

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ  
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΑΛΥΤΙΚΗΣ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΙ ΣΕ  
ΝΑΝΟΪΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΑ  
ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΟ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΠΥΡΙΤΙΟΥ**

**ΑΙΜΙΛΙΑ ΨΑΡΟΥΛΗ**

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2010

**GLUCOSE BIOSENSORS BASED ON CARBON  
NANOFIBERS AND BIOSILICA**

## **ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ**

**Χανιωτάκης Νίκος** (*Επιβλέπων Καθηγητής*)

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

**Γανωτάκης Δημήτριος**

Καθηγητής Τμήματος Χημείας Πανεπιστημίου Κρήτης

**Θερμού Κυριακή**

Καθηγήτρια Φαρμακολογίας Τμήματος Ιατρικής Πανεπιστημίου Κρήτης

## **ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ**

Η παρούσα εργασία πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας, του Πανεπιστημίου Κρήτης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον υπεύθυνο καθηγητή μου, κ. Ν. Χανιωτάκη για την πολύτιμη καθοδήγηση του, την εμπιστοσύνη του και την ηθική υποστήριξή του κατά την εκπόνηση του διπλώματος ειδίκευσης και ελπίζω να φανώ αντάξια στις προσδοκίες του.

Παράλληλα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τα υπόλοιπα μέλη της Τριμελούς Εξεταστικής Επιτροπής μου, τους καθηγητές κ. Δ. Γανωτάκη και κ. Κ. Θερμού, που δέχτηκαν να αξιολογήσουν τη συγκεκριμένη εργασία, αλλά και για τα πολύτιμα σχόλια και τις παρατηρήσεις τους που συνέβαλαν στην τελική διαμόρφωση αυτής της εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τις διδάκτορες Β. Βαμβακάκη, Κ. Περδικάκη 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.

Ιδιαίτερα θα ήθελα να ευχαριστήσω την καθηγήτρια κ. Μ. Κανακίδου για τις ανεκτίμητες συμβουλές της και την ηθική υποστήριξη της κατά την εκπόνηση της παρούσας εργασίας, καθώς και το διδάκτορα Β. Παπαδημητρίου για την σημαντική βοήθεια του σε ό,τι και αν τον χρειάστηκα.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους πραγματικούς φίλους που απέκτησα κατά τη διάρκεια των σπουδών μου στο Πανεπιστήμιο Κρήτης για τις όμορφες στιγμές που περάσαμε μαζί. Αυτοί δεν είναι άλλοι από τους Κ. Κολιαδίμα, Ν. Αλτάνη, Ι. Παναγάκου, Ε. Κωστομοίρη, Φ. Ρόσσα, Ν. Αλεξανδρίδης.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τους γονείς μου για την αμέριστη συμπαράστασή τους και τη συνεχή υποστήριξή τους όλα αυτά τα χρόνια.

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b>1. ABSTRACT - ΠΕΡΙΛΗΨΗ .....</b>	<b>1</b>
<b>2. ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ .....</b>	<b>4</b>
2.1 ΟΡΙΣΜΟΣ – ΑΡΧΗ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑΣ .....	4
<i>Βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης .....</i>	<i>5</i>
<i>Μεταλλάκτης σήματος.....</i>	<i>6</i>
2.2 ΑΜΠΕΡΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ.....	7
<i>Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων .....</i>	<i>9</i>
<i>Εξέλιξη αμπερομετρικών βιοαισθητήρων .....</i>	<i>10</i>
2.3 ΑΝΑΛΥΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ.....	15
2.4 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	18
<b>3. ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ENZYΜΩΝ.....</b>	<b>20</b>
3.1 ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ENZYΜΩΝ .....	21
3.2 ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ENZYΜΩΝ ΜΕ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ.....	23
3.3 ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗ ENZYΜΩΝ ΣΕ ΝΑΝΟΔΟΜΕΣ .....	25
3.4 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	28
<b>4. ΝΑΝΟΪΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ.....</b>	<b>31</b>
4.1 ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΝΑΝΟΪΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ .....	31
4.2 ΧΗΜΙΚΗ ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΝΑΝΟΪΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ .....	33
4.3 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΝΑΝΟΪΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ ΣΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ.....	34
4.4 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	38
<b>5. ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΑ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΟ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΠΥΡΙΤΙΟΥ .....</b>	<b>40</b>
5.1 ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΑ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΟΥ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΠΥΡΙΤΙΟΥ ΑΠΟ ΤΑ ΔΙΑΤΟΜΑ .....	40
5.2 ΤΑ ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΣΤΑ ΔΙΑΤΟΜΑ ΓΙΑ ΤΟ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ ΤΟΥ ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΑ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΟΥ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΠΥΡΙΤΙΟΥ .....	43
5.3 ΧΗΜΕΙΑ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΠΥΡΙΤΙΟΥ ΚΑΙ Η ΔΟΜΗ ΤΩΝ SILAFFINS .....	44

5.4 ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΣΗ ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΑ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΟΥ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΠΥΡΙΤΙΟΥ ΣΕ ΠΟΛΥ-ΑΜΙΝΕΣ .....	45
5.5 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ .....	46
5.6 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	48
<b>6. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΟΥ ΣΕ ΝΑΝΟΙΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΑ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΟ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΠΥΡΙΤΙΟΥ, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΜΕΤΑΦΟΡΕΑ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ .....</b>	<b>51</b>
6.1 ΕΝΖΥΜΙΚΗ ΔΡΑΣΗ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ .....	51
6.2 ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΝΑΝΟΪΝΩΝ ΑΝΘΡΑΚΑ .....	54
6.3 ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΩΝ ΙΔΙΟΤΗΤΩΝ .....	54
<i>Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης Υψηλής Ανάλυσης (TEM-High Resolution) .....</i>	<i>54</i>
<i>Φασματοσκοπία Raman.....</i>	<i>55</i>
6.4 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΝΑΝΟΪΒΡΙΔΙΟΥ CNFs/MED/GOx/SILICA.....	56
6.5 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΝΑΝΟΪΒΡΙΔΙΟΥ ΜΕ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΥΠΕΡΥΘΡΟΥ (ATR-FT-IR).....	57
6.6 ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΣ ΣΕ ΝΑΝΟΙΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΑ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΟ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΠΥΡΙΤΙΟΥ .....	61
<i>Μελέτη Σταθερότητας Βιοαισθητήρα σε Συνθήκες Συνεχούς Λειτουργίας .....</i>	<i>63</i>
6.7 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	65
<b>7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ .....</b>	<b>67</b>
<b>ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ.....</b>	<b>69</b>

## 1.ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Οι μοναδικές φυσικές και ηλεκτροχημικές ιδιότητες των νανοϊνών άνθρακα, τις καθιστούν ως εξαιρετικά υλικά ακινητοποίησης ενζύμων και ταυτόχρονα ως μεταλλάκτες σήματος. Η χημική τροποποίηση των υλικών αυτών, αυξάνει την περιεκτικότητα τους σε οξυγονούχες ομάδες, με αποτέλεσμα οι οξειδωμένες νανοΐνες άνθρακα να αποτελούν ένα πολύ καλό υπόστρωμα για την ακινητοποίηση και σταθεροποίηση ενζύμων. Η σύζευξη επομένως χημικά τροποποιημένων νανοϊνών άνθρακα με ένζυμα, μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων με βελτιστοποιημένα αναλυτικά χαρακτηριστικά όπως η ευαισθησία και η σταθερότητα.

Έχει αποδειχθεί ότι οι βιομιμητικά παραγόμενες πυριτικές δομές είναι ιδανικά υποστρώματα για την ακινητοποίηση και σταθεροποίηση των ενζύμων, χωρίς να επηρεάζεται η καταλυτική τους ενεργότητα. Τα διάτομα είναι εξαιρετικά παραδείγματα για τον σχηματισμό νανοδομών βασισμένων στο πυρίτιο. Έχει αποδειχθεί ότι συγκεκριμένες πρωτεΐνες που βρίσκονται στα διάτομα και στα σφουγγάρια είναι υπεύθυνες για την βιογένεση του οξειδίου του πυριτίου. Η διευκρίνιση της δομής αυτών των πρωτεϊνών επέτρεψε το σχεδιασμό πρότυπων πολυπεπτιδίων, τα οποία είναι ικανά να συνθέσουν βιομιμητικά παραγόμενο διοξείδιο του πυριτίου. Ένα τέτοιο πολυπεπτίδιο είναι το πολυμερές της πολύ-L-λυσίνης, το οποίο μπορεί να καταλύσει το σχηματισμό του οξειδίου του πυριτίου *in vitro*, αφού αποτελείται από κατάλοιπα που είναι θετικά φορτισμένα σε ουδέτερο pH.

Σε αυτή την εργασία χρησιμοποιούνται οξειδωμένες νανοΐνες άνθρακα, για την ακινητοποίηση του ενζύμου της οξειδάσης της γλυκόζης μέσω απλής προσρόφησης, παρουσία μεταφορέα ηλεκτρονίων. Η χρήση του μεταφορέα ηλεκτρονίων παρέχει τη δυνατότητα της μείωσης του δυναμικού στο ηλεκτρόδιο εργασίας στα 400mV, γεγονός που μειώνει τις παρεμβολές από άλλα οξειδοαναγωγικά συστήματα και επιτρέπει την άμεση μέτρηση πραγματικών δειγμάτων. Τέλος, το βιομιμητικά παραγόμενο διοξείδιο του πυριτίου δημιουργεί μία κάψα πυριτίου γύρω από το νανοϋβρίδιο νανοΐνες άνθρακα/ οξειδάση της γλυκόζης/ μεταφορέα ηλεκτρονίων, η οποία προστατεύει την ενεργή διαμόρφωση τόσο του ενζύμου όσο και ολόκληρου του νανοϋβριδίου.

Τα αποτελέσματα από την παρούσα εργασία δείχνουν ότι οι χημικά τροποποιημένες νανοϊνες άνθρακα σε συνδυασμό με το βιομιμητικά παραγόμενο διοξείδιο του πυριτίου ανοίγουν το δρόμο για το σχεδιασμό και την ανάπτυξη βιοαισθητήρων με βελτιωμένα αναλυτικά χαρακτηριστικά. Η τεχνολογία αυτή θα δώσει νέα ώθηση στην κατασκευή και ανάπτυξη βιοαισθητήρων με μεγάλο εύρος εφαρμογών.

#### ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ

Βιοαισθητήρας- Νανοϊνες άνθρακα - Οξειδάση γλυκόζης- Οξείδωση νανοϊνών άνθρακα- Σταθερότητα-Μεταφορέας Ηλεκτρονίων-Βιομιμητικά παραγόμενο διοξείδιο του πυριτίου



## **1. ABSRACT**

Carbon nanofibers are promising materials for the development of biosensors due to their unique electrochemical properties, high surface area, as well as their high mechanical and chemical stability. Oxidation of carbon nanofibers provides the possibility of introducing new additional functional groups onto their surface, lending them more attractive as enzyme immobilization matrices. For this, the conjugation of chemically modified carbon nanofibers with enzymes can lead to the development of biosensors with improved characteristics, such as higher sensitivity and better stability.

Recently, silica biomimetic composites have proven to be an excellent matrix for the encapsulation and stabilization of enzymes. The impressive silica structures formed by diatoms are among the most remarkable examples of biological nanofabrication. It has been shown that certain proteins found in diatoms are responsible for the mediation of the formation of the biogenic silica structures. The elucidation of the chemical structures of these proteins has allowed for the design of model polypeptides which can also serve as very efficient templates for the biomimetic formation of silica nanoparticles, using silicic acid as the building block. Furthermore, utilizing specific biomacromolecules, the synthesis of new bioinspired and biomimetic materials can now be achieved. One such generic but highly efficient template for the formation of silica is the poly(L-lysine) polymer. This template can catalyze the formation of silica in vitro since it is composed of residues which are positively charged at neutral pH.

In this study, oxidized carbon nanofibers have been modified with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. The oxidized carbon nanofibers have been utilized for the development of glucose biosensor for the detection and monitoring of glucose. Glucose oxidase was adsorbed on the oxidized nanofibers in the presence of a mediator. The mediator allows for the reduction of the working potential to 400mV, at which potential the interferences by other redox species is minimized, allowing for the direct measurement of real samples. Finally, biomimetically synthesized silica creates a capsule of silicon round the nanocomposite CNFs/glucose oxidase/mediator, which increases the enzyme stabilization against thermal denaturation, while it protects the protein from external protease attack.

The transduction efficiency of carbon nanofibers in combination with the enhanced stabilization of glucose oxidase and in the presence of a mediator, paves the way for a new class of biosensors with enhanced analytical characteristics, which could be applied in a variety of biosensing disciplines.

## KEYWORDS

Biosensors- carbon nanofibers- glucose oxidase- oxidation of carbon nanofibers- stability-mediator-biomimetically synthesized silica

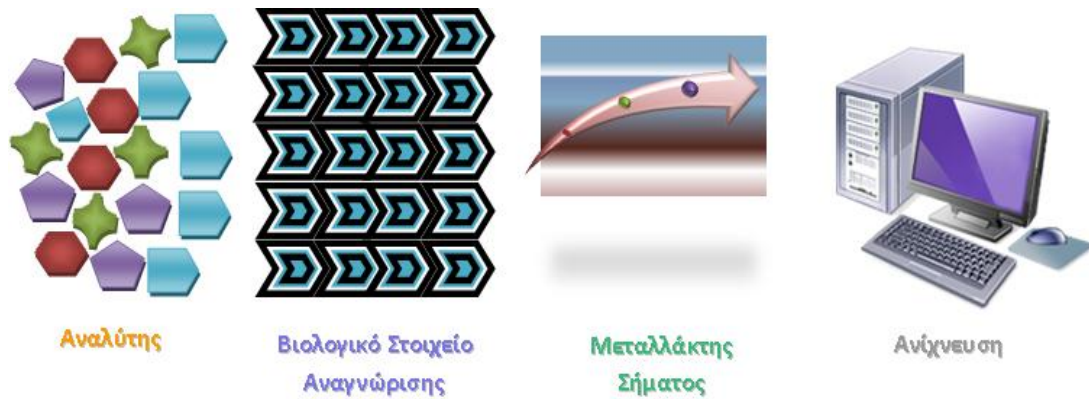
## **2. ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ**

### **2.1 Ορισμός – Αρχή Λειτουργίας**

Οι βιοαισθητήρες αποτελούν ένα ελκυστικό πεδίο έρευνας εξαιτίας της ικανότητας τους να δίνουν ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες για διάφορες χημικές ουσίες. Η ανάπτυξη του πρώτου βιοαισθητήρα το 1962 από τον Clark<sup>i,ii</sup> έθεσε τις βάσεις για την περαιτέρω εξέλιξη τους. Ιδιαίτερα τα τελευταία χρόνια έχουν πραγματοποιηθεί πολλές προσπάθειες από την επιστημονική κοινότητα για την ανάπτυξη νέων, καινοτόμων βιοαισθητήρων με βελτιωμένα χαρακτηριστικά. Η ιδιαιτερότητα των συστημάτων βιοαισθητήρων σε σχέση με άλλα αναλυτικά όργανα οφείλεται στο γεγονός ότι συνδυάζουν την ευαισθησία των χημικών αισθητήρων και την επιλεκτικότητα των βιολογικών μηχανισμών αναγνώρισης. Μέχρι στιγμής, πλήθος εφαρμογών σχετίζεται με τα συστήματα βιοαισθητήρων σε διάφορα πεδία όπως στην ιατρική, σε περιβαλλοντικές αναλύσεις, στη βιοτεχνολογία καθώς και σε αναλύσεις τροφίμων.

Οι βιοαισθητήρες είναι χημικοί αισθητήρες στους οποίους η χημική αναγνώριση πραγματοποιείται μέσω ενός βιοχημικού μηχανισμού. 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 ημι-ποσοτικές αναλυτικές πληροφορίες χρησιμοποιώντας ένα βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης που βρίσκεται σε άμεση επαφή με ένα ηλεκτροχημικό μεταλλάκτη σήματος.»*<sup>iii,iv</sup> Στα συστήματα βιοαισθητήρων, τα βιολογικά μόρια αλληλεπιδρούν με την προς ανάλυση ουσία και μέσω την επιλεκτικής βιολογικής αντίδρασης παράγεται το αναλυτικό σήμα.

Οι βιοαισθητήρες αποτελούνται από δύο βασικά τμήματα, το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης και το φυσικοχημικό μεταλλάκτη σήματος. Η αρχή λειτουργίας των βιοαισθητήρων στηρίζεται στη σύζευξη των προαναφερθέντων δύο τμημάτων, όπως φαίνεται στην Εικόνα 1.



**Εικόνα 1.** Γενικό διάγραμμα λειτουργίας των βιοαισθητήρων

#### *Βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης*

Το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης<sup>v</sup> είναι ένα βιολογικό μόριο, το οποίο βρίσκεται στη διεπιφάνεια του βιοαισθητήρα με το δείγμα και αλληλεπιδρά επιλεκτικά μόνο με την προς ανάλυση ουσία και δεν επηρεάζεται από την ύπαρξη παρεμποδίζοντων ουσιών. Το βιολογικό μόριο κατά την επιλεκτική βιολογική αναγνώριση μπορεί, είτε να αποικοδομεί την προς ανάλυση ουσία, είτε να υφίσταται μεταβολές στη δομή του ή στις βιολογικές ή φυσικοχημικές ιδιότητές του. Ανάλογα με το είδος της αλληλεπίδρασης που λαμβάνει χώρα κατά τη βιολογική αναγνώριση, οι βιοαισθητήρες διακρίνονται σε δύο κατηγορίες, *κατάλυσης* και *συγγένειας*<sup>vi</sup>.

#### *Βιοαισθητήρες Κατάλυσης*

Οι βιοαισθητήρες κατάλυσης βασίζονται στην κατάλυση μιας συγκεκριμένης αντίδρασης από το βιολογικό στοιχείο αναγνώρισης, στην οποία η προς ανάλυση ουσία συμμετέχει ως αντιδρών ή προϊόν. Τα βιολογικά μόρια, που χρησιμοποιούνται πιο συχνά σε αυτή την κατηγορία βιοαισθητήρων, είναι τα ένζυμα. Τα ένζυμα αποτελούν πρωτεΐνες που έχουν την ικανότητα εξειδικευμένης αναγνώρισης και δέσμευσης ενός συγκεκριμένου υποστρώματος, καταλύοντας την ταχύτατη μετατροπή του στα αντίστοιχα προϊόντα.

#### *Βιοαισθητήρες Συγγένειας*

Στους βιοαισθητήρες συγγένειας το βιολογικό μόριο αλληλεπιδρά με μόρια του αναλύτη. Τα βιολογικά μόρια που χρησιμοποιούνται κυρίως σε αυτή την κατηγορία είναι τα αντισώματα, τα νουκλεϊκά οξέα και οι υποδοχείς. Λόγω της

συμπληρωματικής δομής που παρουσιάζουν τα βιολογικά μόρια ως προς τα μόρια του αναλύτη, δεσμεύονται μεταξύ τους προς σχηματισμό συμπλόκου. Η δέσμευση είναι μη-αντιστρεπτή αφού η σταθερά δέσμευσης του βιολογικού μορίου με τον αναλύτη είναι μεγάλη, γεγονός που καθιστά εφικτή την ανίχνευση πολύ μικρών συγκεντρώσεων του αναλύτη. Βέβαια, η μη αντιστρέψιμη διαδικασία δέσμευσης καθιστά αδύνατη τη χρήση των αντίστοιχων βιοαισθητήρων παραπάνω από μία φορά.

#### *Μεταλλάκτης σήματος*

Ο μεταλλάκτης σήματος μετατρέπει τις μεταβολές, που προκύπτουν από την αλληλεπίδραση του βιολογικού στοιχείου με την προς ανάλυση ουσία σε σήμα, το οποίο αφού ανιχνευτεί, μπορεί να εξαχθεί η αναλυτική πληροφορία, με την κατάλληλη επεξεργασία. Ανάλογα με το αποτέλεσμα που προκύπτει κατά τη βιολογική αναγνώριση και το είδος των αλλαγών που επέρχονται στο σύστημα, επιλέγεται ο καταλληλότερος μεταλλάκτης σήματος σε κάθε περίπτωση. Με βάση τον μεταλλάκτη σήματος που χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση, οι βιοαισθητήρες διακρίνονται σε ηλεκτροχημικούς, οπτικούς, πιεζοηλεκτρικούς και θερμικούς, όπως φαίνεται και στον παρακάτω πίνακα.

**Πίνακας 1 :** Διαχωρισμός βιοαισθητήρων με βάση τον μεταλλάκτη σήματος που χρησιμοποιείται.

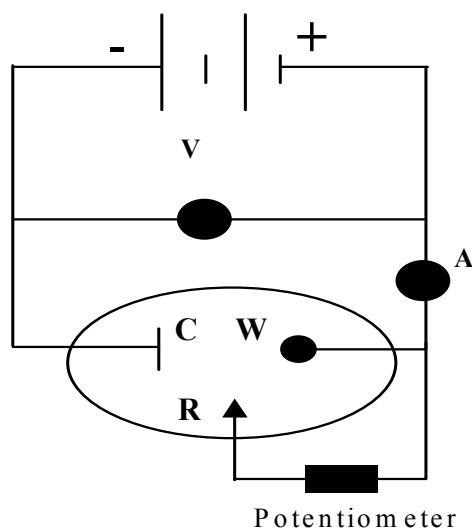
<b>Τύπος</b>	<b>Μετρούμενη Παράμετρος</b>
Ηλεκτροχημικός	
α. Αγωγιμομετρικός	Αγωγιμότητα
β. Ποτενσιομετρικός	Δυναμικό
γ. Αμπερομετρικός	Ρεύμα - Φορτίο
Οπτικός	Οπτικές Ιδιότητες (απορρόφηση, φθορισμός, κλπ)
Θερμικός	Έκλυση – Απορρόφηση Θερμότητας
Πιεζοηλεκτρικός	Αλλαγές στη μάζα

Οι πλέον χρησιμοποιούμενοι και καλύτερα χαρακτηρισμένοι βιοαισθητήρες είναι οι ενζυμικοί αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες των οποίων τα χαρακτηριστικά και ο τρόπος λειτουργίας περιγράφονται αναλυτικά στην επόμενη παράγραφο.

## 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 οξείδωση ή την αναγωγή των ηλεκτρενεργών ουσιών πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας. Το σύστημα που χρησιμοποιείται στην αμπερομετρία αποτελείται από τρία ηλεκτρόδια, το ηλεκτρόδιο εργασίας, το αναφορικό ηλεκτρόδιο και το βοηθητικό ηλεκτρόδιο, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 2. Κατά τη διαδικασία ανάλυσης εφαρμόζεται σταθερό δυναμικό μεταξύ του ηλεκτροδίου εργασίας και του αναφορικού ηλεκτροδίου μέσω ενός ποτενσιοστάτη. Η επιλογή της τιμής του δυναμικού συσχετίζεται με την ικανότητα των ηλεκτρενεργών ουσιών να μπορούν να οξειδωθούν ή να αναχθούν στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Το ρεύμα που παράγεται κατά την οξείδωση ή την αναγωγή των ηλεκτρενεργών ουσιών, διαρρέει το σύστημα 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 και τον μεταλλάκτη που είναι το ηλεκτρόδιο εργασίας. Κατά την προσθήκη του βιοαισθητήρα σε δείγμα, η προς ανάλυση ουσία διαχέεται προς το ενζυμικό στρώμα, αναγνωρίζεται επιλεκτικά και δεσμεύεται από το ακινητοποιημένο ένζυμο. Κατά την ενζυμική αντίδραση παράγεται το προϊόν το οποίο οξειδώνεται ή ανάγεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας, με αποτέλεσμα την παραγωγή ηλεκτρονίων.

