

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Σταθεροποίηση Αμπερομετρικών
Βιοαισθητήρων με τη Χρήση
Διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνης σε Ηλεκτρόδια
Πορώδους Άνθρακα

ΒΑΣΙΛΗΣ Γ. ΓΑΒΑΛΑΣ

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2000

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Κ. ΒΑΡΩΤΣΗΣ	Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
Δ. ΓΑΝΩΤΑΚΗΣ	Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
Σ. ΚΙΝΤΖΙΟΣ	Επίκουρος Καθηγητής Γεωπονικής Αθηνών
Π. ΜΑΧΑΙΡΑΣ	Καθηγητής Πανεπιστημίου Αθηνών
Ε. ΣΤΕΦΑΝΟΥ	Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης
Ε. ΣΤΡΑΤΑΚΗΣ	Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Τμήμα Βιολογίας)
Ν. ΧΑΝΙΩΤΑΚΗΣ	Αναπληρωτής Καθηγητής Πανεπιστημίου Κρήτης (Επιβλέπων Καθηγητής)

“Αυτός που του αρέσει αυτό που κάνει είναι χαρούμενος,
αυτός που κάνει αυτό που του αρέσει είναι πραγματικά ευτυχισμένος.”

Σε όλους αυτούς που με βοήθησαν,
με στήριξαν,
μου έδωσαν δύναμη...

Ολοκληρώνοντας αυτή τη διατριβή αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω ορισμένους ανθρώπους, χωρίς την πολύτιμη συμβολή των οποίων δεν θα ήταν δυνατή η περάτωση της εργασίας. Ευχαριστώ,

τον υπεύθυνο καθηγητή μου κ. Νικόλαο Χανιωτάκη. Ότι και να γράψω δεν μπορεί να εκφράσει αυτά τα οποία αισθάνομαι. Τον ευχαριστώ για την πολύτιμη καθοδήγηση του, την υπομονή του, την ηθική και οικονομική στήριξη που μου παρείχε. Ελπίζω να φανώ αντάξιος των προσδοκιών του.

τα μέλη της επιτροπής μου καθηγητές κ. Βαρώτση, κ. Γανωτάκη, κ. Κίντζιο, κ. Μαχαίρα, κ. Στεφάνου και κ. Στρατάκη για τη συνεισφορά τους στην πραγματοποίηση αυτής της διατριβής,

το Τμήμα Χημείας του Παν/μίου Κρήτης για τη φιλοξενία που μου παρείχε ως προπτυχιακό και μεταπτυχιακό φοιτητή καθώς και για την υλικοτεχνική και οικονομική υποστήριξη,

τη Γενική Γραμματεία Έρευνας και Τεχνολογίας για την οικονομική υποστήριξη που μου πρόσφερε μέσω του προγράμματος ΥΠΕΡ,

το Dr T. Gibson (Un. of Leeds) για τις πολύτιμες συμβουλές του που ήταν καθοριστικές για την πραγματοποίηση αυτής της διατριβής,

τους Dr U. Spohn (Un. of Halle), Καθ. Μ. Ορφανόπουλο (Παν. Κρήτης), Dr Θ. Γκιμήση, Καθ. Β. Κασελούρη-Ρηγοπούλου (Ε.Μ.Π.), Μ. Μεταξά (Ε.Μ.Π.), Β. Δημάκη, Μ. Φουσκάκη, Μ. Ψυλινάκη και Γ. Κουβαράκη για την πολύτιμη συνεισφορά τους σε αυτή την εργασία,

τους συνάδελφους που συνεργαστήκαμε όλα αυτά τα χρόνια στο εργαστήριο του καθ. Ν. Χανιωτάκη και ιδιαίτερα τους Dr Ε. Μόσχου και Dr Ι. Τσαγκατάκη.

τους φίλους μου που μου συμπαραστάθηκαν σε όλη τη διάρκεια της παρουσίας μου στην Κρήτη,

τέλος την οικογένεια μου και ιδιαίτερα τους γονείς μου που χωρίς να λογαριάσουν κόπους και έξοδα μου συμπαραστάθηκαν σε όλα τα στάδια της μέχρι τώρα πορείας μου. Τους υπόσχομαι να κάνω ότι είναι δυνατόν για να μην πάνε οι κόποι τους χαμένοι.

1. ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	1
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	4
2.1 Ορολογία.....	4
2.2 Αρχή Λειτουργίας των Βιοαισθητήρων.....	5
2.2.1 Βιολογικό τμήμα.....	5
2.2.2 Μετατροπéας σήματος.....	8
2.3 Χαρακτηριστικά Ποιότητας Βιοαισθητήρων.....	11
2.4 Εφαρμογές των Βιοαισθητήρων.....	14
3. ΑΜΠΕΡΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ.....	16
3.1 Ενζυμικό Στρώμα.....	17
3.1.1 Ένζυμα.....	17
3.1.2 Κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων.....	19
3.1.3 Μέθοδοι ακινητοποίησης.....	20
3.2 Μεμβράνες.....	23
3.3 Είδη Ηλεκτροδίων Εργασίας.....	24
3.4 Μεταφορείς Ηλεκτρονίων.....	28
4. ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ENZYMΩΝ	32
ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ.....	
4.1 Σταθεροποίηση Ενζύμων.....	32
4.2 Σταθεροποίηση Βιοαισθητήρων.....	36
5. ΠΟΡΩΔΗΣ ΑΝΘΡΑΚΑΣ.....	39
5.1 Φυσικοχημικές Ιδιότητες του Πορώδους Άνθρακα.....	40
5.2 Ηλεκτροχημικές Ιδιότητες του Πορώδους Άνθρακα.....	43
6. ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ.....	45
6.1 Ανασκόπηση.....	45

6.2 Κατασκευή του Βιοαισθητήρα – Διαδικασία Μέτρησης.....	47
6.3 Επίδραση της Ποσότητας του Ενζύμου.....	49
6.4 Επίδραση του pH.....	51
6.5 Επίδραση της Διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνης.....	52
6.6 Σταθερότητα Αποθήκευσης και Συνεχούς Λειτουργίας.....	54
6.7 Ευαισθησία και Αναπαραγωγιμότητα.....	56
6.8 Συμπεράσματα.....	58
7. ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ.....	59
7.1 Ανασκόπηση.....	59
7.2 Κατασκευή του Βιοαισθητήρα.....	61
7.3 Επίδραση της Διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνης.....	62
7.4 Αναλυτικά Χαρακτηριστικά του Βελτιστοποιημένου Βιοαισθητήρα.....	63
7.5 Σταθερότητα Αποθήκευσης και Συνεχούς Λειτουργίας.....	65
7.6 Συμπεράσματα.....	67
8. ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑΣ ΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ.....	69
8.1 Ανασκόπηση.....	69
8.2 Κατασκευή του Βιοαισθητήρα	73
8.3 Επίδραση της Συγκέντρωσης του Πυρρικού.....	74
8.4 Επίδραση της Διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνης.....	75
8.5 Αναλυτικά Χαρακτηριστικά του Βελτιστοποιημένου Βιοαισθητήρα.....	77
8.6 Σταθερότητα Αποθήκευσης και Συνεχούς Λειτουργίας.....	78
8.7 Συμπεράσματα.....	79
9. ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ ΑΠΟ ΦΟΥΛΛΕΡΕΝΙΑ.....	81
9.1 Ανασκόπηση.....	81
9.2 Βιοαισθητήρας Γλυκόζης Βασισμένος στην Προσρόφηση C ₆₀	82

9.2.1	Διαδικασία κατασκευής.....	82
9.2.2	Υπολογισμός του ακινητοποιημένου C_{60}	83
9.2.3	Αξιολόγηση των βιοαισθητήρων.....	84
9.3	Βιοαισθητήρας Γλυκόζης Βασισμένος στην Ομοιοπολική Δέσμευση του C_{60} .	87
9.3.1	Παρασκευή της τροποποιημένης πολυαιθυλενιμίνης (PEI- C_{60}).....	87
9.3.2	Αξιολόγηση των βιοαισθητήρων.....	89
9.4	Συμπεράσματα.....	93
10.	ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ.....	94
10.1	Ανασκόπηση.....	94
10.2	Κατασκευή του Κελιού Προ-οξείδωσης.....	95
10.3	Χαρακτηριστικά Λειτουργίας του Κελιού Προ-οξείδωσης.....	97
10.4	Εφαρμογή στην Ανάλυση Γλυκόζης.....	99
10.5	Εφαρμογή στην Ανάλυση Φωσφορικών Ιόντων στον Ορό Αίματος.....	101
10.6	Συμπεράσματα.....	104
11.	ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	105
	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	108
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	109

1.ΠΡΟΛΟΓΟΣ

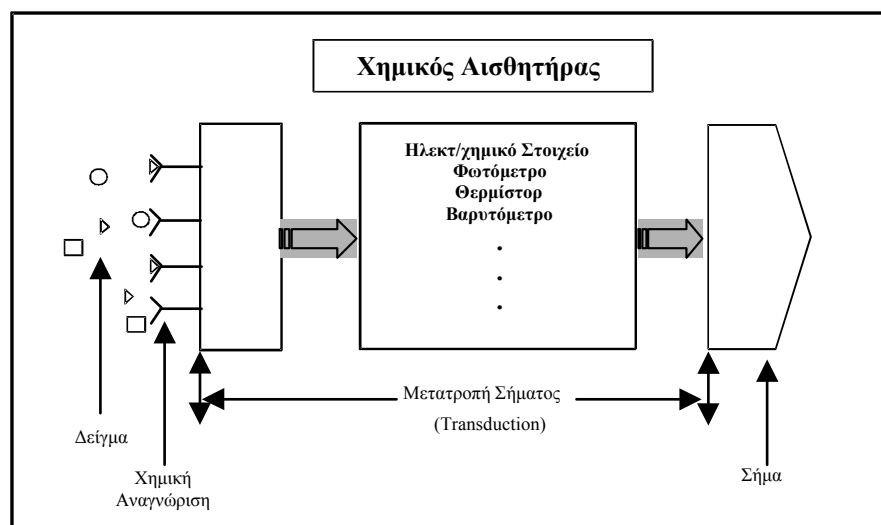
Το 1992 η Ομοσπονδία των Ευρωπαϊκών Ενώσεων Χημικών διεξήγαγε διαγωνισμό για τον προσδιορισμό του «τι είναι Αναλυτική Χημεία;». Η απάντηση που επιλέχθηκε ως καλύτερη δόθηκε από τον καθ. K. Cammann (Univ. of Munster) [1]: *Η Αναλυτική Χημεία παρέχει τις μεθόδους και τα εργαλεία που χρειάζονται για την αντίληψη του υλικού μας κόσμου. Ο Αναλυτικός Χημικός είναι εξειδικευμένος στην παροχή αξιόπιστων εργαλείων για την απάντηση τεσσάρων βασικών ερωτήσεων που αφορούν ένα υλικό δείγμα: Τι είναι; Πού; Πόσο; Σε τι διάταξη, δομή ή μορφή;*^a Ένας πιο λεπτομερής ορισμός δίνεται από το Τμήμα Αναλυτικής Χημείας της Ένωσης Χημικών Αμερικής [2]: *Η Αναλυτική Χημεία ψάχνει για βελτιωμένους τρόπους μέτρησης της χημικής σύστασης φυσικών και τεχνητών υλικών. Οι τεχνικές αυτής της επιστήμης χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση των ουσιών που μπορεί να βρίσκονται σε ένα υλικό και για τον προσδιορισμό της ακριβούς ποσότητας των εξακριβωμένων ουσιών*¹. Η τεχνολογική έκρηξη που συμβαίνει στις μέρες μας έχει επηρεάσει σημαντικά την επιστήμη της Αναλυτικής Χημείας, οδηγώντας σε δραματική ανάπτυξη και επέκταση της τις τελευταίες δεκαετίες. Οι εφαρμογές της στη βιοτεχνολογία, τη χημική βιομηχανία, την επιστήμη υλικών, την ιατρική, την επιστήμη περιβάλλοντος κλπ, καθιστούν την Αναλυτική Χημεία ως μία από τις κολώνες της «εποχής των πληροφοριών», όπως συχνά χαρακτηρίζεται η εποχή μας [3].

Ένας από τους τομείς της Αναλυτικής Χημείας με τη μεγαλύτερη ανάπτυξη τα τελευταία χρόνια είναι οι χημικοί αισθητήρες. Τα όργανα αυτά έχουν την ικανότητα για την συνεχή και άμεση εξαγωγή των πληροφοριών που αφορούν τη χημική σύσταση ενός δείγματος. Οι χημικοί αισθητήρες αποτελούνται από δύο κύρια μέρη α) ένα χημικά ευαίσθητο στρώμα (το τμήμα του αισθητήρα που είναι υπεύθυνο για την χημική αναγνώριση) και β) το μεταλλάκτη σήματος που μετατρέπει τη χημική πληροφορία σε ηλεκτρικό ή οπτικό σήμα (Σχήμα 1). Το πλήθος και η αξιοπιστία των

^a Analytical Chemistry provides the methods for insight into our material world. The Analytical Chemist is specialized in providing reliable tools for answering four basic questions about a material sample: What? Where? How much? What arrangement, structure or form?

¹ Analytical Chemistry seeks ever improved means of measuring the chemical composition of natural and artificial materials. The techniques of this science are used to identify the substances which may be present in a material and to determine the exact amount of the identified substances.

χημικών πληροφοριών που λαμβάνονται με τη χρήση ενός χημικού αισθητήρα εξαρτώνται από τα χαρακτηριστικά λειτουργίας αυτού.



Σχήμα 1. Γενικό μοντέλο λειτουργίας χημικών αισθητήρων.

Στην οικογένεια των χημικών αισθητήρων περιλαμβάνονται και οι βιοαισθητήρες. Στους βιοαισθητήρες, σε αντίθεση με τους υπόλοιπους χημικούς αισθητήρες, η αναγνώριση της προς ανάλυση ουσίας γίνεται με την χρήση βιολογικών μορίων. Ο συνδυασμός της βιολογικής αναγνώρισης με την φυσικοχημική μετάλλαξη του σήματος δίνει τη δυνατότητα στους βιοαισθητήρες να παρέχουν την ευαισθησία των χημικών αισθητήρων και ταυτόχρονα την πολύ καλή επιλεκτικότητα (εκλεκτικότητα) των βιολογικών αναγνωριστικών μηχανισμών.

Από το 1962 και μετά την δημοσίευση για πρώτη φορά της ιδέας των βιοαισθητήρων από τον Clark [4], η εξέλιξη του τομέα είναι ραγδαία. Ειδικά τις τελευταίες δύο δεκαετίες οι δημοσιεύσεις επιστημονικών εργασιών αλλά και βιβλίων που πραγματεύονται την ανάπτυξη και εφαρμογή των βιοαισθητήρων αυξάνονται εντυπωσιακά [5]. Τα τελευταία χρόνια οι κατευθύνσεις της έρευνας στους βιοαισθητήρες περιλαμβάνουν [6]:

- Τη βελτιστοποίηση της σταθερότητας των βιοαισθητήρων (εφαρμογή πρότυπων μεθόδων ακινητοποίησης, ανάπτυξη νέων ηλεκτροδίων και συστημάτων μεταφοράς ηλεκτρονίων, κτλ)
- Τη σχεδίαση πρότυπων συστημάτων για την παρακολούθηση και ανίχνευση νέων ουσιών.

- Την ανάπτυξη αναπαραγώγιμων διαδικασιών κατασκευής των βιοαισθητήρων σε μεγάλες ποσότητες.
- Την κατασκευή συστημάτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αναλύσεις ρουτίνας (σε ιατρικές, βιομηχανικές, περιβαλλοντικές αναλύσεις, κτλ)

Μέσα στα γενικά πλαίσια αυτών των κατευθύνσεων και με κύριο στόχο τη συμβολή στην έρευνα για τη σταθεροποίηση των βιοαισθητήρων, η παρούσα εργασία προσανατολίστηκε στους ακόλουθους τομείς:

- Τη χρήση ενός νέου υλικού για την ακινητοποίηση των ενζύμων.
- Την επίδραση του πολυηλεκτρολύτη διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη στη σταθεροποίηση των βιοαισθητήρων που κατασκευάστηκαν.
- Την δυνατότητα χρήσης νέων μορίων για την βελτιστοποίηση του τρόπου μετατροπής της βιολογικής αναγνώρισης σε ηλεκτρικό σήμα (mediators).
- Την εφαρμογή των βιοαισθητήρων που κατασκευάστηκαν στην ανάλυση πραγματικών δειγμάτων.

Οι διατμηματικές και διαπανεπιστημιακές συνεργασίες με εργαστήρια διεθνούς κύρους ενδυνάμωσαν και εδραίωσαν τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας.

Στη συνέχεια θα αναλυθούν λεπτομερώς η αρχή λειτουργίας των βιοαισθητήρων, με μεγαλύτερη έμφαση στους αμπερομετρικούς βιοαισθητήρες, όπως επίσης και οι εξελίξεις στη σταθεροποίηση των βιοαισθητήρων. Τέλος θα παρατεθούν τα αποτελέσματα και ο χαρακτηρισμός των βιοαισθητήρων που κατασκευάστηκαν καθώς και η χρήση τους στην ανάλυση πραγματικών δειγμάτων.

2.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 Ορολογία

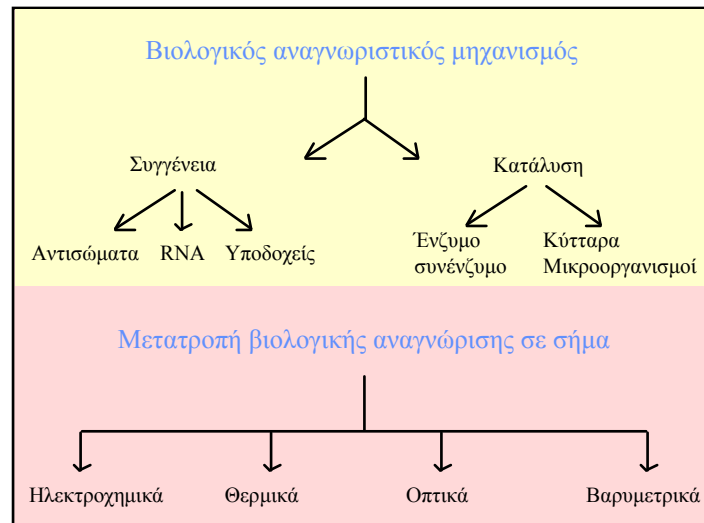
Η ραγδαία εξέλιξη των τελευταίων ετών του ερευνητικού πεδίου των βιοαισθητήρων δημιούργησε σύγχυση στην ορολογία. Κυριότερη ήταν αυτή που επικρατούσε μεταξύ της επιστημονικής κοινότητας για το τι είναι ένας βιοαισθητήρας, πώς διαχωρίζεται από τα βιοαναλυτικά συστήματα (bioanalytical systems) ή τους βιοκαθετήρες (bioprobes), αλλά και το πώς είναι δόκιμο να περιγράφονται τα αναλυτικά χαρακτηριστικά τους όπως η σταθερότητα αποθήκευσης και συνεχούς λειτουργίας (storage and operational stability) κλπ. Όπως χαρακτηριστικά αναφέρει ο A. Cunningham [7], για μεγάλο χρονικό διάστημα υπήρχαν τόσοι ορισμοί του «βιοαισθητήρα», όσοι και οι ερευνητές στο πεδίο. Σε αυτή τη γενική ασάφεια συνέτεινε η πολυσυλλεκτικότητα που παρουσιάζει ο τομέας. Οι ειδικές γνώσεις επιστημόνων από τους τομείς της αναλυτικής χημείας, βιοχημείας, βιοτεχνολογίας, φυσικής, περιβάλλοντος, υγείας, υλικών καθώς και ειδικοί ηλεκτρονικών χρειάζονται να συνεισφέρουν στην ανάπτυξη των βιοαισθητήρων.

Το 1996 ο τομέας Φυσικής Χημείας και Αναλυτικής Χημείας της Διεθνούς Ένωσης της Θεωρητικής και Εφαρμοσμένης Χημείας (IUPAC) έθεσε τις βάσεις για να αποσαφηνιστούν τα παραπάνω θέματα, δημοσιεύοντας [8] για πρώτη φορά ένα ορισμό κοινής αποδοχής που ωστόσο αφορούσε ένα μόνο τμήμα των βιοαισθητήρων, τους ηλεκτροχημικούς. Μια βελτιωμένη έκδοση του ορισμού δημοσιεύτηκε πέρσι [9]. Σύμφωνα λοιπόν με αυτή *«Ένας ηλεκτροχημικός βιοαισθητήρας είναι μία αυτόνομη και ολοκληρωμένη συσκευή, ικανή να παρέχει εξειδικευμένες ποσοτικές ή ημι-ποσοτικές αναλυτικές πληροφορίες χρησιμοποιώντας ένα βιολογικό αναγνωριστικό στοιχείο που διατηρείται σε άμεση χωρική επαφή με ένα ηλεκτροχημικό μεταλλάκτη σήματος»*². Στο άρθρο υπάρχει υποσημείωση ότι οι υποδείξεις που παρατίθενται από την επιτροπή θα γενικευθούν στο μέλλον σε όλα τα είδη βιοαισθητήρων, στην προσπάθεια να τεθούν γενικές αρχές και κανόνες που θα διευκολύνουν την επικοινωνία μεταξύ των επιστημόνων.

² An electrochemical biosensor is a self-containing integrated device, which is capable of providing specific quantitative or semi-quantitative analytical information using a biological

2.2 Αρχή Λειτουργίας των Βιοαισθητήρων

Στο σχήμα 2 συνοψίζεται η αρχή λειτουργίας των βιοαισθητήρων καθώς και τα κυριότερα τμήματα ενός βιοαισθητήρα. Ο βιοαισθητήρας μπορεί να θεωρηθεί ως το αποτέλεσμα της σύζευξης δύο κύριων τμημάτων, του βιολογικού και του μετατροπέα σήματος. Στην συνέχεια θα γίνει μια συνοπτική παρουσίαση τους.



Σχήμα 2. Γενικό διάγραμμα λειτουργίας των βιοαισθητήρων

2.2.1 Βιολογικό τμήμα

Η βιολογική αντίδραση λαμβάνει χώρα στη διεπιφάνεια του βιοαισθητήρα με το δείγμα, δηλαδή στο ενζυμικό στρώμα όπου βρίσκονται ακινητοποιημένα τα βιολογικά μόρια. Η αναγνώριση της προς ανάλυση ουσίας βασίζεται στην αλληλεπίδρασή της με το βιολογικό μόριο. Υπάρχουν δύο κύριες κατηγορίες αλληλεπίδρασης βιομορίου-αναλύτη οι οποίες χρησιμοποιούνται και για την κατηγοριοποίηση των βιοαισθητήρων: η κατάλυση (biocatalysis) και η συγγένεια (bioaffinity) [10]. Στην πρώτη περίπτωση το βιολογικό μόριο έχει την ικανότητα να καταλύει μια συγκεκριμένη αντίδραση, στην οποία συμμετέχει ο αναλύτης είτε ως αντιδρών είτε ως προϊόν. Τα κυριότερα είδη βιολογικών μορίων που χρησιμοποιούνται λόγω της ικανότητάς τους για κατάλυση είναι [11-14]:

recognition element, which is retained in direct spatial contact with an electrochemical transduction element.

- **Ένζυμα.** Τα ένζυμα είναι το πιο διαδεδομένο είδος βιολογικών μορίων που χρησιμοποιείται για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Πρόκειται για πρωτεΐνες αποτελούμενες από μία ή περισσότερες πολυπεπτιδικές αλυσίδες με συγκεκριμένη τρισδιάστατη διάταξη στο χώρο. Η πλειονότητα των ενζύμων, προκειμένου να δράσει καταλυτικά, χρειάζεται την παρουσία κάποιων μορίων, που ονομάζονται συμπαράγοντες. Συνηθισμένοι συμπαράγοντες είναι το νικοτάμιδο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο (NAD), το φλάβινο-αδένινο-δινουκλεοτίδιο (FAD), διάφορες πορφυρίνες ή ακόμα και μεταλλικά ιόντα όπως Mg, Zn, Fe, Cu, κλπ. Οι συμπαράγοντες μπορεί να είναι συνδεδεμένοι με αμινοξέα που βρίσκονται κοντά στο ενεργό κέντρο του ενζύμου (οπότε ονομάζονται *προσθετικές ομάδες*) ή να προστίθενται στο διάλυμα. Η αξιοσημείωτη επιλεκτικότητα, η μεγάλη καταλυτική δραστηριότητα καθώς και η γρήγορη κινητική των περισσοτέρων ενζύμων είναι τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα που εστίασαν το ενδιαφέρον των ερευνητών στη χρήση ενζύμων στους βιοαισθητήρες. Από τα μειονεκτήματα ξεχωρίζουν το μεγάλο κόστος και η αστάθεια των περισσοτέρων ενζύμων.
- **Κύτταρα - Ιστοί - Μικροοργανισμοί.** Κύτταρα, φυτικοί ή ζωικοί ιστοί ή ακόμα και ολόκληροι μικροοργανισμοί μπορεί να χρησιμοποιηθούν για την κατασκευή βιοαισθητήρων. Χαρακτηριστικότερο παράδειγμα είναι ο βιοαισθητήρας για την ανίχνευση της ντοπαμίνης που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας κομμάτια μπανάνας [15]. Μεγάλο πλεονέκτημα είναι ότι δεν χρειάζεται να γίνει η απομόνωση και ο καθαρισμός των αντίστοιχων ενζύμων. Ταυτόχρονα επειδή τα ένζυμα βρίσκονται στο φυσικό τους περιβάλλον οι αντίστοιχοι βιοαισθητήρες είναι πιθανό να έχουν μεγαλύτερο χρόνο ζωής. Παράλληλα όμως επειδή οι ιστοί περιέχουν πολλά διαφορετικά ένζυμα ο βιοαισθητήρας μπορεί να αποκρίνεται και σε άλλες ουσίες εκτός της επιθυμητής. Συγχρόνως αυξάνεται ο χρόνος που χρειάζεται ο βιοαισθητήρας για να αποκριθεί, αφού η προς ανάλυση ουσία πρέπει να διαχυθεί διαμέσου των κυτταρικών μεμβρανών για να γίνει η κατάλυση από τα αντίστοιχα ένζυμα.

Όταν η βιολογική αναγνώριση βασίζεται στη συγγένεια τότε το βιολογικό μόριο αλληλεπιδρά με την προς ανάλυση ουσία και σχηματίζεται ένα σύμπλοκο. Τα κυριότερα είδη βιολογικών μορίων που χρησιμοποιούνται σε αυτού του είδους τους βιοαισθητήρες είναι [11,12,16]:

- Αντισώματα.** Τα αντισώματα έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως στην ανάπτυξη μεθόδων ανοσοχημικών προσδιορισμών. Τα κυριότερα χαρακτηριστικά των αντισωμάτων είναι η μεγάλη επιλεκτικότητα, η εξαιρετική ευαισθησία, η πολύ ισχυρή δέσμευση και η απουσία καταλυτικής δράσης. Η πολύ ισχυρή δέσμευση των αντισωμάτων με τα αντιγόνα (σταθερές συγγένειας $\sim 10^6 \text{ M}^{-1}$) οδηγεί σε αλληλεπιδράσεις μη αντιστρεπτές, με αποτέλεσμα οι αντίστοιχοι βιοαισθητήρες να είναι συνήθως μίας χρήσης. Ταυτόχρονα επειδή αυτή η αλληλεπίδραση δεν επιφέρει κάποια αλλαγή στις οπτικές ή ηλεκτροχημικές ιδιότητες είτε του αντισώματος είτε του αντιγόνου, ο προσδιορισμός γίνεται με έμμεσο τρόπο. Πιο διαδεδομένη τεχνική είναι η επισήμανση των αντιγόνων με ένζυμα. Αυτά τα αντιγόνα προστίθενται στο δείγμα και δρουν ανταγωνιστικά ως προς τα αντιγόνα του δείγματος. Στη συνέχεια το δείγμα απομακρύνεται, ο βιοαισθητήρας εμβαπτίζεται σε διάλυμα που περιέχει το υπόστρωμα του ενζύμου, και η ποσότητα του ενζύμου υπολογίζεται με βάση την ενζυμική ενεργότητα και είναι αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης του αντιγόνου στο δείγμα. Αυτός ο έμμεσος τρόπος προσδιορισμού είχε επιφέρει συζητήσεις μεταξύ της επιστημονικής κοινότητας για το αν θα έπρεπε τα παραπάνω συστήματα να θεωρούνται βιοαισθητήρες. Σύμφωνα μάλιστα με την πρώτη οδηγία της IUPAC [8], όπου υπήρχε ο διαχωρισμός σε βιοκαθετήρες για τα συστήματα που χρησιμοποιούνται μόνο για μία μέτρηση ή δεν δύναται να χρησιμοποιηθούν για τη συνεχή παρακολούθηση της συγκέντρωσης της προς ανάλυσης ουσίας, τα παραπάνω συστήματα δεν θεωρούνταν βιοαισθητήρες. Στην δεύτερη οδηγία [9] αναφέρονται ως μίας χρήσης βιοαισθητήρες. Πρέπει πάντως να σημειωθεί ότι ο πιο ευρέως χρησιμοποιούμενος όρος στην βιβλιογραφία που περιγράφει τέτοια συστήματα είναι «ανοσοαισθητήρες» (immunosensors).
- Νουκλεϊκά οξέα.** Τα νουκλεϊκά οξέα δρουν παρόμοια με τα αντισώματα. Οι ειδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των βάσεων μίας αλληλουχίας νουκλεϊκών οξέων και μορίων DNA μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη DNA καθετήρων (DNA probes). Η χρήση τέτοιων αισθητήρων περιλαμβάνει την ανίχνευση γενετικών ασθενειών, καρκίνου και μόλυνσης από ιούς.
- Υποδοχείς.** Η χρήση βιολογικών υποδοχέων είναι μία πολλά υποσχόμενη προσέγγιση στην κατασκευή βιοαισθητήρων. Το σημαντικότερο πλεονέκτημα είναι η μεγάλη ευαισθησία στην ανίχνευση που μπορεί να φτάσει σε

συγκεντρώσεις της τάξης 10^{-13} Μ. Ωστόσο τα προβλήματα στην απομόνωση των υποδοχέων αλλά και η μεγάλη αστάθεια τους έχει περιορίσει την χρήση τους στην κατασκευή βιοαισθητήρων.

2.2.2 Μετατροπέας σήματος

Η αποτελεσματική μετατροπή της βιολογικής αναγνώρισης σε αναλυτικό σήμα είναι σημαντική για τη σωστή λειτουργία ενός βιοαισθητήρα. Η ενέργεια με την οποία λαμβάνεται η πληροφορία και δημιουργείται το σήμα μπορεί να ταξινομηθεί ανάλογα με το είδος της ως μηχανική, θερμική, μαγνητική, ηλεκτρική, χημική ή ακτινοβολία [17]. Πρέπει να σημειωθεί ότι πολλές φορές υπάρχει συνδυασμός φαινομένων για τη δημιουργία του σήματος. Επίσης η μετατροπή του σήματος δεν είναι επιλεκτική, αφού πρόκειται για μετατροπή ενέργειας ανεξάρτητα από την προέλευσή της. Η επιλογή του μετατροπέα σήματος εξαρτάται κυρίως από το πιο είναι το αποτέλεσμα της βιολογικής αναγνώρισης, και το είδος των αλλαγών που αυτή επιφέρει στο σύστημα, με την προϋπόθεση ότι ο τρόπος που γίνεται η μετατροπή του σήματος δεν επηρεάζει τη βιολογική αναγνώριση. Στον πίνακα 1 παρατίθενται τα κυριότερα είδη μετατροπέων σήματος.

Πίνακας 1. Τύποι μετατροπέων σήματος που χρησιμοποιούνται στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων.

Τύπος	Μετρούμενη Παράμετρος
Ηλεκτροχημικός	
α. Αγωγιμομετρικός	Αγωγιμότητα
β. Ποτενσιομετρικός	Δυναμικό
γ. Αμπερομετρικός	Ρεύμα – φορτίο
Οπτικός	Οπτικές ιδιότητες (απορρόφηση, φθορισμός, χημειοφωταύγεια, κλπ)
Θερμικός	Έκλυση-απορρόφηση θερμότητας
Βαρυμετρικός	Αλλαγές στη μάζα

Επειδή οι μετατροπείς σήματος μπορούν να χρησιμοποιηθούν αυτόνομα για την παρακολούθηση ουσιών, συχνά αναφέρονται και ως χημικοί αισθητήρες, με

αποτέλεσμα η διάκριση των δύο όρων να είναι δυσχερής. Στη συνέχεια θα περιγραφούν εν συντομία οι παραπάνω τύποι μετατροπών [11,16-18].

- **Βαρυμετρικοί.** Διαχωρίζονται σε δύο κύριες κατηγορίες: τους πιεζοηλεκτρικούς (Piezoelectric) και τους ακουστικούς επιφανειακών κυμάτων (Surface Acoustic wave). Οι πιεζοηλεκτρικοί βασίζονται στη μέτρηση της μεταβολής της χαρακτηριστικής συχνότητας συντονισμού των κρυστάλλων από τους οποίους αποτελούνται, λόγω της μεταβολής της ολικής μάζας στην επιφάνεια του κρυστάλλου. Στους ακουστικούς μετατροπείς σήματος, η αλλαγή στη μάζα των κρυστάλλων επιφέρει αλλαγές στη συχνότητα συντονισμού ενός εξωτερικά εφαρμοζόμενου κύματος το οποίο περνά διαμέσου της επιφάνειάς τους.
- **Θερμικοί.** Βασίζονται στη μέτρηση της μεταβολής της θερμοκρασίας που είναι απόρροια της θερμότητας που εκλύεται ή απορροφάται κατά τη βιολογική αναγνώριση του αναλύτη. Η μέτρηση της μεταβολής της θερμοκρασίας γίνεται συνήθως με τη χρήση πολύ ευαίσθητων θερμομέτρων ηλεκτρικής αντίστασης (θερμίστορ, thermistor). Το θερμίστορ είναι συνήθως μία αντίσταση 16 kohm (25°C) με συντελεστή $-3,9\%/^{\circ}\text{C}$, δηλαδή αύξηση της θερμοκρασίας κατά ένα βαθμό Celsius επιφέρει μείωση στην αντίσταση κατά 3,9%. Αυτή η αλλαγή στην αντίσταση μετριέται με την χρήση μίας γέφυρας wheatstone και συσχετίζεται με τη συγκέντρωση της προς ανάλυση ουσίας.
- **Οπτικοί.** Μαζί με τους ηλεκτροχημικούς είναι οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενοι μετατροπείς σήματος. Σε αυτό συνέτεινε η αλματώδης εξέλιξη που έχει τα τελευταία χρόνια η ανάπτυξη των οπτικών ινών. Ανιχνεύεται η αλλαγή στις οπτικές ιδιότητες είτε του βιολογικού μορίου παρουσία του αναλύτη, είτε του ίδιου του αναλύτη και μέσω του νόμου Beer-Lambert συσχετίζεται με την συγκέντρωση του αναλύτη:

$$A = \epsilon \cdot b \cdot C$$

Πλεονεκτήματα των οπτικών αισθητήρων είναι ότι: α) για την μέτρηση δεν χρειάζεται αναφορικό σύστημα, β) περισσότερες από μία ενώσεις μπορούν να ανιχνεύουν ταυτόχρονα παρακολουθώντας περισσότερα από ένα μήκη κύματος, γ) υπάρχει η δυνατότητα για συλλογή πληροφοριών που αφορούν δομικές αλλαγές. Κυριότερο μειονέκτημα είναι ότι η δυσκολία χρήση τους σε θολά ή έγχρωμα διαλύματα. Συγχρόνως, λόγω των

προϋποθέσεων που ισχύουν για τον νόμο Beer-Lambert (αραιά διαλύματα, απουσία αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων, κλπ) η γραμμική απόκριση των οπτικών αισθητήρων μικρή.

- **Αγωγιμομετρικοί.** Η αγωγιμότητα ενός διαλύματος είναι το μέτρο της ευκολίας με την οποία διαρρέεται από ηλεκτρικό ρεύμα και είναι αντιστρόφως ανάλογη της αντίστασης του διαλύματος. Η αγωγιμότητα είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης των ιόντων που υπάρχουν στο διάλυμα και η αλγεβρική τιμή της εξαρτάται από το φορτίο των ιόντων, την κινητικότητά τους, αλλά και τη σταθερά διάστασή τους. Έτσι όταν κατά τη βιολογική αναγνώριση υπάρχει αλλαγή στον αριθμό των ιόντων, το φορτίο τους ή την κινητικότητά τους, τότε μπορεί να χρησιμοποιηθεί αγωγιμομετρικός μετατροπέας σήματος.
- **Ποτενσιομετρικοί.** Στην ποτενσιομετρία καταγράφεται το δυναμικό που διαρρέει ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο σε συνθήκες μηδενικού ρεύματος ($i \leq 10^{-12}$ A). Οι δύο σημαντικότεροι εκπρόσωποι των ποτενσιομετρικών αισθητήρων, είναι τα επιλεκτικά ηλεκτρόδια ιόντων (ISEs) και οι αισθητήρες επαγόμενου πεδίου (FETs). Στα ISEs καταγράφεται το δυναμικό που αναπτύσσεται στην επιφάνεια μίας μεμβράνης (στερεής ή υγρής) συναρτήσεως ενός συστήματος αναφοράς (Ημιστοιχείο με γνωστό και σταθερό δυναμικό). Συνήθως στη διεπιφάνεια μεμβράνης /διαλύματος ανάλυσης λαμβάνει χώρα μια ισορροπία ανταλλαγής ή ιονανταλλαγής. Το δυναμικό που αναπτύσσεται εξαρτάται κυρίως από τη μεταβολή στην ελεύθερη ενέργεια που σχετίζεται με τη μεταφορά μάζας διαμέσου της διεπιφάνειας μεμβράνης /διαλύματος ανάλυσης. Παρόμοια η λειτουργία των αισθητήρων επαγόμενου πεδίου βασίζεται στην επιλεκτική αλληλεπίδραση μίας επιφάνειας με ιόντα που βρίσκονται στο διάλυμα. Αυτή η αλληλεπίδραση αλλάζει το δυναμικό της επιφάνειας και μέσω φαινομένων επαγόμενου πεδίου, επηρεάζεται η αντίσταση ενός ημιαγωγού που βρίσκεται σε κοντινή απόσταση με την επιφάνεια. Το μέγεθος της αλλαγής στην αντίσταση του ημιαγωγού υπολογίζεται από το δυναμικό που χρειάζεται να εφαρμοστεί κατά μήκος του αγωγού για τη διέλευση σταθερής έντασης ρεύματος. Οι ενζυματικές αντιδράσεις οδηγούν πολύ συχνά στην παραγωγή ιόντων και γι' αυτό το λόγο η χρήση ISEs ή FETs για την παρακολούθηση της βιολογικής αναγνώρισης

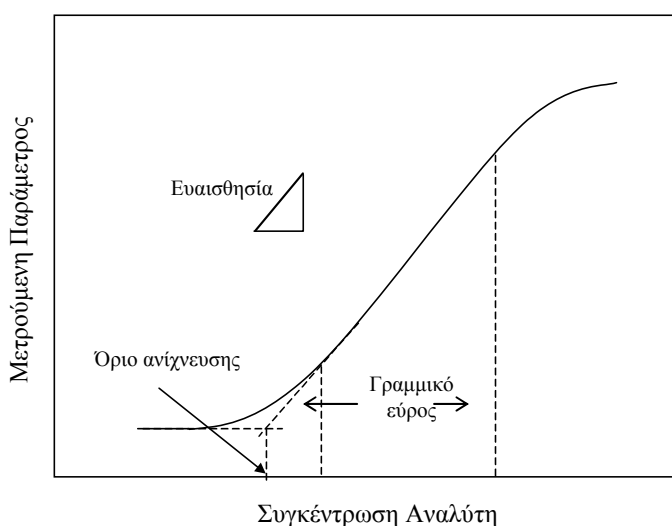
είναι ευρέως διαδεδομένη. Για την κατασκευή ποτενσιομετρικών βιοαισθητήρων απαιτείται η ακινητοποίηση του ενζύμου στην επιφάνεια των μεμβρανών των ISEs ή των FETs.

- **Αμπερομετρικοί.** Βασίζονται στις βολταμετρικές τεχνικές ανάλυσης όπου εφαρμόζεται δυναμικό στο ηλεκτρόδιο εργασίας και το παραγόμενο ρεύμα δίνει πληροφορίες για τη σύσταση του δείγματος. Επειδή είναι το είδος του μετατροπέα σήματος που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία, η θεωρία που διέπει τη λειτουργία των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων θα αναπτυχθεί στο επόμενο κεφάλαιο.

2.3 Χαρακτηριστικά Ποιότητας Βιοαισθητήρων

Σε κάθε τεχνική χρειάζεται να καθιερωθούν κριτήρια που να περιγράφουν τη λειτουργία της τεχνικής και να επιτρέπουν την αξιολόγηση αλλά και τη σύγκριση μεταξύ διαφορετικών αποτελεσμάτων. Οι κυριότεροι παράμετροι, που περιγράφουν τα χαρακτηριστικά ποιότητας των βιοαισθητήρων, αναλύονται εν συντομία στη συνέχεια [11,19].

- **Καμπύλη βαθμονόμησης.** Είναι η γραφική παράσταση της μετρούμενης αναλυτικής παραμέτρου συναρτήσεως της συγκέντρωσης του αναλύτη (Σχήμα 3).



Σχήμα 3. Τυπική καμπύλη βαθμονόμησης

Η καμπύλη βαθμονόμησης χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό αρκετών χαρακτηριστικών ποιότητας των βιοαισθητήρων.

- **Γραμμικό εύρος.** Ορίζεται ως το εύρος των συγκεντρώσεων όπου η μεταβολή της μετρούμενης αναλυτικής παραμέτρου είναι ευθέως ανάλογη της μεταβολής της συγκέντρωσης. Για αξιόπιστες και ακριβείς μετρήσεις απαιτείται μεγάλο γραμμικό εύρος (μεγαλύτερο από δύο τάξεις μεγέθους). Αν το γραμμικό εύρος είναι μικρό απαιτείται η χρήση πιο περίπλοκων μεθόδων ανάλυσης του σήματος για την απόκτηση της αναλυτικής πληροφορίας.
- **Ευαισθησία.** Ορίζεται ως ο λόγος της μεταβολής της μετρούμενης αναλυτικής παραμέτρου δια της μεταβολής της συγκέντρωσης και υπολογίζεται από την κλίση της καμπύλης αναφοράς στο γραμμικό εύρος. Διάφοροι παράγοντες που καθορίζουν την ευαισθησία ενός συγκεκριμένου βιοαισθητήρα είναι το είδος του μετατροπέα σήματος, το μέγεθός του, οι παράμετροι που επηρεάζουν τη μεταφορά του αναλύτη (πχ το πάχος των μεμβρανών που πιθανόν χρησιμοποιούνται), καθώς βεβαίως και η αποτελεσματικότητα της βιολογικής αναγνώρισης (ρυθμός κατάλυσης, σταθερά συγγένειας, κλπ).
- **Όριο ανίχνευσης.** Χαρακτηρίζεται ως η μικρότερη συγκέντρωση ή ποσότητα του μετρούμενου συστατικού, που μπορεί να προσδιορισθεί με αξιοπιστία. Μπορεί να υπολογιστεί από την καμπύλη βαθμονόμησης από το σημείο τομής της προέκτασης των δύο γραμμικών τμημάτων της (δηλαδή την προέκταση του τμήματος που δεν υπάρχει απόκριση και του τμήματος που η απόκριση είναι γραμμική). Συνήθως όμως υπολογίζεται ως η συγκέντρωση που δίνει σήμα τριπλάσιο του θορύβου ($S/N \geq 3$). Ουσίες που παρεμποδίζουν τη μέτρηση χειροτερεύουν το όριο ανίχνευσης ενώ όλοι οι παράγοντες που ελαττώνουν το θόρυβο επιφέρουν βελτίωση στο όριο ανίχνευσης. Η σπουδαιότητα του ορίου ανίχνευσης εξαρτάται από την εφαρμογή για την οποία σχεδιάζεται ο βιοαισθητήρας και γίνεται σημαντική παράμετρος όταν η συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα είναι μικρή.
- **Επιλεκτικότητα.** Επηρεάζει τη δυνατότητα εφαρμογής του βιοαισθητήρα στην ανάλυση ενός δείγματος που περιέχει πολλά συστατικά. Συνήθως εκφράζεται με τη μέγιστη επιτρεπτή συγκέντρωση πιθανών παρεμποδιστών ή

το λόγο συγκεντρώσεων παρεμποδιστή – προσδιοριζόμενου, για την πρόκληση ορισμένου σφάλματος (συνήθως 5%). Υπάρχουν διάφοροι τρόποι για αποφευχθεί ή να μειωθεί η παρεμπόδιση από αυτές τις ουσίες. Η αλλαγή των συνθηκών λειτουργίας (pH, δυναμικό), η χρήση μεμβρανών, η ταυτόχρονη χρήση άλλων ενζύμων που άρουν αυτές τις παρεμποδίσεις, και οι διαφορικές μετρήσεις είναι μερικοί από αυτούς. Οι τρόποι με τους οποίους μπορεί να επιτευχθεί βελτίωση στην επιλεκτικότητα των βιοαισθητήρων θα συζητηθούν λεπτομερώς στο Κεφάλαιο 10.

- **Σταθερότητα.** Η σταθερότητα του βιοαισθητήρα εξαρτάται κυρίως από το χρόνο ζωής του βιολογικού μορίου. Όλοι οι παράγοντες που μπορεί να οδηγήσουν σε απενεργοποίηση του βιολογικού μορίου (θερμοκρασία, ακραία pH, αναστολείς κλπ) επηρεάζουν τη σταθερότητα του βιοαισθητήρα. Άλλοι παράγοντες που ελαττώνουν το χρόνο ζωής είναι: οι οξειδωτικές αντιδράσεις στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, η προσρόφηση μορίων στο ενζυμικό στρώμα ή την επιφάνεια του ηλεκτροδίου, οι συνθήκες λειτουργίας και η κακή ακινητοποίηση του βιολογικού μορίου. Η σταθερότητα ενός βιοαισθητήρα κατά την αποθήκευση (storage stability) και κάτω από συνθήκες συνεχούς λειτουργίας (operational stability) είναι δύο από τα σημαντικότερα ποιοτικά χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα.
- **Αναπαραγωγιμότητα.** Ο όρος "αναπαραγωγιμότητα" χρησιμοποιείται για την ποσοτική περιγραφή τόσο της επαναληπτικότητας της μέτρησης, όσο και της επαναληπτικότητας της κατασκευής των βιοαισθητήρων. Μαθηματικά εκφράζεται από την επί τις εκατό σχετική τυπική απόκλιση (%RSD) μεταξύ των μετρήσεων ή των χαρακτηριστικών του βιοαισθητήρα (ευαισθησία, απόκριση σε συγκεκριμένη συγκέντρωση αναλύτη, κλπ). Πρέπει να τονιστεί ότι κανένα αναλυτικό αποτέλεσμα δεν έχει σημαντική αξία αν η πιθανότητα να αναπαραχθεί είναι μικρή. Ειδικά αν η αναπαραγωγιμότητα στην κατασκευή ενός βιοαισθητήρα είναι κακή, δηλαδή οι βιοαισθητήρες που κατασκευάζονται διαφέρουν σημαντικά στα ποιοτικά χαρακτηριστικά τους, τότε κάθε ένας από αυτούς πρέπει να θεωρείται ξεχωριστό σύστημα. Συνέπεια είναι τα αποτελέσματα που λαμβάνονται αξιολογώντας ένα βιοαισθητήρα να μην μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να περιγράψουν τους βιοαισθητήρες που κατασκευάζονται με την ίδια μεθοδολογία.

Τα παραπάνω χαρακτηριστικά είναι απαραίτητο να παρατίθενται όταν ανακοινώνονται τα αποτελέσματα της ανάπτυξης ενός βιοαισθητήρα, μαζί με τις λεπτομέρειες για τον τρόπο που έγιναν οι μετρήσεις. Δυστυχώς αυτό δε γίνεται πάντα, είτε λόγω παραλήψεων είτε επειδή αποτελούν μέρος ευρεσιτεχνίας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δυσκολία στη σύγκριση αποτελεσμάτων από διαφορετικά εργαστήρια.

