

ΕΘΝΙΚΟ ΜΕΤΣΟΒΙΟ ΠΟΛΥΤΕΧΝΕΙΟ  
ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ  
ΤΟΜΕΑΣ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ & ΤΕΧΝΙΚΗΣ ΥΛΙΚΩΝ

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

---

Ηλεκτροχημική Μελέτη της  
Υπεροξειδάσης *MtPerII* &  
Διερεύνηση Δυνατότητας  
Εφαρμογής Της Σε Βιοαισθητήρα

---

Ζουράρης Δημήτριος

*Επιβλέπων Καθηγητής:*  
Καραντώνης Αντώνης

15 Φεβρουαρίου 2017

---

## Πρόλογος - Ευχαριστίες

Η παρούσα διπλωματική εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσικοχημείας και Εφαρμοσμένης Ηλεκτροχημείας σε συνεργασία με το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου το ακαδημαϊκό έτος 2015-16.

Στο σημείο αυτό οφείλω ένα τεράστιο ευχαριστώ στον επίκουρο καθηγητή του ΕΜΠ Καραντώνη Αντώνη, κατ'αρχάς σε ακαδημαϊκό επίπεδο για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος, για την ελευθερία που μου άφησε όσον αφορά στη διαχείριση της πειραματικής διαδικασίας, για την άριστη συνεργασία παρά τις επιμέρους διαφωνίες καθώς και για τις ατέρμονες συζητήσεις περι οξειδοαναγωγών προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα και να κατανοήσουμε τι γίνεται στο μελετούμενο σύστημα, και κατά δεύτερον σε προσωπικό επίπεδο γιατί η πόρτα του γραφείου του υπήρξε πάντα ανοιχτή για το οτιδήποτε και ειλικρινά είναι ένας από τους πιο αξιόλογους ανθρώπους που έχω γνωρίσει.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επίκουρο καθηγητή Τόπακα Ευάγγελο που υπήρξε πάντα δεκτικός στις απορίες που του έθετα καθώς και την υποψήφια διδάκτορα Ζέρβα Αναστασία για το χρόνο που αφιέρωσε τόσο για την απομόνωση του ενζύμου όσο και κατά τη διάρκεια της διπλωματικής καθώς και για την ευχάριστη παρέα της όλων αυτών τον καιρό.

Κατόπιν, θα πρέπει να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα μέλη του εργαστηρίου ηλεκτροχημείας και συγκεκριμένα στον Αντωνόπουλο Ιωάννη και Γιαννόπουλο Φαίδων τόσο για την αρχική βοήθεια τους στον εγκλιματισμό μου στο περιβάλλον όσο και για το ότι με πείσμωναν ορισμένες φορές (βασικά σχεδόν καθημερινά τον πρώτο καιρό) και δούλεψα παραπάνω, καθώς και στα μέλη του εργαστηρίου βιοτεχνολογίας για το ευχάριστο κλίμα που δημιούργησαν. Ακόμα, οφείλω να πω ευχαριστώ στην αναπληρώτρια καθηγήτρια Παυλάτου Ευαγγελία και το εργαστήριο γενικής χημείας που μας παρείχε το αντιδραστήριο Methylene Blue, την ΕΔΠ Τσακανίκα Λαμπρινή για τη βοήθεια με το ATR και την υποψήφια διδάκτορα Τρομπέτα Αικατερίνη για τη βοήθεια με το UV Vis.

Ακόμα και αν δεν συμμετείχε στη διπλωματική, θα ήθελα να ευχαριστήσω την αναπληρώτρια καθηγήτρια Παππά Αθηνά, καθώς μέσα από το μάθημα της Ενόργανης Χημικής Ανάλυσης μου έδωσε γερές βάσεις στις οποίες μπορούσα να βασιστώ για το κομμάτι της ανάπτυξης του βιοαισθητήρα.

Θα ήμουν επίσης αγνώμων αν δεν ανέφερα στο κομμάτι αυτό τους φίλους μου που με υποστηρίζαν και με υπέμειναν στη διάρκεια αυτής της προσπάθειας, Elise Loppinet, Γιαννικόπουλο Ιωάννη, Στέφα Γεώργιο, Πέππα Μιχάλη, Τζόκα Κυριακή, Πεντάφη Χριστίνα, Κατρίτση Νικόλαο-Μάριο, Καλογεροπούλου Δήμητρα, Νίκου Μαρία, Κωνσταντόπουλο Δημήτριο, Καφύρα Μαρία-Στυλιανή-Γεωργία, Βάρσου Δήμητρα, Ζαχαροπούλου Μαρία, Παπαπέτρου Θεόδωρο, Τσακνιά Σοφία, Νικολακοπούλου Αναστασία Πετσαγκουράκη Παναγιώτη, Vitor Rodrigues και Bruno Zezere. Σε αυτό το σημείο θα ήθελα να κάνω ειδική αναφορά στον Χουρδάκη Γεράσιμο, που σε περίπτωση που δε με είχε «μπλέξει» σε αυτά που με είχε «μπλέξει» πιθανότατα δε θα είχαν έρθει τα γεγονότα έτσι ώστε να πραγματοποιηθεί η διπλω-

---

ματική αυτή.

Τέλος θέλω να ευχαριστήσω τους γονείς μου για τις αρχές και τις αξίες που μου δώσαν από μικρή ηλικία και με βοήθησαν να ανταπεξέλθω στη σχολή αυτή γενικότερα.

Σε αυτά που Δεν τολμήσαμε  
αλλά δεν Μπορούμε να ξεχάσουμε  
και μετανιώσαμε που δεν Κάναμε

---

## Περίληψη

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής εργασίας αποτελεί η ηλεκτροχημική μελέτη της υπεροξειδάσης MtPerII με σκοπό την εύρεση των κινητικών της σταθερών και ο προσδιορισμός του προτύπου δυναμικού της με τη μέθοδο της κυκλικής βολταμετρίας καθώς και η ακινητοποίηση του ενζύμου σε ηλεκτροδίο χρυσού μέσω θειολών με σκοπό τη διερεύνηση δυνατότητας αξιοποίησης της σε βιοαισθητήρα. Αρχικά, υποθέτωντας μηχανισμό ring pong για τη δράση του ενζύμου με το υπεροξείδιο και το συνυπόστρωμα, και αγνοώντας την όποια απενεργοποίηση του ενζύμου, με χρήση της μεθόδου της κυκλικής βολταμετρίας με μεταβολή της ταχύτητας σάρωσης, κατ' αρχάς για συγκέντρωση συνυποστρώματος κυανού του μεθυλενίου 62.5μM και συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου 80mM, υπολογίζεται η σταθερά  $k_{2,2} = 9.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-7}$ , και κατόπιν για συγκέντρωση κυανού του μεθυλενίου 62.5 μM και συγκεντρώσεις του υπεροξειδίου του υδρογόνου 17.5, 34.3, 86.5, 141 mM υπολογίστηκαν οι υπόλοιπες κινητικές σταθερές  $k_1 = 1258\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{1,2} = 110.4 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_{1,M} = 0.088\text{M}$ ,  $k_{1,1} = 2401 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{1,-1} = 101 \text{ s}^{-1}$ .

Εν συνεχεία, με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων, με τη χρήση των σταθερών που εξήχθησαν από την πειραματική διαδικασία έγινε επίλυση της ηλεκτροαναλυτικής μορφής της εξίσωσης Butler - Volmer για υπολογιστική αναπαράγωγή των πειραματικών κυκλικών βολταμογραφημάτων και εν τέλει σύγκριση των πειραματικών δεδομένων με τα υπολογιστικά. Επίσης, έγινε πρόβλεψη της μορφής των κυκλικών βολταμογραφημάτων για ταχύτητες σάρωσης μικρότερες των 5 mV/s, οι οποίες λόγω περιορισμών του συστήματος δεν ήταν δυνατό να επιτευχθούν πειραματικά.

Με τη χρήση πυρολυτικού άνθρακα ως ηλεκτρόδιο εργασίας πραγματοποιήθηκε κυκλική βολταμετρία για τον προσδιορισμό του φαινόμενου πρότυπου δυναμικού  $E'_0$  του ενζύμου για το οξειδοαναγωγικό ζεύγος Fe(III)/Fe(II), το οποίο για pH=8 υπολογίστηκε περίπου -0.265mV vs SCE. Έγινε προσδιορισμός του  $E'_0$  και μέσω ακινητοποίησης του ενζύμου σε ηλεκτρόδιο ελάσματος χρυσού τροποποιημένο με πεντανθειόλη σε ένα εύρος pH 4-8 και βρέθηκε η γραμμική εξάρτηση  $E'_0 = 0.0582\text{pH} + 0.3472$ .

Κατόπιν εξετάστηκε η τροποποίηση ηλεκτροδίου ελάσματος χρυσού με εμφύσηση σε αιθανολικό διάλυμα δωδεκανθειόλης 0.1mM με σκοπό την μετέπειτα προσρόφηση ενζύμου σε αυτό και τη διερεύνηση δυνατότητας εφαρμογής ως βιοαισθητήρα υπεροξειδίου. Αρχικά έγινε καθαρισμός του ηλεκτροδίου χρυσού με κυκλική πόλωση σε υδατικό διάλυμα θειικού οξέος 1 M και κατόπιν υπολογισμός της ηλεκτροχημικής ενεργής επιφάνειας του χρυσού με χρήση κυκλικής βολταμετρίας και τη χρήση σιδηροκυανιούχων ιόντων με φέροντα ηλεκτρολύτη θειικό νάτριο. Η επιφάνεια εκτιμήθηκε  $0.217 \text{ cm}^2$ . Έπειτα επιβεβαιώθηκε η κάλυψη του χρυσού από τη δωδεκανθειόλη με φασματομετρία ηλεκτροχημικής εμπέδισης και κυκλική βολταμετρία με χρήση σιδηροκυανιούχων ιόντων με φέροντα ηλεκτρολύτη θειικό νάτριο. Η κάλυψη μετά από 420 min υπολογίστηκε περίπου 72%. Επίσης μέσω της ηλεκτροχημικής εκρόφησης με τη μέθοδο της γραμμικής βολταμετρίας σάρωσης υπολογίστηκε η επιφανειακή συγκέντρωση του ενζύμου στην επιφάνεια του

---

χρυσού ίση με  $5.8 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$

Στη συνέχεια, έγινε εμβάπτιση του τροποποιημένου με δωδεκανοθειόλη ηλεκτροδίου ελάσματος χρυσού σε ενζυμικό διάλυμα *MtPerII* και η επιβεβαίωση προσρόφησης του ενζύμου πραγματοποιήθηκε ηλεκτροχημικά με γραμμική βολταμετρία σάρωσης και φασματομετρικά με ATR, ενώ η διαπίστωση ενεργότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου με δοκιμή με ABTS. Επίσης με UV-Vis έγινε εκτίμηση της επιφανειακής συγκέντρωσης του ενζύμου στο ηλεκτρόδιο  $3 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$ .

Όσον αφορά στην ανάπτυξη του βιοαισθητήρα, το τροποποιημένο ηλεκτρόδιο δοκιμάστηκε με δύο συνυποστρώματα και προέκυψε ότι για τη χρήση κυανού του μεθυλενίου οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας βρέθηκαν pH=8, δυναμικό -300mV vs SCE, συγκέντρωση συνυποστρώματος 1 mM, υπό ανάδευση στις 200 στροφές ανά λεπτό, όριο ανίχνευσης για λόγο σήματος/θορύβου 2, 0.023 mM, όριο ποσοτικοποίησης 0.115 mM, μεγάλη σταθερότητα μέχρι τις 16 χρήσεις και μέγιστος χρόνος απόκρισης 5 s. Σχετικά με τη χρήση της κατεχόλης ως συνυπόστρωμα οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας βρέθηκαν pH=7, δυναμικό -200mV vs SCE, συγκέντρωση συνυποστρώματος 1 mM, υπό ανάδευση στις 200 στροφές ανά λεπτό, όριο ανίχνευσης για λόγο σήματος/θορύβου 2, 0.033 mM, όριο ποσοτικοποίησης 0.163 mM, μεγάλη σταθερότητα μέχρι τις 15 χρήσεις και μέγιστος χρόνος απόκρισης 8 s. Εν τέλει, έγινε σύγκριση με τους βιοαισθητήρες υπεροξειδίου της βιβλιογραφίας που βασίζονται στην ακινητοποίηση της υπεροξειδάσης horse radish peroxidase.

**Λέξεις Κλειδιά:** Υπεροξειδάση, *MtPerII*, Κυκλική Βολταμετρία, Θειόλες, Βιοαισθητήρας, Κυανό Μεθυλενίου, Πρότυπο Δυναμικο

---

## Abstract

The purpose of this diploma thesis is the electrochemical study of the peroxidase *Mt* PerII so as to estimate its kinetic constants as well as its apparent formal potential using cyclic voltammetry as well as the immobilization of the enzyme on a gold electrode using thiols in order to examine the possibility of it being reclaimed as a biosensor. Initially, assuming a ping-pong mechanism for the activity of the enzyme with the hydrogen peroxide and a co-substrate, and ignoring any deactivation of the enzyme, with the use of cyclic voltammetry and by shifting the scan rate, firstly for methylene blue co substrate concentration 62.5 $\mu$ M and hydrogen peroxide concentration 80mM, the  $k_{2,2}$  constant is estimated equal to  $9.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-7}$ , and consequently for methylene blue concentration 62.5  $\mu$ M and hydrogen peroxide concentrations 17.5, 34.3, 86.5, 141 mM the rest of the kinetic constants are evaluated  $k_1 = 1258\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{1,2} = 110.4 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_{1,M} = 0.088\text{M}$ ,  $k_{1,1} = 2401 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{1,-1} = 101 \text{ s}^{-1}$ .

After that, with the use of the finite elements method, using the experimentally extracted kinetic constants the electroanalytic Butler - Volmer equation was solved for the computational reproduction of the experimental cyclic voltammograms and then the computational and the experimental results were compared. Moreover, a prediction of the cyclic voltammograms for scan rates lower than 5 mV/s was made, since due to the system's restrictions, it was not possible to obtain them experimentally.

With the use of pyrolytic carbon as a working electrode, cyclic voltammetry was conducted for the determination of the apparent formal potential  $E'_0$  of the enzyme for the redox couple Fe(III)/Fe(II), which for a pH=8 was estimated to be about -0.265mV vs SCE. Also, the determination of  $E'_0$  was carried out through immobilization of the enzyme on a plate gold electrode modified with pentanethiol in a pH range of 4-8 and a linear dependence was found equal described by the equation  $E'_0 = 0.0582\text{pH} + 0.3472$ .

Afterwards the modification of the plate gold electrode was examined via immersion in an ethanolic solution of dodecanethiol 0.1mM so as to immobilize the enzyme there through adsorption and examine the possibility of using the system as a hydrogen peroxide biosensor. Initially the gold was cleaned with cyclic polarization in an aqueous solution of sulfuric acid 1 M and thence the electrochemically active surface of the clean gold was estimated with cyclic voltammetry and the use of the redox couple of ferrocyanides and sodium sulfate as a supporting electrolyte. The surface was estimated 0.217  $\text{cm}^2$ . After that the formation of the monolayer of dodecanethiol was confirmed via electrochemical impedance spectroscopy and cyclic voltammetry with the use of the redox couple of ferrocyanides and sodium sulfate as a supporting electrolyte. The coverage after 420 min of immersion was estimated about 72%. Moreover, through electrochemical desorption with the use of linear sweep voltammetry the surface concentration of dodecanethiol on gold was calculated  $5.8 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$

Afterwards, immersion of the modified with dodecanethiol plate gold elec-

---

trode in an enzymatic solution of MtPer II was carried out and the confirmation of the immobilization of the enzyme was done electrochemically with linear sweep voltammetry and spectroscopically with ATR, whereas the ascertainment of the immobilized enzyme's activity was done with an ABTS test. Furthermore, with UV-Vis spectroscopy the surface concentration of the enzyme was estimated equal to  $3 \times 10^{-10}$  mol/cm<sup>2</sup>.

Regarding the biosensor development, the modified electrode was tested with two co-substrates and it was found that for a methylene blue use, the optimum working conditions were pH=8, applied potential -300mV vs SCE, co-substrate concentration 1 mM, under stirring at 200rpm, limit of detection for signal to noise ratio 2, 0.023 mM, limit of quantification 0.115 mM, great stability until the 16th use and maximum response time of 5 s. As far as the use of catechol is concerned as a co-substrate the optimum working conditions were pH=7, potential -200mV vs SCE, co-substrate concentration 1 mM, under stirring at 200 rpm, limit of detection for signal to noise ration 2, 0.033 mM, limit of quantification 0.163 mM, great stabilit until the 15th use and maximum response time of 8 s. Finally, a comparison with peroxide biosensors based on horse radish peroxidase from the bibliography was carried out.

**Key Words:** Peroxidase, *MtPerII*, Cyclic Voltammetry, Thiols, Biosensor, Methylene Blue, Formal Potential



# Περιεχόμενα

<b>I</b>	<b>Εισαγωγικά Στοιχεία</b>	<b>1</b>
<b>1</b>	<b>Υπεροξειδάσες</b>	<b>3</b>
1.1	Κατηγοριοποίηση Υπεροξειδασών . . . . .	3
1.1.1	Κατηγοριοποίηση βάσει του αριθμού EC . . . . .	3
1.1.2	Κατηγοριοποίηση βάσει της αίμης . . . . .	6
1.2	Καταλυτικός Μηχανισμός Υπεροξειδασών . . . . .	8
1.3	Οξειδοαναγωγικό δυναμικό υπεροξειδασών . . . . .	10
1.3.1	Παράγοντες που επηρεάζουν το οξειδοαναγωγικό δυναμικό . . . . .	11
1.3.2	Σημασία $E_0$ . . . . .	11
<b>2</b>	<b>Βιοαισθητήρες</b>	<b>15</b>
2.1	Γενικά Περί Βιοαισθητήρων . . . . .	15
2.2	Κατηγοριοποίηση Βιοαισθητήρων . . . . .	16
2.3	Γενιές Βιοαισθητήρων . . . . .	17
2.4	Εφαρμογές . . . . .	18
2.5	Βασικά χαρακτηριστικά βιοαισθητήρων . . . . .	19

2.6	Μέθοδοι Ακινητοποίησης . . . . .	20
2.7	Βιοαισθητήρας Υπεροξειδίου . . . . .	20
<b>3</b>	<b>Αυτοσυναρμοζόμενες Μονοστιβάδες</b>	<b>23</b>
3.1	Γενικά Περί Αυτοσυναρμοζόμενων Μονοστιβάδων . . . . .	23
3.2	Προσρόφηση . . . . .	24
3.3	Προετοιμασία . . . . .	26
3.4	Κάλυψη . . . . .	26
3.5	Χρήσεις και πλεονεκτήματα . . . . .	28
3.6	Κινητική Ανάπτυξης . . . . .	28
<b>4</b>	<b>Βολταμετρία</b>	<b>31</b>
4.1	Αντιστρεπτότητα Ηλεκτροχημικής Αντίδρασης . . . . .	31
4.1.1	Κριτήρια Αντιστρεπτότητας . . . . .	33
4.2	Περιπτώσεις Κυκλικών Βολταμογραφημάτων . . . . .	33
4.2.1	Ακινητοποιημένο Ένζυμο σε Επιφάνεια Ηλεκτροδίου . . . . .	33
4.2.2	Ένζυμο Ελεύθερο στο Διάλυμα . . . . .	35
4.3	Χρήση Κυκλικής Βολταμετρίας για Μελέτη Ομογενούς Ενζυμικής Κατάλυσης . . . . .	38
<b>II</b>	<b>Ηλεκτροχημική Μελέτη</b>	<b>41</b>
<b>5</b>	<b>Μελέτη Κινητικής</b>	<b>43</b>
5.1	Μηχανισμός Κινητικής Υπεροξειδάσης . . . . .	43
5.2	Πειραματική Διαδικασία . . . . .	48

5.3	Αποτελέσματα . . . . .	49
5.4	Υπολογισμοί με Μέθοδο Πεπερασμένων Στοιχείων . . . . .	60
<b>6</b>	<b>Εύρεση Προτύπου Δυναμικού Fe(III)/Fe(II)</b>	<b>69</b>
6.1	Χρήση Πυρολυτικού Άνθρακα . . . . .	69
6.2	Πειραματική Διαδικασία Αποτελέσματα . . . . .	69
6.3	Ακίνητοποίηση σε Πεντανθειόλη . . . . .	71
6.3.1	Αυτοσυναρμοζόμενη μονοστιβάδα πεντανθειόλης . . . . .	71
6.3.2	Τροποποίηση Ηλεκτροδίου με Πεντανθειόλη . . . . .	71
6.3.3	Πειραματική Διαδικασία . . . . .	72
<b>III</b>	<b>Εφαρμογή ως Ενζυμικό Ηλεκτρόδιο</b>	<b>77</b>
<b>7</b>	<b>Τροποποίηση επιφάνειας Ηλεκτροδίου</b>	<b>79</b>
7.1	Καθαρισμός Επιφάνει Ηλεκτροδίου . . . . .	79
7.2	Υπολογισμός Ηλεκτροχημικώς Ενεργής Επιφάνειας Χρυσού . . . . .	80
7.3	Εμβάπτιση σε Δωδεκανθειόλη . . . . .	82
7.4	Εμβάπτιση σε Ένζυμο . . . . .	86
7.4.1	Ηλεκτροχημική Εκρόφηση . . . . .	86
7.4.2	Χαρακτηρισμός με ATR . . . . .	88
7.4.3	Δοκιμασία με ABTS . . . . .	89
7.4.4	Εκτίμηση προσροφημένης ποσότητας ενζύμου με UV-VIS . . . . .	90

<b>8 Βιοαισθητήρας Υπεροξειδίου</b>	<b>93</b>
8.1 Χρήση κυανού του μεθυλενίου ως συνυπόστρωμα . . . . .	93
8.1.1 Αριστοποίηση ως προς pH, συγκέντρωση συνυποστρώματος και δυναμικό . . . . .	93
8.1.2 Χρονοαμπερομετρία . . . . .	95
8.1.3 Καμπύλη Αναφοράς . . . . .	97
8.1.4 Ευαισθησία, Όρια Ανίχνευσης, Χρόνος Απόκρισης . . . . .	97
8.1.5 Δοκιμασία σταθερότητας χρήσης . . . . .	99
8.2 Χρήση Κατεχόλης ως συνυπόστρωμα . . . . .	100
8.2.1 Αριστοποίηση ως προς pH, συγκέντρωση συνυποστρώμα- τος και δυναμικό . . . . .	100
8.2.2 Χρονοαμπερομετρία . . . . .	102
8.2.3 Καμπύλη Αναφοράς . . . . .	103
8.2.4 Όρια Ανίχνευσης, Όρια ποσοτικοποίησης, Χρόνος Απόκρισης	105
8.2.5 Δοκιμασία σταθερότητας χρήσης . . . . .	106
8.3 Σύγκριση των δυο συνυποστρωμάτων . . . . .	106
8.4 Σύγκριση με τη βιβλιογραφία . . . . .	108
<b>IV Συμπεράσματα - Προτάσεις για μελλοντική έρευνα</b>	<b>109</b>
<b>9 Συμπεράσματα</b>	<b>111</b>
<b>10 Προτάσεις για μελλοντική έρευνα</b>	<b>113</b>

# Κατάλογος σχημάτων

1.1	Κατηγοριοποίηση υπεροξειδασών βάσει της αίμης [6] . . . . .	6
1.2	Μόριο Αίμης [8] . . . . .	7
1.3	Γενικός καταλυτικός κύκλος υπεροξειδασών [1] . . . . .	9
2.1	Στάδια προσδιορισμού ουσίας με τη χρήση βιοαισθητήρα [3] . . . . .	17
2.2	Σχηματική απεικόνιση δράσης HRP σε βιοαισθητήρα δεύτερης γενιάς για ανίχνευση υπεροξειδίου . . . . .	22
3.1	Σχηματική αναπαράσταση αυτοσυναρμοζόμενης μονοστιβάδας αλκανοθειόλης σε μεταλλικό υπόστρωμα [31] . . . . .	24
3.2	Σχηματικό διάγραμμα ιδανικής αυτοσυναρμοζόμενης μονοστιβάδας αλκανοθειόλης σε μονοκρυστάλλο σε επιφάνεια χρυσού (I I I). Επισημαίνονται η ανατομία και τα χαρακτηριστικά της μονοστιβάδας [32] . . . . .	25
3.3	Σχηματικό διάγραμμα φάσεων δεκανοθειόλης σε χρυσό (111) ως προς θερμοκρασία και ποσοστό κάλυψης. Οι διαφορετικές περιοχές και φάσεις υποδεικνύονται ως S (stripes), IS(intermediate structures), C (c(4x2)) και L (liquid). Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν όρια φάσεων των IS, οι οποίες δεν έχουν διερευνηθεί πλήρως. Η γραμμή μεταξύ C και L (melting transition) παρουσιάζει μία οξεία αύξηση κοντά στην πλήρη κάλυψη [36]. . . . .	27
4.1	Τυπικά αντιστρεπτά κυκλικά βολταμογραφήματα στην περίπτωση ακινητοποιημένου σε ηλεκτρόδιο οξειδοαναγωγικού είδους για ταχύτητες σάρωσης 10, 20, 50 και 100 mV/s . . . . .	34

4.2	Τυπικά μη αντιστρεπτά κυκλικά βολταμμογραφήματα στην περίπτωση ακινητοποιημένου σε ηλεκτρόδιο οξειδοαναγωγικού είδους για διαφορετικές ηλεκτροχημικές κινητικές σταθερές $k_{e1}$ . . . . .	35
4.3	Τυπικά αντιστρεπτά κυκλικά βολταμμογραφήματα στην περίπτωση οξειδοαναγωγικού είδους στον κύριο όγκο του διαλύματος για ταχύτητες σάρωσης 10, 20, 50 και 100 mV/s . . . . .	36
4.4	Τυπικά μη αντιστρεπτά κυκλικά βολταμμογραφήματα στην περίπτωση οξειδοαναγωγικού είδους στον κύριο όγκο του διαλύματος για διαφορετικές ηλεκτροχημικές κινητικές σταθερές . . . . .	37
4.5	Τυπικά κυκλικά βολταμμογραφήματα στην περίπτωση της ομογενούς ενζυμικής κατάλυσης για ταχύτητες σάρωσης 1, 0.5, 0.2 και 0.1 mV/s . . . . .	39
5.1	Σχηματική αναπαράσταση μηχανισμού ping-pong όπου S το υπόστρωμα, R το προϊόν, P η ανηγμένη μορφή του συνυποστρώματος (mediator), Q η οξειδωμένη μορφή του συνυποστρώματος (mediator), $E_1$ η ανηγμένη μορφή του ενζύμου και $E_1$ η οξειδωμένη μορφή του ενζύμου [40] . . . . .	44
5.2	Κυκλικό βολταμμογράφημα διαλύματος κυανού του μεθυλενίου 62.5μM, $MtPerII$ $2 \times 10^{-9}M$ σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8 5mM, πριν και μετά την προσθήκη $H_2O_2$ τελικής συγκέντρωσης 80mM, με ρυθμό σάρωσης 5mV/s . . . . .	50
5.3	Κυκλικά βολταμμογραφήματα διαλύματος κυανού του μεθυλενίου 62.5μM, $MtPerII$ $2 \times 10^{-9}M$ σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8 5mM, απουσία $H_2O_2$ , με ρυθμούς σάρωσης 5, 10, 20, 50 , 100 mV/s . . . . .	51
5.4	Κυκλικά βολταμμογραφήματα διαλύματος κυανού του μεθυλενίου 62.5μM, $MtPerII$ $2 \times 10^{-9}M$ σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8 5mM, παρουσία $H_2O_2$ συγκέντρωσης 80 mM, με ρυθμούς σάρωσης 5, 10, 20, 50 , 100 mV/s . . . . .	51
5.5	$\frac{I_p}{I_{po}}$ συναρτήσει του αντιστρόφου της ρίζας της ταχύτητας σάρωσης για διάλυμα κυανού του μεθυλενίου 62.5μM, $MtPerII$ $2 \times 10^{-9}M$ σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8 5mM, πριν και μετά την προσθήκη $H_2O_2$ τελικής συγκέντρωσης 80mM . . . . .	52
5.6	Κυκλικά βολταμμογραφήματα διαλύματος κυανού του μεθυλενίου 250μM, $MtPerII$ $4 \times 10^{-8}M$ σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8 5mM, απουσία $H_2O_2$ για ρυθμούς σάρωσης 5, 10, 20, 50 και 100 mV/s . . . . .	54

5.7	Κυκλικά βολταμογραφήματα διαλύματος κυανού του μεθυλενίου 250μM, $MtPerII$ $4 \times 10^{-8}M$ σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8 5mM, και συγκέντρωση $H_2O_2$ 17.5mM για ρυθμούς σάρωσης 5, 10, 20, 50 και 100 mV/s . . . . .	54
5.8	Κυκλικά βολταμογραφήματα διαλύματος κυανού του μεθυλενίου 250μM, $MtPerII$ $4 \times 10^{-8}M$ σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8 5mM, και συγκέντρωση $H_2O_2$ 34.3mM για ρυθμούς σάρωσης 5, 10, 20, 50 και 100 mV/s . . . . .	55
5.9	Κυκλικά βολταμογραφήματα διαλύματος κυανού του μεθυλενίου 250μM, $MtPerII$ $4 \times 10^{-8}M$ σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8 5mM, και συγκέντρωση $H_2O_2$ 86.5 mM για ρυθμούς σάρωσης 5, 10, 20, 50 και 100 mV/s . . . . .	56
5.10	Κυκλικά βολταμογραφήματα διαλύματος κυανού του μεθυλενίου 250μM, $MtPerII$ $4 \times 10^{-8}M$ σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8 5mM, και συγκέντρωση $H_2O_2$ 141 mM για ρυθμούς σάρωσης 5, 10, 20, 50 και 100 mV/s . . . . .	57
5.11	Κυκλικό βολταμογράφημα διαλύματος κυανού του μεθυλενίου 250μM, $MtPerII$ $4 \times 10^{-8}M$ σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8 5mM, πριν και μετά την προσθήκη $H_2O_2$ τελικής συγκέντρωσης (a) 17.5mM (b)86.5mM, με ρυθμό σάρωσης 5mV/s . . . . .	58
5.12	$\frac{I_p}{I_{po}}$ συναρτήσει της ρίζας του παράγοντα λ για διαφορετικές συγκεντρώσεις $H_2O_2$ . . . . .	59
5.13	$\sigma/k_{2,2}$ ως προς $1/c_0^2$ . . . . .	59
5.14	Υπολογιζόμενα με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων κυκλικά βολταμογραφήματα απουσία υπεροξειδίου και ταχύτητες σάρωσης 5, 10, 20, 50 και 100 mV/s, για συγκέντρωση ενζύμου $2 \times 10^{-8}M$ , $K_{1M} = 88mM$ , $k_{1,2} = 110.4s^{-1}$ , $k_{2,2} = 9.4 \times 10^7$ , $k_{1,1} = 2401M^{-1}s^{-1}$ , $k_{1,-1} = 101^{-1}$ και συγκέντρωση μπλε του μεθυλενίου 62.5 μM . . . . .	62
5.15	Υπολογιζόμενα με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων κυκλικά βολταμογραφήματα για συγκέντρωση υπεροξειδίου 80 mM και ταχύτητες σάρωσης 5, 10, 20, 50 και 100 mV/s, για συγκέντρωση ενζύμου $2 \times 10^{-8}M$ , $K_{1M} = 88mM$ , $k_{1,2} = 110.4s^{-1}$ , $k_{2,2} = 9.4 \times 10^7$ , $k_{1,1} = 2401M^{-1}s^{-1}$ , $k_{1,-1} = 101^{-1}$ και συγκέντρωση μπλε του μεθυλενίου 62.5 μM . . . . .	62

- 5.16  $\frac{I_p}{I_{po}}$  συναρτήσει του αντιστρόφου της ρίζας της ταχύτητας σάρωσης για διάλυμα κυανού του μεθυλενίου 62.5μM,  $MtPerH 4 \times 10^{-8}M$  βάσει υπολογισμών από μέθοδο πεπερασμένων στοιχείων, πριν και μετά την προσθήκη  $H_2O_2$  τελικής συγκέντρωσης 80mM . . . . . 63
- 5.17 Υπολογιζόμενα με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων κυκλικά βολταμμογραφήματα απουσία υπεροξειδίου και ταχύτητες σάρωσης 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5mV/s, για συγκέντρωση ενζύμου  $2 \times 10^{-8}M$ ,  $K_{1M} = 88mM$ ,  $k_{1,2} = 110.4s^{-1}$ ,  $k_{2,2} = 9.4 \times 10^7$ ,  $k_{1,1} = 2401M^{-1}s^{-1}$ ,  $k_{1,-1} = 101^{-1}$  και συγκέντρωση μπλε του μεθυλενίου 62.5 μM . . . . . 64
- 5.18 Υπολογιζόμενα με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων κυκλικά βολταμμογραφήματα για συγκέντρωση υπεροξειδίου 80 mM και ταχύτητες σάρωσης 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5 mV/s, για συγκέντρωση ενζύμου  $4 \times 10^{-8}M$ ,  $K_{1M} = 88mM$ ,  $k_{1,2} = 110.4s^{-1}$ ,  $k_{2,2} = 9.4 \times 10^7$ ,  $k_{1,1} = 2401M^{-1}s^{-1}$ ,  $k_{1,-1} = 101^{-1}$  και συγκέντρωση μπλε του μεθυλενίου 62.5 μM . . . . . 65
- 5.19 Υπολογιζόμενα με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων κυκλικά βολταμμογραφήματα για ρυθμό σάρωσης 5mV/s και συγκεντρώσεις υπεροξειδίου 0, 17.5, 34.3, 86.5 και 141mM, για συγκέντρωση ενζύμου  $4 \times 10^{-8}M$ ,  $K_{1M} = 88mM$ ,  $k_{1,2} = 110.4s^{-1}$ ,  $k_{2,2} = 9.4 \times 10^7$ ,  $k_{1,1} = 2401M^{-1}s^{-1}$ ,  $k_{1,-1} = 101^{-1}$  και συγκέντρωση μπλε του μεθυλενίου 250 μM . . . . . 65
- 5.20 Υπολογιζόμενα με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων κυκλικά βολταμμογραφήματα για ρυθμό σάρωσης 10 mV/s και συγκεντρώσεις υπεροξειδίου 0, 17.5, 34.3, 86.5 και 141mM, για συγκέντρωση ενζύμου  $4 \times 10^{-8}M$ ,  $K_{1M} = 88mM$ ,  $k_{1,2} = 110.4s^{-1}$ ,  $k_{2,2} = 9.4 \times 10^7$ ,  $k_{1,1} = 2401M^{-1}s^{-1}$ ,  $k_{1,-1} = 101^{-1}$  και συγκέντρωση μπλε του μεθυλενίου 250 μM . . . . . 66
- 5.21 Υπολογιζόμενα με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων κυκλικά βολταμμογραφήματα για ρυθμό σάρωσης 20 mV/s και συγκεντρώσεις υπεροξειδίου 0, 17.5, 34.3, 86.5 και 141mM, για συγκέντρωση ενζύμου  $4 \times 10^{-8}M$ ,  $K_{1M} = 88mM$ ,  $k_{1,2} = 110.4s^{-1}$ ,  $k_{2,2} = 9.4 \times 10^7$ ,  $k_{1,1} = 2401M^{-1}s^{-1}$ ,  $k_{1,-1} = 101^{-1}$  και συγκέντρωση μπλε του μεθυλενίου 250 μM . . . . . 66
- 5.22 Υπολογιζόμενα με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων κυκλικά βολταμμογραφήματα για ρυθμό σάρωσης 50 mV/s και συγκεντρώσεις υπεροξειδίου 0, 17.5, 34.3, 86.5 και 141mM, για συγκέντρωση ενζύμου  $4 \times 10^{-8}M$ ,  $K_{1M} = 88mM$ ,  $k_{1,2} = 110.4s^{-1}$ ,  $k_{2,2} = 9.4 \times 10^7$ ,  $k_{1,1} = 2401M^{-1}s^{-1}$ ,  $k_{1,-1} = 101^{-1}$  και συγκέντρωση μπλε του μεθυλενίου 250 μM . . . . . 67



- 5.23 Υπολογιζόμενα με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων κυκλικά βολταμμογραφήματα για ρυθμό σάρωσης 100 mV/s και συγκεντρώσεις υπεροξειδίου 0, 17.5, 34.3, 86.5 και 141mM, για συγκέντρωση ενζύμου  $4 \times 10^{-8} \text{M}$ ,  $K_{1\text{M}}=88\text{mM}$ ,  $k_{1,2}=110.4\text{s}^{-1}$ ,  $k_{2,2}=9.4 \times 10^7$ ,  $k_{1,1}=2401\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{1,-1}=101^{-1}$  και συγκέντρωση μπλε του μεθυλενίου 250  $\mu\text{M}$  . . . . . 67
- 5.24  $\frac{I_p}{I_{po}}$  συναρτήσει της ρίζας του παράγοντα  $\lambda$  για διαφορετικές συγκεντρώσεις  $\text{H}_2\text{O}_2$ , βάσει υπολογισμών με μέθοδο πεπερασμένων στοιχείων . . . . . 68
- 5.25 Υπολογιζόμενα με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων κυκλικά βολταμμογραφήματα για συγκέντρωση υπεροξειδίου 86.5 mM και ταχύτητες σάρωσης 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5, 10, 20, 50 και 100 mV/s, για συγκέντρωση ενζύμου  $4 \times 10^{-8} \text{M}$ ,  $K_{1\text{M}}=88\text{mM}$ ,  $k_{1,2}=110.4\text{s}^{-1}$ ,  $k_{2,2}=9.4 \times 10^7$ ,  $k_{1,1}=2401\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{1,-1}=101^{-1}$  και συγκέντρωση μπλε του μεθυλενίου 250  $\mu\text{M}$  . . . . . 68
- 6.1 Κυκλικό βολταμμογράφημα *MtPerII* συγκέντρωσης 0.270mg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα TrisHCl pH=8, 20mM με ταχύτητες σάρωσης 5, 10, 20, 50 και 100 mV/s με πυρολυτικό άνθρακα ως ηλεκτρόδιο εργασίας . . . . . 70
- 6.2 Κυκλικά βολταμμογραφήματα ακινητοποιημένης υπεροξειδάσης *MtPerII* σε ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος με αυτοσυναρμοζόμενη μονοστιβάδα πεντανθειόλης σε ρυθμιστικά διαλύματα pH 3, 4, 5, 6, 7 και 8 για ρυθμό σάρωσης 100mV/s . . . . . 73
- 6.3 Εξάρτηση  $E^{\circ'}$  ακινητοποιημένης υπεροξειδάσης *MtPerII* σε ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος με αυτοσυναρμοζόμενη μονοστιβάδα πεντανθειόλης για ρυθμό σάρωσης 100mV/s από το pH . . . . . 74
- 6.4 Κυκλικά βολταμμογραφήματα ακινητοποιημένης υπεροξειδάσης *MtPerII* σε ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος με αυτοσυναρμοζόμενη μονοστιβάδα πεντανθειόλης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8, 20mM για ρυθμούς σάρωσης 50, 100m και 200mV/s . . . . . 75
- 7.1 Κυκλικό βολταμμογράφημα σε ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος σε  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M με ρυθμό σάρωσης 100mV/s . . . . . 80
- 7.2 Κυκλικά βολταμμογραφήματα σε ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος σε 0.01 M  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ , με 0.1 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ως φέρων ηλεκτρολύτης για ρυθμούς σάρωσης 5, 10, 20, 50, 100 mV/s . . . . . 81

7.3	Διάγραμμα αναγωγικής κορυφής συναρτήσει της τετραγωνικής ρίζας του ρυθμού σάρωσης από κυκλικά βολταμογραφήματα σε ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος σε 0.01 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ , με 0.1 M $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ως φέρων ηλεκτρολύτης για ρυθμούς σάρωσης 5, 10, 20, 50, 100 mV/s . . . . .	81
7.4	Κυκλικά βολταμογραφήματα σε ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος σε 0.01 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ , με 0.1 M $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ως φέρων ηλεκτρολύτης για ρυθμό σάρωσης 100 mV/s μετά από εμβάπτιση σε αιθανολικό διάλυμα δωδεκανοθειόλης 0.1mM για 4, 5,6 και 7 ώρες . . . . .	82
7.5	Διαγράμματα Nyquist για ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος σε 0.01 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8, 20mM μετά από εμβάπτιση σε αιθανολικό διάλυμα δωδεκανοθειόλης 0.1 mM για χρόνους εμβάπτισης 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 και 420 min . . . . .	83
7.6	Διαγράμματα Bode για ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος σε 0.01 M $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8, 20mM μετά από εμβάπτιση σε αιθανολικό διάλυμα δωδεκανοθειόλης 0.1 mM για χρόνους εμβάπτισης 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 και 420 min . . . . .	84
7.7	Διαφοροποίηση της επικάλυψης $\theta$ (αστερίσκοι) της χωρητικότητας διπλής στοιβάδας $C_{dl}$ (κύκλοι) για αύξοντες χρόνους εμβάπτισης ηλεκτροδίου με χρυσό σε μορφή ελάσματος σε αιθανολικό διάλυμα δωδεκανοθειόλης 0.1mM . . . . .	85
7.8	Γραμμική βολταμετρία σάρωσης με ρυθμό σάρωσης 5mV/s σε αιθανολικό διάλυμα NaOH 0.1 M για καθαρό ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος, ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος τροποποιημένο με δωδεκανοθειόλη και ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος τροποποιημένο με δωδεκανοθειόλη και MtPerII . . . . .	87
7.9	Φάσμα υπερύθρου για ένζυμο, τροποποιημένο ηλεκτρόδιο χρυσού με δωδεκανοθειόλη, τροποποιημένο ηλεκτρόδιο χρυσού με δωδεκανοθειόλη και ένζυμο . . . . .	88
7.10	Διάλυμα ABTS με υπεροξείδιο πριν (A) και μετά την εμβάπτιση (B) του τροποποιημένου με ένζυμο και δωδεκανοθειόλη ηλεκτροδίου χρυσού σε μορφή ελάσματος . . . . .	89
7.11	Καμπύλη αναφοράς απορρόφησης MtPerII στα 408nm . . . . .	90

8.1	Μεταβολή απόκρισης ρεύματος ως προς δυναμικό, τροποποιημένου ηλεκτροδίου για υδατικό διάλυμα 1mM κυανού του μεθυλενίου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH=8 συγκέντρωσης 20mM, υπό ανάδευση 100rpm πριν και μετά την προσθήκη H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> σε τελική συγκέντρωση 1mM . . . . .	94
8.2	Μεταβολή απόκρισης ρεύματος ως προς pH για εφαρμοζόμενο δυναμικό -300mV vs SCE, τροποποιημένου ηλεκτροδίου για υδατικό διάλυμα 1mM κυανού του μεθυλενίου σε ρυθμιστικό διάλυμα συγκέντρωσης 20mM, υπό ανάδευση 100rpm πριν και μετά την προσθήκη H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> σε τελική συγκέντρωση 1mM . . . . .	95
8.3	Μεταβολή απόκρισης ρεύματος ως προς συγκέντρωση κυανού του μεθυλενίου για εφαρμοζόμενο δυναμικό -300mV vs SCE και pH=8 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 20mM), τροποποιημένου ηλεκτροδίου υπό ανάδευση 100rpm πριν και μετά την προσθήκη H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> σε τελική συγκέντρωση 1mM . . . . .	96
8.4	Χρονοαμπερομετρία τροποποιημένου ηλεκτροδίου με προσθήκη H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> για εφαρμοζόμενο δυναμικό -300mV vs SCE, pH=8 και συγκέντρωση κυανού του μεθυλενίου 1mM, υπό ανάδευση στα 100 rpm . . . . .	96
8.5	Εξάρτηση ρεύματος από συγκέντρωση για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο με προσθήκη H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> για εφαρμοζόμενο δυναμικό -300mV vs SCE, pH=8 και συγκέντρωση κυανού του μεθυλενίου 1mM, υπό ανάδευση στα 100 rpm . . . . .	97
8.6	Γραμμική περιοχή Σχήματος 8.5 . . . . .	98
8.7	Διάγραμμα % απόκρισης ρεύματος σε σχέση με αρχικό, συναρτήσει του αριθμού χρήσεων για ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8 20mM, 1mM κυανού του μεθυλενίου, εφαρμοζόμενο δυναμικό -300mV vs SCE και ανάδευση στα 100rpm, για την αξιολόγηση της σταθερότητας χρήσης του τροποποιημένου ηλεκτροδίου . . . . .	100
8.9	Μεταβολή απόκρισης ρεύματος ως προς pH για εφαρμοζόμενο δυναμικό -200mV vs SCE, τροποποιημένου ηλεκτροδίου για υδατικό διάλυμα 1mM κατεχόλης σε ρυθμιστικό διάλυμα συγκέντρωσης 20mM, υπό ανάδευση 100rpm πριν και μετά την προσθήκη H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> σε τελική συγκέντρωση 14mM . . . . .	101
8.8	Μεταβολή απόκρισης ρεύματος ως προς δυναμικό, τροποποιημένου ηλεκτροδίου για υδατικό διάλυμα 1mM κατεχόλης σε ρυθμιστικό διάλυμα pH=7 συγκέντρωσης 20mM, υπό ανάδευση 100rpm πριν και μετά την προσθήκη H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> σε τελική συγκέντρωση 14mM . . . . .	102