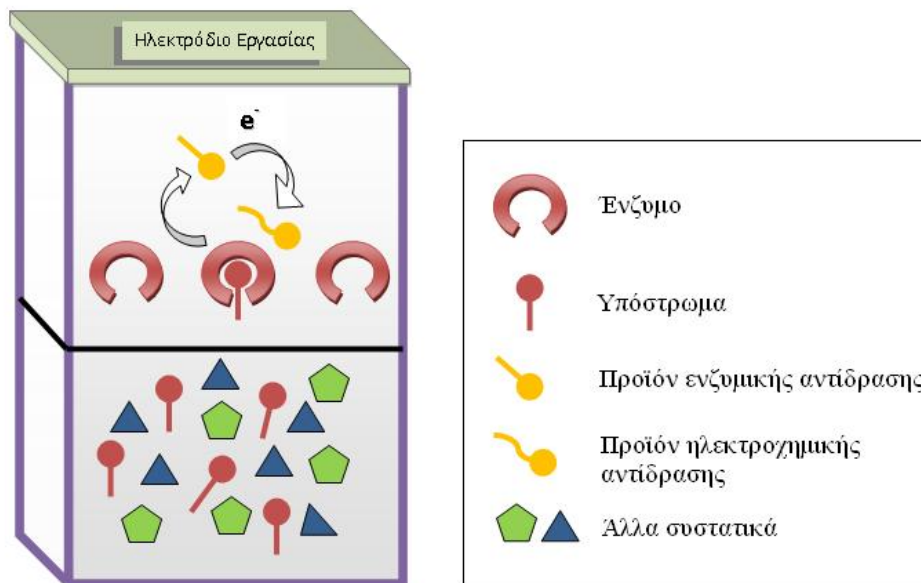


**Εικόνα 2.** Σύστημα τριών ηλεκτροδίων που χρησιμοποιείται στην αμπερομετρία. (W: ηλεκτρόδιο εργασίας, R: αναφορικό ηλεκτρόδιο, C: βοηθητικό ηλεκτρόδιο)

Στην περίπτωση που η ηλεκτρενεργή ουσία αποτελεί προϊόν της αντίδρασης παρατηρείται αύξηση στο παραγόμενο ρεύμα, το οποίο είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του αναλύτη. Όταν η ηλεκτρενεργή ουσία αποτελεί συμπαράγοντα της ενζυμικής αντίδρασης τότε χρησιμοποιείται πάντα σε αφθονία ώστε να μην επηρεάζεται η ενζυμική αντίδραση και η μέτρηση του αναλύτη. Το παραγόμενο ρεύμα μειώνεται εκθετικά με το χρόνο, αποκτώντας μια σταθερή τιμή μετά από την αποκατάσταση της ισορροπίας που δίνεται από την εξίσωση Cottrell:

$$i = nFADC/\delta$$

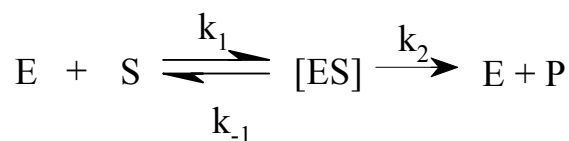
όπου  $n$ : ο αριθμός ηλεκτρονίων που συμμετέχουν στην οξειδοαναγωγική αντίδραση,  $F$ : η σταθερά Faraday,  $A$ : η ενεργή επιφάνεια του ηλεκτροδίου  $D$ : ο συντελεστής διάχυσης της ουσίας,  $C$ : η συγκέντρωση της ουσίας και  $\delta$  είναι μια σταθερά που σχετίζεται με το πάχος του στρώματος διάχυσης.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



**Εικόνα 3.** Αρχή λειτουργίας αμπερομετρικών βιοαισθητήρων κατάλυσης

### **Κινητική ενζυμικών αντιδράσεων**

Η κινητική της ενζυμικής αντίδρασης, ακολουθεί κατά κανόνα το μοντέλο Michaelis-Menten, που περιγράφεται παρακάτω:



Όπου E είναι το ένζυμο, S το υπόστρωμα και ES το σύμπλοκο ενζύμου-υποστρώματος. Το σύμπλοκο μπορεί να διασπαστεί στα αντιδρώντα από τα οποία προήλθε ή να οδηγήσει στο σχηματισμό του προϊόντος P.

Η ταχύτητα μίας ενζυμικής αντίδρασης δείχνει το ρυθμό με τον οποίο το υπόστρωμα μετατρέπεται σε προϊόν και συνήθως εκφράζεται σε  $\mu\text{mole/sec}$ . Η μέγιστη ταχύτητα κατάλυσης ( $V_{\max}$ ) επιτυγχάνεται όταν η συγκέντρωση του υποστρώματος είναι σε περίσσεια, με αποτέλεσμα όλα τα ενζυμικά μόρια του διαλύματος να είναι κατειλημμένα, δηλαδή όταν τα ενεργά κέντρα του ενζύμου είναι κορεσμένα με υπόστρωμα. Η ταχύτητα κατάλυσης προκύπτει από την παρακάτω εξίσωση:

$$V = V_{\max} \frac{[C]}{[C] + K_M} \quad \text{όπου, } K_M: \text{ η σταθερά Michaelis}$$

Η ακινητοποίηση των ενζύμων στους βιοαισθητήρες επιφέρει αλλαγές στην καταλυτική τους δράση λόγω του διαφορετικού περιβάλλοντος με αποτέλεσμα τη μεταβολή στην τιμή της  $K_M$ . Για το λόγο αυτό στα ηλεκτρόδια χρησιμοποιείται η φαινομενική  $K_M$  ( $K_M^{\text{app}}$ ).

Στους ενζυμικούς αμπερομετρικούς βιοαισθητήρες το μετρούμενο ρεύμα, δηλαδή ο ρυθμός παραγωγής ηλεκτρονίων στο ηλεκτρόδιο εργασίας, ισούται με το ρυθμό παραγωγής του προϊόντος δηλαδή την ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης. Κατ' αντιστοιχία με την εξίσωση Michaelis-Menten χρησιμοποιείται η εξίσωση:

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

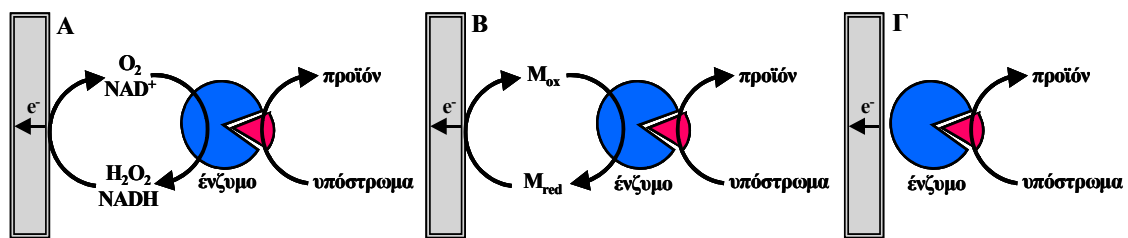
όπου  $i_{\max}$  είναι το μέγιστο ρεύμα που παρατηρείται όταν το ένζυμο είναι κορεσμένο με υπόστρωμα και είναι ανάλογο της συγκέντρωσης του ενζύμου. Από τη σχέση αυτή καθίσταται σαφές ότι η τιμή της  $K_M^{\text{app}}$  καθορίζει το γραμμικό εύρος της απόκρισης του βιοαισθητήρα. Για συγκεντρώσεις υποστρώματος [C], μικρότερες από  $0.1 * K_M^{\text{app}}$  η σχέση γίνεται:

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

Επομένως για αυτές τις τιμές συγκεντρώσεων η απόκριση του βιοαισθητήρα είναι γραμμική.

### Εξέλιξη αμπερομετρικών βιοαισθητήρων

Με την ανάπτυξη των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων οι μελέτες επικεντρώθηκαν στην επίτευξη ταχύτατης μεταφοράς ηλεκτρονίων ανάμεσα στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας, καθώς και στη σύζευξη του βιολογικού στοιχείου αναγνώρισης με το μεταλλάκτη σήματος. Αυτό επέφερε την ανάπτυξη τριών διαφορετικών γενεών αισθητήρων, όπως φαίνεται στην εικόνα 4, κατά την εξέλιξη των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων.



**Εικόνα 4.** Σχηματική αναπαράσταση της Α) Πρώτης γενιάς Β) Δεύτερης Γενιάς και Γ) Τρίτης Γενιάς Βιοαισθητήρων.

### Βιοαισθητήρες πρώτης γενιάς

Σε αυτή τη γενιά βιοαισθητήρων, η μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ του οξειδοαναγωγικού κέντρου του ενζύμου και του ηλεκτροδίου εργασίας, λαμβάνει χώρα μέσω ενός φυσικού συμπαραγόντα του ενζύμου<sup>vii</sup>. Το O<sub>2</sub> και το NAD<sup>+</sup> είναι οι πιο γνωστοί φυσικοί συμπαραγόντες, οι οποίοι λαμβάνουν ηλεκτρόνια από το ένζυμο και ανάγονται σε H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> και NADH, αντίστοιχα. Λόγω της οξείδωσης των παραγόμενων προϊόντων στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, παρατηρείται μία συνεχής ροή ηλεκτρονίων από το ενεργό κέντρο του ενζύμου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας. Παρόλ'αυτά η συγκεκριμένη διαδικασία μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι σχετικά αργή, με αποτέλεσμα οι αντίστοιχοι βιοαισθητήρες να εμφανίζουν τόσο



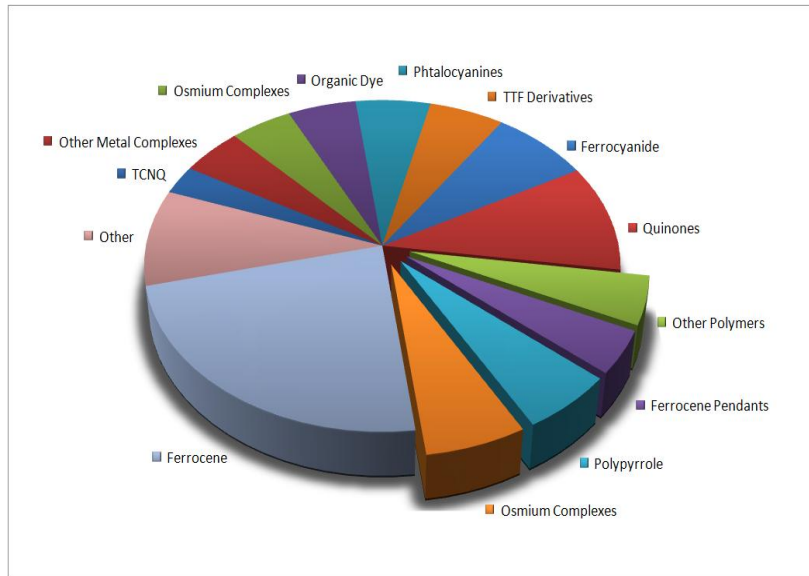
σχετικά αργή απόκριση όσο και σχετικά αργή αναγέννηση του ενζύμου. Επιπλέον, απαιτούνται μεγάλα υπερδυναμικά για την οξειδωση του  $H_2O_2$  και του NADH, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο χρόνος ζωής των αντίστοιχων βιοαισθητήρων και να παρεμποδίζονται από διάφορες άλλες ηλεκτροενεργές ουσίες. Συνέπεια όλων των παραπάνω ήταν να αντικατασταθούν οι φυσικοί συμπαράγοντες από τεχνητούς, οι οποίοι ονομάζονται μεταφορείς ηλεκτρονίων και έτσι να προκύψει η δεύτερη γενιά βιοαισθητήρων.

#### *Βιοαισθητήρες δεύτερης γενιάς*

Στους βιοαισθητήρες δεύτερης γενιάς χρησιμοποιούνται μικρού μοριακού βάρους οξειδοαναγωγικά ζεύγη ως μεταφορείς ηλεκτρονίων, τα οποία έχουν την ικανότητα μεταφοράς ηλεκτρονίων από το οξειδοαναγωγικό κέντρο του ενζύμου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου<sup>viii,ix</sup>. 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 ( $M_{red}$ ).

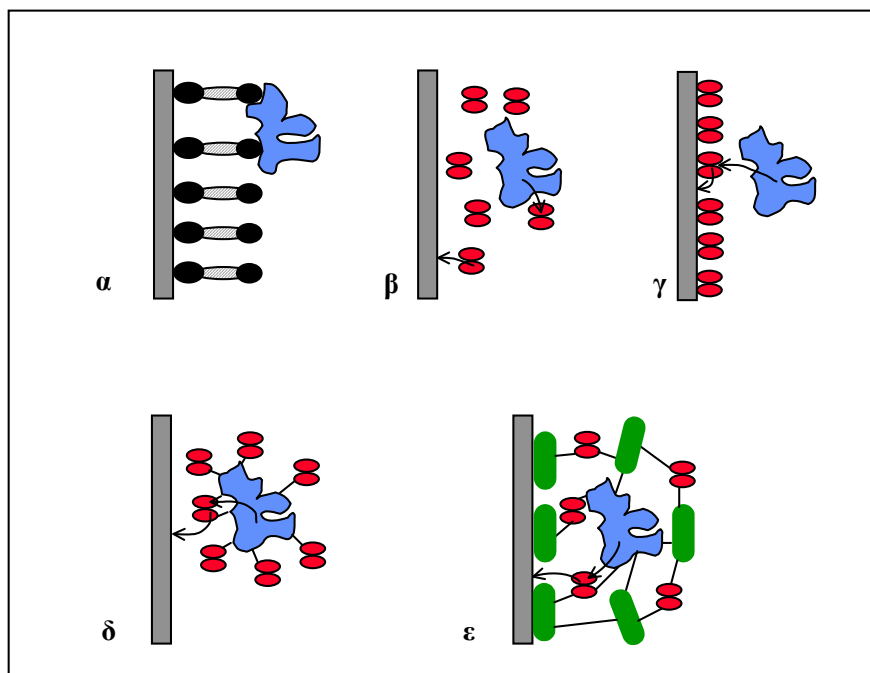
Τα χαρακτηριστικά ενός ιδανικού μεταφορέα ηλεκτρονίων συνοψίζονται παρακάτω:

1. Πρέπει να αντιδρά ταχύτατα με την ανηγμένη μορφή του ενζύμου.
2. Πρέπει να εμφανίζει χαμηλότερο δυναμικό οξειδοαναγωγής σε σχέση με τις υπόλοιπες ηλεκτροενεργές ουσίες που υπάρχουν στο δείγμα.
3. Πρέπει να εμφανίζει αντιστρεπτή ηλεκτροχημική συμπεριφορά και να μην επηρεάζεται από μεταβολές του pH, καθώς και να εμφανίζει αντιστρεπτή κινητική.
4. Πρέπει να είναι σταθερός και στις δύο οξειδοαναγωγικές του μορφές.
5. Πρέπει να μην αντιδρά με τα αντιδρώντα ή τα προϊόντα του καταλυτικού κύκλου και κυρίως με το  $O_2$ , καθώς και να παραμένει σταθερός στις συνθήκες λειτουργίας.
6. Πρέπει να εμφανίζει μικρή διαλυτότητα ώστε να μη διαφεύγει από το ενζυμικό στρώμα.



**Εικόνα 5.** Μεταφορείς ηλεκτρονίων που έχουν χρησιμοποιηθεί στην κατασκευή βιοαισθητήρων.

Οι μεταφορείς ηλεκτρονίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε προστιθέμενοι στο δείγμα είτε ακινητοποιημένοι στο ενζυμικό στρώμα. Οι κυριότεροι τρόποι ακινητοποίησης παρουσιάζονται στην Εικόνα 6.



**Εικόνα 6.** Τρόποι χρήσης των μεταφορέων ηλεκτρονίων στους βιοαισθητήρες. α) υποβοηθούμενη μεταφορά ηλεκτρονίων, β) προσθήκη στο δείγμα, γ) προσρόφηση στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, δ) δέσμευση στο ένζυμο, ε) δέσμευση σε πολυμερή. Τα βελάκια δείχνουν την πιθανή ροή ηλεκτρονίων

Τα περισσότερα ένζυμα δεν μπορούν να ανταλλάξουν ηλεκτρόνια απευθείας με την επιφάνεια του ηλεκτροδίου (εξαιρέση αποτελούν οι υπεροξειδάσες, που έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να ανταλλάξουν ηλεκτρόνια με ηλεκτρόδια άνθρακα στα οποία έχουν προσροφηθεί)<sup>x,x<sub>i</sub>,x<sub>ii</sub></sup>. Η υποβοήθηση της απευθείας ανταλλαγής ηλεκτρονίων μπορεί να επιτευχθεί με την τροποποίηση της επιφάνειας του ηλεκτροδίου.

Πολύ συχνά οι μεταφορείς ηλεκτρονίων δεν ακινητοποιούνται στο ενζυμικό στρώμα αλλά προστίθενται στο δείγμα. Αυτό γίνεται για να αποφευχθεί η εκρόφιση των μεταφορέων από το ενζυμικό στρώμα, που περιορίζει το χρόνο ζωής του βιοαισθητήρα. Η διαφυγή του μεταφορέα ηλεκτρονίων από το ενζυμικό στρώμα μπορεί να αποφευχθεί και με τη δέσμευση του μεταφορέα στο ένζυμο<sup>x<sub>iii</sub>,x<sub>iv</sub>,x<sub>v</sub></sup> ή με τη δέσμευσή του σε πολυμερικές αλυσίδες<sup>x<sub>vi</sub>,x<sub>vii</sub>,x<sub>viii</sub>,x<sub>ix</sub></sup>.

Η χρήση μεταφορέων ηλεκτρονίων προσδίδει κάποια ιδιαίτερα πλεονεκτήματα στους αμπερομετρικούς βιοαισθητήρες, τα οποία αφορούν αρχικά τη διεξαγωγή μετρήσεων ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του O<sub>2</sub>, το οποίο είναι ο φυσιολογικός μεταφορέας ηλεκτρονίων των οξειδοαναγωγικών ενζύμων. Επιπλέον, το δυναμικό του μεταφορέα ηλεκτρονίων, το οποίο είναι χαμηλότερο, καθορίζει το δυναμικό λειτουργίας του βιοαισθητήρα, με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο χρόνος ζωής του. Ο πρώτος μεταφορέας ηλεκτρονίων που χρησιμοποιήθηκε ήταν η κινίνη η οποία ανάγεται σε υδροκινίνη και στη συνέχεια οξειδώνεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Συχνά χρησιμοποιούμενοι μεταφορείς ηλεκτρονίων είναι οι οργανικές βαφές, διάφορα σύμπλοκα του οσμίου, το τετρακυανο-κίνο-διμεθάνιο (TCNQ), το τετραθειοφουλβένιο (TTF) και ο κυανιούχος σίδηρος. Ωστόσο, οι πιο γνωστοί μεταφορείς ηλεκτρονίων με πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα στην κατασκευή σταθερών και ευαίσθητων βιοαισθητήρων είναι το φερροκένιο και διάφορα παράγωγα του<sup>xx,xx<sub>i</sub></sup>.

### *Βιοαισθητήρες τρίτης γενιάς*

Στους βιοαισθητήρες τρίτης γενιάς πραγματοποιείται άμεση μεταφορά ηλεκτρονίων από το ενεργό κέντρο του ενζύμου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας<sup>xx<sub>ii</sub>,xx<sub>iii</sub></sup>. Η άμεση μεταφορά ηλεκτρονίων καθορίζεται από την απόσταση. Έτσι, στην περίπτωση των ακινητοποιημένων οξειδοαναγωγικών πρωτεϊνών, όπου το οξειδοαναγωγικό κέντρο είναι θαμμένο στο εσωτερικό της πρωτεΐνης, 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. Για την επίτευξη άμεσης μεταφοράς ηλεκτρονίων έχουν εφαρμοστεί διάφορες τεχνικές. 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 άμεση ανταλλαγή ηλεκτρονίων

### **2.3 Αναλυτικά Χαρακτηριστικά Αμπερομετρικών Βιοαισθητήρων**

Τα αναλυτικά χαρακτηριστικά των βιοαισθητήρων<sup>xxiv</sup>, καθορίζουν την ποιότητά τους. Οι κυριότερες παράμετροι, που περιγράφουν τα αναλυτικά χαρακτηριστικά, παρουσιάζονται παρακάτω.

#### *Καμπύλη βαθμονόμησης*

Για να χαρακτηριστεί η αναλυτική συμπεριφορά ενός βιοαισθητήρα κατασκευάζεται η καμπύλη βαθμονόμησης του. Η καμπύλη βαθμονόμησης ενός βιοαισθητήρα είναι η γραφική παράσταση του μετρούμενου σήματος, που στην περίπτωση των αμπερομετρικών αισθητήρων είναι η ένταση του ρεύματος, σε συνάρτηση με τη συγκέντρωση του αναλύτη. Η απόκριση του βιοαισθητήρα προκύπτει από το σήμα μετά την αποκατάσταση της ισορροπίας ή με τη μεταβολή της μετρούμενης αναλυτικής παραμέτρου.

#### *Γραμμικό εύρος*

Είναι το εύρος των συγκεντρώσεων εντός του οποίου η μεταβολή της μετρούμενης αναλυτικής παραμέτρου, στην περίπτωση των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων της έντασης ρεύματος, είναι γραμμική ως προς τη συγκέντρωση του αναλύτη. Το γραμμικό εύρος ενός βιοαισθητήρα θεωρείται ικανοποιητικό όταν καλύπτει τουλάχιστον δύο τάξεις μεγέθους της συγκέντρωσης του αναλύτη.

#### *Ευσαιθησία*

Η ευαισθησία ορίζεται ως ο λόγος της μεταβολής της μετρούμενης αναλυτικής παραμέτρου, που στην περίπτωση των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων είναι η ένταση του παρατηρούμενου ρεύματος, προς τη συγκέντρωση του αναλύτη.

Προκύπτει από την κλίση της καμπύλης βαθμονόμησης στο γραμμικό εύρος συγκεντρώσεων.

#### *Όριο ανίχνευσης*

Το όριο ανίχνευσης ορίζεται ως η μικρότερη δυνατή συγκέντρωση του αναλύτη που μπορεί να ανιχνευθεί από το βιοαισθητήρα με αξιοπιστία. Υπολογίζεται από το σημείο τομής της προέκτασης των δύο γραμμικών τμημάτων της καμπύλης βαθμονόμησης. Πρακτικά το όριο ανίχνευσης είναι η συγκέντρωση εκείνη του αναλύτη που δίνει σήμα τριπλάσιο από το θόρυβο ( $S/N = 3$ ).

#### *Επιλεκτικότητα*

Η επιλεκτικότητα εκφράζει την ικανότητα ενός βιοαισθητήρα να αποκρίνεται στον αναλύτη παρουσία άλλων παρεμποδίζοντων ουσιών. Για τον προσδιορισμό της επιλεκτικότητας ενός βιοαισθητήρα σε ένα συγκεκριμένο αναλύτη, μετράται η απόκριση του στον αναλύτη αυτό και συγκρίνεται με την αντίστοιχη απόκριση στις παρεμποδίζουσες ουσίες. Η επιλεκτικότητα εκφράζεται με το λόγο του σήματος σε μια συγκέντρωση αναλύτη ως προς το σήμα στην ίδια συγκέντρωση παρεμποδίζουσας ουσίας. Η επιλεκτικότητα ενός βιοαισθητήρα εξαρτάται κυρίως από το βιολογικό μόριο που χρησιμοποιείται αλλά μπορεί να επηρεαστεί και από το είδος του μεταλλάκτη σήματος που χρησιμοποιείται.

