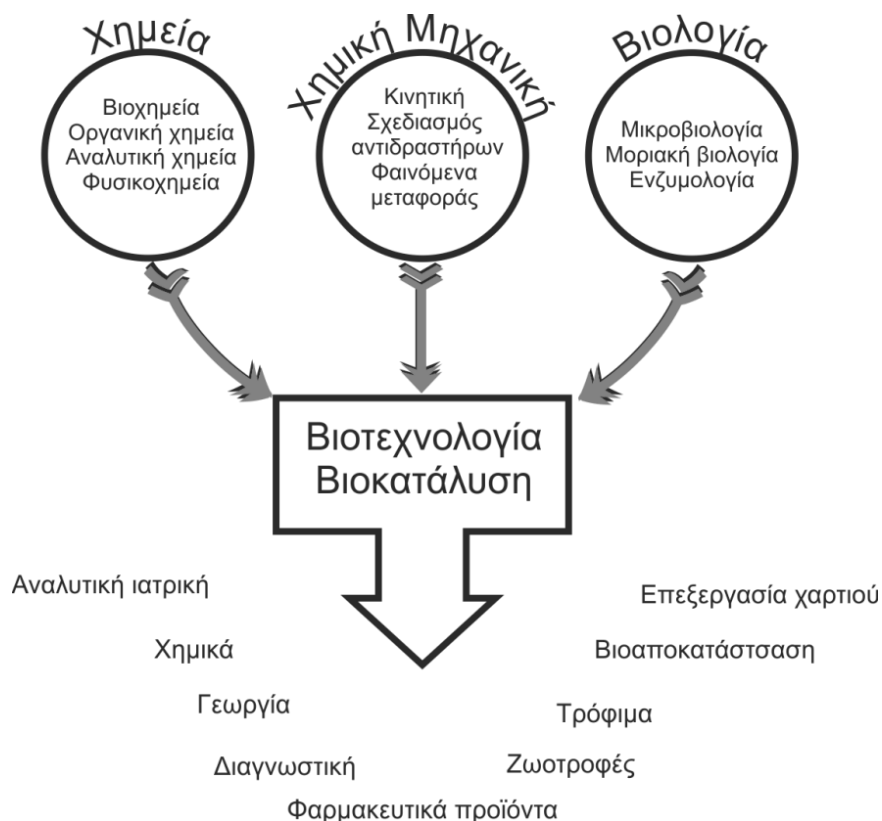
Η χρήση βιολογικών συστημάτων ή συστατικών τους για την παραγωγή προϊόντων ή την παροχή υπηρεσιών αποτελεί έναν ευρύ ορισμό της βιοτεχνολογίας. Αν και βιοτεχνολογικές διεργασίες χρησιμοποιούνται από αρχαιοτάτων χρόνων για την παραγωγή τροφίμων και άλλων αγαθών, ο όρος χρησιμοποιήθηκε μόλις στις αρχές του 20^{ου} αιώνα. Πλέον, η βιοτεχνολογία είναι από τις τεχνολογίες αιχμής που συντελούν στην ανάπτυξη της κοινωνίας και περιλαμβάνει πλήθος εφαρμογών σε σημαντικούς τομείς, όπως η παραγωγή και μετατροπή ενώσεων, η ανάλυση και διάγνωση, κυρίως σε ιατρικές εφαρμογές και η προστασία του περιβάλλοντος και βιοαποκατάσταση.

Οι βιοτεχνολογικές μετατροπές μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε συγκεκριμένες κατηγορίες, τα όρια των οποίων όμως δεν είναι αυστηρά ορισμένα (Bommarius and Riebel 2004):

- Ζυμώσεις: μετατροπή ακατέργαστων πρώτων υλών σε πιο σύνθετα προϊόντα με τη χρήση ζωντανών κυττάρων.
- Βιομετατροπές: μετατροπή συγκεκριμένων πρόδρομων ενώσεων μέσω ενός ή περισσότερων βημάτων με χρήση ενζύμων ή κυττάρων, σε επιθυμητό προϊόν.
- Ενζυμική κατάλυση: μερικώς καθαρισμένα ένζυμα ή ακατέργαστα εκχυλίσματα κυττάρων χρησιμοποιούνται για τη μετατροπή συγκεκριμένου υποστρώματος σε συγκεκριμένο προϊόν. Τα καθαρισμένα ένζυμα, λόγω του υψηλού κόστους παραγωγής και καθαρισμού, χρησιμοποιούνται κυρίως για την παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, όπως φαρμακευτικών ουσιών.

Ακολουθώντας τη συγκεκριμένη κατηγοριοποίηση, οι βιομετατροπές και η ενζυμική κατάλυση συμπεριλαμβάνονται κάτω από το γενικότερο όρο «βιοκατάλυση». Υπό αυτή την έννοια, βιοκαταλυτικές διεργασίες ορίζονται οι μετατροπές ενός συγκεκριμένου υποστρώματος σε ένα προκαθορισμένο προϊόν μέσω ενός ή περισσότερων ενζυμικά καταλυόμενων βημάτων (Bommarius and Riebel 2004).

Η χρήση βιοκαταλυτικών διεργασιών στη βιομηχανική παραγωγή, καλούμενη και ως «λευκή βιοτεχνολογία», έχει καταστεί αναγκαιότητα ύστερα από την κοινωνικοπολιτική απαίτηση για περιβαλλοντικά φιλικές διεργασίες (Tang and Zhao 2009, Wohlgemuth 2009). Η λευκή βιοτεχνολογία καλείται να παίξει καθοριστικό ρόλο στη σύγχρονη εποχή, αντικαθιστώντας τις ρυπογόνες και ενεργειοβόρες χημικές διεργασίες που εφαρμόζονται στη βιομηχανία. Η τεχνογνωσία που χρειάζεται για την κατανόηση των φαινομένων και τον ορθολογικό σχεδιασμό μίας βιοτεχνολογικής διεργασίας προέρχεται από διάφορα επιστημονικά πεδία, όπως η Χημεία, η Βιολογία και η Χημική Μηχανική. Το γεγονός αυτό καθιστά τη βιοτεχνολογία και τη βιοκατάλυση διαθεματικά επιστημονικά πεδία, σύμφωνα με τις σύγχρονες απαιτήσεις της επιστήμης (εικόνα 1).



Εικόνα 1: Ο διεπιστημονικός χαρακτήρας της βιοτεχνολογίας και ορισμένοι από τους κλάδους στους οποίους βρίσκει εφαρμογή.

Τα ένζυμα είναι βιολογικοί καταλύτες οι οποίοι παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα, σε σχέση με τους χημικούς καταλύτες. Οι περισσότερες από τις ιδιότητες τους σχετίζονται άμεσα με τη μοριακή τους δομή και τη βιολογική τους προέλευση. Τα πλεονεκτήματα της χρήσης ενζυμικών καταλυτών για την ανάπτυξη διεργασιών συνοψίζονται στα εξής σημεία (Bommarius and Riebel 2004, Illanes 2008).

- ❖ Παρουσιάζουν υψηλή εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα, τοπο-εκλεκτικότητα και ενάντιο-εκλεκτικότητα, οδηγώντας στην παραγωγή καθαρών προϊόντων.
- ❖ Απαιτούν ήπιες συνθήκες λειτουργίας (πίεσης και θερμοκρασίας), μειώνοντας κατ' αυτόν τον τρόπο το ενεργειακό κόστος της διεργασίας.
- ❖ Είναι βιοαποικοδομήσιμοι καταλύτες.
- ❖ Δρουν σε υδατικά συστήματα, παρουσιάζουν σημαντική δραστηριότητα και σε άλλα μέσα.
- ❖ Παρουσιάζουν υψηλό αριθμό μετατροπής, δηλαδή μορίων προϊόντος που παράγονται ανά μόριο ενζύμου.
- ❖ Τα προϊόντα που παράγονται με βιοκαταλυτικές διεργασίες θεωρούνται φυσικά προϊόντα, αυξάνοντας κατ' αυτό τον τρόπο την αξία τους.

Τα πλεονεκτήματα αυτά έχουν προσελκύσει το ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, οδηγώντας στην εφαρμογή βιοκαταλυτικών διεργασιών σε διάφορους τομείς για την παραγωγή χημικών προϊόντων, εξειδικευμένων χημικών, φαρμακευτικών ενώσεων, τροφίμων, καλλυντικών,

αναλυτικών και διαγνωστικών προϊόντων, βιοκαυσίμων, βιοδιασπώμενων πολυμερών, καθώς επίσης για την προστασία του περιβάλλοντος και τη βιοαποκατάσταση (Bommarius and Riebel 2004, Mahmoudian 2009, Patel 2006, Tan et al. 2009, Woodley 2008)

Αρκετές επιφυλάξεις έχουν διατυπωθεί σχετικά με την ικανότητα πρακτικής εφαρμογής των βιοκαταλυτικών διεργασιών. Η κριτική εστιάζεται κυρίως στα μειονεκτήματα της ενζυμικής βιοκατάλυσης, τα οποία συνοψίζονται στα εξής σημεία:

- ❖ Πεπερασμένος αριθμός ενζύμων έχουν απομονωθεί
- ❖ Η διαθεσιμότητα των ενζύμων είναι περιορισμένη
- ❖ Τα ένζυμα χαρακτηρίζονται από περιορισμένη εξειδίκευση σε υποστρώματα
- ❖ Η σταθερότητα των ενζύμων είναι περιορισμένη
- ❖ Η απόδοση των ενζυμικών αντιδράσεων είναι χαμηλή
- ❖ Ορισμένα ένζυμα απαιτούν συμπράγοντες για τη δράση τους
- ❖ Ο χρόνος ανάπτυξης μίας βιοκαταλυόμενης διεργασίας είναι πολύ μεγάλος

Πλέον, η έρευνα πάνω στην ενζυμική βιοτεχνολογία και η ανάπτυξη νέων τεχνολογιών έχουν βοηθήσει τον τομέα της βιοτεχνολογίας να ξεπεράσει τους περισσότερους από τους προαναφερθέντες περιοριστικούς παράγοντες και να βρει ο τομέας αυτός εφαρμογή σε αρκετά πεδία. Έτσι, ενώ τα πλεονεκτήματα οφείλονται στα εγγενή χαρακτηριστικά των ενζύμων και δεν πρόκειται να εξαλειφθούν, οι περιορισμοί επιλύονται μέσω της έρευνας και της ανάπτυξης σε διάφορους επιστημονικούς κλάδους.

Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA είναι ένα σημαντικό εργαλείο της σύγχρονης βιοτεχνολογίας. Η χρήση της συγκεκριμένης τεχνολογίας και η υπερέκφραση ενζύμων σε κύτταρα – ξενιστές οδήγησε σε σημαντική αύξηση των διαθέσιμων ενζύμων, με χαμηλότερο κόστος παραγωγής και καθαρισμού. Οι τεχνικές της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA καθιστούν πλέον εφικτή την παραγωγή ενζύμων από μικροοργανισμούς που είναι δύσκολο να καλλιεργηθούν σε εργαστηριακές συνθήκες μέσω της έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων σε κύτταρα – ξενιστές. Αυτή η εξέλιξη βοήθησε σημαντικά στην αύξηση του αριθμού των ενζύμων που έχουν απομονωθεί τα τελευταία χρόνια. Πλέον υπάρχουν διαθέσιμα ένζυμα σχεδόν για κάθε αντίδραση. Παρόλα αυτά, οι περισσότεροι βιοκαταλύτες είναι είτε μη επαρκώς χαρακτηρισμένοι, ή πατενταρισμένοι, ή τουλάχιστον όχι εμπορικά διαθέσιμοι. Για αυτό το λόγο είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι μεγάλο ερευνητικό ενδιαφέρον υπάρχει τα τελευταία χρόνια για το χαρακτηρισμό των ενζύμων που παράγονται, με απώτερο σκοπό την ορθολογική χρήση τους σε εμπορική κλίμακα.

Η εξειδίκευση των ενζύμων σε συγκεκριμένα υποστρώματα είναι εν γένει χαρακτηριστικό των ενζύμων, η οποία έχει τη βάση της στο αυστηρά καθορισμένο χωρικά ενεργό κέντρο. Παρόλα αυτά, αρκετά ένζυμα μπορούν να καταλύσουν αντιδράσεις με ένα ευρύ φάσμα ενώσεων, όπως για παράδειγμα οι υδρολάσες (παράγραφος 1.2). Τεχνολογίες όπως ο ορθολογικός σχεδιασμός πρωτεϊνών και η κατευθυνόμενη εξέλιξη μπορούν να επέμβουν στη

δομή του ενεργού κέντρου του ενζύμου και να δημιουργήσουν ένζυμα με την επιθυμητή εξειδίκευση, τόσο ως προς ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα, όσο και ως προς το εύρος των ενώσεων που μπορεί ένα ένζυμο να φιλοξενήσει στο ενεργό του κέντρο (Bornscheuer 2001, Bornscheuer et al. 2002, Bornscheuer and Kazlauskas 2004, Kourist et al. 2010). Εδώ πρέπει να σημειωθεί πως σε βιοκαταλυτικές διεργασίες που χρειάζονται προϊόντα υψηλής καθαρότητας (π.χ. φαρμακευτικά σκευάσματα), η υψηλή ενάντιο-εκλεκτικότητα των ενζύμων είναι επιθυμητή και στην προκειμένη περίπτωση είναι ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της βιοκατάλυσης (Bornscheuer 2002a).

Η περιορισμένη σταθερότητα των ενζύμων είναι ένα από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της ενζυμικής κατάλυσης. Η παροχή ελάχιστης ενέργειας (της τάξης λίγων KJ/mol) αρκεί για την αποδιάταξη ενός ενζυμικού μορίου, ενώ δομικές αλλαγές 1 Å μπορούν να οδηγήσουν σε σημαντική μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας. Τα ένζυμα είναι επιρρεπή σε αποδιάταξη σε ακραίες τιμές pH, υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις, ακόμα και φυσικές δυνάμεις όπως μηχανική πίεση. Από τα παραπάνω φαίνεται πως η σταθεροποίηση των ενζύμων είναι ένα βασικό κριτήριο για την εφαρμογή των ενζύμων σε διεργασίες, και για αυτό το λόγο γίνεται σημαντική ερευνητική προσπάθεια στο συγκεκριμένο τομέα (Ó'Fágáin 2003, Polizzi et al. 2007). Αρκετές τεχνικές έχουν αναπτυχθεί για να βελτιώσουν τη σταθερότητα των ενζύμων όπως η ακινητοποίηση ενζύμων (Kim et al. 2006a, Mateo et al. 2007, Vamvakaki and Chaniotakis 2007), η μηχανική του μέσου και η χρήση μη συμβατικών μέσων όπως τα ιοντικά υγρά (Feher et al. 2007, Kaar et al. 2003, Persson and Bornscheuer 2003, Ulbert et al. 2005) και τα μικρογαλακτώματα (Tziolla et al. 2008, Wu et al. 2001), η πρωτεϊνική μηχανική (Bommarius et al. 2006, Kourist et al. 2010) και η χημική τροποποίηση των ενζύμων (Ó'Fágáin 2003, Siddiqui and Cavicchioli 2005).

Αρκετές κατηγορίες ενζύμων απαιτούν συμπράγοντες για να επιδείξουν καταλυτική ενεργότητα. Για παράδειγμα, οι αφυδρογονάσες δρουν παρουσία νικοτιναμιδο-ενώσεων και οι οξειδάσες παρουσία φλαβινών. Η αναγκαιότητα της παρουσίας του συμπράγοντα αυξάνει το κόστος της διεργασίας και για αυτό το λόγο η εφαρμογή των συγκεκριμένων ενζύμων στη βιομηχανία καθυστέρησε, καθώς δόθηκε βαρύτητα στην ανάπτυξη διεργασιών με ένζυμα που δεν απαιτούν συμπράγοντες, όπως οι λιπάσες και οι υδρολάσες. Τα τελευταία χρόνια όμως αναπτύχθηκαν διάφορες τεχνικές για την επίλυση του συγκεκριμένου προβλήματος, όπως η αναγέννηση του συμπράγοντα (π.χ. μέσω συζευγμένων ενζυμικών αντιδράσεων ή μέσω χημικών, φωτοχημικών ή ηλεκτροχημικών πορειών) (De Wildeman et al. 2007, Wichmann and Vasic-Racki 2005, Zhao and Van Der Donk 2003) και η ακινητοποίηση του συμπράγοντα μαζί με το ένζυμο (Liu and Wang 2007). Η εξέλιξη αυτή, μαζί με την ανάγκη για νέες ενζυμικά καταλύμενες εφαρμογές, οδήγησε τα τελευταία χρόνια στη χρήση τέτοιων ενζύμων στη βιομηχανία.

Τα προηγούμενα χρόνια, ο μέσος χρόνος ανάπτυξης μίας βιοκαταλυτικής διεργασίας για εμπορική αξιοποίηση ήταν 10 έως 20 χρόνια. Είναι σαφές πως η συγκρίσιμη διάρκεια μίας πατέντας και το κόστος για την ανάπτυξη μίας τέτοιας διεργασίας δεν καθιστούσαν δελεαστική

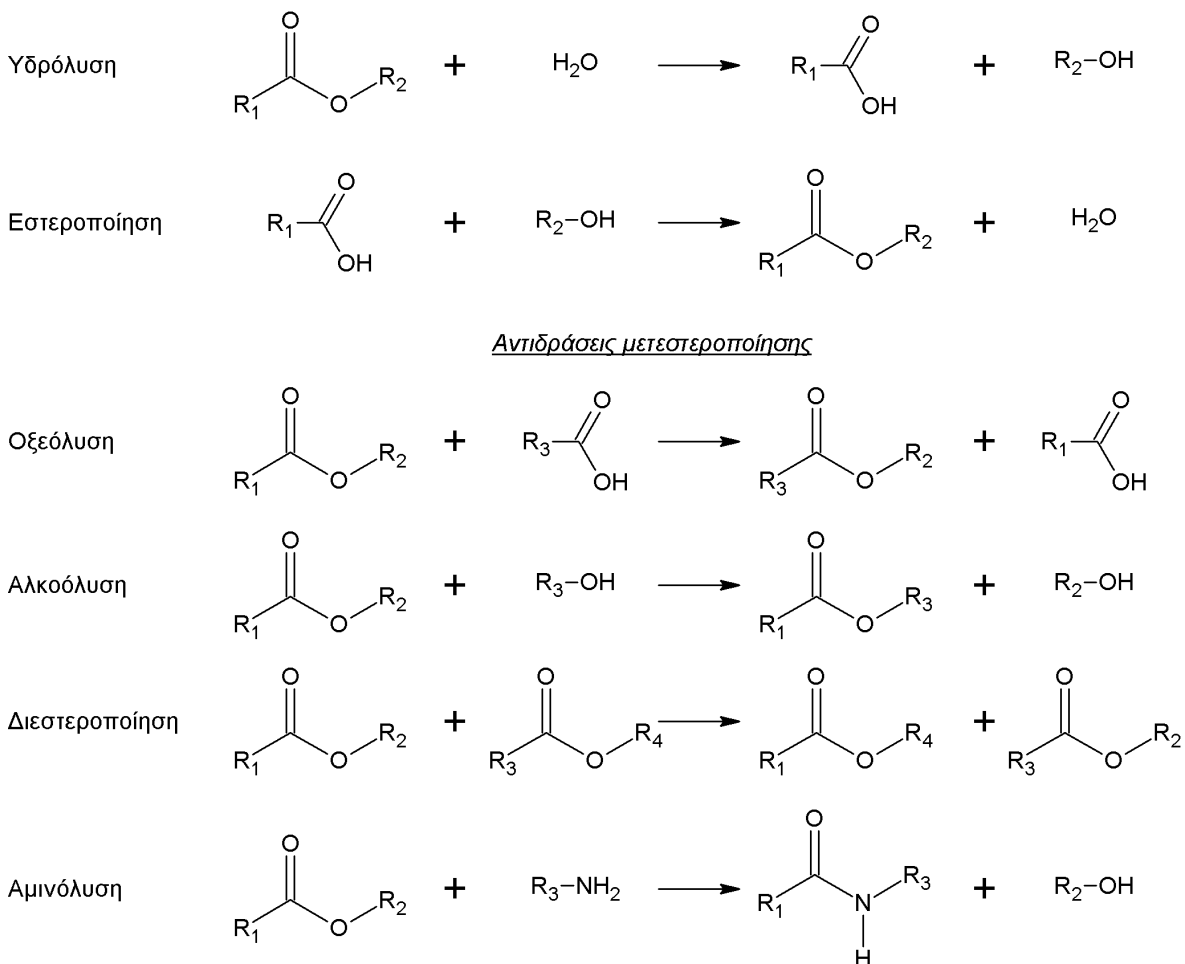
τη χρήση τέτοιων συστημάτων. Η μη ολοκληρωμένη γνώση γύρω από την ενζυμική βιοτεχνολογία και τη βιοκατάλυση ήταν ο κύριος παράγοντας που απαιτούσε τόσο χρονοβόρες διαδικασίες. Η έρευνα τα τελευταία χρόνια πάνω σε αυτά τα θέματα οδήγησε σε εμπλουτισμό της γνωσιακής βάσης, βοηθώντας στον ευκολότερο και πιο στοχευμένο σχεδιασμό των μελλοντικών διεργασιών.

1.2 Υδρολάσες καρβοξυλεστέρων

Οι υδρολάσες (EC 3) είναι μία μεγάλη κατηγορία ενζύμων με σημαντικό φυσιολογικό ρόλο και αξιολογες βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Χαρακτηρίζονται από την ικανότητα τους να καταλύουν αντιδράσεις υδρόλυσης χημικών δεσμών, όπως εστερικών, γλυκοζιτικών, πεπτιδικών και αμιδικών. Η εξειδίκευση των ενζύμων αυτών στην υδρόλυση συγκεκριμένων δεσμών οδήγησε στην περαιτέρω κατηγοριοποίησή τους. Μία από τις σημαντικότερες κατηγορίες υδρολάσων είναι οι υδρολάσες καρβοξυλεστέρων (EC 3.1.1). Είναι υποκατηγορία των εστερασών (EC 3.1) και, όπως γίνεται κατανοητό από το όνομά τους, μπορούν να διασπάσουν εστέρες που προέρχονται από καρβοξυλικά οξέα. Τα περισσότερα ένζυμα αυτής της κατηγορίας ανήκουν στην υπερ-οικογένεια των α/β υδρολάσων, και μοιράζονται δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά όπως η κοινή καταλυτική τριάδα, η αναδίπλωση α/β υδρολάσης, και η μη απαίτηση συμπαραγόντων (Levisson et al. 2009). Σημαντικό εμπορικό και ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι λιπάσες (υδρολάσες τριακυλο-γλυκερολών, EC 3.1.1.3) και οι εστεράσες (εστεράσες καρβοξυλεστέρων, EC 3.1.1.1) (Busto et al. 2010, Jaeger and Eggert 2002, Kirk et al. 2002, Reetz 2002).

Οι λιπάσες συναντώνται κυρίως σε ζώα, φυτά και μικροοργανισμούς, όπου ο φυσιολογικός τους ρόλος σχετίζεται με τη διεργασία της πέψης (π.χ. έναρξη του μεταβολισμού των λιπιδίων/γλυκεριδίων), καθιστώντας εφικτή την εκμετάλλευση της ενέργειας που είναι αποθηκευμένη στα λιπίδια (Woolley and Petersen 1994). Οι λιπάσες είναι συνήθως εξωκυττάρειες, όξινες γλυκοπρωτεΐνες με μοριακό βάρος 20 έως 60 kDa, αν και μερικές έχουν την τάση να σχηματίζουν αρκετά μεγαλύτερα συσσωματώματα (Schmid and Verger 1998). Για παράδειγμα, η λιπάση από *Candida rugosa* τείνει να δημιουργεί διμερή, τετραμερή, ή και ακόμα μεγαλύτερα συσσωματώματα σε υδατικό διάλυμα (Liou et al. 1998), ενώ η λιπάση από ήπαρ επίμοιος δημιουργεί τετραμερή συσσωματώματα (Twu et al. 1984). Η παρουσία μίας μικρής α -έλικας η οποία καλύπτει το ενεργό κέντρο των ενζύμων (παράγραφος 1.2.1), καθώς και η μεσεπιφανειακή ενεργοποίηση (παράγραφος 1.2.3) χρησιμοποιήθηκαν ως διακριτικά χαρακτηριστικά των λιπασών από τις εστεράσες (Secundo et al. 2006, Verger 1997), καθώς οι εστεράσες δεν παρουσιάζουν αυτά τα χαρακτηριστικά (Chahinian et al. 2002, Levisson et al. 2009). Καθώς όμως χαρακτηρίστηκαν αρκετά ένζυμα αυτών των κατηγοριών αποδείχθηκε πως τα συγκεκριμένα κριτήρια κατηγοριοποίησης δεν ήταν ικανοποιητικά (Verger 1997). Αξίζει να σημειωθεί πως οι δύο αυτές κατηγορίες ενζύμων σχετίζονται εξελικτικά και λειτουργικά και για αυτό τα όρια μεταξύ λιπασών και εστερασών δεν είναι αυστηρά καθορισμένα (Anthonsen et al.

1995, Ollis et al. 1992). Το κύριο χαρακτηριστικό το οποίο διαχωρίζει τις λιπάσες από τις εστεράσες είναι η εκλεκτικότητα ως προς το υπόστρωμα. Ως λιπάσες ορίζονται καρβοξυλεστεράσες που μπορούν να καταλύσουν την υδρόλυση ακυλογλυκερολών μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας (Vergier 1997), ενώ οι εστεράσες επιδεικνύουν εξειδίκευση προς τους ακυλ-εστέρες μικρής ανθρακικής αλυσίδας (Chahinian et al. 2002, Levisson et al. 2009).



Εικόνα 2: Αντιδράσεις που καταλύονται από υδρολάσες.

Η ευκολία της παραγωγής των υδρολάσεων, η μη απαίτηση συμπαράγοντα για την καταλυτική λειτουργία τους, η υψηλή τοπο- και στερεο-εκλεκτικότητα, καθώς και η ικανότητά τους να καταλύουν αντιδράσεις προς την αντίθετη κατεύθυνση (σύνθεση δεσμών) σε μη υδατικά συστήματα οδήγησε σε γρήγορη εφαρμογή τους στη βιομηχανία, καταλαμβάνοντας το 44 % των βιομηχανικών βιοκαταλυτικών εφαρμογών (Bommarius and Riebel 2004). Οι υδρολάσες έχουν βρει εφαρμογή στην παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας, στην τροποποίηση λιπιδίων, στη βιομηχανία απορρυπαντικών, τροφίμων και φαρμάκων (Busto et al. 2010, Hari Krishna and Karanth 2002, Villeneuve 2007), ενώ τα τελευταία χρόνια οι λιπάσες χρησιμοποιούνται για την παραγωγή βιοκαυσίμων (Adamczak et al. 2009, Parawira 2009, Tan et al. 2010). Το πλήθος των αντιδράσεων που μπορούν να καταλύσουν παρουσιάζεται στην εικόνα 2, ενώ στον πίνακα 1 παρατίθενται ενδεικτικά ορισμένες από τις πιο ενδιαφέρουσες εφαρμογές

των υδρολασών. Ο Busto και οι συνεργάτες του συνέταξαν μία ενδιαφέρουσα εργασία ανασκόπησης με τις αντιδράσεις βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος που μπορούν να καταλύσουν οι υδρολάσες (Busto et al. 2010). Χαρακτηριστικό του ενδιαφέροντος ως προς αυτά τα ένζυμα είναι πως έως σήμερα έχουν απομονωθεί και χαρακτηριστεί πάνω από 150 εστεράσες και λιπάσες (στοιχεία Protein Data Bank).

Πίνακας 1: Ενδεικτικές εφαρμογές υδρολασών στη βιομηχανία.

Εφαρμογή	Αναφορά
Παραγωγή εναντιομερών ενώσεων	(Ghanem 2007, Santaniello et al. 1993)
Παραγωγή φαρμακευτικών ενώσεων	(Gotor-Fernández et al. 2006, Patel 2001)
Παραγωγή λιπόφιλων παραγώγων	(Hari Krishna and Karanth 2002, Villeneuve 2007)
Τροποποίηση λιπών και ελαίων	(Gupta et al. 2003, Hills 2003)
Βιοαποικοδόμηση	(Gianfreda and Rao 2004, Singh and Walker 2006)
Παραγωγή βιοντήζελ	(Fukuda et al. 2001, Tan et al. 2010)

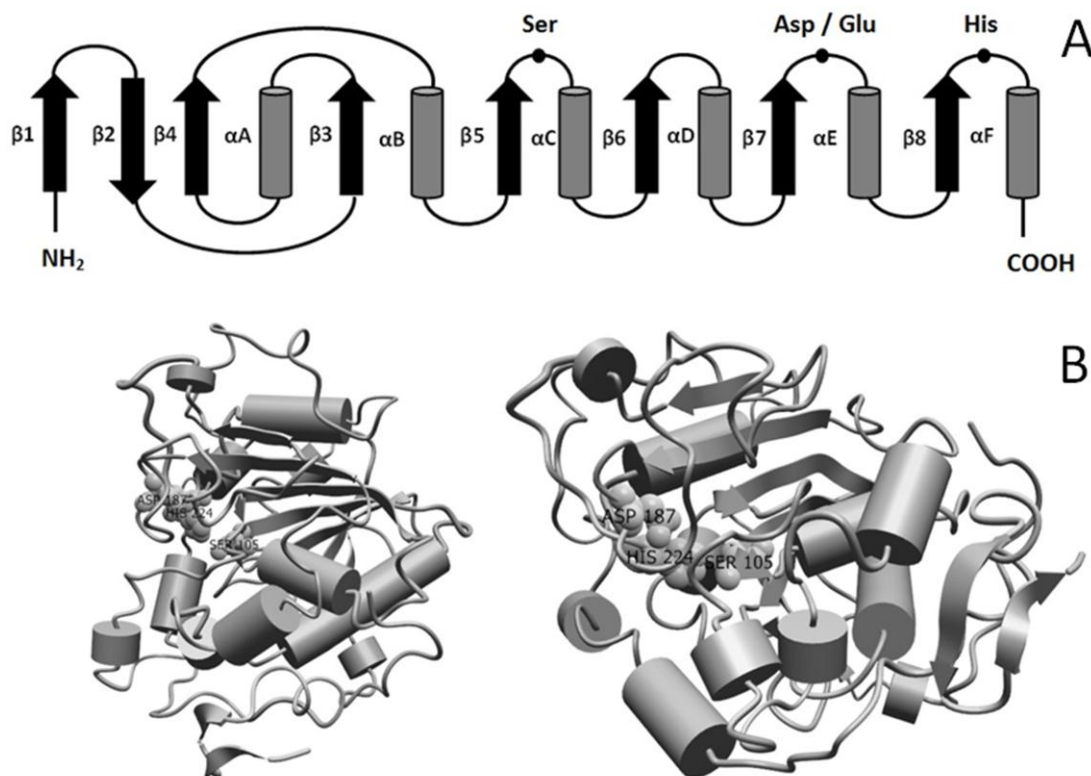
1.2.1 Δομή

Η μελέτη της τριτοταγούς δομής των πρωτεϊνών με τεχνικές όπως η κρυσταλλογραφία και ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός έδειξαν πως οι εστεράσες και οι λιπάσες, όπως οι περισσότερες υδρολάσες, μοιράζονται το ίδιο δομικό πρότυπο των α/β υδρολασών (Schrag and Cygler 1997). Οι πρωτεΐνες που ακολουθούν το συγκεκριμένο δομικό πρότυπο αποτελούνται από μία κεντρική υδρόφοβη β -πτυχωτή επιφάνεια, έως 8 β -πτυχών ($\beta 1$ - $\beta 8$) συνήθως, η οποία βρίσκεται πακεταρισμένη μεταξύ δύο στρωμάτων αμφίφιλων α -ελίκων (Pleiss et al. 1998). Μία σχηματική απεικόνιση της δομής των α/β υδρολασών παρουσιάζεται στην εικόνα 3.

Το ενεργό κέντρο των υδρολασών εμφανίζει μεγάλη ομοιότητα με εκείνο των σερινοπρωτεασών. Αποτελείται από μία καταλυτική τριάδα, αποτελούμενη από μία σερίνη (Ser), μία ιστοιδίνη (His) και ένα ασπαραγινικό (Asp) ή γλουταμινικό (Glu) οξύ (Jaeger et al. 1999, Neves Petersen et al. 2001, Schrag and Cygler 1997). Η πυρηνόφιλη σερίνη βρίσκεται συνήθως στο εσωτερικό ενός ιδιαίτερα συντηρημένου πενταπεπτιδίου Gly-X-Ser-X-Gly (Gly για γλυκίνη και X μπορεί να είναι οποιοδήποτε αμινοξύ), το οποίο πεπταπεπτίδιο σχηματίζει μία γ -στροφή μετά τη πτυχή $\beta 5$ και πριν την έλικα αC (εικόνα 3A). Η εξαιρετικά συντηρημένη αυτή δομή καλείται «πυρηνόφιλος αγκώνας», και φέρνει την πλευρική ομάδα της σερίνης σε κατάλληλο προσανατολισμό ώστε να μπορέσει να καταλύσει την αντίδραση.

Το ενεργό κέντρο των λιπασών καλύπτεται από ένα επιφανειακό κινούμενο στοιχείο, το αποκαλούμενο «καπάκι», το οποίο δεν εμφανίζεται στις εστεράσες. Πρόκειται για ένα ολιγοπεπτίδιο σε διαμόρφωση α -έλικας, συνδεδεμένο με το ένζυμο μέσω ευέλικτων δομικών στοιχείων (Jaeger et al. 1999, Pleiss et al. 1998). Αρχικά αυτό το δομικό στοιχείο χρησιμοποιήθηκε (μαζί με τη μεσεπιφανειακή ενεργοποίηση) ως κριτήριο διαχωρισμού των

λιπασών από τις εστεράσες (Brady et al. 1990, Sarda and Desnuelle 1958). Πρόσφατα όμως, δομικές μελέτες έδειξαν πως ορισμένες λιπάσες δεν εμφανίζουν το συγκεκριμένο δομικό στοιχείο (π.χ. λιπάση από *Bacillus subtilis*) ή εμφανίζουν ένα υπόλειμμα α -έλικας ως καπάκι (π.χ. η λιπάση B από *Pseudozyma antarctica*) (Uppenberg et al. 1994, van Pouderoyen et al. 2001).



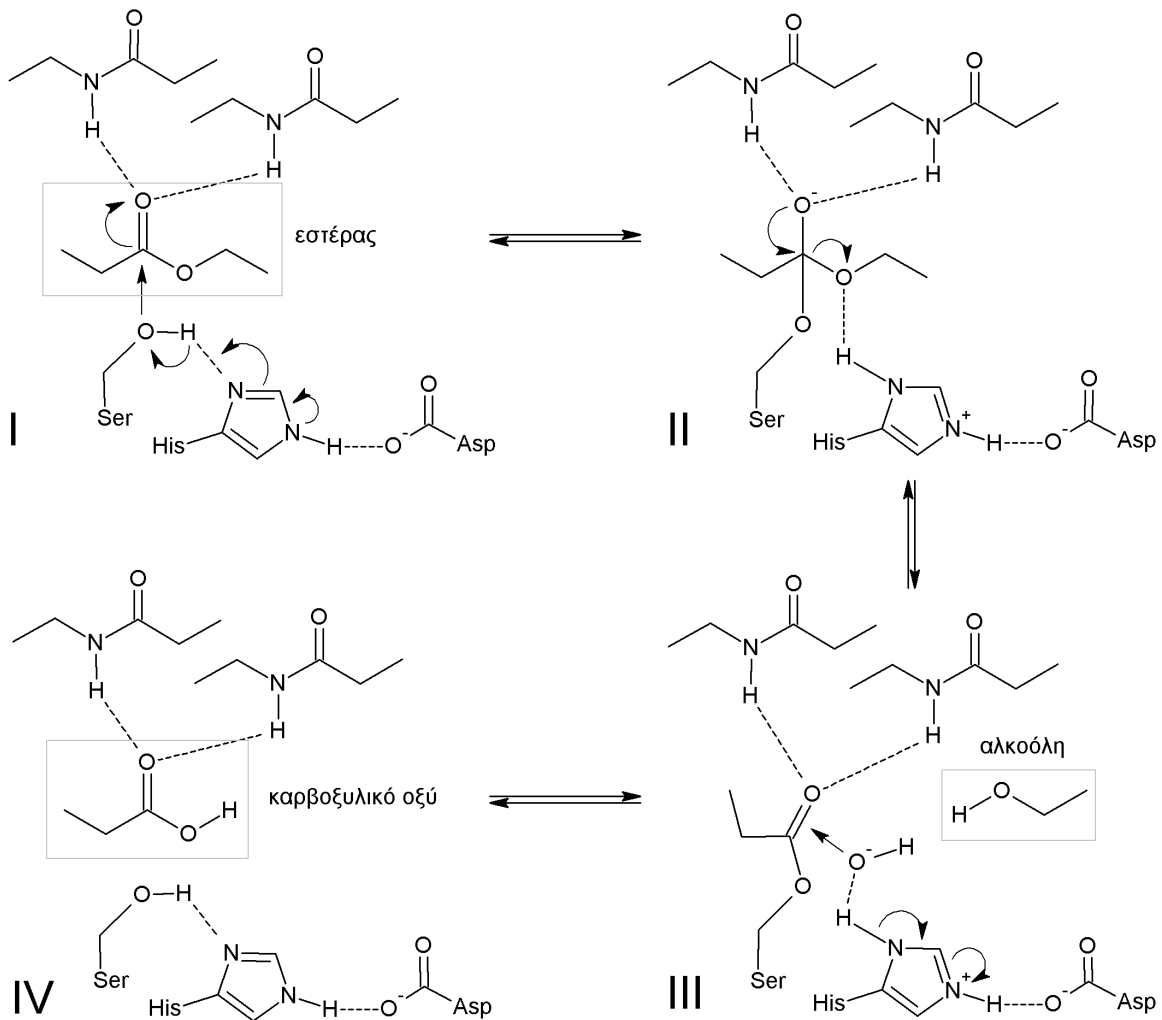
Εικόνα 3: (A) Τοπολογικό διάγραμμα της διαμόρφωσης μίας τυπικής α/β υδρολάσης. Με μαύρα βέλη συμβολίζονται οι β -πτυχές και με γκρι κυλίνδρους οι α -έλικες. (B) Η τρισδιάστατη δομή της λιπάσης B από *Pseudozyma antarctica* (CaIB, rdb 1TCA) από δύο οπτικές γωνίες. Με σφαίρες συμβολίζονται τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου.

Πέρα από την καταλυτική τριάδα, σημαντικό ρόλο στη καταλυτική δραστηριότητα των υδρολασών παίζει και μία άλλη δομική περιοχή, η οξυανιοντική οπή. Η οξυανιοντική οπή σχηματίζεται από τις αμιδικές ομάδες ενός καταλοίπου του N-τελικού άκρου του ενζύμου και ενός γειτονικού καταλοίπου της καταλυτικής σερίνης (Hari Krishna and Karanth 2002, Paiva et al. 2000). Τα δύο αυτά κατάλοιπα δημιουργούν μία ηλεκτρονιόφιλη περιοχή γύρω από την καταλυτική σερίνη, ο ρόλος της οποίας είναι να σταθεροποιεί το τετραεδρικό ενδιάμεσο κατά τη διαδικασία της κατάλυσης.

1.2.2 Καταλυτικός μηχανισμός

Ο καταλυτικός μηχανισμός των εστερασών και των λιπασών είναι παρόμοιος με αυτόν των σερινοπρωτεασών. Οι υδρολάσες δρουν στους καρβοξυλεστερικούς δεσμούς για να τους διασπάσουν προς μία αλκοόλη και ένα καρβοξυλικό οξύ. Στην περίπτωση των λιπασών, αν το

υπόστρωμα είναι ακυλο-γλυκερόλη, παράγονται λιπαρά οξέα και γλυκερόλη. Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, το ενεργό κέντρο αποτελείται από μία καταλυτική τριάδα Ser-His-Asp/Glu, παρόμοια με αυτή που συναντάται στις σερινοπρωτεάσες, και για αυτό το λόγο ο καταλυτικός μηχανισμός παρουσιάζει αρκετές ομοιότητες. Ο μηχανισμός υδρόλυσης λαμβάνει χώρα σε 2 στάδια (εικόνα 4).



Εικόνα 4: Καταλυτικός μηχανισμός υδrolασών. Τη θέση του ασπαραγινικού οξέος (Asp) μπορεί να λάβει και το γλουταμινικό οξύ, ενώ τη θέση της σερίνης μπορεί σε ορισμένες περιπτώσεις να λάβει οποιοδήποτε άλλο πυρηνόφιλο αμινοξύ.

Η υδρόλυση του υποστρώματος ξεκινά με μία πυρηνόφιλη προσβολή του καρβονυλικού άνθρακα του εστερικού δεσμού από το οξυγόνο του υδροξυλίου της καταλυτικής σερίνης (εικόνα 4-I). Ένα μεταβατικό τετραεδρικό ενδιάμεσο δημιουργείται, το οποίο χαρακτηρίζεται από το αρνητικό φορτίο του καρβονυλικού οξυγόνου του εστέρα και από τέσσερα άτομα συνδεδεμένα με το καρβονυλικό άνθρακα σε τετραεδρική διάταξη (εικόνα 4-II). Το υπόστρωμα σταθεροποιείται στη μεταβατική κατάσταση με τη σύναψη δεσμών υδρογόνου. Τα αμινοξέα της οξυανιοντικής σπής δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου με το αρνητικά φορτισμένο καρβοξυλικό

οξυγόνο του υποστρώματος, ενώ η ιστιδίνη, της οποίας ο δακτύλιος βρίσκεται στο σωστό προσανατολισμό λόγω του καταλυτικού οξέος (Asp/Glu), δέχεται ένα πρωτόνιο από την καταλυτική σερίνη, ώστε να υποβοηθήσει την πυρηνόφιλη προσβολή. Ακολούθως, το πρωτόνιο μεταφέρεται στο εστερικό οξυγόνο με αποτέλεσμα τη σχάση του εστερικού δεσμού. Σε αυτό το στάδιο το οξικό τμήμα του υποστρώματος και η πυρηνόφιλη σερίνη εστεροποιούνται με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός ομοιοπολικού ενδιάμεσου και το αλκοολικό τμήμα του υποστρώματος αποχωρεί (εικόνα 4-III). Το επόμενο στάδιο είναι αυτό της αποακυλίωσης, όπου ένα μόριο νερού υδρολύει το ομοιοπολικό ενδιάμεσο. Αυτό το μόριο νερού ενεργοποιείται από την ιστιδίνη, η οποία του αποσπά ένα πρωτόνιο. Το προκύπτον ιόν (OH⁻) προσβάλλει τον καρβονυλικό άνθρακα της ακυλομάδας που είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένη με τη σερίνη. Και πάλι σχηματίζεται ένα μεταβατικό, αρνητικά φορτισμένο τετραεδρικό ενδιάμεσο, το οποίο σταθεροποιείται μέσω αλληλεπιδράσεων με την οξυαντιονική οπή. Η ιστιδίνη δίνει ένα πρωτόνιο στο οξυγόνο της καταλυτικής σερίνης, η οποία στη συνέχεια απελευθερώνει την ακυλομάδα. Μετά την απομάκρυνση του δεύτερου προϊόντος το ένζυμο είναι και πάλι έτοιμο να δεχτεί υπόστρωμα και να το υδρολύσει (Bornscheuer and Kazlauskas 2004, Cygler et al. 1994, Jaeger et al. 1999).

1.2.3 Μεσεπιφανειακή ενεργοποίηση λιπασών

Ως μεσεπιφανειακή ενεργοποίηση ορίζεται το φαινόμενο κατά το οποίο μία λιπάση είναι περισσότερο ενεργή όταν βρίσκεται σε μεσεπιφάνειες μεταξύ νερού και ελαίου (Martinelle et al. 1995, Verger 1997). Το φαινόμενο μελετήθηκε εκτενώς και προτάθηκαν διάφορες ερμηνείες. Έως σήμερα, δύο θεωρίες κυριαρχούν: η ενεργοποίηση των υποστρωμάτων στη μεσεπιφάνεια και η μετάβαση της λιπάσης μέσω δομικών αλλαγών σε μία πιο ενεργή μορφή μόλις έρθει σε επαφή με τη μεσεπιφάνεια (Hari Krishna and Karanth 2002). Όσον αφορά την πρώτη θεωρία, ο Brockman απέδωσε το φαινόμενο της μεσεπιφανειακής ενεργοποίησης στην αυξημένη πιθανότητα σύγκρουσης του ενζύμου με το υπόστρωμα όταν το υπόστρωμα δημιουργεί συσσωματώματα (Brockman et al. 1973). Αυτό συμβαίνει όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος υπερβαίνει τα όρια της διαλυτότητας του στο υδατικό μέσο. Επίσης, η οργανωμένη δομή του νερού και η καλύτερη διευθέτηση των λιπιδίων στις μεσεπιφάνειες φαίνεται να εξηγούν επαρκώς την ενεργοποίηση των υποστρωμάτων (Entressangles and Desnuelle 1974, Hari Krishna and Karanth 2002, Silber et al. 1999).

Μεγαλύτερη αναγνώριση έλαβε η δεύτερη θεωρία, αφού η ανάλυση της τρισδιάστατης δομής των λιπασών από *Rhizomucor miehei* και ανθρώπινο ήπαρ το 1990 επιβεβαίωσε την ύπαρξη μίας εύκαμπτης αμφίφιλης δομής η οποία καλύπτει το ενεργό κέντρο («καπάκι») και η οποία μετακινείται κατά την επαφή της λιπάσης με τη μεσεπιφάνεια (Brady et al. 1990, Winkler et al. 1990). Περαιτέρω μελέτες της δομής διάφορων λιπασών με τεχνικές όπως ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός και η κρυσταλλογραφία απέδειξαν ότι όταν μία λιπάση βρεθεί σε μία μεσεπιφάνεια, το «καπάκι» μετακινείται και καθιστά το ενεργό κέντρο προσβάσιμο στα

υποστρώματα. Πιο συγκεκριμένα, το «καπάκι» στην κλειστή του διαμόρφωση έχει εκτεθειμένα στο περιβάλλον υδρόφιλα κατάλοιπα. Κατά την επαφή της λιπάσης με τη μεσεπιφάνεια, το καπάκι μετακινείται, τα υδρόφιλα αμινοξέα θάβονται σε μία πολική κοιλότητα, ενώ ταυτόχρονα το υδρόφοβο τμήμα του «καπακιού» εκτίθεται στο διαλύτη, με αποτέλεσμα να δημιουργηθεί μία υδρόφοβη περιοχή γύρω από το ενεργό κέντρο (Paiva et al. 2000). Η υδρόφοβη αυτή επιφάνεια που εκτίθεται στο διαλύτη σταθεροποιείται από την ύπαρξη της μεσεπιφάνειας (Brzozowski et al. 1991, Marangoni and Rousseau 1995) και οδηγεί σε αύξηση της συγγένειας του ενζύμου για το υπόστρωμα του (Overbeeke et al. 2000, Verger 1997).

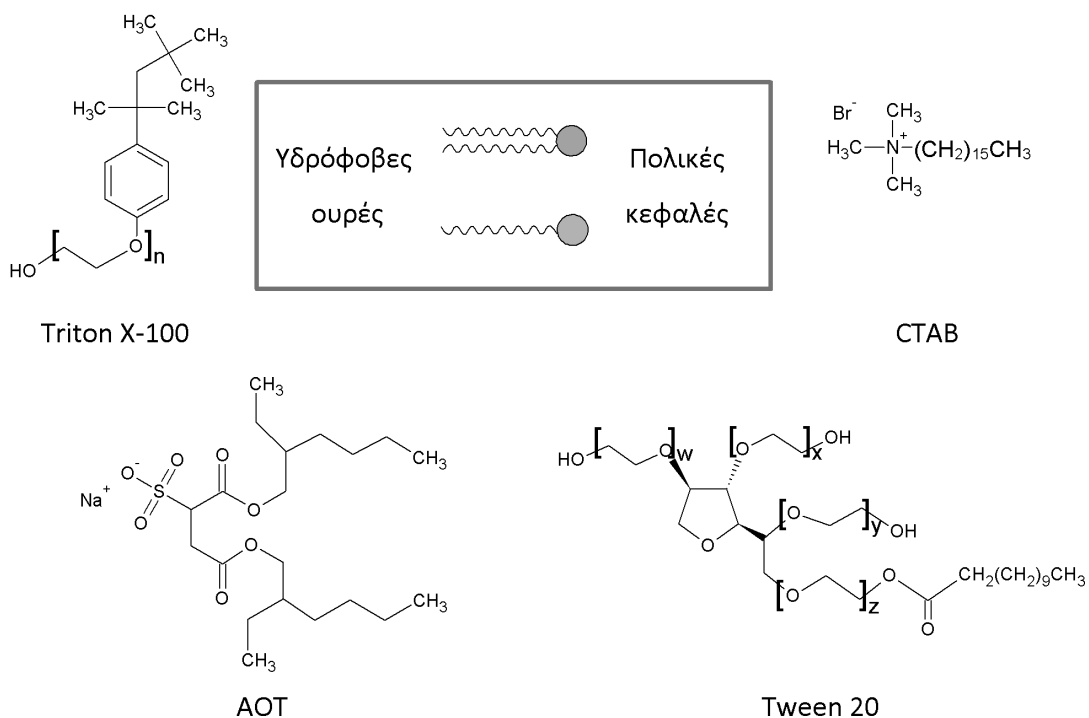
Η μεσεπιφανειακή ενεργοποίηση, από την πρώτη περιγραφή του φαινομένου το 1958, καθιερώθηκε ως βασικό χαρακτηριστικό των λιπασών και, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, έχει χρησιμοποιηθεί ως κύριος παράγοντας διάκρισης τους από τις εστεράσες (Sarda and Desnuelle 1958). Τα τελευταία χρόνια όμως έχει αποδειχθεί πως δεν παρουσιάζουν όλες οι λιπάσες τη συγκεκριμένη ενεργοποίηση. Για παράδειγμα, η λιπάση Β από *Pseudozyma (Candida) antarctica* και οι λιπάσες από *Pseudomonas glumae* και *Pseudomonas aeruginosa* δεν παρουσιάζουν μεσεπιφανειακή ενεργοποίηση (Jaeger et al. 1994, Verger 1997). Επιπλέον, ορισμένες λιπάσες επιδεικνύουν μεσεπιφανειακή ενεργοποίηση μόνο παρουσία συγκεκριμένων υποστρωμάτων (Hari Krishna and Karanth 2002, Jaeger and Reetz 1998).

2 Βιοκατάλυση σε μικρογαλακτώματα

2.1 Υδατικές νανοδιασπορές - Μικρογαλακτώματα

Η μεγάλη επιφανειακή τάση μεταξύ νερού και ελαίου ¹ προκαλεί την ελαχιστοποίηση της διαχωριστικής επιφάνειας και για αυτό το λόγο τα δύο υγρά δεν αναμιγνύονται, αλλά διαχωρίζονται αυθόρμητα σε δύο φάσεις. Αν τα υγρά υποβληθούν σε μηχανική ανάδευση, προκύπτει ένα γαλάκτωμα το οποίο όμως και πάλι διαχωρίζεται σε δύο διακριτές φάσεις μόλις σταματήσει η ανάδευση. Ένα γαλάκτωμα μπορεί να σταθεροποιηθεί με την προσθήκη κατάλληλων αμφίφιλων ενώσεων, οι οποίες καλούνται επιφανειενεργά.

Οι επιφανειενεργές ενώσεις² είναι μόρια με αμφίφιλο χαρακτήρα καθώς αποτελούνται από δύο περιοχές διαφορετικής πολικότητας. Η πολική περιοχή αποκαλείται και πολική «κεφαλή» ενώ η μη πολική περιοχή, η οποία αποτελείται από μία ή περισσότερες αλκυλικές ομάδες, αποκαλείται και υδρόφοβη ουρά (εικόνα 5). Η συνύπαρξη πολικών και μη πολικών περιοχών στο ίδιο μόριο επιτρέπει τον εντοπισμό τους στις μεσεπιφάνειες διφασικών συστημάτων. Τα μόρια αυτά προσανατολίζονται κατάλληλα, έχοντας στραμμένες τις πολικές κεφαλές προς το νερό και τις υδρόφobes ουρές προς το έλαιο, δημιουργώντας μία μονοστιβάδα. Η παρουσία αυτών των ενώσεων αυξάνει τη μεσεπιφάνεια και μειώνει την επιφανειακή τάση (Fanun 2008, Sottmann and Stubenrauch 2009).



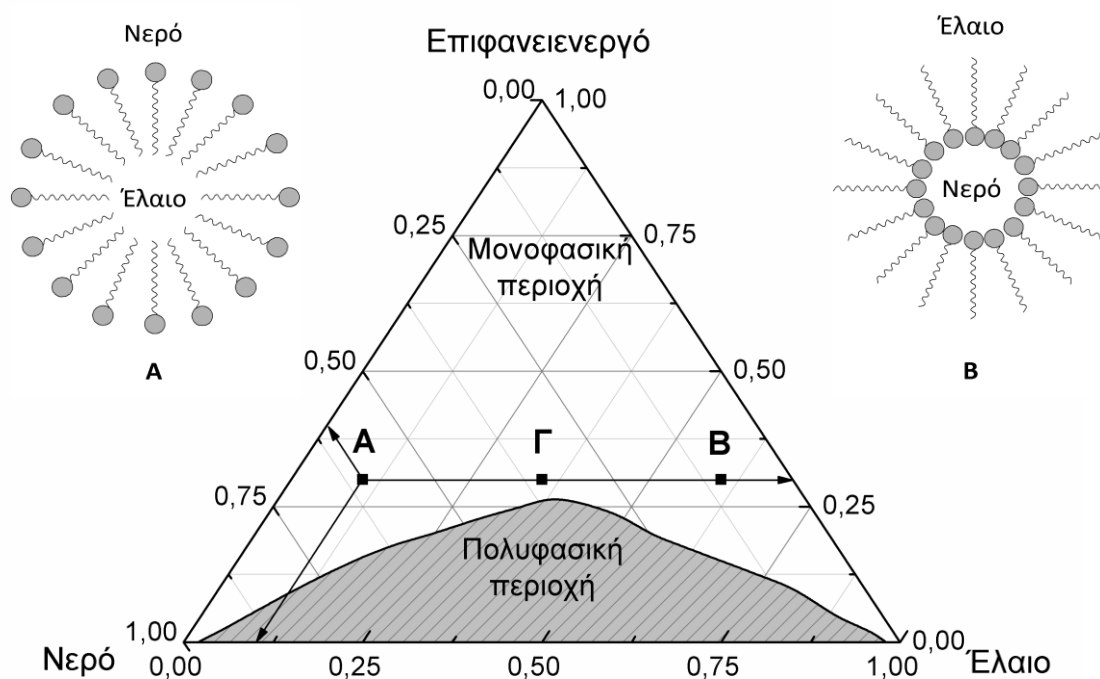
Εικόνα 5: Γραφική απεικόνιση τυπικών επιφανειενεργών μορίων και δομή τεσσάρων ευρέως χρησιμοποιούμενων επιφανειενεργών ενώσεων.

¹ Ο όρος «έλαιο» αναφέρεται σε κάθε οργανικό μη πολικό διαλύτη όπως π.χ. οι υδρογονάνθρακες.

² Αναφέρονται και ως τασιενεργές ή επιφανειοδραστικές ενώσεις.

Οι επιφανειενεργές ενώσεις διακρίνονται σε διάφορες κατηγορίες ανάλογα με τα χαρακτηριστικά τους. Ένα συχνά χρησιμοποιούμενο χαρακτηριστικό για την κατηγοριοποίηση των ενώσεων αυτών είναι η ύπαρξη φορτίου στην πολική κεφαλή. Σύμφωνα με αυτό το χαρακτηριστικό τα επιφανειενεργά διαχωρίζονται σε μη ιοντικά (π.χ. Tween 20³, Triton X-100⁴) και ιοντικά. Τα ιοντικά επιφανειενεργά διαχωρίζονται περαιτέρω σε ανιοντικά όταν το φορτίο είναι αρνητικό (π.χ. AOT⁵), κατιοντικά όταν είναι θετικό (π.χ. CTAB⁶) και αμφοτερικά όταν στην πολική κεφαλή συνυπάρχουν θετικά και αρνητικά φορτία.

Όταν τα επιφανειενεργά μόρια βρεθούν στο νερό σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από την κρίσιμη μικκυλιακή συγκέντρωση (critical micellar concentration, CMC) τότε δημιουργούν τέτοιες δομές ώστε να περιορίσουν την επαφή των υδρόφοβων περιοχών τους με το νερό. Οι δομές αυτές καλούνται μικκύλια. Οι υδρόφοβες ουρές συναθροίζονται στο εσωτερικό των μικκυλίων, ενώ οι υδρόφιλες κεφαλές παραμένουν στην εξωτερική επιφάνεια προκειμένου να αυξήσουν την επιφάνεια επαφής τους με το νερό (εικόνα 6Α).



Εικόνα 6: Ενδεικτικό διάγραμμα φάσης συστήματος νερού - ελαίου - επιφανειενεργού. Αναπαράσταση των συστημάτων μικρογαλακτωμάτων ελαίου σε νερό (σημείο Α) και νερού σε έλαιο (σημείο Β).

Ένα σύστημα τριών συστατικών μπορεί να παρασταθεί από ένα τριγωνικό διάγραμμα φάσεων, όπως αυτό που παρουσιάζεται στην εικόνα 6. Κάθε κορυφή του τριγώνου αντιστοιχεί

³ Μονολαυρικός εστέρας της πολυοξυ-αιθυλενο-σορβιτάνης

⁴ π-(1,1,3,3-Τετραμεθυλοβουτυλο) φαινυλαιθέρας της πολυαιθυλενογλυκόλης

⁵ Δις-(2-αιθυλεξυλ)σουλφοηλεκτρικό νάτριο

⁶ Βρωμιούχο εξαδεκυλο-τριμεθυλαμμώνιο

σε ένα συστατικό, και τα σημεία της πλευράς που ορίζονται από δύο κορυφές αντιστοιχούν σε μείγματα των δύο συστατικών. Κάθε σημείο στο εσωτερικό του τριγώνου αντιστοιχεί σε μείγμα των τριών συστατικών με ορισμένη αναλογία, η οποία ορίζεται όπως φαίνεται στην εικόνα. Σε κάθε τριγωνικό διάγραμμα διακρίνονται δύο διακριτές περιοχές: αυτή που το σύστημα είναι μονοφασικό και αυτή στην οποία το σύστημα είναι πολυφασικό. Στη μονοφασική περιοχή του διαγράμματος εντοπίζονται τα μικρογαλακτώματα. Ως μικρογαλακτώματα μπορούμε να ορίσουμε τα συστήματα νερού, ελαίου και επιφανειοενεργού που σχηματίζουν ένα υγρό διάλυμα, οπτικά ισότροπο και θερμοδυναμικά σταθερό (Danielsson and Lindman 1981). Τα όρια μεταξύ μονοφασικής και πολυφασικής περιοχής εξαρτώνται από παράγοντες όπως η θερμοκρασία και η πίεση του συστήματος (Fanun 2008, Sottmann and Stubenrauch 2009).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο όρος μικρογαλάκτωμα καθιερώθηκε καθώς αρχικά πιστευόταν πως η διάμετρος των διασπορών που δημιουργούνται ήταν της τάξης των μm. Ο όρος αυτός όμως θα μπορούσε να θεωρηθεί παραπλανητικός, καθότι έχει αποδειχθεί πλέον ότι οι διασπορές που δημιουργούνται έχουν διάμετρο της τάξης 1.5 - 100 nm. Ουσιαστικά πρόκειται για συστήματα νανο-διασποράς, τα οποία εσφαλμένα έχει καθιερωθεί να αποκαλούνται μικρογαλακτώματα.

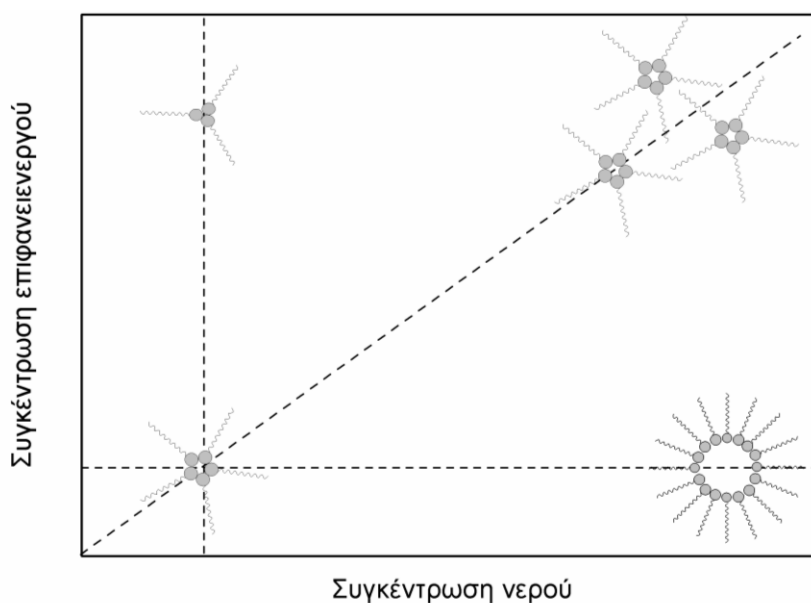
Η σύσταση των μικρογαλακτωμάτων εξαρτάται από την αναλογία των επιμέρους συστατικών. Στο σημείο Α του τριγωνικού διαγράμματος της εικόνας 6 αντιστοιχεί σύστημα υψηλής συγκέντρωσης σε νερό και χαμηλής σε έλαιο, για αυτό και προκύπτουν μικροσταγονίδια ελαίου σε νερό τα οποία διαχωρίζονται με μία μονοστοιβάδα επιφανειοενεργού (εικόνα 6Α). Τα συστήματα αυτά αναφέρονται ως μικρογαλακτώματα ελαίου σε νερό (oil in water, o/w). Στο σημείο Β αντιστοιχεί μικρογαλάκτωμα υψηλής περιεκτικότητας σε έλαιο και χαμηλής σε νερό, και προκύπτουν μικροσταγονίδια νερού σε συνεχή φάση ελαίου (εικόνα 6Β). Τα συστήματα αυτά αναφέρονται ως μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο (water in oil, w/o) ή αντίστροφα μικκύλια, λόγω του ανεστραμμένου προσανατολισμού της στοιβάδας του επιφανειοενεργού. Οι δομές που αντιστοιχούν στο σημείο Γ (παρόμοιες συγκεντρώσεις νερού και ελαίου) δεν έχουν αποσαφηνιστεί πλήρως, αλλά έως σήμερα πιστεύεται πως είναι δισυνεχείς φάσεις των δύο κύριων συστατικών του συστήματος (Fanun 2008).

Η επίδραση της ποσότητας του νερού που περιέχεται σε ένα μικρογαλάκτωμα είναι μία από τις παραμέτρους που έχει μελετηθεί εκτενώς. Έχει βρεθεί ότι η διάμετρος και ο αριθμός των μικρογαλακτωμάτων εξαρτάται από το βαθμός ενυδάτωσης (w_o) του συστήματος (εξίσωση 1), ο οποίος ορίζεται ως ο γραμμομοριακός λόγος του νερού ως προς το επιφανειοενεργό στο σύστημα (Carvalho and Cabral 2000).

$$w_o = \frac{[H_2O]}{[EO]} \text{ όπου } \left\{ \begin{array}{l} [H_2O] \text{ η μοριακή συγκέντρωση του νερού} \\ [EO] \text{ η μοριακή συγκέντρωση του επιφανειοενεργού} \end{array} \right\} \quad (1)$$

Η επίδραση του βαθμού ενυδάτωσης στα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο παρουσιάζεται στην εικόνα 7. Αύξηση της συγκέντρωσης του νερού με ταυτόχρονη διατήρηση

της ποσότητας του επιφανειενεργού σταθερής οδηγεί σε αύξηση της διαμέτρου των μικκυλίων. Αύξηση της συγκέντρωσης του επιφανειενεργού σε σύστημα με σταθερή ποσότητα νερού οδηγεί σε μείωση της διαμέτρου των μικκυλίων και πιθανή αύξηση του αριθμού τους. Είναι εμφανές πως ίδιος βαθμός ενυδάτωσης μπορεί να επιτευχθεί με διαφορετικές συγκεντρώσεις νερού και επιφανειενεργού, διατηρώντας όμως το λόγο τους σταθερό. Σε αυτή την περίπτωση δημιουργούνται μικκύλια της ίδιας διαμέτρου, αλλά όσο αυξάνονται οι συγκεντρώσεις των επιμέρους συστατικών (νερού και επιφανειενεργού) αυξάνεται ο αριθμός των μικκυλίων (Carvalho and Cabral 2000).



Εικόνα 7: Επίδραση της συγκέντρωσης του νερού και του επιφανειενεργού στη δομή των μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο.

Σε ορισμένες περιπτώσεις η προσθήκη των επιφανειενεργών ενώσεων δεν είναι αρκετή από μόνη της για να μειώσει την επιφανειακή τάση και να οδηγήσει σε σχηματισμό μικρογαλακτωμάτων, αλλά χρειάζεται και η προσθήκη ενώσεων μικρής πολικότητας που δρουν ως συν-επιφανειενεργά. Τέτοια δράση έχουν συνήθως οι αλκοόλες και οι αμίνες μικρής ανθρακικής αλυσίδας (Sottmann and Stubenrauch 2009). Η παρουσία τους φαίνεται να σχετίζεται με μία αύξηση της ελαστικότητας στη μεσεπιφάνεια, έτσι ώστε να ευνοηθεί η διασπορά (De Gennes and Taupin 1982).

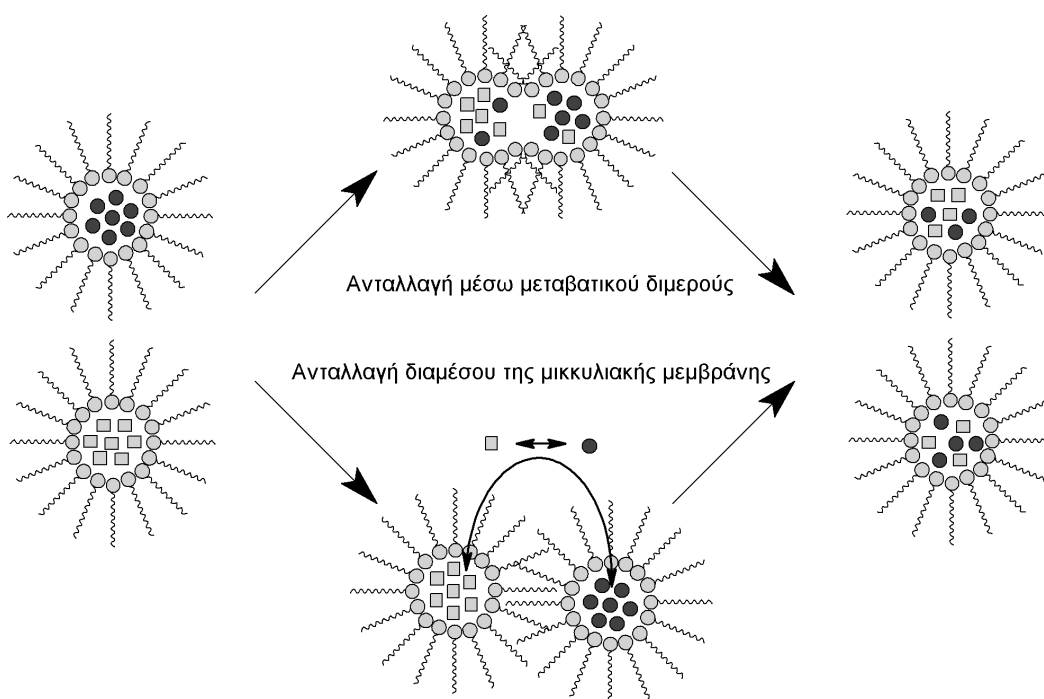
2.2 Κατηγορίες μικρογαλακτωμάτων

2.2.1 Μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο παρουσία επιφανειενεργού

Τα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο που σχηματίζονται με την προσθήκη επιφανειενεργού είναι τα πρώτα που μελετήθηκαν και τα περισσότερο μελετημένα έως σήμερα. Τα συστήματα που μελετήθηκαν εκτενέστερα ήταν αυτά που σχηματίζονται παρουσία ιοντικών

επιφανειοενεργών όπως το AOT ή το CTAB, αν και έχουν αναφερθεί συστήματα που σχηματίζονται με μη ιοντικά επιφανειοενεργά, συνήθως παρουσία κάποιου συνεπιφανειοενεργού. Ως οργανική φάση (έλαιο) χρησιμοποιούνται συνήθως μη πολικοί αλειφατικοί οργανικοί διαλύτες όπως *n*-εξάνιο, *n*-επτάνιο ή ισοοκτάνιο. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το σύστημα νερό / ισοοκτάνιο / AOT, και για αυτό το λόγο ακολουθεί εκτενέστερη παρουσίαση των συστημάτων που σχηματίζονται με το συγκεκριμένο επιφανειοενεργό μόριο.

Το ανιοντικό επιφανειοενεργό δις-(2-αιθυλεξυλ)σουλφοηλεκτρικό νάτριο, γνωστό με την εμπορική ονομασία Aerosol OT ή AOT (εικόνα 5), έχει την ικανότητα να σχηματίζει μικρογαλακτώματα νερού σε διάφορους μη πολικούς οργανικούς διαλύτες, όπως *n*-επτάνιο και ισοοκτάνιο (Zulauf and Eicke 1979). Τα αντίστροφα μικκύλια που σχηματίζονται αυθόρμητα έχουν την ικανότητα να ενσωματώνουν στο εσωτερικό τους σημαντικές ποσότητες νερού χωρίς την παρουσία συνεπιφανειοενεργού (έως 8% v/v), με αποτέλεσμα το σχηματισμό μικροσταγονιδίων νερού στο έλαιο (Luisi et al. 1988, Luisi and Magid 1986). Πρέπει να σημειωθεί πως το όριο διαλυτότητας του νερού μειώνεται αυξανόμενης της αλειφατικής αλυσίδας του υδρογονάνθρακα που αποτελεί τη συνεχή φάση. Η διάμετρος των ενυδατωμένων αντίστροφων μικκυλίων κυμαίνεται από 15 Å έως και πάνω 100 Å, στο εσωτερικό των οποίων είναι δυνατό να φιλοξενηθούν ιόντα, πολικά μόρια ή ακόμα νουκλειικά οξέα και πρωτεΐνες (Luisi et al. 1988). Οι διαστάσεις αυτές καθιστούν εφικτή τη φιλοξενία ιόντων, πολικών μορίων, ή ακόμα νουκλειικών οξέων και πρωτεϊνών στο εσωτερικό των αντίστροφων μικκυλίων, ένα γεγονός που έχει οδηγήσει σε πολλές εφαρμογές, όπως η βιοκατάλυση (Carvalho and Cabral 2000, Klyachko and Levashov 2003, Orlich and Schomäcker 2002), και η σύνθεση νανοσωματιδίων (Destrée and B.Nagy 2006, Eastoe et al. 2006, Husein and Nassar 2008, Turco Liveri 2006).



Εικόνα 8: Πιθανοί μηχανισμοί ανταλλαγής του περιεχομένου των αντίστροφων μικκυλίων.

Τα αντίστροφα μικκύλια είναι ένα δυναμικό σύστημα (Luisi et al. 1988). Για παράδειγμα, υπολογίστηκε πως ο χρόνος παραμονής των επιφανειενεργών μορίων στη μεμβράνη των μικκυλίων δεν είναι μεγαλύτερος από 10^{-7} s, καθώς μετακινούνται μεταξύ των μικκυλίων και του οργανικού διαλύτη (Martinek et al. 1986). Σημαντικό ρόλο για τις βιοκαταλυτικές εφαρμογές αυτών των συστημάτων διαδραματίζει η διαμικκυλιακή ανταλλαγή του περιεχομένου των υδατικών νανοδιασπορών τους. Η διεργασία αυτή ολοκληρώνεται είτε μέσω της μικκυλιακής μεμβράνης, είτε μέσω ενός μεταβατικού διμερούς που δημιουργείται από τη συγχώνευση δύο αντίστροφων μικκυλίων (εικόνα 8) (Luisi et al. 1988, Luisi and Magid 1986). Η διαδικασία συνήθως ολοκληρώνεται σε λιγότερα από 10^{-4} s, αυτή εξαρτάται από το μέγεθος των μικκυλίων και από τη θερμοκρασία του συστήματος (Fletcher et al. 1987).

2.2.2 Μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο απουσία επιφανειενεργών ενώσεων

Από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της χρήσης των μικρογαλακτωμάτων στη βιομηχανία είναι ο διαχωρισμός του προϊόντος και η δυσκολία ανάκτησης του μορίων (π.χ. ένζυμα) που έχουν εγκλωβιστεί στις υδατικές νανο-διασπορές. Τα προβλήματα αυτά πηγάζουν από την παρουσία των επιφανειενεργών μορίων, που οδηγεί στη δημιουργία γαλακτωμάτων και αφρισμού κατά τη διαδικασία διαχωρισμού. Για να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα, αναπτύχθηκαν συστήματα στα οποία τα μικρογαλακτώματα σχηματίζονται χωρίς την παρουσία επιφανειενεργών ουσιών. Αντί του επιφανειενεργού χρησιμοποιούνται αλκοόλες μικρής αλκυλικής αλυσίδας, όπου το ρόλο της υδρόφιλης κεφαλής παίζει η πολική υδροξυλομάδα, ενώ το ρόλο της υδρόφοβης ουράς η αλκυλική αλυσίδα. Τα μικρογαλακτώματα αυτών των συστημάτων είναι θερμοδυναμικά σταθερά και μπορούν να δημιουργήσουν οπτικώς διαυγείς διασπορές νερού μέσα σε έναν μη πολικό οργανικό διαλύτη (Lund and Holt 1980, Smith et al. 1977). Τη σταθερότητα την αποκομίζουν από την προσρόφιση της αλκοόλης στην επιφάνεια των υδατικών νανο-διασπορών, προσδίδοντας τους σφαιρική συμμετρία. Τα συστήματα αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί ως μέσα για βιοκαταλυτικές διεργασίες (Khmelnitsky et al. 1988a, Tziaila et al. 2008, Tziaila et al. 2009).

Πίνακας 2: Συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο χωρίς επιφανειενεργό.

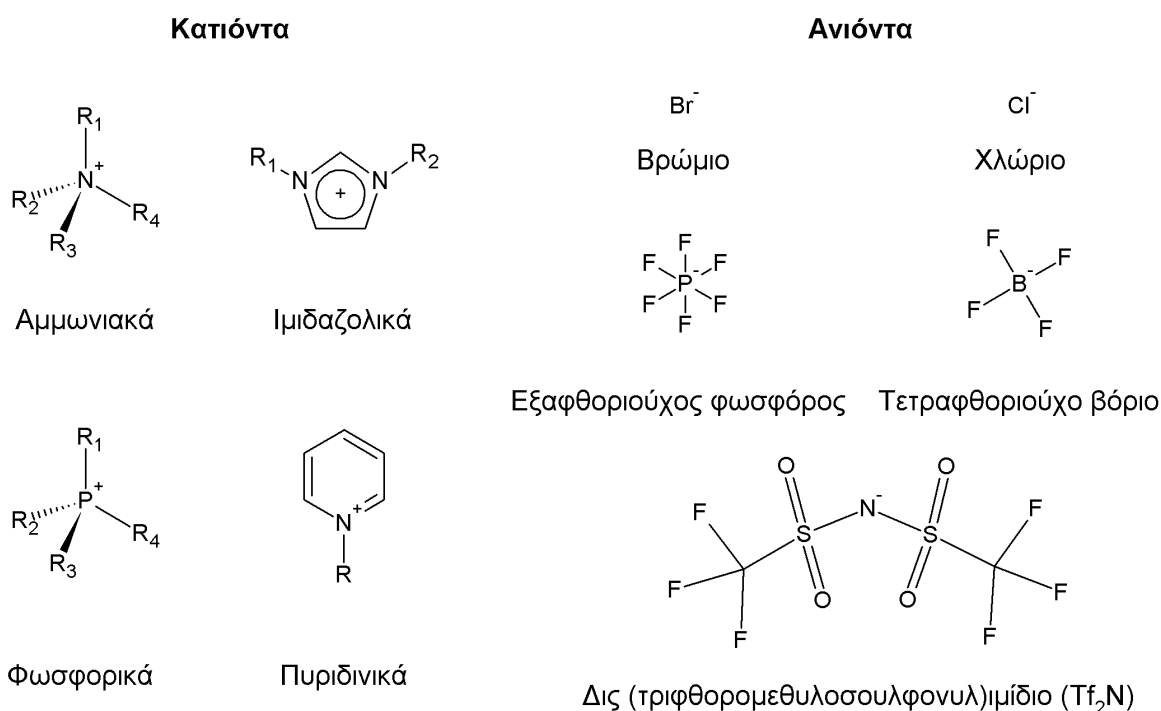
Σύσταση συστημάτων μικρογαλακτωμάτων	Αναφορά
τολουένιο / νερό / 2-προπανόλη	(Lund and Holt 1980)
<i>n</i> -εξάνιο / νερό / 1-βουτανόλη ή τριτοταγής βουτανόλη	(Topakas et al. 2005)
<i>n</i> -εξάνιο / νερό / 1-προπανόλη	(Topakas et al. 2003a)
α -πινένιο ή D-λιμονένιο / νερό / τριτοταγής βουτανόλη	(Tziaila et al. 2009)
α -πινένιο / νερό / 2-προπανόλη ή τριτοταγής βουτανόλη	(Tziaila et al. 2008)

Το πρώτο σύστημα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο χωρίς επιφανειενεργό που αναφέρθηκε στη βιβλιογραφία είναι το σύστημα *n*-εξάνιο / νερό / 2-προπανόλη (Smith et al.

1977), το οποίο χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή. Τα επόμενα χρόνια αναπτυχθήκαν και άλλα τέτοια συστήματα, μερικά από τα οποία παρουσιάζονται στον πίνακα 2. Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως η θερμοδυναμική συμπεριφορά αυτών των συστημάτων μπορεί να μοντελοποιηθεί, και συνεπώς να προβλεφθεί το διάγραμμα φάσης κάθε συστήματος νερού / αλκοόλης / αλκανίου (Voutsas et al. 1999).

2.2.3 Μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικά υγρά

Τα τελευταία χρόνια μία νέα κατηγορία διαλυτών έχει τραβήξει το έντονο ενδιαφέρον της ακαδημαϊκής κοινότητας, τα αποκαλούμενα ιοντικά υγρά. Τα ιοντικά υγρά αποτελούν άλατα (εικόνα 9), τα οποία παραμένουν υγρά σε θερμοκρασίες κάτω των 100 °C.



Εικόνα 9: Τυπικά ιόντα που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό ιοντικών υγρών.

Το ενδιαφέρον για αυτή τη νέα κατηγορία διαλυτών προκύπτει από το γεγονός ότι έχουν προταθεί ως αντικαταστάτες των οργανικών διαλυτών σε αρκετές διεργασίες, καθότι είναι σύμφωνοι με τις αρχές της «πράσινης» χημείας (Kragl et al. 2002, Park and Kazlauskas 2003, Sheldon et al. 2002, van Rantwijk and Sheldon 2007), ενώ παράλληλα έχουν χρησιμοποιηθεί ως μέσα για βιοκαταλυτικές διεργασίες με μεγάλη επιτυχία (Sheldon 2007, van Rantwijk and Sheldon 2007). Τα ιοντικά υγρά επιδεικνύουν χαμηλή τάση ατμών, χαμηλή τοξικότητα, δεν είναι εύφλεκτα και είναι αποικοδομήσιμα. Σημαντικό τους πλεονέκτημα είναι η μεταβλητότητα τους. Μία μικρή αλλαγή στο ανιόν ή το κατιόν μπορεί να επιδράσει σημαντικά στις ιδιότητες τους, όπως για παράδειγμα στην υδροφιλικότητα.

Το ενδιαφέρον για τη χρήση των ιοντικών υγρών οδήγησε τα τελευταία χρόνια στην ανάπτυξη συστημάτων μικρογαλακτωμάτων με τα ιοντικά υγρά να παίζουν είτε το ρόλο του νερού είτε του ελαίου. Μερικά από τα συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικά υγρά που αναπτύχθηκαν παρουσιάζονται στον πίνακα 3. Το ενδιαφέρον που παρουσιάζουν τα συγκεκριμένα συστήματα αντικατοπτρίζεται στο γεγονός ότι από την πρώτη αναφορά που έγινε σε τέτοια συστήματα το 2004 (Gao et al. 2004), ήδη έχουν δημοσιευτεί εργασίες ανασκόπησης (Moniruzzaman et al. 2010c, Qiu and Texter 2008, Zhao 2010) καθώς και αρκετές εφαρμογές αυτών των συστημάτων στη βιοκατάλυση (Moniruzzaman et al. 2008b, Xue et al. 2011) και ως σύστημα χορήγησης φαρμάκων (Moniruzzaman et al. 2010b).

Πίνακας 3: Συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό.

Σύσταση συστημάτων μικρογαλακτωμάτων	Αναφορά
[bmim] PF ₆ ⁷ / νερό / Tween 20	(Gao et al. 2006)
[bmim] PF ₆ / νερό / Triton X-100	(Gao et al. 2005)
[bmim] PF ₆ / νερό / AOT	(Shu et al. 2008)
[omim] Tf ₂ N ⁸ / νερό / AOT / 1-εξανόλη	(Moniruzzaman et al. 2008a)
[bmim]PF ₆ / νερό / AOT / Triton X-100	(Xue et al. 2011)

2.3 Ένζυμα σε μικρογαλακτώματα

Τα πρώτα χρόνια η ενζυμική κατάλυση περιοριζόταν σε υδατικά συστήματα, καθότι τα συστήματα αυτά θεωρούταν ως το φυσικό περιβάλλον του ενζύμου. Η χρήση όμως των συγκεκριμένων συστημάτων περιοριζε σε σημαντικό βαθμό τις βιοκαταλυτικές διεργασίες που μπορούσαν να αναπτυχθούν καθώς δεν μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν μη υδατοδιαλυτά υποστρώματα. Για την επέκταση των δυνατοτήτων της ενζυμικής κατάλυσης έπρεπε να βρεθεί ένας τρόπος οι υδρόφοβες ενώσεις να βρεθούν στο μικροπεριβάλλον των ενζύμων. Σε αυτό το πλαίσιο αναπτύχθηκαν διάφορα μη συμβατικά συστήματα τα οποία είχαν περιορισμένη περιεκτικότητα σε νερό, όπως τα διφασικά συστήματα νερού-οργανικού διαλύτη, τα συστήματα ελεύθερα διαλυτών και τα υπερκρίσιμα ρευστά. Μεταξύ των συστημάτων που αναπτύχθηκαν ήταν και τα μικρογαλακτώματα που, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, έχουν τη δυνατότητα να φιλοξενήσουν ένζυμα στις υδατικές τους νανο-διασπορές.

Η πρώτη εργασία σχετικά με τη χρήση ενζύμων σε μικρογαλακτώματα δημοσιεύτηκε το 1977, όταν ο Martinek και οι συνεργάτες του ανέφεραν ότι η α -χυμοθρυψίνη και η υπεροξειδάση διατηρούν τις καταλυτικές της ιδιότητες σε ένα σύστημα μικρογαλακτώματος νερού σε οργανικούς διαλύτες, όπως οκτάνιο και βενζόλιο (Martinek et al. 1977). Παράλληλα, μελέτες του φάσματος απορρόφησης του ίδιου ενζύμου σε παρόμοια μικρογαλακτώματα έδειξαν ότι το

⁷ 1-βουτυλο-3-μεθυλιμιδαζόλιο εξαφθοριούχος φωσφόρος

⁸ 1-μεθυλο-3-οκτυλιμιδαζόλιο δις(τριφθορομεθυλοσουλφονυλ)ιμίδιο

ένζυμο διατηρεί τη δομή του μέσα σε αυτά τα συστήματα (Luisi et al. 1977). Το ερευνητικό πεδίο άνησε τα επόμενα χρόνια, με τη χρήση αρκετών ενζύμων σε τέτοια συστήματα.

Ο εγκλωβισμός ενζύμων στις υδατικές νανο-διασπορές των συστημάτων μικρογαλακτωμάτων παρουσιάζει δύο βασικά πλεονεκτήματα. Αφενός η επιφάνεια μεταξύ νερού και ελαίου αυξάνεται σημαντικά, διευκολύνοντας τη μεταφορά, αφετέρου το ένζυμο προστατεύεται από τον οργανικό διαλύτη (Stamatis et al. 1999). Η επαφή του ενζυμικού μορίου με κάποιον οργανικό διαλύτη τις περισσότερες φορές διαταράσσει τη δομή του, επιδρώντας αρνητικά στη δραστικότητα του. Τα μόρια του επιφανειενεργού στα μικρογαλακτώματα δημιουργούν μία μεμβράνη η οποία προστατεύει το ένζυμο από τον οργανικό διαλύτη, ενώ ταυτόχρονα καθιστά εφικτή τη ρύθμιση του υδατικού μικροπεριβάλλοντος του ενζύμου.

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης μικρογαλακτωμάτων για τη πραγματοποίηση ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων συνοψίζονται στα εξής σημεία (Orlich and Schomäcker 2002, Stamatis et al. 1999):

- ❖ Διαλυτοποίηση υδρόφιλων και υδρόφοβων αντιδρώντων
- ❖ Αυξημένη επιφάνεια αλληλεπίδρασης μεταξύ νερού - ελαίου
- ❖ Μείωση της αναστολής από το προϊόν
- ❖ Αύξηση της θερμοσταθερότητας του ενζύμου
- ❖ Δυνατότητα ελέγχου της τοπο-, στερεο- και ενάντιο-εξειδίκευσης των ενζύμων
- ❖ Δυνατότητα μετατόπισης της θερμοδυναμικής ισορροπίας μίας αντίδρασης προς την επιθυμητή κατεύθυνση
- ❖ Μειωμένος κίνδυνος μικροβιακής επιμόλυνσης

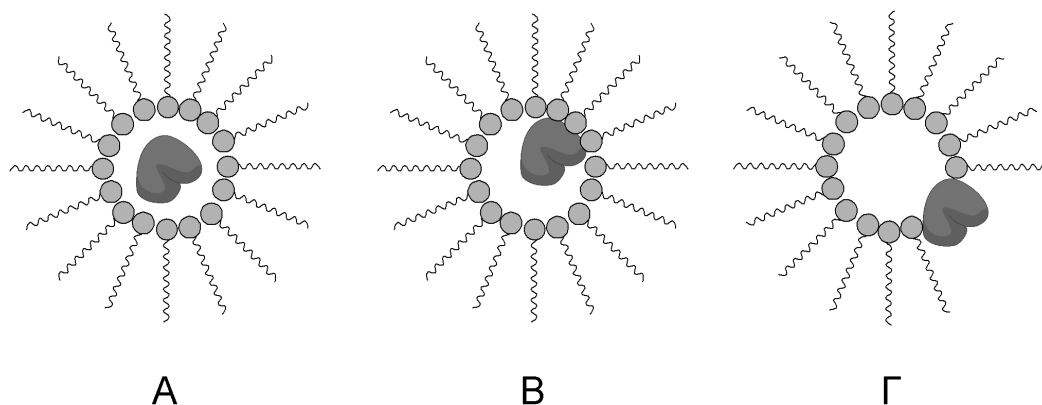
Πέρα από τα παραπάνω πλεονεκτήματα, δεν πρέπει να παραγκωνιστεί το γεγονός ότι η διαμερισματοποίηση που λαμβάνει χώρα σε αυτά τα συστήματα και η παρουσία της μεσεπιφάνειας προσομοιάζουν σε καλύτερο βαθμό τις συνθήκες κάτω από τις οποίες λειτουργούν τα ένζυμα μέσα στα κύτταρα (*in vivo*) από ότι ένα υδατικό σύστημα. Έχει αναφερθεί η χρήση φωσφολιπιδίων ως επιφανειενεργών μορίων για το σχηματισμό μικρογαλακτωμάτων, έτσι ώστε η μεσεπιφάνεια μεταξύ νερού και ελαίου να προσομοιώνει ακόμα περισσότερο τις βιολογικές μεμβράνες (Avramiotis et al. 1996, Svensson et al. 1996, Walde et al. 1990).

Η βέλτιστη καταλυτική δράση των ενζύμων σε κάθε σύστημα έχει άμεση σχέση με τη δομή τους. Η δομή των πρωτεϊνών προκύπτει από δεσμούς υδρογόνου και ηλεκτροστατικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των αμινοξέων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Είναι προφανές ότι για να διατηρήσει το ένζυμο τη διαμόρφωση του, θα πρέπει το περιβάλλον να ευνοεί την ανάπτυξη τέτοιων αλληλεπιδράσεων. Έχει αναφερθεί πως για τη σωστή αναδίπλωση του ενζύμου είναι αναγκαία μία ελάχιστη ποσότητα νερού για την ενυδάτωση του μορίου (Hari Krishna and Karanth 2002, Khmel'nitsky et al. 1988b). Η απώλεια αυτής της ποσότητας του νερού και η επαφή του ενζύμου με μόρια επιφανειενεργού ή

οργανικού διαλύτη έχει ως αποτέλεσμα την αλλαγή της διαμόρφωσης του ενζύμου, με συνέπεια συνήθως την απώλεια της καταλυτικής δραστηριότητας (Zaks and Klibanov 1988).

Από τα προηγούμενα φαίνεται πως η καταλυτική δραστηριότητα των ενζύμων στα μικρογαλακτώματα εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό από το βαθμό ενυδάτωσης του μικρογαλακτώματος (w_0). Η εξάρτηση αυτή συχνά εμφανίζει κωδωνοειδή μορφή με μέγιστο σε σχετικά χαμηλή τιμή του βαθμού ενυδάτωσης. Σε αρκετές περιπτώσεις, η τιμή του w_0 όπου εμφανίζεται το μέγιστο της ταχύτητας αντιστοιχεί σε νανο-δομές με διάμετρο συγκρίσιμη με αυτή του ενζύμου. Στην προκειμένη περίπτωση το ένζυμο διατηρεί την καταλυτική του δραστηριότητα, αφού είναι επαρκώς ενυδατωμένο, και παράλληλα βρίσκεται σε μικρή απόσταση από τη μεσεπιφάνεια, όπου και αλληλεπιδρά με τα υδρόφοβα υποστρώματα. Θα πρέπει να σημειωθεί πως η διαλυτοποίηση των ενζύμων (και άλλων ενώσεων) σε μικρογαλακτώματα διαταράσσει τη δομή των υδατικών νανο-διασπορών, συνήθως αυξάνοντας τη διάμετρο τους και αλλάζοντας το διάγραμμα φάσης (Orlich and Schomäcker 2002).

Ο βαθμός υδροφοβικότητας ενός βιομορίου παίζει σημαντικό ρόλο στον εντοπισμό του ενζύμου μέσα στο σύστημα (Luisi et al. 1988, Stamatis et al. 1993). Μία υδρόφιλη πρωτεΐνη μπορεί να αποφύγει την επαφή με τον οργανικό διαλύτη και να παραμείνει στην υδατική νανο-διασπορά, εφόσον η διάμετρος της νανο-διασποράς είναι επαρκής. Ένα ένζυμο που λειτουργεί σε μεσεπιφάνειες, όπως οι λιπάσες, μπορεί να αλληλεπιδράσει με τη μικκυλιακή μεσεπιφάνεια, ενώ μία διαμεμβρανική πρωτεΐνη μπορεί να είναι μερικώς εκτεθειμένη στον οργανικό διαλύτη (Stamatis et al. 1999). Στην εικόνα 10 παρουσιάζονται οι διάφορες θέσεις στις οποίες μπορεί να εντοπιστεί ένα ενζυμικό μόριο στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο.



Εικόνα 10: Εντοπισμός του ενζύμου στο εσωτερικό της υδατικής νανο-διασποράς (A), στη μεσεπιφάνεια (B) και μερικώς εκτεθειμένο στον οργανικό διαλύτη (Γ).

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας που επιδρά στην καταλυτική δραστηριότητα του ενζύμου είναι ο τύπος του επιφανειενεργού που χρησιμοποιείται για το σχηματισμό του συστήματος. Έχει αναφερθεί πως η παρουσία και μόνο του επιφανειενεργού σε υδατικά διαλύματα επηρεάζει σημαντικά την εναντιοεκλεκτικότητα και την ενεργότητα των λιπασών, λόγω φαινομένων που σχετίζονται με τη διαλυτοποίηση υδρόφοβων υποστρωμάτων και την

ενεργοποίηση των λιπασών σε μεσεπιφάνειες (Helistö and Korpela 1998, Liu et al. 2000, Rees and Robinson 1995). Η συγκέντρωση και ο τύπος του επιφανειενεργού έχουν σημαντική επίδραση στη μεσεπιφάνεια που δημιουργείται, καθώς επιδρούν στις διαστάσεις της (Orlich and Schomäcker 2002, Stamatis et al. 1999). Η έκτασή της ειδικά έχει ιδιαίτερη σημασία, καθώς μέσω της μεσεπιφάνειας γίνεται η αλληλεπίδραση ενζύμου – υποστρώματος. Τέλος, θα πρέπει να σημειωθεί πως οι τιμές του pH, του w_0 και της θερμοκρασίας που αντιστοιχούν στη μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα μπορεί να διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με το επιφανειενεργό μόριο που χρησιμοποιείται για το σχηματισμό του συστήματος (Valis et al. 1992).

2.4 Νανοβιοκατάλυση σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων

Η έρευνα στο πεδίο της μικκυλιακής ενζυμολογίας τα τελευταία χρόνια έχει αποδώσει καρπούς και πλέον έχουν αναπτυχθεί αρκετές εφαρμογές αυτών των συστημάτων σε πεδία όπως η βιοκατάλυση, η βιοαποικοδόμηση, η πεπτιδοχημεία, η αναλυτική χημεία και η φαρμακευτική. Στον πίνακα 4 παρουσιάζονται ενδεικτικά ορισμένες εφαρμογές που απορρέουν από τη χρήση ενζύμων σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε οργανικό διαλύτη. Είναι ενδιαφέρον πως πλήθος διαφορετικών ενζύμων χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των εφαρμογών, ενώ για το σχεδιασμό εφαρμογών δεν περιορίζονται μόνο σε ένα σύστημα μικρογαλακτώματος, αν και οι περισσότερες εργασίες χρησιμοποιούν μικρογαλακτώματα νερού σε ισοοκτάνιο παρουσία AOT.

Πίνακας 4: Ενδεικτικές εφαρμογές ενζύμων σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο.

Ένζυμο	Σύστημα	Εφαρμογή	Αναφορά
Αλκαλική φωσφατάση	AOT, ισοοκτάνιο – αιθυλεστέρας οξικού οξέος	Προσδιορισμός θεοφυλλίνης	(Jourquin and Kauffmann 1998)
α-χυμοθρυψίνη	AOT-Brij30, <i>n</i> -επτάνιο	Σύνθεση ολιγοπεπτιδίου	(Barbaric and Luisi 1981)
Λακκάση	AOT, ισοοκτάνιο	Οξειδωση φαινολικών οξέων	(Rodakiewicz-Nowak et al. 2005)
Λιπάσες	AOT, ισοοκτάνιο	Εστεροποίηση διολών	(Macris et al. 1996)
Λιπάση	AOT, ισοοκτάνιο	Σύνθεση οπτικών αντιπόδων εστέρων ibuprofen	(Ayyagari and John 1995)
Υδρογενάση, αφυδρογονάση	CTAB - 1-εξανόλη, <i>n</i> -οκτάνιο	Αναγωγή κετοστεροειδών	(Hilhorst et al. 1983)
Υπεροξειδάση	AOT, ισοοκτάνιο	Παραγωγή βιοπολυμερών	(Karayigitoglu et al. 1995)

Μία από τις σημαντικότερες εφαρμογές των συστημάτων μικρογαλακτωμάτων στη βιοτεχνολογία είναι η βιοκατάλυση και η βιοσύνθεση ουσιών που είναι αδιάλυτες σε υδατικά

μέσα, όπως λίπη, λιπίδια, στεροειδή, προσταγλαδίνες, αλκαλοειδή κ.ά.. Πλήθος ενζύμων με διαφορετική καταλυτική δράση έχουν εγκλωβιστεί σε μικρογαλακτώματα, έτσι έχουν αναπτυχθεί πλήθος διαφορετικών εφαρμογών. Η οξείδωση φαινολικών οξέων από λακκάσες μπορεί να συνεισφέρει στη βιοαποικοδόμηση φαινολικών ρύπων πετρελαίου (Rodakiewicz-Nowak et al. 2005), ενώ η εναντιοεκλεκτικότητα που επιδεικνύουν τα ένζυμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση ρακεμικών λιπόφιλων παραγώγων βιοδραστικών ενώσεων, όπως το ibuprofen (Ayyagari and John 1995).

Πέρα από την οργανική σύνθεση, τα ένζυμα έχουν χρησιμοποιηθεί σε μικρογαλακτώματα για αναλυτικές εφαρμογές, όπως ο προσδιορισμός της βιταμίνης B2 (Kurganov et al. 1985) και της θεοφυλλίνης, μίας ουσίας με βρογχοδιασταλτικές ιδιότητες (Jourquin and Kauffmann 1998). Η αρχή λειτουργίας αυτών των συστημάτων έγκειται στο ότι τα ένζυμα που εγκλωβίζονται στα μικρογαλακτώματα αναγνωρίζουν τις συγκεκριμένες ενώσεις ως υποστρώματα ή ως αναστολείς και συνεπώς η παρουσία τους στο διάλυμα προκαλεί διαφορά στην ενζυμική δραστηριότητα. Η ευαισθησία και η αξιοπιστία των μετρήσεων στις συγκεκριμένες αναλυτικές τεχνικές έγκειται στην αυξημένη δραστηριότητα που επιδεικνύουν τα ένζυμα σε αυτά τα συστήματα.

Η χρήση ενζύμων στα μικρογαλακτώματα νερού σε οργανικό διαλύτη και η διαφοροποίηση της δραστηριότητας τους, αλλά και του εντοπισμού τους στο σύστημα οδήγησε στην ανάπτυξη της υγρής εκχύλισης πρωτεϊνών. Η υγρή εκχύλιση είναι μία μέθοδος απομόνωσης και καθαρισμού πρωτεϊνών που βασίζεται σε διάφορες ιδιότητες των πρωτεϊνικών μορίων όπως το μέγεθος, το ισοηλεκτρικό σημείο και την υδροφοβικότητα της επιφάνειας. Αρκετές εργασίες έχουν δημοσιευτεί στο συγκεκριμένο τομέα με μικρογαλακτώματα νερού σε οργανικό διαλύτη (Hayes and Marchio 1998, Noritomi et al. 2008, Watarai 1997), ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ήδη έχουν χρησιμοποιηθεί τα συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό για την απομόνωση πρωτεϊνών (Shu et al. 2008).

Η πρώτη χρήση ενζύμων σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό αναφέρθηκε στις αρχές του 2008 (Zhang et al. 2008). Έκτοτε σε αυτά τα συστήματα έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς για βιοκαταλυτικές αντιδράσεις διάφοροι τύποι ενζύμων όπως λιπάσες (Moniruzzaman et al. 2008b), λακκάσες (Xue et al. 2011), υπεροξειδάσες (Moniruzzaman et al. 2009, Zhou et al. 2008) και αφυδρογονάσες (Zhang et al. 2008). Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι σε αρκετές από τις εργασίες αναφέρεται πως η δραστηριότητα των ενζύμων σε αυτά τα συστήματα είναι αυξημένη σε σχέση με τη δραστηριότητα που επιδεικνύουν είτε σε μικρογαλακτώματα νερού σε οργανικό διαλύτη, είτε σε ιοντικά υγρά. Αν και αρκετά ένζυμα επιδεικνύουν πολύ καλή ενεργότητα σε ιοντικά υγρά, η χρήση συστημάτων μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό υπερτερεί, καθώς καθιστά εφικτή τη διαλυτοποίηση των ενζύμων σε αυτά τα συστήματα, ενώ ταυτόχρονα επιτρέπει τη συνύπαρξη δύο φάσεων διαφορετικής πολικότητας στο ίδιο σύστημα. Θα μπορούσε λοιπόν να λεχθεί πως τα συγκεκριμένα συστήματα συνδυάζουν τα πλεονεκτήματα των ιοντικών υγρών και των μικρογαλακτωμάτων νερού σε οργανικό διαλύτη.

3 Βιοκατάλυση σε πηκτώματα μικρογαλακτωμάτων

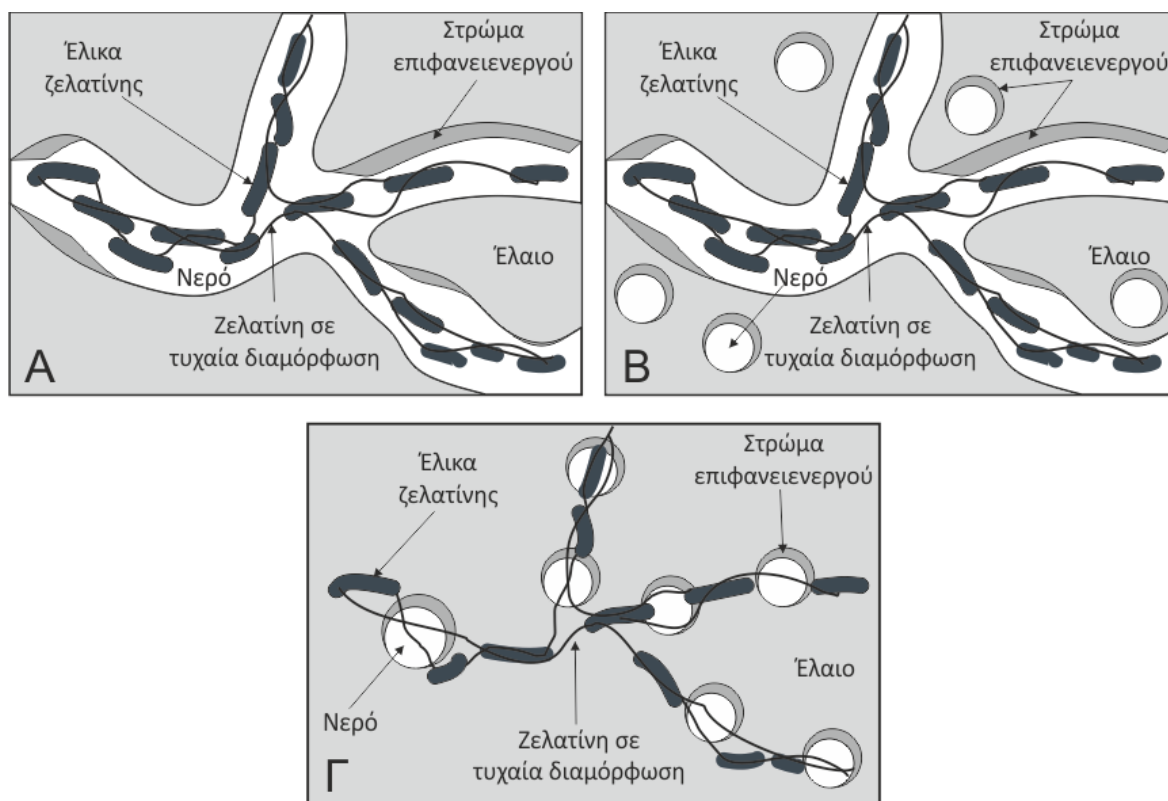
3.1 Πηκτώματα μικρογαλακτωμάτων - Οργανοπηκτώματα

Στο κεφάλαιο που προηγήθηκε αναφέρθηκαν τα πλεονεκτήματα της χρήσης των συστημάτων μικρογαλακτωμάτων για τη πραγματοποίηση βιομετατροπών σε μη πολικούς οργανικούς διαλύτες, καθώς και ορισμένες εναλλακτικές προσεγγίσεις, όπως η χρήση των ιοντικών υγρών. Η πρακτική εφαρμογή όμως ενός τέτοιου μικροετερογενούς συστήματος σε βιομηχανική κλίμακα συναντά σημαντικά εμπόδια σχετικά με την αναγέννηση του ενζύμου και την απομόνωση των προϊόντων. Οι συνήθεις τεχνικές οδηγούν σε ανεπαρκή διαχωρισμό εξαιτίας προβλημάτων όπως ο σχηματισμός γαλακτώματος και ο αφρισμός που προκαλούνται από την παρουσία του επιφανειοενεργού. Η χρήση μικρογαλακτωμάτων που σχηματίζονται χωρίς επιφανειοενεργό λύνει σε ένα βαθμό το πρόβλημα του διαχωρισμού, αλλά δεν προσφέρει λύση στο πρόβλημα της ανάκτησης του ενζύμου.

Ένας τρόπος να αντιμετωπιστούν αυτά τα προβλήματα είναι η πηκτωματοποίηση των συστημάτων μικρογαλακτωμάτων. Αρκετά συστήματα αντίστροφων μικκυλίων μπορούν να πηκτωματοποιηθούν, καθιστώντας τα με αυτό τον τρόπο κατάλληλα συστήματα για ακινητοποίηση ενζύμων (Luisi et al. 1990, Zoumpanioti et al. 2010). Με τον όρο πηκτώματα (gels) χαρακτηρίζονται τα στερεά ή ημιστερεά συστήματα που αποτελούνται από δύο τουλάχιστον συστατικά: ένα παράγοντα πηκτωματοποίησης και ένα υγρό. Εάν το υγρό συστατικό είναι νερό ονομάζονται υδροπηκτώματα (hydrogels), ενώ αν είναι έλαιο ή μικρογαλάκτωμα ονομάζονται οργανοπηκτώματα (organogels)(Zoumpanioti et al. 2010).

Οι πρώτες αναφορές για την παρασκευή τέτοιων πηκτωμάτων εμφανίστηκαν το 1986 (Haering and Luisi 1986, Quellet and Eicke 1986), με χρήση ζελατίνης ως παράγοντα πηκτωματοποίησης. Τα πηκτώματα παρασκευάστηκαν με ανάμειξη μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο με προθερμασμένο υδατικό διάλυμα ζελατίνης. Η ψύξη που ακολουθεί οδηγεί στη πηκτωματοποίηση και τον εγκλωβισμό των μικρογαλακτωμάτων μέσα στη ζελατίνη. Πηκτώματα μπορούν να παραχθούν και με τη χρήση άλλων παραγόντων πηκτωματοποίησης, αλλά και άλλου τύπου μικρογαλακτωμάτων, όπως θα αναφερθεί και παρακάτω.

Τα μορφολογικά και δομικά χαρακτηριστικά των οργανοπηκτωμάτων έχουν μελετηθεί εκτενώς με τεχνικές όπως ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός (Capitani et al. 1988, Capitani et al. 1991), η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Zhao et al. 2006), η μικρής γωνίας σκέδαση νετρονίων και ακτίνων X (Atkinson et al. 1991, Petit et al. 1991), σκέδαση φωτός (Petit et al. 1991), κυκλικός διχρωσμός και μέτρηση αγωγιμότητας (Quellet et al. 1991). Από τα αποτελέσματα αυτών των μελετών προτάθηκαν τρία διαφορετικά μοντέλα για τη μικροδομή ενός τέτοιου συστήματος που παρασκευάζεται με ζελατίνη, τα οποία παρουσιάζονται στην εικόνα 11:



Εικόνα 11: Μοντέλα δομής οργανοπηκτωμάτων που σχηματίζονται με ζελατίνη. Τα μοντέλα A,B, Γ περιγράφονται στο κείμενο.

- A. Κύλινδροι νερού περιέχουν το δίκτυο της ζελατίνης και διαχωρίζονται από τα μόρια του ελαίου με ένα στρώμα επιφανειοενεργών μορίων. Το μοντέλο αυτό υποστηρίζεται από το γεγονός ότι η ζελατίνη δε διαλυτοποιείται στον οργανικό διαλύτη.
- B. Οι δομές που προτείνονται στο πρώτο μοντέλο συνυπάρχουν με αντίστροφα μικκύλια.
- Γ. Τα αντίστροφα μικκύλια του μικρογαλακτώματος συνδέονται μεταξύ τους μέσω της ζελατίνης που υιοθετεί μία ελικοειδή μορφή, ενώ μέρος της ζελατίνης είναι διαλελυμένη στις υδατικές μικροφάσεις του συστήματος.

Κατά την παρασκευή πηκτωμάτων τον παράγοντα πηκτωματοποίησης αποτελεί συχνά κάποιο βιοπολυμερές. Τα βιοπολυμερή είναι ουσίες φυσικές και βιοσυμβατές, ιδιότητες που καθιστούν τα πηκτώματά τους ευρέως χρησιμοποιούμενα σε φαρμακευτικά σκευάσματα και τρόφιμα. Τα βιοπολυμερή που χρησιμοποιούνται κατά κόρον στην παραγωγή οργανοπηκτωμάτων είναι η ζελατίνη (Luisi et al. 1990, Trickett and Eastoe 2008, Zhao et al. 2006), το άγαρ (Delimitsou et al. 2002, Feng et al. 2009, Pastou et al. 2000b, Stamatis and Xenakis 1999), η καρραγενάνη (Feng et al. 2009, Stamatis and Xenakis 1999) και ορισμένα παράγωγα κυτταρίνης (Delimitsou et al. 2002, Pastou et al. 2000b, Zoumpantioti et al. 2008). Παρακάτω παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά δύο παραγόντων πηκτωματοποίησης που χρησιμοποιούνται ευρέως για το σχηματισμό οργανοπηκτωμάτων, της ζελατίνης και των παραγώγων κυτταρίνης.

Ζελατίνη: Η ζελατίνη είναι ένα βιοπολυμερές το οποίο παράγεται από τη αποδιάταξη του κολλαγόνου, το οποίο είναι μία πρωτεΐνη. Το κολλαγόνο αποτελείται από τρεις αριστερόστροφες έλικες που σταθεροποιούνται με δεσμούς υδρογόνου που αναπτύσσονται μεταξύ τους. Η ζελατίνη αποτελείται από μεμονωμένους κλώνους των ελίκων του κολλαγόνου οι οποίοι παράγονται μέσω μη αντιστρεπτής υδρόλυσης. Η ζελατίνη είναι διαλυτή στο νερό σε θερμοκρασίες άνω των 30 °C. Ψύχοντας το διάλυμα κάτω από αυτή τη θερμοκρασία σχηματίζεται ένα ελαστικό πήκτωμα, λόγω του δικτύου που σχηματίζεται από το μερικό επανασχηματισμό της τριπλής έλικας του κολλαγόνου.

Παράγωγα κυτταρίνης: Η κυτταρίνη είναι ένας πολυσακχαρίτης που αποτελείται από μία ευθεία αλυσίδα μονομερών D-γλυκόζης, ενωμένων με (1,4) β-γλυκοσιδικό δεσμό. Βρίσκεται σε αφθονία στο περιβάλλον, καθώς είναι το κύριο συστατικό του κυτταρικού τοιχώματος των φυτών, και φυσικά είναι βιοδιασπώμενη. Η κυτταρίνη δεν είναι υδατοδιαλυτή αλλά είναι υγροσκοπική, δηλαδή έχει την ιδιότητα να απορροφά νερό. Έτσι, η κυτταρίνη και τα παράγωγα της δεν παρουσιάζουν θερμικές ιδιότητες πηκτωματοποίησης. Η υποκατάσταση των ομάδων στην κυτταρίνη τροποποιεί τις ιδιότητες των παραγώγων και ο βαθμός υποκατάστασης τους επηρεάζει τη συμπεριφορά των παραγώγων σε ένα υδατικό διάλυμα. Όταν βρεθούν σε υδατικό διάλυμα, τα παράγωγα της κυτταρίνης διογκώνονται, αυξάνοντας το ιξώδες του διαλύματος.

Η (υδροξυπροπυλο)μεθυλο κυτταρίνη (HPMC), η οποία χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα διατριβή, είναι ένα ημισυνθετικό αδρανές ελαστικό πολυμερές. Όπως και η κυτταρίνη, είναι υγροσκοπική και τείνει να δημιουργεί κολλοειδή όταν διαλύεται στο νερό. Η (υδροξυπροπυλο)μεθυλο κυτταρίνη, εκτός από παράγοντας πηκτωματοποίησης έχει βρει αρκετές εφαρμογές ως σύστημα χορήγησης φαρμάκων (Li et al. 2005a, Siermann and Peppas 2001), ως πρόσθετο τροφίμων (Burdock 2007) και ως λιπαντικό για οφθαλμολογικές παθήσεις (Doughty and Glavin 2009)

3.2 Ακίνητοποίηση ενζύμων σε οργανοπηκτώματα

Τα πηκτώματα μικρογαλακτωμάτων έχουν χρησιμοποιηθεί ως φορείς ακίνητοποίησης ενζύμων για την επίτευξη ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων σε μη συμβατικά συστήματα. Τα οργανοπηκτώματα φαίνεται να διατηρούν τη δομή τους για μεγάλη περίοδο, ακόμα και μέσα σε αυτά τα συστήματα, επιτρέποντας τη διάχυση μη πολικών υποστρωμάτων από και προς το εσωτερικό τους (Backlund et al. 1996, Rees et al. 1991). Ο Nascimento και οι συνεργάτες τους ήταν οι πρώτοι που ανέφεραν την ακίνητοποίηση ενζύμων σε τέτοια πηκτώματα (Da Graca Nascimento et al. 1992). Στη συγκεκριμένη εργασία παρασκεύασαν οργανοπηκτώματα με χρήση ζελατίνης και AOT μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο, στα οποία ακίνητοποιήθηκαν διάφορες λιπάσες, όπως οι λιπάσες από *Chromobacterium viscosum* και από *Candida rugosa*.

Έκτοτε η ζελατίνη χρησιμοποιήθηκε κατά κόρον ως παράγοντας πηκτωματοποίησης, ενώ τα οργανοπηκτώματα σχηματίζονταν συνήθως με AOT μικρογαλακτώματα, αν και σχηματίστηκαν

και πηκτώματα με μικρογαλακτώματα που σχηματίζονται παρουσία CTAB ή λεκιθίνη. Στον πίνακα 5 παρουσιάζονται μερικές από τις μελέτες που έγιναν πάνω στην ακινητοποίηση λιπασών σε τέτοια συστήματα. Η εφαρμογή συνήθως αυτών των συστημάτων είχε να κάνει με σύνθεση εστέρων λιπαρών οξέων ή εναντιοεκλεκτικών ενώσεων.

Πίνακας 5: Συστήματα οργανοπηκτωμάτων στα οποία εγκλωβίστηκαν λιπάσες.

Μικροοργανισμός προέλευσης	Παράγοντας πηκτωματοποίησης	Επιφανειενεργό	Αναφορά
<i>Candida rugosa</i>	HPMC	λεκιθίνη	(Domínguez De María et al. 2004)
	ζελατίνη	CTAB	(Lopez et al. 2006)
	ζελατίνη	AOT, CTAB	(Dandavate and Madamwar 2008)
	ζελατίνη	Triton X-100	(Dave and Madamwar 2008)
<i>Chromobacterium viscosum</i> , <i>Candida sp.</i>	ζελατίνη	AOT, λεκιθίνη	(Backlund et al. 1996)
<i>Rhizopus delemar</i>	ζελατίνη	AOT	(Nagayama et al. 2003)
<i>Chromobacterium viscosum</i>	ζελατίνη	AOT	(Rees et al. 1995)
<i>Trichosporon capitatum</i>	ζελατίνη	AOT	(Song et al. 2008)
<i>Rhizomucor miehei</i> , <i>Candida antarctica</i> (B)	Άγαρ, HPMC	λεκιθίνη	(Pastou et al. 2000b)
<i>Pseudomonas cepacia</i>	ζελατίνη, άγαρ	λεκιθίνη, AOT	(Xenakis and Stamatias 1999)
<i>Rhizomucor miehei</i>	Άγαρ, HPMC	λεκιθίνη, AOT	(Zoumpantioti et al. 2008)

Τα οργανοπηκτώματα που χρησιμοποιούνται ως φορείς για την ακινητοποίηση ενζύμων χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε νερό και από υψηλές συγκεντρώσεις ζελατίνης, συνήθως 10-14 % (w/v). Τα ενζυμικά συστήματα μικρογαλακτωμάτων παρουσιάζουν αρκετά πλεονεκτήματα της βιοκατάλυσης στα μικρογαλακτώματα, όπως η διασπορά του βιοκαταλύτη σε μοριακό επίπεδο και η σταθεροποίηση των ακινητοποιημένων ενζύμων (Zoumpantioti et al. 2010). Τα ένζυμα που ακινητοποιούνται σε τέτοια πηκτώματα μπορούν να διατηρήσουν την καταλυτική τους δραστηριότητα και σταθερότητα για μεγάλο χρονικό διάστημα, ενώ είναι σημαντικό πως είναι εφικτή η επαναχρησιμοποίηση των ενζύμων μετά από μία βιοκαταλυτική διεργασία. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα πηκτώματα παρουσιάζουν το πλεονέκτημα της διπλής ακινητοποίησης του ενζύμου, αρχικά στα αντίστροφα μικκύλια του μικρογαλακτώματος και στη συνέχεια στο πλέγμα του βιοπολυμερούς.

Ωστόσο, τα οργανοπηκτώματα παρουσιάζουν ορισμένα μειονεκτήματα. Τα πηκτώματα που σχηματίζονται με ζελατίνη παρουσιάζουν χαμηλή μηχανική και θερμική αντοχή, αφού η ζελατίνη τείνει να διαλυτοποιείται σε υψηλές θερμοκρασίες και το πήκτωμα να χάνει τη δομή του. Η χρήση παραγώγων κυτταρίνης μπορεί να λύσει τα συγκεκριμένα προβλήματα σε ένα βαθμό, αφού τα συγκεκριμένα βιοπολυμερή δεν παρουσιάζουν θερμικές ιδιότητες πηκτωματοποίησης (Delimitsou et al. 2002). Έχει αναφερθεί ότι τα πηκτώματα που σχηματίζονται με χρήση ΗΡΜC διατηρούν τη δομή τους σε θερμοκρασίες άνω των 50 °C, ενώ το ένζυμο εξακολουθεί να επιδεικνύει καταλυτική δραστηριότητα (Zoumprioti et al. 2008). Επιπλέον, τα οργανοπηκτώματα, λόγω της φύσης του βιοπολυμερούς, έχουν χαμηλή αντοχή σε υδατικά συστήματα, αφού τείνουν να ενυδατωθούν και να χάσουν την αρχική τους δομή. Οι Schuleit και Luisi πρότειναν την ενίσχυση του πηκτώματος με τη χρήση σιλανίων (Schuleit and Luisi 2001). Ο πολυμερισμός των σιλανίων γύρω από το βιοπολυμερές αυξάνει τη μηχανική αντοχή του υλικού, καθώς και την αντοχή του σε υδατικά συστήματα, ενώ τα ακινητοποιημένα ένζυμα επιδεικνύουν αυξημένη δραστηριότητα.

