

ΝΑΝΟΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΓΙΑ ΠΟΛΥΕΝΖΥΜΙΚΕΣ ΑΛΥΣΙΔΩΤΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ

A. Γιαννακοπούλου¹, E. Γκάντζου¹, A. Χατζηκωνσταντίνου¹, M. Πατήλα¹, N. Χαλμπές², K. Σπύρου², A. Πολύδερα¹, Δ. Γουρνής², X. Σταμάτης^{1,*}

¹Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα

² Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης των Υλικών, Πολυτεχνική Σχολή, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα
(*hstamati@uoi.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι αλυσιδωτές αντιδράσεις που καταλύονται από πολυενζυμικά συστήματα έχουν προσελκύσει την τελευταία δεκαετία τεράστιο επιστημονικό ενδιαφέρον. Συνιστούν μια αναδυόμενη τεχνολογία που διευρύνει σημαντικά τη δυνατότητα εφαρμογής των βιοκαταλυτών σε πλήθος διεργασιών με ιδιαίτερο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον, όπως στη σύνθεση προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Τέτοια συστήματα θα μπορούσαν να βελτιώσουν τις βιοκαταλυτικές διεργασίες, εξοικονομώντας χρόνο και μειώνοντας τα απόβλητα, ενώ θα μπορούσαν να είναι αυτάρκη από άποψη απαιτήσεων συμπαραγόντων.

Η ακινητοποίηση ενζύμων σε στερεό φορέα συνιστά μια κοινώς χρησιμοποιούμενη στρατηγική για τη βελτίωση της σταθερότητας και της επαναχρησιμοποίησης των συστημάτων πολλαπλών ενζύμων. Τα μαγνητικά νανοσωματίδια χρησιμοποιούνται ευρέως ως ιδιαίτερα υποσχόμενοι φορείς για την ακινητοποίηση των ενζύμων, καθώς προσφέρουν τη δυνατότητα του εύκολου διαχωρισμού τους από το μίγμα της αντίδρασης με απλή εφαρμογή ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου.

Στην παρούσα εργασία, μελετάται η χρήση μαγνητικών νανοσωματιδίων οξειδίου του σιδήρου γ-Fe₂O₃ τροποποιημένων με 3-(αμινοπροπυλ)-τριαιθοξυσιλάνιο (APTES), για την ταυτόχρονη συν-ακινητοποίηση τριών ενζύμων, όπως η β-γλυκοσιδάση, η οξειδάση της γλυκόζης και η υπεροξειδάση χρένου. Το νανοβιοκαταλυτικό σύστημα αποδείχθηκε εξαιρετικά σταθερό και καταλυτικά αποτελεσματικό παρέχοντας την δυνατότητα επέκτασής του, ενσωματώνοντας σε ένα επόμενο βήμα, το ένζυμο κυτταρινάση για την υδρόλυση αγροτοβιομηχανικών παραπροϊόντων μέσω μιας αλυσιδωτής αντίδρασης τεσσάρων βημάτων. Για τη βελτιστοποίηση των συστημάτων αυτών, μελετήθηκαν διάφοροι παράγοντες που επηρεάζουν την καταλυτική τους απόδοση. Τέλος, τα εν λόγω συστήματα ενσωματώθηκαν σε μικρορευστονικές διατάξεις με τη χρήση εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, ώστε να παρασκευαστούν μικροαντιδραστήρες συνεχούς ροής που προσφέρουν τα επιπλέον οφέλη της άμεσης συλλογής του προϊόντος, της εύκολης ανακύκλωσης του βιοκαταλύτη και της ενισχυμένης λειτουργικής σταθερότητας για πολλούς κύκλους αντίδρασης διατηρώντας αμείωτη τη δραστικότητα του συστήματος.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατά την τελευταία δεκαετία, η νανοβιοκατάλυση έχει αναδειχθεί ως ένας εξαιρετικά υποσχόμενος τομέας για την ανάπτυξη καινοτόμων βιοκαταλυτικών συστημάτων^[1]. Οι αλυσιδωτές αντιδράσεις, δηλαδή η ενσωμάτωση πολλαπλών ενζυμικών μετασχηματισμών, συνιστούν μια σημαντικά αναδυόμενη τεχνολογία λόγω της ανάγκης για τη διερεύνηση πιο οικολογικών και βιώσιμων εναλλακτικών τρόπων παραγωγής χημικών ουσιών και χρήσιμων βιοπροϊόντων. Με την υπόθεση ότι όλα τα μεταβολικά μονοπάτια είναι κυρίως αλυσιδωτές αντιδράσεις, η πιθανότητα μίμησης των μεταβολικών μονοπατιών των κυττάρων ή ακόμα και η ανάπτυξη νέων προηγμένων μεταβολικών οδών που δεν εμφανίζονται στη φύση θα μπορούσαν να αποτελέσουν μελλοντικές καινοτομίες των πολυενζυμικών συστημάτων^[2].

