

ΤΙΤΛΟΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

**ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΥΠΕΡΟΞΕΙΔΑΣΗ ΤΟΥ ΧΡΕΝΟΥ (HRP) ΣΕ
NANO – ΥΦΑΣΜΕΝΕΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΕΣ ΡΜΜΑ ΜΕ ΠΛΑΣΜΑ O₂ ΓΙΑ ΤΗΝ
ΚΑΤΑΣΚΕΥΗ ΕΝΖΥΜΑΤΙΚΟΥ ΜΙΚΡΟ -ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΑ ΓΙΑ
ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΙΚΗ ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΦΑΙΝΟΛΩΝ**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

Βορβή Στεφανίας

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: Γογγολίδης Ευάγγελος, Ερευνητής Α΄ Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Γογγολίδης Ευάγγελος, Ερευνητής Α΄, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

Τσερέπη Αγγελική, Ερευνήτρια Α΄, Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος»

Τσουκαλάς Δημήτριος, Καθηγητής Σ.Ε.Μ.Φ.Ε., Ε.Μ.Π.

Αθήνα 2016

Στεφανία Βορβή

© (2016) Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. All rights Reserved. Απαγορεύεται η αντιγραφή, αποθήκευση και διανομή της παρούσας εργασίας, εξ ολοκλήρου ή τμήματος αυτής, για εμπορικό σκοπό. Επιτρέπεται η ανατύπωση, αποθήκευση και διανομή για σκοπό μη κερδοσκοπικό, εκπαιδευτικής ή ερευνητικής φύσης, υπό την προϋπόθεση να αναφέρεται η πηγή προέλευσης και να διατηρείται το παρόν μήνυμα. Ερωτήματα που αφορούν τη χρήση της εργασίας για κερδοσκοπικό σκοπό πρέπει να απευθύνονται προς το συγγραφέα. Οι απόψεις και τα συμπεράσματα που περιέχονται σ' αυτό το έγγραφο εκφράζουν το συγγραφέα και δεν πρέπει να ερμηνευτεί ότι αντιπροσωπεύουν τις επίσημες θέσεις του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, αξιολογείται η χρήση νανο – υφασμένων πολυμερικών επιφανειών, ως υποστρώματα για ενισχυμένη ακινητοποίηση ενζύμων, διαμέσου λειτουργικών ομάδων, όπως οι υδροξυλικές (OH), οι καρβονυλικές (C=O) και οι καρβοξυλικές (COOH), οι οποίες προκύπτουν κατά την κατεργασία πολυμερικών επιφανειών με πλάσμα O_2 . Ως αντιπροσωπευτικό ένζυμο για την ακινητοποίηση, χρησιμοποιείται η υπεροξειδάση του χρένου (HRP), η οποία χαρακτηριστικά αξιοποιεί το υπεροξείδιο του υδρογόνου προκειμένου να οξειδώσει μια ποικιλία ουσιών. Μέσα από την μελέτη αυτή, στόχος είναι να προκύψουν οι βέλτιστες συνθήκες ακινητοποίησης του ενζύμου πάνω σε νανοδομημένες με πλάσμα πολυμερικές επιφάνειες. Έχοντας ως απώτερο στόχο την ανάδειξη των πρακτικών εφαρμογών της παραπάνω μελέτης, αξιοποιούμε τα προκύπτοντα αποτελέσματα, με την κατασκευή ενός ενζυματικού μικρο – αντιδραστήρα σε ψηφίδα νανοδομημένου PMMA, για την καταλυτική οξείδωση φαινολών, με αντιπροσωπευτική την 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλη.

Η παρούσα εργασία δομείται ως εξής: Στο πρώτο κεφάλαιο, πραγματοποιείται μια εισαγωγή στις βασικές έννοιες που εντάσσονται στο γενικότερο πλαίσιο της εργασίας. Έτσι, ξεκινάμε με μια εισαγωγή στο πλάσμα, τις τεχνικές εγχάραξης και την επίδραση του πλάσματος στην τραχύτητα και στη διαβροχή των πολυμερικών επιφανειών κατά την κατεργασία τους με αυτό. Εν συνεχεία, εισάγουμε τον αναγνώστη στην τεχνολογία ακινητοποίησης των ενζύμων πάνω σε επιφάνειες και ακολούθως περνάμε στο πεδίο των μικρορευστονικών διατάξεων δίνοντας έμφαση στους ενζυματικούς μικροαντιδραστήρες και τα γενικά χαρακτηριστικά τους. Τέλος παρουσιάζονται αναλυτικά οι στόχοι της μεταπτυχιακής εργασίας.

Στο δεύτερο κεφάλαιο, πραγματοποιείται βιβλιογραφική διερεύνηση πάνω στην τεχνολογία ακινητοποίησης ενζύμων, παρουσιάζοντας τις υπάρχουσες μεθόδους ακινητοποίησης και επιχειρώντας μια ανασκόπηση στην ακινητοποίηση των ενζύμων πάνω σε τροποποιημένες με πλάσμα πολυμερικές επιφάνειες, καθώς και στις εφαρμογές τους. Στη συνέχεια γίνεται μελέτη πάνω στο πεδίο των βίο – μικροαντιδραστήρων με ακινητοποιημένα ένζυμα παρουσιάζοντας παραδείγματα από την βιβλιογραφία. Τέλος, γίνεται βιβλιογραφική αναφορά πάνω στο ένζυμο του ενδιαφέροντός μας, μελετώντας τον καταλυτικό μηχανισμό του.

Το τρίτο κεφάλαιο αποτελεί μια παρουσίαση του συνόλου των πειραματικών συσκευών που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της εργασίας (όπως αντιδραστήρας πλάσματος, σύστημα μέτρησης γωνιών επαφής, σφαίρα ολοκλήρωσης κ.τ.λ).

Το τέταρτο κεφάλαιο παρουσιάζει το σύνολο των υλικών και των πειραματικών διαδικασιών που ακολουθήθηκαν στο πλαίσιο της εργασίας και αποτελείται από δύο κυρίως μέρη. Στο πρώτο μέρος του κεφαλαίου περιγράφονται αρχικά οι διαδικασίες κατασκευής και νανο – ύφανσης των επιφανειών πολυ(μεθακρυλικού μεθυλεστέρα) (PMMA) με πλάσμα O₂ και ακολούθως παρουσιάζονται οι μέθοδοι ακινητοποίησης του ενζύμου HRP (προσρόφηση, ομοιοπολική σύνδεση και χημική συγγένεια με το υπόστρωμα) στις νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA καθώς και οι μέθοδοι αξιολόγησης της δραστηρότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου που εφαρμόστηκαν. Στο δεύτερο μέρος του κεφαλαίου μελετάται η βιοκαταλυτική οξείδωση της 4 – φαινυλο – αζο φαινόλης χρησιμοποιώντας τον μικρο – αντιδραστήρα σε ψηφίδα PMMA με ακινητοποιημένο ένζυμο HRP, που κατασκευάστηκε στα πλαίσια της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας. Αναλυτικά, παρουσιάζεται η σχεδίαση και η κατασκευή του μικρο – αντιδραστήρα πάνω σε ψηφίδα PMMA, αναφέρονται τα υλικά και οι μέθοδοι που εφαρμόστηκαν για τη μελέτη της αντίδρασης και στη συνέχεια παρουσιάζεται η διάταξη ανίχνευσης που χρησιμοποιήθηκε για την αξιολόγηση της βιοκαταλυτικής μετατροπής της 4 – φαινυλο – αζο - φαινόλης.

Τέλος, στο πέμπτο κεφάλαιο ακολουθεί παρουσίαση και σχολιασμός των αποτελεσμάτων. Στην πρώτη ενότητα του κεφαλαίου αυτού, παρουσιάζονται υπό τη μορφή κατάλληλων διαγραμμάτων, τα αποτελέσματα κατασκευής επιφανειών και αξιολόγησης του ακινητοποιημένου ενζύμου HRP στις νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA, μελετώντας την επίδραση του χρόνου κατεργασίας των επιφανειών στο πλάσμα, της γήρανσης και της συγκέντρωσης του ενζύμου στην βέλτιστη προσρόφηση ενζύμου στις νανο – υφασμένες επιφάνειες, με στόχο τον προσδιορισμό των βέλτιστων συνθηκών και της βέλτιστης μεθόδου ακινητοποίησης του ενζύμου στις νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA. Στη δεύτερη ενότητα, πραγματοποιείται αξιολόγηση του ενζυματικού μικρο – αντιδραστήρα από PMMA που κατασκευάσαμε, ως προς την ικανότητα του να καταλύει την οξείδωση της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης, παρουσιάζοντας με την βοήθεια κατάλληλων διαγραμμάτων τα αποτελέσματα βιοκαταλυτικής μετατροπής της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης. Στο τέλος κάθε επιμέρους ενότητας παρουσιάζονται τα προκύπτοντα συμπεράσματα καθώς και κάποιες μελλοντικές προτάσεις.

ΛΕΞΕΙΣ ΚΛΕΙΔΙΑ: Εγχάραξη, Πλάσμα οξυγόνου, Ακινητοποίηση Ενζύμου, Ενζυματικός Μικρο – αντιδραστήρας, Υπεροξειδάση του Χρένου, 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλη

ABSTRACT

The purpose of this master thesis is the evaluation of plasma nanotextured polymeric surfaces with increased surface area as substrates for enhanced enzyme immobilization, through functional groups such as hydroxyl (OH), carbonyl (C=O) and carboxyl (COOH) that are formed during oxygen plasma treatment. The horseradish peroxidase (HRP) enzyme will be used as a representative enzyme for immobilization. The HRP enzyme utilizes H₂O₂ to oxidize a wide range of phenols and aromatic amines to their corresponding radicals. The main target of the thesis is to determine the optimal conditions for the enzyme immobilization on the nanotextured polymeric surfaces. In order to point out the practical aspects of the aforementioned study, we employ an enzymatic microreactor manufactured on nanotextured PMMA chip, for the catalytic oxidation of phenols, using 4 – phenyl – azo – phenol as the representative phenol.

The present thesis is structured as follows: In the first chapter an introduction to the fundamentals of the work is presented. At first we introduce the concept of plasma etching, emphasizing on the etching mechanisms and the plasma treatment effect on the morphological and wetting properties of the treated polymeric surfaces. Subsequently, we present the concept of enzyme immobilization technology, the field of microfluidic devices, where we emphasize on the enzymatic microreactors and their general features. At last the main objectives of the master thesis are presented.

In the second chapter of the thesis we review the literature for: a) the enzyme immobilization technology, presenting the existing methods of immobilization and exploring the use of plasma nanotextured polymeric surfaces as substrates for enzyme immobilization as well as some of the main applications of immobilized enzymes, b) the use of bio - microreactors with immobilized enzymes and finally c) the enzyme of interest, HRP, emphasizing on its catalytic mechanism.

In the third chapter we present the experimental apparatus and techniques (plasma reactor, integration sphere etc.) that were used for this study.

In the fourth chapter of the thesis a detailed presentation of the experimental study is given. This chapter is divided into two sections. The first section of the chapter includes the fabrication and plasma treatment processes of poly(methyl methacrylate) (PMMA) surfaces, the detailed description of the HRP immobilization techniques used on nanotextured PMMA (adsorption, covalent binding, streptavidine – biotinylated HRP system) and the immobilized enzyme activity evaluation methods. In the second section of the chapter, the design,

manufacturing and the measuring setup of a PMMA microreactor, used for the study of the catalytic oxidation reaction for the evaluation of the biocatalytic conversion of 4 – phenyl – azo – phenol in the microreactor, is presented.

Finally, in the fifth chapter we present the experimental results followed by discussion. In the first section of this chapter, diagrams are displayed for the evaluation of the immobilized enzyme HRP on the nanotextured PMMA surfaces. Conditions of plasma treatment were found for maximum enzyme immobilization on the nanotextured PMMA surfaces. Also optimal enzyme concentration and incubation time was determined. The immobilization of HRP onto the surfaces was determined through reaction with suitable chromogenic substrates on the presence of hydrogen peroxide. The optimal method for enzyme immobilization on the nanotextured PMMA surfaces arose through the comparison of the three different methods of immobilization we used. We concluded that adsorption on activated with plasma surfaces is preferable due to its high enzyme binding ability in combination with the simplicity that accompanies this method. In particular, it was found that adsorption of HRP was increased up to 5-times with plasma treatment compared to untreated surfaces. In the second section of this chapter, the ability of the enzymatic fabricated PMMA microreactor to catalyze the 4 – phenyl – azo – phenol oxidation is evaluated. Evaluation is based upon absorbance recording of 4 – phenyl – azo – phenol at 347nm before and after the enzymatic reaction. Biocatalytic conversion of 4 – phenyl – azo – phenol is presented for a specific range of flowrates. Maximum conversion of 75% was achieved for the lowest flowrate applied, revealing the ability of our PMMA microreactor with immobilized HRP to be applied for 4-phenyl – azo – phenol removal.

KEYWORDS: Etching, Oxygen Plasma, Enzyme Immobilization, Enzymatic Microreactor, Horseradish Peroxidase, 4 – phenyl – azo – phenol oxidation

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο Ινστιτούτο Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας (INN) του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» κατά το χρονικό διάστημα 2015 – 2016, στα πλαίσια του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Μικροσυστήματα και Νανοδιατάξεις» του Εθνικού Μετσόβιου Πολυτεχνείου, που συντονίζει η Σχολή Εφαρμοσμένων Μαθηματικών και Φυσικών Επιστημών Ε.Μ.Π. με τη συμμετοχή του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» ως συνεργαζόμενο φορέα.

Αρχικά, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα της παρούσας μελέτης, Δρ. Ευαγ. Γογγολίδη, Ερευνητή του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» και επικεφαλή της ερευνητικής ομάδας του εργαστηρίου Πλάσματος στην οποία και συμμετείχα για την υποστήριξη, τη συνεχή επίβλεψη και τις πολύτιμες επιστημονικές συμβουλές και παρατηρήσεις του καθ'όλη τη διάρκεια εκπόνησης της εργασίας.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Δρ. Α. Τσερέπη, Ερευνήτρια του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», για τη βοήθεια που προσέφερε, τις εύστοχες παρατηρήσεις και τον χρόνο που αφιέρωσε κατά τη διάρκεια της μελέτης.

Βαθιά ευχαριστώ, την Δρ. Π. Πέτρου, Ερευνήτρια του Ινστιτούτου Ραδιοϊσοτόπων και Ραδιογνωστικών Προϊόντων του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος», για την πολύτιμη υποστήριξη και την ανεκτίμητη βοήθεια που μου προσέφερε, η οποία ήταν όχι μόνο ουσιαστική αλλά και απαραίτητη για την επιτυχή έκβαση του πειραματικού μέρους της εργασίας.

Ευχαριστώ επίσης από καρδιάς, όλα τα μέλη της ομάδας του εργαστηρίου πλάσματος, για τη βοήθεια και το χρόνο που μου διέθεσαν όποτε τους χρειάστηκα, εκφράζοντας τις πιο θερμές μου ευχαριστίες στους μεταδιδάκτορες Κ. Τσουγένη και Κ. Έλληνα, για την ειλικρινή υποστήριξή τους, τις εύστοχες υποδείξεις τους και τον πολύτιμο χρόνο που μου αφιέρωσαν, καθώς και την υπομονή που επέδειξαν στις όποιες δυσκολίες χρειάστηκε να αντιμετωπίσουμε στα διάφορα στάδια της παρούσας εργασίας.

Κλείνοντας, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για τη συμπαράσταση και τη στήριξη που μου έχει προσφέρει καθ'όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

1.1. Τεχνολογία πλάσματος.....	1
1.1.1. Πλάσμα.....	1
1.1.2. Εγχάραξη με πλάσμα.....	5
1.1.2.1. Ιονοβολή.....	5
1.1.2.2. Χημική εγχάραξη.....	6
1.1.2.3. Υποβοηθούμενη από ιόντα χημική εγχάραξη.....	7
1.1.3. Τροποποίηση πολυμερών σε πλάσμα οξυγόνου.....	7
1.1.3.1. Μορφολογική τροποποίηση σε πλάσμα: τραχύτητα μετά την εγχάραξη.....	8
1.1.3.2. Χημική τροποποίηση σε πλάσμα: μεταβολή διαβροχής.....	8
1.2. Εισαγωγή στα ένζυμα και στην τεχνολογία ακινητοποίησης ενζύμων.....	10
1.2.1. Ένζυμα.....	10
1.2.2. Τεχνολογία ακινητοποίησης ενζύμων.....	11
1.3. Μικρορευστονικές διατάξεις.....	12
1.3.1. Μικρο-αντιδραστήρες.....	13
1.3.1.1. Ενζυματικοί μικρο-αντιδραστήρες.....	17
1.4. Στόχοι της μεταπτυχιακής εργασίας.....	18

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2: ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ

2.1. Νανο-δόμηση Πολυμερικών Επιφανειών με το Πλάσμα.....	19
2.2. Τεχνολογία ακινητοποίησης ενζύμων.....	20
2.2.1. Μέθοδοι ακινητοποίησης ενζύμων.....	21
2.2.1.1. Προσρόφηση.....	21
2.2.1.2. Ομοιοπολική σύνδεση.....	22
2.2.1.3. Εγκλεισμός - Παγίδευση.....	23
2.2.1.4. Σύνδεση μέσω χημικής συγγένειας.....	24
2.2.1.4.1. Το σύστημα στρεπταβιδίνης – βιοτίνης.....	25
2.2.1.5. Ιοντικός δεσμός.....	25
2.2.1.6. Ακινητοποίηση μέσω συνδεδεμένων μετάλλων.....	26
2.2.2. Προσρόφηση σε ενεργοποιημένες με το πλάσμα επιφάνειες.....	27
2.2.3. Ιδιότητες ακινητοποιημένων ενζύμων.....	30
2.2.4. Ακινητοποίηση ενζύμων σε τροποποιημένες με πλάσμα πολυμερικές επιφάνειες.....	30

2.2.5. Εφαρμογές ακινητοποιημένων ενζύμων	31
2.2.5.1. Βιοαισθητήρες	31
2.2.5.2. Βιοϊατρικές εφαρμογές	32
2.2.5.3. Παραγωγή βιοντίζελ	33
2.2.5.4. Επεξεργασία λυμάτων	34
2.3. Βίο – μικροαντιδραστήρες με ακινητοποιημένα ένζυμα	35
2.3.1. Εφαρμογή ενζυματικών μικροαντιδραστήρων για καταλύτικη οξείδωση φαινολών	40
2.4. Υπεροξειδάσες και η υπεροξειδάση του χρένου (horseradish peroxidase - HRP)	42
2.4.1. Το ενεργό κέντρο της υπεροξειδάσης HRP	45
2.4.2. Καταλυτικός μηχανισμός της υπεροξειδάσης HRP	46

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ

3.1. Αντιδραστήρας πλάσματος (RIE)	49
3.2. Σύστημα μέτρησης γωνιών επαφής	50
3.3. Μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονίων (SEM)	52
3.4. Θερμοπρέσσα	53
3.5. Σύστημα μέτρησης ανακλαστικότητας - Σφαίρα ολοκλήρωσης	54
3.6. Άλλα χρησιμοποιηθέντα όργανα	56

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. Κατασκευή επιφανειών και αξιολόγηση του ακινητοποιημένου ενζύμου HRP σε νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA	57
4.1.1. Υλικά και Αντιδραστήρια	57
4.1.2. Κατασκευή και κατεργασία επιφανειών PMMA με πλάσμα O ₂	58
4.1.3. Προσρόφηση του ενζύμου HRP σε νανο-υφασμένες επιφάνειες PMMA	61
4.1.3.1. Πρωτόκολλο προσρόφησης και αξιολόγησης του ενζύμου HRP σε νανο- υφασμένες επιφάνειες PMMA 2 × 2 cm ²	61
4.1.3.2. Πρωτόκολλο προσρόφησης και αξιολόγησης του ενζύμου HRP σε νανο-υφασμένες επιφάνειες PMMA 6 πηγαδιών διαστάσεων 5 × 5mm ²	63
4.1.4. Ομοιοπολική σύνδεση του ενζύμου HRP σε νανο-υφασμένες επιφάνειες PMMA..	67
4.1.5. Σύνδεση του ενζύμου HRP στις νανο-υφασμένες επιφάνειες PMMA μέσω του συμπλέγματος στρεπταβιδίνης – βιοτίνης	69

4.1.5.1. Πρωτόκολλο παρασκευής βιοτινυλιωμένου ενζύμου HRP	69
4.1.5.2. Ακίνητοποίηση του βιοτινυλιωμένου ενζύμου HRP σε τραχείες επιφάνειες PMMA κατεργασμένες με στρεπταβιδίνη	70
4.2. Μελέτη καταλυτικής οξειδωσης της 4 – φαινυλο-αζο-φαινόλης, με χρήση ενζυματικού μικροαντιδραστήρα σε ψηφίδα, με ακίνητοποιημένη HRP.	72
4.2.1. Σχεδίαση και κατασκευή μικρο – αντιδραστήρα πάνω σε ψηφίδα PMMA.....	73
4.2.2. Διάταξη ανίχνευσης βιοκαταλυτικής μετατροπής της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης με τον μικρο – αντιδραστήρα	76

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5: ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

5.1. Αποτελέσματα κατασκευής επιφανειών και αξιολόγησης ακίνητοποιημένου ενζύμου σε νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA	79
5.1.1. Τοπογραφία των κατεργασμένων με πλάσμα O ₂ επιφανειών PMMA	79
5.1.2. Επίδραση της γήρανσης μετά την κατεργασία στο πλάσμα στην προσρόφηση του ενζύμου	80
5.1.3. Επίδραση του χρόνου κατεργασίας στο πλάσμα O ₂ στην προσρόφηση ενζύμου	83
5.1.4. Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης ενζύμου για προσρόφηση στις νανο - υφασμένες επιφάνειες	85
5.1.5. Αξιολόγηση διαφορετικών μεθόδων ακίνητοποίησης του ενζύμου στις νανο - υφασμένες επιφάνειες PMMA	87
5.1.5.1. Αξιολόγηση ομοιοπολικής σύνδεσης του ενζύμου σε νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA	87
5.1.5.2. Αξιολόγηση της ακίνητοποίησης του ενζύμου σε νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA μέσω του συμπλέγματος στρεπταβιδίνης – βιοτίνης	89
5.1.5.3. Προσδιορισμός βέλτιστης μεθόδου ακίνητοποίησης του ενζύμου σε νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA	90
5.1.6. Συμπεράσματα - Προτάσεις.....	92
5.2. Αποτελέσματα μελέτης καταλυτικής οξειδωσης της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης με χρήση μικρο – αντιδραστήρα σε ψηφίδα PMMA, με ακίνητοποιημένο το ένζυμο HRP..	94
5.2.1. Χαρακτηρισμός καναλιών μικροαντιδραστήρα.....	94
5.2.2. Αξιολόγηση ικανότητας του ενζυματικού μικρο – αντιδραστήρα από PMMA στην βιοκαταλυτική μετατροπή της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης	96
5.2.2.1 Έκτίμηση καταλυτικής χωρητικότητας του ενζυματικού μικρο – αντιδραστήρα από PMMA	99

5.2.2.2. Αποτελέσματα βιοκαταλυτικής μετατροπής της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης στον ενζυματικό μικρο – αντιδραστήρα από PMMA	100
5.2.2.3. Εκτίμηση δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου HRP σε μικρο – αντιδραστήρα από PMMA κατεργασμένο για 10min σε πλάσμα O ₂	103
5.2.3. Συμπεράσματα – Προτάσεις	104
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	106
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ.....	117
Κατάλογος εικόνων.....	117
Κατάλογος σχημάτων	119
Κατάλογος πινάκων	124

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΣΤΟΧΟΙ ΤΗΣ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ





ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

Στο παρόν κεφάλαιο, παρουσιάζονται οι βασικές έννοιες που σχετίζονται με το ευρύτερο πεδίο ένταξης της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας. Σε πρώτο στάδιο, γίνεται μια εισαγωγή στην τεχνολογία πλάσματος που εφαρμόζεται για την μικρο- και νανο-σχηματοποίηση των πολυμερικών επιφανειών. Αναφέρονται οι διάφορες μέθοδοι εγχάραξης και εισάγονται οι έννοιες της μορφολογικής (τραχύτητα) και της χημικής (διαβροχή) τροποποίησης πολυμερικών επιφανειών σε πλάσμα. Ακολουθεί μια γενική εισαγωγή στα ένζυμα, με έμφαση στην έννοια της ακινητοποίησης των ενζύμων και στη συνέχεια, γίνεται εισαγωγή στις μικρορευστονικές διατάξεις, εστιάζοντας στην κατασκευή των μικροαντιδραστήρων. Τέλος, παρουσιάζονται οι στόχοι της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας.

1.1.Τεχνολογία πλάσματος

1.1.1. Πλάσμα

Με τον όρο του πλάσματος, αναφερόμαστε σε ένα σχεδόν ουδέτερο ηλεκτρικά αέριο, το οποίο αποτελείται στο σύνολό του, από φορτισμένα (θετικά και αρνητικά ιόντα, ηλεκτρόνια) και ουδέτερα συστατικά και εμφανίζει συλλογική συμπεριφορά. Ο όρος αυτός αποδίδεται στον I. Langmuir (1881-1957) και χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1928. Το πλάσμα, από ενεργειακή άποψη, θεωρείται ως η τέταρτη κατάσταση της ύλης, μετά τη στερεά, την υγρή και την αέρια (Σχήμα 1.1.)

Solid	Liquid	Gas	Plasma
Example Ice H_2O	Example Water H_2O	Example Steam H_2O	Example Ionized Gas $H_2 \rightarrow H^+ + H^+ + 2e^-$
Cold $T < 0^\circ C$	Warm $0 < T < 100^\circ C$	Hot $T > 100^\circ C$	Hotter $T > 100,000^\circ C$ $v > 10$ electron Volts
			
Molecules Fixed in Lattice	Molecules Free to Move	Molecules Free to Move, Large Spacing	Ions and Electrons Move Independently, Large Spacing

Σχήμα 1.1: Οι τέσσερις καταστάσεις της ύλης.

Το πλάσμα συναντάται σε αφθονία στον Ήλιο, στους ηλιακούς ανέμους, στους αστέρες, στον μεσοαστρικό χώρο και στην ιονόσφαιρα, όπου η πλειονότητα της ύλης βρίσκεται υπό τη μορφή πλάσματος. Στην καθημερινότητά μας αντιθέτως, δε το συναντούμε συχνά, με εξαίρεση κάποιες περιορισμένες κατασκευές, όπως οι λάμπες φθορισμού, ενώ χαρακτηριστικό παράδειγμα πλάσματος αποτελεί το φαινόμενο των κεραυνών.



Εικόνα 1.1: Πάνω σειρά: Αριστερά, το φαινόμενο της κεραυνού και οι ηλεκτρικές σπίθες, αποτελούν καθημερινά παραδείγματα φαινομένων που οφείλονται στο πλάσμα. Δεξιά, τα φώτα φθορισμού (neon lights), θα μπορούσαν να αποκαλεστούν και «φώτα πλάσματος», καθώς το φως προέρχεται από το πλάσμα μέσα σε αυτά. Κάτω σειρά: Αριστερά, απεικονίζεται μια σφαίρα πλάσματος, που σχετίζεται με περίπλοκα φαινόμενα πλάσματος. Τα χρώματα που βλέπουμε, προκύπτουν κατά την αποδιέγερση ηλεκτρονίων που βρίσκονται σε διεγερμένες στάθμες, σε

χαμηλότερες ενεργειακές στάθμες, μετά την επανασύνδεσή τους με ιόντα. Δεξιά, απεικονίζεται ίχνος πλάσματος από το διαστημικό λεωφορείο Atlantis, κατά την επαναφορά του στην ατμόσφαιρα της γης, όπως φαίνεται από τον Διεθνή Διαστημικό σταθμό.

Το πλάσμα δημιουργείται κατά την εφαρμογή υψηλής τάσης, συνήθως στην περιοχή των ραδιοσυχνοτήτων (RF Power), μέσα σε ένα αέριο που βρίσκεται σε θάλαμο υπό κενό, με ηλεκτρική εκκένωση. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τη δημιουργία μέσα στο θάλαμο, ενός ηλεκτρικά ουδέτερου μείγματος από ηλεκτρόνια, ιόντα, φωτόνια, προϊόντα επανασύνδεσης και ουδέτερα σωματίδια (ελεύθερες ρίζες, άτομα) με ταυτόχρονη εκπομπή φωτός. Από τα προϊόντα αυτά, τα ελεύθερα ηλεκτρόνια είναι αυτά που ξεκινούν τη διαδικασία του πλάσματος επειδή με την κινητική ενέργεια που αποκτούν και σε συνδυασμό με το γεγονός ότι είναι αρκετά ελαφρά, συγκρούονται συνεχώς με άλλα άτομα ή μόρια και αποκτούν μια υψηλή μέση ενέργεια πολλών eV (electron Volts) που αντιστοιχούν σε δεκάδες χιλιάδες βαθμούς πάνω από τη θερμοκρασία του αερίου, η οποία είναι συνήθως λίγο υψηλότερη από τη θερμοκρασία περιβάλλοντος.

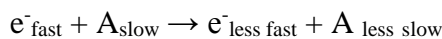
Η υψηλή θερμοκρασία των ηλεκτρονίων επιτρέπει στις συγκρούσεις ηλεκτρονίων-μορίων να προκαλούν αντιδράσεις υψηλής θερμοκρασίας που δημιουργούν ελεύθερες ρίζες, ιόντα και άλλα ηλεκτρόνια, λόγω ιονισμού μέσα στο χαμηλής θερμοκρασίας ουδέτερο αέριο. Χωρίς πλάσμα, η δημιουργία των ίδιων αντιδρώντων στοιχείων, θα απαιτούσε εύρος θερμοκρασιών περίπου από 10^3 έως 10^4 °K, που θα κατέστρεφε τα οργανικά πολυμερή και πολλά ανόργανα φιλμ. Η συνύπαρξη ενός ψυχρού αερίου (από εκεί προκύπτει και ο όρος ‘ψυχρό πλάσμα’ που συχνά χρησιμοποιείται) και των θερμών ηλεκτρονίων είναι αυτό που διαφοροποιεί τον αντιδραστήρα του πλάσματος από μια συμβατική θερμική διεργασία. Είναι σωστή προσέγγιση να θεωρούμε ότι τα περισσότερα ουδέτερα σωματίδια έχουν μία κοινή θερμοκρασία ή μέση ενέργεια. Συνηθίζεται να αναφερόμαστε σε μια ξεχωριστή θερμοκρασία για κάθε είδος σωματιδίου (π.χ. T_i για το σωματίδιο i). Η θερμοκρασία μπορεί να οριστεί σε σχέση με τη μέση ενέργεια, e_i , των σωματιδίων:
$$e_i = \frac{3}{2} kT_i$$

όπου, k είναι η σταθερά Boltzman ίση με 1.38×10^{-23} J°K⁻¹ ή 8.62×10^{-5} eV°K⁻¹. Έτσι η θερμοκρασία και η μέση ενέργεια αναλογούν στο ίδιο πράγμα. Τυπικές τιμές θερμοκρασίας είναι 0.05–100 eV για τα ιόντα, 0.025 eV για τα ουδέτερα και 1-10 eV για τα ηλεκτρόνια.

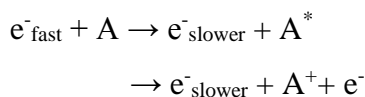
Οι συγκρούσεις που γίνονται μέσα στο πλάσμα μπορεί να είναι ελαστικές ή ανελαστικές. Στις ελαστικές συγκρούσεις, που συνήθως αποτελούν και τη πλειοψηφία των συγκρούσεων μεταξύ ηλεκτρονίων και ατόμων ή μορίων, τα σωματίδια ανταλλάσσουν ορμή

και κινητική ενέργεια χωρίς να επηρεάζονται οι εσωτερικές τους καταστάσεις. Στις ανελαστικές συγκρούσεις αλλάζουν οι εσωτερικές καταστάσεις και τα σωματίδια που συμμετέχουν τοποθετούνται συνήθως σε διεγερμένες καταστάσεις. Αν η μέση ενέργεια των ηλεκτρονίων είναι μικρή για να προκαλέσει διέγερση, οι πιο πολλές συγκρούσεις ηλεκτρονίων-μορίων θα είναι ελαστικές και αυτό συμβαίνει συνήθως με τα ευγενή αέρια ενώ αντίθετα στα μοριακά αέρια ένα μεγαλύτερο μέρος των συγκρούσεων είναι ανελαστικές:

Ελαστική σύγκρουση:



Ανελαστική σύγκρουση που οδηγεί σε διέγερση ή ιονισμό:



Λόγω της μεγάλης κινητικής ενέργειας των ηλεκτρονίων, όλες οι επιφάνειες που έρχονται σε επαφή με το περιβάλλον του πλάσματος (τοιχώματα, δείγματα) φορτίζονται αρνητικά με αποτέλεσμα τα θετικά ιόντα να επιταχύνονται και να πέφτουν κάθετα σε αυτές. Τα αρνητικά ιόντα τα οποία βρίσκονται σε μία πολύ χαμηλότερη θερμοκρασία και διαχέονται πιο δύσκολα είναι γενικά ανίκανα να διαφύγουν το πλάσμα και χάνονται αντίθετα σε συγκρούσεις επανασύνδεσης και απόσπασης. Οι ρίζες που σχηματίζονται μέσα στο πλάσμα αντιδρούν με την επιφάνεια του στρώματος με χημικό τρόπο ενώ τα ιόντα επιδρούν με μηχανικό τρόπο, μέσω της ιονοβολής. Η οπτική εκπομπή που παρατηρείται μέσα σε ένα πλάσμα είναι αποτέλεσμα των διεγερμένων ατόμων και μορίων που σχηματίζονται στο πλάσμα καθώς χάνουν την επιπλέον ενέργειά τους. Το μήκος κύματος της εκπομπής του φωτός είναι ικανό να σπάει και τους χημικούς δεσμούς και μπορεί να είναι χρήσιμο στην τροποποίηση κατά την επεξεργασία πολυμερικών υλικών. Για τις περισσότερες καταστάσεις πλάσματος ο βαθμός ιονισμού είναι πολύ μικρός με τον αριθμό των αρνητικών σωματιδίων να είναι ίσος με αυτόν των θετικών. Τυπικά υπάρχει μόνο ένα φορτισμένο σωματίδιο ανά 100,000 – 1,000,000,000 ουδέτερα άτομα και μόρια.

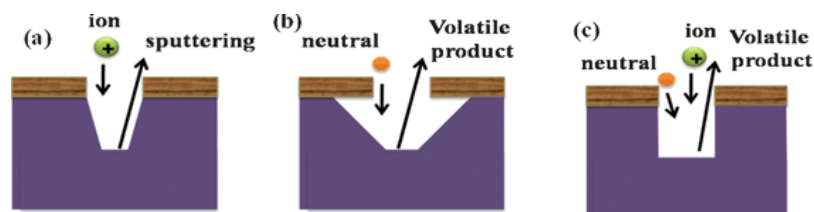
Οι διεργασίες που γίνονται με τεχνολογία πλάσματος χωρίζονται σε τρεις κατηγορίες:

- Εγχάραξη: Αφαίρεση υλικού μέσω αντιδράσεων με ενεργά είδη που οδηγούν σε πτητικά προϊόντα.

- Εναπόθεση: Δημιουργία νέων υλικών υπό τη μορφή λεπτών υμενίων που εναποτίθενται στις επιφάνειες.
- Τροποποίηση: Χημική προσθήκη λειτουργικών ομάδων σε υλικά που εκτίθενται στο πλάσμα.

1.1.2. Εγχάραξη με πλάσμα

Όταν μια επιφάνεια εκτεθεί σε πλάσμα, τότε έρχεται σε επαφή με ροές ουδέτερων ατόμων, μορίων, ιόντων, ηλεκτρονίων, και φωτονίων με αποτέλεσμα να υφίστανται τροποποίηση. Οι βασικοί μηχανισμοί που προκαλούν την εγχάραξη, περιλαμβάνουν: α) την μηχανική αφαίρεση του υλικού που προκαλείται από τα ιόντα του πλάσματος και ονομάζεται ιονοβολή (sputtering), β) τη χημική εγχάραξη (θερμική εγχάραξη) που προκαλείται από τα ενεργά ουδέτερα συστατικά και γ) τη χημική εγχάραξη υποβοηθούμενη από ιόντα (ion enhanced chemical etching), η οποία προκύπτει από τη συνεργιστική δράση όταν ουδέτερων μορίων και ιόντων (Σχήμα 1.2.). Η ποσότητα του υλικού που αφαιρείται κατά την εγχάραξη συναρτίζεται του αντίστοιχου χρόνου εγχάραξης, καλείται ρυθμός εγχάραξης (P.E.) και αποτελεί χαρακτηριστικό μέγεθος της διεργασίας. Όταν δύο υλικά εμφανίζουν διαφορετικούς ρυθμούς εγχάραξης, τότε ο λόγος των δύο ρυθμών ονομάζεται εκλεκτικότητα και αποτελεί σημαντική παράμετρο. Επιλέον, μια άλλη σημαντική παραμέτρος είναι η απόδοση εγχάραξης, η οποία περιγράφει τον αριθμό των ατόμων της επιφανείας που αφαιρούνται ανά προσπίπτον ιόν μέσα στο πλάσμα και ορίζεται σαν το λόγο του ρυθμού εγχάραξης προς τη ροή των ιόντων.



Σχήμα 1.2: Βασικοί μηχανισμοί εγχάραξης με πλάσμα: α) εγχάραξη με ιόντα (ιονοβολή), β) χημική εγχάραξη μόνο με τη δράση ουδέτερων σωματιδίων, γ) χημική εγχάραξη υποβοηθούμενη από ιόντα.

1.1.2.1 Ιονοβολή

Η ιονοβολή ή φυσική εγχάραξη οφείλεται στην κρούση των ιόντων της αέριας φάσης με τα μόρια της επιφανείας του προς εγχάραξη υλικού. Η εγχάραξη του υλικού επιτυγχάνεται με τη μεταφορά της ορμής (ενέργειας) από το προσπίπτον ιόν στο υλικό με αποτέλεσμα το μέρος του δείγματος που δέχτηκε την ενέργεια αυτήν να αποκολλάται. Η κινητική ενέργεια

των ιόντων λίγο πριν την επιφάνεια αποκτάται εξαιτίας της δημιουργίας βαθμίδας δυναμικού μεταξύ του κυρίως μέρους του πλάσματος και του ηλεκτροδίου πάνω στο οποίο είναι τοποθετημένο το προς κατεργασία υλικό. Λόγω της μηχανικής φύσης της διεργασίας, η ταχύτητα ιονβολής εξαρτάται από τη γωνία πρόσπτωσης του ιόντος στην επιφάνεια και εμφανίζει μέγιστο όταν η γωνία θ είναι περίπου 70° . Εξαιτίας της στενής κατανομής των γωνιών πρόσπτωσης των ιόντων η ιονβολή είναι μια ισχυρά ανισοτροπική διεργασία. Η εκλεκτικότητα με την ιονβολή είναι πολύ μικρή γιατί η εγχάραξη στην περίπτωση αυτή δεν εξαρτάται από τη χημική φύση του υλικού. Η εγχάραξη περιορίζεται στο ανώτατο στρώμα της επιφάνειας του υλικού και σπάνια σε μεγαλύτερο βάθος. Επομένως, η τροποποίηση είναι επιφανειακή και το υλικό διατηρεί τις φυσικές και χημικές του ιδιότητες στον κύριο όγκο του. Η αλλαγή στην ιοντική ενέργεια τείνει να αλλάξει τη διαδικασία με την οποία αφαιρείται ένα υλικό. Αυτό σημαίνει ότι επειδή σε χαμηλότερες πιέσεις, η πυκνότητα των αντιδρώντων ουδετέρων ειδών που βρίσκονται στην αέρια φάση μειώνεται, η ιοντική ενέργεια αυξάνει, και οι μηχανισμοί επιφανειακής αλλοίωσης προκαλούμενοι από την ενέργεια είναι πιο σημαντικοί. Επομένως, σε πολύ υψηλή ιοντική ενέργεια και χαμηλή πίεση αντίστοιχα, κυριαρχεί η φυσική ιονβολή.

1.1.2.2 Χημική εγχάραξη

Η χημική εγχάραξη κατά την κατεργασία σε πλάσμα οφείλεται όπως ήδη αναφέρθηκε στα ουδέτερα μόρια της αέριας φάσης. Τα είδη αυτά είναι ιδιαίτερα δραστικά χημικά με αποτέλεσμα να αντιδρούν εύκολα με τα μόρια της επιφάνειας του προς κατεργασία υλικού. Το μόριο που αντέδρασε με κάποιο ουδέτερο σωματίδιο μετατρέπεται πρώτα σε μια πτητική χημική ένωση, η οποία ακολούθως απομακρύνεται από την επιφάνεια. Η ταχύτητα της εγχάραξης εξαρτάται από το πόσο εύκολα ενώνονται οι ελεύθερες ρίζες με τα μόρια του προς κατεργασία υλικού και από το πόσο πτητικότερα είναι τα προϊόντα αυτής της δράσης. Η χημική εγχάραξη οδηγεί σε ισοτροπική αφαίρεση υλικού. Η χημική εγχάραξη μπορεί να παρουσιάσει μεγάλη εκλεκτικότητα καθώς εξαρτάται από τις διαφορές στους δεσμούς και στη χημική συνοχή των διαφορετικών υλικών, και είναι η μέθοδος εγχάραξης που υπερισχύει σε εφαρμογή υψηλότερων πιέσεων, όταν η χημεία είναι κατάλληλη.

1.1.2.3 Υποβοηθούμενη από ιόντα χημική εγχάραξη

Η υποβοηθούμενη από ιόντα εγχάραξη, είναι αποτέλεσμα συνεργιστικής δράσης των δύο προαναφερθέντων μηχανισμών. Από το πείραμα των Coburn και Winter ^[1], προέκυψε ότι ιόντα και ουδέτερα σωματίδια δρουν συνεργιστικά, προκαλώντας αυτό που ονομάζεται «υποβοηθούμενη από ιόντα εγχάραξη» με ρυθμό εγχάραξης που δεν είναι αλγεβρικά ίσος με το άθροισμα των επιμέρους ρυθμών εγχάραξης. Η συνεργιστική δράση οφείλεται στην επιτάχυνση από την ενέργεια των ιόντων του βραδύτερου σταδίου της αντίδρασης. Ο μηχανισμός αυτός, προκαλεί ανισοτροπική εγχάραξη στην κατεύθυνση των ιόντων και παρουσιάζει επιλεκτικότητα που αναμένεται μεγαλύτερη της φυσικής και μικρότερη από την αντίστοιχη της καθαρά χημικής εγχάραξης. της φυσικής και της χημικής ρυθμό εγχάραξης.

1.1.3. Τροποποίηση πολυμερών σε πλάσμα οξυγόνου

Η κυριότερη διαδικασία που είναι υπεύθυνη για την τροποποίηση της επιφάνειας των πολυμερών, κατά την επεξεργασία τους με πλάσμα, είναι οι αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα με ενεργές ρίζες και ιόντα. Αέρια όπως το οξυγόνο, ενεργοποιούνται από το πλάσμα και αλληλεπιδρούν με τις πολυμερικές επιφάνειες, Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ενεργών λειτουργικών ομάδων πάνω στις επιφάνειες, όπως το υδροξύλιο, το καρβονύλιο και το καρβοξύλιο, οι οποίες όταν ενεργοποιηθούν χρησιμεύουν στην πρόσδεση βιομορίων. Η κατεργασία των πολυμερικών επιφανειών με πλάσμα, οδηγεί σε μεγάλες αλλαγές στις ιδιότητες της επιφάνειας των πολυμερών, όπως για παράδειγμα, μορφολογικές τροποποιήσεις με την εμφάνιση τραχύτητας στην επιφάνεια, ή χημικές τροποποιήσεις με την μεταβολή των ιδιοτήτων διαβροχής της επιφάνειας. Βασικό πλεονέκτημα της επεξεργασίας με πλάσμα, αποτελεί η ομοιόμορφη τροποποίηση της επιφάνειας, χωρίς να επηρεάζονται οι ιδιότητες της υπόλοιπης μάζας του υλικού (bulk). Η δόμηση της τοπογραφίας των πολυμερών λαμβάνει χώρα στην κλίμακα του μικρομέτρου και του νανομέτρου και χρησιμοποιείται για τη βελτίωση της συγκόλλησης και της διαβροχής των πολυμερικών υμενίων καθώς και των οπτικών ιδιοτήτων της επιφάνειας. Οι τροποποιήσεις της τοπογραφίας με πλάσμα είναι μεγάλου ενδιαφέροντος σε πολλές εφαρμογές για τις βιοϊατρικές (φακοί επαφής, μοσχεύματα) και τις οπτικές βιομηχανίες (ανάκλαση, απορρόφηση).

1.1.3.1 Τροποποίηση μορφολογική σε πλάσμα: Τραχύτητα μετά την εγχάραξη στο πλάσμα

Μία τραχειά επιφάνεια μπορεί να οριστεί ως μια επιφάνεια με μη μηδενική διακύμανση ύψους με ύψος αναφοράς το μέσο όρο των υψών όλων των σημείων της επιφανείας. Σύμφωνα με τον ορισμό αυτό καμία επιφάνεια δεν μπορεί να είναι λεία τουλάχιστον σε ατομική κλίμακα. Στην επιστήμη της μικροτεχνολογίας η τραχύτητα είναι από τους παράγοντες που επηρεάζει πολλά φαινόμενα, όπως την ταχύτητα μιας χημικής αντίδρασης που λαμβάνει χώρα σε μια επιφάνεια, την γωνία επαφής ενός σταγονιδίου σε μια τραχιά επιφάνεια, την γωνία Brewster και ελέγχει άμεσα πολλές φυσικές και χημικές ιδιότητες των υμενίων. Επιπρόσθετα η τραχύτητα εκφράζει την επιφανειακή αλλοίωση μέσα στο πλάσμα και την απόκλιση της από την ομαλή επιφάνεια και διαχωρίζεται στην επιφανειακή που έχει να κάνει με την ποιότητα της επιφάνειας και στην πλευρική που περιγράφει το πόσο τραχύ είναι το προφίλ των δομών. Η επιφάνεια που βρίσκεται εκτεθειμένη μέσα στο πλάσμα αρχίζει να ελαττώνεται και να γίνεται πιο τραχιά, παρουσιάζοντας κοιλάδες και κορυφές. Η απόσταση μεταξύ μιας κοιλάδας και μιας κορυφής η οποία τείνει να γίνεται μεγαλύτερη με μεγαλύτερους χρόνους κατεργασίας, περιγράφεται για κάθε χρονική στιγμή t , από τη μέση τετραγωνική τιμή της τραχύτητας (rms). Το rms υπολογίζεται αυτόματα από το AFM για όλη την περιοχή στην οποία γίνεται η σάρωση. Όταν αναφερόμαστε σε τραχύτητα στην παρούσα εργασία εννοούμε την μέση τετραγωνική τιμή της. Στην συγκεκριμένη εργασία λόγω μεγάλων χρόνων εγχάραξης η τραχύτητα παρατηρήθηκε από το μικροσκόπιο SEM.

1.1.3.2 Τροποποίηση χημική: μεταβολή διαβροχής (υδροφοβικότητα –υδροφιλικότητα)

Για τον καθορισμό του βαθμού υδροφοβικότητας που παρουσιάζεται από μια δεδομένη επιφάνεια, πρέπει να ληφθούν υπόψη δυο αντιτιθέμενες δυνάμεις, η δύναμη της συνοχής και η δύναμη της προσκόλλησης. Η σχέση μεταξύ αυτών των δυο δυνάμεων καθορίζει τη διαβροχή της επιφάνειας από το νερό. Σε μια υδρόφιλη επιφάνεια η δύναμη της προσκόλλησης είναι ισχυρότερη από τη δύναμη συνοχής και μια σταγόνα νερού θα καλύψει γρήγορα την επιφάνεια. Κατά συνέπεια στις υδρόφοβες επιφάνειες η δύναμη συνοχής είναι κυρίαρχη, ενώ στις υδρόφιλες επιφάνειες η δύναμη προσκόλλησης είναι μεγαλύτερη και υπερνικά τη δύναμη συνοχής.

Η σχέση της τραχύτητας - υδροφοβικότητας περιγράφηκε πριν από δεκαετίες από τον Wenzel ^[2] και τους Cassie και Baxter ^[3]. Στο μοντέλο του Wenzel το υγρό γεμίζει τα διάκενα

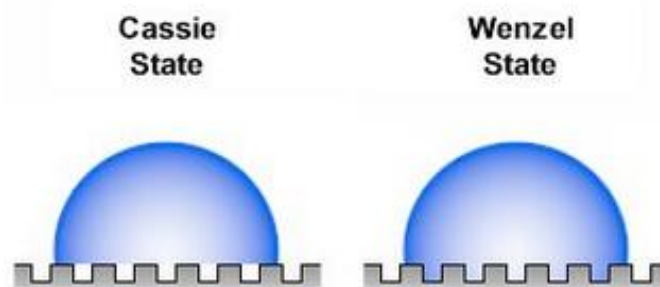
που εμφανίζει η τραχεία επιφάνεια (Σχήμα 1.3.) και η γωνία επαφής του υγρού περιγράφεται από τη σχέση:

$$\cos\theta_w = r \cos\theta$$

όπου r είναι το πηλίκο του συνολικού υγρού τομέα μιας τραχείας επιφάνειας προς την προβολή της επιφάνειας που βρίσκεται σε επαφή με το σταγονίδιο ύδατος ($r > 1$), θ η γωνία επαφής του υγρού στην επίπεδη επιφάνεια και θ_w η γωνία επαφής που προβλέπει το μοντέλο του Wenzel. Στο μοντέλο των Cassie-Baxter, που είναι μια εκτεταμένη μορφή του μοντέλου του Wenzel σε μια προσπάθεια να συμπεριληφθούν και οι πορώδεις επιφάνειες, η σταγόνα του υγρού κάθεται σε μια σύνθετη επιφάνεια φτιαγμένη από στερεό και αέρα. Επομένως, το υγρό δεν γεμίζει τα διάκενα της ύφανσης. Η σχέση που περιγράφει το μοντέλο είναι η ακόλουθη:

$$\cos\theta_c = \Phi_s r_f \cos\theta_0 + \Phi_s - 1$$

όπου το Φ_s είναι το κλάσμα κάλυψης του προβαλλόμενου τομέα της στερεάς επιφάνειας σε επαφή με το υγρό και το r_f ορίζεται ανάλογα με το μοντέλο του Wenzel, με τη μόνη διαφορά ότι το r_f στην εξίσωση δεν είναι ο συντελεστής τραχύτητας όλης της επιφάνειας, αλλά μόνο της περιοχής που βρίσκεται σε επαφή με το υγρό. Με αυτήν την μορφή της εξίσωσης των Cassie-Baxter, οι συνεισφορές της τραχύτητας της επιφάνειας καθώς και του παγιδευμένου αέρα στα διάκενα είναι πολύ σαφέστερες απ' ό,τι σε άλλες μορφές της εξίσωσης που υπάρχουν στη βιβλιογραφία.



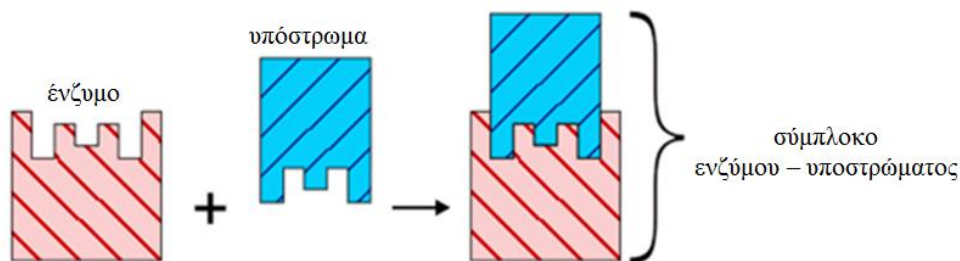
Σχήμα 1.3: Δεξιά η σταγόνα δεν εισχωρεί μέσα στην τοπογραφία της επιφάνειας (Cassie-Baxter state), ενώ αριστερά η σταγόνα εισχωρεί στην τοπογραφία της επιφάνειας (Wenzel state).

1.2. Εισαγωγή στα ένζυμα και στην τεχνολογία ακινητοποίησης ενζύμων

1.2.1. Ένζυμα

Τα ένζυμα είναι καταλύτες με υψηλή αποδοτικότητα σε βιοχημικές αντιδράσεις, που επιταχύνουν το ρυθμό αντίδρασης παρέχοντας ένα εναλλακτικό μονοπάτι αντίδρασης με χαμηλότερη ενέργεια ενεργοποίησης Όπως όλοι οι καταλύτες, τα ένζυμα συμμετέχουν σε μια αντίδραση, χωρίς να υφίστανται μόνιμες αλλαγές, παραμένοντας έτσι αναλλοίωτα στο τέλος της αντίδρασης. Σε αντίθεση με τους κοινούς χημικούς καταλύτες, τα ένζυμα εμφανίζουν υψηλή εκλεκτικότητα, καταλύοντας μόνο συγκεκριμένες αντιδράσεις. Η εξειδίκευση αυτή, οφείλεται στη δομική διαμόρφωση των ενζυμικών μορίων. Πολλά ένζυμα, αποτελούνται από ένα πρωτεϊνικό μόριο και ένα μη πρωτεϊνικό το οποίο καλείται συμπαράγοντας (cofactor). Οι πρωτεΐνες των ενζύμων είναι συνήθως σφαιρικές. Οι ενδομοριακοί δεσμοί που συγκρατούν τις πρωτεΐνες στην δευτεροταγή και την τεταρτοταγή δομή τους, διαταράσσονται με αλλαγές του pH και της θερμοκρασίας, επηρεάζοντας έτσι τη δομή του ενζύμου. Συνεπώς, τα ένζυμα καθίστανται ευαίσθητα στους παράγοντες του pH και της θερμοκρασίας.