#### *Επαναληψιμότητα-Αναπαραγωγιμότητα*

Η επαναληψιμότητα-αναπαραγωγιμότητα εκφράζει την επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) μεταξύ των μετρήσεων του ίδιου βιοαισθητήρα ή διαφορετικών βιοαισθητήρων. Με αυτό τον τρόπο εκφράζεται τόσο η επαναληψιμότητα μετρήσεων του βιοαισθητήρα όσο και η επαναληψιμότητα στην κατασκευή του. Ο προσδιορισμός της επαναληψιμότητας επιτυγχάνεται με επαναλαμβανόμενες μετρήσεις της ευαισθησίας του βιοαισθητήρα ή της απόκρισής του σε συγκεκριμένη συγκέντρωση αναλύτη. Ένας βιοαισθητήρας θεωρείται αξιόπιστο αναλυτικό όργανο μόνο εφόσον η επί τοις εκατό σχετική τυπική απόκλιση του είναι μικρότερη από 10%.

#### *Σταθερότητα-Χρόνος Ζωής*

Η σταθερότητα ενός βιοαισθητήρα ορίζεται ως το χρονικό διάστημα που απαιτείται για να μειωθεί η ευαισθησία του κατά 50% ή 10% της αρχικής τιμής. Διακρίνεται σε σταθερότητα αποθήκευσης (storage stability) και σε σταθερότητα συνεχούς λειτουργίας (operational stability) του βιοαισθητήρα. Εξαρτάται από πολλούς παράγοντες όπως τη θερμοκρασία και το pH, που μπορούν να επηρεάσουν τη δραστηριότητα του ενζύμου και κατ'έπекταση τη σταθερότητα του βιοαισθητήρα,

αλλά κυρίως εξαρτάται από το χρόνο ζωής του βιολογικού μορίου. Επιπλέον, σε μικρότερο βαθμό, εξαρτάται από το μεταλλάκτη σήματος που χρησιμοποιείται, τον τρόπο κατασκευής του βιοαισθητήρα, καθώς επίσης και από τις πειραματικές συνθήκες κάτω από τις οποίες πραγματοποιούνται οι μετρήσεις, όπως το εφαρμοζόμενο δυναμικό, η θερμοκρασία και το pH του διαλύματος.

#### *Χρόνος απόκρισης*

Ορίζεται ως ο χρόνος που απαιτείται έως ότου η μετρούμενη αναλυτική παράμετρος, στην περίπτωση των αμπερομετρικών αισθητήρων είναι η παρατηρούμενη ένταση ρεύματος, φτάσει στο 90% της τελικής της τιμής.

### 3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΕΝΖΥΜΩΝ

Οι πρωτεΐνες και κυρίως τα ένζυμα, συμμετέχουν ως καταλύτες σε διάφορες βιολογικές διεργασίες. Τα κυριότερά τους χαρακτηριστικά είναι ο υψηλός βαθμός εξειδίκευσης που παρουσιάζουν σε συγκεκριμένα υποστρώματα, καθώς και η μεγάλη καταλυτική τους ισχύς, αφού μπορούν να επιταχύνουν τις αντιδράσεις που καταλύουν τουλάχιστον κατά  $10^{12}$  φορές.<sup>xxv</sup> Η καταλυτική τους ισχύς οφείλεται στην ικανότητά τους να ελαττώνουν την ενέργεια της μεταβατικής κατάστασης, με αποτέλεσμα το ένζυμο να προσδίδει στο υπόστρωμα την κατάλληλη δομή στο χώρο, που θα προκαλέσει την ταχύτερη μετατροπή του σε προϊόντα.<sup>xxv</sup>

Η απώλεια της καταλυτικής δράσης των ενζύμων αποτελεί ένα από τα βασικά προβλήματα στην ανάπτυξη ενζυμικών βιοαισθητήρων. Η απώλεια αυτή της δραστηριότητας μπορεί να οφείλεται σε αποδιάταξη, οξειδωτική αποσύνθεση, μη αντιστρεπτή αναστολή, πρωτεόλυση ή καθίζηση. Αποτέλεσμα της αποδιάταξης της τεταρτοταγούς δομής ενός ενζύμου είναι η μείωση της ενεργότητάς του. Το ένζυμο κάτω από ορισμένες συνθήκες μπορεί να μεταβεί από την ενεργή του μορφή (N) στην αποδιαταγμένη του μορφή (U). Η διαδικασία αυτή είναι συνήθως αντιστρεπτή και το ένζυμο μπορεί να επαναδιαταχθεί και να αποκτήσει και πάλι την αρχική του ενεργή μορφή. Ωστόσο, το ένζυμο μπορεί να οδηγηθεί στην ανενεργή του μορφή (I) από την αποδιαταγμένη μορφή, λόγω κάποιας περαιτέρω χημικής αλλαγής στην πολυπεπτιδική του αλυσίδα. Έτσι, το ένζυμο μπορεί να οδηγηθεί σε μόνιμη απενεργοποίηση.



Η βασική αιτία της διαδικασίας αυτής οφείλεται στην αδυναμία των ενζύμων να διατηρήσουν την ενεργότητά τους σε περιβάλλον που διαφέρει σημαντικά από το φυσικό τους. Η σταθερότητα ενός ενζύμου σε ένα διάλυμα επηρεάζεται σημαντικά από διάφορους παράγοντες<sup>xxvi</sup>, όπως η θερμοκρασία, η τιμή pH του περιβάλλοντος, η παρουσία αλάτων.

### 3.1 Σταθεροποίηση Ενζύμων

Η σταθεροποίηση ενός ενζύμου συμβάλλει σημαντικά στην αποφυγή απενεργοποίησής του, καθιστώντας το ανθεκτικό στις διάφορες μεταβολές των συνθηκών του περιβάλλοντός του. Έχουν προταθεί πολλές διαδικασίες σταθεροποίησης των ενζύμων, οι βασικότερες εκ των οποίων παρουσιάζονται παρακάτω.

#### *Γενετική τροποποίηση*

Η μετάλλαξη ενζύμων αποσκοπεί στη σταθεροποίηση και βελτίωση των ιδιοτήτων τους.<sup>xxvii</sup> Η αντικατάσταση συγκεκριμένων αμινοξέων αποσκοπεί στο σχηματισμό επιπλέον δεσμών υδρογόνου και ανάπτυξη περισσότερων δυνάμεων Van der Waals ή στην ενίσχυση των υδρόφοβων αλληλεπιδράσεων.<sup>xxviii</sup> Με αυτές τις τροποποιήσεις επιτυγχάνεται η σταθεροποίηση της δευτεροταγούς δομής του ενζύμου. Μάλιστα, στα κατάλοιπα εκείνα της πρωτεΐνης όπου ο διαλύτης έχει μεγαλύτερη πρόσβαση, πραγματοποιείται μετάλλαξη τους. Έχει βρεθεί ότι στο άμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης εισάγονται όξινα κατάλοιπα, ενώ στο καρβόξυ-τελικό άκρο εισάγονται βασικά. Ακόμα, αύξηση της σταθερότητας της πρωτεΐνης επιτυγχάνεται με αύξηση των δισουλφιδικών δεσμών στη δομή της πρωτεΐνης, εμποδίζοντας έτσι την αποδιάταξή της<sup>xxix</sup>.

#### *Χημική τροποποίηση*

Κατά τη διαδικασία της χημικής τροποποίησης, τα επιφανειακά αμινοξέα των πρωτεϊνών αντιδρούν με ειδικά αντιδραστήρια. Με αυτό τον τρόπο μπορεί να επιτευχθεί σταθεροποίηση της πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα, η δέσμευση υδατανθράκων σε επιφανειακά αμινοξέα ή αντικατάσταση μη-πολικών αμινοξέων από πολικά, συμβάλλει σ' αυτή τη σταθεροποίηση. Η διαδικασία αυτή οδηγεί σε καλύτερη αλληλεπίδραση της πρωτεΐνης με πολικούς διαλύτες περιορίζοντας ενδεχόμενη αποδιάταξή της. Επιπλέον, η προσθήκη πολυαιθυλενογλυκόλης σε πολικές ή άπολες ομάδες των αμινοξέων αυξάνει τη διαλυτότητα και την ενεργότητα των ενζύμων σε πολικούς και άπολους διαλύτες αντίστοιχα. Τέλος, η δέσμευση διδραστικών αντιδραστηρίων οδηγεί στην ανάπτυξη ενδομοριακών και διαμοριακών αλληλεπιδράσεων ευνοώντας τη σταθεροποίηση των ενζύμων.

#### *Πρόσθετα*

Προσθήκη διαφόρων ενώσεων<sup>xxx</sup> μικρού μοριακού βάρους, όπως πολυαλκοόλες, σάκχαρα και πολυηλεκτρολύτες, μπορούν να αυξήσουν τη σταθερότητα των



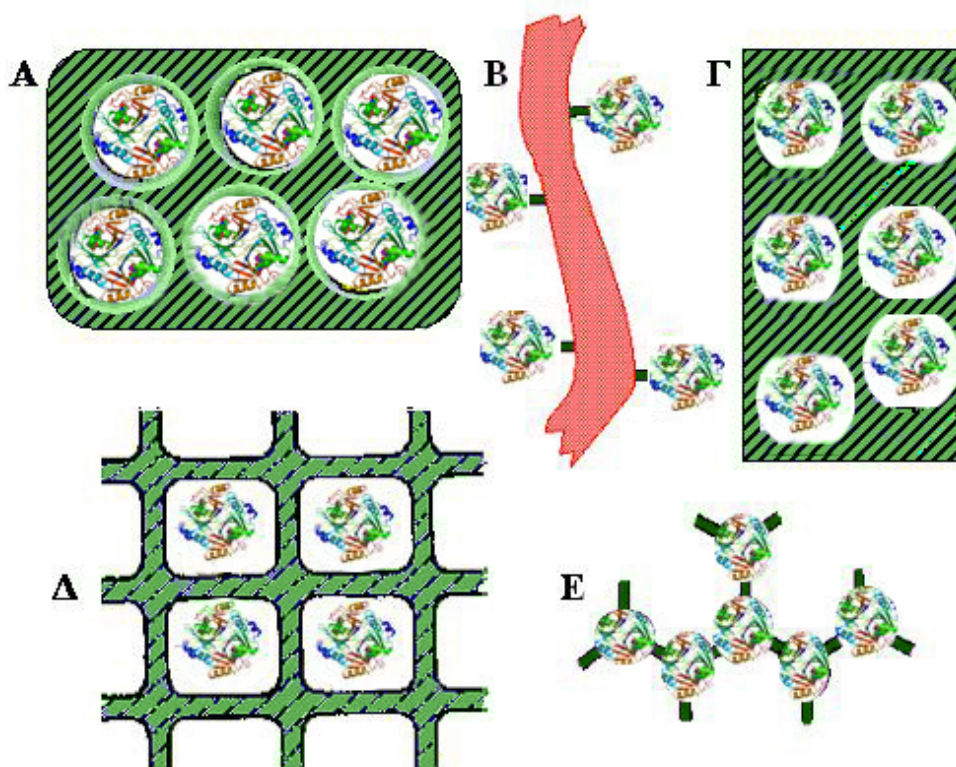
πρωτεϊνών σε υδατικά διαλύματα. Τα σάκχαρα και οι πολυηλεκτρολύτες ενισχύουν τη σταθερότητα των πρωτεϊνών λόγω της αύξησης της επιφανειακής τάσης του νερού, με αποτέλεσμα τη μείωση των μορίων νερού, που περιβάλλουν τις πρωτεΐνες.<sup>xxx1</sup> Επιπλέον, κάποιες ενώσεις, όπως η πολυαιθυλενιμίνη<sup>xxxii</sup> και η διαιθυλαμινοαιθυλοδεξτράνη<sup>xxxiii</sup> αυξάνουν τη σταθερότητα των πρωτεϊνών, λόγω της δημιουργίας μιας δομής κλουβιού γύρω από τα ένζυμα, αλληλεπιδρώντας ηλεκτροστατικά με αυτά.

#### *Ακίνητοποίηση*

Η ακίνητοποίηση ενζύμων σε στερεά υποστρώματα αποτελεί μία αρκετά διαδεδομένη και αποτελεσματική μέθοδο για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων, αφού πραγματοποιείται απ' ευθείας ακίνητοποίηση του ενζύμου στο μεταλλάκτη που έχει επιλεγεί. Παρολ' αυτά η ακίνητοποίηση θα πρέπει να γίνεται με τρόπο ώστε να είναι εφικτή η πρόσβαση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου αλλά και να διατηρείται η ενεργότητα και η επιλεκτικότητα του ενζύμου. Στην επόμενη παράγραφο αναλύονται οι επιμέρους τρόποι ακίνητοποίησης ενζύμων.

### 3.2 Σταθεροποίηση Ενζύμων με Ακίνητοποίηση

Για την ακίνητοποίηση ενζύμων έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα οργανικά και ανόργανα υλικά ως υποστρώματα. Οι βασικότερες μέθοδοι ακίνητοποίησης<sup>xxxiv</sup> ενζύμων περιγράφονται παρακάτω. (Εικόνα 7)



**Εικόνα 7.** Ακίνητοποίηση ενζύμων μέσω Α) φυσικής προσρόφησης, Β) ομοιοπολικής δέσμευσης, Γ) εγκλωβισμού, Δ) φυσικής παγίδευσης και Ε) διαμοριακής σύνδεσης.

#### *Φυσική προσρόφηση*

Η μέθοδος της φυσικής προσρόφησης είναι η πιο συνηθισμένη μέθοδος ακίνητοποίησης ενζύμων στην επιφάνεια στερεών υποστρωμάτων και περιλαμβάνει την απλή προσρόφηση των ενζύμων στα υλικά αυτά. Κατά την προσρόφηση το ενεργό κέντρο του ενζύμου δεν επηρεάζεται, διατηρώντας την καταλυτική του ισχύ. Το ένζυμο συγκρατείται στο υλικό στήριξης μέσω ισχυρών ιοντικών αλληλεπιδράσεων και δεσμών υδρογόνου, καθώς και ασθενών δυνάμεων Van der Waals.<sup>xxxv</sup> Συχνά παρατηρείται εκρόφηση του ενζύμου λόγω της ασθενούς δέσμευσης του στο υλικό στήριξης, που αποτελεί και το κυριότερο μειονέκτημα αυτής της μεθόδου, με αποτέλεσμα τη μείωση της σταθερότητας του βιοαισθητήρα.

### *Ομοιοπολική δέσμευση*

Η ομοιοπολική δέσμευση αποτελεί μια πιο αποτελεσματική μέθοδο για την ακινητοποίηση ενζύμων σε επιφάνειες μέσω δραστικών ομάδων. Περιλαμβάνει το σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ δραστικών ομάδων του ενζύμου, όπως καρβοξυλομάδων, αμινομάδων, θειολομάδων με τις αντίστοιχες ομάδες του υλικού στήριξης.<sup>xxxv</sup> Απαραίτητη προϋπόθεση για την εφαρμογή της ομοιοπολικής δέσμευσης είναι η διατήρηση της δραστηριότητας του ενζύμου. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με ήπιες συνθήκες αντιδράσεων καθώς επίσης και προστατεύοντας τα αμινοξέα του ενεργού κέντρου, ώστε να μη λάβουν μέρος στον ομοιοπολικό δεσμό.

### *Φυσική παγίδευση*

Κατά τη φυσική παγίδευση, ποσότητα ενζύμου παγιδεύεται στην επιφάνεια του μεταλλάκτη σήματος, μέσω κάποιας πολυμερικής μεμβράνης, όπως οξική κυτταρίνη, κολλαγόνο, νάιλον, πολυτετραφθοροαιθυλένιο (Teflon) και πολυουραιθάνη. Το κυριότερο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι η μεμβράνη επιτρέπει τη διέλευση του αναλύτη προς το ενζυμικό στρώμα, δηλαδή προς το ενεργό κέντρο του ενζύμου ενώ ταυτόχρονα εμποδίζεται η διέλευση μεγάλων μορίων του δείγματος, με αποτέλεσμα να προστατεύεται το ένζυμο από επιμολύνσεις. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή εμφανίζει μικρή σταθερότητα που είναι και το κυριότερο μειονέκτημά της.

### *Εγκλωβισμός*

Το ένζυμο προστίθεται σε διάλυμα μονομερών, εγκλωβίζοντας το ένζυμο σε τρισδιάστατα πολυμερικά πλέγματα. Το πλέγμα προκύπτει κατά το συμπολυμερισμό των μονομερών παρουσία του ενζύμου. Τα πολυμερή που έχουν χρησιμοποιηθεί ως τώρα περιλαμβάνουν το πολυακρυλονιτρίλιο, την πολυβινυλοαλκοόλη, τις πυριτικές πηκτές αλλά και το πολυπυρρόλιο, το οποίο ευνοεί την ταχύτατη μεταφορά των ηλεκτρονίων στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Βασικό μειονέκτημα της μεθόδου είναι η αστάθεια των πολυμερικών πλεγμάτων. Ακόμα, λόγω του ότι ο αναλύτης απαιτεί μεγαλύτερο χρόνο για να διαχυθεί μέσω της πολυμερικής μεμβράνης, η μέθοδος μειονεκτεί όσον αφορά το χρόνο απόκρισης.

### *Διαμοριακή σύνδεση*

Κατά τη μέθοδο της διαμοριακής σύνδεσης τα ενζυμικά μόρια συνδέονται μεταξύ τους μέσω ‘συνδετικών κρίκων’, με απώτερο στόχο το σχηματισμό ενός πρωτεϊνικού

πλέγματος. Οι ‘συνδετικοί κρίκοι’ που χρησιμοποιούνται είναι διδραστικά αντιδραστήρια, όπως η γλουταραλδεύδη και το καρβοδιμίδιο. Για την αποφυγή δημιουργίας πλεγμάτων με μειωμένη δραστικότητα θα πρέπει να αποφεύγονται μεγάλες συγκεντρώσεις του ενζύμου.

### 3.3 Σταθεροποίηση Ενζύμων σε Νανοδομές

Η ραγδαία ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας καθώς και η τάση για την ανάπτυξη μικροποιημένων συστημάτων έχουν θέσει τις νανοδομές στο επίκεντρο της έρευνας. Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο η ακινητοποίηση ενζύμων σε στερεά υποστρώματα αποτελεί μία διαδεδομένη μέθοδο, με την οποία επιτυγχάνεται σταθεροποίηση των ακινητοποιημένων ενζύμων. Το μέγεθος των νανοδομών καθώς και οι ιδιότητες τους τις καθιστούν ιδανικά υποστρώματα ακινητοποίησης ενζύμων<sup>xxxvi</sup> δίνοντας νέες προοπτικές προς αυτήν την κατεύθυνση.

Οι νανοδομές είναι υλικά που μία τουλάχιστον από τις διαστάσεις τους είναι της τάξης των νανομέτρων. Οι νανοδομές, μέσω του ελέγχου της δομής τους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα για την ακινητοποίηση ενζύμων καθώς επίσης μπορούν να βελτιώσουν την ενζυμική σταθερότητα. Τα κυριότερα χαρακτηριστικά των νανοδομών είναι η μεγάλη ενεργή τους επιφάνεια επαφής, οι πόροι μεγέθους ανάλογου με αυτών των ενζύμων, επιφάνειες με δραστικές ομάδες που μπορούν να αλληλεπιδράσουν με τα ένζυμα καθώς και ο αυξημένος ρυθμός διάχυσης του υποστρώματος του ενζύμου. Οι κυριότερες κατηγορίες των νανοδομών είναι τα νανοσωματίδια, τα νανοσύρματα και τα νανοπορώδη υλικά.

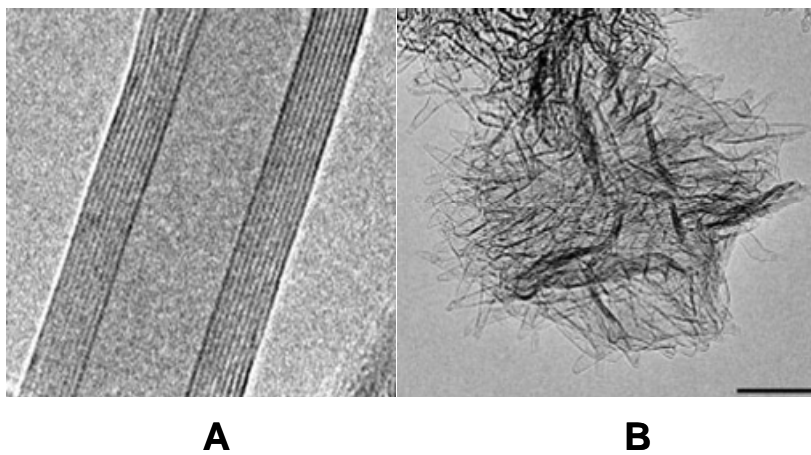
Τα νανοσωματίδια είναι υλικά που και οι τρεις διαστάσεις τους είναι της τάξεως των νανομέτρων. Συνήθως παρασκευάζονται από μέταλλα, οξείδια μετάλλων ή ημιαγώγιμα υλικά<sup>xxxvii,xxxviii</sup>. Η ακινητοποίηση των πρωτεϊνών στα υλικά αυτά πραγματοποιείται μέσω απλής προσρόφησης ή μέσω ομοιοπολικών δεσμών. Μείωση του μεγέθους των νανοσωματιδίων παρέχει μεγαλύτερη δραστική επιφάνεια για την ακινητοποίηση του ενζύμου, με αποτέλεσμα μεγαλύτερο ενζυμικό φορτίο ανά μάζα υλικού<sup>xxxix</sup>. Στην περίπτωση λοιπόν των νανοσωματιδίων οι περισσότερες μελέτες εστιάζονται στην αύξηση της ενζυμικής δραστικότητας και του ενζυμικού φορτίου και όχι στην σταθεροποίηση του ενζύμου σε αυτά.

Τα νανοσύρματα εμφανίζουν δύο διαστάσεις στην κλίμακα των νανομέτρων και κατασκευάζονται κυρίως από πυρίτιο<sup>xl</sup>, χρυσό, άργυρο και αγωγιμα πολυμερή.<sup>xli</sup> Νανοσύρματα χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα για την ακινητοποίηση των

ενζύμων. Η χρήση τους για τη σταθεροποίηση ενζύμων έχει δείξει ότι συμβάλλει στην αύξηση της δραστηριότητας τους. Παρόλ' αυτά η εφαρμογή τους στον τομέα αυτό είναι σχετικά περιορισμένη λόγω προβλημάτων που εμφανίζονται κατά τις μεθόδους παρασκευής τους.<sup>xliii</sup>

Τέλος, τα νανοπορώδη υλικά εμφανίζουν πόρους ή κοιλότητες διαμέτρου της κλίμακας των νανομέτρων, οι οποίες είναι κατάλληλες για να ακινητοποιηθούν βιολογικά μόρια. Τα χαρακτηριστικά αυτών των υλικών είναι η μεγάλη ενεργή επιφάνεια τους σε σχέση με τον όγκο τους και η ύπαρξη πόρων με ομοιόμορφη κατανομή και μέγεθος. Για τη σταθεροποίηση ενζύμων έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα πυριτικά και πολυμερικά νανοπορώδη υλικά. Συνήθως, το ένζυμο ακινητοποιείται μέσω απλής προσρόφησης<sup>xliiii,xliv,xlv</sup>. Όπως έχει φανεί από μελέτες, η σταθερότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων, όπως η οξειδάση της γλυκόζης και η Horse Radish Peroxidase (HRP), εξαρτάται από το μέγεθος των πόρων των πυριτικών υλικών καθώς και από το επιφανειακό τους φορτίο. Πιο συγκεκριμένα, σε υλικά όπου η διάμετρος των πόρων έχει παρόμοιο μέγεθος με αυτό των αντίστοιχων ενζύμων<sup>xlvi</sup>, η δραστηριότητα τους είναι μεγαλύτερη. Εκτός από την προσρόφηση και η ομοιοπολική δέσμευση των ενζύμων, στο εσωτερικό των πόρων των νανοπορώδων υλικών, έχει βρεθεί ότι αυξάνει την ενζυμική σταθερότητα<sup>xlvii,xlviii</sup>.