Οι ιδιαίτερα αποτελεσματικά καταλυτικοί μηχανισμοί των αλυσιδωτών αντιδράσεων καθώς και τα πλεονεκτήματα της ακινητοποίησης των ενζύμων, έχουν προωθήσει την ανάπτυξη

αποτελεσματικών στρατηγικών προκειμένου να συνδυαστούν ποικίλες ενζυμικές δραστηριότητες μέσω της ακινητοποίησης ενζύμων σε νανοφορείς και να δημιουργηθούν τεχνητά νανοβιοκαταλυτικά συστήματα. Η συν-ακινητοποίηση πολλαπλών ενζύμων μπορεί γενικά να επιτευχθεί με πέντε χημικές μεθόδους: (i) μη ειδική ακινητοποίηση, (ii) διαδοχική ακινητοποίηση, (iii) ακινητοποίηση θέσης, (iv) ακινητοποίηση ειδικής θέσης και (v) διασύνδεση^[3]. Παρ' όλα αυτά, προκειμένου να διατηρηθεί η ενζυμική δραστηριότητα όλων των επιμέρους ενζύμων, πρέπει να ληφθούν σημαντικά υπόψη πολλές παράμετροι όπως η κατάλληλη τεχνική ακινητοποίησης, οι φυσικές ιδιότητες του φορέα ακινητοποίησης καθώς και η δομή και η λειτουργία κάθε ενζύμου. Όχι μόνο οι συνθήκες αντίδρασης, αλλά και οι φυσικοχημικές ιδιότητες του φορέα ακινητοποίησης, είναι καθοριστικές για τον προσδιορισμό της καταλυτικής απόδοσης ενός νανοβιοκαταλυτικού συστήματος πολλών ενζύμων. Συνεπώς, η επιλογή του κατάλληλου φορέα για την ακινητοποίηση των ενζύμων συνιστά υψηλή προτεραιότητα. Τα κύρια χαρακτηριστικά των φορέων που εφαρμόζονται ευρέως στην συν-ακινητοποίηση των ενζύμων είναι: χημική και θερμική σταθερότητα, βιοσυμβατότητα, εύκολη ανάκτηση και επαναχρησιμοποίηση, καθώς και διαθεσιμότητα και τιμή.

Η ταχεία ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας τις τελευταίες δεκαετίες οδήγησε στην ανάπτυξη νανοσωματιδίων που χρησιμοποιούνται ως εξαιρετικά υποσχόμενοι φορείς, τόσο στην ακινητοποίηση ενός ενζύμου όσο και στην συν-ακινητοποίηση πολλαπλών ενζύμων. Τα νανοσωματίδια (ΝΣ) παρουσιάζουν πολλά πλεονεκτήματα και κατατάσσονται ευρέως σε έξι κατηγορίες ανάλογα με τα φυσικά και χημικά τους χαρακτηριστικά: (i) ΝΣ με βάση τον άνθρακα, (ii) μεταλλικά ΝΣ, (iii) κεραμικά ΝΣ, (iv) ΝΣ ημιαγωγών, (v) πολυμερή ΝΣ και (vi) βασισμένα σε λιπίδια ΝΣ^[4]. Εντούτοις, υπάρχουν συγκεκριμένοι τύποι νανοϋλικών που ξεχωρίζουν λόγω των εξειδικευμένων ιδιοτήτων τους και εφαρμόζονται ευρέως σε τεχνικές ακινητοποίησης. Αυτοί οι τύποι είναι: υπερπαραμαγνητικά νανοσωματίδια, νανοσωματίδια άνθρακα και μεσοπορώδη νανοϋλικά.

