

**ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΑΛΛΙΠΙΝΑΣΗ ΣΕ ΑΝΟΡΓΑΝΑ
ΒΙΟΣΥΜΒΑΤΑ ΥΛΙΚΑ**

ΑΝΥΦΑΝΤΑΚΗ ΕΛΕΝΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : Δ. ΓΑΝΩΤΑΚΗΣ

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ - ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΚΡΗΤΗΣ**

2007

**ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ
ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΑΛΛΙΠΙΝΑΣΗ ΣΕ ΑΝΟΡΓΑΝΑ
ΒΙΟΣΥΜΒΑΤΑ ΥΛΙΚΑ**

ΑΝΥΦΑΝΤΑΚΗ ΕΛΕΝΗ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ : Δ. ΓΑΝΩΤΑΚΗΣ

**ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ - ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΚΡΗΤΗΣ**

2007

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εκπόνηση της εργασίας αυτής πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ.Δ. Γανωτάκη. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ.Δ. Γανωτάκη για την ανάθεση του θέματος αυτής της εργασίας. Τον ευχαριστώ επίσης για τη συνεχή καθοδήγηση και ενθάρρυνση, τις πολύτιμες συζητήσεις, την εποικοδομητική κριτική, αλλά και την υλικοτεχνική υποδομή που μου προσέφερε κατά την εκπόνηση της εργασίας αυτής.

Ευχαριστώ τον καθηγητή κ.Γ. Τσιώτη και την καθηγήτρια κ.Ι. Σμόνου που δέχθηκαν να είναι στην επιτροπή αξιολόγησης της παρούσας εργασίας.

Ευχαριστώ θερμά τους διδάκτορες Λευτέρη Τουλουπάκη και Μάρκο Τρικεριώτη για την πολύτιμη βοήθεια, τις συμβουλές τους, την άριστη συνεργασία και τις ευχάριστες ώρες δουλειάς που είχαμε καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της εργασίας όπως και τους μεταπτυχιακούς Νίκο Αλεξανδρίδη, Δημήτρη Στεφανάκη, Καλυκάκη Αγγελική για το άριστο και φιλικό κλίμα συνεργασίας όλο αυτό το διάστημα. Ευχαριστώ όλους τους μεταπτυχιακούς φοιτητές και φίλους όλα αυτά τα χρόνια, για τις ευχάριστες στιγμές που έχουμε περάσει.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Παναγιώτη Σαράφη για τη συμπαράσταση και την υποστήριξη του καθώς και για τις συμβουλές του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της εργασίας αυτής.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω βαθύτατα τους γονείς μου, για την υπομονή τους και την αμέριστη ηθική και οικονομική τους υποστήριξη.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα εργασία, αφορά την ακινητοποίηση και το χαρακτηρισμό του ενζύμου Αλλινάση, συστατικό του σκόρδου με σημαντική φαρμακευτική δράση, σε ανόργανα βιοσυμβατά υλικά. Στο πρώτο μέρος της εργασίας η αλλινάση ακινητοποιείται σε σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου, τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των υδρογελών. Στην εργασία προσδιορίζονται οι συνθήκες στις οποίες επιτυγχάνεται η μέγιστη ακινητοποίηση του ενζύμου στα αλγινικά σφαιρίδια, διατηρώντας παράλληλα τη δραστηριότητά του. Στο δεύτερο μέρος της εργασίας πραγματοποιείται η ακινητοποίηση της αλλινάσης σε στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια, η αλλιώς LDH. Και εδώ επιτυγχάνεται η ποσοτική ακινητοποίηση του ενζύμου αλλά και η διατήρηση της δραστηριότητάς του.

ABSTRACT

This master is aimed on immobilization and characterization of the enzyme alliinase, one ingredient of garlic that exhibits substantial pharmaceutical activity, in inorganic, biocompatible polymeric species. In the first part of the present work, alliinase is immobilized into calcium alginate formatted capsules. The experimental conditions that provide practically quantitative immobilization with simultaneous retention of activity of the enzyme are successfully defined. In the second part of the work alliinase is being immobilized in layered double hydroxides or else LDH. Here too the immobilization of the enzyme is quantitative and the reactivity of the enzyme is retained.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

Alliin:	Αλλισίνη
Alliinase:	λυάση της αλλιίνης (αλλιινάση)
Alliin:	αλλιίνη
ASAI:	<i>Allium sativum</i> agglutinin I
ASAI:	<i>Allium sativum</i> agglutinin II
ConA:	Concanavalin A
DTNB:	5, 5'-dithio-bis (2-nitrobenzoic acid)
NTB:	2-nitro-5-benzoate
LDH:	Στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια (Layered Double Hydroxides)
kDa:	kilodalton
PLP:	Φωσφορική πυριδοξάλη
PEG-8000:	Πολυαιθυλενογλυκόλη 8000
PMSF:	Φαίνυλο-μέθυλ-σουφονυλο-φθορίδιο
XRD:	Περίθλαση Ακτίνων Χ
P-5'-P:	Φωσφορική πυριδοξάλη
EDTA	Αιθυλενο-διαμινο-τετραοξικό οξύ
IR	Φασματοσκοπία υπερύθρου
UV – vis	Φασματοσκοπία Υπεριώδους Ορατού
SEM	Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης
TEM	Ηλεκτρονική φασματοσκοπία διέλευσης

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ	- 4 -
Α ΜΕΡΟΣ:	6
ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΓΙΝΑΣΗΣ ΣΕ ΑΛΓΙΝΙΚΑ ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ	6
ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	6
1. ΥΔΡΟΓΕΛΕΣ	6
1.1 Αλγινικά ως φορείς ακινητοποίησης	7
1.2 Προέλευση αλγινικών	8
1.3 Παραγωγή αλγινικών	9
1.4 Χημική σύσταση του αλγινικού οξέος	10
1.5 Μηχανισμός σχηματισμού γέλης	11
1.6 Ιδιότητες αλγινικών σφαιριδίων	14
1.6.1 Μέγεθος	14
1.6.2 Φυσικές ιδιότητες	15
1.6.3 Χημική σταθερότητα	16
1.6.4 Μέγεθος πόρων και μοριακή διάχυση	17
1.7 Βιολογικές ιδιότητες	19
1.7.1 Βιοσυμβατότητα	19
1.7.2 Προσκόλληση σε βιολογικούς ιστούς	19
1.7.3 Ιδανικά χαρακτηριστικά αλγινικών σφαιριδίων	20
1.8 Περιορισμοί στη χρήση αλγινικών	20
1.8.1 Χαμηλή σταθερότητα	20
1.8.2 Μέγεθος πόρων	21
1.8.3 Βιοσυμβατότητα	22
2. ΤΟ ΣΚΟΡΔΟ	23
2.1 Εισαγωγή	23
2.2 Χημική σύσταση του σκόρδου	24
2.3 Θειούχες οργανικές ενώσεις του σκόρδου	24
2.4 Θειοσουλφίδια (Αλλισίνη)	25
2.5 Μετασχηματισμοί θειοσουλφιδίων	26
2.6 Βιολογική δράση του σκόρδου	26
2.6.1 Υποχοληστερινεμικές ιδιότητες	27
2.6.2 Μείωση της πίεσης	27
2.6.3 Αντιπηκτική ικανότητα	27
2.6.4 Αντικαρκινική δράση	27
2.6.5 Αντιβακτηριακή δράση	28
2.6.6 Αντική δράση	28
2.6.7 Μυκητοκτόνο δράση	28

2.7	Αλλυνάση (λύαση της αλίνης)	29
3.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	35
3.1	Απομόνωση αλλυνάσης	36
3.2	Χρωματογραφία συγγένειας	37
3.3	Χαρακτηρισμός ενζύμου	38
3.4	Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού.	38
3.5	Μελέτη της δραστηριότητας του απομονωμένου ενζύμου	39
3.5.1	Προπαρασκευή του NTB	39
3.5.2	Μέτρηση της δραστηριότητας	39
3.6	Ακίνητοποίηση της αλλυνάσης σε αλγινικά σφαιρίδια	40
3.6.1	Παρασκευή αλγινικού διαλύματος	40
3.6.2	Ανάμιξη του ενζύμου με το διάλυμα του αλγινικού νατρίου	41
3.6.3	Ακίνητοποίηση της αλλυνάσης	41
3.7	Διάσπαση αλγινικών σφαιριδίων	42
3.8	Χαρακτηρισμός ακινητοποιημένου ενζύμου	42
3.8.1	Διαπίστωση ακινητοποίησης με φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού	42
3.8.2	Διαπίστωση ακινητοποίησης με ηλεκτροφόρηση	43
3.8.3	Ποσοτικός προσδιορισμός ακινητοποιημένου ενζύμου	43
3.8.4	Μελέτη της δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου	43
4.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ	44
4.1	ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΛΛΥΝΑΣΗΣ	44
4.2	Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά Αλλυνάσης	47
4.3	Μελέτη δραστηριότητας απομονωμένης αλλυνάσης	48
4.4	Ακίνητοποίηση αλλυνάσης σε αλγινικά σφαιρίδια	51
4.5	Διαπίστωση ακινητοποίησης με Φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού	51
4.6	Διαπίστωση εισαγωγής με ηλεκτροφόρηση	59
4.7	Ποσοτικός προσδιορισμός ακινητοποιημένης αλλυνάσης	61
4.8	Μελέτη δραστηριότητας ακινητοποιημένης αλλυνάσης	62
4.9	Φωτογραφίες αλγινικών σφαιριδίων	64
	B ΜΕΡΟΣ	67
1.	ΣΤΟΙΒΑΓΜΕΝΑ ΔΙΠΛΑ ΥΔΡΟΞΕΙΔΙΑ (LDH)	67
1.1	Εισαγωγή	67
1.2	Δομή LDH	68
1.3	Φύση των ανιόντων	69
1.4	Φύση των μετάλλων M^{II} και M^{III}	70
1.5	Ιδιότητες LDH	71
1.6	Χαρακτηρισμός	72

1.6.1	Περίθλαση ακτίνων X	72
1.6.2	Φασματοσκοπία υπερύθρου IR	74
1.6.3	Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC)	75
1.6.4	Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) - Ηλεκτρονική φασματοσκοπία διέλευσης (TEM)	75
1.7	Εφαρμογές των LDH	76
2.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	79
2.1	Σύνθεση στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων (LDH)	79
2.2	Χαρακτηρισμός LDH	79
2.3	Σύνθεση υβριδίων LDH-αλλυνάσης	80
2.4	Χαρακτηρισμός των υβριδίων LDH-αλλυνάση	80
2.5	Διαπίστωση εισαγωγής της αλλυνάσης στο LDH	80
2.6	Πλύση του υβριδίου LDH-αλλυνάση με διάλυμα NaCl	81
2.7	Ποσοτικός προσδιορισμός αλλυνάσης που ακινητοποιήθηκε	81
2.8	Μελέτη δραστηριότητας LDH – αλλυνάσης	81
3.	ΑΝΑΛΥΣΗ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	83
3.1	Σύνθεση στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων (LDH)	83
3.2	Σύνθεση υβριδίου LDH-Αλλυνάση	85
3.3	Διαπίστωση εισαγωγής της αλλυνάσης στο LDH με φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού.	85
3.4	Πλύση του υβριδίου LDH-αλλυνάση με διάλυμα NaCl	87
3.5	Διαπίστωση εισαγωγής της αλλυνάσης στο LDH με ηλεκτροφόρηση	89
3.6	Χαρακτηρισμός των υβριδίων LDH-Αλλυνάση-Περίθλαση ακτίνων X. Φασματοσκοπία υπερύθρου	90
3.7	Ποσοτικός προσδιορισμός ακινητοποιημένης αλλυνάσης	92
3.8	Μελέτη δραστηριότητας ακινητοποιημένης αλλυνάσης	93
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	95

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας και της θεραπευτικής έχουν οδηγήσει σε μία αυξημένη χρήση πεπτιδίων και πρωτεϊνικών φαρμάκων.¹ Ένας από τους πιο σημαντικούς στόχους της βιοτεχνολογίας είναι η ακινητοποίηση των ενζύμων. Τα ένζυμα ως βιοκαταλύτες βρίσκουν πολλές εφαρμογές, καλύπτοντας μία ευρεία περιοχή στους χώρους της βιομηχανίας και της ιατρικής. Τα ίδια, προσφέρουν αρκετά πλεονεκτήματα λόγω της εκλεκτικότητας και της υψηλής καταλυτικής ικανότητας που παρουσιάζουν, σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Το κυριότερο ζήτημα για την ανάπτυξη φαρμακευτικών πρωτεϊνών είναι η φυσική και χημική σταθερότητα των πρωτεϊνών. Η έλλειψη σταθερότητας είναι ο κύριος λόγος που οι φαρμακευτικές πρωτεΐνες παρέχονται σε ενέσιμη μορφή, σε αντίθεση με τα περισσότερα χημικά φάρμακα που λαμβάνονται δια μέσου της στοματικής οδού². Κι αυτό διότι δημιουργούνται προβλήματα, όπως για παράδειγμα η αποικοδόμηση που πραγματοποιείται στο στομάχι, η πρωτεολυτική διάσπαση που λαμβάνει χώρα στη γαστροεντερική περιοχή, η φτωχή διαπερατότητα και ο μεταβολισμός πρώτης διόδου. Οι δυσχέρειες αυτές μπορούν να αντιμετωπιστούν αποτελεσματικά, χρησιμοποιώντας κατάλληλα συστήματα μεταφοράς φαρμάκων. Προκειμένου να πραγματοποιηθεί με επιτυχία η μεταφορά της πρωτεΐνης δια μέσου της στοματικής οδού, είναι απαραίτητο να προστατευθεί από το σκληρό περιβάλλον του στομάχου. Αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί με το σχεδιασμό κατάλληλων συστημάτων μεταφοράς. Οι υδρογέλες όντας ανθεκτικές στις μεταβολές του pH αποτελούν κατάλληλα υλικά για το σκοπό αυτό, καθώς δρουν σαν ένα προστατευτικό περίβλημα για τη φαρμακευτική ουσία.

Στην παρούσα εργασία προκειμένου να επιτευχθεί η σταθεροποίηση της αλλινάσης, μιας πρωτεΐνης του σκόρδου με σημαντική βιολογική δράση, πραγματοποιείται η ακινητοποίηση της σε βιοσυμβατά υλικά που θα μπορούσαν να αποτελέσουν ικανά συστήματα μεταφοράς της, στον ανθρώπινο οργανισμό. Τα συστήματα που επιλέγονται είναι η υδρογέλη αλγινικού ασβεστίου και τα

στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια LDH (Layered Double Hydroxides). Στη συνέχεια ακολουθεί μελέτη των συντιθέμενων υβριδίων. Συγκεκριμένα πραγματοποιείται φασματοσκοπική μελέτη των υβριδίων, σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου-αλλινάση και LDH-αλλινάση και ελέγχεται η δραστηριότητα της ακινητοποιημένης αλλινάσης.

Α ΜΕΡΟΣ:

ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΛΛΗΠΝΑΣΗΣ ΣΕ ΑΛΓΙΝΙΚΑ ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΥΔΡΟΓΕΛΕΣ

Οι υδρογέλες αποτελούν υλικά με σημαντικές βιολογικές και ιατρικές εφαρμογές. Πρόκειται για τρισδιάστατα, υδρόφιλα δίκτυα πολυμερών που παρουσιάζουν την ικανότητα να απορροφούν αρκετά μεγάλες ποσότητες νερού ή βιολογικών υγρών, χωρίς να διαλύονται.^{3,4} Τα δίκτυα αυτά, συγκροτούνται από ομοπολυμερή ή συμπολυμερή και σχηματίζονται μέσω χημικών δεσμών, ιονικών αλληλεπιδράσεων, δεσμών υδρογόνου και υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων.⁵ Λόγω των αλληλεπιδράσεων αυτών, προκύπτει μία σταθερή δομή πολυμερούς.

Η ικανότητα τους να απορροφούν νερό οφείλεται στην παρουσία υδρόφιλων ομάδων όπως, -OH, -CONH-, -CONH₂, -COOH, και -SO₃H.⁶ Οι υδρογέλες παρουσιάζουν θερμοδυναμική συμβατότητα με το νερό με αποτέλεσμα να διογκώνονται σε υδατικά μέσα, χωρίς όμως να διαλύονται.^{7,8,9} Το νερό μπορεί και εισχωρεί μεταξύ των πολυμερικών αλυσίδων του δικτύου του πολυμερούς με αποτέλεσμα να προκαλείται διόγκωση και σχηματισμός της υδρογέλης.¹⁰ Οι υδρογέλες, όντας συστήματα εξαρτώμενα από το περιβάλλον που βρίσκονται, αντιδρούν σε αλλαγές του pH, της θερμοκρασίας, της ιονικής ισχύος, της φύσης και της σύστασης του παράγοντα διόγκωσης. Παράγοντες όπως η σύσταση του πολυμερούς, η πυκνότητα της σύνδεσης και το περιεχόμενο σε νερό καθορίζουν τη διάχυση των μορίων μέσα από τις υδρογέλες.¹¹

Η μορφολογία που εμφανίζουν οι υδρογέλες και οι φυσικοχημικές τους ιδιότητες, τα καθιστούν κατάλληλα υλικά για πολλές εφαρμογές. Ιδιαίτερα, ενδιαφέρον παρουσιάζει η ικανότητα τους να αποτελούν συστήματα μεταφοράς φαρμάκων.^{12,13} Οι υδρογέλες προσομοιάζουν ένα φυσικό ιστό σε μεγαλύτερη κλίμακα. Αυτό αποδίδεται στην υψηλή περιεκτικότητά τους σε νερό, η οποία επιπρόσθετα επηρεάζει και άλλες ιδιότητες όπως η διαπερατότητα, οι μηχανικές ιδιότητες, η μορφολογία και η βιοσυμβατότητα. Επιπλέον, εμφανίζουν

ελαστικότητα και χαμηλή επιφανειακή τάση.¹⁴ Άλλες εφαρμογές των συστημάτων αυτών, είναι χρήση τους σε φακούς επαφής και σε μεμβράνες βιοαισθητήρων.

1.1 Αλγινικά ως φορείς ακινητοποίησης

Το βασικότερο μειονέκτημα των βιολογικών υλικών, που εμποδίζει τη χρήση τους σε τεχνολογικές εφαρμογές, είναι η μειωμένη τους σταθερότητα. Η ακινητοποίηση ενός ενζύμου μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στη σταθεροποίησή του. Ένα ένζυμο θεωρείται ακινητοποιημένο όταν η κινητικότητά του περιορίζεται με τεχνητό τρόπο ενώ παράλληλα διατηρείται η δραστηκότητά του.¹⁵ Η ακινητοποίηση επιτυγχάνεται με διάφορους τρόπους όπως φυσική προσρόφηση ή ομοιοπολική πρόσδεση σε κάποιο στερεό φορέα, παγίδευση εντός πολυμερούς ή ημιπερατής μεμβράνης και διαμοριακή διασύνδεση των ενζύμων μεταξύ τους.

Τα αλγινικά είναι από τα πλέον χρησιμοποιούμενα πολυμερή για την ακινητοποίηση ενζύμων, με την τεχνική της παγίδευσης. Είναι φυσικά βιοπολυμερή και εμφανίζουν πολλές εφαρμογές στη βιομηχανία φαρμάκων και τροφίμων. Στη βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιούνται ως πηκτικά, διογκωτικά, ως γαλακτωματοποιητικά μέσα και ως σταθεροποιητές. Επίσης, στη βιομηχανία φαρμάκων χρησιμοποιούνται αρκετά, λόγω της απουσίας τοξικότητας, της απλής και ήπιας διαδικασίας σχηματισμού της υδρογέλης, καθώς και της βιοσυμβατότητας τους.

Η παγίδευση ως τεχνική ακινητοποίησης των ενζύμων, ορίζεται ως ο φυσικός περιορισμός του ενζύμου εντός καθορισμένου χώρου ή δικτύου. Το πλέγμα του υλικού θα πρέπει να είναι καλά οργανωμένο ώστε να πραγματοποιείται η συγκράτηση του ενζύμου, αλλά και ταυτόχρονα να είναι διαπερατή από το υπόστρωμα και τα προϊόντα.

Αλγινικά σφαιρίδια έχουν χρησιμοποιηθεί για την παγίδευση πολλών πρωτεϊνών (πίνακας 1), λόγω των ιδιοτήτων που παρουσιάζουν καθώς και του χαμηλού κόστους εφαρμογής.

Albumin ¹⁶	Nerve growth factor (NGF) ³¹
Bovine Serum albumin (BSA) ^{17,18,19,20,21}	Myoglobin ³²
CD40L ^{22,23}	Ovalbumin ^{33,34,35,36}
Endothelial cell growth factor (ECGF) ²⁴	TGF alpha (TGF-a) ²⁵
Epidermal growth factor ²⁵	TGF beta (TGF-b) ^{37,38}
Acidic FGF ²⁵	Tumour necrosis factor receptor (TNFR:Fc) ³⁹
Basic FGF (bFGF) ^{25,26,27}	Interleukin-2 (IL-2) ¹⁷
Fibrinogen ²⁸	Lipase ⁴⁰
Gamma globulin ^{21,28}	tyrosinase ⁴¹
Horse-radish peroxidase ¹⁸	Melatonin ⁴²
IgG ^{28,29}	Leukaemia inhibitory factor (LIF) ⁴³
Insulin ³⁰	

Πίνακας 1. Πρωτεΐνες που έχουν ακινητοποιηθεί σε αλγινικά σφαιρίδια.

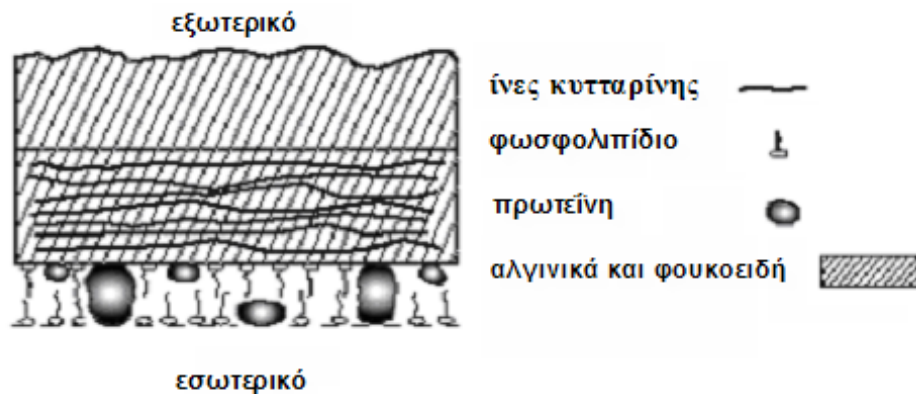
1.2 Προέλευση αλγινικών

Σαν πηγή προέλευσης αλγινικών, αρχικά χρησιμοποιούνταν τρία είδη καφέ αλγών, που περιλαμβάνουν τα *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* και *Macrocystis pyrifera*. Επίσης, πηγές αλγινικών αποτελούν και τα είδη *Laminaria japonica*, *Eclonia maxima*, *Lesonia negerscens* και *Sargassum*.⁴⁴ Σε όλα τα παραπάνω είδη, τα αλγινικά αποτελούν το 40% του συνολικού τους βάρους επί ξηρού. Εντοπίζονται στο ενδοκυττάριο υλικό των παραπάνω οργανισμών και απαντώνται με τη μορφή αλάτων κατιόντων μετάλλων που περιέχονται στο θαλασσίνο νερό, όπως Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Na^{+} .

Επίσης αλγινικά έχουν απομονωθεί και από βακτήρια όπως τα *Azotobacter vinelandii* και διάφορα είδη *Pseudomonas*.⁴⁵

1.3 Παραγωγή αλγινικών

Τα άλγη συλλέγονται και ξηραίνονται πριν από κάθε άλλη επεξεργασία. Τα αλγινικά απομονώνονται με εκχύλιση από τα ξερά άλγη, αφού κατεργαστούν με οξύ ώστε να απομακρυνθούν διάφοροι μη επιθυμητοί ομοπολυσακχαρίτες, όπως η λαμιναρίνη και φουκοϊδίνη, που απαντώνται σε αυτά. Επιπρόσθετα η πλύση με οξύ αποσκοπεί στην απομάκρυνση των μεταλλικών κατιόντων στα οποία οφείλεται η μη διαλυτότητα των αλγινικών. Στη συνέχεια ακολουθεί κατεργασία με υδροξείδιο του νατρίου οπότε παράγεται ένα παχύρευστο μίγμα αλγινικών και κυτταρικών μεμβρανών οι οποίες και περιέχουν κυτταρίνη (σχήμα 1). Κατόπιν το διάλυμα αυτό φιλτράρεται ώστε να απομακρυνθούν οι μεμβράνες και κατόπιν περαιτέρω επεξεργασίας αποχρωματίζεται. Το τελικό προϊόν είναι ένα καθαρό διάλυμα αλγινικών, τα οποία μπορούν να μετατραπούν σε άλας ή οξύ με την ανάλογη κατεργασία.⁴⁶

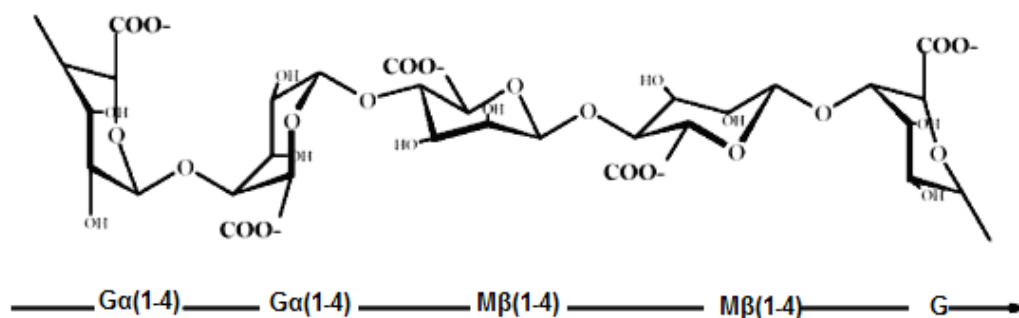


Σχήμα 1. Δομή κυτταρικού τοιχώματος στα καφέ άλγη.

1.4 Χημική σύσταση του αλγινικού οξέος

Τα αλγινικά πολυμερή, είναι γραμμικοί πολυσακχαρίτες σχηματιζόμενοι από β-D-μαννουρονικό (M) και α-L-γουλουρονικό οξύ (G), τα οποία ενώνονται μεταξύ τους με α 1-4 γλυκοζιτικό δεσμό. Σημειώνεται πως στην περίπτωση που ο πολυμερισμός λαμβάνει χώρα μεταξύ μαννουρονικών οξέων (MM) η σύνδεση πραγματοποιείται με β 1-4 γλυκοζιτικό δεσμό.⁴⁷

Η σύσταση των πολυμερών αυτών ποικίλει, καθώς ο πολυμερισμός μπορεί να πραγματοποιηθεί μεταξύ όμοιων G-G, M-M και διαφορετικών G-M, M-G σακχαρικών μονάδων. Λόγω του συγκεκριμένου σχήματος των μονομερών και του τρόπου σύνδεσής τους στα πολυμερή η γεωμετρία των G-G, M-M G-M και M-G περιοχών του πολυμερούς είναι διαφορετική.^{48,49} Συγκεκριμένα οι περιοχές του πολυμερούς όπου υπάρχει α-L-γουλουρονικό οξύ (G-περιοχές) κάμπτονται σχηματίζοντας μία κοιλότητα ενώ οι περιοχές όπου συναντώνται μονάδες β-D-μαννουρονικού οξέος (M-περιοχές) έχουν ευθύγραμμη διάταξη. Έτσι, όταν δύο G-περιοχές έρθουν σε επαφή μεταξύ τους σχηματίζεται μια κοιλότητα (σχήμα 2). Οι διαστάσεις της κοιλότητας αυτής είναι ιδανικές για τη συνεργατική δέσμευση κατιόντων μετάλλων.



Σχήμα 2. Χημική δομή αλγινικών, διαμόρφωση GG μονάδων (αριστερά), MM μονάδων (κέντρο) και MG μονάδων (δεξιά).

Σε αντίθεση με άλλους φυσικούς πολυσακχαρίτες, όπως η πεκτίνη (πολύ-1,4-D-γαλακτουρονικό οξύ) και η κυτταρίνη (πολύ-β-1,4-D-γλυκόζη), η

αλληλουχία των σακχάρων στα αλγινικά πολυμερή δεν επαναλαμβάνεται, αλλά παρατηρείται σχηματισμός διαφόρων περιοχών. Παρατηρούνται περιοχές με υψηλό περιεχόμενο σε μανουρονικό οξύ (M-περιοχές), περιοχές με υψηλό περιεχόμενο σε γουλουρονικό οξύ (G-περιοχές), καθώς και τμήματα όπου εμφανίζονται και τα δύο μονομερή⁵⁰ (σχήμα 2).

Η ακριβής αλληλουχία είναι αρκετά δύσκολο να προσδιοριστεί και εξαρτάται από τον οργανισμό και τον ιστό από τον οποίο έχουν απομονωθεί τα αλγινικά. Αναφέρεται, ότι τα αλγινικά που προέρχονται από το μίσχο του άλγους *L.hyperborea* είναι πλούσια σε α-γουλουρονικό οξύ ενώ τα αλγινικά που προέρχονται από τα άλγη *A. nodosum* και *L. japonica* εμφανίζουν χαμηλό περιεχόμενο σε α-γουλουρονικό οξύ.

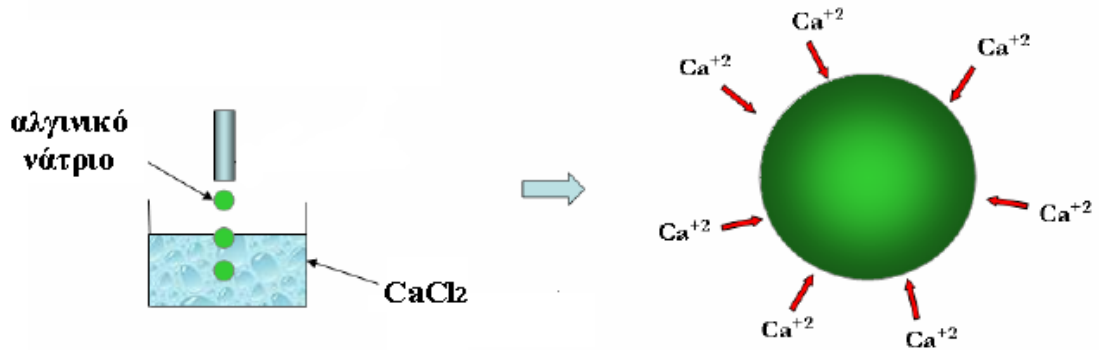
Γενικά η αλληλουχία των αλγινικών μπορεί να περιγραφεί από την εικόνα τεσσάρων δυάδων (MM, GG, MG, GM) και οχτώ τριάδων (GGG, GGM, MGG, MGM, MMM, MMG, GMM, και GMG). Επειδή τα αλγινικά δεν έχουν επαναλαμβανόμενη μονάδα, η κατανομή των μονομερών κατά μήκος της πολυμερικής αλυσίδας δε μπορεί να περιγραφεί από τις στατιστική του Bernoulli. Η ταυτοποίηση της δομής των αλγινικών πολυμερών πραγματοποιείται κυρίως με φασματοσκοπία NMR⁵¹, καθώς επίσης και με φασματοσκοπία κυκλικού διχρωισμού και με σκέδαση φωτός.

Η σύνθεση και το μήκος της αλυσίδας και κατ επέκταση το μοριακό βάρος τους, προσδιορίζουν τις φυσικές ιδιότητες των αλγινικών. Το ιξώδες του αλγινικού διαλύματος εξαρτάται πρωταρχικά από το μοριακό βάρος του υλικού. Το μοριακό βάρος διαφόρων δειγμάτων αλγινικών έχει προσδιοριστεί με σκέδαση φωτός και οι τιμές του, καλύπτουν μια περιοχή μεταξύ 80 kDa και 290 kDa.

1.5 Μηχανισμός σχηματισμού γέλης

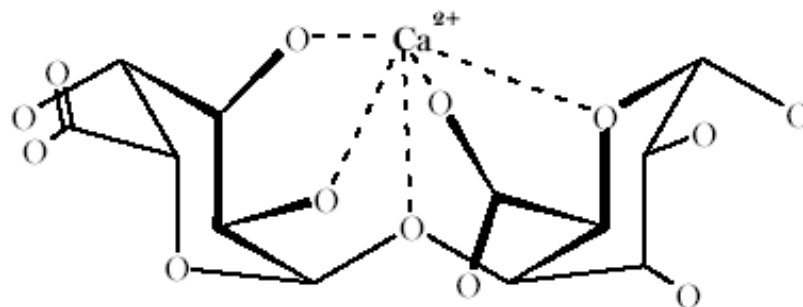
Από τις πιο σημαντικές ιδιότητες των αλγινικών είναι η ικανότητα τους να σχηματίζουν γέλες κατά την αντίδραση τους με δισθενή κατιόντα. Ο σχηματισμός της γέλης πραγματοποιείται σε ήπιο περιβάλλον, απουσία τοξικών αντιδρώντων. Τα αλγινικά σφαιρίδια παρασκευάζονται προσθέτοντας διάλυμα αλγινικού νατρίου σε

διάλυμα δισθενών κατιόντων όπως Ca^{2+} , Sr^{2+} ή Ba^{2+} . Η προσθήκη αυτή πραγματοποιείται με τη βοήθεια σύριγγας όπως παρουσιάζεται στη διάταξη του σχήματος 3.



Σχήμα 3. Σχηματισμός σφαιριδίων αλγινικού ασβεστίου

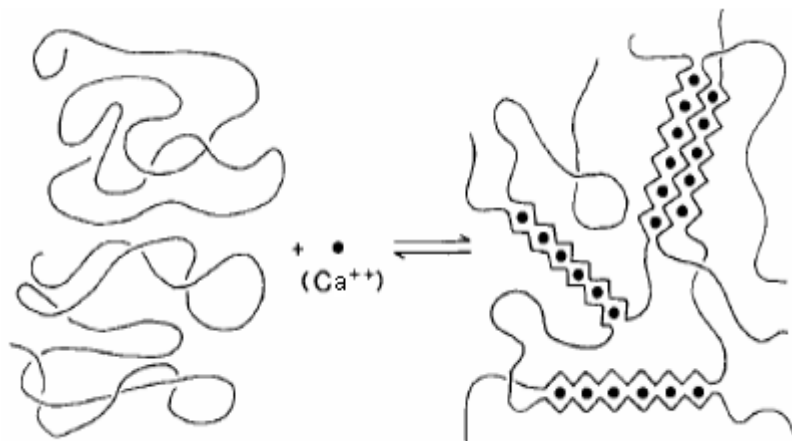
Δισθενή κατιόντα που μπορούν επίσης να σχηματίσουν γέλη είναι τα Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} και Mn^{2+} αλλά η χρήση τους είναι περιορισμένη λόγω της τοξικότητάς τους. Τα μονοσθενή κατιόντα και τα ιόντα Mg^{2+} δεν επάγουν το σχηματισμό γέλης⁵² Η δημιουργία της γέλης και η διασύνδεση του πολυμερούς επιτυγχάνεται κυρίως με ανταλλαγή των ιόντων νατρίου του γουλουρονικού οξέος με τα παραπάνω δισθενή κατιόντα με αποτέλεσμα το σχηματισμό ιονοτροπικών γελών.