8.10 Μεταβολή απόκρισης ρεύματος ως προς συγκέντρωση κατεχόλης για εφαρμοζόμενο δυναμικό -200mV vs SCE και pH=7 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 20mM), τροποποιημένου ηλεκτροδίου υπό ανάδευση 100rpm πριν και μετά την προσθήκη H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> σε τελική συγκέντρωση 14mM . . . . .	103
8.11 Χρονοαμπερομετρία τροποποιημένου ηλεκτροδίου με προσθήκη H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> για εφαρμοζόμενο δυναμικό -200mV vs SCE, pH=7 και συγκέντρωση κατεχόλης 1mM, υπό ανάδευση στα 100 rpm . . . . .	104
8.12 Εξάρτηση ρεύματος από συγκέντρωση για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο με προσθήκη H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> για εφαρμοζόμενο δυναμικό -200mV vs SCE, pH=7 και συγκέντρωση κατεχόλης 1mM, υπό ανάδευση στα 100 rpm . . . . .	104
8.13 Γραμμική περιοχή Σχήματος 8.12 . . . . .	105
8.14 Διάγραμμα % απόκρισης ρεύματος σε σχέση με αρχικό, συναρτήσει του αριθμού χρήσεων για ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=7 20mM, 1mM κατεχόλη, εφαρμοζόμενο δυναμικό -200mV vs SCE και ανάδευση στα 100rpm, για την αξιολόγηση της σταθερότητας χρήσης του τροποποιημένου ηλεκτροδίου . . . . .	107

# Κατάλογος πινάκων

1.1	Κατηγοριοποίηση υπεροξειδασών βάσει αριθμού EC . . . . .	5
1.2	Οξειδοαναγωγικά δυναμικά Fe(III)/Fe(II) διάφορων πρωτεϊνών με αίμη . . . . .	13
5.1	Κλίση και συντελεστής γραμμικής συσχέτισης ( $r^2 \frac{I_p}{I_{po}}$ συναρτήσεως του $\lambda$ για συγκεντρώσεις υπεροξειδίου 17.5, 34.3, 86.5 και 141mM, για διάλυμα κυανού του μεθυλενίου 62.5μM, <i>MtPerII</i> $4 \times 10^{-8}$ M σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8 5mM . . . . .	55
5.2	Παράγοντας $\sigma$ για κάθε συγκέντρωση για συγκεντρώσεις υπεροξειδίου 17.5, 34.3, 86.5 και 141mM, για διάλυμα κυανού του μεθυλενίου 62.5μM, <i>MtPerII</i> $5 \times 10^{-9}$ M σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8 5mM . . . . .	56
6.1	Οξειδωτικές ( $E_{pa}$ ) και αναγωγικές κορυφές ( $E_{pc}$ ) που εξάγονται από Σχήμα 6.1 . . . . .	71
6.2	$E_{1/2a}$ (οξειδωτικά) και $E_{1/2c}$ (αναγωγικά) που εξάγονται από Σχήμα 6.1 . . . . .	71
6.3	Οξειδωτικά Αναγωγικά Δυναμικά και $E^\circ$ για κάθε pH από κυκλικά βολταμογραφήματα ακινητοποιημένης υπεροξειδάσης <i>MtPerII</i> σε ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος με αυτοσυναρμοζόμενη μονοστιβάδα πεντανθειόλης για ρυθμό σάρωσης 100mV/s . . . . .	72

8.1	Μεταβολή απόκρισης ρεύματος τροποποιημένου με δωδεκανοθειόλη και ένζυμο ηλεκτροδίου σε $\mu\text{A}$ συναρτήσει του pH και του εφαρμοζόμενου δυναμικού για υδατικό διάλυμα 1mM κυανού του μεθυλενίου σε ρυθμιστικό διάλυμα συγκέντρωσης 20mM, υπό ανάδευση 100rpm πριν και μετά την προσθήκη $\text{H}_2\text{O}_2$ σε τελική συγκέντρωση 1mM . . . . .	94
8.2	Όρια ανίχνευσης βιοαισθητήρα υπεροξειδίου για διαφορετικούς λόγους σήματος προς θόρυβο με χρήση του κυανού του μεθυλενίου ως συνυπόστρωμα . . . . .	99
8.3	Μεταβολή απόκρισης ρεύματος τροποποιημένου με δωδεκανοθειόλη και ένζυμο ηλεκτροδίου σε $\mu\text{M}$ συναρτήσει του pH και του εφαρμοζόμενου δυναμικού για υδατικό διάλυμα 1mM κατεχόλης σε ρυθμιστικό διάλυμα συγκέντρωσης 20mM, υπό ανάδευση 100rpm πριν και μετά την προσθήκη $\text{H}_2\text{O}_2$ σε τελική συγκέντρωση 14mM . . . . .	101
8.4	Όρια ανίχνευσης βιοαισθητήρα υπεροξειδίου για διαφορετικούς λόγους σήματος προς θόρυβο με χρήση της κατεχόλης ως συνυπόστρωμα . . . . .	106

Μέρος Ι

Εισαγωγικά Στοιχεία

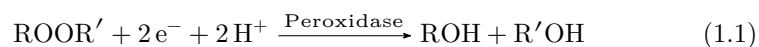




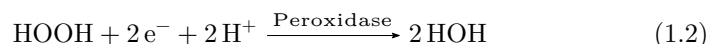
# Κεφάλαιο 1

## Υπεροξειδάσες

Οι υπεροξειδάσες αποτελούν ένζυμα τα οποία βρίσκονται σε όλες τις μορφές ζωής, ακόμα και στα υποχρεωτικά αναερόβια βακτήρια [1]. Ανήκουν σε μία μεγάλη οικογένεια ενζύμων που καταλύουν συνήθως αντιδράσεις της μορφής



Τα περισσότερα από αυτά τα ένζυμα χρησιμοποιούν ως βέλτιστο υπόστρωμα το υπεροξείδιο του υδρογόνου, ενώ αρκετά από αυτά παρουσιάζουν μεγαλύτερη ενεργότητα με οργανικά υδροπεροξείδια [2]. Στην περίπτωση που ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται το υπεροξείδιο του υδρογόνου, η αντίδραση 1.1 μπορεί να γραφεί ως:



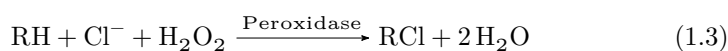
### 1.1 Κατηγοριοποίηση Υπεροξειδασών

#### 1.1.1 Κατηγοριοποίηση βάσει του αριθμού EC

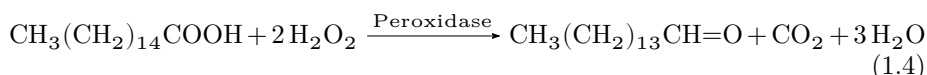
Οι υπεροξειδάσες μπορούν να είναι κατηγοριοποιημένες υπό τον αριθμό κατηγοριοποίησης EC.1.11.1x σύμφωνα με τη διεθνή ένωση βιοχημείας και μοριακής βιολογίας (IUBMB) με βάση την αντίδραση την οποία καταλύουν. Για παράδειγμα η EC 1.11.10 καταλύει τη χλωρίωση οργανικών ενώσεων σύμφωνα με την αντίδραση:

## 1.1. Κατηγοριοποίηση Υπεροξειδάσων

---



ενώ η EC 1.11.1.3 καταλύει την αντίδραση



Μέχρι τώρα έχουν δοθεί 15 διαφορετικοί αριθμοί σε υπεροξειδάσες από το EC 1.11.1.1 έως το EC 1.11.1.16 (ο αριθμός EC 1.11.1.14 έχει αφαιρεθεί) [3].

Επειδή μερικά ένζυμα δρουν σε παραπάνω από ένα πεδία, μερικές υπεροξειδάσες έχουν κατηγοριοποιηθεί με τα εξής νούμερα: EC 1.13.11.44, EC 1.14.99.1, EC 1.6.3.1 και EC 4.1.1.44 ενώ ορισμένες υπεροξειδάσες δεν έχουν αριθμό EC (Pxd, Pxt, AnPOX, NAnPrx, DypPrx, APx-CcP and CII) και μπορούν να κατηγοριοποιηθούν μόνο ως EC 1.11.1.7. Δύο ακόμα αξιοσημείωτες περιπτώσεις είναι οι EC 1.11.1.2 (NADPH peroxidase) και EC 1.11.1.3 (fatty acid peroxidase). Σχετικά με την EC 1.11.1.2, ενεργότητες NADPH peroxidase έχουν παρατηρηθεί σε διάφορες μελέτες, αλλά δεν υπάρχει γνωστή αλληλουχία υπεροξειδάσης που να της έχει αποδοθεί αριθμός EC, καθώς καμία από τις γνωστές υπεροξειδάσες δεν έχει ως κύρια ενεργότητα αυτήν της NADPH peroxidase [3, 4].

Οι Peroxidasins, οι peroxinectins, άλλες μη ζωικές υπεροξειδάσες, οι dyp-type peroxidases, η hybrid ascorbate-cytochrome c peroxidase και άλλες υπεροξειδάσες δεύτερης κλάσης δεν κατέχουν αριθμό EC. Οι αριθμοί 1.11.1.9 και 1.11.1.12 αντιστοιχούν στην glutathione peroxidase και το ποια κατηγοριοποίηση θα χρησιμοποιηθεί κάθε φορά εξαρτάται από τον δέκτη ηλεκτρονίων υπεροξειδίου του υδρογόνου ή υπεροξειδίου λιπιδίου, αντίστοιχα.

Στον Πίνακα 1.1 παρουσιάζονται συγκεντρωμένες οι διάφορες κατηγορίες υπεροξειδάσων βάσει της αρίθμησης EC.

Πίνακας 1.1: Κατηγοριοποίηση υπεροξειδάσων βάσει αριθμού EC

Αριθμός EC	Προτεινόμενο Όνομα	Συννοτομογραφία
EC 1.11.1.1	NADH peroxidase	NadPrx
EC 1.11.1.2	NADPH peroxidase	Μη διαθέσιμη αλληλουχία
EC 1.11.1.3	Fatty acid peroxidase	Μη διαθέσιμη αλληλουχία
EC 1.13.11.11	Tryptophan 2,3-dioxygenase	Δε θεωρείται πλέον υπεροξειδάση
(πρώην EC 1.11.1.4)		
EC 1.11.1.5	Cytochrome-c peroxidase	CcP, DiHcCP
EC 1.11.1.6	Catalase	Kat, CP
EC 1.11.1.7	Peroxidase	Haem peroxidases
EC 1.11.1.8	Iodide peroxidase	TPO
EC 1.11.1.9	Glutathione peroxidase	GPx
EC 1.11.1.10	Chloride peroxidase	HalPrx, HalNPrx, HalVPrx
EC 1.11.1.11	l-ascorbate peroxidase	APx
EC 1.11.1.12	Phospholipid-hydroperoxide glutathione peroxidase	GPx
EC 1.11.1.13	Manganese peroxidase	MnP
EC 1.11.1.14	Lignin peroxidase	LiP
EC 1.11.1.15	Peroxi-redoxin	1CysPrx, 2CysPrx, PrxII/V/PrxGrx, PrxQ/BCP
EC 1.11.1.16	Versatile peroxidase	VP
EC 1.13.11.44	Linoleate diol synthase	LDS
EC 1.14.99.1	Prostaglandin-endoperoxide synthase	PGHS
EC 1.6.3.1	NAD(P)H oxidase	DuOx
EC 4.1.1.44	4-Carboxymuconolactone decarboxylase	AhpD, CMD, CMDn, HCMD

### 1.1.2 Κατηγοριοποίηση βάσει της αίμης

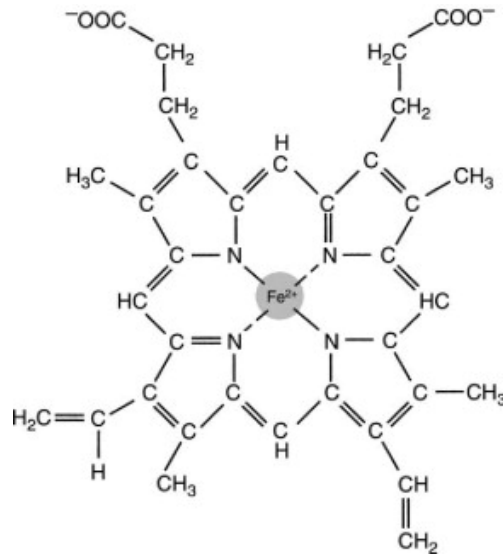
Μία άλλη κατηγοριοποίηση γίνεται βάσει της παρουσίας ή της απουσίας αίμης από το μόριο της υπεροξειδάσης (Σχήμα 1.1). Η αίμη αποτελείται από ένα οργανικό συστατικό και ένα κεντρικό άτομο σιδήρου (Σχήμα 1.2). Το οργανικό συστατικό της το οποίο ονομάζεται πρωτοπορφυρίνη απαρτίζεται από τέσσερις πυρρολικούς δακτύλιους, ενωμένους με μεθινικές γέφυρες για τον σχηματισμό τετραπυρρολικού δακτυλίου. Το άτομο του σιδήρου βρίσκεται στο κέντρο της πρωτοπορφυρίνης ενωμένο με 4 πυρρολικά άτομα αζώτου και αν και μπορεί να βρίσκεται είτε σε δισθενή είτε σε τρισθενή κατάσταση οξειδωσης, μόνο η δισθενής κατάσταση έχει την ικανότητα δέσμευσης οξυγόνου. Επίσης, ο δισθενής σίδηρος στην πρωτοπορφυρίνη σε αντιδράσεις με το υπεροξείδιο αποτελεί δότη ηλεκτρονίων (αναγωγική ουσία) [5].



Σχήμα 1.1: Κατηγοριοποίηση υπεροξειδασών βάσει της αίμης [6]

Γονίδια τα οποία κωδικοποιούν υπεροξειδάσες με αίμη μπορούν να βρεθούν σε όλες τις μορφές ζωής και χωρίζονται σε 2 μεγάλες υπεροικογένειες, μία που βρίσκεται κυρίως σε βακτήρια, μύκητες και φυτά [7] και σε μία δεύτερη που βρίσκεται σε ζώα, μύκητες και βακτήρια [9]. Τα μέλη της πρώτης οικογένειας (μη ζωικές υπεροξειδάσες) έχουν βρεθεί στην πλειονότητα των ζώντων οργανισμών, εκτός από τα ζώα.

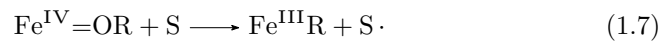
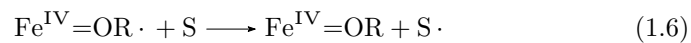
Για την πρώτη υπεροικογένεια υπεροξειδασών τρεις ανεξάρτητες κλάσεις μπορούν να παρατηρηθούν και είναι οι εξής:



Σχήμα 1.2: Μόριο Αίμης [8]

- Κλάση I: που περιέχει ascorbate peroxidase (APx), cytochrome c peroxidase (CcP) and catalase peroxidase (CP) (Ενδοκυττάριας Υπεροξειδάσες)
- Κλάση II: που περιέχει lignin peroxidases (LiP), manganese peroxidases (MnP), versatile peroxidase (VP) (Εξωκυττάριας Υπεροξειδάσες)
- Κλάση III: Οι πιο γνωστές εξωκυττάριας υπεροξειδάσες από φυτά

Οι 3 κλάσεις αυτές διαφέρουν στον αριθμό των δισουλφιδικών δεσμών και των δεσμευμένων ιόντων ασβεστίου, αλλά όλες χρησιμοποιούν τον ακόλουθο καταλυτικό κύκλο [10, 11]



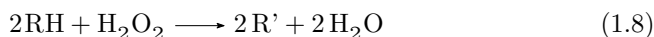
Η δεύτερη υπεροξειογένεια, που καταγράφεται ως υπεροξειδάσες ζώων, αποτελείται από μία ομάδα ομόλογων πρωτεϊνών που βρίσκονται κυρίως σε ζώα και κατηγοριοποιούνται ως εξής: myeloperoxidase, (MPO); eosinophil peroxidase (EPO); lactoperoxidase (LPO); thyroid peroxidase (TPO); prostaglandin H synthase (PGHS); peroxidasin (Pxd) and peroxinectin (Pxt).

Εκτός από τις δύο αυτές υπεροικογένειες, μικρότερες οικογένειες πρωτεϊνών κατηγοριοποιούνται ως ικανές για την αναγωγή υπεροξειδίων: η Catalase (Kat) που μπορεί να ανάξει το υπεροξειδίο του υδρογόνου, οι di-haem cytochrome C peroxidases (DiHCcP), οι dyp-type peroxidases (DypPrx), οι haloperoxidases με (HalPrx) ή χωρίς (HalNPrx, HalVPrx) αίμη.

Οι υπεροξειδάσες που δεν περιέχουν αίμη κατηγοριοποιούνται κυρίως στις ακόλουθες υπερκατηγορίες: alkylhydroperoxidase D-like superfamily (AhpD, CMD, HCMD, DCMD, and AlkyPrx), NADH peroxidase (NadPrx), manganese catalases (MnCat) και δυο υποοικογένειες από thiol peroxidases: glutathione peroxidases (GPx) and peroxiredoxins (1CysPrx, 2CysPrx, PrxII /PrxV /PrxGrx and PrxQ /BCP) [3, 6].

## 1.2 Καταλυτικός Μηχανισμός Υπεροξειδασών

Η συνήθης πλήρης αντίδραση των υπεροξειδασών μπορεί να γραφεί ως ακολούθως, όπου RH το κατάλληλο υπόστρωμα για την υπεροξειδάση και R' το προϊόν ελεύθερης ρίζας

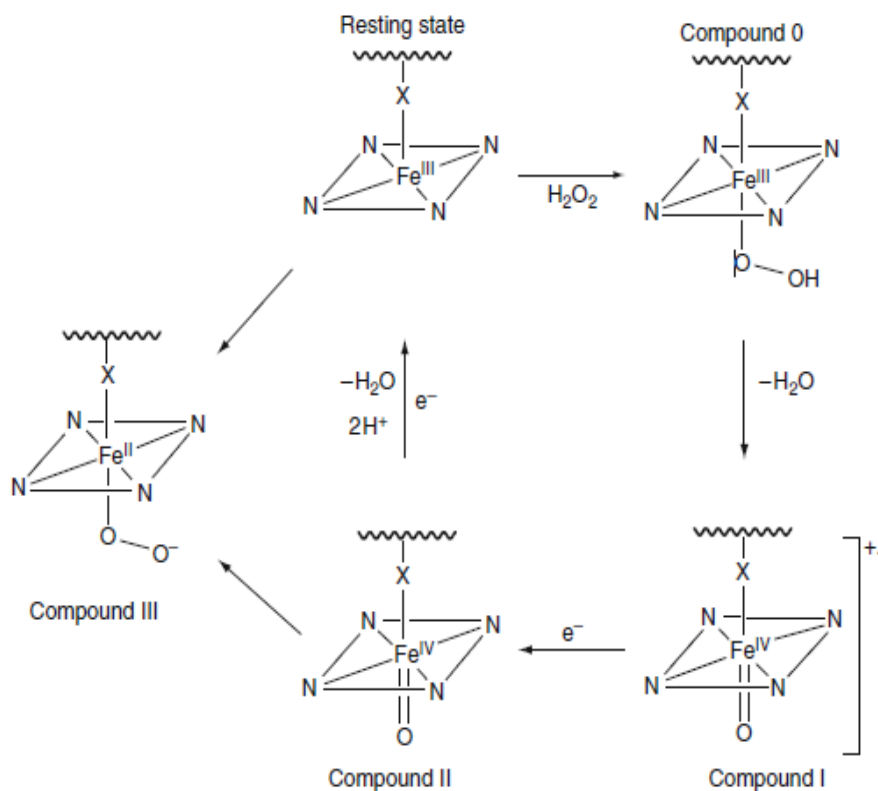


Η καθαρή μετατροπή, όμως, εμπεριέχει έναν πιο σύνθετο μηχανισμό που παρουσιάζεται σχηματικά στο Σχήμα 1.3. Τα Compounds I και II είναι τα κρίσιμα καταλυτικά ενδιάμεσα και διακρίνονται από τις υπόλοιπες οξειδωτικές καταστάσεις λόγω της απορρόφησής τους στο UV-vis φάσμα απορρόφησης [1].

Το πρώτο στάδιο για την κατάλυση της υπεροξειδάσης συμπεριλαμβάνει τη δεσμευση του υπεροξειδίου από το άτομο σιδήρου της αίμης για την παραγωγή ενός σιδηρικού υπεροξειδικού ενδιάμεσου [Fe(III)-OOH] Compound 0.

Η μετατροπή του Compound 0 σε Compound I απαιτεί την πρωτονίωση του άπω οξυγόνου του σιδηρικού υπεροξειδικού ενδιάμεσου για τη δημιουργία σιδηρικών ειδών που μπορούν να συνδεθούν για την απόμακρυνση του άπω οξυγόνου ως μόριο νερού. Πιθανότατα, τα άπω υπολείμματα ιστιδίνης στο ενεργό κέντρο της υπεροξειδάσης αποτελούν τη βάση που αποπρωτονιώνει το υπεροξειδίο κατά τη δημιουργία του Compound 0. Αυτό το πρωτόνιο κατόπιν μεταφέρεται από την ιμιδαζόλη στο τερματικό οξυγόνο του σιδηρικού υπεροξειδικού ενδιάμεσου, καταλύοντας το σπάσιμο των δεσμών O-O για την παραγωγή του Compound I. Μετά από χαρακτηρισμό με UV-vis, EPR, Mossbauer, EXAFS και RAMAN, τα ληφθέντα δεδομένα υποδεικνύουν ότι το Compound I αποτελούνται από φερυλικά είδη [Fe(IV)=O] συνδυασμένα με κατιοντική ρίζα εντοπισμένη στο σκελετό της πορφυρίνης.

Η αναγωγή ενός ηλεκτρονίου του Compound I παράγει Compound II στο οποίο ο σίδηρος βρίσκεται ακόμα σε οξειδωτική κατάσταση [Fe(IV)] αλλά η ρίζα πορφυρίνης έχει «αποσβεστεί».



Σχήμα 1.3: Γενικός καταλυτικός κύκλος υπεροξειδάσων [1]

Το Compound III υποδεικνύει ένα σύμπλοκο στο οποίο το οξυγόνο έχει δεσμευτεί στην άκρη του σιδήρου στην υπεροξειδάση. Είναι επομένως μία δομή που βρίσκεται κοντά σε αυτήν των συμπλόκων οξυγόνου που βρίσκονται στην οξυμογλοβίνη και την οξυαιμογλοβίνη. Το Compound III, σχηματίζεται συνήθως όταν υπάρχει μεγάλη περίσσεια υπεροξειδίου. Πιθανότατα η μορφή αυτή σχηματίζεται κυρίως λόγω του συνδυασμού του σουπεροξειδίου, που προκύπτει από την οξείδωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου, με το ένζυμο[1].

### 1.3 Οξειδοαναγωγικό δυναμικό υπεροξειδασών

Τα ένζυμα τα οποία καταλύουν οξειδοαναγωγικές αντιδράσεις στις οποίες το οξυγόνο δρα ως δέκτης ηλεκτρονίων χωρίζονται σε 2 κατηγορίες: Αυτά που καταλύουν την οξείδωση του υποστρώματος με μεταφορά ηλεκτρονίων στον δέκτη (οξειδάσες και υπεροξειδάσες) και αυτά που καταλύουν την οξείδωση με ενσωμάτωση του οξυγόνου στο μόριο (μονοξυγενάσες και διοξυγενάσες).

Το οξειδοαναγωγικό δυναμικό  $E_0$  διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον προσδιορισμό της ικανότητας της υπεροξειδάσης να καταλύει οξειδωτικές δράσεις, χωρίς όμως να είναι ο μόνος σημαντικός παράγοντας, καθώς η ενεργότητα της εξαρτάται και από τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, τον προσανατολισμό του υποστρώματος και την τοπογραφία του ενεργού κέντρου.

Ενώ το ζεύγος Fe(III)/Fe(II) έχει σταθερό οξειδοαναγωγικό δυναμικό στα 0.77V vs SHE, όταν εμπλέκεται με πρωτοπορφυρίνη για το σχηματισμό ελεύθερης αίμης, το δυναμικό μπορεί να μειωθεί μέχρι και στα -0.115V vs SHE. Όταν η αίμη μπει σε πρωτεϊνική μήτρα, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό δείχνει μία διακύμανση της τάξεως του 1 V.

Στις πρώτες ηλεκτροχημικές έρευνες για τις υπεροξειδάσες εκφράζονταν η άποψη ότι η πολικότητα του περιβάλλοντος της αίμης στην πρωτεΐνη θα μπρούσε να είναι ο κύριος παράγοντας που καθορίζει το οξειδοαναγωγικό δυναμικό. Εφόσον η υποσιδηρούχος αίμη είναι ουδέτερη και η σιδηρούχος αίμη έχει ένα θετικό φορτίο, η δεύτερη μορφή θα αποσταθεροποιούνταν σε περιβάλλον με χαμηλή διηλεκτρική σταθερά, συνεπώς όσο πιο υδρόφοβο είναι το περιβάλλον της αίμης, τόσο πιο σταθερή θα είναι η υποσιδηρούχος αίμη και τόσο πιο θετικό θα είναι το οξειδοαναγωγικό δυναμικό. Έκτοτε έχει αποδειχθεί ότι η διαμόρφωση του οξειδοαναγωγικού δυναμικού αποτελεί ένα πολυπαραγοντικό φαινόμενο και η συνεισφορά κάθε παράγοντα ποικίλλει από πρωτεΐνη σε πρωτεΐνη [1].



### 1.3.1 Παράγοντες που επηρεάζουν το οξειδοαναγωγικό δυναμικό

Όσον αφορά στην κυρίως σφαίρα συντονισμού του σιδήρου, η ταυτότητα του αξονικού προσδέτη είναι σημαντική για τον προσδιορισμό της χημικής δραστηρότητας της αίμης. Εν γένει, η διαδραστικότητα μεταξύ του αξονικού προσδέτη και της αίμης του σιδήρου ακολουθούν την αρχή του σκληρού-μαλακού, οξέος-βάσης (hard-soft acid-base). Οι πιο μαλακοί προσδέτες όπως η μεθειονίνη με δεσμευμένο θείο έχουν υψηλότερη συγγένεια με την υποσιδηρούχο αίμη ενώ οι πιο σκληροί όπως η ιστιδίνη με με προσδεδεμένη μαλτόζη προτιμούν την σιδηρούχο αίμη. Συνεπώς οι μαλακοί προσδέτες ευνοούν υψηλότερα δυναμικά [1, 12]

Επίσης η χημική δομή της αίμης ασκεί σημαντική επιρροή στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό. Οι ιδιότητες λήψης ή πρόσδοσης ηλεκτρονίων των υποκαταστατών της πορφυρίνης επηρεάζουν τη δύναμη πρόσδοσης των ισημερινών συνδετών του σιδήρου της αίμης. Επιπρόσθετα, η ομοιοπολική σύνδεση μεταξύ αίμης και της μήτρας της πρωτεΐνης έχει υποτεθεί ότι επηρεάζει σε συγκεκριμένο βαθμό τις τιμές του οξειδοαναγωγικού δυναμικού [1, 13].

Εκτός από την κυρίως σφαίρα συντονισμού, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις επηρεάζουν επίσης το οξειδοαναγωγικό δυναμικό καθώς τοπικά φορτία σταθεροποιούν τη σιδηρούχο αίμη και μειώνουν τοπικά τη διηλεκτρική σταθερά [1, 14, 15]

### 1.3.2 Σημασία $E_0$

Το οξειδοαναγωγικό δυναμικό αποτελεί την καταλυτικώς σχετική ιδιότητα των υπεροξειδασών με αίμη, καθώς θεωρητικά θέτει το όριο στην οξειδωτική ικανότητα του ενζύμου.

Η σημασία της ικανότητας των υπεροξειδασών να υπάρχουν σε σταθερή βασική κατάσταση και να παράξουν ικανοποιητικά οξειδωτικά ενδιάμεσα για τις αιμοπρωτεΐνες εξηγείται μέσω των ιδιοτήτων δραστηρότητας των ειδών σιδήρου. Σε νερό, η ελεύθερη υποσιδηρούχος αίμη οξειδώνεται γρήγορα από το οξυγόνο σε σιδηρικό ιόν, το οποίο δεν μπορεί να προσδέσει οξυγόνο, όμως, σε πρωτεϊνική μήτρα οι αιμοπρωτεΐνες που δεσμεύουν οξυγόνο όπως η αιμογλοβίνη και η μυογλοβίνη αυξάνουν το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του Fe(III)/Fe(II) σε σχέση με την ελεύθερη αίμη και συνεπώς σταθεροποιούν την αναγωγική κατάσταση. Επίσης, η αυθόρμητη οξείδωση μειώνεται in vivo λόγω χαμηλής διηλεκτρικότητας του περιβάλλοντος. Συγκριτικά οι υπεροξειδάσες παρουσιάζουν ένα πιο αρνητικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό του Fe(III)/Fe(II) τόσο in vivo όσο και in vitro. Επίσης σε πιο αρνητικά οξειδοαναγωγικά δυναμικά όπως αυτά που παρατηρούνται εντός της μήτρας των πρωτεϊνών, υψηλότερες οξειδωτικές βαθμίδες όπως αυτές του Fe(IV) ή Fe(V) θα σταθεροποιούνταν ικανοποιητικά ώστε να βρίσκονται παροδικά σε μία αντίδραση. Επιπρόσθετα, το Fe(III) είναι σε θέση να αντιδράσει με το υπεροξείδιο του υδρογόνου και να παράξει ρίζες υδροξυλίου και συνεπώς επωφελούμεθα από πιο χαμηλά

### 1.3. Οξειδοαναγωγικό δυναμικό υπεροξειδασών

---

οξειδοαναγωγικά δυναμικά εξαλείφοντας τέτοια είδη.

Για τις υπεροξειδάσες, τα σχετικά οξειδοαναγωγικά ζεύγη είναι τα Compound I και Compound II, τα ενδιάμεσα που παρουσιάζονται κατά τον καταλυτικό κύκλο. Όμως, το οξειδοαναγωγικό δυναμικό του ζεύγους Fe(III)/Fe(II) μπορεί να φανεί επίσης χρήσιμος δείκτης του οξειδωτικού χαρακτήρα των υπεροξειδασών. Ένα πιο θετικό οξειδοαναγωγικό δυναμικό του Fe(III)/Fe(II) υποδεικνύει υψηλότερη ηλεκτρονιακή ανεπάρκεια στο ενεργό κέντρο, και συνεπώς την ύπαρξη ενζυματικών ενδιάμεσων με υψηλότερη οξειδωτική ισχύ.

Εν γένει, δεδομένα για τα οξειδοαναγωγικά δυναμικά των Compound I και Compound II δεν είναι διαθέσιμα. Άμεσες μέθοδοι όπως η κυκλική βολταμμετρία δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν λόγω της μικρής διάρκειας ζωής των ενδιάμεσων και της αναντιστρεπτότητας των αντιδράσεων για την παραγωγή αυτών. Οι μέθοδοι που μπορούν να βρεθούν στη βιβλιογραφία για τον προσδιορισμό των δυναμικών των καταλυτικών ειδών συμπεριλαμβάνουν οξειδοαναγωγικές τιτλοδοτήσεις, φασματοηλεκτροχημεία και εκτιμήσεις βάσει της κατάλυσης [1].

Στον Πίνακα 1.2 παρουσιάζονται οξειδοαναγωγικά δυναμικά Fe(III)/Fe(II) διαφορών αιμοπρωτεϊνών

Πίνακας 1.2: Οξειδοαναγωγικά δυναμικά Fe(III)/Fe(II) διάφορων πρωτεϊνών με αίμη

Πρωτεΐνη	pH	$E^\circ$ vs SHE (mV)	Λειτουργία
Cytochrome c	7	247	Μεταφορά ηλεκτρονίων στα μιτοχόνδρια
Myoglobin	7	52	Μεταφορά οξυγόνου
Myeloperoxidase	7	5	Μη ειδικό ανοσοποιητικό σύστημα
Versatile peroxidase	7.5	5	Δημιολυτική δραστηριότητα
Manganese peroxidase	7	-88 έως -93	Δημιολυτική δραστηριότητα
Lignin peroxidase	7	-120 έως -140	Δημιολυτική δραστηριότητα
Eosinophil peroxidase	7	-126	Μη ειδικό ανοσοποιητικό σύστημα
Chloroperoxidase	6.9	-140	Αλογονώση μεταβολιτών
C. cinereus peroxidase	7	-183	Δημιολύση
Nitrophorin 4	5	-187	Μεταφορά NO
Lactoperoxidase	7	-176	Έμφυτο ανοσοποιητικό σύστημα
Cytochrome c peroxidase	6.1	-194	Μεταβολισμός υπεροξειδίου του υδρογόνου
Horseshoe peroxidase	7	-278	Δημιολύση, δημιουργία κυτταρικών τοιχωμάτων
Turnip peroxidase	8	-233 έως -160	Δημιολύση, δημιουργία κυτταρικών τοιχωμάτων
Catalase peroxidase	7	-226	Μεταβολισμός υπεροξειδίου του υδρογόνου
Human peroxidoxin	7	-290	Μεταβολισμός υπεροξειδίου του υδρογόνου
Soybean peroxidase	7	-310	Δημιουργία κυτταρικών τοιχωμάτων

### 1.3. Οξειδοαναγωγικό δυναμικό υπεροξειδασών

---

Το θερμοδυναμικό μοντέλο της αναγωγής του Fe(III) σε Fe(II) στις αιμοπρωτεΐνες, το οποίο δίνει ερμηνεία στη μεταβολή του πρότυπου δυναμικού του οξειδοαναγωγικού ζεύγους αυτού, γενικά δείχνει ότι η μεταβολή της ελεύθερης ενέργειας Gibbs ( $\Delta G_o'$ ) εξαρτάται κυρίως από τις αλληλεπιδράσεις των δεσμών στο αναγωγικό κέντρο ( $\Delta G_{cen}$ ) και τις ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του οξειδοαναγωγικού κέντρου, της πρωτεΐνης και του διαλύτη ( $\Delta G_{el}$ ). Ένας τρίτος όρος σχετίζεται με τις αλλαγές στη διαμόρφωση λόγω της οξειδοαναγωγής ( $\Delta G_{conf}$ ), για παράδειγμα η αλλαγή της τεταρτοταγούς δομής κατά την πρόσδεση του οξυγόνου στην αιμογλοβίνη και τη μυογλοβίνη. Παρ'όλα αυτά ο τελευταίος όρος μπορεί να αγνοηθεί για μεταφορά ηλεκτρονίων σε απλές πρωτεΐνες [1].

$$\Delta G_o' = \Delta G_{cen} + \Delta G_{el} + \Delta G_{conf} \quad (1.9)$$

Ο ηλεκτροστατικός όρος μπορεί να σπάσει σε περαιτέρω 4 όρους

- Την επίδραση των χαμηλών διηλεκτρικών σταθερών του περιβάλλοντος  $\Delta G_{H_2O}$
- Την επίδραση των ιόντων στο διάλυμα, που σχετίζεται με την ιοντική ισχύ  $\Delta G_{ion}$
- Την επίδραση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ της "θαμμένης" αίμης και των θαμμένων φορτίων της πρωτεΐνης  $\Delta G_{int}$
- Την επίδραση των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ θαμμένης αίμης και των θαμμένων φορτίων της πρωτεΐνης  $\Delta G_{surf}$

## Κεφάλαιο 2

# Βιοαισθητήρες

### 2.1 Γενικά Περί Βιοαισθητήρων

Ένας βιοαισθητήρας αποτελεί το σημείο τομής δύο αρχών. Συνδυάζει την εκλεκτικότητα ενός βιολογικού συστήματος και την υπολογιστική ισχύ ενός μικροπεξεργαστή. Πρόκειται για μία συσκευή που ενσωματώνει ένα στοιχείο βιολογικής αναγνώρισης συνδεδεμένο με έναν μετατροπέα. Μπορούν να οριστούν ως αναλυτικές συσκευές στις οποίες ένα βιολογικό στοιχείο έχει συζευχθεί με έναν μετατροπέα για την μετατροπή ενός βιολογικού σήματος σε ηλεκτρικό. Πρόκειται για ένα διεπιστημονικό αντικείμενο έρευνας που συνδυάζει στοιχεία από βιοχημεία, ανοσολογία, ηλεκτροχημεία, επιστήμη των υλικών, ηλεκτρονική καθώς και στοιχεία από άλλες επιστήμες και αρχές μηχανικής [16].

Τα κύρια στοιχεία ενός βιοαισθητήρα είναι:

- Το βιολογικά ευαίσθητο στοιχείο ή ο βιοκαταλύτης, το οποίο είναι συνήθως ένα ακινητοποιημένο βιολογικό σύστημα που μπορεί να αναγνωρίσει επιλεκτικά το μόριο στόχο. Τα χρησιμοποιούμενα βιομόρια είναι συνήθως, ένζυμα, αντισώματα, βακτήρια, κύτταρα, κομμάτια ιστών και άλλα.
- Ο μετατροπέας, ο οποίος μετατρέπει το βιολογικό σήμα σε μετρήσιμο ηλεκτρικό σήμα όπως ρεύμα ή δυναμικό. Η έξοδος του μετατροπέα μπορεί να ληφθεί άμεσα ή να επεξεργαστεί περαιτέρω από έναν ενισχυτή ή άλλες μεθόδους επεξεργασίας σήματος
- Ο ενισχυτής ή ο επεξεργαστής σήματος, οι οποίοι είναι συγκεκριμένες ηλεκτρικές συσκευές για την επεξεργασία του ληφθέντος από τον μετατροπέα σήματος.

Οι πρώτοι βιοαισθητήρες χρησιμοποιούσαν συμβατικά ηλεκτρόδια (ηλεκτρόδια

## 2.2. Κατηγοριοποίηση Βιοαισθητήρων

---

για τη μέτρηση pH, οξυγόνου, ιόντων) για μετατροπείς σε συνδυασμό με έναν κατάλληλο βιοκαταλύτη. Το ενζυμικό ηλεκτρόδιο αποτελεί ένα συνδυασμό κατάλληλου ηλεκτροδιακού αισθητήρα με ακινητοποιημένο ένζυμο που παρέχει μία υψηλής εκλεκτικότητας και ευαισθησίας μέθοδο για τον προσδιορισμό συγκεκριμένου υποστρώματος. Ένας από τους πρώτους βιοαισθητήρες για γλυκόζη χρησιμοποιούσε ηλεκτρόδιο οξυγόνου για την μέτρηση της μείωσης της συγκέντρωσης του οξυγόνου.

## 2.2 Κατηγοριοποίηση Βιοαισθητήρων

Οι βιοαισθητήρες ανάλογα με το είδος του μετατροπέα χωρίζονται σε ηλεκτροχημικούς, οπτικούς, ακουστικούς και θερμοδομετρικούς. Οι ηλεκτροχημικοί χωρίζονται περαιτέρω σε αμπερομετρικούς, ποτενσιομετρικούς και αγωγιμομετρικούς.

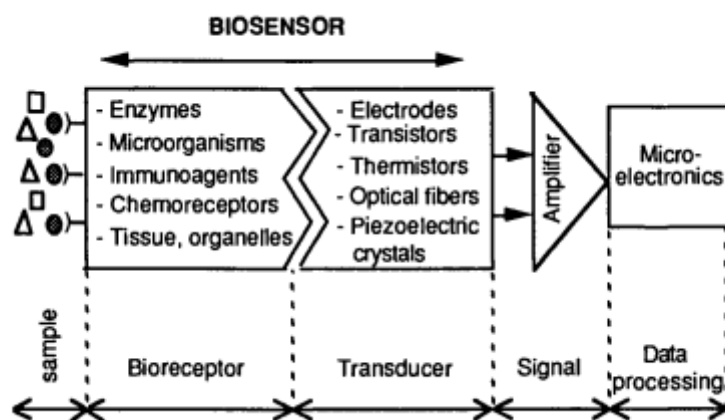
Ένας ποτενσιομετρικός βιοαισθητήρας καταγράφει το δυναμικό υπό συνθήκες μηδενικού ρεύματος και το παραγόμενο δυναμικό είναι ευθέως ανάλογο του λογαρίθμου της συγκέντρωσης του αναλυτή και η βάση για τέτοιου είδους βιοαισθητήρες είναι η εξίσωση του Nernst [16].

Οι αμπερομετρικοί βιοαισθητήρες καταγράφουν το παραγόμενο ρεύμα σε σταθερό δυναμικό και προκύπτει γραμμική συσχέτιση μεταξύ συγκέντρωσης αναλυτή που οξειδοαναγεται και ρεύματος. Συνήθεις τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι η κυκλική βολταμετρία και η χρονοαμπερομετρία. Το ρεύμα σε μόνιμη κατάσταση δίνεται από τη σχέση

$$I = \frac{nFADC}{d} \quad (2.1)$$

Όπου  $n$  ο αριθμός των ηλεκτρονίων που ανταλλάσσονται ανά mol,  $F$  η σταθερά του Faraday,  $A$  η επιφάνεια του ηλεκτροδίου,  $D$  ο συντελεστής διάχυσης του οξειδοαναγόμενου είδους,  $C$  η συγκέντρωση του ηλεκτροενεργού μορίου και  $d$  το πάχος της στιβάδας διάχυσης [16, 17]

Οι αγωγιμομετρικοί βιοαισθητήρες βασίζονται σε βιοκαταλύτες που παράγουν ή καταναλώνουν ιόντα και διάλυμα που γίνεται ο προσδιορισμός έχει χαμηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα [16].

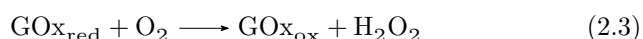
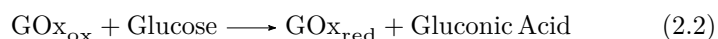


Σχήμα 2.1: Στάδια προσδιορισμού ουσίας με τη χρήση βιοαισθητήρα [3]

## 2.3 Γενιές Βιοαισθητήρων

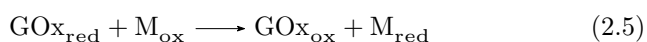
Με βάση το βιοαισθητήρα της γλυκόζης, που αποτελεί τον πιο διαδεδομένο και μελετημένο σύστημα ενζυμικού ηλεκτροδίου, οι βιοαισθητήρες χωρίζονται σε τρεις γενιές

- 1ης γενιάς βιοαισθητήρες. Σε αυτήν την κατηγορία το  $O_2$  λειτουργεί ως συνυπόστρωμα (cosubstrate) στην ενζυμική δράση και παράγεται και τελικά ανιχνεύεται  $H_2O_2$



Αρχικά η γλυκόζη ανάγει το FAD που περιέχεται στην οξειδάση της γλυκόζης  $GOx_{ox}$  και παράγεται η ανηγμένη μορφή της οξειδάσης  $GOx_{red}$ , η οποία τελικά οξειδώνεται από το μοριακό οξυγόνο. Εν τέλει, μετράται το παραγόμενο υπεροξείδιο σε ηλεκτρόδιο λευκοχρύσου εφαρμόζοντας δυναμικό (+0.6 V vs Ag/AgCl)

- 2ης γενιάς βιοαισθητήρες. Σε αυτήν την κατηγορία το μοριακό οξυγόνο αντικαθίσταται από ένα συνυπόστρωμα (mediator) (M) το οποίο δέχεται ηλεκτρόνια από το ενεργό κέντρο του ενζύμου και τα μεταφέρει κατόπιν στην ενεργή επιφάνεια του ηλεκτροδίου.



## 2.4. Εφαρμογές

---

- 3ης γενιάς βιοαισθητήρες. Η επιθυμία για ανάπτυξη βιοαισθητήρων με απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ ενζύμου και ηλεκτροδίου καθώς και η προσπάθεια για μετατόπιση του δυναμικού λειτουργίας του βιοαισθητήρα σε χαμηλότερες τιμές, κοντά στο δυναμικό ισορροπίας του ενζύμου, έχει οδηγήσει στην προσπάθεια ανάπτυξης μεθόδων ακινητοποίησης όπου το ενεργό κέντρο του ενζύμου έρχεται σε απευθείας επαφή με την επιφάνεια του ηλεκτροδίου [24]

Σχετικά με τη δεύτερη γενιά βιοαισθητήρων, τα χρησιμοποιούμενα συνυποστρώματα πρέπει να διαθέτουν τις εξής ιδιότητες

- Να αντιδρούν γρήγορα με το ένζυμο
- Να είναι επαρκώς διαλυτά τόσο στην οξειδωμένη όσο και στην αναγωγική τους μορφή
- Η υπέρταση για την αναγέννηση του συνυποστρώματος στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου να είναι χαμηλή και ανεξάρτητη του pH
- Να μην αντιδρούν με το οξυγόνο

Πολλά συμπλέγματα και ηλεκτροχημικά ενεργά μόρια έχουν χρησιμοποιηθεί ως συνυποστρώματα συμπεριλαμβανομένου του φεροκενίου και των παραγώγων τους, το NADH, η βενζοκινόνη, το κυανό του μεθυλενίου, η υδροκινόνη, η θειονίνη και το πράσινο του μεθυλενίου [16, 18, 19, 20, 21, 22].