Ιδιαίτερα, τα μαγνητικά νανοσωματίδια λόγω του μαγνητικού τους πυρήνα μπορούν εύκολα να διαχωριστούν από το μίγμα της αντίδρασης μόνο με την εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου, έτσι ώστε να μπορούν να επαναχρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά. Επιπλέον, προκειμένου να μειωθεί η τοξικότητά τους και να αυξηθεί η βιοσυμβατότητά τους, τα μαγνητικά νανοσωματίδια μπορούν να επικαλυφθούν με διαφορετικά φυσικά βιοπολυμερή, όπως η χιτοζάνη^[5]. Τα μαγνητικά νανοσωματίδια έχουν εφαρμοστεί εκτεταμένα για την ακινητοποίηση ενός ενζύμου^[6] καθώς και για την ταυτόχρονη συν-ακινητοποίηση.

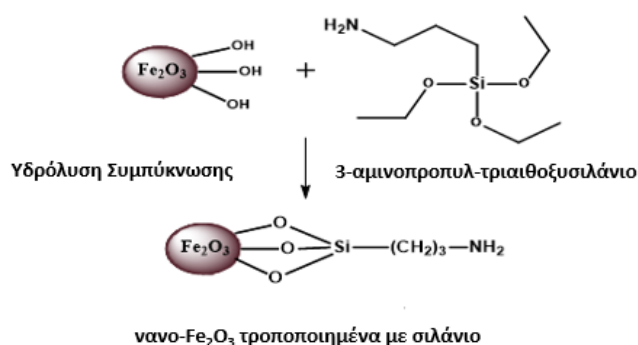
Τέλος, τόσο οι οξειδοαναγωγάσες όσο και οι υδρολάσες λόγω των ιδιοτήτων τους συνιστούν δύο ευρέως αξιοποιήσιμες κατηγορίες ενζύμων^[7] για την ανάπτυξη πολυενζυμικών συστημάτων για βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Μια σύντομη ανασκόπηση της βιβλιογραφίας επισημαίνει ότι τα υδρολυτικά ένζυμα κυτταρινάση και β-γλυκοσιδάση (bgl) εφαρμόζονται ευρύτατα σε συν-ακινητοποιημένα συστήματα με σκοπό την υδρόλυση της κυτταρίνης ενός άφθονου στη φύση βιοπολυμερούς σε αξιοποιήσιμα σάκχαρα ενώ η οξειδάση της γλυκόζης (Gox) και η υπεροξειδάση του χρένου (HRP) εφαρμόζονται ευρέως για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων γλυκόζης και άλλων αναλυτικών συσκευών αλλά και για την οξείδωση της γλυκόζης με σκοπό την παραγωγή ουσιών βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος.