Εκτός από τα παραπάνω πυριτικά υποστρώματα, έχει βρεθεί ότι και διάφορα νανοπορώδη ανθρακικά υποστρώματα διαθέτουν όλα τα πλεονεκτήματα για την ακινητοποίηση και τη σταθεροποίηση των ενζύμων, με απώτερο στόχο την ανάπτυξη και κατασκευή βιοαισθητήρων. Βασικά χαρακτηριστικά των ανθρακικών νανοδομών είναι η υψηλή αγωγιμότητα, η βιοσυμβατότητα και η μεγάλη ενεργή επιφάνεια, η οποία μπορεί να υποστεί κάποια χημική τροποποίηση. Μερικά παραδείγματα τέτοιων υλικών, που έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως, είναι ο πορώδης άνθρακας<sup>xlix,l,li</sup>, ο ενεργοποιημένος υαλώδης άνθρακας<sup>lii</sup>, τα φουλερένια<sup>liii</sup>, οι νανοκάνοι άνθρακα<sup>liv</sup> και οι νανοσωλήνες άνθρακα.



**Εικόνα 8.** Εικόνες από Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (TEM) A) Νανοσωλήνων Άνθρακα και B) Νανοκώνων Άνθρακα

Μετά την αρχική τους εφαρμογή<sup>lv</sup> στην κατασκευή βιοαισθητήρων, οι νανοσωλήνες άνθρακα, χρησιμοποιήθηκαν ευρέως τόσο για την ακινητοποίηση ενζύμων με προσρόφηση<sup>lvi,lvii</sup>, όσο και για την ομοιοπολική δέσμευση<sup>lviii,lix,lx</sup> αυτών. Αποδείχτηκε ότι στα υλικά αυτά, και στις δύο περιπτώσεις η σταθεροποίηση των ενζύμων είναι πολύ αποτελεσματική. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τις εξαιρετικές ηλεκτρικές ιδιότητες που παρουσιάζουν, τα καθιστούν κατάλληλα υλικά για την ανάπτυξη ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων. Οι νανοϊνες άνθρακα είναι άλλη μία κατηγορία νανοδομών, με παρόμοια χαρακτηριστικά με αυτά των νανοσωλήνων άνθρακα. Οι ιδιότητες και οι εφαρμογές τους θα αναλυθούν στο επόμενο κεφάλαιο.

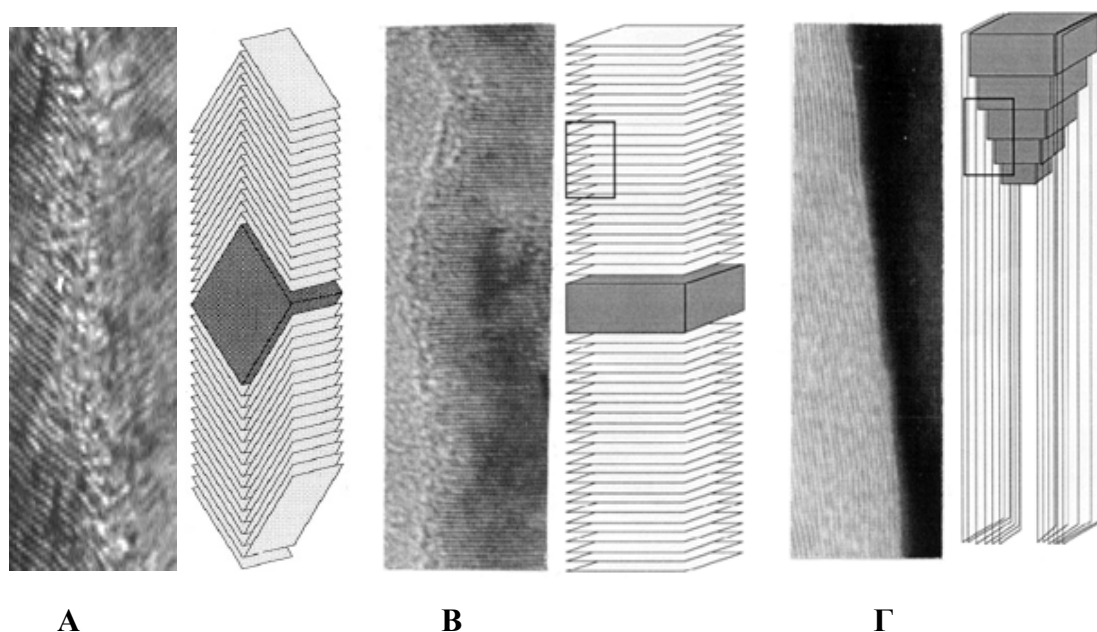
## 4. NANOΪΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ

### 4.1 Φυσικοχημικές Ιδιότητες Νανοϊνών Άνθρακα

Οι νανοΐνες άνθρακα είναι κυλινδρικές νανοδομές που αποτελούνται από διαδοχικά φύλλα γραφίτη διατεταγμένα σε διάφορες διαμορφώσεις ως προς τον άξονα της νανοΐνας, με αποτέλεσμα να προκύπτουν 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. Το μέγεθός τους καθώς και η διάταξη των επιπέδων γραφίτη μπορούν να ελεγχθούν και να ρυθμιστούν κατά τη διαδικασία παρασκευής τους.<sup>lxi</sup> Γενικά, η μείωση στη διάμετρο τους συμβάλλει σημαντικά στη βελτίωση των φυσικοχημικών ιδιοτήτων του υλικού<sup>lxii</sup>.

Οι νανοΐνες άνθρακα παρασκευάζονται συνήθως κατά τη διάσπαση-αποσύνθεση υδρογονανθράκων παρουσία ματαλλικών καταλυτών σε υψηλές θερμοκρασίες. Οι υδρογονάνθρακες προσροφώνται 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 της δομής των νανοϊνών άνθρακα. Τα φυσικά και μορφολογικά χαρακτηριστικά των νανοϊνών άνθρακα που προκύπτουν εξαρτώνται από τη φύση του καταλύτη, από το αντιδρών αέριο που χρησιμοποιείται και από τη θερμοκρασία στην οποία λαμβάνει χώρα η αντίδραση. Ανάλογα με τον προσανατολισμό των επιφανειών στη διεπιφάνεια του μετάλλου με τον άνθρακα, μπορούν να αναπτυχθούν νανοΐνες που είτε αποτελούνται αποκλειστικά από φύλλα γραφίτη είτε περιέχουν μικρές ποσότητες άμορφου άνθρακα. Ως καταλύτες για τη σύνθεση των υλικών αυτών έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα μέταλλα ή συνδυασμός μετάλλων. Τα μέταλλα αυτά είναι ο σίδηρος, το νικέλιο, ο χαλκός καθώς και κράματα αυτών, ενώ ο πιο αποτελεσματικός καταλύτης για την ανάπτυξη των νανοϊνών έχει αποδειχτεί ότι είναι το κράμα σιδήρου-νικελίου.<sup>lxiii</sup> Κατά την παρασκευή των νανοϊνών άνθρακα έχουν παρατηρηθεί τρεις διαφορετικές διαμορφώσεις: νανοΐνες άνθρακα με φύλλα γραφίτη κάθετα στον άξονα της ίνας ή παράλληλα προς τον άξονα της ίνας και νανοΐνες άνθρακα που έχουν την μορφή «ψαροκόκαλου» (Εικόνα 9). Οι δομές που προκύπτουν εξαρτώνται από το σχήμα του μετάλλου, που χρησιμοποιείται ως καταλύτης, για την ανάπτυξη των νανοϊνών άνθρακα, ενώ συνήθως δομές «ψαροκόκαλου» προκύπτουν όταν χρησιμοποιούνται κράματα μετάλλων. Το

ποσοστό των μετάλλων στην τελική δομή των νανοϊνών είναι πολύ μικρό και μπορεί να απομακρυνθεί με κατεργασία με οξέα με αποτέλεσμα να προκύπτουν νανοϊνες υψηλής καθαρότητας.



**Εικόνα 9.** Εικόνες από Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης (TEM) διαφορετικών δομών νανοϊνών άνθρακα που παρασκευάστηκαν και η αντίστοιχη σχηματική αναπαράσταση τους A) Τα φύλλα γραφίτη έχουν τη μορφή ψαροκόκαλου, B) Τα φύλλα γραφίτη είναι κάθετα ως προς τον άξονα της νανοϊνας και Γ) Τα φύλλα γραφίτη είναι παράλληλα ως προς τον άξονα της νανοϊνας.<sup>lxiv</sup>

Οι νανοϊνες άνθρακα συγκεντρώνουν όλα εκείνα τα χαρακτηριστικά που τις καθιστούν κατάλληλα υλικά για την ακινητοποίηση και σταθεροποίηση βιολογικών μορίων με σκοπό την ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Οι νανοϊνες άνθρακα παρουσιάζουν μεγάλη μηχανική αντοχή καθώς και υψηλή αγωγιμότητα, γεγονός που τις καθιστά εξαιρετικούς ηλεκτροχημικούς μεταλλάκτες σήματος. Το σημαντικότερο χαρακτηριστικό και πλεονέκτημα των νανοϊνών είναι ότι τα ελεύθερα άκρα των φύλλων γραφίτη, από τα οποία αποτελούνται, είναι διαθέσιμα να αλληλεπιδρούν φυσικά ή χημικά με διάφορες ουσίες. Η δραστική επιφάνεια αυτών των δομών είναι πολύ μεγάλη και κυμαίνεται από 300 έως 700 m<sup>2</sup>/gr. Οι δραστικές ομάδες που εμφανίζονται στην επιφάνεια των νανοϊνών άνθρακα και περιέχουν οξυγόνο, είναι ιδανικές για την ακινητοποίηση και σταθεροποίηση βιολογικών μορίων στην επιφάνεια των νανοϊνών. Τέλος, ο αριθμός και ο τύπος των δραστικών ομάδων στην



επιφάνεια των νανοϊνών άνθρακα καθώς και η επιλεκτική ομοιοπολική δέσμευση διάφορων βιολογικών μορίων στην επιφάνεια τους, μπορεί να ρυθμιστεί μέσω χημικής τροποποίησης της επιφάνειας των υλικών αυτών.

#### 4.2 Χημική Τροποποίηση Νανοϊνών Άνθρακα

Η χημική τροποποίηση των νανοϊνών άνθρακα μπορεί να βελτιώσει τις ιδιότητές τους. Η εισαγωγή καινούργιων δραστικών ομάδων στην επιφάνεια των νανοϊνών, μεταβάλλει τη χημική τους συμπεριφορά δίνοντας τη δυνατότητα επιλεκτικής σύζευξης με διάφορα μόρια, αύξησης της διαλυτότητάς τους σε διάφορους διαλύτες, καθώς και της μετατροπής τους σε βιο-συμβατά υλικά για ορισμένα συστήματα.

Ο πιο συνηθισμένος τρόπος χημικής τροποποίησης των υλικών αυτών είναι η οξείδωσή τους με διάφορα οξειδωτικά μέσα. Οι αντιδράσεις οξείδωσης παράγουν ένα ευρύ φάσμα χημικών ομάδων που περιλαμβάνουν καρβοξυλικά οξέα, αλκοόλες, αλδεύδες, αιθέρες, λακτόνες, καθώς και εποξειδία. Παρόλα αυτά η πιο χρήσιμη συνθετικά ομάδα είναι τα καρβοξυλικά οξέα λόγω του ότι μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε πλήθος αντιδράσεων σύζευξης με διάφορα μόρια.

Κατά την οξείδωση των υλικών αυτών, η χημική τροποποίηση ξεκινά από περιοχές, που εμφανίζουν ατέλειες στην κρυσταλλική τους δομή, όπως σε γειτονικά πεντάγωνα-επτάγωνα ενώ στη συνέχεια προσβάλλονται  $sp^3$  υβριδισμένοι άνθρακες ( $-CH_2$ ,  $-CH_3$ ). Νέες ατέλειες στο σκελετό από φύλλα γραφίτη εμφανίζονται εξαιτίας της παρουσίας ισχυρών οξειδωτικών μέσων, και μπορούν να δράσουν ως θέσεις έναρξης για το σχηματισμό νέων δραστικών ομάδων.<sup>lxv</sup> Το τελικό προϊόν της οξείδωσης εξαρτάται τόσο από τα χαρακτηριστικά του αρχικού υλικού, δηλαδή τον αριθμό και τον τύπο των ατελειών καθώς και τα μορφολογικά του χαρακτηριστικά, όσο και από το χρησιμοποιούμενο οξειδωτικό μέσο.

Έως τώρα έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα οξειδωτικά μέσα όπως  $HNO_3$ ,  $H_2SO_4/HNO_3$ ,  $KMnO_4$ ,  $RuO_4$ ,  $H_2O_2$ . Τα αποτελέσματα διαφόρων ερευνητικών ομάδων έχουν δείξει ότι η χρήση διαλύματος πυκνού θειϊκού και νιτρικού οξέος προκαλεί τη δημιουργία επιφανειακών καρβοξυλικών ομάδων καθώς και τη μεγαλύτερη έκταση ατελειών στο γραφιτικό σκελετό. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την εισαγωγή επιπλέον καρβοξυλικών ομάδων.<sup>lxv, lxvi</sup> Η δραστηριότητα αυτού του διαλύματος ( $H_2SO_4/HNO_3$ ) οφείλεται στην ικανότητά του να παράγει ιόντα  $NO_2^+$ , που είναι ένα ισχυρό ηλεκτρονιόφιλο, το οποίο έχει την ικανότητα προσβολής σε ήδη υπάρχουσες περιοχές

με ατέλειες στη δομή των νανοϊνών άνθρακα. Επιπλέον, προκαλεί νέες κρυσταλλικές ατέλειες προσβάλλοντας το γραφιτικό σκελετό. Κατά την κατεργασία των νανοϊνών άνθρακα με ισχυρά οξέα έχει παρατηρηθεί ο σχηματισμός άμορφου άνθρακα, ο οποίος όμως μπορεί να απομακρυνθεί με τη χρήση διαφόρων διαλυμάτων, όπως είναι το διάλυμα πυκνού  $\text{H}_2\text{SO}_4/\text{H}_2\text{O}_2$ .<sup>lxvi</sup>

Το  $\text{H}_2\text{O}_2$  είναι ένα σχετικά ήπιο οξειδωτικό μέσο και χρησιμοποιείται συχνά με κάποιο καταλύτη που φέρει ιόντα σιδήρου. Ακόμα, χρησιμοποιείται απουσία καταλυτών και κάτω από ουδέτερες συνθήκες. Το πλεονέκτημα από τη χρήση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε σύγκριση με τα υπόλοιπα οξειδωτικά μέσα είναι ότι δεν ενσωματώνει ξένα μέταλλα στην επιφάνεια του άνθρακα, καθώς επίσης δεν αλλάζει τη διάταξη των νανοϊνών. Γενικά, όσο μεγαλύτερη είναι η διάρκεια της οξείδωσης των ανθρακικών υλικών, τόσο πιο αποτελεσματική είναι η οξείδωση. Παρολ'αυτά θα πρέπει να αναφερθεί ότι η ισχυρή και μεγάλης διάρκειας οξείδωση καταστρέφει τη δομή των νανοϊνών άνθρακα.<sup>lxvii</sup>

### **4.3 Εφαρμογές Νανοϊνών Άνθρακα στην Ανάπτυξη Βιοαισθητήρων**

Οι νανοΐνες άνθρακα έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων, λόγω των μοναδικών φυσικών και χημικών χαρακτηριστικών που εμφανίζουν.

Διάφορα βιομόρια όπως πρωτεΐνες, ένζυμα και DNA έχουν ακινητοποιηθεί σε νανοϊνες άνθρακα μετά την κατάλληλη κατεργασία των νανοδομών αυτών.

Η ομοιοπολική δέσμευση DNA σε νανοϊνες άνθρακα πραγματοποιήθηκε το 2005 από την ερευνητική ομάδα του Baker.<sup>lxviii</sup> Η προσθήκη πρωτοταγών αμινομάδων στην επιφάνεια των νανοϊνών άνθρακα, αποτέλεσε το πρώτο βήμα για την ακινητοποίηση του DNA. Τα μόρια DNA ακινητοποιήθηκαν επιτυχώς στην τροποποιημένη επιφάνεια των νανοϊνών άνθρακα ενώ παράλληλα εμφάνισαν υψηλότερη ικανότητα δέσμευσης με το συμπληρωματικό μόριο DNA, σε σύγκριση με την ακινητοποίησή τους σε τροποποιημένη επιφάνεια υαλώδους άνθρακα.

Οι νανοϊνες άνθρακα αξιολογήθηκαν και ως υλικά ακινητοποίησης και μεταλλάκτες σήματος για την ανάπτυξη αμπερομετρικών βιοαισθητήρων γλυκόζης.<sup>lxix</sup> Παράλληλα, εξετάστηκαν οι νανοσωλήνες άνθρακα για συγκριτικούς λόγους. Τα αποτελέσματα αυτής της μελέτης έδειξαν ότι οι βιοαισθητήρες που βασίζονταν στις νανοϊνες άνθρακα παρουσίασαν υψηλότερη ευαισθησία, μεγαλύτερο χρόνο ζωής καθώς και εξαιρετική αναπαραγωγιμότητα. Μετά από αυτή την εργασία έχει αναφερθεί πληθώρα εφαρμογών αυτών των νανοδομών ως υποστρώματα ακινητοποίησης βιολογικών μορίων. Νανοϊνες άνθρακα με επιφανειακές αμινομάδες και καρβοξυλομάδες εξετάστηκαν ως υπόστρωμα για τη σταθεροποίηση της μεταλλοπρωτεΐνης του κυτοχρώματος c.<sup>lxx</sup> Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η σταθεροποίηση του ενζύμου στις νανοϊνες με τις επιφανειακές καρβοξυλικές ομάδες ήταν αποτελεσματικότερη. Επιπλέον, έχει αναφερθεί η ανάπτυξη αμπερομετρικού βιοαισθητήρα αφυδρογονάσης βασιζόμενου σε νανοϊνες άνθρακα για την ανίχνευση αιθανόλης.<sup>lxxi</sup> Η ίδια ερευνητική ομάδα ανέφερε και την ανάπτυξη ενός ανοσοαισθητήρα.<sup>lxxii</sup> Το καρκινικό αντιγόνο CA125 και ο δείκτης θειονίνη δεσμεύτηκαν ομοιοπολικά σε τροποποιημένες επιφάνειες νανοϊνών άνθρακα. Ο αισθητήρας επώαστηκε σε διάλυμα υπεροξειδάσης *horseradish* (HRP) επισημασμένης με το αντίσωμα CA125. Η συγκέντρωση του αντισώματος CA125 προσδιορίστηκε μέσω της ηλεκτροκαταλυτικής αναγωγής του υδροϋπεροξειδίου. Αυτός ο βιοαισθητήρας εμφάνισε καλύτερα αναλυτικά χαρακτηριστικά σε σχέση με άλλους CA125 αισθητήρες. Επιπλέον, η ίδια ερευνητική ομάδα παρατήρησε ότι η παρουσία μίας μεμβράνης νανοϊνών άνθρακα σε ένα ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC) προωθούσε τη μεταφορά ηλεκτρονίων ανάμεσα στο NADH και την επιφάνεια του ηλεκτροδίου.<sup>lxxiii</sup> Το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο GC εμφάνισε χαμηλό υπερδυναμικό για την οξείδωση του NADH λόγω της ύπαρξης οξυγόνου στις ενεργές

ομάδες που προέκυψαν κατά την οξείδωση των ναοϊνών άνθρακα με  $\text{HNO}_3$ . Ακόμα, η ίδια ομάδα κατασκεύασε έναν αμπερομετρικό αισθητήρα για την ανίχνευση αιθανόλης ο οποίος ήταν βασισμένος σε ηλεκτροπολυμερισμό ενός βήματος θειονίνης με ναοϊνες άνθρακα στις οποίες είχε ακινητοποιηθεί το ένζυμο αλκοολική οξειδάση (AOx).<sup>lxxiv</sup> Η παρουσία των ναοϊνών άνθρακα συνέβαλε στην εξαιρετική καταλυτική ενεργότητα των μεμβρανών για την αναγωγή του διαλυμένου οξυγόνου, παράγοντας έτσι έναν ευαίσθητο βιοαισθητήρα αιθανόλης, ο οποίος εμφάνισε χαμηλό όριο ανίχνευσης, γρήγορη απόκριση και καλή σταθερότητα. Ένας ακόμη αμπερομετρικός ενζυμικός βιοαισθητήρας βασισμένος σε ναοϊνες άνθρακα προτάθηκε από τους Weeks et al. το 2008, για την ανίχνευση αιθανόλης.<sup>lxxv</sup> Η αλκοολική αφυδρογονάση (YADH), που είναι μία οξειδοαναγωγάση και ο συμπαράγοντάς της, νικοτινάμιδο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο ( $\text{NAD}^+$ ), ακινητοποιήθηκαν μέσω προσρόφησης και ομοιοπολικής δέσμευσης στην επιφάνεια των ναοϊνών άνθρακα. Ο συγκεκριμένος βιοαισθητήρας εμφάνισε καλή ευαισθησία και σταθερότητα, ενώ παράλληλα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για περισσότερες από μία μετρήσεις. Οι Wu et al., πρότειναν τον Ιούνιο του 2008, την κατασκευή ενός αισθητήρα που βασιζόταν σε ένα βιοσυμβατό ναοϊβρίδιο ναοϊνών άνθρακα με υδατοδιαλυτή πορφυρίνη για την ανίχνευση αιθανόλης με μεγάλη ευαισθησία.<sup>lxxvi</sup> Το ναοϊβρίδιο, CNF-FeTMPyP, επιτάχυνε τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το CNF-FeTMPyP στο ηλεκτρόδιο. Το γεγονός ότι και η πορφυρίνη και οι ναοϊνες άνθρακα διευκόλυναν τη μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ του διαλυμένου οξυγόνου και του ηλεκτροδίου, απέδειξε την ύπαρξη ενός συνεργατικού αποτελέσματος στην αναγωγή του οξυγόνου. Για το λόγο αυτό, κατασκευάστηκε ένας βιοαισθητήρας αιθανόλης ακινητοποιώντας AOx σε ένα ηλεκτρόδιο τροποποιημένο με CNF-FeTMPyP. Ο συγκεκριμένος αισθητήρας εμφάνισε γρήγορη και υψηλής ευαισθησίας αμπερομετρική απόκριση στην αιθανόλη και χαμηλό δυναμικό αναγωγής. Το ναοϊβρίδιο αυτό λοιπόν αποτέλεσε λειτουργικός ηλεκτροκαταλύτης για την κατασκευή ευαίσθητων βιοαισθητήρων και φάνηκε να μιμείται τις καταλυτικές συμπεριφορές του ενζύμου σε βιολογικά συστήματα.

Οι Liu et al. ανέπτυξαν έναν αισθητήρα που βασιζόταν σε ναοϊνες άνθρακα για την ανίχνευση  $\text{NADH}$  με μεγάλη ευαισθησία.<sup>lxxvii</sup> Οι ναοϊνες άνθρακα προετοιμάστηκαν μέσω του συνδυασμού της τεχνικής electrospinning και μίας θερμικής κατεργασίας. Ο αισθητήρας παρουσίασε χαμηλό όριο ανίχνευσης, υψηλό γραμμικό εύρος και καλή επιλεκτικότητα για το  $\text{NADH}$ , παρουσία ασκορβικού οξέος

(AA). Οι εξαιρετικές ηλεκτροχημικές ιδιότητες του νέου αυτού υλικού το καθιστούν πολλά υποσχόμενο για τον πρακτικό σχεδιασμό αποτελεσματικών βιοαισθητήρων. Η ίδια ερευνητική ομάδα κατασκεύασε πρόσφατα έναν νέο μη-ενζυμικό αισθητήρα γλυκόζης που βασίστηκε σε νανοσωματίδια νικελίου (Ni), και νανοϊνες άνθρακα.<sup>lxxviii</sup>

Το νανοϋβρίδιο NiCF, με μεγάλες ποσότητες Ni και NiO, ενσωματωμένων στα CF, προετοιμάστηκε με συνδυασμό μίας τεχνικής electrospinning και μίας μεθόδου θερμικής κατεργασίας. Ο αισθητήρας παρουσίασε υψηλή ευαισθησία, γρήγορη απόκριση, καλή σταθερότητα και ικανοποιητική αναπαραγωγιμότητα, για το μη-ενζυμικό προσδιορισμό γλυκόζης.