4 Νανοδομημένα υλικά

4.1 Νανοβιοτεχνολογία και νανοδομημένα υλικά

Το πρόθεμα “νανο-” είναι ένα συνθετικό το οποίο υποδηλώνει το ένα δισεκατομμυριοστό μίας μονάδας μέτρησης, το οποίο όμως έχει καταφέρει να επανακαθορίσει την αντίληψη μας για την ύλη τα τελευταία χρόνια. Η νανοτεχνολογία είναι ένα ταχύτατα αναπτυσσόμενο επιστημονικό πεδίο το οποίο ασχολείται με τη μελέτη και την εφαρμογή υλικών και σωμάτων μεγέθους από 1 έως 100 nm. Έως το πρόσφατο παρελθόν, το πεδίο αυτό είχε συσχετισθεί με δομές όπως τα κολλοειδή, τα μικκύλια ή πολυμερή μόρια. Η ανακάλυψη νανοδομημένων υλικών όπως τα φουλερένια (Kroto et al. 1985) και οι νανοσωλήνες άνθρακα (Iijima 1991) ήγειραν το ερευνητικό ενδιαφέρον γύρω από το χαρακτηρισμό και την αξιοποίηση αυτών των νανοδομών. Τα κίνητρα που οδήγησαν στην αύξηση του επιστημονικού ενδιαφέροντος προς αυτό το πεδίο συνοψίζονται στα εξής σημεία (Kuchibhatla et al. 2007, Whitesides 2005):

- ❖ Η κλίμακα μεγέθους των νανοϋλικών καθιστά την επίδραση των κβαντικών φαινομένων στην ύλη αρκετά σημαντική, συνεπώς εφικτή τη μελέτη τους.
- ❖ Η μελέτη των νέων αυτών νανοδομημένων υλικών μπορεί να οδηγήσει σε καταγραφή νέων φαινομένων, αφού για πρώτη φορά μελετώνται τέτοια συστήματα.
- ❖ Μερικές από τις σημαντικότερες λειτουργικές μονάδες βιολογικών συστημάτων, όπως τα νουκλεϊκά οξέα και τα ένζυμα, έχουν διαστάσεις νανομέτρων.
- ❖ Η παρασκευή νανοδομημένων υλικών είναι πολύ ενδιαφέρουσα, καθώς απαιτεί την ανάπτυξη συνθετικών τεχνικών υψηλής ακρίβειας με μεγάλη επαναληψιμότητα.
- ❖ Τα νανοδομημένα υλικά πρόκειται να βρουν πλήθος εφαρμογών τα επόμενα χρόνια.

Το αυξημένο επιστημονικό ενδιαφέρον για τη νανοτεχνολογία και τις νανοεπιστήμες, το οποίο αποτυπώνεται στις πολυάριθμες εργασίες ανασκόπησης και βιβλία που έχουν δημοσιευτεί τα τελευταία χρόνια (ενδεικτικά: (Pagliaro 2010, Schmid 2010, Whitesides 2005)), προέρχεται από τις μοναδικές ιδιότητες των νανοδομημένων υλικών. Τα νανοϋλικά επιδεικνύουν εξαιρετικές ηλεκτρονικές, μηχανικές, οπτικές και μαγνητικές ιδιότητες, οι οποίες είναι σημαντικά διαφοροποιημένες από τις αντίστοιχες των μακροσκοπικών υλικών (Kuchibhatla et al. 2007, Whitesides 2005). Η διαφοροποίηση αυτή μπορεί να αποδοθεί στις διαστάσεις των υλικών αυτών, σύμφωνα με τη θεωρία του κβαντικού περιορισμού (Kuchibhatla et al. 2007).

Μέσα στην τελευταία δεκαετία τα νανοδομημένα υλικά έχουν βρει πολλές εφαρμογές σε διάφορα επιστημονικά πεδία, επιβεβαιώνοντας τη σπουδαιότητά τους. Διάφοροι τύποι νανοϋλικών έχουν αναπτυχθεί και έχουν βρει εφαρμογή σε πεδία όπως η Ηλεκτρονική, η Φαρμακευτική, η Ιατρική, η Φυσική, η Βιολογία, η Γεωργία, η Τεχνολογία τροφίμων και η Βιοτεχνολογία. Στον πίνακα 6 παρουσιάζονται ορισμένες εφαρμογές νανοδομημένων υλικών που έχουν προταθεί έως σήμερα. Σημαντικό ενδιαφέρον παρουσιάζει ο τομέας της νανοβιοτεχνολογίας, ο συγκεκριασμός δηλαδή της βιοτεχνολογίας με τη νανοτεχνολογία, πεδίο το

οποίο απασχόλησε την παρούσα διατριβή καθώς μελετήθηκε η δομή και η λειτουργία ενζύμων σε οργανωμένες νανοδομές (υδατικές νανοδιασπορές και νανοδομημένα υλικά).

Πίνακας 6: Εφαρμογές νανοδομημένων υλικών.

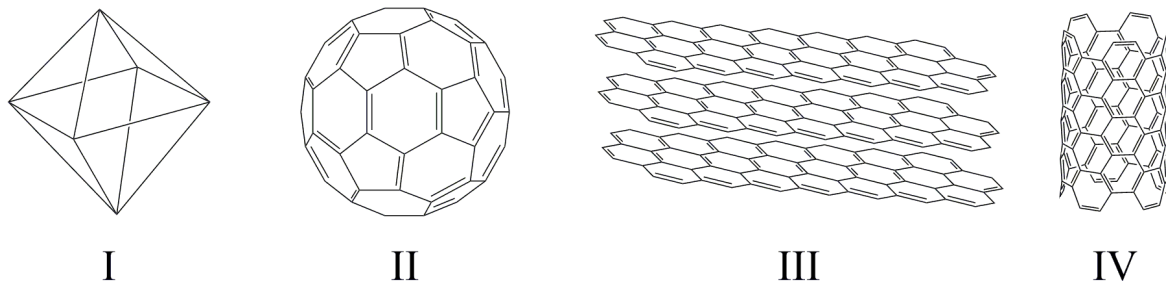
Νανοδομημένο υλικό	Εφαρμογή	Αναφορά
Νανოსωλήνες	Βιοϊατρικές εφαρμογές	(Ji et al. 2010)
άνθρακα	Εκχύλιση στερεής φάσης	(Ravelo-Pérez et al. 2010)
	Ηλεκτροχημεία	(Fujigaya et al. 2010)
	Αποκατάσταση υδάτων	(Upadhyayula et al. 2009)
	Χορήγηση φαρμάκων	(Foldvari and Bagonluri 2008)
Νανოსωματίδια	Ηλεκτρονικοί και οπτικοί αισθητήρες	(Shipway et al. 2000)
	Χορήγηση φαρμάκων, βιοαισθητήρες	(Brayner 2006)
	Εκχύλιση στερεής φάσης	(Ding et al. 2010)
	Φωτοβολταϊκά και κυψέλες καυσίμων	(Pauliac-Vaujour et al. 2011)
Φουλερένια	Βιοϊατρικές εφαρμογές	(Bosi et al. 2003)
	Ηλεκτρονικά κυκλώματα	(Babu et al. 2010)
Γραφένιο	Ηλεκτρονικά κυκλώματα	(Ghosh et al. 2008)
	Κυψέλες καυσίμων	(Liang et al. 2009)

4.2 Νανοϋλικά βασισμένα στον άνθρακα

Τα νανοϋλικά που βασίζονται στον άνθρακα έχουν προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια, λόγω των ιδιοτήτων του άνθρακα. Ο άνθρακας είναι από τα πιο μεταβλητά στοιχεία του περιοδικού πίνακα, όσον αφορά τον αριθμό, τον τύπο και την ισχύ των δεσμών που μπορεί να συνάψει. Το πλήθος των δεσμών που συνάπτει και οι αντίστοιχες γεωμετρίες των δεσμών καθιστούν ικανή την ύπαρξη δομικών ισομερών, στερεοϊσομερών και εναντιομερών. Αυτά βρίσκονται σε μεγάλες, σύνθετες και ποικίλες δομές, το οποίο οδηγεί στην αστείρευτη ποικιλότητα των οργανικών μορίων (Hennrich et al. 2006).

Οι ιδιότητες του άνθρακα απορρέουν από τη διάταξη των ηλεκτρονίων γύρω από τον πυρήνα του ατόμου. Υπάρχουν 6 ηλεκτρόνια στο άτομο του άνθρακα, κατανεμημένα κατά ζεύγη στα τροχιακά 1s, 2s και 2p. Ο άνθρακας μπορεί να συνάψει έως 4 δεσμούς, στους οποίους δεσμούς μπορούν να συμμετέχουν τα ηλεκτρόνια σθένους από τα τροχιακά 2s και 2p. Οι ομοιοπολικοί δεσμοί σχηματίζονται από διέγερση των 2s ηλεκτρονίων σε 2p τροχιακά, δημιουργώντας υβριδικά τροχιακά. Ανάλογα με το πόσα p τροχιακά εμπλέκονται, παράγονται τα sp^1 , sp^2 και sp^3 υβριδικά τροχιακά. Ο υβριδισμός sp^3 είναι υπεύθυνος για την τετραεδρική διαμόρφωση των δεσμών (Hennrich et al. 2006).

Ο άνθρακας μπορεί υπάρξει σε τρεις αλλότροπες μορφές: διαμάντι, γραφίτης και φουλερένια (Hennrich et al. 2006, Mostofizadeh et al. 2011). Η γεωμετρία των συγκεκριμένων υλικών είναι εντυπωσιακή, καθώς το ίδιο άτομο μπορεί να δημιουργήσει υλικά που έχουν από 0 έως 3 διαστάσεις. Οι τυπικές δομές των υλικών αυτών παρουσιάζονται στην εικόνα 12.



Εικόνα 12: Τα αλλότροπα του άνθρακα (I) Διαμάντι, (II) φουλερένιο C_{60} , (III) γραφίτης, (IV) νανοσωλήνας άνθρακα (ανήκει στα φουλερένια).

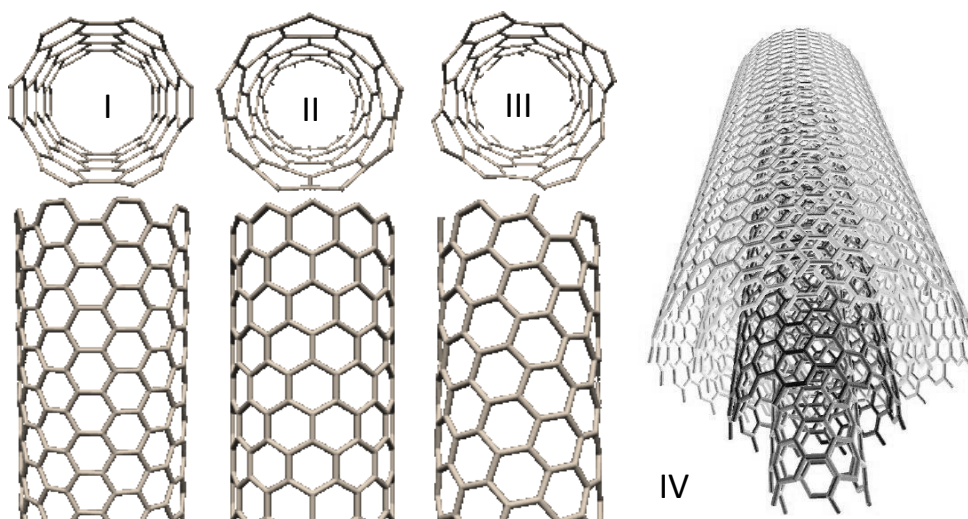
Ο άνθρακας στο διαμάντι έχει sp^3 υβριδισμό και κάθε άτομο αναπτύσσει δεσμούς με άλλα 4 άτομα άνθρακα σε τετραεδρική μορφή. Η κρυσταλλική αυτή τρισδιάστατη δομή δίνει στο διαμάντι την υψηλή μηχανική αντοχή του και την εκπληκτική θερμική αγωγιμότητα του. Ο υβριδισμός sp^3 των ατόμων άνθρακα είναι υπεύθυνος για τη συμπεριφορά του υλικού ως μονωτής, αλλά και για τη διαύγεια του (Hennrich et al. 2006).

Ο γραφίτης αποτελείται από επίπεδα φύλλα sp^2 υβριδισμένων ατόμων άνθρακα, τα οποία δημιουργούν δεσμούς με τα γειτονικά τους σε ένα εξαγωνικό δίκτυο, σαν μία κυψέλη. Η διαμόρφωση του αυτή τον κατατάσσει στα υλικά δύο διαστάσεων. Η διαφορετική γεωμετρία από το διαμάντι καθιστά το γραφίτη μαλακό, ασταθή, αδιαφανή και αγωγίμο. Αντίθετα με τη δομή στο διαμάντι, κάθε άτομο άνθρακα δημιουργεί δεσμούς με μόνο τρία γειτονικά άτομα άνθρακα. Τα ηλεκτρόνια μπορούν ελεύθερα να μετακινηθούν από ένα p τροχιακό που δεν έχει υβριδοποιηθεί σε ένα άλλο, δημιουργώντας έτσι ένα δίκτυο μη εντοπισμένων π -δεσμών. Αυτό το απεντοπισμένο δίκτυο π -δεσμών είναι υπεύθυνο και για την αγωγιμότητα του γραφίτη. Τα τελευταία χρόνια προσέλκυσε το ερευνητικό ενδιαφέρον λόγω του ότι αποτελεί ένα πρόδρομο μόριο για τη παραγωγή αυτόνομων φύλλων γραφενίου (Park and Ruoff 2009, Tung et al. 2009).

Τα φουλερένια είναι το τρίτο αλλότροπο του άνθρακα και η διαφορά τους από το γραφίτη έγκειται στη διαφορετική γεωμετρία των ατόμων του άνθρακα. Ενώ το γραφένιο αποτελείται από ένα πλέγμα ανθράκων σε sp^2 υβριδισμό στο επίπεδο, στα φουλερένια το πλέγμα οργανώνεται σε σφαιρική ή κυλινδρική διάταξη. Τα φουλερένια, λόγω της γεωμετρίας τους κατατάσσονται ως υλικά μηδενικής διάστασης (ή σημείου) ή ως μίας διάστασης. Η διαφορά στη γεωμετρία τους οδηγεί και στις διαφορές των ιδιοτήτων τους, όπως θα αναφερθεί και στην ενότητα 4.4 (Bosi et al. 2003, Hennrich et al. 2006). Οι νανοσωλήνες άνθρακα, υλικά τα οποία χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, είναι υποκατηγορία των φουλερενίων.

Τα φουλερένια ανακαλύφθηκαν το 1985 από τον Smalley και του συνεργάτες του (Kroto et al. 1985). Έκτοτε υπήρξαν εργασίες που πρότειναν την ύπαρξη κυλινδρικών φουλερενίων, αλλά μόλις το 1991 ήρθε η πειραματική επιβεβαίωση, όταν ο Iijima παρουσίασε τις πρώτες εικόνες νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος (2-20 στρωμάτων) από μικροσκόπιο διέλευσης ηλεκτρονίων (Iijima 1991). Δύο χρόνια αργότερα απομονώθηκαν και νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος (Bethune et al. 1993, Iijima and Ichihashi 1993). Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί πως αν και η ανακάλυψη των νανοσωλήνων άνθρακα έχει αποδοθεί στον Iijima, η πρώτη αναφορά στη βιβλιογραφία έγινε το 1960 από τον Bacon, ο οποίος παρατήρησε κυλινδρικές δομές σε ίνες άνθρακα μέσω ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης, τις οποίες τις απέδωσε σε δομές παπύρου (Bacon 1960).

Οι νανοσωλήνες άνθρακα (carbon nanotubes, CNTs) αποτελούν μία σχετικά νέα κατηγορία νανοϋλικών που έχουν προσελκύσει σημαντικό ενδιαφέρον λόγω των ηλεκτρονικών, μηχανικών, οπτικών και μαγνητικών τους ιδιοτήτων (Ajayan and Tour 2007, Wildöer et al. 1998). Οι νανοσωλήνες άνθρακα αποτελούνται είτε από ένα κυλινδρικό φύλλο γραφενίου (μονού τοιχώματος), είτε από πολλά φύλλα σε ομόκεντρη διάταξη (πολλαπλού τοιχώματος), όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 13. Οι νανοσωλήνες μπορούν να παρασκευαστούν έχοντας διάμετρο έως 100 nm, ενώ μπορούν να επεκταθούν έως και μερικά εκατοστά σε μήκος (Capek 2009). Οι άκρες τους μπορεί να είναι κλειστές από δομές που μοιάζουν με φουλερένια (Dyke and Tour 2006), είτε να είναι ανοιχτές ώστε το εσωτερικό να είναι προσβάσιμο σε μικρότερα μόρια (Chamberlain et al. 2010, Tasis et al. 2006). Αν και έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές παραγωγής νανοσωλήνων, η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική είναι η καταλυτική χημική απόθεση από ατμό, λόγω της ευκολίας της, των ήπιων συνθηκών που απαιτούνται αλλά και της καθαρότητας του τελικού προϊόντος (Baddour and Briens 2005, Kumar and Ando 2010).



Εικόνα 13: Νανοσωλήνες άνθρακα μονού (I-III) και πολλαπλού τοιχώματος (IV). Η διαφορετική αναδίπλωση του φύλλου γραφενίου στους νανοσωλήνες μονού τοιχώματος οδηγεί σε δομή ανάκλιτρου (I), ζιγκ-ζαγκ (II) και χειρόμορφους νανοσωλήνες (III).

Οι νανοσωλήνες μονού τοιχώματος παρουσιάζουν την απλούστερη γεωμετρία μεταξύ των νανοσωλήνων και έχουν παρατηρηθεί να έχουν διαμέτρους από 0.4 έως 3 nm. Οι δεσμοί μεταξύ ατόμων άνθρακα έχουν μήκος 0.14 nm, μικρότερο ακόμα και από τους δεσμούς στο διαμάντι, κάτι που ευθύνεται για την υψηλή μηχανική τους αντοχή (Bonard et al. 2001). Το φύλλο του γραφενίου μπορεί να τυλιχθεί με διάφορους τρόπους πάνω στον άξονα συμμετρίας, παράγοντας νανοσωλήνες σε δομή ανακλίντρου ή ζιγκ-ζαγκ (εικόνα 13I και εικόνα 13II αντίστοιχα). Αν η αναδίπλωση γίνει σε κατεύθυνση διαφορετική από τον άξονα συμμετρίας, παράγονται χειρόμορφοι νανοσωλήνες (εικόνα 13III). Αυτό το χαρακτηριστικό είναι σημαντικό για τις ιδιότητες του νανοσωλήνα που παράγεται, καθώς και μόνο η διαφορετική αναδίπλωση μπορεί να κάνει τους νανοσωλήνες να λειτουργούν ως μέταλλα ή ως ημιαγωγοί.

Οι νανοσωλήνες πολλαπλού τοιχώματος (εικόνα 13IV) έχουν διάμετρο έως και 100 nm, ενώ συνήθως αποτελούνται από 2 έως 20 φύλλα. Η απόσταση μεταξύ των φύλλων είναι 0.34-0.36 nm, το οποίο είναι και η απόσταση μεταξύ των διαφορετικών φύλλων στο γραφίτη (Capek 2009). Λόγω της γεωμετρίας τους, δεν μπορούν να σχηματιστούν νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος με διαμόρφωση ζιγκ-ζαγκ, παρά μόνο με δομή ανάκλιντρου ή άλλη χειρόμορφη μορφή (Kuchibhatla et al. 2007).

4.3 Ομοιοπολική τροποποίηση νανοδομημένων υλικών

Η τροποποίηση της επιφάνειας των νανοδομημένων υλικών είναι μία ευρέως χρησιμοποιούμενη τεχνική για την παρασκευή νανοϋλικών με επιθυμητές ιδιότητες. Η τεχνική αυτή συνέβαλε σημαντικά στην αξιοποίηση των υλικών αυτών, λόγω των νέων ιδιοτήτων που τους προσδίδει. Η τροποποίηση μπορεί να γίνει είτε με ομοιοπολικό δεσμό, είτε μη ομοιοπολικά. Η μη ομοιοπολική τροποποίηση της επιφάνειας των νανοϋλικών είναι μια ήπια μέθοδος τροποποίησης της χημείας της επιφάνειας των νανοϋλικών που βασίζεται σε υδρόφοβες, ηλεκτροστατικές ή van der Waals αλληλεπιδράσεις (Herranz and Martín 2010). Συνήθως δεν επηρεάζει τις ιδιότητες του νανοϋλικού, αλλά είναι ευαίσθητη σε αλλαγές του περιβάλλοντος. Η χημική ομοιοπολική τροποποίηση βρήκε ευρεία εφαρμογή στα νανοϋλικά που είναι βασισμένα στον άνθρακα, καθώς η δομή των συγκεκριμένων νανοϋλικών δεν διαταράσσεται από τη χημική τροποποίηση, λόγω του ισχυρού δεσμού που αναπτύσσεται μεταξύ ατόμων άνθρακα (Dyke and Tour 2006). Η ομοιοπολική τροποποίηση εκμεταλλεύεται τους διπλούς δεσμούς στην επιφάνεια αυτών των υλικών, προσβάλλοντας τους και δημιουργώντας ομοιοπολικούς δεσμούς με τα συγκεκριμένα άτομα άνθρακα της επιφάνειας. Τα άτομα αυτά μεταπίπτουν από sp^2 σε sp^3 υβριδισμό, κάτι το οποίο διαταράσσει την ομοιογένεια της επιφάνειας των υλικών, και συνεπώς συγκεκριμένες ιδιότητες όπως η αγωγιμότητα και η μηχανική αντοχή (Herranz and Martín 2010). Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τροποποιημένα νανοϋλικά που παρήχθησαν με χημική ομοιοπολική τροποποίηση και για αυτό το λόγο θα γίνει εκτενέστερη αναφορά στη συγκεκριμένη τεχνική με ορισμένα ενδεικτικά παραδείγματα.

Ένα σημαντικό εμπόδιο στην αξιοποίηση των νανοδομημένων υλικών με βάση τον άνθρακα είναι η χαμηλή διαλυτοποίηση των συγκεκριμένων υλικών σε διάφορα υδατικά ή οργανικά συστήματα. Τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα είναι αρκετά υδρόφοβα και δεν μπορούν να διαλυτοποιηθούν σε υδατικά συστήματα και σε αρκετά οργανικά μέσα. Η χημική οξείδωση των συγκεκριμένων υλικών με ανόργανα οξέα εισαγάγει άτομα οξυγόνου στην επιφάνεια τους με τη μορφή υδροξυ-, καρβοξυ- και εποξυ- ομάδων, τα οποία υποβοηθούν τη διαλυτοποίηση τους σε υδατικά συστήματα. Η συγκεκριμένη τροποποίηση έχει βρει εφαρμογή τόσο σε νανοσωλήνες άνθρακα (Asuri et al. 2007, Asuri et al. 2006a, Capek 2009), όσο και σε γραφίτη, όπου και παράγονται μεμονωμένα φύλλα οξειδίου του γραφενίου (Bourlinos et al. 2003, Zhang et al. 2010b). Η διασπορά των νανοϋλικών μπορεί να υποβοηθηθεί και με άλλες τεχνικές ομοιοπολικής τροποποίησης. Για παράδειγμα, ο Γεωργακίλας και οι συνεργάτες του εισήγαγαν φαινολικές ομάδες στην επιφάνεια νανοσωλήνων για να αυξήσουν τη διαλυτότητα τους σε πολικούς διαλύτες (Georgakilas et al. 2008).

Πέρα από το πρόβλημα της διαλυτοποίησης, τα νανοϋλικά βασισμένα σε άνθρακα δεν παρουσιάζουν λειτουργικές ομάδες στην επιφάνεια τους και ο μόνος τρόπος να αλληλεπιδράσουν τα συγκεκριμένα υλικά με άλλα μόρια είναι μέσω των απεντοπισμένων π-δεσμών (Tasis et al. 2006). Η ομοιοπολική τροποποίηση της επιφάνειας των νανοϋλικών αναπτύχθηκε έτσι ώστε να δημιουργήσει συγκεκριμένες ομάδες στην επιφάνεια του υλικού, έτσι ώστε να καθίστανται εφικτές συγκεκριμένες αντιδράσεις και αλληλεπιδράσεις. Δύο προσεγγίσεις αναπτύχθηκαν για την ομοιοπολική τροποποίηση της επιφάνειας των νανοϋλικών που βασίζονται σε άνθρακα: (α) δέσμευση στους διπλούς δεσμούς της επιφάνειας του νανοϋλικού, (β) οξείδωση του υλικού για την παραγωγή καρβοξυλομαδών στην επιφάνεια και προσθήκη των ομάδων στοχευμένα σε αυτές τις θέσεις (Hauke and Hirsch 2010, Tasis et al. 2006). Η χημική τροποποίηση έχει γνωρίσει ευρεία εφαρμογή, προσθέτοντας στην επιφάνεια των νανοϋλικών διάφορες λειτουργικές ομάδες, όπως αμινομάδες, αλκυλομάδες, αλογόνα, και κυκλικοί υδρογονάνθρακες, ανάλογα με τις εφαρμογές για τις οποίες προορίζονται (Dyke and Tour 2006, Tasis et al. 2006).

Η βιοσυμβατότητα των νανοϋλικών που βασίζονται σε άνθρακα είναι χαμηλή, ένα γεγονός που επηρεάζει σημαντικά την εφαρμογή αυτών των υλικών σε βιολογικές εφαρμογές (Kuchibhatla et al. 2007, Shim et al. 2002). Τα υλικά αυτά, όπως και άλλα νανοσωματίδια, παρουσιάζουν υψηλή τοξικότητα σε κυτταρικές σειρές ή μικροοργανισμούς (Karakoti et al. 2006, Sohaebuddin et al. 2010), η οποία συνήθως οφείλεται στην υδρόφοβη φύση αυτών των σωματιδίων και στη μη διαλυτοποίηση τους σε υδατικά μέσα (Bianco et al. 2005). Χαρακτηριστικά όπως το μέγεθος των νανοϋλικών, η ενεργή επιφάνεια τους και η χημεία της επιφάνειας τους (λειτουργικές ομάδες, φορτίο κ.ά.) επηρεάζουν σημαντικά την τοξικότητα αυτών των υλικών (Karakoti et al. 2006). Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι οι νανοσωλήνες πολλαπλού τοιχώματος παρουσιάζουν χαμηλότερη κυτταροτοξικότητα από τους νανοσωλήνες μονού τοιχώματος (Jia et al. 2005). Η τροποποίηση της επιφάνειας τους τα καθιστά περισσότερο

βιοσυμβατά και λιγότερο τοξικά, καθιστώντας τα έτσι κατάλληλα για βιολογικές εφαρμογές (Bianco et al. 2005, Kuchibhatla et al. 2007, Shim et al. 2002). Σε μοριακό επίπεδο, η τροποποίηση της επιφάνειας των υλικών έχει χρησιμοποιηθεί για την αναγνώριση πρωτεϊνών και άλλων βιομορίων (Shim et al. 2002), αν και το φαινόμενο είναι εξαρτώμενο και από το μόριο μελέτης (π.χ. πρωτεΐνη, νουκλεϊκό οξύ).

Η σημασία της τροποποίησης των νανοϋλικών για την αξιοποίηση τους τονίζεται από τις εφαρμογές που έχουν βρει ήδη τα παράγωγα των νανοδομημένων υλικών. Συγκεκριμένα, έως σήμερα έχει δημιουργηθεί ένα πλήθος τροποποιημένων νανοϋλικών με διαφορετικές λειτουργικές ομάδες στην επιφάνεια τους, τα οποία έχουν επιδείξει ελπιδοφόρες εφαρμογές στη νανο-ηλεκτρονική (Thomas 2009), στη βιολογία (Cirillo et al. 2011, Iancu et al. 2011), στην κατάλυση (Lu and Liu 2009) ή ακόμα και για τη σύνθεση σύνθετων υλικών (Mitchell et al. 2002).

4.4 Ιδιότητες νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα

Οι ιδιαίτερες ιδιότητες των αλλότροπων του άνθρακα προσέλκυσαν το επιστημονικό ενδιαφέρον πολύ σύντομα. Το 1992 μόλις 6 εργασίες δημοσιεύτηκαν με τον όρο “carbon nanotubes” ενώ το 2010 δημοσιεύτηκαν πάνω από 8000 εργασίες (στοιχεία Web of Science – ISI). Ακόμα πιο εντυπωσιακό είναι το γεγονός πως για μία τόσο πρόσφατη ανακάλυψη ήδη δόθηκαν δύο βραβεία Νομπέλ: το Νομπέλ Χημείας του 1996 απονεμήθηκε στον Smalley και την ομάδα του για την ανακάλυψη των φουλερενίων (Kroto et al. 1985), ενώ το Νομπέλ Φυσικής του 2010 απονεμήθηκε στους Geim και Novoselov για την ανακάλυψη του γραφενίου (Geim and Novoselov 2007). Το ενδιαφέρον προς τα συγκεκριμένα υλικά προήλθε από τις μοναδικές ιδιότητες των συγκεκριμένων υλικών, καθώς των πολυάριθμων εφαρμογών τους.

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, ο sp^2 υβριδισμός του άνθρακα στο γραφίτη και στους νανοσωλήνες είναι υπεύθυνος για την αγωγιμότητα αυτών των υλικών, λόγω των απεντοπισμένων π-δεσμών. Η ηλεκτρονιακή συμπεριφορά των νανοϋλικών όμως εξαρτάται σημαντικά από τη δομή τους. Για παράδειγμα, δεν παρουσιάζουν όλοι οι νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος την ίδια συμπεριφορά, αλλά οι νανοσωλήνες σε διαμόρφωση ανακλίντρου έχουν συμπεριφορά μετάλλου, ενώ οι χειρόμορφοι νανοσωλήνες ημιαγωγού (Carek 2009). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι ο γραφίτης, από τον οποίο προέρχονται οι νανοσωλήνες κατατάσσεται στα ημιμέταλλα (Hennrich et al. 2006), δηλαδή παρουσιάζει εντελώς διαφορετική συμπεριφορά από τα παράγωγα του. Η τροποποίηση των πρωταρχικών υλικών με μεταλλικά σωματίδια ή άτομα μπορεί να αυξήσει περαιτέρω την αγωγιμότητα, ενώ η ομοιοπολική τροποποίηση της επιφάνειας των νανοϋλικών συνήθως καταστρέφει το πλέγμα των sp^2 υβριδισμένων ανθράκων και μειώνει την αγωγιμότητα.

Ο δεσμός άνθρακα – άνθρακα είναι από τους ισχυρότερους δεσμούς στη φύση. Η κανονική διάταξη των ατόμων άνθρακα στα νανοδομημένα υλικά είναι υπεύθυνη για την αυξημένη μηχανική αντοχή που παρουσιάζουν. Οι νανοσωλήνες άνθρακα παρουσιάζουν υψηλή

ακαμψία και αξονική δύναμη σε σχέση με άλλα νανοϋλικά από άνθρακα, όπως οι νανοϊνες άνθρακα (Treacy et al. 1996). Οι νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος παρουσιάζουν μεγαλύτερη αντοχή σε εφελκυσμό, ενώ στους νανοσωλήνες πολλαπλού τοιχώματος, η αντοχή εξαρτάται από τη διάμετρο. Συγκεκριμένα, όσο μικρότερη είναι η διάμετρος, τόσο πιο αυξημένη είναι η αντοχή του υλικού (De Heer 2002). Υπολογίστηκε πως η απόσταση μεταξύ δύο ατόμων άνθρακα σε sp^2 υβριδισμό είναι 0.14 nm, μικρότερη από αυτή που συναντάται στα διαμάντια. Η ισχύς αυτού του δεσμού είναι ακόμα μεγαλύτερη από του δεσμού μεταξύ sp^3 υβριδισμένων ατόμων άνθρακα, άρα αναμένεται τα νανοϋλικά αυτά να έχουν μεγαλύτερη μηχανική αντοχή από το διαμάντι (Yu 2004).

Μία από τις σημαντικότερες ιδιότητες των νανοϋλικών αποτελεί η αυξημένη επιφάνεια ανά μονάδα όγκου. Η συγκεκριμένη ιδιότητα των υλικών αυτών αξιοποιείται στην περίπτωση της ακινητοποίησης ενζύμων σε αυτά τα υλικά. Η αυξημένη επιφάνεια επιτρέπει ουσιαστικά τη διασπορά των ενζυμικών μορίων σε μοριακό επίπεδο, ενώ συνδυάζει και τα πλεονεκτήματα της ακινητοποίησης των ενζύμων όπως η σταθεροποίηση και η ανάκτηση του βιοκαταλύτη (Bornscheuer 2003, Gao and Kyrtziz 2008, Kim et al. 2006a). Για να μπορέσει όμως να αξιοποιηθεί η μεγάλη επιφάνεια χρειάζεται να αυξηθεί η διαλυτοποίηση των υλικών σε υδατικά συστήματα, είτε με τη χρήση χημικής ομοιοπολικής τροποποίησης, είτε με τη χρήση κάποιου επιφανειοενεργού μορίου (Capek 2009).

Όσον αφορά την ακινητοποίηση ενζύμων, σημαντικό είναι και το πλήθος των ομάδων στην επιφάνεια των νανοϋλικών. Από μελέτες που έχουν γίνει, έχει αποδειχθεί ότι οι νανοσωλήνες πολλαπλού τοιχώματος μπορούν να φιλοξενήσουν στην επιφάνεια τους μεγαλύτερο πλήθος λειτουργικών ομάδων από ότι οι νανοσωλήνες μονού τοιχώματος (Bianco et al. 2005). Το συγκεκριμένο χαρακτηριστικό είναι σημαντικό καθώς οι προσπάθειες ομοιοπολικής ακινητοποίησης των ενζύμων σε αυτά τα νανοϋλικά γίνονται σε αυτές τις θέσεις και σαφώς εξαρτώνται από το πλήθος των ομάδων.

4.5 Ακινητοποίηση ενζύμων σε νανοϋλικά βασισμένα σε άνθρακα

4.5.1 Προσεγγίσεις ακινητοποίησης

Τα βήματα προόδου που συντελέστηκαν στη δεκαετία του 1990 στον τομέα της νανοτεχνολογίας δεν άφησαν ανεπηρέαστη τη βιοτεχνολογία, και συγκεκριμένα τον τομέα της βιοκατάλυσης. Από τη «ζύμωση» μεταξύ των δύο αυτών πεδίων προέκυψε η νανοβιοκατάλυση, η οποία αναφέρεται στη χρήση ενζύμων που έχουν ακινητοποιηθεί σε νανοδομημένα υλικά (Kim et al. 2008). Αρχικά το ενδιαφέρον ως προς τη χρήση νανοδομημένων υλικών εστιάστηκε στην αυξημένη ενεργή επιφάνεια τους, ένα χαρακτηριστικό των νανοϋλικών που επιτρέπει την ακινητοποίηση περισσότερων ενζυμικών μορίων (έως και 1.3 mg πρωτεΐνης ανά mg φορέα) και συνεπάγεται αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα ανά μονάδα βάρους σε σχέση με τα συμβατικά υλικά (Asuri et al. 2007). Παρόλα αυτά, τα νανοϋλικά παρουσιάζουν και άλλα πλεονεκτήματα ως

φορείς ακινητοποίησης. Τα νανοδομημένα υλικά μπορούν να συντεθούν με συγκεκριμένες διαστάσεις, ιδιότητες (π.χ. ηλεκτρονικές ή μαγνητικές) και λειτουργικές ομάδες, οπότε δεν θα ήταν άστοχο να λεχθεί πως είναι μία κατηγορία υλικών φτιαγμένη για να καλύψει κάθε ανάγκη (tailor-made). Η ακινητοποίηση των ενζύμων στην επιφάνεια των νανοδομημένων υλικών μειώνει σημαντικά τα φαινόμενα μεταφοράς που μπορεί να παρατηρούνται στον εγκλωβισμό των ενζύμων σε άλλους φορείς, όπως τα οργανοπηκτώματα, ενώ συνήθως αυξάνει τη σταθερότητά τους (Du et al. 2007b, Lin et al. 2009).

Οι πρώτες εργασίες νανοβιοκατάλυσης που δημοσιεύτηκαν βασίστηκαν στην ακινητοποίηση ενζύμων σε νανοδομημένα υλικά με φυσική προσρόφηση στην επιφάνεια των νανοϋλικών ή στο εσωτερικό πορωδών υλικών. Η μη ομοιοπολική ακινητοποίηση έλαβε αναγνώριση καθώς είναι ένας απλός τρόπος ακινητοποίησης, ο οποίος δεν είναι επεμβατικός. Η ομοιοπολική ακινητοποίηση μπορεί να απενεργοποιήσει το ένζυμο, ενώ συνήθως διαταράσσει τις ιδιότητες του υλικού (Gao and Kyrtzizis 2008). Στις περισσότερες περιπτώσεις, η μη ομοιοπολική ακινητοποίηση αποδίδεται σε αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και νανοϋλικών που βασίζονται σε ηλεκτροστατικές και υδρόφοβες δυνάμεις (Gómez et al. 2005, Shim et al. 2002). Οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα προέρχονται από την αλληλεπίδραση των π ηλεκτρονίων της επιφάνειας των υλικών με τα π ηλεκτρόνια των αρωματικών δακτυλίων των αμινοξέων στην επιφάνεια της πρωτεΐνης (π-π στοίβαγμα). Όπως γίνεται κατανοητό, η συγκεκριμένη προσέγγιση προϋποθέτει την ύπαρξη αρωματικών αμινοξέων στην επιφάνεια της πρωτεΐνης και το σωστό προσανατολισμό τους. Πιο ευρεία αναγνώριση έλαβε η θεωρία των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων. Οι μη τροποποιημένοι νανοσωλήνες άνθρακα είναι υδρόφοβοι, όπως και τα υπόλοιπα αλλότροπα του άνθρακα, οπότε σε ένα υδατικό διάλυμα, οι υδρόφοβες περιοχές στην επιφάνεια μιας πρωτεΐνης αλληλεπιδρούν με την επιφάνεια των συγκεκριμένων νανοϋλικών ώστε να μην είναι εκτεθειμένες στο υδατικό περιβάλλον (Gao and Kyrtzizis 2008). Ο Azamian και οι συνεργάτες του υποστήριξαν με πειραματικά αποτελέσματα ότι η μη ομοιοπολική ακινητοποίηση πρωτεϊνών σε νανοσωλήνες μονού τοιχώματος είναι ανεξάρτητη του ισοηλεκτρικού σημείου της πρωτεΐνης και συνεπώς δεν σχετίζεται με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις (Azamian et al. 2002). Σε κάθε περίπτωση, το πλήθος των υδρόφοβων ή των αρωματικών αμινοξέων της πρωτεΐνης δεν μπορεί να βοηθήσει στην πρόβλεψη των αλληλεπιδράσεων που θα αναπτυχθούν, λόγω της αναδίπλωσης του πρωτεϊνικού μορίου (Matsuura et al. 2006).

Η μη ομοιοπολική προσρόφηση των πρωτεϊνών είναι ένα ενδιαφέρον φαινόμενο, αλλά αντιπροσωπεύει ένα σχετικά τυχαίο και μη ελεγχόμενο τρόπο ακινητοποίησης ενζύμων. Επιπλέον, κατά τη μη ομοιοπολική ακινητοποίηση, το ένζυμο βρίσκεται σε μία ισορροπία μεταξύ του φορέα ακινητοποίησης και του διαλύματος. Αυτό έχει ως συνέπεια τη σταδιακή απώλεια μορίων του βιοκαταλύτη από την επιφάνεια του νανοϋλικού, ένα φαινόμενο το οποίο καλείται «πρωτεϊνική διαρροή» (Gao and Kyrtzizis 2008). Για να αποφευχθεί η διαρροή του ενζύμου, ομοιοπολικοί δεσμοί χρησιμοποιήθηκαν για να ακινητοποιηθούν τα πρωτεϊνικά μόρια στην

επιφάνεια των νανοδομημένων υλικών, κάτι το οποίο οδηγεί σε πιο σταθερή και στοχευμένη ακινητοποίηση. Είναι ενδεικτικό πως τα ένζυμα τα οποία ακινητοποιούνται με ομοιοπολικό δεσμό παρουσιάζουν καλύτερη σταθερότητα από τα μη-ομοιοπολικά ακινητοποιημένα (Asuri et al. 2007, Chen et al. 2009, Li et al. 2005b). Μία συνηθισμένη μέθοδος για ομοιοπολική ακινητοποίηση ενζύμων σε νανοδομημένα υλικά είναι η χρήση μορίων τα οποία δρουν ως γέφυρες μεταξύ των πρωτεϊνών και των φορέων ακινητοποίησης. Ένα τέτοιο μόριο, το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί αρκετά με νανοϋλικά βασισμένα σε άνθρακα, είναι το 1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο) καρβοδιμίδιο (EDC), το οποίο μπορεί να προσδέσει ομοιοπολικά πρωτεΐνες σε νανοϋλικά που έχουν στην επιφάνεια τους καρβοξυλομάδες (Gao and Kyrtziz 2008, Lin et al. 2004). Η αποτελεσματικότητα της συγκεκριμένης διαδικασίας είναι υπό αμφισβήτηση. Ο Azamian και οι συνεργάτες του ακινητοποίησαν πρωτεΐνες σε νανοσωλήνες μονού τοιχώματος παρουσία και απουσία του EDC σε διαλύματα υψηλής αλατότητας και παρουσία επιφανειενεργών μορίων ώστε να μειωθεί η μη ομοιοπολική ακινητοποίηση (Azamian et al. 2002). Αν και αναμενόταν η απόδοση της ακινητοποίησης να είναι μεγαλύτερη στο δείγμα με τον παράγοντα EDC, δεν υπήρξε στατιστικά σημαντική διαφοροποίηση, υποδεικνύοντας ότι η ακινητοποίηση συμβαίνει κυρίως μη ομοιοπολικά. Μία διαφορετική προσέγγιση είναι η χρήση του 1-πυρενβουτυλεστέρα του ηλεκτριμίδιου ως μορίου γέφυρα (Chen et al. 2001). Η συγκεκριμένη τεχνική βασίζεται στο γεγονός ότι οι δακτύλιοι του πυρενίου αλληλεπιδρούν ισχυρά με την επιφάνεια των νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα μέσω π-π στοιβάγματος, ενώ ο αμιδικός δεσμός μπορεί να προσβληθεί από πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμίνες που υπάρχουν στην επιφάνεια του ενζύμου. Το ένζυμο δεσμεύεται ομοιοπολικά στο 1-πυρενβουτυρικό οξύ, αλλά δεν είναι ομοιοπολικά δεσμευμένο στην επιφάνεια των νανοϋλικών.

Ο έλεγχος της μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης των πρωτεϊνών είναι σημαντικός στα πρωτόκολλα ομοιοπολικής ακινητοποίησης. Υπάρχουν αρκετά μόρια τα οποία χρησιμοποιούνται για την προστασία των επιφανειών από πρωτεΐνες με μηχανισμούς όπως η στερική παρεμπόδιση – απώθηση, ενυδάτωση και η δόμηση του διαλύτη γύρω από την επιφάνεια. Η πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) είναι ένα από τα περισσότερο χρησιμοποιούμενα μόρια για την αποφυγή μη ομοιοπολικής πρόσδεσης πρωτεϊνών (Lin et al. 2004, Shim et al. 2002), αν και υπάρχουν προβλήματα που σχετίζονται με την προσρόφηση της στην επιφάνεια των νανοσωλήνων, λόγω του υδρόφιλου χαρακτήρα της (Foldvari and Bagonluri 2008). Σημαντική προς αυτή την κατεύθυνση είναι και η χρήση επιφανειενεργών μορίων. Τα επιφανειενεργά μόρια καλύπτουν την επιφάνεια των νανοϋλικών με τις υδρόφοβες ουρές τους, καθιστώντας τα πιο υδρόφιλα και αποτρέποντας την ανάπτυξη υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με τα πρωτεϊνικά μόρια. Επιφανειενεργές ενώσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για αυτόν το λόγο είναι το CTAB (Wang et al. 2009), το Triton X-100 (Azamian et al. 2002, Shim et al. 2002) και το Tween 20 (Chen et al. 2003). Ενδιαφέρον παρουσιάζει η τροποποίηση νανοσωλήνων άνθρακα με ένα υβριδικό μόριο Tween 20 – βιοτίνης, η οποία επέτρεψε στη στρεπταβιδίνη να ακινητοποιηθεί

στους νανοσωλήνες λόγω της αναγνώρισης της βιοτίνης, αλλά προστάτευσε την επιφάνεια των νανοσωλήνων από την ακινητοποίηση άλλων πρωτεϊνών (Chen et al. 2003).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι αυτές οι δύο προσεγγίσεις εστιάζουν στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνών και νανοϋλικών κυρίως για δύο λόγους. Αφενός, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις είναι οι κύριες αλληλεπιδράσεις στις οποίες βασίζεται η μη ομοιοπολική ακινητοποίηση, αφετέρου, η ηλεκτρονιακή δομή των νανοϋλικών άνθρακα καταστρέφεται κατά την τροποποίηση της επιφάνειάς του και έτσι ο ρόλος των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων υποβαθμίζεται ακόμα περισσότερο.

4.5.2 Εφαρμογές ενζύμων ακινητοποιημένων σε νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα

Από την ανακάλυψή τους, οι νανοσωλήνες άνθρακα μελετήθηκαν εκτενώς, και έγιναν σημαντικές μελέτες για την ακινητοποίηση ενζύμων, με αποτέλεσμα την ανάπτυξη διάφορων εφαρμογών. Ο γραφίτης, αν και ήταν γνωστός πριν από τους νανοσωλήνες άνθρακα, δεν έτυχε αναγνώρισης έως πρόσφατα, όπου αποδείχθηκε πως είναι πρόδρομη ένωση από την οποία μπορούν να παραχθούν εύκολα φύλλα γραφενίου (Park and Ruoff 2009, Tung et al. 2009). Για αυτό το λόγο οι εφαρμογές που αναπτύχθηκαν έως σήμερα με γραφένιο ή γραφίτη είναι αρκετά περιορισμένες σε σχέση με αυτές που χρησιμοποιούν νανοσωλήνες άνθρακα, αν και αναμένεται να παρουσιάσουν σημαντική αύξηση τα επόμενα χρόνια.

Μεγάλο ποσοστό των εφαρμογών που αναπτύχθηκαν με ακινητοποιημένα ένζυμα σε νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα αφορά την ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Η αγωγιμότητα και γενικότερα η καλή ηλεκτρονιακή συμπεριφορά των συγκεκριμένων νανοϋλικών καθιστά εφικτή τη μεταφορά ηλεκτρονίων από ένα οξειδοαναγωγικό ένζυμο σε ένα ηλεκτρόδιο, ειδικά όταν το ενεργό κέντρο του ενζύμου βρίσκεται κοντά στην επιφάνεια του νανοϋλικού (Agúí et al. 2008). Οι βιοαισθητήρες που αναπτύχθηκαν με τέτοια υλικά έχουν επιδείξει ικανοποιητική ηλεκτρική μετάδοση και ευαισθησία, χαρακτηριστικά που είναι πολύ σημαντικά για εφαρμογή στα πεδία της αναγνώρισης αντιγόνων, ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων και υβριδισμού DNA (Foldvari and Bagonluri 2008). Η ανάπτυξη και εφαρμογή τέτοιων βιοαισθητήρων έχει αναφερθεί εκτενώς σε διάφορες εργασίες ανασκόπησης (Agúí et al. 2008, Arya et al. 2008, Shao et al. 2010, Yáñez-Sedeño et al. 2010). Ενδεικτικά, για το σχεδιασμό βιοαισθητήρων χοληστερόλης έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα ένζυμα όπως η υπεροξειδάση της ραφανίδας, η οξειδάση και η εστεράση της χοληστερόλης και το φλαβοκυτόχρωμα P450sc (Agúí et al. 2008, Arya et al. 2008).

Άλλη μία πολλά υποσχόμενη εφαρμογή των ενζύμων που ακινητοποιούνται σε νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα είναι η ανάπτυξη κυψελών βιοκαυσίμων. Οι κυψέλες βιοκαυσίμων που βασίζονται σε ένζυμα είναι μία πολλά υποσχόμενη τεχνολογία η οποία χρησιμοποιεί βιομόρια ή και ολόκληρα κύτταρα για τη παραγωγή ενέργειας (Kim et al. 2008, Kim et al. 2006b). Έως σήμερα η πρακτική τους εφαρμογή έχει βρει ως εμπόδιο τη χαμηλή σταθερότητα των ενζύμων και τη χαμηλή πυκνότητα ισχύος των συγκεκριμένων κυψελών. Οι αγωγίμες ιδιότητες των

νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα σε συνδυασμό με την αυξημένο ενζυμικό φορτίο το οποίο μπορούν να φιλοξενήσουν στην επιφάνεια τους μπορούν να συνεισφέρουν στην αύξηση της πυκνότητας ισχύος. Παράλληλα, η ακινητοποίηση των ενζύμων συνεισφέρει σημαντικά στη σταθεροποίηση τους (Du et al. 2007b, Kim et al. 2008, Kim et al. 2006b).

Σημαντική πρόοδος έχει γίνει και στον τομέα της βιοϊατρικής. Οι νανοσωλήνες άνθρακα χρησιμοποιούνται ως φορείς για τη μεταφορά και χορήγηση πεπτιδίων, νουκλεϊκών οξέων και φαρμάκων, λόγω της εγγενούς τους ιδιότητας να διαπερνούν τις κυτταρικές μεμβράνες (Bianco et al. 2005, Foldvari and Bagonluri 2008). Η έρευνα τα τελευταία χρόνια στην τροποποίηση της επιφάνειας τους για μείωση της τοξικότητας τους και αποφυγή της ανοσοαπόκρισης έχει παρουσιάσει ενθαρρυντικά αποτελέσματα και ανοίγει το δρόμο για νέες εφαρμογές στον τομέα της χορήγησης φαρμάκων μέσω νανοϋλικών (Bianco et al. 2005).

Πέρα από αυτά τα τρία πεδία, η ακινητοποίηση ενζύμων σε νανοδομημένα υλικά με βάση τον άνθρακα έχει οδηγήσει σε πολλές ακόμα εφαρμογές στη βιοκατάλυση, τη βιοαποκατάσταση, τον καθαρισμό πρωτεϊνών και άλλους τομείς. Στον πίνακα 7 παρουσιάζονται ενδεικτικά μερικές από τις πιο ενδιαφέρουσες εφαρμογές ενζύμων ακινητοποιημένων σε νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα.

Πίνακας 7: Εφαρμογές ενζύμων ακινητοποιημένων σε νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα.

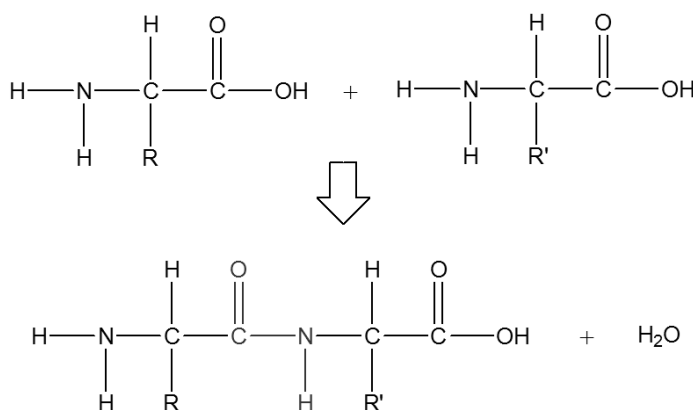
Νανοϋλικό	Τύπος ενζύμου	Εφαρμογή	Αναφορά
Γραφίτης	Λακάση	Ανιχνευτής φαινολικών	(Portaccio et al. 2006)
	Οξειδάση γλυκόζης	Κυψέλες βιοκαυσίμων	(Boland et al. 2009)
	Ουρεάση	Ανιχνευτής ουρίας	(Pizzariello et al. 2001)
Γραφένιο	Κυτόχρωμα C	Ανιχνευτής νιτρικών	(Wu et al. 2010a)
	Λακάση	Ανιχνευτής οξυγόνου	(Wu et al. 2010b)
	Οξειδάση γλυκόζης	Ανιχνευτής γλυκόζης	(Wang et al. 2011)
	Οξειδάση χοληστερόλης	Ανιχνευτής χοληστερόλης	(Dey and Raj 2010)
	Υπεροξειδάση	Ανιχνευτής καρκινικών δεικτών	(Yang et al. 2010)
Οξείδιο του γραφενίου	Τυροσινάση	Ανιχνευτής φαινολικών	(Song et al. 2011)
	Υπεροξειδάση	Βιοαποκατάσταση	(Zhang et al. 2010a)
	Υπεροξειδάση	Βιοκατάλυση	(Zhang et al. 2010b)
Νανოსωλήνες άνθρακα	Αλκοολική δεϋδρογονάση	Αισθητήρας αιθανόλης	(Liu and Cai 2007)
	Κυτόχρωμα C	Κυψέλες βιοκαυσίμων	(Yin et al. 2007)
	Κυτόχρωμα C	Ανιχνευτής H ₂ O ₂	(Zhang and Zheng 2008)
	Κυτόχρωμα C	Ανιχνευτής νιτρικών	(Chen et al. 2009)
	Λακάση	Κυψέλες βιοκαυσίμων	(Smolander et al. 2008)
	Λακάση	Ανιχνευτής οξυγόνου	(Liu et al. 2006)
	Ξυλανάση	Πρωτεϊνική αναδίπλωση	(Shah and Gupta 2008)
	Υπεροξειδάση	Ανιχνευτής νιτρικών	(Jiang et al. 2009)
Οξειδωμένοι νανοςωλήνες άνθρακα	β-Γλυκοσιδάση	Βιοκατάλυση	(Gómez et al. 2005)
	Λιπάση	Βιοκατάλυση	(Shi et al. 2007)
	Ουρεάση	Ανιχνευτής ουρίας	(Ahuja et al. 2011)
	Ριβονουκλεάση A	Απομόνωση RNA	(Yi et al. 2008)
Φουλερένια	Κυτόχρωμα C	Ηλεκτροχημεία	(D'Souza et al. 2005)
	Λιπάση	Ανιχνευτής στερεοϊσομερών αμινοξέων	(Chen et al. 2007)
	Οξειδάση γλυκόζης	Ανιχνευτής γλυκόζης	(Chuang and Shih 2001)
	Σαμπτυλυσίνη	Βιοκατάλυση	(Nednoor et al. 2004)

5 Δομή ενζύμων σε συστήματα με οργανωμένες νανοδομές

5.1 Δομή πρωτεϊνών

Τα ένζυμα είναι βιοπολυμερή, συνήθως πρωτεϊνικής φύσεως⁹, τα οποία επιδεικνύουν καταλυτική δράση λόγω της οργανωμένης δομής τους. Η αναδίπλωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας επιτελείται μέσα στα κύτταρα κατά την έκφραση της πρωτεΐνης, ενώ η διατήρηση αυτής της δομής είναι πολύ σημαντική για τη καταλυτική δραστηριότητα των ενζύμων. Για να γίνει περισσότερο κατανοητό αυτό, θα πρέπει να αναλογιστούμε τον καταλυτικό μηχανισμό των ενζύμων και τη δομή του ενεργού κέντρου, όπως αυτά αναλύθηκαν για τις υδρολάσες σε προηγούμενη ενότητα (παράγραφος 1.2). Αλλαγές στη δομή των ενζύμων μπορούν να επιφέρουν αλλαγές στην καταλυτική συμπεριφορά (για παράδειγμα διαφορετική εκλεκτικότητα) ή, αν είναι αρκετά εκτεταμένες, μπορεί να οδηγήσουν σε πλήρη απώλεια της δραστηριότητας του μορίου. Είναι προφανές λοιπόν ότι η δομή των ενζύμων είναι άρρηκτα συνδεδεμένη με τη λειτουργία τους, και για αυτό το λόγο η ανάλυση της δομής των ενζύμων δεν είναι ένα θέμα που απασχολεί μόνο τη βασική έρευνα, αλλά και την εφαρμοσμένη.

Οι πρωτεΐνες είναι πολυμερή L-αμινοξέων τα οποία διευθετούνται σε μία μη διακλαδισμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα. Τα αμινοξέα συνδέονται μεταξύ τους με έναν πεπτιδικό (αμιδικό) δεσμό, ο οποίος αναπτύσσεται μεταξύ του καρβονυλικού άνθρακα και του αζώτου της αμινομάδας δύο γειτονικών αμινοξέων. Η αντίδραση συμπύκνωσης για την παραγωγή ενός πεπτιδικού δεσμού παρουσιάζεται στην εικόνα 14. Η πρωτοταγής δομή των πρωτεϊνών ορίζεται από την ακολουθία των αμινοξέων που αποτελούν την πολυπεπτιδική αλυσίδα, ξεκινώντας από το αμινοτελικό άκρο, καθώς και από τους δισουλφιδικούς δεσμούς που αναπτύσσονται μεταξύ καταλοίπων κυστεΐνης.



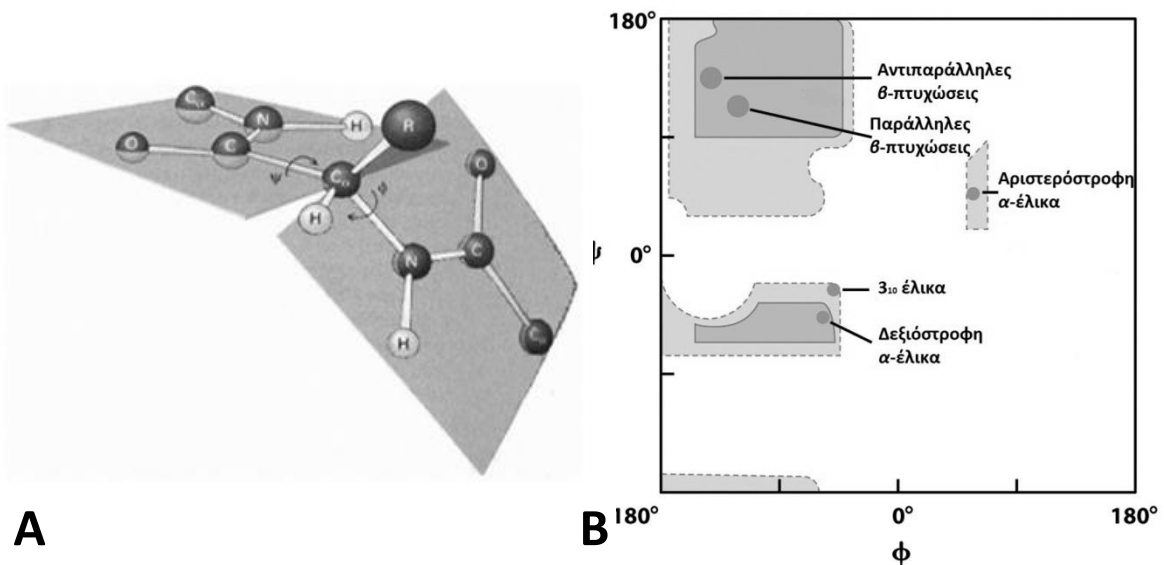
Εικόνα 14: Συμπύκνωση 2 αμινοξέων για τη δημιουργία ενός διπεπτιδίου.

Η εκτεταμένη μορφή της πολυπεπτιδικής αλυσίδας δεν ευνοείται θερμοδυναμικά. Η αναδίπλωση των πρωτεϊνών είναι μία αυθόρμητη διαδικασία που έχει ως σκοπό τη μετάπτωση

⁹ Στην παρούσα διατριβή δεν χρησιμοποιήθηκαν ένζυμα μη πρωτεϊνικής φύσεως (π.χ. ριβοένζυμα) και για αυτό το λόγο το κεφάλαιο εστιάζεται στην ανάλυση της δομής ενζύμων πρωτεϊνικής φύσεως.

της πρωτεΐνης σε ένα χαμηλότερο ενεργειακό επίπεδο (van Holde et al. 2006). Είναι προφανές πως η ενεργειακή κατάσταση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας σχετίζεται άμεσα με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκεται. Για παράδειγμα, σε ένα υδατικό σύστημα η πρωτεΐνη θα πρέπει να αναδιπλωθεί με τέτοιο τρόπο έτσι ώστε να μειωθεί η αλληλεπίδραση των υδρόφοβων αμινοξέων με τα μόρια του νερού. Η κύρια δύναμη που ωθεί την πρωτεΐνη στην αναδίπλωση της είναι η προστασία των υδρόφοβων περιοχών της και η ελαχιστοποίηση της επαφής τους με το νερό. Η αναδίπλωση γίνεται με δύο βασικούς κανόνες: (α) οι δομές είναι όσο το δυνατόν πιο συμπαγείς, έτσι ώστε να μειωθεί η υδρόφοβη επιφάνεια που είναι εκτεθειμένη στο διαλύτη (νερό), (β) οι «θαμμένες» στο εσωτερικό πολικές ομάδες δημιουργούν δεσμούς υδρογόνου μεταξύ τους ώστε να μην αποσταθεροποιούν τη δομή της πρωτεΐνης εκ των έσω (Fersht 1999).

Τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής όπως η α -έλικα και οι β -πτυχωτές επιφάνειες (β -πτυχώσεις) είναι τοπικές διευθετήσεις αμινοξέων στο χώρο οι οποίες σταθεροποιούνται από δεσμούς υδρογόνου μεταξύ αμινοξικών καταλοίπων. Η οργανωμένη τους δομή προσανατολίζει τις πλευρικές ομάδες των αμινοξέων προς μία ορισμένη κατεύθυνση έτσι ώστε να διευκολύνεται η αλληλεπίδραση μεταξύ τους. Γίνεται σαφές ότι αυτή η τοπική οργάνωση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας υποβοηθά την πρωτεΐνη στη σωστή αναδίπλωσή της στη τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή.



Εικόνα 15: (Α) Οι γωνίες ϕ και ψ γύρω από τον άξονα της πεπτιδικής αλυσίδας. (Β) Διάγραμμα Ramachandran. Με σκούρο γκρι σημειώνονται οι επιτρεπτές περιοχές χωρίς στερική παρεμπόδιση και με ανοιχτό γκρι οι επιτρεπτές περιοχές με μικρή στερική παρεμπόδιση.

Σε μια αναδιπλωμένη πολυπεπτιδική αλυσίδα, οι διαμορφώσεις που μπορούν να λάβουν τα αμινοξέα είναι συγκεκριμένες. Υπάρχουν 2 βαθμοί ελευθερίας στον άξονα που ορίζεται από την πεπτιδική αλυσίδα. Η γωνία που δημιουργεί ο α -άνθρακας με τον άνθρακα της καρβοξυλομάδας ονομάζεται ψ , ενώ η γωνία μεταξύ α -άνθρακα και αζώτου ονομάζεται ϕ

(εικόνα 15A). Το ζεύγος τιμών των γωνιών φ και ψ καθορίζουν τη δομή του κάθε αμινοξέος και συνεπώς τη δομή της πρωτεΐνης. Αν και οι γωνίες αυτές θεωρητικά μπορούν να πάρουν τιμές από $+180^\circ$ έως -180° , στερικές παρεμποδίσεις λόγω των πλευρικών ομάδων επιτρέπουν ορισμένους μόνο συνδυασμούς τιμών. Τα επιτρεπόμενα ζεύγη τιμών παρουσιάζονται στο διάγραμμα Ramachandran (εικόνα 15B).

Όπως φαίνεται από το διάγραμμα Ramachandran, η διαμόρφωση των αμινοξέων έχει ως αποτέλεσμα συγκεκριμένα στοιχεία δευτεροταγούς δομής. Οι δεξιόστροφες α -έλικες και οι β -πτυχωτές επιφάνειες είναι από τις πιο σταθερές δομές δευτεροταγούς, καθώς στη συγκεκριμένη διαμόρφωση τα αμινοξέα δεν αντιμετωπίζουν φαινόμενα στερικής παρεμπόδισης (Fersht 1999). Θα πρέπει να σημειωθεί πως η τετραεδρική δομή των 4 διαφορετικών υποκαταστατών των α -ανθράκων της πολυπεπτιδικής αλυσίδας είναι υπεύθυνη για την οπτική ενεργότητα των πρωτεϊνών, όπως θα αναλυθεί στην επόμενη παράγραφο.

5.2 Φασματοσκοπία και δομή πρωτεϊνών

Έως και σήμερα η μέθοδος που χρησιμοποιείται κατά κόρον για την ανάλυση της τρισδιάστατης δομής των πρωτεϊνών είναι η κρυσταλλογραφία ακτινών Χ, ενώ η δομή ορισμένων πρωτεϊνών έχει αναλυθεί με τη μέθοδο του πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού. Οι τεχνικές αυτές έχουν υψηλή ακρίβεια, συνήθως μερικών Ångström, και μπορούν να δώσουν πληροφορίες για συγκεκριμένες περιοχές ενδιαφέροντος (π.χ. για το ενεργό κέντρο του ενζύμου), καθώς και για τη λειτουργική σημασία του κάθε αμινοξέος. Το μειονέκτημα αυτών των τεχνικών είναι οι περιορισμοί τους. Για να γίνει μελέτη της δομής πρωτεϊνών με ακτίνες Χ είναι απαραίτητη η κρυστάλλωση των πρωτεϊνών, κάτι το οποίο απαιτεί σημαντική ποσότητα πρωτεΐνης, ενώ η κρυστάλλωση γίνεται κάτω από ορισμένες συνθήκες, οι οποίες τις περισσότερες φορές δεν είναι αυτές στις οποίες το ένζυμο παρουσιάζει τη μέγιστη δραστικότητα. Είναι πιθανόν η δομή του κρυσταλλωμένου ενζύμου να διαφέρει από αυτή που έχει σε ένα διάλυμα, ενώ αρκετές πρωτεΐνες παρουσιάζουν δυσκολίες στην κρυστάλλωσή τους. Ο πυρηνικός μαγνητικός συντονισμός μπορεί να αποτυπώσει τη τρισδιάστατη δομή των ενζύμων σε ένα διάλυμα, αλλά οι πρωτεΐνες ενδιαφέροντος θα πρέπει να είναι μικρότερες από 30 KDa, καθώς σε μεγαλύτερες πρωτεΐνες η ποιότητα της ανάλυσης μειώνεται (Clare and Gronenborn 1998). Δεν θα πρέπει να θεωρηθεί αμελητέο το γεγονός ότι η ανάλυση των δεδομένων που εξάγονται από αυτές τις τεχνικές είναι αρκετά χρονοβόρα. Συνήθως χρειάζονται αρκετοί μήνες για να αναλυθεί η τρισδιάστατη δομή ενός ενζύμου σε ένα σύστημα (Kelly and Price 2000).

Για την εφαρμοσμένη βιοκατάλυση, όπου τα ένζυμα μπορεί να βρεθούν σε ένα σύστημα αρκετά διαφορετικό από ένα υδατικό διάλυμα, ή ακόμα και να ακινητοποιηθούν, οι συγκεκριμένες τεχνικές δεν μπορούν να προσφέρουν αξιόλογες πληροφορίες. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το γεγονός πως η εκλεκτικότητα ως προς τα υποστρώματα που προβλέπεται για κάποια ένζυμο *in silico* μπορεί να διαψευστεί σε ένα μη συμβατικό σύστημα (Katsoura et al. 2009, Otto et al. 2000). Αυτό οφείλεται στις δομικές αλλαγές στις οποίες μπορεί να υπόκειται ένα

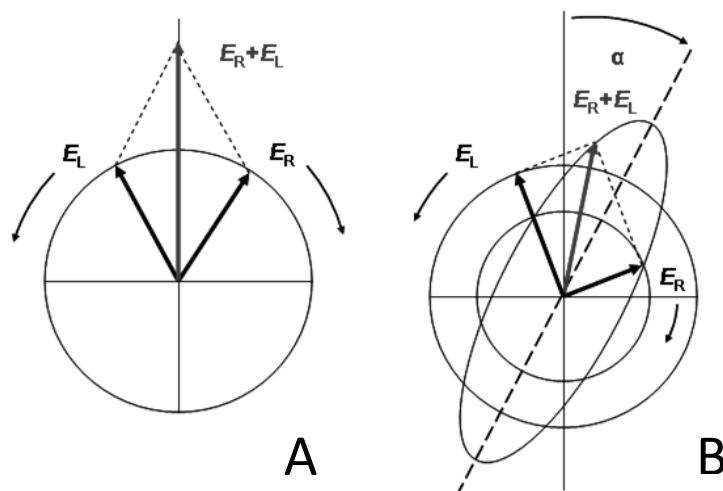
ενζυμικό μόριο σε ένα διαφορετικό σύστημα από αυτό στο οποίο έγινε η κρυστάλλωση. Η ανάπτυξη νέων μη συμβατικών μέσων όπως τα ιοντικά υγρά και οι ευτεκτικοί διαλύτες τροφοδοτεί τη βιοκατάλυση με νέα μέσα για την επίτευξη ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων, με εντυπωσιακά αποτελέσματα έως σήμερα (Gorke et al. 2010, Kragl et al. 2002, Park and Kazlauskas 2003, Sheldon et al. 2002, van Rantwijk et al. 2003, van Rantwijk and Sheldon 2007). Η ενδιαφέρουσα καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων σε αυτά τα συστήματα σχετίζεται με τη δομή τους, όμως οι τεχνικές που προαναφέρθηκαν δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάλυση της δομής των ενζύμων σε αυτά τα συστήματα (Kelly et al. 2005). Στην προκειμένη περίπτωση εφαρμόζονται τεχνικές χαμηλότερης διακριτικής ικανότητας, οι οποίες μπορούν να εφαρμοστούν *in situ*, στα συστήματα μελέτης στα οποία χρησιμοποιούνται τα ένζυμα. Αρκετές από τις τεχνικές αυτές βασίζονται στην οπτική ενεργότητα των πρωτεϊνών, καθώς η τετραεδρική δομή των 4 διαφορετικών υποκαταστατών του α -άνθρακα, αλλά και διάφορες πλευρικές ομάδες καθιστούν τις πρωτεΐνες οπτικά ενεργές.

Το φως είναι ένα ταχύτατα ταλαντευόμενο ηλεκτρομαγνητικό κύμα, το οποίο αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες και από αυτή την αλληλεπίδραση μπορούν εξαχθούν πληροφορίες για τη δομή βιολογικών μακρομορίων. Η οπτική φασματοσκοπία καλύπτει ακτινοβολίες από το πέραν υπεριώδεις έως το πέραν υπέρυθρο (150 nm - 25 μ m). Η οπτική φασματοσκοπία περιλαμβάνει την ακτινοβολία του δείγματος με ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία, μέτρηση κάποιων φασματικών ιδιοτήτων όπως η απορρόφηση, η εκπομπή ή η σκέδαση και ανάλυση των συγκεκριμένων δεδομένων, η οποία παρέχει πληροφορίες για τη δομή των πρωτεϊνών (Van Mierlo et al. 2000). Από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες φασματοσκοπικές τεχνικές είναι ο κυκλικός διχρωσμός (Circular Dichroism - CD), η φασματοσκοπία υπέρυθρου (Fourier Transform Infrared – FTIR) και η φθορισμομετρία. Οι συγκεκριμένες τεχνικές χρησιμοποιούνται ευρέως για την ανάλυση της δομής πρωτεϊνών *in situ* καθώς έχουν μικρό χρόνο ανάλυσης και ανιχνεύουν αλλαγές στη δομή τόσο στο δευτεροταγές επίπεδο, όσο και στο μικροπεριβάλλον συγκεκριμένων αμινοξέων, όπως τα αρωματικά αμινοξέα (Ganesan et al. 2009).

5.2.1 Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωσμού

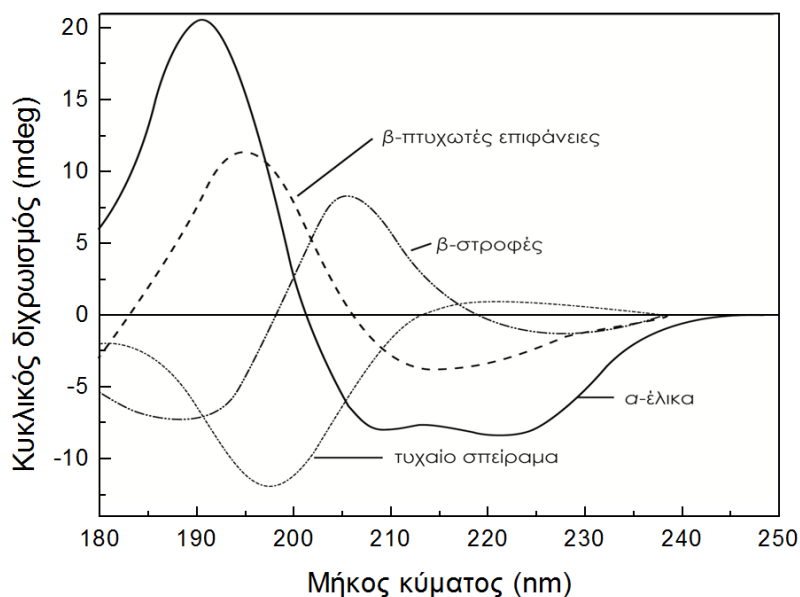
Μία ακτίνα γραμμικά πολωμένου φωτός μπορεί να αναλυθεί σε δύο κυκλικά πολωμένες συνιστώσες (μία αριστερόστροφη και μία δεξιόστροφη) που έχουν ίδιο μέτρο και βρίσκονται σε φάση (εικόνα 16A). Όταν η συγκεκριμένη ακτινοβολία περάσει από ένα οπτικά ενεργό μόριο, η κάθε συνιστώσα αλληλεπιδρά με το μόριο με διαφορετικό τρόπο. Συγκεκριμένα, το αριστερόστροφα και δεξιόστροφα κυκλικά πολωμένο φως ταξιδεύουν με διαφορετικές ταχύτητες μέσα από μία οπτικά ενεργή ένωση, ένα φαινόμενο που καλείται οπτική περιστροφή, ενώ ταυτόχρονα απορροφούνται σε διαφορετικό βαθμό, ένα φαινόμενο το οποίο καλείται κυκλικός διχρωσμός. Η διαφορετική μοριακή απορροφητικότητα στις δύο συνιστώσες της επίπεδα πολωμένης ακτινοβολίας έχει ως αποτέλεσμα την ελλειπτική πόλωση της ακτινοβολίας

(εικόνα 16B), η οποία καταγράφεται στον ανιχνευτή ως ελλειπτικότητα (σε χιλιοστά της μοίρας) συναρτήσει του μήκους κύματος της ακτινοβολίας (Berova et al. 2007).



Εικόνα 16: (A) Ανάλυση μίας επίπεδα πολωμένης ακτινοβολίας στη δεξιόστροφη και αριστερόστροφη συνιστώσα της. (B) Ελλειπτική πόλωση ακτινοβολίας (van Mierlo et al. 2000).

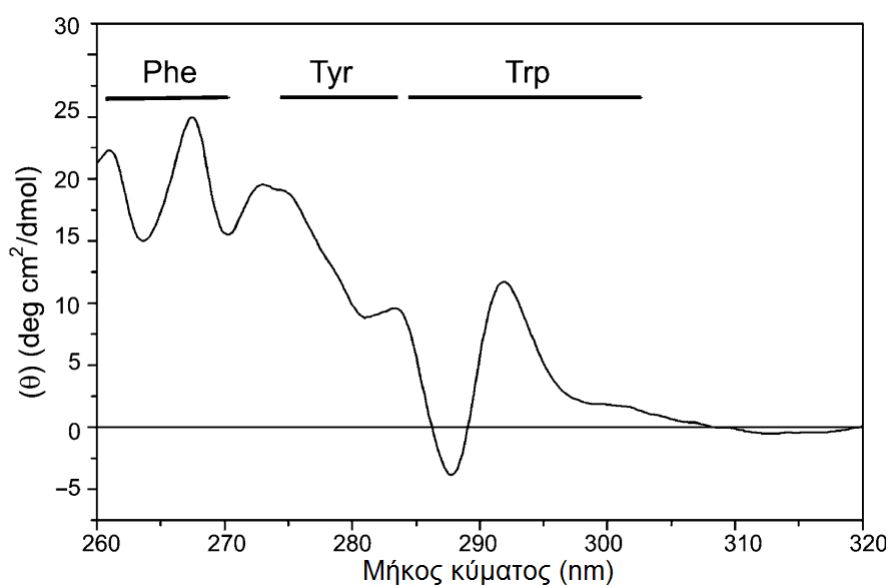
Η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για την ανάλυση της δομής πρωτεϊνών που βρίσκονται σε διάλυμα ή σε φιλμ. Όλα τα αμινοξέα πέραν της γλυκίνης είναι οπτικά ενεργά λόγω της ασυμμετρίας τους. Πέρα από τον πεπτιδικό δεσμό, ο οποίος λογίζεται ως χρωμοφόρα ομάδα στο πέραν υπεριώδες, η οπτική ενεργότητα των πρωτεϊνών προκύπτει και από τα αρωματικά τους αμινοξέα, ή ακόμα και από προσθετικές ομάδες, όπως η αίμη. Έτσι, ο κυκλικός διχρωισμός είναι ευαίσθητος τόσο στη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών, αλλά και σε αλλαγές στην τριτοταγή δομή (Kelly and Price 2000).



Εικόνα 17: Φάσματα κυκλικού διχρωισμού των στοιχείων δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών (Kelly et al. 2005).

Ο πεπτιδικός δεσμός αποτελεί την κύρια αιτία απορρόφησης ακτινοβολίας από τις πρωτεΐνες στην περιοχή του πέραν υπεριώδους (180 έως 250 nm). Ο κυκλικός διχρωσμός σε αυτή την περιοχή οφείλεται στο ασύμμετρο περιβάλλον του πεπτιδικού δεσμού, όπως αυτό αποτυπώνεται στα ζεύγη γωνιών φ και ψ του διαγράμματος Ramachandran, και συνεπώς στα στοιχεία δευτεροταγούς δομής. Κάθε στοιχείο δευτεροταγούς δομής παρουσιάζει χαρακτηριστικό φάσμα κυκλικού διχρωσμού στην περιοχή του πέραν υπεριώδους, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 17. Για παράδειγμα, η α -έλικα παρουσιάζει δύο αρνητικές κορυφές στα 222 nm και στα 208 nm και μία θετική στα 190 nm περίπου, ενώ το φάσμα β -πτυχωτών επιφανειών παρουσιάζει μια αρνητική κορυφή στα 218 nm και μια θετική στα 195-200 nm.

Το φάσμα κυκλικού διχρωσμού μίας πρωτεΐνης είναι η συνισταμένη των τυπικών φασμάτων των στοιχείων δευτεροταγούς δομής, με συνεισφορά του καθενός στο φάσμα ανάλογης με το ποσοστό εμφάνισης του στη δομή του πρωτεϊνικού μορίου. Ένας αριθμός αλγορίθμων έχει αναπτυχθεί οι οποίοι χρησιμοποιούν δεδομένα φασμάτων κυκλικού διχρωσμού στο πέραν υπεριώδους για να παρέχουν μία εκτίμηση της σύστασης της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών (Greenfield 1996, Greenfield 2004, Van Mierlo et al. 2000). Οι περισσότεροι από αυτούς χρησιμοποιούν σύνολα δεδομένων που περιλαμβάνουν φάσματα κυκλικού διχρωσμού πρωτεϊνών που έχουν αναλυθεί με κρυσταλλογραφία ακτίνων X για την προσαρμογή των φασμάτων. Από τους περισσότερο συχνά χρησιμοποιούμενους είναι οι SELCON (Sreerama and Woody 1993), VARSLC (Manavalan and Johnson Jr 1987), CONTIN (Provencher and Glöckner 1981) και K2D (Andrade et al. 1993), χωρίς όμως κάποιος να έχει γνωρίσει καθολική αναγνώριση, καθώς από ότι φαίνεται σημαντικό ρόλο στην ανάλυση διαδραματίζει τόσο η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος, όσο και τα δεδομένα με τα οποία γίνεται η προσαρμογή του φάσματος (Greenfield 2004).



Εικόνα 18: Φάσμα κυκλικού διχρωσμού μίας πρωτεΐνης στο εγγύς υπεριώδες. Σημειώνονται οι περιοχές στις οποίες συνεισφέρουν τα αρωματικά αμινοξέα (Ranjbar and Gill 2009).

Πέρα από τον πεπτιδικό δεσμό, στοιχεία για τη δομή των πρωτεϊνών μπορούν να εξαχθούν από άλλες ομάδες που υπάρχουν σε ένα πρωτεϊνικό μόριο. Τα αρωματικά αμινοξέα απορροφούν ισχυρά στην εγγύς υπεριώδη περιοχή (250-350 nm), ενώ ο προσανατολισμός τους και το μικροπεριβάλλον τους επηρεάζουν σημαντικά το φάσμα κυκλικού διχρωισμού. όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 18. Το φάσμα κυκλικού διχρωισμού στο εγγύς υπεριώδες είναι ευαίσθητο σε αλλαγές της τριτοταγούς δομής μιας πρωτεΐνης, καθώς ο μικρός αριθμός των αρωματικών αμινοξέων σε σχέση με το σύνολο των αμινοξέων μιας πρωτεΐνης, τα καθιστά ιδανικούς δείκτες για αλλαγές στην τριτοταγή δομή. Η ένταση του κυκλικού διχρωισμού είναι αρκετά χαμηλότερη από την ένταση στο πέραν υπεριώδες, και για αυτόν το λόγο είναι απαραίτητη η χρήση πολλαπλάσιας ποσότητας ενζύμου από αυτή που χρειάζεται για τη λήψη φασμάτων στο πέραν υπεριώδες.

Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί μελέτες της δομής πρωτεϊνών από φάσμα κυκλικού διχρωισμού που οφείλεται σε κάποια προσθετική ομάδα, όπως η αίμη και οι φλαβίνες (Kelly and Price 2000). Ενδεικτικό παράδειγμα είναι η περίπτωση του κυτοχρώματος *c*, το οποίο φιλοξενεί μία ομάδα αίμης στο ενεργό κέντρο, η οποία είναι υπεύθυνη για την καταλυτική δραστηριότητα του μορίου. Η οξειδωτική κατάσταση του ατόμου του σιδήρου, καθώς και το μικροπεριβάλλον της αίμης παράγουν χαρακτηριστικές κορυφές στα φάσματα κυκλικού διχρωισμού από το πέραν υπεριώδες έως το ορατό (Blauer et al. 1993, Santucci and Ascoli 1997). Οι περιοχές αυτές, αποκαλούμενες Soret, είναι χαρακτηριστικές για τη δομή και την οξειδωτική κατάσταση της αίμης, και έτσι αλλαγές σε αυτές τις κορυφές στα φάσματα κυκλικού διχρωισμού είναι ενδεικτικές για αλλαγές στη τρισδιάστατη δομή του μορίου.

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης του κυκλικού διχρωισμού για την ανάλυση της δομής πρωτεϊνών πηγάζουν από την ταχύτητα λήψης δεδομένων και το εύρος των πληροφοριών που παρέχουν (Berova et al. 2007, Kelly and Price 2000). Σε σχέση με την κρυσταλλογραφία ακτίνων Χ ή τον πυρηνικό μαγνητικό συντονισμό, οι λήψεις φασμάτων κυκλικού διχρωισμού είναι πολύ γρήγορες, ενώ χρειάζεται πολύ μικρή ποσότητα πρωτεΐνης. Επίσης, εφόσον η τεχνική είναι μη καταστροφική για το δείγμα, το ένζυμο μπορεί να ανακτηθεί και να επαναχρησιμοποιηθεί. Σημαντικό είναι το γεγονός ότι η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ένα εύρος συστημάτων, τα οποία δεν είναι απαραίτητο να είναι υδατικά.

Το σημαντικότερο μειονέκτημα της φασματοσκοπίας κυκλικού διχρωισμού είναι το γεγονός ότι αν και παρέχει αξιόπιστα δεδομένα για τη δευτεροταγή δομή των πρωτεϊνών, δεν μπορεί να αποδώσει αυτά τα δομικά στοιχεία σε συγκεκριμένες περιοχές του μορίου. Επιπλέον, δεν μπορούν να εξαχθούν δεδομένα για την τριτοταγή και την τεταρτοταγή δομή των πρωτεϊνών, παρά μόνο να καταγραφούν αλλαγές σε αυτά τα επίπεδα δομής (Berova et al. 2007, Kelly and Price 2000). Ακόμα όμως και με αυτούς τους περιορισμούς, η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού παίζει ένα σημαντικό ρόλο τόσο στη μελέτη της αναδίπλωσης και αποδιάταξης πρωτεϊνών, όσο και στη μελέτη της χρήσης ενζύμων σε μη συμβατικά μέσα.

5.2.2 Φασματοσκοπία υπέρυθρου

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου είναι μία από τις κλασικές μεθόδους για την ανάλυση της δομής μικρών μορίων, λόγω της ευαισθησίας της τόσο στη χημική σύσταση, όσο και στην αρχιτεκτονική των μορίων. Η συχνότητα της υπέρυθρης ακτινοβολίας είναι σε τάξη μεγέθους εκεί που βρίσκεται και η συχνότητα δόνησης των μοριακών δεσμών. Έτσι, όταν μία υπέρυθρη ακτινοβολία απορροφάται από ένα μόριο, ουσιαστικά επάγει δονητικές μεταπτώσεις σε αυτό. Η συχνότητα δόνησης και συνεπώς η ικανότητα απορρόφησης μίας υπέρυθρης ακτινοβολίας εξαρτάται από την ατομική μάζα των ατόμων που σχηματίζουν το δεσμό, από τον τύπο του δεσμού (απλός, διπλός, τριπλός) και την ηλεκτρονιακή κατάσταση που προκύπτει από το ενδομοριακό και διαμοριακό περιβάλλον (Barth 2007).

Το γεγονός ότι όλοι οι δεσμοί ενός μορίου συνεισφέρουν στο φάσμα απορρόφησης στο υπέρυθρο, είναι σημαντικό πλεονέκτημα της φασματοσκοπίας υπέρυθρου, καθώς δεν χρειάζεται ειδική σήμανση των μορίων προς μελέτη πριν τη λήψη των φασμάτων. Ταυτόχρονα όμως, το πλήθος της πληροφορίας για μεγάλα μόρια όπως οι πρωτεΐνες είναι τεράστιο, καθώς το φάσμα απορρόφησης υπέρυθρου αποτελείται από πολλές αλληλεπικαλυπτόμενες κορυφές, κάτι το οποίο δυσκολεύει την ανάλυση και πολλές φορές αποκρύπτει πληροφορίες (Barth 2007, Jackson and Mantsch 1995).

Η φασματοσκοπία υπέρυθρου έχει χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της δομής πρωτεϊνών (Arrondo and Goñi 1999, Cooper and Knutson 1995, Goormaghtigh et al. 1994a, Goormaghtigh et al. 1994b, Jung 2000, Manning 2005, Surewicz et al. 1993), για την ανάλυση του μηχανισμού κατάλυσης ενζυμικών αντιδράσεων (Barth and Zscherp 2002, Breton 2001, Mantele 1993, Marshall and Rich 2009), αλλά και για τη μελέτη του μηχανισμού αναδίπλωσης ή αποδιάταξης των πρωτεϊνών (Ganim et al. 2008, Lewandowska et al. 2010, Seshadri et al. 2009, Tantipolphan et al. 2008). Αν και η συγκεκριμένη τεχνική μπορεί να εφαρμοστεί σε πλήθος πρωτεϊνών, από τις μικρότερες πρωτεΐνες έως και σε συμπλέγματα μεμβρανικών πρωτεϊνών (Barth 2007), ακόμα δεν έχει γνωρίσει ευρεία εφαρμογή στην πρωτεϊνική ανάλυση. Τα φάσματα υπέρυθρου δεν εμπεριέχουν πληροφορίες για την τρισδιάστατη δομή μίας πρωτεΐνης, αλλά η ανάλυση τους καθιστά εφικτή την ανίχνευση δομικών αλλαγών. Το γεγονός ότι η φασματοσκοπία υπέρυθρου μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να δώσει πληροφορίες για τη δευτεροταγή δομή πρωτεϊνών αναφέρθηκε για πρώτη φορά το 1950, όταν αποδείχθηκε ότι υπάρχει συσχετισμός μεταξύ της συχνότητας της αμιδικής περιοχής I και II και των στοιχείων της δευτεροταγούς δομής, όπως αυτός είχε καταγραφεί από κρυσταλλογραφικές μελέτες (Elliott and Ambrose 1950).

Η δομή των πρωτεϊνών οφείλεται στη διευθέτηση της πολυπεπτιδικής αλυσίδας στο χώρο, όπως αυτή προκύπτει από συγκεκριμένες γεωμετρικές των δεσμών της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, σύμφωνα με το διάγραμμα Ramachandran (Mirkin and Krimm 2002). Για τη μελέτη της δομής πρωτεϊνών με τη φασματοσκοπία υπέρυθρου καταγράφονται οι κορυφές που οφείλονται σε δονήσεις των δεσμών της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Ο πεπτιδικός δεσμός εμφανίζει 9 κορυφές

στο φάσμα απορρόφησης υπερύθρου οι οποίες ονομάζονται αμιδικές κορυφές (I έως VII, A και B) και οφείλονται σε διαφορετικές δονητικές καταστάσεις και σε διαφορετικούς δεσμούς (Barth 2007, Barth and Zscherp 2002). Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες για την ανάλυση της πρωτεϊνικής δομής είναι οι αμιδικές κορυφές I, II και III, τα χαρακτηριστικά των οποίων παρουσιάζονται στον πίνακα 8. Οι συγκεκριμένες κορυφές αποτελούνται από αλληλεπικαλυπτόμενες κορυφές που οφείλονται στον ίδιο τύπο δονήσεων αλλά η ακριβής τους θέση είναι ελάχιστα διαφορετική λόγω της διευθέτησης αυτών των δεσμών στο χώρο. Έτσι, ο διαχωρισμός των αμιδικών κορυφών είναι αυτός που καθιστά εφικτή την ανάλυση της δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών με τη χρήση της φασματοσκοπίας υπερύθρου.

Πίνακας 8: Οι κύριες αμιδικές κορυφές απορρόφησης που εντοπίζονται στο φάσμα υπερύθρου.

Αμιδική κορυφή	Περιοχή υπερύθρου (cm ⁻¹)	Αναγωγή σε δεσμό (συνεισφορά, %)
Αμιδική I	1600 – 1700	Δόνηση έκτασης C=O (80%) Δόνηση έκτασης C-N (20%)
Αμιδική II	1500 – 1600	Δόνηση κάμψης N-H (60%) Δόνηση έκτασης C-N (40%) και C-C (10%)
Αμιδική III	1200 – 1350	Δόνηση κάμψης N-H και C=O Δόνηση έκτασης C-N και C-C (μη ορισμένη συνεισφορά)

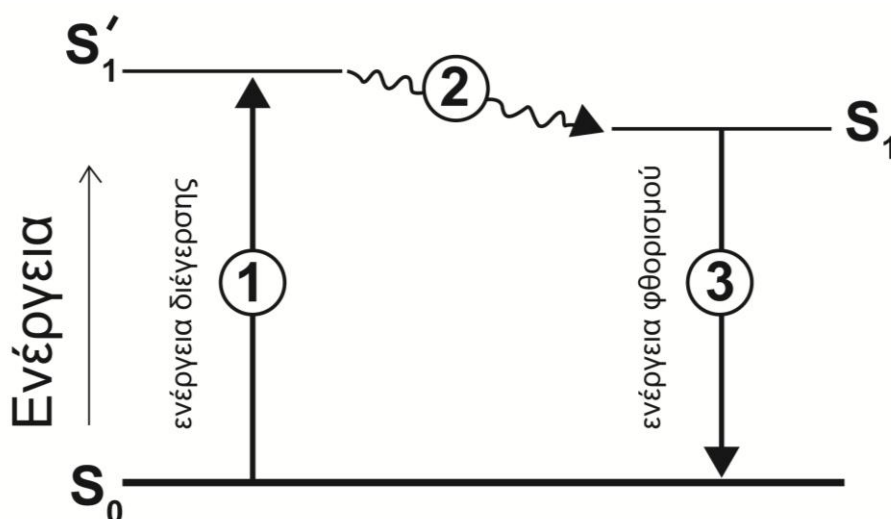
Η αμιδική κορυφή I είναι η περισσότερο συχνά χρησιμοποιούμενη κορυφή για τη δομική μελέτη πρωτεϊνών, καθώς παρουσιάζει την ισχυρότερη τιμή μοριακής απορροφητικότητας σε σχέση με τις άλλες αμιδικές κορυφές. Επιπλέον, έχουν ταυτοποιηθεί οι περιοχές των στοιχείων δευτεροταγούς δομής, κάτι το οποίο καθιστά ευαίσθητη τη μέθοδο ανάλυσης στις αλλαγές των στοιχείων δευτεροταγούς δομής των πρωτεϊνών. Επίσης, η απορρόφηση βασίζεται κυρίως στη δόνηση ενός δεσμού, κάτι το οποίο παράγει πιο εύκολα ερμηνεύσιμο σήμα (Jackson and Mantsch 1995). Το μειονέκτημα της χρήσης της αμιδικής περιοχής I είναι πως στην ίδια περιοχή απορροφά το νερό (Arrondo et al. 1993, Cai and Singh 1999, Jackson and Mantsch 1995). Διάφορες λύσεις έχουν προταθεί όπως η μείωση του μήκους της κυψελίδας ή η χρήση δευτερωμένου νερού για να μετατοπιστεί η κορυφή του νερού (Chittur 1998, Dong et al. 1990).

Ως εναλλακτική έχει προταθεί η χρήση της αμιδικής περιοχής III. Έχει το πλεονέκτημα ότι έχει καθορισμένες περιοχές για τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής, δίχως να απορροφούν οι δεσμοί του νερού στην περιοχή (Cai and Singh 1999). Παρόλα αυτά, η συνεισφορά διάφορων δεσμών στην κορυφή, καθώς και η συνεισφορά από τις πλευρικές αλυσίδες δημιουργούν μία κορυφή η οποία είναι δύσκολα ερμηνεύσιμη, ενώ η ένταση απορρόφησης είναι 10 φορές μικρότερη από αυτή στην αμιδική περιοχή I (Barth 2007). Για αυτό το λόγο η συγκεκριμένη αμιδική κορυφή δεν έχει βρει ευρεία εφαρμογή στη μελέτη της δομής πρωτεϊνών.

Ένα σημαντικό πλεονέκτημα της φασματοσκοπίας υπερύθρου όσον αφορά την εφαρμογή της για τη μελέτη της δομής πρωτεϊνών είναι το γεγονός πως έχουν αναπτυχθεί αρκετές τεχνικές λήψης φασμάτων ώστε να μπορούν να μελετηθούν τόσο υγρά αλλά και στερεά δείγματα. Αυτό καθιστά εφικτή τη λήψη φασμάτων σε ακινητοποιημένα ή λυοφυλιωμένα ένζυμα, κάτι το οποίο στην πλειονότητα των περιπτώσεων είναι ανέφικτο για τη φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού ή τη φθορισμομετρία. Έτσι, τα ακινητοποιημένα ένζυμα ή τα λυοφυλιωμένα μπορούν να μελετηθούν σε δισκία που σχηματίζονται με την προσθήκη άλατος βρωμιούχου καλίου (Forato et al. 1998), ενώ τα υγρά δείγματα μπορούν να μελετηθούν είτε σε κυψελίδες, είτε με την τεχνική της εξασθένησης ολικής ανάκλασης (Chittur 1998).

5.2.3 Φασματοσκοπία φθορισμού

Ο φθορισμός είναι το αποτέλεσμα μίας διεργασίας τριών σταδίων η οποία συμβαίνει σε συγκεκριμένα μόρια, τα οποία καλούνται φθορίζουσες ενώσεις. Αρχικά ένα φωτόνιο συγκεκριμένης ενέργειας παρέχεται από μία εξωτερική πηγή και απορροφάται από τη φθορίζουσα ένωση, η οποία μεταπίπτει σε μία διεγερμένη ηλεκτρονική κατάσταση. Η ένωση αυτή παραμένει στη διεγερμένη κατάσταση για πεπερασμένο χρονικό διάστημα (συνήθως 1-10 nsec), όπου σε αυτό το στάδιο ένα μέρος της ενέργειας εκλύεται και το διεγερμένο μόριο μεταπίπτει σε μία διεγερμένη κατάσταση χαμηλότερης ενέργειας, λόγω των αλληλεπιδράσεων με το μικροπεριβάλλον της. Τελικά το διεγερμένο μόριο εκπέμπει ένα φωτόνιο έτσι ώστε να επανέλθει στην αρχική του ενεργειακή κατάσταση. Η απώλεια της ενέργειας κατά το δεύτερο στάδιο οδηγεί σε μείωση της ενέργειας του εκπεμπόμενου φωτονίου σε σχέση με την ενέργεια του φωτονίου διέγερσης, και συνεπώς εντοπίζεται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος. Η διαδικασία παρουσιάζεται στην εικόνα 19.



Εικόνα 19: Σχηματική απεικόνιση του φαινομένου του φθορισμού. (1) Διέγερση, (2) απώλεια ενέργειας κατά την παραμονή στη διεγερμένη κατάσταση, (3) εκπομπή φωτονίου και επαναφορά στην αρχική κατάσταση.

Σε ένα πρωτεϊνικό μόριο απαντώνται τρία αμινοξέα τα οποία παρουσιάζουν εγγενείς φθορίζουσες ιδιότητες, η φαινυλαλανίνη, η τυροσίνη και η θρυπτοφάνη, λόγω των αρωματικών τους δακτυλίων. Ένα φωτόνιο με μήκος κύματος 280 nm έχει την ικανότητα να διεγείρει και τα τρία αρωματικά αμινοξέα. Σε περιπτώσεις όμως που απαιτείται μεγαλύτερη ακρίβεια υπάρχει η πιθανότητα της επιλεκτικής διέγερσης της θρυπτοφάνης, η οποία παρουσιάζει την υψηλότερη απόδοση φθορισμού, με ένα φωτόνιο μήκους κύματος 295 nm (Eftink 1991, Eftink 1998). Οι περισσότερες μελέτες φθορισμού πρωτεϊνών αφορούν την τυροσίνη και τη θρυπτοφάνη, των οποίων η κβαντική ενέργεια είναι αρκετά υψηλή και οδηγεί σε ικανοποιητικό σήμα φθορισμού. Εδώ εντοπίζεται το μεγαλύτερο μειονέκτημα της φθορισμομετρίας. Η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος πρέπει να φέρει αρκετά αρωματικά αμινοξέα, κυρίως θρυπτοφάνες, για να μπορέσει να μελετηθεί η δομή του με τη συγκεκριμένη τεχνική.

Ο φθορισμός των αρωματικών αμινοξέων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη των δομικών αλλαγών των πρωτεϊνών, καθώς τα φάσματα φθορισμού τους είναι ευαίσθητα σε αλλαγές που εντοπίζονται στο μικροπεριβάλλον των συγκεκριμένων αμινοξέων. Τα κύρια χαρακτηριστικά ενός φάσματος φθορισμού που επηρεάζονται από τις αλλαγές στο μικροπεριβάλλον και στη δομή της πρωτεΐνης είναι η ένταση φθορισμού (F) και το μήκος κύματος μέγιστης εκπομπής (λ_{max}) (Eftink 1998, Monsellier and Bedouelle 2005). Ενδεικτικά, έχει αναφερθεί πως οι θρυπτοφάνες οι οποίες είναι πλήρως εκτεθειμένες σε ένα υδατικό διάλυμα παρουσιάζουν μέγιστο εκπομπής στα 350 nm, ενώ αυτές που είναι θαμμένες στο εσωτερικό των πρωτεϊνών σε μη πολικό περιβάλλον παρουσιάζουν μέγιστο στα 308 nm περίπου. Το γεγονός αυτό έχει συσχετισθεί με την αποδιάταξη των πρωτεϊνών. Κατά την αποδιάταξη των πρωτεϊνών παρατηρείται αύξηση του μήκους κύματος μέγιστης εκπομπής, ενώ όταν η πρωτεΐνη υιοθετεί μία πιο συμπαγή δομή παρατηρείται μείωση (Eftink 1994). Η μέγιστη τιμή έντασης φθορισμού δεν μπορεί εύκολα να χρησιμοποιηθεί για τη μελέτη της δομής των πρωτεϊνών, καθώς εξαρτάται σημαντικά από τη συγκέντρωση της φθορίζουσας ουσίας (των αρωματικών αμινοξέων και συνεπώς της πρωτεΐνης), ενώ έχουν αναφερθεί φαινόμενα απόσβεσης φθορισμού από γειτνιαζουσες ομάδες αμινοξέων, άλλα μόρια στο διάλυμα ή ακόμα και από το διαλύτη (Dumoulin et al. 2002, Monsellier and Bedouelle 2005, Mu et al. 2008, Ruiz et al. 2003).

5.3 Μελέτη της σχέσης δομής-λειτουργίας ενζύμων σε συστήματα οργανωμένων νανοδομών

Η χρήση ενζύμων σε μη συμβατικά συστήματα, καθώς και η ακινητοποίηση τους παρουσιάζουν σημαντικό ερευνητικό και εμπορικό ενδιαφέρον, καθώς τα ένζυμα παρουσιάζουν βελτιωμένη καταλυτική συμπεριφορά (καλύτερη σταθερότητα, διαφορετική εκλεκτικότητα κ.τ.λ.) σε αυτά τα συστήματα (Moniruzzaman et al. 2010c, Pavlidis et al. 2010, Stamatidis et al. 1999, van Rantwijk and Sheldon 2007, Zoumpantioti et al. 2010). Πλέον είναι ευρέως αποδεκτό ότι τα ένζυμα μπορούν να έχουν πάνω από μία καταλυτικά ενεργές διαμορφώσεις, οι οποίες είναι και υπεύθυνες για τη διαφορετική δραστηριότητα που παρατηρείται σε αυτά τα συστήματα. Οι

φασματοσκοπικές τεχνικές με τα δεδομένα που παρέχουν για τη δομή των ενζύμων *in situ* σε αυτά τα συστήματα, καθιστούν εφικτό τον ορθολογικό σχεδιασμό ενζυμικών συστημάτων.

Οι συγκεκριμένες τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς για τη μελέτη της δομής ενζύμων σε μη συμβατικά συστήματα, όπως τα ιοντικά υγρά και τα συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο. Η De Diego και οι συνεργάτες της μελέτησαν τη δομή και την καταλυτική συμπεριφορά της λιπάσης B από *Candida antarctica* σε ιοντικά υγρά και μπόρεσαν να συσχετίσουν τη σταθεροποίηση της λιπάσης στα ιοντικά υγρά με μία περισσότερο συμπαγή δομή (De Diego et al. 2005). Παρόλα αυτά τα ιοντικά υγρά μπορούν να διαταράξουν σε σημαντικό βαθμό τη δομή των ενζύμων και να οδηγήσουν σε αποδιάταξη, λόγω των ισχυρών δεσμών υδρογόνου που μπορούν να συνάψουν με το ένζυμο (Lau et al. 2004). Παρόμοια συμπεριφορά έχει παρατηρηθεί και στα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο, όπου τα ένζυμα υιοθετούν μία περισσότερο συμπαγή δομή σε σχέση με αυτή που έχουν σε ένα υδατικό διάλυμα, κάτι το οποίο σχετίζεται τις περισσότερες φορές με αυξημένη σταθερότητα των ενζύμων σε αυτά τα συστήματα (Mukherjee et al. 2007, Palomo et al. 2003). Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού και φθορισμού υποδεικνύουν δομικές αλλαγές κατά τον εγκλωβισμό των ενζύμων σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων, κάτι το οποίο τις περισσότερες φορές συσχετίζεται με τη διαφορετική καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων (Marangoni 1993, Walde 1993).

Οι φασματοσκοπικές τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί και για την ανάλυση της δομής ενζύμων τα οποία έχουν ακινητοποιηθεί σε νανοϋλικά. Η κλίμακα μεγέθους αυτών των υλικών καθιστά εφικτή τη χρήση οπτικών τεχνικών, είτε σε διασπορές τους σε διάλυμα, είτε ως στερεό υλικό. Η επίδραση που έχει η ακινητοποίηση ενζύμων σε νανοσωλήνες άνθρακα φαίνεται να μην είναι όμοια σε όλα τα ένζυμα. Υπάρχουν μελέτες που υποστηρίζουν ότι η ακινητοποίηση ενζύμων στους νανοσωλήνες επάγει δομικές αλλαγές στα ένζυμα (Karajanagi et al. 2004, Matsuura et al. 2006, Yi et al. 2008), ενώ έχει αναφερθεί πως τα ένζυμα μπορεί να διατηρήσουν τη δομή τους κατά την ακινητοποίηση (Asuri et al. 2006a, Chen et al. 2009, Du et al. 2007b). Όπως και στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων, έτσι και στα ακινητοποιημένα ένζυμα η αυξημένη σταθερότητα έχει συσχετισθεί με μία περισσότερο συμπαγή δομή (Jiang et al. 2004). Το φαινόμενο είναι περισσότερο πολύπλοκο και φαίνεται πως διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν τη δομή του ενζύμου κατά την ακινητοποίηση, πέρα από τη φύση του ενζύμου, όπως ο τύπος των νανοϋλικών που χρησιμοποιούνται, οι λειτουργικές ομάδες στην επιφάνεια τους και το πρωτόκολλο ακινητοποίησης (Mu et al. 2008).

Γίνεται προφανές από τα προηγούμενα πως τα δεδομένα που εξάγονται από τις φασματοσκοπικές τεχνικές για τη δομή των ενζύμων σε συστήματα νανο-διασποράς είναι πολύ σημαντικά για την κατανόηση της λειτουργίας των ενζύμων σε αυτά τα συστήματα. Ο συσχετισμός της δομής με την καταλυτική δράση των ενζύμων που προκύπτει από τη συγκριτική μελέτη δεδομένων καταλυτικής δραστηριότητας και δομής των ενζύμων οδηγούν στον ορθολογικό σχεδιασμό ενζυμικών συστημάτων με επιθυμητές ιδιότητες, τα οποία θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε βιομηχανικές εφαρμογές.

ΥΛΙΚΑ &
ΜΕΘΟΔΟΙ

6 Υλικά

6.1 Αντιδραστήρια

6.1.1 Ένζυμα

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν οι εξής εμπορικά διαθέσιμες λιπάσες:

1. Λιπάση A από *Pseudozyma* (πρώην *Candida*) *antarctica* (CaA). Χρησιμοποιήθηκε σε διαφορετικά σκευάσματα:
 - ❖ Λυοφιλιωμένη με ενεργότητα 2.04 U/mg (Fluka)
 - ❖ Υδατικό διάλυμα περιεκτικότητας 22.4 mg/mL (Novozyme 735, προσφορά της Novozymes)
2. Λιπάση B από *Pseudozyma* (πρώην *Candida*) *antarctica* (CaB). Χρησιμοποιήθηκε σε διαφορετικά σκευάσματα:
 - ❖ Λυοφιλιωμένη με ενεργότητα 10.8 U/mg και 13.2 % w/w περιεκτικότητα (Fluka)
 - ❖ Υδατικό διάλυμα περιεκτικότητας 11.9 mg/mL (Lipozyme CALB L, προσφορά της Novozymes)
 - ❖ Ακίνητοποιημένη σε υδρόφοβο φορέα αποτελούμενο από μακροπορώδη ακρυλική ρητίνη (Novozym 435, προσφορά της Novozymes)
3. Λιπάση από *Candida rugosa* (CrI). Χρησιμοποιήθηκε σε διαφορετικά σκευάσματα:
 - ❖ Λυοφιλιωμένη με ενεργότητα 2.9 U/mg και 2.6 % w/w περιεκτικότητα (Sigma)
 - ❖ Λυοφιλιωμένη με ενεργότητα 724 U/mg και 8.4% w/w περιεκτικότητα (Sigma)
4. Λιπάση από *Chromobacterium viscosum* (CvI). Λυοφιλιωμένη με ενεργότητα 3040 U/mg και 55.7 % w/w περιεκτικότητα (BioChemica)
5. Λιπάση από *Rhizomucor miehei* (RmI). Λυοφιλιωμένη με ενεργότητα 0.92 U/mg (Fluka) (14.0 % w/w περιεκτικότητα)
6. Λιπάση από *Thermomyces lanuginosa* (TII). Υδατικό διάλυμα περιεκτικότητας 34.7 mg/mL (Lipozyme TL 100 L, προσφορά της Novozymes)

Στα πλαίσια συνεργασίας με το Ινστιτούτο Βιοχημείας του Πανεπιστημίου του Greifswald (Γερμανία), στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες ανασυνδυασμένες υδρολάσες που εκφράστηκαν σε *Escherichia coli*.

1. Εστεράση από *Bacillus subtilis* (Bs2). Λυοφιλιωμένη με 28.8 % w/w περιεκτικότητα
2. Εστεράση από *Pyrobaculum calidifontis* (PestE). Λυοφιλιωμένη με 82.5 % w/w περιεκτικότητα
3. Εστεράση από *Pseudomonas fluorescens* (Pfe I). Υδατικό διάλυμα περιεκτικότητας 479 μg/mL
4. Λιπάση από *Geobacillus thermoleovorans* (Gtl). Λυοφιλιωμένη με 60.5 % w/w περιεκτικότητα

Επίσης χρησιμοποιήθηκε η αλβουμίνη από ορό βόας (Sigma) ως πρότυπη πρωτεΐνη σε διάφορες μελέτες όπως για τον καθορισμό της πρότυπης καμπύλης στα πρωτόκολλα ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών, ή για τη μελέτη διαλυτότητας πρωτεϊνών στα μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού.

6.1.2 Υποστρώματα

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν εμπορικά διαθέσιμα υποστρώματα τα οποία προμηθεύτηκαν από τις εταιρίες Merck, Sigma, Fluka, Pareac, Riedel de Hæen και ήταν υψηλής καθαρότητας (>99 %).

Λιπαρά οξέα: Για τις αντιδράσεις εστεροποίησης χρησιμοποιήθηκαν κορεσμένα λιπαρά οξέα με ανθρακική αλυσίδα 2 έως 18 ατόμων άνθρακα καθώς και ακόρεστα λιπαρά οξέα, όπως το ελαϊκό οξύ (C18:1).

Εστέρες: Για τις αντιδράσεις υδρόλυσης εστερικών δεσμών χρησιμοποιήθηκε βουτυρικός (C4) και ο παλμιτικός (C16) εστέρας της 4-νιτροφαινόλης (pNPB και pNPP αντίστοιχα) . Για τις αντιδράσεις μετεστεροποίησης χρησιμοποιήθηκαν τόσο ο βινυλεστέρας του οξικού οξέος, όσο και η τριλαυρίνη.

Αλκοόλες: Για τις αντιδράσεις εστεροποίησης και μετεστεροποίησης χρησιμοποιήθηκαν πρωτοταγείς αλειφατικές αλκοόλες με ανθρακική αλυσίδα 1 έως 8 ατόμων άνθρακα, καθώς και η (±)1-φαινυλαιθανόλη.

Βιοδραστικές ενώσεις: Για τις αντιδράσεις εστεροποίησης βιοδραστικών ενώσεων χρησιμοποιήθηκαν τα 2-φαινυλο βουτυρικό οξύ, 3-φαινυλο βουτυρικό οξύ, φερουλικό οξύ, π-υδροξυφαινυλο οξικό οξύ, π-υδροξυφαινυλο προπιονικό οξύ, κινναμωμικό οξύ, βινυλεστέρας του κινναμωμικού οξέος και λιποϊκό οξύ.

6.1.3 Διαλύτες

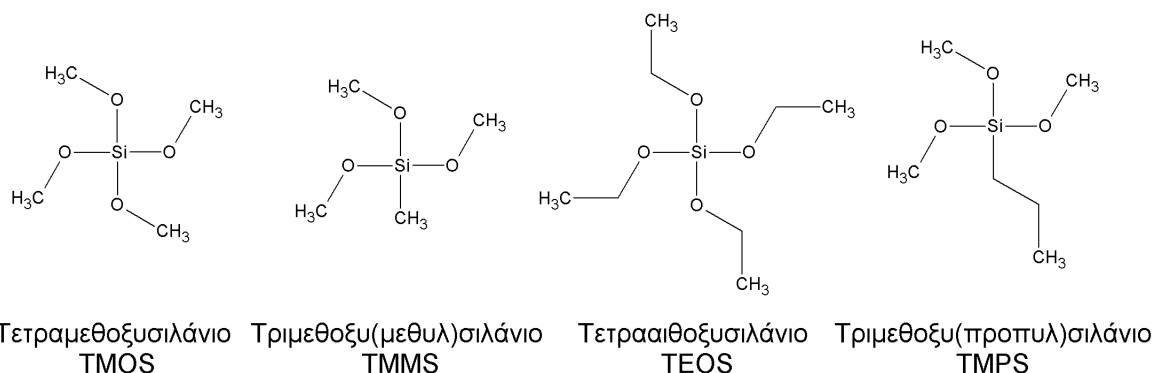
Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων (άλατα, οξέα, βάσεις) ήταν προϊόντα αναλυτικού βαθμού καθαρότητας των εταιρειών Fluka και Riedel de Hæen. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ρυθμιστικά διαλύματα 50 mM, pH 7.5. Για τις μελέτες των μικρογαλακτωμάτων χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα Tris – HCl, ενώ για τις μελέτες των νανοϋλικών χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, καθώς οι αμινομάδες του Tris πιθανόν να επηρέαζαν την ομοιοπολική ακινητοποίηση των ενζύμων στα νανοϋλικά.

Οι οργανικοί διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή ήταν καθαρότητας αναλυτικής βαθμίδας και προμηθεύτηκαν από τις εταιρείες Merck, Pareac και LabScan. Τα ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν υψηλής καθαρότητας (>97%):

- ❖ [bmim]BF₄: 1-βουτυλο-3-μεθυλιμιδαζόλιο τετραφθοριούχο βόριο (Aldrich)
- ❖ [bmim]PF₆: 1-βουτυλο-3-μεθυλιμιδαζόλιο εξαφθοριούχος φωσφόρος (Alpha Aesar)
- ❖ [bdmim]BF₄: 1-βουτυλο-2,3-διμεθυλιμιδαζόλιο τετραφθοριούχο βόριο (Solvent Innovation)

6.1.4 Φορείς ακινητοποίησης

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν διάφορα παράγωγα κυτταρίνης ως παράγοντες πηκτωματοποίησης για την παραγωγή οργανοπηκτωμάτων. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν σκευάσματα (υδροξυπροπυλο)μεθυλο κυτταρίνης (HPMC) με διαφορετικό βαθμό ιξώδους¹⁰ της εταιρείας Sigma. Επίσης, στη μελέτη των οργανοπηκτωμάτων χρησιμοποιήθηκαν διάφοροι τύποι υποκατεστημένων σιλανίων της εταιρείας Fluka, των οποίων η δομή και η συντημήσεις παρατίθενται στην εικόνα 20.



Εικόνα 20: Υποκατεστημένα σιλάνια που χρησιμοποιήθηκαν για την τροποποίηση των οργανοπηκτωμάτων.

Ως φορείς ακινητοποίησης χρησιμοποιήθηκαν τροποποιημένα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα. Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν νανοσωλήνες πολλαπλού τοιχώματος (CNTs) της εταιρείας Aldrich με εσωτερική διάμετρο 2-6 nm, εξωτερική 10-15 nm και μήκος 0.1-10 μm, καθώς και γραφίτης σε μορφή σκόνης από την Fluka. Η τροποποίηση των νανοϋλικών έγινε στο Εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών του Τμήματος Μηχανικής της Επιστήμης των Υλικών, σύμφωνα με την παράγραφο 7.10.1.

6.1.5 Άλλα αντιδραστήρια / υλικά

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν το ανιοντικό επιφανειενεργό δις-(2-αιθυλεξυλ)σουλφοηλεκτρικό νάτριο (AOT) και το μη ιοντικό επιφανειενεργό *p*-(1,1,3,3-τετραμεθυλβουτυλ) φαινυλαιθέρας της πολυαιθυλενογλυκόλης (Triton X-100) της εταιρείας Sigma. Επίσης χρησιμοποιήθηκαν το μη ιοντικό επιφανειενεργό μονολαυρικός εστέρας της πολυοξυ-αιθυλενο-σορβιτάνης (Tween 20) της εταιρείας Fluka.

Τα αντιδραστήρια για την ηλεκτροφόρηση (παράγραφος 7.3) ήταν καθαρότητας αναλυτικής βαθμίδας και προϊόντα των εταιρειών Sigma και Fluka, ενώ οι μάρτυρες μοριακών βαρών ήταν της εταιρείας Fermentas. Για την αφυδάτωση των οργανικών διαλυτών και των ιοντικών υγρών χρησιμοποιήθηκαν μοριακά κόσκινα πόρων 3 και 4 Å των εταιρειών Sigma και Fluka. Όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή ήταν καθαρότητας αναλυτικής βαθμίδας.

¹⁰ Διάλυμα 2 % (w/v) των συγκεκριμένων σκευασμάτων παρουσιάζει ιξώδες 40 - 5600 cP στους 20 °C.

7 Μεθοδολογία

7.1 Ποσοτικός προσδιορισμός πρωτεϊνών

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν 3 πρωτόκολλα ποσοτικού προσδιορισμού πρωτεϊνών. Όλα τα πειράματα έγιναν τουλάχιστον εις τριπλούν και υπολογίστηκε η μέση τιμή.

