

ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ ΣΕ ΥΒΡΙΔΙΚΕΣ ΜΑΓΝΗΤΙΚΕΣ ΝΑΝΟΔΟΜΕΣ (NANOFLOWERS) ΩΣ ΑΠΟΔΟΤΙΚΟ ΕΡΓΑΛΕΙΟ ΓΙΑ ΒΙΟΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΥΣ ΣΕ ΟΡΓΑΝΙΚΟΥΣ ΚΑΙ ΙΟΝΤΙΚΟΥΣ ΔΙΑΛΥΤΕΣ

Ρ. Φωτιάδου¹, Ε.-Δ. Μόορεν¹, Μ. Πατήλα^{1,2}, Κ.-Μ. Λύρα³, Κ. Σπύρου², Α. Πολύδερα¹, Δ. Γουρνής², Χ. Σταμάτης^{1,*}

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

²Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης των Υλικών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα, Ελλάδα

³Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης Νανοτεχνολογίας, NCSR "Δημόκριτος", Αττική, Ελλάδα

(*hstamati@uoi.gr)

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα μελέτη παρασκευάστηκαν οργανικές-ανόργανες υβριδικές νανοδομές (nanoflowers) με βάση ιόντα χαλκού (II) και μαγγανίου (II) με απλή μέθοδο, και χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς για την ανάπτυξη αποτελεσματικών νανο-βιοκαταλυτών μέσω της ακινητοποίησης της λιπάσης Β από *Pseudozyma antarctica*. Οι υβριδικοί νανο-βιοκαταλύτες χαρακτηρίστηκαν από διάφορες τεχνικές, όπως ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM). Εξετάστηκε επίσης η επίδραση της προσθήκης μαγνητικών νανοσωματιδίων όπως ο μαγνημίτης, και νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα όπως οξειδίο του γραφενίου, στη δομή, την καταλυτική δραστηριότητα και τη λειτουργική σταθερότητα των υβριδικών νανοβιοκαταλυτών. Σε όλες σχεδόν τις περιπτώσεις που μελετήθηκαν, η προσθήκη νανοϋλικών αυξάνει την καταλυτική δραστηριότητα και τη λειτουργική σταθερότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου. Τα μαγνητικά nanoflowers λιπάσης χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση εστέρων τυροσόλης σε μη υδατικά μέσα, συμπεριλαμβανομένων οργανικών διαλυτών, ιοντικών υγρών και φιλικών προς το περιβάλλον βαθέων ευτηκτικών διαλυτών.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατά τη διάρκεια των τελευταίων δεκαετιών, η ακινητοποίηση των ενζύμων σε στερεούς φορείς χρησιμοποιείται ευρέως και διευκολύνει την εφαρμογή τους, λόγω του εύκολου χειρισμού, της λειτουργικής σταθερότητας, καθώς και της εύκολης ανάκτησης και επαναχρησιμοποίησης των βιοκαταλυτών, οδηγώντας σε πιο αποδοτικές βιολογικές διεργασίες. Διάφορα σύνθετα υλικά με μεγάλη επιφάνεια και επιθυμητά μεγέθη πόρων, συμπεριλαμβανομένων των νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα (νανοσωλήνες και γραφένιο) και των μαγνητικών νανοσωματιδίων, έχουν βρεθεί ότι είναι ευνοϊκά για τη βιολογική λειτουργία και την σταθερότητα των ενζύμων ^[1-3].