## 2.4 Εφαρμογές

Μερικές εφαρμογές που μπορεί να έχει ένας βιοαισθητήρας, συνοψίζονται κάτωθι:

- Κλινικές και διαγνωστικές: αναγνώριση γλυκόζης για έλεγχο επιπέδων γλυκόζης στο αίμα σε διαβητικά άτομα, γαλακτικού οξέος, ουρικού οξέος για την παρακολούθηση αναπνευστικών ανεπαρκειών, καρδιακών ανεπαρκειών, μεταβολικών διαταραχών κ.α., χοληστερόλης και κρεατίνης για τον προσδιορισμό ρηνικής και μυικής δυσλειτουργίας.
- Βιομηχανία τροφίμων και ποτών: για τον έλεγχο φρεσκάδας του τροφίμου και τη συγχέντρωση συγκεκριμένων συστατικών του, όπως υδρογονάνθρακες, σάκχαρα και άμυλο. Η ανάπτυξη βιοαισθητήρων στη βιομηχανία τροφίμων αποτελεί σχετικά καινούργιο πεδίο καθώς τα χαμηλά κέρδη παρά τη μεγάλη παραγωγή, δεν επέτρεπαν την επικέντρωση της έρευνας σε τέτοια ζητήματα.



- Περιβαλλοντικός έλεγχος: για τον έλεγχο συγκεκριμένων περιβαλλοντικών ρύπων για την επί τόπου ανάλυση δειγμάτων. Στο επίκεντρο της σχετικής έρευνας βρίσκονται οργανικά μόρια όπως παρασιτοκτόνα, υδρογονάνθρακες, βακτήρια, τοξικά αέρια και μέταλλα στο νερό [10].

## 2.5 Βασικά χαρακτηριστικά βιοαισθητήρων

Στα βασικά χαρακτηριστικά των βιοαισθητήρων υπάγονται

- η καλή επαναληψιμότητα, δηλαδή αν τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τον ίδιο βιοαισθητήρα στο ίδιο σύστημα είναι πολύ κοντινά μεταξύ τους
- η αναπαραγωγιμότητα, δηλαδή το μέτρο της διασποράς μεταξύ των αποτελεσμάτων ανεξάρτητων ελέγχων στο ίδιο δείγμα που εκτελούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες
- η εκλεκτικότητα, έτσι ώστε να υπάρχουν ελάχιστες έως καθόλου παρεμβολές από άλλες ουσίες
- η γραμμική περιοχή σήματος συναρτήσει της συγκέντρωσης της υπό προσδιορισμό ουσίας
- η ευαισθησία, δηλαδή η τιμή απόκρισης του ηλεκτροδίου ανά μονάδα συγκέντρωσης υποστρώματος
- το όριο ανίχνευσης
- η σταθερότητα χρήσης (operational stability)
- η σταθερότητα αποθήκευσης (storage stability)
- ο χρόνος απόκρισης (response time)

Οι παράγοντες βάσει των οποίων γίνεται η αριστοποίηση αποτελούν το pH, τη θερμοκρασία, το δυναμικό, την ποσότητα του ενζύμου που ακινητοποιείται στο ηλεκτρόδιο καθώς και τη συγκέντρωση του συνυποστρώματος σε περίπτωση που πρόκειται για βιοαισθητήρα 2ης γενιάς.

Η ενεργότητα του ενζύμου παρουσιάζει ένα μέγιστο σε συγκεκριμένο pH, πάνω από μία ορισμένη θερμοκρασία παρατηρείται μετουσίωση του ενζύμου, η ανιχνεύσιμη ηλεκτροχημική δράση παρουσιάζει βέλτιστο σε ορισμένο δυναμικό, ενώ πολύ μεγάλες ποσότητες τόσο ενζύμου όσο και συνυποστρώματος μπορεί ενδεχομένως να δράσουν παρεμποδιστικά στην απόκριση του ηλεκτροδίου [10, 23]

## 2.6 Μέθοδοι Ακίνητοποίησης

Οι μέθοδοι ακίνητοποίησης των βιολογικά ενεργών φορέων περιλαμβάνουν φυσικές και χημικές μεθόδους καθώς και συνδυασμό και των δύο. Η κύρια φυσική μέθοδος είναι η προσρόφηση σε αδιάλυτους σε νερό φορείς και ο εγκλωβισμός σε μη υδατοδιαλυτές πολυμερικές γέλες. Η χημική ακίνητοποίηση γίνεται με ομοιοπολική σύζευξη με φορείς ή με διαμοριακούς σταυροδεσμούς με βιομόρια.

Η προσρόφηση σε αδιάλυτους σε νερό φορείς είναι η πιο απλή μέθοδος για ακίνητοποίηση. Ένα υδατικό διάλυμα με το βιομορίο έρχεται σε επαφή με τον φορέα για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα. Κατόπιν τα μη προσροφημένα μόρια ξεπλένονται. Ο φορέας πρέπει να παρουσιάζει κάποια συγγένεια με το προς ακίνητοποίηση βιολογικό μόριο, το οποίο πρέπει να παραμένει ενεργό μετά την προσρόφηση. Ο φορέας επίσης δεν πρέπει να προσροφά ούτε τα προϊόντα της αντίδρασης ούτε παρεμποδιστές του βιοκαταλύτη.

Εφόσον η προσρόφηση πρωτεΐνης είναι μία αντιστρεπτή διεργασία, αλλαγές στο pH, την ιονική ισχύ τη συγκέντρωση του υποστρώματος, τη θερμοκρασία κλπ μπορεί να προκαλέσουν αποκοπή του βιομορίου από το φορέα. Σχετικά με τα πλεονεκτήματα της μεθόδου, εκτός από την απλότητα της διαδικασίας, δεν υπάρχει ανάγκη για μη φυσιολογικές συνθήκες σύζευξης ή χρήση χημικών τα οποία ενδεχομένως να προκαλέσουν βλάβη στη λειτουργία του ενζύμου [26]

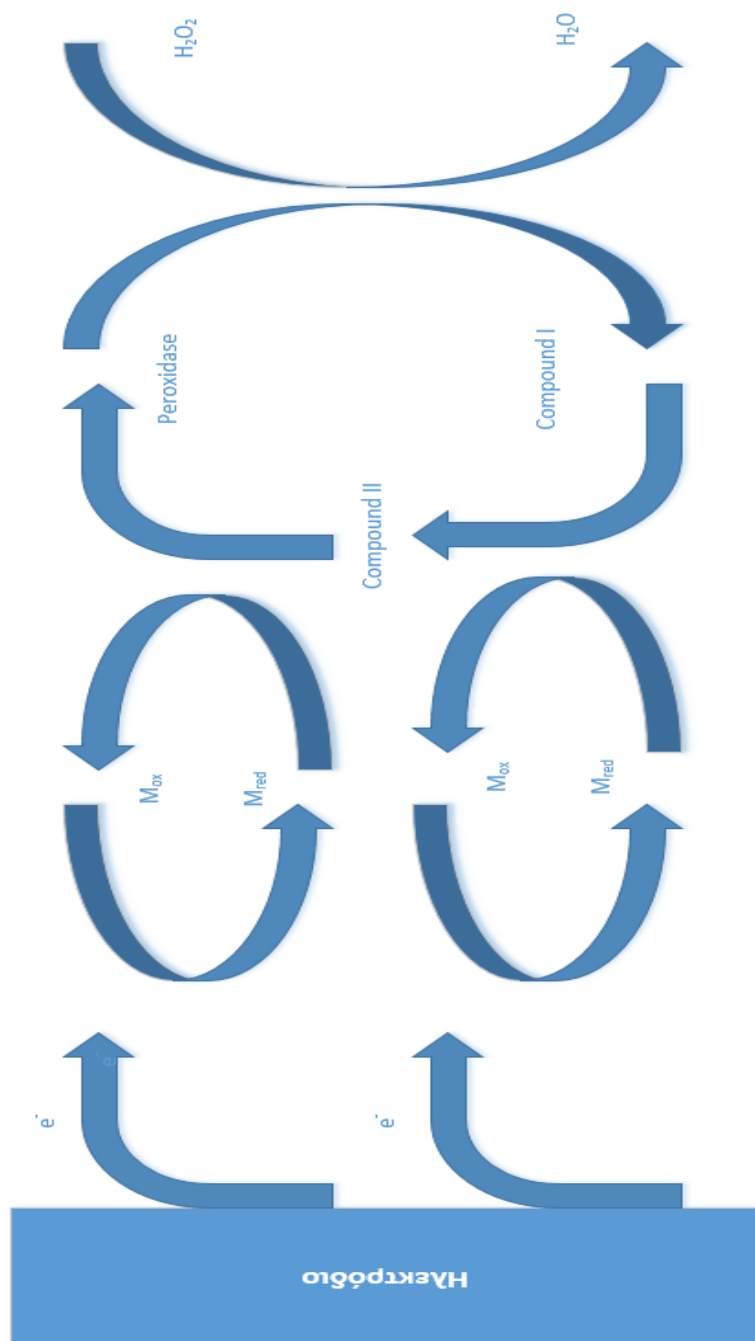
## 2.7 Βιοαισθητήρας Υπεροξειδίου

Η παρακολούθηση των επιπέδων του υπεροξειδίου του υδρογόνου έχει σημασία για περιβαλλοντικούς και ιατρικούς ρόλους καθώς και για διάφορα κομμάτια της βιομηχανίας. Σε μεγάλες συγκεντρώσεις ως προϊόν της βιομηχανίας και από σταθμούς ατομικής ενέργειας επηρεάζει το περιβάλλον. Επίσης χρησιμοποιείται για την απολύμανση πισινών και συσκευασιών τροφίμων και ποτών και επομένως πρέπει να μετρώνται οι υπολειμματικές συγκεντρώσεις του. Από την άλλη, το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι από τους πιο σημαντικούς παράγοντες για ενδείξεις οξειδωτικού στρες και είναι αναγνωρισμένο ως ένας από τους κύριους παράγοντες κινδύνου της επιδείνωσης νόσων που σχετίζονται με παθοφυσιολογικές επιπλοκές στο διαβήτη, αθηροσκληρώση, νεφρικές νόσους, καρκίνο και γήρανση. Εκτός από το οξειδωτικό στρες, το υπεροξείδιο του υδρογόνου είναι από τους πιο πολύτιμους δείκτες για φλεγμονώδεις διεργασίες και ένας μεσολαβητής για τον κυτταρικό θάνατο των των αποπτωτικών κυττάρων [27].

Η Horse Radish Peroxidase (HRP), η οποία ανήκει στην κατηγορία EC 1.11.1.7 και περιέχει αίμη, αποτελεί ένα από τα πιο ευρέως χρησιμοποιούμενα ένζυμα για την κατασκευή βιοαισθητήρων, λόγω της εμπορικής διαθεσιμότητάς τους και της πληθώρας πληροφοριών που αφορούν τη βιοχημική συμπεριφορά και τη δομή της. Η HRP μπορεί να οξειδώσει ποικιλία αρωματικών υποστρωμάτων όπως φαινολικές ουσίες και αρωματικές αμίνες και παρουσιάζει μεγάλη εκλεκτικότητα ως

προς το υπεροξειδίο του υδρογόνου. Οι παραπάνω ιδιότητες έχουν ληφθεί υπόψιν για την κατασκευή ενζυμικών ηλεκτροδίων [28].

Σχηματικά ο μηχανισμός βιοαισθητήρα υπεροξειδίου του υδρογόνου δεύτερης γενιάς παρουσιάζεται στον Σχήμα 2.2, όπου η υπεροξειδάση ανάγει το υπεροξειδίο του υδρογόνου σε νερό και μετατρέπεται σε Compound I και κατόπιν το Compound I ανάγεται διαδοχικά σε Compound II και την αρχική ανηγμένη μορφή του ενζύμου μέσω ανταλλαγής ηλεκτρονίων με την ανηγμένη μορφή του συνυποστρώματος και εν τέλει, η ανηγμένη μορφή του συνυποστρώματος οξειδώνεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.



Σχήμα 2.2: Σχηματική απεικόνιση δράσης HRP σε βιοαισθητήρα δεύτερης γενιάς για ανίχνευση υπεροξειδίου

## Κεφάλαιο 3

# Αυτοσυναρμοζόμενες Μονοστιβάδες

### 3.1 Γενικά Περί Αυτοσυναρμοζόμενων Μονοστιβάδων

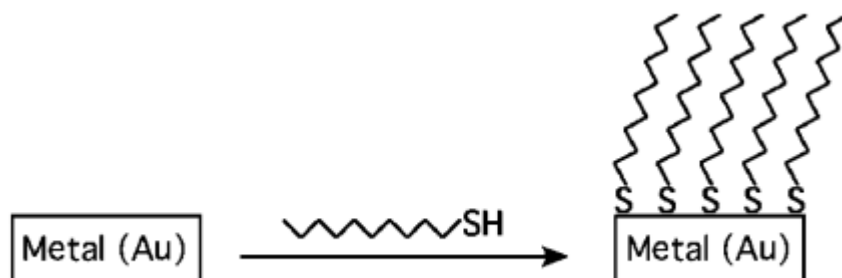
Για την ακινητοποίηση βιολογικών μορίων και την παρασκευή βιοαισθητήρων, μία συνήθης τακτική αποτελεί η τροποποίηση επιφανειών με αυτοσυναρμοζόμενες μονοστιβάδες, πάνω στις οποίες γίνεται η ακινητοποίηση.

Κατ' αρχάς ως αυτοσυναρμοζόμενες μονοστιβάδες (Self - Assembled Monolayers) ορίζονται οι διατεταγμένες μοριακές συναθροίσεις, οι οποίες δημιουργούνται αυθόρμητα μέσω προσρόφησης μίας επιφανειοδραστικής ουσίας σε ένα υπόστρωμα. Η ομάδα-κεφαλή των μορίων που προσροφούνται έχει συγκεκριμένη συγγένεια με τη στερεή επιφάνεια-υπόστρωμα[29, 30]

Το πιο γνωστό παράδειγμα αυτοσυναρμοζόμενου συστήματος αποτελεί το σύστημα θειόλης σε χρυσό. Οι n-αλκανοθειόλες είναι πλήρως κορεσμένες και αρκετά απλά μόρια από χημικής άποψης, και παρουσιάζουν όλα τα απαραίτητα χαρακτηριστικά και βαθμούς ελευθερίας μίας τυπικής αυτοσυναρμοζομένης μονοστιβάδας [30]. Συνήθως, οι περισσότερες από τις εμπορικά διαθέσιμες αλκανοθειόλες χρησιμοποιούνται χωρίς περαιτέρω προεργασία [31].

## 3.2 Προσρόφηση

Οι θειόλες προσροφούνται σε μεταλλικές επιφάνειες μέσω δεσμού μετάλλου-θειού όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.1. Για τη δημιουργία μίας αυτοσυναρμοζόμενης μονοστιβάδας, ένα καθαρό υπόστρωμα εμβαπτίζεται σε διάλυμα για 1-24h και τόσο η θερμοκρασία όσο και ο διαλύτης επηρεάζουν την πυκνότητα και τις αστοχίες του στρώματος [31]. Αυτή η πρακτική χρησιμοποιείται ευρέως και προέρχεται από τις αρχικές μελέτες των αυτοσυναρμοζόμενων μονοστιβάδων [32].



Σχήμα 3.1: Σχηματική αναπαράσταση αυτοσυναρμοζόμενης μονοστιβάδας αλκανοθειόλης σε μεταλλικό υπόστρωμα [31]

Η βασική μοριακή οργάνωση των αλκανοθειολών σε χρυσό (I I I) είναι  $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})R30^\circ$ . Έχει παρατηρηθεί μετά από επισκόπηση της δομής ότι αναπτύσσονται μικρές διαφορές στο ύψος των μορίων της μονοστιβάδας λόγω διαφορετικών γωνιών στροφής μεταξύ των αλυσίδων των αλκανοθειολών ή μικρών αποκλίσεων των θέσεων των ατόμων του θείου από την εξαγωνική συμμετρία [31].

Οι αλκανοθειόλες επίσης αλλάζουν τον προσανατολισμό τους συναρτήσει της κάλυψης. Όταν η κάλυψη είναι χαμηλή, τα μόρια αλκανοθειόλης δε δημιουργούν διατεταγμένες δομές, όμως, καθώς αυξάνεται, τα λεγόμενα pin striped patterns αρχίζουν να δημιουργούνται, όπου τα μόρια προσανατολίζονται παράλληλα στην επιφάνεια και οργανώνονται ώστε η μία θειόλη να «δείχνει» προς την άλλη. Σε επόμενη φάση εμφανίζονται ενδιάμεσες δομές, στις οποίες οι αλυσίδες στοιβάζονται με εκείνες στις επόμενες σειρές.

Στη συνέχεια, αυξανόμενης της κάλυψης, τα μόρια ευθυγραμμίζονται και δημιουργούν μία μοριακή  $(\sqrt{3} \times \sqrt{3})$  διευθέτηση [31]. Πυκνές επικαλύψεις λαμβάνονται γρήγορα στα πρώτα λεπτά, αλλά μία αργή διαδικασία επανοργάνωσης χρειάζεται ώρες για να μεγιστοποιηθεί η πυκνότητα των μορίων και να ελαχιστοποιηθούν οι ατέλειες των μονοστιβάδων [32].

Οι αυτοσυναρμοζόμενες μονοστιβάδες σχηματίζονται από άτομα ή μόρια που αποτελούν τη βασική μονάδα ή το δομικό λίθο του συστήματος. Στις αλκανοθειό-

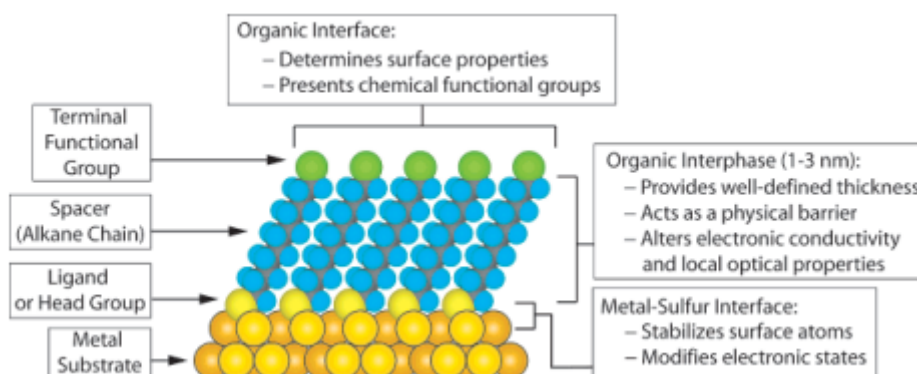
λες κάθε μόριο μπορεί να χωριστεί σε τρία διαφορετικά μέρη

- Την κεφαλή (head group)
- Το σκελετό/ Αλκυλική αλυσίδα (backbone, alkane chain)
- Την τελική λειτουργική ομάδα (terminal functional group)

Στις αλκανοθειόλες σε μεταλλική επιφάνεια, ένα άτομο S συνδέει την υδρογονανθρακική αλυσίδα στη μεταλλική επιφάνεια μέσω ομοιοπολικού δεσμού και οι δυνάμεις van der Waals μεταξύ των γειτονικών μορίων σταθεροποιούν τη δομή. Οι διάφορες γωνίες ορίζουν τον προσανατολισμό των μορίων ως προς το μεταλλικό υπόστρωμα. Η γωνία κλίσης (tilt angle) ορίζεται ως η γωνία μεταξύ του σκελετού και της επιφάνειας ενώ η γωνία στροφής (twist angle) περιγράφει την περιστροφή του δεσμού μεταξύ των ανθράκων της κύριας αλυσίδας της αλκανοθειόλης και της κλίσης της αλυσίδας [33].

Η αλκυλική αλυσίδα τελειώνει στην τερματική ομάδα, η οποία δίνει τις επιθυμητές λειτουργικές ιδιότητες στη μονοστιβάδα. Μια μικρή αλλαγή στην τερματική ομάδα είναι αρκετή για να αλλάξει τις φυσικοχημικές ιδιότητες της μονοστιβάδας. Οι τερματικές ομάδες  $\text{CH}_3$  καθιστούν την επιφάνεια υδρόφοβη, μεταλλόφοβη και αντικολητική, ενώ οι τερματικές ομάδες  $\text{COOH}$ ,  $\text{NH}_2$  και  $\text{OH}$  υδρόφιλη [33].

Υπάρχει μία ποικιλία παραγόντων που μπορούν να επηρεάσουν τη δομή της προκύπτουσας μονοστιβάδας και το ρυθμό διαμόρφωσής της όπως ο διαλύτης, η θερμοκρασία, η συγκέντρωση της προσροφώμενης ουσίας, ο χρόνος εμβάπτισης, η καθαρότητα της προσροφώμενης ουσίας, η καθαρότητα του υποστρώματος και το μήκος της αλυσίδας [32].



Σχήμα 3.2: Σχηματικό διάγραμμα ιδανικής αυτοσυναρμολοζόμενης μονοστιβάδας αλκανοθειόλης σε μονοκρυστάλλο σε επιφάνεια χρυσού (111). Επισημαίνονται η ανατομία και τα χαρακτηριστικά της μονοστιβάδας [32]

## 3.3 Προετοιμασία

Όσον αφορά στην προετοιμασία, ο πιο απλός τρόπος είναι η απλή εναπόθεση με εμφύπτιση σε διάλυμα η οποία συνοδεύεται και από χαμηλό κόστος. Με την προϋπόθεση ότι το υπόστρωμα έχει καθαριστεί σωστά, μία απλή εμφύπτιση στο αντίστοιχο διάλυμα για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, αρκεί για τη δημιουργία μονοστιβάδας [30]. Τυπικά, μερικά mM διαλύματος αλκανοθειόλης σε οργανικό διαλύτη (συνήθως εξάνιο ή αιθανόλη) χρησιμοποιούνται για τη δημιουργία αυτοσυναρμολογούμενης μονοστιβάδας [31].

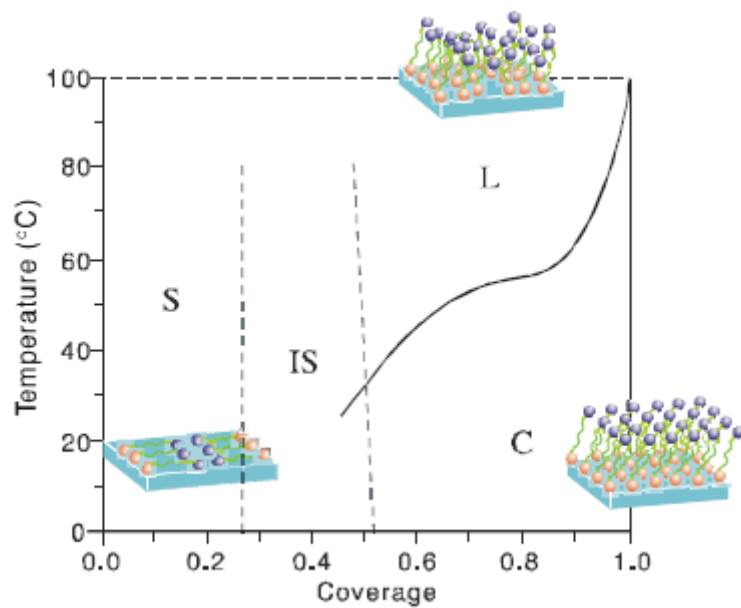
## 3.4 Κάλυψη

Η χημεία που περιλαμβάνεται στην προσρόφηση των θειολών στο χρυσό είναι το πιο ανιγματικό κομμάτι της διαδικασίας. Επειδή ο χρυσός δεν σχηματίζει οξείδια, η δημιουργία αυτοσυναρμολογούμενων μονοστιβάδων δεν περιπλέκεται από χημικές αντιδράσεις που ενδοχομένως ατικαθιστούν ή ανάγουν τα επιφανειακά οξείδια, αλλά οι λεπτομερείες για το δεσμό μετάλλου θείου και τη χωρική διεύθετηση των ομάδων θείου στην επιφάνεια του χρυσού είναι ακόμα και σήμερα αντιφατικές [32]. Επίσης, το που ακριβώς κατευθύνεται το υδρογόνο από την ομάδα S-H δεν έχει προσδιοριστεί επακριβώς. Η μία εκδοχή είναι να χάνονται μέσα στο διάλυμα υπό μορφή  $H_2$  ενώ μία άλλη η μετατροπή σε νερό ερχόμενο σε επαφή με το διαλυμένο οξυγόνο στο διάλυμα [34, 35].

Εν γένει είναι κοινώς αποδεκτό ότι για μικρή επικάλυψη τα μόρια των αλκανοθειολών έχουν μία «ξαπλωτή» (lying down) δομή και για υψηλή κάλυψη μια «όρθια» δομή, οι δομές για ενδιάμεσους βαθμούς επικάλυψης είναι ακόμα υπό συζήτηση. Το φυσικό όριο για την ξαπλωτή δομή είναι το 27% της πλήρους κάλυψης της όρθιας δομής (για μεγάλες αλυσίδες αυτό το όριο είναι μικρότερο). Η όρθια δομή από την άλλη δε δημιουργείται απευθείας μετά το προαναφερθέν 27% αλλά περίπου για πάνω από 50% της πλήρους κάλυψης. Στο ενδιάμεσο διάστημα παρατηρούνται διάφορες δομές που χαρακτηρίζονται από γωνίες κλίσης περίπου  $50^\circ$  ή αλυσίδες που ακουμπούν η μία στην άλλη. Αυτές οι ενδιάμεσες δομές εξαρτώνται αρκετά από τις συνθήκες προετοιμασίας αλλά δεν υπάρχει ξεκάθαρη εικόνα για την εξάρτηση αυτή [36].

Παρά το γεγονός ότι οι πρόδρομοι των μονοστιβάδων είναι αμφιφιλικά μόρια, οι αυτοσυναρμολογούμενες μονοστιβάδες είναι πιο σταθερές λόγω της συγκεκριμένης φύσης της χημειορόφησης. Συνεπώς, η προετοιμασία των μονοστιβάδων είναι αρκετά εύκολη και τα προκύπτοντα στρώματα είναι πιο σταθερά. Επίσης, η δυνατότητα της τροποποίησης της επιφάνειας των μονοστιβάδων, τα καθιστά αρκετά ελκυστικά για χρήση ως επιστρώση σε διάφορες εφαρμογές [37].





Σχήμα 3.3: Σχηματικό διάγραμμα φάσεων δεκανθειόλης σε χρυσό (111) ως προς θερμοκρασία και ποσοστό κάλυψης. Οι διαφορετικές περιοχές και φάσεις υποδεικνύονται ως S (stripes), IS(intermediate structures), C (c(4x2)) και L (liquid). Οι διακεκομμένες γραμμές υποδεικνύουν όρια φάσεων των IS, οι οποίες δεν έχουν διερευνηθεί πλήρως. Η γραμμή μεταξύ C και L (melting transition) παρουσιάζει μία οξεία αύξηση κοντά στην πλήρη κάλυψη [36].

### 3.5 Χρήσεις και πλεονεκτήματα

Εν γένει, οι αυτοσυναρμοζόμενες μονοστιβάδες χρησιμοποιούνται ευρέως για την παρεμπόδιση πρόσβασης μορίων του διαλύτη σε επιφάνεια. Επίσης, η χρήση αυτοσυναρμοζόμενων μονοστιβάδων χρησιμοποιείται ευρέως για την τροποποίηση επιφανειών ηλεκτροδίων με διάφορα μόρια για τη δημιουργία αισθητήρων, επηρεάζοντας την εκλεκτικότητα του ηλεκτροδίου [37].

Μερικοί λόγοι για τους οποίους η χρήση αυτοσυναρμοζόμενων μονοστιβάδων έχει κερδίσει έδαφος στην επιστημονική έρευνα είναι:

- Η ευκολία προετοιμασίας
- Η δυνατότητα τροποποίησης των επιφανειακών ιδιοτήτων των αυτοσυναρμοζόμενων μορίων
- Η χρήση των αυτοσυναρμοζόμενων μορίων ως υπόβαθρο για τη δημιουργία πιο περίπλοκων δομών [30].

Οι λόγοι που χρησιμοποιείται κυρίως ο χρυσός στα μελετούμενα συστήματα αυτοσυναρμοζόμενων μονοστιβάδων είναι η διαθεσιμότητά του, η ευκολία εναπόθεσης της μονοστιβάδας πάνω σε αυτόν και η σχετική αδράνειά του. Οι θειόλες προσροφούνται στο χρυσό με υψηλή συγγένεια και δεν πραγματοποιείται κάποια ασυνήθιστη αντίδραση. Επίσης, ο χρυσός είναι συμβατός με τα κύτταρα χωρίς να παρουσιάζει κάποια τοξικότητα όταν έρχεται σε επαφή με αυτά. Οι αυτοσυναρμοζόμενες μονοστιβάδες που σχηματίζονται από θειόλες και χρυσό είναι σταθερές για χρονικές περιόδους που διαρκούν από μερικές μέρες έως βδομάδες όταν έρχονται σε επαφή με περίπλοκα υγρά μέσα που χρησιμοποιούνται για τη μελέτη κυττάρων [32]. Το κύριο μειονέκτημα των αυτοσυναρμοζόμενων μονοστιβάδων είναι η απαίτηση συγκεκριμένης λειτουργικής μονάδας η οποία θα οδηγήσει τα μόρια στο υπόστρωμα [37].

### 3.6 Κινητική Ανάπτυξης

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι η κινητική ανάπτυξη της μονοστιβάδας από διάλυμα σε θερμοκρασίες δωματίου ακολουθεί προσρόφηση βάσει κινητικής πρώτης τάξης Lagmuir και δίνεται από τη σχέση [38]

$$\frac{d\theta}{dt} = k(1 - \theta) \quad (3.1)$$

$$\theta = 1 - e^{-kt} \quad (3.2)$$

Όπου  $\theta$  κλασματική μονομοριακή επικάλυψη και  $k$  η κινητική σταθερά της χημειορόφησης.

Σε υψηλές θερμοκρασίες και χαμηλούς ρυθμούς πρόσκρουσης, ο ρυθμός δημιουργίας του στρώματος αυξάνει γραμμικά με το ρυθμό πρόσκρουσης της θειόλης. Κάθε τέτοια μη γραμμική σχέση δίνει μια συνεργιστική διεργασία προσρόφησης, όπου απαιτείται παραπάνω του ενός μορίου για την προσρόφηση.

Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι η προσρόφηση των θειολών σε μεταλλική επιφάνεια δεν επηρεάζεται από φαινόμενα όπως η πυρήνωση [38].

Παρά τις εντατικές προσπάθειες ποσοτικοποίησης των κινητικών μεγεθών της προσρόφησης των αυτοσυναρμοζόμενων μονοστιβάδων σε μεταλλικά υποστρώματα, τα αποτελέσματα παρουσιάζουν σημαντική διαφοροποίηση μεταξύ των διάφορων ερευνητικών ομάδων [36]. Οι ιδιότητες των μονοστιβάδων αλκανοθειολών με μέγεθος αλυσίδας με αριθμό μεθυλίων παραπάνω από 8 είναι πιο σταθερές ενώ για πιο κοντές αλυσίδες παρατηρείται μεγαλύτερη αταξία [39]. Όσον αφορά την εξάρτηση της ταχύτητας προσρόφησης από το μέγεθος της αλυσίδας, τα δεδομένα της βιβλιογραφίας φαίνεται να έρχονται σε αντίθεση με τη γενική άποψη που επικρατεί να είναι ότι αυξανόμενου του μεγέθους της αλυσίδας, ο ρυθμός προσρόφησης της μονοστιβάδας στο μεταλλικό υπόστρωμα αυξάνεται [39].

### 3.6. Κινητική Ανάπτυξης

---

## Κεφάλαιο 4

# Βολταμμετρία

Με σκοπό τη μελέτη της κινητικής ενός οξειδοαναγωγικού συστήματος, μία πολύ χρήσιμη μέθοδος είναι αυτή της κυκλικής βολταμμετρίας, μέσω της οποίας μπορεί να γίνει και εξαγωγή κινητικών σταθερών ενζυμικής δράσης οξειδοαναγωγικών ενζύμων.

### 4.1 Αντιστρεπτότητα Ηλεκτροχημικής Αντίδρασης

Για ηλεκτροχημικό σύστημα που λαμβάνει χώρα οξειδοαναγωγή της μορφής:



όταν το σύστημα βρίσκεται σε θερμοδυναμική ισορροπία τόσο η αντίδραση προς τα δεξιά όσο και η αντίδραση προς τα αριστερά γίνονται με τον ίδιο ρυθμό και το ρεύμα που αντιστοιχεί στην αναγωγή των χημικών ειδών σε οξειδωμένη μορφή,  $\text{Ox}$  (καθοδικό ρεύμα) και το ρεύμα που αντιστοιχεί στην οξείδωση των χημικών ειδών σε ανηγμένη μορφή  $\text{Red}$  (ανοδικό ρεύμα) είναι ετερόσημα και κατ'απόλυτη τιμή ίσα. Άρα το ρεύμα είναι σε ισορροπία και το συνολικό ρεύμα που ρέει στο σύστημα είναι μηδέν.

Στη διεπιφάνεια μεταξύ του μεταλλικού ηλεκτροδίου και του ηλεκτρολυτικού διαλύματος λαμβάνει χώρα διαχωρισμός φορτίου που οδηγεί στην εμφάνιση πτώσης τάσης μεταξύ μετάλλου και ηλεκτρολυτικού διαλύματος, η οποία ονομάζεται δυναμικό του ηλεκτροδίου (ημιστοιχείου) και συμβολίζεται με  $E_{\text{eq}}$  και μπορεί να μετρηθεί απλά εμβαπτίζοντας ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς στο ηλεκτρολυτικό διάλυμα και μετρώντας τη διαφορά δυναμικού μεταξύ αυτού και ηλεκτροδίου που λαμβάνει χώρα η ηλεκτροχημική αντίδραση. Για θερμοδυναμική ισορροπία, το δυναμικό δίνεται από την εξίσωση του Nernst

#### 4.1. Αντιστρεπτότητα Ηλεκτροχημικής Αντίδρασης

$$E_{\text{eq}} = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{\text{O}}^*}{C_{\text{R}}^*} \quad (4.2)$$

όπου  $C_{\text{O}}^*$  και  $C_{\text{R}}^*$  οι συγκεντρώσεις των Ox και Red αντίστοιχα,  $R$  η σταθερά των αερίων,  $n$  ο αριθμός των μεταφερόμενων ηλεκτρονίων και  $E^{\circ}$  το πρότυπο δυναμικό.

Εφαρμόζοντας στο παραπάνω σύστημα δυναμικό αρνητικότερο του δυναμικού ισορροπίας, ευνοείται η καθοδική δράση (αναγωγή) και επομένως η ταχύτητα της αναγωγής θα είναι μεγαλύτερη από αυτήν της οξειδωσης, ενώ για δυναμικό θετικότερο του δυναμικού ισορροπίας, το αποτέλεσμα θα είναι το ακριβώς αντίθετο. Για την πρώτη περίπτωση, το ρεύμα που αντιστοιχεί στην αναγωγική δράση θα είναι αρνητικό και κατ' απόλυτη τιμή μεγαλύτερο από το ρεύμα που αντιστοιχεί στην οξειδωση και συνεπώς η ολική πυκνότητα ρεύματος  $i$  θα έχει ορισμένη αρνητική τιμή. Εν προκειμένω, δεν ισχύει ο νόμος του Nernst και το ηλεκτρικό ρεύμα υπό τη μορφή ροής ηλεκτρονίων ρέει στους μεταλλικούς αγωγούς και ιοντικό ρεύμα, υπό μορφή ιόντων ρέει στο ιοντικό διάλυμα. Επίσης η συγκέντρωση των Ox μειώνεται ενώ των Red αυξάνεται. Εν τέλει, η εξάρτηση της πυκνότητας ρεύματος  $i$  από το δυναμικό  $E$  που εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο δίνεται από τη σχέση

$$i = i_0 \left[ \frac{C_{\text{R}}}{C_{\text{R}}^*} e^{\frac{(1-a)nF}{RT}(E-E_{\text{eq}})} - \frac{C_{\text{O}}}{C_{\text{O}}^*} e^{-\frac{anF}{RT}(E-E_{\text{eq}})} \right] \quad (4.3)$$

όπου  $C_{\text{O}}$  και  $C_{\text{R}}$  οι συγκεντρώσεις των Ox και Red αντίστοιχα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου,  $i_0$  η πυκνότητα ρεύματος ανταλλαγής και  $a$  ο παράγοντας συμμετρίας. Για θερμοδυναμική ισορροπία  $i=0$

Για  $i \ll i_0$  προκύπτει

$$\frac{C_{\text{O}}}{C_{\text{R}}} = \frac{C_{\text{O}}^*}{C_{\text{R}}^*} e^{\frac{nF}{RT}(E-E_{\text{eq}})} \quad (4.4)$$

η οποία σχέση μπορεί να μετασχηματιστεί στην

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{\text{O}}}{C_{\text{R}}} \quad (4.5)$$

Συμπερασματικά η σχέση μεταξύ εφαρμοζόμενου δυναμικού  $E$  και των συγκεντρώσεων στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου διέπονται από μία σχέση που είναι ίδια με την εξίσωση Nernst στην ισορροπία, με τη διαφορά ότι  $C_{\text{O}}$  και  $C_{\text{R}}$  είναι διαφορετικά από  $C_{\text{O}}^*$  και  $C_{\text{R}}^*$ , και σε αυτήν την περίπτωση του σύστημα καλείται αντιστρεπτό ή Nερνστιανό.

### 4.1.1 Κριτήρια Αντιστρεπτότητας

Σε περίπτωση που το δυναμικό μεταβάλλεται κυκλικά από μία αρχική τιμή σε μία τελική και πάλι πίσω στην αρχική, με σταθερή ταχύτητα σάρωσης, για νερνοστιανό σύστημα, τόσο κατά την ανοδική όσο και κατά την καθοδική σάρωση, καταγράφονται συμμετρικές καμπύλες κάθε μία από τις οποίες παρουσιάζει ακρότατο σε συγκεκριμένες τιμές δυναμικού  $E_{p,a}$  και  $E_{p,c}$  αντίστοιχα. Μπορεί ναδειχθεί ότι το σύστημα είναι αντιστρεπτό αν ισχύει

$$\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,c} = \frac{58}{n} \text{ mV} \quad (4.6)$$

καθώς και ότι το πρότυπο δυναμικό δίνεται από τη σχέση

$$E^\circ = \frac{E_{p,a} + E_{p,c}}{2} \quad (4.7)$$

## 4.2 Περιπτώσεις Κυκλικών Βολταμμογραφημάτων

### 4.2.1 Ακίνητοποιημένο Ένζυμο σε Επιφάνεια Ηλεκτροδίου

Για απλή αντιστρεπτή δράση της μορφής



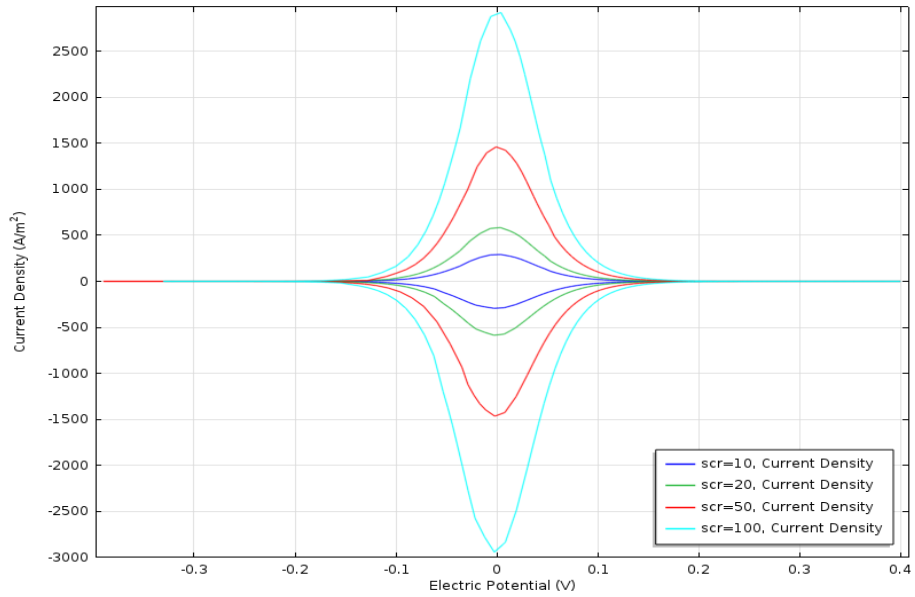
όπου  $E_{ox}$  και  $E_{red}$  η οξειδωμένη και η ανηγμένη μορφή του ενζύμου αντίστοιχα και  $k_{el}$  η ηλεκτροχημική κινητική σταθερά της δράσης, η σχέση που δίνει την εξάρτηση ρεύματος δυναμικού δίνεται από τη σχέση

$$i = F S \Gamma^\circ \frac{\exp \frac{F}{RT} (E - E^\circ)}{(1 + \exp \frac{F}{RT} (E - E^\circ))^2} \quad (4.9)$$

όπου  $i$  η πυκνότητα ρεύματος που διαρρέει την επιφάνεια του ηλεκτροδίου,  $F$  η σταθερά του Faraday,  $S$  η επιφάνεια του ηλεκτροδίου,  $\Gamma^\circ$  τα ολικά μόρια ενζύμου σε moles ανά μονάδα επιφάνειας ηλεκτροδίου,  $v$  ο ρυθμός σάρωσης,  $T$  η απόλυτη θερμοκρασία,  $E$  το δυναμικό του ηλεκτροδίου και  $E^\circ$  το πρότυπο δυναμικό της οξειδοαναγωγής του ενζύμου.

Στη συγκεκριμένη περίπτωση η απόκριση ρεύματος είναι συμμετρική γύρω από τον άξονα των δυναμικών, το οποίο υποδεικνύει ξεκάθαρα αντιστρεπτότητα του

#### 4.2. Περίπτώσεις Κυκλικών Βολταμογραφήματων



Σχήμα 4.1: Τυπικά αντιστρεπτά κυκλικά βολταμογραφήματα στην περίπτωση ακινητοποιημένου σε ηλεκτρόδιο οξειδοαναγωγικού είδους για ταχύτητες σάρωσης 10, 20, 50 και 100 mV/s

συστήματος, όπως αυτή έχει οριστεί παραπάνω (Σχήμα 4.1).

Για αντιστρεπτά συστήματα, η ένταση της κορυφής της πυκνότητας ρεύματος κατά τη σάρωση δίνεται από τη σχέση

$$i_p = FSI^* \frac{Fv}{4RT} \quad (4.10)$$

και το δυναμικό στο οποίο αντιστοιχεί η κορυφή αυτή, ταυτίζεται με το πρότυπο δυναμικό του ακινητοποιημένου οξειδοαναγωγικού ενζύμου.

Για μη αντιστρεπτή δράση η σχέση έντασης πυκνότητας ρεύματος από την επιφανειακή συγκέντρωση του ενζύμου δίνεται από τη σχέση

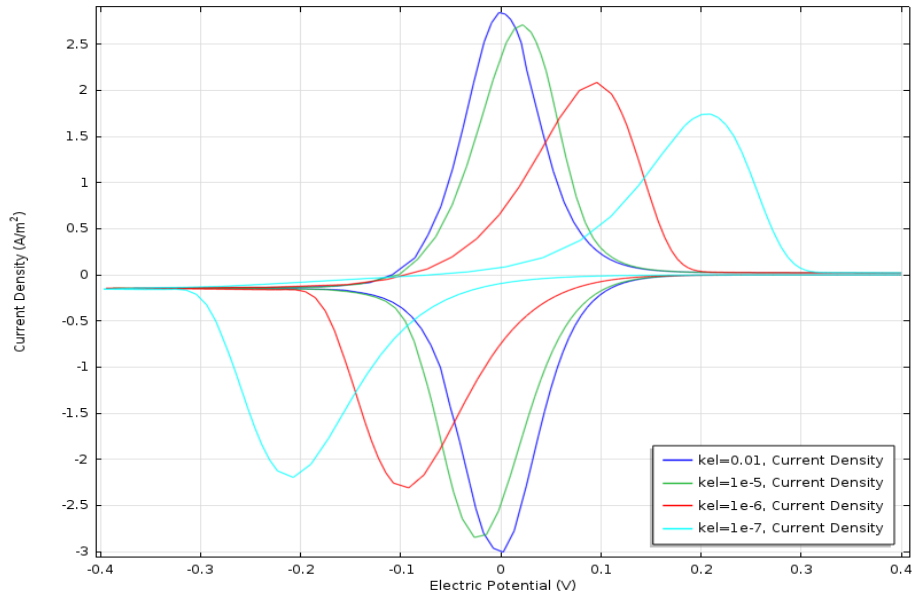
$$i_p = 0.368aFSI^* \frac{Fv}{RT} \quad (4.11)$$

όπου  $a$  ο παράγοντας συμμετρίας του κυκλικού βολταμογραφήματος. Ο παράγοντας συμμετρίας μπορεί να υπολογιστεί από τη σχέση

$$\Delta E_{p/2} = 2.46 \frac{RT}{aF} \quad (4.12)$$

Καθώς το σύστημα απομακρύνεται από την αντιστρεπτότητα κατά την οποία το δυναμικό της κορυφής της πυκνότητας ρεύματος αντιστοιχεί και στο πρότυπο δυ-





Σχήμα 4.2: Τυπικά μη αντιστρεπτά κυκλικά βολταμογραφήματα στην περίπτωση ακινητοποιημένου σε ηλεκτρόδιο οξειδοαναγωγικού είδους για διαφορετικές ηλεκτροχημικές κινητικές σταθερές  $k_{el}$ .

