

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ ΣΕ ΝΑΝΟΔΟΜΕΣ
ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ**

ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΒΑΜΒΑΚΑΚΗ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2006

UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY
LABORATORY OF ANALYTICAL CHEMISTRY

PhD THESIS

**STABILIZATION OF BIOMOLECULES IN
NANOSTRUCTURES FOR THE DEVELOPMENT
OF BIOSENSOR SYSTEMS**

VASILIKI VAMVAKAKI

IRAKLION 2006



ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΕΘΝΙΚΗΣ ΠΑΙΔΕΙΑΣ ΚΑΙ ΘΡΗΣΚΕΥΜΑΤΩΝ
ΕΙΔΙΚΗ ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΔΙΑΧΕΙΡΙΣΗΣ ΕΠΕΑΕΚ

ΕΥΡΩΠΑΪΚΗ ΕΝΩΣΗ
ΣΥΓΧΡΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗ
ΕΥΡΩΠΑΪΚΟ ΚΟΙΝΩΝΙΚΟ ΤΑΜΕΙΟ



Η ΠΑΙΔΕΙΑ ΣΤΗΝ ΚΟΡΥΦΗ

Επιχειρησιακό Πρόγραμμα
Εκπαίδευσης και Αρχικής
Επαγγελματικής Κατάρτισης

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Χανιωτάκης Νίκος (*Επιβλέπων Καθηγητής*)

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Γανωτάκης Δημήτριος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Κατερινόπουλος Χαράλαμπος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Βαρώτσης Κωνσταντίνος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Κοτζάμπασης Κυριάκος

Αναπληρωτής Καθηγητής Τμήματος Βιολογίας Πανεπιστημίου Κρήτης

Μιχαλόπουλος Νικόλαος

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

Δημάδης Κωνσταντίνος

Επίκουρος Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, του Τμήματος Χημείας, του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου, κ. Ν. Χανιωτάκη για την πολύτιμη καθοδήγηση του, την εμπιστοσύνη του αλλά και την ηθική και οικονομική υποστήριξη του κατά τη διάρκεια της πολύχρονης συνεργασίας μας.

Παράλληλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της Επταμελούς Εξεταστικής μου Επιτροπής, τους καθηγητές Δ. Γανωτάκη, Χ. Κατερινόπουλο, Κ. Βαρώτση, Κ. Κοτζάμπαση, Ν. Μιχαλόπουλο και Κ. Δημάδη για τα πολύτιμα σχόλια και τις παρατηρήσεις τους που συνέβαλαν στην τελική διαμόρφωση αυτής της διατριβής.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη διδάκτορα Σ. Σωτηροπούλου και τη Μ. Φουσκάκη καθώς και όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας για την άψογη συνεργασία μας και την πολύτιμη συνεισφορά τους στην εργασία αυτή.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. D. Fournier του πανεπιστημίου P. Sabatier της Τουλούζης για τη συνεργασία μας στην ανάπτυξη των νανοαισθητήρων των λιποσωμάτων, τον καθηγητή κ. Α. Ρίζο του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης για τα φάσματα δυναμικής σκέδασης φωτός, την κ. Κ. Τσαγκαράκη από το Τμήμα Μικροηλεκτρονικής, Ινστιτούτο Μοριακής Δομής και Λέιζερ, ΙΤΕ Κρήτης για τις εικόνες SEM και την καθηγήτρια κ. Μ. Βαμβακάκη από το Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Υλικών του Πανεπιστημίου Κρήτης για τη θερμοσταθμική ανάλυση των δειγμάτων.

Η διδακτορική αυτή διατριβή χρηματοδοτήθηκε από το υπουργείο Παιδείας και την Ευρωπαϊκή Ένωση, πρόγραμμα ΗΡΑΚΛΕΙΤΟΣ, (υποτροφίες έρευνας στο Πανεπιστήμιο Κρήτης) και από τα ευρωπαϊκά προγράμματα SAFEGARD και GANANO.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και τους φίλους μου για την αμέριστη συμπαράσταση και τη συνεχή τους υποστήριξη όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

INTRODUCTION	1
1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	4
2. ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ	8
2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ – ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ	8
<i>Βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης</i>	9
<i>Μεταλλάκτης σήματος</i>	10
2.2 ΑΜΠΕΡΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ	11
<i>Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων</i>	13
<i>Εξέλιξη αμπερομετρικών βιοαισθητήρων</i>	15
2.3 ΟΠΤΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ	18
2.4 ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ.....	21
2.5 ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ	23
2.6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	23
3. ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ENZYMΩΝ	26
3.1 ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ENZYMΩΝ	27
3.2 ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ENZYMΩΝ ΜΕ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ.....	30
3.3 ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ENZYMΩΝ ΣΕ ΝΑΝΟΔΟΜΕΣ	32
3.4 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	35
4. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ	40
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	46
5. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ENZYMΩΝ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗ, ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΚΑΙ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗ HORSERADISH ΣΕ ΝΑΝΟΠΟΡΩΔΗ ΠΥΡΙΤΙΚΑ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΑ ΥΛΙΚΑ	48
5.1 ΦΥΣΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΠΥΡΙΤΙΚΩΝ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΩΝ ΥΛΙΚΩΝ.....	48
5.2 ENZYMΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ENZYMΩΝ AChE, GOx ΚΑΙ HRP	52
<i>Ακετυλοχολινεστεράση (AChE)</i>	52
<i>Οξειδάση της Γλυκόζης (GOx)</i>	55
<i>Υπεροξειδάση Horseradish (HRP)</i>	57
5.3 ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ENZYMΩΝ ΣΕ ΠΟΡΩΔΗ ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ.....	59

5.3.1	ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ AChE ΣΕ ΠΟΡΩΔΗ ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΠΥΡΙΤΙΟΥ ..	62
	<i>Έλεγχος διαφυγής από τη μεμβράνη</i>	62
	<i>Σταθερότητα υπό συνθήκες συνεχούς λειτουργίας</i>	63
	<i>Συμπεράσματα</i>	65
5.3.2	ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟΥ ΜΕΓΕΘΟΥΣ ΣΕ ΝΑΝΟ-ΠΟΡΩΔΗ ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΠΥΡΙΤΙΟΥ	65
	<i>Κατασκευή GOx και HRP Βιοαισθητήρων με Πορώδη Σφαιρίδια Διοξειδίου του Πυριτίου</i>	67
	<i>Σταθερότητα Βιοαισθητήρων υπό συνθήκες συνεχούς λειτουργίας</i>	68
5.3.3	ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΖΥΜΟΥ ΣΕ ΝΑΝΟ-ΠΟΡΩΔΗ ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΑ ΣΦΑΙΡΙΔΙΑ ΜΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ΠΟΡΩΝ	70
	<i>Έλεγχος διαφυγής AChE από τα πορώδη πολυμερικά σφαιρίδια</i>	71
	<i>Σταθερότητα GOx στα πορώδη πολυμερικά σφαιρίδια υπό συνθήκες συνεχούς λειτουργίας</i>	72
5.4	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	73
5.5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	74
6.	ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ GOX ΣΕ ΝΑΝΟΔΟΜΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ	76
6.1	ΝΑΝΟΔΟΜΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ	76
6.2	ΝΑΝΟΪΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ	79
6.3	ΜΕΛΕΤΗ ΤΩΝ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ ΤΩΝ ΝΑΝΟΪΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ	83
	<i>Θερμοσταθμική Ανάλυση</i>	84
	<i>Χαρακτηρισμός επιφανειακών ομάδων</i>	85
	<i>Ηλεκτροχημικός Χαρακτηρισμός</i>	88
	<i>Ηλεκτροχημικός Χαρακτηρισμός Ηλεκτροδίων Πάστας των Νανοδομών Άνθρακα</i>	90
6.4	ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΣΕ ΝΑΝΟΔΟΜΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ	92
6.5	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	94
6.6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	95
7.	ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΟΠΤΙΚΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΩΝ99	
7.1	ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ	99
7.2	ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΩΝ	102
7.3	ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΩΝ	105

7.3 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΥ ΣΕ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ.....	109
<i>Κατασκευή Βιοαισθητήρα Λιποσωμάτων</i>	109
<i>Προσδιορισμός Ενεργότητας Ενζύμου</i>	110
<i>Προσδιορισμός Μεγέθους Λιποσωμάτων</i>	110
<i>Σταθερότητα Βιοαισθητήρα Λιποσωμάτων</i>	110
<i>Επιλογή Μεθόδου Παρακολούθησης της Ενζυμικής Αντίδρασης</i>	111
<i>Επιλογή Φθορισμομετρικού Δείκτη</i>	112
<i>Διαδικασία μέτρησης</i>	114
<i>Αναλυτικά Χαρακτηριστικά Βιοαισθητήρα Λιποσωμάτων</i>	115
7.4 ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΩΝ ΜΕ ΤΟ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ	116
<i>Εφαρμογή του Βιοαισθητήρα Ακετυλοχολινεστεράσης στην Ανίχνευση Παρασιτοκτόνων σε Πόσιμο Νερό</i>	119
7.5 ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΥ ΣΕ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ ΣΕ ΠΗΚΤΗ ΠΥΡΙΤΙΟΥ (SOL GEL)	120
<i>Σύγκριση ελεύθερου βιοαισθητήρα λιποσωμάτων και ακινητοποιημένων σε sol gel</i>	123
<i>Οπτική Μέθοδος για την Ποιοτική Ανίχνευση Παρασιτοκτόνων (Screening)</i>	123
7.6 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	124
7.7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	125
8. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	131
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....	132

INTRODUCTION

Biosensors have been under development for over 30 years while research in this field has become very popular the last 15. Several drawbacks have impeded the large-scale application and performance of biosensors as reliable analytical instruments. Some of the major obstacles in the biosensor systems success are the low sensitivity, their bad sensor-to-sensor reproducibility, as well as the limited operational and storage stability. Of these, the operational and storage stability of the biosensor is the most critical issue, since controlling the stability of the biological recognition element is very difficult. The biological recognizing systems, such as enzymes and antigens, are from their nature not very stable in a biosensor membrane environment, since they are sensitive to denaturation or inactivation by either fluctuations in the pH, the temperature, as well by the presence of organic solvents and detergents usually employed for the construction of a biosensor.

Different approaches have been utilized to improve enzyme stability, including genetic engineering, chemical modification, inclusion of additives and immobilization to various matrices. Genetic engineering involves the optimization of enzyme structures by changing the amino acid sequence. Chemical modifications intend to change the properties of the enzymes by adding functional groups or polymers on their surface, increasing their rigidity, and thus their stability. Additives such as electrolytes, polyelectrolytes and polyols control the water content at the vicinity of the enzymes and generate a cage around the enzymes in order to protect them from denaturation, and improve their stability. At the same time immobilization of enzymes on inorganic, organic or polymeric matrices by simple adsorption, covalent bonding or entrapment is shown to be an efficient stabilization method that increases the rigidity of the enzyme preventing the possibility to unfold and deactivate.

Recent advances in the field of nanotechnology has enabled the development and evaluation of nano-systems based on novel nanomaterials that offer new directions in the field of bio-analytical systems. Nanomaterials with at least one of their critical dimensions in the range of 100 nanometers, display unique physical and chemical characteristics, playing an increasingly important role in the development of biosensors. Their high surface ratio, catalytic activity and electron transfer properties make them ideal immobilization matrices, transduction platforms and mediators.

Scope of the project

The scope of the project was the evaluation of nanomaterials as immobilization matrices for enzymes and transducers for the development of biosensor systems. Stability, sensitivity and other analytical characteristics of biosensors can be improved by using nanomaterials, such as nanoporous silica and polymer beads, carbon nanostructures and liposomes, in their construction.

Nanoporous materials are more exciting candidates for enzyme immobilization compared with conventional materials due to their large surface area and opened pore structure that allows high enzyme loadings. Moreover the size matching between the pore size of the nanomaterials and the molecular diameter of the enzymes seems to provide a stabilizing effect to the immobilized enzymes. In this study enzyme immobilization in nanoporous solid beads with well controlled pore sizes is evaluated in order to verify the stabilization effect, and correlate it with the ratios of the pore to protein sizes. The importance of size matching between the nanocavities and the enzyme for efficient stabilization is verified following two different procedures: A) the immobilization of different size enzymes into the same size nanocavities; B) the immobilization of one enzyme in different size nanocavities. Two different nanoporous materials, spherical silica and polymer beads are utilized as immobilization matrices, which are both challenging and interesting for applications in biosensors. This stabilization effect provides the grounds for the development of novel and highly stable biosensor systems.

Carbon nanostructures have been shown to be ideal for biosensor applications since they are conductive, biocompatible, easily functionalized and possess very large surface areas. Of these, carbon nanotubes (NTs) and fullerenes are subject of extensive experimental and theoretical studies for specific applications. In this study carbon nanofibers are evaluated as transducers, stabilizers and mediators for the construction of amperometric biosensors. Carbon nanofibers are unique in the fact that they have a much larger functionalized surface area compared to that of nanotubes. The ratio of surface-active groups to the volume of these materials is much larger than that of the glassy-like surface of the carbon nanotubes. Also the high conductivity of carbon nanofibers seems to be ideal for the electrochemical signal transduction. The characteristics of carbon nanofibers are compared with that

of graphite, carbon nanotubes and fullerenes. The detailed elucidation of the type and number of surface functional groups, their electrochemical behavior in solution, as well as their protein stabilization capabilities is the basis for the comparison.

Finally liposomes are evaluated as matrices for the immobilization of enzymes and the development of biosensor systems. Liposomes are nanoscale spherical shells composed of lipid bilayers that enclose an aqueous phase. The encapsulation of enzymes in the internal microenvironment of liposomes, has proven to greatly improve enzyme stabilization against unfolding and proteolysis. Liposomes can effectively protect enzymes from the aggression of external agents such as proteases. In addition, enzymes entrapped in liposomes are stabilized against unfolding forces due to hydrophobic interactions between the enzyme and the liposome membrane. One other important characteristic is that enzymes encapsulated inside liposomes retain their activity even at very low concentrations. At the same time liposomes are optically translucent, and can thus be used as optical sensor elements. Combining these characteristics one can envision that under specific experimental conditions they can be used for the development of nano-sized optical biosensors. In this study the stabilizing effect of liposomes is evaluated by encapsulating the inherently unstable enzyme Acetylcholinesterase from *Drosophila melanogaster* in the internal aqueous phase of liposomes. Substrate transport through the liposome walls is achieved by incorporating porins within the lipid bilayers. The response of the liposome biosensor to the substrate is monitored using a pH sensitive fluorescent indicator. These stand alone nano-biosensors are used for the direct detection of organophosphorus pesticides in drinking water samples. Also a proposed optical alarm or screening device of nano-biosensors immobilized in sol-gel matrix that could be useful for pesticide monitoring is evaluated.

KEYWORDS

Nanoporous Material, Carbon Nanofibers, Liposomes, Biosensors, Enzyme Stabilization

1. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι βιοαισθητήρες βρίσκονται στο προσκήνιο της έρευνας τα τελευταία 30 χρόνια, ενώ ραγδαία είναι η εξέλιξη στον τομέα αυτό κυρίως τα τελευταία 15 χρόνια. Ωστόσο η ευρεία εφαρμογή των βιοαισθητήρων ως αξιόπιστων αναλυτικών οργάνων δεν έχει επιτευχθεί ακόμη στον επιθυμητό βαθμό λόγω ορισμένων λειτουργικών προβλημάτων των βιοαισθητήρων. Τα προβλήματα αυτά εντοπίζονται κυρίως στη χαμηλή ευαισθησία τους, τη μικρή επαναληψιμότητα της κατασκευής τους και την περιορισμένη σταθερότητά τους τόσο κατά την αποθήκευση όσο και σε συνθήκες συνεχούς λειτουργίας. Ο βασικότερος παράγοντας που επηρεάζει τα αναλυτικά χαρακτηριστικά των βιοαισθητήρων είναι η σταθερότητά τους, καθώς είναι αρκετά δύσκολο να ρυθμιστεί η σταθερότητα του βιολογικού στοιχείου αναγνώρισης. Τα στοιχεία βιολογικής αναγνώρισης όπως είναι τα ένζυμα και τα αντιγόνα είναι από τη φύση τους ευαίσθητα βιολογικά μόρια και είναι δυνατό να αποδιαταχθούν ή να απενεργοποιηθούν λόγω μικρών μεταβολών στην τιμή του pH ή της θερμοκρασίας, καθώς και παρουσία οργανικών διαλυτών και απορρυπαντικών που συχνά χρησιμοποιούνται για την κατασκευή των βιοαισθητήρων.

Διάφορες μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για τη βελτίωση της σταθερότητας των ενζύμων, όπως είναι η γενετική τροποποίηση, η χημική τροποποίηση, η χρήση πρόσθετων ουσιών και η ακινητοποίηση σε διάφορα υποστρώματα. Η γενετική τροποποίηση αποσκοπεί στη μεταβολή της αλληλουχίας των αμινοξέων των ενζύμων με στόχο τη βελτιστοποίηση της δομής τους. Η χημική τροποποίηση μεταβάλλει τις ιδιότητες των ενζύμων με την εισαγωγή λειτουργικών ομάδων ή πολυμερών στην επιφάνειά τους, αυξάνοντας έτσι την ακαμψία και τη σταθερότητα των ενζυμικών μορίων. Τα πρόσθετα όπως οι ηλεκτρολύτες, οι πολυηλεκτρολύτες και οι πολυαλκοόλες ρυθμίζουν την περιεκτικότητα του νερού και δημιουργούν μία δομή κλουβιού γύρω από το ένζυμο που συμβάλλει στη διατήρηση της ενεργής του διαμόρφωσης. Παράλληλα η ακινητοποίηση των ενζύμων σε ανόργανα, οργανικά και πολυμερικά υποστρώματα μέσω απλής προσρόφησης, ομοιοπολικής δέσμευσης, φυσικής παγίδευσης ή εγκλωβισμού είναι αρκετά αποτελεσματική μέθοδος ώστε να αποφεύγεται η αποδιάταξη και απενεργοποίηση των ενζύμων.

Η ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας τα τελευταία χρόνια καθιστά δυνατή την ανάπτυξη και αξιολόγηση νανο-συστημάτων που βασίζονται σε νανοϋλικά και παρέχουν νέες

προοπτικές στον τομέα των βιοαναλυτικών συστημάτων. Τα νανοϋλικά έχουν τουλάχιστον μία από τις διαστάσεις τους στην κλίμακα των 100 nm και εμφανίζουν μοναδικές φυσικές και χημικές ιδιότητες, παίζοντας καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη των βιοαισθητήρων. Η υψηλή δραστική επιφάνειά τους, οι καταλυτικές τους ιδιότητες και η ικανότητά τους να μεταφέρουν ηλεκτρόνια, τα καθιστούν κατάλληλα υλικά ως υποστρώματα ακινητοποίησης, μεταλλάκτες σήματος και μεταφορείς ηλεκτρονίων.

Σκοπός εργασίας

Στόχος της παρούσας εργασίας είναι η αξιοποίηση των δυνατοτήτων που παρέχουν ορισμένες νανοδομές για την ακινητοποίηση ενζύμων και την ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Η χρήση νανοϋλικών όπως είναι τα νανοπορώδη πυριτικά και πολυμερικά υποστρώματα, οι νανοδομές άνθρακα και τα λιποσώματα στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων είναι δυνατό να συμβάλει στη βελτίωση της σταθερότητας και της ευαισθησίας τους.

Τα νανοπορώδη υλικά παρουσιάζουν μεγαλύτερο ενδιαφέρον όσον αφορά την ακινητοποίηση ενζύμων σε σύγκριση με άλλα υλικά λόγω της υψηλότερης δραστικής τους επιφάνειας και της πορώδους δομής τους, που επιτρέπει μεγαλύτερα ενζυμικά φορτία. Επιπλέον η συσχέτιση του μεγέθους των πόρων των νανοδομών και της διαμέτρου των ενζυμικών μορίων φαίνεται ότι παίζει καθοριστικό ρόλο στη σταθεροποίηση των ακινητοποιημένων ενζύμων. Στην εργασία αυτή μελετάται η ακινητοποίηση ενζύμων σε πορώδη υλικά με καθορισμένη διάμετρο πόρων ώστε να εξεταστεί ο ρόλος που έχει το μέγεθος των πόρων του υλικού ακινητοποίησης στη σταθεροποίηση των ενζύμων. Προκειμένου να επιβεβαιωθεί πειραματικά πόσο σημαντική είναι η σύζευξη του μεγέθους των ενζυμικών μορίων και των πόρων του υλικού ακινητοποίησης για τη σταθεροποίηση των ενζύμων, εξετάζονται η ακινητοποίηση ενζύμων διαφορετικού μεγέθους σε νανο-κοιλότητες ίδιας διαμέτρου και η ακινητοποίηση ενός ενζύμου σε νανο-κοιλότητες διαφορετικής διαμέτρου. Δύο διαφορετικά υλικά, τα νανοπορώδη πυριτικά και πολυμερικά υποστρώματα που εμφανίζουν πολλαπλές εφαρμογές, χρησιμοποιούνται ως μέσα για την ακινητοποίηση ενζύμων. Η σταθεροποιητική επίδραση των πόρων των υλικών ακινητοποίησης θέτει τις βάσεις για την ανάπτυξη νέων εξαιρετικά σταθερών βιοαισθητήρων.

Οι νανοδομές άνθρακα έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την ανάπτυξη αισθητήρων και βιοαισθητήρων λόγω της μεγάλης δραστικής τους επιφάνειας, της αγωγιμότητάς τους, της βιοσυμβατότητάς τους και της δυνατότητας τροποποίησης της επιφάνειάς τους. Ιδιαίτερα οι νανοσωλήνες άνθρακα και τα φουλλερένια έχουν συγκεντρώσει τεράστιο ερευνητικό ενδιαφέρον και αποτελούν αντικείμενο θεωρητικών και πειραματικών ερευνών για ποικίλες εφαρμογές. Στην εργασία αυτή εξετάζονται οι νανοϊνες άνθρακα ως μεταλλάκτες σήματος, μεταφορείς ηλεκτρονίων, υποστρώματα για την ακινητοποίηση και σταθεροποίηση ενζύμων με απώτερο στόχο την ανάπτυξη αμπερομετρικών βιοαισθητήρων. Οι νανοϊνες άνθρακα εμφανίζουν πολύ περισσότερες δραστικές ομάδες στην επιφάνειά τους ανά όγκο του υλικού, σε σύγκριση με τους νανοσωλήνες άνθρακα. Επίσης η υψηλή αγωγιμότητα των νανοϊνών άνθρακα είναι ιδανική για ηλεκτροχημική μετάλλαξη σήματος. Τα χαρακτηριστικά των νανοϊνών άνθρακα συγκρίνονται με αυτά του γραφίτη, των νανοσωλήνων άνθρακα και των φουλλερενίων. Ο τύπος και η συγκέντρωση των δραστικών επιφανειακών ομάδων των νανοδομών, η ηλεκτροχημική τους συμπεριφορά καθώς και η ικανότητά τους να σταθεροποιούν ενζυμικά μόρια αποτελούν τη βάση της σύγκρισης μεταξύ των διαφορετικών νανοδομών άνθρακα.

Τέλος νανοδομές λιποσωμάτων αξιολογούνται ως υποστρώματα για την ακινητοποίηση ενζύμων και την ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Τα λιποσώματα είναι σφαιρικά κυστίδια που αποτελούνται από λιπιδικές διπλοστοιβάδες οι οποίες περιβάλλουν-εγκλωβίζουν υδατικό διάλυμα στο εσωτερικό τους. Η ενθυλάκωση ενζύμων στο εσωτερικό περιβάλλον των λιποσωμάτων έχει αποδειχτεί ότι συμβάλλει στη σταθεροποίησή τους εμποδίζοντας την αποδιάταξη ή πρωτεόλυσή τους. Τα ενθυλακωμένα ένζυμα προστατεύονται από προσβολή από εξωτερικούς παράγοντες όπως διάφορες πρωτεάσες. Επίσης οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενζύμων και της μεμβράνης του λιποσώματος σταθεροποιούν τη διαμόρφωση των ενζύμων ακόμα και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις τους. Ταυτόχρονα τα λιποσώματα είναι οπτικά διαφανή και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε οπτικούς αισθητήρες. Συνδυάζοντας τα παραπάνω χαρακτηριστικά των λιποσωμάτων γίνεται αντιληπτό ότι είναι δυνατό να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη οπτικών νανο-βιοαισθητήρων. Στην εργασία αυτή το ασταθές ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση από το μικροοργανισμό *Drosophila melanogaster* ενθυλακώνεται στο εσωτερικό των λιποσωμάτων και εξετάζεται η σταθερότητα του ενζύμου. Η εισαγωγή του

υποστρώματος στο εσωτερικό των λιποσωμάτων επιτυγχάνεται μέσω ειδικών πορινών στη μεμβράνη του λιποσώματος. Η απόκριση του βιοαισθητήρα των λιποσωμάτων στο υπόστρωμα μετράται μέσω ενός φθορισμομετρικού δείκτη που είναι ευαίσθητος σε μεταβολές του pH. Ο οπτικός βιοαισθητήρας που βασίζεται στα λιποσώματα χρησιμοποιείται για την ανίχνευση οργανοφωσφορικών παρασιτοκτόνων σε δείγματα πόσιμου νερού. Παράλληλα αξιολογείται η ακινητοποίηση των λιποσωμάτων με το ενθυλακωμένο ένζυμο σε μεμβράνες πηκτής πυριτίου και η ανάπτυξη μίας απλής οπτικής μεθόδου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως σύστημα συναγερμού για την ποιοτική ανίχνευση παρασιτοκτόνων.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ

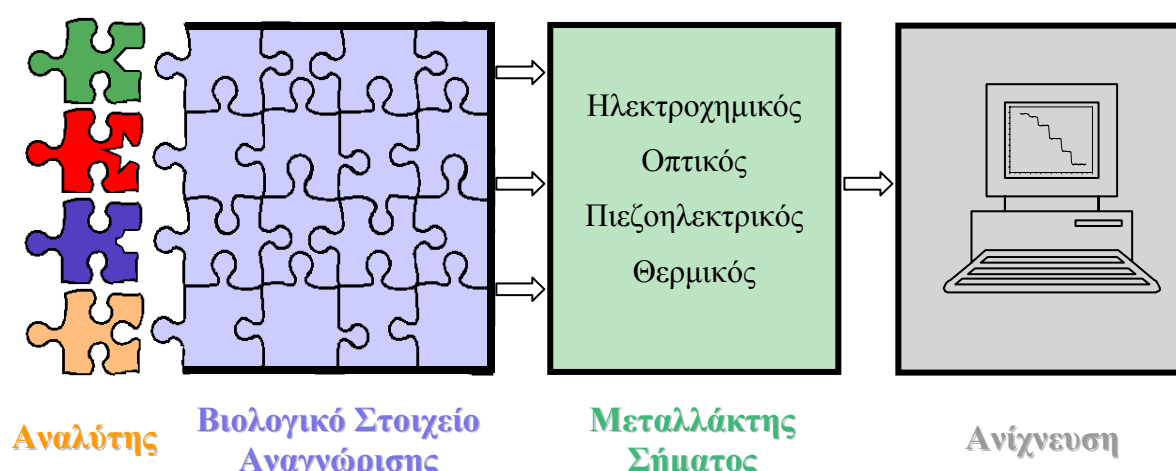
Νανοπορώδη Υλικά, Νανοΐνες Άνθρακα, Λιποσώματα, Βιοαισθητήρες,
Σταθεροποίηση Ενζύμων

2. ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

2.1 Ορισμός – Αρχή Λειτουργίας

Οι βιοαισθητήρες βρίσκονται στο προσκήνιο της έρευνας τα τελευταία 30 χρόνια, ενώ ραγδαία είναι η εξέλιξη στον τομέα αυτό κυρίως τα τελευταία 15 χρόνια. Η ανάπτυξη του πρώτου βιοαισθητήρα το 1962 από τον Clark^{1,2} έθεσε τις βάσεις για τη σύζευξη διαφορετικών επιστημονικών πεδίων όπως της χημείας, της φυσικής, της επιστήμης υλικών και της βιοτεχνολογίας με απώτερο στόχο τη σχεδίαση και ανάπτυξη βελτιωμένων, καινοτόμων και πιο αξιόπιστων συστημάτων βιοαισθητήρων. Η ιδιαιτερότητα που εμφανίζουν τα συστήματα βιοαισθητήρων σε σύγκριση με άλλα αναλυτικά όργανα έγκειται στο γεγονός ότι συνδυάζουν την ευαισθησία των χημικών αισθητήρων και την επιλεκτικότητα των βιολογικών μηχανισμών αναγνώρισης.

Σύμφωνα με τη Διεθνή Ένωση της Θεωρητικής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC) ο βιοαισθητήρας ορίζεται ως «Μία αυτόνομη και ολοκληρωμένη συσκευή ικανή να παρέχει ποσοτικές ή ημιποσοτικές αναλυτικές πληροφορίες χρησιμοποιώντας ένα βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης που βρίσκεται σε άμεση επαφή με ένα μεταλλάκτη σήματος^{3,4}. Τα βιολογικά μόρια στα συστήματα των βιοαισθητήρων αλληλεπιδρούν με την προς ανάλυση ουσία και κατά την επιλεκτική βιολογική αντίδραση παράγεται το αναλυτικό σήμα. Απαραίτητη προϋπόθεση για ένα βιοαισθητήρα είναι το βιολογικό μόριο να βρίσκεται σε στενή επαφή τόσο με τον αναλύτη όσο και με το μεταλλάκτη σήματος. Οι βιοαισθητήρες αποτελούνται από δύο βασικά τμήματα όπως φαίνεται στην Εικόνα 1, το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης και το φυσικοχημικό μεταλλάκτη σήματος.



Εικόνα 1. Γενικό διάγραμμα λειτουργίας των βιοαισθητήρων.

Βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης

Το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης αποτελεί το πιο σημαντικό τμήμα ενός βιοαισθητήρα⁵. Πρόκειται για ένα βιολογικό μόριο το οποίο βρίσκεται στη διεπιφάνεια του βιοαισθητήρα με το δείγμα και αλληλεπιδρά επιλεκτικά μόνο με την προς ανάλυση ουσία χωρίς να επηρεάζεται από την παρουσία παρεμποδίζοντων ουσιών. Το βιολογικό μόριο είτε αποκοδομεί την προς ανάλυση ουσία είτε υφίσταται κάποιες μεταβολές στη δομή του ή στις βιολογικές ή φυσικοχημικές του ιδιότητες κατά την επιλεκτική βιολογική αναγνώριση. Ανάλογα με την αλληλεπίδραση του βιομορίου και του αναλύτη οι βιοαισθητήρες διαχωρίζονται σε δύο κατηγορίες, κατάλυσης και συγγένειας⁶.

Βιοαισθητήρες Κατάλυσης

Στους βιοαισθητήρες κατάλυσης το βιολογικό μόριο καταλύει μία συγκεκριμένη αντίδραση στην οποία ο αναλύτης συμμετέχει ως αντιδρών ή ως προϊόν. Τα βιολογικά μόρια που χρησιμοποιούνται πιο συχνά σε αυτή την περίπτωση είναι τα ένζυμα. Τα ένζυμα αποτελούν πρωτεΐνες που αναγνωρίζουν εξειδικευμένα και δεσμεύουν ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα καταλύοντας την ταχύτατη μετατροπή του στα αντίστοιχα προϊόντα. Πιο σπάνια χρησιμοποιούνται κυτταρικά όργανα, ιστοί, κύτταρα ή ολόκληροι μικροοργανισμοί. Στις δομές αυτές η παρουσία ενός μεγάλου εύρους βιολογικών μορίων οδηγεί σε μία πολύπλοκη αλληλουχία αντιδράσεων καθιστώντας δύσκολη την επιλεκτική βιολογική αναγνώριση ενός συγκεκριμένου αναλύτη.

Βιοαισθητήρες Συγγένειας

Οι βιοαισθητήρες συγγένειας βασίζονται στην αλληλεπίδραση βιολογικών μακρομορίων με μόρια του αναλύτη. Τα βιολογικά μόρια που συνήθως χρησιμοποιούνται σε αυτή την κατηγορία βιοαισθητήρων είναι τα αντισώματα, τα νουκλεϊκά οξέα και οι υποδοχείς. Η συμπληρωματική δομή των βιολογικών μορίων ως προς τα μόρια του αναλύτη έχει ως αποτέλεσμα τη δέσμευση τους και το σχηματισμό ενός συμπλόκου. Η δέσμευση είναι μη αντιστρεπτή καθώς η σταθερά δέσμευσης του βιολογικού μορίου με τον αναλύτη είναι μεγάλη γεγονός που καθιστά δυνατή την ανίχνευση πολύ μικρών συγκεντρώσεων του αναλύτη. Ωστόσο η μη αντιστρεψίμη διαδικασία δέσμευσης έχει ως αποτέλεσμα οι αντίστοιχοι βιοαισθητήρες να είναι συνήθως μίας μόνο χρήσης.

Μεταλλάκτης σήματος

Ο μεταλλάκτης σήματος μετατρέπει τις μεταβολές που προκαλούνται από την αλληλεπίδραση βιολογικού μορίου με τον αναλύτη σε σήμα το οποίο στη συνέχεια υφίσταται την κατάλληλη επεξεργασία και προκύπτει η αναλυτική πληροφορία. Ανάλογα με το σήμα που προκύπτει κατά τη βιολογική αναγνώριση και το είδος των αλλαγών που προκαλούνται στο σύστημα επιλέγεται ο καταλληλότερος μεταλλάκτης σήματος σε κάθε περίπτωση. Οι βιοαισθητήρες ανάλογα με το μεταλλάκτη σήματος που χρησιμοποιείται διακρίνονται σε ηλεκτροχημικούς, οπτικούς, πιεζοηλεκτρικούς και θερμικούς.

Ηλεκτροχημικοί Βιοαισθητήρες

Οι ηλεκτροχημικοί αισθητήρες είναι ευρέως διαδεδομένοι στη χημική ανάλυση εξαιτίας της δυνατότητάς τους να μετατρέπουν τη χημική πληροφορία σε ηλεκτρικό σήμα σε ένα μόνο στάδιο. Διαχωρίζονται σε τρεις κατηγορίες, στους αγωγιμομετρικούς, ποτενσιομετρικούς και αμπερομετρικούς αισθητήρες. Στους αγωγιμομετρικούς βιοαισθητήρες μετράται η μεταβολή στην αγωγιμότητα που προκύπτει από την αλλαγή του αριθμού, του φορτίου ή της κινητικότητας των ιόντων κατά τη βιολογική αναγνώριση του αναλύτη. Στους ποτενσιομετρικούς βιοαισθητήρες μετράται η διαφορά δυναμικού που αναπτύσσεται σε ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο σε συνθήκες μηδενικού ρεύματος, μετά την αποκατάσταση ισορροπίας. Η διαφορά δυναμικού είναι ανάλογη με το λογάριθμο της συγκέντρωσης του αναλύτη, σύμφωνα με την εξίσωση του Nernst. Στους αμπερομετρικούς βιοαισθητήρες εφαρμόζεται σταθερό δυναμικό στο ηλεκτρόδιο εργασίας και μετράται το ρεύμα που παράγεται κατά τη βιολογική αναγνώριση του αναλύτη.

Οπτικοί Βιοαισθητήρες

Οι οπτικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στην ανίχνευση της αλλαγής των οπτικών ιδιοτήτων είτε του βιολογικού μορίου παρουσία του αναλύτη, είτε του ίδιου του αναλύτη. Τα τελευταία χρόνια παρατηρείται ευρεία ανάπτυξη των οπτικών βιοαισθητήρων λόγω της εξέλιξης των οπτικών ινών.

Πιεζοηλεκτρικοί Βιοαισθητήρες

Στους πιεζοηλεκτρικούς βιοαισθητήρες το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης βρίσκεται στην επιφάνεια ενός κρυστάλλου και κατά την επιλεκτική βιολογική αναγνώριση ο

αναλύτης δεσμεύεται με το βιολογικό μόριο και παρατηρείται αύξηση της μάζας του κρυστάλλου. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της συχνότητας συντονισμού του κρυστάλλου.

Θερμικοί Βιοαισθητήρες

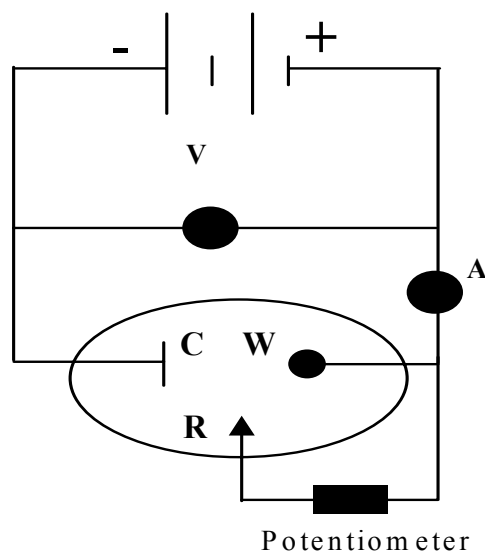
Οι θερμικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στο γεγονός ότι πολλές βιοχημικές διεργασίες συνοδεύονται από έκλυση ή απορρόφηση θερμότητας. Η μεταβολή αυτή στη θερμότητα κατά τη βιολογική αναγνώριση του αναλύτη μετράται μέσω ενός θερμομέτρου ηλεκτρικής αντίστασης (thermistor).

Οι πλέον χρησιμοποιούμενοι και καλύτερα χαρακτηρισμένοι βιοαισθητήρες είναι οι ενζυμικοί αμπερομετρικοί και οπτικοί βιοαισθητήρες των οποίων τα χαρακτηριστικά αναλύονται διεξοδικά παρακάτω.

2.2 Αμπερομετρικοί Βιοαισθητήρες

Οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στην ανίχνευση ηλεκτροχημικά ενεργών ουσιών που παράγονται ή καταναλώνονται κατά τη διαδικασία της βιολογικής αναγνώρισης. Μετράται το ρεύμα που παράγεται κατά την οξειδωση ή αναγωγή των ηλεκτροενεργών ουσιών στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας. Το κύκλωμα που χρησιμοποιείται στην αμπερομετρία περιλαμβάνει τρία ηλεκτρόδια όπως φαίνεται στην Εικόνα 2. Εκτός από το ηλεκτρόδιο εργασίας χρησιμοποιείται ένα αναφορικό και ένα βοηθητικό ηλεκτρόδιο. Σταθερό δυναμικό εφαρμόζεται μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και του αναφορικού ηλεκτροδίου μέσω ενός ποτενσιοστάτη. Η τιμή του δυναμικού επιλέγεται έτσι ώστε οι ηλεκτροενεργές ουσίες να μπορούν να οξειδωθούν ή να αναχθούν στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Το ρεύμα που παράγεται διαρρέει το κύκλωμα μέσω του βοηθητικού ηλεκτροδίου και συσχετίζεται με τη συγκέντρωση του αναλύτη.

Η αρχή λειτουργίας ενός αμπερομετρικού ενζυμικού βιοαισθητήρα φαίνεται στην Εικόνα 3. Ο βιοαισθητήρας αποτελείται από το ενζυμικό στρώμα ή αλλιώς το αισθητήριο στοιχείο και το μεταλλάκτη που είναι το ηλεκτρόδιο εργασίας. Το υπόστρωμα διαχέεται προς το ενζυμικό στρώμα και δεσμεύεται από το ακινητοποιημένο ένζυμο. Κατά την ενζυμική αντίδραση προκύπτει το προϊόν το οποίο οξειδώνεται ή ανάγεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας και παράγονται ηλεκτρόνια.

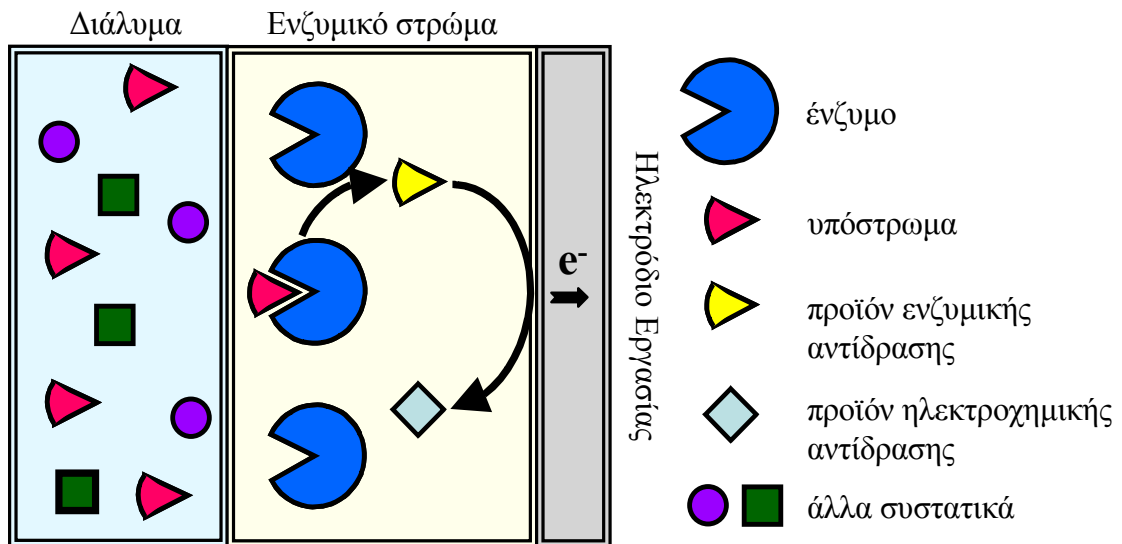


Εικόνα 2. Σύστημα τριών ηλεκτροδίων που χρησιμοποιείται στην αμπερομετρία. (W: ηλεκτρόδιο εργασίας, R: αναφορικό ηλεκτρόδιο, C: βοηθητικό ηλεκτρόδιο).

Στην περίπτωση που η ηλεκτροενεργή ουσία είναι κάποιο από τα προϊόντα της αντίδρασης παρατηρείται αύξηση στο ρεύμα που είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αναλύτη. Όταν η ηλεκτροενεργή ουσία αποτελεί συμπαράγοντα της ενζυμικής αντίδρασης τότε χρησιμοποιείται πάντα σε αφθονία ώστε να μην επηρεάζει την πραγματοποίηση της ενζυμικής αντίδρασης και τη μέτρηση του αναλύτη. Το παραγόμενο ρεύμα μειώνεται εκθετικά με το χρόνο και τελικά αποκτά μία σταθερή τιμή μετά την αποκατάσταση της ισορροπίας που δίνεται από την εξίσωση Cottrell:

$$i = nFADC/\delta$$

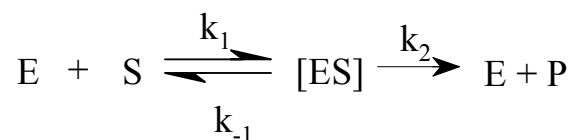
όπου n : αριθμός ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στην οξειδοαναγωγική αντίδραση, F : η σταθερά Faraday, A : η ενεργή επιφάνεια του ηλεκτροδίου, D : ο συντελεστής διάχυσης της ουσίας, C : η συγκέντρωση της ουσίας και δ είναι μια σταθερά που σχετίζεται με το πάχος του στρώματος διάχυσης. Γενικά η αντίδραση στο ηλεκτρόδιο εργασίας δεν εξαρτάται από τη διάχυση του αναλύτη σε αυτό αλλά από την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης.



Εικόνα 3. Αρχή λειτουργίας ενός αμπερομετρικού ενζυμικού βιοαισθητήρα.

Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων

Η κινητική της ενζυμικής αντίδρασης, ακολουθεί κατά κανόνα το μοντέλο Michaelis-Menten. Αν με E συμβολιστεί το ένζυμο, με S το υπόστρωμα και με P το προϊόν τότε η ενζυμική αντίδραση έχει την παρακάτω μορφή:



Η ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης δείχνει τον ρυθμό με τον οποίο το υπόστρωμα μετατρέπεται σε προϊόν και εκφράζεται συνήθως σε $\mu\text{mole/sec}$. Η εξίσωση Michaelis-Menten δείχνει την εξάρτηση της ταχύτητας από την συγκέντρωση του υποστρώματος (Εικόνα 4):

$$V = \frac{V_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]}$$

Η μέγιστη ταχύτητα V_{\max} παρατηρείται όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι αρκετή ώστε όλα τα ένζυμα στο διάλυμα να είναι κατειλημμένα, δηλαδή όταν το ένζυμο είναι κορεσμένο με υπόστρωμα.

$$\text{Για } [S] \gg K_M \Rightarrow K_M + [S] = [S] \Rightarrow V = V_{\max}$$

Η V_{\max} εξαρτάται από τη συγκέντρωση του ενζύμου και συγκεκριμένα είναι ευθέως ανάλογη αυτής: $V_{\max} = k[E]$.

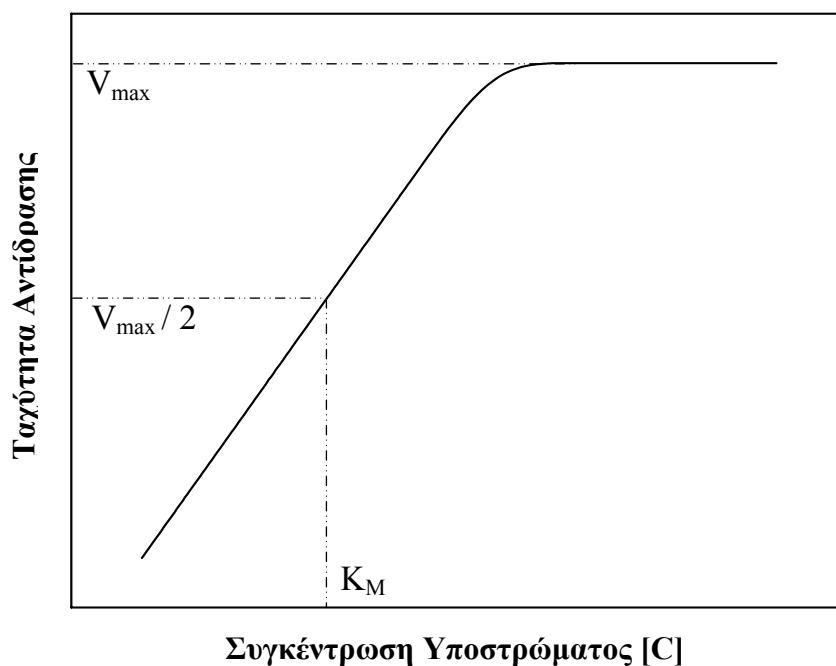
Η σταθερά Michaelis K_M εκφράζει τη συγγένεια του ενζύμου για το υπόστρωμα. Πρακτικά ισούται με τη συγκέντρωση υποστρώματος για την οποία η ταχύτητα είναι η μισή της μέγιστης:

$$\text{Για } [S] = K_M : V = \frac{V_{\max} \cdot K_M}{2K_M} = \frac{V_{\max}}{2}$$

Όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι πολύ μικρότερη της K_M , η σχέση ταχύτητας – συγκέντρωσης υποστρώματος είναι γραμμική:

$$\text{Για } [S] \ll K_M \Rightarrow K_M + [S] = K_M \Rightarrow V = \frac{V_{\max}}{K_M} [S]$$

Κατά την ακινητοποίηση των ενζύμων σε διάφορα υποστρώματα μεταβάλλεται η καταλυτική τους δράση λόγω του διαφορετικού περιβάλλοντος με αποτέλεσμα να μεταβάλλεται η τιμή της σταθεράς Michaelis στη φαινομενική K_M (K_M^{app}).



Εικόνα 4. Γραφική παράσταση της εξίσωσης Michaelis-Menten.

Στους ενζυμικούς αμπερομετρικούς βιοαισθητήρες το ρεύμα που μετράται, δηλαδή ο ρυθμός παραγωγής ηλεκτρονίων στο ηλεκτρόδιο εργασίας, είναι ίσο με το ρυθμό παραγωγής του προϊόντος δηλαδή την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης. Έτσι κατ' αντιστοιχία με την εξίσωση Michaelis-Menten χρησιμοποιείται η εξίσωση:

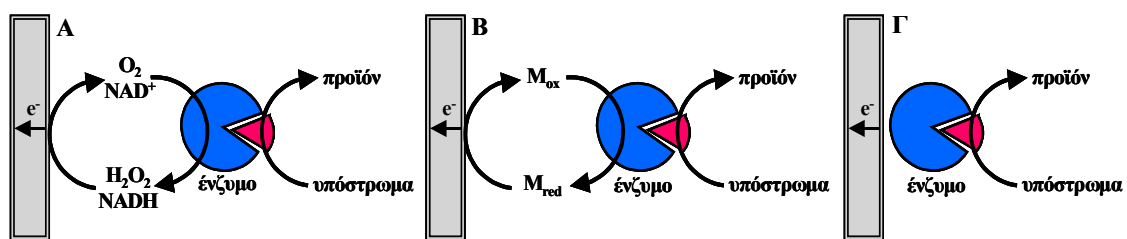
$$i = i_{\max} \frac{[C]}{[C] + K_M^{app}}$$

όπου i_{\max} είναι το μέγιστο ρεύμα που παρατηρείται όταν το ένζυμο είναι κορεσμένο με υπόστρωμα και είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του ενζύμου. Όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι μικρότερη από $0.1 \times K_M^{app}$ τότε η σχέση ρεύματος και συγκέντρωσης του αναλύτη είναι γραμμική και ισχύει:

$$i = i_{\max} \frac{[C]}{K_M^{app}}$$

Εξέλιξη αμπερομετρικών βιοαισθητήρων

Κατά την ανάπτυξη των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων οι μελέτες επικεντρώθηκαν στη σύζευξη του βιολογικού στοιχείου αναγνώρισης με το μεταλλάκτη σήματος και στην επίτευξη ταχύτατης μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ του ενεργού κέντρου του ενζύμου και της επιφάνειας του ηλεκτροδίου εργασίας. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα κατά την εξέλιξη των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων να αναπτυχθούν τρεις διαφορετικές γενιές αισθητήρων (Εικόνα 5).



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση της Α) Πρώτης γενιάς Β) Δεύτερης Γενιάς και Γ) Τρίτης Γενιάς Βιοαισθητήρων.

Βιοαισθητήρες πρώτης γενιάς

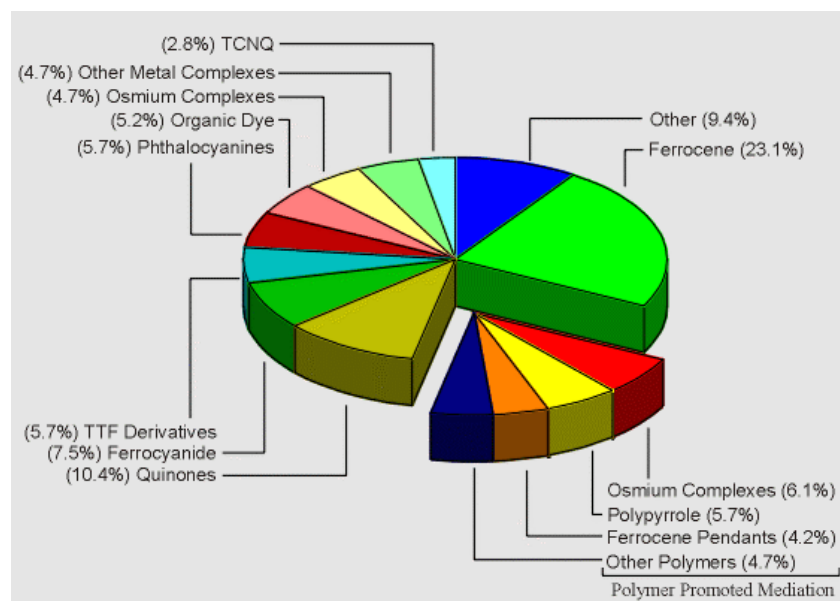
Στους βιοαισθητήρες πρώτης γενιάς η μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ του οξειδοαναγωγικού κέντρου του ενζύμου και του ηλεκτροδίου επιτυγχάνεται μέσω

ενός φυσικού συμπαράγοντα του ενζύμου⁷. Οι πιο γνωστοί φυσικοί συμπαράγοντες είναι το O_2 και το NAD^+ , οι οποίοι λαμβάνουν ηλεκτρόνια από το ένζυμο και ανάγονται σε H_2O_2 και $NADH$ αντίστοιχα. Τα παραγόμενα προϊόντα οξειδώνονται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και έτσι έχουμε μια συνεχή ροή ηλεκτρονίων από το ενεργό κέντρο του ενζύμου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας. Ωστόσο η διαδικασία αυτή μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι σχετικά αργή με αποτέλεσμα οι αντίστοιχοι βιοαισθητήρες να εμφανίζουν αργή απόκριση και αργή αναγέννηση του ενζύμου. Παράλληλα για την οξείδωση του H_2O_2 και του $NADH$ απαιτούνται μεγάλα υπερδυναμικά γεγονός που συμβάλλει στη μείωση του χρόνου ζωής των βιοαισθητήρων καθώς και στην παρεμπόδιση τους από διάφορες άλλες ηλεκτροενεργές ουσίες. Όλα αυτά συνέβαλαν ώστε να αντικατασταθούν οι φυσικοί συμπαράγοντες από τεχνητούς οι οποίοι ονομάζονται μεταφορείς ηλεκτρονίων και να προκύψει η δεύτερη γενιά βιοαισθητήρων.