Στόχος επομένως της παρούσας εργασίας είναι η μεμονωμένη αλλά και η ταυτόχρονη συν-ακινητοποίηση των τεσσάρων αυτών ενζύμων με σκοπό την παραγωγή ενός νανοβιοκαταλυτικού συστήματος ικανού να εκτελεί αλυσιδωτές αντιδράσεις τεσσάρων βημάτων. Το προκύψαν σύστημα χαρακτηρίστηκε με διάφορες φασματοσκοπικές μεθόδους και μελετήθηκε ως προς τις υδρολυτικές και οξειδοαναγωγικές του ιδιότητες. Τέλος, χρησιμοποιήθηκε για την υδρόλυση της κυτταρίνης μέσω μιας αλυσιδωτής αντίδρασης τεσσάρων βημάτων και ενσωματώθηκε σε μικρορευστονικές διατάξεις με τη χρήση εξωτερικού μαγνητικού πεδίου για την παρασκευή ενός μικροαντιδραστήρα συνεχούς ροής.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Υλικά

Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία είναι η οξειδάση της γλυκόζης (Gox) από το μύκητα *Aspergillus niger*, η υπεροξειδάση χρένου (HRP) και η β-γλυκοσιδάση από αμύγδαλα (bgl) από την εταιρεία Merck. Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν είναι το διαμμωνιακό άλας του 2,2'-αζινο-δισ (3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικού οξέος), (ABTS, $\geq 98\%$ [HPLC]), το 4-νιτροφαινυλ β- \ddot{u} -γαλακτοζίδιο (pNPG) και γλουτεραλδεΐδη (25%) της εταιρείας Merck. Τα νανοϋλικά που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία παρασκευάστηκαν στο Εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών του τμήματος Μηχανικών Επιστήμης των Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων σύμφωνα με τη θερμολυτική μέθοδο χωρίς διαλύτη^[8] ενώ η τροποποίηση που ακολούθησε με την ομάδα 3-αμινοπροπυλ-τριαιθοξυσιλάνιο περιγράφεται στο Σχήμα 1.



Σχήμα 1. Δομή και παρασκευή του νανοϋλικού γ -Fe-Aptes (Fe_2O_3 και (3-αμινοπροπυλ)τριαιθοξυσιλάνιο)

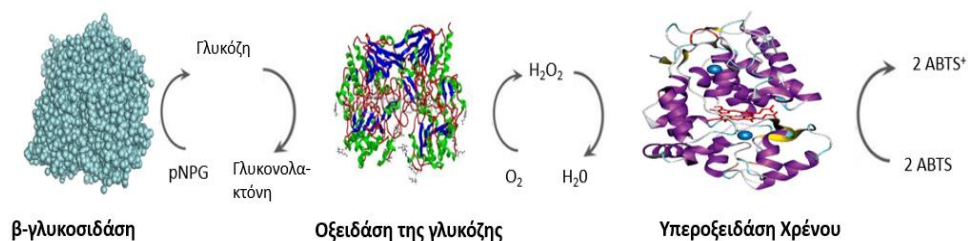
Ομοιοπολική συν-ακινητοποίηση των bgl:Gox:HRP σε γ -Fe-Aptes

Για την ομοιοπολική συν-ακινητοποίηση των ενζύμων bgl, Gox και HRP σε γ -Fe-Aptes, αρχικά ζυγίζονται 10 mg νανοϋλικού, στα οποία προστίθενται 17 ml υδατικού διαλύματος φωσφορικών 0.1 M pH 6. Στη συνέχεια προστίθενται 300 μ L Tween-20 (1% v/v). Το διάλυμα νανοϋλικών διασπείρεται με τη χρήση υπερήχων για 30 min. Μετά τη διασπορά προστίθενται 15 ml γλουτεραλδεΐδης 25% ώστε ο τελικός όγκος να είναι 32 ml. Το μίγμα επωάζεται υπό ανάδευση στους 30 °C για 30 min. Μετά το πέρας της επώασης πραγματοποιούνται φυγοκentrήσεις των διαλυμάτων στις 6,000 rpm για 10 min. Μετά από κάθε φυγοκentrήση απομακρύνεται το υπερκείμενο και εν συνεχεία προστίθενται 6 mL buffer. Μετά την τελευταία φυγοκentrήση τα νανοϋλικά επαναδιασπείρονται σε 18 mL buffer για 10 min. Ακολούθως ζυγίζονται 3 mg bgl τα οποία διαλυτοποιούνται σε 1 mL buffer, 3 mg Gox σε 1 ml buffer και 9 mg HRP σε 1 ml buffer. Έπεται μεταφορά των ενζυμικών διαλυμάτων στο διάλυμα νανοϋλικών. Το τελικό διάλυμα επωάζεται στους 30 °C για 1 h υπό ανάδευση. Ακολουθεί φυγοκentrήση στις 4,000 rpm για 10 min και απομάκρυνση του υπερκειμένου μέχρι 6 ml. Στη συνέχεια, το μίγμα ενζύμων-νανοϋλικού φυγοκentrείται στις 12,000 rpm για 10 min. Τέλος, απομακρύνεται το υπερκείμενο και το τελικό ίζημα αφήνεται για ξήρανση σε silica gel στους 4 °C.