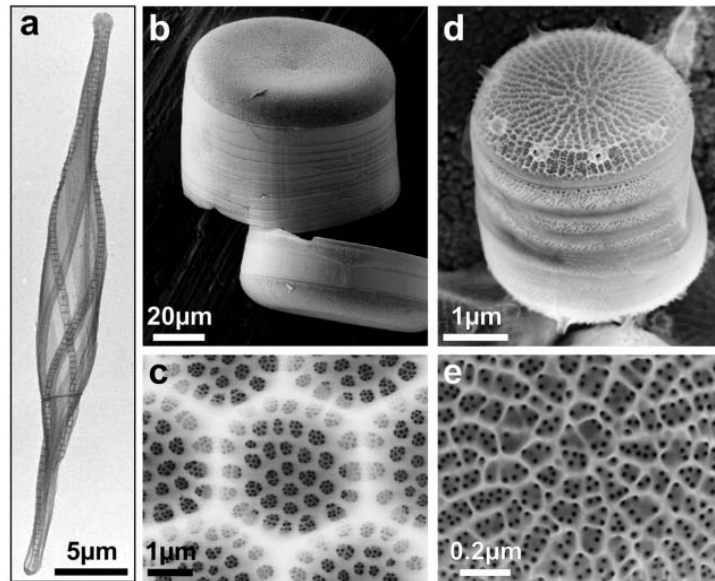
Επιπλέον, πρέπει να αναφερθεί ότι η ερευνητική ομάδα του Kim παρασκεύασε νανοσωματίδια παλλαδίου (Pd) πάνω σε νανοϊνες άνθρακα.<sup>lxxix</sup> Οι νανοϊνες άνθρακα που περιείχαν νανοσωματίδια Pd προετοιμάστηκαν απλά μέσω electrospinning ενός διαλύματος πολυμερούς που περιείχε χλωρίδιο του παλλαδίου και ακολούθησε θερμική κατεργασία σε ατμόσφαιρα Αργού. Μέσω αυτής της διαδικασίας, τα σωματίδια Pd ενσωματώθηκαν στην εξωτερική επιφάνεια των νανοϊνών άνθρακα, με αποτέλεσμα το νέο αυτό υλικό να μπορεί να βρει εφαρμογές τόσο ως αποτελεσματικός καταλύτης όσο και ως αισθητήρας υδρογόνου. Ακόμα, μπορεί να είναι χρήσιμος στην κατασκευή ενός νέου βιοαισθητήρα αερίων, στην κατασκευή φίλτρων υψηλής απόδοσης που θα παρουσιάζουν υψηλές αντιμικροβιακές ιδιότητες καθώς και σε ηλεκτρονικές συσκευές. Τέλος, πρόσφατα οι Stavyiannoudaki et al., πραγματοποίησαν μία σύγκριση των ιδιοτήτων μεταξύ απλών και οξειδωμένων νανοϊνών άνθρακα, και ταυτόχρονα σύγκριναν και τη χρήση τους σε συστήματα βιοαισθητήρων στα οποία το ένζυμο είχε ακινητοποιηθεί είτε με προσρόφιση είτε με ομοιοπολική δέσμευση.<sup>lxxx</sup> Τα οξειδωμένα CNFs έδειξαν αποτελεσματικότερη και εκλεκτικότερη αλληλεπίδραση με τα ένζυμα και αυτό επειδή με την οξείδωση αυξάνεται το ποσοστό των δραστικών ομάδων που υπάρχουν στην επιφάνεια των νανοϊνών και έτσι αυξάνεται και το ποσοστό της πρωτεΐνης που ακινητοποιείται, λόγω ισχυρότερης αλληλεπίδρασης του ενζύμου με τις νανοϊνες. Η μελέτη αυτή απέδειξε ότι τόσο τα απλά CNFs όσο και τα οξειδωμένα, είναι ιδανικά υποστρώματα για την ακινητοποίηση ενζύμων, επιτρέποντας την ανάπτυξη βιοαισθητήρων υψηλής σταθερότητας και με βελτιωμένα αναλυτικά χαρακτηριστικά.

## 5. ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΑ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΟ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΠΥΡΙΤΙΟΥ

Η συλλογή ανόργανων μεταλλευμάτων από φυτικούς οργανισμούς (biomineralization) είναι ένα ευρέως διαδεδομένο φαινόμενο στη φύση<sup>lxxxix</sup>. Μετά το  $\text{CaCO}_3$ , το δεύτερο σε αφθονία βιοορυκτό στη γη είναι το οξείδιο του πυριτίου. Πολλοί επίγειοι καρποί, όπως ρύζι, δημητριακά, αγγούρι, συλλέγουν σημαντικές ποσότητες οξειδίου του πυριτίου με σκοπό να ενισχύσουν τους ιστούς τους<sup>lxxxix</sup>, αλλά και για να απωθήσουν τα παθογόνα<sup>lxxxix</sup>. Επιπλέον, έχειδειχθεί ότι το οξείδιο του πυριτίου είναι απαραίτητο και για την ανάπτυξη των ζώων, συμπεριλαμβανομένων των θηλαστικών, καθώς είναι απαραίτητο συστατικό για την ανάπτυξη του χόνδρου και των οστών<sup>lxxxiv,lxxxv</sup>. Εντούτοις, η βιο-ορυκτοποίηση, πραγματοποιείται κυρίως από τις απλές υδρόβιες μορφές ζωής, όπως οι μονοκύτταροι οργανισμοί (διάτομα, radiolarian, synurophytes), καθώς επίσης και από τα πολυκύτταρα σφουγγάρια. Οι οργανισμοί αυτοί διαθέτουν έξω- και ένδο-σκελετούς, βασισμένους σε οξείδιο του πυριτίου, οι οποίοι αποτελούν την πλειοψηφία της μάζας των σωμάτων τους. Ειδικότερα τα διάτομα, δημιουργούν εκπληκτικές δομές οξειδίου του πυριτίου στην κλίμακα του νανομέτρου και μικρόμετρου (Εικόνα 10). Η κατανόηση του μηχανισμού κατασκευής αυτών των βιολογικών νανοδομών που βασίζονται στο οξείδιο του πυριτίου, μπορεί να οδηγήσει στην παραγωγή νέων συνθετικών υλικών, βασισμένων σε αυτό, υπό ήπιες συνθήκες αντίδρασης<sup>lxxxvi,lxxxvii</sup>.

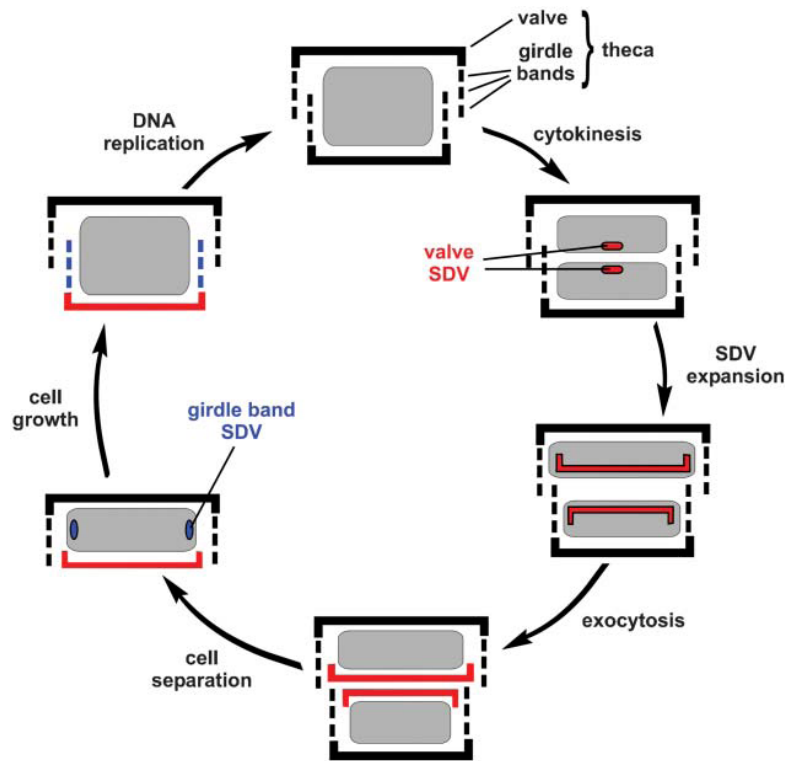
### 5.1 Σχηματισμός βιομιμητικά παραγόμενου διοξειδίου του πυριτίου από τα διάτομα

Οι δομές που παράγουν τα διάτομα αποτελούνται από άμορφο, ενυδατωμένο  $\text{SiO}_2$ , το οποίο περιέχει και ένα μικρό ποσοστό οργανικών μακρομορίων (πρωτεϊνών). Έχει βρεθεί ότι η ύπαρξη των πρωτεϊνών βοηθάει ή και ελέγχει την εναπόθεση και τη νανοδόμηση<sup>lxxxviii,lxxxix</sup>.



**Εικόνα 10.** Σκελετικές δομές τοιχωμάτων των διατομικών κυττάρων. Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου απομονωμένων κυττάρων από διαφορετικά είδη διατόμων: a) *Cylindrotheca fusiformis*, b,c) *Coccinodiscus asteromphatus*, d,e) *Thalassiosira pseudonana*.

Η ανάπτυξη του βιομημητικά παραγόμενου διοξειδίου του πυριτίου γύρω από ένα κύτταρο διατόμων πραγματοποιείται μέσω μιας δομής petri-petri-dish. Στη δομή αυτή, ένα ανώτερο σημείο (epitheca) επικαλύπτει το ελαφρώς μικρότερο κατώτατο σημείο (hypotheca) (Εικόνα 11). Κάθε theca αποτελείται από μια βαλβίδα και διάφορες ζώνες περιζωμάτων, οι οποίες επιδεικνύουν συνήθως τα πορώδη σχέδια που είναι μακριά και λιγότερο επιμελημένα από αυτά της βαλβίδας. Ο σχηματισμός αυτών των δομών του βιομημητικά παραγόμενου διοξειδίου του πυριτίου πραγματοποιείται σε εξειδικευμένα ενδοκυτταρικά διαμερίσματα που καλούνται κύστες (vesicles) απόθεσης πυριτίου (SDVs)<sup>xc</sup>. Ο ακριβής τρόπος σχηματισμού του βιομημητικά παραγόμενου διοξειδίου του πυριτίου μέσα στα SDVs είναι άγνωστος. Ως αρχική πηγή του πυριτίου θεωρείται ότι είναι το μονοπυριτικό οξύ ( $\text{Si}(\text{OH})_4$ ), το οποίο υπάρχει στο περιβάλλον των φυσικών βιότοπων σε συγκεντρώσεις 1- 100  $\mu\text{M}$ .<sup>xcii,xciii</sup> Το μονοπυριτικό οξύ μεταφέρεται στο κύτταρο των διατόμων από συγκεκριμένες  $\text{Na}^+$ -εξαρτώμενες πρωτεΐνες μεταφορέων (SIT)<sup>xciii,xciv</sup>, ενώ ο μηχανισμός της ενδοκυτταρικής αποθήκευσής του και του τρόπου μεταφοράς του στο SDV δεν είναι γνωστός<sup>xcv</sup>



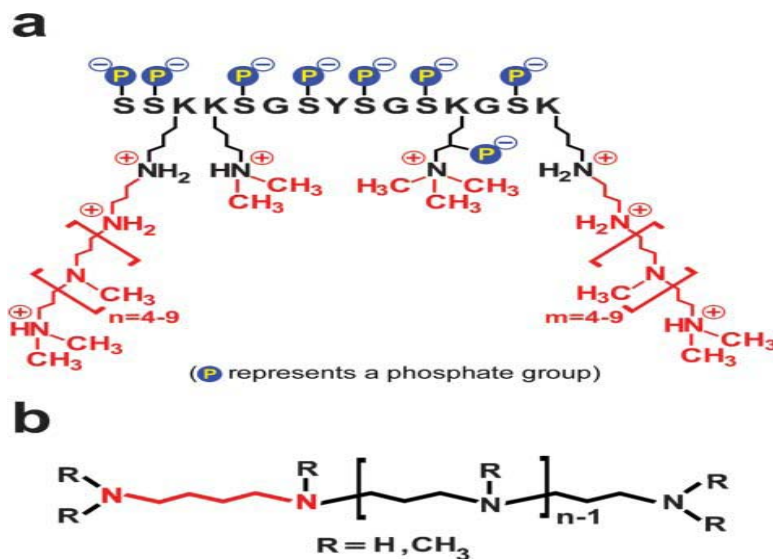
**Εικόνα 11.** Κυτταρικός κύκλος διατόμων. Το βιομιμητικά παραγόμενο διοξείδιο του πυριτίου απεικονίζεται με μαύρο ή κόκκινο χρώμα. Ο πρωτοπλάστης φαίνεται με γκρι χρώμα.

Η βιογένεση του κυψελοειδούς τοίχου στα διάτομα απαιτεί δύο διαφορετικούς τύπους SDVs που είναι παρόντες στα διαφορετικά στάδια του κύκλου των κυττάρων. Κατά τη διάρκεια της κυτταροδιαίρεσης, κάθε κύτταρο αμφιθαλών παράγει μια βαλβίδα SDV, η οποία αυξάνεται βαθμιαία, καθώς εναποτίθεται όλο και περισσότερο οξείδιο του πυριτίου. Όταν ολοκληρωθεί ο σχηματισμός βαλβίδων, το SDV λιώνει με τη κυτταρική μεμβράνη σχηματίζοντας έτσι το βιομιμητικά παραγόμενο διοξείδιο του πυριτίου στην επιφάνεια των κυττάρων. Εξαιτίας της ακαμψίας του βιομιμητικά παραγόμενου διοξειδίου του πυριτίου, η ανάπτυξη των κυττάρων στην ενδιάμεση φάση είναι δυνατή μόνο με την αύξηση της απόστασης μεταξύ του epitheca και του hypotheca. Επομένως, με την αύξηση των κυττάρων, διαμορφώνονται και διάφορες ζώνες περιζωμάτων σε μεμονωμένα SDVs, τα οποία απελευθερώνονται το ένα μετά το άλλο, αποτρέποντας το σχηματισμό χασμάτων στον κυψελοειδή τοίχο. Όταν ο όγκος των κυττάρων φθάσει στο απαραίτητο μέγεθος αρχίζει ένας νέος κύκλος της κυτταροδιαίρεσης (Εικόνα 11) <sup>xcvi</sup>.



## 5.2 Τα πρωτεϊνικά υποστρώματα στα διάτομα για το σχηματισμό του βιομιμητικά παραγόμενου διοξειδίου του πυριτίου

Από τα διάτομα *C. Fusiformis*, έχουν απομονωθεί τρεις οικογένειες πρωτεϊνών κυψελοειδούς τοίχου (frustulins, pleuralins και silaffins). Οι συγκεκριμένες οικογένειες εμφανίζουν νέα χαρακτηριστικά<sup>xvii,xviii,xcix</sup>. Επιπλέον, έχει ανακαλυφθεί ότι οι πολύ-αμίνες με μακριές αλυσίδες (LCPAs) λειτουργούν ως τα συστατικά διατόμων πάνω στις οποίες αναπτύσσεται το βιομιμητικά παραγόμενο διοξείδιο του πυριτίου<sup>c</sup>. Μελέτες όμως έχουν δείξει ότι, τα frustulins και pleuralins δεν λαμβάνουν μέρος αρχικά στο σχηματισμό οξειδίου του πυριτίου καθώς αυτά επικάθονται στο βιομιμητικά παραγόμενο διοξείδιο του πυριτίου, μετά την εναπόθεσή του πάνω στο κύτταρο<sup>ci,cii</sup>. Αντίθετα, τα silaffins και οι πολύ-αμίνες (polyamines) εμφανίζουν μια καταλυτική δράση στο σχηματισμό οξειδίου του πυριτίου, καθώς προκαλούν την άμεση βιογένεσή του. Τα silaffins και οι πολύ-αμίνες συνδέονται άμεσα με το βιομιμητικά παραγόμενο διοξείδιο του πυριτίου των διατόμων και μπορούν να διαλυτοποιηθούν μόνο μετά από την πλήρη αφαίρεση του οξειδίου του πυριτίου.



Εικόνα 12. Χημικές δομές των Silaffins και LCPAs.

## 5.3 Χημεία του οξειδίου του πυριτίου και η δομή των silaffins

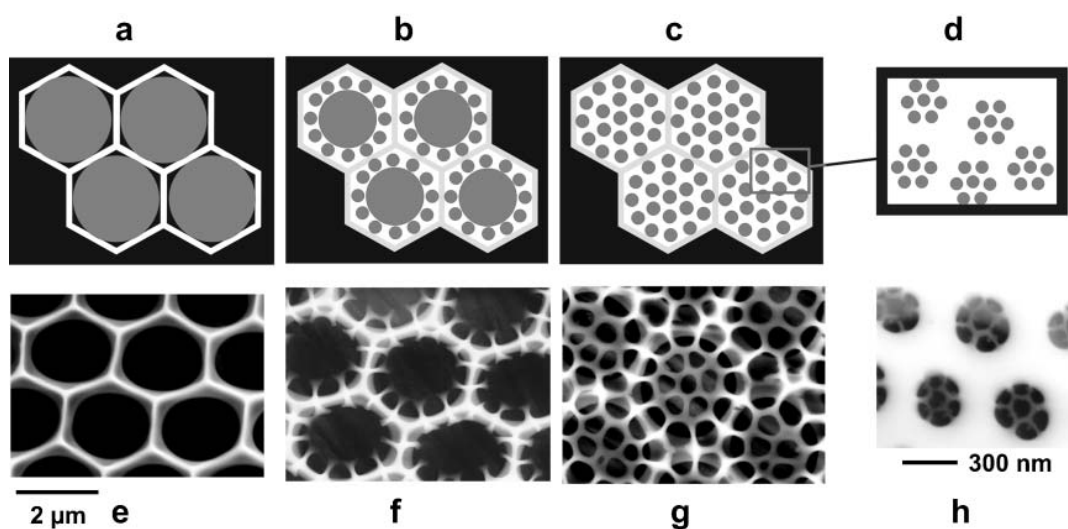
Τα τελευταία χρόνια έχει υπάρξει τεράστιο ενδιαφέρον όσον αφορά την κατανόηση της σύνθετης χημείας που λαμβάνει μέρος μεταξύ του πυριτικού οξέος και των πολυμερικών του παραγώγων<sup>ciii</sup>. Η χημεία της πολύ-συμπύκνωσης του πυριτικού οξέος δίνει τη δυνατότητα εύκολης δομικής προσαρμογής για επικάλυψη κάθε βιομορίου το οποίο λαμβάνει μέρος στη διαδικασία του πολυμερισμού. Αρκετά

χρόνια τώρα, μη-πορώδες οξειδίο του πυριτίου συντίθεται μέσω ελεγχόμενης υδρόλυσης αλκοξειδίων του πυριτίου σε μίγματα αλκοόλης/αμμωνίας<sup>civ</sup>. Πρόσφατα, έχει υπάρξει σημαντική πρόοδος για την παραγωγή πορώδων τέτοιων στερεών δομών, και ιδιαίτερα για τη σύνθεση πολλών μορφολογιών με βάση το οξειδίο του πυριτίου<sup>cv,cvi,cvii</sup>. Με την εφαρμογή αυτής της γνώσης στη δομή των silaffins, έχει προκύψει μια συναρπαστική πτυχή. Υπάρχει στη φύση ένα οργανικό μόριο καταλύτης το οποίο είναι σε θέση να προσαρμόζεται τέλεια στη χημεία του σχηματισμού του οξειδίου του πυριτίου. Ο πολυμερισμός του πυριτικού οξέος αποτελείται από τρία ευδιάκριτα στάδια. Πρώτα, το μονομερικό πυριτικό οξύ πολυμερίζεται μέσω συμπύκνωσης των σιλανολών για να παραχθούν διμερή, τριμερή, και κυκλικά ολιγομερή. Τα όξινα είδη ολιγοπυριτικού έχουν μια ισχυρή τάση να πολυμερίζονται περαιτέρω, ώστε να μεγιστοποιείται ο σχηματισμός δεσμών σιλοξανίου (Si-o-Si). Με αυτόν τον τρόπο, τα διακλαδισμένα πολύ-πυριτικά οξέα, δρουν ως πυρήνες για το σχηματισμό οξειδίου του πυριτίου. Στη συνέχεια, οι πυρήνες τείνουν να διαμορφώσουν τα σφαιρικά μόρια, μέσω συνεχούς πολυμερισμού των μονομερών και των ολιγομερικών πυριτικών οξέων ή μέσω της τήξης των μορίων. Τέλος, τα σφαιρικά μόρια οξειδίου του πυριτίου, διαμορφώνουν μία τρισδιάστατη δικτυωτή δομή, με διακλαδώσεις που συγκρατούνται με δεσμούς σιλοξανίου. Κατά συνέπεια, η μοριακή μάζα των πολύ-πυριτικών οξέων αυξάνεται, το ιξώδες του διαλύματος αυξάνει συνεχώς και τελικά σκληραίνει ως πήκτωμα (πήξη). Εναλλακτικά, τα μόρια μέσω της διαδικασίας του flocculation (καταβύθιση μη κρυσταλλικού ιζήματος), παράγουν το σκληρό οξειδίο του πυριτίου που εναποτίθεται στον κυψελοειδή τοίχο των διατόμων. Τα δομικά στοιχεία των silaffins είναι δυνατόν να περιληφθούν σε κάθε ένα από αυτά τα τρία στάδια, επιταχύνοντας το σχηματισμό του σκληρού οξειδίου του πυριτίου.

#### **5.4 Μορφογένεση βιομιμητικά παραγόμενου διοξειδίου του πυριτίου σε πολύ-αμίνες**

Τα διάτομα του γένους *Coscinodiscus* εκθέτουν εξαιρετικά περίπλοκα σχέδια οξειδίου του πυριτίου, συμπεριλαμβανομένων των λεπτών δομών στα 30-50 nm (Εικόνα 10c). Η δομή των βαλβίδων αποτελείται από μια ιεραρχία ταυτόσημων εξαγωνικών δομών οξειδίου του πυριτίου παράγοντας μια σύνθετη αλλά και ιδιαίτερα συμμετρική διαμόρφωση βαλβίδων. Ανάλυση εκχυλισμάτων HF από αυτά τα διάτομα περιείχαν μόνο οργανικές λιπόφιλες πολύ-αμίνες.

Οι πολύ-αμίνες αυτές λειτουργούν χωριστά μέσα στο SDV για να διαμορφώσουν τα γαλακτώματα των μικροσταγονιδίων<sup>cviii</sup>, τα οποία με τη σειρά τους διαμορφώνουν εξαγωνικά μονοεπίπεδα μέσα στο SDV. Πάνω στην επιφάνεια επαφής νερού/πολυαμίνης ξεκινάει ο πολυμερισμός του οξειδίου του πυριτίου. Αυτό αναγκάζει, το υπόλοιπο μέρος του αρχικού οργανικού σταγονιδίου, να διαχωριστεί σε έναν μέγιστο αριθμό μικρότερων σταγονιδίων, δημιουργώντας πάλι νέες επιφάνειες για τον πολυμερισμό του οξειδίου του πυριτίου (Εικόνα 13). Η επανάληψη αυτού του απλού μηχανισμού δημιουργεί τη νανοδόμηση στις βαλβίδες του γένους *Coscinodiscus*.