Πρωτόκολλο Bradford: Το πρωτόκολλο βασίζεται στην πρόσδεση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 στο πρωτεϊνικό μόριο (Bradford 1976). Η πρόσδεση της χρωστικής στην πρωτεΐνη προκαλεί μετατόπιση του μεγίστου απορρόφησης της χρωστικής από τα 465 nm στα 595 nm. Μία τυπική διαδικασία μέτρησης απαιτεί την ανάμειξη 900 μ L διαλύματος Bradford και 100 μ L πρωτεϊνικού διαλύματος (<0.2 mg/mL). Το διάλυμα αναδεύεται και επωάζεται για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να ολοκληρωθεί η διαδικασία πρόσδεσης. Η απορρόφηση μετράται στα 595 nm. Η ποσοτικοποίηση των παρατηρούμενων απορροφήσεων επιτυγχάνεται μέσω της εφαρμογής πρότυπης καμπύλης αλβουμίνης (1-20 μ g στο διάλυμα μέτρησης).

Πρωτόκολλο Lowry: Ο προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με εφαρμογή του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου απαιτεί 2 στάδια: (α) αντίδραση της πρωτεΐνης με θειικό χαλκό σε αλκαλικό περιβάλλον (αντίδραση biuret) και (β) αναγωγή του φωσφομολυβδικού - φωσφοβολφραιμικού αντιδραστήριου (αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu phenol) από το σύμπλοκο πρωτεΐνης - χαλκού (Lowry et al. 1951). Επί της διαδικασίας, τα πρωτεϊνικά δείγματα (<20 μ g) αραιώνονται με 0.5 M NaOH έως τελικού όγκου 0.5 mL. Σε κάθε δείγμα προστίθεται 2.5 mL διαλύματος θειικού χαλκού 0.5 % (w/v) σε 1 % κιτρικό νάτριο. Τα διαλύματα αναδεύονται και επωάζονται σε θερμοκρασία δωματίου για 10 min. Στη συνέχεια προστίθενται 250 μ L αντιδραστήριου Folin με ταυτόχρονη ανάδευση. Τα δείγματα αφήνονται για 15 min σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα φωτομετρούνται στα 750 nm. Η ποσοτικοποίηση των παρατηρούμενων απορροφήσεων επιτυγχάνεται μέσω της εφαρμογής πρότυπης καμπύλης αλβουμίνης (1-20 μ g στο διάλυμα μέτρησης).

Πρωτόκολλο δικιγχονινικού οξέος (bicinchoninic acid, BCA): Ο προσδιορισμός της πρωτεϊνικής συγκέντρωσης με εφαρμογή του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου απαιτεί 2 στάδια: (α) αντίδραση της πρωτεΐνης με θειικό χαλκό σε αλκαλικό περιβάλλον (αντίδραση biuret) και (β) δημιουργία συμπλόκου μεταξύ δικιγχονινικού οξέος και μονοσθενούς ιόντος χαλκού (Cu^{+1}) (Smith et al. 1985). Για την εφαρμογή του συγκεκριμένου πρωτοκόλλου χρησιμοποιείται το σετ (kit) της Pierce. Επί της διαδικασίας, προστίθεται ένα μέρος αντιδραστήριου A (που περιέχει το δικιγχονινικό οξύ και υδροξείδιο του νατρίου), σε 50 μέρη αντιδραστήριου B (που περιέχουν θειικό χαλκό). Έπειτα, σε 1 mL του μείγματος των αντιδραστηρίων προστίθενται 50 μ L πρωτεϊνικού διαλύματος (<20 μ g). Το δείγμα αναδεύεται και επωάζεται σε 60 °C για 30 min. Έπειτα τα δείγματα ψύχονται σε θερμοκρασία δωματίου και φωτομετρούνται στα 562 nm. Η ποσοτικοποίηση των παρατηρούμενων απορροφήσεων επιτυγχάνεται μέσω της εφαρμογής πρότυπης καμπύλης αλβουμίνης (1-20 μ g στο διάλυμα μέτρησης).

7.2 Καθαρισμός πρωτεϊνών

7.2.1 Θερμική κατεργασία πρωτεϊνών

Τα θερμοανθεκτικά ένζυμα μπορούν να υποστούν θερμική κατεργασία για μερικό καθαρισμό τους από λιγότερο θερμοανθεκτικά ένζυμα. Το ενζυμικό διάλυμα (έως 100 mg/mL) επωάζεται στους 80 °C για 10 έως 30 min. Έπειτα το δείγμα ψύχεται σε παγόλουτρο και φυγοκεντρείται στις 6000 rpm για 10 min ώστε να καθιζάνουν οι αποδιαταγμένες πρωτεΐνες. Το υπερκείμενο διαχωρίζεται από το ίζημα και ελέγχεται για την καθαρότητά του, για την ενζυμική συγκέντρωση και τη δραστικότητα του ενζύμου.

7.2.2 Χρωματογραφία συγγένειας

Οι ανασυνδυασμένες εστεράσες Bs2 και Pfe I φέρουν ένα εξαπεπτιδίο ιστιδινών (His-tag) στο καρβοξυτελικό άκρο της πολυπεπτιδικής αλυσίδας, το οποίο χρησιμοποιήθηκε για το καθαρισμό τους μέσω χρωματογραφίας συγγένειας σε ένα σύστημα υγρής χρωματογραφίας IMAC-FPLC (Pharmacia), το οποίο στεγάζεται στο Ινστιτούτο Βιοχημείας του Πανεπιστημίου του Greifswald. Η χρωματογραφία συγγένειας έγινε σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Krebsfänger et al. 1998). Το εκχύλισμα των κυττάρων (15 mL) αραιώνεται 1 : 10 με ένα ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.5 (50 mM) που περιέχει 0.5 M βεταΐνη. Έπειτα, το δείγμα φορτώνεται σε μία εξισορροπημένη στήλη σεφαρόζης - ψευδαργύρου υψηλής ροής (1.8 cm x 9.8 cm, Pharmacia) με ροή 3.5 mL/min. Ο ιμιδαζολικός δακτύλιος της ιστιδίνης προσδένεται στο υλικό πλήρωσης και η ροή του συγκεκριμένου ρυθμιστικού διαλύματος δεν επιτρέπει την έκλουση της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Η έκλουση γίνεται σε δύο στάδια με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.5 (50 mM) που περιέχει 0.5 M βεταΐνης και 0.3 M ιμιδαζολίου και ροή 1.5 mL/min. Αρχικά χρησιμοποιείται το συγκεκριμένο ρυθμιστικό διάλυμα σε συγκέντρωση 40 % (v/v) ώστε να εκλουστούν οι προσμίξεις που προσδέθηκαν ασθενώς στη στήλη, ενώ έπειτα εκλούεται η πρωτεΐνη ενδιαφέροντος με 100 % του ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει το ιμιδαζίο. Σε ένα κλάσμα 10 mL περιέχεται πάνω από το 85 % της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος. Η αφαίρεση της βεταΐνης και του ιμιδαζολίου γίνεται με τη χρήση ημιπερατών μεμβρανών διαπίδυσης (5 KDa).

7.3 Ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες¹¹

Παρασκευή πήκτωματος: Για την ηλεκτροφόρηση πρωτεϊνών υπό αποδιατακτικές συνθήκες χρησιμοποιείται πήκτωμα πολυακρυλαμίδιου το οποίο αποτελείται από: (α) το πήκτωμα διαχωρισμού και (β) το πήκτωμα επιστοιβάξης.

Αρχικά παρασκευάζεται το πήκτωμα διαχωρισμού σύμφωνα με τις αναλογίες του πίνακα 9. Μόλις το πήκτωμα εισαχθεί στην ηλεκτροφορητική συσκευή καλύπτεται με ένα στρώμα 1-βουτανόλης για να επιταχυνθεί ο πολυμερισμός. Μετά την πάροδο 30 min αφαιρείται η 1-

¹¹ SDS-PAGE: Sodium DodecylSulfate–PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

βουτανόλη και προστίθεται το διάλυμα του πηκτώματος επιστοιβαξης και το χτένι για τη δημιουργία των θέσεων φόρτωσης. Το πήκτωμα αφήνεται για πολυμερισμό για 90 min.

Πίνακας 9: Αναλογίες για την παρασκευή πηκτώματος για SDS-PAGE.

Διάλυμα	Πήκτωμα διαχωρισμού	Πήκτωμα επιστοιβαξης
dH ₂ O	3.6 mL	1.525 mL
Ρυθμιστικό δ/μα Tris-HCl	3.75 mL (1.5 M, pH 8.8)	625 µL (0.5 M, pH 6.8)
Διάλυμα 10% SDS	150 µL	25 µL
Διάλυμα 30% ακρυλαμίδιο/δισ-ακρυλαμίδιο	6 mL	325 µL
TEMED	25 µL	2.5 µL
Διάλυμα 10% υπερθειικό αμμώνιο ¹²	150 µL	25 µL

Προετοιμασία δειγμάτων: Τα πρωτεϊνικά δείγματα παρασκευάζονται με την προσθήκη 5 µL διαλύματος φόρτωσης¹³ σε 20 µL ενζυμικού διαλύματος (~25 µg). Αντίστοιχη ποσότητα λαμβάνεται από τα πρότυπα δείγματα μοριακών βαρών (markers). Τα δείγματα επωάζονται για 5 min στους 100 °C ώστε θερμικά να αποδιαταχθεί η πρωτεΐνη και να δημιουργηθούν σύμπλοκα SDS-πρωτεΐνης.

Διαδικασία ηλεκτροφόρησης: Τα δείγματα και τα πρότυπα μοριακών βαρών φορτώνονται στο πήκτωμα, το οποίο έχει καλυφθεί με το διάλυμα ηλεκτροφόρησης¹⁴. Ο ηλεκτροφορητικός διαχωρισμός πραγματοποιείται στα 200 V, 0.04 A για περίπου 60 min.

Διαδικασία χρώσης: Με το πέρας της ηλεκτροφόρησης το πήκτωμα μεταφέρεται σε διάλυμα χρώσης¹⁵ για 1 h υπό ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου. Ο αποχρωματισμός του πηκτώματος πραγματοποιείται σε διάλυμα αποχρωματισμού¹⁶ υπό ανάδευση μέχρι να εμφανιστούν ευδιάκριτες ζώνες.

Στις εικόνες 21 και 22 παρατίθενται οι φωτογραφίες από την ηλεκτροφόρηση των υδρολασών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή. Οι φωτογραφίες ελήφθησαν μετά τον καθαρισμό των πρωτεϊνών, οπότε παρουσιάζεται η μορφή με την οποία χρησιμοποιήθηκαν τα συγκεκριμένα ένζυμα. Στην εικόνα 21 παρουσιάζονται οι εμπορικά διαθέσιμες λιπάσες, ενώ στην εικόνα 22 παρουσιάζονται οι υδρολάσες που παρασκευαστήκαν στο Ινστιτούτο Βιοχημείας του Πανεπιστημίου του Greifswald.

Οι εμπορικά διαθέσιμες λιπάσες (εικόνα 21) είναι επαρκώς καθαρισμένες, παρουσιάζοντας περιεκτικότητα σε όλες τις περιπτώσεις πάνω από 80 % (w/w). Θα πρέπει να

¹² Το υπερθειικό αμμώνιο προστίθεται τελευταίο γιατί με την προσθήκη του ξεκινά ο πολυμερισμός.

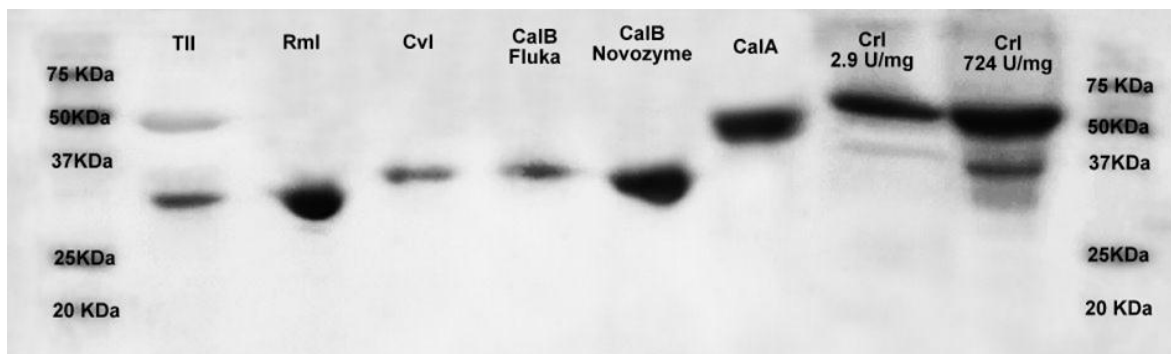
¹³ 285 µL νερό, 50 µL διαλύματος κυανού της βρωμοφαινόλης 0.25%, 50 µL μερκαπτοαιθανόλης

¹⁴ Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl (25 mM, pH 8.3), 0.192 M γλυκίνη, 0.1 % SDS

¹⁵ 250 mL αιθανόλη, 50 mL οξικού οξέος, 62.5 mL διαλύματος Coomassie blue 1%

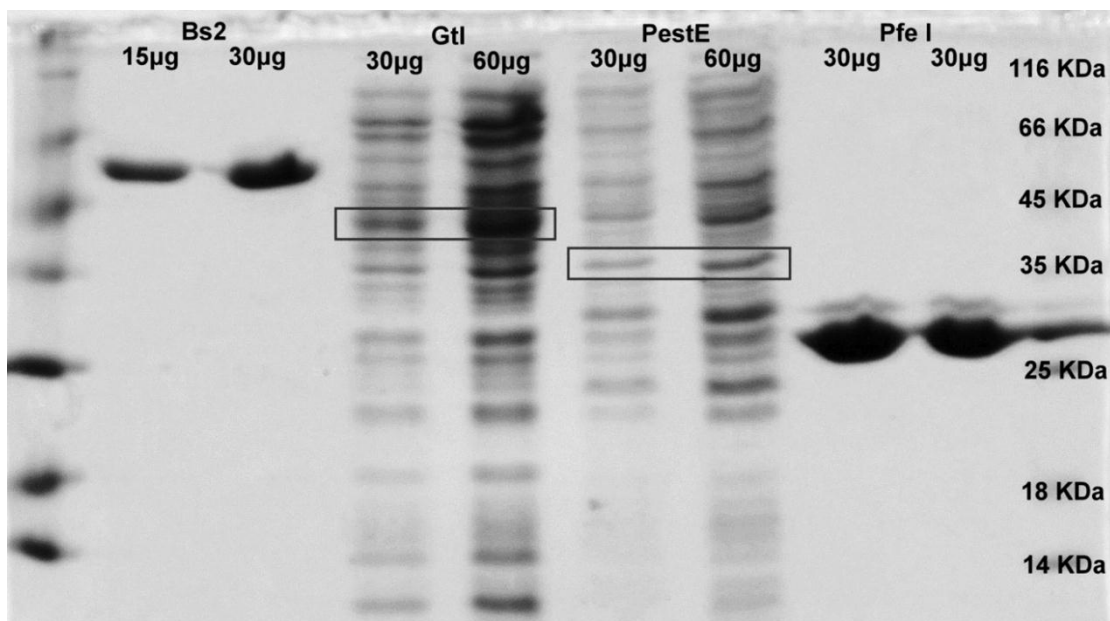
¹⁶ 300 mL μεθανόλη, 50 mL οξικό οξύ, 650 mL νερό

σημειωθεί πως ορισμένες θερμοανθεκτικές λιπάσες, όπως η Lipozyme CalB L και η Novozyme 735, υπέστησαν θερμική κατεργασία για τον καθαρισμό τους.



Εικόνα 21: Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης SDS-PAGE εμπορικά διαθέσιμων λιπασών.

Οι εστεράσες Bs2 και Pfe I καθαρίστηκαν με χρωματογραφία συγγένειας και όπως φαίνεται στην εικόνα 22 παρουσιάζουν μόνο μία ζώνη. Αντίθετα, η λιπάση Gtl και η PestE χρησιμοποιήθηκαν ως κυτταρικό εκχύλισμα, παρουσιάζοντας στο ενζυμικό τους σκεύασμα όλο το πρωτεϊνικό προφίλ της *E.coli*. Θα πρέπει να σημειωθεί πως πέρα των υδρολασών ενδιαφέροντος, καμία πρωτεΐνη της *E. coli* δεν παρουσιάζει υδρολυτική δραστηριότητα, ώστε εσφαλμένα να μετράται για δραστηριότητα της πρωτεΐνης ενδιαφέροντος.



Εικόνα 22: Πήκτωμα ηλεκτροφόρησης SDS – PAGE εστερασών και λιπάσης Gtl.

7.4 Παρασκευή συστημάτων νανοδιασποράς

7.4.1 Παρασκευή μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο

Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν 2 τύποι μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο (αντίστροφων μικκυλίων):

Μικρογαλακτώματα AOT / ισοοκτανίου / νερού: παρασκευάζεται διάλυμα του επιφανειοενεργού AOT σε ισοοκτάνιο, συγκέντρωσης 0.1 M. Το μικρογαλακτώμα σχηματίζεται με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας ρυθμιστικού διαλύματος (50 mM Tris – HCl, pH 7.5) ώστε να επιτευχθεί ο επιθυμητός βαθμός ενυδάτωσης (w_o) του κάθε συστήματος. Ακολουθεί έντονη ανάδευση έως ότου επιτευχθεί ένα σταθερό και διαυγές διάλυμα.

Μικρογαλακτώματα αλκοόλης / *n*-εξανίου / νερού: τα μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειοενεργό, των οποίων η σύσταση παρουσιάζεται στον πίνακα 10, παρασκευάζονται σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Khmelnitsky et al. 1988a). Συγκεκριμένα, αναμιγνύονται οι απαιτούμενοι όγκοι *n*-εξανίου, αλκοόλης (2-προπανόλης), και ρυθμιστικού διαλύματος Tris – HCl (pH 7.5, 50 mM) και ακολουθεί έντονη ανάδευση έως ότου επιτευχθεί ένα σταθερό και διαυγές διάλυμα.

Πίνακας 10: Σύσταση (v/v, %) των συστημάτων μικρογαλακτωμάτων χωρίς επιφανειοενεργό. Τα συστήματα SLM 1-7 είναι δισυνεχή, ενώ τα συστήματα SLM 8-15 είναι μικρογαλακτώματα νερού σε *n*-εξάνιο.

Σύστημα	<i>n</i> -εξάνιο	2-προπανόλη	νερό	Σύστημα	<i>n</i> -εξάνιο	2-προπανόλη	νερό
SLM 1	15.8	65.3	18.9	SLM 9	47.2	50.8	2.0
SLM 2	23.4	64.6	12.0	SLM 10	55.7	39.7	4.6
SLM 3	27.1	64.4	8.5	SLM 11	53.4	43.4	3.2
SLM 4	19.8	74.7	5.5	SLM 12	56.9	41.5	1.6
SLM 5	37.8	57.2	5.0	SLM 13	58.9	38.4	2.7
SLM 6	34.1	63.4	2.5	SLM 14	64.4	33.4	2.2
SLM 7	34.4	63.8	1.8	SLM 15	71.1	27.7	1.2
SLM 8	45.9	47.8	6.3				

Και στις δύο περιπτώσεις, το ένζυμο εισάγεται στο σύστημα με τη μορφή πυκνού υδατικού διαλύματος. Είναι επιθυμητό να σχηματιστούν πρώτα τα αντίστροφα μικκύλια με μικρή ποσότητα νερού και έπειτα να προστεθεί το ένζυμο ώστε να εγκλωβιστεί στις ήδη σχηματισμένες νανοδομές και να επιτευχθεί ο επιθυμητός βαθμός ενυδάτωσης (w_o).

7.4.2 Παρασκευή μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό

Το διάγραμμα φάσης των μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό παρασκευάστηκε με δυναμική τιτλοδότηση ενός μείγματος των δύο συστατικών με σταδιακή προσθήκη του τρίτου συστατικού (Clausse et al. 1987). Σε προθερμασμένο μείγμα ιοντικού υγρού και επιφανειοενεργού προστίθενται σταδιακά μικρές ποσότητες νερού και το σύστημα υπόκειται σε ανάδευση. Το νέο σύστημα αφήνεται να ηρεμήσει στη θερμοκρασία ενδιαφέροντος (~5 min) και έπειτα εξετάζεται προσεκτικά με οπτική παρατήρηση και με παρατήρηση μέσω πολωμένων φίλτρων, έτσι ώστε να διακριθεί εάν το σύστημα παραμένει μονοφασικό ή τείνει να διαχωριστεί σε διακριτές φάσεις. Εφόσον το σύστημα παραμένει μονοφασικό, η διαδικασία επαναλαμβάνεται και σημειώνονται

οι όγκοι που προστίθενται έως ότου προσδιοριστεί το σημείο αλλαγής των φάσεων. Συστήματα κοντά στα σημεία αλλαγής φάσεως παρασκευάστηκαν και παρακολουθήθηκαν για μεγάλα χρονικά διαστήματα (έως 24 ώρες), ώστε να επιβεβαιωθεί η σταθερότητα αυτών των συστημάτων και να οριστεί ακριβέστερα το διάγραμμα φάσεως.

Τα μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό παρασκευάζονται με ανάμειξη των απαιτούμενων όγκων [bmim]PF₆, επιφανειοενεργού και ρυθμιστικού διαλύματος Tris – HCl (pH 7.5, 50 mM). Το μείγμα επωάζεται στους 30 °C υπό ανάδευση για λίγο χρόνο ώστε να μειωθεί το ιξώδες του διαλύματος και έπειτα ακολουθεί έντονη ανάδευση έως ότου επιτευχθεί ένα οπτικά διαυγές ομοιογενές διάλυμα. Το ένζυμο εισάγεται στο σύστημα με τη μορφή πυκνού υδατικού διαλύματος, όπως έχει αναφερθεί και για τα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο. Στην παρούσα διατριβή, αν και μελετήθηκαν συστήματα σε όλο το εύρος της μονοφασικής περιοχής του διαγράμματος φάσης, κυρίως χρησιμοποιήθηκαν συστήματα με σταθερή συγκέντρωση επιφανειοενεργού (50% w/w), τα οποία αναφέρονται ως S συστήματα, καθώς και συστήματα με σταθερή συγκέντρωση ύδατος (5% w/w), τα οποία αναφέρονται ως W. Η σύσταση τους περιγράφεται στον πίνακα 11.

Πίνακας 11: Κατά βάρος σύσταση (%) των συστημάτων μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό που σχηματίζονται παρουσία επιφανειοενεργού Tween 20.

Σύστημα	[bmim]PF ₆	Tween 20	νερό	Σύστημα	[bmim]PF ₆	Tween 20	νερό
S1	47.5	50	2.5	W1	80	15	5
S2	45	50	5	W2	70	25	5
S3	40	50	10	W3	60	35	5
S4	35	50	15	W4	50	45	5
S5	30	50	20	W5	40	55	5
S6	25	50	25	W6	30	65	5
S7	20	50	30	W7	20	75	5
S8	15	50	35	W8	10	85	5
S9	10	50	40	W9	0	95	5
S10	5	50	45				

7.4.3 Προσδιορισμός πολικότητας συστημάτων νανοδιασποράς

Το πορτοκαλόχρουν του μεθυλενίου είναι ένας ευαίσθητος θετικός διαλυτοχρωμικός δείκτης, δηλαδή αύξηση στην πολικότητα του συστήματος οδηγεί σε αύξηση του μήκους κύματος στο οποίο παρατηρείται η μέγιστη απορρόφηση (λ_{max}). Η πολικότητα μετρήθηκε σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων, αλλά και σε οργανικούς διαλύτες. Σε μία τυπική διαδικασία, αρχικά παρασκευάζονται τα συστήματα μικρογαλακτωμάτων και προθερμαίνονται στους 30 °C.

Έπειτα προστίθεται 1μM πορτοκαλόχρουν του μεθυλενίου από πυκνό υδατικό διάλυμα και το σύστημα αναδεύεται. Για τα συστήματα μικρογαλακτωμάτων η ποσότητα του νερού που προστίθεται έχει υπολογιστεί για το βαθμό ενυδάτωσης, ενώ οι οργανικοί διαλύτες είχαν περιεκτικότητα 0.5 % (v/v) σε νερό. Σε όλες τις περιπτώσεις, το υδατικό διάλυμα ήταν ρυθμιστικό διάλυμα Tris – HCl pH 7.5 (50 mM). Το φάσμα απορρόφησης καταγράφεται στο εύρος 300 – 600 nm εις διπλούν και υπολογίζεται η μέση τιμή του μεγίστου απορρόφησης (λ_{max}).

7.5 Ακίνητοποίηση υδρολασών

7.5.1 Ακίνητοποίηση λιπασών σε οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων

Σε μία τυπική διαδικασία, για την παρασκευή των πηκτωμάτων (υδροξυπροπυλο)μεθυλοκυτταρίνης (HPMC) αρχικά ενυδατώνεται 1 g του παραγωγού κυτταρίνης με 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος (50 mM Tris – HCl, pH 7.5) σε θερμοκρασία δωματίου. Ταυτόχρονα παρασκευάζεται 1 mL μικρογαλακτώματος στο οποίο έχει ήδη εγκλωβιστεί το ένζυμο προς ακίνητοποίηση. Το μικρογαλάκτωμα προστίθεται στην ενυδατωμένη HPMC και ακολουθεί έντονη ανάδευση του υλικού με σπαθίδα (~ 5 min), ώστε το ένζυμο να κατανεμηθεί ομοιόμορφα στο φορέα. Το πήκτωμα που προκύπτει απλώνεται σε γυάλινη επιφάνεια και πιέζεται μεταξύ 2 γυάλινων επιφανειών έτσι ώστε να σχηματιστούν λεπτά τεμάχια πάχους περίπου 0.50 mm. Ακολουθεί ξήρανση στους 30 °C για 3 ώρες. Το ακίνητοποιημένο ένζυμο μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα ή να διατηρηθεί στους 4 °C έως τη χρησιμοποίησή του.

Η τροποποίηση των οργανοπηκτωμάτων με σιλάνια προσθέτει ένα ακόμα βήμα στο ήδη υπάρχον πρωτόκολλο. Συγκεκριμένα, μετά την προσθήκη του μικρογαλακτώματος και την ανάδευση προστίθεται συγκεκριμένη ποσότητα υποκατεστημένου σιλανίου (10 – 20 % του όγκου του οργανοπηκτώματος πριν την ξήρανση) και ακολουθεί έντονη ανάδευση του υλικού με σπαθίδα, ώστε το σιλάνιο να κατανεμηθεί ομοιόμορφα στο οργανοπήκτωμα. Έπειτα το πήκτωμα απλώνεται σε γυάλινη επιφάνεια και ακολουθεί ξήρανση όπως στη διαδικασία που αναφέρθηκε για τα απλά οργανοπηκτώματα. Τα υποκατεστημένα σιλάνια παρουσία υδροχλωρικού οξέος (το οποίο υπάρχει στο ρυθμιστικό διάλυμα) πολυμερίζονται (Lee et al. 2007a, Lee et al. 2007b), δημιουργώντας έτσι ένα δίκτυο το οποίο δρα υποστηρικτικά στο δίκτυο της HPMC.

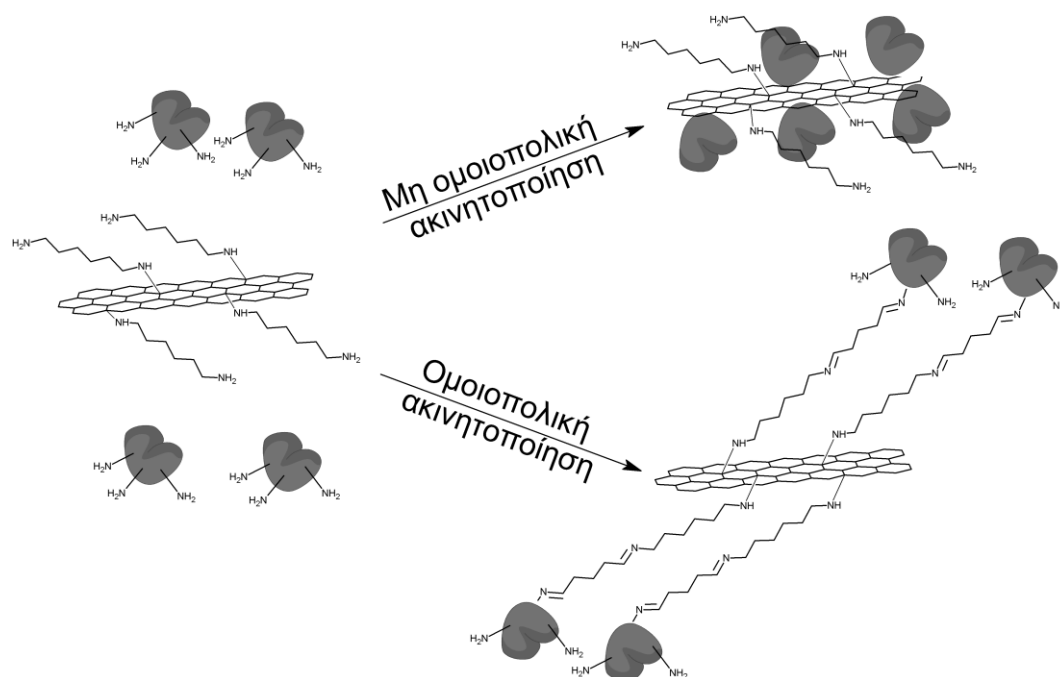
7.5.2 Ακίνητοποίηση υδρολασών σε νανοδομημένα υλικά

Τα πρωτόκολλα που παρατίθενται παρακάτω είναι ενδεικτικά και αναφέρονται στις βέλτιστες συνθήκες. Για τις μελέτες βελτιστοποίησης των συγκεκριμένων πρωτοκόλλων έχουν γίνει παρεκκλίσεις από την τυπική διαδικασία που περιγράφεται εδώ.

Μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση: 5 mg νανοϋλικών διασπείρονται με τη βοήθεια υπερήχων (~ 30 min) σε 9 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (50 mM, pH 7.5). Έπειτα προστίθενται 2 mL πυκνού ενζυμικού διαλύματος, έτσι ώστε να έχουμε την κατάλληλη αναλογία ενζύμου – νανοϋλικού και τελικό όγκο 11 mL. Το μίγμα επιάζεται στους 30 °C για 1 ώρα έτσι

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

Ομοιοπολική ακινητοποίηση: 5 mg νανοϋλικών με ελεύθερες αμινομάδες διασπείρονται με τη βοήθεια υπερήχων (~ 30 min) σε 9 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (50 mM, pH 7.5) που περιέχει 110 μL Tween 20. Έπειτα προστίθεται 4% (v/v) γλουταραλδεΐδης σε τελικό όγκο 11 mL και το μίγμα επωάζεται στους 30 °C για μισή ώρα, έτσι ώστε να σχηματισθούν δεσμοί μεταξύ των αμινομάδων του υλικού και της γλουταραλδεΐδης. Το υλικό φυγοκεντρείται στις 6000 rpm για 30 min και το υπερκείμενο με την περίσσεια γλουταραλδεΐδης και Tween 20 απορρίπτεται. Το υλικό ξεπλένεται με 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος και φυγοκεντρείται στις ίδιες συνθήκες. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και έπειτα προστίθενται 11 mL ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχουν κατάλληλη ποσότητα ενζύμου. Το μίγμα επωάζεται στους 30 °C για μία ώρα ώστε το ένζυμο να ακινητοποιηθεί και έπειτα, για να ανακτηθεί το ακινητοποιημένο ένζυμο, ακολουθείται η διαδικασία που περιγράφηκε για τη μη ομοιοπολική ακινητοποίηση.



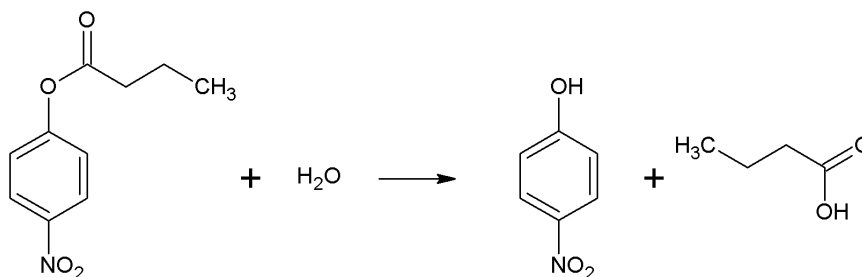
Εικόνα 23: Σχηματική απεικόνιση του μηχανισμού ακινητοποίησης ενζύμων σε τροποποιημένα νανοϋλικά.

Για την κατανόηση του μηχανισμού ακινητοποίησης των ενζύμων στα νανοϋλικά παρατίθεται η εικόνα 23, η οποία παρουσιάζει την ακινητοποίηση ενζύμων σε παράγωγο του οξειδίου του γραφενίου που φέρει ελεύθερες αμινομάδες. Κατά τη μη ομοιοπολική ακινητοποίηση το ένζυμο αλληλεπιδρά με την επιφάνεια του υλικού, ενώ στην ομοιοπολική ακινητοποίηση το ένζυμο προσδένεται στις ελεύθερες αμινομάδες με χρήση γλουταραλδεΐδης.

7.6 Μέθοδοι προσδιορισμού δραστηκότητας ενζύμων

7.6.1 Υδρόλυση βουτυλεστέρα της 4-νιτροφαινόλης

Για τη μελέτη της υδρολυτικής δραστηκότητας λιπασών και εστερασών χρησιμοποιήθηκε το πρωτόκολλο υδρόλυσης του βουτυλεστέρα της 4-νιτροφαινόλης (pNPB). Η αντίδραση παρουσιάζεται στην εικόνα 24.



Εικόνα 24: Αντίδραση υδρόλυσης βουτυλεστέρα της 4-νιτροφαινόλης σε 4-νιτροφαινόλη & βουτυρικό οξύ.

Σε μία τυπική διαδικασία, σε προθερμασμένο σύστημα (30 °C) στο οποίο θα λάβει χώρα η αντίδραση προστίθεται pNPB από πυκνό διάλυμα σε διμεθυλοσουλφοξείδιο (τελική συγκέντρωση 0.5 mM για τις μελέτες μικρογαλακτωμάτων και 1 mM για τις μελέτες των νανοϋλικών). Τέλος προστίθεται το ένζυμο, υπό μορφή υδατικού διαλύματος σε ρυθμιστικό διάλυμα pH 7.5 (50 mM) και το σύστημα αναδεύεται στιγμιαία. Η αντίδραση παρακολουθείται φωτομετρικά. Για τα υδατικά συστήματα η παρακολούθηση γίνεται στα 405 nm, ενώ για τα συστήματα μικρογαλακτωμάτων, λόγω μετατόπισης του μεγίστου απορρόφησης, η παρακολούθηση γίνεται στα 340 nm. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν εις διπλούν.

7.6.2 Εστεροποίηση λιπαρών οξέων με αλκοόλες

Η χρήση μικρογαλακτωμάτων και ακινητοποιημένων ενζύμων καθιστά εφικτή την αντιστροφή της αντίδρασης υδρόλυσης που καταλύουν οι υδρολάσες στο φυσικό περιβάλλον, προς το σχηματισμό εστέρων.

Σε μια τυπική διαδικασία, σε προθερμασμένο σύστημα (30 °C) στο οποίο θα λάβει χώρα η αντίδραση προστίθεται το ένζυμο σε ακινητοποιημένη ή ελεύθερη μορφή. Έπειτα προστίθενται η αλκοόλη και το λιπαρό οξύ σε μοριακό λόγο 2 : 1. Στις μελέτες των μικρογαλακτωμάτων οι ακριβείς συγκεντρώσεις ήταν 0.1 M και 0.05 M αντίστοιχα, ενώ στις υπόλοιπες μελέτες

χρησιμοποιήθηκαν οι διπλάσιες συγκεντρώσεις. Στην αντίδραση προστίθενται 50 mM δεκανίου ως εσωτερικός μάρτυρας. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 30 °C υπό ανάδευση. Γίνεται δειγματοληψία σε τακτά χρονικά διαστήματα και η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με αέριο χρωματογράφο (GC). Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν εις διπλούν.

Για να αναλυθεί μία ένωση στο GC, θα πρέπει στο εύρος των θερμοκρασιών που λειτουργεί να είναι πτητική η ένωση. Τα ιοντικά υγρά που χρησιμοποιήθηκαν έχουν σημείο βρασμού πάνω από 600 °C και για αυτό το λόγο δεν μπορούν να αναλυθούν ως έχουν. Ομοίως, το επιφανειενεργό AOT έχει πολύ υψηλό σημείο βρασμού και δεν μπορεί να αναλυθεί στο GC. Για αυτό το λόγο τα συστήματα που περιέχουν ιοντικά υγρά εκχυλίζονται με ίσο όγκο *n*-εξανίου, ενώ τα συστήματα που περιέχουν AOT εκχυλίζονται με ίσο όγκο ακετονιτριλίου.

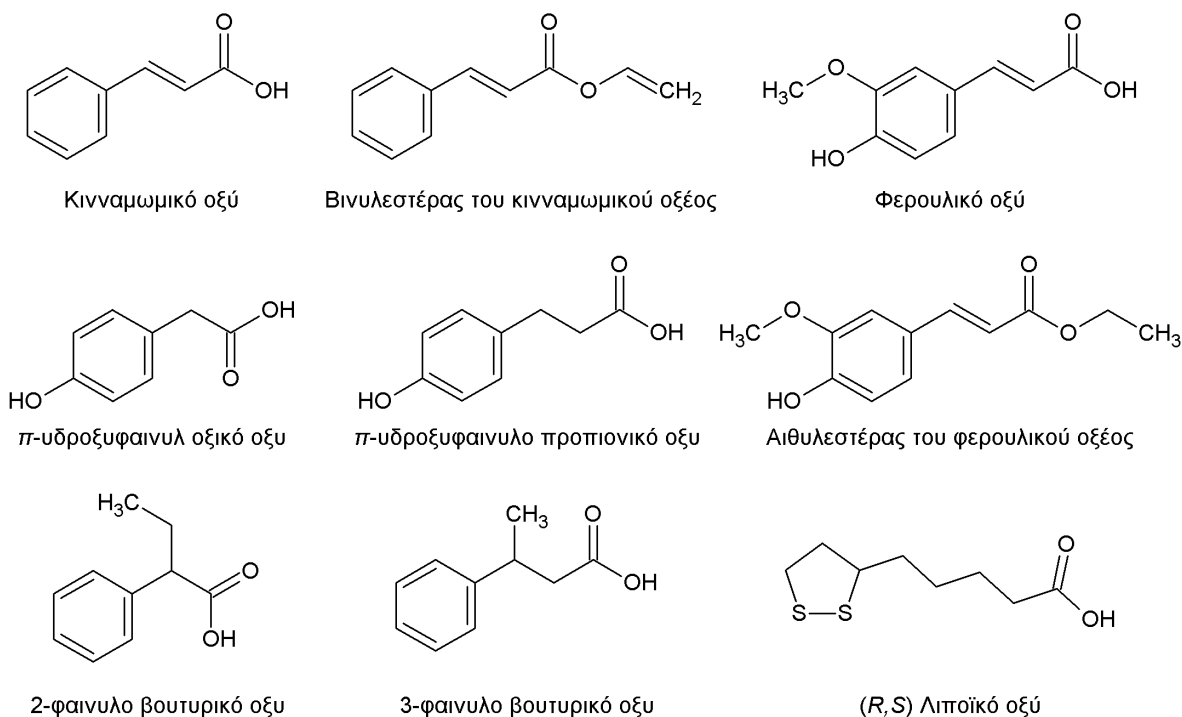
7.6.3 Μετεστεροποίηση βινυλ-οξικού οξέος με την (±)1-φαινυλαιθανόλη

Η ικανότητα μετεστεροποίησης των εστερασών που ακινητοποιήθηκαν σε νανοϋλικά μελετήθηκε στην αντίδραση της (±)1-φαινυλαιθανόλης με βινυλ-οξικό οξύ. Σε φιαλίδιο 2 mL ζυγίζονται 0.5 mg ακινητοποιημένου ενζύμου. Έπειτα προστίθεται 1 mL προθερμασμένου *n*-εξανίου (30 °C) και η διασπορά του ακινητοποιημένου ενζύμου υποβοηθείται από υπερήχους για 30 sec. Έπειτα προστίθενται 0.1 M (±)1-φαινυλαιθανόλης και 0.1 M βινυλ-οξικού οξέος. Στην αντίδραση προστίθενται 50 mM δεκανίου ως εσωτερικός μάρτυρας. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 30 °C υπό ανάδευση. Γίνεται δειγματοληψία σε τακτά χρονικά διαστήματα και η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με αέριο χρωματογράφο (GC). Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν εις διπλούν.

7.6.4 Ενζυμική τροποποίηση βιοδραστικών ενώσεων

Δεδομένου ότι τα μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό είναι ένα νέο μέσο για βιοκαταλυτικές διεργασίες, μελετήθηκε η εφαρμογή τους στην εστεροποίηση βιοδραστικών μορίων. Χρησιμοποιήθηκαν 3 συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό στα οποία οι λιπάσες παρουσιάζουν συνθετική δραστηριότητα και η δραστηριότητα τους συγκρίθηκε με τη δραστηριότητα σε μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο.

Σε μία τυπική διαδικασία, σχηματίστηκαν μικρογαλακτώματα με ρυθμιστικό διάλυμα Tris – HCl pH 7.5 (50 mM) στα οποία εγκλωβίστηκαν 50 µg/mL από τις λιπάσες CalB, Crl, Rml και Tll, ενώ η λιπάση Cvl χρησιμοποιήθηκε σε συγκέντρωση 20 µg/mL. Έπειτα προστέθηκαν τα φαινολικά οξέα (0.05 M) και η 1-προπανόλη (0.1 M) για να ξεκινήσει η αντίδραση. Να σημειωθεί πως για τα μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειενεργό η 1-προπανόλη χρησιμοποιήθηκε ως συστατικό του συστήματος. Η αντίδραση έλαβε χώρα στους 30 °C υπό ανάδευση. Τα βιοδραστικά μόρια που χρησιμοποιήθηκαν παρουσιάζονται στην εικόνα 25.



Εικόνα 25: Βιοδραστικές ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Σε τακτά χρονικά διαστήματα γίνεται δειγματοληψία 50μL τα οποία αραιώνονται με 250 μL μεθανόλης. Το μείγμα φιλτράρεται από φίλτρο 0.45 μm νάιλον μεμβράνης (Nylaflo™, Pall) και αναλύεται με HPLC. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν εις διπλούν. Στην περίπτωση των μικρογαλακτωμάτων χωρίς επιφανειοενεργό γίνεται δειγματοληψία 300 μL τα οποία φιλτράρονται ως έχουν. Η αντίδραση παρακολουθείται στα 325 nm για το (*R,S*) λιπικό οξύ, το φερουλικό οξύ και τα παράγωγα του, στα 220 nm τα φαινολικά οξέα και στα 280 nm τα *π*-υδροξυφαινολικά οξέα.

7.6.5 Αλκοόλυση τριλαυρίνης από μεθανόλη

Δεδομένου ότι οι ακινητοποιημένες λιπάσες που παρήχθησαν στην παρούσα διατριβή παρουσίασαν σημαντική δραστηριότητα και σταθερότητα, μελετήθηκε η εφαρμογή τους στην παραγωγή βιοντήζελ. Η παραγωγή βιοντήζελ αποτελεί μία σημαντική εφαρμογή των ακινητοποιημένων λιπασών, καθώς είναι μία περιβαλλοντικά φιλική διεργασία, σε σχέση με τη χημική μέθοδο παρασκευής βιοντήζελ (Robles-Medina et al. 2009, Tan et al. 2010). Η βιοκαταλυτική παραγωγή βιοντήζελ βασίζεται στην εστεροποίηση λιπαρών οξέων ή τη αλκοόλυση τριγλυκεριδίων ώστε να παραχθούν μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων, το κύριο συστατικό του βιοντήζελ. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε ως πρότυπη αντίδραση παραγωγής βιοντήζελ η αλκοόλυση της τριλαυρίνης από τη μεθανόλη.

Λιπάσες ακινητοποιημένες σε νανοϊκικά (0.5 μg) και σε οργανοπηκτώματα ιοντικού υγρού (100 mg) προστέθηκαν σε 1 mL *n*-εξανίου, το οποίο περιείχε 33.3 M τριλαυρίνης, και 0.3 M μεθανόλης. Χρησιμοποιήθηκαν 50 mM δεκανίου ως εσωτερικός μάρτυρας. Η αντίδραση

λαμβάνει χώρα στους 50 °C υπό ανάδευση. Γίνεται δειγματοληψία σε τακτά χρονικά διαστήματα, το δείγμα αραιώνεται 1:1 με *n*-εξάνιο και η πορεία της αντίδρασης παρακολουθείται με αέριο χρωματογράφο. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν εις διπλούν.

7.6.6 Χημειοενζυμική οξειδωση πολυαρωματικών υδρογονανθράκων

Οι πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες είναι ενώσεις που βρίσκονται στα πετροχημικά και παρουσιάζουν αυξημένη τοξικότητα, λόγω της υψηλής υδροφοβικότητάς τους. Το πρώτο βήμα για τη βιοαποικοδόμηση τους είναι η οξειδωση τους (Gan et al. 2009, Haritash and Kaushik 2009). Οι λιπάσες μπορούν να καταλύσουν την οξειδωση χημικών ενώσεων μέσω μίας χημειοενζυμικής διεργασίας (Warwel and Klaas 1995). Αρχικά οι λιπάσες οξειδώνουν ένα ακόρεστο λιπαρό οξύ με τη βοήθεια ενός οξειδωτικού φορέα. Σε επόμενο βήμα το υπεροξειδίο του λιπαρού οξέος μπορεί να προσβάλει κάποια άλλη χημική ένωση και να την οξειδώσει. Η παρουσία ενδιάμεσων σταδίων αυξάνει τη δυσκολία κατάλυσης της αντίδρασης.

Σε 0.5 mL εκχυλίσματος των πολυαρωματικών υδρογονανθράκων που έχει επαναδιαλυτοποιηθεί σε *n*-εξάνιο (παράγραφος 7.11.2) προστίθενται 5 mg Novozyme 435 (ακίνητοποιημένη CalB), 0.1 mmol καπρυλικού οξέος και 0.11 mmol συμπλόκου ουρίας-H₂O₂ ως οξειδωτικός φορέας. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 30 °C για 14 μέρες. Σε τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνεται δείγμα και αναλύεται με αέρια χρωματογραφία.

Η αντίδραση μελετήθηκε και με πρότυπες πολυαρωματικές ενώσεις, όπως το ναφθαλένιο και το ανθρακένιο. Σε 0.5 mL *n*-εξανίου προστίθενται 5 mg Novozyme 435 (ακίνητοποιημένη CalB), 25 μmol της πρότυπης πολυαρωματικής ένωσης, 0.1 mmol καπρυλικού οξέος και 0.11 mmol συμπλόκου ουρίας-H₂O₂. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 30 °C για 4 μέρες. Ως εσωτερικός μάρτυρας χρησιμοποιήθηκαν 5 μmol δεκανίου. Σε τακτά χρονικά διαστήματα λαμβάνεται δείγμα και αναλύεται με αέρια χρωματογραφία.

Σκοπός ήταν να επιβεβαιωθεί η ικανότητα κατάλυσης της συγκεκριμένης αντίδρασης από ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο εμπορικό σκεύασμα της CalB το οποίο είναι ικανό να καταλύει παρόμοιες αντιδράσεις χημειοενζυμικής εποξειδωσης (Tziolla et al. 2010) ώστε έπειτα να χρησιμοποιηθούν οι ακίνητοποιημένες λιπάσες που παρασκευάστηκαν στην παρούσα διατριβή. Το εμπορικό σκεύασμα δεν παρουσίασε δραστηριότητα και για αυτό δεν παρατίθενται δεδομένα στο κεφάλαιο των αποτελεσμάτων. Δεδομένα για την εκχύλιση και τις δοκιμές παρατίθενται στο παράρτημα I.

7.7 Μέθοδοι προσδιορισμού θερμοσταθερότητας ενζύμων

7.7.1 Προσδιορισμός σταθερότητας λιπασών σε υδατικά συστήματα

Η σταθερότητα των λιπασών σε διάφορα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο μελετήθηκε ακολουθώντας την αντίδραση υδρόλυσης του pNPB, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 7.6.1.

Σε μία τυπική διαδικασία, ρυθμιστικό διάλυμα Tris – HCl pH 7.5 (25 mM) προεπιβάλλεται στη θερμοκρασία που θα μελετηθεί η σταθερότητα και έπειτα προστίθεται το ένζυμο υπό μορφή υδατικού διαλύματος. Οι τελικές συγκεντρώσεις των ενζύμων είναι 13 µg/mL για τη Crl, 10 µg/mL για τη Tll, 6.6 µg/mL για τη CalB και 1.1 µg/mL για τη Cvl. Σε τακτά χρονικά διαστήματα γίνεται δειγματοληψία 995 µL, αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και έπειτα προστίθενται 5 µL διαλύματος pNPB (0.1 M σε διμεθυλοσουλφοξείδιο), ώστε η τελική συγκέντρωση του υποστρώματος να είναι 0.5 mM. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 30 °C και η παραγωγή 4-νιτροφαινόλης καταγράφεται στα 405 nm. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν εις διπλούν.

7.7.2 Προσδιορισμός σταθερότητας λιπασών σε μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο

Η σταθερότητα των λιπασών σε διάφορα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο μελετήθηκε ακολουθώντας την αντίδραση υδρόλυσης του pNPB, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 7.6.1.

Σε μία τυπική διαδικασία, σχηματίζεται το επιθυμητό σύστημα σύμφωνα με το πρωτόκολλο στην παράγραφο 7.4.1 χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα Tris – HCl pH 7.5 (25 mM), και πριν προστεθεί το ένζυμο, το σύστημα επωάζεται στη θερμοκρασία που θα μελετηθεί η σταθερότητα. Έπειτα προστίθεται το ένζυμο υπό μορφή υδατικού διαλύματος. Οι συγκεντρώσεις των ενζύμων είναι 200µg/mL για Crl και Tll, 50 µg/mL για CalB και Rml και 20 µg/mL για τη Cvl. Σε τακτά χρονικά διαστήματα γίνεται δειγματοληψία 995 µL, αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά και έπειτα προστίθενται 5 µL διαλύματος pNPB (0.1 M σε διμεθυλοσουλφοξείδιο), ώστε η τελική συγκέντρωση του υποστρώματος να είναι 0.5 mM. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 30 °C και η παραγωγή 4-νιτροφαινόλης καταγράφεται στα 340 nm. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν εις διπλούν.

7.7.3 Προσδιορισμός σταθερότητας λιπασών σε μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό

Η σταθερότητα των ενζύμων στα μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό μελετήθηκε ακολουθώντας την αντίδραση υδρόλυσης του pNPB, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 7.6.1.

Σε μία τυπική διαδικασία, σχηματίζεται το επιθυμητό σύστημα σύμφωνα με το πρωτόκολλο (παράγραφος 7.4.2) χρησιμοποιώντας ρυθμιστικό διάλυμα Tris – HCl pH 7.5 (25 mM) και πριν προστεθεί το ένζυμο, το σύστημα επωάζεται στη θερμοκρασία που θα μελετηθεί η σταθερότητα. Έπειτα προστίθεται το ένζυμο υπό μορφή υδατικού διαλύματος. Οι συγκεντρώσεις των ενζύμων κατά την επώαση είναι 200 µg/mL για όλα τα ένζυμα. Σε τακτά χρονικά διαστήματα γίνεται δειγματοληψία 20 µL, αραιώνεται σε 975 µL ρυθμιστικού διαλύματος που έχει επωαστεί σε 30 °C και προστίθενται 5 µL διαλύματος pNPB (0.1 M σε διμεθυλοσουλφοξείδιο), ώστε η τελική συγκέντρωση του υποστρώματος να είναι 0.5 mM. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 30 °C και η παραγωγή 4-νιτροφαινόλης καταγράφεται στα 405 nm. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν εις διπλούν.

7.7.4 Προσδιορισμός σταθερότητας λιπασών ακινητοποιημένων σε οργανοπηκτώματα

Η σταθερότητα των λιπασών που ακινητοποιήθηκαν σε οργανοπηκτώματα μελετήθηκε ακολουθώντας την αντίδραση εστεροποίησης του λαυρικού οξέος (0.1 M) με 1-βουτανόλη (0.2 M), όπως περιγράφεται στην παράγραφο 7.6.2.

Σε μία τυπική διαδικασία, ζυγίζονται 100 mg ακινητοποιημένου ενζύμου και προστίθενται 0.5 mL προεπωασμένου ισοοκτανίου. Το ακινητοποιημένο ένζυμο επωάζεται για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα και έπειτα προστίθενται 0.5 mL ισοοκτανίου που περιέχει τα αντιδρώντα και τον εσωτερικό μάρτυρα στις διπλάσιες συγκεντρώσεις και έχει επωαστεί στους 30 °C. Αν η θερμοκρασία επώασης είναι αυξημένη, πριν προστεθούν τα υποστρώματα, το ένζυμο αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 30 °C υπό ανάδευση. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν εις διπλούν.

Στην περίπτωση της μελέτης της θερμοσταθερότητας σε ιοντικό υγρό, 50 mg ακινητοποιημένου ενζύμου προστίθενται σε 0.5 mL [bmim]PF₆ προθερμασμένου στους 90 °C και το σύστημα επωάζεται για συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα στους 90 °C. Έπειτα, το σύστημα μεταφέρεται σε παγόλουτρο για 2 min, επωάζεται στους 30 °C για 5 λεπτά και προστίθενται τα υποστρώματα και ο μάρτυρας. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 30 °C υπό ανάδευση. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν εις διπλούν.

7.7.5 Προσδιορισμός σταθερότητας υδρολασών παρουσία νανοϋλικών

Η σταθερότητα των υδρολασών σε υδατικό διάλυμα παρουσία νανοϋλικών μελετήθηκε ακολουθώντας την αντίδραση υδρόλυσης του pNPB, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 7.6.1.

Σε μία τυπική διαδικασία, ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.5 (50 mM) στο οποίο έχουν διασπαρθεί τα νανοϋλικά προεπωάζεται στους 60 °C και έπειτα προστίθεται το ένζυμο υπό μορφή υδατικού διαλύματος. Οι τελικές συγκεντρώσεις των ενζύμων είναι 0.5 µg/mL για τις CalA, CalB, Crl και Pfe I, 5.0 µg/mL για τις Gtl και PestE και 15.0 ng/mL για την Bs2. Σε τακτά χρονικά διαστήματα γίνεται δειγματοληψία 990 µL, το δείγμα ψύχεται σε παγόλουτρο για 1 min, και ύστερα αφήνεται σε θερμοκρασία δωματίου για 2 min. Έπειτα προστίθενται 10 µL διαλύματος pNPB (0.1 M σε διμεθυλοσουλφοξείδιο) ώστε η τελική συγκέντρωση του υποστρώματος να είναι 1 mM. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα στους 30 °C και η παραγωγή 4-νιτροφαινόλης καταγράφεται στα 405 nm. Όλα τα πειράματα διεξήχθησαν εις διπλούν.

7.7.6 Προσδιορισμός κινητικών σταθερών απενεργοποίησης

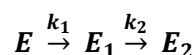
Ο μηχανισμός της διαδικασίας απενεργοποίησης των ενζύμων είναι μείζονος σημασία για την κατανόηση και την περαιτέρω βελτίωση της καταλυτικής συμπεριφοράς των ενζύμων. Είθισται να χρησιμοποιείται ένα μοντέλο απενεργοποίησης ενός σταδίου, κατά το οποίο το ένζυμο από την πλήρως ενεργή μορφή (E) μεταβαίνει σε μία πλήρως απενεργοποιημένη μορφή

(1) σε ένα στάδιο, μέσω εκθετικής μείωσης της δραστικότητας του με ταχύτητα k . Η απενεργοποίηση ενός σταδίου περιγράφεται από την εξίσωση 2, όπου A_t η ενεργότητα σε χρόνο t , A_0 η αρχική ενεργότητα, k η σταθερά απενεργοποίησης και t ο χρόνος.

$$E \xrightarrow{k} I \quad A_t = A_0 e^{-kt} \quad (2)$$

Το συγκεκριμένο μοντέλο θεωρεί πως η απενεργοποίηση του ενζύμου δεν επηρεάζεται από το πλήθος των ενζυμικών μορίων σε ενεργή και ανενεργή μορφή, αλλά οφείλεται σε ένα γεγονός το οποίο διαταράσσει την ενεργή διαμόρφωση του ενζύμου και οδηγεί στην πλήρη αποδιάταξη του ενζύμου.

Λαμβάνοντας υπόψη την πολυπλοκότητα του ενζυμικού μορίου, φαίνεται παράδοξο το γεγονός ότι η εξίσωση 2 έχει εφαρμοστεί με επιτυχία στην περιγραφή της κινητικής απενεργοποίησης πολλών ενζύμων. Η σταθεροποίηση και η ενεργοποίηση των ενζύμων σε ορισμένα συστήματα δεν μπορεί να περιγραφεί με το συγκεκριμένο μοντέλο. Είναι λογικό να αναμένεται πως χρειάζονται παραπάνω από ένα γεγονός για την πλήρη απενεργοποίηση του ενζύμου, άρα και περισσότερες από μία ενεργές καταστάσεις. Για αυτό το λόγο έχουν αναπτυχθεί μοντέλα απενεργοποίησης με περισσότερα από ένα στάδια, όπου μεταξύ της αρχικής κατάστασης και του πλήρως απενεργοποιημένου ενζύμου παρεμβάλλονται ενδιάμεσες ενεργές διαμορφώσεις του ενζύμου. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκε το μοντέλο δύο σταδίων (Henley and Sadana 1985), κατά το οποίο το ένζυμο από την πλήρως ενεργή μορφή (E) μεταβαίνει σε μία ενδιάμεση κατάσταση (E_1) με ρυθμό k_1 και από την ενδιάμεση κατάσταση μεταβαίνει στην τελική κατάσταση (E_2) με ρυθμό k_2 . Τα δύο στάδια της απενεργοποίησης περιγράφονται ικανοποιητικά με την κινητική απενεργοποίησης ενός σταδίου, όταν αναλυθούν αυτόνομα. Επειδή όμως δεν μπορεί κάποιος να γνωρίζει εκ των προτέρων την ενεργότητα της ενδιάμεσης κατάστασης το μοντέλο δύο σταδίων περιγράφεται από την εξίσωση 3.



$$a_t = a_2 + \left[1 + \frac{a_1 k_1}{k_2 - k_1} - \frac{a_2 k_2}{k_2 - k_1} \right] e^{-k_1 t} - \left[\frac{a_1 k_1}{k_2 - k_1} - \frac{a_2 k_1}{k_2 - k_1} \right] e^{-k_2 t} \quad (3)$$

Στην παρούσα εξίσωση a_1 και a_2 είναι οι σχετικές ενεργότητες των ενδιάμεσων σταδίων E_1 και E_2 (αντίστοιχα) ως προς την αρχική ενεργότητα της κατάστασης E , ενώ τα k_1 και k_2 είναι οι κινητικές απενεργοποίησης πρώτου σταδίου για τα στάδια $E \rightarrow E_1$ και $E_1 \rightarrow E_2$ αντίστοιχα. Θα πρέπει να σημειωθεί πως το συγκεκριμένο μοντέλο περιγράφει και την απενεργοποίηση ενός σταδίου, αν το δεύτερο στάδιο δεν ληφθεί υπόψη (ορίζονται τα a_1, a_2 και k_2 ίσα με μηδέν).

Τα πειραματικά αποτελέσματα αρχικά επεξεργάστηκαν και με τα δύο μοντέλα. Οι εξισώσεις εισήχθησαν στο λογισμικό Origin 7.0 (Origin Lab) και χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος μη γραμμικής παλινδρόμησης Levenberg - Marquadt για να προσαρμοστεί η εξίσωση στα πειραματικά δεδομένα. Καθώς η προσαρμογή στα πειραματικά αποτελέσματα ήταν καλύτερη

για το μοντέλο απενεργοποίησης δύο σταδίων, αυτό το μοντέλο χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των αποτελεσμάτων. Η μέθοδος Newton – Raphson χρησιμοποιήθηκε για να υπολογιστεί ο χρόνος ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$) από την εξίσωση απενεργοποίησης δύο σταδίων, χρησιμοποιώντας τις τιμές των παραμέτρων που υπολογίστηκαν από τα πειραματικά αποτελέσματα.

7.8 Αναλυτικές μέθοδοι

7.8.1 Αέριος χρωματογραφία (GC)

Ο αέριος χρωματογράφος (GC) που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό των λιπαρών οξέων, των εστέρων τους αλλά και των κλασμάτων πετρελαιοειδών ήταν της εταιρείας Shimadzu (μοντέλο 17A), εφοδιασμένος με τις στήλες β-DEx 120 (30m x 0.25mm I.D., 0.25 μm) και SBP5 (30m x 0.32mm I.D., 1.0μm) της Supelco, και με ανιχνευτή ιονισμού φλόγας (FID). Ως φέρον αέριο χρησιμοποιήθηκε ήλιο καθαρότητας 99.999%. Σε όλες τις μεθόδους η ροή της στήλης ορίστηκε 1 mL/min, η θερμοκρασία συστήματος έγχυσης 250 °C και η θερμοκρασία του ανιχνευτή 300 °C. Ακολούθως παρατίθενται το θερμοκρασιακό πρόγραμμα για κάθε μέθοδο ανάλυσης:

Στήλη βDEX:

- Ανάλυση λιπαρών οξέων και εστέρων: Η αρχική θερμοκρασία της στήλης ορίζεται 140 °C για 3 min και έπειτα με ρυθμό 30 °C/min αυξανόταν στους 220 °C όπου και παρέμενε για 10 min.

Στήλη SBP5:

- Ανάλυση λιπαρών οξέων και εστέρων: Η αρχική θερμοκρασία της στήλης ορίζεται 120 °C για 3 min και έπειτα με ρυθμό 10 °C/min αυξανόταν στους 220 °C όπου και παρέμενε για 10 min.
- Ανάλυση τριλαυρίνης και προϊόντων: Η αρχική θερμοκρασία της στήλης ορίζεται 120 °C για 10 min και έπειτα με ρυθμό 30 °C/min αυξανόταν στους 300 °C όπου και παρέμενε για 10 min.
- Ανάλυση (±)1-φαινυλαιθανόλης και παραγώγων: Η θερμοκρασία της στήλης ορίζεται 80 °C όπου και παραμένει για 15 min.
- Ανάλυση κλασμάτων πετρελαίου: Η αρχική θερμοκρασία της στήλης ορίζεται 50 °C για 2 min και έπειτα με ρυθμό 5 °C/min αυξανόταν στους 280 °C όπου και παρέμενε για 10 min.

Θα πρέπει να σημειωθεί πως όταν η ανάλυση γίνεται στη στήλη SBP5 γίνεται αραίωση του δείγματος 3 : 1 με το διαλύτη της αντίδρασης, εκτός της ανάλυσης κλασμάτων πετρελαίου. Επίσης, όταν χρησιμοποιούνται νανοϋλικά στο διάλυμα αντίδρασης, το δείγμα που θα εισαχθεί στον αέριο χρωματογράφο πρέπει πρώτα να φυγοκεντρηθεί (12000 rpm για 2 min) ώστε να αποφευχθεί η εισαγωγή νανοϋλικών στη στήλη.

7.8.2 Υγρή χρωματογραφία υψηλής πίεσης (HPLC)

Η συσκευή υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (HPLC) που χρησιμοποιήθηκε ήταν της εταιρείας Shimadju, με ανιχνευτή παράταξης φωτοδιόδων και στήλη ανάστροφης φάσης μ-Bondapak C18 (0.3m x 3.9mm, 10 μm) της εταιρείας Waters. Οι μέθοδοι ανάλυσης που χρησιμοποιήθηκαν ήταν ισοκρατικές, με ροή στήλης 1 mL/min και θερμοκρασία στήλης 27 °C.

- Ανάλυση φαινολικών οξέων και παραγώγων: Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός και η έκλουση από τη στήλη γίνεται με χρήση μείγματος 50 % ακετονιτριλίου και 50% νερό που περιέχει 0.1 % οξικό οξύ. Η πίεση που αναπτύσσεται στην HPLC είναι 65 - 70 Bar.
- Ανάλυση κινναμωμικού οξέος, λιποϊκού οξέος και παραγώγων: Ο χρωματογραφικός διαχωρισμός και η έκλουση από τη στήλη γίνεται με χρήση μείγματος 70 % ακετονιτριλίου και 30% νερό που περιέχει 0.1 % οξικό οξύ. Η πίεση που αναπτύσσεται στην HPLC είναι 50 - 54 Bar.

7.9 Μέθοδοι μελέτης της δομής ενζύμων

7.9.1 Φασματοσκοπία φθορισμού

Τα φάσματα φθορισμού λήφθηκαν σε φασματοφθορισμόμετρο RF-5301PC (Shimadju). Τα ενζυμικά διαλύματα συγκέντρωσης 25 – 225 μg/mL¹⁷ προετοιμάστηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.5 (50 mM) που περιείχε τα νανοδομημένα υλικά και είχε προεπωαστεί στους 30 °C. Το ενζυμικό διάλυμα μεταφέρεται σε κυψελίδα χαλαζία με μήκος διαδρομής 1 cm, διεγείρεται στα 295 nm και καταγράφεται το φάσμα σε εύρος 300 έως 400 nm, χρησιμοποιώντας διάφραγμα (slit) μήκους κύματος διέγερσης και εκπομπής ίσο με 5 nm. Επίσης το φάσμα καταγράφηκε ύστερα από διέγερση στα 280 nm, χρησιμοποιώντας διάφραγμα διέγερσης 3 nm και διάφραγμα εκπομπής 5 nm. Για κάθε σύστημα που μελετήθηκε λήφθηκε ξεχωριστό φάσμα αναφοράς το οποίο αφαιρέθηκε από το φάσμα της πρωτεΐνης. Για τη μελέτη των φασμάτων φθορισμού ύστερα από επώαση στους 60 °C, ακολουθείται η διαδικασία της παραγράφου 7.7.5 και επωάζονται για χρονικά διαστήματα ανάλογα με τη σταθερότητα του κάθε ενζύμου. Τα δείγματα ψύχονται για 1 λεπτό σε παγόλουτρο και έπειτα αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου πριν καταγραφεί το φάσμα φθορισμού τους. Τα αποτελέσματα είναι μέσες τιμές από τουλάχιστον δύο μετρήσεις.

Η αλληλεπίδραση των νανοϋλικών με τα ένζυμα οδηγεί σε φαινόμενα απόσβεσης φθορισμού. Η εξίσωση Stern – Volmer (εξίσωση 4) συσχετίζει την απόσβεση φθορισμού με τη συγκέντρωση του αποσβέστη:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{SV} \cdot [Q] \quad (4)$$

¹⁷ CalA: 225 μg/mL, CalB: 25 μg/mL, CrI: 225μg/mL, Bs2: 75 μg/mL, Pfe I: 100μg/mL. Οι συγκεντρώσεις επιλέχθηκαν σύμφωνα με την ένταση φθορισμού που παρουσίαζαν τα συγκεκριμένα ένζυμα.

όπου F_0 και F είναι η αρχική και η τελική ένταση φθορισμού αντίστοιχα, $[Q]$ είναι η μοριακή συγκέντρωση του αποσβέστη και K_{SV} η σταθερά Stern – Volmer (Stern and Volmer 1919). Καθώς τα νανοδομημένα υλικά παρουσιάζουν ένα εύρος στο μοριακό βάρος τους, η συγκέντρωσή τους υπολογίστηκε ως $\mu\text{g/mL}$. Η μετατροπή αυτή έχει χρησιμοποιηθεί στη βιβλιογραφία (Mu et al. 2008) και λόγω του ότι η σταθερά Stern – Volmer δεν υπολογίζεται σωστά, καλείται ψευδο-σταθερά Stern – Volmer.

7.9.2 Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού (CD)

Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού λήφθηκαν σε δύο φασματοπολωσίμετρα τύπου Jasco J-815 που στεγάζονται στο εργαστήριο Βιοχημείας και Βιοφυσικής του Τμήματος Τεχνολογίας Γεωπονίας του Τ.Ε.Ι. Ηπείρου και στο εργαστήριο Βιολογικής Χημείας της Ιατρικής Σχολής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Και τα δύο φασματοπολωσίμετρα είναι εξοπλισμένα με σύστημα Peltier για ρύθμιση της θερμοκρασίας κατά τη διάρκεια της λήψης φασμάτων.

7.9.2.1 Λήψη φασμάτων σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων

Για τα φάσματα λιπασών σε υδατικό σύστημα χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα χαλαζία με μήκος διαδρομής 1.0 cm, ενώ για τα συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα με μήκος διαδρομής 0.1 cm. Τα φάσματα λήφθηκαν σε θερμοκρασία 25 °C, με ταχύτητα σάρωσης 10 nm/min και εύρος μήκους κύματος (bandwidth) 2 nm. Για κάθε σύστημα που μελετήθηκε λήφθηκε ξεχωριστό φάσμα αναφοράς το οποίο αφαιρέθηκε από το φάσμα της πρωτεΐνης. Η συγκέντρωση των λιπασών στα συγκεκριμένα συστήματα ήταν από 1.3 $\mu\text{g/mL}$ έως 46.2 $\mu\text{g/mL}$, ενώ το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν Tris-HCl pH 7.5 (25 mM). Σε κάθε περίπτωση η απορρόφηση των δειγμάτων δεν ξεπέρασε τις 1.5 μονάδες. Τα αποτελέσματα είναι μέσες τιμές από τουλάχιστον δύο μετρήσεις.

7.9.2.2 Λήψη φασμάτων σε υδατικά συστήματα παρουσία νανοϋλικών

Για τα φάσματα λιπασών σε υδατικό σύστημα χρησιμοποιήθηκε κυψελίδα χαλαζία με μήκος διαδρομής 1.0 cm. Τα φάσματα λήφθηκαν με ταχύτητα σάρωσης 50 nm/min (2 σαρώσεις), ώστε να μην υπάρχει κατακρήμνιση των νανοϋλικών στη διάρκεια τη μέτρησης. Η θερμοκρασία ρυθμίστηκε στους 30 °C και το εύρος μήκους κύματος (bandwidth) στα 2 nm. Για κάθε συγκέντρωση νανοϋλικού που μελετήθηκε λήφθηκε ξεχωριστό φάσμα αναφοράς το οποίο αφαιρέθηκε από το φάσμα της πρωτεΐνης. Η συγκέντρωση των λιπασών στα συγκεκριμένα συστήματα ήταν από 4 $\mu\text{g/mL}$ έως 10 $\mu\text{g/mL}$, ενώ το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.5 (0.5 mM). Σε κάθε περίπτωση η απορρόφηση των δειγμάτων δεν ξεπέρασε τις 1.5 μονάδες. Τα αποτελέσματα είναι μέσες τιμές από τουλάχιστον δύο μετρήσεις.

7.9.2.3 Υπολογισμός στοιχείων δευτεροταγούς δομής με τη χρήση αλγορίθμων

Το φασματοπολωσίμετρο εξάγει τα δεδομένα των φασμάτων σε μονάδες ελλειπτικότητας (mdeg) ανά μήκος κύματος (nm). Για την κανονικοποίηση των φασμάτων είναι απαραίτητο να ληφθεί υπόψη η συγκέντρωση του ενζύμου και το μήκος της διαδρομής. Η μετατροπή των δεδομένων κυκλικού διχρωισμού σε μέση μοριακή ελλειπτικότητα ανά αμινοξύ γίνεται σύμφωνα με την εξίσωση 5:

$$MME = \frac{100 \cdot CD}{l \cdot c \cdot n} \quad (5)$$

Όπου:

❖ MME	Μέση μοριακή ελλειπτικότητα ανά αμινοξύ (deg cm ² dmol ⁻¹)
❖ CD	Κυκλικός διχρωισμός, ελλειπτικότητα (deg)
❖ l	Μήκος οπτικής διαδρομής (cm)
❖ c	Μοριακή συγκέντρωση πρωτεΐνης (M ή αλλιώς mol dm ⁻³)
❖ n	Αριθμός αμινοξικών καταλοίπων πρωτεΐνης

Τα δεδομένα της μέσης μοριακής ελλειπτικότητας μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό των στοιχείων δευτεροταγούς δομής μίας πρωτεΐνης μέσω της χρήσης αλγορίθμων που έχουν αναπτυχθεί για αυτό το σκοπό. Ο υπολογισμός γίνεται μέσω του λογισμικού DichroProt (Deleage and Geourjon 1993) που ουσιαστικά αποτελεί ένα πακέτο των περισσότερο συχνά χρησιμοποιούμενων αλγορίθμων. Για τις μελέτες που παρουσιάζονται στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν ο αλγόριθμος SELCON 2 (Sreerama and Woody 1993) με τη βάση δεδομένων αναφοράς των Kabsch και Sander (Kabsch and Sander 1983), καθώς και το νευρωνικό δίκτυο K2D (Andrade et al. 1993). Οι συγκεκριμένοι αλγόριθμοι επιλέχθηκαν ύστερα από χρήση όλων των αλγορίθμων στα φάσματα των υδρολασών σε νερό και τη σύγκριση των αποτελεσμάτων που εξάγουν με τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα.

7.9.3 Φασματοσκοπία υπερύθρου (FTIR)

Τα φάσματα υπερύθρου λήφθηκαν σε φασματοφωτόμετρο υπερύθρου Perkin - Elmer Spectrum GX που στεγάζεται στο εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Το συγκεκριμένο φασματοφωτόμετρο FTIR είναι εξοπλισμένο με ανιχνευτή δευτεριωμένης θειικής τριγλυκίνης, ενώ δέχεται υποδοχή για κρύσταλλο ψευδαργύρου – σεληνίου για μέτρηση υγρών δειγμάτων με την τεχνική εξασθένησης ολικής ανάκλασης (ATR).

7.9.3.1 Λήψη φασμάτων υπερύθρου υγρών δειγμάτων

Για τη μελέτη της πρωτεϊνικής δομής με την τεχνική της φασματοσκοπίας υπερύθρου είναι απαραίτητη αυξημένη συγκέντρωση πρωτεΐνης. Για τη λήψη των συγκεκριμένων φασμάτων χρησιμοποιήθηκαν ενζυμικά συστήματα με περιεκτικότητα ενζύμου 1.5 mg/mL, ενώ το

ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν Tris-HCl pH 7.5 (25 mM). Το διάλυμα τοποθετείται στον κρύσταλλο του ATR έτσι ώστε να καλύψει όλη την επιφάνεια του. Τα φάσματα των συστημάτων μικρογαλακτωμάτων μετρήθηκαν σε εύρος 4000 – 700 cm^{-1} σε θερμοκρασία δωματίου. Κάθε φάσμα προκύπτει από τη μέση τιμή 32 σαρώσεων του φάσματος με ανάλυση 2 cm^{-1} . Για κάθε σύστημα που μελετήθηκε λήφθηκε ξεχωριστό φάσμα αναφοράς το οποίο αφαιρέθηκε από το φάσμα της πρωτεΐνης. Η σωστή αφαίρεση του φάσματος αναφοράς ελέγχεται από την ύπαρξη μίας επίπεδης γραμμής αναφοράς στην περιοχή 2200-1800 cm^{-1} . Σε κάθε περίπτωση η απορρόφηση των δειγμάτων δεν ξεπέρασε τις 1.5 μονάδες.

7.9.3.2 Λήψη φασμάτων υπερύθρου στερεών δειγμάτων

Η φασματοσκοπία υπερύθρου παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι καθιστά εφικτή τη μελέτη της δομής σε στερεά δείγματα. Τα δείγματα που μελετήθηκαν με αυτή την τεχνική περιλαμβάνουν λυοφυλιωμένα και ακινητοποιημένα ένζυμα, καθώς και τους φορείς ακινητοποίησης. Τα στερεά δείγματα προετοιμάζονται ως δισκία KBr. Ποσότητα KBr αφήνεται για 24 ώρες στους 100 °C ώστε να εξατμιστεί η υγρασία, καθώς το άλας είναι υγροσκοπικό. Έπειτα ζυγίζονται περίπου 200 mg του άλατος μαζί με 1 - 5 mg του δείγματος και το μείγμα λειοτριβείται σε ένα γουδί από αχάτη. Το μείγμα εισάγεται σε ειδική θήκη και με τη βοήθεια υδραυλικής πρέσας ασκείται πίεση 7000 kg/cm^2 για 10 sec ώστε να σχηματιστεί το δισκίο (εικόνα 26). Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία πως η διαδικασία παρασκευής των δισκίων δεν επηρεάζει τη δομή της πρωτεΐνης (Prestrelski et al. 1993).



Εικόνα 26: Δισκία KBr που παρασκευάζονται για τη μελέτη δειγμάτων με φασματοσκοπία υπερύθρου.

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

7.9.3.3 Υπολογισμός στοιχείων δευτεροταγούς δομής με ανάλυση αμιδικών κορυφών

Το φάσμα της πρωτεΐνης μετά από την αφαίρεση του φάσματος αναφοράς θα πρέπει να παρουσιάζει τις χαρακτηριστικές αμιδικές κορυφές. Οι αμιδικές περιοχές I (1700-1600 cm^{-1}) και III (1200-1350 cm^{-1}) απομονώνονται από το φάσμα και εισάγονται στο λογισμικό Origin 7.0

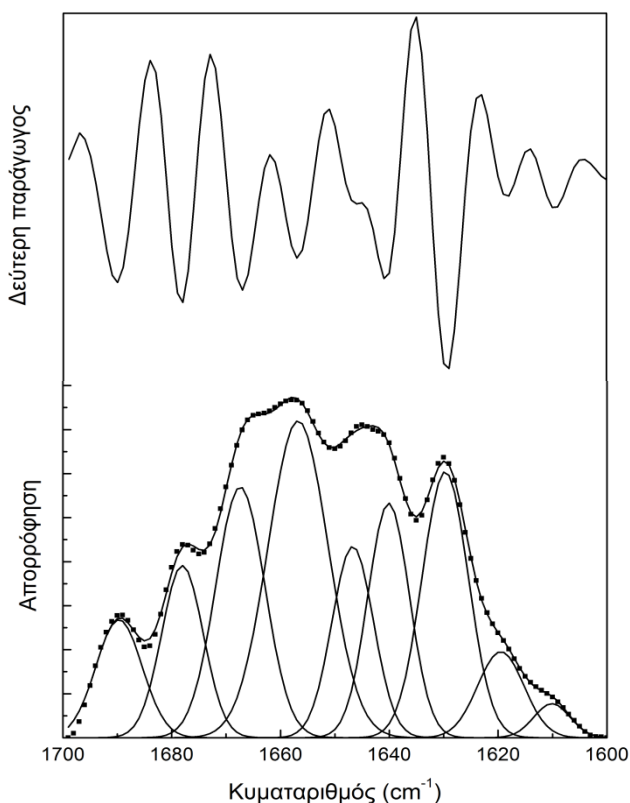
(OriginLab). Ο πιθανός θόρυβος των φασμάτων αφαιρείται ύστερα από εξομάλυνση των φασμάτων με το φίλτρο εξομάλυνσης Savitsky-Golay 11 σημείων (Serefoglou et al. 2008), ενώ χρησιμοποιείται γραμμή αναφοράς μεταξύ των ακραίων σημείων ώστε η κορυφή να ευθυγραμμιστεί με τον άξονα των κυματαριθμών.

Σε αυτό το στάδιο μπορεί να ποσοτικοποιηθεί ο βαθμός ομοιότητας των φασμάτων, μέσω του συντελεστή συσχέτισης r (Prestrelski et al. 1993, Secundo and Carrea 2005), ο οποίος παρουσιάζεται στην εξίσωση 6:

$$r = \frac{\sum x_i y_i}{\sqrt{\sum x_i^2 \sum y_i^2}} \quad (6)$$

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

Μέσω του λογισμικού Origin 7.0 υπολογίζεται η δεύτερη παράγωγος της αμιδικής κορυφής. Οι αρνητικές κορυφές της δεύτερης παραγώγου προσδιορίζουν τη θέση των κορυφών που συνθέτουν την αμιδική κορυφή (Dong et al. 1990, Susi and Byler 1983). Η κορυφή προς ανάλυση εισάγεται στο λογισμικό WinSpec (LISE – Facultés Universitaires Notre Dame de la Paix, Namur, Belgium). Στο λογισμικό ορίζεται ο αριθμός των κορυφών που αποτελούν την αμιδική κορυφή και η θέση τους σύμφωνα με τα δεδομένα της δεύτερης παραγώγου, καθώς και ότι οι κορυφές ακολουθούν κατανομή Gauss. Το αρχικό πλάτος των κορυφών στο μισό της έντασης τους ορίζεται από 7 έως 16 cm^{-1} ανάλογα με το πλήθος και την απόσταση των κορυφών. Το λογισμικό μέσα από ένα κύκλο βελτίωσης της προσαρμογής των κορυφών στο αρχικό φάσμα καθορίζει τις βέλτιστες τιμές έντασης, θέσης και πλάτους για την κάθε κορυφή. Για την επίτευξη βέλτιστης προσαρμογής οι παράμετροι απελευθερώνονται σταδιακά. Στην εικόνα 27 παρατίθεται μία τέτοια ανάλυση.



Εικόνα 27: Δεύτερη παράγωγος (πάνω) και ανάλυση της αμιδικής κορυφής I (κάτω) της CalB σε υδατικό διάλυμα. Με σημεία συμβολίζονται τα πειραματικά δεδομένα και με γραμμή τα αποτελέσματα της προσαρμογής.

Συγκεκριμένες περιοχές των αμιδικών κορυφών ανάγονται στα στοιχεία δευτεροταγούς δομής. Ο υπολογισμός των στοιχείων δευτεροταγούς δομής γίνεται ύστερα από αναγωγή των κορυφών, σύμφωνα με τη θέση τους, σε στοιχεία δευτεροταγούς δομής. Ο υπολογισμός της δομής του ενζύμου βασίζεται στην ποσοστιαία συνεισφορά της κάθε κορυφής στην αμιδική κορυφή, όσον αφορά την περιοχή.

Η αναγωγή των κορυφών που υπολογίζονται σε στοιχεία δευτεροταγούς δομής γίνεται σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Halverson et al. 1991, Kreilgaard et al. 1999, Natalello et al. 2005) και παρατίθεται στον πίνακα 12. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι στην αμιδική κορυφή I μπορούν να διαχωριστούν οι παράλληλες και οι αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες.

Πίνακας 12: Αναγωγή περιοχών του φάσματος υπερύθρου (cm^{-1}) σε στοιχεία δευτεροταγούς δομής.

Στοιχείο δευτεροταγούς δομής	Αμιδική κορυφή I	Αμιδική κορυφή III
α-Έλικα	1650-1665	1295-1330
β-Πτυχωτές επιφάνειες	Παράλληλες 1620-1640	1220-1250
	Αντιπαράλληλες 1610-1620 & 1685-1695	
β-Στροφές	1665-1685	1270-1295
Τυχαίο σπείραμα	1640-1650	1250-1270

7.10 Μέθοδοι τροποποίησης & χαρακτηρισμού νανοδομημένων υλικών

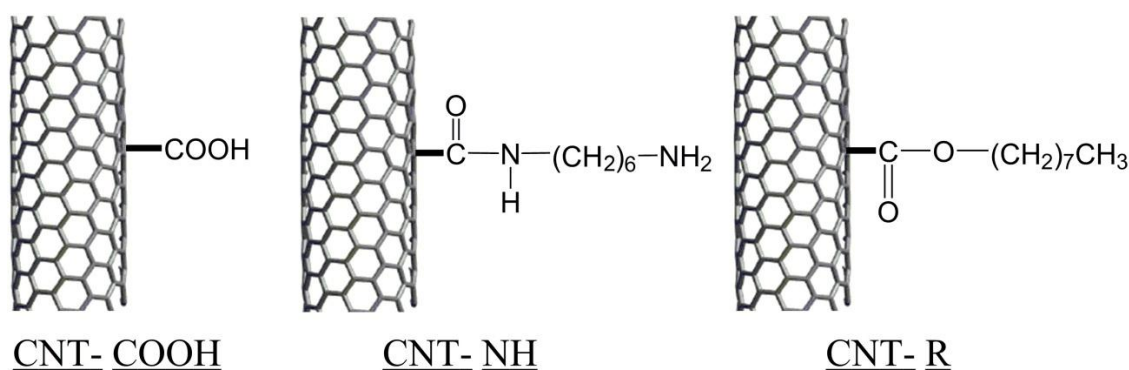
7.10.1 Χημική τροποποίηση νανοδομημένων υλικών

Η χημική τροποποίηση έχει αναπτυχθεί με σκοπό την εισαγωγή λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια των νανοδομημένων υλικών. Όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό μέρος, η επιφάνεια των νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα είναι αρκετά αδρανής καθώς δεν παρουσιάζει συγκεκριμένες ομάδες. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα τα οποία είχαν στην επιφάνεια τους καρβοξυλομάδες, αλκυλομάδες ή αμινομάδες. Η τροποποίηση των νανοδομημένων υλικών έλαβε χώρα στο Εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών του Τμήματος Μηχανικών της Επιστήμης των Υλικών.

7.10.1.1 Τροποποίηση νανοσωλήνων άνθρακα

Η τροποποίηση των νανοσωλήνων άνθρακα έγινε σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Li et al. 2004, Tsoufifis et al. 2008). Εμπορικά διαθέσιμοι νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος (100 mg) διασπείρονται σε 40 mL μείγματος $H_2SO_4 - HNO_3$ (3 : 1, v/v) με τη βοήθεια υπερήχων για 3 h. Το διάλυμα έπειτα φυγοκεντρείται για 30 min στις 3500 rpm και το ίζημα ξεπλένεται 5 φορές με απεσταγμένο νερό. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα στεγνώνεται ολονύκτια σε 50 °C. Το υλικό που παράγεται από αυτή τη διαδικασία έχει στην επιφάνεια του καρβοξυ-, υδροξυ- και εποξυ- ομάδες και συμβολίζεται ως CNT-COOH (εικόνα 28).

Για τη δημιουργία ελεύθερων αμινομάδων στην επιφάνεια των νανοσωλήνων άνθρακα, 50 mg CNT-COOH διασπείρονται με τη βοήθεια υπερήχων (5 min) σε 40 mL μείγματος θειουλοχλωριδίου και *N,N*-διμεθυλοφορμαμίδιου σε αναλογία 20 : 1 (v/v) και το εναιώρημα θερμαίνεται με αναρροή στους 70 °C για 24 ώρες, για την ακυλοχλωρίωση του υλικού. Η αναρροή χρησιμοποιείται ώστε να αποφευχθεί η εξάτμιση του διαλύτη κατά τη διάρκεια της αντίδρασης. Έπειτα οι νανοσωλήνες φυγοκεντρώνονται για 30 min στις 1600rpm, το ίζημα ξεπλένεται τρεις φορές με τολουένιο, και τελικά το δείγμα απλώνεται σε γυάλινη πλάκα και αφήνεται ολονύκτια για ξήρανση υπό κενό στους 50 °C. Την επόμενη μέρα οι ακυλοχλωριωμένοι νανοσωλήνες άνθρακα διασπείρονται σε 50 mL χλωροφόρμιου και το μείγμα παραμένει στο λουτρό υπερήχων για περίπου 50 min. Σε μία δεύτερη σφαιρική φιάλη διαλύονται 100 mg εξαμεθυλοδιαμίνης σε 50 mL χλωροφόρμιου με ανάδευση για περίπου 20 min. Έπειτα αναμειγνύονται τα δύο διαλύματα έτσι ώστε η διαμίνη να χρησιμοποιείται σε περίσσεια ως προς τους νανοσωλήνες. Ακολουθεί θέρμανση στους 80 °C με αναρροή για 3 ημέρες. Το μείγμα φυγοκεντρείται (30 min, 5000 rpm) και το ίζημα ξεπλένεται αρχικά με χλωροφόρμιο και έπειτα με άνυδρο τετραυδροφουράνιο. Το υλικό ξηραίνεται ολονύκτια υπό κενό σε θερμοκρασία δωματίου. Το υλικό που παράγεται παρουσιάζει ελεύθερες αμινομάδες στην επιφάνεια του, οι οποίες αναπτύσσονται πάνω στις καρβοξυλομάδες των CNT-COOH. Το νέο αυτό υλικό συμβολίζεται ως CNT-NH (εικόνα 28).



Εικόνα 28: Τα παράγωγα των νανοσωλήνων άνθρακα που προέκυψαν μετά τη χημική τροποποίηση.

Για την προσθήκη αλκυλομάδων στην επιφάνεια των νανοσωλήνων άνθρακα, 50 mg CNT-COOH διασπείρονται με τη βοήθεια υπερήχων σε 75 mL υδατικού διαλύματος 10 mM NaOH για 2 min. Παράλληλα, σε ένα ποτήρι ζέσεως που περιέχει 1.3 mL εξαδεκυλοβρωμίδιο διαλύονται 85 mg βρωμιούχου τετρα-*n*-οκτυλ αμμωνίου με τη βοήθεια ανάδευσης στους 50 °C. Στη συνέχεια αναμειγνύεται το συγκεκριμένο διάλυμα με το διάλυμα των νανοϋλικών και στο μείγμα που παράγεται πραγματοποιείται θέρμανση στους 80 °C με αναρροή για 4 ώρες. Ύστερα από την επώαση, το διάλυμα αφήνεται να ψυχθεί και οι νανοσωλήνες κατακρημνίζονται. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα επαναδιασπείρεται σε χλωροφόρμιο. Το δείγμα φυγοκεντρείται στις 5000 rpm για 30 min και το ίζημα ξεπλένεται με αιθανόλη. Οι νανοσωλήνες ξηραίνονται ολονύκτια υπό κενό σε 50 °C. Το υλικό που παράγεται έχει αλκυλομάδες στη θέση των καρβοξυλομάδων των CNT-COOH. Το νέο αυτό υλικό συμβολίζεται ως CNT-R (εικόνα 28).

Στο παράρτημα II παρατίθενται αναλυτικό σχεδιάγραμμα που περιγράφει τη χημική τροποποίηση των νανοσωλήνων άνθρακα, παρουσιάζοντας τα ενδιάμεσα στάδια και τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν.

7.10.1.2 Τροποποίηση γραφίτη

Η τροποποίηση του γραφίτη έγινε σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Bourlinos et al. 2003, Dékány et al. 1998). 10 g εμπορικά διαθέσιμου γραφίτη διασπείρονται σε 600 mL μείγματος $\text{H}_2\text{SO}_4 - \text{HNO}_3$ (2 : 1, v/v) με τη βοήθεια υπερήχων ενώ σταδιακά προστίθενται 200 g KClO_3 . Το διάλυμα έπειτα αφήνεται υπό ανάδευση για 18 h φυγοκεντρείται για 30 min στις 3500 rpm και το ίζημα ξεπλένεται 5 φορές με απεσταγμένο νερό. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το ίζημα στεγνώνεται ολονύκτια σε 50 °C. Το υλικό που παράγεται από αυτή τη διαδικασία έχει στην επιφάνεια του καρβοξυ-, υδροξυ- και εποξυ- ομάδες και συμβολίζεται ως Gr-COOH. Θα πρέπει να σημειωθεί πως κατά τη διαδικασία αυτή παρατηρείται αποφυλοποίηση του γραφίτη και για αυτό το παραγόμενο υλικό συναντάται στη βιβλιογραφία και ως οξειδίο του γραφενίου.

Για τη δημιουργία ελεύθερων αμινομάδων στην επιφάνεια του οξειδίου του γραφενίου, 50 mg Gr-COOH διασπείρονται σε 50 mL απεσταγμένου νερού. Παράλληλα, σε κωνική φιάλη διαλυτοποιούνται 150 mg εξαμεθυλοδιαμίνης σε 25 mL αιθανόλης. Τα δύο αυτά διαλύματα αναμειγνύονται και επωάζονται για 20 h σε θερμοκρασία δωματίου υπό ανάδευση. Έπειτα το διάλυμα φυγοκεντρείται (3500 rpm, 30 min) και το ίζημα ξεπλένεται δύο φορές με διάλυμα 1:1 (v/v) νερού – αιθανόλης. Το υλικό ξηραίνεται ολονύκτια υπό κενό σε θερμοκρασία δωματίου. Το υλικό που παράγεται παρουσιάζει ελεύθερες αμινομάδες στην επιφάνεια του, όπως αυτές στο υλικό CNT-NH, οι οποίες όμως αναπτύσσονται πάνω στις εποξυ-ομάδες του Gr-COOH. Το νέο αυτό υλικό συμβολίζεται ως Gr-NH.

7.10.2 Χαρακτηρισμός νανοδομημένων υλικών

7.10.2.1 Φασματοσκοπία υπερέθρου (FTIR)

Ο χαρακτηρισμός των νανοδομημένων υλικών με την τεχνική της φασματοσκοπίας υπερέθρου έγινε σύμφωνα με την παράγραφο 7.9.3.2.

7.10.2.2 Φασματοσκοπία Raman

Τα φάσματα Raman λήφθηκαν σε ένα Micro-Raman σύστημα RM 1000 RENISHAW, το οποίο στεγάζεται στο Εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών του Τμήματος Μηχανικών της Επιστήμης των Υλικών. Η διέγερση του υλικού γίνεται από πηγή laser στα 532 nm (Nd-YAG) ενώ το φάσμα καταγράφεται στο εύρος 2400-1000 cm^{-1} . Κατά τη λήψη του φάσματος χρησιμοποιήθηκε ισχύς 0.5 έως 1 mW με σημείο εστίασης 1 μm για να αποφευχθεί η φωτοαποσύνθεση των δειγμάτων.

7.10.2.3 Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS)

Η λήψη των φασμάτων XPS πραγματοποιήθηκε στο Ινστιτούτο Προηγμένων Υλικών του Πανεπιστημίου του Groningen στην Ολλανδία με ένα φωτοηλεκτρονικό φασματοφωτόμετρο SSX-110 (Surface Science Instruments) εφοδιασμένο με σύστημα μονοχρωμάτορα ακτίνων X A1 K ($h\nu = 1486.6$ eV). Η πίεση στο θάλαμο μέτρησης ήταν 10^{-10} Torr και η ανάλυση ορίστηκε στα 1.16 eV για να μειωθεί ο χρόνος της μέτρησης. Η γωνία της αφετηρίας των φωτοηλεκτρονίων ορίστηκε στις 37° και ένα πιστόλι ροής ηλεκτρονίων χρησιμοποιήθηκε για να αντισταθμίσει τη φόρτιση του δείγματος. Φιλμ χρυσού σε γυάλινη επιφάνεια χρησιμοποιήθηκαν ως υπόστρωμα για τα δείγματα. Τα νανοϋλικά που μελετήθηκαν διαλύθηκαν σε *n*-εξάνιο με τη βοήθεια υπερήχων και μία σταγόνα της διασποράς αυτής εναποτίθεται πάνω στο υπόστρωμα και αφήνεται να εξατμιστεί σε θερμοκρασία δωματίου. Η ανάλυση των φασμάτων και ο διαχωρισμός των κορυφών κατά Gauss έγινε με το λογισμικό WinSpec.

7.11 Ενζυμική αποκατάσταση ρυπασμένων με πετρελαιοειδή εδαφών

7.11.1 Εκχύλιση

Για την εκχύλιση των πολυαρωματικών υδρογονανθράκων και των πετρελαϊκών υδρογονανθράκων από δείγματα εδαφών χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος εκχύλισης με εφαρμογή υπερήχων 3550B της Αμερικανικής Υπηρεσίας Προστασίας του Περιβάλλοντος (EPA method 3550 1995). Η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιείται για την εκχύλιση μη πτητικών ή ημιπτητικών ενώσεων από στερεά δείγματα.

10 g δείγματος αναμειγνύονται με 5 g άνυδρου Na_2SO_4 σε μία κωνική φιάλη. Στη συνέχεια προστίθενται 50 mL διχλωρομεθανίου και η κωνική φιάλη τοποθετείται σε θερμοστατούμενο λουτρό υπερήχων στους 20°C για 15 min. Το δείγμα φιλτράρεται σε προζυγισμένη σφαιρική φιάλη των 100 mL. Έπειτα το δείγμα επιστρέφει στην κωνική φιάλη με 50 mL διχλωρομεθανίου και ακολουθούν άλλα 15 min υπερήχων στους 20°C . Το δείγμα φιλτράρεται στην ίδια προζυγισμένη φιάλη και ο διαλύτης εξατμίζεται σε περιστροφικό εξατμιστήρα, σε θερμοκρασία δωματίου. Η φιάλη ζυγίζεται μετά την εξάτμιση του διαλύτη για να υπολογιστεί η μάζα των υδρογονανθράκων που απομονώθηκαν.

7.11.2 Καθαρισμός - Κλασματοποίηση

Η κλασματοποίηση του πετρελαίου, όσο και των εκχυλισμάτων από ρυπασμένα δείγματα εδάφους σε αλειφατικούς και αρωματικούς υδρογονάνθρακες έγινε σύμφωνα με τη μέθοδο 3611B της Αμερικανικής Υπηρεσίας Προστασίας του Περιβάλλοντος που χρησιμοποιείται γενικά για τον καθαρισμό και την κλασματοποίηση αποβλήτων πετρελαίου (EPA method 3611B 1995).

10 g άνυδρης αλουμίνας (οξείδιο του αλουμινίου), ύστερα από ολονύχτια επώαση σε 130°C , τοποθετούνται σε χρωματογραφική στήλη διαμέτρου 10 mm και πακτώνονται με 50 mL *n*-εξανίου. Στη συνέχεια τοποθετείται 1 cm άνυδρου Na_2SO_4 για να κατακρατήσει τυχόν υγρασία

του δείγματος. Ποσότητα δείγματος μεταφέρεται στη στήλη με χρήση 2 mL *n*-εξανίου. Για να αποφευχθεί η υπερφόρτωση της στήλης, δε συνίσταται να τοποθετούνται στη στήλη πάνω από 0.3 g οργανικού υλικού. Μόλις το δείγμα περάσει στη στήλη, και πριν να στεγνώσει το άνω άκρο της στήλης, προστίθενται άλλα 13 mL *n*-εξανίου και παραλαμβάνεται το αλειφατικό κλάσμα. Στη συνέχεια η στήλη εκλούεται με 100 mL διχλωρομεθάνιο και παραλαμβάνεται το αρωματικό κλάσμα. Επειδή το αρωματικό κλάσμα είναι αρκετά αραιό, χρειάζεται συμπύκνωση και πιθανή αλλαγή διαλύτη για να γίνει ενζυμική αντίδραση σε αυτό το μέσο. Η εξάτμιση του διχλωρομεθανίου λαμβάνει χώρα σε περιστροφικό εξατμιστήρα στους 25 °C, ώστε να μην εξατμιστούν οι αρωματικοί υδρογονάνθρακες. Οι πολυαρωματικοί υδρογονάνθρακες επαναδιαλυτοποιούνται σε 10 mL *n*-εξανίου.

Τα κλάσματα αναλύθηκαν με αέρια χρωματογραφία. Ενδεικτικά χρωματογραφήματα παρουσιάζονται στο παράρτημα Ι.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ
& ΣΥΖΗΤΗΣΗ

8 Εγκλωβισμός λιπασών σε μικρογαλακτώματα ιοντικών υγρών

Τα μικρογαλακτώματα είναι συστήματα νανο-διασποράς με ευρεία εφαρμογή σε βιοκαταλυτικές διεργασίες, γεγονός το οποίο εγείρει το ερευνητικό ενδιαφέρον για την ανάπτυξη και εφαρμογή τέτοιων συστημάτων. Στην παρούσα διατριβή χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά συστήματα μικρογαλακτωμάτων. Έμφαση δόθηκε στη χρήση μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό τα οποία αποτελούν νέα συστήματα νανο-διασποράς που αναπτύχθηκαν μόλις την τελευταία δεκαετία. Σημαντικό είναι το γεγονός πως η πρώτη αναφορά της χρήσης αυτών των συστημάτων ως μέσα για βιοκαταλυτικές διεργασίες δημοσιεύτηκε μόλις το 2008 (Zhang et al. 2008), για αυτό το λόγο ελάχιστα είναι γνωστά για τη δράση των ενζύμων σε αυτά τα συστήματα. Το ενδιαφέρον για τα συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό προκύπτει από το συνδυασμό των πλεονεκτημάτων των μικρογαλακτωμάτων και των ιοντικών υγρών (Moniruzzaman et al. 2008b, Moniruzzaman et al. 2010c, Qiu and Texter 2008, Zhao 2010).

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η καταλυτική συμπεριφορά διάφορων λιπασών σε νέα συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ που σχηματίζονται με τη χρήση Tween 20 και Triton X-100 και συγκρίθηκε με αυτή που επιδεικνύουν σε κλασικά συστήματα μικρογαλακτωμάτων, όπως τα αντίστροφα μικκύλια που σχηματίζονται με ΑΟΤ αλλά και χωρίς επιφανειοενεργό. Τα υπό μελέτη ένζυμα περιλαμβάνουν τις λιπάσες από *Candida rugosa* (Crl), από *Chromobacterium viscosum* (Cvl), από *Rhizomucor miehei* (Rml), από *Thermomyces lanuginosa* (Tll) και τη λιπάση Β από *Pseudozyma antarctica* (CalB). Οι λιπάσες αυτές έχουν βρει ευρεία εφαρμογή σε πλήθος βιοκαταλυτικών διεργασιών (Anderson et al. 1998, Domínguez De María et al. 2006, Fernandez-Lafuente 2010, Rodrigues and Fernandez-Lafuente 2010), ενώ παρουσιάζουν σημαντικές διαφορές στην καταλυτική συμπεριφορά τους που οφείλονται στα διαφορετικά δομικά χαρακτηριστικά τους (πίνακας 13). Οι τρισδιάστατες δομές τους είναι γνωστές (Brady et al. 1990, Brzozowski et al. 2000, Grochulski et al. 1993, Lang et al. 1996, Uppenberg et al. 1994) και διάφορα σκευάσματα τους είναι εμπορικά διαθέσιμα.

Πίνακας 13: Χαρακτηριστικά των λιπασών σύμφωνα με τις κρυσταλλογραφικές τους δομές

	CalB	Crl	Cvl	Rml	Tll
Κωδικός PDB	1TCA	1CRL	1CVL	1TGL	1DTE
Μοριακό Βάρος (kDa)	33	57	33	30	30
Αριθμός αμινοξέων	317	534	319	269	269
Αμινοξέα καπακίου	-	66-92	130-150	82-96	85-93
Ισοηλεκτρικό σημείο (pI)	6.0	4.9	7.1	4.8	4.5
α-Έλικα (%) ¹⁸	37	37	36	33	34
β-Πτυχώσεις (%) ¹⁸	15	15	17	26	23

¹⁸ Στοιχεία της Protein Data Bank (PDB).

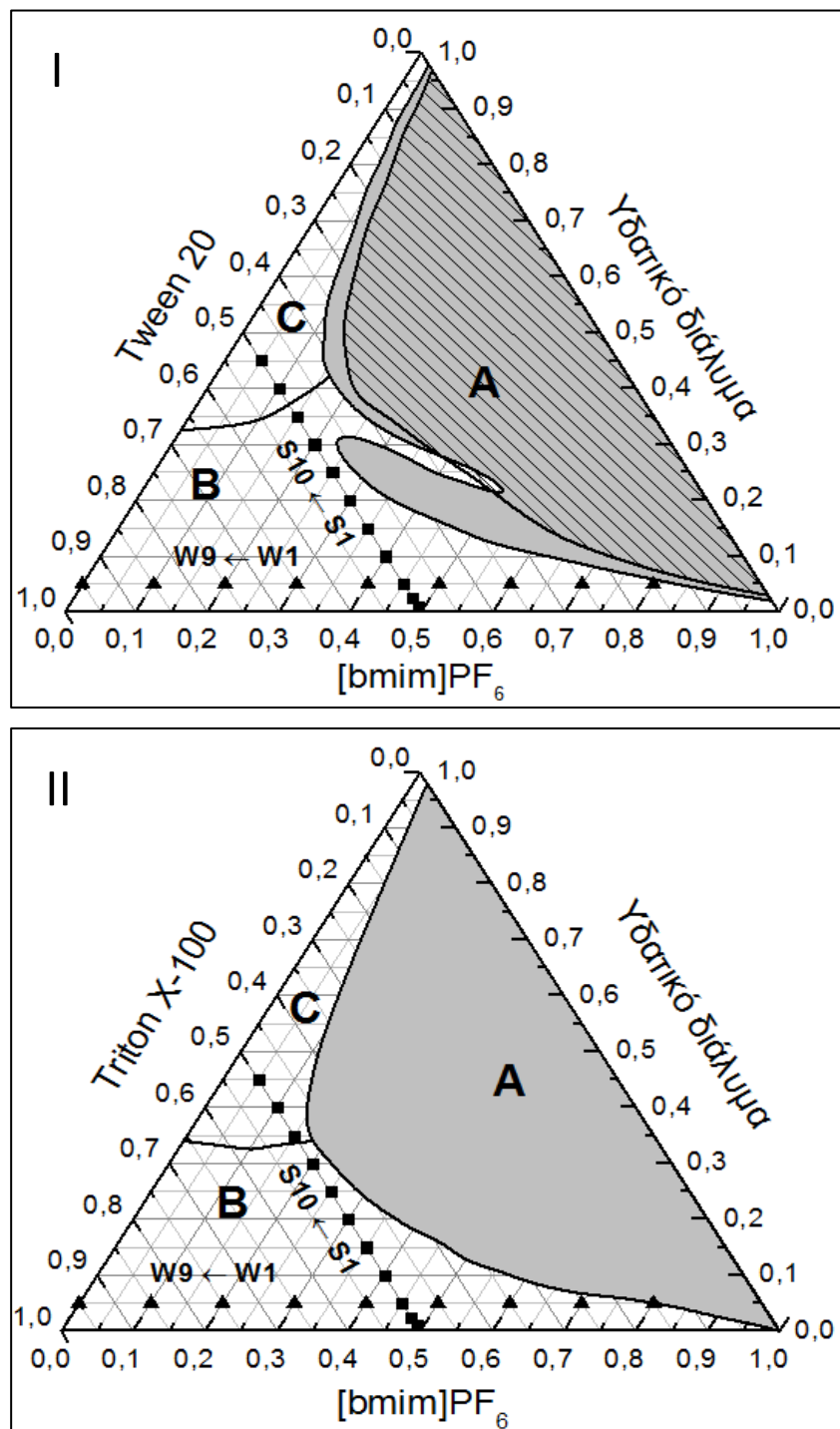
Στο παρών κεφάλαιο θα διερευνηθεί η επίδραση διάφορων παραμέτρων στην καταλυτική συμπεριφορά του ενζύμου, όπως η προέλευση της λιπάσης, η σύσταση του συστήματος και ο βαθμός ενυδάτωσης. Επιπλέον, αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολλο επαναχρησιμοποίησης των ενζύμων που εγκλωβίζονται σε αυτά τα συστήματα. Με σκοπό τη βαθύτερη κατανόηση της καταλυτικής δράσης των λιπασών σε αυτά τα συστήματα, θα μελετηθούν οι πιθανές δομικές αλλαγές που επάγονται από τον εγκλωβισμό τους στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων και θα συσχετισθούν με την καταλυτική συμπεριφορά τους σε αυτά τα συστήματα. Τέλος, για να αναδειχθεί η χρησιμότητα των μικρογαλακτωμάτων για βιοκαταλυτικές διεργασίες, λιπάσες χρησιμοποιήθηκαν στα συγκεκριμένα συστήματα για να καταλύσουν αντιδράσεις εστεροποίησης διάφορων βιοδραστικών ενώσεων.

8.1 Χαρακτηρισμός μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών

8.1.1 Διάγραμμα φάσης

Στην παρούσα διατριβή δύο μονοφασικά τριαδικά συστήματα, αποτελούμενα από το υδρόφοβο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆, νερό και ένα μη ιοντικό επιφανειενεργό μόριο, χρησιμοποιήθηκαν ως μέσα για βιοκαταλυτικές διεργασίες. Το πρώτο σύστημα αποτελείται από [bmim]PF₆, Tween 20 και νερό, ενώ στο δεύτερο σύστημα, το Tween 20 αντικαταστάθηκε από το επιφανειενεργό Triton X-100.

Το διάγραμμα φάσης του τριαδικού συστήματος που σχηματίζεται με Tween 20 στους 30 και 50 °C, όπως αυτό προσδιορίστηκε σύμφωνα με την παράγραφο 7.4.2, παρουσιάζεται στην εικόνα 29-I. Η περιοχή A αντιστοιχεί σε ασταθή συστήματα που τείνουν να διαχωριστούν σε διακριτές φάσεις. Τα συστήματα των περιοχών B και C είναι ομοιογενή, οπτικά ισότροπα και θερμοδυναμικά σταθερά. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι όσο η θερμοκρασία αυξάνει από τους 30 °C στους 50 °C, η μονοφασική περιοχή του συστήματος αυξάνει. Αντίστοιχη εικόνα παρουσιάζει και το διάγραμμα φάσης του συστήματος που σχηματίζεται με το επιφανειενεργό Triton X-100, το οποίο παρουσιάζεται στην εικόνα 29-II. Η συμπεριφορά των φάσεων σε αυτά τα συστήματα είναι παρόμοια με αυτή που έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Gao et al. 2006, Gao et al. 2005). Μελέτες κατέδειξαν ότι όταν η περιεκτικότητα σε νερό είναι μικρότερη από 33 % (w/w) εντοπίζονται μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό (περιοχή B), ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις σχηματίζονταν μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού σε νερό ή δισυνεχή συστήματα (Gao et al. 2006, Gao et al. 2005). Τα συστήματα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή αντιστοιχούν σε νανοδιασπορές νερού σε ιοντικό υγρό. Τα συστήματα που αναφέρονται ως S αντιστοιχούν σε συστήματα με σταθερή συγκέντρωση επιφανειενεργού (50 %, w/w), ενώ τα συστήματα που αναφέρονται ως W έχουν σταθερή ποσότητα νερού (5 %, w/w). Η σύσταση τους παρατίθεται στον πίνακα 11.



Εικόνα 29: Διάγραμμα φάσης (w/w) για τα συστήματα [bmim]PF₆ / επιφανειοενεργού / νερού στους 30 °C (γκρι περιοχή) και 50 °C (διαγραμμισμένη περιοχή). (A) Διφασικά συστήματα, (B) μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό, (C) δισυνεχή συστήματα και μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού σε νερό.

Η υψηλή περιεκτικότητα σε νερό των μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών επιτρέπει τη διαλυτοποίηση υψηλής ποσότητας πρωτεϊνών σε αυτά τα συστήματα σε σχέση με τα ιοντικά υγρά. Σε μικρογαλάκτωμα S7 το οποίο περιέχει 30% (w/w) υδατική φάση διαλυτοποιήθηκαν αλβουμίνη (ως πρότυπη πρωτεΐνη) και η λιπάση από *Thermomyces lanuginosa* (TII), η οποία

παρουσιάζει την υψηλότερη διαλυτότητα σε υδατικό διάλυμα από όλες τις λιπάσες που χρησιμοποιήθηκαν. Αυξάνοντας σταδιακά τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης στο μικρογαλάκτωμα προσδιορίστηκε ότι το σύστημα S7 μπορεί να φιλοξενήσει έως 2.5 mg/mL αλβουμίνης ή 2.0 mg/mL λιπάσης TII στους 30 °C. Στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ η διαλυτότητα της αλβουμίνης και της λιπάσης είναι μόλις 0.8 mg/mL στην ίδια θερμοκρασία, δεδομένης της χαμηλής διαλυτότητας του νερού (μόλις 2.5 % v/v). Αυτό το γεγονός καταδεικνύει ένα σημαντικό πλεονέκτημα τη χρήση των μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών σε σχέση με τα ιοντικά υγρά.

8.1.2 Προσδιορισμός της πολικότητας του νερού στα συστήματα νανο-διασποράς

Τα ένζυμα που εγκλωβίζονται σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων εντοπίζονται στο εσωτερικό των υδατικών νανο-διασπορών. Το μικροπεριβάλλον στο οποίο βρίσκονται διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην καταλυτική συμπεριφορά τους. Η πολικότητα του νερού στις υδατικές νανο-διασπορές είναι ένας από τους παράγοντες που μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα των ενζύμων, τόσο αναφορικά με τη διαλυτότητα των αντιδρώντων, όσο και σχετικά με την οργάνωση αυτών των νανο-δομών (Biswas et al. 2008). Για αυτόν το λόγο μετρήθηκε η πολικότητα των συστημάτων αυτών χρησιμοποιώντας το πορτοκαλόχρουν του μεθυλενίου ως δείκτη. Για τη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν μικρογαλακτώματα νερού σε ισοοκτάνιο που σχηματίζονται παρουσία 0.1 M AOT, μικρογαλακτώματα που σχηματίζονται απουσία επιφανειοενεργού, και μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό που σχηματίζονται με Tween 20. Στα συγκεκριμένα συστήματα διατηρήθηκε σταθερός ο λόγος ιοντικού υγρού προς επιφανειοενεργό 4 : 1 (w/w).

Πίνακας 14: Τιμές μεγίστου απορρόφησης του πορτοκαλόχρουν του μεθυλενίου σε διάφορα συστήματα.

Σύστημα	w _o	λ _{max}	Σύστημα	Συγκέντρωση νερού (v/v)	λ _{max}
Μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο με AOT	5	405.8	Μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο χωρίς επιφανειοενεργό	2.2 %	412.7
	10	407.3		6.3 %	413.6
	20	407.5		18.9 %	419.2
Μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό με Tween 20	5	429.6	2-Προπανόλη	0.5 %	412.2
	10	431.8	Αιθανόλη	0.5 %	417.0
	20	433.9	Νερό	100 %	464.0

Στον πίνακα 14 παρουσιάζονται οι τιμές του μεγίστου απορρόφησης (λ_{max}) του πορτοκαλόχρουν του μεθυλενίου για διάφορα συστήματα τα οποία μελετήθηκαν. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι μεγαλύτερη τιμή λ_{max} υποδεικνύει μεγαλύτερη πολικότητα. Είναι εμφανές πως η πολικότητα του νερού στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων μειώνεται σημαντικά σε σχέση με την πολικότητα που παρουσιάζει σε ένα υδατικό διάλυμα, ενώ η αύξηση του νερού σε αυτά τα

συστήματα οδηγεί σε αύξηση της πολικότητας, γεγονός το οποίο σχετίζεται με την αύξηση της διαμέτρου των μικκυλίων και της οργάνωσης του νερού μέσα σε αυτά. Η μείωση της πολικότητας είναι σημαντικότερη στα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο που σχηματίζονται με την παρουσία επιφανειοενεργού, ενώ αρκετά μειωμένη παρουσιάζεται και η πολικότητα στα μικρογαλακτώματα που σχηματίζονται χωρίς επιφανειοενεργό. Τα αποτελέσματα αυτά υποστηρίζονται από τη βιβλιογραφία, καθώς έχει αποδειχθεί και με άλλες μεθόδους πως η πολικότητα του νερού στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο μειώνεται σημαντικά (Bhattacharyya and Bagchi 2000, Biswas et al. 2008). Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι η πολικότητα του νερού στα μικρογαλακτώματα ιοντικών υγρών διαφέρει σημαντικά από τα μικρογαλακτώματα νερού σε οργανικό διαλύτη. Συγκεκριμένα, η πολικότητα του νερού σε αυτά τα συστήματα είναι μεγαλύτερη ακόμα και από αυτή των αλκοολών μικρής ανθρακικής αλυσίδας όπως η αιθανόλη και η 2-προπανόλη. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην πολική φύση των ιοντικών υγρών τα οποία χρησιμοποιούνται στη θέση των μη πολικών οργανικών διαλυτών, όπως το ισοοκτάνιο και το *n*-εξάνιο. Τα αποτελέσματα αυτά συμφωνούν με τη βιβλιογραφία (Gao et al. 2006).

8.2 Υδρολυτική δραστηριότητα λιπασών σε μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο

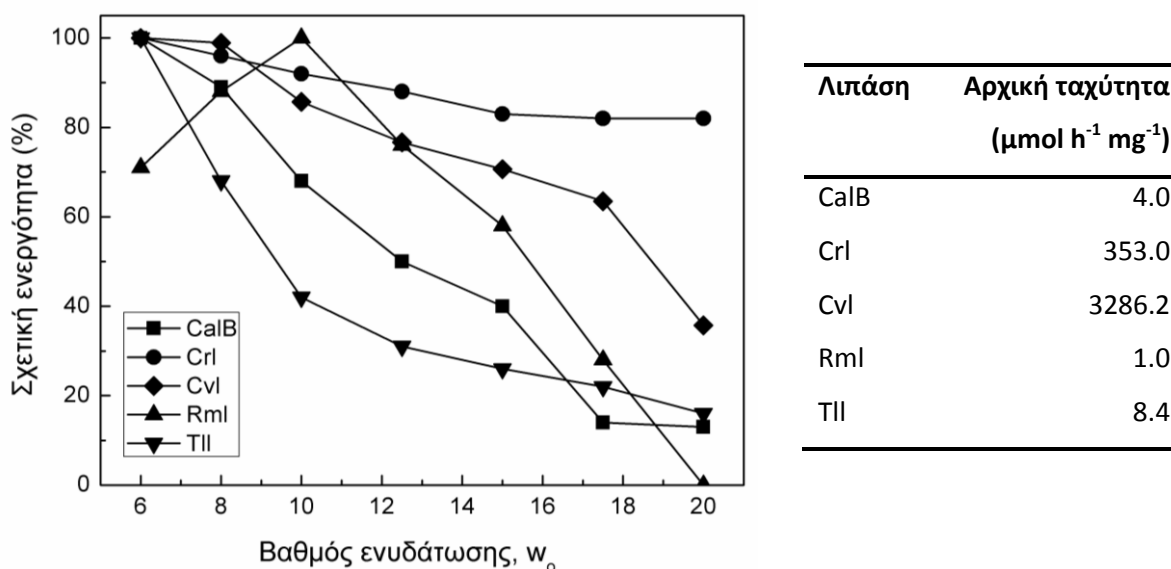
Τα συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο είναι νανοδομημένα συστήματα τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανάπτυξη βιοκαταλυτικών διεργασιών έως σήμερα. Ο εγκλωβισμός λιπασών σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων που σχηματίζονται παρουσία AOT και μικρογαλακτωμάτων νερού, αλκοόλης και *n*-εξανίου και η επακόλουθη χρήση τους σε βιοκαταλυτικές διεργασίες έχει εκτενώς αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Crooks et al. 1995b, Rees and Robinson 1995, Rees et al. 1995, Zoumprioti et al. 2006). Στην παρούσα ενότητα μελετήθηκε η επίδραση που έχει η σύσταση αυτών των συστημάτων στην υδρολυτική δραστηριότητα των λιπασών που επιλέχθηκαν προς μελέτη με σκοπό την επιλογή των συστημάτων στα οποία οι λιπάσες παρουσιάζουν τη βέλτιστη δραστηριότητα, ώστε αυτά τα συστήματα να χρησιμοποιηθούν ως μέτρο σύγκρισης με τα νέα μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό που αποτελούν το αντικείμενο μελέτης της παρούσας διατριβής.

