

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



## Πτυχιακή εργασία

UV/Vis ΚΑΙ FTIR ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ  
ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ  
ΤΗΣ ΛΙΓΝΙΝΗΣ

Μαρία Αντωνίου

Λεμεσός 2013



ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΥΠΡΟΥ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΗΣ ΒΙΟΧΗΜΕΙΑΣ ΚΑΙ  
ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ

## **Πτυχιακή εργασία**

UV/Vis ΚΑΙ FTIR ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ  
ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ  
ΤΗΣ ΛΙΓΝΙΝΗΣ

Μαρία Αντωνίου

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝΤΕΣ

Δρ. Κωνσταντίνος Βαρώτσης

Δρ. Κωνσταντίνος Κουτσοπάκης

Λεμεσός 2013

## **Πνευματικά δικαιώματα**

Copyright © Μαρία Αντωνίου, [2013]

Με επιφύλαξη παντός δικαιώματος. All rights reserved.

Η έγκριση της πτυχιακής εργασίας από το Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Περιβάλλοντος του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου δεν υποδηλώνει απαραίτητως και αποδοχή των απόψεων του συγγραφέα εκ μέρους του Τμήματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον Δρ. Κωνσταντίνο Κουτσουπάκη, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε δίνοντας μου την δυνατότητα να εκπονήσω την πτυχιακή μου εργασία στον επιστημονικό τομέα που επιθυμούσα. Τον ευχαριστώ θερμά για την καθοδήγηση, την υποστήριξη, τις γνώσεις που μου παρείχε αλλά και το αμείωτο ενδιαφέρον καθ' όλη την διάρκεια διεκπεραίωσης της παρούσας πτυχιακής μελέτης.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Κωνσταντίνο Βαρώτση για την παροχή των εργαστηρίων Περιβαλλοντικής Βιοχημείας και Βιοτεχνολογίας όπου εκπονήθηκε η πτυχιακή μου εργασία, αλλά και την πολύτιμη στηριξή του καθώς ακόμη και την συμβολή του στην καλύτερη διεκπεραίωση της.

## ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	iv
ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ .....	vi
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ .....	ix
ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ .....	x
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ .....	xiv
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 .....	1
ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ (Hb) .....	1
1.1 Εισαγωγή.....	1
1.2 Δομή και λειτουργία της Hb .....	2
1.3 Βιβλιογραφία.....	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 .....	6
ΥΠΕΙΡΟΞΕΙΔΑΣΗ ΤΗΣ ΛΙΓΝΙΝΗΣ (LiP).....	6
2.1 Εισαγωγή.....	6
2.2 Ο ρόλος της υπεροξειδάσης στην βιοσύνθεση της λιγνίνης.....	7
2.3 Καταλυτικός κύκλος της LiP .....	8
2.4 Δομή υπεροξειδασών .....	8
2.5 Δομή της LiP.....	9
2.6 Ενεργό κέντρο της LiP.....	10
2.7 Βιβλιογραφία.....	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 .....	12
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΟΡΑΤΟΥ- ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ (UV/Vis) .....	12
3.1 Εισαγωγή.....	12
3.2 Μεταβάσεις σε ενεργειακά επίπεδα .....	12

3.2.1 Η ενέργεια των ηλεκτρονίων σε ηλεκτρονικές μεταβάσεις .....	13
3.3 Νόμος των Beer –Lambert .....	14
3.3.1 Ανάλυση της εξίσωσης Beer- Lambert .....	15
3.4 Αρχή λειτουργίας φασματοφωτόμετρου ορατού- υπεριώδες .....	16
3.5 Βιβλιογραφία.....	17
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 .....	18
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ-INFRARED SPECTROSCOPY (IR).....	18
4.1 Εισαγωγή.....	18
4.2 Αρχές φασματοσκοπίας Υπερύθρου (IR) .....	19
4.3 Αρχή λειτουργίας φασματοφωτόμετρου Υπερύθρου .....	22
4.4 Βιβλιογραφία.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 .....	24
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΟΡΑΤΟΥ – ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ (UV/Vis) ΤΗΣ	
ΑΙΜΟΣΦΑΡΙΝΗΣ (Hb) .....	24
5.1 Εισαγωγή-Στόχος .....	24
5.2 Υποκαταστάτες .....	24
5.2.1 Νατραζίδιο ( $\text{NaN}_3$ ) και αζίδιο ( $\text{N}_3^-$ ) .....	24
5.2.2 Κυάνιο ( $\text{CN}^-$ ) .....	25
5.2.3 Μονοξείδιο του άνθρακα (CO) .....	26
5.3 Πειραματική Διαδικασία.....	27
5.4 Αποτελέσματα της δέσμευσης του αζιδίου ( $\text{N}_3^-$ ) στην αιμοσφαιρίνη .....	29
5.5 Βιβλιογραφία.....	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6 .....	34
ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΟΡΑΤΟΥ – ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ (UV/Vis) ΤΗΣ	
ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΗΣ ΛΙΓΝΙΝΗΣ (LiP).....	34
6.1 Εισαγωγή-Στόχος .....	34
6.2 Πειραματική διαδικασία.....	35

6.3 Αποτελέσματα της δέσμευσης των υποκαταστατών στην υπεροξειδάση της λιγνίνης .....	36
6.4 Συμπεράσματα-Μελλοντικοί Στόχοι.....	43
6.5 Βιβλιογραφία.....	43
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7 .....	45
FTIR ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΗΣ ΛΙΓΝΙΝΗΣ (LiP) ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ (Hb).....	45
7.1 Εισαγωγή – Στόχος .....	45
7.2 Πειραματική διαδικασία.....	46
7.3 Αποτελέσματα της δέσμευσης της λιγνίνης υπεροξειδάσης με το αέριο μονοξείδιο του άνθρακα .....	46
7.4 Αποτελέσματα της δέσμευσης της αιμοσφαιρίνης με το αέριο μονοξείδιο του άνθρακα και το ανιόν αζιδίου .....	48
7.6 Συμπεράσματα-Μελλοντικοί Στόχοι.....	50
7.7 Βιβλιογραφία.....	51



## **ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ**

Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά του νατραζιδίου ( $\text{NaN}_3$ ).....	25
---	----

## ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Εικόνα 1.1: Απεικονίζεται η θέση του σιδήρου στην αίμη .....	2
Εικόνα 1.2: Απεικονίζεται η δακτυλοειδής χημική δομή της αίμης, στην οποία παρέχεται ένα άτομο σιδήρου που φέρεται δεσμευμένο ως μία προσθετική ομάδα σε κάθε αλυσίδα πολυπεπτιδίου .....	3
Εικόνα 1.3: Στα δεξιά απεικονίζεται η δομή της αιμοσφαιρίνης (Hb) σε X-ray κρυσταλλική δομή υπό μορφή cartoon ενώ στα αριστερά η δομή της Hb υπό την μορφή ball and stick .....	4
Εικόνα 2.1: Οι τρεις πρόδρομες ενώσεις που συνθέτουν το μόριο της λιγνίνης.....	7
Εικόνα 2.2: Στα αριστερά απεικονίζεται η δομή της υπεροξειδάσης της λιγνίνης υπό μορφή ball and stick ενώ στα δεξιά η συνολική δομή της LiP υπό μορφή cartoon.....	9
Εικόνα 2.3: Δομή του ενεργού κέντρου της LiP.....	10
Εικόνα 3.1: Απεικονίζεται η ενέργεια των μορίων στις ηλεκτρονικές και δονητικές μεταβάσεις.....	13
Εικόνα 3.2: Απεικονίζεται γραφικά η σχέση του νόμου του Beer, που δεν ισχύει για τιμές απορρόφησης ( $A$ ) μεγαλύτερες του 2.0-2.5. Παρατηρούμε, ότι σε σχετικά μεγάλες συγκεντρώσεις ή πυκνότητες όπου η ( $A$ ) είναι μεγαλύτερη του 2.5 η σχέση δεν είναι γραμμική, λόγω ιξώδους ή λόγω πυκνότητας.....	14
Εικόνα 3.3: Διεργασία της απορρόφησης και μεταβολή της έντασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ( $I_0$ ) μετά από διέλευση από δείγμα πάχους $l$ και συγκέντρωσης $C$ .....	15
Εικόνα 3.4: Σχηματική απεικόνιση της δομής ενός φασματοφωτομέτρου και της αρχής λειτουργίας του.....	17
Εικόνα 4.1: Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα.....	18
Εικόνα 4.2: Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα στο οποίο απεικονίζεται η περιοχή όπου συμβαίνουν οι βασικές μοριακές διαδικασίες (ηλεκτρονικές διεγέρσεις, δονητικές και περιστροφικές).....	19
Εικόνα 4.3: Απεικονίζεται η απορρόφηση του φωτονίου στην υπέρυθη ακτινοβολία όταν	

η ενέργεια του είναι ίση με την ενεργειακή διαφορά των δύο δονητικών καταστάσεων.....	20
Εικόνα 4.4: Οι κυριότεροι τρόποι κάμψης και έκτασης ενός μορίου.....	21
Εικόνα 4.5: Φασματοφωτόμετρο υπερύθρου (IR).....	23
Εικόνα 5.1: Αριστερά απεικονίζεται η ηλεκτροδιακή δομή του αζιδίου ( $N_3^-$ ) και δεξιά η αντίστοιχη της πρωτονιωμένης του μορφής, υδραζίνης ( $HN_3$ ).....	25
Εικόνα 5.2: Η ηλεκτρονιακή δομή του ιόντος του κυανίου.....	26
Εικόνα 5.3: Δομές συντονισμού του μορίου του μονοξειδίου του άνθρακα.....	26
Γράφημα 1: Στα αριστερά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του συμπλόκου Hb- $N_3$ στην οξειδωμένη μορφή της Hb σε pH 7.0 και συγκέντρωση $C_{Hb} = 5 \mu M$ σε αναλογία Hb- $N_3$ ίση με 1:1, στα δεξιά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του ίδιου συμπλόκου με αναλογία Hb- $N_3$ ίση με 1:3.....	29
Γράφημα 2: Στα αριστερά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του συμπλόκου Hb- $N_3$ στην οξειδωμένη μορφή της Hb σε pH 7.0 και συγκέντρωση $C_{Hb} = 5 \mu M$ σε αναλογία Hb- $N_3$ ίση με 1:5, στα δεξιά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του ίδιου συμπλόκου με αναλογία Hb- $N_3$ ίση με 1:10.....	29
Γράφημα 3: Στα αριστερά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του συμπλόκου Hb- $N_3$ στην οξειδωμένη μορφή της Hb σε pH 7.0 και συγκέντρωση $C_{Hb} = 5 \mu M$ σε αναλογία Hb- $N_3$ ίση με 1:50, στα δεξιά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του ίδιου συμπλόκου με αναλογία Hb- $N_3$ ίση με 2:1.....	30
Γράφημα 4: Στα αριστερά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του συμπλόκου Hb- $N_3$ στην οξειδωμένη μορφή της Hb σε pH 9.0 και συγκέντρωση $C_{Hb} = 4.8 \mu M$ σε αναλογία Hb- $N_3$ ίση με 1:1, στα δεξιά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του ίδιου συμπλόκου με αναλογία Hb- $N_3$ ίση με 1:3.....	30
Γράφημα 5: Στα αριστερά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του συμπλόκου Hb- $N_3$ στην οξειδωμένη μορφή της Hb σε pH 9.0 και συγκέντρωση $C_{Hb} = 4.8 \mu M$ σε αναλογία Hb- $N_3$ ίση με 1:5, στα δεξιά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του ίδιου συμπλόκου με αναλογία Hb- $N_3$ ίση με 1:10.....	31
Γράφημα 6: Στα αριστερά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του συμπλόκου Hb- $N_3$ στην οξειδωμένη μορφή της Hb σε pH 9.0 και συγκέντρωση $C_{Hb} = 4.8 \mu M$ σε αναλογία Hb- $N_3$ ίση με 1:20, στα δεξιά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του ίδιου συμπλόκου με αναλογία Hb- $N_3$ ίση με 1:50.....	31
Γράφημα 7: Στα αριστερά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του συμπλόκου Hb- $N_3$ στην οξειδωμένη μορφή της Hb σε pH 5.0 και συγκέντρωση $C_{Hb} = 5 \mu M$ σε αναλογία Hb- $N_3$ ίση	

με 1:1, στα δεξιά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του ίδιου συμπλόκου με αναλογία Hb-N <sub>3</sub> ίση με 1:3.....	31
Γράφημα 8: Στα αριστερά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του συμπλόκου Hb-N <sub>3</sub> στην οξειδωμένη μορφή της Hb σε pH 5.0 και συγκέντρωση C <sub>Hb</sub> = 5 μM σε αναλογία Hb-N <sub>3</sub> ίση με 1:10, στα δεξιά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του ίδιου συμπλόκου με αναλογία Hb-N <sub>3</sub> ίση με 2:1.....	32
Γράφημα 9: Φάσμα διαφοράς βάση την θερμοκρασία σε pH 7.0.....	33
Γράφημα 10: UV/Vis Απόλυτο φάσμα της Υπεροξειδάσης της Λιγνίνης (LiP) σε pH 7.5.....	36
Γράφημα 11: Φάσμα διαφοράς του συμπλόκου LiP – CO στην ανηγμένη μορφή της LiP σε pH 7.5 και συγκέντρωση C <sub>LiP</sub> = 10 μM.....	37
Γράφημα 12: Φάσμα διαφοράς του συμπλόκου LiP – CO στην ανηγμένη μορφή της LiP σε pH 9.0 και συγκέντρωση C <sub>LiP</sub> = 10 μM.....	37
Γράφημα 13: Φάσμα διαφοράς του συμπλόκου LiP – CO στην ανηγμένη μορφή της LiP σε pH 5.5 και συγκέντρωση C <sub>LiP</sub> = 10 μM.....	38
Γράφημα 14: Φάσμα διαφοράς του συμπλόκου LiP – N <sub>3</sub> στην ανηγμένη μορφή της LiP σε pH 5.5 με συγκέντρωση C <sub>LiP</sub> = 10 μM και συγκέντρωση C <sub>N<sub>3</sub></sub> = 50 μM.....	39
Γράφημα 15: Φάσμα διαφοράς του συμπλόκου LiP – N <sub>3</sub> στην ανηγμένη μορφή της LiP σε pH 9.0 με συγκέντρωση C <sub>LiP</sub> = 10 μM και συγκέντρωση C <sub>N<sub>3</sub></sub> = 50 μM.....	39
Γράφημα 16: Φάσμα διαφοράς του συμπλόκου LiP – CN στην ανηγμένη μορφή της LiP σε pH 5.5 με συγκέντρωση C <sub>LiP</sub> = 10 μM και συγκέντρωση C <sub>CN<sup>-</sup></sub> = 50 μM.....	40
Γράφημα 17: Φάσμα διαφοράς του συμπλόκου LiP – CN στην ανηγμένη μορφή της LiP σε pH 9.0 με συγκέντρωση C <sub>LiP</sub> = 10 μM και συγκέντρωση C <sub>CN<sup>-</sup></sub> = 50 μM.....	40
Γράφημα 18: Φάσμα διαφοράς του συμπλόκου LiP – O <sub>2</sub> στην ανηγμένη μορφή της LiP σε pH 7.5 με συγκέντρωση C <sub>LiP</sub> = 10 .....	41
Γράφημα 19: Κινητική του συμπλόκου LiP-CO.....	42
Γράφημα 20: Κινητική του συμπλόκου LiP-CO.....	42
Γράφημα 21: Υπέρυθρο φάσμα του συμπλόκου LiP – CO σε pH 7.3 με συγκέντρωση C <sub>LiP</sub> = 10 μM και laser c.w 447 nm με ισχύ 40 mW.....	46
Γράφημα 22: Υπέρυθρο φάσμα του συμπλόκου LiP – CO σε pH 4.9 με συγκέντρωση C <sub>LiP</sub> = 1 mM και laser c.w 447 nm με ισχύς 40 mW.....	47

Γράφημα 23: Υπέρυθρο φάσμα του ελεύθερου $N_3$ .....	48
Γράφημα 24: Υπέρυθρο φάσμα του συμπλόκου $Hb - N_3$ .....	49
Γράφημα 25: Υπέρυθρο φάσμα του συμπλόκου $Hb - CO$ .....	50

## **ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ**

LiP: Peroxidase Lignini: Υπεροξειδάση της Λιγνίνης

Hb: Hemoglobin: Αιμοσφαιρίνη

UV/Vis: Spectroscopy UV/Vis: Φασματοσκοπία Ορατού – Υπεριώδους

FTIR: Infrared spectroscopy: Φασματοσκοπία Υπερύθρου

c.w laser: Συνεχές laser



# ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

## ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗ (Hb)

### 1.1 Εισαγωγή

Οι πρωτεΐνες είναι μακρομόρια τα οποία αποτελούνται από αλυσίδες αμινοξέων σε συγκεκριμένη αλληλουχία και διαμορφώνονται σε πρωτοταγή, δευτεροταγή, τριτοταγή και τεταρτοταγή δομή. Οι αλυσίδες αυτές αναδιπλώνονται σε συγκεκριμένες δομές και σχηματίζουν τα μόρια των πρωτεϊνών. Οι πρωτεΐνες μπορούν να εξυπηρετήσουν βασικές λειτουργίες σε βιολογικές διεργασίες, μπορούν και λειτουργούν ως καταλύτες αλλά και ως μεταφορείς και αποθηκευτές άλλων μορίων. Έτσι τα μακρομόρια αυτά έχουν σημαντικές ιδιότητες για να μπορούν να συμμετέχουν στις βιολογικές διεργασίες και να λαμβάνουν μέρος σε ένα φάσμα λειτουργιών.

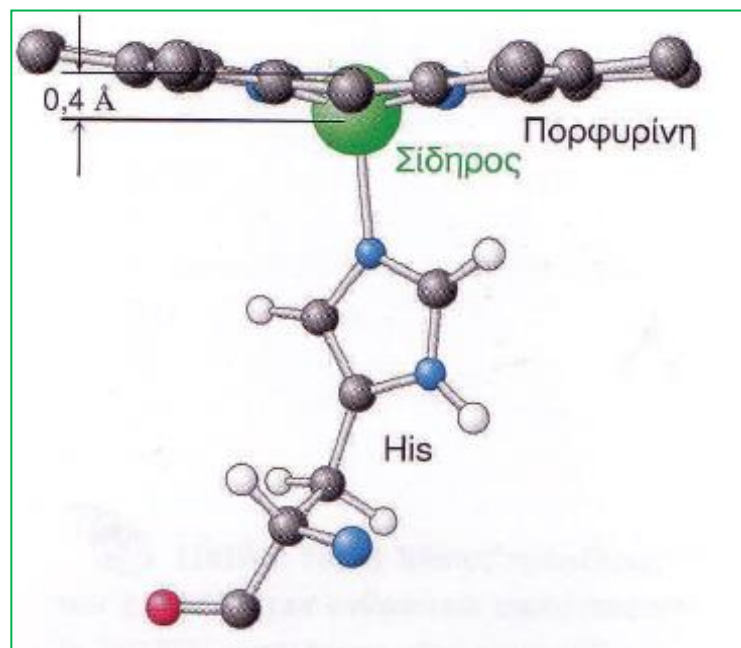
Οι σημαντικότερες ιδιότητες των πρωτεϊνών είναι αρχικά ότι είναι γραμμικά πολυμερή δομημένα από ένα περιορισμένο αριθμό μονομερών αμινοξέων. Έτσι η λειτουργία τους εξαρτάται από την τρισδιάστατη δομή τους, η οποία αναδιπλώνεται αυτόματα και καθορίζεται από την αλληλουχία των αμινοξέων του πρωτεϊνικού πολυμερούς. Οι πρωτεΐνες περιέχουν μια μεγάλη σειρά λειτουργικών ομάδων όπως είναι οι αλκοόλες, οι θειόλες, οι θειοαιθέρες και οι καρβοξυλικές ομάδες και άλλες βασικές ομάδες, οι οποίες όταν συνδυάζονται δίνουν ένα ευρύ φάσμα λειτουργιών. Επίσης οι πρωτεΐνες μπορούν να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους και με άλλα βιολογικά μακρομόρια για να δημιουργήσουν πολύπλοκα συσσωματώματα (Τα συσσωματώματα είναι μακρομοριακές μηχανές που μπορούν να αντιγράφουν το DNA, να μεταγάγουν σήμα μέσα στο κύτταρο αλλά και άλλες απαραίτητες διεργασίες). Στα συσσωματώματα αυτά οι πρωτεΐνες μπορούν να δρουν συνεργειακά και να εμφανίζουν ιδιότητες που δεν προϋπήρχαν. Τέλος, υπάρχουν κάποιες πρωτεΐνες οι οποίες είναι άκαμπτες αλλά και κάποιες που παρουσιάζουν σχετική ευκαμψία. Τα πρωτεϊνικά συστήματα που παρουσιάζουν μια σχετική ευκαμψία χρησιμοποιούνται ως αρθρωτά τμήματα, ελατήρια ή μοχλοί που είναι απαραίτητα για την πρωτεϊνική λειτουργία, την σύνδεση πρωτεϊνών μεταξύ τους, την σύνδεση με άλλα μόρια



σε πολύπλοκα σύμπλοκα και την μεταβίβαση πληροφοριών μεταξύ κυττάρων. Οι άκαμπτες μονάδες λειτουργούν ως δομικά στοιχεία του κυτταρικού σκελετού ή του συνδετικού ιστού.

## 1.2 Δομή και λειτουργία της Hb

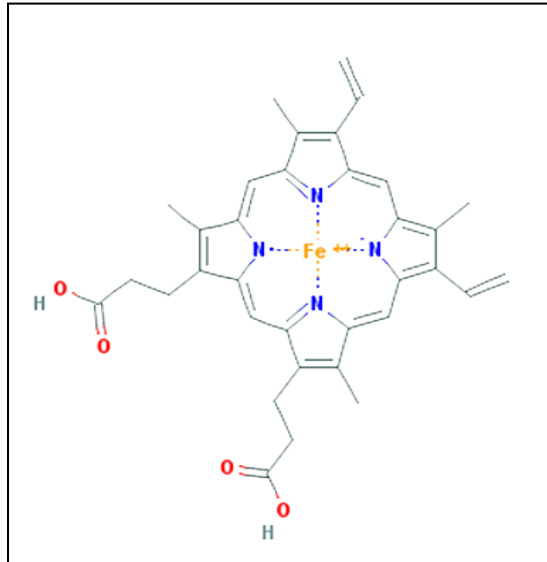
Η αιμοσφαιρίνη είναι μια από τις πρωτεΐνες του αίματος, η οποία έχει την ικανότητα να προσδένει μοριακό οξυγόνο ( $O_2$ ). Στους πνεύμονες υπάρχει η ικανότητα της δημιουργία της οξυαιμοσφαιρίνης που οφείλεται στην μεγάλη συγκέντρωση οξυγόνου λόγω της σύνδεσης του με την αιμοσφαιρίνη. Με αποτέλεσμα να είναι δυνατή η μεταφορά οξυγόνου στα τριχοειδή αγγεία. Το αίμα που έχει κορεστεί από το οξυγόνο και έχει μεγάλη ποσότητα οξυαιμοσφαιρίνης ονομάζεται αρτηριακό αίμα, έτσι καθώς φτάνει στα λεπτά τριχοειδή αγγεία διασπάται σε αιμοσφαιρίνη και οξυγόνο και έτσι γίνεται η μεταφορά του οξυγόνου στους ιστούς. Στην οξυαιμοσφαιρίνη, η έκτη θέση συναρμογής παραμένει ελεύθερη. Το ιόν του σιδήρου βρίσκεται περίπου  $0.4 \text{ \AA}$  κάτω από το επίπεδο της πορφυρίνης (Εικόνα 1.1), λόγω του ότι ο σίδηρος είναι μεγαλύτερος και δεν μπορεί να χωρέσει μέσα στην καθορισμένη οπή του πορφυρινικού δακτυλίου. Καθώς το οξυγόνο προσδένεται στην έκτη θέση συναρμογής του σιδήρου, τα ηλεκτρόνια του μετάλλου ανακατανέμονται έτσι ώστε να γίνεται αποτελεσματικά μικρότερο και να μπορεί να εισέλθει στο επίπεδο της πορφυρίνης.