2.4 Εφαρμογές των Βιοαισθητήρων

Η έρευνα και η ανάπτυξη των βιοαισθητήρων είναι ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα του πώς η βασική έρευνα μπορεί να καθοδηγείται εν μέρει από την αγορά. Καθώς ο τομέας αναπτύσσεται τα τελευταία χρόνια οι βιομηχανίες και οι κυβερνήσεις αντιλαμβάνονται τη δυνατότητα χρήσης των βιοαισθητήρων σε πολλούς τομείς της καθημερινότητας. Ενεργές αγορές εμφανίζονται γρηγορότερα από ότι οι ερευνητές μπορούν να ανταποκριθούν στις προκλήσεις για την ανάπτυξη εμπορικά διαθέσιμων οργάνων. Μπορεί η επίδραση της αγοράς να αποτελεί ένα μέρος μόνο των κινήτρων για την ανάπτυξη των βιοαισθητήρων, ωστόσο η έκταση των εν δυνάμει αγορών αντανάκλα το εύρος των αναγκών και των δυνατών εφαρμογών. Ο πρώτος εμπορικά διαθέσιμος βιοαισθητήρας για την ανίχνευση της γλυκόζης αναπτύχθηκε από την εταιρία Yellow Springs Instrument (YSI) το 1974. Το παράδειγμα της YSI ακολούθησαν πολλές εταιρίες με αποτέλεσμα τα τελευταία χρόνια να υπάρχει πλήθος εμπορικά διαθέσιμων βιοαισθητήρων για μεγάλο εύρος αναλυτών. Οι τομείς που οι βιοαισθητήρες έχουν βρει εφαρμογή καθώς και τα είδη των εφαρμογών περιγράφονται στην συνέχεια.

- **Ιατρική-Φαρμακολογία** [11,20-25]. Αποτελούν τους τομείς με την πλέον διαδεδομένη εφαρμογή των βιοαισθητήρων. Σημαντικοί μεταβολίτες και φάρμακα μπορούν να ανιχνευτούν με τη χρήση βιοαισθητήρων που έχουν αναπτυχθεί για τη γρήγορη, επιτόπια ανίχνευση τους, παρέχοντας σε πολλές περιπτώσεις δυνατότητα για συνεχή παρακολούθηση της συγκέντρωσής τους. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούνται για την παρακολούθηση των επιπέδων της γλυκόζης στο αίμα από τους ίδιους τους διαβητικούς. Πρόκειται για τη μόνη ποσοτική κλινική ανάλυση που μπορεί να γίνει σε ιδιωτικούς χώρους από μη-κλινικό προσωπικό. Στη φαρμακολογία οι βιοαισθητήρες χρησιμοποιούνται κυρίως για τον

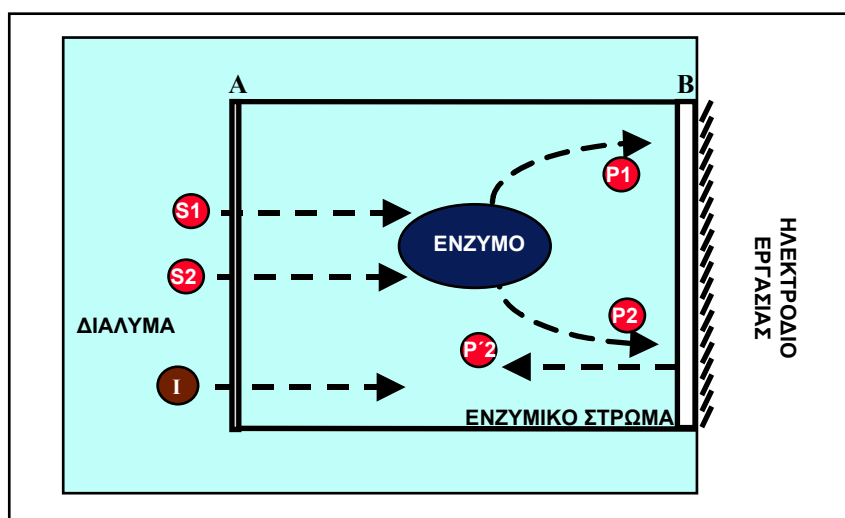
προσδιορισμό της καθαρότητας φαρμάκων αφού παρέχουν την δυνατότητα για ποσοτικό προσδιορισμό των διαφόρων εναντιομερών.

- **Περιβαλλοντικές αναλύσεις** [11,20,24,26-30]. Οι βιοαισθητήρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μετρήσεις πεδίου είτε για το συνεχή προσδιορισμό της συγκέντρωσης του αναλύτη είτε ως συστήματα συναγερμού. Αντανακλώντας το εύρος των ρύπων οι βιοαισθητήρες που έχουν αναπτυχθεί για χρήση σε περιβαλλοντικές αναλύσεις καλύπτουν μεγάλο αριθμό ενώσεων από πολλές χημικές κατηγορίες, αλλά και μικροοργανισμών. Έτσι έχουν κατασκευαστεί βιοαισθητήρες για παρασιτοκτόνα, χλωροφαινόλες, πολυχλωριομένα διφαινύλια, βαρέα μέταλλα, BOD (Biological Oxygen Demand), βακτήρια κλπ.
- **Βιοτεχνολογία** [31-36]. Γενικά οι βιοτεχνολογικές διαδικασίες είναι πολύ πολύπλοκες και τα κύτταρα ή οι μικροοργανισμοί πρέπει να καλλιεργούνται κάτω από καθορισμένες συνθήκες. Γι' αυτό το λόγο ο ακριβής και άμεσος προσδιορισμός για τον έλεγχο των συνθηκών της ζύμωσης είναι απαραίτητος. Οι βιοαισθητήρες λόγω της δυνατότητας που προσφέρουν για αναλύσεις σε πραγματικό χρόνο, έχουν χρησιμοποιηθεί για την παρακολούθηση τέτοιων διαδικασιών.
- **Αναλύσεις τροφίμων** [37-39]. Οι αναλύσεις τροφίμων έχουν δύο κύριους στόχους, τον καθορισμό της ποιότητας και την πιστοποίηση της συμμόρφωσης με τη νομοθεσία. Η δυνατότητα συνεχούς παροχής δεδομένων ενός συγκεκριμένου αναλύτη είναι συχνά ανεκτίμητη για τον έλεγχο της διαδικασίας παρασκευής των τροφίμων. Οι βιοαισθητήρες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον προσδιορισμό σακχάρων (όπως γλυκόζη, φρουκτόζη), αιθανόλης σε ποτά, τεχνητών αρωματικών και γλυκαντικών, αντιμικροβιακών παραγόντων, συντηρητικών, βιταμινών, τοξινών κλπ.

Παρόλα τα βήματα προόδου που έχουν επιτευχθεί τα τελευταία χρόνια, οι βιοαισθητήρες δεν μπορούν να χαρακτηριστούν ως καταξιωμένα αναλυτικά όργανα ακόμα, καθόσον παρουσιάζουν σοβαρά προβλήματα στην λειτουργικότητα τους (κατασκευή εύχρηστων συστημάτων). Επιπλέον προβλήματα παρουσιάζονται στην σταθερότητα και την ευαισθησία τους, αλλά και την δυνατότητα αναπαραγωγής κατασκευής τους σε μεγάλες ποσότητες [6]. Στο επόμενο κεφάλαιο παρουσιάζονται αναλυτικά οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες.

3. ΑΜΠΕΡΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

Οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες βασίζονται στην ανίχνευση ηλεκτροχημικά ενεργών ουσιών που παράγονται ή καταναλώνονται κατά τη διαδικασία της βιολογικής αναγνώρισης. Αποτελούν, βάσει των δημοσιεύσεων, τον πλέον διαδεδομένο τύπο βιοαισθητήρων. Για την κατασκευή τους χρησιμοποιούνται συνήθως ένζυμα ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί και μικροοργανισμοί ή ιστοί. Το συγκεκριμένο κεφάλαιο θα επικεντρωθεί στους ενζυμικούς αμπερομετρικούς βιοαισθητήρες.



Σχήμα 4. Γενικό διάγραμμα αμπερομετρικών βιοαισθητήρων. S1, S2: υποστρώματα, P1, P2: προϊόντα, P'2: προϊόν ηλεκτροχημικής αντίδρασης, I: παρεμποδιστής, A: εξωτερική προστατευτική μεμβράνη, B: εσωτερική φορτισμένη μεμβράνη.

Στο σχήμα 4 παρουσιάζεται διαγραμματικά η αρχή λειτουργίας, καθώς και τα κυριότερα τμήματα ενός αμπερομετρικού βιοαισθητήρα [40]. Αποτελείται από το ηλεκτρόδιο εργασίας και το ενζυμικό στρώμα όπου βρίσκονται ακινητοποιημένα τα ένζυμα, ενώ πολλές φορές χρησιμοποιούνται και δύο μεμβράνες: η εξωτερική προστατευτική μεμβράνη και η εσωτερική φορτισμένη μεμβράνη. Τα αντιδρώντα (S1, S2), ένα εκ των οποίων είναι συνήθως ο αναλύτης, διαχέονται στο ενζυμικό στρώμα όπου η αντίδρασή τους καταλύεται από τα ακινητοποιημένα ένζυμα. Για την επίτευξη της ανάλυσης πρέπει τουλάχιστον ένα από αντιδρώντα ή τα προϊόντα να είναι ηλεκτροενεργό. Η οξείδωση ή η αναγωγή του στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου παράγει το καταγραφόμενο σήμα (ένταση ρεύματος). Αν η ηλεκτροενεργή ουσία είναι κάποιο από τα προϊόντα της αντίδρασης τότε η αύξηση στο ρεύμα που

καταγράφεται κατά την προσθήκη του δείγματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης του αναλύτη. Όταν η ηλεκτροενεργή ουσία είναι συμπαράγοντας της ενζυμικής αντίδρασης η ποσότητα αυτής πρέπει να είναι σταθερή και σε σχετική αφθονία. Με τον τρόπο αυτό η ενζυμική αντίδραση επηρεάζεται μόνο από τον αναλύτη, και αλλαγή του ρεύματος συσχετίζεται με την ποσότητα του αναλύτη στο δείγμα.

Στους περισσότερους αμπερομετρικούς βιοαισθητήρες οι ηλεκτροενεργές ουσίες που παρακολουθούνται από το ηλεκτρόδιο εργασίας είναι το H_2O_2 , το O_2 , και το $NADH$. Το O_2 και το NAD^+ συνήθως είναι συμπαράγοντες των ενζύμων που χρησιμοποιούνται ενώ το H_2O_2 και το $NADH$ είναι τα αντίστοιχα προϊόντα της ενζυμικής αντίδρασης. Τόσο το H_2O_2 όσο και το $NADH$ απαιτούν μεγάλα υπερδυναμικά για να οξειδωθούν. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται τεχνητοί συμπαράγοντες που αντικαθιστούν τους φυσικούς συμπαράγοντες και ονομάζονται *μεταφορείς ηλεκτρονίων*. Η χρήση, τα είδη και οι ιδιότητες των μεταφορέων ηλεκτρονίων θα περιγραφούν σε επόμενη παράγραφο του κεφαλαίου. Στη συνέχεια παρουσιάζονται τα είδη των ενζύμων και οι τρόποι ακινητοποίησής τους.

3.1 Ενζυμικό Στρώμα

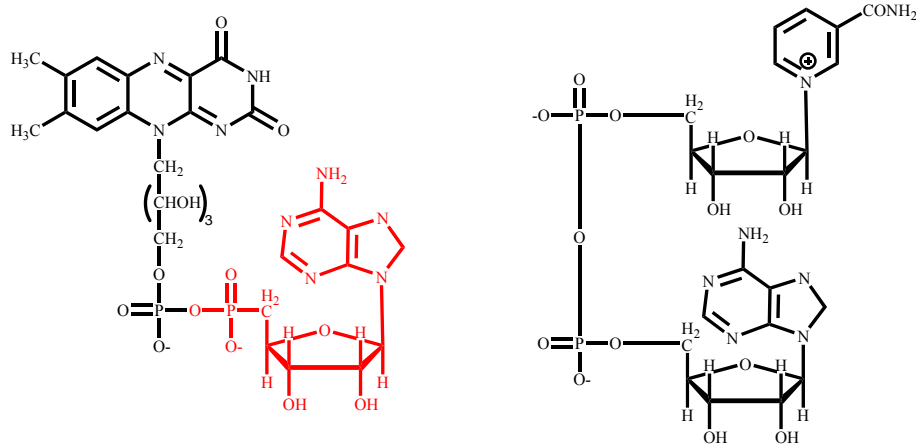
Το ενζυμικό στρώμα είναι το τμήμα του βιοαισθητήρα όπου γίνεται η βιολογική αναγνώριση. Μπορεί να περιέχει εκτός από τα ακινητοποιημένα ένζυμα και ακινητοποιημένους τους συμπαράγοντες της ενζυμικής αντίδρασης.

3.1.1 Ένζυμα

Τα ένζυμα ταξινομούνται σε έξι κύριες κατηγορίες, ανάλογα με το είδος της αντίδρασης που καταλύουν [41]: τις οξειδοοδουκτάσες, τις τρανσφεράσες, τις υδρολάσες, τις λυάσες, τις ισομεράσες και τις λιγάσες. Τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται κατά κύριο λόγο στην ανάπτυξη αμπερομετρικών βιοαισθητήρων είναι οι οξειδοοδουκτάσες [42]. Πρόκειται για την κατηγορία ενζύμων που καταλύουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων για την οξείδωση ή την αναγωγή ομάδων του υποστρώματος όπως: αλκοολομάδες ($>CH-OH$), αλκένια ($>C=CH-$), αλδεΐδες ή κετόνες ($>C=O$), αμίνες ($>CH-NH_x$) κλπ. Οι οξειδοοδουκτάσες μπορούν να χωριστούν σε τρία κύρια είδη:

- **Αφυδρογονάσες.** Μεταφέρουν υδρογόνο από το υπόστρωμα σε ένα δέκτη διαφορετικό του μοριακού οξυγόνου. Μπορούν να διαχωριστούν σε δύο υποκατηγορίες ανάλογα με το αν ο συμπαράγοντας που χρησιμοποιούν είναι

δεσμευμένος στο ένζυμο (οπότε ονομάζεται *προσθετική ομάδα*) ή όχι. Οι κυριότεροι συμπαράγοντες είναι το φλάβινο-αδενινο-νουκλεοτίδιο (FMN), φλάβινο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (FAD), πυρρολο-κινολινο-δινουκλεοτίδιο (PQQ), νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (NAD^+) και το φωσφορικό νικοτιναμιδο-αδενινο-δινουκλεοτίδιο (NADP^+). Οι δομές των σημαντικότερων από τους παραπάνω συμπαράγοντες παρουσιάζονται στο σχήμα 5.



FMN / FAD

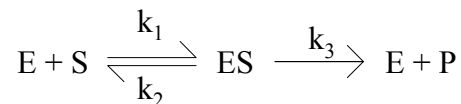
NAD⁺

Σχήμα 5. Δομή των οξειδωμένων μορφών των κυριότερων συμπαράγοντων.

- **Οξειδάσες.** Μεταφέρουν υδρογόνο από το υπόστρωμα στο μοριακό οξυγόνο. Έχουν ισχυρά συνδεδεμένους τους συμπαράγοντες μέσα στην ενζυμική δομή. Μπορούν να διαχωριστούν στις οξειδάσες που παράγουν υπεροξείδιο (μεταφορά $2\text{H}^+ + 2\text{e}^-$) ή που παράγουν νερό (μεταφορά $4\text{H}^+ + 4\text{e}^-$).
- **Υπεροξειδάσες.** Μεταφέρουν υδρογόνο σε υπεροξείδια (H_2O_2 , οργανικά υπεροξείδια). Συνήθως περιέχουν πρωτοπορφυρίνη IX ως προσθετική ομάδα.

3.1.2 Κινητική των ενζυμικών αντιδράσεων

Η κινητική δράση των περισσότερων ενζύμων μπορεί να περιγραφεί από το μοντέλο που προτάθηκε από τους Leonor Michaelis και Maud Menten, γνωστό ως μοντέλο Michaelis-Menten [43,44]. Σύμφωνα με αυτό μία ενζυμική κατάλυση μπορεί να περιγραφεί από την ακόλουθη εξίσωση:



Το ένζυμο (E) αντιδρά με το υπόστρωμα (S) για να σχηματίσει ένα σύμπλοκο (ES) με κινητική σταθερά k_1 . Στη συνέχεια είτε θα διασπαστεί ξανά σε E και S (με σταθερά αντίδρασης k_2) είτε θα σχηματιστεί το προϊόν P (με σταθερά αντίδρασης k_3). Ορίζοντας ως σταθερά Michaelis (K_M) το λόγο $(k_2 + k_3)/k_1$, και θεωρώντας ότι μέγιστη ταχύτητα κατάλυσης (V_{max}) επιτυγχάνεται όταν τα ενεργά κέντρα όλων των ενζύμων είναι κορεσμένα με υπόστρωμα, τότε η ταχύτητα κατάλυσης (V) δίνεται από την σχέση:

$$V = V_{max} \frac{[S]}{[S] + K_M} \quad (1)$$

Η φυσική σημασία της K_M (που έχει μονάδες συγκέντρωσης) είναι η συγκέντρωση του υποστρώματος για την οποία τα μισά από τα ενεργά κέντρα των ενζύμων έχουν καταληφθεί από μόρια του υποστρώματος. Υψηλή τιμή της K_M υποδηλώνει ασθενή πρόσδεση, ενώ αντίστοιχα χαμηλή τιμή της K_M δείχνει ισχυρή πρόσδεση του υποστρώματος στο ένζυμο.

Η ακινητοποίηση των ενζύμων για την κατασκευή των βιοαισθητήρων επιφέρει αλλαγές στην καταλυτική δράση τους [7,19]. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην επίδραση που έχει το μικροπεριβάλλον τους στο ενζυμικό στρώμα, στην πολικότητα του μέσου, στην ικανότητα πρόσβασης των υποστρωμάτων, στην ιονική ισχύ του μέσου, στον προσανατολισμό των ενζύμων, ακόμα και στην μερική απενεργοποίησή τους κατά τη διαδικασία ακινητοποίησης. Αυτές οι αλλαγές επηρεάζουν και την τιμή της K_M , γι' αυτό το λόγο στα ηλεκτρόδια χρησιμοποιείται η φαινομενική K_M (K_M^{app}). Ταυτόχρονα επειδή η ταχύτητα της κατάλυσης είναι ανάλογη του ρεύματος που καταγράφεται ισχύει η σχέση:

$$i = i_{\max} \frac{[C]}{[C] + K_M^{\text{app}}} \quad (2)$$

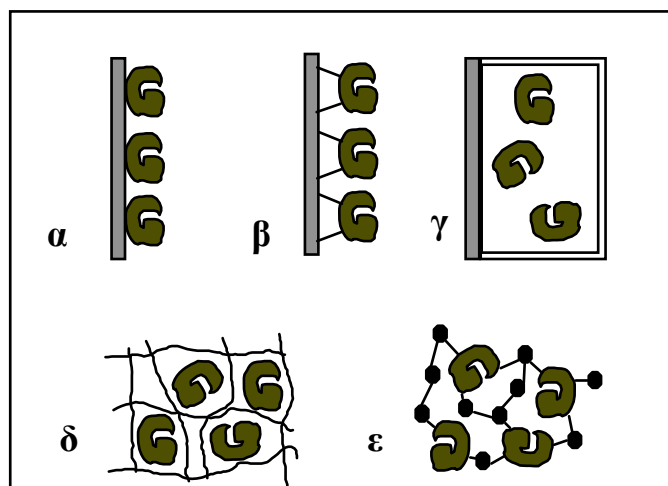
Όπου i_{\max} είναι το μέγιστο ρεύμα. Από την παραπάνω σχέση δίνεται η δυνατότητα να υπολογιστούν οι αλλαγές στην K_M που επιφέρει στο ένζυμο η διαδικασία και το μέσο ακινητοποίησης. Επίσης από την παραπάνω σχέση συμπεραίνεται ότι η τιμή της K_M^{app} καθορίζει το γραμμικό εύρος της απόκριση του βιοαισθητήρα. Για συγκεντρώσεις μικρότερες από $0,1 \times K_M^{\text{app}}$ η σχέση 2 μπορεί να απλοποιηθεί σε

$$i = i_{\max} \frac{[C]}{K_M^{\text{app}}} \quad (3)$$

άρα για αυτές τις συγκεντρώσεις η απόκριση του βιοαισθητήρα είναι γραμμική και ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης του αναλύτη στο δείγμα.

3.1.3 Μέθοδοι ακινητοποίησης

Η μέθοδος της ακινητοποίησης του ενζύμου επηρεάζει σημαντικά την σταθερότητά του. Αυτό έχει άμεση επίδραση στα χαρακτηριστικά λειτουργίας του βιοαισθητήρα και κυρίως τη σταθερότητα του (storage, operational stability). Η ακινητοποίηση πρέπει να γίνεται με τέτοιο τρόπο ώστε τα ένζυμα να διατηρούν την ενεργότητα αλλά και την επιλεκτικότητά τους. Οι κυριότερες μέθοδοι ακινητοποίησης (σχήμα 6) περιγράφονται εν συντομία παρακάτω [11,19,45].



Σχήμα 6. Μέθοδοι ακινητοποίησης ενζύμων. α) Φυσική προσρόφηση, β) ομοιοπολική δέσμευση, γ) φυσική παγίδευση από ημιπερατή μεμβράνη, δ) φυσική παγίδευση εντός πολυμερικού πλέγματος και ε) διαμοριακή σύνδεση.

- **Φυσική προσρόφηση.** Η απλούστερη μέθοδος ακινητοποίησης είναι η φυσική προσρόφηση του ενζύμου. Αυτή μπορεί να επιτευχθεί είτε σε ένα βοηθητικό υλικό (υλικό στήριξης) είτε απευθείας στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Οι δεσμοί που αναπτύσσονται μεταξύ του υλικού στήριξης και του ενζύμου είναι μη-ομοιοπολικής φύσεως (ιονικές αλληλεπιδράσεις, υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, δεσμοί Van der Waals, δεσμοί υδρογόνου). Τα κυριότερα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι το χαμηλό κόστος, η απλή διαδικασία και η δυνατότητα αναγέννησης των ενζύμων. Καθόσον δε χρησιμοποιούνται χημικές αντιδράσεις για την ακινητοποίηση δεν αναμένεται η απενεργοποίηση του ενζύμου κατά την προσρόφηση. Το κυριότερο μειονέκτημα της μεθόδου, είναι ότι λόγω των ασθενών δεσμών που αναπτύσσονται μεταξύ του ενζύμου και του υλικού στήριξης, είναι πιθανή η διαφυγή του ενζύμου από το ενζυμικό στρώμα προς το διάλυμα.
- **Ομοιοπολική δέσμευση.** Η ακινητοποίηση ενζύμων στο βοηθητικό υλικό μέσω της ομοιοπολικής δέσμευσης οδηγεί σε πολύ σταθερή ακινητοποίηση του ενζύμου στο ενζυμικό στρώμα. Οι δεσμοί σχηματίζονται μεταξύ δραστικών ομάδων (καρβοξυλομάδες, αμινομάδες) της επιφάνειας του υλικού και αντίστοιχων δραστικών ομάδων καταλοίπων αμινοξέων (αμινομάδες λυσίνης ή αργινίνης, καρβοξυλομάδες ασπαρτικού ή γλουταμικού, υδροξυλομάδες σερίνης ή θρεονίνης ή σουλφιδικές ομάδες καταλοίπων κυστεΐνης) της εξωτερικής επιφάνειας του ενζύμου [46]. Η ομοιοπολική δέσμευση πρέπει να γίνεται μέσω αμινοξέων που δε βρίσκονται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και που η δέσμευσή τους δε θα επιφέρει αλλοστερικές μετατροπές στο ενεργό κέντρο. Ταυτόχρονα οι αντιδράσεις πρέπει να γίνονται κάτω από ήπιες συνθήκες (χαμηλές θερμοκρασίες, χαμηλή ιονική ισχύ, φυσιολογικό pH) για να αποφεύγεται η απενεργοποίηση του ενζύμου.
- **Φυσική παγίδευση.** Η ακινητοποίηση του ενζύμου με φυσική παγίδευση από ημιπερατή μεμβράνη επιτρέπει στα μόρια του ενζύμου να κινούνται ελεύθερα στο διάλυμα του ενζυμικού στρώματος. Το αποτέλεσμα αυτής της ελευθερίας είναι η διατήρηση της ενεργότητάς τους και όλων των χαρακτηριστικών τους. Οι

μεμβράνες που χρησιμοποιούνται έχουν την ιδιότητα να εμποδίζουν τη διέλευση των μεγάλων μορίων ενώ ταυτόχρονα επιτρέπουν την διέλευση των μικρών. Κατασκευάζονται κυρίως από νάιλον, οξική κυτταρίνη, πολυανθρακικές ή πολυτετραφθοροεθυλένιο (Teflon).

- **Παγίδευση των ενζύμων εντός πολυμερικού πλέγματος.** Η παγίδευση των ενζύμων μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση μονομερών που πολυμερίζονται είτε χημικά είτε ηλεκτροχημικά. Για την ακινητοποίηση του ενζύμου, ο πολυμερισμός γίνεται σε διάλυμα των μονομερών παρουσία του ενζύμου, ώστε το ένζυμο να εγκλωβίζεται εντός του πολυμερικού πλέγματος που σχηματίζεται. Μονομερή που πολυμερίζονται χημικά είναι: το ακρυλαμίδιο ή μέθυλ-ακρυλικό, η πολυβινυλαλκοόλη, διάφορα σιλοξάνια (κατασκευή sol-gel), ακόμα και ίνες μεταξιού [47-50]. Μονομερή που πολυμερίζονται ηλεκτροχημικά είναι κυρίως το πυρρόλιο και διάφορα παράγωγά του, ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί και μονομερή όπως ακετυλένιο, θειοφαίνιο, τυραμίνη, ανιλίνη και διάφορες φαινόλες [50-54]. Πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η χρήση ήπιων συνθηκών για την ακινητοποίηση. Ταυτόχρονα ο ηλεκτροπολυμερισμός δίνει τη δυνατότητα ελεγχόμενης ακινητοποίησης σε μικρές επιφάνειες (μικροηλεκτρόδια). Μειονέκτημα της μεθόδου είναι η χαμηλή σταθερότητα των πολυμερικών πλεγμάτων [55], αλλά και ο περιορισμός της διάχυσης του υποστρώματος μέσα στο ενζυμικό στρώμα που οδηγεί στην κατασκευή βιοαισθητήρων με χαμηλές ευαισθησίες.
- **Διαμοριακή σύνδεση.** Η ακινητοποίηση ενζύμων μέσω διαμοριακής σύνδεσης συντελεί στην παρασκευή ενζυμικών στρωμάτων που περιέχουν μεγάλη ποσότητα ενζύμου. Για την επίτευξη της ακινητοποίησης, τα ένζυμα αντιδρούν με γλουτεραλδεϋδη παρουσία ή απουσία αδρανών πρωτεϊνών όπως η BSA (Bovine Serum Albumin) [56-58]. Το αποτέλεσμα είναι ο σχηματισμός ενός πολυμερικού πλέγματος όπου το ένζυμο αποτελεί δομική μονάδα. Ωστόσο η διαμοριακή σύνδεση μπορεί να οδηγήσει σε μεγάλη απώλεια της ενεργότητας του ενζύμου (~95% της αρχικής ενεργότητας [59]) καθώς και στην συσσωμάτωση ή καθίζηση του ενζύμου.

Στην επιλογή της διαδικασίας ακινητοποίησης που θα χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή ενός βιοαισθητήρα σημαντικό ρόλο παίζουν οι ιδιότητες του κάθε ενζύμου, οι ιδιότητες του ηλεκτροδίου εργασίας, αλλά και οι διαφορετικές κατά

περίσταση ιδιότητες που ο υπό κατασκευή βιοαισθητήρας πρέπει να έχει. Ταυτόχρονα σε πολλές περιπτώσεις γίνεται συνδυασμός τεχνικών για την επίτευξη καλύτερων αποτελεσμάτων.

3.2 Μεμβράνες

Οι μεμβράνες μπορούν χρησιμοποιηθούν στους βιοαισθητήρες σε δύο διαφορετικές θέσεις (σχήμα 4), στη διεπιφάνεια του ενζυμικού στρώματος με το δείγμα (εξωτερική μεμβράνη) και στη διεπιφάνεια του ενζυμικού στρώματος με το ηλεκτρόδιο (εσωτερική μεμβράνη).

Η εσωτερική μεμβράνη χρησιμοποιείται κυρίως για την αύξηση της επιλεκτικότητας του βιοαισθητήρα και την αποφυγή παρεμποδίσεων από μικρά μόρια στη μέτρηση (όπως ασκορβικό, ουρικό, κλπ) που μπορούν να διαπεράσουν το ενζυμικό στρώμα και να οξειδωθούν στο ηλεκτρόδιο εργασίας. Η εσωτερική μεμβράνη είναι συνήθως αρνητικά φορτισμένη για να απωθεί και να εμποδίζει την πρόσβαση των παραπάνω μορίων στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

Η εξωτερική μεμβράνη χρησιμοποιείται για την αύξηση της σταθερότητας, τη βελτιστοποίηση της επιλεκτικότητας, αλλά και την αύξηση του γραμμικού εύρους απόκρισης του βιοαισθητήρα [60,61]. Μερικοί λόγοι που συντελούν στην αύξηση της σταθερότητας του βιοαισθητήρα με τη χρήση εξωτερικής μεμβράνης είναι ότι:

- α) εμποδίζει την εκρόφιση ενζύμου από το ενζυμικό στρώμα προς το διάλυμα
- β) εμποδίζει τη διέλευση μεγάλων μορίων από το δείγμα προς το ενζυμικό διάλυμα, με αποτέλεσμα να αποφεύγεται η προσρόφηση τους σε αυτό
- γ) βοηθάει στην αύξηση της βίο-συμβατότητας (bio-compatibility) του βιοαισθητήρα, παράγοντας σημαντικό για ενδοσωματικές μετρήσεις.

Η επίδραση της εξωτερικής μεμβράνης στο γραμμικό εύρος οφείλεται στη δράση της ως διαχυτικό φράγμα για τον αναλύτη. Έχει υπολογιστεί [62] ότι μείωση κατά μισή τάξη μεγέθους του συντελεστή διάχυσης του αναλύτη στο ενζυμικό διάλυμα, αυξάνει την τιμή της K_M^{app} κατά 50%, επιφέροντας την ανάλογη αύξηση στο γραμμικό εύρος. Ταυτόχρονα όμως επειδή η ευαισθησία του βιοαισθητήρα είναι ίση με i_{max}/K_M^{app} (σχέση 3), η αύξηση της τιμής της K_M^{app} οδηγεί σε δραστική μείωση της ευαισθησίας. Τέλος, η εξωτερική μεμβράνη μπορεί να βελτιώσει την επιλεκτικότητα του βιοαισθητήρα εμποδίζοντας την πρόσβαση των ηλεκτροενεργών ουσιών στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

Στον πίνακα 2 παρατίθενται οι κυριότεροι τύποι μεμβρανών που χρησιμοποιούνται στην κατασκευή βιοαισθητήρων.

Πίνακας 2. Τύποι μεμβρανών που χρησιμοποιούνται στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων.

Τύπος	Ιδιότητες-Παρατηρήσεις
Οξική κυτταρίνη	Αποκλεισμός βάση μεγέθους, φορτίου
Nafion	Αρνητικά φορτισμένα
Πολυουρεθάνιο	Βίο-συμβατή, διαχυτικό φράγμα
Πολυπυρρόλιο	Ηλεκτροχημικός σχηματισμός, έλεγχος της ποροσιμότητας
Πολυβινυλπυριδίνη	Θετικά φορτισμένα
Πολυανθρακικές	Ελεγχόμενο μέγεθος πόρων
Πολυβίνυλο-χλωρίδιο (PVC)	Αποκλεισμός βάση μεγέθους, διαχυτικό φράγμα

3.3 Είδη Ηλεκτροδίων Εργασίας

Τα ηλεκτρόδια εργασίας χωρίζονται σε τρεις κύριες κατηγορίες: α) τα μεταλλικά ηλεκτρόδια, β) τα ηλεκτρόδια από αγώγιμα οργανικά άλατα και γ) τα ανθρακικά ηλεκτρόδια. Τα τελευταία κατατάσσονται σε επιμέρους κατηγορίες ανάλογα με τη δομή του άνθρακα από τον οποίο αποτελούνται [63-65]. Έτσι διαχωρίζονται στα ηλεκτρόδια υαλώδη άνθρακα, γραφίτη, ιών άνθρακα, και πάστας άνθρακα.

Σημαντική παράμετρος στην επιλογή του τύπου του ηλεκτροδίου που θα χρησιμοποιηθεί, είναι το εύρος των δυναμικών στο οποίο μπορεί να λειτουργήσει (πίνακας 3). Το εύρος εξαρτάται από τα δυναμικά στα οποία ο διαλύτης ή ακόμα και το ίδιο το υλικό του ηλεκτροδίου οξειδώνεται ή ανάγεται. Τα όρια μπορεί να διαφέρουν ανάλογα με το pH, την πολικότητα του διαλύτη και το είδος του βοηθητικού ηλεκτρολύτη.

Πίνακας 3. Εύρος δυναμικών που μπορούν να χρησιμοποιηθούν οι διάφοροι τύποι ηλεκτροδίων (Volts συναρτήσεως SCE) [7,64].

Τύπος	Ανοδικό όριο	Καθοδικό όριο
Pt	1,3 έως 0,8	0 έως -0,8

Au	1,5	0
Αγώγιμα άλατα	0,3	-0,2
Γραφίτης	1,8 έως 1,0	-0,4 έως -1,4
Υαλώδης άνθρακας	1,3 έως 1,1	-0,8
Πάστα άνθρακα	1,7 έως 1,0	-0,9 έως -1,2

- **Μεταλλικά ηλεκτρόδια.** Τα μεταλλικά ηλεκτρόδια αποτελούνται συνήθως από ένα αδρανές μέταλλο (πλατίνα ή χρυσός). Σημαντικό μειονέκτημα και των δύο ειδών ηλεκτροδίων είναι το μεγάλο υπερδυναμικό για την οξειδωση του H₂O₂.

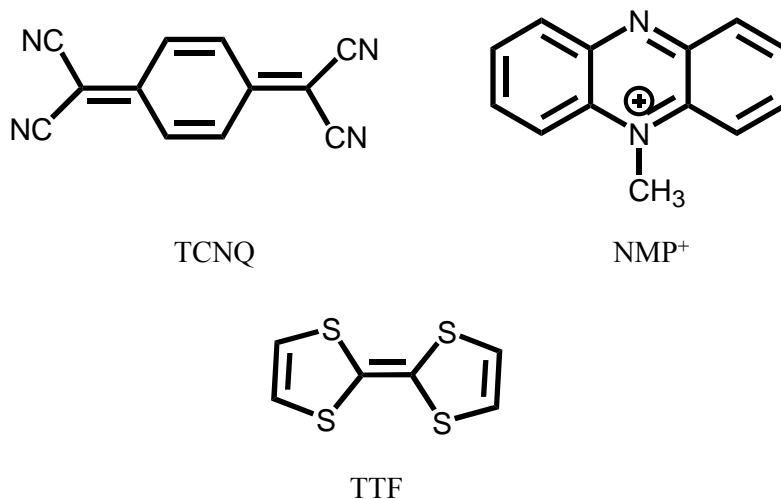
Η ιδιότητα που έχει η πλατίνα για μη-εξειδικευμένη προσρόφηση, κυρίως πρωτεϊνών, συντελεί στο δηλητηριασμό της επιφάνειας του ηλεκτροδίου όταν χρησιμοποιείται σε βιολογικά δείγματα. Για το λόγο αυτό η χρήση μεμβρανών είναι απαραίτητη για να εμποδίζουν την επαφή της επιφάνειας του ηλεκτροδίου με το δείγμα.

Τα ηλεκτρόδια χρυσού έχουν την ικανότητα να προσροφούν μόρια που περιέχουν ομάδες θείου (R-SH, R-S-S-R). Αυτή η ιδιαιτερότητα έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στην τροποποίηση της επιφάνειας των ηλεκτροδίων χρυσού με αυτό-διατασσόμενες (self-assembled) μονοστοιβάδες [66,67]. Η εφαρμογή των μονοστοιβάδων δίνει τη δυνατότητα για ελεγχόμενη κατασκευή πολύπλοκων διατάξεων, αφού η οργανική ομάδα της θειόλης μπορεί να έχει τροποποιηθεί κατάλληλα ώστε να αποτελεί τη βάση για τη δέσμευση του ενζύμου, του μεταφορέα ηλεκτρονίων ή ακόμα να έχει το ίδιο την ικανότητα να μεταφέρει ηλεκτρόνια από το ένζυμο προς το ηλεκτρόδιο.

- **Αγώγιμα οργανικά άλατα.** Η χρήση αγώγιμων οργανικών αλάτων ως ηλεκτρόδιο εργασίας έχει εφαρμοστεί με επιτυχία στην κατασκευή βιοαισθητήρων. Αυτού του είδους τα ηλεκτρόδια κατασκευάζονται με ταυτόχρονη χρήση ενός οργανικού δότη ηλεκτρονίων (πχ τετραθειοφουλβαλένιο, TTF) και ενός δέκτη (πχ τετρακυανοκινονοδιμεθάνιο, TCNQ) που σχηματίζουν ένα αδιάλυτο στο νερό οργανικό αλάτι, το οποίο συμπιέζεται για το σχηματισμό του συμπαγούς σώματος του ηλεκτροδίου [68-70].

Η μεγάλη αγωγιμότητα του ηλεκτροδίου οφείλεται στα π-ηλεκτρόνια που σχηματίζουν ένα πυκνό ηλεκτρονιακό νέφος πάνω και κάτω από την επίπεδη

δομή των μορίων. Τα μόρια πρέπει να διατηρούν την αρωματικότητα τους όταν λαμβάνουν ή δίνουν ένα ηλεκτρόνιο, για να διατηρείται η αγωγιμότητα του ηλεκτροδίου.



Σχήμα 7 Δομή των κυριότερων μορίων που έχουν χρησιμοποιηθεί στην κατασκευή ηλεκτροδίων. TCNQ: τετρακυανοκινονοδιμεθάνιο, NMP⁺: N-μέθυλο φαιναζόνιο, TTF: τετραθειοφουλβαλένιο.

Όπως φαίνεται και στον πίνακα 3, τα ηλεκτρόδια που κατασκευάζονται από αγώγιμα οργανικά άλατα χρησιμοποιούνται σε μικρό εύρος δυναμικών. Παρόλα αυτά η χρήση τους είναι διαδεδομένη επειδή είναι πολύ σταθερά, αλλά και επειδή έχουν την ικανότητα να προσροφούν φλαβοπρωτεΐνες και να ανταλλάζουν ηλεκτρόνια με το ενεργό κέντρο του ενζύμου χωρίς τη χρήση ενδιάμεσων μεταφορέων ηλεκτρονίων.

Τα ανθρακικά υλικά χρησιμοποιούνται ευρέως στην κατασκευή ηλεκτροδίων για δύο σημαντικούς λόγους. Πρώτον είναι διαθέσιμα σε διάφορες μορφές και συνήθως είναι φθηνά υλικά. Δεύτερον μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μεγάλο εύρος δυναμικών (πίνακας 3). Επίσης έχουν καλή ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα, υψηλή καθαρότητα, αλλά και δυνατότητα ρύθμισης των ηλεκτροχημικών ιδιοτήτων τους. Οι φυσικοχημικές και ηλεκτροχημικές τους ιδιότητες έχουν εξεταστεί εκτεταμένα [62-64].

- **Υαλώδης άνθρακας.** Τα ηλεκτρόδια από υαλώδη άνθρακα χρησιμοποιούνται ευρέως στην κατασκευή βιοαισθητήρων. Ο υαλώδης άνθρακας είναι σκληρός, αδιαπέραστος από αέρια, αδιάλυτος στο νερό και στους οργανικούς διαλύτες, ανθεκτικός στις μεγάλες θερμοκρασίες και χημικά αδρανής. Τα κυριότερα μειονεκτήματά του είναι η σκληρότητά του, που δυσκολεύει την κατεργασία του και το κόστος του.
- **Γραφίτης.** Στα ηλεκτρόδια από γραφίτη, η μικροκρυσταλλική δομή ποικίλει από τυχαία κατανεμημένη έως πλήρως δομημένη. Η βασική δομική τους μονάδα είναι ο εξαγωνικός ανθρακικός κρύσταλλος και τα επίπεδα του άνθρακα είναι χαλαρά

συνδεδεμένα μεταξύ τους με δυνάμεις Van der Waals. Η κατασκευή αμπερομετρικών βιοαισθητήρων από γραφίτη είναι ευρέως διαδεδομένη, λόγω κυρίως της ευκολίας κατεργασίας του γραφίτη. Σημαντικό πλεονέκτημα είναι το γεγονός ότι η επιφάνεια των ηλεκτροδίων μπορεί να προκατεργαστεί με διάφορους τρόπους (θερμικά, ηλεκτροχημικά, μηχανικά, κτλ) ώστε να αποκτήσει τις επιθυμητές ιδιότητες.

- **Ίνες άνθρακα.** Η χρήση ινών άνθρακα, ως ηλεκτρόδιο εργασίας, επέτρεψε την κατασκευή ενζυμικών μικροηλεκτροδίων. Τα πλεονεκτήματα από τη χρήση μικροηλεκτροδίων στην ηλεκτροχημεία έχουν προσφάτως ανασκοπηθεί [71], και συνίστανται στη γρήγορη σταθεροποίηση του ρεύματος, την μικρή ωμική αντίσταση, τη δυνατότητα χρήσης τους σε μεγάλη ποικιλία διαλυτών, αλλά και την δυνατότητα για in-vivo μετρήσεις. Το κύριο μειονέκτημα που παρουσιάζουν οι ίνες άνθρακα όταν χρησιμοποιούνται για την κατασκευή βιοαισθητήρων, είναι το υψηλό ρεύμα υποβάθρου που οδηγεί σε υψηλότερο όριο ανίχνευσης.
- **Πάστα άνθρακα.** Η χρήση πάστας άνθρακα ως υλικό για την κατασκευή ενζυμικών ηλεκτροδίων είναι ευρέως διαδεδομένη [14]. Οι βιοαισθητήρες πάστας άνθρακα αποτελούνται από την σκόνη του άνθρακα, ένα οργανικό υγρό, τα απαραίτητα ένζυμα και αν χρειάζεται τον μεταφορέα ηλεκτρονίων. Το οργανικό υγρό χρησιμοποιείται για να γεμίζει τα κενά μεταξύ των σωματιδίων του άνθρακα, αλλά ταυτόχρονα απομονώνει τον άνθρακα από το υδατικό διάλυμα, ενώ δρα και ως το μέσο για την ακινητοποίηση των υπόλοιπων συστατικών της πάστας. Η διαδεδομένη χρήση των βιοαισθητήρων πάστας άνθρακα οφείλεται στην πολύ εύκολη διαδικασία κατασκευής τους (με απλή ανάμειξη όλων των υλικών), στην ευκολία ανανέωσης της επιφάνειας του ηλεκτροδίου αλλά και στο μικρό ρεύμα υποβάθρου που παρουσιάζουν σε σχέση με τα μεταλλικά ηλεκτρόδια. Οι βιοαισθητήρες πάστας άνθρακα όμως παρουσιάζουν τρία σοβαρά προβλήματα: την κακή αναπαραγωγιμότητα του σήματος, την χαμηλή αναπαραγώγιμη κατασκευή, και το μικρό χρόνο ζωής. Το πρόβλημα της αναπαραγωγιμότητας οφείλεται, κατά κύριο λόγο, στην ανομοιογένεια της πάστας. Έχει αποδειχτεί πειραματικά ότι μικρή αλλαγή στον γραμμομοριακό λόγο του οργανικού υγρού ως προς τον άνθρακα, αλλάζει δραστικά την ηλεκτροχημική συμπεριφορά του ηλεκτροδίου [72-74]. Ο μικρός χρόνος ζωής μπορεί να αποδοθεί στη διαφυγή του ενζύμου ή / και του μεταφορέα ηλεκτρονίων προς το

υδατικό διάλυμα, καθώς επίσης και στην πιθανή απενεργοποίηση του ενζύμου εξαιτίας της αλλαγής της τριτοταγούς δομής του στο περιβάλλον της πάστας [75].

Τα τελευταία χρόνια αναπτύσσονται νέα υλικά για την κατασκευή ηλεκτροδίων. Συνήθως αποτελούνται από συνδυασμό δύο ή περισσότερων διαφορετικών υλικών. Η διάχυση σωματιδίων μετάλλου (ρουθενίου [76,77] ή κράμα ρουθενίου-πλατίνας [78]) στην πάστα άνθρακα αλλάζει σημαντικά την επιλεκτικότητα του ηλεκτροδίου, αυξάνοντας την απόκριση στο H_2O_2 και ταυτόχρονα μειώνοντας την απόκριση παρεμποδιζόντων ουσιών όπως το ασκορβικό ή το ουρικό. Αύξηση της επιλεκτικότητας επιτεύχθηκε και κατά την ηλεκτροχημική επιμετάλλωση της επιφάνειας ηλεκτροδίων υαλώδους άνθρακα με μίγμα ροδίου-ρουθενίου [79].

Η ανάπτυξη της τεχνολογίας κατασκευής ηλεκτροδίων λεπτής ταινίας (thin film electrode) βρήκε εφαρμογή και στην κατασκευή βιοαισθητήρων [7,11,64]. Κυριότερα πλεονεκτήματα είναι η δυνατότητα κατασκευής μικροηλεκτροδίων αλλά και συστημάτων για την ταυτόχρονη παρακολούθηση πολλών ουσιών [80]. Η εκτύπωση μάσκας (screen printing) είναι η πλέον συνηθισμένη μέθοδος κατασκευής που χρησιμοποιείται, αφού παρέχει τη δυνατότητα για μαζική κατασκευή με ικανοποιητική αναπαραγωγικότητα [81,82]. Για την κατασκευή με αυτή τη μέθοδο χρησιμοποιείται κυρίως μελάνη από άνθρακα, ενώ η βάση πάνω στην οποία γίνεται η εκτύπωση είναι συνήθως πολυεστέρας. Το ένζυμο μπορεί να τοποθετηθεί και αυτό στο μελάνι ή να ακινητοποιηθεί μετά στην επιφάνεια του στρώματος του άνθρακα.

3.4 Μεταφορείς Ηλεκτρονίων

Όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.1.1, τα ένζυμα που χρησιμοποιούνται στους αμπερομετρικούς βιοαισθητήρες είναι κυρίως οξειδοοδουκτάσες (καταλύουν την οξείδωση του υποστρώματος με ταυτόχρονη αναγωγή του ενεργού τους κέντρου). Για τη σωστή καταλυτική δράση του ενζύμου είναι αναγκαία η γρήγορη και αποτελεσματική αναγέννησή του, με την μεταφορά των ηλεκτρονίων από το ενεργό του κέντρο στον συμπαράγοντα. Όπως προαναφέρθηκε οι φυσικοί συμπαράγοντες των ενζύμων, κυρίως το O_2 και το NAD^+ , αφού πάρουν τα ηλεκτρόνια από το ένζυμο (και αναχθούν σε H_2O_2 και $NADH$ αντίστοιχα) τα μεταφέρουν στο ηλεκτρόδιο. Αυτή η διαδικασία δημιουργεί μια ροή ηλεκτρονίων από το ενεργό κέντρο των ενζύμων στο ηλεκτρόδιο που επιτρέπει την παρακολούθηση της ενζυμικής δράσης και κατ' επέκταση την ανίχνευση του αναλύτη. Για να γίνει όμως η μεταφορά των

ηλεκτρονίων από το φυσικό συμπαράγοντα στο ηλεκτρόδιο, απαιτείται η εφαρμογή υψηλών δυναμικών (>+650 mV συναρτήσει αναφορικού Ag/AgCl) στο ηλεκτρόδιο που οδηγεί σε μείωση του χρόνου ζωής του βιοαισθητήρα [83], αλλά και σε υψηλές παρεμποδίσεις από άλλες ηλεκτροενεργές ουσίες. Ταυτόχρονα η μερική πίεση του O₂ της ατμόσφαιρας επηρεάζει το σήμα του ηλεκτροδίου [84].

Για τους παραπάνω λόγους πολύ συχνά οι φυσικοί συμπαράγοντες αντικαθιστούνται από τεχνητούς που ονομάζονται *μεταφορείς ηλεκτρονίων*. Αρχικά είχε υποθεθεί ότι μειώνοντας το δυναμικό που εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας θα αποφεύγονταν η οξειδωση άλλων ουσιών (πχ ασκορβικό οξύ, ουρικό οξύ). Πρόσφατες εργασίες έχουν δείξει ότι η οξειδωση των παρεμποδιζόντων ουσιών μπορεί επίσης να επιτευχθεί μέσω του μεταφορέα ηλεκτρονίων [85,86]. Έτσι η χρήση των μεταφορέων ηλεκτρονίων δε βελτιώνει ουσιαστικά την επιλεκτικότητα του βιοαισθητήρα.