Μελέτη ενζυμικής δραστηριότητας του πολυενζυμικού νανοβιοκαταλυτικού συστήματος

Η δραστηριότητα του τριενζυμικού νανοβιοκαταλυτικού συστήματος μελετήθηκε σε υπόστρωμα pNPG συγκέντρωσης 5 mM, με σκοπό την υδρόλυσή του από την β-γλυκοσιδάση προς παραγωγή γλυκόζης. Εν συνεχεία, η γλυκόζη οξειδώνεται από την Gox προς παραγωγή H_2O_2 , το οποίο χρησιμοποιείται από την HRP για την μετατροπή του διαμμωνιακού άλατος του ABTS σε $ABTS^+$ (Εικόνα 1). Η εξέλιξη της αντίδρασης παρακολουθήθηκε με λήψη φασμάτων στα 730 nm, ανά τακτά χρονικά διαστήματα, στους 50 °C και σε pH 6. Η συγκέντρωση του νανοβιοκαταλύτη ήταν 0.3 mg/ml

και του ABTS 3 mM. Έγινε επίσης μέτρηση απουσία νανοβιοκαταλύτη (blank) και στην οποία δεν παρατηρήθηκε χρωματική αλλαγή μετά από 24 h. Η μέτρηση της δραστηριότητας του συστήματος των τεσσάρων ενζύμων μελετήθηκε σε διάλυμα που περιείχε καρβοξυμεθυλοκυτταρίνη (CMC) 1% w/v και ABTS 3 mM επίσης με λήψη φασμάτων σε θερμοκρασία 50 °C και σε pH 6.



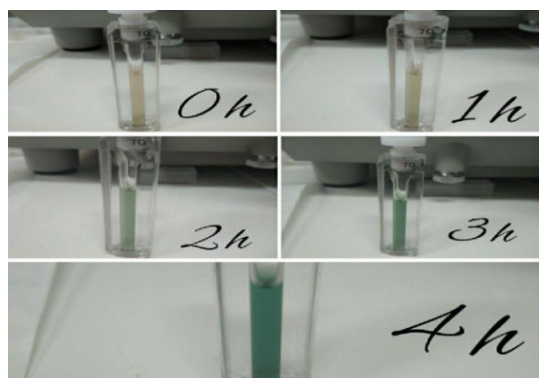
Εικόνα 1. Βιομετατροπή του rNPG σε ABTS⁺ μέσω μιας αλυσιδωτής αντίδρασης τριών βημάτων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα μελέτη αναπτύχθηκε ένα πολυενzymικό νανοβιοκαταλυτικό σύστημα μέσω της ταυτόχρονης ομοιοπολικής συν-ακινητοποίησης των ενζύμων β-γλυκοσιδάση, οξειδάση της γλυκόζης και υπεροξειδάση χρένου σε μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου (γ-Fe-Aptes). Η δραστηριότητα του συν-ακινητοποιημένου συστήματος των τριών ενζύμων εξετάστηκε σε διαφορετικές θερμοκρασίες με βέλτιστη τους 50 °C και υπόστρωμα rNPG συγκέντρωσης 5 mM. Αξίζει να αναφερθεί πως αύξηση της θερμοκρασίας κατά μόλις 10 °C, οδήγησε στην παραγωγή του τελικού προϊόντος στο μισό χρόνο δηλαδή σε 4 ώρες. Σε πρόσφατη μελέτη των Farrugia et al^[9], η συν-ακινητοποίηση των ενζύμων bgl, Gox και HRP σε υβριδικά φιλμ οδήγησε στην παραγωγή προϊόντος μετά από επτά ώρες.