Εικόνα 1.1: Απεικονίζεται η θέση του σιδήρου στην αίμη

Η πρωτεΐνη αυτή έχει σφαιρική δομή αποτελούμενη από τέσσερις προσθετικές ομάδες ονομαζόμενες αίμες (Εικόνα 1.2) οι οποίες είναι ενωμένες μια σε κάθε αλυσίδα. Η αίμη

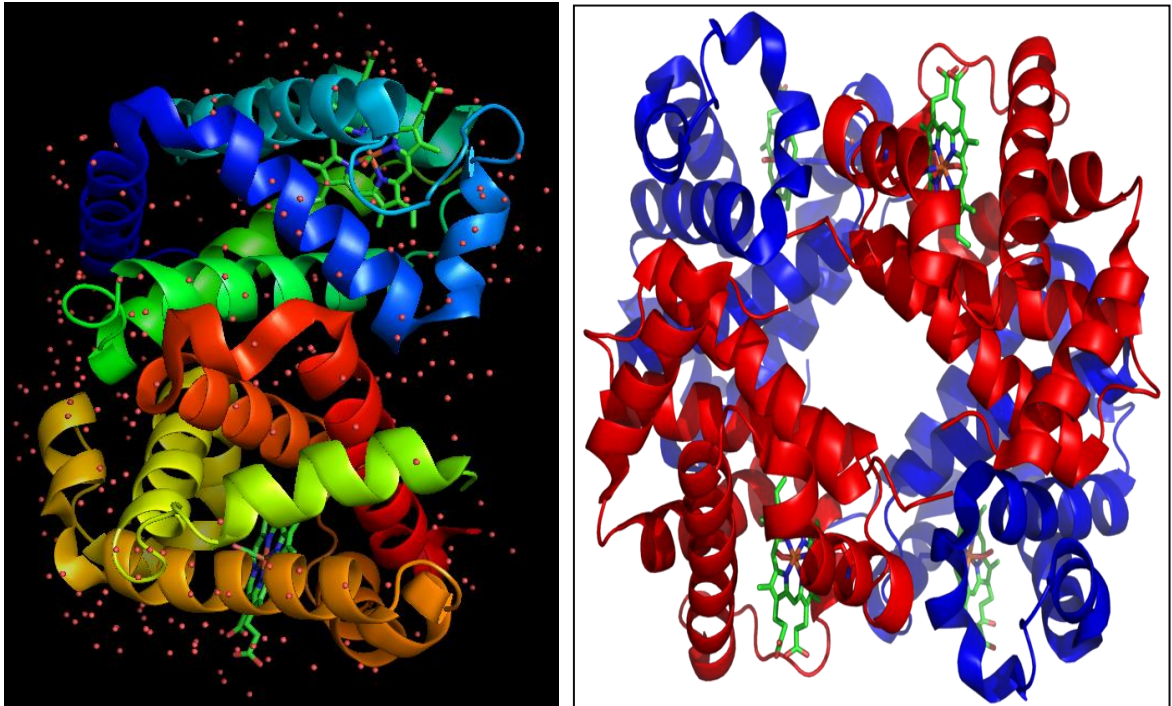
αποτελείται από ένα οργανικό συστατικό την πρωτοπορφυρίνη η οποία αποτελείται από τέσσερις πυρρολικούς δακτυλίους ενωμένους με γέφυρες μεθενίου ούτως ώστε να σχηματιστεί ένας τετραπυρρολικός δακτύλιος όπου σε αυτόν βρίσκονται προσκολλημένες δύο βινυλικές ομάδες και δύο προπιονικές πλευρικές αλυσίδες.



**Εικόνα 1.2:** Απεικονίζεται η δακτυλοειδής χημική δομή της αίμης, στην οποία παρέχεται ένα άτομο σιδήρου που φέρεται δεσμευμένο ως μία προσθετική ομάδα σε κάθε αλυσίδα πολυπεπτιδίου

Η αίμη περιέχει ένα άτομο σιδήρου ο οποίος δεσμεύεται σε μεγάλο βαθμό με το οξυγόνο λόγω της υψηλής τάσης σύνδεσης του, αντίθετα όταν υπάρχει χαμηλότερης τάσης δεσμεύεται με το διοξείδιο του άνθρακα. Το άτομο του σιδήρου βρίσκεται στο κέντρο της πρωτοπορφυρίνης και είναι ενωμένο με τέσσερα πυρρολικά άτομα αζώτου. Λόγω του ότι ο σίδηρος βρίσκεται σε οξειδωμένη μορφή  $Fe^{3+}$ , το ιόν του μπορεί να σχηματίσει δύο επιπρόσθετους δεσμούς σε κάθε πλευρά του επιπέδου της αίμης. Στην αιμοσφαιρίνη αυτές οι θέσεις πρόσδεσης ονομάζονται πέμπτη και έκτη θέση συναρμογής, οι οποίες καταλαμβάνονται από τον ιμιδαζολικό δακτύλιο ενός καταλοίπου ιστιδίνης της πρωτεΐνης. Η απόθεση του διοξειδίου του άνθρακα στις πνευμονικές κυψελίδες γίνεται μέσω της αποβολής τους. Η αιμοσφαιρίνη αυτή ονομάζεται ανθρακοαιμοσφαιρίνη και το αίμα που την περιέχει έχει πιο σκούρο χρώμα από το αρτηριακό και ονομάζεται φλεβικό. Η ανθρακοαιμοσφαιρίνη διασπάται στους πνεύμονες και αποβάλλει το διοξείδιο του άνθρακα. Σύμφωνα με την περιγραφή αυτού του κύκλου φαίνεται ότι η λειτουργία της αιμοσφαιρίνης αφορά στη μεταφορά οξυγόνου στους ιστούς και την απαγωγή του

διοξειδίου του άνθρακα από αυτούς καθώς και ότι η αιμοσφαιρίνη υπάρχει μόνο στα ερυθρά αιμοσφαίρια και είναι αυτή ουσιαστικά που δίνει στο αίμα το χαρακτηριστικό του χρώμα, για τον άνθρωπο, τα σπονδυλωτά και κάποια ασπόνδυλα ζώα.



**Εικόνα 1.3:** Στα δεξιά απεικονίζεται η δομή της αιμοσφαιρίνης (Hb) σε X-ray κρυσταλλική δομή υπό μορφή cartoon ενώ στα αριστερά η δομή της Hb υπό την μορφή ball and stick

Η αιμοσφαιρίνη είναι μια πρωτεΐνη με μοριακό βάρος 260.000 g/mol. Στην εικόνα 1.3 παρατηρούνται δύο προσθετικές ομάδες με πράσινο χρώμα, οι κόκκινες σφαίρες είναι τα μόρια του νερού (H<sub>2</sub>O).

### 1.3 Βιβλιογραφία

- Berg, M.J, Tymoczko, J. & Stryer, L. (2001). *Biochemistry, 1*, (5<sup>th</sup> ed.). USA: W. H. Freeman.
- Jia, Y., & Alayash, A. I. (2009). Effects of cross-linking and zero-link polymerization on oxygen transport and redox. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1234–1242.
- Nicoletti, F. P., Droghetti, E., Howes, B. D., Bustamante, J. P., Bonamore, A., Sciamanna, N., . . . Smulevich, G. (2013). H-bonding networks of the distal residues and water molecules in the active site of *Thermobifida fusca* hemoglobin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*.
- Pietri, R., Leon, R. G., Kiger, L., Marden, M. C., Granell, L. B., Cadilla, C. L., & Lopez-Garriga, J. (2006). Hemoglobin I from *Lucina pectinata*: A model for distal heme-ligand control. *Biochimica et Biophysica Acta*, 758–765.
- Silverman, D. N., Backman, L., & Tu, C. (1978). Role of Hemoglobin in Proton Transfer to the Active Site of Carbonic Anhydrase. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2588-2591.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

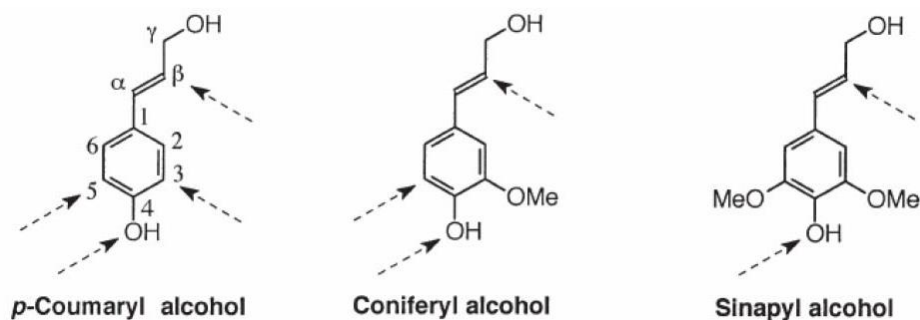
### ΥΠΕΙΡΟΞΕΙΔΑΣΗ ΤΗΣ ΛΙΓΝΙΝΗΣ (LiP)

#### 2.1 Εισαγωγή

Υπάρχουν τρεις κατηγορίες μυκήτων που αναπτύσσονται σαπροτροφικά στο σάπιο ξύλο και αποδομούν επιλεκτικά ένα ή περισσότερα συστατικά του ξύλου. Είναι οι μύκητες λευκής σήψης (white rot), οι μύκητες φαιάς σήψης (brown rot) και οι μύκητες μαλακής σήψης (soft rot).

Οι μύκητες λευκής σήψης είναι οι πιο αποδοτικοί αποδομητές στη φύση και μπορούν να αποδομήσουν την κυτταρίνη και την λιγνίνη. Οι μύκητες αυτοί αποσυνθέτουν πρώτα την λιγνίνη έτσι ώστε να είναι πιο εύκολη η πρόσβαση τους στην κυτταρίνη και τις ημικυτταρίνες που προστατεύονται από αυτή. Οι μύκητες λευκής σήψης έχουν ένα ιδιαίτερο ενζυμικό σύστημα το οποίο συσχετίζεται άμεσα με την δομή της λιγνίνης. Οι μύκητες λευκής σήψης διαθέτουν δύο τύπους εξωκυτταρικών ενζύμων τις λακκάσες και τις υπεροξειδάσες. Μέσα στην κατηγορία των υπεροξειδάσων ανήκει η υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP) και η υπεροξειδάση του μαγγανίου (MnP). Ένα από τα κύρια ενζυμικά συστατικά που συμμετέχουν στην οξείδωση της λιγνίνης και απαιτούν την παρουσία  $H_2O_2$  είναι η υπεροξειδάση της λιγνίνης η οποία οξειδώνει φαινολικά και μη φαινολικά αρωματικά συστατικά. Η υπεροξειδάση της λιγνίνης είναι από τα πρώτα λιγνινολυτικά ένζυμα που ανακαλύφθηκαν σε μύκητες λευκής σήψης, όπως οι βασιδιομύκητες *Phanerochaete chrysosporium* και *Coriolus versicolor*.

Μετά την κυτταρίνη και την ημικυτταρίνη, η πιο διαδεδομένη οργανική ουσία στα φυτά είναι η λιγνίνη. Η λιγνίνη είναι ένα πολυδιακλαδιζόμενο πολυμερές της φαινυλοπροπανιονική ομάδας, το οποίο σχηματίζεται από το πολυμερισμό βασικών πρόδρομων μονομερών ομάδων.



**Εικόνα 2.1: Οι τρεις πρόδρομες ενώσεις που συνθέτουν το μόριο της λιγνίνης**

Η λιγνίνη είναι από τα βασικότερα συστατικά του ξύλου, εξασφαλίζει ακαμψία και προστασία στα αγγεία των φυτών. Μαζί με την κυτταρίνη είναι η πιο άφθονη πηγή άνθρακα στην γη. Δομικά η λιγνίνη είναι ένα τρισδιάστατο πολυμερές από μονάδες οξυγονωμένου φαινυλοπροπανίου που ενώνονται μεταξύ τους με  $\beta$ -O 4 δεσμούς αλλά και δεσμούς C-C και C-O.

## 2.2 Ο ρόλος της υπεροξειδάσης στην βιοσύνθεση της λιγνίνης

Η κυριότερη πρόδρομη ένωση για την βιοσύνθεση της λιγνίνης είναι το σικιμικό οξύ που είναι υπεύθυνο για την παραγωγή της τυροσίνης, του κινναμικού οξέος και των φαινυλοπροπανικών ομάδων. Τα φαινυλοπροπανικά παράγωγα όπως p-κουμαρυλική αλκοόλη, κωνυφερυλική αλκοόλη και σιναπυλική αλκοόλη γλυκοζυλιώνονται και βοηθούν στην παραγωγή της λιγνίνης. Τα φαινυλοπροπανικά παράγωγα χρησιμοποιούν την δράση του ενζύμου  $\beta$ -γλυκοζιδάση στην συνέχεια υδρολύονται και ξανασηματίζονται πολυμερίζοντας τη λιγνίνη. Η λιγνίνη ενισχύει τις στηρικτικές ιδιότητες των κυτταρικών τοιχωμάτων κατά την δευτερογενή τους αύξηση σχηματίζοντας έτσι ένα ανθεκτικό σύστημα που οφείλει την ακαμψία της λιγνίνης. Η δημιουργία της λιγνίνης αποτελεί ένα φυσικό φραγμό στην εισβολή των μικροβίων αφού αποικοδομείται από μύκητες που έχουν την ικανότητα να εκκρίνουν υπεροξειδάσες της λιγνίνης. Ο πολυλειτουργικός ρόλος της υπεροξειδάσης καθορίζεται από το κυτταρικό της τοίχωμα. Έτσι τα βασικά ισοένζυμα των υπεροξειδάσων είναι υπεύθυνα για την παραγωγή υπεροξειδίου υδρογόνου μέσω της οξείδωσης του NADH που στην συνέχεια χρησιμοποιούν τα όξινα ισοένζυμα του τοιχώματος για την αφυδρογόνωση των πρόδρομων ενώσεων της λιγνίνης. Έτσι το

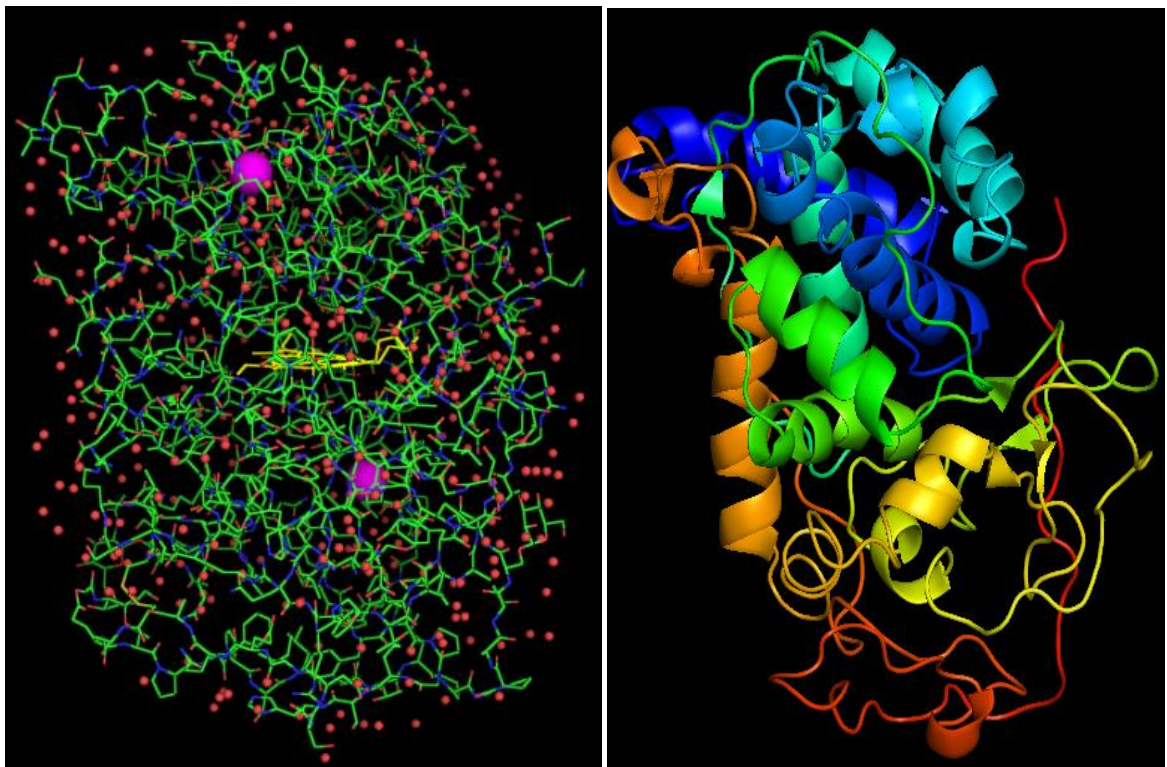


ομάδα αίμης, όπου στο κέντρο της έχει ένα άτομο σιδήρου σε οξειδωμένη μορφή ( $\text{Fe}^{3+}$ ) και ανάγουν το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε νερό ( $\text{H}_2\text{O}$ ). Οι διαφορές μεταξύ των υπεροξειδασών είναι αρκετές, οι οποίες διαφοροποιούν σημαντικά την ενζυμική λειτουργία τους, την διαμόρφωση του ενεργού τους κέντρου, το μέγεθος, την αμινοξική αλληλουχία, την στερεοδιάταξη αλλά και την ποικιλία των υποστρωμάτων που οξειδώνουν.

## 2.5 Δομή της LiP

Η υπεροξειδάση ης λιγνίνης είναι ένα ένζυμο μονομερές, με μοριακό βάρος ίσο με 30.000g/mol και αποτελείται από 350 αμινοξέα.

Στην εικόνα 3.3 απεικονίζεται η κρυσταλλογραφική (X-ray) δομή της υπεροξειδάσης της λιγνίνης στο χώρο σε τρισδιάστατη μορφή από το μύκητα *P.chrysosporium*. Σε αυτή παρατηρούνται άτομα άνθρακα C (με πράσινο χρώμα), άτομα θείου S (με κίτρινο χρώμα), δύο άτομα ασβεστίου  $\text{Ca}^{2+}$  (με μωβ χρώμα υπό μορφής σφαίρα) και με κίτρινο χρώμα είναι η αίμη. Με μπλε χρώμα είναι τα άτομα αζώτου N, με κόκκινο είναι τα οξυγόνα (O), ενώ οι κόκκινες σφαίρες απεικονίζουν τα μόρια νερού  $\text{H}_2\text{O}$ .

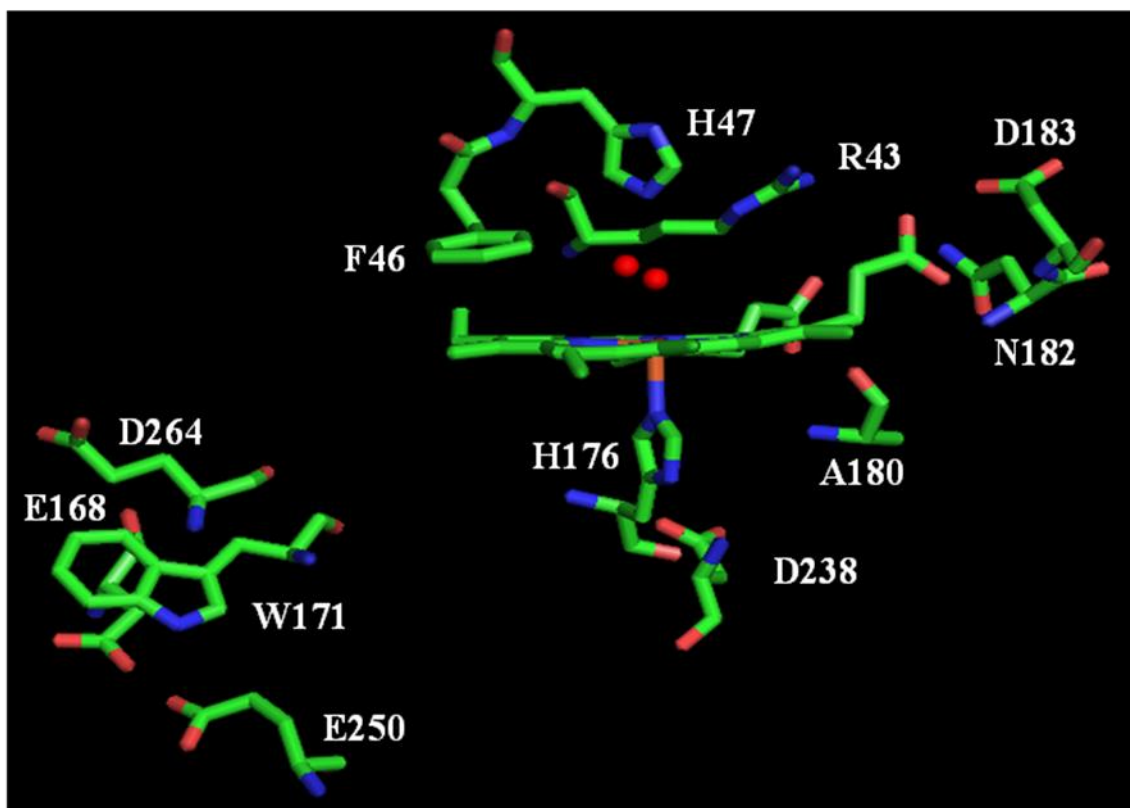


Εικόνα 2.2: Στα αριστερά απεικονίζεται η δομή της υπεροξειδάσης της λιγνίνης υπό μορφή ball and stick ενώ στα δεξιά η συνολική δομή της LiP υπό μορφή cartoon



## 2.6 Ενεργό κέντρο της LiP

Το ενεργό κέντρο της υπεροξειδάση της λιγνίνης που προέρχεται από το βασιδιομύκητα *Phanerochaete chrysosporium* αποτελείται από μία αίμη με ένα άτομο σιδήρου (Fe) στο κέντρο της. Η αίμη συνδέεται με την πρωτεΐνη μέσω μιας ιστοιδίνης (H176) με μήκος δεσμού Fe–N 2.11 Å. Η έκτη θέση συναρμογής του σιδήρου, καταλαμβάνεται από δύο μόρια νερού (κόκκινες σφαίρες). Υπάρχει μια δεύτερη ιστοιδίνη στην περιφερειακή περιοχή πάνω από την αίμη (distal environment) His47 και μία στην περιφερειακή περιοχή κάτω από την αίμη (proximal environment) His176. Τα υπόλοιπα αμινοξέα που βρίσκονται στην περιφερειακή περιοχή πάνω από την αίμη της λιγνίνης υπεροξειδάσης είναι η αργινίνη Arg43, Phe46 ενώ στη περιφερειακή περιοχή κάτω από την αίμη είναι το ασπαρτικό Asp238 και η αλανίνη Ala180.