Βιοαισθητήρες δεύτερης γενιάς

Οι μεταφορείς ηλεκτρονίων που χρησιμοποιούνται στη δεύτερη γενιά βιοαισθητήρων είναι μικρού μοριακού βάρους οξειδοαναγωγικά ζεύγη που έχουν την ικανότητα να μεταφέρουν ηλεκτρόνια από το οξειδοαναγωγικό κέντρο του ενζύμου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου^{8,9}. Κατά τη διάρκεια του καταλυτικού κύκλου η οξειδωμένη μορφή του μεταφορέα ηλεκτρονίων (M_{ox}) αντιδρά με την ανηγμένη μορφή του ενζύμου και στη συνέχεια διαχέεται προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου όπου και υφίσταται ταχύτατη οξείδωση (M_{red}). Ένας ιδανικός μεταφορέας ηλεκτρονίων έχει τα ακόλουθα χαρακτηριστικά:

1. Εμφανίζει αντιστρεπτή ηλεκτροχημική συμπεριφορά.
2. Αντιδρά ταχύτατα με την ανηγμένη μορφή του ενζύμου.
3. Εμφανίζει χαμηλό δυναμικό οξειδοαναγωγής και δεν επηρεάζεται από μεταβολές του pH.
4. Είναι σταθερός και στις δύο οξειδοαναγωγικές του μορφές.
5. Εμφανίζει μικρή διαλυτότητα στο δείγμα για να αποφεύγεται η διαφυγή του από το ενζυμικό στρώμα.
6. Δεν αντιδρά με τα αντιδρώντα ή τα προϊόντα του καταλυτικού κύκλου και κυρίως με το O_2 .



Εικόνα 6. Μεταφορείς ηλεκτρονίων που έχουν χρησιμοποιηθεί στην κατασκευή βιοαισθητήρων.

Η χρήση μεταφορέων ηλεκτρονίων περιορίζει την ανάγκη για την παρουσία του O_2 , ελαχιστοποιεί την επίδραση των παρεμποδιστών, μειώνει το δυναμικό λειτουργίας των ηλεκτροδίων και βελτιώνει το χρόνο ζωής και την ευαισθησία των βιοαισθητήρων. Ο πρώτος μεταφορέας ηλεκτρονίων που χρησιμοποιήθηκε ήταν η κινίνη η οποία ανάγεται σε υδροκινίνη και στη συνέχεια οξειδώνεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Διάφοροι άλλοι μεταφορείς ηλεκτρονίων που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι οι οργανικές χρωστικές, διάφορα σύμπλοκα του οσμίου, το τετρακυανο-κίνο-διμεθάνιο (TCNQ), το τετραθειαφουλβένιο (TTF) και ο κυανιούχος σίδηρος. Ωστόσο οι πιο γνωστοί μεταφορείς ηλεκτρονίων είναι το φερροκένιο και διάφορα παράγωγα του^{10,11}.

Βιοαισθητήρες τρίτης γενιάς

Στην τρίτη γενιά βιοαισθητήρων πραγματοποιείται άμεση μεταφορά ηλεκτρονίων από το ενεργό κέντρο του ενζύμου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας^{12,13}. Η άμεση μεταφορά ηλεκτρονίων είναι πολύ δύσκολο να επιτευχθεί λόγω της απόστασης του ενεργού κέντρου του ενζύμου από το ηλεκτρόδιο. Η αύξηση της απόστασης μεταξύ του ενζύμου και του ηλεκτροδίου συμβάλλει στην εκθετική μείωση του ρυθμού μεταφοράς των ηλεκτρονίων. Επειδή το ενεργό κέντρο των ενζύμων βρίσκεται συνήθως βαθιά στο εσωτερικό της τεταρτοταγούς πρωτεϊνικής δομής, εφαρμόζονται διάφορες τεχνικές για την επίτευξη άμεσης μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Η ομοιοπολική δέσμευση των πρωτεϊνών συμβάλλει στη διευθέτηση τους στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας με τέτοιο τρόπο ώστε να έχουν τον κατάλληλο προσανατολισμό και να είναι εφικτή η άμεση μεταφορά των ηλεκτρονίων. Παράλληλα η εισαγωγή των πρωτεϊνών σε πολυμερικά πλέγματα που είτε είναι αγώγιμα είτε έχουν κάποια οξειδοαναγωγικά κέντρα διευκολύνει την έμμεση ανταλλαγή ηλεκτρονίων.

2.3 Οπτικοί Βιοαισθητήρες

Οι οπτικοί βιοαισθητήρες αποτελούν το δεύτερο πιο διαδεδομένο είδος βιοαισθητήρων αμέσως μετά τους ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες. Βασίζονται στην ανίχνευση των μεταβολών των οπτικών ιδιοτήτων του βιολογικού μορίου ή του αναλύτη κατά τη βιολογική αναγνώριση. Οι χημικές πληροφορίες που λαμβάνονται κατά τη χημική αναγνώριση του αναλύτη μετατρέπονται σε αναλυτικό οπτικό σήμα με τη χρήση φασματοφωτόμετρου, στους οπτικούς αισθητήρες¹⁴. Μετράται το φως που απορροφάται ή εκπέμπεται είτε από το ίδιο το βιολογικό μόριο, είτε από τα αντιδρώντα ή προϊόντα της βιολογικής αναγνώρισης είτε ακόμα από συγκεκριμένα μόρια που έχουν προστεθεί στο σύστημα του βιοαισθητήρα ώστε να είναι εφικτή η παρακολούθηση της βιολογικής αναγνώρισης. Μέσω μίας πηγής φωτός το δείγμα ακτινοβολείται και οι μεταβαλλόμενες οπτικές ιδιότητες που μετρούνται συνήθως είναι η απορρόφηση ή ο φθορισμός¹⁵. Ανάλογα με το μόριο εκείνο του οποίου παρακολουθούνται οι οπτικές ιδιότητες επιλέγεται και το κατάλληλο μήκος κύματος της ακτινοβολίας που αλληλεπιδρά με το δείγμα. Συνήθως παρακολουθείται η αύξηση ή μείωση της έντασης της απορρόφησης ή του φθορισμού του δείγματος σε συγκεκριμένο μήκος κύματος. Βέβαια υπάρχει και η δυνατότητα παρακολούθησης της μετατόπισης των κορυφών της απορρόφησης ή του φθορισμού σε άλλα μήκη κύματος λόγω της μεταβολής των οπτικών ιδιοτήτων της ουσίας που απορροφά ή φθορίζει. Η ενεργότητα της προς ανάλυση ουσίας στο δείγμα συσχετίζεται με το οπτικό σήμα των αισθητήρων με βάση το νόμο του Lambert - Beer:

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot C$$

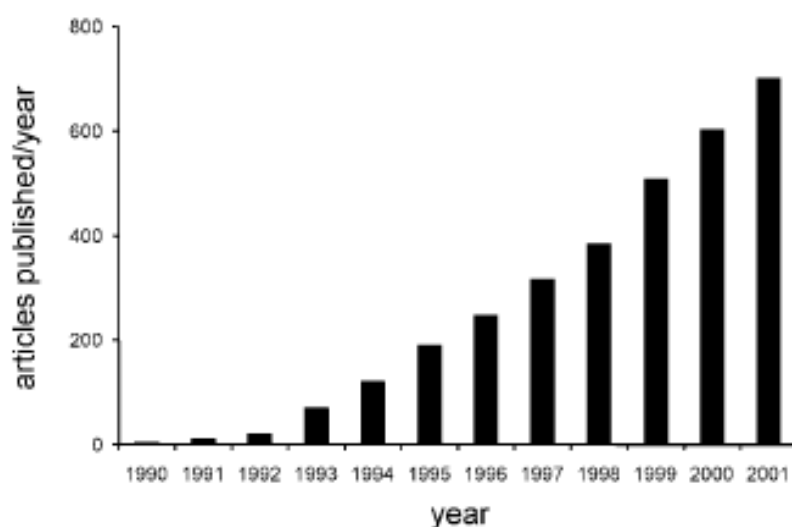
όπου A συνήθως η απορρόφηση των μορίων υποδοχέα, ε ο μοριακός συντελεστής απορροφητικότητας των μορίων του υποδοχέα, b το πάχος της στοιβάδας στην οποία

λαμβάνει χώρα η χημική αναγνώριση του αναλύτη και C η συγκέντρωση της προς ανάλυση ουσίας στο δείγμα.

Στους ενζυμικούς οπτικούς βιοαισθητήρες επειδή η πρόσδεση κάποιου χρωμοφόρου στο βιολογικό μόριο απαιτεί κάποιες προϋποθέσεις και επειδή τα αντιδρώντα ή προϊόντα της ενζυμικής αντίδρασης δεν είναι απαραίτητο να εμφανίζουν οπτικές ιδιότητες συνήθως επιλέγεται η χρήση κάποιου οπτικού ή φθορισμομετρικού δείκτη που είναι ευαίσθητος σε μεταβολές του pH ή της συγκέντρωσης του οξυγόνου. Οι περισσότερες ενζυμικές αντιδράσεις συνοδεύονται από παραγωγή ιόντων υδρογόνου, γεγονός που διευκολύνει την ανίχνευση του αναλύτη μέσω ενός δείκτη που είναι ευαίσθητος σε μεταβολές του pH. Οι δείκτες αυτοί παρόλο που έχουν πολύ μικρό εύρος pH δεν επηρεάζουν την ευαισθησία των οπτικών ενζυμικών βιοαισθητήρων καθώς οι αλλαγές στην τιμή του pH που προκαλούνται κατά τις ενζυμικές αντιδράσεις είναι πάρα πολύ μικρές.

Οι περισσότεροι οπτικοί ενζυμικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στη φθορισμομετρική τεχνική λόγω των πλεονεκτημάτων που εμφανίζει έναντι όλων των άλλων μεθόδων ανίχνευσης¹⁶. Κατά τη φθορισμομετρία, η φθορισμομετρική εκπομπή παρατηρείται σε διαφορετικό μήκος κύματος από τη φθορισμομετρική διέγερση με αποτέλεσμα ο θόρυβος υποβάθρου να είναι πολύ χαμηλός και τα όρια ανίχνευσης πολύ χαμηλότερα. Πρόκειται επομένως για εξαιρετικά ευαίσθητη τεχνική που επιτρέπει την ανίχνευση συγκεντρώσεων του αναλύτη σε επίπεδα ppb ή ppt. Στη βιβλιογραφία συναντώνται όλο και περισσότερα παραδείγματα ανίχνευσης ενός μόνο μορίου μέσω φθορισμομετρικών μεθόδων¹⁷. Γενικά τα φθορισμόμετρα παρέχουν 1,000 με 500,000 καλύτερα όρια ανίχνευσης σε σύγκριση με τα φασματοφωτόμετρα. Επίσης στις φασματοφωτομετρικές τεχνικές συναντώνται πολλοί παρεμποδιστές καθώς πολλά υλικά απορροφούν φως καθιστώντας δύσκολη την απομόνωση του σήματος του αναλύτη σε ένα πολύπλοκο δείγμα. Αντίθετα κατά τη φθορισμομετρία έχουμε μεγαλύτερη επιλεκτικότητα και λιγότερους παρεμποδιστές καθώς λιγότερα υλικά απορροφούν και εκπέμπουν φως ταυτόχρονα. Παράλληλα ακόμη και στην περίπτωση όπου υπάρχουν κάποιοι παρεμποδιστές είναι πολύ δύσκολο να εκπέμπουν φως στο ίδιο μήκος κύματος με τον αναλύτη. Ταυτόχρονα η φθορισμομετρία επιτρέπει τη μέτρηση μεγαλύτερου εύρους συγκεντρώσεων του αναλύτη χωρίς να απαιτείται αραίωση του δείγματος. Παράλληλα είναι σχετικά απλή αναλυτική τεχνική. Δεν προαπαιτείται συμπύκνωση του αναλύτη ή απομάκρυνση των

παρεμποδίζοντων ουσιών από το δείγμα πριν την ανάλυση. Εφόσον δεν είναι απαραίτητη η προκατεργασία του δείγματος οι αναλύσεις είναι γρήγορες και αρκετά απλοποιημένες. Επίσης λόγω της πολύ μεγάλης ευαισθησίας της τεχνικής η ποσότητα των αντιδραστηρίων που απαιτούνται για να πραγματοποιηθούν οι αναλύσεις είναι ελάχιστη. Τέλος το κόστος των αντιδραστηρίων και των οργάνων που απαιτούνται για τη φθορισμομετρία είναι πολύ μικρό σε σύγκριση με τις πιο πολύπλοκες αναλυτικές τεχνικές όπως η αέρια χρωματογραφία (GC) και η υγρή χρωματογραφία υψηλής αποδόσεως (HPLC).



Εικόνα 7. Ρυθμός αύξησης των δημοσιεύσεων στον τομέα των οπτικών βιοαισθητήρων την δεκαετία 1990-2000.

Γενικότερα τα πλεονεκτήματα που εμφανίζουν οι οπτικοί βιοαισθητήρες⁷ συνέβαλαν στη ραγδαία εξέλιξη στον τομέα αυτό, τα τελευταία 15 χρόνια. Αυτό αντικατοπτρίζεται και από τον αυξανόμενο αριθμό δημοσιεύσεων όσον αφορά τους οπτικούς βιοαισθητήρες τη δεκαετία 1990-2000¹⁸ (Εικόνα 7). Στους οπτικούς βιοαισθητήρες, σε αντίθεση με τους ηλεκτροχημικούς δεν είναι απαραίτητη η παρουσία αναφορικού συστήματος. Επίσης οι οπτικοί βιοαισθητήρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών αναλυτών παρακολουθώντας περισσότερα από ένα μήκη κύματος ενώ παράλληλα υπάρχει η δυνατότητα για συλλογή πληροφοριών που αφορούν δομικές αλλαγές στις ουσίες που συμμετέχουν στο σύστημα του βιοαισθητήρα. Βέβαια η αλματώδης εξέλιξη στον τομέα των οπτικών βιοαισθητήρων συνδέεται άμεσα και με την ανάπτυξη των οπτικών ινών¹⁹. Οι οπτικές ίνες λειτουργούν όπως τα ηλεκτρικά καλώδια που

χρησιμοποιούνται για τη μεταφορά ηλεκτρισμού. Με παρόμοιο τρόπο οι οπτικές ίνες λειτουργούν ως δίοδοι φωτός και μεταφέρουν το φως σε μεγάλες αποστάσεις.

2.4 Αναλυτικά Χαρακτηριστικά Βιοαισθητήρων

Η ποιότητα ενός βιοαισθητήρα εξαρτάται από τα αναλυτικά του χαρακτηριστικά. Οι κυριότεροι παράμετροι, που περιγράφουν τα αναλυτικά χαρακτηριστικά ποιότητας των βιοαισθητήρων⁷ περιγράφονται παρακάτω.

Καμπύλη Βαθμονόμησης

Είναι η γραφική παράσταση του μετρούμενου σήματος σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αναλύτη. Η βαθμονόμηση του βιοαισθητήρα πραγματοποιείται είτε μέσω διαλυμάτων γνωστών συγκεντρώσεων είτε με τη μέθοδο προσθήκης γνωστής ποσότητας. Η απόκριση του βιοαισθητήρα προκύπτει από το σήμα μετά την αποκατάσταση της ισορροπίας ή τη μεταβολή της μετρούμενης αναλυτικής παραμέτρου.

Γραμμικό Εύρος

Είναι η περιοχή εκείνη των συγκεντρώσεων όπου η μεταβολή της μετρούμενης αναλυτικής παραμέτρου είναι ευθέως ανάλογη με τη μεταβολή της συγκέντρωσης του αναλύτη. Το γραμμικό εύρος θεωρείται ικανοποιητικό όταν καλύπτει τουλάχιστον δύο τάξεις μεγέθους της συγκέντρωσης του αναλύτη.

Ευαισθησία

Από την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης στο γραμμικό εύρος συγκεντρώσεων προκύπτει η ευαισθησία του βιοαισθητήρα. Η ευαισθησία ορίζεται ως ο λόγος της μεταβολής της μετρούμενης αναλυτικής παραμέτρου προς τη συγκέντρωση του αναλύτη.

Όριο Ανίχνευσης

Το όριο ανίχνευσης είναι η μικρότερη δυνατή συγκέντρωση του αναλύτη που μπορεί να προσδιοριστεί με αξιοπιστία. Υπολογίζεται μέσω της καμπύλης βαθμονόμησης, από το σημείο τομής της προέκτασης των δύο γραμμικών τμημάτων της καμπύλης.

Ωστόσο πιο συχνά το όριο ανίχνευσης ορίζεται ως η συγκέντρωση εκείνη του αναλύτη που δίνει σήμα τριπλάσιο από το θόρυβο ($S/N = 3$).

Επιλεκτικότητα

Αποτελεί το μέτρο της ικανότητας ενός αισθητήρα να αποκρίνεται στον αναλύτη παρουσία άλλων παρεμποδίζοντων συστατικών (ορισμένης συγκέντρωσης). Συνήθως μετράται η απόκριση του αισθητήρα στον αναλύτη και συγκρίνεται με την αντίστοιχη απόκριση στις παρεμποδίζουσες ουσίες. Η επιλεκτικότητα εκφράζεται με τη μέγιστη επιτρεπτή συγκέντρωση πιθανών παρεμποδιστών ή το λόγο των συγκεντρώσεων παρεμποδιστή – αναλύτη, για την πρόκληση ορισμένου σφάλματος (συνήθως 5%). Η επιλεκτικότητα ενός βιοαισθητήρα εξαρτάται κυρίως από το βιολογικό μόριο, αλλά πολλές φορές επηρεάζεται και από το μεταλλάκτη σήματος που χρησιμοποιείται.

Σταθερότητα-Χρόνος Ζωής

Η σταθερότητα ενός βιοαισθητήρα ορίζεται ως το χρονικό διάστημα που απαιτείται για να μειωθεί η ευαισθησία του κατά 10% ή κατά 50%. Διακρίνεται σε σταθερότητα αποθήκευσης (storage stability) και σε σταθερότητα συνεχούς λειτουργίας (operational stability) του βιοαισθητήρα. Η σταθερότητα του βιοαισθητήρα εξαρτάται κυρίως από το χρόνο ζωής του βιολογικού μορίου. Όλοι εκείνοι οι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν τη δραστηριότητα του ενζύμου όπως π.χ. η θερμοκρασία και το pH επηρεάζουν και τη σταθερότητα του βιοαισθητήρα. Επίσης, σε μικρότερο βαθμό, εξαρτάται από το μεταλλάκτη σήματος που χρησιμοποιείται αλλά και από τον τρόπο κατασκευής του βιοαισθητήρα.

Αναπαραγωγιμότητα – Επαναληψιμότητα

Εκφράζει την επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) μεταξύ των μετρήσεων ή των χαρακτηριστικών του ίδιου αισθητήρα ή διαφορετικών αισθητήρων. Διαχωρίζεται επομένως σε επαναληψιμότητα μεταξύ των μετρήσεων και σε επαναληψιμότητα κατασκευής των βιοαισθητήρων. Μία αναλυτική μέθοδος ή ένα αναλυτικό όργανο θεωρείται αξιόπιστο μόνο εφόσον η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση είναι μικρότερη από 10%.

Χρόνος Απόκρισης

Ορίζεται ως ο χρόνος εκείνος που απαιτείται έως ότου η μετρούμενη αναλυτική παράμετρος λάβει το 90% της τελικής της τιμής.

2.5 Προβλήματα Βιοαισθητήρων

Οι βιοαισθητήρες εμφανίζουν ένα μεγάλο εύρος δυνατών εφαρμογών στην ανάλυση τροφίμων, σε κλινικές αναλύσεις και σε περιβαλλοντικές μελέτες. Ωστόσο η ευρεία ανάπτυξη εμπορικά διαθέσιμων συστημάτων βιοαισθητήρων δεν έχει επιτευχθεί ακόμη στον επιθυμητό βαθμό, παρά τις μεγάλες ανάγκες της αγοράς, λόγω ορισμένων λειτουργικών προβλημάτων που εμφανίζονται στον τομέα των βιοαισθητήρων. Τα προβλήματα αυτά εστιάζονται κυρίως στη σταθερότητά τους τόσο κατά την αποθήκευση τους όσο και σε συνθήκες συνεχούς λειτουργίας, την ευαισθησία τους και την επαναληψιμότητα της κατασκευής τους^{20,21}. Μεταξύ αυτών των παραμέτρων ο βασικότερος παράγοντας που επηρεάζει τα αναλυτικά χαρακτηριστικά των βιοαισθητήρων είναι η σταθερότητά τους. Η σταθερότητα των βιοαισθητήρων εξαρτάται κυρίως από το χρόνο ζωής και από το ρυθμό αποικοδόμησης ή απενεργοποίησης του βιολογικού μορίου που χρησιμοποιείται. Διάφοροι παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το pH, οι οργανικοί διαλύτες αλλά και το υψηλό δυναμικό που εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας στην περίπτωση των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων, μπορούν να οδηγήσουν σε απενεργοποίηση του βιολογικού μορίου κατά τη διάρκεια της παρασκευής των βιοαισθητήρων ή κατά τη διάρκεια των αναλύσεων. Οι ενζυμικοί βιοαισθητήρες και πιο συγκεκριμένα η βελτίωση της σταθερότητάς τους, μέσω σταθεροποίησης του ενζύμου αποτελούν το θέμα της παρούσας εργασίας και για το λόγο αυτό θα γίνει ιδιαίτερα αναφορά στα ένζυμα και στις ήδη υπάρχουσες μεθόδους σταθεροποίησης τους.

2.6 Βιβλιογραφία

1. Clark L.C., Lyons C., Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. Ann. N. Y. Acad. Sci. 1962, 102, 29.
2. Clark L.C., Monitor and control of blood and tissue O₂ tensions. Trans. Am. Soc. Artif. Intern. Organs 1956, 2, 41.

3. IUPAC Compendium of Chemical Terminology 2nd Edition (1997)
<http://www.iupac.org/goldbook/B00663.pdf>
4. Thévenot D.R., Toth K., Durst R.A., Wilson G.S., Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Pure Appl. Chem.* 1999, 71, 2333.
5. Byfield M.P., Abuknesha R.A., Biochemical aspects of biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 1994, 9, 373.
6. Collings A.F., Caruso F., Biosensors: recent advances. *Rep. Prog. Phys.* 1997, 60, 1397.
7. Eggins B., *Biosensors an Introduction*, John Wiley & Sons, New York, 1997.
8. Scheller F., Schubert F., Neumann B., Pfeiffer D., Hintsche R., Dransfeld I., Wollenberger U., Renneberg R., Warsinke A., Johansson G., Skoog M., Yang X., Bogdanovskaya V., Bückmann A., Zaitsev S.Y., Second generation biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 1991, 6, 245.
9. Chaubey A., Malhotra B.D., Mediated biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 2002, 17, 441.
10. Turner A., Amperometric biosensors based on mediator-modified electrodes. *Meth. Enzym.* 1988, 137, 90.
11. Cass A., Davis G., Francis G., Hill A., Aston W., Higgins J., Plotkin E., Scott L., Turner A., Ferrocene mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose. *Anal. Chem.* 1984, 56, 667.
12. Gorton L., Lindgren A., Larsson T., Munteanu F.D., Ruzgas T., Gazaryan I., Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors. *Anal. Chim. Acta* 1999, 400, 91L.
13. Lotzbeyer T., Schumann W., Schmidt H.L., Minizymes. A new strategy for the development of reagentless amperometric biosensors based on direct electron-transfer processes. *Biosens. Bioelectron.* 1997, 12, 1.
14. Ramsden J.J., *Optical Biosensors*. *J. Mol. Recogn.* 1997, 10, 109.
15. Diamond D., *Principles of Chemical and Biological Sensors*. John Wiley & Sons, New York, 1998.
16. Pickup J.C., Hussain F., Evans N.D., Rolinski O.J., Birch D.J.S., Fluorescence-based glucose sensors. *Biosens. Bioelectron.* 2005, 20, 2555.
17. Weiss S., Fluorescence spectroscopy of single molecules. *Science* 1999, 283, 1676.

-
18. Rich R.L., Myszka D.G., Survey of the year 2001 commercial optical biosensor literature. *Journal of Molecular Recognition* 2002, 15, 1.
 19. Göpel W., Hesse J., Zemel J.N., *Sensors, A Comprehensive Survey, Volume 2*, VCH Publishers Inc., New York, 1991.
 20. Perdomo J., Sundermeier C., Hinkers H., Martvnez M.O., Seifert W., Knoll M., Containment sensors for the determination of L-lactate and glucose. *Biosens. Bioelectron.* 1999, 14, 27.
 21. Weetall H.H., Chemical sensors and biosensors, update, what, where, when and how. *Biosens. Bioelectron.* 1999, 14, 237.

3. ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΕΝΖΥΜΩΝ

Οι πρωτεΐνες και ειδικότερα τα ένζυμα παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο σε όλες σχεδόν τις βιολογικές διεργασίες, στις οποίες συμμετέχουν ως καταλύτες. Η καταλυτική αντίδραση είναι τουλάχιστον 10^{12} φορές ταχύτερη σε σύγκριση με την αντίστοιχη αντίδραση απουσία του καταλύτη¹. Η επιτάχυνση της βιολογικής αντίδρασης πραγματοποιείται εξαιτίας της μείωσης της ενέργειας της μεταβατικής κατάστασης. Με άλλα λόγια το ένζυμο διευκολύνει το υπόστρωμα να πάρει εκείνη τη δομή στο χώρο που θα προκαλέσει την ταχύτερη μετατροπή του σε προϊόντα². Παράλληλα τα ένζυμα εμφανίζουν μεγάλη επιλεκτικότητα καθώς έχουν την ικανότητα να αναγνωρίζουν εξειδικευμένα και να δεσμεύουν ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα και να μετατρέπουν στα αντίστοιχα προϊόντα.

Η απώλεια της καταλυτικής δράσης των ενζύμων αποτελεί ένα από τα βασικά προβλήματα που εμποδίζουν την ευρεία εφαρμογή τους. Αυτό οφείλεται στην αδυναμία των ενζύμων να διατηρήσουν την ενεργότητα τους σε περιβάλλον που διαφέρει σημαντικά από το φυσικό τους. Διάφορες παράμετροι όπως οι ακραίες τιμές θερμοκρασίας ή pH, αλλά και τα απορρυπαντικά, μεταβάλλουν την τριτοταγή δομή των ενζύμων συμβάλλοντας στη μείωση της δραστηρότητάς τους. Η απώλεια της δραστηρότητας μπορεί να οφείλεται σε αποδιάταξη, οξειδωτική αποσύνθεση, μη ανιστρεπτή αναστολή, πρωτεόλυση ή καθίζηση. Η μείωση της ενεργότητας ενός ενζύμου είναι αποτέλεσμα της αποδιάταξης της τεταρτοταγούς δομής του. Το ένζυμο μεταπίπτει από την ενεργή του μορφή (N) στην αποδιαταγμένη του μορφή (U). Η διαδικασία αυτή είναι συνήθως ανιστρεπτή και το ένζυμο μπορεί να επαναδιαταχτεί και να αποκτήσει και πάλι την ενεργή του μορφή. Ωστόσο κάποια περαιτέρω χημική αλλαγή στην πολυπεπτιδική αλυσίδα μπορεί να οδηγήσει σε μόνιμη απενεργοποίηση του ενζύμου (I)³ (Εικόνα 1).



Εικόνα 1. Σχηματική αναπαράσταση της απώλειας της ενζυμικής δομής και λειτουργίας.

Τα δύο αυτά ξεχωριστά φαινόμενα, της απώλειας της ενζυμικής δομής και λειτουργίας συνέβαλαν στο να δημιουργηθούν δύο ορισμοί για τη σταθερότητα των ενζύμων. Ο πρώτος ορισμός συνδέεται με την ικανότητα του ενζύμου να αντιστέκεται στην αποδιάταξη της ενεργής του μορφής ($N \leftrightarrow U$) και ονομάζεται θερμοδυναμική σταθερότητα. Ο δεύτερος ορισμός αναφέρεται στην ικανότητα του ενζύμου να αντιστέκεται στην απενεργοποίηση του ($U \rightarrow I$) και ονομάζεται κινητική σταθερότητα.

Η προστασία των ενζύμων από τους παράγοντες εκείνους που επηρεάζουν την καταλυτική τους δραστηριότητα αλλά και τη σταθερότητά τους αποτελεί ένα πεδίο που συγκεντρώνει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας.

3.1 Σταθεροποίηση Ενζύμων

Τα ένζυμα ως βιοκαταλύτες χρησιμοποιούνται κυρίως σε υδατικά συστήματα. Η σταθερότητα των ενζύμων σε υδατικά διαλύματα είναι περιορισμένη καθώς συχνά προκαλείται αποδιάταξή τους. Παράλληλα όμως και οι οργανικοί διαλύτες δεν αποτελούν το καταλληλότερο μέσο για τα ένζυμα καθώς συμβάλλουν στην απενεργοποίησή τους. Ο βαθμός απενεργοποίησης εξαρτάται από το ένζυμο που χρησιμοποιείται και από το ποσοστό του νερού στο μέσο⁴. Η παρουσία του νερού έστω και σε μικρό ποσοστό είναι απαραίτητη για τη διατήρηση της καταλυτικής δράσης των ενζύμων⁵. Έτσι σε κάθε περίπτωση πρέπει να βρίσκεται το καταλληλότερο μέσο ώστε όχι μόνο να είναι σταθερό το ένζυμο αλλά και δραστικό.

Διάφοροι παράγοντες επηρεάζουν τη σταθερότητα των ενζύμων σε διάλυμα⁶. Ένας βασικός παράγοντας είναι η θερμοκρασία αφού τα ένζυμα είναι σταθερά σε μικρό εύρος θερμοκρασιών. Καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία οι δεσμοί υδρογόνου γίνονται πιο ασθενείς και οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μειώνονται. Έτσι σε υψηλές θερμοκρασίες ευνοείται η αποδιάταξη των ενζύμων. Μία άλλη σημαντική παράμετρος είναι το pH του περιβάλλοντος. Σε πολύ χαμηλές ή πολύ υψηλές τιμές pH τα ένζυμα υφίστανται υδρόλυση και απενεργοποιούνται. Πολλές φορές η παρουσία μικρής συγκέντρωσης αλάτων σε πρωτεϊνικά διαλύματα ευνοεί τη σταθερότητα της πρωτεΐνης. Ωστόσο όταν η συγκέντρωση του άλατος γίνεται πολύ μεγάλη αυξάνεται η επιφανειακή τάση του διαλύματος με αποτέλεσμα να παρατηρείται καταβύθιση της πρωτεΐνης και τελικά απενεργοποίησή της.

Για να αποφευχθεί η απενεργοποίηση των ενζύμων σε διάλυμα έχουν προταθεί πολλές διαδικασίες για τη σταθεροποίησή τους. Οι βασικότερες από αυτές αναπτύσσονται στη συνέχεια.

Γενετική τροποποίηση

Στην πρωτεϊνική μηχανική εφαρμόζεται ευρύτατα η μετάλλαξη ενζύμων με στόχο τη σταθεροποίηση και τη βελτίωση των ιδιοτήτων τους⁷. Γενικά η αντικατάσταση συγκεκριμένων αμινοξέων στην πρωτεϊνική αλυσίδα αποσκοπεί στην αύξηση των πιθανών δεσμών υδρογόνου και των δυνάμεων Van der Waals ή στην ενίσχυση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων στην πρωτεϊνική αλυσίδα⁸. Με αυτό τον τρόπο επιτυγχάνεται σταθεροποίηση της δευτεροταγούς δομής της πρωτεΐνης. Η αντικατάσταση συγκεκριμένων καταλοίπων στην αλληλουχία των αμινοξέων μπορεί να επιφέρει αύξηση στη σταθερότητα των πρωτεϊνών. Μάλιστα συνήθως πραγματοποιείται μετάλλαξη στα κατάλοιπα εκείνα στα οποία έχει μεγαλύτερη πρόσβαση ο διαλύτης. Έχει βρεθεί ότι η εισαγωγή όξινων καταλοίπων στο αμινοτελικό άκρο της πρωτεΐνης και βασικών καταλοίπων στο καρβοξυ-τελικό άκρο, σταθεροποιεί τις έλικες της πρωτεΐνης. Επίσης η αύξηση των δισουλφιδικών δεσμών στην πρωτεϊνική δομή αυξάνει τη σταθερότητα της πρωτεΐνης εμποδίζοντας την αποδιάταξη της τεταρτοταγούς δομής της⁷.

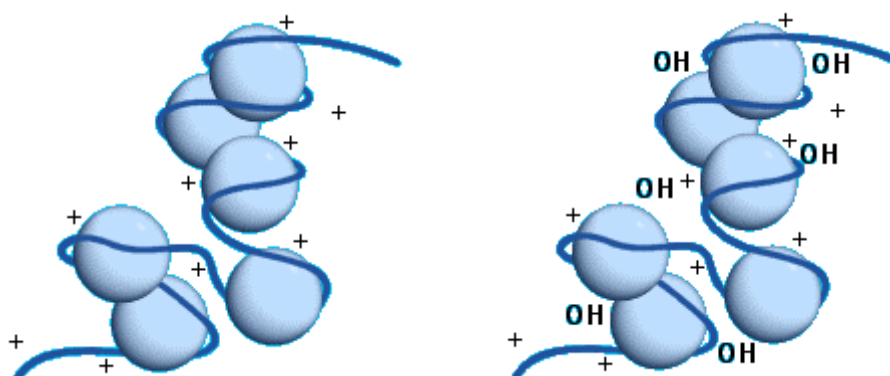
Χημική τροποποίηση

Η χημική τροποποίηση των πρωτεϊνών πολλές φορές συμβάλλει στη σταθεροποίησή τους. Κατά την αντίδραση συγκεκριμένων ομάδων των αμινοξέων μίας πρωτεΐνης με ειδικά αντιδραστήρια είναι δυνατό να μεταβληθούν οι ιδιότητες της πρωτεΐνης. Πολύ συχνά πραγματοποιείται η μετατροπή των μη-πολικών ομάδων της εξωτερικής επιφάνειας της πρωτεΐνης σε πολικές⁹. Η σταθεροποίηση αυτή πραγματοποιείται με την αντικατάσταση των μη-πολικών αμινοξέων από πολικά ή με δέσμευση υδατανθράκων σε επιφανειακά αμινοξέα της πρωτεΐνης. Με αυτή τη διαδικασία η πρωτεΐνη αλληλεπιδρά καλύτερα με πολικούς διαλύτες και η ενδεχόμενη αποδιάταξή της περιορίζεται. Παράλληλα, η δέσμευση πολυαιθυλενογλυκόλης με πολικές ή άπολες ομάδες, σε επιφανειακά αμινοξέα αυξάνει τη διαλυτότητα και την ενεργότητα της πρωτεΐνης σε πολικούς και άπολους διαλύτες αντίστοιχα. Τέλος η προσθήκη διδραστικών αντιδραστηρίων στις πρωτεΐνες καθιστά δυνατή την ανάπτυξη

διαμοριακών ή ενδομοριακών δεσμών που αυξάνουν τη σταθερότητα της δομής της πρωτεΐνης.

Πρόσθετα

Η σταθερότητα των ενζύμων σε υδατικά διαλύματα αυξάνεται με την προσθήκη ορισμένων ενώσεων¹⁰, όπως οι πολυαλκοόλες, τα σάκχαρα και οι πολυηλεκτρολύτες, που ονομάζονται πρόσθετα. Τα σάκχαρα και οι πολυαλκοόλες αυξάνουν την επιφανειακή τάση του νερού, με αποτέλεσμα λιγότερα μόρια νερού να περιβάλλουν το ένζυμο και να μην ευνοείται η αποδιάταξη του³ (Εικόνα 2). Η αύξηση της σταθερότητας των ενζύμων παρουσία των πολυηλεκτρολυτών όπως η πολυαιθυλενιμίμη¹¹, η διαιθυλαμινοαιθυλοδεξτράνη¹² και το DNA¹³ θεωρείται ότι επιτυγχάνεται μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που προστατεύουν το ένζυμο. Δημιουργείται μία δομή κλουβιού γύρω από το ένζυμο που συμβάλλει στη διατήρηση της ενεργής του διαμόρφωσης.



Εικόνα 2. Σταθεροποίηση ενζύμων με πολυηλεκτρολύτες και πολυαλκοόλες.

Ακίνητοποίηση

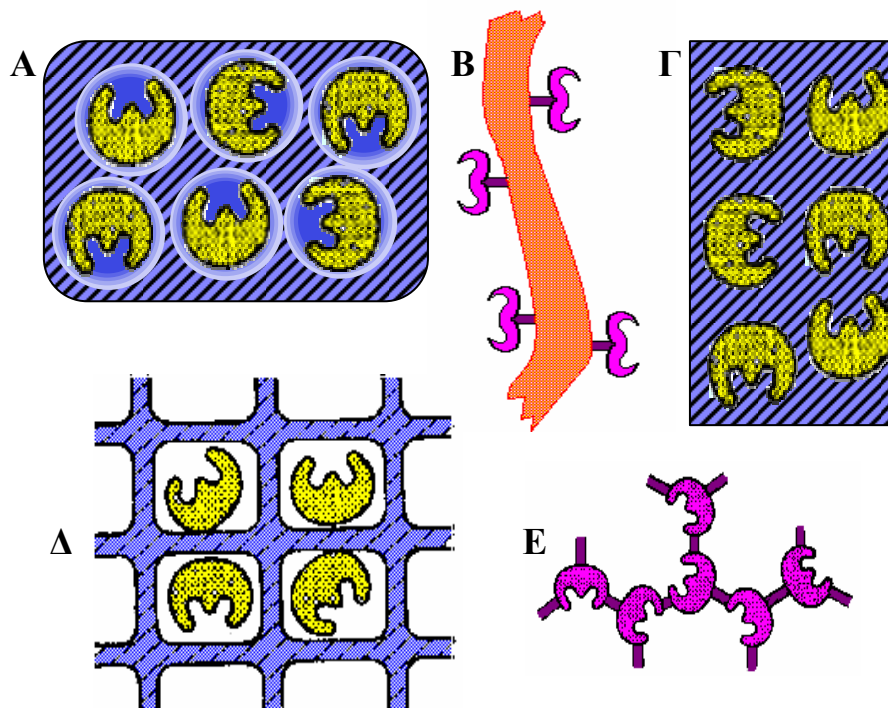
Ένας επιπλέον τρόπος σταθεροποίησης των ενζύμων αποτελεί η ακίνητοποίηση τους σε στερεά υποστρώματα. Ο τρόπος αυτός σταθεροποίησης είναι ο πιο διαδεδομένος ειδικά στην περίπτωση των ενζυμικών βιοαισθητήρων, καθώς με την απευθείας ακίνητοποίηση του ενζύμου στο μετάλλακτη δεν απαιτείται επιπλέον σταθεροποίηση του ενζύμου. Η ακίνητοποίηση πρέπει να γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε τα ένζυμα να διατηρούν την ενεργότητα και την επιλεκτικότητα τους και να είναι δυνατή η πρόσβαση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Οι κυριότερες μέθοδοι ακίνητοποίησης περιγράφονται αναλυτικά παρακάτω.

3.2 Σταθεροποίηση Ενζύμων με Ακίνητοποίηση

Διάφορα οργανικά και ανόργανα υλικά έχουν χρησιμοποιηθεί ως υποστρώματα για την ακίνητοποίηση βιολογικών μορίων και συγκεκριμένα ενζύμων. Οι πιο βασικές μέθοδοι ακίνητοποίησης των ενζύμων είναι η φυσική προσρόφηση, η ομοιοπολική δέσμευση, η παγίδευση, ο εγκλωβισμός και η διαμοριακή σύνδεση¹⁴ (Εικόνα 3).

Φυσική προσρόφηση

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος ακίνητοποίησης είναι η φυσική προσρόφηση σε στερεά υλικά. Το ένζυμο συγκρατείται στο υλικό στήριξης μέσω ισχυρών ιοντικών αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου καθώς και ασθενών δυνάμεων Van der Waals ή υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων⁴. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου δεν επηρεάζεται κατά τη φυσική προσρόφηση με αποτέλεσμα να διατηρείται πλήρως η δραστηριότητα του ενζύμου. Ωστόσο πολύ συχνά παρατηρείται εκρόφιση του ενζύμου λόγω της ασθενούς δέσμευσής του στο υλικό στήριξης.



Εικόνα 3. Ακίνητοποίηση ενζύμων μέσω Α) φυσικής προσρόφησης, Β) ομοιοπολικής δέσμευσης, Γ) παγίδευσης, Δ) εγκλωβισμού και Ε) διαμοριακής σύνδεσης.

Ομοιοπολική δέσμευση

Πιο αποτελεσματική μέθοδο ακινητοποίησης αποτελεί η ομοιοπολική δέσμευση σε επιφάνειες μέσω διαφόρων δραστικών ομάδων. Συνήθως ο ομοιοπολικός δεσμός σχηματίζεται μεταξύ των αμινομάδων, καρβοξυλομάδων, υδροξυλομάδων και θειολικών ομάδων των αμινοξέων του ενζύμου με τις αντίστοιχες δραστικές ομάδες της επιφάνειας του υλικού δέσμευσης⁴. Για τη διατήρηση της δραστηρότητας του ενζύμου, οι συνθήκες των αντιδράσεων πρέπει να είναι ήπιες και τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου είναι απαραίτητο να προστατεύονται ώστε να μη συμμετέχουν στον ομοιοπολικό δεσμό.

Φυσική Παγίδευση

Η παγίδευση ενζύμων στην επιφάνεια του μεταλλάκτη σήματος πραγματοποιείται μέσω μεμβρανών που έχουν διαφορετικά μεγέθη πόρων. Με αυτή τη μέθοδο ακινητοποίησης το ένζυμο συγκρατείται κοντά στο μεταλλάκτη σήματος και διατηρεί πλήρως την ενεργότητα του. Οι μεμβράνες που χρησιμοποιούνται κατασκευάζονται συνήθως από οξική κυτταρίνη, πολυουραιθάνη, πολυτετραφθοροεθυλένιο (Teflon) και νάιλον. Χαρακτηριστικό των μεμβρανών είναι ότι επιτρέπουν τη διέλευση του αναλύτη προς το ενζυμικό στρώμα ενώ εμποδίζουν τη διέλευση μεγάλων μορίων του δείγματος προστατεύοντας έτσι το ένζυμο. Το κυριότερο μειονέκτημα της μεθόδου είναι η μικρή σταθερότητα.

Εγκλωβισμός

Ο εγκλωβισμός ενζύμων σε τρισδιάστατα πολυμερικά πλέγματα πραγματοποιείται μέσω διαφόρων μεθόδων πολυμερισμού. Το πλέγμα προκύπτει κατά το συμπολυμερισμό των κατάλληλων μονομερών παρουσία του ενζύμου. Με τον τρόπο αυτό ελέγχονται οι συνθήκες ακινητοποίησης του ενζύμου. Ωστόσο η αστάθεια των πολυμερικών πλεγμάτων αποτελεί βασικό μειονέκτημα της μεθόδου.

Διαμοριακή σύνδεση

Μία ακόμη μέθοδος χημικής ακινητοποίησης πραγματοποιείται μέσω διαμοριακής σύνδεσης των ενζύμων. Τα ενζυμικά μόρια συνδέονται μεταξύ τους μέσω διαφόρων συνδετικών κρίκων, όπως η γλουταραλδεΐδη και τελικά σχηματίζεται ένα πρωτεϊνικό πλέγμα. Μεγάλες συγκεντρώσεις του ενζύμου πρέπει να αποφεύγονται καθώς στην

περίπτωση αυτή είναι πολύ πιθανό να προκύψει πλέγμα ενζύμων με μειωμένη δραστηριότητα⁴.

Γενικά η ακινητοποίηση ενζύμων σε επιφάνειες στερεών υποστρωμάτων περιορίζει την απενεργοποίησή τους μέσω διαδικασιών όπως είναι η συσσωμάτωση και η πρωτεόλυση. Ο βαθμός σταθεροποίησης που επιτυγχάνεται διαφέρει, ανάλογα με το ένζυμο και το υπόστρωμα ακινητοποίησης. Για αυτό άλλωστε γίνονται μελέτες βελτιστοποίησης σε κάθε περίπτωση, ώστε να βρεθούν οι ιδανικές συνθήκες για την ακινητοποίηση των ενζύμων.

Οι παραπάνω μέθοδοι ακινητοποίησης εμφανίζουν αρκετά προβλήματα με αποτέλεσμα να μην έχει επιτευχθεί ο επιθυμητός βαθμός σταθερότητας του ενζύμου. Τα ένζυμα είτε δεσμεύονται ασθενώς στα υποστρώματα είτε απενεργοποιούνται λόγω των χημικών αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται κατά την ακινητοποίησή τους. Παράλληλα είναι δυσχερής η εφαρμογή των διαδικασιών ακινητοποίησης σε συστήματα βιοαισθητήρων καθώς οι περισσότερες περιλαμβάνουν περισσότερα του ενός στάδια, με αποτέλεσμα να μην είναι επαναλήψιμη η διαδικασία παρασκευής τους. Ωστόσο η ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας τα τελευταία χρόνια παρέχει νέες προοπτικές και δυνατότητες για τη σταθεροποίηση των ενζύμων μέσω της ανάπτυξης ποικίλων νανοδομών.

3.3 Σταθεροποίηση Ενζύμων σε Νανοδομές

Οι νανοδομές βρίσκονται στο επίκεντρο του σύγχρονου ερευνητικού ενδιαφέροντος λόγω της ευρύτερης τάσης που υπάρχει για την ανάπτυξη μικροποιημένων συστημάτων και την εξέλιξη της νανοτεχνολογίας. Το μέγεθος των νανοδομών αλλά και οι ιδιότητες τους τις καθιστούν χρήσιμα υποστρώματα για ευρύτερες τεχνολογικές εφαρμογές. Ωστόσο πολλές από τις ιδιότητες και δυνατότητες των συστημάτων αυτών παραμένουν ανεξερεύνητες. Η σύζευξη των συστημάτων αυτών με βιολογικά μόρια επιτρέπει τη μελέτη μηχανισμών μοριακής ή και βιολογικής αναγνώρισης με περαιτέρω επίδραση στους τομείς της βιοχημικής ανίχνευσης, της γονιδιακής θεραπείας και της μεταφοράς φαρμάκων. Στα πλαίσια της ευρύτερης

εξερεύνησης των υλικών αυτών, διάφορες νανοδομές έχουν εξεταστεί και αξιολογηθεί ως υποστρώματα για την ακινητοποίηση και σταθεροποίηση ενζύμων¹⁵.

Οι νανοδομές αποτελούν υλικά που μια τουλάχιστον από τις διαστάσεις τους είναι της τάξης των 100nm και μικρότερη. Οι κυριότερες κατηγορίες νανοδομών είναι τα νανοσωματίδια, τα νανοσύρματα και τα νανοπορώδη υλικά. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των υλικών αυτών διαφέρουν σημαντικά από τις ιδιότητες του κύριου όγκου υλικού (bulk). Μέσω του ελέγχου της δομής των νανοϋλικών που προορίζονται ως υποστρώματα για την ακινητοποίηση ενζύμων, είναι δυνατό να επιτευχθεί βελτίωση της σταθερότητας των ενζύμων. Οι νανοδομές γενικά παρέχουν μεγάλη επιφάνεια επαφής, πόρους με μεγέθη ανάλογα με αυτά των ενζύμων, επιφάνειες με διάφορες δραστικές ομάδες που είναι δυνατό να αλληλεπιδρούν με τα ένζυμα καθώς και αυξημένο ρυθμό διάχυσης του υποστρώματος του ενζύμου.

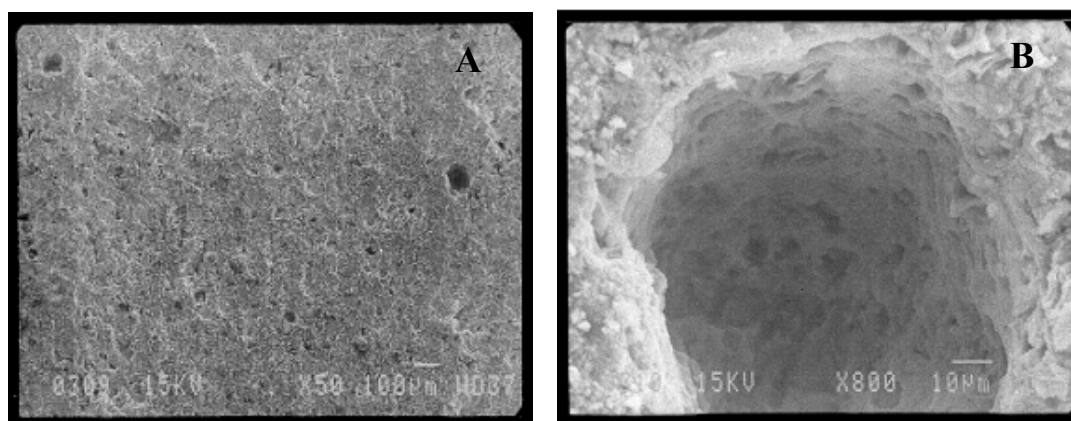
Τα νανοσωματίδια είναι υλικά που και οι τρεις διαστάσεις τους είναι της τάξης των nm. Συντίθενται συνήθως από μέταλλα, οξειδία των μετάλλων ή ημιαγώγιμα υλικά (Au, Ag₂S, CdS, CdSe, TiO₂)^{16,17}. Διάφορες μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί για τη σύζευξη των νανοσωματιδίων με βιολογικά μόρια¹⁸. Μείωση του μεγέθους των νανοσωματιδίων παρέχει μεγαλύτερη επιφάνεια για την ακινητοποίηση ενζύμων και επομένως μεγαλύτερο ενζυμικό φορτίο ανά μάζα του υλικού¹⁹. Ωστόσο οι περισσότερες μελέτες που έχουν πραγματοποιηθεί με νανοσωματίδια εστιάζονται στην αύξηση της ενζυμικής δραστηριότητας και του ενζυμικού φορτίου, και όχι τόσο στη σταθεροποίηση των ενζύμων στα υλικά αυτά. Μία μελέτη που αφορά τη σταθεροποίηση ενζύμων σχετίζεται με την ακινητοποίηση του ενζύμου λιπάση στην επιφάνεια μαγνητικών σωματιδίων γ-Fe₂O₃ μέσης διαμέτρου 20 ± 10 nm μέσω ομοιοπολικών δεσμών²⁰. Παρόλο που το ακινητοποιημένο ένζυμο παρουσιάζει χαμηλότερη ενεργότητα από το ελεύθερο ένζυμο, η σταθερότητα του ενζύμου στα μαγνητικά σωματίδια υπό συνθήκες συνεχούς λειτουργίας αυξάνεται σημαντικά και μέσα σε ένα μήνα το ένζυμο χάνει μόλις 15% από την ενεργότητα του.

Τα νανοσύρματα έχουν δύο διαστάσεις στην κλίμακα των νανομέτρων. Κατασκευάζονται από πυρίτιο²¹, χρυσό, άργυρο και από αγωγίμα πολυμερή²². Όπως όλες οι νανοδομές εμφανίζουν μεγάλη δραστική επιφάνεια και αυξημένο ρυθμό διάχυσης του αναλύτη. Νανοσύρματα έχουν χρησιμοποιηθεί ως υποστρώματα για την ακινητοποίηση ενζύμων²³. Κατά την ακινητοποίηση της α-χυμοθρυψίνης σε

νανοσύρματα πολυστυρενίου διαμέτρου 120nm, παρατηρήθηκε αύξηση της δραστηριότητας του ενζύμου σε σύγκριση με το ελεύθερο ένζυμο σε διάλυμα. Παράλληλα το ακινητοποιημένο ένζυμο εμφάνισε κατά τρεις τάξεις μεγέθους μεγαλύτερη δραστηριότητα σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο, παρουσία οργανικών διαλυτών. Η χρήση των νανοσυρμάτων για την ακινητοποίηση και σταθεροποίηση ενζύμων είναι περιορισμένη λόγω των προβλημάτων που συναντώνται στις μεθόδους παρασκευής τους²⁴.

Τέλος τα νανοπορώδη υλικά έχουν πόρους ή κοιλότητες με διάμετρο στην κλίμακα των νανομέτρων. Χαρακτηριστικό αυτών των υλικών είναι ότι έχουν μεγάλη ενεργή επιφάνεια σε σχέση με τον όγκο τους, εμφανίζουν μεγάλη πορωσιμότητα και η κατανομή των πόρων τους είναι συνήθως ομοιόμορφη. Στο εσωτερικό των πόρων των υλικών αυτών είναι δυνατό να ακινητοποιηθούν βιολογικά μόρια. Διάφορα νανοπορώδη πυριτικά υποστρώματα όπως τα MCM-41 (διάμετρος πόρων 4nm), SBA-15 (διάμετρος πόρων 5-13 nm) και MCF (διάμετρος πόρων 15-40 nm) έχουν χρησιμοποιηθεί για την ακινητοποίηση και σταθεροποίηση ενζύμων. Η ακινητοποίηση του ενζύμου πραγματοποιείται συνήθως μέσω απλής προσρόφησης στο εσωτερικό των πόρων των πυριτικών υποστρωμάτων^{25,26,27}. Η σταθερότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων εξαρτάται από το μέγεθος των πόρων των πυριτικών υποστρωμάτων αλλά και από το φορτίο στην επιφάνειά τους. Κατά την ακινητοποίηση του ενζύμου HRP (Horse Radish Peroxidase) σε διάφορα πυριτικά υποστρώματα με διαφορετικό μέγεθος πόρων, η μεγαλύτερη δραστηριότητα ενζύμου παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα εκείνο που το μέγεθος των πόρων του ήταν παρόμοιο με το μέγεθος του ενζύμου²⁸. Επίσης όταν το φορτίο στην επιφάνεια των υλικών είναι αντίθετο με το φορτίο στην επιφάνεια των ενζύμων, τα ενζυμικά μόρια σταθεροποιούνται περισσότερο λόγω της αλληλεπίδρασης των ετερόνυμων φορτίων^{26,28,29}. Εκτός από την προσρόφηση και η ομοιοπολική δέσμευση των ενζύμων στο εσωτερικό των πόρων, και μάλιστα η δέσμευση του ίδιου ενζυμικού μορίου σε περισσότερα από ένα σημεία στην επιφάνεια των πυριτικών υποστρωμάτων έχει βρεθεί ότι αυξάνει τη σταθερότητα των ενζύμων^{30,31}. Εκτός από τα πυριτικά υποστρώματα διάφορα νανοπορώδη ανθρακικά υποστρώματα έχει αποδειχτεί ότι αποτελούν κατάλληλα υλικά για την ακινητοποίηση και σταθεροποίηση ενζύμων. Ένα από αυτά είναι και ο πορώδης αγωγίμος άνθρακας που οι διαστάσεις των πόρων του είναι είτε 100-300nm είτε μικρότεροι των 70 nm όπως προκύπτει από πειράματα

ηλεκτρονικής μικροσκοπίας σάρωσης (Scanning Electron Microscopy) (Εικόνα 4). Τα διαφορετικά μεγέθη πόρων του άνθρακα επιτρέπουν τη σταθεροποίηση ενζύμων διαφόρων μεγεθών. Πράγματι έχει αποδειχτεί ότι σταθερά ένζυμα, όπως η οξειδάση της γλυκόζης³² αλλά και σχετικά ασταθή ένζυμα όπως η οξειδάση του πυρουβικού¹³, η οξειδάση του γαλακτικού^{32,33} και η ακετυλχολινεστεράση^{34,35} παρουσιάζουν μεγάλη σταθερότητα στους πόρους του άνθρακα. Εκτός από τον πορώδη άνθρακα και άλλα νανοπορώδη ανθρακικά υλικά όπως ο ενεργοποιημένος υαλώδης άνθρακας³⁶, τα φουλερένια³⁷ και οι νανοσωλήνες άνθρακα^{38,39,40} έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για την ακινητοποίηση και σταθεροποίηση ενζύμων. Παράλληλα νανοπορώδη υλικά από χρυσό⁴¹ και αργίλιο⁴² έχουν χρησιμοποιηθεί για την ακινητοποίηση πρωτεϊνών.