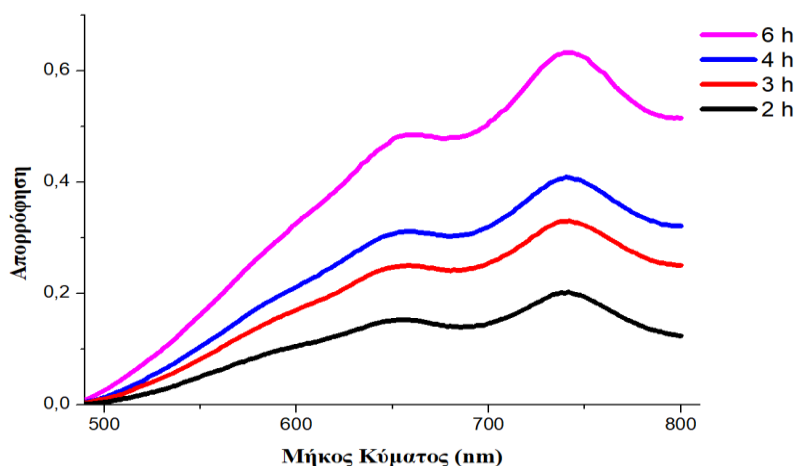
Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης επίσης υποδεικνύουν ότι τα νανοβιοκαταλυτικά συστήματα ακινητοποιημένων ενζύμων σε μαγνητικά νανοσωματίδια, χαρακτηρίζονται από υψηλή απόδοση ακινητοποίησης και καλή δραστηριότητα (Εικόνα 2 και Διάγραμμα 1) τόσο συγκριτικά με τα ελεύθερα ένζυμα όσο και με άλλα νανοβιοκαταλυτικά συστήματα που αναφέρονται στη βιβλιογραφία. Επίσης, διατηρούν την δραστηριότητά τους μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους αντίδρασης (Διάγραμμα 3). Συνεπώς, ένα τέτοιο νανοβιοκαταλυτικό σύστημα θα μπορούσε να αποτελέσει πολύτιμο εργαλείο για την επαναλαμβανόμενη κατάλυση αλυσιδωτών αντιδράσεων βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος.

Τέλος, στην παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε και η ενσωμάτωση ενός ακόμα ενζύμου στο σύστημα, της κυτταρινάσης, αποδίδοντας έναν νανοβιοκαταλύτη τεσσάρων ενζύμων που κατέλυσε με επιτυχία την αντίδραση υδρόλυσης της κυτταρίνης (Διάγραμμα 2) μέσω μιας αλυσιδωτής αντίδρασης.