**Εικόνα 13.** Σχηματική απεικόνιση του διαχωρισμού φάσεων (a-d) και σύγκριση των ενδιάμεσων σταδίων βιογένεσης κυψελοειδών δομών(e-h).

## 5.5 Εφαρμογές

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, είναι πλέον γνωστό ότι ορισμένες πρωτεΐνες που υπάρχουν στα σφουγγάρια και τα διάτομα είναι αρμόδιες για την κατάλυση του σχηματισμού των δομών με βάση το βιογενές πυρίτιο<sup>cix,cx</sup>. Η ταυτοποίηση της χημικής δομής των πρωτεϊνών αυτών, έχει επιτρέψει το σχεδιασμό πρότυπων πολύπεπτιδίων τα οποία μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν ως πολύ καλά υποστρώματα για το βιομιμητικό σχηματισμό του πυριτίου, με βάση το πυριτικό οξύ<sup>cx</sup>. Επιπλέον, άλλα βιομακρομόρια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη σύνθεση νέων βιομιμητικών υλικών<sup>cxii,cxiii</sup>. (Πίνακας 1) Ένα τέτοιο μόριο το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί με μεγάλη επιτυχία για το σχηματισμό του πυριτίου είναι το πολυμερές της (L-λυσίνης). Αυτό το υπόστρωμα μπορεί να καταλύσει το σχηματισμό

του πυριτίου in vitro, δεδομένου ότι αποτελείται από υπομονάδες, που σε ουδέτερο pH, είναι θετικά φορτισμένες.

Silica catalyst	Silica characteristics	Refs
Silaffin and R5 peptide <sup>a</sup>	Spherical particles 500-700 nm	[56]
Poly(EAK)n-R5 <sup>b</sup>	Bimodal spheres ~83 and ~463 nm	[57]
Lysozyme	Spherical particles ~500 nm	[46,58,59]
Silica-binding peptides	Spherical particles 250-500 nm	[60]
Silicateins	Silica sheets along protein filaments	[61]
Block co-polypeptides	Various morphologies from spheres to columns depending upon the precursor	[62]
Poly-L-lysine	Various morphologies, including nanoparticles (50-100 nm), hexagonal platelets (0.5-1 μm)	[53,63-65]
Polyethyleneimine	Various morphologies: spheres, ribbons, nanofibres and platelets	[17,66,67]
Amine-terminated dendrimers	Spherical particles, size dependent upon reaction conditions	[68]
Spermine/spermidine	Spherical particles 500 nm to 1 μm	[69]
Cysteamine	Spherical particles ~40-100 nm	[70]
Protamine	Spherical particles ~25 nm	[32]

<sup>a</sup>R5 sequence: n-SSKKSGSYSGSKGSKRRIL-c.

<sup>b</sup>Poly(EAK)n sequence: n-AEAEAKAKAEAEAKAK-c.

**Πίνακας 2.** Χαρακτηριστικά παραγωγής πυριτικών δομών με βιολογικούς και bioinspired καταλύτες.

Οι βιομιμητικά παραγόμενες πυριτικές δομές έχουν χρησιμοποιηθεί σε μελέτες ακινητοποίησης και σταθεροποίησης ενζύμων. Τα ένζυμα HRP (Horse Radish Peroxidase)<sup>cxiv</sup> και βουτυρυλοχολινεστεράση<sup>cxv</sup>, έχουν σταθεροποιηθεί επιτυχώς σε πυριτικά υποστρώματα

Σύγχρονα νανοϋλικά, όπως οι νανοϊνες άνθρακα και οι βιομιμητικά παραγόμενες πυριτικές δομές, έχουν συμβάλει πρόσφατα στη βελτίωση πολλών αναλυτικών χαρακτηριστικών των βιοαισθητήρων. Η χρήση νανοσωλήνων άνθρακα (CNTs)<sup>cxvi</sup> ή νανοϊνών άνθρακα (CNFs)<sup>cxvii,cxviii</sup> έχει δώσει πολύ καλά αποτελέσματα. Στις μελέτες αυτές έχουν χρησιμοποιηθεί η λυσοζύμη και η πολύ-L-λυσίνη, αντίστοιχα, ως υποστρώματα για το βιομιμητικό σχηματισμό οξειδίου του πυριτίου. Κατά τη διαδικασία, τα ένζυμα επικαλύπτονται στο δημιουργημένο κέλυφος του νανοϋβριδίου οξειδίου του πυριτίου/νανοδομών άνθρακα. Έτσι, οι διαφορετικές διαμορφώσεις του ενζύμου αλληλεπιδρούν τόσο με το ανιονικό οξύδιο του πυριτίου, όσο και με τις νανοδομές άνθρακα, με αποτέλεσμα την καλύτερη σταθεροποίηση του ενζύμου, αυξάνοντας και το χρόνο ζωής των αισθητήρων. Ταυτόχρονα, η χρήση των αγωγίμων νανοϊνών άνθρακα δίνει τη δυνατότητα μετάλλαξης του σήματος, με πολύ χαμηλή πόλωση συγκέντρωσης.

Η ραγδαία ανάπτυξη της νανοτεχνολογίας τα τελευταία χρόνια, καθιστά δυνατή τη δημιουργία και αξιολόγηση νανο-συστημάτων που βασίζονται σε νανοϋλικά και βιομιμητικά παραγόμενες πυριτικές δομές, προετοιμάζοντας το έδαφος για μια νέα κατηγορία βιοαισθητήρων που μπορεί να βρει μεγάλης κλίμακας εφαρμογή σε βιοαναλυτικές νανο-συσκευές.

## 6. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΒΑΣΙΖΟΜΕΝΟΥ ΣΕ ΝΑΝΟΪΝΕΣ ΑΝΘΡΑΚΑ ΚΑΙ ΒΙΟΜΙΜΗΤΙΚΑ ΠΑΡΑΓΟΜΕΝΟ ΔΙΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΠΥΡΙΤΙΟΥ, ΠΑΡΟΥΣΙΑ ΜΕΤΑΦΟΡΕΑ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ

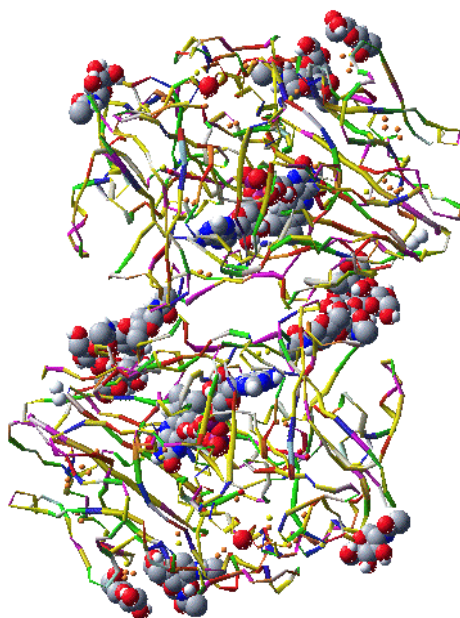
Η οξειδάση της γλυκόζης είναι ένα αρκετά σταθερό ένζυμο γεγονός που το καθιστά σύστημα αναφοράς για την ανάπτυξη και αξιολόγηση συστημάτων που βασίζονται σε ένζυμα. Στην παρούσα εργασία, χρησιμοποιείται η οξειδάση της γλυκόζης για την ανάπτυξη αμπερομετρικών βιοαισθητήρων με σκοπό την αξιολόγηση των οξειδωμένων νανοϊνών άνθρακα και του βιομιμητικά παραγόμενου διοξειδίου του πυριτίου ως υποστρώματα ακινητοποίησης και σταθεροποίησης ενζύμων.

### 6.1 Ενζυμική Δράση Οξειδάσης της Γλυκόζης

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε η οξειδάση της γλυκόζης (GOx) από το μικροοργανισμό *Aspergillus niger*. Πρόκειται για μια διμερής γλυκοπρωτεΐνη που καταλύει την οξειδωση της D-γλυκόζης μέσω του μοριακού οξυγόνου. Αποτελείται από 583 αμινοξέα και το μοριακό της βάρος είναι 150 έως 180 kDa. Οι υδατανθρακικές αλυσίδες (κυρίως μαννόζης) που είναι δεσμευμένες στο ένζυμο αποτελούν το 10-16% του μοριακού της βάρους.<sup>cxix</sup> Το μονομερές του ενζύμου είναι ένα συμπαγές σφαιροειδές με διαστάσεις 60 Å x 52 Å x 37 Å, ενώ η διμερής μορφή του ενζύμου έχει διαστάσεις 60 Å x 52 Å x 77 Å. Η παρουσία δύο μορίων φλαβινο-αδενινο-δινουκλεοτιδίου (FAD) στη δομή της οξειδάσης της γλυκόζης, συνδέεται άμεσα με την καταλυτική της δράση. Σε συνθήκες που είναι ακατάλληλες για το ένζυμο, λαμβάνει χώρα αποδέσμευση του FAD από την οξειδάση της γλυκόζης με αποτέλεσμα το διαχωρισμό των δύο υπομονάδων του ενζύμου και επομένως αποδιάταξή του.

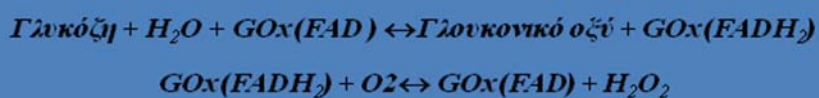
Η περιοχή πρόσδεσης του υποστρώματος αποτελείται από ομάδες που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές της αλληλουχίας αμινοξέων και σχηματίζουν μία βαθιά κοιλάτητα. Η μία πλευρά αυτής της κοιλάτητας απαρτίζεται από έξι αντιπαράλληλες β-πτυχωτές επιφάνειες, ενώ στην άλλη πλευρά της κοιλάτητας, στον πυθμένα, 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

τιμήμα 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 14.** Προσομοίωση μοριακής δυναμικής της κρυσταλλικής δομής της οξειδάσης της γλυκόζης.<sup>cxv</sup>

Ο μηχανισμός της ενζυμικής αντίδρασης της οξειδάσης της γλυκόζης 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, η οποία στη συνέχεια υδρολύεται αυθόρμητα σε γλουκονικό οξύ. Το μόριο FAD δρα ως δέκτης των πρωτονίων και των ηλεκτρονίων του υποστρώματος και προκύπτει το FADH<sub>2</sub> (ανηγμένη μορφή του ενζύμου). Στο δεύτερο στάδιο το μοριακό οξυγόνο, ο φυσικός συμπαράγοντας του ενζύμου, είναι ο δέκτης των ηλεκτρονίων από το ενεργό κέντρο του ενζύμου 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. Επιπλέον, πρόκειται για ένα αρκετά σταθερό ένζυμο γεγονός που συνέβαλε στο να θεωρείται ως σύστημα αναφοράς για την ανάπτυξη και αξιολόγηση συστημάτων που βασίζονται σε ένζυμα. Όλα αυτά είχαν σαν αποτέλεσμα την ευρεία χρήση του ενζύμου αυτού στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων για τον ποσοτικό προσδιορισμό της γλυκόζης. Κατά την ενζυμική αντίδραση, το σχηματιζόμενο υδροϋπεροξειδίο οξειδώνεται με την εφαρμογή κάποιου δυναμικού με αποτέλεσμα την παραγωγή ηλεκτρικού ρεύματος. Η παρατηρούμενη αύξηση της έντασης του ρεύματος σχετίζεται άμεσα με τη συγκέντρωση της γλυκόζης στο μετρούμενο δείγμα, επιτρέποντας την ποσοτικοποίησή της.





## 6.2 Οξείδωση Νανοϊνών Άνθρακα

Το αρχικό υλικό που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία είναι νανοϊνες άνθρακα (CNFs) που έχουν υποστεί θερμική κατεργασία στους 1000 °C. Τα φυσικά χαρακτηριστικά του αρχικού δείγματος συνοψίζονται παρακάτω.

<b>Φυσικά Χαρακτηριστικά Νανοϊνών Άνθρακα (HTE)</b>	
Διάμετρος (nm)	80-150
N <sub>2</sub> Εμβαδό Επιφάνειας (m <sup>2</sup> /g)	80-100
Πυκνότητα (g/cm <sup>3</sup> )	1.98
Θερμική Κατεργασία (° C)	1000
Περιεκτικότητα Μετάλλου (wt. %)	< 0.50
Ηλεκτρική Αντίσταση (Ohm/cm)	< 10 <sup>-3</sup>

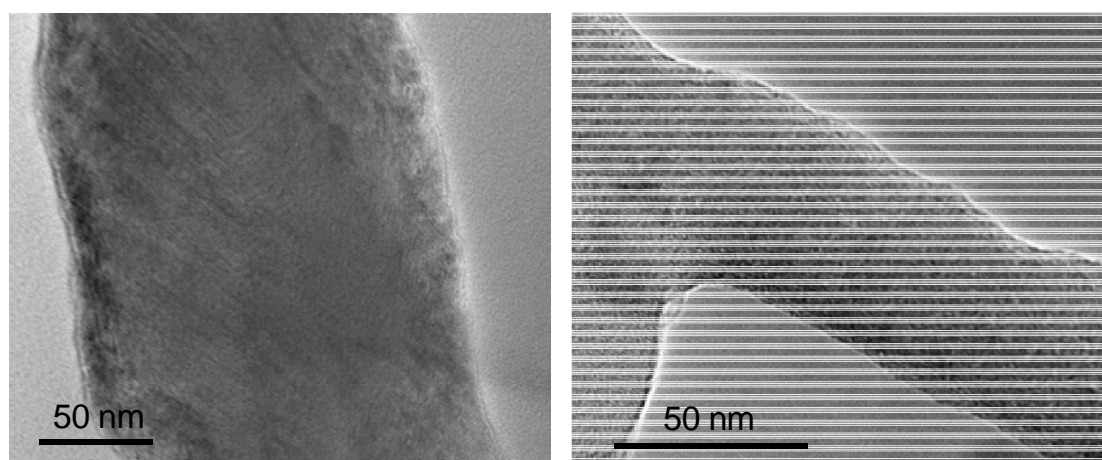
Η οξείδωση των νανοϊνών άνθρακα πραγματοποιείται με τη χρήση διαλύματος H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (υπεροξειδίου του υδρογόνου) 30%. 150mg HTE νανοϊνών άνθρακα προστίθενται σε 150ml διαλύματος H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%. Το αιώρημα που προκύπτει, τοποθετείται στους υπέρηχους για 20 λεπτά. Στη συνέχεια, θερμαίνεται στους 100°C περίπου – υπό ανάδευση – με χρήση ψυκτήρα, ενώ παράλληλα ακτινοβολείται με λάμπα υπεριώδους (UV) για 2 ώρες. Το αιώρημα φιλτράρεται και πραγματοποιούνται εκπλύσεις με δια-απιονισμένο νερό. Το προκύπτον υλικό ξηραίνεται στον ατμοσφαιρικό αέρα για 5 ώρες.

### 6.3 Φυσικοχημικές ιδιότητες Νανοϊνών Άνθρακα

Αρχικά εξετάστηκαν οι ιδιότητες των οξειδωμένων και μη οξειδωμένων νανοϊνών άνθρακα.

#### Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Διέλευσης-Υψηλής Ανάλυσης (TEM-High Resolution)

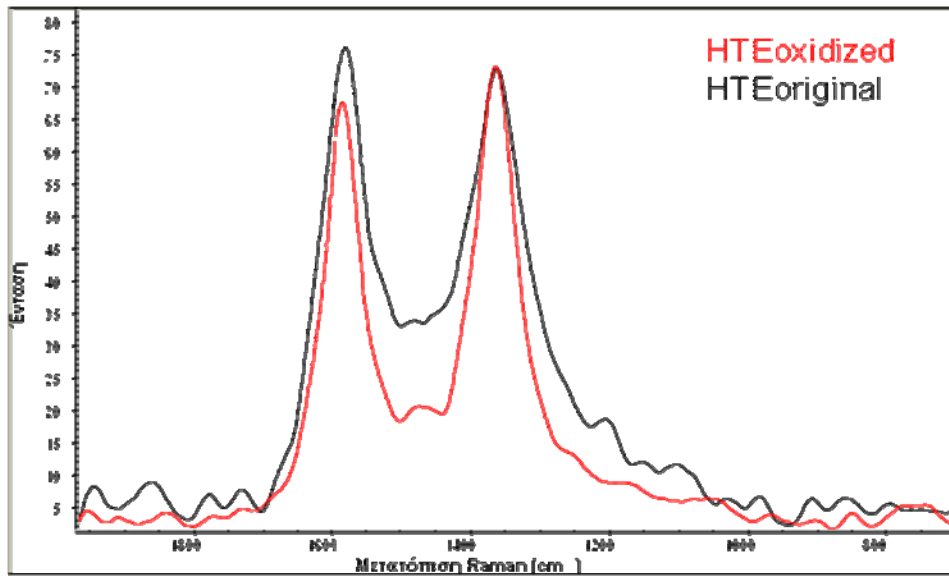
Στην Εικόνα 15, παρουσιάζονται εικόνες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο διέλευσης-υψηλής ανάλυσης των νανοϊνών άνθρακα πριν και μετά τη χημική κατεργασία. Είναι φανερό ότι μετά την οξείδωση οι νανοϊνες άνθρακα διατηρούν την αρχική τους δομή. Ωστόσο, οι οξειδωμένες νανοϊνες άνθρακα, εμφανίζουν ελαφρώς μικρότερη διάμετρο (110nm) σε σύγκριση με τις νανοϊνες που δεν έχουν υποστεί χημική κατεργασία (146nm).



**Εικόνα 15.** Εικόνα από Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Διέλευσης-Υψηλής Ανάλυσης (TEM-High Resolution) A) νανοϊνών άνθρακα, B) οξειδωμένων νανοϊνών άνθρακα.

#### Φασματοσκοπία Raman

Ο βαθμός οξείδωσης των νανοϊνών άνθρακα μπορεί να προσδιοριστεί με φασματοσκοπία Raman. Η κατεργασία αυτών των νανοϋλικών με ισχυρά οξειδωτικά μέσα προκαλεί ατέλειες στο γραφιτικό τους σκελετό, μετατρέποντας έτσι ένα ποσοστό  $sp^2$  υβριδισμένων ανθράκων σε άνθρακες με  $sp^3$  υβριδισμό. Στα φάσματα Raman των νανοϊνών άνθρακα η κορυφή στους  $1350\text{ cm}^{-1}$  (D-band) και η κορυφή στους  $1580\text{ cm}^{-1}$  (G-band) αποδίδονται στην παρουσία  $sp^3$  και  $sp^2$  υβριδισμένων ανθράκων αντίστοιχα.<sup>cxxi</sup> Ο λόγος των εντάσεων της D-band προς την G-band αποτελεί ένα μέτρο του βαθμού ατελειών που περιέχονται στη δομή των νανοϊνών άνθρακα.<sup>cxxii</sup> Στην Εικόνα 16, παρατίθενται τα φάσματα Raman των νανοϊνών άνθρακα πριν υποστούν χημική κατεργασία με διάλυμα  $\text{H}_2\text{O}_2$  30% και μετά από αυτή.



**Εικόνα 16.** Φάσματα Raman νανοϊνών άνθρακα πριν και μετά την οξείδωση

Ο λόγος των εντάσεων των κορυφών D-band / G-band για το αρχικό υλικό είναι 0.95, ενώ αντίστοιχα μετά την οξείδωση η τιμή του λόγου είναι 1.08. Η παρατηρούμενη αύξηση, αν και μικρή λόγω της ήπιας οξείδωσης των νανοϊνών άνθρακα, είναι μια σαφής ένδειξη ότι ένα ποσοστό  $sp^2$  υβριδισμένων ανθράκων έχει μετατραπεί σε  $sp^3$  υβρισμένους άνθρακες, λόγω της αύξησης των ατελειών στη δομή των νανοϊνών άνθρακα.

#### 6.4 Παρασκευή Νανοϋβριδίου CNFs/med/GOx/Silica

Η ακινητοποίηση του ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης στα οξειδωμένα CNFs πραγματοποιείται με απλή προσρόφηση, παρουσία μεταφορέα ηλεκτρονίων και πραγματοποιείται σιλανοποίηση παρουσία πολύ-L-λυσίνης, με αποτέλεσμα το σχηματισμό ενός επιφανειακού στρώματος  $SiO_2$ .

Πιο συγκεκριμένα, 8 mg οξειδωμένων CNFs τοποθετούνται σε ενζυμικό διάλυμα  $KH_2PO_4$  (10mM) (buffer) ρυθμισμένο σε pH=7,5 με την επιθυμητή συγκέντρωση GOx (10mg/ml). Στο ίδιο δείγμα τοποθετούνται 5mg μεταφορέα ηλεκτρονίων (ferrocene acetic acid). Η προσρόφηση πραγματοποιείται για 24h, στους 5°C, υπό ανάδευση. Στη συνέχεια τοποθετούνται στο δείγμα 200μL διαλύματος poly-L-λυσίνης 1mM, και 500μl διαλύματος buffer και το δείγμα τοποθετείται ξανά για άλλες 24h, στους 5°C, υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, προσθέτουμε 600μL διαλύματος buffer και 200μL πρότυπου διαλύματος TMOS(tetra-methyl-ortho-silicate) και το

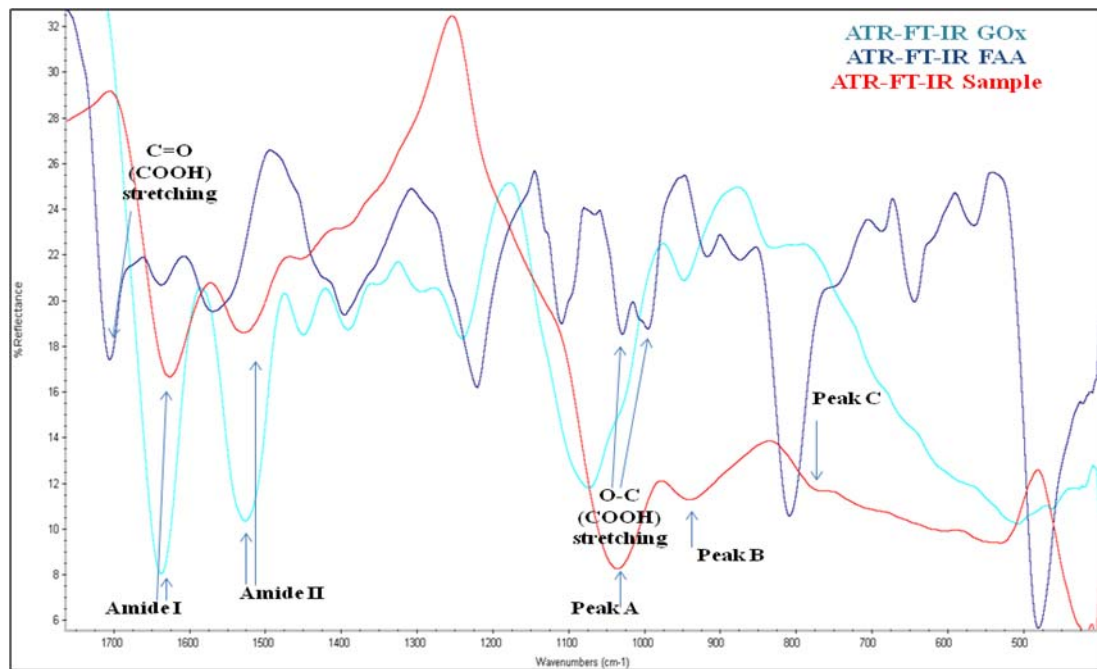
δείγμα αναδεύεται για ½ h. Στο τέλος της διαδικασίας πραγματοποιούνται τρεις φυγοκεντρήσεις του δείγματος στα 4500rpm, στους 20°C, για 15min. και τρεις εκπλύσεις με διάλυμα buffer. Το δείγμα συλλέγεται σε διηθητικό χαρτί και το αφήνουμε να στεγνώσει στον ατμοσφαιρικό αέρα για 5 h.