Εικόνα 2.3: Δομή του ενεργού κέντρου της LiP

## 2.7 Βιβλιογραφία

- Choinowski, T., Blodig, W., Winterhalter, K. H., & Piontek, K. (1999). The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70 Å resolution reveals a hydroxy group on the Cβ of tryptophan 171: A novel radical site formed during the redox cycle. *Journal of Molecular Biology*, 286(3), 809-827
- Edwards, S. L., Raag, R., Wariishi, H., Gold, M. H., & Poulos, T. L. (1993). Crystal structure of lignin peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(2), 750-754
- Smith, A. T., Doyle, W. A., Dorlet, P., & Ivancich, A. (2009). Spectroscopic evidence for an engineered, catalytically active trp radical that creates the unique reactivity of lignin peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(38), 16084-16089
- Sundaramoorthy, M., Kishi, K., Gold, M. H. & Poulos, T. L. (1994). The crystal structure of manganese peroxidase from Phanerochate chrysosporium at 2.06 Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 269(52), 32759-32767.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΟΡΑΤΟΥ-ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ (UV/Vis)

#### 3.1 Εισαγωγή

Η φασματοσκοπία υπεριώδους (UltraViolet, UV) και ορατού (Visible, Vis) τμήματος είναι μεταξύ 10 - 380 nm και 380-700 nm αντίστοιχα. Η απορρόφηση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στις περιοχές αυτές είναι αποτέλεσμα των ενεργειακών μεταβολών στην ηλεκτρονική δομή των μορίων. Συγκεκριμένα, τα φάσματα απορρόφησης που προκαλούνται σε αυτό το είδος της φασματοσκοπίας οφείλονται στην ανύψωση ή την πτώση ηλεκτρονίων από την μια τροχιά σε μια άλλη. Στην φασματοσκοπία ορατού - υπεριώδους, η απορροφούμενη ενέργεια αντιστοιχεί στην ποσότητα που απαιτείται για τη μετακίνηση ενός ηλεκτρονίου από ένα τροχιακό σε κάποιο άλλο.

#### 3.2 Μεταβάσεις σε ενεργειακά επίπεδα

Οι ηλεκτρονιακές μεταβάσεις εμφανίζονται στην περιοχή ορατού – υπεριώδους (UV/Vis), συγκεκριμένα χωρίζονται σε τρεις περιοχές την ορατή περιοχή (400-700nm), την κυρίως υπεριώδη περιοχή (200- 400 nm) και την άπω υπεριώδη περιοχή (κάτω των 200 nm).

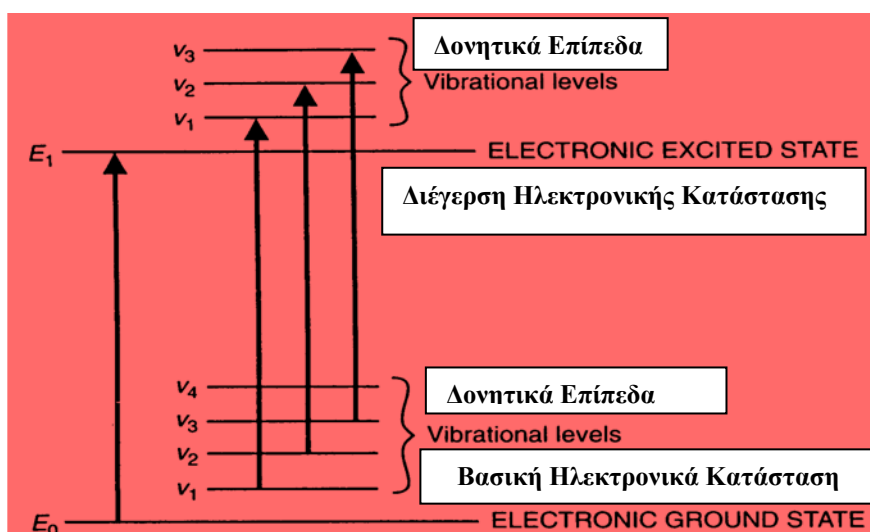
Τα ηλεκτρόνια των οργανικών μορίων κατατάσσονται σε τρεις κατηγορίες τα σ-ηλεκτρόνια, τα π-ηλεκτρόνια και τα n-ηλεκτρόνια που δεν μπορούν να πάρουν μέρος στους δεσμούς και συγκρατούνται ασθενέστερα. Τα σ-ηλεκτρόνια είναι πιο σταθερά όταν βρίσκονται προσκολλημένα στους πυρήνες όμως απαιτούν μεγαλύτερη ενέργεια για να μπορέσουν να μεταβούν σε άλλο ενεργειακό επίπεδο. Τα n-ηλεκτρόνια απαιτούν λιγότερη ενέργεια από τα π-ηλεκτρόνια για να μεταβούν σε άλλα ενεργειακά επίπεδα. Οι μεταβάσεις  $\sigma \longrightarrow \sigma^*$  βρίσκονται στην άπω υπεριώδη περιοχή δηλαδή η μετάβαση από ένα δεσμικό σ-ηλεκτρόνιο σε ένα μη δεσμικό σ-ηλεκτρόνιο που απαιτεί ενέργεια της οποίας το μήκος κύματος ανήκει σε αυτή την περιοχή. Οι μεταβάσεις  $\pi \longrightarrow \pi^*$  και

$n \rightarrow \sigma^*$  εμφανίζονται στην διαχωριστική γραμμή της άπω και της κυρίως υπεριώδης περιοχής. Οι  $n \rightarrow \pi^*$  μεταβάσεις που βρίσκονται στην κυρίως υπεριώδη περιοχή παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον λόγω του ότι απορροφούν σε μεγαλύτερο μήκος κύματος. Στην ορατή περιοχή οι μεταβάσεις που υπάρχουν είναι οι  $n \rightarrow \pi^*$ , όπου με την παρουσία δύο ή περισσότερων διπλών δεσμών στα οργανικά μόρια παρατηρήθηκαν σημαντικές αλλαγές στα φάσματα UV/Vis.

### 3.2.1 Η ενέργεια των ηλεκτρονίων σε ηλεκτρονιακές μεταβάσεις

Μια από τις πιο σημαντικές πειραματικές μεθόδους για την μελέτη μοριακών συστημάτων είναι οι φασματοσκοπικές, οι οποίες μελετούν την αλληλεπίδραση της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας με την ύλη. Τα μόρια μπορούν να απορροφούν ή να εκπέμπουν φωτόνια ενέργειας  $E=h\nu$ . Όπου  $\nu$  είναι η συχνότητα της ακτινοβολίας και  $h$  η σταθερά του Planck.

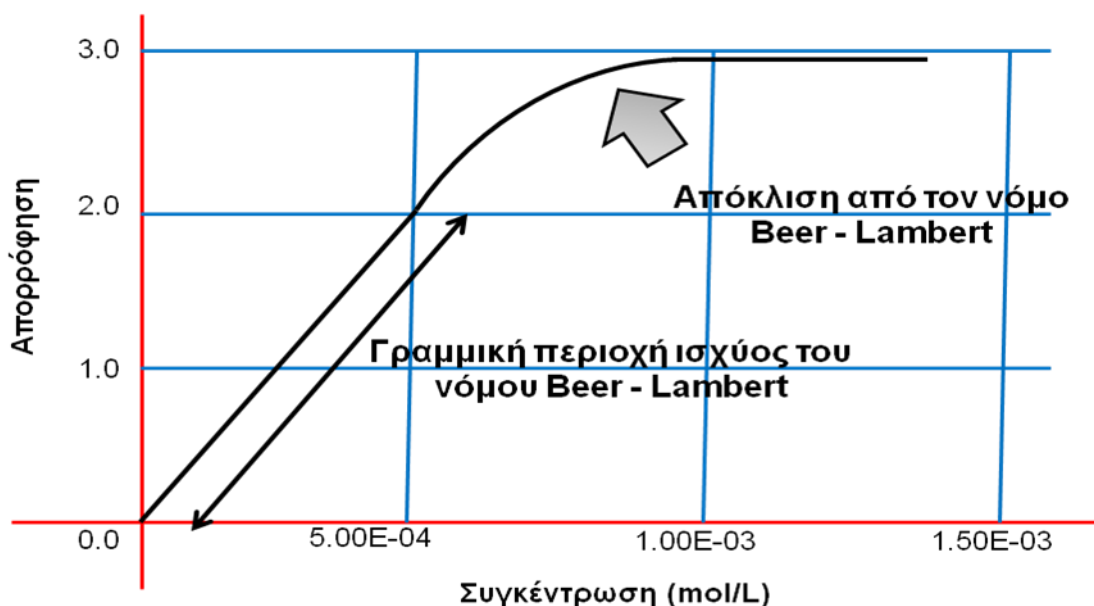
Το ορατό φως εμφανίζει ιδιότητες κύματος και σωματιδίου σύμφωνα με το κυματοσωματιδιακό δισυσμό του φωτός. Το σωματίδιο είναι ένα φωτόνιο ενώ το άτομο είναι η πηγή της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας στο ορατό ή όχι. Αυτό είναι αποτέλεσμα του φαινομένου ότι τα ηλεκτρόνια κινούνται γύρω από τον πυρήνα του ατόμου σε καθορισμένες τροχιές που εκπροσωπούν ένα ενεργειακό επίπεδο η κάθε μία. Τα ηλεκτρόνια απορροφούν ενέργεια από εξωτερικούς παράγοντες και κατευθύνονται σε ανώτερη ενεργειακή στάθμη, αυτή η κατάσταση είναι ασταθής και συνήθως χάνει την επιπλέον ενέργεια με αποτέλεσμα να επιστρέφει πίσω στην ενεργειακή κατάσταση που βρισκόταν (εικόνα 3.1). Για να γίνει αυτό εκπέμπει φωτόνια, η ενέργεια των οποίων είναι ίση με αυτή που απορρόφησε το ηλεκτρόνιο.



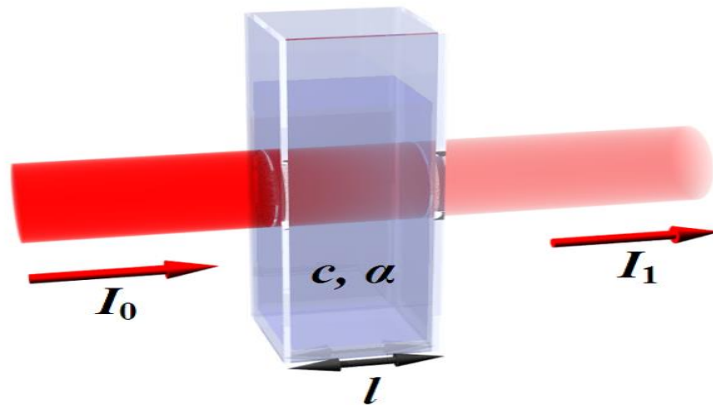
Εικόνα 3.1: Απεικονίζεται η ενέργεια των μορίων στις ηλεκτρονικές και δονητικές μεταβάσεις

### 3.3 Νόμος των Beer – Lambert

Η βασική αρχή της μεθόδου της φασματοσκοπίας στηρίζεται στο νόμο των Beer-Lambert. Η ποσοτικοποίηση της απορρόφησης γίνεται με τη μέτρηση της ακτινοβολίας που εξέρχεται από το δείγμα που μελετάται. Όταν μονοχρωματική ακτινοβολία διέρχεται από ένα διάλυμα το οποίο περιέχει μια ουσία που απορροφά, η ισχύς της ακτινοβολίας ελαττώνεται προοδευτικά κατά μήκος της διαδρομής, λόγω απορροφήσεώς της από την ουσία. Η ελάττωση της ισχύος εξαρτάται από την συγκέντρωση της ουσίας και από την απόσταση που διένυσε η δέσμη μέσα στο διάλυμα. Ο νόμος των Beer – Lambert ισχύει γενικά σε αραιά διαλύματα, οι μετρήσεις των οποίων δίνουν τιμές απορρόφησης ( $A$ ) μέχρι το 2.5. Αυτό συμβαίνει γιατί στα πυκνότερα διαλύματα τα μόρια της ουσίας βρίσκονται σε πιο κοντινές θέσεις και έτσι η απορρόφηση της ακτινοβολίας δεν είναι αποτελεσματική, με αποτέλεσμα οι τιμές των απορροφήσεων να είναι μικρότερες των αναμενομένων.



Εικόνα 3.2: Απεικονίζεται γραφικά η σχέση του νόμου του Beer, που δεν ισχύει για τιμές απορρόφησης ( $A$ ) μεγαλύτερες του 2.0 -2.5. Παρατηρούμε, ότι σε σχετικά μεγάλες συγκεντρώσεις ή πυκνότητες όπου η ( $A$ ) είναι μεγαλύτερη του 2.5 η σχέση δεν είναι γραμμική, λόγω ιξώδους ή λόγω πυκνότητας.



Εικόνα 3.3: Διεργασία της απορρόφησης και μεταβολή της έντασης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας ( $I_0$ ) μετά από διέλευση από δείγμα πάχους  $l$  και συγκέντρωσης  $C$ .

Η μέτρηση της απορρόφησης ενός δείγματος συγκέντρωσης  $C$ , μέσα σε κυψελίδα πάχους  $l$ , σχετίζεται άμεσα με την αλληλεπίδραση μεταξύ των φωτονίων και των μορίων του δείγματος που μελετώνται. Η αλληλεπίδραση αυτή πραγματοποιείται υπό την μορφή συγκρούσεων, όπου η κάθε σύγκρουση είναι ευθέως ανάλογη με τον αριθμό των φωτονίων και τον αριθμό των μορίων.

### 3.3.1 Ανάλυση της εξίσωσης Beer - Lambert

Αν ο αριθμός των φωτονίων που εισέρχεται ανά μονάδα επιφάνειας συμβολίζεται με ( $I$ ), ο αριθμός των μορίων με ( $N$ ), το πάχος της κυψελίδας ( $b$ ) και ( $c$ ) η συγκέντρωση του δείγματος, τότε προκύπτει μια σχέσης της μορφής:

$$N * I = k_1 * I * c * b \quad (3.1)$$

Έτσι η μεταβολή της έντασης της ακτινοβολίας είναι ανάλογη με το γινόμενο  $N * I$ . Όπου  $k$  είναι η σταθερά της αναλογίας και η σχέση που προκύπτει είναι:

$$dI = -k * I * c * b \quad (3.2)$$

Το αρνητικό πρόσημο στην εξίσωση 2.4 οφείλεται στην ελάττωση της έντασης της ακτινοβολίας που μειώνεται καθώς μεγαλώνει το πάχος της κυψελίδας ( $b$ ).

Αν ολοκληρώσουμε την εξίσωση 3.2 για ολόκληρο το μήκος της και θέσουμε αρχικές συνθήκες ( $I=I_0$ ) προκύπτει ο νόμος των Beer- Lambert στην μορφή:

$$\ln \frac{I}{I_0} = -k * c * b \quad (3.3)$$

Επίσης το νόμο αυτό μπορούμε να τον εκφράσουμε σε δεκαδικούς λογάριθμους, όπου  $\epsilon$  είναι ο μοριακός συντελεστής απορρόφησης και  $c$  είναι η συγκέντρωση της χημικής ένωσης που απορροφά (M) και  $A$  η απορρόφηση.

$$\frac{\log I}{I_0} = \log(T) = -\epsilon * b * c \quad (3.4)$$

$$A = -\log(T) = \epsilon * b * c \quad (3.5)$$

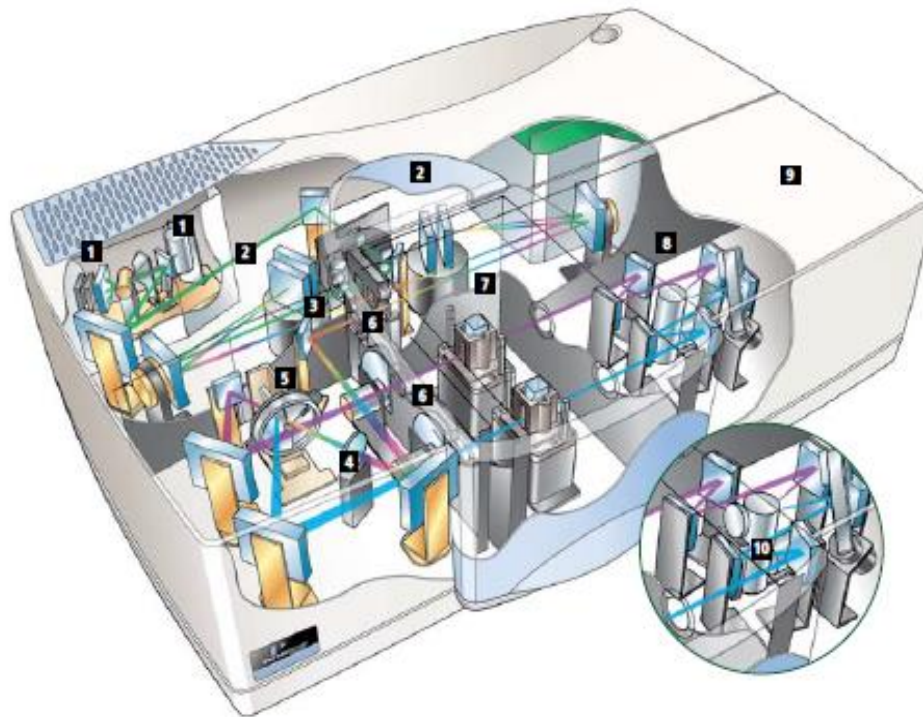
### 3.4 Αρχή λειτουργίας φασματοφωτόμετρου Ορατού - Υπεριώδες

Στην εικόνα 3.4 που ακολουθεί βλέπουμε στο σημείο (1) την πηγή ακτινοβολίας όπου γίνεται η διέγερση με δύο λυχνίες που εκπέμπουν σε διαφορετικές περιοχές ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Η μία είναι η λάμπα εκκένωσης δευτερίου ( $D_2$ ) για τα μήκη κύματος που αντιστοιχούν στην υπεριώδη περιοχή (10–380 nm) του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος και η δεύτερη μια λάμπα πυρακτώσεως αλογόνου ή βολφραμίου (W) για τα μήκη κύματος που αντιστοιχούν στο ορατό τμήμα (380-700 nm). Η λάμπα βολφραμίου ή αλογόνου βρίσκεται σε ένα γυάλινο περίβλημα όπου σπείραμα από σύρμα βολφραμίου πυρακτώνεται με ηλεκτρικό ρεύμα και φωτοβολεί. Η ακτινοβολία της κάθε λάμπας ανακλάται σε ένα κάτοπτρο μονοχρωμάτορα (σημείο 2) όπου ένα φράγμα περιθλάσεως μπλοκάρει τα μήκη κύματος που δεν είναι επιθυμητά, επιτρέποντας τη διέλευση μόνο της προεπιλεγμένης μονοχρωματικής ακτινοβολίας.

Ακολουθως βλέπουμε (σημείο 3) την εναλλαγή δέσμης δείγματος και διαλύματος αναφοράς. Σε αυτό το σημείο η δέσμη διαχωρίζεται σε δύο τμήματα, ένα για το διάλυμα του δείγματος και ένα για το τυφλό ή διάλυμα αναφοράς. Η κάθε μια από τις δέσμες διέρχεται από την κάθε κυψελίδα ξεχωριστά όπου λαμβάνει χώρα η απορρόφηση. Οι

κυψελίδες είναι κατασκευασμένες από χαλαζία για μετρήσεις στην περιοχή του υπεριώδους ή από γυαλί για μετρήσεις στο ορατό.

Τέλος, στο σημείο (4) βρίσκεται ο ανιχνευτής και οι συλλέκτης – καθρέφτης όπου μετά την διέλευση των δεσμών φωτός από τις κυψελίδες, κατευθύνονται προς τους αντίστοιχους ανιχνευτές για την μετατροπή του οπτικού σήματος σε ηλεκτρικό και για την ενίσχυση του. Στο φασματοφωτόμετρο την θέση των ανιχνευτών την καταλαμβάνουν οι φωτοδιόδοι πυριτίου, οι οποίοι αποτελούνται από ένα επίπεδο ηλεκτρόδιο στο οποίο έχει αποθεθεί στρώμα ημιαγωγού. Στην επιφάνεια του ημιαγωγού υπάρχει διαφανές μεταλλικό στρώμα που δρα ως δεύτερο ηλεκτρόδιο- συλλέκτης. Καθώς προσπίπτει ακτινοβολία στην επιφάνεια του ημιαγωγού, προκαλείται ροή ηλεκτρονίων από τον αγωγό προς το μεταλλικό στρώμα.



Εικόνα 3.4: Σχηματική απεικόνιση της δομής ενός φασματοφωτομέτρου και της αρχής λειτουργίας του.

### 3.5 Βιβλιογραφία

Harris, D.C. (2009). *Ποσοτική Χημική Ανάλυση, Α*, (Ν. Χανιωτάκης, Μ. Φουσκάκη, Κ. Περδικάκη, Β. Βαμβάκη, Μ. Χατζημαρινάκη, Μεταφρ.). Ηράκλειο: Κρήτης

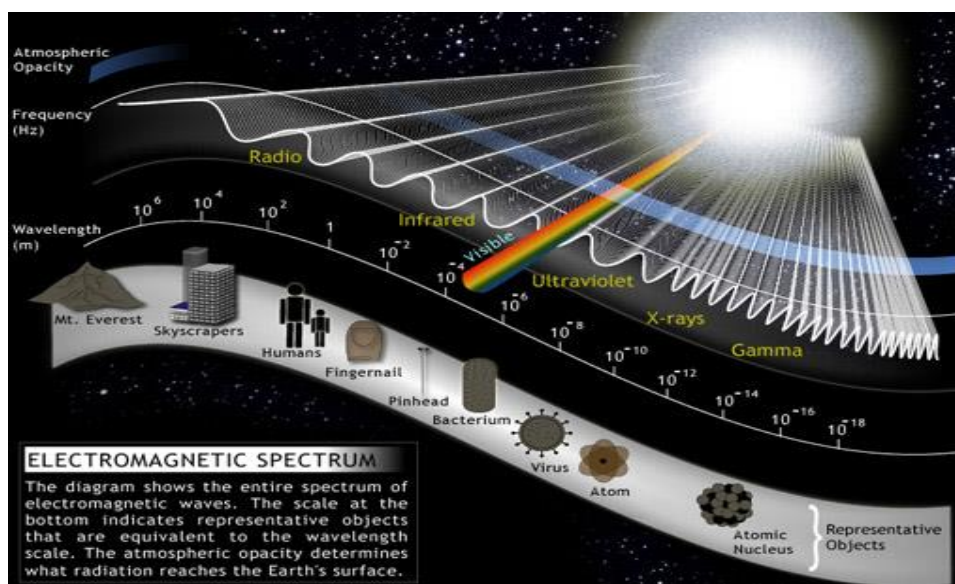


## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ-INFRARED SPECTROSCOPY (IR)

#### 4.1 Εισαγωγή

Η υπέρυθη φασματοσκοπία (Infrared, IR) είναι μια από της πιο διαδεδομένες τεχνικές λόγω του ότι δίνει σημαντικές πληροφορίες για την δομή των χημικών μορίων. Είναι μια σημαντική τεχνική επίσης λόγω της ευκολίας λήψης φασμάτων και της σύγκρισης με φάσματα γνωστών οργανικών ενώσεων. Στην υπέρυθη περιοχή του φάσματος παρατηρούνται απορροφήσεις που συμβαίνουν λόγω των εκτάσεων ή των κάμψεων των δεσμών των μορίων για ενώσεις με μόνιμη διπολική ροπή. Οι ενώσεις αυτές μεταβάλλονται κατά την παραμόρφωση του μορίου με αποτέλεσμα να απορροφούν σημαντικά στην περιοχή του υπέρυθρου. Το υπέρυθρο είναι το τμήμα της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας που εκτείνεται πέρα από το ορατό και φτάνει μέχρι την περιοχή των μικροκυμάτων (Εικόνα 4.1).