Οι συμπαράγοντες των ενζύμων μπορεί να είναι α) οργανικές ομάδες μονίμως συνδεδεμένες με το ένζυμο (προσθετικές ομάδες) β) κατιόντα – θετικά φορτισμένα μεταλλικά ιόντα (activators), που συνδέονται προσωρινά με το ενεργό κέντρο του ενζύμου και γ) οργανικά μόρια, συνήθως βιταμίνες ή συνένζυμα βιταμινών, που δεν είναι μονίμως συνδεδεμένα με το υπόστρωμα αλλά συνδυάζονται με το σύμπλοκο ενζύμου – υποστρώματος προσωρινά. Τα ένζυμα διαθέτουν ένα ενεργό κέντρο, στο οποίο λαμβάνει χώρα η καταλυτική αντίδραση. Το τμήμα αυτό του ενζύμου, διαθέτει το κατάλληλο σχήμα και λειτουργικές ομάδες, ώστε να γίνει η σύνδεσή του σε κάποιο από τα αντιδρώντα μόρια, το οποίο καλείται υπόστρωμα. Ο πιο απλός τρόπος να περιγράψουμε τη λειτουργία ενός ενζύμου, είναι χρησιμοποιώντας το μοντέλο «κλειδιού – κλειδαριάς», όπου το υπόστρωμα προσδέεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, το οποίο διαθέτει συμπληρωματικό σχήμα ως προς αυτό του υποστρώματος, δημιουργώντας έτσι το ενδιάμεσο μόριο της αντίδρασης (σχήμα 1.4). Ένα άλλο, πιο εξελιγμένο μοντέλο που χρησιμοποιείται, είναι αυτό της «επαγόμενης προσαρμογής». Σύμφωνα με αυτό το μοντέλο, το ένζυμο αλλάζει σχήμα καθώς έρχεται σε επαφή με τα μόρια του υποστρώματος, με αποτέλεσμα το ενεργό κέντρο του ενζύμου να έχει συμπληρωματικό σχήμα ως προς αυτό του υποστρώματος μετά την προσδεση.



Σχήμα 1.4: Σχηματική αναπαράσταση μοντέλου «κλειδιού – κλειδαριάς» για το ένζυμο και το υπόστρωμά του.

1.2.2 Τεχνολογία ακινητοποίησης ενζύμων

Τα ένζυμα, γνωστά και ως «βιοκαταλύτες» αποτελούν μια αξιοσημείωτη ανακάλυψη στον τομέα της βιοτεχνολογίας. Οι «βιοκαταλύτες» έχουν υιοθετηθεί ευρέως σε ποικίλους τομείς, καθώς παρουσιάζουν ευκολία στην παραγωγή τους, εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα και προωθούν την «πράσινη χημεία». Παρόλα αυτά, για να είναι εφικτή η εμπορευματοποίηση των βιοκαταλυτών σε μεγάλο βαθμό, σημαντικό ρόλο παίζει ο παράγοντας επαναχρησιμοποίησής τους, απουσία του οποίου παύουν πλέον να θεωρούνται οικονομικοί. Επιπλέον, η διατήρηση της δομικής τους σταθερότητας κατά τη διάρκεια των βιοχημικών αντιδράσεων αποτελεί μία μεγάλη πρόκληση. Συνεπώς, ως εναλλακτική λύση, χρησιμοποιούνται τα ακινητοποιημένα ένζυμα, τα οποία εμφανίζουν υψηλή απόδοση στη λειτουργικότητά τους και διαθέτουν καλύτερη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης, παρά το υψηλότερο κόστος τους.

Όταν αναφερόμαστε σε ακινητοποιημένα ένζυμα, περιγράφουμε ένζυμα φυσικώς περιορισμένα σε κάποιο συγκεκριμένο τμήμα μιας περιοχής, που διατηρούν την καταλυτική δραστηριότητά τους και μπορούν να χρησιμοποιούνται επαναλαμβανόμενα και συνεχώς ^[4]. Η διαδικασία της ακινητοποίησης, επιτρέπει στο ένζυμο να γίνει πιο σταθερό και ανθεκτικό σε δριμείς συνθήκες, όπως σε μεγάλο εύρος θερμοκρασιών και pH και να διατηρεί τη δραστηριότητά του για αρκετούς κύκλους διεργασιών. Η ακινητοποίηση των ενζύμων βρίσκει ευρεία εφαρμογή με επιτυχία, σε τομείς όπως τα τρόφιμα, η χημεία και η φαρμακευτική βιομηχανία. Η οικονομική βιωσιμότητα τέτοιων ακινητοποιημένων ενζύμων, εξαρτάται από

διάφορους παράγοντες, όπως τον τύπο του υποστρώματος και τη μέθοδο ακινητοποίησης που θα εφαρμοστεί, καθώς επηρεάζουν σε μεγάλο βαθμό τη δραστικότητα του βιοκαταλύτη.

1.3. Μικρορευστονικές Διατάξεις

Ο όρος μικρορευστονική αναφέρεται στο σύνολο των τεχνολογιών οι οποίες ελέγχουν την ροή μικροποσοτήτων υγρών ή αερίων με όγκους που κυμαίνονται από micro liters ($1 \mu\text{L} = (1 \text{ mm})^3$) σε pico liters ($1 \text{ pL} = (10 \mu\text{m})^3$) σε μία μικροδιάταξη [5]. Η πρόσφατη ανάπτυξη της τεχνολογίας των MEMS (μικρο – ηλεκτρομηχανικών συστημάτων), έχει επιτρέψει στις συμβατικές βιοτεχνολογικές αναλυτικές διεργασίες, τη δυνατότητα να εκτελούνται ταχέως, χρησιμοποιώντας βιοψηφίδες (biochips) σε σμίκρυνση. Οι βιοψηφίδες κατηγοριοποιούνται σε δύο βασικές ομάδες: τις μικροσυστοιχίες και τα μικροεργαστήρια.

Ένα μικροεργαστήριο, είναι η σμίκρυνση και η ολοκλήρωση της πλήρους λειτουργικότητας ενός χημικού ή βιολογικού εργαστηρίου σε ψηφίδα, όπως η προετοιμασία δείγματος, η ανάμιξη, οι αντιδράσεις, οι διαχωρισμοί και η ανίχνευση σε μια μόνο ψηφίδα. Για το λόγο αυτό, τα μικροεργαστήρια είναι γνωστά ως Lab-on-a-Chip (Ολοκληρωμένα εργαστήρια σε ψηφίδα) ή μTAS (Ολοκληρωμένα Μικρο-Αναλυτικά Συστήματα). Το μικροεργαστήριο, εμφανίζει πλεονεκτήματα όπως: πολύ μικρότερο απαιτούμενο χρόνο ανάλυσης, πολύ μικρές απαιτούμενες ποσότητες δειγμάτων και αντιδραστηρίων, χαμηλό κόστος, υψηλή ακρίβεια ανάλυσης, χαμηλή επιμόλυνση, ευκολία στη χρήση κ.α. Ένα μικροεργαστήριο αποτελείται από πολλές μικρορευστονικές διατάξεις όπως κανάλια, συστήματα ανάμειξης, αντλίες, φίλτρα, εναλλάκτες θερμότητας κ.ά., με κατάλληλη ολοκλήρωση των οποίων καθίσταται δυνατή η προσθήκη, η ανάμειξη, ο διαχωρισμός, η ανίχνευση και η μετακίνηση (πριν ή και μετά την ανίχνευση) συστατικών σε ένα διάλυμα [6]. Η συνεχής ροή των δειγμάτων και των αντιδραστηρίων εισόδου μέσω των μικρορευστονικών διατάξεων, μπορεί να ελαχιστοποιήσει σημαντικά τον χρόνο διεργασίας και την μόλυνση των δειγμάτων.

Τυπικά υλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί ως υποστρώματα για την κατασκευή μικρορευστονικών διατάξεων, είναι διάφορα είδη γυαλιού (fused silica glass) ή πολυμερή, όπως το PDMS (polydimethyl siloxane), το PMMA (polymethyl metacrylate), το COC (cyclic olefin copolymer) κ.α. Τα πολυμερικά υποστρώματα παρουσιάζουν σημαντικά πλεονεκτήματα σαν υλικά κατασκευής μικρορευστονικών διατάξεων, όπως μειωμένο κόστος, ευκολία κατασκευής, και καλές φυσικοχημικές ιδιότητες (βιοσυμβατότητα, οπτική διαφάνεια, χαμηλό μέτρο ελαστικότητας, κ.λ.π.).

Υπάρχει μια ποικιλία μεθόδων για την κατασκευή των μικρορευστονικών διατάξεων συμπεριλαμβανομένης της υγρής εγχάραξης, της εγχάραξης ενεργών ιόντων, της συμβατικής μικρο – μηχανικής [7], της φωτολιθογραφίας, της μαλακής λιθογραφίας ή της έγχυσης και σκλήρυνσης ελαστομερούς (soft lithography), της εν θερμώ σφράγισης (hot embossing), της εν θερμώ έγχυσης (injection molding), της εγχάραξης με laser (laser ablation) και της εγχάραξης με πλάσμα. Κατά γενικό κανόνα, η επιλογή της κατασκευαστικής μεθόδου καθορίζεται από διάφορους παράγοντες, όπως οι διαθέσιμες τεχνολογίες και ο εξοπλισμός, το κόστος, η ταχύτητα, οι δυνατότητες κατασκευής (π.χ., το επιθυμητό χαρακτηριστικό μέγεθος και το προφίλ) και η προτίμηση στο υλικό του υποστρώματος.

Μετά την κατασκευή των μικροκαναλιών σε ένα υπόστρωμα, πρέπει να κολληθεί στο υπόστρωμα που εμπεριέχει τα μικροκανάλια ένα πλακίδιο-κάλυμμα ώστε να σχηματιστεί ένα κλειστό δίκτυο από μικροκανάλια. Στις διάφορες μεθόδους που έχουν εφαρμοστεί για την συγκόλληση πλαστικών στις μικρορευστονικές διατάξεις ανήκουν, η θερμική συγκόλληση, [8] η συγκόλληση μέσω χρήσης πιεζοευαίσθητων ταινιών ελασματοποίησης (lamination), [9-10] η συγκόλληση μέσω χρήσης συγκολλητικών ουσιών, διαλυτών [11] και επιφανειακών τροποποιήσεων [12].

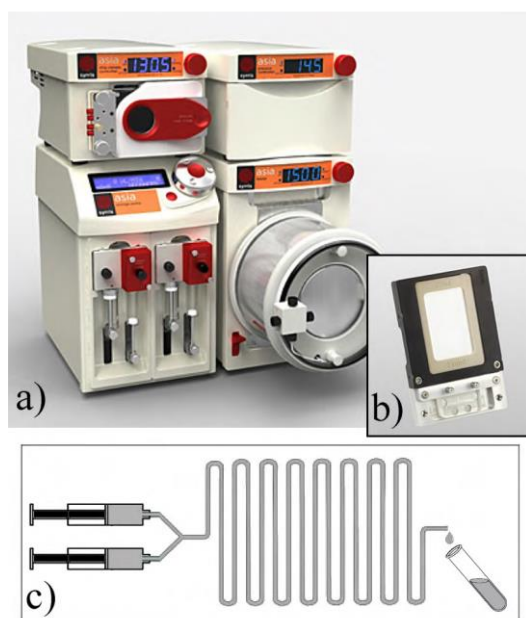
Στα πλαίσια της παρούσας εργασίας, όσον αφορά τη μικρορευστονική διάταξη που θα παρουσιαστεί, η μέθοδος που εφαρμόστηκε για την κατασκευή της διάταξης ήταν η τεχνική CNC (Computer Numerical Control) micro-milling, η οποία αποτελεί μία απλή και ευέλικτη μικρο-μηχανική μέθοδο αφαίρεσης υλικού από το υπόστρωμα, με τη χρήση περιστροφικού κόπτη, ενώ για τη σφράγιση της διάταξης ακολουθήθηκε η προσέγγιση των πιεζοευαίσθητων ταινιών ελασματοποίησης, ώστε να μην υπάρχει πιθανότητα αλλοίωσης του σχήματος των καναλιών αλλά και καθώς πρόκειται για μια γρήγορη και φτηνή μέθοδο.

1.3.1. Μικρο – αντιδραστήρες

Ο μικρο – αντιδραστήρας αποτελεί μία μικρο-ρευστονική διάταξη, μέσα στην οποία λαμβάνουν χώρα χημικές αντιδράσεις. Μπορεί να περιγραφεί ως μία συσκευή με στενά κανάλια (με τυπική εσωτερική διάμετρο <1 mm), κατασκευασμένη από σταθερά και αδρανή υλικά (πχ. γυαλί, πυρίτιο, ανοξείδωτο ατσάλι, κεραμικά ή πολυμερή) και εξοπλισμένη με ένα ρυθμιζόμενο αντλητικό σύστημα, δύο ή τρεις «δεξαμενές» αντιδρώντων και ένα σύστημα για την επιλεκτική συλλογή των προϊόντων της αντίδρασης [13-14].

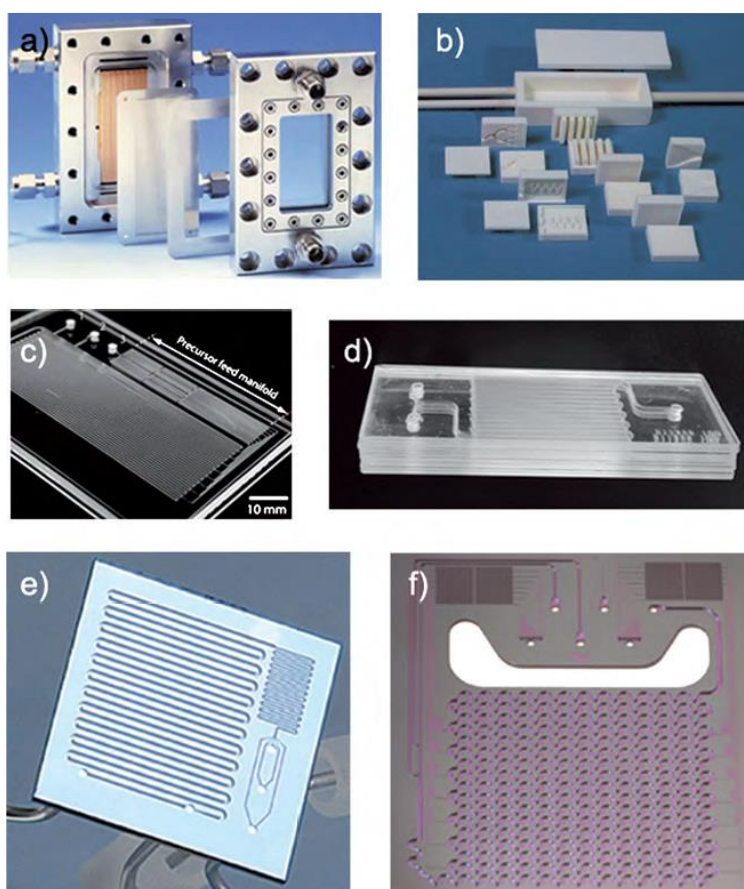
Στους μικρο – αντιδραστήρες, οι διαστάσεις στη μικροκλίμακα, σε συνδυασμό με τον υψηλό λόγο επιφάνειας/όγκο, επιτρέπουν την ταχεία μεταφορά θερμότητας και μάζας, οδηγώντας σε υψηλότερο ρυθμό και απόδοση αντίδρασης σε σχέση με τους συμβατικούς αντιδραστήρες. Επιπλέον, η χαμηλότερη κατανάλωση ενέργειας και ο ευκολότερος διαχωρισμός των προϊόντων, επιτρέπουν σε τέτοια συστήματα να εμφανίζουν μικρότερες περιβαλλοντικές επιπτώσεις, σε σύγκριση με τους συμβατικούς αντιδραστήρες στη μακρο – κλίμακα. Οι μικρο – αντιδραστήρες προσφέρουν μοναδικές δυνατότητες, στο σχεδιασμό καινοτόμων βιομηχανικών διεργασιών, σε συνθήκες που δεν είναι εφαρμόσιμες στην μακρο – κλίμακα, και λόγω της εύκολης μεταφοράς τους σε μέρη όπου είναι διαθέσιμα τα αντιδρώντα συστατικά και/ή απαιτούνται τα προϊόντα της αντίδρασης (on site) [15].

Οι μικρο – αντιδραστήρες που έχουν αναπτυχθεί μέχρι τώρα, μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε δύο τύπους: τους μικρο – αντιδραστήρες πάνω σε ψηφίδα, και τις μικρο – τριχοειδείς συσκευές. Η πρώτη κατηγορία, παρέχει πολλά πλεονεκτήματα, όπως τον εύκολο έλεγχο της μικροροής και την ενσωμάτωση πολλών διεργασιών σε μία συσκευή αντίδρασης, και βρίσκει εφαρμογή κυρίως στην ανάπτυξη συσκευών για βιοαναλυτικούς σκοπούς. Στην εικόνα 1.2., απεικονίζεται το βασικό σχήμα ενός απλού μικρο – αντιδραστήρα και η εξωτερική πλευρά του αντίστοιχου τυπικού εμπορικού συστήματος:



Εικόνα 1.2: Απεικόνιση εμπορικού μικρο-αντιδραστήρα: α) η εξωτερική όψη του συστήματος (Asia120 system by Syrris), β) μεγεθυμένη εικόνα του μικρο-αντιδραστήρα από γυαλί, γ) Δομή μικρο-αντιδραστήρα με δύο εισόδους.

Σε γενικές γραμμές, η επιλογή του υλικού κατασκευής ενός μικρο – αντιδραστήρα, εξαρτάται από τις συνθήκες λειτουργίας του μικροαντιδραστήρα ^[16-17]. Για παράδειγμα, στην περίπτωση που το αντιδρών μείγμα είναι υγρό κάτω από τους 200°C, μπορεί να χρησιμοποιηθεί γυάλινος μικροαντιδραστήρας, ενώ εάν η αντίδραση λαμβάνει χώρα σε συνθήκες υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης, απαιτούνται αντιδραστήρες κατασκευασμένοι από πυρίτιο και ατσάλι, ενώ σε ακόμα υψηλότερες θερμοκρασίες, θα πρέπει να χρησιμοποιηθεί κεραμικός αντιδραστήρας ^[17]. Για το σκοπό αυτό, αποτελεσματική επιλογή αποτελούν επίσης και τα λειτουργικώς τροποποιημένα πολυμερή ^[18]. Στην παρακάτω εικόνα, παρουσιάζονται κάποια παραδείγματα μικροαντιδραστήρων κατασκευασμένων από διαφορετικά υλικά. ^[19]



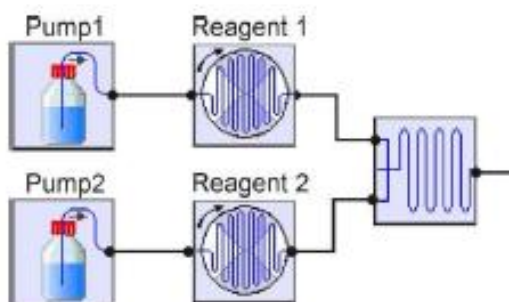
Εικόνα 1.3: Παραδείγματα μικρο – αντιδραστήρων κατασκευασμένων από διαφορετικά υλικά:
a) μέταλλο b) κεραμικός c) PDMS d) γυαλί και e), f) πυρίτιο.

Βασικά χαρακτηριστικά μεγέθη ενός μικροαντιδραστήρα αποτελούν η ροή, ο χρόνος παραμονής, ο όγκος του αντιδραστήρα και ρυθμός παραγωγής. Ο χρόνος παραμονής των

αντιδρώντων σε έναν μικροαντιδραστήρα, προκύπτει από τον όγκο του αντιδραστήρα και το ρυθμό ροής μέσω της σχέσης 1.1:

$$\text{Χρόνος παραμονής} = \frac{\text{Όγκος αντιδραστήρα}}{\text{Ρυθμός ροής}} \quad \text{Σχέση 1.1.}$$

Σύμφωνα με την παραπάνω σχέση, για να επιτύχουμε μεγαλύτερους χρόνους παραμονής, μπορούμε να μειώσουμε την ταχύτητα άντλησης, δηλαδή να μειώσουμε τη ροή ή/και να αυξήσουμε τον όγκο του μικροαντιδραστήρα. Συνεπώς, αν δύο αντιδρώντα συστατικά εισαχθούν σε ένα γυάλινο μικροαντιδραστήρα χωρητικότητας 1 ml, με ροή 0.25 mL/min το καθένα (εικόνα 1.4), τότε ο χρόνος παραμονής θα προκύψει με βάση τη συνδυασμένη ροή των αντιδρώντων (0.5ml/min) από τη σχέση 1.1. ίσως με 2min. Αν επιθυμούμε αύξηση του χρόνου παραμονής σε πχ. 8min, τότε οι επιλογές μας είναι, είτε να μειώσουμε τη ροή του κάθε αντιδρώντος σε 0,0625 ml/min το καθένα, είτε να αυξήσουμε τον όγκο του αντιδραστήρα σε 4 ml. [20]



Εικόνα 1.4: Ροή δύο αντιδρώντων συστατικών μέσα σε μικρο-αντιδραστήρα από γυαλί.

Οι μικρο – αντιδραστήρες έχουν την ικανότητα να λειτουργούν σε χρόνους αντίδρασης που κυμαίνονται από μερικά δευτερόλεπτα έως και μερικές ώρες. Για τον ίδιο χρόνο αντίδρασης, κανείς μπορεί να επιλέξει είτε μεγαλύτερο αντιδραστήρα (μεγαλύτερη ροή), είτε μικρότερο αντιδραστήρα (μικρότερη ροή). Η βασική διαφορά μεταξύ των δύο, έγκειται στο ότι με τη χρήση μεγαλύτερου αντιδραστήρα, θα παραχθεί περισσότερο προϊόν για δεδομένο χρόνο [20].

1.3.1.1. Ενζυματικοί μικρο-αντιδραστήρες

Λόγω του πλήθους πλεονεκτημάτων που εμφανίζουν οι μικρο-αντιδραστήρες, η χρήση τους στο πεδίο της βιοκατάλυσης αυξάνεται συνεχώς, βρίσκοντας εφαρμογή με επιτυχία στους τομείς της χημείας και της βιοχημείας. Η ακινητοποίηση των ενζύμων στην βιοκατάλυση, προσφέρει τη δυνατότητα για ενισχυμένο έλεγχο της αντίδρασης διαχωρίζοντας τον καταλύτη από τα αντιδρώντα και τα προϊόντα, εμποδίζει την μόλυνση των προϊόντων από το ένζυμο, καταπνίγει ανεπιθύμητες παράπλευρες αντιδράσεις και δίνει την δυνατότητα για επαναχρησιμοποίηση του καταλύτη. Από την άποψη της σμίκρυνσης ενός αντιδραστήρα, η μείωση των διαστάσεων είναι σημαντική καθώς βελτιώνει την κινητική απόδοση των ενζύμων, καθιστώντας αυτές τις συσκευές ιδιαίτερα ελκυστικές για αναλυτικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Οι ενζυματικοί μικρο – αντιδραστήρες, έχουν χρησιμοποιηθεί σε αναλυτικές εφαρμογές, ως ενσωματωμένα εξαρτήματα ολοκληρωμένων συστημάτων, γνωστά με τον όρο lab-on-a-chip (ολοκληρωμένα εργαστήρια σε ψηφίδα) ή μTAS (Ολοκληρωμένα Μικρο-Αναλυτικά Συστήματα) ^[21].

Οι αναλυτικές εφαρμογές των ενζυματικών μικρο – αντιδραστήρων, μπορούν να διαχωριστούν σε δύο κατηγορίες: α) στους μικρο – αντιδραστήρες που χρησιμοποιούν τη μέθοδο της βιοκατάλυσης για να μετατρέψουν έναν αναλύτη που είναι δύσκολο να μετρηθεί, σε μια μετρήσιμη μορφή και β) στους μικρο – αντιδραστήρες που εφαρμόζονται για την on-line παρακολούθηση των υποστρωμάτων και των ενζύμων και τη μελέτη της κινητικής τους ^[22]. Σημαντικό πλεονέκτημα, είναι η μείωση του χρόνου ανάμιξης, που μπορεί να επιτευχθεί με την ενσωμάτωση μικροαναμείκτη σε μικρορευστονικές συσκευές, επιτρέποντας τη μελέτη εξαιρετικά γρήγορων αντιδράσεων για χημική σύνθεση.

Ένα από τα πλεονεκτήματα των μικρο – αντιδραστήρων, είναι το ελάχιστο ποσό καταλύτη που απαιτείται για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση. Ο παράγοντας αυτός είναι ιδιαίτερα σημαντικός στην περίπτωση που χρησιμοποιείται το ένζυμο ως καταλύτης. Συνεπώς, η δυνατότητα να προκύπτουν εξαιρετικά αποτελέσματα, χρησιμοποιώντας μικρή ποσότητα ενζύμου, είναι ένας από τους λόγους στους οποίους οφείλεται το αυξανόμενο ενδιαφέρον στους βιο – μικρο – αντιδραστήρες ^[19]. Σύμφωνα με την κατηγοριοποίηση των M. Miyazaki and H. Maeda ^[23], οι βιο – μικρο – αντιδραστήρες, μπορούν να χωριστούν σε δύο βασικές ομάδες: η πρώτη ομάδα περιλαμβάνει τους μικροαντιδραστήρες συνεχούς ροής που διαθέτουν το ένζυμο μέσα σε διάλυμα, και η δεύτερη αφορά όλα τα συστήματα που διαθέτουν το ένζυμο ακινητοποιημένο σε μικροαντιδραστήρα. Οι περισσότεροι μικρο – αντιδραστήρες, διαθέτουν το ένζυμο ακινητοποιημένο πάνω σε σφαιρίδια (beads) ή στα τοιχώματα των

μικρορευστονικών καναλιών, ενώ συνηθέστερα ακινητοποιημένα ένζυμα είναι η οξειδάση της γλυκόζης, η υπεροξειδάση του χρένου και η αλκαλική φωσφατάση [22]. Στο πλαίσιο της παρούσας εργασίας, θα μελετήσουμε την κατασκευή μικρο – αντιδραστήρα πάνω σε ψηφίδα PMMA, με ακινητοποιημένο το ένζυμο υπεροξειδάση του χρένου (HRP) στα τοιχώματα των μικρορευστονικών καναλιών, με στόχο την βιοκαταλυτική οξείδωση φαινολών.

1.4. Στόχοι της μεταπτυχιακής εργασίας

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία έχει ως κύριο στόχο την μελέτη και την αξιολόγηση της επιφανειακής κατεργασίας πολυμερικών επιφανειών με πλάσμα, για την αξιοποίησή τους ως υποστρώματα κατάλληλα για την ακινητοποίηση ενζύμων. Σκοπός είναι να προσδιοριστούν οι βέλτιστες συνθήκες ακινητοποίησης τόσο σε επίπεδο κατεργασίας του υποστρώματος (χρόνος κατεργασίας με πλάσμα O₂), όσο και σε επίπεδο προσρόφησης του ενζύμου, υπεροξειδάση του χρένου (συγκέντρωση, χρόνος επώασης, μέθοδος ακινητοποίησης). Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την παραπάνω μελέτη έρχονται να αξιοποιηθούν σε επόμενο στάδιο, με την κατασκευή ενός ενζυματικού μικρο – αντιδραστήρα, που αποτελεί και τον δευτερεύοντα στόχο της εργασίας. Στο στάδιο αυτό, σκοπός είναι να γίνει μια επίδειξη των δυνατοτήτων που προσφέρει η κατεργασμένη πολυμερική επιφάνεια με πλάσμα O₂ με ακινητοποιημένη υπεροξειδάση, στην λειτουργία ενζυματικού μικρο – αντιδραστήρα σε ψηφίδα PMMA, ο οποίος θα εφαρμοστεί για τη βιοκαταλυτική οξείδωση φαινολών. Για την επίδειξη αυτή, παρουσιάζονται τα αποτελέσματα που αφορούν το ποσοστό μετατροπής των φαινολών μετά από μια προκαταρκτική μελέτη συνθηκών ροής στον μικρο – αντιδραστήρα και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται σε σύγκριση με το αντίστοιχο ακατέργαστο υπόστρωμα.

2. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΕΠΙΣΚΟΠΗΣΗ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

Σε αυτό το κεφάλαιο πραγματοποιείται βιβλιογραφική επισκόπηση των επιμέρους περιοχών τεχνολογικού ενδιαφέροντος που θα παρουσιαστούν στην μεταπτυχιακή εργασία. Αρχικά, παρουσιάζονται οι εφαρμογές της εγχάραξης σε πλάσμα οξυγόνου πάνω σε πολυμερικές επιφάνειες. Ακολουθεί βιβλιογραφική έρευνα πάνω στις μεθόδους ακινητοποίησης των ενζύμων και στις εφαρμογές τους, δίνοντας έμφαση στην χρήση νανο – δομημένων υποστρωμάτων ως φορείς ακινητοποίησης ενζύμων. Στη συνέχεια, διερευνάται η εφαρμογή ακινητοποιημένων ενζύμων στην βιοκατάλυση, στο πλαίσιο κατασκευής ενζυματικών μικρο – αντιδραστήρων. Τέλος, γίνεται αναφορά στις υπεροξειδάσες και διερευνάται σε βάθος η υπεροξειδάση του χρένου (HRP) που αποτελεί και το ένζυμο ενδιαφέροντος της παρούσας εργασίας. Πιο αναλυτικά, παρουσιάζονται βασικές εφαρμογές του συγκεκριμένου ενζύμου και μελετάται τόσο η δομή, όσο και ο καταλυτικός μηχανισμός δράσης του.

2.1. Νανο-δόμηση Πολυμερικών Επιφανειών με το Πλάσμα

Η κατεργασία των πολυμερικών υποστρωμάτων με πλάσμα είναι μια καθιερωμένη τεχνική για πολλές εφαρμογές, λόγω της μοναδικής δυνατότητάς της να τροποποιεί τις πολυμερικές επιφάνειες χωρίς να επηρεάζει τις ιδιότητες του όγκου. Οι διαδοσόμενες εφαρμογές της επεξεργασίας με πλάσμα στηρίζονται στα ανταγωνιστικά πλεονεκτήματα που διαθέτει, όπως είναι ο ξηρός χαρακτήρας, η επεξεργασία με χαμηλή θερμοκρασία και κυρίως η ευελιξία στην εναλλαγή της διαδικασίας από εναπόθεση σε εγχάραξη, νανο-ύφανση και χημική τροποποίηση, αλλάζοντας τη χημεία της αέριας φάσης και την ενέργεια βομβαρδισμού των ιόντων. Η κατεργασία με πλάσμα έχει χρησιμοποιηθεί για την χημική τροποποίηση πολυμερικών επιφανειών ως το πρώτο βήμα πριν την ακινητοποίηση βιομορίων, καθώς είναι μια μέθοδος που παρέχει υψηλή ταχύτητα και στοχευμένη χημεία. Στις περισσότερες περιπτώσεις, το πλάσμα χρησιμοποιείται για τη δημιουργία λειτουργικών ομάδων (όπως NH_x, SO_x, C=O, COOH, OH) εφαρμόζοντας κατάλληλα αέρια μείγματα, τα οποία είτε εγχάρασσουν το υπόστρωμα, είτε εναποθέτουν υλικό πάνω σε αυτό. Ακολουθώς οι δημιουργούμενες

λειτουργικές ομάδες χρησιμοποιούνται για την πρόσδεση βιομορίων μέσω κατάλληλης χημείας. Κατεργασμένες με πλάσμα πολυμερικές επιφάνειες, όπως το πολυαιθυλένιο (PE), έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς ως υποστρώματα για την ακινητοποίηση ενζύμων, όπως η υπεροξειδάση του χρένου (HRP), υποδεικνύοντας την γενικότερη χρήση της συγκεκριμένης τεχνικής για την ακινητοποίηση διαφόρων τύπων βιομορίων, συμπεριλαμβανομένου των ενζύμων ^[24]. Επίσης, η τροποποίηση πολυμερικών επιφανειών, όπως το PMMA, με χημεία πλάσματος, έχει χρησιμοποιηθεί για την δημιουργία υποστρωμάτων που διαθέτουν χημική λειτουργικότητα, σταθερή στο χρόνο, και μικρο- / νανο- τοπογραφία με μεγάλη ενεργή επιφάνεια, πάνω στα οποία μπορούν να συνδεθούν με ομοιοπολικό τρόπο βιομόρια, όπως οι πρωτεΐνες και τα αντισώματα ^[25].

2.2. Τεχνολογία ακινητοποίησης ενζύμων

Ο όρος «ακινητοποίηση των ενζύμων», υιοθετήθηκε το 1971 στο πρώτο «Συνέδριο Μηχανικής Ενζύμων» και αναφέρεται στον περιορισμό του ενζύμου σε κάποια φάση (matrix/support) διαφορετική από αυτή του υποστρώματος και των προϊόντων ^[26]. Τα ακινητοποιημένα ένζυμα, χρησιμοποιούνται ήδη από το 1916, όταν οι Nelson και Griffin ανακάλυψαν πως η ινβερτάση, προσροφημένη σε ξυλάνθρακα, έχει την ικανότητα να υδρολύει την σουκρόζη ^[27]. Η ικανότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων να επαναχρησιμοποιούνται καθώς και η σταθερότητα που τα διακρίνει, αναγνωρίστηκαν πρώτα από τους Grubhofer και Schelth, οι οποίοι μελέτησαν την ομοιοπολική σύνδεση διαφόρων ενζύμων ^[28]. Με την ακινητοποίηση του ενζύμου σε κάποιο υπόστρωμα, δίνεται η δυνατότητα να πραγματοποιηθούν επαναληπτικές μελέτες, μειώνοντας έτσι το κόστος της μελέτης ^[29].

Συνήθως, ως φορείς – επιφάνειες για την ακινητοποίηση των ενζύμων, χρησιμοποιούνται αδρανή πολυμερή και ανόργανα υλικά. Στα συνθετικά πολυμερή που έχουν χρησιμοποιηθεί ως επιφάνειες ακινητοποίησης, ανήκει το πολυστυρένιο (PS), το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί σε μορφή φιλμ και σε μορφή μη πορωδών σφαιριδίων στη μικροκλίμακα, αλλά και ο πολυ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας) (PMMA), υπό τη μορφή μικροσφαιριδίων, νανοσωματιδίων, νανοϊνών και μικροκαναλιών ^[30].

Προκειμένου μια επιφάνεια να θεωρείται ιδανική, θα πρέπει εκτός από τον χαμηλό παράγοντα κόστους, να διαθέτει χαρακτηριστικά όπως, αδράνεια, φυσική αντοχή, σταθερότητα και αναπαραξιμότητα. Επίσης, είναι σημαντικό να ενισχύει την αύξηση της εξειδίκευσης/δραστικότητας του ενζύμου και να μειώνει αντίστοιχα την μη εξειδικευμένη προσρόφηση του ενζύμου καθώς και τις μικροβιακές μολύνσεις ^[31]. Η ακινητοποίηση των

ενζύμων, όταν εφαρμοστεί, οδηγεί σε συνεχείς, αυτοματοποιημένες και οικονομικές διαδικασίες και στην ανάκτηση προϊόντων με υψηλή καθαρότητα ^[32]. Για την ακινητοποίηση των ενζύμων έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές, όπως θα αναλυθούν στην πορεία, ενώ επίσης έχει μελετηθεί μια ποικιλία παραγόντων που επηρεάζουν την απόδοση των ακινητοποιημένων ενζύμων (πίνακας 2.1).

Παράγοντες	Επίδραση στην ακινητοποίηση των ενζύμων
Μικρο – περιβάλλον του φορέα – επιφάνεια	Σταθεροποίηση του ενζύμου σε υδροφιλικό περιβάλλον
Πολλαπλά σημεία προσάρτησης στον φορέα - επιφάνεια	Ενίσχυση της θερμικής σταθερότητας του ενζύμου
Περιορισμοί στη διάχυση	Μείωση της δραστηριότητας & αύξηση της σταθερότητας του ενζύμου
Μέθοδος ακινητοποίησης του ενζύμου	Επίδραση στη δραστηριότητα & σταθερότητα του ενζύμου
Φυσική δομή του φορέα – επιφάνειας, πχ. πορώδες	Οι πόροι μεγαλύτερης διαμέτρου μειώνουν τον περιορισμό στη διάχυση, αυξάνοντας τη διατήρηση δραστηριότητας του ενζύμου
Φυσικές κατεργασίες μετά την ακινητοποίηση	Βελτίωση στην απόδοση του ενζύμου

Πίνακας 2.1: Παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση του ακινητοποιημένου ενζύμου ^[33].

2.2.1. Μέθοδοι ακινητοποίησης ενζύμων

2.2.1.1. Προσρόφιση

Πρόκειται για την πιο απλή μέθοδο παρασκευής ακινητοποιημένων ενζύμων. Η μέθοδος αυτή, που αποτελεί την παλαιότερη μέθοδο ακινητοποίησης ενζύμων, είναι μια αναστρέψιμη μέθοδος, οικονομική και εύκολη στη χρήση ^[34]. Το μειονέκτημα της, έγκειται στην ασθενή σύνδεση που αναπτύσσεται μεταξύ του φορέα και του ενζύμου ^[35]. Η αλληλεπίδραση μεταξύ του ενζύμου και της επιφάνειας του υποστρώματος, πραγματοποιείται μέσω ασθενών δυνάμεων, όπως είναι οι δεσμοί υδρογόνου, οι υδροφοβικοί δεσμοί, οι ιονικοί

δεσμοί, οι δυνάμεις van der waals και η γέφυρα άλατος (salt bridge), η οποία αποτελεί συνδυασμό δεσμών υδρογόνου και ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων. Ανάλογα με τα φορτία του υποστρώματος και την διάταξη των πρωτεϊνών, σχηματίζεται το ισχυρά δεσμευμένο ένζυμο χωρίς να υποστεί αλλοίωση ^[36]. Σημαντικό πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου, αποτελεί το γεγονός ότι τα βήματα ενεργοποίησης που απαιτούνται είναι τα ελάχιστα δυνατά, με αποτέλεσμα έτσι να ελαχιστοποιείται και η χρήση αντιδραστηρίων.

Στα διάφορα υλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί ως υποστρώματα για την προσρόφηση ενζύμων, περιλαμβάνονται, ο ενεργοποιημένος ξυλάνθρακας, το οξείδιο του αργιλίου (αλουμίνα) και οι ιονοανταλλακτικές ρητίνες ^[29]. Οι ερευνητές έχουν επίσης χρησιμοποιήσει φιλικά προς το περιβάλλον υποστρώματα, όπως ίνες καρύδας, που διαθέτουν καλή χωρητικότητα ως προς τη συγκράτηση του νερού και υψηλή ικανότητα ανταλλαγής κατιόντων, καολίνη, με υψηλή ικανότητα διατήρησης ενζύμου μέσω χημικής ακετυλίωσης και μικρο/μεσο-πορώδη υλικά που διαθέτουν μεγάλη ενεργή επιφάνεια λειτουργικοποιημένη με θειόλες, ιδανική για τις αντιδράσεις αναγωγής και οξείδωσης ^[37-41]. Επίσης ως υποστρώματα, έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σιλανοποιημένα μοριακά φίλτρα, τα οποία λόγω της παρουσίας των σιλανολών στα πορώδη τοιχώματα, διευκολύνουν την ακινητοποίηση του ενζύμου μέσω δεσμών υδρογόνου ^[42].

2.2.1.2. Ομοιοπολική σύνδεση

Η ομοιοπολική σύνδεση είναι μια συμβατική μέθοδος ακινητοποίησης των ενζύμων, η οποία μπορεί να επιτευχθεί μέσω απευθείας σύνδεσης του ενζύμου με το υπόστρωμα μέσω ομοιοπολικών δεσμών ^[43]. Ο ομοιοπολικός δεσμός είναι ισχυρός και σταθερός και στα υλικά που έχουν χρησιμοποιηθεί ως υποστρώματα για την παρούσα μέθοδο ακινητοποίησης, περιλαμβάνονται το πολυακρυλαμίδιο, το πορώδες γυαλί, η αγαρόζη και το πορώδες πυρίτιο ^[44]. Η ακινητοποίηση με ομοιοπολική σύνδεση χρησιμοποιείται κυρίως όταν απαιτείται η μη παρουσία ενζύμου στο προϊόν μιας αντίδρασης. Η ομοιοπολική σύνδεση του ενζύμου με το υπόστρωμα, περιλαμβάνει δύο βασικά βήματα. Το πρώτο βήμα, αφορά την τροποποίηση της επιφάνειας του πολυμερούς με την προσθήκη κατάλληλων δραστικών ομάδων και το δεύτερο βήμα την ενεργοποίηση της επιφάνειας του πολυμερούς ^[29]. Η τροποποίηση της επιφάνειας οδηγεί στη δημιουργία ηλεκτρονιόφιλων ομάδων στην επιφάνεια του πολυμερούς, οι οποίες στη συνέχεια ενεργοποιούνται ώστε να αντιδράσουν με τις ισχυρές πυρηνόφιλες ομάδες των πρωτεϊνών ^[45].

Η ομοιοπολική σύνδεση των ενζύμων με την επιφάνεια, οφείλεται στα αμινοξέα της πλευρικής αλυσίδας των ενζύμων, όπως η αργινίνη (arginine) και η ιστοιδίνη (histidine) ενώ ο βαθμός δραστηριότητας, εξαρτάται από διάφορες λειτουργικές ομάδες, όπως είναι η ιμιδαζόλη, η ινδόλη, οι φαινολικές και οι υδροξυλικές ομάδες [31-32]. Οι τροποποιημένες με πεπτίδια επιφάνειες έχει βρεθεί ότι εμφανίζουν μεγαλύτερη εξειδικευμένη δραστηριότητα και σταθερότητα με ελεγχόμενο προσανατολισμό των πρωτεϊνών [46]. Σύμφωνα με μελέτες, έχει βρεθεί ότι το βρωμιούχο κυάνιο αγαρόζης και η ενεργοποιημένη με βρωμιούχο κυάνιο σεφαρόζη, που περιέχουν τμήματα υδατανθράκων και γλουταραλδεΐδη ως παράγοντα επιμήκυνσης της αλυσίδας (spacer arm), εισάγουν θερμική σταθερότητα στα συνδεδεμένα ένζυμα [47-48]. Επίσης, έχει παρατηρηθεί αύξηση του χρόνου ημιζωής και της θερμικής σταθερότητας των ενζύμων μέσω της ομοιοπολικής τους σύνδεσης με διάφορες επιφάνειες, όπως είναι το μεσοπορώδες οξείδιο του πυριτίου, η χιτοζάνη, κ.α. [47], [49]. Η σύνδεση των ενζύμων σε νανοϊνες που έχουν παραχθεί με ηλεκτροστατική διαδικασία, έχει δείξει μεγαλύτερη εναπομείνασα δραστηριότητα λόγω της αυξημένης ενεργούς επιφάνειας και του πορώδους. Η χρήση τέτοιων νανοδομημένων υποστρωμάτων αποτελεί σημείο καμπής στον τομέα ακινητοποίησης βιοκαταλυτών [50-54]. Χαρακτηριστικά αναφέρουμε την ομοιοπολική σύνδεση της αλκοολικής αφυδρογονάσης σε νανοϊνες ατταπουλγκίτη (ένυδρο πυριτικό μαγνήσιο), η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένη θερμική αντοχή [55]. Αξίζει να σημειωθεί, ότι οι διαφορετικοί προσανατολισμοί ακινητοποιημένου ενζύμου σε μαγνητικές νανοσυστάδες, που προέκυψαν μετά από ομοιοπολική σύνδεση, έχουν ήδη βρει εφαρμογή στις φαρμακευτικές βιομηχανίες λόγω της ενισχυμένης διάρκειας ζωής, της λειτουργικής σταθερότητας και της ικανότητας επαναχρησιμοποίησής τους [56]. Η διατήρηση της δομικής και λειτουργικής ιδιότητας των ενζύμων κατά την ακινητοποίηση, είναι ένας από τους βασικούς ρόλους που διαδραματίζει ένας παράγοντας χημικής σύνδεσης (cross-linking agent). Ένας τέτοιος παράγοντας, είναι η γλουταραλδεΐδη, η οποία χρησιμοποιείται ευρέως ως διδραστικός παράγοντας διασύνδεσης, καθώς είναι διαλυτή σε υδατικούς διαλύτες και μπορεί να σχηματίσει σταθερούς ομοιοπολικούς δεσμούς τόσο στο εσωτερικό των υπομονάδων όσο και μεταξύ τους.

2.2.1.3 Εγκλεισμός – παγίδευση

Κατά την μέθοδο της παγίδευσης, τα ένζυμα περιφράσσονται μέσα σε συνθετικά ή φυσικά πολυμερικά δίκτυα, δηλαδή μια διαπερατή μεμβράνη που επιτρέπει τη διέλευση των προϊόντων αλλά συγκρατεί το ένζυμο μέσα στο πολυμερικό πλέγμα. Η παγίδευση του ενζύμου

μπορεί να επιτευχθεί είτε μέσα σε γέλη ή ίνες μέσω ομοιοπολικής ή μη –ομοιοπολικής σύνδεσης^[31], είτε μέσω μικροενθυλάκωσης. Το πλεονέκτημα της ακινητοποίησης του ενζύμου μέσω παγίδευσης είναι οι γρήγορες, οικονομικές και ήπιες συνθήκες που απαιτούνται για τις διεργασίες αντίδρασης, ενώ μειονέκτημα αποτελεί ο περιορισμός που εμφανίζει στην μεταφορά μάζας. Με την μέθοδο της μικροενθυλάκωσης, τα μόρια του ενζύμου ενθυλακώνονται μέσα σε σφαιρικές ημιπερατές μεμβράνες με επιλεκτική και ελεγχόμενη διαπερατότητα^[57]. Η μέθοδος αυτή, παρέχει μεν μεγάλη ενεργή επιφάνεια μεταξύ του πολυμερικού υλικού και του ενζύμου, αλλά κατά την ενθυλάκωση το ένζυμο υφίσταται μερική απενεργοποίηση και αυτό αποτελεί το βασικό μειονέκτημα της μεθόδου^[58].

Αποτελεσματική ενθυλάκωση έχει επιτευχθεί με τη χρήση υβριδικών υποστρωμάτων άλατος αλγινικού οξέως - ζελατίνης – ασβεστίου, τα οποία παρεμπόδισαν τη διαρροή του ενζύμου και παρείχαν αυξημένη μηχανική σταθερότητα^[59]. Ο εγκλεισμός των ενζύμων σε νανοδομημένα υποστρώματα, όπως οι νανοϊνες, έφερε επανάσταση στον τομέα ακινητοποίησης των ενζύμων λόγω των ευρέων εφαρμογών τους σε τομείς όπως η χημεία, η βιοϊατρική, οι βιοαισθητήρες και τα βιοκάυσιμα^{[51], [60-62]}. Ο εγκλεισμός της λιπάσης του μύκητα *Candida rugose* σε χιτοζάνη, έχει παρατηρηθεί ότι παρεμποδίζει την διαρροή του ενζύμου και αυξάνει την αποδοτικότητα και την δραστικότητα αυτού μέσω της ενθυλάκωσης. Το συγκεκριμένο υπόστρωμα, έχει επίσης χαρακτηριστεί ως μη τοξικό, βιοσυμβατό και δεκτικό σε χημικές τροποποιήσεις ενώ, λόγω της υδροφιλικής φύσεως του, εμφανίζει υψηλή συγγένεια με τις πρωτεΐνες^[63].

2.2.1.4 Σύνδεση μέσω χημικής συγγένειας

Η σύνδεση μέσω χημικής συγγένειας είναι μια μέθοδος ακινητοποίησης, όπου το ένζυμο συνδέεται με το υπόστρωμα μέσω εξειδικευμένων αλληλεπιδράσεων. Η μέθοδος αυτή επιτυγχάνεται με δύο τρόπους: είτε γίνεται μια πρωταρχική σύζευξη του υποστρώματος με τον προσδέτη συγγένειας (affinity ligand) στον οποίο θα συζευχθεί ακολούθως το ένζυμο – στόχος, είτε πραγματοποιείται σύζευξη του ενζύμου με κάποιο άλλο μόριο, το οποίο με τη σειρά του αναπτύσσει συγγένεια ως προς το υπόστρωμα^[64].

Σύνθετα υποστρώματα χημικής συγγένειας, όπως πορώδη σφαιρίδια οξειδίου του πυριτίου επικαλυμμένα με χιτοζάνη και πολυστρωματική κονκαβαλίνη Α συνδεδεμένη με αγαρόζη, επιτρέπουν μεγαλύτερη ποσότητα ενζύμων, οδηγώντας σε αυξημένη σταθερότητα και αποδοτικότητα^[65-66]. Η μέθοδος «βιοσυγγένειας σε στρώσεις» (bioaffinity layering) αποτελεί εξέλιξη της τεχνικής αυτής, που έχει βρεθεί ότι αυξάνει εκθετικά την ικανότητα

πρόσδεσης και επαναχρησιμοποίησης του ενζύμου λόγω της παρουσίας μη – ομοιοπολικών δυνάμεων, όπως δυνάμεις Coulomb, δεσμών υδρογόνου και δυνάμεις van der Waals forces [66-67].

2.2.1.4.1. Το σύστημα στρεπταβιδίνης – βιοτίνης

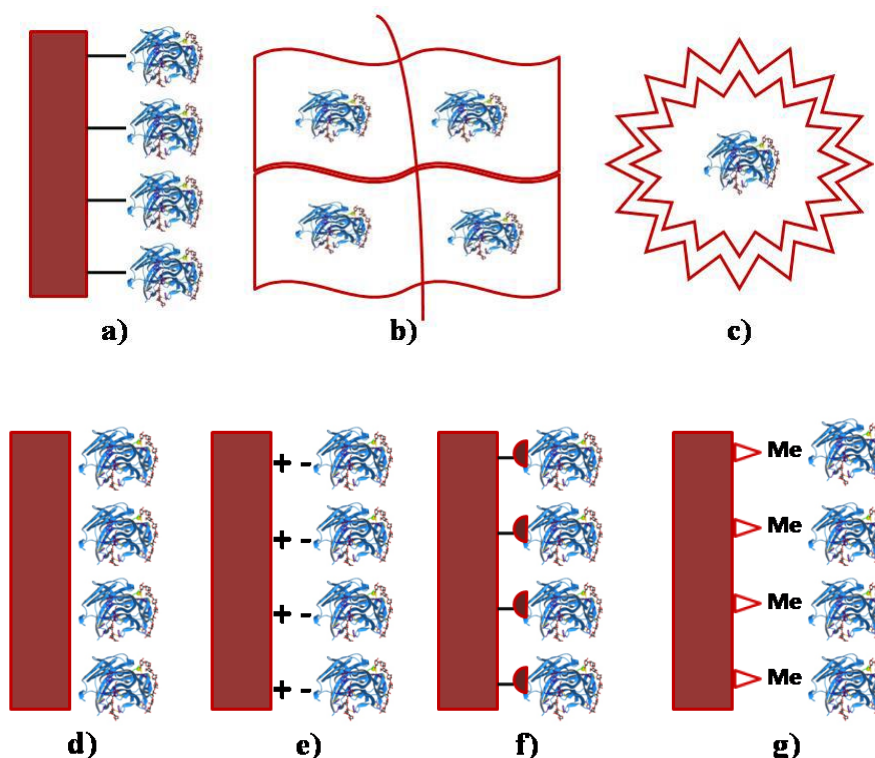
Μια ειδική υποκατηγορία της ακινητοποίησης του ενζύμου μέσω χημικής συγγένειας, αποτελεί το σύμπλοκο στρεπταβιδίνης – βιοτίνης, το οποίο με σταθερά αποσύνδεσης (K_d) της τάξης περίπου των $\sim 10^{-14}$ mol/L [68], αποτελεί μία από τις πιο ισχυρές μη – ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις που συναντάμε στη φύση. Η στρεπταβιδίνη είναι μία τετραμερής πρωτεΐνη, με μάζα 52.8 kDa, η οποία προέρχεται από τον στρεπτομύκητα *Streptomyces avidinii* και είναι γνωστή για την εξαιρετικά ισχυρή συγγένεια που εμφανίζει ως προς τη βιταμίνη βιοτίνη. Χρησιμοποιείται ευρέως στη μοριακή βιολογία και τη βιονανοτεχνολογία, καθώς το σύμπλοκο στρεπταβιδίνης – βιοτίνης, εμφανίζει ισχυρή αντίσταση σε οργανικούς διαλύτες και απορρυπαντικές ουσίες καθώς και σε ακραίες συνθήκες θερμοκρασίας και pH. Μεταξύ των πιο κοινών χρήσεων είναι ο καθαρισμός ή η ανίχνευση των διαφόρων βιομορίων. Ο ισχυρός δεσμός στρεπταβιδίνης – βιοτίνης μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να συνδέσει τα διάφορα βιομόρια μεταξύ τους ή επάνω σε κάποιο στερεό υπόστρωμα. Επίσης, η στρεπταβιδίνη βρίσκεται ευρεία εφαρμογή στη μέθοδο *Western blot* και σε ανοσολογικές δοκιμές, με την σύζευξή της σε κάποιο μόριο αναφοράς, όπως το ένζυμο υπεροξειδάση του χρένου. Στη βιοτεχνολογία, η βιοτίνη συνδέεται χημικά με κάποιο μόριο ή πρωτεΐνη, με τη διαδικασία της βιοτυνιλίωσης και βρίσκεται εφαρμογή σε βιοαναλυτικές μεθόδους. Λόγω της «προτίμησης» που εμφανίζει η βιοτίνη στη δέσμευση της βιοτίνης, το σύστημα στρεπταβιδίνης – βιοτίνης χρησιμοποιείται στις βιοαναλυτικές μεθόδους, είτε για την ακινητοποίηση είτε για την σήμανση των βιομορίων [69].