8.2.1 Επίδραση του βαθμού ενυδάτωσης των μικρογαλακτωμάτων με AOT

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επηρεάζουν την καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων είναι ο βαθμός ενυδάτωσης (w_o) των συστημάτων. Στην παρούσα ενότητα μελετήθηκε η επίδραση του βαθμού ενυδάτωσης των AOT μικρογαλακτωμάτων στην υδρολυτική δραστηριότητα των λιπασών μέσω παρακολούθησης της υδρόλυσης του *p*NPB, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 7.6.1. Οι λιπάσες χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις από 1.0 έως 7.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ¹⁹, ανάλογα με τη δραστηριότητα την

¹⁹ CalB: 6.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$, CrI: 1.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Cvi: 1.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Rmi: 7.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Tli: 5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$

οποία επέδειξαν, σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων με 0.1 M AOT με βαθμό ενυδάτωσης από 6 έως 20. Το pH του ρυθμιστικού διαλύματος ήταν 7.5 (Tris – HCl, 50 mM), ενώ η θερμοκρασία των συστημάτων ήταν 30 °C. Στην εικόνα 30 παρατίθενται τα αποτελέσματα της υδρολυτικής δραστηριότητας ως σχετική ενεργότητα προς τη βέλτιστη δραστηριότητα που παρατηρήθηκε για την κάθε λιπάση. Στον πίνακα παρουσιάζονται οι τιμές της αρχικής ταχύτητας, όπως υπολογίστηκαν στο βέλτιστο βαθμό ενυδάτωσης για κάθε λιπάση.



Εικόνα 30: Επίδραση του βαθμού ενυδάτωσης των AOT μικρογαλακτωμάτων στην υδρολυτική δραστηριότητα των λιπασών. Στον πίνακα παρουσιάζεται η αρχική ταχύτητα στο βέλτιστο βαθμό ενυδάτωσης για την κάθε λιπάση (Τυπική απόκλιση < 5%).

Σύμφωνα με το προφίλ των λιπασών σε αυτά τα συστήματα, φαίνεται πως η αύξηση του βαθμού ενυδάτωσης έχει αρνητική επίδραση στη δραστηριότητα των λιπασών που μελετήθηκαν. Οι περισσότερες λιπάσες παρουσίασαν βέλτιστη δραστηριότητα στο σύστημα με το μικρότερο βαθμό ενυδάτωσης που μελετήθηκε ($w_0 = 6$), ενώ η μόνη λιπάση που διαφοροποιήθηκε ήταν η λιπάση από *Rhizomucor miehei*. Η συγκεκριμένη λιπάση παρουσίασε κωδωνοειδές προφίλ με μέγιστη δραστηριότητα σε σύστημα με βαθμό ενυδάτωσης 10. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί πως η βέλτιστη δραστηριότητα παρατηρείται στα συστήματα όπου τα μικκύλια έχουν διάμετρο αρκετά μεγάλη ώστε να φιλοξενήσουν στο εσωτερικό τους το ενζυμικό μόριο, χωρίς όμως το ένζυμο να απομακρύνεται από το υπόστρωμα το οποίο βρίσκεται διαλυμένο στον οργανικό διαλύτη (O'Connor and Cleverly 1994). Έτσι, το αναμενόμενο για όλα τα ένζυμα σε τέτοια συστήματα είναι να παρουσιάζουν ένα κωδωνοειδές προφίλ. Για τα υπόλοιπα ένζυμα θα έπρεπε να ελεγχθούν και συστήματα με χαμηλότερο βαθμό ενυδάτωσης, όμως κάτι τέτοιο ήταν ανέφικτο καθώς δεν ήταν δυνατή η προσθήκη της ίδιας συγκέντρωσης ενζύμου

Οι βέλτιστες τιμές για τις Tll και Rml που βρέθηκαν στην παρούσα μελέτη έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά (Crooks et al. 1995a). Θα πρέπει να σημειωθεί πως στη βιβλιογραφία έχουν

αναφερθεί διαφορετικές βέλτιστες τιμές (Fernandes et al. 2004, Moniruzzaman et al. 2006), οι οποίες όμως έχουν προσδιοριστεί με διαφορετικά πρωτόκολλα. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται, το pH και η συγκέντρωση του επιφανειενεργού είναι σημαντικοί παράγοντες για τις βιοκαταλυτικές διεργασίες σε αυτά τα μικροετερογενή συστήματα. Για παράδειγμα, έχει αναφερθεί ως βέλτιστος βαθμός ενυδάτωσης της TII για την υδρόλυση της τριελαΐνης η τιμή 15 (Fernandes et al. 2004). Τα τριγλυκερίδια μπορούν να δράσουν ως συνεπιφανειενεργά και να οδηγήσουν σε μείωση της διαμέτρου των μικκυλίων ανεξάρτητα από το βαθμό ενυδάτωσης (Carvalho and Cabral 2000), εξηγώντας με αυτόν τον τρόπο το γεγονός ότι οι βέλτιστες τιμές διαφέρουν. Επιπλέον, ο τύπος της αντίδρασης που παρακολουθείται είναι σημαντικός. Για παράδειγμα, οι λιπάσες επιδεικνύουν τη βέλτιστη υδρολυτική τους δραστηριότητα σε συστήματα με μεγαλύτερο βαθμό ενυδάτωσης σε σχέση με τις συνθετικές αντιδράσεις, καθώς το νερό στις συγκεκριμένες αντιδράσεις είναι υπόστρωμα, πέρα από συστατικό του συστήματος (Fernandes et al. 2004).

Δεδομένου του προφίλ που παρουσίασαν οι λιπάσες για την υδρολυτική τους δραστηριότητα και λαμβάνοντας υπόψη ότι η δραστηριότητα των λιπασών στα μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό μελετήθηκε σε συνθετικές αντιδράσεις, επιλέχθηκε ο βαθμός ενυδάτωσης 6 για τις επόμενες μελέτες.

8.2.2 Επίδραση της σύστασης των μικρογαλακτωμάτων χωρίς επιφανειενεργό στην ενζυμική δραστηριότητα

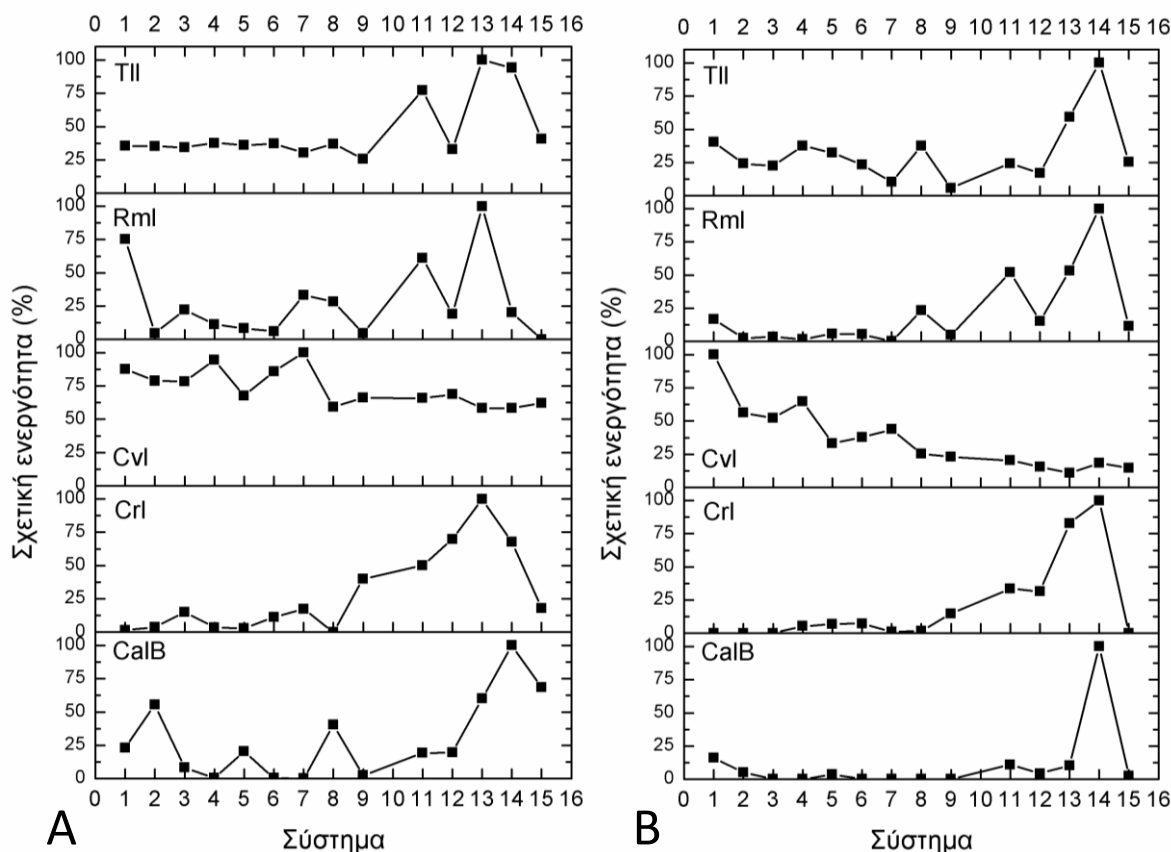
Τα μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειενεργό είναι πολύ λιγότερο μελετημένα συστήματα σε σχέση με τα μικρογαλακτώματα που σχηματίζονται με επιφανειενεργό. Ο Khmel'nitsky και οι συνεργάτες του ανέφεραν για πρώτη φορά τη χρήση τέτοιων συστημάτων ως μέσα για την επίτευξη βιοκαταλυτικών αντιδράσεων, χρησιμοποιώντας την οξειδάση της χοληστερόλης (Khmel'nitsky et al. 1988a).

Η μελέτη για τα συγκεκριμένα συστήματα έγινε στις ίδιες συνθήκες όπως και στην προηγούμενη παράγραφο, εκτός από τη συγκέντρωση των ενζύμων που κυμάνθηκε σε συγκεντρώσεις από 0.65 έως 15.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ²⁰. Στη συγκεκριμένη μελέτη, πέρα από το *p*NPB, χρησιμοποιήθηκε και ο παλμιτικός (C16) εστέρας της 4-νιτροφαινόλης (*p*NPP) ως υπόστρωμα με σκοπό να μελετηθεί η επίδραση του υποστρώματος στην καταλυτική συμπεριφορά των λιπασών. Όπως αναφέρθηκε και στο θεωρητικό μέρος (παράγραφος 1.2), οι λιπάσες παρουσιάζουν εκλεκτικότητα ως προς τα υποστρώματα μεγάλης ανθρακικής αλυσίδας, οπότε η δραστηριότητα τους αναμένεται αυξημένη στην αντίδραση υδρόλυσης του *p*NPP σε σχέση με το *p*NPB.

Στην εικόνα 31 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της υδρόλυσης των δύο εστέρων της 4-νιτροφαινόλης από τις λιπάσες. Δε βρέθηκε κάποιος άμεσος συσχετισμός της υδρολυτικής δραστηριότητας με τη συγκέντρωση κάποιου συστατικού του συστήματος (π.χ. νερό) και έτσι τα

²⁰ CalB: 3.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Crl: 0.65 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Cvl: 13.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Rml: 3.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$, Tll: 15.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$

αποτελέσματα παρουσιάζονται ως προς τα αριθμημένα συστήματα. Η σύσταση των συστημάτων παρατίθεται στον πίνακα 10. Θα πρέπει να σημειωθεί πως τα συστήματα SLM 8-15 είναι μικρογαλακτώματα νερού σε *n*-εξάνιο και τα συστήματα SLM 1-7 είναι δισυνεχή και παρουσιάζουν τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε νερό. Το σύστημα 10 δε μελετήθηκε γιατί αν και στη βιβλιογραφία αναφερόταν ως μονοφασικό (Khmelnitsky et al. 1988a), δεν ήταν σταθερό και έτεινε να διαχωρίζεται σε διακριτές φάσεις.



Εικόνα 31: Επίδραση της σύστασης του τριαδικού συστήματος στην υδρολυτική ενεργότητα των λιπασών. Ο άξονας των X παρουσιάζει τα συστήματα σύμφωνα με την αρίθμηση της αναφοράς, ενώ ο Y τη σχετική ενεργότητα. Αποτελέσματα για την υδρόλυση του rNPB (A) και του rNPP (B) (Τυπική απόκλιση < 4%).

Από το προφίλ που προέκυψε από την υδρόλυση και των δύο υποστρωμάτων φαίνεται πως όλες οι λιπάσες εκτός της Cvl παρουσιάζουν βέλτιστη δραστικότητα στα συστήματα SLM 12 έως 15, τα οποία παρουσιάζουν οργανωμένες νανο-δομές με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις νερού (1.2-2.7 %, v/v/v). Από αυτό το γεγονός φαίνεται πως η οργανωμένη δομή των συστημάτων σε νανο-διασπορές νερού σε *n*-εξάνιο έχει θετική επίδραση στη δραστικότητα των λιπασών. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία για την εστεράση του φερουλικού οξέος (Torakas et al. 2003a, Torakas et al. 2003b), η οποία παρουσίαζε τη μέγιστη δραστικότητα της σε συστήματα με μόλις 2 % κατ' όγκο νερό. Η καταλυτική συμπεριφορά της Cvl διαφέρει σε σχέση με τις υπόλοιπες λιπάσες, παρουσιάζοντας βέλτιστη δραστικότητα σε

δισυνεχή συστήματα. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ότι η οξειδάση της χοληστερόλης παρουσιάζει βέλτιστη δραστικότητα στο σύστημα SLM 1 (Khmelnitsky et al. 1988a), το οποίο είναι δισυνεχές. Επιπλέον, η CalB και η Rml παρουσίασαν βέλτιστη συνθετική δραστικότητα στα περισσότερα ενυδατωμένα συστήματα του τριαδικού συστήματος *n*-εξάνιο, 1-προπανόλη, νερό από αυτά που μελετήθηκαν (Zoumprioti et al. 2006). Εδώ θα πρέπει να σημειωθεί πως σε αυτά τα συστήματα η 1-προπανόλη λειτουργούσε και ως υπόστρωμα, οπότε δεν είναι αρκετά αξιόπιστος ο συσχετισμός της δραστικότητας μόνο με την περιεκτικότητα του συστήματος σε νερό.

Όσον αφορά τη δραστικότητα των λιπασών ως προς τα δύο υποστρώματα, θα πρέπει να σημειωθεί πως όλες οι λιπάσες παρουσίασαν σημαντικά μεγαλύτερη ταχύτητα υδρόλυσης του *p*NPP σε σχέση με το *p*NPB. Οι ταχύτητες υδρόλυσης παρουσιάζονται στον πίνακα 15.

Πίνακας 15: Αρχική ταχύτητα ($\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$) υδρόλυσης εστέρων της 4-νιτροφαινόλης που καταλύεται από λιπάσες. Παρουσιάζονται οι τιμές για το σύστημα στο οποίο οι λιπάσες παρουσιάζουν τη μέγιστη δραστικότητα (Τυπική απόκλιση < 4%).

	CalB	Cri	Cvl	Rml	Tll
<i>p</i>NPB	1.19	10.48	7.75	2.32	0.53
<i>p</i>NPP	3.64	18.46	11.87	2.60	0.58

Όλες οι λιπάσες παρουσίασαν εκλεκτικότητα ως προς το *p*NPP, τον εστέρα δηλαδή με τη μεγαλύτερη ανθρακική αλυσίδα. Πιο σημαντικό όμως σε αυτό τον πίνακα είναι το γεγονός πως όλες οι λιπάσες, εκτός της Cvl, παρουσιάζουν σημαντικά μεγαλύτερη υδρολυτική δραστικότητα σε αυτά τα συστήματα, σε σχέση με αυτή που παρατηρήθηκε στα μικρογαλακτώματα με AOT (εικόνα 30). Το γεγονός ότι η καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων αλλάζει από σύστημα σε σύστημα γίνεται εμφανές παρατηρώντας τις σχετικές δραστικότητες των ενζύμων. Στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων με AOT την καλύτερη δραστικότητα επέδειξε η Cvl, ενώ στα συστήματα χωρίς επιφανειενεργό την καλύτερη δραστικότητα παρουσίασε η Cri. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στην παρούσα παράγραφο, για τα επόμενα πειράματα επιλέχθηκε το σύστημα SLM 14, στο οποίο οι περισσότερες λιπάσες επέδειξαν αυξημένη υδρολυτική δραστικότητα.

8.3 Συνθετική δραστικότητα λιπασών σε μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό

Τα ιοντικά μικρογαλακτώματα είναι συστήματα τα οποία αναπτύχθηκαν μόλις την τελευταία δεκαετία. Θα πρέπει να σημειωθεί πως η πρώτη εργασία που ανέφερε τη χρήση τους ως μέσα για βιοκαταλυτικές διεργασίες δημοσιεύτηκε καθώς εκπονούνταν η παρούσα διατριβή (Zhang et al. 2008). Είναι προφανές ότι το ενδιαφέρον για τα συγκεκριμένα συστήματα ξεκινάει από το κατά πόσο τα συγκεκριμένα συστήματα μπορούν όντως να χρησιμοποιηθούν ως μέσα για

αντιδράσεις που καταλύονται από λιπάσες και κατά δεύτερο λόγο από το πώς επιδρούν διάφορα χαρακτηριστικά τους στην καταλυτική δραστηριότητα των ενζύμων.

Τα μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού παρουσιάζουν αυξημένο ιξώδες και ο φωτομετρικός προσδιορισμός της δραστηριότητας των λιπασών δεν ήταν εύκολα επαναλήψιμος. Αντ' αυτού, μελετήθηκε η συνθετική δραστηριότητα των ενζύμων σε αντιδράσεις εστεροποίησης λιπαρών οξέων με αλειφατικές πρωτοταγείς αλκοόλες. Για να συγκριθεί η δραστηριότητα των λιπασών στα νέα αυτά μέσα με τη δραστηριότητα που παρουσιάζουν στα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο, οι ίδιες αντιδράσεις διεξάγονται και στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων που επιλεγθήκαν στην παράγραφο 8.2.

8.3.1 Δραστηριότητα λιπασών σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων ιοντικού υγρού

Η ικανότητα των λιπασών να διατηρήσουν την καταλυτική τους δραστηριότητα στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό μελετήθηκε αρχικά σε διάσπαρτα συστήματα που κάλυπταν μία ευρεία περιοχή του διαγράμματος φάσης των μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό που σχηματίζονται παρουσία Tween 20, καθώς δεν υπήρχε κάποια ένδειξη ότι οι λιπάσες διατηρούν τη δραστηριότητα τους σε αυτά τα συστήματα. Η δραστηριότητα των λιπασών προσδιορίστηκε ως προς την εστεροποίηση του λαυρικού οξέος με 1-προπανόλη στους 30 °C, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 7.6.2. Η δραστηριότητα των λιπασών στα νέα αυτά συστήματα συγκρίθηκε με αυτή που παρουσιάζουν σε μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο.

Πίνακας 16: Απόδοση (%) σε 24 h της αντίδρασης εστεροποίησης λαυρικού οξέος με 1-προπανόλη. Στο σύστημα SLM14 η 1-προπανόλη χρησιμοποιήθηκε ως συστατικό του συστήματος. Η σύσταση των μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών δίνεται σε κατά βάρος αναλογία (Τυπική απόκλιση < 7%).

Σύστημα	CalB	CrI	CvI	RmI	TII
[bmim]PF ₆ 20 %, Tween 20 50 %, νερό 30 %	75.2	11.5	21.6	24.2	36.9
[bmim]PF ₆ 12.5 %, Tween 20 75 %, νερό 12.5 %	10.4	21.7	40.4	54.5	87.7
[bmim]PF ₆ 50 %, Tween 20 40 %, νερό 10 %	77.7	22.4	42.0	36.4	78.1
AOT / RM (w _o 6)	33.7	0.74	83.6	2.0	74.1
SLM 14	53.0	13.0	75.6	73.5	7.3

Όπως φαίνεται στον πίνακα 16, όλες οι λιπάσες που μελετήθηκαν διατηρούν την καταλυτική τους δραστηριότητα στα νέα αυτά συστήματα. Ορισμένες λιπάσες, όπως η CalB και η CrI, επέδειξαν αυξημένη δραστηριότητα στα μικρογαλακτώματα ιοντικών υγρών σε σχέση με τα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η σύσταση του μικρογαλακτωματος επηρεάζει σημαντικά τη δραστηριότητα των λιπασών, με διαφορετικό τρόπο όμως για το κάθε ένζυμο. Έτσι, το σύστημα με 10 % (w/w/w) υδατική φάση είναι το βέλτιστο μέσο από όσα μελετήθηκαν για τις λιπάσες CalB, CrI και CvI, ενώ οι λιπάσες RmI και TII επέδειξαν

τη μέγιστη δραστικότητα τους στο σύστημα με περιεκτικότητα 12.5 %. Η επίδραση της σύστασης των μικρογαλακτωμάτων μελετάται στις επόμενες ενότητες. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και σε αντιδράσεις εστεροποίησης του καπρυλικού οξέος με 1-βουτανόλη. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της δραστικότητας που παρουσιάζονται στον πίνακα 16 και τα χαρακτηριστικά των λιπασών (πίνακας 13), επιλέχθησαν οι λιπάσες CrI, CvI και TII για τις επόμενες μελέτες.

Η συνθετική δραστικότητα των συγκεκριμένων λιπασών μελετήθηκε σε 16 συστήματα μικρογαλακτωμάτων ιοντικού υγρού που σχηματίζονται παρουσία Tween 20. Όπως φαίνεται στον πίνακα 17 οι λιπάσες διατηρούν τη δραστικότητα τους σε όλα τα συστήματα μικρογαλακτωμάτων που μελετήθηκαν. Θα πρέπει να σημειωθεί πως στις περισσότερες περιπτώσεις η απόδοση των αντιδράσεων σε 24 h ήταν έως και 80 %. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για την εστεροποίηση λιπαρών οξέων με διαφορετικό μήκος αλκυλικής αλυσίδας (C8 έως C18) με την 1-προπανόλη.

Πίνακας 17: Συνθετική δραστικότητα που επιδεικνύουν οι λιπάσες (σύνθεση προπυλεστέρα του λαυρικού οξέος) όταν εγκλωβίζονται σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών (Τυπική απόκλιση < 8%).

Σύστημα	Σύσταση συστημάτων % (w/w/w)			Αρχική ταχύτητα (mmol h ⁻¹ mg ⁻¹)		
	[Bmim] PF ₆	Tween 20	Νερό	CrI	CvI	TII
S1	47.5	50	2.5	0.796	1.202	0.858
S2	45	50	5	0.958	0.761	0.877
S3	40	50	10	1.085	0.627	0.662
S4	35	50	15	0.738	0.620	0.583
S5	30	50	20	0.623	0.605	0.617
S6	25	50	25	0.588	0.455	0.673
S7	20	50	30	0.577	0.414	0.713
S8	15	50	35	0.519	0.373	0.762
W1	80	15	5	0.646	0.670	0.419
W2	70	25	5	0.658	0.713	0.470
W3	60	35	5	0.681	0.732	0.616
W4	50	45	5	0.773	0.763	0.687
W5	40	55	5	0.935	0.868	0.747
W6	30	65	5	0.958	1.066	0.825
W7	20	75	5	0.854	0.898	0.923
W8	10	85	5	0.715	0.761	0.873

Η σύσταση των μικρογαλακτωμάτων επηρεάζει σημαντικά τη δραστικότητα των λιπασών. Η απόκλιση της μέγιστης από την ελάχιστη δραστικότητα που παρατηρήθηκαν ήταν έως και 70 % (στην περίπτωση της CνI). Και οι τρεις λιπάσες παρουσιάζουν μεγαλύτερη δραστικότητα στα περισσότερα άνυδρα συστήματα, όταν η συγκέντρωση του επιφανειοενεργού παραμένει σταθερή (S συστήματα με 50 % w/w επιφανειοενεργό). Όταν διατηρήθηκε σταθερή η περιεκτικότητα των συστημάτων σε νερό (W συστήματα με 5 % w/w υδατική φάση), οι λιπάσες παρουσίασαν τη μεγαλύτερη τους δραστικότητα σε συστήματα με μεγαλύτερη συγκέντρωση επιφανειοενεργού. Οι παράγοντες αυτοί μελετώνται εκτενέστερα στις επόμενες ενότητες.

Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί πως συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε [bmim]PF₆ μπορούν να σχηματιστούν παρουσία του επιφανειοενεργού Triton X-100 (Gao et al. 2005). Έτσι, μελετήθηκε η δραστικότητα της λιπάσης TII στα δύο διαφορετικά αυτά συστήματα μικρογαλακτωμάτων ιοντικού υγρού και συγκρίθηκε με τη δραστικότητα που εμφανίζει στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο.

Πίνακας 18: Συνθετική δραστικότητα της λιπάσης TII (σύνθεση προπυλεστέρα του λαυρικού οξέος) όταν εγκλωβίζεται σε διάφορα μικροετερογενή συστήματα (Τυπική απόκλιση < 8%).

Σύστημα	Αρχική ταχύτητα (mmol h ⁻¹ mg ⁻¹)		Απόδοση σε 24 h (%)	
	με Tween 20	με Triton X-100	με Tween 20	με Triton X-100
S2	0.877	0.077	75.1	19.1
S4	0.583	0.150	85.1	6.1
S7	0.713	0.051	69.9	3.2
W1	0.419	0.213	100.0	14.2
W3	0.616	0.043	94.5	13.7
W7	0.923	0.077	55.7	5.3
[bmim] PF₆²¹		0.063		55.3
AOT/RM (w_o 6)		0.257		74.1
SLM 14		0.008		7.3

Στον πίνακα 18 παρουσιάζονται οι αρχικές ταχύτητες της συνθετικής δραστικότητας και οι αποδόσεις σε 24 h της λιπάσης TII για την αντίδραση εστεροποίησης του λαυρικού οξέος με 1-προπανόλη σε διάφορα συστήματα μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών που σχηματίζονται τόσο με Tween 20 όσο και με Triton X-100, αλλά και σε άλλα μικροετερογενή συστήματα που χρησιμοποιούνται για την επίτευξη βιοκαταλυτικών αντιδράσεων όπως είναι τα συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο και τα ιοντικά υγρά. Στις περισσότερες περιπτώσεις η δραστικότητα που εμφανίζει στα συστήματα που σχηματίζονται με Tween 20 είναι σημαντικά

²¹ Ιοντικό υγρό κορεσμένο σε νερό (~2.5 % νερό κατ'όγκο)

μεγαλύτερη από τη δραστικότητα που παρατηρείται στα υπόλοιπα συστήματα που μελετήθηκαν, ακόμα και από τα συστήματα με την ίδια σύσταση που σχηματίζονται με το επιφανειοενεργό Triton X-100. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί πως η καταλυτική συμπεριφορά των λιπασών παρουσία επιφανειοενεργών Tween είναι καλύτερη από αυτή που παρουσιάζουν παρουσία Triton X-100 (Lima et al. 2004). Επίσης, η δραστικότητα οξειδασών που εγκλωβίστηκαν σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων [bmim]PF₆, Triton X-100 και νερού μειωνόταν σημαντικά με αύξηση της συγκέντρωσης του Triton X-100 (Zhou et al. 2008). Η αρνητική επίδραση του Triton X-100 στη δραστικότητα της λιπάσης TII γίνεται εμφανής στον πίνακα 18, όπου αύξηση της συγκέντρωσης του επιφανειοενεργού σε σταθερή συγκέντρωση νερού (συστήματα W) οδηγεί σε μείωση της ταχύτητας της αντίδρασης και της απόδοσης σε 24 h. Για αυτό το λόγο τα συγκεκριμένα συστήματα δε μελετήθηκαν εκτενέστερα στα πλαίσια της παρούσας διατριβής.

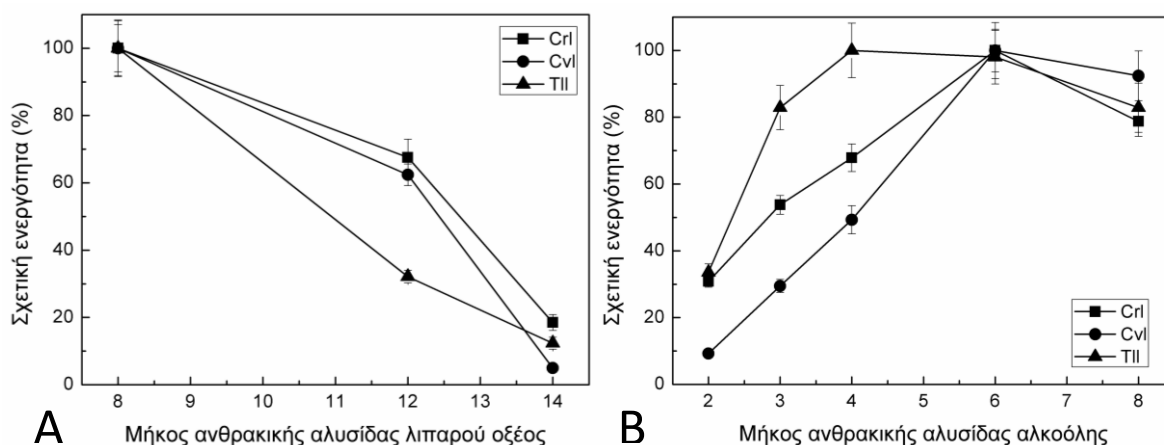
Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως η βελτιωμένη καταλυτική συμπεριφορά που παρουσιάζει η λιπάση TII στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων ιοντικού υγρού σε σχέση με αυτή που παρουσιάζει σε ιοντικό υγρό κορεσμένο σε νερό υποδεικνύει το πλεονέκτημα του σχηματισμού νανο-διασπορών. Η βελτίωση της καταλυτικής δραστικότητας των ενζύμων σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό σε σχέση με τα ιοντικά υγρά έχει αναφερθεί και για άλλα ένζυμα σε παρόμοια συστήματα (Moniruzzaman et al. 2009, Moniruzzaman et al. 2008b, Zhou et al. 2008). Η καταλυτική συμπεριφορά της λιπάσης TII στα νέα αυτά συστήματα ήταν καλύτερη σε σχέση με άλλα ευρέως χρησιμοποιούμενα συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο, ανεξαρτήτως της σύστασης τους αλλά και του λιπαρού οξέος το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα (τα αποτελέσματα για τη σύνθεση εστέρων του καπρυλικού οξέος δεν παρουσιάζονται). Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν τη σημαντική συνεισφορά που μπορούν να έχουν τα νέα αυτά μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό στις νανοβιοκαταλυτικές διεργασίες.

Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί πως σε ορισμένα συστήματα (όπως το S7 και το W7) η απόδοση που παρουσιάζει η λιπάση ύστερα από 24 h είναι σχετικά χαμηλή αν ληφθεί υπόψη η υψηλή αρχική ταχύτητα. Η περίεργη αυτή καταλυτική συμπεριφορά μπορεί να αποδοθεί στη σταθερότητα των λιπασών σε αυτά τα συστήματα, όπως θα αναλυθεί σε επόμενη ενότητα (παράγραφος 8.4). Επιπλέον, καθώς οι αλκοόλες μικρής αλκυλικής αλυσίδας μπορούν να δρουν ως συν-επιφανειοενεργές ενώσεις, η μείωση της συγκέντρωσης τους (λόγω της αντίδρασης εστεροποίησης) θα μπορούσε να επηρεάσει τη δομή των μικκυλίων που σχηματίζονται, ανάλογα και με τη σύσταση των μικρογαλακτωμάτων, και συνεπώς την καταλυτική συμπεριφορά των εγκλωβισμένων ενζύμων (Stamatis et al. 1999).

8.3.2 Εκλεκτικότητα των λιπασών στα μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού

Όπως αναφέρθηκε στις προηγούμενες ενότητες, η συνθετική δραστικότητα των λιπασών δε μελετήθηκε μόνο σε μία αντίδραση, αλλά χρησιμοποιήθηκαν λιπαρά οξέα και πρωτοταγείς αλκοόλες με διαφορετικό μήκος ανθρακικής αλυσίδας. Πιο συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν

λιπαρά οξέα με 8 έως 18 άτομα άνθρακα και αλκοόλες με 2 έως 8 άτομα άνθρακα. Η εκλεκτικότητα των λιπασών ως προς τα υποστρώματα μελετήθηκε στο σύστημα W3 που σχηματίζεται με το επιφανειοενεργό Tween 20. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 32.



Εικόνα 32: Επίδραση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας των υποστρωμάτων στη συνθετική δραστικότητα των λιπασών. (A) Εκλεκτικότητα ως προς το λιπαρό οξύ στην αντίδραση εστεροποίησης με 1-εξανόλη (B) Εκλεκτικότητα ως προς την αλκοόλη στην αντίδραση εστεροποίησης του καπρυλικού οξέος (C8).

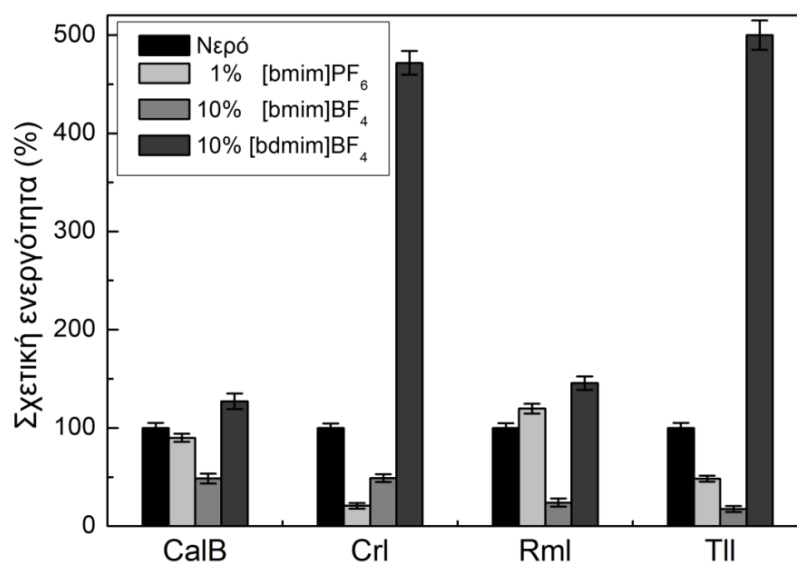
Στην εικόνα 32A παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της εκλεκτικότητας ως προς την εστεροποίηση κορεσμένων λιπαρών οξέων με την 1-εξανόλη. Παρατηρείται ότι οι λιπάσες που μελετήθηκαν παρουσιάζουν καλύτερη δραστικότητα στην εστεροποίηση του καπρυλικού οξέος (C8), ενώ μόνο η Tll παρουσίασε ικανότητα εστεροποίησης του ελαϊκού οξέος (C18:1), με πολύ χαμηλή απόδοση (5% ύστερα από 24 h). Τα αποτελέσματα συμφωνούν με τη βιβλιογραφία (Gomes et al. 2004, Rees and Robinson 1995), αν και η εγγενής εκλεκτικότητα των λιπασών αναμένεται να είναι προς λιπαρά οξέα μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας. Όντως, στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί πως η λιπάση Cvl σε άνυδρο ακετονιτρίλιο παρουσιάζει εκλεκτικότητα ως προς λιπαρά οξέα 16 και 18 ατόμων άνθρακα (Barros et al. 1994). Το μέσο στο οποίο γίνεται η αντίδραση διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην εκλεκτικότητα που επιδεικνύουν τα ένζυμα, καθώς επηρεάζει την κατανομή του υποστρώματος μέσα στο σύστημα. Όσον αφορά τα συστήματα μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών θα πρέπει να σημειωθεί ότι στο υδρόφοβο [bmim]PF₆ η διαλυτότητα των λιπαρών οξέων αυξάνεται με αύξηση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας τους. Συνεπώς είναι αναμενόμενο ότι τα λιπαρά οξέα μικρής ανθρακικής αλυσίδας, τα οποία είναι περισσότερο υδρόφιλα να είναι περισσότερο διαθέσιμα στο υδατικό μικροπεριβάλλον του ενζύμου.

Εφόσον η μέγιστη δραστικότητα και για τις τρεις λιπάσες παρατηρήθηκε με το καπρυλικό οξύ, η μελέτη της εκλεκτικότητας ως προς την αλκοόλη έγινε ως προς αυτό το λιπαρό οξύ. Φαίνεται από την εικόνα 32B ότι οι λιπάσες παρουσιάζουν εκλεκτικότητα ως προς τις αλκοόλες μεσαίου μεγέθους (C4-C6). Η Tll παρουσιάζει εκλεκτικότητα ως προς την 1-βουτανόλη, ενώ οι Cvl και Crl ως προς την 1-εξανόλη. Σημαντική μείωση της δραστικότητας των λιπασών παρατηρείται

με τη χρήση αλκοολών μικρότερης ανθρακικής αλυσίδας. Συγκεκριμένα, η χαμηλότερη ταχύτητα εστεροποίησης παρατηρήθηκε για όλες τις λιπάσες όταν η αιθανόλη χρησιμοποιήθηκε ως υπόστρωμα. Αυτό έχει παρατηρηθεί σε διάφορες λιπάσες σε άλλα συστήματα και μπορεί να αποδοθεί σε απενεργοποίηση τους από την αλκοόλη, λόγω της αυξημένης διαλυτότητάς της στο μικροπεριβάλλον του ενζύμου (Delimitsou et al. 2002, Stamatis et al. 1993). Δεν μπορεί όμως να παραβλεφθεί το γεγονός ότι και άλλοι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν την καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων, όπως η κατανομή των αλκοολών στις μικροφάσεις του συστήματος και η δυνατότητα της αλκοόλης να δρα ως συνεπιφανειενεργό και να επηρεάζει τη δομή των συστημάτων νανο-διασποράς (Stamatis et al. 1993, Zoumprioti et al. 2006).

8.3.3 Επίδραση ιοντικών υγρών στην υδρολυτική δραστηριότητα λιπασών

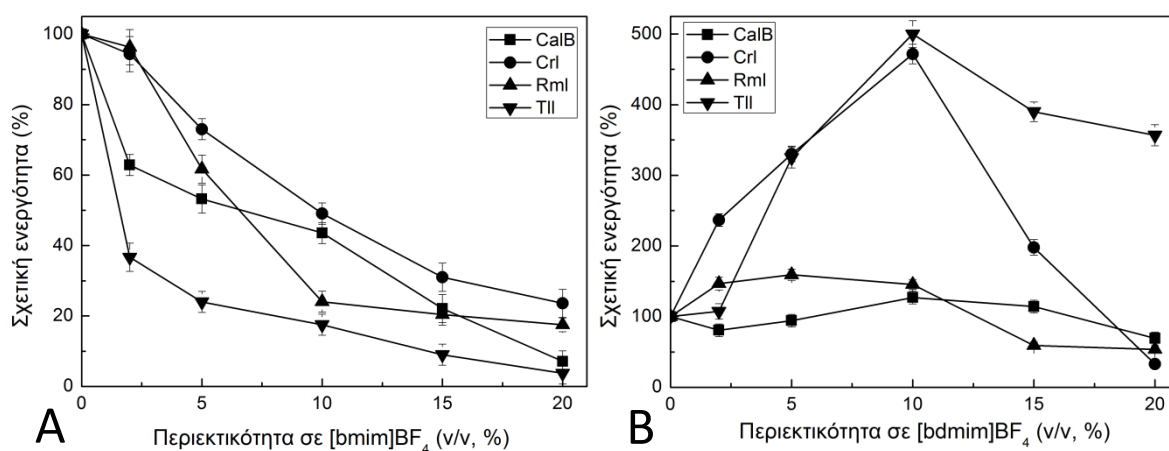
Καθώς γίνεται σαφές το πλεονέκτημα των συστημάτων μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών σε σχέση με τα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί η επίδραση που έχει η παρουσία του ιοντικού υγρού στην υδρολυτική δραστηριότητα των λιπασών. Αν και τα ιοντικά υγρά είναι πολικά, δεν είναι κατ' ανάγκη υδρόφιλα. Συγκεκριμένα, το ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ είναι υδρόφοβο και παρουσιάζει αναμιξιμότητα με το νερό έως 5 % (v/v) σε υψηλές θερμοκρασίες. Στην παρούσα μελέτη προσδιορίστηκε η επίδραση 3 διαφορετικών ιοντικών υγρών στην υδρολυτική δραστηριότητα 4 λιπασών. Τα ιοντικά υγρά διαφέρουν στο βαθμό υποκατάστασης του ιμιδαζολικού δακτυλίου, καθώς και στο ανιόν τους. Συγκεκριμένα, τα ιοντικά υγρά που φέρουν το ανιόν BF₄⁻ είναι πλήρως αναμίξιμα με το νερό. Οι λιπάσες χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις από 6.5 έως 35.0 µg/mL²² και η υδρόλυση του pNPB σε θερμοκρασία δωματίου παρακολούθηθηκε φωτομετρικά.



Εικόνα 33: Επίδραση της παρουσίας των ιοντικών υγρών στην υδρολυτική δραστηριότητα των λιπασών

²² CalB: 33.0 µg/mL, Crl: 6.5 µg/mL, Rml: 35.0 µg/mL, Tll: 15.0 µg/mL

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση της παρουσίας ιοντικών υγρών στο υδατικό διάλυμα σε σταθερές συγκεντρώσεις. Τα αναμίγματα με το νερό ιοντικά υγρά χρησιμοποιήθηκαν σε συγκέντρωση 10 % (v/v), ενώ το ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ σε συγκέντρωση 1 % (v/v). Η δραστηριότητα συγκρίθηκε με τη δραστηριότητα που επιδεικνύουν οι λιπάσες απουσία των ιοντικών υγρών. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στην εικόνα 33. Είναι προφανές από τα αποτελέσματα ότι η φύση του ιοντικού υγρού επηρεάζει σημαντικά τη δραστηριότητα των λιπασών. Το ιοντικό υγρό [bdmim]BF₄ αυξάνει τη δραστηριότητα των λιπασών έως και 5 φορές, ενώ το ιοντικό υγρό [bmim]BF₄, το οποίο διαφέρει μόνο σε μία θέση υποκατάστασης μειώνει δραστικά την υδρολυτική ενεργότητα του νερού. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Katsoura et al. 2009). Συγκεκριμένα, συγκρίνοντας την ενζυμική δραστηριότητα ακινητοποιημένων λιπασών (CalB και Rml) σε ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά που διέφεραν μόνο κατά το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας του υποκαταστάτη, παρατηρήθηκε ότι οι λιπάσες επιδεικνύουν καλύτερη δραστηριότητα στα ιοντικά υγρά που έχουν μεγαλύτερους υποκαταστάτες. Σημαντικό είναι επίσης να σημειωθεί πως το ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ δεν παρουσιάζει θετική επίδραση στη δραστηριότητα των λιπασών, παρά μόνο για τη λιπάση Rml. Καθίσταται προφανές ότι η αυξημένη δραστηριότητα που παρατηρείται στα μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ δεν είναι αποτέλεσμα της παρουσίας κάποιου συστατικού αποκλειστικά, αλλά των οργανομένων νανοδομών που δημιουργούνται.



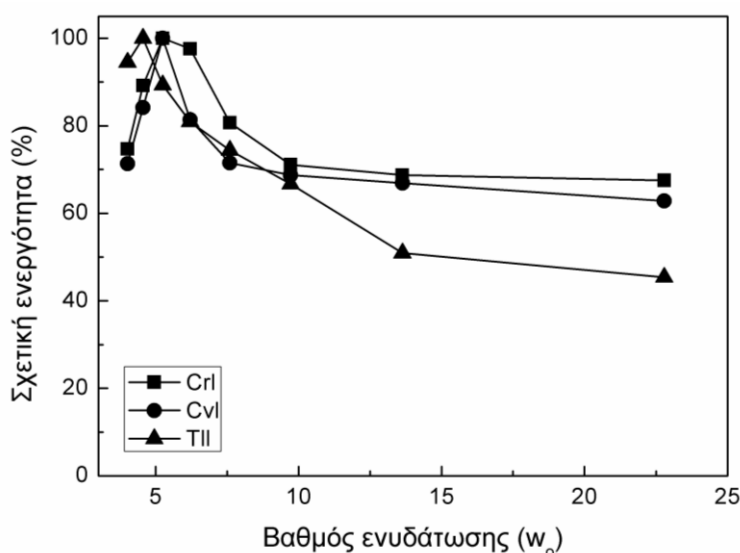
Εικόνα 34: Επίδραση της περιεκτικότητας του υδατικού συστήματος σε ιοντικό υγρό (A. [bmim]BF₄, B. [bdmim]BF₄) στην υδρολυτική δραστηριότητα λιπασών.

Λαμβάνοντας υπόψη τη διαφορετική συμπεριφορά των δύο υδρόφιλων ιοντικών υγρών, μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσής τους στην υδρολυτική δραστηριότητα των λιπασών. Το εύρος των συγκεντρώσεων που μελετήθηκε ήταν από 2 έως 20 % (v/v). Είναι προφανές από την εικόνα 34A ότι η παρουσία του ιοντικού υγρού [bmim]BF₄ έχει αρνητική επίδραση στην υδρολυτική δραστηριότητα των λιπασών. Αντίθετα, η παρουσία του ιοντικού υγρού [bdmim]BF₄ στο μικροπεριβάλλον των λιπασών Crl και Tll οδηγεί σε σημαντική αύξηση της δραστηριότητας, έως και 5 φορές για συγκέντρωση ιοντικού υγρού 10 % (v/v). Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις η

θετική επίδραση του συγκεκριμένου ιοντικού υγρού φαίνεται να μετριάζεται. Στην περίπτωση όμως των λιπασών CalB και Rml η δραστηριότητα τους παρουσία του ιοντικού υγρού [bdmim]BF₄ κυμαίνεται κοντά στα επίπεδα της δραστηριότητας που παρουσιάζουν στο υδατικό σύστημα. Είναι προφανές λοιπόν η επίδραση που έχει το ιοντικό υγρό στην ενζυμική δραστηριότητα εξαρτάται σε σημαντικό βαθμό και από τη φύση του ίδιου του ενζύμου.

8.3.4 Επίδραση του βαθμού ενυδάτωσης σε μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού

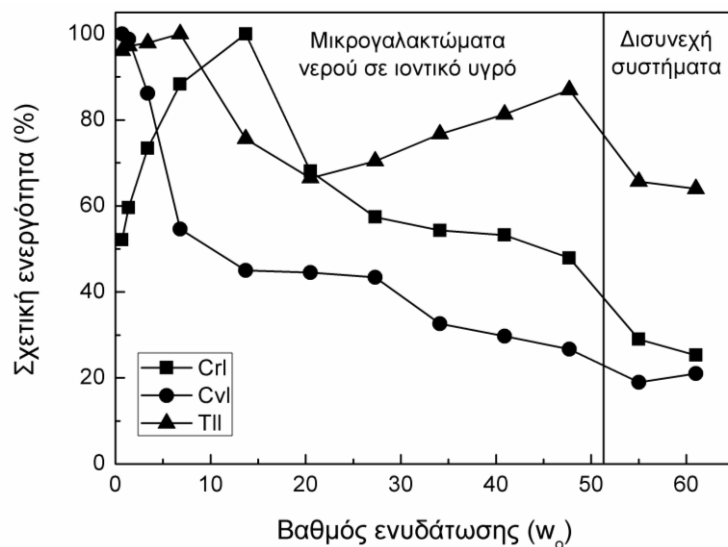
Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που επιδρούν στην καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων στα μικροετερογενή συστήματα είναι ο βαθμός ενυδάτωσης τους (w_0). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η εξάρτηση της ενεργότητας των λιπασών από το βαθμό ενυδάτωσης τόσο σε συστήματα σταθερής συγκέντρωσης νερού (W συστήματα), όσο και σε συστήματα σταθερής συγκέντρωσης επιφανειενεργού (S συστήματα).



Εικόνα 35: Επίδραση του βαθμού ενυδάτωσης στη δραστηριότητα των λιπασών (σύνθεση προπυλεστέρα του λαυρικού οξέος) που εγκλωβίζονται σε μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό σταθερής συγκέντρωσης νερού (Τυπική απόκλιση < 5%).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 35, ο βαθμός ενυδάτωσης παρουσιάζει σημαντική επίδραση στην ενεργότητα των λιπασών. Η συνθετική δραστηριότητα των λιπασών που μελετήθηκαν ακολουθεί ένα κωδωνοειδές προφίλ, παρουσιάζοντας μέγιστη δραστηριότητα σε τιμές βαθμού ενυδάτωσης γύρω από την τιμή $w_0 = 5$. Συγκεκριμένα, οι λιπάσες CrI και CrII παρουσίασαν μέγιστη δραστηριότητα σε $w_0 = 5.3$, ενώ η λιπάση TII σε τιμή $w_0 = 4.6$. Παρόμοια κωδωνοειδή εξάρτηση της δραστηριότητας αυτών των λιπασών παρατηρήθηκε σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο (Fernandes et al. 2004, Moniruzzaman et al. 2006), αν και η βέλτιστη τιμή του βαθμού ενυδάτωσης που υπολογίστηκε ήταν μεγαλύτερη. Έχει αναφερθεί πως η χρήση μη ιοντικών επιφανειενεργών, όπως το Tween 20, για το σχηματισμό μικρογαλακτωμάτων νερού σε οργανικό διαλύτη οδηγεί σε σημαντική μείωση του βέλτιστου

βαθμού ενυδάτωσης για την Cvl, σε σχέση με τη βέλτιστη τιμή που παρατηρείται σε συστήματα που σχηματίζονται με ιοντικά επιφανειοενεργά, όπως το AOT (Hossain et al. 1999). Παρόλα αυτά σημαντικός είναι και ο ρόλος της σύστασης του συστήματος. Όταν η επίδραση του βαθμού ενυδάτωσης στην ενζυμική δραστηριότητα μελετήθηκε σε συστήματα σταθερής περιεκτικότητας σε επιφανειοενεργό (εικόνα 36), τα ένζυμα παρουσίασαν διαφορετικές βέλτιστες τιμές από αυτές που παρατηρήθηκαν όταν η συγκέντρωση του νερού ήταν σταθερή. Συγκεκριμένα, η λιπάση Crl παρουσίασε βέλτιστη δραστηριότητα σε συστήματα βαθμού ενυδάτωσης $w_o = 13.7$, η λιπάση Tll σε $w_o = 6.8$ και η λιπάση Cvl σε $w_o = 0.7$.



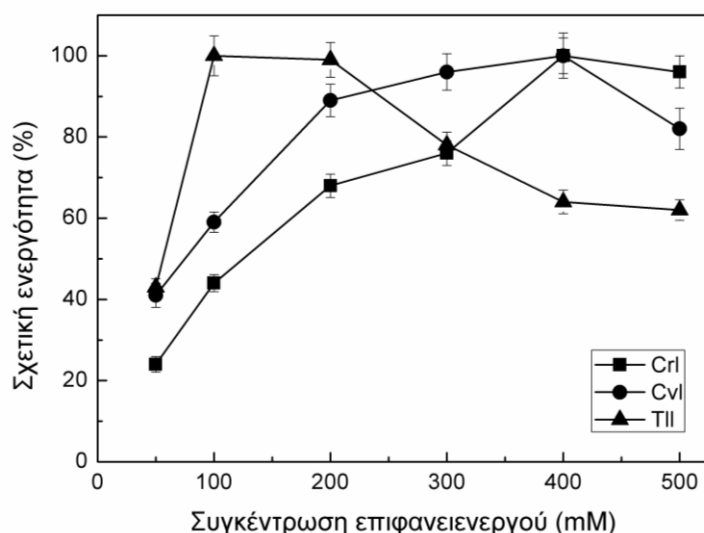
Εικόνα 36: Επίδραση του βαθμού ενυδάτωσης στη δραστηριότητα των λιπασών (σύνθεση προπυλεστέρα του λαυρικού οξέος) που εγκλωβίζονται σε μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό σταθερής συγκέντρωσης Tween 20 (Τυπική απόκλιση < 6%).

Όπως φαίνεται από τα πειραματικά αποτελέσματα ο βέλτιστος βαθμός ενυδάτωσης για την ενζυμική δραστηριότητα εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως η σύσταση του μικρογαλακτώματος, η συγκέντρωση του ενζύμου και οι μοριακές του διαστάσεις (Carvalho and Cabral 2000, Topova and Lazarova 2008). Έχει προταθεί πως η μέγιστη δραστηριότητα παρατηρείται σε συστήματα όπου το μέγεθος των υδατικών νανο-διασπορών είναι συγκρίσιμο με τις διαστάσεις του ενζύμου που φιλοξενεί (Luisi and Magid 1986, Martinek et al. 1989). Σε αυτή την περίπτωση, οι αυθόρμητες κινήσεις του πρωτεϊνικού μορίου που διαταράσσουν τη δομή του περιορίζονται (Klyachko and Levashov 2003, Luisi and Magid 1986, Martinek et al. 1989). Πιο συγκεκριμένα, οι υδατικές νανο-διασπορές που φιλοξενούν μικρή ποσότητα νερού δεν παρέχουν επαρκή ενυδάτωση στο ενζυμικό μόριο και το μόριο δεν μπορεί να εγκλωβιστεί στα αντίστροφα μικκύλια που σχηματίζονται, κάτι το οποίο συνήθως οδηγεί σε δομικές αλλαγές και αποδιάταξη του μορίου. Από την άλλη, η μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας σε συστήματα με μεγάλο βαθμό ενυδάτωσης θα μπορούσε να συσχετισθεί με τη μειωμένη σταθερότητα των ενζύμων σε αυτά τα συστήματα (όπως θα συζητηθεί στην παράγραφο 8.4), αλλά και την απόσταση του ενζυμικού μορίου από τα υδρόφοβα υποστρώματα, τα οποία δε

διαλυτοποιούνται στις υδατικές νανοδιασπορές. Αν και ακόμα δεν είναι πλήρως αποδεκτό το ότι η εξάρτηση της δραστηριότητας από το βαθμό ενυδάτωσης σε αυτά τα συστήματα σχετίζεται με το μέγεθος των ενζύμων (Carvalho and Cabral 2000, Luisi and Magid 1986, Martinek et al. 1989, Orlich and Schomäcker 2002, Stamatis et al. 1999), η συγκεκριμένη θεωρία φαίνεται να προτείνει μία εξήγηση για την αυξημένη τιμή βαθμού ενυδάτωσης στην οποία παρουσίασε βέλτιστη δραστηριότητα η CrI σε σχέση με τις άλλες δύο λιπάσες, όταν η μελέτη έγινε σε συστήματα σταθερής συγκέντρωσης σε Tween 20 (εικόνα 36).

8.3.5 Επίδραση της συγκέντρωσης του επιφανειοενεργού

Είναι ευρέως γνωστό ότι η προσθήκη επιφανειοενεργών ενώσεων μπορούν να βελτιώσουν τη δραστηριότητα των λιπασών σε υδατικά συστήματα, λόγω της μεσεπιφανειακής ενεργοποίησης που παρουσιάζουν τα συγκεκριμένα ένζυμα και λόγω της γαλακτωματοποίησης των υδρόφοβων υποστρωμάτων (Lee and Dordick 2002). Στα μικρογαλακτώματα, η συγκέντρωση του επιφανειοενεργού σε συστήματα σταθερού βαθμού ενυδάτωσης είναι μία παράμετρος η οποία καθορίζει τη συγκέντρωση των αντίστροφων μικκυλίων που σχηματίζονται και τοιουτοτρόπως την έκταση της μεσεπιφάνειας του συστήματος.



Εικόνα 37: Επίδραση της συγκέντρωσης του επιφανειοενεργού στη συνθετική δραστηριότητα (σύνθεση προπυλεστέρα του λαυρικού οξέος) λιπασών σε μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού με $w_0 = 5$.

Στην εικόνα 37 παρουσιάζεται η επίδραση της συγκεκριμένης παραμέτρου σε συστήματα με βαθμό ενυδάτωσης $w_0 = 5$ (όπου τα ένζυμα παρουσίασαν αυξημένη δραστηριότητα) στη δραστηριότητα των τριών λιπασών στα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο που σχηματίζονται παρουσία Tween 20. Όπως φαίνεται, καθώς η συγκέντρωση του επιφανειοενεργού αυξάνεται, η ενεργότητα των λιπασών φτάνει σε μία βέλτιστη τιμή και έπειτα μειώνεται. Παρόμοια μείωση της ενζυμικής δραστηριότητας σε υψηλές συγκεντρώσεις επιφανειοενεργού έχει παρατηρηθεί σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο για την παγκρετική λιπάση χοίρου (Marangoni

1993) και τις λιπάσες από *Chromobacterium viscosum* (Moniruzzaman et al. 2006, Zaman et al. 2006) και *Rhizopus arrhizus* (Brown et al. 1993).

Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, όταν η συγκέντρωση του επιφανειοενεργού αυξάνεται σε σταθερό βαθμό ενυδάτωσης, τότε ο αριθμός των υδατικών νανο-διασπορών και η έκταση της μεσεπιφάνειας αυξάνεται και συνεπώς αυξάνεται η αλληλεπίδραση με ενζυμικά μόρια που ενεργοποιούνται με μεσεπιφάνειες, όπως οι λιπάσες. Έχει αναφερθεί πως αυτές οι αλληλεπιδράσεις μπορεί να μειώσουν την ενζυμική δραστηριότητα λόγω αναστολής από τα μόρια του επιφανειοενεργού, όταν αυτά χρησιμοποιούνται σε υψηλές συγκεντρώσεις (Brown et al. 1993, Marangoni 1993). Θα πρέπει επίσης να ληφθεί υπόψη η επίδραση της συγκέντρωσης του επιφανειοενεργού στην κατανομή του υποστρώματος στη μικκυλιακή μεσεπιφάνεια. Η αύξηση της συγκέντρωσης του επιφανειοενεργού επηρεάζει την προσρόφηση αμφίφιλων μορίων, όπως τα λιπαρά οξέα και οι αλκοόλες, στη μεσεπιφάνεια και συνεπώς τη διαθεσιμότητα τους στο μικροπεριβάλλον του ενζύμου (Carvalho and Cabral 2000, Moniruzzaman et al. 2006).

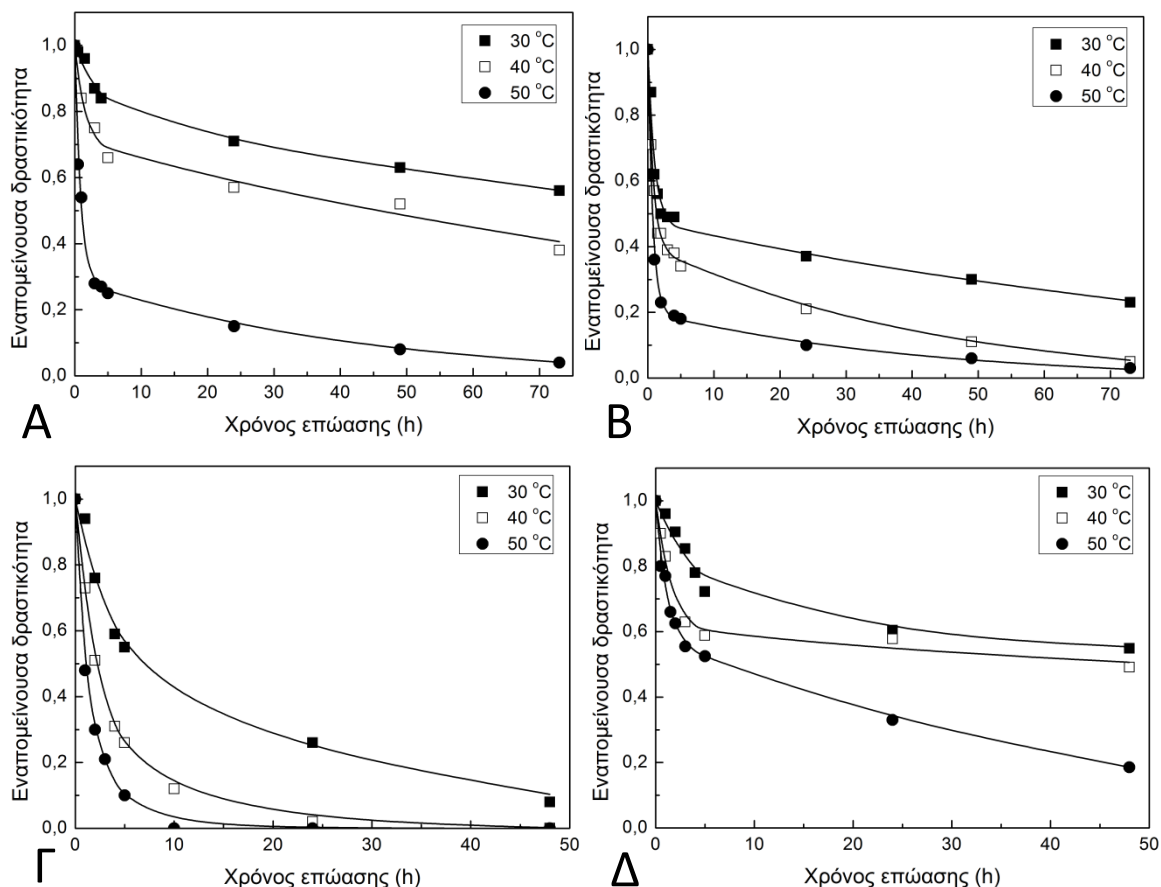
8.4 Σταθερότητα λιπασών σε μικροετερογενή συστήματα

Η σταθερότητα των ενζύμων είναι σημαντικός παράγοντας για τη χρήση των ενζύμων σε βιομηχανικές εφαρμογές. Διάφοροι παράγοντες μπορεί να οδηγήσουν στην αποδιάταξη των ενζύμων, όπως η αυξημένη θερμοκρασία, το ακραίο pH ή η παρουσία κάποιου αποδιατακτικού παράγοντα. Στο παρών κεφάλαιο θα μελετηθεί η επίδραση της θερμοκρασίας στη σταθερότητα λιπασών, τόσο σε υδατικό περιβάλλον, όσο και σε μικροετερογενή συστήματα όπως τα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο και τα μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό. Επιπλέον, στην προσπάθεια κατανόησης της καταλυτικής συμπεριφοράς των λιπασών σε αυτά τα συστήματα, θα γίνει προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων της μελέτης της σταθερότητας με δύο ευρέως χρησιμοποιούμενα μοντέλα ενζυμικής απενεργοποίησης, όπως αυτά περιγράφονται στην παράγραφο 7.7.6.

8.4.1 Σταθερότητα σε υδατικό σύστημα

Η σταθερότητα των λιπασών σε υδατικό σύστημα μελετήθηκε σε θερμοκρασίες 30, 40 και 50 °C σύμφωνα με τη διαδικασία που αναφέρεται στην παράγραφο 7.7.1 και τα πειραματικά αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το μοντέλο απενεργοποίησης δύο σταδίων που περιγράφεται στην παράγραφο 7.7.6. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στην εικόνα 38.

Οι λιπάσες που μελετήθηκαν παρουσίασαν διαφορετικό προφίλ απενεργοποίησης. Οι λιπάσες Cvl και Crl παρουσιάζουν χαμηλή σταθερότητα στο συγκεκριμένο υδατικό σύστημα (ρυθμιστικό διάλυμα Tris – HCl 50 mM, pH 7.5), κάτι το οποίο υποστηρίζεται από τη βιβλιογραφία (Melo et al. 2000, Sohn et al. 1987), ενώ οι λιπάσες CalB και Tll παρουσιάζονται περισσότερο θερμοσταθερές.



Εικόνα 38: Θερμική απενεργοποίηση λιπασών (A. CalB, B. Crl, Γ. Cvl, Δ. Tll) σε υδατικό σύστημα. Τα σύμβολα αντιστοιχούν σε πειραματικά δεδομένα και οι γραμμές στην προβλεπόμενη καμπύλη απενεργοποίησης.

Από τα διαγράμματα είναι προφανές πως η απενεργοποίηση δεν μπορεί να περιγραφεί με την κινητική ενός σταδίου, αφού δεν παρατηρείται εκθετική μείωση της δραστηριότητας. Η προσαρμογή του μοντέλου δύο σταδίων στα πειραματικά δεδομένα είναι ικανοποιητική και, όπως σχολιάζεται και στη συνέχεια, το συγκεκριμένο μοντέλο περιγράφει ικανοποιητικά την απενεργοποίηση των συγκεκριμένων ενζύμων. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί πως η απενεργοποίηση της λιπάσης Crl σε υδατικό διάλυμα δεν ακολουθεί κινητική ενός σταδίου, αλλά υπάρχει μία ενδιάμεση κατάσταση στην οποία μεταπίπτει κατά την απενεργοποίηση (Sohn et al. 1987). Η ενδιάμεση αυτή κατάσταση περιγράφεται από το μοντέλο δύο σταδίων. Τα αποτελέσματα της μαθηματικής επεξεργασίας παρουσιάζονται στον πίνακα 19. Η πολύ καλή προσαρμογή του μοντέλου δύο σταδίων στα πειραματικών δεδομένων υποδεικνύεται από το συντελεστή προσδιορισμού (r^2) σε όλες τις περιπτώσεις. Ακολουθεί ένας ενδεικτικός σχολιασμός των κινητικών παραμέτρων που υπολογίστηκαν για τη σταθερότητα των λιπασών σε υδατικά συστήματα, έτσι ώστε να κατανοηθεί ο ρόλος και η χρησιμότητά τους.

Είναι προφανές ότι όσο αυξάνεται η θερμοκρασία, ο ρυθμός απενεργοποίησης των ενζύμων αυξάνεται. Η συγκεκριμένη παραδοχή αποτυπώνεται στις παραμέτρους k_1 και k_2 , οι οποίες περιγράφουν το ρυθμό με τον οποίο το ένζυμο μεταβαίνει από τη μία κατάσταση στην

άλλη. Όπως φαίνεται στον πίνακα 19, η τιμή των δύο αυτών παραμέτρων αυξάνεται με αύξηση της θερμοκρασίας. Επιπλέον, η αύξηση της θερμοκρασίας στις περισσότερες των περιπτώσεων οδηγεί σε μείωση της ενεργότητας του ενδιάμεσου (E_1), όπως αυτή περιγράφεται από την παράμετρο α_1 . Αξίζει να σημειωθεί πως σε όλες τις περιπτώσεις το μοντέλο προβλέπει πλήρη απενεργοποίηση του ενζύμου ($\alpha_2 = 0.000$). Θα πρέπει να σημειωθεί πως οι Henley και Sadana περιέγραψαν επαρκώς τη φυσική υπόσταση των συγκεκριμένων παραμέτρων (Henley and Sadana 1985). Για παράδειγμα περιέγραψαν περιπτώσεις που το ένζυμο δεν απενεργοποιούταν πλήρως ($\alpha_2 \neq 0$) ή που παρουσίαζε ενεργοποίηση σε αρχικό χρόνο ($\alpha_1 > 1$), περιπτώσεις τις οποίες αδυνατεί να περιγράψει το μοντέλο απενεργοποίησης ενός σταδίου. Τέτοιες περιπτώσεις συναντώνται στις επόμενες παραγράφους.

Πίνακας 19: Κινητικές σταθερές απενεργοποίησης λιπασών σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl pH 7.5 (50 mM) σύμφωνα με το μοντέλο απενεργοποίησης σε 2 στάδια, καθώς και ο χρόνος ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$).

Λιπάση	T (°C)	α_1	α_2	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	r^2	$t_{1/2}$ (h)
CalB	30	0.772 ±0.032	0.000 -	0.242 ±0.060	0.005 ±0.001	0.992	90.9
	40	0.693 ±0.048	0.000 -	0.662 ±0.287	0.007 ±0.001	0.987	48.2
	50	0.283 ±0.021	0.000 -	1.174 ±0.109	0.027 ±0.006	0.996	1.0
Crl	30	0.468 ±0.041	0.000 -	1.022 ±0.220	0.010 ±0.002	0.978	2.6
	40	0.397 ±0.015	0.000 -	1.313 ±0.100	0.028 ±0.004	0.996	1.3
	50	0.196 ±0.020	0.000 -	1.420 ±0.103	0.028 ±0.011	0.997	0.7
Cvl	30	0.455 ±0.221	0.000 -	0.272 ±0.158	0.034 ±0.016	0.989	6.5
	40	0.259 ±0.064	0.000 -	0.479 ±0.058	0.110 ±0.027	0.999	2.2
	50	0.529 ±0.088	0.000 -	2.180 ±0.746	0.380 ±0.037	1.000	0.9
Tll	30	0.616 ±0.067	0.000 -	0.191 ±0.050	0.003 ±0.002	0.980	75.0
	40	0.584 ±0.031	0.000 -	0.600 ±0.113	0.003 ±0.002	0.990	53.4
	50	0.567 ±0.029	0.000 -	0.930 ±0.151	0.024 ±0.003	0.992	6.4

Το πλήθος των παραμέτρων που εξάγονται από τη μοντελοποίηση της απενεργοποίησης των λιπασών δεν καθιστά εύκολη τη σύγκριση της σταθερότητας διαφορετικών ενζύμων, ή ακόμα και του ίδιου ενζύμου σε διαφορετικά συστήματα. Για αυτό το λόγο υπολογίζεται ο χρόνος ημίσειας ζωής από τις παραμέτρους του μοντέλου 2 σταδίων. Για παράδειγμα, αν συγκριθούν οι χρόνοι ημίσειας ζωής των τεσσάρων λιπασών στους 30 °C, καθίσταται σαφές ότι οι CalB και TII είναι αρκετά πιο σταθερές από τις Cvi και Crl, κάτι το οποίο φαίνεται στην εικόνα 38, αλλά δεν είναι τόσο προφανές από τις κινητικές παραμέτρους.

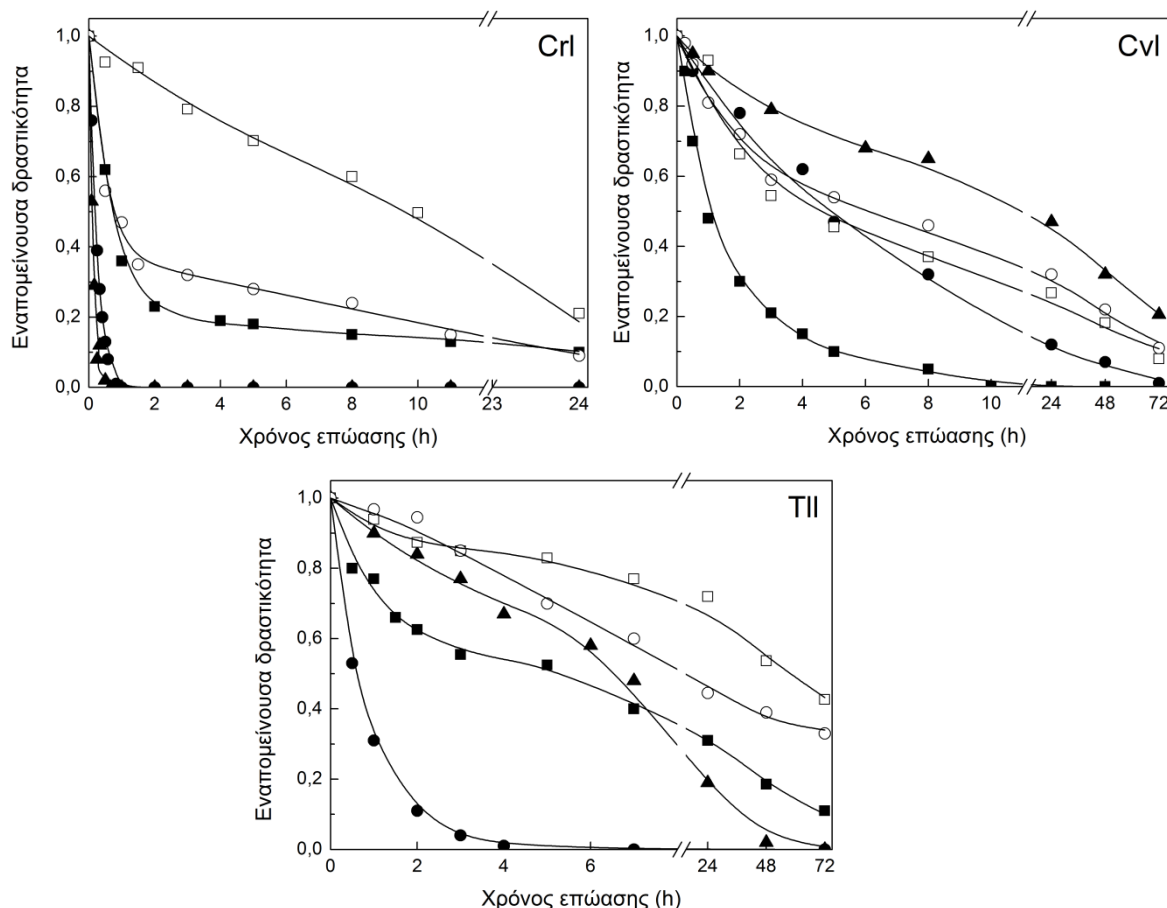
8.4.2 Σταθερότητα σε μικροετερογενή συστήματα

Η σταθερότητα των λιπασών Crl, Cvi και TII σε διάφορα συστήματα μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών μελετήθηκε και συγκρίθηκε με τη σταθερότητα που επιδεικνύουν σε άλλα μικροετερογενή συστήματα και σε υδατικό διάλυμα. Η σταθερότητα των λιπασών μελετήθηκε για διάστημα 5 ημερών στους 30, 40 και 50 °C απουσία υποστρωμάτων, σύμφωνα με τα πρωτόκολλα που αναφέρονται στην παράγραφο 7.7. Τα αποτελέσματα (διαγράμματα και πίνακες κινητικών σταθερών απενεργοποίησης) για όλα τα μικροετερογενή συστήματα που μελετήθηκαν παρουσιάζονται στον Παράρτημα III. Θα πρέπει να σημειωθεί πως η προσαρμογή της κινητικής απενεργοποίησης δύο σταδίων στα πειραματικά αποτελέσματα είναι αρκετά ικανοποιητική σε όλες τις περιπτώσεις ($r^2 > 0.920$). Αξίζει να σημειωθεί πως από την προσαρμογή των πειραματικών αποτελεσμάτων προέκυψαν περιπτώσεις όπου:

- ❖ Η απενεργοποίηση ακολουθεί κινητική ενός σταδίου (π.χ. Crl σε AOT μικρογαλακτώματα).
- ❖ Παρατηρείται ενεργοποίηση των λιπασών έως και 200% ($\alpha_1 > 1$) στα μικρογαλακτώματα ιοντικών υγρών, κυρίως σε χαμηλές θερμοκρασίες. Ενεργοποίηση των συγκεκριμένων λιπασών έχει αναφερθεί τόσο σε μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο (Crooks et al. 1995b, Fernandes et al. 2004), όσο και σε ιοντικά υγρά (Sheldon et al. 2002).
- ❖ Το μοντέλο δεν προβλέπει πλήρη απενεργοποίηση των λιπασών ($\alpha_2 \neq 0$) σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα για τις Cvi και TII στα συστήματα S των ιοντικών μικρογαλακτωμάτων. Οι περιπτώσεις αυτές σχετίζονται πάντα με ενεργοποίηση των λιπασών. Θα πρέπει να σημειωθεί πως αν και ο συντελεστής προσδιορισμού είναι αρκετά υψηλός ($r^2 > 0.920$), είναι χαμηλότερος από αυτόν που παρατηρείται όταν προβλέπεται πλήρης απενεργοποίηση των λιπασών, κάτι το οποίο υποδηλώνει ότι πέραν της ενεργοποιημένης κατάστασης, ίσως υπάρχει και ένα δεύτερο ενδιάμεσο, οπότε μία κινητική τριών σταδίων ίσως περιέγραφε την κινητική απενεργοποίησης ακόμα καλύτερα.

Στην εικόνα 39 παρουσιάζονται ενδεικτικά διαγράμματα της σταθερότητας των τριών λιπασών σε διάφορα συστήματα στους 50 °C. Είναι προφανές ότι η σταθερότητα των λιπασών στα διάφορα συστήματα εξαρτάται σημαντικά από τη φύση του ενζύμου. Για παράδειγμα η λιπάση Crl απενεργοποιείται ταχύτατα σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων χωρίς επιφανειενεργό, ενώ η λιπάση Cvi παρουσιάζει πολύ καλή σταθερότητα σε αυτά τα συστήματα. Σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη σταθερότητα των λιπασών είναι η σύσταση των

συστημάτων νανο-διασποράς. Στην εικόνα 39 φαίνεται η διαφοροποίηση μεταξύ των δύο ενδεικτικών συστημάτων ιοντικού υγρού. Επίσης, είναι εμφανές ότι τα μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό αυξάνουν τη σταθερότητα των λιπασών σε σχέση με τα υδατικά συστήματα, το ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ κορεσμένο σε νερό, αλλά και με ευρέως χρησιμοποιούμενα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο.



Εικόνα 39: Θερμική απενεργοποίηση λιπασών σε διάφορα συστήματα στους 50 °C. ■ Υδατικό σύστημα, ● AOT Μικρογαλακτώματα (w_0 6), ▲ Μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειενεργό (SLM 14), □ μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού (S2), ○ μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού (S4). Τα σύμβολα αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα και οι γραμμές στην προβλεπόμενη καμπύλη απενεργοποίησης.

Οι χρόνοι ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$) των τριών λιπασών που μελετήθηκαν, όπως υπολογίστηκαν από το μοντέλο απενεργοποίησης δύο σταδίων, παρουσιάζονται στον πίνακα 20. Τα μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό αυξάνουν τη σταθερότητα των λιπασών στο πλήθος των περιπτώσεων σε σχέση με τη σταθερότητα στο υδατικό διάλυμα. Η σταθερότητα στα νέα αυτά συστήματα σε αρκετές περιπτώσεις είναι μεγαλύτερη ακόμα και από τη σταθερότητα που εμφανίζουν σε άλλα ευρέως χρησιμοποιούμενα συστήματα νανο-διασποράς. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει ότι τα μικρογαλακτώματα ιοντικών υγρών παρέχουν ένα προστατευτικό μικροπεριβάλλον για τις συγκεκριμένες λιπάσες, το οποίο γίνεται ιδιαίτερα εμφανές σε υψηλές

θερμοκρασίες. Η βελτιωμένη σταθεροποιητική ικανότητα των νέων αυτών συστημάτων νανο-διασποράς σε σχέση με τα AOT μικρογαλακτώματα έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά για την υπεροξειδάση της ραφανίδας (Moniruzzaman et al. 2009). Στην περίπτωση της λιπάσης Cvl, η οποία παρουσιάζει χαμηλή σταθερότητα σε υδατικό σύστημα (παράγραφος 8.4.1), όλα τα συστήματα νανο-διασποράς που χρησιμοποιήθηκαν αύξησαν σημαντικά τη σταθερότητα του ενζύμου, υποδεικνύοντας το σταθεροποιητικό ρόλο των υδατικών νανο-διασπορών. Θα πρέπει να σημειωθεί πως η σταθερότητα των λιπασών στα μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού είναι μεγαλύτερη από αυτή που παρουσιάζουν σε ιοντικό υγρό (παράρτημα III). Στη βιβλιογραφία, η χρήση των ιοντικών μικρογαλακτωμάτων προτείνεται για τη σταθεροποίηση των ενζύμων (Moniruzzaman et al. 2010a, Ulbert et al. 2005, Zhao 2010). Το γεγονός αυτό, μαζί με το γεγονός ότι στα συστήματα αυτά οι λιπάσες παρουσιάζουν αυξημένη καταλυτική δραστηριότητα (παράγραφος 8.3.1), καθιστά τα νέα αυτά μέσα κατάλληλα για την ανάπτυξη βιοκαταλυτικών εφαρμογών.

Πίνακας 20: Χρόνος ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$, h) λιπασών σε διάφορα μικροετερογενή συστήματα.

Σύστημα	Crl			Cvl			TII		
Θερμοκρασία (°C)	30	40	50	30	40	50	30	40	50
Υδατικό δ/μα	2.5	1.3	0.7	6.5	2.2	0.9	75.0	53.4	6.4
AOT / RM (w_o 6)	0.2	0.1	< 0.1	> 100	90.0	4.9	0.9	0.8	0.6
SLM 1	0.2	0.2	<0.1	> 100	47.8	16.1	>100	89.0	36.8
SLM 14	0.3	0.2	< 0.1	> 100	> 100	19.6	32.6	17.1	8.8
W1	12.6	2.0	0.9	58.8	40.5	28.4	> 100	36.9	3.4
W3	23.5	8.3	6.8	> 100	48.0	41.3	> 100	47.7	31.2
W7	8.5	7.1	4.7	6.1	2.9	1.8	> 100	> 100	64.9
S2	30.1	13.3	9.9	> 100	22.7	4.3	> 100	67.9	38.9
S4	1.7	1.0	0.7	> 100	24.2	5.9	24.0	22.6	20.7
S7	1.5	1.2	0.1	24.4	20.7	10.9	17.6	17.4	16.0

Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί ότι η θετική επίδραση των μικρογαλακτωμάτων ιοντικού υγρού στη σταθερότητα των ενζύμων δεν μπορεί να συσχετιστεί με τη συγκέντρωση του επιφανειοενεργού ή του ιοντικού υγρού, αν και η μεγαλύτερη σταθερότητα των λιπασών παρατηρήθηκε στα συστήματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε νερό (π.χ. S2 από τα συστήματα S). Αυτό το φαινόμενο έχει παρατηρηθεί και σε άλλα μικροετερογενή συστήματα και συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο (Carvalho and Cabral 2000, Stamatis et al. 1999, Tzialla et al. 2008). Η αύξηση της σταθερότητας στα περισσότερο άνυδρα συστήματα μπορεί να συσχετισθεί με την αυξημένη ακαμψία που παρουσιάζουν τα ένζυμα σε αυτά τα συστήματα. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι ο συσχετισμός που παρατηρείται στα συστήματα S μεταξύ του βαθμού

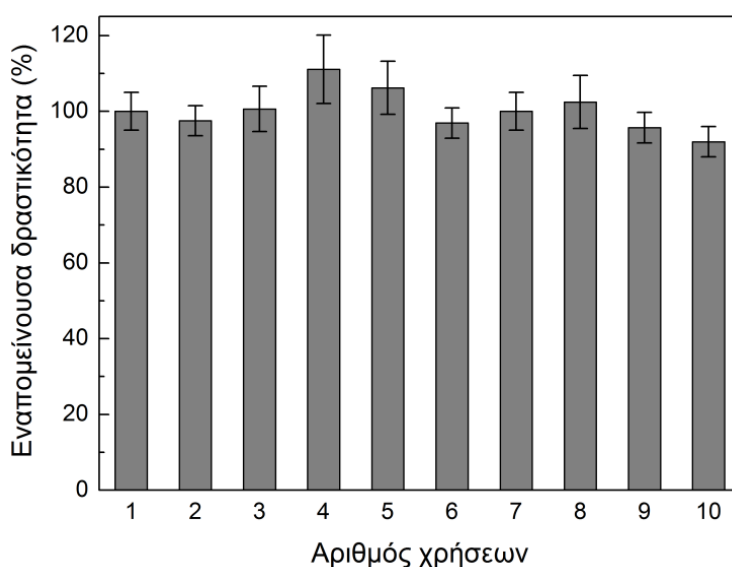
ενυδάτωσης και της σταθερότητας των λιπασών δεν παρατηρείται στα W συστήματα (π.χ. για τις Crl και Cvl), το οποίο υποδεικνύει ότι η σύσταση των συστημάτων επιδρά στη σταθερότητα των ενζύμων. Σε προηγούμενη μελέτη έχει αναφερθεί πως η σταθερότητα της υπεροξειδάσης της ραφανίδας σε ένα παρόμοιο σύστημα μικρογαλακτωμάτων ιοντικού υγρού είναι αυξημένη σε σχέση τη σταθερότητα που επιδεικνύει σε AOT μικρογαλακτώμα νερού σε έλαιο, αν και χαμηλότερη από τη σταθερότητα στο ιοντικό υγρό (Moniruzzaman et al. 2009).

Αρκετές εργασίες αναφέρουν πως οι λιπάσες διατηρούν τη δραστηριότητα τους για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στα ιοντικά υγρά σε σχέση με τους οργανικούς διαλύτες, ιδιαίτερα σε υψηλές θερμοκρασίες (Gubicza et al. 2003, Kaar et al. 2003, Lozano et al. 2007, Ulbert et al. 2005). Η σταθεροποίηση συνήθως αποδίδεται σε διάφορους παράγοντες όπως ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ιοντικών υγρών και των ενζύμων (Yuan et al. 2006). Ο Sheldon και οι συνεργάτες του πρότειναν ότι το ιοντικό υγρό σταθεροποιεί το ένζυμο υποβοηθώντας τη διατήρηση των μορίων του νερού που είναι απαραίτητα για τη σωστή αναδίπλωση του ενζύμου, ενώ παράλληλα το αυξημένο ιξώδες των ιοντικών υγρών μειώνει τις κινήσεις των ενζύμων και με αυτό τον τρόπο δυσχεραίνεται η μετάβαση από την ενεργή στην αποδιαταγμένη μορφή (Sheldon et al. 2002, van Rantwijk and Sheldon 2007). Στην περίπτωση των μικρογαλακτωμάτων ιοντικού υγρού αναμένεται ότι μία ποσότητα ιοντικού υγρού θα είναι διαλυτή στο μικροπεριβάλλον του ενζύμου, διευκολύνοντας έτσι την προστατευτική δράση που έχουν τα ιοντικά υγρά στα πρωτεϊνικά μόρια. Σε συνδυασμό με τη σταθεροποιητική δράση που έχουν τα νανοδομημένα συστήματα (Stamatis et al. 1999, Tuena De Gomez-Puyou and Gomez-Puyou 1998), τα μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό είναι ένα σύστημα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για τη σταθεροποίηση των ενζύμων (Moniruzzaman et al. 2010a, Zhao 2010).

8.4.3 Επαναχρησιμοποίηση λιπασών που έχουν εγκλωβιστεί σε μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού

Αν και η χρήση των μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό ως μέσα για την επίτευξη αντιδράσεων επιφέρει πολλαπλά πλεονεκτήματα στην καταλυτική συμπεριφορά των λιπασών (π.χ. αυξημένη δραστηριότητα και σταθερότητα), η πρακτική εφαρμογή αυτών των συστημάτων σε βιομηχανικές διεργασίες εμποδίζεται από τη δυσκολία ανάκτησης του προϊόντος και την επαναχρησιμοποίηση του βιοκαταλύτη. Σε αυτή τη διατριβή αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολλο επαναχρησιμοποίησης ενζύμων που έχουν εγκλωβιστεί στα συγκεκριμένα συστήματα. Η εκχύλιση των συγκεκριμένων συστημάτων με ένα μη πολικό υδρόφοβο οργανικό διαλύτη, όπως το *n*-εξάνιο, επιτρέπει την ανάκτηση των αντιδρώντων και επακολούθως το διαχωρισμό του προϊόντος, καθώς η διαλυτότητα του νερού, του [bmim]PF₆ και του Tween 20 είναι αμελητέα στη φάση του οργανικού διαλύτη. Επιπλέον, οι υδατικές νανο-διασπορές του μικρογαλακτώματος παρέχουν ένα φιλικό μικροπεριβάλλον για το ένζυμο δεν επιτρέπει τη μετάβαση του ενζύμου στον οργανικό διαλύτη και σταθεροποιεί το ένζυμο κατά τη διαδικασία της εκχύλισης.

Η ικανότητα της επαναχρησιμοποίησης της λιπάσης TII που έχει εγκλωβιστεί σε μικρογαλάκτωμα νερού σε ιοντικό υγρό W3 μελετήθηκε στην αντίδραση εστεροποίησης του καπρυλικού οξέος με 1-βουτανόλη στους 30 °C. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα για 8 ώρες και έπειτα εκχυλίζονται τα αντιδρώντα (υποστρώματα και προϊόντα) με ίση ποσότητα *n*-εξανίου. Η διαδικασία της εκχύλισης επαναλαμβάνεται 5 φορές ώστε να εξαλειφθεί κάθε ίχνος αντιδρώντος από το μικρογαλάκτωμα. Από ανάλυση των εκχυλισμάτων βρέθηκε πως στο μικρογαλάκτωμα παραμένουν λιγότερα από 0.5 mM των αντιδρώντων. Το ένζυμο παραμένει μετά την εκχύλιση στις υδατικές νανο-διασπορές του μικρογαλακτώματος και μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί. Ποσότητα υποστρωμάτων προστίθενται στο μικρογαλάκτωμα μετά την εκχύλιση και το σύστημα επωάζεται στους 30 °C για ένα νέο κύκλο επαναχρησιμοποίησης. Από την εικόνα 40 φαίνεται πως ύστερα από 10 χρήσεις (80 ώρες συνολικού χρόνου δραστηριότητας) η λιπάση TII διατηρεί 90 % της αρχικής της δραστηριότητας. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την εξαιρετική σταθεροποιητική ικανότητα που έχουν αυτά τα συστήματα για την επαναλαμβανόμενη χρήση ενζύμων.



Εικόνα 40: Επαναχρησιμοποίηση της λιπάσης TII που έχει εγκλωβιστεί σε μικρογαλάκτωμα νερού σε ιοντικό υγρό (W3) στους 30 °C.

8.5 Μελέτη της δευτεροταγούς δομής λιπασών σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων

Η ενδιαφέρουσα καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων στα μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό πιθανόν να οφείλεται σε αλλαγές στη δομή των ενζύμων. Με σκοπό τη συσχέτιση πιθανών δομικών αλλαγών με τη βελτίωση των καταλυτικών ιδιοτήτων των ενζύμων εφαρμόστηκαν διάφορες φασματοσκοπικές τεχνικές για την ανάλυση της δομής των πρωτεϊνών στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων.

8.5.1 Μελέτη της δομής σε μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο

Η μελέτη της δομής των λιπασών σε μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο έγινε με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωσισμού. Τα δομικά χαρακτηριστικά των λιπασών μελετήθηκαν αρχικά στο ρυθμιστικό διάλυμα, ώστε να επιβεβαιωθεί η εγκυρότητα των αποτελεσμάτων ύστερα από σύγκριση με τα δεδομένα από τις κρυσταλλικές δομές, αλλά και τυχόν αποκλίσεις που μπορεί να υπάρχουν. Επιπλέον, μέσω αυτής της διαδικασίας επιλέχθηκε και ο αλγόριθμος που περιγράφει καλύτερα τις δομές των ενζύμων. Στον πίνακα 21 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα για την α -έλικα και β -πτυχωτή επιφάνεια των 5 λιπασών που μελετήθηκαν στο παρών κεφάλαιο.

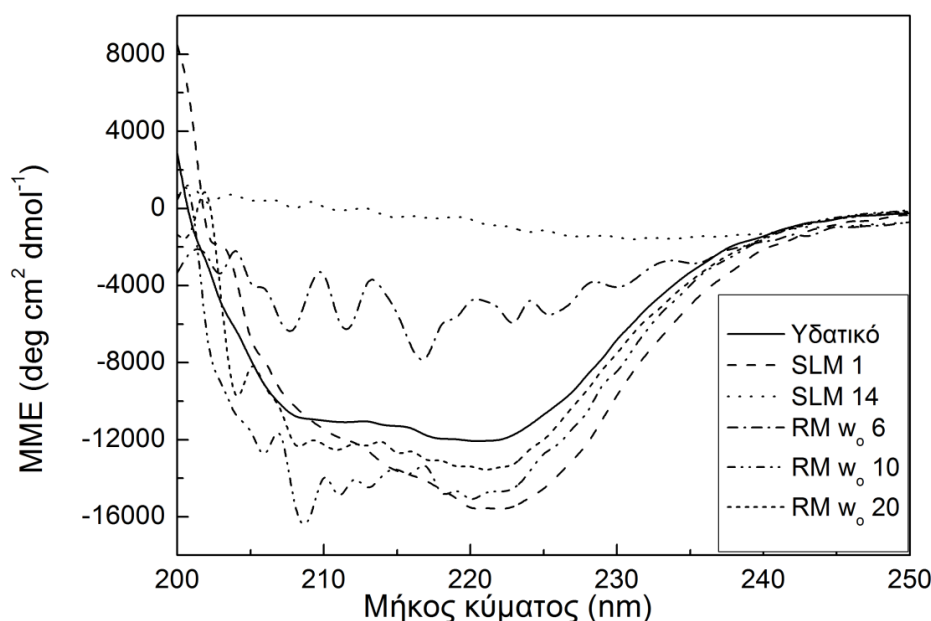
Πίνακας 21: Προσδιορισμός (%) της δευτεροταγούς δομής (α -έλικας και β -πτυχωτής επιφάνειας) λιπασών σε υδατικό διάλυμα Tris-HCl pH 7.5 (50 mM) σύμφωνα με διάφορους αλγόριθμους.

Λιπάση	CalB		Crl		Cvl		Rml		Tll	
	α	β	α	β	α	β	α	β	α	β
Προέλευση δεδομένων										
Κρυσταλλογραφικά δεδομένα	37	15	37	15	36	17	33	26	34	23
Varselec	21	21	27	14	24	14	16	9	8	6
Selcon 2	27	12	26	13	34	10	27	16	36	7
Selcon 3	27	18	30	17	33	15	27	16	22	5
K2D	31	11	38	4	30	17	28	12	27	21
CONTIN	26	0	43	0	14	6	22	29	9	45

Φαίνεται χαρακτηριστικά στον πίνακα 21 ότι σε όλα τα ένζυμα παρατηρούνται αποκλίσεις από τη δομή που περιγράφει η κρυσταλλογραφία. Αυτό οφείλεται στις διαφορετικές συνθήκες κρυστάλλωσης μιας πρωτεΐνης και των συνθηκών που λήφθηκαν τα συγκεκριμένα φάσματα κυκλικού διχρωσισμού. Παρόλα αυτά, οι αλγόριθμοι Varselec και CONTIN αποκλίνουν πάρα πολύ από την κρυσταλλογραφική δομή και για αυτό το λόγο αποκλείστηκαν από την ανάλυση των φασμάτων. Οι υπόλοιποι τρεις αλγόριθμοι περιγράφουν ικανοποιητικά τη δομή των λιπασών στο υδατικό σύστημα. Καθίσταται σαφές ότι από πρωτεΐνη σε πρωτεΐνη είναι διαφορετικός ο αλγόριθμος που περιγράφει καλύτερα τη δομή. Λαμβάνοντας όλα αυτά υπόψη, για την ανάλυση των φασμάτων κυκλικού διχρωσισμού στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο επιλέχθηκε ο αλγόριθμος Selcon 2 με τη βάση δεδομένων που πρότειναν οι Kabsch και Sanders (Kabsch and Sander 1983), καθώς περιγράφει σε ικανοποιητικό βαθμό τη δομή όλων των λιπασών που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή.

Η δομή των λιπασών μελετήθηκε με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωσισμού σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο που σχηματίζονται παρουσία AOT και σε μικρογαλακτώματα που σχηματίζονται χωρίς την παρουσία επιφανειοενεργού. Στα AOT μικρογαλακτώματα επιλέχθηκαν συστήματα με διαφορετικό βαθμό ενυδάτωσης, καθώς η

συγκεκριμένη παράμετρος επηρεάζει σημαντικά τη δραστικότητα των λιπασών. Από τα συστήματα μικρογαλακτωμάτων χωρίς επιφανειοενεργό επιλέχθηκαν 2 συστήματα. Το SLM 1 είναι ένα μονοφασικό μείγμα διαλυτών, ενώ το σύστημα SLM 14 παρουσιάζει οργανωμένες υδατικές νανο-διασπορές στη συνεχή φάση του οργανικού διαλύτη.



Εικόνα 41: Φάσματα κυκλικού διχρωισμού στο πέραν υπεριώδες της λιπάσης CνI σε υδατικό σύστημα και σε διάφορα συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο.

Στην εικόνα 41 παρατίθενται τα κανονικοποιημένα φάσματα κυκλικού διχρωισμού στο πέραν υπεριώδες της λιπάσης CνI για μία σειρά μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο. Είναι προφανές ότι σημαντικές δομικές αλλαγές λαμβάνουν χώρα κατά τον εγκλωβισμό της συγκεκριμένης λιπάσης στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων. Η τιμή της μέσης μοριακής ελλειπτικότητας ανά αμινοξύ στα 222 nm είναι ενδεικτική της περιεκτικότητας της πρωτεΐνης σε α -έλικες. Φαίνεται ότι στο μικρογαλακτώμα χωρίς επιφανειοενεργό SLM 14 η λιπάση CνI χάνει σχεδόν πλήρως την ελικοειδή της δομή, ενώ σημαντικά μειώνεται και στο AOT μικρογαλακτώμα με βαθμό ενυδάτωσης 6. Αντίθετα, η λιπάση φαίνεται να αυξάνει τα ποσοστά α -έλικας της στα συστήματα SLM 1 και στα AOT μικρογαλακτώματα με βαθμό ενυδάτωσης πάνω από 10.

Η δευτεροταγής δομή των λιπασών που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη, σύμφωνα με την ανάλυση των φασμάτων κυκλικού διχρωισμού με τον αλγόριθμο Selcon 2, παρατίθενται στον πίνακα 22. Το πρώτο συμπέρασμα που μπορεί να εξαχθεί από τα αποτελέσματα είναι πως δεν παρατηρείται σημαντική αύξηση του τυχαίου σπειράματος κατά τον εγκλωβισμό των ενζύμων σε συστήματα νανοδιασποράς, η οποία να συνάδει με την αποδιάταξη των λιπασών. Το αποτέλεσμα αυτό ταιριάζει με τα αποτελέσματα της δραστικότητας των λιπασών σε αυτά τα συστήματα, καθώς φαίνεται πως οι λιπάσες διατηρούν μία οργανωμένη και καταλυτικά ενεργή διαμόρφωση στα μικροετερογενή συστήματα.

Πίνακας 22: Προσδιορισμός (%) της δευτεροταγούς δομής λιπασών σε υδατικό συστήματα και διάφορα συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο, με χρήση του αλγορίθμου Selcon 2.

Λιπάση	Σύστημα	α -έλικα	β -πτυχώσεις	β -στροφές	Άλλες δομές	RMSD
CALB	Υδατικό	27	12	11	50	0.392
	SLM 1	8	44	4	44	0.509
	SLM 14	4	42	7	47	0.432
	RM $w_o = 6$	7	46	3	44	0.593
	RM $w_o = 10$	25	17	3	55	0.554
	RM $w_o = 20$	27	26	3	44	0.384
Crl	Υδατικό	26	13	10	51	0.520
	SLM 1	3	43	7	47	0.674
	SLM 14	3	43	7	47	0.475
	RM $w_o = 6$	7	34	13	46	0.541
	RM $w_o = 10$	13	20	13	54	0.725
	RM $w_o = 20$	16	19	11	54	0.493
Cvl	Υδατικό	34	10	7	49	1.666
	SLM 1	40	6	9	45	0.202
	SLM 14	2	45	7	46	0.247
	RM $w_o = 6$	8	45	4	43	0.306
	RM $w_o = 10$	39	8	3	50	0.160
	RM $w_o = 20$	43	3	2	52	0.367
Rml	Υδατικό	27	16	4	53	0.231
	SLM 1	4	41	8	47	0.231
	SLM 14	8	43	5	44	0.651
	RM $w_o = 6$	3	43	7	47	0.681
	RM $w_o = 10$	10	37	1	52	0.519
	RM $w_o = 20$	25	18	2	55	0.368
TII	Υδατικό	36	6	19	39	0.330
	SLM 1	6	36	9	49	0.447
	SLM 14	2	39	19	40	0.319
	RM $w_o = 6$	7	45	3	45	0.228
	RM $w_o = 10$	7	45	3	45	0.243
	RM $w_o = 20$	8	44	4	44	0.280

SLM: Μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο χωρίς επιφανειοενεργό

RM: Μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο που σχηματίζονται παρουσία AOT

RMSD: μέση τετραγωνική ρίζα της απόκλισης

Παρόλα αυτά, σημαντικές αλλαγές παρατηρούνται στη διαμόρφωση των λιπασών, ανάλογα με το σύστημα στο οποίο εγκλωβίζονται και το βαθμό ενυδάτωσης του. Στις περισσότερες περιπτώσεις ακολουθείται μία τάση για αύξηση της β-πτυχωτής επιφάνειας και αντίστοιχη μείωση της α-έλικας (έως και 34 %) όταν οι λιπάσες εισέρχονται σε τέτοια συστήματα. Παρόμοια συμπεριφορά έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία και για άλλα ένζυμα (De Diego et al. 2005, Lozano et al. 2005, Marangoni 1993, McCabe et al. 2005). Οι αναφορές αυτές συσχετίζουν την αύξηση των β-πτυχωτών επιφανειών με μία περισσότερο συμπαγή δομή που υιοθετούν τα ένζυμα, η οποία είναι υπεύθυνη για τη σταθεροποίηση των ενζύμων σε αυτά τα συστήματα. Η σταθεροποίηση της λιπάσης CnI στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων συνοδεύεται από σημαντική αύξηση των β-πτυχωτών επιφανειών. Επιπλέον, η τάση που εμφανίζουν οι λιπάσες να δημιουργούν συσσωματώματα μπορεί να οφείλεται για τις αλλαγές στη δομή και την καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων σε αυτά τα συστήματα (Palomo et al. 2003). Έχει αναφερθεί ότι τα συσσωματώματα ενζυμικών μορίων οφείλονται στη δημιουργία διαμοριακών β-πτυχωτών επιφανειών (Mukherjee et al. 2007). Είναι λογικό λοιπόν σε συστήματα αφιλόξενα προς το ένζυμο να δημιουργούνται εκτενείς β-πτυχωτές επιφάνειες στην επιφάνεια του πρωτεϊνικού μορίου για να αυξήσει την αλληλεπίδραση με άλλα ενζυμικά μόρια, δημιουργώντας συσσωματώματα, και να αποτρέψει την αλληλεπίδραση με τον οργανικό διαλύτη.

Ενδιαφέρον είναι το γεγονός ότι στις περισσότερες περιπτώσεις, αύξηση του βαθμού ενυδάτωσης οδηγεί σε αύξηση της α-έλικας και μείωση της β-πτυχωτής επιφάνειας. Φαίνεται πως το ένζυμο «επιστρέφει» σε μία δομή αρκετά όμοια με αυτή που εμφανίζει στο νερό. Αυτό μπορεί να εξηγηθεί λαμβάνοντας υπόψη δομή των αντίστροφων μικκυλίων. Όταν ο βαθμός ενυδάτωσης αυξάνεται στα αντίστροφα μικκύλια, η διάμετρος των υδατικών νανο-διασπορών αυξάνεται. Έτσι, το ένζυμο, ανάλογα με την υδροφοβικότητα της επιφάνειας του, μπορεί να τοποθετηθεί είτε στη μεσεπιφάνεια, είτε στο κέντρο του μικκυλίου όπου το μικροπεριβάλλον προσομοιάζει το υδατικό σύστημα (εικόνα 10). Εφόσον η επιφάνεια της λιπάσης είναι αρκετά υδρόφιλη, μόλις οι υδατικές νανοδιασπορές έχουν αρκετά μεγάλη διάμετρο, το ένζυμο θα διαλυτοποιηθεί στο κέντρο του αντίστροφου μικκυλίου για να μειώσει την επαφή με το επιφανειενεργό ή τον οργανικό διαλύτη. Έτσι το μικροπεριβάλλον του ενζύμου ομοιάζει με αυτό σε ένα υδατικό σύστημα και το ένζυμο υιοθετεί μία παρόμοια δομή. Μερικές περιπτώσεις όπου με αύξηση του βαθμού ενυδάτωσης το ένζυμο δεν επανήλθε στη διαμόρφωση που έχει στο νερό, όπως για παράδειγμα η περίπτωση της TII, πιθανόν οφείλονται στον εντοπισμό του ενζύμου κοντά στην επιφάνεια του αντίστροφου μικκυλίου ή ανάμεσα στα μόρια του επιφανειενεργού. Έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία ότι η επιφάνεια της λιπάσης TII παρουσιάζει αυξημένη υδροφοβικότητα (Kreilgaard et al. 1999), άρα ο εντοπισμός του ενζύμου στη μεσεπιφάνεια των μικρογαλακτωμάτων ανεξαρτήτως του βαθμού ενυδάτωσης είναι πιθανός.

Η μεταβολή των δομικών χαρακτηριστικών των λιπασών στο μικρογαλακτώμα SLM 1 παρουσιάζει ενδιαφέρον. Αν και η συγκέντρωση του νερού είναι σημαντικά αυξημένη σε σχέση με το σύστημα SLM 14 (18.6 και 2.2 % v/v αντίστοιχα), δεν παρατηρείται επαναφορά της δομής

σε αυτή που εμφανίζει σε υδατικό σύστημα. Το γεγονός αυτό οφείλεται στο ότι δεν εντοπίζονται υδατικές νανοδιασπορές όπου το ένζυμο να μπορεί να εντοπιστεί. Παρά την αυξημένη συγκέντρωση νερού σε αυτά τα συστήματα, τα ένζυμα δεν μπορούν να βρουν ένα πυρήνα νερού στον οποίο να διαλυτοποιηθούν. Η μόνη λιπάση που παρουσιάζει αυξημένα ποσοστά α -έλικας στο σύστημα SLM 1 είναι η Cvl, η οποία παρουσιάζει αυξημένη δραστηριότητα στο συγκεκριμένο σύστημα, σε αντίθεση με τις υπόλοιπες λιπάσες (παράγραφος 8.2.2).

8.5.2 Μελέτη της δομής των ενζύμων σε μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό

Η δομή των λιπασών στα μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό μελετήθηκε με τη χρήση της φασματοσκοπίας υπερύθρου. Θα πρέπει να σημειωθεί πως η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού δεν μπορεί να εφαρμοστεί στα συγκεκριμένα συστήματα καθώς η απορρόφηση του ιμιδαζολικού δακτυλίου στο πέραν υπεριώδες μειώνει σημαντικά το λόγο σήματος / θορύβου, παράγοντας φάσματα χαμηλής ευκρίνειας (Lau et al. 2004). Συγκεντρώσεις ακόμα και 0.5 % (v/v) δεν επιτρέπουν τη λήψη φασμάτων (παράρτημα IV). Αντίθετα, η τεχνική της εξασθένισης ολικής ανάκλασης (ATR) καθιστά εφικτή τη μελέτη της δομής των ενζύμων σε υγρά δείγματα (Chittur 1998).

Δεδομένου ότι η λήψη των φασμάτων υπερύθρου γίνεται με άλλη τεχνική και άλλες συνθήκες σε σχέση με αυτές που περιγράφονται στην προηγούμενη παράγραφο, η δομή των λιπασών μελετήθηκε ξανά στο ρυθμιστικό διάλυμα και συγκρίθηκε με τη δομή που εμφανίζουν στο ιοντικό μικρογαλάκτωμα S4, στο οποίο οι λιπάσες παρουσίασαν αυξημένη δραστηριότητα και σταθερότητα. Στον πίνακα 23 παρατίθενται τα αποτελέσματα από τη μελέτη της δομής στην αμιδική περιοχή I του φάσματος υπερύθρου.

Πίνακας 23: Προσδιορισμός (%) της δευτεροταγούς δομής λιπασών σε υδατικό σύστημα και σε μικρογαλάκτωμα ιοντικού υγρού S4, ύστερα από ανάλυση της αμιδικής περιοχής I. Το ποσοστό β -πτυχωτών επιφανειών εμπεριέχει το ποσοστό αντιπαράλληλων β -πτυχώσεων (Τυπική απόκλιση < 5%).

Ένζυμο	Crl		Cvl		Tll	
	Υδατικό	S4	Υδατικό	S4	Υδατικό	S4
α -έλικα	25.3	23.5	22.0	25.1	32.6	26.7
β -πτυχώσεις	30.7	44.2	37.5	39.6	26.7	46.9
β -στροφές	23.3	20.2	22.8	20.1	34.1	15.1
Τυχαίο σπείραμα	20.7	12.1	17.7	15.1	6.6	11.4
Αντιπαράλληλες β -πτυχώσεις	13.0	13.7	25.9	11.5	7.3	10.5

Πρέπει να σημειωθεί ότι υπάρχουν αποκλίσεις στη δευτεροταγή δομή που υπολογίζεται στα υδατικά δείγματα σε σχέση με αυτή που υπολογίστηκε με τη φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού, αλλά και με τη δομή που έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά, τόσο για τις κρυσταλλικές

δομές, όσο και για τη δομή τους σε διάλυμα (Lang et al. 1996, Melo et al. 2000, Noinville et al. 2002, Otero et al. 2005, Walde 1993). Αυτή η διαφοροποίηση μπορεί να αποδοθεί στην πολύ υψηλή συγκέντρωση ενζύμου που χρησιμοποιείται κατά τη χρήση της τεχνικής ATR (1.5 mg/mL), η οποία μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό συσσωματωμάτων (Palomo et al. 2003). Το πλήθος αντιπαράλληλων β-πτυχώσεων είναι ένας δείκτης για τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται κατά το σχηματισμό των πρωτεϊνικών συσσωματωμάτων (Mukherjee et al. 2007). Από τα αποτελέσματα φαίνεται πως η λιπάση Cnl δημιουργεί τα περισσότερα συσσωματώματα στο υδατικό διάλυμα, το οποίο εξηγεί και τη μεγάλη απόκλιση που έχει από τη δομή που υπολογίστηκε με την ανάλυση των φασμάτων κυκλικού διχρωισμού. Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν για τις λιπάσες CalB και Rml, οι οποίες δεν παρουσιάζονται καθώς δεν υπάρχουν δεδομένα για την καταλυτική τους δραστηριότητα σε αυτά τα συστήματα, αλλά και ύστερα από ανάλυση της αμιδικής περιοχής III.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 23, οι λιπάσες υφίστανται ορισμένες αλλαγές στη δομή τους όταν εγκλωβίζονται στα ιοντικά μικρογαλακτώματα (σύστημα S4). Η λιπάση Cnl παρουσιάζει μείωση στο τυχαίο σπείραμα, ενώ η λιπάση Tll παρουσιάζει μείωση στις α-έλικες και τις β-στροφές με επακόλουθη αύξηση των β-πτυχωτών επιφανειών και του τυχαίου σπειράματος. Όλες οι λιπάσες παρουσίασαν αύξηση των β-πτυχώσεων κατά τον εγκλωβισμό τους στο μικρογαλακτώμα S4, η οποία δεν αποδίδεται στην αύξηση των αντιπαράλληλων β-πτυχώσεων και συνεπώς στη δημιουργία συσσωματωμάτων. Αντίθετα, η συγκεκριμένη αύξηση οφείλεται σε μία περισσότερο συμπαγή δομή την οποία οι λιπάσες τείνουν να υιοθετούν σε μη συμβατικά συστήματα (De Diego et al. 2005, Griebenow and Klibanov 1996), η οποία είναι υπεύθυνη για την αυξημένη σταθερότητα των λιπασών σε αυτά τα συστήματα (παράγραφος 8.4.2).

Πίνακας 24: Προσδιορισμός (%) της δευτεροταγούς δομής της λιπάσης Cnl σε διάφορα μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού, ύστερα από ανάλυση της αμιδικής περιοχής I. Το ποσοστό β-πτυχωτών επιφανειών εμπεριέχει το ποσοστό αντιπαράλληλων β-πτυχώσεων (Τυπική απόκλιση < 5%).

Σύστημα	Υδατικό	S2	S4	S7	W1	W3	W7
α-έλικα	22.0	25.8	25.1	16.3	24.1	26.5	11.7
β-πτυχώσεις	37.5	41.4	39.6	46.8	27.6	47.7	63.9
β-στροφές	22.8	15.7	20.1	10.7	27.2	21.0	12.5
Τυχαίο σπείραμα	17.7	17.2	15.1	26.1	21.1	5.0	11.7
Αντιπαράλληλες β-πτυχώσεις	25.9	0.7	11.5	15.9	5.1	5.0	33.5

Η επίδραση της σύστασης των συστημάτων ιοντικών υγρών στη δομή των ενζύμων μελετήθηκε χρησιμοποιώντας τη λιπάση Cnl ως πρότυπη πρωτεΐνη. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 24. Στις περισσότερες περιπτώσεις που μελετήθηκαν δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση στα ποσοστά α-έλικας. Αν και παρατηρήθηκε μείωση των αντιπαράλληλων β-πτυχωτών επιφανειών στις περισσότερες περιπτώσεις (εκτός του

συστήματος W7), η μείωση δε συνοδεύεται με μείωση των συνολικών β-πτυχώσεων. Η παρατήρηση αυτή είναι σε συμφωνία με την υπόθεση ότι οι λιπάσες υιοθετούν μία περισσότερο συμπαγή δομή στα συγκεκριμένα συστήματα, η οποία είναι πιο σταθερή από τη δομή που παρουσιάζει το ένζυμο στο υδατικό διάλυμα. Είναι ενδιαφέρον ότι στα συστήματα S7 και W7, όπου η σταθερότητα της CnI είναι χαμηλότερη από τα υπόλοιπα μικρογαλακτώματα ιοντικών υγρών που μελετήθηκαν (πίνακας 20) παρουσιάζεται σημαντική μείωση των α-ελίκων. Στο σύστημα S7 η αύξηση του τυχαίου σπειράματος είναι ενδεικτική για την αποδιάταξη του ενζύμου η οποία οδηγεί σε αδρανοποίηση του μορίου. Στην περίπτωση του συστήματος W7 παρατηρείται μία αύξηση των αντιπαράλληλων β-πτυχώσεων, το οποίο μπορεί να οφείλεται σε απώλεια των δεσμών υδρογόνου μεταξύ της πρωτεΐνης και των μορίων νερού που βοηθούν στη διατήρηση της δομής των πρωτεϊνών (De Diego et al. 2005). Η απώλεια αυτών των μορίων νερού από την επιφάνεια της πρωτεΐνης οδηγεί σε διαμοριακές αλληλεπιδράσεις, σαν αυτές που παρατηρούνται κατά τη διαδικασία λυοφιλοποίησης (Vecchio et al. 1999), οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε αποδιάταξη του μορίου.

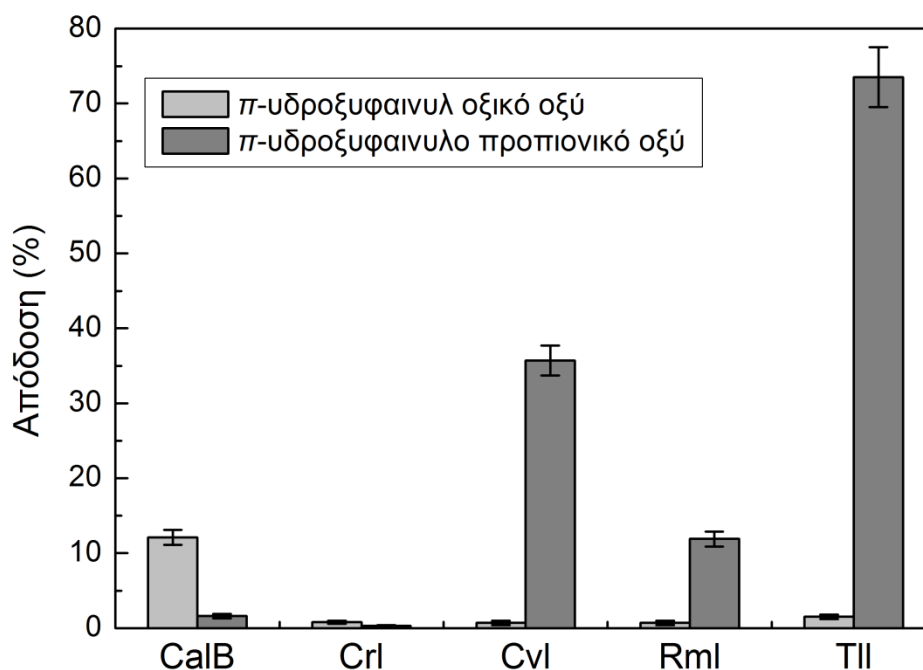
8.6 Εφαρμογή λιπασών εγκλωβισμένων σε μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού για την εστεροποίηση βιοδραστικών ενώσεων

Καθώς οι λιπάσες παρουσιάζουν ενδιαφέρουσα καταλυτική συμπεριφορά στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων, μελετήθηκε η εφαρμογή των συγκεκριμένων συστημάτων ως μέσα για την εστεροποίηση φυσικών βιοδραστικών ενώσεων που καταλύεται από λιπάσες. Οι ενώσεις που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση και χρησιμοποιούνται σε αρκετές περιπτώσεις ως διατροφικά συμπληρώματα (Alamed et al. 2009, Rice-Evans et al. 1996). Έμφαση δόθηκε στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων χωρίς επιφανειενεργό, αφού η απουσία του επιφανειενεργού διευκολύνει την απομόνωση των προϊόντων και τα καθιστά κατάλληλα για τη χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων.

Αρχικά μελετήθηκε η ικανότητα εστεροποίησης διάφορων υποκατεστημένων φαινολικών οξέων στο μικρογαλακτώμα χωρίς επιφανειενεργό SLM 14, στο οποίο οι λιπάσες παρουσίασαν αυξημένη δραστηριότητα. Καμία λιπάση δεν παρουσίασε δραστηριότητα στην εστεροποίηση των φαινυλο βουτυρικών οξέων με την 1-προπανόλη. Ενδιαφέρον όμως παρουσιάζει το γεγονός ότι οι λιπάσες είναι ικανές να καταλύσουν την εστεροποίηση των π-υδροξυφαινολικών οξέων (εικόνα 42).