Για να είναι δυνατή η χρήση μιας ένωσης ως μεταφορέα ηλεκτρονίων στην κατασκευή του βιοαισθητήρα, πρέπει αυτή να έχει τις ακόλουθες ιδιότητες:

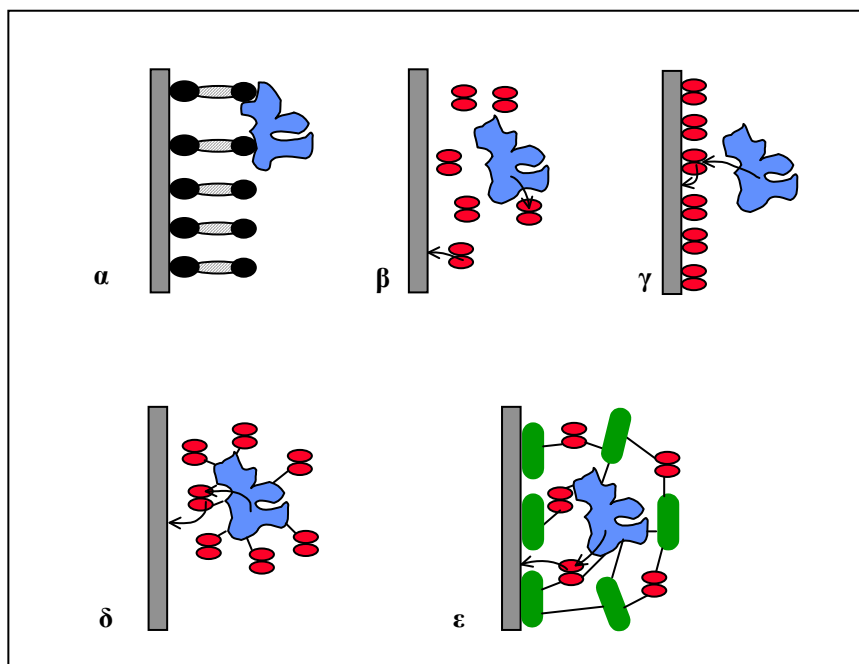
- κανονικό δυναμικό οξειδοαναγωγής κοντά στο δυναμικό οξειδοαναγωγής του ενεργού κέντρου του ενζύμου ώστε να μπορεί να επιτευχθεί η μεταφορά ηλεκτρονίων από το ενεργό κέντρο στον μεταφορέα ηλεκτρονίων
- γρήγορη αντίδραση με το ενεργό κέντρο του ενζύμου για την ταχεία αναγέννηση του ενζύμου
- αντιστρεπτή ηλεκτροχημική συμπεριφορά, ανεξάρτητη του pH
- σταθερότητα τόσο στην οξειδωμένη όσο και στην ανηγμένη μορφή
- απουσία αυτοοξειδοαναγωγής
- μικρή διαλυτότητα στο δείγμα για να αποφεύγεται η απομάκρυνσή της από το ενζυμικό στρώμα.

Οι ενώσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως μεταφορείς ηλεκτρονίων στην κατασκευή βιοαισθητήρων είναι το φερροκένιο και διάφορα παράγωγά του [87-88]. Άλλες ενώσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί ως μεταφορείς ηλεκτρονίων είναι οργανικές ενώσεις και σύμπλοκα οσμίου [7,11,40]. Οι σημαντικότεροι μεταφορείς ηλεκτρονίων καθώς και το δυναμικό οξειδωσης ή αναγωγής τους παρουσιάζονται στον πίνακα 4.

Πίνακας 4. Μεταφορείς ηλεκτρονίων που έχουν χρησιμοποιηθεί στην κατασκευή βιοαισθητήρων.

Ένωση	E^0 (pH 7) V συναρτήσει NHE
$\text{Os}(\text{bpy})_3^{3+/2+}$	0,84
1,1- dicarboxylic acid ferrocene	0,64
Ferrocene	0,44
1,1' - dimethyl ferrocene	0,37
$\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-/4-}$	0,36
1,4-benzoquinone	0,28
2,6-dichloroindophenol	0,22
1,2-naphthoquinone	0,14
Phenazine methosulfate	0,08
Methylene blue	0,01
Phenosafranine	-0,25
Methyl viologen	-0,44

Πρέπει να σημειωθεί ότι τα δυναμικά που παρατίθενται στον πίνακα μπορεί να διαφέρουν σημαντικά ανάλογα με το είδος του ηλεκτροδίου που χρησιμοποιείται, αλλά και το pH του διαλύματος.



Σχήμα 8. Τρόποι χρήσης των μεταφορέων ηλεκτρονίων στους βιοαισθητήρες.
 α) υποβοηθούμενη μεταφορά ηλεκτρονίων, β) προσθήκη στο δείγμα,

γ) προσρόφιση στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, δ) δέσμευση στο ένζυμο, ε) δέσμευση σε πολυμερή. Τα βελάκια δείχνουν την πιθανή ροή ηλεκτρονίων.

Οι μεταφορείς ηλεκτρονίων μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε προστιθέμενοι στο δείγμα είτε ακινητοποιημένοι στο ενζυμικό στρώμα. Οι κυριότεροι τρόποι ακινητοποίησης παρουσιάζονται στο σχήμα 8.

Τα περισσότερα ένζυμα δεν μπορούν να ανταλλάξουν ηλεκτρόνια απευθείας με την επιφάνεια του ηλεκτροδίου (εξαίρεση είναι οι υπεροξειδάσες που έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να ανταλλάξουν ηλεκτρόνια απευθείας με ηλεκτρόδια άνθρακα στα οποία έχουν προσροφηθεί) [89-92]. Η υποβοήθηση της απευθείας ανταλλαγής ηλεκτρονίων μπορεί να επιτευχθεί με την τροποποίηση της επιφάνειας του ηλεκτροδίου. Σημαντικότερο παράδειγμα είναι η κατεργασία της επιφάνειας ηλεκτροδίων χρυσού με 4,4'-bipyridyl που επιτρέπει την αντιστρεπτή ανταλλαγή ηλεκτρονίων με το κυτόχρωμα C [93].

Οι μεταφορείς ηλεκτρονίων πολύ συχνά 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 [94-96] ή με την δέσμευση του σε πολυμερικές αλυσίδες [97-100].

Η χρήση των βιοαισθητήρων που χρησιμοποιούν μεταφορείς ηλεκτρονίων συχνά απαιτεί την απομάκρυνση του O_2 από το διάλυμα, αφού το οξυγόνο δρα ανταγωνιστικά προς τον μεταφορέα [101]. Ωστόσο η απομάκρυνση του οξυγόνου κατά την ανάλυση πραγματικών δειγμάτων δεν είναι εύκολη, ειδικά αν οι μετρήσεις γίνονται *in-vivo* ή *in-situ*. Γι' αυτό το λόγο σημαντική παράμετρος στην αξιολόγηση ενός βιοαισθητήρα που περιέχει μεταφορέα ηλεκτρονίων, είναι η *ανεξαρτησία του από το οξυγόνο*. Θα πρέπει δηλαδή η απόκριση του ηλεκτροδίου να παραμένει σταθερή ανεξάρτητα από το αν περιέχει ή όχι οξυγόνο το διάλυμα.

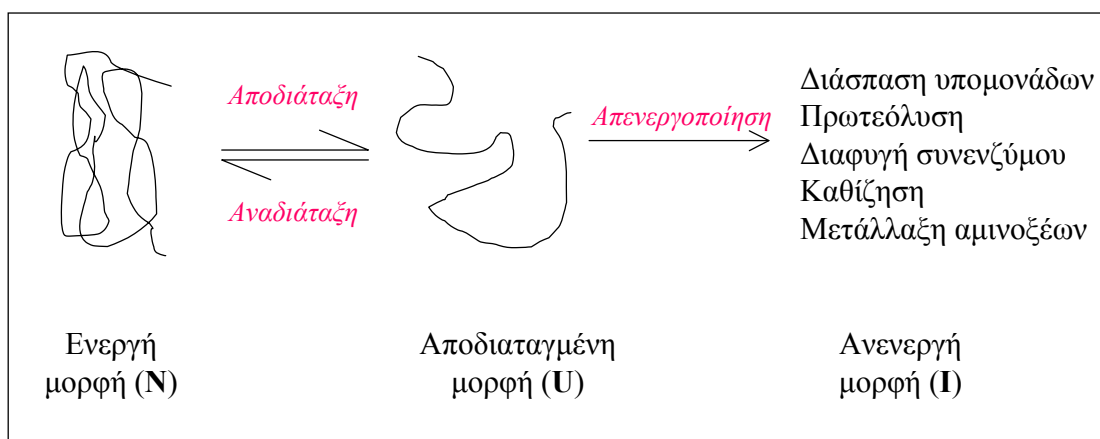
Στο επόμενο κεφάλαιο θα αναλυθεί η σταθερότητα των ενζύμων και θα παρουσιαστούν οι τρόποι σταθεροποίησης των βιοαισθητήρων.

4.ΜΕΘΟΔΟΙ ΣΤΑΘΕΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΕΝΖΥΜΩΝ - ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ

Ο περιορισμένος χρόνος ζωής που παρουσιάζουν οι περισσότεροι βιοαισθητήρες αποτελεί το μεγαλύτερο φράγμα στην εφαρμογή αυτών των οργάνων [6,¹⁰²]. Το βασικότερο αίτιο είναι η αδυναμία διατήρησης της ενεργότητας των ακινητοποιημένων βιολογικών μορίων για μεγάλο χρονικό διάστημα. Σε αυτό συμβάλλει η αστάθεια που παρουσιάζουν τα περισσότερα ένζυμα όταν τοποθετούνται σε ένα περιβάλλον (ενζυμικό στρώμα) που διαφέρει σημαντικά από το φυσικό τους περιβάλλον (κυτταρικές μεμβράνες, μυτταρόπλασμα, κλπ). Η πρόκληση της σταθεροποίησης των ενζύμων που χρησιμοποιούνται στους βιοαισθητήρες έχει θέλξει πολλούς ερευνητές. Ταυτόχρονα η άνθηση της βιοτεχνολογίας τα τελευταία χρόνια παρέχει νέα εργαλεία για την επίτευξη του συγκεκριμένου στόχου. Στη συνέχεια θα παρουσιαστούν οι βασικές αρχές και οι γενικές μέθοδοι σταθεροποίησης ενζύμων, ενώ ακολούθως θα αναφερθούν οι τρόποι εφαρμογής στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων.

4.1 Σταθεροποίηση Ενζύμων

Με τον όρο σταθερότητα ορίζεται η ικανότητα ενός ενζύμου να διατηρεί την καταλυτική του δράση όταν επιδέχεται δυσμενείς εξωτερικές επιδράσεις. Η αποδιάταξη της τεταρτοταγούς δομής ενός ενζύμου (U) (χωροδιάταξη των πολυπεπτιδικών αλυσίδων) είναι το αποτέλεσμα τέτοιων εξωτερικών επιδράσεων και είναι ο βασικός λόγος για τη μείωση της ενεργότητας (σχήμα 9).



Σχήμα 9. Μοριακά γεγονότα που οδηγούν σε απώλεια της ενζυμικής δομής και λειτουργίας.

Ωστόσο αυτή η διαδικασία είναι συνήθως αντιστρεπτή και το ένζυμο μπορεί να επανέλθει στην ενεργή του μορφή (N) εφόσον η πολυπεπτιδική αλυσίδα δεν έχει υποστεί δραστικές χημικές αλλαγές. Αν όμως συμβεί κάποια χημική αλλαγή στην πολυπεπτιδική αλυσίδα τότε το ένζυμο απενεργοποιείται μη αντιστρεπτά (I). Σε αυτά τα δύο ξεχωριστά φαινόμενα οφείλονται οι δύο διαφορετικοί ορισμοί του όρου σταθερότητα, αυτός της *θερμοδυναμικής* (ή *θερμικής*) σταθερότητας και αυτός του *χρόνου ζωής* (long-term stability). Η θερμοδυναμική σταθερότητα περιγράφει την ικανότητα του ενζύμου να αντιστέκεται στην αποδιάταξη της ενεργής του μορφής ($N \leftrightarrow U$). Με τον όρο χρόνος ζωής περιγράφεται η αντίσταση του ενζύμου σε χημικές μεταβολές που θα το απενεργοποιήσουν ($U \rightarrow I$) [103]. Από το σχήμα 9 είναι φανερό ότι η αύξηση της θερμοδυναμικής σταθερότητας ενός ενζύμου θα επιφέρει βελτίωση και στο χρόνο ζωής του.

Η διαδικασία σταθεροποίησης ενός ενζύμου μπορεί να επιτευχθεί μέσω μετάλλαξης, χημικής τροποποίησης, ή χρήσης προσθέτων.

- **Μετάλλαξη.** Η χρήση πρωτεϊνικής μηχανικής για την παραγωγή ενζύμων με επιθυμητές ιδιότητες είναι ευρέως διαδεδομένη [104,105]. Η απομόνωση πιο σταθερών ενζύμων από θερμοφίλους ή εξτρεμόφιλους (extremophilic) οργανισμούς και η ανάλυση των διαφορών που έχουν με τα αντίστοιχα ένζυμα από μεσόφιλους ή ψυχρόφιλους οργανισμούς, παρέχει την δυνατότητα για κατανόηση των δομικών χαρακτηριστικών που αυξάνουν τη σταθερότητα ενός ενζύμου [106,107]. Η αντικατάσταση συγκεκριμένων καταλοίπων στην αλληλουχία των αμινοξέων μπορεί να επιφέρει σημαντική αύξηση στη σταθερότητα του ενζύμου. Αμινοξέα όπως η σερίνη, η θρεονίνη, ή το ασπαρτικό στο άμινο-τελικό άκρο της πρωτεΐνης, η ασπαργινίνη, η γλυκίνη, η ιστιδίνη, ή η λυσίνη στο καρβόξυ-τελικό άκρο αυξάνουν την σταθερότητα του ενζύμου [104]. Παρόμοιες αλλαγές στο εσωτερικό τμήμα των ενζύμων μπορεί να οδηγήσουν σε αύξηση της σταθερότητάς τους.
- **Χημική τροποποίηση.** Κάθε ένα από τα 19 αμινοξέα (εκτός από τη γλυκίνη) έχει μια πλευρική αλυσίδα. Πολλές από αυτές τις αλυσίδες περιέχουν χημικά ενεργές ομάδες όπως αμινομάδες, καρβοξυλομάδες, υδροξυλομάδες και θειόλες. Αυτές μπορούν να αντιδράσουν κάτω από ήπιες συνθήκες με ειδικά αντιδραστήρια και να δώσουν χημικά τροποποιημένες πρωτεΐνες που συχνά είναι πιο σταθερές [59,103,107]. Ο κίνδυνος της απενεργοποίησης του ενζύμου είναι υπαρκτός,

ειδικά αν τα αμινοξέα που θα αντιδράσουν είναι απαραίτητα για την δράση του ενζύμου. Αν όμως η επιλογή των αντιδραστηρίων είναι προσεκτική ο κίνδυνος απενεργοποίησης μπορεί να ελαττωθεί σημαντικά. Σημαντικότερες μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι η χημική μετατροπή υδρόφοβων αμινοξέων της εξωτερικής επιφάνειας του ενζύμου σε υδρόφιλες ομάδες (πχ μετατροπή των τυροσινών σε άμινο-τυροσίνες), η δέσμευση στο ένζυμο υδατανθράκων (είναι γνωστό ότι οι γλυκοπρωτεΐνες είναι σταθερές) και η δέσμευση υδρόφιλων πολυμερών (πχ πολυαιθυλεν-γλυκόλη). Κοινός στόχος όλων των παραπάνω τροποποιήσεων είναι η αύξηση των αλληλεπιδράσεων του ενζύμου με το νερό αυξάνοντας έτσι την ενέργεια που χρειάζεται για την αποδιάταξή του [102].

- **Πρόσθετα.** Η παρουσία του νερού ευνοεί την αποδιάταξη του ενζύμου μετατοπίζοντας την ισορροπία $N \leftrightarrow U$ προς την πλευρά της αποδιαταγμένης μορφής (U) [107]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της πιθανότητας να απενεργοποιηθεί το ένζυμο. Έτσι η τοποθέτηση των ενζύμων σε λιπόφιλα μέσα, όπου είναι μειωμένη η ενεργότητα του νερού, μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της θερμικής σταθερότητας του ενζύμου [108-110]. Ταυτόχρονα όμως η παρουσία του νερού είναι απαραίτητη για τη σωστή καταλυτική δράση του ενζύμου [108]. Η αύξηση της υδροφιλίας του μέσου οδηγεί σε μείωση της σταθερότητας, αλλά σε αύξηση της ενεργότητας [110]. Όταν τα ένζυμα χρησιμοποιούνται σε υδατικά διαλύματα η σταθερότητά τους μπορεί να αυξηθεί από την παρουσία συγκεκριμένων προσθέτων. Τέτοια πρόσθετα είναι πολυαλκοόλες, σάκχαρα, αδρανή πολυμερή όπως η πολυαιθυλεν-γλυκόλη, αλλά και φορτισμένα πολυμερή όπως πολυαιθυλενιμίνη και διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνη. Ο τρόπος με τον οποίο δρουν και αυξάνουν τη σταθερότητα του ενζύμου δεν είναι ακόμα πλήρως κατανοητός. Για τα μικρού μοριακού βάρους αφόρτιστα πρόσθετα (πολυαλκοόλες, σάκχαρα) πιστεύεται ότι αυξάνουν την ενέργεια που χρειάζεται για την ενυδάτωση της αποδιαταγμένης μορφής του ενζύμου. Το αποδιαταγμένο ένζυμο είναι λιγότερο συμπαγές από ότι είναι στην ενεργή του μορφή, με αποτέλεσμα να χρειάζεται περισσότερα μόρια νερού στη σφαίρα επιδιαλύτωσης του. Η παρουσία των προσθέτων (σε υψηλές συγκεντρώσεις της τάξης του 1 M) μειώνει τα διαθέσιμα μόρια νερού οπότε η αποδιάταξη του ενζύμου δεν ευνοείται θερμοδυναμικά [103,111]. Αυτός ο μηχανισμός σταθεροποίησης έχει εντοπιστεί και σε μικροοργανισμούς. Ο θερμοφίλος μικροοργανισμός *Methanothermus*

fervidus περιέχει στα κύτταρα του 1 M K⁺ και 0,3 M κυκλικό 2,3-διφωσφογλυκερικό που αυξάνουν την σταθερότητα των ενζύμων του. Όταν αυξάνεται η θερμοκρασία ο μικροοργανισμός αυξάνει τη συγκέντρωση των παραπάνω μορίων στο εσωτερικό του για να διατηρήσει την ενεργότητα των ενζύμων [103].

Τα φορτισμένα πολυμερή πιστεύεται ότι δρουν με διαφορετικό τρόπο. Αναπτύσσουν ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις με τα φορτισμένα αμινοξέα που υπάρχουν στην επιφάνεια του ενζύμου. Μέσω αυτών των αλληλεπιδράσεων σχηματίζουν μια δομή κλουβιού γύρω από το ένζυμο «κλειδώνοντάς» το στην ενεργή του μορφή [112,113]. Έχει βρεθεί ότι η παρουσία αρκετών πολυκατιόντων ή πολυανιόντων αυξάνει τη σταθερότητα διαφόρων ενζύμων ενώ πολύ συχνά αυξάνει και την ενεργότητά τους [114-116]. Πρόσφατες μελέτες [117], απέδειξαν ότι η πολυαιθυλενιμίνη αυξάνει το χρόνο ζωής του ενζύμου σταθεροποιώντας τη δευτεροταγή δομή του ενζύμου, ενώ παράλληλα αυξάνει και την ενεργότητά του (αυξάνει το V_{max}). Συγχρόνως η πολυαιθυλενιμίνη σταθεροποιεί το ένζυμο με το να προστατεύει τις σουλφουδριλομάδες που βρίσκονται στην επιφάνειά του ενζύμου, εμποδίζοντας την οξειδωσή τους η οποία θα είχε ως αποτέλεσμα την αλλαγή της δομής του ενζύμου και κατ' επέκταση την αποσταθεροποίησή του.

Το 1992 οι T. D. Gibson και J. R. Woodward παρουσίασαν τη σταθεροποίηση 8 διαφορετικών ενζύμων με την χρήση συνδυασμού υδατανθράκων και του κατιονικού πολυμερούς διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη [112,118,119]. Τα ένζυμα ξεραίνονταν παρουσία των προσθέτων και στη συνέχεια εξετάζονταν η θερμική σταθερότητά τους. Η σταθεροποίηση που επέφερε αυτός ο συνδυασμός προσθέτων είναι εντυπωσιακή, όπως για παράδειγμα στην οξειδάση αλκοολών που διατηρεί το 100% της αρχικής ενεργότητας μετά από διάστημα 19 ημερών στους 37⁰C ενώ χωρίς τα πρόσθετα η ενεργότητα της είναι μόλις 20% της αρχικής της. Αργότερα παρουσιάστηκε η σταθεροποίηση που επιφέρει αυτός ο συνδυασμός σε ένζυμα που έχουν ακινητοποιηθεί σε πορώδης σφαίρες γυαλιού [120], καθώς και η αντικατάσταση της διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνης με ένα άλλο κατιονικό πολυμερές το Gafquat 755N (συμπολυμερές vinyl pyrrolidone και methyl methacrylate) [121].

Η χρήση αυτών των τεχνικών της σταθεροποίησης ενζύμων στη σταθεροποίηση των βιοαισθητήρων εξετάζεται στην επόμενη ενότητα.

4.2 Σταθεροποίηση Βιοαισθητήρων

Ο χρόνος ζωής ενός βιοαισθητήρα εξαρτάται κυρίως από τη σταθερότητα του ενζύμου που χρησιμοποιείται. Μπορεί να κυμαίνεται από μερικές μετρήσεις έως αρκετούς μήνες ανάλογα με την σταθερότητα του ενζύμου, τη μέθοδο ακινητοποίησης του ενζύμου, τη μέθοδο κατασκευής (χρήση μεμβρανών, μεταφορέων ηλεκτρονίων) και τον τρόπο λειτουργίας και αποθήκευσης του βιοαισθητήρα. Κάθε μία από τις παραπάνω παραμέτρους πρέπει να βελτιστοποιείται για την επίτευξη του καλύτερου δυνατού αποτελέσματος. Η συγκεκριμένη παράγραφος θα επικεντρωθεί στις τεχνικές σταθεροποίησης των ενζύμων (μετάλλαξη, χημική τροποποίηση, χρήση προσθέτων) που έχουν εφαρμοστεί κατά καιρούς στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων.

Η χρήση μεταλλαγμένων ενζύμων δεν είναι ακόμα διαδεδομένη στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Μοναδική αναφορά είναι η χρήση μεταλλαγμένης *οξειδάσης του γαλακτικού* για την κατασκευή βιοαισθητήρα γαλακτικού από τους H. Minagawa et al [122]. Χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικοί τύποι μεταλλαγμένων ενζύμων και οι βιοαισθητήρες που κατασκευάστηκαν συγκρίθηκαν με αυτό που είχε το φυσικό ένζυμο. Η χρήση του μεταλλαγμένου ενζύμου είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του χρόνου ζωής κατά 50%, αλλά και την αύξηση του γραμμικού εύρους. Ωστόσο παρατηρήθηκε μείωση της ευαισθησίας του βιοαισθητήρα.

Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί η χρήση χημικά τροποποιημένων ενζύμων με πολυαιθυλεν-γλυκόλη. Δύο διαφορετικά ένζυμα η *οξειδάση της γλυκόζης* [123,124] και η *οξειδάση της χολίνης* [125] έχουν τροποποιηθεί με πολυαιθυλεν-γλυκόλη και έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Στην περίπτωση της *οξειδάσης της γλυκόζης* αναφέρθηκε ότι η τροποποίηση με την πολυαιθυλεν-γλυκόλη επέτρεψε την απευθείας οξείδωση του ενζύμου από το ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα χωρίς τη χρήση του φυσικού συμπαραγόντα (O_2) ή μεταφορέα ηλεκτρονίων [124]. Παρόλα αυτά η συγκεκριμένη τροποποίηση της *οξειδάσης της γλυκόζης* δεν αύξησε το χρόνο ζωής του βιοαισθητήρα [126]. Η τροποποίηση της *οξειδάσης της χολίνης* με πολυαιθυλεν-γλυκόλη επέτρεψε την κατασκευή πολύ πιο σταθερού βιοαισθητήρα για την ανίχνευση της χολίνης [125].

Η χρήση προσθέτων για την σταθεροποίηση των βιοαισθητήρων είναι ευρέως διαδεδομένη κυρίως κατά την κατασκευή βιοαισθητήρων πάστας άνθρακα. Η μεγάλη πιθανότητα της απενεργοποίησης, αλλά και της διαφυγής του ενζύμου από την

πάστα, εξαιτίας της μεγάλης λιποφιλικότητας που έχει το μίγμα της πάστας, οδηγούν στην ανάγκη για τη χρήση προσθέτων. Επιπλέον λόγω του τρόπου κατασκευής αυτών των βιοαισθητήρων (απλή ανάμιξη των υλικών), η χρήση των προσθέτων δεν κάνει πιο πολύπλοκη την μεθοδολογία που ακολουθείται. Η επίδραση που έχουν διάφορα πρόσθετα στην ηλεκτροχημική συμπεριφορά της πάστας του άνθρακα μελετήθηκε από τους J. Kulys, L. Gorton et al [127]. Από αυτά που μελετήθηκαν (πολυαιθυλενιμίνη, καναμικίνη, chitosan glutamate, συμπολυμερές βινυλπυρρολιδίνης-διμεθυλάμινοαιθυλ μεθακρυλικού) βρέθηκε ότι η πολυαιθυλενιμίνη βελτιώνει σημαντικά την ηλεκτροχημική συμπεριφορά της πάστας του άνθρακα (πιο αντιστρεπτή οξειδοαναγωγή ηλεκτροενεργών ουσιών, μεγαλύτερα ρεύματα).

Χρήση προσθέτων έχει αναφερθεί για την σταθεροποίηση βιοαισθητήρων που χρησιμοποιούν *οξειδάση της γλυκόζης* [128], *οξειδάση του γαλακτικού* [129,130], *τυροσινάση* [131-133], *οξειδάση του πυρουβικού* [134], *αφυδρογονάση της φρουκτόζης* [135], *οξειδάση της πυρανόζης* [136] κλπ. Τα πρόσθετα που έχουν χρησιμοποιηθεί είναι η πολυαιθυλενιμίνη [129-132,135,136], λακτιτόλη [131,134-136], θρειαλόζη [128,134], πολύ-L-λυσίνη [129,134], πολύ-L-αργινίνη [129,134], καναμικίνη [131,135], DNA [133] κλπ.

Οι Gibson και Woodward εφάρμοσαν το σύστημα σταθεροποίησης ενζύμων που ανέπτυξαν, στην κατασκευή διάφορων βιοαισθητήρων. Τα ένζυμα που χρησιμοποίησαν ήταν *οξειδάση αλκοολών* [137], *οξειδάση του γλουταμικού* [137,138], *οξειδάση της γλυκόζης* [139], *οξειδάση του γαλακτικού* [139], *αφυδρογονάση του μηλεϊνικού* [138,139] και *ακετυλχολινεστεράση* [140]. Για την κατασκευή των βιοαισθητήρων χρησιμοποιήθηκαν παγίδευση του ενζύμου μεταξύ ημιπερατών μεμβρανών στην επιφάνεια ηλεκτροδίου πλατίνας [137], ομοιοπολική δέσμευση στην επιφάνεια ηλεκτροδίου γραφίτη [137-139], ή ομοιοπολική δέσμευση στην επιφάνεια ηλεκτροδίων ταινίας που κατασκευάστηκαν με την τεχνική εκτύπωσης μάσκας [140]. Σε όλες τις περιπτώσεις η χρήση των φορτισμένων πολυμερών σε συνδυασμό με υδατάνθρακες (κυρίως λακτιτόλη) επέφερε σημαντική βελτίωση στη σταθερότητα των βιοαισθητήρων. Θα πρέπει να σημειωθεί όμως ότι μεγαλύτερη έμφαση σε αυτές τις μελέτες δόθηκε στη θερμική σταθερότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων και των βιοαισθητήρων.

Η διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνη χρησιμοποιήθηκε πρόσφατα για την σταθεροποίηση της *οξειδάσης του γλουταμικού* που ακινητοποιήθηκε στην επιφάνεια

ηλεκτροδίου γραφίτη [141]. Η χρήση της διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνης αύξησε την σταθερότητα αποθήκευσης του βιοαισθητήρα κατά 1300%.

Παρόλες τις προσπάθειες που έχουν γίνει τα τελευταία χρόνια για τη βελτίωση της σταθερότητας των βιοαισθητήρων, ο περιορισμένος χρόνος ζωής των συγκεκριμένων οργάνων εξακολουθεί να είναι ένα από τα σημαντικότερα μειονεκτήματά τους [6,102]. Με αυτό το δεδομένο κύριος στόχος της παρούσας εργασίας ήταν η συμβολή στην έρευνα για τη σταθεροποίηση των βιοαισθητήρων. Για την επίτευξη του στόχου εξετάστηκε ο συνδυασμός της σταθεροποιητικής δράσης της διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνης με τη χρήση ηλεκτροδίου από πορώδη άνθρακα υψηλής αγωγιμότητας. Τα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν σε αυτή την εργασία είναι η *οξειδάση της γλυκόζης* (κατασκευή βιοαισθητήρα για την ανίχνευση γλυκόζης, κεφάλαιο 6), η *οξειδάση του γαλακτικού* (κατασκευή βιοαισθητήρα για την ανίχνευση γαλακτικού οξέος, κεφάλαιο 7) και η *οξειδάση του πυρουβικού* (κατασκευή βιοαισθητήρα για την ανίχνευση φωσφορικών ιόντων, κεφάλαιο 8). Στο επόμενο κεφάλαιο θα περιγραφούν οι ιδιότητες και τα χαρακτηριστικά του υλικού από το οποίο κατασκευάστηκαν τα ηλεκτρόδια, δηλαδή του πορώδους άνθρακα υψηλής αγωγιμότητας.

5.ΠΟΡΩΔΗΣ ΑΝΘΡΑΚΑΣ*

Η επιλογή των υλικών που θα χρησιμοποιηθούν για την ακινητοποίηση του ενζύμου και τη μετατροπή του σήματος είναι καθοριστική για τα χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα. Το είδος των υλικών αυτών επηρεάζει την ποσότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου και τη μέθοδο ακινητοποίησής του, την ευαισθησία, τη σταθερότητα και την επιλεκτικότητα του βιοαισθητήρα.

Στην εργασία αυτή επιλέχθηκε η χρήση ηλεκτροδίου από πορώδη άνθρακα υψηλής αγωγιμότητας για την κατασκευή των βιοαισθητήρων για τους παρακάτω λόγους:

- α) η μεγάλη αγωγιμότητα του συγκεκριμένου υλικού επιτρέπει τη χρήση του ως ηλεκτροδίου εργασίας
- β) η πορώδης υφή του άνθρακα παρέχει τη δυνατότητα για απευθείας ακινητοποίηση του ενζύμου μέσω φυσικής προσρόφησης
- γ) η ευκολία στην κατεργασία και μορφοποίηση του άνθρακα αποτελούν ένα πρόσθετο πλεονέκτημα, αφού είναι δυνατή η κατασκευή ηλεκτροδίων σε διάφορα μεγέθη και σχήματα.

Για τους παραπάνω λόγους παρέχεται η δυνατότητα ανάπτυξης ενός πρωτοκόλλου κατασκευής με λίγα στάδια και χωρίς τη χρήση χημικών αντιδράσεων που μπορεί να απενεργοποιούσαν το ένζυμο.

Το συγκεκριμένο υλικό έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην ανάπτυξη και σταθεροποίηση επιλεκτικών ηλεκτροδίων ιόντων στερεής επαφής. Πιο συγκεκριμένα έχουν κατασκευαστεί ηλεκτρόδια για την ανίχνευση ιόντων καλίου [142], νιτρικών [142-144], φωσφορικών [145] και χλωρίου [145-147]. Στη συνέχεια θα αναλυθούν οι φυσικοχημικές και ηλεκτροχημικές ιδιότητες του πορώδους άνθρακα.

* Οι αναλύσεις X-ray, πορωσιμετρία Hg και SEM που παρουσιάζονται στο συγκεκριμένο κεφάλαιο, έγιναν από τον Μ. Μεταξά στο Εργαστήριο Ανόργανης και Αναλυτικής Χημείας, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Εθνικό Μετσόβειο Πολυτεχνείο, υπό την διεύθυνση της Αν. Καθ. Β. Κασελούρη-Ρηγοπούλου, τους οποίους ευχαριστώ.

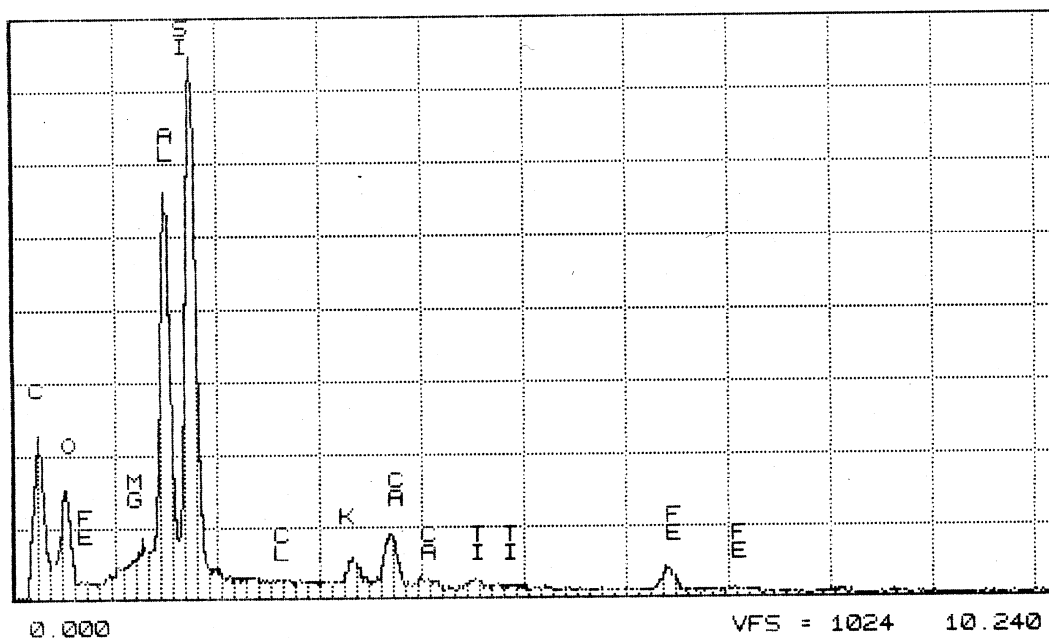
5.1 Φυσικοχημικές Ιδιότητες του Πορώδους Άνθρακα

Η χημική σύσταση του υλικού παρουσιάζεται στον πίνακα 5.

Πίνακας 5. Χημική σύσταση του πορώδους άνθρακα.

Στοιχείο	% Περιεκτικότητα	Στοιχείο	% περιεκτικότητα
Άνθρακας	54,6	Κάλιο	1,2
Πυρίτιο	22,8	Τιτάνιο	0,5
Αργίλιο	12,1	Μαγνήσιο	0,4
Ασβέστιο	3,4	Υδρογόνο	0,2
Σίδηρος	2,4	Χλώριο	0,2
Οξυγόνο (Οργανικό)	2,1	Άζωτο	>0, 1
		Σύνολο	99,9 / 100

Στο σχήμα 10 παρουσιάζεται η ανάλυση με X-Ray του πορώδους άνθρακα.

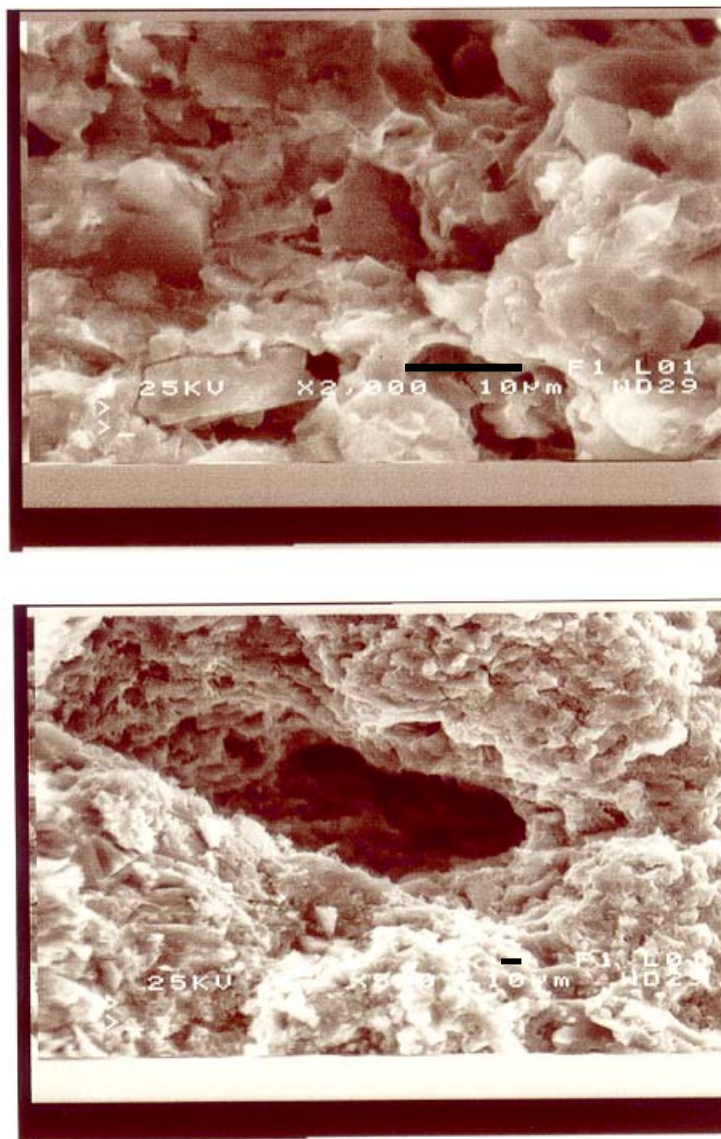


Σχήμα 10. X-ray ανάλυση του πορώδους άνθρακα.

Η αυξημένη περιεκτικότητα του υλικού σε ανόργανα μεταλλικά στοιχεία παρέχει μία εξήγηση της υψηλής αγωγιμότητας του. Ταυτόχρονα τα μεταλλικά στοιχεία είναι πιθανό να αυξάνουν τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις του υλικού με τα

προσροφημένα ένζυμα, αυξάνοντας έτσι την ποσότητα που προσροφάται αλλά και την ισχύ της προσρόφησης.

Στο σχήμα 11 παρουσιάζεται η ανάλυση του υλικού με scanning electron microscopy (SEM).



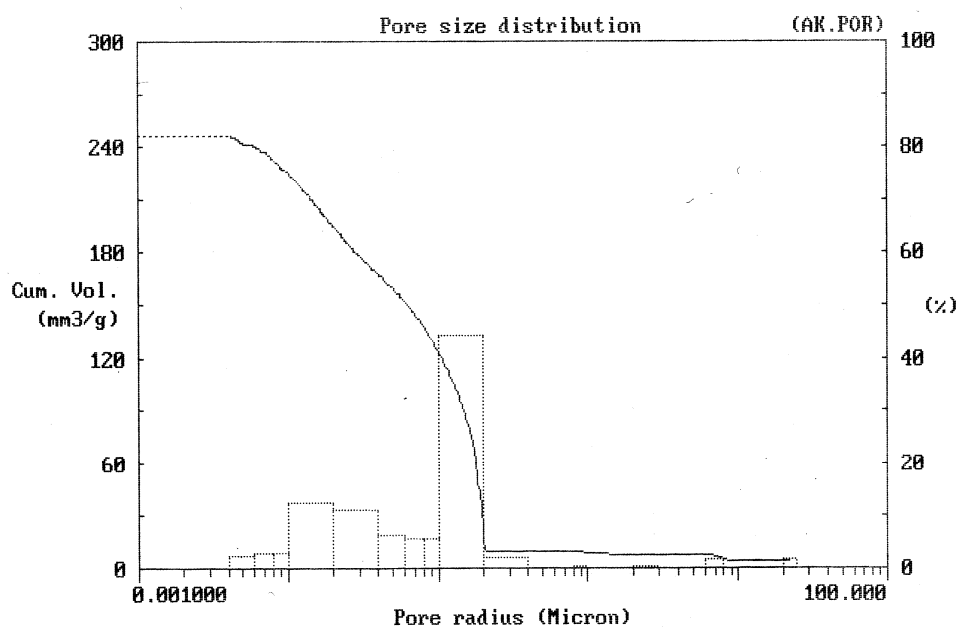
Σχήμα 11. SEM μικροφωτογραφίες της επιφάνειας του άνθρακα. Οι παύλες αντιστοιχούν σε μήκος 10 μm.

Από το σχήμα 11 φαίνεται η πορώδης υφή του υλικού και η ιδιαίτερα τραχεία επιφάνεια του. Η κατανομή των πόρων είναι αρκετά ομοιογενής και η επιφάνειά του, παρά την τραχύτητα, παρουσιάζεται ομοιόμορφη, χωρίς μεγάλες διακυμάνσεις στο μέγεθος και την υφή των μικροκρυστάλλων του υλικού.

Η ανάλυση με πορωσιμετρία Hg του υλικού έδωσε τα ακόλουθα αποτελέσματα:

Συνολικός όγκος πόρων	246 mm ³ /g υλικού
Πορωσιμότητα	34,7%
Εμβαδόν επιφάνειας	15,5 m ² /g
Μέση ακτίνα των πόρων	0,17 μm
Πυκνότητα	1,4 g/cm ³

Στο σχήμα 12 παρουσιάζεται η κατανομή των πόρων ανάλογα με τη διάμετρό τους (μπάρες) καθώς και η συνεισφορά τους στο συνολικό όγκο των πόρων (διακεκομμένη γραμμή).

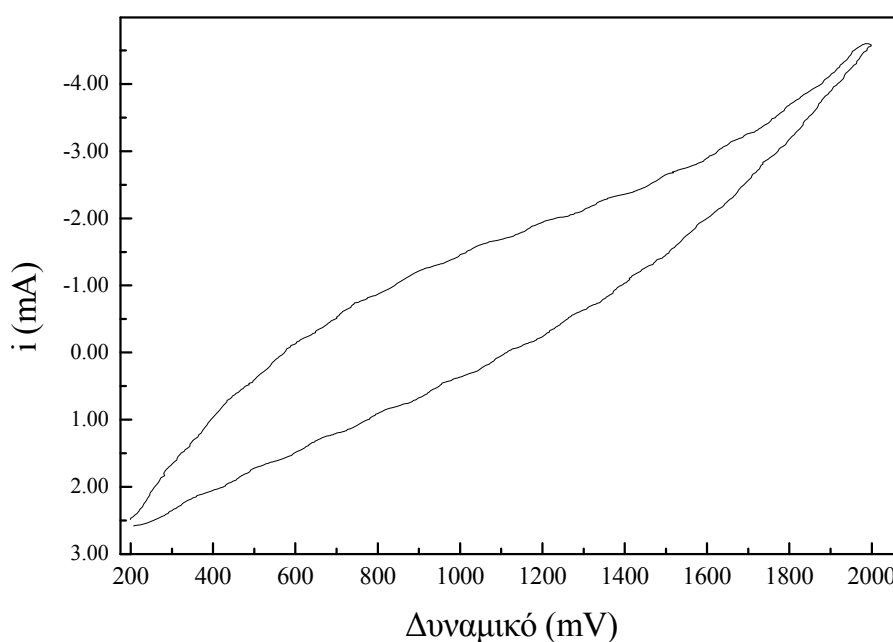


Σχήμα 12. Κατανομή των πόρων ανάλογα με την ακτίνα (μπάρες) και τη συνεισφορά τους στο συνολικό όγκο των πόρων (διακεκομμένη γραμμή).

Από το σχήμα φαίνεται ότι το 45% περίπου των πόρων έχει ακτίνα από 0,1 έως 0,2 μm, ενώ οι πόροι με ακτίνα μεγαλύτερη από 0,1 μm συνεισφέρουν περίπου το 50% του συνολικού όγκου των πόρων (~120 mm³/g από τα 246 mm³/g υλικού).

5.2 Ηλεκτροχημικές Ιδιότητες του Πορώδους Άνθρακα

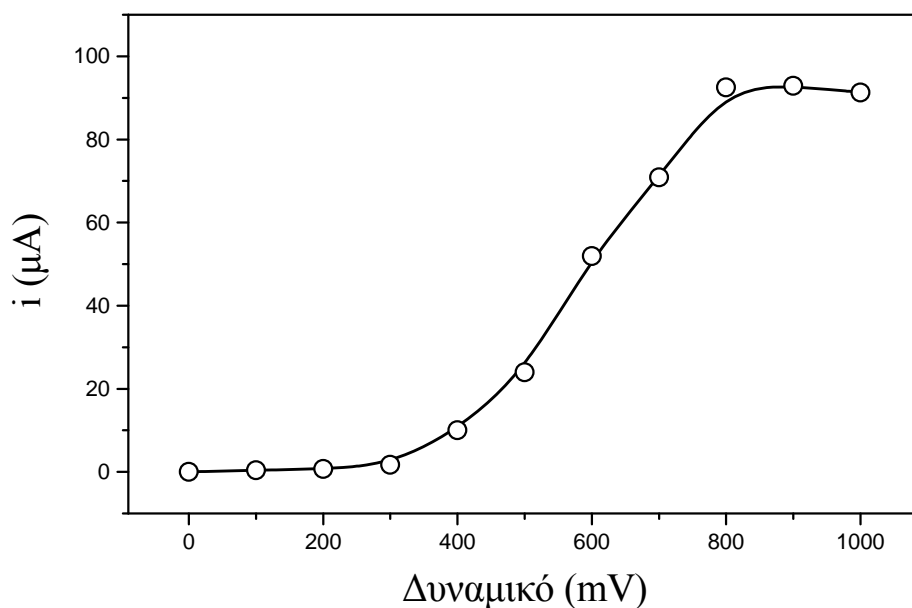
Στο σχήμα 13 παρουσιάζεται το κυκλικό βολταμογράφημα ενός ηλεκτροδίου κατασκευασμένου από πορώδη άνθρακα. Το πείραμα έγινε με τη χρήση βοηθητικού ηλεκτροδίου πλατίνας, και αναφορικού ηλεκτροδίου Ag/AgCl. Το υλικό είναι ανθεκτικό σε οξειδωτικά δυναμικά μέχρι τα 2,0 V (ανοδικό όριο), τιμή που είναι από τις μεγαλύτερες που έχουν αναφερθεί για τους διάφορους τύπους ηλεκτροδίων (Πίνακας 3, σελ. 24), ενώ το καθοδικό όριο του ηλεκτροδίου είναι μεγαλύτερο από -1,0 V.



Σχήμα 13. Κυκλικό βολταμογράφημα του πορώδους άνθρακα. Ταχύτητα σάρωσης: 100 mV/sec, βοηθητικός ηλεκτρολύτης 0,1 M KCl.

Οι τιμές του ρεύματος (της τάξης των mA) δείχνουν τη χαμηλή αντίσταση του ηλεκτροδίου, ενώ η διαπλάτυνση του γραφήματος από τα +400 mV έως τα +1400 mV υποδηλώνει την παρουσία στοιχείων ή ομάδων που βρίσκονται στον άνθρακα και οξειδώνονται σε αυτά τα δυναμικά.

Για την κατασκευή βιοαισθητήρων που βασίζουν την λειτουργία τους στην οξείδωση του H_2O_2 που παράγεται κατά τη βιολογική αναγνώριση, είναι σημαντική η ανίχνευση του H_2O_2 με μεγάλη ευαισθησία. Στο σχήμα 14 παρουσιάζεται η εξάρτηση της απόκρισης του ηλεκτροδίου σε διάλυμα 5 mM H_2O_2 , από το δυναμικό το οποίο εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο.



Σχήμα 14. Εξάρτηση της απόκρισης του ηλεκτροδίου από το εφαρμοζόμενο δυναμικό. Διάλυμα 5 mM H_2O_2 , ρυθμιστικό 10 mM KH_2PO_4 , pH 7,5.