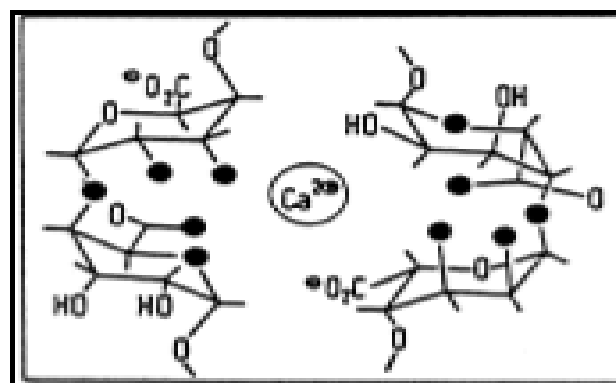
Σχήμα 4. Δέσμευση ιόντων Ca^{2+} .

Όπως φαίνεται στο παραπάνω σχήμα το ιόν ασβεστίου συναρμόζεται με τη μία μόνο καρβοξυλική ομάδα του γουλουρονικού οξέος.

Οι G-περιοχές δύο διαφορετικών αλγινικών αλυσίδων συμπλοκοποιούνται με το κατιόν ασβεστίου με αποτέλεσμα τη δημιουργία μιας μακρομοριακής δομής, χαρακτηριστικής ως μοντέλο αυγού-θήκης⁵³, σχήματα 4,5,6,7.

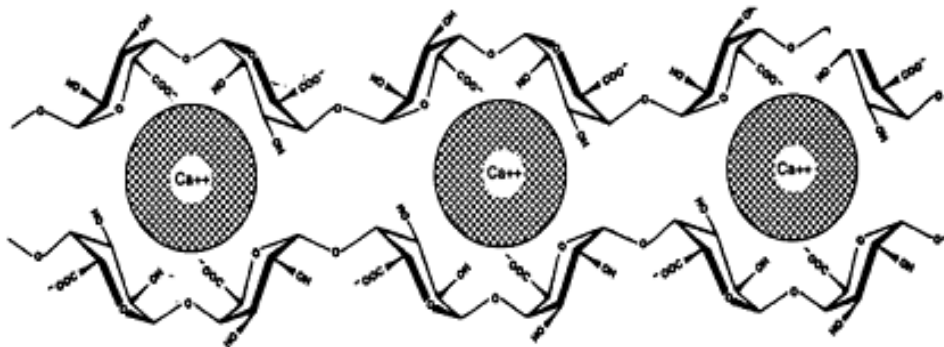


Σχήμα 5. Μηχανισμός σχηματισμού της γέλης.



Σχήμα 6. Τρόπος σύνδεσης ιόντων Ca^{2+} σε $\alpha\text{-L-GulA-(1-4)-L-GulA}$. GulA: γουλουρονικό οξύ.

Η δέσμευση αυτών των κατιόντων και οι ιδιότητες της σχηματιζόμενης γέλης εξαρτάται κυρίως από τη σύσταση και την αλληλουχία του αλγινικού οξέος.^{54,55} Τα κατιόντα συνδέονται επιλεκτικά στις μονάδες του α-L-γουλουρονικού οξέος με υψηλό συνεργατικό βαθμό και το μέγεθος των συνεργατικών μονάδων αναφέρεται να είναι πάνω από 20 μονομερή.⁵⁰ Επομένως το μήκος των G-περιοχών είναι το κυριότερο δομικό χαρακτηριστικό το οποίο συνεισφέρει σημαντικά, στον σχηματισμό της γέλης.



Σχήμα 7. Τρόπος σύνδεσης ιόντων Ca^{2+} σε α-L-GulA-(1-4)-L-GulA. GulA: γουλουρονικό οξύ, μοντέλο αυγού-θήκης.

Επομένως, οι λειτουργικές ιδιότητες των αλγινικών ως μήτρες ακινητοποίησης εξαρτώνται κυρίως από τη σύσταση και την δομή του πολυμερούς.

1.6 Ιδιότητες αλγινικών σφαιριδίων

1.6.1 Μέγεθος

Το μέγεθος και το σχήμα των σφαιριδίων εξαρτάται κυρίως από το ιξώδες του διαλύματος του αλγινικού νατρίου, το μέγεθος της σύριγγας που χρησιμοποιείται και το ύψος μεταξύ της σύριγγας και του διαλύματος του CaCl_2 . Χρησιμοποιώντας σύριγγα μεγάλης διαμέτρου και διάλυμα αλγινικών υψηλού ιξώδους παράγονται σφαιρίδια μεγάλου μεγέθους. Τα σφαιρίδια, όσο αυξάνεται η

συγκέντρωση του διαλύματος του αλγινικού νατρίου εμφανίζονται περισσότερο ομοιόμορφα και σφαιρικά.⁵⁶ Ωστόσο η παρασκευή τους καθίσταται δύσκολη πρακτικά, όταν αυξάνει η συγκέντρωση του αλγινικού νατρίου πάνω από 6% w/v, λόγω σημαντικής ανάλογης αύξησης του ιξώδους του διαλύματος.

Επιπρόσθετα, κατά τη διαδικασία σχηματισμού της γέλης παρατηρείται συρρίκνωση των σχηματιζόμενων σφαιριδίων οδηγώντας σε απώλεια ύδατος, με επακόλουθη αύξηση της συγκέντρωσης του πολυμερούς σε σχέση με το διάλυμα των αλγινικών.^{57,58,59}

1.6.2 Φυσικές ιδιότητες

Οι λειτουργικές και φυσικές ιδιότητες των αλγινικών σφαιριδίων εξαρτώνται από τη σύνθεση, την εμφανιζόμενη αλληλουχία στη δομή και το μοριακό βάρος του πολυμερούς.^{60,61} Η ευκαμψία των αλγινικών πολυμερών σε διάλυμα αυξάνει κατά τη σειρά $MG > MM > GG$ ⁶⁰ (G : α-L-γουλουρονικό οξύ, M: β-D-μανουρονικό οξύ).

Τα σφαιρίδια με τη μικρότερη παρατηρούμενη συρρίκνωση, μεγαλύτερη μηχανική αντοχή, μεγάλο πορώδες και μεγαλύτερη σταθερότητα προέρχονται από αλγινικά, με περιεκτικότητα σε α-L-γουλουρονικό οξύ πάνω από 70% και μέσο μήκος G-περιοχών μεγαλύτερο από 15.⁶¹ Τα σφαιρίδια που προέρχονται από αλγινικά με υψηλό περιεχόμενο σε G-περιοχές εμφανίζουν χαρακτηριστική ακαμψία, ενώ αυτά που προκύπτουν από αλγινικά με χαμηλότερο ποσοστό σε G-περιοχές παρουσιάζουν μεγαλύτερη ελαστικότητα.⁶²

Καθοριστικός παράγοντας στη σκληρότητα των σφαιριδίων αποτελεί ο χρόνος παραμονής τους στο διάλυμα του $CaCl_2$ (χρόνος σκλήρυνσης). Όσο αυξάνεται ο χρόνος σκλήρυνσης, λαμβάνει χώρα ισχυρότερη αλληλεπίδραση μεταξύ του διαλύματος των αλγινικών και του διαλύματος ασβεστίου, με αποτέλεσμα να παράγονται σφαιρίδια με μικρότερη ελαστικότητα και μεγάλη μηχανική αντοχή.⁴⁷

Η θολερότητα που παρατηρείται στα παραγόμενα σφαιρίδια είναι αντιστρόφως ανάλογη της αντοχής τους. Χρησιμοποιώντας αλγινικά με υψηλό

περιεχόμενο σε G-περιοχές, επιτυγχάνεται σχηματισμός διάφανων γελών, τα οποία και παρουσιάζουν και μεγαλύτερη αντοχή.

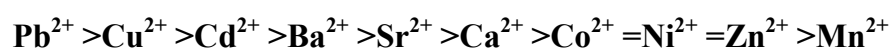
Τα αλγινικά συνθέτουν θερμοσταθερές γέλες σε μια περιοχή θερμοκρασιών από 0°C ως 100°C. Ωστόσο ο συντελεστής σκληρότητας των γελών μειώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας, υποδεικνύοντας ότι οι φυσικές και οι μηχανικές ιδιότητες των αλγινικών γελών είναι συνάρτηση της θερμοκρασίας.⁶³ Οι γέλες δύναται να παρασκευασθούν τόσο σε ζεστό όσο και σε κρύο περιβάλλον.⁶²

1.6.3 Χημική σταθερότητα

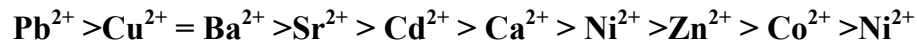
Για το σχηματισμό των γελών, ως καταλληλότερα επιλέγονται τα κατιόντα ασβεστίου, διότι πλεονεκτούν τόσο από πλευράς κόστους όσο και από πλευράς χαμηλής τοξικότητας. Επίσης η ευαισθησία που παρουσιάζουν όσον αφορά τη σύνδεσή τους με χηλικές ενώσεις, όπως φωσφορικές και κιτρικές ή παρουσία κατιόντων που παρεμποδίζουν το σχηματισμό της γέλης, όπως τα κατιόντα Na⁺ και Mg²⁺, καθιστά το ασβέστιο περιοριστικό αντιδραστήριο για τη δημιουργία γελών.⁵⁰ Συχνά οι παραπάνω περιορισμοί, αποτελούν τροχοπέδη, παρά την παραπάνω ανάλυση της χρησιμότητάς τους, στο σχηματισμό γελών. Παρόλα αυτά έχουν διατυπωθεί αρκετές προτάσεις, που καθιστούν τελικά δυνατή τη χρησιμοποίηση του κατιόντος του ασβεστίου για το σκοπό αυτό. Η απλούστερη μέθοδος, προτείνει τη συντήρηση των παραγόμενων αλγινικών σφαιριδίων σε μέσο το οποίο περιέχει ελεύθερα κατιόντα ασβεστίου, και τη διατήρηση της αναλογίας Na⁺:Ca²⁺ σε τιμή που εξαρτάται από την σύσταση των αλγινικών.^{21,61}

Για την σταθεροποίηση αλγινικών γελών έχουν χρησιμοποιηθεί κι άλλα δισθενή κατιόντα πέραν του ασβεστίου, τα οποία παρουσιάζουν υψηλότερη συγγένεια για τα αλγινικά.

Η σειρά συγγένειας η οποία ωστόσο μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα με την πηγή προέλευσης των αλγινικών, ακολουθεί το παρακάτω σχήμα.



Ανάλογα με τη συγγένεια του κατιόντος ως προς τα αλγινικά, λαμβάνονται σφαιρίδια με διαφορετικές μηχανικές ιδιότητες.⁵⁴ Κατιόντα με υψηλή συγγένεια οδηγούν σε άκαμπτα και σκληρά σφαιρίδια, με εξαίρεση τα κατιόντα Ni²⁺ και Cd²⁺. Οπότε η σειρά μηχανικών ιδιοτήτων ακολουθεί το παρακάτω σχήμα.



Λόγω της τοξικότητας που εμφανίζουν αρκετά από τα παραπάνω κατιόντα και ιδιαίτερα τα Pb²⁺, Cu²⁺ και Cd²⁺ περιορίζεται η χρήση τους για τη δημιουργία μήτρων ακινητοποίησης ζωντανών κυττάρων και πρωτεϊνών. Επίσης με την προσθήκη τρισθενών κατιόντων όπως Ti³⁺ και Al³⁺ μπορεί να πραγματοποιηθεί σταθεροποίηση γελών αλγινικού ασβεστίου.⁶¹

Τα αλγινικά σχηματίζουν ισχυρά σύμπλοκα με κατιονικά πολυμερή όπως η χιτοσάνη, επίσης με πολυπεπτίδια όπως η πολυλυσίνη ή ακόμη και με συνθετικά πολυμερή όπως η πολυαιθυλαμίνη. Η δομή των παραπάνω συμπλόκων δεν επηρεάζεται από την παρουσία χηλικών ενώσεων και για το λόγο αυτό πλεονεκτούν όσον αφορά τη σταθεροποίηση των γελών, με επακόλουθο τη βελτίωση της σταθερότητας τους και την αύξηση της μηχανικής τους αντοχής.⁶⁰

1.6.4 Μέγεθος πόρων και μοριακή διάχυση

Η απελευθέρωση των ακινητοποιημένων πρωτεϊνών από τη μήτρα των αλγινικών μπορεί να πραγματοποιηθεί με δύο μηχανισμούς. Πραγματοποιείται είτε με διάχυση διαμέσου των πόρων του πολυμερούς είτε με αποικοδόμηση του δικτύου του πολυμερούς. Το μέγεθος των πόρων των αλγινικών σφαιριδίων, το οποίο παίζει μείζονα ρόλο στην απελευθέρωση της πρωτεΐνης, εξαρτάται από την προέλευση του αλγινικού. Μελέτη με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο της μορφής δείγματος αλγινικών σφαιριδίων, συγκέντρωσης σε αλγινικό 2% w/v, δείχνει ότι το μέγεθος των πόρων κυμαίνεται από 5nm έως 200 nm.⁶⁴ Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι οι πόροι στην επιφάνεια των σφαιριδίων έχουν πιο πυκνή διαμόρφωση σε σχέση με τον πυρήνα του.⁶⁰

Η διάχυση μικρών μορίων όπως η γλυκόζη και η αιθανόλη επηρεάζεται ελάχιστα από τη μήτρα των αλγινικών, ενώ η διάχυση μεγάλων πρωτεϊνών φαίνεται να εξαρτάται σημαντικά από το μοριακό τους βάρος.⁶¹ Έχουν αναφερθεί αρκετές πρωτεΐνες που υφίστανται διάχυση από τα αλγινικά σφαιρίδια, μεταξύ των οποίων είναι και η ανοσοσφαιρίνη (IgG),^{28,29} το ινωδογόνο²⁸ και η ινσουλίνη.³⁰ Ο ρυθμός διάχυσης των πρωτεϊνών από τα σφαιρίδια είναι δυνατόν να μειωθεί, με την αύξηση της συγκέντρωσης των αλγινικών.

Η γέλη που προέρχεται από αλγινικά με υψηλό περιεχόμενο σε α-L-γουλουρονικό οξύ, εμφανίζει δομή με μεγάλο άνοιγμα πόρων, που πιθανόν οφείλεται στη μικρότερη συρρίκνωση που υφίστανται οι γέλες αυτού του τύπου και προωθούν περισσότερο τη διάχυση των πρωτεϊνών.⁶¹ Η απελευθέρωση της δραστικής ουσίας από τα αλγινικά σφαιρίδια μπορεί να μειωθεί σημαντικά ελέγχοντας το μέγεθος των πόρων, υποβάλλοντας τα σφαιρίδια σε ρυθμιζόμενες συνθήκες ξήρασης, ώστε να αποφευχθεί τυχόν διάρρηξη τους, με αποτέλεσμα την απώλεια της μεταφερόμενης πρωτεΐνης.⁶⁰

Επιπλέον, η μείωση του μεγέθους των πόρων μπορεί να επιτευχθεί εκθέτοντας τα σφαιρίδια σε συνθήκες χαμηλού pH. Στις συνθήκες αυτές παρατηρείται σημαντική μείωση της διαμέτρου των πόρων.³⁷ Η μείωση της απελευθέρωσης των μακρομορίων από τα αλγινικά σφαιρίδια σε χαμηλό pH, (γαστρικό περιβάλλον) αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα για την ανάπτυξη και το σχεδιασμό συστημάτων μεταφοράς μορίων, μέσω της στοματικής οδού.^{37,65,66,67} Στα γαστρικά υγρά όπου το pH είναι όξινο, τα ενυδατωμένα αλγινικά μετατρέπονται σε μια αδιάλυτη μορφή. Καθώς το pH αυξάνεται όπως συμβαίνει στην εντερική περιοχή του ανθρώπινου οργανισμού, η αδιάλυτη αυτή πάστα μετατρέπεται σε μία διαλυτή και κολλώδη στοιβάδα.^{65,66,67,68} Αυτή η εξαρτώμενη απ' το pH συμπεριφορά των αλγινικών μπορεί να χρησιμοποιηθεί προκειμένου να ρυθμιστεί ο τρόπος και ο τόπος απελευθέρωσης του παγιδευμένου στα αλγινικά φαρμάκου.

Το φορτίο που εμφανίζει η πρωτεΐνη μπορεί επίσης να επηρεάσει το ρυθμό διάχυσης της, από τη μήτρα. Στη περίπτωση που η παγιδευμένη πρωτεΐνη εμφανίζει θετικό φορτίο, αλληλεπιδρά με την αρνητικά φορτισμένη μήτρα των αλγινικών, εμποδίζοντας με τον τρόπο αυτό τη διάχυση της.^{44,52} Αντίθετα στην περίπτωση

αρνητικά φορτισμένης πρωτεΐνης η απελευθέρωση από τη μήτρα πραγματοποιείται γρηγορότερα.

1.7 Βιολογικές ιδιότητες

1.7.1 Βιοσυμβατότητα

Τα αλγινικά όντας φυσικά πολυμερή, δεν παρουσιάζουν τοξικότητα και χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων ως βοηθητικά πήξης, γαλακτωματοποιητές και σταθεροποιητές. Ανήκουν στην κατηγορία των ενώσεων που είναι εγκεκριμένα από τον FDA για τη χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων και φαρμάκων. Κατά τη χορήγηση τους δια της στοματικής οδού δεν παρατηρείται ανοσοαπόκριση, ενώ επίσης δεν παρουσιάζουν τοξικότητα και είναι βιοδιασπώμενα.⁵²

1.7.2 Προσκόλληση σε βιολογικούς ιστούς

Τα αλγινικά μεταξύ των άλλων χαρακτηριστικών, διαθέτουν την ικανότητα να προσκολλώνται σε βιολογικούς ιστούς, μια ιδιότητα που καθίσταται ιδιαίτερα χρήσιμη στην περίπτωση συστημάτων μεταφοράς φαρμάκων. Ο τρόπος λειτουργίας των συστημάτων αυτών στηρίζεται στην αύξηση του χρόνου αντοχής του φάρμακου. Έχει αποδειχθεί ότι τα πολυμερή που παρουσιάζουν μεγάλη πυκνότητα φορτίου αποτελούν καλούς παράγοντες βιοπροσκόλλησης^{69,70,71,72} και μάλιστα όσο αυξάνεται το φορτίο η προσκόλληση που πραγματοποιείται είναι μεγαλύτερη. Επιπρόσθετα τα ανιονικά πολυμερή είναι πιο αποτελεσματικά από τα κατιονικά ή τα μη ιονικά πολυμερή.⁶⁹ Τα αλγινικά όντας ανιονικά πολυμερή, παρουσιάζουν αυξημένη την ικανότητα αυτή και η δύναμη της προσκόλλησης είναι μεγαλύτερη συγκρινόμενη με άλλα πολυμερή, όπως το πολυστυρένιο, η χιτοζάνη, η κάρβοξυ-μεθυλο-κυτταρίνη και το πολύ-λακτικό οξύ.^{70,71}

Η ικανότητα βιοπροσκόλλησης των αλγινικών βρίσκει εφαρμογή στην περίπτωση μεταφοράς φαρμάκων σε βλεννώδεις ιστούς όπως η γαστροεντερική περιοχή.⁷³ Η προσκόλληση των μικροσφαιριδίων στους βλεννώδεις ιστούς

περιορίζει τοπικά το φάρμακο και καθυστερεί το χρόνο μεταφοράς της πρωτεΐνης με αποτέλεσμα να βελτιώνεται σημαντικά η αποτελεσματικότητα και βιοδιαθεσιμότητα του φαρμάκου.

1.7.3 Ιδανικά χαρακτηριστικά αλγινικών σφαιριδίων

Οι διάφορες μελέτες ακινητοποίησης εμφανίζονται ιδιαίτερα απαιτητικές όσον αφορά τα χαρακτηριστικά των αλγινικών σφαιριδίων, όμως η παρασκευή ιδανικών αλγινικών παρουσιάζει αρκετές δυσκολίες. Οι απαραίτητες ιδιότητες που θα πρέπει να παρουσιάζουν τα αλγινικά σφαιρίδια ώστε να θεωρηθούν κατάλληλα ως μήτρες ακινητοποίησης είναι η μεγάλη μηχανική και χημική σταθερότητα, οι ελεγχόμενες ιδιότητες διόγκωσης, το χαμηλό ποσοστό τοξικότητας, το καθορισμένο μέγεθος πόρων και η ομοιόμορφη κατανομή τους. Οι ιδιότητες αυτές μπορούν να επιτευχθούν λαμβάνοντας υπόψη τις παρακάτω παραμέτρους:

- επιλογή των αλγινικών,
- καθαρότητα των αλγινικών,
- επιλογή και ρύθμιση της διαδικασίας της γελοποίησης,
- συνδυασμός με άλλα πολυμερή,

1.8 Περιορισμοί στη χρήση αλγινικών

Τα αλγινικά σφαιρίδια αποτελούν κατάλληλα υλικά ακινητοποίησης καθώς σχηματίζονται με απλή και ήπια διαδικασία και προσφέρουν το κατάλληλο περιβάλλον για το ακινητοποιημένο υλικό. Ωστόσο, η τεχνική ακινητοποίησης σε αλγινικά σφαιρίδια παρουσιάζει κάποιους περιορισμούς.

1.8.1 Χαμηλή σταθερότητα

Ουσίες όπως φωσφορικά ή κιτρικά, τα οποία παρουσιάζουν υψηλή συγγένεια για τα ιόντα Ca^{2+} , δεσμεύουν τα συνδεδεμένα ιόντα ασβεστίου,

οδηγώντας στην καταστροφή της γέλης.⁴⁴ Επιπλέον, η γέλη μπορεί να αποσταθεροποιηθεί από υψηλές συγκεντρώσεις ιόντων τα οποία δεν προκαλούν γελοποίηση, όπως είναι τα Na^+ και Mg^{2+} , λόγω της ιοντοανταλλαγής που λαμβάνει χώρα με τα Ca^{2+} .

1.8.2 Μέγεθος πόρων

Ο κυριότερος περιορισμός της χρήσης των αλγινικών ως μήτρα ακινητοποίησης καθίσταται στο γεγονός ότι κατά τη διαδικασία σχηματισμού των σφαιριδίων παρατηρείται απώλεια της δραστικής ουσίας διαμέσου των πόρων των σφαιριδίων. Η απώλεια αυτή οφείλεται στην ανοιχτή δομή του πλέγματος των σφαιριδίων.^{74,75} Ωστόσο, έχουν πραγματοποιηθεί αρκετές τροποποιήσεις των αλγινικών προκειμένου να αντιμετωπισθεί το πρόβλημα αυτό, όπως ο σχηματισμός συμπλόκων αλγινικών με κυστεΐνη⁷⁶, ο σχηματισμός υδρόφοβων αλγινικών καθώς και ο σχηματισμός συμπλόκων με άλλα πολυμερή. Ο συνδυασμός των αλγινικών με άλλα πολυμερή όπως η πηκτίνη⁷⁴, η χιτοζάνη⁷⁷, η αιθυλο-κυτταρίνη⁷⁸ επηρεάζει το μέγεθος των πόρων και τη μορφή του δικτύου, με αποτέλεσμα να περιορίζεται η διάχυση.

Συγκεκριμένα, μεγάλο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα μικροσφαιρίδια που προκύπτουν από τον συνδυασμό αλγινικών και χιτοζάνης, ως συστήματα μεταφοράς πρωτεϊνών και φαρμάκων, καθώς και η ελεγχόμενη απελευθέρωση τους.^{79,80,81,82,83,84} Τα σύμπλοκα αλγινικών-χιτοζάνης αποτελούν υδρογέλες ευαίσθητες στις μεταβολές του pH. Τα αλγινικά παρουσιάζουν την ιδιότητα να συρρικνώνονται σε χαμηλό pH και να καθίστανται διαλυτά σε υψηλότερα pH. Αντίθετα, η χιτοζάνη διαλύεται σε χαμηλό pH και παραμένει αδιάλυτη σε περιοχές υψηλότερου pH. Επομένως, η διάλυση της χιτοζάνης σε χαμηλό pH παρεμποδίζεται από το δίκτυο του αλγινικού που είναι αδιάλυτο σε χαμηλό pH και αντίστοιχα η πιθανή διάλυση του αλγινικού σε υψηλό pH αποτρέπεται από την χιτοζάνη που παρουσιάζεται σταθερή σε υψηλές τιμές pH. Τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα παρουσιάζουν μειωμένο μέγεθος πόρων, οπότε παρεμποδίζεται η διαφυγή του εγκλεισμένου δραστικού μορίου.

1.8.3 Βιοσυμβατότητα

Παρόλο που τα αλγινικά καλύπτουν όλες τις απαιτήσεις προκειμένου να χρησιμοποιηθούν ως πρόσθετα στα τρόφιμα και στα φαρμακευτικά προϊόντα, κάποια αλγινικά μπορεί να περιέχουν μικρές ποσότητες ουσιών ικανές να αλληλεπιδράσουν με τις δραστικές ουσίες που ακινητοποιούνται. Για το λόγο αυτό, είναι απαραίτητο να πραγματοποιείται ταυτοποίηση των χημικών συστατικών των αλγινικών ή να καθορίζεται η προέλευση των αλγών από τα οποία προέρχονται τα αλγινικά. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατό να επιλέγονται τα κατάλληλα αλγινικά ανάλογα με τη χρήση για την οποία προορίζονται.

2. ΤΟ ΣΚΟΡΔΟ

2.1 Εισαγωγή

Εδώ και πολλά χρόνια ελκυστικό πεδίο διατροφικής όσο και κλινικής έρευνας, αποτελούν τα τρόφιμα που τροποποιούν εν μέρει, τα χαρακτηριστικά διάφορων ασθενειών. Το σκόρδο (*Allium Sativum*) αποτελείται από συστατικά τα οποία εμφανίζουν ευεργετική δράση στην ανθρώπινη υγεία.

Εδώ και αιώνες το σκόρδο έχει κατακτήσει επάξια τον τίτλο, του μαγικού θεραπευτικού φυτού. Όπως αναφέρεται σε Σανσκριτικά κείμενα χρησιμοποιείται σαν θεραπευτικός παράγοντας πάνω από 5000 χρόνια. Οι Αιγύπτιοι θεωρούσαν το σκόρδο ιερό και υπάρχουν πολλές αναφορές σε ιατρικούς παπύρους. Οι Έλληνες και οι Ρωμαίοι θεραπευτές ονόμαζαν το σκόρδο «πατέρα της ιατρικής» δεδομένου ότι χρησιμοποιούνταν σαν φαρμακευτική ουσία για πλειάδα ασθενειών, όπως, μολυσματικές ασθένειες, προβλήματα ροής του αίματος, αντίδοτο σε δηλητήρια⁸⁵, θεραπεία της αρτηριοσκλήρυνσης, της υπέρτασης, της κεφαλαλγίας, του άσθματος καθώς και του καρκίνου.^{86,87}

Το σκόρδο ανήκει στο γένος *Allium* της οικογένειας *Liliaceae*. Είναι ποώδες φυτό το οποίο μπορεί να φθάσει μέχρι και τα 70 εκατοστά σε ύψος με μικρά ροδόχροα-λευκά ή λευκοπράσινα άνθη, ή πολλές φορές με μικρούς ερυθρούς βολβούς αντί για άνθη. Έχει βολβώδες στέλεχος και τα φύλλα μέχρι το ήμισυ περίπου του μήκους τους, είναι επίπεδα και λεία. Ο βολβός του σκόρδου ή κεφαλή του σκόρδου, αποτελείται από πολλά μικρά βολβοειδή μέρη που είναι γνωστά με την ονομασία σκελίδες. Αυτές, καλύπτονται από τρεις με πέντε μεμβράνες που έχουν μορφή σωληνοειδούς θήκης. Το σκόρδο πολλαπλασιάζεται με τους βολβούς του. Ανθίζει τους καλοκαιρινούς μήνες, από τον Ιούνιο ως τον Αύγουστο και απαντάται στην Ευρώπη και σε χώρες της Ασίας.

2.2 Χημική σύσταση του σκόρδου

Το βασικό συστατικό του σκόρδου είναι το νερό που αποτελεί το 56-68% του βάρους του και ακολουθούν οι υδατάνθρακες σε ποσοστό 26-30%.⁸⁸

Ιατρικά, ως σημαντικότερο συστατικό του σκόρδου θεωρούνται οι θειούχες οργανικές ενώσεις που ποσοτικοποιούνται σε 11-35mg/g φρέσκου σκόρδου. Η περιεκτικότητα των ενώσεων αυτών στο σκόρδο είναι τριπλάσια σε σχέση με άλλα γνωστά λαχανικά όπως το μπρόκολο, το κρεμμύδι και το κουνουπίδι.⁸⁹

Η κατηγορία αυτή των χημικών ενώσεων είναι επίσης υπεύθυνη για την χαρακτηριστική οσμή και τη γεύση των *Allium* ειδών και επιπλέον σχετίζονται με τις θετικές βιολογικές δράσεις που παρουσιάζει το σκόρδο.

Σε αντίθεση με τα άλλα είδη *Allium* τα οποία περιέχουν μία μόνο λεκτίνη, στο σκόρδο παρουσιάζονται δύο είδη λεκτινών, η ετεροδιμερής λεκτίνη ASAI και η ομοδιμερής λεκτίνη ASAII.^{90,91}

Άλλα συστατικά που απαντούν στο σκόρδο είναι οι σαπωνίνες, οι βιταμίνες⁹² A, B, C και E, διάφορα μέταλλα όπως τα γερμάνιο, ασβέστιο, χαλκός, κάλιο, μαγνήσιο, σελήνιο, ψευδάργυρος, καθώς και άλλες ενώσεις.⁸⁹

2.3 Θειούχες οργανικές ενώσεις του σκόρδου

Οι κύριες οργανικές θειούχες ενώσεις που περιέχονται στο σκόρδο, είναι τα κυστεϊνικά σουλφοξείδια όπως η αλιίνη που αποτελεί το 5-14mg/g φρέσκου σκόρδου, η μεθίνη και η ισοαλιίνη. Οι ενώσεις αυτές προέρχονται από τις γ-γλουταμυλο-κυστεϊνες κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης και της ανάπτυξης όπου το ένζυμο γ-γλουταμυλο τρανσπεπτιδάση βρίσκεται σε υψηλά επίπεδα. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται επίσης κατά την αποθήκευση και είναι ταχύτερη σε χαμηλές θερμοκρασίες. Τα κυστεϊνικά σουλφοξείδια καλύπτοντας 8-19 mg/g φρέσκου σκόρδου και οι γ-γλουταμυλο-κυστεϊνες 5-16mg/g σκόρδου αποτελούν περίπου το 95% των συνολικών θειούχων ενώσεων στο σκόρδο.⁹³

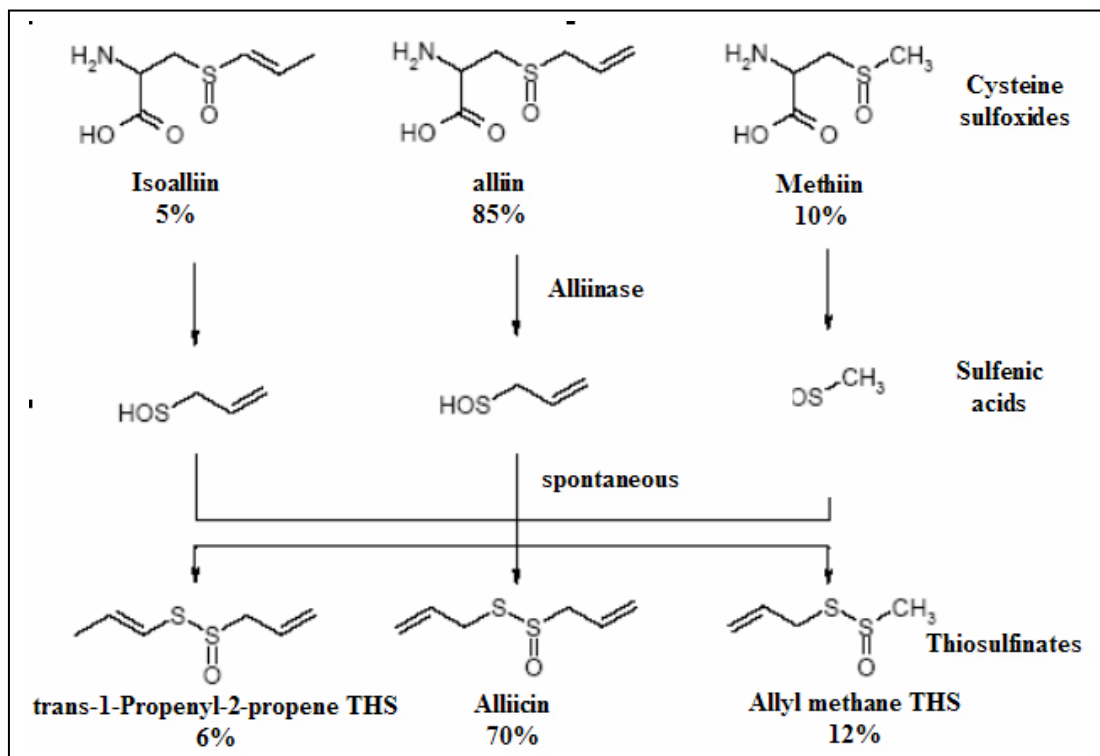
Περίπου το 85% των κυστεϊνικών παραγώγων βρίσκονται στο βολβό, με το 12% στα φύλλα και το 2% στις ρίζες, ενώ οι γ-γλουταμυλο-κυστεϊνες εντοπίζονται μόνο στους βολβούς.⁹⁴

Τα κυστεϊνικά σουλφοξειδία (αλιίνη, μεθίνη, ισοαλιίνη) είναι άσπρα κρυσταλλικά, άοσμα στερεά τα οποία παρουσιάζουν μεγάλη διαλυτότητα στο νερό, ενώ αντίθετα είναι αδιάλυτα στους περισσότερους οργανικούς διαλύτες.