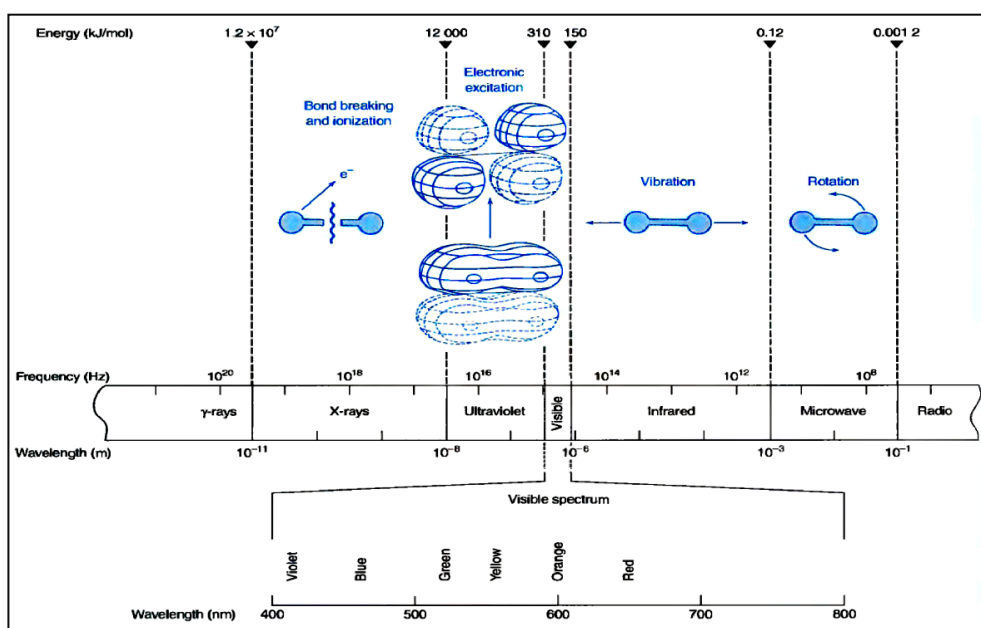


Εικόνα 4.1: Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα

Η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία που ανήκει στην περιοχή του υπέρυθρου διακρίνεται σε τρεις περιοχές. Αρχικά υπάρχει το εγγύς υπέρυθρο από  $12800\text{ cm}^{-1}$  -  $4000\text{ cm}^{-1}$ , στην συνέχεια το κυρίως υπέρυθρο από  $4000\text{ cm}^{-1}$ -  $200\text{ cm}^{-1}$  και τέλος το άπω υπέρυθρο από  $200\text{ cm}^{-1}$ - $10\text{ cm}^{-1}$ . Η υπέρυθρη φασματοσκοπία στηρίζεται στην αλληλεπίδραση της ύλης με το υπέρυθρο φως, η οποία προκαλεί δονητικές μεταβάσεις λόγω της αλλαγής στην διπολική ροπή των μορίων.

## 4.2 Αρχές φασματοσκοπίας Υπερύθρου (IR)

Η απορρόφηση της υπέρυθρης ακτινοβολίας περιορίζεται στα μόρια τα οποία παρουσιάζουν μικρές ενεργειακές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών δονητικών και περιστροφικών καταστάσεων. Όλες οι οργανικές και ανόργανες ουσίες είναι σε θέση να απορροφούν σε ορισμένες συχνότητες σε ένα υπέρυθρο φάσμα. Ένα μόριο για να απορροφήσει υπέρυθρη ακτινοβολία πρέπει να υποστεί αλλαγές στην διπολική ροπή με αποτέλεσμα το εναλλασσόμενο μαγνητικό πεδίο της ακτινοβολίας να μπορεί να αλληλεπιδράσει με το μόριο. Στην φασματοσκοπία υπέρυθρου η ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία με μήκος κύματος ( $\lambda$ ) από 1-100  $\mu\text{m}$  απορροφάται ή εκπέμπεται όταν η συχνότητα της ενέργειας των φωτονίων συμπίπτει με την συχνότητα δόνησης του μορίου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τα φωτόνια μπορούν να προκαλούν ταλαντωτικές (δονητικές) και περιστροφικές κινήσεις στα μόρια όταν συμβεί σύζευξη με την διπολική ροπή τους (Εικόνα 4.2).



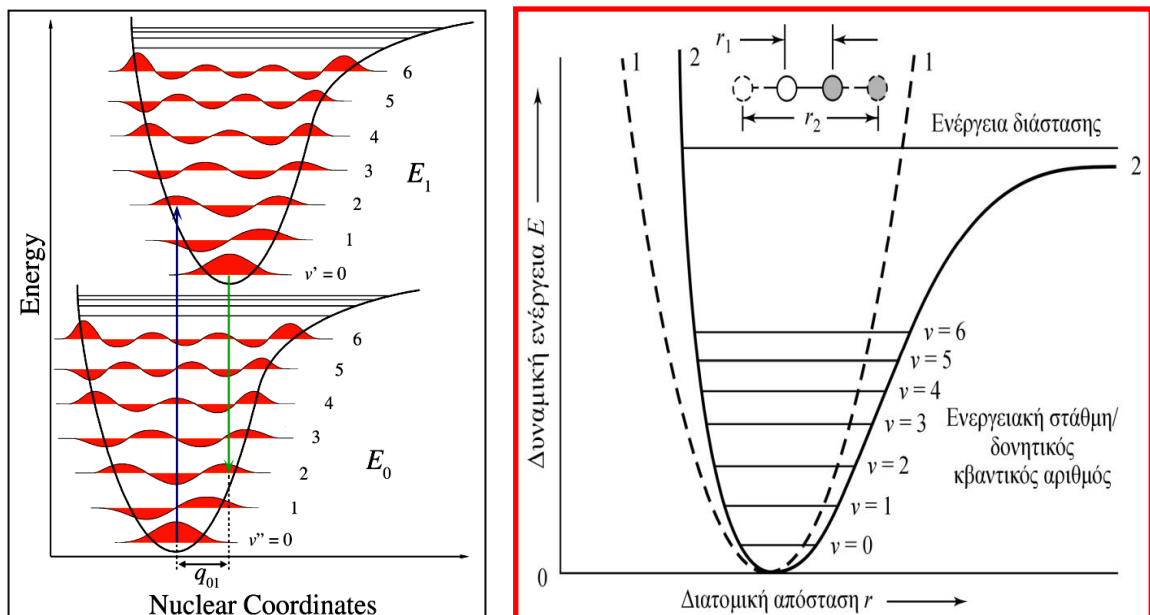
Εικόνα 4.2: Ηλεκτρομαγνητικό φάσμα στο οποίο απεικονίζεται η περιοχή όπου συμβαίνουν οι βασικές μοριακές διαδικασίες (ηλεκτρονικές διεγέρσεις, δονητικές και περιστροφικές).

Η ενέργεια που απαιτείται για τη μετάβαση ενός μορίου από μια δονητική κατάσταση σε μια άλλη, αντιστοιχεί σε ακτινοβολία με μήκος κύματος στην περιοχή του υπέρυθρου. Ένα μόριο μπορεί να απορροφήσει ένα φωτόνιο υπέρυθρης ακτινοβολίας όταν αυτό έχει ενέργεια ίση με την ενεργειακή διαφορά μεταξύ δονητικών καταστάσεων του μορίου, αυτής που βρίσκεται το μόριο αρχικά και σε αυτής όπου το μόριο μπορεί να διεγερθεί εφόσον η μετάπτωση είναι επιτρεπτή όταν υπάρχει μεταβολή της ηλεκτρικής διπολικής ροπής του μορίου τα άτομα μετατοπίζονται το ένα ως προς το άλλο (Εικόνα 4.3). Η φασματοσκοπία υπέρυθρου καταγράφει την απορρόφηση της ακτινοβολίας κατά την μεταβολή του μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Η καταγραφή αυτή παράγει ένα διάγραμμα απορρόφησης (A) – κυματαριθμού (ν), με αποτέλεσμα να συλλέγονται πληροφορίες σχετικά με την χημική σύσταση του δείγματος που μελετάται. Στα φάσματα IR δεν χρησιμοποιείται η συχνότητα ή το μήκος κύματος της χρησιμοποιούμενης ακτινοβολίας αλλά χρησιμοποιείται η έννοια του κυματαριθμού.

Ο κυματοριθμός δίνεται από την σχέση:

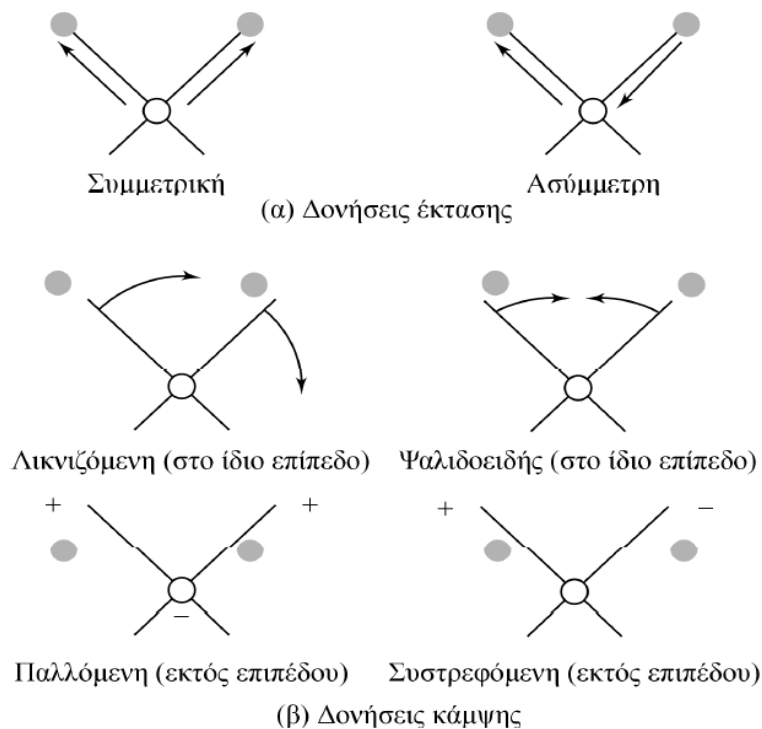
$$\nu = \frac{1}{\lambda} \quad (4.1)$$

όπου  $\lambda$  το μήκος κύματος της ακτινοβολίας



**Εικόνα 4.3:** Απεικονίζεται η απορρόφηση του φωτονίου στην υπέρυθρη ακτινοβολία όταν η ενέργεια του είναι ίση με την ενεργειακή διαφορά των δύο δονητικών καταστάσεων.

Στην φασματοσκοπία υπερύθρου, τα άτομα των μορίων βρίσκονται σε μια ενεργειακή κατάσταση όμως δεν μένουν ακίνητα αντιθέτως εκτελούν δονητικές και περιστροφικές κινήσεις. Όταν μια δέσμη φωτός εισέρχεται στο δείγμα που μελετάται τα μόρια της ακτινοβολίας που διέρχεται διεγείρονται αυξάνοντας έτσι την ενέργεια δόνησης και περιστροφής τους. Για να μπορούν τα μόρια του δείγματος να απορροφούν στο υπέρυθρο φάσμα θα πρέπει η συχνότητα της προσπίπτουσας ακτινοβολίας να συμπίπτει με την συχνότητα δόνησης των ατόμων του δεσμού. Οι συχνότητες με τις οποίες δονούνται τα άτομα στο μόριο εξαρτώνται μόνο από τις μάζες των ατόμων, τον τύπο του δεσμού και το σχήμα του μορίου. Τα μόρια για να μπορούν να απορροφούν στο IR πρέπει να μεταβάλλεται η διπολική ροπή τους κατά την διάρκεια της δόνησης, αφού όσο μεγαλύτερη είναι η μεταβολή της διπολικής ροπής τόσο ισχυρότερη είναι η απορρόφηση. Οι δονήσεις που λαμβάνουν μέρος σε φάσματα υπερύθρου διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, τις δονήσεις τάσης και τις δονήσεις κάμψης, όμως υπάρχουν και άλλα είδη παραμορφώσεων της δομής των μορίων όπως το σείεται (wagging), κλυδωνίζεται (rocking), στρεβλώνεται (twisting) και η ψαλιδοειδής κίνηση (scissoring). Στις δονήσεις τάσης, τα άτομα του δεσμού πλησιάζουν και απομακρύνονται μεταξύ τους κατά μήκος του δεσμού, ενώ στις δονήσεις κάμψης τα άτομα των γειτονικών δεσμών κινούνται έτσι ώστε να αλλάζει η γωνία των δεσμών (Εικόνα 4.4).



**Εικόνα 4.4: Οι κυριότεροι τρόποι κάμψης και έκτασης ενός μορίου.**

### 4.3 Αρχή λειτουργίας φασματοφωτόμετρου Υπερύθρου

Η μορφή που έχει ένα φάσμα υπερύθρου, είναι στον άξονα τον  $\chi$  παρατηρείται το μήκος κύματος της ακτινοβολίας ( $\lambda$ ) ή τον κυματαριθμό ( $\text{cm}^{-1}$ ) και στον άξονα τον  $\psi$  η διαπερατότητα (T %) ή απορρόφηση.

Σε ένα φασματοφωτόμετρο υπερύθρου (IR) υπάρχουν βασικά σημεία ίδια με ένα φασματοφωτόμετρο ορατού – υπεριώδους. Στην εικόνα 4.5 απεικονίζονται τα βασικά μέρη ενός τέτοιου οργάνου. Παρατηρείται ως πηγή ακτινοβολίας (Globar – σημείο 1) να χρησιμοποιείται μια λυχνία από κεραμικό υλικό, η οποία μετά από ηλεκτρική θέρμανση στους 1600 °C δίνει ένα μεγάλο μέρος της σε υπέρυθη ακτινοβολία η οποία χρησιμοποιείται ως πηγή ακτινοβολίας. Οι κυψελίδες που χρησιμοποιούνται σε αυτό το φασματοφωτόμετρο έχουν παράθυρα  $\text{CaF}_2$ . Στην συνέχεια η υπέρυθη ακτινοβολίας προχωρά προς τους καθρέφτες μέσω οπτικών. Στο σημείο 2 είναι ο διαχωριστής δέσμης BMS (beamsplitter) και το συμβολόμετρο το οποίο εισάγει την οπτική διαδρομή ( $\delta$ ). Τέλος στο σημείο 3 βρίσκεται το δείγμα, στο οποίο μέσω άλλων οπτικών η υπέρυθη ακτινοβολία φεύγει από το διαμέρισμα του συμβολόμετρου και κατευθύνεται προς το δείγμα όπου και εστιάζεται. Στο σημείο 4 η δέσμη κατευθύνεται μέσω των κατάλληλων οπτικών στο ανιχνευτή. Ο ανιχνευτής που χρησιμοποιείται είναι θερμικός με αποτέλεσμα να μετατρέπει την ακτινοβολία σε θερμική ενέργεια. Η μεταβολή της θερμοκρασίας μετριέται με ένα θερμοστοιχείο, η λειτουργία του οποίου οφείλεται στην αύξηση της θερμοκρασίας που προκαλείται λόγω της αύξησης του ηλεκτρικού δυναμικού. Η δέσμη η οποία ανιχνεύει ο ανιχνευτής είναι το σύνολο της υπέρυθρης ακτινοβολίας που διαπέρασε το δείγμα.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5

### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΟΡΑΤΟΥ – ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ (UV/Vis) ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ (Hb)

#### 5.1 Εισαγωγή-Στόχος

Ο σκοπός των συγκεκριμένων πειραμάτων είναι η μελέτη του συμπλόκου Hb-N<sub>3</sub>, και ο προσδιορισμός των ιδιοτήτων του ενεργού κέντρου της αιμοσφαιρίνης σε ένα εύρος pH 5.0-9.0. Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφονται επίσης τα χαρακτηριστικά των υποκαταστατών που χρησιμοποιήθηκαν, αναλύεται η διαδικασία προετοιμασίας των δειγμάτων, αλλά και ο λόγος για τον οποίο διεξάχθηκαν τα συγκεκριμένα πειράματα. Στην συνέχεια παρατίθενται η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για τον χαρακτηρισμό των ιδιοτήτων του ενεργού κέντρου της αιμοσφαιρίνης (Hb).

#### 5.2 Υποκαταστάτες

Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων με την χρήση της τεχνικής της φασματοσκοπίας ορατού-υπεριώδους (UV/Vis) χρησιμοποιήθηκαν ως υποκαταστάτες το ανιόν του αζιδίου (N<sub>3</sub><sup>-</sup>), το ανιόν του κυανίου (CN<sup>-</sup>), το αέριο μονοξείδιο του άνθρακα (CO) και ως αναγωγικό μέσο το θειοθειικό νάτριο (sodium dithionite, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>).

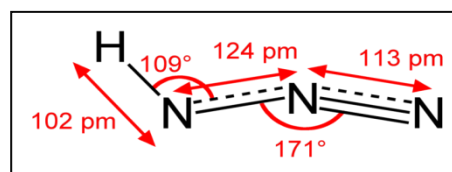
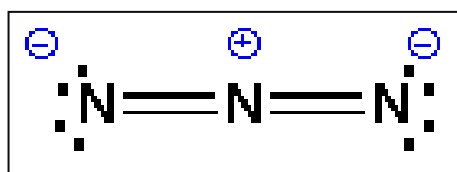
##### 5.2.1 Νατραζίδιο (NaN<sub>3</sub>) και αζίδιο (N<sub>3</sub><sup>-</sup>)

Το ανιόν του αζιδίου (N<sub>3</sub><sup>-</sup>) προέρχεται από το άλας του νατραζιδίου (NaN<sub>3</sub>) και είναι ένα γραμμικό ιόν, το οποίο αποτελείται από τρία άτομα αζώτου με συνολικά δέκα έξι ηλεκτρόνια σθένους τα οποία είναι ενωμένα με δύο διπλούς δεσμούς μεταξύ τους. Το αζίδιο του νατρίου όταν βρίσκεται σε καθαρή μορφή είναι ένα άσπρο κρυσταλλικό στερεό

το οποίο είναι εύκολα διαλυτό στο νερό και ελαφρώς διαλυτό στην αιθανόλη. Είναι τοξικό στο υδρόβιο περιβάλλον και έτσι η διάθεση του πρέπει να ρυθμιστεί προσεκτικά.

**Πίνακας 1: Χαρακτηριστικά του νατραζιδίου (NaN<sub>3</sub>)**

ΑΖΙΔΙΟ ΤΟΥ ΝΑΤΡΙΟΥ	
Μοριακός τύπος	NaN <sub>3</sub>
Μοριακή μάζα	65 g/mol
ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ	
Πυκνότητα και φάση	1.85 g/m <sup>3</sup> , στερεό
Διαλυτότητα στο νερό	41.7 g/100 mL (17 °C)
Σημείο τήξης	275 °C



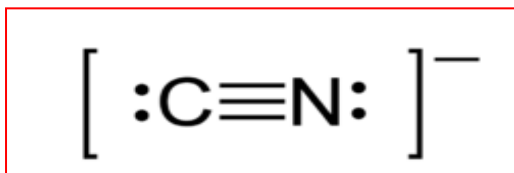
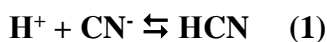
**Εικόνα 5.1:** Αριστερά απεικονίζεται η ηλεκτροδιακή δομή του αζιδίου (N<sub>3</sub><sup>-</sup>) και δεξιά η αντίστοιχη της πρωτονιωμένης του μορφής, υδραζίνης (HN<sub>3</sub>).

### 5.2.2 Κυάνιο (CN<sup>-</sup>)

Το κυανιούχο κάλιο (KCN) είναι μία ένωση (άλας) με μοριακό βάρος 65.12 g/mol, που όταν διαλυθεί στο νερό δίσταται σε ένα κατιόν καλίου (K<sup>+</sup>) και ένα ανιόν κυανίου (CN<sup>-</sup>). Το τελευταίο αποτελείται από ένα άτομο αζώτου (N) και ένα άτομο άνθρακα (C) τα οποία ενώνονται με τριπλό δεσμό και αριθμούν συνολικά δέκα ηλεκτρόνια σθένους. Το κυάνιο λόγω της κυανιούχας ρίζας που σχηματίζει εύκολα ενώσεις με το σίδηρο της αιμοσφαιρίνης του αίματος μπορεί να αναστέλλει την κυτταρική αναπνοή αδρανοποιώντας την αιμοσφαιρίνη και την οξειδωση του κυτοχρώματος που έχει προσθετικές ομάδες που περιέχουν τρισθενή σίδηρο (Fe<sup>3+</sup>). Η έκθεση στο κυάνιο γίνεται από την εισπνοή υδροκυανικού οξέος ή από την πρόσληψη κυανικού άλατος από τις τροφές. Συγκεντρώσεις κυανίου οι οποίες είναι μικρότερες των 2.0 μg/mL δεν προκαλούν παρενέργειες, ενώ συγκεντρώσεις κυανίου μεγαλύτερες των 2.0 μg/mL προκαλούν ζάλη, κεφαλαλγία, ύπνο και ταχυκαρδία. Σε υψηλά pH, τα ιόντα του κυανίου παραμένουν σταθερά και δεν σχηματίζουν υδροκυάνιο σε αντίθεση με τα χαμηλά pH (<7), όπου η



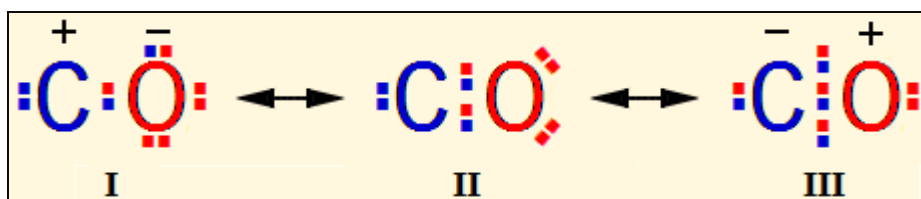
ποσότητα των ιόντων κυανίου μετατρέπεται όλη σε υδροκυάνιο (HCN). Η σταθερά ισορροπίας του κυανίου εμφανίζει  $pK_a$  9.3 και έχει την μορφή:



Εικόνα 5.2: Η ηλεκτρονιακή δομή του ιόντος του κυανίου.