Η μεγαλύτερη απόδοση επιτεύχθηκε με τη λιπάση TII, η οποία ύστερα από 4 ημέρες μετέτρεψε το 74 % του π-υδροξυφαινυλο προπιονικού οξέος σε εστέρα. Η διαφορετική συμπεριφορά των λιπασών ως προς τα φαινολικά οξέα και π-υδροξυφαινολικά οξέα που χρησιμοποιήθηκαν πιθανόν να οφείλεται στη διαφορετική ηλεκτρονιακή κατάσταση του φαινολικού δακτυλίου, λόγω της παρουσίας του υδροξυλίου. Επίσης, στερικές παρεμποδίσεις μπορεί να υπάρχουν στην περίπτωση των φαινυλο βουτυρικών οξέων, καθώς ο φαινολικός

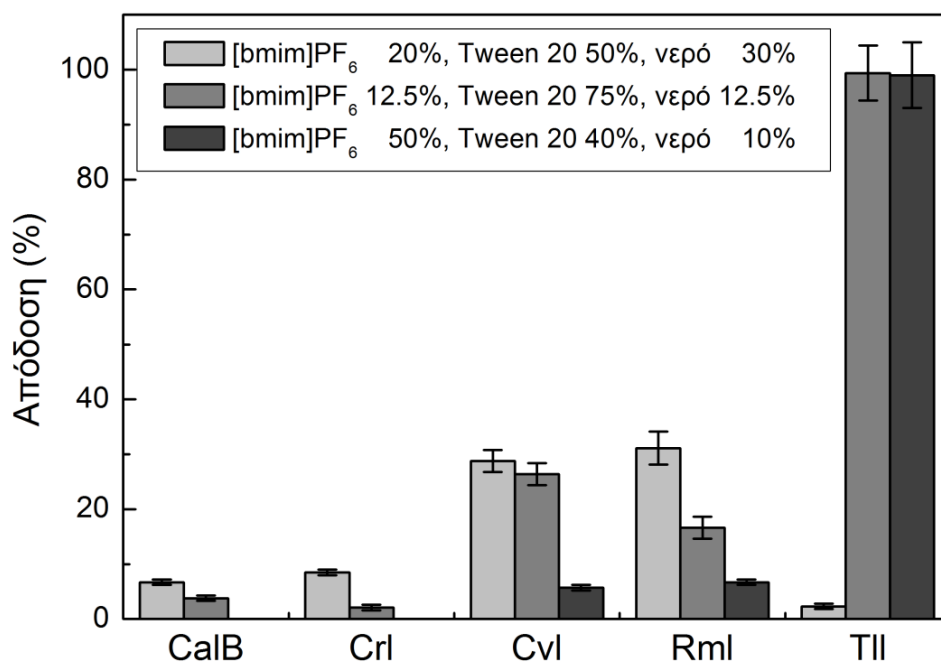
δακτύλιος είναι συνδεδεμένος στη θέση 2 ή 3 του βουτυρικού οξέος και έτσι η εναπομείνουσα αιθυλ- ή μεθυλ-ομάδα αντίστοιχα μπορεί να εμποδίσει την πρόσδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο των ενζύμων. Αντίθετα, τέτοιες ομάδες δεν εμφανίζονται στα π -υδροξυφαινολικά οξέα τα οποία μπορούν να εστεροποιηθούν από τις λιπάσες. Τα πειραματικά δεδομένα ενισχύουν αυτή την υπόθεση, αφού οι περισσότερες λιπάσες παρουσιάζουν σημαντικά βελτιωμένη δραστηριότητα με το π -υδροξυφαινυλο προπιονικό οξύ σε σχέση με το π -υδροφαινυλο οξικό οξύ.



Εικόνα 42: Απόδοση σε 4 ημέρες της αντίδρασης εστεροποίησης π -υδροξυφαινολικών οξέων με την 1-προπανόλη που καταλύεται από λιπάσες που εγκλωβίστηκαν σε μικρογαλακτώματα SLM14.

Σε επόμενη σειρά πειραμάτων ελέγχθηκε η ικανότητα εστεροποίησης του κινναμωμικού οξέος και ενός παραγώγου του, του φερουλικού οξέος, με την 1-προπανόλη από τις λιπάσες σε διάφορα συστήματα νανο-διασποράς. Σε καμία αντίδραση δεν παρατηρήθηκε εστεροποίηση των οξέων, κάτι το οποίο δεν ήταν αναμενόμενο. Οι εμπορικά ακινητοποιημένες λιπάσες CalB, Rml και Tll παρουσιάζουν αποδόσεις εστεροποίησης με 1-βουτανόλη έως και 60 % ύστερα από 3 ημέρες στους 50 °C σε άνυδρο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ (Κατσούρα 2010), γεγονός το οποίο υποδεικνύει πως τα συγκεκριμένα υποστρώματα μπορούν να αναγνωριστούν από το ενεργό κέντρο των συγκεκριμένων λιπασών. Η διαφοροποίηση αυτή στην καταλυτική δραστηριότητα μπορεί να οφείλεται στη μετατόπιση της θερμοδυναμικής ισορροπίας, καθώς σε όλα τα συστήματα μικρογαλακτωμάτων που μελετήθηκαν υπήρχε παρουσία υδατικής φάσης και το νερό είναι προϊόν της αντίδρασης εστεροποίησης. Μελέτες έγιναν και με εστέρες των συγκεκριμένων οξέων στα ιοντικά μικρογαλακτώματα, καθώς η μετεστεροποίηση τους είναι συνήθως ευκολότερη από την εστεροποίηση των αντίστοιχων οξέων (Κατσούρα 2010). Οι λιπάσες δεν μπόρεσαν να καταλύσουν τη μετεστεροποίηση του αιθυλεστέρα του φερουλικού

οξέος, αλλά στα ιοντικά μικρογαλακτώματα πραγματοποιήθηκε η αντίδραση μετεστεροποίησης του βινυλεστέρα του κινναμωμικού οξέος. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στην εικόνα 43.



Εικόνα 43: Απόδοση σε 4 ημέρες της αντίδρασης μετεστεροποίησης του βινυλεστέρα του κινναμωμικού οξέος με 1-προπανόλη που καταλύεται από λιπάσες εγκλωβισμένες σε μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού. Η σύσταση των μικρογαλακτωμάτων αναφέρεται σε κατά βάρος αναλογία.

Από την εικόνα 43 φαίνεται πως ο βινυλεστέρας του κινναμωμικού οξέος είναι αρκετά πιο ενεργός από το αντίστοιχο οξύ, αφού όλες οι λιπάσες καταλύουν τη μετεστεροποίηση του. Συγκεκριμένα, η λιπάση Tll καταλύει την αντίδραση μετεστεροποίησης με αποδόσεις έως και 100%. Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι η σύσταση των μικρογαλακτωμάτων επηρεάζει σημαντικά τη δραστηριότητα των λιπασών. Έτσι, ενώ η λιπάση Tll μπορεί να καταλύσει με 100% απόδοση της μετεστεροποίησης στα συστήματα με χαμηλότερη περιεκτικότητα νερού, οι υπόλοιπες λιπάσες παρουσίασαν την καλύτερη δραστηριότητα τους στο σύστημα με 30% (w/w) υδατική φάση, με αποδόσεις έως και 30%. Το γεγονός αυτό μπορεί να σχετίζεται με την κατανομή των υποστρωμάτων σε αυτά τα συστήματα.

Τέλος, μελετήθηκε η ικανότητα εστεροποίησης του (*R,S*) λιποϊκού οξέος με την 1-προπανόλη από λιπάσες σε μικροετερογενή συστήματα. Όπως φαίνεται από τον πίνακα 25, οι λιπάσες αναγνωρίζουν το λιποϊκό οξύ ως υπόστρωμα και μπορούν να καταλύσουν την εστεροποίηση του. Η αντίδραση αυτή επιτυγχάνεται με μεγάλες αποδόσεις στα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο, αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν τόσο ενθαρρυντικά όταν χρησιμοποιήθηκαν μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό, εν αντιθέσει των αποτελεσμάτων για τα *π*-υδροξυφαινολικά οξέα. Από τα παραπάνω φαίνεται πως τα μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό είναι ένα πολλά υποσχόμενο μέσο το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για

βιοκαταλυτικές διεργασίες, αλλά η γενικευμένη εφαρμογή του θα πρέπει να διερευνηθεί περαιτέρω.

Πίνακας 25: Απόδοση (%) σε 4 ημέρες της ενζυμικά καταλυόμενης αντίδρασης εστεροποίησης λιποϊκού οξέος με 1-προπανόλη. Στο σύστημα SLM14 η 1-προπανόλη χρησιμοποιήθηκε ως συστατικό του συστήματος. Η σύσταση των μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών δίνεται σε κατά βάρος αναλογία (Τυπική απόκλιση < 4%).

Σύστημα	CalB	Cri	Cvi	Rml	Til
AOT / RM (w _o 6)	93.0	12.0	46.0	47.0	91.0
SLM 14	55.0	1.1	33.8	29.3	84.5
[bmim]PF ₆ 20 % , Tween 20 50 % , νερό 30 %	4.5	0.0	1.0	4.0	3.2
[bmim]PF ₆ 12.5 % , Tween 20 75 % , νερό 12.5 %	3.7	0.0	1.5	0.0	3.6
[bmim]PF ₆ 50 % , Tween 20 40 % , νερό 10 %	7.6	0.0	0.0	0.0	6.4

9 Ακίνητοποίηση λιπασών σε οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών

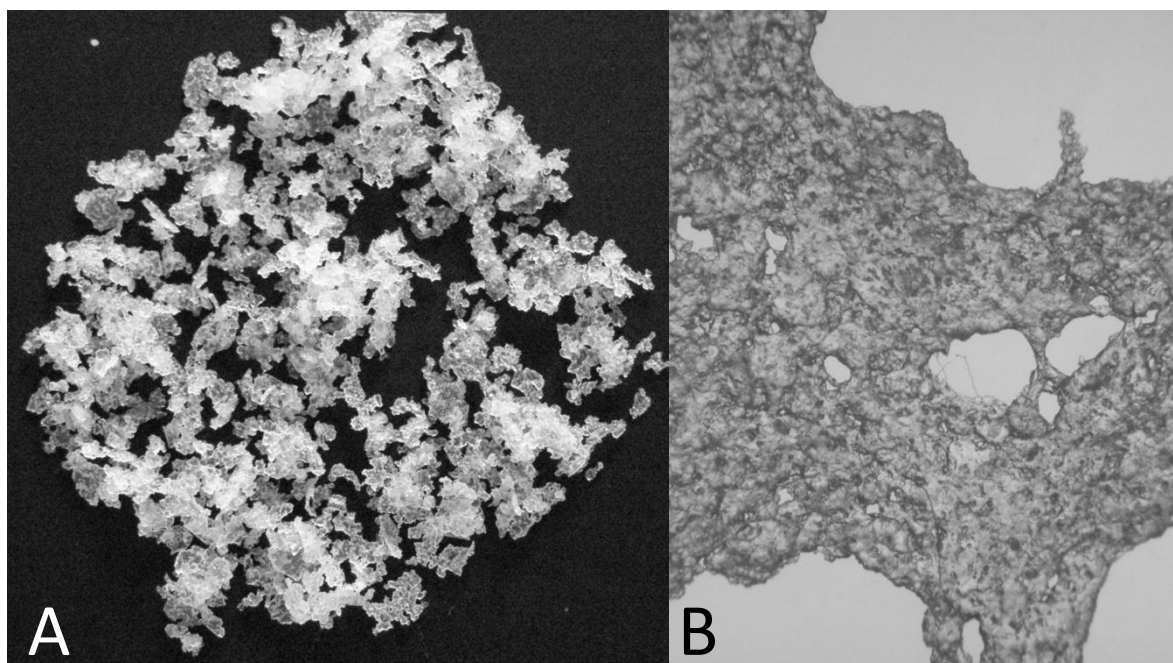
Τα πλεονεκτήματα των συστημάτων μικρογαλακτωμάτων ως μέσα για την επίτευξη ενζυμικών διεργασιών αναπτύχθηκαν εκτενώς στο κεφάλαιο 2. Επιπλέον, στο κεφάλαιο 8 παρουσιάστηκαν τα πλεονεκτήματα των μικρογαλακτωμάτων που σχηματίζονται με ιοντικό υγρό ως μέσα για βιοκαταλυτικές διεργασίες λιπασών. Τα συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο μπορούν να πηκτωματοποιηθούν με τη χρήση βιοπολυμερών όπως η ζελατίνη και η κυτταρίνη, καθιστώντας έτσι εφικτή την ακίνητοποίηση των ενζύμων που έχουν εγκλωβιστεί σε αυτά τα συστήματα (Delimitsou et al. 2002, Jenta et al. 1997, Zoumpanioti et al. 2008, Zoumpanioti et al. 2010). Επιπλέον, το ενδιαφέρον που έχουν προκαλέσει τα ιοντικά υγρά ως μέσο για βιοκαταλυτικές διεργασίες οδήγησε τα τελευταία χρόνια στη παρασκευή πηκτωμάτων για διάφορες εφαρμογές (Le Bideau et al. 2011). Τα οργανοπηκτώματα αυτά ξεπερνούν τα προβλήματα της εφαρμογής των συστημάτων μικρογαλακτωμάτων σε βιομηχανικές διεργασίες, αφού πλέον καθίσταται εφικτή η ανάκτηση του προϊόντος και η αναγέννηση του βιοκαταλύτη. Επιπλέον, η ακίνητοποίηση με αυτόν τον τρόπο μπορεί να επιδράσει θετικά στην καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων, όσον αφορά την ενεργότητα, την εκλεκτικότητα και τη σταθερότητα τους (Mateo et al. 2007, Zoumpanioti et al. 2010). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι τα ένζυμα που ακίνητοποιούνται σε οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων διατηρούν την καταλυτική τους δραστηριότητα σε πλήθος οργανικών διαλυτών, επιτρέποντας έτσι την επίτευξη αντιδράσεων με πλήθος διαφορετικών υποστρωμάτων (Dave and Madamwar 2008, Delimitsou et al. 2002, Stamatis and Xenakis 1999, Zoumpanioti et al. 2010).

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η ικανότητα πηκτωματοποίησης μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό και η ακίνητοποίηση λιπασών σε αυτά τα συστήματα. Ως παράγοντας πηκτωματοποίησης χρησιμοποιήθηκε η (υδροξυπροπυλο)μεθυλο κυτταρίνη (HPMC). Το συγκεκριμένο βιοπολυμερές έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για το σχηματισμό οργανοπηκτωμάτων (Domínguez De María et al. 2004, Pastou et al. 2000b, Zoumpanioti et al. 2008). Λαμβάνοντας υπόψη ότι τα συγκεκριμένα οργανοπηκτώματα παρουσιάζουν χαμηλή αντοχή σε συνθήκες μηχανικής πίεσης ή πολικών οργανικών διαλυτών (Delimitsou et al. 2002), η διαδικασία ακίνητοποίησης τροποποιήθηκε εισάγοντας ένα στάδιο ξήρανσης του πηκτώματος μετά την ακίνητοποίηση, σύμφωνα με τη βιβλιογραφία (Schuleit and Luisi 2001). Επιπλέον, μελετήθηκε η επίδραση της επεξεργασίας του οργανοπηκτώματος με σιλάνια για την αύξηση της σταθερότητας των ακίνητοποιημένων ενζύμων (Schuleit and Luisi 2001). Στο παρών κεφάλαιο θα διερευνηθούν διάφοροι παράγοντες που επιδρούν στην ακίνητοποίηση των λιπασών στα οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών ώστε να βελτιστοποιηθεί το πρωτόκολλο ακίνητοποίησης. Η καταλυτική συμπεριφορά (ενεργότητα, σταθερότητα) των ακίνητοποιημένων λιπασών μελετήθηκε παρακολουθώντας την αντίδραση εστεροποίησης του λαυρικού οξέος με 1-βουτανόλη, ενώ η δευτεροταγής δομή των ακίνητοποιημένων λιπασών μελετήθηκε με τη χρήση της φασματοσκοπίας υπερύθρου. Τέλος, θα παρουσιαστεί η

δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των ακίνητοποιημένων ενζύμων, ενώ παρουσιάζεται η βελτίωση των οργανοπηκτωμάτων με τη χρήση σιλανίων.

9.1 Βελτιστοποίηση της διαδικασίας παρασκευής οργανοπηκτωμάτων

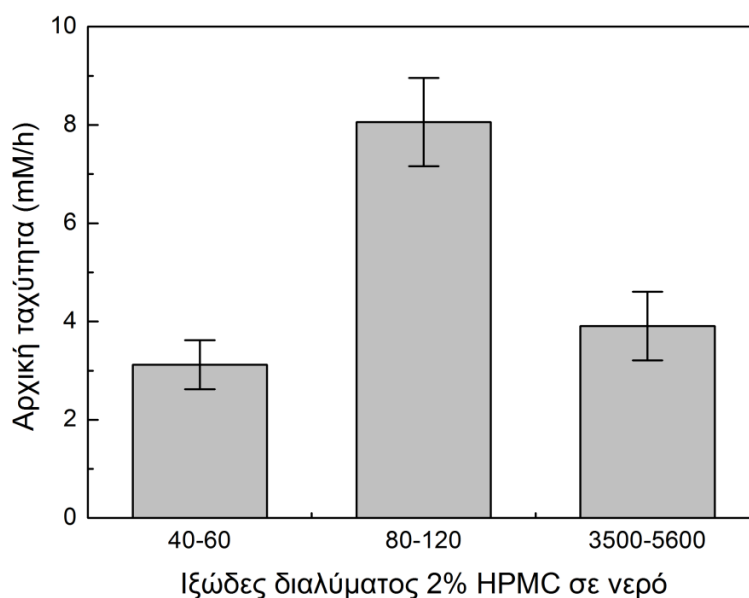
Στην παρούσα παράγραφο μελετήθηκε η ικανότητα πηκτωματοποίησης των μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών που αναπτύχθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο με τη χρήση ενός βιοσυμβατού πολυμερούς όπως η (υδροξυπροπυλο)μεθυλο κυτταρίνη (HPMC) και η χρήση των συγκεκριμένων οργανοπηκτωμάτων ως φορείς ακίνητοποίησης λιπασών. Βρέθηκε πως η πηκτωματοποίηση των μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό είναι εφικτή, παράγοντας σταθερά οργανοπηκτώματα, τα οποία διατηρούν τη δομική τους ακεραιότητα για χρόνια σε θερμοκρασία δωματίου. Η μακροσκοπική εικόνα των οργανοπηκτωμάτων παρουσιάζεται στην εικόνα 44.



Εικόνα 44: (A) Μακροσκοπική εικόνα των οργανοπηκτωμάτων που σχηματίζονται με μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού σε φυσικό μέγεθος. (B) Φωτογραφία από στερεοσκόπιο Leica MZ12₅ σε μεγέθυνση 50x.

Ο βαθμός πολυμερισμού της HPMC επηρεάζει τις ιδιότητες της, όπως για παράδειγμα το ιξώδες ενός υδατικού τους διαλύματος. Αν και όλα τα παράγωγα της HPMC που μελετήθηκαν σχηματίζουν σταθερά οργανοπηκτώματα, ο βαθμός πολυμερισμού επηρεάζει τη δομή των δικτύων που δημιουργεί το βιοπολυμερές και κατ' επέκταση επηρεάζει τη δραστηριότητα των ενζύμων που εγκλωβίζονται μέσα στα συγκεκριμένα οργανοπηκτώματα. Ύστερα από μελέτη τριών προϊόντων HPMC με διαφορετικό ιξώδες, βρέθηκε πως τα οργανοπηκτώματα που σχηματίζονται με την HPMC με ιξώδες 80-120 cP είναι ο βέλτιστος φορέας ακίνητοποίησης για τις λιπάσες, όπως φαίνεται στην εικόνα 45. Πηκτώματα που σχηματίζονται με HPMC υψηλού

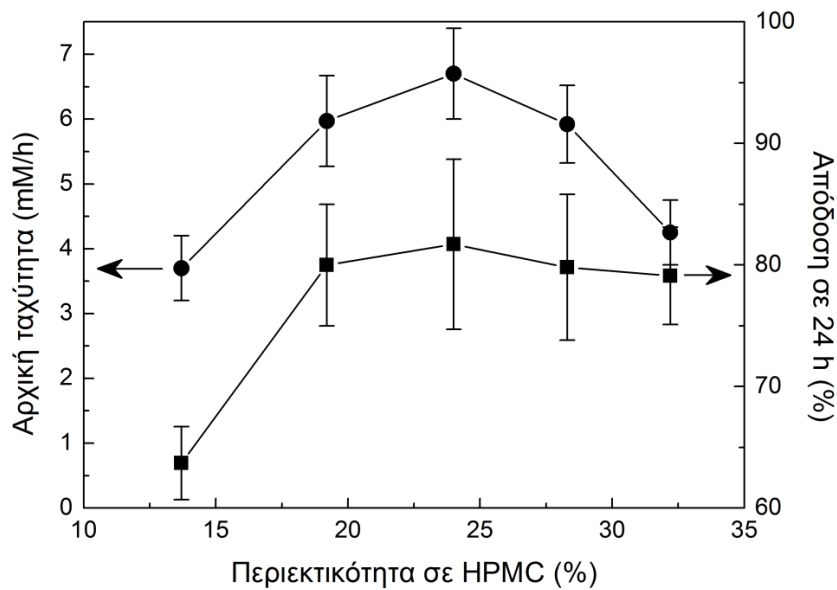
βαθμού ιώδους μπορεί να εμφανίζουν φαινόμενα περιορισμού μεταφοράς των υποστρωμάτων στο εσωτερικό των πηκτωμάτων, μειώνοντας τη διαθεσιμότητα του υποστρώματος στο μικροπεριβάλλον του ενζύμου. Αντίθετα, το παράγωγο της HPMC με χαμηλό βαθμό ιώδους πιθανόν να μην εγκλωβίζει ικανοποιητικά το ένζυμο και να επιτρέπει την προσβολή της δομής του από τον οργανικό διαλύτη. Λαμβάνοντας υπόψη τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης, εφεξής θα χρησιμοποιείται HPMC με ιώδες 80-120 cP χωρίς να αναφέρεται.



Εικόνα 45: Επίδραση του βαθμού πολυμερισμού (δοσμένου μέσω του ιώδους) της HPMC στη συνθετική δραστηριότητα της CalB σε οργανοπηκτώματα που σχηματίζονται με το σύστημα S4.

9.1.1 Επίδραση της περιεκτικότητας σε HPMC

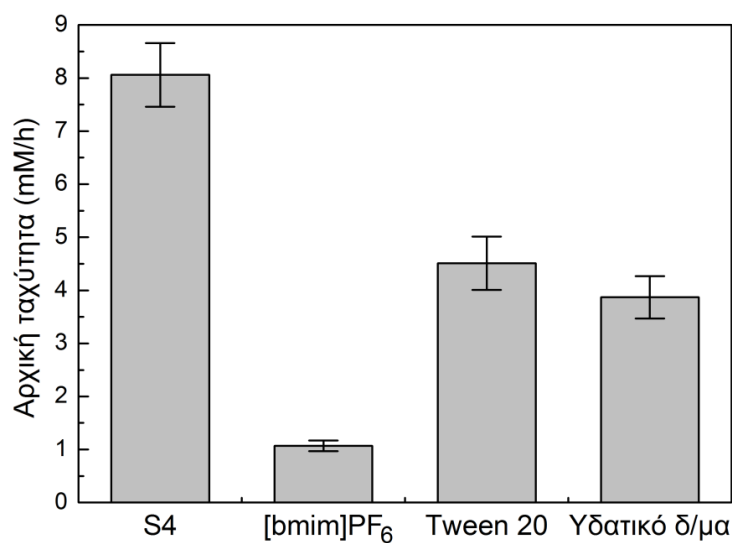
Οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό μπορούν να σχηματιστούν με περιεκτικότητα σε HPMC (πριν το στάδιο της ξήρανσης) από 13 % έως 35 % (w/w). Παρόμοια συμπεριφορά έχουν επιδείξει τα οργανοπηκτώματα που σχηματίζονται με μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο, όπως προκύπτει από τη βιβλιογραφία (Blattner et al. 2006, Delimitsou et al. 2002, Pastou et al. 2000a). Στην εικόνα 46 παρουσιάζεται η επίδραση που παρουσιάζει η περιεκτικότητα των οργανοπηκτωμάτων σε HPMC στη δραστηριότητα της λιπάσης CalB. Όπως φαίνεται, η μέγιστη δραστηριότητα επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας 24 % (w/w) HPMC για το σχηματισμό των οργανοπηκτωμάτων. Η συγκεκριμένη περιεκτικότητα επιλέχθηκε για τα οργανοπηκτώματα που σχηματίστηκαν εφεξής. Θα πρέπει να σημειωθεί πως σε προηγούμενες μελέτες όπου χρησιμοποιήθηκαν λιπάσεις ακίνητοποιημένες σε οργανοπηκτώματα HPMC που σχηματίζονται από μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο, η μέγιστη δραστηριότητα των λιπασών παρατηρήθηκε σε οργανοπηκτώματα με περιεκτικότητα σε HPMC μεγαλύτερη από 25 % κατά βάρος (Blattner et al. 2006, Delimitsou et al. 2002, Pastou et al. 2000a). Η διαφοροποίηση αυτή μπορεί να οφείλεται είτε στη χρήση διαφορετικού τύπου μικρογαλακτώματος, είτε στη διαδικασία παρασκευής των οργανοπηκτωμάτων.



Εικόνα 46: Επίδραση της περιεκτικότητας (% w/w) των οργανοπηκτωμάτων μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών σε HPMC στη συνθετική δραστηριότητα της CalB σε n-εξάνιο στους 30 °C.

9.1.2 Αναγκαιότητα της χρήσης συστημάτων νανοδιασποράς

Καθώς οι λιπάσες παρουσιάζουν δραστηριότητα τόσο σε υδατικό σύστημα όσο και στο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆, μελετήθηκε η αναγκαιότητα της χρήσης των μικρογαλακτωμάτων για το σχηματισμό πηκτωμάτων με HPMC. Η χρήση μόνο ιοντικού υγρού ή μόνο νερού θα δημιουργούσε περισσότερο βιοσυμβατά πηκτώματα πιο απλής σύστασης. Στην εικόνα 47 παρατίθενται τα αποτελέσματα της δραστηριότητας της λιπάσης CalB σε ισοοκτάνιο ύστερα από ακίνητοποίηση σε πηκτώματα που σχηματίστηκαν από το μικρογαλάκτωμα ιοντικού υγρού S4, αλλά και από τα συστατικά του ξεχωριστά.

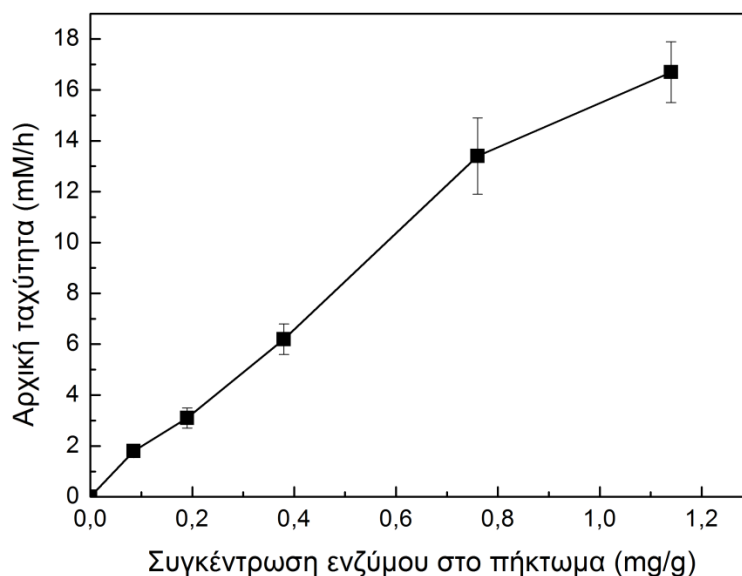


Εικόνα 47: Επίδραση του συστήματος που χρησιμοποιείται για την ακίνητοποίηση του ενζύμου στη συνθετική δραστηριότητά του σε ισοοκτάνιο στους 30 °C.

Είναι προφανές πως ο πρότερος εγκλωβισμός της λιπάσης σε συστήματα με οργανωμένες νανοδομές, όπως αυτές που σχηματίζονται στα μικρογαλακτώματα, παρουσιάζει θετική επίδραση στη δραστικότητα του ενζύμου μετά την ακίνητοποίηση. Σημαντικό είναι ακόμα το γεγονός ότι η δραστικότητα της λιπάσης που ακίνητοποιήθηκε από επιφανειενεργό Tween 20 παρουσίασε σχετικά υψηλή δραστικότητα, κάτι το οποίο υποδηλώνει το σημαντικό ρόλο των επιφανειενεργών μορίων κατά τη διαδικασία της ακίνητοποίησης, γεγονός το οποίο υποδεικνύεται και στην παράγραφο 9.2.1.

9.1.3 Επίδραση της συγκέντρωσης του ενζύμου

Όπως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο, ένα από τα πλεονεκτήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό είναι η ικανότητα τους να φιλοξενήσουν μεγάλες ποσότητες ενζύμων (παράγραφος 8.1.1). Το πλεονέκτημα αυτό μεταφέρεται και στα οργανοπηκτώματα, καθώς στα πήκτωμα που σχηματίζονται με μικρογαλακτώματα ιοντικών υγρών μπορεί να ακίνητοποιηθούν έως 2.5 mg/g ενζύμου, συγκέντρωση σημαντικά αυξημένη από αυτή που έχει αναφερθεί για τα οργανοπηκτώματα που σχηματίζονται από μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο (Delimitsou et al. 2002, Jenta et al. 1997).

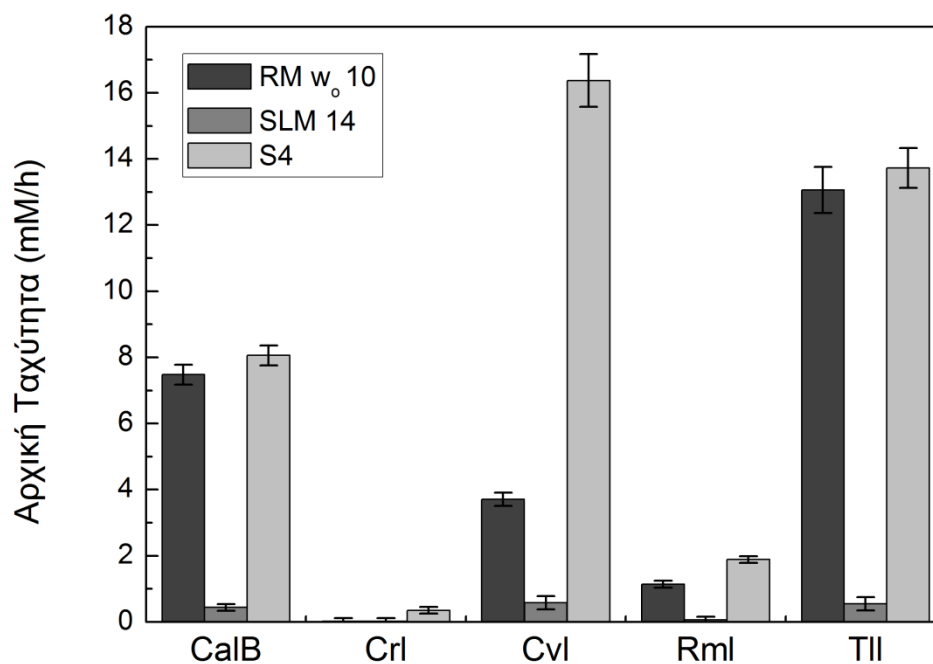


Εικόνα 48: Εξάρτηση της ταχύτητας εστεροποίησης στους 30 °C από τη συγκέντρωση της CalB σε οργανοπήκτωμα που σχηματίζεται από μικρογαλάκτωμα S4.

Η αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου οδηγεί σε γραμμική αύξηση της δραστικότητας έως συγκέντρωσης ενζύμου 0.8 mg/g (εικόνα 48). Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις ενζύμου, η δραστικότητα συνεχίζει να αυξάνει, αλλά όχι με γραμμική συσχέτιση, πιθανότατα λόγω φαινομένων περιορισμού μεταφοράς μάζας, κάτι το οποίο έχει αναφερθεί και για άλλους τύπους οργανοπηκτωμάτων (Stamatis and Xenakis 1999).

9.2 Ενζυμική δραστικότητα λιπασών ακινητοποιημένων σε οργανοπηκτώματα

Είναι προφανές από την προηγούμενη παράγραφο ότι η λιπάση CalB που εγκλωβίστηκε σε ιοντικά μικρογαλακτώματα διατηρεί τη δραστικότητα της μετά το σχηματισμό των πηκτωμάτων του μικρογαλακτώματος. Η δραστικότητα των λιπασών που χρησιμοποιήθηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο (CalB, Crl, Cvl, Rml, Tll) μελετήθηκε ύστερα από ακινητοποίηση σε οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων που σχηματίζονται με HPMC.



Εικόνα 49: Επίδραση του τύπου του μικρογαλακτώματος που χρησιμοποιείται για το σχηματισμό των οργανοπηκτωμάτων στη συνθετική δραστικότητα λιπασών σε ισοοκτάνιο στους 30 °C.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 49, διάφορες μικροβιακές λιπάσες μπορούν να ακινητοποιηθούν στα νέα αυτά οργανοπηκτώματα και να διατηρήσουν την καταλυτική τους δραστικότητα. Είναι εμφανές ότι οι λιπάσες που ακινητοποιούνται μετά από εγκλωβισμό σε μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό (σύστημα S4) παρουσιάζουν έως και 3.4 φορές μεγαλύτερη συνθετική δραστικότητα από ότι όταν ακινητοποιούνται σε οργανοπηκτώματα που σχηματίζονται με AOT μικρογαλακτώματα. Οι επιφανειενεργές ενώσεις στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων φαίνεται πως δρουν προστατευτικά για τη διατήρηση της ενζυμικής δραστικότητας, καθώς οι λιπάσες που ακινητοποιούνται σε HPMC από μικρογαλακτώματα χωρίς επιφανειενεργό παρουσιάζουν σημαντικά χαμηλότερη δραστικότητα. Ο σημαντικός ρόλος του επιφανειενεργού κατά την ακινητοποίηση αναδείχθηκε και στην παράγραφο 9.1.2. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί πως η χρήση AOT μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο για το σχηματισμό οργανοπηκτωμάτων είναι ευνοϊκή για τη συνθετική δραστικότητα των λιπασών CalB και Rml σε σχέση με τη χρήση μικρογαλακτωμάτων χωρίς επιφανειενεργό (Zoumprioti et al.

2006). Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειωθεί πως η δραστικότητα που επιδεικνύουν οι λιπάσες στα μικρογαλακτώματα ιοντικών υγρών στην εστεροποίηση του λαυρικού οξέος με την 1-βουτανόλη είναι χαμηλότερη από τη δραστικότητα μετά το σχηματισμό των οργανοπηκτωμάτων, αν και μία τέτοια σύγκριση δεν μπορεί να είναι απόλυτα ακριβής, καθώς δε χρησιμοποιείται το ίδιο μέσο για την επίτευξη της αντίδρασης.

9.2.1 Επίδραση της σύστασης του μικρογαλακτώματος

Η επίδραση της σύστασης του μικρογαλακτώματος ιοντικού υγρού που χρησιμοποιείται για το σχηματισμό των οργανοπηκτωμάτων στη δραστικότητα της λιπάσης CalB μελετήθηκε στην αντίδραση σύνθεσης του βουτυλεστέρα του λαυρικού οξέος σε ισοοκτάνιο στους 30 °C.

Πίνακας 26: Επίδραση της σύστασης του μικρογαλακτώματος στη συνθετική δραστικότητα της ακίνητοποιημένης λιπάσης CalB (Τυπική απόκλιση < 5 %).

Σύστημα	Σύσταση κατά βάρος (%)			w _o	Αρχική ταχύτητα (mM/h) (Απόδοση (%) σε 24h)
	[bmim]PF ₆	Tween 20	Νερό		
S1	47.5	50.0	2.5	3.4	4.6 (78.2)
S2	45.0	50.0	5.0	6.8	5.1 (80.8)
S3	40.0	50.0	10.0	13.7	10.8 (100.0)
S4	35.0	50.0	15.0	20.5	8.1 (100.0)
S5	30.0	50.0	20.0	27.3	7.9 (77.8)
S7	20.0	50.0	30.0	40.9	5.8 (88.6)
W1	80.0	15.0	5.0	22.8	0.5 (17.4)
W3	60.0	35.0	5.0	9.7	4.1 (79.8)
W5	40.0	55.0	5.0	6.2	5.2 (81.9)
W7	20.0	75.0	5.0	4.6	6.0 (75.0)
W8	10.0	85.0	5.0	4.0	9.3 (89.0)

Όπως φαίνεται στον πίνακα 26, όταν η συγκέντρωση του νερού παραμένει σταθερή (συστήματα W , 5 % w/w), η ενεργότητα της λιπάσης αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης του επιφανειοενεργού. Η θετική επίδραση του επιφανειοενεργού κατά την ακίνητοποίηση αναφέρθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο, ενώ παρόμοια καταλυτική συμπεριφορά παρατηρήθηκε σε οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο (Jenta et al. 1997). Αύξηση της συγκέντρωσης του επιφανειοενεργού σε σταθερή συγκέντρωση νερού οδηγεί σε αύξηση των υδατικών νανο-διασπορών στο σύστημα, όπως έχει αναφερθεί στην παράγραφο 8.3.5, γεγονός το οποίο φαίνεται να διευκολύνει τη διασπορά του ενζύμου στο πήκτωμα. Κατά την πηκτωματοποίηση μικρογαλακτωμάτων με σταθερή συγκέντρωση επιφανειοενεργού

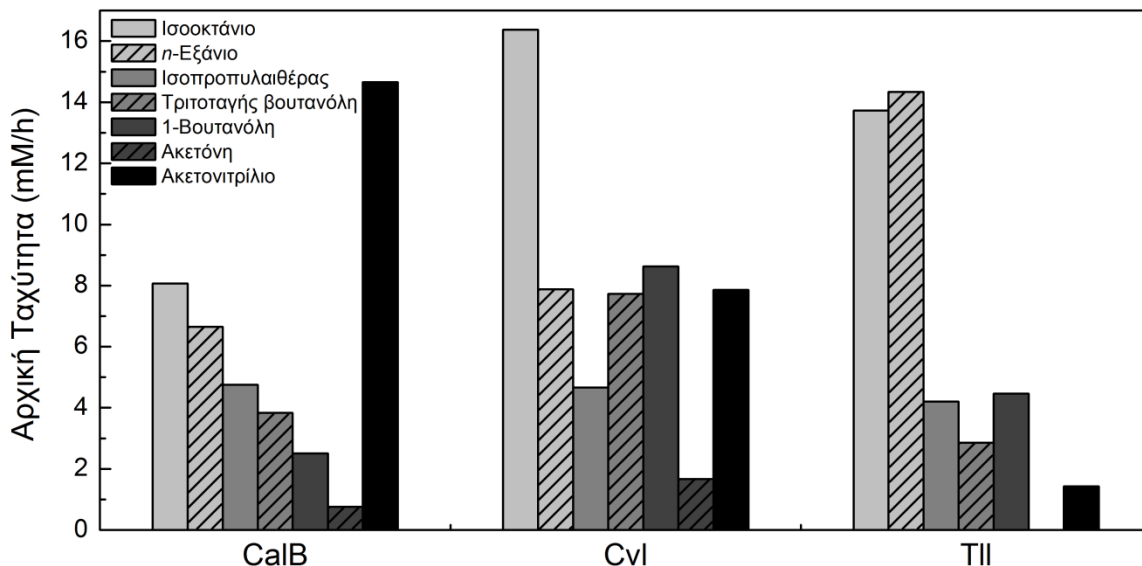
(συστήματα S, 50 % w/w) η ενεργότητα της λιπάσης εξαρτάται από τη συγκέντρωση του νερού. Στην προκειμένη περίπτωση η μέγιστη ταχύτητα παρατηρήθηκε σε σύστημα με βαθμό ενυδάτωσης 14. Η τιμή αυτή είναι σημαντικά χαμηλότερη από αυτή που έχει αναφερθεί για οργανοπηκτώματα που σχηματίζονται με μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο (Jenta et al. 1997, Nagayama et al. 2008, Nagayama et al. 2003, Soni and Madamwar 2001). Η διαφοροποίηση αυτή μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι οι λιπάσες παρουσιάζουν τη βέλτιστη δραστικότητα τους σε συστήματα χαμηλότερου βαθμού ενυδάτωσης για τα μικρογαλακτώματα ιοντικών υγρών, σε σχέση με τα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο, όπως αναφέρεται και στην παράγραφο 8.3.4.

9.2.2 Επίδραση του μέσου αντίδρασης

Είναι ευρέως αποδεκτό ότι η φύση του μέσου στο οποίο γίνεται μία αντίδραση επιδρά σημαντικά στην καταλυτική συμπεριφορά των ακίνητοποιημένων ενζύμων και, σε κάποιο βαθμό, στη δομή του πηκτώματος. Σε προηγούμενες μελέτες είχε αναφερθεί ότι πολικοί διαλύτες, όπως η ακετόνη, επηρεάζουν τη σταθερότητα του πηκτώματος, οδηγώντας σε απώλεια της δομής και απενεργοποίηση του ακίνητοποιημένου ενζύμου (Delimitsou et al. 2002). Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η επίδραση της φύσης του μέσου σε λιπάσες που έχουν ακίνητοποιηθεί σε οργανοπηκτώματα από μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό και νερού σε έλαιο. Για τη συγκεκριμένη μελέτη χρησιμοποιήθηκαν ως μέσα αντίδρασης διάφοροι πολικοί και μη πολικοί οργανικοί διαλύτες, καθώς και δύο ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά. Τα οργανοπηκτώματα διατήρησαν τη δομή τους σε όλους τους διαλύτες για αρκετές ημέρες στους 30 °C.

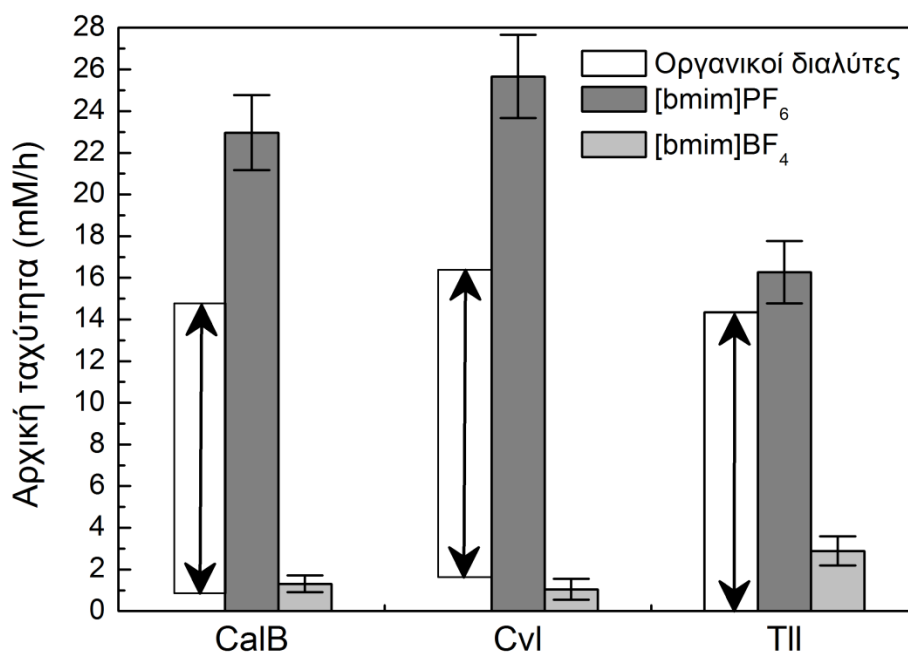
Στην εικόνα 50 παρουσιάζεται η δραστικότητα που επιδεικνύουν οι λιπάσες CalB, Cvl και Tll σε 7 οργανικούς διαλύτες, ύστερα από την ακίνητοποίησή τους σε HPMC από σύστημα S4. Οι διαλύτες στο διάγραμμα έχουν ταξινομηθεί με σειρά αυξανόμενης πολικότητας από τα αριστερά προς τα δεξιά. Παρατηρούνται σημαντικές διαφοροποιήσεις από διαλύτη σε διαλύτη, αλλά γενικότερα οι λιπάσες δείχνουν να παρουσιάζουν μεγαλύτερη δραστικότητα στους μη πολικούς διαλύτες, όπως το ισοοκτάνιο και το *n*-εξάνιο. Στην περίπτωση της λιπάσης CalB υπάρχει πολύ καλή συσχέτιση του συντελεστή κατανομής με τη δραστικότητα ($r^2 > 0.990$), αν δεν ληφθεί υπόψη η δραστικότητα στο ακετονιτρίλιο. Παρόμοια συμπεριφορά έχει αναφερθεί για λιπάσες που έχουν ακίνητοποιηθεί σε οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο (Delimitsou et al. 2002, Zoumprioti et al. 2006), ενώ η αυξημένη δραστικότητα της CalB στο ακετονιτρίλιο σε σχέση με λιγότερο πολικούς διαλύτες έχει παρατηρηθεί σε προηγούμενες εργασίες (Céliz and Daz 2011). Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως τα οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών διατηρούν τη δομή τους στην ακετόνη και οι λιπάσες CalB και Cvl επιδεικνύουν δραστικότητα, ενώ στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ότι παρόμοια οργανοπηκτώματα που σχηματίζονται με μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο καταστρέφονται στο συγκεκριμένο διαλύτη (Delimitsou et al. 2002, Zoumprioti et al. 2006). Η ξήρανση του οργανοπηκτώματος είναι καθοριστική για τη διατήρηση της δομής του οργανοπηκτώματος, αφού και τα οργανοπηκτώματα HPMC που σχηματίστηκαν με AOT μικρογαλακτώματα στην

παρούσα διατριβή διατήρησαν τη δομή τους. Σημαντικό είναι επίσης το γεγονός ότι οι λιπάσες μπορούν να λειτουργήσουν σε συστήματα χωρίς διαλύτη, όπου το ένα υπόστρωμα χρησιμοποιείται ως διαλύτης, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση της 1-βουτανόλης.



Εικόνα 50: Επίδραση του μέσου αντίδρασης στη δραστηριότητα λιπασών που ακίνητοποιήθηκαν σε οργανοπηκτώματα από μικρογαλάκτωμα S4 (σύνθεση βουτυλεστέρα του λαυρικού οξέος).

Τα ιοντικά υγρά έχουν προταθεί ως αντικαταστάτες των οργανικών διαλυτών ως ένα νέο μέσο για την επίτευξη βιοκαταλυτικών αντιδράσεων, με ενδιαφέροντα αποτελέσματα έως σήμερα (Kragl et al. 2002, Park and Kazlauskas 2003, Sheldon et al. 2002, van Rantwijk and Sheldon 2007). Οι λιπάσες που ακίνητοποιήθηκαν στα οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων ιοντικού υγρού χρησιμοποιήθηκαν για να καταλύσουν την αντίδραση σύνθεσης του βουτυλεστέρα του λαυρικού οξέος σε δύο ιμιδαζολικά ιοντικά υγρά, εκ των οποίων το ένα είναι συστατικό του μικρογαλακτώματος. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στην εικόνα 51, ενώ εμφανίζεται και το εύρος της δραστηριότητας στους οργανικούς διαλύτες. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι και οι τρεις λιπάσες παρουσιάζουν τη μέγιστη δραστηριότητα τους στο υδρόφοβο ιοντικό υγρό [bmim]PF₆, το οποίο είναι και συστατικό του μικρογαλακτώματος, το οποίο υποστηρίζει τη χρήση των ιοντικών υγρών ως μέσα για βιοκαταλυτικές διεργασίες. Αντίθετα, στο ιοντικό υγρό [bmim]BF₄, η δραστηριότητα είναι πολύ χαμηλή, συγκρίσιμη με τους οργανικούς διαλύτες στους οποίους οι λιπάσες παρουσίασαν τη μικρότερη δραστηριότητα. Το συγκεκριμένο ιοντικό υγρό, αν και διαφέρει μόνο κατά το ανιόν από το [bmim]PF₆, είναι υδρόφιλο και πιθανόν η διαφορά της δραστηριότητας των λιπασών μεταξύ των δύο ιοντικών υγρών να οφείλεται στη διαφορετική διαλυτότητα των υποστρωμάτων, αλλά και στη διαφορετική σταθερότητα των λιπασών σε αυτά τα μέσα (Katsoura et al. 2009).



Εικόνα 51: Επίδραση ιμιδαζολικών ιοντικών υγρών στη δραστικότητα λιπασών που ακίνητοποιήθηκαν σε οργανοπηκτώματα από μικρογαλάκτωμα S4 (σύνθεση βουτυλεστέρα του λαυρικού οξέος). Με βέλη συμβολίζεται το εύρος τιμών της αρχικής ταχύτητας που παρατηρήθηκε σε οργανικούς διαλύτες.

Για να αναδειχθεί το πλεονέκτημα της χρήσης των μικρογαλακτωμάτων ιοντικού υγρού για το σχηματισμό οργανοπηκτωμάτων στη δραστικότητα των λιπασών, μελετήθηκε η δραστικότητα της ακίνητοποιημένης λιπάσης CalB από AOT μικρογαλακτώματα ($w_o = 10$) στους οργανικούς διαλύτες και στα ιοντικά υγρά. Στον πίνακα 27 παρατίθενται τα αποτελέσματα, τα οποία συγκρίνονται με τη δραστικότητα της λιπάσης όταν ακίνητοποιείται από μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό (S4). Οι διαλύτες έχουν ταξινομηθεί με σειρά αύξουσας πολικότητας.

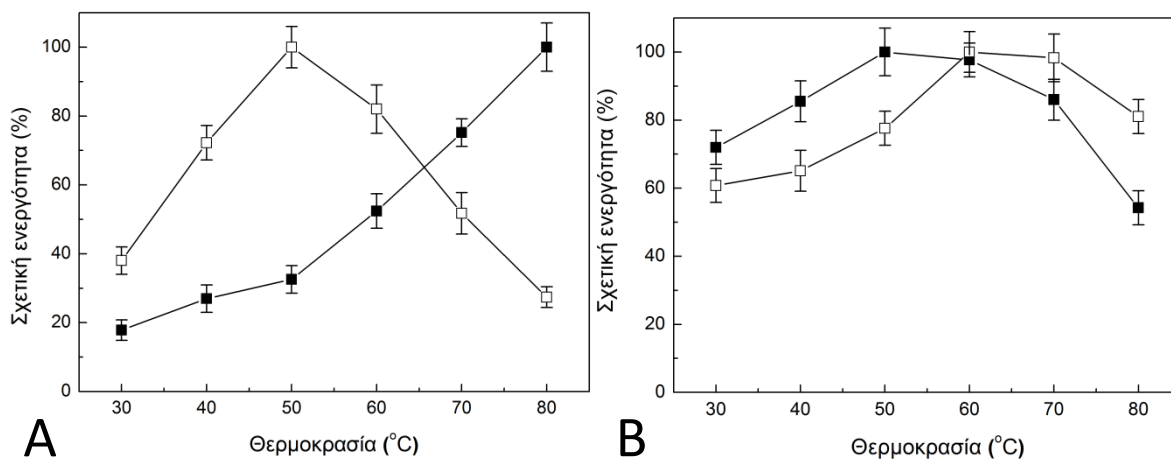
Πίνακας 27: Επίδραση του μέσου αντίδρασης στη συνθετική δραστικότητα (mM/h) και την απόδοση σε 24 h (μέσα σε παρένθεση, %) της λιπάσης CalB (Τυπική απόκλιση < 7 %).

Μέσο αντίδρασης	Μικρογαλάκτωμα ιοντικού υγρού	AOT μικρογαλάκτωμα
Ισοοκτάνιο	8.1 (100.0)	7.5 (80.5)
n-Εξάνιο	6.7 (81.7)	6.9 (80.6)
Ισοπροπυλαιθέρας	4.8 (66.4)	5.8 (68.4)
Τριτοταγής βουτανόλη	3.8 (41.6)	1.4 (19.3)
1-Βουτανόλη	2.5 (18.7)	0.6 (16.0)
Ακετόνη	0.8 (10.3)	0.5 (19.1)
Ακετονιτρίλιο	14.7 (90.3)	10.1 (79.9)
[bmim]PF ₆	23.0 (100.0)	0.9 (61.9)
[bmim]BF ₄	1.3 (49.2)	0.1 (3.0)

Είναι εμφανές ότι δραστικότητα της λιπάσης CalB στις περισσότερες περιπτώσεις είναι καλύτερη όταν ακινητοποιείται από μικρογαλάκτωμα ιοντικού υγρού. Η δραστικότητα της λιπάσης όταν ακινητοποιείται από ΑΟΤ μικρογαλακτώματα αρκετά χαμηλή στα ιοντικά υγρά, ενώ παρουσιάζει ικανοποιητική δραστικότητα στους μη πολικούς οργανικούς διαλύτες. Φαίνεται λοιπόν πως η φύση του υδρόφοβου διαλύτη του μικρογαλακτώματος φαίνεται να επηρεάζει τη δραστικότητα της ακινητοποιημένης λιπάσης ανάλογα με το μέσο στο οποίο χρησιμοποιείται.

9.2.3 Επίδραση της θερμοκρασίας

Η επίδραση της θερμοκρασίας στη συνθετική ενεργότητα των ακινητοποιημένων λιπασών CalB και Cnl σε οργανοπηκτώματα HPMC από μικρογαλακτώματα ιοντικών υγρών μελετήθηκε παρακολουθώντας την αντίδραση εστεροποίησης του λαυρικού οξέος με 1-βουτανόλη σε ισοοκτάνιο. Το προφίλ της δραστικότητας συγκρίθηκε με τη δραστικότητα που επιδεικνύουν οι λιπάσες εγκλωβισμένες στο αντίστοιχο μικρογαλάκτωμα ιοντικού υγρού (σύστημα S4).



Εικόνα 52: Επίδραση της θερμοκρασίας στη συνθετική δραστικότητα των λιπασών CalB (A) και Cnl (B), εγκλωβισμένες σε S4 μικρογαλάκτωμα (λευκά σημεία) ή ακινητοποιημένες σε HPMC (μαύρα σημεία).

Όπως φαίνεται στην εικόνα 52A, η βέλτιστη θερμοκρασία για τη συνθετική δραστικότητα της λιπάσης CalB στο μικρογαλάκτωμα S4 είναι 50 °C, ενώ σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες παρατηρείται μείωση της ενεργότητας. Σημαντική διαφοροποίηση στο θερμοκρασιακό προφίλ της ενεργότητας της λιπάσης CalB παρατηρείται μετά την ακινητοποίηση σε οργανοπηκτώματα HPMC, καθώς η αύξηση της θερμοκρασίας από τους 30 στους 80 °C οδήγησε σε αύξηση της ενζυμικής δραστικότητας. Παρόμοιο θερμοκρασιακό προφίλ παρατηρήθηκε για τη Novozyme 435 (ακίνητοποιημένη CalB) όταν χρησιμοποιήθηκε για τον πολυμερισμό της ϵ -καπρολακτόνης, η οποία παρουσίασε τη μέγιστη δραστικότητα της σε θερμοκρασία 90 °C (Kumar and Gross 2000).

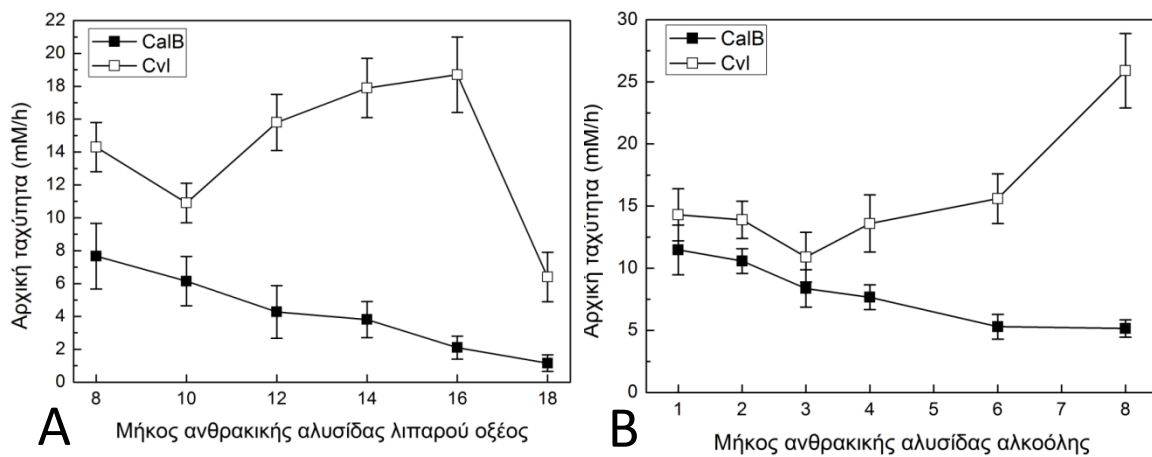
Στην περίπτωση της λιπάσης Cnl δεν παρατηρήθηκε μετατόπιση της βέλτιστης θερμοκρασίας (εικόνα 52B), καθώς η βέλτιστη θερμοκρασία για τη λιπάση στο μικρογαλάκτωμα και στο οργανοπηκτώμα ήταν περίπου 60 °C. Η συγκεκριμένη λιπάση σε όλες τις θερμοκρασίες

που μελετήθηκαν διατήρησε πάνω από 50 % της βέλτιστης δραστηριότητας της, ενώ η ακίνητοποίηση της οδηγεί σε διατήρηση μεγαλύτερου ποσοστού της δραστηριότητας σε χαμηλές θερμοκρασίες. Η θετική επίδραση που έχει η ακίνητοποίηση στην καταλυτική συμπεριφορά των δύο αυτών λιπασών, όσον αφορά τη θερμοκρασία μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη σταθερότητα των ακίνητοποιημένων ενζύμων, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 9.3.1.

9.2.4 Εκλεκτικότητα των λιπασών

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στις προηγούμενες παραγράφους προέρχονται από την καταγραφή της δραστηριότητας των λιπασών στην αντίδραση σύνθεσης του βουτυλεστέρα του λαυρικού οξέος. Παρόμοιο προφίλ παρατηρήθηκε και σε άλλες αντιδράσεις εστεροποίησης, όπως η εστεροποίηση του καπρυλικού οξέος με την 1-προπανόλη. Στην παρούσα παράγραφο μελετήθηκε η εκλεκτικότητα των ακίνητοποιημένων λιπασών CalB και Cvl σε αντιδράσεις εστεροποίησης σε ισοοκτάνιο.

Αρχικά μελετήθηκε η εκλεκτικότητα ως προς το λιπαρό οξύ, εστεροποιώντας ακόρεστα λιπαρά οξέα ανθρακικής αλυσίδας από 8 έως 18 ατόμων άνθρακα με 1-βουτανόλη. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 53A. Η λιπάση CalB παρουσιάζει μέγιστη δραστηριότητα ως προς τα οξέα μικρής ανθρακικής αλυσίδας, όπως είχε βρεθεί και στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων ιοντικού υγρού (παράγραφος 8.3.2).



Εικόνα 53: Επίδραση του μήκους της ανθρακικής αλυσίδας (A) του λιπαρού οξέος και (B) της αλκοόλης στη συνθετική δραστηριότητα των ακίνητοποιημένων λιπασών.

Θα πρέπει να σημειωθεί πως η συγκεκριμένη λιπάση δεν παρουσιάζει ενεργοποίηση σε μεσεπιφάνειες ενώ η δραστηριότητα της ομοιάζει με αυτή των εστερασών (Salis et al. 2003), οπότε δεν είναι περίεργη η εκλεκτικότητα προς μικρότερα υποστρώματα. Αντίθετα, στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί πως η λιπάση CalB παρουσιάζει εκλεκτικότητα ως προς λιπαρά οξέα με ανθρακική αλυσίδα 4 έως 8 ατόμων άνθρακα, ανάλογα με την αλκοόλη που χρησιμοποιείται και το μέσο της αντίδρασης (Chang et al. 1999, de los Rios et al. 2008, Lee and Parkin 2001, Patkar et al. 1998). Η εκλεκτικότητα αυτή πιθανότατα να οφείλεται στις μικρές

διαστάσεις του ενεργού κέντρου, όπως αποκαλύφθηκε από μελέτες μοριακής μοντελοποίησης (Otto et al. 2000). Η λιπάση CnI παρουσιάζει εκλεκτικότητα ως προς το παλμιτικό οξύ (C16), κάτι το οποίο υποστηρίζεται και από βιβλιογραφικά δεδομένα (Barros et al. 1994). Το προφίλ αυτό διαφέρει από το προφίλ που παρουσίασε στα μικρογαλακτώματα, γεγονός το οποίο μπορεί να αποδοθεί στη διαφορετική διαλυτότητα των υποστρωμάτων στο σύστημα, όπως είχε αναφερθεί και στην παράγραφο 8.3.2.

Η εκλεκτικότητα ως προς την αλκοόλη μελετήθηκε στην αντίδραση εστεροποίησης του καπρυλικού οξέος (C8). Τα αποτελέσματα παρατίθενται στην εικόνα 53B, συμπληρώνοντας την εικόνα που παρατηρήθηκε για τα λιπαρά οξέα. Η λιπάση CnI παρουσιάζει εκλεκτικότητα ως προς την 1-οκτανόλη, η οποία ήταν η μεγαλύτερη αλκοόλη που μελετήθηκε. Αντίθετα, η λιπάση CalB παρουσιάζει εκλεκτικότητα προς τη μεθανόλη. Η de los Rios και οι συνεργάτες της αναφέρουν πως η CalB σε ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ παρουσιάζει εκλεκτικότητα ως προς αλκοόλες μικρής ανθρακικής αλυσίδας, παρατηρώντας τη μέγιστη δραστηριότητα για την 1-βουτανόλη (de los Rios et al. 2008). Παρόλα αυτά, αναφέρει πως η εκλεκτικότητα εξαρτάται από το οξύ με το οποίο μελετάται η εκλεκτικότητα, αφού αυτό είναι το υπόστρωμα που προσδένεται πρώτο και καταλαμβάνει το χώρο στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Έτσι, η διαφορά στα πειραματικά αποτελέσματα και στα βιβλιογραφικά δεδομένα μπορεί να εξηγηθεί αν ληφθεί υπόψη το συνολικό μήκος του εστέρα που παράγεται. Έτσι, για παράδειγμα η βέλτιστη δραστηριότητα στη βιβλιογραφία αναφέρεται στη σύνθεση εστέρα με 8 άτομα άνθρακα (de los Rios et al. 2008), ενώ η βέλτιστη δραστηριότητα στα πειραματικά αποτελέσματα βρέθηκε για τη σύνθεση εστέρα 9 ατόμων άνθρακα.

9.3 Σταθερότητα ακινητοποιημένων λιπασών

9.3.1 Θερμοσταθερότητα ακινητοποιημένων λιπασών

Η ακινητοποίηση ενζύμων σε οργανοπηκτώματα είναι μία μέθοδος που χρησιμοποιείται για την αύξηση της σταθερότητάς τους, μέσω του φυσικού τους περιορισμού στο δίκτυο του βιοπολυμερούς (Zoumprianti et al. 2010). Η σταθερότητα των λιπασών CalB και CnI που ακινητοποιήθηκαν σε HPMC από μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό μελετήθηκε σε θερμοκρασίες έως 70 °C. Τα πειραματικά αποτελέσματα επεξεργάστηκαν με το μοντέλο απενεργοποίησης 2 σταδίων και υπολογίστηκαν οι κινητικές σταθερές απενεργοποίησης. Στον πίνακα 28 παρατίθενται οι κινητικές σταθερές απενεργοποίησης που υπολογίστηκαν από τα πειραματικά δεδομένα.

Όπως φαίνεται από τον πίνακα, οι ακινητοποιημένες λιπάσες παρουσιάζουν αυξημένη σταθερότητα σε σχέση με τις ελεύθερες. Ο χρόνος ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$) στους 50 °C αυξήθηκε και για τις δύο λιπάσες τουλάχιστον κατά 150 φορές σε σχέση με τη σταθερότητα στο υδατικό διάλυμα και 25 φορές σε σχέση με τη σταθερότητα στο μικρογαλάκτωμα S4 (πίνακας 20). Είναι προφανές ότι τα οργανοπηκτώματα που σχηματίζονται από μικρογαλακτώματα ιοντικών υγρών

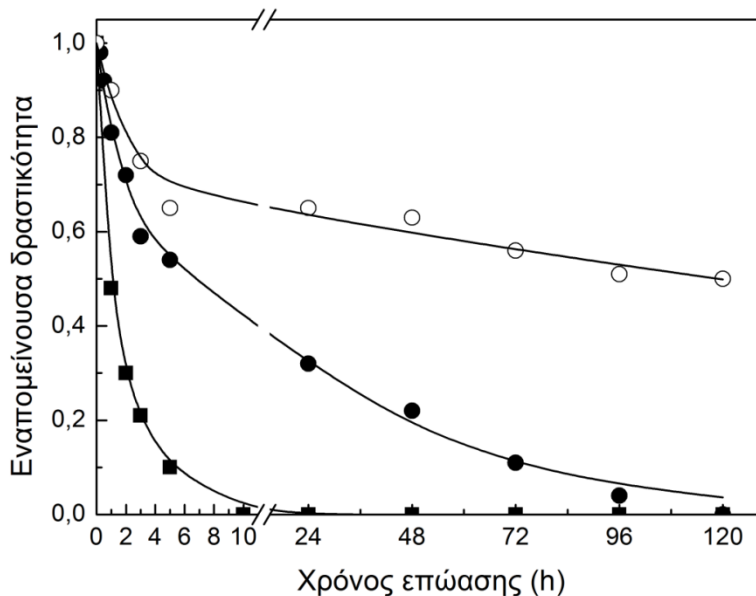
παρέχουν ένα προστατευτικό μικροπεριβάλλον για τις λιπάσες, ιδιαίτερα σε υψηλές θερμοκρασίες.

Πίνακας 28: Κινητικές σταθερές απενεργοποίησης και χρόνος ημίσειας ζωής ($t_{1/2}$) για τις λιπάσες που ακίνητοποιήθηκαν σε ΗΡΜC από μικρογαλάκτωμα S4, όπως υπολογίστηκαν από το μοντέλο απενεργοποίησης σε δύο στάδια.

Λιπάση	T (°C)	α_1	α_2	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	r^2	$t_{1/2}$ (h)
CalB	30	1.612 ±0.312	0.000 -	1.085 ±0.165	0.003 ±0.001	0.974	391
	50	0.748 ±0.238	0.000 -	2.056 ±0.287	0.002 ±0.001	0.965	202
	70	0.510 ±0.121	0.000 -	1.830 ±0.109	0.030 ±0.006	0.972	2
Cvl	30	1.263 ±0.267	0.000 -	0.006 ±0.001	0.006 ±0.002	0.972	319
	50	0.670 ±0.131	0.000 -	0.451 ±0.063	0.002 ±0.001	0.989	149
	70	0.431 ±0.119	0.000 -	0.662 ±0.081	0.026 ±0.006	0.973	3

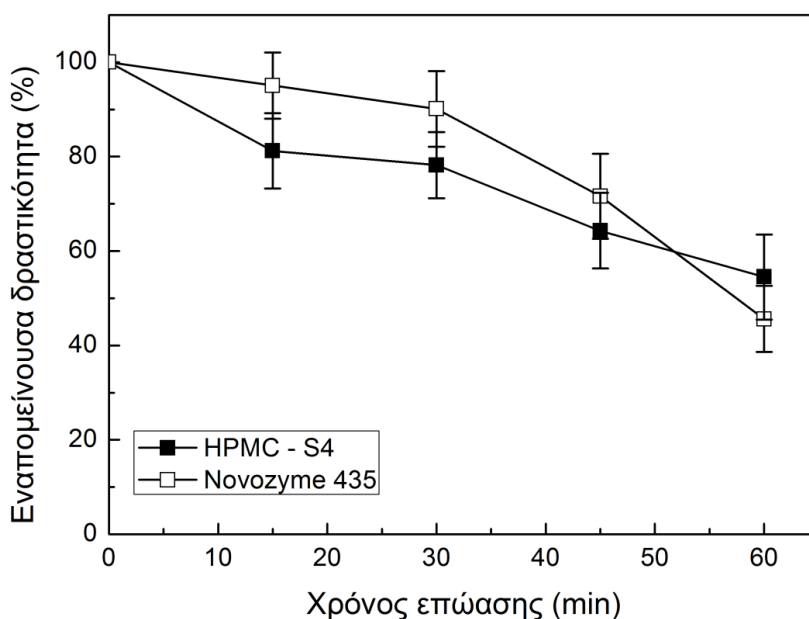
Αξίζει να σημειωθεί πως σε θερμοκρασία 30 °C παρατηρήθηκε ενεργοποίηση και για τις δύο λιπάσες ($\alpha_1 > 1.000$). Έχει προταθεί πως το πρώτο στάδιο απενεργοποίησης εκθέτει στην επιφάνεια της πρωτεΐνης μερικά ασταθή αμινοξικά κατάλοιπα, γεγονός το οποίο παρέχει ένα βαθμό ευελιξίας στη δομή της ενδιάμεσης κατάστασης E₁ της λιπάσης και συνεπώς αυξημένη δραστηριότητα (Carvalho et al. 1999). Αυτό το φαινόμενο δεν παρατηρείται σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες, καθώς η απενεργοποίηση του ενζύμου είναι ταχύτερη και έτσι η δραστηριότητα του ενδιάμεσου E₁ είναι μικρότερη από αυτή της αρχικής κατάστασης ($\alpha_1 < 1.000$).

Για να γίνει περισσότερο κατανοητή η σταθεροποίηση των λιπασών κατά την ακίνητοποίηση, στην εικόνα 54 παρατίθενται τα δεδομένα της θερμικής απενεργοποίησης της λιπάσης Cvl σε υδατικό σύστημα, σε μικρογαλάκτωμα νερού σε ιοντικό υγρό (S4) και ύστερα από ακίνητοποίηση σε ΗΡΜC από το μικρογαλάκτωμα S4. Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα (παράγραφος 8.4.2), ο εγκλωβισμός της λιπάσης σε μικρογαλακτώματα ιοντικών υγρών αυξάνει τη σταθερότητα σημαντικά, φαίνεται όμως ότι η ακίνητοποίηση αυξάνει ακόμα περισσότερο τη σταθερότητα. Η ακίνητοποιημένη Cvl διατηρεί περίπου το 60 % της αρχικής της δραστηριότητας ύστερα από 5 ημέρες επώασης σε ισοοκτάνιο στους 50 °C, ενώ η ελεύθερη λιπάση (σε υδατικό σύστημα ή σε μικρογαλάκτωμα S4) διατηρεί λιγότερο από 5 %.



Εικόνα 54: Θερμική απενεργοποίηση της Cnl στους 50 °C. ■ Υδατικό σύστημα, ● Μικρογαλάκτωμα ιοντικού υγρού (S4), ○ Ακίνητοποιημένη σ πήκτωμα HPMC - S4 σε ισοοκτάνιο. Τα σύμβολα αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα και οι γραμμές στην προβλεπόμενη καμπύλη απενεργοποίησης.

Καθώς οι ακίνητοποιημένες λιπάσες παρουσιάζουν εντυπωσιακή σταθερότητα σε υψηλές θερμοκρασίες, κρίθηκε ενδιαφέρον να μελετηθεί η σταθερότητα σε ακραίες θερμοκρασίες και να συγκριθεί με τη σταθερότητα ενός εμπορικά διαθέσιμου σκευάσματος. Η μελέτη έλαβε χώρα στους 90 °C σε ιοντικό υγρό [bmim]PF₆, καθώς σε αυτή τη θερμοκρασία το ιοντικό δεν παρουσιάζει αυξημένη τάση ατμών, ενώ έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία πως τα ιοντικά υγρά σταθεροποιούν τα ένζυμα (van Rantwijk and Sheldon 2007).

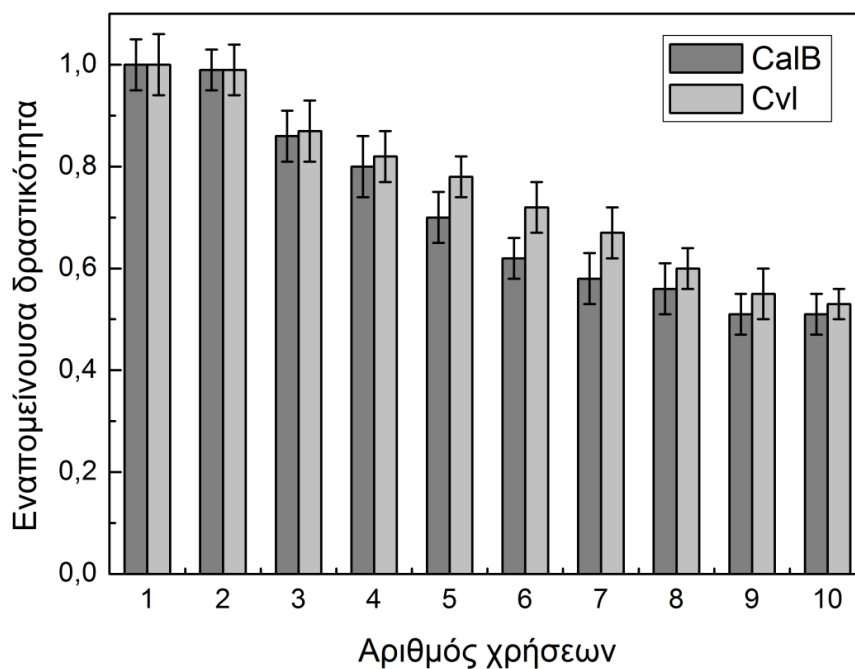


Εικόνα 55: Θερμική απενεργοποίηση της λιπάσης CalB σε ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ στους 90 °C.

Στην εικόνα 55 παρατίθενται τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης. Είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι η λιπάση CalB που ακίνητοποιήθηκε σε οργανοπηκτώματα HPMC από μικρογαλάκτωμα S4 παρουσιάζει παρόμοιο προφίλ απενεργοποίησης με την εμπορικά διαθέσιμη Novozyme 435. Και τα δύο παρασκευάσματα διατηρούν περίπου το 50 % της δραστηκότητας τους ύστερα από μία ώρα επώασης στους 90 °C, το οποίο υποδεικνύει την εξαιρετική τους θερμοσταθερότητα. Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να επισημανθεί πως η σταθερότητα της λιπάσης CalB μετά από την ακίνητοποίηση σε HPMC θα μπορούσε να επηρεαστεί από τη σύσταση του μικρογαλακτώματος, κάτι το οποίο δεν μελετήθηκε στην παρούσα διατριβή και θα μπορούσε να οδηγήσει σε ακόμα πιο εντυπωσιακά αποτελέσματα. Επίσης, η χρήση σιλανίων κατά την ακίνητοποίηση σε HPMC αυξάνει τη σταθερότητα των λιπασών, όπως θα αναφερθεί σε επόμενη ενότητα (παράγραφος 9.5.2).

9.3.2 Επαναχρησιμοποίηση ακίνητοποιημένων λιπασών

Όπως έχει αναφερθεί και νωρίτερα, ορισμένα από τα πλεονεκτήματα της ακίνητοποίησης των ενζύμων είναι η ανάκτηση του βιοκαταλύτη και η ικανότητα επαναχρησιμοποίησης, πλεονεκτήματα τα οποία καθιστούν πρακτικά εφικτή τη χρήση των ενζύμων στη βιομηχανία. Η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης των συγκεκριμένων ακίνητοποιημένων λιπασών στην εστεροποίηση του καπρυλικού οξέος με 1-βουτανόλη μελετήθηκε σε ισοοκτάνιο στους 50 °C. Η αντίδραση λαμβάνει χώρα για 3 ώρες στη συγκεκριμένη θερμοκρασία και έπειτα το οργανοπήκτωμα αφαιρείται, ξεπλένεται 5 φορές με ισοοκτάνιο για την αφαίρεση των αντιδρώντων και προστίθεται σε ένα νέο διάλυμα υποστρωμάτων.



Εικόνα 56: Επαναχρησιμοποίηση των λιπασών CalB και Cvl που ακίνητοποιήθηκαν σε οργανοπηκτώματα HPMC-S4 στους 50 °C σε ισοοκτάνιο.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 56, ύστερα από 10 χρήσεις (30 ώρες χρήσης) στους 50 °C και οι δύο λιπάσες διατήρησαν πάνω από 50 % της αρχικής τους δραστικότητας. Τα συγκεκριμένα αποτελέσματα είναι αρκετά ικανοποιητικά, δεδομένης της υψηλής θερμοκρασίας επώασης. Στους 30 °C οι λιπάσες διατήρησαν πάνω από το 80 % της αρχικής τους δραστικότητας ύστερα από 100 ώρες χρήσης (10 χρήσεις), σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό σε σχέση με αυτό που έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία για πηκτώματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο (Jenta et al. 1997, Rees and Robinson 1995, Zoumprianoti et al. 2006). Η χρήση των μικρογαλακτωμάτων ιοντικού υγρού για το σχηματισμό του οργανοπηκτώματος, καθώς και η ξήρασή του, αυξάνει σημαντικά τη σταθερότητα των ακίνητοποιημένων λιπασών, μειώνοντας τη θερμική απενεργοποίηση τους και την απομάκρυνση από το φορέα ακίνητοποίησης.

9.4 Μελέτη της δομής των ακίνητοποιημένων λιπασών

Είναι ευρέως αποδεκτό πλέον πως τα ένζυμα μπορεί να υποστούν δομικές αλλαγές κατά την ακίνητοποίησή τους (Mena et al. 2008, Palomo et al. 2003). Η δευτεροταγής δομή των ακίνητοποιημένων λιπασών μελετήθηκε μέσω της φασματοσκοπίας υπερύθρου. Στον πίνακα 29 παρατίθενται τα δεδομένα της δευτεροταγούς δομής των ακίνητοποιημένων λιπασών σε οργανοπηκτώμα HPMC από μικρογαλάκτωμα S4 (HPMC-S4) και συγκρίνονται με τη δομή των λιπασών σε υδατικό διάλυμα και σε μικρογαλάκτωμα S4, τα φάσματα των οποίων ελήφθησαν με την τεχνική ATR, όπως προέκυψαν από την ανάλυση της αμιδικής περιοχής I.

Πίνακας 29: Προσδιορισμός (%) της δευτεροταγούς δομής λιπασών ύστερα από ανάλυση της αμιδικής περιοχής I και ο συντελεστής συσχέτισης (r) ως προς τη δομή σε υδατικό διάλυμα. Το ποσοστό β-πτυχώσεων εμπεριέχει το ποσοστό αντιπαράλληλων β-πτυχώσεων (Τυπική απόκλιση < 6%)

Λιπάση	Σύστημα	α-έλικα	β-πτυχώσεις	Άλλα στοιχεία	Αντιπαράλληλες β-πτυχώσεις	r
CalB	Υδατικό	24.0	29.0	47.0	8.5	-
	S4	25.7	33.4	40.9	8.7	0.953
	HPMC – S4	21.0	42.0	37.0	11.7	0.896
Cvi	Υδατικό	22.0	37.5	40.5	25.9	-
	S4	25.1	39.6	35.2	11.5	0.910
	HPMC – S4	21.8	53.1	25.2	5.1	0.749

Όπως αναφέρθηκε και σε προηγούμενη ενότητα, τα δεδομένα στο υδατικό διάλυμα διαφέρουν σε σχέση με τη κρυσταλλογραφική δομή (Lang et al. 1996, Uppenberg et al. 1994), καθώς η συγκέντρωση του ενζύμου κατά τη λήψη του φάσματος είναι αυξημένη (1.5 mg/mL) και μπορεί να οδηγήσει στη δημιουργία συσσωματωμάτων (Palomo et al. 2003). Από τις τιμές του συντελεστή συσχέτισης (r) φαίνεται πως η ακίνητοποίηση στα οργανοπηκτώματα οδηγεί σε

δομικές αλλαγές, οι οποίες είναι περισσότερο εκτεταμένες από ότι όταν οι λιπάσες εγκλωβίστηκαν σε μικρογαλάκτωμα S4. Συγκεκριμένα, αν και τα ποσοστά της α -έλικας δεν διαφοροποιούνται σημαντικά κατά την ακίνητοποίηση, παρατηρείται αύξηση των β -πτυχωτών επιφανειών. Η αύξηση αυτή δεν συνοδεύεται από αντίστοιχη αύξηση των αντιπαράλληλων β -πτυχώσεων, κάτι το οποίο υποδηλώνει ενδομοριακές δομικές αλλαγές και όχι δημιουργία συσσωματωμάτων (Mukherjee et al. 2007). Συγκεκριμένα, στην περίπτωση της λιπάσης CnI φαίνεται πως οι διαμοριακές αλληλεπιδράσεις μειώνονται σημαντικά. Η αύξηση των β -πτυχωτών επιφανειών συνάδει με την υιοθέτηση μίας περισσότερο συμπαγούς δομής σε σχέση με τη δομή στο υδατικό διάλυμα, στην οποία μπορεί να αποδοθεί η αυξημένη σταθερότητα που επιδεικνύουν οι λιπάσες μετά την ακίνητοποίηση. Η αλλαγή αυτή φαίνεται να είναι σταδιακή από το υδατικό διάλυμα στο S4 και έπειτα κατά την ακίνητοποίηση του μικρογαλακτώματος, κάτι το οποίο φαίνεται και στο συντελεστή συσχέτισης, αλλά συσχετίζεται και με την αύξηση της σταθερότητας των λιπασών. Παρόμοιες αλλαγές στη δομή ενζύμων κατά την ακίνητοποίηση έχουν αναφερθεί βιβλιογραφικά (De Diego et al. 2005, Griebenow and Klibanov 1996).

9.5 Τροποποίηση των οργανοπηκτωμάτων HPMC με χρήση σιλανίων

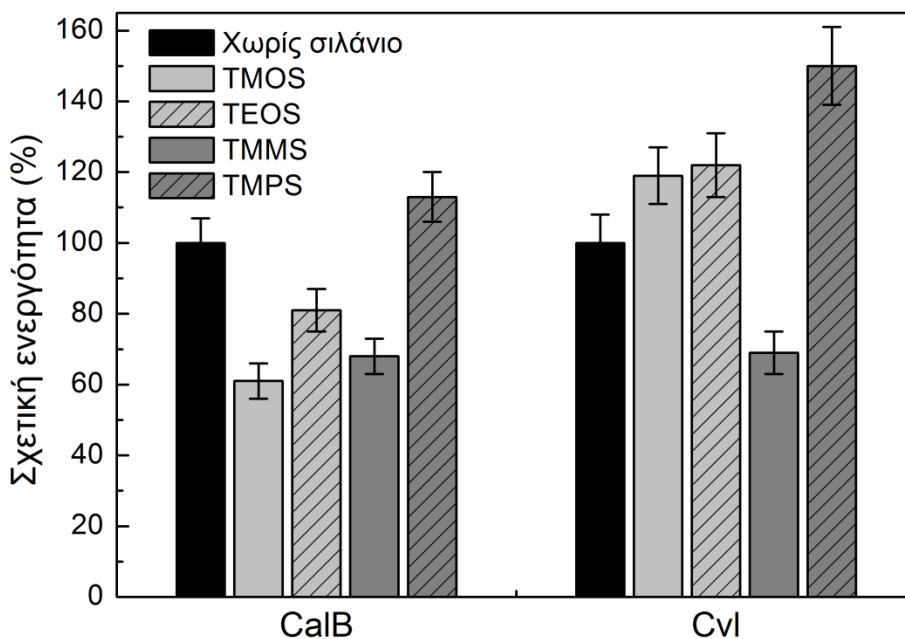
Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, η δομή των οργανοπηκτωμάτων μπορεί να τροποποιηθεί με τη χρήση υποκατεστημένων σιλανίων με σκοπό την αύξηση της δραστηριότητας και της σταθερότητας των ακίνητοποιημένων ενζύμων (Reetz 1997, Schuleit and Luisi 2001). Υποκατεστημένα σιλάνια έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη δημιουργία sol-gels, υλικά τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί ως φορείς ακίνητοποίησης ενζύμων (Pierre 2004). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η χρήση τεσσάρων υποκατεστημένων σιλανίων (εικόνα 20) για την τροποποίηση του οργανοπηκτώματος HPMC, καθώς και η επίδραση τους στη καταλυτική συμπεριφορά των ακίνητοποιημένων λιπασών.

9.5.1 Επίδραση στην ενεργότητα των ακίνητοποιημένων λιπασών

Τα υποκατεστημένα σιλάνια χρησιμοποιήθηκαν σε συγκεντρώσεις έως και 20 % του συνολικού όγκου του οργανοπηκτώματος (πριν την ξήρανση). Η εικόνα του οργανοπηκτώματος με τη χρήση των σιλανίων δεν διαφοροποιείται σε σχέση με αυτή της εικόνας 44. Στην εικόνα 57 παρατίθενται τα αποτελέσματα για τη δραστηριότητα των λιπασών CalB και CnI που ακίνητοποιήθηκαν σε οργανοπηκτώμα HPMC – S4 απουσία και παρουσία 20 % (v/v) σιλανίου.

Είναι εμφανές πως η παρουσία των υποκατεστημένων σιλανίων επηρεάζει σημαντικά τη δραστηριότητα των λιπασών που ακίνητοποιούνται στα συγκεκριμένα οργανοπηκτώματα. Συγκεκριμένα, η λιπάση CnI παρουσιάζει αυξημένη δραστηριότητα (έως και κατά 50 %) στις περισσότερες περιπτώσεις σε σχέση με τη δραστηριότητα σε οργανοπηκτώματα χωρίς σιλάνιο. Το φαινόμενο αυτό όμως δεν είναι γενικευμένο, καθώς η λιπάση CalB παρουσιάζει χαμηλότερη δραστηριότητα παρουσία των σιλανίων (εκτός από την περίπτωση του σιλανίου TMPS). Μεταξύ των σιλανίων που χρησιμοποιήθηκαν, οι λιπάσες παρουσιάζουν βελτίωση της καταλυτικής τους

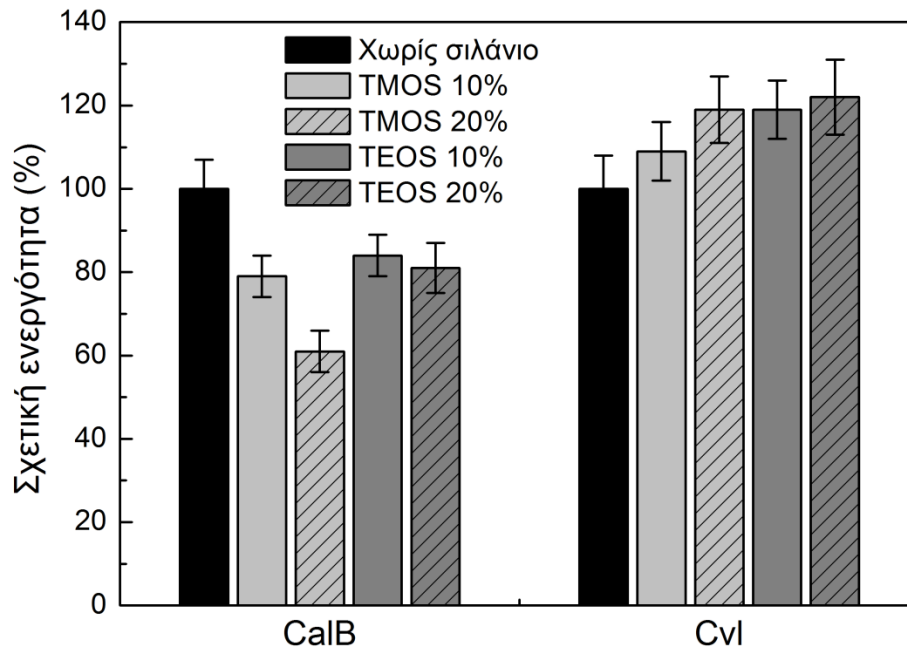
δραστικότητας με αύξηση της αλκυλικής αλυσίδας των υποκαταστατών των σιλανίων. Παρόμοια συμπεριφορά έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία για λιπάσες ακινητοποιημένες σε sol-gel (Reetz 1997), αποδίδοντας την αύξηση της δραστηριότητας των ακινητοποιημένων λιπασών στην αυξημένη διαθεσιμότητα του υποστρώματος στο μικροπεριβάλλον του ενζύμου λόγω της αύξησης της υδροφοβικότητας του φορέα και της ελαχιστοποίησης των φαινομένων μεταφοράς, καθώς το δίκτυο που σχηματίζεται παρουσιάζει μεγαλύτερο πορώδες.



Εικόνα 57: Επίδραση της χρήσης 20 % (v/v) σιλανίου κατά το σχηματισμό HPMC – S4 οργανοπηκτωμάτων στη συνθετική δραστηριότητα των ακινητοποιημένων λιπασών.

Καθώς παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση στη δραστηριότητα των λιπασών (έως και 50 %), μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του σιλανίου που χρησιμοποιείται κατά την ακινητοποίηση. Μελετήθηκαν δύο συγκεντρώσεις (10 και 20 %, v/v) για δύο σιλάνια τα οποία χρησιμοποιούνται ευρέως για την ακινητοποίηση ενζύμων και παρουσιάζουν συμμετρική δομή.

Από την εικόνα 58 φαίνεται πως η χρήση σιλανίων στο οργανοπηκτώμα HPMC - S4 έχει θετική επίδραση στη συνθετική δραστηριότητα της λιπάσης Cvl, αλλά όχι στη δραστηριότητα της λιπάσης CalB, όπως παρουσιάστηκε και στην εικόνα 57. Η επίδραση αυτή φαίνεται να είναι δόσοεξαρτώμενη. Συγκεκριμένα, αύξηση της συγκέντρωσης του σιλανίου οδηγεί σε περαιτέρω αύξηση της δραστηριότητας της Cvl, ενώ στην περίπτωση της CalB οδηγεί σε περαιτέρω μείωση της δραστηριότητας. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η χρήση του TEOS οδηγεί σε αυξημένη δραστηριότητα σε σχέση με τη χρήση του TMOS σε κάθε συγκέντρωση που μελετήθηκε, υποδεικνύοντας έτσι την επίδραση του μήκους της αλκυλικής ομάδας των υποκαταστατών στη δραστηριότητα των ακινητοποιημένων λιπασών.



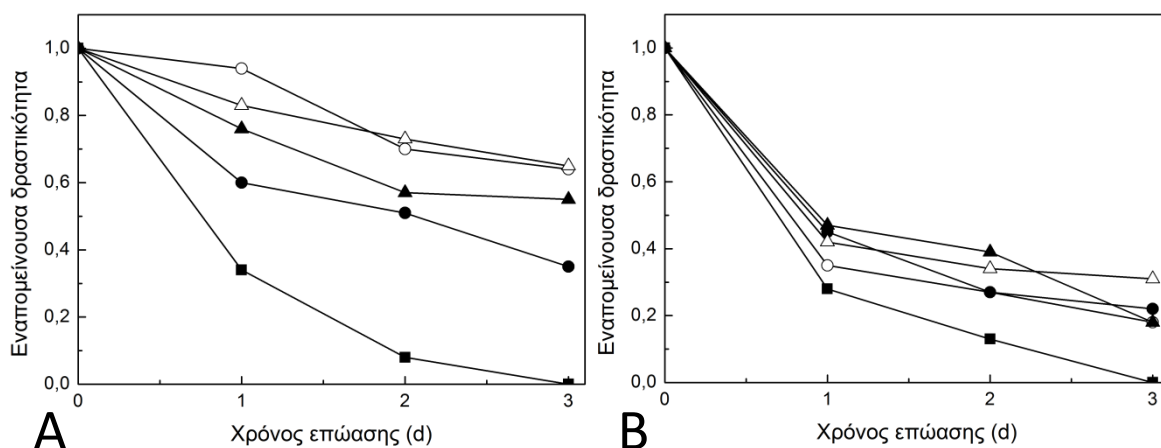
Εικόνα 58: Επίδραση της συγκέντρωσης (v/v) του σιλανίου κατά το σχηματισμό HPMC – S4 οργανοπηκτωμάτων στη συνθετική δραστηριότητα των ακίνητοποιημένων λιπασών.

9.5.2 Επίδραση στη σταθερότητα των ακίνητοποιημένων λιπασών

Η σταθεροποίηση λιπασών που ακίνητοποιήθηκαν σε οργανοπηκτώματα ζελατίνης με τη χρήση υποκατεστημένων σιλανίων έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Schuleit and Luisi 2001). Η σταθερότητα των λιπασών CalB και Cvi που ακίνητοποιήθηκαν σε οργανοπηκτώματα που τροποποιήθηκαν με σιλάνιο μελετήθηκε στους 70 °C.

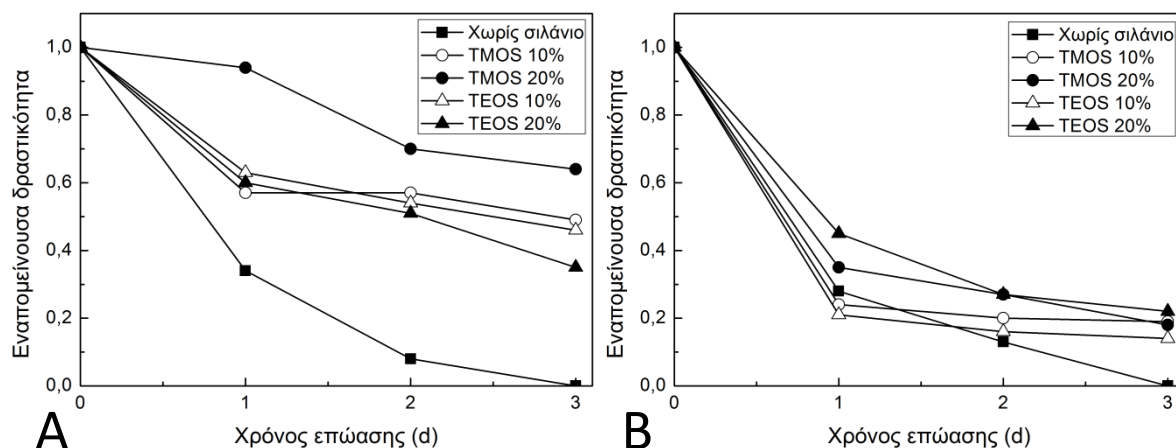
Στην εικόνα 59 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της μελέτης της θερμοσταθερότητας των ακίνητοποιημένων λιπασών στους 70 °C. Είναι ενδιαφέρον πως η χρήση των σιλανίων κατά την ακίνητοποίηση σταθεροποιεί και τις δύο λιπάσες. Ενδεικτικά, ενώ η λιπάση Cvi ακίνητοποιημένη σε HPMC - S4 απενεργοποιείται πλήρως ύστερα από 3 μέρες επώασης χωρίς τη χρήση σιλανίων, με τη χρήση των σιλανίων στο πρωτόκολλο της ακίνητοποίησης διατηρεί περίπου το 20 % της αρχικής δραστηριότητας (εικόνα 59B). Πιο ενδιαφέροντα είναι τα αποτελέσματα της ακίνητοποιημένης λιπάσης CalB σε HPMC – S4 όπου ενώ ύστερα από 3 μέρες επώασης στους 70 °C απενεργοποιείται πλήρως, η χρήση των σιλανίων οδηγεί σε σημαντική σταθεροποίηση, διατηρώντας με αυτό τον τρόπο πάνω από 35 % της αρχικής της δραστηριότητας. Στην προκειμένη λιπάση παρατηρείται σημαντική διαφοροποίηση της σταθερότητας η οποία σχετίζεται με το μήκος του της αλκυλομάδας του υποκαταστάτη. Συγκεκριμένα, η χρήση μεθυλ-υποκαταστατών σε σχέση με υποκαταστάτες μεγαλύτερης ανθρακικής αλυσίδας παρουσιάζει σημαντικό πλεονέκτημα όσον αφορά τη σταθεροποίηση της λιπάσης CalB. Το φαινόμενο είναι αντίστροφο από αυτό που παρατηρήθηκε για τη δραστηριότητα των λιπασών, όπως περιγράφεται στην προηγούμενη παράγραφο. Η καταλυτική συμπεριφορά αυτή έχει παρατηρηθεί για ένζυμα

ακίνητοποιημένα σε sol-gels και φαίνεται να σχετίζεται με το μέγεθος των πόρων του δικτύου των πολυμερισμένων σιλανίων (Bosley and Clayton 1994, Mena et al. 2008, Soares et al. 2004).



Εικόνα 59: Σταθερότητα των λιπασών *CalB* (A) και *Cvl* (B) ακίνητοποιημένων σε HPMC – S4 απουσία και παρουσία 20 % (v/v) σιλανίων στους 70 °C. ■ Απουσία σιλανίου, ○ TMOS, ● TEOS, △ TMMS, ▲ TMPS. (Τυπική απόκλιση < 7%).

Η επίδραση της συγκέντρωσης του σιλανίου που χρησιμοποιείται κατά την ακίνητοποίηση στη σταθερότητα των λιπασών μελετήθηκε για τα υποκατεστημένα σιλάνια TMOS και TEOS σε συγκεντρώσεις 10 και 20 % (v/v). Όπως φαίνεται στην εικόνα 60, μικρή διαφοροποίηση στη σταθερότητα παρατηρείται στις περισσότερες περιπτώσεις με αλλαγή της συγκέντρωσης. Συγκεκριμένα, αύξηση του TMOS από 10 % σε 20 % έχει σημαντική σταθεροποιητική επίδραση για τη λιπάση *CalB*, ενώ στο TEOS δεν φαίνεται να επιδρά σημαντικά. Στην περίπτωση της *Cvl* η χρήση μεγαλύτερης συγκέντρωσης σιλανίου οδηγεί σε μικρή αύξηση της σταθερότητας.



Εικόνα 60: Επίδραση της περιεκτικότητας (v/v) του οργανοπηκτώματος HPMC-S4 σε σιλάνιο στη θερμοσταθερότητα των ακίνητοποιημένων (A) *CalB* και (B) *Cvl* (Τυπική απόκλιση < 7%).

Από τα αποτελέσματα που παρουσιάστηκαν στην παράγραφο 9.5 φαίνεται πως η χρήση των σιτανίων για τη τροποποίηση των οργανοπηκτωμάτων όντως μπορεί να σταθεροποιήσει τα ένζυμα που ακίνητοποιούνται σε οργανοπηκτώματα, ενώ επιδρά και στην καταλυτική δραστηριότητα των ενζύμων. Η συγκεκριμένη τεχνική παρουσιάζει σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον και αξίζει να μελετηθεί διεξοδικότερα σε επόμενες μελέτες.

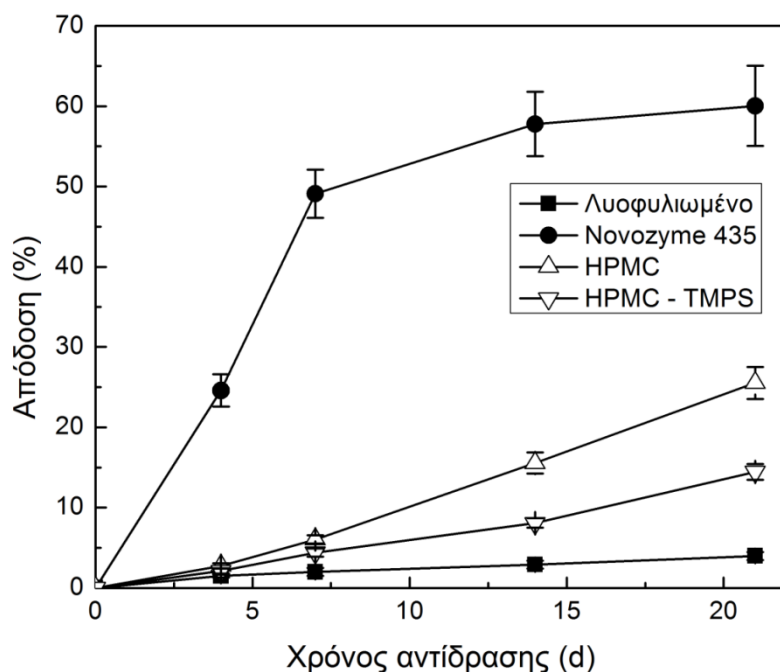
9.6 Εφαρμογή ακίνητοποιημένων λιπασών στην παραγωγή βιοντήζελ

Οι ενεργειακές απαιτήσεις των προηγούμενων αιώνων καλύπτονταν με μη ανανεώσιμα φυσικά καύσιμα όπως το πετρέλαιο και οι διάφορες μορφές γαιανθράκων. Πλέον, στον 21^ο αιώνα γίνεται προσπάθεια οι μη ανανεώσιμες αυτές πηγές ενέργειας να αντικατασταθούν με άλλες μορφές ανανεώσιμης ενέργειας, καθώς οι περιβαλλοντικές απαιτήσεις και η εξάντληση των φυσικών πόρων πιέζουν για αλλαγές στην ενεργειακή πολιτική. Το βιοντήζελ έχει προταθεί ως μία εναλλακτική πηγή ενέργειας τα τελευταία χρόνια. Αν και δεν είναι λιγότερο ρυπογόνο από τα πετροχημικά, είναι μία ανανεώσιμη πηγή ενέργειας η οποία μπορεί να εκμεταλλευτεί την υπάρχουσα τεχνολογία, κάτι το οποίο λογίζεται ως σημαντικό πλεονέκτημα (Fukuda et al. 2001, Lin et al. 2011). Το βιοντήζελ αποτελείται από μεθυλεστέρες λιπαρών οξέων μακράς ανθρακικής αλυσίδας. Παράγεται από τη μετεστεροποίηση τριγλυκεριδίων φυτικών ελαίων ή ζωικών λιπών με μεθανόλη. Ως πρώτη ύλη χρησιμοποιούνται πλέον και απόβλητα ελαιοτριβείων ή χρησιμοποιημένα λάδια, ανακυκλώνοντας τα με αυτό τον τρόπο και μειώνοντας έτσι το περιβαλλοντικό αποτύπωμα της χρήσης του βιοντήζελ (Kulkarni and Dalai 2006).

Έως σήμερα δύο τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βιοντήζελ: η χημική και η ενζυμική κατάλυση (Marchetti et al. 2007). Η χημική κατάλυση της μετεστεροποίησης των τριγλυκεριδίων είναι εύκολη και οικονομική μέθοδος και επιτυγχάνεται χρησιμοποιώντας είτε οξέα (π.χ. υδροχλωρικό οξύ, θειικό οξύ), είτε βάσεις (π.χ. καυστικό νάτριο) ως καταλύτες. Η συγκεκριμένη μέθοδος όμως παρουσιάζει ευαισθησία στην παρουσία ελεύθερων λιπαρών οξέων (οδηγεί στη δημιουργία αλάτων λιπαρών οξέων) και στην παρουσία νερού (οδηγεί στην υδρόλυση των τριγλυκεριδίων με επακόλουθη παραγωγή ελεύθερων λιπαρών οξέων). Επιπλέον, τα απόβλητα που παράγονται είναι αρκετά τοξικά και χρίζουν ειδικής μεταχείρισης, ενώ η γλυκερίνη που παράγεται είναι χαμηλής καθαρότητας (Lin et al. 2011). Για όλους αυτούς τους λόγους η ενζυμική κατάλυση τα τελευταία χρόνια κερδίζει έδαφος στην παραγωγή βιοντήζελ. Η λιπάση CalB είναι μία από τις περισσότερο συχνά χρησιμοποιούμενες λιπάσες που χρησιμοποιούνται για τη μετεστεροποίηση των τριγλυκεριδίων (Adamczak et al. 2009).

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ικανότητα μετεστεροποίησης της τριλαυρίνης με μεθανόλη σε *n*-εξάνιο από την ακίνητοποιημένη σε οργανοπηκτώματα CalB, με σκοπό την παραγωγή μεθυλεστέρων λαυρικού οξέος. Η συγκεκριμένη αντίδραση είναι ουσιαστικά μία πρότυπη αντίδραση για να ελεγχθεί το κατά πόσο η λιπάση είναι ικανή να παρουσιάσει δραστηριότητα σε συστήματα με υψηλή συγκέντρωση μεθανόλης, καθώς στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί ο αποδιατακτικός ρόλος της στη συγκεκριμένη αντίδραση. Θα πρέπει να σημειωθεί

ότι η λιπάση CalB παρουσιάζει εκλεκτικότητα ως προς τις θέσεις 1 και 3 του τριγλυκεριδίου, οπότε αναμένεται ως μέγιστη απόδοση της αντίδρασης το 66 %.



Εικόνα 61: Απόδοση της αντίδρασης παραγωγής μεθυλεστέρων από τριλαυρίνη χρησιμοποιώντας διάφορα ακίνητοποιημένα σκευάσματα της λιπάσης CalB σε *n*-εξάνιο στους 50 °C. Συγκέντρωση ενζύμου για όλα τα σκευάσματα = 0.1 mg/mL.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 61, η λιπάση CalB μπορεί να καταλύσει την αντίδραση μετεστεροποίησης της τριλαυρίνης ακόμα και σε ελεύθερη μορφή, παρουσιάζοντας χαμηλή δραστικότητα. Το εμπορικά διαθέσιμο σκευάσμα Novozyme 435 (CalB ακίνητοποιημένη σε ακρυλική ρητίνη) παρουσιάζει πολύ καλή δραστικότητα, φτάνοντας σε απόδοση 60 % ύστερα από 3 εβδομάδες. Η λιπάση που ακίνητοποιήθηκε σε οργανοπηκτώματα HPMC-S4 παρουσίασε βελτιωμένη δραστικότητα σε σχέση με τη δραστικότητα που επιδεικνύει η λυοφυλιωμένη λιπάση, αρκετά χαμηλότερη όμως από τη Novozyme 435.

Πέρα από τα οργανοπηκτώματα HPMC μελετήθηκε και η χρήση οργανοπηκτωμάτων τα οποία τροποποιήθηκαν με σιλάνιο, όμως η χρήση τους μείωσε δραστικά την ενζυμική δραστικότητα. Συγκεκριμένα η παρουσία των σιλανίων TEOS, TMOS και TMMS οδήγησε σε πλήρη απώλεια της δραστικότητας του ενζύμου, καθώς δεν παρατηρήθηκε προϊόν ύστερα από 21 ημέρες. Η χρήση του σιλανίου TMPS για τη τροποποίηση του οργανοπηκτώματος οδήγησε σε μείωση της δραστικότητας της ακίνητοποιημένης λιπάσης σε HPMC-S4. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το συγκεκριμένο σιλάνιο είναι το μόνο σιλάνιο από αυτά που χρησιμοποιήθηκαν που παρουσίασε θετική επίδραση στη δραστικότητα της συγκεκριμένης λιπάσης (παράγραφος 9.5.1), κάτι το οποίο είχε αποδοθεί στη παρουσία μεγαλύτερων υποκαταστατών. Στην προκειμένη περίπτωση φαίνεται πως το δίκτυο που δημιουργεί ο πολυμερισμός των σιλανίων δεν επιτρέπει

τη διάχυση της τριλαυρίνης, η οποία είναι ογκώδες μόριο, στο εσωτερικό του οργανοπηκτώματος, επιδρώντας με αυτό τον τρόπο αρνητικά στην παραγωγή των μεθυλεστέρων. Το TMPS, λόγω του ότι παρουσιάζει την προπυλομάδα, πιθανόν να δημιουργεί δίκτυα με πόρους μεγαλύτερης διαμέτρου, επιτρέποντας σε κάποιο βαθμό την προσέγγιση του ενζύμου από το υπόστρωμα, παρουσιάζοντας όμως παράλληλα σε κάποιο βαθμό φαινόμενα μεταφοράς. Σε κάθε περίπτωση όμως τα οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων ιοντικού υγρού μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βιοντήζελ.

10 Αλληλεπίδραση υδρολασών με νανοδομημένα υλικά

Πλήθος εργασιών τα τελευταία χρόνια αναφέρει την ακινητοποίηση ενζύμων σε νανοϋλικά με σκοπό κάποια εφαρμογή (π.χ. ανάπτυξη βιοαισθητήρων, κυψελών βιοκαυσίμων), χωρίς όμως στις περισσότερες περιπτώσεις να κατανοείται πλήρως η αλληλεπίδραση μεταξύ των ενζύμων και των νανοδομημένων υλικών. Η κατανόηση των αλληλεπιδράσεων αυτών θα μπορούσε να οδηγήσει σε μία βελτιστοποιημένη διαδικασία ακινητοποίησης, με ακόμα πιο εντυπωσιακά αποτελέσματα.

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η καταλυτική συμπεριφορά διάφορων ανασυνδυασμένων λιπασών και εστερασών σε υδατικά διαλύματα τροποποιημένων νανοϋλικών, καθώς και η επίδραση που έχει η παρουσία των συγκεκριμένων νανοϋλικών στη δομή των ενζύμων. Οι λιπάσες και οι εστεράσες είναι δύο κατηγορίες ενζύμων που παρουσιάζουν σημαντικό ενδιαφέρον για βιοκαταλυτικές διεργασίες (Bornscheuer 2002b, Bornscheuer et al. 2002, Jaeger and Eggert 2002). Η συγκριτική μελέτη δύο κατηγοριών ενζύμων αναμένεται να αποδώσει μία πιο ολοκληρωμένη εικόνα τόσο της αλληλεπίδρασης των ενζύμων με τα νανοϋλικά, όσο και της επίδρασης των χαρακτηριστικών των υλικών στην καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων. Τα υπό μελέτη ένζυμα περιλαμβάνουν τις λιπάσες A και B από *Pseudozyma antarctica* (CalA και CalB αντίστοιχα), από *Candida rugosa* (CrI) και από *Geobacillus thermoleovorans* (Gtl), ενώ από εστεράσες μελετήθηκαν οι εστεράσες από *Bacillus subtilis* (Bs2), από *Pyrobaculum calidifontis* (PestE) και από *Pseudomonas fluorescens* (Pfe I), των οποίων τα χαρακτηριστικά παρουσιάζονται στον πίνακα 30.

Πίνακας 30: Χαρακτηριστικά υδρολασών σύμφωνα με τις κρυσταλλογραφικές τους δομές

Ένζυμο	Κατηγορία	Μοριακό βάρος (kDa)	Ισοηλεκτρικό σημείο (pI)	Υδροφοβικότητα ²³	Κωδικός PDB ²⁴
CalA	Λιπάση	47	7.5	-0.042	2VEO
CalB	Λιπάση	33	6.0	0.037	1TCA
CrI	Λιπάση	57	4.9	-0.056	1CRL
Gtl	Λιπάση	43	6.4	-0.389	2DSN
Bs2	Εστεράση	54	6.4	-0.254	1QE3
PestE	Εστεράση	34	6.9	-0.037	2WIR
Pfe I	Εστεράση	31	6.4	0.177	1VA4

²³ Χρησιμοποιήθηκε το λογισμικό ExPASy ProtParam, το οποίο λειτουργεί με την παραδοχή πως όλα τα αμινοξέα συνεισφέρουν το ίδιο στην υδροφοβικότητα του μορίου. Θετικές τιμές παρουσιάζουν οι υδρόφοβες πρωτεΐνες και αρνητικές οι υδρόφιλες.

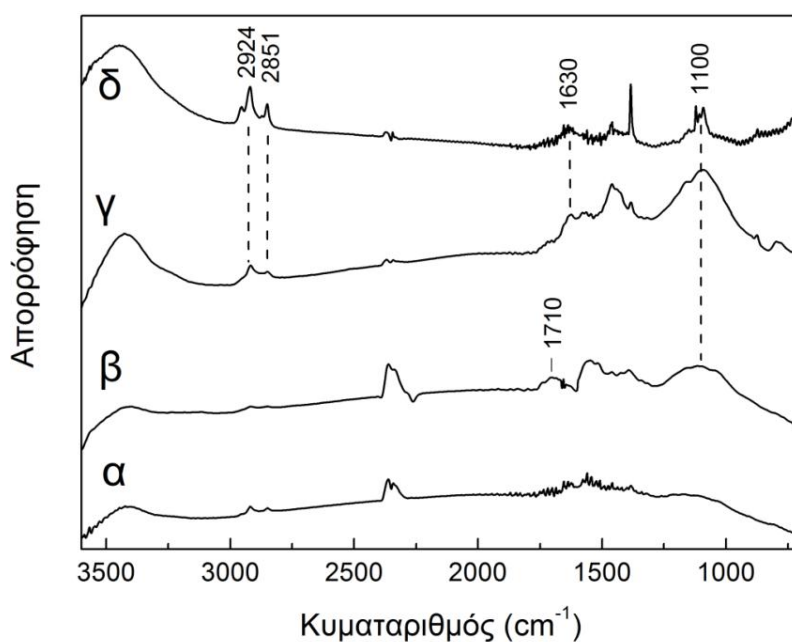
²⁴ Η δομή των υδρολασών Gtl, Bs2 και Pfe I δεν έχει αναλυθεί κρυσταλλογραφικά και οι κωδικοί της PDB που δίνονται εδώ είναι από πρωτεϊνών με ομολογία πάνω από 95 %.

10.1 Χαρακτηρισμός των τροποποιημένων νανοδομημένων υλικών

Ο χαρακτηρισμός των νανοδομημένων υλικών μπορεί να παρέχει πληροφορίες τόσο για τα ίδια τα υλικά (γεωμετρία, λειτουργικές ομάδες) όσο και για την αλληλεπίδραση τους με άλλες ενώσεις. Συγκεκριμένα για τις τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν στο παρών κεφάλαιο, η φασματοσκοπία Raman και η φασματοσκοπία υπερέυθρου (FT-IR) είναι δύο δονητικές φασματοσκοπικές τεχνικές οι οποίες παρέχουν πληροφορίες για τις λειτουργικές ομάδες που υπάρχουν στο υλικό, τους δεσμούς που αναπτύσσονται και την κατάσταση υβριδισμού του άνθρακα. Στις επόμενες ενότητες παρατίθενται τα αποτελέσματα από το χαρακτηρισμό των νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα, πριν και μετά τη χημική τροποποίηση της επιφάνειάς τους.

10.1.1 Φασματοσκοπία υπερέυθρου

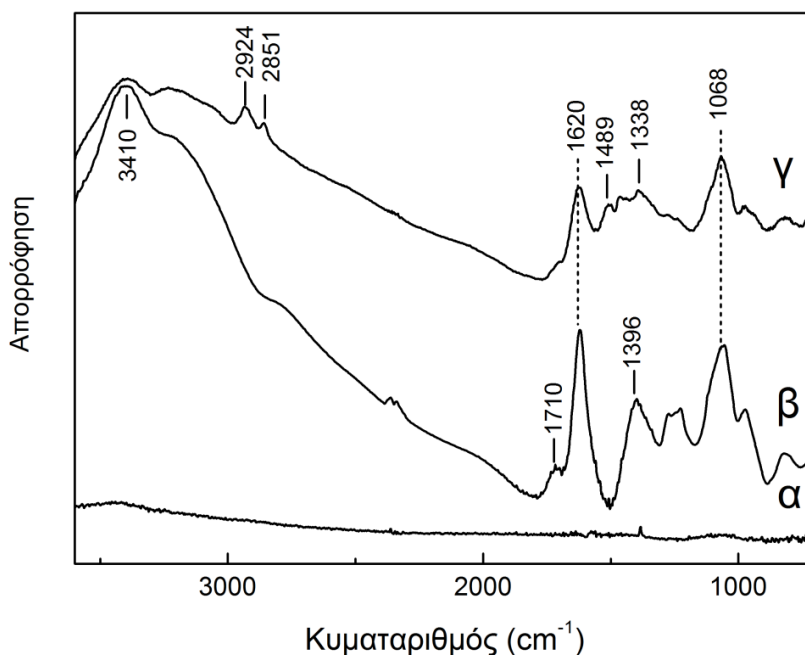
Φάσματα υπερέυθρου των νανοδομημένων υλικών ελήφθησαν πριν και μετά τη χημική τους τροποποίηση, σε μορφή KBr δισκίων. Τα φάσματα, τα οποία παρατίθενται στις εικόνες 62 και 63 επιβεβαιώνουν την επιτυχή τροποποίηση των νανοϋλικών, παρουσιάζοντας χαρακτηριστικές κορυφές για τις ομάδες που εισήχθησαν.



Εικόνα 62: Φάσματα υπερέυθρου νανοσωλήνων άνθρακα πριν την τροποποίηση (α) και των αντίστοιχων τροποποιημένων παραγώγων: (β) CNT-COOH, (γ) CNT-NH και (δ) CNT-R.

Τα φάσματα υπερέυθρου των τροποποιημένων νανοσωλήνων άνθρακα παρατίθενται στην εικόνα 62. Η οξείδωση των νανοσωλήνων άνθρακα οδηγεί στη δημιουργία καρβοξυ-, εποξυ- και υδροξυ- ομάδων στην επιφάνειά τους, η οποία επιβεβαιώνεται από τις χαρακτηριστικές κορυφές που εμφανίζονται στο φάσμα (β). Η κορυφή στα 1710 cm⁻¹ οφείλεται στη δόνηση έκτασης του καρβονυλίου του καρβοξυλικού οξέος ενώ η ευρεία κορυφή στα 1100 cm⁻¹ αποδίδεται στη

δόνηση έκτασης του απλού δεσμού άνθρακα οξυγόνου, επιβεβαιώνοντας την οξείδωση των ανθράκων των νανοσωλήνων και τη μετάπτωση τους από sp^2 σε sp^3 υβριδισμό (Du et al. 2008, Georgakilas et al. 2008, Νυκονίτς et al. 2009). Όσον αφορά τα φάσματα των τροποποιημένων νανοσωλήνων με αμινομάδες και αλκυλομάδες (CNT-NH και CNT-R αντίστοιχα), παρουσιάζονται δύο νέες κορυφές στα 2844 cm^{-1} και 2924 cm^{-1} που οφείλονται στις συμμετρικές και ασύμμετρες δονήσεις των $-CH_2-$ ομάδων τους αντίστοιχα. Αυτές οι κορυφές δεν παρουσιάζονται στα φάσματα των μη τροποποιημένων CNTs και των CNT-COOH, κάτι το οποίο υποδηλώνει την επιτυχή επισύναψη των οργανικών ομάδων στους νανοσωλήνες άνθρακα, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 28. Επιπλέον, η κορυφή του καρβονυλίου μετατοπίζεται σε χαμηλότερους κυματαριθμούς (1630 cm^{-1}) καθώς πλέον δεν εντάσσεται σε καρβοξυλομάδα, αλλά γειτνιάζει με έναν αμιδικό ή έναν εστερικό δεσμό. Η εικόνα αυτή υποδηλώνει πως η περαιτέρω τροποποίηση των νανοσωλήνων μετά το στάδιο οξείδωσης λαμβάνει χώρα στις καρβοξυλομάδες που έχουν δημιουργηθεί στην επιφάνεια των νανοσωλήνων άνθρακα.