2.4 Θειοσουλφίδια (Αλλισίνη)

Τα θειοσουλφίδια, με κύριο εκπρόσωπο την αλλισίνη, είναι οι ενώσεις στις οποίες οφείλεται η βιολογική δράση του σκόρδου. Αυτές οι ασταθείς ενώσεις παράγονται κατά το κόψιμο ή άλεσμα του σκόρδου και είναι υπεύθυνες για την χαρακτηριστική οσμή του σκόρδου.

Η αλλινάση μια γλυκοπρωτεΐνη του σκόρδου καταλύει την μετατροπή των κυστεϊνικών σουλφοξειδίων σε θειοσουλφινικά. Η αλλισίνη είναι το θειοσουλφινικό που παράγεται σε μεγαλύτερη ποσότητα (70%), ενώ ακολουθεί το αλλυλικό μεθυλο-θειοσουλφινικό (12%) (σχήμα 8). Επιπλέον, σε χαμηλότερες όμως συγκεντρώσεις, σχηματίζονται διάφορα άλλα θειοσουλφινικά.



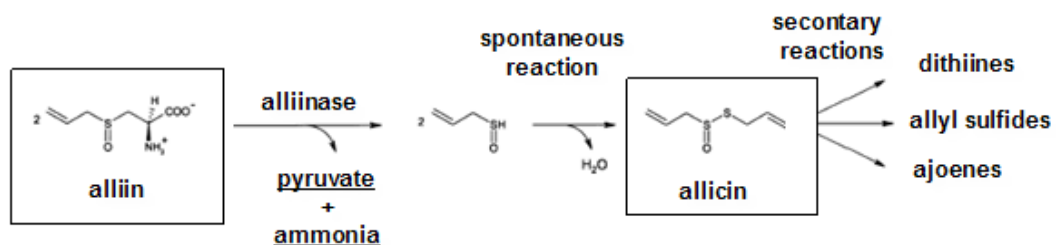
Σχήμα 8. Μετασχηματισμός κυστεϊνικών σουλφοξειδίων σε θειοσουλφινικά.

Η μετατροπή της αλλιίνης σε αλλισίνη πραγματοποιείται σε 0.2-0.5 λεπτά σε θερμοκρασία δωματίου. Η σταθερότητα των θειοσουλφινικών και ειδικότερα της αλλισίνης εξαρτάται από το ποσοστό καθαρότητας, τη συγκέντρωση, από τον διαλύτη που χρησιμοποιείται, και την θερμοκρασία στην οποία λαμβάνει χώρα η αντίδραση. Ο χρόνος ημίσειας ζωής της καθαρής αλλισίνης είναι 16 ώρες.⁹⁴

Η αλλισίνη είναι ελάχιστα διαλυτή στο νερό ενώ η διαλυτότητα της αυξάνει στους οργανικούς διαλύτες και ιδιαίτερα στους πολικούς οργανικούς διαλύτες.

2.5 Μετασχηματισμοί θειοσουλφινικών

Τα θειοσουλφινικά υφίστανται διάφορους μετασχηματισμούς ώστε να παραχθούν περισσότερο σταθερές ενώσεις, όπως δισουλφίδια, τρισουλφίδια, αλλυλικά σουλφίδια, βυνιλικές διθειίνες, αζοένια και μερκαπτοκουστείνες (σχήμα 9). Τα προϊόντα των αντιδράσεων αυτών εξαρτώνται σημαντικά από τη θερμοκρασία, το pH και το χρησιμοποιούμενο διαλύτη.⁹⁴



Σχήμα 9. Μετασχηματισμοί θειοσουλφινικών.

2.6 Βιολογική δράση του σκόρδου

Η θεραπευτική δράση του σκόρδου οφείλεται στην αλλισίνη και στα παράγωγα της αλλισίνης, διθειίνες, αλλυλικά σουλφίδια και αζοένια.

2.6.1 Υποχοληστερινεμικές ιδιότητες

Πολλές κλινικές έρευνες έχουν επιβεβαιώσει τη μείωση του επιπέδου των λιπιδίων στο αίμα λόγω κατανάλωσης σκόρδου.^{93,95-101} Επίσης έχει δειχθεί ότι τα αλλυλικά δισουλφίδια και οι αλλυλικές μερκαπτάνες αναστέλλουν τη δράση της HMG-CoA αναγωγάσης, του περιοριστικού ενζύμου, για την σύνθεση της χοληστερόλης στο σώμα.¹⁰²

2.6.2 Μείωση της πίεσης

Η επίδραση του σκόρδου στην πίεση του αίματος αποτελεί αντικείμενο μελέτης από το 1921. Οι αναλύσεις παρουσιάζουν ότι το σκόρδο μειώνει σημαντικά την πίεση του αίματος.¹⁰¹ Το σκόρδο ευνοεί τη δράση της συνθετάσης του νιτρικού οξέος, η οποία πετυχαίνει αγγειδιασταλτικά αποτελέσματα μέσω της παραγωγής νιτρικού οξέος.¹⁰³

2.6.3 Αντιπηκτική ικανότητα

Το σκόρδο έχει την ικανότητα να ελαττώνει τη συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων με αποτέλεσμα να ελαττώνει της πιθανότητες εμφάνισης θρομβωτικού επεισοδίου.¹⁰⁴ Οι δραστικές ενώσεις του σκόρδου αναστέλλουν τον παράγοντα που σχετίζεται με την συσσωμάτωση των αιμοπεταλίων και ιδιαίτερα των εικοσανοειδών τα οποία προέρχονται από το αραχιδονικό οξύ¹⁰⁴⁻¹¹⁰.

2.6.4 Αντικαρκινική δράση

Αρκετές μελέτες έχουν διεξαχθεί και επιδεικνύουν τα επιθυμητά αποτελέσματα του σκόρδου σε διάφορους τύπους καρκίνου.¹¹¹⁻¹¹⁴ Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι το σκόρδο συνδέεται με την απόπτωση διάφορων καρκινικών κυττάρων.¹¹⁵⁻¹¹⁸ Επιδημιολογικές μελέτες έχουν αποκαλύψει ότι η κατανάλωση σκόρδου ενδέχεται να μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης όγκων.¹¹⁸

2.6.5 Αντιβακτηριακή δράση

Το σκόρδο παρουσιάζει ένα ευρύ φάσμα αντιβακτηριακής δράσης, αναστέλλοντας τη δράση *Gram-θετικών* και *Gram –αρνητικών* βακτηρίων στα οποία περιλαμβάνονται είδη των *Escherichia*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Bacillus*, και *Clostridium*.^{119,120,121} Επιπλέον βακτήρια όπως το *Mycobacterium tuberculosis* είναι αρκετά ευαίσθητα στο σκόρδο.¹²² Επιπλέον, εκχύλισμα σκόρδου είναι αποτελεσματικό ενάντια στο *Helicobacter pylori* το οποίο είναι υπεύθυνο για το έλκος του στομάχου.¹²³

2.6.6 Αντική δράση

Το σκόρδο εμφανίζει θετικά αποτελέσματα όσον αφορά την ενίσχυση του ανοσοποιητικού συστήματος. Παρουσιάζει ευεργετικές ιδιότητες, που δρουν συνεργατικά προκειμένου να ενισχύσουν τη αντίδραση του οργανισμού απέναντι στις ασθένειες. Στις ιδιότητες αυτές συγκαταλέγονται ότι ευνοεί τη δράση των φαγοκυτταρικών κυττάρων, ενισχύει τη δράση των φυσικών μεθόδων κυτταρικού θανάτου και αναστέλλει την ανάπτυξη παθογόνων μικροοργανισμών.

Παρουσιάζει *in vitro* και *in vivo* αντιϊική δράση ενάντια στους παρακάτω ιούς: *human cytomegalovirus*, *influenza B*, *herpes simplex virus*, *parainfluenza virus type 3*, *vaccinia virus*, *vesicular stomatitis virus* και *human rhinovirus type 2*. Η αντική δράση των συστατικών του σκόρδου αυξάνεται σύμφωνα με το σχήμα αζοένια > αλλισίνη > αλλυλο-μέθυλο- θειοσουλφίδιο

2.6.7 Μυκητοκτόνο δράση

Όπως αποδεικνύεται από πολλές έρευνες το σκόρδο παρουσιάζει εξαιρετική μυκητοκτόνο δράση.¹²⁴⁻¹³⁰

Σημαντική είναι η αναστολή που προκαλεί το σκόρδο στον μύκητα *Candida albicans*. Η βιολογική δράση της αλλισίνης που προέρχεται από το φρέσκο σκόρδο θεωρείται ότι είναι συνδυασμός των παρακάτω παραγόντων:

- παρουσιάζει αντιοξειδωτική ικανότητα,

- έχει την δυνατότητα να καταστρέφει τις ομάδες SH των ενζύμων και των πρωτεϊνών και να τροποποιεί την δραστηριότητα τους,
- παρουσιάζει το πλεονέκτημα ότι μπορεί να διεισδύει ταχύτατα μέσα στα κύτταρα διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών.

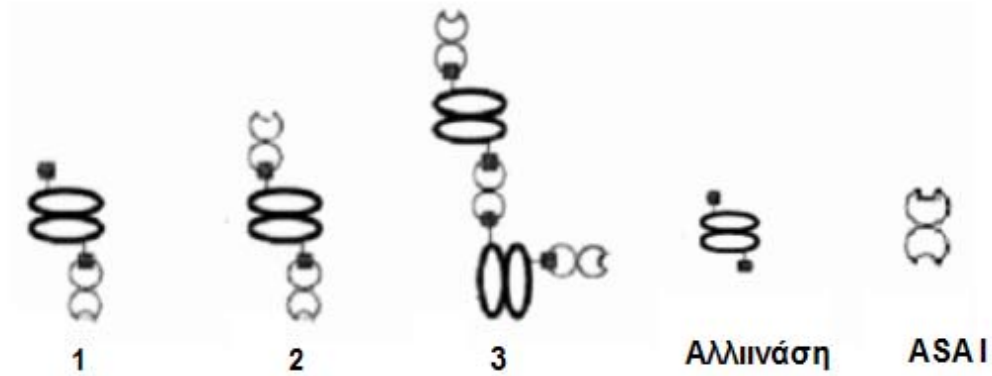
2.7 Αλλινάση (λύαση της αλίνης)

Όταν ο ιστός του σκόρδου υποβάλλεται σε κάποιο τραύμα, η αλλινίνη η μεθίνη και η ισοαλίνη υφίστανται σε ένα ταχύτατο ενζυμικό μετασχηματισμό παράγοντας κυρίως αλλισίνη. Η αντίδραση αυτή καταλύεται από την αλλινάση, μία γλυκοπρωτεΐνη που βρίσκεται συνήθως στα κενοτόπια^{89,131,132} ενώ η αλλινίνη και τα άλλα κυστεϊνικά σουλφοξείδια εντοπίζονται στο κυτταρόπλασμα. Η αλλινάση καταλύει την διάσπαση του δεσμού μεταξύ C-S και ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των αμινοτρανσφερασών. Το ένζυμο αυτό βρίσκεται σε δεκαπλάσια ποσότητα στους βολβούς σε σχέση με τα φύλλα του.¹³³ Η χημική αντίδραση του μετασχηματισμού απεικονίζεται στο σχήμα 9.

Η πρώτη περιγραφή της αλλινάσης επιτεύχθηκε από το Stool και τον Seebeck το 1951. Πρόκειται για ένα ομοδιμερές ένζυμο το οποίο αποτελείται από από 2x448 αμινοξέα και έχει μοριακό βάρος 103000Da.¹³⁴ Σε κάθε υπομονάδα, το ένζυμο περιέχει ένα μόριο φωσφορικής πυριδοξάλης (pyridoxal-5-phosphate), ως συμπαραράγοντα, και ανήκει στην κατηγορία I των PLP-εξαρτώμενων ενζύμων/¹³⁵ Το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης¹³⁶ είναι pI=6.3 και περιέχει θεωρητικά 4 σημεία N-γλυκοζυλίωσης Asn19, Asn146, Asn191, και Asn328, από τα οποία το ένα είναι γλυκοζυλιωμένο (Asn146).¹³⁷ Τα σάκχαρα, αποτελούν το 6% της αλλινάσης στα οποία προσδένονται οι λεκτίνες του σκόρδου και σχηματίζουν σύμπλοκα.¹³⁸ Συνήθως ένα ή δύο από τα τέσσερα σημεία γλυκοζυλίωσης καλύπτονται από τις λεκτίνες (σχήμα 10). Αναφέρεται ότι κυρίως οι ετεροδιμερείς λεκτίνες ASAI I του σκόρδου σχηματίζουν σύμπλοκα με την αλλινάση.¹³⁸

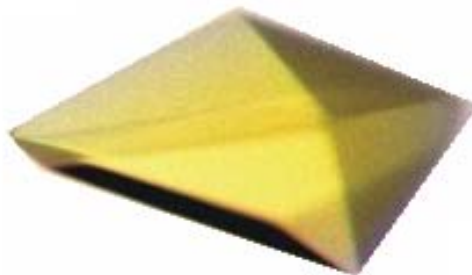
Ο σχηματισμός των συμπλόκων αλλινάσης-λεκτίνης οδηγεί σε αύξηση του συνολικού μοριακού βάρους και προσδίδει μεγάλη σταθερότητα στο ένζυμο,

ευνοώντας με τον τρόπο αυτό την δραστικότητα του.¹³⁹ Ωστόσο, τα σχηματιζόμενα σύμπλοκα δημιουργούν δυσκολίες στην απομόνωση καθαρής αλλινάσης.



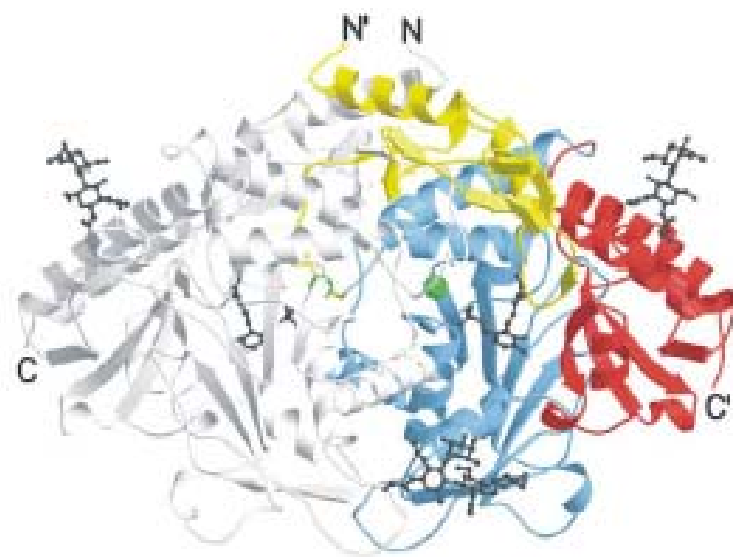
Σχήμα 10. Μορφές συμπλόκων αλλινάσης

Οι κρύσταλλοι της πρωτεΐνης έχουν απομονωθεί¹³² και εμφανίζουν χαρακτηριστικό κίτρινο χρώμα (σχήμα 11). Το χρώμα αυτό των κρυστάλλων οφείλεται στην παρουσία του συμπαραγόντα (φωσφορική πυριδοξάλη) της πρωτεΐνης, ο οποίος είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένος μαζί της.



Σχήμα 11. Κρυσταλλική μορφή της αλλινάσης.

Η μελέτη της κρυσταλλικής δομής της αλλινάσης έχει προσφέρει πολλές πληροφορίες για την τρισδιάστατη δομή και το ενεργό κέντρο της¹³² (σχήματα 12,14).

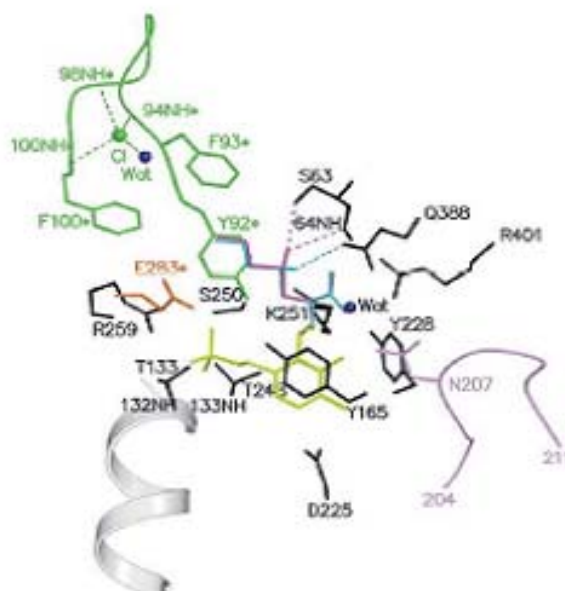


Σχήμα 12. Η τρισδιάστατη δομή της αλλινάσης (ομοδιμερές). Το ένα μονομερές παρουσιάζεται χρωματισμένο: με κίτρινο η περιοχή N-τερματικού (αμινοξέα 2–100), με μπλε η κεντρική περιοχή (αμινοξέα 101–310), με κόκκινο η C-τερματική περιοχή (αμινοξέα 311–427). Η πυριδοξάλη και τα σάκχαρα παρουσιάζονται με μαύρο χρώμα ενώ τα ιόντα χλωρίου με πράσινα σφαιρίδια.

Η αλλινάση επιδεικνύει σιγμοειδή δομή η οποία είναι χαρακτηριστική για την κατηγορία I των PLP-εξαρτώμενων ενζύμων, (σχήμα 13). Κάθε μονομερές αποτελείται από τρεις περιοχές, την κεντρική περιοχή, την C-τερματική περιοχή και τη μοναδική N-τερματική περιοχή. Η μοναδικότητα της περιοχής αυτής συνδέεται με την ύπαρξη στην περιοχή αυτή, του επιδερμικού παράγοντα ανάπτυξης (epidermal growth factor, EGF-περιοχή).¹³² Η EGF-περιοχή εμφανίζει μία πλούσια σε δισουλφιδικούς δεσμούς δομή.¹⁴⁰ Ο ρόλος της περιοχής αυτής δεν έχει διευκρινιστεί απόλυτα αλλά έχει επικρατήσει η υπόθεση ότι αποτελεί σημείο δέσμευσης για άλλες πρωτεΐνες.

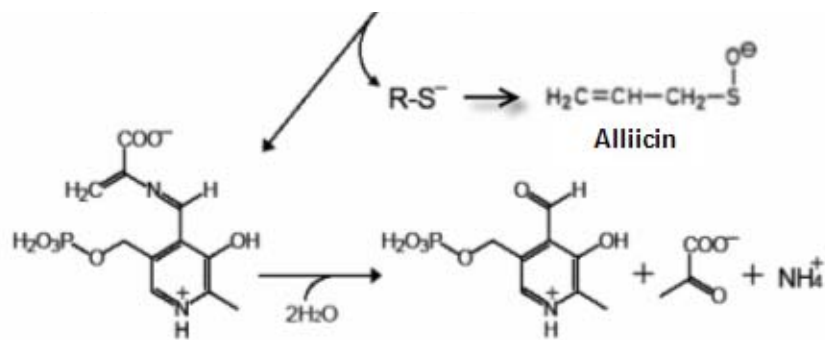
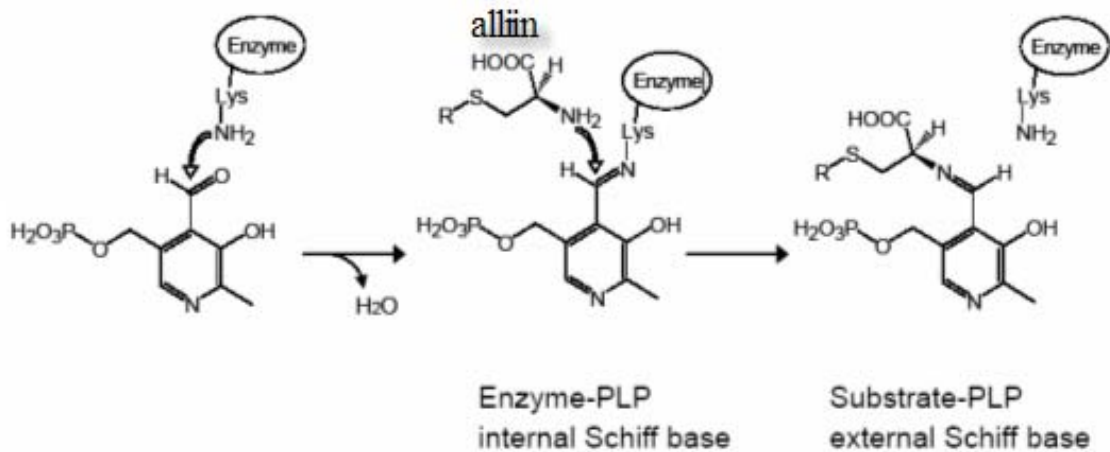


Σχήμα 13. Σιγμοειδής δομή της αλλινάσης.



Σχήμα 14. Ενεργό κέντρο της αλλινάσης. Η πυριδοξάλη (κίτρινο), και τα δυο ισομερή αλλιίνης (+)-alliin (πορφυρό), (-)-αλλιίνη (κυανό).

Η απομόνωση της αλλινάσης στα κενοτόπια και της αλλιλίνης στο κυτταρόπλασμα, προσδίδει στο σύστημα αλλινάσης-αλλιλίνης την ιδιότητα του φυσικού αμυντικού μηχανισμού του φυτού, ενάντια στα μικρόβια.¹⁴¹ Όταν ο βολβός προσβάλλεται από μύκητες ή άλλους παθογόνους μικροοργανισμούς λαμβάνει χώρα σταδιακή διάρρηξη της μεμβράνης, που περικλείει τους τομείς με το ένζυμο και το υπόστρωμα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την αλληλεπίδραση της αλλιλίνης με την αλλινάση και τον ταχύτατο σχηματισμό της αλλισίνης η οποία αναστέλλει τη δράση του παθογόνου οργανισμού.



Σχήμα 15. Μηχανισμός παραγωγής αλλισίνης.

Ο μηχανισμός σχηματισμού της αλλισίνης από την αλλιλίνη απαιτεί την παρουσία του συμπαραγόντα του ενζύμου, της φωσφορική πυριδοξάλη. Η αλλιλίνη συνδέεται στο ένζυμο μέσω σχηματισμού μιας βάσης Schiff. Το κρίσιμο βήμα της ενζυμικής αντίδραση είναι η σχάση του δεσμού C-S της αλλιλίνης. Με την μετακίνηση ενός πρωτονίου, το υπόστρωμα διαχωρίζεται σε αλλυλοσουλφενικό οξύ και α-αμινοακρυλικό οξύ.¹³⁴ Το πρώτο οδηγεί στο σχηματισμό της αλλισίνης και το δεύτερο υδρολύεται αυθόρμητα σε πυροσταφυλικό οξύ και αμμωνία (σχήμα 15).

3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Όργανα και διατάξεις

- Φυγόκεντρος Heraeus SEPATECH, τύπου Suprafuge 22, κεφαλής HFA 21.94, 21500 rpm, No. 5156.
- Σύστημα υγρής χρωματογραφίας της Pharmacia, αποτελούμενη από δύο περισταλτικές αντλίες τύπου P1, ανιχνευτή UV (280nm), καταγραφικό και μονάδα προγραμματισμού GP250. Το υλικό πλήρωσης της στήλης ήταν: ConA-Sepharose 4B (SigmaAldrich).
- Φίλτρα μεγέθους πόρων 0,45 μm της PALL τύπου Supor® 200.
- Συσκευή ηλεκτροφόρησης Hoefer Scientific Instruments Vertical Slab gel Unit Model SE 400 με δυναμικό 200 V και ένταση ρεύματος στα 30 mA.
- Τα φάσματα FT-IR καταγράφηκαν στο Parkin Elmer FT-IR spectrometer 1760X.
- Τα φάσματα UV-Vis καταγράφηκαν στο SLM AMINCO, SLM Instruments, INC.

3.1 Απομόνωση αλλινάσης

Αρχικά, λαμβάνονται 150g σκελίδων σκόρδου από τους βολβούς, αφού πρώτα αφαιρεθεί το προστατευτικό υμένιο. Κατόπιν ψύξης των σκελίδων στους 4°C, ακολουθεί ομογενοποίηση τους σε μίξερ χρησιμοποιώντας 200ml διαλύματος αλέσεως (διάλυμα Α). Το διάλυμα αλέσεως παρασκευάζεται με ανάμιξη των παρακάτω αντιδραστηρίων:

Διάλυμα Α (αλέσεως)

- 60mM Na₂HPO₄ PH=7.2
- 170mM NaCl
- 10%v/v γλυκερόλη
- 0.5%w/v PVP
- 1mM EDTA
- 1 mM b-mercaptoethanol
- 1 mM PMSF
- 20μM P-5'-P

Στη συνέχεια το ομογενοποιημένο διάλυμα διηθείται με οκταπλό φύλλο γάζας και φυγοκεντρείται για 30 λεπτά στα 19.650g διατηρώντας τη θερμοκρασία σταθερή στους 4°C. Με τη διαδικασία αυτή απομακρύνονται τα μη θραυσμένα κύτταρα. Μετά το πέρας της φυγοκέντρωσης λαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα και ξαναφυγοκεντρείται στα 33.600g για 30 λεπτά. Στη συνέχεια, το υπερκείμενο φιλτράρεται και στο προκύπτον διάλυμα προστίθεται σιγά-σιγά πολυαιθυνογλυκόλη (PEG 8000) ώστε η τελική συγκέντρωση στο διάλυμα να είναι 2.5% w/v. Το διάλυμα αφήνεται υπό ήπια ανάδευση για 20 λεπτά σε παγόλουτρο ώστε η θερμοκρασία να διατηρείται στους 0°C. Ακολουθεί φυγοκέντρωση στα 19.650g για 15 λεπτά. Στο υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης προστίθεται PEG ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος που προκύπτει να είναι 25% w/v. Η προσθήκη γίνεται σιγά-σιγά διατηρώντας το διάλυμα σε πάγο και με ήπια ανάδευση για 20 λεπτά επιπλέον. Στη συνέχεια το διάλυμα φυγοκεντρείται

για 15 λεπτά στα 19.650g. Κατόπιν το υπερκείμενο της φυγοκέντρωσης αποχύνεται και το κίτρινο ίζημα που προκύπτει επαναδιασπείρεται σε 60 ml διαλύματος Β. Το διάλυμα Β προκύπτει από την ανάμιξη των αντιδραστηρίων που φαίνονται παρακάτω.

Διάλυμα Β

- 50mM HEPES PH=7.2
- 1mM MgCl₂
- 1mM CaCl₂
- 1mM MnCl₂
- 5%v/v γλυκερόλη
- 20μM P-5'-P

Μετά το τέλος της επαναιώρησης το διάλυμα ομογενοποιείται ώστε να διασπαστούν τα τυχόν μεγάλα σωματίδια κι έπειτα φυγοκεντρείται για 20 λεπτά στα 17.000rpm. Στη συνέχεια λαμβάνεται το υπερκείμενο διάλυμα το οποίο διηθείται χρησιμοποιώντας φίλτρα με μέγεθος πόρων 0.45 μm και αποθηκεύεται στους -20°C μέχρι την επόμενη χρήση. Ο διαχωρισμός της αλλινάσης από το διάλυμα αυτό, το οποίο περιέχει και άλλες πρωτεΐνες πραγματοποιείται με χρωματογραφία συγγένειας. Κατά τη διάρκεια της παραπάνω διαδικασίας η θερμοκρασία διατηρείται στους 4°C.

Τα διαλύματα Α και Β διηθούνται πριν από την χρήση τους με φίλτρα μεγέθους πόρων 0.45 μm και διατηρούνται σε χαμηλή θερμοκρασία καθ' όλη τη διάρκεια της διαδικασίας της απομόνωσης.

3.2 Χρωματογραφία συγγένειας

Ο διαχωρισμός των πρωτεϊνών με τη χρωματογραφία συγγένειας πραγματοποιείται λόγω της υψηλής συγγένειας που παρουσιάζουν οι πρωτεΐνες με συγκεκριμένες χημικές ομάδες του υλικού πλήρωσης. Για το διαχωρισμό της αλλινάσης από το μίγμα των πρωτεϊνών, πραγματοποιείται χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη ConA-Sepharose 4B που έχει εξισορροπηθεί σε διάλυμα Β¹⁰⁰.

Κατά τη διαδικασία αυτή, από τη στήλη διέρχεται με ροή 1ml/min διάλυμα φόρτωσης B και αφήνεται να διέλθει όγκος περίπου 10 φορές περισσότερος σε σχέση με τον όγκο της στήλης. Κατά τη διάρκεια της εξισορρόπησης όπως και καθ' όλη τη διαδικασία η θερμοκρασία διατηρείται στους 4°C. Όταν ολοκληρωθεί η σταθεροποίηση της στήλης, φορτώνεται το δείγμα με ροή 0.5 ml/min και έπειτα ακολουθεί πλύση με διάλυμα B που περιέχει 0.1mM NaCl (διάλυμα πλύσης), διατηρώντας σταθερή τη ροή. Εφόσον διέλθει δεκαπλάσιος όγκος διαλύματος πλύσης σε σχέση με τη στήλη, ακολουθεί η έκλυση της αλλινάσης με διάλυμα B που περιέχει 150mM methyl α -D-mannopyranoside (διάλυμα έκλυσης) και γίνεται συλλογή των δειγμάτων.

3.3 Χαρακτηρισμός ενζύμου

Ο χαρακτηρισμός της αλλινάσης πραγματοποιείται με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμίδιου και με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού. Ο ποσοτικός προσδιορισμός της αλλινάσης πραγματοποιείται με τη μέθοδο Bradford.¹⁴²

3.4 Φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού.

Η αλλινάση εκτός από την κύρια κορυφή στα 280nm παρουσιάζει και μία χαρακτηριστική κορυφή, στην περιοχή του ορατού στα 430 nm, η οποία οφείλεται στο συμπάραγοντα της, την φωσφορική πυριδοξάλη.¹⁴³ Επιπλέον, καθώς είναι γνωστή η τιμή του μοριακού συντελεστή απορρόφησης ϵ_{280} της αλλινάσης, είναι δυνατό να υπολογιστεί η συγκέντρωση των δειγμάτων της πρωτεΐνης από το νόμο των Lambert-Beer

$$A = \epsilon CI$$

- A : η απορρόφηση
- ϵ : ο συντελεστής μοριακής απορρόφησης
- I: οπτική διαδρομή

φωσφορική πυριδοξάλη (διάλυμα Γ) ώστε η τελική συγκέντρωσή του NTB στο διάλυμα να είναι 12 mM. Προκειμένου να επιτευχθεί πλήρης διάλυση των κρυστάλλων γίνεται χρήση υπερήχων. Επίσης σε 1ml διαλύματος 50mM Na₂HPO₄, pH 6.5 και 1mM EDTA, 2x10⁻⁵ M φωσφορική πυριδοξάλη διαλύονται 10mg υποστρώματος αλλιλίνης ώστε η τελική συγκέντρωσης της αλλιλίνης στο διάλυμα να είναι 56mM.

Προκειμένου να προσδιοριστούν οι κινητικές παράμετροι Km, Vmax του ενζύμου ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία. Σε μια κυψελίδα quartz που πραγματοποιείται ταυτόχρονα ανάδευση, προστίθενται διαφορετικές ποσότητες υποστρώματος (αλλιλίνης) και παρατηρείται η μείωση της απορρόφησης στα 412nm. Δηλαδή γίνεται μέτρηση της ταχύτητας σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος. Ο όγκος της αντίδρασης είναι 2ml.

Κατόπιν ,αφού προσδιοριστούν οι τιμές Km και Vmax, υπολογίζεται η δραστηκότητα του ενζύμου U. Ως μονάδα δραστηκότητας του ενζύμου ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που παράγει 1μmol προϊόντος το λεπτό. Η δραστηκότητα προσδιορίζεται μελετώντας τη μείωση της απορρόφησης στο ακόλουθο διάλυμα. 1885 μl Διάλυμα Γ και 20 μl αλλινάσης από διάλυμα της πρωτεΐνης 4x10⁻³mg/ml (αντιστοιχούν σε 80ng αλλινάσης) και 20 μl NTB από διάλυμα 12mM και 75 μl αλλιλίνης από διάλυμα 56mM.

3.6 Ακίνητοποίηση της αλλινάσης σε αλγινικά σφαιρίδια

3.6.1 Παρασκευή αλγινικού διαλύματος

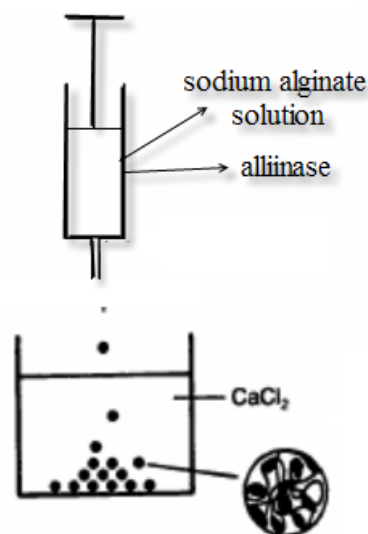
Το αλγινικό διάλυμα που χρησιμοποιείται στον σχηματισμό των σφαιριδίων παρασκευάζεται με διάλυση, κατόπιν ανάδευσης, του αλγινικού νατρίου σε απιονισμένο νερό. Η ανάδευση που πραγματοποιείται είναι ήπια προκειμένου να μην δημιουργηθούν φυσαλίδες. Τα διαλύματα αλγινικού νατρίου που χρησιμοποιήθηκαν είναι περιεκτικότητας από 2%w/v έως 6%w/v

3.6.2 Ανάμιξη του ενζύμου με το διάλυμα του αλγινικού νατρίου

Στο διάλυμα που βρίσκεται η αλλινάση (διάλυμα Β) προστίθεται διάλυμα 50mM οξικό νάτριο pH=4 και το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 5.8. Κατόπιν το ένζυμο εισάγεται προσεκτικά στο παχύρρευστο διάλυμα του πολυμερούς, με αναλογία αλγινικού προς ένζυμο, 3:2 και ακολουθεί ήπια ανάδευση για 10 λεπτά. Η ανάδευση πραγματοποιείται σε παγόλουτρο ώστε η θερμοκρασία να διατηρείται σταθερή στους 4°C. Στην περίπτωση που δημιουργηθούν φυσαλίδες από την ανάδευση, το μίγμα φυγοκεντρείται για δύο λεπτά στα 15.000 g.