2.2.1.5 Ιοντικός δεσμός

Η παρούσα μέθοδος ακινητοποίησης βασίζεται στον ιοντικό δεσμό του ενζύμου με φορείς που περιέχουν ιοντοανταλλακτικές ομάδες. Οι συνηθέστεροι φορείς είναι ανιοντικοί και κατιοντικοί ανταλλάκτες, κυρίως οργανικής σύστασης. Με τη μέθοδο αυτή, η σύνδεση του ενζύμου με τον φορέα πραγματοποιείται με ευκολία και υπό ήπιες συνθήκες, με αποτέλεσμα να προκαλούνται ελάχιστες αλλαγές στην διαμόρφωση και το ενεργό κέντρο του ενζύμου, οδηγώντας έτσι στη δημιουργία ακινητοποιημένων ενζύμων με υψηλή δραστηριότητα στις περισσότερες περιπτώσεις [70]. Η φύση αυτής της μη-ομοιοπολικής μεθόδου είναι αναστρέψιμη με μεταβολή των συνθηκών θερμοκρασίας, της πολικότητας και της ιοντικής ισχύος [71].

2.2.1.6 Ακίνητοποίηση μέσω συνδεδεμένων μετάλλων

Η μέθοδος ακίνητοποίησης μέσω συνδεδεμένων μετάλλων χρησιμοποιεί κάποιο άλας μετάλλου για την σύνδεση του ενζύμου σε κάποιον φορέα – επιφάνεια. Συγκεκριμένα, τα άλατα των μετάλλων (πχ. FeCl_3 , SnCl_2 , TiCl_4) κατακρημνίζονται στην επιφάνεια του φορέα, κάτι που μπορεί να επιτευχθεί μέσω θέρμανσης. Τα ιόντα των μεταλλικών αλάτων που θα προκύψουν με τη μορφή ιζήματος στην επιφάνεια, χρησιμοποιούνται για τη σύνδεση μεταξύ του φορέα και του ενζύμου. Η μέθοδος αυτή είναι απλή και εμφανίζει σχετικά υψηλή δραστηριότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων (30-80%). Ο φορέας και το ένζυμο μπορούν να διαχωριστούν μεταξύ τους, μειώνοντας την τιμή του pH, οπότε πρόκειται για μια αναστρέψιμη διαδικασία, που επιτρέπει την αναγέννηση του ενζύμου ^[72].



Σχήμα 2.1: Αναπαράσταση διαφορετικών μεθόδων ακίνητοποίησης:

- a) ομοιοπολική σύνδεση b) εγκλεισμός – παγίδευση c) ενθυλάκωση d) φυσική προσρόφηση e) ιονικός δεσμός f) σύνδεση μέσω χημικής συγγένειας και g) ακίνητοποίηση μέσω συνδεδεμένων μετάλλων.^[29]

2.2.2. Προσρόφηση σε ενεργοποιημένες με το πλάσμα επιφάνειες

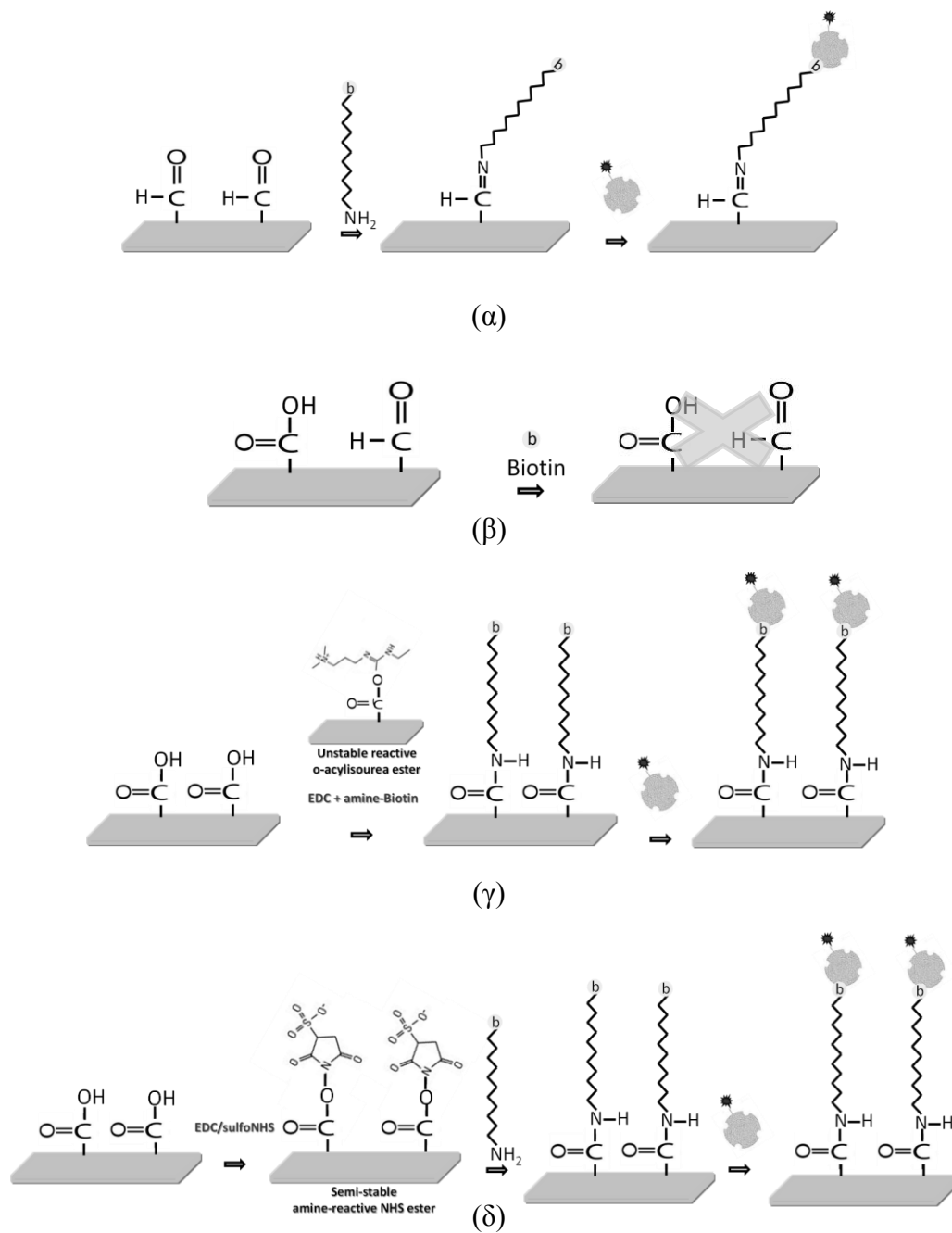
Η φυσική προσρόφηση για τα περισσότερα υποστρώματα οδηγεί σε απομάκρυνση των βιομορίων κατά τα διάφορα στάδια έκπλυσης και καταλήγει σε πλήρη απομάκρυνση τους, όταν στα στάδια έκπλυσης χρησιμοποιούνται διαλύματα που περιέχουν επιφανειοδραστικές ουσίες. Έτσι, για να παραμένουν τα βιομόρια στη θέση τους χρησιμοποιείται ομοιοπολική σύνδεση, η οποία απαιτεί υγρή χημεία ενεργοποίησης των επιφανειών και χρήση συνδετικών μορίων. Σύμφωνα με πρόσφατη μελέτη^[25] που πραγματοποιήθηκε μέσα από την «ομάδα πλάσματος» του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του Ε.Κ.Ε.Φ.Ε. «Δημόκριτος» περιγράφεται μια εφεύρεση που παρέχει απευθείας, ομοιοπολική ακινητοποίηση βιομορίων σε βελτιστοποιημένες επιφάνειες οργανικού πολυμερούς ή SiO₂ με επαγόμενη από πλάσμα, τυχαία υψηλής ενεργής επιφανείας τοπογραφία, επιθυμητή χημική δραστηριότητα (και ικανότητα διαβροχής), η οποία είναι σταθερή με την πάροδο του χρόνου. Σύμφωνα με την παρούσα εφεύρεση η νανοϋφανση θα πρέπει να είναι αρκετή για να αυξάνει τη ενεργή διαθέσιμη για τη σύνδεση βιομορίων επιφάνεια, σε σύγκριση με τη μη κατεργασμένη επιφάνεια, κατά ένα συντελεστή 1-10.

Οι φρέσκες κατεργασμένες με το πλάσμα επιφάνειες δεσμεύουν ομοιοπολικά, εξαιτίας της παρουσίας δραστικών ομάδων και κυρίως λόγω των ομάδων C = O και -COOH. Η κατεργασία των επιφανειών PMMA με πλάσμα O₂ δημιουργεί δραστικές ομάδες όπως C=O, -COOH, και C-OH, όπως έχει αποκαλυφθεί με ανάλυση XPS^[25]. Αποδείχθηκε ότι βιομόρια, όπως οι πρωτεΐνες και αντισώματα, συνδέονται ομοιοπολικά με τις νανοϋφασμένες επιφάνειες μέσω των δραστικών ομάδων που σχηματίζονται μετά το πλάσμα O₂. Αυτό αποδείχθηκε από την παρατήρηση των επιφανειών με φθορισμό μετά από επανειλημμένες εκπλύσεις με δωδεκυλοθειικό νάτριο (SDS) στους 90°C, ένα ισχυρό και επιθετικό πρωτόκολλο κατεργασίας με επιφανειοδραστικό σχεδιασμένο για να αφαιρεί όλα τα μη ομοιοπολικά συνδεδεμένα μόρια. Στα πλαίσια της μελέτης η παραμονή του φθορισμού μετά από ένα τέτοιο ισχυρό βήμα έκπλυσης ήταν η έμμεση απόδειξη της ομοιοπολικής σύνδεσης. Αντίθετα, στην περίπτωση των μη κατεργασμένων επιφανειών, η έκπλυση με SDS βρέθηκε ότι απομακρύνει όλα τα προσροφημένα βιομόρια.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η ικανότητα για ομοιοπολική ακινητοποίηση στις κατεργασμένες με πλάσμα επιφάνειες με σταθερή χημική δραστηριότητα, σε σύγκριση με τις μη κατεργασμένες επιφάνειες, στην μελέτη που περιγράφουμε, χρησιμοποιήθηκαν ειδικά βιομόρια, ονομαστικά παράγωγα βιοτίνης, όπως ένα υδατοδιαλυτό παράγωγο βιοτίνης με πολυαιθυλενογλυκόλη (PEG) ως πλευρική ομάδα που καταλήγει σε μια ελεύθερη αμινομάδα

(Amine-PEG₃-Biotin), μείγμα Amine-PEG₃-Biotin με EDC (1-αιθυλο-3(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)καρβοδιϊμίδιο) και σουλφο-NHS (N-υδροξυσουλφοηλεκτριμίδιο)/EDC, τα οποία σχηματίζουν ομοιοπολικούς δεσμούς με συνήθεις δραστικές ομάδες όπως οι ομάδες καρβοξυλίου (-COOH) ή οι αλδεϋδομάδες (C=O). Η απευθείας σύνδεση της Amine-PEG₃-Biotin στις κατεργασμένες επιφάνειες υποδήλωσε την ομοιοπολική σύνδεση μέσω των ομάδων αλδεϋδης, ενώ το EDC ενεργοποιεί τις ομάδες καρβοξυλίου από το νανοφασμένο υπόστρωμα για να συνδεθούν με την ομάδα -NH₂ της Amine-PEG₃-Biotin. Έτσι, η άμεση σύνδεση του μείγματος Amine-PEG₃-Biotin/EDC κατέδειξε επίσης την παρουσία δραστικών ομάδων καρβοξυλίου. Το μείγμα σουλφο-NHS/EDC ενεργοποιεί τις ομάδες καρβοξυλίου από το τροποποιημένο υπόστρωμα σχηματίζοντας μια ενδιάμεση ένωση O-ακυλο-ουρίας. Αυτό το ενδιάμεσο κατόπιν αντιδρά άμεσα με την ομάδα-NH₂ της Amine-PEG₃-Biotin, δίδοντας ένα σταθερό αμιδικό δεσμό. Οι νανοϋφασμένες με το πλάσμα επιφάνειες PMMA έδωσαν υψηλές τιμές φθορισμού, υποδεικνύοντας την αντίδραση καρβοξυλικών ομάδων με NHS/EDC ή/και Amine-PEG₃-Biotin ή των αλδεϋδομάδων με Amine-PEG₃-Biotin [Σχήμα 2.2. (α -δ)] ^[25]. Τα συνολικά αποτελέσματα της παραπάνω εργασίας υποδηλώνουν ότι οι χημικώς σταθεροποιημένες νανοϋφασμένες επιφάνειες PMMA μετά την κατεργασία με το πλάσμα οδηγούν στο σχηματισμό δραστικών και διαθέσιμων ομάδων καρβοξυλίου και αλδεϋδομάδων οι οποίες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ομοιοπολική ακινητοποίηση των βιομορίων.

Επισημαίνεται ότι, στα πλαίσια της παρούσας διπλωματικής εργασίας, ο όρος «προσρόφηση του ενζύμου στις νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA», θα χρησιμοποιείται για να περιγράψει την προσρόφηση του ενζύμου στις ενεργοποιημένες με πλάσμα επιφάνειες με τον τρόπο που περιγράφεται στο παρόν κεφάλαιο, δηλαδή η ακινητοποίηση του ενζύμου με προσρόφηση θα αποδίδεται εν μέρει σε ένα ποσοστό φυσικής προσρόφησης και εν μέρει στην ομοιοπολική σύνδεση του ενζύμου με τις λειτουργικές ομάδες που σχηματίζονται στην επιφάνεια PMMA μετά την κατεργασία με πλάσμα O₂.



Σχήμα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση διαδικασιών ομοιοπολικής σύνδεσης και ανίχνευσης παραγώγων βιοτίνης σε ενεργοποιημένες με πλάσμα επιφάνειες PMMA: (α) Απευθείας ακινητοποίηση *amine-PEG₃-biotin*, (β) Απευθείας επώαση με *D-biotin* (δεν λαμβάνει χώρα αντίδραση πρόσδεσης), (γ) Απευθείας ακινητοποίηση μείγματος *amine-PEG₃-biotin/EDC*, (δ) Ενεργοποίηση με μείγμα *sulfo-NHS/EDC* ακολουθούμενη από αντίδραση με *amine-PEG₃-biotin*.^[25]

2.2.3. Ιδιότητες ακινητοποιημένων ενζύμων

Η σταθερότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων εξαρτάται τόσο από τη θερμοκρασία όσο και από τον παράγοντα του χρόνου. Λόγω της ακινητοποίησης, οι ιδιότητες των ενζύμων, όπως η καταλυτική ικανότητα, υφίστανται μεταβολή ανάλογα με την επιφάνεια ακινητοποίησης. Η μεταβολή αυτή, οφείλεται στην αντίδραση μεταξύ ενζύμου και επιφάνειας που λαμβάνει χώρα στο μικρο-περιβάλλον, η οποία διαφέρει από την αντίστοιχη αντίδραση που πραγματοποιείται σε συνθήκες περιβάλλοντος μέσα στον όγκο του διαλύματος (bulk). Ένας άλλος παράγοντας, είναι ότι το ένζυμο μετά την ακινητοποίησή του στο υπόστρωμα, υφίσταται τροποποίηση στην τρισδιάστατη διαμόρφωσή του. Τέτοιες αλλαγές στην διαμόρφωση συμβάινουν σε μικρότερο βαθμό και λαμβάνουν χώρα σε συστήματα όπου το ένζυμο βρίσκεται υπό περιορισμό ^[73]. Η ακινητοποίηση των ενζύμων βελτιώνει την λειτουργική σταθερότητα, η οποία είναι αποτέλεσμα του αριθμού και του είδους των δεσμών που αναπτύσσονται μεταξύ του ενζύμου και του υποστρώματος. Όταν το ακινητοποιημένο ένζυμο δρα σε μακρομοριακά υποστρώματα, το ενεργό κέντρο των ενζύμων δεν γίνεται προσβάσιμο στα υποστρώματα, με αποτέλεσμα το ένζυμο να χάνει τη δραστηριότητά του ^[74].

2.2.4. Ακινητοποίηση ενζύμων σε τροποποιημένες με πλάσμα πολυμερικές επιφάνειες

Για την εισαγωγή λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια των πολυμερικών υλικών έχουν εφαρμοσθεί διάφορες τεχνικές με πλάσμα όπως: κατεργασία με πλάσμα με αδρανή και ενεργά αέρια, πολυμερισμός με πλάσμα και πολυμερισμός προκαλούμενος από πλάσμα. Με τις μεθόδους αυτές, έχουν ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια των πολυμερών μια ποικιλία ενζύμων, όπως η λιπάση ^[75], η υπεροξειδάση του χρένου ^[76-77], η α-χυμοτρυψίνη ^[78] και άλλα. Χαρακτηριστικά πολυμερή που έχουν χρησιμοποιηθεί ως υποστρώματα για την ακινητοποίηση ενζύμου, αποτελούν το πολυαιθυλένιο (PE) και το πολυ(διμεθυλο)σιλοξάνιο (PDMS). Την τροποποίηση PE με πλάσμα, ως υπόστρωμα για την ακινητοποίηση της υπεροξειδάσης του χρένου, παρουσίασε στην εργασία του ο Alvarez με την ομάδα του ^[76-77], οι οποίοι χρησιμοποίησαν πλάσμα Ar/DS για την εμφύτευση Si - (Cl)_x λειτουργικών ομάδων, στις οποίες συνδέθηκε ομοιοπολικά το ένζυμο HRP. Η ακινητοποίηση έγινε με επιτυχία και χρησιμοποιήθηκε περαιτέρω για τη σύνθεση της πολυανιλίνης παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου. Ο Kreider παρουσίασε στο άρθρο του μια νέα στρατηγική σύνδεσης του ενζύμου HRP σε επίστρωση πολυουρεθάνης (2C-PUR), τροποποιημένης με PDMS, όπου χρησιμοποίησε ατμοσφαιρικό πλάσμα για την μετατροπή των μεθυλο – ομάδων του PDMS

σε ενεργές ομάδες σιλανόλης. Η ακινητοποίηση του ενζύμου έγινε με σιλανοποίηση μέσω (3-αμινο-πρόπυλο)τρι-μεθοξυ-σιλανίου (APTMS) και χρησιμοποιώντας γλουταραλδεϋδη ως παράγοντα σταυροειδούς σύνδεσης^[79].

2.2.5. Εφαρμογές ακινητοποιημένων ενζύμων με έμφαση στη χρήση νανοδομημένων επιφανειών

Η ακινητοποίηση των ενζύμων, βρίσκει ευρεία εφαρμογή σε διάφορες βιομηχανίες, όπως στη βιομηχανία τροφίμων, στις φαρμακευτικές βιομηχανίες, στην επεξεργασία υγρών αποβλήτων, καθώς και στις βιομηχανίες παραγωγής υφασμάτων και απορρυπαντικών ουσιών. Επίσης, τα ακινητοποιημένα ένζυμα βρίσκουν εφαρμογή στην παραγωγή βιοντίζελ και στην ανάπτυξη διαφόρων τύπων βιοαισθητήρων. Στο κεφάλαιο αυτό, αναλύονται μερικά από τα πολλά πεδία εφαρμογών των ακινητοποιημένων ενζύμων και δίνεται έμφαση σε βιβλιογραφικές μελέτες που αφορούν εφαρμογές ενζύμων ακινητοποιημένων σε νανοδομημένες επιφάνειες.

2.2.5.1. Βιοαισθητήρες

Οι βιοκαταλύτες παίζουν κυρίαρχο ρόλο σε μια πληθώρα βιομηχανικών διαδικασιών. Συνεχείς προσπάθειες πραγματοποιούνται για αύξηση της δραστηριότητας και της αποδοτικότητας του ενζύμου, καθώς και για την ενίσχυση της σταθερότητας του κατά την εφαρμογή του σε βιομηχανικές διεργασίες^[80]. Μια σημαντική εφαρμογή των ακινητοποιημένων ενζύμων, περιλαμβάνει την ανάπτυξη βιοαισθητήρων, οι οποίοι αποτελούν χρήσιμο εργαλείο για την ανίχνευση βιομορίων, για κλινικές αναλύσεις και αναλύσεις τροφίμων καθώς και για περιβαλλοντικό έλεγχο. Η κατασκευή βιοαισθητήρων που βασίζονται σε ακινητοποιημένα ένζυμα, έδωσε λύσεις σε αρκετά προβλήματα, όπως το θέμα απώλειας του ενζύμου, τη διατήρηση της σταθερότητας του ενζύμου και το χρόνο ζωής των βιοαισθητήρων, ενώ παράλληλα βοήθησε στη μείωση του χρόνου ενζυματικής απόκρισης των βιοαισθητήρων και προσέφερε τη δυνατότητα ανάπτυξης αναλώσιμων συσκευών που μπορούν εύκολα να ενσωματωθούν τόσο σε στατικά όσο και σε δυναμικά συστήματα^[81].

Διάφορα νανοϋλικά έχουν χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων. Μια πολύ ενδιαφέρουσα μελέτη πάνω στη χρήση νανοσωματιδίων για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων, παρουσιάστηκε από τον Wang και την ομάδα του^[82], οι οποίοι κατασκεύασαν έναν καινοτόμο βιοαισθητήρα τρίτης γενιάς για την ανίχνευση της γλυκόζης, βασισμένο στη χρήση

νανοσωλήνων άνθρακα μαζί με νανοδομημένη πλατίνα (HPt-CNTs), ως επιφάνεια για την ακινητοποίηση της οξειδάσης της γλυκόζης (GOD). Άλλες εφαρμογές περιλαμβάνουν τη χρήση μικροσωματιδίων πλατίνας διεσπαρμένα σε νανοϊνες πολυανιλίνης (PANI) για την ανάπτυξη αμπερομετρικού βιοαισθητήρα γλυκόζης ^[83], καθώς και τη χρήση σύνθετων νανοσωλήνων άνθρακα/πολυμερικού υμενίου κατεργασμένο με πλάσμα, που εφαρμόστηκαν για την κατασκευή βιοαισθητήρων με ακινητοποιημένη την οξειδάση της γλυκόζης ^[84]. Κάποιες σημαντικές αναφορές στο τομέα των βιοαισθητήρων, αφορούν την ανάπτυξη βιοαισθητήρων για την ανίχνευση υπεροξειδίου του υδρογόνου, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη μελέτη του Liu και της ομάδας του, που για την ανάπτυξη τέτοιου τύπου βιοαισθητήρα χρησιμοποίησαν νανοσωματίδια τριοξειδίου του γ – αλουμινίου πάνω σε ηλεκτρόδιο τροποποιημένο με υμένιο χιτοζάνης, ως επιφάνεια ακινητοποίησης της υπεροξειδάσης του χρένου ^[85]. Την σημασία της ακινητοποίησης των ενζύμων σε νανοκοιλότητες, ανέδειξε η Βαμβακάκη με την ομάδα της, μέσα από την οποία εξετάστηκε η ακινητοποίηση των ενζύμων υπεροξειδάση του χρένου και οξειδάσης της γλυκόζης χρησιμοποιώντας ως επιφάνειες ακινητοποίησης νανο – πορώδη υλικά, όπως σφαιρίδια διοξειδίου του πυριτίου και πολυμερικά σφαιρίδια, με διαφορετικά μεγέθη πόρων στην κλίμακα του νανομέτρου ^[86]. Η μελέτη αυτή, έδειξε ότι η ακινητοποίηση ενζύμων, κατάλληλων για την εφαρμογή τους σε βιοαισθητήρες, μέσα σε νανο-κοιλότητες, αυξάνει αξιοσημείωτα τη σταθερότητα των βιοαισθητήρων.

2.2.5.2. Βιοϊατρικές εφαρμογές

Τα ακινητοποιημένα ένζυμα χρησιμοποιούνται στο πεδίο της ιατρικής από το 1990 ^[87-88] τόσο ως διαγνωστικά εργαλεία, όσο και για την θεραπεία ασθενειών. Η ενθυλάκωση των ενζύμων σε κύτταρα (πχ. ερυθρά αιμοσφαίρια) μέσω ηλεκτροδιάτρησης, όπου εφαρμόζεται ρεύμα υψηλής τάσης για την διάτρηση της κυτταρικής μεμβράνης, αποτελεί τον πιο εύκολο τρόπο ακινητοποίησής των ενζύμων στον βιοϊατρικό τομέα και είναι μια αναστρέψιμη διαδικασία, που δίνει τη δυνατότητα στο ένζυμο να αναγεννηθεί ^[89]. Όταν τα ένζυμα συνδυαστούν με βιοϋλικά, παρέχουν βιολογικά και λειτουργικά συστήματα. Τα βιοϋλικά χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές της μηχανικής ιστών για την ανακατασκευή των ελαττωματικών ιστών. Το πλεονέκτημα της ακινητοποίησης ενζύμων στην βιοϊατρική, είναι ότι τα ελεύθερα ένζυμα καταναλώνονται από τα κύτταρα και δεν διατηρούνται ενεργά για εκτεταμένη χρήση, ενώ τα ακινητοποιημένα ένζυμα διατηρούν τη σταθερότητά τους.

Η θεραπεία κατά του καρκίνου με τη μεταφορά ενζύμων στα σημεία καρκινογένεσης, έχει βελτιωθεί με την ανάπτυξη νέων μεθόδων, όπου νανοσωματίδια και νανοσφαιρίδια, χρησιμοποιούνται συχνά, ως φορείς ενζύμων για την αποδέσμευση θεραπευτικών παραγόντων [29]. Χαρακτηριστικό παράδειγμα, είναι η χρήση νανοσωματιδίων χρυσού ως φορείς ακινητοποιημένου ενζύμου, τα οποία παρέχουν πολλές εφαρμογές στον τομέα της ιατρικής και της βιολογίας, λόγω της μη τοξικότητας και της βιοσυμβατότητας που διαθέτουν, τόσο σε *in vivo*, όσο και σε *in vitro* περιβάλλον. Στη διάγνωση και θεραπεία κατά του καρκίνου, χρησιμοποιούνται ως εναλλακτική για τη μεταφορά φαρμακευτικών ουσιών, ενώ μια από τις πιο αποτελεσματικές χρήσεις των νανοσωματιδίων χρυσού τα τελευταία χρόνια, περιλαμβάνει την ανίχνευση και αντιμετώπιση του ιού HIV [90]. Σε παρόμοιες εφαρμογές του πεδίου της βιοϊατρικής, ενδιαφέρον παρουσιάζει και η χρήση τροποποιημένου λειτουργικά γραφενίου στη νανοκλίμακα, το οποίο λόγω της μεγάλης ενεργούς επιφάνειας που διαθέτει και το χαμηλό του κόστος, αποτελεί ιδανικό υπόστρωμα για την ακινητοποίηση ενζύμων [91].

2.2.5.3. Παραγωγή βιοντίζελ

Το βιοντίζελ είναι μια εναλλακτική μορφή καυσίμου ντίζελ, που παράγεται από ανανεώσιμες βιολογικές πηγές, όπως τα φυτικά έλαια και το ζωικό λίπος. Είναι βιοαποικοδομήσιμο, μη τοξικό, με δυνατότητα χαμηλών εκπομπών ρυπογόνων αερίων [92]. Το βιοντίζελ αποτελείται από μονο – αλκυλο εστέρες λιπαρών οξέων και παράγεται με τη μέθοδο της μετεστεροποίησης των τριγλυκεριδίων και της εστεροποίησης των ελεύθερων λιπαρών οξέων με αλκοόλες μικρού μοριακού βάρους (μεθανόλη, αιθανόλη), παρουσία καταλύτη. Οι συμβατικές διεργασίες εφαρμογής της αντίδρασης μετεστεροποίησης, βασίζονται συνήθως στη χρήση βασικών ομογενών καταλυτών, όπως το υδροξείδιο του νατρίου (NaOH). Παρόλο που μια τέτοια αντίδραση ολοκληρώνεται σε σύντομο χρονικό διάστημα, παρουσιάζει προβλήματα που σχετίζονται με την ποιότητα και την καθαρότητα των πρώτων υλών, καθώς η χρήση πρώτων υλών με συγκεντρώσεις υγρασίας και οξύτητας υψηλότερες από τα επιτρεπτά όρια, έχει ως συνέπεια τον σχηματισμό σαπώνων μέσω της ανεπιθύμητης αντίδρασης σαπωνοποίησης των ελεύθερων λιπαρών οξέων από τον βασικό καταλύτη. Η αντιμετώπιση των προβλημάτων αυτών, αυξάνει το κόστος παραγωγής του βιοντίζελ, ενώ η διαδικασία καθαρισμού της γλυκερίνης που προκύπτει ως παραπροϊόν της αντίδρασης είναι επίσης δαπανηρή. Από την άλλη μεριά, οι όξινοι ομογενείς καταλύτες, όπως το θειϊκό οξύ (H₂SO₄), εμφανίζουν μικρότερους ρυθμούς αντίδρασης ενώ επίσης αντιμετωπίζουν προβλήματα που σχετίζονται με τη διάβρωση που προκαλούν στον μηχανολογικό εξοπλισμό, στα πλαίσια των

βιομηχανικών εφαρμογών. Συνεπώς, προκειμένου να αντιμετωπιστούν τα παραπάνω προβλήματα, έχει προταθεί ως υποσχόμενη εναλλακτική μέθοδος παραγωγής, η καταλυόμενη από ένζυμα μετεστεροποίηση, με τις λιπάσες να ξεχωρίζουν ως το ιδανικό ένζυμο για τη μετεστεροποίηση των ελαίων ^[93].

Η λιπάση καταλύει την αντίδραση απαιτώντας χαμηλότερη ενέργεια και ήπιες συνθήκες αντίδρασης, αλλά παρουσιάζει το μειονέκτημα του υψηλού κόστους παραγωγής, ενώ επιπλέον κατά τη βιολογική διαδικασία παραγωγής του βιοντίζελ, η λιπάση απενεργοποιείται από την μεθανόλη. Συνεπώς, έχει προταθεί η χρήση της λιπάσης στην ακινητοποιημένη μορφή της, με την οποία εξασφαλίζεται η σταθερότητα και η δυνατότητα για επαναλαμβανόμενη χρήση του ενζύμου ^{[94], [95]}. Χαρακτηριστικά, αναφέρουμε την ακινητοποίηση της λιπάσης *Burkholderia sp* σε νανοσωματίδια αποτελούμενα από οξειδίο του σιδήρου (Fe_3O_4) στον πυρήνα τους επικαλυμμένα από οξειδίο του πυριτίου, για την κατάλυση της μετεστεροποίησης του ελαιόλαδου με μεθανόλη, που είχε ως αποτέλεσμα την παραγωγή των μεθυλεστέρων λιπαρού οξέος (FAMES) σε ποσοστό πάνω από 90%, μέσα σε 30 ώρες, σε σύστημα ημισυνεχούς λειτουργίας ^[96]. Σε μία άλλη μελέτη, χρησιμοποιήθηκαν υβριδικές οργανικές νανοσφαίρες τετρααιθυλοπυριτίου (TEOS) και φθοριούχου νατρίου, που περιείχαν την εμπορική λιπάση RML για την κατάλυση της αντίδρασης μετεστεροποίησης της τριολείνης με μεθανόλη προς μεθυλεστέρες. Το ενθυλακωμένο ένζυμο, διατήρησε τη δραστηριότητά του μετά από πέντε συνεχείς κύκλους αντίδρασης και η συνολική παραγωγικότητα του καταλύτη βρέθηκε ότι ήταν υψηλότερη από αυτή του ελεύθερου ενζύμου ^[97].

2.2.5.4. Επεξεργασία λυμάτων

Τα υγρά αποβλήτα βιομηχανιών που ασχολούνται με την κατεργασία διαφόρων υλικών, όπως χαρτιού, υφασμάτων και δέρματος, είναι πλούσια σε διαλυτές χρωστικές με αποτέλεσμα να αποτελούν απειλή τόσο για το περιβάλλον όσο και για τον άνθρωπο, καθώς ακόμα και σε μικρές συγκεντρώσεις είναι καρκινογόνα. Στις μέρες μας, η διάσπαση των αποβλήτων των χρωστικών πραγματοποιείται με τη χρήση ενζύμων. Τέτοια ένζυμα, που βρίσκουν εφαρμογή σε συστήματα επεξεργασίας υγρών αποβλήτων, είναι οι υπεροξειδάσες, η λακάση και οι αζο – ρεδουκτάσες. Τα ένζυμα αυτά, λόγω της έκθεσής τους σε δριμείς συνθήκες, όπως είναι οι ακραίες θερμοκρασίες, το χαμηλό ή υψηλό pH και η υψηλή ιοντική ισχύς, υφίστανται απενεργοποίηση χάνοντας τη δραστηριότητά τους. Προκειμένου να ξεπεραστεί το παραπάνω πρόβλημα, προτείνεται η χρήση ακινητοποιημένων ενζύμων.

Η λιπάση έχει την ικανότητα να διασπά τα τριγλυκερίδια των ελαίων και των λιπών, σε λιπαρά οξέα και γλυκερόλη. Η χρήση ακινητοποιημένης λιπάσης στην επεξεργασία αποβλήτων από τις βιομηχανίες τροφίμων, παρουσιάζει υψηλό ενδιαφέρον, καθώς οι συμβατικές μέθοδοι επεξεργασίας παρουσιάζουν το μειονέκτημα της αργής βιοδιάσπασης, με αποτέλεσμα έλαια και λίπη να προσροφούνται στην επιφάνεια της ιλύος ^[98]. Η ακινητοποιημένη λιπάση σε υδρόλυμα γέλης αλγινικού ασβεστίου, χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς σε σύστημα επεξεργασίας ιλύος συνεχούς λειτουργίας 100 ημερών ^[99].

Η λακάση, είναι ένα ακόμα ένζυμο που έχει ακινητοποιηθεί σε έναν αριθμό υποστρωμάτων για τον αποχρωματισμό/υποβάθμιση διαφόρων χρωστικών ουσιών και φαινολικών ενώσεων. Ως παράδειγμα, αναφέρουμε την ακινητοποιημένη λακάση σε τροποποιημένο οξείδιο του πυριτίου με ιμιδαζόλιο, που χρησιμοποιήθηκε για την υποβάθμιση χρωστικών στα απόβλητα της βιομηχανίας υφασμάτων ^[100], καθώς και την ακινητοποιημένη λακάση σε εποξειδικά ενεργοποιημένους φορείς για την κατεργασία συνθετικών βαφών ^[101]. Μια άλλη εφαρμογή είναι η χρήση ακινητοποιημένης λακάσης σε νανοσωματίδια οξειδίου του πυριτίου για την εξάλειψη μικρο-ρυπογόνων ουσιών από τα υγρά απόβλητα ^[102].

Πρόσφατες μελέτες, έχουν δείξει ότι η ενζυματική προσέγγιση στην απομάκρυνση φαινολικών ρυπογόνων ουσιών από υδατικά διαλύματα, έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον των ερευνητών, ως εναλλακτική μέθοδος αντί των συμβατικών χημικών και μικροβιολογικών μεθόδων κατεργασίας των αποβλήτων, καθώς οι τελευταίες συνδέονται με μια σειρά σημαντικών περιορισμών ^[103]. Προσφάτως, υπεροξειδάσες από το φυτό *M.Charantia*, ακινητοποιημένες σε φτηνά υποστρώματα, βρέθηκε ότι είναι ιδιαίτερα αποδοτικές στον αποχρωματισμό ενεργών χρωστικών από τη βιομηχανία υφασμάτων, σε σύγκριση με την αντίστοιχη διαλυτή μορφή του ενζύμου, αφού το ακινητοποιημένο ένζυμο έχασε μόνο 50% της δραστηριότητάς του, ακόμα και μετά από δέκα συνεχείς κύκλους χρήσης ^[104]. Επίσης, οι υπεροξειδάσες, έχει αναφερθεί ότι καταλύουν τις φαινόλες και τα παράγωγά τους, με την υπεροξειδάση του χρένου να διακρίνεται για την εξαιρετική ικανότητα που διαθέτει να καταλύει την οξειδωση των φαινολών, όπως θα δούμε αναλυτικότερα παρακάτω ^[105-106].

2.3. Βίο – μικρο – αντιδραστήρες με ακινητοποιημένα ένζυμα

Για την κατασκευή μικρο – αντιδραστήρων, έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως πολυμερικά υλικά, όπως το πολυ(διμεθυλο)σιλοξάνιο (PDMS), ο πολυ(μεθακρυλικός μεθυλεστέρας) (PMMA), ο πολυανθρακικός εστέρας και το τεφλόν τα οποία αποτελούν επιφάνειες για την ακινητοποίηση ενζύμων. Το τελικό αποτέλεσμα εξαρτάται από τις ιδιότητες του υλικού, την

μηχανική μελέτη και τις εφαρμοζόμενες τεχνικές. Όλοι αυτοί οι παράγοντες είναι κρίσιμοι για την βελτίωση της αποδοτικότητας του συστήματος και συνεισφέρουν στην ανάπτυξη ενός βέλτιστου συστήματος, όπως επίσης βελτιώνουν την έκταση της επιφάνειας επαφής μεταξύ ενζύμου και αντιδρώντων. Για την ακρίβεια, η αύξηση της ενεργούς επιφάνειας ενός μικρο – αντιδραστήρα είναι απαραίτητη και γι’ αυτό έχουν χρησιμοποιηθεί τεχνικές όπως sol-gel σύνθεση, ηλεκτροχημική ανοδίωση, εναπόθεση μεμβράνης και διεργασίες με πλάσμα. Ο τελικός στόχος είναι να αποκτηθούν δομές χωρίς ατέλειες ώστε να βελτιωθεί ο ρυθμός αντίδρασης και να αποφευχθεί η παρουσία ζωνών που μπορούν να παρεμποδίσουν την κανονική ροή των ουσιών μέσα στον μικρο – αντιδραστήρα ^[107]. Παρά τις διαφορετικές μεθόδους, όσον αφορά τα υλικά και τα ένζυμα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν, οι πιο κοινοί τύποι βιο – μικρο – αντιδραστήρων, διαχωρίζονται στις εξής κατηγορίες ^[19]:

(α) Μικρο – αντιδραστήρες με ακινητοποιημένο ένζυμο σε επιφάνεια: το ένζυμο ακινητοποιείται στην επιφάνεια ενός προκατασκευασμένου μικρο – αντιδραστήρα και ακολούθως εκτίθεται στη ροή των αντιδρώντων.

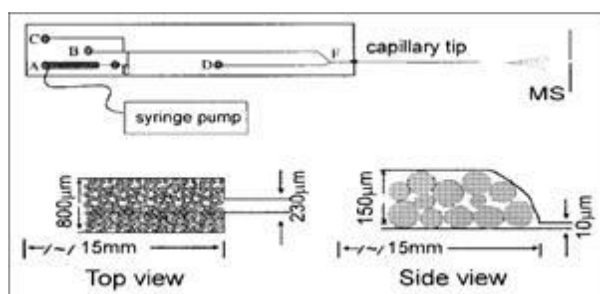
(β) Μικρο – αντιδραστήρες με πακεταρισμένα σφαιρίδια, με ακινητοποιημένο ένζυμο: κατάλληλη ποσότητα πορώδων σφαιριδίων που έχει πρωτίστως λειτουργικοποιηθεί με ένζυμο, πακετάρεται ώστε να γεμίσει το θάλαμο ενός μικρο – αντιδραστήρα .

(γ) Μικρο – αντιδραστήρες με μονόλιθους που περιέχουν ένζυμο: μέσο – ή μάκρο – πορώδεις μονόλιθοι συντίθενται απευθείας στον μικρο – αντιδραστήρα και λειτουργικοποιούνται με ένζυμο.

(δ) Μεμβράνες: τα ένζυμα ακινητοποιούνται πάνω σε μια επιλεκτική μεμβράνη υπερδιήθησης.

Στην περίπτωση που χρησιμοποιούνται ακινητοποιημένα ένζυμα σε επιφάνειες, κάθε υλικό που θα χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα, απαιτεί ειδικές τροποποιήσεις προκειμένου να προσδεθεί το ένζυμο. Στους μικρο – αντιδραστήρες από διοξείδιο του πυριτίου, η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος περιλαμβάνει ενεργοποίηση της επιφάνειας με (3-άμινο-πρόπυλο -) τρι-αιθόξυ-σιλάνιο (APTES) και γλουταραλδεϋδη (GA), ενώ έχουν αναφερθεί και ανάλογες αντιδράσεις με ιμίδια και εποξείδια ^[108-111]. Παρόμοιες μέθοδοι έχουν επίσης χρησιμοποιηθεί για την λειτουργική τροποποίηση πολυκαρβονικών με καρβοδιϊμίδιο και PMMA με διάφορα συμπολυμερή. Το PMMA, έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε μικρονηφίδα ως επιφάνεια ακινητοποίησης της τρυψίνης, μετά από τροποποίηση με νανοσωματίδια από ζεόλιθο ^[112]. Σε μια άλλη περίπτωση, η τρυψίνη προσροφήθηκε επιτυχώς σε πολυστοιβάδα πολυ-(4-στυρένιου-σουλφονικού άλατος)/β-ζεόλιθου ^[113].

Ο Wang με την ομάδα του ^[114], κατασκεύασε έναν μικρο – αντιδραστήρα πέψης πρωτεϊνών, ο οποίος ήταν ένα κανάλι μεγάλων διαστάσεων, πλάτους 800 μm, βάθους 150 μm και μήκους 15 mm και περιείχε τρυψίνη, ακινητοποιημένη σε σφαιρίδια διαμέτρου 40 - 60 μm. Ο διαχωρισμός διεξήχθη σε εγχαραγμένα κανάλια βάθους 10 μm, πλάτους 30 μm και μήκους περίπου 45 mm. Η εφαρμογή αυτής της διάταξης για την ταχεία πέψη, το διαχωρισμό και την ταυτοποίηση των πρωτεϊνών επιδείχθηκε για τις πρωτεΐνες melittin, cytochrome c και bovine serum albumin (BSA). Η συγκεκριμένη διάταξη απεικονίζεται στην εικόνα 2.1:

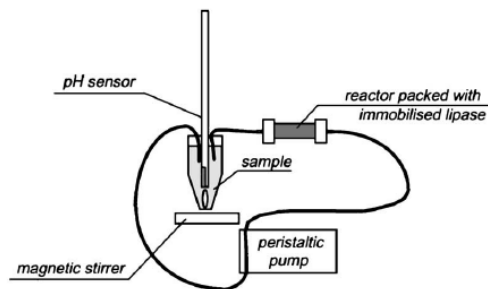


Εικόνα 2.1: Η διάταξη της ομάδας του Wang et.al συνδεδεμένη με φασματογράφο μάζας για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών. ^[114]

Στην εργασία του Miyazaki, μελετάται η αντίδραση συνεχούς ροής σε μικρο – αντιδραστήρα πάνω σε ψηφίδα, κατασκευασμένο από πλακίδιο PMMA ^[115-116]. Η αντίδραση πραγματοποιήθηκε με απλή φόρτωση των διαλυμάτων του υποστρώματος και του ενζύμου σε διαφορετικές εισόδους, χρησιμοποιώντας μικροαντλίες. Με αυτού του είδους τους μικρο – αντιδραστήρες, επιτεύχθηκε η καταλυόμενη από τρυψίνη υδρόλυση της ένωσης *benzoyl-arginine-p-nitroanilide* ^[115] καθώς και αντιδράσεις υδρόλυσης καταλυόμενες από γλυκοσιδάση ^[116], με βελτιωμένη απόδοση σε όλες τις περιπτώσεις. Μια άλλη μελέτη των Gleason et al. ^[117], περιγράφει την κατασκευή μικρο – αντιδραστήρα για τον ταχύ προσδιορισμό κινητικής του ενζύμου, με προσρόφηση βιοτινυλιωμένης λυσίνης σε επιφάνεια γυαλιού, για την ακινητοποίηση ακολούθως της αλκαλικής φωσφατάσης συζευγμένης με στρεπταβιδίνη.

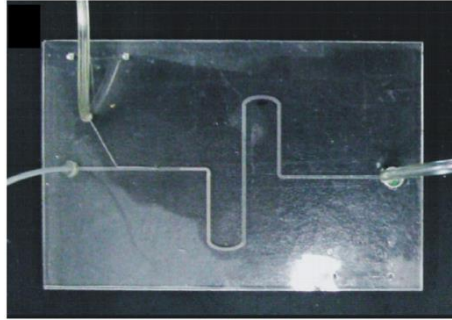
Οι αντιδράσεις εστεροποίησης και υδρόλυσης, αποτελούν επίσης κάποιες σημαντικές διεργασίες της βιομηχανίας, που έχουν πραγματοποιηθεί σε μικρορευστονικά συστήματα. Σε πολλές περιπτώσεις, μια ενζυματική αντίδραση είναι πολύ γρήγορη και μπορεί να φτάσει σε ισορροπία, με ένα μονο πέρασμα του ρεύματος ροής του υποστρώματος διαμέσου των μικροκαναλιών του μικρο – αντιδραστήρα. Παρόλ'αυτά, αρκετές βιομετατροπές, όπως για παράδειγμα αυτές που καταλύονται από τις λιπάσες, είναι πιο αργές. Σε αυτές τις περιπτώσεις,

μπορεί να κατασκευαστεί ένα σύστημα επανακυκλοφορίας χρησιμοποιώντας έναν βρόγχο σωληνώσεων μαζί με τον μικρο – αντιδραστήρα. Στην εικόνα, βλέπουμε ένα τέτοιο σύστημα που αναπτύχθηκε από τους Rijanowska et al. ^[118], όπου το διάλυμα του υποστρώματος αντλείται μέσω μιας περισταλτικής αντλίας. Η υδρόλυση του υποστρώματος μετράται με την αλλαγή του pH κατά την αρχική φάση αντίδρασης μέσα σε μια περίοδο 25min. Ο απαιτούμενος χρόνος προκειμένου να φτάσει το σύστημα σε σταθερή κατάσταση εκτιμήθηκε στα 110 min.



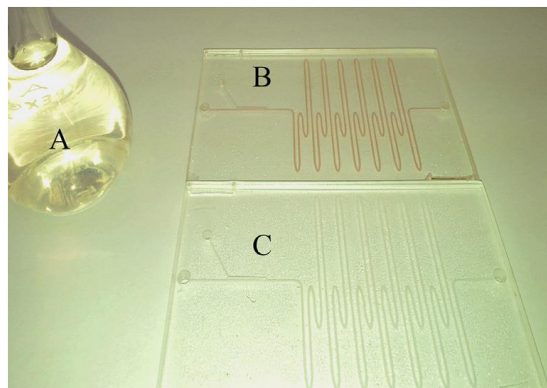
Εικόνα 2.2: Σχηματική απεικόνιση αντίδρασης συνεχούς ροής και παρακολούθησης της υδρόλυσης των εστέρων, με μικροαντιδραστήρα που πριέχει λιπάση ακινητοποιημένη είτε σε φύλλα μικροκυτταρίνης, είτε σε γυάλινα σφαιρίδια επικαλυμμένα με κερατίνη. ^[118]

Στην εργασία του Ferreira και της ομάδας του ^[119], προτάθηκε μια καινοτόμος διεργασία ακινητοποίησης της οξειδάσης της γλυκόζης (GOx) στην επιφάνεια σφραγισμένων μικρο – καναλιών από PMMA, μετά από λειτουργική τροποποίηση του PMMA με polyethyleneimine (PEI) και χρησιμοποιώντας γλουταραλδεΐδη ως παραγοντα διασύνδεσης. Όλες οι διεργασίες, λειτουργικής τροποποίησης της επιφάνειας και ακινητοποίησης του ενζύμου, πραγματοποιήθηκαν υπό συνεχή ροή και μετά από τη σφράγιση της συσκευής. Για την αξιολόγηση της αναλυτικής απόδοσης του ενζυματικού μικρο – αντιδραστήρα, η ομάδα ανέπτυξε μια νέα μεθοδολογία, που αφορά τον διαφορικό αμπερομετρικό προσδιορισμό τη γλυκόζης, παρουσιάζοντας υψηλή ευαισθησία και χαμηλό όριο ανίχνευσης. Ο μικρο – αντιδραστήρας PMMA που χρησιμοποίησε ο Ferreira και η ομάδα του για τον αμπερομετρικό προσδιορισμό της γλυκόζης, απεικονίζεται στην εικόνα 2.3:



Εικόνα 2.3: Απεικόνιση ενζυματικού μικρο – αντιδραστήρα από PMMA. ^[119]

Η ίδια ομάδα απέδειξε σε επόμενη μελέτη της ^[120], ότι το συγκεκριμένο σύστημα μπορεί να εφαρμοστεί με επιτυχία για την αποτελεσματική ακινητοποίηση και άλλων ενζύμων εκτός της οξειδάσης της γλυκόζης χρησιμοποιώντας γλουταραλδεΐδη ως παραγοντα διασύνδεσης. Συγκεκριμένα, τα ένζυμα που ακινητοποιήθηκαν επιτυχώς, αποδεικνύοντας την ικανότητα για ευρεία εφαρμογή του PMMA μικρο – αντιδραστήρα τροποποιημένου με PEI, ήταν η ασκορβική οξειδάση (AAO), η καταλάση (CAT), η γλουταμινική αφυδρογονάση (GDH) καθώς επίσης και ένα σύστημα ενζύμων αποτελούμενο από οξειδάση της γλυκόζης και υπεροξειδάση του χρένου (GOD, HRP). Στην εικόνα που ακολουθεί, απεικονίζεται το χρωματομετρικό τεστ που πραγματοποίησε η ομάδα του Cerqueira, ώστε να επιβεβαιωθεί η παρουσία του ακινητοποιημένου ένζυμου στα μικροκανάλια του μικρο – αντιδραστήρα από PMMA.



Εικόνα 2.4: Χρωματομετρικό τεστ για την επιβεβαίωση της παρουσίας του ακινητοποιημένου ενζύμου GOx στα μικροκανάλια του PMMA: (A) το διάλυμα που εισάγεται στα μικροκανάλια (φαινόλη/4-αμινοαντιπυρίνη/υπεροξειδάση/ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών/γλυκόζη), (B) μικροκανάλια PMMA με ακινητοποιημένο ένζυμο, (Γ) μικροκανάλια PMMA χωρίς το ένζυμο. ^[120]

2.3.1. Εφαρμογή ενζυματικών μικρο – αντιδραστήρων για καταλύτικη οξείδωση φαινολών

Μέχρι σήμερα, για την απομάκρυνση οργανικών και ανόργανων μικρο – ρυπογόνων ουσιών από υδατικά διαλύματα, χρησιμοποιείται ευρέως η τεχνολογία της προσρόφησης, η οποία αποτελεί μία αποτελεσματική και απλή προσέγγιση. Ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο προσροφητικό υλικό αποτελεί ο ενεργοποιημένος άνθρακας, ο οποίος εμφανίζει αρκετά καλή ικανότητα απομάκρυνσης φαινολικών ουσιών. Παρόλα αυτά, η χρήση του εμφανίζει περιορισμούς, καθώς το ποσό ενέργειας που απαιτείται για την αναγέννησή του καθιστά τη διαδικασία πολύ ακριβή. Επιπλέον, για την αναγέννησή του απαιτείται η εφαρμογή υψηλών θερμοκρασιών, που συχνά καταστρέφουν ως ένα ποσοστό τον ενεργοποιημένο άνθρακα. Συνεπώς, για τους παραπάνω λόγους, προέκυψε η ανάγκη για χρήση καταλληλότερων προσροφητικών υλικών, χαμηλότερου κόστους, στην κατεργασία υγρών αποβλήτων, αναδεικνύοντας τα πολυμερικά υλικά ως πιθανή εναλλακτική λύση έναντι του ενεργοποιημένου άνθρακα. Σημαντικό πλεονέκτημα των πολυμερικών υλικών αποτελεί η εύκολα τροποποιούμενη επιφανειακή τους χημεία, έτσι ώστε να προσροφούν επιλεκτικά οργανικές ενώσεις, ανάλογα με την πολικότητα και την υδατοδιαλυτότητά τους. Επίσης, στα πολυμερικά υλικά είναι εύκολος ο έλεγχος της εσωτερικής ενεργής επιφάνειάς τους, ανάλογα με τις συνθήκες που εφαρμόζονται κατά την παραγωγή τους. Οι ομοιόμορφες φυσικές ιδιότητες οδηγούν σε ομοιογένεια της προσρόφησης στο πολυμερικό υλικό, επιτρέποντας την αναγέννησή του κάτω από ηπιότερες συνθήκες, χρησιμοποιώντας είτε διαλύτες, είτε κατάλληλη πίεση, χωρίς να απαιτείται η προσθήκη επιπλέον θερμικής ενέργειας για αναγέννηση ^[121].