Εικόνα 4. SEM μικροφωτογραφίες A) της επιφάνειας του άνθρακα και B) ενός πόρου του άνθρακα. Οι παύλες αντιστοιχούν σε μήκος 100µm και 10µm αντίστοιχα.

Πρόσφατα δημιουργήθηκαν μαθηματικά μοντέλα ώστε να μελετηθεί θεωρητικά η αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με τα υλικά ακινητοποίησης. Η ανάπτυξη των θεωρητικών αυτών μοντέλων θεωρείται ότι μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στην καλύτερη κατανόηση του μηχανισμού σταθεροποίησης και άρα στην ανάπτυξη μίας καθολικής διαδικασίας ακινητοποίησης και σταθεροποίησης.

3.4 Βιβλιογραφία

1. Copeland R.A., *Enzymes-A Practical Introduction to Structure, Mechanism and Data Analysis*, Wiley-VCH, Inc., 1996.

2. Stryer L., Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1997.
3. Fágáin C.Ó., Understanding and Increasing Protein Stability. *Biochim. Biophys. Acta* 1995, 1252, 1.
4. Drauz K., Waldmann H., *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. Vol 1, 2nd edition, Wiley-VCH, Inc., 2002.
5. Klibanov A.M, Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends in Biotechn.* 1997, 15, 97.
6. Fersht A., *Structure and Mechanism in Protein Science-A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding*. W.H. Freeman and Company, New York, 1999.
7. Lee B., Vasmatzis G., Stabilization of protein structures. *Cur. Opin. Biotechn.* 1997, 8, 423.
8. Querol E., Perez-Pons J.A., Mozo-Villarias A., Analysis of protein conformational characteristics related to thermostability. *Prot. Eng.* 1996, 9, 265.
9. Fágáin C.Ó., Enzyme stabilization-recent experimental progress. *Enz. Microbial Technol.* 2003, 33, 137.
10. Chaniotakis N.A., Enzyme stabilization strategies based on electrolytes and polyelectrolytes for biosensor applications. *Anal. Bioanal. Chem.* 2004, 378, 89.
11. Dimakis V.T., Gavalas V.G., Chaniotakis N.A., Polyelectrolyte-stabilized biosensors based on macroporous carbon electrode. *Anal. Chim. Acta* 2002, 467, 217.
12. Gibson T.D., Hulbert J.N., Parker S.M., Woodward J.R., Higgins I.J., Extended shelf life of enzyme-based biosensors using a novel stabilization system. *Biosens. Bioelectron.* 1992, 7, 701.
13. Gavalas V.G., Chaniotakis N.A., Phosphate biosensor based on polyelectrolyte-stabilized pyruvate oxidase. *Anal. Chim. Acta* 2001, 427, 271.
14. Eggins B.R., *Chemical Sensors and Biosensors*, John Wiley & Sons, 2002.
15. Kim J., Grate J.W., Wang P., Nanostructures for enzyme stabilization. *Chem. Eng. Sci.* 2006, 61, 1017.
16. Jianrong C., Yuqing M., Nongyue H., Xiaohua W., Sijao L., Nanotechnology and biosensors. *Biotech. Adv.* 2004, 22, 505.
17. Maxwell D.J., Taylor J.R., Nie S., Self-assembled nanoparticle probes for recognition and detection of biomolecules. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 9606.

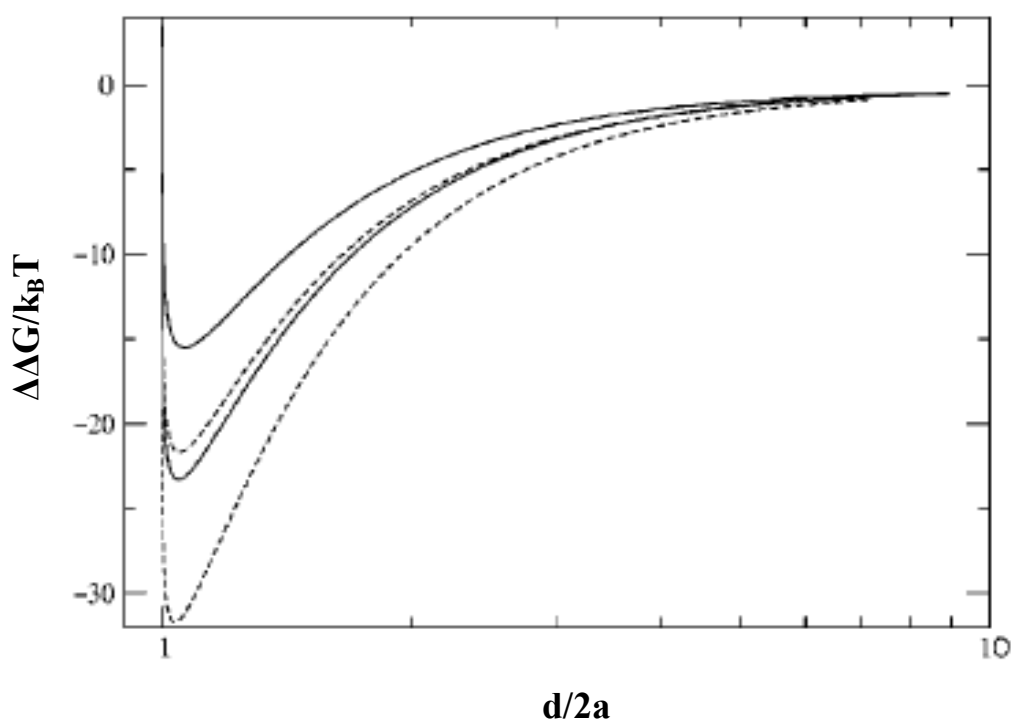
18. Niemeyer C.M., Nanoparticles, proteins and nucleic acids: Biotechnology meets materials science. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2001, 40, 4128.
19. Jia H., Zhu G., Wang P., Catalytic behaviors of enzymes attached to nanoparticles: the effect of particle mobility. *Biotechnol. Bioengineer.* 2003, 84, 406.
20. Dyal A., Loos K., Noto M., Chang S.W., Spagnoli C., Shafi K., Ulman A., Cowman M., Gross R.A., Activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on gamma-Fe₂O₃ magnetic nanoparticles. *J. Am. Chem. Soc.* 2003, 125, 1684.
21. Cui Y., Wei Q., Park H., Lieber C.M., Nanowire nanosensors for highly sensitive and selective detection of biological and chemical species. *Science* 2001, 293, 1289.
22. Ramanathan K., Bangar M.A., Yun M., Chen W., Myung N.V., Mulchandani A., Bioaffinity sensing using biologically functionalized conducting-polymer nanowire. *J. Am. Chem. Soc.* 2005, 127, 496.
23. Jia H, Zhu G, Vugrinovich B., Kataphinan W., Reneker D.H., Wang P., Enzyme-carrying polymeric nanofibers prepared via electrospinning for use as unique biocatalysts. *Biotechnol. Prog.* 2002, 18, 1027.
24. Wang Y., Tang Z., Tan S., Kotov N.A., Biological assembly of nanocircuit prototypes from protein-modified CdTe nanowires. *Nano Lett.* 2005, 5, 243.
25. Diaz J.F., Balkus Jr KJ., Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 1996, 2, 115.
26. Han Y.J., Watson J.T., Stucky G.D., Butler A., Catalytic activity of mesoporous silicate-immobilized chloroperoxidase. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 2002, 17, 1.
27. Wie Y., Xu J., Feng Q., Dong H., Lin M., Encapsulation of enzymes in mesoporous host materials via the nonsurfactant-templated sol-gel process. *Mater. Lett.* 2000, 44, 6.
28. Takahashi H., Li B., Sasaki T., Miyazaki C., Kajino T., Inagaki S., Catalytic activity in organic solvents and stability of immobilized enzymes depend on the pore size and surface characteristics of mesoporous silica. *Chem. Mater.* 2000, 12, 3301.
29. Lei C., Shin Y., Liu J., Ackerman E.J., Entrapping enzyme in a functionalized nanoporous support. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 11242.

30. Wang P., Dai S., Waezsada S.D., Tsao A., Davison B.H., Enzyme stabilization by covalent binding in nanoporous sol-gel glass for nonaqueous biocatalysis. *Biotechnol. Bioeng.* 2001, 74, 249.
31. Mozhaev V.V., Melik-Nubarov N.S., Sergeeva M.V., Siksnis V., Martinek K., Strategy for stabilizing enzymes Part One: Increasing stability of enzymes via their multi-point interaction with a support. *Biocatalysis* 1990, 3, 179.
32. Gavalas V.G., Chaniotakis N.A., Polyelectrolyte stabilized oxidase based biosensors: effect of diethylaminoethyl-dextran on the stabilization of glucose and lactate oxidases into porous conductive carbon. *Anal. Chim. Acta* 2000, 404, 67.
33. Gavalas V.G., Chaniotakis N.A., Lactate biosensor based on the adsorption of polyelectrolyte stabilized lactate oxidase into porous conductive carbon. *Microchim. Acta* 2001, 136, 211.
34. Sotiropoulou S., Chaniotakis N.A., Lowering the detection limit of the acetylcholinesterase biosensor using a nanoporous carbon matrix. *Anal. Chim. Acta* 2005, 530, 199.
35. Sotiropoulou S., Fournier D., Chaniotakis N.A., Genetically engineered acetylcholinesterase-based biosensor for attomolar detection of dichlorvos. *Biosens. Bioelectron.* 2005, 20, 2347.
36. Sotiropoulou S., Gavalas V., Vamvakaki V., Chaniotakis N.A., Novel carbon materials in biosensor systems. *Biosens. Bioelectron.* 2003, 18, 211.
37. Gavalas V.G., Chaniotakis N.A., [60]Fullerene-mediated amperometric biosensors. *Anal. Chim. Acta* 2000, 409, 131.
38. Sotiropoulou S., Chaniotakis N.A., Carbon nanotube array-based biosensor. *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, 375, 103.
39. Tsang S.C., Davis J.J., Green M., Hill A., Leung Y.C., Sadler P.J., Immobilization of small proteins in carbon nanotubes: high resolution transmission electron microscopy study and catalytic activity. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 1995, 17, 1803.
40. Tsang S.C., Guo Z., Chen Y.K., Green M., Hill A., Hambley T.W., Sadler P.J., Immobilization of platinated and iodinated oligonucleotides on carbon nanotubes. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 1997, 36 (20), 2198.

-
41. Van Noort D., Mandenius C.F., Porous gold surfaces for biosensor applications. *Biosens. Bioelectron.* 2000, 15, 203.
 42. Popat K.C., Mor G., Grimes C.A., Desai T.A., Surface modification of nanoporous alumina surfaces with poly(ethylene glycol). *Langmuir* 2004, 20, 8035.

4. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΟΝΤΕΛΟ ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ

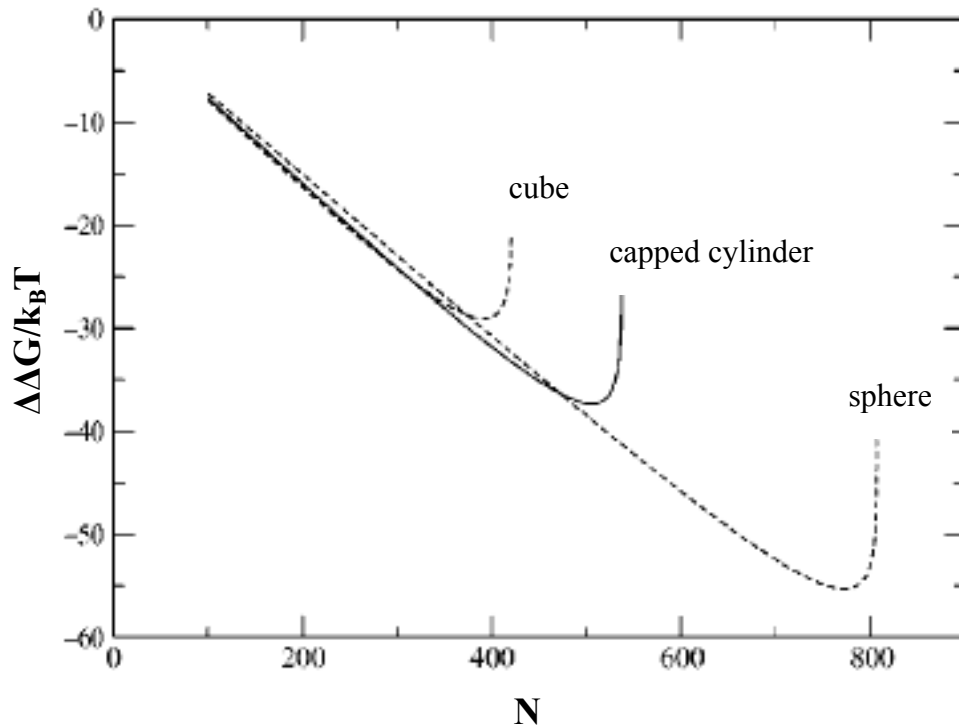
Οι Zhou et. al. το 2001 ανέπτυξαν ένα θεωρητικό μοντέλο¹, που σχετίζεται με τη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών κατά τον εγκλωβισμό τους σε κελιά μικρών διαστάσεων. Το μοντέλο αυτό βασίστηκε στο γεγονός ότι οι δυνάμεις αναδίπλωσης των πρωτεϊνών όταν βρίσκονται ελεύθερες σε διάλυμα διαφέρουν από τις αντίστοιχες δυνάμεις αναδίπλωσης κατά τον εγκλωβισμό τους σε περιορισμένους χώρους. Συγκεκριμένα σε κελιά μικρών διαστάσεων δεν ευνοούνται θερμοδυναμικά οι αποδιαταγμένες διαμορφώσεις της πρωτεϊνικής αλυσίδας και επομένως η χαλάρωση της τριτοταγούς δομής της πρωτεΐνης. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η πρωτεΐνη να σταθεροποιείται στην ενεργή της φυσιολογική δομή, που είναι πιο συμπαγής και καταλαμβάνει μικρότερο χώρο.



Εικόνα 1. Μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας αναδίπλωσης των πρωτεϊνών συναρτήσει του μεγέθους των κελιών στα οποία έχουν εγκλωβιστεί. Οι δύο πάνω καμπύλες είναι για κυβικά κελιά ενώ οι δύο κάτω για σφαιρικά. Το μέγεθος των πρωτεϊνών είναι (—) 100 κατάλοιπα και (·····) 200 κατάλοιπα.

Θεωρώντας ότι μία πρωτεΐνη στην αποδιαταγμένη της μορφή είναι μία τυχαία Gaussian αλυσίδα, οι Zhou et. al. μελέτησαν τη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών κατά τον εγκλωβισμό τους σε κελιά διαφόρων μεγεθών και σχημάτων. Σε κάθε περίπτωση υπολογίστηκε η ελεύθερη ενέργεια αναδίπλωσης των πρωτεϊνών ($\Delta\Delta G k_B^{-1}T^{-1}$) σε συνάρτηση με το μέγεθος-διάμετρο των κελιών που έχουν εγκλωβιστεί ($d/2a$), όπου k_B είναι η σταθερά Boltzmann, T η απόλυτη θερμοκρασία, d η διάμετρος του κελιού, a_N η ακτίνα της ενεργής μορφής της πρωτεΐνης ($a = 3.73N^{1/3}$) και N ο αριθμός των καταλοίπων της πρωτεΐνης. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τους υπολογισμούς συνοψίζονται στην Εικόνα 1. Η ελεύθερη ενέργεια αναδίπλωσης των πρωτεϊνών εμφανίζει ελάχιστη τιμή, όταν το μέγεθος των κελιών είναι παρόμοιο με το μέγεθος των πρωτεϊνών. Παράλληλα στην περιοχή εκείνη του γραφήματος που αντιστοιχεί σε πολύ μικρές διαμέτρους κελιών, η ελεύθερη ενέργεια αναδίπλωσης των πρωτεϊνών είναι πολύ μικρότερη στα σφαιρικά κελιά σε σύγκριση με τα κυβικά κελιά. Τέλος αύξηση του αριθμού των καταλοίπων των πρωτεϊνών συνοδεύεται από μείωση της ελεύθερης ενέργειας αναδίπλωσής τους τόσο στα σφαιρικά όσο και στα κυβικά κελιά. Η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας αναδίπλωσης σε συνάρτηση με το μήκος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας φαίνεται πολύ καλύτερα στην Εικόνα 2. Διαπιστώνεται ότι η σταθεροποίηση πρωτεϊνών σε κυβικά, σφαιρικά και κυλινδρικά κελιά σταθερού όγκου της τάξης των 175nm^3 , εξαρτάται από το μήκος της πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Το εύρος του μεγέθους των πρωτεϊνών που μπορούν να σταθεροποιηθούν σε σφαιρικά κελιά είναι πολύ μεγαλύτερο από το αντίστοιχο σε κυβικά και κυλινδρικά κελιά καθώς οι σφαιρικές πρωτεΐνες προσαρμόζονται πολύ καλύτερα στο εσωτερικό σφαιρικών κελιών.

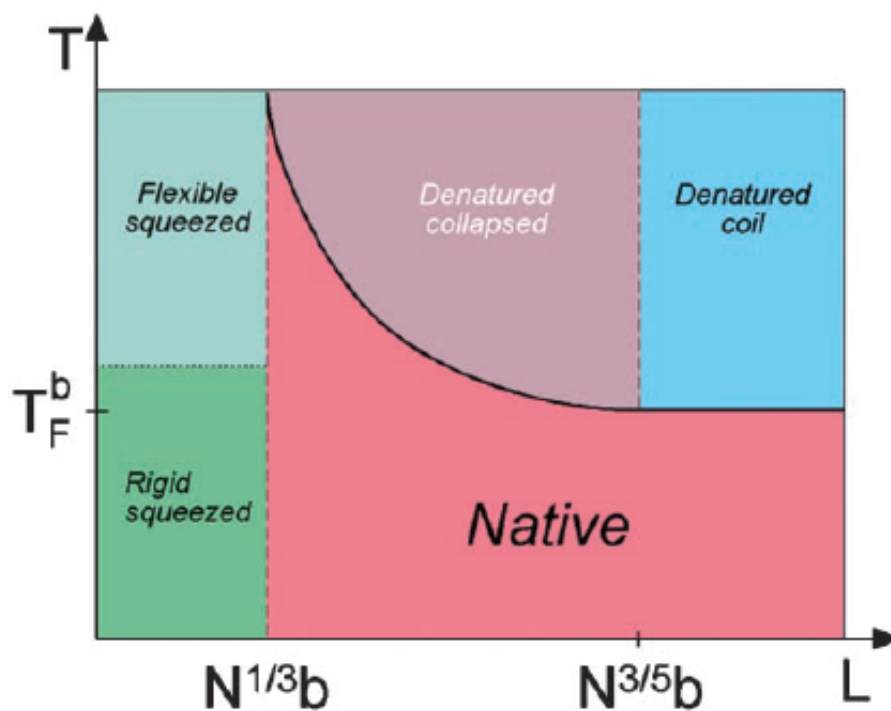
Από τους παραπάνω θεωρητικούς υπολογισμούς αποδεικνύεται ότι μέγιστη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται κατά την ακινητοποίηση τους σε σφαιρικά κελιά με μέγεθος περίπου 2-6 φορές μεγαλύτερο από αυτό της πρωτεΐνης. Σύμφωνα πάντα με τους υπολογισμούς αυτούς και λαμβάνοντας υπόψιν ότι το μέγεθος μίας ενυδατωμένης πρωτεΐνης μεσαίου μεγέθους κυμαίνεται γύρω στα 7nm αναμένεται ότι υλικά με διάμετρο πόρων της τάξης των 10-100nm θα είναι ιδανικά για την ακινητοποίηση και σταθεροποίηση πρωτεϊνικών μορίων.



Εικόνα 2. Μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας αναδίπλωσης των πρωτεϊνών συναρτήσει του μήκους της πολυπεπτιδικής αλυσίδας σε κυβικά, κυλινδρικά και σφαιρικά κελιά. Οι διαστάσεις των κελιών είναι, $5.59 \times 5.59 \text{ nm}$ για τον κύβο, $6.09 \times 6.09 \text{ nm}$ για τον κύλινδρο και 6.94 nm για τη σφαίρα. Όλα τα κελιά έχουν σταθερό όγκο 175 nm^3 .

Το παραπάνω μοντέλο επιβεβαιώθηκε από μεταγενέστερο μοντέλο το οποίο μελέτησε μία συγκεκριμένη περιοχή της πρωτεΐνης G, 16 αμινοξέων. Μελετήθηκε ο ρυθμός με τον οποίο το πεπτίδιο έχοντας αρχικά τυχαία διαμόρφωση σχηματίζει δομή β-στροφής στο εσωτερικό σφαιρικών κοιλοτήτων διαφορετικής ακτίνας². Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό η β-στροφή σταθεροποιείται καλύτερα μέσα σε κοιλότητες εξαιτίας της μείωσης της εντροπίας της αποδιαταγμένης της μορφής. Ο ρυθμός σχηματισμού της β-στροφής μέσα στις σφαιρικές κοιλότητες είναι μεγαλύτερος σε σύγκριση με τον αντίστοιχο ρυθμό σε διάλυμα. Όταν το μέγεθος των κοιλοτήτων είναι 1.5 φορές μεγαλύτερο από το μέγεθος της β-στροφής, ο ρυθμός σχηματισμού της γίνεται μέγιστος. Ακόμη και όταν οι κοιλότητες είναι 10 φορές μεγαλύτερες σε μέγεθος από την β-στροφή ο ρυθμός σχηματισμού της β-στροφής είναι μεγαλύτερος από ότι στο διάλυμα. Προτείνεται επομένως και πάλι ότι οι σφαιρικές κοιλότητες με μέγεθος περίπου 1.5-10 φορές μεγαλύτερο από αυτό της πρωτεΐνης ευνοούν τη σταθεροποίηση των πρωτεϊνικών μορίων.

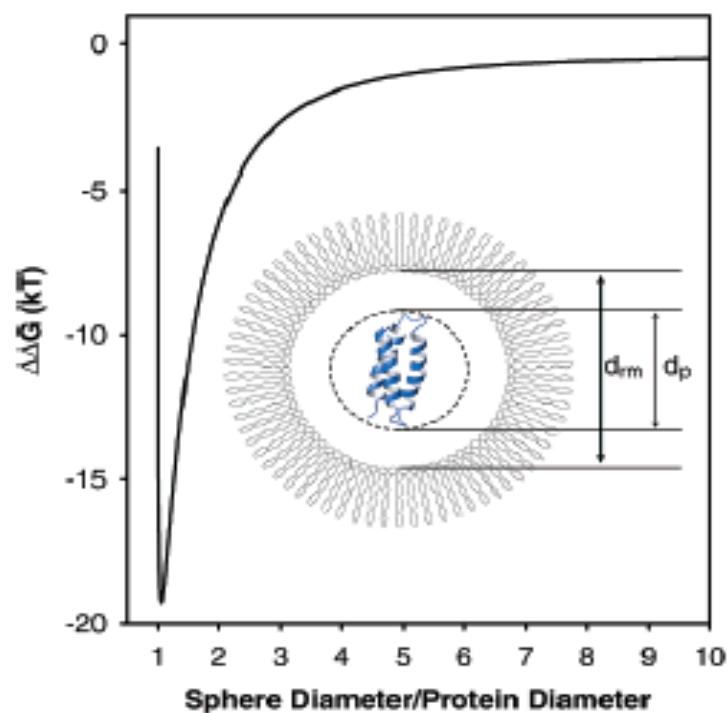
Οι Takagi et al. το 2003 μελέτησαν την αναδίπλωση των πρωτεϊνών σε κελιά που μοιάζουν με τις τσαπερόνες (chaperone)³. Οι τσαπερόνες είναι πρωτεΐνες που σχηματίζουν μία δομή κλουβιού στο εσωτερικό τους και έχουν την ιδιότητα να εγκλωβίζουν και να αναδιαμορφώνουν τη δομή πρωτεϊνών που έχουν αποδιαταχτεί. Διαπίστωσαν και αυτοί με τη σειρά τους ότι οι πρωτεΐνες σταθεροποιούνται καλύτερα σε κελιά που έχουν παρόμοιο μέγεθος με αυτό των πρωτεϊνών. Η σταθεροποίηση αυτή βρέθηκε ότι συνδέεται και με την αύξηση των θερμοκρασιών αναδίπλωσης της πρωτεΐνης στο εσωτερικό των κελιών. Στην Εικόνα 3 παρουσιάζεται το διάγραμμα φάσεων των πρωτεϊνών σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία και το μέγεθος των σφαιρικών κελιών στα οποία έχουν εγκλωβιστεί όπως προέκυψε μετά από μελέτες των Thirumalai et al⁴.



Εικόνα 3. Σχηματικό διάγραμμα φάσεων των πρωτεϊνών σε συνάρτηση με τη θερμοκρασία και το μέγεθος των σφαιρικών κελιών στα οποία έχουν εγκλωβιστεί.

Όταν το μήκος του κελιού L είναι μεγαλύτερο από $N^{3/5}b$ (N είναι ο αριθμός των αμινοξέων της πρωτεΐνης και b είναι το μέγεθος του μονομερούς) εμφανίζονται η ενεργή και η αποδιαταγμένη μορφή της πρωτεϊνικής αλυσίδας. Όταν $N^{1/3}b < L < N^{3/5}b$ η ενεργή μορφή της πρωτεΐνης παραμένει ενώ ο περιορισμός στο εσωτερικό του κελιού προκαλεί την κατάρρευση της αποδιαταγμένης πολυπεπτιδικής αλυσίδας. Η έντονη μαύρη γραμμή αναπαριστά τη μετάβαση φάσεων από την ενεργή στην

αποδιαταγμένη μορφή της πρωτεΐνης. Όταν το μήκος του κελιού L γίνεται μικρότερο από $N^{1/3}b$ τότε οι πρωτεΐνες χάνουν την ενεργή τους διαμόρφωση και σε υψηλές θερμοκρασίες υπερτερεί η εύκαμπτη δομή τους ενώ σε χαμηλές θερμοκρασίες η άκαμπτη δομή τους. Παράλληλα από το γράφημα προκύπτει ότι μείωση του μήκους του κελιού συνοδεύεται από αύξηση της θερμικής σταθερότητας των πρωτεϊνών.



Εικόνα 4. Μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας σταθεροποίησης μίας πρωτεΐνης 67 αμινοξέων σε συνάρτηση με το λόγο της εσωτερικής διαμέτρου του μικυλίου (d_p) προς τη διάμετρο της πρωτεΐνης (d_m).

Τέλος εξετάστηκε η ακινητοποίηση μίας μετασταθούς πρωτεΐνης στο εσωτερικό υδατικό περιβάλλον αντίστροφων μικκυλίων (reverse micelle)⁵. Η αποδιαταγμένη μορφή της πρωτεΐνης θεωρείται ως μία τυχαία συνάρτηση Gaussian ενώ η ενεργή μορφή της ως μία σφαίρα. Σε απόλυτη συμφωνία με το μοντέλο των Zhou et al. βρέθηκε ότι ασταθείς πρωτεΐνες που εισέρχονται στο εσωτερικό των μικκυλίων αναδιπλώνονται αποκτώντας την ενεργή τους μορφή. Στην Εικόνα 4 παρουσιάζεται η ελεύθερη ενέργεια σταθεροποίησης μίας πρωτεΐνης 67 αμινοξέων σε συνάρτηση με το λόγο της εσωτερικής διαμέτρου του μικκυλίου (d_p) προς τη διάμετρο της πρωτεΐνης (d_m). Είναι εμφανές ότι όταν η διάμετρος του μικυλίου προσεγγίζει τη διάμετρο της πρωτεΐνης η ελεύθερη ενέργεια σταθεροποίησης μειώνεται με αποτέλεσμα τη μεγαλύτερη σταθεροποίηση της πρωτεΐνης.

Οι παραπάνω θεωρητικοί υπολογισμοί είναι αρκετά απλοποιημένοι και παρέχουν περισσότερο ποιοτικές πληροφορίες όσον αφορά τη σταθεροποίηση πρωτεϊνών σε κελιά μικρών διαστάσεων. Είναι επομένως αρκετά δύσκολο να συγκριθούν άμεσα οι θεωρητικοί αυτοί υπολογισμοί με πειραματικά αποτελέσματα. Ωστόσο ήδη έχουν αρχίσει να εμφανίζονται στη βιβλιογραφία πειραματικά δεδομένα τα οποία ενισχύουν τη θεωρία της σταθεροποίησης πρωτεϊνών σε κελιά μικρών διαστάσεων.

Αρχικά οι Kumar et al. διαπίστωσαν ότι κατά την εισαγωγή πρωτεϊνών σε στρώματα α-φωσφορικού ζirkονίου (galleries of layered α -zirconium phosphate) (α -ZrP), η απόσταση μεταξύ των στρωμάτων συσχετίζεται άμεσα με τη μέση διάμετρο των πρωτεϊνών⁶. Οι πρωτεΐνες διατήρησαν την ενεργότητά τους στα στρώματα α -ZrP και σε ορισμένες περιπτώσεις παρατηρήθηκε μικρή αύξηση της ενεργότητας τους. Επίσης οι Egger και Valentine εξέτασαν την ακινητοποίηση πρωτεϊνών σε πηκτή πυριτίου (sol gel)⁷. Επιβεβαιώθηκε ότι όταν το μέγεθος των πόρων της πηκτής πυριτίου είναι παρόμοιο με το μέγεθος των πρωτεϊνών επιτυγχάνεται καλύτερη σταθεροποίηση των πρωτεϊνών. Μάλιστα κατά την ακινητοποίηση της λυσοζύμης, της α-λακταλβουμίνης και της μυοσφαιρίνης στα υποστρώματα αυτά παρατηρήθηκε αύξηση της θερμικής σταθερότητας των πρωτεϊνών. Συγκεκριμένα η ακινητοποίηση της α-λακταλβουμίνης στην πηκτή πυριτίου είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της θερμοκρασίας τήξης της πρωτεΐνης κατά 30 °C. Η εισαγωγή λειτουργικών ομάδων όπως καρβοξυλομάδων στην επιφάνεια των πόρων πυριτικών υποστρωμάτων συνέβαλε στην ενθυλάκωση μεγαλύτερης ποσότητας οργανοφωσφορικής υδρολάσης (organophosphorus hydrolase) αλλά και σε αυξημένη δραστηριότητα του ενζύμου⁸. Παράλληλα κατά την ακινητοποίηση της Ριβονουκλεάσης Α (RNA A) σε μεσοπορώδη πυριτικά υποστρώματα με μέγεθος πόρων παρόμοιο με αυτό της πρωτεΐνης βρέθηκε ότι η αυξημένη σταθερότητα της πρωτεΐνης οφείλεται τόσο στον εγκλωβισμό της στους πόρους του υποστρώματος όσο και στην αυξημένη ενυδάτωση της πρωτεΐνης στο εσωτερικό των πόρων⁹. Επίσης το κυτόχρωμα *c* (Cyt *c*) αποδείχτηκε ότι εμφανίζει μέγιστη δραστηριότητα στα μεσοπορώδη αλουμινοπυριτικά υποστρώματα τα οποία συγκρατούν την πρωτεΐνη σε περιορισμένο χώρο, παρεμποδίζοντας την αποδιάταξή της και τη μη αντιστρεπτή αποδιάταξή της¹⁰. Τέλος βρέθηκε ότι η πρωτεΐνη ουβικουΐτινη (ubiquitin) διατηρεί πλήρως την ενεργή της μορφή στο υδατικό περιβάλλον εντός των αντίστροφων μικκυλίων λόγω του εγκλωβισμού της πρωτεΐνης σε περιορισμένο χώρο¹¹.

Αυτά είναι τα βασικότερα πειραματικά δεδομένα που έχουν προκύψει μέχρι σήμερα όσον αφορά τον περιορισμό πρωτεϊνών σε κελιά μικρών διαστάσεων. Περαιτέρω μελέτες απαιτούνται ώστε να αποδειχτεί ότι αναμφίβολα τα νανοπορώδη υλικά είναι τα πλέον αξιόπιστα για τη σταθεροποίηση ενζύμων και την ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Το μέγεθος και το σχήμα των κελιών καθώς και ο τύπος και η πληθώρα των δραστικών ομάδων στο εσωτερικό των κελιών είναι ορισμένες από τις παραμέτρους που απαιτείται να μελετηθούν ώστε να εξασφαλιστεί το απαραίτητο πειραματικό υπόβαθρο που θα μπορεί να βρει εφαρμογή μελλοντικά σε συστήματα βιοαισθητήρων.

Βιβλιογραφία

1. Zhou H-X., Dill K.A., Stabilization of Proteins in Confined Spaces. *Biochemistry* 2001, 40(38), 11289.
2. Klimov D.K., Newfield D., Thirumalai D., Simulations of β -hairpin folding confined to spherical pores using distributed computing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2002, 99, 8019.
3. Takagi F., Koga N., Takada S., How protein thermodynamics and folding mechanisms are altered by the chaperonin cage: Molecular simulations. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003, 100(20), 11367.
4. Thirumalai D., Klimov D.K., Lorimer G.H., Caging helps proteins fold. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 2003, 100(20), 11195.
5. Peterson R.W., Anbalagan K., Tommos C., Wand A.J., Forced Folding and Structural Analysis of Metastable Proteins. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 9498.
6. Kumar C.V., Chaudhari A., Proteins Immobilized at the Galleries of Layered α -Zirconium Phosphate: Structure and Activity Studies. *J. Am. Chem. Soc.* 2000, 122, 830.
7. Eggers D.K., Valentine J.S., Molecular confinement influences protein structure and enhances thermal protein stability. *Protein Sci.* 2001, 10, 250.
8. Lei C., Shin Y., Liu J., Ackerman E.J., Entrapping Enzyme in a Functionalized Nanoporous Support. *J. Am. Chem. Soc.* 2002, 124, 11242.

-
9. Ravindra R., Zhao S., Gies H., Winter R., Protein Encapsulation in Mesoporous Silicate: The Effects of Confinement on Protein Stability, Hydration, and Volumetric Properties. *J. Am. Chem. Soc.* 2004, 126, 12224.
 10. Lee C.H., Lang J., Yen C.W., Shih P.C., Lin T.S., Mou C.Y., Enhancing Stability and Oxidation Activity of Cytochrome c by Immobilization in the Nanochannels of Mesoporous Aluminosilicates. *J. Phys. Chem. B* 2005, 109, 12277.
 11. Simorellis A.K., Flynn P.F., Fast Local Backbone Dynamics of Encapsulated Ubiquitin. *J. Am. Chem. Soc.* 2006, 128, 9580.

5. ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ENZYMΩΝ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗ, ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΚΑΙ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗ HORSERADISH ΣΕ ΝΑΝΟΠΟΡΩΔΗ ΠΥΡΙΤΙΚΑ ΚΑΙ ΠΟΛΥΜΕΡΙΚΑ ΥΛΙΚΑ

5.1 Φυσικά Χαρακτηριστικά Πυριτικών και Πολυμερικών Υλικών

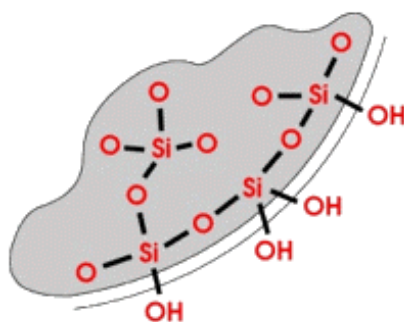
Τα πορώδη πυριτικά και πολυμερικά υποστρώματα χρησιμοποιούνται ευρέως τα τελευταία χρόνια ως προσροφητικά υλικά, καταλύτες και βιοενεργές επιφάνειες. Ανάλογα με το μέγεθος των πόρων τους τα υλικά αυτά διακρίνονται σε μικροπορώδη με διάμετρο πόρων μικρότερη των 2.0 nm, μακροπορώδη με διάμετρο που ξεπερνά τα 50 nm και μεσοπορώδη με ενδιάμεση διάμετρο πόρων μεταξύ 2.0 και 50.0 nm. Η εξέλιξη στον τομέα της σύνθεσης υλικών παρέχει τη δυνατότητα ρύθμισης του μεγέθους των πόρων και της πορωσιμότητας των πυριτικών και πολυμερικών υποστρωμάτων. Όσο πιο μικρό είναι το μέγεθος των πόρων τόσο πιο μεγάλη είναι η ενεργός επιφάνεια του υλικού και επομένως τόσο πιο δραστικό είναι. Παράλληλα η δυνατότητα τροποποίησης των υλικών αυτών με την εισαγωγή λειτουργικών ομάδων στην επιφάνειά τους οδηγεί σε υποστρώματα με επιθυμητές ιδιότητες.

Επειδή όμως η διάμετρος των πόρων ορισμένων πυριτικών υποστρωμάτων προσέγγιζε τη μοριακή διάμετρο των ενζύμων προτάθηκε η ενθυλάκωση ενζύμων στα υποστρώματα αυτά¹. Έτσι σήμερα, πολλά πορώδη πυριτικά και πολυμερικά υποστρώματα έχουν χρησιμοποιηθεί για την ακινητοποίηση πρωτεϊνών και ενζύμων. Η ακινητοποίηση πραγματοποιείται συνήθως μέσω απλής προσρόφησης ή μέσω ομοιοπολικής δέσμευσης και συμβάλλει στη σταθεροποίηση των βιολογικών μορίων. Πολύ σύντομα αποδείχτηκε πειραματικά ότι τόσο το μέγεθος των πόρων των πυριτικών υποστρωμάτων όσο και ο χαρακτήρας της επιφάνειας του υλικού παίζουν καθοριστικό ρόλο στην επίτευξη βέλτιστης σταθερότητας και ενεργότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου.

Στην εργασία αυτή προκειμένου να μελετηθεί η σταθεροποίηση ενζύμων σε νανοπορώδη υλικά και συγκεκριμένα η επίδραση που έχει η διάμετρος των πόρων των υλικών ακινητοποίησης στη σταθερότητα των ενζύμων χρησιμοποιούνται δύο

νανοπορώδη υποστρώματα, τα πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου και τα πορώδη σφαιρίδια πολυστυρενίου διβινυλοβενζολίου (PLRP-S).

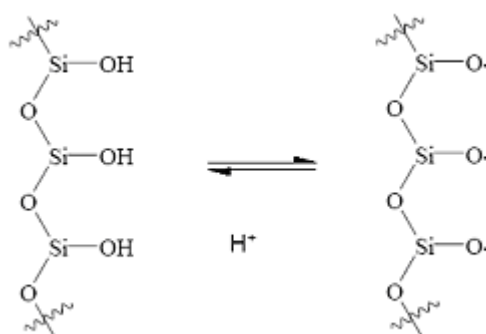
Τα σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου αποτελούν μία πορώδη μορφή του διοξειδίου του πυριτίου (SiO_2) και σχηματίζονται ως ομοιόμορφα σωματίδια σε ποικίλες διαμέτρους. Είναι πολύ υψηλής καθαρότητας υλικά, είναι χημικά αδρανή και δεν είναι τοξικά ή εύφλεκτα. Παράλληλα εμφανίζουν μεγάλη χημική σταθερότητα και υψηλή μηχανική αντοχή. Αποτελούνται από ένα ευρύ δίκτυο πόρων που συνδέονται μεταξύ τους. Η διάμετρος των πόρων τους κυμαίνεται από 5 Å έως 3000 Å και είναι δυνατό να ρυθμιστεί κατά τη διαδικασία της παρασκευής τους. Τα σφαιρίδια που έχουν μέγεθος πόρων γύρω στα 20 Å είναι γνωστά ως σφαιρίδια στενών πόρων (narrow pore) ενώ τα σφαιρίδια που έχουν μέγεθος πόρων που κυμαίνεται στα 110 Å είναι γνωστά ως σφαιρίδια μεγάλων πόρων (wide pore). Τα πυριτικά υποστρώματα εμφανίζουν πολύ μεγάλη χωρητικότητα προσρόφησης δείγματος και ανάλογα με την κατανομή των πόρων που εμφανίζουν χρησιμοποιούνται για την προσρόφηση υγρών ή αέριων ουσιών. Διάφορες ουσίες προσροφούνται στο εσωτερικό των πόρων των σφαιριδίων μέσω δυνάμεων Van der Waals, διπόλου-διπόλου ή δεσμών υδρογόνου. Η προσροφητική ικανότητά τους είναι τόσο μεγάλη ώστε σε ορισμένες περιπτώσεις ανάλογα με το είδος του πυριτικού υποστρώματος να μπορούν να προσροφήσουν ποσότητα νερού ίση με 1.2 φορές το βάρος τους.



Εικόνα 1. Δομή πυριτικών υποστρωμάτων.

Όσον αφορά τη δομή τους, τα πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου αποτελούνται από άτομα πυριτίου συνδεδεμένα με άτομα οξυγόνου (Si-O-Si), ενώ στην επιφάνειά τους υπάρχουν υδροξυλομάδες οι οποίες προσδίδουν πολικότητα στα πυριτικά υποστρώματα (Εικόνα 1). Τυπικές επιφάνειες διοξειδίου του πυριτίου περιέχουν περίπου $8 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ υδροξυλομάδων. Υπάρχουν περισσότερες από μία τύποι υδροξυλομάδων στην επιφάνεια των πυριτικών υποστρωμάτων οι οποίες

μπορεί να είναι ισχυρά συνδεδεμένες (χημικά προσροφημένο νερό) ή ασθενώς συνδεδεμένες (φυσικά προσροφημένο νερό) με τον πυριτικό σκελετό. Είναι δυνατό να έχουμε μία, δύο ή τρεις υδροξυλομάδες συνδεδεμένες με ένα άτομο πυριτίου του πυριτικού σκελετού το οποίο είναι συνδεδεμένο με τρία, δύο ή ένα άτομα οξυγόνου. Οι σιλανόλες στην επιφάνεια των πυριτικών υποστρωμάτων είναι πλήρως ιονισμένες σε διαλύματα με pH μεγαλύτερο από 5 (pKa σιλανολών ~ 4 - 5) όπως φαίνεται στην Εικόνα 2.



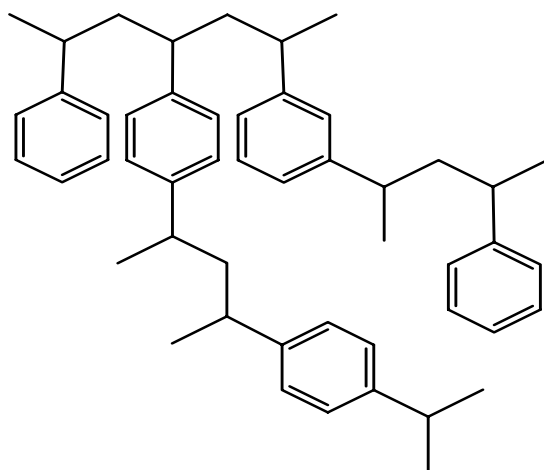
Εικόνα 2. Ιονισμός των σιλανολών σε pH μεγαλύτερο από 5.

Τα πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου παρασκευάζονται από άλατα του πυριτικού οξέος με δύο διαφορετικές μεθόδους. Στην πρώτη μέθοδο ένα άλας του πυριτικού οξέος ψεκάζεται και σχηματίζονται συγκεκριμένου μεγέθους σταγονίδια τα οποία ξηραίνονται με ένα ρεύμα ζεστού αέρα. Στη δεύτερη μέθοδο το διάλυμα silica sol σε μορφή σταγονιδίων (σχηματίζουν ένα γαλάκτωμα) εισάγεται σε κατάλληλο οργανικό διαλύτη και τα σταγονίδια πήζουν. Δυστυχώς δεν υπάρχουν πολλές πληροφορίες σχετικά με τη σύνθεση των σφαιριδίων διοξειδίου του πυριτίου λόγω της μεγάλης εμπορικής εκμετάλλευσης των υλικών αυτών.

Στη χημεία τα πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου χρησιμοποιούνται ευρέως σε διάφορες χρωματογραφικές τεχνικές ως στατικές φάσεις. Τα μόρια του διαλύτη και των διαλυμένων σωματιδίων διαχέονται μέσα στο δίκτυο ομοιόμορφων πόρων των σφαιριδίων διοξειδίου του πυριτίου. Εξαιτίας της πολικότητας που εμφανίζουν τα πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου, τα μη πολικά συστατικά εξέρχονται από τις χρωματογραφικές κολώνες πιο γρήγορα από τα πολικά συστατικά.

Τα πολυμερικά σφαιρίδια που αποτελούνται από διασταυρούμενα συμπολυμερή στυρενίου-διβινυλοβενζολίου έχουν άκαμπτη πορώδη δομή και παρουσιάζουν αξιοσημείωτη χημική και φυσική σταθερότητα. Εμφανίζουν μεγάλη αντοχή σε

υψηλές πιέσεις (>8,000 psi) και σε υψηλές θερμοκρασίες (ελάχιστη θερμοκρασία σε νερό 150°C). Η πολυμερική φύση των σφαιριδίων εμποδίζει τη διάλυσή τους ενώ μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε όλο το εύρος pH (1-14). Τα πορώδη πολυμερικά σφαιρίδια δεν έχουν δραστικές ομάδες στην επιφάνειά τους, είναι αρκετά υδρόφοβα και δεν περιέχουν ιόντα βαρέων μετάλλων. Η διαδικασία παρασκευής τους είναι επαναλήψιμη και στο εμπόριο υπάρχει μία μεγάλη ποικιλία συμπολυμερών στυρενίου-διβινυλοβενζολίου με πόρους διαφόρου μέσου μεγέθους για την πλήρωση χρωματογραφικών στηλών. Το μέγεθος των πόρων των πολυμερών ελέγχεται με διεύρυνση της διασταύρωσης, δηλαδή με αύξηση της σχετικής ποσότητας του διβινυλο-βενζολίου κατά την παρασκευή του συμπολυμερούς. Τα πορώδη πολυμερικά σφαιρίδια χρησιμοποιούνται ευρέως στη χρωματογραφία υψηλής απόδοσης αντίστροφης φάσης για την ανάλυση και τον καθαρισμό πεπτιδίων και πρωτεϊνών. Η ευκολία προσέγγισης και η διαπερότητα των βιολογικών μορίων στο εσωτερικό των πόρων των σφαιριδίων προσδίδει υψηλή σταθερότητα στα βιομόρια.



Εικόνα 3. Δομή συμπολυμερούς στυρενίου διβινυλοβενζολίου.

Επίσης λόγω της χημικής αδράνειας του υλικού δεν παρατηρείται επιμόλυνση των δειγμάτων. Τα πολυμερικά σφαιρίδια δεν αλληλεπιδρούν με τα βασικά αμινοξέα των πρωτεϊνών (λυσίνη, αργινίνη). Παράλληλα η δυνατότητα χρησιμοποίησης όλου του εύρους pH αλλά και όλων των διαλυτών παρέχει μεγάλη επιλεκτικότητα. Ανάλογα με το μέγεθος των πόρων τους τα πολυμερικά σφαιρίδια χρησιμοποιούνται για την ανάλυση διαφορετικών ουσιών. Τα σφαιρίδια με διάμετρο πόρων 100 Å είναι ιδανικά για την ανάλυση μικρών μορίων, μικρών πεπτιδίων και ολιγονουκλεοτιδίων. Τα πολυμερικά σφαιρίδια με διάμετρο πόρων 300 Å χρησιμοποιούνται για την ανάλυση μεγάλων πεπτιδίων και σφαιρικών πρωτεϊνών. Τέλος τα σφαιρίδια που

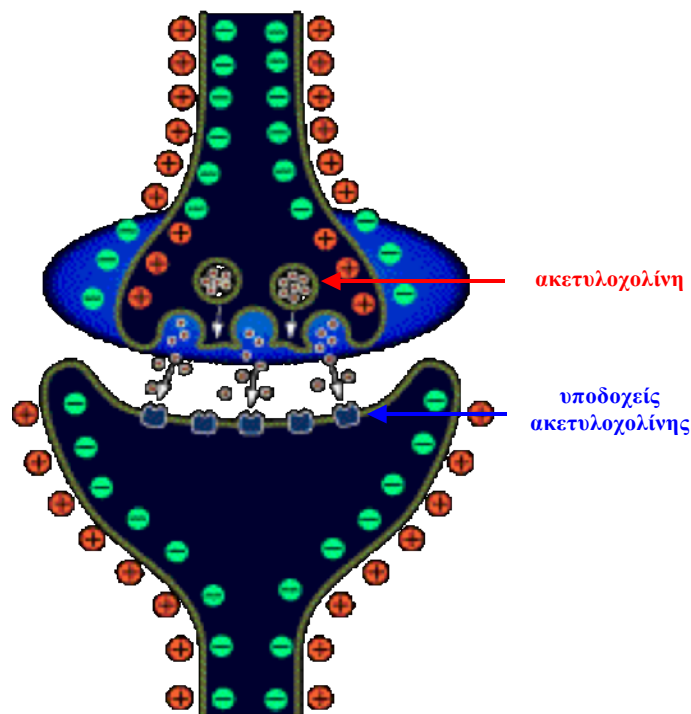
εμφανίζουν μεγαλύτερες διαμέτρους πόρων (1000-4000 Å) χρησιμοποιούνται για μεγάλα βιομόρια.

5.2 Ενζυμική δράση των Ενζύμων AChE, GOx και HRP

Στην εργασία αυτή εξετάζεται η σταθεροποίηση τριών διαφορετικών ενζύμων, κατά την ακινητοποίηση τους σε πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου και σε πορώδη πολυμερικά σφαιρίδια. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται είναι η Ακετυλοχολινεστεράση από τη μύγα *Drosophila melanogaster*, η Οξειδάση της γλυκόζης από το μικροοργανισμό *Aspergillus niger* και η Υπεροξειδάση από το φυτό *Horseradish*. Η ενζυμική δράση των ενζύμων περιγράφεται παρακάτω.