Για λόγους σύγκρισης παρασκευάστηκε και νανοϋβρίδιο χωρίς μεταφορέα ηλεκτρονίων, ακολουθώντας την ίδια πειραματική διαδικασία.

### **6.5 Χαρακτηρισμός νανοϋβριδίου με Φασματοσκοπία Υπερύθρου ATR-FT-IR**

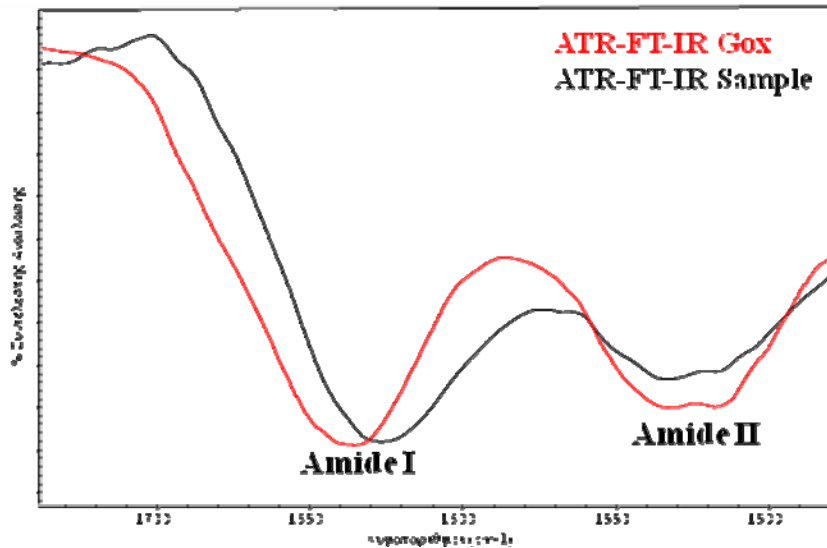
Στην παρούσα εργασία το ένζυμο ακινητοποιήθηκε επάνω σε οξειδωμένες νανοϊνες άνθρακα, παρουσία μεταφορέα ηλεκτρονίων. Στη συνέχεια, το βιομιμητικά παραγόμενο διοξείδιο του πυριτίου αναπτύχθηκε κατά μήκος του άξονα των νανοϊνών άνθρακα, παρουσία της πολύ-L-λυσίνης. Με τη βοήθεια της Φασματοσκοπίας Υπερύθρου, μελετήθηκαν τόσο το ένζυμο και ο μεταφορέας ηλεκτρονίων όσο και το νανοϋβρίδιο.

Το φάσμα IR της οξειδάσης της γλυκόζης παρουσιάζει δύο χαρακτηριστικές κορυφές στις περιοχές 1700-1600cm<sup>-1</sup> και 1600-1500cm<sup>-1</sup>, αντίστοιχα, όπως φαίνεται και στην Εικόνα 17. Συγκεκριμένα, στους 1635cm<sup>-1</sup>, εμφανίζεται η κορυφή του Αμιδίου I, που οφείλεται σε δονήσεις έκτασης του -C=O, από τους πεπτιδικούς δεσμούς που βρίσκονται στη σπονδυλική στήλη της πρωτεΐνης. Στους 1529cm<sup>-1</sup>, εμφανίζεται η χαρακτηριστική κορυφή του Αμιδίου II, η οποία είναι αποτέλεσμα του συνδυασμού των δονήσεων κάμψης του -N-H και των δονήσεων έκτασης του -C-N, των πεπτιδικών ομάδων.



**Εικόνα 17.** Φάσματα Υπερύθρου (ATR-FT-IR) της Οξειδάσης της Γλυκόζης, του μεταφορέα ηλεκτρονίων και του τελικού δείγματος.

Όπως είναι φανερό από την Εικόνα 17, στο φάσμα του ναουβριδίου οι κορυφές του Αμιδίου I και II, εμφανίζονται στους  $1628\text{cm}^{-1}$  και  $1531\text{cm}^{-1}$ , αντίστοιχα. Η παρουσία των δυο αυτών χαρακτηριστικών κορυφών, δείχνει ξεκάθαρα ότι η ακινητοποίηση της οξειδάσης της γλυκόζης στα CNFs και το βιομιμητικά παραγόμενο διοξείδιο του πυριτίου, δεν διαταράσσει δραστικά τις διαμορφώσεις του ενζύμου. Οι κορυφές του Αμιδίου I και II είναι αυτές που έχουν μελετηθεί περισσότερο, αφού είναι πολύ ευαίσθητες σε αλλαγές της δευτεροταγούς δομής.<sup>cxxiii,cxxiv</sup> Το σχήμα της κορυφής του Αμιδίου I, μπορεί να παράσχει πληροφορίες για τον τύπο και την ποσότητα της δευτεροταγούς δομής<sup>cxxv</sup> και όπως φαίνεται και από την εικόνα δεν επηρεάζεται από τις πλευρικές αλυσίδες. Η μετατόπιση της κορυφής του Αμιδίου I, σε σχέση με την κορυφή της στερεής οξειδάσης της γλυκόζης, οφείλεται στην παρουσία του βιομιμητικά παραγόμενου διοξειδίου του πυριτίου και σε ηλεκτροστατικές και υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις της οξειδάσης της γλυκόζης με την κάψα πυριτίου<sup>cxxvi,cxxvii</sup>.



**Εικόνα 18.** Φάσματα Υπερύθρου (ATR-FT-IR), του ενζύμου και του τελικού δείγματος που δείχνουν ξεκάθαρα τις κορυφές του Αμιδίου I & II.

Στη συνέχεια, το φάσμα του μεταφορέα ηλεκτρονίων (ferrocene acetic acid) (Εικόνα 17), εμφανίζει μια ισχυρή κορυφή, στους  $1712\text{cm}^{-1}$ , η οποία οφείλεται σε δονήσεις έκτασης του  $\text{-C=O}$  από την καρβοξυλομάδα ( $\text{-COOH}$ ). Στους  $1229\text{cm}^{-1}$  και  $1252\text{cm}^{-1}$ , εμφανίζεται η δόνηση έκτασης του  $\text{-C-O}$  της καρβοξυλομάδας. Επιπλέον, στους  $1574\text{cm}^{-1}$  βλέπουμε τις δονήσεις των αρωματικών δακτυλίων και οι δονήσεις κάμψης των δαχτυλιδίων εμφανίζονται στους  $808\text{cm}^{-1}$ . Ακόμα, οι δονήσεις έκτασης των δεσμών  $\text{-C=C}$  και  $\text{-C-H}$ , δίνονται από την κορυφή στους  $1640\text{cm}^{-1}$  και στους  $3084\text{cm}^{-1}$ , αντίστοιχα. Τέλος, στους  $2925\text{cm}^{-1}$ , εμφανίζεται η δόνηση έκτασης του  $\text{-O-H}$  της καρβοξυλικής ομάδας και στους  $1399\text{cm}^{-1}$  εμφανίζεται μία μέτρια κορυφή που οφείλεται στη δόνηση κάμψης του  $\text{-C-O-H}$ . Κοιτώντας το φάσμα του νανοϋβριδίου, παρατηρούμε ότι οι κορυφές του μεταφορέα ηλεκτρονίων δεν μπορούν να προσδιοριστούν, αφού επικαλύπτονται από τις χαρακτηριστικές κορυφές του Αμιδίου I και II του ενζύμου, αλλά και από τις χαρακτηριστικές κορυφές του οξειδίου του πυριτίου, που εμφανίζονται στο νανοϋβρίδιο.

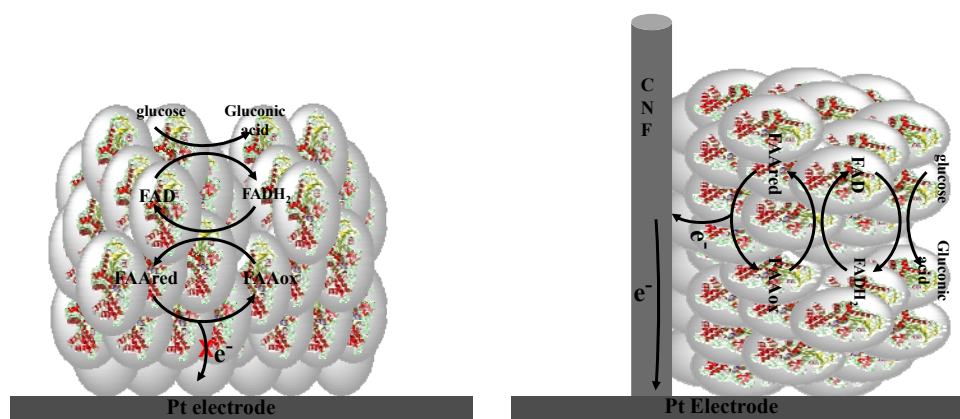
Πιο συγκεκριμένα, στο νανοϋβρίδιο (Εικόνα 17), εμφανίζονται και οι τρεις χαρακτηριστικές κορυφές A, B, Γ του οξειδίου πυριτίου, στην περιοχή  $760\text{-}1300\text{cm}^{-1}$ . Οι κορυφές A στους  $1035\text{cm}^{-1}$  και Γ στους  $772\text{cm}^{-1}$ , προκύπτουν από τις ασύμμετρες και συμμετρικές δονήσεις του  $\text{Si-O-Si}$ , αντίστοιχα. Το μέγιστο της κύριας κορυφής A του νανοϋβριδίου εμφανίζεται σε χαμηλότερους κυματάριθμους  $1035\text{cm}^{-1}$ , συγκρινόμενο με τις αναμενόμενες κορυφές,  $1070\text{-}1100\text{cm}^{-1}$ , σε άλλα υδατικά

διαλύματα οξειδίου του πυριτίου<sup>cxxviii,cxxix</sup>. Η μετατόπιση αυτή μπορεί να αποδοθεί στην παρουσία της παρεμβαλλόμενης πρωτεΐνης μέσα στην κάψα οξειδίου του πυριτίου, που προκαλεί τις δονήσεις έκτασης των γειτονικών Si-O-Si ομάδων. Τέλος, το μέγιστο που εμφανίζεται στους  $938\text{cm}^{-1}$ , κορυφή B, αποδίδεται σε δονήσεις έκτασης του Si-O, είτε ως silanol group (Si-OH), είτε ως γέφυρα σιλοξανίου (Si-O<sup>-</sup>).<sup>cxxx,cxxxi,cxxxii,cxxxiii</sup>

## 6.6 Βιοαισθητήρας Γλυκόζης βασισμένος σε νανοϊνες άνθρακα και βιομιμητικά παραγόμενο διοξείδιο του πυριτίου, παρουσία μεταφορέα ηλεκτρονίων

Για την αξιολόγηση των οξειδωμένων νανοϊνών άνθρακα και του βιομιμητικά παραγόμενου διοξειδίου του πυριτίου ως υλικά ακινητοποίησης και σταθεροποίησης ενζύμων, κατασκευάζεται βιοαισθητήρας πάστας και μελετώνται τα αναλυτικά του χαρακτηριστικά. Η διαδικασία κατασκευής του βιοαισθητήρα ξεκινά με την ανάμιξη του νανοϋβριδίου CNFs/med/GOx/Silica, με λάδι σιλκόνης (poly-phenyl-methyl-siloxane) και η τελική πάστα τοποθετείται σε ηλεκτρόδιο πλατίνας.

Αρχικά, εξετάζεται η απόκρισή του βιοαισθητήρα σε D-γλυκόζη, σε ένα εύρος δυναμικών από 400-700mV. Τέλος, μελετάται η σταθερότητα του συγκεκριμένου βιοαισθητήρα σε συνθήκες συνεχούς λειτουργίας.

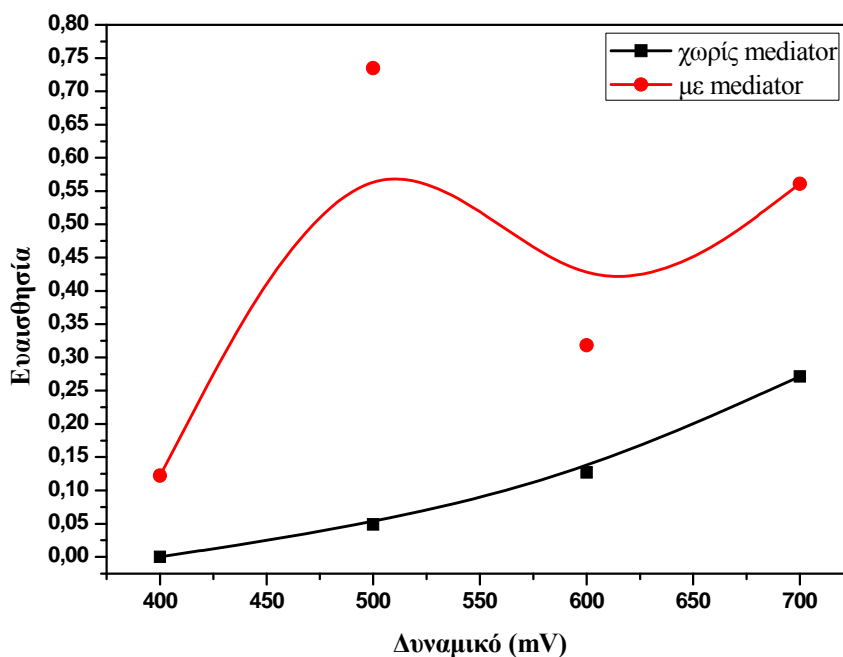


**Εικόνα 19.** Σχηματική Αναπαράσταση Med/GOx/Silica και CNFs/Med/GOx/Silica βιοαισθητήρα.

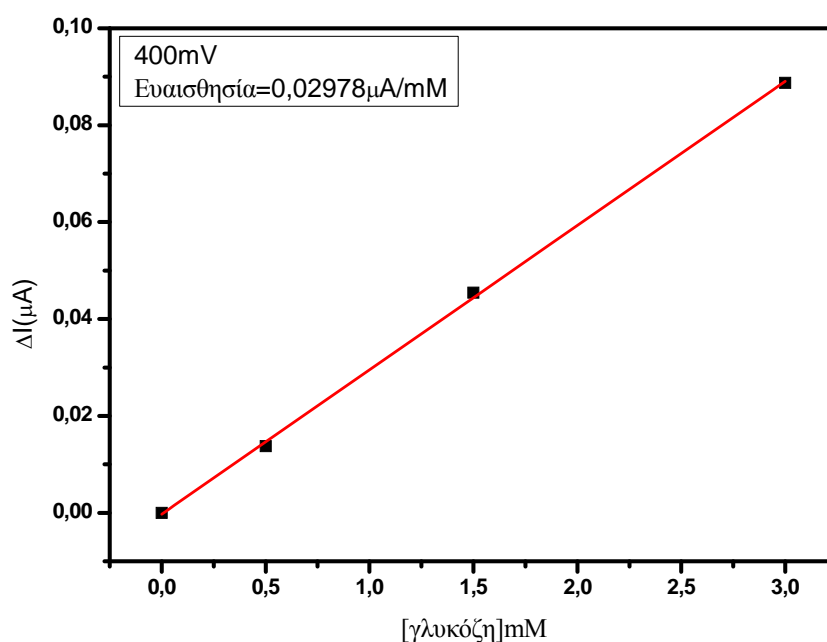
Η απόκριση του βιοαισθητήρα εξετάζεται, σε γνωστές προσθήκες διαλύματος γλυκόζης (0.5M), σε ένα εύρος δυναμικών από 400-700mV. Ο χρόνος απόκρισης του αισθητήρα είναι σχετικά μεγάλος, γεγονός που υποδεικνύει την αργή μεταφορά ηλεκτρονίων στο ηλεκτρόδιο εργασίας, αλλά και την έντονη σιλανοποίηση του δείγματος που δεν επιτρέπει τη γρήγορη μεταφορά της γλυκόζης στο υπόστρωμα. Στην εικόνα 20, παρατίθεται το υδροδυναμικό βολταμμογράφημα του αισθητήρα. Για



λόγους σύγκρισης κατασκευάστηκε και βιοαισθητήρας χωρίς μεταφορέα ηλεκτρονίων. Όπως φαίνεται και από την εικόνα, η παρουσία του μεταφορέα ηλεκτρονίων μας επιτρέπει να δουλέψουμε με δυναμικό εργασίας τα 400mV, παρόλο που η ευαισθησία της πρώτης μέρας, όπως φαίνεται και από την καμπύλη βαθμονόμησης είναι αρκετά μικρή (0,02978μΑ/mM). (Εικόνα 21). Απουσία του μεταφορέα ηλεκτρονίων το σύστημα δεν αποκρίνεται στα 400mV.



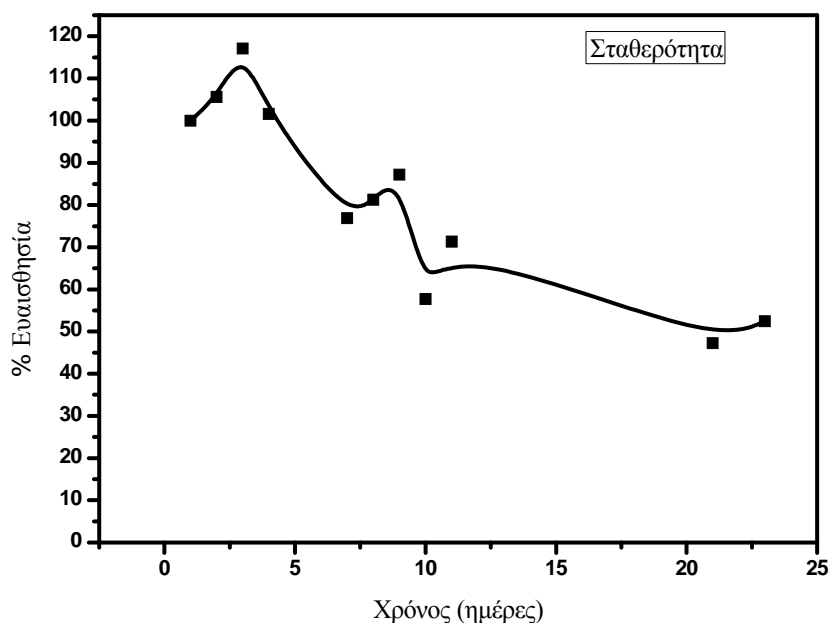
**Εικόνα 20.** Υδροδυναμικό βολταμμογράφημα των αισθητήρων με και χωρίς μεταφορέα ηλεκτρονίων από τα 400-700mV



**Εικόνα 21.** Καμπύλη βαθμονόμησης του βιοαισθητήρα GOx/CNFs/FAA/Silica (+400mV, 25°C)

### Μελέτη Σταθερότητας Βιοαισθητήρων σε Συνθήκες Συνεχούς Λειτουργίας

Η σταθερότητα ενός βιοαισθητήρα αποτελεί σημαντικό αναλυτικό χαρακτηριστικό, δεδομένου ότι τα συστήματα που βασίζονται σε ένα βιολογικό μόριο παρουσιάζουν συνήθως περιορισμένο χρόνο ζωής, λόγω της απώλειας της δραστηριότητάς του. Η σταθερότητα του παραπάνω βιοαισθητήρα μελετάται υπό συνθήκες συνεχούς λειτουργίας, με εφαρμοζόμενο δυναμικό +400mV, στους 25°C. Στην Εικόνα 22 παρατίθεται το διάγραμμα της % ευαισθησίας του βιοαισθητήρα σε συνάρτηση με το χρόνο. Μετά από 72h συνεχούς λειτουργίας η ευαισθησία του βιοαισθητήρα είναι στο 117%. Η παρατηρούμενη άνοδος στην ευαισθησία, οφείλεται σε αλλαγές της τριτοταγούς δομής του ενζύμου στα υλικά ακινητοποίησης.<sup>cxxxiv</sup> Η μείωση της % ευαισθησίας του συγκεκριμένου βιοαισθητήρα στο 50% παρατηρείται μετά από 23 ημέρες. (Εικόνα 22)



**Εικόνα 22.** Σταθερότητα Βιοαισθητήρα GOx/HTEox/FAA/Silica, υπό συνθήκες συνεχούς λειτουργίας (+400mV, 25°C)

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται ότι η οξειδάση της γλυκόζης σταθεροποιείται ισχυρά στις οξειδωμένες νανοϊνες άνθρακα και το βιομημητικά παραγόμενο διοξείδιο του πυριτίου και ο μεταφορέας ηλεκτρονίων παραμένει στο νανοϋβρίδιο για μεγάλο χρονικό διάστημα, επιτρέποντας την ανίχνευση γλυκόζης σε χαμηλά δυναμικά. Η σταθερότητα του βιοαισθητήρα στα 400mV, μας δίνει τη δυνατότητα μέτρησης βιολογικών δειγμάτων, κάτι που είναι αδύνατο με βιοαισθητήρες που δουλεύουν στα 700mV, παρόλο που χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη σταθερότητα του ενζύμου και μεγαλύτερο χρόνο ζωής.

Όσον αφορά την ακινητοποίηση του ενζύμου στις οξειδωμένες νανοϊνες άνθρακα και το βιομημητικά παραγόμενο διοξείδιο του πυριτίου, είναι πολύ ικανοποιητική και μπορεί να αποδοθεί στο γεγονός ότι οι διαφορετικές διαμορφώσεις του ενζύμου αλληλεπιδρούν τόσο με το ανιονικό οξείδιο του πυριτίου, όσο και με τα CNFs, με αποτέλεσμα τη δημιουργία βιοαισθητήρα με βελτιωμένα αναλυτικά χαρακτηριστικά. Ο συνδυασμός των CNFs με το βιομημητικά παραγόμενο διοξείδιο του πυριτίου, προετοιμάζει το έδαφος για μία νέα κατηγορία βιοαισθητήρων που μπορεί να βρει μεγάλη κλίμακα εφαρμογή στις βιοαναλυτικές νανο-συσκευές<sup>CXXXV</sup>.

## 7. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Σε αυτή την εργασία εξετάζονται οι ηλεκτροχημικές ιδιότητες χημικά τροποποιημένων νανοϊνών άνθρακα, καθώς και η εφαρμογή αυτών στη σταθεροποίηση ενζύμων, παρουσία μεταφορέα ηλεκτρονίων και βιομιμητικά παραγόμενου διοξειδίου του πυριτίου. Από φασματοσκοπικές μελέτες Raman έχειδειχθεί ότι η οξειδωση των νανοδομών άνθρακα έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ατελειών στη γραφιτική δομή τους. Παράλληλα, η χημική αυτή επεξεργασία των νανοϊνών έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των επιφανειακών ενεργών ομάδων. Ο μεγάλος αριθμός των ενεργών ομάδων συμβάλλει στην ισχυρότερη αλληλεπίδραση του ενζύμου με την ανθρακική επιφάνεια, σταθεροποιώντας την πρωτεΐνη, οδηγώντας σε βιοαισθητήρες με μεγαλύτερη σταθερότητα ακόμα και σε συνθήκες συνεχούς λειτουργίας. Σε επόμενο στάδιο, η εισαγωγή του μεταφορέα ηλεκτρονίων στο νανοϋβρίδιο, οδηγεί σε χαμηλότερα δυναμικά εργασίας του βιοαισθητήρα. Ενώ οι περισσότεροι βιοαισθητήρες απαιτούν δυναμικό λειτουργίας άνω των 700mV, η χρήση του μεταφορέα ηλεκτρονίων έχει ως αποτέλεσμα την μείωση του απαιτούμενου δυναμικού στα 400mV. Το χαμηλότερο αυτό δυναμικό δίνει τη δυνατότητα μέτρησης πραγματικών δειγμάτων, δίχως παρεμβολές από βιογενή οξειδοαναγωγικά συστήματα, κάτι που δεν είναι εφικτό στα 700mV. Ο βιοαισθητήρας που βασίστηκε σε επεξεργασμένες νανοϊνες άνθρακα, σε συνδυασμό με μεταφορέα ηλεκτρονίων, αν και παρουσίασε μικρή ευαισθησία, εμφάνιζε μια σταθερότητα 25 ημερών, σε συνθήκες συνεχούς λειτουργίας.