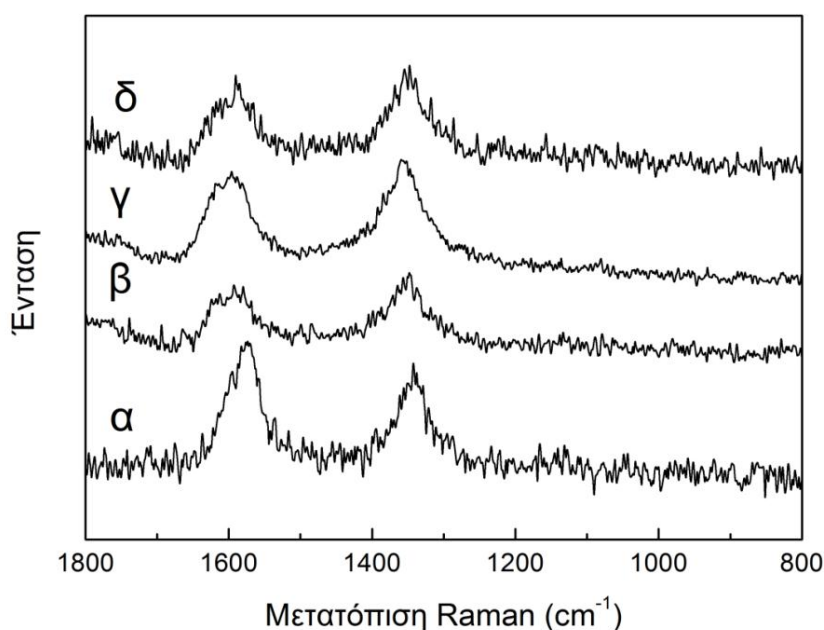
Εικόνα 63: Φάσματα υπερώθρου γραφίτη πριν την τροποποίηση (α) και των αντίστοιχων τροποποιημένων παραγώγων: (β) Gr-COOH και (γ) Gr-NH.

Στην εικόνα 63 παρατίθενται τα φάσματα υπερώθρου του γραφίτη και των παραγώγων του. Φαίνεται από το φάσμα (α) πως το μη τροποποιημένο γραφένιο δεν παρουσιάζει κάποια χαρακτηριστική κορυφή, υποδηλώνοντας με αυτό τον τρόπο πως δεν υπάρχουν ατέλειες στο γραφητικό πλέγμα και όλα τα άτομα άνθρακα βρίσκονται σε sp^2 υβριδισμό. Οι μη τροποποιημένοι νανοσωλήνες άνθρακα παρουσιάζουν κάποιες μικρές κορυφές που οφείλονται σε ατέλειες και σε προσμίξεις κατά τη διαδικασία παρασκευής τους. Το φάσμα του οξειδίου του γραφενίου (Gr-COOH, φάσμα (β)) παρουσιάζει όλες τις χαρακτηριστικές κορυφές των καρβοξυ-εποξυ- και υδροξυ- ομάδων, όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα για τους νανοσωλήνες άνθρακα. Η

ευρεία κορυφή στα 3410 cm^{-1} οφείλεται στις δονήσεις έκτασης της υδροξυλομάδας, ενώ οι κορυφές στα 1710 cm^{-1} και στα 1620 cm^{-1} αποδίδονται στις δονήσεις έκτασης του καρβονυλίου της καρβοξυλομάδας. Επιπλέον, η κορυφή στα 1396 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις παραμόρφωσης του δεσμού οξυγόνου - υδρογόνου, ενώ η κορυφή στα 1068 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις έκτασης του απλού δεσμού άνθρακα - οξυγόνου. Όταν το Gr-COOH τροποποιείται περαιτέρω σε Gr-NH εμφανίζονται νέες κορυφές στα 1489 και 1338 cm^{-1} λόγω των δονήσεων κάμψης των ομάδων $-\text{CH}_2-$ και $-\text{NH}-$ αντίστοιχα. Επίσης, οι συμμετρικές και ασύμμετρες δονήσεις των ομάδων $-\text{CH}_2-$ εμφανίζουν χαρακτηριστικές κορυφές στα 2929 και 2869 cm^{-1} αντίστοιχα. Οι χαρακτηριστικές κορυφές του οξειδίου του γραφενίου εμφανίζονται στο φάσμα υπερύθρου του Gr-NH καθώς η εξαμεθυλοδιαμίνη δεσμεύεται στις εποξυ-ομάδες του υλικού. Για αυτή την πρόσδεση σπάνε ορισμένοι δεσμοί οξυγόνου - άνθρακα, αλλά η κορυφή στα 1068 cm^{-1} παραμένει καθώς ο συγκεκριμένος δεσμός εμφανίζεται σε όλες τις λειτουργικές ομάδες του οξειδίου του γραφενίου.

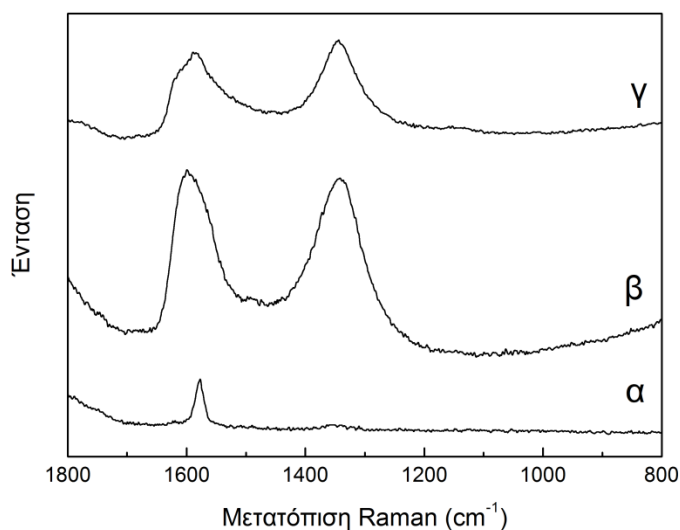
10.1.2 Φασματοσκοπία Raman

Τα φάσματα Raman των νανοσωλήνων άνθρακα παρατίθενται στην εικόνα 64. Οι δύο χαρακτηριστικές κορυφές που παρουσιάζονται σε όλα τα φάσματα στα 1350 cm^{-1} και 1590 cm^{-1} αντιστοιχούν στις γραφιτικές κορυφές D και G αντίστοιχα. Η κορυφή G στα 1590 cm^{-1} οφείλεται στην E_{2g} κατάσταση του γραφιτικού πλέγματος, λόγω του sp^2 υβριδισμού των ατόμων άνθρακα. Η κορυφή D στα 1350 cm^{-1} οφείλεται στον sp^3 υβριδισμό των ατόμων άνθρακα που μπορεί να προέρχεται από τις ατέλειες στο δίκτυο των sp^2 υβριδισμένων ατόμων άνθρακα λόγω της χημικής τροποποίησης (Janjonič et al. 2006).



Εικόνα 64: Φάσματα Raman νανοσωλήνων άνθρακα πριν την τροποποίηση (α) και των αντίστοιχων τροποποιημένων παραγώγων: (β) CNT-COOH, (γ) CNT-NH και (δ) CNT-R.

Η σχετική ένταση της κορυφής D προς την κορυφή G (I_D/I_G) μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να δώσει πληροφορίες για το βαθμό τροποποίησης των νανοϋλικών, ποσοτικοποιώντας σε ένα βαθμό τη διατάραξη του πλέγματος ατόμων άνθρακα. Το προφίλ των φασμάτων Raman των νανοσωλήνων άνθρακα δεν διαφέρει σημαντικά, κάτι το οποίο υποδηλώνει πως οι νανοσωλήνες άνθρακα διατηρούν ανέπαφα τα κύρια δομικά τους χαρακτηριστικά καθόλα τα στάδια της χημικής τροποποίησης. Οι τροποποιημένοι νανοσωλήνες άνθρακα παρουσιάζουν υψηλότερο λόγο I_D/I_G σε σχέση με τους μη τροποποιημένους νανοσωλήνες άνθρακα. Συγκεκριμένα, η τιμή που υπολογίστηκε για τους μη τροποποιημένους νανοσωλήνες άνθρακα ήταν 0.84, τιμή η οποία είναι στο εύρος τιμών που έχουν παρατηρηθεί στη βιβλιογραφία για τους νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος (Antunes et al. 2006, DiLeo et al. 2007). Η παρουσία της κορυφής D στους μη τροποποιημένους νανοσωλήνες άνθρακα οφείλεται στις ατέλειες του γραφιτικού πλέγματος και σε προσμίξεις κατά τη διαδικασία παρασκευής τους, όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο. Η οξείδωση των νανοσωλήνων άνθρακα προς CNT-COOH δημιουργεί ατέλειες στο πλέγμα των ατόμων άνθρακα, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο το λόγο I_D/I_G σε 1.21. Παρόμοια αύξηση έχει παρατηρηθεί και σε άλλες μελέτες κατά την οξείδωση των νανοσωλήνων άνθρακα (Tsoufis et al. 2008). Παρόμοιες τιμές υπολογίστηκαν για τα υλικά CNT-NH και CNT-R (1.18 και 1.17 αντίστοιχα), το οποίο υποδηλώνει πως η περαιτέρω τροποποίηση που λαμβάνει χώρα μετά την οξείδωση δεν δημιουργεί επιπλέον ατέλειες στο γραφιτικό πλέγμα, αλλά συμβαίνει πάνω στις καρβοξυλομάδες που ήδη σχηματίστηκαν στο πρώτο στάδιο της χημικής τροποποίησης, όπως αναφέρεται στην παράγραφο 7.10.1 και στο παράρτημα II.



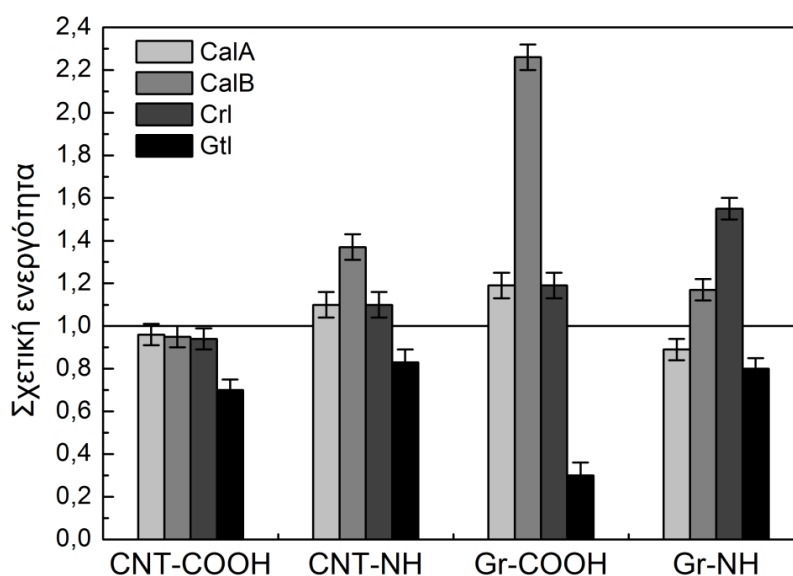
Εικόνα 65: Φάσματα Raman μη τροποποιημένου γραφίτη (α) και των αντίστοιχων τροποποιημένων παραγώγων (β) Gr-COOH και (γ) Gr-NH.

Τα φάσματα Raman των παραγώγων του γραφίτη παρουσιάζονται στην εικόνα 65. Όπως και στην περίπτωση των νανοσωλήνων άνθρακα εμφανίζονται οι δύο κορυφές D και G, ανάλογα με το πλήθος των sp^3 και sp^2 υβριδισμένων ατόμων άνθρακα αντίστοιχα. Ο μη τροποποιημένος

γραφίτης παρουσιάζει πολύ μικρή κορυφή στα 1350 cm^{-1} , υποδηλώνοντας έτσι πως δεν υπάρχουν ουσιαστικά ατέλειες στο γραφιτικό πλέγμα, καθώς όλα σχεδόν τα άτομα άνθρακα βρίσκονται σε sp^2 υβριδισμό. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και με τη φασματοσκοπία υπερύθρου. Η οξείδωση του γραφίτη δημιουργεί ατέλειες στο πλέγμα, διασπώντας τους διπλούς δεσμούς των ατόμων άνθρακα για την εισαγωγή ατόμων οξυγόνου με τη μορφή καρβοξυ-, υδροξυ- και εποξυ- ομάδων. Έτσι τα άτομα άνθρακα που προσβάλλονται μεταπίπτουν σε sp^3 υβριδισμό και για αυτό παρατηρείται σημαντική αύξηση της κορυφής D. Ο λόγος I_D/I_G για το Gr-COOH υπολογίστηκε 1.06, όταν για το μη τροποποιημένο γραφίτη ήταν σχεδόν μηδέν. Η περαιτέρω τροποποίηση του υλικού Gr-COOH με εξαμεθυλοδιαμίνη λαμβάνει χώρα στις ήδη υπάρχουσες εποξυ-ομάδες της επιφάνειάς του, για αυτό ο λόγος I_D/I_G παραμένει ουσιαστικά αμετάβλητος για το υλικό Gr-NH ($I_D/I_G = 1.07$).

10.2 Δραστικότητα υδρολασών παρουσία νανοϋλικών

Η δραστικότητα των υδρολασών παρουσία νανοϋλικών μελετήθηκε στην αντίδραση υδρόλυσης του rNPB (1 mM) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 7.5 (50 mM) στους $30\text{ }^\circ\text{C}$. Θα πρέπει να σημειωθεί πως το συγκεκριμένο υπόστρωμα αναγνωρίζεται από τις λιπάσες και τις εστεράσες και για αυτό το λόγο επιλέχθηκε για την παρούσα μελέτη. Η δραστικότητα των υδρολασών μελετήθηκε παρουσία 12.5 και 25.0 $\mu\text{g/mL}$ νανοϋλικών και συγκρίθηκε με τη δραστικότητα που επιδεικνύουν απουσία των νανοϋλικών.

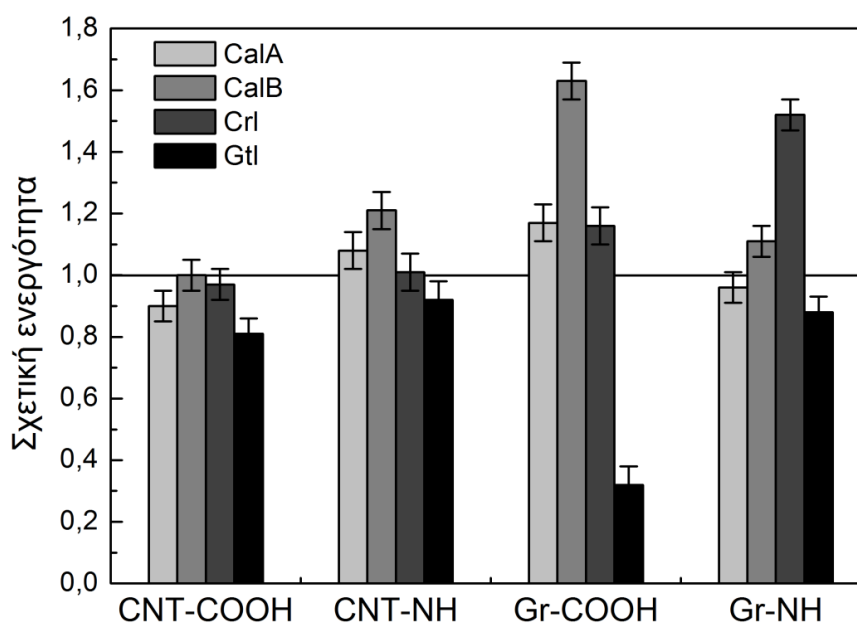


Εικόνα 66: Επίδραση της παρουσίας 25 $\mu\text{g/mL}$ νανοϋλικών στην υδρολυτική δραστικότητα των λιπασών. Η ενεργότητα απουσία νανοϋλικών αντιστοιχεί στην τιμή 1.

Στην εικόνα 66 παρατίθενται τα αποτελέσματα της δραστικότητας των λιπασών παρουσία 25 $\mu\text{g/mL}$ νανοϋλικών. Είναι προφανές ότι η παρουσία των νανοϋλικών έχει σημαντική επίδραση στη δραστικότητα των λιπασών, κάτι το οποίο υποδεικνύει τις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ ενζύμων και νανοϋλικών. Οι λιπάσες CalA, CalB και Cri ενεργοποιούνται

στις περισσότερες περιπτώσεις, πέραν των CNT-COOH. Η διασπορά ενός υδρόφοβου υλικού σε ένα υδατικό μέσο αναμένεται να οδηγήσει στη δημιουργία μίας μεσεπιφάνειας, κάτι το οποίο οδηγεί στην ενεργοποίηση των λιπασών. Για αυτό το λόγο παρατηρείται αύξηση της δραστηριότητας (έως και 120 %) σε αρκετές περιπτώσεις. Συγκεκριμένα για τη λιπάση CalB, στην οποία παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη ενεργοποίηση, έχει αναφερθεί πως η ακινητοποίηση του συγκεκριμένου ενζύμου σε υδρόφοβες επιφάνειες μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων οδηγεί σε ευνοϊκό προσανατολισμό του μορίου, καθιστώντας το ενεργό κέντρο προσβάσιμο στο υπόστρωμα (Chen et al. 2008).

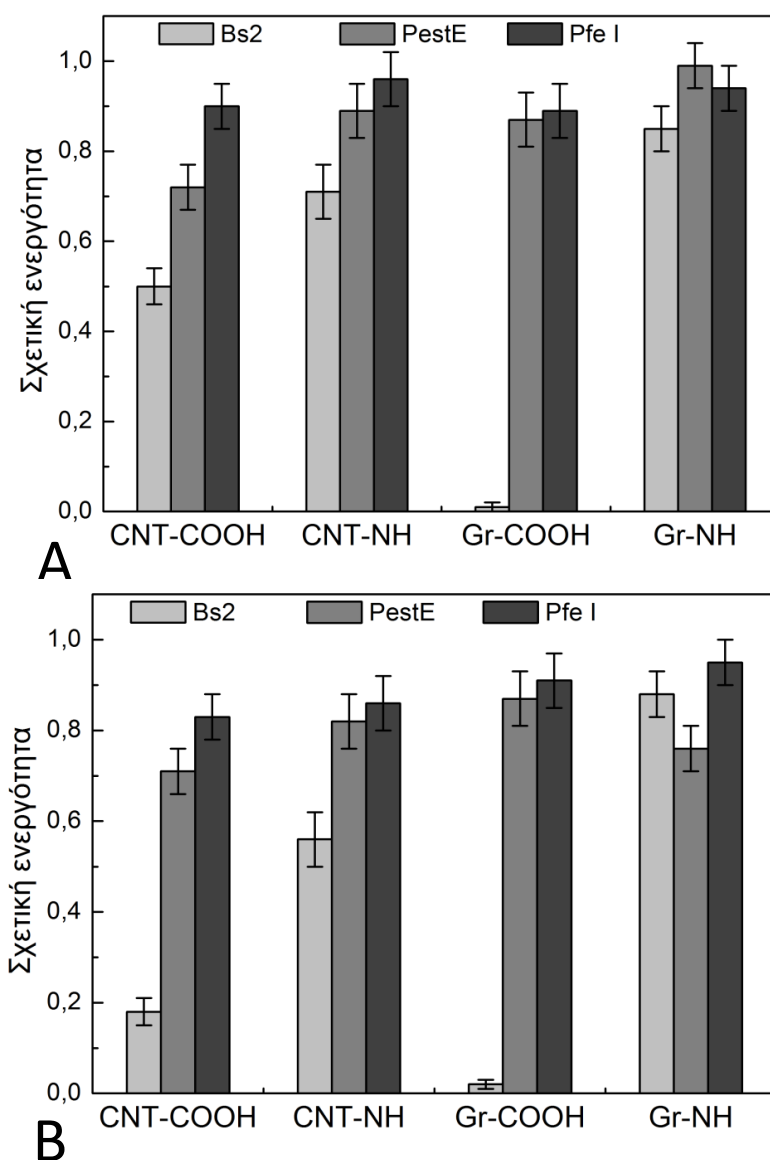
Στην περίπτωση της λιπάσης Gtl δεν παρατηρείται ενεργοποίηση παρουσία των νανοϋλικών. Αυτό το γεγονός πιθανόν να οφείλεται στο ότι το σκεύασμα της συγκεκριμένης λιπάσης περιέχει πλήθος άλλων πρωτεϊνών λόγω της χαμηλής του καθαρότητας. Έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά ότι η χρήση της αλβουμίνης επιδρά στην ενεργότητα της ακινητοποιημένης λιπάσης Crl (Shah et al. 2007). Αναμένεται λοιπόν οι πρωτεΐνες που υπάρχουν στο διάλυμα και οι οποίες δεν παρουσιάζουν υδρολυτική δραστηριότητα να αλληλεπιδρούν με τα νανοϋλικά, ανταγωνιζόμενες με τη Gtl. Για αυτό το λόγο δεν μπορούν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα για τη συγκεκριμένη λιπάση.



Εικόνα 67: Επίδραση της παρουσίας 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ νανοϋλικών στην υδρολυτική δραστηριότητα των λιπασών. Η ενεργότητα απουσία νανοϋλικών αντιστοιχεί στην τιμή 1.

Παρόμοια είναι η εικόνα όταν χρησιμοποιήθηκαν 12.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ νανοϋλικών (εικόνα 67). Από τη σύγκριση των δύο εικόνων φαίνεται πως η επίδραση των νανοϋλικών στη δραστηριότητα είναι δοσοεξαρτώμενη. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι το προφίλ της κάθε λιπάσης είναι αρκετά διαφορετικό, κάτι το οποίο σχετίζεται με τα χαρακτηριστικά του κάθε ενζυμικού μορίου. Οι δυνάμεις που ευθύνονται για την αλληλεπίδραση μεταξύ ενζύμων - νανοϋλικών είναι κυρίως

υδροφοβικής φύσεως (Gao and Kyrtziz 2008, In Het Panhuis et al. 2003, Kim et al. 2005, Shah et al. 2007). Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις αναμένεται να είναι ιδιαίτερα ισχυρές σε υδατικά μέσα, καθώς τα ένζυμα στην προσπάθειά τους να καλύψουν τις υδρόφοβες περιοχές που εκτίθενται στην επιφάνεια τους αλληλεπιδρούν με την υδρόφοβη επιφάνεια των νανοδομημένων υλικών. Η αλληλεπίδραση αυτή μπορεί να προκαλέσει δομικές αλλαγές όπως αναφέρεται σε επόμενη ενότητα (παράγραφος 10.4).



Εικόνα 68: Επίδραση της παρουσίας (A) 12.5 µg/mL και (B) 25.0 µg/mL νανοϋλικών στην υδρολυτική δραστηριότητα εστερασών. Η ενεργότητα συγκρίνεται με την ενεργότητα απουσία νανοϋλικών.

Οι εστεράσες παρουσιάζουν διαφορετικό προφίλ σε σχέση με τις λιπάσες, όπως παρουσιάζεται στην εικόνα 68. Οι εστεράσες δεν παρουσιάζουν το φαινόμενο της μεσεπιφανειακής ενεργοποίησης και για αυτό το λόγο δεν παρατηρείται ενεργοποίησή τους παρουσία των υδρόφοβων νανοϋλικών. Αντίθετα, η χρήση νανοϋλικών στο διάλυμα της

αντίδρασης οδηγεί σε μείωση της ενεργότητας των εστερασών. Το φαινόμενο φαίνεται να είναι δοσοεξαρτώμενο, όπως και στην περίπτωση των λιπασών, καθώς αύξηση της συγκέντρωσης των νανοϋλικών προσφέρει μεγαλύτερη διαθέσιμη επιφάνεια στα ένζυμα για αλληλεπίδραση, οδηγώντας σε εκτεταμένες αλληλεπιδράσεις που οδηγούν σε σημαντικότερη επίδραση στη δραστικότητα.

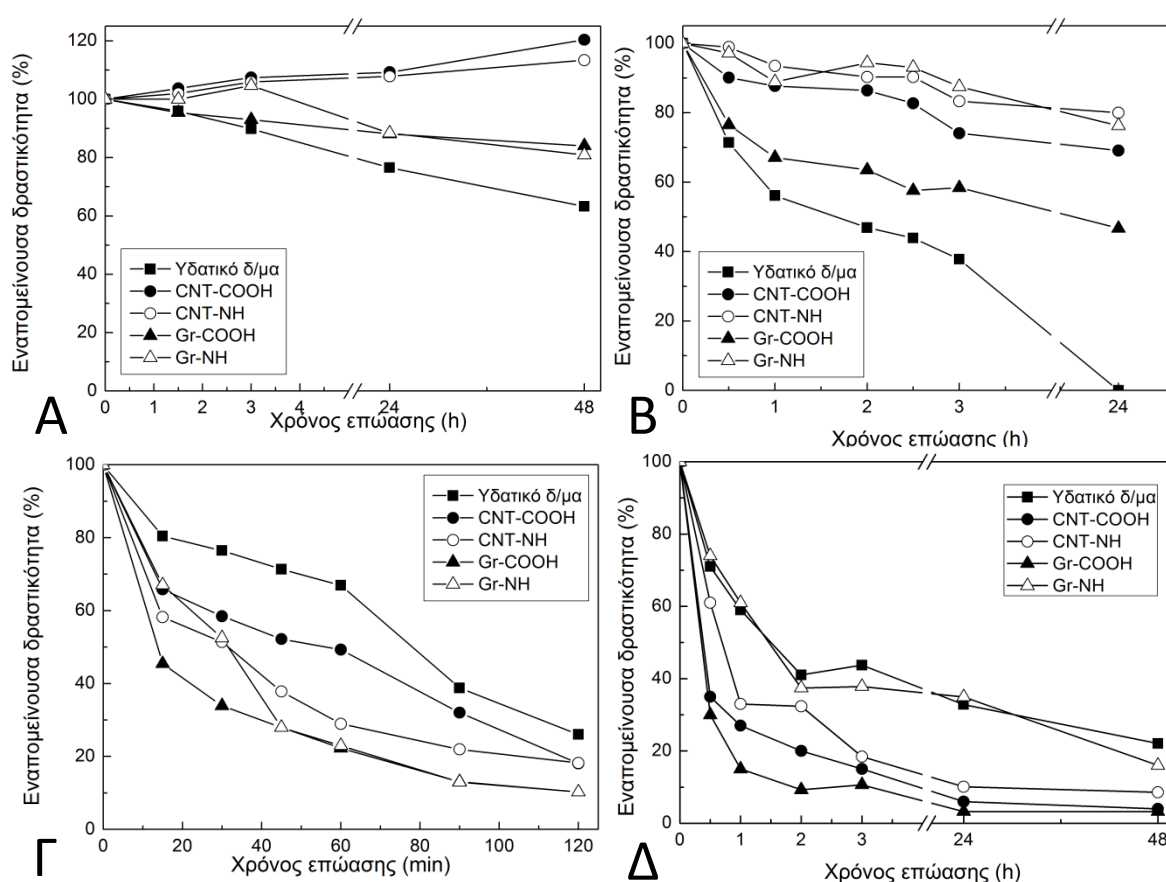
Είναι σημαντικό να σημειωθεί πως η χημεία της επιφάνειας των νανοϋλικών είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων. Η προσθήκη της εξαμεθυλοδιαμίνης στην επιφάνεια των νανοϋλικών αυξάνει την υδροφοβικότητά τους. Η συγκεκριμένη αύξηση της υδροφοβικότητας είναι ευνοϊκή στις περισσότερες περιπτώσεις, ενώ μπορεί να σχετίζεται με την καλύτερη κατανομή του υδρόφοβου *p*NPB στο μικροπεριβάλλον των υδρολασών. Σημαντικότερη είναι η διατήρηση της δραστικότητας που παρατηρείται στην περίπτωση της εστεράσης Bs2. Ενώ η εστεράση σχεδόν απενεργοποιείται πλήρως παρουσία Gr-COOH, εμφανίζει πάνω από 80 % της αρχικής δραστικότητας παρουσία του Gr-NH. Δεν πρέπει να παραληφθεί το γεγονός ότι οι καρβοξυλομάδες μπορούν να αναγνωριστούν από το ενεργό κέντρο των ενζύμων. Η μείωση στη δραστικότητα των υδρολασών όταν χρησιμοποιούνται νανοϋλικά που παρουσιάζουν καρβοξυλομάδες στην επιφάνεια τους είναι πιθανό να οφείλεται στην πρόσδεση των καρβοξυλομάδων στο ενεργό κέντρο και να δρουν ως αναστολείς, παρεμποδίζοντας την πρόσδεση του *p*NPB. Στην περίπτωση της Bs2, όταν το Gr-COOH αφαιρέθηκε από το διάλυμα με φυγοκέντρηση, η εστεράση ανέκτησε το μεγαλύτερο ποσοστό της αρχικής της δραστικότητας (90 %). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει πως η απενεργοποίηση (είτε λόγω αναστολής, είτε λόγω δομικών αλλαγών) μπορεί να είναι αναστρέψιμη.

10.3 Σταθερότητα υδρολασών παρουσία νανοϋλικών

Η σταθερότητα των υδρολασών μελετήθηκε παρουσία 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ τροποποιημένων νανοϋλικών στους 60 °C. Τα ένζυμα επώαστηκαν για προκαθορισμένο χρονικό διάστημα, ανάλογα με την εγγενή σταθερότητα τους και έπειτα η εναπομείνουσα δραστικότητα υπολογίστηκε παρακολουθώντας την υδρόλυση του *p*NPB στους 30 °C.

Τα διαγράμματα απενεργοποίησης που προέκυψαν από τη συγκεκριμένη μελέτη για τις λιπάσες παρουσιάζονται στην εικόνα 69. Είναι προφανές ότι η παρουσία των νανοϋλικών επηρεάζει τη σταθερότητα των λιπασών. Η επίδραση αυτή φαίνεται να εξαρτάται από τη φύση του ενζύμου, τη γεωμετρία των υλικών και τις λειτουργικές ομάδες που παρουσιάζουν στην επιφάνεια τους. Η παρουσία των νανοϋλικών οδηγεί σε σταθεροποίηση των λιπασών CalA και CalB, ενώ οι Crl και Gtl απενεργοποιούνται ταχύτερα παρουσία αυτών των υλικών. Η λιπάση CalA, η οποία έχει αναφερθεί πως είναι ιδιαίτερα θερμοσταθερή (Kirk and Christensen 2002), παρουσιάζει ενεργοποίηση ύστερα από επώαση σε 60 °C παρουσία νανοσωλήνων άνθρακα, ενώ η χημική τροποποίηση τους δε φαίνεται να επηρεάζει τη σταθερότητά της. Παρόμοια σταθεροποιητική επίδραση των νανοσωλήνων άνθρακα παρατηρείται και για τη λιπάση Crl μεταξύ των δύο τύπων νανοϋλικών που χρησιμοποιήθηκαν. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η

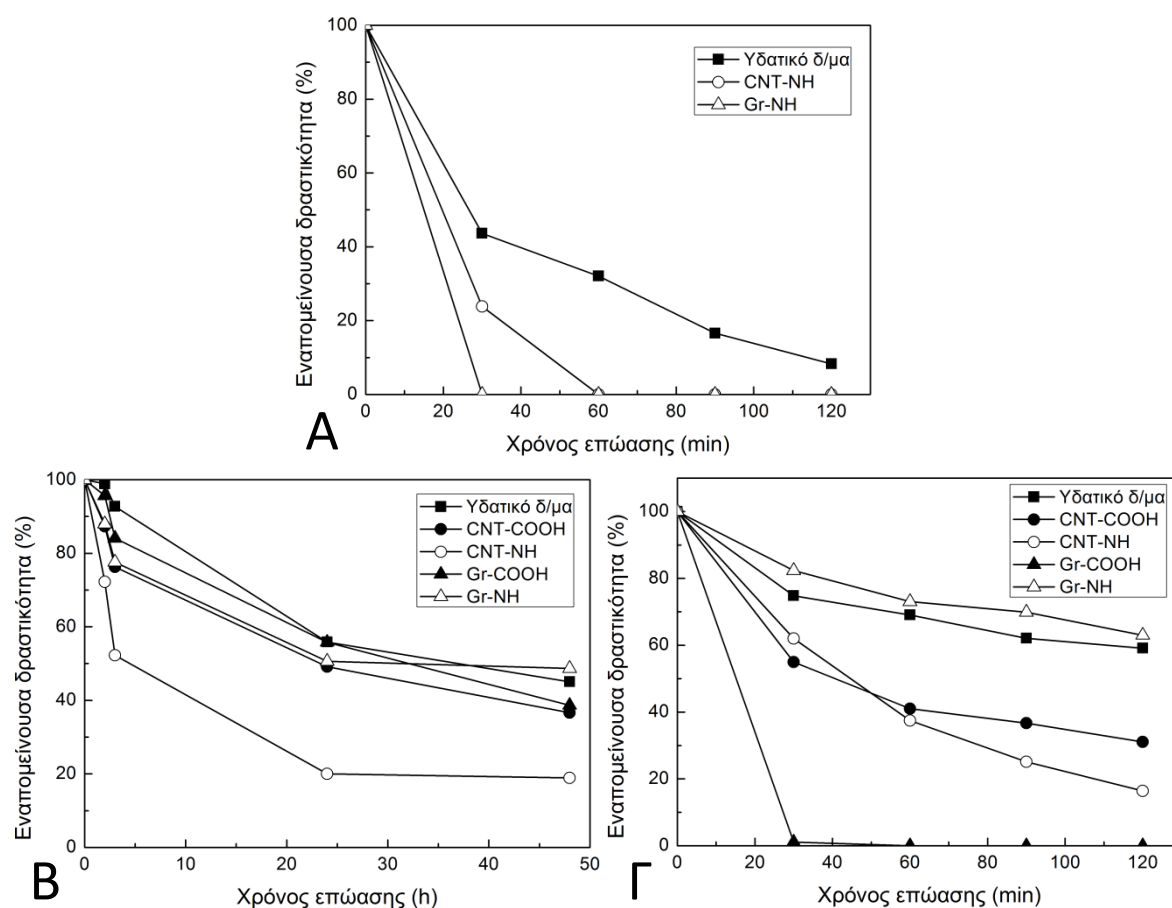
διαφορά μεταξύ των νανοσωλήνων άνθρακα και του γραφίτη έγκειται στη γεωμετρία των υλικών, αφού ο γραφίτης είναι ένα επίπεδο φυλλόμορφο υλικό, ενώ οι νανοσωλήνες παρουσιάζουν καμπυλότητα ανάλογη με τη διάμετρο τους. Έχει αναφερθεί πως όταν η καμπυλότητα του υλικού είναι μικρή, μεγαλύτερη επιφάνεια του βρίσκεται στο περιβάλλον του ενζύμου, οδηγώντας σε ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις και σημαντικότερες αλλαγές στη δομή των ενζύμων (Mu et al. 2008). Η επίπεδη επιφάνεια των υλικών του γραφίτη είναι πιο προσβάσιμη σε μία πρωτεΐνη σε σχέση με την επιφάνεια των νανοσωλήνων άνθρακα, κάτι που πιθανόν να οδηγεί σε μεγαλύτερες αλλαγές στη δομή και στη χαμηλότερη σταθερότητα που παρατηρήθηκε. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για την ακινητοποίηση πρωτεϊνών σε νανοσωματίδια πυριτίου (Lundqvist et al. 2004, Shang et al. 2007).



Εικόνα 69: Διαγράμματα θερμικής απενεργοποίησης λιπασών στους 60 °C παρουσία 25 μg/mL νανοϋλικών. (A) CalA, (B) CalB, (Γ) Crl, (Δ) Gtl (Τυπική απόκλιση < 5%).

Όσον αφορά τη χημεία της επιφάνειας των υλικών, στην εικόνα 69 φαίνεται πως η τροποποίηση των υλικών με τη χρήση διαμίνης παρουσιάζει θετική επίδραση στη σταθερότητα των λιπασών CalB και Gtl, ενώ δε φαίνεται να επιδρά στις λιπάσες CalA και Crl. Η χημική αυτή τροποποίηση αυξάνει την υδροφοβικότητα του υλικού καθώς προστίθεται μία ακόρεστη αλκυλική αλυσίδα στη θέση των καρβοξυ- και εποξυ- ομάδων οι οποίες παρείχαν έναν περισσότερο υδρόφιλο χαρακτήρα στα νανοϋλικά. Επιπλέον, μπορεί να επηρεάσει το φορτίο της

επιφάνειας των νανοϋλικών με άμεση συνέπεια στις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται με την πρωτεΐνη. Τα πειραματικά δεδομένα όμως δεν μπορούν να συσχετιστούν με τα χαρακτηριστικά των πρωτεϊνών (υδροφοβικότητα ή ισοηλεκτρικό σημείο) που παρατίθενται στον πίνακα 30. Φαίνεται όμως, όπως και στη δραστηριότητα, η υδροφοβικότητα των νανοϋλικών να παίζει ένα σημαντικό ρόλο και να βελτιώνει την καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων.



Εικόνα 70: Διαγράμματα θερμικής απενεργοποίησης εστερασών στους 60 °C παρουσία 25 µg/mL νανοϋλικών. (A) Bs2, (B) PestE, (Γ) Pfe I (Τυπική απόκλιση < 5%).

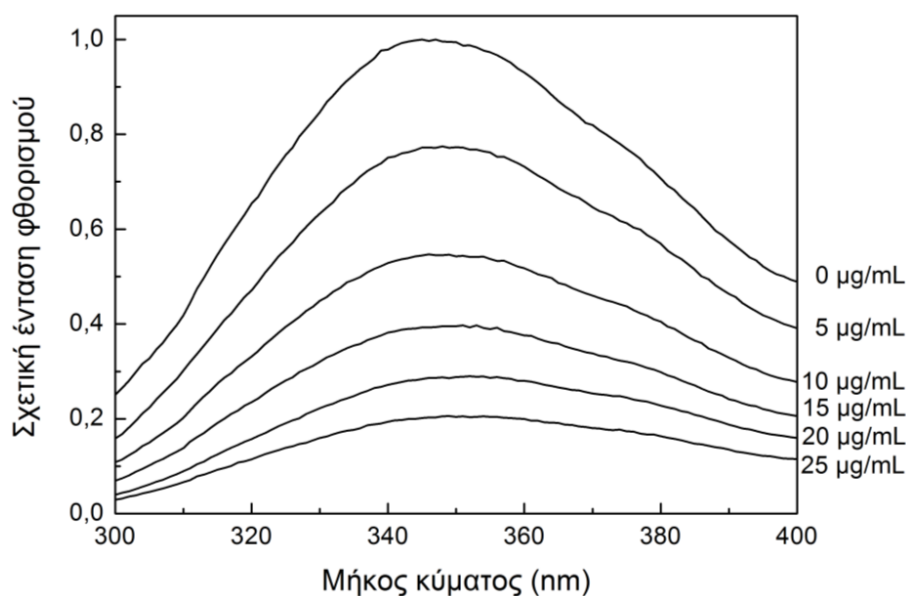
Στην εικόνα 70 παρουσιάζονται τα πειραματικά αποτελέσματα της σταθερότητας των εστερασών στις ίδιες συνθήκες στις οποίες μελετήθηκαν και οι λιπάσες. Για την εστεράση Bs2 δεν μελετήθηκαν τα οξειδωμένα νανοϋλικά (CNT-COOH και Gr-COOH), καθώς παρουσία των συγκεκριμένων υλικών επιδείκνυε πολύ χαμηλή δραστηριότητα ώστε να μετρηθεί η σταθερότητα της. Φαίνεται πως τα νανοϋλικά οδηγούν σε αποσταθεροποίηση των εστερασών. Συγκεκριμένα, η εστεράση Bs2 απενεργοποιείται ταχύτατα παρουσία νανοϋλικών, ενώ η Pfe I παρουσιάζει σημαντικά χαμηλότερη σταθερότητα παρουσία των νανοϋλικών, εκτός του Gr-NH. Η εστεράση PestE δεν επηρεάζεται σημαντικά από την παρουσία των νανοϋλικών, εκτός από την περίπτωση του CNT-NH, το οποίο φαίνεται να αποσταθεροποιεί σημαντικά το ένζυμο. Η επίδραση της

παρουσίας των νανοϋλικών στην ενζυμική δραστηριότητα εξαρτάται από τη φύση του ενζύμου. Όπως και στην περίπτωση των λιπασών, τα πειραματικά αποτελέσματα δεν μπόρεσαν να συσχετισθούν με κάποιο χαρακτηριστικό της δομής των εστερασών, αποτρέποντας την εξαγωγή γενικευμένων συμπερασμάτων.

10.4 Μελέτη της δομής των υδρολασών παρουσία νανοϋλικών

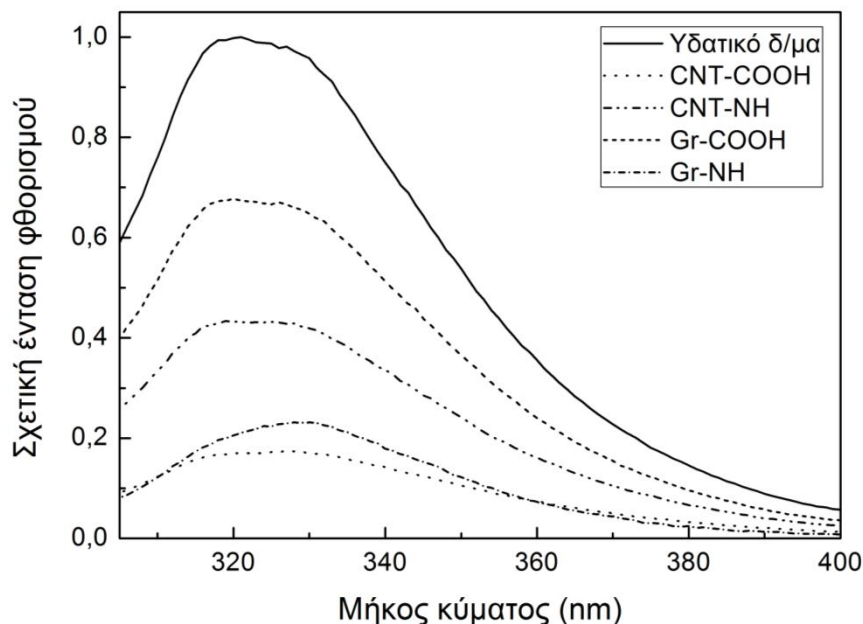
10.4.1 Φασματοσκοπία φθορισμού

Η φασματοσκοπία φθορισμού είναι κατάλληλη τεχνική για τη μελέτη της αλληλεπίδρασης των ενζύμων με τα νανοϋλικά καθώς η διέγερση των μορίων διαρκεί μόλις ορισμένα νανοδευτερόλεπτα, βρίσκεται δηλαδή στην ίδια κλίμακα χρόνου με αρκετές μοριακές διεργασίες όπως είναι η αλληλεπίδραση μορίων και οι δομικές αλλαγές των πρωτεϊνών (Gratton et al. 1984). Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε ο φθορισμός των υδρολασών παρουσία νανοϋλικών σε συγκέντρωση 5 έως 25 $\mu\text{g/mL}$. Θα πρέπει να αναφερθεί πως η εστεράση PestE και η λιπάση Gtl δεν μελετήθηκαν, λόγω της μειωμένης καθαρότητάς τους.



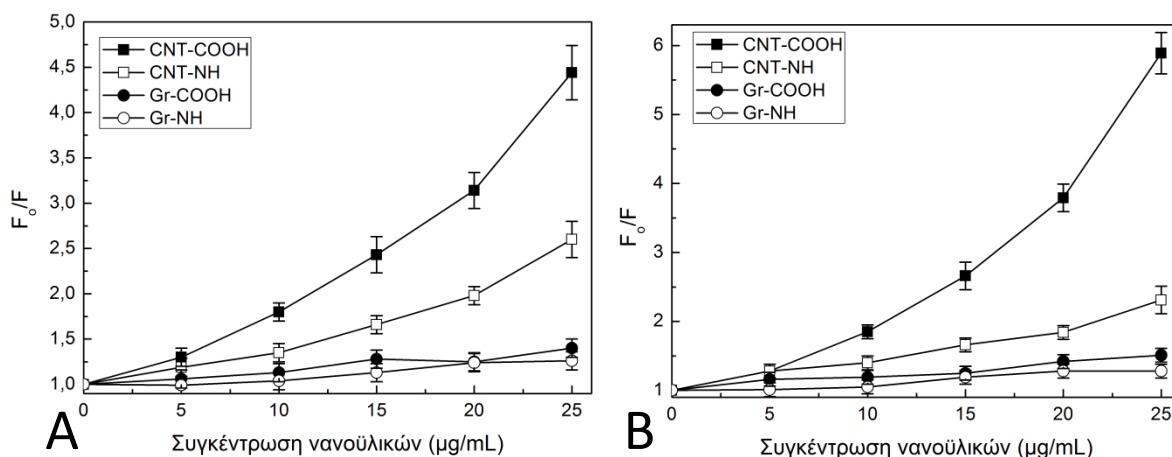
Εικόνα 71: Σχετική ένταση φθορισμού της λιπάσης CalA με σταδιακή προσθήκη CNT-COOH.

Σε όλες τις περιπτώσεις παρατηρήθηκε μείωση του εγγενούς φθορισμού των υδρολασών παρουσία νανοϋλικών, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική μετατόπιση του λ_{max} . Ενδεικτικά, στην εικόνα 71 παρουσιάζεται η απόσβεση φθορισμού της CalA που οφείλεται στη παρουσία CNT-COOH. Όλα τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν οδηγούν σε απόσβεση φθορισμού, όπως φαίνεται στην εικόνα 72, παρουσιάζοντας όμως διαφορετικό βαθμό απόσβεσης. Η απόσβεση του φθορισμού παρουσία νανοσωλήνων άνθρακα έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Mu et al. 2008) και σχετίζεται με τις μοριακές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των νανοϋλικών και των πρωτεϊνών.



Εικόνα 72: Σχετική ένταση φθορισμού της λιπάσης CalB παρουσία 25 µg/mL νανοϋλικών.

Η επίδραση του τύπου του νανοϋλικού και της συγκέντρωσης του στο φάσμα φθορισμού περιγράφεται από τα διαγράμματα Stern – Volmer (εικόνα 73). Όπως φαίνεται, η χρήση τροποποιημένων νανοσωλήνων άνθρακα οδηγεί σε μεγαλύτερη απόσβεση φθορισμού σε σχέση με τα νανοϋλικά που προέρχονται από γραφίτη, ενώ η μεγαλύτερη απόσβεση και για τα δύο ένζυμα παρατηρήθηκε παρουσία των CNT-COOH.



Εικόνα 73: Διάγραμμα Stern – Volmer των λιπασών (A) CalA και (B) CalB ύστερα από διέγερση στα 295 nm.

Είναι προφανές από την εικόνα 73 πως το φαινόμενο της απόσβεσης φθορισμού είναι δοσοεξαρτώμενο. Τα πειραματικά αποτελέσματα δεν ακολουθούν τη γραμμική εξίσωση Stern – Volmer (εξίσωση 4) και συνεπώς δεν μπορεί να υπολογιστεί η σταθερά K_{SV} . Η εξίσωση Stern – Volmer ισχύει με την παραδοχή ότι οι φθορίζουσες ουσίες είναι ανεξάρτητες και συνεισφέρουν ισόποσα (Mu et al. 2008). Κάτι τέτοιο όμως δεν ισχύει για τις πρωτεΐνες, καθώς τα αρωματικά

αμινοξέα μπορεί να είναι θαμμένα μέσα στην πρωτεΐνη είτε εκτεθειμένα στον διαλύτη. Το διαφορετικό αυτό μικροπεριβάλλον επηρεάζει το φθορισμό τους και συνεπώς δε συνεισφέρουν με τον ίδιο τρόπο. Ο Lehrer τροποποίησε την εξίσωση Stern – Volmer εισάγοντας την παράμετρο f_0 που περιγράφει το κλάσμα των προσβάσιμων φθορίζουσων ουσιών (Lehrer 1971). Καθώς δεν είναι γνωστή αυτή η παράμετρος για τα ένζυμα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, συγκρίθηκαν οι λόγοι F_0/F για την υψηλότερη συγκέντρωση νανοϋλικών που χρησιμοποιήθηκε.

Από τον πίνακα 31 φαίνεται πως δεν υπάρχει ουσιαστική διαφοροποίηση των αποτελεσμάτων μελετώντας το φθορισμό των πρωτεϊνών ύστερα από διέγερση στα 280 nm ή στα 295 nm. Το αποτέλεσμα αυτό είναι αναμενόμενο καθώς στα 280 nm μπορεί να διεγείρονται όλα τα αρωματικά αμινοξέα, όμως ο φθορισμός της θρυπτοφάνης είναι σημαντικά πιο ισχυρός από το φθορισμό της τυροσίνης και της φαινυλαλανίνης (Eftink 1998). Έτσι, ακόμα και με διέγερση στα 280 nm η θρυπτοφάνη παρουσιάζει τη σημαντικότερη συνεισφορά στο φάσμα φθορισμού. Για αυτό το λόγο εφεξής θα παρουσιαστούν μόνο τα αποτελέσματα της διέγερσης στα 295 nm, αφού δεν παρατηρήθηκε κάποια διαφοροποίηση με τα αποτελέσματα ύστερα από διέγερση στα 280 nm.

Πίνακας 31: Λόγος F_0/F υδρολασών παρουσία 25 $\mu\text{g/mL}$ νανοϋλικών (Τυπική απόκλιση < 10 %).

Διέγερση (nm)	Νανοϋλικό	CalA	CalB	CrI	Bs2	Pfe I
295 nm	CNT-COOH	4.4	5.9	5.1	4.0	4.5
	CNT-NH	2.6	2.3	2.1	3.3	1.9
	Gr-COOH	1.4	1.5	1.6	6.1	3.7
	Gr-NH	1.3	1.3	1.2	1.2	1.1
280 nm	CNT-COOH	4.8	5.7	5.2	4.3	4.7
	CNT-NH	2.6	2.3	2.1	3.0	2.6
	Gr-COOH	1.4	1.5	1.6	5.8	3.9
	Gr-NH	1.5	1.7	1.6	1.1	1.1

Όπως φαίνεται από τον πίνακα 31, η απόσβεση φθορισμού σε όλες τις υδρολάσες που μελετήθηκαν είναι μεγαλύτερη για τους τροποποιημένους νανοσωλήνες άνθρακα σε σχέση με τα αντίστοιχα παράγωγα του γραφίτη. Το γεγονός αυτό υποδεικνύει την ισχυρότερη αλληλεπίδραση των υδρολασών με τα συγκεκριμένα υλικά. Επιπλέον, η χημική τροποποίηση των νανοϋλικών επηρεάζει την αλληλεπίδραση. Η τροποποίηση με αμινομάδες μειώνει τις αλληλεπιδράσεις του υλικού με το ένζυμο, οδηγώντας σε χαμηλότερους λόγους F_0/F . Η σημαντικότερη απόσβεση φθορισμού παρατηρήθηκε με τους CNT-COOH στις περισσότερες περιπτώσεις, κάτι το οποίο συμφωνεί με τη βιβλιογραφία (Mu et al. 2008).

Συνδυάζοντας τα αποτελέσματα της ενεργότητας των υδρολασών (παράγραφος 10.2) με τα πειραματικά δεδομένα του φθορισμού, φαίνεται πως οι ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ

ενζύμων και νανοϋλικών ($F_o/F > 3$) οδηγούν σε διατάραξη της πρωτεϊνικής δομής και συνεπώς σε μείωση της καταλυτικής δραστηρότητάς τους. Η μη γραμμικότητα των πειραματικών δεδομένων στο διάγραμμα Stern – Volmer υποδηλώνει πως η διευθέτηση των αρωματικών αμινοξέων στο χώρο επηρεάζεται παρουσία των συγκεκριμένων νανοϋλικών, είτε μέσω δομικών αλλαγών (Lakowicz 2006) είτε με το σχηματισμό συμπλόκων (Eftink and Ghiron 1981), κάτι το οποίο είναι περισσότερο εμφανές όταν αναπτύσσονται ισχυρότερες αλληλεπιδράσεις (π.χ. CNT-COOH). Σε αυτές τις περιπτώσεις η υδρολυτική δραστηρότητα των υδρολασών είναι χαμηλότερη. Για παράδειγμα, οι νανοσωλήνες CNT-COOH είναι το μόνο υλικό στο οποίο οι λιπάσες δεν παρουσίασαν ενεργοποίηση, κάτι το οποίο πιθανόν να οφείλεται στην ισχυρή αλληλεπίδραση που αναπτύσσεται μεταξύ των λιπασών και του συγκεκριμένου νανοϋλικού. Στην περίπτωση της Bs2, η μεγαλύτερη απόσβεση παρατηρείται με το Gr-COOH, υλικό το οποίο οδήγησε στη πλήρη απενεργοποίηση του ενζύμου.

Για να μελετηθεί περαιτέρω η αλληλεπίδραση μεταξύ νανοϋλικών και ενζύμων, καταγράφηκαν τα φάσματα φθορισμού υδρολασών ύστερα από επώαση στους 60 °C παρουσία 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ νανοϋλικών. Τα αποτελέσματα παρατίθενται στον πίνακα 32.

Πίνακας 32: Σχετική ένταση φθορισμού (ως προς τον αρχικό χρόνο) των υδρολασών ύστερα από επώαση στους 60 °C παρουσία 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ νανοϋλικών (Τυπική απόκλιση < 8 %).

Ένζυμο	CalA	CalB	CrI	Bs2	Pfe I
Χρόνος επώασης	48 h	3 h	2 h	1 h	2 h
Υδατικό $\delta/\mu\text{a}$	0.89	0.41	0.95	1.26	0.83
CNT-COOH	0.90	0.57	0.83	$\Delta.M.^{25}$	1.34
CNT-NH	0.89	0.58	0.84	0.49	0.82
Gr-COOH	0.91	0.38	0.90	$\Delta.M.^{25}$	1.02
Gr-NH	0.90	0.55	0.91	1.10	1.09

Υπάρχει καλή συσχέτιση των δεδομένων του πίνακα 32 με τα αποτελέσματα της σταθερότητας των υδρολασών παρουσία νανοϋλικών (παράγραφος 10.3). Η ένταση φθορισμού μαζί με τη μετατόπιση του λ_{max} προς μεγαλύτερα μήκη κύματος είναι ενδεικτική για την αδρανοποίηση των πρωτεϊνών (Monsellier and Bedouelle 2005). Συγκεκριμένα, η μείωση της έντασης φθορισμού παρουσία των νανοϋλικών έχει συσχετισθεί με την απώλεια της δομής των πρωτεϊνών, καθώς τα αρωματικά αμινοξέα που βρίσκονται στο εσωτερικό του μορίου, τα οποία συνεισφέρουν σε ένα βαθμό στο φθορισμό της πρωτεΐνης, εκτίθενται στην επιφάνεια και αλληλεπιδρούν με τα νανοϋλικά, οπότε και παρατηρείται απόσβεση του φθορισμού τους (Mu et al. 2008). Η μείωση της έντασης φθορισμού στις λιπάσες μπορεί να οφείλεται και στην τάση που

²⁵ Δεν μελετήθηκε καθώς η δραστηρότητα της Bs2 είναι πολύ χαμηλή παρουσία αυτών των νανοϋλικών και δεν είχε μελετηθεί ούτε η σταθερότητα της.

έχουν να δημιουργούν συσσωματώματα, μειώνοντας τη συνολικά εκτεθειμένη επιφάνεια τους (Liou et al. 1998, Schmid and Verger 1998, Twu et al. 1984). Αν η πρωτεΐνη όμως αποδιαταχθεί χωρίς αλληλεπιδράσεις με τα νανοϋλικά και δημιουργία συσσωματωμάτων μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της έντασης (Zhuang et al. 2000).

Στην περίπτωση της CalA δεν παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στην ένταση του φθορισμού παρουσία νανοϋλικών, ενώ η λιπάση σταθεροποιείται παρουσία των νανοϋλικών. Αντίστοιχα, για τη λιπάση CalB η μεγαλύτερη μείωση στην ένταση φθορισμού παρατηρήθηκε στο υδατικό διάλυμα και παρουσία Gr-COOH, διαλύματα στα οποία παρουσίασε τη χαμηλότερη σταθερότητα. Συσχέτιση με τα πειραματικά αποτελέσματα της σταθερότητας βρέθηκε και για τη λιπάση CrI. Η σχετική ένταση φθορισμού παρουσία νανοϋλικών είναι χαμηλότερη από σε υδατικό διάλυμα, κάτι που υποδηλώνει την αποσταθεροποίηση του ενζύμου παρουσία των νανοϋλικών και το οποίο επιβεβαιώνεται από τα αποτελέσματα σταθερότητας.

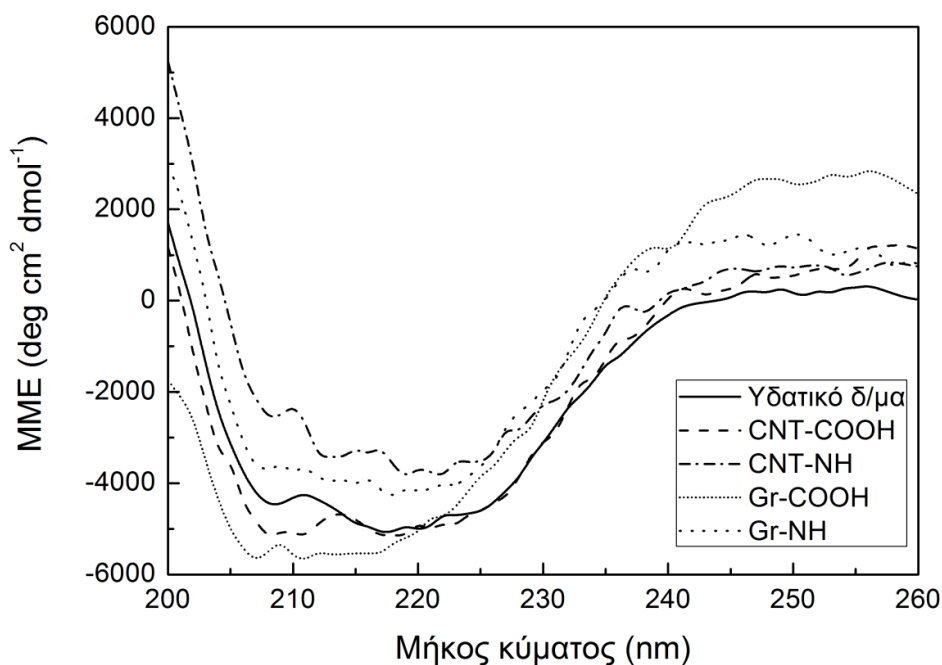
Στην περίπτωση των εστερασών τα αποτελέσματα δεν καταδεικνύουν συσχέτιση των φασματοσκοπικών χαρακτηριστικών με την επίδραση στη δραστηριότητα. Η εστεράση Bs2 απενεργοποιείται ταχύτατα παρουσία των νανοϋλικών, το οποίο όμως δεν μπορεί να συσχετισθεί με τη μείωση της έντασης φθορισμού, όπως συμβαίνει για τις λιπάσες, αφού η ένταση του φθορισμού είναι πάνω από 50 % της αρχικής τιμής. Σημαντικό είναι να σημειωθεί πως για τις εστεράσες σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται αύξηση της έντασης φθορισμού, κάτι το οποίο δεν παρατηρείται στις λιπάσες. Η εγγενής τάση των λιπασών να δημιουργούν συσσωματώματα (Liou et al. 1998, Schmid and Verger 1998, Twu et al. 1984) ή να εντοπίζονται σε μεσεπιφάνειες (Stamatis et al. 1993) πιθανόν οδηγεί σε μείωση της έντασης φθορισμού. Οι εστεράσες δεν παρουσιάζουν τέτοια συμπεριφορά και για αυτό διαφέρουν τα αποτελέσματα της μελέτης των φασμάτων φθορισμού τους. Έτσι, η διαφορετική καταλυτική δραστηριότητα των λιπασών και των εστερασών μπορεί να οδηγήσει σε διαφορετικού τύπου αλληλεπιδράσεις με τα νανοϋλικά, και να επηρεάσει τα φάσματα φθορισμού. Η διαφοροποίηση αυτή θα μπορούσε να συσχετισθεί με την υδροφοβικότητα των ενζύμων. Η λιπάση CalB και η εστεράση Pfe I που είναι υδρόφοβες, σύμφωνα με τα δεδομένα του πίνακα 30, παρουσιάζουν μεγαλύτερη σχετική ένταση φθορισμού ύστερα από επώαση παρουσία νανοϋλικών, ενώ οι περισσότερο υδρόφιλες Bs2 και CrI παρουσιάζουν μείωση.

10.4.2 Φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού

Τα δεδομένα της φασματοσκοπίας φθορισμού υποδηλώνουν ισχυρές αλληλεπιδράσεις των νανοϋλικών και πιθανές δομικές αλλαγές, όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο. Οι δομικές αλλαγές αυτές μελετήθηκαν περαιτέρω με τη φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού για τις υδρολάσες CalA, CalB και Bs2. Αν και τα νανοϋλικά δεν παρουσιάζουν κυκλικό διχρωισμό, χρησιμοποιήθηκαν χαμηλότερες συγκεντρώσεις από ότι στα υπόλοιπα πειράματα (έως 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$), έτσι ώστε να μειωθεί η πιθανότητα εμφάνισης οπτικών φαινομένων που θα οδηγήσει σε αύξηση του θορύβου στο φάσμα και θα αποτρέψει τη μελέτη παρουσία των

νανοϋλικών. Για τον ίδιο λόγο δεν μελετήθηκε ο κυκλικός διχρωσμός κάτω από τα 200 nm, αν και περιέχει πολλές πληροφορίες για τη δομή των πρωτεϊνών.

Στην εικόνα 74 παρατίθενται ενδεικτικά τα φάσματα κυκλικού διχρωσμού της λιπάσης CalA παρουσία 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ νανοϋλικών. Παρατηρούνται διαφοροποιήσεις των φασμάτων κυκλικού διχρωσμού παρουσία νανοϋλικών, οι οποίες είναι ενδεικτικές των δομικών αλλαγών που συμβαίνουν και συμφωνούν με τα αποτελέσματα της φθορισμομετρίας. Όπως και στην περίπτωση των μικρογαλακτωμάτων (παράγραφος 8.5.1), όλοι οι αλγόριθμοι που περιλαμβάνονται στο λογισμικό DichroProt δοκιμάστηκαν και επιλέχθηκε το νευρωνικό δίκτυο K2D (Andrade et al. 1993) για την επεξεργασία των φασμάτων, καθώς τα αποτελέσματα που εξάγει για το φάσμα κυκλικού διχρωσμού των συγκεκριμένων πρωτεϊνών σε υδατικό διάλυμα ταιριάζουν με τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα.



Εικόνα 74: Φάσματα κυκλικού διχρωσμού στο πέραν υπεριώδες της λιπάσης CalA (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) σε υδατικό διάλυμα και παρουσία νανοϋλικών (5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

Στον πίνακα 33 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα ύστερα από ανάλυση των φασμάτων κυκλικού διχρωσμού στο πέραν υπεριώδες των λιπασών CalA και CalB και της εστεράσης Bs2. Παρουσία των νανοϋλικών παρατηρείται μείωση της α -έλικας με αντίστοιχη αύξηση των β -πτυχωτών επιφανειών. Σε καμία περίπτωση δεν παρατηρείται αύξηση του τυχαίου σπειράματος. Η αύξηση των β -πτυχωτών επιφανειών για τις λιπάσες μπορεί να συσχετισθεί με τη δημιουργία μίας περισσότερο συμπαγούς δομής η οποία οδηγεί σε σταθεροποίηση, όπως αναφέρθηκε και για τα συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό και τα οργανοπηκτώματα (παράγραφοι 8.5.2 και 9.4 αντίστοιχα). Επιπλέον, η αύξηση των β -πτυχωτών επιφανειών μπορεί να αποδοθεί στις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μορίων του ενζύμου και των

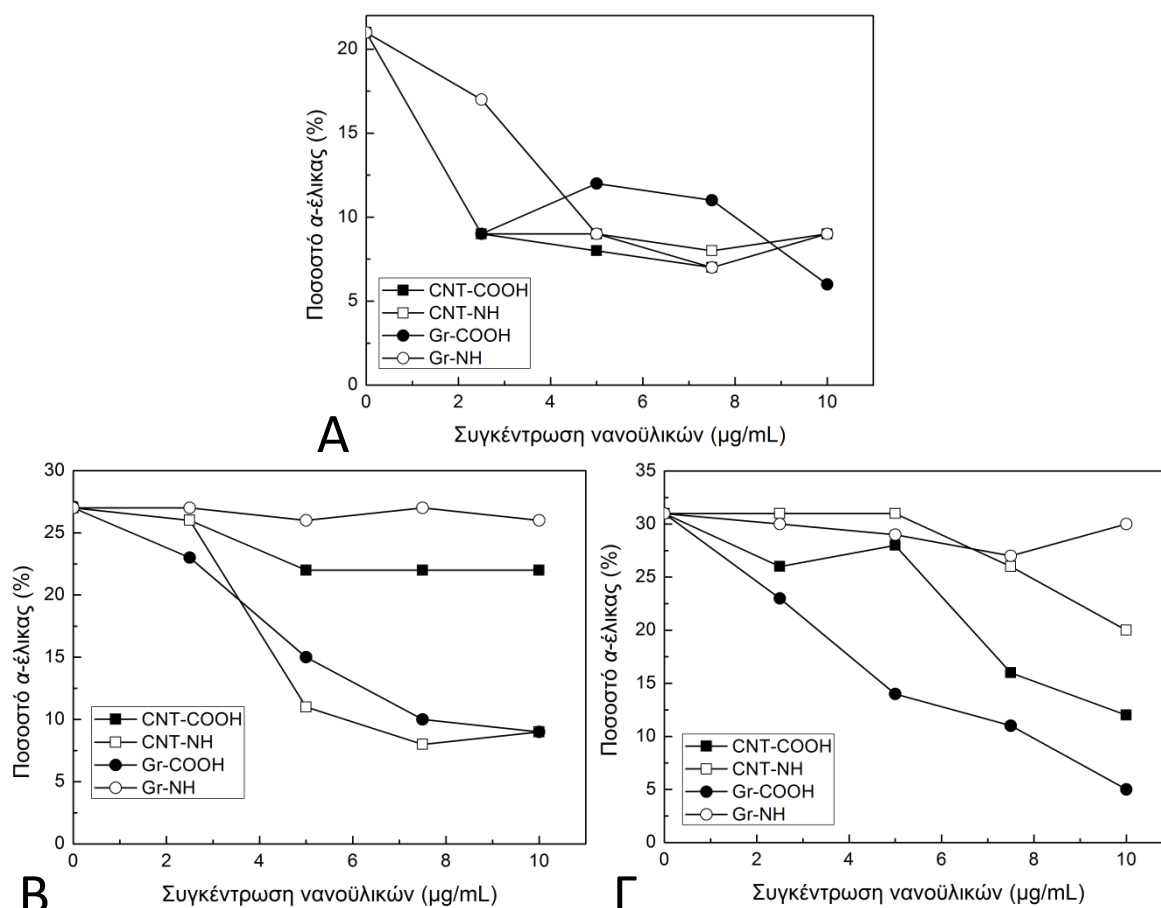
νανούλικών (Gao and Kyrtziz 2008, In Het Panhuis et al. 2003, Kim et al. 2005, Shah et al. 2007). Τα ένζυμα για να καλύψουν τις υδρόφοβες περιοχές της επιφάνειας τους σε ένα υδρόφιλο μέσο δημιουργούν συσσωματώματα πρωτεϊνών μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων οι οποίες επάγουν τη δημιουργία διαμοριακών β-πτυχωτών επιφανειών (Mukherjee et al. 2007). Αντίστοιχα, στην προσπάθεια τους να αυξήσουν την επιφάνεια αλληλεπίδρασης με τα υδρόφοβα νανοϋλικά δημιουργούν παρόμοιες β-πτυχώσεις για να αυξήσουν τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Η εστεράση Bs2 σχηματίζει εκτεταμένες β-πτυχωτές επιφάνειες παρουσία των νανοϋλικών, με ταυτόχρονη αποδιάταξη της α-έλικας. Η περιεκτικότητα της πρωτεΐνης σε α-έλικα συσχετίζεται με τη δραστηριότητα του ενζύμου σε αρκετές μελέτες (Asuri et al. 2007, Tzialla et al. 2010), κάτι το οποίο συμφωνεί με τα ευρήματα για την εστεράση Bs2.

Πίνακας 33: Προσδιορισμός (%) της δευτεροταγούς δομής λιπασών σε υδατικό διάλυμα και παρουσία νανοϋλικών (5 µg/mL) με χρήση του αλγορίθμου K2D.

Ένζυμο	Σύστημα	α-έλικα	β-πτυχώσεις	Άλλες δομές
CalA (4 µg/mL)	Υδατικό δ/μα	27	21	52
	CNT-COOH	22	26	52
	CNT-NH	11	41	48
	Gr-COOH	15	34	51
	Gr-NH	26	20	54
CalB (5 µg/mL)	Υδατικό δ/μα	31	14	55
	CNT-COOH	28	19	53
	CNT-NH	31	11	58
	Gr-COOH	14	38	48
	Gr-NH	29	19	52
Bs2 (10 µg/mL)	Υδατικό δ/μα	21	27	52
	CNT-COOH	8	44	48
	CNT-NH	9	43	48
	Gr-COOH	12	38	50
	Gr-NH	9	43	48

Στην εικόνα 75 παρουσιάζεται η επίδραση της συγκέντρωσης των νανοϋλικών στην περιεκτικότητα σε α-έλικα των υδρολασών. Φαίνεται πως στις περισσότερες περιπτώσεις το φαινόμενο είναι δόσοεξαρτώμενο. Η μείωση της α-έλικας εξαρτάται από τη συγκέντρωση των νανοϋλικών στο διάλυμα και παρατηρείται ήδη από χαμηλές συγκεντρώσεις νανοϋλικών (2.5 µg/mL). Επίσης, η παρουσία του Gr-NH δε φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά τη δομή των λιπασών, κάτι το οποίο σχετίζεται με την ασθενή αλληλεπίδραση του συγκεκριμένου υλικού με

τις λιπάσες, σύμφωνα με τα δεδομένα της φασματοσκοπίας φθορισμού (πίνακας 31). Σημαντικό είναι το γεγονός ότι για την εστεράση Bs2 παρατηρούνται σημαντικές αλλαγές στη δομή ακόμα και με μόλις 2.5 $\mu\text{g/mL}$ νανοϋλικού. Η απώλεια της α -έλικας για το συγκεκριμένο ένζυμο φαίνεται να σχετίζεται με την απώλεια της δραστικότητας του, όπως αναφέρεται στη παράγραφο 10.2. Αντίθετα, για τις λιπάσες η απώλεια της α -έλικας δεν φαίνεται να σχετίζεται άμεσα με τη καταλυτική συμπεριφορά του ενζύμου. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί πως η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με νανοσωλήνες άνθρακα μπορεί να επάγει αποδιάταξη του ενζύμου ή εκτεταμένες δομικές αλλαγές, οι οποίες όμως εξαρτώνται σημαντικά από τον τύπο του ενζύμου που χρησιμοποιείται (Matsuura et al. 2006). Από τα αποτελέσματα του συγκεκριμένου κεφαλαίου, όπως και των δομικών μελετών στα κεφάλαια που προηγήθηκαν φαίνεται πως οι λιπάσες παρουσιάζουν περισσότερες από μία ενεργές διαμορφώσεις, οι οποίες μπορεί να διαφέρουν αρκετά. Αυτό πιθανόν να σχετίζεται με το γεγονός ότι είναι ένζυμα τα οποία έχουν προσαρμοστεί να δρουν σε μεσεπιφάνειες, να έρχονται δηλαδή σε επαφή με μία υδρόφοβη επιφάνεια, δίχως να χάνουν την καταλυτική τους δραστικότητα.



Εικόνα 75: Επίδραση της συγκέντρωσης των νανοϋλικών στην περιεκτικότητα (%) σε α -έλικα των υδρολασών (Α) Bs2, (Β) CalA και (Γ) CalB

11 Ακίνητοποίηση υδρολασών σε νανοδομημένα υλικά

Τα αποτελέσματα του προηγούμενου κεφαλαίου έδειξαν ισχυρές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενζύμων και των νανοδομημένων υλικών με βάση τον άνθρακα οι οποίες επάγουν σημαντικές διαφοροποιήσεις στην καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων. Η προσρόφηση των ενζυμικών μορίων στην επιφάνεια των νανοϋλικών είναι μία τεχνική που έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για τη μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση ενζύμων σε αυτά τα υλικά (Gómez et al. 2005, In Het Panhuis et al. 2003, Kim et al. 2005, Shah et al. 2007, Shim et al. 2002). Για αυτό το λόγο τα αποτελέσματα του προηγούμενου κεφαλαίου αναμένεται να συνεισφέρουν σημαντικά στην κατανόηση της καταλυτικής συμπεριφοράς των ακίνητοποιημένων ενζύμων.

Στο παρών κεφάλαιο μελετάται η ακίνητοποίηση υδρολυτικών ενζύμων, όπως οι λιπάσες και οι εστεράσες, σε τροποποιημένα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα με φυσική προσρόφηση και με ομοιοπολική πρόσδεση. Η ομοιοπολική ακίνητοποίηση βασίζεται στη διασύνδεση των ελεύθερων αμινομάδων της επιφάνειας των ενζύμων και των νανοϋλικών με τη χρήση ενός παράγοντα σύζευξης όπως η γλουταραλδεΐδη. Τα παραγόμενα βιοϋλικά χαρακτηρίζονται με φασματοσκοπία XPS και μελετάται η καταλυτική τους συμπεριφορά. Επίσης, στο συγκεκριμένο κεφάλαιο μελετάται η επίδραση της μεθόδου ακίνητοποίησης και των χαρακτηριστικών των νανοϋλικών, όπως η γεωμετρία τους και οι λειτουργικές ομάδες που φέρουν στην επιφάνεια τους, στη καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων.

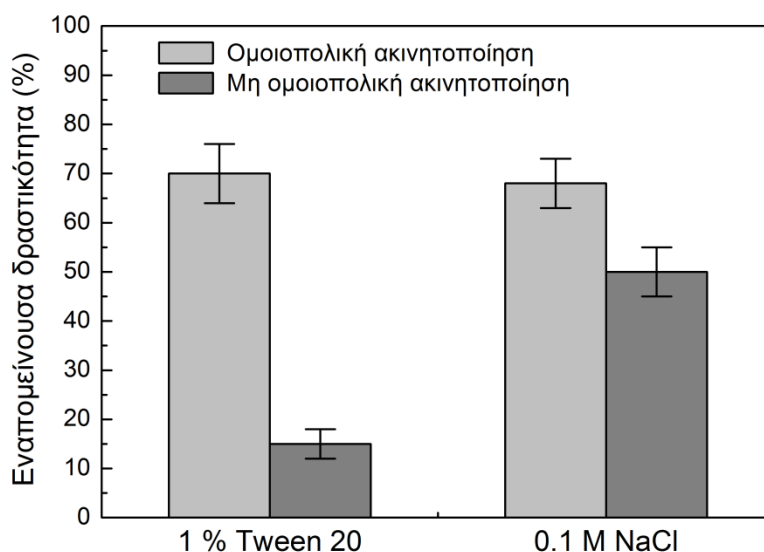
11.1 Βελτιστοποίηση πρωτοκόλλων ακίνητοποίησης

11.1.1 Διερεύνηση των δυνάμεων που διέπουν τη μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση

Όπως έχει αναφερθεί και στο θεωρητικό μέρος, η μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση των ενζύμων στα νανοϋλικά βασίζεται σε ηλεκτροστατικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (Gómez et al. 2005, Shim et al. 2002). Ο βαθμός που οι συγκεκριμένες αλληλεπιδράσεις είναι υπεύθυνες για τη προσρόφηση της CalB πάνω σε CNT-NH μελετήθηκε με δύο απλά πρωτόκολλα. Στο πρώτο η λιπάση ακίνητοποιήθηκε ομοιοπολικά και μη ομοιοπολικά παρουσία επιφανειοενεργού (1 % v/v Tween 20) ώστε να ελαχιστοποιηθούν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις (Azamian et al. 2002, Shim et al. 2002, Wang et al. 2003). Η δραστηριότητα των λιπασών που ακίνητοποιήθηκαν ομοιοπολικά και μη ομοιοπολικά ήταν συγκρίσιμες, πώς αναφέρεται και στις επόμενες ενότητες. Όταν όμως στο πρωτόκολλο της μη ομοιοπολικής ακίνητοποίησης χρησιμοποιήθηκε 1 % (v/v) Tween 20, το ακίνητοποιημένο ένζυμο παρουσίασε μόλις 9 % της δραστηριότητας που παρουσίαζε χωρίς την προσθήκη του επιφανειοενεργού. Θα πρέπει να σημειωθεί πως το επιφανειοενεργό δεν οδήγησε σε αποδιάταξη του ενζύμου, καθώς μετρήθηκε η δραστηριότητα στο ενζυμικό διάλυμα (υπερκείμενο) μετά την απομόνωση του ακίνητοποιημένου ενζύμου και βρέθηκε πως παρουσίαζε παρόμοια δραστηριότητα με την αρχική δραστηριότητα του ενζύμου πριν την ακίνητοποίηση. Το γεγονός αυτό υποδηλώνει τη σημαντική συνεισφορά που έχουν οι

υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις στη μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση των ενζύμων σε υδρόφοβα νανοϋλικά όπως οι νανοσωλήνες άνθρακα.

Σε ένα δεύτερο πείραμα, λιπάση CalB η οποία ακίνητοποιήθηκε ομοιοπολικά και μη ομοιοπολικά σε CNT-NH ξεπλύθηκε τρεις φορές είτε με διάλυμα 1% (v/v) Tween 20 για να ελαχιστοποιηθούν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, είτε με διάλυμα 0.1 M NaCl για να παρεμποδιστούν οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 76. Η πλύση της λιπάσης CalB που ακίνητοποιήθηκε μη ομοιοπολικά με διάλυμα επιφανειοενεργού οδηγεί σε απώλεια του 85 % της αρχικής του δραστηριότητας, υποδηλώνοντας το σημαντικό ρόλο που διαδραματίζουν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις κατά τη μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση. Η πλύση με NaCl οδηγεί σε μείωση της δραστηριότητας κατά 50 %, κάτι το οποίο υποδηλώνει πως και οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις παίζουν κάποιο ρόλο κατά τη μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση, σε μικρότερο βαθμό όμως από τις υδρόφοβες. Αντίθετα, η ομοιοπολικά ακίνητοποιημένη λιπάση απώλεσε το 30 % της δραστηριότητας της ανεξαρτήτως του διαλύματος ξεπλύματος που χρησιμοποιήθηκε. Η συγκεκριμένη απώλεια φαίνεται να οφείλεται σε αδρανοποίηση του ενζύμου λόγω του χειρισμού κατά τις πλύσεις, καθώς δεν παρατηρήθηκε διαφοροποίηση με τα δύο διαλύματα ξεπλύματος. Η σημαντική συνεισφορά των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων κατά τη μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση ενζύμων στα συγκεκριμένα νανοϋλικά έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία (In Het Panhuis et al. 2003, Kim et al. 2005, Shah et al. 2007).



Εικόνα 76: Επεξεργασία της ακίνητοποιημένης σε CNT-NH CalB με διαλύματα επιφανειοενεργού και άλατος.

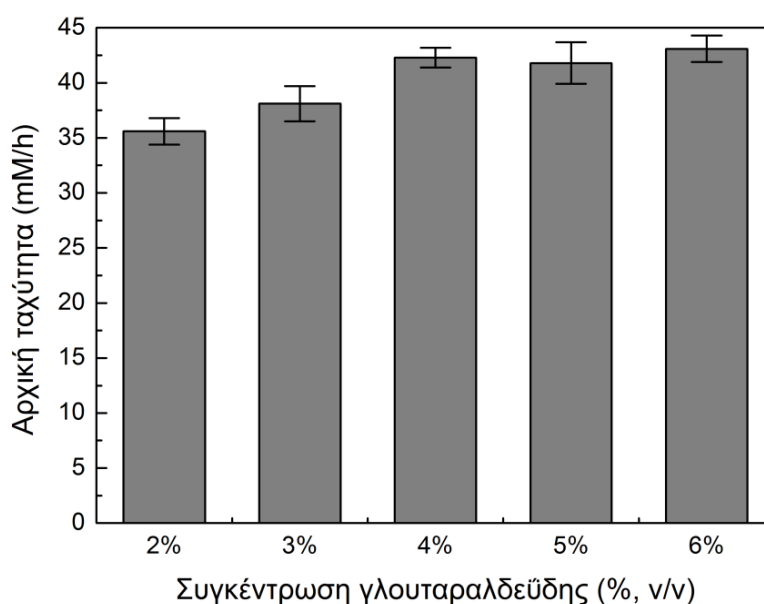
Για να είναι εφικτή η μελέτη της επίδρασης της ομοιοπολικής πρόσδεσης των ενζύμων πάνω στα νανοϋλικά θα πρέπει να ελαχιστοποιηθούν οι μη ειδικές αλληλεπιδράσεις του ενζύμου με το νανοϋλικό, κυρίως δηλαδή να ελαχιστοποιηθούν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Σε αυτό το πλαίσιο, κατά την ομοιοπολική ακίνητοποίηση των υδρολασών χρησιμοποιείται 1 % (v/v) Tween 20, ποσότητα που από τα προηγούμενα αποτελέσματα κρίνεται ικανή να αποτρέψει τη

μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση του ενζύμου. Η χρήση επιφανειοενεργών μορίων για την παρεμπόδιση της αλληλεπίδρασης πρωτεϊνών - νανοϋλικών έχει αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Azamian et al. 2002, Shim et al. 2002, Wang et al. 2003). Τα επιφανειοενεργά μόρια επικαλύπτουν την υδρόφοβη επιφάνεια των νανοϋλικών και τα καθιστούν περισσότερο υδρόφιλα, ελαχιστοποιώντας έτσι τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο τη μη ομοιοπολική πρόσδεση του ενζύμου.

11.1.2 Βελτιστοποίηση της ενεργοποίησης των νανοϋλικών με γλουταραλδεΰδη για την ομοιοπολική ακίνητοποίηση υδρολασών

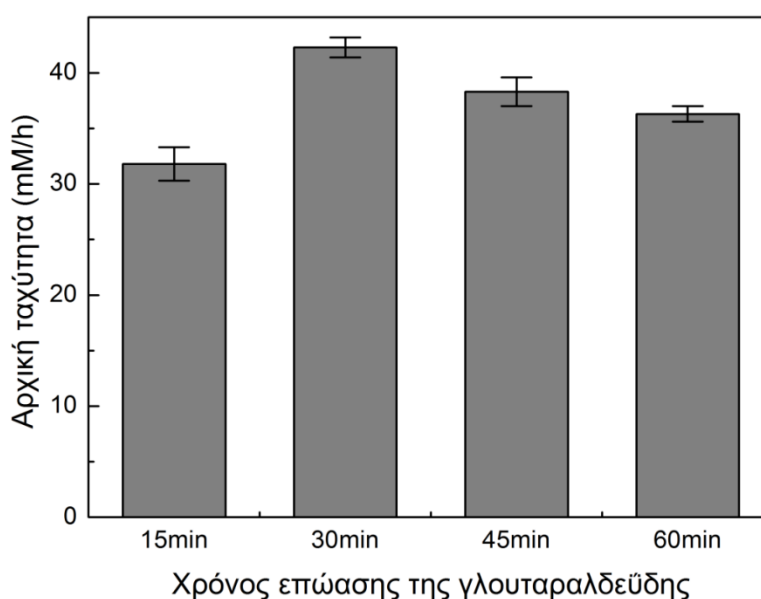
Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε ένα πρωτόκολλο ομοιοπολικής ακίνητοποίησης ενζύμων σε νανοϋλικά τα οποία φέρουν στην επιφάνεια τους ελεύθερες αμινομάδες χρησιμοποιώντας ως παράγοντα διασύνδεσης τη γλουταραλδεΰδη, βασιζόμενοι σε βιβλιογραφικά δεδομένα (Du et al. 2007a, Santos et al. 2006). Η συγκέντρωση της γλουταραλδεΰδης που χρησιμοποιείται, καθώς και ο χρόνος επώασης της με το νανοϋλικό είναι σημαντικοί παράγοντες οι οποίοι επιδρούν στη δημιουργία της ενδιάμεσης βάσης Schiff και συνεπώς, στη δραστηριότητα των ομοιοπολικά ακίνητοποιημένων ενζύμων. Οι συγκεκριμένες παράμετροι βελτιστοποιήθηκαν, μελετώντας τη συνθετική δραστηριότητα της ομοιοπολικά ακίνητοποιημένης λιπάσης CalB σε CNT-NH.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 77, η χρήση γλουταραλδεΰδης σε συγκέντρωση έως 4 % (v/v) οδηγεί σε αύξηση της δραστηριότητας της ακίνητοποιημένης λιπάσης, δημιουργούνται περισσότερες βάσεις Schiff μεταξύ της γλουταραλδεΰδης και των νανοϋλικών. Η συγκέντρωση αυτή της γλουταραλδεΰδης επαρκεί για την ενεργοποίηση των νανοϋλικών, καθώς πάνω από αυτή τη συγκέντρωση δεν παρατηρείται επίδραση στη δραστηριότητα.



Εικόνα 77: Επίδραση της συγκέντρωσης της γλουταραλδεΰδης στην ενεργότητα της ακίνητοποιημένης CalB

Παράλληλα, μελετήθηκε ο χρόνος επώασης της γλουταραλδεΐδης με τα νανοϋλικά, για το σχηματισμό της βάσης Shiff. Γλουταραλδεΐδη σε συγκέντρωση 4 % (v/v) επώαστηκε με CNT-NH από 15 έως 60 min για το σχηματισμό της βάσης Shiff, η οποία χρησιμοποιήθηκε επακολούθως για την ακίνητοποίηση της λιπάσης CalB. Όπως φαίνεται στην εικόνα 78, η ακίνητοποιημένη CalB παρουσίασε τη μέγιστη δραστηριότητα όταν οι νανοσωλήνες άνθρακα επώαστηκαν 30 min με τη γλουταραλδεΐδη. Μεγαλύτερη επώαση οδήγησε σε μείωση της δραστηριότητας του ακίνητοποιημένου ενζύμου. Ο μεγαλύτερος χρόνος παραμονής της γλουταραλδεΐδης με τα νανοϋλικά είναι πιθανό να οδηγεί σε διασύνδεση μεταξύ των νανοϋλικών, μειώνοντας με αυτό τον τρόπο τις διαθέσιμες θέσεις για την ακίνητοποίηση των ενζυμικών μορίων.

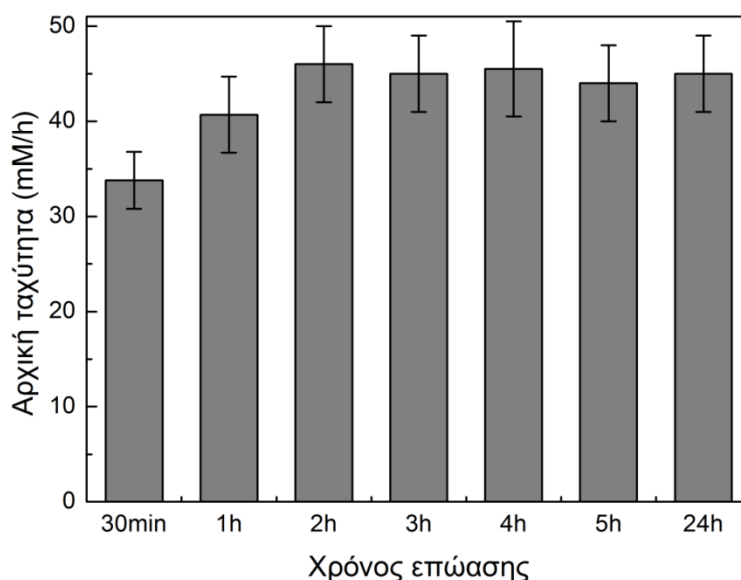


Εικόνα 78: Επίδραση του χρόνου επώασης της γλουταραλδεΐδης στη συνθετική ενεργότητα της ακίνητοποιημένης σε CNT-NH CalB.

11.1.3 Βελτιστοποίηση του χρόνου επώασης του ενζύμου με τα νανοϋλικά

Ένας άλλος σημαντικός παράγοντας κατά την ακίνητοποίηση των υδρολασών είναι ο χρόνος επώασης του ενζύμου με το νανοϋλικό, έως ότου επιτευχθεί η ακίνητοποίηση. Η παράμετρος αυτή είναι πιο σημαντική κατά την ομοιοπολική ακίνητοποίηση, όπου πρέπει να δοθεί χρόνος στο ένζυμο ώστε να βρει τις συγκεκριμένες θέσεις στις οποίες μπορεί να προσδεθεί με τη σωστή διευθέτηση. Για αυτό το λόγο μελετήθηκε η επίδραση που έχει ο χρόνος επώασης στην ενεργότητα των ομοιοπολικά ακίνητοποιημένων λιπασών. Η λιπάση CalB επώαστηκε με βάσεις Shiff των νανοσωλήνων άνθρακα CNT-NH από 30 min έως 24 h. Όπως φαίνεται στην εικόνα 79 δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφοροποίηση στη δραστηριότητα της ακίνητοποιημένης λιπάσης για χρόνο επώασης πάνω από 2 h. Όπως όμως αναφέρθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο (παράγραφος 10.3), η σταθερότητα ορισμένων υδρολασών παρουσία νανοϋλικών είναι μικρή (π.χ. Bs2, CrI) και συνεπώς παρατεταμένη επώαση πιθανόν να οδηγούσε

στην αδρανοποίηση των ενζύμων. Για αυτό το λόγο επιλέχθηκε ως βέλτιστη προσέγγιση η επώαση για 1 h στους 30 °C υπό ανάδευση και ύστερα στους 4 °C ολονύκτια, με σκοπό να μειωθεί η θερμική απενεργοποίηση για τα λιγότερο θερμοσταθερά ένζυμα, ενώ παράλληλα να δοθεί αρκετός χρόνος ώστε να ολοκληρωθεί η διαδικασία ακίνητοποίησης.



Εικόνα 79: Επίδραση του χρόνου επώασης της λιπάσης με τους ενεργοποιημένους νανοσωλήνες CNT-NH κατά την ομοιοπολική ακίνητοποίηση στη συνθετική δραστηριότητα του ακίνητοποιημένου ενζύμου.

11.1.4 Επίδραση του μέσου στο οποίο γίνεται η ακίνητοποίηση

Τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή είναι αρκετά υδρόφοβα και παρουσιάζουν δυσκολία στο χειρισμό τους και τη διασπορά τους σε υδατικά συστήματα. Καθώς στο κεφάλαιο 8 μελετήθηκε η καταλυτική δράση των λιπασών σε μικροετερογενή συστήματα που είχαν ως κύρια φάση κάποιον υδρόφοβο διαλύτη, κρίθηκε σκόπιμο να μελετηθεί το κατά πόσον είναι εφικτό να ακίνητοποιηθούν τα ένζυμα σε ένα τέτοιο σύστημα. Ως φορείς ακίνητοποίησης για τη μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση της λιπάσης CalB χρησιμοποιήθηκαν οι τροποποιημένοι νανοσωλήνες άνθρακα. Ως συστήματα διασποράς των νανοϋλικών χρησιμοποιήθηκαν AOT μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο με βαθμό ενυδάτωσης $w_o = 10$, ιοντικό υγρό [bmim]PF₆ κορεσμένο σε νερό (~2.5 %, v/v) και το μικρογαλάκτωμα νερού σε ιοντικό υγρό S4. Θα πρέπει να σημειωθεί πως σε αυτά τα συστήματα τα νανοϋλικά διασπείρονται αρκετά καλύτερα από ότι σε ένα υδατικό διάλυμα και για αυτό η διαδικασία ακίνητοποίησης λαμβάνει χώρα σε τελικό όγκο 1 mL.

Στον πίνακα 34 παρουσιάζεται η δραστηριότητα της λιπάσης CalB που ακίνητοποιήθηκε σε τροποποιημένους νανοσωλήνες άνθρακα σε διάφορα μικροετερογενή συστήματα. Τα βιοϋλικά που παράγονται σε αυτά τα συστήματα παρουσιάζουν ενζυμική δραστηριότητα, υποδεικνύοντας ότι τα μικροετερογενή συστήματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μέσα για την ακίνητοποίηση

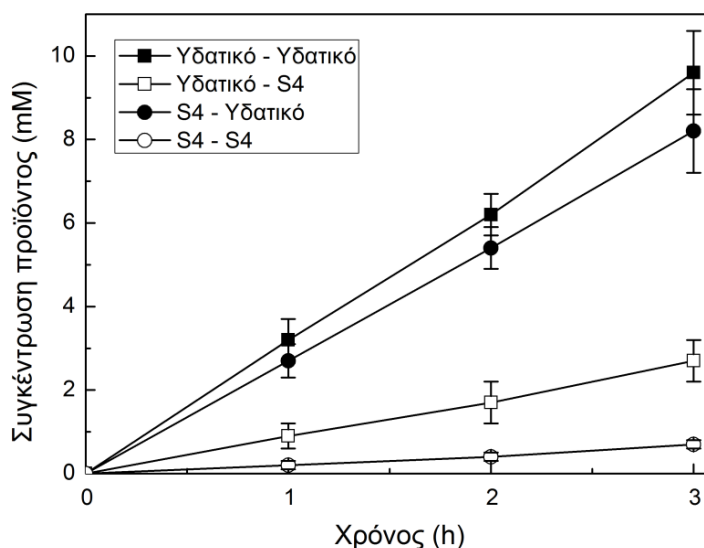
ενζύμων σε νανοϋλικά. Παρόλα αυτά η δραστηριότητα τους είναι αρκετά χαμηλότερη από τη δραστηριότητα που επιδεικνύει η λιπάση όταν ακίνητοποιείται σε υδατικό σύστημα. Μία πιθανή εξήγηση για αυτό είναι ο εντοπισμός του ενζύμου και του νανοϋλικού σε διαφορετικές μικροφάσεις του συστήματος. Τα νανοϋλικά διασπείρονται καλά σε αυτά τα συστήματα λόγω του υδρόφοβου διαλύτη. Το ένζυμο όμως σε αυτά τα συστήματα εντοπίζεται στο εσωτερικό των υδατικών νανοδιασπορών που δημιουργούνται. Στα μικροετερογενή συστήματα λοιπόν αναμένεται μείωση των αλληλεπιδράσεων ενζύμων - νανοϋλικών, όπως παρατηρήθηκε στα πειραματικά αποτελέσματα.

Πίνακας 34: Συνθετική δραστηριότητα ($mM\ h^{-1}\ mg^{-1}$ βιοϋλικού) της λιπάσης CalB που ακίνητοποιήθηκε σε τροποποιημένους νανοσωλήνες άνθρακα σε διάφορα μικροετερογενή συστήματα. Αναλογία ενζύμου – νανοϋλικού 0.1:1 (w/w) (Τυπική απόκλιση < 5%).

Σύστημα	CNT-COOH	CNT-NH	CNT-R
Υδατικό σύστημα	3.2	9.4	16.1
AOT / RM $w_o = 10$	< 0.1	3.1	4.9
[bmim]PF ₆	0.0	0.2	0.2
Μικρογαλάκτωμα S4	< 0.1	3.2	2.0

Με σκοπό να μελετηθεί περαιτέρω η χρήση των ιοντικών μικρογαλακτωμάτων ως μέσο για την ακίνητοποίηση λιπασών σε νανοϋλικά, σε αυτά τα συστήματα έλαβε χώρα η ομοιοπολική ακίνητοποίηση της λιπάσης CalB σε Gr-NH. Η ομοιοπολική ακίνητοποίηση, όπως περιγράφεται στην παράγραφο 7.5.2, μπορεί να χωριστεί σε δύο στάδια: το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει τη διασπορά του νανοϋλικού και τη δημιουργία της ενδιάμεσης βάσης Shiff με τη χρήση της γλουταραλδεϋδης, ενώ κατά το δεύτερο στάδιο προστίθεται το ένζυμο και επωάζεται παρουσία της βάσης Shiff ώστε να σχηματιστεί ο ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ του ενζύμου και του νανοϋλικού. Ανάμεσα στα δύο στάδια γίνεται φυγοκέντρηση και απορρίπτεται η περίσσεια της γλουταραλδεϋδης και του Tween 20. Μετά τη φυγοκέντρηση το μέσο στο οποίο διασπείρονται οι βάσεις Shiff των νανοϋλικών μπορεί να αλλάξει. Εκμεταλλευόμενοι αυτή τη δυνατότητα, μελετήθηκε η χρήση του μικρογαλακτώματος S4 και στα δύο στάδια της ακίνητοποίησης.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 80, όταν το μικρογαλάκτωμα S4 χρησιμοποιείται κατά το στάδιο της δημιουργίας της βάσης Shiff δεν επηρεάζει σημαντικά τη δραστηριότητα του ενζύμου. Όταν όμως το μικρογαλάκτωμα S4 χρησιμοποιείται ως μέσο κατά το δεύτερο στάδιο, στο οποίο συμβαίνει η ακίνητοποίηση του ενζύμου, η δραστηριότητα του βιοϋλικού που παράγεται είναι πολύ χαμηλότερη σε σχέση με την κλασική μεθοδολογία (υδατικό διάλυμα). Το γεγονός αυτό αποτρέπει τη χρήση των ιοντικών μικρογαλακτωμάτων κατά την ακίνητοποίηση των ενζύμων. Έτσι, στις επόμενες παραγράφους αναφέρονται αποτελέσματα για ένζυμα τα οποία ακίνητοποιήθηκαν σε υδατικό διάλυμα, σύμφωνα με τη διαδικασία που περιγράφεται στη παράγραφο 7.5.2.



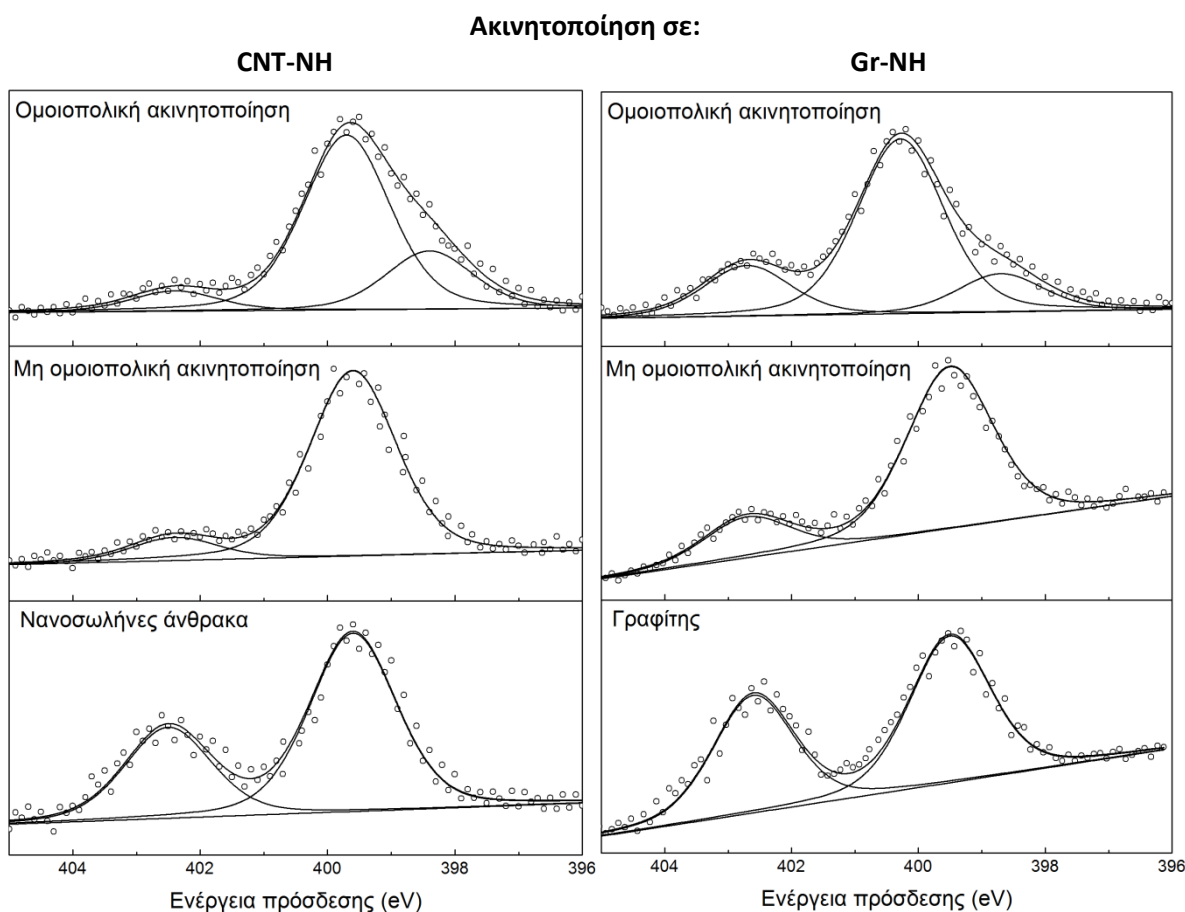
Εικόνα 80: Κινητική της αντίδρασης σύνθεσης βουτυλεστέρα του καπρυλικού οξέος σε *n*-εξάνιο που καταλύεται από λιπάση CalB ακινητοποιημένη ομοιοπολικά σε γραφίτη.

11.2 Χαρακτηρισμών των βιοϋλικών με τη χρήση φασματοσκοπίας XPS

Η φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων Χ (XPS) είναι τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για το χαρακτηρισμό ακινητοποιημένων ενζύμων και για τη στοιχειακή σύσταση των παραγόμενων βιοϋλικών (Seretoglou et al. 2008, Tziaila et al. 2010). Στην παρούσα εργασία η συγκεκριμένη μέθοδος χρησιμοποιήθηκε για να μελετηθεί ο τρόπος με τον οποίο οι υδρολάσες ακινητοποιούνται πάνω στα νανοϋλικά χρησιμοποιώντας τα πρωτόκολλα ομοιοπολικής ακινητοποίησης και φυσικής προσρόφησης. Η παρουσία ατόμων αζώτου στο ένζυμο (στον πεπτιδικό δεσμό και στις ελεύθερες αμινομάδες) και στα τροποποιημένα νανοϋλικά (CNT-NH και Gr-NH) καθιστά εφικτή την ανάλυση των φασμάτων εκπομπής της ενέργειας δέσμησης του τροχιακού 1s του πυρήνα του αζώτου (N 1s). Η ανάλυση της χημικής κατάστασης του ατόμου αζώτου στα παραγόμενα βιοϋλικά είναι μείζονος σημασίας για τη κατανόηση της φύσεως των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των νανοϋλικών και των ακινητοποιημένων ενζύμων.

Στην εικόνα 81 παρατίθενται τα φάσματα εκπομπής του τροχιακού 1s του πυρήνα του αζώτου των νανοσωλήνων άνθρακα CNT-NH και του παραγώγου του γραφίτη Gr-NH, καθώς και των βιοϋλικών που παράγονται από την ομοιοπολική και μη ομοιοπολική ακινητοποίηση της λιπάσης CalB σε αυτά τα νανοϋλικά. Το φάσμα εκπομπής των τροποποιημένων νανοϋλικών μπορεί να αναλυθεί σε δύο διακριτές κορυφές στα 402.6 eV και 399.5 eV. Η κορυφή στα 402.6 eV οφείλεται στις πρωτονιομένες ελεύθερες αμινομάδες ($-\text{NH}_3^+$) του νανοϋλικού (Benne et al. 2006, Gournis et al. 2006), ενώ η κορυφή στα 399.5 eV αποδίδεται στα άτομα αζώτου του δεσμού άνθρακα - οξυγόνου που σχηματίζεται μεταξύ των οξειδωμένων νανοϋλικών και της εξαμεθυλοδιαμίνης, και σε μικρότερο βαθμό στη μη πρωτονιομένη ελεύθερη αμινομάδα του τροποποιημένου νανοϋλικού (Benne et al. 2006, Gournis et al. 2006, Pietrzak 2009). Θα πρέπει να σημειωθεί πως από τις σχετικές ατομικές συγκεντρώσεις των νανοϋλικών ο λόγος C:N

βρέθηκε 9:1 για τους νανοσωλήνες άνθρακα CNT-NH και 8:1 για το γραφίτη Gr-NH, γεγονός το οποίο υποδεικνύει τον υψηλό βαθμό χημικής τροποποίησης των νανοϋλικών.



Εικόνα 81: Φωτοηλεκτρονικό φάσμα ακτίνων X του τροχιακού 1s του πυρήνα του αζώτου των νανοσωλήνων άνθρακα CNT-NH και του γραφίτη Gr-NH, καθώς και των βιοϋλικών που προέκυψαν από την ακίνητοποίηση της λιπάσης CalB.

Η συνεισφορά των δύο κορυφών στα 399.5 eV και στα 402.6 eV στο συνολικό φάσμα θα έπρεπε να είναι ίση αν ο βαθμός πρωτονίωσης του αζώτου δεν επηρέαζε τη θέση της κορυφής εκπομπής της αμινομάδας καθώς η μία αμινομάδα της εξαμεθυλοδιαμίνης είναι προσδεδεμένη στο νανοϋλικό ενώ η άλλη βρίσκεται ελεύθερη στο άλλο άκρο (εικόνα 23). Καθώς όμως στην κορυφή στα 399.5 eV συνεισφέρει και η μη πρωτονιομένη μορφή της ελεύθερης αμινομάδας, είναι λογικό να είναι μεγαλύτερη η συνεισφορά αυτής της κορυφής στο φάσμα των τροποποιημένων νανοϋλικών, όπως φαίνεται στον πίνακα 35. Οι συγκεκριμένες κορυφές εμφανίζονται και στα φάσματα των βιοϋλικών που μελετήθηκαν. Η συνεισφορά της κορυφής στα 399.5 eV στο φάσμα εκπομπής μετά την ακίνητοποίηση της λιπάσης αυξάνεται σημαντικά λόγω των πεπτιδικών δεσμών του ενζύμου. Έχει αναφερθεί πως οι πεπτιδικοί δεσμοί της λιπάσης CalB εμφανίζουν κορυφή στα 399.4 eV (Tziaila et al. 2010). Η ομοιοπολική ακίνητοποίηση του ενζύμου επιβεβαιώνεται από την εμφάνιση μίας νέας κορυφής στα 399.0 eV, η οποία αποδίδεται στον

μιδικό δεσμό (-C=N-) που δημιουργείται μεταξύ του ενζύμου και του νανοϋλικού (Pietrzak 2009, Raffa et al. 2003, Szunerits et al. 2006). Κατά την ομοιοπολική ακίνητοποίηση η συνεισφορά της κορυφής στα 402.6 eV μειώνεται ακόμα περισσότερο σε σχέση με τη μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση, γεγονός που οφείλεται στο ότι οι ελεύθερες αμινομάδες του νανοϋλικού και του ενζύμου χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία του ομοιοπολικού δεσμού.

Πίνακας 35: Συνεισφορά των κορυφών του φάσματος εκπομπής του τροχιακού 1s του πυρήνα του αζώτου στο συνολικό φάσμα των νανοϋλικών και των αντίστοιχων βιοϋλικών.

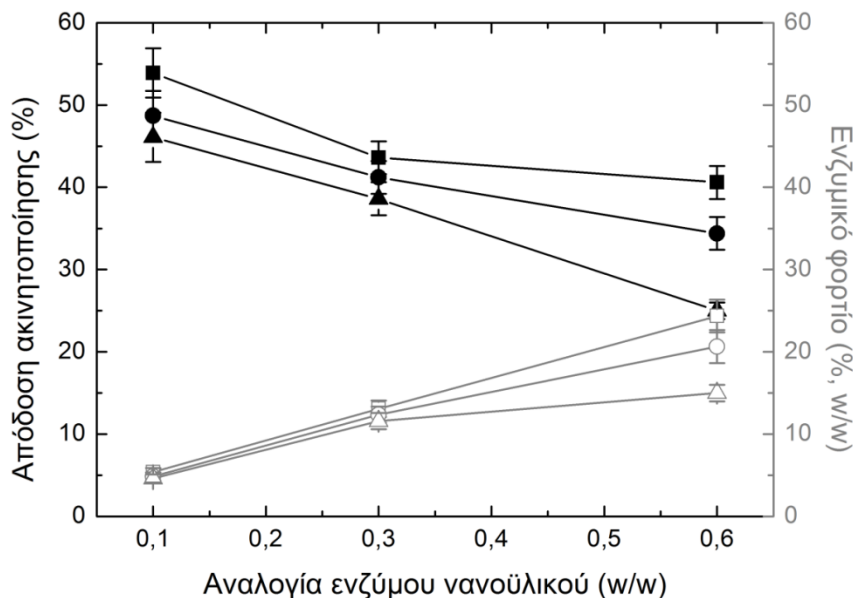
Νανοϋλικό	Σκεύασμα	402.6 eV	399.5 eV	399.0 eV
		(NH ₃ ⁺)	(C-NH & NH ₂)	(C=N)
Γραφίτης	Χωρίς ένζυμο	40 %	60 %	0 %
	Μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση	20 %	80 %	0 %
	Ομοιοπολική ακίνητοποίηση	15 %	70 %	15 %
CNTs	Χωρίς ένζυμο	35 %	65 %	0 %
	Μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση	10 %	90 %	0 %
	Ομοιοπολική ακίνητοποίηση	8 %	68 %	24 %

Ένας δείκτης της ακίνητοποίησης των ενζύμων στα βιοϋλικά είναι ο λόγος C:S. Κορυφή για τα άτομα του θείου στο φάσμα εκπομπής φωτοηλεκτρονίων εμφανίζεται μόνο στα βιοϋλικά, καθώς τα ένζυμα φέρουν άτομα θείου λόγω των πλευρικών ομάδων των κυστεϊνών και των μεθειονινών. Ο λόγος αυτός είναι μεγαλύτερος όταν η λιπάση ακίνητοποιείται ομοιοπολικά στα νανοϋλικά (14.1 για τους CNT-NH και 13.2 για το Gr-NH) από ότι όταν ακίνητοποιείται με φυσική προσρόφηση (11.3 και 10.7 αντίστοιχα). Αυτό υποδεικνύει πως κατά τη μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση το ενζυμικό φορτίο των παραγόμενων βιοϋλικών είναι μεγαλύτερο. Το αποτέλεσμα αυτό συμφωνεί με τα δεδομένα της επόμενης παραγράφου και σχετίζεται με τις διαθέσιμες θέσεις ακίνητοποίησης στην επιφάνεια των νανοϋλικών. Κατά τη μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση η λιπάση μπορεί να ακίνητοποιηθεί σε όλη την επιφάνεια του νανοϋλικού, ενώ η ομοιοπολική ακίνητοποίηση λαμβάνει χώρα σε συγκεκριμένες θέσεις.

11.3 Απόδοση ακίνητοποίησης

Ένα από τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των νανοϋλικών είναι η αυξημένη επιφάνεια στη μονάδα του όγκου. Έχει αναφερθεί πως αυτό το χαρακτηριστικό τους επιτρέπει την ακίνητοποίηση μεγάλων ποσοτήτων ενζύμου στην επιφάνεια τους, αυξάνοντας έτσι τη δραστηριότητα του βιοϋλικού στη μονάδα βάρους (Asuri et al. 2007, Cang-Rong and Pastorin 2009, Karajanagi et al. 2004, Kim et al. 2006a, Shi et al. 2007). Η καταλυτική ενεργότητα των βιοϋλικών που παράγονται από την ακίνητοποίηση των ενζύμων στα νανοϋλικά εξαρτάται σημαντικά από την αναλογία ενζύμου - νανοϋλικού που χρησιμοποιείται κατά τη διαδικασία ακίνητοποίησης,

καθώς επηρεάζει την ποσότητα του ενζύμου που ακινητοποιείται στα νανοϋλικά. Η απόδοση της ακινητοποίησης υπολογίστηκε από τις μετρήσεις πρωτεϊνικής συγκέντρωσης στα πρωτεϊνικά διαλύματα πριν και μετά την ακινητοποίηση.



Εικόνα 82: Απόδοση ακινητοποίησης (%) της λιπάσης CalB σε τροποποιημένους νανοσωλήνες άνθρακα (■, □) CNT-COOH, (●, ○) CNT-NH₂, (▲, △) CNT-R, καθώς και το ενζυμικό φορτίο ανά μονάδα βάρους.

Αρχικά μελετήθηκε η επίδραση των λειτουργικών ομάδων των τροποποιημένων νανοσωλήνων άνθρακα κατά τη μη ομοιοπολική ακινητοποίηση της λιπάσης CalB. Στην εικόνα 82 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της συγκεκριμένης μελέτης. Όπως φαίνεται, η μέγιστη απόδοση ακινητοποίησης για όλους τους τύπους νανοσωλήνων άνθρακα που χρησιμοποιήθηκαν επιτεύχθηκε για τη χαμηλότερη συγκέντρωση ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε. Η συμπεριφορά αυτή είναι λογική, καθώς τα ενζυμικά μόρια ανταγωνίζονται για να αλληλεπιδράσουν με την επιφάνεια του νανοϋλικού (Shah et al. 2007). Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ενζύμου η απόδοση ακινητοποίησης φτάνει έως και 55 %, ενώ όσο αυξάνεται η συγκέντρωση του ενζύμου η επιφάνεια του υλικού κορεννύεται σε ενζυμικά μόρια και μειώνεται η απόδοση. Θα πρέπει να σημειωθεί πως αν και η απόδοση ακινητοποίησης μειώνεται, το ενζυμικό φορτίο στη μονάδα βάρους του νανοϋλικού αυξάνεται. Συγκεκριμένα, η μεγαλύτερη τιμή ενζυμικού φορτίου επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας ως φορέα ακινητοποίησης τα CNT-COOH. Αυτή η παρατήρηση μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι αναπτύσσονται σημαντικότερες αλληλεπιδράσεις μεταξύ της συγκεκριμένης λιπάσης και των CNT-COOH σε σχέση με τα άλλα νανοϋλικά, όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 10.4.1. Επιπλέον, είναι πιθανόν οι καρβοξυλομάδες στην επιφάνεια των νανοσωλήνων άνθρακα να αναγνωρίζονται από το ενεργό κέντρο του ενζύμου και το ένζυμο να προσδένεται με αυτό τον τρόπο ισχυρά στα CNT-COOH, δημιουργώντας έναν ασταθή ομοιοπολικό δεσμό, όπως αναφέρεται στο μηχανισμό κατάλυσης των υδρολασών (παράγραφος 1.2.2). Η ομοιοπολική αυτή πρόσδεση έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά για τη

λιπάση Crl η οποία ακίνητοποιήθηκε σε οξειδωμένους νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος (Shi et al. 2007). Η υπόθεση αυτή ενισχύεται περαιτέρω από τη χαμηλή δραστηριότητα που παρουσιάζει η λιπάση όταν ακίνητοποιείται σε CNT-COOH σε σχέση με τους άλλους τύπους τροποποιημένων νανοσωλήνων άνθρακα, όπως σχολιάζεται στην επόμενη ενότητα (παράγραφος 11.4).

Σε μία δεύτερη σειρά πειραμάτων μελετήθηκε η απόδοση της ομοιοπολικής και μη ομοιοπολικής ακίνητοποίησης διάφορων υδρολασών σε CNT-NH και Gr-NH, χρησιμοποιώντας αναλογία ενζύμου – νανοϋλικού κατά την ακίνητοποίηση 3 : 1 (w/w). Η συγκεκριμένη αναλογία χρησιμοποιήθηκε γιατί, όπως θα αναφερθεί και στην παράγραφο 11.4.2, περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου δεν επιδρά στη δραστηριότητα του βιοϋλικού, οπότε φαίνεται ο φορέας να φτάνει σε ένα κορεσμό ως προς το ένζυμο που μπορεί να φιλοξενήσει στην επιφάνεια του. Όπως φαίνεται στον πίνακα 36, όλες οι υδρολάσες που μελετήθηκαν, πέραν της Pfe I, ακίνητοποιήθηκαν επιτυχώς στους δύο τύπους νανοϋλικών, ανεξάρτητα του πρωτοκόλλου ακίνητοποίησης που χρησιμοποιήθηκε. Επετεύχθησαν αποδόσεις ακίνητοποίησης έως 55 %, το οποίο στη συγκεκριμένη αναλογία ενζύμου υποστρώματος υπολογίζεται σε 1.65 mg ενζύμου ανά mg φορέα. Η συγκεκριμένη τιμή ενζυμικού φορτίου είναι σημαντικά υψηλότερη από αυτές που επετεύχθησαν στην προηγούμενη μελέτη λόγω της περίσσειας ενζύμου που χρησιμοποιήθηκε, αλλά και σε σχέση με τις τιμές που έχουν αναφερθεί στη βιβλιογραφία για την ακίνητοποίηση ενζύμων σε νανοϋλικά (Asuri et al. 2007, Cang-Rong and Pastorin 2009, Karajanagi et al. 2004, Shi et al. 2007).

Πίνακας 36: Απόδοση ομοιοπολικής και μη ομοιοπολικής ακίνητοποίησης (%) υδρολασών σε τροποποιημένους νανοσωλήνες άνθρακα και γραφίτη (Τυπική απόκλιση < 3%).