### 5.2.3 Μονοξείδιο του άνθρακα (CO)

Το μονοξείδιο του άνθρακα (CO) είναι ένα άχρωμο, άοσμο, άγευστο, εύφλεκτο αέριο με μοριακό βάρος 28.010 g/mol, το οποίο αποτελείται από ένα άτομο άνθρακα (C) και από ένα άτομο οξυγόνου (O). Στο CO, ο άνθρακας και το οξυγόνο έχουν συνολικά δέκα ηλεκτρόνια σθένους με αποτέλεσμα να είναι ένα μόριο ισοηλεκτρονιακό προς το άζωτο (N<sub>2</sub>), αλλά και το ιόν του κυανίου (CN<sup>-</sup>). Οι δομές κατά Lewis που απεικονίζουν την κατανομή των ηλεκτρονίων παρουσιάζονται στην εικόνα 5.3 και εμφανίζουν το CO να έχει έναν, δύο ή και τρεις ομοιοπολικούς δεσμούς. Στην πρώτη (I) δομή κατά Lewis απεικονίζεται ένας ομοιοπολικός δεσμός όπου το οξυγόνο έχει μεγαλύτερη ηλεκτραρνητικότητα σε σχέση με τον άνθρακα. Στην δεύτερη δομή (II) προκύπτουν δύο ομοιοπολικοί δεσμοί όπου συνεπάγεται η συμμετρική κατανομή των ηλεκτρονίων με αποτέλεσμα η δομή αυτή να περιγράφει το μόριο με μηδενική διπολική ροπή. Τέλος, για την τρίτη (III) δομή κατά Lewis υπάρχουν τρεις ομοιοπολικοί δεσμοί. Η δομή αυτή στηρίζεται στο κανόνα της οκτάδας με αποτέλεσμα να συνεπάγεται ασύμμετρη κατανομή ηλεκτρονίων λόγω μεταφοράς ηλεκτρονίου του οξυγόνου προς τον άνθρακα. Επικρατούσα δομή με βάση φασματοσκοπικά δεδομένα είναι η τρίτη, με το CO να εμφανίζει περίσσεια αρνητικού φορτίου στον άνθρακα (C) και περίσσεια θετικού στο άτομο οξυγόνου (O).



Εικόνα 5.3: Δομές συντονισμού του μορίου του μονοξειδίου του άνθρακα

### 5.3 Πειραματική Διαδικασία

Εφαρμόζοντας την φασματοσκοπική τεχνική Ορατού – Υπεριώδους (UV/Vis) και χρησιμοποιώντας ως ένζυμο την αιμοσφαιρίνη (Hb) και ως υποκαταστάτη το αζίδιο του νατρίου (NaN<sub>3</sub>) με σκοπό το χαρακτηρισμό των ιδιοτήτων του ενεργού κέντρου της αιμοσφαιρίνης διεξάχθηκαν τα ακόλουθα πειράματα διαφοροποιώντας τις συνθήκες διεξαγωγής όπως το pH και την θερμοκρασία.

Για την παρασκευή του αζιδίου του νατρίου σε συγκέντρωση ίση με 6 mM και τελικό όγκο 2.5 mL ακολουθήθηκαν οι παρακάτω υπολογισμοί:

$$C = \frac{n}{V} \quad (5.1)$$

$$6 * 10^{-3} = \frac{mole}{2.5 * 10^{-3}} \quad (5.2)$$

$$mole = 1.5 * 10^{-5} \quad (5.3)$$

$$Μοριακό Βάρος = \frac{Μάζα}{mole} \quad (5.4)$$

$$\frac{65gr}{mole} = \frac{Μάζα}{1.5 * 10^{-5}} \quad (5.5)$$

$$Μάζα = 9,75 * 10^{-4} gr \quad (5.6)$$

όπου n: είναι τα mole, C: είναι η συγκέντρωση της ουσίας και V: είναι ο τελικός όγκος της ουσίας

Για την παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer) σε pH 7.0, με τελικό όγκο 50ml και συγκέντρωση ίση με 50 mM ακολουθήθηκαν οι πιο κάτω υπολογισμοί:

$$C = \frac{n}{V} \quad (5.7)$$

$$50 * 10^{-3} = \frac{mole}{0.05L} \quad (5.8)$$

$$mole = 0.0025 \quad (5.9)$$

$$Μοριακό Βάρος = \frac{Μάζα}{mole} \quad (5.10)$$

$$\frac{238.31gr}{mole} = \frac{Μάζα}{0.0025} \quad (5.11)$$

$$Μάζα = 0.5957gr \quad (5.12)$$

Σε πρώτο στάδιο διαλύεται η αιμοσφαιρίνη σε ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) pH 7.0 το οποίο έχει την ικανότητα να διατηρεί το pH της πρωτεΐνης σταθερό για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα. Στην συνέχεια η πρωτεΐνη αραιώνεται και ένα δείγμα (10  $\mu\text{L}$ ) τοποθετείτε στην κυψελίδα του φασματοφωτόμετρου ορατού – υπεριώδους με αποτέλεσμα να παρθεί φάσμα απορρόφησης (A) – Μήκους κύματος (nm). Ο τελικός όγκος του δείγματος στην κυψελίδα του UV/Vis είναι 1000  $\mu\text{L}$ , αφού το δείγμα είναι 10  $\mu\text{L}$  και το υπόλοιπο 990  $\mu\text{L}$  είναι ρυθμιστικό διάλυμα σε pH 7.0.

Η απορρόφηση που πάρθηκε από το συγκεκριμένο πείραμα είναι  $A = 1.18$  στα 406 nm.

Έτσι εφαρμόζοντας το νόμο των Beer- Lambert και δεδομένου της απορρόφησης του δείγματος αλλά και του πάχους (b) της κυψελίδας που είναι ίσο με 1 cm και τον μοριακό συντελεστή απορρόφησης ( $\epsilon$ ) να είναι ίσο με  $180 \text{ mM}^{-1}$ , ακολουθήθηκαν οι πιο κάτω υπολογισμοί

$$A = -\log(T) = \epsilon * b * c \quad (5.13)$$

$$1.18 = (180 \text{ Mm}^{-1}) * (1 \text{ cm}^{-1}) * c \quad (5.14)$$

$$c = 6.55 \mu\text{M} \quad (5.15)$$

Στην συνέχεια αφού έχει υπολογιστεί η συγκέντρωση της αιμοσφαιρίνης σε pH 7.0, έχει υπολογιστεί η ακριβείς ποσότητα αζιδίου που θα προστεθεί στο διάλυμα.

Για συγκέντρωση αζιδίου σε αναλογία 1-5

$6.55 \mu\text{M} * (5) = 32.75 \mu\text{M}$  είναι η συγκέντρωση του αζιδίου

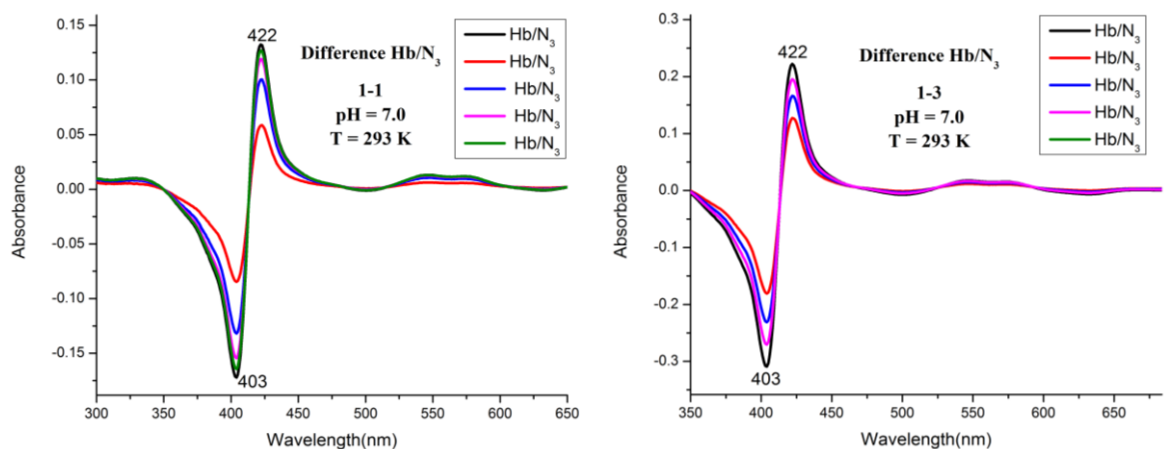
Άρα θα προστεθεί στο δείγμα που βρίσκεται στην κυψελίδα του φασματοφωτόμετρου Ορατού – Υπεριώδους 15  $\mu\text{L}$  αζίδιο ( $\text{NaN}_3$ ).

Πάρθηκε ως φάσμα αναφοράς το δείγμα, με αποτέλεσμα το επόμενο να είναι ένα φάσμα διαφοράς (difference), στο οποίο παρατηρείται θετική κορυφή στα 405 nm με απορρόφηση (A) ίση με 0.42 και μία αρνητική κορυφή στα 422 nm. Η ύπαρξη της θετικής κορυφής οφείλεται στην δέσμευση του αζιδίου στην αίμη της αιμοσφαιρίνης και στην

δημιουργία συμπλόκου Hb-N<sub>3</sub> ενώ η αρνητική κορυφή οφείλεται στην κατανάλωση του συμπλόκου. Με αυτό τον τρόπο διεξάχθηκαν όλα τα πειράματα σε ένα ευρύ φάσμα pH, αρχίζοντας από το ουδέτερο pH (7) λόγω του ότι οι πρωτεΐνες λειτουργούν σε φυσιολογικά pH στην συνέχεια σε πιο βασικό pH (9) και τέλος σε ένα ακραίο pH (5) για να παρατηρηθούν οι ιδιότητες του ενεργού κέντρου της αιμοσφαιρίνης.

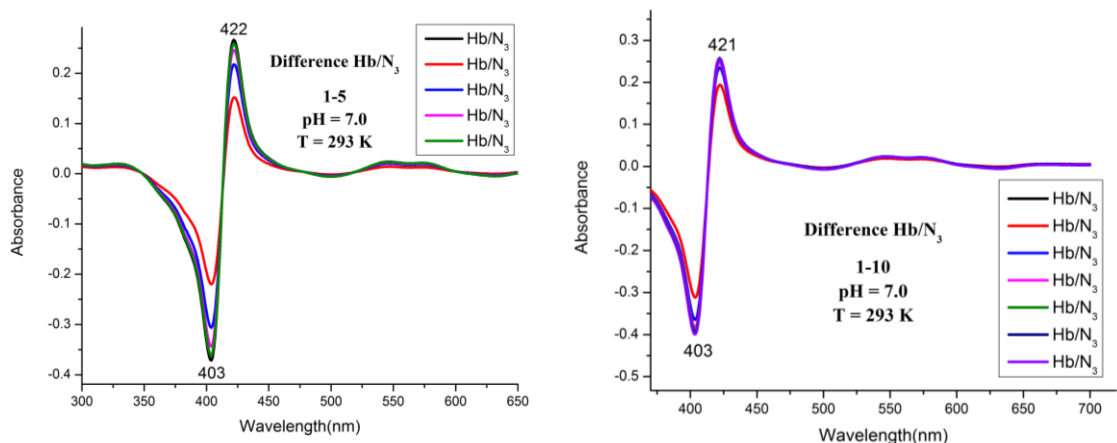
#### 5.4 Αποτελέσματα της δέσμευσης του αζιδίου (N<sub>3</sub><sup>-</sup>) στην αιμοσφαιρίνη

Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν από το φασματοφωτόμετρο Ορατού – Υπεριώδους αναγράφονται πιο κάτω σε ξεχωριστά pH.

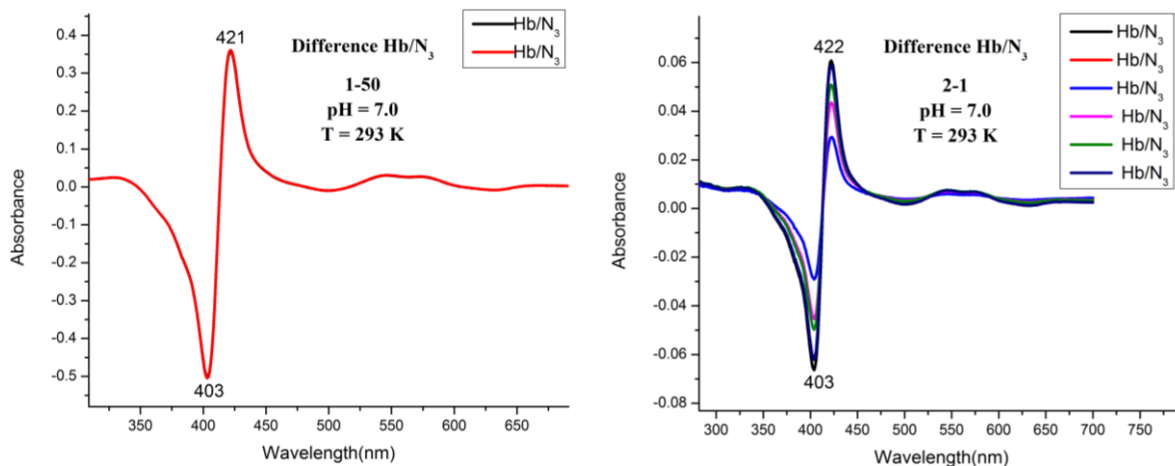


**Γράφημα 1:** Στα αριστερά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του συμπλόκου Hb-N<sub>3</sub> στην οξειδωμένη μορφή της Hb σε pH 7.0 και συγκέντρωση C<sub>Hb</sub>=5 μΜ σε αναλογία Hb-N<sub>3</sub> ίση με 1:1, στα δεξιά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του ίδιου συμπλόκου με αναλογία Hb-N<sub>3</sub> ίση με 1:3.

Το φάσμα διαφοράς που βρίσκεται στα αριστερά έχει απορρόφηση (A) ίση με 0.13 στα 422 nm όπου εμφανίζεται μια θετική κορυφή λόγω της δημιουργίας του συμπλόκου Hb-N<sub>3</sub> από την δέσμευση του αζιδίου στην αίμη, και μια αρνητική κορυφή στα 403 nm όπου προκύπτει από την κατανάλωση του συμπλόκου.

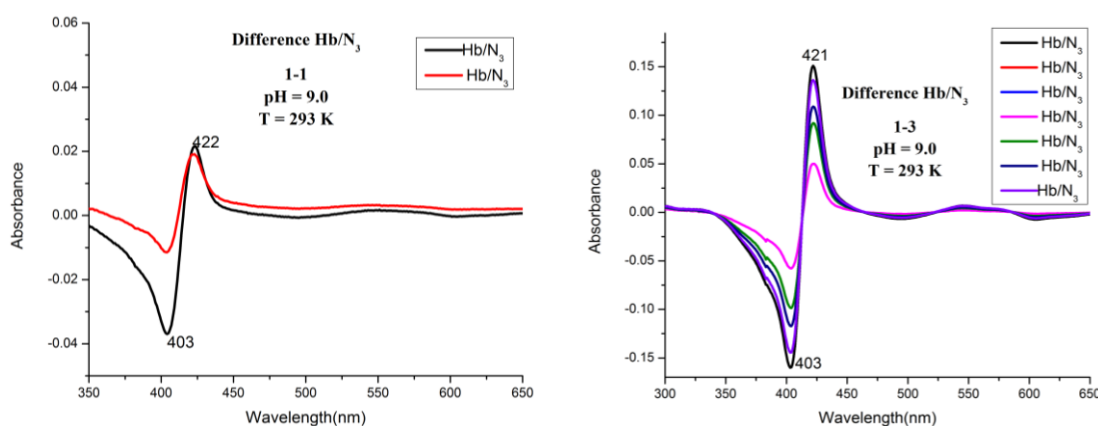


**Γράφημα 2:** Στα αριστερά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του συμπλόκου Hb-N<sub>3</sub> στην οξειδωμένη μορφή της Hb σε pH 7.0 και συγκέντρωση C<sub>Hb</sub>=5 μΜ σε αναλογία Hb-N<sub>3</sub> ίση με 1:5, στα δεξιά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του ίδιου συμπλόκου με αναλογία Hb-N<sub>3</sub> ίση με 1:10.

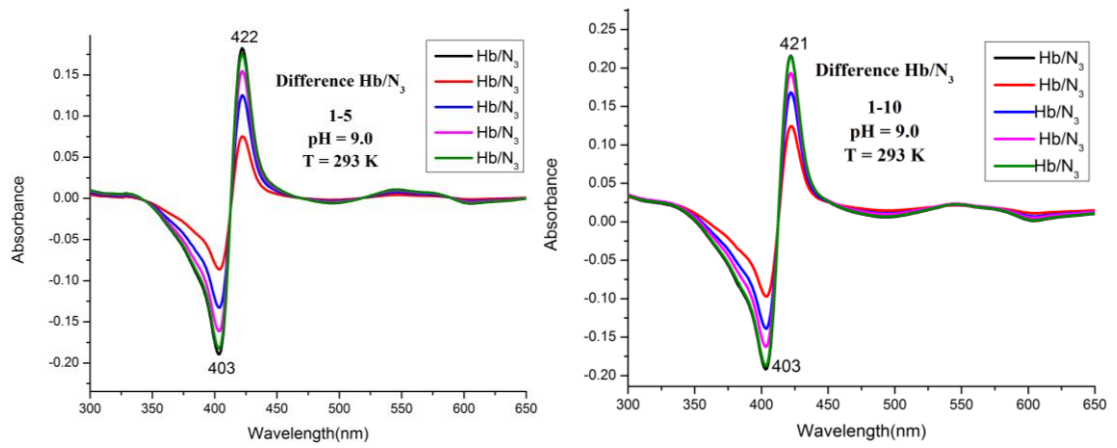


**Γράφημα 3:** Στα αριστερά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του συμπλόκου Hb-N<sub>3</sub> στην οξειδωμένη μορφή της Hb σε pH 7.0 και συγκέντρωση C<sub>Hb</sub> = 5 μM σε αναλογία Hb-N<sub>3</sub> ίση με 1:50, στα δεξιά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του ίδιου συμπλόκου με αναλογία Hb-N<sub>3</sub> ίση με 2:1.

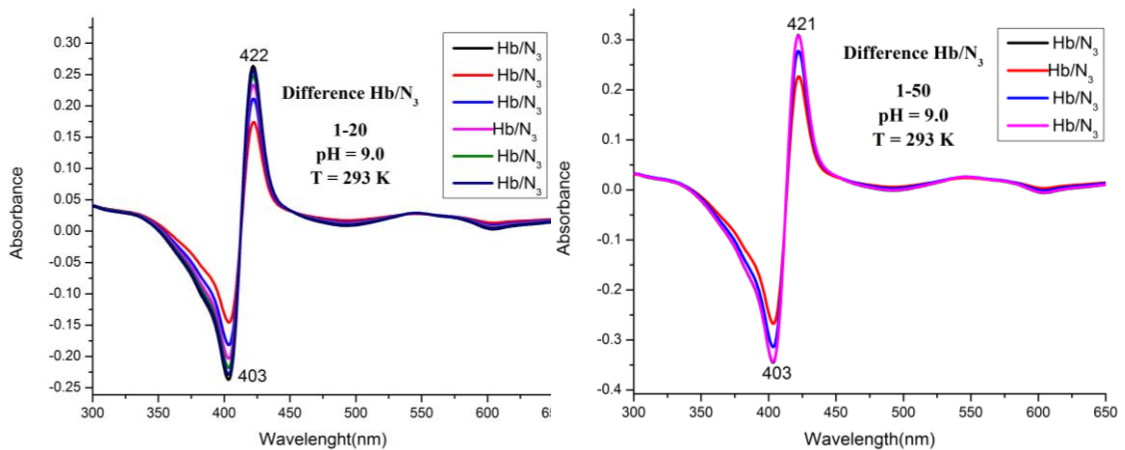
Στα πιο πάνω γραφήματα απεικονίζονται φάσματα διαφοράς της αιμοσφαιρίνης με του αζιδίου σε pH 7.0 σε ένα ευρύ φάσμα συγκεντρώσεων – αναλογιών. Από τα συμπεράσματα που πάρθηκαν από την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας, αρχικά δεν παρατηρούνται μετατοπίσεις στο μήκος κύματος τις κάθε αναλογίας, αφού η αρνητική κορυφή εμφανίζεται στα 403 nm και η θετική κορυφή στα 421-422 nm. Η θετική κορυφή οφείλεται λόγω της δέσμευσης του υποκαταστάτη στην αίμη και η δημιουργία του συμπλόκου Hb-N<sub>3</sub> ενώ η αρνητική κορυφή οφείλεται στην κατανάλωση της αιμοσφαιρίνης.



**Γράφημα 4:** Στα αριστερά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του συμπλόκου Hb-N<sub>3</sub> στην οξειδωμένη μορφή της Hb σε pH 9.0 και συγκέντρωση C<sub>Hb</sub> = 4.8 μM σε αναλογία Hb-N<sub>3</sub> ίση με 1:1, στα δεξιά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του ίδιου συμπλόκου με αναλογία Hb-N<sub>3</sub> ίση με 1:3.

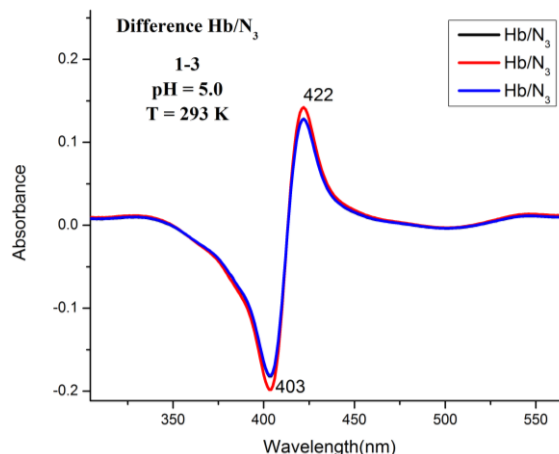
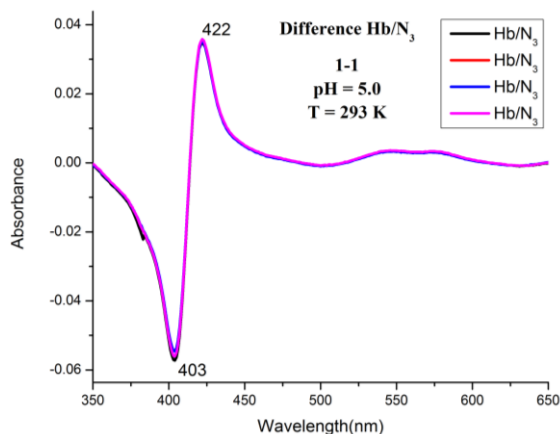


**Γράφημα 5:** Στα αριστερά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του συμπλόκου Hb-N<sub>3</sub> στην οξειδωμένη μορφή της Hb σε pH 9.0 και συγκέντρωση C<sub>Hb</sub>=4.8 μM σε αναλογία Hb-N<sub>3</sub> ίση με 1:5, στα δεξιά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του ίδιου συμπλόκου με αναλογία Hb-N<sub>3</sub> ίση με 1:10.