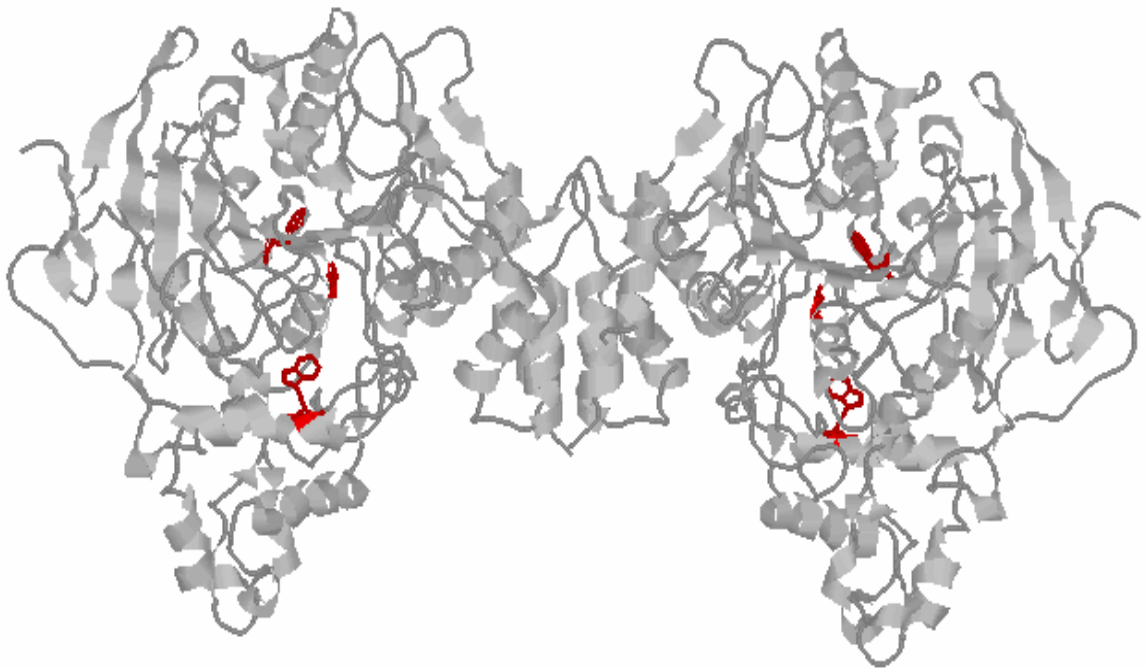
Ακετυλοχολινεστεράση (AChE)

Η ακετυλοχολινεστεράση είναι ένα ένζυμο που συμμετέχει στη νευροδιαβίβαση καταλύοντας την υδρόλυση του νευροδιαβιβαστή ακετυλοχολίνη². Τα μόρια της ακετυλοχολίνης συντίθενται στην προσυναπτική μεμβράνη μέσω της μεταφοράς μίας ακετυλομάδας του ακετυλο CoA στη χολίνη και προσλαμβάνονται από τα συναπτικά κυστίδια της προσυναπτικής μεμβράνης. Κατά την άφιξη μίας νευρικής ώσης η ακετυλοχολίνη απελευθερώνεται από τα συναπτικά κυστίδια στη συναπτική σχισμή και διαχέεται προς τη μετασυναπτική μεμβράνη όπου δεσμεύεται από ειδικούς υποδοχείς (Εικόνα 4). Η διαδικασία αυτή μεταβάλλει την ιοντική διαπερατότητα της μετασυναπτικής μεμβράνης με αποτέλεσμα να παρατηρείται εκπόλωση της μεμβράνης, γεγονός που επιτρέπει τη μετάδοση της ηλεκτρικής διέγερσης κατά μήκος της μεμβράνης του δεύτερου νευρικού κυττάρου. Ο ρόλος της ακετυλοχολινεστεράσης σε όλη αυτή την πορεία της νευροδιαβίβασης είναι να υδρολύει την ακετυλοχολίνη ώστε να αποκαθίσταται η πόλωση της μετασυναπτικής μεμβράνης. Η ακετυλοχολινεστεράση βρίσκεται στη συναπτική σχισμή και είναι δεσμευμένη με ένα πλέγμα κολλαγόνου και γλυκοζαμινογλυκανών που προέρχονται από το μετασυναπτικό κύτταρο. Η ταχύτητα υδρόλυσης της ακετυλοχολίνης από την ακετυλοχολινεστεράση είναι πολύ γρήγορη (40μsec) γεγονός που επιτρέπει την ταχύτερη επαναφορά της διεγερσιμότητας της μεμβράνης.



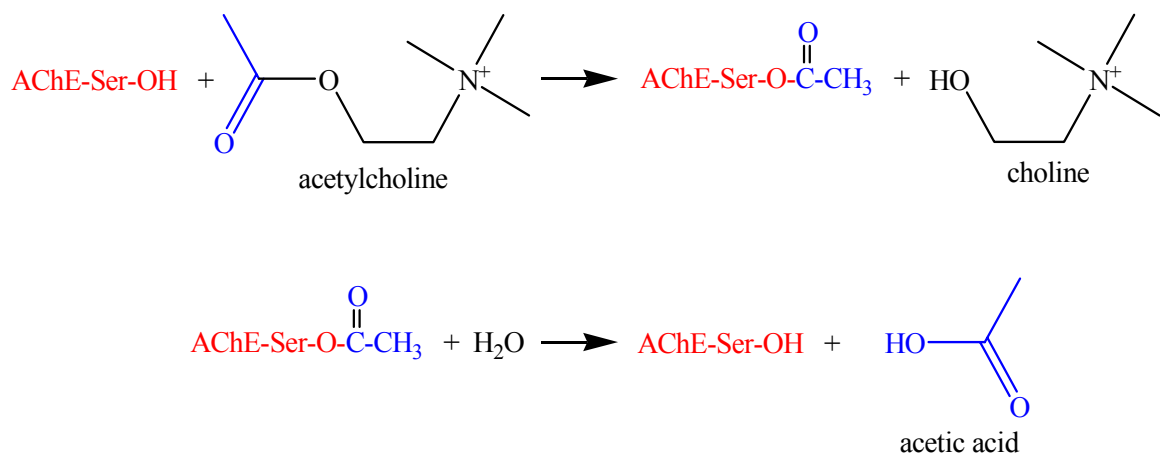
Εικόνα 4. Σχηματική παράσταση της χολινεργικής σύναψης.

Η ακετυλοχολινεστεράση ανήκει στην οικογένεια των α/β υδρολασών και συναντάται σε πολλές μορφές όπως είναι η μονομερής, η διμερής και η τετραμερής. Η κρυσταλλική δομή του ενζύμου διαφέρει ανάλογα με την πηγή από όπου προέρχεται. Βέβαια όλες οι ακετυλοχολινεστεράσες ανεξάρτητα από το αν προέρχονται από τον άνθρωπο, τα ποντίκια³, το ηλεκτρικό ψάρι *Torpedo californica*⁴ ή το έντομο *Drosophila melanogaster*⁵ εμφανίζουν κάποια κοινά δομικά χαρακτηριστικά που έχουν καθοριστική σημασία για την καταλυτική δράση του ενζύμου. Το ενεργό κέντρο του ενζύμου αποτελείται από μία τριάδα αμινοξέων (Ser 238, His 440, Glu 367, στη *Drosophila melanogaster*) και βρίσκεται στον πυθμένα ενός στενού καναλιού που έχει βάθος 20 Å. Κατά μήκος του καναλιού υπάρχουν αρωματικά υπολείμματα με αποτέλεσμα το κανάλι να είναι στενό στην είσοδο του και να πλαταίνει κατά τη διαδρομή προς τον πυθμένα. Στο βάθος του καναλιού βρίσκεται το καταλυτικό κέντρο του ενζύμου ενώ στην είσοδο του βρίσκεται το περιφερειακό ανιονικό κέντρο. Ο ρόλος του ανιονικού κέντρου είναι να διευκολύνει την προσέγγιση των υποστρωμάτων στο καταλυτικό κέντρο μέσω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Ανάλογα με την πηγή προέλευσης της ακετυλοχολινεστεράσης διαφοροποιούνται τα αμινοξέα του περιφερειακού ανιονικού κέντρου και παρατηρείται διαφορετική επιλεκτικότητα του ενζύμου σε διάφορα κατιονικά υποστρώματα⁶.



Εικόνα 5. Διμερής μορφή της ακετυλοχολινεστεράσης. Η τριάδα των καταλυτικών αμινοξέων του ενεργού κέντρου παρουσιάζονται με κόκκινο.

Ο μηχανισμός δράσης της ακετυλοχολινεστεράσης μοιάζει σε μεγάλο βαθμό με το μηχανισμό των σερίνο-πρωτεασών. Η σερίνη του ενεργού κέντρου του ενζύμου επιτελεί πυρηνόφιλη προσβολή στην καρβονυλική ομάδα της ακετυλοχολίνης και σχηματίζεται ένα ομοιοπολικό ενδιάμεσο ακετυλοενζύμου και απελευθερώνεται η χολίνη. Στη συνέχεια το ακετυλιωμένο ενζυμικό ενδιάμεσο αντιδρά με νερό και αναγεννάται το ελεύθερο ένζυμο με ταυτόχρονη απελευθέρωση ενός μορίου οξικού οξέος όπως φαίνεται παρακάτω:

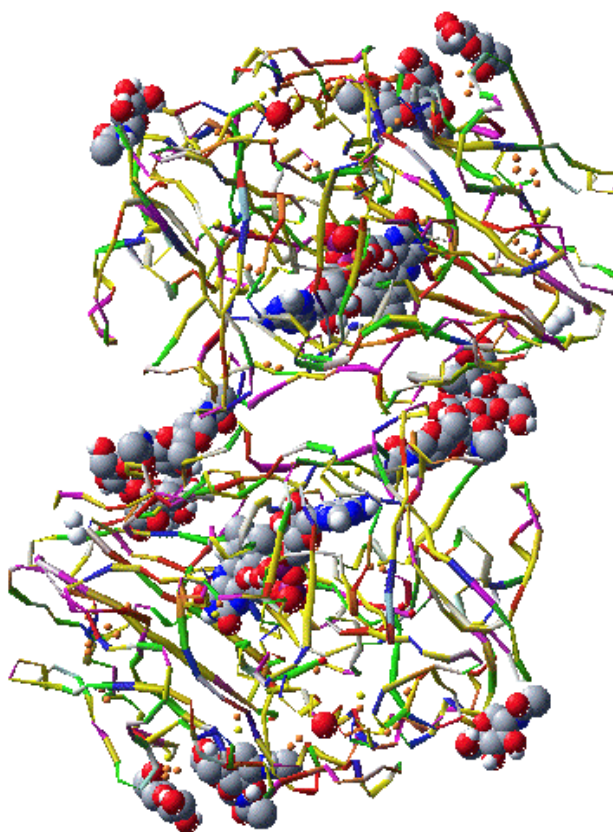


Η ακετυλοχολινεστεράση χρησιμοποιείται στην ιατρική για τη θεραπεία διάφορων ασθενειών όπως είναι η Alzheimer. Παράλληλα η ακετυλοχολινεστεράση χρησιμοποιείται για την έμμεση ανίχνευση παρασιτοκτόνων. Διάφορα παρασιτοκτόνα όπως οι οργανοφωσφορικοί και καρβαμυλικοί εστέρες αναστέλλουν τη δράση του ενζύμου σχηματίζοντας ένα ομοιοπολικό ενδιάμεσο που υδρολύεται με αργό ρυθμό. Περαιτέρω αναφορά στη δράση των παρασιτοκτόνων θα πραγματοποιηθεί στο Κεφάλαιο 7.

Οξειδάση της Γλυκόζης (GOx)

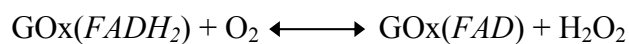
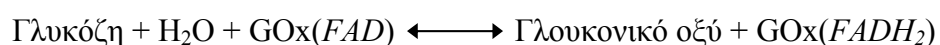
Η οξειδάση της γλυκόζης από το μικροοργανισμό *Aspergillus niger* είναι μία διμερής γλυκοπρωτεΐνη που καταλύει την οξείδωση της D-γλυκόζης μέσω του μοριακού οξυγόνου. Αποτελείται από 580 αμινοξέα, έχει μοριακό βάρος 150 με 180 kDa και πολύ υψηλό ποσοστό υδατανθράκων μαννόζης που κυμαίνεται στα 10-16% του μοριακού της βάρους⁷. Το μονομερές του ενζύμου είναι ένα συμπαγές σφαιροειδές με διαστάσεις 60 Å x 52 Å x 37 Å, ενώ οι διαστάσεις της διμερούς μορφής του ενζύμου είναι 60 Å x 52 Å x 77 Å. Η καταλυτική δράση της οξειδάσης της γλυκόζης συνδέεται άμεσα με την παρουσία δύο μορίων φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (FAD) στη δομή της. Αποδέσμευση του FAD από την οξειδάση της γλυκόζης, σε συνθήκες που δεν είναι κατάλληλες για το ένζυμο, συμβάλλει στο διαχωρισμό των δύο υπομονάδων του ενζύμου και επομένως στην αποδιάταξή του.

Η περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος αποτελείται από ομάδες που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές της αλληλουχίας αμινοξέων και σχηματίζουν μία βαθιά κοιλότητα. Η μία πλευρά αυτής της κοιλότητας απαρτίζεται από έξι αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες, ενώ στην άλλη πλευρά της κοιλότητας, στον πυθμένα βρίσκεται το FAD. Ένα τμήμα της εισόδου του ενεργού κέντρου του ενζύμου βρίσκεται στη διεπιφάνεια μεταξύ των δυο υπομονάδων του διμερούς ενζύμου και αποτελείται από 20 αμινοξέα που δημιουργούν ένα καπάκι το οποίο καλύπτει και τμήμα της περιοχής πρόσδεσης του FAD. Σε αυτό το άκρο της σχισμής συνδέονται οι δύο υπομονάδες του ενζύμου με πρόσδεση του υδατανθρακικού τμήματος στην ασπαραγίνη 89.



Εικόνα 6. Προσομοίωση μοριακής δυναμικής της κρυσταλλικής δομής της Οξειδάσης της γλυκόζης⁸.

Ο μηχανισμός της ενζυμικής αντίδρασης της οξειδάσης της γλυκόζης έχει μελετηθεί εκτενώς και διαχωρίζεται σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο παρατηρείται η οξείδωση του υποστρώματος με την επακόλουθη αναγωγή του ενζύμου. Η D-γλυκόζη οξειδώνεται σε δ-γλουκονολακτόνη (δ-gluconolactone) η οποία στη συνέχεια υδρολύεται αυθόρμητα σε γλουκονικό οξύ. Το μόριο FAD του ενζύμου δρα ως δέκτης των πρωτονίων και των ηλεκτρονίων του υποστρώματος και προκύπτει το FADH₂ (ανηγμένη μορφή του ενζύμου). Στο δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται οξείδωση του ενζύμου μέσω του μοριακού οξυγόνου και τελικά σχηματίζεται υπεροξειδίο του υδρογόνου και αναγεννάται η αρχική μορφή του ενζύμου.



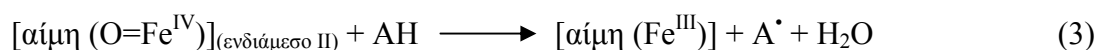
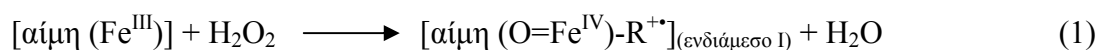
Η οξειδάση της γλυκόζης είναι ένα εξαιρετικά επιλεκτικό ένζυμο καθώς παρουσία πολλών μονοσακχαριτών καταλύει επιλεκτικά την οξείδωση της D-γλυκόζης, ενώ οι διάφοροι άλλοι μονοσακχαρίτες οξειδώνονται σε πολύ μικρά ποσοστά. Παράλληλα είναι αρκετά σταθερό ένζυμο γεγονός που συνέβαλε στο να θεωρείται ως σύστημα αναφοράς για την ανάπτυξη και αξιολόγηση συστημάτων που βασίζονται σε ένζυμο. Όλα αυτά συνέβαλαν στην ευρεία χρήση του ενζύμου σε διάφορες εμπορικές εφαρμογές. Έτσι για παράδειγμα στη βιομηχανία χρησιμοποιείται για την παραγωγή γλουκονικού οξέος και τη συντήρηση τροφίμων. Η πιο σημαντική εφαρμογή όμως του ενζύμου είναι στον τομέα των βιοαισθητήρων όπου χρησιμοποιείται για τον ποσοτικό προσδιορισμό της γλυκόζης σε βιολογικά υγρά, σε τρόφιμα κλπ.

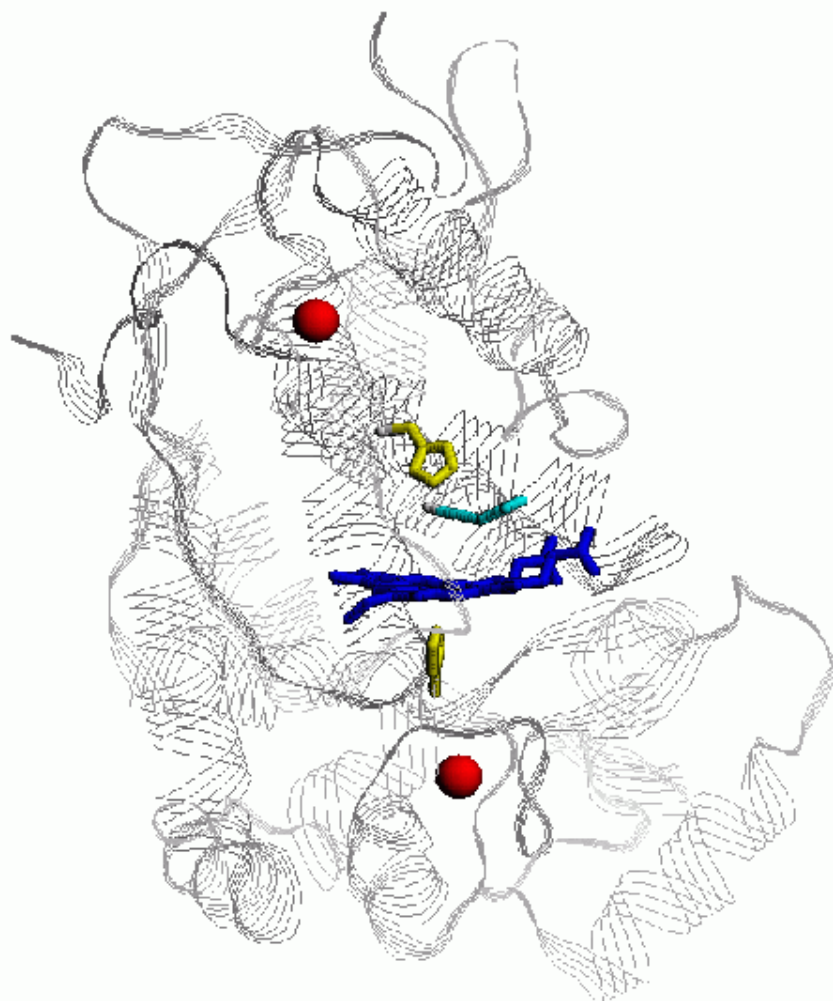
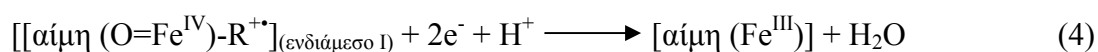
Υπεροξειδάση Horseradish (HRP)

Η Υπεροξειδάση από το φυτό *Horseradish* (HRP) είναι μία σφαιρική γλυκοπρωτεΐνη που αποτελείται από 306 αμινοξέα. Το μοριακό της βάρος είναι 42kDa από το οποίο το πρωτεϊνικό τμήμα καλύπτει μόλις τα 34kDa ενώ το υπόλοιπο προκύπτει από μία προσθετική ομάδα αίμης, δύο ιόντα ασβεστίου και ορισμένους πολυσακχαρίτες στην επιφάνεια της πρωτεΐνης. Η δομή της HRP παρουσιάζεται στην Εικόνα 7.

Αποτελείται από δύο παρόμοια, καλά καθορισμένα τμήματα, κάθε ένα από τα οποία έχει ένα ιόν ασβεστίου που παρέχει σταθερότητα στη δομή της πρωτεΐνης και καθορίζει τη δραστηριότητά της. Τα δύο αυτά τμήματα της πρωτεΐνης δημιουργούν μία υδρόφοβη σχισμή στην οποία βρίσκεται η προσθετική ομάδα της αίμης. Το άτομο του σιδήρου της αίμης είναι δεσμευμένο με μία ιστιδίνη του ενός τμήματος της πρωτεΐνης. Η ιστιδίνη αυτή καταλαμβάνει την πέμπτη θέση συναρμογής του σιδήρου και ονομάζεται εγγύς ιστιδίνη. Στο άλλο τμήμα της πρωτεΐνης υπάρχει μία δεύτερη ιστιδίνη που βρίσκεται κοντά στην αίμη αλλά δεν είναι δεσμευμένη σε αυτή και ονομάζεται μακρυνή ιστιδίνη.

Ο μηχανισμός δράσης της Υπεροξειδάσης *Horseradish* περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια⁹:





Εικόνα 7. Δομή της HRP. Η ομάδα της αίμης παρουσιάζεται με μπλε χρώμα, τα δύο ιόντα ασβεστίου με κόκκινο χρώμα, η εγγύς (κάτω) και μακρυνή (πάνω) ιστιδίνη με κίτρινο χρώμα και η μακρυνή αργινίνη με κυανό χρώμα.

Στο πρώτο στάδιο το υπόστρωμα αλληλεπιδρά με το ενεργό κέντρο του ενζύμου και καταλύεται η διάσπαση του υπεροξειδίου του υδρογόνου. Η ιστιδίνη H42 δέχεται ένα πρωτόνιο από το υπεροξείδιο του υδρογόνου και η ομάδα OOH συναρμόζεται στο σίδηρο. Έτσι παρατηρείται μεταφορά αρνητικού φορτίου από τη μακρυνή περιοχή του ενζύμου στην εγγύς. Στη συνέχεια η εγγύς ιστιδίνη αποπρωτονιώνεται και παρατηρείται περίσσεια αρνητικού φορτίου στην εγγύς περιοχή του ενζύμου, ενώ δύο θετικά φορτισμένα κατάλοιπα βρίσκονται στην μακρυνή περιοχή. Η εγγύς ιστιδίνη H 170 ωθεί το ηλεκτρόνιο προς τη μακρυνή περιοχή του ενζύμου ενώ η

ιστιδίνη H42 και η αργινίνη R38 προωθούν αυτή την ώθηση. Έτσι τελικά στο πρώτο στάδιο του μηχανισμού της HRP ένα άτομο οξυγόνου του υπεροξειδίου μεταφέρεται στη Fe(III)-μορφή του ενζύμου (οξειδωση $2e^-$) και προκύπτει ένα ασταθές ενδιάμεσο I, ενώ το υπεροξείδιο ανάγεται σε νερό. Το ασταθές ενδιάμεσο I αποτελείται από ένα $Fe^{IV}=O$ κέντρο και μία π κατιοντική ρίζα πορφυρίνης. Στη συνέχεια το ενδιάμεσο I οξειδώνει ένα αναγωγικό μέσο AH με αποτέλεσμα να μεταφέρεται ένα ηλεκτρόνιο στην π κατιοντική ρίζα πορφυρίνης δίνοντας έτσι τη ρίζα του αναγωγικού και το ενδιάμεσο II. Τέλος το ενδιάμεσο II ανάγεται από ένα δεύτερο μόριο αναγωγικού μέσου και αναγεννάται η αρχική μορφή του ενζύμου με το Fe(III).

Όταν ένα ηλεκτρόδιο αντικαθιστά το αναγωγικό μέσο (δότης ηλεκτρονίων) στον καταλυτικό κύκλο της HRP, τότε ουσιαστικά παρατηρείται άμεση μεταφορά ηλεκτρονίων. Το ένζυμο που είναι ακινητοποιημένο στο ηλεκτρόδιο οξειδώνεται από το υπεροξείδιο του υδρογόνου (εξίσωση 1) και στη συνέχεια ανάγεται από τα ηλεκτρόνια που παρέχει το ηλεκτρόδιο (εξίσωση 4). Σε ένα αμπερομετρικό βιοαισθητήρα και οι δύο αυτές προσεγγίσεις οδηγούν σε ένα αναγωγικό ρεύμα το οποίο συσχετίζεται με τη συγκέντρωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου στο δείγμα. Το ρεύμα αυτό προέρχεται από την αναγωγή των ενδιάμεσων I και II. Η αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου πραγματοποιείται σε δυναμικά πολύ κοντά στα τυπικά δυναμικά των ενδιάμεσων I/II και II/HRP (Fe^{3+}) που έχουν υπολογιστεί ότι κυμαίνονται στα 0.63-0.69 V ως προς το κορεσμένο ηλεκτρόδιο καλομέλανος σε pH 7.0.

Από την οικογένεια των υπεροξειδασών που περιέχουν ομάδα αίμης, η Υπεροξειδάση *Horseradish* εμφανίζει μεγαλύτερο εύρος εφαρμογών καθώς διατηρεί τη δραστηριότητα της σε μεγάλο εύρος τιμών pH και θερμοκρασίας. Χρησιμοποιείται για την ανίχνευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου στη βιομηχανία, σε μελέτες για την προστασία του περιβάλλοντος και σε κλινικές αναλύσεις. Η ανίχνευση του υπεροξειδίου του υδρογόνου με μεγάλη ακρίβεια είναι απαραίτητη καθώς πολύ μικρές συγκεντρώσεις του προκαλούν βλάβη στα κύτταρα των θηλαστικών.

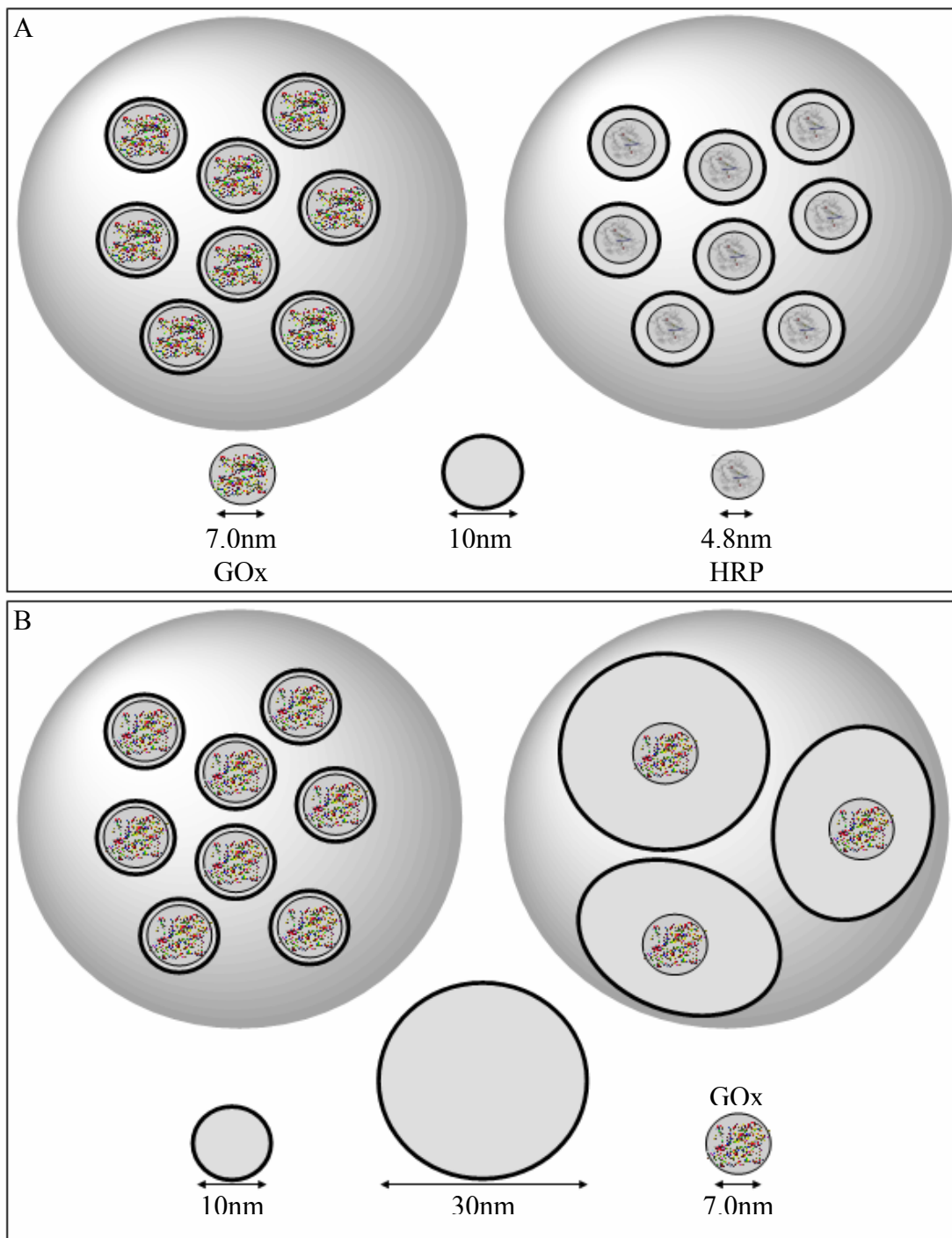
5.3 Συσχέτιση Σταθεροποίησης Ενζύμων σε Πορώδη Σφαιρίδια

Η ακινητοποίηση ενζύμων σε πορώδη υποστρώματα έχει ευρεία εφαρμογή στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Αρχικά πειράματα πραγματοποιούνται προκειμένου να

εξεταστεί η αλληλεπίδραση των ενζύμων με νανοπορώδη πυριτικά υποστρώματα. Για τη μελέτη αυτή επιλέγεται να χρησιμοποιηθούν πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου με διάμετρο πόρων 10nm και το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση, το οποίο παρουσιάζει μεγάλο βιολογικό (παίζει βασικό ρόλο στη νευροδιαβίβαση και σχετίζεται με την ασθένεια Alzheimer) και αναλυτικό ενδιαφέρον (χρησιμοποιείται στην ανίχνευση παρασιτοκτόνων με βιοαισθητήρες). Πιο συγκεκριμένα επιλέχθηκε μια γενετικά τροποποιημένη ακετυλοχολινεστεράση από *Drosophila melanogaster* (m-AChE) εξαιρετικά ασταθής, ώστε να επιταχυνθούν οι μελέτες σταθερότητας.

Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση που έχει το μέγεθος των πόρων του υλικού ακινητοποίησης στη σταθερότητα των ενζύμων εξετάζονται δύο εμπορικά διαθέσιμα νανοπορώδη υποστρώματα, τα πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου και τα πορώδη πολυμερικά σφαιρίδια. Τα πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου έχουν μέγεθος 60-80 mesh και καθορισμένο μέγεθος πόρων διαμέτρου 10nm. Τα πολυμερικά σφαιρίδια πολυστυρενίου / διβινυλοβενζολίου (polystyrene / divinylbenzene) (PLRP-S) έχουν μέγεθος που κυμαίνεται στα 50-70 μ m ενώ η διάμετρος των πόρων τους είναι είτε 10nm είτε 30nm.

Ακολουθούνται δύο διαφορετικές διαδικασίες-πορείες προκειμένου να επιβεβαιωθεί πειραματικά πόσο σημαντική είναι η σύζευξη του μεγέθους των ενζυμικών μορίων και των πόρων του υλικού ακινητοποίησης για τη σταθεροποίηση των ενζύμων. Εξετάζεται η ακινητοποίηση ενζύμων διαφορετικού μεγέθους σε νανο-κοιλότητες ίδιας διαμέτρου και η ακινητοποίηση ενός ενζύμου σε νανο-κοιλότητες διαφορετικής διαμέτρου (Εικόνα 8).



Εικόνα 8. Α) Ακινητοποίηση ενζύμων διαφορετικού μεγέθους σε νανο-κοιλότητες ίδιας διαμέτρου. Β) Ακινητοποίηση ενός συγκεκριμένου ενζύμου σε νανο-κοιλότητες διαφορετικής διαμέτρου.

5.3.1 Σταθεροποίηση AChE σε Πορώδη Σφαιρίδια Διοξειδίου του Πυριτίου

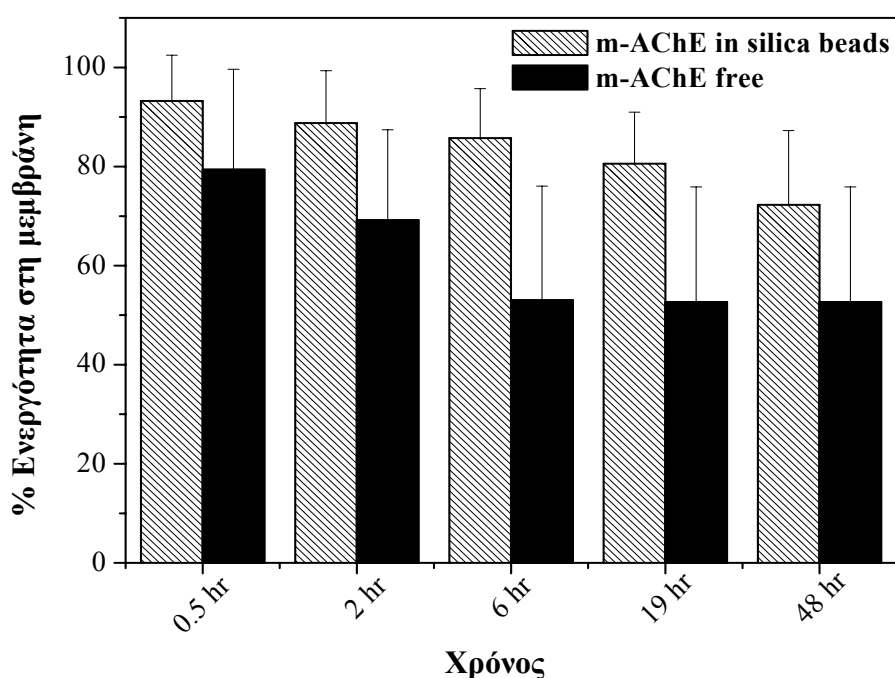
Η ακινητοποίηση του ενζύμου ακετυλοχολινεστεράση στα σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου επιτυγχάνεται με προσθήκη 0.5g/mL σφαιριδίων διοξειδίου του πυριτίου σε 500μL ενζυμικού διαλύματος m-AChE (3.7 Units /mL). Η προσρόφηση του ενζύμου στα σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου πραγματοποιείται για 72hr στους +4 °C. Ακολουθεί διήθηση του διαλύματος με φίλτρα 0.2 μm, διαδοχική έκπλυση των σφαιριδίων διοξειδίου του πυριτίου με ρυθμιστικό διάλυμα και ξήρανσή τους σε θερμοκρασία δωματίου. Τα σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου με το ακινητοποιημένο ένζυμο φυλάσσονται στους -20 °C, για περαιτέρω χρήση.

Έλεγχος διαφυγής από τη μεμβράνη

Ένα από τα βασικά μειονεκτήματα της προσρόφησης ενζύμων σε πορώδη υποστρώματα είναι η ασθενής δέσμευση του ενζύμου με αποτέλεσμα τη γρήγορη διαφυγή του από το υλικό ακινητοποίησης προς το διάλυμα μέτρησης. Αυτό συμβάλλει στη μείωση της ενεργότητας του ενζύμου στο υλικό ακινητοποίησης και επομένως στη μείωση της ευαισθησίας και του χρόνου ζωής του αντίστοιχου βιοαισθητήρα. Προκειμένου να διαπιστωθεί η ισχύς της ακινητοποίησης του ενζύμου στα πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου πραγματοποιείται εξέταση της διαφυγής του ενζύμου. Κατασκευάζονται πολυμερικές μεμβράνες υδροξυαιθυλοκυτταρίνης (HEC) στις οποίες ακινητοποιείται το ένζυμο είτε ελεύθερο, είτε προσροφημένο σε σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου και συγκρίνεται ο ρυθμός διαφυγής του ενζύμου στις δύο περιπτώσεις.

Το πολυμερές HEC παρασκευάζεται σε ποσοστό 3% με διαλυτοποίηση του σε δι-απιονισμένο νερό και χρησιμοποιείται 20hr μετά την ανάδευση του σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να έχει προχωρήσει επαρκώς ο πολυμερισμός του. Η παρασκευή των μεμβρανών HEC με ακινητοποιημένο ένζυμο επιτυγχάνεται με απλή ανάμιξη του πολυμερούς (200μL) με 50μL διαλύματος ενζύμου ή με 50mg σφαιριδίων διοξειδίου του πυριτίου με ακινητοποιημένο ένζυμο. Στη συνέχεια το μίγμα εισάγεται σε φιαλίδια erpendorff και τοποθετείται για 12hr στους +4 °C προκειμένου να πολυμεριστεί πλήρως. Σε κάθε μεμβράνη η ενεργότητα του ενζύμου υπολογίζεται να είναι γύρω στα 4 Units. Έπειτα οι μεμβράνες εμβαπτίζονται σε 500μL ρυθμιστικού διαλύματος και μετράται η ενζυμική ενεργότητα του υπερκείμενου διαλύματος σε τακτά χρονικά διαστήματα.

Η επί τοις εκατό ενεργότητα του ενζύμου στις μεμβράνες με το χρόνο παρουσιάζεται στην Εικόνα 9. Στην περίπτωση που το ένζυμο είναι σταθεροποιημένο στα πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου, ο ρυθμός διαφυγής του ενζύμου είναι 0.4 %/hr. Έτσι μετά από 48hr πλύσης, μόνο το 27% του ενζύμου έχει διαφύγει προς το διάλυμα. Αντίθετα, στην περίπτωση του ελεύθερου ενζύμου, ο ρυθμός διαφυγής από τη μεμβράνη είναι 4.6 %/hr, με αποτέλεσμα μετά από 48hr να έχει διαφύγει στο διάλυμα το 47 % του ενζύμου. Επομένως ο ρυθμός διαφυγής του ελεύθερου ενζύμου από τη μεμβράνη είναι 11.5 φορές μεγαλύτερος από το ρυθμό διαφυγής του ενζύμου που έχει ακινητοποιηθεί στα πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου.

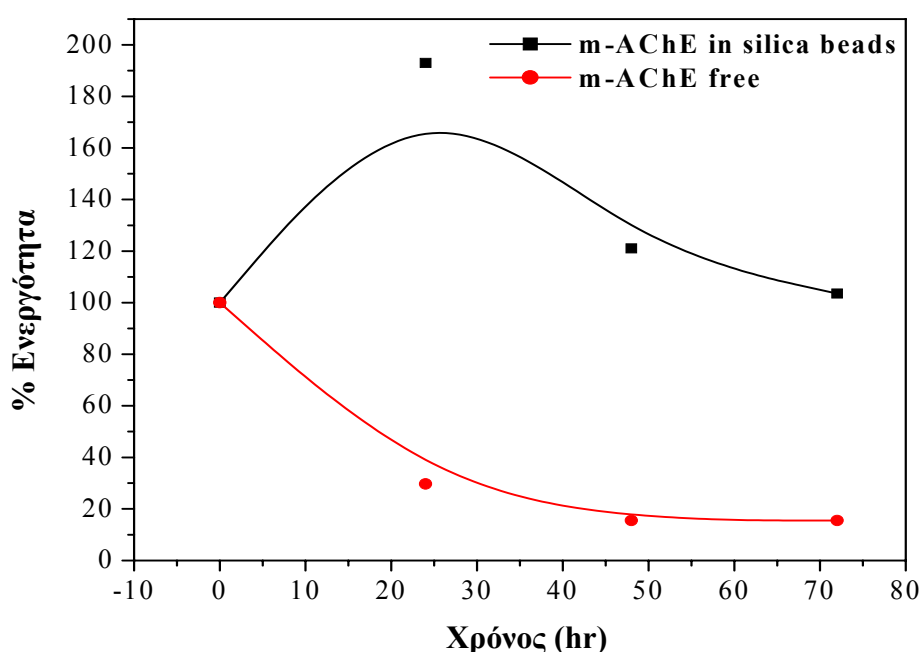


Εικόνα 9. Έλεγχος διαφυγής της m-AChE από τη μεμβράνη HEC με το χρόνο. Συγκρίνονται η ελεύθερη m-AChE με την m-AChE, σταθεροποιημένη σε πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου. Οι τιμές αποτελούν μέσο όρο τριών μετρήσεων.

Σταθερότητα υπό συνθήκες συνεχούς λειτουργίας

Η σταθερότητα του ενζύμου στα πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου μελετάται κατασκευάζοντας τον αντίστοιχο βιοαισθητήρα και εξετάζοντας τη σταθερότητά του υπό συνθήκες συνεχούς λειτουργίας. 10μL από το μίγμα του HEC με το ελεύθερο ένζυμο και το μίγμα με το ένζυμο ακινητοποιημένο σε πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου τοποθετούνται στην επιφάνεια ηλεκτροδίων

πλατίνας (d. 5.9mm) και αφήνονται σε θερμοκρασία δωματίου για 24hr για να ολοκληρωθεί ο πολυμερισμός. Οι βιοαισθητήρες εξετάζονται αμπερομετρικά ως προς την ευαισθησία τους στο υπόστρωμα ακετυλοθειοχολινοχλωρίδιο (AChCl), σε θερμοκρασία 25 °C και σε δυναμικό εργασίας 350mV (vs Ag/AgCl). Κατά την ενζυμική αντίδραση η ακετυλοθειοχολίνη υδρολύεται σε θειοχολίνη η οποία στη συνέχεια σε χαμηλά δυναμικά οξειδώνεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου πλατίνας παράγοντας το μετρούμενο αμπερομετρικό σήμα. Η ευαισθησία κάθε βιοαισθητήρα συσχετίζεται άμεσα και είναι μέτρο της ενεργότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου¹⁰.



Εικόνα 10. Σταθερότητα του βιοαισθητήρα ελεύθερης m-AChE (□) και σταθεροποιημένης σε πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου m-AChE (○), υπό συνθήκες συνεχούς λειτουργίας (+350mV, 25 °C).

Στην Εικόνα 10, παρουσιάζεται η επί τοις εκατό ενεργότητα των δύο βιοαισθητήρων με το χρόνο. Η ενεργότητα του βιοαισθητήρα με την ελεύθερη m-AChE μειώνεται δραστικά τις πρώτες 20 ώρες συνεχούς λειτουργίας. Μετά από 72hr συνεχούς λειτουργίας η ενεργότητα του βιοαισθητήρα έχει πλέον μειωθεί στο 15% της αρχικής τιμής. Ο ρυθμός μείωσης της ενεργότητας του βιοαισθητήρα με την ελεύθερη m-AChE είναι μεγαλύτερος από το ρυθμό διαφυγής του ενζύμου από τη μεμβράνη, γεγονός που υποδηλώνει ότι λαμβάνει χώρα και απενεργοποίηση της m-AChE στο

εσωτερικό της μεμβράνης. Αντίθετα, ο βιοαισθητήρας όπου η m-AChE είναι σταθεροποιημένη σε πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου δεν παρουσιάζει μείωση της ενεργότητας του καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Μετά από 72hr συνεχούς λειτουργίας η ενεργότητα του βιοαισθητήρα είναι 103%. Η μικρή αύξηση της ενεργότητας του βιοαισθητήρα, κατά τις πρώτες ώρες των μετρήσεων είναι ένα φαινόμενο που συναντάται συχνά στους βιοαισθητήρες και αποδίδεται σε αλλαγή της τριτοταγούς δομής του ενζύμου μέσα στους πόρους του υλικού ακινητοποίησης¹¹. Από τα παραπάνω αποτελέσματα γίνεται αντιληπτό ότι τα πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου είναι κατάλληλα υλικά για τη σταθεροποίηση ενζύμων και την ανάπτυξη βιοαισθητήρων.

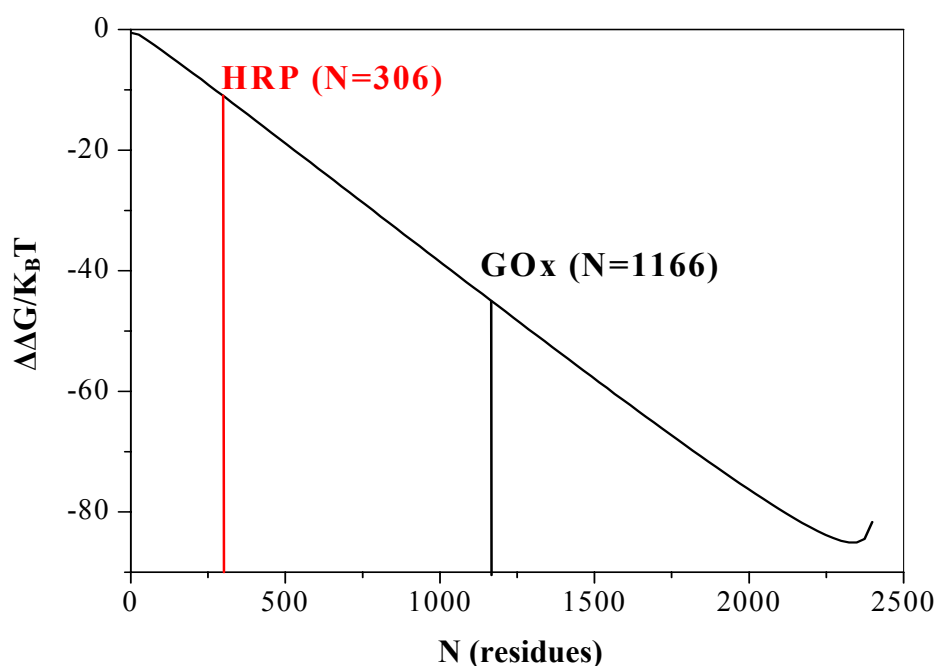
Συμπεράσματα

Από τα πρώτα αυτά πειράματα που πραγματοποιούνται με πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου διαπιστώνεται ότι η ακινητοποίηση ενζύμων σε νανοπορώδη υλικά συμβάλλει στη σταθεροποίησή τους. Το πολύ ευαίσθητο και ασταθές ένζυμο m-AChE διατηρεί την ενεργή του μορφή στο εσωτερικό των πόρων των σφαιριδίων διοξειδίου του πυριτίου καθώς ο αντίστοιχος βιοαισθητήρας δεν παρουσιάζει μείωση της ενεργότητας του μετά από 72hr συνεχούς λειτουργίας. Παράλληλα η διαφυγή της m-AChE από τα σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου στο διάλυμα είναι πάρα πολύ μικρή υποδηλώνοντας την ισχυρή συγκράτηση του ενζύμου στο εσωτερικό των πόρων των πυριτικών υποστρωμάτων. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν φαίνεται να συμφωνούν με το θεωρητικό μοντέλο σταθεροποίησης πρωτεϊνών σε σφαιρικές κοιλότητες της τάξης των nm. Οι πρώτες αυτές θετικές ενδείξεις θέτουν τη βάση για περαιτέρω διερεύνηση της συσχέτισης μεταξύ του μεγέθους των ενζύμων και των πόρων του υλικού ακινητοποίησης για να επιτευχθεί η βέλτιστη σταθεροποίηση των ενζυμικών μορίων.

5.3.2 Σταθεροποίηση Ενζύμων Διαφορετικού Μεγέθους σε Νανο-Πορώδη Σφαιρίδια Διοξειδίου του Πυριτίου

Προκειμένου να επιβεβαιωθεί το θεωρητικό μοντέλο σταθεροποίησης πρωτεϊνών, κατασκευάζονται δύο βιοαισθητήρες με πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου (διάμετρο πόρων 10nm) με ένζυμα διαφορετικού μεγέθους. Συγκεκριμένα χρησιμοποιούνται η Υπεροξειδάση HRP (Horse Radish Peroxidase) που αποτελείται

από 306 αμινοξέα και έχει διάμετρο περίπου 4.8nm και η Οξειδάση της Γλυκόζης (GOx) που αποτελείται από 1166 αμινοξέα και έχει διάμετρο περίπου 7.0nm. Σύμφωνα με το θεωρητικό μοντέλο της σταθεροποίησης πρωτεϊνών η GOx αναμένεται να σταθεροποιείται πιο αποτελεσματικά στα πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου σε σύγκριση με την HRP καθώς το μέγεθος της GOx είναι μεγαλύτερο και συγκλίνει περισσότερο με το μέγεθος των πόρων των σφαιριδίων διοξειδίου του πυριτίου. Στην Εικόνα 11 παρουσιάζεται η γραφική παράσταση της μεταβολής της ελεύθερης ενέργειας αναδίπλωσης ($\Delta\Delta G/K_B T$) μίας πρωτεΐνης συναρτήσει του μήκους της πρωτεϊνικής αλυσίδας (N κατάλοιπα) κατά τον εγλωβισμό της σε σφαιρικές κοιλότητες διαμέτρου 10nm όπως προκύπτει από το θεωρητικό μοντέλο των Zhou et al.



Εικόνα 11. Μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας αναδίπλωσης των πρωτεϊνών συναρτήσει του μήκους της πρωτεϊνικής αλυσίδας κατά τον εγλωβισμό τους σε σφαιρικές κοιλότητες διαμέτρου 10nm.

Η ελεύθερη ενέργεια αναδίπλωσης της πρωτεΐνης ελαττώνεται με αύξηση του αριθμού των καταλοίπων της πρωτεΐνης. Θεωρώντας ότι τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται σε αυτή την εργασία, η HRP και η GOx, ικανοποιούν τις προϋποθέσεις που έχουν θέσει οι Zhou et al. στο μοντέλο τους για τις πρωτεΐνες,

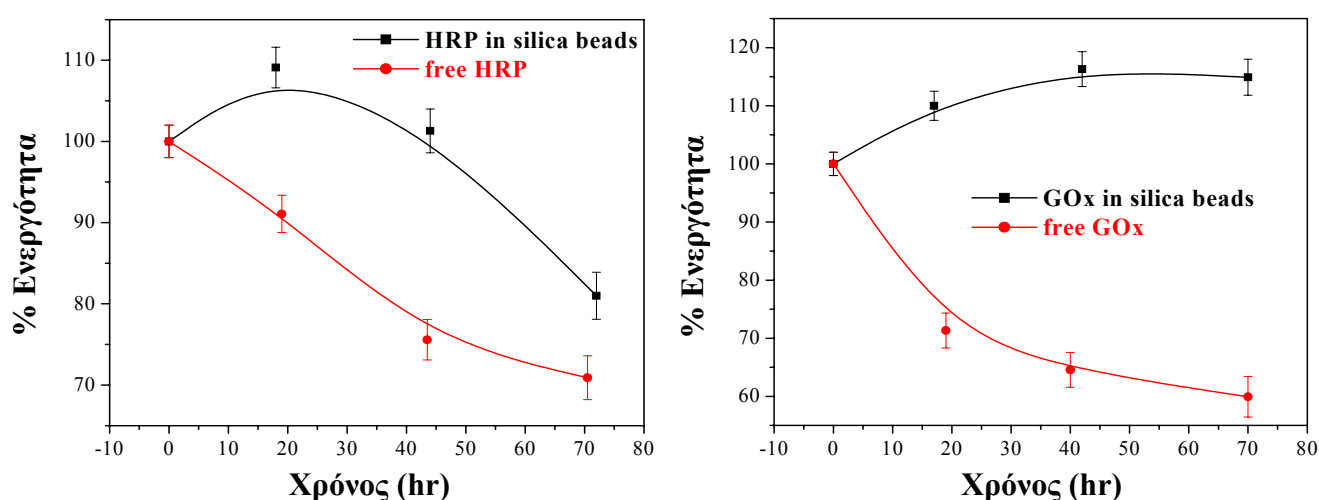
βρίσκεται η αναμενόμενη ελεύθερη ενέργεια αναδίπλωσης της HRP και της GOx στους πόρους των 10nm των σφαιριδίων διοξειδίου του πυριτίου. Η ελεύθερη ενέργεια αναδίπλωσης της GOx που έχει 1166 αμινοξέα υπολογίζεται θεωρητικά ότι θα είναι 75% μικρότερη από αυτή της HRP που έχει 306 αμινοξέα. Αυτό σημαίνει ότι σύμφωνα με το θεωρητικό μοντέλο η μεγαλύτερη σε μέγεθος GOx θα σταθεροποιείται πιο αποτελεσματικά στα πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου σε σύγκριση με τη μικρότερη σε μέγεθος HRP.

Κατασκευή GOx και HRP Βιοαισθητήρων με Πορώδη Σφαιρίδια Διοξειδίου του Πυριτίου

Η σταθεροποίηση της HRP και της GOx σε πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου αξιολογείται πειραματικά εξετάζοντας την ευαισθησία των αντίστοιχων βιοαισθητήρων. Η ακινητοποίηση του ενζύμου στα σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου επιτυγχάνεται με προσθήκη 0.5g σφαιριδίων διοξειδίου του πυριτίου σε 500μL ενζυμικού διαλύματος (2500 Units/mL GOx and HRP). Η προσρόφηση του ενζύμου στα σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου πραγματοποιείται για 24 hr στους +4 °C. Ακολουθεί διήθηση του διαλύματος με φίλτρα 0.2 μm, διαδοχική έκπλυση των σφαιριδίων διοξειδίου του πυριτίου με ρυθμιστικό διάλυμα και ξήρανσή τους σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια τα σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου με το προσροφημένο ένζυμο (HRP ή GOx) ακινητοποιούνται σε ηλεκτρόδιο πλατίνας με τη βοήθεια μίας Nafion μεμβράνης. Το διάλυμα Nafion (ρητίνη σε 5% διάλυμα αλκοολών μικρού μοριακού βάρους με 15-20% H₂O) αραιώνεται με αιθανόλη 98% σε τελική συγκέντρωση 1%, και το pH του διαλύματος ρυθμίζεται στο 5.5 με NaHCO₃. Τα σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου με το προσροφημένο ένζυμο αναμιγνύονται με το διάλυμα Nafion 1% (10mg/mL) και 10μL του τελικού διαλύματος εναποτίθενται στην επιφάνεια ηλεκτροδίου πλατίνας (d = 5.9mm). Σε χρονικό διάστημα μίας ώρας παρατηρείται πλήρης εξάτμιση του διαλύτη και σχηματίζεται μία λεπτή μεμβράνη στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Τέλος πραγματοποιείται έκπλυση της επιφάνειας του ηλεκτροδίου με ρυθμιστικό διάλυμα. Για λόγους σύγκρισης ακολουθώντας την ίδια διαδικασία κατασκευάζονται HRP και GOx βιοαισθητήρες στους οποίους το ένζυμο δεν είναι ακινητοποιημένο σε πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου αλλά ελεύθερο στη Nafion μεμβράνη (περιεκτικότητα νερού στο διάλυμα nafion/ενζύμου 10%).

Σταθερότητα Βιοαισθητήρων υπό συνθήκες συνεχούς λειτουργίας

Η σταθερότητα των βιοαισθητήρων παρακολουθείται αμπερομετρικά υπό συνθήκες συνεχούς λειτουργίας σε δυναμικό εργασίας +600mV για 70h στους 25 °C. Μετράται η ευαισθησία των HRP και GOx βιοαισθητήρων στα υποστρώματα υπεροξειδίου του υδρογόνου και D-γλυκόζη αντίστοιχα. Όπως αναφέρθηκε η ευαισθησία των βιοαισθητήρων συσχετίζεται άμεσα με την ενεργότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου. Η επί τοις εκατό ενεργότητα των HRP και GOx βιοαισθητήρων σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσιάζεται στην Εικόνα 12.