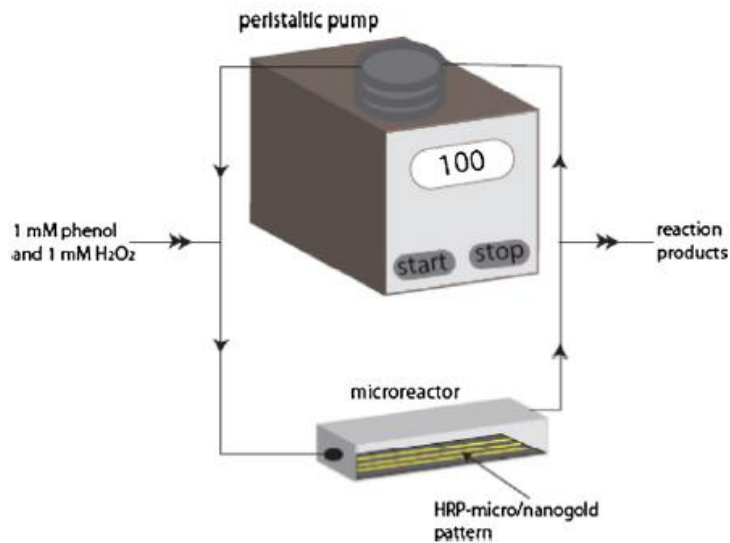
Για την απομάκρυνση φαινολικών ουσιών έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα πολυμερικά υλικά, όπως οι πολυμερικές ρητίνες, το πολυστυρένιο και ο πολυακρυλικός εστέρας. Το PMMA, το οποίο είναι ένα πολυμερές μη τοξικό, φτηνό και αδιάλυτο στο νερό, το οποίο όμως μπορεί να υποστεί διόγκωση σε υδατικό περιβάλλον, έχει αναφερθεί ως αποτελεσματικό υλικό στην προσρόφηση ανιονικών αζωχρωστικών ενώσεων. Επίσης, μελέτη έδειξε την ικανότητα του PMMA ως πιθανό προσροφητικό υλικό για την απομάκρυνση των φαινολών από υδατικά διαλύματα σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων φαινόλης ^[122].

Η μέθοδος της προσρόφησης σε κατάλληλα προσροφητικά υλικά για την απομάκρυνση φαινολών αν και αποτελεσματική δεν είναι πάντα αρκετή, καθιστώντας αναγκαία την οξείδωση ή αναγωγή των φαινολικών ενώσεων σε λιγότερο βλαβερές ουσίες. Η οξείδωση των φαινολών με χημικά αντιδραστήρια όπως το υπεροξείδιο του υδρογόνου χρησιμοποιείται

ευρέως, καθώς το υπεροξειδίο υδρογόνου έχει το πλεονέκτημα της παραγωγής οξυγόνου που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την αυξημένη βιολογική αποδόμηση των φαινολών. Για την αποτελεσματική οξείδωση των φαινολών είναι απαραίτητη η παρουσία καταλύτη ^[123].

Η βιοκαταλυτική οξείδωση φαινολών παρουσία υπεροξειδάσης ως καταλύτη, αποτελεί μία από τις πλέον χρήσιμες αντιδράσεις στον τομέα της βιομηχανίας φαινολών και περιλαμβάνει τις περισσότερες υδροξυλιωμένες αρωματικές ενώσεις που μπορούν να οξειδωθούν σε κινόνες, ενώ περαιτέρω οξείδωση οδηγεί στο σχηματισμό ενός πολύπλοκου μείγματος οργανικών ενώσεων με υψηλή περιεκτικότητα σε πολυφαινόλες ^[124]. Η ενζυματική σύνθεση των πολυφαινολών, παρουσιάζει ως πλεονεκτήματα την υψηλή καταλυτική δραστηριότητα, τις ήπιες συνθήκες αντίδρασης, την υψηλή εκλεκτικότητα και την απουσία παραπροϊόντων κατά την αντίδραση ^[125]. Οι υπεροξειδάσες έχει αναφερθεί ότι καταλύουν τη σύνθεση φαινολικών πολυμερών και συμπολυμερών από ένα ευρύ πεδίο φαινολών, συμπεριλαμβανομένης της π-κρεσόλης, της π-φαινυλοφαινόλης, διαφόρων ναφθολών και της ίδιας της φαινόλης, μαζί με αντίστοιχες ανιλίνες ^[126-129]. Συγκεκριμένα, η υπεροξειδάση του χρένου (HRP), όπως θα δούμε παρακάτω, επιδεικνύει εξαιρετική ικανότητα ως καταλύτης στην αντίδραση οξείδωσης φαινολών, η οποία ακολουθείται από την αντίδραση πολυμερισμού των οξειδωμένων φαινολών ^{[130], [106]}.

Η κατασκευή μικρο – αντιδραστήρων με ακινητοποιημένη υπεροξειδάση HRP, αποτελεί σημαντικό στόχο για τους ερευνητές, καθώς μπορεί να συνεισφέρει στην μείωση του κόστους και στη βελτίωση της αποδοτικότητας, ενώ επίσης αποτελεί μια πιο φιλική προς το περιβάλλον προσέγγιση. Χαρακτηριστική είναι η εφαρμογή που ανέπτυξε η Tudorachea με την ομάδα της ^[131], που περιελάμβανε την κατασκευή βιοκαταλυτικού μικρο – αντιδραστήρα με ακινητοποιημένο την υπεροξειδάση HRP, σε μικρο-/νανο-σχηματοποιημένο χρυσό για την μελέτη της οξείδωσης διαφόρων τύπων φαινολών (Εικόνα 2.5). Για την ανάλυση των προϊόντων, χρησιμοποιήθηκε φασματοσκοπία NMR και εφαρμόστηκε η τεχνική HPLC-UV/Vis. Από την μελέτη αυτή, προέκυψε ότι το ακινητοποιημένο ένζυμο διατήρησε τη δραστηριότητά του για αρκετούς κύκλους αντίδρασης, ενώ η ακινητοποίησή του σε νανο – διαστάσεις, επέτρεψε μεγαλύτερη χωρητικότητα ενζύμου, για μικρότερη ποσότητα χρυσού, αυξάνοντας την αποδοτικότητα της βιοκαταλυτικής οξείδωσης των φαινολών.

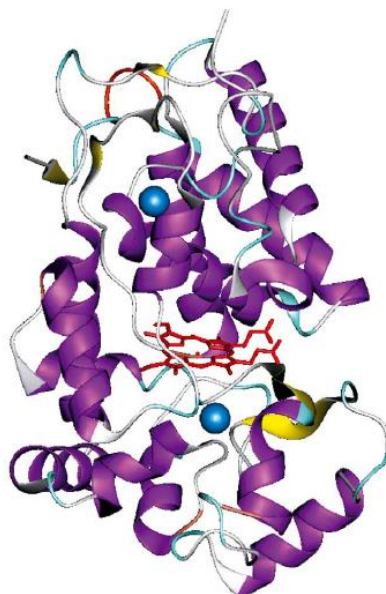


Εικόνα 2.5: Μείγμα 1mM φαινολών και 1mM H₂O₂ σε 100mM ρθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7.4) καταλυτικό μικροσύστημα συνεχούς ροής 100μL/min. ^[131]

2.4. Υπεροξειδάσες και η υπεροξειδάση του χρένου (horseradish peroxidase - HRP)

Οι υπεροξειδάσες είναι οξειδοαναγωγάσες που παράγονται από τα ζώα και τα φυτά. Χρησιμοποιούν υπεροξείδιο του υδρογόνου ως δέκτη ηλεκτρονίων για να οξειδώσουν τα υποστρώματα και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν σε τρεις οικογένειες: τις υπεροξειδάσες των ζώων, των φυτών και τις καταλάσες. Όλες αυτές οι υπεροξειδάσες διαθέτουν την προσθετική ομάδα *ferriprotoporphyrin IX* στο ενεργό κέντρο τους, που τους παρέχει τη δυνατότητα να προστατεύουν τον οργανισμό από τη τοξικότητα των φαινολικών και των ανιλινικών ενώσεων ^[132]. Οι υπεροξειδάσες των φυτών μπορούν να διαχωριστούν περαιτέρω σε τρεις τάξεις με βάση τις δομικές τους διαφορές. Οι φυτικές υπεροξειδάσες 1^{ης} τάξης έχουν προκαρυωτική προέλευση. Συνήθως αυτή η τάξη υπεροξειδασών είναι μονομερής, αλλά κάποιες από τις βακτηριδιακές καταλάσες – υπεροξειδάσες μπορεί να είναι διμερείς ή τετραμερείς. Οι φυτικές υπεροξειδάσες 2^{ης} τάξης απαντώνται κυρίως σε μύκητες και συγκριτικά με τις 1^{ης} τάξης υπεροξειδάσες, διαθέτουν δύο τμήματα, καθένα από τα οποία διαθέτει από μία θέση στην οποία συνδέεται ασβέστιο, τέσσερις δισουλφιδικές γέφυρες και μία εκκριματική σηματοδοτική αλληλουχία πεπτιδίων. Οι υπεροξειδάσες 3^{ης} τάξης, διαθέτουν σχεδόν την ίδια δομή με τις 2^{ης} τάξης υπεροξειδάσες αλλά έχουν τις τέσσερις δισουλφιδικές γέφυρες σε διαφορετικές θέσεις και διαθέτουν κάποιους επιπλέον έλικες που μπορούν να παρέχουν πρόσβαση στο άκρο της ομάδας ^[132].

Το ένζυμο υπεροξειδάση του χρένου (horseradish peroxidase - HRP), που συναντάται στις ρίζες του φυτού χρένου, χρησιμοποιείται ευρέως σε βιοχημικές εφαρμογές κυρίως λόγω της δυνατότητάς του να ενισχύει ένα αδύναμο σήμα και να αυξάνει την ικανότητα ανίχνευσης ενός μορίου – στόχου. Πρόκειται για ένα μεταλλοένζυμο με πολλές ισομερείς δομές, εκ των οποίων περισσότερο έχει μελετηθεί η δομή τύπου C. Η δομή του ενζύμου πρωτοαναλύθηκε το 1997 με κρυσταλλογραφία ακτίνων-X^[133]. Είναι μια α – ελικοειδής πρωτεΐνη που διαθέτει την αίμη ως οξειδοαναγωγικό συμπράγοντα και έξι κατάλοιπα λυσίνης, τα οποία μπορούν να συζευχθούν σε ένα επισημασμένο μόριο, παράγοντας έτσι κάποιο έγχρωμο, φθορίζον ή φωταυγές παράγωγο του επισημασμένου μορίου όταν αυτό επωαστεί με κατάλληλο υπόστρωμα. Με τον τρόπο αυτό, γίνεται εφικτή η ανίχνευση και η ποσοτικοποίησή του.



Εικόνα 2.6: Τρισδιάστατη αναπαράσταση με X-ray της κρυσταλλικής δομής του ισοένζυμου C της υπεροξειδάσης του χρένου. Η ομάδα της αίμης (με κόκκινο χρώμα) βρίσκεται ανάμεσα στις απομακρυσμένα (distal) και πλησιέστερα (proximal) τμήματα, με το καθένα να διαθέτει από ένα άτομο ασβεστίου (μπλε σφαίρες). Οι α -ελικοειδείς και β -φυλλοειδείς περιοχές του ενζύμου απεικονίζονται με μοβ και κίτρινο χρώμα αντίστοιχα.^[134]

Η HRP χρησιμοποιείται συχνά σε συζευγμένη μορφή για να καθορίσει την παρουσία ενός μορίου-στόχου, όπως για παράδειγμα στην περίπτωση εφαρμογής της τεχνικής western blot. Στην τεχνική αυτή, η ανίχνευση κάποιας συγκεκριμένη πρωτεΐνης - στόχου από ένα πολύπλοκο μείγμα πρωτεϊνών, πραγματοποιείται με τη χρήση ενός αντισώματος συζευγμένου με κάποιο ένζυμο, όπως η HRP. Στην περίπτωση αυτή, το αντίσωμα παρέχει την εξειδίκευση

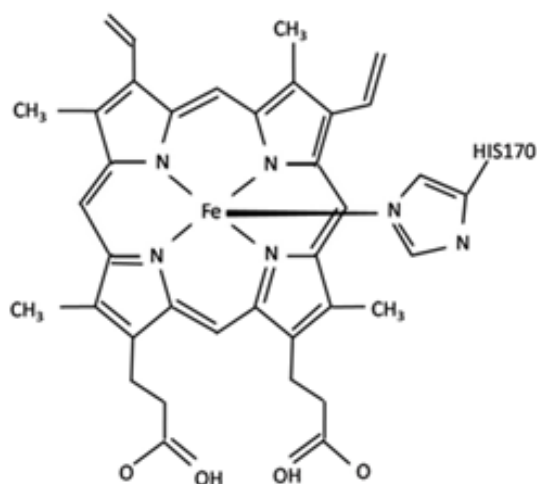
στον εντοπισμό της πρωτεΐνης του ενδιαφέροντός μας, ενώ το ένζυμο παρουσία ενός υποστρώματος, παρέχει ένα ανιχνεύσιμο σήμα ^[135]. Η HRP βρίσκει επίσης συχνά εφαρμογή σε τεχνικές όπως η μέθοδος ELISA και σε μελέτες ανοσοϊστοχημείας, λόγω της μονομερούς φύσης που διαθέτει και της ευκολίας με την οποία παράγει έγχρωμα προϊόντα. Κατάλληλα υποστρώματα για την HRP έχει μελετηθεί ότι αποτελούν κάποια χρωμογόνα υποστρώματα (πχ., TMB, DAB, ABTS), τα οποία παρουσία της HRP ως καταλύτη και χρησιμοποιώντας ως οξειδωτικό παράγοντα το υπεροξειδίο του υδρογόνου μετατρέπονται σε έγχρωμα προϊόντα, ή χημειοφθορίζοντα υποστρώματα από τα οποία εκλύεται φως παρουσία HRP. (πχ. Enhanced Chemiluminescence by luminol) ^[136]. Το ένζυμο HRP είναι ιδανικό από πολλές απόψεις για αυτές τις εφαρμογές, καθώς είναι μικρότερο μόριο, πιο σταθερό και πιο οικονομικό σε σύγκριση με άλλα δημοφιλή ένζυμα που χρησιμοποιούνται εναλλακτικά, όπως η αλκαλική φωσφατάση.

Πέρα από τις βιοϊατρικές εφαρμογές, το ένζυμο HRP, βρίσκει σημαντική χρήση και σε πολλές περιβαλλοντικές εφαρμογές, καθώς είναι κατάλληλο για την απομάκρυνση υδροξυλιωμένων αρωματικών ενώσεων, οι οποίες θεωρούνται από τις βασικές ρυπογόνες ουσίες στα βιομηχανικά λύματα. Μια υποσχόμενη μέθοδος για την αντιμετώπιση των προβλημάτων που προκαλούνται από τις φαινολικές ενώσεις, είναι να χρησιμοποιηθούν ένζυμα, όπως η HRP, για να καταλύσουν τον πολυμερισμό των φαινολικών ενώσεων σε σχετικά λιγότερο διαλυτά προϊόντα που θα μπορούν εύκολα να διαχωριστούν από το νερό. ^[137]

Το 1980, ο Klibanov και οι συνεργάτες του, πρότειναν μια ενζυμική κατεργασία των υγρών αποβλήτων, χρησιμοποιώντας υπεροξειδάσες ως καταλύτες, ανακαλύπτοντας ότι χρησιμοποιώντας το ένζυμο HRP, πάνω από 30 διαφορετικές αρωματικές ενώσεις (φαινόλες και ανιλίνες) μπορούν να κατεργαστούν μέσω οξειδωτικών αντιδράσεων παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου ^[138 - 139]. Κατά την κατεργασία, αυτή η ενζυματική οξειδωτική αντίδραση μετατρέπει τις αρωματικές ενώσεις σε αρωματικές ελεύθερες ρίζες στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Στη συνέχεια, αφού οι αρωματικές ελεύθερες ρίζες διαχυθούν από το ενεργό κέντρο, ενώνονται με άλλες αρωματικές ελεύθερες ρίζες μέσω μιας μη ενζυματικής αντίδρασης. Έτσι, αρχικά σχηματίζονται διμερή και ακολούθως αυτά τα διμερή μπορούν να αντιδράσουν μέσω ενός άλλου κύκλου υπεροξειδάσης με άλλες ελεύθερες ρίζες, σχηματίζοντας oligομερή. Οι αρωματικές ελεύθερες ρίζες τελικά σχηματίζουν πολυμερή, τα οποία καταβυθίζονται και απομακρύνονται από το διάλυμα. ^{[132], [140]}

2.4.1. Το ενεργό κέντρο της υπεροξειδάσης HRP

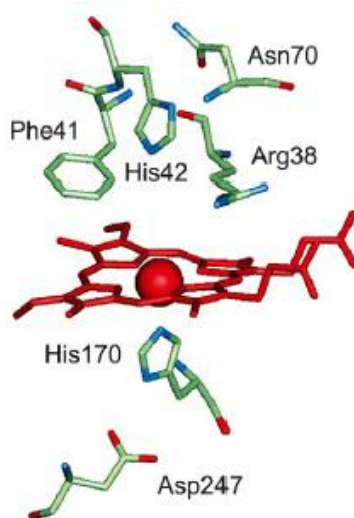
Η υπεροξειδάση HRP, διαθέτει δύο διαφορετικούς τύπους μετάλλου στο κέντρο του μορίου: την πρωτοπορφυρίνη IX τρισθενούς σιδήρου Fe(III), γνωστή ως «αίμη», και δύο άτομα ασβεστίου. Και οι δύο αυτές ομάδες, καθορίζουν τη δομική και λειτουργική ακεραιότητα του ενζύμου. Η ομάδα της αίμης έχει επίπεδη δομή, με το άτομο σιδήρου να συγκρατείται στο μέσο του πορφυρινικού δακτυλίου, ο οποίος αποτελείται από τέσσερα μόρια πυρόλης. Ο Fe(III), διαθέτει δύο ανοιχτές θέσεις σύνδεσης, μία πάνω και μία κάτω από το επίπεδο της ομάδας της αίμης. Το άτομο σιδήρου στην ομάδα της αίμης συνδέεται με ημιπολικό δεσμό με το αμινοξύ ιστιδίνη (histidine - His), μέσω του πλησιέστερου κατάλοιπου ιστιδίνης, His170, το οποίο βρίσκεται στην κάτω πλευρά της ομάδας της αίμης (Εικόνα 2.7).



Εικόνα 2.7: Δομή της αίμης της υπεροξειδάσης HRP. Το άτομο σιδήρου της αίμης συνδέεται με το αμινοξύ ιστιδίνη, μέσω του πλησιέστερου κατάλοιπου ιστιδίνης, His170 (κάτω από το επίπεδο της ομάδας της αίμης). ^[134]

Το δεύτερο κατάλοιπο ιστιδίνης στην απομακρυσμένη πλευρά της αίμης, πάνω από την ομάδα της αίμης, είναι κενό σε κατάσταση ηρεμίας, αλλά διατίθεται για την σύνδεση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, κατά τη διάρκεια οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων. Κατά την ενεργοποίηση του ενζύμου, η κενή αυτή θέση θα συνδεθεί με ένα άτομο οξυγόνου. Μικρά μόρια, όπως μονοξείδιο του άνθρακα, κυανιούχες ή φθοριούχες ενώσεις και αζίδια, συνδέονται με τον σίδηρο της αίμης στην απομακρυσμένη πλευρά της αίμης, δίνοντας έξι σύμπλοκα συντονισμού με την υπεροξειδάση. Κάποια από αυτά τα μόρια, συνδέονται μόνο στην

πρωτονιωμένη μορφή τους, όπου σταθεροποιούνται μέσω δεσμών υδρογόνου με δύο κατάλοιπα πλευρικών αλυσίδων αμινοξέος που βρίσκονται στην απομακρυσμένη πλευρά της αίμης. Τα δύο αυτά κατάλοιπα αμινοξέων είναι το Arg38 (απομακρυσμένη αργινίνη) και το His42 (απομακρυσμένη ιστοιδίνη) (Εικόνα 2.8). Το His42, λειτουργεί ως δέκτης πρωτονίου του υπεροξειδίου του υδρογόνου κατά την όξινη – βασική κατάλυση και το Arg38, μπορεί να σταθεροποιήσει το αρνητικό φορτίο στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. [134]



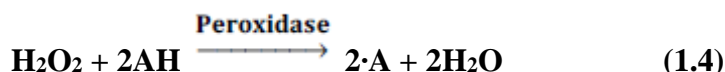
Εικόνα 2.8: Κατάλοιπα αμινοξέων στην περιοχή σύνδεσης της αίμης της HRP C. Η ομάδα της αίμης και το άτομο σιδήρου της αίμης απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα. Το πλησιέστερο κατάλοιπο ιστοιδίνης, His170, είναι συντονισμένο στο άτομο σιδήρου της αίμης, ενώ η αντίστοιχη απομακρυσμένη περιοχή συντονισμού (*distal coordination site*) πάνω από το επίπεδο της αίμης, είναι κενή. [134]

2.4.2. Καταλυτικός μηχανισμός των υπεροξειδασών

Η αντίδραση της υπεροξειδάσης ακολουθεί ένα μοντέλο μηχανισμού τύπου «ring-pong» που προτάθηκε από τον Dunford και τους συνεργάτες του, ενώ μελετούσαν την κατάλυση με το ένζυμο HRP. Αυτός ο μηχανισμός αποτελεί έναν καταλυτικό κύκλο τριών βημάτων που περιλαμβάνει δύο ενδιάμεσα. [132], [140]



Συνολική αντίδραση:



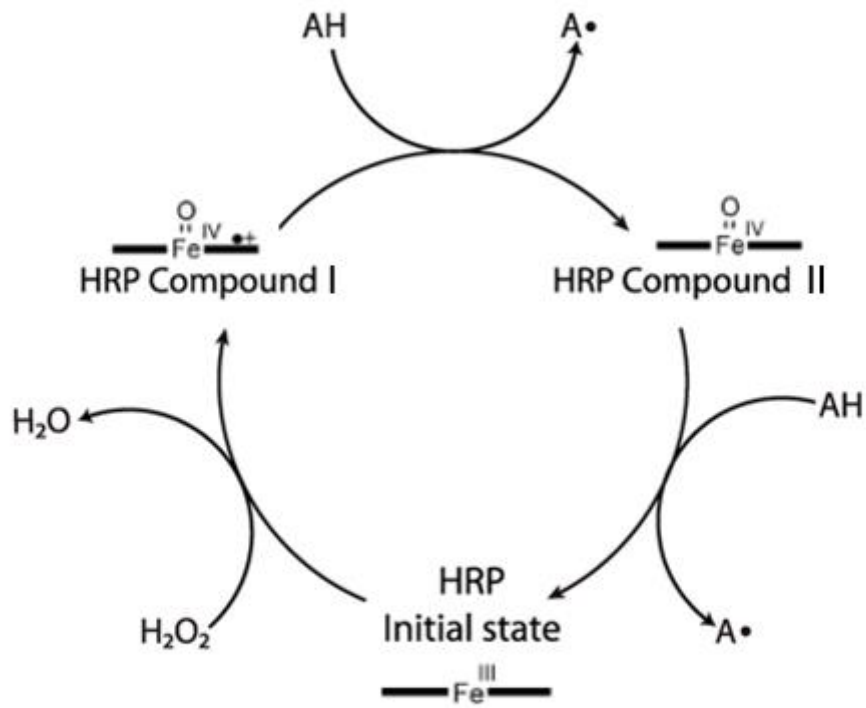
όπου, το AH αντιπροσωπεύει το αναγόμενο υπόστρωμα (φαινόλες και ανιλίνες) και το $\cdot\text{A}$ αντιπροσωπεύει τις φαινυλο- ή ανιλινο- ελεύθερες ρίζες.

Στο σχήμα 2.3 που ακολουθεί, απεικονίζεται συνοπτικά ο καταλυτικός κύκλος της υπεροξειδάσης HRP. Αρχικά, η υπεροξειδάση (HRP Initial state) αντιδρά με το υπεροξείδιο του υδρογόνου για να σχηματίσει το *Compound I*. Κατά την αντίδραση αυτή, η απομακρυσμένη ιστιδίνη, His 42, δέχεται ένα πρωτόνιο από το υπεροξείδιο του υδρογόνου, ενώ η απομακρυσμένη αργινίνη, Arg 38, σταθεροποιεί το φορτίο στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Έτσι, ο τρισθενής σίδηρος, Fe(III), της αίμης, ενώνεται με την ομάδα $-\text{OOH}$ και μετατρέπεται στο ενδιάμεσο μόριο Fe(III)-OOH. Επειδή αυτό το ενδιάμεσο μόριο είναι ασταθές, μπορεί εύκολα να ενωθεί με το πρωτόνιο που απομένει στο His 42 για να σχηματίσει νερό. Οπότε τελικά, το ενδιάμεσο μόριο Fe(III)-OOH οξειδώνεται και μετατρέπεται στο *Compound I*, το οποίο διαθέτει μια ομάδα Fe(IV)=O και ένα κατιονικό δακτύλιο πορφυρίνης.^[132]

Μετά το σχηματισμό του *Compound I*, το αναγωγικό υπόστρωμα (AH) αντιδρά με το ένζυμο. Σε αυτήν την αντίδραση, ένα υπόστρωμα εισέρχεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και προσλαμβάνεται ένα πρωτόνιο μέσω της απομακρυσμένης ιστιδίνης, His 42, από την υδροξυλική ομάδα ή την αμινο-ομάδα. Ταυτόχρονα, ένα ηλεκτρόνιο από την υδροξυλική ομάδα (πχ. αν λάβουμε τη φαινόλη ως υπόστρωμα) θα μεταφερθεί στην αίμη, ανάγοντας τον δακτύλιο πορφυρίνης πίσω στην κανονική του κατάσταση. Αυτή η αντίδραση ολοκληρώνεται με τον σχηματισμό μιας ελεύθερης ρίζας του υποστρώματος ($\cdot\text{A}$) και του *Compound II*, το οποίο περιέχει την ομάδα Fe(IV)=O και ένα δακτύλιο πορφυρίνης στην κανονική του κατάσταση.^[132]

Στο τελευταίο βήμα του κύκλου, το *Compound II* αντιδρά με ένα άλλο υπόστρωμα για να σχηματίσει μια άλλη ελεύθερη ρίζα ($\cdot\text{A}$) και το ένζυμο επιστρέφει στην αρχική κατάσταση ηρεμίας. Κατά την αντίδραση αυτή, ένα άλλο μόριο του υποστρώματος εισέρχεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου και προσλαμβάνεται ένα πρωτόνιο από την απομακρυσμένη ιστιδίνη, His

42. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, το σχηματισμό άλλης μία ελεύθερης ρίζας του υποστρώματος και ενός μορίου νερού.^[132]



Σχήμα 2.3: Καταλυτικός κύκλος υπεροξειδάσης του χρένου (HRP C), όπου AH το αναγόμενο υπόστρωμα (πχ. φαινόλη).^[134]

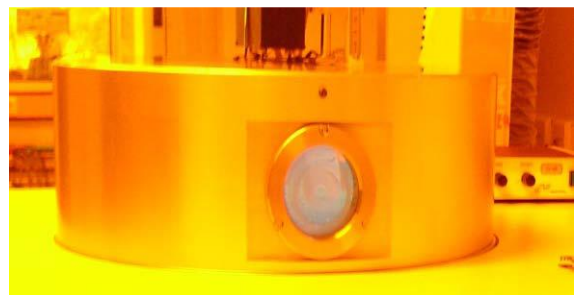
3. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ΚΕΦΑΛΑΙΟΥ

Σε αυτό το κεφάλαιο παρουσιάζονται οι πειραματικές διατάξεις που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της κατασκευής και του χαρακτηρισμού των νανοδομημένων πολυμερικών επιφανειών πριν και μετά την ακινητοποίηση του ενζύμου πάνω σε αυτές.

3.1. Αντιδραστήρας πλάσματος RIE

Ο αντιδραστήρας πλάσματος RIE NE330 (Εικόνα 3.1) βρίσκεται στον καθαρό χώρο του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας και χρησιμοποιείται για την εγχάραξη υλικών, όπως πυρίτιο, νιτρίδιο και οξειδίο του πυριτίου, και φωτοπολυμερή. Η εγχάραξη γίνεται από αέριο σε χαμηλή πίεση, στο οποίο γίνεται εκκένωση πλάσματος με εφαρμογή τάσης RF. Η τάση επιταχύνει τα ιόντα και επιτυγχάνει έντονο βομβαρδισμό εξασφαλίζοντας εγχάραξη με κατάλληλη ανισοτροπία, επιλεκτικότητα και ομοιομορφία.



Εικόνα 3.1: Ο αντιδραστήρας πλάσματος RIE του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας.

Ο θάλαμος διεργασιών είναι κατασκευασμένος από αλουμίνιο και έχει εσωτερική διάμετρο 42 cm. Η κάθοδος, διαμέτρου 33 cm, καλύπτεται από ένα δίσκο χαλαζία, στον οποίο

τοποθετούνται τα προς εγγάραξη δείγματα. Έτσι, αποφευγεται οποιαδήποτε μόλυνση από το χάλυβα της καθόδου. Πάνω από την κάθοδο τοποθετείται το ηλεκτρόδιο της ανόδου, διαμέτρου 30 cm, που είναι γειωμένο και σε ρυθμιζόμενη απόσταση από την κάθοδο. Τα αέρια των διεργασιών τροφοδοτούνται στον θάλαμο συμμετρικά μέσα από την άνοδο. Το σύστημα κενού που επιτρέπει την εκκένωση των αερίων και των προϊόντων των αντιδράσεων, αποτελείται από μία μηχανική αντλία και μια τουρμπο-μοριακή αντλία που εξασφαλίζει κενό μέχρι 10⁻⁶ mbar. Η πίεση του θαλάμου ρυθμίζεται από 5 μέχρι 100 mTorr και διατηρείται σταθερή με τη βοήθεια ρυθμιστικής βαλβίδας, που διαχωρίζει το θάλαμο από το σύστημα κενού. Για την εισαγωγή των αερίων διατίθενται τρεις ρυθμιστές ροής για τα αέρια SF₆, CHF₃ και O₂. Οι μέγιστες ροές είναι 25 sccm, 50 sccm και 100 sccm, αντίστοιχα.

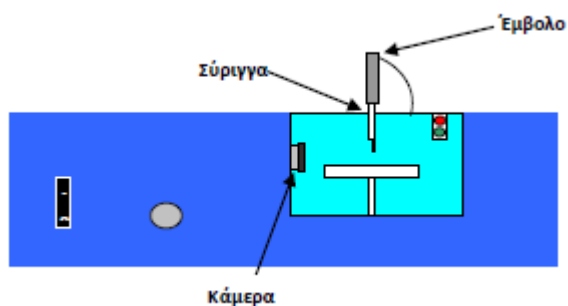
Ο εγχαράκτης λειτουργεί στη συχνότητα εναλλασσόμενης τάσης 13,56 MHz και διαθέτει ένα δίκτυο προσαρμογής (matching network), για να ελαχιστοποιεί την ανακλώμενη ισχύ προς τη πηγή. Το δίκτυο περιλαμβάνει μία σταθερή επαγωγή και δύο μεταβλητούς πυκνωτές. Η μέγιστη ισχύς της γεννήτριας RF είναι 600 W.

Για τον έλεγχο και την παρακολούθηση των επιτελούμενων διεργασιών, το σύστημα είναι εξοπλισμένο με ένα συμβολόμετρο με laser, για τη μέτρηση της αλλαγής του πάχους των δειγμάτων και τον υπολογισμό του ρυθμού εγγάραξης, ένα φασματοφωτόμετρο και ένα φασματογράφο μάζας.

3.2. Σύστημα μέτρησης γωνιών επαφής.

Το σύστημα που χρησιμοποιείται στο εργαστήριο πλάσματος του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας για τις μετρήσεις γωνιών επαφής είναι το GBX Digidrop Contact Angle Measurement System.

Το σύστημα εναποθέτει αυτόματα, με ανέβασμα της βάσης πάνω στην οποία τοποθετείται το δείγμα, μια σταγόνα πάνω στην επιφάνεια, για να μετρηθεί η ικανότητα διαβροχής αυτής. Το υγρό τοποθετείται μέσα σε μια μικρομετρική σύριγγα που συγκρατείται πάνω από το δείγμα. Η επιφάνεια του δείγματος και η άκρη της σύριγγας είναι τοποθετημένες έτσι ώστε να βρίσκονται στο οπτικό πεδίο μιας κάμερας για να φαίνεται στην οθόνη ενός υπολογιστή μια μεγενθυμένη εικόνα της σταγόνας και του σημείου επαφής της με την επιφάνεια. Το σύστημα περιέχει εκτός από την CCD κάμερα για την καταγραφή των δεδομένων, και ένα software για την ανάλυση της εικόνας. Το software αυτό καθορίζει το σχήμα και την περίμετρο της σταγόνας και εξάγει τις γωνίες επαφής (δεξιά και αριστερή γωνία).



Εικόνα 3.2: Σύστημα μέτρησης γωνιών επαφής.

Στον πίνακα που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι προδιαγραφές του συγκεκριμένου συστήματος μέτρησης της γωνίας επαφής:

Εύρος μετρήσεων	0 – 180°
Ακρίβεια	± 0,5°
Διακριτικότητα	0,1°
Όγκος σταγόνας	≥ 0, 5μl
Χωρητικότητα σύριγγας	1ml

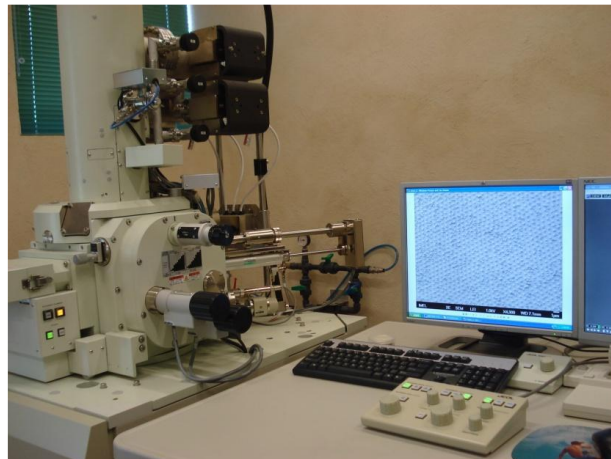
Πίνακας 3.1: Προδιαγραφές μηχανήματος μέτρησης της γωνίας επαφής.

Επισημαίνεται ότι στην παρούσα εργασία, για το σύνολο των μετρήσεων των γωνιών επαφής, χρησιμοποιήθηκαν σταγόνες απιονισμένου νερού με όγκο 5μl.

3.3. Μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονικής δέσμης (SEM)

Για τη μελέτη των δομών που κατασκευάζουμε το βασικό όργανο που χρησιμοποιείται είναι το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης. Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο είναι ένα μικροσκόπιο που όπως υποδηλώνει και το όνομα του στηρίζει τη λειτουργία του σε μια δέσμη ηλεκτρονίων μεγάλης κινητικής ενέργειας που προσπίπτει στην την περιοχή του δείγματος που πρόκειται να μελετηθεί. Η δέσμη των ηλεκτρονίων που προέρχεται από το δείγμα επεξεργάζεται με τη βοήθεια του προγράμματος που συνοδεύει το SEM αναπαριστώντας μια τρισδιάστατη εικόνα της εξωτερικής επιφάνειας της δομής. Το μικροσκόπιο της ηλεκτρονικής σάρωσης του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος είναι το JEOL JSM-7401F FEG SEM, με διακριτική ικανότητα από σημείο σε σημείο κάτω από 1nm.

- Τάση δέσμης: 1-2 KV
- Ρεύμα δέσμης: 2-10 Μα



Εικόνα 3.3: Το μικροσκόπιο JEOL JSM-7401F FEG SEM του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος.

Τα δείγματα προτού παρατηρηθούν στο SEM επιμεταλλώνονται με ένα στρώμα πλατίνας ώστε να μη φορτίζεται η επιφάνεια τους από τα ηλεκτρόνια που πέφτουν πάνω της.

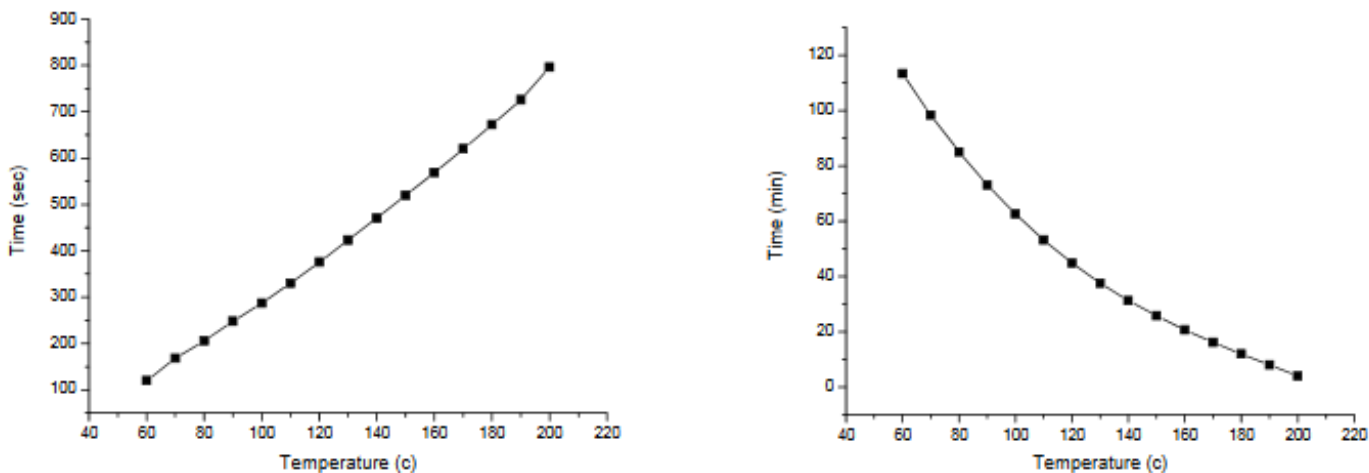
Η επιμετάλλωση με ιοντοβολή (sputtering) πραγματοποιείται μέσα σε μια διάταξη πλάσματος. Το πάχος της επιμετάλλωσης είναι περίπου 10 nm, και επιτυγχάνεται μετά από επιμετάλλωση διάρκειας 2 min.

3.4. Θερμοπρέσα της εταιρίας Carver

Η θερμοπρέσα της εταιρίας Carver είναι ένα απλό σύστημα με το οποίο υπάρχει δυνατότητα να εφαρμόζονται διαφορετικές πιέσεις σε μια ή περισσότερες επιφάνειες παράλληλα με την εφαρμογή θερμοκρασίας (εικόνα 3.4). Κατά την διαδικασία των πειραμάτων, ο χρήστης απλώς εφαρμόζει την θερμοκρασία και την πίεση στις επιφάνειες που θέλει. Στα παρακάτω διαγράμματα, απεικονίζονται οι καμπύλες ανόδου και καθόδου της θερμοκρασίας ώστε να μπορεί ο χρήστης να υπολογίσει τον χρόνο που χρειάζεται για την κάθε διεργασία. Έτσι από τα παραπάνω διαγράμματα προκύπτει ότι χρειάζονται, για παράδειγμα, περίπου 6-8 λεπτά για να φτασουμε στη θερμοκρασία των 120°C. Κατά αντιστοιχία, υπολογίζεται και ο χρόνος πτώσης, ενώ σε συνδυασμό με την θερμοκρασία μπορεί να εφαρμοστεί και η αντίστοιχη πίεση που απαιτείται, όπως βλέπουμε και στο σχήμα 3.1.



Εικόνα 3.4: Η Θερμοπρέσα της εταιρίας Carver του εργαστηρίου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας.



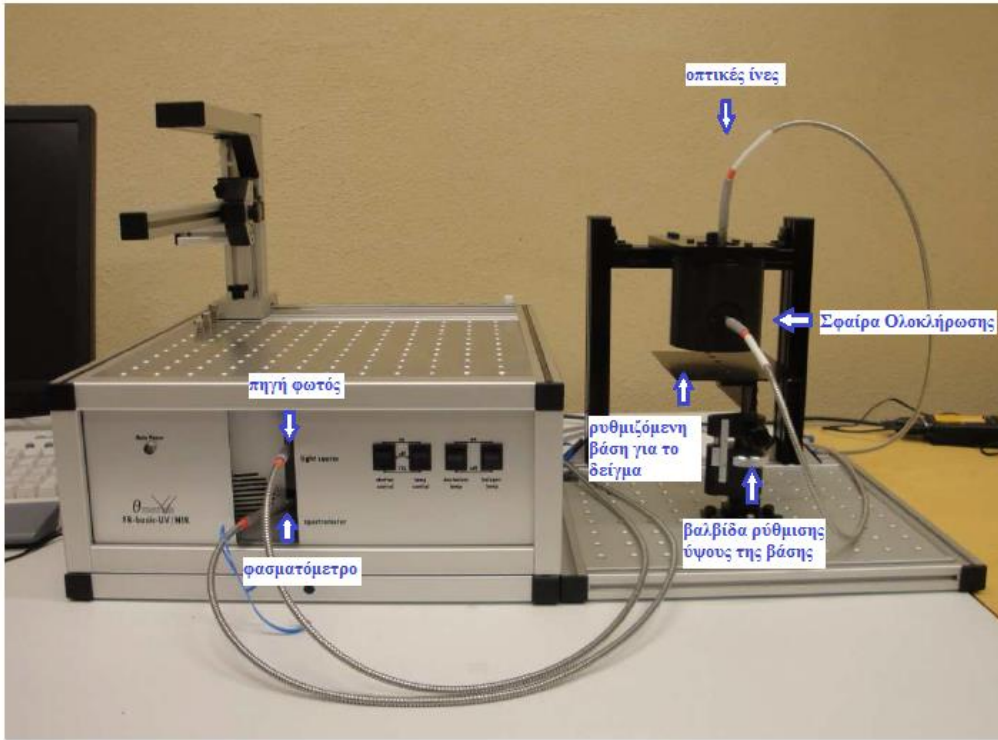
Σχημα 3.1: Καμπύλες ανόδου-καθόδου θερμοκρασίας σε σχέση με τον χρόνο, της θερμοπρέσας του εργαστηρίου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας.

3.5. Σύστημα μέτρησης ανακλαστικότητας - Σφαίρα ολοκλήρωσης

Η σφαίρα ολοκλήρωσης είναι μια οπτική διάταξη που αποτελείται από μια κοιλότητα, της οποίας το εσωτερικό είναι ομοιόμορφα επικαλυμμένο με ένα υλικό υψηλής ανακλαστικότητας, (Polytetrafluoroethylene PTFE) και διαθέτει μικρές οπές που λειτουργούν ως θύρες εισόδου και εξόδου, ούτως ώστε η ακτινοβολία να εισέρχεται στο εσωτερικό της, να προσπίπτει στο εξεταζόμενο δείγμα και εν συνεχεία να συλλέγεται και να καταγράφεται από τον ανιχνευτή. Πιο αναλυτικά, οι ακτίνες φωτός προσπίπτουν σε ένα σημείο του εσωτερικού τοιχώματος και ύστερα από πολλαπλές σκεδαζόμενες ανακλάσεις διαχέονται ομοιόμορφα σε όλα τα υπόλοιπα σημεία της σφαίρας, με αποτέλεσμα να φτάνει στον ανιχνευτή το ολικό σήμα [Εικόνα 3.5(γ)].

Η συνολική διάταξη που χρησιμοποιήθηκε για της μετρήσεις μας, αποτελείται από την σφαίρα ολοκλήρωσης της εταιρίας Ocean Optics και το σύστημα ThetaMetrisis FR-Reflection kit [Εικόνα 3.5(α,β)]. Όπως φαίνεται και στην εικόνα, οι οπτικές ίνες της σφαίρας ολοκλήρωσης, συνδέονται αντιστοίχως με το φασματόμετρο και την πηγή φωτός προκειμένου να μετρηθεί η ολική ανακλαστικότητα του δείγματος, το οποίο τοποθετείται απέναντι από την θύρα εισόδου της σφαίρας (sample port). Η σφαίρα ολοκλήρωσης διατίθεται με «λευκή» ή «μαύρη» παγίδα, η επιλογή της οποίας γίνεται ανάλογα με το αν επιθυμούμε να συμπεριληφθεί ή να αποκλειστεί αντίστοιχα, η κατοπτρική ανάκλαση. Στην παρούσα εργασία, όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν με χρήση της «λευκής» παγίδας και οι οπτικές ίνες που

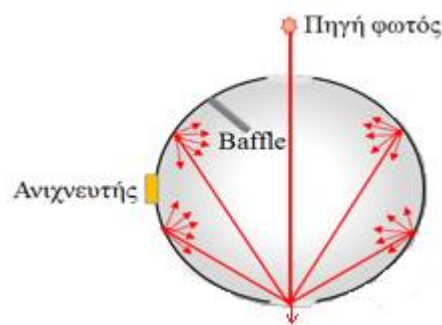
χρησιμοποιήθηκαν είχαν εσωτερική διάμετρο 600μm (P600-2-SR). Η πηγή φωτός της διάταξης μας διαθέτει λάμπα δευτερίου (<600nm) και λάμπα αλογόνου (600 - 950nm).



(α)



(β)



(γ)

Εικόνα 3.5: (α) Απεικόνιση του συστήματος μέτρησης ανακλαστικότητας με τα χαρακτηριστικά του και (β), (γ) η σφαίρα ολοκλήρωσης.

Στον πίνακα που ακολουθεί παρουσιάζονται οι βασικές προδιαγραφές του μοντέλου της σφαίρας ολοκλήρωσης που χρησιμοποιήθηκε στην εργασία:

Φασματικό εύρος	200-2500 nm
Διάμετρος σφαίρας	50 mm
Sample port	8 mm
Εσωτερική επικάλυψη σφαίρας	PTFE-based diffusing material
Ανακλαστικότητα	>98% (400-1500 nm), >95% (250-2000 nm)

Πίνακας 3.2: Προδιαγραφές της σφαίρας ολοκλήρωσης της Ocean Optics - μοντέλο ISP-50-8-R-GT.

3.6. Άλλα χρησιμοποιηθέντα όργανα

Εκτός των οργάνων που περιγράφηκαν ανωτέρω, στα πλαίσια της μεταπτυχιακής εργασίας, για το κομμάτι που αφορά τη κατασκευή του μικροαντιδραστήρα, χρησιμοποιήθηκαν επίσης:

1. Microtiter plate reader (photometer)
2. Συσκευή ελασματοποίησης (Laminator) της εταιρίας Mega Photopolymer για τη στεγανοποίηση των διατάξεων με λεπτό έλασμα (lamination films).
3. Προφιλόμετρο ακίδας της εταιρίας Ambios Technology μοντέλο XP-2 για τη μέτρηση του βάθους των δομών των διατάξεων.
4. Τρυπάνι κωνικής διατομής, της εταιρίας DREMEL, για την διάνοιξη τρυπών στις εισόδους και εξόδους των διατάξεων.

4. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ

4.1. Κατασκευή επιφανειών και αξιολόγηση του ακινητοποιημένου ενζύμου HRP σε νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA.

4.1.1. Υλικά και αντιδραστήρια

Στον παρακάτω πίνακα, παρουσιάζονται τα υλικά, οι διαλύτες και όλα τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της διαδικασίας ακινητοποίησης και αξιολόγησης του ενζύμου σε νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA.

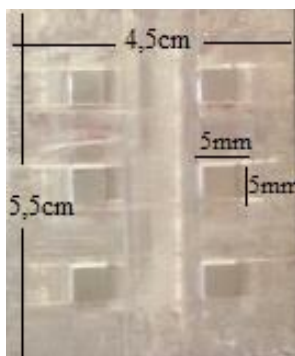
Υλικά & Διαλύτες	Πολύ (μεθακρυλικός μεθυλεστέρας) (PMMA), πάχους 2mm - <i>IRPEN</i> .
	Ισοπροπανόλη (Isopropyl Alcohol, IPA)
	Διμέθυλοσουλφοξείδιο (Dimethylsulfoxide, DMSO)
Βιολογικά αντιδραστήρια	Υπεροξειδάση του χρένου (Peroxidase from horseradish, HRP) - <i>Meetterich</i>
	Υπεροξειδάση του χρένου (Peroxidase from horseradish, HRP) type VI-A - <i>Sigma-Aldrich</i>
	Στρεπταβιδίνη (Streptavidin Protein) - ThermoFischer Scientific
	EZ-Link™ Sulfo-NHS-LC-Biotin - ThermoFischer Scientific
	Οραλβουμίνη βοός (BSA, Cohn fraction V, RIA grade) - Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, ΗΠΑ)
Αντιδραστήρια ομοιοπολικής σύνδεσης	Sulfo-NHS (N-hydroxysulfosuccinimide) - <i>Thermo Fisher Scientific</i>
	1-Ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide hydrochloride (EDC)- Thermo Fisher Scientific
Χρωμογόνα υποστρώματα	2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS)
	Immunopure Metal Enhanced DAB Substrate Kit – <i>Pierce Inc.</i>
Ρυθμιστικά διαλύματα	Phosphate buffer (Na ₂ HPO ₄ ·2H ₂ O/KH ₂ PO ₄)
	Carbonate buffer (Na ₂ CO ₃ / NaHCO ₃)
	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid (MES) buffer

Πίνακας 4.1: Υλικά, διαλύτες και αντιδραστήρια.

4.1.2 Κατασκευή και κατεργασία επιφανειών PMMA με πλάσμα O₂

A. Προετοιμασία επιφανειών PMMA

Το PMMA είναι ένα ευρέως χρησιμοποιούμενο υψηλής διαφάνειας άμορφο πολυμερές με θερμοκρασία υαλώδους μετάπτωσης $T_g \sim 119^\circ\text{C}$. Καθ'όλη τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν υποστρώματα PMMA πάχους 2mm. Στα πρώτα στάδια της μεταπτυχιακής εργασίας, τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν σε επιφάνειες PMMA διαστάσεων $2 \times 2\text{cm}^2$. Στην πορεία, για την καλύτερη εξυπηρέτηση των πειραμάτων, κατασκευάστηκαν κατάλληλες επιφάνειες PMMA διαστάσεων $4,5 \times 5,5\text{cm}^2$ που διέθεταν 6 πηγάδια (wells) η κάθεμία. Για την κατασκευή τέτοιων επιφανειών έγινε χρήση της θερμοπρέσσας της εταιρίας Carver, όπου εφαρμόστηκε η τεχνική θερμής αποτύπωσης πάνω σε επιφάνειες PMMA με τη χρήση δύο σφραγίδων αλουμινίου συνολικής επιφάνειας $4,5 \times 5,5\text{cm}^2$ η κάθε μία. Η κάθε σφραγίδα κατασκευάστηκε ώστε να διαθέτει έξι κίονες διαστάσεων $5 \times 5 \times 1,5\text{mm}^3$ ο καθένας. Οι χαρακτηριστικές διαστάσεις της σφραγίδας αλουμινίου απεικονίζονται στην εικόνα 4.1.



Εικόνα 4.1: Απεικόνιση σφραγίδας αλουμινίου με 6 κίονες με τις χαρακτηριστικές διαστάσεις της.

Προκειμένου να διευκολυνθεί η αποκόλληση της σφραγίδας αλουμινίου από την επιφάνεια PMMA, μετά την εξαγωγή τους από την θερμοπρέσσα, προηγήθηκε επίστρωση της κάθε σφραγίδας με λεπτό φιλμ από πολυτετραφθοροαιθυλένιο (τεφλόν) για 1h στους 100°C . Επίσης, πραγματοποιήθηκε χημικό – μηχανική λείανση της σφραγίδας (lapping), όπου έγινε επίστρωση της σφραγίδας με γαλάκτωμα σκόνης καρβιδίου του πυριτίου, για 50min με ταχύτητα περιστροφής 45rpm, ώστε να μειωθεί η τραχύτητα που διέθετε η κάθε σφραγίδα από κατασκευής .

Η πειραματική διαδικασία κατασκευής, περιελάμβανε ταυτόχρονη εισαγωγή δύο επιφανειών PMMA στη θερμοπρέσσα. Οι βέλτιστες συνθήκες που εφαρμόστηκαν κατά τη διαδικασία θερμής αποτύπωσης των σφραγίδων στις επιφάνειες PMMA, απεικονίζονται στον παρακάτω πίνακα:

Αριθμός επιφανειών PMMA	2
Θερμοκρασία λειτουργίας θερμοπρέσσας	135 °C
Εφαρμοζόμενη πίεση	4000 pounds
Χρόνος παραμονής επιφανειών στη θερμοπρέσσα	20min

Πίνακας 4.2: Συνθήκες λειτουργίας θερμοπρέσσας.

Οι επιφάνειες PMMA που προέκυψαν από την παραπάνω διαδικασία διαθέτουν από έξι πηγάδια χωρητικότητας 37,5μl το καθένα (Εικόνα 4.2). Όλα τα δείγματα πριν από την κατεργασία τους με πλάσμα, καθαρίστηκαν διεξοδικά με ισο-προπυλική-αλκοόλη (IPA) και στη συνέχεια με απιονισμένο νερό (DI), ώστε να αφαιρεθεί κάθε πιθανή μόλυνση (π.χ. σκόνη ή λίπος από επαφή των δειγμάτων).



Εικόνα 4.2: Επιφάνεια PMMA με 6 πηγάδια (wells) όπως προέκυψε με τη μέθοδο της θερμής αποτύπωσης με σφραγίδα αλουμινίου.