Για επιπλέον αύξηση της σταθερότητας του βιοαισθητήρα αναπτύχθηκε βιομιμητικά παραγόμενο διοξείδιο του πυριτίου κατά μήκος του άξονα των νανοϊνών άνθρακα. Η δημιουργία μίας δομής κλουβιού γύρω από το νανοϋβρίδιο νανοϊνες άνθρακα/οξειδάση της γλυκόζης/ μεταφορέα ηλεκτρονίων επιτρέπει την αλληλεπίδραση των διαφορετικών διαμορφώσεων του ενζύμου τόσο με το ανιονικό πυρίτιο όσο και με τις νανοϊνες άνθρακα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία πιο σταθερών συστημάτων.

Οι μελέτες των παραπάνω συστημάτων απέδειξαν ότι, η οξειδωση των νανοϊνών άνθρακα επιφέρει σημαντικές αλλαγές στις ιδιότητές της επιφάνειας του υλικού, καθιστώντάς τα ιδιαίτερα ελκυστικά για την ανάπτυξη και κατασκευή βιοαισθητήρων. Οι νανοϊνες άνθρακα σε συνδυασμό με βιομιμητικά παραγόμενο διοξείδιο του πυριτίου, και παρουσία μεταφορέα ηλεκτρονίων, προσφέρουν ιδανικές συνθήκες για το σχεδιασμό και την κατασκευή βιοαισθητήρων με βελτιωμένα

αναλυτικά χαρακτηριστικά, όπως ευαισθησία και σταθερότητα και με μεγάλος εύρος εφαρμογών σε βιολογικά και περιβαλλοντικά δείγματα.

---

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- <sup>i</sup>. Clark L.C., Lyons C., Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1962, 102, 29
- <sup>ii</sup>. Clark L.C., Monitor and control of blood and tissue O<sub>2</sub> tensions. *Trans Am Soc Artif Intern Organs* 1956, 2, 41
- <sup>iii</sup>. IUPAC Compendium of Chemical Terminology 2nd Edition (1997)  
<http://www.iupac.org/goldbook/B00663.pdf>
- <sup>iv</sup>. Thévenot D.R., Toth K., Durst R. A., Wilson G.S., Electrochemical biosensors: Recommended definitions and classification. *Pure Appl. Chem.* 1999, 71, 2333
- <sup>v</sup>. Byfield M.P., Abuknesha R.A., Biochemical aspects of biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 1994, 9, 373
- <sup>vi</sup>. Collings A.F., Caruso F., Biosensors: recent advances. *Rep. Prog. Phys.* 1997, 60, 1397
- <sup>vii</sup>. Eggins B., *Biosensors an Introduction*, John Wiley & Sons, 1997
- <sup>viii</sup>. 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
- <sup>ix</sup>. Chaubey A., Malhotra B.D., Mediated biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 2002, 17, 441
- <sup>x</sup> Gorton L., Jonsson-Pettersson G., Csoregi E., Johansson K., Dominguez E., Marko-Varga G., *Analyst*, 1992, 117, 1235
- <sup>xi</sup> Yaropolov A. I., Cherednikova T. V., Emneus J., Marko-Varga G., Gorton L., *Bioelectr. Bioenerg.*, 1995, 38, 401
- <sup>xii</sup> Lindgren A., Tanaka M., Ruzgas T., Gorton L., Gazaryan I., Ishimori K., Morishima I., *Electrochem. Commun.*, 1999, 1, 171
- <sup>xiii</sup> Bartlell P. N., Bradford V. Q., *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, 1990, 1135
- <sup>xiv</sup> Schuhmann W., Ohara T. J., Schmidt H.-L., Heller A., *J. Am. Chem. Soc.*, 1991, 113, 1394
- <sup>xv</sup> Sampath S., Lev. O., *Electroanal.*, 1996, 8, 1112
- <sup>xvi</sup> Michael A.C., Heller A., *Anal. Chem.*, 1991, 63, 2268
- <sup>xvii</sup> Narvaez A., Suarez G., Popescu I. C., Katakis I., Dominguez E., *Biosens. Bioelectr.*, 2000, 15, 43

- 
- <sup>xviii</sup> Bharathi S., Sampath S., Gun J., Rabinovich L., Wu Z., Pankratov I., Lev. O., J. Sol-Gel Sc. Techn., 1998, 13, 241
- <sup>xix</sup> Ohara T.J., Rajagopalan R., Heller A., Anal. Chem., 1994, 66, 2451
- xx. Turner A., Amperometric biosensors based on mediator-modified electrodes. Methods in Enzymology 1988, 137, 90
- xxi. 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
- xxii. 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
- xxiii. 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
- <sup>xxiv</sup> . Eggins B., Biosensors an Introduction, John Willey & Sons, New York, 1997
- <sup>xxv</sup> . Stryer L., Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1997
- <sup>xxvi</sup> . Fersht A., Structure and Mechanism in Protein Science-A Guide to Enzyme Catalysis and Protein Folding. W.H. Freeman and Company, New York, 1999
- <sup>xxvii</sup> . Lee B., Vasmatzis G., Stabilization of protein structures. Cur. Opin. Biotechn. 1997, 8, 423
- <sup>xxviii</sup> . Querol E., Perez-Pons J.A., Mozo-Villarias A., Analysis of protein conformational characteristics related to thermostability. Prot. Eng. 1996, 9, 265
- <sup>xxix</sup> . Lee B., Vasmatzis G., Stabilization of protein structures. Cur. Opin. Biotechn. 1997, 8, 423
- <sup>xxx</sup> . Chaniotakis N.A., Enzyme stabilization strategies based on electrolytes and polyelectrolytes for biosensor applications. Anal. Bioanal. Chem. 2004, 378, 89
- <sup>xxxi</sup> . Fágáin C.Ó., Understanding and Increasing Protein Stability. Biochim. Biophys. Acta 1995, 1252, 1
- <sup>xxxii</sup> . Dimakis V.T., Gavalas V.G., Chaniotakis N.A., Polyelectrolyte-stabilized biosensors based on macroporous carbon electrode. Anal. Chim. Acta 2002, 467, 217.
- <sup>xxxiii</sup> . 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

- 
- <sup>xxxiv</sup>. Eggins B.R., *Chemical Sensors and Biosensors*, John Wiley & Sons, 2002
- <sup>xxxv</sup>. Drauz K., Waldmann H., *Enzyme Catalysis in Organic Synthesis*. Wiley-VCH, Inc., Vol 1, 2nd edition, 2002
- <sup>xxxv</sup>. Klibanov A.M, Why are enzymes less active in organic solvents than in water? *Trends in Biotechn.* 1997, 15, 97.
- <sup>xxxvi</sup>. Kim J., Grate J.W., Wang P., Nanostructures for enzyme stabilization. *Chem. Eng. Sci.* 2006, 61, 1017
- <sup>xxxvii</sup>. Jianrong C., Yuqing M., Nongyue H., Xiaohua W., Sijao L., *Nanotechnol. and biosensors. Biotech. Adv.* 2004, 22, 505
- <sup>xxxviii</sup>. 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
- <sup>xxxix</sup>. Jia H., Zhu G., Wang P., Catalytic behaviors of enzymes attached to nanoparticles: the effect of particle mobility. *Biotechnol. Bioeng.* 2003, 84, 406
- <sup>xl</sup>. 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
- <sup>xli</sup>. 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
- <sup>xlii</sup>. Wang Y., Tang Z., Tan S., Kotov N.A., Biological assembly of nanocircuit prototypes from protein-modified CdTe nanowires. *Nano Lett.* 2005, 5, 243
- <sup>xliii</sup>. Diaz J.F., Balkus Jr KJ., Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve. *J. Mol. Catal. B Enzym.* 1996, 2, 115
- <sup>xliv</sup>. 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
- <sup>xlv</sup>. 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
- <sup>xlvi</sup>. Vamvakaki V., Chaniotakis N.A., Immobilization of enzymes into nanocavities for the improvement of biosensor stability. *Biosens. Bioelectron.* 2007, 22, 2650
- <sup>xlvii</sup>. 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



- 
- <sup>xlviii</sup>. 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
- <sup>xlix</sup>. 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
- <sup>1</sup>. 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
- <sup>li</sup>. Sotiropoulou S., Chaniotakis N.A., Lowering the detection limit of the acetylcholinesterase biosensor using a nanoporous carbon matrix. *Anal. Chim. Acta* 2005, 530, 199
- <sup>lii</sup>. Sotiropoulou S., Gavalas V., Vamvakaki V., Chaniotakis N.A., Novel carbon materials in biosensor systems. *Biosens. Bioelectron.* 2003, 18, 211
- <sup>liii</sup>. Gavalas V.G., Chaniotakis N.A., [60]Fullerene-mediated amperometric biosensors. *Anal. Chim. Acta* 2000, 409, 131
- <sup>liv</sup>. Bekyarova, E., Kaneko, K., Yudasaka, M., Murata, K., Kasuya, D., and Iijima, S., Micropore development and structure rearrangement of single-wall carbon nanohorn assemblies by compression. *Adv. Mater.* 2002, 14, 973
- <sup>lv</sup>. Sotiropoulou S., Chaniotakis N.A., Carbon nanotube array-based biosensor. *Anal. Bioanal. Chem.* 2003, 375, 103
- <sup>lvi</sup>. Wang J., Musameh M., Enzyme-dispersed carbon-nanotube electrodes: A needle microsensor for monitoring glucose. *Analyst* 2003, 128, 1382
- <sup>lvii</sup>. Boo H., Jeong R.A., Park S., Kim K.S., An K.H., Lee Y.H., Han J.H., Kim H. C., Chung T.D., Electrochemical nanoneedle biosensor based on multiwall carbon nanotube. *Anal. Chem.* 2006, 78, 617
- <sup>lviii</sup>. Yu X., Chattopadhyay D., Galeska I., Papadimitrakopoulos F., Rusling J.F., Peroxidase activity of enzymes bound to the ends of single-wall carbon nanotube forest electrodes. *Electrochem. Commun.* 2003, 5, 408
- <sup>lix</sup>. Besteman K., Lee J.O., Wiertz F.G. M., Heering H.A., Dekker C., Enzyme-coated carbon nanotubes as single-molecule biosensors. *Nano Lett.* 2003, 3, 727
- <sup>lx</sup>. Patolsky F., Weizmann Y., Willner I., Long-range electrical contacting of redox enzymes by SWCNT connectors. *Angew. Chem. Int. Ed.* 2004., 43, 2113

- 
- <sup>lxi</sup>. 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
- <sup>lxii</sup>. Dzenis Y., Spinning Continuous Fibers for Nanotechnology. *Science* 2004, 304,1917.
- <sup>lxiii</sup>. 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
- <sup>lxiv</sup>. Rodriguez N.M., Chambers A., Baker R.T.K., Catalytic engineering of carbon nanostructures. *Langmuir* 1995, 11, 3862
- <sup>lxv</sup>. Zhang J., Zou H., Qing Q., Yang Y., Li Q., Liu Z., Guo X., Du Z., Effect of chemical oxidation on the structure of single-walled carbon nanotubes. *J. Phys. Chem. B.* 2003, 107(16),3712
- <sup>lxvi</sup>. Rasheed A., Howe J. Y., Dadmun M. D., Britt P. F., [The efficiency of the oxidation of carbon nanofibers with various oxidizing agents](#). *Carbon* 2007, 45, 1072
- <sup>lxvii</sup>. Yun Peng., and Hewen Liu., Effects of oxidation by hydrogen peroxide on the structures of multiwalled carbon nanotubes
- <sup>lxviii</sup>. Baker S.E., Tse K.Y., Hindin E., Nichols B.M., Clare T.L., Hamers R.J., Covalent functionalization for biomolecular recognition on vertically aligned carbon nanofibers. *Chem. Mater.* 2005, 17, 4971
- <sup>lxix</sup>. Vamvakaki V., Tsagaraki K., Chaniotakis N., Carbon nanofiber-based glucose biosensor. *Anal. Chem.* 2006., 78, 5538
- <sup>lxx</sup>. Baker S.E., Colavita P.E., Tse K.Y., Hamers R.J., Functionalized vertically aligned carbon nanofibers as scaffolds for immobilization and electrochemical detection of redox-active proteins. *Chem. Mater.* 2006, 18, 4415
- <sup>lxxi</sup>. Wu L., Zhang X., Ju H., Detection of NADH and ethanol based on catalytic activity of soluble carbon nanofiber with low overpotential. *Anal. Chem.* 2007, 79, 453
- <sup>lxxii</sup>. Wu L., Yan F., Ju H., An amperometric immunosensor for separation-free immunoassay of CA125 based its covalent immobilization coupled with thionine on carbon nanofiber. *J. Immunol. Methods* 2007, 322, 12
- <sup>lxxiii</sup> Wu, L., Zhang, X., and Ju, H. 2007a. Detection of NADH and ethanol based on catalytic activity of soluble carbon nanofiber with low overpotential. *Anal. Chem.*,

---

79: 453–458

<sup>lxxiv</sup> Wu L., McIntosh M., Zhang X., Ju H., Amperometric sensor for ethanol based on one-step electropolymerization of thionine-carbon nanofiber nanocomposite containing alcohol oxidase. *Talanta*, 2007, 74, 387-392.

<sup>lxxv</sup> Weeks M.L., Rahman T., Frymier P.D., Islam S.K., McKnight T.E., A reagentless enzymatic amperometric biosensor using vertically aligned carbon nanofibers (VACNF). *Sensors and Actuators B*, 2008, 133, 53-59.

<sup>lxxvi</sup> Wu L., Lei J., Zhang X., Ju H., Biofunctional nanocomposite of carbon nanofiber with water-soluble porphyrin for highly sensitive ethanol biosensing. *Biosensors and Bioelectronics*, 2008, 24, 644-649.

<sup>lxxvii</sup> Liu Y., Hou H., You T., Synthesis of carbon nanofibers for mediatorless sensitive detection of NADH. *Electroanalysis* 20, 2008, No.15, 1708-1713.

<sup>lxxviii</sup> Liu Y., Teng H., Hou H., You T., Nonenzymatic glucose sensor based on renewable electrospun Ni nanoparticle-loaded carbon nanofiber paste electrode. *Biosensors and Bioelectronics* 24, 2009, 3329-3334.

<sup>lxxix</sup> Kim Ch., Kim Y. A., Kim J. H., Kataoka M., Endo M., Self-assembled palladium nanoparticles on carbon nanofibers. *Nanotechnology* 19, 2008, 145602 (5pp).

<sup>lxxx</sup> Stavyiannoudaki V., Vamvakaki V., Chaniotakis N., Comparison of protein immobilization onto oxidized and native carbon nanofibers for optimum biosensor development.

<sup>lxxxii</sup> H. A. Lowenstam and S. Weiner, *On Biomineralization*, Oxford University Press, Oxford, 1989

<sup>lxxxiii</sup> E. Epstein, *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 1999, 50, 641–664

<sup>lxxxiv</sup> A. L. Samuels, A. D. M. Glass, J. G. Menzies and D. L. Ehret, *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 1994, 44, 237–242

<sup>lxxxv</sup> K. Schwarz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1973, 70, 1608–1612

<sup>lxxxvi</sup> E. M. Carlisle, in *Silicon and Siliceous Structures in Biological Systems*, T. L. Simpson and B. E. Volcani, ed., Springer, New York, 1981, p. 69

<sup>lxxxvii</sup> S. Mann and G. Ozin, *Nature*, 1996, 382, 313–318

<sup>lxxxviii</sup> J. Parkinson and R. Gordon, *Trends Biotechnol.*, 1999, 17, 190–196

<sup>lxxxix</sup> T. Nakajima and B. E. Volcani, *Science*, 1969, 164, 1400–1406

<sup>lxxxix</sup> R. Hecky, K. Mopper, P. Kilham and T. Degens, *Mar. Biol.*, 1973, 19, 323–331

- 
- <sup>xc</sup> R. W. Drum and H. S. Pankratz, *J. Ultrastruct. Res.*, 1964, 10, 217–223
- <sup>xc<sup>i</sup></sup> P. Tre'guer, D. M. Nelson, A. J. van Bennekom, D. J. DeMaster, A. Leynaert and B. Que'guiner, *Science*, 1995, 268, 375–379
- <sup>xc<sup>ii</sup></sup> Y. Del Amo and M. A. Brzezinski, *J. Phycol.*, 1999, 35, 1162–1170
- <sup>xc<sup>iii</sup></sup> M. Hildebrand, B. E. Volcani, W. Gassmann and J. I. Schroeder, *Nature*, 1997, 385, 688–689
- <sup>xc<sup>iv</sup></sup> M. Hildebrand, K. Dahlin and B. E. Volcani, *Mol. Gen. Genet.*, 1998, 260, 480–486
- <sup>xc<sup>v</sup></sup> V. Martin-Je'ze'quel, M. Hildebrand and M. A. Brzezinski, *J. Phycol.*, 2000, 36, 821–840
- <sup>xc<sup>vi</sup></sup> J. Pickett-Heaps, A. M. Schmid and L. A. Edgar, in *Progress in Phycological Research: Vol. 7*, F. E. Round and D. J. Chapman, ed., Biopress, Bristol, 1990, pp. 1–168
- <sup>xc<sup>vii</sup></sup> N. Kro'ger, C. Bergsdorf and M. Sumper, *EMBO J.*, 1994, 13, 4676–4683
- <sup>xc<sup>viii</sup></sup> N. Kro'ger, G. Lehmann, R. Rachel and M. Sumper, *Eur. J. Biochem.*, 1997, 250, 99–105
- <sup>xc<sup>ix</sup></sup> N. Kro'ger, R. Deutzmann and M. Sumper, *Science*, 1999, 286, 1129–1132
- <sup>c</sup> N. Kro'ger, R. Deutzmann, C. Bergsdorf and M. Sumper, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2000, 97, 14133–14138
- <sup>c<sup>i</sup></sup> W. H. van de Poll, E. G. Vrieling and W. W. C. Gieskes, *J. Phycol.*, 1999, 35, 1044–1053
- <sup>c<sup>ii</sup></sup> N. Kro'ger and R. Wetherbee, *Protist*, 2000, 151, 263–273
- <sup>c<sup>iii</sup></sup> R. K. Iler, *The Chemistry of Silica*, Wiley, New York, 1979
- <sup>c<sup>iv</sup></sup> J. Sto'ber, A. Fink and E. Bohn, *J. Colloid Interface Sci.*, 1968, 26, 62–69
- <sup>c<sup>v</sup></sup> S. Mann, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2000, 39, 3392–3406
- <sup>c<sup>vi</sup></sup> M. E. Davis, *Nature*, 2002, 417, 813–821
- <sup>c<sup>vii</sup></sup> K. J. van Bommel, A. Friggeri and S. Shinkai, *Angew. Chem., Int. Ed.*, 2003, 42, 980–999
- <sup>c<sup>viii</sup></sup> M. Sumper, *Science*, 2002, 295, 2430–2433
- <sup>c<sup>ix</sup></sup> J. N. Cha, K. Shimizu, Y. Zhou, S. C. Christiansen, B. F. Chmelka, G. D. Stucky and D. E. Morse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1999, 96, 361
- <sup>c<sup>x</sup></sup> N. Kroger, R. Deutzmann and M. Sumper, *Science*, 1999, 286, 1129

- 
- <sup>cx</sup>i R. R. Naik, L. L. Brott, S. J. Clarson and M. O. Stone, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, 2002, 2, 95
- <sup>cx</sup>ii P. J. Lopez, C. Gautier, J. Livage and T. Coradin, *Curr. Nanoscience*, 2005, 1, 73
- <sup>cx</sup>iii S. V. Patwardhan, S. J. Clarson and C. C. Perry, *Chem. Commun.*, 2005, 1113
- <sup>cx</sup>iv Naik R.R., Tomczak M.M., Luckarift H.R., Spain J.C., Stone M.O., Entrapment of enzymes and nanoparticles using biomimetically synthesized silica, *Chem. Comm.* 2004, 1684
- <sup>cx</sup>v Luckarift H.R., Spain J.C., Naik R.R., Stone M.O., Enzyme immobilization in a biomimetic silica support, *Nature Biotechnology*, 2004, 22, 211
- <sup>cx</sup>vi D. Ivnitski, K. Artyushkova, R. A. Rico'n, P. Atanassov, H. R. Luckarift and G. R. Johnson, *Small*, 2008, 4, 357
- <sup>cx</sup>vii V. Vamvakaki, M. Hatzimarinaki and N. Chaniotakis, *Anal. Chem.*, 2008, 15, 5970
- <sup>cx</sup>viii M.Hatzimarinaki, V.Vamvakaki and N.Chaniotakis, *J. Mater. Chem.*, 2009, 19, 428-433
- <sup>cx</sup>ix . 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
- <sup>cx</sup>x . 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.
- <sup>cx</sup>xi . Filho A.G. S., Jorio A., Samsonidze G. G., Dresselhaus G., Saito R., Dresselhaus M. S., Raman spectroscopy for probing chemically/physically induced phenomena in carbon nanotubes. *Nanotechnology* 2003, 14, 1130
- <sup>cx</sup>xii . Endo M., Nishimura K., Kim Y.A., Hakamada K., Matushita T., Dresselhaus M.S., Dresselhaus G., Raman spectroscopic characterization of vapour-grown carbon fibers and carbon nanofibers obtained by pyrolyzing hydrocarbons. *J. of Mat. Res.* 1999, 14, 4474
- <sup>cx</sup>xiii Krimm, S.; Bandekar, J. *Adv. Protein Chem.* 1986, 38, 181–364
- <sup>cx</sup>xiv Bandekar, J. *Biochim. Biophys. Acta* 1992, 1120, 123–143
- <sup>cx</sup>xv Barth, A.; Zscherp, C. *Q. Rev. Biophys.* 2002, 35, 369–430
- <sup>cx</sup>xvi Sotiropoulou, S.; Chaniotakis, N. A. *Biomaterials* 2005, 26, 6771–6779

- 
- <sup>cxxvii</sup> Wu, S.; Ju, H.; Liu, Y. *Adv. Funct. Mater.* 2007, *17*, 585–592
- <sup>cxxviii</sup> Bertoluzza, A.; Fagnano, C.; Morelli, M. A.; Gottardi, V.; Guglielmi, M. *J. Non-Cryst. Solids* 1982, *48*, 117–128
- <sup>cxxix</sup> Martinez, J. R.; Ruiz, F.; Vorobiev, Y. V.; Pe´rez-Robles, F.; Gonza´lez-Herna´ndez, J. *J. Chem. Phys.* 1998, *109*, 7511–7514
- <sup>cxix</sup> Almeida, R. M.; Guiton, T. A.; Pantano, C. G. *J. Non-Cryst. Solids* 1990, *121*, 193–197
- <sup>cxix</sup> Perry, C. C.; Li, X.; Waters, D. N. *Spectrochim. Acta* 1991, *47A*, 1487–1494
- <sup>cxxii</sup> Innocenzi, P. *J. Non-Cryst. Solids* 2003, *316*, 309–319
- <sup>cxxiii</sup> Fidalgo, A.; Cirimanna, R.; Ilharco, L. M.; Pagliaro, M. *Chem. Mater.* 2005, *17*, 6686–6694
- <sup>cxxiv</sup> Khan G. F., Wernet W., Design of enzyme electrodes for extended use and storage life. *Anal. Chem.* 1997, *69*, 2682
- <sup>cxxv</sup> Vamvakaki, V., Hatzimarinaki, M., Chaniotakis, N., Biomimetically Synthesized Silica-Carbon Nanofiber Architectures for the Development of Highly Stable Electrochemical Biosensor Systems. *Anal. Chem.* 2008, *80*, 5970-5975