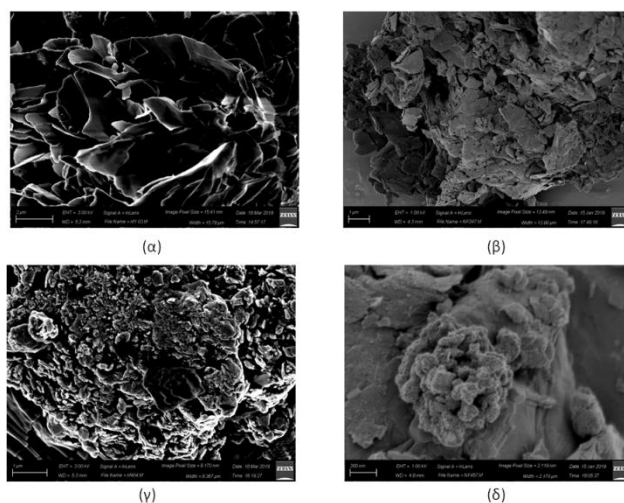
Οι οργανικές-ανόργανες υβριδικές δομές (Nanoflowers) είναι μια νέα κατηγορία, για την ακινητοποίηση ενζύμων, που εμφανίζουν δομική ομοιότητα με άνθη στο μέγεθος της νανοκλίμακας. Τα υβριδικά Nanoflowers (HNFs) έχουν προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια ως πλατφόρμες για την ακινητοποίηση ενζύμων, λόγω της μεγαλύτερης αναλογίας επιφάνειας προς όγκο σε σύγκριση με τα σφαιρικά νανοσωματίδια, καθώς και των απλών, φιλικών προς το περιβάλλον και μικρού κόστους μεθόδων σύνθεσης ^[4, 5]. Ο σχηματισμός των HNFs δεν απαιτεί σκληρές συνθήκες και τοξικά αντιδραστήρια για την αυτο-συναρμολόγηση τους, και έτσι η διαδικασία ακινητοποίησης πραγματοποιείται σε ένα βήμα. Επιπλέον, το ενσωματωμένο ένζυμο υποβάλλεται σε μικρότερο χειρισμό σε σύγκριση με άλλες συμβατικές μεθόδους ακινητοποίησης, διατηρώντας έτσι τη βιοκαταλυτική του δράση. Nanoflowers που περιέχουν διάφορα ένζυμα παρασκευάζονται συνήθως ως υβρίδια ενζύμου-Cu₃(PO₄)₂·3H₂O συνδυάζοντας θειικό χαλκό (CuSO₄) με ένζυμα σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών αλάτων (PBS). Επιπλέον, έχει αναφερθεί η ανάπτυξη υβριδικών Nanoflowers με βάση και άλλα ιόντα

μετάλλων, όπως ασβέστιο, ψευδάργυρος, κοβάλτιο και σίδηρος [6-9]. Ο σχηματισμός των HNFs περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια: πυρήνωση και δημιουργία πρωτογενών κρυστάλλων, ανάπτυξη κρυστάλλων ώστε να εμφανιστούν «πέταλα» και σχηματισμός ολοκληρωμένης δομής Nanoflowers [5]. Στο πρώτο στάδιο, τα πρωτεϊνικά μόρια σχηματίζουν σύμπλοκα με ιόντα μετάλλων, κυρίως μέσω του συντονισμού μεταξύ των ατόμων αζώτου των αμιδικών ομάδων στη ραχοκοκαλιά της πρωτεΐνης με τα μεταλλικά ιόντα. Αυτά τα σύμπλοκα παρέχουν μια θέση για πυρήνωση των πρωτογενών κρυστάλλων και περαιτέρω ανάπτυξη. Ο συνδυασμός των Nanoflowers με νανοϋλικά και μαγνητικά νανοσωματίδια προσφέρει βελτιωμένες βιοχημικές και άλλες ιδιότητες, που οφείλονται στα επιμέρους χαρακτηριστικά τους. Ηλεκτροστατικές και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις δημιουργούνται μεταξύ των θετικά φορτισμένων μεταλλικών ιόντων ή κάποιων βασικών αμινοξέων και των ομάδων πλούσιων σε οξυγόνο των GO, Fe₂O₃, οδηγώντας σε μία δομή άνθους.

Στην παρούσα εργασία περιγράφουμε την παρασκευή νέων υβριδικών νανοδομών με βάση ιόντα χαλκού (II) ή μαγγάνιου (II) σε συνδυασμό με μαγνητικά νανοσωματίδια και νανοϋλικά με βάση το άνθρακα και ερευνούμε τη χρήση τους ως φορείς για την αποτελεσματική ακινητοποίηση της λιπάσης B από *Pseudozyma antarctica* (CaLB). Η προσθήκη νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα, όπως το οξείδιο του γραφένιου (GO) αναμένεται να παρέχει μεγάλη ειδική επιφάνεια και εξαιρετικές μηχανικές ιδιότητες, ενώ η ενσωμάτωση μαγνητικών νανοσωματιδίων, όπως ο μαγγεμίτης (Fe₂O₃), θα επιτρέψει την εύκολη και γρήγορη ανάκτηση των nanoflowers με εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Παρουσιάζεται επίσης η ικανότητα των nanoflowers με βάση τη λιπάση να καταλύουν τη σύνθεση λιπόφιλων παραγώγων φαινολικών αντιοξειδωτικών, όπως η τυροσόλη, σε μη υδατικά μέσα, καθώς και σε φιλικούς προς το περιβάλλον ιοντικούς διαλύτες.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Εικόνες ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (SEM) των μη τροποποιημένων CaLB-Cu₃(PO₄)₂ HNFs αποκαλύπτουν ένα υψηλής ποιότητας σχηματισμό nanoflower με διαμέτρους που κυμαίνονται από 15-30 μm (Σχήμα 1α). Επιπλέον, οι εικόνες SEM που βασίζονται σε μη τροποποιημένα CaLB-Mn₃(PO₄)₂ HNFs (Σχήμα 1γ) εμφανίζουν επίσης μια όμοια με λουλούδια δομή, αλλά όχι τόσο σαφή όπως στην περίπτωση των Cu₂(PO₄)₂ HNFs. Μετά την προσθήκη GO και Fe₂O₃ νανοσωματιδίων στα nanoflowers με βάση το χαλκό παρατηρείται ο σχηματισμός μιας περισσότερο συσσωματωμένης δομής (Σχήμα 1β), ενώ στην περίπτωση των nanoflowers με βάση το μαγγάνιο, η δομή είναι πιο κοκκώδης παρουσία των νανοϋλικών.