Όπως φαίνεται από το γράφημα το υπεροξείδιο οξειδώνεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου σε δυναμικά μεγαλύτερα από τα +400 mV, ενώ η απόκριση σταθεροποιείται για δυναμικά μεγαλύτερα από + 800 mV (μέγιστη ευαισθησία). Παρότι δεν υπάρχουν αρκετά παρόμοια αποτελέσματα στη βιβλιογραφία, η ευαισθησία του ηλεκτροδίου στο H_2O_2 μπορεί να θεωρηθεί εξαιρετική [78], ειδικά επειδή πρόκειται για ηλεκτρόδιο από άνθρακα.

Συνοψίζοντας τις φυσικοχημικές και ηλεκτροχημικές ιδιότητες του πορώδους άνθρακα, συμπεραίνεται ότι το συγκεκριμένο υλικό μπορεί να αποτελέσει τη βάση για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Η μεγάλη ευαισθησία του στην ανίχνευση του H_2O_2 είναι καθοριστική για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων με αντίστοιχα μεγάλη ευαισθησία, ενώ η πορώδης υφή του καθιστά δυνατή την ακινητοποίηση των ενζύμων μέσω φυσικής προσρόφησης.

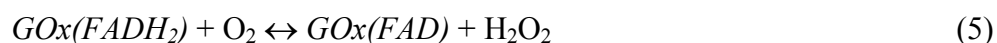
6.ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ

6.1Ανασκόπηση

Η ανάπτυξη βιοαισθητήρων για την ανίχνευση της γλυκόζης αποτελεί το συνηθέστερο παράδειγμα βιοαισθητήρων που συναντάται στη βιβλιογραφία. Στο γεγονός αυτό συμβάλλει η μεγάλη σημασία της ανίχνευσης της γλυκόζης σε διάφορα δείγματα όπως αίμα, τρόφιμα κλπ. Είναι χαρακτηριστικό της ευρείας έρευνας που γίνεται στο συγκεκριμένο θέμα, ότι ο A. Cunningham στο βιβλίο του [7] παραθέτει περισσότερες από 100 εργασίες που δημοσιεύτηκαν το χρονικό διάστημα 1993-1996, χωρίς να περιλαμβάνει το σύνολο των εργασιών.

Για την ανάπτυξη αμπερομετρικών βιοαισθητήρων γλυκόζης χρησιμοποιείται κυρίως η οξειδάση της γλυκόζης, ενώ έχουν χρησιμοποιηθεί και η αφυδρογονάση της γλυκόζης [148] αλλά και μικροοργανισμοί όπως ο *Aspergillus niger* [149]. Η ευρεία χρήση της οξειδάσης της γλυκόζης συνέβαλε στο να θεωρείται το συγκεκριμένο ένζυμο ως σύστημα αναφοράς. Έτσι η ανάπτυξη κάθε νέας μεθόδου για την κατασκευή αμπερομετρικών βιοαισθητήρων συνήθως αξιολογείται με τη χρήση του συγκεκριμένου ενζύμου.

Η οξειδάση της γλυκόζης (GOx) είναι μία διμερής γλυκοπρωτεΐνη, μοριακού βάρους 150 έως 180 kDa, που αποτελείται από 583 αμινοξέα, ενώ οι υδατανθρακικές αλυσίδες (κυρίως μαννόζης) που είναι δεσμευμένες στο ένζυμο αποτελούν το 10-16% του μοριακού του βάρους [150]. Η GOx περιέχει ένα μόριο FAD δεσμευμένο σε κάθε υπομονάδα της, που δρα ως δέκτης των πρωτονίων και των ηλεκτρονίων του υποστρώματος (γλυκόζη). Η αντίδραση που καταλύει η GOx δίνεται στις εξισώσεις 4 και 5:



Το μοριακό οξυγόνο, ο φυσικός συμπαράγοντας του ενζύμου, είναι ο δέκτης των ηλεκτρονίων από το ενεργό κέντρο του ενζύμου, βοηθώντας την επαναφορά του ενζύμου στην ενεργή του μορφή (GOx(FAD)). Ωστόσο το O₂ μπορεί να αντικατασταθεί από κάποιο μεταφορέα ηλεκτρονίων (βλ. παράγραφο 3.4, σελ. 28), οπότε η εξίσωση 5 μετατρέπεται σε:



Στον πίνακα 6 παρατίθενται ορισμένες από τις σημαντικότερες εργασίες που αφορούν αμπερομετρικούς βιοαισθητήρες γλυκόζης. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα επί τοις εκατό ποσοστά που δίνονται στις στήλες της σταθερότητας αναφέρονται στην %ενεργότητα του βιοαισθητήρα σε σχέση με την αρχική, ενώ στη στήλη της αναπαραγωγιμότητας τα αντίστοιχα ποσοστά αφορούν τη σχετική τυπική απόκλιση μεταξύ των μετρήσεων ή των ηλεκτροδίων.

Πίνακας 6. Επιλεγμένες εργασίες που αναφέρονται στην κατασκευή βιοαισθητήρων γλυκόζης με την χρήση GOx. Στην στήλη «Μεθοδολογία» αναφέρονται το είδος του ηλεκτροδίου, η μέθοδος ακινητοποίησης, ο μεταφορέας ηλεκτρονίων (αν χρησιμοποιείται), οι μεμβράνες και το δυναμικό εργασίας.

Μεθοδολογία	Σταθερότητα			Αναπαραγωγιμότητα	
	Λειτουργίας	Χρόνος Ζωής	Αποθήκευσης	Μετρήσεων	Κατασκευής
Υαλώδης άνθρακας με επιμετάλλωση (Pt), ηλεκτροπολυμερισμός τυραμίνης, +650 mV. [53]	-	71% μετά από 45 μέρες. Αποθήκευση στους +4°C.	90% μετά από 6 μήνες στους +4°C.	3-5%	0,7-6,7%
Υαλώδης άνθρακας, χημικός πολυμερισμός, πολυμερικό σύμπλοκο Os, +200 mV. [151]	50% μετά από 127 ώρες	50% μετά από 20 μέρες	20% μετά από 3 μήνες στους +4°C.	3%	18%
Ηλεκτρόδιο οξυγόνου, ομοιοπολική δέσμευση σε μεμβράνη οξικής κυτταρίνης. [152]	76% μετά από 240 ώρες	-	-	3,5-4,2%	-
Πλατίνα, διαμοριακή σύνδεση, μεμβράνη PVC, +650mV. [153]	100% μετά από 48 ώρες	100% μετά από 3 μήνες.	100% μετά από 1 χρόνο.	3%	-
Υαλώδης άνθρακας, χημικός πολυμερισμός, +1050 mV. [154]	85% μετά από 48 ώρες	100% μετά από 5 μήνες.	-	-	5,4%

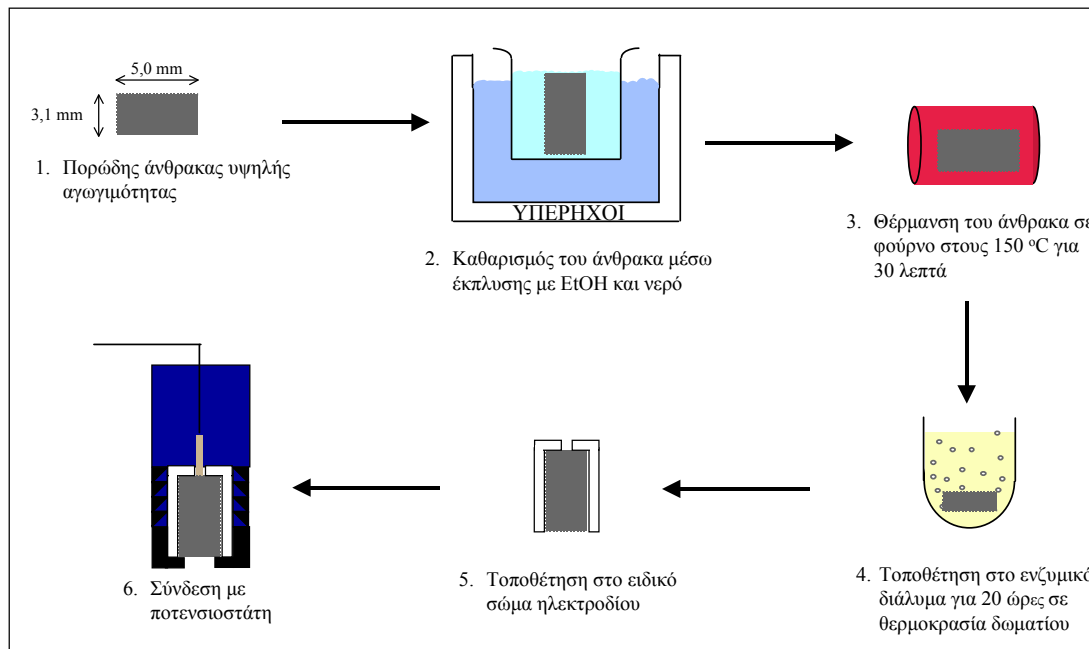
Πλατίνα, χημικός πολυμερισμός, +550mV. [155]	87,5 % μετά από 8 ώρες.	-	70% μετά από 6 μήνες στους +4°C.	-	4,8%
--	-------------------------------	---	---	---	------

Οι εργασίες που παρατίθενται στον πίνακα 6 αποτελούν ένα ελάχιστο δείγμα από το σύνολο των εργασιών. Κριτήριο επιλογής είναι η αυξημένη σταθερότητα, η παράθεση όσον των δυνατών περισσότερων στοιχείων αλλά και η εγκυρότητα του περιοδικού στο οποίο δημοσιεύτηκαν. Παράλληλα σε πολλές από τις εργασίες που δημοσιεύονται ο χρόνος ζωής του βιοαισθητήρα γλυκόζης κυμαίνεται από μερικές εβδομάδες [94,¹⁵⁶], λίγες ημέρες [124,157], μέχρι λίγες ώρες [57]. Δυστυχώς όμως, στις περισσότερες δημοσιεύσεις δεν παρουσιάζεται το σύνολο των χαρακτηριστικών, γεγονός που δυσκολεύει τη σύγκριση των διαφορετικών τεχνικών.

Στη συνέχεια θα παρουσιαστεί η κατασκευή βιοαισθητήρα γλυκόζης με την χρήση του πορώδους άνθρακα και τη σταθεροποίηση με την χρήση διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνης.

6.2 Κατασκευή του Βιοαισθητήρα – Διαδικασία Μέτρησης

Η κατασκευή των βιοαισθητήρων βασίστηκε στην προσρόφιση του συμπλέγματος του ενζύμου και του θετικά φορτισμένου πολυηλεκτρολύτη διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνη. Η διαδικασία κατασκευής τους έχει ως ακολούθως (σχήμα 15):



Σχήμα 15. Πειραματική διαδικασία κατασκευής του βιοαισθητήρα.

- Αρχικά ένα κομμάτι του πορώδους άνθρακα που έχει καθορισμένο σχήμα (μήκος 5 mm, διάμετρο 3,1 mm) καθαρίζεται από τυχόν ακαθαρσίες με εκπλύσεις σε αιθανόλη για 10 λεπτά σε υπερήχους και στη συνέχεια σε νερό για άλλα 10 λεπτά σε υπερήχους. Ακολούθως, ο άνθρακας θερμαίνεται στο φούρνο στους 150°C για 30 λεπτά.

- Παρασκευάζεται διάλυμα του ενζύμου, με χρήση ρυθμιστικού διαλύματος 10 mM φωσφορικού καλίου, που περιέχει την επιλεγμένη ποσότητα της οξειδάσης της γλυκόζης. Στην συνέχεια προστίθεται ο πολυηλεκτρολύτης (όταν χρησιμοποιείται) και αφήνεται να αλληλεπιδράσει με το ένζυμο για τουλάχιστον 20 λεπτά.

- Το τελευταίο στάδιο είναι η προσθήκη του άνθρακα στο ενζυμικό διάλυμα. Ο άνθρακας παραμένει στο διάλυμα για 20 ώρες προκειμένου να προσροφήσει το σύμπλεγμα του πολυηλεκτρολύτη με το ένζυμο. Στην συνέχεια, ξεπλένεται ο άνθρακας με ρυθμιστικό διάλυμα για να απομακρυνθεί η περίσσεια ενζύμου, και τοποθετείται σε ένα ειδικό σώμα ηλεκτροδίου από teflon. Για να επιτευχθεί ηλεκτρική επαφή στο πίσω μέρος του άνθρακα προσαρμόζεται ένα σύρμα πλατίνας. Η μεταφορά του σήματος γίνεται μέσω ενός σύρματος χαλκού.

Για την εξέταση του βιοαισθητήρα μπορεί να χρησιμοποιηθούν δύο διαφορετικές πειραματικές διατάξεις: η στατική διάταξη ή η διάταξη ροής. Στη στατική διάταξη ο βιοαισθητήρας μαζί με το αναφορικό και το βοηθητικό ηλεκτρόδιο εμβαπτίζονται σε συγκεκριμένο όγκο (συνήθως 100 ml) ρυθμιστικού διαλύματος. Στη συνέχεια

εφαρμόζεται ελεγχόμενο δυναμικό (συνήθως +800 mV) συναρτήσει του αναφορικού ηλεκτροδίου, μεταξύ του βιοαισθητήρα (ηλεκτρόδιο εργασίας) και του βοηθητικού και το ρεύμα που διαρρέει το σύστημα καταγράφεται. Όταν το σύστημα ισορροπήσει (συνήθως μετά από 3 με 4 ώρες), γίνονται προσθήκες στο διάλυμα συγκεκριμένων ποσοτήτων της προς ανάλυση ουσίας (στη συγκεκριμένη περίπτωση της γλυκόζης). Η αύξηση της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο διάλυμα αυξάνει την ποσότητα του υπεροξειδίου του υδρογόνου που παράγεται (εξίσωση 5). Το H₂O₂ οξειδώνεται στην επιφάνεια του πορώδους άνθρακα σε δυναμικά μεγαλύτερα από +400 mV (σχήμα 14), σύμφωνα με την εξίσωση:



Έτσι βάσει των εξισώσεων 4,5,7 η αύξηση στο ρεύμα το οποίο καταγράφεται είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της γλυκόζης στο διάλυμα.

Στη διάταξη ροής, ο βιοαισθητήρας εισάγεται σε ένα ειδικό κελί το οποίο έχει στο κάτω μέρος (μετωπικά με την επιφάνεια του βιοαισθητήρα) ένα σωληνάκι που χρησιμεύει για τη μεταφορά του διαλύματος. Το σωληνάκι συνδέεται με μία βαλβίδα εισαγωγής δείγματος (ο όγκος του βρόγχου είναι 400 μl), η οποία με τη σειρά της είναι συνδεδεμένη με μία αντλία. Η αντλία χρησιμεύει για τη συνεχή παροχή ρυθμιστικού διαλύματος στο κελί, δηλαδή στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα. Για την αξιολόγηση του βιοαισθητήρα, παρασκευάζονται διαλύματα διαφορετικής συγκέντρωσης γλυκόζης και δείγματα από το κάθε διάλυμα εισάγονται μέσω του βρόγχου της βαλβίδας στο σύστημα. Το δείγμα παρασύρεται από το ρυθμιστικό που διαρρέει συνεχώς το σύστημα και φτάνει στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα όπου ανάλογα με την ποσότητα της γλυκόζης στο κάθε δείγμα καταγράφεται η ανάλογη αύξηση στο ρεύμα.

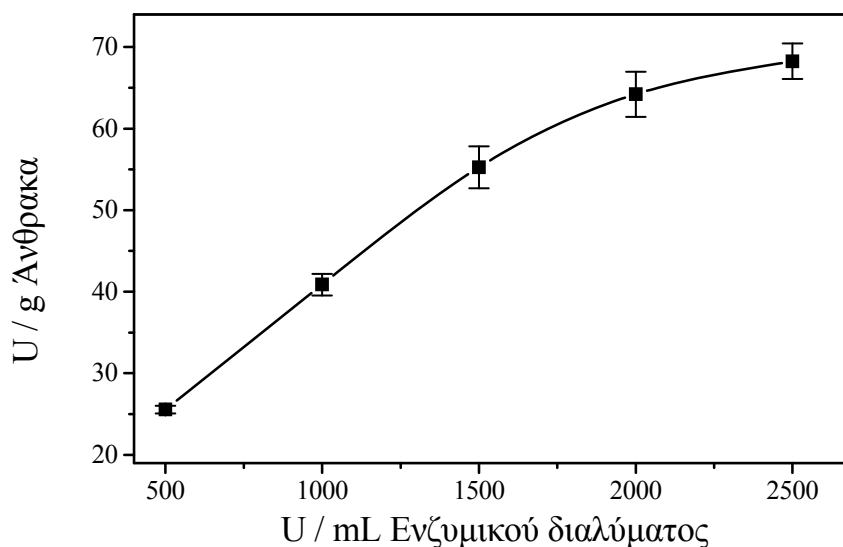
6.3 Επίδραση της Ποσότητας του Ενζύμου

Η συγκέντρωση του ενζύμου στο διάλυμα προσρόφησης (σχήμα 15, στάδιο 4) καθορίζει την ποσότητα του ενζύμου που θα προσροφηθεί στον άνθρακα. Για να υπολογιστεί η ποσότητα του ενζύμου που προσροφάται, ο άνθρακας μετά την διαδικασία ακινητοποίησης κονιοποιείται και η ποσότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου υπολογίζεται βάσει της ακόλουθης φωτομετρικής διαδικασίας [120]:

- Τμήμα της σκόνης (10-15 mg) τοποθετείται σε 5 mL ρυθμιστικού διαλύματος που περιέχει 0,1 M γλυκόζη προκειμένου να πραγματοποιηθούν οι αντιδράσεις (4) και (5). Το H₂O₂ που παράγεται θα προσδιοριστεί φωτομετρικά στη συνέχεια. Το διάλυμα επωάζεται στους 37°C για 4 με 5 λεπτά. Στη συνέχεια το διάλυμα φιλτράρεται μέσω φίλτρου που έχει πόρους 0,2 μm, για να απομακρυνθούν τα σωματίδια του άνθρακα που περιέχουν το ένζυμο και να σταματήσει η αντίδραση.
- 500 μL από το παραπάνω διάλυμα τοποθετούνται σε μία κυψελίδα που περιέχει 2 mL από το χρωμοφόρο διάλυμα (10 mM KH₂PO₄, 1 mM 4-aminoantipyridine, 20 mM phenol-4-sulphonic acid, 10 U/mL Horseradish peroxidase, pH 6.0). Το συγκεκριμένο διάλυμα χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της συγκέντρωσης του H₂O₂, αφού η ταχύτητα αύξησης της απορρόφησης στα 505 nm είναι ανάλογη της ποσότητας του H₂O₂. Η ποσότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου υπολογίζεται από την εξίσωση 8, βάσει του ορισμού ότι «1 U ενζύμου είναι η ποσότητα του ενζύμου που καταλύει την παραγωγή ενός μmole H₂O₂ στους 37°C σε ένα λεπτό»:

$$U / g = \frac{U \text{ (}\mu\text{moles H}_2\text{O}_2\text{)} 1000}{(\text{βάρους δείγματος, mg}) (\text{χρόνος επώασης, min})} \quad (8)$$

Στο σχήμα 17 παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της παραπάνω μελέτης. Η ποσότητα της GOx που προσροφάται στον άνθρακα είναι ευθέως ανάλογη της συγκέντρωσης της GOx στο ενζυμικό διάλυμα μέχρι τα 1500 U/mL. Στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις παρατηρείται σταθεροποίηση της ποσότητας του ενζύμου που προσροφάται.



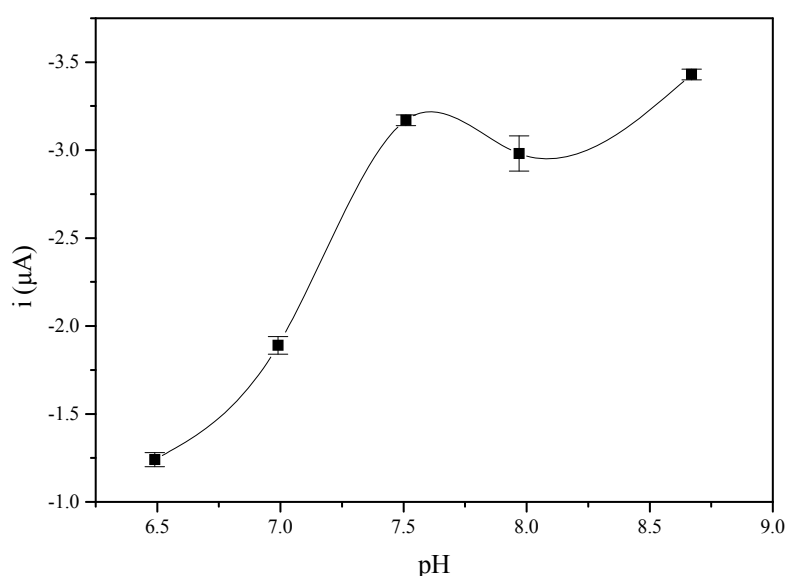
Σχήμα 17. Συσχέτιση της συγκέντρωσης της GOx στο ενζυμικό διάλυμα με την ποσότητα του ενζύμου που προσροφάται στον άνθρακα.

Όπως αναμένεται η ποσότητα του ενζύμου που ακινητοποιείται επηρεάζει τα χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα. Έτσι αυξάνοντας την ποσότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου από 25,6 U/g (ενζυμικό διάλυμα 500 U/mL) σε 55,3 U/g (ενζυμικό διάλυμα 1500 U/mL) η ευαισθησία του βιοαισθητήρα αυξάνεται από 3,28 σε 4,16 $\mu\text{A}/\text{mM}$. Αυτή η αύξηση (περίπου 25%) είναι μικρότερη από την αύξηση του ακινητοποιημένου ενζύμου (περίπου 120%), υποδεικνύοντας ότι μέρος από το κυρίως σώμα του άνθρακα δε συμμετέχει ενεργά στο μηχανισμό απόκρισης. Μετά από μία εβδομάδα οι βιοαισθητήρες που κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας τα διαλύματα 500 και 1000 U/mL, χάνουν το 30 και 15% αντίστοιχα της ευαισθησίας τους. Αντίθετα οι βιοαισθητήρες που κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας τα διαλύματα 1500 και 2500 U/mL, παρουσιάζουν αυξημένη ευαισθησία κατά 16 και 25% αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το κύριο μέρος του άνθρακα πιθανόν συμπεριφέρεται ως δεξαμενή για το ένζυμο, βοηθώντας με αυτό τον τρόπο στην αύξηση της σταθερότητας του βιοαισθητήρα.

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων το ενζυμικό διάλυμα 2500 U/mL χρησιμοποιήθηκε στα υπόλοιπα πειράματα για την κατασκευή των βιοαισθητήρων.

6.4 Επίδραση του pH

Το pH στο οποίο γίνονται οι μετρήσεις είναι σημαντικό για την ενζυμική ενεργότητα και σταθερότητα, και κατ' επέκταση για την λειτουργία του



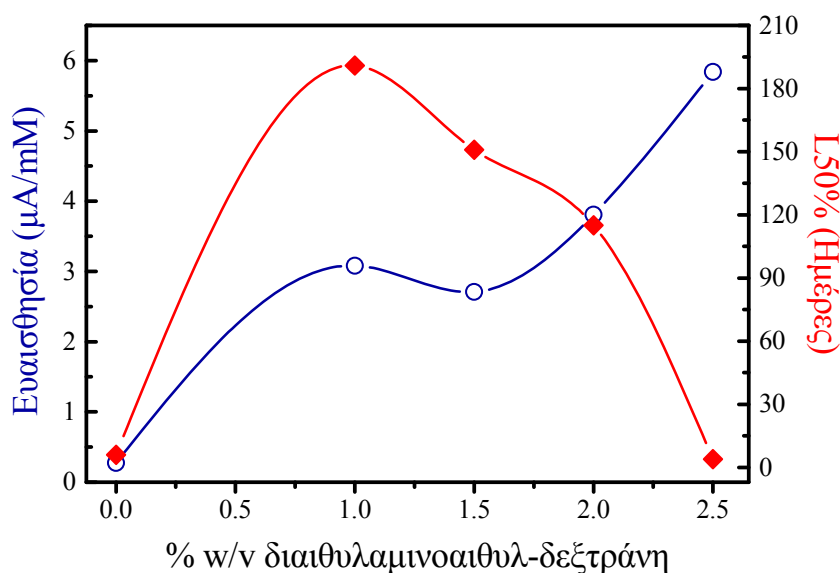
βιοαισθητήρα. Στο σχήμα 18 παρουσιάζεται η επίδραση του pH στην απόκριση του βιοαισθητήρα που έχει κατασκευαστεί από το ενζυμικό διάλυμα 2500 U/mL και 1,0% διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνη. Το πείραμα έγινε χρησιμοποιώντας τη διάταξη ροής (ταχύτητα ροής 1,25 mL/min) και ρυθμιστικά διαλύματα 10 mM KH_2PO_4 διαφορετικού pH.

Σχήμα 18. Επίδραση του pH στην απόκριση του βιοαισθητήρα γλυκόζης. Το ρεύμα αναφέρεται στην απόκριση σε ενέσεις 10 mM γλυκόζης.

Όπως φαίνεται από το σχήμα, όταν το pH του διαλύματος μεταβληθεί από 6,5 σε 7,5, η απόκριση του βιοαισθητήρα αυξάνεται κατά 256%. Σε pH 8,5 η απόκριση του βιοαισθητήρα είναι μέγιστη, αλλά αυτό οφείλεται στην αύξηση της ευαισθησίας του πορώδους άνθρακα για το υπεροξείδιο του υδρογόνου ($8,0 \pm 0,2 \mu\text{A}/\text{mM}$ σε pH 7,5 και $11,5 \pm 0,4 \mu\text{A}/\text{mM}$ σε pH 8,5) και όχι στην αύξηση της ενεργότητας του ενζύμου. Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων όλα τα υπόλοιπα πειράματα έγιναν σε pH 7,5.

6.5 Επίδραση της Διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνης

Για την εξέταση της επίδρασης που έχει η ποσότητα της διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνης στα χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα, κατασκευάστηκαν βιοαισθητήρες από ενζυμικά διαλύματα που περιείχαν διαφορετικές ποσότητες πολυηλεκτρολύτη. Οι βιοαισθητήρες εξετάζονταν περιοδικά χρησιμοποιώντας το σύστημα ροής, και φυλάσσονταν ενδιάμεσα σε ρυθμιστικό διάλυμα στους $+4^\circ\text{C}$. Στο σχήμα 19 παρουσιάζεται η επίδραση της ποσότητας του πολυηλεκτρολύτη στην ευαισθησία και το χρόνο ζωής του βιοαισθητήρα (ως L50% ορίζεται ο χρόνος που χρειάζεται για να μειωθεί η ευαισθησία του βιοαισθητήρα στο 50% της αρχικής της τιμής).

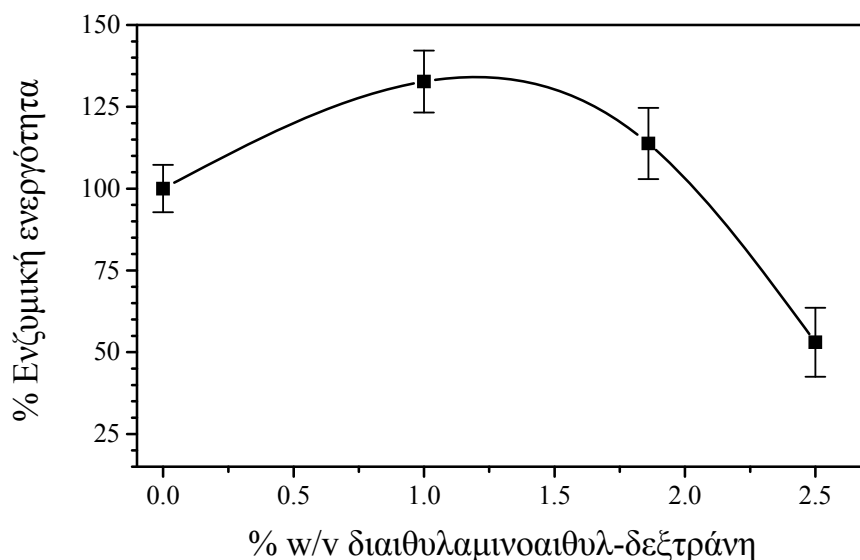


Σχήμα 19. Επίδραση της ποσότητας της διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνης στην ευαισθησία (-O-) και το χρόνο ζωής (-♦-) του βιοαισθητήρα γλυκόζης.

Όπως φαίνεται στο σχήμα, η προσθήκη της διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνης αυξάνει εντυπωσιακά την ευαισθησία του βιοαισθητήρα η οποία αυξάνει με την αύξηση της ποσότητας του πολυηλεκτρολύτη. Ταυτόχρονα και ο χρόνος ζωής αυξάνει εντυπωσιακά με την προσθήκη της διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνης. Αντίθετα όταν αυξάνεται η ποσότητα του πολυηλεκτρολύτη που προστίθεται μειώνεται η σταθεροποιητική επίδρασή του. Βέλτιστη συγκέντρωση διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνης βρέθηκε ότι είναι το 1,0% w/v. Εντύπωση προκαλεί ο πολύ μικρός χρόνος ζωής του βιοαισθητήρα που έχει κατασκευαστεί χρησιμοποιώντας 2,5% w/v διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνη (L50% μόνο 4 ημέρες). Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτουν δύο σημαντικά ερωτήματα:

- α) η ευαισθησία αυξάνεται επειδή η διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνη επιδρά στην καταλυτική δράση του ενζύμου (αύξηση V_{max} , ρυθμού κατάλυσης) ή επειδή βοηθάει στην ακινητοποίηση μεγαλύτερης ποσότητας ενζύμου;
- β) που οφείλεται η αποσταθεροποίηση του βιοαισθητήρα όταν χρησιμοποιούνται 2,5% w/v διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνης;

Για να δοθεί η απάντηση στα παραπάνω ερωτήματα είναι σημαντικό να απομονωθεί και να μελετηθεί η επίδραση της διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνης στο ακινητοποιημένο ένζυμο. Για να επιτευχθεί ο παραπάνω στόχος πρέπει να εξασφαλιστεί ότι θα ακινητοποιηθεί η ίδια ποσότητα ενζύμου στους βιοαισθητήρες που θα κατασκευαστούν, ώστε οι όποιες διαφορές βρεθούν να οφείλονται στην επίδραση της διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνης στο ακινητοποιημένο ένζυμο. Έτσι κατασκευάστηκαν νέοι άνθρακες, που σε καθ' ενός την επιφάνεια τοποθετήθηκαν 25 μ L ενζυμικού διαλύματος. Το ενζυμικό διάλυμα περιείχε για όλα την ίδια ποσότητα GOx αλλά διαφορετικές ποσότητες διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνης. Με αυτό τον



τρόπο εξασφαλίστηκε ότι θα ακινητοποιηθεί σε κάθε άνθρακα η ίδια ποσότητα ενζύμου. Πρέπει να σημειωθεί ότι ο συγκεκριμένος όγκος διαλύματος είναι μικρότερος από τον όγκο του διαλύματος που προσροφάνε οι άνθρακες (περίπου 40 μL). Μετά από 20 ώρες αναμονής για την ολοκλήρωση της προσρόφησης του ενζύμου, οι άνθρακες κονιοποιήθηκαν και μετρήθηκε η ενεργότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου, με τη χρήση της φωτομετρικής μεθόδου που περιγράφηκε στην παράγραφο 6.3.

Σχήμα 20. Επίδραση της ποσότητας της διαιθυλαμινοαιθύλ- δεξτράνης στην ενεργότητα της ακινητοποιημένης GOx.

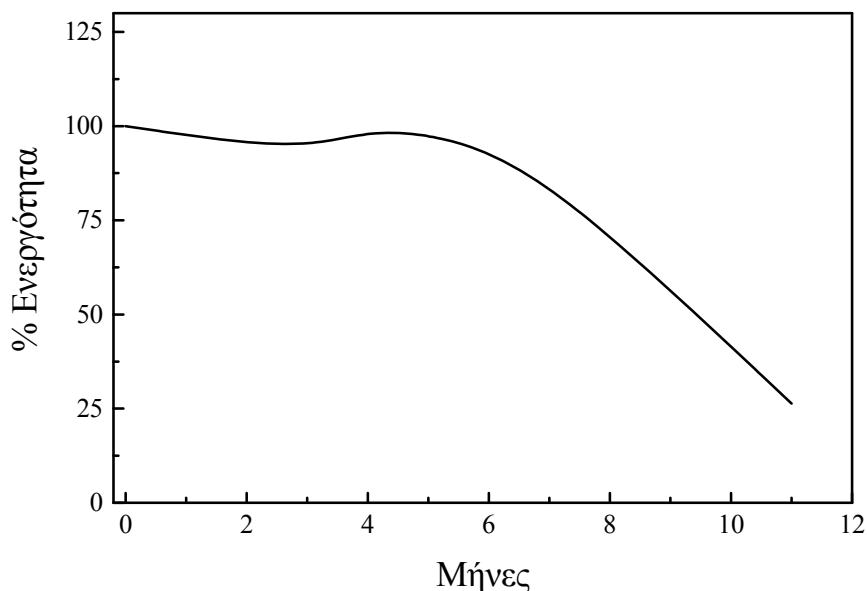
Όπως φαίνεται από το σχήμα 20, η διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη έχει θετική επίδραση στην GOx για ποσότητες μέχρι 2,0% w/v. Για μεγαλύτερες ποσότητες πολυηλεκτρολύτη η ενεργότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου μειώνεται. Η αύξηση της ενεργότητας της ακινητοποιημένης GOx λόγω της επίδρασης της διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνης είναι πολύ μικρότερη από την αύξηση της ευαισθησίας των αντίστοιχων βιοαισθητήρων (σχήμα 19). Συγκρίνοντας αυτά τα αποτελέσματα συμπεραίνεται ότι η διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη βοηθάει στην ακινητοποίηση μεγαλύτερης ποσότητας ενζύμου οπότε συμβαίνει ανάλογη αύξηση της ευαισθησίας. Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται 2,5% w/v διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη, η ακινητοποίηση μεγαλύτερης ποσότητας ενζύμου είναι ο λόγος που υπερνικάται η μειωμένη ενεργότητα της GOx. Ο μικρός χρόνος ζωής του συγκεκριμένου βιοαισθητήρα (σχήμα 19) μπορεί να οφείλεται στην αποσταθεροποίηση του ενζύμου όταν χρησιμοποιείται τόσο μεγάλη συγκέντρωση διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνης (σχήμα 20), ή ακόμα και στην ασθενή προσρόφηση της περίσσειας του ενζύμου που οδηγεί σε σταδιακή εκρόφηση του.

Συμπερασματικά, η διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη αυξάνει την ευαισθησία του βιοαισθητήρα γλυκόζης μέσω δύο διαφορετικών μηχανισμών, της αύξησης της ενεργότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου και της αύξησης της ποσότητας του ενζύμου που ακινητοποιείται. Ταυτόχρονα η διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη αυξάνει σημαντικά και το χρόνο ζωής του βιοαισθητήρα γλυκόζης. Βέλτιστη ποσότητα βρέθηκε το 1,0% w/v και χρησιμοποιήθηκε σε όλα τα υπόλοιπα πειράματα.

6.6 Σταθερότητα Αποθήκευσης και Συνεχούς Λειτουργίας

Για τη μελέτη της σταθερότητας αποθήκευσης κατασκευάστηκε μια παρτίδα βιοαισθητήρων από το ίδιο ενζυμικό διάλυμα (2500 U/mL GOx και 1,0% w/v διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη). Μετά την κατασκευή οι βιοαισθητήρες αφυδατώθηκαν με ψυχρή ξήρανση και φυλάχτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου. Στο τέλος κάθε μήνα ένας βιοαισθητήρας τοποθετείται για 20 ώρες σε ρυθμιστικό διάλυμα για να ενυδατωθεί και στην συνέχεια εξετάζεται. Η ευαισθησία του και η απόκριση στα 5 mM γλυκόζης χρησιμοποιούνται ως μέτρο της ενεργότητάς του.

Σχήμα 21. Σταθερότητα του βιοαισθητήρα κατά την αποθήκευση. Οι βιοαισθητήρες



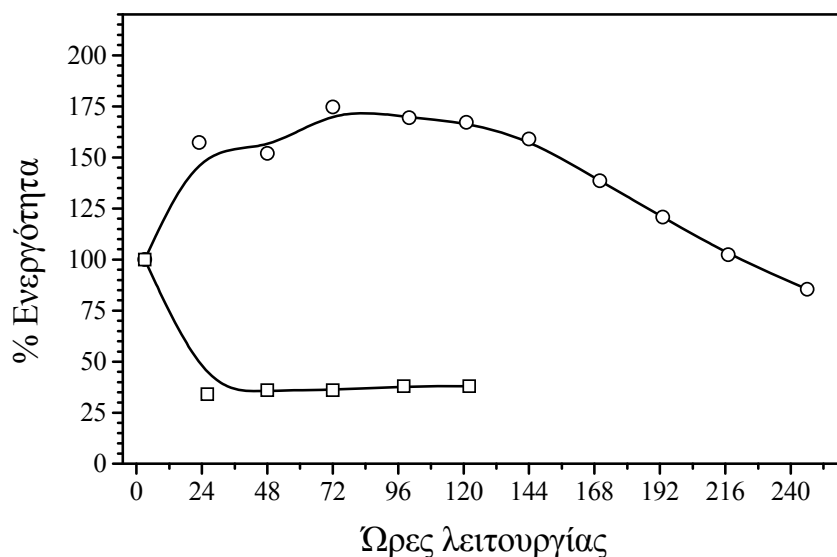
φυλάσσονταν σε θερμοκρασία δωματίου.

Όπως φαίνεται από το σχήμα 21 οι βιοαισθητήρες γλυκόζης διατηρούν το 100% της ενεργότητας τους για 6 μήνες, ενώ μετά παρατηρείται σταδιακή μείωση της ενεργότητας. Η ευαισθησία των βιοαισθητήρων γλυκόζης πέφτει στο 50% της αρχικής της τιμής μετά από 9 μήνες. Το παραπάνω αποτέλεσμα καταδεικνύει τη μεγάλη σταθερότητα του βιοαισθητήρα που κατασκευάζεται με τη συγκεκριμένη τεχνική.

Στην συνέχεια εξετάστηκε η σταθερότητα του βιοαισθητήρα γλυκόζης κάτω από συνθήκες συνεχούς λειτουργίας. Ο βιοαισθητήρας που κατασκευάστηκε (2500 U/mL GOx και 1,0% w/v διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνη) εισήχθη στο σύστημα ροής όπου παρέμεινε για περισσότερες από 240 ώρες με συνεχή εφαρμογή δυναμικού +800 mV. Η ταχύτητα ροής ήταν 1,0 mL/min και το ρυθμιστικό διάλυμα ήταν 10 mM KH_2PO_4 ρυθμισμένο σε pH 7,5. Καθημερινά γινόταν καμπύλη βαθμονόμησης και η ευαισθησία του βιοαισθητήρα χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο της ενεργότητάς του. Για

λόγους σύγκρισης το συγκεκριμένο πείραμα επαναλήφθηκε για τον βιοαισθητήρα γλυκόζης που έχει κατασκευαστεί χωρίς τη χρήση διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνης*.

Σχήμα 22. Σταθερότητα του βιοαισθητήρα γλυκόζης χωρίς (-□-) και με 1,0% w/v διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη



(-O-) σε συνθήκες συνεχούς λειτουργίας. Το εφαρμοζόμενο δυναμικό ήταν +800 mV.

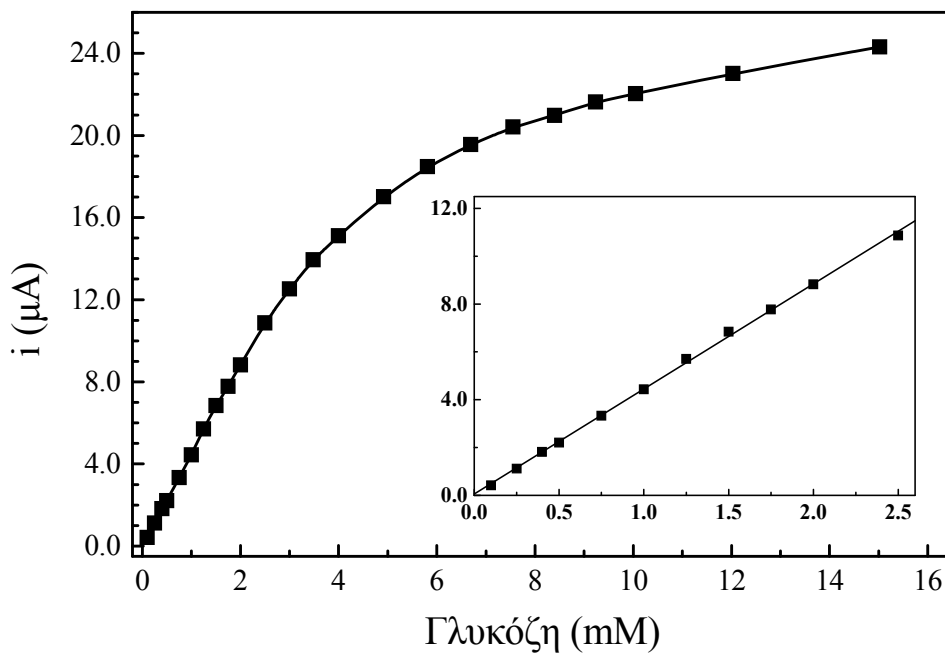
Όπως φαίνεται από το σχήμα 22, ο βιοαισθητήρας που έχει διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη διατηρεί το 85% της αρχικής ενεργότητας του μετά από 245 ώρες συνεχούς λειτουργίας. Η αρχική αύξηση της ενεργότητας του βιοαισθητήρα είναι μία συμπεριφορά που έχει παρατηρηθεί και από άλλους ερευνητές [154,158]. Αντίθετα ο βιοαισθητήρας χωρίς διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη χάνει πολύ γρήγορα την ενεργότητά του (34% της αρχικής ενεργότητας μετά από μία ημέρα συνεχούς λειτουργίας).

Το παραπάνω αποτέλεσμα, σε σύγκριση και με τα αντίστοιχα αποτελέσματα του πίνακα 6, πιστοποιεί την αξιοσημείωτη σταθερότητα που παρουσιάζει ο συγκεκριμένος βιοαισθητήρας γλυκόζης.

* Το ηλεκτρόδιο χωρίς διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη εξετάστηκε από τον Β. Δημάκη στα πλαίσια της διπλωματικής του εργασίας «Μελέτη της επίδρασης του πολυηλεκτρολύτη πολυαιθυλενιμίνη (PEI) στα χαρακτηριστικά λειτουργίας του βιοαισθητήρα γλυκόζης».

6.7 Ευαισθησία και Αναπαραγωγικότητα

Για την ολοκλήρωση του ποιοτικού χαρακτηρισμού του βέλτιστου βιοαισθητήρα γλυκόζης (2500 U/mL GOx και 1,0% w/v διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνη) που κατασκευάστηκε κατά τη διάρκεια αυτής της εργασίας, εξετάστηκαν και τα υπόλοιπα αναλυτικά χαρακτηριστικά του (καμπύλη βαθμονόμησης, ευαισθησία, όριο ανίχνευσης, αναπαραγωγικότητα κατασκευής και μετρήσεων). Στο σχήμα 23



παρουσιάζεται η καμπύλη βαθμονόμησης.

Σχήμα 23. Καμπύλη βαθμονόμησης του βελτιστοποιημένου βιοαισθητήρα γλυκόζης. Στο ένθετο παρουσιάζεται το γραμμικό τμήμα της καμπύλης.

Η ευαισθησία του βιοαισθητήρα είναι $4,39 \pm 0,04 \mu\text{A}/\text{mM}$ και η απόκριση είναι γραμμική για συγκεντρώσεις γλυκόζης από $50 \mu\text{M}$ ως $2,50 \text{mM}$. Το όριο ανίχνευσης (υπολογισμένο για λόγο σήματος προς θόρυβο ίσον με τρία) είναι περίπου $10 \mu\text{M}$. Οι μετρήσεις έχουν σχετική τυπική απόκλιση μεταξύ 0,5 και 4,5% για όλο το εύρος των συγκεντρώσεων που εξετάστηκαν. Ο χρόνος απόκρισης (υπολογισμένος ως ο χρόνος που χρειάζεται το ρεύμα μετά την προσθήκη της γλυκόζης για να φτάσει το 90% της

τελικής τιμής) κυμαίνεται από 10 ως 30 δευτερόλεπτα, ανάλογα με τη συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα που αναλύεται.

Η αναπαραγωγιμότητα της διαδικασίας κατασκευής εξετάστηκε συγκρίνοντας την απόκριση στα 5 mM γλυκόζης και την ευαισθησία τεσσάρων διαφορετικών βιοαισθητήρων που κατασκευάστηκαν από το ίδιο ενζυμικό διάλυμα. Η σχετική τυπική απόκλιση στα χαρακτηριστικά των τεσσάρων βιοαισθητήρων ήταν μεταξύ του 1,0 και 2,5%. Το παραπάνω αποτέλεσμα κρίνεται ως άκρως ικανοποιητικό και αποτελεί μία από τις καλύτερες τιμές που έχουν δημοσιευτεί στη βιβλιογραφία.

6.8 Συμπεράσματα

Η οξειδάση της γλυκόζης αποτελεί ένα από τα πλέον μελετημένα ένζυμα που έχουν χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή αμπερομετρικών βιοαισθητήρων. Η επιλογή αυτού του ενζύμου, για την κατασκευή βιοαισθητήρα γλυκόζης με τη χρήση του πορώδους άνθρακα και τη σταθεροποίηση της λειτουργίας του με τη διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη, έδωσε τη δυνατότητα για την καλύτερη δυνατή αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Η ποσότητα της διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνης που χρησιμοποιείται επηρεάζει σημαντικά την ευαισθησία και το χρόνο ζωής του βιοαισθητήρα. Η διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη αυξάνει την ενεργότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου, ενώ ταυτόχρονα βοηθάει και στην ακινητοποίηση μεγαλύτερης ποσότητας ενζύμου. Η βέλτιστη συγκέντρωση βρέθηκε ότι είναι 1,0% w/v.

Οι βιοαισθητήρες που κατασκευάστηκαν παρουσιάζουν αξιοσημείωτη σταθερότητα κατά τη συνεχή λειτουργία τους, ενώ και η σταθερότητα κατά την αποθήκευσή τους είναι εξίσου σημαντική.

Η ικανότητα του πορώδους άνθρακα να προσροφά μεγαλομόρια (όπως το σύμπλεγμα της GOx με την διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη), αλλά και η υψηλή αγωγιμότητά του που επιτρέπει τη χρήση του ως ηλεκτροδίου εργασίας, απλοποίησαν τη διαδικασία κατασκευής. Η εύκολη και απλή διαδικασία κατασκευής των βιοαισθητήρων που δεν απαιτεί τη χρήση χημικών αντιδράσεων, έδωσε τη δυνατότητα για κατασκευή βιοαισθητήρων με αναπαραγώγιμα χαρακτηριστικά.

Στο επόμενο κεφάλαιο θα συζητηθεί η ανάπτυξη βιοαισθητήρα για την ανίχνευση του γαλακτικού οξέος.

7.ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑΣ ΓΑΛΑΚΤΙΚΩΝ ΙΟΝΤΩΝ

7.1Ανασκόπηση

Η ανάπτυξη βιοαισθητήρων για την ανίχνευση του γαλακτικού έχει απασχολήσει πάρα πολλές ερευνητικές ομάδες, κυρίως λόγω της δυνατότητας εφαρμογής των βιοαισθητήρων γαλακτικού στην ανάλυση τροφίμων [159-164] και δειγμάτων ιατρικού ενδιαφέροντος [163-169]. Η συγκέντρωση του γαλακτικού στο αίμα συσχετίζεται με την οξυγόνωση των κυττάρων [170], αλλά και με παθολογικές καταστάσεις [167,168]. Επιπλέον η συγκέντρωση του γαλακτικού σε γαλακτοκομικά προϊόντα αποτελεί δείκτη ποιότητας [159].

Για την κατασκευή βιοαισθητήρων γαλακτικού έχουν χρησιμοποιηθεί τα ένζυμα οξειδάση του γαλακτικού (LOx), αφυδρογονάση του γαλακτικού [171-174], αποκαρβοξυλάση του γαλακτικού [152], αλλά και μικροοργανισμοί όπως το βακτήριο *Paracoccus denitrificans* [175], ή η *Yeast Hansenula anomala* [176].

