

## ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΕΝΖΥΜΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ ΡΟΗΣ ΜΕ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΜΕΝΗ Β-ΓΛΥΚΟΖΙΔΑΣΗ

**Έ. Γκάντζου<sup>1</sup>, Κ. Γκοβάτση<sup>2</sup>, Α. Γιαννακοπούλου<sup>1</sup>, Σ. Τελλή<sup>1</sup>, Α. Πολύδερα<sup>1</sup>, Σ. Γιαννόπουλος<sup>2</sup>,  
Χ. Σταμάτης<sup>1\*</sup>**

1. Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα (\*hstamati@uoi.gr)
2. Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Ινστιτούτο Επιστημών Χημικής Μηχανικής (ΙΤΕ-ΙΕΧΜΗ), Ρίο-Πάτρα, Ελλάδα

### ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η μικρορευστομηχανική περιλαμβάνει την ανάπτυξη μεθόδων και εργαλείων για τον χειρισμό βιοδιεργασιών από τη μικρο- έως τη νανοκλίμακα και εφαρμόζεται ολοένα και περισσότερο στην ενζυμική βιοτεχνολογία και τη βιοκατάλυση. Οι ενζυμικοί μικροαντιδραστήρες συνεχούς ροής δίνουν τη δυνατότητα εφαρμογής πολύ μικρών όγκων αντιδραστηρίων, προσφέροντας ταυτόχρονα υψηλές αποδόσεις και εξαιρετική επαναληψιμότητα. Τα συστήματα αυτά συχνά λειτουργούν με βιοκαταλύτες σε ελεύθερη μορφή, ωστόσο το ερευνητικό ενδιαφέρον στρέφεται πλέον προς την ενσωμάτωση τεχνικών ακινητοποίησης ώστε να αναπτυχθούν σταθερά νανοβιοκαταλυτικά συστήματα. Στη συγκεκριμένη έρευνα, στοχεύουμε στην ανάπτυξη καινοτόμων ενζυμικών μικροαντιδραστήρων, στην εσωτερική επιφάνεια των οποίων ενσωματώνεται ένα νανοβιοκαταλυτικό σύστημα, με βάση το οξειδίο του ψευδαργύρου (ZnO) στη νανο-μορφή του. Η προσέγγισή μας συνδυάζει τροποποιημένες νανοδομές με ακινητοποιημένα ένζυμα, παρέχοντάς μας τα πλεονεκτήματα της ανακύκλωσης του βιοκαταλύτη, την εύκολη απομόνωση του προϊόντος και την ενισχυμένη λειτουργική σταθερότητα. Οι νανοβιοκαταλυτικές διατάξεις χρησιμοποιήθηκαν σε διεργασίες βιομετασχηματισμών, όπως η υδρόλυση γλυκοζιδικών δεσμών.

### ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι βιοδιεργασίες, συμπεριλαμβανομένης της βιοκατάλυσης, και οι συνεχείς διεργασίες έχουν αναγνωριστεί ως τα σημαντικότερα ερευνητικά πεδία πράσινης τεχνολογίας για τη φαρμακευτική και χημική βιομηχανία. Για πολλές δεκαετίες μέχρι και σήμερα, η βιοκατάλυση πραγματοποιείται σε αντιδραστήρες μεγάλης κλίμακας, με ιδιαίτερες απαιτήσεις σε κόστος και υλικά. Ωστόσο, η τεχνολογία των μικροαντιδραστήρων που βασίζεται σε διεργασίες ροής έχει επιφέρει σημαντικές προοπτικές επιτάχυνσης των βιομετασχηματισμών, με σημαντικά μικρότερων διαστάσεων εξοπλισμό και ουσιαστική μείωση του χρόνου αντίδρασης. Τα βασικότερα πλεονεκτήματα της τεχνολογίας αυτής περιλαμβάνουν: α) αποτελεσματικότερο έλεγχο των παραμέτρων της αντίδρασης, λόγω των μικρών διαστάσεων, β) σημαντικά ενισχυμένη αναλογία επιφάνειας προς όγκο, γ) φαινόμενα γραμμικής ροής και λειτουργία με χαμηλούς αριθμούς Reynolds, δ) υψηλά αποτελεσματική μεταφορά θερμότητας και μάζας και ε) δυνατότητα ενσωμάτωσης διαφόρων αναλυτικών τεχνικών στη συνολική διάταξη[1]. Τυπικά, οι μικροαντιδραστήρες διαθέτουν εσωτερικές διαμέτρους της τάξεως των μικρομέτρων και χωρητικότητα της τάξεως των μερικών μικρολίτρων (μL), προσφέροντας τη δυνατότητα χειρισμού πολύ μικρών όγκων ρευστών καθώς και του σχεδιασμού πολλών διαφορετικών διατάξεων.