Ένζυμο		CalA	CalB	Crl	Gtl	Bs2	PestE	Pfe I
CNTs	NCI	36.5	26.4	55.5	30.6	37.2	46.2	5.2
	CI	29.0	24.8	46.1	23.6	29.5	46.5	0.0
Γραφίτης	NCI	33.5	23.5	49.7	22.4	29.4	43.5	Δ.Μ. ²⁶
	CI	24.1	22.0	48.5	18.8	25.7	42.4	Δ.Μ. ²⁶

Όπως φαίνεται στον πίνακα 36, η χρήση νανοσωλήνων άνθρακα ως φορείς ακίνητοποίησης οδήγησε σε μεγαλύτερες αποδόσεις ακίνητοποίησης σε σχέση με τις τιμές που επετεύχθησαν χρησιμοποιώντας γραφίτη. Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση βασίζεται κυρίως σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ενζύμου και του νανοϋλικού (Gao and Kyrtzizis 2008, In Het Panhuis et al. 2003, Kim et al. 2005, Shah et al. 2007), η υψηλότερη απόδοση ακίνητοποίησης που παρατηρείται στην περίπτωση των νανοσωλήνων άνθρακα μπορεί να αποδοθεί στην υψηλότερη υδροφοβικότητα τους σε σχέση με το αντίστοιχο

²⁶ Δεν μελετήθηκε.

παράγωγο του γραφίτη. Η χαμηλότερη απόδοση ακίνητοποίησης που παρατηρείται όταν οι υδρολάσες ακίνητοποιούνται ομοιοπολικά πιθανόν να οφείλεται στις περιορισμένες θέσεις (ελεύθερες αμινομάδες) που είναι διαθέσιμες για την ομοιοπολική πρόσδεση του ενζύμου (Cang-Rong and Pastorin 2009).

Σε αυτό το σημείο θα πρέπει να σημειωθεί πως οι μεγαλύτερες αποδόσεις ακίνητοποίησης παρατηρήθηκαν για τη λιπάση CrI. Το γεγονός αυτό μπορεί να συσχετισθεί με το μεγαλύτερο μοριακό βάρος της συγκεκριμένης λιπάσης σε σχέση με τις υπόλοιπες υδρολάσες που μελετήθηκαν (πίνακας 30). Το μεγαλύτερο μοριακό βάρος συνεπάγεται μεγαλύτερες μοριακές διαστάσεις (στις περισσότερες περιπτώσεις) και συνεπώς αυξημένη επιφάνεια αλληλεπίδρασης με το νανοϋλικό. Ταυτόχρονα περισσότερα αμινοξέα είναι εκτεθειμένα στην επιφάνεια πρωτεϊνικού μορίου, άρα η πιθανότητα να υπάρχουν ελεύθερες αμινομάδες στην επιφάνεια αυξάνεται και συνεπώς αυξάνεται και η απόδοση της ομοιοπολικής ακίνητοποίησης. Έτσι, αν δεν υπολογιστούν οι υδρολάσες PestE και Gtl οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν από σκευάσματα χαμηλής καθαρότητας, φαίνεται να υπάρχει συσχέτιση του μοριακού βάρους της πρωτεΐνης και της απόδοσης ακίνητοποίησης. Αυτή η συσχέτιση είναι αρκετά καλή για τη μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση ($r^2 \sim 0.900$) όταν μελετώνται μόνο οι λιπάσες (CalA, CalB και CrI) αλλά μειώνεται όταν εισάγονται και οι εστεράσες (Bs2 και Pfe I) στην ανάλυση, γεγονός το οποίο υποδεικνύει πως και ο τύπος του ενζύμου παίζει σημαντικό ρόλο στην ακίνητοποίηση τους στα νανοϋλικά.

11.4 Συνθετική δραστηριότητα υδρολασών ακίνητοποιημένων σε νανοϋλικά

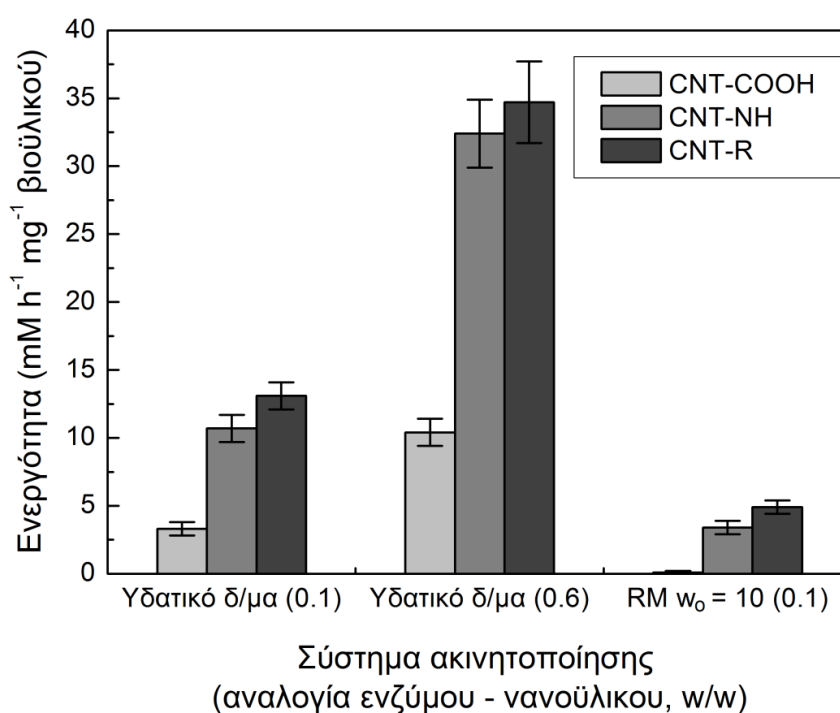
11.4.1 Επίδραση των λειτουργικών ομάδων της επιφάνειας των CNTs

Η συνθετική δραστηριότητα της μη ομοιοπολικά ακίνητοποιημένης λιπάσης CalB σε τροποποιημένους νανοσωλήνες άνθρακα μελετήθηκε σε άνυδρο *n*-εξάνιο, στην αντίδραση σύνθεσης βουτελεστέρα του καπρυλικού οξέος στους 30 °C.

Όπως φαίνεται από την εικόνα 83, η ακίνητοποιημένη CalB παρουσιάζει αυξημένη δραστηριότητα όταν ως φορέας ακίνητοποίησης χρησιμοποιούνται οι CNT-R, ενώ τη χαμηλότερη δραστηριότητα επέδειξε με τους CNT-COOH. Εάν η λιπάση προσδέεται στην καρβοξυλομάδα των CNT-COOH με το ενεργό της κέντρο, όπως προτείνεται στη βιβλιογραφία (Shi et al. 2007), λιγότερα ενεργά κέντρα θα είναι διαθέσιμα για το υπόστρωμα, κάτι το οποίο θα οδηγεί στη χαμηλότερη δραστηριότητα που παρατηρείται, σε σχέση με τους άλλους φορείς ακίνητοποίησης. Δεδομένου ότι στο συγκεκριμένο υλικό η απόδοση ακίνητοποίησης είναι μεγαλύτερη και συνεπώς το βιοϋλικό φέρει περισσότερο ένζυμο στη μονάδα του βάρους (παράγραφος 11.3), η συγκεκριμένη υπόθεση φαίνεται να ισχύει.

Η υδροφοβικότητα των νανοσωλήνων άνθρακα αλλάζει κατά την ομοιοπολική τους τροποποίηση και συνεπώς μπορεί να επηρεάζει την ενεργότητα των ακίνητοποιημένων ενζύμων. Η οξείδωση των νανοσωλήνων άνθρακα οδηγεί στη δημιουργία σχετικά υδρόφιλων παραγώγων

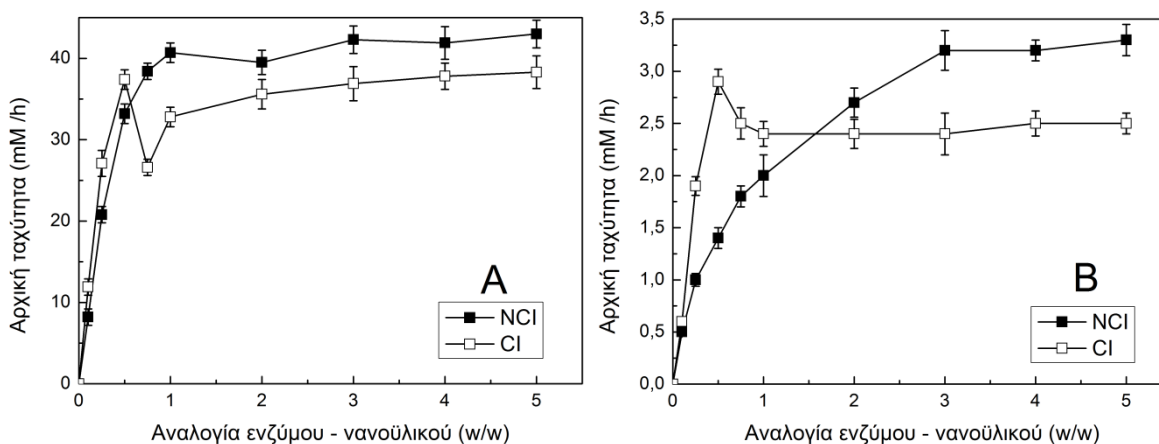
(CNT-COOH) ενώ η περαιτέρω τροποποίηση (CNT-NH και CNT-R) αυξάνει την υδροφοβικότητα λόγω της αλκυλικής αλυσίδας που εισάγεται. Πρόσφατα έχει αναφερθεί ότι η αύξηση της υδροφοβικότητας του φορέα ακίνητοποίησης οδηγεί σε αύξηση της σταθερότητας και της δραστηριότητας των ακίνητοποιημένων ενζύμων (Mena et al. 2008). Το υδρόφοβο περιβάλλον που δημιουργούν οι CNT-R και CNT-NH θα μπορούσε να επηρεάσει τη διάχυση και την κατανομή των υποστρωμάτων και των προϊόντων στο μικροπεριβάλλον του ακίνητοποιημένου ενζύμου, αυξάνοντας με αυτό τον τρόπο τη διαθεσιμότητα των υδρόφοβων υποστρωμάτων και συνεπώς αυξάνοντας τη συνθετική δραστηριότητα. Η ίδια συμπεριφορά παρατηρείται ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης του ενζύμου που χρησιμοποιείται κατά την ακίνητοποίηση και του μέσου στο οποίο γίνεται η ακίνητοποίηση του ενζύμου.



Εικόνα 83: Συνθετική δραστηριότητα λιπάσης CalB ακίνητοποιημένης σε τροποποιημένους CNTs.

11.4.2 Επίδραση της αναλογίας ενζύμου - νανοϋλικού

Ένας παράγοντας που επιδρά σημαντικά στην ακίνητοποίηση των ενζύμων στα νανοϋλικά και στη δραστηριότητά τους είναι η αναλογία ενζύμου – νανοϋλικού που χρησιμοποιείται κατά την ακίνητοποίηση. Όπως φάνηκε από την προηγούμενη παράγραφο (εικόνα 83), αύξηση της αναλογίας οδηγεί σε αύξηση της δραστηριότητας του νανοϋλικού που παράγεται. Έτσι, για να επιτευχθεί το μέγιστο ενζυμικό φορτίο και η μέγιστη ενζυμική δραστηριότητα, μελετήθηκε η επίδραση της συγκεκριμένης αναλογίας, σε ένας εύρος από 0.1 έως 5 (w/w), κατά την ομοιοπολική και τη μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση της λιπάσης CalB στη σύνθεση του βουτυλεστέρα του καπρυλικού οξέος. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στην εικόνα 84.



Εικόνα 84: Δραστηκότητα της λιπάσης CalB στη σύνθεση του βουτυλεστέρα του καπρυλικού οξέος όταν ακίνητοποιείται σε (A) νανοσωλήνες άνθρακα και σε (B) γραφίτη.

Η χρήση των τροποποιημένων νανοσωλήνων άνθρακα ως φορείς ακίνητοποίησης οδηγεί στην παραγωγή βιοϋλικών με σημαντικά αυξημένη δραστηκότητα (~ 10 φορές) σε σχέση με τη χρήση των αντίστοιχων νανοϋλικών με βάση το γραφίτη. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και για άλλες υδρολάσες, όπως θα σχολιαστεί στην επόμενη ενότητα. Αν και στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί πως η χρήση νανοσωλήνων άνθρακα σε οργανικούς διαλύτες σταθεροποιεί τις πρωτεΐνες σε σχέση με το γραφίτη (Asuri et al. 2006b), δεν υπάρχει κάποια συγκριτική μελέτη της δραστηκότητας ακίνητοποιημένων ενζύμων σε νανοσωλήνες άνθρακα και γραφίτη. Συνεπώς δεν υπάρχουν βιβλιογραφικά δεδομένα για να συσχετισθούν με τα πειραματικά αποτελέσματα της παρούσας μελέτης. Παρόλα αυτά, τα αποτελέσματα του φθορισμού υποδεικνύουν αυξημένη αλληλεπίδραση των ενζύμων με τους νανοσωλήνες άνθρακα σε σχέση με τα αντίστοιχα παράγωγα του γραφίτη (παράγραφος 10.4.1). Όσον αφορά τη συγκέντρωση του ενζύμου που χρησιμοποιείται κατά την ακίνητοποίηση, φαίνεται πως η δραστηκότητα των βιοϋλικών αυξάνεται έως της αναλογίας ενζύμου προς νανοϋλικό 3:1 (w/w). Περαιτέρω αύξηση δεν παρουσιάζει σημαντική επίδραση στη δραστηκότητα των βιοϋλικών που παράγονται. Για αυτό το λόγο τα περισσότερα πειράματα στην παρούσα διατριβή έγιναν χρησιμοποιώντας αυτή την αναλογία.

Σε μία προηγούμενη μελέτη, οι Cang-Rong και Pastorin παρατήρησαν ότι η ομοιοπολική ακίνητοποίηση αμυλογλυκοσιδάσης σε νανοσωλήνες πολλαπλού τοιχώματος οδηγεί σε βιοϋλικά με σημαντικά χαμηλότερη δραστηκότητα από ότι όταν το ένζυμο είχε ακίνητοποιηθεί μη ομοιοπολικά (Cang-Rong and Pastorin 2009). Στην παρούσα μελέτη, όπως φαίνεται στην εικόνα 84, η ομοιοπολικά ακίνητοποιημένη CalB παρουσιάζει συγκρίσιμη ενεργότητα με τη μη ομοιοπολικά ακίνητοποιημένη. Είναι ενδιαφέρον να σημειωθεί πως η ομοιοπολικά ακίνητοποιημένη λιπάση παρουσιάζει διαφορετικό προφίλ σε σχέση με τη μη ομοιοπολικά ακίνητοποιημένη, κάτι το οποίο υποδεικνύει το διαφορετικό μηχανισμό ακίνητοποίησης, σύμφωνα και με τα αποτελέσματα του χαρακτηρισμού με τη φασματοσκοπία XPS (παράγραφος 11.2). Κατά τη μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση η λιπάση φαίνεται να ακολουθεί μία

συμπεριφορά ψευδο-κορεσμού, η οποία είναι παρόμοια με αυτή που έχει αναφερθεί σε προηγούμενες εργασίες (Karajnapagi et al. 2004). Η διαφοροποίηση στη συμπεριφορά είναι αρκετά ενδιαφέρουσα στις χαμηλές αναλογίες ενζύμου - νανοϋλικού, όπου η ομοιοπολική ακίνητοποίηση αποδίδει βιοϋλικά με μεγαλύτερη δραστικότητα από ότι η μη ομοιοπολική. Μία πιθανή εξήγηση είναι ότι κατά τη μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση το ένζυμο προσπαθεί να αυξήσει την επιφάνεια επαφής του με το νανοϋλικό, κάτι το οποίο οδηγεί σε ανεπιθύμητες δομικές αλλαγές (παράγραφος 10.4) και συνεπώς σε απώλεια της δραστικότητας (Bosley and Peilow 2000, Tziaila et al. 2010). Σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ενζύμου, η αρνητική αυτή αλληλεπίδραση μειώνεται λόγω της ελαχιστοποίησης της διαθέσιμης επιφάνειας στο νανοϋλικό ανά ενζυμικό μόριο (Shah et al. 2007), ενώ είναι πιθανό να προσροφούνται νέα ενζυμικά μόρια πάνω στα ήδη ακίνητοποιημένα μόρια. Αντίθετα, κατά την ομοιοπολική ακίνητοποίηση η λιπάση CalB ακίνητοποιείται σε συγκεκριμένες θέσεις με συγκεκριμένο τρόπο, κάτι το οποίο δεν επηρεάζεται από τη συγκέντρωση του ενζύμου. Έτσι, σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ενζύμου το πρωτόκολλο μη ομοιοπολικής ακίνητοποίησης οδηγεί σε βιοϋλικά τα οποία παρουσιάζουν μεγαλύτερη δραστικότητα από τα ομοιοπολικά ακίνητοποιημένα.

11.4.3 Συνθετική δραστικότητα υδρολασών

Η συνθετική δραστικότητα των ακίνητοποιημένων υδρολασών μελετήθηκε ύστερα από ακίνητοποίηση των ενζύμων στα νανοϋλικά χρησιμοποιώντας αναλογία 3:1 (w/w), όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη ενότητα. Η ενεργότητα των λιπασών μελετήθηκε στη σύνθεση του βουτυλεστέρα του καπρυλικού οξέος σε άνυδρο *n*-εξάνιο στους 30 °C, ενώ η δραστικότητα των εστερασών καταγράφηκε για την μετεστεροποίηση του βινυλ-οξικού οξέος με την (±)1-φαινυλαιθανόλη.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 37, τα ακίνητοποιημένα ένζυμα παρουσίασαν αυξημένη δραστικότητα σε σχέση με τα μη ακίνητοποιημένα. Η λιπάση CalB παρουσίασε τη μεγαλύτερη δραστικότητα μεταξύ των λιπασών που μελετήθηκαν, ενώ η λιπάση Gtl που ακίνητοποιήθηκε ομοιοπολικά πάνω σε νανοσωλήνες άνθρακα παρουσίασε πάνω από 75 φορές βελτίωση της δραστικότητάς της σε σχέση με το λυοφυλιωμένο σκεύασμα. Αντίθετα, η εστεράση Bs2 δεν παρουσίασε ενζυμική δραστικότητα στις περισσότερες περιπτώσεις μετά την ακίνητοποίηση, αν και ακίνητοποιήθηκε επιτυχώς και στους δύο τύπους νανοϋλικών (παράγραφος 11.3). Θα πρέπει να αναφερθεί πως η επώαση του συγκεκριμένου ενζύμου με τα νανοϋλικά οδηγεί σε ταχύτατη απενεργοποίηση του ενζύμου, κάτι το οποίο δεν παρατηρήθηκε για τις υπόλοιπες υδρολάσες (παράγραφος 10.3). Το γεγονός αυτό υποδεικνύει ότι η επίδραση που έχουν τα νανοϋλικά βασισμένα στον άνθρακα στη καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων, καθώς και στην αποτελεσματικότητα της διαδικασίας ακίνητοποίησης είναι εξαρτώμενη από τη φύση του ενζύμου. Θα πρέπει να σημειωθεί όμως πως το ελεύθερο ένζυμο δεν παρουσίασε δραστικότητα, οπότε η απουσία δραστικότητας δεν είναι ενδεικτική της αποδιάταξης του ενζύμου.

Πίνακας 37: Αρχική ταχύτητα ($\text{mmol h}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ενζύμου) της συνθετικής δράσης των λιπασών και της μετεστεροποίησης που καταλύεται από εστεράσες. Η αναλογία (w/w) ενζύμου - νανοϋλικού κατά την ακίνητοποίηση ήταν 3:1 (Τυπική απόκλιση < 5%).

		Λιπάσες				Εστεράσες		
		CalA	CalB	CrI	Gtl	Bs2	PestE	Pfe I
Μη ακίνητοποιημένο		0.33	9.33	2.00	1.00	0.00	0.00	Δ.Μ. ²⁷
CNTs	NCI	1.15	191.40	3.20	11.70	0.00	2.27	5.50
	CI	1.29	173.00	4.14	76.22	0.00	3.48	0.00
Γραφίτης	NCI	0.15	15.45	0.33	6.47	0.38	0.58	Δ.Μ. ²⁷
	CI	0.10	12.07	0.67	11.09	0.00	0.84	Δ.Μ. ²⁷

Τα ομοιοπολικά ακίνητοποιημένα ένζυμα παρουσιάζουν συγκρίσιμη δραστηριότητα με τα μη ομοιοπολικά ακίνητοποιημένα, και σε ορισμένες περιπτώσεις (CrI, Gtl και PestE) παρουσιάζουν ακόμα και μεγαλύτερη. Αν και η ομοιοπολική ακίνητοποίηση έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς στη παραγωγή βιοαισθητήρων (Dai et al. 2004, Du et al. 2007a, Santos et al. 2006, Tiwari and Dhakate 2009) και ορισμένες μελέτες υποδεικνύουν ότι η ομοιοπολική ακίνητοποίηση των ενζύμων μπορεί να επιφέρει καλύτερη απόκριση (Santos et al. 2006), τα αποτελέσματα στη βιβλιογραφία δεν συμφωνούν απόλυτα. Για παράδειγμα, η ομοιοπολική ακίνητοποίηση της αμυλογλυκοσιδάσης σε CNTs παράγει βιοϋλικά με χαμηλότερη δραστηριότητα σε σχέση με τη μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση (Cang-Rong and Pastorin 2009).

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι τα ένζυμα παρουσίασαν πολύ μεγαλύτερη δραστηριότητα όταν ακίνητοποιήθηκαν σε νανοσωλήνες άνθρακα σε σχέση με το γραφίτη, όπως αναφέρθηκε ήδη για τη λιπάση CalB στην παράγραφο 11.4.2. Είναι αναμενόμενο ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ ενζύμου και νανοϋλικού, και συνεπώς η δομή και η καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων, να επηρεάζεται από το μέγεθος και το σχήμα των νανοϋλικών (Cang-Rong and Pastorin 2009, Mu et al. 2008, Vijayaraj et al. 2010). Η αυξημένη δραστηριότητα που παρουσιάζουν οι υδρολάσες όταν ακίνητοποιούνται σε νανοσωλήνες άνθρακα μπορεί να αποδοθεί στην καμπυλότητα του σε σχέση με το γραφίτη (Mu et al. 2008). Η επίπεδη επιφάνεια του γραφίτη μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές δομικές αλλαγές στο ενζυμικό μόριο και συνεπώς σε χαμηλότερη δραστηριότητα.

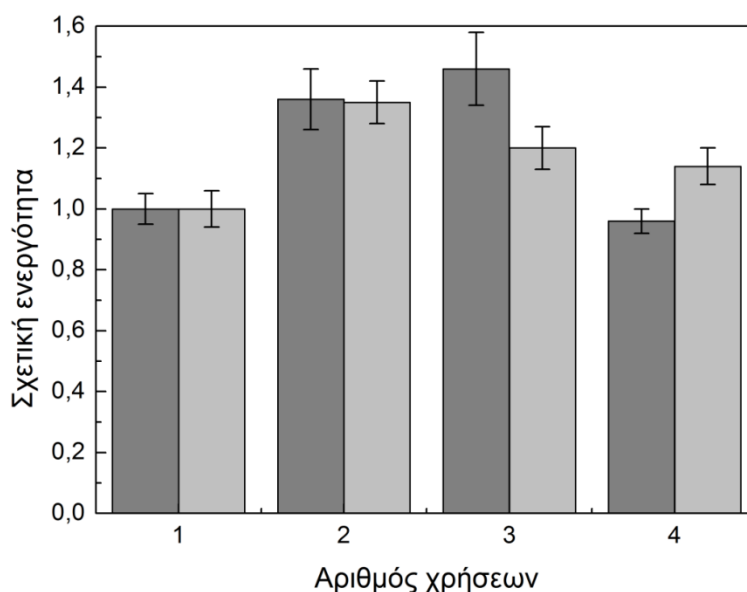
11.5 Επαναχρησιμοποίηση ακίνητοποιημένης λιπάσης CalB

Η βιωσιμότητα μίας βιομηχανικής εφαρμογής που βασίζεται στη χρήση ακίνητοποιημένων ενζύμων εξαρτάται σημαντικά από την ικανότητα αναγέννησης του βιοκαταλύτη και την επακόλουθη επαναχρησιμοποίησή του. Η επαναχρησιμοποίηση των υδρολασών που ακίνητοποιήθηκαν σε νανοϋλικά μελετήθηκε σε δύο περιπτώσεις.

²⁷ Δε μελετήθηκε.

Σε πρώτο στάδιο μελετήθηκε η επαναχρησιμοποίηση της λιπάσης CalB η οποία ακίνητοποιήθηκε μη ομοιοπολικά σε νανοσωλήνες άνθρακα CNT-NH. Η ακίνητοποιημένη λιπάση χρησιμοποιήθηκε για τη σύνθεση βουτυλεστέρα του καπρυλικού οξέος σε *n*-εξάνιο στους 30 °C για 5 h. Μετά το πέρας της αντίδρασης το διάλυμα φυγοκεντρείται ώστε να καθιζάνει το ακίνητοποιημένο ένζυμο. Το υπερκείμενο απορρίπτεται και το βιοϋλικό ξεπλένεται από τα αντιδρώντα με το διαλύτη της αντίδρασης τρεις φορές. Το υλικό αφήνεται να στεγνώσει σε θερμοκρασία 30 °C και έπειτα προστίθεται νέος διαλύτης με τα υποστρώματα.

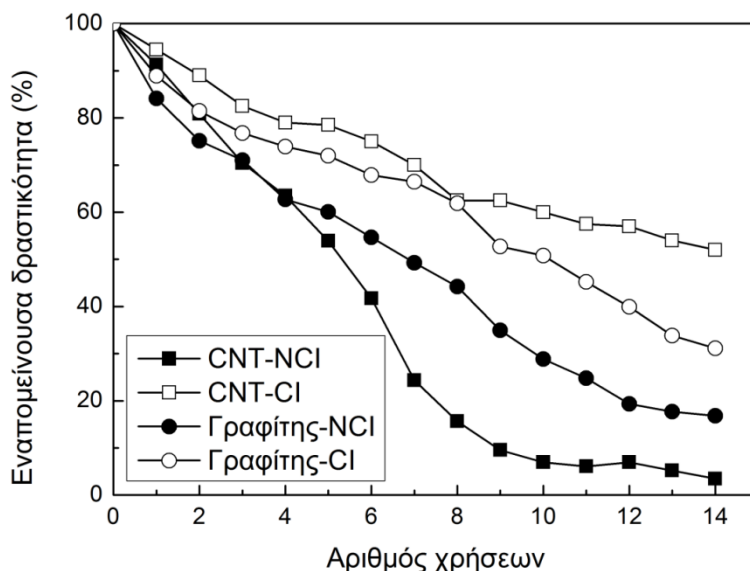
Όπως φαίνεται στην εικόνα 85, δεν παρατηρείται σημαντική μείωση της δραστηριότητας ύστερα από 4 κύκλους χρήσης (20 h συνολικού λειτουργικού χρόνου). Το ακίνητοποιημένο ένζυμο διατηρεί πάνω από 90 % της αρχικής του δραστηριότητας, υποδεικνύοντας με αυτό τον τρόπο πως δεν παρατηρείται απομάκρυνση του ενζύμου από το φορέα ακίνητοποίησης ή απενεργοποίηση κατά τη διαδικασία του ξεπλύματος. Επιπλέον, μετά την πρώτη χρήση παρατηρήθηκε ενεργοποίηση έως 50 %. Αυτό το φαινόμενο μπορεί να οφείλεται στην καλύτερη διευσθέτηση του ενζύμου ύστερα από τη πρώτη διασπορά του βιοϋλικού στο *n*-εξάνιο. Η καλύτερη διασπορά των CNT-NH στο *n*-εξάνιο μπορεί να παρέχει στο ένζυμο ένα ευνοϊκότερο μικροπεριβάλλον, ενώ μπορεί να σχετίζεται και με την αυξημένη διαθεσιμότητα του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου.



Εικόνα 85: Επαναχρησιμοποίηση της λιπάσης CalB ακίνητοποιημένης σε CNT-NH από υδατικό διάλυμα (σκούρο γκρι) και από αντίστροφα μικκύλια (ανοιχτό γκρι) στην αντίδραση εστεροποίησης (αναλογία ενζύμου νανοϋλικού 0.1 w/w)

Καθώς η επαναχρησιμοποίηση της λιπάσης CalB στους 30 °C παρουσίασε ενδιαφέροντα αποτελέσματα, έγινε εκτενέστερη μελέτη της επαναχρησιμοποίησης της συγκεκριμένης λιπάσης στους 60 °C. Η επαναχρησιμοποίηση της ακίνητοποιημένης λιπάσης μελετήθηκε ύστερα από ομοιοπολική και μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση σε CNT-NH και Gr-NH. Η αντίδραση σύνθεσης

του βουτυλεστέρα του καπρυλικού οξέος έλαβε χώρα σε *n*-εξάνιο για 24 h. Έπειτα το ακίνητοποιημένο ένζυμο ξεπλύθηκε τρεις φορές με *n*-εξάνιο και επαναχρησιμοποιήθηκε. Όπως φαίνεται στην εικόνα 86, όλα τα βιοϋλικά διατήρησαν περισσότερο από 50 % της ενεργότητας τους ύστερα από 5 επαναλαμβανόμενες χρήσεις (120 h συνολικού λειτουργικού χρόνου) στους 60 °C. Η χρήση των νανοϋλικών ως φορείς ακίνητοποίησης φαίνεται να σταθεροποιεί τα ένζυμα αφού η λιπάση CalB ύστερα από ακίνητοποίηση σε HPMC χάνει το 50% της δραστηριότητας της ύστερα από μόλις 30 ώρες συνολικού χρόνου λειτουργίας στους 50 °C (παράγραφος 9.3.2). Η σταθεροποιητική δράση της χρήσης νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα ως φορείς ακίνητοποίησης έχει παρατηρηθεί για άλλα ένζυμα όταν ακίνητοποιήθηκαν σε CNT-COOH μη ομοιοπολικά (Asuri et al. 2006a). Σημαντική σταθεροποίηση της λιπάσης CalB επιτυγχάνεται κατά την ομοιοπολική ακίνητοποίηση της και στους δύο τύπους νανοϋλικών που χρησιμοποιήθηκαν. Η ομοιοπολικά ακίνητοποιημένη CalB σε νανοσωλήνες άνθρακα διατηρεί περίπου το 60 % της αρχικής της δραστηριότητας ύστερα από 14 χρήσεις (336 h συνολικού χρόνου λειτουργίας), ενώ όταν ακίνητοποιείται μη ομοιοπολικά χάνει πάνω από το 90 % της αρχικής της δραστηριότητας ύστερα από 9 χρήσεις. Η σταθερότητα που επιδεικνύουν τα ομοιοπολικά ακίνητοποιημένα σκευάσματα είναι εντυπωσιακή, αν συγκριθεί με βιβλιογραφικά δεδομένα. Η εμπορικά διαθέσιμη Novozyme 435 χάνει πάνω από 15 % της αρχικής της δραστηριότητας ύστερα από μόλις 63 ώρες επώασης στους 25 °C (Hernández-Martín and Otero 2008) και πάνω από 20 % ύστερα από 5 μέρες επώασης στους 50 °C σε ιοντικό υγρό (Ha et al. 2010).



Εικόνα 86: Επαναχρησιμοποίηση της ακίνητοποιημένης λιπάσης CalB σε *n*-εξάνιο στους 60 °C (Τυπική απόκλιση < 5 %).

Αξίζει να σημειωθεί ότι η CalB που ακίνητοποιήθηκε μη ομοιοπολικά σε τροποποιημένο γραφίτη είναι αρκετά πιο σταθερή από αυτή που ακίνητοποιήθηκε σε CNT-NH, μία συμπεριφορά που έρχεται σε αντίθεση με την εικόνα της ενεργότητας των ακίνητοποιημένων υδρολασών (παράγραφος 11.4.3). Η εικόνα αυτή μπορεί να οφείλεται στο γεγονός ότι η επιφάνεια του

γραφίτη ευνοεί περισσότερο τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, όπως αναπτύχθηκε στην παράγραφο 10.2, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε αυξημένη συγκράτηση του ενζύμου από το φορέα ακίνητοποίησης.

11.6 Μελέτη της δευτεροταγούς δομής ακίνητοποιημένων υδρολασών

Οι πιθανές δομικές αλλαγές των υδρολασών ύστερα από την ακίνητοποίηση τους στα νανοϋλικά μελετήθηκαν μέσω της φασματοσκοπίας υπερύθρου. Φάσματα των ακίνητοποιημένων ενζύμων ελήφθησαν με τη μορφή KBr δισκίων και συγκρίθηκαν με τα φάσματα που ελήφθησαν για το λυοφυλιωμένο ένζυμο. Τα στοιχεία δευτεροταγούς δομής που παρατίθενται υπολογίστηκαν ύστερα από ανάλυση της αμιδικής περιοχής I. Ο συντελεστής συσχέτισης r δε φαίνεται να παρουσιάζει αξιόπιστα αποτελέσματα, αφού δεν αποδίδει ικανοποιητικά τις αλλαγές στη δομή των ενζύμων, και για αυτό το λόγο δε θα σχολιαστεί στη συγκεκριμένη παράγραφο.

Όπως φαίνεται στον πίνακα 38, οι υδρολάσες που μελετήθηκαν παρουσίασαν δομικές αλλαγές ύστερα από την ακίνητοποίηση τους και στους δύο τύπους νανοϋλικών, κάτι το οποίο έχει αναφερθεί και για άλλους τύπους φορέων ακίνητοποίησης (Asuri et al. 2007, Cang-Rong and Pastorin 2009, Karajanagi et al. 2004, Serefoglou et al. 2008, Tziaila et al. 2010). Η περιεκτικότητα σε α -έλικα είναι ένας καλός δείκτης για τη σωστή αναδίπλωση του ενζύμου. Η απώλεια αυτού του στοιχείου δευτεροταγούς δομής συνήθως οδηγεί σε απώλεια της ενζυμικής δραστηριότητας, αν και η παρουσία της δεν εγγυάται τη δραστηριότητα του ενζύμου (Cang-Rong and Pastorin 2009). Η α -έλικα όλων των υδρολασών που ακίνητοποιήθηκαν και στους δύο τύπους νανοϋλικών αυξήθηκε σε σχέση με την α -έλικα που παρουσίαζαν σε λυοφυλιωμένη μορφή. Οι μόνες περιπτώσεις που παρατηρήθηκε μείωση της α -έλικας ήταν για τη μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση των λιπασών CalA και CalB. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι η μη ομοιοπολική ακίνητοποίηση βασίζεται σε υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ ενζύμων και νανοϋλικών. Η επώαση αυτή οδηγεί στη μείωση της α -έλικας των συγκεκριμένων λιπασών, όπως έχει αναφερθεί στην παράγραφο 10.4.2. Γενικότερα, η ομοιοπολική ακίνητοποίηση των ενζύμων οδηγεί σε αύξηση της α -έλικας σε σχέση με τη δομή της ελεύθερης μορφής του ενζύμου. Παραδείγματος χάριν, όταν η CalB ακίνητοποιήθηκε ομοιοπολικά στα νανοϋλικά παρουσίασε αύξηση της α -έλικας με επακόλουθη αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας (πίνακας 38), κάτι το οποίο έχει αναφερθεί για ένζυμα τα οποία έχουν ακίνητοποιηθεί και σε άλλους υδρόφοβους φορείς ακίνητοποίησης (Mena et al. 2008, Tziaila et al. 2010).

Πίνακας 38: Προσδιορισμός (%) της δευτεροταγούς δομής υδρολασών και ο συντελεστής συσχέτισης (*r*) των ακινητοποιημένων υδρολασών σε σχέση με την ελεύθερη μορφή τους, όπως υπολογίστηκαν ύστερα από ανάλυση της αμιδικής περιοχής I από φάσματα υπερύθρου.

Ένζυμο	Σκεύασμα	α-έλικα	β-πτυχώσεις	άλλη δομή	<i>r</i>
CalA	Λυοφυλιωμένο	25	35	40	-
	CNT-NCI	30	23	47	0.899
	CNT-CI	35	13	52	0.787
	Γραφίτης-NCI	22	40	38	0.985
	Γραφίτης-CI	26	14	60	0.924
CalB	Λυοφυλιωμένο	27	33	40	-
	CNT-NCI	20	42	38	0.933
	CNT-CI	36	19	45	0.956
	Γραφίτης-NCI	18	42	40	0.942
	Γραφίτης-CI	28	21	51	0.967
CrI	Λυοφυλιωμένο	29	25	46	-
	CNT-NCI	41	14	45	0.958
	CNT-CI	39	16	45	0.929
	Γραφίτης-NCI	29	19	52	0.947
	Γραφίτης-CI	28	14	58	0.931
Bs2	Λυοφυλιωμένο	22	30	48	-
	CNT-NCI	26	17	57	0.787
	CNT-CI	27	31	42	0.995
	Γραφίτης-NCI	31	26	43	0.989
	Γραφίτης-CI	30	22	48	0.982

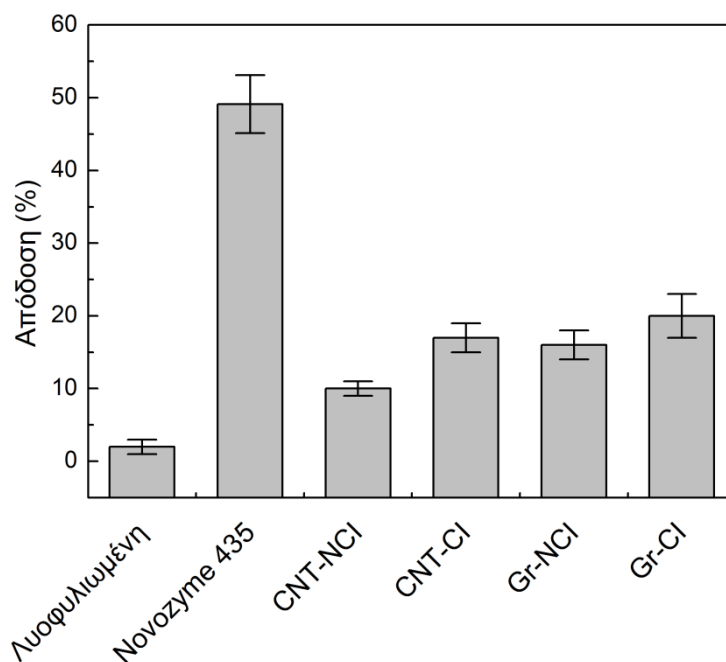
Όταν οι λιπάσες CalA και CalB ακινητοποιούνται σε γραφίτη η περιεκτικότητά τους σε α-έλικα δεν αυξάνεται σημαντικά, όπως συμβαίνει με τους νανοσωλήνες άνθρακα. Η χαμηλότερη αυτή περιεκτικότητα σε α-έλικα αποτυπώνεται στη δραστηριότητα των ακινητοποιημένων λιπασών, καθώς οι λιπάσες αυτές παρουσιάζουν αρκετά χαμηλότερη δραστηριότητα όταν ακινητοποιούνται σε Gr-NH σε σχέση με όταν ακινητοποιούνται σε CNT-NH (Παράγραφοι 11.4.2 και 11.4.3). Η διαφορετική επίδραση των νανοσωλήνων άνθρακα και του γραφίτη στη δραστηριότητα και δομή των ενζύμων μπορεί να συσχετισθεί με τις ειδικές αλληλεπιδράσεις των ενζύμων με τα νανοϋλικά, όπως αναπτύχθηκε στο προηγούμενο κεφάλαιο και σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα (Kim et al. 2008). Επιπλέον, η θετική επίδραση που έχει η χρήση των νανοσωλήνων άνθρακα θα μπορούσε να συσχετισθεί με την καμπυλότητα την οποία

παρουσιάζουν σε σχέση με το γραφίτη, όπως έχει αναφερθεί για την ακίνητοποίηση πρωτεϊνών σε νανοσωλήνες άνθρακα και σε γραφίτη (Asuri et al. 2006b, Mu et al. 2008). Συγκεκριμένα, η καμπυλότητα των νανοσωλήνων άνθρακα μπορεί να οδηγήσει σε μείωση των αλληλεπιδράσεων μεταξύ των γειτονικά ακίνητοποιημένων ενζυμικών μορίων, γεγονός το οποίο μπορεί να οδηγήσει στη σταθεροποίηση των ακίνητοποιημένων ενζύμων (Asuri et al. 2006b). Όμως, η αλληλεπίδραση πρωτεϊνών με τα νανοϋλικά εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη φύση του ενζύμου (Matsuura et al. 2006). Το γεγονός ότι η εστεράση Bs2 παρουσιάζει συνθετική δραστηριότητα μόνο όταν είναι ακίνητοποιημένη σε γραφίτη, μπορεί να συσχετισθεί με την αύξηση της α -έλικας στο πρωτεϊνικό μόριο, αλλά υποδεικνύει και την εξάρτηση της καταλυτικής συμπεριφοράς του ακίνητοποιημένου ενζύμου από τη φύση του ίδιου του ενζυμικού μορίου. Η Bs2 δεν παρουσιάζει αποδιάταξη κατά την ακίνητοποίηση σύμφωνα με τα δεδομένα του πίνακα 38, όμως δεν παρουσιάζει σχεδόν καθόλου δραστηριότητα. Έτσι, η έλλειψη δραστηριότητας πιθανόν να μην οφείλεται σε δομικές αλλαγές, αλλά στην αδυναμία κατάλυσης της συγκεκριμένης αντίδρασης, αφού η αντίδραση δεν καταλύεται ούτε από το λυοφυλιωμένο ένζυμο.

11.7 Εφαρμογή ακίνητοποιημένων λιπασών στην παραγωγή βιοντήζελ

Οι λιπάσες οι οποίες ακίνητοποιήθηκαν σε νανοϋλικά χρησιμοποιήθηκαν για να καταλύσουν την αντίδραση αλκοόλυσης της τριλαυρίνης από μεθανόλη σε *n*-εξάνιο, με σκοπό την παραγωγή μεθυλεστέρων λαυρικού οξέος. Η συγκεκριμένη αντίδραση, όπως αναφέρθηκε και στην παράγραφο 9.6, είναι πρότυπη αντίδραση για να ελεγχθεί το κατά πόσο οι ακίνητοποιημένες σε νανοϋλικά λιπάσες είναι ικανές να καταλύσουν την παραγωγή βιοντήζελ σε συστήματα με αυξημένη συγκέντρωση μεθανόλης. Στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν οι λιπάσες CalA, CalB και Crl ακίνητοποιημένες σε νανοσωλήνες άνθρακα και τροποποιημένο γραφίτη μέσω ομοιοπολικής πρόσδεσης ή φυσικής προσρόφησης.

Όπως φαίνεται στην εικόνα 87, η ακίνητοποιημένη λιπάση CalB παρουσίασε δραστηριότητα και στα 4 σκευάσματα που παρασκευάστηκαν στο εργαστήριο. Η ομοιοπολική ακίνητοποίηση φαίνεται να σταθεροποιεί το ένζυμο και να οδηγεί σε αυξημένη δραστηριότητα σε σχέση με τις λιπάσες που ακίνητοποιήθηκαν μη ομοιοπολικά. Σημαντικό είναι το γεγονός πως η δραστηριότητα της λιπάσης όταν ακίνητοποιείται σε τροποποιημένο γραφίτη είναι συγκρίσιμη με τη δραστηριότητα όταν ως φορέας ακίνητοποίησης χρησιμοποιούνται οι νανοσωλήνες άνθρακα, αν και στην παράγραφο 11.4.3 είχε παρατηρηθεί σημαντικότερα χαμηλότερη δραστηριότητα. Καθώς η συγκεκριμένη αντίδραση καταλύεται σε αυξημένη θερμοκρασία (50 °C) παρουσία μεθανόλης για αρκετές μέρες, σημαντικό ρόλο στην απόδοση παίζει η σταθερότητα του ενζύμου. Η δραστηριότητα της ακίνητοποιημένης CalB σε νανοϋλικά είναι αρκετά χαμηλότερη από αυτή του εμπορικού σκευάσματος ακίνητοποιημένης CalB (Novozyme 435), αλλά βελτιωμένη σε σχέση με τη δραστηριότητα που επιδεικνύει όταν ακίνητοποιείται σε οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων ιοντικού υγρού (εικόνα 61).



Εικόνα 87: Απόδοση της αντίδρασης παραγωγής μεθυλεστέρων από τριλαυρίνη χρησιμοποιώντας διάφορα ακίνητοποιημένα σκευάσματα της λιπάσης CalB σε η-εξάνιο στους 50 °C.

Αντίθετα με τη λιπάση CalB, η λιπάση ClI δεν παρουσίασε δραστικότητα ύστερα από την ακίνητοποίηση σε νανοϋλικά. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί πως η συγκεκριμένη λιπάση παρουσιάζει χαμηλή απόδοση παραγωγής βιοντίζελ λόγω της χαμηλής σταθερότητας της (Lee et al. 2006, Tongboriboon et al. 2010). Παρόλα αυτά χρησιμοποιείται σε μείγματα λιπασών για τη παραγωγή βιοντίζελ γιατί μπορεί να καταλύσει τη μετεστεροποίηση στη θέση 2 του τριγλυκεριδίου.

Αν και η λιπάση CalA μπορεί να καταλύσει την εστεροποίηση τριτοταγών αλκοολών (Kirk and Christensen 2002), δεν έχει αναφερθεί έως σήμερα η χρήση της για τη παραγωγή βιοντίζελ. Η συγκεκριμένη λιπάση παρουσίασε δραστικότητα ύστερα από ακίνητοποίηση σε νανοσωλήνες άνθρακα (έως 15 % απόδοση ύστερα από 21 μέρες), ενώ όταν ακίνητοποιήθηκε σε τροποποιημένο γραφίτη δεν παρουσίασε δραστικότητα.

12 Συμπεράσματα

Στην παρούσα διατριβή μελετήθηκε η καταλυτική συμπεριφορά υδρολυτικών ενζύμων σε συστήματα οργανωμένων νανοδομών καθώς και η σχέση δομής και λειτουργίας τους σε αυτά τα συστήματα. Τα συστήματα τα οποία παρουσιάζουν σημαντικό ερευνητικό ενδιαφέρον και επιλέχθηκαν προς μελέτη είναι ένα μικροετερογενές σύστημα μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό και τα νανοδομημένα υλικά με βάση τον άνθρακα. Τα μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό $[bmim]PF_6$ μπορούν να σχηματιστούν παρουσία μη ιοντικών επιφανειοενεργών ενώσεων (όπως το Tween 20 ή το Triton X-100) και παρουσιάζουν υδατικές νανοδιασπορές σε μία συνεχή φάση του ιοντικού υγρού. Το ένζυμο μπορεί να εγκλωβιστεί σε αυτές τις νανοδιασπορές και να επιδείξει καταλυτική δραστικότητα. Όσον αφορά τα νανοδομημένα υλικά, τα τελευταία χρόνια αναφέρεται όλο και συχνότερα η χρήση τους ως φορέας ακινητοποίησης ενζύμων λόγω των μοναδικών τους ιδιοτήτων, όπως η αυξημένη ενεργή επιφάνεια τους και η βιοσυμβατότητά τους, οδηγώντας στη δημιουργία καινοτόμων βιοϋλικών με σημαντικές βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Η κατανόηση της σχέσης δομής και λειτουργίας των υδρολυτικών ενζύμων στα συστήματα οργανωμένων νανοδομών θα οδηγήσει σε ορθολογικό σχεδιασμό βιοκαταλυτικών διεργασιών, συμβάλλοντας με αυτό τον τρόπο στην ανάπτυξη του τομέα της νανοβιοκατάλυσης.

Το αυξημένο ερευνητικό ενδιαφέρον για τα νανοδομημένα συστήματα μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών αποτυπώνεται στο γεγονός πως αρκετά σύντομα μετά την πρώτη αναφορά δημιουργίας τέτοιων συστημάτων (Gao et al. 2004) δημοσιεύτηκαν εργασίες ανασκόπησης του πεδίου (Qiu and Texter 2008), καθώς και μελέτες της χρήσης τους ως μέσα για βιοκαταλυτικές διεργασίες (Zhang et al. 2008). Το ενδιαφέρον που παρουσιάζει η αξιοποίηση των ιοντικών υγρών για το σχηματισμό τέτοιων συστημάτων εντοπίζεται στην ανάγκη χρήσης περισσότερο περιβαλλοντικά φιλικών μέσων για την πραγματοποίηση βιοκαταλυτικών διεργασιών. Τα ιοντικά υγρά χαρακτηρίζονται ως «πράσινοι διαλύτες» και αντικαταστάτες των οργανικών διαλυτών λόγω του ότι είναι μη πτητικά μέσα, χαμηλής τοξικότητας και υψηλής θερμικής και χημικής σταθερότητας. Η χρήση τους σε ένα σύστημα μικρογαλακτωμάτων συνδυάζει τα πλεονεκτήματα της χρήσης μικροετερογενών συστημάτων και των ιοντικών υγρών. Με βάση τα παραπάνω, μελετήθηκε η καταλυτική συμπεριφορά των μικροβιακών λιπασών από *Candida rugosa*, *Chromobacterium viscosum*, *Rhizomucor miehei*, *Thermomyces lanuginosa* και της λιπάσης B από *Pseudozyma antarctica* μετά τον εγκλωβισμό τους σε μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό $[bmim]PF_6$. Οι λιπάσες παρουσίασαν αυξημένη συνθετική δραστικότητα στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό που σχηματίζονται παρουσία Tween 20 σε σχέση με τη δραστικότητα που επιδεικνύουν στο ιοντικό υγρό $[bmim]PF_6$, αλλά και ως προς τα ευρέως χρησιμοποιούμενα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο. Τα συστήματα οργανωμένων νανοδομών νερού στο ιοντικό υγρό είναι καταλληλότερα μέσα για βιοκαταλυτικές διεργασίες σε σχέση με τα δισυνεχή συστήματα, τα οποία αποτελούν μείγματα των ίδιων συστατικών χωρίς συγκεκριμένη δομή. Καθίσταται σαφές λοιπόν πως οι οργανωμένες νανοδομές

των μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό παρουσιάζουν θετική επίδραση στις καταλυτικές ιδιότητες των λιπασών που εγκλωβίζονται σε αυτά.

Ο βαθμός ενυδάτωσης των μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών επηρεάζει σημαντικά την ενεργότητα των ενζύμων που εγκλωβίζονται σε αυτά. Οι λιπάσες παρουσιάζουν αύξηση της δραστηριότητας τους σε περισσότερο άνυδρα συστήματα, συμπεριφορά η οποία είναι τυπική για τα συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο (Stamatis et al. 1999). Παρόλα αυτά ο βαθμός ενυδάτωσης στον οποίο παρουσιάζεται η μέγιστη δραστηριότητα επηρεάζεται από τη σύσταση του μικρογαλακτώματος στο οποίο γίνεται η μελέτη. Επιπλέον, η αντικατάσταση του Tween 20 από το επίσης μη ιοντικό επιφανειοενεργό Triton X-100 οδηγεί σε σημαντικότερα χαμηλότερη καταλυτική δραστηριότητα των λιπασών. Οι μελέτες της καταλυτικής δραστηριότητας των λιπασών στα μικρογαλακτώματα ιοντικών υγρών κατέδειξαν ότι η αυξημένη ενεργότητα δεν σχετίζεται αποκλειστικά με κάποιο συστατικό τους, αλλά με τις οργανωμένες νανοδομές τις οποίες δημιουργούνται σε αυτά τα συστήματα, ανάλογα με τη σύσταση των μικρογαλακτωμάτων. Σε συγκεκριμένα συστήματα δημιουργούνται οι κατάλληλες συνθήκες για το κάθε ένζυμο ώστε να επιδείξει τη βέλτιστη δραστηριότητα του. Πέρα από αυτές τις συνθήκες, η καταλυτική ενεργότητα των λιπασών μπορεί να μειωθεί έως και 80 %. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν πως σημαντικότερος παράγοντας είναι η σύσταση του μικρογαλακτώματος από τις επιμέρους συγκεντρώσεις των συστατικών, κάτι το οποίο σχετίζεται με τις οργανωμένες νανοδομές που δημιουργούνται σε αυτά τα συστήματα.

Η αυξημένη καταλυτική δραστηριότητα των λιπασών στα μικρογαλακτώματα ιοντικών υγρών μπορεί να αποδοθεί στην αυξημένη σταθερότητα τους σε αυτά τα συστήματα ή ακόμα και στην ενεργοποίησή τους. Οι λιπάσες στα μικρογαλακτώματα ιοντικών υγρών παρουσιάζουν σημαντικά αυξημένη θερμική σταθερότητα σε σχέση με τη σταθερότητα σε υδατικό διάλυμα ή ακόμα και σε μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο, ιδιαίτερα σε υψηλές θερμοκρασίες. Η πολύ καλή προσαρμογή του μοντέλου απενεργοποίησης δύο σταδίων στα πειραματικά αποτελέσματα υποδεικνύει την ύπαρξη μίας ενδιάμεσης κατάστασης του ενζύμου η οποία στα περισσότερα μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού που μελετήθηκαν παρουσιάζει αυξημένη δραστηριότητα (έως και 200 %) σε σχέση με την αρχική κατάσταση. Παρόλα αυτά, η σταθερότητα των λιπασών στα μικρογαλακτώματα ιοντικών υγρών επηρεάζεται σημαντικά από τη σύσταση των συστημάτων αυτών.

Η ενδιαφέρουσα καταλυτική συμπεριφορά των λιπασών στα μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού συσχετίζεται με ορισμένες δομικές αλλαγές που παρατηρούνται κατά τον εγκλωβισμό τους στα νέα αυτά συστήματα. Χρησιμοποιώντας φασματοσκοπικές τεχνικές όπως η φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού και η φασματοσκοπία υπεριώθρου αποδείχθηκε ότι η αυξημένη σταθερότητα που επιδεικνύουν οι λιπάσες στα μικρογαλακτώματα ιοντικών υγρών οφείλεται σε μία περισσότερο συμπαγή δομή που υιοθετούν σε αυτά τα συστήματα, η οποία διατηρεί τις α -έλικες του μορίου και αυξάνει την περιεκτικότητα σε β -πτυχωτές επιφάνειες. Η επίδραση που έχει η σύσταση του μικρογαλακτώματος στην καταλυτική συμπεριφορά των

ενζύμων, κυρίως στη σταθερότητα, αποτυπώνεται στις δομικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα στο ενζυμικό μόριο όταν εγκλωβίζεται σε μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού διαφορετικής σύστασης. Η μείωση της σταθερότητας των λιπασών σε συγκεκριμένα συστήματα οφείλεται στην απώλεια των α -ελίκων, κάτι το οποίο παρατηρείται και στα μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο που μελετήθηκαν, στα οποία οι λιπάσες παρουσίαζαν χαμηλή σταθερότητα.

Τα ένζυμα στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων είναι εγκλωβισμένα μέσα στις υδατικές νανοδιασπορές. Αν και θα μπορούσαν να θεωρηθούν ακινητοποιημένα, αφού εντοπίζονται σε συγκεκριμένες περιοχές του συστήματος, η ανάκτηση και επαναχρησιμοποίηση του βιοκαταλύτη δεν είναι εύκολα εφικτή. Η μη αναμιξιμότητα των συστατικών του συγκεκριμένου συστήματος με έναν μη πολικό οργανικό διαλύτη όπως το *n*-εξάνιο οδήγησε στην ανάπτυξη μιας αποτελεσματικής διαδικασίας για την απομόνωση των προϊόντων και την επαναχρησιμοποίηση των ενζύμων που έχουν εγκλωβιστεί σε αυτά τα συστήματα. Τα υδρόφοβα προϊόντα ύστερα από μία βιοκαταλυτική διεργασία εκχυλίζονται με *n*-εξάνιο, ενώ το ένζυμο παραμένει εγκλωβισμένο στα μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού και μπορεί να επαναχρησιμοποιηθεί. Η δραστηριότητα των λιπασών ύστερα από 10 χρήσεις παραμένει σε υψηλά επίπεδα. Για παράδειγμα, η λιπάση από *Thermomyces lanuginosa* διατηρεί 90 % της δραστηριότητας της ύστερα από 10 χρήσεις (30 ώρες συνολικού λειτουργικού χρόνου) στους 30 °C.

Με σκοπό την ευρύτερη εφαρμογή των λιπασών που εγκλωβίζονται σε μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού σε συστήματα που αποτελούνται και από άλλους διαλύτες, τα συγκεκριμένα συστήματα μπορούν να ακινητοποιηθούν σε πηκτώματα με τη χρήση της (υδροξυπροπυλο)μεθυλο κυτταρίνης (HPMC). Τα οργανοπηκτώματα των μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών παρουσιάζουν υψηλή δομική σταθερότητα, διατηρώντας τη δομή τους σε εύρος οργανικών διαλυτών (πολικών και μη πολικών) για αρκετές ημέρες, σε αντίθεση με τα οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο, των οποίων η δομή καταστρέφεται σε πολικούς διαλύτες όπως η ακετόνη (Delimitsou et al. 2002, Zoumprioti et al. 2006). Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής, οι λιπάσες που ακινητοποιήθηκαν σε οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών παρουσίασαν αυξημένη συνθετική δραστηριότητα σε σχέση με την ακινητοποίησή τους σε οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο και σε υδροπηκτώματα. Η βελτιωμένη αυτή καταλυτική δραστηριότητα παρατηρήθηκε σε πλήθος οργανικών διαλυτών και ιοντικών υγρών. Σημαντικό επίσης είναι το γεγονός ότι η θερμοσταθερότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων αυξάνεται έως και 25 φορές σε σχέση με τη σταθερότητα που επιδεικνύουν σε μικρογαλακτώματα νερού σε ιοντικό υγρό (~150 φορές σε σχέση με τη σταθερότητα σε υδατικό διάλυμα), επιτρέποντας τη χρήση των λιπασών σε βιοκαταλυτικές διεργασίες που απαιτούν υψηλές θερμοκρασίες. Ενδεικτικά αναφέρεται πως η λιπάση CalB ακινητοποιημένη σε οργανοπηκτώματα μικρογαλακτώματος ιοντικού υγρού παρουσιάζει παρόμοια σταθερότητα με το ευρέως χρησιμοποιούμενο εμπορικό σκεύασμα Novozyme 435 (ακινητοποιημένη CalB) στους 90 °C σε [bmim]PF₆. Και τα δύο ακινητοποιημένα σκευάσματα διατηρούν περίπου το 50 % της αρχικής της δραστηριότητας

ύστερα από μία ώρα. Η σταθερότητα των ακινητοποιημένων λιπασών μπορεί να βελτιωθεί ακόμα περισσότερο με τη τροποποίηση των οργανοπηκτωμάτων με υποκατεστημένα σιλάνια. Μελέτες που έγιναν με διάφορα υποκατεστημένα σιλάνια κατέδειξαν ότι ο βαθμός υποκατάστασης τους επηρεάζει τη θερμική σταθερότητα των λιπασών που εξετάστηκαν στη παρούσα διατριβή, παρουσιάζοντας καλύτερη σταθεροποιητική δράση όταν η ομάδα υποκατάστασης έχει μικρότερη αλκυλική αλυσίδα. Αντίθετα, η παρουσία μικρότερων υποκαταστατών στο μόριο του σιλανίου συνήθως έχει αρνητική επίδραση στη καταλυτική συμπεριφορά του ενζύμου, κάτι το οποίο φαίνεται να σχετίζεται με το μέγεθος των πόρων στο δίκτυο που δημιουργούν τα σιλάνια με τον πολυμερισμό τους.

Η αυξημένη σταθερότητα των ακινητοποιημένων λιπασών στα οργανοπηκτώματα μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών οφείλεται στην υιοθέτηση μίας περισσότερο συμπαγούς δομής, όπως αναφέρθηκε και για τα μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού. Θα πρέπει να σημειωθεί πως παρόλο που παρατηρήθηκαν σημαντικές δομικές αλλαγές τόσο κατά τον εγκλωβισμό των λιπασών στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών, όσο και κατά την ακινητοποίηση τους στα αντίστοιχα οργανοπηκτώματα, οι λιπάσες όχι μόνο διατήρησαν την καταλυτική τους δραστηριότητα, αλλά βελτίωσαν και τα καταλυτικά τους χαρακτηριστικά (π.χ. σταθερότητα). Καθώς ο φυσιολογικός τους ρόλος επιβάλλει τη δράση τους σε συστήματα με μεσεπιφάνειες, είναι πιθανόν τα συστήματα μικρογαλακτωμάτων ιοντικών υγρών να παρέχουν ένα μικροπεριβάλλον το οποίο να προσομοιώνει καλύτερα το φυσικό μικροπεριβάλλον αυτών των ενζύμων, σε σχέση με το υδατικό διάλυμα, και συνεπώς η αλλαγμένη δομή του ενζύμου που παρατηρείται σε αυτά τα συστήματα να είναι πιο κοντά στη δομή των λιπασών στα συστήματα στα οποία δρα στη φύση.

Η ακινητοποίηση των λιπασών στα οργανοπηκτώματα καθιστά εφικτή την επαναχρησιμοποίηση των βιοκαταλυτών σε διάφορα μέσα, καθώς η ανάκτηση του ακινητοποιημένου βιοκαταλύτη διευκολύνεται σημαντικά. Η αυξημένη θερμική σταθερότητα των λιπασών στα συγκεκριμένα οργανοπηκτώματα μαζί με το φυσικό εγκλωβισμό των ενζύμων στο δίκτυο του βιοπολυμερούς οδηγεί σε πολύ ενδιαφέροντα αποτελέσματα κατά την επαναχρησιμοποίηση των ακινητοποιημένων ενζύμων. Συγκεκριμένα, ύστερα από 10 χρήσεις (30 ώρες λειτουργικού χρόνου) στους 50 °C οι λιπάσες CnI και CalB διατήρησαν πάνω από 50 % της αρχικής τους δραστηριότητας.

Τα νανοδομημένα υλικά με βάση τον άνθρακα είναι σχετικά νέα υλικά τα οποία έχουν προταθεί ως φορείς ακινητοποίησης λόγω των μοναδικών τους ιδιοτήτων όπως η αυξημένη ενεργή επιφάνεια και η βιοσυμβατότητά τους. Στη συγκεκριμένη διατριβή χρησιμοποιήθηκαν νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος (CNTs) και γραφίτης. Καθώς τα συγκεκριμένα υλικά είναι πολύ υδρόφοβα και δεν μπορούν να διασπαρθούν σε υδατικά διαλύματα αλλά και σε αρκετά οργανικά μέσα είναι απαραίτητη η χημική τροποποίηση των υλικών αυτών. Τα συγκεκριμένα νανοϋλικά οξειδώθηκαν ώστε να αυξηθεί ο υδρόφιλος χαρακτήρας τους μέσω της ένθεσης καρβοξυ-, υδροξυ- και εποξυ- ομάδων στην επιφάνεια τους. Με χημική τροποποίηση

πάνω σε αυτές τις ομάδες παρήχθησαν νανοϋλικά με μία κορεσμένη αλειφατική αλυσίδα, αλλά και με ελεύθερες αμινομάδες. Η επιτυχής χημική τροποποίηση των νανοϋλικών επιβεβαιώθηκε με τη χρήση φασματοσκοπικών τεχνικών, όπως η φασματοσκοπία υπερύθρου, Raman και XPS.

Στα τροποποιημένα νανοϋλικά ακινητοποιήθηκαν εστεράσες και λιπάσες, δύο κατηγορίες υδρολυτικών ενζύμων, με ομοιοπολική πρόσδεση και με φυσική προσρόφηση. Κατά τη μη ομοιοπολική ακινητοποίηση των ενζύμων στα νανοϋλικά σημαντικό ρόλο παίζουν οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, αλλά σε ορισμένο βαθμό επιδρούν και οι ηλεκτροστατικές. Η ομοιοπολική ακινητοποίηση βασίζεται στη διασύνδεση των ελεύθερων αμινομάδων που υπάρχουν στο νανοϋλικό και στην επιφάνεια του ενζύμου μέσω ενός μορίου «γέφυρας» όπως η γλουταραλδεΐδη. Για την προστασία των νανοϋλικών από τη μη ομοιοπολική ακινητοποίηση των ενζύμων χρησιμοποιείται το επιφανειενεργό Tween 20, το οποίο μειώνει τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Η ακινητοποίηση των υδρολασών έλαβε χώρα σε υδατικό διάλυμα, σε AOT μικρογαλακτώματα και σε μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού. Παρά τη βελτιωμένη διασπορά των υδρόφοβων νανοϋλικών στα συστήματα μικρογαλακτωμάτων, τη μεγαλύτερη καταλυτική δραστηριότητα παρουσίασε το ακινητοποιημένο ένζυμο που ακινητοποιήθηκε σε υδατικό διάλυμα. Η επιτυχής ακινητοποίηση των υδρολασών στα νανοϋλικά επιβεβαιώθηκε με μετρήσεις πρωτεϊνικής συγκέντρωσης και με αποτελέσματα της φασματοσκοπίας XPS. Ύστερα από βελτιστοποίηση του πρωτοκόλλου ακινητοποίησης βρέθηκε πως τα νανοϋλικά που χρησιμοποιήθηκαν μπορούν να φέρουν έως και 1.65 mg ενζύμου ανά mg νανοϋλικού. Το συγκεκριμένο ενζυμικό φορτίο είναι μεγαλύτερο από ότι έχει αναφερθεί έως σήμερα στη βιβλιογραφία και παρουσιάζει με εμφατικό τρόπο ένα από τα πλεονεκτήματα της ακινητοποίησης των ενζύμων σε νανοδομημένα υλικά. Το μοριακό βάρος του ενζυμικού μορίου, και συνεπώς οι μοριακές του διαστάσεις, επιδρούν στην απόδοση της ακινητοποίησης. Ένζυμα με μεγαλύτερο μοριακό βάρος παρουσίασαν μεγαλύτερη απόδοση ακινητοποίησης από τα μικρότερα, γεγονός το οποίο αποδίδεται στη μεγαλύτερη επιφάνεια των ενζύμων διαθέσιμη για την ανάπτυξη υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων με το μόριο. Πέρα όμως από το μοριακό βάρος του ενζύμου, σημαντική επίδραση στην ακινητοποίηση των ενζύμων στα νανοϋλικά παίζει η γεωμετρία των νανοϋλικών και οι λειτουργικές ομάδες τις οποίες φέρουν στην επιφάνεια τους. Μεγαλύτερη απόδοση ακινητοποίησης παρατηρήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκαν τροποποιημένοι νανοσωλήνες άνθρακα σε σχέση με τα αντίστοιχα παράγωγα του γραφίτη, κάτι το οποίο οφείλεται στην αυξημένη υδροφοβικότητα τους. Επιπλέον, και οι λειτουργικές ομάδες επηρεάζουν την ακινητοποίηση των ενζύμων. Τα υψηλότερα ποσοστά ακινητοποίησης παρατηρήθηκαν για τους οξειδωμένους νανοσωλήνες άνθρακα (CNT-COOH), κάτι το οποίο έχει συσχετισθεί στη βιβλιογραφία με την αναγνώριση του καρβοξυλίου από το ενεργό κέντρο των λιπασών (Shi et al. 2007). Η συγκεκριμένη υπόθεση υποστηρίζεται από το γεγονός ότι μεταξύ των τροποποιημένων νανοσωλήνων άνθρακα, στα συγκεκριμένα νανοϋλικά παρατηρήθηκε η χαμηλότερη δραστηριότητα των ακινητοποιημένων υδρολασών, υποδηλώνοντας πιθανή αναστολή λόγω των καρβοξυλομάδων της επιφάνειας του νανοϋλικού.

Η συνθετική δραστηριότητα των υδρολασών που ακινητοποιούνται σε νανοϋλικά αυξάνεται σημαντικά μετά την ακινητοποίηση, έως και 75 φορές σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο. Η αλληλεπίδραση των τροποποιημένων νανοσωλήνων άνθρακα με το ένζυμο είναι πιο ισχυρή από ότι με τα αντίστοιχα παράγωγα του γραφίτη, όπως υποδεικνύεται από τα αποτελέσματα της φασματοσκοπίας φθορισμού, οδηγώντας σε βιοϋλικά που παρουσιάζουν αυξημένη δραστηριότητα. Τα βιοϋλικά που παράγονται από την ακινητοποίηση ενζύμων σε νανοϋλικά μπορούν να απομονωθούν από το μέσο της αντίδρασης με φυγοκέντρηση και να επαναχρησιμοποιηθούν. Η ικανότητα επαναχρησιμοποίησης τους είναι πολύ καλή, αφού η ακινητοποιημένη λιπάση CalB διατηρεί πάνω από το 50 % της αρχικής δραστηριότητας της ύστερα από 5 κύκλους χρήσης (120 h συνολικού λειτουργικού χρόνου) στους 60 °C. Η ομοιοπολική ακινητοποίηση σταθεροποιεί σημαντικά το ένζυμο. Η λιπάση CalB που ακινητοποιήθηκε ομοιοπολικά σε CNT-NH διατηρεί πάνω από το 60% της αρχικής της δραστηριότητας ύστερα από 14 διαδοχικές χρήσεις (336 ώρες συνολικού λειτουργικού χρόνου) στους 60 °C, ενώ όταν ακινητοποιήθηκε μη ομοιοπολικά απώλεσε σχεδόν ολοκληρωτικά τη δραστηριότητα της ύστερα από 9 χρήσεις. Τα αποτελέσματα αυτά είναι σημαντικά βελτιωμένα σε σχέση με την ικανότητα επαναχρησιμοποίησης της ακινητοποιημένης λιπάσης CalB σε οργανοπηκτώματα, κυρίως λόγω της χρήσης των νανοϋλικών και της ομοιοπολικής πρόσδεσης του ενζύμου.

Οι αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται σε μοριακό επίπεδο μεταξύ του ενζύμου και του νανοϋλικού διαταράσσουν τη δομή των ενζύμων. Στην περίπτωση των λιπασών, οι δομικές αλλαγές παρατηρείται αύξηση των β-πτυχωτών επιφανειών η οποία συνάδει με τα δεδομένα της δομής των λιπασών στα μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού και στα οργανοπηκτώματα, υποδηλώνοντας την ύπαρξη μίας περισσότερο συμπαγούς δομής. Επίσης παρατηρήθηκε μικρή μείωση της α-έλικας η οποία όμως δεν οδηγεί σε απώλεια της ενζυμικής δραστηριότητας. Αντίθετα, σε αρκετές περιπτώσεις οι λιπάσες επέδειξαν ενεργοποίηση έως και 120 % παρουσία των νανοϋλικών, κάτι το οποίο είναι πιθανόν να σχετίζεται με το φυσιολογικό τους ρόλο και τη μεσεπιφανειακή ενεργοποίηση, καθώς τα νανοδομημένα υλικά παρουσιάζουν εκτεταμένες υδρόφοβες επιφάνειες. Φαίνεται λοιπόν πως όταν οι λιπάσες εντοπίζονται σε συστήματα οργανωμένων νανοδομών που φέρουν κάποια υδρόφοβη επιφάνεια (είτε είναι κάποιο νανοϋλικό, είτε μικρογαλάκτωμα) παρουσιάζουν βελτιωμένη καταλυτική συμπεριφορά μέσω συγκεκριμένων δομικών αλλαγών. Αντίθετα, η αλληλεπίδραση της εστεράσης Bs2 με τα νανοϋλικά οδηγεί σε σημαντική μείωση της περιεκτικότητας της δομής της σε α-έλικα, η οποία σχετίζεται άμεσα με τη μείωση της καταλυτικής δραστηριότητας του συγκεκριμένου ενζύμου σε αυτά τα συστήματα.

Κατά την ομοιοπολική ακινητοποίηση των υδρολυτικών ενζύμων στα τροποποιημένα νανοϋλικά η δομή των ενζύμων δεν διαταράσσεται, ενώ η φυσική προσρόφηση τους μέσω υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων οδηγεί σε εκτεταμένες αλλαγές. Συγκεκριμένα, σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρείται μείωση της α-έλικας κατά τη μη ομοιοπολική ακινητοποίηση η οποία συσχετίζεται με τη χαμηλότερη καταλυτική δραστηριότητα που επιδεικνύουν αυτά τα βιοϋλικά.

Η αύξηση της δραστηριότητας των λιπασών σε υδατικά διαλύματα νανοϋλικών δεν παρατηρήθηκε για τις εστεράσες, κάτι το οποίο πιθανόν να σχετίζεται με τη μεσεπιφανειακή ενεργοποίηση των λιπασών. Καθώς οι λιπάσες αλληλεπιδρούν με μία υδρόφοβη επιφάνεια όπως η επιφάνεια των νανοϋλικών, το καπάκι μετακινείται από το ενεργό κέντρο και περισσότερα ενζυμικά μόρια μεταβαίνουν στην ενεργή διαμόρφωση. Από αυτή την παρατήρηση, αλλά και από τις δομικές μελέτες καθίσταται σαφές πως η επίδραση των χαρακτηριστικών του νανοϋλικού (π.χ. γεωμετρία, λειτουργικές ομάδες, υδροφοβικότητα) στη καταλυτική συμπεριφορά των ενζύμων εξαρτάται σημαντικά και από τον τύπο του ενζύμου που μελετάται. Παρόλα αυτά, για όλα τα ένζυμα που μελετήθηκαν βρέθηκε πως η επίδραση των νανοϋλικών στη καταλυτική δραστηριότητα των ενζύμων σε ένα υδατικό διάλυμα εξαρτάται από τη γεωμετρία του νανοϋλικού και τις λειτουργικές ομάδες. Για παράδειγμα, η εστεράση Bs2 απενεργοποιείται παρουσία οξειδωμένων νανοϋλικών, ενώ όταν τα ίδια νανοϋλικά τροποποιηθούν περαιτέρω με εξαμεθυλοδιαμίνη, η δραστηριότητα του ενζύμου παραμένει σε υψηλά επίπεδα. Αντίστοιχη θετική επίδραση της παρουσίας της εξαμεθυλοδιαμίνης στην επιφάνεια των νανοϋλικών παρατηρήθηκε και για τη θερμική σταθερότητα των υδρολασών.

Τα συστήματα οργανωμένων νανοδομών που αναπτύχθηκαν στην παρούσα εργασία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη εφαρμοσμένων βιοκαταλυτικών διεργασιών, όπως η τροποποίηση φυσικών βιοδραστικών ενώσεων και η παραγωγή βιοντήζελ. Οι λιπάσες στα μικρογαλακτώματα ιοντικών υγρών μπορούν να καταλύσουν την εστεροποίηση βιοδραστικών ενώσεων, όπως φαινολικά οξέα και λιποϊκό οξύ, αν και η απόδοση εξαρτάται σημαντικά από τη δομή του υποστρώματος. Οι λιπάσες παρουσίασαν αυξημένη δραστηριότητα στην τροποποίηση του βινυλεστέρα του κινναμωμικού οξέος σε μικρογαλακτώματα ιοντικού υγρού σε σχέση με μικρογαλακτώματα νερού σε έλαιο, ενώ παρουσίασαν χαμηλότερες αποδόσεις στην τροποποίηση του λιποϊκού οξέος. Οι ακινητοποιημένες λιπάσες (στα οργανοηκτώματα και στα νανοϋλικά) χρησιμοποιήθηκαν για τη μετεστεροποίηση της τριλαυρίνης με μεθανόλη, μίας αντίδρασης που χρησιμοποιείται ως πρότυπο για τη παραγωγή βιοντήζελ. Οι ακινητοποιημένη λιπάση CalB παρουσίασε αυξημένη δραστηριότητα σε σχέση με την ελεύθερη λιπάση. Ικανότητα κατάλυσης της συγκεκριμένης αντίδρασης παρουσίασε και η CalA όταν ακινητοποιήθηκε σε νανοϋλικά.

Τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής καταδεικνύουν τη σημασία της νανοτεχνολογίας στη βιοκατάλυση και ιδιαίτερα στο νέο πεδίο της νανοβιοκατάλυσης. Τα συστήματα οργανωμένων νανοδομών βελτιώνουν σημαντικά την καταλυτική δράση των υδρολυτικών ενζύμων, οδηγώντας σε νέα βιοκαταλυτικά συστήματα με ενδιαφέρουσες ιδιότητες. Επιπλέον, τα συγκεκριμένα συστήματα που αναπτύχθηκαν στην παρούσα διατριβή συνάδουν με τις επιταγές της πράσινης χημείας, αφού τα ιοντικά υγρά, η HPMC και τα τροποποιημένα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα παρουσιάζουν χαμηλή τοξικότητα και υψηλή βιοσυμβατότητα.

Τα συστήματα που αναπτύχθηκαν στην παρούσα διατριβή θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε διάφορες βιοκαταλυτικές διεργασίες, όπως η παραγωγή υβριδικών αντιοξειδωτικών ενώσεων, η παραγωγή βιοντήζελ από χρησιμοποιημένα έλαια και η βιοαποικοδόμηση πετρελαϊκών ρύπων. Σημαντικό όμως, πέρα από το εφαρμοσμένο κομμάτι της έρευνας, είναι να μελετηθεί η ακινητοποίηση και άλλων ενζύμων που παρουσιάζουν βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον σε αυτά τα συστήματα, όπως οι οξειδοαναγωγάσες (π.χ. μονοξυγενάσες), ένζυμα τα οποία τα τελευταία χρόνια κερδίζουν έδαφος στις βιομηχανικές εφαρμογές. Η δυνατότητα τροποποίησης των ιδιοτήτων των ιοντικών υγρών (μέσω της αλλαγής της φύσης των ιόντων τους), όσο και των νανοϋλικών (μέσω της τροποποίησης της επιφάνειάς τους) επιτρέπει τον ορθολογικό έλεγχο του μικροπεριβάλλοντος των ενζύμων και κατά συνέπεια τον έλεγχο και τη βελτιστοποίηση των καταλυτικών τους ιδιοτήτων.

13 Βιβλιογραφία

- Adamczak M., Bornscheuer U.T., Bednarski W.** (2009) The application of biotechnological methods for the synthesis of biodiesel. *European Journal of Lipid Science and Technology* 111(8):800-813.
- Agúí L., Yáñez-Sedeño P., Pingarrón J.M.** (2008) Role of carbon nanotubes in electroanalytical chemistry. A review. *Analytica Chimica Acta* 622(1-2):11-47.
- Ahuja T., Kumar D., Singh N., Biradar A.M., Rajesh** (2011) Potentiometric urea biosensor based on multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs)/silica composite material. *Materials Science and Engineering C* 31(2):90-94.
- Ajayan P.M., Tour J.M.** (2007) Materials science: Nanotube composites. *Nature* 447(7148):1066-1068.
- Alamed J., Chaiyasit W., McClements D.J., Decker E.A.** (2009) Relationships between free radical scavenging and antioxidant activity in foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 57(7):2969-2976.
- Anderson E.M., Larsson K.M., Kirk O.** (1998) One biocatalyst - many applications: The use of *Candida antarctica* B lipase in organic synthesis. *Biocatalysis and Biotransformation* 16(3):181-204.
- Andrade M.A., Chacon P., Merelo J.J., Moran F.** (1993) Evaluation of secondary structure of proteins from UV circular dichroism spectra using an unsupervised learning neural network. *Protein Engineering* 6(4):383-390.
- Anthonsen H.W., Baptista A., Drabløs F., Martel P., Petersen S.B., Sebastião M., Vaz L.** (1995) Lipases and esterases: a review of their sequences, structure and evolution. *Biotechnology Annual Review* 1:315-371.
- Antunes E.F., Lobo A.O., Corat E.J., Trava-Airoldi V.J., Martin A.A., Veríssimo C.** (2006) Comparative study of first- and second-order Raman spectra of MWCNT at visible and infrared laser excitation. *Carbon* 44(11):2202-2211.
- Arrondo J.L.R., Goñi F.M.** (1999) Structure and dynamics of membrane proteins as studied by infrared spectroscopy. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 72(4):367-405.
- Arrondo J.L.R., Muga A., Castresana J., Goñi F.M.** (1993) Quantitative studies of the structure of proteins in solution by fourier-transform infrared spectroscopy. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 59(1):23-56.
- Arya S.K., Datta M., Malhotra B.D.** (2008) Recent advances in cholesterol biosensor. *Biosensors and Bioelectronics* 23(7):1083-1100.
- Asuri P., Bale S.S., Pangule R.C., Shah D.A., Kane R.S., Dordick J.S.** (2007) Structure, function, and stability of enzymes covalently attached to single-walled carbon nanotubes. *Langmuir* 23(24):12318-12321.
- Asuri P., Karajanagi S.S., Sellitto E., Kim D.Y., Kane R.S., Dordick J.S.** (2006a) Water-soluble carbon nanotube-enzyme conjugates as functional biocatalytic formulations. *Biotechnology and Bioengineering* 95(5):804-811.
- Asuri P., Karajanagi S.S., Yang H., Yim T.J., Kane R.S., Dordick J.S.** (2006b) Increasing protein stability through control of the nanoscale environment. *Langmuir* 22(13):5833-5836.
- Atkinson P.J., Robinson B.H., Howe A.M., Heenan R.K.** (1991) Structure and stability of microemulsion-based organo-gels. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions* 87(20):3389-3397.

- Avramiotis S., Stamatis H., Kolisis F.N., Lianos P., Xenakis A.** (1996) Structural studies of lecithin- and AOT-based water-in-oil microemulsions in the presence of lipase. *Langmuir* 12(26):6320-6325.
- Ayyagari M.S., John V.T.** (1995) Substrate-induced stability of the lipase from *Candida cylindracea* in reversed micelles. *Biotechnology Letters* 17(2):177-182.
- Azamian B.R., Davis J.J., Coleman K.S., Bagshaw C.B., Green M.L.H.** (2002) Bioelectrochemical single-walled carbon nanotubes. *Journal of the American Chemical Society* 124(43):12664-12665.
- Babu S.S., Möhwald H., Nakanishi T.** (2010) Recent progress in morphology control of supramolecular fullerene assemblies and its applications. *Chemical Society Reviews* 39(11):4021-4035.
- Backlund S., Eriksson F., Hedström G., Laine A., Rantala M.** (1996) Lipase-catalyzed enantioselective esterifications using different microemulsion-based gels. *Colloid and Polymer Science* 274(6):540-547.
- Bacon R.** (1960) Growth, structure, and properties of graphite whiskers. *Journal of Applied Physics* 31(2):283-290.
- Baddour C.E., Briens C.** (2005) Carbon nanotube synthesis: A review. *International Journal of Chemical Reactor Engineering* 3.
- Barbaric S., Luisi P.L.** (1981) Micellar solubilization of biopolymers in organic solvents. 5. Activity and conformation of α -chymotrypsin in isooctane-AOT reverse micelles. *Journal of the American Chemical Society* 103(14):4239-4244.
- Barros R.J., Moura-Pinto P.G., Franssen M.C., Janssen A.E., de Groot A.** (1994) Regioselectivity and fatty acid specificity of *Chromobacterium viscosum* lipase. *Bioorganic & medicinal chemistry* 2(7):707-713.
- Barth A.** (2007) Infrared spectroscopy of proteins. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1767(9):1073-1101.
- Barth A., Zscherp C.** (2002) What vibrations tell us about proteins. *Quarterly Reviews of Biophysics* 35(4):369-430.
- Benne D., Maccallini E., Rudolf P., Sooambar C., Prato M.** (2006) X-ray photoemission spectroscopy study on the effects of functionalization in fulleropyrrolidine and pyrrolidine derivatives. *Carbon* 44(14):2896-2903.
- Berova N., Nakanishi K., Woody R., editors** (2007) Circular dichroism: principles and applications. 2nd ed. New York, U.S.A.: Wiley-VCH.
- Bethune D.S., Kiang C.H., De Vries M.S., Gorman G., Savoy R., Vazquez J., Beyers R.** (1993) Cobalt-catalysed growth of carbon nanotubes with single-atomic-layer walls. *Nature* 363(6430):605-607.
- Bhattacharyya K., Bagchi B.** (2000) Slow dynamics of constrained water in complex geometries. *Journal of Physical Chemistry A* 104(46):10603-10613.
- Bianco A., Kostarelos K., Partidos C.D., Prato M.** (2005) Biomedical applications of functionalised carbon nanotubes. *Chemical Communications*(5):571-577.
- Biswas R., Das A.R., Pradhan T., Touraud D., Kunz W., Mahiuddin S.** (2008) Spectroscopic studies of cationic reverse microemulsion: Correlation with the superactivity of horseradish peroxidase enzyme in a restricted environment. *Journal of Physical Chemistry B* 112(21):6620-6628.
- Blattner C., Zoupanioti M., Kröner J., Schmeer G., Xenakis A., Kunz W.** (2006) Biocatalysis using lipase encapsulated in microemulsion-based organogels in supercritical carbon dioxide. *Journal of Supercritical Fluids* 36:182-193.

- Blauer G., Sreerama N., Woody R.W.** (1993) Optical activity of hemoproteins in the solet region. Circular dichroism of the heme undecapeptide of cytochrome c in aqueous solution. *Biochemistry* 32(26):6674-6679.
- Boland S., Jenkins P., Kavanagh P., Leech D.** (2009) Biocatalytic fuel cells: A comparison of surface pre-treatments for anchoring biocatalytic redox films on electrode surfaces. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 626(1-2):111-115.
- Bommarius A.S., Broering J.M., Chaparro-Riggers J.F., Polizzi K.M.** (2006) High-throughput screening for enhanced protein stability. *Current Opinion in Biotechnology* 17(6):606-610.
- Bommarius A.S., Riebel B.R.** (2004) Biocatalysis: Fundamental and applications. Weinheim: Wiley-VCH Verlag.
- Bonard J.M., Kind H., Stöckli T., Nilsson L.O.** (2001) Field emission from carbon nanotubes: The first five years. *Solid-State Electronics* 45(6):893-914.
- Bornscheuer U.T.** (2001) Directed evolution of enzymes for biocatalytic applications. *Biocatalysis and Biotransformation* 19(2):85-97.
- Bornscheuer U.T.** (2002a) Methods to increase enantioselectivity of lipases and esterases. *Current Opinion in Biotechnology* 13(6):543-547.
- Bornscheuer U.T.** (2002b) Microbial carboxyl esterases: Classification, properties and application in biocatalysis. *FEMS Microbiology Reviews* 26(1):73-81.
- Bornscheuer U.T.** (2003) Immobilizing enzymes: How to create more suitable biocatalysts. *Angewandte Chemie - International Edition* 42(29):3336-3337.
- Bornscheuer U.T., Bessler C., Srinivas R., Hari Krishna S.** (2002) Optimizing lipases and related enzymes for efficient application. *Trends in Biotechnology* 20(10):433-437.
- Bornscheuer U.T., Kazlauskas R.J.** (2004) Catalytic promiscuity in biocatalysis: Using old enzymes to form new bonds and follow new pathways. *Angewandte Chemie - International Edition* 43(45):6032-6040.
- Bosi S., Da Ros T., Spalluto G., Prato M.** (2003) Fullerene derivatives: An attractive tool for biological applications. *European Journal of Medicinal Chemistry* 38(11-12):913-923.
- Bosley J., Peilow A.** (2000) Immobilization of lipases for use in non-aqueous reaction systems. In: MN G, editor. *Methods in Nonaqueous Enzymology*. Basel: Birkhauser-Verlag. p 52-69.
- Bosley J.A., Clayton J.C.** (1994) Blueprint for a lipase support: Use of hydrophobic controlled-pore glasses as model systems. *Biotechnology and Bioengineering* 43(10):934-938.
- Bourlinos A.B., Gournis D., Petridis D., Szabó T., Szeri A., Dékány I.** (2003) Graphite oxide: Chemical reduction to graphite and surface modification with primary aliphatic amines and amino acids. *Langmuir* 19(15):6050-6055.
- Bradford M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochemistry* 72(1-2):248-254.
- Brady L., Brzozowski A.M., Derewenda Z.S., Dodson E., Dodson G., Tolley S., Turkenburg J.P., Christiansen L., Huge-Jensen B., Norskov L. and others** (1990) A serine protease triad forms the catalytic centre of a triacylglycerol lipase. *Nature* 343(6260):767-770.
- Brayner R.** (2006) Current approaches in natural biopolymer-nanoparticle hybrid functional materials: From drug delivery to bio-detection applications. *Frontiers in Drug Design & Discovery* 2(1):241-258.
- Breton J.** (2001) Fourier transform infrared spectroscopy of primary electron donors in type I photosynthetic reaction centers. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1507(1-3):180-193.

- Brockman H.L., Law J.H., Kezdy F.J.** (1973) Catalysis by adsorbed enzymes. The hydrolysis of tripropionin by pancreatic lipase adsorbed to siliconized glass beads. *Journal of Biological Chemistry* 248(14):4965-4970.
- Brown E.D., Yada R.Y., Marangoni A.G.** (1993) The dependence of the lipolytic activity of *Rhizopus arrhizus* lipase on surfactant concentration in Aerosol-OT/isooctane reverse micelles and its relationship to enzyme structure. *Biochimica et Biophysica Acta - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1161(1):66-72.
- Brzozowski A.M., Derewenda U., Derewenda Z.S., Dodson G.G., Lawson D.M., Turkenburg J.P., Bjorkling F., Høge-Jensen B., Patkar S.A., Thim L.** (1991) A model for interfacial activation in lipases from the structure of a fungal lipase-inhibitor complex. *Nature* 351(6326):491-494.
- Brzozowski A.M., Savage H., Verma C.S., Turkenburg J.P., Lawson D.M., Svendsen A., Patkar S.** (2000) Structural origins of the interfacial activation in *Thermomyces (Humicola) lanuginosa* lipase. *Biochemistry* 39(49):15071-15082.
- Burdock G.A.** (2007) Safety assessment of hydroxypropyl methylcellulose as a food ingredient. *Food and Chemical Toxicology* 45(12):2341-2351.
- Busto E., Gotor-Fernández V., Gotor V.** (2010) Hydrolases: Catalytically promiscuous enzymes for non-conventional reactions in organic synthesis. *Chemical Society Reviews* 39(11):4504-4523.
- Cai S., Singh B.R.** (1999) Identification of β -turn and random coil amide III infrared bands for secondary structure estimation of proteins. *Biophysical Chemistry* 80(1):7-20.
- Cang-Rong J.T., Pastorin G.** (2009) The influence of carbon nanotubes on enzyme activity and structure: Investigation of different immobilization procedures through enzyme kinetics and circular dichroism studies. *Nanotechnology* 20(25).
- Capek I.** (2009) Dispersions, novel nanomaterial sensors and nanoconjugates based on carbon nanotubes. *Advances in Colloid and Interface Science* 150(2):63-89.
- Capitani D., Segre A.L., Haering G., Luisi P.L.** (1988) Mobility measurements in microemulsion gels. *Journal of Physical Chemistry* 92(12):3500-3504.
- Capitani D., Segre A.L., Sparapani R., Giustini M., Scartazzini R., Luisi P.L.** (1991) Lecithin microemulsion gels: A NMR study of molecular mobility based on line widths. *Langmuir* 7(2):250-253.
- Carvalho C.M.L., Cabral J.M.S.** (2000) Reverse micelles as reaction media for lipases. *Biochimie* 82(11):1063-1085.
- Carvalho C.M.L., Cabral J.M.S., Aires-Barros M.R.** (1999) Cutinase stability in AOT reversed micelles: System optimization using the factorial design methodology. *Enzyme and Microbial Technology* 24(8-9):569-576.
- Céliz G., Daz M.** (2011) Biocatalytic preparation of alkyl esters of citrus flavanone glucoside prunin in organic media. *Process Biochemistry* 46(1):94-100.
- Chahinian H., Nini L., Boitard E., Dubès J.P., Comeau L.C., Sarda L.** (2002) Distinction between esterases and lipases: A kinetic study with vinyl esters and TAG. *Lipids* 37(7):653-662.
- Chamberlain T.W., del carmen Gimenez-Lopez M., Khlobystov A.N.** (2010) Carbon nanotubes as containers. In: Guldi DM, Martin N, editors. Carbon nanotubes and related structures: Synthesis, characterization, functionalization and applications. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag. p 349-384.
- Chang Q.L., Lee C.H., Parkin K.L.** (1999) Comparative selectivities of immobilized lipases from *Pseudomonas cepacia* and *Candida antarctica* (fraction B) for esterification reactions with glycerol and glycerol analogues in organic media. *Enzyme and Microbial Technology* 25(3-5):290-297.

- Chen B., Pernodet N., Rafailovich M.H., Bakhtina A., Gross R.A.** (2008) Protein immobilization on epoxy-activated thin polymer films: Effect of surface wettability and enzyme loading. *Langmuir* 24(23):13457-13464.
- Chen C.H., Chang H.W., Shih J.S.** (2007) Optical isomer piezoelectric crystal sensor for L-amino acid esters based on immobilized C60-lipase enzyme. *Sensors and Actuators, B: Chemical* 123(2):1025-1033.
- Chen Q., Ai S., Zhu X., Yin H., Ma Q., Qiu Y.** (2009) A nitrite biosensor based on the immobilization of cytochrome c on multi-walled carbon nanotubes-PAMAM-chitosan nanocomposite modified glass carbon electrode. *Biosensors and Bioelectronics* 24(10):2991-2996.
- Chen R.J., Bangsaruntip S., Drouvalakis K.A., Wong Shi Kam N., Shim M., Li Y., Kim W., Utz P.J., Dai H.** (2003) Noncovalent functionalization of carbon nanotubes for highly specific electronic biosensors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100(9):4984-4989.
- Chen R.J., Zhang Y., Wang D., Dai H.** (2001) Noncovalent sidewall functionalization of single-walled carbon nanotubes for protein immobilization. *Journal of the American Chemical Society* 123(16):3838-3839.
- Chittur K.K.** (1998) FTIR/ATR for protein adsorption to biomaterial surfaces. *Biomaterials* 19(4-5):357-369.
- Chuang C.W., Shih J.S.** (2001) Preparation and application of immobilized C60-glucose oxidase enzyme in fullerene C60-coated piezoelectric quartz crystal glucose sensor. *Sensors and Actuators, B: Chemical* 81(1):1-8.
- Cirillo G., Hampel S., Klingeler R., Puoci F., Iemma F., Curcio M., Parisi O.I., Spizzirri U.G., Picci N., Leonhardt A. and others** (2011) Antioxidant multi-walled carbon nanotubes by free radical grafting of gallic acid: New materials for biomedical applications. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 63(2):179-188.
- Clausse M., Nicolas-Morgantini L., Zrabda A., Touraud D.** (1987) Water/ionic surfactant/alcohol/hydrocarbon systems: influence of certain constitution and composition parameters upon the realms-of-existence and transport of microemulsion-type media. In: Rossano H, Clausse M, editors. *Microemulsion systems*. New York, U.S.A.: Marcel Dekker Inc. p 15-62.
- Clore G.M., Gronenborn A.M.** (1998) NMR structure determination of proteins and protein complexes larger than 20 kDa. *Current Opinion in Chemical Biology* 2(5):564-570.
- Cooper E.A., Knutson K.** (1995) Fourier transform infrared spectroscopy investigations of protein structure. *Pharmaceutical biotechnology* 7:101-143.
- Crooks G.E., Rees G.D., Robinson B.H., Svensson M., Stephenson G.R.** (1995a) Comparison of hydrolysis and esterification behavior of *Humicola lanuginosa* and *Rhizomucor miehei* lipases in AOT-stabilized water-in-oil microemulsions. 1. Effect of pH and water content on reaction kinetics. *Biotechnology and Bioengineering* 48(1):78-88.
- Crooks G.E., Rees G.D., Robinson B.H., Svensson M., Stephenson G.R.** (1995b) Comparison of hydrolysis and esterification behavior of *Humicola lanuginosa* and *Rhizomucor miehei* lipases in AOT stabilized water-in-oil microemulsions. 2. Effect of temperature on reaction kinetics and general considerations of stability and productivity. *Biotechnology and Bioengineering* 48(3):190-196.
- Cyglar M., Grochulski P., Kazlauskas R.J., Schrag J.D., Bouthillier F., Rubin B., Serreqi A.N., Gupta A.K.** (1994) A structural basis for the chiral preference of lipases. *Journal of the American Chemical Society* 116(8):3180-3186.
- D'Souza F., Rogers L.M., O'Dell E.S., Kochman A., Kutner W.** (2005) Immobilization and electrochemical redox behavior of cytochrome c on fullerene film-modified electrodes. *Bioelectrochemistry* 66(1-2 SPEC. ISS.):35-40.

- Da Graca Nascimento M., Rezende M.C., Vecchia R.D., De Jesus P.C., Aguiar L.M.Z.** (1992) Enzyme-catalyzed esterifications in microemulsion-based organogels. *Tetrahedron Letters* 33(40):5891-5894.
- Dai Z., Yan F., Yu H., Hu X., Ju H.** (2004) Novel amperometric immunosensor for rapid separation-free immunoassay of carcinoembryonic antigen. *Journal of Immunological Methods* 287(1-2):13-20.
- Dandavate V., Madamwar D.** (2008) Reusability of surfactant-coated *Candida rugosa* lipase immobilized in gelatin microemulsion-based organogels for ethyl isovalerate synthesis. *Journal of Microbiology and Biotechnology* 18(4):735-741.
- Danielsson I., Lindman B.** (1981) The definition of microemulsion. *Colloids and Surfaces* 3(4):391-392.
- Dave R., Madamwar D.** (2008) *Candida rugosa* lipase immobilized in Triton-X100 microemulsion based organogels (MBGs) for ester synthesis. *Process Biochemistry* 43(1):70-75.
- De Diego T., Lozano P., Gmouh S., Vaultier M., Iborra J.L.** (2005) Understanding structure - stability relationships of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids. *Biomacromolecules* 6(3):1457-1464.
- De Gennes P.G., Taupin C.** (1982) Microemulsions and the flexibility of oil/water interfaces. *Journal of Physical Chemistry* 86(13):2294-2304.
- De Heer W.A.** (2002) Carbon nanotubes: Structure and transport in nanotubes. *Nature Materials* 1(3):153-154.
- de los Rios A.P., Hernandez-Fernandez F.J., Tomas-Alonso F., Gomez D., Villora G.** (2008) Synthesis of esters in ionic liquids. The effect of vinyl esters and alcohols. *Process Biochemistry* 43(8):892-895.
- De Wildeman S.M.A., Sonke T., Schoemaker H.E., May O.** (2007) Biocatalytic reductions: From lab curiosity to "first choice". *Accounts of Chemical Research* 40(12):1260-1266.
- Dékány I., Krüger-Grasser R., Weiss A.** (1998) Selective liquid sorption properties of hydrophobized graphite oxide nanostructures. *Colloid & Polymer Science* 276(7):570-576.
- Deleage G., Geourjon C.** (1993) An interactive graphic program for calculating the secondary structure content of proteins from circular dichroism spectrum. *Computer Applications in the Biosciences* 9(2):197-199.
- Delimitsou C., Zoumpantioti M., Xenakis A., Stamatis H.** (2002) Activity and stability studies of *Mucor miehei* lipase immobilized in novel microemulsion-based organogels. *Biocatalysis and Biotransformation* 20(5):319-327.
- Destrée C., B.Nagy J.** (2006) Mechanism of formation of inorganic and organic nanoparticles from microemulsions. *Advances in Colloid and Interface Science* 123-126(SPEC. ISS.):353-367.
- Dey R.S., Raj C.R.** (2010) Development of an amperometric cholesterol biosensor based on graphene-Pt nanoparticle hybrid material. *Journal of Physical Chemistry C* 114(49):21427-21433.
- DiLeo R.A., Landi B.J., Raffaele R.P.** (2007) Purity assessment of multiwalled carbon nanotubes by Raman spectroscopy. *Journal of Applied Physics* 101(6).
- Ding J., Gao Q., Luo D., Shi Z.G., Feng Y.Q.** (2010) *n*-Octadecylphosphonic acid grafted mesoporous magnetic nanoparticle: Preparation, characterization, and application in magnetic solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* 1217(47):7351-7358.
- Domínguez De María P., Sánchez-Montero J.M., Sinisterra J.V., Alcántara A.R.** (2006) Understanding *Candida rugosa* lipases: An overview. *Biotechnology Advances* 24(2):180-196.

- Domínguez De María P., Xenakis A., Stamatis H., Sinisterra J.V.** (2004) Unexpected reaction profile observed in the synthesis of propyl laurate when using *Candida rugosa* lipases immobilized in microemulsions based organogels. *Biotechnology Letters* 26(19):1517-1520.
- Dong A., Huang P., Caughey W.S.** (1990) Protein secondary structures in water from second-derivative amide I infrared spectra. *Biochemistry* 29(13):3303-3308.
- Doughty M.J., Glavin S.** (2009) Efficacy of different dry eye treatments with artificial tears or ocular lubricants: A systematic review. *Ophthalmic and Physiological Optics* 29(6):573-583.
- Du D., Huang X., Cai J., Zhang A., Ding J., Chen S.** (2007a) An amperometric acetylthiocholine sensor based on immobilization of acetylcholinesterase on a multiwall carbon nanotube-cross-linked chitosan composite. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 387(3):1059-1065.
- Du F., Wu K., Yang Y., Liu L., Gan T., Xie X.** (2008) Synthesis and electrochemical probing of water-soluble poly(sodium 4-styrenesulfonate-co-acrylic acid)-grafted multiwalled carbon nanotubes. *Nanotechnology* 19(8).
- Du P., Liu S., Wu P., Cai C.** (2007b) Preparation and characterization of room temperature ionic liquid/single-walled carbon nanotube nanocomposites and their application to the direct electrochemistry of heme-containing proteins/enzymes. *Electrochimica Acta* 52(23):6534-6547.
- Dumoulin M., Conrath K., Van Meirhaeghe A., Meersman F., Heremans K., Frenken L.G.J., Muyldermans S., Wyns L., Matagne A.** (2002) Single-domain antibody fragments with high conformational stability. *Protein Science* 11(3):500-515.
- Dyke C.A., Tour J.M.** (2006) Functionalized carbon nanotubes in composites. In: O'Connell MJ, editor. Carbon nanotubes: Properties and applications. Boca Raton, USA: CRC Press - Taylor & Francis group. p 275-294.
- Eastoe J., Hollamby M.J., Hudson L.** (2006) Recent advances in nanoparticle synthesis with reversed micelles. *Advances in Colloid and Interface Science* 128-130:5-15.
- Eftink M.R.** (1991) Fluorescence techniques for studying protein structure. *Methods of biochemical analysis* 35:127-205.
- Eftink M.R.** (1994) The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. *Biophysical Journal* 66(2 I):482-501.
- Eftink M.R.** (1998) The use of fluorescence methods to monitor unfolding transitions in proteins. *Biochemistry (Moscow)* 63(3):276-284.
- Eftink M.R., Ghiron C.A.** (1981) Fluorescence quenching studies with proteins. *Analytical Biochemistry* 114(2):199-227.
- Elliott A., Ambrose E.J.** (1950) Structure of synthetic polypeptides. *Nature* 165(4206):921-922.
- Entressangles B., Desnuelle P.** (1974) Action of pancreatic lipase on monomeric tripropionen in the presence of water miscible organic compounds. *Biochimica et Biophysica Acta* 341(2):437-446.
- EPA method 3550** (1995) Ultrasonic extraction. Test methods for evaluating solid waste. 3rd ed., Update III. EPA SW-846. U.S. GPO. Washington DC.
- EPA method 3611B** (1995) Alumina column cleanup and separation of petroleum wastes. Test methods for evaluating solid waste, 3rd ed., Update III, EPA SW-846. U.S. GPO, Washington DC.
- Fanun M.** (2008) Microemulsions: properties and applications: CRC Press.
- Fehér E., Major B., Belafi-Bako K., Gubicza L.** (2007) On the background of enhanced stability and reusability of enzymes in ionic liquids. *Biochemical Society Transactions* 35(6):1624-1627.
- Feng G., Xiong Y., Wang H., Yang Y.** (2009) Gelation of microemulsions and release behavior of sodium salicylate from gelled microemulsions. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 71(2):297-302.

- Fernandes M.L.M., Krieger N., Baron A.M., Zamora P.P., Ramos L.P., Mitchell D.A.** (2004) Hydrolysis and synthesis reactions catalysed by *Thermomyces lanuginosa* lipase in the AOT/Isocetane reversed micellar system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 30(1):43-49.
- Fernandez-Lafuente R.** (2010) Lipase from *Thermomyces lanuginosus*: Uses and prospects as an industrial biocatalyst. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 62(3-4):197-212.
- Fersht A.** (1999) The three-dimensional structure of proteins. Structure and mechanism in protein science: a guide to enzyme catalysis and protein folding. New York, U.S.A.: W.H. Freeman and Company.
- Fletcher P.D.I., Howe A.M., Robinson B.H.** (1987) The kinetics of solubilisation exchange between water droplets of a water-in-oil microemulsion. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases* 83(4):985-1006.
- Foldvari M., Bagonluri M.** (2008) Carbon nanotubes as functional excipients for nanomedicines: II. Drug delivery and biocompatibility issues. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 4(3):183-200.
- Forato L.A., Bernardes-Filho R., Colnago L.A.** (1998) Protein structure in KBr pellets by infrared spectroscopy. *Analytical Biochemistry* 259(1):136-141.
- Fujigaya T., Tanaka Y., Nakashima N.** (2010) Soluble carbon nanotubes and application to electrochemistry. *Electrochemistry* 78(1):2-15.
- Fukuda H., Kondo A., Noda H.** (2001) Biodiesel fuel production by transesterification of oils. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 92(5):405-416.
- Gan S., Lau E.V., Ng H.K.** (2009) Remediation of soils contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs). *Journal of Hazardous Materials* 172(2-3):532-549.
- Ganesan A., Moore B.D., Kelly S.M., Price N.C., Rolinski O.J., Birch D.J.S., Dunkin I.R., Halling P.J.** (2009) Optical spectroscopic methods for probing the conformational stability of immobilised enzymes. *ChemPhysChem* 10(9-10):1492-1499.
- Ganim Z., Hoi S.C., Smith A.W., Deflores L.P., Jones K.C., Tokmakoff A.** (2008) Amide I two-dimensional infrared spectroscopy of proteins. *Accounts of Chemical Research* 41(3):432-441.
- Gao H., Li J., Han B., Chen W., Zhang J., Zhang R., Yan D.** (2004) Microemulsions with ionic liquid polar domains. *Physical Chemistry Chemical Physics* 6(11):2914-2916.
- Gao Y., Kyrtzidis I.** (2008) Covalent immobilization of proteins on carbon nanotubes using the cross-linker 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide - A critical assessment. *Bioconjugate Chemistry* 19(10):1945-1950.
- Gao Y., Li N., Zheng L.Q., Zhao X.Y., Zhang S.H., Han B.X., Hou W.G., Li G.Z.** (2006) A cyclic voltammetric technique for the detection of micro-regions of bmimPF₆/Tween 20/H₂O microemulsions and their performance characterization by UV-Vis spectroscopy. *Green Chemistry* 8(1):43-49.
- Gao Y.N., Han S.B., Han B.X., Li G.Z., Shen D., Li Z.H., Du J.M., Hou W.G., Zhang G.Y.** (2005) TX-100/water/1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate microemulsions. *Langmuir* 21(13):5681-5684.
- Geim A.K., Novoselov K.S.** (2007) The rise of graphene. *Nature Materials* 6(3):183-191.
- Georgakilas V., Bourlinos A., Gournis D., Tsoufis T., Trapalis C., Mateo-Alonso A., Prato M.** (2008) Multipurpose organically modified carbon nanotubes: From functionalization to nanotube composites. *Journal of the American Chemical Society* 130(27):8733-8740.
- Ghanem A.** (2007) Trends in lipase-catalyzed asymmetric access to enantiomerically pure/enriched compounds. *Tetrahedron* 63(8):1721-1754.

- Ghosh S., Calizo I., Teweldebrhan D., Pokatilov E.P., Nika D.L., Balandin A.A., Bao W., Miao F., Lau C.N.** (2008) Extremely high thermal conductivity of graphene: Prospects for thermal management applications in nanoelectronic circuits. *Applied Physics Letters* 92(15).
- Gianfreda L., Rao M.A.** (2004) Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: A review. *Enzyme and Microbial Technology* 35(4):339-354.
- Gomes F.M., Pereira E.B., de Castro H.F.** (2004) Immobilization of lipase on chitin and its use in nonconventional biocatalysis. *Biomacromolecules* 5(1):17-23.
- Gómez J.M., Romero M.D., Fernández T.M.** (2005) Immobilization of β -glucosidase on carbon nanotubes. *Catalysis Letters* 101(3-4):275-278.
- Goormaghtigh E., Cabiaux V., Ruyschaert J.M.** (1994a) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. I. Assignments and model compounds. *Sub-cellular biochemistry* 23:329-362.
- Goormaghtigh E., Cabiaux V., Ruyschaert J.M.** (1994b) Determination of soluble and membrane protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy. III. Secondary structures. *Sub-cellular biochemistry* 23:405-450.
- Gorke J., Srienc F., Kazlauskas R.** (2010) Toward advanced ionic liquids. Polar, enzyme-friendly solvents for biocatalysis. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 15(1):40-53.
- Gotor-Fernández V., Brieva R., Gotor V.** (2006) Lipases: Useful biocatalysts for the preparation of pharmaceuticals. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 40(3-4):111-120.
- Gournis D., Jankovič L., Maccallini E., Benne D., Rudolf P., Colomer J.F., Sooambar C., Georgakilas V., Prato M., Fanti M. and others** (2006) Clay-fulleropyrrolidine nanocomposites. *Journal of the American Chemical Society* 128(18):6154-6163.
- Gratton E., Jameson D.M., Hall R.D.** (1984) Multifrequency phase and modulation fluorometry. *Annual review of biophysics and bioengineering* 13:105-124.
- Greenfield N.J.** (1996) Methods to estimate the conformation of proteins and polypeptides from circular dichroism data. *Analytical Biochemistry* 235(1):1-10.
- Greenfield N.J.** (2004) Analysis of circular dichroism data. Numerical Computer Methods, Pt D. p 282-317.
- Griebenow K., Klivanov A.M.** (1996) On protein denaturation in aqueous-organic mixtures but not in pure organic solvents. *Journal of the American Chemical Society* 118(47):11695-11700.
- Grochulski P., Li Y., Schrag J.D., Bouthillier F., Smith P., Harrison D., Rubin B., Cygler M.** (1993) Insights into interfacial activation from an open structure of *Candida rugosa* lipase. *Journal of Biological Chemistry* 268(17):12843-12847.
- Gubicza L., Nemestóthy N., Fráter T., Bélafi-Bakó K.** (2003) Enzymatic esterification in ionic liquids integrated with pervaporation for water removal. *Green Chemistry* 5(2):236-239.
- Gupta R., Rathi P., Bradoo S.** (2003) Lipase mediated upgradation of dietary fats and oils. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* 43(6):635-644.
- Ha S.H., Hiep N.M., Lee S.H., Koo Y.M.** (2010) Optimization of lipase-catalyzed glucose ester synthesis in ionic liquids. *Bioprocess and Biosystems Engineering* 33(1):63-70.
- Haering G., Luisi P.L.** (1986) Hydrocarbon gels from water-in-oil microemulsions. *Journal of Physical Chemistry* 90(22):5892-5895.
- Halverson K.J., Sucholeiki I., Ashburn T.T., Lansbury Jr P.T.** (1991) Location of β -sheet-forming sequences in amyloid proteins by FTIR. *Journal of the American Chemical Society* 113(17):6701-6703.
- Hari Krishna S., Karanth N.G.** (2002) Lipases and lipase-catalyzed esterification reactions in nonaqueous media. *Catalysis Reviews - Science and Engineering* 44(4):499-591.

- Haritash A.K., Kaushik C.P.** (2009) Biodegradation aspects of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs): A review. *Journal of Hazardous Materials* 169(1-3):1-15.
- Hauke F., Hirsch A.** (2010) Covalent functionalization of carbon nanotubes. In: Guldi DM, Martin N, editors. Carbon nanotubes and related structures: Synthesis, characterization, functionalization and applications. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag. p 135-198.
- Hayes D.G., Marchio C.** (1998) Expulsion of proteins from water-in-oil microemulsions by treatment with cosurfactant. *Biotechnology and Bioengineering* 59(5):557-566.
- Helistö P., Korpela T.** (1998) Effects of detergents on activity of microbial lipases as measured by the nitrophenyl alkanoate esters method. *Enzyme and Microbial Technology* 23(1-2):113-117.
- Henley J.P., Sadana A.** (1985) Categorization of enzyme deactivations using a series-type mechanism. *Enzyme and Microbial Technology* 7(2):50-60.
- Hennrich F., Chan C., Moore V., Rolandi M., O'Connell M.J.** (2006) The element carbon. In: O'Connell MJ, editor. Carbon nanotubes - Properties and applications. Boca Raton, USA: CRC Press - Taylor & Francis group. p 1-18.
- Hernández-Martín E., Otero C.** (2008) Different enzyme requirements for the synthesis of biodiesel: Novozym® 435 and Lipozyme® TL IM. *Bioresource Technology* 99(2):277-286.
- Herranz M.Á., Martín N.** (2010) Noncovalent functionalization of carbon nanotubes: Synthesis, characterization, functionalization and applications. In: Guldi DM, Martín N, editors. Carbon nanotubes and related structures. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH. p 103-134.
- Hilhorst R., Laane C., Veeger C.** (1983) Enzymatic conversion of apolar compounds in organic media using an NADH-regenerating system and dihydrogen as reductant. *FEBS Letters* 159(1-2):225-228.
- Hills G.** (2003) Industrial use of lipases to produce fatty acid esters. *European Journal of Lipid Science and Technology* 105(10):601-607.
- Hossain M.J., Takeyama T., Hayashi Y., Kawanishi T., Shimizu N., Nakamura R.** (1999) Enzymatic activity of *Chromobacterium viscosum* lipase in an AOT/Tween 85 mixed reverse micellar system. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 74(5):423-428.
- Husein M.M., Nassar N.N.** (2008) Nanoparticle preparation using the single microemulsions scheme. *Current Nanoscience* 4(4):370-380.
- Iancu C., Mocan L., Bele C., Orza A.I., Tabaran F.A., Catoi C., Stiufluic R., Stir A., Matea C., Iancu D. and others** (2011) Enhanced laser thermal ablation for the in vitro treatment of liver cancer by specific delivery of multiwalled carbon nanotubes functionalized with human serum albumin. *International Journal of Nanomedicine* 6(1):129-141.
- Iijima S.** (1991) Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature* 354(6348):56-58.
- Iijima S., Ichihashi T.** (1993) Single-shell carbon nanotubes of 1nm diameter. *Nature* 363(6430):603-605.
- Illanes A., editor.** (2008) Enzyme biocatalysis: Principles and applications: Springer.
- In Het Panhuis M., Salvador-Morales C., Franklin E., Chambers G., Fonseca A., Nagy J.B., Blau W.J., Minett A.I.** (2003) Characterization of an interaction between functionalized carbon nanotubes and an enzyme. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 3(3):209-213.
- Jackson M., Mantsch H.H.** (1995) The use and misuse of FTIR spectroscopy in the determination of protein structure. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 30(2):95-120.
- Jaeger K.E., Dijkstra B.W., Reetz M.T.** (1999) Bacterial biocatalysts: Molecular biology, three-dimensional structures, and biotechnological applications of lipases. p 315-351.
- Jaeger K.E., Eggert T.** (2002) Lipases for biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 13(4):390-397.

- Jaeger K.E., Ransac S., Dijkstra B.W., Colson C., Van Heuvel M., Misset O.** (1994) Bacterial lipases. *FEMS Microbiology Reviews* 15(1):29-63.
- Jaeger K.E., Reetz M.T.** (1998) Microbial lipases form versatile tools for biotechnology. *Trends in Biotechnology* 16(9):396-403.
- Jankovič L., Gournis D., Trikalitis P.N., Arfaoui I., Cren T., Rudolf P., Sage M.H., Palstra T.T.M., Kooi B., De Hosson J. and others** (2006) Carbon nanotubes encapsulating superconducting single-crystalline tin nanowires. *Nano Letters* 6(6):1131-1135.
- Jenta T.R.J., Batts G., Rees G.D., Robinson B.H.** (1997) Biocatalysis using gelatin microemulsion-based organogels containing immobilized *Chromobacterium viscosum* lipase. *Biotechnology and Bioengineering* 53(2):121-131.
- Ji S.R., Liu C., Zhang B., Yang F., Xu J., Long J., Jin C., Fu D.L., Ni Q.X., Yu X.J.** (2010) Carbon nanotubes in cancer diagnosis and therapy. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* 1806(1):29-35.
- Jia G., Wang H., Yan L., Wang X., Pei R., Yan T., Zhao Y., Guo X.** (2005) Cytotoxicity of carbon nanomaterials: Single-wall nanotube, multi-wall nanotube, and fullerene. *Environmental Science and Technology* 39(5):1378-1383.
- Jiang H., Du C., Zou Z., Li X., Akins D.L., Yang H.** (2009) A biosensing platform based on horseradish peroxidase immobilized onto chitosan-wrapped single-walled carbon nanotubes. *Journal of Solid State Electrochemistry* 13(5):791-798.
- Jiang X., Qu X., Zhang L., Zhang Z., Jiang J., Wang E., Dong S.** (2004) pH-dependent conformational changes of ferricytochrome c induced by electrode surface microstructure. *Biophysical Chemistry* 110(3):203-211.
- Jourquin G., Kauffmann J.M.** (1998) Fluorimetric determination of theophylline in serum by inhibition of bovine alkaline phosphatase in AOT based water/in oil microemulsion. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 18(4-5):585-596.
- Jung C.** (2000) Insight into protein structure and protein-ligand recognition by Fourier transform infrared spectroscopy. *Journal of Molecular Recognition* 13(6):325-351.
- Kaar J.L., Jesionowski A.M., Berberich J.A., Moulton R., Russell A.J.** (2003) Impact of ionic liquid physical properties on lipase activity and stability. *Journal of the American Chemical Society* 125(14):4125-4131.
- Kabsch W., Sander C.** (1983) How good are predictions of protein secondary structure. *Febs Letters* 155(2):179-182.
- Karajanagi S.S., Vertegel A.A., Kane R.S., Dordick J.S.** (2004) Structure and function of enzymes adsorbed onto single-walled carbon nanotubes. *Langmuir* 20(26):11594-11599.
- Karakoti A.S., Hench L.L., Seal S.** (2006) The potential toxicity of nanomaterials - The role of surfaces. *JOM* 58(7):77-82.
- Karayigitoglu C.F., Kommareddi N., Gonzalez R.D., John V.T., McPherson G.L., Akkara J.A., Kaplan D.L.** (1995) The morphology of phenolic polymers enzymatically synthesized in surfactant microstructures. *Materials Science and Engineering: C* 2(3):165-171.
- Katsoura M.H., Polydera A.C., Tsironis L.D., Petraki M.P., Rajačić S.K., Tselepis A.D., Stamatis H.** (2009) Efficient enzymatic preparation of hydroxycinnamates in ionic liquids enhances their antioxidant effect on lipoproteins oxidative modification. *New Biotechnology* 26(1-2):83-91.
- Kelly S.M., Jess T.J., Price N.C.** (2005) How to study proteins by circular dichroism. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1751(2):119-139.
- Kelly S.M., Price N.C.** (2000) The use of circular dichroism in the investigation of protein structure and function. *Current Protein and Peptide Science* 1(4):349-384.