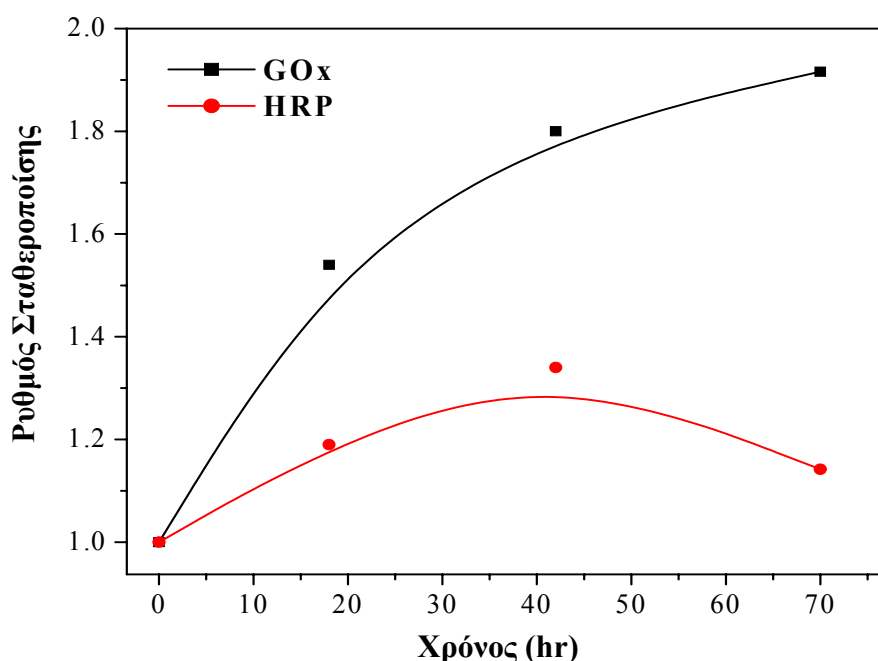


Εικόνα 12. Σύγκριση της σταθερότητας του ελεύθερου και σταθεροποιημένου ενζύμου σε πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου σε A) HRP βιοαισθητήρα και B) GOx βιοαισθητήρα κάτω από συνθήκες συνεχούς λειτουργίας (+600mV, 25° C).

Ο HRP βιοαισθητήρας με τα πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου εμφανίζει ενεργότητα 81% μετά από 70h συνεχούς λειτουργίας ενώ η ενεργότητα του βιοαισθητήρα με την ελεύθερη HRP μειώνεται στο 71% μέσα στο ίδιο χρονικό διάστημα. Ο GOx βιοαισθητήρας με τα πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου δεν παρουσιάζει μείωση της ενεργότητας του καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Μάλιστα η αυξημένη τιμή της ενεργότητάς του (115% μετά από 70h συνεχούς λειτουργίας) όπως αναφέρθηκε αποτελεί γνωστό φαινόμενο που αποδίδεται στην αλλαγή της τριτοταγούς δομής του ενζύμου μέσα στους πόρους των σφαιριδίων πυριτίου. Αντίθετα ο βιοαισθητήρας με την ελεύθερη GOx εμφανίζει ενεργότητα 60% μετά από 70h συνεχούς λειτουργίας. Παρατηρείται επομένως και στις δύο περιπτώσεις ότι όταν το ένζυμο είναι σταθεροποιημένο στα πορώδη σφαιρίδια

πυριτίου οι βιοαισθητήρες εμφανίζουν μεγαλύτερη σταθερότητα σε σύγκριση με αυτούς όπου το ένζυμο είναι ελεύθερο στη Nafion μεμβράνη.

Η επίδραση που επιφέρει στη σταθερότητα των ενζύμων η ακινητοποίηση τους στα πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου φαίνεται πολύ καλύτερα στην Εικόνα 13. Στην Εικόνα αυτή απεικονίζεται ο λόγος της σταθερότητας των βιοαισθητήρων με το σταθεροποιημένο ένζυμο στα σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου προς αυτούς με το ελεύθερο ένζυμο σε συνάρτηση με το χρόνο. Όπως προκύπτει από το γράφημα, ο ρυθμός σταθεροποίησης των ενζύμων λόγω της ακινητοποίησης τους στα σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου είναι αρκετά ικανοποιητικός και για τα δύο ένζυμα. Ωστόσο ο ρυθμός σταθεροποίησης του ενζύμου GOx έναντι της HRP είναι πολύ μεγαλύτερος (1.7 φορές μεγαλύτερος) όπως άλλωστε αναμενόταν από το θεωρητικό μοντέλο καθώς το μέγεθος της GOx ταιριάζει περισσότερο με το μέγεθος των πόρων των σφαιριδίων διοξειδίου του πυριτίου.



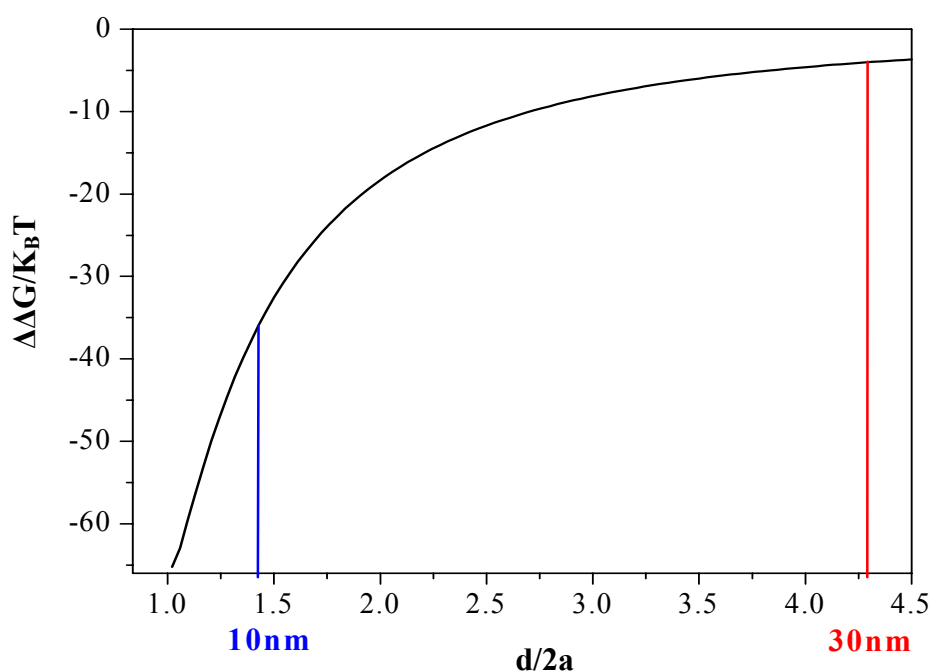
Εικόνα 13. Ρυθμός σταθεροποίησης των ενζύμων GOx και HRP στα πορώδη σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου σε συνάρτηση με το χρόνο, όπως προκύπτει από το λόγο της σταθερότητας των βιοαισθητήρων με το σταθεροποιημένο προς το ελεύθερο ένζυμο.

Ωστόσο στη μελέτη αυτή δεν υπολογίστηκε η επίδραση της πολικότητας των σφαιριδίων διοξειδίου του πυριτίου και των επιφανειακών φορτίων των ενζύμων στη σταθεροποίηση των ενζύμων στους πόρους των πυριτικών υποστρωμάτων. Γι' αυτό

το λόγο μία δεύτερη σειρά πειραμάτων πραγματοποιείται, στην οποία εξετάζεται η σταθεροποίηση του ίδιου ενζύμου σε νανο-κοιλότητες διαφορετικής διαμέτρου του ίδιου υλικού.

5.3.3 Σταθεροποίηση Ενζύμου σε Νανο-Πορώδη Πολυμερικά Σφαιρίδια με Διαφορετικό Μέγεθος Πόρων

Για την περαιτέρω επιβεβαίωση το θεωρητικού μοντέλου σταθεροποίησης πρωτεϊνών, εξετάζεται η σταθεροποίηση ενζύμων σε πορώδη πολυμερικά σφαιρίδια που έχουν πόρους διαμέτρου 10nm και 30nm. Σύμφωνα με το θεωρητικό μοντέλο το ένζυμο GOx που έχει 1166 αμινοξέα αναμένεται να σταθεροποιείται πιο αποτελεσματικά στα πολυμερικά σφαιρίδια με διάμετρο πόρων 10nm σε σύγκριση με αυτά που έχουν διάμετρο πόρων 30nm. Θεωρώντας και πάλι ότι η GOx ικανοποιεί τις προϋποθέσεις που έχουν θέσει οι Zhou et al. στο μοντέλο τους για τις πρωτεΐνες, υπολογίζεται η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας αναδίπλωσης της GOx ($\Delta\Delta G_{KB} T$) σε συνάρτηση με το μέγεθος των πόρων του υλικού ακινητοποίησης ($d/2a_N$) (όπου d η διάμετρος των πόρων, a_N η ακτίνα της ενεργής μορφής της πρωτεΐνης).



Εικόνα 14. Μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας αναδίπλωσης της GOx σε συνάρτηση με το μέγεθος των πόρων του υλικού ακινητοποίησης (d η διάμετρος των πόρων, $2a_N$ η διάμετρος της GOx).

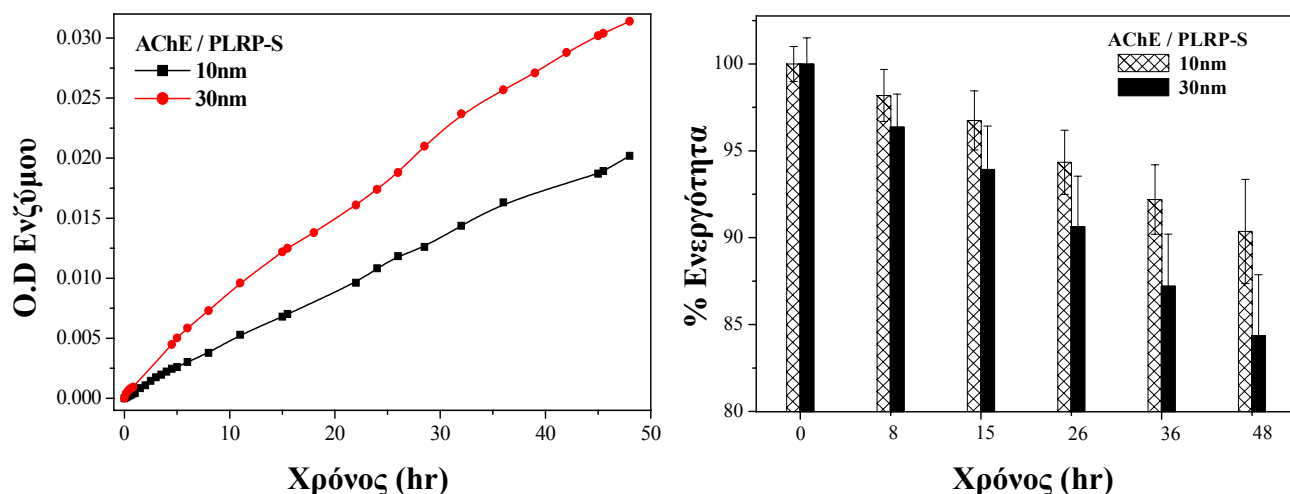
Όπως φαίνεται στην Εικόνα 14 η ελεύθερη ενέργεια αναδίπλωσης της GOx ελαττώνεται με τη μείωση του μεγέθους των πόρων του υλικού ακινητοποίησης. Κατά την ακινητοποίηση της GOx σε πόρους μεγέθους 10nm η ελεύθερη ενέργεια αναδίπλωσης του ενζύμου υπολογίζεται ότι είναι 90% μικρότερη από αυτή που θα εμφάνιζε σε πόρους μεγέθους 30nm. Παρόμοια αποτελέσματα αναμένονται και για το ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση που έχει περίπου τον ίδιο αριθμό αμινοξέων με τη GOx. Με βάση τους υπολογισμούς αυτούς εξετάζεται ο ρυθμός διαφυγής και η σταθερότητα των ενζύμων στους πόρους των 10nm και 30nm των πολυμερικών σφαιριδίων.

Έλεγχος διαφυγής AChE από τα πορώδη πολυμερικά σφαιρίδια

Κατά τη φυσική προσρόφηση ενζύμων σε πορώδη υλικά ακινητοποίησης παρατηρείται διαφυγή του ενζύμου προς το διάλυμα γεγονός που συμβάλλει στη μείωση της ενεργότητας του ενζύμου στο υλικό ακινητοποίησης και στην περαιτέρω μείωση της ευαισθησίας και του χρόνου ζωής του αντίστοιχου βιοαισθητήρα. Προκειμένου να μελετηθεί κατά πόσο το μέγεθος των πόρων του υλικού ακινητοποίησης επηρεάζει τη διαφυγή των ενζυμικών μορίων, η AChE ακινητοποιείται σε πορώδη πολυμερικά σφαιρίδια με διάμετρο πόρων 10nm και 30nm. Η ακινητοποίηση επιτυγχάνεται με προσθήκη 0.5g πολυμερικών σφαιριδίων σε 500μL ενζυμικού διαλύματος (100 OD/mL AChE). Η προσρόφηση πραγματοποιείται για 24hr στους +4°C και ακολουθεί διήθηση του διαλύματος, έκπλυση των σφαιριδίων και ξήρανσή τους σε θερμοκρασία δωματίου. Με τη μέθοδο Ellman προσδιορίζεται ότι η ενεργότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου είναι $4.2 \cdot 10^{-3}$ O.D./mg στα πολυμερικά σφαιρίδια με διάμετρο πόρων 10nm και $4.0 \cdot 10^{-3}$ O.D./mg σε αυτά με διάμετρο πόρων 30nm. Η διαφυγή του ενζύμου από κάθε δείγμα πολυμερικών σφαιριδίων μετράται τοποθετώντας 50mg σφαιριδίων με ακινητοποιημένο το ένζυμο σε ένα φίλτρο και ενσωμάτωση του φίλτρου σε ένα σύστημα ροής (0.1mL/min ρυθμιστικό διάλυμα). Το ρυθμιστικό διάλυμα που περνάει από το φίλτρο με τα πολυμερικά σφαιρίδια συλλέγεται και μετράται η ενεργότητα του ενζύμου που έχει διαφύγει στο διάλυμα.

Όπως φαίνεται στην Εικόνα 15(A) η ενεργότητα του ενζύμου το οποίο διαφεύγει από τα πολυμερικά σφαιρίδια με διάμετρο πόρων 30nm είναι μεγαλύτερη σε σύγκριση με

αυτή στα 10nm. Μετά από 48h συνεχούς έκπλυσης η ενεργότητα του ενζύμου στα σφαιρίδια των 10nm έχει μειωθεί μόνο κατά 10% ενώ η ενεργότητα του ενζύμου στα σφαιρίδια των 30nm κατά 16% (Εικόνα 15(B)). Επομένως η AChE συγκρατείται πιο ισχυρά στους πόρους διαμέτρου 10nm έναντι των 30nm των πολυμερικών σφαιριδίων, όπως προκύπτει από τον έλεγχο του ρυθμού διαφυγής του ενζύμου προς το διάλυμα.

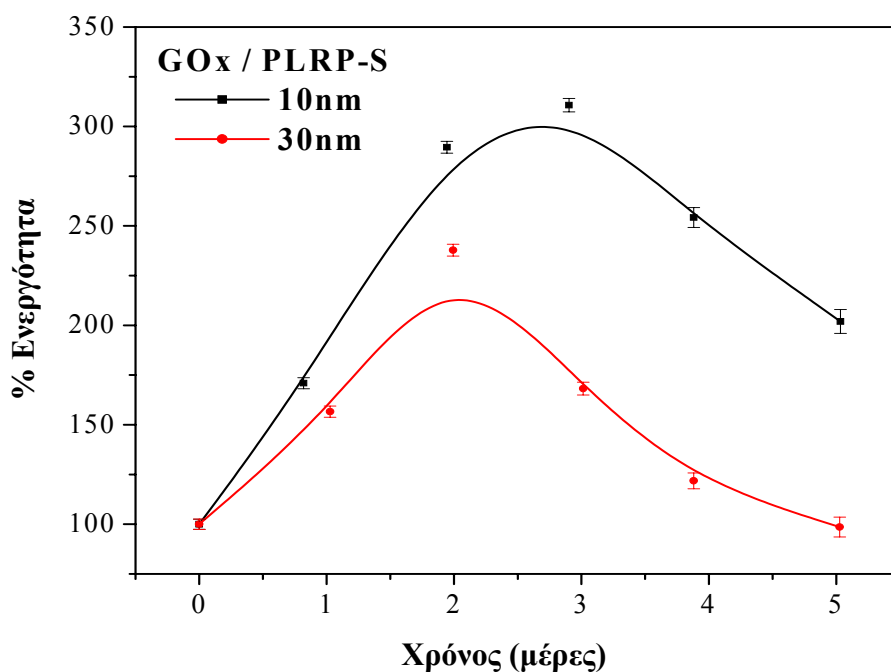


Εικόνα 15. Α) Ενεργότητα του ενζύμου AChE το οποίο διαφεύγει από τα πολυμερικά σφαιρίδια με διάμετρο πόρων 10nm και 30nm σε συνάρτηση με το χρόνο. Β) Σταθερότητα του ενζύμου AChE στα πολυμερικά σφαιρίδια με διάμετρο πόρων 10nm και 30nm σε συνάρτηση με το χρόνο κατά τον έλεγχο διαφυγής του ενζύμου στο διάλυμα.

Σταθερότητα GOx στα πορώδη πολυμερικά σφαιρίδια υπό συνθήκες συνεχούς λειτουργίας

Η σταθερότητα της GOx στα πορώδη πολυμερικά σφαιρίδια με διαφορετική διάμετρο πόρων εξετάζεται κατασκευάζοντας τους αντίστοιχους βιοαισθητήρες και μετρώντας την ευαισθησία τους υπό συνθήκες συνεχούς λειτουργίας για 5 ημέρες σε δυναμικό εργασίας +600mV στους 25 °C. Η διαδικασία ακινητοποίησης του ενζύμου στα πορώδη πολυμερικά σφαιρίδια και κατασκευής των βιοαισθητήρων είναι ίδια με αυτή που ακολουθείται για τα σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου. Τα πολυμερικά σφαιρίδια με την προσροφημένη GOx ακινητοποιούνται και πάλι σε ηλεκτρόδια πλατίνας με τη βοήθεια μίας Nafion μεμβράνης. Η επί τοις εκατό ενεργότητα των GOx βιοαισθητήρων σε συνάρτηση με το χρόνο παρουσιάζεται στην Εικόνα 16. Στην περίπτωση που το ένζυμο είναι ακινητοποιημένο στα πολυμερικά σφαιρίδια των

10nm ο βιοαισθητήρας δεν παρουσιάζει μείωση της ενεργότητας του καθ' όλη τη διάρκεια του πειράματος. Η ενεργότητα του βιοαισθητήρα μετά από 5 ημέρες συνεχούς λειτουργίας φτάνει στο 202%, σε σύγκριση με την αρχική του ενεργότητα. Όσον αφορά το βιοαισθητήρα όπου η GOx είναι ακινητοποιημένη στα πολυμερικά σφαιρίδια των 30nm, η ενεργότητα του μειώνεται μόνο κατά 2% μετά από 5 ημέρες συνεχούς λειτουργίας του βιοαισθητήρα. Από τα αποτελέσματα αυτά είναι εμφανές ότι η GOx σταθεροποιείται ισχυρότερα στα πολυμερικά σφαιρίδια με τη μικρότερη διάμετρο πόρων. Μάλιστα το ένζυμο είναι κατά 2.1 φορές πιο σταθερό στους πόρους με μέγεθος 10nm έναντι των 30nm. Διαπιστώνουμε επομένως για μία ακόμη φορά ότι το μέγεθος της κοιλότητας του υλικού ακινητοποίησης είναι καθοριστικό για τη σταθεροποίηση των ενζυμικών μορίων στο εσωτερικό τους.



Εικόνα 16. Σύγκριση της σταθερότητας υπό συνθήκες συνεχούς λειτουργίας των βιοαισθητήρων GOx με πολυμερικά σφαιρίδια διαμέτρου πόρων 10nm και 30nm (+600mV, 25° C).

5.4 Συμπεράσματα

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα αποδεικνύεται ότι τα νανοπορώδη υλικά είναι κατάλληλα για την ακινητοποίηση και σταθεροποίηση ενζύμων και για την ανάπτυξη

βιοαισθητήρων μεγάλης σταθερότητας. Κατά τη μελέτη της σταθερότητας ενζύμων διαφορετικού μεγέθους σε σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου με διάμετρο πόρων 10nm βρίσκεται ότι το ένζυμο εκείνο που το μέγεθος του προσεγγίζει περισσότερο το μέγεθος των πόρων των σφαιριδίων διοξειδίου του πυριτίου σταθεροποιείται ισχυρότερα. Παράλληλα κατά την ακινητοποίηση ενζύμων σε πορώδη πολυμερικά σφαιρίδια με διάμετρο πόρων 10nm και 30nm διαπιστώνεται ότι τα συγκεκριμένα ένζυμα συγκρατούνται ισχυρότερα και σταθεροποιούνται πιο αποτελεσματικά στα σφαιρίδια με τη μικρότερη διάμετρο πόρων. Τα αποτελέσματα αυτά φαίνεται γενικά να συμφωνούν με το θεωρητικό μοντέλο που περιγράφηκε από τους Zhou et al. για μέγιστη σταθεροποίηση πρωτεϊνών σε σφαιρικές κοιλότητες με διάμετρο 2-6 φορές μεγαλύτερη από τη διάμετρο των πρωτεϊνών. Η συμφωνία αυτή θεωρητικών υπολογισμών και πειραματικών αποτελεσμάτων θέτει τις βάσεις για την εδραίωση μίας νέας προσέγγισης όσον αφορά τη σταθεροποίηση ενζύμων σε νανοπορώδη υλικά. Καθιέρωση αυτής της νέας προσέγγισης θα έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη βιοαισθητήρων με βελτιωμένα αναλυτικά χαρακτηριστικά.

5.5 Βιβλιογραφία

1. Thomas J.M., The chemistry of crystalline sponges. Nature 1994, 368, 289.
2. Stryer L., Βιοχημεία, Τόμος II, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1997.
3. Bourne Y., Taylor P., Bougis P.E., Marchot P., Crystal structure of mouse acetylcholinesterase. J.Biol. Chem. 1999, 274, 5, 2963.
4. Sussman J.L., Harel M., Frolow F., Oefner C., Goldman A., Toker L., Silman I., Atomic structure of acetylcholinesterase from *Torpedo californica*: A prototypic acetylcholine-binding protein. Science 1991, 253, 872.
5. Harel M., Krger G., Rosenberry T., Mallender W.D., Lewis T., Fletcher R.J., Guss J.M., Silman I., Sussman J.L., Three-dimensional structure of *Drosophila melanogaster* acetylcholinesterase and of its complexes with two potent inhibitors. Prot. Sci. 2000, 9, 1063.
6. Szegletes T., Mallender W.D., Thomas P.J., Rosenberry T.L., Substrate binding to the peripheral site of acetylcholinesterase initiates enzymatic catalysis. Substrate inhibition arises as a secondary effect. Biochemistry 1999, 38, 122.

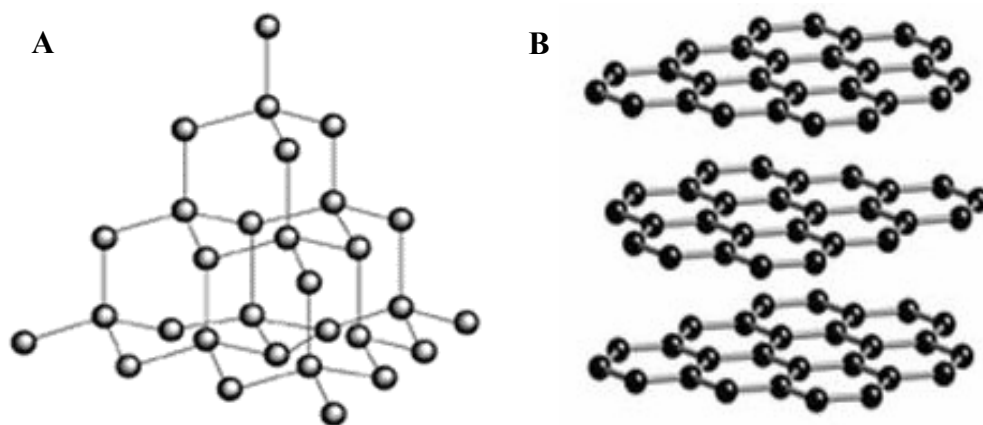
-
7. Hecht H.J., Kalisz H.M., Hendle J., Schmid R.D., Schomburg D., Crystal structure of Glucose Oxidase from *Aspergillus niger* refined at 2.3 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 1993, 229, 153.
 8. Wohlfahrt G., Witt S., Hendle J., Schomburg D., Kalisz H.M., Hecht H.J., 1.8 and 1.9 Å resolution structures of the *Penicillium amagasakiense* and *Aspergillus niger* glucose oxidases as a basis for modelling substrate complexes. *Acta Crystallogr. Sect D* 1999, 55, 969.
 9. Banci, L. Structural Properties of Peroxidases , *J Biotechnol* 1997, 53, 253.
 10. Rippeth J.J., Gibson T.D., Hart J.P., Hartley I.C., Nelson G., Flow-injection Detector Incorporating a Screen-printed Disposable Amperometric Biosensor for Monitoring Organophosphate Pesticides. *Analyst* 1997, 122, 1425.
 11. Khan G.F., Wernet W., Design of enzyme electrodes for extended use and storage time. *Anal. Chem.* 1997, 69, 2682.

6. ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ GO_x ΣΕ ΝΑΝΟΔΟΜΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ

6.1 Νανοδομές άνθρακα

Οι ανθρακικές νανοδομές βρίσκονται στο επίκεντρο της έρευνας τα τελευταία χρόνια. Η ανακάλυψη του φουλλερενίου C₆₀ το 1985 από την ομάδα του Smalley¹ και των νανοσωλήνων άνθρακα (carbon nanotubes) το 1991 από τον Iijima², άνοιξε νέες προοπτικές στη μελέτη των ανθρακικών υλικών. Παρόλο που οι έρευνες έχουν επικεντρωθεί κυρίως στα φουλλερένια και τους νανοσωλήνες άνθρακα, διάφορες άλλες ανθρακικές νανοδομές όπως είναι οι νανοϊνες άνθρακα (carbon nanofibers)^{3,4,5,6,7}, οι νανοκώννοι άνθρακα (carbon nanohorns)^{8,9} και διάφορες νανοπορώδεις δομές^{10,11} παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον λόγω της παρόμοιας συμπεριφοράς τους με τα φουλλερένια και τους νανοσωλήνες.

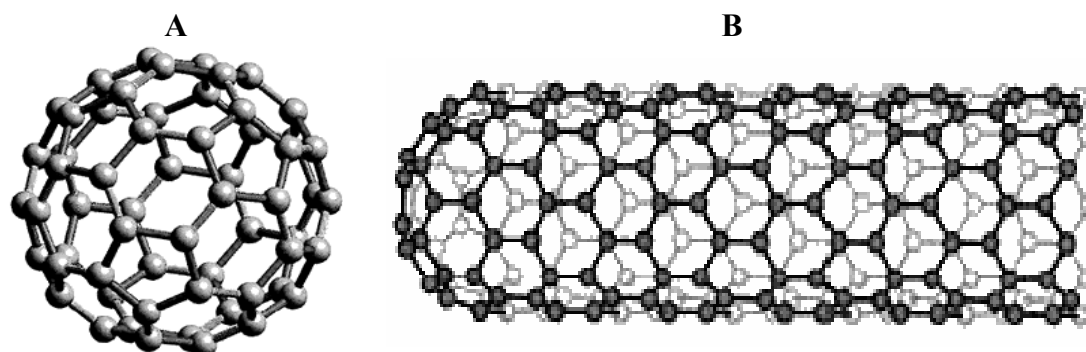
Οι δύο πιο γνωστές αλλοτροπικές μορφές του άνθρακα είναι το διαμάντι και ο γραφίτης¹² (Εικόνα 1). Το διαμάντι είναι ένα πολύ σταθερό και άκαμπτο υλικό στο οποίο κάθε άτομο άνθρακα είναι ομοιοπολικά δεσμευμένο με τέσσερα άλλα άτομα άνθρακα μέσω απλών δεσμών C-C. Η κρυσταλλική του δομή προσδίδει στο υλικό όλα αυτά τα χαρακτηριστικά που το καθιστούν πολύτιμο.



Εικόνα 1. Δομή δύο αλλοτροπικών μορφών του άνθρακα, A) Διαμάντι, B) Γραφίτης.

Σε αντίθεση με το διαμάντι, ο γραφίτης είναι μαλακό και εύθραστο υλικό. Η διαφορά αυτή έγκειται στο γεγονός ότι τα άτομα άνθρακα στο γραφίτη διευθετούνται με διαφορετικό τρόπο. Κάθε άτομο άνθρακα με υβριδισμό sp^2 (στο διαμάντι είναι sp^3) ενώνεται με τρία άλλα άτομα άνθρακα τα οποία έχουν επίπεδη τριγωνική γεωμετρία μέσω δεσμών C-C και προκύπτουν οργανωμένα εξάγωνα. Το αδέσμευτο ηλεκτρόνιο

από κάθε άτομο άνθρακα απεντοπίζεται σε όλη τη δομή με αποτέλεσμα ο γραφίτης να άγει τον ηλεκτρισμό. Τα φύλλα του γραφίτη πακετάρονται το ένα πάνω στο άλλο και ενώνονται μεταξύ τους μέσω ασθενών δυνάμεων Van der Waals. Ο γραφίτης αποτελεί την πιο σταθερή αλλοτροπική μορφή του άνθρακα.



Εικόνα 2. Δομή του A) φουλλερενίου C_{60} και των B) νανοσωλήνων άνθρακα.

Η τρίτη αλλοτροπική μορφή του άνθρακα είναι τα φουλλερένια (Εικόνα 2Α). Το πιο γνωστό φουλλερένιο είναι το C_{60} που αποτελείται από 60 άτομα άνθρακα οργανωμένα σε 20 εξάγωνα και 12 πεντάγωνα. Το φουλλερένιο C_{60} είναι μεγάλο σφαιρικό μόριο που μοιάζει με μπάλα ποδοσφαίρου και έχει διάμετρο 7.10\AA ^{13,14}. Υπάρχουν βέβαια και φουλλερένια με μεγαλύτερο μοριακό βάρος όπως είναι τα C_{70} , C_{76} , C_{78} , C_{80} κλπ, που εμφανίζουν διαφορετική γεωμετρική δομή. Τα φουλλερένια γενικά είναι λιπόφιλα και χημικά αδρανή μόρια ενώ εμφανίζουν ενδιαφέρουσες ηλεκτροχημικές ιδιότητες¹⁵. Έχουν την ικανότητα να προσλαμβάνουν και να αποβάλλουν ηλεκτρόνια και είναι σταθερά σε διάφορες οξειδωτικές και αναγωγικές καταστάσεις. Λόγω των sp^2 υβριδισμένων δεσμών τους είναι δυνατό να υποστούν μέχρι και έξι αντιστρεπτές αναγωγές ενός ηλεκτρονίου σε δυναμικά μεταξύ -0.61 και 1.00 V ως προς το πρότυπο ηλεκτρόδιο υδρογόνου (SHE). Το μεγάλο εύρος κανονικών δυναμικών οξειδοαναγωγής που εμφανίζουν, τους επιτρέπει να ανταλλάζουν ηλεκτρόνια με πολλών ειδών ενώσεις¹⁶ καθώς και με βιολογικά μόρια. Έτσι για παράδειγμα μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μεταφορείς ηλεκτρονίων σε συστήματα αμπερομετρικών βιοαισθητήρων διευκολύνοντας την ανταλλαγή ηλεκτρονίων μεταξύ του ενεργού κέντρου των ενζύμων και του ηλεκτροδίου εργασίας. Τα φουλλερένια δεν είναι επιβλαβή για τα βιολογικά μόρια, ενώ το μικρό μέγεθος τους επιτρέπει την προσέγγιση τους πολύ κοντά στο ενεργό κέντρο των ενζύμων. Επιπλέον είναι αδιάλυτα στο νερό, γεγονός που διασφαλίζει την παραμονή τους στο ενζυμικό στρώμα. Παράλληλα τα φουλλερένια είναι δυνατό να

τροποποιηθούν χημικά αυξάνοντας έτσι τις πιθανές εφαρμογές τους. Η χημική τροποποίησή τους αποσκοπεί συνήθως στη μεταβολή των φυσικοχημικών χαρακτηριστικών τους ώστε να είναι πιο ευδιάλυτα στο νερό, να μπορούν να δεσμευτούν με βιολογικά μόρια και να συμμετέχουν πιο εύκολα σε οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις.

Μία ακόμη αλλοτροπική μορφή του άνθρακα είναι οι νανοσωλήνες άνθρακα (Εικόνα 2B). Οι νανοσωλήνες αποτελούνται από άτομα άνθρακα με υβριδισμό sp^2 οργανωμένα σε εξάγωνα που σχηματίζουν ένα φύλλο γραφίτη το οποίο αναδιπλώνεται και εμφανίζει κυλινδρικό σχήμα. Οι νανοσωλήνες άνθρακα διακρίνονται σε μονο-κυλινδρικούς (Single Wall nanotubes, SWNT) και πολύ-κυλινδρικούς (Multi Wall Nanotubes, MWNT) ανάλογα με το αν αποτελούνται από ένα μόνο κύλινδρο ή από πολλούς ομόκεντρους κυλίνδρους αντίστοιχα. Τα πλευρικά τοιχώματα των νανοσωλήνων άνθρακα ενώνονται στα άκρα τους με πεντάγωνα και δημιουργούνται καπάκια (end caps) που μοιάζουν με ημισφαίρια φουλλερενίου με αποτέλεσμα οι νανοσωλήνες να είναι κλειστοί και στα δύο άκρα τους^{17,18}. Η διάμερος των SWNT κυμαίνεται στα 1.4 nm και είναι παρόμοια με τη διάμετρο του φουλλερενίου C_{60} , ενώ αυτή των MWNT είναι της τάξης των 10-20 nm και η απόσταση μεταξύ των ομόκεντρων κυλινδρικών τοιχωμάτων είναι περίπου 3.4 Å. Οι νανοσωλήνες άνθρακα εμφανίζουν αντοχή στην ελατότητα εκατό φορές μεγαλύτερη από αυτή του ατσαλιού και θερμική αγωγιμότητα πολύ υψηλότερη από αυτή του διαμαντιού. Παράλληλα η ηλεκτρική αγωγιμότητά τους είναι παρόμοια με αυτή του χαλκού αλλά με τη διαφορά ότι οι νανοσωλήνες αντέχουν σε πολύ υψηλά ρεύματα $10^{12} A/cm^2$ ενώ ο χαλκός καταρρέει στα $10^6 A/cm^2$. Οι ιδιότητες αυτές των νανοσωλήνων τα καθιστούν πολύτιμα υλικά για πολλαπλές εφαρμογές, όπως μπαταρίες¹⁹, ακίδες σε συστήματα μικροσκοπίας²⁰, αποθήκευση καυσίμων, ανάπτυξη χημικών αισθητήρων²¹ και αισθητήρων επαγόμενου πεδίου^{22,23} κτλ. Για πρώτη φορά οι νανοσωλήνες άνθρακα χρησιμοποιήθηκαν στο εργαστήριο μας για την ανάπτυξη ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων²⁴ με βάση το γεγονός ότι οι νανοσωλήνες μπορούν να χρησιμοποιηθούν παράλληλα ως υποστρώματα για την ακινητοποίηση βιολογικών μορίων αλλά και ως μεταλλάκτες σήματος. Έκτοτε έχει προκύψει πληθώρα δημοσιεύσεων που αφορούν τη μελέτη των νανοσωλήνων άνθρακα σε συστήματα βιοαισθητήρων. Ωστόσο κατά τη σχεδίαση ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων που βασίζονται σε νανοσωλήνες άνθρακα εντοπίζονται διάφορα προβλήματα. Ένας

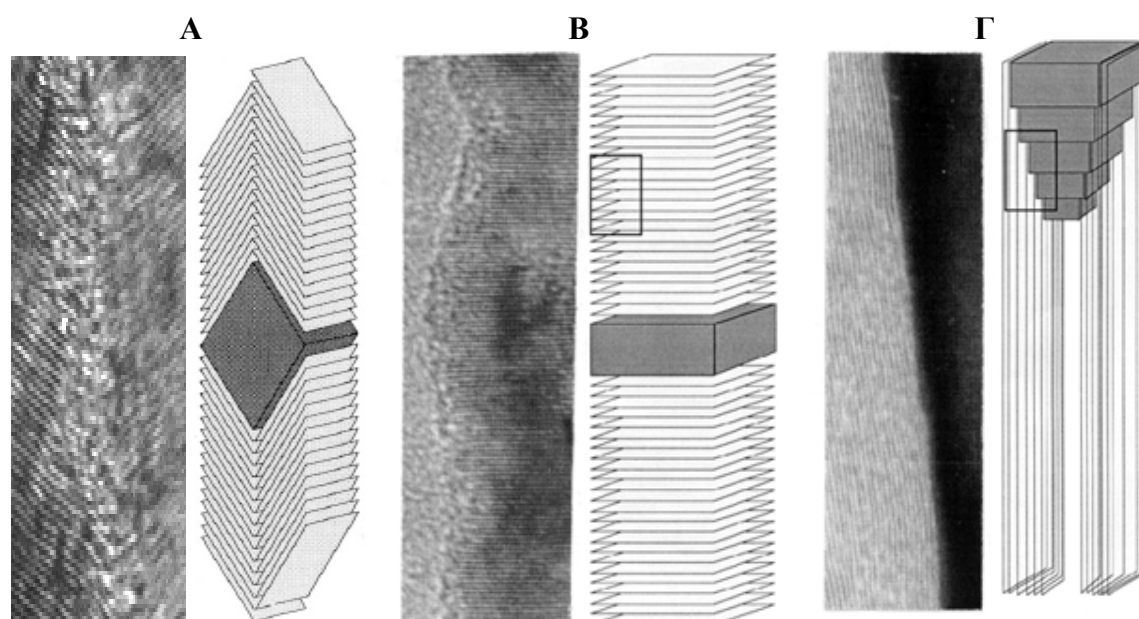
περιοριστικός παράγοντας στην ευρεία χρήση των νανοσωλήνων άνθρακα σε συστήματα βιοαισθητήρων είναι ο χαρακτήρας των υλικών αυτών (μεταλλικός ή ημιαγωγίμος) που εξαρτάται από τη χειρομορφία τους και τη διάμετρο τους²⁵. Η αγωγιμότητα των νανοσωλήνων άνθρακα σχετίζεται άμεσα με το χαρακτήρα τους και αυξάνεται με την οξειδωσή τους. Ωστόσο η αδυναμία να ρυθμιστούν πλήρως οι ηλεκτρικές ιδιότητες των νανοσωλήνων ώστε να προκύψουν δομές που έχουν μόνο μεταλλικό χαρακτήρα έρχεται σε αντίθεση με την απαίτηση της υψηλής αγωγιμότητας των υλικών που χρησιμοποιούνται ως μεταλλάκτες σήματος σε ηλεκτροχημικούς αισθητήρες. Πέρα όμως από τη δυνατότητα των νανοσωλήνων άνθρακα να λειτουργούν ως μεταλλάκτες σήματος ακόμη πιο σημαντική είναι η δυνατότητα αλληλεπίδρασης των νανοσωλήνων με βιολογικά μόρια. Τα πλευρικά τοιχώματα των νανοσωλήνων άνθρακα δε φέρουν καμία δραστική ομάδα και χαρακτηρίζονται από χημική αδράνεια. Βιολογικά μόρια μπορούν να ακινητοποιηθούν μέσω προσρόφησης ή ομοιοπολικής δέσμευσης μόνο στα ανοιχτά άκρα των νανοσωλήνων άνθρακα. Η ακινητοποίηση βιολογικών μορίων στα πλευρικά τοιχώματα των νανοσωλήνων απαιτεί την οξειδωση τους²⁶ και τη χημική τροποποίησή τους²⁷ που έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία δραστικών ομάδων στην επιφάνεια τους (πχ καρβοξυλομάδων) κατάλληλων για περαιτέρω χημικές αντιδράσεις. Έτσι η ποσότητα των βιολογικών μορίων που μπορούν να ακινητοποιηθούν στους νανοσωλήνες άνθρακα είναι περιορισμένη, με αποτέλεσμα τα αντίστοιχα συστήματα βιοαισθητήρων να μην εμφανίζουν μεγάλη ευαισθησία και σταθερότητα. Τα μειονεκτήματα αυτά που εμφανίζουν οι νανοσωλήνες άνθρακα φαίνεται να υπερνικούνται με τη χρήση των νανοϊνών άνθρακα.

6.2 Νανοϊνες άνθρακα

Οι νανοϊνες άνθρακα είναι κυλινδρικές νανοδομές που αποτελούνται από διαδοχικά φύλλα γραφίτη διατεταγμένα σε διάφορες διαμορφώσεις ως προς τον άξονα της νανοϊνας, δίνοντας καλά ταξινομημένες δομές σε μορφή κώνου, κυπέλλου ή παράλληλων επιπέδων. Η διάμετρος των νανοϊνών άνθρακα κυμαίνεται από 5 έως 200 nm ενώ το μήκος τους είναι στην κλίμακα των μικρομέτρων. Η μηχανική αντοχή και οι ηλεκτρικές ιδιότητες των νανοϊνών άνθρακα είναι παρόμοιες με αυτές των νανοσωλήνων άνθρακα²⁸. Το μέγεθός τους και η διάταξη των επιπέδων του γραφίτη

ρυθμίζονται²⁹ κατά τη διαδικασία παρασκευής τους. Γενικά η μείωση στη διάμετρο τους συμβάλλει στη βελτίωση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του υλικού³⁰.

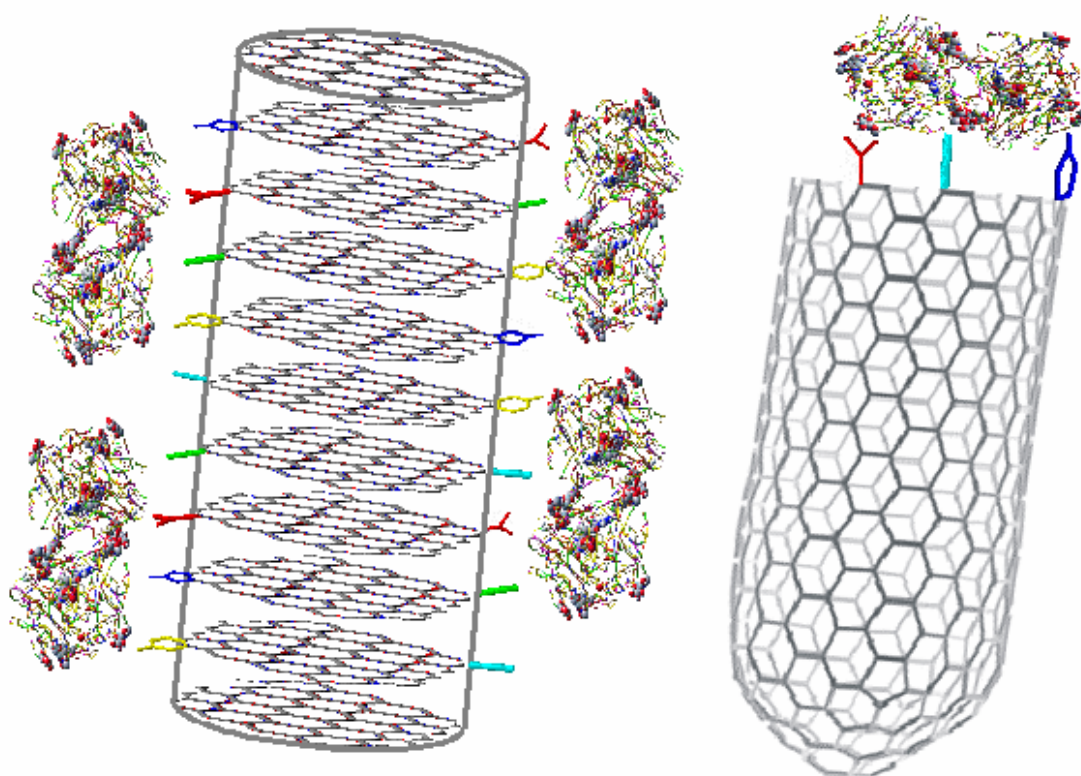
Οι νανοϊνες άνθρακα παρασκευάζονται συνήθως από τη διάσπαση-αποσύνθεση υδρογονανθράκων παρουσία μεταλλικών καταλυτών σε διάφορες θερμοκρασίες. Ο υδρογονάνθρακας προσροφάται στην επιφάνεια ενός μετάλλου και οι συνθήκες που επικρατούν ευνοούν τη διάσπαση των δεσμών C-C και τη διάχυση των ατόμων σε επιφάνειες με αποτέλεσμα τη σταδιακή ανάπτυξη των νανοϊνών άνθρακα.



Εικόνα 3. Εικόνες από Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (TEM) τριών διαφορετικών δομών νανοϊνών άνθρακα που παρασκευάστηκαν κατά τη διάσπαση-αποσύνθεση υδρογονανθράκων παρουσία μεταλλικών καταλυτών και η αντίστοιχη σχηματική αναπαράσταση της δομής των νανοϊνών άνθρακα. Α) Τα φύλλα γραφίτη έχουν τη μορφή ψαροκόκαλου, Β) Τα φύλλα γραφίτη είναι κάθετα ως προς τον άξονα της νανοϊνας και Γ) Τα φύλλα γραφίτη είναι παράλληλα ως προς τον άξονα της νανοϊνας.³¹

Ο βαθμός της κρυσταλλικής τελειότητας των εναποτιθέμενων ινών εξαρτάται από τη φύση του καταλύτη, από το αντιδρών αέριο που χρησιμοποιείται και από τη θερμοκρασία. Ανάλογα με τον προσανατολισμό των επιφανειών στη διεπιφάνεια του μετάλλου με τον άνθρακα, είναι δυνατό να αναπτυχθούν νανοϊνες που είτε αποτελούνται αποκλειστικά από φύλλα γραφίτη ή περιέχουν και μικρές ποσότητες άμορφου άνθρακα. Διάφορα μέταλλα ή συνδυασμός μετάλλων έχουν αξιολογηθεί ως καταλύτες για τη σύνθεση νανοϊνών άνθρακα. Τέτοια μέταλλα είναι ο σίδηρος, το

νικέλιο, ο χαλκός καθώς και κράματα αυτών των μετάλλων. Το κράμα σιδήρου-νικελίου έχει αποδειχτεί ότι είναι ο πιο αποτελεσματικός καταλύτης για την ανάπτυξη των νανοϊνών³². Συνήθως όταν χρησιμοποιούνται κράματα μετάλλων ως καταλύτες προκύπτουν δομές νανοϊνών άνθρακα που έχουν τη μορφή ψαροκόκαλου (Εικόνα 3Α). Εκτός από αυτή τη δομή διακρίνονται και δύο άλλες διαμορφώσεις νανοϊνών στις οποίες τα φύλλα γραφίτη είναι κάθετα ή παράλληλα ως προς τον άξονα της νανοϊνας (Εικόνα 3Β-Γ). Οι δομές αυτές προκύπτουν ανάλογα με το σχήμα του μετάλλου που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη των νανοϊνών άνθρακα. Το ποσοστό των μετάλλων στην τελική δομή των νανοϊνών άνθρακα είναι μικρότερο από 0.4% και είναι δυνατό να απομακρυνθεί με κατεργασία με οξέα ώστε να προκύψουν νανοΐνες μεγάλης καθαρότητας.



Εικόνα 4. Σχηματική αναπαράσταση της ακινητοποίησης του ενζύμου GOx σε νανοΐνες άνθρακα και σε μονο-κυλινδρικούς νανοσωλήνες άνθρακα. Οι νανοΐνες άνθρακα εμφανίζουν πολύ περισσότερες δραστικές ομάδες στην επιφάνεια τους.

Το πιο αξιοσημείωτο χαρακτηριστικό των νανοϊνών άνθρακα είναι ότι τα ελεύθερα άκρα καθενός από τα φύλλα γραφίτη είναι διαθέσιμα να αλληλεπιδρούν φυσικά ή χημικά με διάφορες ουσίες. Η δραστική επιφάνεια αυτών των καλά διατεταγμένων δομών είναι πολύ μεγάλη και κυμαίνεται από 300 έως 700 m²/g. Σε σύγκριση επομένως με τους νανοσωλήνες άνθρακα, οι νανοϊνες άνθρακα εμφανίζουν πολύ περισσότερες δραστικές ομάδες στην επιφάνειά τους ανά όγκο του υλικού (Εικόνα 4).

Οι δραστικές ομάδες που περιέχουν οξυγόνο στην επιφάνεια των νανοϊνών άνθρακα είναι ιδανικές για την ακινητοποίηση και σταθεροποίηση βιολογικών μορίων στην επιφάνεια των νανοϊνών. Επίσης ο αριθμός και ο τύπος των δραστικών ομάδων στην επιφάνεια των νανοϊνών άνθρακα μπορεί να ρυθμιστεί γεγονός που καθιστά δυνατή την επιλεκτική ακινητοποίηση και σταθεροποίηση βιολογικών μορίων όπως πρωτεϊνών, ενζύμων και DNA στην επιφάνεια τους. Τέλος οι νανοϊνες άνθρακα εμφανίζουν πολύ μεγάλη αγωγιμότητα και είναι ιδανικές για ηλεκτροχημική μετάλλαξη σήματος. Τα πλεονεκτήματα αυτά που εμφανίζουν οι νανοϊνες άνθρακα δεν έχουν αξιοποιηθεί μέχρι σήμερα για την ακινητοποίηση και σταθεροποίηση ενζύμων και την περαιτέρω ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Στη εργασία αυτή τρεις διαφορετικοί τύποι νανοϊνών άνθρακα χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων γλυκόζης. Οι φυσικοχημικές ιδιότητες των νανοϊνών άνθρακα και η δυνατότητα τους να ακινητοποιούν και να σταθεροποιούν το ένζυμο Οξειδάση της γλυκόζης εξετάζεται σε σύγκριση με αντίστοιχες μελέτες με μονο-κυλινδρικούς νανοσωλήνες άνθρακα και γραφίτη. Σύμφωνα με τα παραπάνω οι νανοϊνες άνθρακα αναμένεται να οδηγήσουν σε συστήματα βιοαισθητήρων με βελτιωμένα αναλυτικά χαρακτηριστικά και συγκεκριμένα με αυξημένη ευαισθησία και σταθερότητα σε σύγκριση με τους νανοσωλήνες άνθρακα και το γραφίτη.

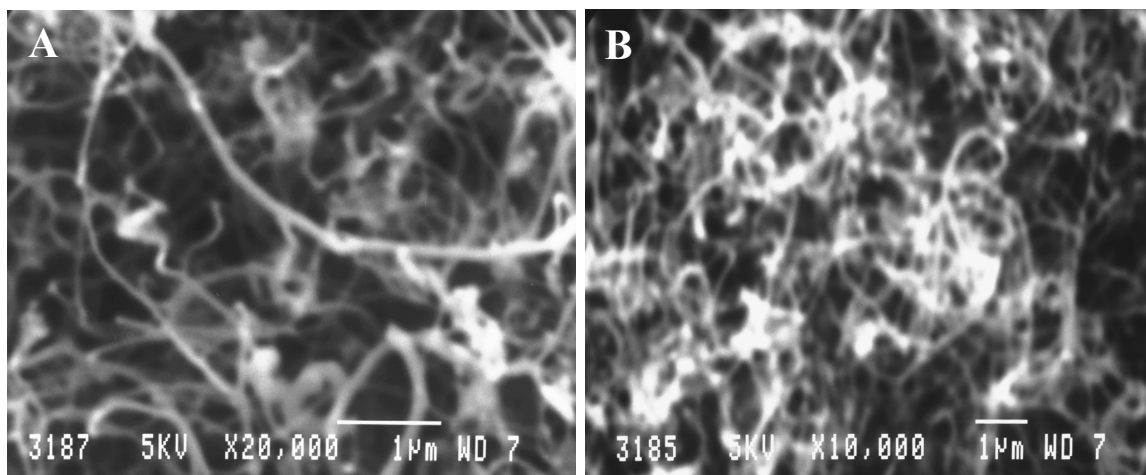
6.3 Μελέτη των Φυσικοχημικών Ιδιοτήτων των Νανοϊνών Άνθρακα

Οι νανοΐνες άνθρακα που μελετώνται σε αυτή την εργασία έχουν υποστεί διαφορετική θερμική κατεργασία κατά την παρασκευή τους, με αποτέλεσμα να εμφανίζουν διαφορετικά φυσικά χαρακτηριστικά. Στον Πίνακα 1 συνοψίζονται τα φυσικά χαρακτηριστικά των δειγμάτων LHT, HTE και GFE των νανοϊνών άνθρακα.