ναμικό της δράσης, η καθοδική κορυφή οδηγείται προς αρνητικότερα δυναμικά ενώ η ανοδική προς θετικότερα (Σχήμα 4.2) σύμφωνα με τις σχέσεις

$$E_{p,c} = E^\circ + \frac{RT}{aF} \ln \frac{RT}{aF} \frac{k_s}{v} \quad (4.13)$$

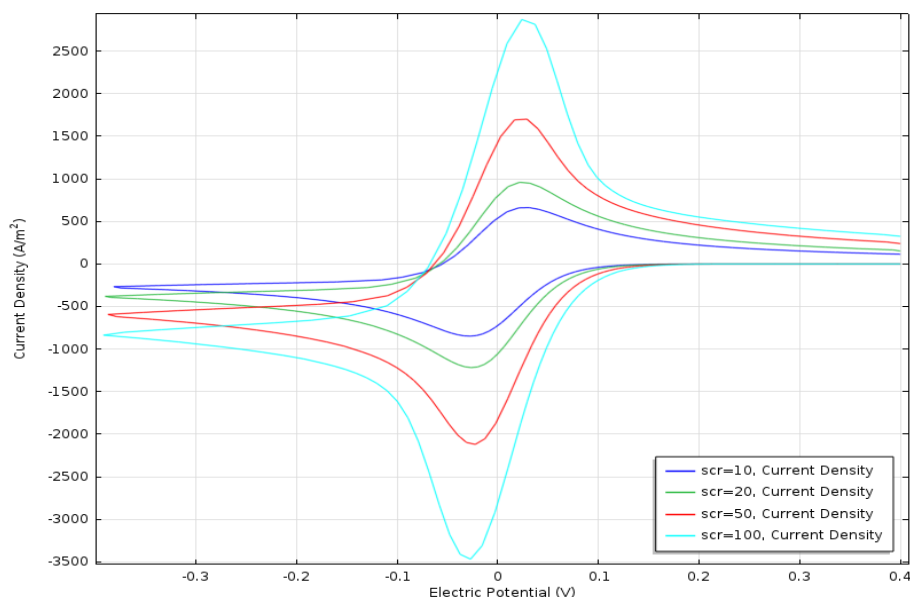
$$E_{a,c} = E^\circ + \frac{RT}{(1-a)F} \ln \frac{RT}{aF} \frac{k_s}{v} \quad (4.14)$$

όπου,  $E_{p,c}$  το δυναμικό που αντιστοιχεί στην καθοδική κορυφή πυκνότητας ρεύματος του κυκλικού βολταμογραφήματος ενώ  $E_{a,c}$  το δυναμικό που αντιστοιχεί στην ανοδική κορυφή πυκνότητας ρεύματος του κυκλικού βολταμογραφήματος [40].

#### 4.2.2 Ένζυμο Ελεύθερο στο Διάλυμα

Στη συγκεκριμένη περίπτωση στην ανάλυση των κυκλικών βολταμογραφημάτων για την οξειδοαναγωγή του ενζύμου (σχέση 4.8), πρέπει να ληφθεί υπόψιν και η διάχυση.

#### 4.2. Περιπτώσεις Κυκλικών Βολταμμογραφήματων



Σχήμα 4.3: Τυπικά αντιστρεπτά κυκλικά βολταμμογραφήματα στην περίπτωση οξειδοαναγωγικού είδους στον κύριο όγκο του διαλύματος για ταχύτητες σάρωσης 10, 20, 50 και 100 mV/s

Στην περίπτωση που η δράση είναι αντιστρεπτή, η πυκνότητα ρεύματος που αντιστοιχεί στο δυναμικό όπου παρουσιάζεται κορυφή δίνεται από τη σχέση

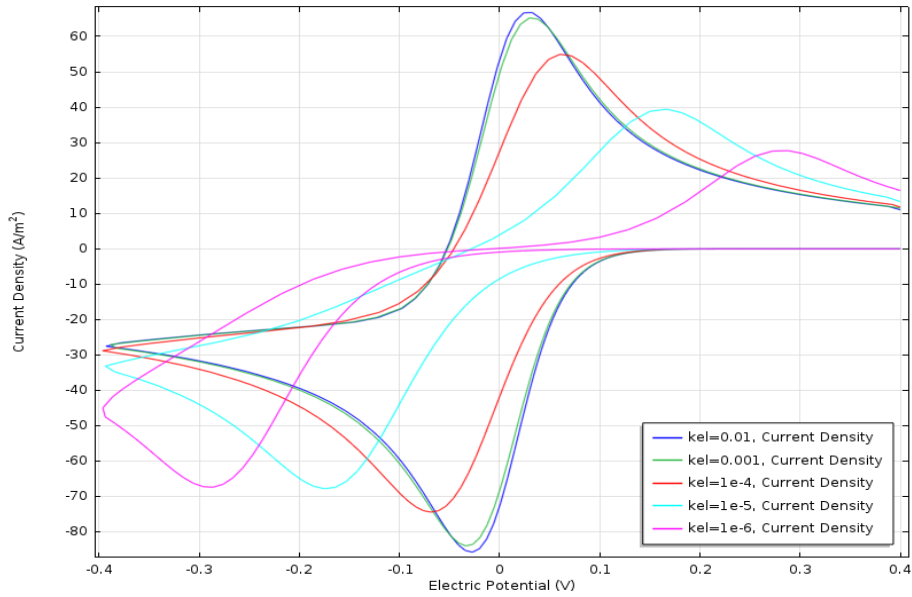
$$i_p = 0.446FSC^{\circ}\sqrt{D}\sqrt{\frac{FV}{RT}} \quad (4.15)$$

και το δυναμικό όπου εμφανίζεται κορυφή πυκνότητας ρεύματος, συνδέεται με το πρότυπο δυναμικό μέσω της σχέσης

$$E_p = E^{\circ} - 1.11\frac{RT}{F} \quad (4.16)$$

Στο Σχήμα 4.3 παρουσιάζονται τυπικά αντιστρεπτά κυκλικά βολταμμογραφήματα για οξειδοαναγωγικό είδος στον κύριο όγκο του διαλύματος.

Καθώς το σύστημα απομακρύνεται από την αντιστρεπτότητα, όπου η κορυφή πλησιάζει το πρότυπο δυναμικό και είναι ανεξάρτητη του ρυθμού σάρωσης, η καθοδική κορυφή οδεύει προς πιο αρνητικά δυναμικά ενώ η ανοδική προς θετικότερα (Σχήμα 4.4) σύμφωνα με τις σχέσεις



Σχήμα 4.4: Τυπικά μη αντιστρεπτά κυκλικά βολταμμογραφήματα στην περίπτωση οξειδοαναγωγικού είδους στον κύριο όγκο του διαλύματος για διαφορετικές ηλεκτροχημικές κινητικές σταθερές

$$E_{p,c} = E^\circ - 0.78 \frac{RT}{aF} + \frac{RT}{aF} \ln(k_s \sqrt{\frac{RT}{aFvD}}) \quad (4.17)$$

$$E_{p,a} = E^\circ + 0.78 \frac{RT}{aF} + \frac{RT}{(1-a)F} \ln(k_s \sqrt{\frac{RT}{(1-a)FvD}}) \quad (4.18)$$

Από τις 2 τελευταίες σχέσεις, αν υπάρχει γνώση του πρότυπου δυναμικού  $E^\circ$ , μπορεί να βρεθεί η σταθερά  $k_s$ .

Επίσης, απουσία αντιστρεπτότητας για οξειδοαναγωγικό ελεύθερο στο διάλυμα, ισχύει η σχέση

$$E_{p/2,c} - E_{p,c} = 1.857 \frac{RT}{aF} \quad (4.19)$$

όπου  $E_{p/2,c}$  το δυναμικό που αντιστοιχεί στο μισό της έντασης της καθοδικής κορυφής της πυκνότητας ρεύματος του κυκλικού βολταμμογραφήματος[40].

### 4.3 Χρήση Κυκλικής Βολταμετρίας για Μελέτη Ομογενούς Ενζυμικής Κατάλυσης

Η μελέτη ομογενούς ενζυμικής κατάλυσης μέσω κυκλικής βολταμετρίας μπορεί να επιτευχθεί με τη χρήση συνυποστρώματος το οποίο θα έχει αντιστρεπτή οξειδοαναγωγική δράση, όπως αυτή έχει οριστεί παραπάνω, και υπό την προϋπόθεση ότι δεν υπάρχει άμεση ανταλλαγή ηλεκτρονίων του ενζύμου με τον ηλεκτροδίο έτσι ώστε να παρεμποδίζεται η διαδικασία. Η αντιστρεπτότητα της δράσης του συνυποστρώματος εξασφαλίζει ότι η κινητική του δε θα επηρεάζει την εξαγωγή των κινητικών σταθερών του ενζύμου, καθώς η ενζυμική δράση θα είναι ο μοναδικός παράγοντας πέραν της διαχύσεως που θα επηρεάζει το ρυθμό της διεργασίας. Για τον μηχανισμό που παρουσιάζεται ακολούθως που αναπαριστά εν συντομία την κατάλυση της αντίδρασης ενός υποστρώματος S από ένζυμο  $E_1$  με κινητική σταθερά  $k_e$  προς προϊόν R στον κύριο όγκο του διαλύματος, με τη βοήθεια συνυποστρώματος P το οποίο παράγεται από την αναγωγή της οξειδωμένης του μορφής Q η οποία γίνεται διαρκώς στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

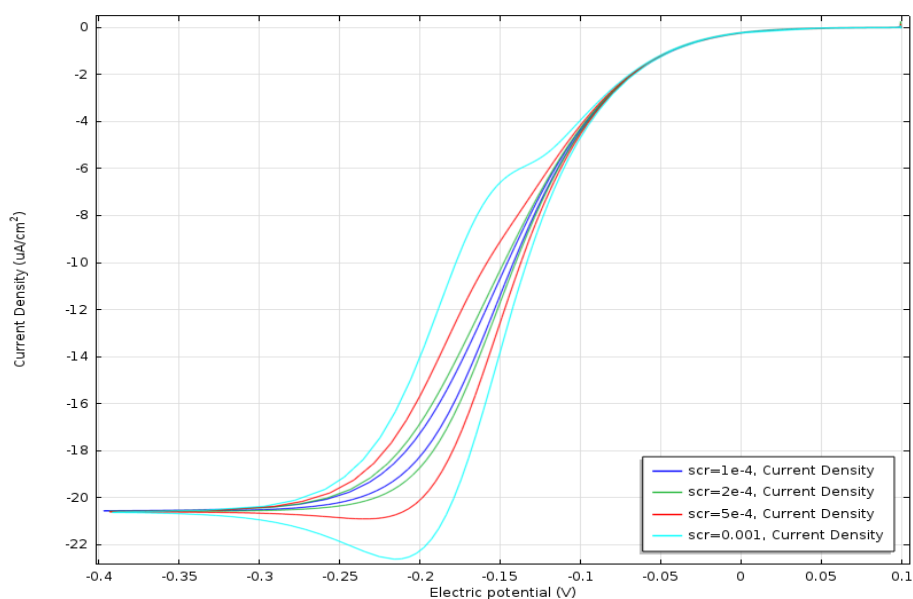


Για την περίπτωση που η συγκέντρωση της οξειδωμένης μορφής του συνυποστρώματος στον κύριο όγκο του διαλύματος είναι κατά πολύ μικρότερη από τη συγκέντρωση του υποστρώματος ώστε ο λόγος  $\gamma = c_S^0/c_Q^0$  να είναι πολύ μεγαλύτερος από τη μονάδα και ο λόγος της κινητικής σταθεράς  $k_e$  προς την ταχύτητα σάρωσης  $v$ , για μικρές ταχύτητες σάρωσης να είναι πολύ μεγάλος, τα κυκλικά βολταμογραφήματα που προκύπτουν αντιστοιχούν σε σιγμοειδείς καμπύλες όπου το καθοδικό ρεύμα καταλήγει εν τέλει σε πλατώ τα οποία είναι ανεξάρτητα της ταχύτητας σάρωσης και βάσει αυτών μπορεί να γίνει εξαγωγή της κινητικής σταθεράς κάνοντας κατάλληλη προσαρμογή στην εξίσωση που περιγράφει τις σιγμοειδείς καμπύλες αυτές. Μια εξίσωση που περιγράφει τα πλατώ πυκνότητας ρεύματος που περιγράφουν τον ανωτέρω (συμπτηγμένο) μηχανισμό είναι η

$$i_p = 0.466Fc_Q^0\sqrt{D}\sqrt{k_e c_S^0} \quad (4.22)$$

όπου  $F$  η σταθερά του Faraday,  $c_Q^0$  η συγκέντρωση της οξειδωμένης μορφής του συνυποστρώματος στον κύριο όγκο του διαλύματος,  $D$  ο συντελεστής διάχυσης της οξειδωμένης μορφής του συνυποστρώματος (ο οποίος λαμβάνεται ίδιος με τον συντελεστή διάχυσης της ανηγμένης μορφής του),  $k_e$  η κινητική σταθερά της κατάλυσης και  $c_S^0$  η συγκέντρωση του υποστρώματος στον κύριο όγκο του διαλύματος.

Ανάλογα με το μηχανισμό που θα επιλεγεί για την ανάλυση, το μαθηματικό



Σχήμα 4.5: Τυπικά κυκλικά βολταμογραφήματα στην περίπτωση της ομογενούς ενζυμικής κατάλυσης για ταχύτητες σάρωσης 1, 0.5, 0.2 και 0.1 mV/s

πρότυπο που περιγράφει τις σιγμοειδείς καμπύλες και από το οποίο πρέπει να εξαχθούν οι επιμέρους κινητικές σταθερές διαφέρει [40].

Στο Σχήμα 4.5 παρουσιάζονται τυπικές σιγμοειδείς καμπύλες για κυκλική βολταμετρία σε περίπτωση ομογενούς ενζυμικής κατάλυσης για ταχύτητες σάρωσης 1, 0.5, 0.2 και 0.1 mV/s

#### 4.3. Χρήση Κυκλικής Βολταμετρίας για Μελέτη Ομογενούς Ενζυμικής Κατάλυσης

---

## Μέρος II

# Ηλεκτροχημική Μελέτη





## Κεφάλαιο 5

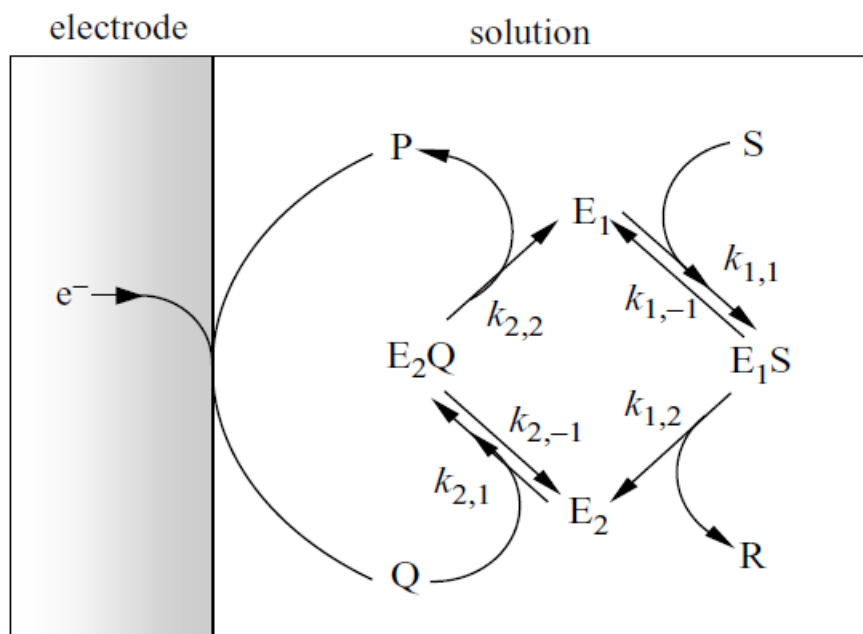
# Μελέτη Κινητικής

### 5.1 Μηχανισμός Κινητικής Υπεροξειδάσης

Με απώτερο σκοπό τη μελέτη της κινητικής της υπεροξειδάσης *MtPerII* με το  $\text{H}_2\text{O}_2$  με συνυπόστρωμα το κυανό του μεθυλενίου, επιλέγεται ο μηχανισμός ο οποίος συνοψίζεται στις σχέσεις 5.1-5.5, αγνοώντας το στάδιο της απενεργοποίησης του ενζύμου προς  $\text{E}_3$  καθώς θεωρείται ότι δε χρησιμοποιούνται τόσο μεγάλες ποσότητες  $\text{H}_2\text{O}_2$  έτσι ώστε να προκύπτει η μορφή αυτή.



$\text{E}_1$ ,  $\text{E}_2$  είναι η ανηγμένη και η οξειδωμένη μορφή του ενζύμου αντίστοιχα,  $\text{S}$  το υπεροξειδίο του υδρογόνου,  $\text{E}_1\text{S}$  το σύμπλοκο μεταξύ ενζύμου και υπεροξειδίου,  $\text{Q}$  η ανηγμένη μορφή του κυανού του μεθυλενίου και  $\text{P}$  η οξειδωμένη του και  $\text{E}_2\text{Q}$



Σχήμα 5.1: Σχηματική αναπαράσταση μηχανισμού ping-pong όπου S το υπόστρωμα, R το προϊόν, P η ανηγμένη μορφή του συνυποστρώματος (mediator), Q η οξειδωμένη μορφή του συνυποστρώματος (mediator), E<sub>1</sub> η ανηγμένη μορφή του ενζύμου και E<sub>2</sub> η οξειδωμένη μορφή του ενζύμου [40]

το σύμπλοκο μεταξύ της ανηγμένης μορφής του κυανού του μεθυλενίου και της οξειδωμένης μορφής του ενζύμου [40, 41, 42]. Πρόκειται για μηχανισμό ping-pong ο οποίος φαίνεται στη Σχήμα 5.1.

Με την παραδοχή ότι ισχύει η προσέγγιση της σταθερής κατάστασης, εξάγονται οι κινητικές σταθερές που εκφράζονται από τις σχέσεις 5.6 και 5.7 και και σταθερές Michaelis-Menten που εκφράζονται από τις σχέσεις 5.8 και 5.9, όπου  $K_{1,M}$  η σταθερά Michaelis-Menten του ενζύμου για το υπεροξειδίο και  $K_{2,M}$  αντίστοιχη σταθερά του ενζύμου για το συνυπόστρωμα.

$$k_1 = \frac{k_{1,1}k_{1,2}}{k_{1,-1} + k_{1,2}} \quad (5.6)$$

$$k_2 = \frac{k_{2,1}k_{2,2}}{k_{2,-1} + k_{2,2}} \quad (5.7)$$

$$K_{1,M} = \frac{k_{1,-1} + k_{1,2}}{k_{1,1}} \quad (5.8)$$

$$K_{2,M} = \frac{k_{2,-1} + k_{2,2}}{k_{2,1}} \quad (5.9)$$

Για την απλοποίηση του συστήματος, για την αντίδραση της μορφής  $E_2$  του ενζύμου με το συνυπόστρωμα, θεωρείται αρχικά ένα στάδιο σύμφωνα με την εξίσωση 5.10



Οι κινητικές μετρήσεις με τη χρήση ηλεκτροχημικών τεχνικών βασίζονται στον προσδιορισμό των καταλυτικών ρευμάτων που λαμβάνονται παρουσία του ενζύμου, του υποστρώματος και του συνυποστρώματος. Η διαδικασία ξεκινάει με την οξειδωμένη μορφή Q του συνυποστρώματος και κατόπιν παράγεται η ανηγμένη μορφή του P μέσω σάρωσης του δυναμικού. Προκειμένου η μέθοδος να είναι αξιόπιστη δεν πρέπει το ένζυμο να επηρεάζει τη σταθερότητα της ανηγμένης μορφής του συνυποστρώματος. Κατόπιν, η προσθήκη υπεροξειδίου ενεργοποιεί μία αύξηση του αναγωγικού ρεύματος που προκαλείται από την αναγέννηση του Q μέσω του καταλυτικού κύκλου που παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.1.

Για την περαιτέρω ανάλυση προκειμένου να εξασφαλιστεί ότι η κατανάλωση του υπεροξειδίου του υδρογόνου είναι αμελητέα μέσα στη στιβάδα διάχυσης, χρησιμοποιείται μία αναλογία υπεροξειδίου/συνυποστρώματος 50/1 τουλάχιστον. Έτσι η συγκέντρωση του υπεροξειδίου μπορεί να θεωρηθεί σταθερή και ίση με τη συγκέντρωση στον κύριο όγκο του διαλύματος, το οποίο απλοποιεί την εξαγωγή κινητικών πληροφοριών από δεδομένα κυκλικής βολταμετρίας. Εφόσον η συγκέντρωση του υπεροξειδίου παραμένει σταθερή και το ένζυμο μπορεί να θεωρηθεί ακίνητο σε σχέση με το συνυπόστρωμα (τα ένζυμα έχουν συντελεστή διάχυσης της τάξης του  $10^{-7} \text{cm}^2/\text{s}$  ενώ τα συνυποστρώματα της τάξης του  $10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$ ) με αποτέλεσμα το μόνο είδος που συμμετέχει και στη χημική διεργασία και στη διάχυση να είναι οι οξειδοαναγόμενες μορφές του συνυποστρώματος. Το άθροισμα των συγκέντρωσεων των P και Q στη στιβάδα αντίδρασης και διάχυσης είναι ίσο με το άθροισμα της συγκέντρωσης του P στον κύριο όγκο του διαλύματος,  $C_0$  κάθε χρονική στιγμή. Η απόκριση ρεύματος μπορεί κατόπιν να εξαχθεί από την εξίσωση της ροής του P (Σχέση 5.12 με τις αρχικές και περιοριστικές συνθήκες:

για  $t=0$ ,  $x \geq 0$  και  $x=\infty$ ,  $t \geq 0$ ,  $[P]=0$

για  $x=0$ ,  $t \geq 0$ , τότε

$$[P] = \frac{C_P^0}{1 + \exp \frac{E}{RT} (E - E^0)}$$

όπου E το δυναμικό του ηλεκτροδίου και  $E^0$  το πρότυπο δυναμικό του οξειδοαναγωγικού ζεύγους του συνυποστρώματος.

### 5.1. Μηχανισμός Κινητικής Υπεροξειδάσης

---

Το καθοδικό ρεύμα  $I$  που διέρχεται από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου λαμβάνεται από τη βαθμίδα συγκέντρωσης του P στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου σύμφωνα με τη σχέση

$$I = -FSDA\left(\frac{\partial[P]}{\partial x}\right)_{x=0} \quad (5.11)$$

$$\frac{\partial[P]}{\partial t} = D\frac{\partial^2[P]}{\partial x^2} - 2k_{2,2}C_E^{\circ}[P] \quad (5.12)$$

Το δυναμικό του ηλεκτροδίου σχετίζεται με το χρόνο κατά την ανοδική σάρωση σύμφωνα με τη σχέση

$$E = E_i + vt \quad (5.13)$$

όπου  $E_i$  το αρχικό δυναμικό και  $v$  ο ρυθμός σάρωσης.

Για λόγους ευκολίας, με σκοπό την αδιαστατοποίηση των σχέσεων, προκύπτουν οι παράμετροι

$$\tau = \frac{Fv}{RT}t \quad (5.14)$$

$$\xi = \frac{F}{RT}(E - E_i) \quad (5.15)$$

Συνεπώς για  $\tau = \xi + u$  με

$$u = -\frac{F}{RT}(E_i - E^{\circ}) \quad (5.16)$$

$$y = x\left(\frac{Fv}{RTD}\right)^{1/2} \quad (5.17)$$

$$p = \frac{[P]}{c_P^{\circ}} \quad (5.18)$$

$$\lambda = k_{2,2}c_E^{\circ}\frac{RT}{F}\frac{1}{v^{1/2}} \quad (5.19)$$

$$\sigma = k_{2,2}c_P^{\circ}\left[\frac{1}{k_{1,2}} + \frac{1}{k_1c_S^{\circ}}\right] \quad (5.20)$$

Άρα προκύπτει

$$\frac{\partial p}{\partial \tau} = \frac{\partial^2 p}{\partial y^2} - \frac{\lambda q}{1 + \sigma p} \quad (5.21)$$

όταν  $\tau=0$ ,  $y \geq 0$  και  $y=\infty$ ,  $\tau \geq 0$ , τότε  $p=0$

και για  $y=0$  και  $t \geq 0$ ,

$$p = \frac{1}{1 + \exp(-\xi)}$$

όπου  $F$  η σταθερά του Faraday ίση με 96485 C/mol,  $T$  η θερμοκρασία σε K,  $R$  η παγκόσμια σταθερά των αερίων,  $C_E^o$  η συγκέντρωση του ενζύμου μέσα στο διάλυμα σε M, και  $C_P^o$  η συγκέντρωση του P στο διάλυμα

Άρα το ρεύμα που λαμβάνεται από τη βαθμίδα του  $p$  στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου δίνεται από τη σχέση

$$i = FSc_Q^o \left( \frac{DFv}{RT} \right)^{1/2} \left( \frac{\partial p}{\partial y} \right)_{y=0} \quad (5.22)$$

Οι προκύπτουσες αναγωγικές καμπύλες ρεύματος-δυναμικού παρουσιάζουν πλατώ εν γένει για μεγάλες τιμές του  $\lambda$  ενώ για μικρές τιμές του  $\lambda$  παρουσιάζονται και κορυφές. Όταν  $\frac{\partial q}{\partial \tau} = 0$  και απλή ολοκλήρωση των σχέσεων 5.21 και 5.22, προκύπτει η Σχέση 5.23 όπου  $I_p$  το καταλυτικό ρεύμα και  $I_{po}$  το ρεύμα απουσία του  $H_2O_2$ , το οποίο δίνεται από τη Σχέση

$$\frac{I_p}{I_{po}} = \frac{\lambda^{1/2}}{0,446} \left[ \frac{1}{\sigma} - \frac{1}{\sigma^2} \ln(1 + \sigma) \right]^{1/2} \quad (5.23)$$

$$I_{po} = 0.446 F S C_P^o \left( \frac{DFv}{RT} \right)^{1/2} \quad (5.24)$$

Για την περίπτωση που ο παράγοντας  $\sigma$  τείνει στο μηδέν, επιτυγχάνεται συμπεριφορά ψευδοπρώτης τάξης η οποία διέπεται από την απλοποιημένη Σχέση 5.25 η οποία επιτυγχάνεται για μικρές συγκεντρώσεις κυανού του μεθυλενίου και μεγάλες συγκεντρώσεις  $H_2O_2$

$$\frac{I_p}{I_{po}} = \frac{\lambda^{1/2}}{0.446} \quad (5.25)$$

Η γενική διαδικασία για τον κινητικό χαρακτηρισμό είναι η εξής: απουσία του  $H_2O_2$ , όταν τα μόνα χημικά είδη που βρίσκονται μέσα στο διάλυμα είναι το ένζυμο και το P, λαμβάνεται κυκλικό βολταμογράφημα το οποίο αντιστοιχεί στην ηλεκτροχημικώς αντιστρεπτή δράση που αντιστοιχεί στην εξίσωση 5.5. Η αναγωγική κορυφή  $I_{p,o}$  είναι ανάλογη της τετραγωνικής ρίζας του ρυθμού σάρωσης  $v$ . Με προσθήκη  $H_2O_2$  παρατηρείται αύξηση της αναγωγικής κορυφής  $I_p$ . Η καταλυτική αύξηση του ρεύματος εξαρτάται από τις αδιάστατες παραμέτρους  $\lambda$  και  $\sigma$  [40, 41, 42]

## 5.2 Πειραματική Διαδικασία

Η πειραματική διαδικασία με σκοπό την εξαγωγή των κινητικών σταθερών επεξηγείται παρακάτω:

1. Αρχικά, γίνεται καταγραφή των αντιστρεπτών κυκλικών βολταμογραφημάτων απουσία υπεροξειδίου του υδρογόνου για διαφορετικές ταχύτητες σάρωσης  $v$  καθώς και διαφορετικές συγκεντρώσεις  $c_P^o$ . Έτσι γίνεται προσδιορισμός των τιμών των κορυφών  $I_{p,o}$  για διάφορες ταχύτητες σάρωσης και για κάθε συγκέντρωση  $c_P^o$ .
2. Στο σύστημα παρουσία ενζύμου και υψηλής συγκέντρωσης  $c_S^o$ , γίνεται καταγραφή των κυκλικών βολταμογραφημάτων για μειούμενες συγκεντρώσεις  $c_P^o$  και γίνεται προσδιορισμός του  $I_p$  για κάθε συγκέντρωση  $c_P^o$ . Σε περίπτωση που εμφανίζεται, ή τείνει να εμφανιστεί πλατώ, το  $I_p$  αντιστοιχεί στην τιμή του πλατώ, ειδάλλως, αντιστοιχεί στην αναγωγική κορυφή.
3. Καταστρώνονται τα διαγράμματα  $I_p/I_{p,o}$  ως προς  $v^{1/2}$ . Για υψηλές τιμές  $v^{1/2}$  η συσχέτιση  $I_p/I_{p,o}$  ως προς  $v^{1/2}$  πρέπει να είναι γραμμική.
4. Από το διάγραμμα που αντιστοιχεί στη μικρότερη συγκέντρωση  $c_P^o$  προσδιορίζεται η κλίση της σχέσης 5.19, από την οποία εξάγεται η κινητική σταθερά  $k_{2,2}$ .
5. Για υψηλή συγκέντρωση  $c_P^o$  και μειούμενες τιμές της συγκέντρωσης  $c_S^o$  γίνεται καταγραφή των κυκλικών βολταμογραφημάτων και προσδιορίζονται τα  $I_p$  για κάθε συγκέντρωση  $c_S^o$ .
6. Καταστρώνονται τα διαγράμματα  $I_p/I_{p,o}$  ως προς  $v^{1/2}$ . Για υψηλές τιμές  $v^{1/2}$  η συσχέτιση  $I_p/I_{p,o}$  ως προς  $v^{1/2}$  πρέπει να είναι γραμμική.
7. Από τη σχέση 5.23 προσδιορίζεται ο παράγοντας  $\sigma$  για κάθε συγκέντρωση  $c_S^o$ .
8. Καταστρώνεται το διάγραμμα  $\sigma$  ως προς  $k_{2,2}c_P^o/c_S^o$ , ώστε από τη γραμμική εξάρτηση που θα υπακούει στη σχέση 5.20. Από την αποτέμνουσα προσδιορίζεται η  $k_{1,2}$  και από την κλίση η  $k_1$ . Κατόπιν από τις  $k_{1,2}$  και  $k_1$  εξάγεται η  $K_M$ .

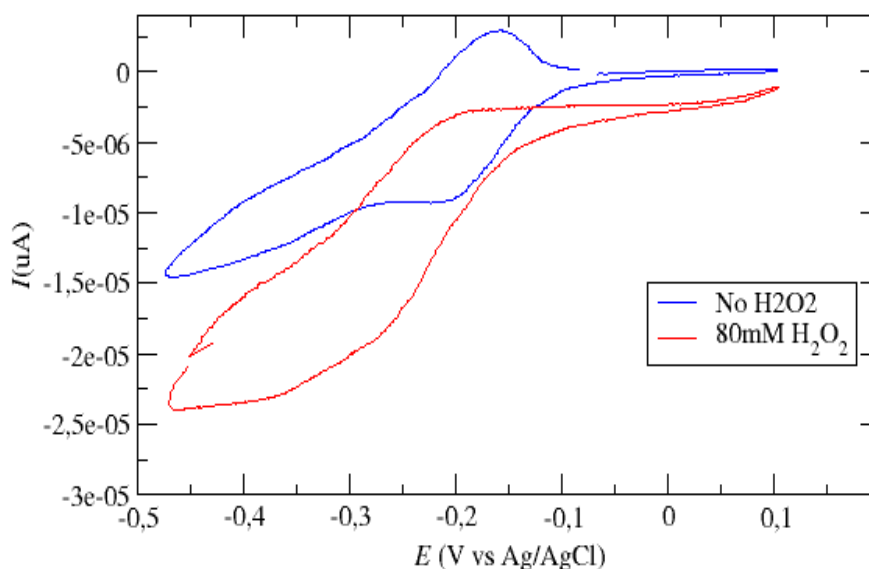
### 5.3 Αποτελέσματα

Εν προκειμένω, χρησιμοποιείται σύστημα τριών ηλεκτροδίων με ηλεκτρόδιο εργασίας δίσκου υαλώδους άνθρακα, διαμέτρου 3mm, ηλεκτρόδιο αναφοράς Ag/AgCl (+0.197V vs SHE) και αντίθετο ηλεκτρόδιο, ράβδος άνθρακα. Χρησιμοποιήθηκε ποτενσιοστάτης Scanning Potentiostat Model 362 της EG & G Instruments, Princeton Applied Research συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η συγκέντρωση του κυανού του μεθυλενίου είναι 62.5μM ενώ του ενζύμου  $2 \times 10^{-9}$ M και το ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8, 5mM. Η συγκέντρωση του συνυποστρώματος εν προκειμένω είναι αρκετά χαμηλή, έτσι ώστε η αναλογία υποστρώματος/συνυποστρώματος να είναι πάνω από 50, αλλά ταυτόχρονα είναι και ακούστως μεγάλη ώστε να λαμβάνεται σήμα από την κυκλική βολταμετρία Αρχικά, απουσία  $H_2O_2$  γίνεται κυκλική βολταμετρία για ρυθμούς σάρωσης 5, 10, 20, 50 και 100mV/s και καταγράφονται οι αναγωγικές κορυφές. Κατόπιν προστίθεται υπεροξειδίο του υδρογόνου ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος που θα προκύψει να είναι 80mM και πραγματοποιείται πάλι κυκλική βολταμετρία στους ίδιους ρυθμούς σάρωσης με πριν, και καταγράφονται πάλι οι αναγωγικές κορυφές και οι υπολογίζονται οι λόγοι  $\frac{I_p}{I_{p0}}$  για κάθε ρυθμό σάρωσης. Για μικρότερες συγκεντρώσεις συνυποστρώματος το σήμα που λαμβάνεται κατά την κυκλική βολταμετρία είναι πολύ ασθενές και κατά την προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου το αναγωγικό σήμα καλύπτεται από το σήμα που λαμβάνεται από την αναγωγή των υδρογονοκατιόντων. Συνεπώς, λόγω των ορίων του συστήματος, για αυτήν την συγκέντρωση θεωρείται σ ίσο με 0. Επίσης, η συγκέντρωση ενζύμου που χρησιμοποιείται είναι μικρή σε σχέση με τη βιβλιογραφία άρα, οι αναμενόμενες τιμές των  $\lambda$  θα είναι μικρές και θα παρουσιάζονται κορυφές αντί για καθαρά πλατώ στις περισσότερες ταχύτητες σάρωσης.

Στο Σχήμα 5.2 παρουσιάζονται τα κυκλικά βολταμογραφήματα που προέκυψαν από την κυκλική σάρωση με όρια 0.1V έως -0.5V ξεκινώντας από τα 0.1V με ρυθμό σάρωσης 5mV/s, για σύσταση διαλύματος όπως αναφέρεται παραπάνω, πριν και μετά την προσθήκη υπεροξειδίου. Απουσία υπεροξειδίου παρατηρείται αναγωγική κορυφή στα -0.2V και οξειδωτική στα -0.14V. Παρουσία υπεροξειδίου η οξειδωτική κορυφή στα -0.14V έχει μειωθεί ενώ η αναγωγική στα -0.2V έχει μεγαλώσει κατ' απόλυτη τιμή. Λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης του κυανού του μεθυλενίου οι κορυφές απουσία του υπεροξειδίου δεν είναι τόσο έντονες και φαίνεται να παρουσιάζεται και η αναγωγή των υδρογονοκατιόντων από τα -0.3V και καθοδικότερα, όμως, γίνεται η θεώρηση ότι δεν επηρεάζονται τα αποτελέσματα της ανάλυσης από ενδεχόμενη παραμόρφωση των αναγωγικών κορυφών από τη δράση των υδρογονοκατιόντων.

Στο Σχήμα 5.3 παρουσιάζονται τα κυκλικά βολταμογραφήματα για κυκλική σάρωση μεταξύ 0.1 και -0.4 V vs Ag/AgCl ξεκινώντας από τα 0.1V vs Ag/AgCl με ρυθμούς σάρωσης 5, 10, 20, 50, 100 mV/s με σύσταση ίδια με την προαναφερθείσα, απουσία  $H_2O_2$ . Μειώνοντας το ρυθμό σάρωσης διαφαίνεται μείωση της έντασης των οξειδοαναγωγικών κορυφών, ενώ η παρατηρούμενη μετατόπισή τους μπορεί να θεωρηθεί ότι βρίσκεται εντός του περιθωρίου των πειραματικών σφαλμάτων. Επιπροσθέτως, η απόσταση των κορυφών για κάθε ταχύτητα σάρωσης είναι ελαφρώς πάνω από 50 mV η οποία για οξειδοαναγωγική αντίδραση μεταφοράς 2

### 5.3. Αποτελέσματα

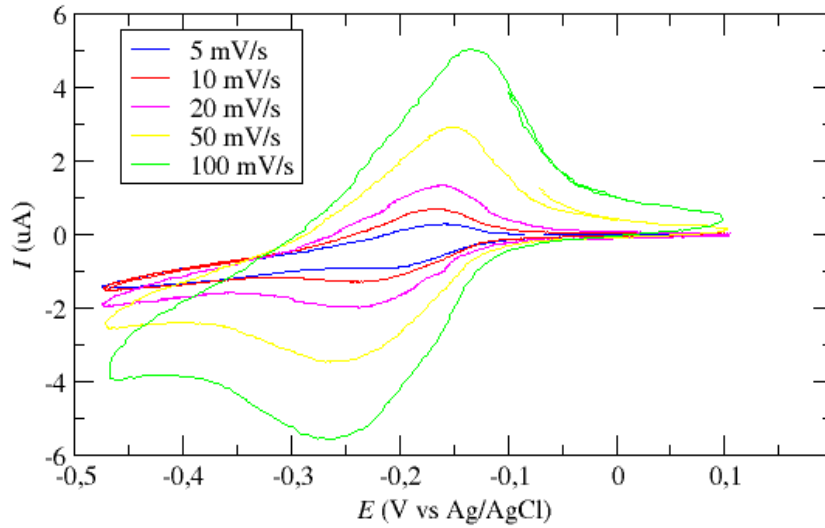


Σχήμα 5.2: Κυκλικό βολταμογράφημα διαλύματος κυανού του μεθυλενίου  $62.5\mu\text{M}$ ,  $MtPerII$   $2 \times 10^{-9}\text{M}$  σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων  $\text{pH}=8$   $5\text{mM}$ , πριν και μετά την προσθήκη  $\text{H}_2\text{O}_2$  τελικής συγκέντρωσης  $80\text{mM}$ , με ρυθμό σάρωσης  $5\text{mV/s}$

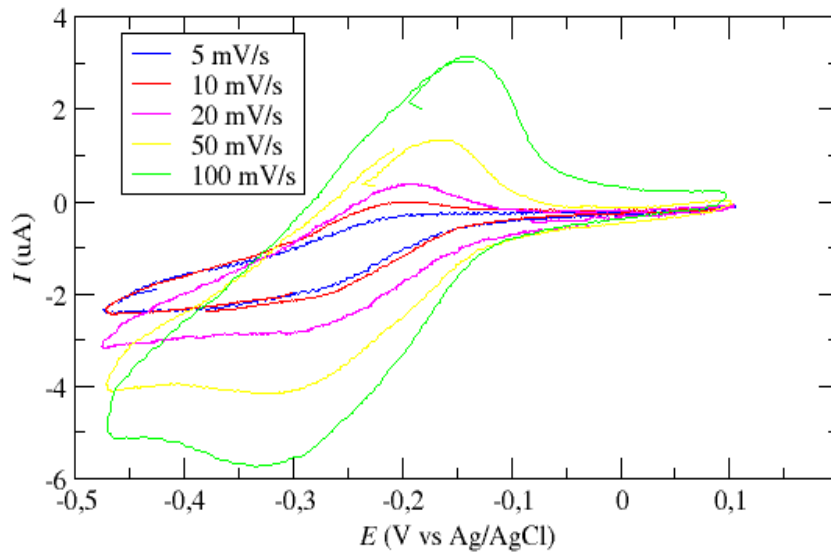
ηλεκτρονίων, μπορεί να θεωρηθεί αντιστρεπτή στα πλαίσια της παρούσας πειραματικής διαδικασίας. Στο Σχήμα 5.4 παρουσιάζονται τα κυκλικά βολταμογραφήματα που ελήφθησαν υπό τις ίδιες συνθήκες, αλλά με τη διαφορά ότι έχει γίνει προσθήκη  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε συγκέντρωση  $80\text{mM}$ . Τα δυναμικά στα οποία παρατηρούνται οι κορυφές καθώς και η μεταξύ τους απόσταση φαίνεται να μην έχουν μεταβληθεί, όμως, παρατηρείται διαφορά στην ένταση αυτών. Πιο συγκεκριμένα, μετά την προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου, για όλες τις ταχύτητες σάρωσης παρατηρείται μείωση της έντασης της οξειδωτικής κορυφής, και αύξηση της έντασης της αναγωγικής. Επίσης για μικρές ταχύτητες σάρωσης ( $5, 10, 20\text{mV/s}$ ) φαίνεται να τείνουν να εμφανιστούν πλατώ ρεύματος στην περιοχή των  $-0.3\text{V}$  vs  $\text{Ag/AgCl}$ , τα οποία είναι σε πολύ κοντινές μεταξύ τους αποστάσεις.

Στο Σχήμα 5.5, όπου παρουσιάζεται η εξάρτηση του λόγου  $\frac{I_p}{I_{po}}$  από την αντίστροφη τετραγωνική ρίζα του ρυθμού σάρωσης, φαίνεται ότι για υψηλούς ρυθμούς σάρωσης ( $100\text{mV/s}$ ) ο λόγος  $\frac{I_p}{I_{po}}$  είναι πολύ κοντά στη μονάδα, συνεπώς εκεί δεν μπορεί να εντοπιστεί η καταλυτική δράση του ενζύμου, ενώ για πιο αργούς ρυθμούς σάρωσης ( $5, 10, 20, 50\text{mV/s}$ ) παρατηρείται μία γραμμική αύξηση του  $\frac{I_p}{I_{po}}$  μειώνοντας το ρυθμο σάρωσης με πολύ καλή προσαρμογή ( $R^2=0.9917$ ). Θεωρητικά θα λαμβάνονταν περαιτέρω γραμμική αύξηση σε περίπτωση που χρησιμοποιούνταν πιο αργοί ρυθμοί σάρωσης, όμως, λόγω περιορισμών του εύρους καταγραφόμενων ρευμάτων του χρησιμοποιούμενου ποτενσιοστάτη, καθώς για πιο αργούς ρυθμούς σάρωσης, μειώνονται τα καταγραφόμενα ρεύματα και φτάνουν στα όρια μέτρησης





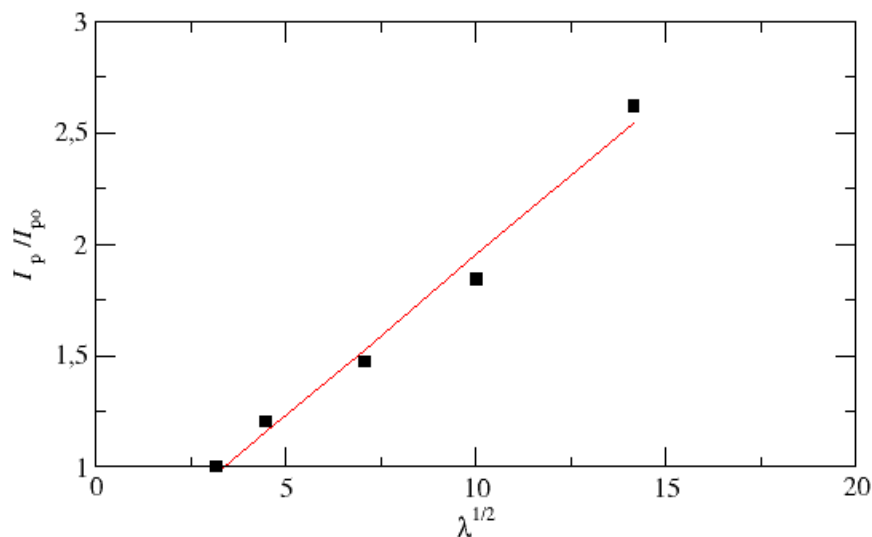
Σχήμα 5.3: Κυκλικά βολταμογραφήματα διαλύματος κυανού του μεθυλενίου 62.5μM,  $MtPerII$   $2 \times 10^{-9}M$  σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8 5mM, απουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, με ρυθμούς σάρωσης 5, 10, 20, 50 , 100 mV/s



Σχήμα 5.4: Κυκλικά βολταμογραφήματα διαλύματος κυανού του μεθυλενίου 62.5μM,  $MtPerII$   $2 \times 10^{-9}M$  σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8 5mM, παρουσία H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> συγκέντρωσης 80 mM, με ρυθμούς σάρωσης 5, 10, 20, 50 , 100 mV/s

### 5.3. Αποτελέσματα

του οργάνου, οδηγώντας σε μεγάλο θόρυβο και καθιστώντας έτσι μη εφικτή την περαιτέρω μελέτη.