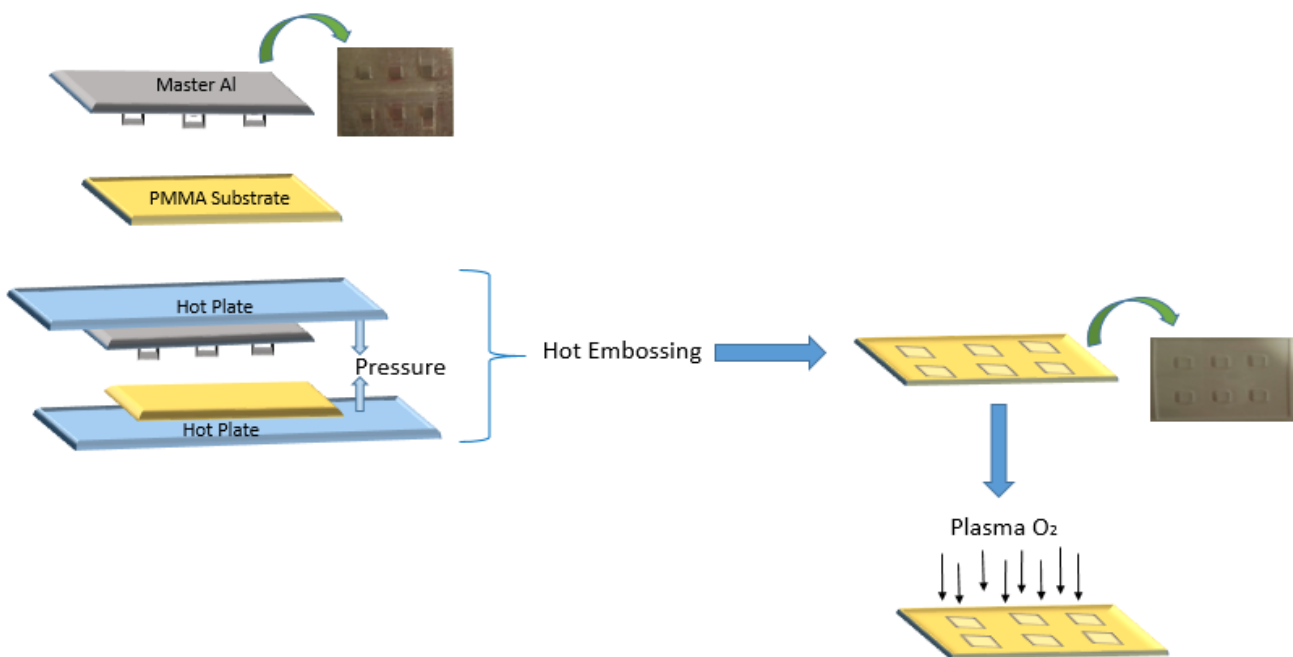
B. Κατεργασία επιφανειών PMMA με πλάσμα O₂

Όλες οι διεργασίες πλάσματος έλαβαν χώρα στον αντιδραστήρα RIE NE330 του καθαρού χώρου του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας. Η κατεργασία των

επιφανειών PMMA με πλάσμα O_2 , πραγματοποιήθηκε σε ισχυρά ανισοτροπικές συνθήκες εγχάραξης με ισχύ πλάσματος 400W, πίεση 10mTorr και ροή οξυγόνου 50 sccm. Οι χρόνοι εγχάραξης που εφαρμόστηκαν στις παραπάνω συνθήκες ήταν: 1 ή 3, 5 ή 6, 10, 15 & 25min. Για ορισμένα πειράματα, εφαρμόστηκαν συνθήκες εγχάραξης με ισχύ πλάσματος 100W, πίεση 100mTorr και χρόνο εγχάραξης 1min ώστε να προκύψουν επιφάνειες PMMA χωρίς τοπογραφία ως δείγματα αναφοράς.

Αμέσως μετά την επεξεργασία με πλάσμα, στην πλειοψηφία των πειραμάτων, εφαρμόστηκε θερμική ανόπτηση στις κατεργασμένες επιφάνειες PMMA προκειμένου να σταθεροποιηθεί η γωνία επαφής, επιταχύνοντας το φαινόμενο της γήρανσης. Η θερμική ανόπτηση έλαβε χώρα στο φούρνο του καθαρού χώρου, στους $110^{\circ}C$ για 1:20min.

Στο σχήμα που ακολουθεί απεικονίζεται η συνολική διαδικασία κατασκευής των επιφανειών PMMA που περιγράφονται στο κεφάλαιο:



Σχήμα 4.1: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας κατασκευής των επιφανειών PMMA με τη διαδικασία θερμής αποτύπωσης και την κατεργασία με πλάσμα O_2 .

Γ. Αξιολόγηση επιφανειών PMMA μετά την κατεργασία με πλάσμα O_2

Η αξιολόγηση των κατεργασμένων επιφανειών έγινε ως προς την ικανότητα διαβροχής και την τραχύτητα τους μετά τη διεργασία πλάσματος και τη θερμική ανόπτηση. Επίσης οι επιφάνειες αξιολογήθηκαν ως προς την υδροφοβική αποκατάσταση (hydrophobic recovery)

τους, καταγράφοντας τη βαθμιαία αύξηση της γωνίας επαφής με το χρόνο. Οι γωνίες επαφής μετρήθηκαν μέσω του συστήματος μέτρησης γωνιών επαφής της εταιρείας GBX-DIGIDROP σε ατμοσφαιρικές συνθήκες περιβάλλοντος. Για όλες τις μετρήσεις των γωνιών επαφής χρησιμοποιήθηκε απιονισμένο νερό και σταγονίδια των 5 μl. Ο έλεγχος της τραχύτητας των επιφανειών πραγματοποιήθηκε με μικροσκοπία σάρωσης ηλεκτρονίων SEM.

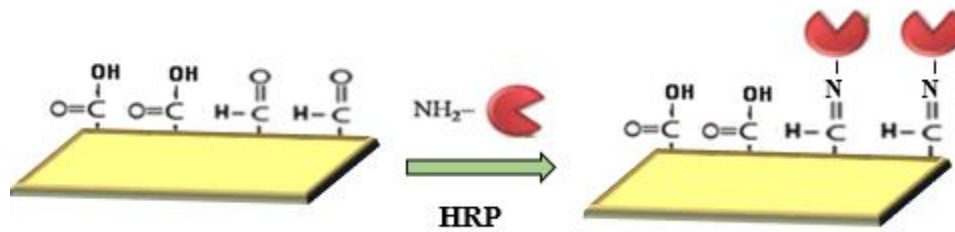
4.1.3. Προσρόφηση του ενζύμου HRP σε νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA

4.1.3.1. Πρωτόκολλο προσρόφησης και αξιολόγησης του ενζύμου HRP σε νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA 2×2 cm²

Η πρώτη σειρά πειραμάτων προσρόφησης του ενζύμου HRP πραγματοποιήθηκε σε νανο-υφασμένες επιφάνειες PMMA με χρόνους κατεργασίας σε πλάσμα O₂, 1, 5 & 10min. Για λόγους σύγκρισης χρησιμοποιήθηκαν και επιφάνειες κατεργασμένες για 1min σε ισχύ πλάσματος 100W καθώς και ακατέργαστα δείγματα PMMA. Επιπλέον, στο στάδιο αυτό, η διαδικασία εφαρμόστηκε τόσο σε δείγματα γηρασμένα, που είχαν πρωτίστως υποστεί θερμική ανόπτηση, όσο και σε δείγματα υπερυδρόφιλα, όπως εξήλθαν απευθείας μετά την κατεργασία τους με πλάσμα. Για την παρούσα σειρά πειραμάτων το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η HRP της εταιρείας Meetterrich. Παρακάτω περιγράφεται η γενική διαδικασία ακινητοποίησης του ενζύμου HRP σε επιφάνειες PMMA διαστάσεων 2×2cm² καθώς και η μέθοδος αξιολόγησης, για τη δραστηριότητα του ενζύμου, που εφαρμόστηκε.

A. Πειραματική διαδικασία

Η ακινητοποίηση του ενζύμου HRP στις επιφάνειες PMMA, πραγματοποιήθηκε αρχικά παρασκευάζοντας το ενζυμικό διάλυμα HRP (1, 5, 25 μg/ml) με διάλυση του ενζύμου σε 100 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Na₂HPO₄·2H₂O/KH₂PO₄) με pH 7 και ακολούθως, εναποθέτοντας με πιπέτα 200μl ενζυμικού διαλύματος HRP σε κάθε επιφάνεια με χρόνο επώασης 1 ή/και 24 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου και σε θάλαμο με υγρασία. Μετά το πέρας της επώασης, τα δείγματα εκπλύθηκαν τρεις φορές με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών για την απομάκρυνση μη συνδεδεμένου ενζύμου από την επιφάνεια. Στο σχήμα που ακολουθεί, απεικονίζεται η απευθείας ακινητοποίηση του ενζύμου HRP με τη μέθοδο της προσρόφησης στις σχηματιζόμενες καρβονλικές ομάδες των επιφανειών PMMA μετά την ενεργοποίησή τους με πλάσμα:



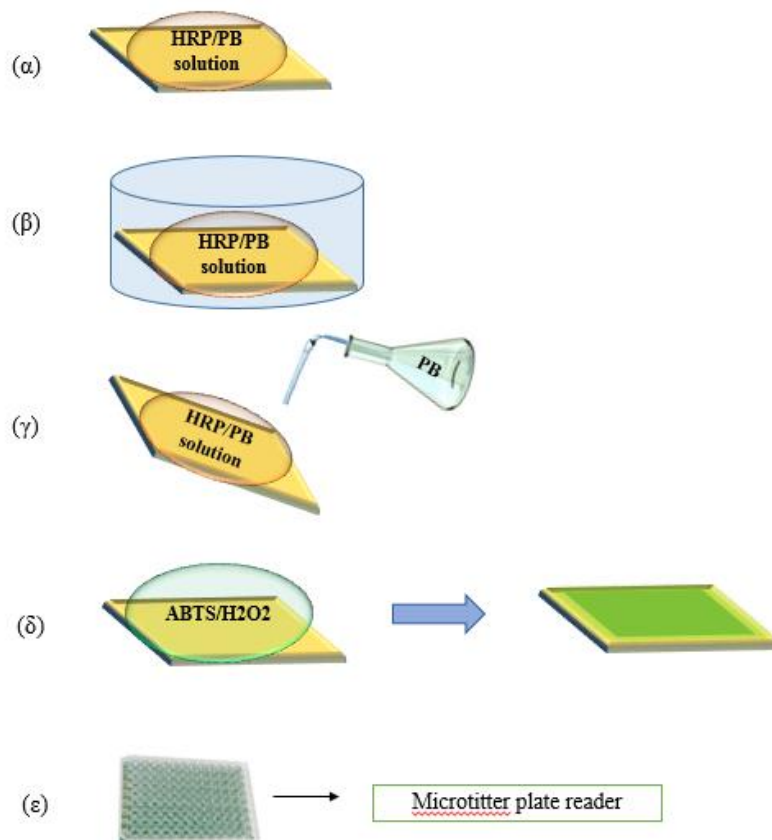
Σχήμα 4.2: Απευθείας ακινητοποίηση του ενζύμου HRP στις ενεργοποιημένες με πλάσμα O_2 επιφάνειες PMMA.

B. Αξιολόγηση του ακινητοποιημένου ενζύμου HRP

Η αξιολόγηση της δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου HRP, πραγματοποιήθηκε αμέσως μετά την έκπλυση των δειγμάτων με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, εναποθέτοντας 300μl διαλύματος ABTS/ H_2O_2 , σε κάθε επιφάνεια, με χρόνο παραμονής 4min.

Στη συνέχεια, έγινε χρήση ενός τρυβλίου 96 βοθρίων (microtiter 96-wells plate), όπου σε κάθε πηγάδι προστέθηκαν 100μl του υπερκείμενου διαλύματος που συλλέξαμε από κάθε επιφάνεια. Η εκτίμηση της δραστηριότητας του HRP έγινε με την καταγραφή της απορρόφησης κάθε δείγματος που περιείχε το τριβλίο, στο φασματοφωτόμετρο (405nm, 0,1sec).

Στο ακόλουθο σχήμα (4.3) απεικονίζεται η διαδικασία ακινητοποίησης και αξιολόγησης του ενζύμου HRP σε επιφάνειες PMMA διαστάσεων $2 \times 2 \text{cm}^2$:



Σχήμα 4.3: Διαδικασία προσρόφησης και αξιολόγησης του ενζύμου HRP στις επιφάνειες PMMA 2×2cm²: (α) χειροκίνητη εναπόθεση διαλυμάτων HRP σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH 7, (β) επώαση μέχρι και 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, σε θάλαμο με υγρασία, (γ) έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών(PB) 100 mM, pH 7, (δ) προσθήκη του χρωμογόνου υποστρώματος ABTS σε H₂O₂ πάνω στην επιφάνεια και επώαση για 4min, (ε) συλλογή υπερκείμενου διαλύματος από την επιφάνεια σε τριβλίο και καταγραφή της απορρόφησης.

4.1.3.2. Πρωτόκολλο προσρόφησης και αξιολόγησης του ενζύμου HRP σε νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA 6 πηγαδιών διαστάσεων 5×5mm²

Η δεύτερη σειρά πειραμάτων προσρόφησης του ενζύμου HRP πραγματοποιήθηκε σε νανο-υφασμένες επιφάνειες PMMA με χρόνους κατεργασίας σε πλάσμα O₂: 3, 6, 10, 15 & 25min. Όλες οι επιφάνειες που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα, ήταν της κατασκευής που περιγράφεται στο κεφάλαιο 4.1., και είχαν υποστεί στο σύνολό τους θερμική ανόπτηση μετά την κατεργασία τους με πλάσμα. Για την παρούσα σειρά πειραμάτων, το ένζυμο που

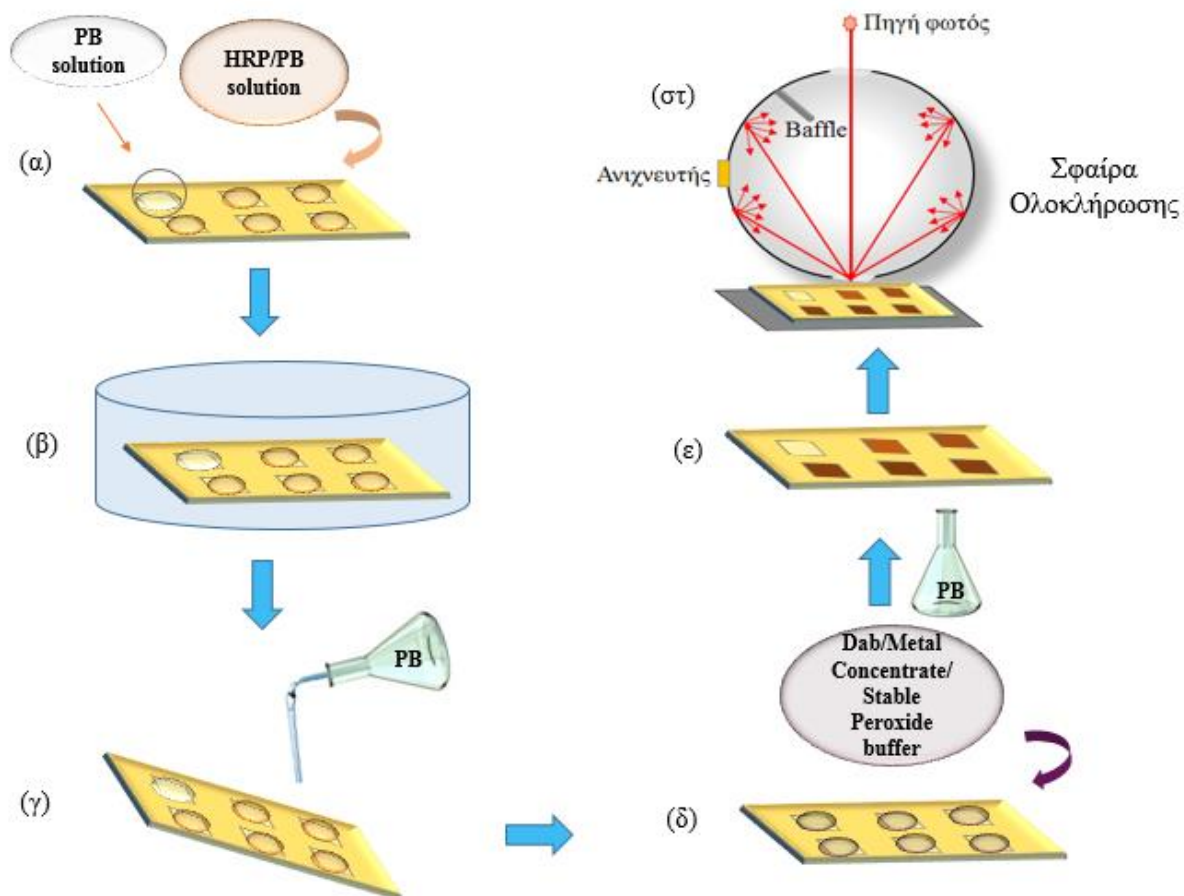
χρησιμοποιήθηκε ήταν η HRP της εταιρίας Sigma Aldrich. Η γενική διαδικασία ακινητοποίησης του ενζύμου HRP, καθώς και η μέθοδος αξιολόγησης, που περιγράφονται παρακάτω, αφορούν τη διερεύνηση επιφανειών PMMA διαφορετικής τραχύτητας ως προς την προσρόφηση ενζύμου σε διάφορες συγκεντρώσεις.

A. Πειραματική διαδικασία

Η ακινητοποίηση του ενζύμου HRP στις επιφάνειες PMMA, πραγματοποιήθηκε μέσω εναπόθεσης στα πηγάδια μιας επιφάνειας συγκεκριμένης τραχύτητας, 25μl διαλυμάτων HRP [(25-1000 μg/ml) σε 100 mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών] με επώαση για 2-24 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου και σε θάλαμο με υγρασία. Σε κάθε επιφάνεια υπήρχε από ένα πηγάδι στο οποίο προστέθηκε μόνο το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών, απουσία ενζύμου (πηγάδι αναφοράς). Σε κάθε ένα από τα υπόλοιπα πηγάδια της επιφάνειας προστέθηκε διάλυμα HRP με διαφορετική συγκέντρωση. Μετά το πέρας της επώασης, τα δείγματα εκπλύθηκαν τρεις φορές με το ρυθμιστικό διάλυμα για την απομάκρυνση μη συνδεδεμένου ενζύμου από την επιφάνεια.

B. Αξιολόγηση του ακινητοποιημένου ενζύμου HRP

Για την αξιολόγηση της δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου HRP, εφαρμόστηκε η μέθοδος προσθήκης 25μl διαλύματος χρωμογόνου υποστρώματος σε υπεροξείδιο του υδρογόνου, σε κάθε πηγάδι της κάθε επιφάνειας. Ο χρόνος επώασης προσαρμόστηκε κατά περίπτωση από 4 έως 14min, ανάλογα με το χρωμογόνο υπόστρωμα. Μετά το πέρας της αντίδρασης, οι επιφάνειες εκπλύθηκαν με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και απιονισμένο νερό. Ακολούθως οδηγήθηκαν στη σφαίρα ολοκλήρωσης, όπου μετρήθηκε η σχετική ανακλαστικότητα των δειγμάτων, όπως θα αναλυθεί στη συνέχεια. Η συνολική διαδικασία της ακινητοποίησης του ενζύμου και της αξιολόγησής τους απεικονίζεται στο σχήμα 4.4:



Σχήμα 4.4: Διαδικασία ακινητοποίησης με φυσική προσρόφηση και αξιολόγησης του ενζύμου HRP στις επιφάνειες PMMA 6 πηγαδιών: (α) χειροκίνητη εναπόθεση διαλυμάτων HRP(25-1000 $\mu\text{g/ml}$) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH 7 στα πηγάδια των επιφανειών του PMMA, εκτός από ένα (πηγάδι αναφοράς), (β) επώαση μέχρι και 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, σε θάλαμο με υγρασία, (γ) έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών(PB) 100 mM, pH 7, (δ) προσθήκη του χρωμογόνου υποστρώματος Dab/Metal Concentrate/Stable Peroxide buffer σε κάθε πηγάδι της επιφάνειας και επώαση για 14min, (ε) μετά την έκπλυση με PB και απιονισμένο νερό και στέγνωμα της επιφάνειας, δημιουργία καφέ ιζήματος διαφορετικής έντασης σε κάθε πηγάδι, ανάλογα της συγκέντρωσης HRP, (στ) μετρήσεις σχετικής ανακλαστικότητας με τη σφαίρα ολοκλήρωσης.

Γ. Μετρήσεις με τη σφαίρα ολοκλήρωσης

Η σφαίρα ολοκλήρωσης, η λειτουργία της οποίας αναπτύχθηκε λεπτομερώς στο κεφάλαιο 3, χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να μετρηθεί η ανακλαστικότητα των δειγμάτων, μετά την προσθήκη του χρωμογόνου υποστρώματος dab/ Metal Concentrate/Stable Peroxide

buffer στα πηγάδια των επιφανειών PMMA διαφορετικής τραχύτητας που περιείχαν ενζυμικό διάλυμα HRP. Ο χρόνος ολοκλήρωσης για κάθε μέτρηση ήταν 4min. Το δείγμα αναφοράς σε κάθε περίπτωση ήταν το αντίστοιχο πηγάδι κάθε επιφάνειας, από το οποίο απουσίαζε το ένζυμο HRP. Με βάση αυτό, υπολογίστηκε η σχετική ανακλαστικότητα του προς μελέτη δείγματος $R(\lambda)$ (σχέση 4.1.) την οποία ακολούθως μετατρέψαμε σε απορρόφηση (A) (σχέση 4.2.) για να προκύψουν τα αντίστοιχα διαγράμματα. Από τα πειράματα αυτά, προέκυψε η επιφάνεια PMMA με τη βέλτιστη τραχύτητα, ο βέλτιστος χρόνος επώασης του ενζύμου και η βέλτιστη συγκέντρωση HRP για φυσική προσρόφηση σε νανο – υφασμένες επιφάνειες.

$$R(\lambda) = \left(\frac{I_{sam} - I_{dark}}{I_{ref} - I_{dark}} \right) \times 100\% \quad \text{Σχέση (4.1)}$$

$$A = -\log \left(\frac{R(\lambda)}{100} \right) \quad \text{Σχέση (4.2)}$$

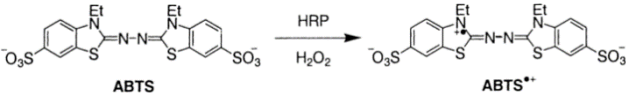
Όπου:

I_{sam} : η ένταση του φωτός που καταγράφεται όταν το φως ανακλάται από το δείγμα ενδιαφέροντος

I_{ref} : η ένταση του φωτός που καταγράφεται όταν το φως ανακλάται από το δείγμα αναφοράς

I_{dark} : η ένταση του φωτός που καταγράφεται όταν κλείσουμε την πηγή του φωτός

Στον πίνακα που ακολουθεί, απεικονίζονται συνοπτικά τα πρωτόκολλα παρασκευής για κάθε χρωμογόνο υπόστρωμα μαζί με τον τρόπο δράσης τους καθώς και η μέθοδος μέτρησης που εφαρμόστηκε για την αξιολόγησή τους.

Χρωμογόνο υπόστρωμα	Πρωτόκολλο παρασκευής	Χαρακτηριστική αντίδραση παρουσία HRP	Μέθοδος αξιολόγησης
1.ABTS/H ₂ O ₂	Έτοιμο διάλυμα ABTS/H ₂ O ₂ . Αραίωση 5 φορές σε SDS (ώστε να σταματήσει η εξέλιξη της αντίδρασης). Χρόνος παραμονής 4min σε κάθε well.	 <p>Πράσινο χρώμα διαλύματος</p>	Μέτρηση Απορρόφησης (405nm) – Microtitter Plate Reader
2.Dab/Metal Concentrate/Stable Peroxide buffer	Διάλυση του Dab-Metal Concentrate σε Stable Peroxide buffer σε αναλογία 1:10 με πολύ καλή ανάδευση. Χρόνος παραμονής 14min σε κάθε well.	<p>Peroxidase + H₂O₂ -> O₂ + 2H₂O</p> <p>O₂ + DAB/Metal concentrate -> σκούρο καφέ ίζημα</p>	Μέτρηση ανακλαστικότητας – Σφαίρα Ολοκλήρωσης

Πίνακας 4.3: Πρωτόκολλα παρασκευής χρωμογόνων υποστρωμάτων για την αξιολόγηση της δραστηριότητας του ενζύμου HRP.

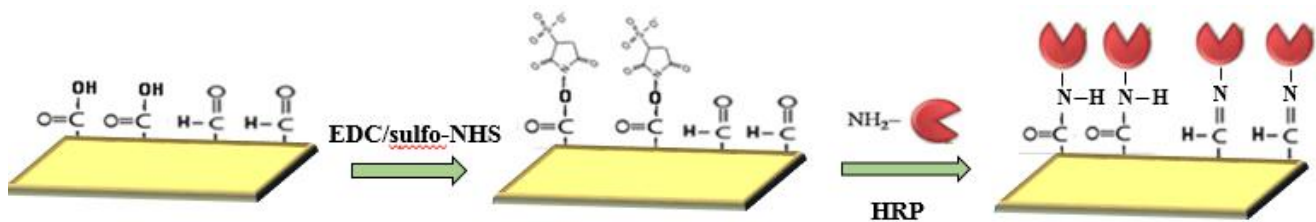
4.1.4. Ομοιοπολική σύνδεση του ενζύμου HRP σε νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA

Η διαδικασία ομοιοπολικής σύνδεσης του ενζύμου HRP, πραγματοποιήθηκε σε νανο-υφασμένες επιφάνειες PMMA με χρόνο κατεργασίας σε πλάσμα O₂ 10min και μετά από θερμική ανόπτηση. Όλες οι επιφάνειες που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα, ήταν της κατασκευής που περιγράφεται στο κεφάλαιο 4.1. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε σε αυτή τη σειρά πειραμάτων ήταν η HRP της εταιρίας Sigma Aldrich.

Η διαδικασία ομοιοπολικής σύνδεσης του ενζύμου HRP στις νανο- υφασμένες επιφάνειες PMMA, βασίζεται στην περαιτέρω ενεργοποίηση των καρβοξυλικών ομάδων που σχηματίζονται στην επιφάνεια PMMA μετά την κατεργασία τους με πλάσμα O₂. Η περαιτέρω ενεργοποίηση λαμβάνει χώρα κατά την επώαση των επιφανειών με διάλυμα sulfo –NHS/EDC σε ρυθμιστικό διάλυμα MES. Μετά την ενεργοποίηση, οι επιφάνειες επωάζονται με το

ενζυμικό διάλυμα, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ισχυρών πεπτιδικών δεσμών μεταξύ των ενεργοποιημένων καρβοξυλικών ομάδων της επιφάνειας και των αμινο - ομάδων του ενζύμου.

Η διαδικασία ομοιοπολικής σύνδεσης του ενζύμου HRP στις νανο - υφασμένες επιφάνειες PMMA απεικονίζεται στο σχήμα 4.5:



Σχήμα 4.5: Σχηματική αναπαράσταση ομοιοπολικής σύνδεσης του ενζύμου στις κατεργασμένες επιφάνειες PMMA: **1)** Ενεργοποίηση των καρβοξυλικών ομάδων με εναπόθεση διαλύματος που περιέχει 5mM sulfo -NHS και 10mM EDC σε 0.1M MES buffer, pH 5 & επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. **2)** Έκπλυση των επιφανειών με MES buffer και ακολούθως εναπόθεση του ενζύμου HRP σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PB 100mM, pH 7.4, επώαση για 2 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου και σε θάλαμο με υγρασία.

Στο παρόν πείραμα, έγινε εναπόθεση διαφορετικών συγκεντρώσεων του ενζύμου HRP [(50 – 500μg/ml) σε 100mM ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών] ξεχωριστά σε κάθε επιφάνεια, έτσι ώστε κάθε επιφάνεια ίδιας τραχύτητας να περιέχει διαφορετική συγκέντρωση ενζύμου. Για την αξιολόγηση της δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου HRP, έγινε προσθήκη 25μl διαλύματος Dab/Metal Concentrate/Stable Peroxide buffer, σε κάθε πηγάδι της κάθε επιφάνειας, με χρόνο παραμονής 14min. Μετά την έκπλυση των επιφανειών με PBS και απιονισμένο νερό, έγιναν μετρήσεις ανακλαστικότητας κάθε δείγματος στη σφαίρα ολοκλήρωσης όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 4.1.3.

4.1.5. Σύνδεση του ενζύμου HRP στις νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA μέσω του συμπλέγματος στρεπταβιδίνης – βιοτίνης

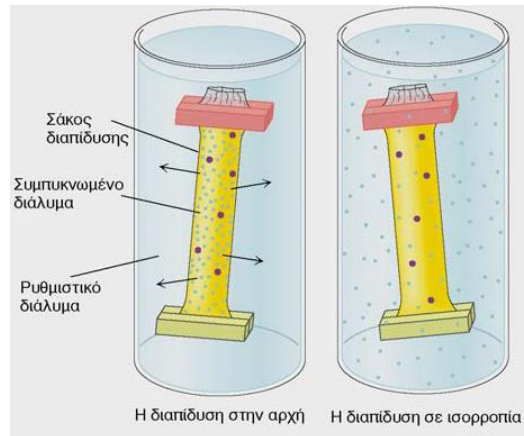
4.1.5.1. Πρωτόκολλο παρασκευής βιοτινυλιωμένου ενζύμου HRP

Για τη βιοτινυλίωση του ενζύμου HRP ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Αρχικά, παρασκευάστηκε πυκνό διάλυμα HRP συγκέντρωσης 2mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα ανθρακικών/όξινων ανθρακικών αλάτων ($\text{Na}_2\text{CO}_3/\text{NaHCO}_3$) 1M, pH 9.1 το οποίο περιείχε 0.9% NaCl. Επίσης, παρασκευάστηκε διάλυμα βιοτίνης συγκέντρωσης 100mg/ml σε διμέθυλοσουλφοξείδιο (DMSO). Στο διάλυμα του HRP, προστέθηκε το διάλυμα βιοτίνης στάγδην και το μείγμα επώαστηκε επί 2 ώρες υπό ανάδευση, σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να προκύψει η βιοτινυλιωμένη HRP (Σχήμα 4.6).



Σχήμα 4.6: Σχηματική απεικόνιση βιοτινυλίωσης του ενζύμου HRP.

Μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, εφαρμόστηκε η τεχνική της διαπίδυσης, σύμφωνα με την οποία έγινε απόχυση του διαλύματος της βιοτινυλιωμένης HRP μέσα σε ημιπερατή μεμβράνη (σάκος διαπίδυσης), έτσι ώστε τα μόρια με διάμετρο μεγαλύτερη από τους πόρους της μεμβράνης να συγκρατηθούν μέσα στον σάκο διαπίδυσης, ενώ τα μικρά μόρια να διαχυθούν δια μέσω των πόρων, στον διαλύτη που περιβάλλει τον σάκο (Σχήμα 4.7). Για τη διαπίδυση παρασκευάστηκαν συνολικά 51 ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 100mM με pH 7.4.

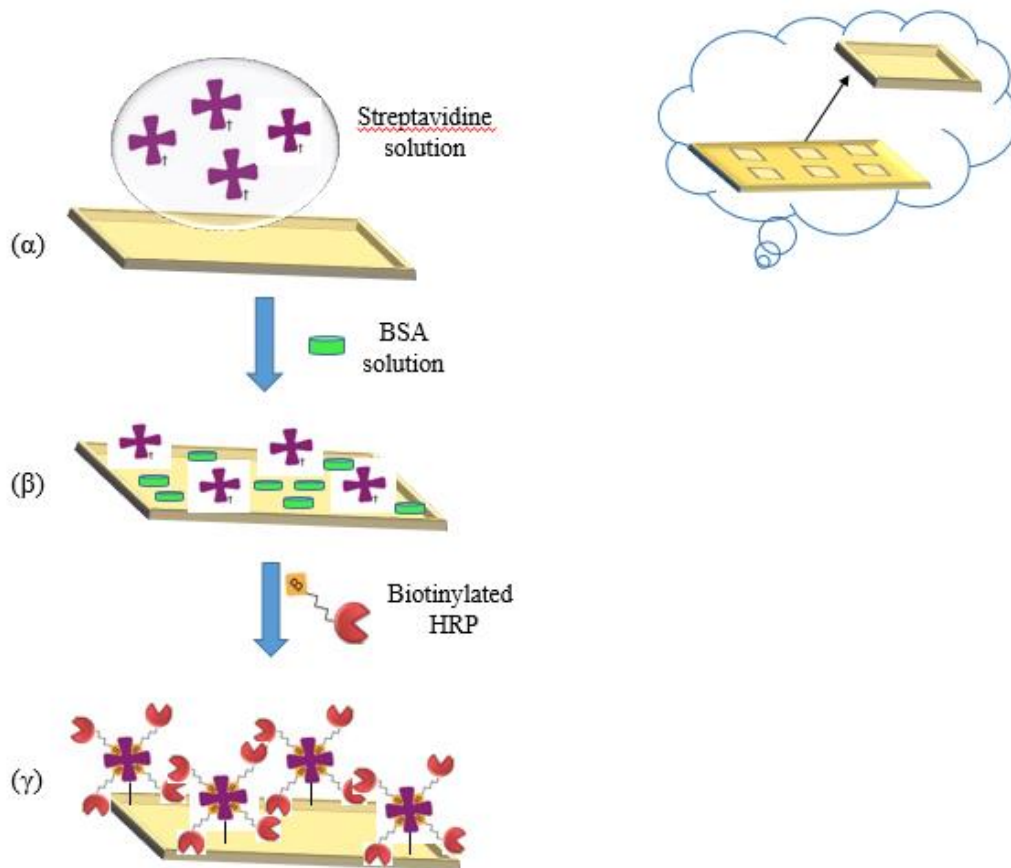


Σχήμα 4.7: Το σύστημα αφέθηκε να έρθει σε 100% ισορροπία στους 4°C με ταυτόχρονη ανάδευση για 24 ώρες. Ακολούθως, ζυγίστηκε το περιεχόμενο της μεμβράνης και η νέα συγκέντρωση του βιοτινυλιωμένου ενζύμου HRP προέκυψε 1.8mg/ml.

4.1.5.2. Ακίνητοποίηση του βιοτινυλιωμένου ενζύμου HRP σε νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA κατεργασμένες με στρεπταβιδίνη

Το παρόν πείραμα χωρίστηκε σε δύο στάδια. Σε πρώτο στάδιο, έγινε βαθμονόμηση της στρεπταβιδίνης ώστε να καταλήξουμε στη βέλτιστη συγκέντρωση που θα εφαρμοστεί στην πορεία των πειραμάτων. Η βαθμονόμηση πραγματοποιήθηκε μέσω εναπόθεσης στα πηγάδια μιας επιφάνειας συγκεκριμένης τραχύτητας, 25μl στρεπταβιδίνης [(50 – 500μg/ml) σε 100 mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών με pH 7] με χρόνο επώασης 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Για τον αποκλεισμό των ελεύθερων θέσεων σε κάθε επιφάνεια, παρασκευάστηκε διάλυμα αποκλεισμού 10mg/ml (blocking buffer) διαλύοντας βόειο οραλβουμίνη (BSA) με pH 5 σε 100mM ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών, pH 7. Μετά το πέρας της επώασης, τα δείγματα εκπλύθηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και ακολούθως εμβαπτίστηκαν στο διάλυμα αποκλεισμού για 1 ώρα. Ακολούθησε ξανά έκπλυση των δειγμάτων με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και αμέσως μετά πραγματοποιήθηκε εναπόθεση 200μg/ml βιοτινυλιωμένου ενζύμου HRP σε διάλυμα αποκλεισμού 10mg/ml, για κάθε επιφάνεια ορισμένης συγκέντρωσης στρεπταβιδίνης, με χρόνο επώασης 1 ώρα. Το δεύτερο στάδιο αφορά τη βαθμονόμηση του βιοτινυλιωμένου ενζύμου HRP. Στην περίπτωση αυτή ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία που περιγράφεται παραπάνω, διατηρώντας όμως σταθερή τη συγκέντρωση της στρεπταβιδίνης για όλες τις επιφάνειες και δοκιμάζοντας διαφορετικές συγκεντρώσεις βιοτινυλιωμένου ενζύμου HRP (50 – 500μg/ml). Στο ακόλουθο σχήμα (4.8), απεικονίζεται η

γενική διαδικασία ακινητοποίησης του βιοτινυλιωμένου ενζύμου HRP στα πηγάδια επιφάνειας PMMA, μέσω του συμπλέγματος βιοτίνης – στρεπταβιδίνης:



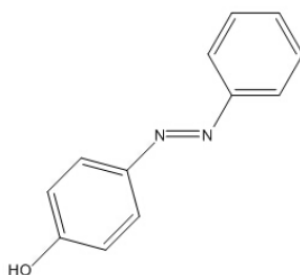
Σχήμα 4.8: Σχηματική απεικόνιση ακινητοποίησης του ενζύμου HRP με τη μέθοδο του συμπλέγματος στρεπταβιδίνης – βιοτίνης: (α) Χειροκίνητη εναπόθεση διαλύματος στρεπταβιδίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH 7, στα πηγάδια των επιφανειών PMMA και επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, β) κατεργασία των επιφανειών με διάλυμα αποκλεισμού των ελεύθερων θέσεων του υποστρώματος αποτελούμενο από 10 mg/ml BSA σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH 7 και επώαση για 1 ώρα, (γ) χειροκίνητη εναπόθεση βιοτινυλιωμένου ενζύμου HRP σε διάλυμα BSA 10mg/ml και επώαση για 1 ώρα. Σε όλα τα ενδιάμεσα στάδια της διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε έκπλυση των επιφανειών με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH 7.

Η αξιολόγηση της δραστηριότητας του ακινητοποιημένου βιοτινυλιωμένου ενζύμου HRP, έγινε με την προσθήκη 25μl διαλύματος Dab/Metal Concentrate/Stable Peroxide buffer, σε κάθε πηγάδι των επιφανειών, με χρόνο παραμονής 14min. Οι επιφάνειες ακολούθως εκπλύθηκαν με PBS και απιονισμένο νερό και οδηγήθηκαν στη σφαίρα ολοκλήρωσης όπου

πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις ανακλαστικότητας κάθε δείγματος. Ως αναφορά σε όλες τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκε το πηγάδι εκείνο από κάθε επιφάνεια, από το οποίο απουσίαζε το βιοτινυλιωμένο ένζυμο HRP.

4.2. Μελέτη καταλυτικής οξειδωσης της 4 – φαινυλο-αζο-φαινόλης, με χρήση ενζυματικού μικροαντιδραστήρα σε ψηφίδα, με ακινητοποιημένη HRP.

Για την παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκε η ένωση 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλη με 98% καθαρότητα από την εταιρία Aldrich – Chemie. Η δομή της ένωσης και τα φυσικοχημικά χαρακτηριστικά της ένωσης απεικονίζονται στην εικόνα 4.3 και τον πίνακα 4.4 αντίστοιχα. Για την παρασκευή του αντιδρώντος μείγματος, χρησιμοποιήθηκε υπεροξείδιο του υδρογόνου (H₂O₂) (30% wt. %), ενώ όλα τα διαλύματα παρασκευάστηκαν σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 0.1M με pH 7. Το ένζυμο που χρησιμοποιήθηκε για την ακινητοποίηση στα μικρο-κανάλια του μικρο-αντιδραστήρα ήταν η υπεροξειδάση του χρένου (HRP) τύπου VI-A από την Sigma – Aldrich.



Εικόνα 4.3: Δομή της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης.

Ιδιότητες	4 – φαινυλο – αζο – φαινόλη
Χημικός τύπος	C ₁₂ H ₁₀ N ₂ O
Μοριακό βάρος	198.2 g/mol
Φυσική κατάσταση	Κίτρινη σκόνη
Σημείο τήξης / Σημείο βρασμού	155-157 °C / 220-230 °C
pKa	8.2
Υδατοδιαλυτότητα	Αδιάλυτο
Διαλυτότητα σε διαλύτες	Ακετόνη, αιθανόλη, βενζένιο κ.α.

Πίνακας 4.4: Φυσικοχημικές ιδιότητες της 4 -- φαινυλο – αζο – φαινόλης

Το διάλυμα 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης/ H_2O_2 παρασκευάστηκε σε μοριακή αναλογία 1:1.5 mM. Η 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλη, λόγω του ότι είναι αδιάλυτη σε νερό και διαλυτή σε αλκοόλες, διαλύθηκε αρχικά σε 1ml αιθανόλης και ακολούθως συμπληρώθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών μέχρι τα 10ml. Η διαδικασία έλαβε χώρα υπό συνεχή ανάδευση. Μετά την πλήρη διάλυση της φαινόλης, παρασκευάστηκε το μείγμα 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης/ H_2O_2 αναμιγνύοντας ίσα μέρη φαινόλης και υπεροξειδίου του υδρογόνου.

Για την ακινητοποίηση του ενζύμου HRP, παρασκευάστηκε διάλυμα HRP/ ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών 100mM, σε συγκέντρωση 200μg/ml και εναποτέθηκε πάνω στα μικροκανάλια του μικρο-αντιδραστήρα σε περίσσεια ποσότητα, όπου αφέθηκε για επώαση όλο το βράδυ σε θάλαμο με υγρασία. Μετά το πέρας του χρόνου επώασης πραγματοποιήθηκε προσεκτική έκπλυση του μικρο-αντιδραστήρα με το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών και η επιφάνεια στεγνώθηκε υπό ροή αζώτου. Η διαδικασία ακινητοποίησης του ενζύμου πάνω στον μικρο-αντιδραστήρα σε κάθε περίπτωση προηγήθηκε της διαδικασίας συγκόλλησης των διατάξεων με λεπτό έλασμα.

4.2.1. Σχεδίαση και κατασκευή μικρο – αντιδραστήρα πάνω σε ψηφίδα PMMA

Ο σχεδιασμός των καναλιών του μικρο – αντιδραστήρα που θα χρησιμοποιήσουμε στην παρούσα εργασία, έγινε με τη βοήθεια προγραμμάτων CAD. Η κατασκευή του μικρο – αντιδραστήρα , πραγματοποιήθηκε στο Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο, όπου εφαρμόστηκε η τεχνική CNC Milling, για τη δημιουργία των μικροκαναλιών, σε ψηφίδα PMMA πάχους 2mm. Ο μικρο – αντιδραστήρας όπως μπορούμε να δούμε στην εικόνα, αποτελείται από 17 μαιάνδρους, δύο εισόδους και ένα μικροαναμείκτη (micromixer) με μεσό βάθος 158μm. Το συνολικό μήκος των μαιάνδρων είναι 8cm και το συνολικό εμβαδόν της μικροδιάταξης, όπως υπολογίστηκε με χρήση του προγράμματος Autocad, 122.3mm². Για την εισαγωγή και εξαγωγή των ρευστών από την διάταξη, έγινε διάνοιξη κωνικών τρυπών σε κάθε είσοδο και στην έξοδο των μικροκαναλιών, με τρυπάνι κωνικής διατομής της εταιρίας DREMEL. Στην εικόνα 4.4., απεικονίζεται η μικρορευστονική διάταξη καθώς και η αντίστοιχη μάσκα (stencil) σε υπόστρωμα PMMA πάχους 0,5mm, που χρησιμοποιήθηκε κατά την κατεργασία των διατάξεων με πλάσμα O_2 για τη δημιουργία τοπογραφίας στην περιοχή των μικροκαναλιών.



(α)

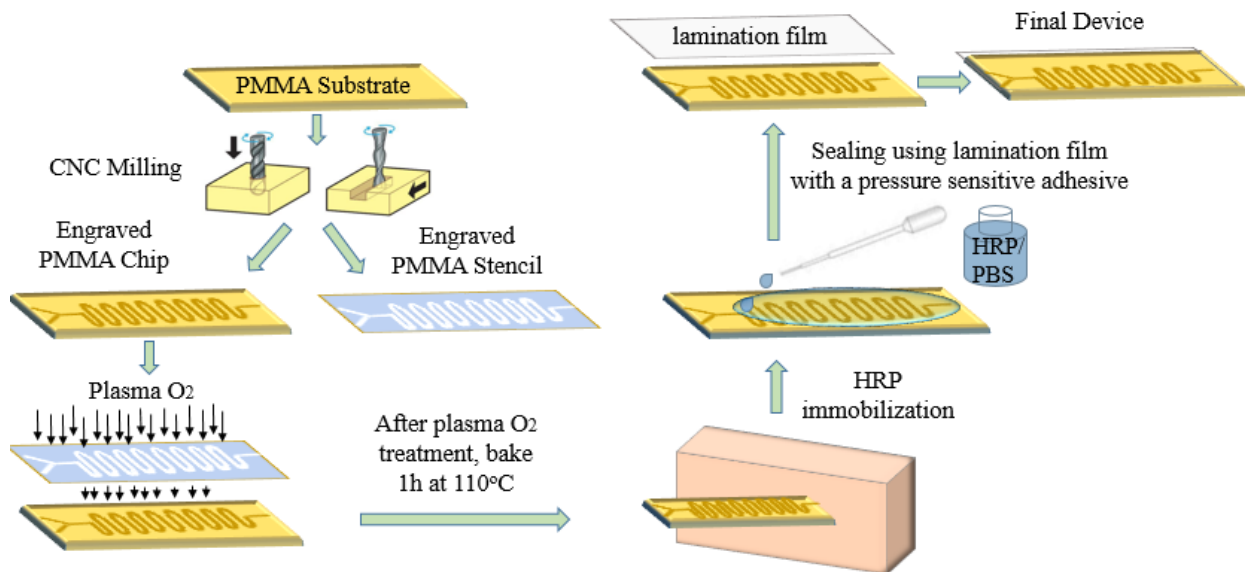


(β)

Εικόνα 4.4: (α) Μικροαντιδραστήρας από PMMA και (β) μάσκα PMMA πάχους 0,5mm.

Το επόμενο στάδιο, περιλαμβάνει την χημική ενεργοποίηση των μικροδιατάξεων, με πλάσμα O_2 , που έλαβε χώρα στον αντιδραστήρα RIE NE330 του καθαρού χώρου του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας. Πριν την εισαγωγή τους στον αντιδραστήρα πλάσματος, οι μικροδιατάξεις καθαρίστηκαν διεξοδικά με ισοπροπυλική αλκοόλη και στεγνώθηκαν υπό ροή αέριου αζώτου. Σε κάθε μικροδιάταξη τοποθετήθηκε το στένσιλ πλήρως ευθυγραμμισμένο με τα κανάλια της διάταξης, χρησιμοποιώντας ταινία διπλής όψης. Η κατεργασία με πλάσμα O_2 , πραγματοποιήθηκε για 10min στις εξής συνθήκες εγχάραξης: ισχύ πλάσματος 400W, πίεση 12mTorr και ροή οξυγόνου 100 sccm. Ακολούθησε θέρμανση των διατάξεων στους 110°C για 1h.

Το τελευταίο βήμα, ήταν η συγκόλληση των διατάξεων με λεπτό έλασμα (lamination films), ώστε να προκύψει κλειστό δίκτυο καναλιών. Η συγκόλληση πραγματοποιήθηκε στη συσκευή ελασματοποίησης της εταιρείας Mega Photopolymer Laminators.



Σχήμα 4.9: Σχηματική αναπαράσταση κατασκευής του μικρο – αντιδραστήρα από PMMA.

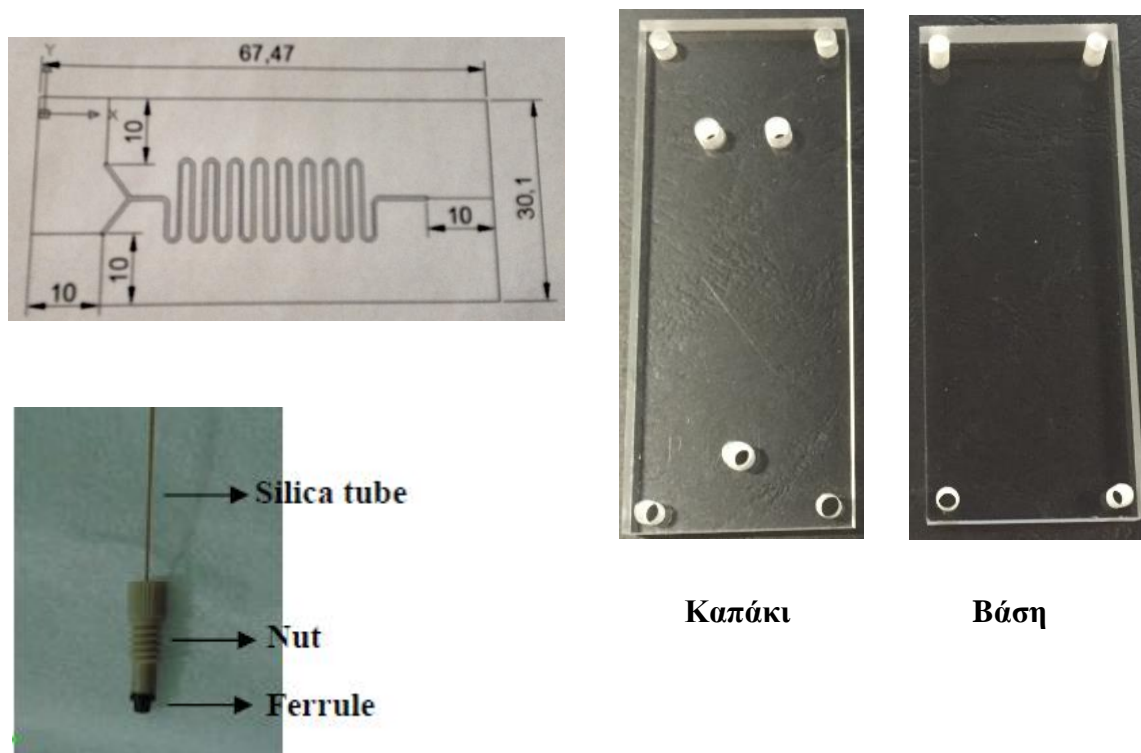
Το βάθος εγχάραξης για κάθε δείγμα μετρήθηκε με ένα προφιλόμετρο ακίδας. Ο όγκος της διάταξης προσδιορίστηκε πειραματικά από τον υπολογισμό της ποσότητας κόκκινης χρωστικής ουσία που χωρεί στα μικροκανάλια της διάταξης:



Εικόνα 4.5: Διάταξη μικροκαναλιών, σε ακατέργαστο υπόστρωμα PMMA, μετά από συγκόλληση με έλασμα, όπου έχουμε περάσει κόκκινη χρωστική ουσία.

Για την συγκράτηση του μικροαντιδραστήρα, κατασκευάστηκε μια ειδική συσκευή συγκράτησης από PMMA, η οποία δέχεται διατάξεις με διαστάσεις 3,01 cm πλάτος και 6,747 cm μήκος. Η συσκευή συγκράτησης, αποτελείται από δύο κομμάτια, το κάτω μέρος (βάση) είναι ο υποδοχέας της διάταξης και το πάνω μέρος (καπάκι) έχει τις εισόδους και εξόδους που συνδέονται με την διάταξη και βιδώνονται μεταξύ τους για την συγκράτηση της διάταξης. Η

συγκεκριμένη βάση βιδώνεται με το καπάκι μέσω 4 υποδοχών, και το καπάκι διαθέτει 3 εισόδους και εξόδους που συνδέονται με τη διάταξη (Εικόνα 4.6). Για την σύνδεση των σωληνώσεων στην διάταξη ανίχνευσης που θα παρουσιαστεί στη συνέχεια, χρησιμοποιήθηκαν ειδικά εξαρτήματα καθώς και τριχοειδή σωληνάκια (εσωτερικής διαμέτρου 150 μm και εξωτερικής διαμέτρου 360 μm) από τηγμένο διοξείδιο του πυριτίου (fused silica).

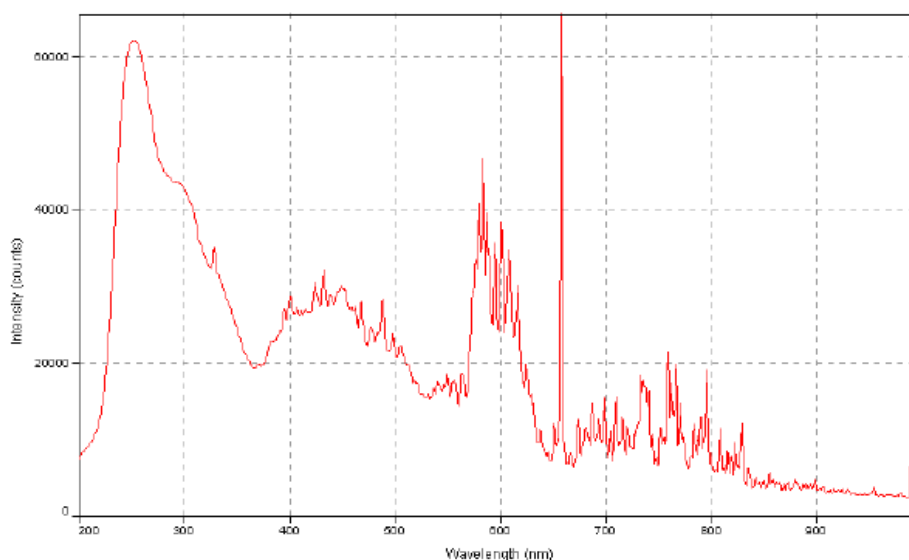


Εικόνα 4.6: Σχέδιο με τις διαστάσεις του μικρο-αντιδραστήρα και *κάτοψη της συσκευής συγκράτησης από PMMA (καπάκι και βάση) μαζί με τα εξαρτήματα για τη σύνδεση των σωληνώσεων από την εταιρεία Urchurch. Τα εξαρτήματα που χρησιμοποιήθηκαν ονομαστικά με τον κωδικό τους είναι τα εξής: 1) N-123-03x: NanoPort Ferrule 6-32 FB-360/510 μm , 2) FS-115: Tub Fused Silica 360 μm x 150 μm x 2m, 3) F-123Hx: Nut, nanoport, headless, 6-32 FB, 360 μm , PEEK, Natural.*

4.2.2 Διάταξη ανίχνευσης βιοκαταλυτικής μετατροπής της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης με τον μικρο –αντιδραστήρα.