Από την άλλη πλευρά, η ακινητοποίηση ενζύμων σε νανουκικά αποτελεί μία εδραιωμένη τεχνολογία των ημερών μας, με πλήθος εφαρμογών στη βιοτεχνολογία και τη βιοϊατρική[2]. Η δημιουργία νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων προσφέρει στα ένζυμα το απαραίτητο περιβάλλον για να δρουν υπό αντίξοες συνθήκες, καθώς και να επαναχρησιμοποιούνται για πολλούς κύκλους διεργασιών.

Με βάση τις παραπάνω θεωρήσεις, επιχειρήσαμε να σχεδιάσουμε μία νανοβιοκαταλυτική συσκευή με υδρολυτική δράση. Στα εσωτερικά τοιχώματα τριχοειδούς γυάλινου σωλήνα πραγματοποιήθηκε σύνθεση νανοράβδων οξειδίου του ψευδαργύρου (ZnO) και ακολούθησε ακινητοποίηση ενζύμου β-γλυκοσιδάσης από τον οργανισμό *Thermotoga maritima* (TM). Έτσι, δημιουργήθηκε ένα μικροβιονατιδραστήρας που ελέγχθηκε για τις βιοχημικές του ιδιότητες και την καταλυτική του ικανότητα. Από όσο μπορούμε να γνωρίζουμε, πρόκειται για την πρώτη προσπάθεια ενσωμάτωσης νανουλικών στην εσωτερική επιφάνεια μικροαντιδραστήρα, χρησιμοποιώντας *in situ* σύνθεση, με επακόλουθη ενζυμική δράση.

### ΣΤΟΧΟΙ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Οι στόχοι της παρούσας εργασίας αφορούν:

- Τη δημιουργία μίας νανοβιοκαταλυτικής συσκευής
- Τη μελέτη των βιοχημικών ιδιοτήτων του νανοβιοκαταλυτικού συστήματος
- Το φασματοσκοπικό χαρακτηρισμό του μικροβιονατιδραστήρα

Για την παρασκευή μικροβιονατιδραστήρων χρησιμοποιήθηκαν τριχοειδείς γυάλινοι σωλήνες με διαστάσεις εσωτερικής διαμέτρου: ~1mm και μήκους: ~3cm, ενώ η χωρητικότητά τους ήταν ~20μL. Για την ανάπτυξη νανοράβδων ZnO στο εσωτερικό μικροσωλήνα χρησιμοποιήθηκε υδροθερμική μέθοδος, με βάση προηγούμενες μελέτες ανάπτυξης των εν λόγω νανουλικών σε γυάλινες επιφάνειες[3]. Η ακινητοποίηση ενζύμου έγινε με ομοιοπολική σύνδεση στην εσωτερική επιφάνεια του μικροαντιδραστήρα ZnO, ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή σταθερότητα του βιοκαταλύτη. Για τη μελέτη δραστηριότητας του συστήματος χρησιμοποιήθηκε πρότυπο υπόστρωμα για το ένζυμο β-γλυκοσιδάση που αποδίδει έγχρωμο προϊόν ώστε να είναι δυνατή η φωτομετρική ποσοτικοποίηση της αντίδρασης. Για τον φασματοσκοπικό χαρακτηρισμό του συστήματος, χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία φωτοφθορισμού (PL) στερεάς κατάστασης.

### ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

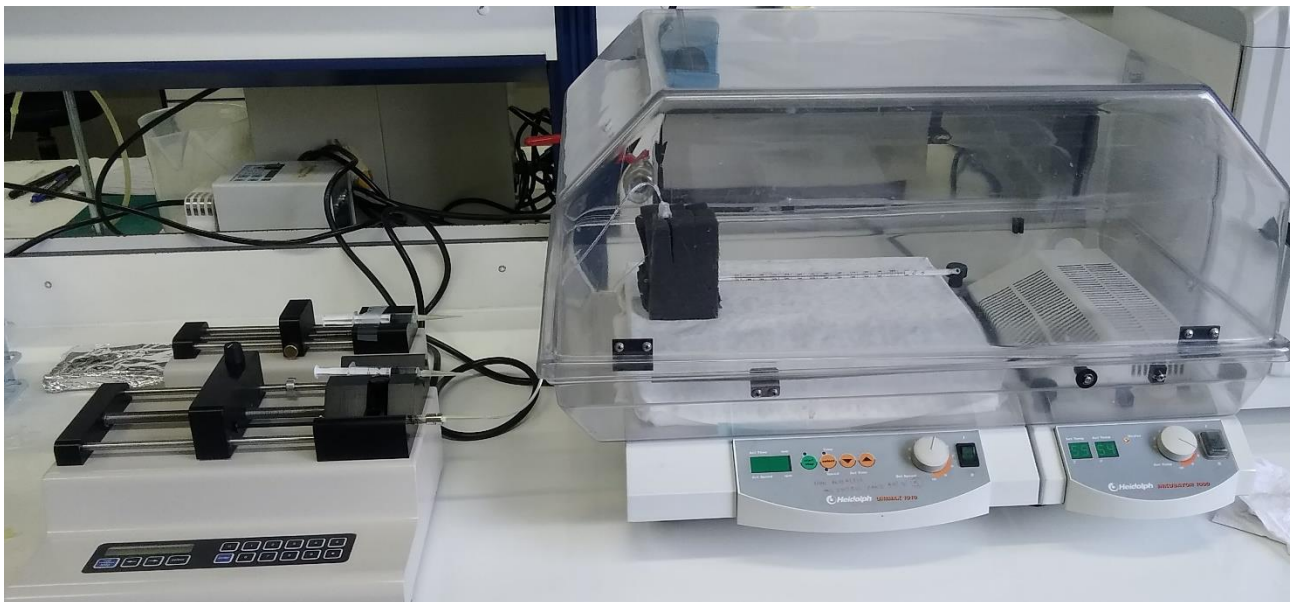
Το σύστημα που παρασκευάστηκε ελέγχθηκε φασματοσκοπικά για να επιβεβαιωθεί η σύστασή του (παρουσία νανοράβδων ZnO και παρουσία ενζύμου). Πραγματοποιήθηκαν επίσης βιοχημικές μελέτες, με βάση την αντίδραση υδρόλυσης ενός πρότυπου υποστρώματος για το ένζυμο β-γλυκοσιδάση. Στα παρακάτω γραφήματα φαίνονται οι επιδράσεις ρυθμού ροής στην απόδοση παραγωγής προϊόντος, καθώς και η σταθερότητα που παρουσιάζει το σύστημα μετά από επαναλαμβανόμενους κύκλους συνεχούς λειτουργίας.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι παρασκευάστηκε ενζυμικός μικροαντιδραστήρας με τη μέθοδο της ακινητοποίησης ενζύμου σε νανουλικά οξειδίου του ψευδαργύρου (ZnO). Με την τεχνική του φωτοφθορισμού επιβεβαιώθηκε η παρουσία ενζύμου στα εσωτερικά τοιχώματα του μικροαντιδραστήρα, καθώς προέκυψε η χαρακτηριστική κορυφή που αποδίδεται σε αρωματικά αμινοξέα μετά από διέγερση στα 280nm. Από βιοχημικές μελέτες, προκύπτει ότι ο βέλτιστος ρυθμός ροής του συστήματος κινείται γύρω από μία μέση τιμή πάνω από την οποία η απόδοση του συστήματος μειώνεται δραστικά και κάτω από την οποία δεν παρουσιάζεται σημαντική αύξηση της απόδοσης. Το σύστημα που παρασκευάστηκε επιδεικνύει ιδιαίτερη λειτουργική σταθερότητα, διατηρώντας πάνω από το 80% της αρχικής του δραστηριότητας μετά από 10 συνεχόμενους κύκλους λειτουργίας.