Σχήμα 5.5:  $\frac{I_p}{I_{po}}$  συναρτήσει του αντιστρόφου της ρίζας της ταχύτητας σάρωσης για διάλυμα κυανού του μεθυλενίου 62.5 $\mu$ M, *MtPerII*  $2 \times 10^{-9}$ M σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8 5mM, πριν και μετά την προσθήκη  $H_2O_2$  τελικής συγκέντρωσης 80mM

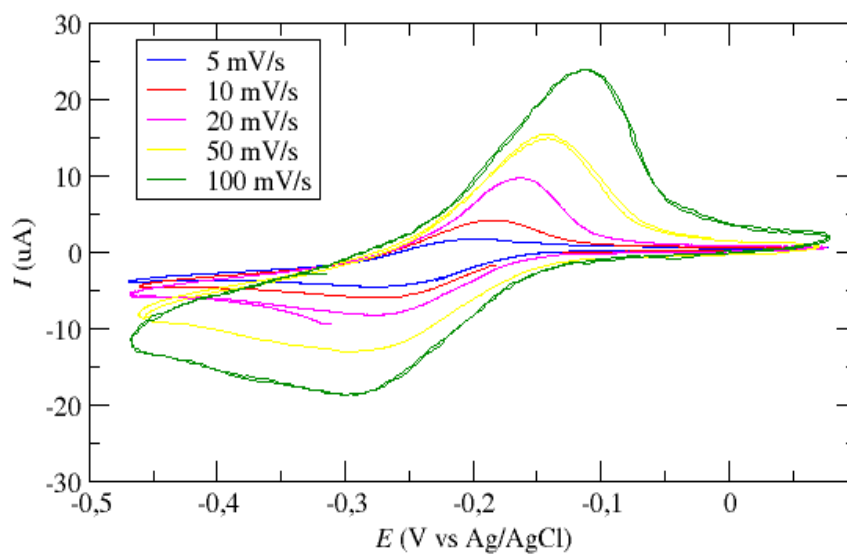
Για την εύρεση της κινητικής σταθεράς  $k_{2,2}$  μέσω των υπολογιζόμενων από την κυκλική βολταμετρία κορυφών πριν και μετά την προσθήκη υπεροξειδίου πρέπει να γίνει προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων στην σχέση 5.25 για το γραμμικό κομμάτι των δεδομένων εξάρτησης του λόγου  $\frac{I_p}{I_{po}}$  από τετραγωνική ρίζα του  $\lambda$ . Αρχικά γίνεται υπόθεση για την τιμή της κινητικής σταθεράς, και βάσει του ότι πρόκειται για μία ενζυμική δράση η οποία πρέπει να είναι πολύ γρήγορη, επιλέγεται η τιμή  $10^{-5} M^{-1} s^{-1}$ . Έτσι, από την εξίσωση 5.19 γίνεται βάσει της κινητικής σταθεράς αυτής υπολογισμός για τον παράγοντα  $\lambda$  για κάθε ταχύτητα σάρωσης που εμπίπτει στο γραμμικό κομμάτι των δεδομένων εξάρτησης ρεύματος από τετραγωνική ρίζα του  $\lambda$  και στη συνέχεια από τη σχέση 5.25, υπολογίζονται οι αντίστοιχες τιμές  $\frac{I_p}{I_{po}^{theor}}$ . Για τον υπολογισμό τώρα της σταθεράς  $k_{2,2}$  χρησιμοποιείται η μέθοδος Newton-Raphson με μεταβλητή την  $k_{2,2}$  αυτή που έχει ήδη υποτεθεί, ώστε να επιτευχθεί ελαχιστοποίηση του τετραγώνου διαφορών των  $\frac{I_p}{I_{po}} - \frac{I_p}{I_{po}^{theor}}$  για κάθε ρυθμό σάρωσης στο γραμμικό κομμάτι της εξάρτησης του λόγου  $\frac{I_p}{I_{po}}$  από την τετραγωνική ρίζα του  $\lambda$  για τα πειραματικά δεδομένα. Η μέθοδος Newton Raphson συγκλίνει για  $k_{2,2} = 9.4 \times 10^7 M^{-1} s^{-1}$ .

Για την εύρεση των υπολοίπων κινητικών παραμέτρων χρησιμοποιείται και πάλι σύστημα τριών ηλεκτροδίων με ηλεκτρόδιο εργασίας ηλεκτρόδιο δίσκου υαλώδους άνθρακα, διαμέτρου 3mm, ηλεκτρόδιο αναφοράς (Ag/AgCl +0,197V vs SHE) και αντίθετο ηλεκτρόδιο, ράβδος άνθρακα. Η συγκέντρωση κυανού του μεθυλενίου είναι 250μM ενώ του ενζύμου  $4 \times 10^{-8}$ M και το διάλυμα που χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8. Για κάθε ρυθμό σάρωσης υπολογίζονται τα  $I_p$  από τη σχέση 5.19 βασει της  $k_{2,2}$  που έχει ήδη βρεθεί. Γίνεται αρχικά κυκλική βολταμετρία σε ρυθμούς σάρωσης 5, 10, 20, 50 και 100mV/s και καταγράφονται οι αναγωγικές κορυφές. Κατόπιν, προστίθεται υπεροξειδίο του υδρογόνου ώστε η τελική συγκέντρωση του διαλύματος που θα προκύψει να είναι 17.5, 34.3, 86.5 και 141 mM για κάθε δείγμα και πραγματοποιείται πάλι κυκλική βολταμετρία στους ίδιους ρυθμούς σάρωσης με πριν, καταγράφονται πάλι οι αναγωγικές κορυφές και τα πλατώ και γίνονται υπολογισμοί για τους λόγους  $\frac{I_p}{I_{po}}$ .

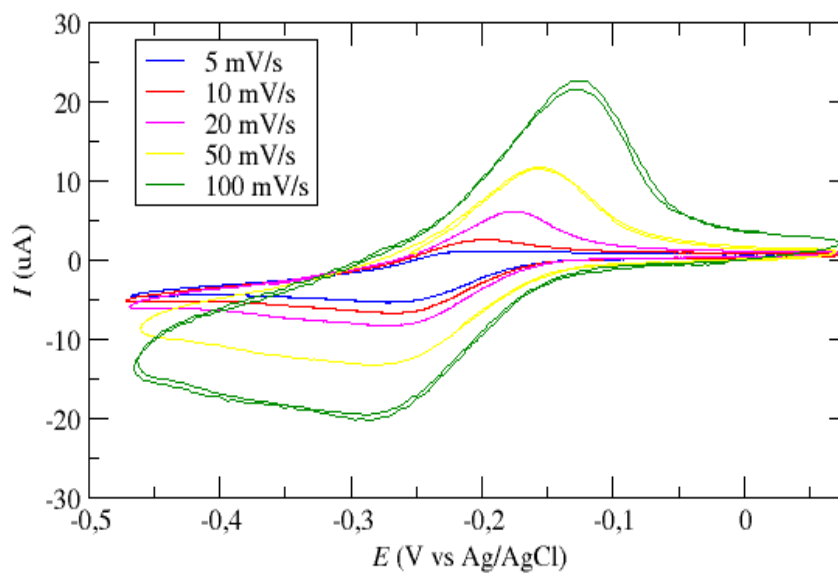
Στο Σχήμα 5.6 παρουσιάζονται τα κυκλικά βολταμμογραφήματα μεταξύ 0.1 και -0.4 V vs Ag/AgCl για ρυθμούς σάρωσης 5, 10, 20, 50, 100 mV/s απουσία  $H_2O_2$  για συγκέντρωση κυανού του μεθυλενίου 250 μM, ενζύμου  $4 \times 10^{-8}$ M και ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8. Κατόπιν παρουσιάζονται στα Σχήματα 5.7 - 5.10 τα κυκλικά βολταμμογραφήματα που αντιστοιχούν στις ίδιες συνθήκες με τη διαφορά ότι έχει προστεθεί  $H_2O_2$  σε συγκεντρώσεις 17.5, 34.3, 86.5 και 141.0 mM. Εδώ πρέπει να αναφερθεί ότι για κάθε σειρά μετρήσεων έχει γίνει και καταγραφή κυκλικών βολταμμογραφήματων απουσία  $H_2O_2$ , επειδή δεν κρίνεται απαραίτητα να παρουσιαστούν όλες τις αντίστοιχες μετρήσεις και παρουσιάζεται ενδεικτικά στο Σχήμα 5.6 μία σειρά τέτοιων μετρήσεων, η οποία αντιστοιχεί στις μετρήσεις για το τυφλό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για κατόπιν συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου 17.5 mM. Για όλες τις συγκεντρώσεις  $H_2O_2$  παρατηρείται μείωση των οξειδωτικών κορυφών και αύξηση των αναγωγικών μετά την προσθήκη  $H_2O_2$  σε σχέση με τις αντίστοιχες μετρήσεις απουσία του  $H_2O_2$ , μεταβολές οι οποίες είναι εντονότερες αυξανόμενης της συγκέντρωσης του υπεροξειδίου. Σε καμία περίπτωση δεν υπάρχει ξεκάθαρη σιγμοειδής καμπύλη σε χαμηλές ταχύτητες σάρωσης, όμως, φαίνεται έντονα η τάση των βολταμμογραφήματων να ωθούνται προς αυτήν την κατάσταση. Επίσης λόγω σχετικά υψηλής συγκέντρωσης του κυανού του μεθυλενίου, τα κυκλικά βολταμμογραφήματα φαίνεται να απομακρύνονται από την ιδανική αντιστρεπτότητα το οποίο, όμως, συμβαίνει κυρίως σε ταχύτητες σάρωσης μεγαλύτερες των 20mV/s οι οποίες δε χρησιμοποιούνται στην μετέπειτα επεξεργασία των αποτελεσμάτων για την εξαγωγή κινητικών σταθερών καθώς δεν πληρούν τις προϋποθέσεις για να αξιοποιηθούν στη διαδικασία αυτή.

Στο Σχήμα 5.11 παρουσιάζονται πιο συγκεκριμένα για τη σύγκριση πριν και μετά την προσθήκη του υπεροξειδίου του υδρογόνου για χαμηλές ταχύτητες σάρωσης, τα κυκλικά βολταμμογραφήματα που προέκυψαν από την κυκλική σάρωση με όρια 0.1V έως -0.4V ξεκινώντας από τα 0.1V με ρυθμο σάρωσης 5mV/s για σύσταση διαλυμάτων όπως αναγράφεται παραπάνω, πριν και μετά την προσθήκη υπεροξειδίου σε τελική συγκέντρωση 17.5 και 86.5mM  $H_2O_2$ . Απουσία υπεροξειδίου παρατηρείται αναγωγική κορυφή στα -0.26V και οξειδωτική στα -0.2V. Παρουσία υπεροξειδίου η οξειδωτική κορυφή στα -0.2V έχει μειωθεί ενώ η αναγωγική στα -0.26V έχει αυξηθεί, και μάλιστα περισσότερο για συγκέντρωση υπεροξειδίου 86.5mM από ότι για 17.5mM. Επίσης, εδώ λόγω υψηλότερης συγκέντρωσης του κυανού του μεθυλενίου τα υδρογονοκατίοντα δεν επηρεάζουν το σχήμα των βολ-

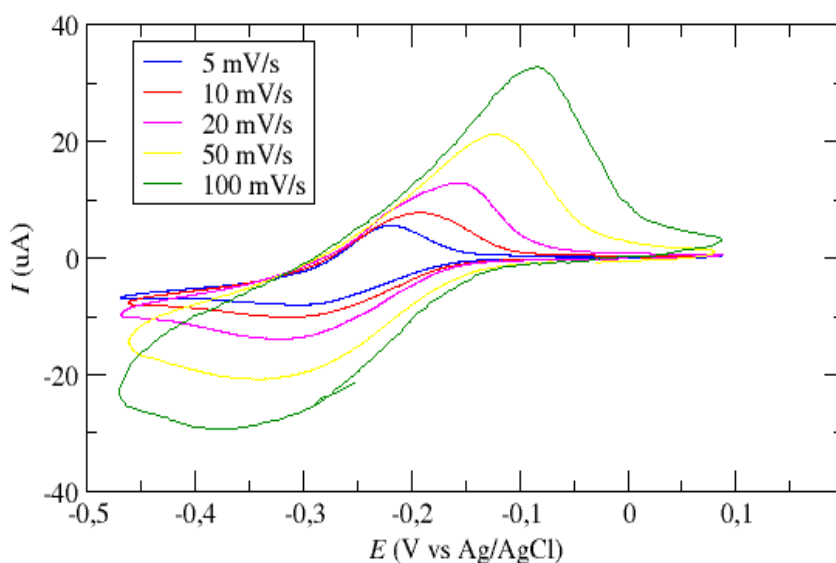
### 5.3. Αποτελέσματα



Σχήμα 5.6: Κυκλικά βολταμμογραφήματα διαλύματος κυανού του μεθυλενίου  $250\mu\text{M}$ ,  $MtPerII$   $4 \times 10^{-8}\text{M}$  σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων  $\text{pH}=8$   $5\text{mM}$ , απουσία  $\text{H}_2\text{O}_2$  για ρυθμούς σάρωσης 5, 10, 20, 50 και  $100\text{ mV/s}$



Σχήμα 5.7: Κυκλικά βολταμμογραφήματα διαλύματος κυανού του μεθυλενίου  $250\mu\text{M}$ ,  $MtPerII$   $4 \times 10^{-8}\text{M}$  σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων  $\text{pH}=8$   $5\text{mM}$ , και συγκέντρωση  $\text{H}_2\text{O}_2$   $17.5\text{mM}$  για ρυθμούς σάρωσης 5, 10, 20, 50 και  $100\text{ mV/s}$



Σχήμα 5.8: Κυκλικά βολταμογραφήματα διαλύματος κυανού του μεθυλενίου 250 $\mu$ M, *MtPerII* 4  $\times 10^{-8}$ M σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8 5mM, και συγκέντρωση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 34.3mM για ρυθμούς σάρωσης 5, 10, 20, 50 και 100 mV/s

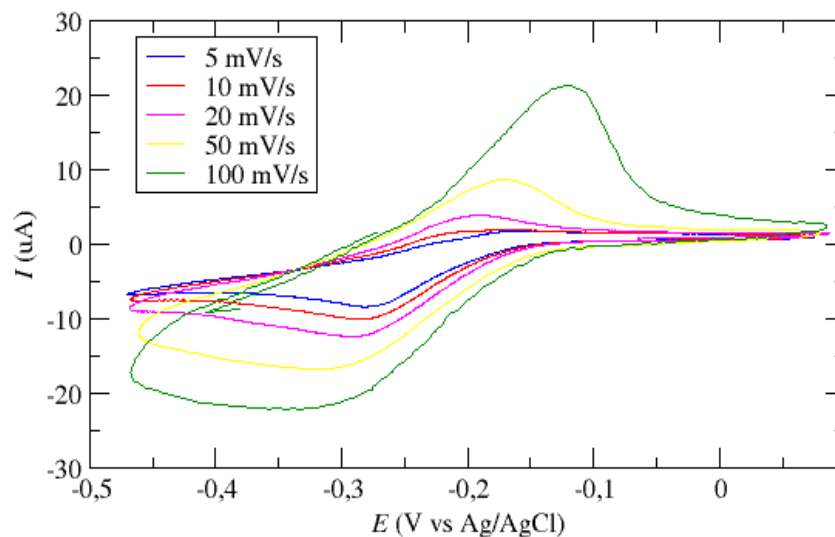
ταμογραφημάτων.

Στο Σχήμα 5.12 απεικονίζονται οι λόγοι  $\frac{I_p}{I_{po}}$  ως προς  $\lambda^{1/2}$  για τις ανωτέρω συγκεντρώσεις υπεροξειδίου. Το γραμμικό κομμάτι βρίσκεται για ρυθμούς σάρωσης 5, 10 και 20mV/s, με εξαίρεση να αποτελούν τα 141mM για τα οποία συμπεριλαμβάνονται και τα 50mV/s. Οι κλίσεις που υπολογίζονται για κάθε προσθήκη υπεροξειδίου παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.1 μαζί με τον συντελεστή γραμμικής συσχέτισης, ο οποίος κρίνεται σε όλες τις περιπτώσεις ικανοποιητικός.

Πίνακας 5.1: Κλίση και συντελεστής γραμμικής συσχέτισης ( $r^2$   $\frac{I_p}{I_{po}}$  συναρτήσει του  $\lambda$  για συγκεντρώσεις υπεροξειδίου 17.5, 34.3, 86.5 και 141mM, για διάλυμα κυανού του μεθυλενίου 62.5 $\mu$ M, *MtPerII* 4  $\times 10^{-8}$ M σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8 5mM

$c_{s^o}$ (mM)	κλίση	$r^2$
17.5	0.118	0.978
34.3	0.161	0.955
86.5	0.198	0.987
141	0.225	0.954

### 5.3. Αποτελέσματα



Σχήμα 5.9: Κυκλικά βολταμμογραφήματα διαλύματος κυανού του μεθυλενίου 250μM, *MtPerII*  $4 \times 10^{-8}$ M σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8 5mM, και συγκέντρωση  $H_2O_2$  86.5 mM για ρυθμούς σάρωσης 5, 10, 20, 50 και 100 mV/s

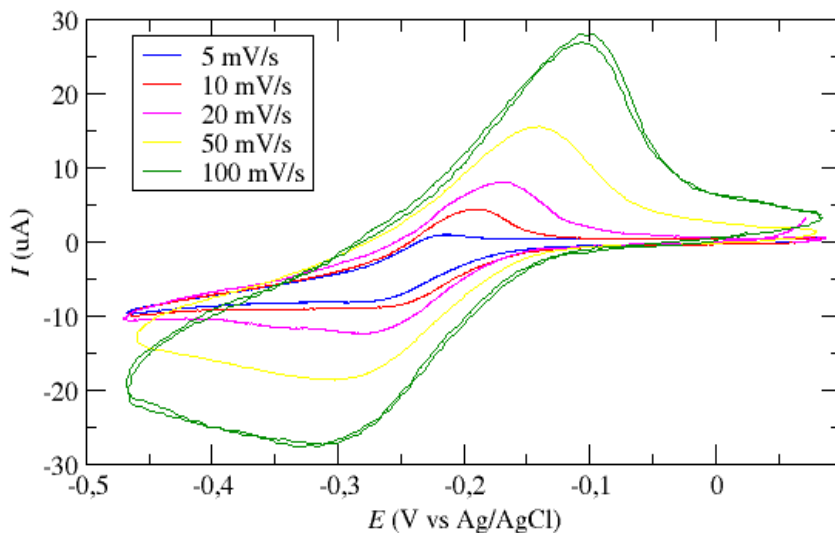
Από την εξίσωση 5.26 βρίσκεται ο παράγοντας  $\sigma$  για κάθε συγκέντρωση υπεροξειδίου και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στον Πίνακα 5.2

$$slope_{theoretical} = \frac{1}{0.446} \left[ \frac{1}{\sigma} - \frac{1}{\sigma^2} \ln(1 + \sigma) \right]^{1/2} \quad (5.26)$$

Πίνακας 5.2: Παράγοντας  $\sigma$  για κάθε συγκέντρωση για συγκεντρώσεις υπεροξειδίου 17.5, 34.3, 86.5 και 141mM, για διάλυμα κυανού του μεθυλενίου 62.5μM, *MtPerII*  $5 \times 10^{-9}$ M σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8 5mM

$c_{s_0}$ (mM)	$\sigma$
17.5	715
34.3	380
86.5	251
141	194

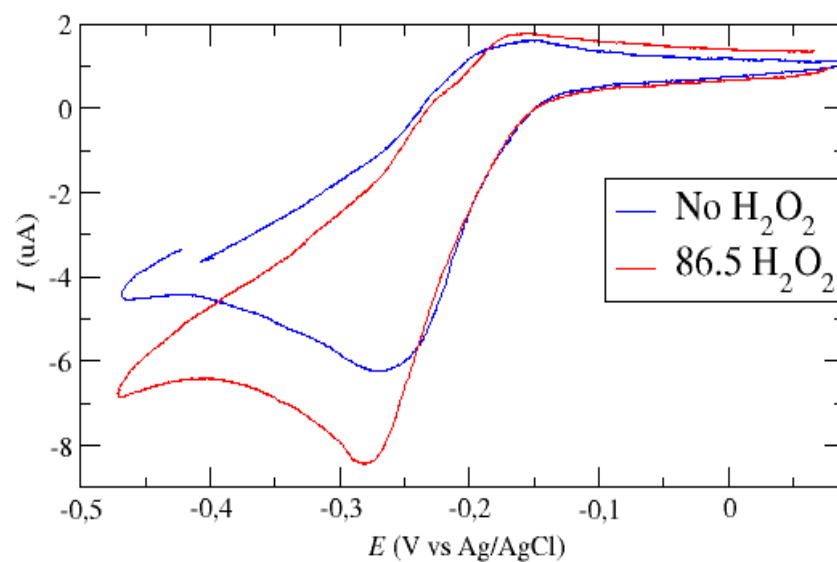
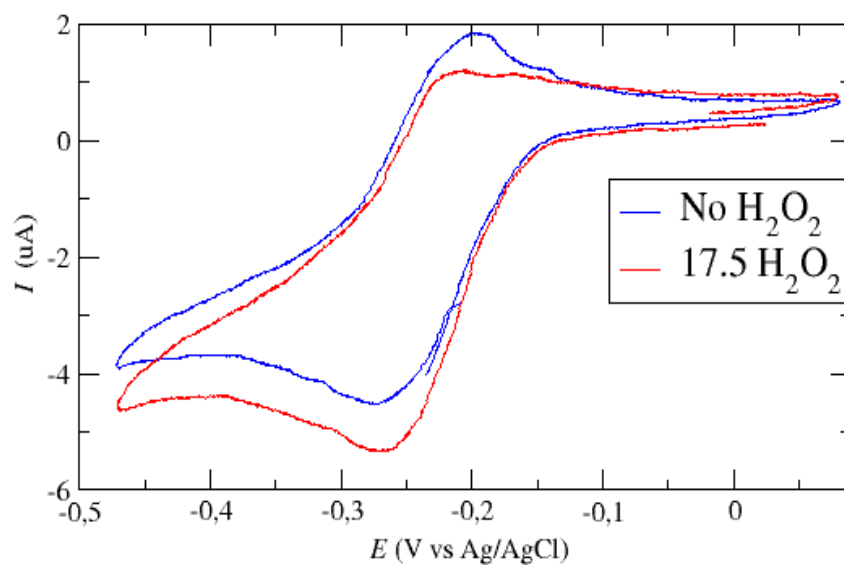
Τέλος από τα δεδομένα που προκύπτουν από την παραπάνω ανάλυση κατασκευάζεται το διάγραμμα  $\sigma/k_{2,2}$  ως προς  $1/c_{s_0}$  (Σχήμα 5.13) και από την κλίση βρίσκεται το  $1/k_1$  και από την αποτένουσα το  $1/k_{1,2}$ , σύμφωνα με τη Σχέση 5.20



Σχήμα 5.10: Κυκλικά βολταμογραφήματα διαλύματος κυανού του μεθυλενίου 250μM, MtPerII  $4 \times 10^{-8}$ M σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8 5mM, και συγκέντρωση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 141 mM για ρυθμούς σάρωσης 5, 10, 20, 50 και 100 mV/s

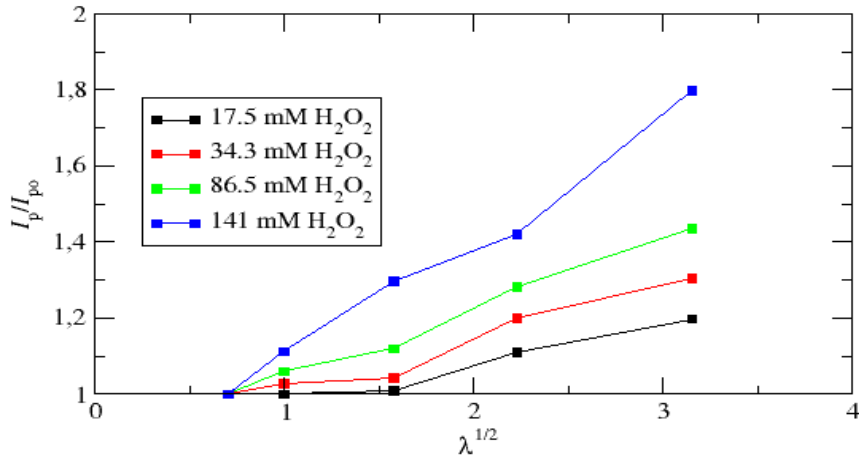
Από γραμμική παλινδρόμηση προκύπτει από το Σχήμα 5.13 η κλίση ίση με 0.000976 και η αποτέμονουσα ίση με 0.00906 με συντελεστή γραμμικής συσχέτισης 0.9947. Έτσι, η  $k_1$  υπολογίζεται  $1258\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  ενώ η  $k_{1,2}$   $110.4\text{s}^{-1}$ . Κατόπιν διαιρώντας την  $k_{1,2}$  με την  $k_1$  υπολογίζεται η  $K_{1M}$  (Σχέση 5.8) που αντιστοιχεί στην  $k_M$  του ενζύμου με το υπεροξειδίο εκτιμάται ίση με 0.088M. Τέλος, από τις σχέσεις 5.8 και 5.6 υπολογίζονται οι σταθερές  $k_{1,1}=2401\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  και  $k_{1,-1}=101\text{s}^{-1}$ .

### 5.3. Αποτελέσματα

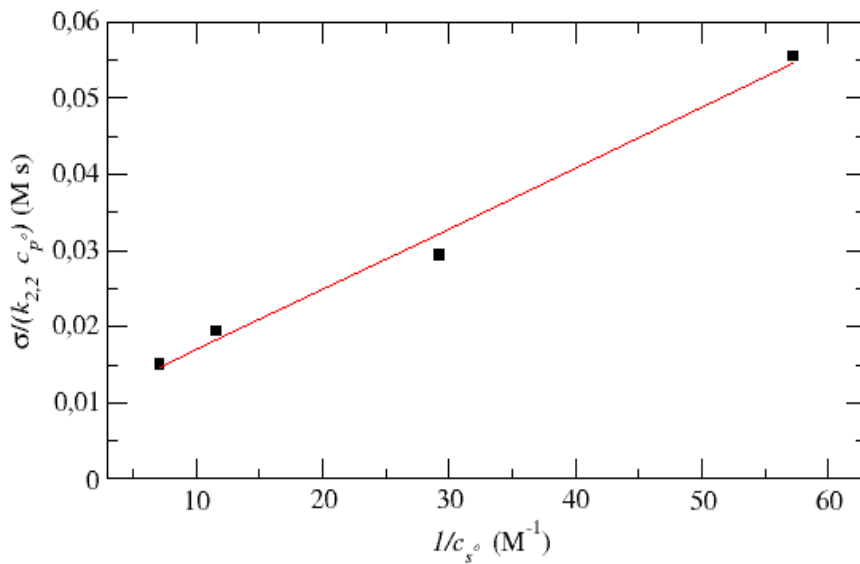


Σχήμα 5.11: Κυκλικό βολταμογράφημα διαλύματος κυανού του μεθυλενίου 250μM, MtPerII  $4 \times 10^{-8}$ M σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8 5mM, πριν και μετά την προσθήκη H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> τελικής συγκέντρωσης (a) 17.5mM (b)86.5mM, με ρυθμό σάρωσης 5mV/s





Σχήμα 5.12:  $\frac{I_p}{I_{p,po}}$  συναρτήσει της ρίζας του παράγοντα  $\lambda$  για διαφορετικές συγκεντρώσεις  $H_2O_2$



Σχήμα 5.13:  $\sigma/k_{2,2}$  ως προς  $1/c_s^o$

## 5.4 Υπολογισμοί με Μέθοδο Πεπερασμένων Στοιχείων

Βάσει των αποτελεσμάτων που εξήχθησαν στην προηγούμενη ενότητα όσον αφορά στις κινητικές σταθερές, έγινε χρήση της μεθόδου των πεπερασμένων στοιχείων, τόσο για την επιβεβαίωση των τιμών που εξήχθησαν όσο και για πρόβλεψη της συμπεριφοράς του συστήματος για πιο χαμηλές ταχύτητες σάρωσης που δεν είναι δυνατό να εξεταστούν πειραματικά λόγω περιορισμών των χρησιμοποιούμενων οργάνων.

Γίνεται επίλυση της ηλεκτροαναλυτικής μορφής της εξίσωσης Butler-Volmer υπό τη μορφή που παρουσιάζεται στη Σχέση 5.27

$$i = nFk_o(c_{\text{red}} \exp(\frac{(n - a_c F \eta)}{RT})) - c_{\text{ox}} \exp(\frac{(a_c F \eta)}{RT}) \quad (5.27)$$

όπου,  $i$  η πυκνότητα ανταλασσόμενου ρεύματος,  $k_o$ ,  $c_{\text{red}}$  η συγκέντρωση της ανηγμένης μορφής της οξειδοαναγώμενης ουσίας στον κύριο όγκο του διαλύματος,  $c_{\text{ox}}$  η συγκέντρωση της οξειδωμένης μορφής της οξειδοαναγώμενης ουσίας στον κύριο όγκο του διαλύματος,  $\eta$  η ετερογενής κινητική σθερά της αντίδρασης,  $a_c$  ο καθοδικός συντελεστής μεταφοράς,  $\eta$  η διαφορά μεταξύ του εφαρμοζόμενου δυναμικού και του δυναμικού ισορροπίας του οξειδοαναγωγικού ζεύγους,  $n$  ο αριθμός των ανταλασσόμενων ηλεκτρονίων,  $F$  η σταθερά του Faraday,  $R$  η σταθερά των ιδανικών αερίων και  $T$  η απόλυτη θερμοκρασία.

Βάσει του μοντέλου που αναπτύχθηκε στην προηγούμενη ενότητα, δεν πραγματοποιούνται αντιδράσεις στον κύριο όγκο του διαλύματος και οι ρυθμοί των αντιδράσεων που συμβαίνουν στην στιβάδα διάχυσης του ηλεκτροδίου δίνονται από τις σχέσεις

$$r_{E1} = -k_{1,1}c_{E1}c_S + k_{1,-1}c_{E1S} + k_{22}c_{E2}c_Q \quad (5.28)$$

$$r_{E2} = -k_{12}c_{E1S} - k_{22}c_{E2}c_Q \quad (5.29)$$

$$r_{E1S} = k_{1,1}c_{E1}c_S - k_{1,-1}c_{E1S} - k_{22}c_{E2}c_Q \quad (5.30)$$

$$r_S = -k_{1,1}c_{E1}c_S + k_{1,-1}c_{E1S} \quad (5.31)$$

$$r_P = k_{22}c_{E2}c_Q \quad (5.32)$$

$$r_Q = -k_{22}c_{E2}c_Q \quad (5.33)$$

Επίσης για το παρόν σύστημα γίνεται η παραδοχή ότι η μεταφορά μάζας γίνεται μόνο λόγω της διάχυσης, αγνοώντας την ηλεκτρομεταφορά χάρη στον φέροντα ηλεκτρολύτη.

Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται για τα διάφορα χημικά είδη είναι ίδιες με αυτές που χρησιμοποιήθηκαν για την πειραματική διαδικασία της προηγούμενης ενότητας και οι κινητικές σταθερές, αυτές που εξήχθησαν επίσης στην προηγούμενη ενότητα. Τα όρια των κυκλικών βολταμογραφήματων, αυτά είναι 0.1 V και -0.4 V ενώ το δυναμικό ισορροπίας που χρησιμοποιήθηκε, -0.17 V. Για  $k_0$  επιλέχθηκε η τιμή 0.0001m/s, καθώς από τα πειραματικά αποτελέσματα, η αντίδραση δε φαινόταν να είναι πλήρως αντιστρεπτή ώστε η τιμή να είναι πιο μεγάλη (μεγαλύτερο  $k_0$  υποδηλώνει υψηλότερη αντιστρεπτότητα οξειδοαναγωγικής δράσης). Όσον αφορά στους συντελεστές διάχυσης, χρησιμοποιήθηκε και για τις δύο μορφές του συνυποστρώματος συντελεστής διάχυσης με τιμή  $10^{-5} \text{cm}^2/\text{s}$  ενώ και για τις τρεις μορφές του ενζύμου  $10^{-7} \text{cm}^2/\text{s}$  ελλείψει πειραματικών δεδομένων. Εξ' άλλου, οι συντελεστές διάχυσης δεν εμφανίζονται στις εξαρτήσεις του λόγου  $I_p/I_{p0}$ , συνεπώς δε θα επηρεάσουν τα προς σύγκριση αποτελέσματα με τα πειραματικά, αποτελέσματα. Για το μήκος του σχεδιαζόμενου χωρίου  $L$  κατά την επίλυση χρησιμοποιήθηκε η Σχέση 5.34 και έχει καθαρά υπολογιστικό χαρακτήρα.

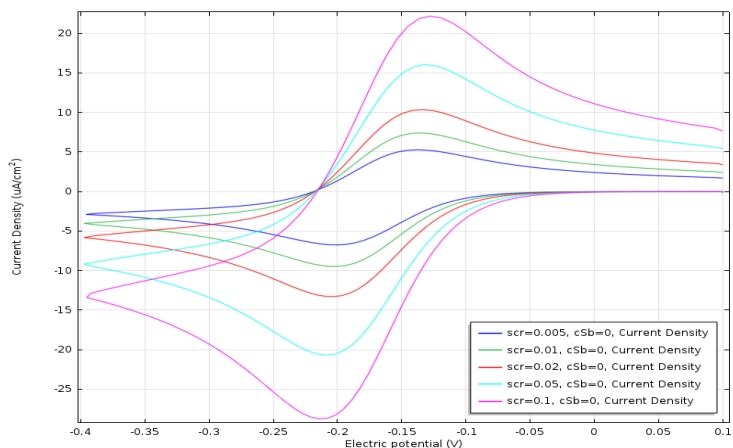
$$L = \sqrt{D_A^2 \frac{|E_{\text{vertex},1} - E_{\text{vertex},2}|}{v}} \quad (5.34)$$

όπου  $D_A$  ο συντελεστής διάχυσης του οξειδοαναγόμενου είδους,  $E_{\text{vertex},i}$  τα όρια δυναμικού του συστήματος,  $v$  η ταχύτητα σάρωσης.

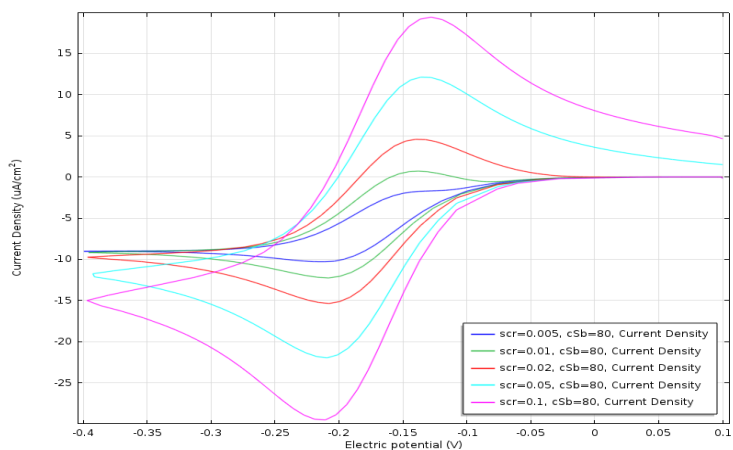
Αρχικά γίνονται οι υπολογισμοί για τα κυκλικά βολταμογραφήματα απουσία υπεροξειδίου για ταχύτητες σάρωσης 5, 10, 20, 50 και 100 mV/s (Σχήμα 5.14) και μετά παρουσία υπεροξειδίου σε συγκέντρωση 80mM για τις ίδιες ταχύτητες σάρωσης (Σχήμα 5.15) και καταγράφονται και στις δύο περιπτώσεις οι αναγωγικές κορυφές. Στη συνέχεια, καταστρώνεται διάγραμμα το λόγου  $\frac{I_p}{I_{p0}}$  συναρτήσει του αντιστρόφου της ρίζας της ταχύτητας σάρωσης και γίνεται σύγκριση με το αντίστοιχο πειραματικό 5.5. Η κλίση του γραμμικού μέρους του διαγράμματος για τα πειραματικά δεδομένα είναι 0.143 με συντελεστή γραμμικής συσχέτισης 0.985 ενώ για τα υπολογιζόμενα με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων 0.131 με συντελεστή γραμμικής συσχέτισης 0.931. Παρατηρείται σφάλμα 8%, το οποίο αποτελεί μία ένδειξη ότι τα πειραματικά αποτελέσματα ανταποκρίνονται στα θεωρητικό μοντέλο, όπως έχει αυτό στηθεί. Επίσης, συγκρίνοντας οπτικά τα δύο διαγράμματα, είναι εμφανές ότι ποιοτικά τουλάχιστον ακολουθούν την ίδια συμπεριφορά περίπου.

Κατόπιν, η μέθοδος των πεπερασμένων στοιχείων χρησιμοποιήθηκε προκειμένου να προβλεφθεί η συμπεριφορά του συστήματος για χαμηλότερες ταχύτητες

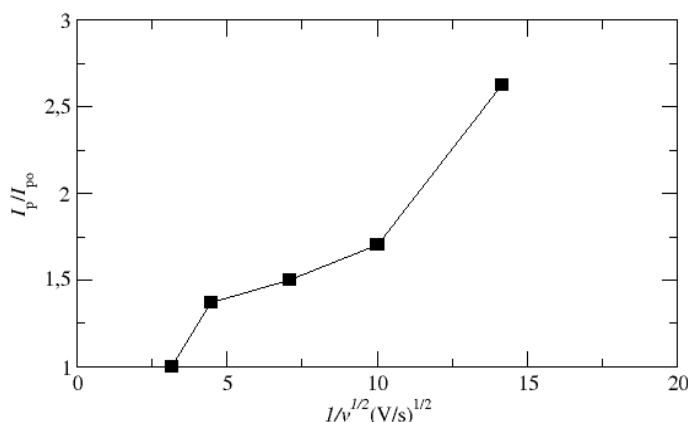
#### 5.4. Υπολογισμοί με Μέθοδο Πεπερασμένων Στοιχείων



Σχήμα 5.14: Υπολογιζόμενα με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων κυκλικά βολταμμογραφήματα απουσία υπεροξειδίου και ταχύτητες σαρωσης 5, 10, 20, 50 και 100 mV/s, για συγκέντρωση ενζύμου  $2 \times 10^{-8} \text{M}$ ,  $K_{1\text{M}} = 88 \text{mM}$ ,  $k_{1,2} = 110.4 \text{s}^{-1}$ ,  $k_{2,2} = 9.4 \times 10^7$ ,  $k_{1,1} = 2401 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ,  $k_{1,-1} = 101^{-1}$  και συγκέντρωση μπλε του μεθυλενίου 62.5  $\mu\text{M}$



Σχήμα 5.15: Υπολογιζόμενα με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων κυκλικά βολταμμογραφήματα για συγκέντρωση υπεροξειδίου 80 mM και ταχύτητες σαρωσης 5, 10, 20, 50 και 100 mV/s, για συγκέντρωση ενζύμου  $2 \times 10^{-8} \text{M}$ ,  $K_{1\text{M}} = 88 \text{mM}$ ,  $k_{1,2} = 110.4 \text{s}^{-1}$ ,  $k_{2,2} = 9.4 \times 10^7$ ,  $k_{1,1} = 2401 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ,  $k_{1,-1} = 101^{-1}$  και συγκέντρωση μπλε του μεθυλενίου 62.5  $\mu\text{M}$



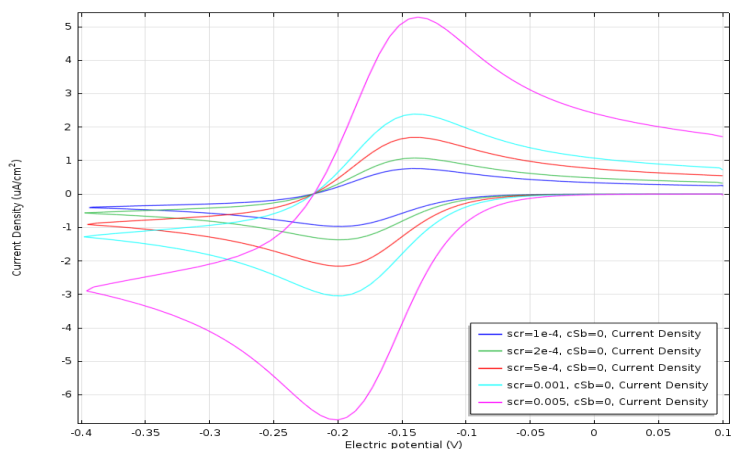
Σχήμα 5.16:  $\frac{I_p}{I_{p_{po}}}$  συναρτήσει του αντιστρόφου της ρίζας της ταχύτητας σάρωσης για διάλυμα κυανού του μεθυλενίου 62.5 $\mu$ M, MtPerII  $4 \times 10^{-8}$ M βάσει υπολογισμών από μέθοδο πεπερασμένων στοιχείων, πριν και μετά την προσθήκη  $H_2O_2$  τελικής συγκέντρωσης 80mM

σάρωσης. Απουσία υπεροξειδίου, για ταχύτητες σάρωσης 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5 mV/s φαίνεται να συνεχίζεται η κλασική συμπεριφορά μιας αντιστρεπτής δράσης σε ένα κυκλικό βολταμογράφημα, καθώς μειώνεται η ένταση των κορυφών για μειούμενη ταχύτητα σάρωσης (Σχήμα 5.17). Για τους υπολογισμούς όπου έχουν προστεθεί και 80mM υπεροξειδίου του υδρογόνου, παρατηρούνται σιγμοειδείς καμπύλες οι οποίες ανταποκρίνονται στην καταλυτική δράση του ενζύμου σε χαμηλές ταχύτητες σάρωσης, όπως προβλέπεται και από τη θεωρία (Σχήμα 5.18).

Στη συνέχεια, πάλι με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων γίνονται υπολογισμοί για τα κυκλικά βολταμογραφήματα για συγκεντρώσεις σε υπεροξειδίου 0, 17.5, 34.3, 86.5 και 141 mM για ρυθμούς σάρωσης 5, 10, 20, 50 και 100 mV/s και τα αντίστοιχα σετ διαγραμμάτων για κάθε ταχύτητα σάρωσης παρουσιάζονται στα Σχήματα 5.19 έως 5.23. Στη συνέχεια από τις αναγωγικές κορυφές για κάθε κυκλικό βολταμογράφημα υπολογίζεται ο λόγος  $\frac{I_p}{I_{p_{po}}}$  για κάθε ζεύγος ρυθμού σάρωσης-συγκέντρωσης υπεροξειδίου του υδρογόνου και εν τέλει κατασκευάζεται το διάγραμμα της εξάρτησης  $\frac{I_p}{I_{p_{po}}}$  από την τετραγωνική ρίζα του παράγοντα  $\lambda$  για κάθε συγκέντρωση υπεροξειδίου, το οποίο παρουσιάζεται στο Σχήμα 5.24.

Συγκρίνοντας το Σχήμα 5.24 για τα υπολογιζόμενα δεδομένα από τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων με το Σχήμα 5.12, οπτικά παρατηρείται αρκετά παρόμοια τάση στις καμπύλες για κάθε συγκέντρωση υπεροξειδίου για την εξάρτηση  $\frac{I_p}{I_{p_{po}}}$  από την τετραγωνική ρίζα του παράγοντα  $\lambda$ . Για τα δεδομένα από τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων οι κλίσεις των γραμμικών κομματιών κάθε καμπύλης υπολογίζονται, 0.124, 0.158, 0.207, και 0.235 για συγκέντρωση υπεροξειδίου 17.5, 34.3, 86.5 και 141 mM αντίστοιχα, και συγκρίνοντας με τις τιμές του πίνακα 5.1 οι αποκλίσεις υπολογίζονται, 5.37, 2.28, 4.63 και 4.61% αντίστοιχα, γεγονός το

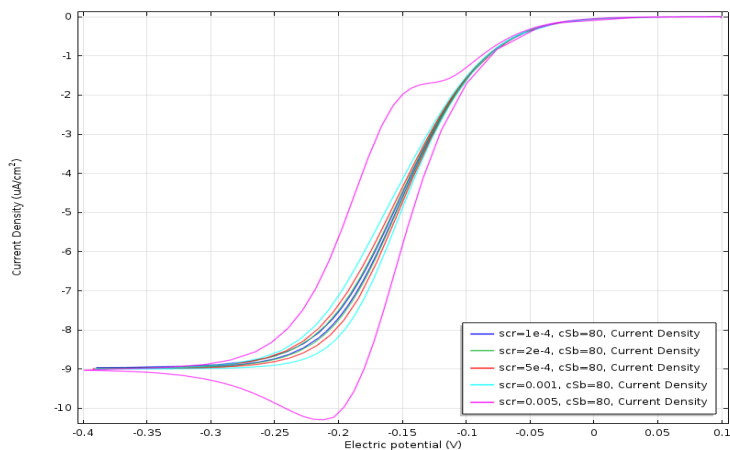
#### 5.4. Υπολογισμοί με Μέθοδο Πεπερασμένων Στοιχείων



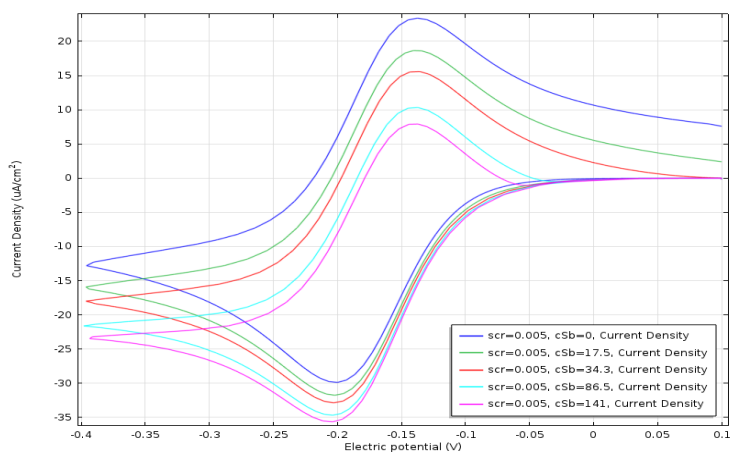
Σχήμα 5.17: Υπολογιζόμενα με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων κυκλικά βολταμμογραφήματα απουσία υπεροξειδίου και ταχύτητες σάρωσης 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5mV/s, για συγκέντρωση ενζύμου  $2 \times 10^{-8} \text{M}$ ,  $K_{1\text{M}} = 88 \text{mM}$ ,  $k_{1,2} = 110.4 \text{s}^{-1}$ ,  $k_{2,2} = 9.4 \times 10^7$ ,  $k_{1,1} = 2401 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ,  $k_{1,-1} = 101^{-1}$  και συγκέντρωση μπλε του μεθυλενίου 62.5  $\mu\text{M}$

οποίο υποδεικνύει ότι οι υπολογισμοί πεπερασμένων στοιχείων επιβεβαιώνουν σε σημαντικό ποσοστό τα πειραματικά αποτελέσματα καθώς και το μοντέλο που έχει προταθεί για την ανάλυση.