Η LOx είναι το πλέον χρησιμοποιημένο ένζυμο στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων γαλακτικού. Μπορεί να απομονωθεί από αρκετούς μικροοργανισμούς, όπως *Pediococcus sp.*, *Tetrahymena pyriformis*, *Streptococcus faecalis*, *Aerococcus viridans* [177] Αποτελείται από τέσσερις υπομονάδες (συνολικό μοριακό βάρος ~160 kDa) που κάθε μια έχει ένα μόριο FAD ως προσθετική ομάδα*. Η αντίδραση που καταλύει η LOx δίνεται στις εξισώσεις 9 και 10:



Το μοριακό οξυγόνο αποτελεί και γι' αυτό το ένζυμο το συμπαραγοντα που γίνεται ο δέκτης ηλεκτρονίων από το ενεργό κέντρο ώστε να αναγεννηθεί το ένζυμο. Όπως και στην περίπτωση της οξειδάσης της γλυκόζης, για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων γαλακτικού έχουν χρησιμοποιηθεί μεταφορείς ηλεκτρονίων για την αναγέννηση της LOx.

* Είναι δυνατόν, ανάλογα με την πηγή του ενζύμου, να αλλάζει η προσθετική ομάδα από FAD σε FMN. Ωστόσο επειδή συνήθως χρησιμοποιείται η οξειδάση του γαλακτικού από *Pediococcus sp.* που περιέχει FAD, στις εξισώσεις θα χρησιμοποιείται αυτό το παράδειγμα.

Στον πίνακα 7 παρατίθενται ορισμένες από τις σημαντικότερες εργασίες που αφορούν αμπερομετρικούς βιοαισθητήρες γαλακτικού.

Πίνακας 7. Επιλεγμένες εργασίες που αναφέρονται στην κατασκευή βιοαισθητήρων γαλακτικού με τη χρήση LOx. Στη στήλη «Μεθοδολογία» αναφέρονται το είδος του ηλεκτροδίου, η μέθοδος ακινητοποίησης, ο μεταφορέας ηλεκτρονίων (αν χρησιμοποιείται), οι μεμβράνες και το δυναμικό εργασίας.

Μεθοδολογία	Σταθερότητα			Αναπαραγωγιμότητα	
	Λειτουργίας	Χρόνος Ζωής	Αποθήκευσης	Μετρήσεων	Κατασκευής
Πάστα άνθρακα, υπεροξειδάση (HRP), πολυαιθυλενιμίνη, -50 mV. [130]	84% μετά από 18 ώρες	100% μετά από 20 μέρες.	-	-	20-40%
Δισκία γραφίτη-Teflon, HRP, φερροκένιο, 0,0 mV. [161]	-	50% μετά από 2 μήνες	100% μετά από 6 μήνες στους +4 °C	5,6 %	6,6%
Πλατίνα, διαμοριακή σύνδεση, εξωτερική μεμβράνη PVC, +650 mV. [178]	82% μετά από 216 ώρες	100% μετά από 9 μήνες	-	2%	10-15%
TTF - TCNQ, διαμοριακή σύνδεση, πολυανθρακική μεμβράνη, +150 mV. [179]	100% μετά από 6 ώρες	90% μετά από 3 εβδομάδες	-	-	24%
Επιπλατίωση ατσάλινης επιφάνειας, φυσική προσρόφηση, εξωτερική μεμβράνη ζελατίνας, +400 mV. [180]	50% μετά από 1440 ώρες	-	100% μετά από 18 μήνες στους -18°C.	-	-
Πάστα άνθρακα, methylene green, +150 mV. [181]	70% μετά από 8 λεπτά	-	95% μετά από 2 μήνες	-	-

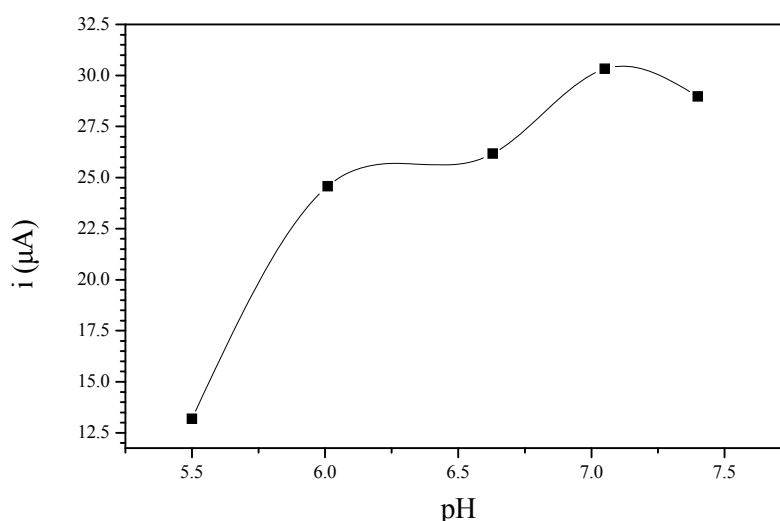
Όπως και στην περίπτωση των βιοαισθητήρων γλυκόζης, πολλές από τις δημοσιευμένες εργασίες [182-185] περιορίζονται στη μελέτη των αναλυτικών χαρακτηριστικών των βιοαισθητήρων γαλακτικού (καμπύλη βαθμονόμησης, ευαισθησία, όριο ανίχνευσης κλπ) χωρίς να παραθέτουν περισσότερα στοιχεία.

Στη συνέχεια θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας για την κατασκευή βιοαισθητήρα γαλακτικού με χρήση του πορώδους άνθρακα και τη σταθεροποίηση του ενζύμου με τη χρήση διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνης.

7.2 Κατασκευή του Βιοαισθητήρα

Η κατασκευή των βιοαισθητήρων έγινε με παρόμοιο τρόπο με τη κατασκευή των βιοαισθητήρων γλυκόζης. Χρησιμοποιήθηκαν ενζυμικά διαλύματα (10 mM KH_2PO_4 pH 7,0) που περιείχαν 200 U/mL LOx και διαφορετικές ποσότητες διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνης (0,0 έως 1,0 % w/v). Ο πορώδης άνθρακας (3,1 mm διάμετρο, 5,0 mm μήκος) αφού καθαριστεί, τοποθετείται στο ενζυμικό διάλυμα για να επιτευχθεί η προσρόφηση του ενζύμου. Μετά από την πάροδο 20 ωρών, ο άνθρακας απομακρύνεται από το διάλυμα και τοποθετείται σε ειδικό σώμα ηλεκτροδίου για να εξεταστεί. Οι μετρήσεις έγιναν χρησιμοποιώντας τις ίδιες διατάξεις που παρουσιάστηκαν στο προηγούμενο κεφάλαιο (παρ. 6.2).

Αρχικά, εξετάστηκε το βέλτιστο pH λειτουργίας του βιοαισθητήρα. Όπως φαίνεται από το σχήμα 24, ο βιοαισθητήρας χάνει σημαντικό μέρος της ευαισθησίας του για το γαλακτικό σε pH μικρότερα από 6,0. Στην περιοχή pH από 6,0 ως 7,0 η ευαισθησία αυξάνει όσο λιγότερο όξινο γίνεται το pH του διαλύματος, για να μειωθεί και πάλι όταν το pH γίνει ελαφρώς βασικό (7,5).

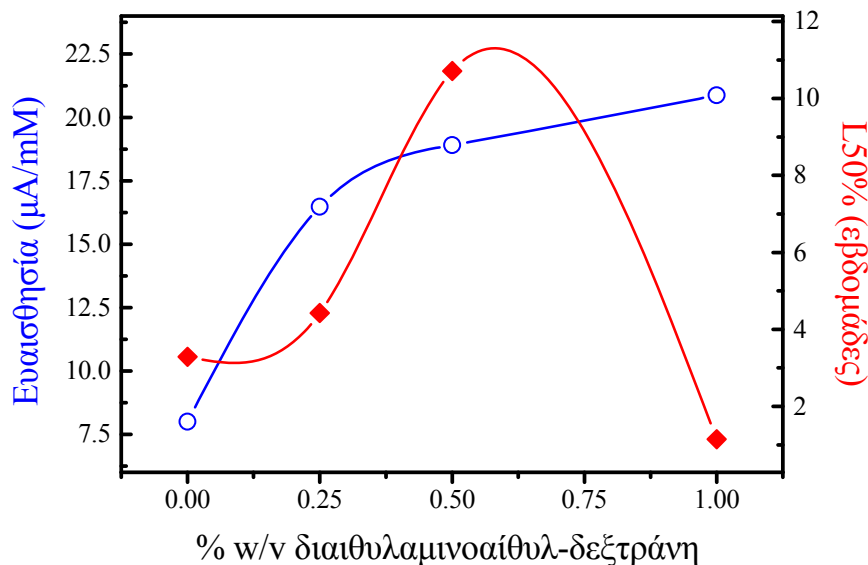


Σχήμα 24. Επίδραση του pH στην απόκριση του βιοαισθητήρα γαλακτικού.
Το ρεύμα αναφέρεται στην απόκριση σε 2 mM γαλακτικού.

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων, τα υπόλοιπα πειράματα έγιναν χρησιμοποιώντας ρυθμιστικά διαλύματα 10 mM KH_2PO_4 ρυθμισμένα σε pH 7,0.

7.3 Επίδραση της Διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνης

Για την εξέταση της επίδρασης που έχει η ποσότητα της διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνης στα χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα γαλακτικού, κατασκευάστηκαν βιοαισθητήρες από ενζυμικά διαλύματα που περιείχαν διαφορετικές ποσότητες πολυηλεκτρολύτη. Οι βιοαισθητήρες εξετάζονταν περιοδικά χρησιμοποιώντας τη στατική διάταξη, και φυλάσσονταν ενδιάμεσα σε ρυθμιστικό διάλυμα στους $+4^\circ\text{C}$. Για τα συγκεκριμένα πειράματα το δυναμικό που εφαρμόζονταν στους βιοαισθητήρες ήταν $+800\text{ mV}$. Στο σχήμα 25 παρουσιάζεται η επίδραση της ποσότητας του πολυηλεκτρολύτη στην ευαισθησία και το χρόνο ζωής του βιοαισθητήρα.



Σχήμα 25. Επίδραση της ποσότητας της διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνης στην ευαισθησία (-○-) και το χρόνο ζωής (-◆-) του βιοαισθητήρα γαλακτικού.

Η επίδραση της διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνης στα χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα γαλακτικού είναι παρόμοια με την επίδραση που είχε στους βιοαισθητήρες γλυκόζης. Έτσι αυξάνοντας την συγκέντρωση της διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνης αυξάνεται η ευαισθησία του βιοαισθητήρα στο γαλακτικό. Αυτή η αύξηση πιστεύεται ότι προέρχεται από την αύξηση της καταλυτικής δράσης του ενζύμου σε

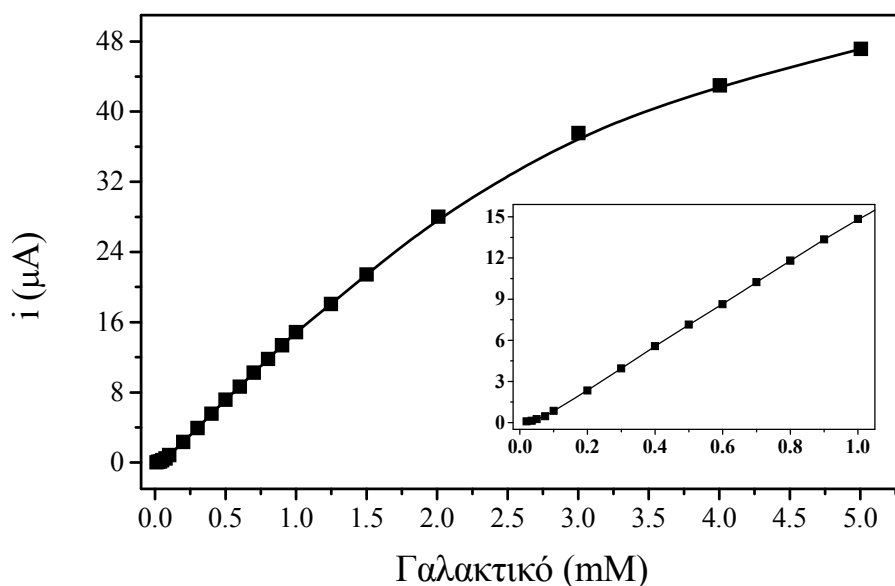
συνδυασμό με την ακινητοποίηση μεγαλύτερης ποσότητας ενζύμου όταν χρησιμοποιείται διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνη (παρ. 6.5). Ταυτόχρονα μέχρι τα 0,5% w/v η προσθήκη της διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνης βελτιώνει σημαντικά το χρόνο ζωής του βιοαισθητήρα γαλακτικού, αυξάνοντας τον από 3 σε 11 εβδομάδες (χρόνος για να μειωθεί η ευαισθησία στο 50% της αρχικής της τιμής). Ο χρόνος ζωής του βιοαισθητήρα που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας 0,5% w/v διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνη είναι καλύτερος από την πλειονότητα των βιοαισθητήρων γαλακτικού που δημοσιεύονται στην βιβλιογραφία (Πίνακας 7).

Η ευαισθησία του βιοαισθητήρα που κατασκευάστηκε χρησιμοποιώντας 1,0% w/v διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνη, μειώνεται πολύ γρήγορα με το χρόνο. Η γρήγορη απώλεια της ευαισθησίας, όταν χρησιμοποιείται μεγάλη ποσότητα πολυηλεκτρολύτη, έχει παρατηρηθεί και στους βιοαισθητήρες γλυκόζης (σχ. 19, παρ. 6.5). Όπως προαναφέρθηκε ο λόγος αυτής της συμπεριφοράς πιστεύεται ότι είναι η αποσταθεροποίηση του ενζύμου σε συνδυασμό με την ασθενή προσρόφηση της περίσσειας του ενζύμου.

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων το ενζυμικό διάλυμα που περιείχε 200 U/mL LOx και 0,5 w/v διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνη χρησιμοποιήθηκε στα υπόλοιπα πειράματα για την κατασκευή των βιοαισθητήρων γαλακτικού.

7.4 Αναλυτικά Χαρακτηριστικά του Βελτιστοποιημένου Βιοαισθητήρα

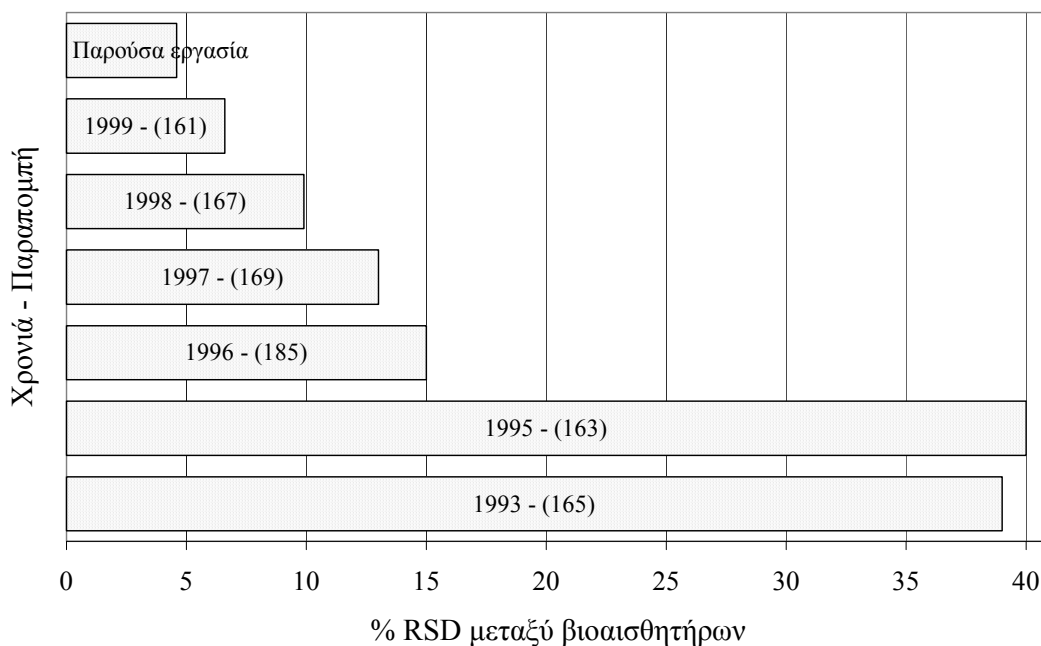
Στο σχήμα 26 παρουσιάζεται η καμπύλη βαθμονόμησης του βελτιστοποιημένου βιοαισθητήρα γαλακτικού.



Σχήμα 26. Καμπύλη βαθμονόμησης του βελτιστοποιημένου βιοαισθητήρα γαλακτικού. Στο ένθετο παρουσιάζεται το γραμμικό τμήμα της καμπύλης.

Η ευαισθησία του βιοαισθητήρα είναι $15,59 \pm 0,72 \mu\text{A}/\text{mM}$, τιμή που είναι από τις μεγαλύτερες που έχουν δημοσιευτεί. Η μεγάλη αρχική ευαισθησία παρατείνει τη χρήση του βιοαισθητήρα, αφού μπορεί να χρησιμοποιηθεί ακόμα και όταν η ευαισθησία του μειωθεί στο 10% της αρχικής της τιμής, δηλαδή μετά από 6 μήνες. Η απόκριση του βιοαισθητήρα είναι γραμμική για συγκεντρώσεις γαλακτικού από 75 μM ως 1000 μM , ενώ το όριο ανίχνευσης (υπολογισμένο για λόγο σήματος προς θόρυβο ίσον με τρία) είναι περίπου 10 μM . Οι μετρήσεις έχουν σχετική τυπική απόκλιση μεταξύ 2,0 και 5,5% για όλο το εύρος των συγκεντρώσεων που εξετάστηκαν. Ο χρόνος απόκρισης (υπολογισμένος ως ο χρόνος που χρειάζεται το ρεύμα μετά την προσθήκη του γαλακτικού για να φτάσει το 90% της τελικής τιμής) κυμαίνεται από 20 ως 60 δευτερόλεπτα, ανάλογα με το πόσο πυκνό είναι το δείγμα που αναλύεται.

Η αναπαραγωγιμότητα της διαδικασίας κατασκευής εξετάστηκε συγκρίνοντας την ευαισθησία τριών διαφορετικών βιοαισθητήρων που κατασκευάστηκαν από το ίδιο ενζυμικό διάλυμα. Η σχετική τυπική απόκλιση στην ευαισθησία των τριών βιοαισθητήρων ήταν 4,6%. Αυτή η τιμή είναι η μικρότερη που έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα στην βιβλιογραφία για την κατασκευή βιοαισθητήρων γαλακτικού.



Σχήμα 27. Βέλτιστες τιμές αναπαραγωγιμότητας κατασκευής που έχουν δημοσιευτεί ανά χρονιά. Εντός των παρενθέσεων αναγράφονται οι αντίστοιχες παραπομπές.

Στο σχήμα 27 παρουσιάζονται οι καλύτερες τιμές αναπαραγωγιμότητας κατασκευής που έχουν δημοσιευτεί την τελευταία επταετία. Από το σχήμα γίνεται φανερό, ότι τα τελευταία χρόνια παρατηρείται σημαντική βελτίωση στην ανάπτυξη αναπαραγωγικών διαδικασιών κατασκευής βιοαισθητήρων γαλακτικού. Παρόλα αυτά εξακολουθούν να δημοσιεύονται εργασίες που η σχετική τυπική απόκλιση μεταξύ των χαρακτηριστικών των βιοαισθητήρων είναι της τάξης του 20% [162,179].

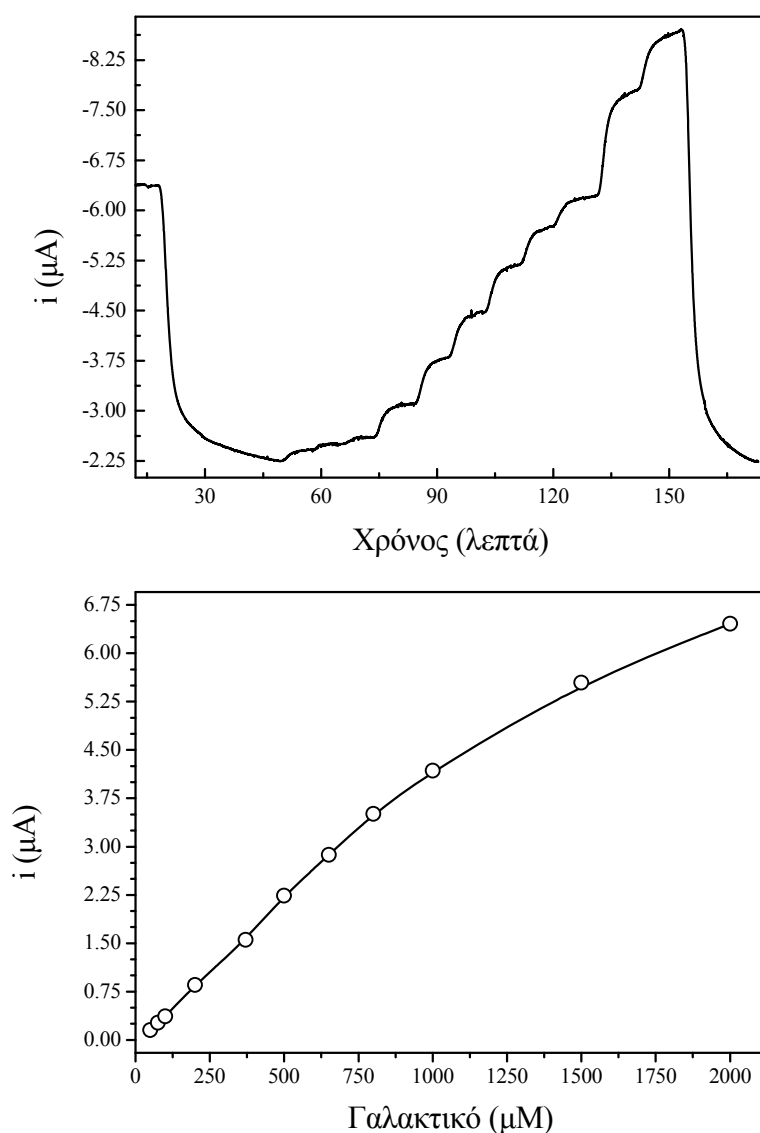
7.5 Σταθερότητα Αποθήκευσης και Συνεχούς Λειτουργίας

Για τη μελέτη της σταθερότητας αποθήκευσης κατασκευάστηκε μια παρτίδα βιοαισθητήρων από το ίδιο ενζυμικό διάλυμα (200 U/mL LOx και 0,5% w/v διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη). Μετά την κατασκευή οι βιοαισθητήρες αφυδατώθηκαν με ψυχρή ξήρανση και φυλάχτηκαν στους +4°C. Στο τέλος κάθε μήνα ένας βιοαισθητήρας τοποθετείται για 20 ώρες σε ρυθμιστικό διάλυμα για να ενυδατωθεί και στη συνέχεια εξετάζεται. Η ευαισθησία του χρησιμοποιείται ως μέτρο της ενεργότητάς του.

Η ενεργότητα των βιοαισθητήρων γαλακτικού αυξήθηκε μετά από ένα μήνα αποθήκευσης κατά 20% περίπου. Αυτή η αυξημένη ευαισθησία διατηρήθηκε μέχρι και τον πέμπτο μήνα αποθήκευσης. Στη συνέχεια η ενεργότητα μειώθηκε σημαντικά, με αποτέλεσμα τον έκτο μήνα να έχει περιοριστεί στο 63% της αρχικής τιμής. Ωστόσο η συνολική σταθερότητα των βιοαισθητήρων γαλακτικού κατά την αποθήκευση κρίνεται ικανοποιητική.

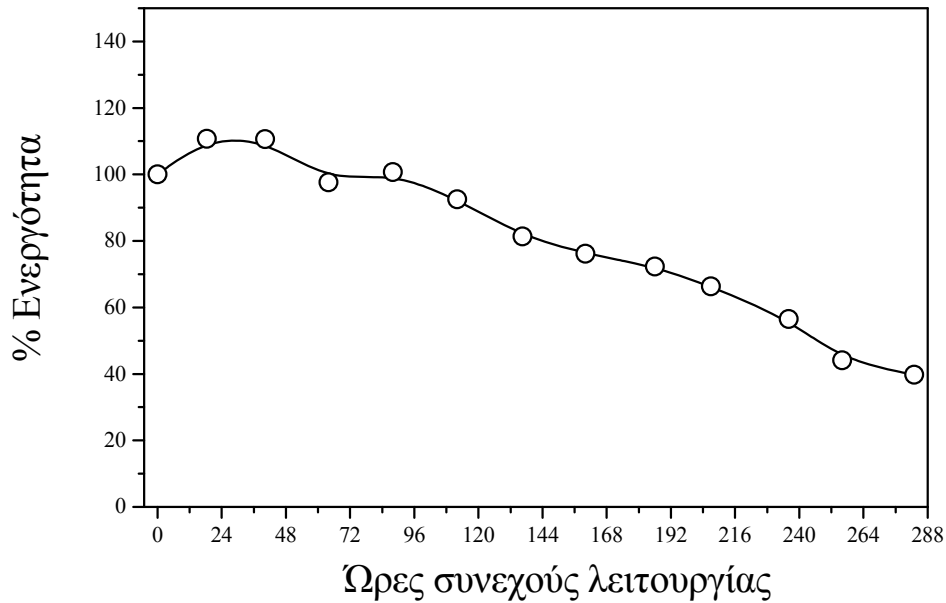
Ακολούθως εξετάστηκε η σταθερότητα του βιοαισθητήρα γαλακτικού κάτω από συνθήκες συνεχούς λειτουργίας. Ο βιοαισθητήρας που κατασκευάστηκε (200 U/mL LOx και 0,5% w/v διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη) εισήχθη στο σύστημα ροής όπου παρέμεινε για περισσότερες από 280 ώρες υπό συνεχή εφαρμογή δυναμικού +600 mV. Η ταχύτητα ροής ήταν 0,5 mL/min και το διάλυμα ροής ήταν 10 mM KH₂PO₄ και 1 mM γαλακτικό οξύ ρυθμισμένο σε pH 7,0. Λόγω της παρουσίας του γαλακτικού οξέος στο διάλυμα ροής υπάρχει συνεχής κατάλυση από το

ακίνητο ένζυμο. Καθημερινά γινότανε καμπύλη βαθμονόμησης και η ευαισθησία του βιοαισθητήρα χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο της ενεργότητάς του. Πριν γίνει η καμπύλη βαθμονόμησης, το διάλυμα ροής αντικαθιστάται με ρυθμιστικό διάλυμα (10 mM KH_2PO_4 ρυθμισμένο σε pH 7,0) που δεν περιέχει γαλακτικό οξύ. Ένα τυπικό καταγράφημα και η αντίστοιχη καμπύλη βαθμονόμησης παρουσιάζονται στο σχήμα 28.



Σχήμα 28. Τυπικό καταγράφημα και καμπύλη βαθμονόμησης του βελτιστοποιημένου βιοαισθητήρα γαλακτικού που έχει εισαχθεί στο σύστημα ροής. Η ταχύτητα ροής ήταν 0,5 mL/min και το εφαρμοζόμενο δυναμικό +600 mV.

Η ευαισθησία του βιοαισθητήρα, κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες, είναι $4,35 \pm 0,08 \mu\text{A}/\text{mM}$ και το γραμμικό εύρος απόκρισης από 50 μM έως 1000 μM . Ο χρόνος απόκρισης κυμαίνεται από 2,9 ως 6,4 λεπτά ανάλογα με τη συγκέντρωση του γαλακτικού στο δείγμα που αναλύεται.



Σχήμα 29. Σταθερότητα λειτουργίας του βελτιστοποιημένου βιοαισθητήρα γαλακτικού. Η ταχύτητα ροής ήταν 0,5 mL/min και το εφαρμοζόμενο δυναμικό +600 mV.

Στο σχήμα 29 παρουσιάζεται η σταθερότητα του βιοαισθητήρα γαλακτικού κάτω από συνθήκες συνεχούς λειτουργίας. Η ευαισθησία του βιοαισθητήρα, μετά από μία μικρή αύξηση τις πρώτες ώρες, παραμένει σταθερή στο 100% για 100 ώρες. Στην συνέχεια αρχίζει να μειώνεται σταδιακά, για να φτάσει στο 50% της αρχικής τιμής μετά από 245 ώρες συνεχούς λειτουργίας. Πρέπει να σημειωθεί ότι το γραμμικό εύρος απόκρισης του βιοαισθητήρα παραμένει σταθερό καθ' όλη την διάρκεια της λειτουργίας του βιοαισθητήρα, χωρίς να επηρεάζεται από τις αλλαγές στην ευαισθησία.

7.6 Συμπεράσματα

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο παρουσιάστηκε η κατασκευή βιοαισθητήρα για την ανίχνευση του γαλακτικού οξέως. Παρόλη την εκτεταμένη έρευνα που έχει γίνει η ανάπτυξη αναπαραγωγικών διαδικασιών για την κατασκευή βιοαισθητήρων γαλακτικού εξακολουθεί να προκαλεί το ενδιαφέρον πολλών ερευνητικών ομάδων [161,164,174,178,183,184].

Σε αυτή την εργασία παρουσιάζεται η κατασκευή βιοαισθητήρα γαλακτικού με τη χρήση της οξειδάσης του γαλακτικού. Ο συνδυασμός της σταθεροποιητικής δράσης της διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνης με τη χρήση του πορώδους άνθρακα ως

ηλεκτροδίου εργασίας συντέλεσαν στην κατασκευή βιοαισθητήρων με αναπαραγώγιμα χαρακτηριστικά και αξιοσημείωτη σταθερότητα κατά τη συνεχή λειτουργία τους. Ταυτόχρονα η σταθερότητα των βιοαισθητήρων κατά την αποθήκευση τους είναι εξίσου σημαντική.

Όπως και στην περίπτωση του βιοαισθητήρα γλυκόζης, η ποσότητα της διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνης που χρησιμοποιείται βελτιώνει σημαντικά την ευαισθησία και το χρόνο ζωής του βιοαισθητήρα. Η βέλτιστη συγκέντρωση βρέθηκε ότι είναι 0,5% w/v.

Στο επόμενο κεφάλαιο θα συζητηθεί η ανάπτυξη βιοαισθητήρα για την ανίχνευση φωσφορικών ιόντων.

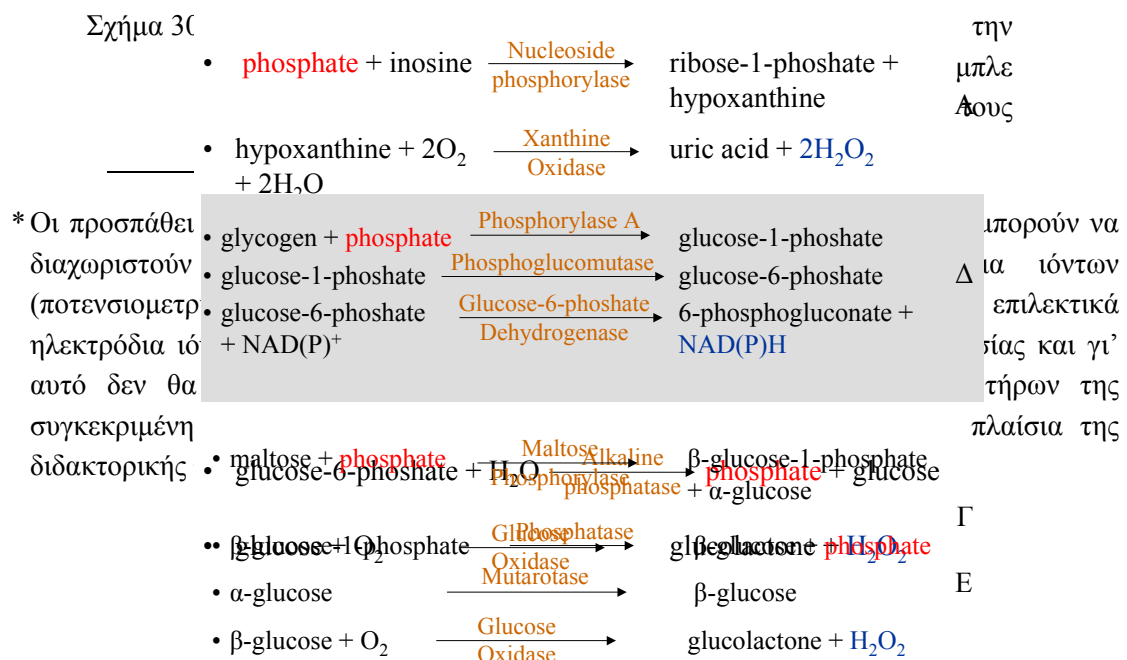
8.ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΑΣ ΦΩΣΦΟΡΙΚΩΝ

8.1Ανασκόπηση

Η γρήγορη και ακριβής ανίχνευση των φωσφορικών ιόντων προσλαμβάνει ιδιαίτερη σημασία σε τομείς της επιστήμης που είναι σημαντικοί για τη σύγχρονη κοινωνία. Τα φωσφορικά ιόντα συμμετέχουν στις κυριότερες δομικές και λειτουργικές μονάδες των οργανισμών (RNA, DNA, ATP, φωσφολιπίδια), ενώ ταυτόχρονα αποτελούν το ρυθμιστή του pH του αίματος. Η μεταβολή της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων στο αίμα σχετίζεται με παθολογικές καταστάσεις όπως ο υπερπαραθυροϊδισμός [186,187], το σύνδρομο Fanconi [188,189] κλπ. Παράλληλα, τα φωσφορικά ιόντα σχετίζονται άμεσα με πολλές καθημερινές ανθρώπινες δραστηριότητες καθώς αποτελούν βασικό συστατικό λιπασμάτων, απορρυπαντικών, φυτοφαρμάκων κλπ. Η υπερβολική χρήση των παραπάνω παρασκευασμάτων, σε συνδυασμό με τον αργό βιολογικό κύκλο του φωσφόρου, έχει ως αποτέλεσμα τη συνεχή συσσώρευση των φωσφορικών ιόντων στο περιβάλλον, συμβάλλοντας στο φαινόμενο του ευτροφισμού [145,190].

Η σπουδαιότητα της ανάπτυξης αισθητήρων για την ανίχνευση των φωσφορικών ιόντων κέντρισε το ενδιαφέρον πολλών ερευνητικών ομάδων [191]*. Για την ανάπτυξη αμπερομετρικών βιοαισθητήρων φωσφορικών έχουν χρησιμοποιηθεί πάρα πολλά διαφορετικά ένζυμα. Στην πλειονότητα των δημοσιευμένων εργασιών χρησιμοποιείται συνδυασμός δύο ή και περισσότερων ενζύμων για ανίχνευση των φωσφορικών ιόντων [191].

Στο σχήμα 30 παρουσιάζονται οι ενζυματικές αντιδράσεις που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη αμπερομετρικών βιοαισθητήρων φωσφορικών ιόντων.



ανιχνεύεται αμπερομετρικά και συσχετίζεται με την συγκέντρωση των φωσφορικών ιόντων.

Τα χαρακτηριστικά των κυριότερων αμπερομετρικών βιοαισθητήρων φωσφορικών που έχουν αναπτυχθεί παρουσιάζονται στον πίνακα 8.

Πίνακας 8. Επιλεγμένες εργασίες που αναφέρονται στην κατασκευή βιοαισθητήρων φωσφορικών. Στην στήλη «Μεθοδολογία» αναφέρονται οι ενζυματικές αντιδράσεις που χρησιμοποιούνται (το γράμμα αντιστοιχεί στις ανάλογες αντιδράσεις του σχήματος 30), το είδος του ηλεκτροδίου, η μέθοδος ακινητοποίησης, ο μεταφορέας ηλεκτρονίων (αν χρησιμοποιείται), οι μεμβράνες και το δυναμικό εργασίας.

Μεθοδολογία	Σταθερότητα		Όριο ανίχ νευσης	Αναπαραγωγιμό τητα	
	Λειτουργίας	Αποθήκευσης		Μετρήσεων	Κατασκευής
[192] A Πλατίνα, ομοιοπολική δέσμευση σε μεμβράνη, +650 mV.	70% μετά από 20 ώρες	-	0,1 μM	4%	-
[193] A Πλατίνα, ομοιοπολική δέσμευση σε μεμβράνη, εξωτερική μεμβράνη κυτταρίνης, +650 mV.	40% μετά από 25 αναλύσεις	-3% κάθε μέρα αποθήκευσης στους +4°C.	10 μM	-	-
[194] B Υαλώδης άνθρακας, ηλεκτροπολυμερισμός πυρρολίου, -200 mV	64% μετά από 120 αναλύσεις	67% μετά από 5 εβδομάδες (-20°C)	2 μM	3,1 %	9,5%
[195] Δ Υαλώδης άνθρακας, φυσική παγίδευση με μεμβράνη κυτταρίνης, σύμπλοκο Os, +200 mV	-	100% μετά από 21 ημέρες.	6 μM	-	15- 40%
[196] E Πλατίνα, ομοιοπολική δέσμευση σε μεμβράνη, εξωτερική μεμβράνη κυτταρίνης, +650 mV.	-	-	0,01 μM	-	-

Η απλούστερη προσέγγιση για την κατασκευή αμπερομετρικών βιοαισθητήρων φωσφορικών είναι η χρήση της οξειδάσης του πυρουβικού (POD). Η αντίδραση που καταλύει το συγκεκριμένο ένζυμο είναι:



Η POD αποτελείται από τέσσερις ταυτόσημες υπομονάδες και έχει μοριακό βάρος 190-260 kDa [197]. Για την επίτευξη της κατάλυσης απαιτείται η παρουσία πυροφωσφορικής θειαμίνης (TPP), φλάβινο-αδένινο δινουκλεοτιδίου (FAD) και ιόντων Mg(II). Αυτή η απαίτηση κάνει πολύπλοκη την κατασκευή των αντίστοιχων βιοαισθητήρων. Επιπλέον, η POD είναι ένα πολύ ασταθές ένζυμο και η παρουσία των φωσφορικών ιόντων είναι απαραίτητη για τη σταθεροποίησή του [198]. Η απουσία των φωσφορικών ιόντων από τα διαλύματα εργασίας και αποθήκευσης του βιοαισθητήρα έχει ως αποτέλεσμα οι βιοαισθητήρες να παρουσιάζουν μικρό χρόνο ζωής και να είναι ασταθείς.

Για τους παραπάνω λόγους είναι περιορισμένη η χρήση της POD στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων φωσφορικών. Μόλις δύο εργασίες έχουν δημοσιευτεί για την κατασκευή βιοαισθητήρα φωσφορικών με τη χρήση της POD.

- Το 1991 οι Kubo et al.[199] ακινητοποίησαν την POD σε μεμβράνη πολυβινυλικής αλκοόλης και ακολούθως τοποθέτησαν τη μεμβράνη στην επιφάνεια ηλεκτροδίου οξυγόνου. Το όριο ανίχνευσης του βιοαισθητήρα ήταν 12 μM KH_2PO_4 και η αναπαραγωγικότητα μετρήσεων 5,9%. Ο χρόνος ζωής του βιοαισθητήρα, εκφρασμένος ως L50% ήταν μόλις επτά ημέρες.
- Οι Gajonic et al.[200] εναπόθεσαν στην επιφάνεια ηλεκτροδίου υαλώδους άνθρακα πολυμερές θειοφαινίου εμπλουτισμένου με σύμπλοκο Os (μεταφορέας ηλεκτρονίων). Η POD ακινητοποιήθηκε μέσω φυσικής προσρόφησης στο πολυμερές. Οι μετρήσεις γίνονταν εφαρμόζοντας δυναμικό +400 mV. Το όριο ανίχνευσης του βιοαισθητήρα είναι 20 μM , ενώ μετά από δύο εβδομάδες η ευαισθησία του μειώνεται στο 14% της αρχικής της τιμής.

Η POD έχει χρησιμοποιηθεί και για την ανάπτυξη βιοαναλυτικών συστημάτων ανίχνευσης των φωσφορικών. Για να παραταθεί ο μικρός χρόνος ζωής του ενζύμου, μεγάλες ποσότητες ενζύμου ακινητοποιούνται με ομοιοπολική δέσμευση σε σφαιρίδια πορώδους γυαλιού, τα οποία στη συνέχεια τοποθετούνται σε ειδική στήλη. Το δείγμα διέρχεται από τη στήλη, όπου λαμβάνει χώρα η ενζυματικά καταλυόμενη

αντίδραση, και η ανίχνευση γίνεται είτε ηλεκτροχημικά [198] είτε φωτομετρικά [201,202].

Όπως φαίνεται από την εξίσωση 11 η POD μπορεί να χρησιμοποιηθεί και στην ανάπτυξη βιοαισθητήρα για την ανίχνευση πυρουβικού [203,204]. Η παρουσία φωσφορικών ιόντων στα διαλύματα εργασίας και φύλαξης αυξάνουν τη σταθερότητα των αντίστοιχων βιοαισθητήρων (100% ενεργότητα μετά από 2 μήνες φύλαξης [203], 95% ενεργότητα μετά από 30 ώρες συνεχούς λειτουργίας [204]).

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε ανασυνδυασμένη (recombinant) POD από *Lactobacillus plantarum* που περιέχει τους συμπαραγόντες TPP, FAD και Mg(II) δεσμευμένους στο ενεργό κέντρο [205]. Η χρήση του συγκεκριμένου ενζύμου απλοποιεί την κατασκευή του βιοαισθητήρα, αφού πλέον δε χρειάζεται η προσθήκη των συμπαραγόντων στο ενζυμικό διάλυμα ή το διάλυμα εργασίας. Επιπλέον, το ένζυμο έχει τροποποιηθεί μέσω μετάλλαξης, ώστε να αυξηθεί η σταθερότητα του [206-208]. Οι Bergmann et al.[134] χρησιμοποίησαν το συγκεκριμένο ένζυμο για την κατασκευή βιοαισθητήρα πυρουβικού με ηλεκτρόδιο πάστας άνθρακα. Ο συγκεκριμένος βιοαισθητήρας διατηρεί το 66% της ενεργότητάς του μετά από 6 μήνες αποθήκευσης, και το 76% της ενεργότητάς του μετά από 12 ώρες συνεχούς λειτουργίας.

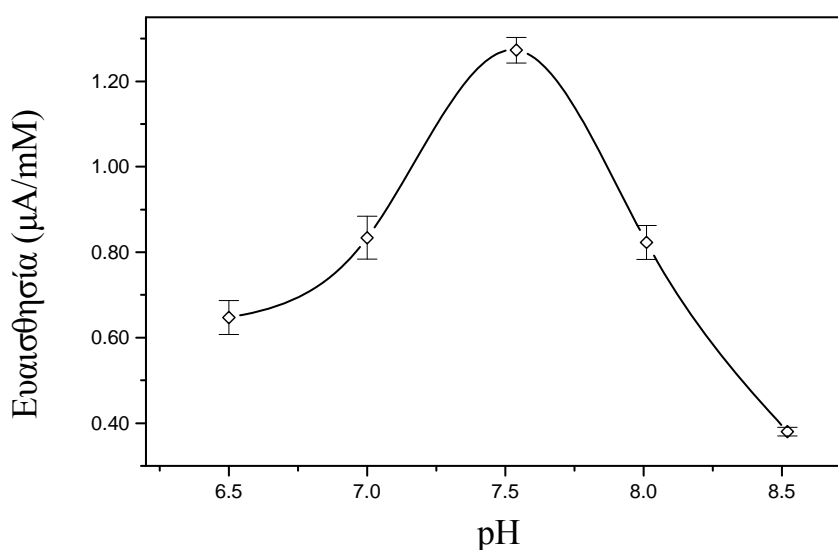
Στη συνέχεια θα παρουσιαστούν τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας για την κατασκευή βιοαισθητήρα φωσφορικών με τη χρήση του πορώδους άνθρακα και τη σταθεροποίηση των αναλυτικών χαρακτηριστικών του με τη χρήση διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνης.

8.2 Κατασκευή του Βιοαισθητήρα

Η κατασκευή των βιοαισθητήρων έγινε με παρόμοιο τρόπο με τον τρόπο κατασκευής των βιοαισθητήρων γλυκόζης και γαλακτικού. Για την κατασκευή χρησιμοποιήθηκαν ενζυμικά διαλύματα [10 mM 4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid (HEPES) pH 7,5] που περιείχαν 100 U/mL POD και διαφορετικές ποσότητες διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνης (0,0 έως 1,0 % w/v). Ο πορώδης άνθρακας (2,1 mm διάμετρο, 4,0 mm μήκος) αφού καθαριστεί, τοποθετείται στο ενζυμικό διάλυμα για να επιτευχθεί η προσρόφηση του ενζύμου. Μετά την πάροδο 20 ωρών, ο άνθρακας απομακρύνεται από το διάλυμα και τοποθετείται σε ειδικό σώμα ηλεκτροδίου για να εξεταστεί. Οι μετρήσεις έγιναν χρησιμοποιώντας τις ίδιες

διατάξεις που παρουσιάστηκαν σε προηγούμενο κεφάλαιο (παρ. 6.2). Μοναδική τροποποίηση ήταν η προσθήκη πυρουβικού οξέος στο διάλυμα μέτρησης, αφού η παρουσία του είναι απαραίτητη για την ενζυμική αντίδραση (εξίσωση 11).

Αρχικά, εξετάστηκε το βέλτιστο pH λειτουργίας του βιοαισθητήρα. Σε κάθε διάλυμα μέτρησης προστέθηκαν 10 mM πυρουβικού οξέος. Όπως φαίνεται από το σχήμα 31, ο βιοαισθητήρας παρουσιάζει μεγαλύτερη ευαισθησία στα φωσφορικά όταν το pH του διαλύματος είναι 7,5. Οποιαδήποτε μεταβολή του pH σε πιο όξινες ή βασικές τιμές, οδηγεί σε απότομη μείωση της ευαισθησίας του βιοαισθητήρα.



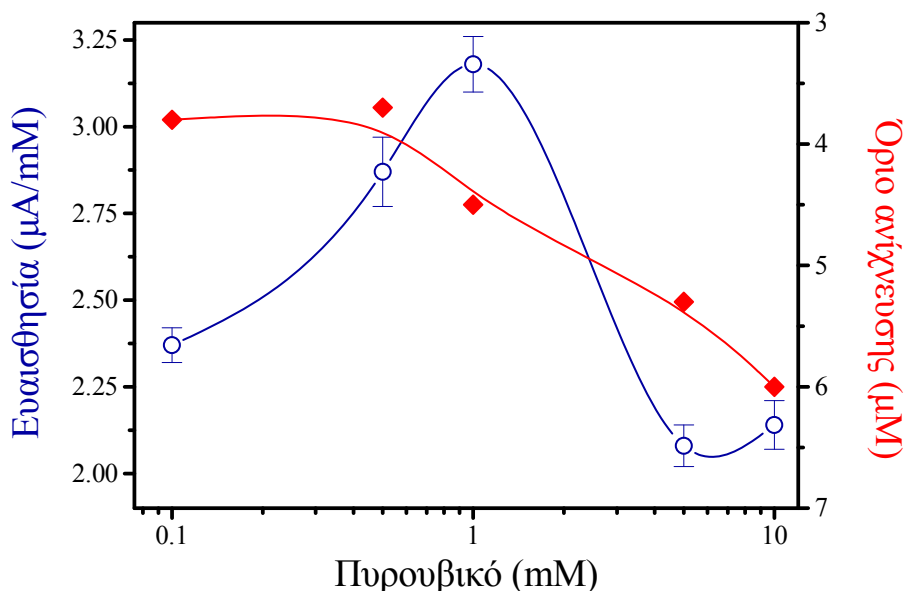
Σχήμα 31. Επίδραση του pH στην απόκριση του βιοαισθητήρα φωσφορικών. Στα διαλύματα μέτρησης προστέθηκαν 10 mM πυρουβικού.

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων, τα υπόλοιπα πειράματα έγιναν χρησιμοποιώντας ρυθμιστικά διαλύματα 10 mM HEPES ρυθμισμένα σε pH 7,5.