3.6.3 Ακίνητοποίηση της αλλινάσης

Το μίγμα αλγινικού – αλλινάσης εισάγεται στάγδην, με τη βοήθεια σύριγγας, σε 10 ml διαλύματος 0.1M CaCl₂ σε 20mM HEPES με pH=6,5. Κατά την εισαγωγή εφαρμόζεται ήπια ανάδευση στο διάλυμα του ασβεστίου προκειμένου να αποφευχθεί η συγκόλληση των σφαιριδίων. Η διάμετρος εξόδου της σύριγγας είναι περίπου 1mm. Η σύριγγα, τοποθετείται σε ύψος 20cm από την επιφάνεια του διαλύματος του CaCl₂ (σχήμα 16). Μόλις έρθει σε επαφή η σταγόνα, η οποία σχηματίζεται καθώς ελευθερώνεται μίγμα από το στόμιο της σύριγγας, με το διάλυμα του ασβεστίου, πραγματοποιείται ο σχηματισμός του σφαιριδίου. Τα σχηματιζόμενα σφαιρίδια αφήνονται υπό ανάδευση για τέσσερις ώρες ώστε να σκληρύνουν (φάση σκλήρυνσης).



Σχήμα 16. Διαδικασία ακίνητοποίησης σε αλγινικά σφαιρίδια

Όταν ολοκληρωθεί η διαδικασία της σκλήρυνσης, τα σφαιρίδια φιλτράρονται και ξεπλένονται με 10 ml από το διάλυμα του ασβεστίου. Στη συνέχεια ξεπλένονται με άφθονο νερό ώστε να απομακρυνθεί η ποσότητα του ενζύμου που δεν ακινητοποιήθηκε στα αλγινικά σφαιρίδια και κατόπιν φυλάσσονται στους 4°C σε διάλυμα 20 mM HEPES, pH=6.5 που περιέχει 0.1M CaCl₂.

3.7 Διάσπαση αλγινικών σφαιριδίων

Τα αλγινικά σφαιρίδια είναι δυνατόν να διασπαστούν και να απελευθερωθεί η ακινητοποιημένη αλλινάση. Αυτό επιτυγχάνεται όταν διαταραχθεί το δίκτυο της γέλης, με αποτέλεσμα την καταστροφή της δομής της και την ελευθέρωση του ενζύμου. Με εισαγωγή των σφαιριδίων σε διάλυμα φωσφορικών, κιτρικών ή EDTA, λόγω της υψηλής συγγένειας που παρουσιάζουν τα διαλύματα αυτά για το ασβέστιο οδηγούν σε αποσταθεροποίηση της γέλης. Για την διάλυση των σφαιριδίων χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 10% κιτρικού ασβεστίου pH=6.5.

3.8 Χαρακτηρισμός ακινητοποιημένου ενζύμου

Ο χαρακτηρισμός του ακινητοποιημένου ενζύμου πραγματοποιείται με φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού και με αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση. Επιπλέον, πραγματοποιείται μελέτη της δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου. Ο ποσοτικός προσδιορισμός του ενζύμου που ακινητοποιήθηκε πραγματοποιείται με τη μέθοδο Bradford.¹⁴²

3.8.1 Διαπίστωση ακινητοποίησης με φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού

Προκειμένου να διαπιστωθεί η εισαγωγή της αλλινάσης στα αλγινικά σφαιρίδια, λαμβάνονται φάσματα της αλλινάσης πριν την εισαγωγή στα σφαιρίδια και μετά την εισαγωγή της, αφού προηγουμένως διαλυτοποιηθούν τα σφαιρίδια.

Επιπλέον λαμβάνονται φάσματα στο διάλυμα σχηματισμού των σφαιριδίων καθώς και στο διάλυμα της πλύσης.

3.8.2 Διαπίστωση ακινητοποίησης με ηλεκτροφόρηση

Επίσης, για να διαπιστωθεί η εισαγωγή της αλλινάσης πραγματοποιείται αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση. Στην πηκτή πολυακρυλαμιδίου γίνεται φόρτωση δείγματος από το διάλυμα ενζύμου πριν την εισαγωγή στα σφαιρίδια, δείγματος από το διάλυμα σχηματισμού των σφαιριδίων, δείγματος από το διάλυμα της πλύσης και δείγματος από τα διαλυτοποιημένα σφαιρίδια.

3.8.3 Ποσοτικός προσδιορισμός ακινητοποιημένου ενζύμου

Τα δείγματα που μελετώνται για τον προσδιορισμό της ποσότητας της αλλινάσης που ακινητοποιήθηκε είναι, από το διάλυμα του ενζύμου πριν την εισαγωγή στα σφαιρίδια, από το διάλυμα σχηματισμού των σφαιριδίων και από το διάλυμα της πλύσης.

3.8.4 Μελέτη της δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας πραγματοποιείται όμοια διαδικασία με αυτή του απομονωμένου ενζύμου. Σε μια κυψελίδα quartz στην οποία πραγματοποιείται ανάδευση εισάγονται 1895 μl διαλύματος Γ (διαλύματος 50mM Na_2HPO_4 , pH 6.5 και 1mM EDTA, 2×10^{-5} M φωσφορική πυριδοξάλη), 10 μl διαλυμένων σφαιριδίων –αλλινάσης, 20 μl NTB, και 75 μl υποστρώματος (αλλιίνης) και παρακολουθείται η μείωση της απορρόφησης στα 412nm .

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΑΛΛΗΠΝΑΣΗΣ

Για την απομόνωση της αλλινάσης, αρχικά, στο ομογενοποιημένο μίγμα που προκύπτει μετά από τη διήθηση με τα φύλλα γάζας, πραγματοποιείται φυγόκεντρηση προκειμένου να απομακρυνθούν τα άθραυστα κύτταρα. Στη συνέχεια επειδή το διάλυμα που προκύπτει περιέχει μίγμα πρωτεϊνών πραγματοποιείται καταβύθιση τους με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG 8000).

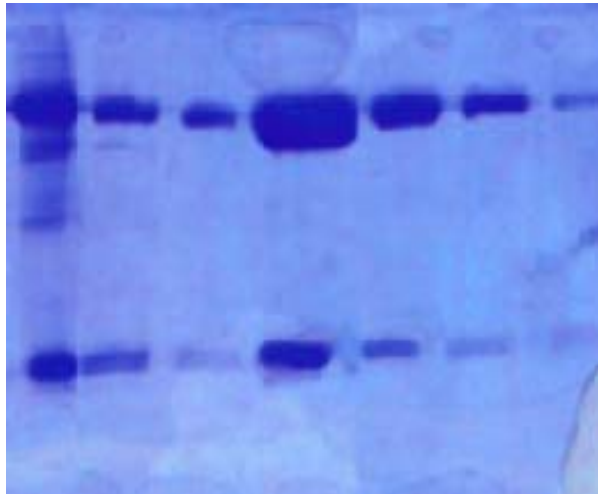
Με αύξηση της συγκέντρωσης της πολυαιθυλενογλυκόλης σε μίγμα πρωτεϊνών, επιτυγχάνεται η καταβύθιση των πρωτεϊνών, χωρίς να επηρεάζεται η δραστηριότητα τους. Η καταβύθιση οφείλεται στο γεγονός, ότι με την προσθήκη της πολυαιθυλενογλυκόλης, απομακρύνονται μόρια νερού από την επιφάνεια των πρωτεϊνών με αποτέλεσμα τη συσσωμάτωσή τους. Η καταβύθιση διευκολύνεται όταν η διαδικασία πραγματοποιείται σε χαμηλή θερμοκρασία, εντός υδατόλουτρου, συμβάλλοντας ταυτόχρονα στην μη απενεργοποίηση των πρωτεϊνών.

Αρχικά πραγματοποιείται μια πρώτη καταβύθιση με προσθήκη διαλύματος πολυαιθυλενογλυκόλης 2,5% w/v και στη συνέχεια ακολουθεί δεύτερη καταβύθιση με προσθήκη διαλύματος πολυαιθυλενογλυκόλης 25% w/v.

Κατόπιν, για το διαχωρισμό της αλλινάσης από το μίγμα των πρωτεϊνών, πραγματοποιείται χρωματογραφία συγγένειας σε στήλη ConA-Sepharose 4B και η έκλυση της πρωτεΐνης γίνεται με προσθήκη methyl α -D-mannopyranoside.

Τα δείγματα που συλλέχθηκαν από τη στήλη φορτώνονται σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και μετά το πέρας της ηλεκτροφόρησης λαμβάνονται τα ακόλουθα αποτελέσματα, εικόνα 1.

A B C D E F G



Εικόνα 1. Gel μετά από χρωματογραφία συγγένειας. **A:** δείγμα φόρτωσης, **B, C, D, F, G:** δείγματα έκλουσης (αλλιινάση).

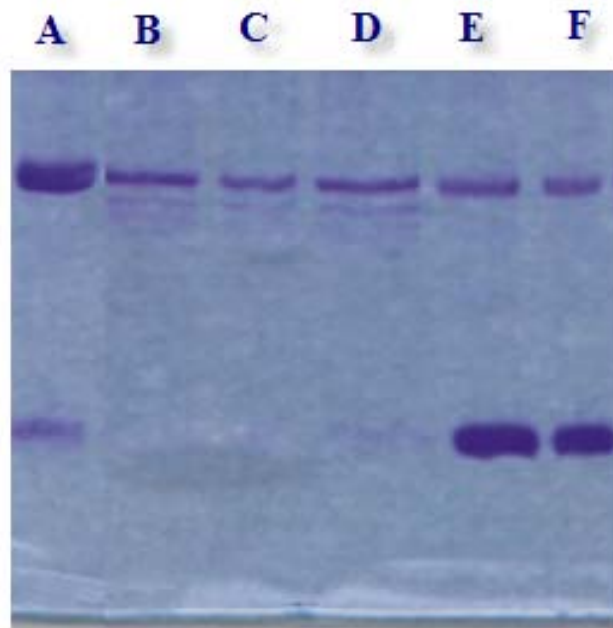
Στο παραπάνω gel εμφανίζεται το μίγμα των πρωτεϊνών που φορτώθηκε στη κολώνα (ζώνη A) καθώς και τα κλάσματα της καθαρής αλλιινάσης που ελήφθησαν από την κολώνα (ζώνες A, B, C, D, F, G). Όπως παρατηρείται στο gel, η ζώνη D επιδεικνύει πιο έντονο χρώμα σε σχέση με τις άλλες ζώνες, γεγονός που υποδηλώνει μεγαλύτερη συγκέντρωση αλλιινάσης.

Επίσης στο gel είναι φανερή η ζώνη που αντιστοιχεί στις λεκτίνες που συνδέονται με την αλλιινάση. Επειδή οι λεκτίνες του σκόρδου έχουν παραπλήσιο μοριακό βάρος, συγκεκριμένα 11.5 kDa και 12.5 kDa, οι δύο ζώνες στο gel αλληλεπικαλύπτονται και εμφανίζονται σα μία.

Η συγκέντρωση της αλλιινάσης που απομονώθηκε υπολογίστηκε με τη μέθοδο Bradford¹⁴² και βρέθηκε ίση με 3mg/ml.

Επίσης, αλλιινάση απομονώθηκε και από αποξηραμένα λέπια σκόρδου καθώς και από φύλλα σκόρδου. Αυτό επιβεβαιώνει την ύπαρξη της πρωτεΐνης όχι μόνο στον βολβό του φυτού αλλά και στα λέπια και τα φύλλα του. Η διαδικασία απομόνωσης της πρωτεΐνης έγινε με τον ίδιο τρόπο, όπως περιγράφεται παραπάνω. Μετά από την ολοκλήρωση της χρωματογραφίας συγγένειας σε κάθε περίπτωση, τα

δείγματα φορτώθηκαν σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου και τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης παρουσιάζονται στην εικόνα 2.



Εικόνα 2. Gel των δειγμάτων που απομονώθηκαν. **A:** αλλινάση από βολβό σκόρδου, **B, C ,D:** αλλινάση από φύλλα σκόρδου, **E, F:** αλλινάση από λέπια σκόρδου.

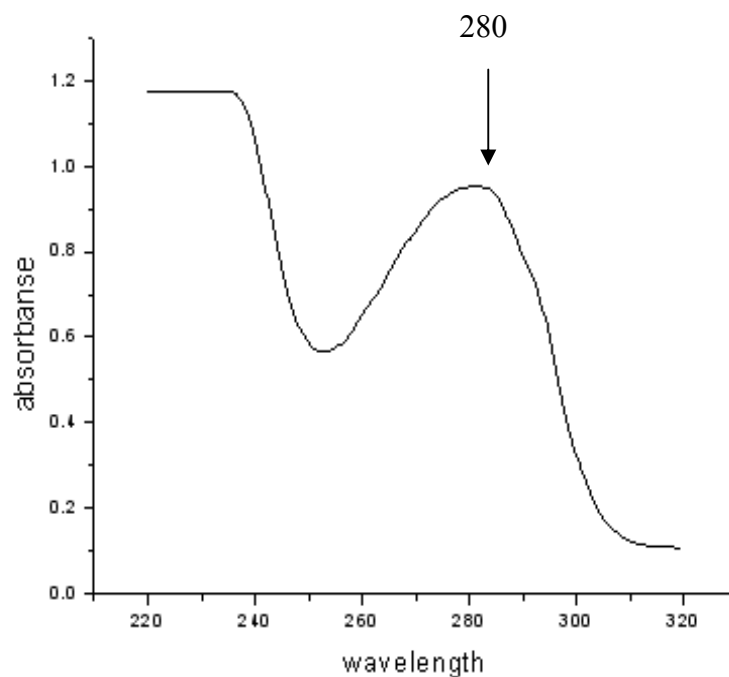
Στο παραπάνω gel εμφανίζεται η αλλινάση που προέκυψε από τους βολβούς του σκόρδου (ζώνη A), καθώς και η αλλινάση που προέκυψε από τα φύλλα του σκόρδου (B, C, D) και από τα αποξηραμένα λέπια του σκόρδου (E, F). Όπως φαίνεται στο gel, στην περίπτωση της αλλινάσης που απομονώθηκε από τα λέπια του σκόρδου, παρατηρείται μεγάλη αναλογία λεκτινών-αλλινάσης σε σχέση με την αλλινάση που προέκυψε από τους βολβούς, ενώ στην περίπτωση της αλλινάσης που απομονώθηκε από τα φύλλα του σκόρδου δεν εμφανίζονται έντονα οι ζώνες των λεκτινών. Στην περίπτωση όμως της αλλινάσης από τα φύλλα σκόρδου εμφανίζονται κάποιες μικρές ζώνες κάτω από τη ζώνη της αλλινάσης, που πιθανόν να αντιστοιχούν σε πρωτεΐνες του φωτοσυστήματος, λόγω του ότι εμφανίζονται μόνο στα φύλλα του φυτού.

Η συγκέντρωση της αλλινάσης που προκύπτει από τα φύλλα του σκόρδου είναι αρκετά μικρή και η αλλινάση στα λέπια του σκόρδου περιέχει μεγάλη ποσότητα λεκτινών, που μπορούν να δημιουργήσουν πρόβλημα στην

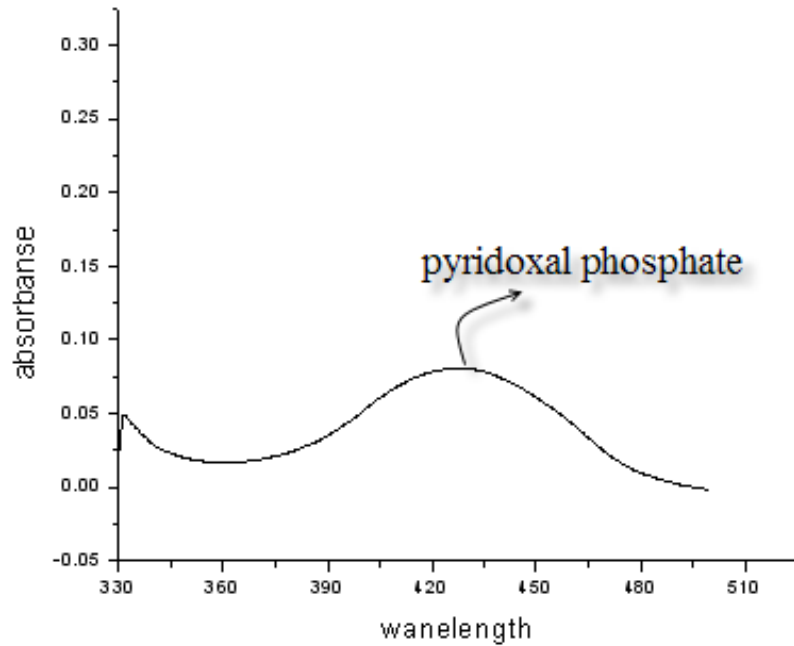
ακινήτοποίηση της πρωτεΐνης. Στους βολβούς του σκόρδου, περιέχεται μεγαλύτερη ποσότητα αλλινάσης και η αναλογία λεκτινών-αλλινάσης είναι μικρότερη σε σχέση με αυτή που παρουσιάζεται στα λέπια του σκόρδου. Για τους λόγους αυτούς, στα παρακάτω πειράματα ακινήτοποίησης της αλλινάσης, χρησιμοποιείται η αλλινάση που προκύπτει από τους βολβούς του σκόρδου.

4.2 Φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά Αλλινάσης

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω για τον χαρακτηρισμό της απομονωμένης αλλινάσης χρησιμοποιείται και η φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού. Τα φάσματα που προκύπτουν από την φασματοσκοπική ανάλυση δείγματος καθαρής αλλινάσης παρουσιάζονται στα σχήματα 1 και 2.



Σχήμα 1. Φασματοσκοπική ανάλυση αλλινάσης.

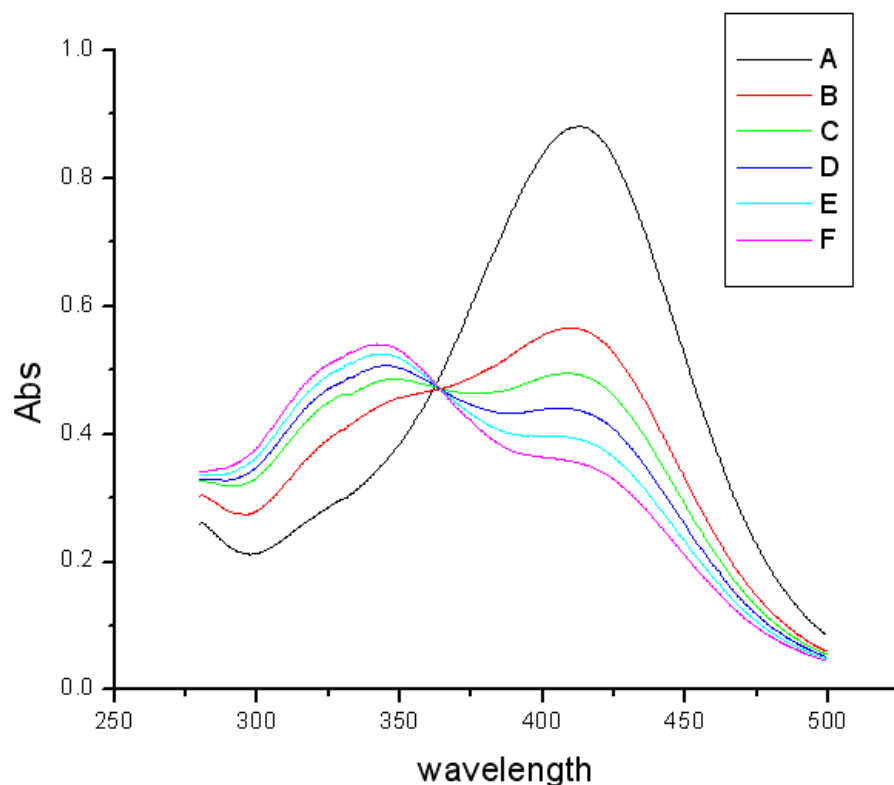


Σχήμα 2. Φασματοσκοπική ανάλυση αλλινάσης.

Από το σχήμα 1, καθώς είναι γνωστή η τιμή του μοριακού συντελεστή απορρόφησης της αλλινάσης στα 280nm, είναι δυνατόν να υπολογιστεί η συγκέντρωση του δείγματος με βάση το νόμο των Lambert-Beer. Στο σχήμα 2, επιδεικνύεται η χαρακτηριστική κορυφή της αλλινάσης, στα 430nm, η οποία αντιστοιχεί στο συμπράγοντα της, τη φωσφορική πυριδοξάλη.¹⁴⁴

4.3 Μελέτη δραστηριότητας απομονωμένης αλλινάσης

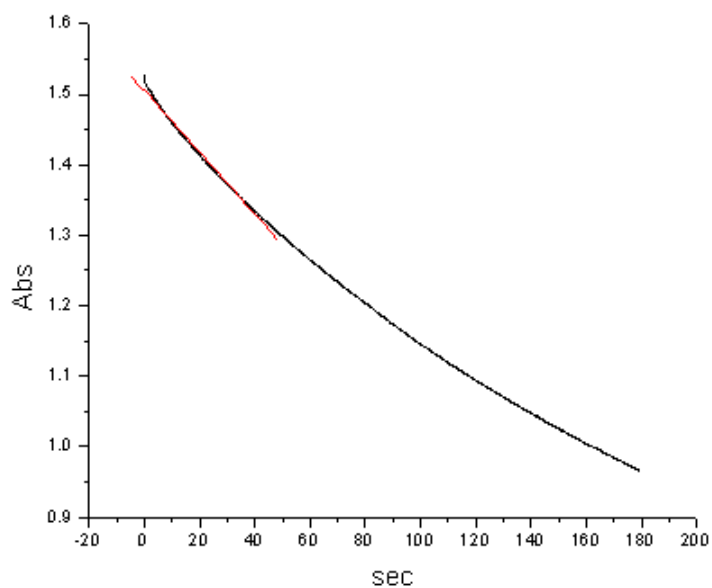
Όπως αναφέρθηκε, η μελέτη της δραστηριότητας της αλλινάσης πραγματοποιείται φασματοφωτομετρικά, χρησιμοποιώντας το αντιδραστήριο NTB.¹⁴⁵



Σχήμα 3. Μείωση της απορρόφησης του NTB παρουσία αλλισίνης.

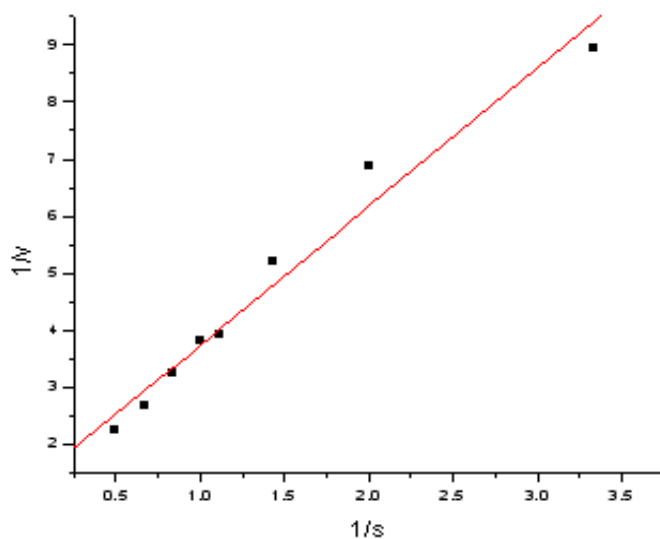
Στο σχήμα 3 παρουσιάζεται η απορρόφηση του NTB παρουσία αλλισίνης, που αντιστοιχεί σε 0 min (A), 1.5 min (B), 3min (C), 4.5min (D), 6 min (E), 7.5 min (F) αντίδρασης. Όπως φαίνεται στο σχήμα, παρατηρείται μείωση της απορρόφησης στα 412nm, που οφείλεται στην κατανάλωση του NTB και ταυτόχρονη αύξηση της απορρόφησης στα 336nm που αντιστοιχεί στο σχηματισμό του S-αλλυλομέρκαπτο-NTB. Η γρήγορη κατανάλωση του NTB υποδεικνύει έντονη δραστηριότητα της αλλινάσης. Ως μονάδα δραστηριότητας του ενζύμου ορίζεται η ποσότητα του ενζύμου που παράγει 1μmol προϊόντος το λεπτό (Units).

Από το φάσμα που παρουσιάζεται στο σχήμα 4 υπολογίζεται η δραστηριότητα της απομονωμένης αλλινάσης, η οποία αντιστοιχεί σε 523,7 U/mg αλλινάσης. Γενικά η δραστηριότητα της αλλινάσης μπορεί να ποικίλλει από 218-660 U/mg, ανάλογα την προέλευση του σκόρδου.



Σχήμα 4. Μελέτη δραστηριότητας απομονωμένης αλλιινάσης.

Οι τιμές των σταθερών K_m , V_{max} υπολογίζονται, μελετώντας την ταχύτητα της αντίδρασης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (αλλιίνης). Από τις μετρήσεις κατασκευάζεται το διάγραμμα Lineweaver-Burk (σχήμα 5).



Σχήμα 4. Διάγραμμα Lineweaver-Burk.

Από το διάγραμμα Lineweaver-Burk υπολογίζονται οι τιμές των παραμέτρων K_m , V_{max} με βάση και τη σχέση Lineweaver-Burk:

$$1/V = K_m/V_{max}[S] + 1/V_{max}$$

Οι τιμές των παραμέτρων K_m , V_{max} που προέκυψαν είναι, $K_m = 1.83 \text{ mM}$ και $V_{max} = 37.9 \cdot 10^{-5} \text{ M min}^{-1}$.

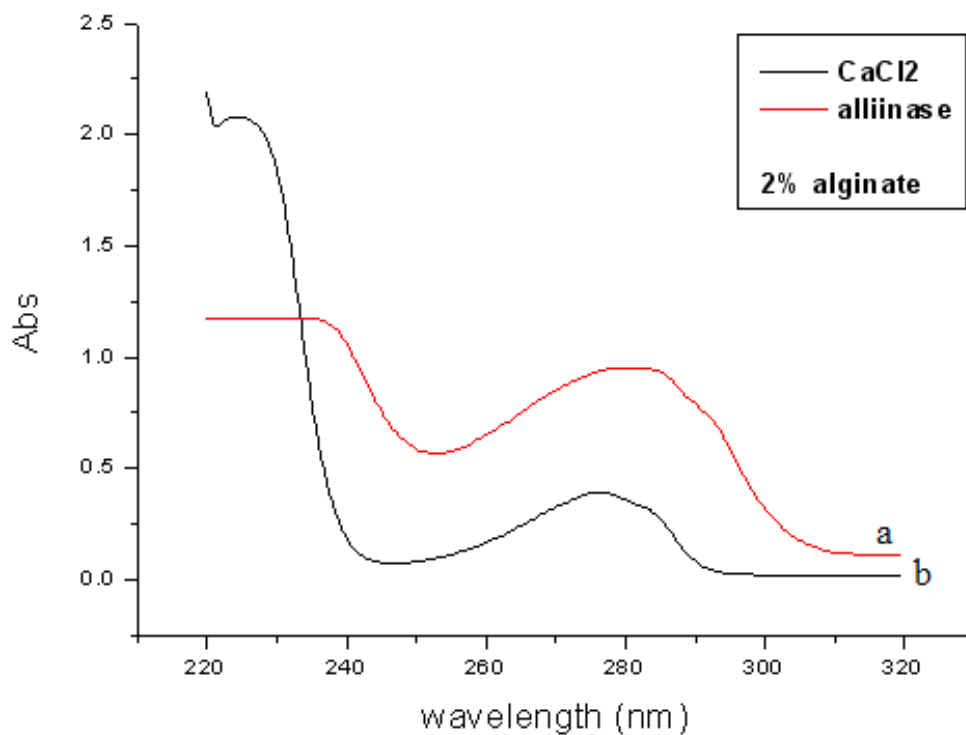
4.4 Ακίνητοποίηση αλλινάσης σε αλγινικά σφαιρίδια

Όπως αναφέρεται παραπάνω η ακίνητοποίηση της αλλινάσης στα αλγινικά σφαιρίδια πραγματοποιείται σε $\text{pH}=5.8$, εφόσον στο συγκεκριμένο pH , η αλλινάση είναι θετικά φορτισμένη, καθώς το ισοηλεκτρικό της σημείο είναι 6,3 και ευνοείται η αλληλεπίδραση με το πολυανιονικό αλγινικό.⁸¹

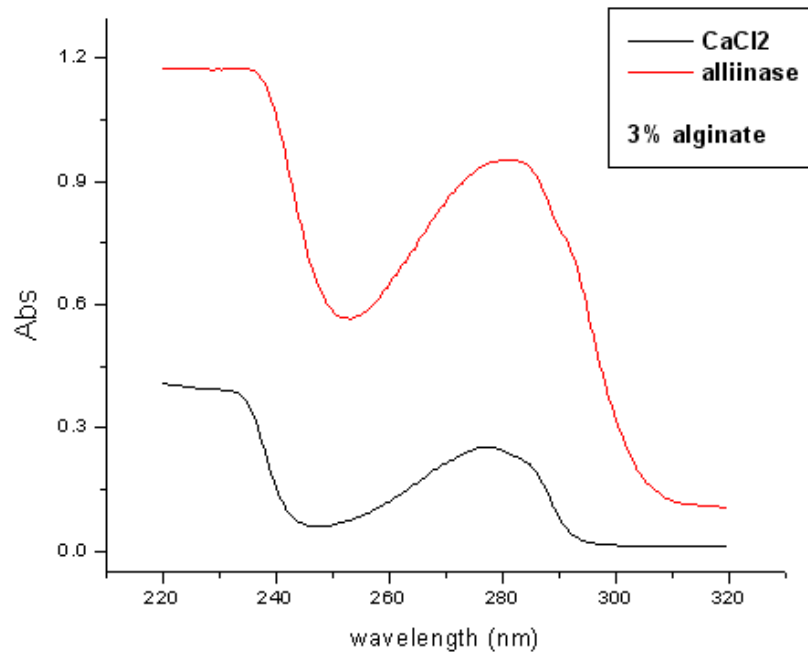
4.5 Διαπίστωση ακίνητοποίησης με Φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού

Σύμφωνα και με παραπάνω, η εισαγωγή της αλλινάσης στα αλγινικά σφαιρίδια μπορεί να διαπιστωθεί, με τη χρήση της φασματοσκοπίας uv-vis . Προκειμένου να γίνει η μελέτη αυτή, λαμβάνονται τα φάσματα της αλλινάσης πριν τη γελοποίηση, καθώς και μετά το σχηματισμό των σφαιριδίων στο διάλυμα. Η ακίνητοποίηση διαπιστώνεται όταν η ένταση της χαρακτηριστικής κορυφής της αλλινάσης στα 280nm στο διάλυμα σχηματισμού των σφαιριδίων, μειώνεται μετά τη γελοποίηση ή παύει να υπάρχει.. Παρατηρήθηκε πως η μεταβολή της συγκέντρωσης των αλγινικών παίζει καθοριστικό παράγοντα στην ακίνητοποίηση της πρωτεΐνης. Με τη χρήση διαλύματος 2%w/v αλγινικών παρατηρείται σημαντική διάχυση της πρωτεΐνης στο υπερκείμενο δ/μα κατά τη δημιουργία των σφαιριδίων σχήμα 5. Για το λόγο αυτό, αυξάνεται βαθμιαία η συγκέντρωση των αλγινικών και παρατηρείται

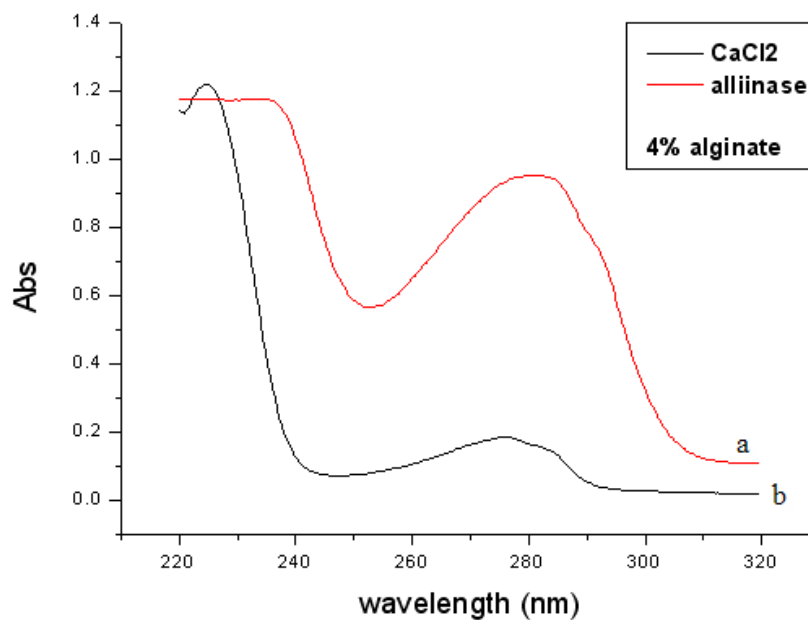
(σχήματα 6,7,8,9) ότι αυξανόμενη της συγκέντρωσης του αλγινικού η διάχυση της αλλινάσης στο διάλυμα σχηματισμού μειώνεται. Τα βέλτιστα αποτελέσματα λαμβάνονται, σε συγκέντρωση διαλύματος αλγινικού με αρχική συγκέντρωση 6%w/v. Συγκεκριμένα, παρατηρείται ότι καθώς αυξάνεται η συγκέντρωση του διαλύματος του αλγινικού η κορυφή που αντιστοιχεί στο υπερκείμενο μειώνεται, δηλαδή αυξάνεται η ποσότητα της πρωτεΐνης που ακινητοποιείται.



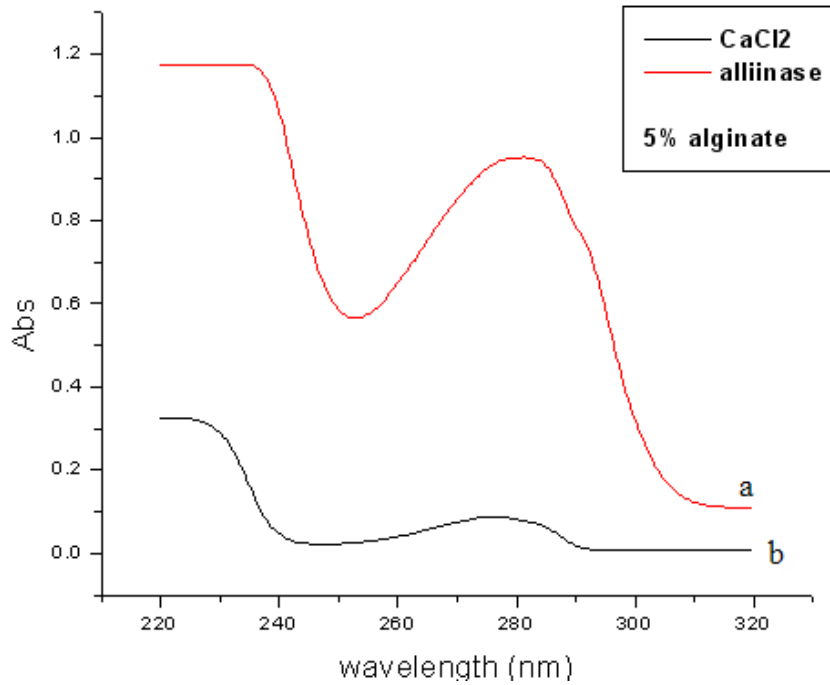
Σχήμα 5. Μελέτη αντίδρασης αλλινάσης-αλγινικών 2%w/v α) αλλινάση πριν την αντίδραση, β) διάλυμα σχηματισμού (CaCl₂) μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης.