Στο Σχήμα 5.25 παρουσιάζονται τα υπολογιζόμενα με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων κυκλικά βολταμμογραφήματα για συγκέντρωση υπεροξειδίου 86.5mM, με συνυπόστρωμα 250  $\mu\text{M}$ , για ταχύτητες σάρωσης 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5, 10, 20, 50 και 100 mV/s με όρια σάρωσης -0.1 με 0.4 V. Παρατηρείται ότι ενώ για ταχύτητες σάρωσης άνω των 10mV/s παρατηρούνται κλασσικά κυκλικά βολταμμογραφήματα με αυξημένη την αναγωγική κορυφή σε σχέση με την οξειδωτική, για μικρότερες ταχύτητες σάρωσης, οι καμπύλες μετατρέπονται σταδιακά σε σιγμοειδείς υποδεικνύοντας έτσι την καταλυτική δράση του ενζύμου.

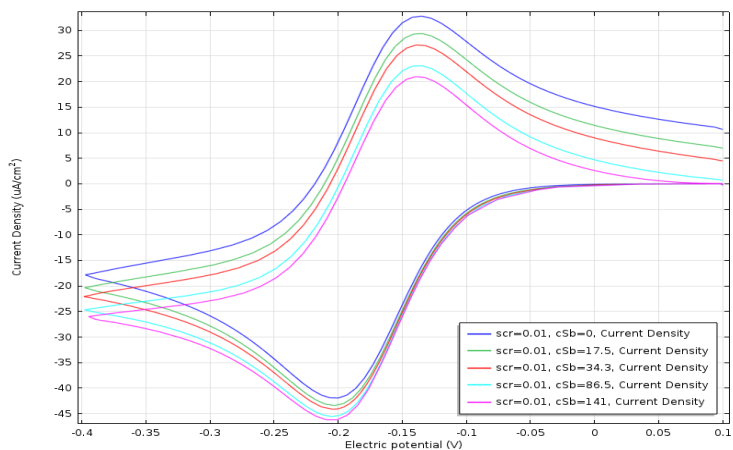


Σχήμα 5.18: Υπολογιζόμενα με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων κυκλικά βολταμογραφήματα για συγκέντρωση υπεροξειδίου 80 mM και ταχύτητες σάρωσης 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5 mV/s, για συγκέντρωση ενζύμου  $4 \times 10^{-8} \text{M}$ ,  $K_{1M}=88 \text{mM}$ ,  $k_{1,2}=110.4 \text{s}^{-1}$ ,  $k_{2,2}=9.4 \times 10^7$ ,  $k_{1,1}=2401 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ,  $k_{1,-1}=101^{-1}$  και συγκέντρωση μπλε του μεθυλενίου 62.5  $\mu\text{M}$

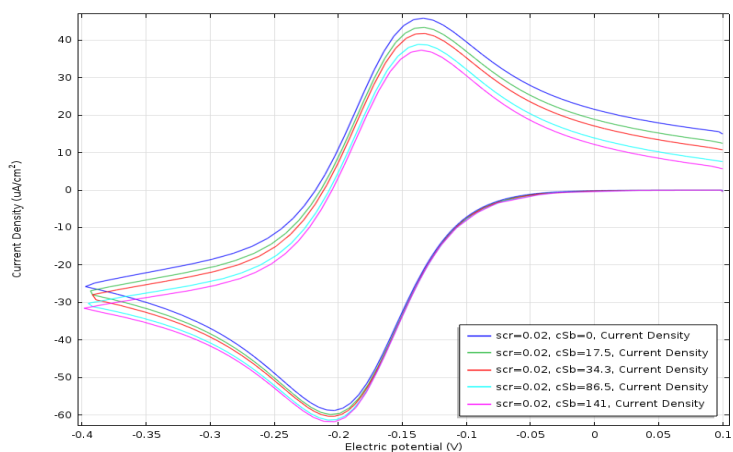


Σχήμα 5.19: Υπολογιζόμενα με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων κυκλικά βολταμογραφήματα για ρυθμό σάρωσης 5mV/s και συγκεντρώσεις υπεροξειδίου 0, 17.5, 34.3, 86.5 και 141mM, για συγκέντρωση ενζύμου  $4 \times 10^{-8} \text{M}$ ,  $K_{1M}=88 \text{mM}$ ,  $k_{1,2}=110.4 \text{s}^{-1}$ ,  $k_{2,2}=9.4 \times 10^7$ ,  $k_{1,1}=2401 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ,  $k_{1,-1}=101^{-1}$  και συγκέντρωση μπλε του μεθυλενίου 250  $\mu\text{M}$

#### 5.4. Υπολογισμοί με Μέθοδο Πεπερασμένων Στοιχείων

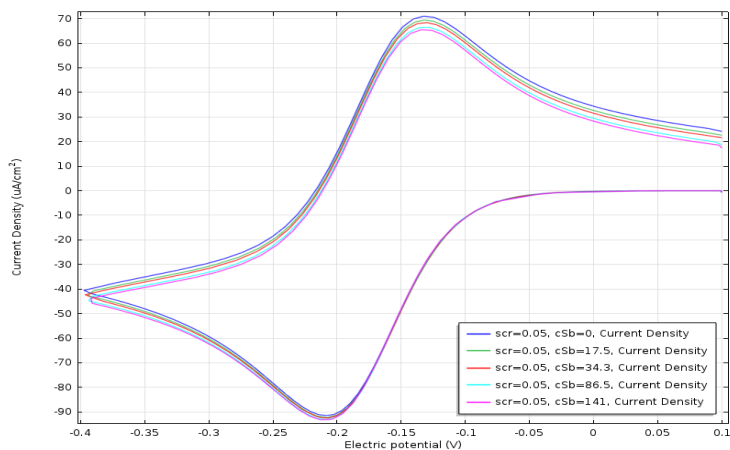


Σχήμα 5.20: Υπολογιζόμενα με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων κυκλικά βολταμογραφήματα για ρυθμό σάρωσης 10 mV/s και συγκεντρώσεις υπεροξειδίου 0, 17.5, 34.3, 86.5 και 141mM, για συγκέντρωση ενζύμου  $4 \times 10^{-8} \text{M}$ ,  $K_{1M}=88 \text{mM}$ ,  $k_{1,2}=110.4 \text{s}^{-1}$ ,  $k_{2,2}=9.4 \times 10^7$ ,  $k_{1,1}=2401 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ,  $k_{1,-1}=101^{-1}$  και συγκέντρωση μπλε του μεθυλενίου 250  $\mu\text{M}$

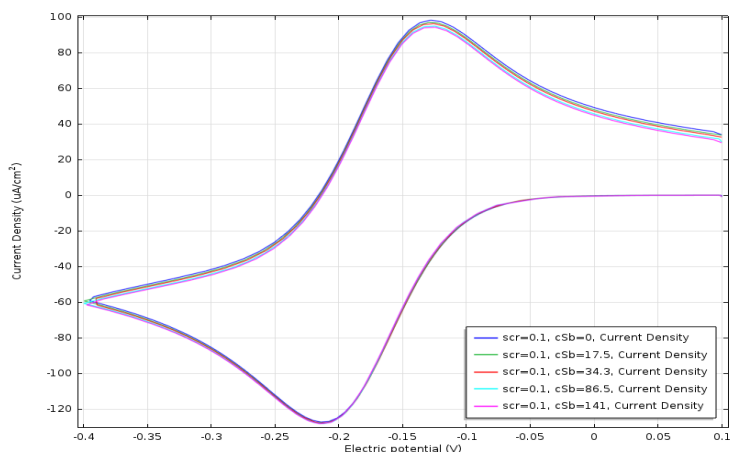


Σχήμα 5.21: Υπολογιζόμενα με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων κυκλικά βολταμογραφήματα για ρυθμό σάρωσης 20 mV/s και συγκεντρώσεις υπεροξειδίου 0, 17.5, 34.3, 86.5 και 141mM, για συγκέντρωση ενζύμου  $4 \times 10^{-8} \text{M}$ ,  $K_{1M}=88 \text{mM}$ ,  $k_{1,2}=110.4 \text{s}^{-1}$ ,  $k_{2,2}=9.4 \times 10^7$ ,  $k_{1,1}=2401 \text{M}^{-1} \text{s}^{-1}$ ,  $k_{1,-1}=101^{-1}$  και συγκέντρωση μπλε του μεθυλενίου 250  $\mu\text{M}$



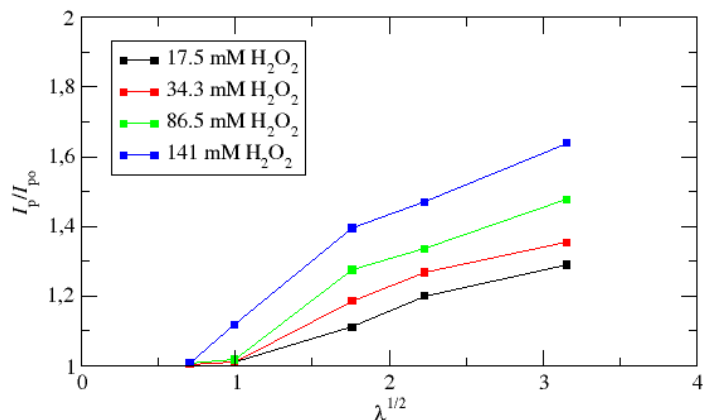


Σχήμα 5.22: Υπολογιζόμενα με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων κυκλικά βολταμμογραφήματα για ρυθμό σάρωσης 50 mV/s και συγκεντρώσεις υπεροξειδίου 0, 17.5, 34.3, 86.5 και 141mM, για συγκέντρωση ενζύμου  $4 \times 10^{-8}\text{M}$ ,  $K_{1\text{M}}=88\text{mM}$ ,  $k_{1,2}=110.4\text{s}^{-1}$ ,  $k_{2,2}=9.4 \times 10^7$ ,  $k_{1,1}=2401\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{1,-1}=101^{-1}$  και συγκέντρωση μπλε του μεθυλενίου 250  $\mu\text{M}$

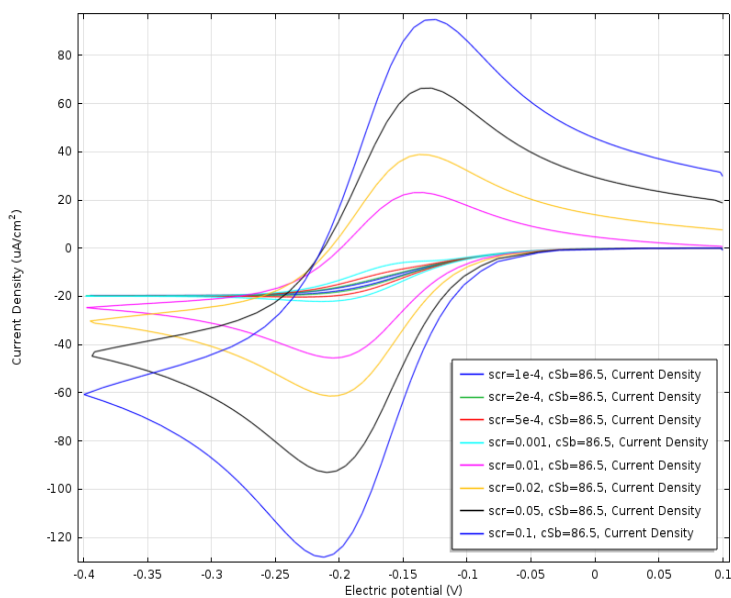


Σχήμα 5.23: Υπολογιζόμενα με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων κυκλικά βολταμμογραφήματα για ρυθμό σάρωσης 100 mV/s και συγκεντρώσεις υπεροξειδίου 0, 17.5, 34.3, 86.5 και 141mM, για συγκέντρωση ενζύμου  $4 \times 10^{-8}\text{M}$ ,  $K_{1\text{M}}=88\text{mM}$ ,  $k_{1,2}=110.4\text{s}^{-1}$ ,  $k_{2,2}=9.4 \times 10^7$ ,  $k_{1,1}=2401\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{1,-1}=101^{-1}$  και συγκέντρωση μπλε του μεθυλενίου 250  $\mu\text{M}$

#### 5.4. Υπολογισμοί με Μέθοδο Πεπερασμένων Στοιχείων



Σχήμα 5.24:  $\frac{I_p}{I_{po}}$  συνάρτηση της ρίζας του παράγοντα  $\lambda$  για διαφορετικές συγκεντρώσεις  $H_2O_2$ , βάσει υπολογισμών με μέθοδο πεπερασμένων στοιχείων



Σχήμα 5.25: Υπολογιζόμενα με τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων κυκλικά βολταμμογραφήματα για συγέντρωση υπεροξειδίου 86.5 mM και ταχύτητες σαρωσης 0.1, 0.2, 0.5, 1, 5, 10, 20, 50 και 100 mV/s, για συγέντρωση ενζύμου  $4 \times 10^{-8} M$ ,  $K_{1M}=88mM$ ,  $k_{1,2}=110.4s^{-1}$ ,  $k_{2,2}=9.4 \times 10^7$ ,  $k_{1,1}=2401M^{-1}s^{-1}$ ,  $k_{1,-1}=101^{-1}$  και συγέντρωση μπλε του μεθυλενίου 250  $\mu M$

## Κεφάλαιο 6

# Εύρεση Προτύπου Δυναμικού Fe(III)/Fe(II)

### 6.1 Χρήση Πυρολυτικού Άνθρακα

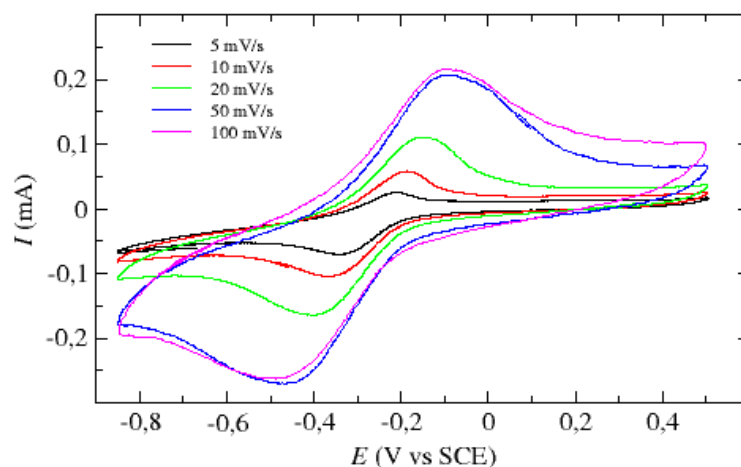
Για την μέτρηση του πρότυπου δυναμικού Fe(III)/Fe(II) του ενζύμου αρχικά έγινε χρήση πυρολυτικού άνθρακα για ηλεκτρόδιο εργασίας. Η χρήση του συγκεκριμένου ηλεκτροδίου εργασίας έγινε καθώς βιβλιογραφικά φαίνεται ότι υπάρχει η δυνατότητα προσρόφησης ενζύμου στη δομή του πυρολυτικού άνθρακα με αποτέλεσμα την απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων[49]. Η επιφάνεια του πυρολυτικού άνθρακα έχει πολλές λειτουργικές ομάδες C-O στις οποίες προσροφούνται αρκετές πρωτεΐνες και παρουσιάζουν γρήγορη μεταφορά ηλεκτρονίων [48].

### 6.2 Πειραματική Διαδικασία Αποτελέσματα

Αρχικά για τον καθαρισμό του πυρολυτικού άνθρακα έγινε εμβάπτιση σε τολουόλιο [17] για απομάκρυνση τυχόν ακαθαρσιών ή υπολειμμάτων από προηγούμενα πειράματα. Κατόπιν χρησιμοποιήθηκε σύστημα τριών ηλεκτροδίων με ηλεκτρόδιο εργασίας κομμάτι πυρολυτικού άνθρακα για βαθμονόμηση SEM (Graphite Plate, Pyrolytic 1.27x9.98x9.98mm), με ηλεκτρόδιο αναφοράς καλομέλανα (+244 mV vs SHE) και ως αντίθετο ηλεκτρόδιο ράβδο άνθρακα. Χρησιμοποιήθηκε ποτενσιοστάτης Scanning Potentiostat Model 362 της EG & G Instruments, Princeton Applied Research συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Στο Σχήμα 6.1 παρουσιάζονται τα κυκλικά βολταμογραφήματα της υπεροξει-

## 6.2. Πειραματική Διαδικασία Αποτελέσματα



Σχήμα 6.1: Κυκλικό βολταμμογράφημα *MtPerII* συγκέντρωσης 0.270mg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα TrisHCl pH=8, 20mM με ταχύτητες σάρωσης 5, 10, 20, 50 και 100 mV/s με πυρολυτικό άνθρακα ως ηλεκτρόδιο εργασίας

δάσης *MtPerII* για ταχύτητες σάρωσης 5, 10, 20, 50 και 100 mV/s. Η κυκλική σάρωση έχει όρια -0.8 και 0.5 V και ξεκίνησε από τα -0.8 V. Ο χρησιμοποιούμενος όγκος είναι 3 ml και η συγκέντρωση του διαλύματος είναι 0.270mg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα TrisHCl pH=8, 20mM. Για μεγάλες ταχύτητες σάρωσης (50 και 100 mV/s) οι οξειδοαναγωγικές κορυφές των κυκλικών βολταμμογραφημάτων είναι πιο απομακρυσμένες σε σχέση με τις πιο χαμηλές. Επίσης για την πιο χαμηλή ταχύτητα σάρωσης των 5mV/s ο οξειδωτική κορυφή είναι πολύ μικρότερη από την αναγωγική, κάτι το οποίο δεν παρατηρείται στις υπόλοιπες περιπτώσεις.

Στον Πίνακα 6.1 παρουσιάζονται οι τιμές των αναγωγικών και οξειδωτικών κορυφών που εξάγονται από την ανάλυση των κυκλικών βολταμμογραφημάτων με ηλεκτρόδιο εργασίας τον πυρολυτικό άνθρακα. Είναι εμφανές ότι δεν πρόκειται για αντιστρεπτή δράση καθώς όλα τα ζεύγη κορυφών απέχουν μεταξύ τους τουλάχιστον κατά 138 mV, το οποίο είναι πάνω από το διπλάσιο του κριτηρίου αντιστρεπτότητας (58 mV για μεταφορά ενός ηλεκτρονίου), άρα δεν μπορεί να θεωρηθεί ότι το πρότυπο δυναμικό είναι το μέσο των οξειδοαναγωγικών κορυφών. Για αυτόν τον λόγο έγινε χρήση των  $E_{1/2}$  που αντιστοιχούν στο δυναμικό που εντοπίζεται στο μισό της έντασης του ρεύματος της κάθε οξειδοαναγωγικής κορυφής και παρουσιάζονται στον Πίνακα 6.2. Από περαιτέρω επεξεργασία των δεδομένων του Πίνακα 6.2 παρατηρείται ότι ο μέσος όρος των ανωδικών  $E_{1/2}$  συμπίπτει με αυτόν των καθοδικών και αντιστοιχεί περίπου σε -0.265 mV, το οποίο μπορεί να θεωρηθεί ως το φαινόμενο δυναμικό Fe(III)/Fe(II) (formal potential) του ενζύμου.

Πίνακας 6.1: Οξειδωτικές ( $E_{pa}$ ) και αναγωγικές κορυφές ( $E_{pc}$ ) που εξάγονται από Σχήμα 6.1

Scan rate (mV/s)	$E_{pa}$	$E_{pc}$
5	-0.205	-0.343
10	-0.189	-0.364
20	-0.144	-0.399
50	-0.093	-0.470
100	-0.093	-0.488

Πίνακας 6.2:  $E_{1/2a}$  (οξειδωτικά) και  $E_{1/2c}$  (αναγωγικά) που εξάγονται από Σχήμα 6.1

Scan rate (mV/s)	$E_{1/2a}$	$E_{1/2c}$
5	-0.265	-0.245
10	-0.266	-0.254
20	-0.256	-0.266
50	-0.275	-0.289
100	-0.251	-0.288

### 6.3 Ακίνητοποίηση σε Πεντανοθειόλη

#### 6.3.1 Αυτοσυναρμοζόμενη μονοστιβάδα πεντανοθειόλης

Σκοπός της εν προκειμένω πειραματικής διαδικασίας αποτελεί η ακίνητοποίηση του ενζύμου σε ηλεκτρόδιο χρυσού, προκειμένου να επιτευχθεί η απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ ενεργού κέντρου του ενζύμου και ηλεκτροδίου. Αρχικά για το σκοπό αυτό είχε γίνει ακίνητοποίηση του ενζύμου με χρήση δωδεκανοθειόλης, όμως, λόγω του μεγάλου μήκους της αλυσίδας δεν επιτεύχθηκε. Κατόπιν έγινε δοκιμή με πεντανοθειόλη, καθώς για μικρότερο μήκος αλυσίδας υποτέθηκε ότι ίσως να είναι εφικτή η απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων. Επίσης λόγω μικρότερου μήκους αλυσίδας, η πεντανοθειόλη παρουσιάζει μικρότερη τάξη κατά την επικάλυψη της επιφάνειας του χρυσού, συνεπώς λιγότερη μόνωση και αυξάνει τις πιθανότητες άμεσης μεταφοράς ηλεκτρονίων.

#### 6.3.2 Τροποποίηση Ηλεκτροδίου με Πεντανοθειόλη

Σε 20 mL αιθανολικού διαλύματος 1-πεντανοθειόλη συγκέντρωσης 0,08 M, εμβαπτίζεται καθαρισμένο με πόλωση σε  $H_2SO_4$  1 M, ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος ηλεκτροχημικά ενεργής επιφάνειας  $0.217 \text{ cm}^2$  για 8 ώρες. Κατόπιν, αφαιρείται από το αιθανολικό διάλυμα, στεγνώνεται με ρεύμα αερίου αζώτου και

### 6.3. Ακίνητοποίηση σε Πεντανοθειόλη

Πίνακας 6.3: Οξειδωτικά Αναγωγικά Δυναμικά και  $E_o$  για κάθε pH από κυκλικά βολταμμογραφήματα ακινητοποιημένης υπεροξειδάσης MtPerII σε ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος με αυτοσυναρμολογούμενη μονοστιβάδα πεντανοθειόλης για ρυθμό σάρωσης 100mV/s

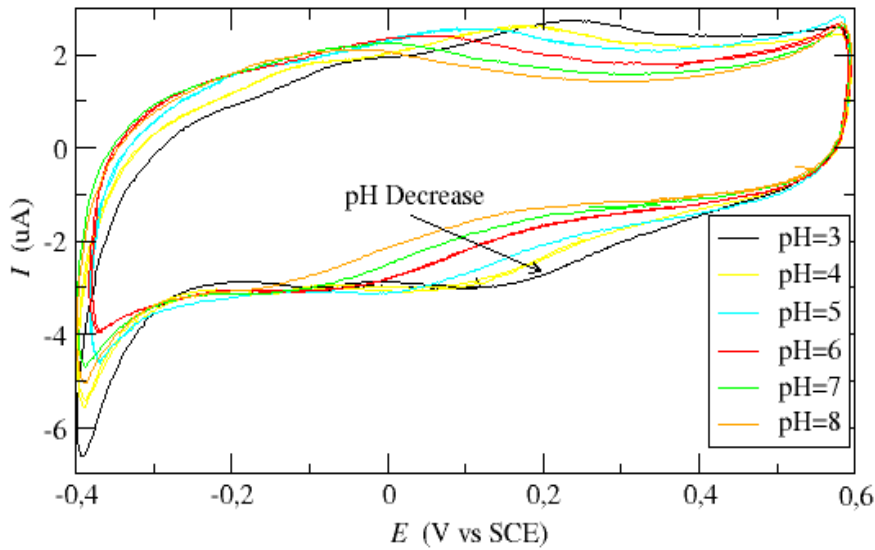
pH	$E_a$ (V)	$E_c$ (V)	$E'_o$ (V)
8.0	-0.078	-0.148	-0.113
7.0	-0.017	-0.106	-0.062
6.0	0.035	-0.064	-0.015
5.0	0.098	0.020	0.059
4.0	0.161	0.074	0.118
3.0	0.234	0.122	0.178

τοποθετείται σε ενζυμικό διάλυμα MtPerII 0.270 mg/ml, TrisHCl pH=8 20mM, στους 4°C για 17 ώρες. Έπειτα αφαιρείται από το ενζυμικό διάλυμα και αφήνεται για 15 λεπτά στο ψυγείο.

#### 6.3.3 Πειραματική Διαδικασία

Έγινε χρήση συστήματος τριών ηλεκτροδίων, όπου ως ηλεκτρόδιο εργασίας χρησιμοποιείται το τροποποιημένο με 1-πεντανοθειόλη ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος, ως ηλεκτρόδιο αναφοράς καλομέλανας (-244 mV vs SHE) και ως αντίθετο ηλεκτρόδιο ράβδος άνθρακα. Χρησιμοποιήθηκε ποτενσιοστάτης Scanning Potentiostat Model 362 της EG & G Instruments, Princeton Applied Research συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Στο Σχήμα 6.2 παρουσιάζονται τα κυκλικά βολταμμογραφήματα του ακινητοποιημένου στο ηλεκτρόδιο ενζύμου σε ρυθμιστικά διαλύματα με pH 3, 4, 5, 6, 7 και 8. Τα ρυθμιστικά διαλύματα με pH 6, 7 και 8 αντιστοιχούν σε ρυθμιστικά διαλύματα φωσφορικών ιόντων ενώ για pH 3, 4 και 5 σε ρυθμιστικό διάλυμα τρυγικού οξέος-τρυγικού νατρίου συγκέντρωσης 20mM έκαστο. Η κυκλική βολταμετρία πραγματοποιείται εν προκειμένω μεταξύ -0.4 και 0.6V ξεκινώντας από τα -0.4V με ρυθμό σάρωσης 100mV/s. Οι οξειδοαναγωγικές κορυφές που εμφανίζονται δεν είναι τόσο έντονες, όμως, μετά από κυκλική σάρωση και στα ρυθμιστικά διαλύματα χωρίς να έχει προηγηθεί ακινητοποίηση του ενζύμου στο χρυσό και απουσία οξειδοαναγωγικών κορυφών στα αντίστοιχα βολταμμογραφήματα, μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι αντιστοιχούν στο ένζυμο. Επίσης, χρησιμοποιήθηκαν δύο διαφορετικού τύπου ρυθμιστικά διαλύματα και οι κορυφές υπάρχουν και στα δύο, συνεπώς οι πιθανότητες η απόκριση να μην οφείλεται σε οξειδοαναγωγή του ενεργού κέντρου του ενζύμου μειώνονται ακόμα περισσότερο. Επίσης, οι διαφορές μεταξύ οξειδωτικής και αναγωγικής κορυφής για κάθε μελετούμενο pH είναι περίπου 70 με 100 mV συνεπώς, η δράση μπορεί να θεωρηθεί «καταχρηστικά» αντιστρεπτή εφόσον οι δύο κορυφές δεν απέχουν πάνω από 100 mV μεταξύ τους. Στον Πίνακα 6.3 παρουσιάζονται τα δυναμικά στα οποία εμφανίζονται οι οξειδοαναγωγικές κορυφές που εξάγονται από το Σχήμα 6.2 καθώς και τα υπολογιζόμενα  $E'_o$  (Fe(III)/Fe(II))

Όπως φαίνεται από τον Πίνακα 6.3, το πρότυπο δυναμικό του ενζύμου δεν εί-



Σχήμα 6.2: Κυκλικά βολταμογραφήματα ακινητοποιημένης υπεροξειδάσης *MtPerII* σε ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος με αυτοσυναρμολογούμενη μονοστιβάδα πεντανοθειώλης σε ρυθμιστικά διαλύματα pH 3, 4, 5, 6, 7 και 8 για ρυθμό σάρωσης 100mV/s

ναι σταθερό, ενώ κανονικά θα έπρεπε να μένει ίδιο ανεξαρτήτως του pH, καθώς πρόκειται για ένα θερμοδυναμικό μέγεθος. Η μεταβολή του πρότυπου δυναμικού αυτή οφείλεται στην ιοντική ισχύ του εκάστοτε διαλύματος. Στην εξίσωση Nernst (Σχέση 6.1) εμπεριέχεται τόσο το πρότυπο δυναμικό, όσο και η ενεργότητα των οξειδωμένων και των ανηγμένων ενεργών ειδών στο διάλυμα. Με δεδομένο ότι η ενεργότητα ισούται με τον συντελεστή ενεργότητας,  $\gamma$ , επί τη συγκέντρωση των οξειδωμένων και ανηγμένων χημικών ειδών στο διάλυμα,  $c$ , η εξίσωση Nernst μετασχηματίζεται όπως φαίνεται στη Σχέση 6.2

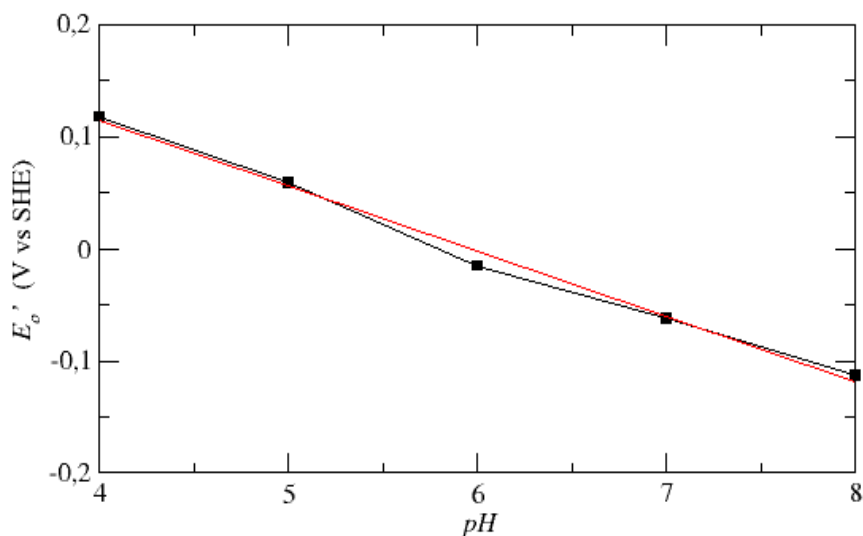
$$E_{eq} = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{ox}}{a_{red}} \quad (6.1)$$

όπου  $E_{eq}$  το δυναμικό ισορροπίας του κελιού,  $E^{\circ}$  το πρότυπο δυναμικό του συστήματος,  $a_{ox}$  η ενεργότητα των οξειδωμένων ειδών στο διάλυμα και  $a_{red}$  η ενεργότητα των ανηγμένων ειδών στο διάλυμα.

$$E_{eq} = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{\gamma_{ox}}{\gamma_{red}} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{c_{ox}}{c_{red}} \quad (6.2)$$

Συνεπώς, το μετρούμενο με την κυκλική βολταμετρία δυναμικό  $E^{\circ}$ , αντιστοιχεί στο πρότυπο δυναμικό συν τον όρο  $\frac{RT}{nF} \ln \frac{\gamma_{ox}}{\gamma_{red}}$ , και αλλάζοντας το pH παρατηρείται μεταβολή του. Η εξάρτηση του  $E^{\circ}$  από το pH παρουσιάζεται στο Σχήμα 6.3.

### 6.3. Ακίνητοποίηση σε Πεντανοθειώλη



Σχήμα 6.3: Εξάρτηση  $E'_0$  ακινητοποιημένης υπεροξειδάσης *MtPerII* σε ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος με αυτοσυναρμολοζόμενη μονοστιβιάδα πεντανοθειώλης για ρυθμό σάρωσης 100mV/s από το pH

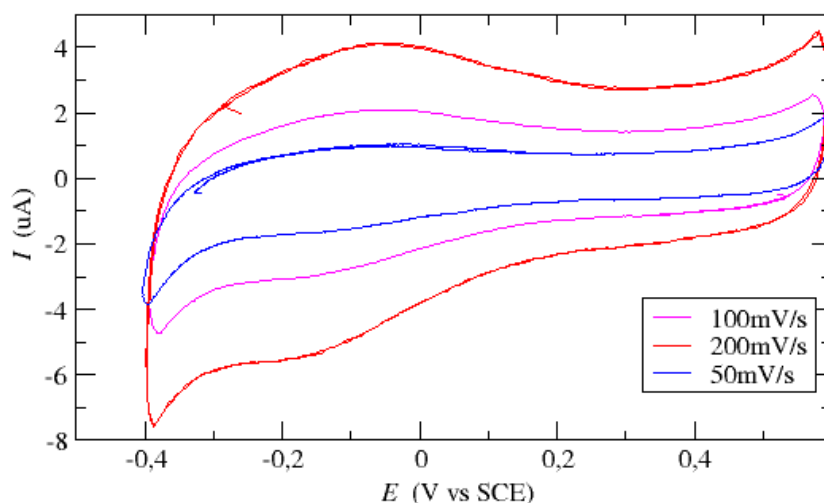
Παρατηρείται γραμμική εξάρτηση με συντελεστή γραμμικής συσχέτισης 0.9967 και μαθηματικώς περιγράφεται από τη Σχέση 6.3.

$$y = -0.0583 + 0.3472 \quad (6.3)$$

Στο Σχήμα 6.4 παρουσιάζονται τα κυκλικά βολταμογραφήματα του ακινητοποιημένου ενζύμου σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8 για ρυθμούς σάρωσης 50, 100 και 200mV/s με όρια τα -0.4 και τα 0.6 V ξεκινώντας από τα -0.4V. Για ρυθμό σάρωσης 50 mV/s δεν είναι εμφανής κάποια οξειδοαναγωγική κορυφή, για τα 100mV/s αρχίζει να φαίνεται οξειδωτική κορυφή στα -0.078 V vs SCE και αναγωγική στα -0.148 V vs SCE και στα 200 mV/s οι κορυφές φαίνονται να είναι πιο ξεκάθαρες. Συνεπώς, εφόσον αυξανόμενη της ταχύτητας σάρωσης φαίνονται πιο έντονες οι οξειδοαναγωγικές κορυφές φαίνεται ότι πρόκειται για ταχύτερη ηλεκτροχημική δράση.

Όσον αφορά στον υπολογισμό του  $E'_0$  Fe(III)/Fe(II) έχοντας ακινητοποιήσει το ένζυμο, παρατηρείται ότι είναι διαφορετικό κατά περίπου 100 mV για pH=8 σε σχέση με αυτό που υπολογίζεται όταν είναι ελεύθερο στο διάλυμα. Αυτό μπορεί να οφείλεται είτε σε αλλαγή της διαμόρφωσης του ενζύμου κατά την ακινητοποίηση είτε σε διαφορά στην ιοντική ισχύ και διηλεκτρική σταθερά του χρησιμοποιούμενου ρυθμιστικού διαλύματος σε κάθε ένα από τα δύο πειράματα. Πάντως συγκρίνοντας και τα δύο νούμερα με τα στοιχεία για  $E'_0$  για τις πρωτεΐνες που καταλύουν την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου (Πίνακας 1.2), η τιμή που υπολογίζεται για





Σχήμα 6.4: Κυκλικά βολταμογραφήματα ακινητοποιημένης υπεροξειδάσης *MtPerII* σε ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος με αυτοσυναρμολογούμενη μονοστιβάδα πεντανοθειόλης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8, 20mM για ρυθμούς σάρωσης 50, 100m και 200mV/s

την *MtPerII* φαίνεται να έχει φυσική σημασία και να βρίσκεται σε λογικά επίπεδα και ελαφρώς ανοδικότερα από τις αντίστοιχες των άλλων πρωτεϊνών. Επίσης, σε αυτό το σημείο πρέπει να σημειωθεί ότι έγινε προσδιορισμός για το οξειδοαναγωγικό ζεύγος Fe(III)/Fe(II) της αίμης της υπεροξειδάσης, το οποίο μπορεί να δώσει μία ένδειξη μόνο για την οξειδωτική δράση του ενζύμου, καθώς οι οξειδωτικές βαθμίδες του σιδήρου της αίμης που συμμετέχουν στην ενζυμική κατάλυση των υπεροξειδασών που περιέχουν αίμη είναι οι Fe(III), Fe(IV) και Fe(V). Με δεδομένο ότι συγκρίνοντας με τις τιμές που έχουν βρεθεί για τα αντίστοιχα ένζυμα της βιβλιογραφίας, το δυναμικό που προκύπτει είναι ανοδικότερο, συνεπάγεται ότι έχει καλύτερη οξειδωτική δράση από τα ομοειδή του, το οποίο συνεπάγεται ότι μπορεί να οξειδώσει πιο εύκολα τις ανηγμένες μορφές των εκάστοτε συνυποστρωμάτων του.

### 6.3. Ακίνητοποίηση σε Πεντανοθειόλη

---

## Μέρος ΙΙΙ

# Εφαρμογή ως Ενζυμικό Ηλεκτρόδιο



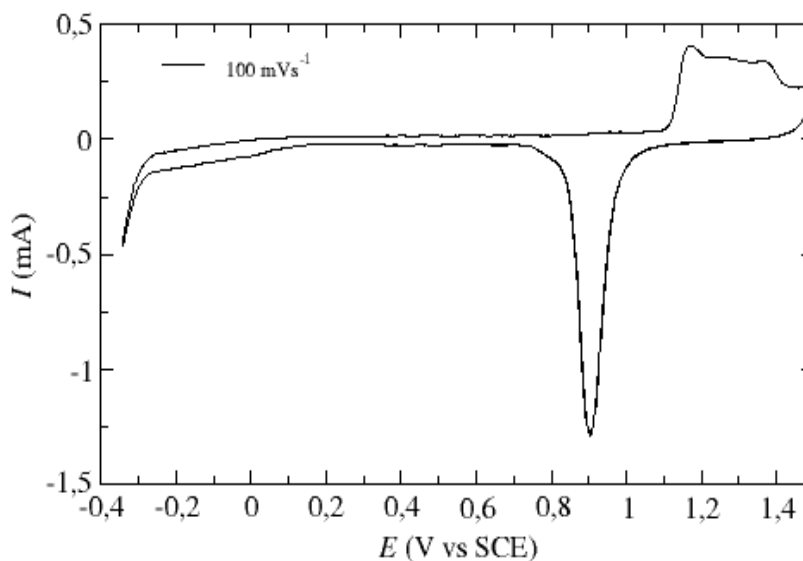
## Κεφάλαιο 7

# Τροποποίηση επιφάνειας Ηλεκτροδίου

### 7.1 Καθαρισμός Επιφάνειας Ηλεκτροδίου

Σε πρώτη φάση, με σκοπό την τροποποίηση της ηλεκτροδιακής επιφάνειας για να ακολουθήσει η προσρόφηση της υπεροξειδάσης *MtPerII* σε αυτήν, πραγματοποιείται καθαρισμός ηλεκτροδίου Au σε μορφή ελάσματος με κυκλική πόλωση μεταξύ -1.0 και 2.3 V vs SCE σε υδατικό διάλυμα  $H_2SO_4$  συγκέντρωσης 1 M, με χρήση συστήματος τριών ηλεκτροδίων, με ηλεκτρόδιο εργασίας το χρυσό, ηλεκτρόδιο αναφοράς καλομέλινα (+244mV vs SHE) και αντίθετο ηλεκτρόδιο ράβδος άνθρακα. Χρησιμοποιήθηκε ποτενσιοστάτης Scanning Potentiostat Model 362 της EG & G Instruments, Princeton Applied Research συνδεδεμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Αρχικά πραγματοποιείται σάρωση για 10 λεπτά με ρυθμό 50 mV/s και κατόπιν με αλλαγή διαλύματος θεικού οξέος  $H_2SO_4$ , με το ίδιο σύστημα τριών ηλεκτροδίων, εκ νέου σάρωση για 10 λεπτά με ρυθμό 100 mV/s. Μετά το πέρας της διαδικασίας πραγματοποιείται κυκλική βολταμερία μεταξύ -0.3 και 1.5 V vs SCE, ξεκινώντας από τα -0.3 V vs SCE με ρυθμό σάρωσης 100 mV/s ώστε να προκύψει ένα τυπικό κυκλικό βολταμογραφήμα καθαρής επιφάνειας χρυσού όπως αυτό που παρουσιάζεται στο Σχήμα 7.1, όπου στα +1.1 V vs SCE παρουσιάζεται μια χαρακτηριστική για το χρυσό οξειδωτική κορυφή και ακολουθούν δύο μικρότερες και στα +0.9 V vs SCE μία οξεία αναγωγική κορυφή, ενώ κάτω από τα 0 V vs SCE παρατηρείται η αναγωγή των υδρογονοκατιόντων[58].

## 7.2. Υπολογισμός Ηλεκτροχημικώς Ενεργής Επιφάνειας Χρυσού



Σχήμα 7.1: Κυκλικό βολταμογράφημα σε ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος σε  $\text{H}_2\text{SO}_4$  1 M με ρυθμό σάρωσης 100mV/s

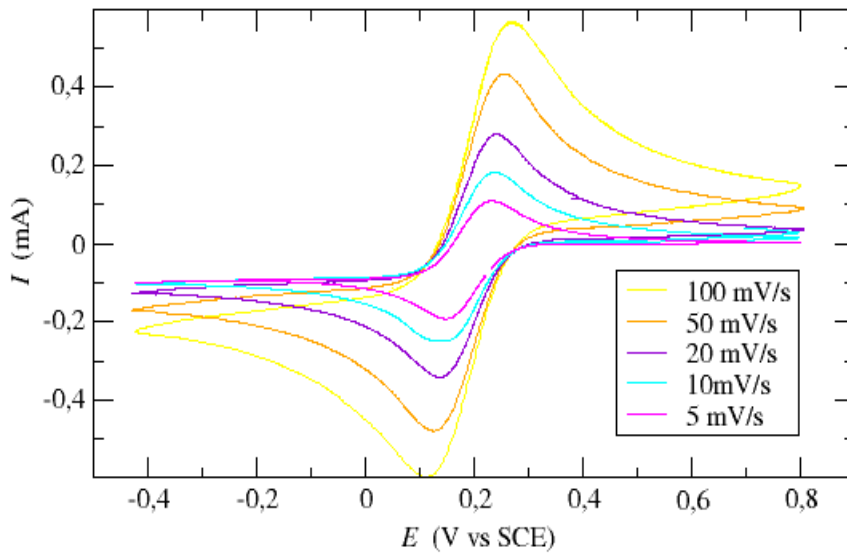
## 7.2 Υπολογισμός Ηλεκτροχημικώς Ενεργής Επιφάνειας Χρυσού

Για τον υπολογισμό της ηλεκτροχημικώς ενεργής επιφάνειας του ηλεκτροδίου χρυσού σε μορφή ελάσματος, πραγματοποιείται κυκλική βολταμετρία σε υδατικό διάλυμα  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  συγκέντρωσης 0.01 M με 0.1 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  για φέροντα ηλεκτρολύτη, για ταχύτητες σάρωσης 5, 10, 20, 50, 100 mV/s. Στο Σχήμα 7.2 παρουσιάζονται τα κυκλικά βολταμογραφήματα που ελήφθησαν από την ανωτέρω πειραματική διαδικασία, με όρια σάρωσης -0.4 και 0.8 V vs SCE ξεκινώντας από τα -0.4V vs SCE.