Πίνακας 1. Φυσικά Χαρακτηριστικά Νανοϊνών Άνθρακα

Νανοΐνες Άνθρακα	LHT	HTE	GFE
Διάμετρος (nm)	70-150	80-150	80-150
N ₂ Εμβαδό Επιφάνειας (m ² /g)	43	80-100	> 50
Πυκνότητα (g/cm ³)	> 1.95	1.98	2.17
Θερμική Κατεργασία (° C)	1000	1000	3000
Περιεκτικότητα Μετάλλου (wt. %)	< 0.50	< 0.50	< 0.01
Ηλεκτρική Αντίσταση (Ohm/cm)	< 10 ⁻³	< 10 ⁻³	< 10 ⁻³

Οι GFE νανοΐνες άνθρακα έχουν υποστεί θερμική κατεργασία στους 3000 °C (κατεργασία γραφίτη-graphitization process). Η κατεργασία αυτή σε τόσο υψηλή θερμοκρασία απουσία οξυγόνου, προκαλεί την απομάκρυνση-διαβρωτική χημική χάραξη (etching) των εξωτερικών επιφανειακών στρωμάτων των νανοϊνών άνθρακα. Έτσι δημιουργείται μία πριονωτή διαμόρφωση αντιστροφής (“reversing saw-toothed type” morphology) και τελικά σχηματίζονται καλά διατεταγμένες δομές με πολύ μικρή απόσταση μεταξύ των στρωμάτων γραφίτη^{28,33,34}. Εξαιτίας αυτής της διαδικασίας οι GFE νανοΐνες άνθρακα εμφανίζουν μεγαλύτερη πυκνότητα γραφίτη. Τα δύο άλλα δείγματα νανοϊνών άνθρακα LHT και HTE έχουν υποστεί θερμική κατεργασία στους 1000 °C και εμφανίζουν διαφορετικά χαρακτηριστικά επειδή η θερμική διαδικασία που εφαρμόζεται σε κάθε δείγμα είναι διαφορετική³⁵. Όλα τα δείγματα νανοϊνών άνθρακα έχουν παρόμοια πολύ μικρή ηλεκτρική ειδική αντίσταση. Παράλληλα η μέση διάμετρος τους είναι 110nm ενώ το μήκος τους κυμαίνεται στην τάξη των δεκάδων nm όπως φαίνεται στις εικόνες από Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (Εικόνα 5).



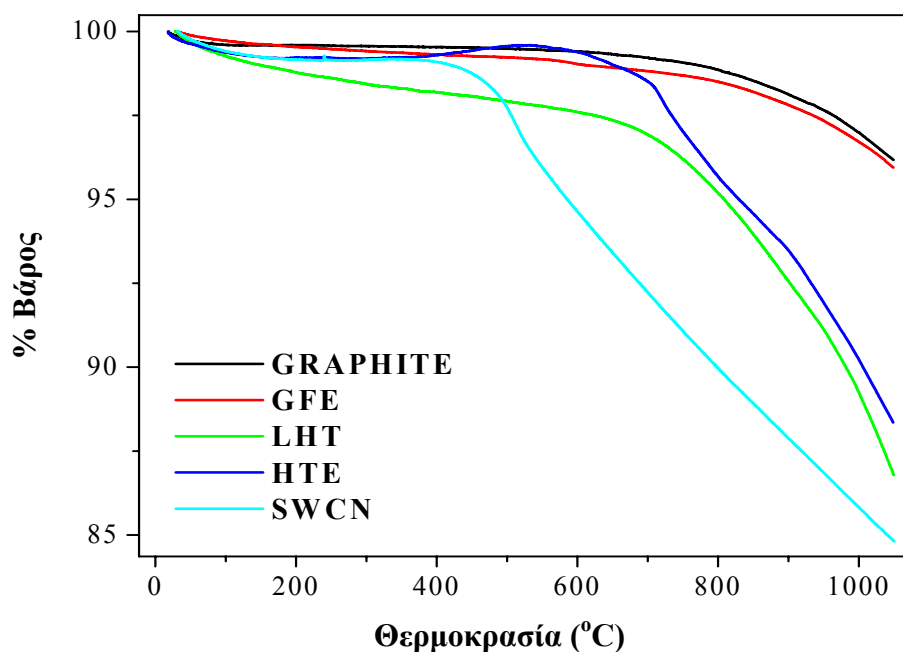
Εικόνα 5. Εικόνες από Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης (SEM) των νανοϊνών άνθρακα. Α) HTE και Β) LHT. Η μέση διάμετρος των νανοϊνών άνθρακα είναι 110nm ενώ το μήκος τους είναι της τάξης των δεκάδων nm.

Η πούδρα γραφίτη που χρησιμοποιείται σε αυτή την εργασία εμφανίζει μέγεθος σωματιδίων μικρότερο από 0.1mm, ενώ οι μονο-κυλινδρικοί νανοσωλήνες άνθρακα έχουν μέση διάμετρο 1.4nm και μήκος που κυμαίνεται από 2.0 έως 5.0μm.

Θερμοσταθμική Ανάλυση

Η θερμική αποσύνθεση των ανθρακικών υλικών που χρησιμοποιούνται σε αυτή την εργασία μελετάται ώστε να προσδιοριστεί η σταθερότητά τους. Κατά τη θερμοσταθμική ανάλυση κάθε δείγμα θερμαίνεται παρουσία αζώτου μεταξύ 30-1000 °C με ρυθμό 10 °C/min. Τα αποτελέσματα των θερμοσταθμικών αναλύσεων των ανθρακικών υλικών παρουσιάζονται στην Εικόνα 6. Ο γραφίτης και οι GFE νανοϊνες άνθρακα δεν παρουσιάζουν απώλεια βάρους για θερμοκρασίες μέχρι 800 °C ενώ καθώς η θερμοκρασία προσεγγίζει τους 1000 °C παρατηρείται πολύ μικρή απώλεια βάρους της τάξης του 3%. Αυτή η απώλεια βάρους κοντά στους 1000 °C μπορεί να αποδοθεί στην απομάκρυνση των οξυγονούχων λειτουργικών ομάδων από την επιφάνεια των νανοϊνών άνθρακα³⁶. Οι LHT νανοϊνες άνθρακα παρουσιάζουν μικρή απώλεια βάρους της τάξης των 3% για θερμοκρασίες μέχρι 800 °C και περαιτέρω μικρή απώλεια βάρους καθώς η θερμοκρασία προσεγγίζει τους 1000 °C. Η αρχική απώλεια βάρους οφείλεται στην εκρόφιση των μορίων νερού που έχουν χημειοροφηθεί στις LHT νανοϊνες και συγκρατούνται με χημικούς δεσμούς (chemisorbed water)³⁶. Οι HTE νανοϊνες άνθρακα δεν παρουσιάζουν απώλεια

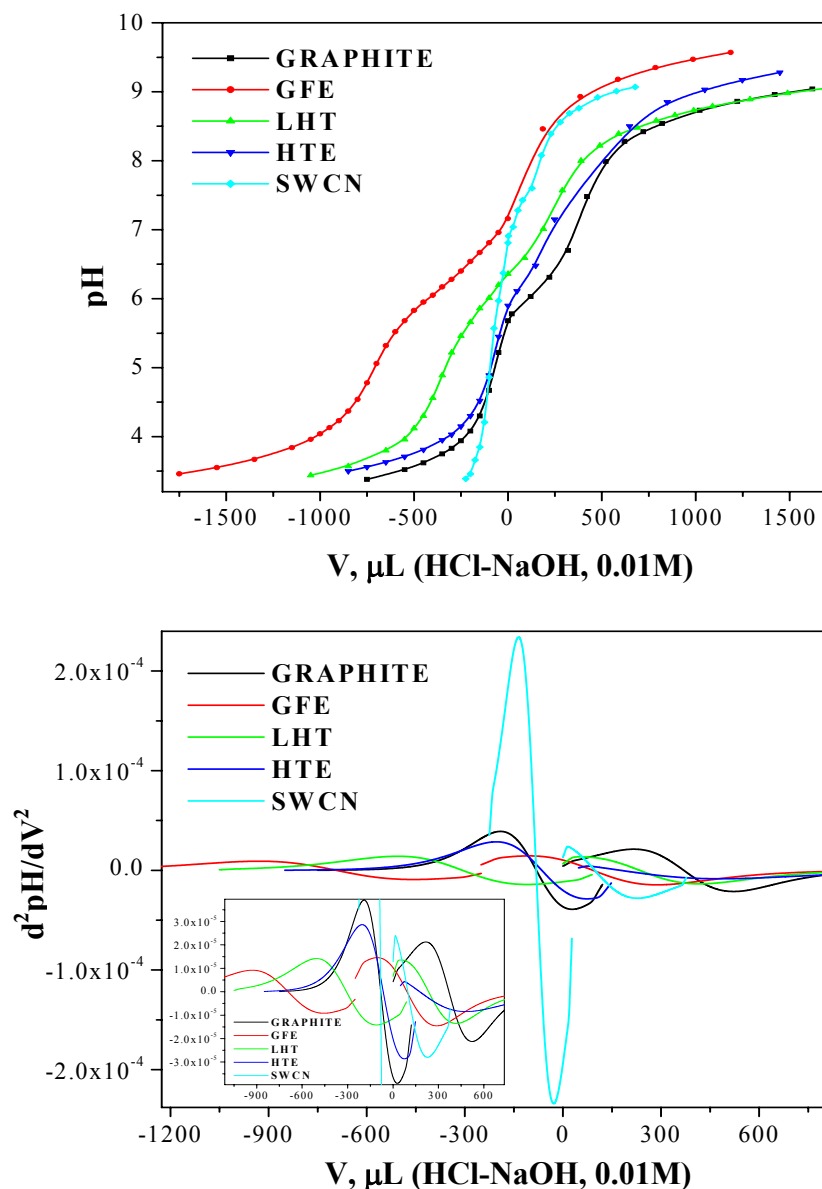
βάρους για θερμοκρασίες μέχρι 700 °C και μικρή απώλεια βάρους καθώς η θερμοκρασία προσεγγίζει τους 1000 °C. Η θερμική αποσύνθεση των μονοκυλινδρικών νανοσωλήνων άνθρακα ξεκινάει κοντά στους 450 °C και αυξάνεται σημαντικά με περαιτέρω αύξηση της θερμοκρασίας. Γίνεται επομένως αντιληπτό ότι οι GFE νανοϊνες άνθρακα είναι πιο ανθεκτικές στη θερμική κατεργασία σε σύγκριση με τις LHT νανοϊνες και τους νανοσωλήνες άνθρακα.



Εικόνα 6. Θερμοσταθμική ανάλυση των GFE, LHT και HTE νανοϊνών άνθρακα, του γραφίτη και των νανοσωλήνων άνθρακα.

Χαρακτηρισμός επιφανειακών ομάδων

Ο ποιοτικός και ποσοτικός προσδιορισμός των δραστικών ομάδων στην επιφάνεια των υλικών ακινητοποίησης είναι πολύ σημαντικός για τη σχεδίαση βιοαισθητήρων, καθώς οι ομάδες αυτές είναι υπεύθυνες για την ακινητοποίηση των πρωτεϊνών. Ωστόσο ο προσδιορισμός του τύπου και της συγκέντρωσης των δραστικών αυτών ομάδων είναι αρκετά δύσκολος. Για αυτό το λόγο συχνά εξετάζεται η όξινη (H^+) και η βασική (OH^-) ρυθμιστική ικανότητα των υλικών αυτών προκειμένου να προσδιοριστεί έμμεσα ο τύπος και η συγκέντρωση των επιφανειακών ομάδων¹². Ο όξινος χαρακτήρας των υλικών συνδέεται με την παρουσία λακτονών, καρβοξυλικών και φαινολικών ομάδων στην επιφάνεια του υλικού ενώ ο βασικός χαρακτήρας με την παρουσία πυρονών, αιθερικών και καρβονυλικών ομάδων.



Εικόνα 7. Α) Ποτενσιομετρικές καμπύλες τιτλοδότησης των νανοδομών άνθρακα και Β) αντίστοιχες καμπύλες της δεύτερης παραγώγου αυτών. Ένθετο: Μεγέθυνση των καμπυλών της δεύτερης παραγώγου.

Για τον προσδιορισμό των δραστικών ομάδων της επιφάνειας των νανοϊών άνθρακα, του γραφίτη και των νανοςωλήνων άνθρακα πραγματοποιείται τιτλοδότηση με ισχυρό οξύ και ισχυρή βάση ακολουθώντας μεθόδους που ήδη έχουν εφαρμοστεί σε ανθρακικά υλικά με κάποιες τροποποιήσεις^{37,38}. Οι νανοδομές άνθρακα κονιορτοποιούνται σε γουδί και 0.1gr από κάθε δείγμα τοποθετείται σε 50mL δις-απιονισμένου και απαερωμένου νερού. Το αιώρημα αναδεύεται για 24 ώρες και στη

συνέχεια πραγματοποιούνται προσθήκες διαλύματος ισχυρού οξέος (0.01M HCl) ή ισχυρής βάσης (0.01M NaOH) και μετράται το pH του αιωρήματος με ηλεκτρόδιο pH. Οι ποτενσιομετρικές καμπύλες τιτλοδότησης των νανοδομών άνθρακα και η δεύτερη παράγωγος αυτών απεικονίζονται στην Εικόνα 7. Από την ποσότητα HCl που απαιτείται για την τιτλοδότηση υπολογίζεται ο αριθμός των βασικών ομάδων των ανθρακικών υλικών και από την ποσότητα του NaOH ο αριθμός των όξινων ομάδων. Τα αποτελέσματα που προκύπτουν παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Ο γραφίτης, οι νανοσωλήνες άνθρακα και οι HTE νανοϊνες άνθρακα παρουσιάζουν μικρή συγκέντρωση επιφανειακών ομάδων βασικού χαρακτήρα. Αντίθετα, οι LHT νανοϊνες άνθρακα έχουν βασικού χαρακτήρα οξυγονούχες ομάδες συγκέντρωσης 6.1×10^{-5} mol/gr ενώ οι GFE νανοϊνες άνθρακα εμφανίζουν τη μεγαλύτερη συγκέντρωση ομάδων βασικού χαρακτήρα της τάξης των 1.4×10^{-4} mol/gr. Όσον αφορά τις επιφανειακές ομάδες όξινου χαρακτήρα, η συγκέντρωσή τους είναι πολύ μικρή στα δείγματα των νανοσωλήνων άνθρακα και των GFE νανοϊνών άνθρακα, ενώ στα υπόλοιπα ανθρακικά δείγματα η συγκέντρωσή τους αυξάνεται κατά την ακόλουθη σειρά, HTE < LHT < γραφίτης. Εφόσον οι επιφανειακές ομάδες βασικού χαρακτήρα των υλικών ακινητοποίησης είναι δυνατό να αλληλεπιδρούν με τις αρνητικά φορτισμένες ομάδες της επιφάνειας των πρωτεϊνών, αντιλαμβανόμαστε ότι στις GFE νανοϊνες άνθρακα αναμένεται να έχουμε τη βέλτιστη σταθεροποίηση πρωτεϊνών. Παράλληλα οι LHT νανοϊνες άνθρακα που εμφανίζουν σημαντική συγκέντρωση οξυγονούχων ομάδων στην επιφάνειά τους αναμένεται να είναι πολύ καλά υλικά για την ακινητοποίηση βιομορίων.

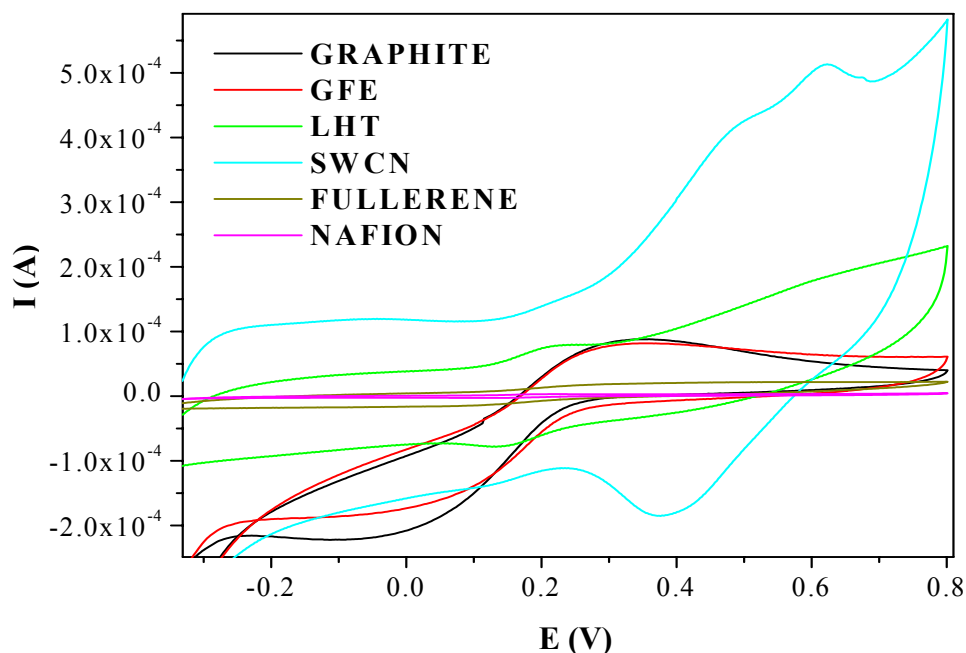
Πίνακας 2. HCl και NaOH που απαιτείται για την τιτλοδότηση διαλυμάτων των νανοδομών άνθρακα. Το πρώτο και δεύτερο ισοδύναμο σημείο υποδεικνύουν τον τύπο των δραστικών επιφανειακών ομάδων.

Νανοδομές Άνθρακα	$V_{\text{HCl}, 0.01\text{M}}$ (μL) βασικές ομάδες (mol/gr)	$V_{\text{NaOH}, 0.01\text{M}}$ (μL) όξινες ομάδες (mol/gr)	pH 1 ^{ου} ισοδύναμου σημείου	pH 2 ^{ου} ισοδύναμου σημείου
Γραφίτης	81 / 1.6×10^{-5}	370 / 7.4×10^{-5}	4.9	7.1
SWCN	81 / 1.6×10^{-5}	98 / 1.9×10^{-5}	5.4	7.5
GFE	693 / 1.4×10^{-4}	92 / 1.8×10^{-5}	5.1	7.8
LHT	307 / 6.1×10^{-5}	234 / 4.7×10^{-5}	5.2	7.3
HTE	64 / 1.3×10^{-5}	177 / 3.5×10^{-5}	5.3	6.7

Ηλεκτροχημικός Χαρακτηρισμός

Κυκλική Βολταμετρία

Οι ηλεκτροχημικές ιδιότητες των GFE και LHT νανοϊνών άνθρακα, των νανοσωλήνων, του γραφίτη και των φουλλερενίων μελετώνται λαμβάνοντας τα κυκλικά βολταμμογραφήματα των αντίστοιχων αισθητήρων. Κάθε δείγμα ανθρακικού υλικού αναμιγνύεται με 1% διάλυμα Nafion (25mg/mL) και 40μL του μίγματος τοποθετούνται στην επιφάνεια ηλεκτροδίων υαλώδους άνθρακα (d. 5.2mm). Μετά την εξάτμιση του διαλύτη προκύπτουν μεμβράνες στις οποίες έχουν ακινητοποιηθεί οι νανοδομές άνθρακα. Τα κυκλικά βολταμμογραφήματα που λαμβάνονται για κάθε αισθητήρα σε 5mM $K_4Fe(CN)_6$ και 0.1M KCl με ταχύτητα σάρωσης 20mV/s παρουσιάζονται στην Εικόνα 8. Το ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα που έχει καλυφθεί μόνο με Nafion μεμβράνη εμφανίζει πολύ μικρές ανοδικές και καθοδικές κορυφές, όπως άλλωστε αναμενόταν καθώς η μεμβράνη εμποδίζει τη διάχυση προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Όταν τα ανθρακικά υλικά εισέρχονται στη Nafion μεμβράνη παρατηρείται αύξηση των ανοδικών και καθοδικών κορυφών.



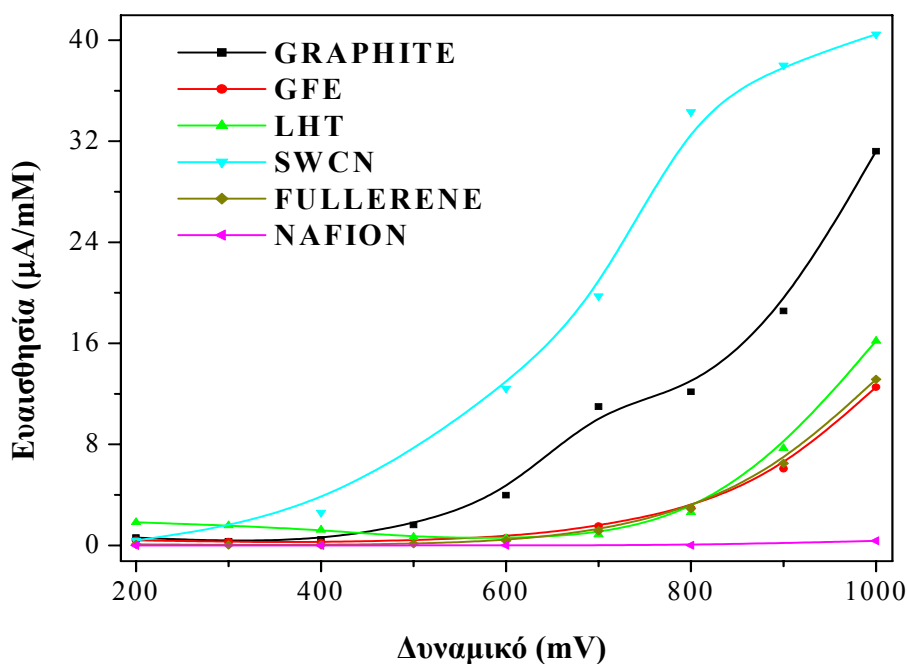
Εικόνα 8. Κυκλικά βολταμμογραφήματα των αισθητήρων των νανοδομών άνθρακα σε 5mM $K_4Fe(CN)_6$ και 0.1M KCl. Ταχύτητα σάρωσης 20mV/s.

Στην περίπτωση των αισθητήρων του γραφίτη, των φουλλερενίων και των GFE και LHT ναοϊνών άνθρακα, οι κορυφές οξειδωσης και αναγωγής είναι συμμετρικές γεγονός που αποδεικνύει ότι η αντίδραση οξειδοαναγωγής ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$) είναι αντιστρεπτή στα ηλεκτρόδια αυτά. Αντίθετα, οι μη συμμετρικές ανοδικές και καθοδικές κορυφές του αισθητήρα των ναοσωλήνων άνθρακα υποδεικνύουν τη μη αντιστρεπτή οξειδοαναγωγή στο υλικό αυτό. Ωστόσο οι ανοδικές και καθοδικές κορυφές του αισθητήρα των ναοσωλήνων άνθρακα είναι αρκετά υψηλότερες από αυτές των άλλων ναοδομών άνθρακα. Η διαφορά δυναμικού μεταξύ των κορυφών οξειδωσης και αναγωγής ($\Delta E_{\text{red-ox}}$) που συσχετίζεται άμεσα με το ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι πολύ μικρή για τον αισθητήρα LHT και αυξάνεται διαδοχικά για τους αισθητήρες των ναοσωλήνων άνθρακα, των φουλλερενίων, του γραφίτη και των GFE ναοϊνών άνθρακα.

Υδροδυναμικό Βολταμμογράφημα στο Υπεροξειδίο του Υδρογόνου

Η ικανότητα των ναοδομών άνθρακα να λειτουργούν ως μεταλλάκτες σήματος αξιολογείται εξετάζοντας την απόκριση των αντίστοιχων αισθητήρων στο υπεροξειδίο του υδρογόνου. Οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες με ένζυμα οξειδάσες, βασίζονται στην οξείδωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου που παράγεται κατά την ενζυμική αντίδραση, στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας. Η αμπερομετρική απόκριση των αισθητήρων υαλώδους άνθρακα τροποποιημένων με τις ναοδομές άνθρακα, στο υπεροξειδίο του υδρογόνου μετράται σε εύρος δυναμικών +0.2 V έως +1.0 V. Ο χρόνος απόκρισης των αισθητήρων είναι πολύ γρήγορος καθώς το ρεύμα αποκτά σταθερή τιμή μέσα σε 5s αμέσως μετά την προσθήκη του υπεροξειδίου. Στην Εικόνα 9 παρατίθενται τα Υδροδυναμικά Βολταμμογραφήματα όλων των αισθητήρων. Οι αισθητήρες υαλώδη άνθρακα που έχουν τροποποιηθεί με τις ναοδομές άνθρακα εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερα ανοδικά ρεύματα σε σύγκριση με τον αισθητήρα με τη Nafion μεμβράνη μόνο. Όπως φαίνεται ο αισθητήρας με τη Nafion μεμβράνη δεν παρουσιάζει σημαντική απόκριση στο υπεροξειδίο ακόμη και στα υψηλά δυναμικά. Αντίθετα όταν στις μεμβράνες εισάγονται ναοδομές άνθρακα η απόκριση στο υπεροξειδίο είναι μεγάλη σε όλο το εύρος των δυναμικών που εξετάζονται. Η απόκριση του αισθητήρα των ναοσωλήνων άνθρακα στο υπεροξειδίο είναι σημαντική ακόμα και στα 200mV και αυξάνεται σταδιακά με την

αύξηση του δυναμικού. Η ευαισθησία των αισθητήρων GFE, φουλλερενίων, LHT, γραφίτη και νανοσωλήνων άνθρακα στο υπεροξείδιο σε δυναμικό 0.9V είναι 6.1, 6.5, 7.7, 18.6 and 38.01 $\mu\text{A}/\text{mM}$ αντίστοιχα. Από τα αποτελέσματα αυτά διαπιστώνουμε ότι οι νανοσωλήνες άνθρακα είναι ο καταλληλότερος ηλεκτροχημικός μεταλλάκτης σήματος.



Εικόνα 9. Υδροδυναμικό βολταμμογράφημα των αισθητήρων των νανοδομών άνθρακα.

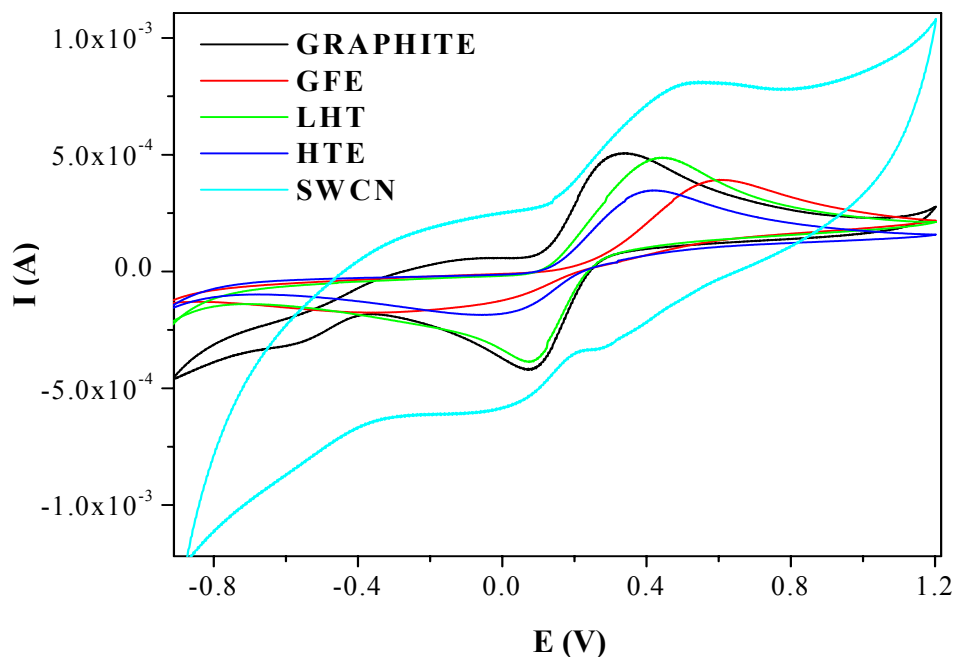
Ηλεκτροχημικός Χαρακτηρισμός Ηλεκτροδίων Πάστας των Νανοδομών Άνθρακα

Κατά την ακινητοποίηση των νανοδομών άνθρακα σε ηλεκτρόδια πλατίνας μέσω μίας Nafion μεμβράνης οι τιμές του ρεύματος που λαμβάνονται είναι πολύ μικρές και η ενεργή επιφάνεια του ηλεκτροδίου περιορίζεται στην ελάχιστη ποσότητα των νανοδομών που έχει ακινητοποιηθεί στο ηλεκτρόδιο. Προκειμένου να αυξηθεί η ενεργή επιφάνεια των αισθητήρων των νανοδομών άνθρακα ώστε να μελετηθεί η σταθεροποίηση ενζύμων στα υλικά αυτά, κατασκευάζονται ηλεκτρόδια πάστας. Η διαδικασία κατασκευής των ηλεκτροδίων πάστας είναι πολύ εύκολη και περιλαμβάνει απλά την ανάμιξη των νανοδομών άνθρακα με λάδι σιλικόνης. Το μίγμα στη συνέχεια τοποθετείται σε ηλεκτρόδιο, που κατασκευάζεται στο Εργαστήριο (Εικόνα 10).



Εικόνα 10. Ηλεκτρόδια πάστας των νανοδομών άνθρακα.

Οι αισθητήρες πάστας των νανοδομών άνθρακα αρχικά εξετάζονται με κυκλική βολταμετρία. Τα κυκλικά βολταμμογραφήματα λαμβάνονται σε 5mM $K_4Fe(CN)_6$ και 0.1M KCl με ταχύτητα σάρωσης 100mV/s (Εικόνα 11). Οι αισθητήρες του γραφίτη και των LHT νανοϊνών άνθρακα εμφανίζουν συμμετρικές κορυφές οξείδωσης και αναγωγής ενώ οι GFE και HTE αισθητήρες μη συμμετρικές κορυφές. Παράλληλα οι κορυφές οξείδωσης και αναγωγής για τους GFE και HTE αισθητήρες είναι πολύ χαμηλές σε σύγκριση με τους άλλους αισθητήρες. Τέλος η διαφορά δυναμικού μεταξύ των κορυφών οξείδωσης και αναγωγής (ΔE_{red-ox}) αυξάνεται διαδοχικά στους αισθητήρες γραφίτη, LHT, HTE και GFE. Από την παραπάνω ηλεκτροχημική μελέτη διαπιστώνουμε ότι οι νανοσωλήνες άνθρακα και οι GFE νανοϊνες άνθρακα δεν εμφανίζουν ιδανική συμπεριφορά για μεταλλάκτες σήματος. Ωστόσο για να επιβεβαιωθεί κάτι τέτοιο εξετάζεται η συμπεριφορά όλων των νανοδομών άνθρακα σε συστήματα βιοαισθητήρων.

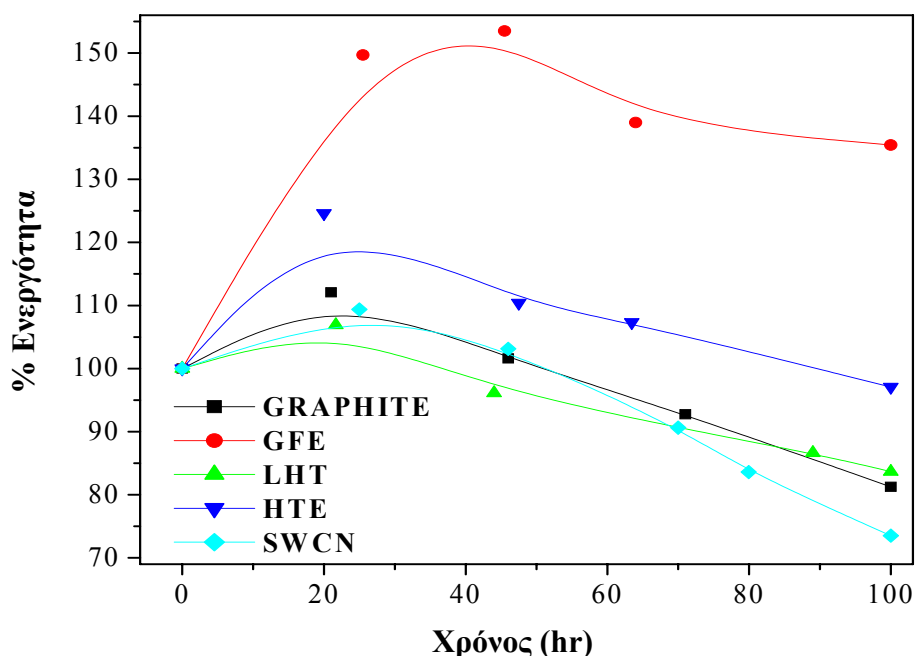


Εικόνα 11. Κυκλικά βολταμογραφήματα των αισθητήρων πάστας των νανοδομών άνθρακα σε 5mM $K_4Fe(CN)_6$ και 0.1M KCl. Ταχύτητα σάρωσης 100mV/s.

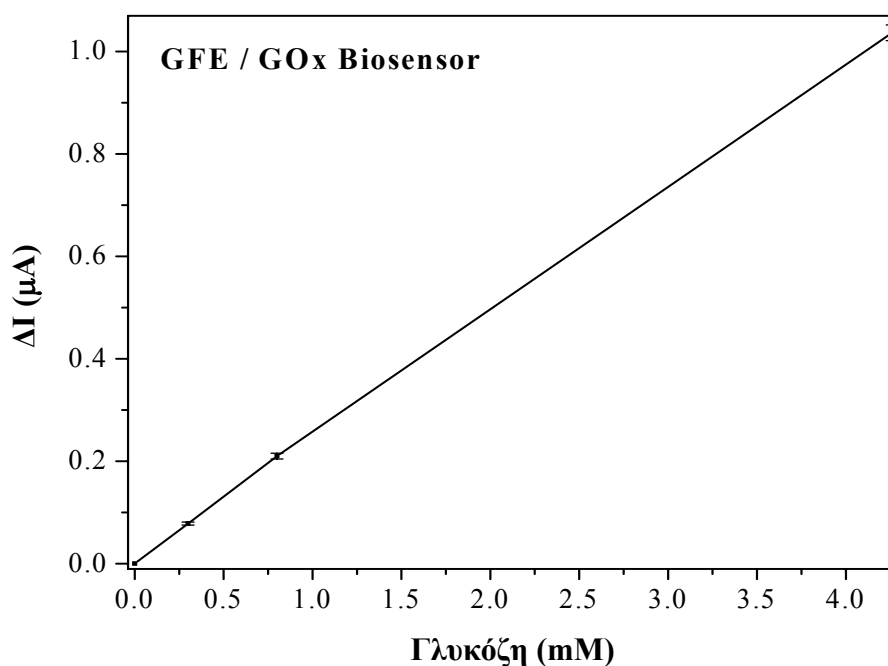
6.4 Σταθεροποίηση Οξειδάσης της Γλυκόζης σε Νανοδομές Άνθρακα

Η ακινητοποίηση και σταθεροποίηση ενζύμων στις νανοδομές άνθρακα εξετάζεται χρησιμοποιώντας το πρότυπο ένζυμο Οξειδάση της Γλυκόζης (GOx). Η ακινητοποίηση του ενζύμου στις GFE, LHT, HTE νανοϊνες άνθρακα, στους νανοσωλήνες άνθρακα και στο γραφίτη πραγματοποιείται με απλή προσρόφηση για 24h στους 4 °C. Η ποσότητα του ενζύμου που ακινητοποιείται σε κάθε δείγμα μετράται με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο Trinder³⁹. Προσδιορίζεται ότι το ακινητοποιημένο ένζυμο είναι 25, 19.5, 16, 14 και 5.5 Units/g για τα δείγματα γραφίτη, GFE, LHT, HTE και νανοσωλήνων άνθρακα αντίστοιχα. Κατασκευάζονται οι αντίστοιχοι βιοαισθητήρες πάστας με τις νανοδομές άνθρακα και μελετάται η σταθερότητα τους υπό συνθήκες συνεχούς λειτουργίας με δυναμικό εργασίας τα +600mV στους 25°C. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 12 μετά από 100h συνεχούς λειτουργίας ο βιοαισθητήρας με τις GFE νανοϊνες άνθρακα δεν παρουσιάζει μείωση στην ενεργότητα του. Η παρατηρούμενη άνοδος της ενεργότητας οφείλεται σε αλλαγές της τριτοταγούς δομής του ενζύμου στις νανοϊνες άνθρακα. Οι βιοαισθητήρες LHT και HTE εμφανίζουν ενεργότητα 97% και 83% αντίστοιχα μετά

από 100h συνεχούς λειτουργίας ενώ οι βιοαισθητήρες του γραφίτη και των νανοσωλήνων άνθρακα εμφανίζουν ενεργότητα 81% και 73% αντίστοιχα. Επομένως η GOx σταθεροποιείται πιο ισχυρά στις GFE νανοϊνες άνθρακα ενώ αρκετά ικανοποιητική είναι και η σταθεροποίηση της στις LHT νανοϊνες άνθρακα. Η επαναληψιμότητα μεταξύ των μετρήσεων των βιοαισθητήρων των νανοδομών άνθρακα είναι πολύ ικανοποιητική. Στην Εικόνα 13 παρουσιάζεται η καμπύλη βαθμονόμησης του GFE βιοαισθητήρα που προκύπτει μετά από διαδοχικές προσθήκες γλυκόζης. Οι μετρήσεις επαναλαμβάνονται τρεις φορές και η σχετική τυπική απόκλιση μεταξύ τους είναι μικρότερη από 1%.



Εικόνα 12. Σύγκριση της σταθερότητας υπό συνθήκες συνεχούς λειτουργίας των βιοαισθητήρων GOx με τις διαφορετικές νανοδομές άνθρακα.



Εικόνα 13. Καμπύλη βαθμονόμησης του GOx βιοαισθητήρα με GFE νανοϊνες άνθρακα (+600mV, 25 °C, N=3).

6.5 Συμπεράσματα

Σε αυτή την εργασία συγκρίνονται οι ηλεκτροχημικές ιδιότητες των νανοϊνών άνθρακα και των νανοσωλήνων άνθρακα και η ικανότητα τους να σταθεροποιούν ένζυμα. Όλες οι νανοδομές άνθρακα εμφανίζουν πολύ μεγάλη αγωγιμότητα και μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μεταλλάκτες σήματος και ως μεταφορείς ηλεκτρονίων σε συστήματα βιοαισθητήρων. Βέβαια εξαιτίας των διαφορετικών χαρακτηριστικών που εμφανίζουν κάθε μία από τις νανοδομές άνθρακα που εξετάζεται υπερτερεί ή μειονεκτεί έναντι των άλλων ανάλογα με το σκοπό που χρησιμοποιείται. Έτσι ενώ οι νανοσωλήνες άνθρακα μπορεί να εμφανίζουν χαμηλό υπερδυναμικό για την οξείδωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, παρουσιάζουν πολύ μεγάλο ρεύμα υποβάθρου. Από την άλλη οι νανοϊνες άνθρακα εμφανίζουν υψηλό υπερδυναμικό για την οξείδωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου και χαμηλό ρεύμα υποβάθρου. Παράλληλα οι νανοϊνες άνθρακα παρουσιάζουν μεγαλύτερη θερμική σταθερότητα γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε πιο σταθερούς και ευαίσθητους βιοαισθητήρες. Όσον αφορά την αλληλεπίδραση των νανοδομών άνθρακα με τα ένζυμα, διαπιστώνουμε ότι οι νανοϊνες άνθρακα έχουν πολύ

μεγαλύτερη επιφάνεια επαφής και μεγαλύτερο αριθμό δραστικών ομάδων στην επιφάνεια τους σε σύγκριση με τους νανοσωλήνες άνθρακα. Έτσι μεγαλύτερες ποσότητες ενζύμου μπορούν ακινητοποιηθούν στην επιφάνεια των νανοϊνών άνθρακα. Παράλληλα τα ένζυμα σταθεροποιούνται πιο ισχυρά στις νανοϊνες άνθρακα όπως προκύπτει από την εξέταση της σταθερότητας των αντίστοιχων βιοαισθητήρων GOx. Μέγιστη σταθεροποίηση του ενζύμου GOx παρατηρείται στο βιοαισθητήρα με τις GFE νανοϊνες άνθρακα, γεγονός που μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία περισσότερων δραστικών ομάδων στην επιφάνεια των GFE νανοϊνών λόγω της οδοντωτής δομής που αποκτούν κατά τη θερμική κατεργασία τους.

Διαπιστώνουμε επομένως από όλα τα παραπάνω, ότι οι νανοϊνες άνθρακα αποτελούν άριστα υλικά για την ακινητοποίηση και σταθεροποίηση ενζύμων και άρα για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων με βελτιωμένα αναλυτικά χαρακτηριστικά. Η μελέτη αυτή αποτελεί την πρώτη προσέγγιση των δυνατοτήτων εφαρμογής των νανοϊνών άνθρακα για την ακινητοποίηση βιολογικών μορίων και την ανάπτυξη βιοαισθητήρων.

6.6 Βιβλιογραφία

1. Kroto H.W., Heath J.R., O'Brien S.C., Curl R.F., Smalley R.E., C₆₀: Buckminsterfullerene. Nature 1985, 318, 162.
2. Iijima S., Helical microtubules of graphitic carbon. Nature 1991, 354, 56.
3. Rodriguez N.M., Kim M.S., Baker R.T.K., Carbon Nanofibers: A Unique Catalyst Support Medium. J. Phys. Chem. 1994, 98, 13108.
4. McKnight T.E., Melechko A.V., Guillorn M.A., Merkulov V.I., Doktycz M.J., Culbertson, C.T., Jacobson S.C., Lowndes D.H., Simpson M.L., Effects of Microfabrication Processing on the Electrochemistry of Carbon Nanofiber Electrodes. J. Phys. Chem. B 2003, 107, 10722.
5. McKnight T.E., Melechko A.V., Hensley D.K., Mann D.G.J., Griffin G.D., Simpson M.L., Tracking Gene Expression after DNA Delivery Using Spatially Indexed Nanofiber Arrays. Nano Lett. 2004, 4, 1213.
6. Baker S.E., Tse K.Y., Hindin E., Nichols B.M., Lasseter Clare T., Hamers R.J., Covalent Functionalization for Biomolecular Recognition on Vertically Aligned Carbon Nanofibers. Chem. Mater. 2005, 17, 4971.

7. Rzepka M., Bauer E., Reichenauer G., Schliermann T., Bernhardt B., Bohmhammel K., Henneberg E., Knoll U., Maneck H.E., Braue W., Hydrogen Storage Capacity of Catalytically Grown Carbon Nanofibers. *J. Phys. Chem. B* 2005, 109, 14979.
8. Bekyarova E., Kaneko K., Yudasaka M., Murata K., Kasuya D., Iijima S., Micropore Development and Structure Rearrangement of Single-Wall Carbon Nanohorn Assemblies by Compression. *Adv. Mater.* 2002, 14, 973.
9. Fan J., Yudasaka M., Miyawaki J., Ajima K., Murata K., Iijima S., Control of Hole Opening in Single-Wall Carbon Nanotubes and Single-Wall Carbon Nanohorns Using Oxygen. *J. Phys. Chem. B* 2006, 110, 1587.
10. Sotiropoulou S., Gavalas V., Vamvakaki V., Chaniotakis N.A., Novel carbon materials in biosensor systems. *Biosens. Bioelectron.* 2003, 18, 211.
11. Joo S.H., Choi S.J., Oh I., Kwak J., Liu Z., Terasaki O., Ryoo R., Ordered nanoporous arrays of carbon supporting high dispersions of platinum nanoparticles. *Nature* 2001, 412, 169.
12. Kinoshita K., Carbon: Electrochemical and physicochemical characteristics. Wiley & Sons. New York, 1988.
13. Campbell S.E., Luengo G., Srdanov V.I., Wudl F., Israelachvili J. N., Very low viscosity at the solid-liquid interface induced by adsorbed C₆₀ monolayers. *Nature* 1996, 382, 520.
14. Stephens P.W., Mihaly L., Lee P.L., Whetten R.L., Huang S.M., Kane R., Deiderich F., Holczer K., Structure of single-phase superconducting K₃C₆₀. *Nature* 1991, 351, 632.
15. Haufler R.E., Conceicao J., Chibante L.P.F., Chai Y., Byrne N.E., Flanagan S., Haley M.M., O'Brien S.C., Pan C., Efficient production of C₆₀ (buckminsterfullerene), C₆₀H₃₆, and the solvated buckide ion. *J. Phys. Chem.* 1990, 94, 8634.
16. Guldi D.M., Fullerenes: three dimensional electron acceptor materials. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 2000, 321.
17. Terrones M., Hsu W.K., Kroto H.W., Walton D.R.M., Nanotubes: A revolution in materials science and electronics. *Top. Curr. Chem.* 1999, 199, 189.
18. Dai H., Carbon nanotubes: Opportunities and challenges. *Surf. Sci.* 2001, 500, 218.

19. Che G., Lakshmi B.B., Fisher E.R., Martin C.R., Carbon nanotubule membranes for electrochemical energy storage and production. *Nature* 1998, 393, 346.
20. Wong S., Harper J.D., Lansbury P.T., Lieber C.M., Carbon nanotube tips: High resolution probes for imaging biological systems. *J. Am. Chem. Soc.* 1998, 120, 603.
21. Kong J., Franklin R.N., Zhou C., Chapline M.G., Peng S., Cho K., Dai H., Nanotube molecular wires as chemical sensors. *Science* 2000, 287, 6226.
22. Avouris P., Molecular electronics with carbon nanotubes. *Acc. Chem. Res.* 2002, 35, 1026.
23. Martel R., Schmidt T., Shea H.R., Hertel T., Avouris P., Single- and Multi-wall carbon nanotube field effect transistors. *Appl. Phys. Lett.* 1998, 73, 17, 2447.
24. Sotiropoulou S., Chaniotakis N.A., Carbon nanotube array-based biosensor. *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, 375, 103.
25. Odom T.W., Huang J.L., Kim P., Lieber C.M., Structure and electronic properties of carbon nanotubes. *J. Phys. Chem. B* 2000, 104, 2794.
26. Azamian B.R., Coleman K.S., Davis J.J., Hanson N., Green M.L.H., Directly observed covalent coupling of quantum dots to single-wall carbon nanotubes. *J. Chem. Soc. Chem. Commun.* 2002, 4, 366.
27. Hirsch A., Functionalization of Single-Walled Carbon Nanotubes. *Angew. Chem. Intern. Ed.* 2002, 41, 1853.
28. Endo M., Kim Y.A., Fukai T., Hayashi T., Oshida K., Terrones M., Yanagisawa T., Higaki S., Dresselhaus M.S., Structural characterization of cup-stacked-type nanofibers with an entirely hollow core. *Appl. Phys. Lett.* 2002, 80, 1267.
29. Merkulov V.I., Hensley D.H., Melechko A.V., Guillorn M.A., Lowndes D.H., Simpson M.L., Control Mechanisms for the Growth of Isolated Vertically Aligned Carbon Nanofibers. *J. Phys. Chem. B* 2002, 106, 10570.
30. Dzenis Y., Spinning Continuous Fibers for Nanotechnology. *Science* 2004, 304, 1917.
31. Rodriguez N.M., Chambers A., Baker R.T.K., Catalytic engineering of carbon nanostructures. *Langmuir* 1995, 11, 3862.
32. Krishnankutty N., Rodriguez N.M., Baker R.T.K., Effect of Copper on the Decomposition of Ethylene over an Iron Catalyst. *J. Catal.* 1996, 158, 217.

33. Ci L., Zhu H., Wei B., Xu C., Liang J., Wu D., Graphitization behavior of carbon nanofibers prepared by the floating catalyst method. *Mater. Lett.* 2000, 43, 291.
34. Beechem T., Lafdi K., Novel high strength graphitic foams. *Carbon* 2006, 44, 1548.
35. Προσωπική επικοινωνία με τους κατασκευαστές
36. Park C., Anderson P.E., Chambers A., Tan C.D., Hidalgo R., Rodriguez N.M., Further studies of the interaction of hydrogen with graphite nanofibers. *J. Phys. Chem. B* 1999, 103, 10572.
37. Barton S.S., Evans M.J.B., Halliop E., MacDonald J.A.F., Acidic and basic sites in the surface of porous carbon. *Carbon* 1997, 35, 1361.
38. Lopez-Ramon M.V., Stoeckli F., Moreno-Castilla C., Carrasco-Marin F., On the characterization of acidic and basic surface sites on carbons by various techniques. *Carbon* 1999, 37, 1215.
39. Appleton B., Gibson T.D., Woodward J.R., High temperature stabilisation of immobilised glucose oxidase: potential applications in biosensors. *Sens. Actuat. B* 1997, 43, 65.

7. ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΑΚΕΤΥΛΟΧΟΛΙΝΕΣΤΕΡΑΣΗΣ ΣΕ ΛΙΠΟΣΩΜΑΤΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΟΠΤΙΚΟΥ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΠΑΡΑΣΙΤΟΚΤΟΝΩΝ

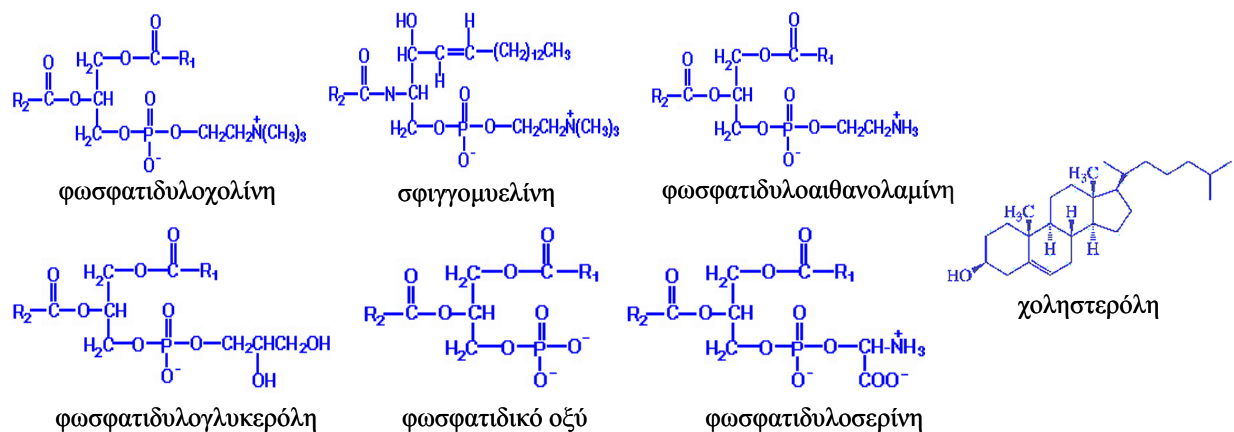
7.1 Λιποσώματα

Τα λιπίδια εμφανίζουν αμφίφιλο χαρακτήρα καθώς αποτελούνται από ένα τμήμα που διαλύεται σε πολικούς διαλύτες και ένα δεύτερο που διαλύεται σε μη πολικούς διαλύτες. Η ιδιότητα τους αυτή προάγει την αυθόρμητη συνάθροιση τους σε ποικίλες μικροδομές όταν αυτά βρεθούν σε υδατικό περιβάλλον¹. Το σχήμα και το μέγεθος των διαφορετικών μικροδομών που σχηματίζονται εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη γεωμετρία των λιπιδίων.

Μία τέτοια μικροδομή αποτελούν τα λιποσώματα. Πρόκειται για σφαιρικά κυστίδια που αποτελούνται από λιπιδικές διπλοστοιβάδες οι οποίες περιβάλλουν-εγκλωβίζουν υδατικό διάλυμα στο εσωτερικό τους. Τα λιποσώματα αποτελούνται από μία μόνο λιπιδική διπλοστοιβάδα που περιβάλλει τον υδατικό πυρήνα (unilamellar) ή από μερικές διπλοστοιβάδες που περιβάλλουν ομοκεντρικά τον υδατικό πυρήνα (multilamellar)². Στη λιπιδική διπλοστοιβάδα οι υδρόφοβες ουρές των λιπιδίων προσανατολίζονται προς το εσωτερικό της μεμβράνης ενώ οι υδρόφιλες κεφαλές προς το υδατικό περιβάλλον στο εσωτερικό και εξωτερικό της μεμβράνης.

Τα λιποσώματα παρασκευάζονται πολύ εύκολα και είναι σταθερά σε διάλυμα για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να μεταβάλλεται το μέγεθος τους ή η δομή τους³. Το μέγεθος και οι ιδιότητες των λιποσωμάτων εξαρτώνται από το πρωτόκολλο παρασκευής τους και τα συστατικά της διπλοστοιβάδας². Το μέγεθος τους κυμαίνεται από πολύ μικρά διαμέτρου 20nm έως πολύ μεγάλα διαμέτρου 10μm. Το πρωτόκολλο παρασκευής των λιποσωμάτων καθορίζει αν θα προκύψουν ομογενή ή ετερογενή εναιωρήματα λιποσωμάτων και ανάλογα με την ενδεχόμενη εφαρμογή τους επιλέγεται και η καταλληλότερη μέθοδος παρασκευής λιποσωμάτων. Υπάρχουν πολλές μέθοδοι παρασκευής λιποσωμάτων οι οποίες διαφέρουν ως προς την αρχική μορφή των λιπιδίων που χρησιμοποιούνται στη διαδικασία παρασκευής. Τα λιπίδια μπορεί να είναι σε ξηρή μορφή μεμβράνης (dry lipid film), ή σε μορφή γαλακτώματος σε άπολο διαλύτη, ή παρουσία ενός απορρυπαντικού που σχηματίζει μικκύλια, ή σε ένα μη-υδατικό διαλύτη και αναμιγνύονται στη συνέχεια με ένα υδατικό διαλύτη. Η επιλογή των συστατικών της διπλοστοιβάδας καθορίζει την

ακαμψία και το φορτίο των λιποσωμάτων. Έτσι μπορούμε να έχουμε ουδέτερα ή φορτισμένα λιποσώματα ανάλογα με το φορτίο των φωσφολιπιδίων που χρησιμοποιούνται, ενώ η μεμβράνη μπορεί να είναι ρευστή ή άκαμπτη. Ουδέτερα φωσφολιπίδια είναι η σφιγγομυελίνη και η φωσφατιδυλο-αιθανολαμίνη. Το πιο γνωστό όμως φωσφολιπίδιο είναι η φωσφατιδυλοχολίνη (λεκιθίνη) που χρησιμοποιείται ευρέως λόγω του μικρού της κόστους και του ουδέτερου φορτίου της. Η φωσφατιδυλοχολίνη που συναντάται στη φύση αποτελεί μίγμα φωσφολιπιδίων με αλυσίδα που διαφέρει ως προς το μήκος και το βαθμό ακορεστότητας¹ (Εικόνα 1). Τα κορεσμένα φωσφολιπίδια με μακριές άκυλο-αλυσίδες όπως η διπαλμιτόυλο-φωσφατιδυλοχολίνη σχηματίζουν άκαμπτες, μη διαπερατές διπλοστοιβάδες, ενώ από την ακόρεστη φωσφατιδυλοχολίνη (από φυσικές πηγές όπως αυγά ή σόγια) προκύπτουν διαπερατές και σχετικά ασταθείς διπλοστοιβάδες. Αρνητικά φορτισμένα φωσφολιπίδια είναι η φωσφατιδυλο-γλυκερόλη, το φωσφατιδικό οξύ και η φωσφατιδυλοσερίνη. Η χοληστερόλη αποτελεί ένα άλλο σημαντικό συστατικό των βιολογικών μεμβρανών καθώς παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της διαπερατότητας και της ρευστότητας της μεμβράνης.