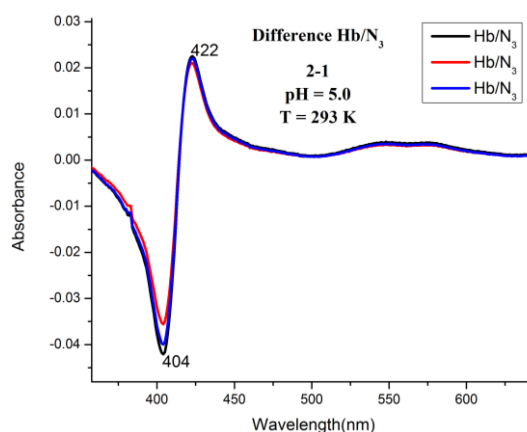
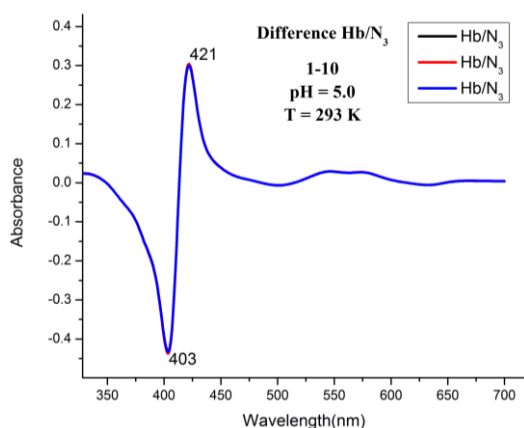


**Γράφημα 2:** Στα αριστερά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του συμπλόκου Hb-N<sub>3</sub> στην οξειδωμένη μορφή της Hb σε pH 9.0 και συγκέντρωση C<sub>Hb</sub>=4.8 μM σε αναλογία Hb-N<sub>3</sub> ίση με 1:20, στα δεξιά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του ίδιου συμπλόκου με αναλογία Hb-N<sub>3</sub> ίση με 1:50.

Τα συμπεράσματα που πάρθηκαν από το pH 9.0 σε όλες τις συγκεντρώσεις είναι ίδια με του pH 7.0 αφού εμφανίζεται θετική κορυφή στα 421-422 nm λόγω της δέσμευσης του υποκαταστάτη στην αίμη της αιμοσφαιρίνης και αρνητική κορυφή στα 403 nm λόγω της κατανάλωσης της αιμοσφαιρίνης.



**Γράφημα 3:** Στα αριστερά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του συμπλόκου Hb-N<sub>3</sub> στην οξειδωμένη μορφή της Hb σε pH 5.0 και συγκέντρωση C<sub>Hb</sub> = 5 μM σε αναλογία Hb-N<sub>3</sub> ίση με 1:1, στα δεξιά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του ίδιου συμπλόκου με αναλογία Hb-N<sub>3</sub> ίση με 1:3.

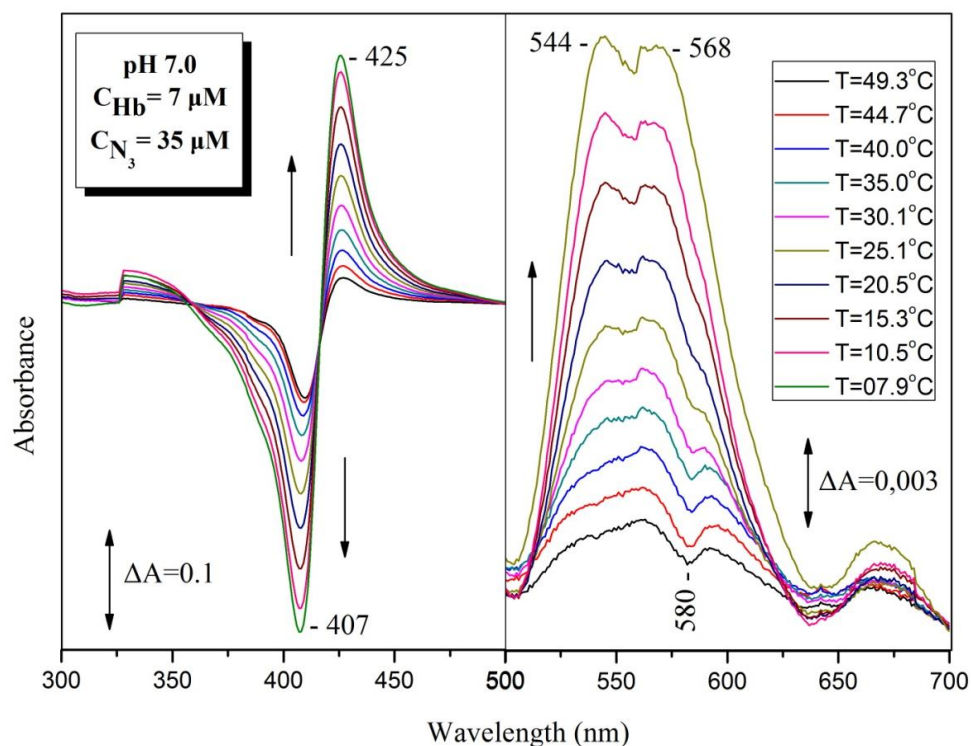


**Γράφημα 4:** Στα αριστερά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του συμπλόκου Hb-N<sub>3</sub> στην οξειδωμένη μορφή της Hb σε pH 5.0 και συγκέντρωση C<sub>Hb</sub> = 5 μM σε αναλογία Hb-N<sub>3</sub> ίση με 1:10, στα δεξιά απεικονίζεται φάσμα διαφοράς του ίδιου συμπλόκου με αναλογία Hb-N<sub>3</sub> ίση με 2:1.

Οι κορυφές που εντοπίζονται στα γραφήματα απορρόφησης (A) – Μήκους κύματος (nm) είναι στα 403 nm η αρνητική κορυφή και στα 422 nm η θετική κορυφή. Η ύπαρξη των θετικών κορυφών οφείλεται στην δέσμευση του αζιδίου στην αίμη και στην δημιουργία του συμπλόκου Hb-N<sub>3</sub> ενώ η αρνητική κορυφή οφείλεται λόγω της κατανάλωσης του συμπλόκου. Συμπερασματικά, σε όλα τα pH παρατηρήθηκε ξεκάθαρη δέσμευση του αζιδίου στην αίμη της αιμοσφαιρίνης η οποία φυσικά είναι εξαρτώμενη από την συγκέντρωση του υποκαταστάτη.

Στην συνέχεια διεξάχθηκαν πειράματα στα pH 7.0, pH 5.0 και pH 9.0 διαφοροποιώντας το παράγοντα της θερμοκρασίας και την συγκέντρωση του αζιδίου του νατρίου, για να παρατηρηθεί πως συμπεριφέρεται η πρωτεΐνη σε χαμηλές και σε υψηλές θερμοκρασίες, η συμπεριφορά της δομής και των αμινοξέων που την περιβάλλουν στο εγγύς και στο άπω

περιβάλλον (distal and proximal environment). Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν από τα πειράματα της δέσμευσης του συμπλόκου Hb-N<sub>3</sub> με συντελεστή την θερμοκρασία αναγράφονται στο ακόλουθο γράφημα, στην περιοχή του Ορατού – Υπεριώδους. Οι θερμοκρασίες στις οποίες εκτίθηκε η πρωτεΐνη (Hb) αρχίζουν από 7.9 °C η μικρότερη και καταλήγουν στην μεγαλύτερη 49.3 °C.



**Γράφημα 5: Φάσμα διαφοράς βάση την θερμοκρασία σε pH 7.0**

Στο γράφημα 9 απεικονίζονται τα UV/Vis φάσματα διαφοράς, όπου παρατηρείτε η ένταση της κορυφής να μειώνεται καθώς μειώνεται η αναλογία – συγκέντρωση. Προκύπτουν δύο κορυφές, στα 425 nm η θετική λόγω της δέσμευσης του συμπλόκου Hb-N<sub>3</sub> και στα 407 nm η αρνητική κορυφή λόγω της κατανάλωσης του συμπλόκου. Τα πειράματα με τις θερμοκρασίες έχουν γίνει και στο pH 5.0 και σε pH 9.0 χωρίς καμία διαφορά από το pH 7.0. Συμπερασματικά, παρατηρήθηκε ότι η δέσμευση του υποκαταστάτη αζιδίου στην αίμη είναι μεγαλύτερη όσο η θερμοκρασία μειώνεται. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στους θερμοδυναμικούς παράγοντες σχηματισμού του συμπλόκου Hb-N<sub>3</sub> (εντροπία (ΔS) και ενθαλπία (ΔH)).

## 5.5 Βιβλιογραφία

Harris, D.C. (2009). *Ποσοτική Χημική Ανάλυση, Α*, (Ν. Χανιωτάκης, Μ. Φουσκάκη, Κ. Περδικάκη, Β. Βαμβάκη, Μ. Χατζημαρινάκη, Μεταφρ.). Ηράκλειο: Κρήτης



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 6

### ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΟΡΑΤΟΥ – ΥΠΕΡΙΩΔΟΥΣ (UV/Vis) ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΗΣ ΛΙΓΝΙΝΗΣ (LiP)

#### 6.1 Εισαγωγή-Στόχος

Για την αρχική μελέτη της LiP πραγματοποιήθηκε οπτικός χαρακτηρισμός των συμπλόκων που δημιουργεί τόσο σε οξειδωμένη, όσο και σε ανηγμένη μορφή με διάφορους υποκαταστάτες όπως το μονοξείδιο του άνθρακα (CO), το κυάνιο (CN), το αζίδιο (N<sub>3</sub>) και το μοριακό οξυγόνο (O<sub>2</sub>).

Με την χρήση της τεχνικής Φασματοσκοπίας Ορατού – Υπεριώδους (UV/Vis) διεξάχθηκαν τα απαραίτητα πειράματα με σκοπό το χαρακτηρισμό των ιδιοτήτων του ενεργού της κέντρου, και για να παρατηρηθούν οι ηλεκτρονικές μεταβάσεις των μορίων της πρωτεΐνης.

Τα πειράματα που διεξάχθηκαν με την χρήση της φασματοσκοπίας UV/Vis έγιναν σε ένα ευρύ φάσμα pH 5.5-9.0. Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων της LiP αντιμετωπίστηκαν προβλήματα τα οποία σχετίζονται με την δυσκολία διάλυσης της πρωτεΐνης στα ρυθμιστικά διαλύματα, αλλά και επειδή υπήρχε λίγη ποσότητα πρωτεΐνης με αποτέλεσμα οι κορυφές που παρατηρούνται στα φάσματα απορρόφησης (A) – Μήκους κύματος (nm) να είναι πολύ μικρές.

Τα φάσματα που συλλέχθηκαν από τα πειράματα της λιγνίνης υπεροξειδάσης χρησιμοποιώντας ως υποκαταστάτη το ανιόν αζιδίου (N<sub>3</sub><sup>-</sup>), το ανιόν κυανίου (CN<sup>-</sup>), το αέριο μονοξείδιο του άνθρακα (CO) και ως αναγωγικό το θειοθειικό νάτριο (Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>)

## 6.2 Πειραματική διαδικασία

Εφαρμόζοντας την φασματοσκοπική τεχνική Ορατού – Υπεριώδους (UV/Vis) και χρησιμοποιώντας ως ένζυμο την υπεροξειδάση της Λιγνίνης (LiP) και ως υποκαταστάτη το αέριο μονοξείδιο του άνθρακα με σκοπό το χαρακτηρισμό των ιδιοτήτων του ενεργού κέντρου της υπεροξειδάση της Λιγνίνης διεξάχθηκαν τα ακόλουθα πειράματα διαφοροποιώντας τις συνθήκες διεξαγωγής (pH). Τα πειράματα διεξάχθηκαν σε pH 5.5 , 7.5 και 9.0.

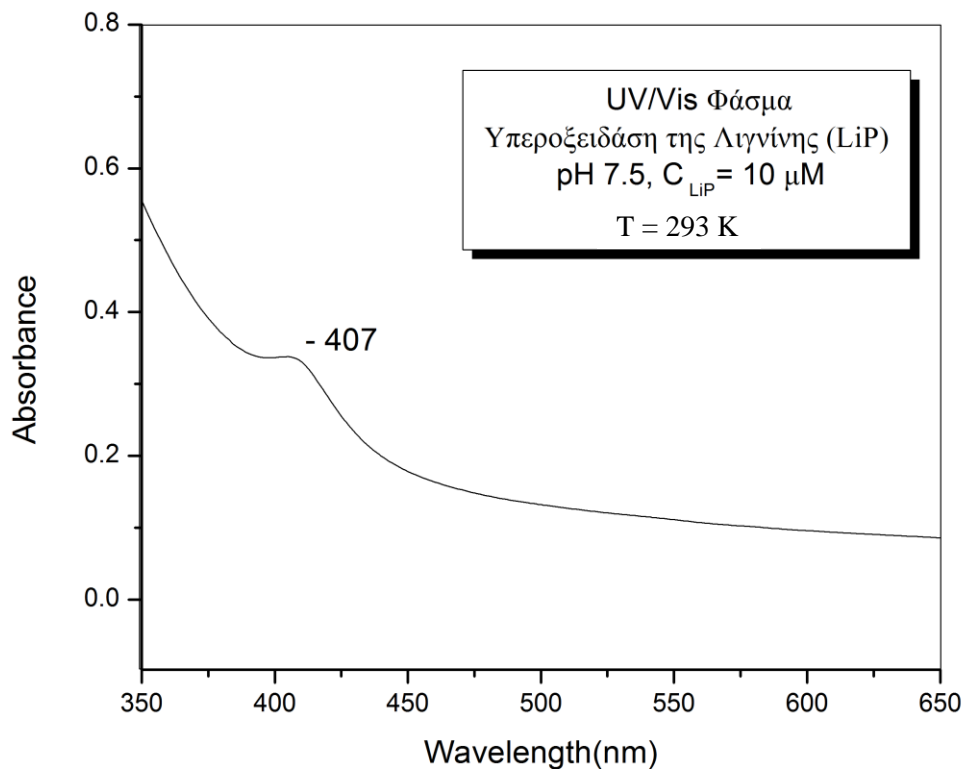
Σε πρώτο στάδιο διαλύεται η πρωτεΐνη (LiP) σε ρυθμιστικό διάλυμα (buffer) λόγω του ότι θα κρατήσει το pH του διαλύματος σταθερό για αρκετό χρόνο. Για την παρασκευή των ρυθμιστικών διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκε Potassium phosphate monobasic για pH 5.5, HEPES για pH 7.5 και για pH 9.0 Potassium phosphate dibasic. Στην συνέχεια το προς εξέταση δείγμα τοποθετείτε στην κυψελίδα UV/Vis όπου και πάρθηκαν τα απόλυτα φάσματα (Absolute), για την αναγωγή του δείγματος χρησιμοποιήθηκε ελάχιστη ποσότητα αναγωγικού sodium dithionite ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ). Αφού το δείγμα έχει αναχθεί ακολούθως προστέθηκε ο υποκαταστάτης. Οι υποκαταστάτες που χρησιμοποιήθηκαν συνολικά για τα πειράματα με την υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP) είναι το κυάνιο ( $\text{CN}^-$ ), το αζίδιο του νατρίου ( $\text{NaN}_3$ ) και το αέριο μονοξείδιο του άνθρακα ( $\text{CO}$ ).

Για την παρασκευή του δείγματος που έχει ως υποκαταστάτη το αέριο μονοξείδιο του άνθρακα, το προς εξέταση δείγμα τοποθετείτε σε κυψελίδα UV/Vis κάτω από αναερόβιες συνθήκες. Στην συνέχεια το δείγμα περνάει από μια διαδικασία στην γραμμή του κενού όπου το δείγμα μαζί με το ρυθμιστικό διάλυμα και το αναγωγικό sodium dithionite ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ ) βρίσκεται κάτω από συνθήκες κενού και συνθήκες αζώτου. Κατά την τοποθέτηση του αναγωγικού στο δείγμα παρατηρείτε αλλαγή του χρώματος από ελαφρύ κόκκινο σε πιο βαθύ κόκκινο λόγω του ότι το δείγμα έχει αναχθεί με αποτέλεσμα να δημιουργείται διαφορετικό σύμπλοκο, το οποίο απορροφά σε διαφορετικά μήκη κύματος. Τέλος, τοποθετείται ο υποκαταστάτης, το αέριο  $\text{CO}$  για να παρατηρηθεί η δημιουργία συμπλόκου με την πρωτεΐνη και η δέσμευση στην αίμη αλλά και η κατανάλωση της πρωτεΐνης.

Ακολουθούν τα αποτελέσματα που πάρθηκαν κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων της υπεροξειδάσης της Λιγνίνης (LiP).

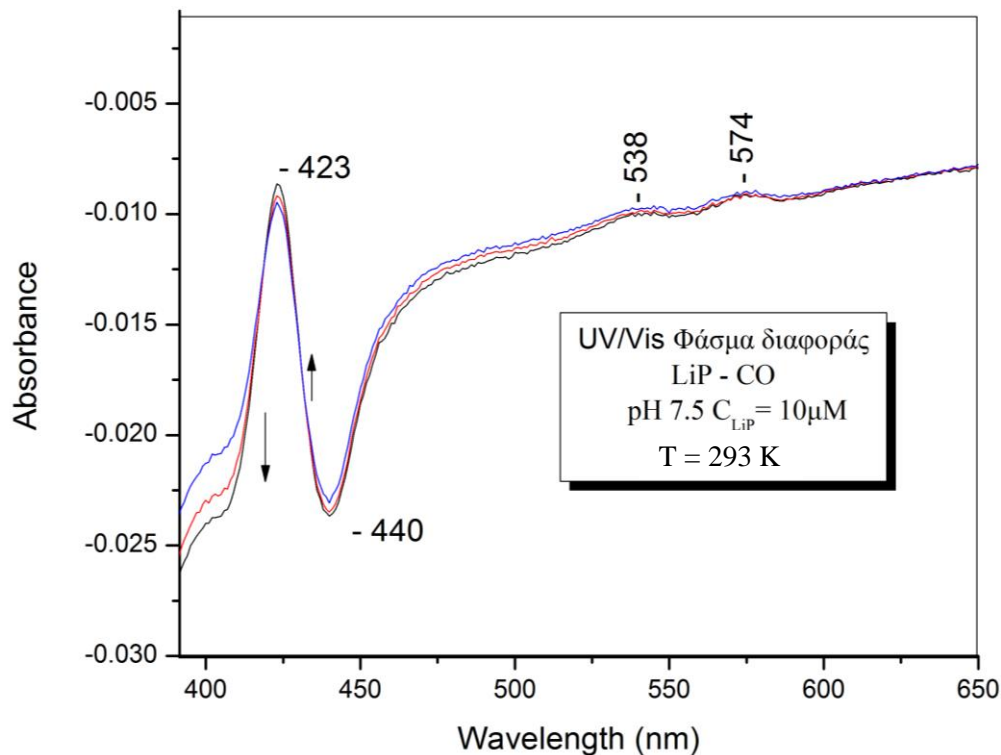
### 6.3 Αποτελέσματα της δέσμευσης των υποκαταστατών στην υπεροξειδάση της λιγνίνης

Το γράφημα 15 απεικονίζει το απόλυτο φάσμα της υπεροξειδάσης της Λιγνίνης (LiP) σε pH 7.5, παρατηρείται θετική κορυφή στα 407 nm λόγω του ότι η LiP βρίσκεται στην οξειδωμένη της μορφή με αποτέλεσμα να απορροφά η αίμη της πρωτεΐνης σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Σε όλο το εύρος pH που διεξάχθηκαν τα πειράματα με την LiP δεν υπήρχαν διακυμάνσεις στο μήκος κύματος που απορροφάει η οξειδωμένη της μορφή.

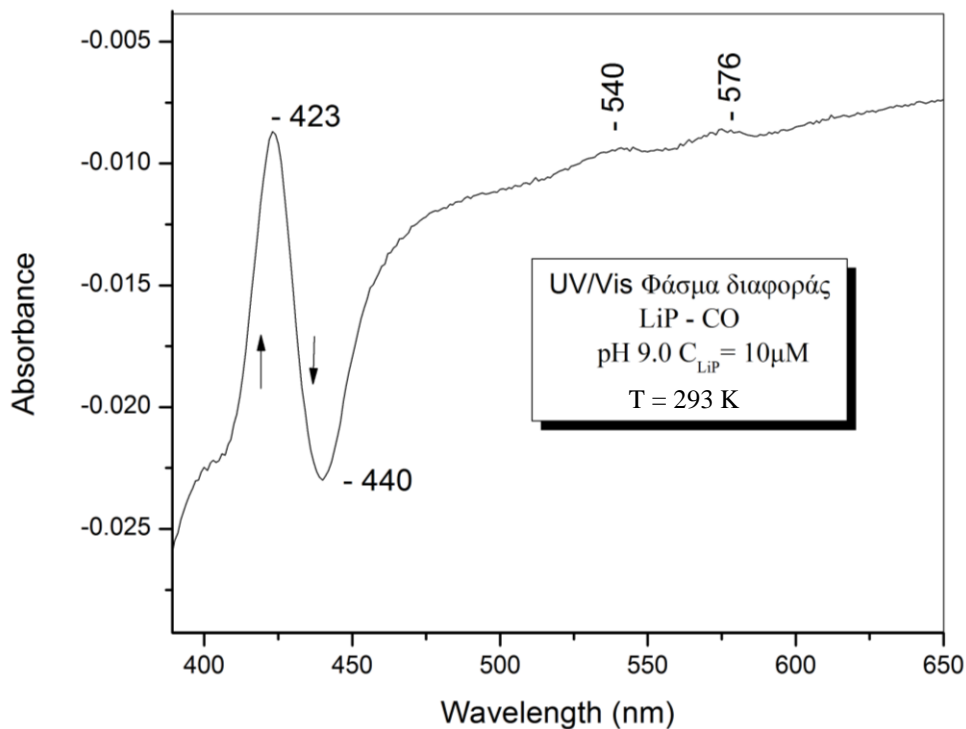


Γράφημα 6: UV/Vis Απόλυτο φάσμα της Υπεροξειδάσης της Λιγνίνης (LiP) σε pH 7.5.

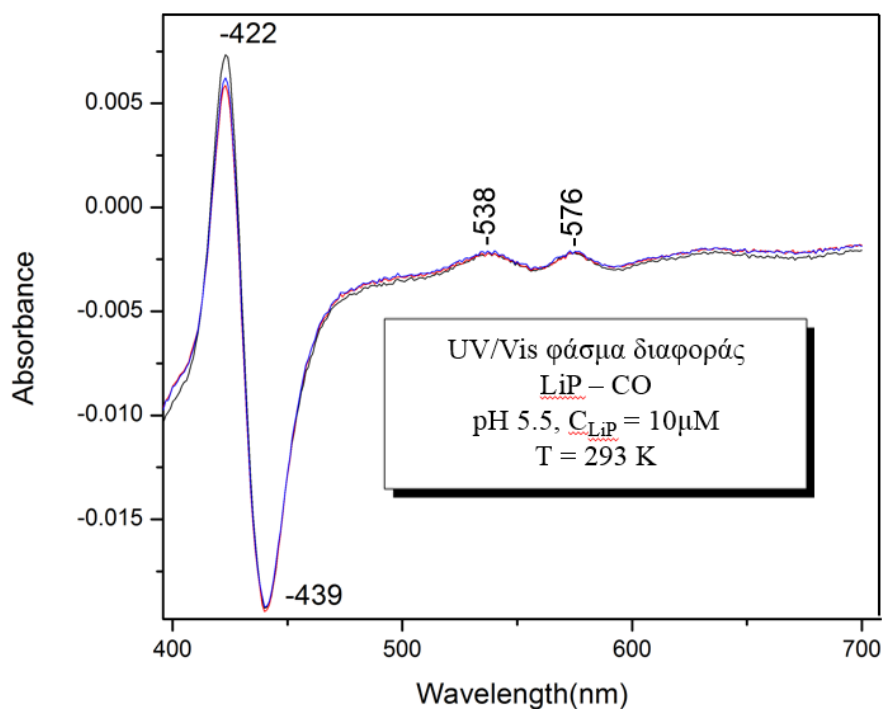
Στην συνέχεια πάρθηκαν φάσματα διαφοράς με την υπεροξειδάση της λιγνίνης και το αέριο μονοξείδιο του άνθρακα (CO) κάτω από αναερόβιες συνθήκες.