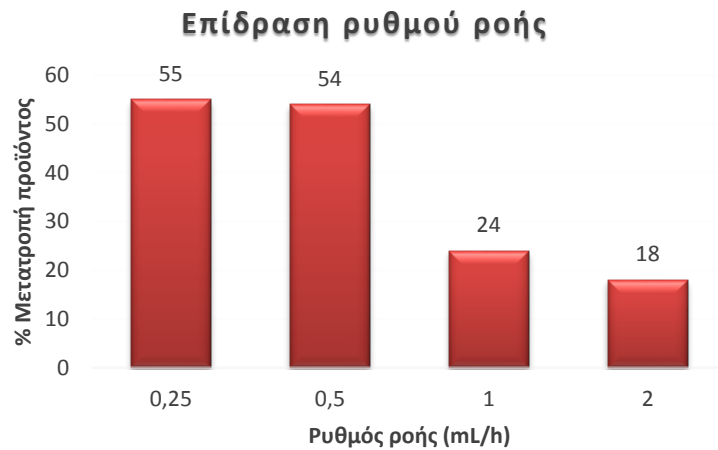
## Απεικόνιση του συστήματος μικροβιοαντιδραστήρα



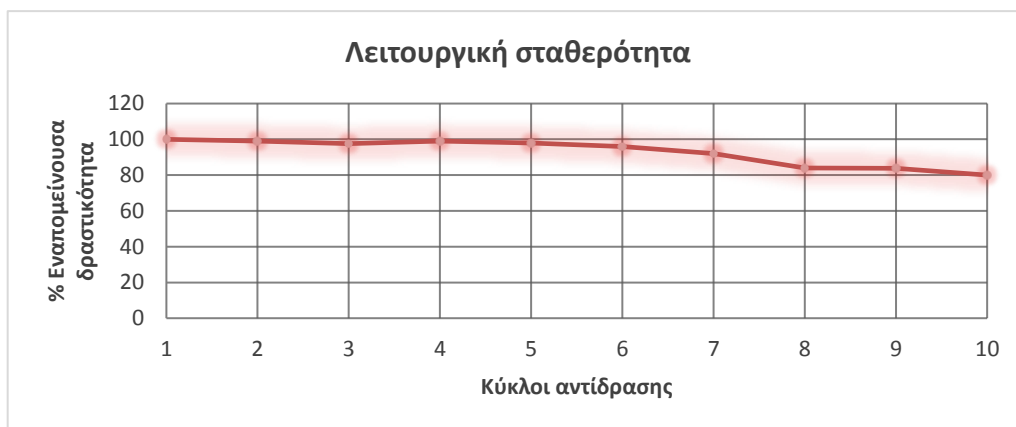
**Εικόνα 1** Μικροβιοαντιδραστήρας: Τριχοειδής σωλήνας μήκους 3cm και εσωτερικής διαμέτρου ~1mm στα εσωτερικά τοιχώματα του οποίου έχει πραγματοποιηθεί ανάπτυξη νανοράβδων ZnO και ομοιοπολική ακινητοποίηση ενζύμου β-γλυκοσιδάσης