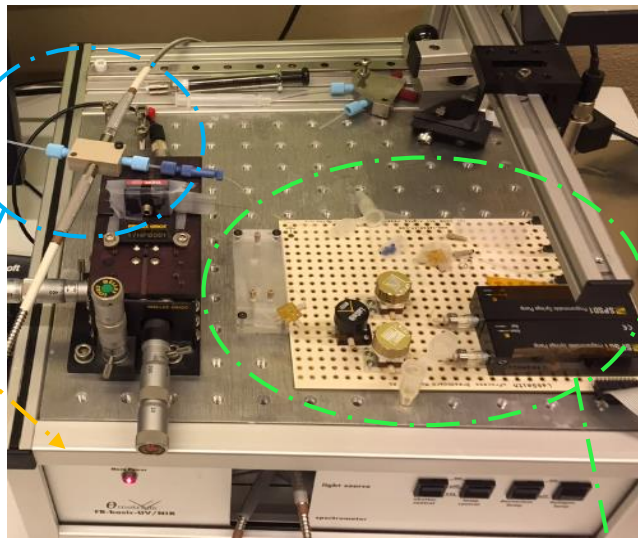
Το σύστημα που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση της βιοκαταλυτικής μετατροπής της φαινόλης, περιλαμβάνει τη χρήση μίας βάσης (Labsmith board), όπου βρίσκονται τοποθετημένες οι μικρο-αντλίες ροής χωρητικότητας 93 μl . Η μία μικρο – αντλία είναι υπεύθυνη για τη ροή μείγματος 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης/υπεροξειδίου του υδρογόνου και

η άλλη για τη ροή ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών. Οι δύο μικρο – αντλίες συνδέονται με τις αντίστοιχες μικρο-βαλβίδες με σωληνάκια από χαλαζία (εσωτερικής διάμετρου 150 μm) και το άνοιγμα ή κλείσιμο αυτών, ρυθμίζει το διάλυμα που εισάγεται κάθε φορά στον μικρο – αντιδραστήρα. Σημειώνουμε ότι το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ρέει συνεχώς στον μικρο – αντιδραστήρα και μέσω αυτού μεταφέρεται συγκεκριμένη ποσότητα μείγματος (plug) μετά το άνοιγμα της αντίστοιχης μικρο – βαλβίδας. Οι μικρο-βαλβίδες ενώνονται με μία κεντρική μικρο – βαλβίδα, η οποία επικοινωνεί με τη διάταξη του μικρο-αντιδραστήρα με σωληνάκι από χαλαζία, το οποίο εισάγεται πρωτίστως σε έναν διαχωριστή τύπου “τ”, που χωρίζει στα δύο το διάλυμα ροής προτού αυτό εισέλθει στις δύο εισόδους του μικρο – αντιδραστήρα. Το σωληνάκι εξόδου του μικρο-αντιδραστήρα συνδέεται σε κελί ροής με σχήμα τύπου z (SMA-Z standard Flow Cell), το οποίο διαθέτει συνολικό όγκο 2 μl και μήκος διαδρομής 2.5mm. Η ανίχνευση πραγματοποιείται μέσω του κελιού ροής, το οποίο συνδέεται μέσω δύο οπτικών ίνών διαμέτρου 200 μm , με την πηγή φωτός και με το φασματοφωτόμετρο UV. Έτσι όταν ένα υγρό περνά από το σωληνάκι εξόδου του μικρο-αντιδραστήρα και εισέρχεται στο κελί ροής, καταγράφεται η ένταση της κορυφής της UV ακτινοβολίας από τις οπτικές ίνες. Στο παρακάτω Σχήμα 4.8(α, β) παρουσιάζεται το φάσμα της λάμπας δευτερίου που χρησιμοποιήθηκε για την υπεριώδη περιοχή και ο μικρο-αντιδραστήρας συνδεδεμένος με το φασματοφωτόμετρο UV.



(α)

Κουτί που περιέχει την πηγή φωτός και το φασματοφωτόμετρο



Οπτική ίνα που συνδέεται με την πηγή φωτός

Συσκευή συγκράτησης με τον μικρο - αντιδραστήρα

Κελί ροής με σχήμα τύπου z

Σωληνάκι από χαλαζία που βγαίνει από την έξοδο του μικρο - αντιδραστήρα και εισέρχεται στο κελί ροής

Μικρο - βαλβίδες

Μικρο - αντλία ροής ρυθμιστικού διαλύματος

Οπτική ίνα που συνδέεται με το φασματοφωτόμετρο

Μικρο - αντλία ροής μείγματος

(β)

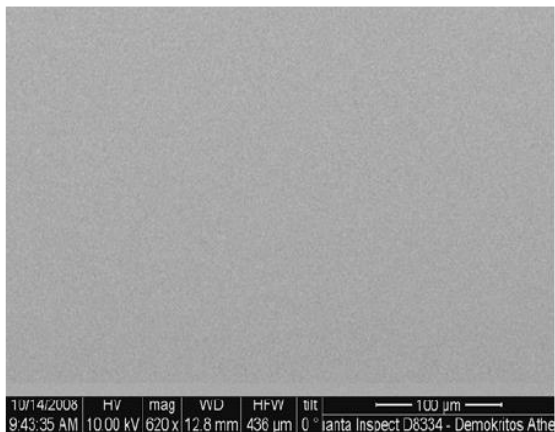
Σχήμα 4.10: (α) Φάσμα της λάμπας δευτερίου για την υπεριώδη περιοχή (εκπέμπει από 200 έως 410 nm). (β) Διάταξη σύνδεσης μικρο-αντιδραστήρα με τη βάση και το κελί ροής συνδεδεμένο με το φασματοφωτόμετρο UV.

5. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

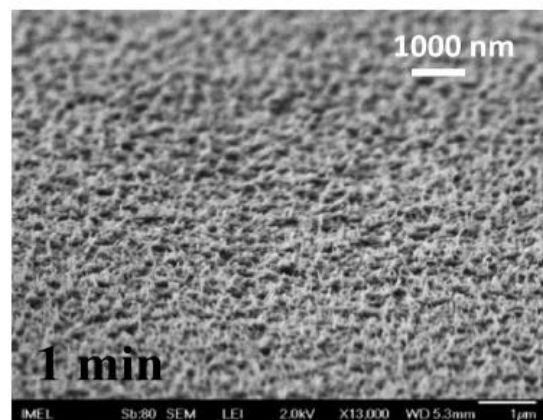
5.1. Αποτελέσματα κατασκευής επιφανειών και αξιολόγησης ακινητοποιημένου ενζύμου σε νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA

5.1.1. Τοπογραφία των κατεργασμένων με πλάσμα O₂ επιφανειών PMMA

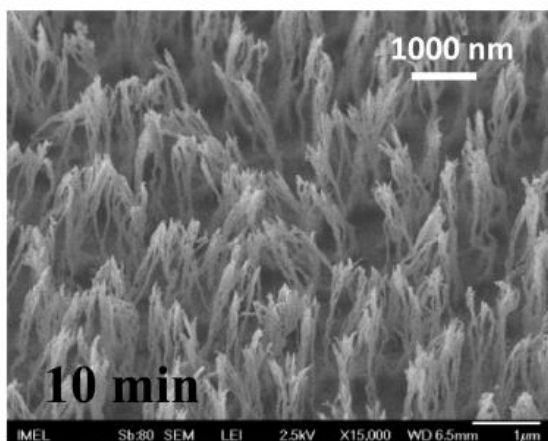
Στο Σχήμα 5.1 παρουσιάζονται εικόνες από το SEM, σε πλάγια όψη, (α) μιας μη κατεργασμένης επιφάνειας και επιφανειών PMMA κατεργασμένων σε πλάσμα O₂ στον αντιδραστήρα πλάσματος αντιδρώντων ιόντων, RIE, με χρόνους εγχάραξης (β) 1 min και (γ) 10 min (10 mT, 400 W, 50 sccm), καθώς και για (δ) 10min μετά από θερμική ανόπτηση. Όπως έχουμε αναφέρει και στη θεωρία, στον συγκεκριμένο αντιδραστήρα ο θάλαμος διεργασιών είναι από αλουμίνιο, ενώ ο δίσκος τοποθέτησης των δειγμάτων είναι κατασκευασμένος από χαλαζία (quartz), έτσι ώστε να αποφευχθεί η μόλυνση των δειγμάτων από την εναπόθεση Al, από το δίσκο συγκράτησης των δειγμάτων. Αξίζει να σημειωθεί ότι τα αποτελέσματα από ανάλυση με XPS, που έχει πραγματοποιηθεί σε προηγούμενη μελέτη [25], υπέδειξαν πως κατά την διάρκεια της κατεργασίας λαμβάνει χώρα εναπόθεση SiO₂, που προέρχεται από τα ηλεκτρόδια από χαλαζία. Η επεξεργασία των επιφανειών PMMA στο πλάσμα έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό κολωνοειδών νανο-δομών με ύψος που αυξάνεται ανάλογα με τον χρόνο εγχάραξης. Όπως παρατηρούμε από τις εικόνες, το δείγμα το οποίο έχει κατεργαστεί για 1 min (β) παρουσιάζει μικρή τοπογραφία, με σχηματισμό νανο – κολωνών ύψους 0.3 μm, ενώ μετά από κατεργασία των επιφανειών για 10 min (γ), σχηματίζονται κολώνες ύψους 1.3 μm αντίστοιχα. Επιπλέον από την εικόνα (δ) γίνεται εμφανές ότι μετά τη θερμική ανόπτηση των κατεργασμένων με πλάσμα επιφανειών, δεν παρατηρείται παραμόρφωση της τοπογραφίας των επιφανειών.



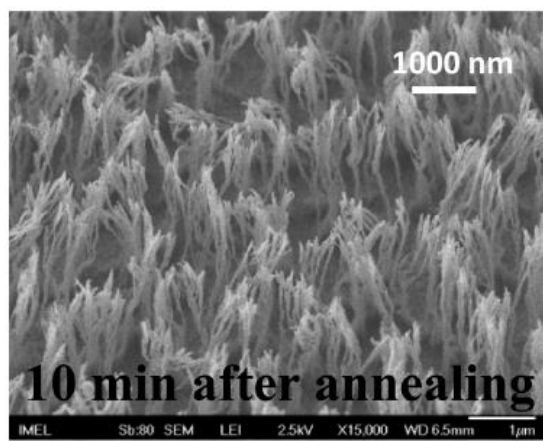
(α)



(β)



(γ)



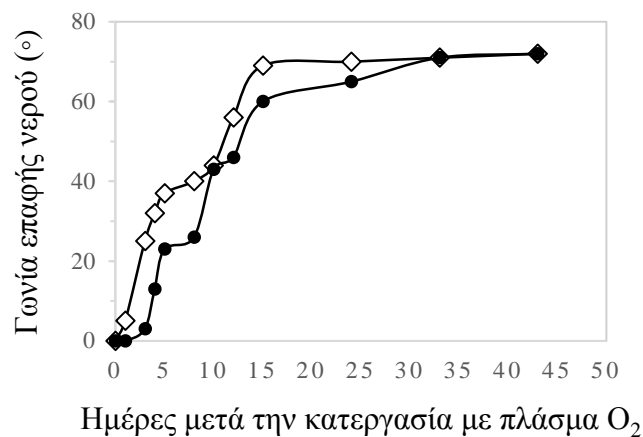
(δ)

Σχήμα 5.1: Εικόνα SEM επιφάνειας PMMA σε πλάγια όψη μετά από (α) 0min, (β) 1min, (γ) 10 min και (δ) 10min μετά από θερμική ανόπτηση κατεργασία σε πλάσμα O₂, στον αντιδραστήρα RIE (10 mT, 400 W, 50 sccm, ρυθμός εγχάραξης 480 nm/min).

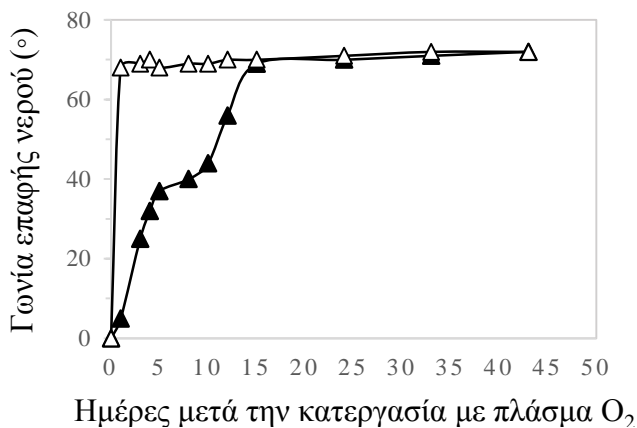
5.1.2. Επίδραση της γήρανσης μετά την κατεργασία στο πλάσμα στην προσρόφιση του ενζύμου

Η γήρανση των κατεργασμένων στο πλάσμα O₂ επιφανειών PMMA δεν έχει επίδραση στη τοπογραφία της επιφάνειας, ωστόσο η χημική σύνθεση της επιφάνειας επηρεάζεται σε μεγάλο βαθμό. Οι γερασμένες επιφάνειες αποκαλύπτουν μια σημαντικά αυξημένη γωνία επαφής σε σχέση με τις φρέσκες επιφάνειες. Στο Σχήμα 5.2 (α), παρουσιάζεται η γωνία επαφής νερού ως συνάρτηση της διάρκειας γήρανσης. Οι νανο-υφασμένες στο πλάσμα O₂ επιφάνειες

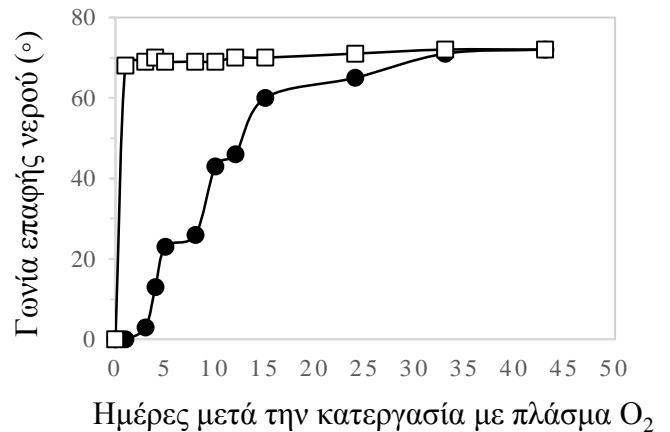
για 5 και 10 min επιστρέφουν στην αρχική τιμή της γωνίας επαφής (70°) εντός 15 ημερών για τα 5 min κατεργασίας και εντός 30 ημερών για τα 10 min κατεργασίας, αντίστοιχα. Στα σχήματα 5.2 (β) και (γ) απεικονίζεται για τους αντίστοιχους χρόνους κατεργασίας, συγκριτικά η μεταβολή της γωνίας επαφής συναρτήσει της γήρανσης, για δείγματα που έχουν υποστεί θερμική ανόπτηση, οπότε και έχουν επιφέρει υδροφοβική αποκατάσταση, και για δείγματα που αφήνουμε να γηράσκουν φυσικά. Όπως μπορούμε να διακρίνουμε και τα δύο δείγματα (5 και 10 min) που έχουν υποστεί θερμική ανόπτηση μετά την κατεργασία τους με πλάσμα O_2 , σταθεροποιούνται απευθείας στην αρχική γωνία επαφής.



(α)



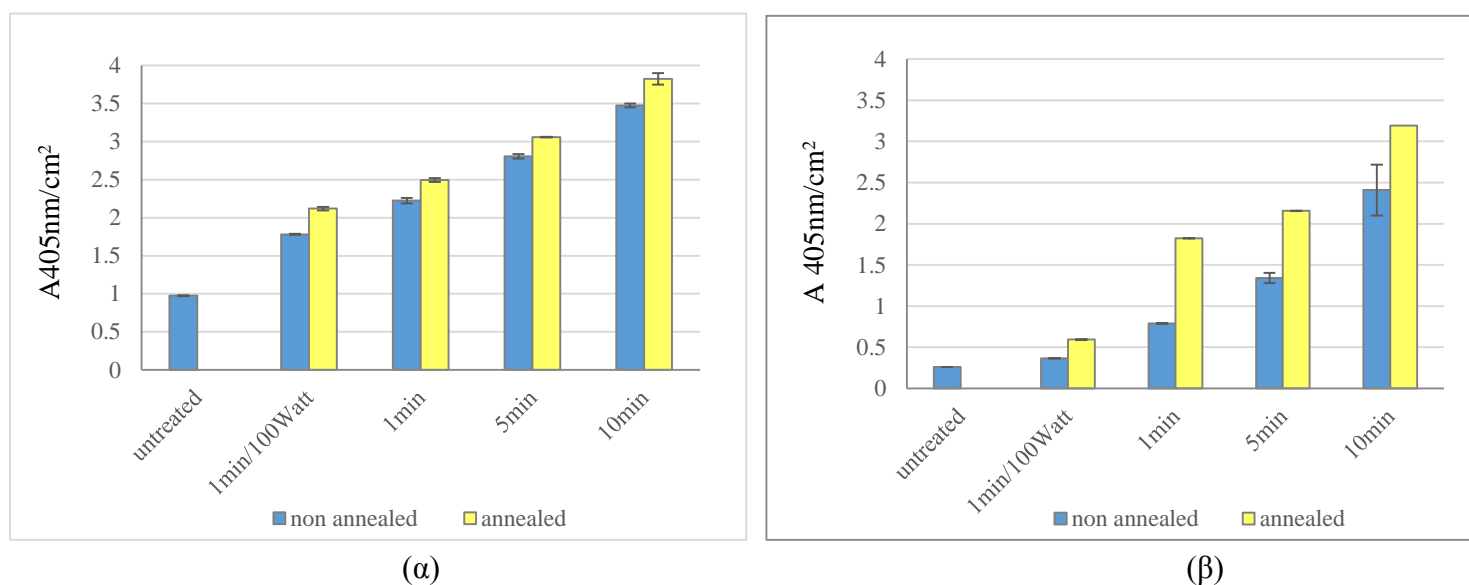
(β)



(γ)

Σχήμα 5.2: Μεταβολή της γωνίας επαφής των νανο-δομημένων επιφανειών PMMA: (α) για 5 min (\diamond) και 10 min (\bullet) ως συνάρτηση της γήρανσης μετά την κατεργασία στο πλάσμα O_2 , (β) για 5 min χωρίς θερμική ανόπτηση (\blacktriangle), και μετά από θερμική ανόπτηση (\triangle) συνάρτηση της γήρανσης μετά την κατεργασία στο πλάσμα και (γ) για 10 min χωρίς θερμική ανόπτηση (\bullet), και μετά από θερμική ανόπτηση (\square) ως συνάρτηση της γήρανσης μετά την κατεργασία στο πλάσμα.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η επίδραση της θερμικής ανόπτησης στην ικανότητα προσρόφησης του ενζύμου κατεργασμένων επιφανειών PMMA με πλάσμα O_2 , σε σχέση με τις φρέσκες επιφάνειες, χρησιμοποιήθηκε η φωτομετρική μέθοδος, κατά την οποία η ανίχνευση του ενζύμου πραγματοποιείται μετά από αντίδραση με το χρωμογόνο υπόστρωμα $H_2O_2/ABTS$ και μετρώντας την απορρόφηση (A) του υπερκείμενου στα 405 nm. Στα διαγράμματα που ακολουθούν γίνεται σύγκριση της απορρόφησης για επιφάνειες με χρόνο κατεργασίας 1, 5 και 10 min ως προς την ακατέργαστη επιφάνεια, μετά από 1 ώρα (5.3 α) και μετά από 24 ώρες (5.3 β) επώασης του ενζύμου. Στη μελέτη συμπεριλήφθηκε επίσης και μια επιφάνεια κατεργασμένη για 1min σε ισχύ πλάσματος 100Watt, η οποία αναμένεται να έχει τη χημική τροποποίηση που οφείλεται στην έκθεση στο πλάσμα O_2 , αλλά έχει σχεδόν αμελητέα τοπογραφία.



Σχήμα 5.3: Τιμές απορρόφησης (A) στα 405 nm μετά από (α) 1 ώρα επώασης και (β) 24 ώρες επώασης του ενζύμου, που ελήφθησαν από μη κατεργασμένη και κατεργασμένες επιφάνειες PMMA (1,5,10 min/400W και 1min/100W) φρέσκες και γηρασμένες μετά από θερμική ανόπτηση, μετά από προσρόφηση του ενζύμου HRP και ανίχνευση της δραστηριότητας με χρωμογόνο υπόστρωμα $H_2O_2/ABTS$.

Όπως προκύπτει και από τα δύο διαγράμματα, οι επιφάνειες που έχουν υποστεί θερμική ανόπτηση (annealed), και επομένως έχει σταθεροποιηθεί η γωνία επαφής τους, εμφανίζουν μεγαλύτερη προσρόφηση ενζύμου σε σχέση με τις φρέσκες επιφάνειες (non annealed). Παρ'όλα αυτά για 1 ώρα επώασης η διαφορά μεταξύ των τιμών φαίνεται να είναι μικρή, αυξάνεται όμως με αύξηση του χρόνου επώασης σε 24 ώρες, υποδεικνύοντας ότι η

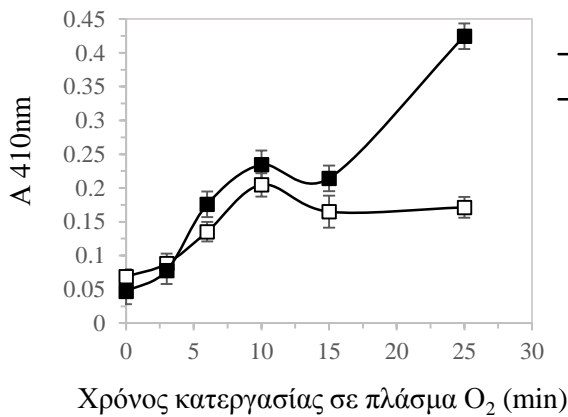
υπερυδροφιλικότητα των φρέσκων επιφανειών επιδρά αρνητικά μετά από κάποια ώρα στην προσρόφηση του ενζύμου. Επισημαίνεται, ότι στα φρέσκα δείγματα δεν επιτυγχάνεται καλή ομοιογένεια της κάλυψης της επιφάνειας από το ένζυμο, ενώ επιπλέον είναι πιο δύσκολη η συλλογή του υπερκείμενου υγρού από την επιφάνεια για τις απαραίτητες μετρήσεις. Συνεπώς, για βέλτιστα αποτελέσματα, προτιμάται η χρήση επιφανειών PMMA με σταθεροποιημένη τη γωνία επαφής, ως καταλληλότερες επιφάνειες ακινητοποίησης του ενζύμου.

Ένα άλλο αξιοσημείωτο συμπέρασμα που προκύπτει, είναι ότι η κατεργασμένη για 1 min επιφάνεια, με αμελητέα σχεδόν τοπογραφία, εμφανίζει έως και 2 φορές μεγαλύτερη ικανότητα στην ενζυματική προσρόφηση σε σύγκριση με τη μη κατεργασμένη επιφάνεια. Αυτό είναι ενδεικτικό της ύπαρξης επιφανειακής χημείας στο PMMA μετά την έκθεση σε πλάσμα O_2 , η οποία προφανώς επιδρά θετικά στην προσρόφηση του ενζύμου από την επιφάνεια. Συγκεκριμένα, η αύξηση αυτή θα μπορούσε να αποδοθεί στις δημιουργούμενες καρβονυλικές ομάδες της επιφάνειας μετά την κατεργασία με πλάσμα, οι οποίες έχουν ως αποτέλεσμα την εν μέρει ομοιοπολική σύνδεση του ενζύμου πάνω στην επιφάνεια, (Tsougeni, 2015) κάτι που δεν προκύπτει για τις μη κατεργασμένες επιφάνειες, στις οποίες λαμβάνει χώρα μόνο φυσική προσρόφηση του ενζύμου.

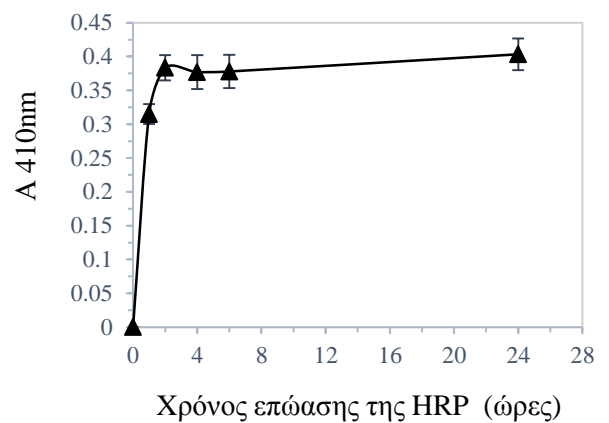
5.1.3. Επίδραση του χρόνου κατεργασίας στο πλάσμα O_2 στην προσρόφηση ενζύμου

Στο Σχήμα 5.4 παρουσιάζεται (α) η απορρόφηση (A) των επιφανειών PMMA μετά από απευθείας προσρόφηση του ενζύμου, ως συνάρτηση του χρόνου κατεργασίας στο πλάσμα O_2 , (β) η απορρόφηση των επιφανειών PMMA μετά από απευθείας προσρόφηση του ενζύμου συναρτήσει του χρόνου επώασης του ενζύμου και (γ) αντιπροσωπευτικές εικόνες από μικροσκόπιο του έγχρωμου προϊόντος που προέκυψε μετά την αντίδραση του ενζύμου με χρωμογόνο υπόστρωμα από μη κατεργασμένες και κατεργασμένες στο πλάσμα επιφάνειες (3min, 6min, 10min και 15min), ενδεικτικές της ικανότητας προσρόφησης του ενζύμου των νανο-δομημένων επιφανειών. Μια τάση που παρατηρείται σε γενικές γραμμές είναι η αύξηση της απορρόφησης με το χρόνο κατεργασίας στο πλάσμα O_2 μέχρι περίπου 5 φορές, σε σύγκριση με τις μη κατεργασμένες επιφάνειες. Αυτή η αύξηση μπορεί να αποδοθεί στην αύξηση της πραγματικής ενεργής επιφάνειας που διατίθεται για την προσρόφηση του ενζύμου στις νανο-υφασμένες επιφάνειες που δημιουργούνται κατά την κατεργασία στο πλάσμα O_2 . Από την άλλη πλευρά, η κατεργασμένη για 10 min επιφάνεια παρουσίασε 3-5 φορές υψηλότερες τιμές απορρόφησης σε σχέση με τις μη κατεργασμένες επιφάνειες. Ωστόσο, η μεγαλύτερη διάρκεια κατεργασίας στο πλάσμα δεν απεικονίζεται στην αύξηση της

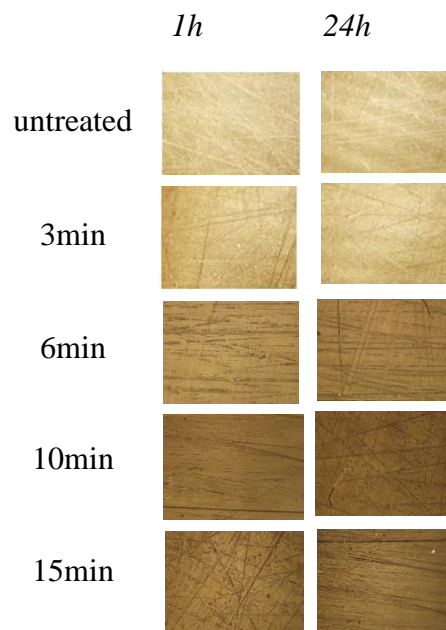
προσρόφησης ενζύμου για τις αντίστοιχες επιφάνειες. Αυτό είναι πιθανόν να οφείλεται στο γεγονός ότι η εξαιρετικά πορώδης επιφάνεια που προκύπτει μετά από μεγάλη κατεργασία στο πλάσμα είναι λιγότερο προσβάσιμη στο ένζυμο. Επιπλέον, το γεγονός ότι η παράταση του χρόνου επώασης με το διάλυμα του ενζύμου πέραν των 2h είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική αύξηση της απορρόφησης (2.5 φορές περισσότερη προσρόφηση) μόνο στις επιφάνειες που αντιστοιχούν σε μεγάλους χρόνους κατεργασίας στο πλάσμα (25min), θα μπορούσε επίσης να αποδοθεί στην παρουσία της πορώδης επιφάνειας η οποία επηρεάζει την κινητική της προσρόφησης. Στο σχήμα 5.4 (β), επιβεβαιώνεται ότι η αύξηση του χρόνου επώασης από 2 σε 24 ώρες δεν εμφανίζει ιδιαίτερη αύξηση στην προσρόφηση του ενζύμου, από επιφάνειες με μικρούς χρόνους κατεργασίας σε πλάσμα O₂.



(α)



(β)



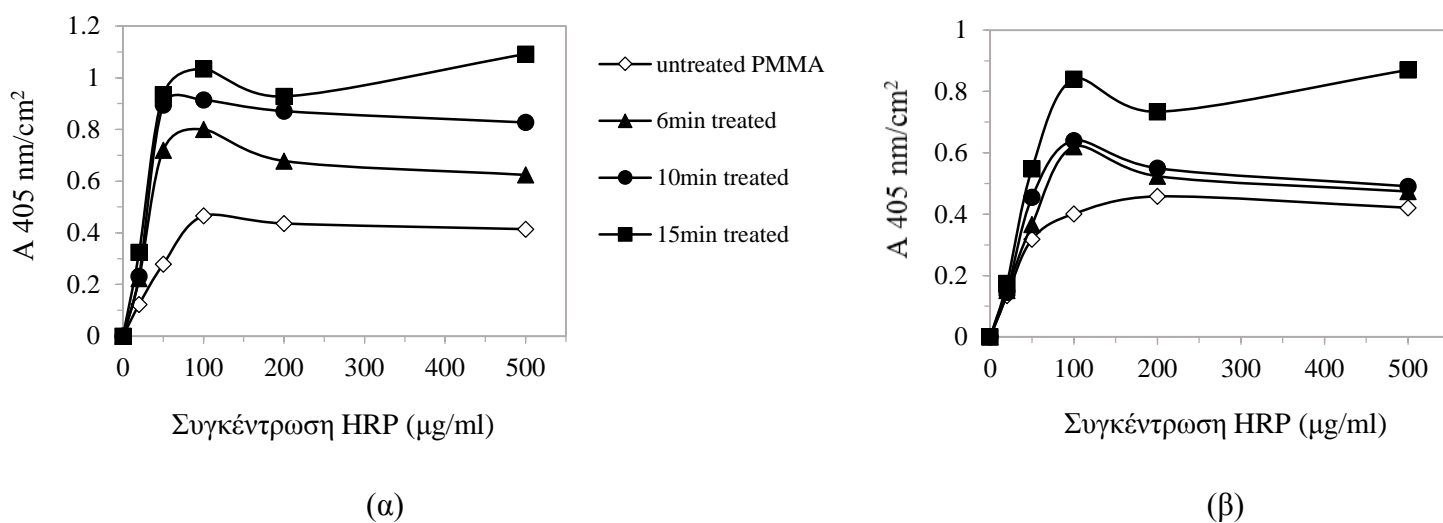
(γ)

Σχήμα 5.4: (α) Απορρόφηση (A) στα 410nm ακινητοποιημένου ενζύμου HRP, που αντιστοιχεί σε χρόνους επώασης 2 h (ανοικτά σύμβολα) ή 24 h (κλειστά σύμβολα), μετά από αντίδραση με χρωμογόνο υπόστρωμα *dab/metal concentrate/H₂O₂*, ως συνάρτηση του χρόνου έκθεσης στο πλάσμα O₂, (β) Απορρόφηση στα 410nm συναρτήσει του χρόνου επώασης του ενζύμου HRP (200μg/ml) σε κατεργασμένη επιφάνεια PMMA για 10min και (γ) Εικόνες από μικροσκόπιο μετά την αντίδραση του ενζύμου με το χρωμογόνο υπόστρωμα που ελήφθησαν από μη κατεργασμένες και κατεργασμένες στο πλάσμα O₂ επιφάνειες PMMA για 3 min, 6 min, 10 min και 15min οι οποίες επικαλύφθηκαν με διάλυμα 200 μg/ml HRP.

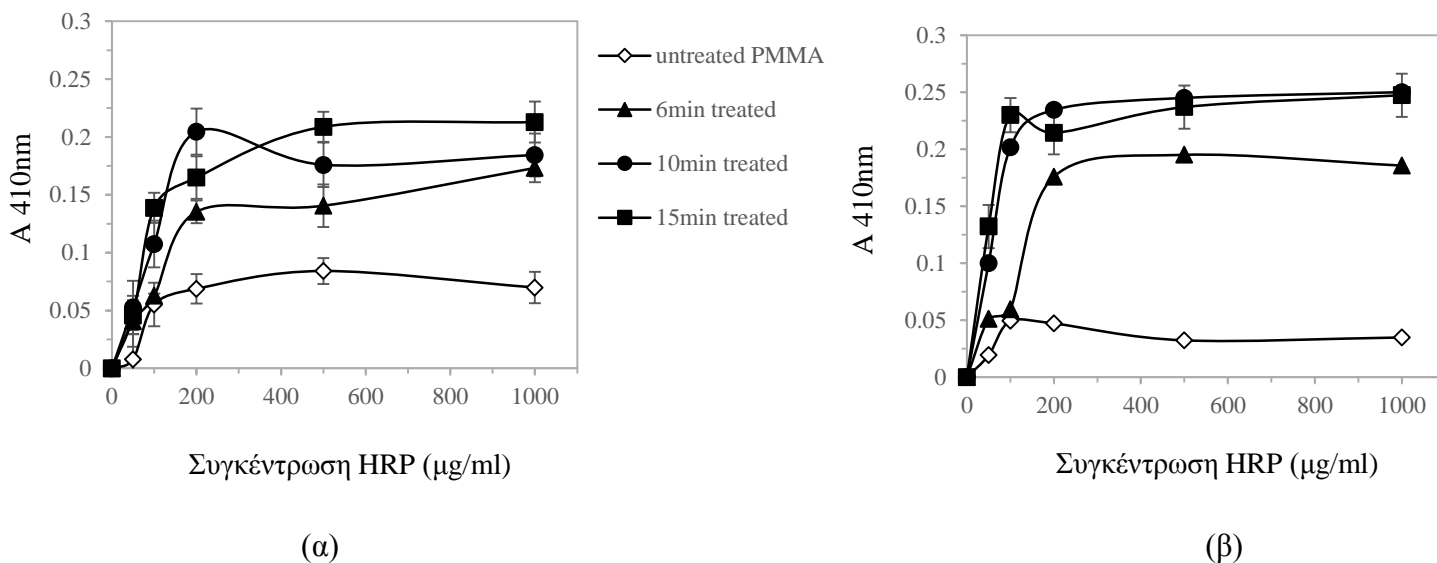
5.1.4. Προσδιορισμός βέλτιστης συγκέντρωσης ενζύμου για προσρόφηση στις νανο - υφασμένες επιφάνειες

Προκειμένου να προσδιοριστεί η ικανότητα δέσμευσης ενζύμου των νανο-δομημένων επιφανειών με πλάσμα O₂, σε σύγκριση με τις μη κατεργασμένες επιφάνειες, χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα HRP με συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 20 έως 1000μg/ml. Στα Σχήματα 5.5 και 5.6, παρουσιάζονται οι τιμές της απορρόφησης που ελήφθησαν από τις επικαλυμμένες επιφάνειες με HRP για επώαση επι 2 h (α) ή 24 h (β), αντίστοιχα, συναρτήσει των συγκεντρώσεων της HRP, για τις μη κατεργασμένες και τις κατεργασμένες σε πλάσμα O₂ επιφάνειες PMMA (6 min, 10 min και 15min χρόνος κατεργασίας). Η προσρόφηση καθορίστηκε με βάση δύο μεθόδους ανίχνευσης του ενζύμου HRP: μέσω της αντίδρασης με ABTS/H₂O₂ και καταγραφή της απορρόφησης στα 405nm στο φασματοφωτόμετρο (5.5) και μέσω της αντίδρασης με *dab/metal concentrate/H₂O₂* και υπολογισμό της απορρόφησης στα 410nm με μέτρηση στη σφαίρα ολοκλήρωσης (5.6). Η εκτίμηση της προσρόφησης που βασίστηκε στην χρήση του χρωμογόνου υποστρώματος ABTS/H₂O₂, έδωσε βέλιστα αποτελέσματα απορρόφησης για συγκέντρωση ενζύμου 100μg/ml όπως προκύπτει και από το αντίστοιχο σχήμα. Παρόλα αυτά η μέθοδος αυτή συνδέεται με κάποιους περιορισμούς, καθώς η προσθήκη του ABTS στην επικαλυμμένη με HRP επιφάνεια, δίνει έντονο σήμα σε πολύ μικρό χρόνο, με αποτέλεσμα να απαιτείται αραίωση με την προσθήκη SDS και συνεπώς η τιμή που παίρνουμε να μην είναι απόλυτα αντιπροσωπευτική της πραγματικότητας. Για το λόγο αυτό έχοντας κάνει μια πρώτη εκτίμηση των αποτελεσμάτων με το ABTS, περάσαμε στη χρήση ενός καλύτερου και πιο αξιόπιστου χρωμογόνου υποστρώματος, του *dab/metal concentrate/H₂O₂*, το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την καθίζηση του προϊόντος στην καλυμμένη με HRP επιφάνεια. Όπως προκύπτει από τα

σχήματα 5.6 (α, β), οι κατεργασμένες με πλάσμα επιφάνειες παρουσίασαν 5 - 6 φορές υψηλότερες τιμές απορρόφησης και συνεπώς τουλάχιστον 5 - 6 φορές υψηλότερη προσρόφηση ανάλογα με τη συγκέντρωση του ενζύμου σε σύγκριση με τη μη κατεργασμένη επιφάνεια. Επιπλέον, οι κατεργασμένες με πλάσμα επιφάνειες για 6 και 10min φαίνεται να φτάνουν σε κορεσμό για συγκέντρωση ενζύμου 200μg/ml, ενώ για μεγαλύτερο χρόνο κατεργασίας οι κατεργασμένες επιφάνειες δεν φτάνουν σε κορεσμό παρά σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ενζύμου, κάτι που αναμενόταν από την αύξηση της ενεργής επιφάνειας των νανο-δομημένων δειγμάτων. Σε συγκέντρωση κορεσμού, η κατεργασμένη για 10 min επιφάνεια παρουσίασε 3-5 φορές υψηλότερες τιμές απορρόφησης σε σχέση με τις μη κατεργασμένες επιφάνειες. Για χρόνο επώασης του ενζύμου πέρα των 2h, η προσρόφηση του ενζύμου στις κατεργασμένες επιφάνειες φαίνεται να σταθεροποιείται για εφαρμογή συγκεντρώσεων μεγαλύτερων από 500μg/ml, με μια αύξηση της απορρόφησης σε ποσοστό 20-40%, συγκριτικά με τις αντίστοιχες τιμές για 2h επώασης του ενζύμου.



Σχήμα 5.5: Απορρόφηση (A) στα 405nm μετά από (α) 2 ώρες και (β) 24 ώρες επώασης του ενζύμου, για μη κατεργασμένη (◇) και κατεργασμένες επιφάνειες PMMA 6min (▲), 10 min (●) και 15min (■) στο πλάσμα O_2 , μετά από αντίδραση με χρωμογόνο υπόστρωμα $ABTS/H_2O_2$, ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του ενζύμου HRP.



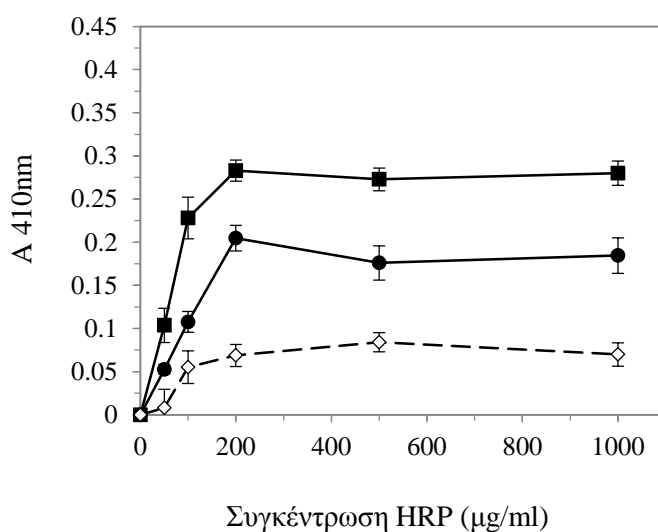
Σχήμα 5.6: Απορρόφηση (A) στα 410nm μετά από (α) 2 ώρες και (β) 24 ώρες επώασης του ενζύμου, για μη κατεργασμένη (◇) και κατεργασμένες επιφάνειες PMMA 6min (▲), 10 min (●) και 15min (■) στο πλάσμα O₂, μετά από αντίδραση με χρωμογόνο υπόστρωμα Dab/Metal Concentrate/H₂O₂, ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του ενζύμου HRP.

5.1.5. Αξιολόγηση διαφορετικών μεθόδων ακινητοποίησης του ενζύμου στις νανο - υφασμένες επιφάνειες PMMA

5.1.5.1 Αξιολόγηση ομοιοπολικής σύνδεσης του ενζύμου σε νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA

Για την ακινητοποίηση του ενζύμου με τη μέθοδο ομοιοπολικής σύνδεσης, σε νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA, χρησιμοποιήθηκαν διαλύματα HRP με συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 50 έως 1000μg/ml. Στο Σχήμα 5.7 (α) παρουσιάζεται η απορρόφηση (A) που προέκυψε για επιφάνειες PMMA, κατεργασμένες σε πλάσμα O₂ για 10 min χωρίς χημική ενεργοποίηση των καρβοξυλικών ομάδων της επιφάνειας (απλή προσρόφηση) και μετά από χημική ενεργοποίηση των καρβοξυλικών ομάδων (ομοιοπολική σύνδεση), επικαλυμμένες με HRP μετά από 2 h επώαση του ενζύμου. Για λόγους σύγκρισης στη μελέτη συμπεριλήφθηκαν και μη κατεργασμένες επιφάνειες, που αποτελούν κοινή αναφορά για τις δύο μεθόδους ακινητοποίησης. Η ανίχνευση του ακινητοποιημένου ενζύμου, καθορίστηκε μέσω της αντίδρασης με dab/metal concentrate/H₂O₂ και υπολογισμό της απορρόφησης στα 410nm.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα απορρόφησης για τις δύο μεθόδους, παρατηρούμε ότι οι τιμές απορρόφησης που προκύπτουν μετά από ομοιοπολική σύνδεση του ενζύμου στα ενεργοποιημένα καρβοξύλια της κατεργασμένης επιφάνειας, είναι περίπου 1.5 φορές υψηλότερες σε σχέση με τις αντίστοιχες που λαμβάνουμε για την απευθείας προσρόφηση, ανάλογα με τη συγκέντρωση του ενζύμου, και 4 φορές υψηλότερες ως προς την μη κατεργασμένη επιφάνεια. Επισημαίνεται, ότι η απευθείας προσρόφηση του ενζύμου στις ενεργοποιημένες με πλάσμα επιφάνειες, είναι αποτέλεσμα όχι μόνο φυσικής προσρόφησης αλλά και ομοιοπολικής σύνδεσης του ενζύμου με τις καρβονυλικές ομάδες της κατεργασμένης με πλάσμα επιφάνειας. Παρόλα αυτά, στην δεύτερη περίπτωση ακινητοποίησης, αναπτύσσεται επιπλέον και ένας σταθερότερος πεπτιδικός ομοιοπολικός δεσμός μεταξύ των ενεργοποιημένων καρβοξυλίων και του ενζύμου, ο οποίος αυξάνει ως ένα μικρό βαθμό την προσρόφηση του ενζύμου. Από το διάγραμμα γίνεται εμφανές, ότι οι επιφάνειες PMMA που έχουν υποστεί χημική ενεργοποίηση των καρβοξυλίων φτάνουν σε κορεσμό για συγκεντρώση ενζύμου 200μg/ml, όπως ισχύει και για τις μη ενεργοποιημένες επιφάνειες.

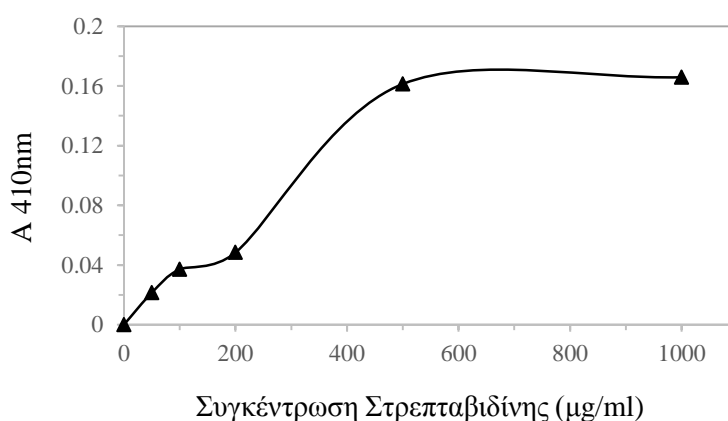


Σχήμα 5.7: Απορρόφηση (A) στα 410nm για προσρόφηση (●) και ομοιοπολική σύνδεση του ενζύμου στα ενεργοποιημένα καρβοξύλια (■) σε κατεργασμένες επιφάνειες PMMA για 10min στο πλάσμα O₂ μετά από αντίδραση (α) με χρωμογόνο υπόστρωμα Dab/Metal Concentrate/H₂O₂.

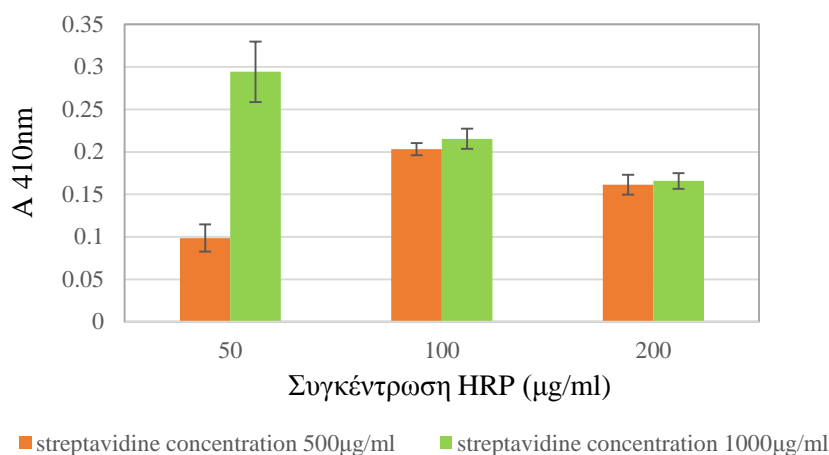
5.1.5.2 Αξιολόγηση της ακινητοποίησης του ενζύμου σε νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA μέσω του συστήματος στρεπταβιδίνης – βιοτίνης

Για την εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου ακινητοποίησης, εφαρμόστηκαν διαλύματα βιοτινυλιωμένου ενζύμου σε συγκεντρώσεις 50 – 200 $\mu\text{g/ml}$ με χρόνο επώασης 2 h, πάνω σε νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA κατεργασμένες σε πλασμα O_2 για 10 min, οι οποίες είχαν επικαλυφθεί με στρεπταβιδίνη σε συγκεντρώσεις 50 – 1000 $\mu\text{g/ml}$. Η αξιολόγηση της μεθόδου βασίστηκε στην ανίχνευση του ακινητοποιημένου ενζύμου μέσω της αντίδρασης με το χρωμογόνο υπόστρωμα $\text{dab/metal concentrate/H}_2\text{O}_2$ και τον υπολογισμό της απορρόφησης στα 410nm. Στο Σχήμα 5.8 παρουσιάζεται η απορρόφηση (A) των νανο – υφασμένων επιφανειών PMMA (α) ως συνάρτηση της συγκέντρωσης της στρεπταβιδίνης, για σταθερή συγκέντρωση βιοτινυλιωμένου ενζύμου 200 $\mu\text{g/ml}$ και (β) ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του βιοτινυλιωμένου ενζύμου HRP, για συγκεντρώσεις στρεπταβιδίνης 500 και 1000 $\mu\text{g/ml}$.

Από το πρώτο διάγραμμα, προκύπτει ότι η νανο – υφασμένη επιφάνεια PMMA φτάνει σε κορεσμό για συγκέντρωση στρεπταβιδίνης >200 $\mu\text{g/ml}$ και συνεπώς επιχειρείται διερεύνηση της συγκέντρωσης του ενζύμου για τις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις στρεπταβιδίνης. Παρατηρούμε ότι όσο αυξάνεται η συγκέντρωση της στρεπταβιδίνης, η μέγιστη απορρόφηση μετατοπίζεται σε χαμηλότερη συγκέντρωση βιοτινυλιωμένου ενζύμου. Τα παραπάνω αποτελέσματα πιθανότατα οφείλονται στη μείωση της δραστηριότητας του ενζύμου λόγω στερεοχημικής παρεμπόδισης από το μόριο της στρεπταβιδίνης. Η στερεοχημική παρεμπόδιση αυξάνεται με αύξηση της συγκέντρωσης της στρεπταβιδίνης για αυτό και η μέγιστη απορρόφηση καταγράφεται σε χαμηλότερη συγκέντρωση ενζύμου (50 $\mu\text{g/ml}$) για 1000 $\mu\text{g/ml}$ στρεπταβιδίνης απ'ότι για 500 $\mu\text{g/ml}$ στρεπταβιδίνης (100 $\mu\text{g/ml}$ ενζύμου).



(α)



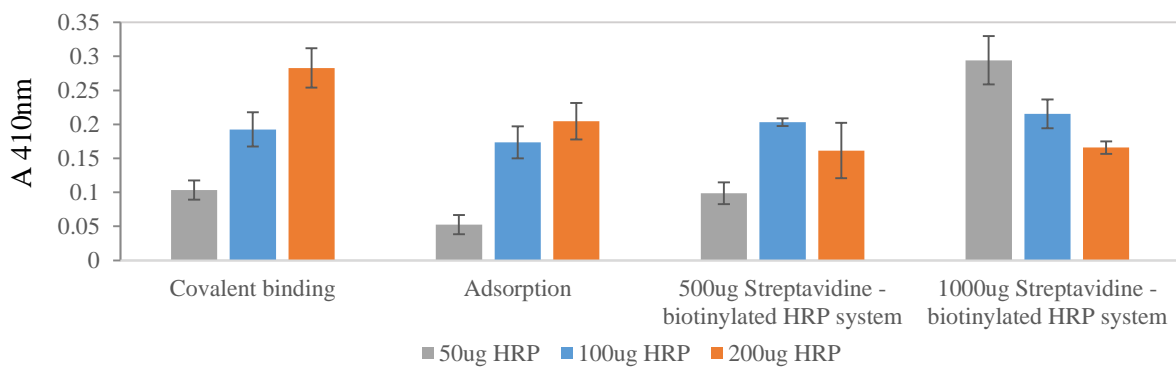
(β)

Σχήμα 5.8: Απορρόφηση (*A*) στα 410nm επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη επιφανειών PMMA κατεργασμένων για 10min στο πλάσμα O₂, μετά από προσθήκη βιοτινυλιωμένου ενζύμου και αντίδραση με χρωμογόνο υπόστρωμα Dab/Metal Concentrate/H₂O₂ (α) συναρτήσει διαφορετικών συγκεντρώσεων στρεπταβιδίνης για 200µg/ml HRP και (β) συναρτήσει διαφορετικών συγκεντρώσεων βιοτινυλιωμένου ενζύμου για συγκεντρώσεις στρεπταβιδίνης 500 και 1000µg/ml.