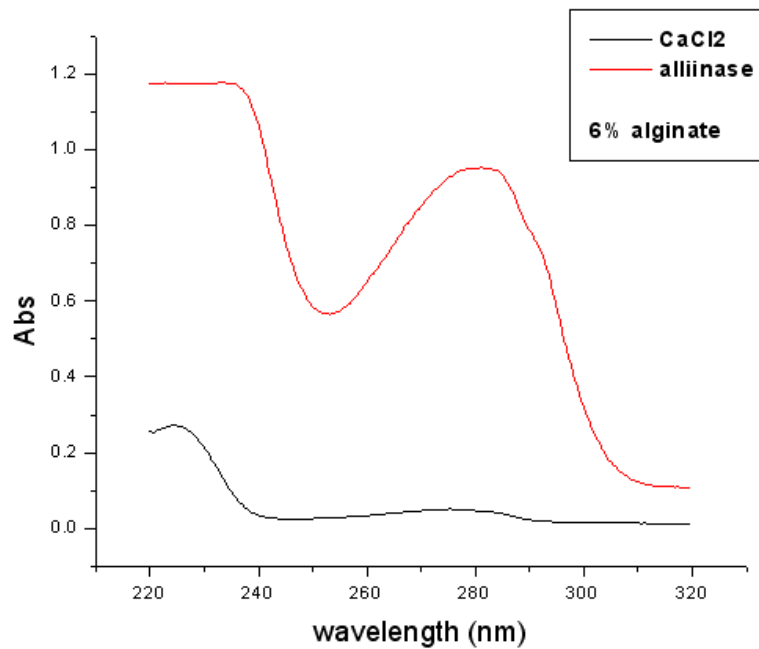
Σχήμα 6. Μελέτη αντίδρασης αλλινάσης-αλγινικών 3%w/v. α) αλλινάση πριν την αντίδραση, β) διάλυμα σχηματισμού (CaCl₂) μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης.



Σχήμα 7. Μελέτη αντίδρασης αλλινάσης-αλγινικών 4%w/v. α) αλλινάση πριν την αντίδραση, β) διάλυμα σχηματισμού (CaCl₂) μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης.



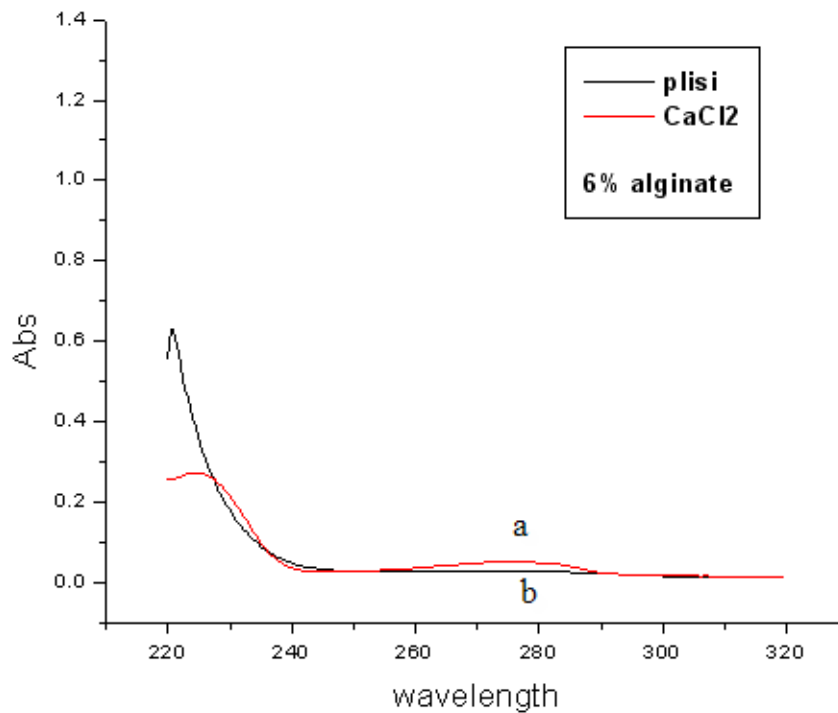
Σχήμα 8. Μελέτη αντίδρασης αλλιινάσης-αλγινικών 5%w/v. α) αλλιινάση πριν την αντίδραση, β) διάλυμα σχηματισμού (CaCl₂) μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης



Σχήμα 9. Μελέτη αντίδρασης αλλιινάσης-αλγινικών 6%w/v. α) αλλιινάση πριν την αντίδραση, β) διάλυμα σχηματισμού (CaCl₂) μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης.

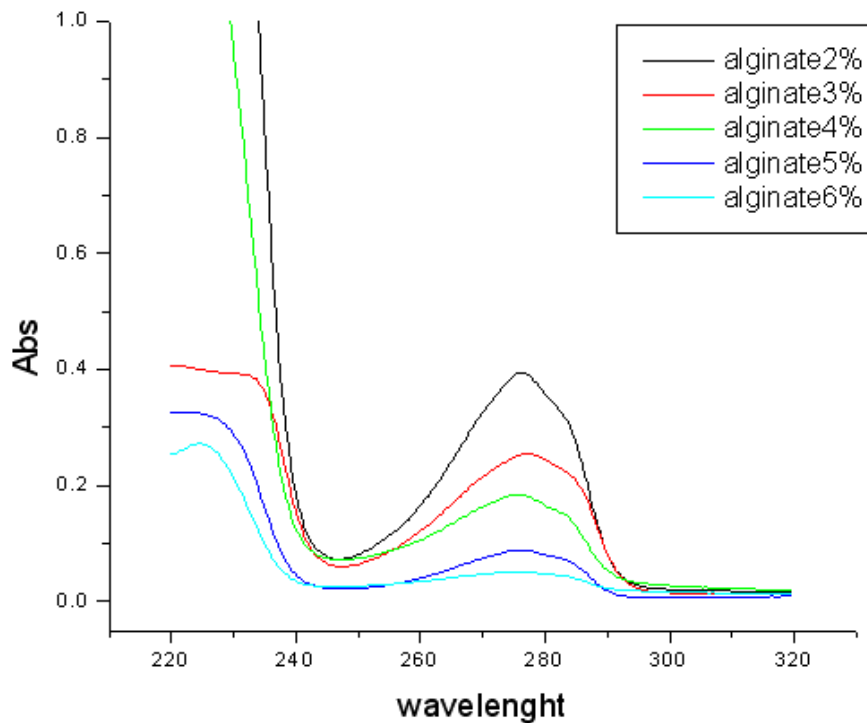
Επομένως, σύμφωνα και με τα παραπάνω φάσματα, καλύτερη ακινητοποίηση της αλλεινάσης επιτυγχάνεται με τη χρήση διαλύματος αλγινικού αρχικής συγκέντρωσης 6%w/v, καθώς στην περίπτωση αυτή, χάνεται η κορυφή στο διάλυμα σχηματισμού, δηλαδή η διάχυση της αλλεινάσης από τα σχηματιζόμενα σφαιρίδια στο διάλυμα σχηματισμού, είναι η μικρότερη.

Επιπλέον, το φάσμα στο διάλυμα της πλύσης των σφαιριδίων στην περίπτωση αυτή, δείχνει ότι δεν παρατηρείται απώλεια της αλλεινάσης κατά την πλύση σχήμα 10.



Σχήμα 10. Μελέτη αντίδρασης αλλεινάσης-αλγινικών 6%w/v. α) διάλυμα σχηματισμού (CaCl_2) μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης β) διάλυμα πλύσης των σχηματιζόμενων σφαιριδίων μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης.

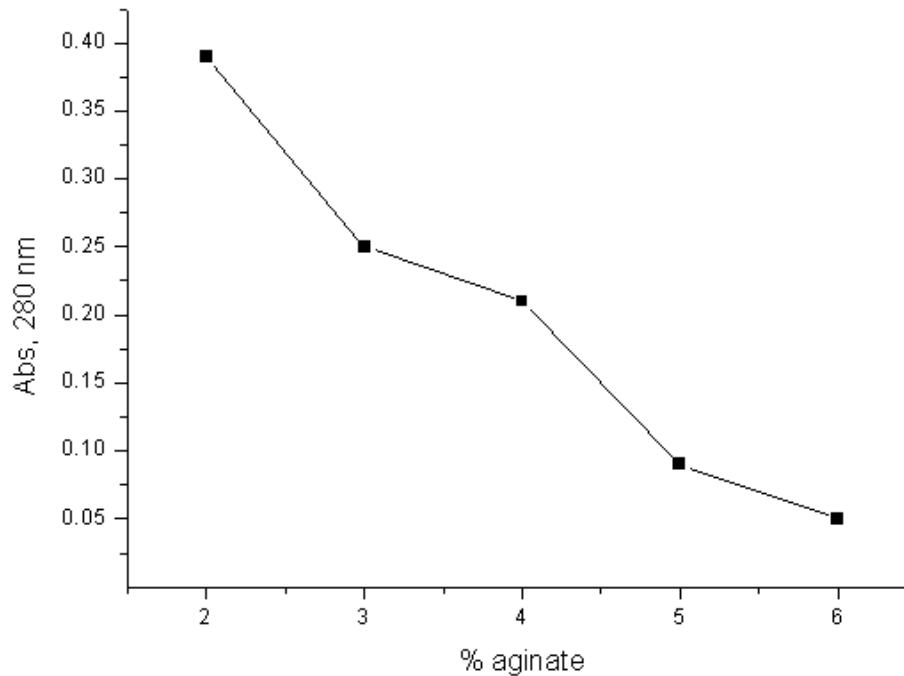
Στο παρακάτω διάγραμμα παρουσιάζεται συγκεντρωτικά η επίδραση της συγκέντρωσης του διαλύματος των αλγινικών. (σχήμα 11)



σ **Σχήμα 11.** Επίδραση της συγκέντρωσης των αλγινικών στην ακινητοποίηση της αλλινάσης.

Η μεγαλύτερη διάχυση, η οποία παρατηρείται στην περίπτωση συγκέντρωσης αλγινικού 2% w/v, 3% w/v, 4% w/v οφείλεται στο γεγονός ότι σε μικρές συγκεντρώσεις αλγινικού το δίκτυο του σχηματιζόμενου πολυμερούς είναι πιο ανοιχτό, ευνοώντας έτσι την διαφυγή της πρωτεΐνης από τους πόρους του πολυμερούς. Καθώς όμως αυξάνεται η συγκέντρωση, το πλέγμα του πολυμερούς γίνεται πιο συνεπτυγμένο, εμποδίζοντας πιθανή διαφυγή της πρωτεΐνης.

Επιπρόσθετα, παρατηρείται ότι αυξανόμενης της συγκέντρωσης του διαλύματος αλγινικού πάνω από 5% w/v, η διάχυση της αλλινάσης που παρατηρείται είναι μικρή. Η σταθεροποίηση της διάχυσης φαίνεται καλύτερα στο διάγραμμα που ακολουθεί.

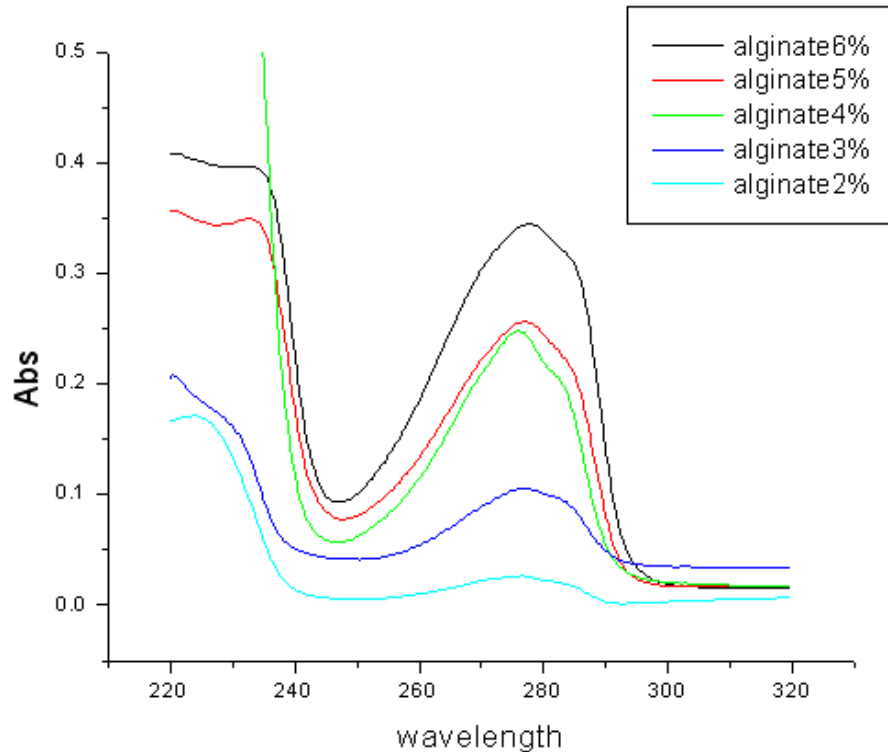


Σχήμα 12. Επίδραση της συγκέντρωσης των αλγινικών.

Η διάχυση της πρωτεΐνης ελαττώνεται αυξανόμενης της συγκέντρωσης των αλγινικών. Όταν η συγκέντρωση γίνει μεγαλύτερη του 5% w/v, η διάχυση τείνει να ελαχιστοποιηθεί, καθώς βλέπουμε πως η απορρόφηση στα 280 nm της πρωτεΐνης ελαττώνεται.

Έπειτα από τον σχηματισμό των αλγινικών σφαιριδίων, ένα μέρος από τα σχηματιζόμενα σφαιρίδια διαλύονται σε διάλυμα κιτρικού νατρίου. Η διάλυση επιτυγχάνεται, όπως έχει προαναφερθεί, λόγω της υψηλής συγγένειας του διαλύματος για τα κατιόντα ασβεστίου των αλγινικών σφαιριδίων. Συγκεκριμένα 0.5g αλγινικών σφαιριδίων διαλύονται σε 3ml διαλύματος κιτρικού νατρίου 10%, pH=6,5. Αφού

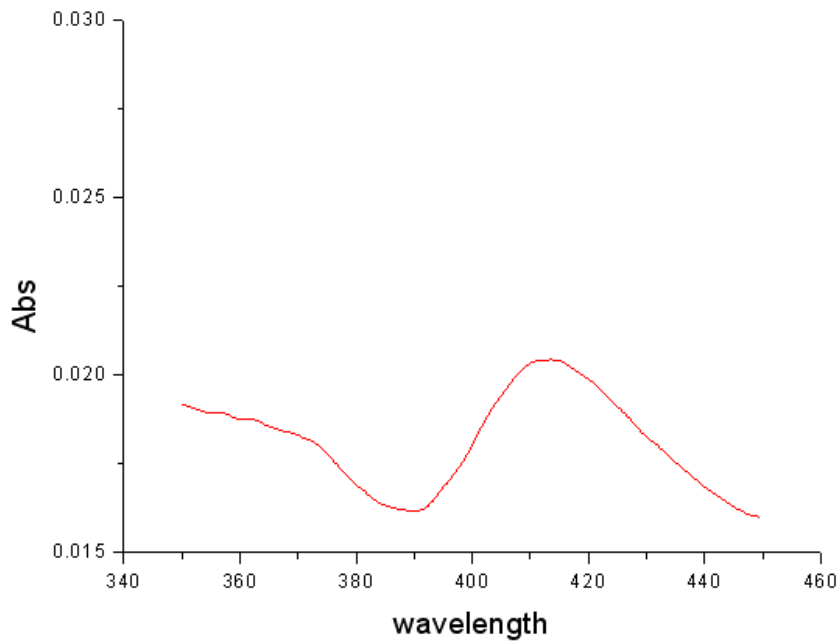
ολοκληρωθεί η διάλυση, λαμβάνονται φάσματα στα αντίστοιχα διαλύματα των σφαιριδίων.



Σχήμα 13. Διαλυμένα αλγινικά σφαιρίδια.

Επιπλέον επιβεβαίωση για την καλύτερη ακινητοποίηση σε συγκέντρωση αλγινικού 6% αποτελεί το παραπάνω διάγραμμα, που δείχνει ότι τα σφαιρίδια στην περίπτωση αυτή περιέχουν μεγαλύτερη ποσότητα αλλινάσης σε σχέση με τα σφαιρίδια που προκύπτουν από τις μικρότερες συγκεντρώσεις του αλγινικού.

Η αλλινάση παρουσιάζει μία επιπλέον κορυφή στα 430nm χαρακτηριστική του συμπαραγόντα της, φωσφορική πυριδοξάλη. Η κορυφή αυτή εμφανίζεται στο διάλυμα των σφαιριδίων (6% w/v αλγινικού), πράγμα που αποτελεί επιπρόσθετη απόδειξη για την ακινητοποίηση της πρωτεΐνης, σχήμα 14.

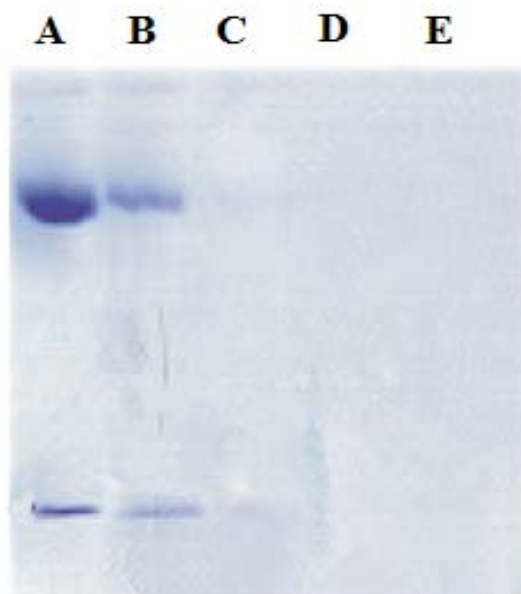


Σχήμα 14. Απορρόφηση φωσφορικής πυριδοξάλης.

Στο παραπάνω διάγραμμα φαίνεται η κορυφή που αντιστοιχεί στο συμπάγοντα της αλλινάσης, η οποία μάλιστα εμφανίζεται μετά την εισαγωγή της στα αλγινικά σφαιρίδια, μετατοπισμένη αριστερά στα 415 nm. Επομένως η ύπαρξη της κορυφής αυτής επιβεβαιώνει την ακινητοποίηση της αλλινάσης.

4.6 Διαπίστωση εισαγωγής με ηλεκτροφόρηση

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, για να διαπιστωθεί η εισαγωγή της αλλινάσης στα αλγινικά σφαιρίδια πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την ηλεκτροφόρηση παρουσιάζονται στην παρακάτω εικόνα.



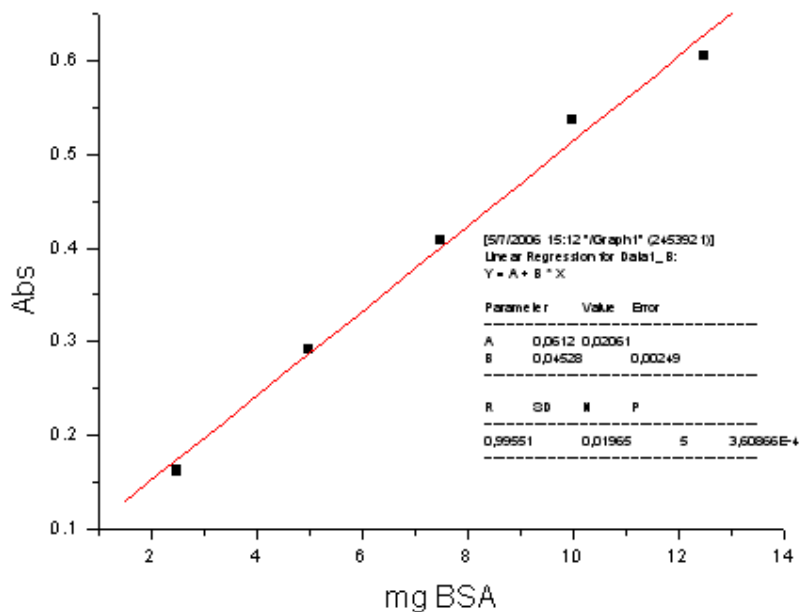
Εικόνα 3. Διαπίστωση εισαγωγής της αλλινάσης στα αλγινικά σφαιρίδια **A.** διάλυμα αλλινάσης πριν την αντίδραση, **B.** αλλινάση στα αλγινικά σφαιρίδια, **C.** διάλυμα σχηματισμού των σφαιριδίων (CaCl_2), **D.** πλύση 1, **E.** πλύση 2.

Στο παραπάνω gel φαίνεται η αλλινάση πριν την εισαγωγή στα αλγινικά σφαιρίδια (ζώνη A), η αλλινάση που εμπεριέχεται στα αλγινικά σφαιρίδια που διαλύθηκαν με κιτρικό νάτριο (ζώνη B), το διάλυμα σχηματισμού των αλγινικών σφαιριδίων, CaCl_2 , (ζώνη C) και οι διαδοχικές πλύσεις των σφαιριδίων (ζώνες D, E). Όπως διαπιστώνεται από το gel η ζώνη που αντιστοιχεί στα διαλυμένα σφαιρίδια, είναι ευδιάκριτη, γεγονός που πιστοποιεί την εισαγωγή της αλλινάσης εντός των σφαιριδίων. Η ένταση της ζώνης αντιστοιχεί στην ποσότητα των σφαιριδίων που διαλύθηκαν και φορτώθηκαν στο gel.

Επίσης, εμφανίζεται μία αρκετά αγνή δυσδιάκριτη ζώνη στην περίπτωση του διαλύματος σχηματισμού των σφαιριδίων, που υποδηλώνει ότι ένα πολύ μικρό ποσοστό από την αλλινάση διαχέεται στο διάλυμα CaCl_2 κατά τον σχηματισμό των σφαιριδίων. Όπως φαίνεται στο gel, οι ζώνες που αντιστοιχούν στις πλύσεις απουσιάζουν οπότε διαπιστώνεται ότι η ποσότητα που εισάγεται στα σφαιρίδια δεν επηρεάζεται από τις πλύσεις και παραμένει σταθερά εντός τους.

4.7 Ποσοτικός προσδιορισμός ακινητοποιημένης αλλινάσης

Η ποσότητα της αλλινάσης που ακινητοποιήθηκε στα αλγινικά σφαιρίδια προσδιορίζεται με τη μέθοδο Bradford.¹⁴² Αρχικά πραγματοποιείται ο προσδιορισμός της πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιώντας ως γνωστή πρωτεΐνη, την BSA. Η καμπύλη που προκύπτει παρουσιάζεται στο σχήμα 15.



Σχήμα 15. Πρότυπη καμπύλη.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν συνοψίζονται στον πίνακα 1

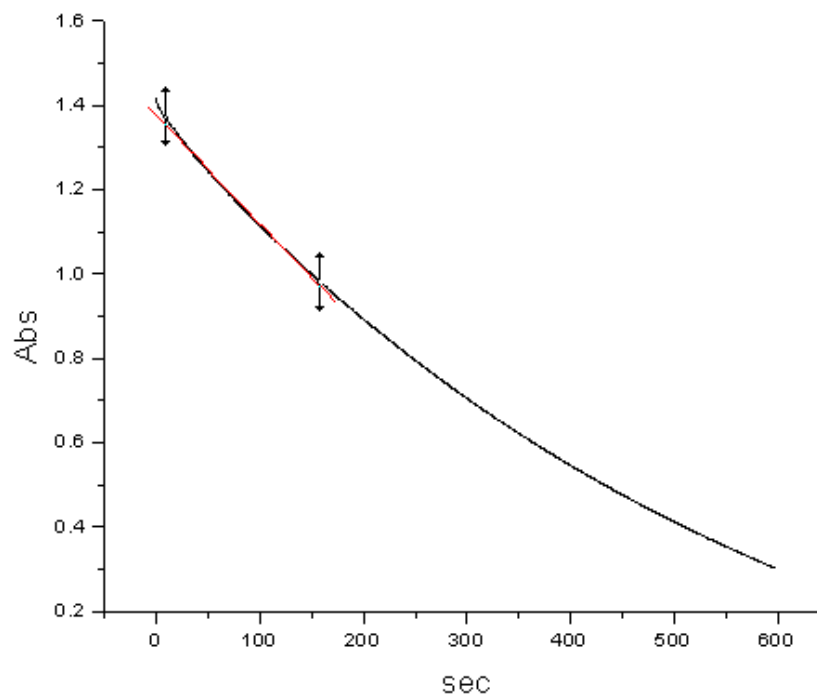
Αλλινάση πριν την εισαγωγή στα σφαιρίδια	3.2 mg
Αλλινάση που διέφυγε στο διάλυμα σχηματισμού (CaCl ₂)	0.1 mg
Αλλινάση που διέφυγε στις εκπλύσεις	0 mg

Πίνακας 1. Αποτελέσματα της Bradford.

Με βάση τα αποτελέσματα της Bradford (πίνακας 1), η ποσότητα της αλλινάσης που ακινητοποιήθηκε στα αλγινικά σφαιρίδια είναι 3.1 mg. Επομένως, η ακινητοποίηση της αλλινάσης στα αλγινικά σφαιρίδια πραγματοποιήθηκε κατά 96%. Επιπλέον, η ποσότητα της αλλινάσης ανά αλγινικό σφαιρίδιο υπολογίζεται στα 0,036mg/σφαιρίδιο.

4.8 Μελέτη δραστηριότητας ακινητοποιημένης αλλινάσης

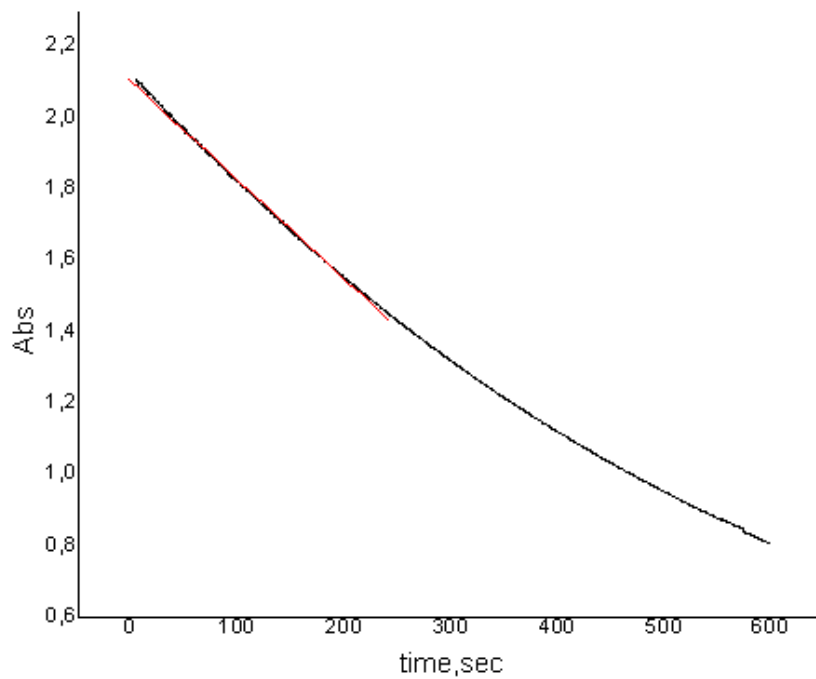
Για την μελέτη της δραστηριότητας της ακινητοποιημένης αλλινάσης, πραγματοποιείται διαδικασία όμοια με την απομονωμένη αλλινάση. Το φάσμα που προκύπτει κατά την μελέτη αυτή παρουσιάζεται στο σχήμα 16.



Σχήμα 16. Μελέτη δραστηριότητας ακινητοποιημένης αλλινάσης.

Από το παραπάνω φάσμα προσδιορίζεται η δραστικότητα της ακινητοποιημένης αλλινάσης και υπολογίζεται στα 221 U/mg αλλινάσης.

Επιπλέον μετρήθηκε η δραστικότητα της ακινητοποιημένης αλλινάσης, στα αλγινικά σφαιρίδια ενάμισι μήνα μετά την διαδικασία της ακινητοποίησης και βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη εξακολουθούσε να είναι το ίδιο δραστική, σχήμα 17.



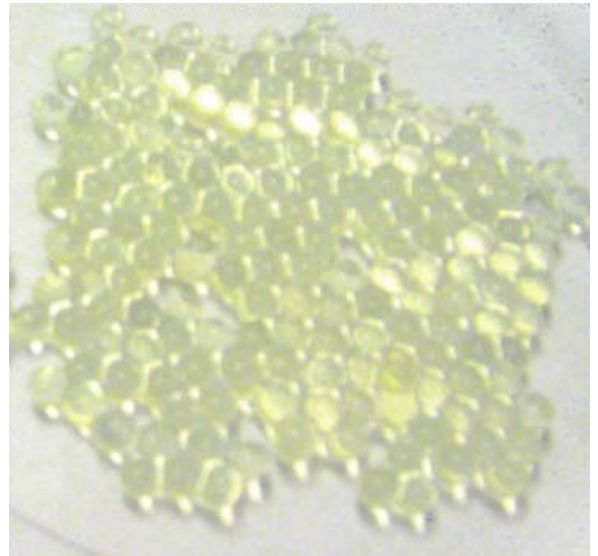
Σχήμα 17. Μελέτη δραστικότητας ακινητοποιημένης αλλινάσης ενάμισι μήνα μετά την ακινητοποίηση.

Με βάση το παραπάνω φάσμα, η δραστικότητα υπολογίζεται ίση με 210 U/mg, πράγμα που δείχνει ότι η αλλινάση διατηρεί την δραστικότητά της και δεν επηρεάζεται από την αποθήκευση.

4.9 Φωτογραφίες αλγινικών σφαιριδίων

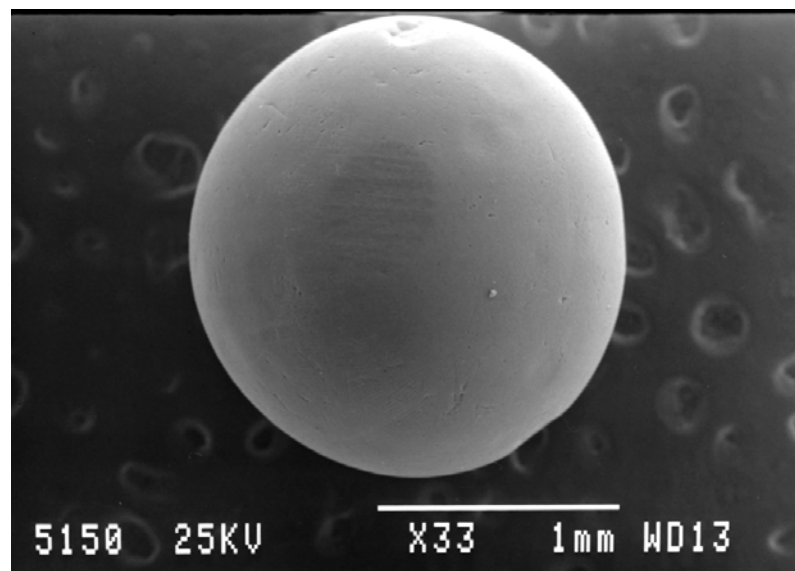
Όπως φαίνεται στην παρακάτω εικόνα των σφαιριδίων που σχηματίζονται κατά τη διαδικασία της γελοποίησης με τον τρόπο που αναφέρεται παραπάνω, τα αλγινικά σφαιρίδια είναι ιδιαίτερα ομοιόμορφα μεγέθους 2-4 mm, άχρωμα και ελαστικά. Σε αντιδιαστολή τα σφαιρίδια που παρασκευάζονται παρουσία της πρωτεΐνης, ενώ είναι επίσης ομοιόμορφα και διατηρούν το σφαιρικό τους σχήμα και τα υπόλοιπα χαρακτηριστικά τους, αποκτούν μία ιδιαίτερα εμφανή υποκίτρινη χρώση, η οποία μάλιστα διατηρείται έπειτα και από αλληπάλληλες πλύσεις. Ο έντονος αυτός χρωματισμός πιθανότατα οφείλεται στην εισαγωγή της αλλινάσης στο εσωτερικό του σφαιριδίου.

4.10 Φωτογραφίες αλγινικών σφαιριδίων με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης

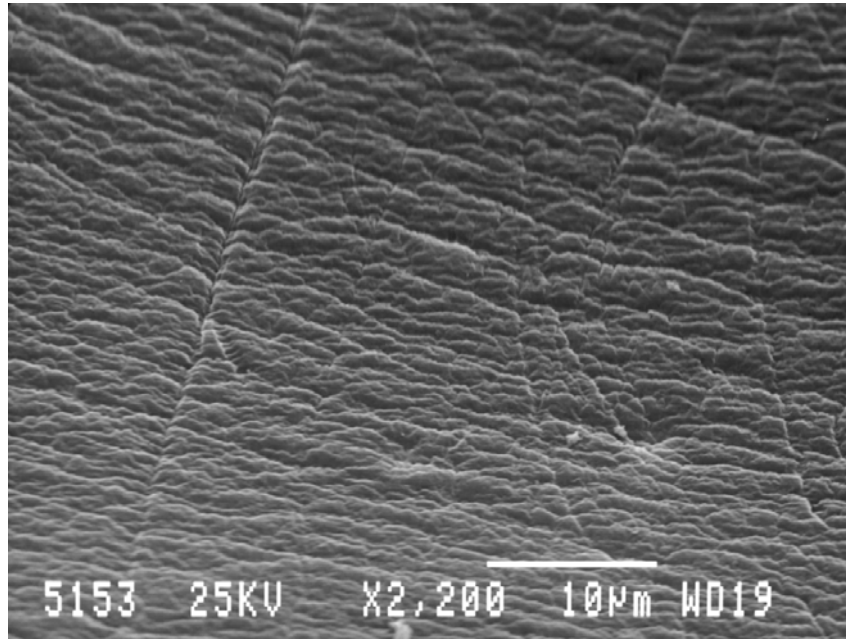


Εικόνα 4. Φωτογραφίες αλγινικών σφαιριδίων χωρίς την αλλινάση (άχρωμα σφαιρίδια) και με την αλλινάση (κίτρινα σφαιρίδια).