Σχήμα 1. Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM) των (α) μη τροποποιημένων nanoflowers Cu₃(PO₄)₂, (β) τροποποιημένων nanoflowers GO/Fe₂O₃-Cu₃(PO₄)₂, (γ) μη τροποποιημένων nanoflowers Mn₃(PO₄)₂ και (δ) τροποποιημένων nanoflowers GO/Fe₂O₃-Mn₃(PO₄)₂.

Η απόδοση ενκαψυλίωσης και η ειδική ενεργότητα όλων των nanoflowers παρουσιάζονται στον Πίνακα 1. Στην περίπτωση των μη τροποποιημένων $\text{CaLB-Cu}_3(\text{PO}_4)_2$ και $\text{CaLB-Mn}_3(\text{PO}_4)_2$ HNFs ακινητοποιείται το 57,6% και 49,0% του ενζύμου αντίστοιχα, ενώ η ειδική ενεργότητα υπολογίστηκε σε 8,3 και 96,7 U/g αντίστοιχα, υποδεικνύοντας ότι η φύση του μεταλλικού ιόντος επηρεάζει σημαντικά τη δράση της ακινητοποιημένης λιπάσης. Όλα τα HNFs εμπλουτισμένα με μαγνητικά νανοϋλικά έδειξαν υψηλότερες αποδόσεις ενκαψυλίωσης από εκείνες χωρίς νανοϋλικά, ανεξάρτητα από το χρησιμοποιούμενο τύπο μεταλλικού ιόντος. Επιπλέον, η τροποποίηση των nanoflowers με μαγνητικά νανοϋλικά φαίνεται να ενισχύει την ειδική υδρολυτική δράση του ακινητοποιημένου ενζύμου σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις.

Πίνακας 1. Απόδοση ενκαψυλίωσης (%) και υδρολυτική δράση της ακινητοποιημένης λιπάσης σε δομές nanoflowers.

Nanoflower	Απόδοση ακινητοποίησης (%)	Ειδική ενεργότητα (U/mg nanoflower)
$\text{Cu}_3(\text{PO}_4)_2$	57,6	8,3
$\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Cu}_3(\text{PO}_4)_2$	58,3	15,6
$\text{GO/Fe}_2\text{O}_3\text{-Cu}_3(\text{PO}_4)_2$	59,0	116,3
$\text{Mn}_3(\text{PO}_4)_2$	49,0	84,7
$\text{Fe}_2\text{O}_3\text{-Mn}_3(\text{PO}_4)_2$	55,2	39,0
$\text{GO/Fe}_2\text{O}_3\text{-Mn}_3(\text{PO}_4)_2$	60,9	95,0

Τα τροποποιημένα μαγνητικά nanoflowers χρησιμοποιήθηκαν για τη μετεστεροποίηση της τυροσόλης με βινυλικό βουτυλεστέρα σε διάφορους οργανικούς διαλύτες και πράσινα μέσα, όπως ιοντικά υγρά και βαθείς ευτηκτικοί διαλύτες. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2, τα μαγνητικά CaLB-HNFs ήταν σε θέση να καταλύσουν τη μετεστεροποίηση της τυροσόλης, επιτυγχάνοντας υψηλές αποδόσεις μετατροπής στους περισσότερους από τους μη υδατικούς διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν. Έχει προταθεί πρόσφατα ότι η υδρόφοβη επιφάνεια των nanoflowers ωφελεί την πραγματοποίηση αντιδράσεων σύνθεσης σε μη υδατικούς διαλύτες, προάγοντας την προσανατολισμένη απελευθέρωση των υποστρωμάτων κοντά στην υδρόφοβη επιφάνεια των nanoflowers και συνεπώς στις ενεργές θέσεις του ακινητοποιημένου ενζύμου^[10]. Οι αποδόσεις μετατροπής της μετεστεροποίησης φαίνεται να εξαρτώνται έντονα από τη φύση του οργανικού διαλύτη, όπως την πολικότητα και το ιξώδες του.