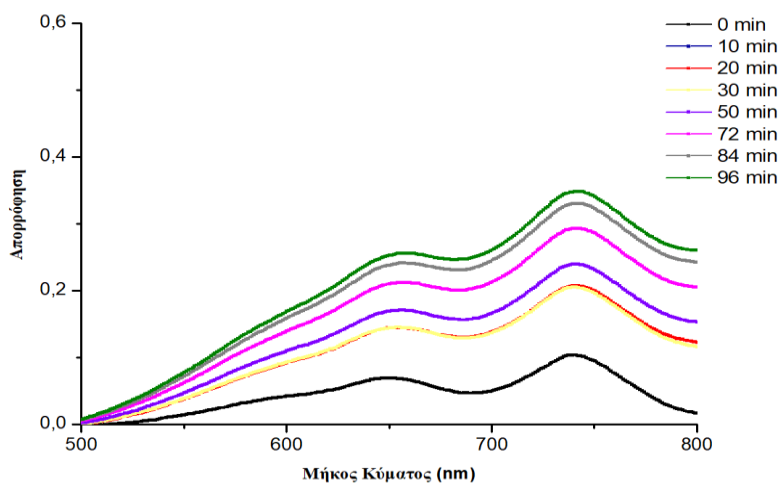


Εικόνα 2. Βιομετατροπή της 4-νιτροφαινυλ-γλυκοπυρανόζη (rNPG) στην οξειδωμένη μορφή του ABTS μέσω μιας αλυσιδωτής αντίδρασης 3 βημάτων από το συν-ακινητοποιημένο σύστημα bgl-Gox-HRP-γ-Fe-Aptes.

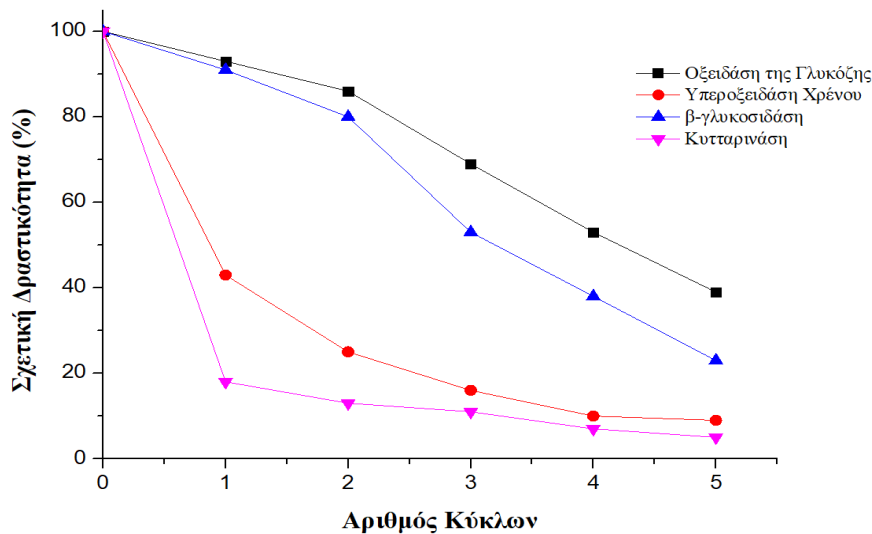
Στις εικόνες παρουσιάζονται υδατικά διαλύματα που περιέχουν rNPG, ABTS και νανοβιοκαταλύτη σε χρόνους $t=0, 1, 2, 3$ και 4 ώρες στους 50°C .



Διάγραμμα 1. Χρονοεξαρτώμενο φάσμα ορατού υπεριώδους καταγεγραμμένο από διαλύματα που περιέχουν rNPG, ABTS και νανοβιοκαταλύτη σε χρόνους $t= 2, 3, 4$ και 6 ώρες στους 50°C παρουσιάζοντας την αύξηση απορρόφησης της κορυφής στα 730 nm (ABTS⁺).



Διάγραμμα 2. Χρονοεξαρτώμενο φάσμα ορατού υπεριώδους καταγεγραμμένο από διαλύματα που περιέχουν CMC, ABTS και τον νανοβιοκαταλύτη στους 50°C παρουσιάζοντας την αύξηση απορρόφησης της κορυφής στα 730 nm (ABTS⁺).