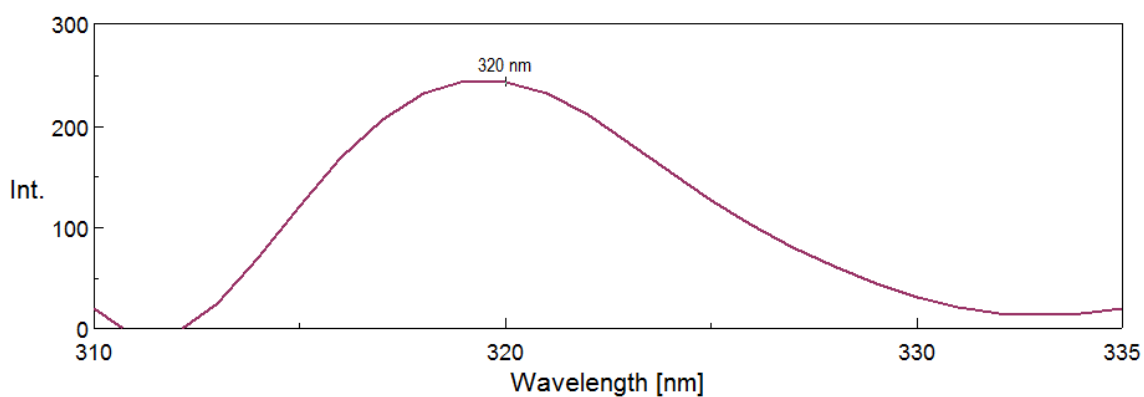
**Εικόνα 2** Σύστημα μικροβιοαντιδραστήρα: το σύστημα αποτελείται από αυτόματες αντλίες ρυθμιζόμενης ροής όπου σε κατάλληλη σύριγγα φορτώνεται ο επιθυμητός όγκος διαλύματος υποστρώματος και μέσα από σωλήνες τύπου Tygon καταλήγει στον μικροβιοαντιδραστήρα που βρίσκεται στο εσωτερικό θερμαινόμενου θαλάμου, όπου και γίνεται η συλλογή του προϊόντος.



**Γράφημα 1.** Επίδραση του ρυθμού ροής που εφαρμόζεται κατά τη λειτουργία του συστήματος μικροβιοαντιδραστήρα στην απόδοση παραγωγής προϊόντος



**Γράφημα 2.** Λειτουργική σταθερότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου β-γλυκοσιδάσης στο εσωτερικό μικροαντιδραστήρα μετά από 10 επαναλαμβανόμενους κύκλους αντίδρασης υδρόλυσης



**Γράφημα 4.** Ένταση φθορισμού του ακινητοποιημένου ενζύμου β-γλυκοσιδάσης στο εσωτερικό μικροαντιδραστήρα, μετά από διέγερση στα 280nm.

## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η μέθοδος που προτείνεται για την παρασκευή ενζυμικών μικροαντιδραστήρων λειτουργεί με σημαντικές αποδόσεις παραγωγής προϊόντος, καθώς η ιδιαίτερη σταθερότητα του συστήματος κάτω από ποικίλες συνθήκες το καθιστά ένα πολλά υποσχόμενο βιοκαταλυτικό εργαλείο. Πρόκειται για ένα σύστημα που μπορεί εύκολα να εφαρμοστεί για διαφορετικές ενζυμικές αντιδράσεις ενδιαφέροντος, ενώ η ανάπτυξή του βασίζεται σε απλές διεργασίες με χαμηλό κόστος.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η έρευνα πραγματοποιείται στα πλαίσια του Επιχειρησιακού Προγράμματος «Ανάπτυξη Ανθρώπινου Δυναμικού, Εκπαίδευση και Διά Βίου Μάθηση», στο πλαίσιο της Πράξης «Ενίσχυση του ανθρώπινου ερευνητικού δυναμικού μέσω της υλοποίησης διδακτορικής έρευνας» (MIS-5000432), που υλοποιεί το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (ΙΚΥ), και συγχρηματοδοτείται από την Ελλάδα και την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο).

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] E. Gkantzou, M. Patila, H. Stamatis, E. Gkantzou, M. Patila, and H. Stamatis, "Magnetic Microreactors with Immobilized Enzymes—From Assemblage to Contemporary Applications," *Catalysts*, vol. 8, no. 7, p. 282, Jul. 2018.
- [2] C. Bernal, K. Rodríguez, and R. Martínez, "Integrating enzyme immobilization and protein engineering: An alternative path for the development of novel and improved industrial biocatalysts," *Biotechnol. Adv.*, vol. 36, no. 5, pp. 1470–1480, 2018.
- [3] K. Govatsi, A. Seferlis, S. G. Neophytides, and S. N. Yannopoulos, "Influence of the morphology of ZnO nanowires on the photoelectrochemical water splitting efficiency," *Int. J. Hydrogen Energy*, vol. 43, no. 10, pp. 4866–4879, 2018.