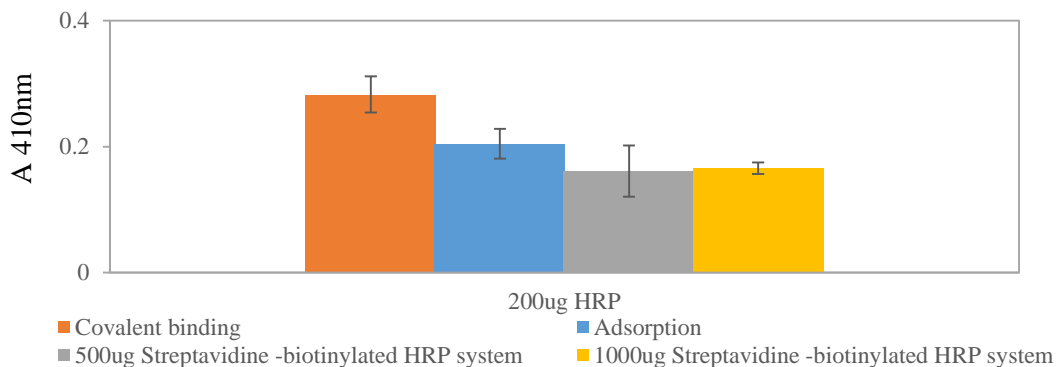
5.1.5.3 Προσδιορισμός βέλτιστης μεθόδου ακινητοποίησης του ενζύμου σε νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA

Στο σχήμα 5.9 (α, β), απεικονίζονται τα αποτελέσματα απορρόφησης που προκύπτουν για νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA, κατεργασμένες για 10min σε πλάσμα O₂, όπως προέκυψαν μετά από απευθείας προσρόφηση του ενζύμου HRP στις ενεργοποιημένες με πλάσμα επιφάνειες σε σύγκριση με τις εναλλακτικές μεθόδους ακινητοποίησης μέσω ομοιοπολικής σύνδεσης και μέσω του συστήματος στρεπταβιδίνης (500 και 1000µg/ml) – βιοτινυλιωμένου ενζύμου. Λόγω του ότι όπως είδαμε παραπάνω, ανάλογα της συγκέντρωσης της στρεπταβιδίνης τα βέλτιστα αποτελέσματα απορρόφησης προκύπτουν για διαφορετική συγκέντρωση ενζύμου, κρίθηκε σκόπιμο στο διάγραμμα (α) να συμπεριληφθούν και οι τρεις βέλτιστες συγκεντρώσεις ενζύμου ανάλογα τη μέθοδο ακινητοποίησης, οπότε για κάθε μέθοδο απεικονίζονται τα αντίστοιχα αποτελέσματα απορρόφησης για 50, 100 και 200µg/ml ενζύμου HRP. Στο διάγραμμα (β) οι τιμές απορρόφησης παρουσιάζονται για όλες τις μεθόδους ακινητοποίησης αλλά μόνο για τη βέλτιστη συγκέντρωση ενζύμου 200µg/ml. Η αξιολόγηση όλων των μεθόδων, βασίστηκε στην ανίχνευση του ακινητοποιημένου ενζύμου μέσω της

αντίδρασης με το χρωμογόνο υπόστρωμα dab/metal concentrate/H₂O₂ και τον υπολογισμό της απορρόφησης στα 410nm. Όπως μπορούμε να διεξάγουμε από το σχήμα ως προς τις εναλλακτικές μεθόδους ακινητοποίησης, η μέθοδος της ομοιοπολικής σύνδεσης του ενζύμου μετά τη χημική ενεργοποίηση των καρβοξυλίων της επιφάνειας δίνει καλύτερα αποτελέσματα για εφαρμογή μεγαλύτερων συγκεντρώσεων ενζύμου, ενώ η μέθοδος που περιλαμβάνει την επικάλυψη των επιφανειών με στρεπταβιδίνη σε συγκέντρωση 1000μg/ml, δίνει βέλτιστη απορρόφηση για εφαρμογή μικρότερης συγκέντρωσης ενζύμου. Η μέθοδος της απευθείας προσρόφησης στις ενεργοποιημένες με πλάσμα επιφάνειες για συγκέντρωση κορεσμού, δίνει υψηλή απορρόφηση η οποία αποκλίνει από τη αντίστοιχη για ομοιοπολική σύνδεση κατά ένα μικρό ποσοστό της τάξης του 25%, ενώ σε σύγκριση με την εφαρμογή του συστήματος στρεπταβιδίνης – βιοτίνης, είναι αυξημένη κατά 20%. Από τα παραπάνω αποτελέσματα, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η απευθείας προσρόφηση σε ενεργοποιημένες με πλάσμα επιφάνειες, οδηγεί σε υψηλή ακινητοποίηση του ενζύμου χωρίς να απαιτεί την εφαρμογή περαιτέρω βημάτων ενεργοποίησης, όπως συμβαίνει με τις εναλλακτικές μεθόδους ακινητοποίησης. Συνεπώς, η υψηλή απόδοση σε συνδυασμό με την ευκολία και το χαμηλότερο κόστος που προσφέρει η ακινητοποίηση με απευθείας προσρόφηση σε ενεργοποιημένες με πλάσμα επιφάνειες, την καθιστούν ως τη βέλτιστη μέθοδο ακινητοποίησης.



(α)



(β)

Σχήμα 5.9: Απορρόφηση (A) στα 410nm επιφανειών PMMA κατεργασμένων για 10min στο πλάσμα O₂, επικαλυμμένων με το ένζυμο HRP, για διαφορετικές μεθόδους ακινητοποίησης του ενζύμου (α) σε συγκεντρώσεις HRP 50, 100, 200ug, (β) στη βέλτιστη συγκέντρωση HRP 200ug.

5.1.6. Συμπεράσματα – Προτάσεις

Βελτιστοποιημένες πολυμερικές επιφάνειες PMMA με κατάλληλη μορφολογική και χημική τροποποίηση, προκαλούμενη από την κατεργασία τους με πλάσμα O₂, αξιολογήθηκαν ως προς την ικανότητα τους να χρησιμοποιηθούν ως υποστρώματα ακινητοποίησης ενζύμων, με αντιπροσωπευτικό ένζυμο την υπεροξειδάση του χρένου (HRP). Για την αξιολόγηση του ενζύμου εφαρμόστηκε νέα μέθοδος υπολογισμού της απορρόφησης, μέσω καταγραφής της σχετικής ανακλαστικότητας των δειγμάτων, μετά την προσθήκη κατάλληλου χρωμογόνου υποστρώματος, στη σφαίρα ολοκλήρωσης, οδηγώντας σε αξιόπιστα και επαναλήψιμα αποτελέσματα για την παρούσα μελέτη. Η θερμική ανόπτηση που εφαρμόστηκε μετά την κατεργασία των επιφανειών, έδειξε σταθεροποίηση της γωνίας επαφής των επιφανειών σχεδόν αμέσως μετά την εφαρμογή της και οδήγησε σε καλύτερη ομοιογένεια κάλυψης της επιφάνειας από το ένζυμο σε σύγκριση με τις φρέσκες επιφάνειες. Όπως διαπιστώθηκε, οι νανο-υφασμένες με πλάσμα επιφάνειες, κατεργασμένες για 10min σε πλάσμα, παρουσίασαν από 3 έως και 5 φορές υψηλότερη ικανότητα προσρόφησης του ενζύμου για χρόνους επώασης του ενζύμου 2 και 24 ώρες αντίστοιχα, σε σύγκριση με μη κατεργασμένες επιφάνειες, χρησιμοποιώντας ως μέθοδο ακινητοποίησης την απευθείας προσρόφηση του ενζύμου πάνω σε αυτές. Στην περίπτωση αυτή, η αυξημένη ικανότητα των νανο-υφασμένων επιφανειών για προσρόφηση του ενζύμου, αποδόθηκε στην αυξημένη ενεργή επιφάνεια σε σύγκριση με τις μη κατεργασμένες επιφάνειες, αλλά και στην παρουσία καρβονυλίων στις επιφάνειες μετά την κατεργασία τους με πλάσμα, οι οποίες όπως επισημάνθηκε σχηματίζουν ομοιοπολικό δεσμό με τις αμινομάδες του ενζύμου. Εκτός από την απευθείας προσρόφηση, διερευνήθηκαν και δύο εναλλακτικές μέθοδοι ακινητοποίησης του ενζύμου, με ομοιοπολική σύνδεση στα ενεργοποιημένα καρβοξύλια των κατεργασμένων επιφανειών και χρησιμοποιώντας τη μέθοδο χημικής συγγένειας που αναπτύσσεται μέσω του συστήματος στρεπταβιδίνης – βιοτίνης. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την ομοιοπολική σύνδεση του ενζύμου στις νανο – υφασμένες επιφάνειες έδειξαν 4 φορές υψηλότερη ικανότητα δέσμευσης του ενζύμου σε σύγκριση με μη κατεργασμένες επιφάνειες, όταν ο χρόνος επώασης του ενζύμου στις

επιφάνειες ήταν 2 ώρες. Η αυξημένη αυτή ικανότητα δέσμευσης οφείλεται τόσο στην νανο – ύφανση των επιφανειών που οδηγεί σε αυξημένη ενεργή επιφάνεια όσο και στη δημιουργία χημικών λειτουργικών ομάδων, όπως οι καρβοξυλικές, που προκύπτουν μετά την κατεργασία των επιφανειών PMMA σε πλάσμα O₂, οι οποίες μετά την ενεργοποίησή τους, σχηματίζουν ισχυρό δεσμό με τις ελεύθερες αμινομάδες του ενζύμου. Τόσο στην περίπτωση της απευθείας προσρόφησης αλλά και της ομοιοπολικής σύνδεσης του ενζύμου με το υπόστρωμα, η βέλτιστη συγκέντρωση ακινητοποιημένου ενζύμου ήταν τα 200μg/ml. Το σύστημα στρεπταβιδίνης – βιοτίνης παρουσίασε διακυμαινόμενα αποτελέσματα ανάλογα με τη συγκέντρωση του ενζύμου και τη συγκέντρωση της στρεπταβιδίνης που εφαρμοζόταν κάθε φορά στις νανο – υφασμένες επιφάνειες. Σε σύγκριση με τις άλλες δύο μεθόδους ακινητοποίησης, στην περίπτωση αυτή φάνηκε ότι η επιφάνεια φτάνει σε κορεσμό σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις ενζύμου, ένα φαινόμενο που αποδόθηκε στην ύπαρξη στερεοχημικής παρεμπόδισης από το ογκώδες μόριο της στρεπταβιδίνης. Αξίζει να σημειώσουμε ότι σημαντικό πλεονέκτημα της συγκεκριμένης μεθόδου αποτελεί το γεγονός ότι καθώς το ένζυμο δεν έρχεται σε απευθείας επαφή με την επιφάνεια λόγω της χρήσης ενδιάμεσου μορίου διασύνδεσης, η αλλοίωση που είναι πιθανό να υποστεί το ένζυμο κατά την ακινητοποίησή του στην επιφάνεια μειώνεται σε μεγάλο βαθμό.

Ως γενικό συμπέρασμα της παραπάνω μελέτης, προκύπτει ότι η μέθοδος ακινητοποίησης του ενζύμου με απευθείας προσρόφηση σε ενεργοποιημένες με πλάσμα επιφάνειες, προτιμάται συγκριτικά με τις εναλλακτικές μεθόδους, καθώς η δημιουργία κατάλληλων λειτουργικών ομάδων και η αυξημένη ενεργή επιφάνεια που προκύπτει μετά την έκθεση των επιφανειών σε πλάσμα, παρέχουν υψηλή ικανότητα δέσμευσης του ενζύμου, που πλησιάζει σχεδόν τη βέλτιστη. Επιπλέον, η μέθοδος αυτή πλεονεκτεί ως προς την ευκολία και την απλούστευση που τη χαρακτηρίζει, καθώς απαιτούνται τα ελάχιστα δυνατά βήματα ενεργοποίησης της επιφάνειας ακινητοποίησης και συνεπώς τα λιγότερα αντιδραστήρια σε σύγκριση με τις άλλες μεθόδους, καθιστώντας την ως οικονομικότερη επιλογή. Συνδυάζοντας όλα τα παραπάνω χαρακτηριστικά, μπορούμε ασφαλώς να οδηγηθούμε στο συμπέρασμα ότι η προσρόφηση σε ενεργοποιημένες με πλάσμα επιφάνειες, αποτελεί τη βέλτιστη μέθοδο ακινητοποίησης του ενζύμου. Με εφαρμογή της συγκεκριμένης μεθόδου βρέθηκε ότι οι νανο – υφασμένες επιφάνειες PMMA φτάνουν σε κορεσμό για συγκέντρωση ενζύμου 200μg/ml, ενώ διερεύνηση του χρόνου επώασης του ενζύμου στις νανο – υφασμένες επιφάνειες έδειξε ότι η ικανότητα δέσμευσης των επιφανειών δεν παρουσιάζει σημαντική αύξηση για χρόνο επώασης του ενζύμου πέρα των 2 ωρών.

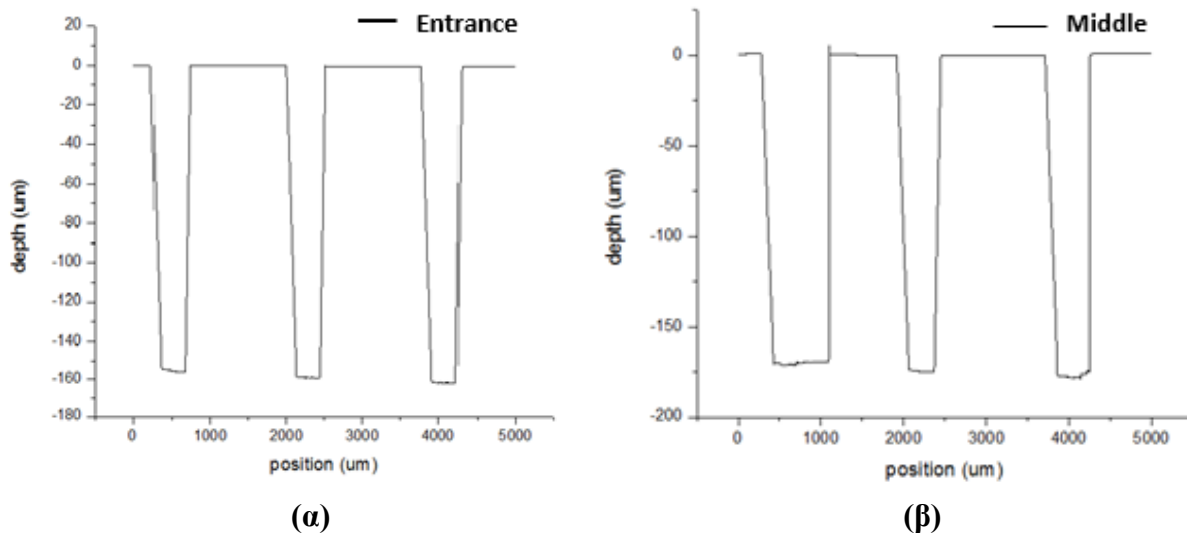
Για πιο ολοκληρωμένη και σφαιρική διερεύνηση των μεθόδων ακινητοποίησης του ενζύμου στις νανο – υφασμένες επιφάνειες, προτείνεται μελλοντικά η περαιτέρω αξιολόγηση

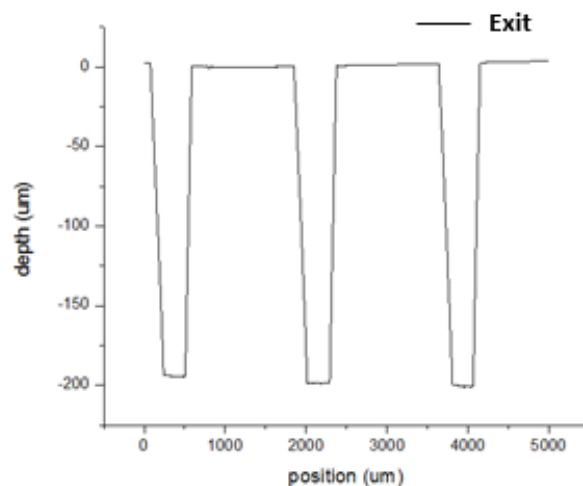
των συγκεκριμένων μεθόδων ακινητοποίησης που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία, ως προς την ικανότητα διατήρησης της καταλυτικής δραστηρότητας του ενζύμου ανάλογα με την εφαρμοζόμενη μέθοδο ακινητοποίησης, ελέγχοντας ανά τακτά χρονικά διαστήματα την δραστηρότητα του ενζύμου μετά από τη διατήρησή του σε κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης.

5.2. Αποτελέσματα μελέτης καταλυτικής οξείδωσης της 4 – φαίνυλο – αζο – φαινόλης με χρήση μικρο – αντιδραστήρα σε ψηφίδα PMMA, με ακινητοποιημένο το ένζυμο HRP

5.2.1. Χαρακτηρισμός καναλιών μικροαντιδραστήρα

Μετά την κατασκευή των καναλιών, είναι απαραίτητος ο χαρακτηρισμός των διαστάσεων του. Από τις μετρήσεις με το προφιλόμετρο ακίδας, προσδιορίζεται το μέσο βάθος των καναλιών, από το οποίο προκύπτει και ο θεωρητικός όγκος του μικροαντιδραστήρα. Στο σχήμα 5.10 που ακολουθεί, απεικονίζεται το βάθος του μικρο – αντιδραστήρα ως συνάρτηση της θέσης, όπως προκύπτει από τις μετρήσεις με το προφιλόμετρο, στην είσοδο (α) στη μέση (β) και στην έξοδο (γ) του τσιπ.





(γ)

Σχήμα 5.10: Διαγράμματα βάθους των καναλιών συναρτήσει της θέσης (α) στην είσοδο, (β) στην μέση και (γ) στην έξοδο του μικρο – αντιδραστήρα.

Τμήμα μαιάνδρου	Βάθος (μm)			Μέσος όρος
Είσοδος	155,6	158,85	162	158,82
Μέση	194,5	198,6	200,55	197,9
Έξοδος	170,1	175	177,4	174,17
Μέσος όρος βάθους				177μm

Ο θεωρητικός όγκος του μικροαντιδραστήρα θα προκύψει ως γινόμενο της συνολικής επιφάνειας του μικρο – αντιδραστήρα, η οποία υπολογίστηκε με χρήση του προγράμματος Autocad, επί το μέσο όρο βάθους, ως εξής:

$$V = \text{total area} \times \text{average depth} \Rightarrow V = 122,3\text{mm}^2 \times 177 \times 10^{-3}\text{mm} \Rightarrow V = 21.65\text{mm}^3$$

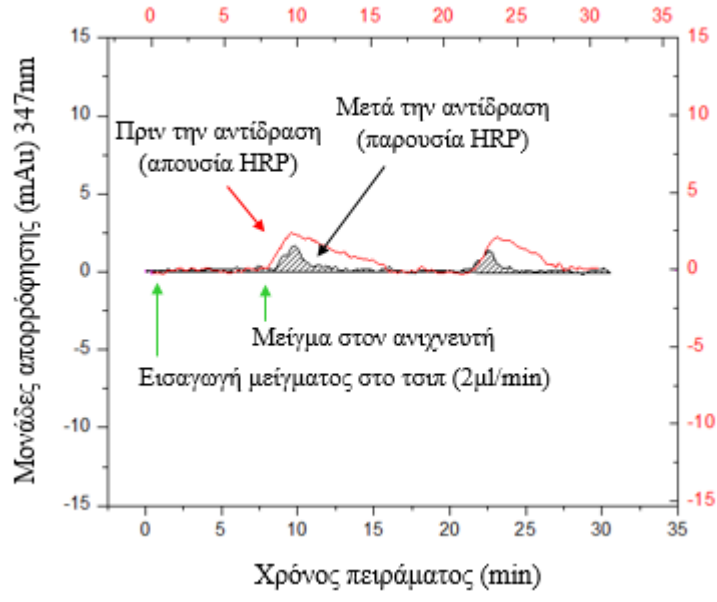
Επισημαίνουμε ότι ο πειραματικός όγκος του μικροαντιδραστήρα παρουσιάζει απόκλιση από τον θεωρητικό, καθώς από το πείραμα που πραγματοποιήθηκε με τη διέλευση χρωστικής ουσίας από τα μικρο – κανάλια, προέκυψε ίσος με 16μl.

5.2.2. Αξιολόγηση ικανότητας του ενζυματικού μικρο – αντιδραστήρα από PMMA στην βιοκαταλυτική μετατροπή της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης

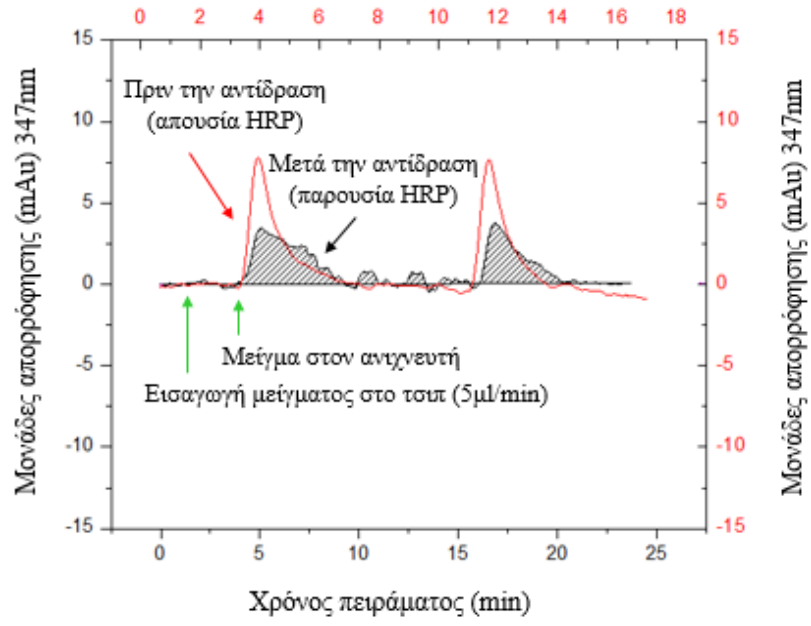
Η αξιολόγηση της ικανότητας του μικρο – αντιδραστήρα από PMMA που κατασκευάσαμε ως προς την ενζυματική μετατροπή φαινόλων, βασίστηκε στην καταγραφή της απορρόφησης στα 347nm του μείγματος 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης/υπεροξειδίου του υδρογόνου, μετά τη διέλευση του από ακατέργαστες ψηφίδες PMMA ή κατεργασμένες για 10min σε πλάσμα O₂, σε κάθε περίπτωση χωρίς την παρουσία ενζύμου, και από κατεργασμένες ψηφίδες PMMA για 10min σε πλάσμα O₂ με ακινητοποιημένο το ένζυμο HRP.

Στο Σχήμα 5.11, απεικονίζεται η απορρόφηση στα 347nm συναρτήσει του χρόνου κατεργασίας του πειράματος για το αντιδρών μείγμα 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης/υπεροξειδίου του υδρογόνου με ρυθμό ροής (α) 2μl/min, (β) 5μl/min (γ) 7.5 μl/min, (δ) 10μl/min, (ε) 15μl/min, (στ) 20μl/min (ζ) 25μl/min και (η) 30μl/min. Σε όλα τα σχήματα απεικονίζεται ενδεικτικά με βελάκι πάνω στο γράφημα, το χρονικό σημείο εισόδου του μείγματος στον μικρο – αντιδραστήρα και στον ανιχνευτή. Τονίζουμε ότι η φάση που ρέει συνεχώς στον μικρο – αντιδραστήρα είναι ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών μέσω του οποίου μεταφέρεται κάθε φορά ποσότητα μείγματος 3μl. Ενώ το ρυθμιστικό διάλυμα ρέει συνεχώς στο τσιπ, σε κάποιο χρόνο t εισάγεται ποσότητα 3μl του αντιδρώντος μείγματος, το οποίο ανάλογα με την ροή που εφαρμόζουμε κάθε φορά, φτάνει στον ανιχνευτή σε διαφορετικό χρόνο. Ο χρόνος αυτός που καταγράφεται όταν το μείγμα διέρχεται από το κατεργασμένο τσιπ με ακινητοποιημένο ένζυμο αντιστοιχεί στον χρόνο διέλευσης, ο οποίος εδώ είναι ίδιος με το χρόνο αντίδρασης καθώς το ένζυμο βρίσκεται μέσα στον μικρο – αντιδραστήρα, και είναι ίσος με t = 6, 4, 2.5, 1.5, 0.83, 0.66, 0.4 και 0,33 min για ρυθμούς ροής 5, 7.5, 10, 15, 20, 25 και 30 μl/min αντίστοιχα. Συνεπώς με αύξηση του ρυθμού ροής παρατηρείται μείωση του χρόνου αντίδρασης για δεδομένη ποσότητα αντιδρώντος μείγματος. Όταν το μείγμα εξέλθει από τον ανιχνευτή εμφανίζεται κορυφή η οποία αντιστοιχεί σε μειωμένη απορρόφηση μετά τη διέλευση από τον κατεργασμένο ενζυματικό μικρο – αντιδραστήρα, συγκριτικά με την αντίστοιχη απορρόφηση για το τσιπ χωρίς ακινητοποιημένο ένζυμο, υποδεικνύοντας την ικανότητα του ενζυματικού μικρο- αντιδραστήρα να καταλύει την οξειδωση της φαινόλης.

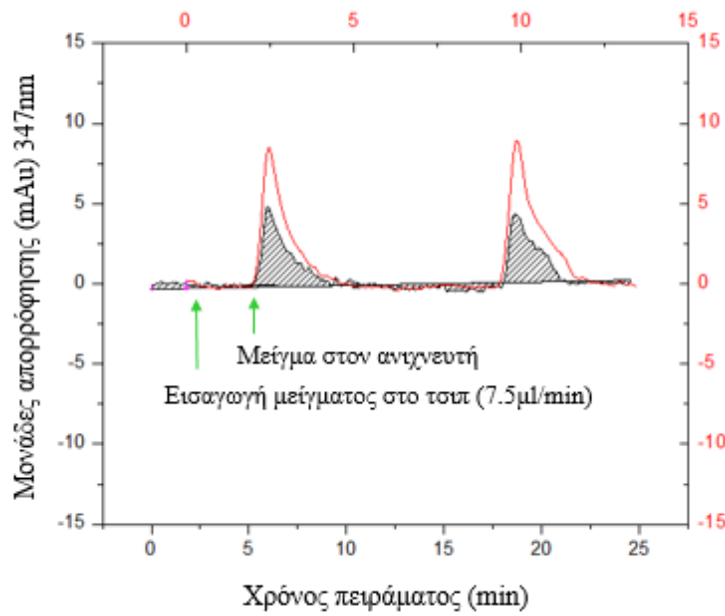
Επισημαίνουμε ότι η απεικόνιση δύο κορυφών κατά περίπτωση σε κάθε διάγραμμα, οφείλεται σε διπλό επαναληπτικό πείραμα που διεξήχθη για κάθε ροή και για την ίδια ποσότητα μείγματος. Οι κορυφές που απεικονίζονται προέκυψαν μετά από επαναλαμβανόμενη χρήση του ίδιου ενζυματικού μικρο – αντιδραστήρα, υποδεικνύοντας τη δυνατότητά του να επαναχρησιμοποιηθεί για τουλάχιστον 16 φορές.



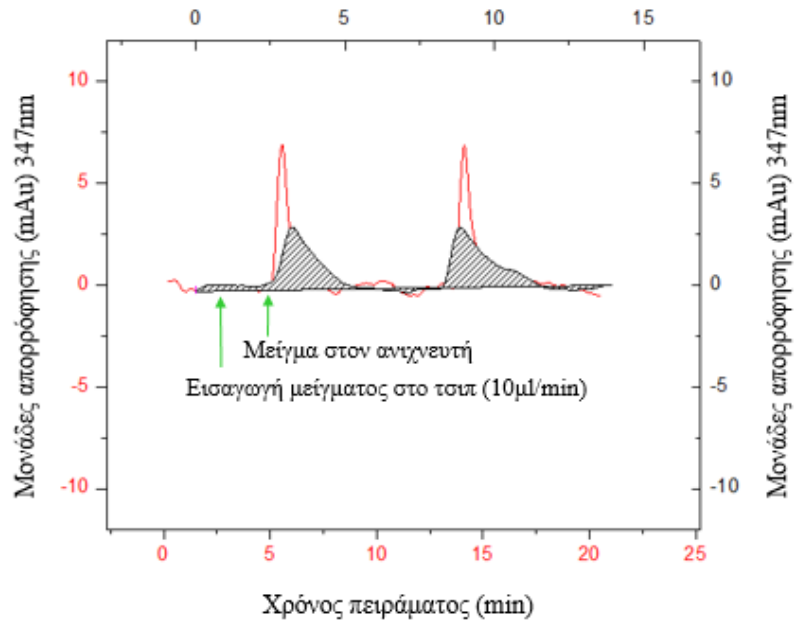
(α)



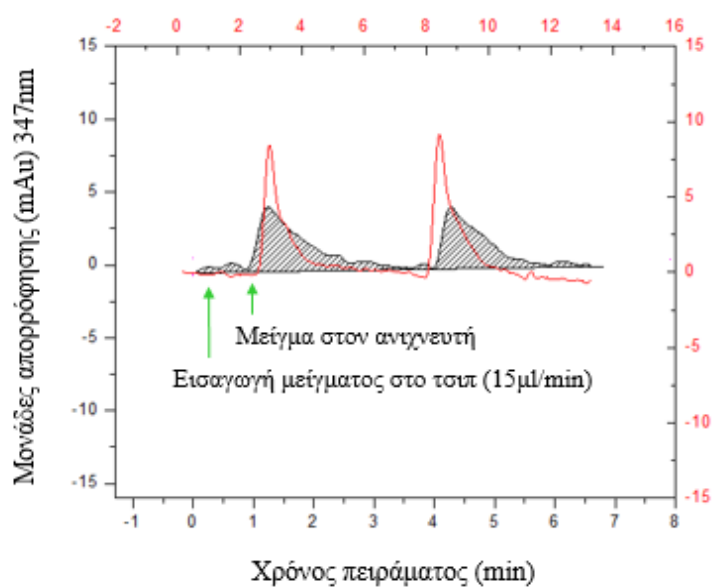
(β)



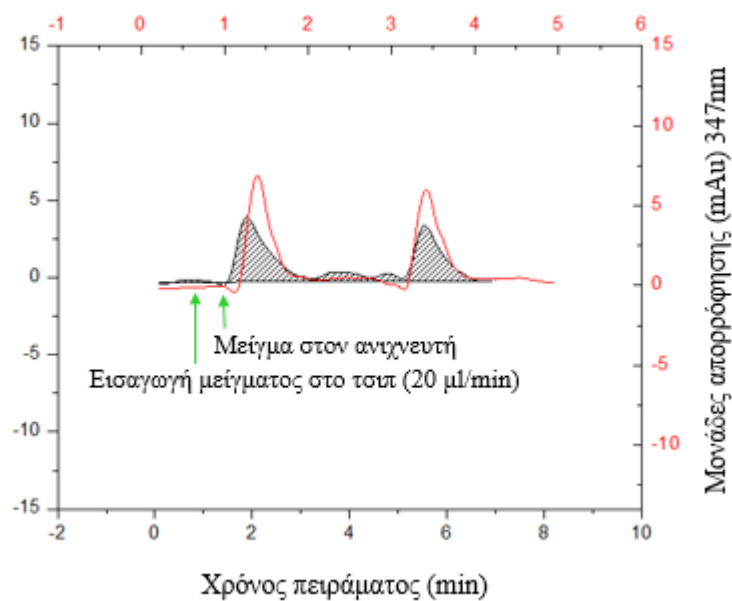
(γ)



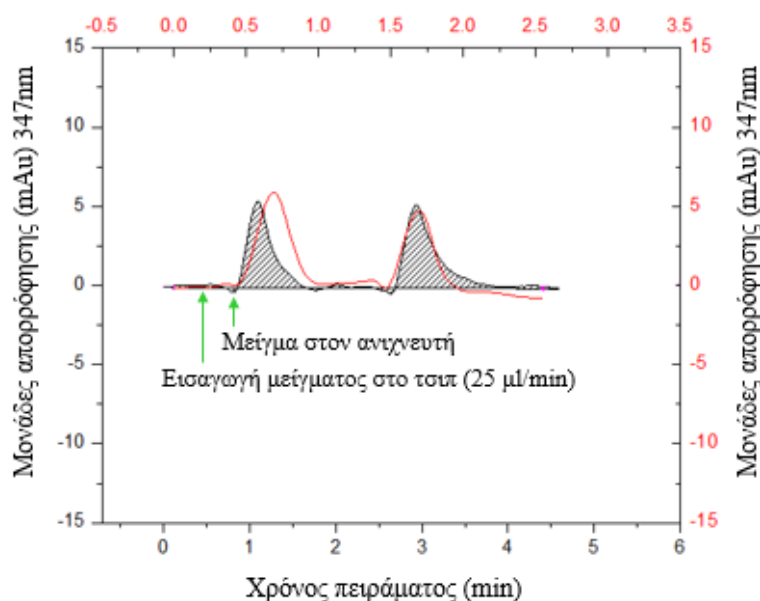
(δ)



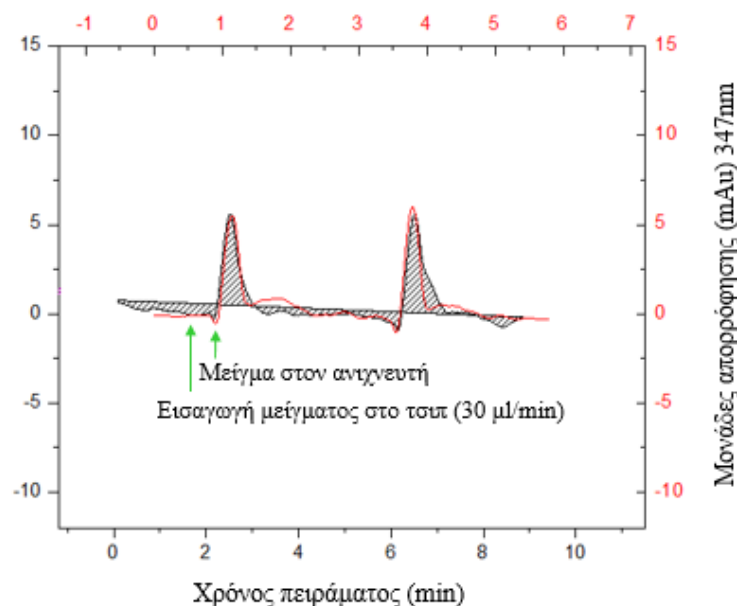
(ε)



(στ)



(ζ)

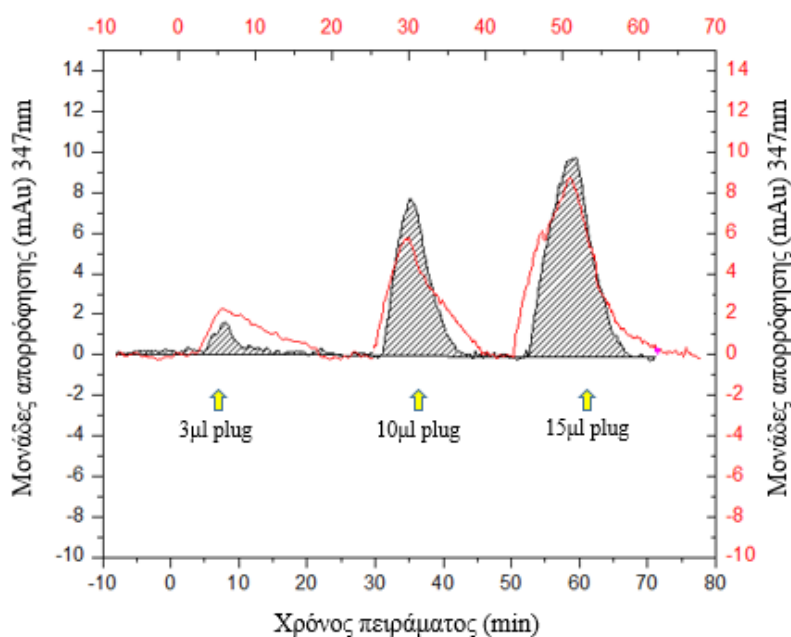


(η)

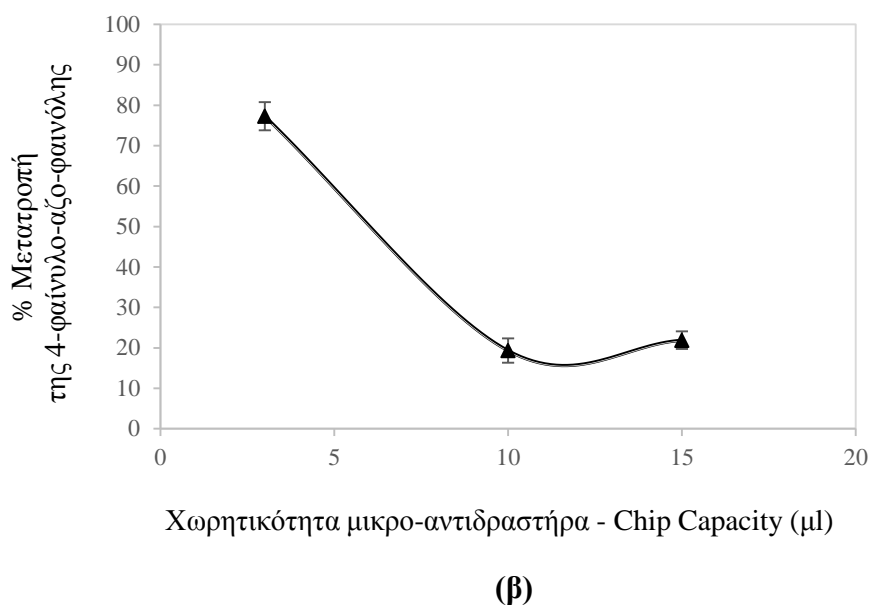
Σχήμα 5.11: Μονάδες απορρόφησης στα 347nm ως συνάρτηση του χρόνου πειράματος για κατεργασμένα σε πλάσμα O_2 τσιπ PMMA, χωρίς ακινητοποιημένη HRP (κόκκινο γράφημα) και με ακινητοποιημένη HRP (γραμμοσκιασμένο γράφημα), για ρυθμούς ροής αντιδρώντος μείγματος (α) 2 μl/min, (β) 5 μl/min (γ) 7.5 μl/min, (δ) 10 μl/min, (ε) 15 μl/min, (στ) 20 μl/min, (ζ) 25 μl/min και (η) 30 μl/min

5.2.2.1. Έκτιμηση καταλυτικής χωρητικότητας του ενζυματικού μικρο – αντιδραστήρα από PMMA

Στο σχήμα 5.12 (α) παρουσιάζονται οι κορυφές απορρόφησης στα 347nm συναρτήσει του χρόνου κατεργασίας του πειράματος, για ποσότητες (plug) αντιδρώντος μείγματος 4-φαινυλο-αζο-φαινόλης/υπεροξειδίου του υδρογόνου 3, 10 και 15μl με ρυθμό ροής 2μl/min, όπως προκύπτουν μετά από τη διέλευση του μείγματος από ακατέργαστες ψηφίδες PMMA χωρίς ένζυμο και από κατεργασμένες ψηφίδες PMMA για 10min σε πλάσμα O₂ με ακινητοποιημένο το ένζυμο HRP. Όπως γίνεται προφανές, αυξάνοντας την ποσότητα του μείγματος που διέρχεται από το μικρο – αντιδραστήρα, το εμβαδό κορυφής αυξάνεται, αλλά η πτώση στο εμβαδόν που παρατηρείται όταν το μείγμα διέρχεται από τα κατεργασμένα τσιπ με ακινητοποιημένο ένζυμο, σε σύγκριση με τα ακατέργαστα τσιπ χωρίς ένζυμο, παρουσιάζει μείωση με αύξηση της ποσότητας του μείγματος. Αυτό είναι ενδεικτικό του πώς επηρεάζει η χωρητικότητα του μικρο – αντιδραστήρα το ποσοστό μετατροπής της της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης, το οποίο προκύπτει από τη σύγκριση του εμβαδού κορυφής για τα κατεργασμένα τσιπ με ακινητοποιημένο ένζυμο, ως προς τα ακατέργαστα τσιπ χωρίς ένζυμο, και το οποίο απεικονίζεται στο σχήμα 5.12 (β). Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε, ήδη με αύξηση της χωρητικότητας του μικρο – αντιδραστήρα από τα 3 στα 10μl, το ποσοστό μετατροπής ελαττώνεται σημαντικά υποδεικνύοντας ότι, για ρυθμό ροής 2μl/min, βέλτιστα αποτελέσματα προκύπτουν όταν η ποσότητα του μείγματος που επιτρέπουμε να περάσει από τον μικρο – αντιδραστήρα δεν καταλαμβάνει περισσότερο από το 1/5 της συνολικής χωρητικότητάς του.



(α)

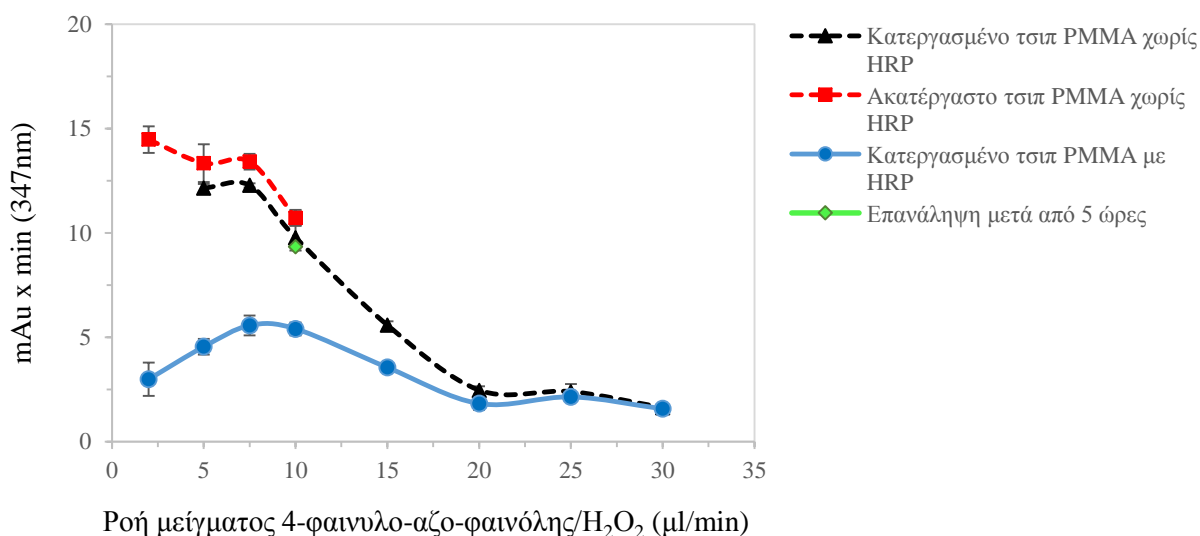


Σχήμα 5.12: (α) Μονάδες απορρόφησης στα 347nm ως συνάρτηση του χρόνου πειράματος, για ακατέργαστα τσιπ PMMA, χωρίς ακινητοποιημένη HRP (κόκκινο γράφημα) και με ακινητοποιημένη HRP (γραμμοσκιασμένο γράφημα), με ρυθμό ροής αντιδρώντος μείγματος 2μl/ml, για χωρητικότητες μικρο – αντιδραστήρα 3, 10 & 15μl, (β) Ποσοστό μετατροπής της 4-φαινυλο-αζο-φαινόλης ως συνάρτηση της χωρητικότητας του μικρο – αντιδραστήρα.

5.2.2.2. Αποτελέσματα βιοκαταλυτικής μετατροπής της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης στον ενζυματικό μικρο – αντιδραστήρα από PMMA

Στο ακόλουθο σχήμα 5.13, απεικονίζεται το εμβαδόν κορυφής που προκύπτει ως γινόμενο της απορρόφησης στα 347nm επί το αντίστοιχο χρόνο διεξαγωγής του πειράματος (mAu x min) ως συνάρτηση του ρυθμού ροής του αντιδρώντος μείγματος 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης/ H₂O₂, για κατεργασμένο τσιπ PMMA για 10 min σε πλάσμα O₂ με ακινητοποιημένο το ένζυμο HRP, για κατεργασμένο τσιπ PMMA για 10 min σε πλάσμα O₂ χωρίς ένζυμο και για ακατέργαστο τσιπ PMMA χωρίς ένζυμο. Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε το εμβαδό κορυφής του μείγματος στα 347nm παρουσιάζει πτώση μετά την διεξαγωγή της ενζυματικής αντίδρασης υποδεικνύοντας την κατανάλωση της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης. Σε γενικές γραμμές παρατηρείται φθίνουσα τάση στην απορρόφηση, με αύξηση του ρυθμού ροής και συνεπώς με μείωση του χρόνου παραμονής στον μικρο – αντιδραστήρα. Αξίζει να αναφέρουμε ότι οι τιμές που προκύπτουν για το κατεργασμένο τσιπ

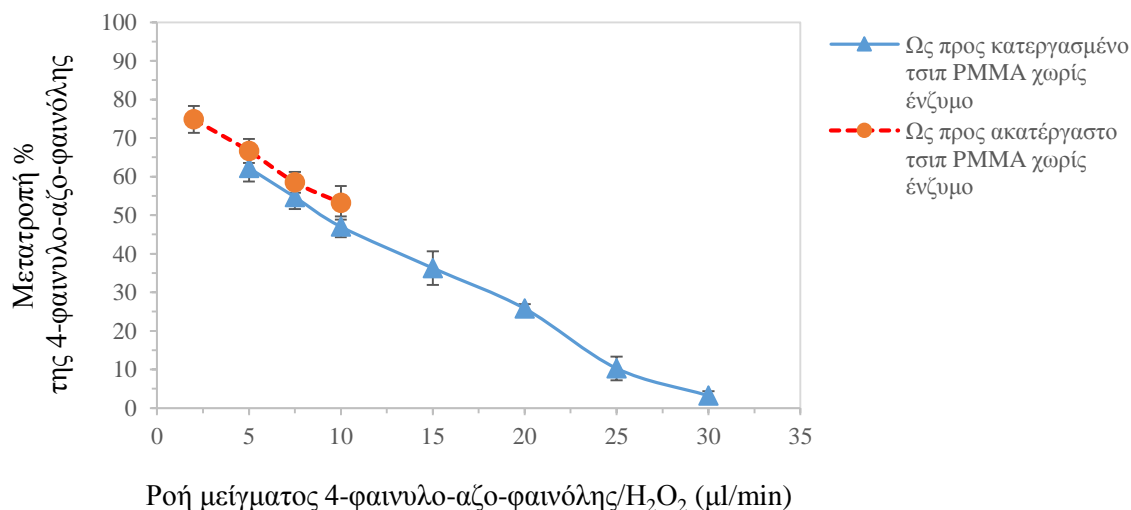
χωρίς ένζυμο και για το ακατέργαστο τσιπ χωρίς ένζυμο, είναι πολύ κοντά μεταξύ τους με κάποιο περιθώριο λάθους όπως γίνεται προφανές και από το διάγραμμα, υποδεικνύοντας ότι και τα δύο τσιπ λειτουργούν σωστά ως αναφορά για τον υπολογισμό της μετατροπής της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης, ενώ επίσης δείχνουν ότι η κατεργασία των τσιπ με το πλάσμα O_2 , δεν επηρεάζει τη συμπεριφορά της φαινόλης πάνω στο τσιπ από PMMA. Με στόχο να αποδειχθεί ότι η φαινόλη δεν αλλοιώνει το PMMA με κάποιο τρόπο, η τιμή που προέκυψε από επαναληπτικό πείραμα για μια επιλεγθείσα ροή μετά από κάποιες ώρες συνεχούς λειτουργίας του πειράματος, απεικονίζεται στο σχήμα. Είναι προφανές, ότι η τιμή απορρόφησης που παίρνουμε είναι σχεδόν ίδια ακόμα και μετά από 8 ώρες συνεχούς διέλευσης φαινόλης στο τσιπ από PMMA, αποδεικνύοντας ότι δεν επηρεάζεται το υλικό μας από την παρουσία της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης.



Σχήμα 5.13: Μονάδες απορρόφησης στα 347nm επί τον χρόνο διεξαγωγής του πειράματος συναρτήσει του ρυθμού ροής μείγματος 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης/ H_2O_2 για κατεργασμένο τσιπ PMMA για 10min σε πλάσμα O_2 χωρίς ένζυμο HRP (μαύρη διακεκομμένη γραμμή) και με ακινητοποιημένο ένζυμο HRP (μπλε γραμμή) και για ακατέργαστο τσιπ PMMA χωρίς ένζυμο (κόκκινη γραμμή). Με πράσινο απεικονίζεται η αντίστοιχη τιμή για επανάληψη του πειράματος μετά από 8 ώρες.

Με βάση τα αποτελέσματα που προκύπτουν από το παραπάνω σχήμα, πραγματοποιήθηκε ο υπολογισμός του ποσοστού της βιοκαταλυτικής μετατροπής της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης που αντιστοιχεί στους διαφορετικούς χρόνους παραμονής στον

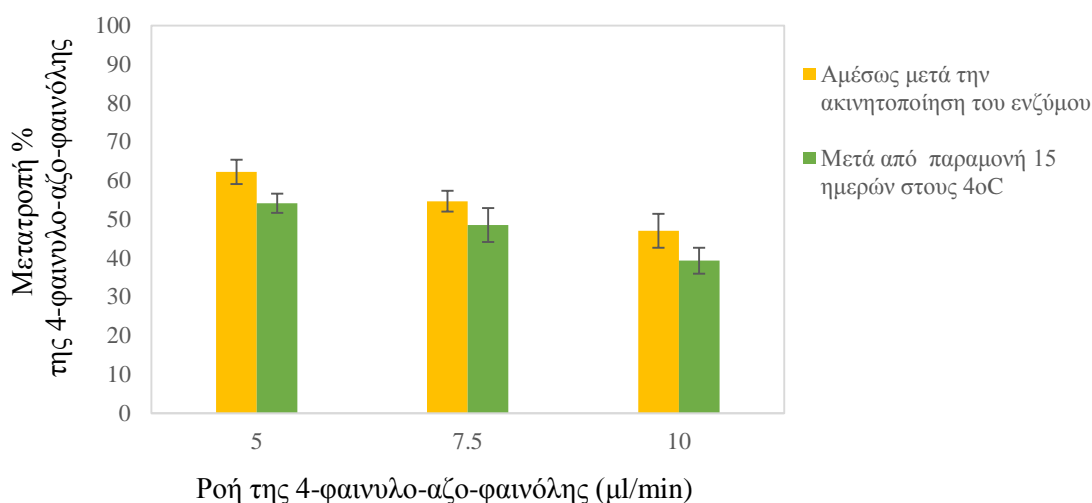
ενζυματικό μικρο – αντιδραστήρα, λαμβάνοντας ως αναφορά το αντίστοιχα εμβαδά κορυφής που προκύπτουν, όταν το μείγμα διέρχεται από τσιπ χωρίς ένζυμο. Συγκεκριμένα, στο σχήμα 5.14. απεικονίζεται το ποσοστό μετατροπής της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης ως συνάρτηση του ρυθμού ροής του μείγματος, όπως προκύπτει με βάση κατεργασμένο τσιπ PMMA χωρίς ένζυμο και με βάση ακατέργαστο τσιπ χωρίς ένζυμο. Παρατηρούμε ότι και για τα δύο τσιπ αναφοράς, οι τιμές που προκύπτουν είναι πολύ κοντά με μια διαφορά της τάξης του 5%. Όπως μπορούμε να διακρίνουμε με αύξηση του ρυθμού ροής, το ποσοστό μετατροπής μειώνεται συνεχώς πλησιάζοντας το μηδέν για ρυθμούς ροής $\geq 30 \mu\text{l}/\text{min}$. Για τον χαμηλότερο εφαρμοζόμενο ρυθμό ροής των $2 \mu\text{l}/\text{min}$, που αντιστοιχεί σε χρόνο αντίδρασης 6min, φαίνεται ότι πετυχαίνουμε την μεγαλύτερη μετατροπής της 4 - φαινυλο – αζο – φαινόλης με ποσοστό 75%. Η πτώση του ποσοστού μετατροπής κατά την εφαρμογή μεγαλύτερων ρυθμών ροής, υποδεικνύει ότι μικρότεροι χρόνοι παραμονής του μείγματος στον μικρο – αντιδραστήρα, οδηγούν σε χαμηλότερο βαθμό αντίδρασης της 4 - φαινυλο – αζο – φαινόλης, παρόλα αυτά όμως σημειώνεται ότι ακόμα και για μικρούς χρόνους παραμονής στον μικρο – αντιδραστήρα, της τάξης του 1 min , παρατηρείται μετατροπή της φαινόλης σε ποσοστό 25% & 35% (για ρυθμούς ροής 20 & 15 $\mu\text{l}/\text{min}$ αντίστοιχα).



Σχήμα 5.14: Μετατροπή της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης % στα 347nm συναρτήσει του ρυθμού ροής του αντιδρώντος μείγματος 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης/ H₂O₂ σε κατεργασμένο τσιπ PMMA, 10min σε πλάσμα O₂, με ακινητοποιημένο το ένζυμο HRP, ως προς κατεργασμένο τσιπ PMMA χωρίς ένζυμο (μπλε γραμμή) και ως προς ακατέργαστο τσιπ PMMA χωρίς ένζυμο (κόκκινη γραμμή).

5.2.2.3. Εκτίμηση δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου HRP σε μικρο – αντιδραστήρα από PMMA κατεργασμένο για 10min σε πλάσμα O₂

Για την εκτίμηση της δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου σε μικρο – αντιδραστήρα από PMMA κατεργασμένο για 10min σε πλάσμα O₂, κατασκευάστηκε συγκριτικό διάγραμμα (Σχήμα 5.15.) της μετατροπής της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης, για την περίπτωση όπου η αντίδραση πραγματοποιήθηκε αμέσως μετά την ακινητοποίηση του ενζύμου και μετά από παραμονή 15 ημερών στους 4°C, ως συνάρτηση της ροής του μείγματος. Όπως μπορούμε να παρατηρήσουμε, το ένζυμο HRP διατηρεί την καταλυτική του ικανότητα σε ποσοστό 84 – 89% ανάλογα με τη ροή, ακόμα και μετά από διάστημα 15 ημερών στις κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης.



Σχήμα 5.15: Μετατροπή της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης % στα 347nm για κατεργασμένο τσιπ PMMA, 10min σε πλάσμα O₂, με ακινητοποιημένο το ένζυμο HRP, όπως προέκυψε αμέσως μετά την ακινητοποίηση του ενζύμου (κίτρινη στήλη) και μετά από την παραμονή 15 ημερών στους 4°C (πράσινη στήλη), ως συνάρτηση του ρυθμού ροής.