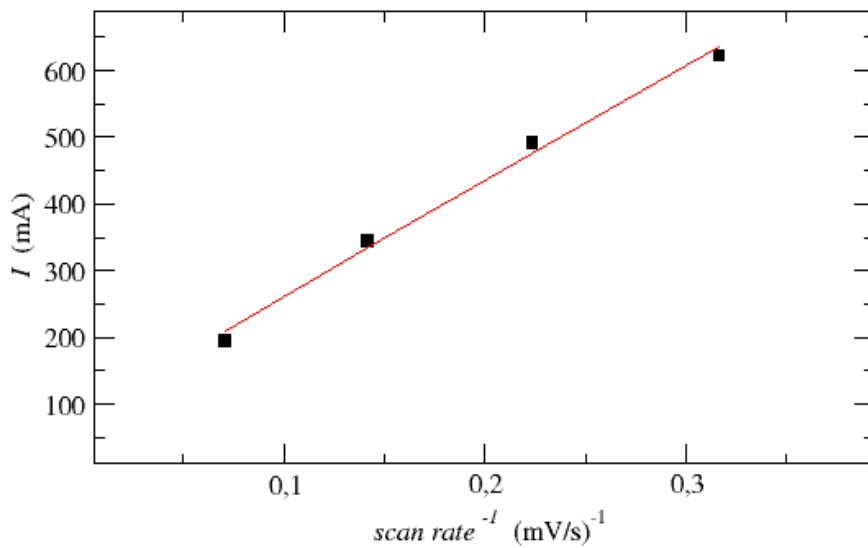
Για κάθε ρυθμό σάρωσης φέρεται η επαπτομένη στην ασύμπτωτη τιμή του ρεύματος για πολύ ανοδικά δυναμικά και κατόπιν υπολογίζεται η απόσταση της επαπτομένης αυτής από την αναγωγική κορυφή. Στη συνέχεια καταστρώνεται το διάγραμμα ρεύματος συναρτήσεως της ρίζας του ρυθμού σάρωσης και παρουσιάζεται στο Σχήμα 7.3. Από γραμμική προσαρμογή των δεδομένων η κλίση προκύπτει ίση με  $0.00173 \text{ A}\sqrt{\text{V}/\text{s}}$ . Από την εξίσωση 7.1 υπολογίζεται η επιφάνεια  $0.217\text{cm}^2$

$$I_p = 2.69 \times 10^5 n^{3/2} A \sqrt{D_o} v C_o \quad (7.1)$$

όπου  $D_o$  ο συντελεστής διάχυσης των σιδηροκυανιούχων ίσος με  $0.896\text{cm}^2/\text{s}$ ,



Σχήμα 7.2: Κυκλικά βολταμογράφημα σε ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος σε 0.01 M  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ , με 0.1 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ως φέρων ηλεκτρολύτης για ρυθμούς σάρωσης 5, 10, 20, 50, 100 mV/s



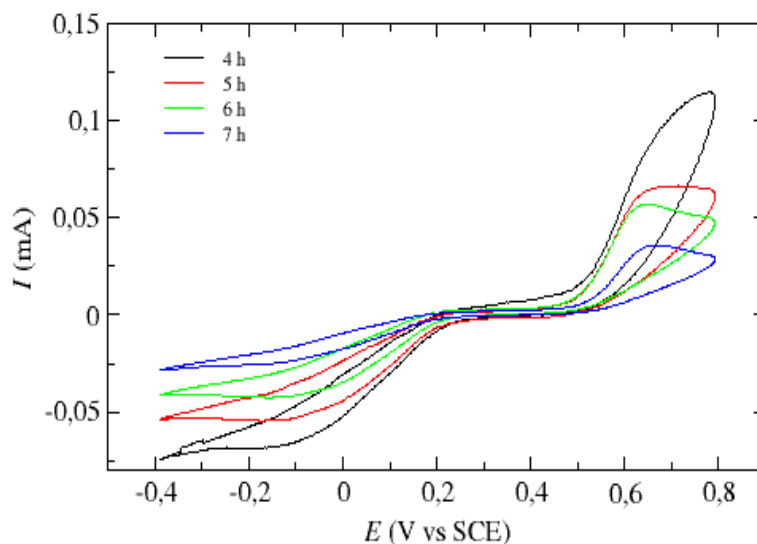
Σχήμα 7.3: Διάγραμμα αναγωγικής κορυφής συναρτήσει της τετραγωνικής ρίζας του ρυθμού σάρωσης από κυκλικά βολταμογράφημα σε ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος σε 0.01 M  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ , με 0.1 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ως φέρων ηλεκτρολύτης για ρυθμούς σάρωσης 5, 10, 20, 50, 100 mV/s

### 7.3. Εμβάπτιση σε Δωδεκανοθειόλη

$C_o$  η συγκέντρωση της οξειδωμένης μορφής των σιδηροκυανιούχων στο διάλυμα ίσο με 0.01M,  $v$  η ταχύτητα σάρωσης σε V/s και  $A$  η επιφάνεια του ηλεκτροδίου σε  $\text{cm}^2$ .

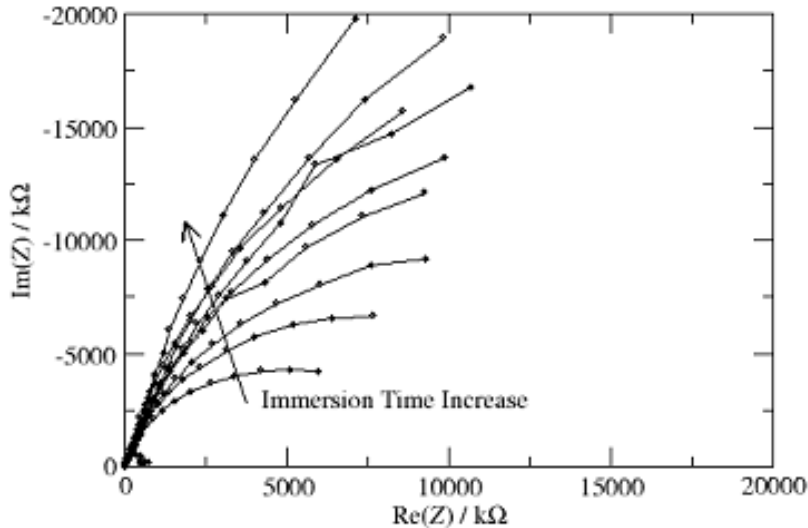
### 7.3 Εμβάπτιση σε Δωδεκανοθειόλη

Μετά τον καθαρισμό του ηλεκτροδίου χρυσού σε μορφή ελάσματος, γίνεται εμβάπτισή του σε αιθανολικό διάλυμα δωδεκανοθειόλης συγκέντρωσης 0.1 mM. Για την εξακρίβωση της δημιουργίας αυτοσυναρμοζόμενης μονοστιβάδας από τη δωδεκανοθειόλη που καλύπτει την επιφάνεια του χρυσού, σε πρώτο στάδιο πραγματοποιείται κυκλική βολταμετρία σε υδατικό διάλυμα  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  συγκέντρωσης 0.01 M με 0.1 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ως φέροντα ηλεκτρολύτη για ταχύτητες σάρωσης 5, 10, 20, 50, 100 mV/s, μετά από την εμβάπτιση του ηλεκτροδίου στο αιθανολικό διάλυμα δωδεκανοθειόλης για διάφορα χρονικά διαστήματα. Στο Σχήμα 7.4 παρουσιάζονται τα κυκλικά βολταμογραφήματα που ελήφθησαν από την ανωτέρω πειραματική διαδικασία, με όρια σάρωσης -0.4 και 0.8 V vs SCE ξεκινώντας από τα -0.4V vs SCE και παρατηρείται ότι ήδη από τις 4 ώρες το σήμα που λαμβάνεται σε καθαρή επιφάνεια (Σχήμα 7.2) έχει παραμορφωθεί και καθώς αυξάνεται ο χρόνος εμβάπτισης, η παραμόρφωση αυξάνεται όλο και περισσότερο, τείνοντας στην πλήρη εξαφάνιση του σήματος.



Σχήμα 7.4: Κυκλικά βολταμογραφήματα σε ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος σε 0.01 M  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ , με 0.1 M  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  ως φέρον ηλεκτρολύτης για ρυθμό σάρωσης 100 mV/s μετά από εμβάπτιση σε αιθανολικό διάλυμα δωδεκανοθειόλης 0.1mM για 4, 5,6 και 7 ώρες





Σχήμα 7.5: Διαγράμματα Nyquist για ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος σε 0.01 M  $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$  σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8, 20mM μετά από εμβάπτιση σε αιθανολικό διάλυμα δωδεκανοθειόλης 0.1 mM για χρόνους εμβάπτισης 0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360 και 420 min

Σε δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται ηλεκτροχημική φασματοσκοπία εμπέδισης σε συσκευή Solatron SI 1260, Impedance Gain Phase Analyser, συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή.

Από τα διαγράμματα Nyquist στο Σχήμα 7.5, για  $t=0$ , δηλαδή για καθαρή επιφάνεια ηλεκτροδίου, ενώ αρχικά παρατηρείται ένα ημικύκλιο, με την εμβάπτιση στη δωδεκανοθειόλη, η καμπύλη σταδιακά τείνει να γίνει κάθετη στον άξονα των x, το οποίο υποδεικνύει μείωση της χωρητικότητας και συνεπώς κάλυψη της επιφάνειας από την αυτοσυναρμολογούμενη μονοστιβάδα της δωδεκανοθειόλης.

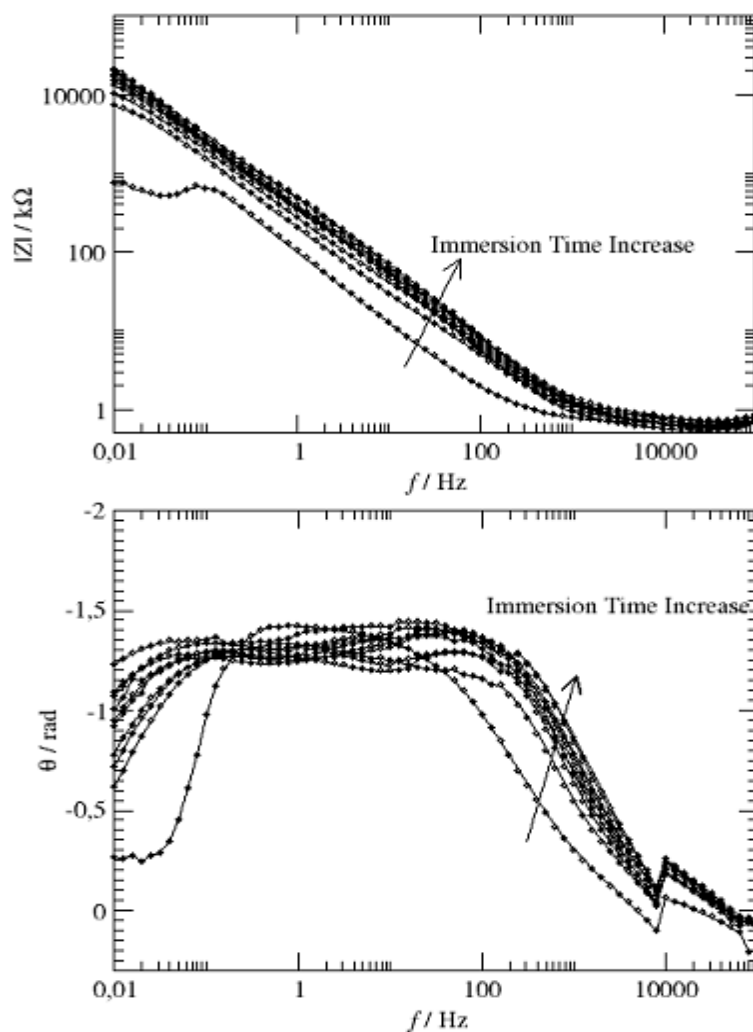
Από τα διαγράμματα Bode στο Σχήμα 7.6 για αύξοντες χρόνους εμβάπτισης του ηλεκτροδίου χρυσού σε αιθανολικό διάλυμα δωδεκανοθειόλης, μπορεί να γίνει μία εκτίμηση του ποσοστού κάλυψης της επιφάνειας από δωδεκανοθειόλη υποθέτοντας μονοστρωματική επικάλυψη. Η χωρητικότητα της διπλοστοιβάδας  $C_{dl}$  συσχετίζεται με την επικάλυψη  $\theta$  μέσω της σχέσης

$$\theta = 1 - \frac{C_{dl}}{C_{dl}^0} \quad (7.2)$$

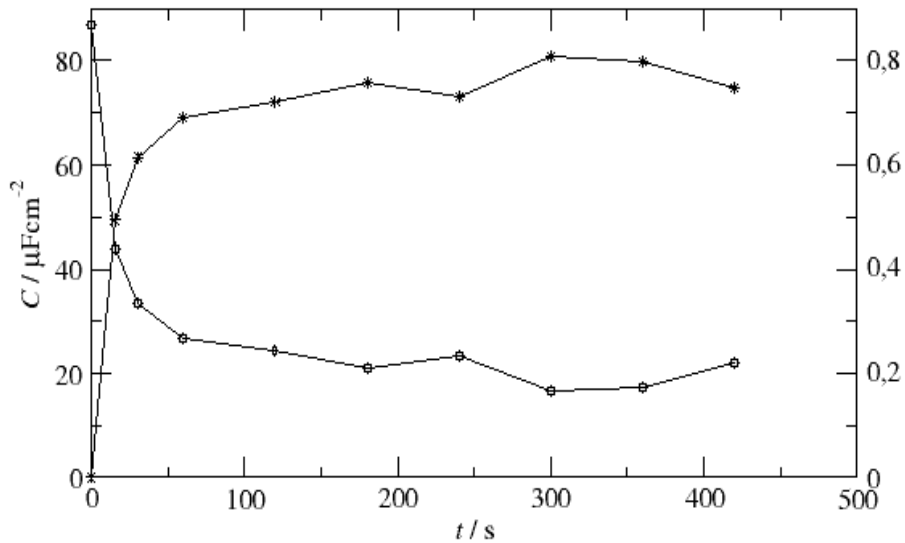
όπου  $C_{dl}^0$  η χωρητικότητα της διπλοστοιβάδας για καθαρή επιφάνεια.

Πιο συγκεκριμένα στο γραμμικό κομμάτι από το διάγραμμα Bode  $Z_C(f)$  όπως

### 7.3. Εμβάπτιση σε Δωδεκανοθειόλη



Σχήμα 7.6: Διαγράμματα Bode για ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος σε  $0.01 \text{ M Fe(CN)}_6^{3-}$  σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων  $\text{pH}=8$ ,  $20\text{mM}$  μετά από εμβάπτιση σε αιθανολικό διάλυμα δωδεκανοθειόλης  $0.1 \text{ mM}$  για χρόνους εμβάπτισης  $0, 15, 30, 60, 120, 180, 240, 300, 360$  και  $420 \text{ min}$



Σχήμα 7.7: Διαφοροποίηση της επικάλυψης  $\theta$  (αστερίσκοι) της χωρητικότητας διπλής στοιβάδας  $C_{dl}$  (κύκλοι) για αύξοντες χρόνους εμβάπτισης ηλεκτροδίου με χρυσό σε μορφή ελάσματος σε αιθανολικό διάλυμα δωδεκανοθειόλης 0.1mM

παρουσιάζεται στο Σχήμα 7.6 είναι το λογαριθμικό διάγραμμα της σχέσης

$$|Z_C| = \frac{1}{2\pi fC} \quad (7.3)$$

η οποία μεταχηματίζεται σε

$$\log|Z_C| = \log\frac{1}{2\pi} - \log f - \log C \quad (7.4)$$

και για  $f=2\pi$ , υπολογίζεται τελικά η χωρητικότητα ως

$$|Z_C| = \frac{1}{C} \quad (7.5)$$

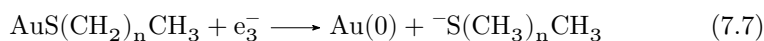
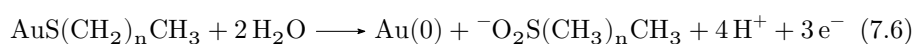
Μετά από 420 min εμβάπτισης όπως φαίνεται από το Σχήμα 7.7 υπολογίζεται η επικάλυψη 74% και η χωρητικότητα της διπλοστοιβάδας 21.36  $\mu\text{F}/\text{cm}^2$ , νόυμερα τα οποία εν γένει συμφωνούν με τα αντίστοιχα βιβλιογραφικά για τις τιμές κάλυψης χρυσού μετά από εμβάπτιση σε θειόλες.

## 7.4 Εμβάπτιση σε Ένζυμο

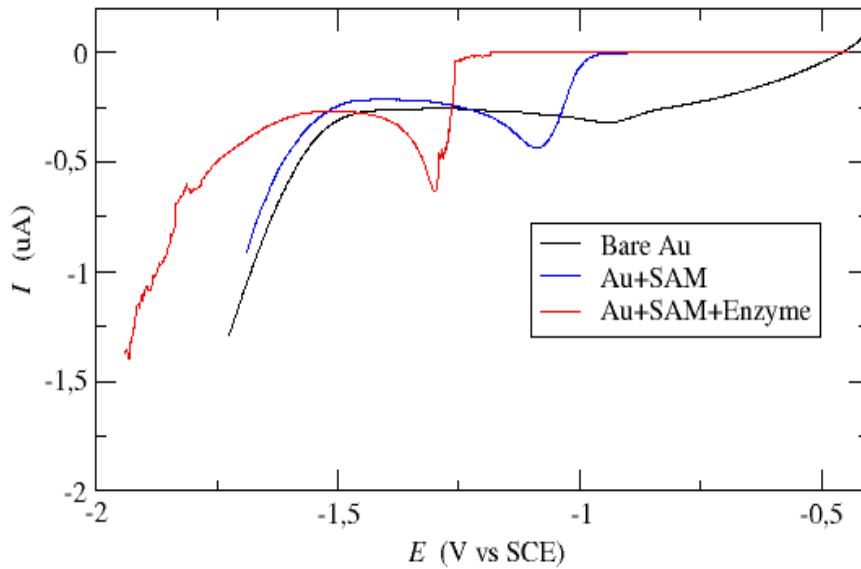
Εφόσον διαπιστώθηκε ότι όντως το ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος έχει επικαλυφθεί σε ένα συγκεκριμένο ποσοστό από τη δωδεκανοθειόλη μέσω της εμβάπτισης, πραγματοποιήθηκε και εμβάπτιση σε διάλυμα ενζύμου για γίνει προσρόφηση του ενζύμου στην αυτοσυναρμοζόμενη μονοστιβάδα που έχει δημιουργηθεί από τη δωδεκανοθειόλη. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την επιβεβαίωση προσρόφησης ενζύμου στη δωδεκανοθειόλη περιγράφεται παρακάτω.

### 7.4.1 Ηλεκτροχημική Εκρόφηση

Στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι για πολύ αλκαλικά pH (>11) μονοστρωματικές στιβάδες αλκανοθειολών ( $\text{CH}_3(\text{CH}_2)_n\text{SH}$ ) σε χρυσό μπρρούν να εκροφηθούν μέσω των αντιδράσεων που παρουσιάζονται στις Σχέσεις 7.6 και 7.7 [44].



Αρχικά σε αιθανολικό διάλυμα NaOH 0.1 M πραγματοποιείται βολταμμετρία γραμμικής σάρωσης (Linear Sweep Voltammetry) με ρυθμό σάρωσης 5 mV/s από τα -0.4 έως τα -1.75 V vs SCE σε σύστημα τριών ηλεκτροδίων με ηλεκτρόδιο εργασίας το χρυσό, ηλεκτρόδιο αναφοράς καλομέλινα (+244 mV vs SHE) και αντίθετο ηλεκτρόδιο ράβδου άνθρακα. Η συγκεκριμένη συγκέντρωση υπεροξειδίου του νατρίου αυξάνει το pH του διαλύματος, με αποτέλεσμα να επιτυγχάνεται μετατόπιση της αναγωγής των υδρογονοκατιόντων σε πολύ καθοδικά δυναμικά και να μην παρουσιάζεται κάποια παρεμπόδιση από αυτά στις μετρήσεις. Χρησιμοποιήθηκε ποτενσιοστάτης Potentiostat/Galvanostat Model 263A της Princeton Applied Research συνδεδεμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Κατόπιν, γίνεται εμβάπτιση του ηλεκτροδίου σε αιθανολικό διάλυμα δωδεκανοθειόλης 0.1mM για πέντε ώρες και κατόπιν επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία με την κυκλική βολταμμετρία σάρωσης. Έπειτα γίνεται καθαρισμός του χρυσού με κυκλική πόλωση όπως περιγράφηκε παραπάνω. Τέλος, γίνεται εμβάπτιση σε αιθανολικό διάλυμα δωδεκανοθειόλης 0.1mM για πέντε ώρες και κατόπιν εκ νεου εμβάπτιση σε 250μL ενζυμικού διαλύματος *MtPerII* συγκεντρώσεως 0.270mg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris HCl pH=8, 20 mM για 8 ώρες και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία σάρωσης. Τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 7.8, όπου δεν εμφανίζεται καθαρή αναγωγική κορυφή για σκέτο χρυσό σε αιθανολικό διάλυμα NaOH. Για το ηλεκτρόδιο χρυσού με προσροφημένη την αυτοσυναρμοζόμενη μονοστιβάδα από δωδεκανοθειόλη, εμφανίζεται κορυφή στα -1.08 V vs SCE ενώ για τον χρυσό μαζί με δωδεκανοθειόλη και ένζυμο παρατηρείται αναγωγική κορυφή στα -1.29 V vs SCE. Μετά

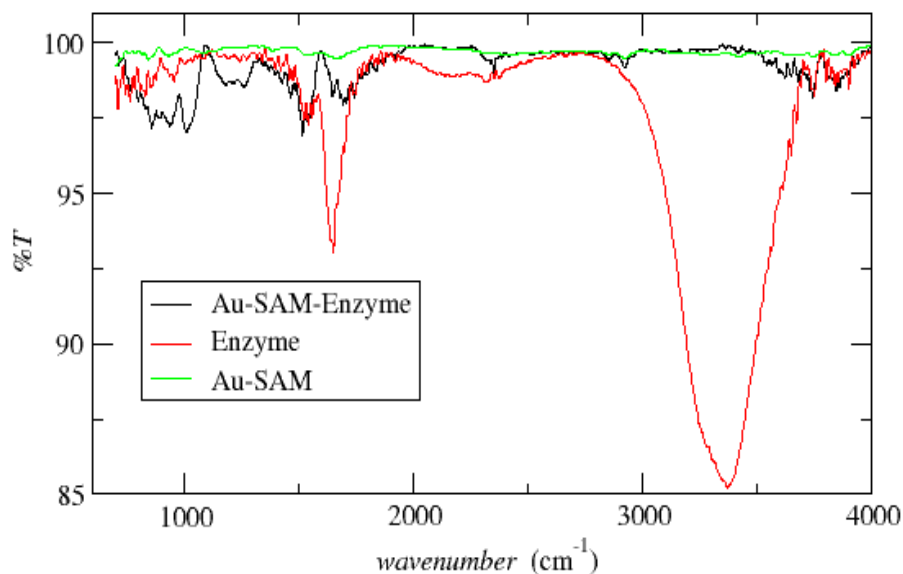


Σχήμα 7.8: Γραμμική βολταμετρία σάρωσης με ρυθμό σάρωσης 5mV/s σε αιθανολικό διάλυμα NaOH 0.1 M για καθαρό ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος, ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος τροποποιημένο με δωδεκανοθειόλη και ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος τροποποιημένο με δωδεκανοθειόλη και MtPerII

την προσρόφηση και του ενζύμου δηλαδή παρατηρείται μία μετατόπιση προς αρνητικότερα δυναμικά της αναγωγικής κορυφής το οποίο οφείλεται τόσο στην αύξηση της υδροφοβικότητας όσο και στην αύξηση του μήκους του στρώματος που έχει καλύψει την επιφάνεια του χρυσού [43]. Υπολογίζοντας το εμβαδόν μεταξύ της καμπύλης της βολταμετρίας σάρωσης του καθαρού ηλεκτροδίου και του ηλεκτροδίου τροποποιημένου με δωδεκανοθειόλη μόνο, υπολογίζεται το εμβαδόν κάτω από την καμπύλη  $6.1 \times 10^{-8}$  A/V και διαιρώντας με το ρυθμό σάρωσης 0.005V/s προκύπτει φορτίο 1.22μC. Ανάγοντας τη χωρητικότητα αυτή με την επιφάνεια  $A=0.217\text{cm}^2$ , προκύπτει χωρητικότητα ανά μονάδα επιφάνειας  $56.2\mu\text{C}/\text{cm}^2$ . Χρησιμοποιώντας το νόμο του Faraday (Σχέση 7.8) υπολογίζεται η επιφανειακή συγκέντρωση  $5.8 \cdot 10^{-10}$  μmol/cm<sup>2</sup>, τιμή η οποία συμφωνεί με τις επιφανειακές συγκεντρώσεις που βρίσκονται στη βιβλιογραφία για την εκρόφιση αυτοσυναρμολογούμενων επιφανειών [44, 45, 46, 47].

$$m = \frac{Q}{F} \frac{M}{z} \quad (7.8)$$

όπου  $Q$  το ηλεκτρικό φορτίο σε F,  $F$  η σταθερά του Faraday  $96485 \text{ C mol}^{-1}$ ,  $M$  το μοριακό βάρος της δωδεκανοθειόλης σε g/mol, και  $z$  ο αριθμός των μεταφερόμενων ηλεκτρονίων, εν προκειμένω μεταφέρεται ένα ηλεκτρόνιο.



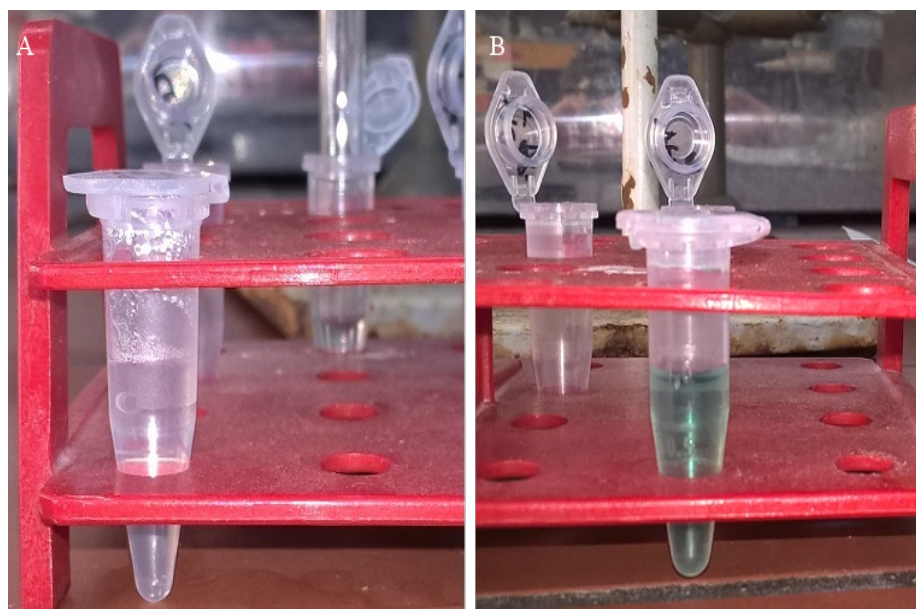
Σχήμα 7.9: Φάσμα υπερύθρου για ένζυμο, τροποποιημένο ηλεκτρόδιο χρυσού με δωδεκανοθειόλη, τροποποιημένο ηλεκτρόδιο χρυσού με δωδεκανοθειόλη και ένζυμο

#### 7.4.2 Χαρακτηρισμός με ATR

Με σκοπό την επιβεβαίωση επιτυχίας της ακινητοποίησης του ενζύμου πάνω στην τροποποιημένη με δωδεκανοθειόλη επιφάνεια του ηλεκτροδίου χρυσού πραγματοποιείται φασματομετρία ATR για το ηλεκτρόδιο χρυσού μετά από εμβάπτιση σε αιθανολικό διάλυμα δωδεκανοθειόλης 0.1mM για 5 ώρες, για το ηλεκτρόδιο χρυσού μετά από εμβάπτιση σε αιθανολικό διάλυμα δωδεκανοθειόλης 0.1mM για 5 ώρες και σε 250μL ενζυμικού διαλύματος *MtPerII* συγκέντρωσης 0.270mg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris HCl pH=8, 20 mM για 8 ώρες και για υδατικό διάλυμα *MtPerII*. Τα ληφθέντα φάσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 7.9. Οι κοινές κορυφές μεταξύ ενζύμου και ηλεκτροδίου τροποποιημένου με ένζυμο και δωδεκανοθειόλη βρίσκονται μεταξύ κυματαριθμών 1640 και 1680  $\text{cm}^{-1}$  που αντιστοιχούν σε αμιδικό δεσμό, στα 1540  $\text{cm}^{-1}$  σε δεσμό αζώτου οξυγόνου και μεταξύ 930-950  $\text{cm}^{-1}$  καθώς και 3640-3680  $\text{cm}^{-1}$  που αντιστοιχούν σε υδροξύλια. Μεταξύ του ηλεκτροδίου τροποποιημένου με δωδεκανοθειόλη και του ηλεκτροδίου τροποποιημένου με δωδεκανοθειόλη και ένζυμο οι κοινές κορυφές βρίσκονται μεταξύ 2850-2925  $\text{cm}^{-1}$  που αντιστοιχούν σε  $\text{CH}_2$  και  $\text{CH}_3$ . Συνεπώς, εφόσον υπάρχουν κοινές κορυφές μεταξύ του τροποποιημένου με ένζυμο και δωδεκανοθειόλη ηλεκτροδίου και του ενζυμικού διαλύματος και του τροποποιημένου με δωδεκανοθειόλη ηλεκτροδίου, διαπιστώνεται η ύπαρξη ενζύμου πάνω στο ηλεκτρόδιο. Το μηχάνημα που χρησιμοποιήθηκε είναι FT-IR Jasco 4200 (Japan) συνδυασμένο με ATR PRO - 410S με κρύσταλλο Γερμανίου με όρια 4000-700  $\text{cm}^{-1}$ , διακριτική ικανότητα 4.0  $\text{cm}^{-1}$  και accumulation 50, και ανιχνευτή TGS.

### 7.4.3 Δοκιμασία με ABTS

Για την διαπίστωση της ενεργότητας του ακινητοποιημένου στο ηλεκτρόδιο ενζύμου, ακολουθείται η παρακάτω πειραματική διαδικασία. Σε eppendorf προστίθενται 800μL ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών-κιτρικού pH=5, 100μL ABTS 20mM και 100μL H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10mM και το διάλυμα που προκύπτει είναι διαυγές. Στη συνέχεια γίνεται εμβάπτιση ηλεκτροδίου χρυσού το οποίο έχει ήδη εμβαπτιστεί σε αιθανολικό διάλυμα δωδεκανοθειόλης 0.1mM για πέντε ώρες και σε 250μL ενζυμικού διαλύματος *MtPerII* συγκέντρωσης 0.270mg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα Tris HCl pH=8, 20 mM για 8 ώρες. Μετά από λιγότερο από ένα λεπτό παρατηρήθηκε αλλαγή του χρώματος του διαλύματος από διαυγές σε πράσινο το οποίο υποδεικνύει ενζυμική δράση καθώς το ABTS αναγεννά την υπεροξειδάση που έχει αντιδράσει με το υπεροξείδιο του υδρογόνου δίνοντας μία κατιοντική ρίζα η οποία δίνει ένα πράσινο χρώμα και απορροφά στα 420 nm. Η διαφορά χρώματος παρουσιάζεται στα Σχήμα 7.10. Από την εμφάνιση του πράσινου χρώματος υποδεικνύεται εκτός από το ότι το ένζυμο έχει ακινητοποιηθεί πάνω στο ηλεκτρόδιο, ότι είναι και ενεργό και μπορεί να καταλύσει την αναγωγή του υπεροξειδίου του υδρογόνου [57]. Επίσης παρατηρήθηκε πολύ γρήγορη μεταβολή του χρώματος, το οποίο αποτελεί ένδειξη μεγάλης ενεργότητας με δεδομένο ότι έχει ακινητοποιηθεί πολύ μικρή ποσότητα της πρωτεΐνης πάνω στο ηλεκτρόδιο.

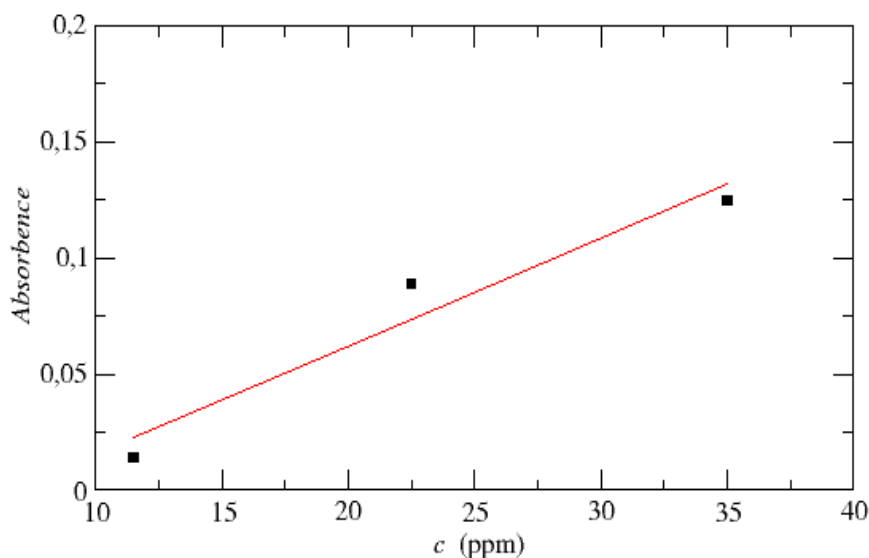


Σχήμα 7.10: Διάλυμα ABTS με υπεροξείδιο πριν (A) και μετά την εμβάπτιση (B) του τροποποιημένου με ένζυμο και δωδεκανοθειόλη ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματα

### 7.4.4 Εκτίμηση προσροφημένης ποσότητας ενζύμου με UV-VIS

Αρχικά κατασκευάζεται η καμπύλη αναφοράς που παρουσιάζεται στο Σχήμα 7.11. Χρησιμοποιήθηκαν πρότυπα διαλύματα ενζύμου *MtPerII* συγκεντρώσεων 11.5, 22.5 και 35mM. Η εξίσωση που προκύπτει από τις απορροφήσεις των πρότυπων διαλυμάτων στα 408nm είναι

$$y = 0.0047x - 0.0311 \quad (7.9)$$



Σχήμα 7.11: Καμπύλη αναφοράς απορρόφησης *MtPerII* στα 408nm

Κατόπιν, ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος ηλεκτροχημικά ενεργής επιφάνειας  $0.217\text{cm}^2$  που έχει εμβαπτιστεί σε 0.1mM αιθανολικού διαλύματος δωδεκανοθειόλης για 5 ώρες, εμβαπτίζεται σε 0.5 mL σε ενζυμικό διάλυμα *MtPerII* 0.270 mg/ml (270ppm), TrisHCl pH=8 20mM, στους  $4^\circ\text{C}$  για 17 ώρες.

Κατόπιν, το ηλεκτρόδιο αφαιρείται προσεκτικά από το διάλυμα στο οποίο είχε γίνει η εμβάπτιση του ηλεκτροδίου, αραιώνεται 1:12 και μετράται η απορρόφηση ίση με 0.711, το οποίο βάσει της καμπύλης βαθμονόμησης αντιστοιχεί σε συγκέντρωση 21.6 ppm, ενώ η αρχική συγκέντρωση του διαλύματος αραιωμένου 1:12 είναι 22.5 ppm. Συνεπώς, η διαφορά συγκέντρωσης πριν και μετά την τοποθέτηση του ηλεκτροδίου στο ενζυμικό διάλυμα είναι 0.9ppm. Με δεδομένο ότι το μοριακό βάρος του ενζύμου είναι περίπου 65kDalton, τα 0.9 ppm αντιστοιχούν σε  $1.4 \cdot 10^{-7}$  mol/l. Με δεδομένο ότι ο όγκος του διαλύματος όπου τοποθετήθηκε



## Κεφάλαιο 7. Τροποποίηση επιφάνειας Ηλεκτροδίου

το ηλεκτρόδιο ήταν 0.5ml, τα moles που προσροφήθηκαν στις θειόλες είναι περίπου  $7 \times 10^{-11}$  και εφόσον η επιφάνεια έχει υπολογιστεί  $0.217\text{cm}^2$ , η επιφανειακή συγκέντρωση υπολογίζεται περίπου  $3 \times 10^{-10} \text{ mol/cm}^2$ .

Για την παραπάνω διαδικασία έγινε χρήση του φαρματομέτρου υπεριώδους ορατού τύπου V-630iRM UV-Vis spectrometer της JASCO.

#### 7.4. Εμβάπτιση σε Ένζυμο

---

## Κεφάλαιο 8

# Βιοαισθητήρας Υπεροξειδίου

### 8.1 Χρήση κυανού του μεθυλενίου ως συνυπόστρωμα

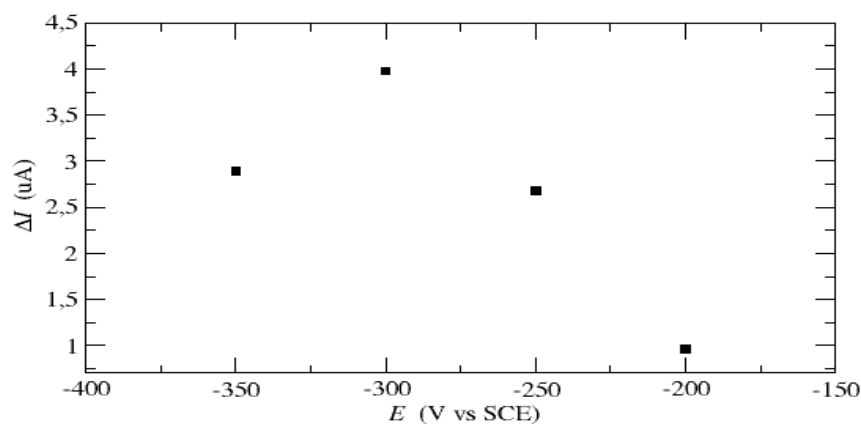
#### 8.1.1 Αριστοποίηση ως προς pH, συγκέντρωση συνυποστρώματος και δυναμικό

Έγινε χρήση συστήματος τριών ηλεκτροδίων με ηλεκτρόδιο εργασίας, τροποποιημένο με δωδεκανοθειόλη και ένζυμο *MtPerrI* ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος διατομής  $0.217\text{cm}^2$ , ηλεκτρόδιο αναφοράς καλομέλινα ( $+244\text{mV}$  vs SCE) και ως αντίθετο ηλεκτρόδιο ράβδος άνθρακα. Η τροποποίηση του ηλεκτροδίου έχει γίνει μέσω εμβάπτισης του ελάσματος ηλεκτροδίου χρυσού για 5h σε αιθανολικό διάλυμα δωδεκανοθειόλης  $0.1\text{mM}$ , στέγνωμα και κατόπιν εμβάπτιση σε ενζυμικό διάλυμα *MtPerII* συγκέντρωσης  $0.270\text{mg/mL}$ ,  $\text{pH}=8$  για 8h. Χρησιμοποιήθηκε ποτενσιοστάτης Scanning Potentiostat Model 362 της EG & G Instruments, Princeton Applied Research συνδεδεμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή.  $20\text{ mL}$  υδατικού διαλύματος που περιέχουν  $1\text{mM}$  κυανού του μεθυλενίου σε ρυθμιστικό διάλυμα τίθενται υπό αναδευση στα  $100\text{rpm}$ . Τα ρυθμιστικά διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν αντιστοιχούν σε  $\text{pH}$  5, 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 και 8. Για εύρος  $\text{pH}$  5.5-8 χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων ενώ για  $\text{pH}=5$  ρυθμιστικό διάλυμα τρυγικού οξέος-τρυγικού νατρίου συγκέντρωσης  $20\text{mM}$ . Για κάθε  $\text{pH}$  γίνεται εφαρμογή δυναμικού στα  $-200$ ,  $-250$ ,  $-300$  και  $-350\text{mV}$  και γίνεται καταγραφή της απόκρισης ρεύματος. Κατόπιν, γίνεται προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση  $1\text{mM}$  και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία και καταγράφεται πάλι η απόκριση του ρεύματος. Εν συνεχεία, λαμβάνεται η διαφορά απόκρισης ρεύματος για κάθε ζεύγος  $\text{pH}$ -δυναμικού και κα-

### 8.1. Χρήση κυανού του μεθυλενίου ως συνυπόστρωμα

Πίνακας 8.1: Μεταβολή απόκρισης ρεύματος τροποποιημένου με δωδεκανοθειόλη και ένζυμο ηλεκτροδίου σε  $\mu\text{A}$  συναρτήσει του pH και του εφαρμοζόμενου δυναμικού για υδατικό διάλυμα 1mM κυανού του μεθυλενίου σε ρυθμιστικό διάλυμα συγκέντρωσης 20mM, υπό ανάδευση 100rpm πριν και μετά την προσθήκη  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε τελική συγκέντρωση 1mM

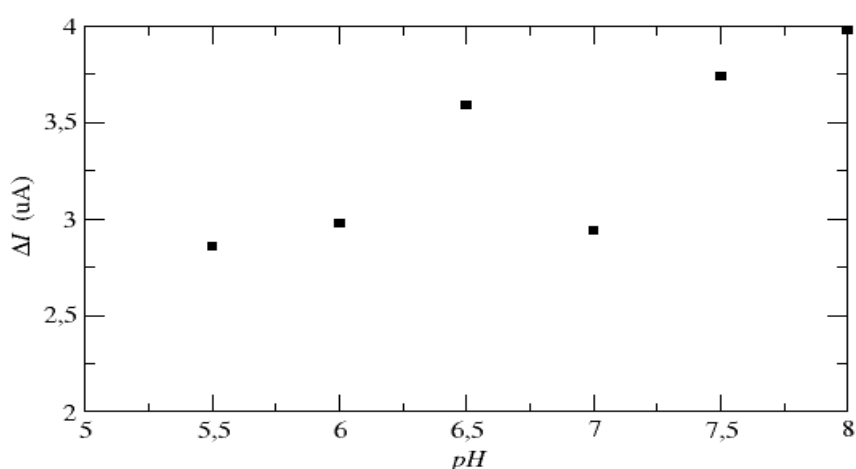
pH	8.0	7.5	7.0	6.5	6.0	5.5	5.0
$E(\text{mV vs SCE})$							
-350	4.71	4.19	3.93	3.78	3.52	2.89	3.07
-300	3.98	3.74	2.94	3.59	2.98	2.86	1.65
-250	2.68	2.20	2.10	2.64	2.15	1.81	0.73
-200	0.96	1.53	1.47	1.99	1.69	1.22	0.42



Σχήμα 8.1: Μεταβολή απόκρισης ρεύματος ως προς δυναμικό, τροποποιημένου ηλεκτροδίου για υδατικό διάλυμα 1mM κυανού του μεθυλενίου σε ρυθμιστικό διάλυμα pH=8 συγκέντρωσης 20mM, υπό ανάδευση 100rpm πριν και μετά την προσθήκη  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε τελική συγκέντρωση 1mM

ταστρώνεται ο Πίνακας 8.1 και επιλέγεται το ζεύγος με την υψηλότερη διαφορά απόκρισης ρεύματος. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 8.1 αυτό είναι για δυναμικό -350 mV vs SCE και pH=8, όμως, λόγω ενδεχόμενης επικάλυψης του σήματος από την αναγωγή των υδρογονοκατιόντων και λόγω πιθανής ταχύτερης αδρανοποίησης του ενζύμου, τελικά επιλέγεται το δυναμικό -350 mV vs SCE για pH=8. Στα Σχήματα 8.1 και 8.2 παρουσιάζονται διαγραμματικά οι σχέσεις της μεταβολής απόκρισης ρεύματος ως προς το δυναμικό για pH=8 και ως προς το pH για εφαρμοζόμενο δυναμικό -300mV vs SCE αντίστοιχα.

Κατόπιν, πάλι με το ίδιο σύστημα τριών ηλεκτροδίων και για εφαρμοζόμενο δυναμικό -300 mV vs SCE και pH=8 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 20mM), σε υδατικά διαλύματα 20mL για συγκετρώσεις κυανού του μεθυλενίου 0.5, 1, 2 και 3 mM υπό ανάδευση στα 200rpm, καταγράφεται η απόκριση ρεύματος πριν και μετά την προσθήκη  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε τελική συγκέντρωση 1mM. Στο Σχήμα



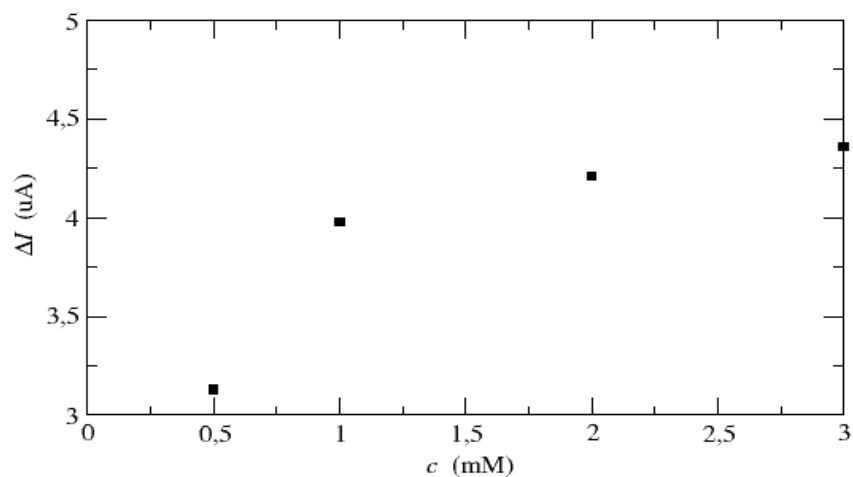
Σχήμα 8.2: Μεταβολή απόκρισης ρεύματος ως προς pH για εφαρμοζόμενο δυναμικό  $-300\text{mV vs SCE}$ , τροποποιημένου ηλεκτροδίου για υδατικό διάλυμα  $1\text{mM}$  κυανού του μεθυλενίου σε ρυθμιστικό διάλυμα συγκέντρωσης  $20\text{mM}$ , υπό ανάδευση  $100\text{rpm}$  πριν και μετά την προσθήκη  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε τελική συγκέντρωση  $1\text{mM}$

**8.3** παρουσιάζεται η εξάρτηση της μεταβολής της απόκρισης του ρεύματος πριν και μετά την προσθήκη  $\text{H}_2\text{O}_2$  ως προς τη συγκέντρωση του κυανού του μεθυλενίου. Παρά το γεγονός ότι φαίνεται αυξανόμενη της συγκέντρωσης του κυανού του μεθυλενίου να αυξάνεται η μεταβολή απόκρισης, για συγκεντρώσεις παραπάνω από  $1\text{mM}$  κυανού του μεθυλενίου, η σταθεροποίηση της απόκρισης καθυστερούσε πάρα πολύ, με αποτέλεσμα να επιλεγεί τελικά η συγκέντρωση των  $1\text{mM}$  για τη λειτουργία του τροποποιημένου ηλεκτροδίου.