Εικόνα 1. Δομές φωσφολιπιδίων.

Η δυνατότητα ελέγχου των φυσικοχημικών ιδιοτήτων των λιποσωμάτων καθώς και η βιοσυμβατότητά τους τα καθιστούν κατάλληλα για πολλαπλές εφαρμογές². Τα λιποσώματα δημιουργούνται παρόμοια με τις βιολογικές μεμβράνες και για αυτό συχνά χρησιμοποιούνται ως μοντέλα κυτταρικών μεμβρανικών συστημάτων. Παράλληλα έχουν την ικανότητα να εγκλωβίζουν διάφορες ενεργές λιπόφιλες ή

υδρόφιλες ουσίες (π.χ. φάρμακα, αντιγόνα) και να τις προστατεύουν από πιθανή αποικοδόμηση. Επίσης μπορούν να κατευθύνουν τις ουσίες αυτές σε καθορισμένα σημεία-στόχους και στη συνέχεια να τις ελευθερώνουν κάτω από συγκεκριμένες χημικές ή φυσικές συνθήκες. Λόγω των ιδιοτήτων τους αυτών τα λιποσώματα συναντώνται ευρύτατα σε συστήματα μεταφοράς φαρμάκων⁴, στη γονιδιακή θεραπεία και στη βιομηχανία καλλυντικών ως συστατικά σε κρέμες και λοσιόν.

Τα λιποσώματα όμως χρησιμοποιούνται επιτυχώς και ως μέσα ακινητοποίησης και σταθεροποίησης πρωτεϊνών και ενζύμων. Τα ένζυμα όταν εισέρχονται στο εσωτερικό των λιποσωμάτων παραμένουν ελεύθερα μέσα σε ένα περιορισμένο χώρο χωρίς να μεταβάλλεται η διαμόρφωσή τους. Μάλιστα το μικροπεριβάλλον μέσα στο οποίο βρίσκονται είναι αρκετά βιοσυμβατό καθώς είναι παρόμοιο με αυτό εντός των βιολογικών κυτταρικών μεμβρανών. Οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ενζύμων και της μεμβράνης του λιποσώματος σταθεροποιούν τη διαμόρφωση των ενζύμων⁵. Επιπλέον τα ενθυλακωμένα ένζυμα προστατεύονται από προσβολή από εξωτερικούς παράγοντες (πρωτεάσες)⁶. Κατά την ενθυλάκωση μικρής συγκέντρωσης του ενζύμου ακετυλχολινεστεράση σε λιποσώματα παρατηρήθηκε ότι το ένζυμο είναι πολύ πιο σταθερό από ότι όταν είναι ελεύθερο σε διάλυμα⁷. Παράλληλα όμως πολλά άλλα ένζυμα έχει αποδειχτεί ότι σταθεροποιούνται κατά την ενθυλάκωση τους μέσα σε λιποσώματα². Η παρουσία των λιποσωμάτων μάλιστα, πολλές φορές μπορεί να συμβάλλει στην επαναδιάταξη ενζύμων που έχουν αποδιαταχτεί⁸. Διαπιστώνουμε λοιπόν ότι η ενθυλάκωση ενζύμων μέσα σε λιποσώματα δίνει τη δυνατότητα στα ένζυμα να βρίσκονται σε ένα περιβάλλον που μοιάζει αρκετά με το φυσικό τους περιβάλλον.

Οι ιδιότητες αυτές των λιποσωμάτων τα καθιστούν κατάλληλα υλικά για τη σχεδίαση και ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Στη βιβλιογραφία ελάχιστες αναφορές συναντώνται όσον αφορά τη σχεδίαση ενζυμικών βιοαισθητήρων βασιζόμενων σε λιποσώματα. Αρχικές προσπάθειες για την ανάπτυξη ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων πραγματοποιήθηκαν με την ακινητοποίηση της Οξειδάσης της γλυκόζης ενθυλακωμένης σε λιποσώματα, σε ηλεκτρόδια οξυγόνου και την ανίχνευση του παραγόμενου υπεροξειδίου του υδρογόνου κατά την προσθήκη D-γλυκόζης⁹. Ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία αναπτύχθηκαν αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες στους οποίους εκτός από την Οξειδάση της γλυκόζης ήταν ακινητοποιημένες στο εσωτερικό των λιποσωμάτων η Υπεροξειδάση *Horseradish* ή η

Υπεροξειδάση της Λακτόζης (Lactoperoxidase)¹⁰. Παράλληλα αναπτύχθηκαν αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες όπου τα λιποσώματα με ενθυλακωμένη την Οξειδάση της γλυκόζης ακινητοποιήθηκαν είτε σε ηλεκτρόδια πλατίνας μέσω πολυμερικών μεμβρανών είτε σε ηλεκτρόδια μεταξοτυπίας¹¹. Το γραμμικό εύρος των βιοαισθητήρων και στις δύο περιπτώσεις ήταν πολύ μεγαλύτερο από το αντίστοιχο χωρίς την παρουσία των λιποσωμάτων. Ταυτόχρονα αναπτύχθηκε ένας βιοαισθητήρας β-λακταμάσης που βασίστηκε στη μέθοδο της ιωδομετρίας¹². Το ένζυμο ενθυλακώθηκε σε λιποσώματα και η εισαγωγή του υποστρώματος αμικιλίνη στο εσωτερικό των λιποσωμάτων μέσω πορινών (που βρίσκονται στη μεμβράνη του λιποσώματος και λειτουργούν ως κανάλια), είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή αμικιλινικού οξέος. Το παραγόμενο οξύ ανήγαγε το ιώδιο I₂ σε ιωδίδιο Γ και παρατηρήθηκε ο αποχρωματισμός του συμπλόκου αμύλου-ιωδίου. Τέλος παρασκευάστηκε ένας βιοαισθητήρας ακετυλοχολινεστεράσης, όπου το ένζυμο ήταν ενθυλακωμένο στο εσωτερικό λιποσωμάτων και το υπόστρωμα οξικός ο-νιτροφαινυλοεστέρας διαπερνούσε τη μεμβράνη του λιποσώματος και παρατηρούνταν αύξηση στην ένταση της απορρόφησης λόγω της παραγωγής του προϊόντος ο-νιτροφαινόλη (410nm) κατά την ενζυμική αντίδραση.

Στην εργασία αυτή βασίζομενοι στο γεγονός ότι τα λιποσώματα είναι οπτικά διαφανή^{13,14} αναπτύσσεται ένας οπτικός βιοαισθητήρας ακετυλοχολινεστεράσης που βασίζεται σε λιποσώματα, για την ανίχνευση παρασιτοκτόνων.

7.2 Βιοαισθητήρες Ακετυλοχολινεστεράσης για την ανίχνευση παρασιτοκτόνων

Η εκτεταμένη χρήση παρασιτοκτόνων τα τελευταία χρόνια και η επίδραση τους στο περιβάλλον σε παγκόσμια κλίμακα απασχολεί πολύ τα κοινά. Τα παρασιτοκτόνα χρησιμοποιούνται ευρέως σε γεωργικές και βιομηχανικές διαδικασίες καθώς και για τον έλεγχο των ζιζανίων (pest control) για την προστασία της δημόσιας υγείας¹⁵. Το πιο διαδεδομένο είδος παρασιτοκτόνων είναι τα οργανοφωσφορικά λόγω της αποτελεσματικότητάς τους στην καταπολέμηση των εντόμων και του μικρού χρόνου ζωής τους στο περιβάλλον κάτω από φυσικές συνθήκες υγρασίας και θερμοκρασίας. Τα οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα εμφανίζουν πολύ υψηλή τοξικότητα και είναι επιβλαβή στην ανθρώπινη υγεία ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Μικρές ποσότητες αυτών των παρασιτοκτόνων επιδρούν στο κεντρικό νευρικό σύστημα και

συμβάλλουν σε καρκινογένεσεις, σε ανωμαλίες στην ανάπτυξη των οστών, σε αναπνευστικά, μυοκαρδιακά και νευρομυϊκά προβλήματα, που μπορούν να οδηγήσουν ακόμα και στο θάνατο. Η ευρεία χρήση των οργανοφωσφορικών παρασιτοκτόνων έχει ως αποτέλεσμα να συναντώνται στα εδάφη, στην ατμόσφαιρα, στα γεωργικά προϊόντα καθώς και στα υπόγεια και επιφανειακά ύδατα. Από τα παραπάνω διαπιστώνουμε ότι είναι επιτακτική η ανάγκη ανίχνευσης των ουσιών αυτών σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις τόσο στα τρόφιμα όσο και στο πόσιμο νερό.

Συνήθως η ανίχνευση παρασιτοκτόνων πραγματοποιείται με αναλυτικές μεθόδους μεγάλης ακρίβειας όπως είναι η αέρια χρωματογραφία (GC)¹⁶ και η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)¹⁷, συζευγμένες με διάφορους ανιχνευτές^{18,19}. Οι μέθοδοι αυτές παρόλο που εμφανίζουν μεγάλη ευαισθησία (της τάξης των ng/l) και ακρίβεια, έχουν πολύ μεγάλο κόστος, είναι χρονοβόρες, απαιτούν συνήθως προκατεργασία του δείγματος καθώς και την παρουσία άριστα καταρτισμένου τεχνικού προσωπικού και δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μετρήσεις πεδίου. Πολύ πιο απλά και καινοτόμα συστήματα βιοαισθητήρων που βασίζονται στο ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση έχουν αναπτυχθεί για την ανίχνευση παρασιτοκτόνων^{20,21,22}. Τα συστήματα αυτά είναι πολύ ευαίσθητα, με χαμηλό κόστος, εύκολα στη χρήση, φορητά και ικανά να παρέχουν αξιόπιστες αναλυτικές μετρήσεις για τη συνεχή παρακολούθηση των παρασιτοκτόνων.

Ακετυλοχολινεστεράσες από διαφορετικές πηγές καθώς και γενετικά τροποποιημένα ένζυμα^{23,24} έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων αναστολής ώστε να εξασφαλιστεί η υψηλή ενζυμική ενεργότητα, η ευαισθησία και η σταθερότητα των βιοαισθητήρων. Παράλληλα διαφορετικές μέθοδοι ακινητοποίησης και σταθεροποίησης των ενζύμων έχουν εφαρμοστεί²⁵ χρησιμοποιώντας διαφορετικά υποστρώματα ακινητοποίησης και μεθόδους ανίχνευσης. Οι βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούνται συνήθως για την ανίχνευση παρασιτοκτόνων είναι ηλεκτροχημικοί σε ποσοστό που φτάνει το 80%, ενώ οι οπτικοί βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται μόλις κατά 12.6%. Μέσω ενός αμπερομετρικού μεταλλάκτη σήματος μετράται το οξειδωτικό ή αναγωγικό ρεύμα που προκύπτει από τα προϊόντα της ενζυμικής αντίδρασης^{26,27,28,29,30}. Ένας ποτενσιομετρικός μεταλλάκτης σήματος όπως είναι ένα ηλεκτρόδιο pH^{31,32,33} ή ένας αισθητήρας επαγόμενου πεδίου^{34,35} ανιχνεύει τις μεταβολές στην τιμή του pH κατά την ενζυμική αντίδραση. Οι μεταβολές στην τιμή του pH μετρώνται και μέσω οπτικών συστημάτων και συγκεκριμένα με

φθορισμομετρικούς^{36,37,38} ή οπτικούς^{39,40,41,42} δείκτες που είναι ευαίσθητοι στις μεταβολές του pH. Γενικά οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες παρασιτοκτόνων εμφανίζουν πολύ χαμηλότερα όρια ανίχνευσης και ευρύτερο πεδίο εφαρμογών (πχ. σε δείγματα θολά χωρίς προκατεργασία)⁴³. Τα όρια ανίχνευσης διαφέρουν ανάλογα με το είδος και την ποσότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου, τη μέθοδο ακινητοποίησης, το χρόνο ανάλυσης αλλά και τον αναλύτη. Τα χαμηλότερα όρια ανίχνευσης οργανοφωσφορικών παρασιτοκτόνων, που έχουν επιτευχθεί με αμπερομετρικούς βιοαισθητήρες της εμπορικά διαθέσιμης ακετυλοχολινεστεράσης *Electrophorus electricus* κυμαίνονται στην τάξη των 10^{-9} M⁴⁴. Τα όρια ανίχνευσης μειώνονται αρκετά με τη χρήση ακετυλοχολινεστεράσης από *Drosophila melanogaster*⁴⁵ ενώ πολύ χαμηλότερα όρια ανίχνευσης της τάξης των 10^{-17} M έχουν επιτευχθεί με αμπερομετρικό βιοαισθητήρα που βασίζεται στη γενετικά τροποποιημένη ακετυλοχολινεστεράση από *Drosophila melanogaster*²⁸. Στην περίπτωση των οπτικών βιοαισθητήρων τα όρια ανίχνευσης για τα οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα είναι αρκετά υψηλότερα και κυμαίνονται στην τάξη των 10^{-7} M στους οπτικούς αισθητήρες και στην τάξη των 10^{-6} – 10^{-7} M στους φθορισμομετρικούς αισθητήρες.

Η σταθερότητα των περισσότερων βιοαισθητήρων ακετυλοχολινεστεράσης δεν ξεπερνά τις 3-4 εβδομάδες. Μελέτες έχουν δείξει ότι πολυηλεκτρολύτες σε συνδυασμό με σάκχαρα μπορούν να αυξήσουν τη σταθερότητα αποθήκευσης και συνεχούς λειτουργίας του βιοαισθητήρα, χωρίς να μειώνουν την ευαισθησία του στα παρασιτοκτόνα⁴⁶. Η επιλεκτικότητα των βιοαισθητήρων ακετυλοχολινεστεράσης προς τα παρασιτοκτόνα είναι μικρή, γεγονός που καθιστά δύσκολη την ανίχνευση ενός συγκεκριμένου παρασιτοκτόνου σε ένα δείγμα. Επομένως οι βιοαισθητήρες ακετυλοχολινεστεράσης χρησιμοποιούνται κυρίως για την ποιοτική εξέταση των δειγμάτων (screening) και τη μέτρηση της ολικής τοξικότητας ενός δείγματος.

ταχύτητα διάχυσης του υποστρώματος από τον κύριο όγκο του διαλύματος στο ενζυμικό στρώμα. Όταν η ποσότητα του ενζύμου στο ενζυμικό στρώμα είναι αρκετά μεγάλη, η μείωση στη συγκέντρωση του υποστρώματος δεν αντισταθμίζεται από την ταχύτητα μεταφοράς του υποστρώματος λόγω παρεμπόδισης της διάχυσης. Έτσι μόνο ένα μικρό ποσοστό του ενζύμου συμμετέχει στην κατάλυση. Στην περίπτωση αυτή η απόκριση του αισθητήρα ελέγχεται από την ταχύτητα διάχυσης του υποστρώματος στο ενζυμικό στρώμα. Στους ενζυμικούς βιοαισθητήρες αναστολής όταν το ενζυμικό φορτίο είναι υψηλό, η παρατηρούμενη επίδραση του αναστολέα είναι μικρή καθώς τα απενεργοποιημένα μόρια του ενζύμου αντικαθίστανται από άλλα μέσα στο ενζυμικό στρώμα με αποτέλεσμα η αναστολή να είναι πολύ μικρή και επομένως η απόκριση του αισθητήρα να παραμένει υψηλή. Αντίθετα στην περίπτωση που το ενζυμικό φορτίο είναι μικρό, η επίδραση του αναστολέα είναι ικανοποιητική καθώς τα απενεργοποιημένα μόρια του ενζύμου δεν αντικαθίστανται επαρκώς από ενεργά μόρια του ενζύμου, στο ενζυμικό στρώμα. Έτσι η απόκριση του βιοαισθητήρα εξαρτάται από την ταχύτητα μετατροπής του υποστρώματος από το ενζυμικό στρώμα και έχουμε κινητικό έλεγχο της απόκρισης⁵⁰. Κάτω από αυτές τις συνθήκες, ο βιοαισθητήρας παρουσιάζει σαφώς μικρότερη απόκριση από αντίστοιχους βιοαισθητήρες που ελέγχονται από τη διάχυση του υποστρώματος, αλλά εμφανίζει μεγαλύτερη ευαισθησία ως προς τους αναστολείς.

Η επιλογή ανάμεσα σε κινητικές συνθήκες ή συνθήκες ελεγχόμενες από τη διάχυση επιτυγχάνεται μέσω της ρύθμισης του ενζυμικού φορτίου όπως αναφέρθηκε, αλλά και της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Πολύ υψηλές συγκεντρώσεις του υποστρώματος οδηγούν στην αναστολή του ενζύμου και επομένως στην αδυναμία να μετρηθούν τα παρασιτοκτόνα με ακρίβεια. Γι' αυτό το λόγο επιλέγεται μία συγκέντρωση υποστρώματος που είναι στο γραμμικό εύρος του βιοαισθητήρα και κοντά στο άνω όριο ανίχνευσης.

Τέλος η επώαση των βιοαισθητήρων με τον αναστολέα έχει καθοριστικό ρόλο στην ανίχνευση των παρασιτοκτόνων. Στους αντιστρεπτούς αναστολείς η επώαση με το παρασιτοκτόνο πραγματοποιείται παρουσία του υποστρώματος. Αντίθετα στους μη αντιστρεπτούς αναστολείς όπως είναι τα οργανοφωσφορικά παρασιτοκτόνα, η διαδικασία αναστολής πραγματοποιείται απουσία του υποστρώματος και η μείωση της ενεργότητας του ενζύμου αυξάνεται με το χρόνο επώασης στο διάλυμα του παρασιτοκτόνου. Με τη μέθοδο της επώασης στο παρασιτοκτόνο πριν την αντίδραση

με το υπόστρωμα επιτυγχάνονται χαμηλότερα όρια ανίχνευσης σε σύγκριση με την επώαση παρουσία του υποστρώματος⁵¹.

Η διαδικασία μέτρησης των οργανοφωσφορικών παρασιτοκτόνων περιλαμβάνει τα ακόλουθα στάδια:

1. Μέτρηση της αρχικής απόκρισης του βιοαισθητήρα $F_{initial}$.
2. Επώαση του βιοαισθητήρα με το διάλυμα του παρασιτοκτόνου για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα.
3. Μέτρηση της τελικής απόκρισης του βιοαισθητήρα F_{final} .

Η αναστολή της δράσης του ενζύμου οδηγεί στη μείωση της τελικής απόκρισης του αισθητήρα. Το ποσοστό της μείωσης της απόκρισης συσχετίζεται τελικά με τη συγκέντρωση του παρασιτοκτόνου. Υπό κινητικές συνθήκες, και για μη αντιστρεπτούς αναστολείς συγκέντρωσης C το ποσοστό αναστολής (I%) είναι ανάλογο του ποσοστού του απενεργοποιημένου ενζύμου και δίνεται από τη σχέση^{52,53}.

$$I\% = \frac{\{EI\}}{\{E_0\}} * 100 = -\ln k_i t C$$

Η ποσότητα του ενεργού ενζύμου πριν και μετά την επώαση με τον αναστολέα ($\{E_0\}$ και $\{E\}$ αντίστοιχα) είναι απευθείας ανάλογη της αρχικής και τελικής απόκρισης του βιοαισθητήρα αντίστοιχα ($F_{initial}$ και F_{final}) και τελικά ισχύει:

$$I\% = \frac{\{EI\}}{\{E_0\}} * 100 = \frac{[\{E_0\} - \{E\}]}{\{E_0\}} * 100 = \frac{F_{initial} - F_{final}}{F_{initial}} * 100$$

Από το ποσοστό αναστολής (I%) σε σχέση με το λογάριθμο της συγκέντρωσης του παρασιτοκτόνου (logC) προκύπτει η καμπύλη βαθμονόμησης του βιοαισθητήρα ή αλλιώς η καμπύλη αναστολής. Η ευαισθησία του βιοαισθητήρα βρίσκεται από το γραμμικό τμήμα της καμπύλης. Το όριο ανίχνευσης καθορίζεται με βάση τη σχετική τυπική απόκλιση των μετρήσεων (%RSD) και ορίζεται ως η συγκέντρωση εκείνη του αναστολέα που προκαλεί αναστολή ίση με $I\% = 3 * RSD$. Τέλος, η επιλεκτικότητα

έναντι διαφορετικών αναστολέων υπολογίζεται από το λόγο των κλίσεων των καμπυλών βαθμονόμησης, που έχουν ληφθεί κάτω από ακριβώς ίδιες πειραματικές συνθήκες.

Στην εργασία αυτή αναπτύσσεται και αξιολογείται ένας καινοτόμος οπτικός βιοαισθητήρας παρασιτοκτόνων που βασίζεται σε λιποσώματα.

7.3 Ανάπτυξη Βιοαισθητήρα Ακετυλοχολινεστεράσης βασισμένου σε Λιποσώματα

Κατασκευή Βιοαισθητήρα Λιποσωμάτων

Το ασταθές ένζυμο ακετυλοχολινεστεράση ακινητοποιείται στο εσωτερικό των λιποσωμάτων ακολουθώντας την τεχνική της ενυδάτωσης της λιπιδικής μεμβράνης (lipid film's hydration technique)⁵⁴. Αρχικά 5mg φωσφατιδυλοχολίνης αναμιγνύονται με 5μL διαλύματος της πορίνης OmpF (2mg/mL σε 1% octyl-POE απορρυπαντικό). Στη συνέχεια στο διάλυμα προστίθενται σταδιακά 100μL ρυθμιστικού διαλύματος μονόξινων και δισόξινων φωσφορικών 25mM pH 7.8, 100μL ακετυλοχολινεστεράσης (~500 OD/mL) και 30μL του φθορισμομετρικού δείκτη πυρανίνη ($7.6 \times 10^{-5} M$). Ακολουθεί διαδοχική ψύξη και τήξη του διαλύματος τοποθετώντας το για 5s σε υγρό άζωτο (-195° C) και στη συνέχεια για 30s σε υδρόλουτρο στους 37°C. Κατά την ψύξη του διαλύματος η μεμβράνη των σχηματιζόμενων λιποσωμάτων σπάει σε ορισμένα σημεία λόγω της διόγκωσης του νερού στο εσωτερικό τους. Στη συνέχεια κατά τη διαδικασία της τήξης, η μεμβράνη των λιποσωμάτων επανασηματίζεται, εγκλωβίζοντας στο εσωτερικό τους διάλυμα με ακετυλοχολινεστεράση. Με τη διαδοχική ψύξη-τήξη του μίγματος, επιτυγχάνεται η εισαγωγή της ακετυλοχολινεστεράσης στο εσωτερικό των λιποσωμάτων. Σύμφωνα με μελέτες το ποσοστό του ενζύμου που ενθυλακώνεται στα λιποσώματα αυξάνεται με αύξηση του αριθμού των κύκλων ψύξης-τήξης του μίγματος⁵⁴. Αν και η ακινητοποίηση της ακετυλοχολινεστεράσης είναι ικανοποιητική μετά από 10 κύκλους ψύξης-τήξης, παρόλα αυτά πραγματοποιούνται 50 κύκλοι⁵⁵ ψύξης και τήξης του μίγματος ώστε να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή ενθυλάκωση του ενζύμου ενώ μετά από κάθε κύκλο το μίγμα αναδεύεται καλά. Στη συνέχεια, το μίγμα αραιώνεται σε τελικό όγκο 1mL με ρυθμιστικό διάλυμα και περνάει από φίλτρο πολυανθρακικού εστέρα 0.2μm δέκα φορές τουλάχιστον. Με τη διήθηση του διαλύματος τα λιποσώματα μεγάλου μεγέθους σπάνε και τελικά σχηματίζονται λιποσώματα με παρόμοιο μέγεθος χωρίς απώλεια ενζύμου. Το ένζυμο που δεν εισέρχεται στα λιποσώματα και βρίσκεται ελεύθερο στο διάλυμα, αποικοδομείται με την εισαγωγή στο διάλυμα των λιποσωμάτων 5mg/mL προνάσης (πρωτεάσης) και επώαση για 3 ώρες στους 25 °C.

Προσδιορισμός Ενεργότητας Ενζύμου

Το ποσοστό της AChE που εγκλωβίζεται στα λιποσώματα υπολογίζεται με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο Ellman⁵⁶. Συγκρίνεται η αρχική ενεργότητα του ενζύμου (πριν την ανάμιξη του με τα λιποσώματα) και η ενεργότητα του ενζύμου που δεν εγκλωβίστηκε στα λιποσώματα αλλά παρέμεινε ελεύθερο στο διάλυμα. Η μέτρηση της ενεργότητας της AChE βασίζεται στην παρακολούθηση της κινητικής της αντίδρασης της με το υπόστρωμα ακετυλθειοχολινοϊωδίδιο (ACThI). Κατά την αντίδραση της AChE με ACThI παράγεται οξικό οξύ και θειοχολίνη. Η θειοχολίνη στη συνέχεια αντιδρά με το διθειονιτροβενζοϊκό οξύ που περιέχεται στο αντιδραστήριο Ellman και παράγεται θειονιτροβενζοϊκό οξύ το οποίο έχει κίτρινο χρώμα και απορροφά στα 412nm. Από την κλίση της καμπύλης της απορρόφησης σε συνάρτηση με το χρόνο προσδιορίζεται η ενεργότητα του ενζύμου ($\text{Abs min}^{-1} \text{mL}^{-1}$). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή προσδιορίζεται ότι το 20% της AChE εγκλωβίζεται στο εσωτερικό των λιποσωμάτων.

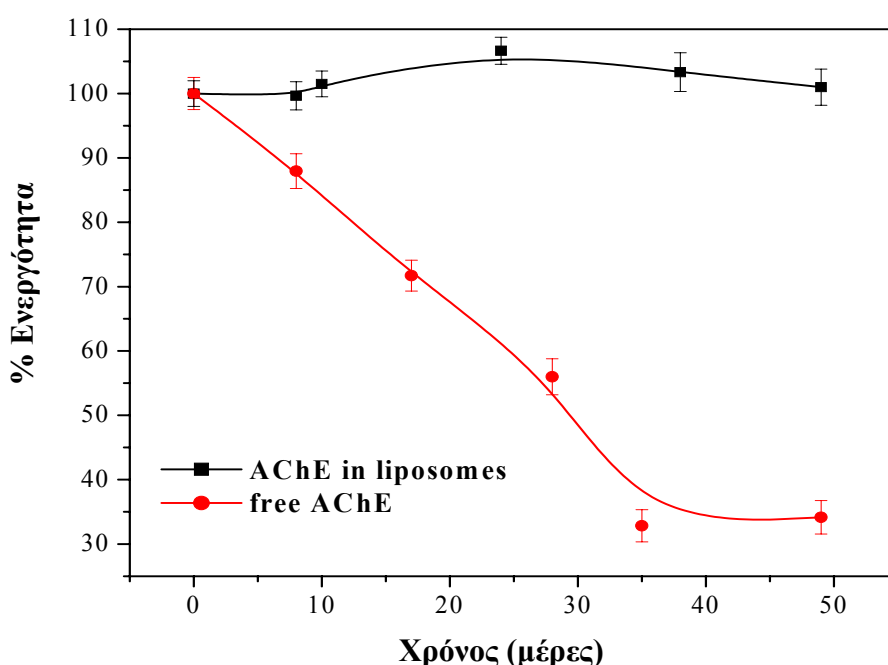
Προσδιορισμός Μεγέθους Λιποσωμάτων

Ακολουθώντας την παραπάνω διαδικασία παρασκευής λιποσωμάτων παρασκευάζονται δομές με μία μόνο λιπιδική διπλοστοιβάδα⁵⁵. Το μέγεθος των λιποσωμάτων με το ένζυμο προσδιορίζεται με δυναμική σκέδαση φωτός (Dynamic Light Scattering) (Εργαστήριο Σκέδασης Φωτός, ΙΤΕ, Καθηγητής Α. Κ. Ρίζος). Παρατηρείται μία ομοιομορφία στο μέγεθος των λιποσωμάτων και η διάμετρος τους είναι περίπου $300 \pm 4\text{nm}$.

Σταθερότητα Βιοαισθητήρα Λιποσωμάτων

Για τη μελέτη της σταθερότητας αποθήκευσης του βιοαισθητήρα λιποσωμάτων κατασκευάζεται ένα δείγμα λιποσωμάτων με AChE το οποίο φυλάσσεται στους 4 °C για 50 μέρες. Ανά τακτά χρονικά διαστήματα τμήμα του δείγματος λαμβάνεται και εξετάζεται η ενεργότητα του ενζύμου σε θερμοκρασία δωματίου μέσω της φασματοφωτομετρικής μεθόδου Ellman⁵⁶. Παράλληλα με το δείγμα λιποσωμάτων παρασκευάζεται και μελετάται κάτω από τις ίδιες συνθήκες η σταθερότητα ενός διαλύματος ακετυλοχολινεστεράσης αντίστοιχης ενεργότητας με αυτή που έχει ενθυλακωθεί στα λιποσώματα. Στην Εικόνα 2 παρουσιάζεται η σταθερότητα του βιοαισθητήρα λιποσωμάτων έναντι της σταθερότητας του διαλύματος ακετυλοχολινεστεράσης σε χρονικό διάστημα 50 ημερών. Όπως φαίνεται και στο

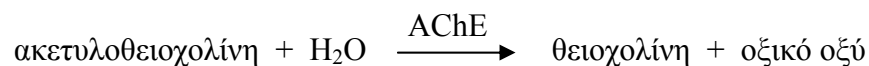
διάγραμμα η ενεργότητα της AChE στο εσωτερικό των λιποσωμάτων παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια των 50 ημερών. Η παρατηρούμενη άνοδος της ενεργότητας τις πρώτες 3 εβδομάδες είναι ένα φαινόμενο που παρατηρείται συχνά στους βιοαισθητήρες και αποδίδεται σε αλλαγές της τριτοταγούς δομής του ενζύμου μέσα στις κοιλότητες του υλικού ακινητοποίησης⁵⁷. Αντίθετα, η ενεργότητα της AChE σε διάλυμα μειώνεται στο 50% της αρχικής της τιμής ήδη από τον πρώτο μήνα, παρουσιάζοντας μόλις 34% ενεργότητα μετά από 50 ημέρες. Τα λιποσώματα επομένως παρέχουν ένα κατάλληλο περιβάλλον για τη σταθεροποίηση βιολογικών μορίων όπως αποδεικνύεται από τη μεγάλη σταθερότητα του βιοαισθητήρα των λιποσωμάτων που κατασκευάστηκε.



Εικόνα 2. Σταθερότητα AChE στο εσωτερικό των λιποσωμάτων και ελεύθερης σε διάλυμα στους 4 °C.

Επιλογή Μεθόδου Παρακολούθησης της Ενζυμικής Αντίδρασης

Η παρακολούθηση των ενζυμικών αντιδράσεων βασίζεται συνήθως στην ανίχνευση των παραγόμενων προϊόντων. Όταν τα προϊόντα αυτά είναι οξέα, τότε μεταβάλλεται η τιμή του pH του διαλύματος και είναι εφικτή η ανίχνευση της συγκέντρωσης του υποστρώματος του ενζύμου μέσω της μεταβολής στην τιμή του pH. Η ενζυμική αντίδραση της AChE φαίνεται στο ακόλουθο σχήμα:

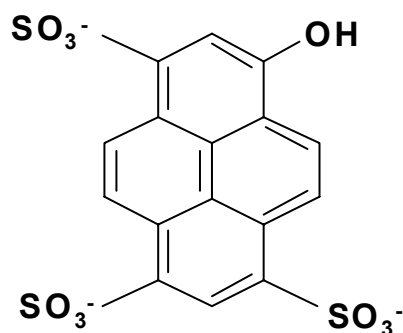


Η ακετυλοχολινεστεράση (AChE) καταλύει την υδρόλυση της ακετυλοθειοχολίνης προς θειοχολίνη και οξικό οξύ. Το παραγόμενο οξύ μεταβάλλει τοπικά το pH του διαλύματος στο ευρύτερο περιβάλλον του ενζύμου. Η ενεργότητα του ενζύμου στο εσωτερικό των λιποσωμάτων συνήθως προσδιορίζεται με τη φασματοφωτομετρική μέθοδο Ellman^{54,56}. Ωστόσο στην παρούσα εργασία επιλέγεται η φθορισμομετρική παρακολούθηση της ενζυμικής αντίδρασης μέσω φθορίζοντων δεικτών έναντι της οπτικής μεθόδου Ellman. Η επιλογή αυτή έγκειται στο γεγονός ότι η φθορισμομετρία παρέχει μεγαλύτερη ευαισθησία και επιλεκτικότητα, χαμηλότερα όρια ανίχνευσης, μικρότερη επίδραση από παρεμποδίζουσες ουσίες και μεγαλύτερο γραμμικό εύρος της μετρούμενης αναλυτικής παραμέτρου. Παράλληλα η εισαγωγή ενός φθορισμομετρικού δείκτη που είναι ευαίσθητος σε μεταβολές του pH στο βιοαισθητήρα των λιποσωμάτων επιτρέπει την άμεση παρακολούθηση της ενζυμικής αντίδρασης σε ένα μόνο βήμα, σε αντίθεση με τη μέθοδο Ellman όπου απαιτούνται δύο βήματα, η ενζυμική αντίδραση και στη συνέχεια η αντίδραση Ellman. Η ανάπτυξη ενός ευαίσθητου συστήματος φθορισμομετρικής ανίχνευσης, όπου το ένζυμο θα είναι σταθεροποιημένο μέσα σε λιποσώματα μπορεί να οδηγήσει σε ένα βιοαισθητήρα με αυξημένη σταθερότητα και βελτιωμένα αναλυτικά χαρακτηριστικά.

Επιλογή Φθορισμομετρικού Δείκτη

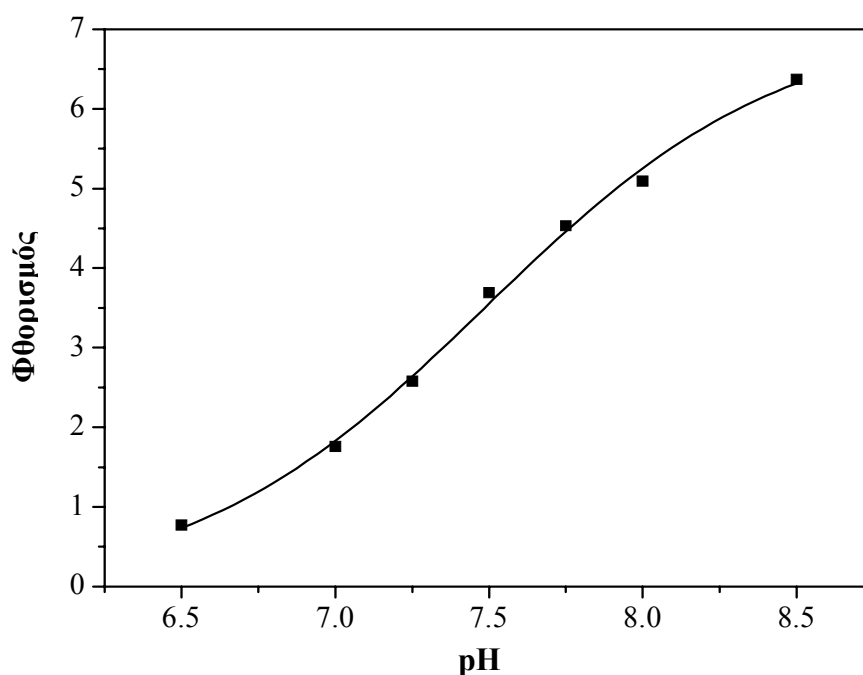
Η καταλυτική δράση της ακετυλοχολινεστεράσης είναι βέλτιστη όταν το ένζυμο βρίσκεται σε υδατικά διαλύματα ουδέτερου pH. Έτσι για την ανάπτυξη ενός φθορισμομετρικού βιοαισθητήρα AChE απαιτείται ένας φθορισμομετρικός δείκτης pH που εμφανίζει τιμές pK_a πολύ κοντά στο 7.0. Μετά από εκτενή βιβλιογραφική έρευνα αποδείχτηκε ότι η πυρανίνη πληρεί όλες τις προϋποθέσεις και επομένως είναι η καταλληλότερη για το βιοαισθητήρα λιποσωμάτων (Εικόνα 3). Η πυρανίνη είναι ένας φθορισμομετρικός δείκτης ευαίσθητος σε μεταβολές του pH, έχει $pK_a = 7.3$ και μήκη κύματος διέγερσης και εκπομπής τα 460nm και 513nm αντίστοιχα. Χαρακτηριστικό της πυρανίνης είναι ότι δε διαπερνά τις μεμβράνες και είναι αρκετά ευδιάλυτη στο νερό⁵⁸. Μάλιστα έχει χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση των μεταβολών του pH στο εσωτερικό των βακτηρίων *E.coli*⁵⁹. Όλες αυτές οι ιδιότητες

της πυρανίνης συνέβαλαν ώστε να επιλεγθεί ως ο καταλληλότερος και πιο ευαίσθητος δείκτης για το βιοαισθητήρα λιποσωμάτων.



Εικόνα 3. Δομή του φθορισμομετρικού δείκτη πυρανίνη.

Προκειμένου να προσδιοριστεί το εύρος του pH στο οποίο λειτουργεί βέλτιστα ο βιοαισθητήρας λιποσωμάτων πραγματοποιείται πεχαμετρική τιτλοδότηση του δείκτη πυρανίνη.



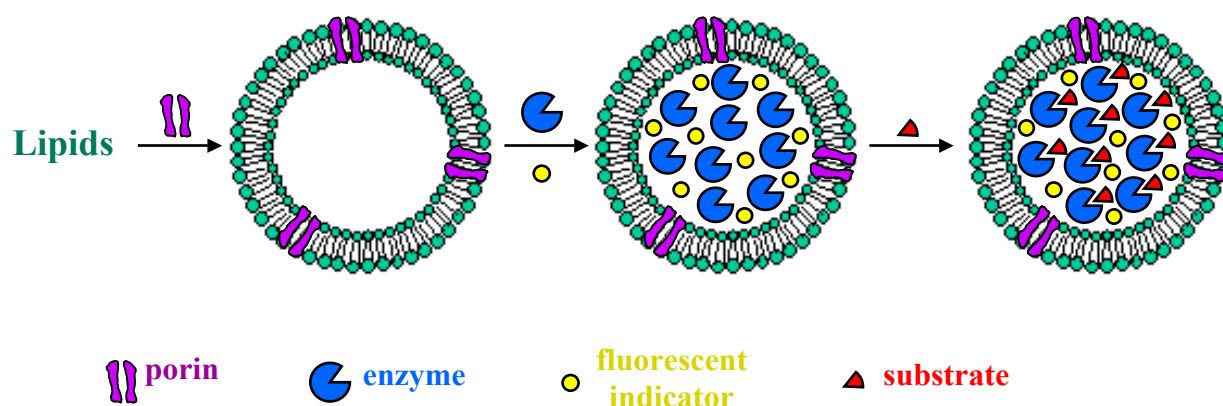
Εικόνα 4. Πεχαμετρική καμπύλη τιτλοδότησης του δείκτη πυρανίνη. Εξασθένηση της έντασης του φθορισμού της πυρανίνης στα 513nm με μείωση του pH.

Όπως φαίνεται και στην καμπύλη τιτλοδότησης (Εικόνα 4) η ένταση του φθορισμού της πυρανίνης ελαττώνεται γραμμικά με τη μείωση του pH στο εύρος 7.0 με 7.8. Επίσης λόγω της μεγάλης ευαισθησίας του δείκτη στις αλλαγές του pH είναι δυνατή

η ανίχνευση πολύ μικρών μεταβολών του pH. Με βάση την καμπύλη τιτλοδότησης η τιμή pH 7.8 επιλέγεται ως την καταλληλότερη για το βιοαισθητήρα λιποσωμάτων ώστε να εξασφαλιστεί η υψηλότερη δυνατή ευαισθησία και το μεγαλύτερο εύρος απόκρισης για την ανίχνευση των μεταβολών του pH.

Διαδικασία μέτρησης

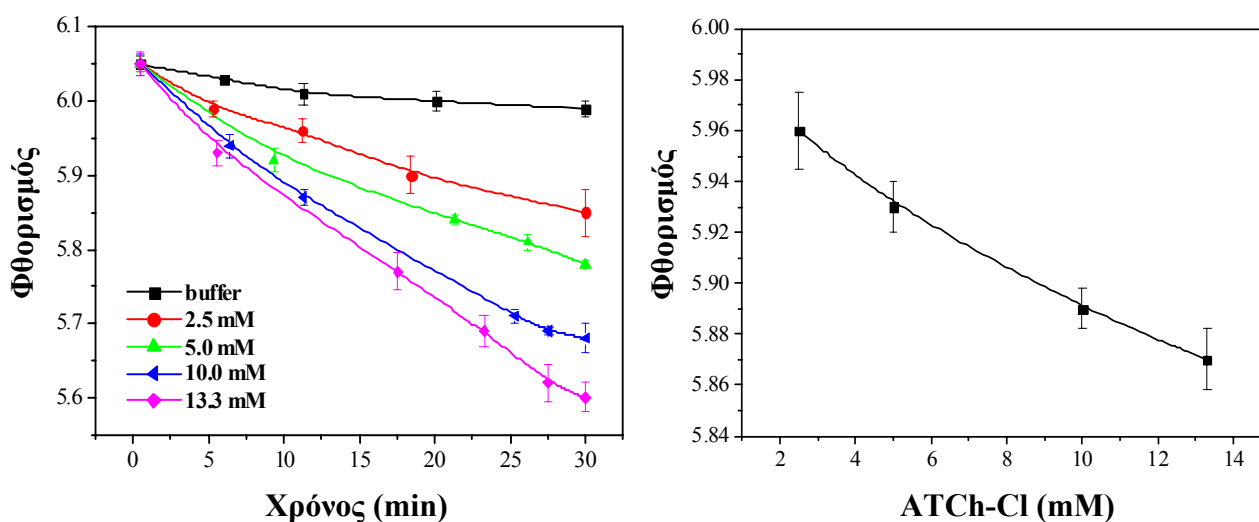
Σε κυψελίδες φθορισμού εισάγονται οι βιοαισθητήρες λιποσωμάτων (20μL) και στη συνέχεια το υπόστρωμα ακετυλοθειοχολίνη (50μL). Το υπόστρωμα εισέρχεται στο εσωτερικό των λιποσωμάτων μέσω των πορινών που βρίσκονται στη μεμβράνη των λιποσωμάτων. Στο εσωτερικό των λιποσωμάτων πραγματοποιείται η ενζυμική αντίδραση και το παραγόμενο οξικό οξύ μειώνει τοπικά το pH του διαλύματος στο ευρύτερο περιβάλλον του ενζύμου. Η μείωση στην τιμή του pH συμβάλλει στη μείωση της έντασης του φθορισμού του δείκτη πυρανίνη, η οποία συσχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Η σχηματική αναπαράσταση του βιοαισθητήρα AChE που βασίζεται σε λιποσώματα παρουσιάζεται στην Εικόνα 5. Για να επιβεβαιωθεί ότι το υπόστρωμα εισέρχεται στο εσωτερικό των λιποσωμάτων μέσω των πορινών παρασκευάστηκαν βιοαισθητήρες AChE/λιποσωμάτων χωρίς την παρουσία πορινών. Οι βιοαισθητήρες δεν παρουσίασαν απόκριση στο υπόστρωμα ακετυλοθειοχολίνη. Παράλληλα κατά την επώαση των βιοαισθητήρων αυτών με απορρυπαντικό Triton X-100 η απόκριση στο υπόστρωμα επανακτήθηκε λόγω της διάσπασης των λιποσωμάτων παρουσία του απορρυπαντικού. Γίνεται επομένως αντιληπτό ότι το ένζυμο AChE βρίσκεται στο εσωτερικό περιβάλλον των λιποσωμάτων.



Εικόνα 5. Σχηματική αναπαράσταση του βιοαισθητήρα AChE που βασίζεται σε λιποσώματα.

Αναλυτικά Χαρακτηριστικά Βιοαισθητήρα Λιποσωμάτων

Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα λιποσωμάτων αξιολογούνται εξετάζοντας την απόκριση του αισθητήρα στο υπόστρωμα ακετυλοθειοχολίνη. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 6Α η ένταση του φθορισμού του δείκτη στο εσωτερικό των λιποσωμάτων μειώνεται με την πάροδο του χρόνου για διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος. Ο χρόνος απόκρισης του βιοαισθητήρα κυμαίνεται από 1 έως 5 min ανάλογα με τη συγκέντρωση του υποστρώματος. Το χρονικό διάστημα των 5 min είναι αρκετά ικανοποιητικό για να μετράται η απόκριση του βιοαισθητήρα, καθώς η διαφορά στο σήμα φθορισμού για τις διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος είναι αρκετά μεγάλη. Στην Εικόνα 6B παρουσιάζεται η καμπύλη βαθμονόμησης του βιοαισθητήρα λιποσωμάτων μετά από 10min αντίδραση με το υπόστρωμα. Παρατηρείται ότι υπάρχει γραμμική συσχέτιση μεταξύ της μεταβολής της έντασης του φθορισμού του δείκτη και της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Η ευαισθησία του βιοαισθητήρα είναι $8.1 \times 10^{-3} \text{ Abs min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ για συγκεντρώσεις υποστρώματος μεταξύ 1.0 - 13.3 mM, και το όριο ανίχνευσης είναι μικρότερο από 1.0 mM. Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων για το ίδιο εύρος συγκεντρώσεων είναι πολύ ικανοποιητική (RSD < 10%, $n=3$).

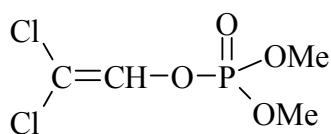


Εικόνα 6. Α) Σήμα φθορισμού του βιοαισθητήρα AChE βασισμένου σε λιποσώματα σε συνάρτηση με το χρόνο, για διαφορετικές συγκεντρώσεις ATChCl 2.5, 5.0, 10.0 και 13.3 mM. Β) Καμπύλη αναφοράς του βιοαισθητήρα AChE βασισμένου σε λιποσώματα. Η ένταση του φθορισμού μετράται 10min μετά την προσθήκη του ATChCl. (ανίχνευση στα 513nm, ενζυμικό φορτίο 6.4 pmoles).

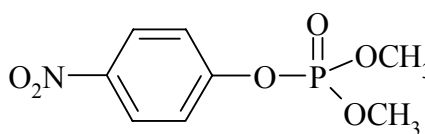
Από τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώνουμε ότι ο βιοαισθητήρας λιποσωμάτων που παρασκευάστηκε παρουσιάζει πολύ καλά αναλυτικά χαρακτηριστικά. Παρόλο που η ποσότητα του ενζύμου σε κάθε βιοαισθητήρα είναι αρκετά μικρή (6.4pmol), είναι ικανοποιητική για να εξασφαλιστεί αξιόπιστο σήμα φθορισμού για τις μετρήσεις. Γίνεται επομένως αντιληπτό ότι ο βιοαισθητήρας λιποσωμάτων μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανίχνευση παρασιτοκτόνων με μεγάλη ευαισθησία και χαμηλά όρια ανίχνευσης.

7.4 Ανίχνευση Παρασιτοκτόνων με το Βιοαισθητήρα Ακετυλοχολινεστεράσης

Ο βιοαισθητήρας λιποσωμάτων που αναπτύχθηκε βρίσκει εφαρμογή στην ανίχνευση παρασιτοκτόνων. Συγκεκριμένα χρησιμοποιείται για την ανίχνευση δύο ευρέως διαδεδομένων οργανοφωσφορικών παρασιτοκτόνων, του Dichlorvos (2,2-Dichlorovinyl dimethyl phosphate) και του Paraoxon (diethyl-p-nitro-phenyl-phosphate) (Εικόνα 7). Και τα δύο αυτά παρασιτοκτόνα είναι τοξικά και μάλιστα το Dichlorvos έχει χαρακτηριστεί από την Παγκόσμια Οργάνωση Υγείας ως «υψηλής τοξικότητας» παρασιτοκτόνο καθώς εμφανίζει υψηλή πτητικότητα, που το καθιστά επικίνδυνο για τη δημόσια υγεία.



Dichlorvos

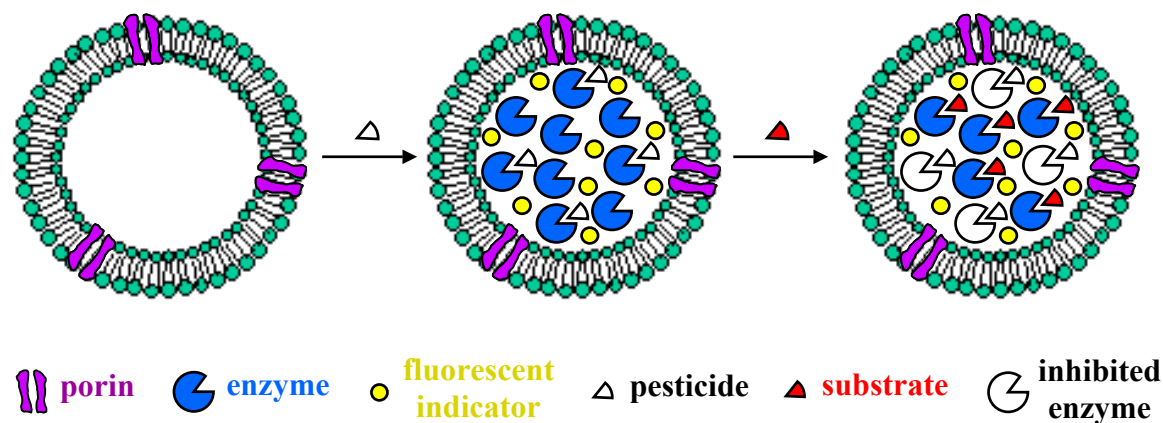


Paraoxon-methyl

Εικόνα 7. Δομή των οργανοφωσφορικών παρασιτοκτόνων dichlorvos και paraoxon.

Τα παρασιτοκτόνα όπως αναφέρθηκε λειτουργούν ως αναστολείς του ενζύμου AChE παρεμποδίζοντας την ενζυμική αντίδραση. Έτσι με την εισαγωγή του παρασιτοκτόνου στο εσωτερικό των λιποσωμάτων μέσω των πορινών, παρατηρείται μείωση του παραγόμενου οξικού οξέος και κατά συνέπεια μείωση της έντασης του φθορισμού του δείκτη σε σύγκριση με αυτή που εμφανίζει απουσία παρασιτοκτόνων (Εικόνα 8). Η μειωμένη αυτή απόκριση του βιοαισθητήρα στο υπόστρωμα συσχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωση του παρασιτοκτόνου που εισήχθη στο εσωτερικό των λιποσωμάτων.

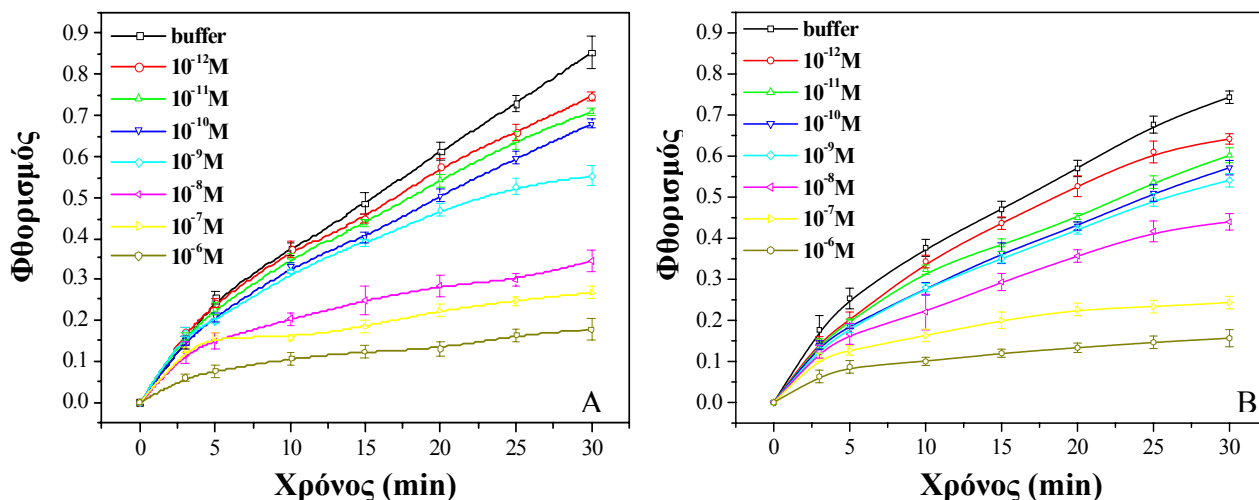
Το ενζυμικό φορτίο σε κάθε βιοαισθητήρα είναι 6.4 pmol. Αρχικά οι βιοαισθητήρες λιποσωμάτων επωάζονται με διαλύματα διαφορετικών συγκεντρώσεων παρασιτοκτόνων για 15min και στη συνέχεια μετράται η απόκριση τους σε 10mM ακετυλοθειοχολίνη. Η συγκέντρωση αυτή του υποστρώματος επιλέγεται για όλες τις μετρήσεις από την καμπύλη αναφοράς του βιοαισθητήρα στο υπόστρωμα. Πολύ υψηλές συγκεντρώσεις του υποστρώματος οδηγούν στην αναστολή του ενζύμου και επομένως στην αδυναμία να μετρηθούν τα παρασιτοκτόνα με ακρίβεια. Γι' αυτό το λόγο επιλέγεται μία συγκέντρωση υποστρώματος που είναι στο γραμμικό εύρος του βιοαισθητήρα και κοντά στο άνω όριο ανίχνευσης. Το γραμμικό εύρος του βιοαισθητήρα AChE βασισμένου σε λιποσώματα υπολογίστηκε ότι είναι μεταξύ 1.0 - 13.3 mM υποστρώματος, όπως αναφέρθηκε παραπάνω. Έτσι η συγκέντρωση των 10mM υποστρώματος εκτιμάται ως την καταλληλότερη για να εξασφαλιστεί η ικανοποιητική απόκριση του βιοαισθητήρα. Στις Εικόνες 9 (Α και Β) παρουσιάζεται η μεταβολή της απόκρισης του βιοαισθητήρα λιποσωμάτων στο υπόστρωμα μετά από επώαση σε διαφορετικές συγκεντρώσεις Dichlorvos και Paraoxon αντίστοιχα. Η αύξηση της συγκέντρωσης του παρασιτοκτόνου προκαλεί μείωση στην ένταση του φθορισμού του δείκτη. Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων είναι πολύ ικανοποιητική (RSD < 10%, $n=3$).