5.2.3. Συμπεράσματα – Προτάσεις

Μικρο – αντιδραστήρας από PMMA συνολικής χωρητικότητας 16μl αποτελούμενος από μικρο – κανάλια βάθους 177μm κατασκευάστηκε και υπέστη κατάλληλη μορφολογική και χημική τροποποίηση κατά την κατεργασία του με πλάσμα O₂ για 10min, προκειμένου να ακινητοποιηθεί στα τοιχώματα του η υπεροξειδάση του χρένου (HRP) υπό τις βέλτιστες συνθήκες ακινητοποίησης που προσδιορίστηκαν στο πρώτο μέρος της μελέτης. Ο παρών ενζυματικός μικρο – αντιδραστήρας χρησιμοποιήθηκε για την βιοκαταλυτική μετατροπή της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης παρουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου. Για τον υπολογισμό της βιοκαταλυτικής μετατροπής, χρησιμοποιήθηκαν ως αναφορά, τόσο κατεργασμένα τσιπ PMMA σε πλάσμα O₂ όσο και ακατέργαστα τσιπ PMMA, από τα οποία και στις δύο περιπτώσεις απουσίαζε το ένζυμο HRP. Οι ρυθμοί ροής μείγματος 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης/υπεροξειδίου του υδρογόνου που εφαρμόστηκαν κυμάνθηκαν από 2 – 30μl/min ενώ δοκιμάστηκαν ποσότητες μείγματος 3, 10 & 15μl για τον προσδιορισμό της βέλτιστης χωρητικότητας του μικρο – αντιδραστήρα. Όπως διαπιστώθηκε, με αύξηση της χωρητικότητας του μικρο – αντιδραστήρα, το ποσοστό μετατροπής της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης ελαττώθηκε σημαντικά, οδηγώντας μας στο συμπέρασμα ότι για επίτευξη μετατροπής >75%, θα πρέπει η ποσότητα του μείγματος που επιτρέπουμε να περάσει από τον μικρο – αντιδραστήρα να μην καταλαμβάνει περισσότερο από το 1/5 της συνολικής χωρητικότητάς του. Η μέγιστη μετατροπή της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης, επιτεύχθηκε για το χαμηλότερο εφαρμοζόμενο ρυθμό ροής των 2μl/min που αντιστοιχεί σε χρόνο παραμονής στον μικρο – αντιδραστήρα 6min, σε ποσοστό 75%. Για εφαρμοζόμενους ρυθμούς ροής μείγματος 5, 7.5 & 10μl/min επιτεύχθηκε επίσης ικανοποιητική μετατροπή σε ποσοστά 62%, 54% & 47% αντίστοιχα. Η εφαρμογή μεγαλύτερων ρυθμών ροής και συνεπώς μικρότερων χρόνων παραμονής, οδήγησε σε ακόμα μικρότερους βαθμούς μετατροπής, πλησιάζοντας το μηδέν για ρυθμούς ροής $\geq 30\mu\text{l}/\text{min}$. Συνεπώς, αποδεικνύεται η πολύ καλή ικανότητα του μικρο – αντιδραστήρα από PMMA με ακινητοποιημένο το ένζυμο HRP που κατασκευάσαμε, να καταλύει την οξειδωση της συγκεκριμένης φαινόλης για κάποιο εύρος ρυθμών ροής, ενώ προτείνεται η εφαρμογή χαμηλών ρυθμών ροής μείγματος 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης/υπεροξειδίου του υδρογόνου στον μικρο – αντιδραστήρα για την επίτευξη της μεγαλύτερης δυνατής βιοκαταλυτικής μετατροπής της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης.

Επισημαίνεται, ότι ο ενζυματικός μικρο – αντιδραστήρας επαναχρησιμοποιήθηκε για τουλάχιστον 16 φορές με την ίδια αποδοτικότητα, ενώ από τα αποτελέσματα που προέκυψαν μετά από επαναληπτικό πείραμα που διεξήχθη μετά από 8 ώρες συνεχούς λειτουργίας του

μικρο – αντιδραστήρα, έγινε προφανές ότι η εφαρμογή της συγκεκριμένης φαινόλης στο τσιπ PMMA δεν αλλοιώνει με οποιοδήποτε τρόπο το υλικό, για τη συγκεκριμένη ποσότητα που εφαρμόζεται (3μl) και για το συγκεκριμένο τρόπο λειτουργίας. Τέλος, αξίζει να σημειωθεί ότι το ένζυμο HRP φάνηκε να διατηρεί την καταλυτική του ικανότητα σε αρκετά υψηλό ποσοστό 84 – 89% ανάλογα με τον εφαρμοζόμενο ρυθμό ροής, ακόμα και μετά από διάστημα 15 ημερών στις κατάλληλες συνθήκες αποθήκευσης.

Μελλοντικές προτάσεις:

- Διερεύνηση της επίδρασης της συγκέντρωσης του υπεροξειδίου του υδρογόνου και της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης στην βιοκαταλυτική μετατροπή της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης.
- Διερεύνηση της επίδρασης της μοριακής αναλογίας 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλη/υπεροξείδιο του υδρογόνου στην βιοκαταλυτική μετατροπή της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης.
- Ανάλυση των προϊόντων που σχηματίζονται κατά την ενζυματική αντίδραση με τη χρήση φασματοσκοπίας μάζας.
- Αξιοποίηση του μικροαναμείκτη, με εισαγωγή της φαινόλης και του υπεροξειδίου του υδρογόνου από διαφορετικές εισόδους και την ανάμιξή τους εντός του μικρο – αντιδραστήρα, προκειμένου να αξιολογηθεί η ικανότητα αξιοποίησης του συστήματος σε εφαρμογές μεγαλύτερης κλίμακας, παρουσία συνεχούς ροής φαινόλης.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. J. W. Coburn and H. F. Winters, Ion- and electron-assisted gas-surface chemistry - An important effect in plasma etching, *J. Appl. Phys.*, 50, 3189, (1979).
2. Wenzel, R. N., "Surface roughness and contact angle", *Industrial Engineering Chemistry* 28, 988-994, (1936).
3. A.B.D. Cassie, and S. Baxter, "Wettability of porous surfaces", *Trans. Faraday Society*, 40, 546, (1944).
4. U. Kragl, Immobilized enzymes and membrane reactor, in *Industrial Enzymology*, Godfrey, T. and Wet, S., Eds., Macmillan Press, London, (1996).
5. H. Becker, C. Gärtner, *Electrophoresis*, 21, 12, (2000).
6. B. Bhushan Ed, *Handbook of Nanotechnology*, Springer-Verlag, (2004).
7. T. Schaller, L. Bohn, J. Mayer, and K. Schubert, *Precis. Eng.*, 23, 229, (1999).
8. Y. Sun, Y. C. Kwok, and N-T Nguyen, *J. Micromech. Microeng.*, 16, 1681, (2006).
9. F. Dang, O. Tabata, M. Kurokawa, A. A. Ewis, L. Zhang, Y. Yamaoka, S. Shinohara, Y. Shinohara, M. Ishikawa, and Y. Baba, *Anal. Chem.*, 77, 2140, (2005).
10. J.S Rossier, P. Bercier, A. Schwarz, S. Loidant, and H. H Girault, *Langmuir*, 15, 5173, (1999).
11. C-H Lin, C-H Chao, C-W Lan, *Sens. Actuat. B*, 121, 698, (2007).
12. M.E. Vlachopoulou, A. Tserepi, P. Pagoni, P. Argitis, M. Sanopoulou, and K. Misiakos, *J. Micromech. Microeng.*, 19, 015007, (2009).
13. Wiles C., Watts P., Continuous flow reactors, a tool for the modern synthetic chemist, *Eur. J. Org. Chem.*, 1655-1671, (2008).
14. Frost C.G., Mutton L., Heterogeneous catalytic synthesis using microreactor technology, *Green Chem.*, 12, 1687-1703, (2010).
15. Wohlgenuth R., Plazl I., Znidarsic-Plazl P., Gernaey K. V., Woodley J. M., Microscale technology and biocatalytic processes: opportunities and challenges for synthesis, *Trends Biotechnol.*, 33, 302-314, (2015).

16. McMullen J.P., Jensen K.F., Integrated Microreactors for Reaction Automation: New Approaches to Reaction Development, *Annu. Rev. Anal. Chem.*, 3, 19-42, (2010).
17. Brandner J.J., Microfabrication in metals, ceramics and polymers, *Russ. J. Gen. Chem.*, 82, 2025-2033, (2012).
18. Schönfeld H., Hunger K., Cecilia R., Kunz U., Enhanced mass transfer using a novel polymer/carrier microreactor, *Chem. Eng. J.*, 101, 455-463, (2004).
19. Enzo Laurenti, Ardson dos Santos Vianna Jr., Enzymatic microreactors in biocatalysis: history, features, and future perspectives, *Biocatalysis*, 1, 148–165, (2015).
20. Judit Nemethne-Sovagol–Mate Benke, Microreactors: A new concept for chemical synthesis and technological feasibility, *Materials Science and Engineering*, 39(2), 89–101, (2014).
21. Vilkner T., Janasek D., Manz A., Micro total analysis systems Recent developments, *Anal. Chem.*, 76, 3373– 86, (2004).
22. Pawel L. Urban, David M. Goodall, Neil C. Bruce, Enzymatic microreactors in chemical analysis and kinetic studies, *Biotechnology Advances* 24, 42– 57, (2006).
23. Miyazaki M., Maeda H., Microchannel enzyme reactors and their applications for processing, *Trends Biotechnol.*, 24, 463-470, (2006).
24. Alvarez S., Manolache S., Denes F., Synthesis of Polyaniline Using Horseradish Peroxidase Immobilized on Plasma-Functionalized Polyethylene Surfaces as Initiator, *Journal of Applied Polymer Science*, 88, 369–379 (2003).
25. K. Tsougeni, P.S. Petrou, K. Awsruk, M.M. Marzec, N. Ioannidis, V. Petrouleas, A. Tserepi, S. E. Kakabakos and E. Gogolides, Direct Covalent Biomolecule Immobilization on Plasma-Nanotextured Chemically Stable Substrates, *ACS Appl. Mater. Interfaces*, 7, 14670–14681, (2015).
26. Sumitra Datta, L. Rene Christena, Yamuna Rani Sriramulu Rajaram, Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials, *Biotech.*, 3, 1–9, (2013).
27. Nelson J.M., Griffin E.G., Adsorption of Invertase, *J. Am. Chem. Soc.*, 38, 1109-1115, (1916).
28. N. Grubhofer and N. Schelth, *Nature*, 4, 508, (1953).

29. Nisha S., Arun Karthick S. and Gobi N., A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme, *Che. Sci. Rev. Lett.*, 1(3), 148-155, (2012).
30. Xinyang Li, Xiaolin Wang, Gang Ye, Weijuan Xia, Xiaogong Wang. Polystyrene-based diazonium salt as adhesive: A new approach for enzyme immobilization on polymeric supports, *Polymer*, 51, 860–867, (2010).
31. Singh B.D., *Biotechnology expanding horizons*, Kalyani, India, (2009).
32. D'Souza SF, Immobilized enzymes in bioprocess, *Curr. Sci.* 77, 69–79, (1998).
33. Cao L., Immobilized enzymes: past, present and prospects. In: *Carrier-bound immobilized enzymes: principles, application and design*, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, (2006).
34. Tanyolac D., Yuruksoy B.I., Ozdural A.R., *Biochem. Eng. J.*, 2, 179-186, (1998).
35. Brady D., Jordan A., *Advances in enzyme immobilization*, *Biotechnol. Lett.*, 31, 1639, (2009).
36. Tosa T., Mori T., Fuse N., and Chibata I., *Enzymologia*, 31, 214–224, (1966).
37. Brigida A.I.S., Calado V.M.A., Goncalves L.R.B., Coelho MAZ Effect of chemical treatments on properties of green coconut fiber, *Carbohydr. Polym.* 79, 832–838, (2010).
38. Dey G., Nagpal V., Banerjee R., Immobilization of alphaamylase from *Bacillus circulans* GRS 313 on coconut fiber, *Appl. Biochem. Biotechnol.* 102–103, 303–313, (2002).
39. Hernandez M.R., Kispert L., Ramirez E.T., Rosales D.R., Ulloa R.Z., Ferrara J.T., Electron paramagnetic resonance analyses of biotransformation reactions with cytochrome P-450 immobilized on mesoporous molecular sieves, *Biotechnol. Lett.* 29, 919–924, (2007).
40. Karagulyan H.K., Gasparyan V.K., Decker S.R., Immobilization of fungal beta-glucosidase on silica gel and kaolin carriers, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 146, 39–47, (2008).
41. Mitchell S., Ramirez J.P., Mesoporous zeolites as enzyme carriers: synthesis, characterization and application in biocatalysis, *Catal. Today*, 168, 28–37, (2011).
42. Diaz F.J. Jr, Balkus K.J., Enzyme immobilization in MCM-41 molecular sieve, *J. Mol. Catal. B- Enzym.*, 2, 115–126, (1996).
43. Wong L.S., Thirlway J., Micklefield J. J., *Am. Chem.Soc.* 130 (37): 12456-12464, (2008).

44. Ghous T., *J. chem. Soc. Pak.*, 23, 4, (2001).
45. Berna B.M. and Batista F., *Enzyme immobilization literature survey methods in Biotechnology: Immobilization of enzymes and cells*, 2nd (Ed.), 15-30, (2006).
46. Fu J., Reinhold J., Woodbury N.W., *Peptide-modified surfaces for enzyme immobilization*, (2011).
47. Hsieh H.J., Liu P.C., Liao W.J., *Immobilization of invertase via carbohydrate moiety on chitosan to enhance its thermal stability*, *Biotechnol. Lett.*, 22, 1459–1464, (2000).
48. Cunha A.G., Fernandez-Lorente G., Bevilaqua J.V., Destain J., Paiva L.M., Freire D.M., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M., *Immobilization of Yarrowia lipolytica lipase—a comparison of stability of physical adsorption and covalent attachment techniques*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 146, 49–56, (2008).
49. Ispas C., Sokolov I., Andreescu S., *Enzyme-functionalized mesoporous silica for bioanalytical applications*, *Anal. Bioanal. Chem.*, 393, 543–554, (2009).
50. Wu L., Yuan X., Sheng J., *Immobilization of cellulase in nanofibrous PVA membranes by electrospinning*, *J. Membr. Sci.*, 250, 167–173, (2005).
51. Kim J., Jia H., Wang P., *Challenges in biocatalysis for enzymebased biofuel cells*, *Biotechnol. Adv.* 24, 296–308, (2006).
52. Ren G., Xu X., Liu Q et al, *Electrospun poly(vinyl alcohol)/glucose oxidase biocomposite membranes for biosensor applications*, *React. Funct. Polym.* 66, 1559–1564, (2006).
53. Li S.F., Chen J.P., Wu W.T., *Electrospun polyacrylonitrile nanofibrous membranes for lipase immobilization*, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, 47, 117–124, (2007).
54. Sakai S., Liu Y., Yamaguchi T., Watanabe R. Kawabe M., Kawakami K., *Immobilization of Pseudomonas cepacia lipase onto electrospun polyacrylonitrile fibers through physical adsorption and application to transesterification in nonaqueous solvent*, *Biotechnol. Lett.*, 32, 1059–1062, (2010).
55. Zhao Q., Hou Y., Gong G.H., Yu M.A, Jiang L., Liao F., *Characterization of alcohol dehydrogenase from permeabilized brewer's yeast cells immobilized on the derived attapulgitic nanofibers.*, *Appl. Biochem. Biotechnol*, 160, 2287–2299, (2010).

56. Yusdy, Patel S.R., Yap M.G.S., Wang D.I.C., Immobilization of L-lactate dehydrogenase on magnetic nanoclusters for chiral synthesis of pharmaceutical compounds, *Biochem. Eng. J.* 48, 13–21, (2009).
57. Rosevear A. et al., *Immobilized Enzymes and Cells*, Adam Hilger, Philadelphia, (1987).
58. Bernfeld P. and Wan J. Antigens and enzymes made insoluble by entrapping them into the lattices of synthetic polymers science, 142, 678-679, (1963).
59. Shen Q., Yang R., Hua X., Ye F., Zhang W., Zhao W., Gelatin templated biomimetic calcification for b-galactosidase immobilization, *Process Biochem.*, 46, 1565–1571, (2011).
60. Dai D., Xia L., Effect of lipase immobilization on resolution of (R, S)-2-octanol in non aqueous media using modified ultrastable-Y molecular sieve as support, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 134, 39–49, (2006).
61. Wang Z.G., Wan L.S., Liu Z.M., Huang X.J., Xu Z.K., Enzyme immobilization on electrospun polymer nanofibers: an overview, *J. Mol. Catal. B-Enzym.* 56, 189–195, (2009).
62. Wen H., Nallathambi V., Chakraborty D., Barton S.C., Carbon fiber microelectrodes modified with carbon nanotubes as a new support for immobilization of glucose oxidase, *Microchim. Acta*, 175, 283–289, (2011).
63. Betigeri S.S., Neau S.H., Immobilization of lipase using hydrophilic polymers in the form of hydrogel beads, *Biomaterials*, 23, 3627–3636, (2002)
64. Sardar M., Roy I., Gupta M.N., Simultaneous purification and immobilization of *Aspergillus niger* xylanase on the reversibly soluble polymer Eudragit(TM) L-100, *Enzyme Microb. Tech.*, 27, 672–679, (2000).
65. Shi Q-H, Tian Y, Dong X-Y, Bai S, Sun Y, Chitosan-coated silica beads as immobilized metal affinity support for protein adsorption, *Biochem Eng J* 16:317–322, (2003).
66. Sardar M., Gupta M.N., Immobilization of tomato pectinase on Con A–Seralose 4B by bioaffinity layering, *Enzyme Microb. Tech.* 37, 355–359, (2005).
67. Haider T., Husain Q., Concanavalin A layered calcium alginate–starch beads immobilized b-galactosidase as a therapeutic agent for lactose intolerant patients, *Int. J. Pharm.* 359, 1–6, (2008).
68. Green N.M., "Avidin". *Advances in protein chemistry*, 29, 85–133, (1975).

69. "Overview of Protein Labeling". Thermo Fisher Scientific. Retrieved 22 April 2012.
70. <http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/IMMOB/ionic.htm>
71. Guisan J.M., Penzol G., Armisen P. et al, Immobilization of enzyme acting on macromolecular substrates, immobilization of enzymes and cells, Humana press, Totowa, NJ, 261-275, (1997).
72. Yücel Y., *Bioresource Technology*, 102, 3977–3980, (2011).
73. Sharma M., Kumar V. and Pundir C.S., *Indian journal of Biotechnology*, 7, 328-332, (2008).
74. Trevan M., Effect of immobilization of enzyme activity in Immobilized enzymes: An introduction and application in biotechnology, Wiley Chichester-Newyork, 11-56, (1980).
75. Matsuda K, Harada H, Kashiwada A, Yamada K, Hirata M., Preparation of expanded poly(tetrafluoroethylene) films grafted by oxygen plasma pretreatment and immobilization of lipase, *J. Photopolym. Sci. Technol.*, 16(1), 49, (2003).
76. Alvarez S., Manolache S., Denes F., Synthesis of polyaniline using horseradish peroxidase immobilized on plasma-functionalized polyethylene surfaces as initiator, *J. Appl. Polym. Sci.*, 88(2), 369, (2003).
77. Alvarez-Blanco S., Manolache S., Denes F., A novel plasma enhanced way for surface-functionalization of polymeric substrates, *Polym. Bull.*, 47(3–4), 329, (2001).
78. Ganapathy R., Manolache S., Sarmadi M., Simonsick W.J., Denes F., Immobilization of active alpha-chymotrypsin on RF-plasma-functionalized polymer surfaces, *J. Appl. Polym. Sci.*, 78(10), 1783, (2000).
79. Alexej Kreider, Katharina Richter, Stephan Sell, Mandus Fenske, Christian Tornow, Volkmar Stenzel, Ingo Grunwald, Functionalization of PDMS modified and plasma activated two component polyurethane coatings by surface attachment of enzymes, *Applied Surface Science*, 273, 562– 569, (2013).
80. Wang L., Wei L., Chen Y., Jiang R. Specific and reversible immobilization of NADH oxidase on functionalized carbon nanotubes, *J. Biotechnol.*, 150, 57–63, (2010).

81. Amjah Ali Khan and Mohammad A. Alzohairy, Recent Advances and Applications of Immobilized Enzyme Technologies: A Review, *Research Journal of Biological Sciences*, 5(8), 565-575, (2010).
82. Wang Y., Li Z.H., Wang J., Li J.H., Lin Y.H., *Trends Biotechnol.*, 29, 205–212, (2011).
83. Zhou H., Chen H., Luo S., Chen J., Wei W., Kuang Y., *Biosens. Bioelectron.* 20, 1305–1311, (2005).
84. Muguruma H., Shibayama Y., Matsui Y., *Biosens. Bioelectron.*, 23, 827–832, (2008).
85. Liu X., Luo L., Ding Y., Xu Y., Li F., Hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of horseradish peroxidase on c-Al₂O₃ nanoparticles/chitosan film-modified electrode. *J Solid State Electrochem* 15, 447–453, (2010)
86. Vicky Vamvakaki, Nikos A. Chaniotakis, Immobilization of enzymes into nanocavities for the improvement of biosensor stability, *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 2650–2655, (2007).
87. Ofagain C., Okennedy R., *Biotechnol. Adv.*, 9, 351–409, (1992).
88. Tischer W., Wedekind F., Immobilized enzyme: Methods and applications, *Biocatalysis-From Discovery to Application*, 200, 95–126, (1992).
89. Lizano C., Sanz S., Luque J., Pinilla M., *Biochem. Biophys. Acta.*, 1425, 328–336, (1998).
90. A.G. Rad, H. Abbasi, M.H. Afzali, *Phys. Procedia*, 22, 203–208, (2011).
91. L. Feng, Z. Liu, *Nanomedicine* 6, 317–324, (2011).
92. M. Fangrui, A.H. Milford, *Bioresour. Technol.* 70, 1–5, (1999).
93. Eliane P. Cipolatti, María José A. Silva, Manuela Kleina, Vivian Feddern, Maria Manuela C. Feltes, J. Vladimir Oliveira, Jorge L. Ninowa, Débora de Oliveira., Current status and trends in enzymatic nanoimmobilization, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 99, 56– 67, (2014).
94. Cao L., Immobilised enzymes: science or art? *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 9, 217–26, (2005).
95. Salis A., Pinna M., Monduzzi M., Solinas V., *J. Mol. Catal. B- Enzym.*, 54, 19–26, (2008).
96. D.T. Tran, C.L. Chen, J.S. Chang, *J. Biotechnol.*, 158, 112–119, (2012).
97. A. Macario, F. Verri, U. Diaz, A. Corma, G. Giordano, *Catal. Today*, 204, 148–155, (2013).

98. U.J. Trivedi, A. Bassi, J. Zhu *Can. J. Chem. Eng.*, 84, 239–247, (2006).
99. J. Jeganathan, G. Nakhla, *Journal of Hazardous Materials*, 145(1–2), 127–135, (2007).
100. Peralta-Zamora P., Pereira C., Tiburtius E., Moraes S., Rosa M., Minussi R., Duran N., Decolorization of reactive dyes by immobilized laccase, *Appl. Catal. B.* 42(2), 131–144, (2003).
101. Kunamneni A., Ghazi I., Camarero S., Ballesteros A., Plou F., Alcalde M., Decolorization of synthetic dyes by laccase immobilized on epoxy-activated carriers, *Process Biochem.*, 43(2), 169–173, (2008).
102. Yannick-Serge Zimmermann & Patrick Shahgaldian & Philippe F. X. Corvini & Gregor Hommes, Sorption-assisted surface conjugation: a way to stabilize laccase enzyme, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 92, 169–178, (2011).
103. Chen J.P. and Y.S. Lin, Decolorization of azo dye by immobilized *Pseudomonas luteola* entrapped in alginate-silicate sol-gel beads, *Process Biochem.*, 42, 934–942, (2007).
104. Akhtar, S., A.A. Khan and Q. Husain, Potential of immobilized bitter gourd (*Momordica charantia*) peroxidases in the decolorization and removal of textile dyes from polluted wastewater and dyeing effluent, *Chemosphere*, 60, 291–301, (2005).
105. N. Duran, E. Esposito, *Appl. Catal. B: Environ.* 28, 83–99, (2000)
106. S. Akhtar, Q. Husain, *Chemosphere* 65, 1228–1235, (2006).
107. Hereijgers J., Desmet G., Breugelmans T., De Malsche W., Strategies to integrate porous layers in microfluidic devices, *Microelectron. Eng.*, 132, 1–13, (2015).
108. Wong L. S., Khan F., Micklefield J., Selective covalent protein immobilization: Strategies and applications, *Chem. Rev.*, 109, 4025–4053, (2009).
109. Stojkovič G., Plazl I., Žnidaršič-Plazl P., L-Malic acid production within a microreactor with surface immobilised fumarase, *Microfluid. Nanofluid.*, 10, 627–635, (2011).
110. Vojinović V., Esteves F. M. F., Cabral J. M. S., Fonseca L. P., Bionzymatic analytical microreactors for glucose, lactate, ethanol, galactose and l-amino acid monitoring in cell culture media, *Anal. Chim. Acta*, 565, 240–249, (2006).

111. Matosevic S., Lye G. J., Baganz F., Immobilised enzyme microreactor for screening of multi-step bioconversions: Characterisation of a de novo transketolase- ω -transaminase pathway to synthesise chiral amino alcohols, *J. Biotechnol.*, 155, 320-329, (2011).
112. Huang Y., Shan W., Liu B., Liu Y., Zhang Y., Zhao Y., Lu H., Tang Y., Yang P., Zeolite nanoparticle modified microchip reactor for efficient protein digestion, *Lab. Chip*, 6, 534-539, (2006).
113. Ji J., Zhang Y., Zhou X., Kong J., Tang Y., Liu B., Enhanced protein digestion through the confinement of nanozeolite assembled microchip reactors, *Anal. Chem.*, 80, 2457-2463, (2008).
114. Wang C., Oleschuk R., Ouchen F., Li J., Thibault P., and Harrison D. J., Rapid commun. Mass spectrum, 14, 1377, (2000).
115. Miyazaki M., Nakamura H. and Maeda H., Improved yield of enzyme reaction in microchannel reactor, *Chemistry Letters*, 442-443, (2001).
116. Kanno K., Kawazumi H., Miyazaki M., Maeda H. and Fujhi M., Enhanced enzymatic reactions in a microchannel reactor, *Australian Journal of Chemistry*, 55, 687-690, (2002).
117. Gleason N.J. and Carbeck J.D., Measurement of enzyme kinetics using microscaler steady-state kinetic analysis, *Langmuir*, 20, 6374-6381, (2004).
118. Pijanowska D.G., Baraniecka A., Wiater R., Ginalska Goobarzewski J, Torbicz W., The pH-detection of triglycerides, *Sens. Actuators B. Chem.*, 78, 263-6, (2001).
119. Luís Marcos Cerdeira Ferreira, Eric Tavares da Costa, Claudimir Luciodo Lago, Lúcio Angnes., Miniaturized flow system based on enzyme modified PMMA microreactor for amperometric determination of glucose, *Biosensors and Bioelectronics*, 47, 539-544, (2013).
120. Marcos Rodrigues Facchini Cerqueira, Daniel Grasseschi, Renato Camargo Matos, Lucio Angnes., A novel functionalisation process for glucose oxidase immobilisation in poly(methyl methacrylate) microchannels in a flow system for amperometric determinations, *Talanta*, 126, 20-26, (2014).
121. Lennart Nilsson, Per Olof Persson, Lars Rydén, Siarhei Darozhka and Audrone Zaliauskiene., *Cleaner Production: Technologies and Tools for Resource Efficient Production*, 128-129, (2007).

122. Ala H. Al-Muhtaseba, Khalid A. Ibrahim, Ahmad B. Albadarin, Omar Ali-khashman, Gavin M. Walker, Mohammad N.M. Ahmad, Remediation of phenol-contaminated water by adsorption using poly(methyl methacrylate) (PMMA), *Chemical Engineering Journal*, 168, 691–699, (2011).
123. Hany El-Hamshary, Mohamed H. El-Newehy and Salem S. Al-Deyab., Oxidation of Phenol by Hydrogen Peroxide Catalyzed by Metal-Containing Poly(amidoxime) Grafted Starch Molecules, 16, 9900-9911, (2011).
124. L.F. Liotta, M. Gruttadauri, G. Di Carlo, G. Perrini, V. Librando, *Hazard. Mater.*, 162, 588–606, (2009).
125. K. Hamamoto, H. Kawakita, K. Ohto, K. Inoue, *Reactive Funct. Polym.* 69, 694–697, (2009).
126. I. Alemzadeh, S. Nejati, *J. Hazard. Mater.*, 166, 1082–1086, (2009).
127. F.-Y. Jeng, S.-C. Lin, *Process Biochem.*, 41, 1566–1573, (2006).
128. M. Reihmann, H. Ritter, *Adv. Polym. Sci.*, 194, 1–49, (2006).
129. R.A. Gross, A. Kumar, B. Kalra, *Chem. Rev.*, 101, 2097–2124, (2001) .
130. N. Duran, E. Esposito, *Appl. Catal. B: Environ.*, 28, 83–99, (2000).
131. Madalina Tudorache, Diana Mahalu, Cristian Teodorescu, Razvan Stan, Camelia Bala, Vasile I. Parvulescu. Biocatalytic microreactor incorporating HRP anchored on micro-/nanolithographic patterns for flow oxidation of phenols, *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 69, 133–139, (2011).
132. Dunford H.B., *Heme peroxidases*. Wiley–VCH, New York, (1999).
133. Gajhede M, Schuller DJ, Henriksen A, Smith AT, Poulos TL, Crystal structure of horseradish peroxidase C at 2.15 Å resolution, *Nature Structural Biology.*, 4(12), 1032–8, (1997)
134. Veitch N.C., Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme, *Phytochemistry*, 65, 249–259, (2004).
135. Chau Y.P., Lu K.S., "Investigation of the blood-ganglion barrier properties in rat sympathetic ganglia by using lanthanum ion and horseradish peroxidase as tracers", *Acta Anatomica.*, 153(2), 135–44, (1995).

136. Ana M. Azevedo, Veronica C. Martins, Duarte M.F. Prazeres, Vojislav Vojinovic, Joaquim M.S. Cabral and Luis P. Fonseca, Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology. *Biotechnology Annual Review*, 9, 1387-2656, (2003).
137. Barry J. Ryan, Neil Carolan and Ciarán Ó'Fágáin, *Trends in Biotechnology*, 24(8), 355–363, (2006).
138. Klibanov A. M., Alberti B. N., Morris, E. D., Felshin, L. M., Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from waste waters, *J. Appl. Biochem.*, 2(5), 414-421, (1980).
139. Al-Ansari M. M., Saha B., Mazloun S., Taylor K.E., Bewtra J. K., Biswas N., Soybean peroxidase applications in wastewater treatment. In *Soyabean: cultivation, Uses and Nutrition*, Maxwell, J. E., Eds., Nova Science Pub Inc., (2011).
140. Ghoul M., Chebil L., *Enzymatic Polymerization of Phenolic Compounds by Oxidoreductases*, Springer, USA, (2012).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 1.1: Πάνω σειρά: Αριστερά, το φαινόμενο της κεραυνού και οι ηλεκτρικές σπίθες, αποτελούν καθημερινά παραδείγματα φαινομένων που οφείλονται στο πλάσμα. Δεξιά, τα φώτα φθορισμού (neon lights), θα μπορούσαν να αποκαλεστούν και «φώτα πλάσματος», καθώς το φως προέρχεται από το πλάσμα μέσα σε αυτά. Κάτω σειρά: Αριστερά, απεικονίζεται μια σφαίρα πλάσματος, που σχετίζεται με περίπλοκα φαινόμενα πλάσματος. Τα χρώματα που βλέπουμε, προκύπτουν κατά την αποδιέγερση ηλεκτρονίων που βρίσκονται σε διεγερμένες στάθμες, σε χαμηλότερες ενεργειακές στάθμες, μετά την επανασύνδεσή τους με ιόντα. Δεξιά, απεικονίζεται ίχνος πλάσματος από το διαστημικό λεωφορείο Atlantis, κατά την επαναφορά του στην ατμόσφαιρα της γης, όπως φαίνεται από τον Διεθνή Διαστημικό σταθμό.

Εικόνα 1.2: Απεικόνιση εμπορικού μικρο-αντιδραστήρα: α) η εξωτερική όψη του συστήματος (Asia120 system by Syrris), β) μεγεθυμένη εικόνα του μικρο-αντιδραστήρα από γυαλί, γ) Δομή μικρο-αντιδραστήρα με δύο εισόδους.

Εικόνα 1.3: Παραδείγματα μικρο – αντιδραστήρων κατασκευασμένων από διαφορετικά υλικά: α) μέταλλο β) κεραμικός γ) PDMS δ) γυαλί και ε), f) πυρίτιο.

Εικόνα 1.4: Ροή δύο αντιδρώντων συστατικών μέσα σε μικρο-αντιδραστήρα από γυαλί.

Εικόνα 2.1: Η διάταξη της ομάδας του Wang et.al συνδεδεμένη με φασματογράφο μάζας για τον διαχωρισμό πρωτεϊνών.

Εικόνα 2.2: Σχηματική απεικόνιση αντίδρασης συνεχούς ροής και παρακολούθησης της υδρόλυσης των εστέρων, με μικροαντιδραστήρα που πριέχει λιπάση ακινητοποιημένη είτε σε φύλλα μικροκυτταρίνης, είτε σε γυάλινα σφαιρίδια επικαλυμμένα με κερατίνη.

Εικόνα 2.3: Απεικόνιση ενζυματικού μικροαντιδραστήρα από PMMA

Εικόνα 2.4: Χρωματομετρικό τεστ για την επιβεβαίωση της παρουσίας του ακινητοποιημένου ενζύμου GOx στα μικροκανάλια του PMMA: (Α) το διάλυμα που εισάγεται στα μικροκανάλια (φαινόλη/4-αμινοαντιπυρίνη/υπεροξειδάση/ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών/γλυκόζη), (Β) μικροκανάλια PMMA με ακινητοποιημένο ένζυμο, (Γ) μικροκανάλια PMMA χωρίς το ένζυμο

Εικόνα 2.5: Μείγμα 1mM φαινολών και 1mM H₂O₂ σε 100mM ρθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (pH 7.4) καταλυτικό μικροσύστημα συνεχούς ροής 100μL/min.

Εικόνα 2.6: Τρισδιάτατη αναπαράσταση με X-ray της κρυσταλλικής δομής του ισοένζυμου C της υπεροξειδάσης του χρένου. Η ομάδα της αίμης (με κόκκινο χρώμα) βρίσκεται ανάμεσα στις απομακρυσμένα (distal) και πλησιέστερα (proximal) τμήματα, με το καθένα να διαθέτει από ένα άτομο ασβεστίου (μπλε σφαίρες). Οι α-ελικοειδείς και β-φυλλοειδείς περιοχές του ενζύμου απεικονίζονται με μοβ και κίτρινο χρώμα αντίστοιχα.

Εικόνα 2.7: Δομή της αίμης της υπεροξειδάσης HRP. Το άτομο σιδήρου της αίμης συνδέεται με το αμινοξύ ιστιδίνη, μέσω του πλησιέστερου κατάλοιπου ιστιδίνης, His170 (κάτω από το επίπεδο της ομάδας της αίμης).

Εικόνα 2.8: Κατάλοιπα αμινοξέων στην περιοχή σύνδεσης της αίμης της HRP C. Η ομάδα της αίμης και το άτομο σιδήρου της αίμης απεικονίζονται με κόκκινο χρώμα. Το πλησιέστερο υπόλειμμα ιστιδίνης, His170, είναι συντονισμένο στο άτομο σιδήρου της αίμης, ενώ η αντίστοιχη απομακρυσμένη περιοχή συντονισμού (distal coordination site) πάνω από το επίπεδο της αίμης, είναι κενή.

Εικόνα 3.1: Ο αντιδραστήρας πλάσματος RIE του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας.

Εικόνα 3.2: Σύστημα μέτρησης γωνιών επαφής.

Εικόνα 3.3: Το μικροσκόπιο JEOL JSM-7401F FEG SEM του Ινστιτούτου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας του ΕΚΕΦΕ Δημόκριτος.

Εικόνα 3.4: Η Θερμοπρέσα της εταιρίας Carver του εργαστηρίου Νανοεπιστήμης και Νανοτεχνολογίας.

Εικόνα 3.5: (α) Απεικόνιση του συστήματος μέτρησης ανακλαστικότητας με τα χαρακτηριστικά της και (β), (γ) η σφαίρα ολοκλήρωσης.

Εικόνα 4.1: Απεικόνιση σφραγίδας αλουμινίου με 6 κίονες με τις χαρακτηριστικές διαστάσεις της.

Εικόνα 4.2: Επιφάνεια PMMA με 6 πηγάδια (wells) όπως προέκυψε με τη μέθοδο της θερμής αποτύπωσης με σφραγίδα αλουμινίου.

Εικόνα 4.3: Δομή της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης.

Εικόνα 4.4: (α) Μικροαντιδραστήρας από PMMA και (β) μάσκα PMMA πάχους 0,5mm.

Εικόνα 4.5: Διάταξη μικροκαναλιών, σε ακατέργαστο υπόστρωμα PMMA, μετά από συγκόλληση με έλασμα, όπου έχουμε περάσει κόκκινη χρωστική ουσία.

Εικόνα 4.6: Σχέδιο με τις διαστάσεις του μικρο-αντιδραστήρα και κάτοψη της συσκευής συγκράτησης από PMMA (καπάκι και βάση) μαζί με τα εξαρτήματα για τη σύνδεση των σωληνώσεων από την εταιρεία Urchurch. Τα εξαρτήματα που χρησιμοποιήθηκαν ονομαστικά με τον κωδικό τους είναι τα εξής: 1) N-123-03x: NanoPort Ferrule 6-32 FB-360/510μm, 2) FS-115: Tub Fused Silica 360μm x 150μm x 2m, 3) F-123Hx: Nut, nanoport, headless, 6-32 FB, 360μm, PEEK, Natural.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 1.1: Οι τέσσερις καταστάσεις της ύλης.

Σχήμα 1.2: Βασικοί μηχανισμοί εγχάραξης με πλάσμα: α) εγχάραξη με ιόντα (ιονοβολή), β) χημική εγχάραξη μόνο με τη δράση ουδετέρων σωματιδίων, γ) χημική εγχάραξη υποβοηθούμενη από ιόντα

Σχήμα 1.3: Δεξιά η σταγόνα δεν εισχωρεί μέσα στην τοπογραφία της επιφάνειας (Cassie-Baxter state), ενώ αριστερά η σταγόνα εισχωρεί στην τοπογραφία της επιφάνειας (Wenzel state).

Σχήμα 1.4: Σχηματική αναπαράσταση μοντέλου «κλειδιού – κλειδαριάς» για το ένζυμο και το υπόστρωμά του.

Σχήμα 2.1: Αναπαράσταση διαφορετικών μεθόδων ακινητοποίησης α) ομοιοπολική σύνδεση β) εγκλεισμός – παγίδευση γ) ενθυλάκωση δ) φυσική προσρόφηση ε) ιονικός δεσμός f) σύνδεση μέσω χημικής συγγένειας και g) ακινητοποίηση μέσω συνδεδεμένων μετάλλων.

Σχήμα 2.2: Σχηματική αναπαράσταση διαδικασιών ομοιοπολικής σύνδεσης και ανίχνευσης παραγώγων βιοτίνης σε ενεργοποιημένες με πλάσμα επιφάνειες PMMA: (α) Απευθείας ακινητοποίηση amine-PEG₃-biotin (β) Απευθείας επώαση με D-biotin (δεν λαμβάνει χώρα αντίδραση πρόσδεσης), (γ) Απευθείας ακινητοποίηση μείγματος amine-PEG₃-biotin/EDC, (δ)

Ενεργοποίηση με μείγμα sulfo-NHS/EDC ακολουθούμενη από αντίδραση με amine-PEG₃-biotin (Tsougeni)

Σχήμα 2.3: Καταλυτικός κύκλος υπεροξειδάσης του χρένου (HRP C), όπου AH το αναγόμενο υπόστρωμα (πχ. φαινόλη).

Σχήμα 4.1: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας κατασκευής των επιφανειών PMMA με τη διαδικασία θερμής αποτύπωσης και την κατεργασία με πλάσμα O₂.

Σχήμα 4.2: Απευθείας ακινητοποίηση του ενζύμου HRP στις ενεργοποιημένες με πλάσμα O₂ επιφάνειες PMMA.

Σχήμα 4.3: Διαδικασία προσρόφησης και αξιολόγησης του ενζύμου HRP στις επιφάνειες PMMA 2 × 2cm²: (α) χειροκίνητη εναπόθεση διαλυμάτων HRP σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH 7, (β) επώαση μέχρι και 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, σε θάλαμο με υγρασία, (γ) έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών(PB) 100 mM, pH 7, (δ) προσθήκη του χρωμογόνου υποστρώματος ABTS σε H₂O₂ πάνω στην επιφάνεια και επώαση για 6 - 15min, (ε) συλλογή υπερκείμενου διαλύματος από την επιφάνεια σε τριβλίο και καταγραφή της απορρόφησης.

Σχήμα 4.4: Διαδικασία ακινητοποίησης με φυσική προσρόφηση και αξιολόγησης του ενζύμου HRP στις επιφάνειες PMMA 6 πηγαδιών: (α) χειροκίνητη εναπόθεση διαλυμάτων HRP(25-1000 μg/ml) σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH 7 στα πηγάδια των επιφανειών του PMMA, εκτός από ένα (πηγάδι αναφοράς), (β) επώαση μέχρι και 24 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, σε θάλαμο με υγρασία, (γ) έκπλυση με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών(PB) 100 mM, pH 7, (δ) προσθήκη του χρωμογόνου υποστρώματος Dab/Metal Concentrate/Stable Peroxide buffer σε κάθε πηγάδι της επιφάνειας και επώαση για 14min, (ε) μετά την έκπλυση με PB και απιονισμένο νερό και στέγνωμα της επιφάνειας, δημιουργία καφέ ιζήματος διαφορετικής έντασης σε κάθε πηγάδι, ανάλογα της συγκέντρωσης HRP, (στ) μετρήσεις σχετικής ανακλαστικότητας με τη σφαίρα ολοκλήρωσης

Σχήμα 4.5: Σχηματική αναπαράσταση ομοιοπολικής σύνδεσης του ενζύμου στις κατεργασμένες επιφάνειες PMMA: 1) Ενεργοποίηση των καρβοξυλικών ομάδων με εναπόθεση διαλύματος που περιέχει 5mM sulfo -NHS και 10Mm EDC σε 0.1M MES buffer, pH 5 & επώαση για 1 ώρα σε θερμοκρασία δωματίου. 2) Έκπλυση των επιφανειών με MES buffer και ακολούθως εναπόθεση του ενζύμου HRP σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών PB 100mM, pH 7.4, επώαση για 2 ώρες, σε θερμοκρασία δωματίου και σε θάλαμο με υγρασία.

Σχήμα 4.6: Σχηματική απεικόνιση βιοτινυλίωσης του ενζύμου HRP.

Σχήμα 4.7: Το σύστημα αφέθηκε να έρθει σε 100% ισορροπία στους 4°C με ταυτόχρονη ανάδευση για 24 ώρες. Ακολούθως, ζυγίστηκε το περιεχόμενο της μεμβράνης και η νέα συγκέντρωση του βιοτινυλιωμένου ενζύμου HRP προέκυψε 1.8mg/ml.

Σχήμα 4.8: Σχηματική απεικόνιση ακινητοποίησης του ενζύμου HRP με τη μέθοδο του συμπλέγματος στρεπταβιδίνης – βιοτίνης: (α) Χειροκίνητη εναπόθεση διαλύματος στρεπταβιδίνης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH 7, στα πηγάδια των επιφανειών PMMA και επώαση για 2 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, β) κατεργασία των επιφανειών με διάλυμα αποκλεισμού των ελεύθερων θέσεων του υποστρώματος αποτελούμενο από 10 mg/ml BSA σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH 7 και επώαση για 1 ώρα, (γ) χειροκίνητη εναπόθεση βιοτινυλιωμένου ενζύμου HRP σε διάλυμα BSA 10mg/ml και επώαση για 1 ώρα. Σε όλα τα ενδιάμεσα στάδια της διαδικασίας, πραγματοποιήθηκε έκπλυση των επιφανειών με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών 100 mM, pH 7.

Σχήμα 4.9: Σχηματική αναπαράσταση κατασκευής του μικρο – αντιδραστήρα από PMMA.

Σχήμα 4.10: (α) Φάσμα της λάμπας δευτερίου για την υπεριώδη περιοχή (εκπέμπει από 200 έως 410 nm). (β) Διάταξη σύνδεσης μικρο-αντιδραστήρα με τη βάση και το κελί ροής συνδεδεμένο με το φασματοφωτόμετρο UV.

Σχήμα 5.1: Εικόνα SEM επιφάνειας PMMA σε πλάγια όψη μετά από (α) 0min, (β) 1min, (γ) 10 min και (δ) 10min μετά από θερμική ανόπτηση κατεργασία σε πλάσμα O₂, στον αντιδραστήρα RIE (10 mT, 400 W, 50 sccm, ρυθμός εγχάραξης 480 nm/min).

Σχήμα 5.2: Μεταβολή της γωνίας επαφής των νανο-δομημένων επιφανειών PMMA: (α) για 5 min (◇) και 10 min (●) ως συνάρτηση της γήρανσης μετά την κατεργασία στο πλάσμα O₂, (β) για 5 min χωρίς θερμική ανόπτηση (▲), και μετά από θερμική ανόπτηση (Δ) συνάρτηση της γήρανσης μετά την κατεργασία στο πλάσμα και (γ) για 10 min χωρίς θερμική ανόπτηση (●), και μετά από θερμική ανόπτηση (□) ως συνάρτηση της γήρανσης μετά την κατεργασία στο πλάσμα.

Σχήμα 5.3: Τιμές απορρόφησης (A) στα 405 nm μετά από (α) 1 ώρα επώασης και (β) 24 ώρες επώασης του ενζύμου, που ελήφθησαν από μη κατεργασμένη και κατεργασμένες επιφάνειες PMMA (1,5,10 min/400W και 1min/100W) φρέσκες και γηρασμένες μετά από θερμική ανόπτηση, μετά από προσρόφηση του ενζύμου HRP και ανίχνευση της δραστηριότητας με χρωμογόνο υπόστρωμα H₂O₂/ABTS.

Σχήμα 5.4: (α) Απορρόφηση (A) στα 410nm ακινητοποιημένου ενζύμου HRP, που αντιστοιχεί σε χρόνους επώασης 2 h (ανοικτά σύμβολα) ή 24 h (κλειστά σύμβολα), μετά από αντίδραση με χρωμογόνο υπόστρωμα *dab/metal concentrate/H₂O₂*, ως συνάρτηση του χρόνου έκθεσης στο πλάσμα O₂, (β) Απορρόφηση στα 410nm συναρτήσει του χρόνου επώασης του ενζύμου HRP (200μg/ml) σε κατεργασμένη επιφάνεια PMMA για 10min και (γ) Εικόνες από μικροσκόπιο μετά την αντίδραση του ενζύμου με το χρωμογόνο υπόστρωμα που ελήφθησαν από μη κατεργασμένες και κατεργασμένες στο πλάσμα O₂ επιφάνειες PMMA για 3 min, 6 min, 10 min και 15min οι οποίες επικαλύφθηκαν με διάλυμα 200 μg/ml HRP.

Σχήμα 5.5: Απορρόφηση (A) στα 405nm μετά από (α) 2 ώρες και (β) 24 ώρες επώασης του ενζύμου, για μη κατεργασμένη (◇) και κατεργασμένες επιφάνειες PMMA 6min (▲), 10 min (●) και 15min (■) στο πλάσμα O₂, μετά από αντίδραση με χρωμογόνο υπόστρωμα *ABTS/H₂O₂*, ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του ενζύμου HRP.

Σχήμα 5.6: Απορρόφηση (A) στα 410nm μετά από (α) 2 ώρες και (β) 24 ώρες επώασης του ενζύμου, για μη κατεργασμένη (◇) και κατεργασμένες επιφάνειες PMMA 6min (▲), 10 min (●) και 15min (■) στο πλάσμα O₂, μετά από αντίδραση με χρωμογόνο υπόστρωμα *Dab/Metal Concentrate/H₂O₂*, ως συνάρτηση της συγκέντρωσης του ενζύμου HRP

Σχήμα 5.7: Απορρόφηση (A) στα 410nm για προσρόφηση (●) και ομοιοπολική σύνδεση του ενζύμου στα ενεργοποιημένα καρβοξύλια (■) σε κατεργασμένες επιφάνειες PMMA για 10min στο πλάσμα O₂ μετά από αντίδραση (α) με χρωμογόνο υπόστρωμα *Dab/Metal Concentrate/H₂O₂*.

Σχήμα 5.8: Απορρόφηση (A) στα 410nm επικαλυμμένων με στρεπταβιδίνη επιφανειών PMMA κατεργασμένων για 10min στο πλάσμα O₂, μετά από προσθήκη βιοτινυλιωμένου ενζύμου και αντίδραση με χρωμογόνο υπόστρωμα *Dab/Metal Concentrate/H₂O₂* (α) ως συνάρτηση διαφορετικών συγκεντρώσεων στρεπταβιδίνης για 200μg/ml HRP και (β) ως συνάρτηση διαφορετικών συγκεντρώσεων βιοτινυλιωμένου ενζύμου για συγκεντρώσεις στρεπταβιδίνης 500 και 1000μg/ml.

Σχήμα 5.9: Απορρόφηση (A) στα 410nm επιφανειών PMMA κατεργασμένων για 10min στο πλάσμα O₂, επικαλυμμένων με το ένζυμο HRP, για διαφορετικές μεθόδους ακινητοποίησης του ενζύμου (α) σε συγκεντρώσεις HRP 50, 100, 200μg, (β) στη βέλτιστη συγκέντρωση HRP 200μg.

Σχήμα 5.10: Διαγράμματα βάθους των καναλιών συναρτήσει της θέσης (α) στην είσοδο, (β) στην μέση και (γ) στην έξοδο του μικρο – αντιδραστήρα.

Σχήμα 5.11: Μονάδες απορρόφησης στα 347nm ως συνάρτηση του χρόνου πειράματος για κατεργασμένα σε πλάσμα O_2 τσιπ PMMA, χωρίς ακινητοποιημένη HRP (κόκκινο γράφημα) και με ακινητοποιημένη HRP (γραμμοσκιασμένο γράφημα), για ρυθμούς ροής αντιδρώντος μείγματος (α) 2μl/min, (β) 5μl/min (γ) 7.5μl/min, (δ) 10μl/min, (ε) 15μl/min, (στ) 20μl/min, (ζ) 25μl/min και (η) 30μl/min.

Σχήμα 5.12: (α) Μονάδες απορρόφησης στα 347nm ως συνάρτηση του χρόνου πειράματος, για ακατέργαστα τσιπ PMMA, χωρίς ακινητοποιημένη HRP (κόκκινο γράφημα) και με ακινητοποιημένη HRP (γραμμοσκιασμένο γράφημα), με ρυθμό ροής αντιδρώντος μείγματος 2μl/ml, για χωρητικότητες μικρο – αντιδραστήρα 3, 10 & 15μl, (β) Ποσοστό μετατροπής της 4-φαινόλης ως συνάρτηση της χωρητικότητας του μικρο – αντιδραστήρα.

Σχήμα 5.13: Μονάδες απορρόφησης στα 347nm επί τον χρόνο διεξαγωγής του πειράματος συναρτήσει του ρυθμού ροής μείγματος 4 – φαινύλο – αζο – φαινόλης/ H_2O_2 για κατεργασμένο τσιπ PMMA για 10min σε πλάσμα O_2 χωρίς ένζυμο HRP (μαύρη διακεκομμένη γραμμή) και με ακινητοποιημένο ένζυμο HRP (μπλε γραμμή) και για ακατέργαστο τσιπ PMMA χωρίς ένζυμο (κόκκινη γραμμή). Με πράσινο απεικονίζεται η αντίστοιχη τιμή για επανάληψη του πειράματος μετά από 8 ώρες.

Σχήμα 5.14: Μετατροπή της 4 – φαινύλο – αζο – φαινόλης % στα 347nm συναρτήσει του ρυθμού ροής του αντιδρώντος μείγματος 4 – φαινύλο – αζο – φαινόλης/ H_2O_2 σε κατεργασμένο τσιπ PMMA, 10min σε πλάσμα O_2 , με ακινητοποιημένο το ένζυμο HRP, ως προς κατεργασμένο τσιπ PMMA χωρίς ένζυμο (μπλε γραμμή) και ως προς ακατέργαστο τσιπ PMMA χωρίς ένζυμο.

Σχήμα 5.15: Μετατροπή της 4 – φαινύλο – αζο – φαινόλης % στα 347nm για κατεργασμένο τσιπ PMMA, 10min σε πλάσμα O_2 , με ακινητοποιημένο το ένζυμο HRP, όπως προέκυψε αμέσως μετά την ακινητοποίηση του ενζύμου (κίτρινη στήλη) και μετά από την παραμονή 15 ημερών στους 4°C (πράσινη στήλη), ως συνάρτηση του ρυθμού ροής.

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 2.1: Παράγοντες που επηρεάζουν την απόδοση του ακινητοποιημένου ενζύμου.

Πίνακας 3.1: Προδιαγραφές μηχανήματος μέτρησης της γωνίας επαφής.

Πίνακας 3.2: Προδιαγραφές της σφαίρας ολοκλήρωσης της Ocean Optics - μοντέλο ISP-50-8-R-GT.

Πίνακας 4.1: Υλικά, διαλύτες και αντιδραστήρια.

Πίνακας 4.2: Συνθήκες λειτουργίας θερμοπρέσσας.

Πίνακας 4.3: Πρωτόκολλα παρασκευής χρωμογόνων υποστρωμάτων για την αξιολόγηση της δραστηριότητας του ενζύμου HRP.

Πίνακας 4.4: Φυσικοχημικές ιδιότητες της 4 – φαινυλο – αζο – φαινόλης.