- Khmelnitsky Y.L., Hilhorst R., Veeger C.** (1988a) Detergentless microemulsions as media for enzymatic reactions - Cholesterol oxidation catalyzed by cholesterol oxidase. *European Journal of Biochemistry* 176(2):265-271.
- Khmelnitsky Y.L., Levashov A.V., Klyachko N.L., Martinek K.** (1988b) Engineering biocatalytic systems in organic media with low water content. *Enzyme and Microbial Technology* 10(12):710-724.
- Kim J., Grate J.W., Wang P.** (2006a) Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Science* 61(3):1017-1026.
- Kim J., Grate J.W., Wang P.** (2008) Nanobiocatalysis and its potential applications. *Trends in Biotechnology* 26(11):639-646.
- Kim J., Jia H., Wang P.** (2006b) Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells. *Biotechnology Advances* 24(3):296-308.
- Kim S.S., Fisher T.S., Huang T.T., Ladisch M.R.** Effects of carbon nanotube structure on protein adsorption; 2005. p 37-42.
- Kirk O., Borchert T.V., Fuglsang C.C.** (2002) Industrial enzyme applications. *Current Opinion in Biotechnology* 13(4):345-351.
- Kirk O., Christensen M.W.** (2002) Lipases from *Candida antarctica*: Unique biocatalysts from a unique origin. *Organic Process Research and Development* 6(4):446-451.
- Klyachko N.L., Levashov A.V.** (2003) Bioorganic synthesis in reverse micelles and related systems. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 8(2):179-186.
- Kourist R., Brundiek H., Bornscheuer U.T.** (2010) Protein engineering and discovery of lipases. *European Journal of Lipid Science and Technology* 112(1):64-74.
- Kragl U., Eckstein M., Kaftzik N.** (2002) Enzyme catalysis in ionic liquids. *Current Opinion in Biotechnology* 13(6):565-571.
- Krebsfänger N., Zocher F., Altenbuchner J., Bornscheuer U.T.** (1998) Characterization and enantioselectivity of a recombinant esterase from *Pseudomonas fluorescens*. *Enzyme and Microbial Technology* 22(7):641-646.
- Kreilgaard L., Frokjaer S., Flink J.M., Randolph T.W., Carpenter J.F.** (1999) Effects of additives on the stability of *Humicola lanuginosa* lipase during freeze-drying and storage in the dried solid. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 88(3):281-290.
- Kroto H.W., Heath J.R., O'Brien S.C., Curl R.F., Smalley R.E.** (1985) C₆₀: Buckminsterfullerene. *Nature* 318(6042):162-163.
- Kuchibhatla S.V.N.T., Karakoti A.S., Bera D., Seal S.** (2007) One dimensional nanostructured materials. *Progress in Materials Science* 52(5):699-913.
- Kulkarni M.G., Dalai A.K.** (2006) Waste cooking oil - An economical source for biodiesel: A review. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 45(9):2901-2913.
- Kumar A., Gross R.A.** (2000) *Candida antartica* lipase B catalyzed polycaprolactone synthesis: Effects of organic media and temperature. *Biomacromolecules* 1(1):133-138.
- Kumar M., Ando Y.** (2010) Chemical vapor deposition of carbon nanotubes: A review on growth mechanism and mass production. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 10(6):3739-3758.
- Kurganov B.I., Tsetlin L.G., Malakhova E.A., Chebotareva N.A., Lankin V.Z., Glebova G.D., Berezovsky V.M., Levashov A.V., Martinek K.** (1985) A novel approach to study of action of water-insoluble inhibitors of enzymic reactions. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods* 11(2-3):177-184.
- Lakowicz J.R.** (2006) Principles of fluorescence spectroscopy. Berlin, Germany: Springer.

- Lang D., Hofmann B., Haalck L., Hecht H.J., Spener F., Schmid R.D., Schomburg D.** (1996) Crystal structure of a bacterial lipase from *Chromobacterium viscosum* ATCC 6918 refined at 1.6 angstrom resolution. *Journal of Molecular Biology* 259(4):704-717.
- Lau R.M., Sorgedragger M.J., Carrea G., Van Rantwijk F., Secundo F., Sheldon R.A.** (2004) Dissolution of *Candida antarctica* lipase B in ionic liquids: Effects on structure and activity. *Green Chemistry* 6(9):483-487.
- Le Bideau J., Viau L., Vioux A.** (2011) Ionogels, ionic liquid based hybrid materials. *Chemical Society Reviews* 40(2):907-925.
- Lee C.H., Parkin K.L.** (2001) Effect of water activity and immobilization on fatty acid selectivity for esterification reactions mediated by lipases. *Biotechnology and Bioengineering* 75(2):219-227.
- Lee D.H., Kim J.M., Shin H.Y., Kang S.W., Kim S.W.** (2006) Biodiesel production using a mixture of immobilized *Rhizopus oryzae* and *Candida rugosa* lipases. *Biotechnology and Bioprocess Engineering* 11(6):522-525.
- Lee M.Y., Dordick J.S.** (2002) Enzyme activation for nonaqueous media. *Current Opinion in Biotechnology* 13(4):376-384.
- Lee S.H., Doan T.T.N., Ha S.H., Chang W.J., Koo Y.M.** (2007a) Influence of ionic liquids as additives on sol-gel immobilized lipase. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 47(3-4):129-134.
- Lee S.H., Doan T.T.N., Ha S.H., Koo Y.M.** (2007b) Using ionic liquids to stabilize lipase within sol-gel derived silica. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 45(1-2):57-61.
- Lehrer S.S.** (1971) Solute perturbation of protein fluorescence. The quenching of the tryptophyl fluorescence of model compounds and of lysozyme by iodide ion. *Biochemistry* 10(17):3254-3263.
- Levisson M., van der Oost J., Kengen S.W.M.** (2009) Carboxylic ester hydrolases from hyperthermophiles. *Extremophiles* 13(4):567-581.
- Lewandowska A., Oldziej S., Liwo A., Scheraga H.A.** (2010) β -hairpin-forming peptides: models of early stages of protein folding. *Biophysical Chemistry* 151(1-2):1-9.
- Li C.L., Martini L.G., Ford J.L., Roberts M.** (2005a) The use of hypromellose in oral drug delivery. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* 57(5):533-546.
- Li J., Wang Y.B., Qiu J.D., Sun D.C., Xia X.H.** (2005b) Biocomposites of covalently linked glucose oxidase on carbon nanotubes for glucose biosensor. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 383(6):918-922.
- Li S., Qin Y., Shi J., Guo Z.-X., Li Y., Zhu D.** (2004) Electrical properties of soluble carbon nanotube/polymer composite films. *Chemistry of Materials* 17(1):130-135.
- Liang M., Luo B., Zhi L.** (2009) Application of graphene and graphene-based materials in clean energy-related devices. *International Journal of Energy Research* 33(13):1161-1170.
- Lima V.M.G., Krieger N., Mitchell D.A., Fontana J.D.** (2004) Activity and stability of a crude lipase from *Penicillium aurantiogriseum* in aqueous media and organic solvents. *Biochemical Engineering Journal* 18(1):65-71.
- Lin J., He C., Zhao Y., Zhang S.** (2009) One-step synthesis of silver nanoparticles/carbon nanotubes/chitosan film and its application in glucose biosensor. *Sensors and Actuators, B: Chemical* 137(2):768-773.
- Lin L., Cunshan Z., Vittayapadung S., Xiangqian S., Mingdong D.** (2011) Opportunities and challenges for biodiesel fuel. *Applied Energy* 88(4):1020-1031.
- Lin Y., Allard L.F., Sun Y.P.** (2004) Protein-affinity of single-walled carbon nanotubes in water. *Journal of Physical Chemistry B* 108(12):3760-3764.

- Liou Y.C., Marangoni A.G., Yada R.Y.** (1998) Aggregation behavior of *Candida rugosa* lipase. *Food Research International* 31(3):243-248.
- Liu S., Cai C.** (2007) Immobilization and characterization of alcohol dehydrogenase on single-walled carbon nanotubes and its application in sensing ethanol. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 602(1):103-114.
- Liu W., Wang P.** (2007) Cofactor regeneration for sustainable enzymatic biosynthesis. *Biotechnology Advances* 25(4):369-384.
- Liu Y.-Y., Xu J.-H., Hu Y.** (2000) Enhancing effect of Tween-80 on lipase performance in enantioselective hydrolysis of ketoprofen ester. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 10(5):523-529.
- Liu Y., Qu X., Guo H., Chen H., Liu B., Dong S.** (2006) Facile preparation of amperometric laccase biosensor with multifunction based on the matrix of carbon nanotubes-chitosan composite. *Biosensors and Bioelectronics* 21(12):2195-2201.
- Lopez F., Venditti F., Cinelli G., Ceglie A.** (2006) The novel hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) based organogel as reactor for ester synthesis by entrapped *Candida rugosa* lipase. *Process Biochemistry* 41(1):114-119.
- Lowry O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J.** (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. p 265-275.
- Lozano P., De Diego T., Gmouh S., Vaultier M., Iborra J.L.** (2005) Dynamic structure-function relationships in enzyme stabilization by ionic liquids. *Biocatalysis and Biotransformation* 23(3-4):169-176.
- Lozano P., De Diego T., Sauer T., Vaultier M., Gmouh S., Iborra J.L.** (2007) On the importance of the supporting material for activity of immobilized *Candida antarctica* lipase B in ionic liquid/hexane and ionic liquid/supercritical carbon dioxide biphasic media. *Journal of Supercritical Fluids* 40(1):93-100.
- Lu Y., Liu J.** (2009) Catalyst-functionalized nanomaterials. *Wiley interdisciplinary reviews. Nanomedicine and nanobiotechnology* 1(1):35-46.
- Luisi P.L., Giomini M., Pileni M.P., Robinson B.H.** (1988) Reverse micelles as hosts for proteins and small molecules. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Biomembranes* 947(1):209-246.
- Luisi P.L., Henninger F., Joppich M.** (1977) Solubilization and spectroscopic properties of α -chymotrypsin in cyclohexane. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 74(4):1384-1389.
- Luisi P.L., Magid L.J.** (1986) Solubilization of enzymes and nucleic acids in hydrocarbon micellar solutions. *CRC critical reviews in biochemistry* 20(4):409-474.
- Luisi P.L., Scartazzini R., Haering G., Schurtenberger P.** (1990) Organogels from water-in-oil microemulsions. *Colloid & Polymer Science* 268(4):356-374.
- Lund G., Holt S.L.** (1980) Detergentless water/oil microemulsions: IV. the ternary pseudo-phase diagram for and properties of the system toluene/2-propanol/water. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 57(8):264-267.
- Lundqvist M., Sethson I., Jonsson B.H.** (2004) Protein adsorption onto silica nanoparticles: Conformational changes depend on the particles' curvature and the protein stability. *Langmuir* 20(24):10639-10647.
- Macris J.B., Stamatis H., Kolisis F.N.** (1996) Microemulsions as a tool for the regioselective lipase-catalysed esterification of aliphatic diols. *Applied Microbiology and Biotechnology* 46(5-6):521-523.

- Mahmoudian M.** (2009) Biocatalysis and key future trends in the big pharma. *Chimica Oggi* 27(4):1-2.
- Manavalan P., Johnson Jr W.C.** (1987) Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra. *Analytical Biochemistry* 167(1):76-85.
- Manning M.C.** (2005) Use of infrared spectroscopy to monitor protein structure and stability. *Expert Review of Proteomics* 2(5):731-743.
- Mantele W.** (1993) Reaction-induced infrared difference spectroscopy for the study of protein function and reaction mechanisms. *Trends in Biochemical Sciences* 18(6):197-202.
- Marangoni A.G.** (1993) Effects of the interaction of porcine pancreatic lipase with AOT isooctane reverse micelles on enzyme structure and function follow predictable patterns. *Enzyme and Microbial Technology* 15(11):944-949.
- Marangoni A.G., Rousseau D.** (1995) Engineering triacylglycerols: The role of interesterification. *Trends in Food Science & Technology* 6(10):329-335.
- Marchetti J.M., Miguel V.U., Errazu A.F.** (2007) Possible methods for biodiesel production. *Renewable and Sustainable Energy Reviews* 11(6):1300-1311.
- Marshall D., Rich P.R.** (2009) Studies of complex I by Fourier transform infrared spectroscopy. p 53-74.
- Martinek K., Klyachko N.L., Kabanov A.V., Khmel'nitsky Y.L., Levashov A.V.** (1989) Micellar enzymology: Its relation to membranology. *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 981(2):161-172.
- Martinek K., Levashov A.V., Klyachko N., Khmel'nitski Y.L., Berezin I.V.** (1986) Micellar enzymology. *European journal of biochemistry / FEBS* 155(3):453-468.
- Martinek K., Levashov A.V., Klyachko N.L., Berezin I.V.** (1977) Catalysis of water soluble enzymes in organic solvents. Stabilization of enzyme against denaturation (inactivation) when they are included in reversed micelles of surface active substance. *Doklady Akademii Nauk SSSR* 236:920-927.
- Martinelle M., Holmquist M., Hult K.** (1995) On the interfacial activation of *Candida antarctica* lipase A and B as compared with *Humicola lanuginosa* lipase. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism* 1258(3):272-276.
- Mateo C., Palomo J.M., Fernandez-Lorente G., Guisan J.M., Fernandez-Lafuente R.** (2007) Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques. *Enzyme and Microbial Technology* 40(6):1451-1463.
- Matsuura K., Saito T., Okazaki T., Ohshima S., Yumura M., Iijima S.** (2006) Selectivity of water-soluble proteins in single-walled carbon nanotube dispersions. *Chemical Physics Letters* 429(4-6):497-502.
- McCabe R.W., Rodger A., Taylor A.** (2005) A study of the secondary structure of *Candida antarctica* lipase B using synchrotron radiation circular dichroism measurements. *Enzyme and Microbial Technology* 36(1):70-74.
- Melo E.P., Taipa M.A., Castellar M.R., Costa S.M.B., Cabral J.M.S.** (2000) A spectroscopic analysis of thermal stability of the *Chromobacterium viscosum* lipase. *Biophysical Chemistry* 87(2-3):111-120.
- Mena B., Herrero M., Rives V., Lavrenko M., Eggers D.K.** (2008) Favourable influence of hydrophobic surfaces on protein structure in porous organically-modified silica glasses. *Biomaterials* 29(18):2710-2718.

- Mirkin N.G., Krimm S.** (2002) Amide III mode φ , ψ dependence in peptides: A vibrational frequency map. *Journal of Physical Chemistry A* 106(14):3391-3394.
- Mitchell C.A., Bahr J.L., Arepalli S., Tour J.M., Krishnamoorti R.** (2002) Dispersion of functionalized carbon nanotubes in polystyrene. *Macromolecules* 35(23):8825-8830.
- Moniruzzaman M., Hayashi Y., Talukder M.M.R., Saito E., Kawanishi T.** (2006) Effect of aprotic solvents on the enzymatic activity of lipase in AOT reverse micelles. *Biochemical Engineering Journal* 30(3):237-244.
- Moniruzzaman M., Kamiya N., Goto M.** (2009) Biocatalysis in water-in-ionic liquid microemulsions: A case study with horseradish peroxidase. *Langmuir* 25(2):977-982.
- Moniruzzaman M., Kamiya N., Goto M.** (2010a) Activation and stabilization of enzymes in ionic liquids. *Organic and Biomolecular Chemistry* 8(13):2887-2899.
- Moniruzzaman M., Kamiya N., Goto M.** (2010b) Ionic liquid based microemulsion with pharmaceutically accepted components: Formulation and potential applications. *Journal of Colloid And Interface Science* 352(1):136-142.
- Moniruzzaman M., Kamiya N., Nakashima K., Goto M.** (2008a) Formation of reverse micelles in a room-temperature ionic liquid. *ChemPhysChem* 9(5):689-692.
- Moniruzzaman M., Kamiya N., Nakashima K., Goto M.** (2008b) Water-in-ionic liquid microemulsions as a new medium for enzymatic reactions. *Green Chemistry* 10(5):497-500.
- Moniruzzaman M., Nakashima K., Kamiya N., Goto M.** (2010c) Recent advances of enzymatic reactions in ionic liquids. *Biochemical Engineering Journal* 48(3):295-314.
- Monsellier E., Bedouelle H.** (2005) Quantitative measurement of protein stability from unfolding equilibria monitored with the fluorescence maximum wavelength. *Protein Engineering, Design and Selection* 18(9):445-456.
- Mostofizadeh A., Li Y.W., Song B., Huang Y.D.** (2011) Synthesis, properties, and applications of low-dimensional carbon-related nanomaterials. *Journal of Nanomaterials*.
- Mu Q., Liu W., Xing Y., Zhou H., Li Z., Zhang Y., Ji L., Wang F., Si Z., Zhang B. and others** (2008) Protein binding by functionalized multiwalled carbon nanotubes is governed by the surface chemistry of both parties and the nanotube diameter. *Journal of Physical Chemistry C* 112(9):3300-3307.
- Mukherjee S., Chowdhury P., Gai F.** (2007) Infrared study of the effect of hydration on the amide I band and aggregation properties of helical peptides. *Journal of Physical Chemistry B* 111(17):4596-4602.
- Nagayama K., Katakura R., Hata T., Naoe K., Imai M.** (2008) Reactivity of *Candida rugosa* lipase in cetyltrimethylammonium bromide microemulsion–gelatin complex organogels. *Biochemical Engineering Journal* 38:274-276.
- Nagayama K., Tada K., Naoe K., Imai M.** (2003) *Rhizopus delemar* lipase in microemulsion-based organogels: Reactivity and rate-limiting study. *Biocatalysis and Biotransformation* 21(6):321-324.
- Natalello A., Ami D., Brocca S., Lotti M., Doglia S.M.** (2005) Secondary structure, conformational stability and glycosylation of a recombinant *Candida rugosa* lipase studied by Fourier-transform infrared spectroscopy. *Biochemical Journal* 385(2):511-517.
- Nednoor P., Capaccio M., Gavalas V.G., Meier M.S., Anthony J.E., Bachas L.G.** (2004) Hybrid nanoparticles based on organized protein immobilization on fullerenes. *Bioconjugate Chemistry* 15(1):12-15.
- Neves Petersen M.T., Fojan P., Petersen S.B.** (2001) How do lipases and esterases work: The electrostatic contribution. *Journal of Biotechnology* 85(2):115-147.

- Noinville S., Revault M., Baron M.H.** (2002) Conformational changes of enzymes adsorbed at liquid-solid interface: Relevance to enzymatic activity. *Biopolymers - Biospectroscopy Section* 67(4-5):323-326.
- Noritomi H., Takasugi T., Kato S.** (2008) Refolding of denatured lysozyme by water-in-oil microemulsions of sucrose fatty acid esters. *Biotechnology Letters* 30(4):689-693.
- O'Connor C.J., Cleverly D.R.** (1994) Fourier-transform infrared assay of bile salt-stimulated lipase activity in reversed micelles. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 61(3):209-214.
- Ó'Fágáin C.** (2003) Enzyme stabilization - Recent experimental progress. *Enzyme and Microbial Technology* 33(2-3):137-149.
- Ollis D.L., Cheah E., Cygler M., Dijkstra B., Frolof F., Franken S.M., Harel M., Remington S.J., Silman I., Schrag J. and others** (1992) The α/β hydrolase fold. *Protein Engineering* 5(3):197-211.
- Orlich B., Schomäcker R.** (2002) Enzyme catalysis in reverse micelles. *Advances in biochemical engineering/biotechnology* 75:185-208.
- Otero C., Fernandez-Perez M., Perez-Gil J.** (2005) Effects of interactions with micellar interfaces on the activity and structure of different lipolytic isoenzymes from *Candida rugosa*. *Enzyme and Microbial Technology* 37(7):695-703.
- Otto R.T., Scheib H., Bornscheuer U.T., Pleiss J., Sylđatk C., Schmid R.D.** (2000) Substrate specificity of lipase B from *Candida antarctica* in the synthesis of arylaliphatic glycolipids. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic* 8(4-6):201-211.
- Overbeeke P.L.A., Govardhan C., Khalaf N., Jongejan J.A., Heijnen J.J.** (2000) Influence of lid conformation on lipase enantioselectivity. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic* 10(4):385-393.
- Pagliaro M.** (2010) Nano-Age: How nanotechnology changes our future. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag.
- Paiva A.L., Balcão V.M., Malcata F.X.** (2000) Kinetics and mechanisms of reactions catalyzed by immobilized lipases. *Enzyme and Microbial Technology* 27(3-5):187-204.
- Palomo J.M., Fuentes M., Fernández-Lorente G., Mateo C., Guisan J.M., Fernández-Lafuente R.** (2003) General trend of lipase to self-assemble giving bimolecular aggregates greatly modifies the enzyme functionality. *Biomacromolecules* 4(1):1-6.
- Parawira W.** (2009) Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalysed transesterification: A review. *Critical Reviews in Biotechnology* 29(2):82-93.
- Park S., Kazlauskas R.J.** (2003) Biocatalysis in ionic liquids - advantages beyond green technology. *Current Opinion in Biotechnology* 14(4):432-437.
- Park S., Ruoff R.S.** (2009) Chemical methods for the production of graphenes. *Nature Nanotechnology* 4(4):217-224.
- Pastou A., Stamatis H., Xenakis A.** (2000a) Microemulsion-based organogels containing lipase: Application in the synthesis of esters. *Progress in Colloid Polymer Science* 115:192-195.
- Pastou A., Stamatis H., Xenakis A.** (2000b) Microemulsion-based organogels containing lipase: Application in the synthesis of esters. p 192-195.
- Patel R.N.** (2001) Enzymatic synthesis of chiral intermediates for drug development. *Advanced Synthesis and Catalysis* 343(6-7):527-546.
- Patel R.N., editor.** (2006) Biocatalysis in the pharmaceutical and biotechnology industries: CRC Press Taylor & Francis Group.
- Patkar S., Vind J., Kelstrup E., Christensen M.W., Svendsen A., Borch K., Kirk O.** (1998) Effect of mutations in *Candida antarctica* B lipase. *Chemistry and Physics of Lipids* 93(1-2):95-101.

Pauliac-Vaujour E., Quesnel E., Muffato V. (2011) Modeling nanoparticle synthesis by gas condensation in a nanocluster source for applications in photovoltaic and hydrogen fuel cells. p 163-172.

Pavlidis I.V., Tziaila A.A., Enotiadis A., Stamatis H., Gournis D. (2010) Enzyme immobilization on layered and nanostructured materials. In: Loos K, editor. *Biocatalysis in Polymer Chemistry*. Weinheim: Wiley-VCH. p 35-64.

Persson M., Bornscheuer U.T. (2003) Increased stability of an esterase from *Bacillus stearothermophilus* in ionic liquids as compared to organic solvents. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 22(1-2):21-27.

Petit C., Zemb T., Pileni M.P. (1991) Structural study of microemulsion-based gels at the saturation point. *Langmuir* 7(2):223-231.

Pierre A.C. (2004) The sol-gel encapsulation of enzymes. *Biocatalysis and Biotransformation* 22(3):145-170.

Pietrzak R. (2009) XPS study and physico-chemical properties of nitrogen-enriched microporous activated carbon from high volatile bituminous coal. *Fuel* 88(10):1871-1877.

Pizzariello A., Stredanský M., Stredanská S., Miertuš S. (2001) Urea biosensor based on amperometric pH-sensing with hematein as a pH-sensitive redox mediator. *Talanta* 54(4):763-772.

Pléiss J., Fischer M., Schmid R.D. (1998) Anatomy of lipase binding sites: The scissile fatty acid binding site. *Chemistry and Physics of Lipids* 93(1-2):67-80.

Polizzi K.M., Bommaris A.S., Broering J.M., Chaparro-Riggers J.F. (2007) Stability of biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* 11(2):220-225.

Portaccio M., Di Martino S., Maiuri P., Durante D., De Luca P., Lepore M., Bencivenga U., Rossi S., De Maio A., Mita D.G. (2006) Biosensors for phenolic compounds: The catechol as a substrate model. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 41(3-4):97-102.

Prestrelski S.J., Tedeschi N., Arakawa T., Carpenter J.F. (1993) Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophysical Journal* 65(2):661-671.

Provencher S.W., Glöckner J. (1981) Estimation of globular protein secondary structure from circular dichroism. *Biochemistry* 20(1):33-37.

Qiu Z., Texter J. (2008) Ionic liquids in microemulsions. *Current Opinion in Colloid and Interface Science* 13(4):252-262.

Quellet C., Eicke H.F. (1986) Mutual gelation of gelatin and water-in-oil microemulsions. *Chimia* 40:233-238.

Quellet C., Eicke H.F., Sager W. (1991) Formation of microemulsion-based gelatin gels. *Journal of Physical Chemistry* 95(14):5642-5655.

Raffa D., Leung K.T., Battaglini F. (2003) A microelectrochemical enzyme transistor based on an *n*-alkylated poly(aniline) and its application to determine hydrogen peroxide at neutral pH. *Analytical Chemistry* 75(19):4983-4987.

Ranjbar B., Gill P. (2009) Circular dichroism techniques: Biomolecular and nanostructural analyses- A review. *Chemical Biology and Drug Design* 74(2):101-120.

Ravelo-Pérez L.M., Herrera-Herrera A.V., Hernández-Borges J., Rodríguez-Delgado M.T. (2010) Carbon nanotubes: Solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A* 1217(16):2618-2641.

Rees G.D., Nascimento M.G., Jenta T.R.J., Robinson B.H. (1991) Reverse enzyme synthesis in microemulsion-based organo-gels. *Biochimica et Biophysica Acta* 1073:493-501.

- Rees G.D., Robinson B.H.** (1995) Esterification reactions catalyzed by *Chromobacterium viscosum* lipase in CTAB-based microemulsion systems. *Biotechnology and Bioengineering* 45(4):344-355.
- Rees G.D., Robinson B.H., Stephenson G.R.** (1995) Preparative-scale kinetic resolutions catalysed by microbial lipases immobilised in AOT-stabilised microemulsion-based organogels: Cryoenzymology as a tool for improving enantioselectivity. *Biochimica et Biophysica Acta - Lipids and Lipid Metabolism* 1259(1):73-81.
- Reetz M.T.** (1997) Entrapment of biocatalysts in hydrophobic sol-gel materials for use in organic chemistry. *Advanced Materials* 9(12):943-954.
- Reetz M.T.** (2002) Lipases as practical biocatalysts. *Current Opinion in Chemical Biology* 6(2):145-150.
- Rice-Evans C.A., Miller N.J., Paganga G.** (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine* 20(7):933-956.
- Robles-Medina A., González-Moreno P.A., Esteban-Cerdán L., Molina-Grima E.** (2009) Biocatalysis: Towards ever greener biodiesel production. *Biotechnology Advances* 27(4):398-408.
- Rodakiewicz-Nowak J., Pozdnyakova N.N., Turkovskaya O.V.** (2005) Water-in-oil microemulsions as the reaction medium for the solvent-sensitive yellow laccases. *Biocatalysis and Biotransformation* 23(3-4):271-279.
- Rodrigues R.C., Fernandez-Lafuente R.** (2010) Lipase from *Rhizomucor miehei* as an industrial biocatalyst in chemical process. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 64(1-2):1-22.
- Ruiz J.L., Ferrer J., Pire C., Llorca F.I., Bonete M.J.** (2003) Denaturation studies by fluorescence and quenching of thermophilic protein NAD⁺-glutamate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* HB8. *Journal of Protein Chemistry* 22(3):295-301.
- Salis A., Svensson I., Monduzzi M., Solinas V., Adlercreutz P.** (2003) The atypical lipase B from *Candida antarctica* is better adapted for organic media than the typical lipase from *Thermomyces lanuginosa*. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1646(1-2):145-151.
- Santaniello E., Ferraboschi P., Grisenti P.** (1993) Lipase-catalyzed transesterification in organic solvents: Applications to the preparation of enantiomerically pure compounds. *Enzyme and Microbial Technology* 15(5):367-382.
- Santos A.S., Pereira A.C., Durán N., Kubota L.T.** (2006) Amperometric biosensor for ethanol based on co-immobilization of alcohol dehydrogenase and Meldola's Blue on multi-wall carbon nanotube. *Electrochimica Acta* 52(1):215-220.
- Santucci R., Ascoli F.** (1997) The Soret circular dichroism spectrum as a probe for the heme Fe(III)-Met(80) axial bond in horse cytochrome c. *Journal of Inorganic Biochemistry* 68(3):211-214.
- Sarda L., Desnuelle P.** (1958) Action de la lipase pancréatique sur les esters en émulsion. *BBA - Biochimica et Biophysica Acta* 30(3):513-521.
- Schmid G., editor.** (2010) Nanoparticles: From theory to application. 2nd ed. Weinheim: Wiley-VCH Verlag.
- Schmid R.D., Verger R.** (1998) Lipases: Interfacial enzymes with attractive applications. *Angewandte Chemie - International Edition* 37(12):1609-1633.
- Schrag J.D., Cygler M.** (1997) Lipases and α/β hydrolase fold. p 85-107.
- Schuleit M., Luisi P.L.** (2001) Enzyme immobilization in silica-hardened organogels. *Biotechnology and Bioengineering* 72(2):249-253.
- Secundo F., Carrea G.** (2005) Mono- and disaccharides enhance the activity and enantioselectivity of *Burkholderia cepacia* lipase in organic solvent but do not significantly affect its conformation. *Biotechnology and Bioengineering* 92(4):438-446.

- Secundo F., Carrea G., Tarabiono C., Gatti-Lafranchi P., Brocca S., Lotti M., Jaeger K.E., Puls M., Eggert T.** (2006) The lid is a structural and functional determinant of lipase activity and selectivity. *Journal of Molecular Catalysis B-Enzymatic* 39(1-4):166-170.
- Serefoglou E., Litina K., Gournis D., Kalogeris E., Tziaila A.A., Pavlidis I.V., Stamatis H., Maccallini E., Lubomska M., Rudolf P.** (2008) Smectite clays as solid supports for immobilization of β -glucosidase: Synthesis, characterization, and biochemical properties. *Chemistry of Materials* 20(12):4106-4115.
- Seshadri S., Oberg K.A., Uversky V.N.** (2009) Mechanisms and consequences of protein aggregation: The role of folding intermediates. *Current Protein and Peptide Science* 10(5):456-463.
- Shah S., Gupta M.N.** (2008) Simultaneous refolding, purification and immobilization of xylanase with multi-walled carbon nanotubes. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics* 1784(2):363-367.
- Shah S., Solanki K., Gupta M.N.** (2007) Enhancement of lipase activity in non-aqueous media upon immobilization on multi-walled carbon nanotubes. *Chemistry Central Journal* 1(1).
- Shang W., Nuffer J.H., Dordick J.S., Siegel R.W.** (2007) Unfolding of ribonuclease α on silica nanoparticle surfaces. *Nano Letters* 7(7):1991-1995.
- Shao Y., Wang J., Wu H., Liu J., Aksay I.A., Lin Y.** (2010) Graphene based electrochemical sensors and biosensors: A review. *Electroanalysis* 22(10):1027-1036.
- Sheldon R.A.** (2007) Enzyme immobilization: The quest for optimum performance. *Advanced Synthesis and Catalysis* 349(8-9):1289-1307.
- Sheldon R.A., Madeira Lau R., Sorgedraeger M.J., Van Rantwijk F., Seddon K.R.** (2002) Biocatalysis in ionic liquids. *Green Chemistry* 4(2):147-151.
- Shi Q., Yang D., Su Y., Li J., Jiang Z., Jiang Y., Yuan W.** (2007) Covalent functionalization of multi-walled carbon nanotubes by lipase. *Journal of Nanoparticle Research* 9(6):1205-1210.
- Shim M., Kam N.W.S., Chen R.J., Li Y., Dai H.** (2002) Functionalization of carbon nanotubes for biocompatibility and biomolecular recognition. *Nano Letters* 2(4):285-288.
- Shipway A.N., Katz E., Willner I.** (2000) Nanoparticle arrays on surfaces for electronic, optical, and sensor applications. *ChemPhysChem* 1(1):18-52.
- Shu Y., Cheng D., Chen X., Wang J.** (2008) A reverse microemulsion of water/AOT/1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate for selective extraction of hemoglobin. *Separation and Purification Technology* 64(2):154-159.
- Siddiqui K.S., Cavicchioli R.** (2005) Improved thermal stability and activity in the cold-adapted lipase B from *Candida antarctica* following chemical modification with oxidized polysaccharides. *Extremophiles* 9(6):471-476.
- Siepmann J., Peppas N.A.** (2001) Modeling of drug release from delivery systems based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC). *Advanced Drug Delivery Reviews* 48(2-3):139-157.
- Silber J.J., Biasutti A., Abuin E., Lissi E.** (1999) Interactions of small molecules with reverse micelles. *Advances in Colloid and Interface Science* 82(1):189-252.
- Singh B.K., Walker A.** (2006) Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiology Reviews* 30(3):428-471.
- Smith G.D., Donelan C.E., Barden R.E.** (1977) Oil-continuous microemulsions composed of hexane, water, and 2-propanol. *Journal of Colloid and Interface Science* 60(3):488-496.
- Smith P.K., Krohn R.I., Hermanson G.T.** (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry* 150(1):76-85.

- Smolander M., Boer H., Valkiainen M., Roozeman R., Bergelin M., Eriksson J.E., Zhang X.C., Koivula A., Viikari L.** (2008) Development of a printable laccase-based biocathode for fuel cell applications. *Enzyme and Microbial Technology* 43(2):93-102.
- Soares C.M.F., Dos Santos O.A., Olivo J.E., De Castro H.F., De Moraes F.F., Zanin G.M.** (2004) Influence of the alkyl-substituted silane precursor on sol-gel encapsulated lipase activity. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 29(1-6):69-79.
- Sohaebuddin S.K., Thevenot P.T., Baker D., Eaton J.W., Tang L.** (2010) Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Particle and Fibre Toxicology* 7.
- Sohn H.S., Chung S.S., Rhee J.S.** (1987) Deactivation of *Candida rugosa* lipase. *Biotechnology Letters* 9(2):117-122.
- Song W., Li D.W., Li Y.T., Li Y., Long Y.T.** (2011) Disposable biosensor based on graphene oxide conjugated with tyrosinase assembled gold nanoparticles. *Biosensors and Bioelectronics*.
- Song X., Qi X., Qu Y.** (2008) Resolution of (R,S)-(±)-glycidyl butyrate with immobilized Y-11 *Trichosporon capitatum* lipase in gelatin-containing microemulsion-based organogels. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 67(1):127-131.
- Soni K., Madamwar D.** (2001) Ester synthesis by lipase immobilized on silica and microemulsion based organogels (MBGs). *Process Biochemistry* 36:607-611.
- Sottmann T., Stubenrauch C.** (2009) Phase behaviour, interfacial tension and microstructure of microemulsions: John Wiley & Sons, Ltd. 1-47 p.
- Sreerama N., Woody R.W.** (1993) A self-consistent method for the analysis of protein secondary structure from circular dichroism. *Analytical Biochemistry* 209(1):32-44.
- Stamatis H., Xenakis A.** (1999) Biocatalysis using microemulsion-based polymer gels containing lipase. *Journal of Molecular Catalysis - B Enzymatic* 6(4):399-406.
- Stamatis H., Xenakis A., Kolisis F.N.** (1999) Bioorganic reactions in microemulsions: The case of lipases. *Biotechnology Advances* 17(4-5):293-318.
- Stamatis H., Xenakis A., Provelegiou M., Kolisis F.N.** (1993) Esterification reactions catalyzed by lipases in microemulsions: The role of enzyme localization in relation to its selectivity. *Biotechnology and Bioengineering* 42(1):103-110.
- Stern O., Volmer M.** (1919) Über die Abklingzeit der Fluoreszenz. *Physikalische Zeitschrift* 20:183 - 188.
- Surewicz W.K., Mantsch H.H., Chapman D.** (1993) Determination of protein secondary structure by Fourier transform infrared spectroscopy: A critical assessment. *Biochemistry* 32(2):389-394.
- Susi H., Byler D.M.** (1983) Protein structure by Fourier transform infrared spectroscopy: Second derivative spectra. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 115(1):391-397.
- Svensson M., Rees G.D., Robinson B.H., Stephenson G.R.** (1996) Phospholipid-stabilised water-in-oil microemulsions: A study of ester synthesis by *Humicola lanuginosa* lipase. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 8(1-2):101-111.
- Szunerits S., Jama C., Coffinier Y., Marcus B., Delabouglise D., Boukherroub R.** (2006) Direct amination of hydrogen-terminated boron doped diamond surfaces. *Electrochemistry Communications* 8(7):1185-1190.
- Tan T., Lu J., Nie K., Deng L., Wang F.** (2010) Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnology Advances* 28(5):628-634.
- Tan T., Xu J.H., Asano Y.** (2009) Biocatalysis in biorefinery: A green and highly efficient way to convert renewables. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 56(2-3):77.
- Tang W.L., Zhao H.** (2009) Industrial biotechnology: Tools and applications. *Biotechnology Journal* 4(12):1725-1739.

- Tantipolphan R., Rades T., Medlicott N.J.** (2008) Insights into the structure of protein by vibrational spectroscopy. *Current Pharmaceutical Analysis* 4(2):53-68.
- Tasis D., Tagmatarchis N., Bianco A., Prato M.** (2006) Chemistry of carbon nanotubes. *Chemical Reviews* 106(3):1105-1136.
- Thomas K.M.** (2009) Adsorption and desorption of hydrogen on metal-organic framework materials for storage applications: Comparison with other nanoporous materials. *Dalton Transactions*(9):1487-1505.
- Tiwari A., Dhakate S.R.** (2009) Chitosan-SiO₂-multiwall carbon nanotubes nanocomposite: A novel matrix for the immobilization of creatine amidinohydrolase. *International Journal of Biological Macromolecules* 44(5):408-412.
- Tongboriboon K., Cheirsilp B., H-Kittikun A.** (2010) Mixed lipases for efficient enzymatic synthesis of biodiesel from used palm oil and ethanol in a solvent-free system. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 67(1-2):52-59.
- Tonova K., Lazarova Z.** (2008) Reversed micelle solvents as tools of enzyme purification and enzyme-catalyzed conversion. *Biotechnology Advances* 26(6):516-532.
- Topakas E., Stamatis H., Biely P., Kekos D., Macris B.J., Christakopoulos P.** (2003a) Purification and characterization of a feruloyl esterase from *Fusarium oxysporum* catalyzing esterification of phenolic acids in ternary water-organic solvent mixtures. *Journal of Biotechnology* 102(1):33-44.
- Topakas E., Stamatis H., Mastihubova M., Biely P., Kekos D., Macris B.J., Christakopoulos P.** (2003b) Purification and characterization of a *Fusarium oxysporum* feruloyl esterase (FoFAE-I) catalysing transesterification of phenolic acid esters. *Enzyme and Microbial Technology* 33(5):729-737.
- Topakas E., Vafiadi C., Stamatis H., Christakopoulos P.** (2005) *Sporotrichum thermophile* type C feruloyl esterase (StFaeC): Purification, characterization, and its use for phenolic acid (sugar) ester synthesis. *Enzyme and Microbial Technology* 36(5-6):729-736.
- Treacy M.M.J., Ebbesen T.W., Gibson J.M.** (1996) Exceptionally high Young's modulus observed for individual carbon nanotubes. *Nature* 381(6584):678-680.
- Trickett K., Eastoe J.** (2008) Surfactant-based gels. *Advances in Colloid and Interface Science* 144(1-2):66-74.
- Tsoufis T., Tomou A., Gournis D., Douvalis A.P., Panagiotopoulos I., Kooi B., Georgakilas V., Arfaoui I., Bakas T.** (2008) Novel nanohybrids derived from the attachment of FePt nanoparticles on carbon nanotubes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* 8(11):5942-5951.
- Tuena De Gomez-Puyou M., Gomez-Puyou A.** (1998) Enzymes in low water systems. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 33(1):53-89.
- Tung V.C., Allen M.J., Yang Y., Kaner R.B.** (2009) High-throughput solution processing of large-scale graphene. *Nature Nanotechnology* 4(1):25-29.
- Turco Liveri V.** (2006) Controlled synthesis of nanoparticles in microheterogeneous systems. New York: Springer Science + Business Media. 174 p.
- Twu J.-S., Garfinkel A.S., Schotz M.C.** (1984) Hepatic lipase purification and characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Lipids and Lipid Metabolism* 792(3):330-337.
- Tziaila A.A., Kalogeris E., Gournis D., Sanakis Y., Stamatis H.** (2008) Enhanced catalytic performance and stability of chloroperoxidase from *Caldariomyces fumago* in surfactant free ternary water-organic solvent systems. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 51(1-2):24-35.

- Tzialla A.A., Pavlidis I.V., Felicissimo M.P., Rudolf P., Gournis D., Stamatis H.** (2010) Lipase immobilization on smectite nanoclays: Characterization and application to the epoxidation of α -pinene. *Bioresource Technology* 101:1587-1594.
- Tzialla A.A., Taha A.A., Kalogeris E., Stamatis H.** (2009) Improving the catalytic performance of fungal laccases in monoterpene-based reaction systems. *Biotechnology Letters* 31(9):1451-1456.
- Ulbert O., Bélafi-Bakó K., Tonova K., Gubicza L.** (2005) Thermal stability enhancement of *Candida rugosa* lipase using ionic liquids. *Biocatalysis and Biotransformation* 23(3-4):177-183.
- Upadhyayula V.K.K., Deng S., Mitchell M.C., Smith G.B.** (2009) Application of carbon nanotube technology for removal of contaminants in drinking water: A review. *Science of the Total Environment* 408(1):1-13.
- Uppenberg J., Patkar S., Bergfors T., Jones T.A.** (1994) Crystallization and preliminary X-ray studies of lipase B from *Candida antarctica*. *Journal of Molecular Biology* 235(2):790-792.
- Valis T.P., Xenakis A., Kolisis F.N.** (1992) Comparative studies of lipase *Rhizopus delemar* in various microemulsion systems. *Biocatalysis* 6:267-279.
- Vamvakaki V., Chaniotakis N.A.** (2007) Immobilization of enzymes into nanocavities for the improvement of biosensor stability. *Biosensors and Bioelectronics* 22(11):2650-2655.
- van Holde K.E., Curtis Johnson W., Shing Ho P.** (2006) Molecular thermodynamics. Principles of physical biochemistry. 2nd ed. Upper Saddle River, N.J., U.S.A.: Pearson Prentice Hall.
- Van Mierlo C.P.M., De Jongh H.H.J., Visser A.J.W.G.** (2000) Circular dichroism of proteins in solution and at interfaces. *Applied Spectroscopy Reviews* 35(4):277-313.
- van Pouderoyen G., Eggert T., Jaeger K.E., Dijkstra B.W.** (2001) The crystal structure of *Bacillus subtilis* lipase: A minimal α/β hydrolase fold enzyme. *Journal of Molecular Biology* 309(1):215-226.
- van Rantwijk F., Lau R.M., Sheldon R.A.** (2003) Biocatalytic transformations in ionic liquids. *Trends in Biotechnology* 21(3):131-138.
- van Rantwijk F., Sheldon R.A.** (2007) Biocatalysis in ionic liquids. *Chemical Reviews* 107(6):2757-2785.
- Vecchio G., Zambianchi F., Zacchetti P., Secundo F., Carrea G.** (1999) Fourier-transform infrared spectroscopy study of dehydrated lipases from *Candida antarctica* B and *Pseudomonas cepacia*. *Biotechnology and Bioengineering* 64(5):545-551.
- Verger R.** (1997) 'Interfacial activation' of lipases: Facts and artifacts. *Trends in Biotechnology* 15(1):32-38.
- Vijayaraj M., Gadiou R., Anselme K., Ghimbeu C., Vix-Guterl C., Orikasa H., Kyotani T., Ittisanronnachai S.** (2010) The influence of surface chemistry and pore size on the adsorption of proteins on nanostructured carbon materials. *Advanced Functional Materials* 20(15):2489-2499.
- Villeneuve P.** (2007) Lipases in lipophilization reactions. *Biotechnology Advances* 25(6):515-536.
- Voutsas E.C., Yakoumis I.V., Tassios D.P.** (1999) Prediction of phase equilibria in water/alcohol/alkane systems. *Fluid Phase Equilibria* 158-160:151-163.
- Vuković G., Marinković A., Obradović M., Radmilović V., Čolić M., Aleksić R., Uskoković P.S.** (2009) Synthesis, characterization and cytotoxicity of surface amino-functionalized water-dispersible multi-walled carbon nanotubes. *Applied Surface Science* 255(18):8067-8075.
- Walde P.** (1993) Spectroscopic and kinetic studies of lipases solubilized in reverse micelles. *Biochemistry* 32(15):4029-4034.
- Walde P., Giuliani A.M., Boicelli C.A., Luisi P.L.** (1990) Phospholipid-based reverse micelles. *Chemistry and Physics of Lipids* 53(4):265-288.

- Wang K., Liu Q., Guan Q.M., Wu J., Li H.N., Yan J.J.** (2011) Enhanced direct electrochemistry of glucose oxidase and biosensing for glucose via synergy effect of graphene and CdS nanocrystals. *Biosensors and Bioelectronics* 26(5):2252-2257.
- Wang S., Humphreys E.S., Chung S.Y., Delduco D.F., Lustig S.R., Wang H., Parker K.N., Rizzo N.W., Subramoney S., Chiang Y.M. and others** (2003) Peptides with selective affinity for carbon nanotubes. *Nature Materials* 2(3):196-200.
- Wang S., Xie F., Liu G.** (2009) Direct electrochemistry and electrocatalysis of heme proteins on SWCNTs-CTAB modified electrodes. *Talanta* 77(4):1343-1350.
- Warwel S., Klaas M.R.** (1995) Chemo-enzymatic epoxidation of unsaturated carboxylic acids. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 1(1):29-35.
- Watarai H.** (1997) Microemulsions in separation sciences. *Journal of Chromatography A* 780(1-2):93-102.
- Whitesides G.M.** (2005) Nanoscience, nanotechnology, and chemistry. *Small* 1(2):172-179.
- Wichmann R., Vasic-Racki D.** (2005) Cofactor regeneration at the lab scale. p 225-260.
- Wildöer J.W.G., Venema L.C., Rinzler A.G., Smalley R.E., Dekker C.** (1998) Electronic structure of atomically resolved carbon nanotubes. *Nature* 391(6662):59-62.
- Winkler F.K., D'Arcy A., Hunziker W.** (1990) Structure of human pancreatic lipase. *Nature* 343(6260):771-774.
- Wohlgemuth R.** (2009) The locks and keys to industrial biotechnology. *New Biotechnology* 25(4):204-213.
- Woodley J.M.** (2008) New opportunities for biocatalysis: making pharmaceutical processes greener. *Trends in Biotechnology* 26(6):321-327.
- Woolley P., Petersen S.B.** (1994) Lipases: Their structure, biochemistry and application. Cambridge: Cambridge University Press.
- Wu J.C., He Z.M., Yao C.Y., Yu K.T.** (2001) Increased activity and stability of *Candida rugosa* lipase in reverse micelles formed by chemically modified AOT in isooctane. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 76(9):949-953.
- Wu J.F., Xu M.Q., Zhao G.C.** (2010a) Graphene-based modified electrode for the direct electron transfer of cytochrome c and biosensing. *Electrochemistry Communications* 12(1):175-177.
- Wu X., Hu Y., Jin J., Zhou N., Wu P., Zhang H., Cai C.** (2010b) Electrochemical approach for detection of extracellular oxygen released from erythrocytes based on graphene film integrated with laccase and 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid). *Analytical Chemistry* 82(9):3588-3596.
- Xenakis A., Stamatis H.** (1999) Lipase immobilization on microemulsion-based polymer gels. p 132-135.
- Xue L., Qiu H., Li Y., Lu L., Huang X., Qu Y.** (2011) A novel water-in-ionic liquid microemulsion and its interfacial effect on the activity of laccase. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 82(2):432-437.
- Yáñez-Sedeño P., Pingarrón J.M., Riu J., Rius F.X.** (2010) Electrochemical sensing based on carbon nanotubes. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 29(9):939-953.
- Yang M., Javadi A., Li H., Gong S.** (2010) Ultrasensitive immunosensor for the detection of cancer biomarker based on graphene sheet. *Biosensors and Bioelectronics* 26(2):560-565.
- Yi C., Fong C.C., Zhang Q., Lee S.T., Yang M.** (2008) The structure and function of ribonuclease A upon interacting with carbon nanotubes. *Nanotechnology* 19(9).

- Yin Y., Wu P., Lu M., Y., Du P., Shi Y., Cai C.** (2007) Immobilization and direct electrochemistry of cytochrome c at a single-walled carbon nanotube-modified electrode. *Journal of Solid State Electrochemistry* 11(3):390-397.
- Yu M.F.** (2004) Fundamental mechanical properties of carbon nanotubes: Current understanding and the related experimental studies. *Journal of Engineering Materials and Technology, Transactions of the ASME* 126(3):271-278.
- Yuan Y., Bai S., Sun Y.** (2006) Comparison of lipase-catalyzed enantioselective esterification of (\pm)-menthol in ionic liquids and organic solvents. *Food Chemistry* 97(2):324-330.
- Zaks A., Klibanov A.M.** (1988) Enzymatic catalysis in nonaqueous solvents. *Journal of Biological Chemistry* 263(7):3194-3201.
- Zaman M.M., Hayashi Y., Talukder M.M.R., Kawanishi T.** (2006) Activity of acetone-treated *Chromobacterium viscosum* lipase in AOT reverse micelles in the presence of low molecular weight polyethylene glycol. *Biochemical Engineering Journal* 29(1-2):46-54.
- Zhang F., Zheng B., Zhang J., Huang X., Liu H., Guo S.** (2010a) Horseradish peroxidase immobilized on graphene oxide: Physical properties and applications in phenolic compound removal. *Journal of Physical Chemistry C* 114(18):8469-8473.
- Zhang J., Zhang F., Yang H., Huang X., Liu H., Guo S.** (2010b) Graphene oxide as a matrix for enzyme immobilization. *Langmuir* 26(9):6083-6085.
- Zhang Y., Huang X., Li Y.** (2008) Negative effect of [bmim][PF₆] on the catalytic activity of alcohol dehydrogenase: Mechanism and prevention. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 83(9):1230-1235.
- Zhang Y., Zheng J.** (2008) Direct electrochemistry and electrocatalysis of cytochrome c based on chitosan-room temperature ionic liquid-carbon nanotubes composite. *Electrochimica Acta* 54(2):749-754.
- Zhao H.** (2010) Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids - A review. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 85(7):891-907.
- Zhao H., Van Der Donk W.A.** (2003) Regeneration of cofactors for use in biocatalysis. *Current Opinion in Biotechnology* 14(6):583-589.
- Zhao X.Y., Cao Q., Zheng L.Q., Zhang G.Y.** (2006) Rheological properties and microstructures of gelatin-containing microemulsion-based organogels. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 281(1-3):67-73.
- Zhou G.P., Zhang Y., Huang X.R., Shi C.H., Liu W.F., Li Y.Z., Qu Y.B., Gao P.J.** (2008) Catalytic activities of fungal oxidases in hydrophobic ionic liquid 1-butyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate-based microemulsion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 66(1):146-149.
- Zhuang X., Ha T., Kim H.D., Centner T., Labeit S., Chu S.** (2000) Fluorescence quenching: A tool for single-molecule protein-folding study. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(26):14241-14244.
- Zoumpantioti M., Karali M., Xenakis A., Stamatis H.** (2006) Lipase biocatalytic processes in surfactant free microemulsion-like ternary systems and related organogels. *Enzyme and Microbial Technology* 39(4):531-539.
- Zoumpantioti M., Parmaklis P., De María P.D., Stamatis H., Sinisterra J.V., Xenakis A.** (2008) Esterification reactions catalyzed by lipases immobilized in organogels: Effect of temperature and substrate diffusion. *Biotechnology Letters* 30(9):1627-1631.
- Zoumpantioti M., Stamatis H., Xenakis A.** (2010) Microemulsion-based organogels as matrices for lipase immobilization. *Biotechnology Advances* 28(3):395-406.

Zulauf M., Eicke H.F. (1979) Inverted micelles and microemulsions in the ternary system H₂O/aerosol-OT/isooctane as studied by photon correlation spectroscopy. *Journal of Physical Chemistry* 83(4):480-486.

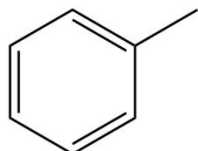
Κατσούρα Μ. (2010) Βιομετασχηματισμοί φυσικών αντιοξειδωτικών σε ιοντικά υγρά [Διδακτορική διατριβή]. Ιωάννινα: Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

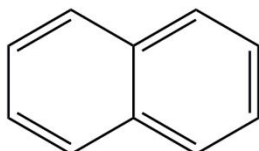
ΧΡΩΜΑΤΟΓΡΑΦΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΑΛΕΙΦΑΤΙΚΟΥ ΚΑΙ **ΑΡΩΜΑΤΙΚΟΥ ΚΛΑΣΜΑΤΟΣ ΠΕΤΡΕΛΑΙΟΥ**

Καθώς η χημειοενzymική εποξείδωση των πολυαρωματικών υδρογονανθράκων με την ακινητοποιημένη λιπάση Novozyme 435 δεν παρουσίασε αποτελέσματα, στις επόμενες σελίδες παρατίθενται οι δομές των πολυαρωματικών υδρογονανθράκων που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διατριβή, καθώς και τα χρωματογραφήματα του αλειφατικού και το αρωματικού κλάσματος του πετρελαίου.

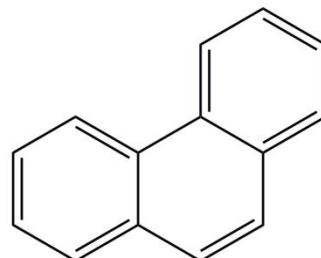
Χημικές δομές τυπικών πολυκυκλικών αρωματικών υδρογονανθράκων οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν για την ταυτοποίηση των κορυφών του χρωματογραφήματος του αρωματικού κλάσματος



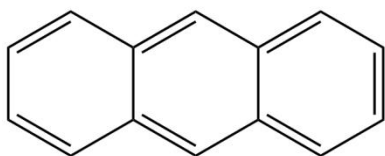
Τολουένιο



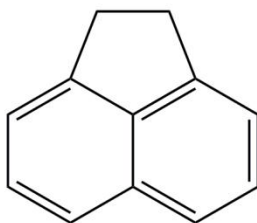
Ναφθαλένιο



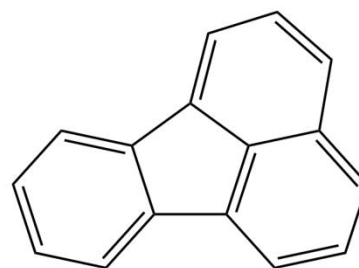
Φαινανθρένιο



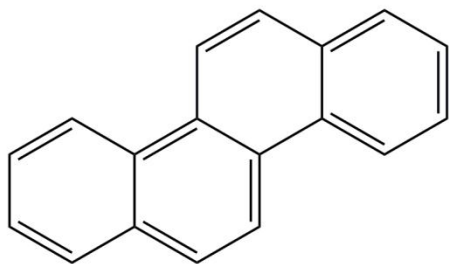
Ανθρακένιο



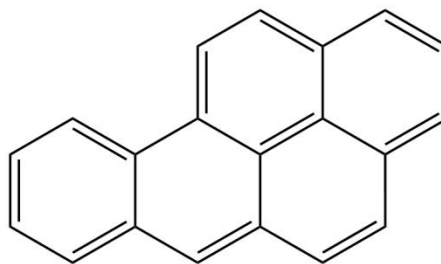
Ακεναφθένιο



Φλουρανθένιο

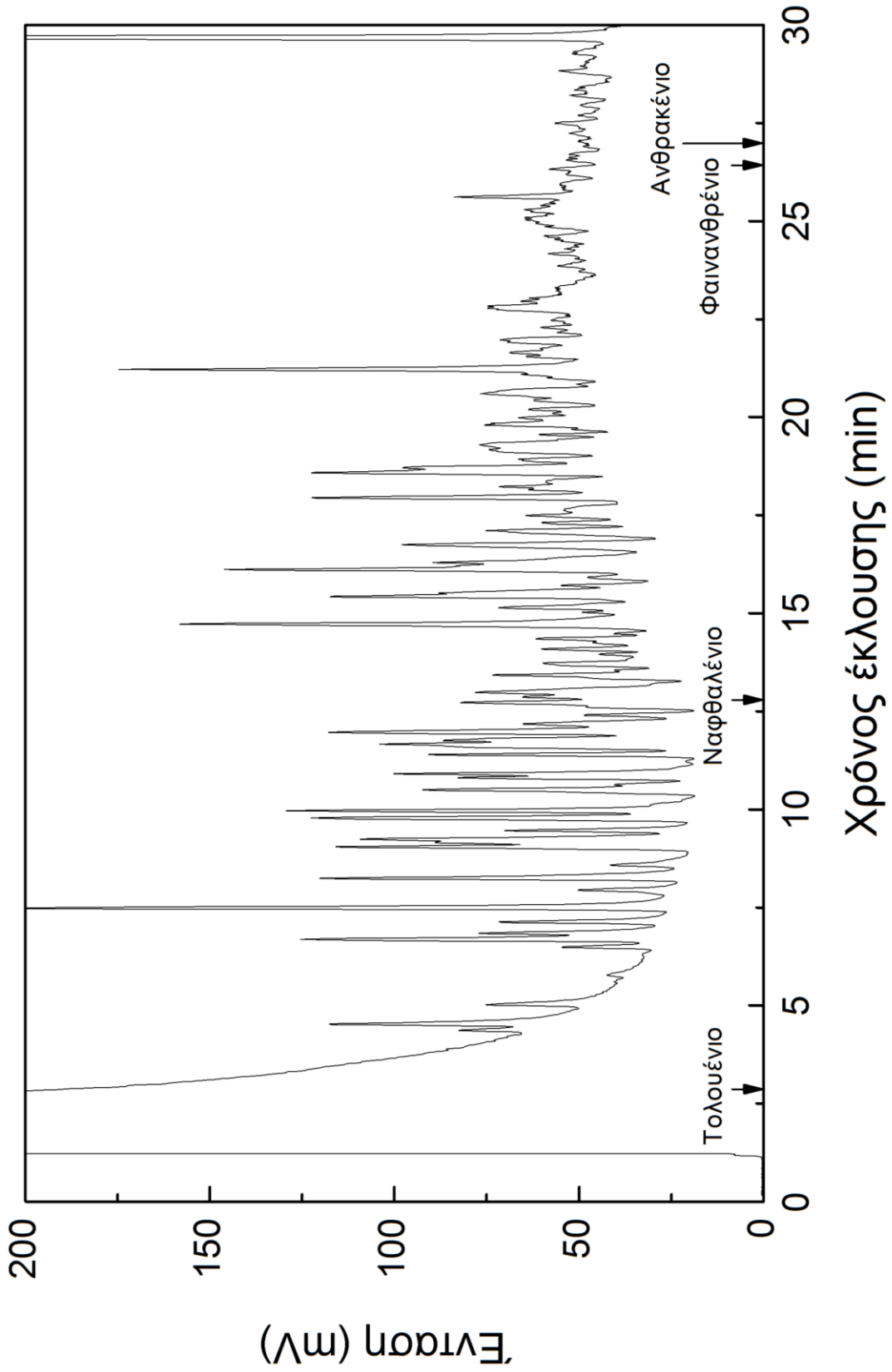


Χρυσένιο

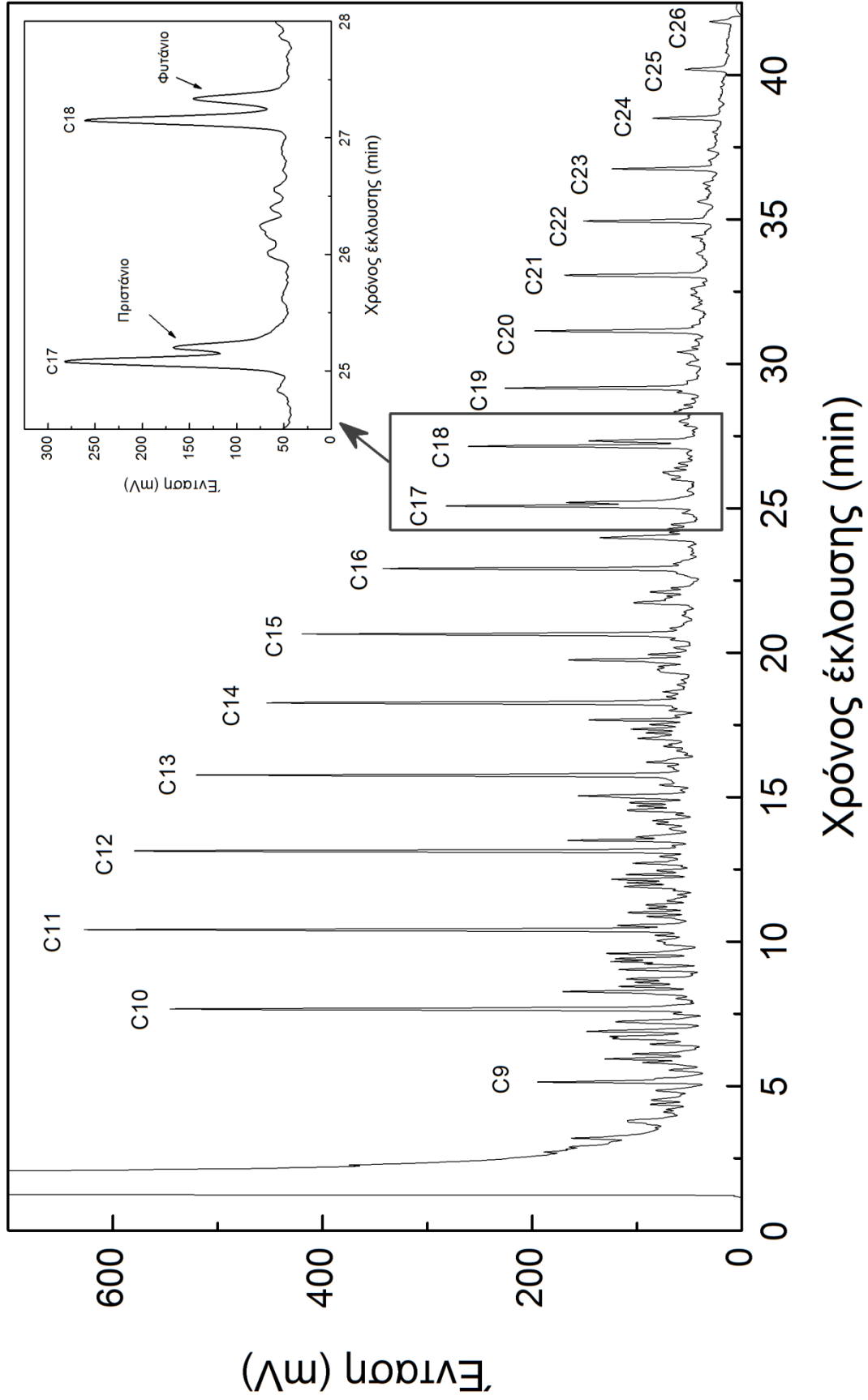


Βενζο-(α)-πυρένιο

Αρωματικό κλάσμα εμπορικά διαθέσιμου πετρελαίου



Αλειφατικό κλάσμα εμπορικά διαθέσιμου πετρελαίου

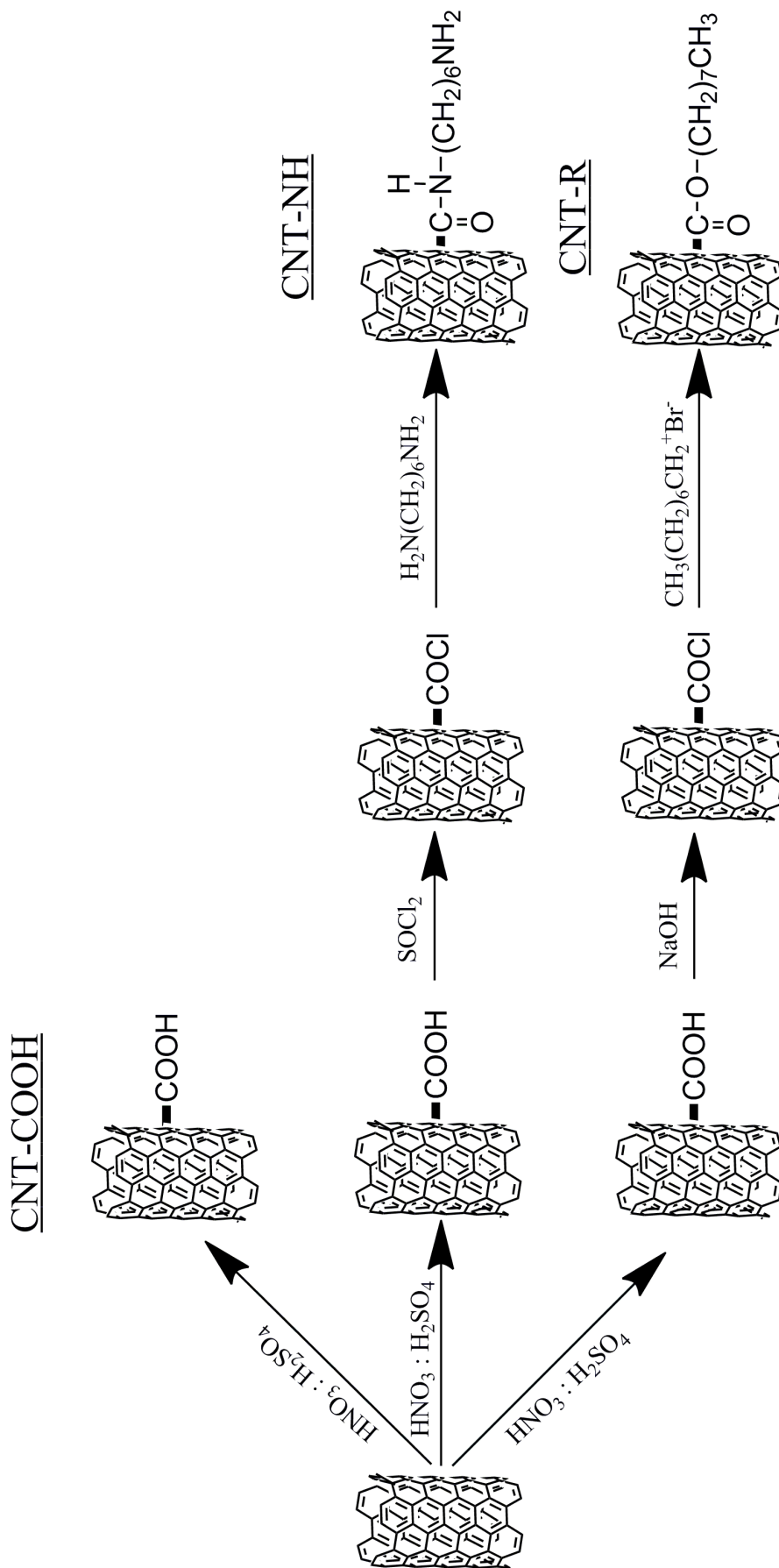


ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

ΧΗΜΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΝΑΝΟΣΩΛΗΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ

Στην επόμενη σελίδα παρουσιάζεται η διαδικασία χημικής τροποποίησης των νανοσωλήνων άνθρακα με όλα τα ενδιάμεσα στάδια που προκύπτουν και τα αντιδραστήρια τα οποία χρησιμοποιούνται.

Χάριν απλότητας, στους νανοσωλήνες άνθρακα CNT-COOH δεν παρουσιάζονται οι εποξυ- και υδροξυ-ομάδες, οι οποίες δε διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στα επόμενα στάδια της χημικής τροποποίησης.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ

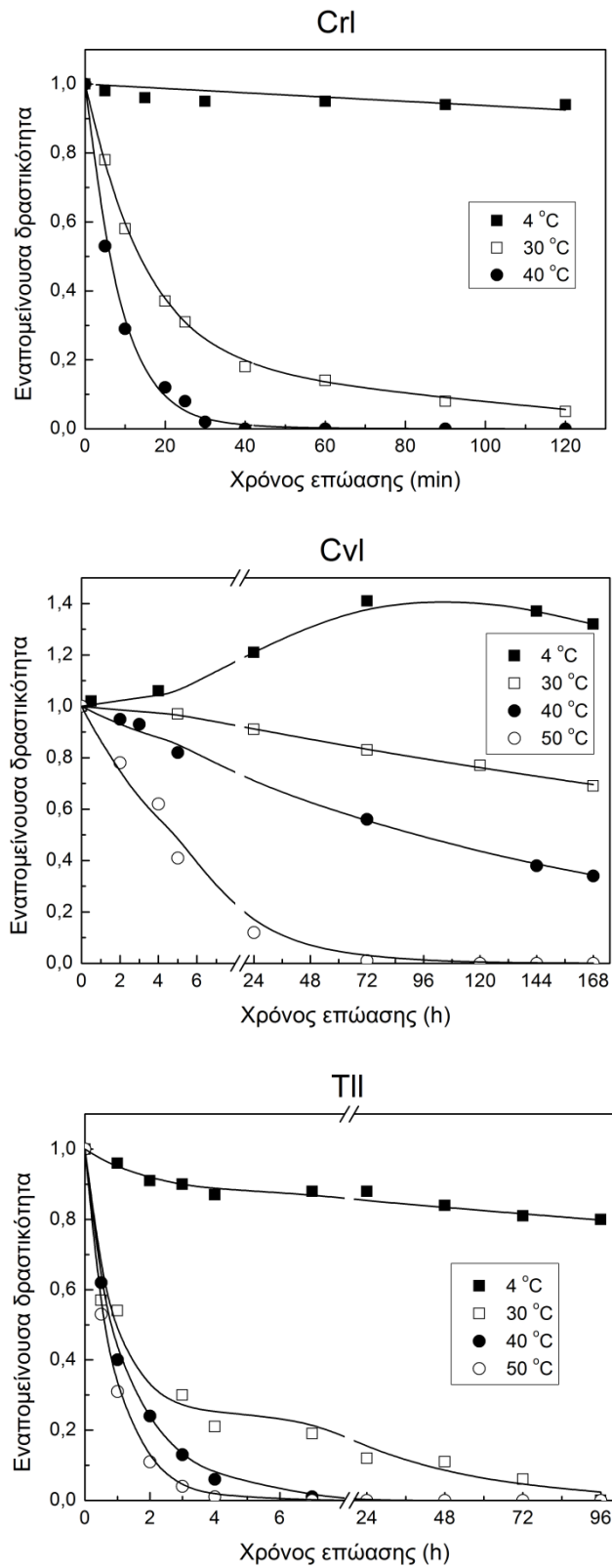
ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑΣ

ΛΙΠΑΣΩΝ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΝΑΝΟ-ΔΙΑΣΠΟΡΑΣ

Στην αριστερή σελίδα (ζυγή) παρατίθενται τα διαγράμματα σταθερότητας για κάθε ένζυμο ξεχωριστά. Τα σημεία αντιστοιχούν στα πειραματικά δεδομένα, ενώ οι καμπύλες στην προβλεπόμενη καμπύλη απενεργοποίησης.

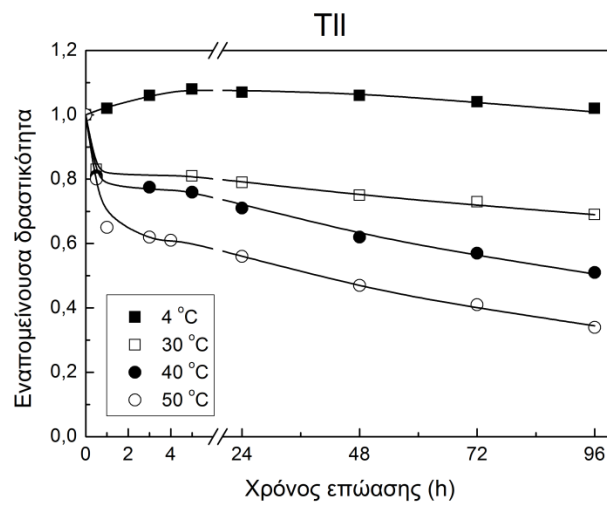
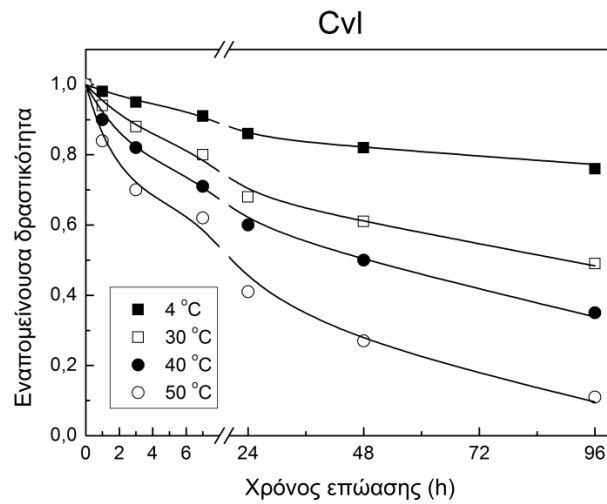
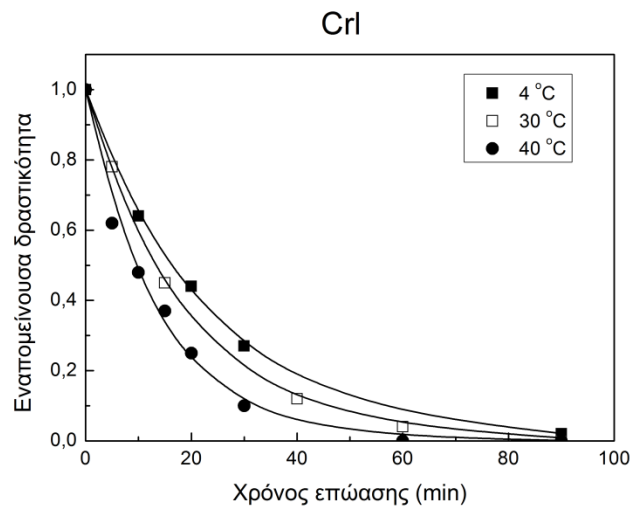
Στη δεξιά σελίδα (μονή) παρατίθενται οι κινητικές σταθερές απενεργοποίησης λιπασών, σύμφωνα με το μοντέλο απενεργοποίησης σε 2 στάδια, καθώς και ο χρόνος ημίσειας ζωής.

Α. Σταθερότητα λιπασών σε συστήματα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο που σχηματίζονται με ΑΟΤ



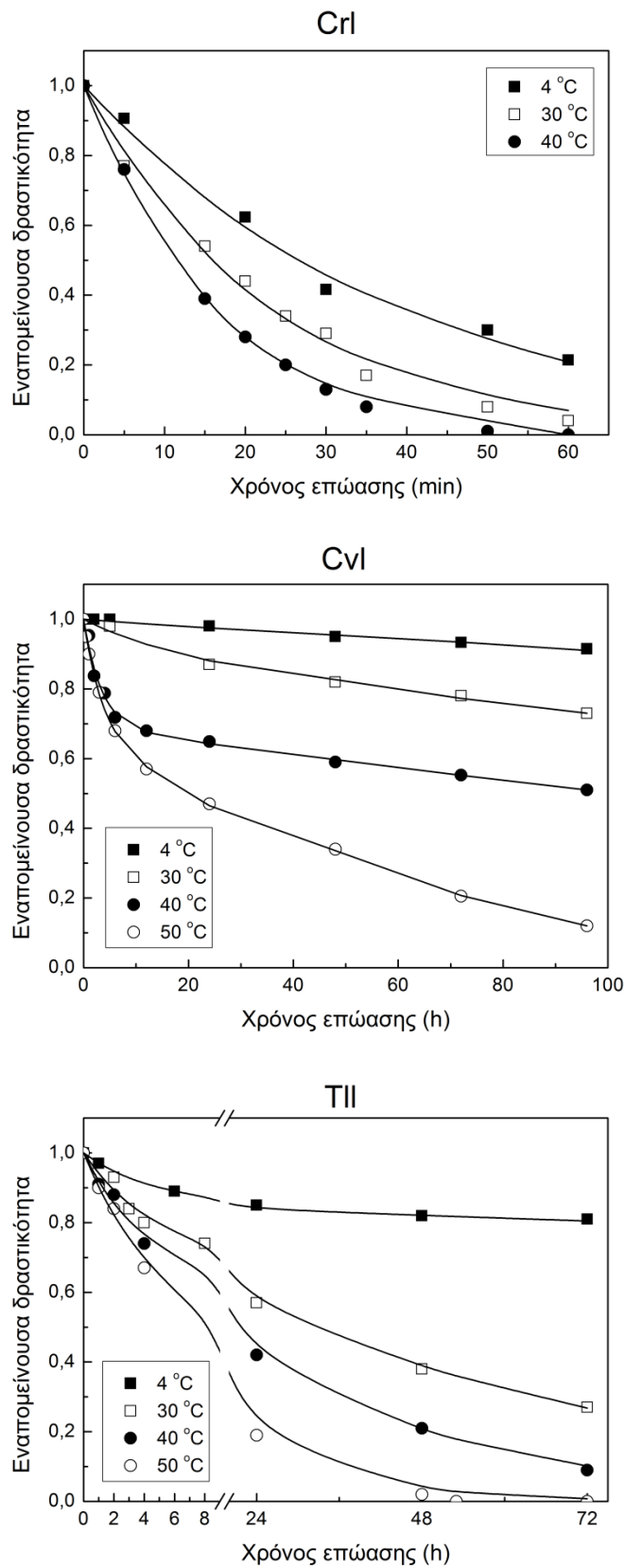
Λιπάση	T (°C)	α_1	α_2	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	r^2	$t_{1/2}$ (h)
CrI	4	0.000	0.000	0.039	0.000	0.994	17.7
		-	-	±0.002	-		
	30	0.189	0.000	4.150	0.705	0.999	0.22
		±0.050	-	±0.395	±0.250		
	40	0.000	0.000	7.209	0.000	0.997	0.10
		-	-	±0.220	-		
CvI	4	1.968	0.000	0.012	0.003	0.997	551
		±0.403	-	±0.006	±0.002		
	30	0.936	0.000	0.121	0.002	0.998	332
		±0.015	-	±0.063	±0.000		
	40	0.761	0.000	0.170	0.005	0.991	90
	±0.107	-	±0.109	±0.001			
50	0.173	0.000	0.184	0.033	0.990	4.9	
	±0.215	-	±0.064	±0.045			
TII	4	0.871	0.000	0.492	0.001	0.993	558
		±0.021	-	±0.140	±0.000		
	30	0.267	0.000	1.287	0.025	0.980	0.88
		±0.049	-	±0.257	±0.010		
	40	0.514	0.000	2.349	0.559	0.999	0.75
	±0.140	-	±0.924	±0.073			
50	0.700	0.000	5.174	1.040	1.000	0.55	
	±0.069	-	±1.620	±0.018			

B. Σταθερότητα λιπασών σε σύστημα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο που σχηματίζονται απουσία επιφανειοενεργού (SLM 1)



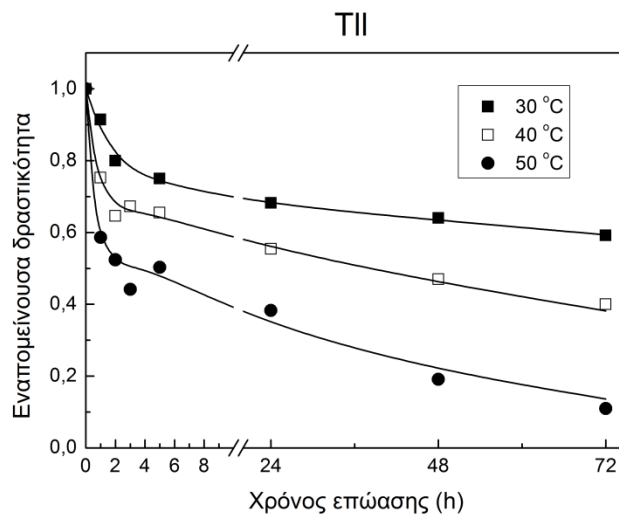
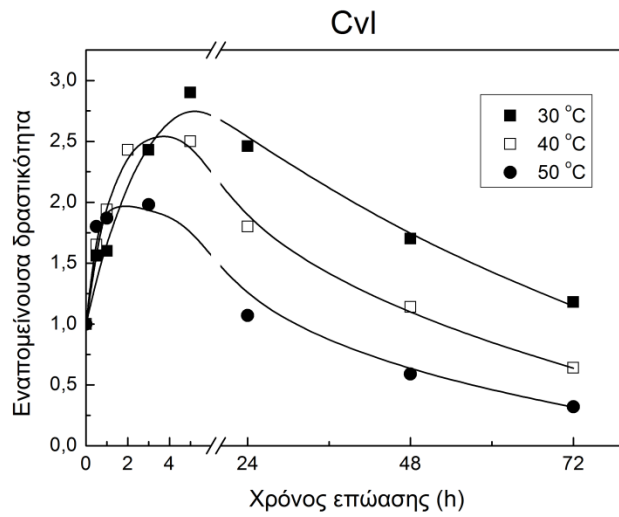
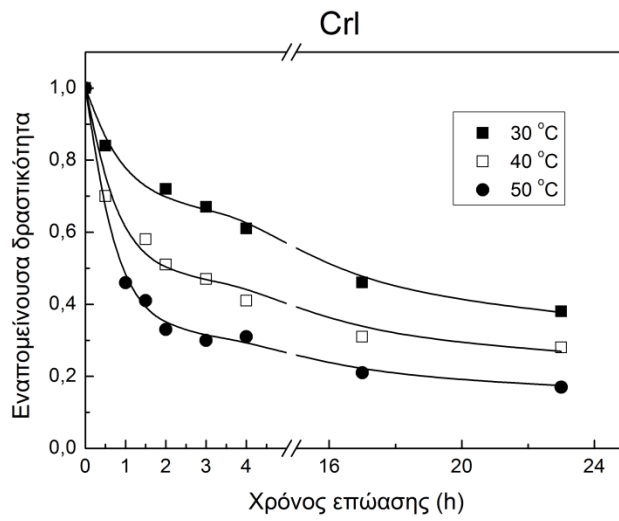
Λιπάση	T (°C)	α_1	α_2	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	r^2	$t_{1/2}$ (h)
CrI	4	0.000	0.000	2.570	0.000	0.999	0.27
		-	-	±0.045	-		
	30	0.000	0.000	3.162	0.000	1.000	0.22
		-	-	±0.043	-		
	40	0.000	0.000	4.417	0.000	0.991	0.16
		-	-	±0.203	-		
CvI	4	0.864	0.000	0.134	0.001	0.996	555
		±0.012	-	±0.042	±0.000		
	30	0.748	0.000	0.210	0.004	0.998	106
		±0.020	-	±0.030	±0.001		
	40	0.716	0.000	0.348	0.008	0.998	47.8
	±0.038	-	±0.079	±0.001			
50	0.679	0.000	0.660	0.021	0.999	16.1	
	±0.020	-	±0.108	±0.001			
TII	4	1.124	0.000	0.219	0.001	0.992	814
		±0.006	-	±0.026	±0.000		
	30	0.817	0.000	5.165	0.002	1.000	246
		±0.001	-	±0.102	±0.000		
	40	0.779	0.000	3.869	0.005	0.999	89.0
	±0.005	-	±0.476	±0.000			
50	0.621	0.000	1.794	0.006	0.994	36.8	
	±0.016	-	±0.267	±0.001			

Γ. Σταθερότητα λιπασών σε σύστημα μικρογαλακτωμάτων νερού σε έλαιο που σχηματίζονται απουσία επιφανειοενεργού (SLM 14)



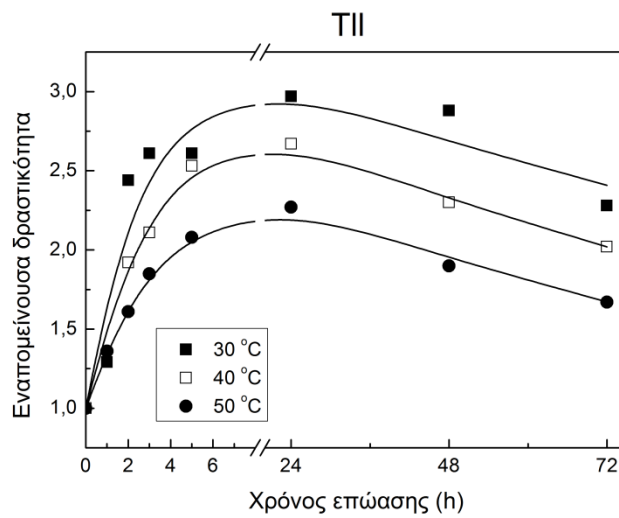
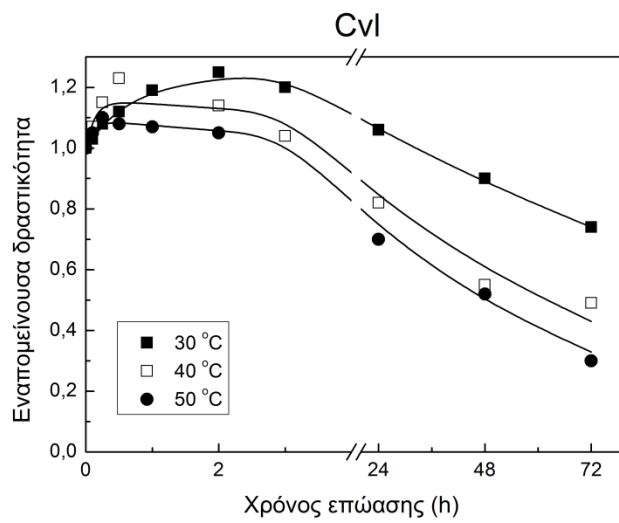
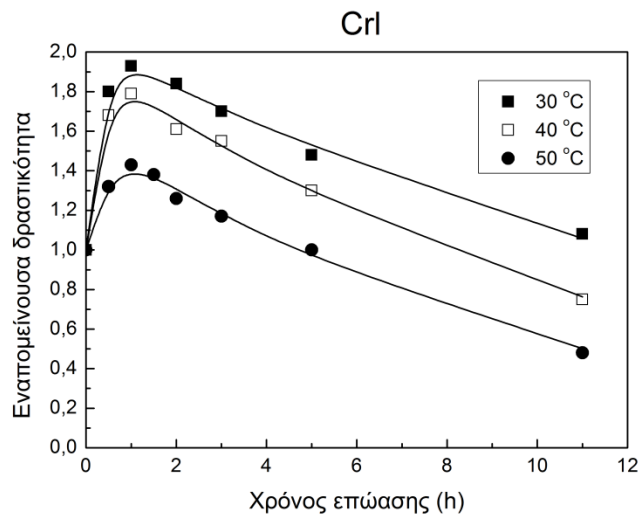
Λιπάση	T (°C)	α_1	α_2	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	r^2	$t_{1/2}$ (h)
CrI	4	0.000	0.000	1.567	0.000	0.995	0.44
		-	-	±0.068	-		
	30	0.000	0.000	2.661	0.000	0.992	0.26
		-	-	±0.089	-		
	40	0.000	0.000	3.869	0.000	0.996	0.18
		-	-	±0.108	-		
CvI	4	0.869	0.000	0.009	0.0003	0.998	1956
		±0.059	-	±0.005	±0.0002		
	30	0.874	0.000	0.061	0.002	0.996	296
		±0.039	-	±0.033	±0.000		
	40	0.685	0.000	0.295	0.003	0.991	109
	±0.027	-	±0.054	±0.001			
50	0.658	0.000	0.304	0.017	1.000	19.6	
		±0.012	-	±0.020	±0.001		
TII	4	0.852	0.000	0.220	0.001	1.000	538
		±0.002	-	±0.007	±0.000		
	30	0.807	0.000	0.381	0.016	0.992	32.6
		±0.061	-	±0.223	±0.002		
	40	0.763	0.000	0.410	0.029	0.998	17.1
	±0.058	-	±0.165	±0.002			
50	0.775	0.000	0.507	0.066	0.998	8.8	
		±0.181	-	±0.516	±0.007		

Δ. Σταθερότητα λιπασών σε σύστημα μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό (W1)



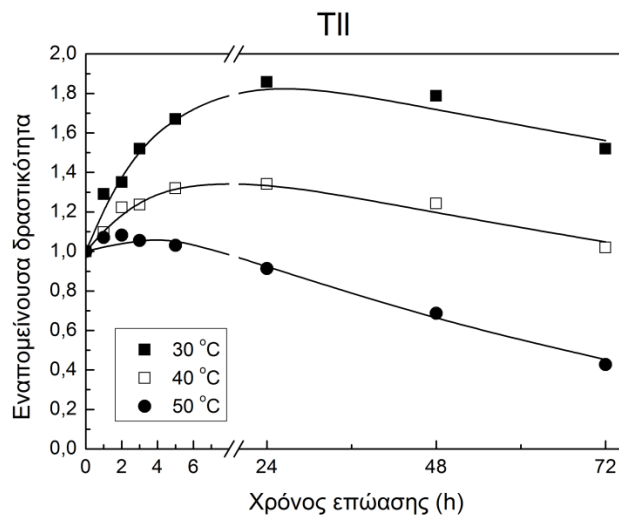
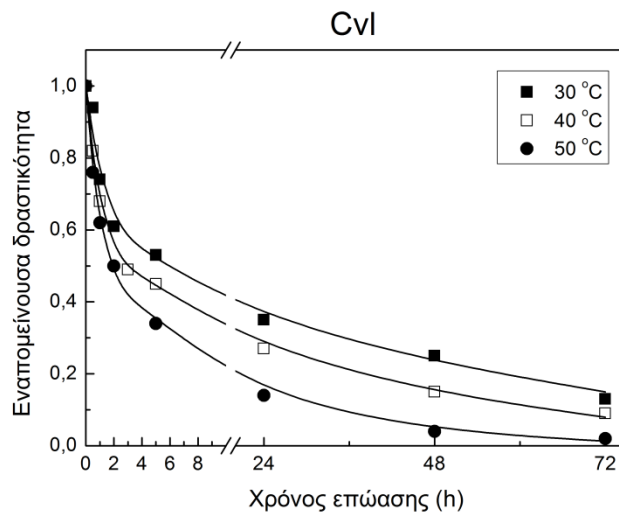
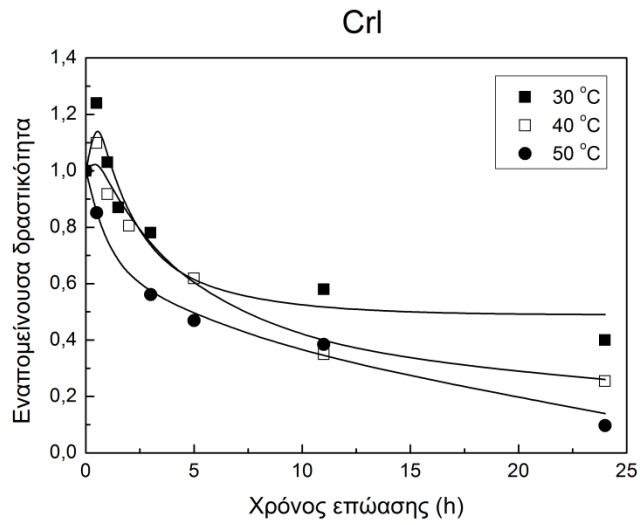
Λιπάση	T (°C)	α_1	α_2	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	r^2	$t_{1/2}$ (h)		
CrI	30	0.695 ±0.027	0.000 -	1.262 ±0.364	0.028 ±0.004	0.992	12.6		
	40	0.488 ±0.029	0.000 -	1.446 ±0.290	0.027 ±0.005			0.987	2.0
	50	0.326 ±0.015	0.000 -	1.521 ±0.133	0.028 ±0.004				
CvI	30	3.549 ±0.525	0.000 -	0.310 ±0.114	0.016 ±0.004	0.980	126		
	40	2.811 ±0.312	0.000 -	0.817 ±0.341	0.020 ±0.005			0.930	87.6
	50	2.072 ±0.072	0.000 -	2.507 ±0.606	0.026 ±0.003				
TII	30	0.720 ±0.039	0.000 -	0.502 ±0.139	0.003 ±0.001	0.990	124		
	40	0.668 ±0.020	0.000 -	1.490 ±0.376	0.008 ±0.002			0.988	36.9
	50	0.528 ±0.062	0.000 -	2.041 ±1.623	0.019 ±0.007				

Ε. Σταθερότητα λιπασών σε σύστημα μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό (W3)



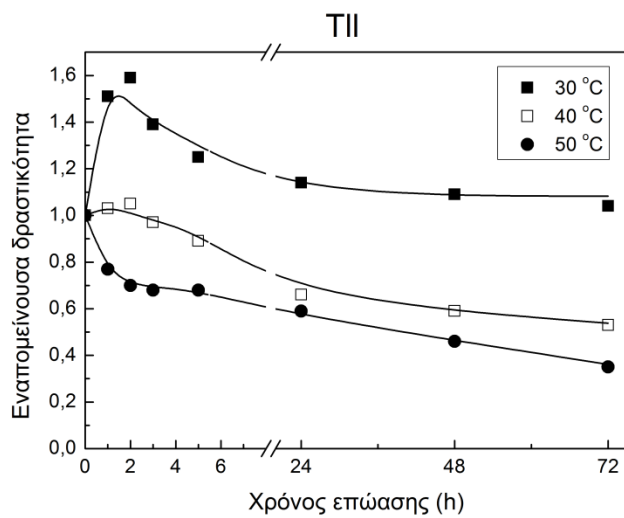
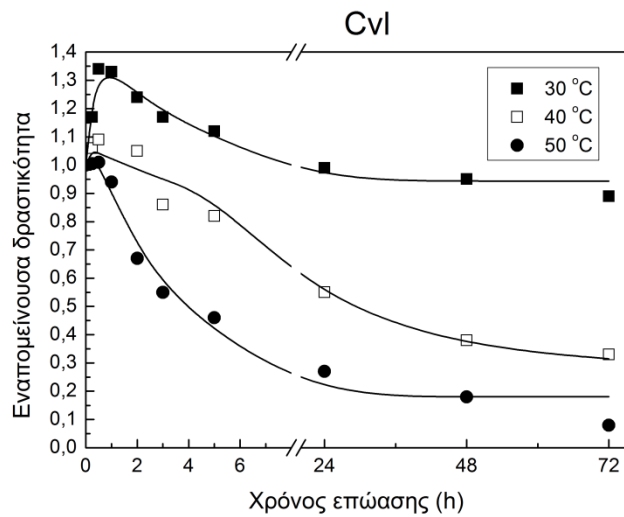
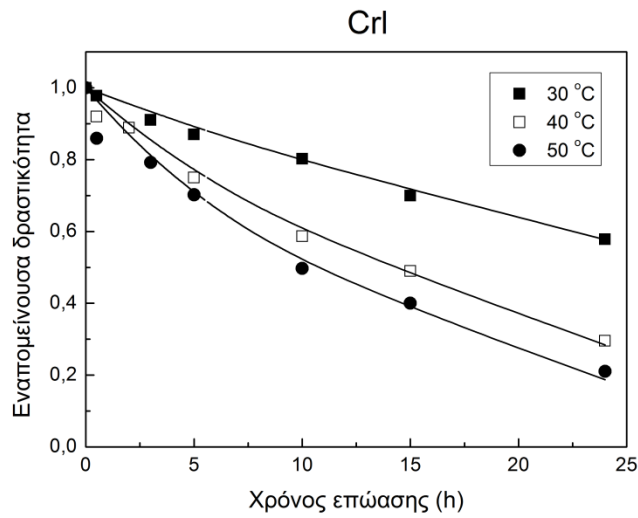
Λιπάση	T (°C)	α_1	α_2	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	r^2	$t_{1/2}$ (h)
CrI	30	2.018	0.000	3.500	0.060	1.000	23.5
		±0.053	-	±0.734	±0.005		
	40	1.920	0.000	3.135	0.086	0.995	16.0
		±0.031	-	±0.434	±0.005		
	50	1.552	0.000	2.238	0.107	0.990	11.0
		±0.033	-	±0.477	±0.008		
CvI	30	1.262	0.000	1.324	0.008	0.999	116
		±0.008	-	±0.077	±0.000		
	40	1.160	0.000	8.508	0.014	0.967	60.2
		±0.033	-	±7.895	±0.001		
	50	1.091	0.000	10.575	0.017	0.997	46.0
		±0.012	-	±6.773	±0.001		
TII	30	3.292	0.000	0.344	0.005	0.900	380
		±0.396	-	±0.121	±0.003		
	40	3.017	0.000	0.293	0.006	0.998	303
		±0.060	-	±0.017	±0.000		
	50	2.577	0.000	0.254	0.006	0.999	277
		±0.027	-	±0.008	±0.000		

ΣΤ.Σταθερότητα λιπασών σε σύστημα μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό (W7)



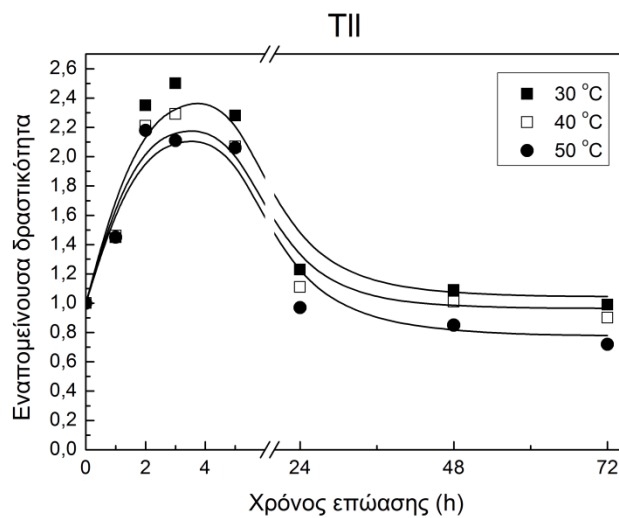
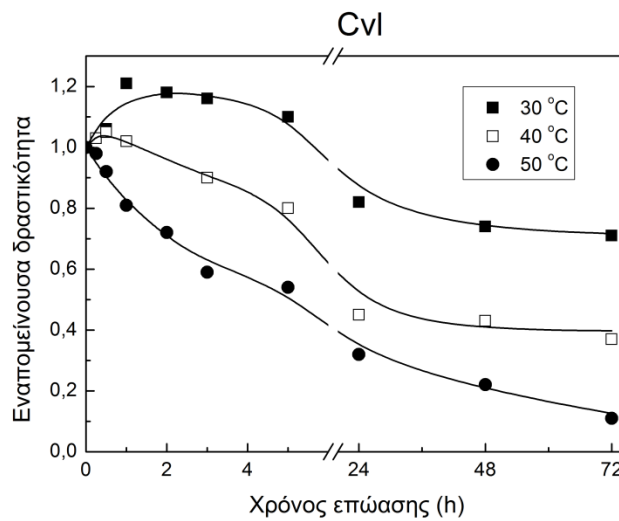
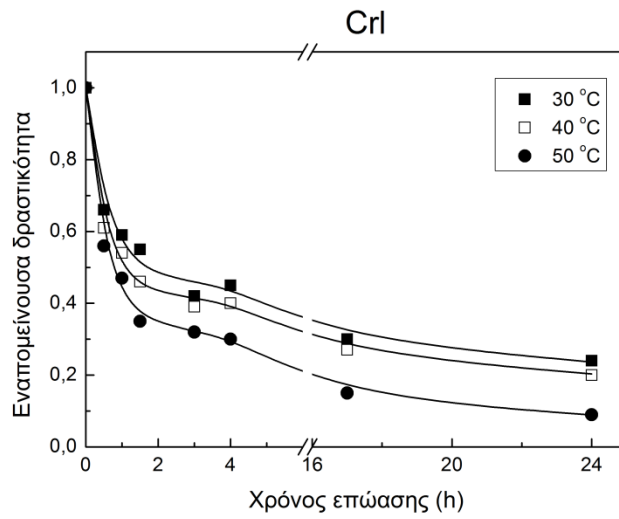
Λιπάση	T (°C)	α_1	α_2	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	r^2	$t_{1/2}$ (h)
Crl	30	1.358	0.490	33.119	0.444	0.946	10.0
		∞	± 0.070	∞	± 0.239		
	40	1.114	0.252	33.119	0.192	0.982	6.5
		± 0.055	± 0.059	∞	± 0.045		
	50	0.634	0.000	1.049	0.066	0.990	4.7
		± 0.083	-	± 0.575	± 0.014		
Cvl	30	0.536	0.000	0.694	0.018	0.987	6.1
		± 0.071	-	± 0.230	± 0.004		
	40	0.486	0.000	0.918	0.026	0.999	2.9
		± 0.011	-	± 0.047	± 0.002		
	50	0.426	0.000	1.013	0.049	0.997	1.8
		± 0.027	-	± 0.101	± 0.007		
TII	30	2.039	0.000	0.230	0.004	0.973	356
		± 0.084	-	± 0.034	± 0.001		
	40	1.513	0.000	0.227	0.005	0.956	226
		± 0.050	-	± 0.041	± 0.001		
	50	1.195	0.000	0.129	0.015	0.980	66.3
		± 0.059	-	± 0.065	± 0.002		

Ζ. Σταθερότητα λιπασών σε σύστημα μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό (S2)



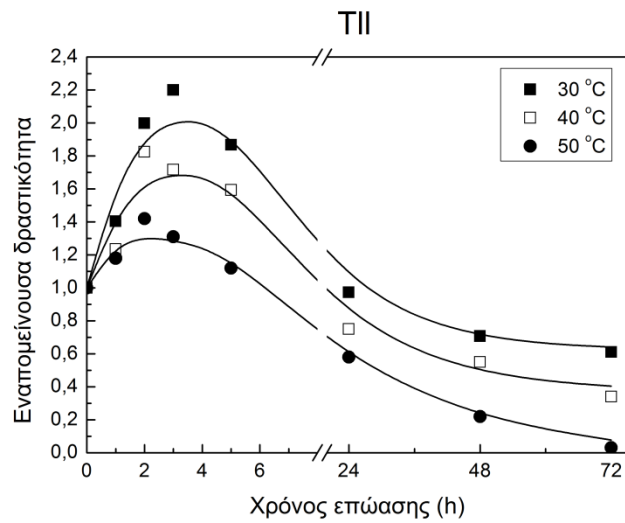
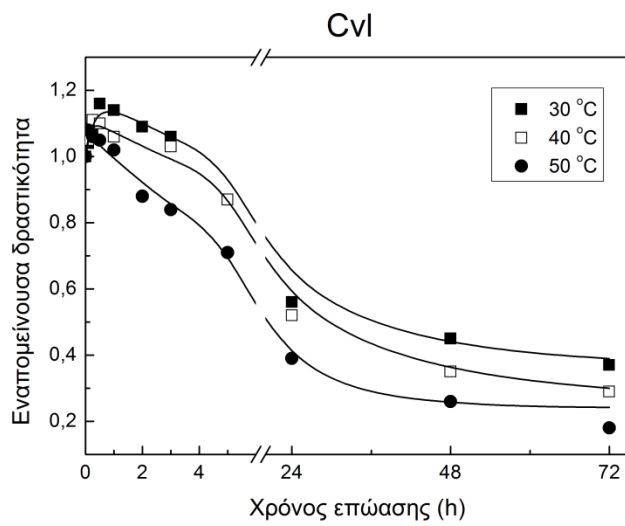
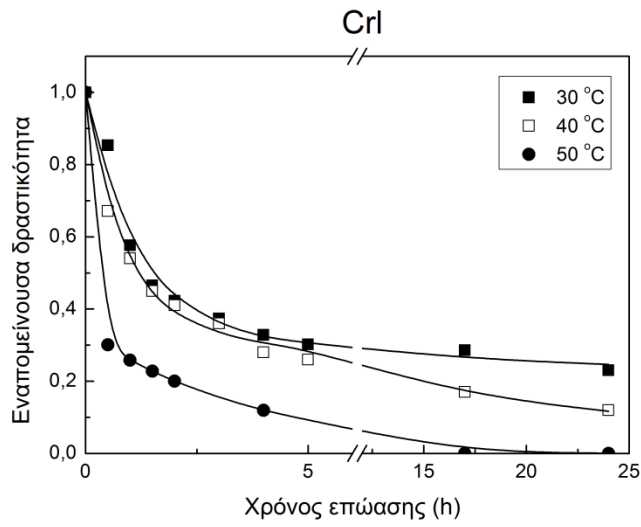
Λιπάση	T (°C)	α_1	α_2	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	r^2	$t_{1/2}$ (h)
CrI	30	0.000	0.000	0.023	0.000	0.994	30.1
		-	-	±0.001	-		
	40	0.000	0.000	0.052	0.000	0.991	13.3
		-	-	±0.003	-		
	50	0.000	0.000	0.070	0.000	0.970	9.9
		-	-	±0.006	-		
CvI	30	1.413	0.944	3.059	0.240	0.956	-
		±0.069	±0.024	±1.164	±0.081		
	40	1.061	0.297	128.257	0.053	0.977	25.0
		∞	±0.048	∞	±0.014		
	50	1.076	0.180	3.891	0.292	0.973	3.8
		±0.078	±0.052	±8.420	±0.086		
TII	30	1.670	1.082	10.000	0.207	0.928	-
		±0.115	±0.055	∞	±0.096		
	40	1.064	0.533	2.399	0.067	0.987	-
		±0.030	±0.036	±6.443	±0.019		
	50	0.705	0.000	1.546	0.009	0.996	38.9
		±0.012	-	±0.303	±0.001		

Η. Σταθερότητα λιπασών σε σύστημα μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό (S4)



Λιπάση	T (°C)	α_1	α_2	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	r^2	$t_{1/2}$ (h)
Crl	30	0.490	0.000	1.793	0.030	0.988	1.65
		±0.039	-	±0.408	±0.006		
	40	0.447	0.000	2.124	0.032	0.994	1.03
		±0.026	-	±0.329	±0.005		
	50	0.371	0.000	2.175	0.058	0.995	0.70
		±0.032	-	±0.375	±0.015		
Cvl	30	1.258	0.713	1.048	0.071	0.979	-
		±0.048	±0.032	±0.449	±0.022		
	40	1.070	0.397	3.850	0.102	0.977	18.7
		±0.028	±0.018	±4.702	±0.034		
	50	0.494	0.000	0.426	0.020	0.996	5.9
		±0.046	-	±0.072	±0.003		
TII	30	3.442	1.046	0.400	0.131	0.945	-
		±1.321	±0.152	±0.296	±0.120		
	40	3.090	0.965	0.445	0.140	0.956	-
		±1.067	±0.122	±0.307	±0.126		
	50	2.895	0.780	0.456	0.114	0.967	-
		±0.639	±0.115	±0.237	±0.067		

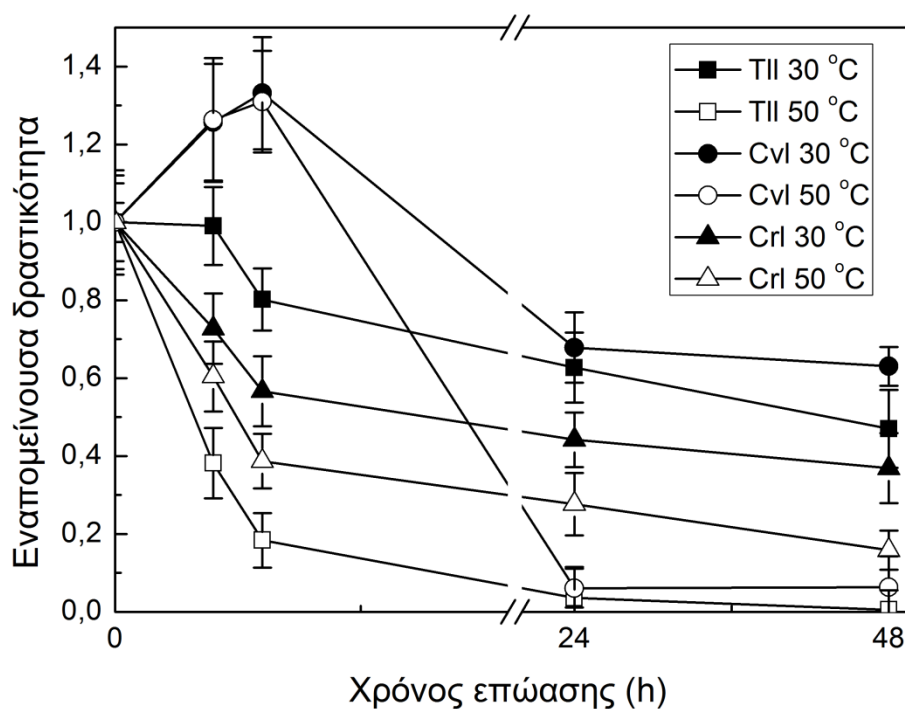
Θ. Σταθερότητα λιπασών σε σύστημα μικρογαλακτωμάτων νερού σε ιοντικό υγρό (S7)



Λιπάση	T (°C)	α_1	α_2	k_1 (h ⁻¹)	k_2 (h ⁻¹)	r^2	$t_{1/2}$ (h)
Crl	30	0.305	0.000	0.831	0.009	0.980	1.52
		±0.042	-	±0.129	±0.010		
	40	0.348	0.000	1.209	0.047	0.994	1.16
		±0.023	-	±0.119	±0.008		
	50	0.326	0.000	9.308	0.258	1.000	0.14
		±0.004	-	±0.973	±0.006		
Cvl	30	1.180	0.379	3.294	0.061	0.997	31.3
		±0.014	±0.021	±0.853	±0.007		
	40	1.113	0.284	8.464	0.055	0.995	24.6
		±0.018	±0.030	±5.646	±0.007		
	50	1.075	0.242	180.923	0.103	0.988	11.4
		∞	±0.031	∞	±0.018		
TII	30	2.547	0.635	0.539	0.081	0.961	-
		±0.411	±0.141	±0.272	±0.041		
	40	2.043	0.388	0.581	0.066	0.957	42.6
		±0.306	±0.153	±0.363	±0.033		
	50	1.425	0.000	1.073	0.041	0.985	26.5
		±0.064	-	±0.618	±0.005		

I. Σταθερότητα λιπασών σε [bmim]PF₆ με 2.5 % (v/v) νερό

Η σταθερότητα των λιπασών δεν μελετήθηκε εκτενώς σε συστήματα ιοντικού υγρού, καθώς το ενδιαφέρον εστιάστηκε σε συστήματα με οργανωμένες δομές όπως τα μικρογαλακτώματα. Καθώς όμως το [bmim]PF₆ είναι συστατικό του συστήματος και έχει αναφερθεί ότι τα ιοντικά υγρά αυξάνουν τη σταθερότητα των ενζύμων, θα έπρεπε να ελεχθεί εάν η σταθεροποίηση οφείλεται στο ιοντικό υγρό μόνο, ή στην οργανωμένη δομή των μικρογαλακτωμάτων. Τα δεδομένα δεν κρίθηκαν αρκετά ώστε να χρησιμοποιηθούν για στατιστική επεξεργασία. Παρόλα αυτά, η σύγκριση των συγκεκριμένων δεδομένων με τα δεδομένα της σταθερότητας στα μικρογαλακτώματα ιοντικών υγρών υποδεικνύει την καλύτερη σταθερότητα που παρουσιάζουν οι λιπάσες στα νέα αυτά συστήματα σε σχέση με το ιοντικό υγρό.



ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

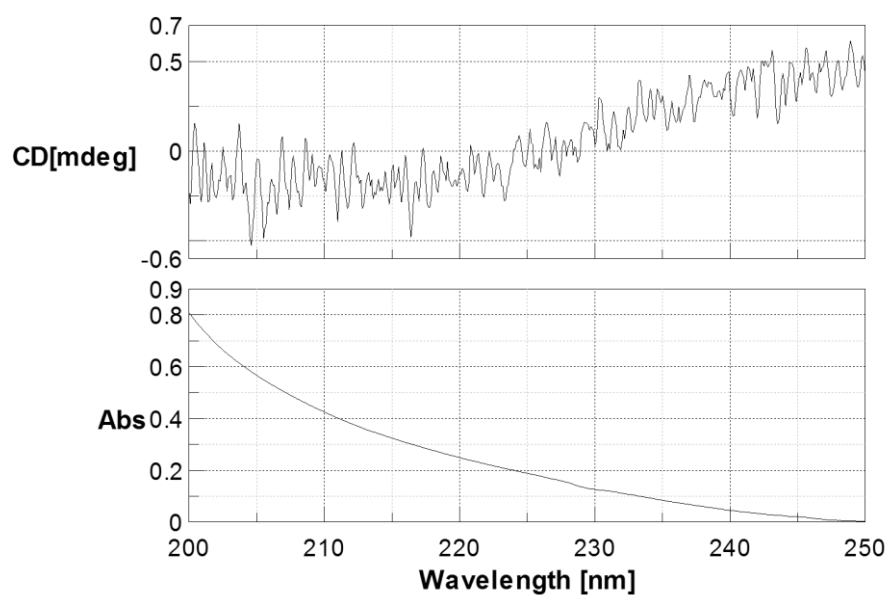
ΦΑΣΜΑΤΑ ΚΥΚΛΙΚΟΥ ΔΙΧΡΩΙΣΜΟΥ ΣΕ ΥΔΑΤΙΚΑ

ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΙΟΝΤΙΚΩΝ ΥΓΡΩΝ

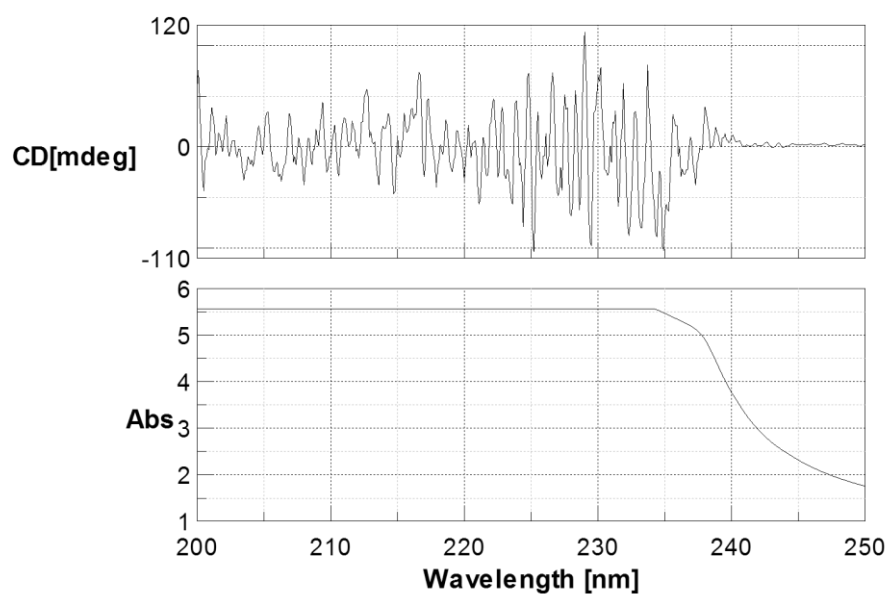
Στις επόμενες σελίδες παρουσιάζονται τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού και απορρόφησης διάφορων διαλυμάτων ιοντικών υγρών σε ρυθμιστικό διάλυμα. Ως μέτρο σύγκρισης παρατίθεται το φάσμα κυκλικού διχρωισμού και απορρόφησης του ρυθμιστικού διαλύματος.

Παρατηρείται σημαντική αύξηση της απορρόφησης κάτω από τα 230 nm, ανάλογα με τη συγκέντρωση των ιοντικών υγρών, η οποία αποτυπώνεται στο θόρυβο που προκύπτει στο φάσμα κυκλικού διχρωισμού.

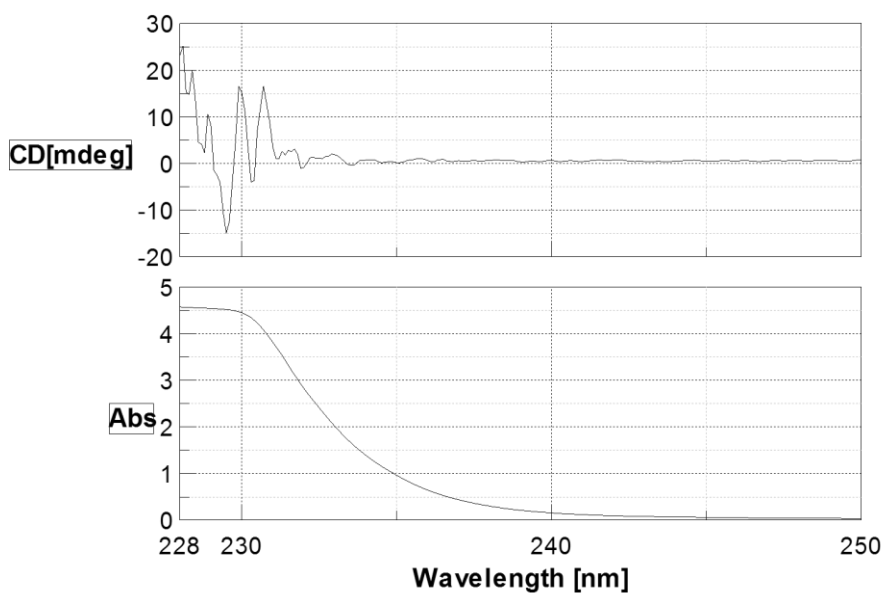
Ρυθμιστικό διάλυμα Tris-HCl pH 7.5 25 mM



Διάλυμα 2% (v/v) [bmim]PF₆



Διάλυμα 2% (v/v) [bdmim]BF₄



0.5% [bmim]BF₄