8.3 Επίδραση της Συγκέντρωσης του Πυρουβικού

Όπως φαίνεται από την εξίσωση 11, η παρουσία του πυρουβικού στο διάλυμα μέτρησης είναι απαραίτητη για την επίτευξη της ανίχνευσης των φωσφορικών ιόντων. Η συγκέντρωση του πυρουβικού αναμένεται να επηρεάζει τη λειτουργία του βιοαισθητήρα και ιδιαίτερα την ευαισθησία του και το όριο ανίχνευσης. Η απόκριση του βιοαισθητήρα εξετάστηκε για συγκεντρώσεις του πυρουβικού στο διάλυμα εργασίας από 0,1 έως 10 mM. Για κάθε διαφορετική συγκέντρωση γίνονταν καμπύλη βαθμονόμησης για να υπολογιστούν η ευαισθησία και το όριο ανίχνευσης.

Τα αποτελέσματα που παρουσιάζονται στο σχήμα 32, δείχνουν ότι η ευαισθησία του βιοαισθητήρα αυξάνεται, όταν συγκέντρωση του πυρουβικού αυξάνεται από 0,1 σε 1,0 mM. Περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του πυρουβικού οδηγεί σε απότομη μείωση της ευαισθησίας του βιοαισθητήρα. Η μείωση της ευαισθησίας όταν χρησιμοποιούνται μεγάλες συγκεντρώσεις πυρουβικού έχει παρατηρηθεί και από



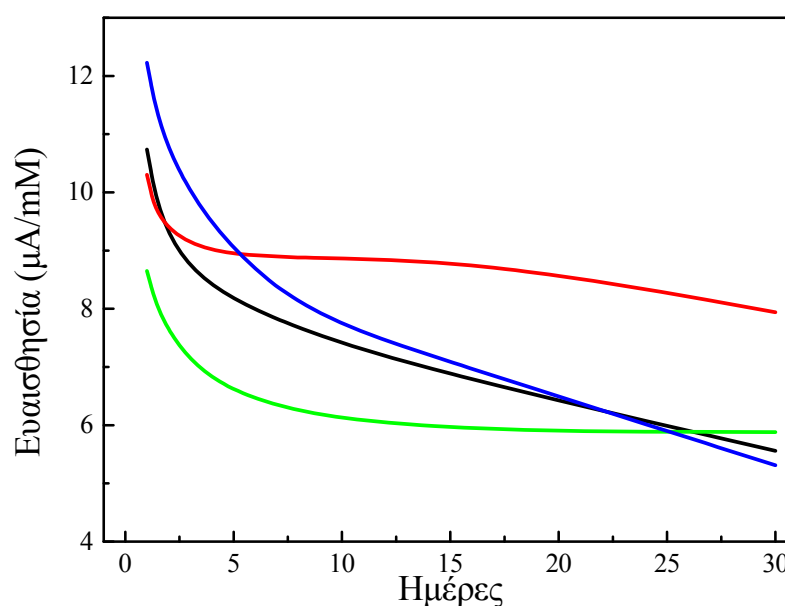
άλλους ερευνητές [199]. Ταυτόχρονα, όπως φαίνεται στο σχήμα, για τα 5,0 και 10 mM πυρουβικού λαμβάνονται παρόμοιες ευαισθησίες. Ως σημαντικότερος λόγος για αυτή την συμπεριφορά πρέπει να θεωρηθεί η επίδραση του οξυγόνου. Γι' αυτές τις υψηλές συγκεντρώσεις πυρουβικού, η συγκέντρωση του οξυγόνου καθορίζει την ταχύτητα της κατάλυσης, με αποτέλεσμα η αλλαγή στην συγκέντρωση του πυρουβικού να μην επηρεάζει σημαντικά την ευαισθησία του βιοαισθητήρα.

Σχήμα 32. Επίδραση της ποσότητας του πυρουβικού στην ευαισθησία (-O-) και το όριο ανίχνευσης (-♦-) του βιοαισθητήρα φωσφορικών ιόντων.

Όπως αναμενόταν, η ποσότητα του πυρουβικού στο διάλυμα εργασίας επηρεάζει και το όριο ανίχνευσης. Όταν η συγκέντρωση του πυρουβικού αυξάνεται από 0,1 σε 0,5 mM το όριο ανίχνευσης δεν αλλάζει (3,8 και 3,7 μM αντίστοιχα). Περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του πυρουβικού από 0,5 σε 10 mM οδηγεί σε αύξηση του ορίου ανίχνευσης στα 6 μM. Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων, σε όλα τα υπόλοιπα πειράματα το διάλυμα εργασίας περιείχε 1,0 mM πυρουβικού οξέως.

8.4 Επίδραση της Διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνης

Για την εξέταση της επίδρασης που έχει η ποσότητα της διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνης στα χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα φωσφορικών, κατασκευάστηκαν βιοαισθητήρες από ενζυμικά διαλύματα που περιείχαν διαφορετικές ποσότητες πολυηλεκτρολύτη. Οι βιοαισθητήρες εξετάζονταν περιοδικά χρησιμοποιώντας τη στατική διάταξη, και φυλάσσονταν ενδιάμεσα σε ρυθμιστικό διάλυμα στους +4°C.



Σχήμα 33. Επίδραση της ποσότητας της διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνης στο χρόνο ζωής των βιοαισθητήρων φωσφορικών. [(—) 0,0% w/v, (—) 0,10% w/v, (—) 0,25% w/v, (—) 0,50% w/v].

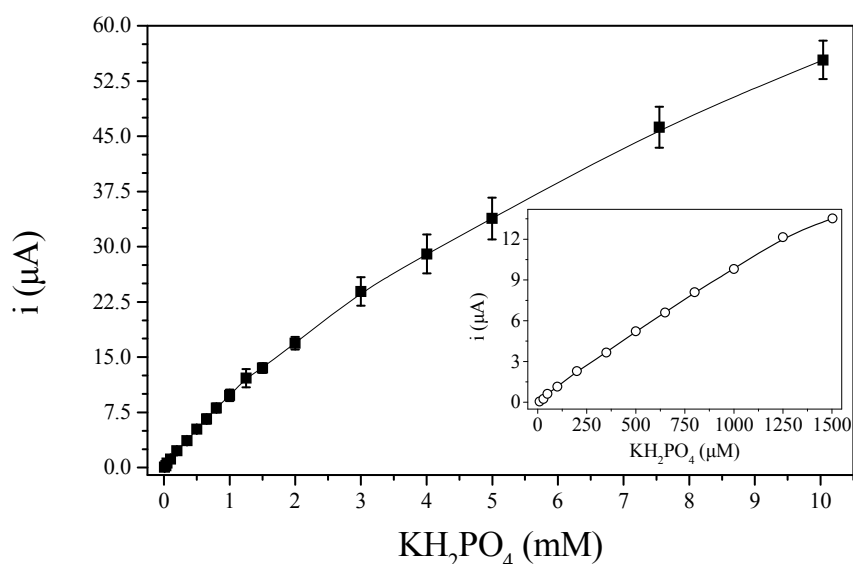
Στο σχήμα 33 παρουσιάζεται η επίδραση της διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνης στο χρόνο ζωής αλλά και την ευαισθησία των βιοαισθητήρων φωσφορικών. Όπως φαίνεται από τις αρχικές τιμές της ευαισθησίας, στην συγκεκριμένη περίπτωση η προσθήκη της διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνης δεν επηρεάζει την ευαισθησία του βιοαισθητήρα (τουλάχιστον όχι στο βαθμό που επηρεάζει στις περιπτώσεις των GOx και LOx). Η ελαφρώς μειωμένη ευαισθησία που παρουσιάζει ο βιοαισθητήρας που έχει κατασκευαστεί χρησιμοποιώντας 0,25% w/v διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνης δεν μπορεί να εξηγηθεί.

Ωστόσο, η προσθήκη της διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνης επηρεάζει σημαντικά το χρόνο ζωής των βιοαισθητήρων. Από το σχήμα 33 γίνεται φανερό ότι όλοι οι βιοαισθητήρες χάνουν γύρω στο 20% της αρχικής τους ενεργότητας μέσα στις πρώτες τρεις ημέρες. Στην συνέχεια όμως, και ανάλογα με την ποσότητα της διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνης που χρησιμοποιείται, η απώλεια της ενεργότητας των βιοαισθητήρων ελαχιστοποιείται. Έτσι ο χρόνος ζωής (εκφρασμένος ως L50%) αυξάνεται από 32 ημέρες για το βιοαισθητήρα χωρίς διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνη, σε 72 και 66 ημέρες για τους βιοαισθητήρες που κατασκευάστηκαν χρησιμοποιώντας 0,1% και 0,25% w/v διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνης αντίστοιχα. Αντίθετα, όταν χρησιμοποιείται 0,5% w/v διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνης ο χρόνος ζωής μειώνεται στις 23 ημέρες.

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων το ενζυμικό διάλυμα που περιείχε 100 U/mL POD και 0,1 w/v διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνη χρησιμοποιήθηκε στα υπόλοιπα πειράματα για την κατασκευή των βιοαισθητήρων φωσφορικών.

8.5 Αναλυτικά Χαρακτηριστικά του Βελτιστοποιημένου Βιοαισθητήρα

Στο σχήμα 34 παρουσιάζεται η καμπύλη βαθμονόμησης του βελτιστοποιημένου βιοαισθητήρα φωσφορικών.



Σχήμα 34. Καμπύλη βαθμονόμησης του βελτιστοποιημένου βιοαισθητήρα φωσφορικών. Στο ένθετο παρουσιάζεται το γραμμικό τμήμα της καμπύλης.

Η ευαισθησία του βιοαισθητήρα είναι $10,30 \pm 0,23 \mu\text{A}/\text{mM}$, η απόκρισή του είναι γραμμική για συγκεντρώσεις φωσφορικών από $50 \mu\text{M}$ ως $1250 \mu\text{M}$, ενώ το όριο ανίχνευσης (υπολογισμένο για λόγο σήματος προς θόρυβο ίσον με τρία) είναι $4,8 \mu\text{M}$. Ο χρόνος απόκρισης κυμαίνεται από 20 ως 40 δευτερόλεπτα, ανάλογα με τη συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα που αναλύεται.

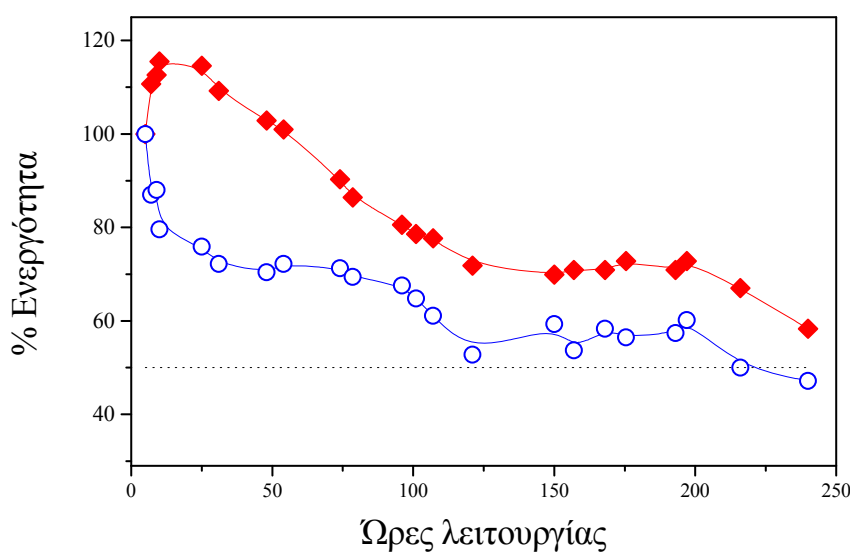
Η αναπαραγωγιμότητα της διαδικασίας κατασκευής εξετάστηκε συγκρίνοντας την ευαισθησία τριών διαφορετικών βιοαισθητήρων που κατασκευάστηκαν από το ίδιο ενζυμικό διάλυμα ($100 \text{ U}/\text{mL}$ POD και $0,10\%$ w/v διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνης). Η σχετική τυπική απόκλιση στην ευαισθησία των τριών βιοαισθητήρων ήταν $2,2\%$, ενώ η σχετική τυπική απόκλιση στην απόκρισή τους στο 1 mM φωσφορικών ιόντων ήταν $7,6\%$. Και οι δύο τιμές υποδεικνύουν ότι οι βιοαισθητήρες που κατασκευάζονται με τη συγκεκριμένη διαδικασία έχουν αναπαραγωγίμα χαρακτηριστικά.

8.6 Σταθερότητα Αποθήκευσης και Συνεχούς Λειτουργίας

Για τη μελέτη της σταθερότητας αποθήκευσης κατασκευάστηκε μια παρτίδα βιοαισθητήρων από το ίδιο ενζυμικό διάλυμα ($100 \text{ U}/\text{mL}$ POD και $0,10\%$ w/v διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη). Μετά την κατασκευή οι βιοαισθητήρες αφυδατώθηκαν με ψυχρή ξήρανση και φυλάχθηκαν στους $+4^\circ\text{C}$. Στο τέλος κάθε μήνα ένας βιοαισθητήρας τοποθετείται για 20 ώρες σε ρυθμιστικό διάλυμα για να ενυδατωθεί και στη συνέχεια εξετάζεται. Η ευαισθησία του χρησιμοποιείται ως μέτρο της ενεργότητάς του.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η ενεργότητα παραμένει στο $84 \pm 5\%$ της αρχικής ενεργότητας μετά από δύο μήνες ξηρής φύλαξης στους $+4^\circ\text{C}$, ενώ μετά από έξι μήνες η ενεργότητά τους είχε μειωθεί στο $49 \pm 4\%$. Οι συγκεκριμένες τιμές είναι εμφανώς καλύτερες από την καλύτερη σταθερότητα αποθήκευσης βιοαισθητήρα φωσφορικών που έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα στη βιβλιογραφία (66% μετά από 5 εβδομάδες) [194].

Ακολούθως εξετάστηκε η σταθερότητα του βιοαισθητήρα φωσφορικών κάτω από συνθήκες συνεχούς λειτουργίας. Ο βιοαισθητήρας που κατασκευάστηκε (100 U/mL POD και 0,10% w/v διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνη) εισήχθη στο σύστημα ροής όπου παρέμεινε για 240 ώρες υπό συνεχή εφαρμογή δυναμικού +600 mV. Η ταχύτητα ροής ήταν 0,65 mL/min και το διάλυμα ροής ήταν 10 mM HEPES, 1 mM πυρουβικό οξύ και 1 mM KH_2PO_4 ρυθμισμένο σε pH 7,5. Λόγω της παρουσίας των φωσφορικών ιόντων και του πυρουβικού οξέος στο διάλυμα ροής υπάρχει συνεχής κατάλυση από το ακινητοποιημένο ένζυμο. Καθημερινά γινόταν καμπύλη βαθμονόμησης και η ευαισθησία του βιοαισθητήρα χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο της ενεργότητάς του. Πριν γίνει η καμπύλη βαθμονόμησης, το διάλυμα ροής αντικαθίσταται με ρυθμιστικό διάλυμα (10 mM HEPES και 1 mM πυρουβικό οξύ ρυθμισμένο σε pH 7,5) που δεν περιέχει φωσφορικά ιόντα. Για λόγους σύγκρισης το συγκεκριμένο πείραμα επαναλήφθηκε για τον βιοαισθητήρα φωσφορικών που έχει κατασκευαστεί χωρίς τη χρήση διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνης.



Σχήμα 35. Σταθερότητα λειτουργίας του βιοαισθητήρα φωσφορικών χωρίς διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνη (-O-) και του βελτιστοποιημένου βιοαισθητήρα φωσφορικών (-♦-). Η ταχύτητα ροής ήταν 0,65 mL/min και το εφαρμοζόμενο δυναμικό +600 mV.

Η ευαισθησία του βιοαισθητήρα, μετά από μία μικρή αύξηση τις πρώτες δύο ημέρες, αρχίζει να μειώνεται σταδιακά. Μετά από 240 ώρες συνεχούς λειτουργίας η ενεργότητα του βελτιστοποιημένου βιοαισθητήρα είναι στο 58% της αρχικής της τιμής. Αντίθετα, ο βιοαισθητήρας που έχει κατασκευαστεί χωρίς την χρήση διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνης χάνει το 40% της αρχικής του ενεργότητας μέσα στις

πρώτες 100 ώρες. Στη συνέχεια η ενεργότητά του παραμένει σταθερή ($57\pm 3\%$) για τις επόμενες 100 ώρες, για να μειωθεί τελικά στο 47% της αρχικής τιμής μετά από 240 ώρες συνεχούς λειτουργίας.

8.7 Συμπεράσματα

Η ανάπτυξη βιοαισθητήρων για την ανίχνευση των φωσφορικών ιόντων έχει απασχολήσει πολλές ερευνητικές ομάδες. Ωστόσο οι βιοαισθητήρες που έχουν κατασκευαστεί μέχρι σήμερα παρουσιάζουν πολύ μικρή σταθερότητα, ενώ η χρήση πολλών ενζύμων για την ανίχνευση των φωσφορικών μειώνουν την ευαισθησία των αντίστοιχων βιοαισθητήρων και κάνουν πολύπλοκη τη διαδικασία κατασκευής τους. Η χρήση της οξειδάσης του πυρουβικού έχει βρει περιορισμένη εφαρμογή στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων φωσφορικών κυρίως λόγω της μεγάλης αστάθειας του συγκεκριμένου ενζύμου, αλλά και της αναγκαίας παρουσίας συμπαραγόντων (TPP, Mg(II), FAD). Η δέσμευση των συγκεκριμένων συμπαραγόντων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου έδωσε τη δυνατότητα για την απλοποίηση της διαδικασίας κατασκευής αλλά και της χρήσης ενός βιοαισθητήρα που θα βασίζεται στην ανασυνδυασμένη POD.

Σε αυτή την εργασία παρουσιάζεται η κατασκευή βιοαισθητήρα φωσφορικών με τη χρήση ανασυνδυασμένης POD. Ο συνδυασμός της σταθεροποιητικής δράσης της διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνης με τη χρήση του πορώδους άνθρακα ως ηλεκτροδίου εργασίας συντέλεσαν στην κατασκευή βιοαισθητήρων με αναπαραγωγίμα χαρακτηριστικά και αξιοσημείωτη σταθερότητα κατά τη συνεχή λειτουργία τους. Ταυτόχρονα η σταθερότητα των βιοαισθητήρων κατά την αποθήκευσή τους είναι η καλύτερη που έχει αναφερθεί μέχρι σήμερα.

Στην περίπτωση του βιοαισθητήρα φωσφορικών, η ποσότητα της διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνης που χρησιμοποιείται υπερδιπλασιάζει το χρόνο ζωής του βιοαισθητήρα, χωρίς όμως να επιδρά στην ευαισθησία του. Επιπλέον, η χρήση της διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνης αυξάνει τη σταθερότητα του βιοαισθητήρα κατά τη συνεχή λειτουργία του. Η βέλτιστη συγκέντρωση βρέθηκε ότι είναι 0,10% w/v διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνης.

Στο επόμενο κεφάλαιο θα συζητηθεί η χρησιμοποίηση φουλλερενίων ως μεταφορέων ηλεκτρονίων για την κατασκευή βιοαισθητήρων.

9.ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ ΒΑΣΙΣΜΕΝΟΙ ΣΤΗΝ ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ ΑΠΟ ΦΟΥΛΛΕΡΕΝΙΑ

9.1Ανασκόπηση

Η ροή ηλεκτρονίων από το ενεργό κέντρο των ενζύμων προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου είναι η βάση της λειτουργίας των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων. Ανάλογα με τον τρόπο που επιτυγχάνεται αυτή η ροή, οι βιοαισθητήρες διαχωρίζονται στις ακόλουθες κατηγορίες [11]:

- *Πρώτης γενιάς*. Η ροή γίνεται μέσω του φυσικού συμπαράγοντα του ενζύμου (O_2 , NAD^+), ο οποίος αφού δεχθεί τα ηλεκτρόνια από το ενεργό κέντρο του ενζύμου οξειδώνεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.
- *Δεύτερης γενιάς*. Ο φυσικός συμπαράγοντας αντικαθιστάται από τεχνητές ενώσεις (μεταφορείς ηλεκτρονίων) που υποβοηθούν τη μεταφορά των ηλεκτρονίων στο ηλεκτρόδιο.
- *Τρίτης γενιάς*. Το ένζυμο αναγεννάται απευθείας από το ηλεκτρόδιο, μεταφέροντας τα ηλεκτρόνια από το ενεργό του κέντρο στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου χωρίς τη μεσολάβηση άλλου μορίου [90,²⁰⁹⁻²¹¹].

Η χρήση των μεταφορέων ηλεκτρονίων στην κατασκευή βιοαισθητήρων παρουσιάστηκε στην παράγραφο 3.4 (σελ. 28). Πάρα πολλές ενώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί ως μεταφορείς ηλεκτρονίων, με πιο διαδεδομένες τα διάφορα παράγωγα του φερροκενίου και τα σύμπλοκα οσμίου. Ωστόσο οι περισσότερες ενώσεις δεν καλύπτουν το σύνολο των προϋποθέσεων που απαιτούνται για τη χρήση τους ως μεταφορέων ηλεκτρονίων. Για τον παραπάνω λόγο γίνεται εκτεταμένη έρευνα για την ανακάλυψη μεταφορέων ηλεκτρονίων που θα εκπληρώνουν όσο το δυνατόν περισσότερες από τις απαιτούμενες προϋποθέσεις [212-215].

Τα φουλλερένια είναι μια σχετικά νέα κατηγορία ενώσεων που έχουν ορισμένες σημαντικές ιδιότητες [216]. Αποτελούνται από ανθρακικούς αρωματικούς δακτυλίους συμπυκνωμένους σε σφαιρικές δομές (ουσιαστικά πρόκειται για «μπάλες» αποτελούμενες από 60 ή περισσότερα άτομα άνθρακα)*. Τα φουλλερένια είναι σταθερά σε διάφορες οξειδωτικές και αναγωγικές καταστάσεις (μια από τις βασικότερες προϋποθέσεις για κάποιο μεταφορέα ηλεκτρονίων), ενώ συγχρόνως παρουσιάζουν αντιστρεπτή ηλεκτροχημική συμπεριφορά. Το μεγάλο εύρος

κανονικών δυναμικών οξειδοαναγωγής που έχουν, τους επιτρέπει να ανταλλάζουν ηλεκτρόνια με πολλών ειδών ενώσεις [217]. Γι' αυτό το λόγο είναι πολύ πιθανή η ανταλλαγή ηλεκτρονίων με το ενεργό κέντρο των ενζύμων. Επιπλέον είναι αδιάλυτα στο νερό, γεγονός που διασφαλίζει την παραμονή τους στο ενζυμικό στρώμα.

Η δυνατότητα ανταλλαγής ηλεκτρονίων μεταξύ ενζύμων και φουλλερενίων παρουσιάστηκε πρόσφατα από τους F. Patolsky et al.[218]. Στη συγκεκριμένη εργασία μόρια C_{60} ακινητοποιήθηκαν μέσω ομοιοπολικής δέσμησης σε μόρια κυσταμίνης που είχαν προσροφηθεί στην επιφάνεια ηλεκτροδίου χρυσού. Το κανονικό δυναμικό οξείδωσης του C_{60} σε $C_{60}^{*\cdot+}$ υπολογίστηκε ότι είναι 310 mV. Το ηλεκτρόδιο εμβαπτίστηκε σε απαερωμένο υδατικό διάλυμα που περιείχε διαλυμένη GOx και εφαρμόστηκε δυναμικό +400 mV. Όταν στο διάλυμα προστέθηκε γλυκόζη το ρεύμα αυξήθηκε αναλόγως της συγκέντρωσης της γλυκόζης. Η αλλαγή αυτή στο ρεύμα οφείλεται στη μεταφορά ηλεκτρονίων από το ενεργό κέντρο της GOx στο $C_{60}^{*\cdot+}$ το οποίο ανάγεται σε C_{60} και επανοξειδώνεται από το ηλεκτρόδιο χρυσού.

Βάσει των παραπάνω αποτελεσμάτων συμπεραίνεται ότι είναι δυνατή η χρήση φουλλερενίων ως μεταφορέων ηλεκτρονίων. Στη συγκεκριμένη εργασία εξετάστηκαν δύο διαφορετικοί τρόποι χρήσης των φουλλερενίων για την κατασκευή βιοαισθητήρων γλυκόζης. Στην πρώτη περίπτωση το C_{60} προσροφάται στον πορώδη άνθρακα πριν την ακινητοποίηση του ενζύμου. Στη δεύτερη περίπτωση το C_{60} δεσμεύεται ομοιοπολικά στο πολυμερές πολυαιθυλενιμίνη το οποίο χρησιμοποιείται ως σταθεροποιητής αντί της διαιθυλαμινοαιθυλ-δεξτράνης.

9.2 Βιοαισθητήρας Γλυκόζης Βασισμένος στην Προσρόφιση C_{60}

9.2.1 Διαδικασία κατασκευής

Όπως προαναφέρθηκε το C_{60} είναι αδιάλυτο στο νερό. Γι' αυτό το λόγο η κατασκευή των βιοαισθητήρων χωρίστηκε σε δύο στάδια, την προσρόφιση του μεταφορέα ηλεκτρονίων και την προσρόφιση του ενζύμου.

Μετά τον καθαρισμό του ο πορώδης άνθρακας τοποθετείται σε διάλυμα 2mg/ml C_{60} σε τολουόλιο. Μετά την πάροδο 10 ωρών ο άνθρακας απομακρύνεται από το διάλυμα και ξηραίνεται στους 150°C για 4 ώρες (πρώτος κύκλος). Η συγκεκριμένη

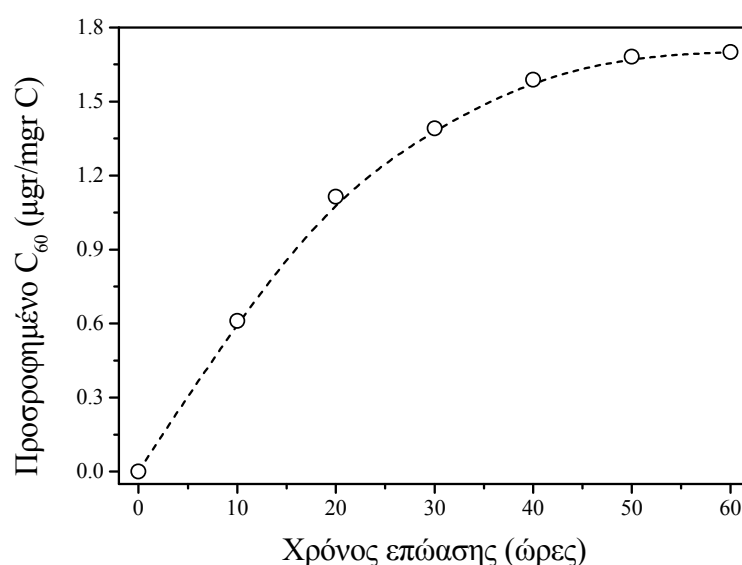
*Ανάλογα με τον αριθμό των ατόμων άνθρακα από τα οποία αποτελείται το φουλλερένιο συμβολίζεται ως C_{60} (60 άτομα άνθρακα), C_{70} (70 άτομα άνθρακα), κλπ.

διαδικασία επαναλαμβάνεται, μέχρι 6 φορές ανάλογα με την περίπτωση, για να επιτευχθεί η προσρόφηση μεγαλύτερων ποσοτήτων φουλλερενίου.

Στη συνέχεια, ο άνθρακας που περιέχει το ακινητοποιημένο φουλλερένιο τοποθετείται στο ενζυμικό διάλυμα (2500 U/mL GOx και 1,0% w/v διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη) για να γίνει η προσρόφηση του ενζύμου. Κατά τη διάρκεια των μετρήσεων με τους βιοαισθητήρες που περιείχαν φουλλερένιο, υπήρχε συνεχής ροή αργού για την απομάκρυνση του οξυγόνου.

9.2.2 Υπολογισμός του ακινητοποιημένου C_{60}

Αρχικά υπολογίστηκε η ποσότητα του C_{60} που προσροφάται στον πορώδη άνθρακα ανάλογα με τις ώρες που αυτός παρέμενε στο διάλυμα του τολουολίου. Για να μετρηθεί το ακινητοποιημένο C_{60} , μετά την ολοκλήρωση κάθε κύκλου ένας άνθρακας κονιορτοποιείται και μέρος της σκόνης (~10mg) τοποθετείται σε 2 ml τολουολίου. Το μίγμα αναδεύεται ισχυρά υπό την επίδραση υπερήχων για 15 λεπτά και αφήνεται να ισορροπήσει για 20 ώρες, ώστε να ολοκληρωθεί η εκρόφηση του C_{60} . Το μίγμα φιλτράρεται (0,2 μm φίλτρο) για να απομακρυνθεί ο άνθρακας και η συγκέντρωση του φουλλερενίου υπολογίζεται από την απορρόφηση στα 329 nm^{216} . Το όριο ανίχνευσης της συγκεκριμένης μεθόδου είναι περίπου 0,1 $\mu\text{g } C_{60}/\text{ml}$ τολουολίου.

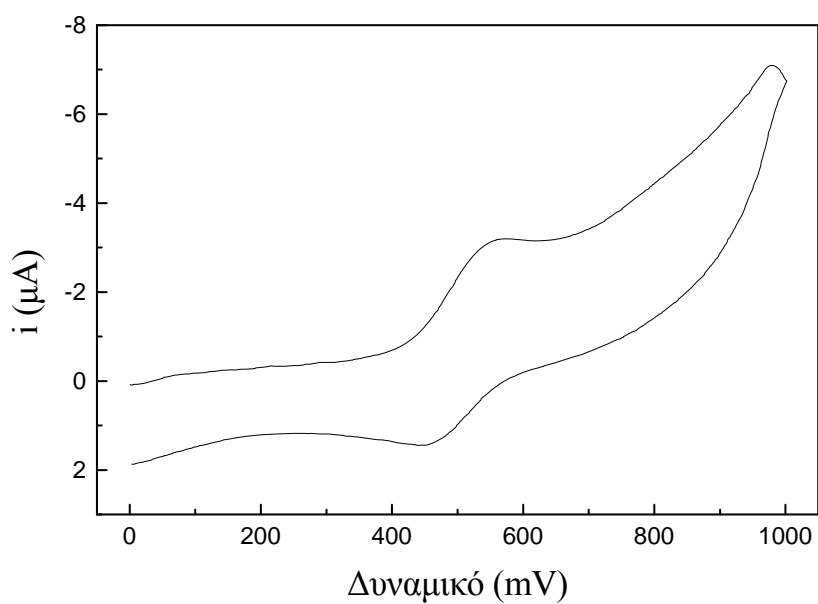


Σχήμα 36. Επίδραση του χρόνου επώασης του πορώδους άνθρακα στη ποσότητα του φουλλερενίου που ακινητοποιείται.

Όπως φαίνεται από το σχήμα 36 η ποσότητα του φουλλερενίου που προσροφάται στον πορώδη άνθρακα αυξάνεται όσο περισσότεροι είναι οι κύκλοι επώασης. Για περισσότερους από τέσσερις κύκλους (40 ώρες) η επιπλέον ποσότητα του C₆₀ που ακινητοποιείται είναι μικρή.

9.2.3 Αξιολόγηση των βιοαισθητήρων

Το κυκλικό βολταμογράφημα του πορώδους άνθρακα με το προσροφημένο C₆₀ παρουσιάζεται στο σχήμα 37.



Σχήμα

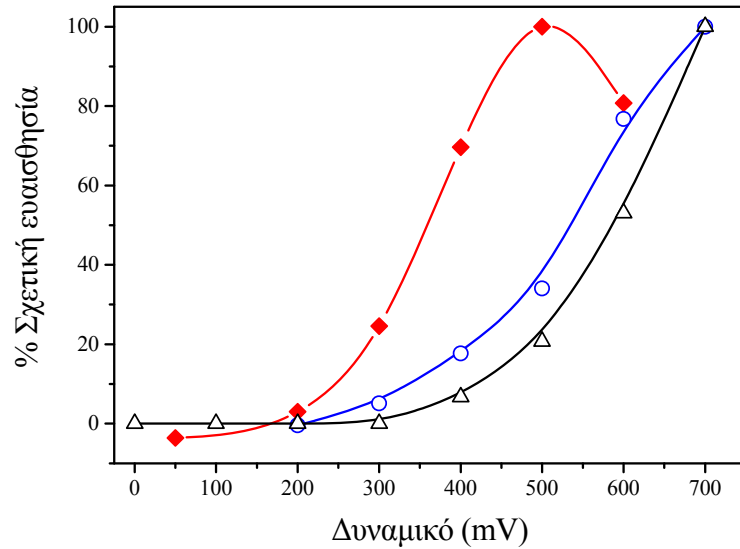
37.

Κυκλικό βολταμογράφημα του βιοαισθητήρα που περιέχει 1,7 μg C₆₀ ανά mg άνθρακα. Διάλυμα τολουόλιο - διμέθυλ-φορμαμίδιο 1:1, 5 mM

tetrabutylammonium perchlorate (βοηθητικός ηλεκτρολύτης). Ταχύτητα σάρωσης 25 mV/sec.

Οι κορυφές οξείδωσης (C_{60} σε $C_{60}^{\bullet+}$) και αναγωγής ($C_{60}^{\bullet+}$ σε C_{60}) είναι στα 560 και 463 mV αντίστοιχα, ενώ το κανονικό δυναμικό του οξειδοαναγωγικού ζεύγους $C_{60}/C_{60}^{\bullet+}$ υπολογίστηκε ότι είναι 508 ± 4 mV. Η απόσταση μεταξύ των δύο κορυφών είναι 97 mV, τιμή λίγο μεγαλύτερη από την αναμενόμενη των 59 mV (για οξειδοαναγωγή ενός ηλεκτρονίου). Αυτή η διαφορά υποδεικνύει ότι η οξειδοαναγωγή του φουλλερενίου στον πορώδη άνθρακα είναι ημι-αντιστρεπτή. Η διαφορά μεταξύ των κορυφών αυξάνεται όσο αυξάνεται η ταχύτητα σάρωσης, όπως αναμένεται και από την θεωρία [219] (στα 100 mV/sec είναι 142 mV, ενώ στα 500 mV/sec είναι 201 mV). Πολύ σημαντικό είναι ότι οι κορυφές οξείδωσης και αναγωγής είναι συμμετρικές. Αυτό επιβεβαιώνει ότι το φουλλερένιο είναι σταθερό στην οξειδωμένη του μορφή ($C_{60}^{\bullet+}$) αφού σε αντίθετη περίπτωση η κορυφή της αναγωγής θα ήταν μικρότερη από την αντίστοιχη της οξείδωσης.

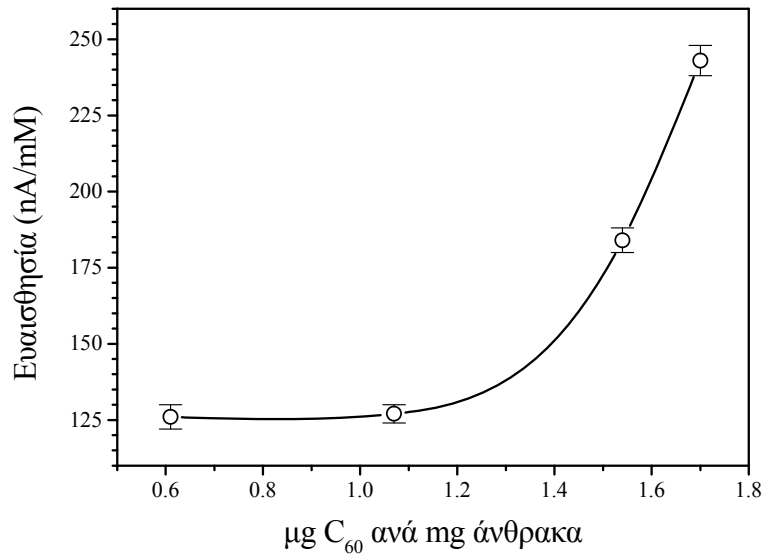
Η επίδραση που έχει το εφαρμοζόμενο δυναμικό στην απόκριση των βιοαισθητήρων που περιέχουν 0,0 μg, 1,5 μg και 1,7 μg C_{60} παρουσιάζεται στο σχήμα 38. Κατά τις μετρήσεις με το βιοαισθητήρα που δεν περιέχει φουλλερένιο δεν έγινε απαέρωση των δειγμάτων, ώστε να ολοκληρώνεται η αντίδραση με τη βοήθεια του οξυγόνου.



Σχήμα 38. Επίδραση του εφαρμοζόμενου δυναμικού στην ευαισθησία των βιοαισθητήρων γλυκόζης που περιέχουν 0 μg (-Δ-), 1,5 μg (-Ο-) και 1,7 μg C₆₀ (-♦-).

Όπως φαίνεται από το σχήμα, η ευαισθησία του βιοαισθητήρα στην γλυκόζη, όταν υπάρχει ακινητοποιημένο φουλλερένιο στο βιοαισθητήρα, αυξάνεται σε χαμηλά δυναμικά. Τα αποτελέσματα πιστοποιούν ότι το C₆₀ μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μεταφορέας ηλεκτρονίων και ότι η ανίχνευση της γλυκόζης μπορεί να γίνει σε δυναμικά μεγαλύτερα από +200 mV. Το βέλτιστο δυναμικό είναι στα +500 mV, τιμή που συμφωνεί με τα αποτελέσματα της κυκλικής βολταμμετρίας.

Η ποσότητα του φουλλερενίου που έχει ακινητοποιηθεί επηρεάζει σημαντικά την ευαισθησία του βιοαισθητήρα. Στο σχήμα 39 παρουσιάζεται η συσχέτιση της ευαισθησίας του βιοαισθητήρα γλυκόζης με την ποσότητα του C₆₀ που ακινητοποιείται στον πορώδη άνθρακα. Τα πειράματα έγιναν εφαρμόζοντας σταθερό δυναμικό +350 mV.



Σχήμα 39. Επίδραση της ποσότητας του ακινητοποιημένου φουλλερενίου στην ευαισθησία του αντίστοιχου βιοαισθητήρα στην γλυκόζη.

Όπως φαίνεται από το σχήμα, η αύξηση της ποσότητας του φουλλερενίου από 0,6 μg σε 1,7 μg C₆₀ ανά mg άνθρακα αυξάνει την ευαισθησία του βιοαισθητήρα από 127±4 σε 243±5 nA/mM. Ταυτόχρονα ο χρόνος απόκρισης για αλλαγή της συγκέντρωσης της γλυκόζης από 0 σε 0,5 mM μειώνεται από 215 σε 170 sec.

Από το γράφημα είναι φανερό ότι η ακινητοποίηση μεγαλύτερης ποσότητας φουλλερενίου είναι πιθανό να συντελέσει στην κατασκευή βιοαισθητήρων γλυκόζης με μεγαλύτερες ευαισθησίες. Όπως όμως φαίνεται από το σχήμα 36, με την συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία δεν είναι δυνατή η ακινητοποίηση μεγαλύτερων ποσοτήτων C₆₀.

Έτσι εξετάστηκε η πιθανότητα της ακινητοποίησης του C₆₀ μέσω ομοιοπολικής δέσμευσής του στην πολυμερική αλυσίδα του πολυηλεκτρολύτη. Όπως έχει προαναφερθεί, ο πολυηλεκτρολύτης αλληλεπιδρά ηλεκτροστατικά με το ένζυμο με αποτέλεσμα να βρίσκεται σε στενή επαφή μαζί του. Έτσι ο μεταφορέας ηλεκτρονίων που θα είναι δεσμευμένος με το πολυμερές, θα βρίσκεται στο μικροπεριβάλλον του ενζύμου και σε συνεχή επαφή με αυτό. Με αυτό τον τρόπο ο τροποποιημένος πολυηλεκτρολύτης εκτός από τη σταθεροποιητική του δράση θα βοηθάει και στη μεταφορά ηλεκτρονίων από το ένζυμο στο ηλεκτρόδιο.

9.3 Βιοαισθητήρας Γλυκόζης Βασισμένος στην Ομοιοπολική

Δέσμευση του C₆₀

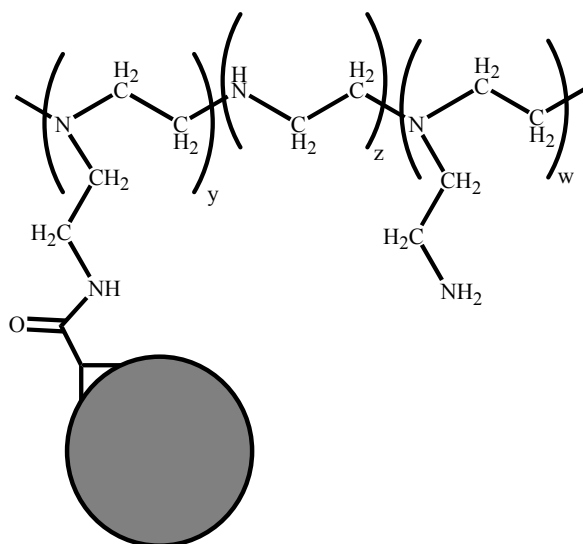
Για την ακινητοποίηση του C₆₀ χρησιμοποιήθηκε ένα καρβοξυλιομένο παράγωγο του, το (1,2-methano fullerene)-61-carboxylic acid. Η καρβοξυλομάδα μπορεί να αντιδράσει με κάποια αμινομάδα του πολυμερούς και να δημιουργηθεί ομοιοπολικός δεσμός. Επειδή η διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη περιέχει τριτοταγείς και τεταρτοταγείς αμινομάδες, που αντιδρούν δύσκολα, επιλέχθηκε η χρήση ενός άλλου πολυμερούς, της πολυαιθυλενιμίνης (PEI). Η πολυαιθυλενιμίνη έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στην κατασκευή βιοαισθητήρων για τη σταθεροποίηση των ενζύμων (παρ. 4.2, σελ. 37). Περιέχει πρωτοταγείς και δευτεροταγείς αμινομάδες που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη δέσμευση του C₆₀. Στη βιβλιογραφία έχει αναφερθεί η τροποποίησή της με καρβοξυλιομένο φερροκένιο για την κατασκευή ηλεκτροχημικά ενεργού πολυμερούς που συνδυάζει τη σταθεροποιητική δράση της πολυαιθυλενιμίνης με τη μεταφορά ηλεκτρονίων από το φερροκένιο [220]. Η τροποποιημένη πολυαιθυλενιμίνη χρησιμοποιήθηκε στην κατασκευή βιοαισθητήρα γλυκόζης.

9.3.1 Παρασκευή της τροποποιημένης πολυαιθυλενιμίνης (PEI-C₆₀)^{*}

Για την ομοιοπολική δέσμευση του C₆₀ στην πολυμερική αλυσίδα της πολυαιθυλενιμίνης ακολουθήθηκε η πειραματική διαδικασία των Y. P. Sun et al.[221] 20 mg (1,2-methano fullerene)-61-carboxylic acid διαλύονται σε 20 ml THF-CH₂Cl₂ στους 0°C. Στη συνέχεια προστίθενται 30 mg 1-ethyl-1,3-(3-dimethylamino-propyl) carbodiimide hydrochloride και το μίγμα αναδεύεται για 30 λεπτά. Κατόπιν προστίθενται 20 ml CH₂Cl₂ που περιέχουν 80 mg πολυαιθυλενιμίνης (M.B.: 25000). Το μίγμα παραμένει 12 ώρες υπό ισχυρή ανάδευση στους 0°C για ολοκληρωθεί η αντίδραση. Ακολούθως απομακρύνεται ο διαλύτης και τα στερεά υπολείμματα διαλύονται σε 50 ml νερό (η διάλυση δεν είναι πλήρης). Το μίγμα φυγοκεντρείται για 20 λεπτά στις 5000 στροφές ανά λεπτό και συλλέγεται το υπερκείμενο. Στη συνέχεια μεταφέρεται σε σωλήνα διαπίδυσης (dialysis tube) με cut-off 12-16 kDa, που τοποθετείται σε ένα λίτρο νερό, το οποίο αλλάζεται ανά τακτά χρονικά διαστήματα.

* Η παρασκευή του τροποποιημένου πολυμερούς έγινε με τη συνεργασία του Dr. Θ. Γκιμήση, ενώ ο καθαρισμός του πολυμερούς έγινε με τη συνεργασία του Μ. Ψυλινάκη.

Μετά από τρεις ημέρες, το διάλυμα που περιέχει την τροποποιημένη πολυαιθυλενιμίνη συλλέγεται και απομακρύνεται το νερό. Το στερεό υπόλειμμα που έχει έντονο σκούρο κίτρινο χρώμα είναι 60 mg. Η στοιχειακή ανάλυση του προϊόντος έδειξε ότι έχουν δεσμευτεί περίπου τέσσερα μόρια φουλλερενίου ανά πολυμερική αλυσίδα. Στο σχήμα 40 παρουσιάζεται η δομή του πολυμερούς.



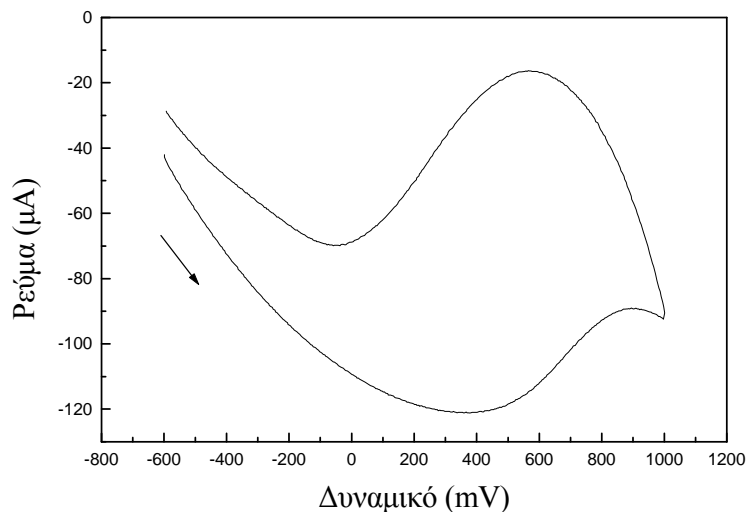
Σχήμα 40. Δομή της πολυαιθυλενιμίνης που περιέχει ομοιοπολικά δεσμευμένα μόρια φουλλερενίου (PEI-C₆₀).

Η κατασκευή των βιοαισθητήρων γίνεται όπως και στην περίπτωση των βιοαισθητήρων γλυκόζης (παρ. 6.2) με μόνη διαφορά ότι στο ενζυμικό διάλυμα (2500 U/mL GOx) προστίθενται διαφορετικές ποσότητες PEI-C₆₀ (0,05 έως 0,50 mg/ml) αντί για διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη.

Η επίδραση που έχει η πολυαιθυλενιμίνη (χωρίς φουλλερένιο) στα χαρακτηριστικά λειτουργίας του βιοαισθητήρα γλυκόζης μελετήθηκε από τον Β. Δημάκη στα πλαίσια της διπλωματικής του εργασίας [222]. Βρέθηκε ότι η πολυαιθυλενιμίνη αυξάνει την ευαισθησία των βιοαισθητήρων, χωρίς όμως η ποσότητά της να επηρεάζει την αύξηση. Αντίθετα, η ποσότητα της πολυαιθυλενιμίνης επηρεάζει σημαντικά τη σταθερότητα του βιοαισθητήρα. Η βέλτιστη συγκέντρωση πολυαιθυλενιμίνης βρέθηκε ότι είναι 0,1 mg/ml και ο αντίστοιχος βιοαισθητήρας διατηρεί το 100% της ευαισθησίας του μετά από 4 μήνες από την κατασκευή του.

9.3.2 Αξιολόγηση των βιοαισθητήρων

Το κυκλικό βολταμογράφημα της PEI-C₆₀ παρουσιάζεται στο σχήμα 41.

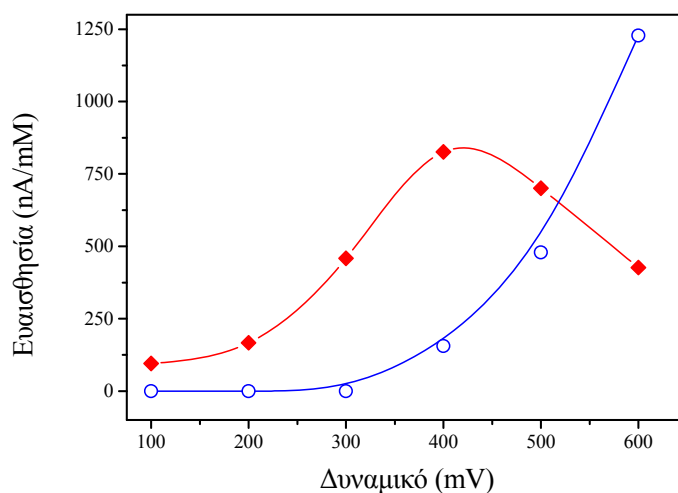


Σχήμα

41.