Η σάρωση της επιφάνειας των αλγινικών σφαιριδίων με τη χρήση ηλεκτρονικού μικροσκοπίου παρέχει αρκετές πληροφορίες όσον αφορά τη μορφολογία των σφαιριδίων. Εξωτερικά η επιφάνεια των σφαιριδίων παρουσιάζει ιδιαίτερη ομοιομορφία ενώ ταυτόχρονα δίνει την εντύπωση μιας ιδιαίτερα συμπαγούς δομής, εικόνα 5. Αυτό επιβεβαιώνεται και από την εικόνα που λαμβάνεται κατά τη σάρωση, της επιφάνειας τομής ενός αλγινικού σφαιριδίου. Παρατηρώντας την εικόνα 6, το υλικό φαίνεται ομοιόμορφα πακεταρισμένο χωρίς να υπάρχουν αυλακώσεις ή κενά που συχνά παρατηρούνται σε σαρώσεις τέτοιων υλικών. Συνεπώς η πρωτεΐνη θα μπορούσε εύκολα να παγιδευτεί σε αυτό το κλειστό, συγκροτούμενο από το πολυμερές, δίκτυο. Έτσι ο απεγκλωβισμός της πρωτεΐνης φαντάζει ιδιαίτερα δυσχερής ελλείψει κάποιας διόδου διαφυγής.



Εικόνα 5. Φωτογραφία αλγινικού σφαιριδίου.



Εικόνα 5. Φωτογραφία της εσωτερικής επιφάνειας ενός αλγινικού σφαιριδίου.

B ΜΕΡΟΣ

1. ΣΤΟΙΒΑΓΜΕΝΑ ΔΙΠΛΑ ΥΔΡΟΞΕΙΔΙΑ (LDH)

1.1 Εισαγωγή

Τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια (LDH: layered double hydroxides) είναι ανόργανα πολυμερή και αποτελούνται από υδροξείδια δύο διαφορετικών μετάλλων. Επίσης καλούνται και ανιονικοί πηλοί, ονομασία που αποδίδεται στη δομή που εμφανίζουν καθώς αποτελούνται από θετικά φορτισμένα στρώματα, μεταξύ των οποίων παρεμβάλλονται μόρια του νερού και ανιόντα, όπως CO_3^- , NO_3^- , Cl^- κ.ά. Σε αντίθεση με τα LDH, τα περισσότερα στοιβαγμένα υλικά παρουσιάζουν αρνητικά φορτισμένα στρώματα και όχι θετικά, ενώ το αρνητικό φορτίο εξισορροπείται από κατιόντα που περιέχονται στην περιοχή μεταξύ των στρωμάτων. Παραδείγματα κατιονικών πηλών αποτελούν οι φυλλοπυριτικοί πηλοί (ιλίτης, μοντμοριλλόνιτης) και οι πηλοί του φωσφορικού ζirkονίου. Οι ανιονικοί πηλοί εμφανίζουν παραπλήσιες ιδιότητες με τους άλλους πηλούς, σχηματίζοντας έτσι κρυστάλλους, που το μέγεθος τους κυμαίνεται από μερικά μικρόμετρα, μέχρι και λιγότερο από 1μm. Επιπλέον, ανάλογα με την υγρασία του περιβάλλοντος χώρου προσροφούν σημαντικές ποσότητες νερού. Οι ανιονικοί πηλοί, σε αντίθεση με τους κατιονικούς, δεν απαντώνται συχνά στη φύση.

Ο γενικός τύπος που περιγράφει τη χημική σύσταση των LDH είναι $[\text{M}^{\text{II}}_x\text{M}^{\text{III}}_y(\text{OH})_{2x+2y}][\text{A}^{n-}]_y/n \cdot z\text{H}_2\text{O}$. Τα M^{II} και M^{III} αναπαριστούν ένα δισθενές και ένα τρισθενές μέταλλο αντίστοιχα ενώ το A^{n-} είναι το αντισταθμιστικό ανιόν. Τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια παρασκευάζονται εύκολα και με χαμηλό κόστος^{146,147,148}.

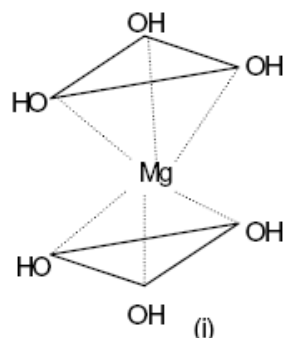
Το είδος και η αναλογία του δισθενούς και τρισθενούς μετάλλου καθώς και του αντισταθμιστικού ανιόντος ποικίλλουν, οπότε υπάρχει η δυνατότητα να παραχθούν διάφοροι πηλοί ελέγχοντας τις παραπάνω παραμέτρους. Έχει αναφερθεί

η σύνθεση LDH με Mg-Al, Mg-Fe, Ni-Al, Zn-Al, Li-Al κ.ά.^{146,148} και τα ανιόντα που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι κυρίως $\text{CO}_3^{=}$, NO_3^- , Cl^- , ClO_4^- , OH^- .

Η συνήθως χρησιμοποιούμενη αναλογία $\text{M}^{\text{II}}/\text{M}^{\text{III}}$ είναι 4/1, 3/1 και 2/1. Η πυκνότητα φορτίου των στρωμάτων στα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια καθορίζεται από την αναλογία των μετάλλων $\text{M}^{\text{II}}/\text{M}^{\text{III}}$. Η ιδιότητα αυτή, αποτελεί πλεονέκτημα των LDH, καθώς μεταβάλλοντας την αναλογία μπορεί να ρυθμιστεί η ποσότητα και η διευθέτηση των εισαχθέντων στα LDH ανιόντων. Επιπρόσθετα, ανάλογα με το αντισταθμιστικό ανιόν που χρησιμοποιείται, είναι δυνατόν να παρασκευαστούν πηλοί με διαφορετική απόσταση μεταξύ των στρωμάτων.

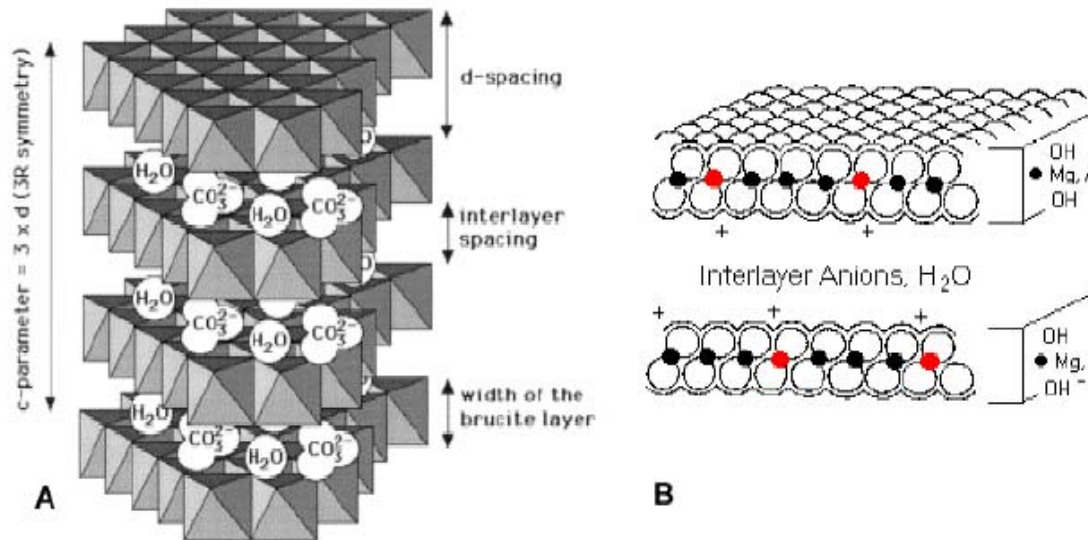
1.2 Δομή LDH

Κύριο χαρακτηριστικό της δομής των LDH είναι ότι σχηματίζουν διαδοχικά στρώματα μεταλλικών υδροξειδίων και ανιόντων. Τα στρώματα αυτά στοιβάζονται το ένα πάνω στο άλλο και συγκρατούνται μεταξύ τους με ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις και με δεσμούς υδρογόνου. Τα στρώματα των μεταλλικών υδροξειδίων παρουσιάζουν δομή παρόμοια με το ορυκτό Βρουσίτης $[\text{Mg}(\text{OH})_2]$, και το πάχος των στρωμάτων είναι 4.78 \AA .¹⁴⁶ Στο Βρουσίτη κάθε άτομο Mg βρίσκεται στο κέντρο ενός οκταέδρου, συναρμοσμένο με έξι υδροξύλια (σχήμα 1). Τα οκτάεδρα σχηματίζουν δισδιάστατα στρώματα, μεταξύ των οποίων περιέχονται ανιόντα και μόρια νερού. Η ποσότητα του νερού μεταξύ των στρωμάτων καθορίζεται από τα ενσωματωμένα ανιόντα καθώς και από τη θερμοκρασία.¹⁴⁹⁻¹⁵³ Τα μόρια του νερού συνδέονται τόσο με τα στρώματα υδροξειδίων όσο και με τα ανιόντα, με δεσμούς υδρογόνου.^{154,155,156}



Σχήμα 1. Οκταεδρική παρουσίαση της δομής του Βρουσίτη.

Η μερική αντικατάσταση των δισθενών ατόμων Mg από τα τρισθενή άτομα Al επάγει την εμφάνιση θετικού φορτίου στο στρώμα (σχήμα 2). Το θετικό αυτό φορτίο αντισταθμίζεται από τα ανιόντα που παρεμβάλλονται μεταξύ των στρωμάτων.



Σχήμα 2. Αναπαράσταση της δομής των στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων

Με τη βοήθεια της ηλεκτρονικής μικροσκοπίας έχει διαπιστωθεί ότι τα LDH σχηματίζουν κρυστάλλους σε σχήμα εξαγωνικής πλάκας.^{147,157,158} Το μέγεθος των κρυστάλλων αυτών κυμαίνεται από 100nm μέχρι και μερικά μικρόμετρα ανάλογα με τη μέθοδο που χρησιμοποιείται κατά την σύνθεσή τους.

1.3 Φύση των ανιόντων

Δεν υπάρχει σχεδόν κανένας περιορισμός για τα ανιόντα που μπορούν να ενσωματωθούν στα LDH, ωστόσο είναι πολύ σημαντικό τα ανιόντα αυτά να μην αποσπών τα μεταλλικά κατιόντα από τα στρώματα των υδροξειδίων. Χρησιμοποιώντας διαφορετικά είδη ανιόντων για την σύνθεση των LDH πετυχαίνεται διαφορετικό πάχος στρωμάτων. Μερικά ανιόντα τα οποία έχουν ενσωματωθεί με επιτυχία στα LDH είναι τα παρακάτω είναι¹⁵⁹ :

- διάφορα ανόργανα ανιόντα,

- διάφορα οργανικά καρβοξυλικά, θειικά, σουλφονικά και οξικά ανιόντα,
- πολυμερή ανιόντα,
- σύμπλοκα ανιόντων,
- διάφορα βιοχημικά ανιόντα.

Τα ανιόντα αυτά διαφέρουν μεταξύ τους στη δομή, στις διαστάσεις, και στο φορτίο και συγκρατούνται στενά μεταξύ των στρωμάτων. Τα χαρακτηριστικά τους μπορούν να μελετηθούν με τη βοήθεια της περίθλασης ακτίνων-X, οπότε και προσδιορίζεται το κενό μεταξύ των στρωμάτων. Τα ανιόντα μεταξύ των στρωμάτων τοποθετούνται κατά τέτοιο τρόπο ώστε να έχουν περισσότερες αλληλεπιδράσεις από το περιβάλλον τους. Για παράδειγμα, τα ανιόντα CO_3^{2-} τοποθετούνται παράλληλα μεταξύ των στρωμάτων, προκειμένου τα τρία άτομα οξυγόνου να δέχονται τη μεγαλύτερη αλληλεπίδραση με τις υδροξυλικές ομάδες των στρωμάτων.¹⁶⁰

1.4 Φύση των μετάλλων M^{II} και M^{III}

Τα M^{II} και M^{III} εντοπίζονται μεταξύ των στενά πακεταρισμένων υδροξυλοομάδων των στρωμάτων σχήμα. Τα δισθενή και τρισθενή κατιόντα που χρησιμοποιούνται συνήθως για την σύνθεση των LDH είναι τα Mg^{2+} και Al^{3+} . Η σύνθεση των LDH μπορεί να πραγματοποιηθεί κατόπιν συνδυασμών πολλών κατιόντων, ωστόσο σημαντικό κριτήριο για την επιλογή των κατιόντων αυτών, είναι, οι ιοντικές τους ακτίνες να είναι παραπλήσιες με αυτές των Mg^{2+} και Al^{3+} . Στον πίνακα που ακολουθεί, παρατίθενται οι ιοντικές ακτίνες μερικών κατιόντων που έχουν ενσωματωθεί σε LDH.

MII	Fe 0.061	Co 0.065	Ni 0.069	Mg 0.072	Cu 0.073	Zn 0.074	Mn 0.083	Cd 0.095	Ca 0.100
MIII	Al 0.054	Co 0.055	Fe 0.055	Mn 0.058	Ga 0.062	Ru 0.068	Cr 0.069	V 0.074	In 0.080

Πίνακας 1. Ιοντικές ακτίνες κατιόντων που έχουν ενσωματωθεί σε LDH.

1.5 Ιδιότητες LDH

Τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια είναι βιοσυμβατά υλικά με μεγάλη ιονανταλλακτική ικανότητα, στην οποία και οφείλεται το μεγάλο πλήθος εφαρμογών που παρουσιάζουν. Επιπλέον η παραγωγή μεταλλικών οξειδίων μετά από φρύξη καθώς επίσης και η αποσύνθεση σε όξινες συνθήκες αποτελούν σημαντικές ιδιότητες για τα LDH.

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται κυρίως για την αλλαγή του ενδιάμεσου ανιόντος είναι η ιονανταλλαγή. Η αλλαγή αυτή πραγματοποιείται λόγω της διαφορετικής συγγένειας που παρουσιάζουν τα διάφορα ανιόντα για το LDH. Το αποτέλεσμα της διαδικασίας αυτής είναι ότι τα ισχυρά συγκρατούμενα ανιόντα εκτοπίζουν αυτά που δεσμεύονται ασθενέστερα. Η σειρά σταθερότητας για ορισμένα συνηθισμένα μονοσθενή και δισθενή ανόργανα ανιόντα ακολουθεί το παρακάτω σχήμα.^{147,161}



Όπως φαίνεται από την παραπάνω σειρά τα δισθενή ανιόντα συγκρατούνται ισχυρότερα σε σχέση με τα μονοσθενή.

Από τη σειρά σταθερότητας των ανιόντων προκύπτει ότι αν αφαιρεθεί διάλυμα LDH-NO³⁻ να έρθει σε ισορροπία με τον ατμοσφαιρικό αέρα, τότε θα παραχθεί LDH-CO₃⁼ λόγω της παρουσίας CO₂ στο νερό. Επομένως τα νιτρικά ανιόντα

συγκρατούνται ασθενέστερα στο LDH και η ανταλλαγή τους παρουσία άλλων ιόντων είναι εύκολη. Στην μικρή συγγένεια που παρουσιάζουν τα νιτρικά με τον πηλό, αποδίδεται η εκτεταμένη χρήση τους στις πειραματικές εφαρμογές. Προκειμένου να αποφευχθεί το πρόβλημα που προκαλεί το CO₂, λόγω της ισχυρής δέσμευσης του στο πλέγμα, κατά την προετοιμασία σύνθεσης του πηλού, απαιτείται η χρήση αερίου αζώτου.

Με την ιονανταλλαγή είναι αρκετά εύκολο να δεσμευτούν και να αποδεσμευτούν ανιόντα από τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια και μάλιστα σε ήπιες συνθήκες με αποτέλεσμα να αποτελεί την κυριότερη ιδιότητα των υλικών αυτών.

Υποβάλλοντας το LDH σε φρύξη για 18 ώρες στους 500⁰C παράγονται μικτά μεταλλικά οξείδια, τα οποία εμφανίζουν μικρό μέγεθος κρυστάλλων με μεγάλο εμβαδόν επιφάνειας, αντοχή στις υψηλές θερμοκρασίες καθώς και αλκαλικές ιδιότητες.¹⁶² Η φρύξη τροποποιεί τη δομή και τις ιδιότητες του υλικού καθώς κατά τη διάρκειά της, το υλικό υφίσταται απώλεια μορίων νερού όπως και ανιόντων.

Τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια υφίστανται υδρόλυση όταν το pH του διαλύματος στο οποίο βρίσκονται πάρει τιμές χαμηλότερες του 3. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι αποσυντίθενται τα θετικά φορτισμένα στρώματα των μεταλλικών υδροξειδίων οδηγώντας σε απελευθέρωση των ενδιάμεσων ανιόντων. Πρόκειται επομένως για μια διαδικασία αντίστροφη της σύνθεσης των LDH.

1.6 Χαρακτηρισμός

Για τον χαρακτηρισμό των LDH χρησιμοποιούνται αρκετές τεχνικές μεταξύ των οποίων είναι η περίθλαση ακτίνων X, η φασματοσκοπία υπερύθρου, η ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM), η διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC) και η ηλεκτρονική φασματοσκοπία διέλευσης (TEM).

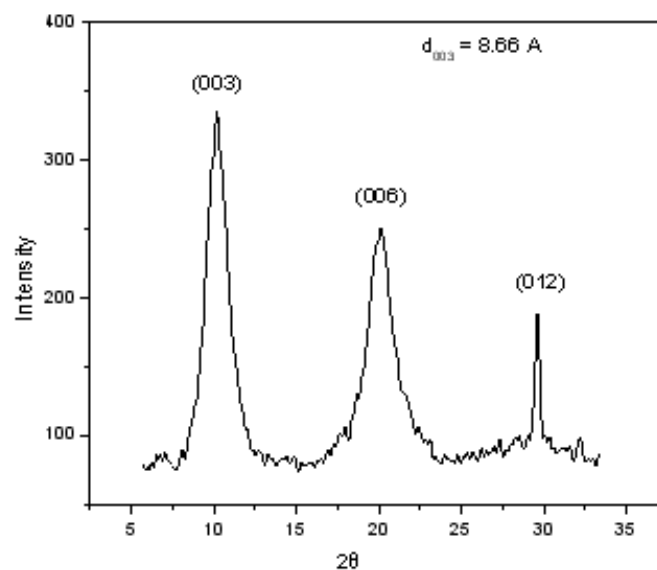
1.6.1 Περίθλαση ακτίνων X

Η περίθλαση των ακτίνων X, είναι η κύρια αναλυτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό της δομής των LDH. Με τη μέθοδο αυτή

προσδιορίζεται το πάχος των στρωμάτων του LDH καθώς και η απόσταση μεταξύ των στρωμάτων του. Στο παρακάτω διάγραμμα, εμφανίζονται οξείες κορυφές σε χαμηλές τιμές της γωνίας περίθλασης 2θ . Στις κορυφές αυτές αποδίδονται οι δείκτες Miller (003), (006), (012).^{146,162} Από τη θέση των κορυφών αυτών, προκύπτει η απόσταση d μεταξύ δύο διαδοχικών στρωμάτων μεταλλικών υδροξειδίων. Για τον υπολογισμό της απόστασης χρησιμοποιείται ο νόμος του Bragg που χαρακτηρίζει την περίθλαση ακτίνων X. Σύμφωνα με το νόμο αυτό ισχύει

$$n\lambda = 2d \sin\theta$$

όπου n είναι η τάξη ανάκλασης της κορυφής, λ είναι το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, θ είναι η γωνία περίθλασης που εμφανίζεται η κορυφή και d είναι η απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών στρωμάτων μεταλλικών υδροξειδίων.



Σχήμα 3. Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X του Mg₂-Al-LDH

Η περίθλαση ακτίνων X είναι η καλύτερη μέθοδος για τον προσδιορισμό της απόστασης d . Η τιμή της γωνίας 2θ κυμαίνεται από 5° έως 65°.

Καθώς τα διάφορα ανιόντα έχουν διαφορετική δομή και διαστάσεις, η παρουσία τους μεταξύ των στοιβαγμένων στρωμάτων προκαλούν διεύρυνση του χώρου μεταξύ των στρωμάτων, ανάλογη των ιδιοτήτων των ανιόντων. Επομένως η

περίθλαση των ακτίνων X επιβεβαιώνει την πραγματοποίηση της αντίδρασης ιονανταλλαγής καθώς η απόσταση των στρωμάτων πριν και μετά την αντίδραση παρουσιάζεται διαφορετική. Επιπρόσθετα το διάγραμμα ακτίνων X, παρέχει σημαντικές πληροφορίες όσον αφορά την οργάνωση του προϊόντος. Στην περίπτωση καλά οργανωμένου υλικού εμφανίζονται οξείες κορυφές με μεγάλη ένταση, ενώ στην αντίθετη περίπτωση οι κορυφές είναι ευρείες με χαμηλή ένταση.

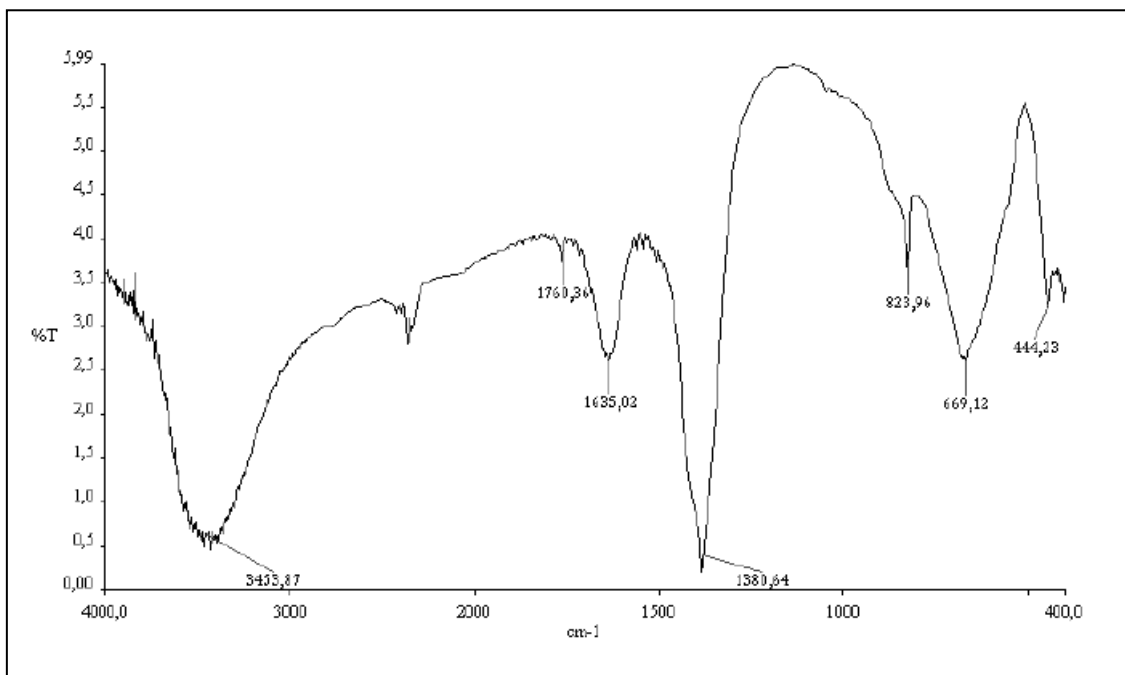
1.6.2 Φασματοσκοπία υπερύθρου IR

Η φασματοσκοπία υπερύθρου παρέχει σημαντικές πληροφορίες για την ταυτοποίηση του ενδιάμεσου ανιόντος, ιδιαίτερα στην περίπτωση των οργανικών ανιόντων.

Τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια εμφανίζουν χαρακτηριστικές κορυφές. Στα 3500 cm^{-1} εμφανίζεται μια ευρεία ταινία απορρόφησης, που οφείλεται στη δόνηση τάσης των υδροξυλίων των μεταλλικών στρωμάτων καθώς και του νερού του ενδιάμεσου στρώματος, το οποίο παρουσιάζει επίσης στους 1640 cm^{-1} τη δόνηση κάμψης $\nu_{\text{H-O-H}}$.^{146,162,163} Επιπλέον οι δονήσεις που εμφανίζονται στους 670 cm^{-1} και 445 cm^{-1} οφείλονται στους δεσμούς των μετάλλων με τα υδροξύλια.¹⁶⁴

Πληροφορίες για τον προσδιορισμό του ενδιάμεσου ανιόντος, καθώς και του τρόπου με τον οποίο αλληλεπιδρά με τα θετικά φορτισμένα στρώματα, λαμβάνονται από την περιοχή των 1000 cm^{-1} έως 2000 cm^{-1} . Στην περίπτωση του LDH-NO₃, στο φάσμα υπερύθρου φαίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές του νιτρικού ιόντος στους 1380 cm^{-1} , 1760 cm^{-1} και 825 cm^{-1} (σχήμα 4).

Επομένως με τη φασματοσκοπία IR μπορεί να διαπιστωθεί η εισαγωγή κάποιου ανιόντος, καθώς στο φάσμα θα απουσιάζει η χαρακτηριστική κορυφή που αντιστοιχεί στη δόνηση τάσης του NO₃⁻.



Σχήμα 4. Φάσμα υπερύθρου $Mg_2Al-LDH-NO_3$

1.6.3 Διαφορική θερμιδομετρία σάρωσης (DSC)

Η τεχνική αυτή παρέχει πληροφορίες για την θερμική συμπεριφορά που υλικού, μετράει δηλαδή τις αλλαγές στη μάζα του υλικού ως συνάρτηση της θερμοκρασίας. Οι μεταβολές που παρατηρούνται οφείλονται στην εξάτμιση του νερού των ενδιάμεσων στρωμάτων και στην δημιουργία των μικτών μεταλλικών οξειδίων κατά την αποσύνθεσή του υλικού.¹⁶⁵

1.6.4 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM) - Ηλεκτρονική φασματοσκοπία διέλευσης (TEM)

Με την ηλεκτρονική μικροσκοπία είναι δυνατόν να ληφθούν πληροφορίες για την μορφολογία του υλικού, όπως για παράδειγμα το μέγεθος των κρυστάλλων.¹⁶⁶

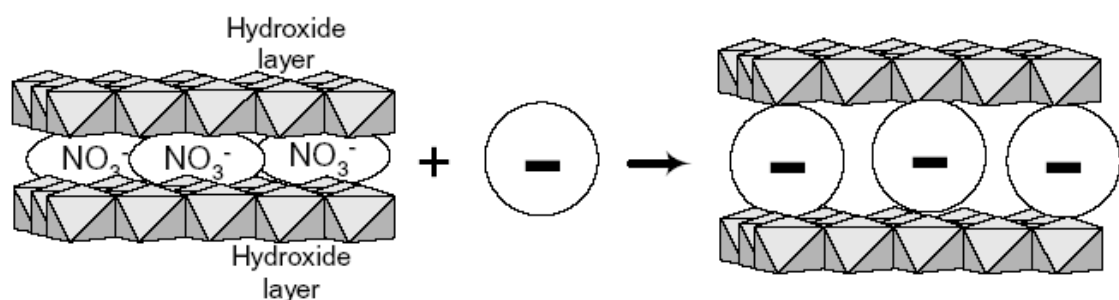
Η ηλεκτρονική μικροσκοπία διέλευσης πραγματοποιεί ποιοτική ανάλυση στο δείγμα. Επιτρέπει την ανάλυση μικροδομών και νανοδομών των περισσότερων

υλικών. Παρέχει εικόνες υψηλής ανάλυσης, κάνοντας δυνατή την απευθείας πρόσβαση, και μελέτη των κρυσταλλικών δομών.

1.7 Εφαρμογές των LDH

Η χαρακτηριστική δομή που παρουσιάζουν τα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια τα καθιστά δυναμικά υλικά με πολλαπλές εφαρμογές σε διάφορους τομείς όπως στην κατάλυση, στην ηλεκτροχημεία, στην ιονανταλλαγή, στην απορρόφηση, στην οπτική, στην ιατρική και στη τεχνολογία σύνθεσης νέων νανουλικών.¹⁶⁷⁻¹⁷⁸

Με την ιονανταλλαγή πραγματοποιείται η εισαγωγή στο LDH ενός μορίου, το οποίο δεν επηρεάζει τη δομή του υλικού. Με την ολοκλήρωση της εισαγωγής του μορίου, το υπάρχον NO_3^- ανιόν μεταξύ των στρωμάτων, αντικαθίσταται (σχήμα 5).



Σχήμα 5. Μηχανισμός ιονανταλλαγής και σχηματισμός υβριδίου -LDH

Πρόσφατα, πολλά ανιονικά πολυμερή έχουν εισαχθεί σε LDH με αποτέλεσμα το σχηματισμό LDH-πολυμερών νανουβριδίων. Με την εισαγωγή αυτή αυξάνεται η απόσταση μεταξύ των στρωμάτων, επηρεάζεται η κρυσταλλικότητα και η δομή του LDH.^{164,172,177,178}

Έχει αναφερθεί επίσης, η ακινητοποίηση με ιονανταλλαγή αρκετών μικροβιοκτόνων. Συγκεκριμένα έχει επιτευχθεί η ακινητοποίηση του 2,4 διχλωροφαινόξυ-οξικού οξέος γνωστό ως (2,4D) σε $[\text{Zn-Al-Cl}]$ με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός σταθερού υβριδίου LDH.^{179,180,181}

Με τη διαδικασία της φρύξης τα LDH αποκτούν μεγάλο εμβαδόν επιφάνειας με αλκαλικές ιδιότητες με αποτέλεσμα να βρίσκουν εφαρμογή ως ετερογενείς καταλύτες σε μεγάλο αριθμό χημικών μετατροπών. Έχουν χρησιμοποιηθεί LDH σε αλδολικές συμπυκνώσεις, υδρογονώσεις, οξειδώσεις, και αντιδράσεις πολυμερισμού.¹⁶² Επιπρόσθετα τα LDH χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα για την ακινητοποίηση καταλυτών και τη μετατροπή τους από ομογενείς σε ετερογενείς καθώς και για την αύξηση της δραστηριότητάς τους. Συγκεκριμένα με ιονανταλλαγή έχουν ακινητοποιηθεί MoO_4^{2-} και πολυξομεταλλικά ανιόντα ($\text{V}_{10}\text{O}_{28}^{6-}$, $\text{H}_2\text{W}_{12}\text{O}_{40}^{6-}$, $\text{Mo}_7\text{O}_{24}^{6-}$)¹⁸²⁻¹⁸⁵ όπως επίσης διάφορες πορφυρίνες¹⁸⁵ και φθαλοκυανίνες^{186,187}. Καθώς τα LDH είναι βιοσυμβατά, τα τελευταία χρόνια έχει αναπτυχθεί ο τομέας της σύνθεσης υβριδίων των LDH με βιομόρια. Έτσι έχουν συντεθεί υβρίδια με εισαγωγή αμινοξέων, λιπαρών οξέων, νουκλεϊκών οξέων και DNA καθώς και του ενζύμου ακυλάση της πενικιλίνης G.¹⁸⁸

Τα βιομόρια που αποθηκεύονται στα LDH μπορούν να απελευθερωθούν εύκολα σε όξινες συνθήκες. Αυτή η μοναδική ιδιότητα των LDH καθιστά τα υλικά αυτά ως τον καταλληλότερο φορέα ακινητοποίησης βιομορίων.

Τα νουκλεϊκά οξέα και το DNA εισάγονται με ιονανταλλαγή στο LDH λόγω του αρνητικού φορτίου που διαθέτουν.¹⁸⁹ Τα νανοϋβρίδια LDH-DNA είναι δυνατόν να εισαχθούν σε ευκαριωτικά κύτταρα, όπου απελευθερώνουν το DNA δρώντας ως γονιδιακοί φορείς. Στα λυσοσώματα, το όξινο περιβάλλον οδηγεί στην υδρόλυση του πηλού οπότε απελευθερώνεται το DNA, ενώ στο κυτταρόπλασμα πραγματοποιείται ιονανταλλαγή με τα ιόντα του κυτταροπλάσματος. Έχει αναφερθεί ότι ένα υβρίδιο LDH με το κατάλληλο ολιγονουκλεοτίδιο μπορεί να αναστείλει την ανάπτυξη καρκινικών κυττάρων ενώ το σκέτο LDH δεν προκαλεί αναστολή.¹⁹⁰ Επίσης το ολιγονουκλεοτίδιο μόνο του δεν έχει επαρκή δράση καθώς δεν εισέρχεται μέσα στα κύτταρα. Λόγω της ιδιότητας των στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων, να μπορούν να μεταφέρουν το φορτίο τους μέσα σε κύτταρα, τα LDH καθίστανται ικανά, για εφαρμογές μεταφοράς και ελεγχόμενης απελευθέρωσης φαρμάκων. Μελέτες τέτοιων εφαρμογών έχουν γίνει για το αντιφλεγμονώδες φάρμακο *ibuprofen*¹⁹¹, για τη φυτική αυξητική ορμόνη *α-naphthaleneacetate*¹⁶³

καθώς και για τα αντιβιοτικά γραμισιδίνη, αμφοτερίκη Β, αμπικιλίνη και ναλιδιξικό οξύ.¹⁹²

2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.1 Σύνθεση στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων (LDH)

Η σύνθεση των στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων έγινε με βάση το πρωτόκολλο του Miyata.¹⁴⁶ Συγκεκριμένα, σε τρίλαιμη σφαιρική φιάλη του ενός λίτρου με 200ml H₂O τοποθετείται πεχάμετρο και μαγνητικός αναδευτήρας. Στη φιάλη προσαρμύζονται δύο προσθετικές φιάλες από τις οποίες η μία περιέχει 200ml διαλύματος 0.6M Mg(NO₃)₂ και 0.3M Al(NO₃)₃ και η άλλη 200ml διαλύματος 2M NaOH. Τα δύο διαλύματα προστίθενται στο H₂O ταυτόχρονα με τη ροή να ρυθμίζεται έτσι ώστε το pH του διαλύματος να παραμένει σταθερό και ίσο με 10.0 ± 0.5. Όλα τα διαλύματα παρασκευάζονται με απιονισμένο νερό που έχει απαερωθεί με διοχέτευση N₂ για 20min και στη συνέχεια παραμένουν σφραγισμένα ώστε να μην έρχονται σε επαφή με τον ατμοσφαιρικό αέρα. Επίσης κατά τη διάρκεια της αντίδρασης η συσκευή είναι κλειστή και διοχετεύεται αέριο N₂ στη σφαιρική φιάλη.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης σχηματίζεται λευκό ίζημα το οποίο αφήνεται υπό ανάδευση στους 65⁰C, overnight. Ακολουθεί φυγοκέντρηση του διαλύματος και επαναιώρηση του ιζήματος σε απαερωμένο και απιονισμένο νερό. Το διάλυμα απαερώνεται εκ νέου και αφήνεται σφραγισμένο μέχρι τη χρήση του.