Εικόνα 8. Σχηματική αναπαράσταση της αναστολής του βιοαισθητήρα AChE που βασίζεται σε λιποσώματα.

Το επί τοις εκατό ποσοστό αναστολής ($I\%$) που προκαλούν τα παρασιτοκτόνα υπολογίζεται από την ακόλουθη σχέση:

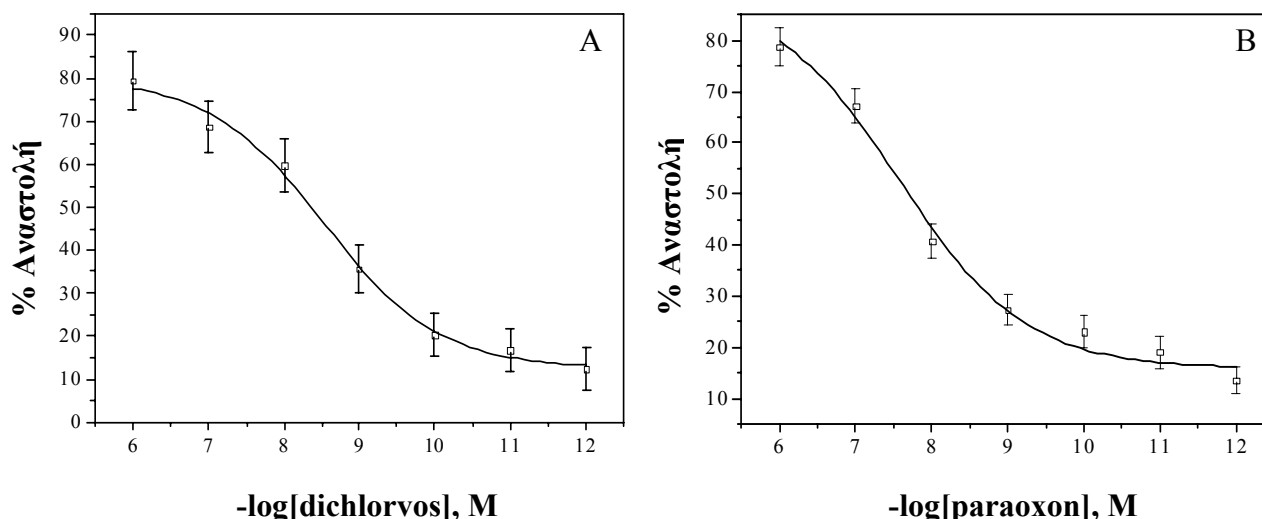
$$I\% = \frac{F_{initial} - F_{final}}{F_{initial}} * 100$$



Εικόνα 9. Σήμα φθορισμού του βιοαισθητήρα AChE βασισμένου σε λιποσώματα σε συνάρτηση με το χρόνο, για διαφορετικές συγκεντρώσεις (A) dichlorvos και (B) paraoxon. (ανίχνευση στα 513nm, ενζυμικό φορτίο 6.4 pmoles, συγκέντρωση ATChCl 10mM).

όπου $F_{initial}$ η ένταση του φθορισμού του δείκτη απουσία του παρασιτοκτόνου και F_{final} η ένταση του φθορισμού παρουσία του παρασιτοκτόνου. Η καμπύλη βαθμονόμησης της αναστολής προκύπτει από το ποσοστό της αναστολής (I%) σε σχέση με το λογάριθμο της συγκέντρωσης του παρασιτοκτόνου ($\log[\text{παρασιτοκτόνου}]$). Οι καμπύλες αναστολής του βιοαισθητήρα λιποσωμάτων στα παρασιτοκτόνα Dichlorvos και Paraoxon 30 λεπτά μετά την προσθήκη του υποστρώματος παρουσιάζονται στις Εικόνες 10 (A και B). Οι καμπύλες είναι σιγμοειδής όπως άλλωστε αναμενόταν και το ποσοστό αναστολής κυμαίνεται από 13% έως 80% για συγκεντρώσεις παρασιτοκτόνου από 10^{-12} M έως 10^{-6} M. Συγκεντρώσεις παρασιτοκτόνου υψηλότερες από 10^{-6} M προκαλούν πλήρη αναστολή του βιοαισθητήρα. Επειδή τα σφάλματα στις χαμηλές συγκεντρώσεις παρασιτοκτόνων επικαλύπτονται, τα όρια ανίχνευσης του βιοαισθητήρα υπολογίζονται για ποσοστό αναστολής ίσο με 25% και βρίσκονται ότι είναι ίσα με 2.0×10^{-10} M για το Dichlorvos και 6.7×10^{-10} M για το Paraoxon. Το χαμηλότερο όριο ανίχνευσης στην περίπτωση του Dichlorvos αποδίδεται στο γεγονός ότι το ένζυμο εμφανίζει μεγαλύτερη σταθερά δέσμευσης για το Dichlorvos έναντι του Paraoxon. Οι τιμές αυτές των ορίων ανίχνευσης είναι από τις χαμηλότερες που έχουν επιτευχθεί μέχρι σήμερα με φθορισμομετρικές μεθόδους που βασίζονται στις μεταβολές του pH.

Εφόσον το ενζυμικό φορτίο των βιοαισθητήρων αναστολής επηρεάζει το κάτω και άνω όριο ανίχνευσης των βιοαισθητήρων, αναμένεται η μείωση του ενζυμικού φορτίου είτε με εισαγωγή λιγότερου ενζύμου στο εσωτερικό των λιποσωμάτων είτε με μείωση της ποσότητας των βιοαισθητήρων AChE/λιποσωμάτων που χρησιμοποιούνται σε κάθε μέτρηση, να οδηγήσει σε ακόμη χαμηλότερα όρια ανίχνευσης.

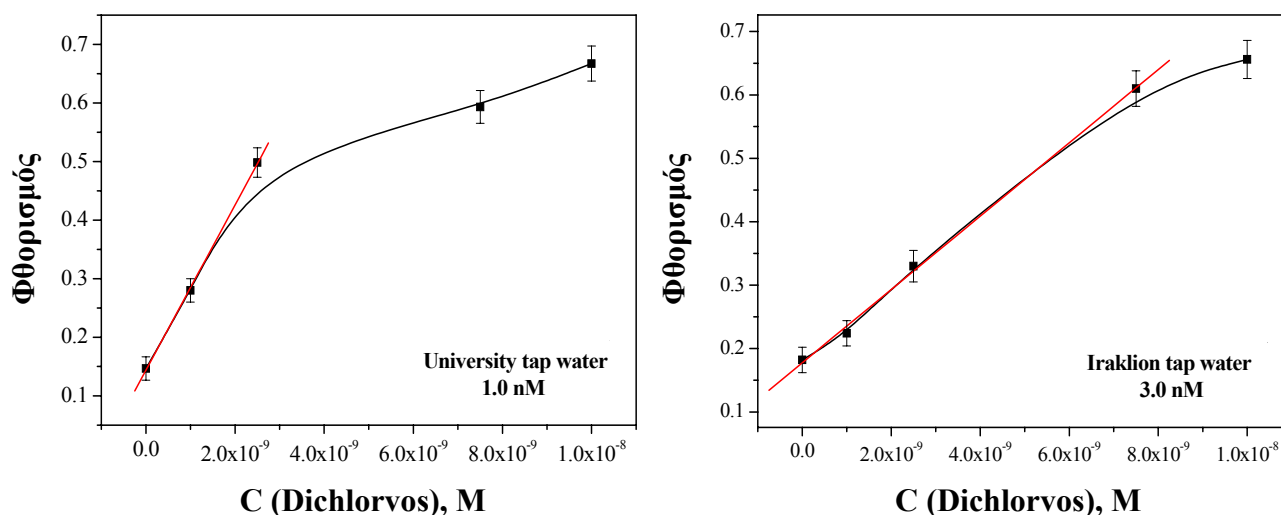


Εικόνα 10. Καμπύλες αναστολής του βιοαισθητήρα AChE που βασίζεται σε λιποσώματα στα παρασιτοκτόνα A) dichlorvos και B) paraoxon (ενζυμικό φορτίο 6.4 pmoles, συγκέντρωση ATChCl 10mM, χρόνος επώασης με το παρασιτοκτόνο 15min).

Εφαρμογή του Βιοαισθητήρα Ακετυλοχολινεστεράσης στην Ανίχνευση Παρασιτοκτόνων σε Πόσιμο Νερό

Ο βιοαισθητήρας λιποσωμάτων που παρασκευάστηκε αξιολογήθηκε για τη δυνατότητα ανίχνευσης παρασιτοκτόνων σε δείγματα πόσιμου νερού. Στο πόσιμο νερό υπάρχουν πολλές παρεμποδίζουσες ουσίες όπως διάφορα παρασιτοκτόνα και μέταλλα που αναστέλλουν τη δράση της Ακετυλοχολινεστεράσης. Για αυτό το λόγο οι βιοαισθητήρες AChE δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανίχνευση ενός συγκεκριμένου παρασιτοκτόνου σε πραγματικά δείγματα αλλά μόνο για τη μέτρηση της ολικής τοξικότητας των δειγμάτων. Η εύρεση της ολικής τοξικότητας των δειγμάτων νερού πραγματοποιήθηκε με τη μέθοδο της προσθήκης γνωστής ποσότητας. Γνωστές συγκεντρώσεις του παρασιτοκτόνου Dichlorvos προστίθενται στα δείγματα νερού ώστε να βρεθεί η ολική τοξικότητα στο αρχικό άγνωστο δείγμα. Στην Εικόνα 11 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα των μετρήσεων που προέκυψαν

από τις διαδοχικές προσθήκες Dichlorvos στα δείγματα πόσιμου νερού. Από τις γραφικές παραστάσεις υπολογίζεται ότι η ολική τοξικότητα στο αρδευτικό σύστημα του Πανεπιστημίου Κρήτης και σε αυτό της πόλης του Ηρακλείου είναι 1nM και 3nM αντίστοιχα. Η μικρότερη ολική τοξικότητα στο δείγμα του νερού του Πανεπιστημίου Κρήτης πιθανότατα οφείλεται στο σύστημα καθαρισμού του νερού που χρησιμοποιείται στο Πανεπιστήμιο Κρήτης.



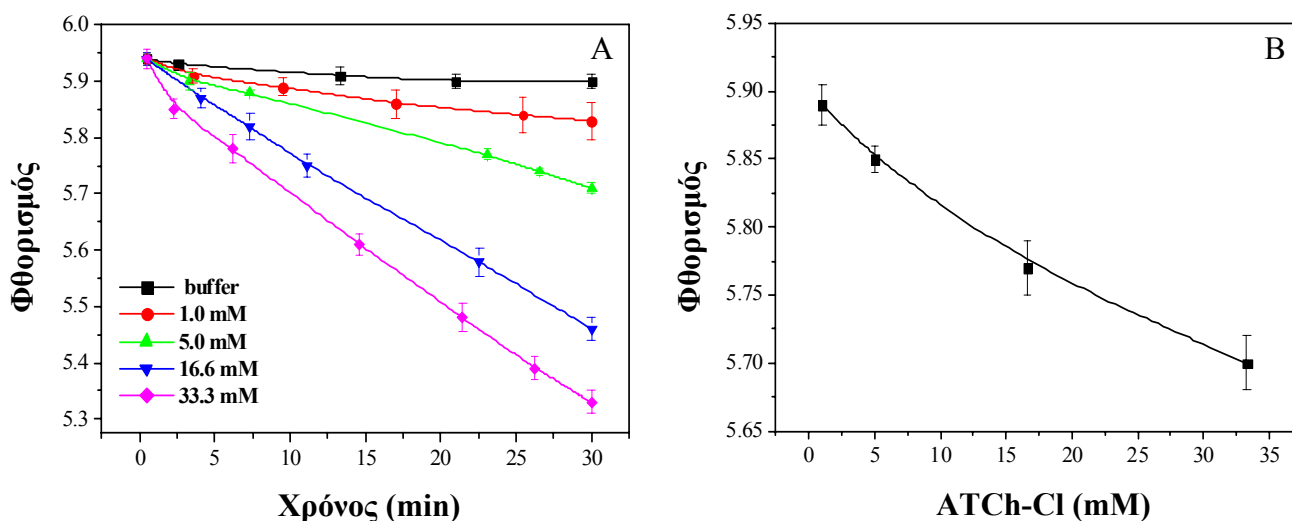
Εικόνα 11. Προσδιορισμός της ολικής τοξικότητας στο αρδευτικό σύστημα του Πανεπιστημίου Κρήτης και της πόλης του Ηρακλείου με τη μέθοδο προσθήκης γνωστής ποσότητας.

7.5 Εισαγωγή βιοαισθητήρα Ακετυλοχολινεστεράσης βασισμένου σε Λιπосώματα σε πήκτη πυριτίου (sol gel)

Ο βιοαισθητήρας λιπосωμάτων που παρασκευάστηκε μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για μία μέτρηση. Προκειμένου να αναπτυχθεί ένας αυτοτελής βιοαισθητήρας, τα λιπосώματα με το ενθυλακωμένο ένζυμο πρέπει να ακινητοποιηθούν σε ένα σταθερό υλικό στο οποίο θα διατηρείται πλήρως η ενεργότητα του ενζύμου. Κάτω από αυτές τις συνθήκες ο βιοαισθητήρας θα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για διαδοχικές μετρήσεις και παράλληλα θα μπορεί να εισαχθεί σε μικροσυσκευές (micro-devices) αλλά και σε συστήματα με έγχυση σε ροή (Flow Injection Systems).

Ο βιοαισθητήρας λιπосωμάτων επιλέχθηκε σε αυτή την εργασία να εισαχθεί σε πήκτη πυριτίου (sol gel). Η διαδικασία παρασκευής των sol gel πολυμερών

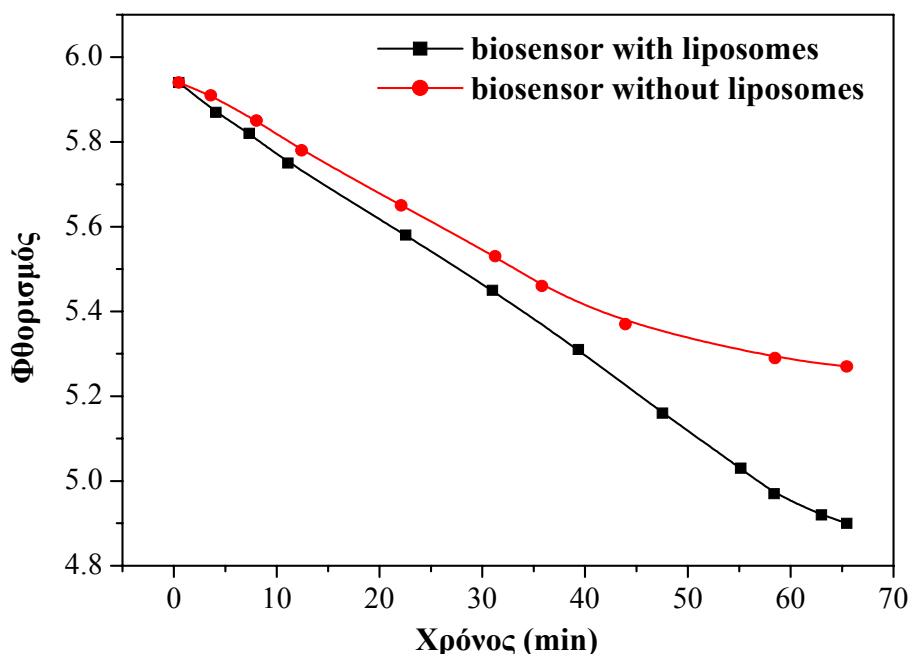
βελτιστοποιείται ώστε να προκύψουν μεμβράνες υψηλής μηχανικής αντοχής, καλής οπτικής διαπερατότητας, χωρίς την παρουσία ρωγμών και υψηλού ποσοστού συρρίκνωσης. Το πρόδρομο μόριο που χρησιμοποιείται για την παρασκευή των sol gel πολυμερών είναι ο τετραμεθυλορθοπυριτικός εστέρας (TMOS). Διάλυμα του TMOS σε H₂O (5/1) με καταλύτη 0.04M HCl τοποθετείται σε λουτρό υπερήχων για 20min ώστε να λάβει χώρα η αντίδραση υδρόλυσης. Στη συνέχεια το διάλυμα του sol gel αναμιγνύεται με το διάλυμα των λιποσωμάτων με το ένζυμο και την πυρανίνη σε αναλογία 2:1 και το μίγμα τοποθετείται σε κυψελίδες. Η αντίδραση πολυμερισμού πραγματοποιείται μέσα σε λίγα λεπτά και οι κυψελίδες με τις sol gel μεμβράνες και τα λιποσώματα φυλάσσονται στους 4° C σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 25mM, pH=7.8, ώστε να αποφευχθεί η συρρίκνωση των μεμβρανών. Το ένζυμο που ακινητοποιείται σε κάθε κυψελίδα είναι 6.4pmol.



Εικόνα 12. A) Σήμα φθορισμού του sol gel βιοαισθητήρα σε συνάρτηση με το χρόνο, για διαφορετικές συγκεντρώσεις ATChCl 1.0, 5.0, 16.6 και 33.3 mM. B) Καμπύλη αναφοράς του sol gel βιοαισθητήρα. Η ένταση του φθορισμού μετράται 10min μετά την προσθήκη του ATChCl (ανίχνευση στα 513nm, ενζυμικό φορτίο 6.4 pmoles).

Εξετάστηκε η απόκριση του sol gel βιοαισθητήρα σε συνάρτηση με το χρόνο σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ακετυλοθειοχολίνης (Εικόνα 12A). Παρατηρείται ότι η ένταση του φθορισμού του δείκτη στις sol gel μεμβράνες μειώνεται με την πάροδο του χρόνου για τις διάφορες συγκεντρώσεις υποστρώματος. Στην Εικόνα 12B παρουσιάζεται η αντίστοιχη καμπύλη αναφοράς του βιοαισθητήρα 10min μετά την προσθήκη του υποστρώματος. Ο βιοαισθητήρας εμφανίζει γραμμική απόκριση για

συγκεντρώσεις υποστρώματος από 1.0 έως 15.0 mM και η ευαισθησία του είναι $7.5 \times 10^{-3} \text{ Abs min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$. Η επαναληψιμότητα των μετρήσεων για το ίδιο εύρος συγκεντρώσεων είναι πολύ ικανοποιητική ($\text{RSD} < 10\%$, $n=3$).



Εικόνα 13. Σήμα φθορισμού του sol gel βιοαισθητήρα σε συνάρτηση με το χρόνο, για συγκέντρωση 16.6mM ATChCl. (●) sol-gel με ελεύθερη AChE, και (■) sol-gel όπου η AChE είναι ακινητοποιημένη σε λιποσώματα (ανίχνευση στα 513nm, ενζυμικό φορτίο 6.4 pmoles).

Κατά τη διαδικασία παρασκευής των sol gel μεμβρανών δημιουργούνται ορισμένα παραπροϊόντα, όπως είναι η μεθανόλη η οποία μπορεί να είναι καταστρεπτική για το ένζυμο. Προκειμένου να εξεταστεί αυτή η πιθανή παράμετρος, παρασκευάζονται δύο sol gel βιοαισθητήρες στους οποίους η ακετυλοχολινεστεράση είτε είναι ενθυλακωμένη σε λιποσώματα είτε ελεύθερη μέσα στη sol gel μεμβράνη. Μετράται η απόκριση των δύο βιοαισθητήρων στο υπόστρωμα (16.6mM ακετυλοθειοχολίνη) σε συνάρτηση με το χρόνο. Όπως φαίνεται στην Εικόνα 13, ο sol gel βιοαισθητήρας στον οποίο η AChE είναι ελεύθερη μέσα στη μεμβράνη εμφανίζει πολύ μικρή απόκριση στο υπόστρωμα σε σύγκριση με τον βιοαισθητήρα με τα λιποσώματα. Η μειωμένη αυτή απόκριση του βιοαισθητήρα χωρίς τα λιποσώματα μπορεί να αποδοθεί στη μερική απενεργοποίηση του ενζύμου μέσα στη sol gel μεμβράνη. Στην προκειμένη περίπτωση αποδεικνύεται ότι τα λιποσώματα προστατεύουν το ένζυμο

από την μεθανόλη που παράγεται κατά τη διαδικασία υδρόλυσης του sol gel διαλύματος.

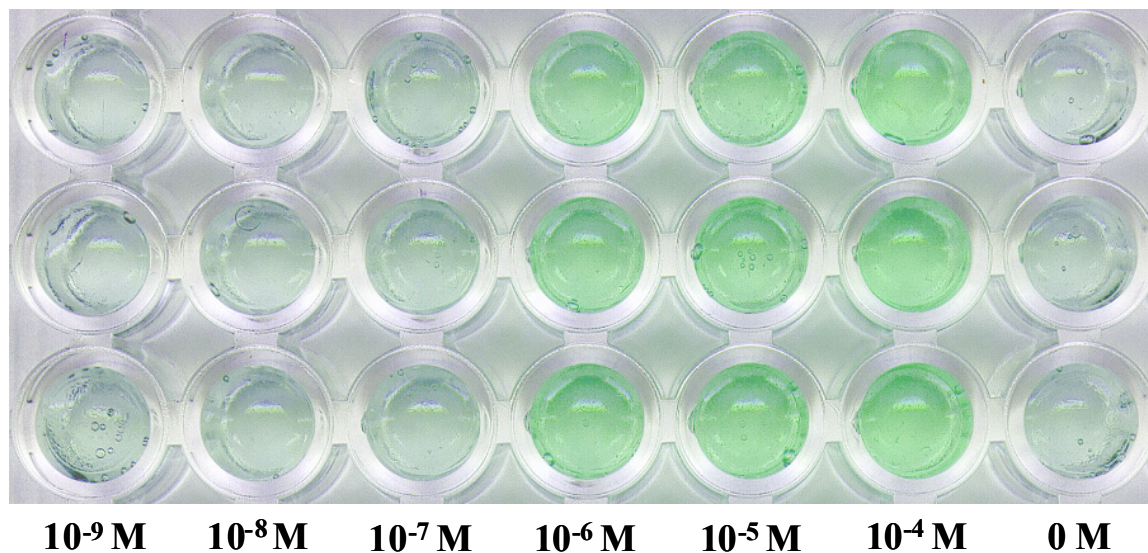
Σύγκριση ελεύθερου βιοαισθητήρα λιποσωμάτων και ακινητοποιημένου σε sol gel

Οι βιοαισθητήρες λιποσωμάτων είτε είναι ακινητοποιημένοι σε sol gel μεμβράνες είτε όχι, εμφανίζουν παρόμοια αναλυτικά χαρακτηριστικά. Και στις δύο περιπτώσεις ο χρόνος απόκρισης του βιοαισθητήρα υπολογίζεται να είναι λιγότερο από 10min. Η ευαισθησία του βιοαισθητήρα με τη sol gel μεμβράνη είναι $7.5 \times 10^{-3} \text{ Abs min}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ και είναι λίγο μικρότερη από την ευαισθησία του βιοαισθητήρα που δεν έχει ακινητοποιηθεί σε sol gel μεμβράνη. Παράλληλα η φαινομενική σταθερά Michaelis (K_M^{app}) του sol gel βιοαισθητήρα υπολογίζεται να είναι 5.3 ενώ αυτή του βιοαισθητήρα χωρίς sol gel είναι 4.9, τιμές παραπλήσιες. Γίνεται επομένως αντιληπτό ότι η κινητική της ενζυμικής αντίδρασης της ακετυλοχολινεστεράσης δεν επηρεάζεται από την ακινητοποίηση του βιοαισθητήρα λιποσωμάτων στη sol gel μεμβράνη. Έτσι ο βιοαισθητήρας λιποσωμάτων μπορεί να βρει πολλαπλές εφαρμογές καθώς η ακινητοποίησή του δεν εμποδίζει τη διάχυση του υποστρώματος μέσα στο ενζυμικό στρώμα και δε μεταβάλλει σημαντικά την κινητική της ενζυμικής αντίδρασης.

Οπτική Μέθοδος για την Ποιοτική Ανίχνευση Παρασιτοκτόνων (Screening)

Με βάση τον sol gel βιοαισθητήρα αναπτύχθηκε μία απλή οπτική μέθοδος για την ποιοτική ανίχνευση παρασιτοκτόνων. Οι βιοαισθητήρες λιποσωμάτων αναμιγνύονται με διάλυμα του sol gel σε αναλογία 2:1 και το μίγμα τοποθετείται σε συστοιχία από μικροκυψελίδες (microtiter plates) όπου και πολυμερίζεται. Μετά την ολοκλήρωση του πολυμερισμού (3h περίπου) σε κάθε μικροκυψελίδα της συστοιχίας εισάγεται διαφορετική συγκέντρωση του παρασιτοκτόνου dichlorvos. Μετά από 15min επώαση με το παρασιτοκτόνο προστίθενται 10mM ακετυλοθειοχολίνης και εξετάζεται η μεταβολή στο χρώμα του δείκτη πυρανίνη σε κάθε μικροκυψελίδα. Παρατηρούνται μεταβολές του χρώματος από ανοιχτό σε σκούρο πράσινο. Στην Εικόνα 14 απεικονίζεται η συστοιχία των μικροκυψελίδων 15min μετά την προσθήκη του υποστρώματος. Οι κυψελίδες που δεν επωαστεί με dichlorvos εμφανίζουν πολύ ανοιχτό πράσινο χρώμα σε αντίθεση με τις κυψελίδες που έχουν επωαστεί με 10^{-6} M dichlorvos και εμφανίζουν σκούρο πράσινο χρώμα. Ωστόσο για συγκεντρώσεις του dichlorvos μικρότερες από 10^{-6} M δεν είναι ευδιάκριτες οι

μεταβολές του χρώματος του δείκτη. Η οπτική αυτή μέθοδος μπορεί να μην παρέχει τα χαμηλά όρια ανίχνευσης που επιτυγχάνονται με τη φθορισμομετρική μέθοδο, ωστόσο μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως σύστημα συναγερμού για την ποιοτική ανίχνευση παρασιτοκτόνων σε πραγματικά δείγματα.



Εικόνα 14. Απεικόνιση της συστοιχίας από κυψέλες παρουσία διαφορετικών συγκεντρώσεων του παρασιτοκτόνου dichlorvos. Η φωτογραφία λαμβάνεται 15min μετά την προσθήκη 10mM ATChCl (χρόνος επώασης με το παρασιτοκτόνο 15min).

7.6 Συμπεράσματα

Συνοψίζοντας στην εργασία αυτή αναπτύσσεται ένας φθορισμομετρικός βιοαισθητήρας που βασίζεται στην ενθυλάκωση του ενζύμου AChE στο εσωτερικό μικρο-περιβάλλον των λιποσωμάτων. Η AChE παρουσιάζει αυξημένη σταθερότητα στο εσωτερικό των λιποσωμάτων καθώς διατηρεί την ενεργότητά της για τουλάχιστον 50 ημέρες. Η εισαγωγή πορινών στη μεμβράνη των λιποσωμάτων επιτρέπει τη μεταφορά του υποστρώματος στο εσωτερικό των λιποσωμάτων και μέσω ενός φθορισμομετρικού δείκτη ευαίσθητου σε μεταβολές του pH παρακολουθείται η ενζυμική αντίδραση. Η απόκριση του βιοαισθητήρα στο υπόστρωμα ακετυλοθειοχολίνη είναι σχετικά γρήγορη και επαναλήψιμη. Ο σφαιρικός αυτός βιοαισθητήρας διαμέτρου 300 ± 4 nm χρησιμοποιείται για την ανίχνευση δύο οργανοφωσφορικών παρασιτοκτόνων του Dichlorvos και του

Paraoxon. Τα όρια ανίχνευσης για τα δύο παρασιτοκτόνα είναι της τάξης των 10^{-10} M, και είναι από τα χαμηλότερα που έχουν επιτευχθεί με φθορισμομετρικό βιοαισθητήρα. Παράλληλα ο βιοαισθητήρας χρησιμοποιείται για την ανίχνευση της ολικής τοξικότητας δειγμάτων πόσιμου νερού. Κατά την εισαγωγή των λιποσωμάτων με το ενθυλακωμένο ένζυμο σε sol gel μεμβράνες προκύπτει ένας αυτοτελής βιοαισθητήρας που εμφανίζει παρόμοια αναλυτικά χαρακτηριστικά με το βιοαισθητήρα που δεν έχει ακινητοποιηθεί στη μεμβράνη. Έτσι επιβεβαιώνεται η σταθερότητα του βιοαισθητήρα με τα λιποσώματα και παράλληλα αυξάνονται οι πιθανές εφαρμογές του. Η ακινητοποίηση του βιοαισθητήρα λιποσωμάτων σε κάποιο υλικό στήριξης όχι μόνο επιτρέπει τη διαδοχική χρήση του σε πολλαπλές μετρήσεις αλλά και συμβάλλει στη δυνατότητα εισαγωγής του σε μικροσυσκευές αλλά και σε συστήματα με έγχυση σε ροή. Ο sol gel βιοαισθητήρας χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη μίας απλής οπτικής μεθόδου για την ποιοτική ανίχνευση παρασιτοκτόνων που βασίζεται απλά στην παρατήρηση της μεταβολής του χρώματος του φθορισμομετρικού δείκτη από ανοιχτό σε σκούρο πράσινο για συγκεντρώσεις παρασιτοκτόνου από 10^{-6} M και μεγαλύτερες.

7.7 Βιβλιογραφία

1. Stryer L., Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, 1997.
2. Walde P., Ichikawa S., Enzymes inside lipid vesicles: preparation, reactivity and applications. *Biomol. Engineer.* 2001, 18, 143.
3. Woodle M.C., Sterically stabilized liposome therapeutics. *Adv. Drug Delivery Rev.* 1995, 16, 249.
4. Drummond D.C., Zignani M., Leroux J.C., Current status of pH-sensitive liposomes in drug delivery. *Prog. Lipid Res.* 2000, 39, 409.
5. Han X., Li G., Lin K., FTIR Study of the Thermal Denaturation of α -Actinin in Its Lipid-Free and Dioleoylphosphatidylglycerol-Bound States and the Central and N-Terminal Domains of α -Actinin in D₂O. *Biochemistry* 1998, 37, 10730.
6. Winterhalter M., Hilty C., Bezrukov S.M., Nardin C., Meier W., Fournier D., Controlling membrane permeability with bacterial porins: application to encapsulated enzymes. *Talanta* 2001, 55, 965.

7. Nasseau M., Boublik Y., Meier W., Winterhalter M., Fournier D., Substrate-permeable encapsulation of enzymes maintains effective activity, stabilizes against denaturation, and protects against proteolytic degradation. *Biotechnol. Bioeng.* 2001, 75, 615.
8. Zardeneta G., Horowitz P.M., Detergent, liposome, and micelle-assisted protein refolding. *Anal. Biochem.* 1994, 223, 1.
9. Taylor M.A., Jones M.N., Vadgama P.M., Higson S.P., The effect of lipid bilayer manipulation on the response of the glucose oxidase-liposome electrode. *Biosens. Bioelectron.* 1997, 12, 467.
10. Kaszuba M., Jones M.N., Hydrogen peroxide production from reactive liposomes encapsulating enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* 1999, 1419, 221.
11. Memoli A., Annesini M.C., Mascini M., Papale S., Petralito S., A comparison between different immobilised glucoseoxidase-based electrodes. *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2002, 29, 1045.
12. Graff A., Winterhalter M., Meier W., Nanoreactors from Polymer-Stabilized Liposomes. *Langmuir* 2001, 17, 919.
13. Kulin S., Kishore R., Helmerson K.; Locascio L., Optical Manipulation and Fusion of Liposomes as Microreactors. *Langmuir* 2003, 19, 8206.
14. Singh A.K., Harrison S.H., Schoeniger J.S., Gangliosides as Receptors for Biological Toxins: Development of Sensitive Fluoroimmunoassays Using Ganglioside-Bearing Liposomes. *Anal. Chem.* 2000, 72, 6019.
15. Pesticides, Industry sales and usage report, Environmental Protection Agency, USA. 2001.
16. Hall G.L., Mourer C.R., Shibamoto T., Development and validation of an analytical method for Naled and Dichlorvos in air. *J. Agric. Food Chem.* 1997, 45, 145.
17. Yao S., Meyer A., Henze G., Comparison of amperometric and UV-spectrophotometric monitoring in the HPLC analysis of pesticides. *Fresenius J. Anal. Chem.* 1991, 339, 207.
18. Sherma J., Pesticides. *Anal. Chem.* 1993, 65, R40.
19. Sherma J., Pesticides. *Anal. Chem.* 1995, 67, R1.
20. Marty J.L., Garcia D., Rouillon R., Biosensors: potential in pesticide detection. *Trends Anal. Chem.* 1995, 14, 329.

21. La Rosa C., Pariente F., Hernandez L., Lorenzo E., Amperometric flow-through biosensor for the determination of pesticides. *Anal. Chim. Acta* 1995, 308, 129.
22. Velasco-Garcia M.N., Mottram T., Biosensor technology addressing agricultural problems. *Biosys. Eng.* 2003, 84, 1.
23. Schulze H., Vorlová S., Villatte F., Bachmann T.T., Schmid R.D., Design of acetylcholinesterases for biosensor applications. *Biosens. Bioelectron.* 2003, 18, 201.
24. Bachmann T.T., Leca B., Vuilatte F., Marty J.L., Fournier D., Schmid R.D., Improved multianalyte detection of organophosphates and carbamates with disposable multielectrode biosensors using recombinant mutants of *Drosophila* acetylcholinesterase and artificial neural networks. *Biosens. Bioelectron.* 2000, 15, 193.
25. Andreescu S., Marty J.L., Twenty years research in cholinesterase biosensors: From basic research to practical applications. *Biomol. Engineer.* 2006, 23, 1.
26. Anitha K., Venkata Mohan S., Jayarama Reddy S., Development of acetylcholinesterase silica sol-gel immobilized biosensor-an application towards oxydemeton methyl detection. *Biosens. Bioelectron.* 2004, 20, 848.
27. Sotiropoulou S., Chaniotakis N.A., Lowering the detection limit of the Acetylcholinesterase biosensor using a nanoporous carbon matrix. *Anal. Chim. Acta* 2005, 530, 199.
28. Sotiropoulou S., Fournier D., Chaniotakis N.A., Genetically engineered acetylcholinesterase-based biosensor for attomolar detection of dichlorvos. *Biosens. Bioelectron.* 2005, 20, 2347.
29. Vakurov A., Simpson C.E., Daly C.L., Gibson T.D., Millner P.A., Acetylcholinesterase-based biosensor electrodes for organophosphate pesticide detection: II. Immobilization and stabilization of acetylcholinesterase. *Biosens. Bioelectron.* 2005, 20, 2324.
30. Liu G., Lin Y., Biosensor Based on Self-Assembling Acetylcholinesterase on Carbon Nanotubes for Flow Injection/Amperometric Detection of Organophosphate Pesticides and Nerve Agents. *Anal. Chem.* 2006, 78, 835.
31. Tran-Minh C., Pandey P.C., Kumaran S., Studies on acetylcholine sensor and its analytical application based on the inhibition of cholinesterase. *Biosens. Bioelectron.* 1990, 5, 461.

32. Snejdarkova M., Svobodova L., Evtugyn G., Budnikov H., Karyakin A., Nikolelis D.P., Hianik T., Acetylcholinesterase sensors based on gold electrodes modified with dendrimer and polyaniline: A comparative research. *Anal. Chim. Acta* 2004, 514, 79.
33. Suwansa-ard S., Kanatarana P., Asawatreratanakul P., Limsakul C., Wongkittisuksa B., Thavarungkul P., Semi disposable reactor biosensors for detecting carbamate pesticides in water. *Biosens. Bioelectron.* 2005, 21, 445.
34. Ristori C., Del Carlo C., Martini M., Barbaro A., Ancarani A., Potentiometric detection of pesticides in water samples. *Anal. Chim. Acta* 1996, 325, 151.
35. Singh A., Flounders A., Volponi J., Ashley C., Wally K., Shoeniger J., Development of sensors for direct detection of organophosphates. Part I: immobilization, characterization and stabilization of acetylcholinesterase and organophosphate hydrolase on silica supports. *Biosens. Bioelectron.* 1999, 14, 703.
36. Navas Díaz A., Ramos Peinado M.C., Sol-gel cholinesterase biosensor for organophosphorus pesticide fluorimetric analysis. *Sens. Actuators B.* 1997, 38-39, 426.
37. Jin S., Xu Z., Chen J., Liang X., Wu Y., Qian X., Determination of organophosphate and carbamate pesticides based on enzyme inhibition using a pH-sensitive fluorescence probe. *Anal. Chim. Acta* 2004, 523, 117.
38. Tsai H., Doong R., Simultaneous determination of pH, urea, acetylcholine and heavy metals using array-based enzymatic optical biosensor. *Biosens. Bioelectron.* 2005, 20, 1796.
39. Andres R.T., Narayanaswamy R., Fibre-optic pesticide biosensor based on covalently immobilized acetylcholinesterase and thymol blue. *Talanta* 1997, 44, 1335.
40. Xavier M.P., Vallejo B., Marazuela M.D., Moreno-Bondi M.C., Baldini F., Falai A., Fiber optic monitoring of carbamate pesticides using porous glass with covalently bound chlorophenol red. *Biosens. Bioelectron.* 2000, 14, 895.
41. Andreou V.G., Clonis Y.D., A portable fiber-optic pesticide biosensor based on immobilized cholinesterase and sol-gel entrapped bromcresol purple for in-field use. *Biosens. Bioelectron.* 2002, 17, 61.

42. Wong F.C.M., Ahmad M., Heng L.Y., Peng L.B. An optical biosensor for dichlorvos using stacked sol-gel films containing acetylcholinesterase and a lipophilic chromoionophore. *Talanta* 2006, 69, 888.
43. Trojanowicz M., Hitchman M.L., Determination of pesticides using electrochemical biosensors. *Tr. Anal. Chem.* 1996, 15, 38.
44. Nunes G.S., Jeanty G., Marty J-L., Enzyme immobilization procedures on screen-printed electrodes for the detection of anticholinesterase pesticides. Comparative study. *Anal. Chim. Acta* 2004, 523, 107.
45. Villatte F., Marcel V., Estrada-Mondaca S., Fournier D., Engineering sensitive acetylcholinesterase for detection of organophosphate and carbamate insecticides. *Biosens. Bioelectron.* 1998, 13, 157.
46. Hart A.L., Collier W.A., Stability and function of screen printed electrodes based on cholinesterase, stabilized by a co-polymer/sugar alcohol mixture. *Sens. Act.B* 1998, 53, 111.
47. Schumacher M., Camp S., Maulet Y., Newton M., MacPhee-Quigley K., Taylor S.S., Friedmann T., Taylor P., Primary structure of *Torpedo californica* acetylcholinesterase deduced from its cDNA sequence. *Nature* 1986, 319, 407.
48. Aldridge W. N., Some properties of specific acetylcholinesterase with particular reference to the mechanism of inhibition by diethyl p-nitrophenyl thiophosphate (E605) and analogues. *Biochem. J.* 1950, 46, 451.
49. Ordentlich A., Kronman C., Barak D., Stein D., Ariel N., Marcus D., Velan B., Shafferman A., Engineering resistance to 'aging' of phosphorylated human acetylcholinesterase Role of hydrogen bond network in the active center. *FEBS Lett.* 1993, 334, 215.
50. Zhang S., Zhao H., John R., A theoretical model for immobilized enzyme inhibition biosensors. *Electroanalysis* 2001, 13, 1528.
51. La Rosa C., Pariente F., Hernández L., Lorenzo E., Determination of organophosphorus and carbamic pesticides with an acetylcholinesterase amperometric biosensor using 4-aminophenyl acetate as substrate. *Anal. Chim. Acta* 1994, 295, 273.
52. Zhang S., Zhao H., John R., Development of a quantitative relationship between inhibition percentage and both incubation time and inhibitor concentration for

-
- inhibitor biosensors-theoretical and practical considerations. *Biosens. Bioelectron.* 2001, 16, 1119.
53. Neufeld T., Eshkenazi I., Cohen E., Rishpon J., A micro flow injection electrochemical biosensor for organophosphorus pesticides. *Biosens. Bioelectron.* 2000, 15, 323.
54. Chaize B., Winterhalter M., Fournier D., Encapsulation of Acetylcholinesterase in preformed liposomes. *BioTechniques* 2003, 34, 1158.
55. Colletier J.P., Chaise B., Winterhalter M., Fournier D., Protein encapsulation in liposomes: efficiency depends on interactions between protein and phospholipid bilayer. *BMC Biotechnology* 2002, 2, 9.
56. Ellman G.L., Courtney K.D., Andres V.Jr., Featherstone R.M., A new and rapid colorimetric determination of Acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.* 1961, 7, 88.
57. Khan G.F., Wernet W. Design of enzyme electrodes for extended use and storage time. *Anal. Chem.* 1997, 69, 2682.
58. Zignani M., Drummond D.C, Meyer O., Hong K., Leroux J.C., In vitro characterization of a novel polymeric-based pH-sensitive liposome system. *Biochim. Biophys. Acta* 2000, 1463, 383.
59. Damiano E., Bassilana M., Rigaud J.L., Leblanc G., Use of the pH sensitive fluorescence probe pyranine to monitor internal pH changes in *Escherichia coli* membrane vesicles. *FEBS Letters* 1984, 166, 120.

8. ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την εργασία αυτή επιβεβαιώνουν ότι οι νανοδομές αποτελούν κατάλληλα υλικά για την ακινητοποίηση και σταθεροποίηση ενζύμων και την ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Οι βιοαισθητήρες που παρασκευάστηκαν παρουσίασαν αυξημένη ευαισθησία και σταθερότητα και χαμηλά όρια ανίχνευσης. Η επιβεβαίωση της επίδρασης που έχει το μέγεθος των πόρων των νανοδομών στη σταθερότητα των ενζύμων θέτει τις βάσεις για την ανάπτυξη νέων σταθερών βιοαισθητήρων.

Ωστόσο περαιτέρω μελέτες απαιτούνται ώστε να αξιοποιηθούν όλες οι δυνατότητες που παρέχουν οι νανοδομές για την ανάπτυξη βελτιωμένων βιοαισθητήρων. Η δυνατότητα τροποποίησης της επιφάνειας των νανοδομών είναι εφικτό να οδηγήσει σε υλικά με συγκεκριμένες δραστικές ομάδες στην επιφάνειά τους, που σε συνδυασμό με τον καθορισμό του μεγέθους των πόρων των νανοδομών μπορεί να συμβάλλει στην ενίσχυση της σταθεροποίησης των βιολογικών μορίων. Επομένως θα ήταν ενδιαφέρον να εξεταστούν νανοπορώδη υλικά με διάφορα μεγέθη πόρων και διάφορες δραστικές επιφανειακές ομάδες ως υποστρώματα για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Παράλληλα η χημική τροποποίηση των νανοϊνών άνθρακα είναι δυνατό να οδηγήσει σε υλικά με ακόμα μεγαλύτερη δραστική επιφάνεια και συγκεκριμένες δραστικές ομάδες που θα αλληλεπιδρούν καλύτερα με τα βιολογικά μόρια και θα συμβάλλουν στην βελτίωση των βιοαισθητήρων. Όσον αφορά στις νανοδομές των λιποσωμάτων περαιτέρω βελτιστοποίησή τους είναι δυνατό να πραγματοποιηθεί μέσω της σταθεροποίησης της μεμβράνης των λιποσωμάτων με διάφορες μεθόδους που θα συμβάλλει στην αυξημένη σταθεροποίηση των βιολογικών μορίων στο εσωτερικό τους.

Εκτός όμως από τις νανοδομές που αναφέρθηκαν σε αυτή την εργασία ενδιαφέρον θα είναι να μελετηθεί η χρήση μονοδιάστατων-κβαντικών νανοϋλικών όπως είναι οι κβαντικές τελείες στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Οι νανοδομές αυτές έχουν οπτικά χαρακτηριστικά, όπως φθορισμό, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ανάπτυξη νέων οπτικών βιοαισθητήρων. Αναμένεται ότι η αλληλεπίδραση τους με πρωτεϊνικά μόρια, οργανικούς ή ανόργανους υποκαταστάτες είναι δυνατό να οδηγήσει σε συστήματα βιοαισθητήρων με βελτιωμένα αναλυτικά χαρακτηριστικά.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

ΣΠΟΥΔΕΣ

- 2003-σήμερα:** Εκπόνηση Διδακτορικής Διατριβής στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Ν. Χανιωτάκη, με θέμα «ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ ΣΕ NANOΔΟΜΕΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ».
- 2001-2003:** Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Ν. Χανιωτάκη, με θέμα «NANOΔΟΜΕΣ ΣΕ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΚΑΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ».
- 1997-2001:** Πτυχίο Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης, Βαθμός πτυχίου 8.08 (Λίαν καλώς).
- 1993-1996:** Τέταρτο Γενικό Λύκειο Χανίων, Βαθμός απολυτηρίου 18 και 1/10.

ΕΠΑΓΓΕΛΜΑΤΙΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Ερευνητική Εμπειρία

- 03-09/2003:** Πανεπιστήμιο Kentucky. Lexington. Αμερική. Εργαστήριο Αναλυτικής Βιοχημείας. Μελέτη της απομόνωσης της Glucose Binding Protein (GBP) και ανάπτυξη GBP αισθητήρα. Υπεύθυνη Καθηγήτρια κ. S. Daunert.
- 2000-2001:** Διπλωματική εργασία στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, υπό την επίβλεψη του Καθηγητή κ. Ν. Χανιωτάκη, με θέμα «Μελέτη βελτιστοποίησης βιοαισθητήρων βασισμένων στα ένζυμα

Τυροσινάση και Οξειδάση της Γλυκόζης». Βαθμός διπλωματικής 10/10.

Συμμετοχή σε Ερευνητικά Προγράμματα

- 2006-Σήμερα:** Ευρωπαϊκό Πρόγραμμα GANANO (“New Generation of GaN-based sensor arrays for nano- and pico-fluidic systems for fast and reliable biomedical testing”, European Commission Research Contract No.STREP-505641-1).
- 2004-2005:** Πρόγραμμα Ηράκλειτος του Υπουργείου Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων (“Σταθεροποίηση βιομορίων σε νανοδομές για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων”, Ε.Π.Ε.Α.Ε.Κ. II).
- 2001-2003:** Ευρωπαϊκό Πρόγραμμα SAFEGARD (“Sensor Arrays for Environmental, Generic and Routine Detection of Pesticides”, European Commission Research Contract No.QLK3-CT-2000-000481).

Διδακτική Εμπειρία

- 01-12/2001:** Βοηθός στα Εργαστήρια Αναλυτικής Χημείας I και II. Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Υπεύθυνος κ. Ι. Σαριδάκης.
- 02-06/2005:** Φροντιστηριακές ασκήσεις στο μάθημα «Αναλυτική Χημεία I». Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης. Υπεύθυνος Καθηγητής κ. Ν. Α. Χανιωτάκης.

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

1. Novel Carbon Materials in Biosensor Systems. S. Sotiropoulou, V. Gavalas, V. Vamvakaki, N.A. Chaniotakis, *Biosensors & Bioelectronics*, **2003**, 18, 211-215.
2. Stabilization of Enzymes in Nanoporous Materials for Biosensor Applications. S. Sotiropoulou, V. Vamvakaki, N.A. Chaniotakis, *Biosensors & Bioelectronics*, **2004**, 20, 18, 1674-1679.
3. Fluorescence detection of enzymatic activity within a liposome based nano-biosensor. V. Vamvakaki, D. Fournier, N.A. Chaniotakis, *Biosensors & Bioelectronics*, **2005**, 21, 384-388.
4. Carbon Nanofiber-based Glucose Biosensor. V. Vamvakaki, K. Tsagaraki, N.A. Chaniotakis, *Analytical Chemistry*, **2006**, *In press*.
5. Immobilization of Enzymes into Nanocavities for the Improvement of Biosensor Stability. V. Vamvakaki, N.A. Chaniotakis, *Biosensors & Bioelectronics*, **2006**, *In press*.
6. Carbon Nanostructures as Transducers in biosensors. V. Vamvakaki, N.A. Chaniotakis, *Sensors & Actuators B*, **2006**, *Accepted*.
7. Pesticide Detection with a Liposome-Based Nano-Biosensor. V. Vamvakaki, N.A. Chaniotakis, *Biosensors & Bioelectronics*, **2006**, *Accepted*.

ΑΝΑΚΟΙΝΩΣΕΙΣ ΣΕ ΣΥΝΕΔΡΙΑ

Γραπτές Ανακοινώσεις

1. Recombinant Acetylcholinesterase enzyme-based activated carbon biosensor for detection of organophosphorus pesticides. S. Sotiropoulou, V. Vamvakaki,

- N.A. Chaniotakis, “7th World Congress on BIOSENSORS”, Kyoto, Japan, **2002**.
2. Lowering the Detection Limit of the Acetylcholinesterase-based Pesticide Biosensor. S. Sotiropoulou, V. Vamvakaki, D. Fournier, N. A. Chaniotakis, “EUROANALYSIS 2002”, Dortmund, Germany **2002**.
 3. Detection of pesticides using a Genetically Engineered AChE-based Biosensor. S. Sotiropoulou, V. Vamvakaki, D. Fournier, N. A. Chaniotakis, “19th National Chemistry Conference”, Iraklion, Crete, Greece, **2002**.
 4. Pesticide Biosensor for Direct Environmental Analysis. S. Sotiropoulou, V. Vamvakaki, D. Fournier, N. A. Chaniotakis, “3rd Aegean Analytical Chemistry Days”, Lesvos, Greece, **2002**.
 5. Stabilization of Enzymes in Nanoporous Materials for Biosensor Applications, S. Sotiropoulou, V. Vamvakaki, N.A Chaniotakis, “8th World Congress on BIOSENSORS”, Granada, Spain, **2004**.
 6. Novel Fluorescent Liposome Biosensor. V. Vamvakaki, S. Sotiropoulou, D. Fournier, N.A. Chaniotakis, “8th World Congress on BIOSENSORS”, Granada, Spain, **2004**.
 7. Biosensors Based on Enzymes Stabilized in Nanoporous Materials. V. Vamvakaki, N.A. Chaniotakis, “Instrumental Methods of Analysis (IMA)”, Crete, Greece, **2005**.
 8. Fluorescence Detection of Enzymatic Activity within a Liposome based Nano-Biosensor. V. Vamvakaki, S. Sotiropoulou, D. Fournier, N.A. Chaniotakis “PITTCON 2005”, Orlando, Florida, USA, **2005**.
 9. Biosensors Based on Enzymes Stabilized in Nanocavities. V. Vamvakaki, N.A. Chaniotakis, “PITTCON 2006”, Orlando, Florida, USA, **2006**.

Προφορικές Ανακοινώσεις

1. Atto - molar Detection of Organophosphorus Pesticides using a Recombinant Acetylcholinesterase – based Biosensor. N.A.Chaniotakis, S. Sotiropoulou, V. Vamvakaki, D. Fournier, “PITTCON 2003”, Orlando, Florida, USA, **2003**.
2. Σταθεροποίηση Ενζύμων σε Λιποσώματα για την Ανάπτυξη Φθορισμομετρικού Βιοαισθητήρα. B. Βαμβακάκη, N.A. Χανιωτάκης, “Συνέδριο Μεταπτυχιακών Φοιτητών Παν/μίου Κρήτης” Κολυμπάρι, Κρήτη, Ελλάδα, **2004**.
3. Nanostructures in BioSensors. V. Vamvakaki, N.A. Chaniotakis, “Nanotechnology in BioDiagnostics and Analytics (NBDA)”, Grenoble, France, **2005**.
4. Nanomaterials in the Design of Chemical Sensors and Biosensors. A Bottom Up Approach. S. Sotiropoulou, V. Vamvakaki, N.A. Chaniotakis, “Aegean Analytical Chemistry Days”, Thessaloniki, Greece, **2006**.

ΑΛΛΕΣ ΓΝΩΣΕΙΣ

Ξένες Γλώσσες

Αγγλικά: Καλή (Cambridge First Certificate)

Υπολογιστές

Γνώση και χρήση Η/Υ σε περιβάλλον Windows '98 και 2000.

Προγράμματα Microsoft Office (Word, Excel, PowerPoint), Origin, Corel.