Κυκλικό βολταμογράφημα της PEI-C₆₀ σε υδατικό διάλυμα 0,1 M KCl (βοηθητικός ηλεκτρολύτης). Ταχύτητα σάρωσης 250 mV/sec.

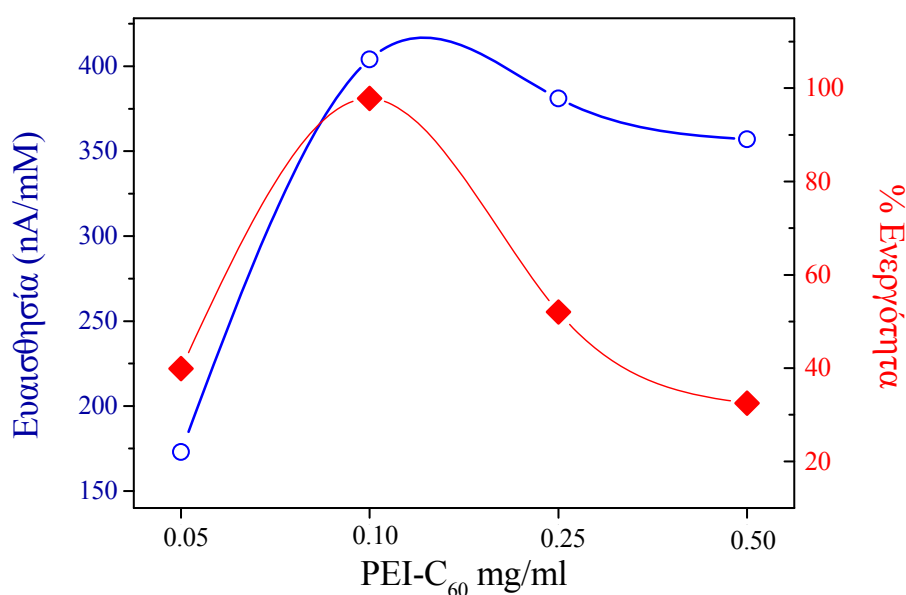
Στο συγκεκριμένο πείραμα χρησιμοποιήθηκε πλατίνα ως ηλεκτρόδιο εργασίας. Οι κορυφές οξείδωσης και αναγωγής είναι στα 426 και 575 mV αντίστοιχα, ενώ το κανονικό δυναμικό υπολογίστηκε ότι είναι 500 mV. Η διαπλάτυνση των κορυφών είναι δυνατόν να οφείλεται στη δυσκολία κίνησης των μορίων του φουλλερενίου λόγω της μεγάλης πολυμερικής αλυσίδας στην οποία είναι δεσμευμένα.



Σχήμα 42. Επίδραση του εφαρμοζόμενου δυναμικού στην ευαισθησία των βιοαισθητήρων γλυκόζης, 0,1 mg/ml PEI-C₆₀ (-♦-) και 0 mg/ml (-O-).

Η αλλαγή της ευαισθησίας του βιοαισθητήρα γλυκόζης (0,1 mg/ml PEI-C₆₀) ανάλογα με το δυναμικό λειτουργίας παρουσιάζεται στο σχήμα 42. Όπως φαίνεται στο σχήμα, το φουλλερένιο που είναι δεσμευμένο στην πολυαιθυλενιμίνη μπορεί να λειτουργήσει ως μεταφορέας ηλεκτρονίων. Το βέλτιστο δυναμικό είναι στα +400 mV, τιμή που συμφωνεί με τα αποτελέσματα της κυκλικής βολταμμετρίας και είναι μικρότερη από την αντίστοιχη τιμή για το προσροφημένο C₆₀.

Για την εξέταση της επίδρασης που έχει η ποσότητα της PEI-C₆₀ στα χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα, κατασκευάστηκαν βιοαισθητήρες από ενζυμικά διαλύματα που περιείχαν διαφορετικές ποσότητες πολυηλεκτρολύτη. Οι βιοαισθητήρες εξετάζονταν περιοδικά και φυλάσσονταν ενδιάμεσα σε ρυθμιστικό διάλυμα στους +4°C. Στο σχήμα 43 παρουσιάζεται η επίδραση της ποσότητας του πολυηλεκτρολύτη στην ευαισθησία και το χρόνο ζωής του βιοαισθητήρα.

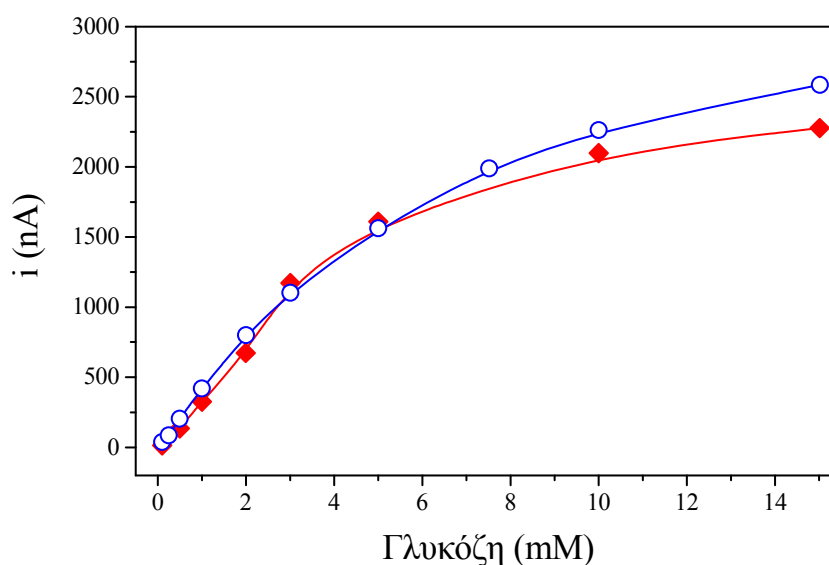


Σχήμα 43. Επίδραση της ποσότητας της PEI-C₆₀ στην ευαισθησία (-O-) και την ενεργότητα μετά από ένα μήνα λειτουργίας (-♦-) του βιοαισθητήρα γλυκόζης.

Όπως φαίνεται στο σχήμα, η ευαισθησία του βιοαισθητήρα υπερδιπλασιάζεται όταν αντί για 0,05 mg/ml χρησιμοποιηθούν 0,1 mg/ml PEI-C₆₀, ενώ μεγαλύτερες ποσότητες PEI-C₆₀ οδηγούν σε μικρή μείωση της ευαισθησίας. Παρόμοια επίδραση έχει η ποσότητα της PEI-C₆₀ και στην σταθερότητα του βιοαισθητήρα. Ο

βιοαισθητήρας διατηρεί σχεδόν το 100% της ενεργότητάς του μετά από ένα μήνα, όταν χρησιμοποιούνται 0,1 mg/ml PEI-C₆₀. Αντίθετα όταν χρησιμοποιούνται 0,05 mg/ml PEI-C₆₀ ή 0,5 mg/ml PEI-C₆₀ η ενεργότητα μειώνεται στο 30 έως 40 % μέσα στο ίδιο χρονικό διάστημα. Πρέπει να σημειωθεί ότι βιοαισθητήρες που περιέχουν περισσότερο από 0,1 mg/ml PEI-C₆₀ έχουν ευαισθησία πολύ μεγαλύτερη από τους βιοαισθητήρες που κατασκευάστηκαν με προσρόφιση του φυλλερενίου στον άνθρακα.

Στη συνέχεια εξετάστηκε η επίδραση που έχει η παρουσία οξυγόνου στην απόκριση του βιοαισθητήρα.

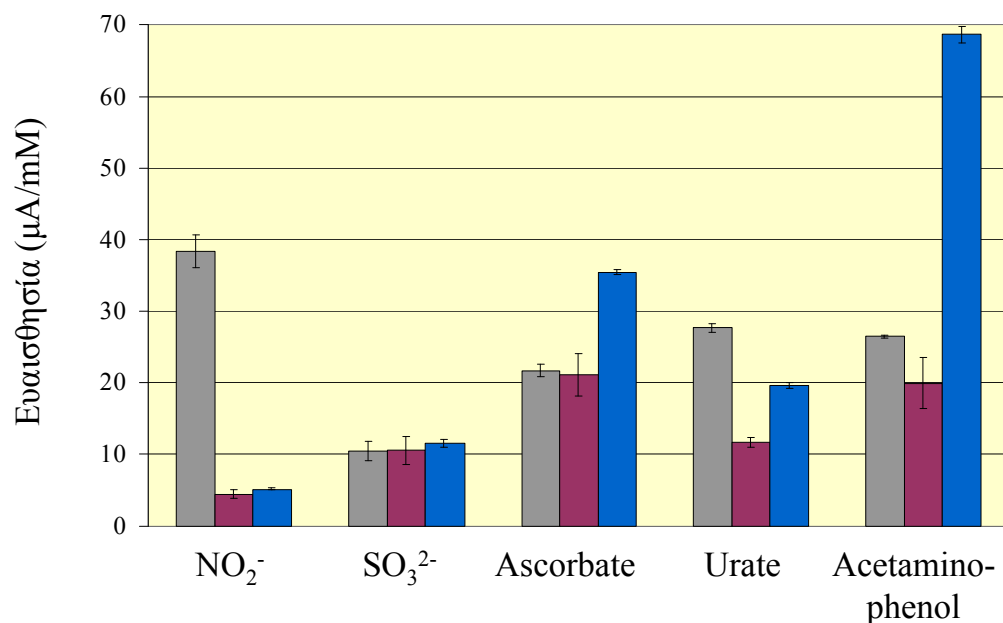


Σχήμα 44. Καμπύλη βαθμονόμησης του βιοαισθητήρα γλυκόζης (0,1 mg/ml PEI-C₆₀) παρουσία (-O-) και απουσία (-♦-) οξυγόνου. Δυναμικό εργασίας +350 mV.

Η απόκριση του βιοαισθητήρα σε μικρές συγκεντρώσεις γλυκόζης δεν επηρεάζεται από την παρουσία του οξυγόνου και η ευαισθησία του παραμένει σταθερή (395±19 nA/mM απουσία οξυγόνου, 405±9 nA/mM παρουσία οξυγόνου). Σε μεγάλες συγκεντρώσεις γλυκόζης η απόκριση του βιοαισθητήρα αυξάνεται ελαφρώς όταν στο διάλυμα υπάρχει οξυγόνο.

Τέλος μελετήθηκε η επιλεκτικότητα του βιοαισθητήρα που κατασκευάζεται χρησιμοποιώντας 0,1 mg/ml PEI-C₆₀. Έτσι εξετάστηκε η ευαισθησία του βιοαισθητήρα στο ασκορβικό, το ουρικό, την ακεταμινοφαινόλη, τα νιτρώδη και τα θειώδη. Για λόγους σύγκρισης παρουσιάζεται η αντίστοιχη επιλεκτικότητα του βιοαισθητήρα που περιέχει 0,1 mg/ml PEI (δυναμικό εργασίας + 800 mV), καθώς και

η ευαισθησία του πορώδους άνθρακα στις ηλεκτροενεργές ουσίες (δυναμικό εργασίας



+ 350 mV).

Σχήμα 45.

Ευαισθησία.δι

■ αφόρων ηλεκτροδίων σε ηλεκτροενεργές ουσίες.

■ βιοαισθητήρας γλυκόζης με PEI (+800 mV)

■ πορώδης άνθρακας (+350 mV)

■ βιοαισθητήρας γλυκόζης με PEI-C₆₀ (+350 mV)

Όπως φαίνεται από το σχήμα 45, η ευαισθησία του βιοαισθητήρα με την PEI-C₆₀ είναι μεγαλύτερη για τις περισσότερες ουσίες από την αντίστοιχη ευαισθησία του βιοαισθητήρα με την PEI, παρότι το δυναμικό εργασίας είναι πολύ μικρότερο. Συγκρίνοντας τις ευαισθησίες του πορώδους άνθρακα και του βιοαισθητήρα με την PEI-C₆₀ παρατηρείται ότι για όλες τις ενώσεις η ευαισθησία του βιοαισθητήρα είναι αυξημένη. Η παρουσία του φουλλερενίου μπορεί να δικαιολογήσει αυτή τη διαφορά, αφού είναι πιθανό να υποβοηθάει την οξειδωση αυτών των ουσιών [85,86]. Από τα παραπάνω αποτελέσματα είναι φανερό ότι παρόλο που με τη χρήση μεταφορέα ηλεκτρονίων μειώνεται το δυναμικό εργασίας, η επιλεκτικότητα του βιοαισθητήρα δεν βελτιώνεται.

9.4 Συμπεράσματα

Στο συγκεκριμένο κεφάλαιο παρουσιάστηκε η δυνατότητα χρήσης των φουλλερενίων ως μεταφορέων ηλεκτρονίων για την κατασκευή βιοαισθητήρων γλυκόζης. Με τη χρήση του φουλλερενίου οι βιοαισθητήρες μπορούσαν να λειτουργήσουν σε δυναμικά μικρότερα των +300 mV. Δυο διαφορετικοί τρόποι ακινητοποίησης των φουλλερενίων εξετάστηκαν, μέσω προσρόφησης στον πορώδη άνθρακα ή μέσω ομοιοπολικής δέσμησης στην πολυμερική αλυσίδα της πολυαιθυλενιμίνης. Στη δεύτερη περίπτωση οι αντίστοιχοι βιοαισθητήρες είχαν μεγαλύτερες ευαισθησίες για τη γλυκόζη, πιθανότατα επειδή το C₆₀ βρισκόταν σε στενή επαφή με το ένζυμο. Συγχρόνως η απόκριση των βιοαισθητήρων που κατασκευάστηκαν με την χρήση της PEI-C₆₀ ήταν ανεξάρτητη της συγκέντρωσης του οξυγόνου. Παρότι ελαττώθηκε το δυναμικό λειτουργίας των βιοαισθητήρων γλυκόζης (από +800 σε +350 mV) η απόκρισή τους σε ηλεκτροενεργές ουσίες αυξήθηκε, ενδεχομένως λόγω της υποβοηθούμενης από το φουλλερένιο οξείδωσης αυτών των ουσιών.

10.ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΛΕΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ - ΑΝΑΛΥΣΕΙΣ ΠΡΑΓΜΑΤΙΚΩΝ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

10.1Ανασκόπηση

Παρεμποδίσεις στο σήμα των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων μπορεί να γίνουν μέσω δύο διαφορετικών μηχανισμών, της βιολογικής αναγνώρισης ή της ηλεκτροχημικής μετατροπής του σήματος. Στην πρώτη περίπτωση το βιολογικό μόριο μπορεί να καταλύει την αντίδραση και άλλων ουσιών εκτός του αναλύτη, με αποτέλεσμα όταν αυτές οι ουσίες βρίσκονται στο προς ανάλυση δείγμα να υπεισέρχεται σφάλμα στη μέτρηση [134,223-226]. Αντίστοιχα, ηλεκτροενεργές ουσίες που βρίσκονται στο δείγμα, μπορεί να οξειδώνονται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εμποδίζοντας την ακριβή μέτρηση του αναλύτη. Ακόμα και όταν μειώνεται το δυναμικό εργασίας (μικρότερο από +300 mV) με τη χρήση μεταφορών ηλεκτρονίων, η μέτρηση αλλοιώνεται μέσω της καταλυτικής οξείδωσης των ηλεκτροενεργών ουσιών από τους ίδιους τους μεταφορείς ηλεκτρονίων [85,86,227,228]. Οι ηλεκτροενεργές ουσίες που θεωρούνται ισχυρότεροι παρεμποδιστές είναι το ασκορβικό οξύ, το ουρικό οξύ και η p-ακεταμινοφαινόλη (παρακεταμόλη). Το ασκορβικό οξύ περιέχεται σε υψηλές συγκεντρώσεις σε πολλά τρόφιμα και ποτά [229], καθώς χρησιμοποιείται πολύ συχνά ως αντιοξειδωτικό [230]. Το ουρικό οξύ και η ακεταμινοφαινόλη βρίσκονται κυρίως σε βιολογικά υγρά.

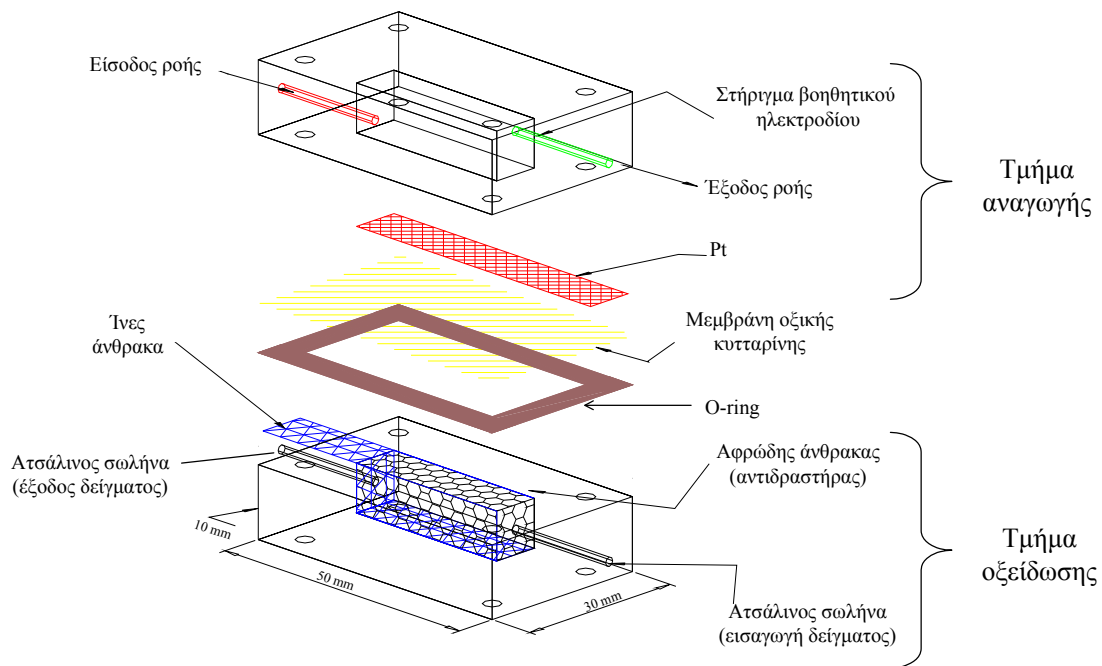
Η επιλεκτικότητα των αμπερομετρικών βιοαισθητήρων μπορεί να βελτιωθεί καλύπτοντας την εξωτερική επιφάνεια του ηλεκτροδίου με ειδικές μεμβράνες [231-233] (παρ. 3.2), ή οξειδώνοντας τους παρεμποδιστές με ένζυμο που έχουν ακινητοποιηθεί στο ενζυμικό στρώμα για αυτό το σκοπό. Τέτοια ένζυμο είναι η *υπεροξειδάση* [234,235] (HRP) ή η *οξειδάση του ασκορβικού* [236,237]. Οι παραπάνω προσεγγίσεις κάνουν πολύπλοκη την κατασκευή των βιοαισθητήρων και μειώνουν την ευαισθησία του, ενώ ταυτόχρονα η εφαρμογή τους δεν είναι συμβατή με όλους τους βιοαισθητήρες [200]. Όπως αναφέρθηκε στην παρ. 3.3, η ηλεκτροχημική επιμετάλλωση της επιφάνειας ανθρακικών ηλεκτροδίων αυξάνει την επιλεκτικότητα της οξείδωσης του H₂O₂ έναντι των παρεμποδιστών [79]. Ωστόσο η μηχανική και η καταλυτική σταθερότητα των παραπάνω ηλεκτροδίων είναι ακόμα ανεπαρκής.

Ένας άλλος τρόπος αποφυγής των παρεμποδίσεων είναι η ηλεκτροχημική οξείδωση των παρεμποδιστών πριν αυτοί έρθουν σε επαφή με το βιοαισθητήρα. Για αυτό το σκοπό ο βιοαισθητήρας εισάγεται σε σύστημα ροής και το δείγμα πριν

φτάσει στο βιοαισθητήρα διέρχεται από ένα κελί προ-οξείδωσης [171,238,239], στο οποίο εφαρμόζεται υψηλό δυναμικό ώστε να επιτευχθεί η ποσοτική οξείδωση των παρεμποδιστών. Με αυτό τον τρόπο όταν το δείγμα φτάσει στο βιοαισθητήρα δεν περιέχει ηλεκτροενεργές ουσίες και αποφεύγεται η παρεμπόδιση στην ανάλυση. Η εξάλειψη της παρεμπόδισης δεν επηρεάζεται από το μέγεθος ή το φορτίο του παρεμποδιστή (όπως συμβαίνει με τις μεμβράνες) ενώ ταυτόχρονα τα αναλυτικά χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα παραμένουν αναλλοίωτα. Επιπρόσθετα, η συγκεκριμένη διαδικασία αποφυγής των παρεμποδίσεων είναι συμβατή με όλους τους αμπερομετρικούς βιοαισθητήρες, ανεξαρτήτως των ειδικών χαρακτηριστικών τους (είδος μετατροπέα σήματος, μέθοδο ακινητοποίησης κλπ.) αλλά και των συνθηκών λειτουργίας του (pH, θερμοκρασία κλπ.). Αυτό συμβαίνει γιατί η προ-οξείδωση συντελείται σε ξεχωριστό τμήμα του συστήματος και επομένως το δείγμα μπορεί να κατεργαστεί μετά, πριν φτάσει στο βιοαισθητήρα.

10.2 Κατασκευή του Κελιού Προ-οξείδωσης

Το σχέδιο του κελιού προ-οξείδωσης παρουσιάζεται στο σχήμα 46.



Σχήμα 46.

Διάγραμμα του

κελιού προ-οξείδωσης.

Το κελί αποτελείται από δύο ξεχωριστά κομμάτια, το τμήμα οξείδωσης και το τμήμα αναγωγής που είναι συνδεδεμένα με μια πηγή συνεχούς δυναμικού. Προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι πρέπει να απομονωθεί η κάθοδος καθώς στην επιφάνειά της σχηματίζονται φυσαλίδες υδρογόνου κατά τη λειτουργία του κελιού. Αυτές οι φυσαλίδες εμποδίζουν την κανονική ροή του δείγματος και πρέπει να απομακρυνθούν για να λειτουργήσει ομαλά το σύστημα ροής. Αυτό επιτυγχάνεται τοποθετώντας την κάθοδο σε διαφορετικό τμήμα του κελιού με ξεχωριστή είσοδο και έξοδο διαλύτη. Για να υπάρχει όμως ηλεκτρική επαφή και άρα δυνατότητα ροής ρεύματος διαμέσου του κελιού, η κάθοδος τοποθετείται παράλληλα με την άνοδο. Έτσι το κελί διαχωρίζεται σε δύο τμήματα που το κάθε ένα έχει ξεχωριστή είσοδο και έξοδο διαλύματος. Η είσοδος του τμήματος οξείδωσης (άνοδος) είναι συνδεδεμένη με τη βαλβίδα εισαγωγής του δείγματος, έτσι ώστε το δείγμα να διέρχεται μόνο από το συγκεκριμένο τμήμα του κελιού. Η έξοδος του τμήματος οξείδωσης συνδέεται με το κελί στο οποίο είναι τοποθετημένος ο βιοαισθητήρας. Η είσοδος του τμήματος αναγωγής (κάθοδος) είναι συνδεδεμένη με δεξαμενή που περιέχει ρυθμιστικό διάλυμα, ενώ η έξοδος είναι συνδεδεμένη με τα απόβλητα.

Η ηλεκτρική επαφή μεταξύ των δύο ημιστοιχείων επιτυγχάνεται διαμέσου μίας μεμβράνης οξικής κυτταρίνης (12-16 kDa cut-off) που είναι τοποθετημένη μεταξύ τους. Η οξείδωση των παρεμποδιστών λαμβάνει χώρα στην άνοδο, που περιέχει αφρό υαλώδους άνθρακα (3.0 x 0.9 x 0.5 cm) με πορωσιμότητα 96,5%. Το τμήμα οξείδωσης αποτελείται από πλάκα (5.0 x 3.0 x 1.0 cm) polymethylmethacrylate (PMMA) στην οποία έχει ανοιχτεί μία τρύπα στις διαστάσεις του άνθρακα. Ο άνθρακας τοποθετείται στην τρύπα με προσοχή ώστε να μην δημιουργούνται κενά στο περιθώριο. Παρότι είναι πιθανό μέρος του δείγματος να διέρχεται γύρω από τον άνθρακα και όχι διαμέσου αυτού, το δείγμα παραμένει σε στενή επαφή με τον άνθρακα επιτρέποντας την οξείδωση των παρεμποδιστών. Για να διασφαλιστεί η ομοιογενής εφαρμογή δυναμικού στον άνθρακα, η ηλεκτρική επαφή με την πηγή επιτυγχάνεται από το κάτω τμήμα της πλάκας του άνθρακα μέσω πλέγματος ιών άνθρακα.

Το τμήμα της καθόδου (επίσης κατασκευασμένο από PMMA 5.0 x 3.0 x 1.5 cm) περιέχει πλέγμα πλατίνας (3.0 x 0.8). Στο PMMA γίνεται τρύπα (3.0 x 0.9 x 1.0 cm) και το πλέγμα της πλατίνας τοποθετείται εσωτερικά προσέχοντας να είναι κοντά στην μεμβράνη αλλά όχι σε επαφή με αυτή. Η έξοδος αυτού του τμήματος είναι σχεδιασμένη ώστε οι φυσαλίδες υδρογόνου να απομακρύνονται γρήγορα από την

επιφάνεια της πλατίνας. Η πιθανότητα ανάμιξης του δείγματος που διέρχεται από την άνοδο με το διάλυμα που διέρχεται από την κάθοδο εξετάστηκε χρησιμοποιώντας έγχρωμα διαλύματα. Στις ταχύτητες ροής που εξετάστηκαν (0,5 – 1,0 ml/min) δεν παρατηρήθηκε ανάμιξη.

10.3 Χαρακτηριστικά Λειτουργίας του Κελιού Προ-οξειδωσης

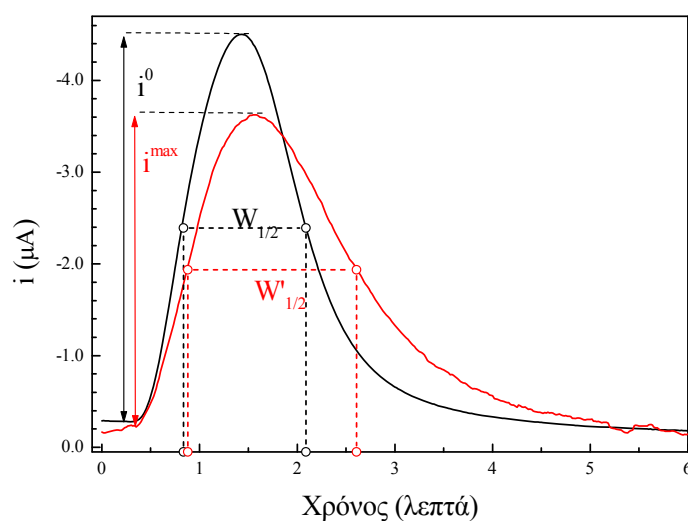
Αρχικά εξετάστηκε η επίδραση που έχει η προσθήκη του κελιού προ-οξειδωσης στο σύστημα ροής στα αναλυτικά χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα γλυκόζης. Σε αναλογία με το νόμο του Fick, η συνεισφορά του κελιού στην αξονική διασπορά του δείγματος δίνεται από την εξίσωση 12 [240]:

$$\partial C / \partial t = D \partial^2 C / \partial x^2 \quad (12)$$

όπου C είναι η συγκέντρωση του δείγματος, t είναι ο χρόνος και D ο συντελεστής αξονικής διασποράς. Η συνολική αξονική διασπορά δίνεται από το γινόμενο των επιμέρους διασπορών που οφείλονται στα διάφορα τμήματα του συστήματος ροής (σύστημα εισαγωγής του δείγματος, σωλήνες ροής, κλπ.) [241]. Η συνεισφορά του κελιού στην διασπορά του δείγματος μπορεί να υπολογιστεί βάσει της εξίσωσης 13:

$$D_k = i^0 / i^{\max} \quad (13)$$

όπου D_k είναι η μερική αξονική διασπορά του δείγματος που οφείλεται στο κελί, i^0 είναι η απόκριση του βιοαισθητήρα όταν στο σύστημα ροής δεν υπάρχει το κελί και i^{\max} είναι η απόκριση του βιοαισθητήρα όταν υπάρχει το κελί.



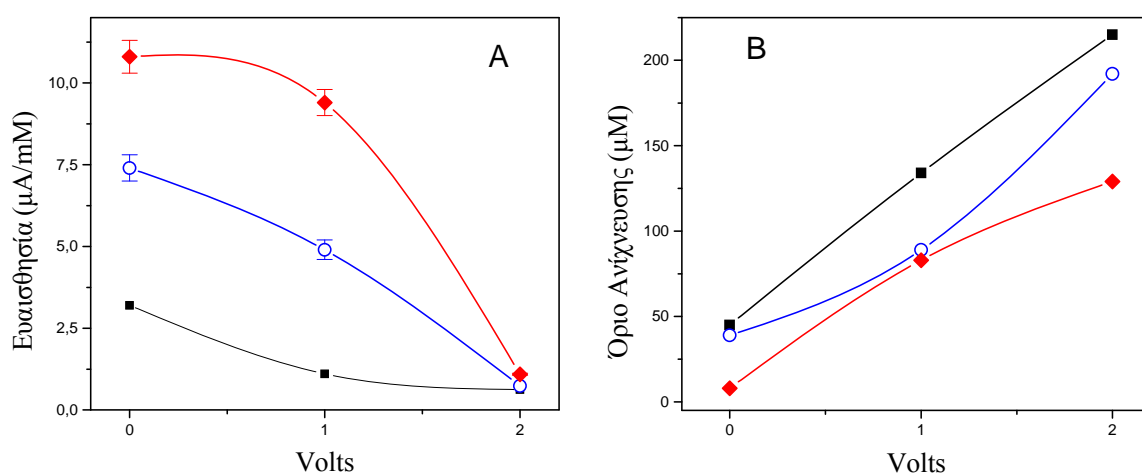
Σχήμα 47.

Σύγκριση της

απόκρισης του βιοαισθητήρα απουσία (—) και παρουσία (—) του κελιού στο σύστημα ροής.

Στο σχήμα 47 παρουσιάζεται η αλλαγή στην απόκριση του βιοαισθητήρα όταν στο σύστημα εισαχθεί το κελί προ-οξειδώσης. Οι κορυφές αναφέρονται σε ενέσεις 5 mM γλυκόζης, ενώ η ταχύτητα ροής ήταν και στις δύο περιπτώσεις 1,0 ml/min. Αντικαθιστώντας στην εξίσωση 13 τις τιμές $i^0 = 4,22 \mu\text{A}$ και $i^{\text{max}} = 3,44 \mu\text{A}$, υπολογίζεται ότι $D_k = 1,23$. Αυτή η τιμή δείχνει ότι η αξονική διασπορά που οφείλεται στο κελί είναι μικρή [240,241]. Η μικρή διασπορά αποδεικνύεται και από την μικρή αύξηση του πλάτους της κορυφής ($W^{1/2}$ αυξάνεται από 75 σε 104 δευτερόλεπτα). Το γραμμικό εύρος της απόκρισης του βιοαισθητήρα δεν επηρεάζεται (0.5 to 10 mM), η ευαισθησία του βιοαισθητήρα μειώνεται από $0,83 \pm 0,01 \mu\text{A/mM}$ σε $0,70 \pm 0,05 \mu\text{A/mM}$ (17.6% μείωση), ενώ το όριο ανίχνευσης αυξάνεται από 70 σε 150 μM γλυκόζης.

Ακολούθως εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα του κελιού στην εξάλειψη της απόκρισης του βιοαισθητήρα στο ασκορβικό οξύ, το ουρικό οξύ και την ακεταμινοφαινόλη. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στο σχήμα 48.



Σχήμα 48. Επίδραση του δυναμικού που εφαρμόζεται στο κελί (A) στην ευαισθησία και (B) το όριο ανίχνευσης του βιοαισθητήρα γλυκόζης για το ασκορβικό (-■-), το ουρικό (-○-) και την ακεταμινοφαινόλη (-◇-) (ταχύτητα ροής 1,0 ml/min).

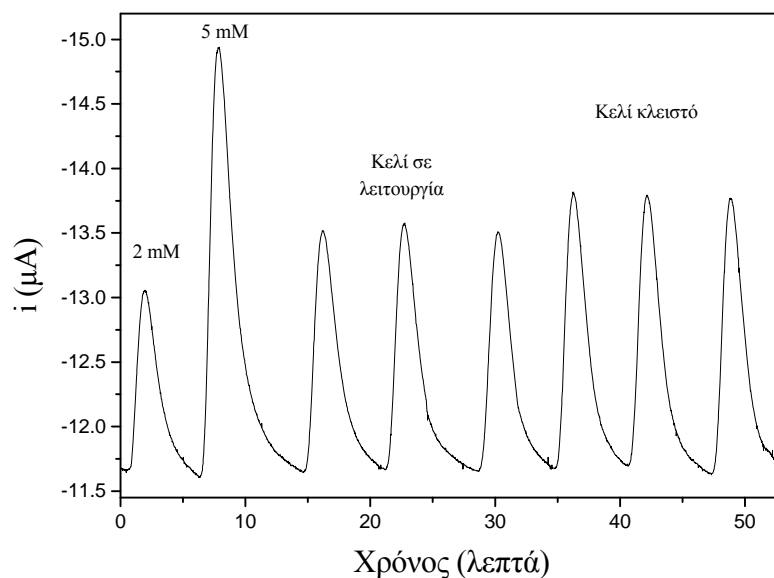
Η μείωση της ευαισθησίας του βιοαισθητήρα για τους παρεμποδιστές εξαρτάται από το δυναμικό που εφαρμόζεται στο κελί. Όταν εφαρμόζεται 1,0 Volt η ευαισθησία στο ασκορβικό μειώνεται κατά 66% αλλά μόνο κατά 35% και 13% για το ουρικό και την ακεταμινοφαινόλη αντίστοιχα. Αυξάνοντας το εφαρμοζόμενο δυναμικό σε 2,0 Volt η ευαισθησία του βιοαισθητήρα μειώνεται κατά 80-90% για όλους τους παρεμποδιστές. Εφαρμογή δυναμικού μεγαλύτερου από 2,0 Volt οδηγεί σε ηλεκτρόλυση του νερού που δημιουργεί φυσαλίδες οξυγόνου στην άνοδο εμποδίζοντας την ομαλή ροή του δείγματος. Στο σχήμα 48B παρουσιάζονται τα όρια ανίχνευσης του βιοαισθητήρα για κάθε ένα από τους παρεμποδιστές, ανάλογα με το δυναμικό που εφαρμόζεται στο κελί. Το όριο ανίχνευσης σε αυτή την περίπτωση αντιπροσωπεύει τη μέγιστη συγκέντρωση του παρεμποδιστή που οξειδώνεται πλήρως από το κελί προ-οξείδωσης. Αν η συγκέντρωση του παρεμποδιστή στο δείγμα είναι μεγαλύτερη από το όριο ανίχνευσης τότε θα αλλοιωθεί το σήμα του βιοαισθητήρα και θα υπάρξει σφάλμα στην ανάλυση.

Η αποτελεσματικότητα του κελιού στην άρση των παρεμποδίσεων αυξάνεται όσο μειώνεται η ταχύτητα ροής. Για παράδειγμα, όταν η ταχύτητα ροής είναι 0,65 ml/min το όριο ανίχνευσης για το ουρικό οξύ είναι μεγαλύτερο από 500 μM , ενώ για τα 500 μM ασκορβικού οξέως η μείωση του σήματος είναι 90%. Η αύξηση της αποτελεσματικότητας του κελιού με τη μείωση της ταχύτητας ροής, οφείλεται στο ότι όσο μικρότερη είναι η ταχύτητα ροής τόσο μεγαλύτερος είναι ο χρόνος που το δείγμα παραμένει στο κελί. Ωστόσο όταν η ταχύτητα ροής είναι μικρότερη από 1,0 ml/min τα αναλυτικά χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα αλλοιώνονται σημαντικά.

10.4 Εφαρμογή στην Ανάλυση Γλυκόζης

Το σύστημα ροής με το κελί προ-οξείδωσης χρησιμοποιήθηκε για την ανάλυση γλυκόζης σε εμπορικά διαθέσιμα προϊόντα, όπως χυμούς φρούτων (πορτοκάλι και βερίκοκο), μη-ανθρακούχα πορτοκαλάδα (Fanta), καραμέλες (Halls original), ημίξηρο λευκό κρασί και τοπικό κρητικό μέλι. Οι χυμοί αραιώθηκαν 1:100 με ρυθμιστικό διάλυμα (10 mM KH_2PO_4 pH 7,5), ενώ το κρασί αραιώθηκε 1:50. Η καραμέλα (3,957 g) διαλύθηκε σε 1000 ml ρυθμιστικού διαλύματος. 1,795 g από το μέλι διαλύθηκαν σε 100 ml ρυθμιστικού διαλύματος και από αυτό το διάλυμα παρασκευάστηκε νέο διάλυμα με αραιώση 1:25. Καθημερινά γινόταν καμπύλη βαθμονόμησης του βιοαισθητήρα, ενώ πριν την ανάλυση κάθε δείγματος γίνονταν

ενέσεις δύο πρότυπων διαλυμάτων γλυκόζης. Στο σχήμα 49 παρουσιάζεται ένα παράδειγμα της ανάλυσης (καραμέλα Halls). Η βελτίωση στην ακρίβεια της



ανάλυσης που οφείλεται στην χρήση του κελιού προ-οξειδωσης αποδεικνύεται από την διαφορά στις κορυφές όταν το κελί είναι σε λειτουργία και όταν το κελί είναι κλειστό. Όπως φαίνεται από το σχήμα, όταν το κελί είναι εκτός λειτουργίας η απόκριση του βιοαισθητήρα γλυκόζης είναι μεγαλύτερη από την απόκριση που οφείλεται στη γλυκόζη του δείγματος (κελί σε λειτουργία), οδηγώντας σε 12% σφάλμα στην ανάλυση.

Σχήμα 49.

Ανάλυση της

περιεκτικότητας γλυκόζης της καραμέλας Halls. Οι δύο πρώτες κορυφές είναι η ανάλυση πρότυπων διαλυμάτων γλυκόζης 2 και 5 mM αντίστοιχα. Οι επόμενες τρεις κορυφές είναι η απόκριση του βιοαισθητήρα στο δείγμα καραμέλας (3,957 g καραμέλας διαλυμένα σε 1 λίτρο ρυθμιστικού) όταν το κελί προ-οξειδωσης είναι σε λειτουργία (2 Volt). Οι τρεις τελευταίες κορυφές είναι η απόκριση του βιοαισθητήρα όταν το κελί προ-οξειδωσης είναι εκτός λειτουργίας. Η ταχύτητα ροής είναι 1,0 ml/min.

Τα αποτελέσματα από την ανάλυση των δειγμάτων με το βιοαισθητήρα γλυκόζης συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα της ανάλυσης των αντίστοιχων δειγμάτων με τη χρήση υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης με χημική τροποποίηση μετά τη στήλη (PCD-HPLC) [242] *.

Πίνακας 9. Σύγκριση των αποτελεσμάτων της ανάλυσης διαφόρων δειγμάτων με τον βιοαισθητήρα γλυκόζης και το PCD-HPLC.

Δείγμα	Βιοαισθητήρας	PCD-HPLC	% σφάλμα
Καραμέλα Halls ^α	119 ± 5	120 ± 7	- 0,8
Μέλι ^α	197 ± 3	201 ± 25	- 2,0
Fanta ^β	314 ± 10	304 ± 14	3 ,3
Χυμός πορτοκάλι ^β	155 ± 7	139 ± 4	1 1,5
Χυμός βερίκοκο ^β	143 ± 3	139 ± 6	2 ,9
Ημίξηρο κρασί ^β	38,5 ± 2,3	37,0 ± 1,2	4 ,1

(α) Γλυκόζη σε mg/g δείγματος, (β) Γλυκόζη σε mmol/l δείγματος

Από τον πίνακα 9 φαίνεται ότι οι συγκεντρώσεις γλυκόζης που υπολογίστηκαν με τις δύο μεθόδους είναι σε πολύ καλή συμφωνία. Θεωρώντας την τιμή από την ανάλυση με το PCD-HPLC ως την πραγματική τιμή, το σφάλμα στη μέτρηση με το βιοαισθητήρα υπολογίζεται από την εξίσωση:

$$\% \sigma \phi \acute{\alpha} \lambda \mu \alpha = \frac{([\beta \text{ιοαισθητήρα}] - [\text{PCD-HPLC}]) \times 100}{[\text{PCD-HPLC}]} \quad (14)$$

όπου [βιοαισθητήρα] η συγκέντρωση γλυκόζης στο δείγμα όπως υπολογίζεται από την ανάλυση με τον βιοαισθητήρα, ενώ αντίστοιχα [PCD-HPLC] η συγκέντρωση

* Η ανάλυση των δειγμάτων με PCD-HPLC έγινε από τη Μ. Φουσκάκη.

όπως υπολογίζεται από την ανάλυση του δείγματος με την PCD-HPLC. Όπως παρατηρείται από τον πίνακα 10 το % σφάλμα στην ανάλυση των δειγμάτων με το βιοαισθητήρα είναι μικρότερο από 4,1%, με εξαίρεση το χυμό από πορτοκάλι που είναι 11,5%. Το σφάλμα στην συγκεκριμένη ανάλυση μπορεί να εξηγηθεί από τη μεγάλη συγκέντρωση ασκορβικού οξέως στο χυμό πορτοκαλιού.

Η συσχέτιση των δύο μεθόδων δίνει γραμμική σχέση που περιγράφεται από την εξίσωση:

$$[\text{Biosensor}] = (1,04 \pm 0,02) [\text{PCD-HPLC}] \quad (15)$$

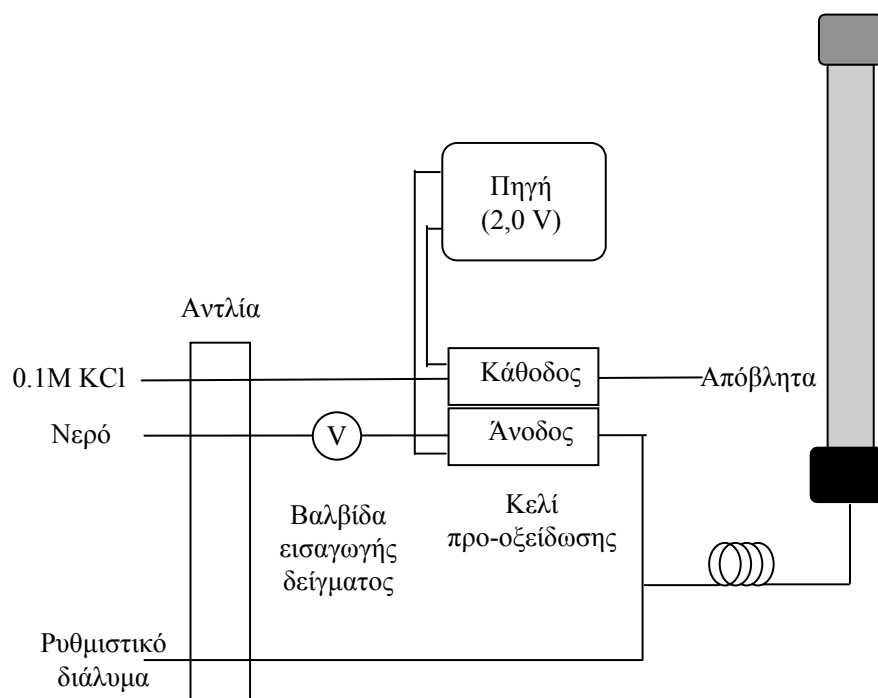
με συντελεστή συσχέτισης (R) = 0,999.

10.5 Εφαρμογή στην Ανάλυση Φωσφορικών Ιόντων στον Ορό Αίματος

Στο κεφάλαιο 8 περιγράφηκε η σπουδαιότητα της ακριβούς ανάλυσης της συγκέντρωσης των φωσφορικών ιόντων στο αίμα. Η μέγιστη συγκέντρωση των παρεμποδιστών στον ορό αίματος είναι 100 μM ασκορβικό οξύ, 500 μM ουρικό οξύ και 200 μM ακεταμινοφαινόλη [231]. Οι παραπάνω συγκεντρώσεις είναι μεγαλύτερες από τις συγκεντρώσεις που μπορούν να οξειδωθούν πλήρως από το κελί προ-οξείδωσης (σχήμα 48B). Γι' αυτό το λόγο έγιναν βελτιώσεις στο κελί προ-οξείδωσης. Αυξήθηκε το μήκος του αντιδραστήρα από 30 σε 63 mm για να αυξηθεί ο χρόνος που έρχεται σε επαφή το δείγμα με τον άνθρακα (χρόνος αντίδρασης). Παράλληλα για να αποφευχθεί εκτεταμένη διασπορά του δείγματος μειώθηκε το πλάτος του αντιδραστήρα από 9 σε 6 mm. Αντίστοιχα, αυξήθηκε και το μήκος του πλέγματος πλατίνας από 30 σε 35 mm.

Όπως παρουσιάστηκε στο κεφάλαιο 8 η βέλτιστη συγκέντρωση πυρρουβικού οξέος στο διάλυμα εργασίας είναι 1,0 mM. Επειδή όμως το αίμα περιέχει πυρρουβικό οξύ σε αρκετά υψηλή συγκέντρωση (150 μM) η παρουσία του στο δείγμα θα αλλοιώσει την απόκριση του βιοαισθητήρα. Γι' αυτό το λόγο η συγκέντρωση του πυρρουβικού οξέως στο διάλυμα εργασίας αυξήθηκε σε 10 mM. Ταυτόχρονα η συγκέντρωση του HEPES στο ρυθμιστικό διάλυμα αυξήθηκε από 10 mM σε 50 mM για να αυξηθεί η ρυθμιστική του ικανότητα.

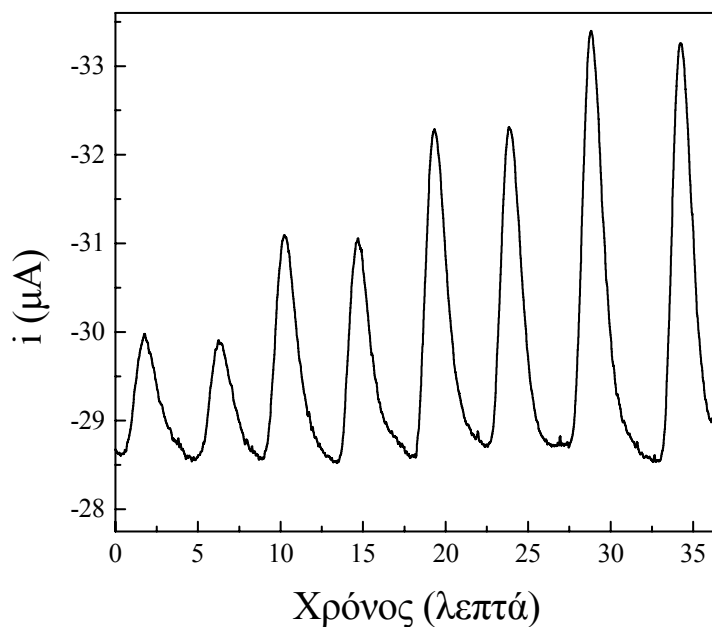
Προκαταρκτικά πειράματα έδειξαν ότι η ανάμιξη του ρυθμιστικού διαλύματος με το δείγμα πρέπει να γίνεται μετά την προ-οξείδωση του δείγματος. Όταν το ρυθμιστικό διάλυμα αναμειγνύεται με το δείγμα πριν την προ-οξείδωση τότε μειώνεται η αναπαραγωγιμότητα των μετρήσεων. Η πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για τις αναλύσεις παρουσιάζεται στο σχήμα 50.



Σχήμα 50. Πειραματική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε στην ανάλυση φωσφορικών ιόντων στον ορό αίματος. Η ταχύτητα ροής είναι 0,65 ml/min για όλα τα διαλύματα. Το ρυθμιστικό διάλυμα είναι 50 mM HEPES και 10 mM πυρουβικό οξύ ρυθμισμένο σε pH 7,5.