Γράφημα 7: Φάσμα διαφοράς του συμπλόκου LiP – CO στην ανηγμένη μορφή της LiP σε pH 7.5 και συγκέντρωση C<sub>LiP</sub> = 10 μM.



Γράφημα 8: Φάσμα διαφοράς του συμπλόκου LiP – CO στην ανηγμένη μορφή της LiP σε pH 9.0 και συγκέντρωση C<sub>LiP</sub> = 10 μM

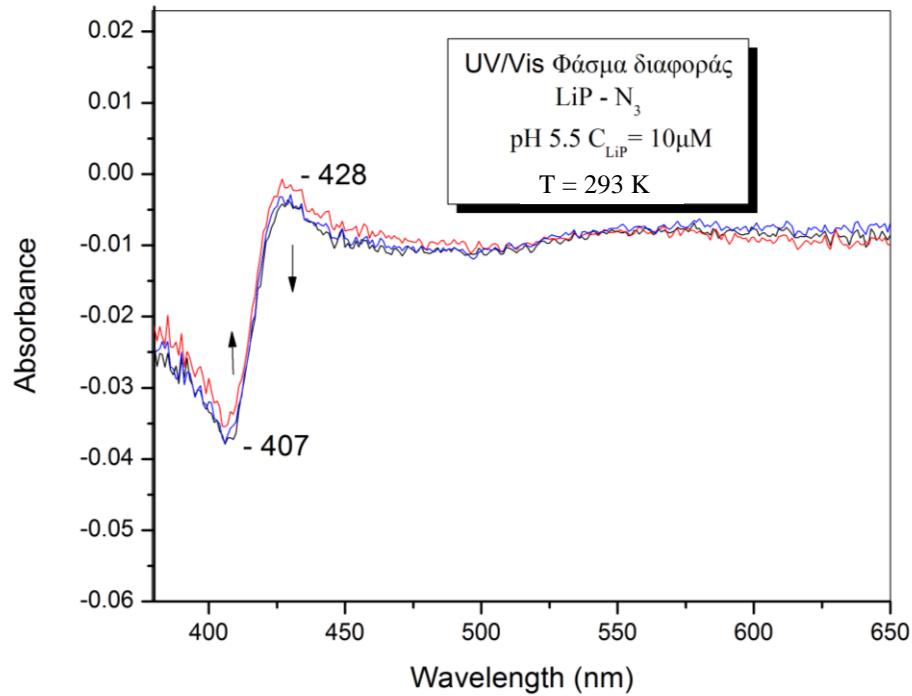


**Γράφημα 9: Φάσμα διαφοράς του συμπλόκου LiP – CO στην ανηγμένη μορφή της LiP σε pH 5.5 και συγκέντρωση  $C_{LiP} = 10 \mu M$ .**

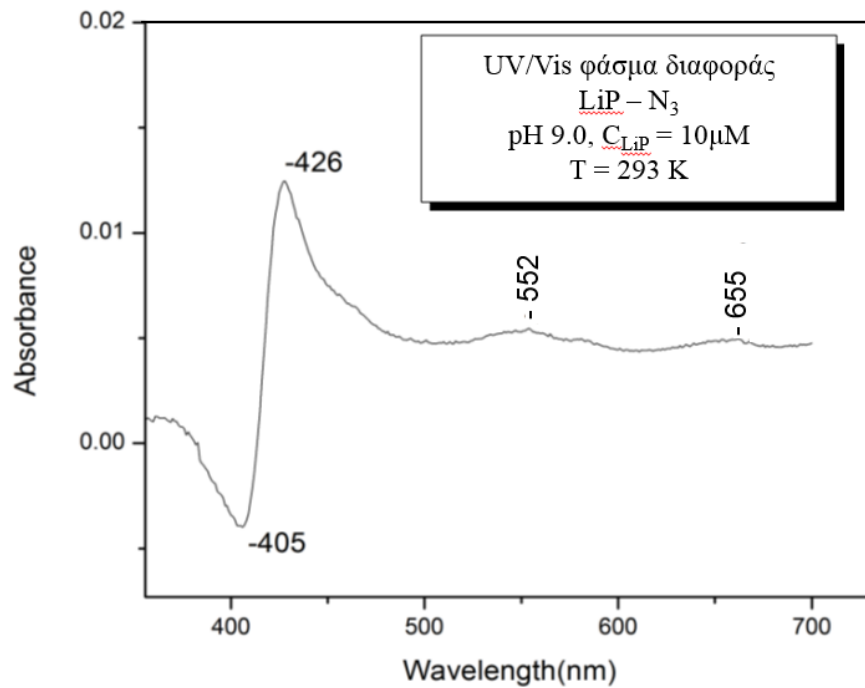
Το φάσμα διαφοράς του συμπλόκου LiP-CO σε pH 7.5 παρουσιάζει μια θετική κορυφή σε μήκος κύματος 423 nm και αρνητική κορυφή στα 440 nm, ως ένδειξη συναρμογής του υποκαταστάτη στην αίμη. Η θετική κορυφή αντιπροσωπεύει το σύμπλοκο LiP-CO. Η αρνητική κορυφή αντιπροσωπεύει την πρωτεΐνη που καταναλώνεται. Επίσης παρατηρούνται οι απορροφήσεις των Q-bands στα 538 και 574 nm. Σε pH 9.0 και pH 5.5 παρουσιάζονται οι ίδιες κορυφές στα ίδια μήκη κύματος.

Στην συνέχεια διεξάχθηκαν τα πειράματα με την υπεροξειδάση της Λιγνίνης (LiP) με την χρήση διαφορετικών υποκαταστατών. Χρησιμοποιήθηκε το κυάνιο και το αζίδιο του νατρίου για να παρατηρηθούν οι ιδιότητες του ενεργού κέντρου της πρωτεΐνης.

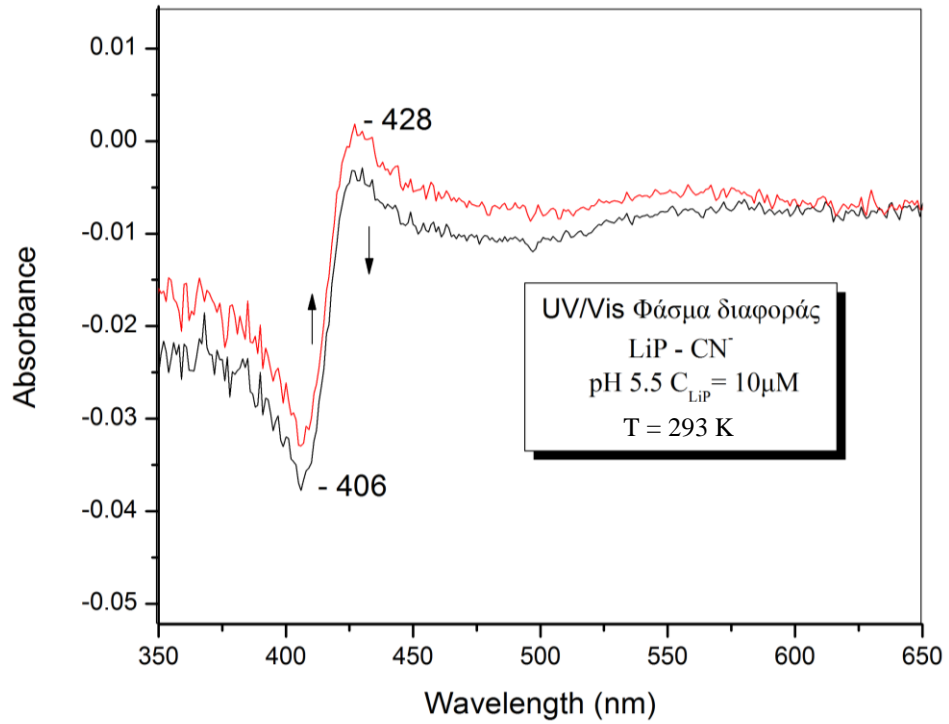
Τα αποτελέσματα που πάρθηκαν σε όλο το εύρος των pH είναι τα εξής:



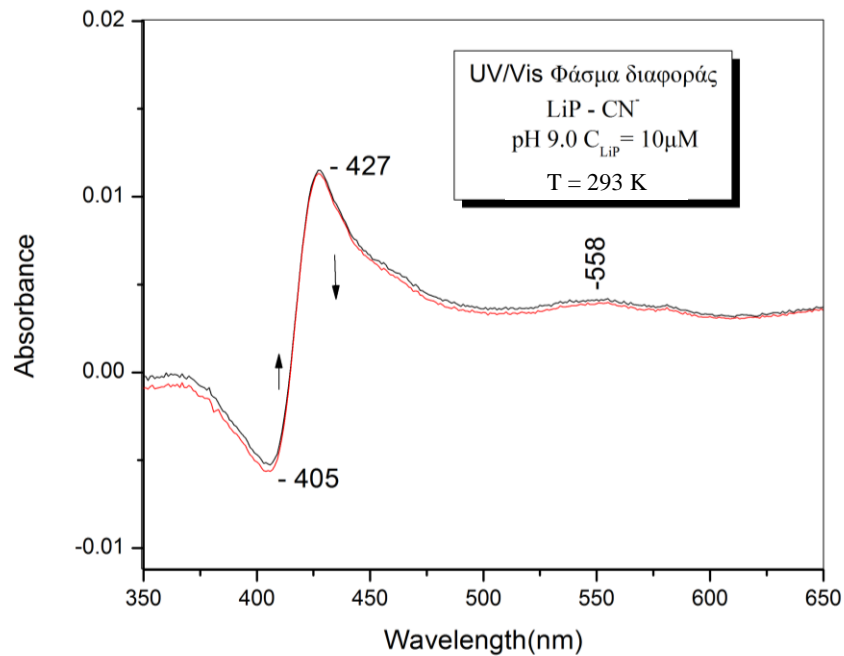
Γράφημα 10: Φάσμα διαφοράς του συμπλόκου LiP – N<sub>3</sub> στην ανηγμένη μορφή της LiP σε pH 5.5 με συγκέντρωση C<sub>LiP</sub> = 10 μM και συγκέντρωση C<sub>N<sub>3</sub></sub> = 50 μM



Γράφημα 11: Φάσμα διαφοράς του συμπλόκου LiP – N<sub>3</sub> στην ανηγμένη μορφή της LiP σε pH 9.0 με συγκέντρωση C<sub>LiP</sub> = 10 μM και συγκέντρωση C<sub>N<sub>3</sub></sub> = 50 μM.

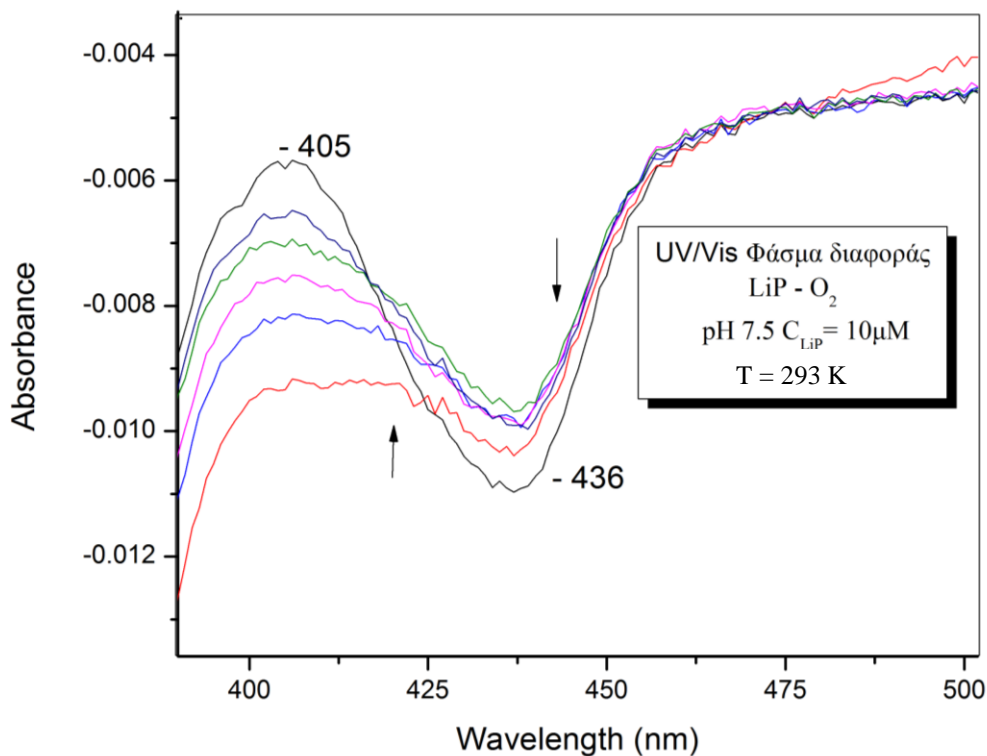


Γράφημα 12: Φάσμα διαφοράς του συμπλόκου LiP – CN στην ανηγμένη μορφή της LiP σε pH 5.5 με συγκέντρωση  $C_{LiP} = 10 \mu M$  και συγκέντρωση  $C_{CN^-} = 50 \mu M$ .



Γράφημα 13: Φάσμα διαφοράς του συμπλόκου LiP – CN στην ανηγμένη μορφή της LiP σε pH 9.0 με συγκέντρωση  $C_{LiP} = 10 \mu M$  και συγκέντρωση  $C_{CN^-} = 50 \mu M$

Αφού διεξάχθηκαν τα πειράματα με όλους τους υποκαταστάτες και τα αποτελέσματα που πάρθηκαν είναι τα ίδια με το CO, τέλος χρησιμοποιήθηκε ως υποκαταστάτης το οξυγόνο για το pH 7.5.



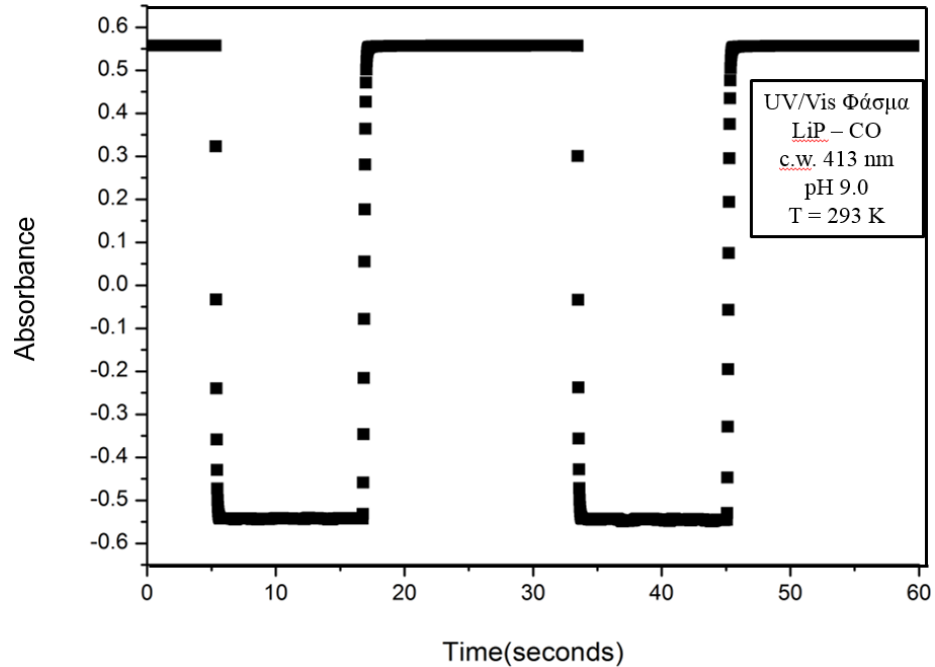
**Γράφημα 14:** Φάσμα διαφοράς του συμπλόκου LiP – O<sub>2</sub> στην ανηγμένη μορφή της LiP σε pH 7.5 με συγκέντρωση C<sub>LiP</sub> = 10 μM.

Το γράφημα 18 απεικονίζει ένα φάσμα διαφοράς της υπεροξειδάσης της Λιγνίνης (LiP) με το αέριο οξυγόνο (O<sub>2</sub>). Στα 405 nm παρατηρείται μια θετική κορυφή λόγω της δέσμευσης του οξυγόνου στην αίμη της υπεροξειδάσης της λιγνίνης, ενώ η αρνητική κορυφή στα 436 nm προκύπτει λόγω της κατανάλωσης της ανηγμένης μορφής της πρωτεΐνης. Το παραγόμενο σύμπλοκο είναι ασταθές και αποσυντίθεται μέσα σε λίγα λεπτά. Στο συγκεκριμένο πείραμα παρουσιάζονται οι κορυφές όπου κατά το πέρασμα λίγο δευτερολέπτων μειώνονται με αποτέλεσμα να μην δημιουργείται σταθερό σύμπλοκο όπως με το αέριο μονοξείδιο του άνθρακα.

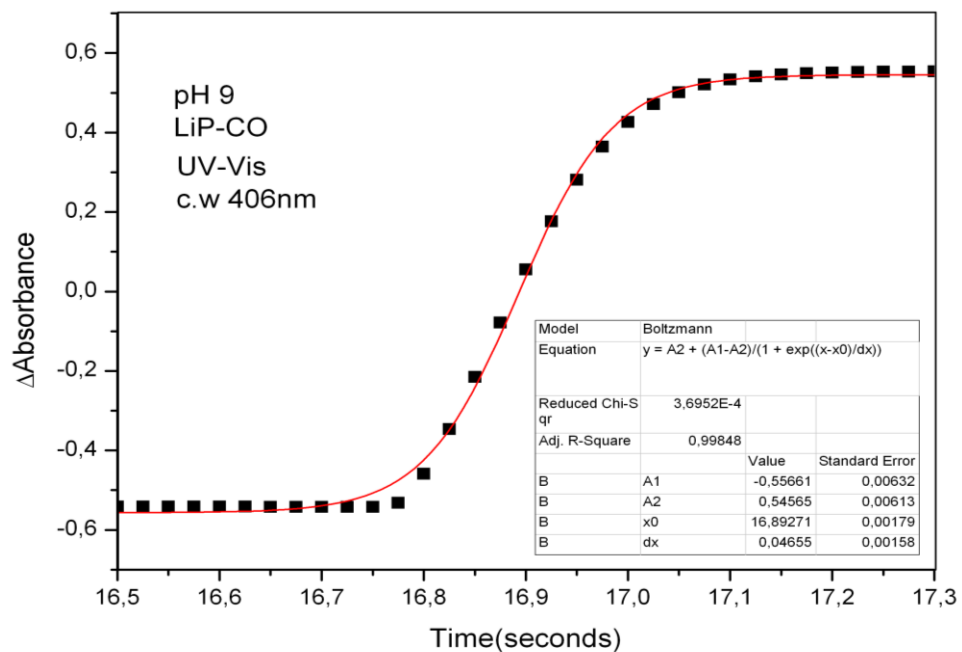
Συνοψίζοντας, σε όλες τις περιπτώσεις υπήρξε δημιουργία σταθερών συμπλόκων και σε ένα εύρος pH 5.0-9.0. Στην περίπτωση του αζιδίου υπήρξε ένα μικρότερο ποσοστό δέσμευσης, ίσως λόγω του μεγέθους του υποκαταστάτη σε σχέση με τα διατομικά CO και CN. Επίσης, στην περίπτωση αντίδρασης με το O<sub>2</sub> το παραγόμενο σύμπλοκο ήταν ασταθές και έφθινε με την πάροδο του χρόνου λόγω της οξειδωσης του σιδήρου Fe.



Στην συνέχεια διεξάχθηκαν πειράματα με την υπεροξειδάση της λιγνίνης για να μελετηθεί η κινητική της πρωτεΐνης με την χρήση συνεχούς laser (c.w.) σε μήκος κύματος 413 nm. Αρχικά στο γράφημα 19 παρουσιάζεται ένα στιγμιότυπο από τα 0-60 δευτερόλεπτα.



Γράφημα 15: Κινητική του συμπλόκου LiP-CO



Γράφημα 16: Κινητική του συμπλόκου LiP-CO

Τα πειράματα που διεξάχθηκαν στο UV/Vis με την χρήση laser στα 406 nm στα pH 5.5, pH 7.2, pH 9.0 παρατηρείτε στον άξονα τον Y η απορρόφηση και στον άξονα τον X ο χρόνος από 0-60 seconds. Μέχρι τα πρώτα 5 s το laser ήταν κλειστό στην συνέχεια το laser κατευθύνθηκε προς το δείγμα, αυτό είχε ως αποτέλεσμα την φωτόλυση του συμπλόκου LiP-CO. Στην συνέχεια το laser έκλεισε και παρατηρήθηκε η κινητική του φαινομένου της επαναδέσμευσης του CO στην αίμη. Στο γράφημα 25 παρατηρείται εκθετική μορφή (στιγμιότυπο από τα 16.5-20 s). Στην εκθετική φάση του γραφήματος παρουσιάζεται η κινητική του συστήματος για να προσδιοριστεί η σταθερά K από το γνωστό τύπο

$$t_{1/2} = \frac{\ln 2}{k}$$

Ο χρόνος της επαναδέσμευσης του CO υπολογίζεται στα 300-400 ms φανερώνοντας ένα αργό σύστημα, συμβατό με αλληλεπιδράσεις που πιθανόν να δέχεται ο υποκαταστάτης τόσο όταν είναι δεσμευμένος στην αίμη, όσο και όταν είναι ελεύθερος.

#### 6.4 Συμπεράσματα-Μελλοντικοί Στόχοι

Πραγματοποιήθηκε ένας πρώτος βασικός χαρακτηρισμός του ενεργού κέντρου της LiP υπεροξειδάσης με την χρήση μικρών υποκαταστατών. Περαιτέρω μελέτη είναι απαραίτητη σε πιο ακραίες τιμές pH, αλλά και με την τεχνική time-resolved UV/Vis για την κινητική μελέτη των ιδιοτήτων του ενεργού κέντρου της LiP υπεροξειδάσης.