2.2 Χαρακτηρισμός LDH

Ο χαρακτηρισμός του προϊόντος γίνεται με περίθλαση ακτίνων X και με φασματοσκοπία υπερύθρου. Προκειμένου να ληφθούν τα παραπάνω φάσματα το διάλυμα διηθείται υπό κενό, πλένεται με αρκετό απαερωμένο νερό και αφού ξηραθεί και κονιοποιηθεί είναι κατάλληλο για τη λήψη των φασμάτων.

2.3 Σύνθεση υβριδίων LDH-αλλινάσης

Στο διάλυμα που περιέχεται το ένζυμο προστίθεται ρυθμιστικό διάλυμα 50mM HEPES pH=8.2 ώστε το pH του διαλύματος να λάβει την αντίστοιχη τιμή. Σε κωνική φιάλη που περιέχει μαγνητικό αναδευτήρα, τοποθετούνται 6ml διαλύματος αλλινάσης. Η φιάλη προσαρμόζεται σε υδρόλουτρο. Στη συνέχεια κατόπιν ανάδευσης προστίθεται στάγδην 20ml υδατικού διαλύματος LDH περιεκτικότητας 7.7mg/ml. Έπειτα το μίγμα αφήνεται υπό ανάδευση overnight για να ολοκληρωθεί η αντίδραση. Η θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της αντίδρασης διατηρείται στους 4°C περίπου, προκειμένου να προστατευθεί η δραστηριότητα του ενζύμου.

Μετά το τέλος της ανάδευσης, ακολουθεί φυγοκέντρηση του διαλύματος στα 10.000g. Κατόπιν λαμβάνεται δείγμα από το υπερκείμενο της φυγοκέντρησης. Στη συνέχεια ακολουθεί πλύση του ίζηματος με προσθήκη 20 ml διαλύματος 50mM HEPES pH=8.2 και φυγοκέντρηση στα 10.000g. Έπειτα πραγματοποιείται και δεύτερη πλύση με το παραπάνω διάλυμα, φυγοκέντρηση στα 10.000g και λαμβάνονται δείγματα και από τις δύο πλύσεις. Το υποκίτρινο ίζημα που προκύπτει αφήνεται να ξηραθεί και αφού κονιοποιηθεί φυλάσσεται στο ψυγείο.

2.4 Χαρακτηρισμός των υβριδίων LDH-αλλινάση

Ο χαρακτηρισμός των υβριδίων πραγματοποιείται με περίθλαση ακτίνων X και με φασματοσκοπία υπερύθρου. Επίσης ακολουθεί μελέτη των φασματοσκοπικών χαρακτηριστικών της αλλινάσης. Επιπρόσθετα μελετάται φασματοφωτομετρικά, η δραστηριότητα της ακινητοποιημένης αλλινάσης.

2.5 Διαπίστωση εισαγωγής της αλλινάσης στο LDH

Για να διαπιστωθεί η εισαγωγή της αλλινάσης στο LDH πραγματοποιείται αποδιατακτική ηλεκτροφόρηση σε πηκτή πολυακρυλαμιδίου. Στην πηκτή φορτώνονται το δείγμα από το διάλυμα της αλλινάσης πριν την εισαγωγή στο

LDH, δείγμα από το υπερκείμενο της αντίδρασης, δείγμα από τις πλύσεις, καθώς και δείγμα από εναιωρημένο διάλυμα LDH-αλλινάση.

Επίσης με τη φασματοσκοπία υπεριώδους – ορατού, λαμβάνοντας υπόψη τα φασματοσκοπικά χαρακτηριστικά της αλλινάσης, μπορεί να διεξαχθεί συμπέρασμα για την εισαγωγή της αλλινάσης στο πηλό. Για το λόγο αυτό λαμβάνονται φάσματα στο διάλυμα της αλλινάσης πριν την αντίδραση, στο υπερκείμενο της αντίδρασης, στις πλύσεις και σε εναιωρημένο διάλυμα LDH-αλλινάση.

2.6 Πλύση του υβριδίου LDH-αλλινάση με διάλυμα NaCl

Για να επιβεβαιωθεί η ακινητοποίηση της αλλινάσης στο LDH πραγματοποιούνται πλύσεις του υβριδίου με διάλυμα NaCl, με διαδοχικά αυξανόμενη συγκέντρωση. Πραγματοποιούνται πλύσεις με διάλυμα NaCl συγκεντρώσεων από 0.2M NaCl έως 1 M NaCl (0.2M, 0.4M, 0.6M, 0.8M, 1.0M). μετά την ολοκλήρωση των πλύσεων, το ίζημα απαναιωρείται και λαμβάνεται φάσμα προκειμένου να πραγματοποιηθεί σύγκριση με αντίστοιχο φάσμα πριν τις πλύσεις. Επιπρόσθετα τα υπερκείμενα των πλύσεων μελετήθηκαν με τη μέθοδο Bradford.¹⁴²

2.7 Ποσοτικός προσδιορισμός αλλινάσης που ακινητοποιήθηκε

Για τον προσδιορισμό της ποσότητας της αλλινάσης που ακινητοποιήθηκε πραγματοποιείται μελέτη στα παρακάτω δείγματα, σε δείγμα από το διάλυμα της αλλινάσης πριν την αντίδραση, σε δείγμα από το υπερκείμενο της αντίδρασης, καθώς και σε δείγμα από τις δύο πλύσεις.

2.8 Μελέτη δραστηριότητας LDH – αλλινάσης

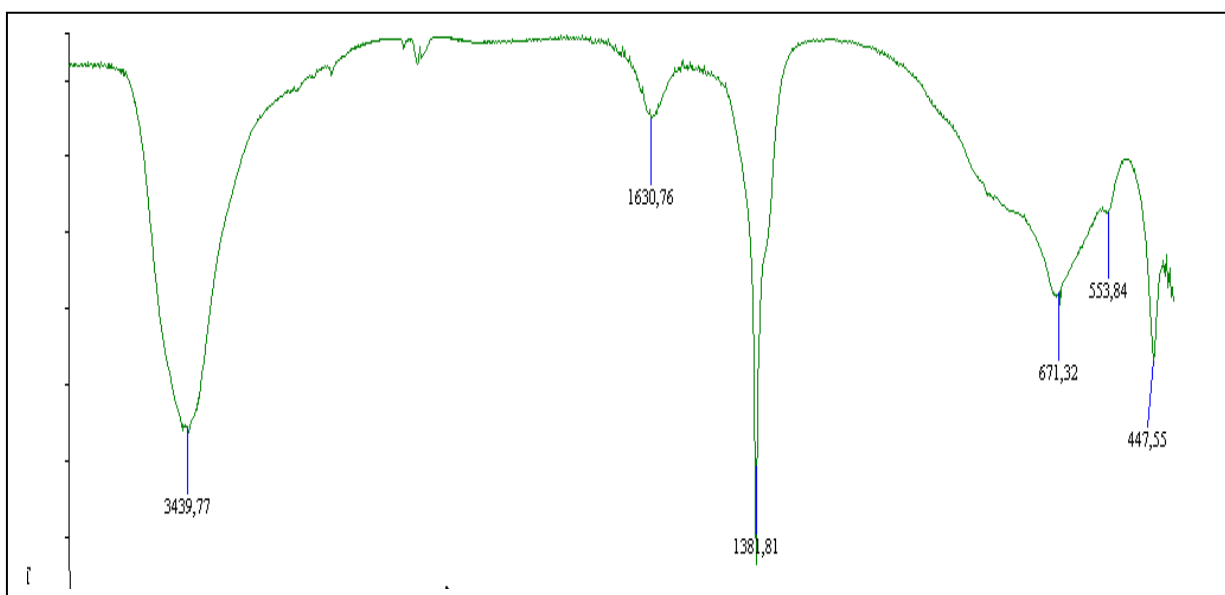
Για την μελέτη της δραστηριότητας της ακινητοποιημένης αλλινάσης διαλύονται 8mg LDH – αλλινάση σε 1ml διαλύματος Γ (50 mM Na₂HPO₄, pH=6.5 και 1mM EDTA, 2x10⁻⁵ M φωσφορική πυριδοξάλη). Προκειμένου να επιτευχθεί

καλή διαλυτοποίηση γίνεται χρήση υπερήχων. Για να αποφευχθεί η πιθανότητα μείωσης της λειτουργικότητας της αλλινάσης λόγω θέρμανσης του διαλύματος της από τη χρήση υπερήχων, η διαδικασία διάλυσης πραγματοποιείται διατηρώντας το διάλυμα σε χαμηλή θερμοκρασία με τη βοήθεια υδατόλουτρου. Στη συνέχεια, για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας, ακολουθείται όμοια διαδικασία με αυτή του απομονωμένου ενζύμου, δηλαδή μελετάται φασματοσκοπικά η μείωση της απορρόφησης στα 412nm. Συγκεκριμένα σε μια κυψελίδα quartz στην οποία πραγματοποιείται ανάδευση εισάγονται 1895 μl διαλύματος Γ 10 μl εναιωρημένου LDH –αλλινάσης 20 μl NTB από διάλυμα 12mM, και 75 μl υποστρώματος (αλλίνης) από διάλυμα 56mM και παρακολουθείται η μείωση της απορρόφησης στα 412nm.

3. ΑΝΑΛΥΣΗ- ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

3.1 Σύνθεση στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων (LDH)

Ο χαρακτηρισμός του LDH που συντέθηκε, πραγματοποιείται χρησιμοποιώντας την φασματοσκοπία υπερύθρου (IR), σχήμα 1, και περίθλασης ακτίνων X (XRD), σχήμα 2.

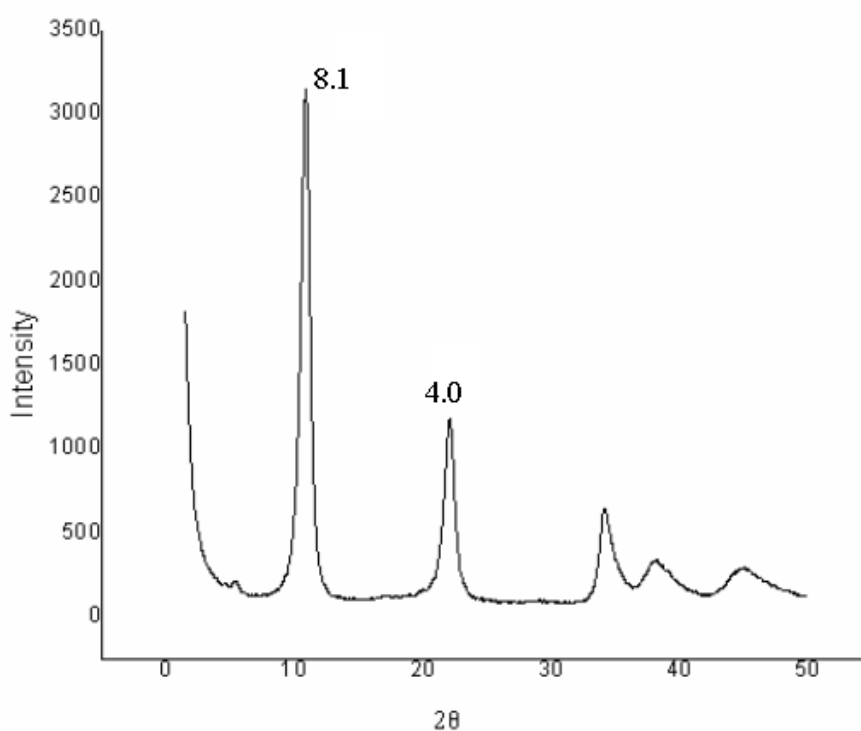


Σχήμα 1. Φάσμα υπερύθρου του Mg₂Al-LDH-NO₃.

Στο παραπάνω φάσμα, εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές του συντιθέμενου πηλού. Στα 3500 cm⁻¹ εμφανίζεται μια ευρεία ταινία απορρόφησης, που οφείλεται στη δόνηση τάσης των υδροξυλίων των μεταλλικών στρωμάτων καθώς και του νερού του ενδιάμεσου στρώματος, το οποίο παρουσιάζει επίσης στους 1640 cm⁻¹ τη δόνηση κάμψης ν_{H-O-H}.^{147,163,164}

Επιπλέον οι δονήσεις που εμφανίζονται στους 670 cm^{-1} και 445 cm^{-1} οφείλονται στους δεσμούς των μετάλλων με τα υδροξύλια.¹⁶⁵

Πληροφορίες για τον προσδιορισμό του ενδιάμεσου ανιόντος, καθώς και του τρόπου με τον οποίο αλληλεπιδρά με τα θετικά φορτισμένα στρώματα, λαμβάνονται από την περιοχή των 1000 cm^{-1} έως 2000 cm^{-1} . Στην περίπτωση του LDH-NO₃, στο φάσμα υπερύθρου φαίνονται οι χαρακτηριστικές κορυφές του νιτρικού ιόντος στους 1380 cm^{-1} και 1630 cm^{-1} , σχήμα 1.



Σχήμα 2. Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X του Mg₂Al-LDH-NO₃.

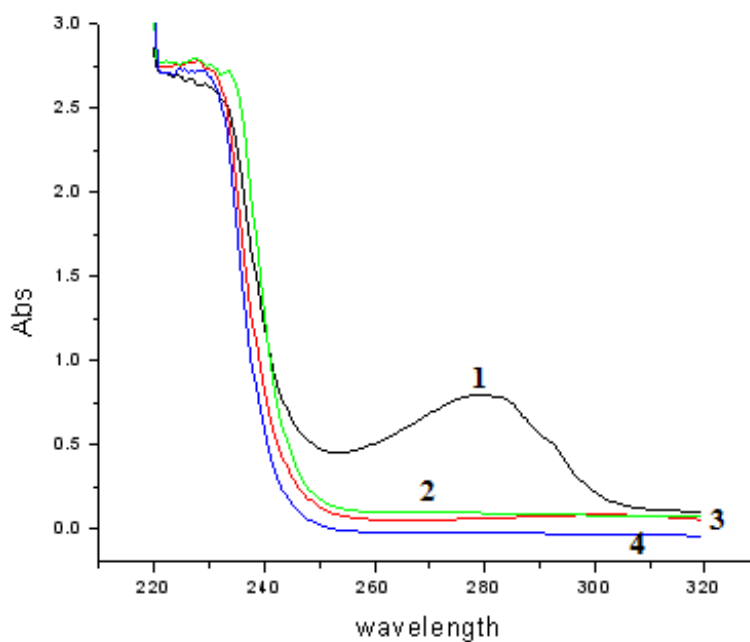
Στο παραπάνω διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X, οι κορυφές εμφανίζονται αρκετά οξείες και μάλιστα παρουσιάζουν μεγάλη ένταση. Το σχήμα των κορυφών, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, παρέχει αρκετές πληροφορίες όσον αφορά την οργάνωση του πηλού. Στη συγκεκριμένη περίπτωση το δείγμα είναι πολύ οργανωμένο, καθώς οι κορυφές που λαμβάνονται είναι οξείες και με μεγάλη ένταση.

3.2 Σύνθεση υβριδίου LDH-Αλλιινάση

Η αλλιινάση που χρησιμοποιείται για τη σύνθεση του υβριδίου LDH-αλλιινάση, απομονώνεται όπως αναφέρεται στο πρώτο μέρος. Για την σύνθεση του υβριδίου δοκιμάστηκαν διάφορες αναλογίες LDH και αλλιινάσης, έτσι ώστε να προκύπτουν βέλτιστα αποτελέσματα. Οι συνθήκες αυτές, αναφέρονται αναλυτικά στο πειραματικό μέρος. Το pH του διαλύματος που βρίσκεται η αλλιινάση ρυθμίζεται στα 8.2, ώστε η αλλιινάση να φορτιστεί αρνητικά εφόσον το ισοηλεκτρικό της σημείο είναι το 6.3, και να αλληλεπιδρά με τα θετικά φορτισμένα στρώματα του πηλού.

3.3 Διαπίστωση εισαγωγής της αλλιινάσης στο LDH με φασματοσκοπία υπεριώδους ορατού.

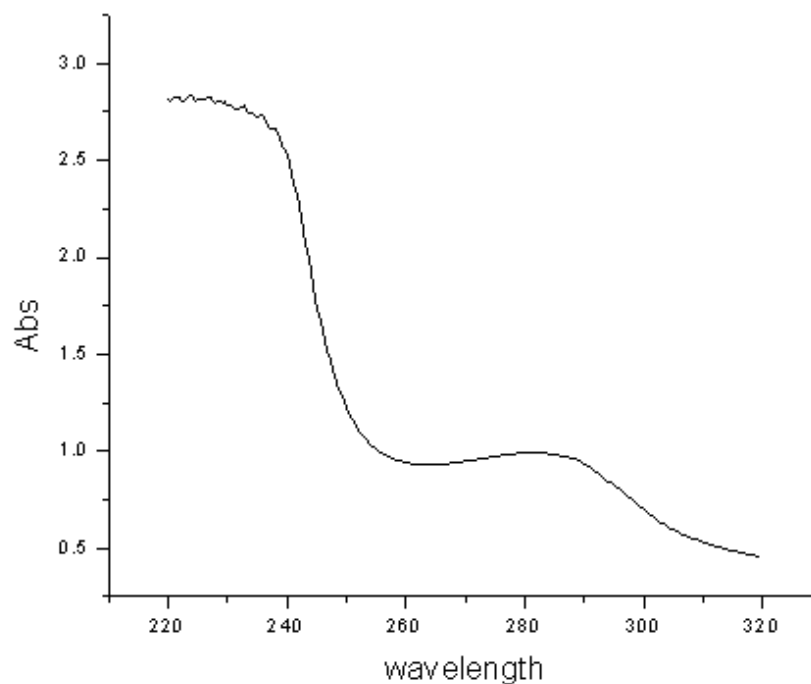
Η εισαγωγή της αλλιινάσης στο LDH μπορεί να διαπιστωθεί χρησιμοποιώντας την φασματοσκοπία uv-vis. Για να πραγματοποιηθεί η μελέτη αυτή, λαμβάνονται τα φάσματα στο διάλυμα της αλλιινάσης πριν την αντίδραση, στο υπερκείμενο της αντίδρασης, στις πλύσεις και σε εναιωρημένο διάλυμα LDH-αλλιινάση.



Σχήμα 3. Μελέτη αντίδρασης LDH-αλλιινάσης. **1.** αλλιινάση πριν την αντίδραση, **2.** υπερκείμενο της αντίδρασης, **3.** 1^η πλύση, **4.** 2^η πλύση.

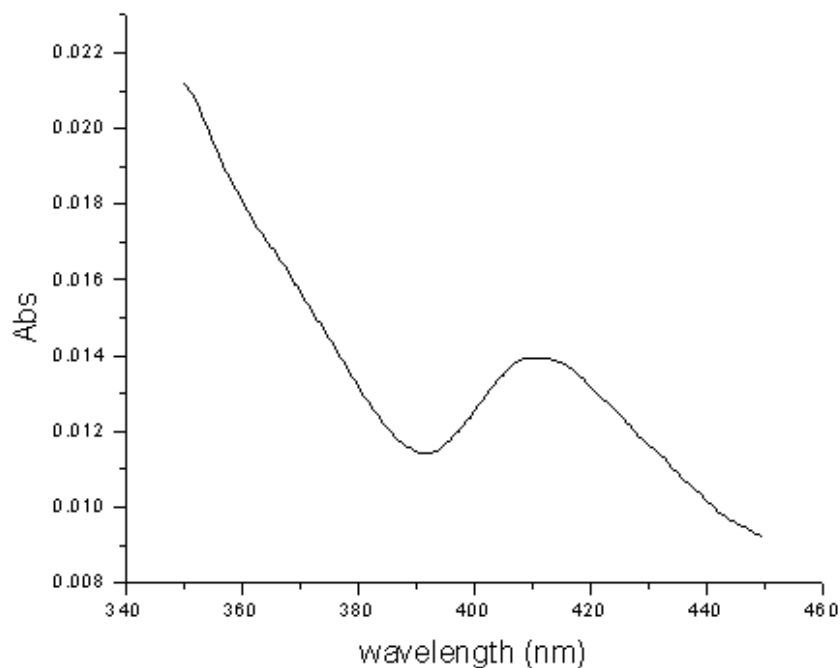
Όπως φαίνεται στο παραπάνω φάσμα, στη περίπτωση του υπερκειμένου και των πλύσεων η χαρακτηριστική κορυφή της αλλινάσης στα 280nm απουσιάζει, γεγονός που πιστοποιεί την εισαγωγή της μέσα στον πηλό.

Επιπλέον διαλύεται ορισμένη ποσότητα LDH-αλλινάσης και λαμβάνεται φάσμα στο αιώρημα που προκύπτει, σχήμα 4.



Σχήμα 4. Φάσμα αιωρήματος LDH-αλλινάσης

Όπως φαίνεται από το φάσμα του αιωρήματος εμφανίζεται η κορυφή στα 280nm, οπότε επιβεβαιώνεται η εισαγωγή της αλλινάσης στο LDH. Επιπλέον στοιχείο που συνηγορεί υπέρ της εισαγωγής της αλλινάσης στον πηλό είναι η χαρακτηριστική κορυφή στα 430nm, σχήμα 5, που αντιστοιχεί στον συμπαράγοντα της αλλινάσης, τη φωσφορική πυριδοξάλη.

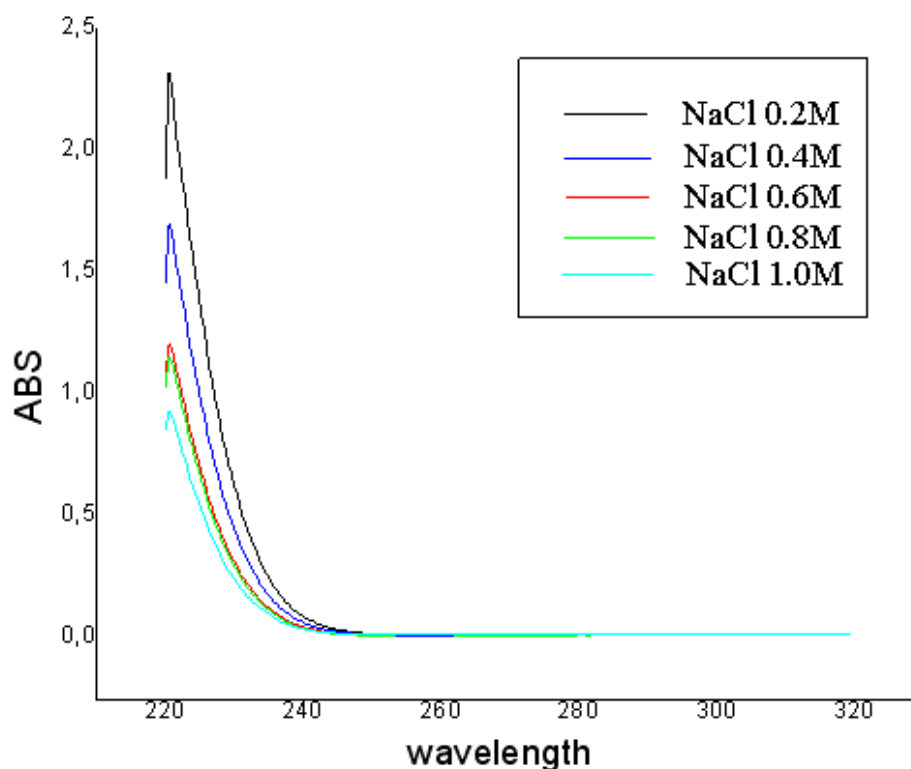


Σχήμα 5. Απορρόφηση φωσφορικής πυριδοξάλης

Στο παραπάνω διάγραμμα παρουσιάζεται η κορυφή που αντιστοιχεί στη φωσφορική πυριδοξάλη και παρατηρείται ότι η κορυφή αυτή έχει μετατοπιστεί μετά την εισαγωγή της αλλινάσης στον πηλό, προς τα αριστερά, στα 415 nm. Επομένως η ύπαρξη της κορυφής αυτής επιβεβαιώνει την εισαγωγή της αλλινάσης.

3.4 Πλύση του υβριδίου LDH-αλλινάση με διάλυμα NaCl

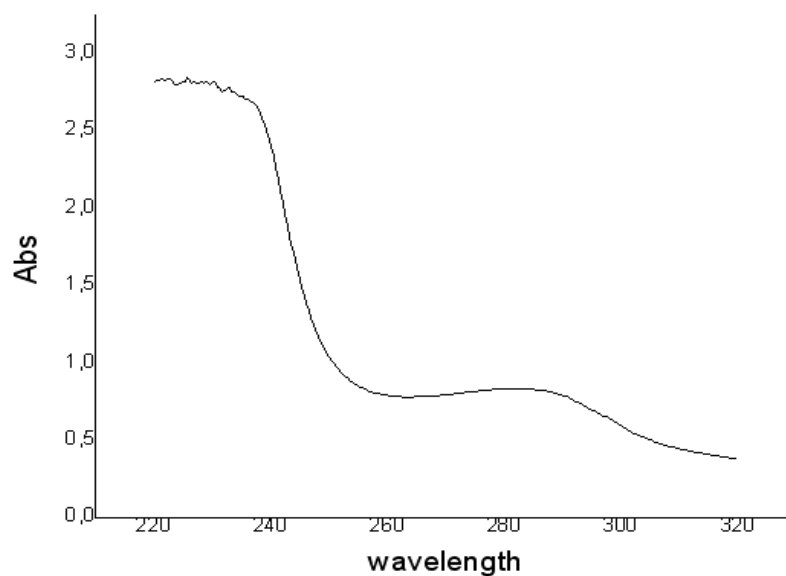
Προκειμένου να επιβεβαιωθεί η σταθερότητα της εισαγωγής της αλλινάσης πραγματοποιήθηκαν διαδοχικές πλύσεις με διάλυμα NaCl αυξανόμενης συγκέντρωσης. Το συγκεντρωτικό φάσμα που προκύπτει κατόπιν την μελέτη των υπερκειμένων των πλύσεων, με φασματοσκοπία uv-vis παρατίθενται στο σχήμα 6.



Σχήμα 6. Διαδοχικές πλύσεις υβριδίου LDH-αλλινάση με διάλυμα NaCl

Όπως φαίνεται στο παραπάνω φάσμα, δεν παρατηρείται καμία κορυφή στα 280 nm γεγονός που υποδεικνύει ότι η αλλινάση πρέπει είναι σταθερά ακινητοποιημένη στα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια και δεν διαφεύγει στο υπερκείμενο κατά τη διάρκεια των πλύσεων με το διάλυμα NaCl. Επιπρόσθετα κατά την επεξεργασία των υπερκειμένων των πλύσεων με τη μέθοδο Bradford, παρατηρήθηκε ότι δεν έδειξαν κάποιο σήμα, αποτελώντας επιπλέον απόδειξη για τη σταθερή εισαγωγή της αλλινάσης στον πηλό.

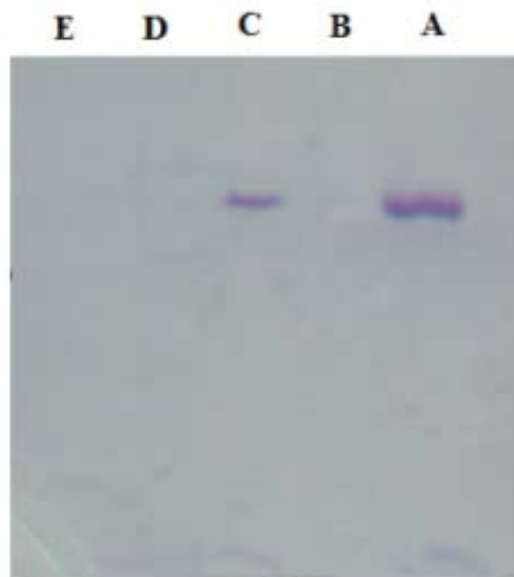
Μετά την ολοκλήρωση της μελέτης των υπερκειμένων, το ίζημα επαναιωρήθηκε προκειμένου να ληφθεί το φάσμα του και να πραγματοποιηθεί η σύγκριση με το αρχικό. Το φάσμα που προκύπτει παρουσιάζεται στο σχήμα 7.



Σχήμα 7. Επαναιωρημένο LDH-αλλινάση.

3.5 Διαπίστωση εισαγωγής της αλλινάσης στο LDH με ηλεκτροφόρηση

Επιπρόσθετα, για να διαπιστωθεί η εισαγωγή της αλλινάσης στο LDH πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την ηλεκτροφόρηση παρουσιάζονται στην εικόνα 1.



Εικόνα 1. Διαπίστωση εισαγωγής της αλλινάσης στο LDH. **A.** αλλινάση πριν την αντίδραση, **B.** υπερκείμενο της αντίδρασης LDH-αλλινάσης, **C.** LDH-αλλινάση, **D.** 1^η πλύση, **E.** 2^η πλύση.

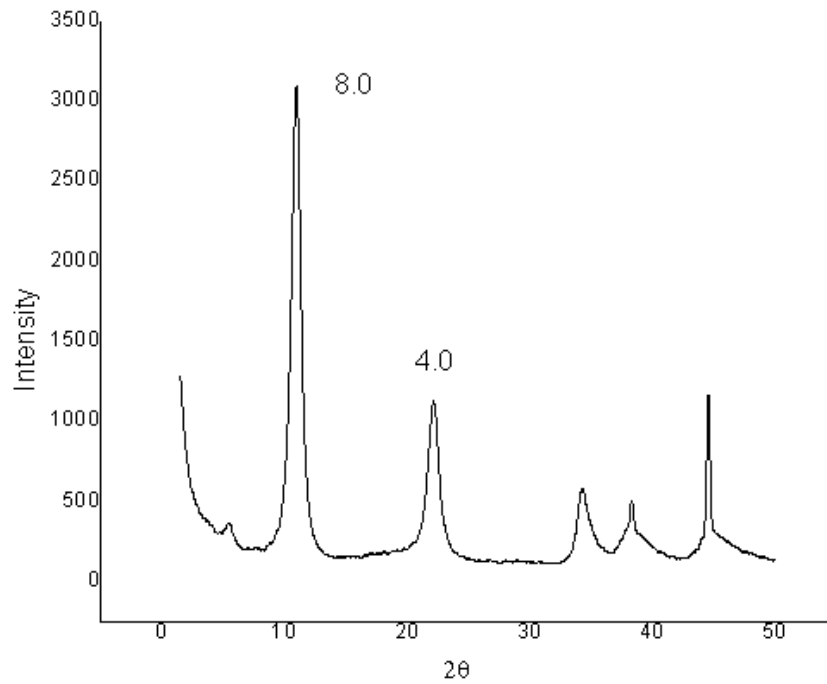
Στο παραπάνω gel φαίνεται η αλλινάση πριν την εισαγωγή στο LDH (ζώνη A), το υπερκείμενο της αντίδρασης LDH-αλλινάσης (ζώνη B), το αιώρημα του LDH-αλλινάση (ζώνη C) καθώς και οι δύο εκπλύσεις που πραγματοποιήθηκαν στον πηλό μετά το τέλος της αντίδρασης (ζώνες D, E). Όπως διαπιστώνεται από το gel η ζώνη που αντιστοιχεί στο δείγμα LDH-αλλινάση είναι αρκετά εμφανής , γεγονός που επιβεβαιώνει την εισαγωγή της αλλινάσης εντός του πηλού.

Αντίθετα οι ζώνες που αντιπροσωπεύουν το υπερκείμενο της αντίδρασης και τις δύο εκπλύσεις δεν παρουσιάζουν κάποια ένδειξη, με αποτέλεσμα να πιστοποιείται η εισαγωγή της αλλινάσης στο LDH, καθώς και η παραμονή της εντός του.

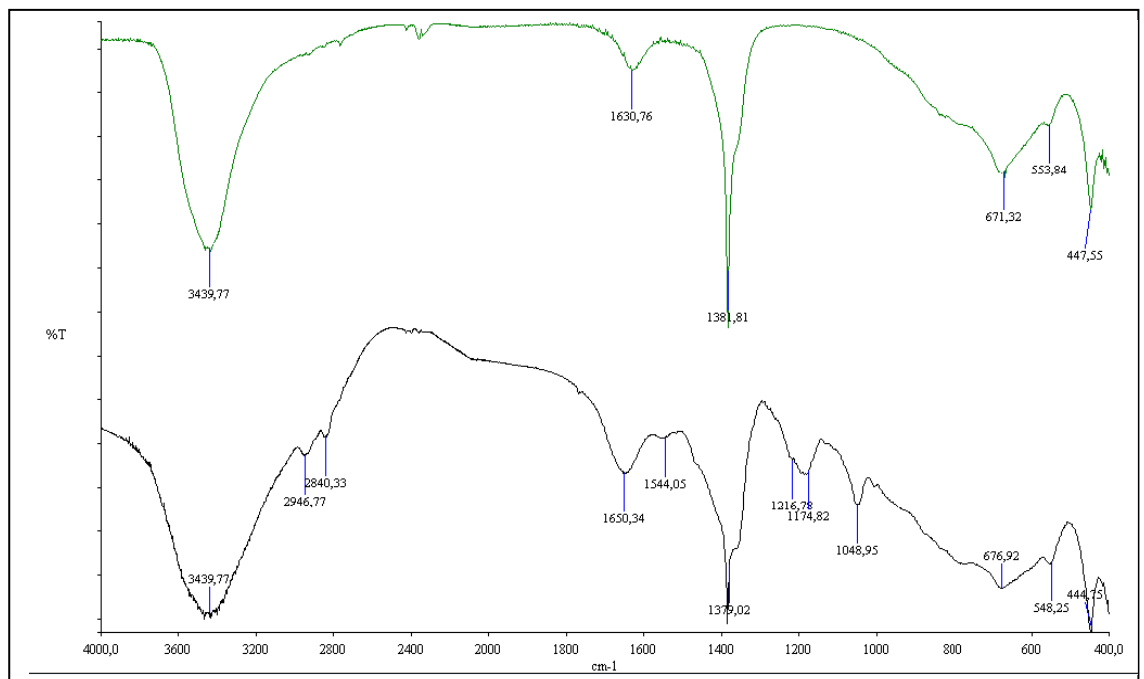
3.6 Χαρακτηρισμός των υβριδίων LDH-Αλλινάση-Περίθλαση ακτίνων X. Φασματοσκοπία υπερύθρου

Ο χαρακτηρισμός των υβριδίων πραγματοποιείται με περίθλαση ακτίνων X και με φασματοσκοπία υπερύθρου, σχήματα 8,9. Συγκρίνοντας το διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X του LDH και του υβριδίου LDH-αλλινάση, δεν παρατηρείται κάποια διαφοροποίηση στο διάστημα μεταξύ των στρωμάτων σχήματα 2,8. Πιθανότατα η εισαγωγή της αλλινάσης δεν έχει πραγματοποιηθεί στο εσωτερικό των στρωμάτων του πηλού, αλλά στο διάκενο που δημιουργείται μεταξύ των στρωμάτων των στοιβαγμένων διπλών υδροξειδίων.