Το δείγμα εισάγεται με ένεση από τη βαλβίδα εισαγωγής και στη συνέχεια διέρχεται από το ανοδικό τμήμα του κελιού προ-οξείδωσης, όπου οξειδώνονται οι ηλεκτροενεργές ουσίες. Κατόπιν αναμειγνύεται με το ρυθμιστικό διάλυμα στο ειδικό σπείραμα ανάμιξης (όγκος σπειράματος 400 μ l) όπου λαμβάνει χώρα η ανάμιξη, για να φτάσει στη συνέχεια στο βιοαισθητήρα. Κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες η ευαισθησία του βιοαισθητήρα είναι 445 ± 9 nA/mM, το γραμμικό εύρος

ανάλυσης είναι από 0,5 έως 10 mM, ενώ το όριο ανίχνευσης είναι μικρότερο από 0,3 mM. Στο σχήμα 51 παρουσιάζεται η απόκριση του βιοαισθητήρα φωσφορικών κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες.



Σχήμα 51. Καταγράφημα της απόκρισης του βιοαισθητήρα φωσφορικών με τη χρήση του συστήματος ροής που παρουσιάστηκε στο σχήμα 49. Οι κορυφές αντιστοιχούν σε ενέσεις πρότυπων διαλυμάτων 2,5, 5,0, 7,5 και 10 mM φωσφορικών ιόντων αντίστοιχα. Το δυναμικό εργασίας είναι +800 mV συναρτήσεως Ag/AgCl. Το ρυθμιστικό διάλυμα είναι 50 mM HEPES και 10 mM πυροϋβικό οξύ ρυθμισμένο σε pH 7,5.

Στη συνέχεια εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα του τροποποιημένου κελιού προ-οξείδωσης. Όταν το κελί είναι εκτός λειτουργίας η ευαισθησία του βιοαισθητήρα για το ασκορβικό οξύ, το ουρικό οξύ και την ακεταμινοφαινόλη είναι 1,72, 1,63 και 2,27 $\mu\text{A}/\text{mM}$ αντίστοιχα. Αντίθετα όταν στο κελί εφαρμόζεται δυναμικό 2,0 V οι ευαισθησίες μειώνονται σε 0,26, 0,51 και 0,30 $\mu\text{A}/\text{mM}$ αντίστοιχα. Τα όρια

ανίχνευσης για αυτούς τους παρεμποδιστές είναι (ισοδύναμα με τις συγκεντρώσεις που μπορούν να προκαλέσουν παρεμπόδιση) είναι 362, 816 και 853 μM για το ασκορβικό, το ουρικό και την ακεταμινοφαινόλη αντίστοιχα. Οι παραπάνω συγκεντρώσεις είναι πολύ μεγαλύτερες από τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις αυτών των ουσιών στον ορό αίματος.

Η παραπάνω πειραματική διάταξη χρησιμοποιήθηκε για τη μέτρηση φωσφορικών σε ορό αίματος (το δείγμα λήφθηκε από το Βενιζέλειο νοσοκομείο). Τρία δείγματα του ορού αναλύθηκαν και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα της ανάλυσης των αντίστοιχων δειγμάτων με ιοντική χρωματογραφία*. Τα δείγματα εισήχθησαν στο σύστημα ροής χωρίς να γίνει αραίωσή τους. Όταν το κελί ήταν εκτός λειτουργίας η φαινομενική συγκέντρωση των φωσφορικών στο δείγμα υπολογίστηκε σε $2,23 \pm 0,14$ mM. Όταν το κελί ήταν σε λειτουργία η συγκέντρωση των φωσφορικών ιόντων βρέθηκε $1,03 \pm 0,06$ mM. Τα αποτελέσματα από τη χρωματογραφική ανάλυση των δειγμάτων ήταν $0,99 \pm 0,02$ mM, δηλαδή πολύ κοντά στην τιμή που βρέθηκε κατά την ανάλυση των δειγμάτων με το βιοαισθητήρα όταν το κελί ήταν σε λειτουργία. Έτσι με τη χρήση του κελιού προ-οξειδωσης είναι δυνατή η ανάλυση δειγμάτων ορού αίματος και αποφεύγονται μεγάλα σφάλματα (116%) που οφείλονται στις ηλεκτροενεργές ουσίες που βρίσκονται στο δείγμα.

10.6 Συμπεράσματα

Οι παρεμποδίσεις από ηλεκτροενεργές ουσίες κατά την ανάλυση δειγμάτων με αμπερομετρικούς βιοαισθητήρες μπορεί να οδηγήσουν σε μεγάλα σφάλματα. Για την άρση αυτών των παρεμποδίσεων κατασκευάστηκε ένα πρότυπο κελί προ-οξειδωσης ώστε να οξειδώνονται οι παρεμποδιστές πριν την ανάλυση του δείγματος από το βιοαισθητήρα. Η χρήση του κελιού δε διαφοροποιεί σημαντικά τα αναλυτικά χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα, ενώ ταυτόχρονα μειώνει την παρεμπόδιση από ουσίες όπως το ασκορβικό οξύ, το ουρικό οξύ και την ακεταμινοφαινόλη. Έτσι με τη χρήση του κελιού επιτεύχθηκαν ακριβείς μετρήσεις της συγκέντρωσης της γλυκόζης σε δείγματα τροφίμων και ποτών. Επιπλέον έγινε δυνατή η μέτρηση των φωσφορικών ιόντων στο πολύπλοκο δείγμα του ορού του αίματος.

* Οι αναλύσεις των δειγμάτων με τη χρήση ιοντικής χρωματογραφίας έγιναν από τον Γ. Κουβαράκη, στο εργαστήριο του Καθ. Ν. Μιχαλόπουλου.

11.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ανάπτυξη και κατασκευή βιοαισθητήρων είναι ένας από τους ραγδαία αναπτυσσόμενους τομείς της Αναλυτικής Χημείας. Η βελτιστοποίηση της σταθερότητας των βιοαισθητήρων (εφαρμογή πρότυπων μεθόδων ακινητοποίησης, ανάπτυξη νέων ηλεκτροδίων και συστημάτων μεταφοράς ηλεκτρονίων, κτλ), η σχεδίαση πρότυπων συστημάτων για την παρακολούθηση και ανίχνευση νέων ουσιών, η ανάπτυξη αναπαραγωγίμων διαδικασιών κατασκευής των βιοαισθητήρων σε μεγάλες ποσότητες, καθώς και η κατασκευή συστημάτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αναλύσεις ρουτίνας (σε ιατρικές, βιομηχανικές, περιβαλλοντικές αναλύσεις, κτλ) αποτελούν τις κύριες κατευθύνσεις της έρευνας που γίνεται τα τελευταία χρόνια στον τομέα των βιοαισθητήρων.

Μέσα στα γενικά πλαίσια αυτών των κατευθύνσεων και με κύριο στόχο τη συμβολή στην έρευνα για τη σταθεροποίηση των βιοαισθητήρων, η παρούσα εργασία προσανατολίστηκε στους ακόλουθους τομείς:

Τη χρήση ενός νέου υλικού (πορώδης άνθρακας) για την ακινητοποίηση των ενζύμων και την κατασκευή των βιοαισθητήρων. Ο πορώδης άνθρακας είναι ένα ιδιαίτερα αγωγίμο υλικό, με αποτέλεσμα να παρουσιάζει μεγάλη ευαισθησία στην ανίχνευση του H_2O_2 , ευαισθησία που αποτελεί τη βάση για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων με αντίστοιχα μεγάλη ευαισθησία. Ταυτόχρονα η υψηλή πορωσιμότητα του καθιστά δυνατή την ακινητοποίηση των ενζύμων μέσω φυσικής προσρόφησης.

Την επίδραση του πολυηλεκτρολύτη διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη στη σταθεροποίηση των βιοαισθητήρων που κατασκευάστηκαν. Αρχικά επιλέχθηκε η οξειδάση της γλυκόζης (ένα από τα πλέον μελετημένα ένζυμα) για την κατασκευή βιοαισθητήρα γλυκόζης με τη χρήση του πορώδους άνθρακα και τη σταθεροποίηση της λειτουργίας του με την διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη. Η διαιθυλαμινοαιθύλ-δεξτράνη αυξάνει την ενεργότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου, ενώ ταυτόχρονα βοηθάει και στην ακινητοποίηση μεγαλύτερης ποσότητας ενζύμου. Έτσι ο βιοαισθητήρας γλυκόζης που κατασκευάστηκε παρουσιάζει αξιοσημείωτη σταθερότητα. Η εύκολη και απλή διαδικασία κατασκευής των βιοαισθητήρων που δεν απαιτεί τη χρήση χημικών αντιδράσεων, έδωσε τη δυνατότητα για κατασκευή βιοαισθητήρων με αναπαραγώγιμα χαρακτηριστικά.. Εξίσου σημαντικά ήταν τα

αποτελέσματα της ανάπτυξης βιοαισθητήρων γαλακτικού και φωσφορικών. Η αναπαραγωγιμότητα κατασκευής του βιοαισθητήρα γαλακτικού είναι η καλύτερη που έχει δημοσιευτεί μέχρι σήμερα στη βιβλιογραφία. Παράλληλα ο βιοαισθητήρας φωσφορικών που κατασκευάστηκε παρουσιάζει εξαιρετική σταθερότητα κατά τη λειτουργία και την αποθήκευσή του σε σχέση με αντίστοιχες εργασίες που έχουν δημοσιευτεί (Πίνακας 8).

Τη δυνατότητα χρήσης νέων μορίων για τη βελτιστοποίηση του τρόπου μετατροπής της βιολογικής αναγνώρισης σε ηλεκτρικό σήμα. Έτσι εξετάστηκε η δυνατότητα χρήσης των φουλλερενίων ως μεταφορέων ηλεκτρονίων για την κατασκευή βιοαισθητήρων γλυκόζης. Με τη χρήση του φουλλερενίου οι βιοαισθητήρες μπορούσαν να λειτουργήσουν σε δυναμικά μικρότερα των +300 mV. Συγχρόνως η απόκριση των βιοαισθητήρων που κατασκευάστηκαν με τη χρήση της PEI-C₆₀ ήταν ανεξάρτητη της συγκέντρωσης του οξυγόνου.

Την εφαρμογή των βιοαισθητήρων που κατασκευάστηκαν στην ανάλυση πραγματικών δειγμάτων. Οι παρεμποδίσεις από ηλεκτροενεργές ουσίες κατά την ανάλυση δειγμάτων με αμπερομετρικούς βιοαισθητήρες μπορεί να οδηγήσουν σε μεγάλα σφάλματα. Για την άρση των παρεμποδίσεων από ηλεκτροενεργές ουσίες κατασκευάστηκε ένα πρότυπο κελί προ-οξειδωσης ώστε να οξειδώνονται οι παρεμποδιστές πριν την ανάλυση του δείγματος από το βιοαισθητήρα. Η χρήση του κελιού δε διαφοροποιεί σημαντικά τα αναλυτικά χαρακτηριστικά του βιοαισθητήρα, ενώ ταυτόχρονα μειώνει την παρεμπόδιση από ουσίες όπως το ασκορβικό οξύ, το ουρικό οξύ και την ακεταμινοφαινόλη. Έτσι με τη χρήση του κελιού επιτεύχθηκαν ακριβείς μετρήσεις της συγκέντρωσης της γλυκόζης σε δείγματα τροφίμων και ποτών. Επιπλέον έγινε δυνατή η μέτρηση των φωσφορικών ιόντων στο πολύπλοκο δείγμα του ορού του αίματος.

Τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας μπορούν να αποτελέσουν τη βάση για την αναπαραγωγίμη κατασκευή αμπερομετρικών βιοαισθητήρων με αυξημένη σταθερότητα. Ταυτόχρονα έγιναν τα πρώτα βήματα για την κατασκευή συστημάτων που θα μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αναλύσεις ρουτίνας.

Όπως είναι φυσικό, μία εργασία ποτέ δεν καλύπτει το σύνολο των ερωτημάτων και επιπλέον είναι λογικό τα αποτελέσματα της να δημιουργούν καινούργια ερωτήματα. Η βελτίωση των συνθηκών φύλαξης των βιοαισθητήρων (παρουσία πρόσθετων στο διάλυμα φύλαξης, επίδραση φύσης ρυθμιστικού, κλπ), αλλά και η

χρήση άλλων σταθεροποιητών μπορεί να οδηγήσει στη κατασκευή βιοαισθητήρων με καλύτερη σταθερότητα. Ο τομέας της παρούσας εργασίας στον οποίο μπορεί να γίνει περισσότερη έρευνα και βελτίωση είναι η επιλεκτικότητα των βιοαισθητήρων. Η εφαρμογή τεχνολογιών που έχουν αναφερθεί στην βιβλιογραφία, όπως η χρήση μεμβρανών κυρίως του υπεροξειδωμένου πολυπυρρολίου (overoxidized poly pyrrole films [231,232]), αλλά και η επιμετάλλωση του ηλεκτροδίου πορώδους άνθρακα είναι δύο τεχνικές που χωρίς να κάνουν πολύπλοκη τη διαδικασία κατασκευής (αφού προσθέτουν μόνο ένα στάδιο) μπορεί να βελτιώσουν σημαντικά την επιλεκτικότητα. Επιπλέον διερεύνηση χρειάζεται και η χρησιμοποίηση μεταφορών ηλεκτρονίων. Η χρήση άλλων μορίων, η πρόσδεση του μεταφορέα ηλεκτρονίων πάνω στο πολυμερές της διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνης ή στο ένζυμο το οποίο στη συνέχεια θα σταθεροποιείται, μπορεί να οδηγήσει στην κατασκευή βιοαισθητήρων με καλύτερα αναλυτικά χαρακτηριστικά. Περαιτέρω διερεύνηση χρειάζεται και το ηλεκτρόδιο εργασίας. Τροποποίηση των ιδιοτήτων του πορώδους άνθρακα με ηλεκτροχημική ή χημική κατεργασία μπορεί να προσδώσει στον άνθρακα χαρακτηριστικά που να βελτιώσουν τη συμπεριφορά του (πχ δημιουργία δραστικών ομάδων στην επιφάνεια του άνθρακα μπορεί να αυξήσει τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του άνθρακα και των μορίων του προσροφημένου ενζύμου). Επιπλέον ίσως θα ήταν δόκιμη η εξέταση και άλλων ανθρακικών υλικών.

Αυτό που πρέπει να τονιστεί είναι ότι λόγω της φύσης του αντικειμένου είναι πολύ σημαντική η παρακολούθηση των εξελίξεων της βιοτεχνολογίας. Όπως αναφέρθηκε και στο κεφάλαιο 4, η άνθηση της βιοτεχνολογίας παρέχει καινούργια εργαλεία για τη σταθεροποίηση των ενζύμων και η μεταφορά και εφαρμογή τους στην κατασκευή βιοαισθητήρων είναι πολύ σημαντική.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. Ένζυμα

Η οξειδάση της γλυκόζης (GOx) από *Aspergillus Niger* (EC 1.1.3.4, 200U/mg) και η οξειδάση του γαλακτικού (LOx) από *Pediococcus* sp. (EC 1.1.3.2, 44U/mg) αγοράστηκαν από τη Fluka Chemie AG.

Η ανασυνδιασμένη οξειδάση του πυρουβικού (POD) από *Lactobacillus plantarum* (EC 1.2.3.3, 1,66 U/mg), διαθέσιμη από τη Roche Diagnostics GmbH (Germany), παραχωρήθηκε από τον Dr. U. Spohn (Univ. of Halle).

2. Υλικά-Αντιδραστήρια

Η διαιθυλαμινοαίθυλ-δεξτράνη (deae-dextran) (D-9885) αγοράστηκε από την Sigma Chemical Co. Ο αφρώδης άνθρακας (πυκνότητα 0,05 g/cm³, πορωσιμότητα 96,5%), οι ίνες άνθρακα (βάρος/m² 200gr, warp and weft yarn 200 Tex, plain weave) και το πλέγμα πλατίνας (wire diameter 0,06 mm, wires/inch 82x82) αγοράστηκαν από την Goodfellow Cambridge Ltd. Το φουλλερένιο (C₆₀) παραχωρήθηκε από τον καθ. Μ. Ορφανόπουλο (Παν. Κρήτης). Το παράγωγο του φουλλερενίου [1,2-methano fullerene)-61-carboxylic acid] αγοράστηκε από τη Fluka Chemie AG.

Τα πειράματα έγιναν με τη χρήση ποτενσιοστάτη τριών-ηλεκτροδίων Metrohm (μοντέλο 641 VA-Detector). Εκτός του βιοαισθητήρα (ηλεκτρόδιο εργασίας) χρησιμοποιήθηκαν αναφορικό ηλεκτρόδιο αργύρου/χλωριούχου-αργύρου (Μοντέλο 90-02, ORION Res.Inc.) και βοηθητικό ηλεκτρόδιο πλατίνας (CORNING, cat.no. 476060). Το σήμα καταγραφόταν με τη χρήση υπολογιστή εξοπλισμένου με κάρτα 16-bit A/D και ελεγχόταν με τη βοήθεια λογισμικού προγράμματος γραμμένου σε BASIC. Η θερμοκρασία του διαλύματος μέτρησης διατηρούταν σταθερή στους 24,0 ± 0,1 °C με τη χρήση κυκλοφορητή νερού (Μοντέλο 9105, Polyscience). Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε nano-pure water (~18 ΜΩ, EASYpure model D7033, Barnstead).

1. K. Cammann, **Fres. J. Anal. Chem.**, 343 (1992) 812.
2. <http://nexus.chemistry.duq.edu/analytical/whatisanalyticalchem.html>
3. R. Kellner, J.-M. Mermet, M. Otto, H. M. Widmer, **Analytical Chemistry**, Wiley-VCH, 1998.
4. L.C.Clark, C.Lyons, **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 102 (1962) 29.
5. M. de la Guardia, **Mikrochim. Acta**, 120 (1995) 243.
6. H. H. Weetall, **Biosens. Bioelectr.**, 14 (1999) 237.
7. A. Cunningham, **Introduction to Bioanalytical Sensors**, John Wiley&Sons, 1998.
8. D. R. Thevenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson, (IUPAC commission V.5), **Sens. Act. B**, 30 (1996) 81.
9. D. R. Thevenot, K. Toth, R. A. Durst, G. S. Wilson, (IUPAC commission V.5), **Pure & Appl. Chem.**, 71 (1999) 2333.
10. M. A. Arnold, M. E. Meyerhoff, **CRC Crit. Revs. Anal. Chem.**, 20 (1988) 149.
11. B. Eiggins, **Biosensors an Introduction**, John Wiley & Sons, 1997.
12. M.P.Byfield, R.A.Abuknesha, **Biosens. Bioelectr.**, 9 (1994) 373.
13. M. A. Arnold, G. A. Rechnitz, **Biosensors: Fundamentals and Applications**, A. P. F. Turner, I. Karube, G. S. Wilson (ed.), Oxford University Press, 1987, p. 30.
14. L. Gordon, **Electroanalysis**, 7 (1995) 23.
15. J. S. Sidwell, G. A. Rechnitz, **Biotechnol. Lett.**, 7 (1985) 419.
16. K. Cammann, U. Lemke, A. Rohen, J. Sander, H. Wilken, B. Winter, **Angew. Chem. Int. Ed. Engl.**, 30 (1991) 516.
17. U. E. Spichiger-Keller, **Chemical Sensors and Biosensors for Medical and Biological Applications**, Wiley-VCH, 1998.
18. R. S. Sethi, **Biosens. Bioelectr.**, 9 (1994) 243.
19. E. Csöregi, **Construction and Miniaturization of Peroxidase Based Amperometric Biosensors**, Lund University, 1994.
20. G. Ramsay, **Commercial Biosensors**, John Wiley & Sons, 1998.
21. J. Wang, **J. Pharm. Biomed. Anal.**, 19 (1999) 47.
22. R. I. Stefan, J. F. van Staden, H. Y. Aboul-Enein, **Electroanal.**, 11 (1999) 1233.
23. I. R. Lauks, **Acc. Chem. Res.**, 31 (1998) 317.
24. V. A. Bogdanovskaya, M. R. Tarasevich, **Biosens. Bioelectr.**, 11 (1996) 853.
25. C. Henry, **Anal. Chem.**, 70 (1998) 594A.
26. K. R. Rogers, M. Mascini, **Field Anal. Chem. Tech.**, 2 (1998) 317.

27. 2nd Workshop on Biosensors and Bioanalytical Techniques in Environmental Analysis, **Anal. Chim. Acta**, 347 (1997), Special Issue.
28. Biosensors for Environmental Monitoring: Technology evaluation, **Anal. Chim. Acta**, 387 (1999), Special Issue.
29. 5th European Workshop on Biosensors for Environmental Monitoring and Stability of Biosensors, **Anal. Chim. Acta**, 362 (1998), Special Issue.
30. I. Karube, E. Tamiya, **Pure & Appl. Chem.**, 59 (1987) 545.
31. T. Scheper, B. Hitzmann, E. Stärk, R Ulber, R. Faurie, P. Sosnitza, K. F. Reardon, **Anal. Chim. Acta**, 400 (1999) 121.
32. H. A. Fishman, D. R. Greenwald, R. N. Zare, **Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.**, 27 (1998) 165.
33. K. Ramanathan, M. Rank, J. Svitel, A. Dzgoev, B. Danielsson, **Trends in Biotech.**, 17 (1999) 499.
34. C. R. Lowe, **Cur. Opin. Chem. Biol.**, 3 (1999) 106.
35. T. Scheper, W. Brandes, C. Grau, H. G. Hundek, B. Reinhardt, F. Rütther, F. Plötz, C. Schelp, K. H. Scheider, F. Giffhorn, B. Rehr, H. Sahm, **Anal. Chim. Acta**, 249 (1991) 25.
36. M. Rank, J. Gram, B. Danielsson, **Anal. Chim. Acta**, 281 (1993) 521.
37. J. H. T. Luong, P. Bouvrette, K. B. Male, **Trends in Biotech.**, 15 (1997) 369.
38. A. O. Scott (ed.), **Biosensors for Food Analysis**, The Royal Society of Chemistry, 1998.
39. M. D. L. de Castro, J. L. Luque-Garsia, **Anal. Lett.**, 33 (2000) 963.
40. A. E. G. Cass (ed.), **Biosensors A Practical Approach**, Oxford University Press, 1990.
41. G. D. Fasman (ed.), **Handbook of Biochemistry and Molecular Biology**, CRC Press, 1976.
42. S. W. May, **Cur. Opin. Biotech.**, 10 (1999) 370.
43. L. Stryer, **Βιοχημεία**, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 1994.
44. T. Keleti, **Basic Enzyme Kinetic**, Akadémiai Kiadó, 1986.
45. W. Tischer, V. Kasche, **Trends in Biotech.**, 17 (1999) 326.
46. H. H. Weetall, **Appl. Biochem. Biotech.**, 41 (1993) 157.
47. J. Wang, **Anal. Chim. Acta**, 399 (1999) 21.
48. J. Qian, Y. Liu, H. Liu, T. Yu, J. Deng, **J. Electroanal. Chem.**, 397 (1995) 157.

49. E. A. H. Hall, J. J. Gooding, C. E. Hall, N. Martens, **Fresenius J. Anal. Chem.**, 364 (1999) 58.
50. S. A. Emr, A. M. Yacynych, **Electroanal.**, 7 (1995) 913.
51. S. Cosnier, **Biosens. Bioelectr.**, 14 (1999) 443.
52. G. G. Wallace, M. Smyth, H. Zhao, **Trends in Anal. Chem.**, 18 (1999) 245.
53. M. Situmorang, J. J. Gooding, D. B. Hibbert, **Anal. Chim. Acta**, 394 (1999) 211.
54. P. N. Bartlett, J. M. Cooper, **J. Electroanal. Chem.**, 362 (1993) 1.
55. H. Yamato, M. Ohwa, W. Wernet, **J. Electroanal. Chem.**, 397 (1997) 163.
56. C. P. Govardhan, **Cur. Opin. Biotech.**, 10 (1999) 331.
57. M. S. Vreeke, P. Rocca, **Electroanal.**, 8 (1996) 55.
58. A. Josten, M. Meusel, F. Spener, L. Haalck, **J. Mol. Cat. B**, 7 (1999) 57.
59. G. DeSantis, J. B. Jones, **Cur. Opin. Biotech.**, 10 (1999) 324.
60. J. Wang, in **Biosensors and Chemical Sensors. Optimizing Performance through Polymeric Materials**, P. G. Edelman, J. Wang (ed.). ACS Symposium Series, 10 (1992) 125.
61. E. A. H. Hall, J. J. Gooding, C. E. Hall, **Mikrochim. Acta**, 121 (1995) 119.
62. A. Cambiaso, L. Delfino, M. Grattarola, G. Verreschi, D. Ashworth, A. Maines, P. Vadgama, **Sens. Act. B**, 33 (1996) 203.
63. R. L. McCreery, in **Electroanalytical Chemistry: A Series of Advances**. A. J. Bard (ed.), Marcel Dekker, 17 (1991) 221.
64. K. Kinoshita, in **Carbon. Electrochemical and Physicochemical Properties**. K. Kinoshita (ed.), John Wiley & Sons, 1988, 226.
65. R. L. McCreery, K. K. Cline, in **Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry**, P. T. Kissinger, W. R. Heineman (eds), Marcel Dekker, 10 (1996) 293.
66. T. Wink, S. J. van Zuilen, A. Bult, W. P. van Bennekom, **Analyst**, 122 (1997) 43R.
67. J. J. Gooding, V. G. Praig, E. A. H. Hall, **Anal. Chem.**, 70 (1998) 2396.
68. C. D. Jaeger, A. J. Bard, **J. Am. Chem. Soc.**, 101 (1979) 1690.
69. P. Bianco, J. Haladjian, **Electroanal.**, 8 (1996) 190.
70. J. L. Kawagoe, D. E. Niehaus, R. M. Wightman, **Anal. Chem.**, 63 (1991) 2961.
71. R. J. Foster, **Chem. Soc. Rev.**, (1994) 289.
72. M. E. Rice, Z. Galus, R. N. Adams, **J. Electroanal. Chem.**, 143 (1983) 89.
73. C. Urbaniczky, K. Lundström, **J. Electroanal. Chem.**, 176 (1984) 169.
74. M. Boujtita, M. Chapleau, N. El Murr, **Anal. Chim. Acta**, 319 (1996) 91.
75. J. Wang, N. Naser, **Electroanal.**, 6 (1994) 571.

76. J. Wang, J. Liu, L. Chen, F. Lu, **Anal. Chem.**, 66 (1994) 3600.
77. A. Cagnini, I. Palchetti, M. Mascini, A. P. F. Turner, **Mikrochim. Acta**, 121 (1995) 155.
78. J. Liu, F. Lu, J. Wang, **Electrochem. Commun.**, 1 (1999) 341.
79. P. J. O'Connell, C. K. O'Sullivan, G. G. Guilbault, **Anal. Chim. Acta**, 373 (1998) 261.
80. H. Frebel, G.-C. Chemnitz, K. Cammann, R. Kakerow, M. Rospert, W. Mokwa, **Sens. Act. B**, 43 (1997) 87.
81. H. D. Goldberg, R. B. Brown, D. P. Liu, M. E. Meyerhoff, **Sens. Act. B**, 21 (1994) 171.
82. A. Erlenkötter, M. Kottbus, G.-C. Chemnitz, **J. Electroanal. Chem.**, 481 (2000) 82.
83. G. F. Khan, W. Wernet, **Anal. Chem.**, 69 (1997) 2682
84. E.A.H. Hall, in **Biosensors and Chemical Sensors. Optimizing Performance through Polymeric Materials**, P. G. Edelman, J. Wang (ed.). ACS Symposium Series, 1 (1992) 1.
85. P. C. Pandey, S. Upadhyay, H. C. Pathak, C. M. D. Pandey, **Anal. Lett.**, 31 (1998) 2327.
86. J. R. Woodward, A. Brunsmann, T. D. Gibson, S. Parker, in **Biosensors for food analysis**, A.O. Scott (ed.), The Royal Society of Chemistry, 8 (1998) 71.
87. W. Göpel, J. Hesse, J. N. Zemel, **Sensors. A Comprehensive Survey**, VCH Verlagsgesellschaft mbH, v. 3, 1992.
88. C. M. Casado, I. Cuadrado, M. Morana, B. Alonso, B. Garcia, B. Gonzalez, J. Losada, **Coord. Chem. Rev.**, 185–186 (1999) 53.
89. L. Gorton, G. Jonsson-Pettersson, E. Csoregi, K. Johansson, E. Dominguez, G. Marko-Varga, **Analyst**, 117 (1992) 1235.
90. L. Gorton, A. Lindgren, T. Larsson, F. D. Munteanu, T. Ruzgas, I. Gazaryan, **Anal. Chim. Acta**, 400 (1999) 91.
91. A. I. Yaropolov, T. V. Cherednikova, J. Emneus, G. Marko-Varga, L. Gorton, **Bioelectr. Bioenerg.**, 38 (1995) 401.
92. A. Lindgren, M. Tanaka, T. Ruzgas, L. Gorton, I. Gazaryan, K. Ishimori, I. Morishima, **Electrochem. Commun.**, 1 (1999) 171.
93. M. J. Eddowes, H. A. O. Hill, **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, (1977) 771.
94. P. N. Bartlell, V. Q. Bradford. **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, (1990) 1135.

95. W. Schuhmann, T. J. Ohara, H.-L. Schmidt, A. Heller, **J. Am. Chem. Soc.**, 113 (1991) 1394.
96. S.Sampath, O.Lev. **Electroanal.**, 8 (1996) 1112.
97. A.C.Michael, A.Heller, **Anal. Chem.**, 63 (1991) 2268.
98. A. Narvaez, G. Suarez, I. C. Popescu, I. Katakis, E. Dominguez, **Biosens. Bioelectr.**, 15 (2000) 43.
99. S. Bharathi, S. Sampath, J. Gun, L. Rabinovich, Z. Wu, I. Pankratov, O. Lev, **J. Sol-Gel Sc. Techn.**, 13 (1998) 241.
100. T.J.Ohara, R.Rajagopalan, A.Heller, **Anal. Chem.**, 66 (1994) 2451.
101. N. Martens, E. A. H. Hall, **Anal. Chem.**, 66 (1994) 2763.
102. P. T. Kissinger, **Cur. Separ.**, 16 (1997) 101.
103. C. O. Fagain, **Biochim. Biophys. Acta**, 1252 (1995) 1.
104. A. R. Fersht, L. Serrano, **Cur. Opin. Struct. Biol.**, 3 (1993) 75.
105. B. Lee, G. Vasmatzis, **Cur. Opin. Biotechn.**, 8 (1997) 423.
106. M. C. Davis, **Trends in Biotechn.**, 16 (1998) 102.
107. A. Illanes, **Electr. J. Biotechn.**, 2 (1999) 7.
108. A. M. Klibanov, **Trends in Biotechn.**, 15 (1997) 97.
109. J. Wang, J. Liu, G. Cepra, **Anal. Chem.**, 69 (1997) 3124.
110. A. O. Triantafyllou, E. Wehtje, P. Adlercreutz, B. Mattiasson, **Biotechn. Bioengin.**, 54 (1997) 67.
111. G. Xie, S. N. Timasheff, **Biophys. Chem.**, 64 (1997) 25.
112. T. D. Gibson, J. R. Woodward, in **Biosensors and Chemical Sensors. Optimizing Performance through Polymeric Materials**, P. E. Edelman, J. Wang (eds.), 5 (1992) 40.
113. B. L. J. Pierce, T. D. Gibson, P. Bunnell, in **Biosensors for Food Analysis**, A. O. Scott (ed.), The Royal Society of Chemistry, 6 (1998) 54.
114. M. M. Dikov, A. P. Osipov, A. M. Egorov, A. Y. Karulin, M. I. Mustafayev, V. A. Kabanov, **J. Solid-Phase Biochem.**, 5 (1980) 1.
115. M. Teramoto, H. Nishibue, K. Okuhara, **Appl. Microbiol. Biotechn.**, 38 (1992) 203.
116. L. G. Gahn, R. Roskoski, **Biochem.**, 34 (1995) 252.
117. M. M. Andersson, R. Hatti-Kaul, **J. Biotechn.**, 72 (1999) 21.
118. T. D. Gibson, J. R. Woodward, PCT/GB91/00443, **Enzyme Stabilization**, Publ. No Wo91/14773, 1991.

119. T. D. Gibson, I. J. Higgins, J. R. Woodward, **Analyst**, 117 (1992) 1293.
120. B. Appleton, T. D. Gibson, J. R. Woodward, **Sens. Actuat. B**, 43 (1997) 65.
121. T. D. Gibson, J. N. Hulbert, J. R. Woodward, **Anal. Chim. Acta**, 279 (1993) 185.
122. H. Minagawa, N. Nakayama, T. Matsumoto, N. Ito, **Biosens. Bioelectr.**, 13 (1998) 313.
123. S. Yabuki, F. Mizutani, T. Katsura, **Biosens. Bioelectr.**, 7 (1992) 695.
124. C. Saby, F. Mizutani, S. Yabuki, **Anal. Chim. Acta**, 304 (1995) 33.
125. S. Yabuki, F. Mizutani, T. Katsura, **Sens. Actuat. B**, 20 (1994) 159.
126. F. Mizutani, S. Yabuki, A. Okuda, T. Katsura, **Bull. Chem. Soc. Jpn.**, 64 (1991) 2849.
127. J. Kulys, L. Gorton, E. Dominguez, J. Emneus, H. Jarskog, **J. Electroanal. Chem.**, 372 (1994) 49.
128. J. Kulys, H. E. Hansen, **Anal. Chim. Acta**, 303 (1995) 285.
129. U. Spohn, D. Narasaih, L. Gorton, **Electroanal.**, 8 (1996) 507.
130. U. Spohn, D. Narasaih, L. Gorton, D. Pfeiffer, **Anal. Chim. Acta**, 319 (1996) 79.
131. M. Lutz, E. Burestedt, J. Emneus, H. Liden, S. Gobhadi, L. Gorton, G. Marko-Varga, **Anal. Chim. Acta**, 305 (1995) 8.
132. J. Wang, Q. Chen, **Anal. Chim. Acta**, 312 (1995) 39.
133. P. Dantoni, S. H. P. Serrano, A. M. O. Brett, I. G. R. Gutz, **Anal. Chim. Acta**, 366 (1998) 137.
134. W. Bergmann, R. Rudolph, U. Spohn, **Anal. Chim. Acta**, 394 (1999) 233.
135. J. Parellada, E. Dominguez, V. M. Fernandez, **Anal. Chim. Acta**, 330 (1996) 71.
136. H. Liden, J. Volc, G. Marko-Varga, L. Gorton, **Electroanal.**, 10 (1998) 223.
137. T. D. Gibson, J. N. Hulbert, S. M. Parker, J. R. Woodward, I. J. Higgins, **Biosens. Bioelectr.**, 7 (1992) 701.
138. T. D. Gibson, B. L. J. Pierce, S. M. Parker, in **Biosensors for Food Analysis**, A. O. Scott (ed.), The Royal Society of Chemistry, 5 (1998) 46.
139. T. D. Gibson, B. L. J. Pierce, J. N. Hulbert, S. Gillespie, **Sens. Actuat. B**, 33 (1996) 13.
140. J. J. Rippeth, T. D. Gibson, J. P. Hart, I. C. Hartley, G. Nelson, **Analyst**, 122 (1997) 1425.
141. J. Tkac, P. Gemeiner, E. Sturdik, **Biotechn. Techn.**, 13 (1999) 931.
142. M. Vamvakaki, N. A. Chaniotakis, **Anal. Chim. Acta**, 320 (1996) 53.

143. Γ. Ε. Ανδρεδάκης, Ανιονική χημική αναγνώριση μέσω συμπλόκων παραγώγων φαινανθρολίνης. Κατασκευή και βελτιστοποίηση αισθητήρων νιτρικών, **Δίπλωμα ειδίκευσης**, Ηράκλειο, 1998.
144. G. E. Andredakis, E. A. Moschou, A. Matthaiou, N. A. Chaniotakis, in preparation.
145. Ι. Τσαγκατάκης, Ανάπτυξη νέων ποτενσιομετρικών αισθητήρων φωσφορικών ιόντων, **Διδακτορική διατριβή**, Ηράκλειο, 1999.
146. K. Perdikaki, J. K. Tsagkatakis, N. A. Chaniotakis, **Instrumental Methods of Analysis, Conference Proceedings**, Vol. I, (1999) 91.
147. K. Perdikaki, J. K. Tsagkatakis, N. A. Chaniotakis, **Mikrochim. Acta**, in press.
148. M. Hedenmo, A. Narvaez, E. Dominguez, I. Katakis, **Analyst**, 121 (1996) 1891.
149. J. Katrlík, R. Brandsteter, J. Svorc, M. Rosenberg, S. Miertus, **Anal. Chim. Acta**, 356 (1997) 217.
150. H. J. Hecht, H. M. Kalisz, J. Hendle, R. D. Schmid, D. Schomburg, **J. Mol. Biol.**, 229 (1993) 153.
151. T. J. Ohara, R. Rajagopalan, A. Heller, **Anal. Chem.**, 66 (1994) 2451.
152. L. Campanella, M. Tomassetti, F. Mazzei, **Biosens. Bioelectr.**, 8 (1993) 307.
153. Q. Yang, P. Atanasov, E. Wilkins, **Electroanal.**, 10 (1998) 752.
154. B. Wang, B. Li, Q. Deng, S. Dong, **Anal. Chem.**, 70 (1998) 3170.
155. B. Liu, R. Hu, J. Deng, **Anal. Chem.**, 69 (1997) 2343.
156. S. Poyard, N. Jaffrezic-Renault, C. Martelet, S. Cosnier, P. Labbe, J. L. Besombes, **Sens. Actuat. B**, 33 (1996) 44.
157. M. S. Celej, G. Rivas, **Electroanal.**, 10 (1998) 771.
158. G. Guilbault, M. Mascini, **Analytical Uses of Immobilized Biological Compounds**, D. Reider Publ. Co., Boston (1988) 59.
159. A. Mulchandani, A. S. Bassi, A. Nguyen, **J. Food Sc.**, 60 (1995) 74.
160. N. Kim, R. Haginoya, I. Karube, **J. Food Sc.**, 61 (1996) 286.
161. B. Serra, A. J. Reviejo, C. Parrado, J. M. Pingarron, **Biosens. Bioelectr.**, 14 (1999) 505.
162. W. A. Collier, P. Lovejoy, A. L. Hart, **Biosens. Bioelectr.**, 13 (1998) 219.
163. F. Mizutani, S. Yabuki, Y. Hirata, **Anal. Chim. Acta**, 314 (1995) 233.
164. C. A. Marquette, L. J. Blum, **Anal. Chim. Acta**, 381 (1999) 1.
165. C. Meyerhoff, F. Bischof, F. J. Mennel, F. Sternberg, J. Bican, E. F. Pfeiffer, **Biosens. Bioelectr.**, 8 (1993) 409.
166. D. A. Baker, D. A. Gough, **Anal. Chem.**, 67 (1995) 1536.

167. N. F. Shram, L. I. Netchiporouk, C. Martelet, N. Jaffrezic-Renault, C. Bonnet, R. Cespeglio, **Anal. Chem.**, 70 (1998) 2618.
168. J. V. Divatia, T. Jacques, P. Day, D. J. Bihari, **Anaesth. Intens. Care**, 26 (1998) 186.
169. Y. Hu, G. S. Wilson, **J. Neurochem.**, 69 (1997) 1484.
170. M. H. De Keijzer, R. W. Brandts, P. G.W. Brans, **Clin. Biochem.**, 32 (1999) 109.
171. G. Marrazza, A. Cagnini, M. Mascini, **Talanta**, 41 (1994) 1007.
172. P. C. Pandey, V. Pandey, S. Mehta, **Biosens. Bioelectr.**, 9 (1994) 365.
173. J. Motonaka, Y. Katumoto, S. Ikeda, **Anal. Chim. Acta**, 368 (1998) 91.
174. C. R. Molina, M. Boujtita, N. El Murr, **Anal. Chim. Acta**, 401 (1999) 155.
175. T. Kalab, P. Skladal, **Electroanal.**, 6 (1994) 1004.
176. J. Kulys, L. Wang, V. Razumas, **Electroanal.**, 4 (1992) 527.
177. J. D. Duncan, J. O. Wallis, M. R. Azari, **Biochem. Biophys. Res. Comm.**, 164 (1989) 919.
178. Q. Yang, P. Atanasov, E. Wilkins, **Biosens. Bioelectr.**, 14 (1999) 203.
179. S. A. M. Marzouk, V. V. Cosofret, R. P. Buck, H. Yang, W. E. Cascio, S. S. M. Hassan, **Anal. Chem.**, 69 (1997) 2646.
180. G. F. Khan, W. Wernet, **Anal. Chem.**, 69 (1997) 2682.
181. J. Kulys, L. Wang, A. Maksimoviene, **Anal. Chim. Acta**, 274 (1993) 53.
182. F. Palmisano, G. E. De Benedetto, C. G. Zambonin, **Analyst**, 122 (1997) 365.
183. E. I. Iwuoha, A. Rock, M. R. Smyth, **Electroanal.**, 11 (1999) 367.
184. J. Perdomo, C. Sundermeier, H. Hinkers, O. M. Morell, W. Seifert, M. Knoll, **Biosens. Bioelectr.**, 14 (1999) 27.
185. A. L. Hart, A. P. F. Turner, D. Hopcroft, **Biosens. Bioelectr.**, 11 (1996) 263.
186. D. Brancaccio, M. Gallieni, M. Cozzolino, **Nephrol. Dial. Transplant**, 11 (1996) 420.
187. R. Krmar, D. Haffner, E. Wuhl, O. Mehls, **Nephrol. Dial. Transplant**, 10 (1995) 2343.
188. S. Eiam-Ong, M. Spohn, N. A. Kurtzman, S. Sabatini, **Kidney International**, 48 (1995) 1542.
189. B. L. Clarke, A. G. Wynne, D. M. Wilson, L. A. Fitzpatrick, **Clin. Endocrinol.**, 43 (1995) 479.
190. H. Stoker, S. Seager, in **Environmental Chemistry**, J. Bockris (ed.), Plenum Press, 1978, chapter 13.

191. S. O. Engblom, **Biosens. Bioelectr.**, 13 (1998) 981.
192. E. M. d'Urso, P. R. Coulet, **Anal. Chim. Acta**, 239 (1990) 1.
193. S. D. Haemmerli, A. A. Suleiman, G. G. Guilbault, **Anal. Biochem.**, 191 (1990) 106.
194. S. Cosnier, C. Gondran, J. C. Watelet, W. De Giovani, R. P. M. Furriel, F. A. Leone, **Anal. Chem.**, 70 (1998) 3952.
195. J. J. Fernandez, J. R. Lopez, X. Correig, I. Katakis, **Sens. Actuat. B**, 47 (1998) 13.
196. N. Conrath, B. Grundig, S. Huwel, K. Cammann, **Anal. Chim. Acta**, 309 (1995) 47.
197. J. Bergmeyer, **Methods of Enzymatic Analysis**, VCH Verlagsgesellschaft mbH, II (1988) 304.
198. M. Tabata, T. Murachi, **Biotechn. Bioengin.**, 25 (1983) 3013.
199. I. Kubo, M. Inagawa, T. Sugawara, Y. Arikawa, I. Karube, **Anal. Lett.**, 24 (1991) 1711.
200. N. Gajovic, K. Habermuller, A. Warsinke, W. Schuhmann, F. W. Scheller, **Electroanal.**, 11 (1999) 1377.
201. K. Ikebukuro, H. Wakamura, I. Karube, I. Kubo, M. Inagawa, T. Sugawara, Y. Arikawa, M. Suzuki, T. Takeuchi, **Biosens. Bioelectr.**, 11 (1996) 959.
202. K. Ikebukuro, R. Nishida, H. Yamamoto, Y. Arikawa, H. Nakamura, M. Suzuki, I. Kubo, T. Takeuchi, I. Karube, **J. Biotechn.**, 48 (1996) 67.
203. J. Kulys, L. Wang, N. Daugvilaite, **Anal. Chim. Acta**, 265 (1992) 15.
204. G. Arai, T. Noma, H. Habu, I. Yasumori, **J. Electroanal. Chem.**, 464 (1999) 143.
205. Y. Muller, G. Schumacher, R. Rudolph, G. Schulz, **J. Mol. Biol.**, 237 (1994) 315
206. E. Kopetzki, K. Lehnert, P. Buckel, **Clin. Chem.**, 40 (1994) 688.
207. B. Risse, G. Stempfer, R. Rudolph, H. Mollering, R. Jaenicke, **Prot. Sci.**, 1 (1992) 1699.
208. B. Risse, G. Stempfer, R. Rudolph, G. Schumacher, R. Jaenicke, **Prot. Sci.**, 1 (1992) 1710.
209. L. Gorton, G. Jonsson-Pettersson, E. Csoregi, K. Johansson, E. Dominguez, G. Marko-Varga, **Analyst**, 117 (1992) 1235.
210. C. Gobet, M. Boujtita, N. E. Murr, **New J. Chem.**, 23 (1999) 795.
211. T. Lotzbeyer, W. Schuhmann, H. L. Schmidt, **Sens. Actuat. B**, 33 (1996) 50.
212. H. Liu, Z. Zhang, X. Zhang, D. Qi, Y. Liu, T. Yu, J. Deng, **Electrochim. Acta**, 42 (1997) 349.

213. F. Yang, C. Ruan, J. Xu, C. Lei, J. Deng, **Fresenius J. Anal. Chem.**, 361 (1998) 115.
214. M. S. Lin, Y. C. Wu, B. I. Jan, **Biotechn. Bioengin.**, 62 (1999) 56.
215. E. Iwuaha, A. R. Williams, L. A. Hall, **Biosensors 2000**, P-79 (2000) 321.
216. M. S. Dresselhaus, G. Dresselhaus, P. C. Eklund, **Science of Fullerenes and Carbon Nanotubes**, Academic Press, San Diego, 1995.
217. D. M. Guldi, **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, (2000) 321.
218. F. Patolsky, G. Tao, E. Katz, I. Willner, **J. Electroanal. Chem.**, 454 (1998) 9.
219. R. S. Nicholson, **Anal. Chem.**, 37 (1965) 1351.
220. J. Rippeth, T. Gibson, G. Nelson, R. Pittson, **Biosensors 1998**, P-117 (1998) 319.
221. Y. P. Sun, B. Liu, D. K. Morton, **J. Chem. Soc., Chem. Commun.**, (1996) 2699.
222. V. E. Dimakis, V. G. Gavalas, N. A. Chaniotakis, in preparation.
223. S. Zhao, R. Lennox, **Anal. Chem.**, 63 (1991) 1174.
224. J. Wang, E. Gonzalez-Romero, M. Ozsoz, **Electroanal.**, 4 (1992) 539.
225. X. Yang, G. A. Rechnitz, **Electroanal.**, 7 (1995) 105.
226. M. Gilis, H. Durliat, M. Comtat, **Anal. Chim. Acta**, 355 (1997) 235.
227. J. Kulys, W. Schuhmann, H.-L. Schmidt, **Anal. Lett.**, 25 (1992) 1011.
228. T.-M. Park, E. I. Iwuoha, M. R. Smyth, R. Freaney, A. J. McShane, **Talanta**, 44 (1997) 973.
229. W. Friedrich, **Vitamins**, W. de Gruyter & Co., Berlin-N. York, (1988) 22.
230. R.S. Kirk, R. Sawyer, **Pearson's composition and analysis of foods**, Longman Group UK Limited, 9th edn., (1991) 98.
231. F. Palmisano, A. Guerrieri, M. Quinto, P. G. Zambonin, **Anal. Chem.**, 67 (1995) 1005.
232. D. Centonze, I. Losito, C. Malitesta, F. Palmisano, P. G. Zambonin, **J. Electroanal. Chem.**, 435 (1997) 103.
233. L. J. Murphy, **Anal. Chem.**, 70 (1998) 2928.
234. R. Maidan, A. Heller, **Anal. Chem.**, 64 (1992) 2889.
235. M.-C. Shin, H. C. Yoon, H.-S. Kim, **Anal. Chim. Acta**, 329 (1996) 223.
236. J. P. Lowry, R. D. O'Neil, **J. Electroanal. Chem.**, 334 (1992) 183.
237. J. Anzai, H. Takeshita, Y. Kobayashi, T. Osa, T. Hoshi, **Anal. Chem.**, 70 (1998) 811.
238. Y. Okawa, H. Kobayashi, **Chem. Lett.**, (1991) 849.

239. A. Koshy, E. Zilkha, T. P. Obrenovitch, H. P. Bennetto, D. A. Richards, L. Symon, **Anal. Lett.**, 26 (1993) 831.
240. J. Růžička, E. H. Hansen, **Anal. Chim. Acta**, 99 (1978) 37.
241. D. Betteridge, **Anal. Chem.**, 50 (1978) 831.
242. M. G. Fouskaki, N. A. Chaniotakis, P. G. Rigas, **Proceedings of Instrumental Methods of Analysis-Modern Trends and Applications**, v. II (1999) 604.