Διάγραμμα 3. (%) Σχετική Δραστικότητα των τεσσάρων συν-ακίνητοποιημένων σε γ -Fe-Aptes ενζύμων (κυτταρινάση, β -γλυκοσιδάση, οξειδάση της γλυκόζης και υπεροξειδάση του χρένου) μετά από πέντε επαναλαμβανόμενους κύκλους αντίδρασης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ταυτόχρονη συν-ακίνητοποίηση τεσσάρων ενζύμων, της κυτταρινάσης, της β -γλυκοσιδάσης, της οξειδάσης της γλυκόζης και της υπεροξειδάσης χρένου σε μαγνητικά νανοσωματίδια οξειδίου του σιδήρου (γ -Fe-Aptes) με σκοπό την ανάπτυξη νανοβιοκαταλυτών για αλυσιδωτές αντιδράσεις. Το νανοβιοκαταλυτικό αυτό σύστημα εφαρμόστηκε με επιτυχία στην αλυσιδωτή αντίδραση υδρόλυσης της κυτταρίνης όπου και αποδείχθηκε καταλυτικά αποδοτικό και σταθερό μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους αντίδρασης. Επομένως, οι πρώτες μελέτες φαίνονται ελπιδοφόρες αλλά είναι απαραίτητη περαιτέρω μελέτη και βελτιστοποίηση τέτοιων συστημάτων.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα εργασία υλοποιήθηκε στα πλαίσια του ερευνητικού έργου ««Synthetic Biology: From omics technologies to genomic engineering (OMIC-ENGINE) (MIS 5002636)», που εντάσσεται στη Δράση «Ενίσχυση των Υποδομών Έρευνας και Καινοτομίας» και χρηματοδοτείται από το Επιχειρησιακό Πρόγραμμα «Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα και Καινοτομία» (ΕΠΑνΕΚ), στο πλαίσιο του ΕΣΠΑ 2014-2020, με τη συγχρηματοδότηση της Ελλάδας και της Ευρωπαϊκής Ένωσης (Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης).

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] Rostro-alanis, Magdalena De Jesús, Elena Ivonne Mancera-andrade, Mayra Beatriz, Gómez Patiño, Daniel Arrieta-baez, Braulio Cardenas, and others, 'Nanobiocatalysis: Nanostructured Materials – a Minireview', (2016), 1–24
- [2] Sperl, Josef M., and Volker Sieber, 'Multienzyme Cascade Reactions - Status and Recent Advances', *ACS Catalysis*, 8 (2018), 2385–96
- [3] Schoffelen, Sanne, and Jan C M Van Hest, 'Chemical Approaches for the Construction of Multi-Enzyme Reaction Systems', *Current Opinion in Structural Biology*, 23 (2013), 613–21
- [4] Characteristics, I. A General Overview of Support Materials for Enzyme Immobilization: Characteristics, Properties, Practical Utility. (2018)
- [5] Hoang, D.Q.; Tran, T.V.; Tran, N.Q.; Nguyen, C.K.; Nguyen, T.H.; Truong, M.D.; Tran, D.L.; Thu, L. Van; Nguyen, D.H. Functionalization of Fe₃O₄ nanoparticles with biodegradable chitosan-grafted-mPEG for paclitaxel delivery. *Green Process. Synth.* (2016), 5, 459–466
- [6] Orfanakis, G., Patila, M., Çηatzikonstantinou, A. V., Lyra, K-M., Kouloumpis, A., Spyrou, K., ... Stamatis, H. Hybrid Nanomaterials of Magnetic Iron Nanoparticles and Graphene Oxide as Matrices for the Immobilization of beta-Glucosidase: Synthesis, Characterization, and Biocatalytic Properties. *Frontiers in Materials*, 5, (2018), 1-11
- [7] Pavlidis, I. V., Patila, M., Bornscheuer, U. T., Gournis, D., & Stamatis, H. Graphene-based nanobiocatalytic systems: Recent advances and future prospects. *Trends in Biotechnology*, 32(6), (2014), 312–320.
- [8] Tzitzios, V. K., et al. *Large-Scale Synthesis, Size Control, and Anisotropic Growth of -Fe₂O₃ Nanoparticles: Organosols and Hydrosols*. Vol. 7, no. 8, 2007, pp. 2753–57
- [9] Farrugia, T., Perriman, A. W., Sharma, K. P., & Mann, S. Multi-enzyme cascade reactions using protein-polymer surfactant self-standing films. *Chem. Commun.*, 53(13), (2017), 2094–2097