Επιπλέον, από το σχήμα 8 φαίνεται καθαρά ότι ο πηλός εξακολουθεί να διατηρεί την καλά οργανωμένη δομή του, όπως και πριν την διαδικασία εισαγωγής, σχήμα 2, καθώς οι κορυφές στο φάσμα διατηρούν την ένταση και την οξύτητα τους. Επομένως η εισαγωγή της αλλινάσης δεν έχει κάποια αρνητική επίδραση στη δομή και τα χαρακτηριστικά του πηλού.



Σχήμα 8. Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων X του υβριδίου LDH-αλλυνάση.



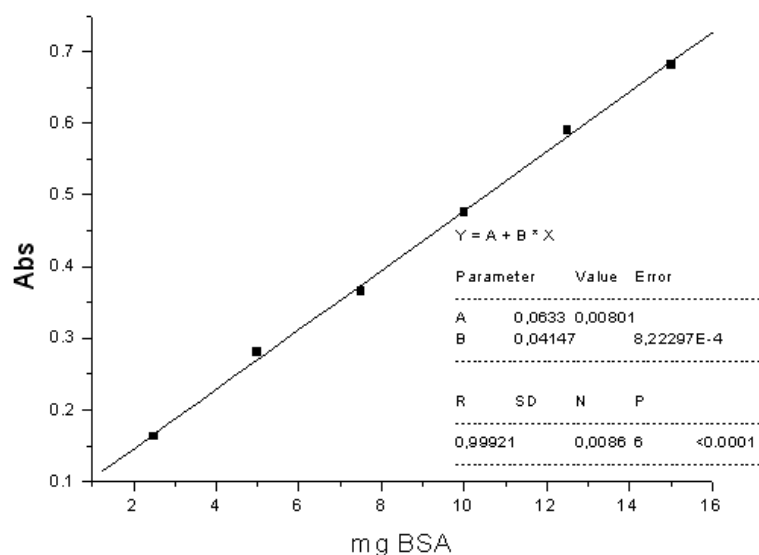
Σχήμα 9. Φάσμα υπεράυθρου του υβριδίου LDH-αλλυνάση

Συγκρίνοντας τα φάσματα υπεράυθρου του LDH και του υβριδίου LDH-αλλυνάση, εύκολα εντοπίζονται οι χαρακτηριστικές κορυφές που αντιστοιχούν στον πηλό. Ωστόσο παρατηρείται μία μείωση της έντασης της κορυφής στους 1381 cm^{-1}

συγκριτικά με τις υπόλοιπες, στην περίπτωση του φάσματος που αντιστοιχεί στο υβρίδιο LDH-αλλινάση. Η κορυφή αυτή αντιστοιχεί στο νιτρικό ανιόν, το οποίο βρίσκεται ενδιάμεσα των στρωμάτων, συνεπώς θα μπορούσε να εξαχθεί το συμπέρασμα πως μια ποσότητα νιτρικών ανιόντων εγκαταλείπει την αρχική του θέση. Κάτι τέτοιο θα μπορούσε να λάβει χώρα στην περίπτωση αντικατάστασης των νιτρικών από κάποιο άλλο ανιόν. Επίσης παρατηρείται η εμφάνιση κάποιων νέων κορυφών 1544 cm^{-1} , 1217 cm^{-1} , 1175 cm^{-1} , 1049 cm^{-1} .

3.7 Ποσοτικός προσδιορισμός ακινητοποιημένης αλλινάσης

Ο προσδιορισμός της ποσότητας της αλλινάσης που ακινητοποιήθηκε στα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια πραγματοποιείται με τη μέθοδο Bradford.¹⁴² Αρχικά πραγματοποιείται ο προσδιορισμός της πρότυπης καμπύλης, χρησιμοποιώντας ως γνωστή πρωτεΐνη, την BSA. Η καμπύλη που προκύπτει παρουσιάζεται στο σχήμα 8



Σχήμα 8. Πρότυπη καμπύλη.

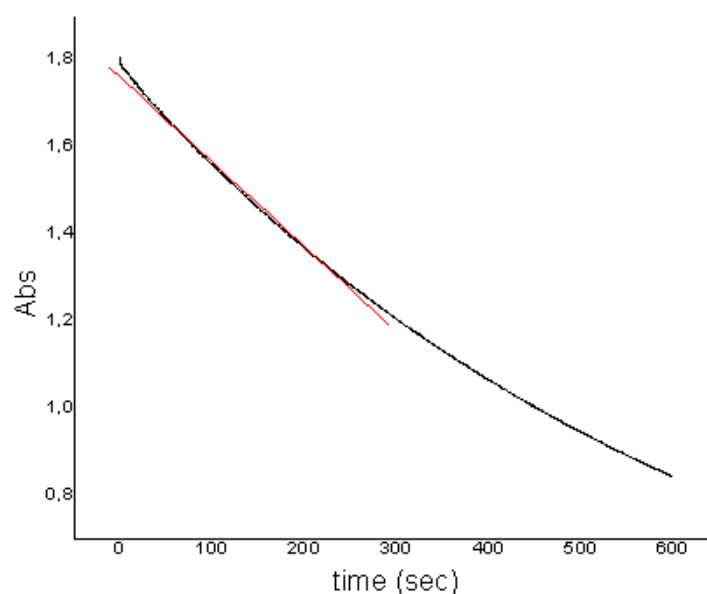
Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από τη μέθοδο Bradford για την ακινητοποιημένη αλλινάση βάσει της πρότυπης καμπύλης, παρουσιάζονται στον παρακάτω πίνακα.

Αλλινάση πριν την εισαγωγή στο LDH	10 mg
Αλλινάση μετά την αντίδραση (υπερκείμενο)	0 mg
Εκπλύσεις	0mg

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της Bradford, η ποσότητα της αλλινάσης που ακινητοποιήθηκε είναι 10 mg, οπότε η ακινητοποίηση της αλλινάσης στα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια έλαβε χώρα 100%, σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα. Επιπλέον υπολογίστηκε η ποσότητα της αλλινάσης ανά mg πηλού και βρέθηκε ίση με 0,062 mg/ml.

3.8 Μελέτη δραστηριότητας ακινητοποιημένης αλλινάσης

Η μελέτη της δραστηριότητας της ακινητοποιημένης αλλινάσης, στα στοιβαγμένα διπλά υδροξείδια πραγματοποιείται με την ίδια πειραματική διαδικασία, με αυτή που ακολουθείται για την απομονωμένη αλλινάση. Το φάσμα που προκύπτει, παρουσιάζεται στο σχήμα 9.



Σχήμα 8. Μελέτη δραστηριότητας ακινητοποιημένης αλλινάσης.

Από το παραπάνω φάσμα προσδιορίζεται η δραστικότητα της ακινητοποιημένης αλλινάσης και υπολογίζεται ότι είναι ίση με 186 U/mg αλλινάσης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ¹ X.H. Zhou, L.A. Wan Po, *Int. J. Pharm.* 75 (1991a) 97±115.
- ² W. wang, *Int. J. Pharm.* 185 (1999) 129-188.
- ³ N.A. Peppas, A.G. Mikos, *Hydrogels in Medicine and Pharmacy*. 1 (1986) 1±27.
- ⁴ L. Brannon-Peppas, *Absorbent Polymer Technology*, Elsevier, Amsterdam, 1990, 45±66.
- ⁵ N.A. Peppas, Mikos CRC Press, Boca Raton, FL. A. G. (1986), 1-26
- ⁶ N.A. Peppas, A.R. Khare, *Adv. Drug Del. Rev.* 11 (1993), 1.
- ⁷ P.J. Flory, J. Rehner, *J. Chem. Phys.* 11 (1943) 521±526.
- ⁸ P.J. Flory, *J. Chem. Phys.* 18 (1950) 108±111.
- ⁹ P.J. Flory Cornell University Press, Ithaca, NY, (1953)
- ¹⁰ R. Langer, N. A. Peppas, *AICHE J.* 49 (2003), 2990.
- ¹¹ A.K. Andrianov, L.G. Payne, *Adv. Drug Del. Rev.* 34 (1998) 155.
- ¹² H. Ertesvag, S. Valla, *Polym. Degrad. Stab.* 59 (1998) 85-91.
- ¹³ O. Smidsrod, G. Skjak-Braek, *Trends Biotechnol.* 8 (1990) 71-8.
- ¹⁴ M.D. Blanco, O. Garcia, R.M. Trigo, J.M. Teijon, I. Katime, *Biomaterials*. 17 (1996) 1061.
- ¹⁵ J. Lalonde, A. Margolin, *Immobilization of enzymes*. (2002) 163-184, Wiley-VCH, Weinheim.
- ¹⁶ O.N. Singh, D.J. Burgess, *J. Pharm. Pharmacol.* 41 (1989) 670–673.
- ¹⁷ L.S. Liu, S.Q. Liu, S.Y. Ng, M. Froix, T. Ohno, J. Heller, *J. Controlled Release*. 43 (1997) 65–74.
- ¹⁸ Y. Igari, P.G. Kibat, R. Langer, *J. Controlled Release*. 14 (1990) 263–267.
- ¹⁹ P.G. Kibat, Y. Igari, M. Wheatley, H. Eisen, R. Langer, *FASEB J.* 4 (1990) 2533–2539.
- ²⁰ E.R. Edelman, E. Mathiowitz, R. Langer, M. Klagsbrun, *Biomaterials*. 12 (1991) 619–626.
- ²¹ A. Martinsen, G. Skjak-Braek, O. Smidsrod, *Biotechnol. Bioeng.* 33 (1989) 79–89.
- ²² W.C. Fanslow, K.A. Campbell, S.F. Wee, K.N. Clifford, C. Maliszewski, R. Hall, M. Peterson, L. Whitney, R. Kiinke, R. Armitage. Presentation at the 37th American Society of Hematology Meeting, Seattle, WA, 1995.

-
- ²³ W.C. Fanslow, L. Schuh, S.F. Wee, R. Armitage, A. Rousseau, T. Lofton, C. Maliszewski, M. Kennedy, K. Campbell. Presentation at the International Meeting of Cytokine in Bone Marrow, Sydney, Australia, 1996.
- ²⁴ C. Ko, V. Dixit, W. Shaw, G. Gitnick, *Immob. Biotech.* 23 (1995) 143–151.
- ²⁵ E.C. Downs, N.E. Robertson, T.L. Riss, M.L. Plunkett, *J. Cell. Physiol.* 152 (1992) 422–429.
- ²⁶ E.R. Edelman, E. Mathiowitz, R. Langer, M. Klagsbrun, *Biomaterials* 12 (1991) 619–626.
- ²⁷ E.R. Edelman, M.A. Nugent, M.J. Karnovsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90 (1993) 1513–1517.
- ²⁸ H. Tanaka, M. Matsumara, I.A. Veliky, *Biotechnol. Bioeng.* 26 (1984) 53–58.
- ²⁹ P. Chevalier, G.P. Consentino, J. de la Noue, S. Rakhit, *Biotechnol. Tech.* 1 (1987) 201–206.
- ³⁰ C.J. Gray, J. Dowsett, *Biotechnol. Bioeng.* 31 (1988) 607–612.
- ³¹ D. Maysinger, I. Jalsenjak, A.C. Cuello, *Neurosci. Lett.* 140 (1992) 71–74.
- ³² E.R. Edelman, E. Mathiowitz, R. Langer, M. Klagsbrun, *Biomaterials* 12 (1991) 619–626.
- ³³ T.L. Bowersock, H. HogenEsch, M. Suckow, E. Davis Synder, D. Borie, H. Park, K. Park, *Polym. Prepr. (Am. Chem. Soc., Div. Polym. Chem.)*35(II) (1994) 405–406.
- ³⁴ T.L. Bowersock, H. HogenEsch, M. Suckow, R.E. Porter, R. Jackson, K. Park, *J. Controlled. Release* 39 (1996) 209–220.
- ³⁵ S.F. Wee, W.R. Gombotz, W. Fanslow, *Proc. Int. Symp. Controlled. Release Bioact. Mater.* 22 (1995) 566–567.
- ³⁶ J. Schuh, W. Fanslow, W. Gombotz, S.F. Wee, *Vet. Pathol.* 33(5) (1996) 581.
- ³⁷ R.J. Mumper, A.S. Hoffman, P. Puolakkainen, L.S. Bouchard, W.R. Gombotz, *J. Controlled Release.* 30 (1994) 241–251.
- ³⁸ P.A. Puolakkainen, J.E. Ranchalis, W.R. Gombotz, A.S. Hoffman, R.J. Mumper, D.R. Twardzik, *Gastroenterology* 107 (1994) 1319–1326.
- ³⁹ S.F. Wee, W.R. Gombotz, *Proc. Int. Symp. J. Controlled Release Bioact. Mater.* 21 (1994) 730–731.
- ⁴⁰ W. Keehoon, K. Sangbum, K. Kwang-je, P. Hong Woo, *Process Biochem.* 40 (2005) 2149–2154.
- ⁴¹ M. Neeru, S.K. Sawhney, *Enzyme Microb. Technol.*30 (2002) 613–619.

-
- ⁴² B. J. Lee, G.H. Min., *Int. J. Pharm.* 144 (1996) 3092-3095.
- ⁴³ A. M. Sun, *Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* 33 (1987) 787-790.
- ⁴⁴ O. Smidsrod, G. Skjak-Braek, *TIBTECH* 8 (1990) 71-78.
- ⁴⁵ G. Skjak-Braek, H. Grasdalen, B. Larsen, *Carbohydr. Res.* 154 (1986) 239-250.
- ⁴⁶ I.W. Sutherland, *Biomaterials*, Stockton, New York, (1991) 309-331.
- ⁴⁷ M. George, T. Emilia Abraham, *J. Controlled Release*, 114 (2006) 1-14
- ⁴⁸ A. Haug, B. Larsen, O. Smidsrod, *Acta Chem. Scand.* 21 (1967) 691-704.
- ⁴⁹ A. Haug, B. Larsen, *Acta Chem. Scand.* 16 (1962) 1908-1918.
- ⁵⁰ O. Smidsrod, G. Skjak-Braek, *Trends Biotechnol.*, 8 (1990) 71-8.
- ⁵¹ H. Grasdalen, *Carbohydrate research.* 118 (1983) 255-260.
- ⁵² I.W. Sutherland, *Biomaterials*, Stockton, New York, (1991) 309-331.
- ⁵³ D.A. Rees, *Pure Appl. Chem.* 53 (1981) 1-14.
- ⁵⁴ O. Smidsred, *Faraday Discuss. Chem. Soc.* 57 (1974) 263-274.
- ⁵⁵ O. Smidsred, A. Haug, B. Lian, *Acta Chem. Scand.* 26 (1972), 71-78
- ⁵⁶ A.A. Badwan, A. Abumaloo, E. Sallam, A. Abukalaf, O. Jawan, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 11 (1985) 239-256.
- ⁵⁷ B. Thu, O. Gaserod, D. Paus, A. Mikkelsen, G. Skjak-Braek, R. Toffanin, F. Vittur, R. Rizzo, *Biopolymers.* 53 (2000) 60-71.
- ⁵⁸ B.T. Stokke, K.I. Draget, O. Smidsrod, Y. Yuguchi, H. Urakawa, K. Kajiwara, *Macromolecules.* 33 (2000) 1853-1863.
- ⁵⁹ A. Mikkelsen, A. Elgsaeter, *Biopolymers.* 36 (1995) 17-41.
- ⁶⁰ O. Smidsrod, *Carbohydr. Res.* 27 (1973) 107-118.
- ⁶¹ A. Martinsen, G. Skjak-Braek, O. Smidsrod, F. Zanetti, S. Paoletti, *Carbohydr. Polym.* 15 (1991) 171-193.
- ⁶² V.J. Chapman, D. J. Chapman, *Seaweeds and their Uses*, Chapman and Hall, New York. (1980) Chapter 6.
- ⁶³ P. Gacesa, *Carbohydr. Polym.* 8 (1988) 161-182.
- ⁶⁴ I.L. Andresen, O. Skipnes, O. Smidsrod, K. Ostgaard, P.C.Hemmer, *ACS Symp. Ser.* 48 (1977) 361-381.
- ⁶⁵ C.K. Kim, E.J. Lee, *Int. J. Pharm.* 79 (1992) 11-19.
- ⁶⁶ T. Yotsuyanagi, T. Ohkubo, T. Ohhashi, K. Ikeda, *Chem. Pharm. Bull.* 35 (1987) 1555-1563.
- ⁶⁷ S. Sugawara, T. Imai, M. Otagiri, *Pharm. Res.* 11 (1994) 272-277.

-
- ⁶⁸ S.C. Chen, Y.C. Wu, F.L. Mi, Y.H. Lin, L.C. Yu, H.W. Sung, *J. Controlled Release*. 96 (2004) 285-300.
- ⁶⁹ D.E. Chickering, E. Mathiowitz, *J. Controlled Release*. 34 (1995) 251–261.
- ⁷⁰ H. Chang, H. Park, P. Kelly, J. Robinson, *J. Pharm. Sci.* 74 (1985) 399–405.
- ⁷¹ K.K. Kwok, M.J. Groves, D.J. Burgess, *Proc. Int. Symp. Control. Release Bioact. Mater.* 16 (1989) 170–171.
- ⁷² K.K. Kwok, M.J. Groves, D.J. Burgess, *Pharm. Res.* 8 (1991) 341–344.
- ⁷³ W.R. Gombotz, S, F. Wee, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 31 (1998) 267-285.
- ⁷⁴ P. Liu, T.R. Krishnan, *J. Pharm. Pharmacol.* 51 (1999) 141-149.
- ⁷⁵ M.L. Torre, P. Giunchedi, L. Maggi, R. Stefli, E. Ochoa, Machiste, U. Conte, *Pharm. Technol.* 3 (1998) 193-198.
- ⁷⁶ A.B. Schnurch, C.E. Kast, M.F. Richter, *J. Controlled Release*. 71 (2001) 277-285.
- ⁷⁷ A.D. Sezer, J.Akbuga, *J. Microencapsul.* 16 (1999)195-203.
- ⁷⁸ R. Bodmeier, J. Wang, *J. Pharm. Sci.* 82 (1993) 191-194.
- ⁷⁹ P. R. Hari, T. Chandy, C.P. Sharma, *J.Appl. Polym.. Sci.* 59 (1996) 1795-1801.
- ⁸⁰ M.L. Huguet, A. Groillot, R.J. Neufeld, D. Poncelet, E. Dellacherie, *J. Appl. Polym. Sci.*51 (1994)1427-1432
- ⁸¹ F.L. Mi, H.W. Sung, S.S. Shyu, *Carbohydr. Polym.* 48 (2002) 61-72.
- ⁸² M. Ramadas, W. Paul, K.J. Dileep, Y.Anitha. C.P. Sharma, *J. Microencapsul.* 17 (2000) 405-411.
- ⁸³ G.W. Vandenberg, J. De La Noue, *J. Microencapsul.* 18 (2001) 433-441.
- ⁸⁴ M. A. Wheatley, M. Chang, E.Park, R. Langer, *J.Appl. Polym. Sci.* 43 (1991) 2123-2135.
- ⁸⁵ N. Culpeper, (1692) *The English Physician*, London
- ⁸⁶ G.R. Fenwick, A.C. Hanley, C. R. C. *Crit.Rev. Food Sci.Nutr*: 22: 199-27 1,273-377.
- ⁸⁷ M.J. Murry, (1995) *The healing power of herbs*. 2nd Ed. Prima Publishing.Rocklin, CA.
- ⁸⁸ L.D. Lawson, In: *Human medicinal agents from plants*. (1993a) 306-330. ACS, Washington, DC.
- ⁸⁹ L.D. Lawson, In: *Garlic: the science and therapeutic application of Allium sativum L. and related species* (Koch, H.P. & Lawson, L.D.,eds.), Williams & Wilkins, Baltimore, MD. (1996) 37-107
- ⁹⁰ E.J.M. Van Damme, I.J. Goldstein, W.J. Peumans, *Phytochemistry.* 30 (1991) 509-514
- ⁹¹ A. Rabinkov, M. Wilchek, D.Mirelman, *Glycoconjugate J.* 12 (1995) 690-698.

-
- ⁹² P.I. Yutsis, Wonderful "Stinking Rose". New Editions Health World. Mar/Apr (1994).
- ⁹³ L.D. Lawson, In: *Phytomedicines of Europe: their chemistry and biological activity* (Lawson, L.D. & Bauer, R., eds.), American Chemical Society, (1998a) 176-209, Washington, DC.
- ⁹⁴ L.D. Lawson, Human medical agents from plants. (1993) 306-330. ACS, Washington, DC.
- ⁹⁵ H.D. Reuter, A. Sendl, *Econ.Med.Plant.* 6 (1994) 56- 113.
- ⁹⁶ I. Han, L. Lawson, G. Han, P. Han, *Anal.Biochem.* 225 (1995) 157-160.
- ⁹⁷ J. Kleijnen, P. Knipschild, G. Riet, *Br.J. Clin. Pharmacol.* 28 (1989) 535-544.
- ⁹⁸ H.D. Reuter, H.P. Koch, L.D. Lawson, (1996) (Koch, HP. & Lawson, LD.) 135-212. Williams & Wilkins, Baltimore, MD
- ⁹⁹ A.J. Adler, B.J. Holub, *Am. J. Clin.nutr.* 65 (1997) 445-450.
- ¹⁰⁰ S. Warshafsky, RS Kamer, S.L Sivak, *Ann-Intern.Med.* 119 (1993) 599-605.
- ¹⁰¹ C. Silagy, A. Neil, J.R. Coll Physicians. *Lond.* 28 (1994) 3 9-45.
- ¹⁰² R Gebhardt, H. Beck, KG. Wagner, *Biochim.Biophys.Acta.* 12 13 (1994) 57-62.
- ¹⁰³ I. Das, N.S. Khan, SR. Sooranna, *Biochem.Soc. T'rans.* 23 (1995) 136s
- ¹⁰⁴ L.D. Lawson, D.K. Ransom, B.G. Hughes, *Thromb.Res.* 65(1992) 141-1 56.
- ¹⁰⁵ M.Ali, T. Bordia, T.Mustafa, *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 60 (1999) 143-47.
- ¹⁰⁶ A.N. Makheja, J.M. Bailey, *Agents Actions* 29 (1990) 360-363.
- ¹⁰⁷ D.L. Venton, S.O Kim, Le G.C. Breton, *Econ. Med Plant Res* 5 (1991) 323-351
- ¹⁰⁸ KC. Srivastava, OD. Tyagi, *Prostagladins-Leukot. Essent.Fatty Acids.* 49 (1993) 587-595.
- ¹⁰⁹ R Apitz-Castro, J.J Badimon., L Badimon, *Thromb.Res.* 68 (1992) 145-155
- ¹¹⁰ H.E. Batirel, S. Aktan, C. Aykut, B.C. Yegen, T. Coskun, *Prostaglandins Leukot.Essent.Fatty Acids.* 54 (1996) 289-292.
- ¹¹¹ X. Mei, M.C. Wang, K.X. Xu, X.I. Pan, C.Y. Gao, N. Han, M.Y. Fu, *Acta.Nutr.Sinica*, 4 (1982) 53-58.
- ¹¹² K.A Steinmetz, L.H. Kushi, R.M. Bostick, AR. Folsom, JD. Potter, *Am.J. Epidmiol.* 139 (1994) 1-15.
- ¹¹³ J.A Milner, *Nutr.Rev.* 54 (1996) 82-86
- ¹¹⁴ L.D. Lawson, (1998b) *Quartedy Rev. Nat. Med.* Fall: 188- 189.
- ¹¹⁵ D.S. Antlsperger, V.M. Dirsch, D. Ferreira, J.L. Su, M.L Kuo, A.M. Vollmar, *Oncogene.* 22 (2003) 582-589.

-
- ¹¹⁶ V.M. Dirsch, A.L. Gerbes, A.M. Vollmar, *Mol. Pharmacol.* 53 (1998a) 402-407.
- ¹¹⁷ Y. Dong, D. Lisk, E. Block, C. Ip, *Cancer Res.* 61 (2001) 2923-2928.
- ¹¹⁸ V. Robert, B. Mouille, C. Mayeur, M. Michaud, F. Blachier, *Carcinogenesis.* 22 (2001) 1155-1161.
- ¹¹⁹ M.G. Johnson, R.H. Vaughn, *Appl. Microbiol.* 17 (1969) 903 – 905.
- ¹²⁰ A.J. Mantis, P.G. Karaioannoglou, G.P. Spanos *Lebensm. Wiss. Technol.* 11 (1978) 26–28.
- ¹²¹ U.P. Singh, B. Prithiviraj, B.K. Sarma, M. Singh A.B. Ray, *Indian Journal of Experimental Biology.* 39 (2001) 310 – 322.
- ¹²² Y. Uchida, T. Takahashi, N. Sato, *J. Antibiotics* 28 (1975) 638-642.
- ¹²³ L. Cellini, E. Di Campli, M. Masulli, S. Di Bartolomeo, N. Allocati *FEMS Immunol Med Microbiol.* 13 (4) (1996) 273 – 277.
- ¹²⁴ M.A. Adetumbi, BH Lau, *Med Hypothesis.* 12 (1983) 227-37.
- ¹²⁵ G.S Moore, R.D. Atkins *Mycologia.* 69 (1977) 341-8.
- ¹²⁶ D.K Sandhu, M.K Warraich S Singh, *Mykosen* 23 (1980) 691-8.
- ¹²⁷ G Prasad, V.D Sharma, *Br Vet J* 136 (1980) 448-51.
- ¹²⁸ Human Hospital, *Chinese Med J.* 93 (1980) 123-6.
- ¹²⁹ M. Amer, M. Taha, Z. Tosson *Int. J. Dermatol.* 19 (1980) 285-7.
- ¹³⁰ R. Fromtling G. Bulmer *Mycologia.* 70 (1978) 397-405.
- ¹³¹ LD. Lawson. Z.J Wan, B.G. Hughes, *Med.* 57 (1991) 363-370.
- ¹³² E.B. Kuettner, Hilgenfeld, M.S.Weiss, *J. Biol. Chem.* 277, 48, (2002) 46402 – 46407.
- ¹³³ G.S Ellmore, R.S. Feldberg, *Am. J. Bot.* 81 (1994) 89-94.
- ¹³⁴ H. Jansen, B. Muller, K. Knobloch, *Planta Med.*, 55 (1989a) 434 – 439.
- ¹³⁵ G. Schneider, H. Kack, Y. Lindqvist, *Structure Fold. Des.* 8 (2000)
- ¹³⁶ A. Rabinkov, Z.X. Zhu, X. Grafi, G. Galili, D. Mirelman, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 48 (1994) 149 – 171.
- ¹³⁷ E.J.M. Van Damme, K. Smeets, S. Torrekens, F Van Leuven., W.J. Perumans, *Eur. J. Biochem.* 209 (1992) 751 – 757.
- ¹³⁸ A. Rabinkov, M. Wilchek, D. Mirelman *Glycoconjugate J.* 12 (1995) 690 – 698.
- ¹³⁹ W.J. Peumans, K. Smeets, K. Van Nerum, F. Van Leuven, E.J.M Van Damme. *Planta Med.* 201 (1997) 298 –302.
- ¹⁴⁰ I.D. Campbell, P. Bork, *Curr. Op. Struct. Biol.* 3 (1993) 385-392

-
- ¹⁴¹ G.S. Ellmore, R.S. Feldberg, *Am. J. Bot.* 81 (1994) 89-94
- ¹⁴² M.M Bradford, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248.
- ¹⁴³ L.P. Nock, M. Mazelis, *Arch. Biochem. Biophys.* 249 (1986) 27 – 33.
- ¹⁴⁴ T. Miron, A. Rabinkov, D. Mirelman, L. Weiner, M. Wilchek, *Anal. Biochem.* 265(1998) 317 – 325.
- ¹⁴⁵ Y. Degani, A. Patchornik, *J. Org. Chem.* 36 (1971) 2727 – 2728.
- ¹⁴⁶ S. Miyata, *Clays Clay Miner.* 23 (1975) 369.
- ¹⁴⁷ W. Reiche, *Solid State Ionics.* 22 (1986) 135
- ¹⁴⁸ J. Olanrewaju, B.L. Newalkar, C. Mancino, S. Komarneni, *J. Mater. Lett.* 45 (2000) 307.
- ¹⁴⁹ A. Vaccari, *Appl. Clay Sci.* 10 (1995) 1.
- ¹⁵⁰ R.K. Kukkadapu, M.S. Witkowski, J.E. Amonette, *J. Mater. Chem.* 9 (1997) 417.
- ¹⁵¹ W.W. Kagunya, *J. Phys. Chem.* 100 (1996) 327.
- ¹⁵² G.D. Moggridge, P. Parent and G. Tourillon, *Clays Clay Miner.* 42 (1994) 462.
- ¹⁵³ M. Vucelic, W. Jones, G.D. Moggridge, *Clays Clay Miner.*, in the press
- ¹⁵⁴ L. Raki, D.G. Rancourt, C. Detellier, *J. Mater. Chem.* 7 (1995) 221.
- ¹⁵⁵ G.T.D. Shouldice, P.Y. Choi, B.E. Koene, L.F. Nazar, A. Rudin *J. Polym. Sci., Part A: Polym. Chem.* 33 (1995) 1409.
- ¹⁵⁶ L. Ukrainczyk, M. Chibwe, T.J. Pinnavaia and S.A. Boyd, *J. Phys. Chem.* 98 (1994) 2668.
- ¹⁵⁷ M. Ogawa, H. Kaiho, *Langmuir* 18 (2002) 4240
- ¹⁵⁸ Y. Zhao, F. Li, R. Zhang, D. Enans, X. Duan, *J. Mater. Chem.* 14 (2002) 4286
- ¹⁵⁹ Z.P. Xu, P.S. Braterman, 2004, Inc., New York, pp. 3387 – 3398.
- ¹⁶⁰ P.S. Braterman, Z.P. Xu, F. Yarberry, In *Handbook of Layered Materials*, Marcel Dekker, Inc. (2003) New York.
- ¹⁶¹ S. Carlino, *Solid State Ionics.* 987 (1997) 73
- ¹⁶² F. Cavani, F. Trifiro, Vaccaria., *Catalysis Today*, 11 (1991) 173
- ¹⁶³ M. Hussein, Z.B. Zainal, Yahaya *J. Controlled Release.* 82 (2002) 417.
- ¹⁶⁴ N.T. Whilton, P.J. Vickers, S. Mann, *J. Mater. Chem.* 7 (1997) 1623
- ¹⁶⁵ Impact Analytical 2004, Thermogravimetric Analysis [Online] Available at: <http://www.impactanalytical.com/tga.html> viewed on 21st April 2004

-
- ¹⁶⁶ Institut de Physique et Chimie des Matériaux de Strasbourg 2004, Electronic Microscopy[Online]Availableat:http://www.ipcms.ustrasbg.fr/competences/framescompuk.html?precrana=/competences/microscopie_electronique/mic_elec-uk.html
- ¹⁶⁷ M. Meyn, K. Beneke and G. Lagaly, *Inorg. Chem.* 29 (1990) 5210.
- ¹⁶⁸ A. Ookubo, K. Ooi and H. Hayashi, *Langmuir*. 9 (1993) 1418.
- ¹⁶⁹ H. Nakayama, N. Wada and M. Tsuchioka, *Int. J. Pharm.* 269 (2004) 469.
- ¹⁷⁰ S. Wang, S. Vasudhavan and R.A. Vaia, *J. Amer. Chem. Soc.* 117 (1995) 7568.
- ¹⁷¹ J.H. Choy, S. Y. Kwak, J.S. Park and Y. J. Jeong, *J. Mater. Chem.* (2001) 1671.
- ¹⁷² F. Leroux and J. P. Besse, *J. Mater. Chem.* 13 (2001) 3507
- ¹⁷³ T. Kwon, G. A. Tsigdinos and T. J. Pinnavaia, *J. Am. Chem. Soc.* 110 (1988) 3653.
- ¹⁷⁴ E. Suzuki, M. Okamoto and Y. Ono, *J. Chem. Lett.*, (1989) 1485.
- ¹⁷⁵ O. Clause, B. Rebours, E. Merlen, F. Triro and A. Vaccari, *J. Catal.* 133 (1991) 231.
- ¹⁷⁶ B. Hourri, A. Legrouri, A. Barroug, C. Forano J.P. Besse, *J. Chem. Phys.* 96 (1999) 455.
- ¹⁷⁷ P.B. Messersmith and S.I. Stupp, *J. Mater. Res.*, 7 (1992) 2599
- ¹⁷⁸ P.B. Messersmith and S.I. Stupp, *J. Mater. Chem.* 7 (1995) 454.
- ¹⁷⁹ A. Wettasinghe, MSc Thesis, Oregon State University, USA, 1992.
- ¹⁸⁰ N.T.L. Tortensson, J. Stark and B. Goransson, *Research*, 15 (1975) 159.
- ¹⁸¹ R.G. Wilson and H.H. Cheng, *J. Environ. Qual.* 7 (1978), 281.
- ¹⁸² T.J. Pinnavaia, M. Chibwe, V.R.L. Constantino, S. Yun, K., *Appl. Clay Sci.* 10 (1995) 117.
- ¹⁸³ F.,M.,P.,R. Van Laar, D.,E. De Vos, F. Pierard, A. Kirsch-De Mesmaeker, L. Fiermans, P.A. Jacobs, *J. Catal.* 197 (2001) 139.
- ¹⁸⁴ M.A. Drezdon, *Inorg. Chem.* 27 (1988), 4628.
- ¹⁸⁵ G. Kantonis, M. Trikeriotis, D. Ghanotakis, *J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry* 185 (2007) 62-66.
- ¹⁸⁶ M. Chibwe, L. Ukrainczyk, S.A. Boyd, T.J. Pinnavaia, *Inorg. Chem.* 249(1996) 113.
- ¹⁸⁷ D.,S. Robins, P.,K. Dutta, *Langmuir*, 12 (1996) 402.
- ¹⁸⁸ Z. Tong, T. Shichi, K. Takagi *J. Mater. Sci. Lett.* 57 (2003) 2258.
- ¹⁸⁹ L. Ren, J. He, S. Zhang, D.G. Evans, X. Duan, *J. Mol. Catal. B: Enzym.* 18 (2002) 3.
- ¹⁹⁰ J.H. Choy, S.Y. Kwak, J.,S. Park, Y.J. Jeong, J. Portier, *J. Am. Chem. Soc.* 121 (1999) 1399.
- ¹⁹¹ S.,Y. Kwak, Y.,J. Jeong, J.,S. Park, J. H Choy, *Solid State Ionics.* 151 (2002) 229.

¹⁹² M. Trikeriotis, D. Ghanotakis, *Int. J. Pharm.* 332 (2007) 176-184.