Πίνακας 2. Αποδόσεις μετασχηματισμού για την ενζυμική μετεστεροποίηση της τυροσόλης με βινυλικό βουτυλεστέρα σε διάφορα μη υδατικά μέσα από $\text{CaLB-HNF GO/Fe}_2\text{O}_3\text{-Cu}_3(\text{PO}_4)_2$.

Διαλύτης	Απόδοση μετεστεροποίησης (%)
n-Hexane	99.6
Acetonitrile	80.3
2-Methyl-2-butanol	30.2
<i>tert</i> -Butyl-methylether	98.9
<i>tert</i> -Butanol	23.2
[BMIM][PF ₆]	13.6
ChCl:U	33.2

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία περιγράφηκε η παρασκευή νέων υβριδικών νανοδομών με βάση ιόντα χαλκού (II) ή μαγγανίου (II), σε συνδυασμό με μαγνητικά νανοσωματίδια και νανοϋλικά με βάση το άνθρακα. Αυτά τα nanoflowers χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς ως φορείς για την ακινητοποίηση της λιπάσης B (CaLB). Το μεταλλικό ιόν και η φύση των προστιθέμενων νανοϋλικών επηρεάζουν με διάφορους τρόπους τα δομικά και καταλυτικά χαρακτηριστικά της ακινητοποιημένης λιπάσης. Τα υβριδικά nanoflowers που τροποποιήθηκαν με νανοϋλικά μαγνητικά νανοσωματίδια σιδήρου παρουσίασαν εξαιρετική καταλυτική απόδοση στην παραγωγή εστέρων τυροσόλης σε διάφορους οργανικούς διαλύτες και φιλικούς προς το περιβάλλον ιοντικούς διαλύτες, υποδηλώνοντας ότι αυτοί οι νανοβιοκαταλύτες θα μπορούσαν ενδεχομένως να χρησιμοποιηθούν αποτελεσματικά για ετερογενείς βιοκαταλυτικούς μετασχηματισμούς σε εφαρμογές μεγάλης κλίμακας.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

«Η εργασία υλοποιήθηκε στο πλαίσιο της Δράσης ΕΡΕΥΝΩ – ΔΗΜΙΟΥΡΓΩ – ΚΑΙΝΟΤΟΜΩ συγχρηματοδοτήθηκε από το Ευρωπαϊκό Ταμείο Περιφερειακής Ανάπτυξης (ΕΤΠΑ) της Ευρωπαϊκής Ένωσης και εθνικούς πόρους μέσω του Ε.Π. Ανταγωνιστικότητα, Επιχειρηματικότητα & Καινοτομία (ΕΠΑνΕΚ) (κωδικός έργου:Τ1ΕΔΚ-01716)»

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- [1] I.V. Pavlidis, M. Patila, U.T. Bornsheuer, D. Goumis, H. Stamatis. *Trend. Nanotechnol.* 32 (2014) 312-320.
- [2] M. Patila, I.V. Pavlidis, A. Kouloumpis, K. Dimou, K. Spyrou, P. Katapodis, D. Gournis, H. Stamatis. *Int. J. Biol. Macromol.* 84 (2016) 227-235.
- [3] G. Orfanakis, M. Patila, A.V. Catzikonstantinou, K.-M. Lyra, A. Kouloumpis, K. Spyrou, P. Katapodis, A. Paipetis, P. Rudolf, D. Gournis, H. Stamatis. *Front. Mater.* 5 (2018).
- [4] J.-H. Song, J.-H. Yoon, H. Lee, K.-H. Lee. *J. Chem. Eng. Data* 41 (1996) 497-499.
- [5] J. Ge, J. Lei, R.N. Zare. *Nat. Nanotechnol.* 7 (2012) 428-432.
- [6] J. Cui, S. Jia. *Coord. Chem. Rev.* 352 (2017) 249-263.
- [7] X. Chen, L. Xu, A. Wang, H. Li, C. Wang, X. Pei, P. Zhang, S.G. Wu. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 94 (2019) 236–243.
- [8] B. Zhang, P. Li, H. Zhang, L. Fan, H. Wang, X. Li, L. Tian, N. Ali, Z. Ali, Q. Zhang. *RSC Adv.* 6 (2016) 46702–46710.
- [9] F. López-Gallego, L. Yate. *Chem. Commun.* 51 (2015) 8753–8756.
- [10] J. Gao, W. Kong, L. Zhou, Y. He, L. Ma, Y. Wang, L. Yin, Y. Jiang, Y. Chem. *Eng. J.* 309 (2017) 70–79.