#### 6.5 Βιβλιογραφία

Choinowski, T., Blodig, W., Winterhalter, K. H., & Piontek, K. (1999). The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70 Å resolution reveals a hydroxy group on the Cβ of tryptophan 171: A novel radical site formed during the redox cycle. *Journal of Molecular Biology*, 286(3), 809-827

Edwards, S. L., Raag, R., Wariishi, H., Gold, M. H., & Poulos, T. L. (1993). Crystal structure of lignin peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(2), 750-754

Smith, A. T., Doyle, W. A., Dorlet, P., & Ivancich, A. (2009). Spectroscopic evidence for an engineered, catalytically active trp radical that creates the unique reactivity of lignin peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(38), 16084-16089

Sundaramoorthy, M., Kishi, K., Gold, M. H. & Poulos, T. L. (1994). The crystal structure of manganese peroxidase from *Phanerochate chrysosporium* at 2.06 Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 269(52), 32759-32767.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 7

### **FTIR ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ (IR) ΤΗΣ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΗΣ ΛΙΓΝΙΝΗΣ (LiP) ΚΑΙ ΤΗΣ ΑΙΜΟΣΦΑΙΡΙΝΗΣ (Hb)**

#### **7.1 Εισαγωγή – Στόχος**

Ο προσδιορισμός των ιδιοτήτων του ενεργού κέντρου της υπεροξειδάσης της λιγνίνης, τόσο σε κατάσταση ισορροπίας, όσο και σε μεταβατική κατάσταση (φωτόλυση CO) μελετήθηκε και με την χρήση της FTIR φασματοσκοπίας σε pH 4.9 και pH 7.3, με στόχο την παρατήρηση φαινομένων πρωτονίωσης και αποπρωτονίωσης αμινοξέων του αιμικού περιβάλλοντος και ειδικότερα της ιστιδίνης και αργινίνης.

Στο κεφάλαιο αυτό αναλύεται η διαδικασία παρασκευής των δειγμάτων για την υπέρυθρη φασματοσκοπία χρησιμοποιώντας ως πρωτεΐνη την Λιγνίνη Υπεροξειδάση (LiP). Στην συνέχεια παρατίθενται οι τεχνικές που χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό των ιδιοτήτων του ενεργού κέντρου των δειγμάτων.

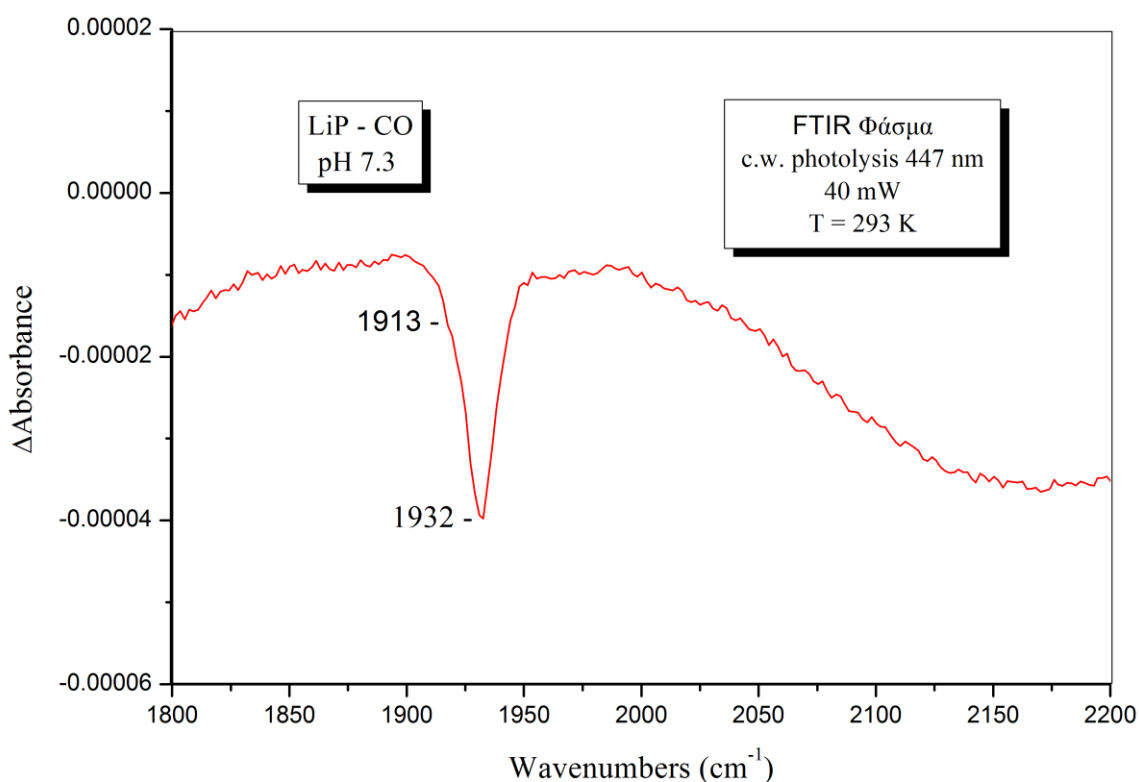
Κατά την διεξαγωγή των πειραμάτων με την χρήση της φασματοσκοπίας υπέρυθρου χρησιμοποιήθηκε ως αναγωγικό μέσο το θειοθειικό νάτριο (sodium dithionite, Na<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) και ως υποκαταστάτης το αέριο μονοξείδιο του άνθρακα (CO), ούτως ώστε να δημιουργηθεί ένα σταθερό σύμπλοκο LiP-CO και με αυτό τον τρόπο να παρατηρηθούν οι δονήσεις των μορίων αλλά και τις αλλαγές στην δομή και στο ενεργό κέντρο της πρωτεΐνης.

## 7.2 Πειραματική διαδικασία

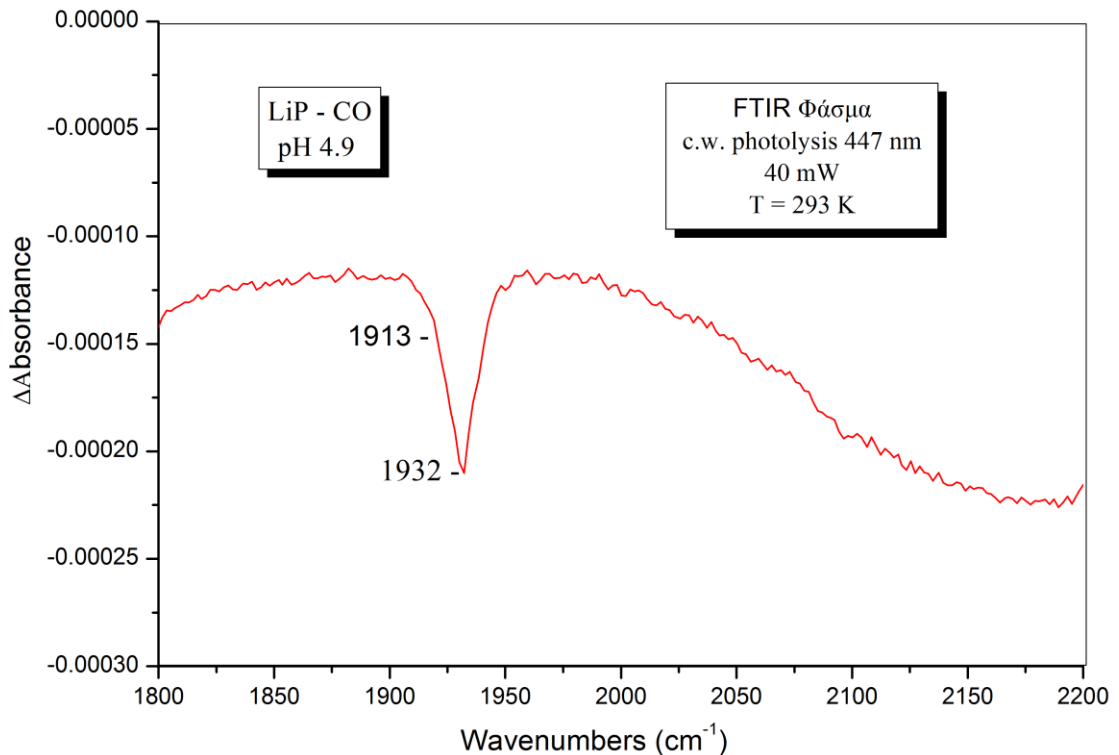
Εφαρμόζοντας την τεχνική της φασματοσκοπίας υπερύθρου (IR) και χρησιμοποιώντας ως ένζυμο την υπεροξειδάση της λιγνίνης (LiP) και ως υποκαταστάτη το αέριο μονοξείδιο του άνθρακα με σκοπό το χαρακτηρισμό των ιδιοτήτων του ενεργού κέντρου της LiP διεξάχθηκαν τα ακόλουθα πειράματα σε pH 7.3.

Κατά την διεξαγωγή της πειραματικής διαδικασίας, το προς εξέταση δείγμα ανάγεται με την διαδικασία της γραμμή του κενού στην συνέχεια τοποθετούμε το αέριο μονοξείδιο του άνθρακα λόγω του ότι δεσμεύεται στην ανηγμένη μορφή της πρωτεΐνης. Τέλος, τοποθετείται το προς εξέταση δείγμα στην κυψελίδα του φασματοφωτόμετρου υπερύθρου αφού πάρθηκε αρχικά ως φάσμα αναφοράς αυτό του ρυθμιστικού διαλύματος (buffer).

## 7.3 Αποτελέσματα της δέσμευσης της λιγνίνης υπεροξειδάσης με το αέριο μονοξείδιο του άνθρακα



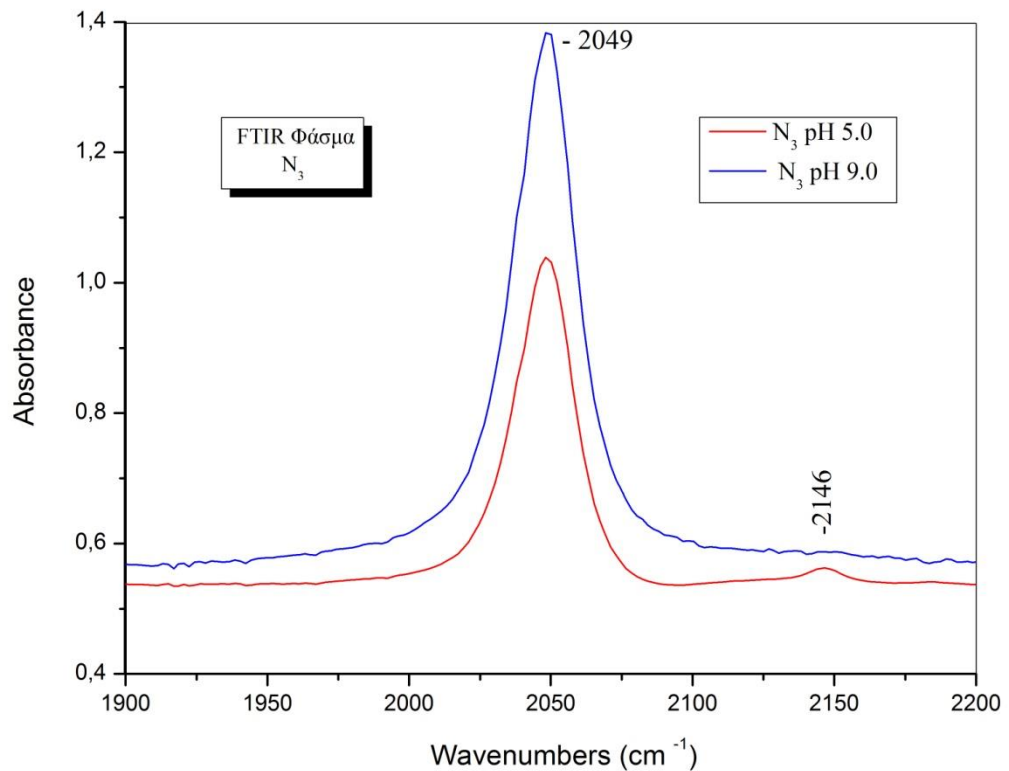
Γράφημα 21: Υπέρυθρο φάσμα του συμπλόκου LiP – CO σε pH 7.3 με συγκέντρωση  $C_{LiP} = 1 \text{ mM}$  και laser c.w 447 nm με ισχύ 40 mW.



**Γράφημα 22: Υπέρυθρο φάσμα του συμπλόκου LiP – CO σε pH 4.9 με συγκέντρωση  $C_{LiP} = 1 \text{ mM}$  και laser c.w 447 nm με ισχύς 40 mW**

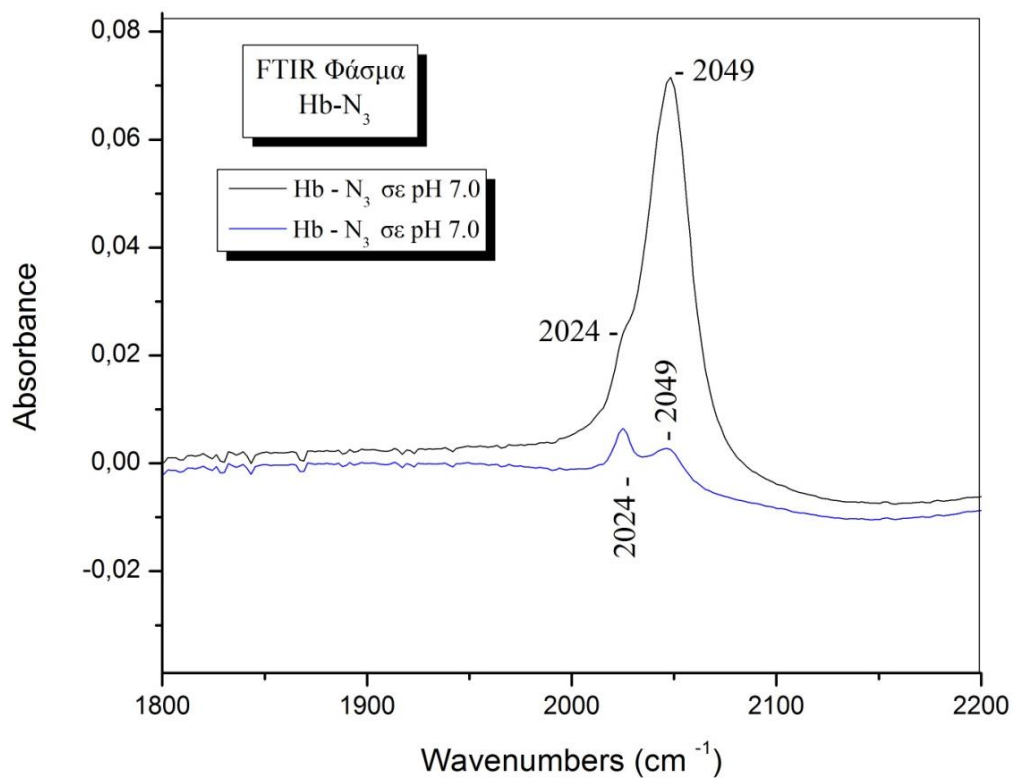
Στο γράφημα 21 και 22 απεικονίζεται ένα υπέρυθρο φάσμα του συμπλόκου LiP – CO όπου παρατηρείτε μια αρνητική κορυφή στους  $1932 \text{ cm}^{-1}$ , είναι αρνητική λόγω του ότι πάρθηκε φάσμα αναφοράς το προς εξέταση δείγμα. Επίσης λόγω της φωτόλυσης του συμπλόκου LiP-CO, στους  $1913 \text{ cm}^{-1}$  παρατηρείτε ένας μικρός ώμος που ίσως να πρόκειται για την ίδια κορυφή λόγω της ομοιότητας του περιβάλλοντος της υπεροξειδάσης της λιγνίνης με την υπεροξειδάση του χρένου (HRP). Πιθανόν να είναι ηλεκτροστατική αλληλεπίδραση με δεσμό υδρογόνου με την ιστιδίνη και την αργινίνη που βρίσκονται στο εγγύς και στο άπω περιβάλλον (proximal and distal environment).

#### 7.4 Αποτελέσματα της δέσμευσης της αιμοσφαιρίνης με το αέριο μονοξείδιο του άνθρακα και το ανιόν αζιδίου



Γράφημα 23: Υπέρυθρο φάσμα του ελεύθερου  $N_3$ .

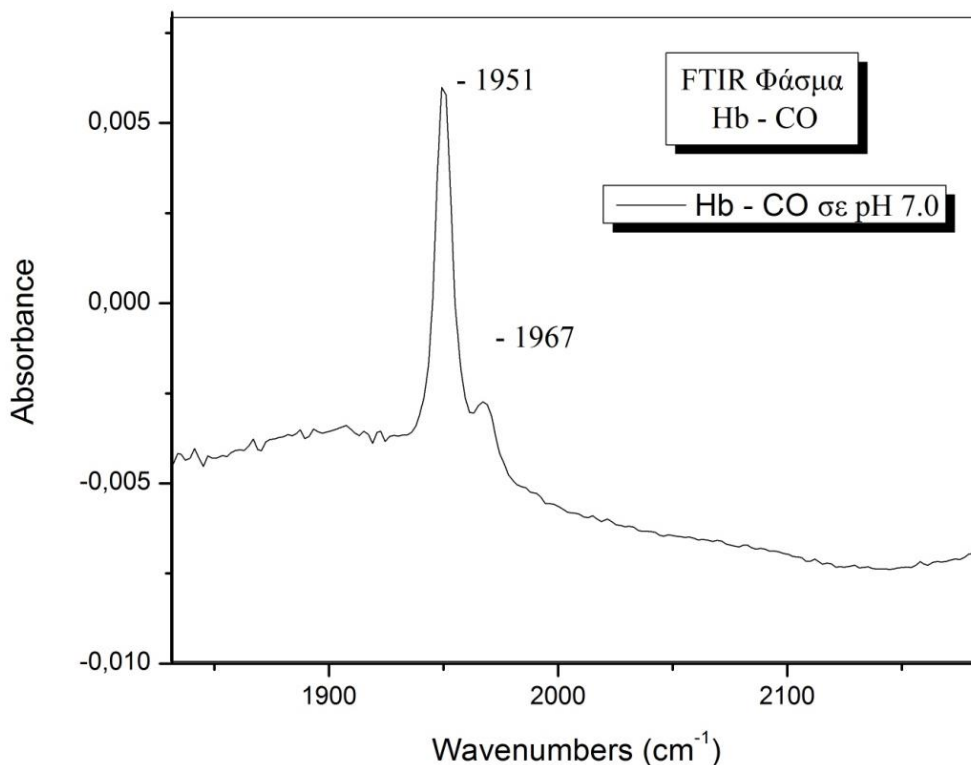
Στο γράφημα 23 απεικονίζεται το ελεύθερο  $N_3$  το οποίο απορροφά στους 2049  $cm^{-1}$ , ενώ στους 2146  $cm^{-1}$  είναι η προτονιωμένη μορφή του λόγω του χαμηλού pH (5.0). Η κόκκινη φασματική γραμμή είναι σε pH 5.0 ενώ η μπλε φασματική γραμμή είναι σε pH 9.0.



**Γράφημα 24:** Υπέρυθρο φάσμα του συμπλόκου Hb – N<sub>3</sub>.

Στο γράφημα 24 απεικονίζεται το σύμπλοκο Hb-N<sub>3</sub> στους 2049 cm<sup>-1</sup>, παρατηρείται όμως στην γκρίζα φασματική γραμμή που διακρίνεται καλύτερα στην μπλε φασματική γραμμή η οποία προκύπτει από την αφαίρεση του ελεύθερου αζιδίου από το δεσμευμένο. Στους 2024 και 2049 cm<sup>-1</sup> απορροφούν οι δύο διαμορφώσεις του συμπλόκου Hb-N<sub>3</sub>, ενώ στους 2049 cm<sup>-1</sup> απορροφάει και το ελεύθερο ιόν του αζιδίου.





**Γράφημα 25: Υπέρυθρο φάσμα του συμπλόκου Hb – CO**

Στο γράφημα 25 απεικονίζεται το FTIR φάσμα του συμπλόκου Hb-CO με την δόνηση στους  $1951\text{ cm}^{-1}$  να αντιστοιχεί στην κύρια διαμόρφωση του δεσμευμένου στην αίμη CO και αυτή στους  $1967\text{ cm}^{-1}$  στην δεύτερη διαμόρφωση.

## 7.6 Συμπεράσματα-Μελλοντικοί Στόχοι

Χρησιμοποιώντας ως υποκαταστάτη «ανιχνευτή» το αέριο μονοξείδιο του άνθρακα CO αποκτήσαμε πληροφορίες για τις ιδιότητες του ενεργού κέντρου του ενζύμου, τόσο σε κατάσταση ισορροπίας, όσο και σε μεταβατική κατάσταση (φωτόλυση του CO) σε ένα εύρος pH 4.9-7.3. Παρά το ότι υπήρξαν προβλήματα με την συγκέντρωση των δειγμάτων τα αποτελέσματα έδειξαν στην περιοχή απορρόφησης του δεσμού CO ( $1900\text{-}2200\text{ cm}^{-1}$ ) τουλάχιστον δύο διαμορφώσεις του συμπλόκου LiP-CO, ένδειξη ύπαρξης δεσμών υδρογόνου προς το CO, από το ευρύτερο αιμικό περιβάλλον. Σε αυτό το εύρος δεν παρατηρήσαμε φαινόμενα πρωτονίωσης και αποπρωτονίωσης των distal αμινοξέων της αίμης His και Arg, τα οποία πιθανότατα συμμετέχουν και στην καταλυτική λειτουργία του ενζύμου. Περαιτέρω μελέτη είναι απαραίτητη σε πιο ακραίες τιμές pH, αλλά και με την τεχνική step-scan FTIR για την κινητική μελέτη των ιδιοτήτων του ενεργού κέντρου της LiP υπεροξειδάσης.

## 7.7 Βιβλιογραφία

- Choinowski, T., Blodig, W., Winterhalter, K. H., & Piontek, K. (1999). The crystal structure of lignin peroxidase at 1.70 Å resolution reveals a hydroxy group on the C $\beta$  of tryptophan 171: A novel radical site formed during the redox cycle. *Journal of Molecular Biology*, 286(3), 809-827
- Edwards, S. L., Raag, R., Wariishi, H., Gold, M. H., & Poulos, T. L. (1993). Crystal structure of lignin peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(2), 750-754
- Smith, A. T., Doyle, W. A., Dorlet, P., & Ivancich, A. (2009). Spectroscopic evidence for an engineered, catalytically active trp radical that creates the unique reactivity of lignin peroxidase. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(38), 16084-16089
- Sundaramoorthy, M., Kishi, K., Gold, M. H. & Poulos, T. L. (1994). The crystal structure of manganese peroxidase from Phanerochate chrysosporium at 2.06 Å resolution. *Journal of Biological Chemistry*, 269(52), 32759-32767.
- Berg, M.J, Tymoczko, J. & Stryer, L. (2001). *Biochemistry*, 1, (5<sup>th</sup> ed.). America: W. H. Freeman.
- Jia, Y., & Alayash, A. I. (2009). Effects of cross-linking and zero-link polymerization on oxygen transport and redox. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1234–1242.
- Nicoletti, F. P., Droghetti, E., Howes, B. D., Bustamante, J. P., Bonamore, A., Sciamanna, N., . . . Smulevich, G. (2013). H-bonding networks of the distal residues and water molecules in the active site of *Thermobifida fusca* hemoglobin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*.

- Pietri, R., Leon, R. G., Kiger, L., Marden, M. C., Granell, L. B., Cadilla, C. L., & Lopez-Garriga, J. (2006). Hemoglobin I from *Lucina pectinata*: A model for distal heme-ligand control. *Biochimica et Biophysica Acta*, 758–765.
- Silverman, D. N., Backman, L., & Tu, C. (1978). Role of Hemoglobin in Proton Transfer to the Active Site of Carbonic Anhydrase. *THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY*, 2588-2591.