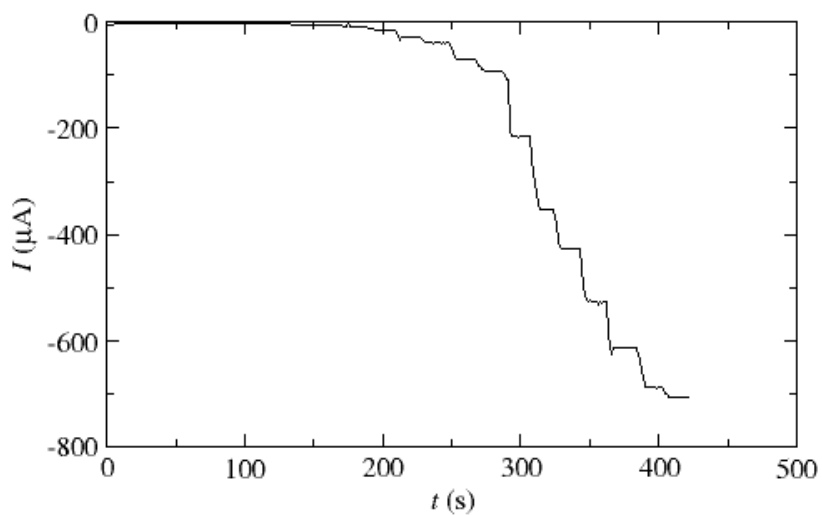
### 8.1.2 Χρονοαμπερομετρία

Χρησιμοποιώντας το σύστημα τριών ηλεκτροδίων με ηλεκτρόδιο εργασίας, τροποποιημένο με δωδεκανθειόλη και ένζυμο *MtPerrII* ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος διατομής  $0.217\text{cm}^2$ , ηλεκτρόδιο αναφοράς καλομέλινα ( $+244\text{ vs SHE}$ ) και αντίθετο ηλεκτρόδιο ράβδο άνθρακα, εφαρμόζοντας δυναμικό  $-300\text{mV vs SCE}$ , σε υδατικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων  $\text{pH}=8$   $20\text{mM}$  με συγκέντρωση κυανού του μεθυλενίου  $1\text{mM}$ , γίνεται προσθήκη  $\text{H}_2\text{O}_2$  ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι η μεταβολή απόκρισης του σήματος με την προσθήκη υπεροξειδίου να μειωθεί σημαντικά. Χρησιμοποιήθηκε ποτενοσιστάτης Potentiostat/Galvanostat Model 263A της Princeton Applied Research συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Αρχικά, γίνεται προσθήκη  $0.3\% \text{ w/w}$ , κατόπιν  $3\% \text{ w/w}$  και τέλος  $30\% \text{ w/w}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Το χρονοαμπερογράφημα που προκύπτει παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.4.

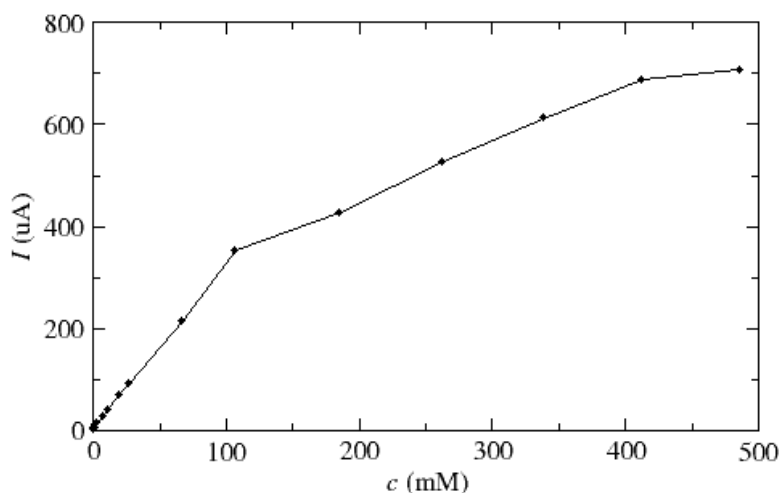
### 8.1. Χρήση κυανού του μεθυλενίου ως συνυπόστρωμα



Σχήμα 8.3: Μεταβολή απόκρισης ρεύματος ως προς συγκέντρωση κυανού του μεθυλενίου για εφαρμοζόμενο δυναμικό  $-300\text{mV vs SCE}$  και  $\text{pH}=8$  (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων  $20\text{mM}$ ), τροποποιημένου ηλεκτροδίου υπό ανάδευση  $100\text{rpm}$  πριν και μετά την προσθήκη  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε τελική συγκέντρωση  $1\text{mM}$



Σχήμα 8.4: Χρονοαμπερομετρία τροποποιημένου ηλεκτροδίου με προσθήκη  $\text{H}_2\text{O}_2$  για εφαρμοζόμενο δυναμικό  $-300\text{mV vs SCE}$ ,  $\text{pH}=8$  και συγκέντρωση κυανού του μεθυλενίου  $1\text{mM}$ , υπό ανάδευση στα  $100\text{rpm}$



Σχήμα 8.5: Εξάρτηση ρεύματος από συγκέντρωση για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο με προσθήκη  $\text{H}_2\text{O}_2$  για εφαρμοζόμενο δυναμικό  $-300\text{mV vs SCE}$ ,  $\text{pH}=8$  και συγκέντρωση κυανού του μεθυλενίου  $1\text{mM}$ , υπό ανάδευση στα  $100\text{ rpm}$

### 8.1.3 Καμπύλη Αναφοράς

Βάσει του χρονοαμπερογραφήματος από το Σχήμα 8.4 και των συγκεντρώσεων υπεροξειδίου που προκύπτουν από την εκάστοτε προσθήκη, κατασκευάζεται το διάγραμμα έντασης ρεύματος συγκέντρωσης που παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.5. Φαίνεται μία γραμμικότητα μέχρι τα  $106.9\text{ mM}$  και μετά παρουσιάζεται μία κύρτωση στην καμπύλη. Αναλυτικότερα, το γραμμικό κομμάτι της εξάρτησης της απόκρισης ρεύματος από τη συγκέντρωση παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.6 και εκτείνεται από τα  $44\text{ }\mu\text{M}$  έως τα  $106.9\text{ mM}$ . Ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης που προκύπτει είναι  $0.9993$ , το οποίο υποδεικνύει πάρα πολύ καλή γραμμική εξάρτηση του ρεύματος από τη συγκέντρωση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  και η εξίσωση που προκύπτει είναι

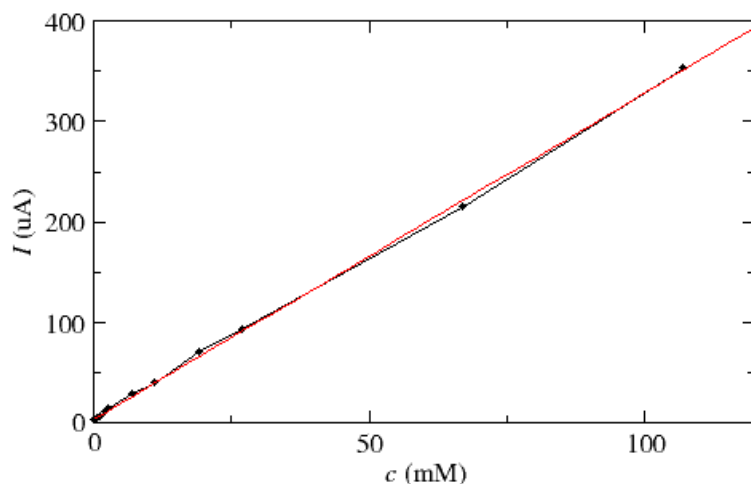
$$y = 3.247x + 3.540 \quad (8.1)$$

### 8.1.4 Ευαισθησία, Όρια Ανίχνευσης, Χρόνος Απόκρισης

Από τη Σχέση 8.1 προκύπτει από την κλίση η ευαισθησία του τροποποιημένου ηλεκτροδίου που είναι  $3.247\text{ }\mu\text{A}/\text{mM}_{\text{H}_2\text{O}_2}$

Επίσης, πριν το πείραμα της χρονοαμπερομετρίας πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απόκρισης ρεύματος με σύστημα τριών ηλεκτροδίων με ηλεκτρόδιο εργα-

### 8.1. Χρήση κυανού του μεθυλενίου ως συνυπόστρωμα



Σχήμα 8.6: Γραμμική περιοχή Σχήματος 8.5

σίας, τροποποιημένο με δωδεκανοθειόλη και ένζυμο *MtPerrII* ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος διατομής  $0.217\text{cm}^2$ , ηλεκτρόδιο αναφοράς καλομέλινα ( $+244\text{mV vs SHE}$ ) και αντίθετο ηλεκτρόδιο ράβδου άνθρακα, εφαρμόζοντας δυναμικό  $-300\text{mV vs SCE}$ , σε 11 υδατικά διαλύματα φωσφορικών ιόντων  $\text{pH}=8$   $20\text{mM}$  με συγκέντρωση κυανού του μεθυλενίου  $1\text{mM}$ , χωρίς να προστεθεί  $\text{H}_2\text{O}_2$  (τυφλά διαλύματα) και υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση ίση με  $37.3\ \mu\text{A}$ . Κατόπιν για λόγο σήματος προς θόρυβο 2 προς 1 υπολογίζεται το όριο ανίχνευσης  $\text{LOD}$  (Limit Of Detection)  $0.023\ \text{mM}$  σύμφωνα με τη Σχέση 8.2

$$\text{LOD} = \frac{(S/N)S.D.\text{blank}}{S} \quad (8.2)$$

όπου  $\text{LOD}$  το όριο ανίχνευσης,  $S/N$  ο λόγος σήματος προς θόρυβο,  $S.D.\text{blank}$  η τυπική απόκλιση της απόκρισης του συστήματος απουσία υπεροξειδίου και  $S$  η ευαισθησία.

Σε περίπτωση που επιλεγθεί διαφορετικός λόγος σήματος προς θόρυβο, τα αντίστοιχα όρια ανίχνευσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.2. Για μεγαλύτερους λόγους  $S/N$  το όριο ανίχνευσης αυξάνεται αλλά παραμένει της τάξεως των  $10^{-2}\ \text{mM}$ .



Πίνακας 8.2: Όρια ανίχνευσης βιοαισθητήρα υπεροξειδίου για διαφορετικούς λόγους σήματος προς θόρυβο με χρήση του κυανού του μεθυλενίου ως συνυπόστρωμα

$S/N$	$LOD$ (mM)
2	0.023
3	0.034
4	0.046

Το όριο ποσοτικοποίησης  $LOQ$  (Limit Of Quantification) υπολογίζεται από τη Σχέση 8.3 ίσο με 115  $\mu\text{M}$ , το οποίο συνεπάγεται ότι παρά το ότι η γραμμική περιοχή ξεκινά από τα 44  $\mu\text{M}$ , ασφαλής μέτρηση μπορεί να γίνει από τα 115  $\mu\text{M}$  και πάνω.

$$LOQ = \frac{10S \cdot D_{\text{blank}}}{S} \quad (8.3)$$

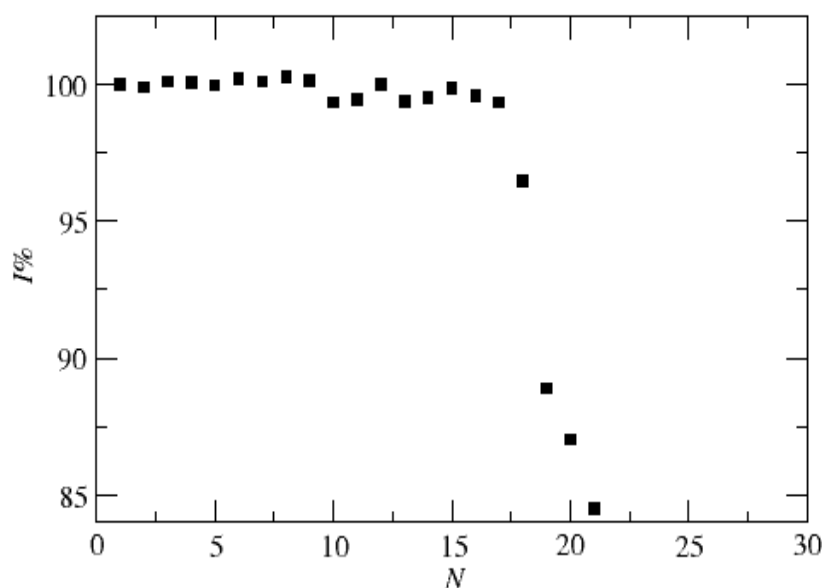
όπου  $LOQ$  το όριο ποσοτικοποίησης,  $S \cdot D_{\text{blank}}$  η τυπική απόκλιση της απόκρισης του συστήματος απουσία υπεροξειδίου και  $S$  η ευαισθησία.

Ο χρόνος απόκρισης, δηλαδή ο απαιτούμενος χρόνος για την σταθεροποίηση της απόκρισης ρεύματος, όπως προκύπτει από το Σχήμα 8.4 είναι περίπου 5 s για τις υψηλές συγκεντρώσεις (μεγαλύτερες από 27mM υπεροξειδίου), ενώ για τις πιο χαμηλές είναι μικρότερος.

### 8.1.5 Δοκιμασία σταθερότητας χρήσης

Με χρήση του συστήματος τριών ηλεκτροδίων με ηλεκτρόδιο εργασίας, τροποποιημένο με δωδεκανοθειόλη και ένζυμο *MtPerrII* ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος διατομής  $0.217\text{cm}^2$ , ηλεκτρόδιο αναφοράς Καλομέλινα (+244mV vs SHE) και αντίθετο ηλεκτρόδιο ράβδου άνθρακα, εφαρμόζοντας δυναμικό -300mV vs SCE, σε υδατικά διαλύματα φωσφορικών ιόντων pH=8 20mM με συγκέντρωση κυανού του μεθυλενίου 1mM και συγκέντρωση  $\text{H}_2\text{O}_2$  5mM γίνεται μέτρηση της απόκρισης ρεύματος συναρτήσει του αριθμού των μετρήσεων για να προσδιορισθεί η σταθερότητα του ενζυμικού ηλεκτροδίου με τη χρήση και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 8.7. Χρησιμοποιήθηκε ποτενσιοστάτης Potentiostat/Galvanostat Model 263A της Princeton Applied Research συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Μέχρι τις 17 χρήσεις η απόκριση παραμένει περίπου στο 99% της απόκρισης του πρώτου δείγματος, ενώ μετά αρχίζει να φθίνει φτάνοντας στο 84.5% της αρχικής απόκρισης για την 21η μέτρηση.

## 8.2. Χρήση Κατεχόλης ως συνυπόστρωμα



Σχήμα 8.7: Διάγραμμα % απόκρισης ρεύματος σε σχέση με αρχικό, συναρτήσει του αριθμού χρήσεων για ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=8 20mM, 1mM κυανού του μεθυλενίου, εφαρμοζόμενο δυναμικό -300mV vs SCE και ανάδευση στα 100rpm, για την αξιολόγηση της σταθερότητας χρήσης του τροποποιημένου ηλεκτροδίου

## 8.2 Χρήση Κατεχόλης ως συνυπόστρωμα

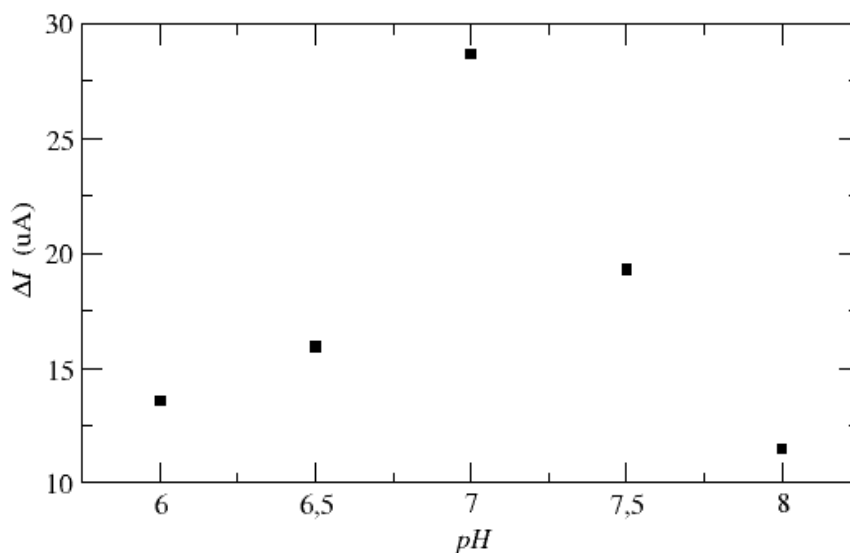
### 8.2.1 Αριστοποίηση ως προς pH, συγκέντρωση συνυποστρώματος και δυναμικό

Έγινε χρήση συστήματος τριών ηλεκτροδίων με ηλεκτρόδιο εργασίας, τροποποιημένο με δωδεκανοθειόλη και ένζυμο *MtPerrII* ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος διατομής  $0.217\text{cm}^2$ , ηλεκτρόδιο αναφοράς Καλομέλανα (+244 mV vs SCE) και αντίθετο ηλεκτρόδιο ράβδου άνθρακα. Χρησιμοποιήθηκε ποτενσιοστάτης Scanning Potentiostat Model 362 της EG & G Instruments, Princeton Applied Research συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή. 20 mL υδατικού διαλύματος που περιέχουν 1mM κυανού του μεθυλενίου σε ρυθμιστικό διάλυμα τίθεται υπό αναδευση στα 100rpm. Τα ρυθμιστικά διαλύματα αντιστοιχούν σε pH 5.5, 6, 6.5, 7, 7.5 και 8. Χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων συγκέντρωσης 20mM για το κάθε pH. Για κάθε pH γίνεται εφαρμογή δυναμικού στα 50, 0, -50, -100, -150, -200mV και γίνεται καταγραφή της απόκρισης ρεύματος. Κατόπιν, γίνεται προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου ώστε να προκύψει τελική συγκέντρωση 14mM και επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία και καταγράφεται πάλι

Πίνακας 8.3: Μεταβολή απόκρισης ρεύματος τροποποιημένου με δωδεκανοθειόλη και ένζυμο ηλεκτροδίου σε  $\mu\text{M}$  συναρτήσει του pH και του εφαρμοζόμενου δυναμικού για υδατικό διάλυμα 1mM κατεχόλης σε ρυθμιστικό διάλυμα συγκέντρωσης 20mM, υπό ανάδευση 100rpm πριν και μετά την προσθήκη  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε τελική συγκέντρωση 14mM

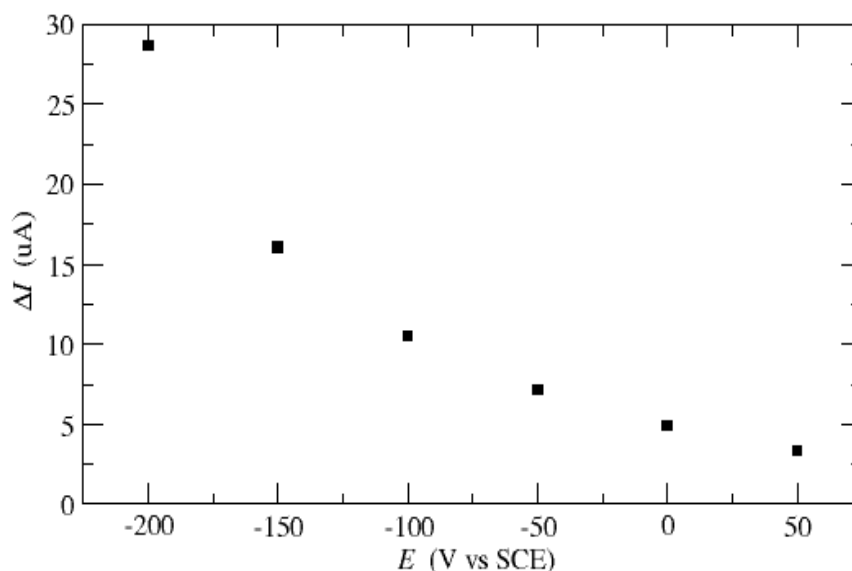
pH	8.0	7.5	7.0	6.5	6.0	5.5
$E(\text{mV vs SCE})$						
50	0.99	2.28	3.37	2.27	2.17	1.84
0	1.99	3.45	4.94	3.75	3.42	2.3
-50	2.79	5.49	7.12	5.28	4.78	3.68
-100	4.84	8.72	10.52	8.04	7.00	3.92
-150	7.4	12.91	16.09	10.92	9.79	5.80
-200	11.5	19.31	28.69	15.95	13.57	8.69

η απόκριση του ρεύματος. Κατόπιν λαμβάνεται η διαφορά απόκρισης ρεύματος για κάθε ζεύγος pH-δυναμικού και καταστρώνεται ο Πίνακας 8.3 και επιλέγεται το ζεύγος με την υψηλότερη διαφορά απόκρισης ρεύματος. Όπως φαίνεται στον Πίνακα 8.3 αυτό είναι για δυναμικό -200 mV vs SCE και pH=7. Στα Σχήματα 8.8 και 8.9 παρουσιάζονται διαγραμματικά οι σχέσεις της μεταβολής απόκρισης ρεύματος ως προς το δυναμικό για pH=7 και ως προς το pH για εφαρμοζόμενο δυναμικό -200mV vs SCE αντίστοιχα.



Σχήμα 8.9: Μεταβολή απόκρισης ρεύματος ως προς pH για εφαρμοζόμενο δυναμικό -200mV vs SCE, τροποποιημένου ηλεκτροδίου για υδατικό διάλυμα 1mM κατεχόλης σε ρυθμιστικό διάλυμα συγκέντρωσης 20mM, υπό ανάδευση 100rpm πριν και μετά την προσθήκη  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε τελική συγκέντρωση 14mM

## 8.2. Χρήση Κατεχόλης ως συνυπόστρωμα

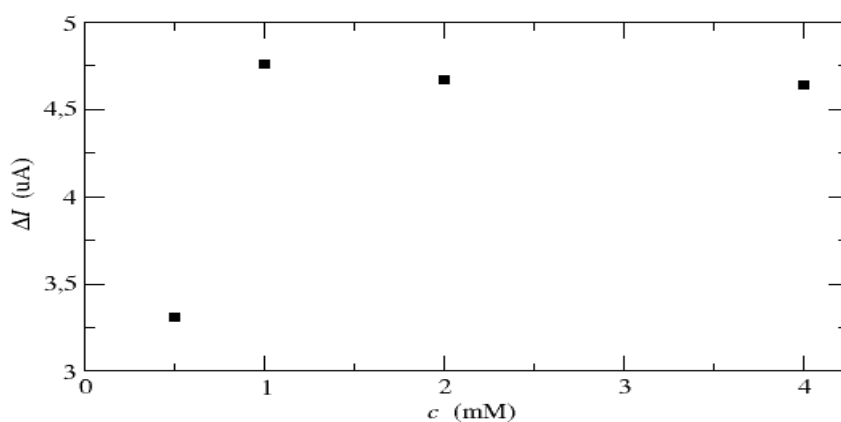


Σχήμα 8.8: Μεταβολή απόκρισης ρεύματος ως προς δυναμικό, τροποποιημένου ηλεκτροδίου για υδατικό διάλυμα 1mM κατεχόλης σε ρυθμιστικό διάλυμα pH=7 συγκέντρωσης 20mM, υπό ανάδευση 100rpm πριν και μετά την προσθήκη H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε τελική συγκέντρωση 14mM

Κατόπιν, πάλι με το ίδιο σύστημα τριών ηλεκτροδίων και για εφαρμοζόμενο δυναμικό -200 mV vs SCE και pH=7 (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων 20mM), σε υδατικά διαλύματα 20mL για συγκεντρώσεις κατεχόλης 0.5, 1, 2 και 4 mM υπό ανάδευση στα 200rpm, καταγράφεται η απόκριση ρεύματος πριν και μετά την προσθήκη H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> σε τελική συγκέντρωση 14mM. Στο Σχήμα 8.10 παρουσιάζεται η εξάρτηση της μεταβολής της απόκρισης του ρεύματος πριν και μετά την προσθήκη H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ως προς τη συγκέντρωση της κατεχόλης και φαίνεται ότι βέλτιστη συγκέντρωση αντιστοιχεί σε 1mM.

### 8.2.2 Χρονοαμπερομετρία

Χρησιμοποιώντας το σύστημα τριών ηλεκτροδίων με ηλεκτρόδιο εργασίας, τροποποιημένο με δωδεκανοθειόλη και ένζυμο MtPerrII ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος διατομής 0.217cm<sup>2</sup>, ηλεκτρόδιο αναφοράς Καλομέλινα (+244 vs SHE) και αντίθετο ηλεκτρόδιο ράβδου άνθρακα, εφαρμόζοντας δυναμικό -200mV vs SCE, σε υδατικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=7 20mM με συγκέντρωση κατεχόλης 1mM, γίνεται προσθήκη H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ανά τακτά χρονικά διαστήματα μέχρι η μεταβολή απόκρισης του σήματος με την προσθήκη υπεροξειδίου να μειωθεί σημαντικά. Χρησιμοποιήθηκε ποτενσιοστάτης Potentiostat/Galvanostat Model 263A της Princeton Applied Research συνδεδεμένο με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Αρχικά, γίνεται προσθήκη 0.3 % w/w, κατόπιν 3 % w/w και τέλος 30% w/w H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.



Σχήμα 8.10: Μεταβολή απόκρισης ρεύματος ως προς συγκέντρωση κατεχόλης για εφαρμοζόμενο δυναμικό  $-200\text{mV vs SCE}$  και  $\text{pH}=7$  (ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων  $20\text{mM}$ ), τροποποιημένου ηλεκτροδίου υπό ανάδευση  $100\text{rpm}$  πριν και μετά την προσθήκη  $\text{H}_2\text{O}_2$  σε τελική συγκέντρωση  $14\text{mM}$

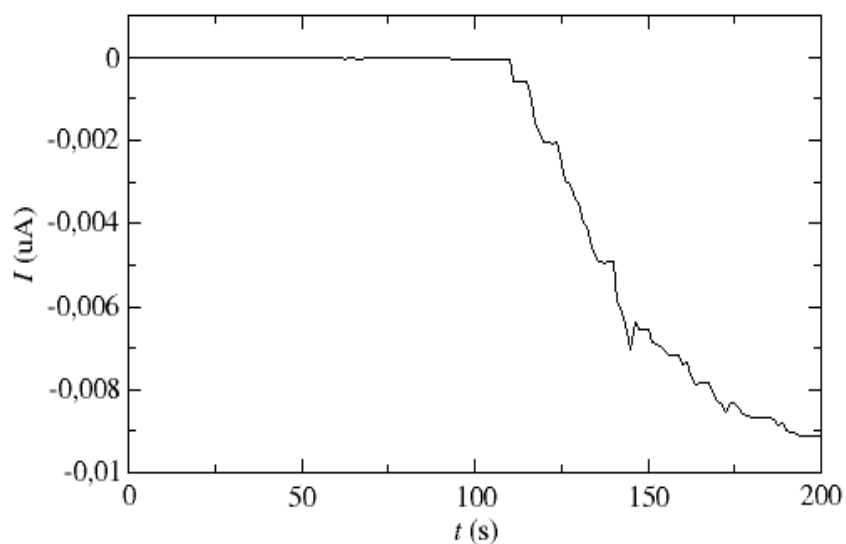
Το χρονοαμπερογράφημα που προκύπτει παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.11.

### 8.2.3 Καμπύλη Αναφοράς

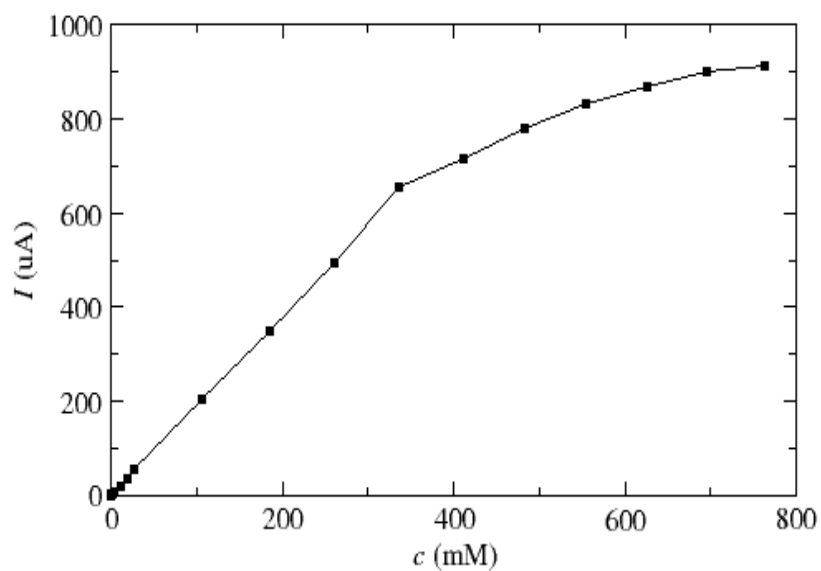
Βάσει του χρονοαμπερογραφήματος από το Σχήμα 8.11 και των συγκεντρώσεων υπεροξειδίου που προκύπτουν από την εκάστοτε προσθήκη, κατασκευάζεται το διάγραμμα έντασης ρεύματος συγκέντρωσης που παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.12. Φαίνεται μία γραμμικότητα μέχρι τα  $336.8\text{ mM}$  και μετά παρουσιάζεται μία κύρτωση στην καμπύλη. Αναλυτικότερα, το γραμμικό κομμάτι της εξάρτησης της απόκρισης ρεύματος από τη συγκέντρωση παρουσιάζεται στο Σχήμα 8.13 και εκτείνεται από τα  $1.84\text{ mM}$  έως τα  $336.8\text{ mM}$ . Ο συντελεστής γραμμικής συσχέτισης που προκύπτει είναι  $0,9996$ , το οποίο υποδεικνύει πάρα πολύ καλή γραμμική εξάρτηση του ρεύματος από τη συγκέντρωση του  $\text{H}_2\text{O}_2$  και η εξίσωση που προκύπτει είναι

$$y = 1.913x + 1.459 \quad (8.4)$$

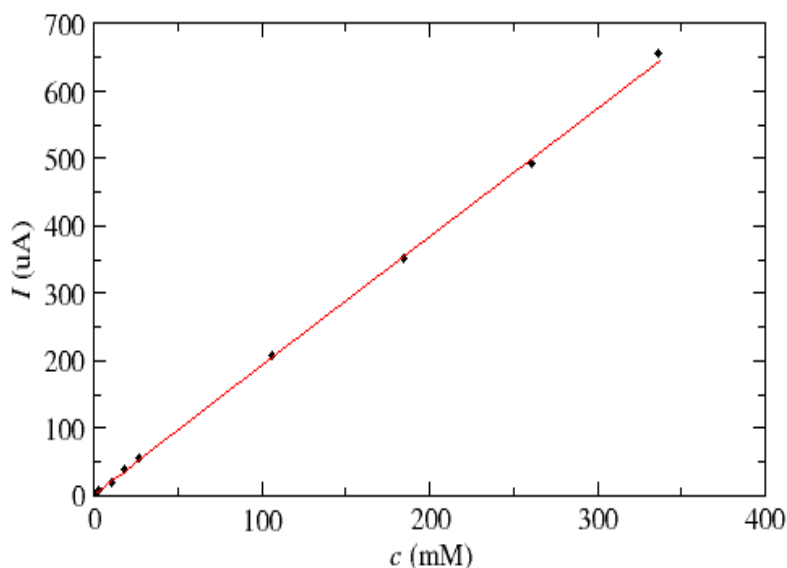
## 8.2. Χρήση Κατεχόλης ως συνυπόστρωμα



Σχήμα 8.11: Χρονοαμπερομετρία τροποποιημένου ηλεκτροδίου με προσθήκη  $H_2O_2$  για εφαρμοζόμενο δυναμικό  $-200mV$  vs SCE,  $pH=7$  και συγκέντρωση κατεχόλης  $1mM$ , υπό ανάδευση στα  $100$  rpm



Σχήμα 8.12: Εξάρτηση ρεύματος από συγκέντρωση για τροποποιημένο ηλεκτρόδιο με προσθήκη  $H_2O_2$  για εφαρμοζόμενο δυναμικό  $-200mV$  vs SCE,  $pH=7$  και συγκέντρωση κατεχόλης  $1mM$ , υπό ανάδευση στα  $100$  rpm



Σχήμα 8.13: Γραμμική περιοχή Σχήματος 8.12

#### 8.2.4 Όρια Ανίχνευσης, Όρια ποσοτικοποίησης, Χρόνος Απόκρισης

Από τη Σχέση 8.4 προκύπτει από την κλίση η ευαισθησία του τροποποιημένου ηλεκτροδίου που είναι  $1.913 \mu\text{A}/\text{mM}_{\text{H}_2\text{O}_2}$  με τη χρήση της κατεχολής ως συνυπόστρωμα.

Επίσης, πριν το πείραμα της χρονοαμπερομετρίας πραγματοποιήθηκε μέτρηση της απόκρισης ρεύματος με σύστημα τριών ηλεκτροδίων με ηλεκτρόδιο εργασίας, τροποποιημένο με δωδεκανοθειόλη και ένζυμο *MtPerII* ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος διατομής  $0.217\text{cm}^2$ , ηλεκτρόδιο αναφοράς Καλομέλινα (+244 vs SHE) και αντίθετο ηλεκτρόδιο ράβδου άνθρακα, εφαρμόζοντας δυναμικό  $-200\text{mV}$  vs SCE, σε 11 υδατικά διαλύματα φωσφορικών ιόντων  $\text{pH}=7$   $20\text{mM}$  με συγκέντρωση κατεχολής  $1\text{mM}$ , χωρίς να προστεθεί  $\text{H}_2\text{O}_2$  (τυφλά διαλύματα) και υπολογίστηκε η τυπική απόκλιση ίση με  $32.7 \mu\text{A}$ . Κατόπιν για λόγο σήματος προς θόρυβο 2 προς 1 υπολογίζεται το όριο ανίχνευσης LOD (Limit Of Detection)  $0.033 \text{mM}$  σύμφωνα με τη Σχέση 8.2

Σε περίπτωση που επιλεγθεί διαφορετικός λόγος σήματος προς θόρυβο, τα αντίστοιχα όρια ανίχνευσης παρουσιάζονται στον Πίνακα 8.4. Για μεγαλύτερους λόγους  $S/N$  το όριο ανίχνευσης αξάνεται αλλά παραμένει της τάξεως των  $10^{-2}\text{mM}$ .

Το όριο ποσοτικοποίησης LOQ (Limit Of Quantification) υπολογίζεται από

### 8.3. Σύγκριση των δυο συνυποστρωμάτων

Πίνακας 8.4: Όρια ανίχνευσης βιοαισθητήρα υπεροξειδίου για διαφορετικούς λόγους σήματος προς θόρυβο με χρήση της κατεχόλης ως συνυπόστρωμα

<i>S/N</i>	<i>LOD</i> (mM)
2	0.033
3	0.049
4	0.065

τη Σχέση 8.3 ίσο με 163  $\mu\text{M}$ , άρα μπορεί να αξιοποιηθεί ολόκληρη η γραμμική περιοχή που προκύπτει από το Σχήμα 8.13 εφόσον ξεκινάει από τα 1.84 mM.

Ο χρόνος απόκρισης, δηλαδή ο απαιτούμενος χρόνος για τη σταθεροποίηση της απόκρισης ρεύματος, όπως προκύπτει από το Σχήμα 8.11 είναι περίπου 8 s για τις υψηλές συγκεντρώσεις (μεγαλύτερες από 106mM υπεροξειδίου), ενώ για τις πιο χαμηλές είναι μικρότερος.

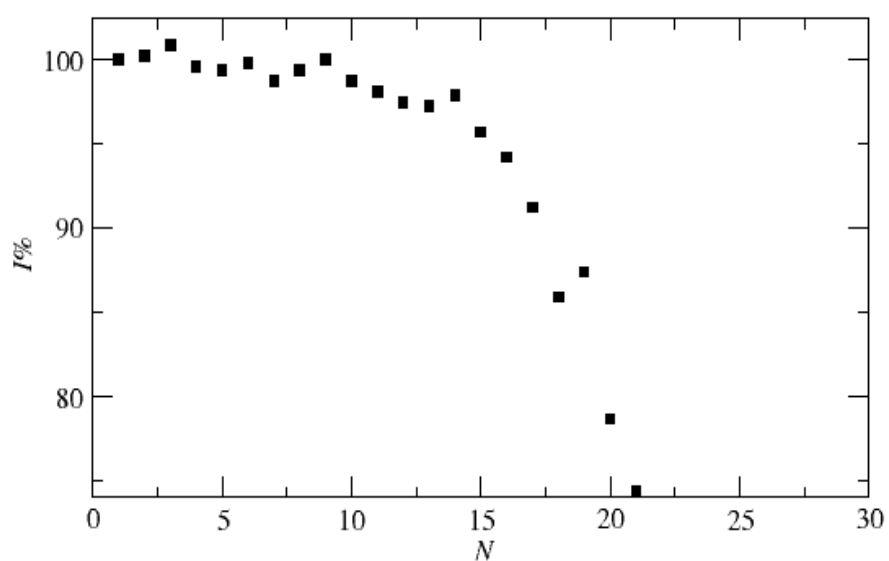
#### 8.2.5 Δοκιμασία σταθερότητας χρήσης

Με χρήση του συστήματος τριών ηλεκτροδίων με ηλεκτρόδιο εργασίας, τροποποιημένο με δωδεκανοθειόλη και ένζυμο *MtPerII* ηλεκτρόδιο χρυσού σε μορφή ελάσματος διατομής 0.217cm<sup>2</sup>, ηλεκτρόδιο αναφοράς καλομέλινα (+244mV vs SHE) και αντίθετο ηλεκτρόδιο ράβδου άνθρακα, εφαρμόζοντας δυναμικό -200mV vs SCE, σε υδατικά διαλύματα φωσφορικών ιόντων pH=7 20mM με συγκέντρωση κατεχόλης 1mM και συγκέντρωση H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20mM γίνεται μέτρηση της απόκρισης ρεύματος συναρτήσει του αριθμού των μετρήσεων για να προσδιοριστεί η σταθερότητα του ενζυμικού ηλεκτροδίου με τη χρήση και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 8.14. Χρησιμοποιήθηκε ποτενσιοστάτης Potentiostat/Galvanostat Model 263A της Princeton Applied Research συνδεδεμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Μέχρι τις 15 χρήσεις η απόκριση παραμένει περίπου στο 95.7% της απόκρισης του πρώτου δείγματος, ενώ μετά αρχίζει να φθίνει φτάνοντας στο 74.4% της αρχικής απόκρισης για την 21η μέτρηση.

### 8.3 Σύγκριση των δυο συνυποστρωμάτων

Όσον αφορά στη χρήση τα χαρακτηριστικά των δύο συστημάτων που εξετάστηκαν με χρήση του κυανού του μεθυλενίου και της κατεχόλης ως συνυπόστρωμα, παρουσιάζουν μερικές διαφορές μεταξύ τους. Κατ'αρχάς, παρουσιάζουν διαφορετικές βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας, καθώς με την κατεχόλη παρουσιάζεται βέλτιστο για pH=7 και εφαρμοζόμενο δυναμικό -200mV vs SCE ενώ για το κυανό του μεθυλενίου για pH=8 και εφαρμοζόμενο δυναμικό -300mV vs SCE, ενώ τελικά η χρησιμοποιούμενη συγκέντρωση συνυποστρώματος και για τις δύο περιπτώσεις παραμένει ίδια. Το γεγονός ότι με το κυανό του μεθυλενίου για συνυπόστρωμα ο βιοαισθητήρας λειτουργεί σε πιο αρνητικά δυναμικά, δυναμικά μπορεί





Σχήμα 8.14: Διάγραμμα % απόκρισης ρεύματος σε σχέση με αρχικό, συναρτήσει του αριθμού χρήσεων για ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών ιόντων pH=7 20mM, 1mM κατεχόλη, εφαρμοζόμενο δυναμικό -200mV vs SCE και ανάδευση στα 100rpm, για την αξιολόγηση της σταθερότητας χρήσης του τροποποιημένου ηλεκτροδίου

#### 8.4. Σύγκριση με τη βιβλιογραφία

---

να το οδηγήσει πιο εύκολα στην αδρανοποίηση καθώς το σύστημα απομακρύνεται από το πρότυπο δυναμικό του ενζύμου.

Σχετικά με τη γραμμική περιοχή, με τη χρήση της κατεχόμενης παρουσιάζεται μία πολύ μεγαλύτερη γραμμική περιοχή λειτουργίας, όμως υψηλότερο όριο ανίχνευσης, το οποίο υποδεικνύει ότι μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο για πολύ υψηλές συγκεντρώσεις υπεροξειδίου. Επίσης με τη χρήση της κατεχόμενης παρουσιάζεται μικρότερη ευαισθησία και μεγαλύτερος χρόνος απόκρισης.

Τέλος, συγκρίνοντας τον παρόντα βιοαισθητήρα, δεν μπορεί να εξαχθεί ασφαλές συμπέρασμα για τη συγκριτική ανθεκτικότητα των δύο συστημάτων, καθώς στις δοκιμασίες αντοχής σε χρήση στο σύστημα με την κατεχόμενη για συνυπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε υψηλότερη συγκέντρωση υπεροξειδίου του υδρογόνου. Πάντως και στις δύο περιπτώσεις, παρουσιάζονταν πολύ καλή επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων μέχρι τις 15 μετρήσεις.

## 8.4 Σύγκριση με τη βιβλιογραφία

Συγκρίνοντας τα μελετούμενα συστήματα βιοαισθητήρων με τα αντίστοιχα της βιβλιογραφίας για τη χρήση HRP, παρατηρείται ότι όσον αφορά στο εφαρμοζόμενο δυναμικό, κυμαίνεται γενικώς μεταξύ -200 και -400 V, το οποίο συμπίπτει με τα βέλτιστα δυναμικά που έχουν βρεθεί από την παρούσα εργασία και το χρησιμοποιούμενο pH συνήθως βρίσκεται μεταξύ 5.5 και 8, και συμφωνεί επίσης με τα βέλτιστα pH που βρέθηκαν τόσο για τη χρήση του κυανού του μεθυλενίου όσο και για την κατεχόμενη ως συνυπόστρωμα. Ενδεικτικά από τη βιβλιογραφία γίνεται παραπομπή στις παρακάτω αναφορές [18, 19, 21, 50, 51, 52, 53, 54, 55].

Όσον αφορά στη γραμμική περιοχή, στους περισσότερους βιοαισθητήρες που χρησιμοποιούν την HRP, συνήθως έχει ένα εύρος από  $\mu\text{M}$  έως και μερικά  $\text{mM}$ , συνήθως κάτω από  $10\text{mM}$ , και τα όρια ανίχνευσης είναι της τάξεως των μερικών  $\mu\text{M}$  και ορισμένες φορές φτάνουν και κάτω από το  $1\ \mu\text{M}$ , ενώ ο βιοαισθητήρας που έχει αναπτυχθεί στην παρούσα εργασία, με τη χρήση και των 2 συνυποστρωμάτων εμφανίζει γραμμική περιοχή της τάξεως των  $\text{mM}$ , σαφώς υψηλότερη από τη βιβλιογραφία, όμως με ένα πολύ μεγάλο συγκριτικά εύρος. Επίσης, τα όρια ανίχνευσης στη βιβλιογραφία είναι πολύ χαμηλότερα συγκριτικά με αυτά που έχουν υπολογιστεί εν προκειμένω[56]. Επιπρόσθετα, στη βιβλιογραφία παραδόξως δεν εξετάζεται το όριο ποσοτικοποίησης ενώ επίσης συνήθως παραλείπεται η αναφορά στο χρόνο απόκρισης.

## Μέρος IV

# Συμπεράσματα - Προτάσεις για μελλοντική έρευνα



## Κεφάλαιο 9

# Συμπεράσματα

Από την παρούσα εργασία εξήχθησαν εξής συμπεράσματα

- Οι κινητικές σταθερές του ενζύμου *MtPerII* από την ηλεκτροχημική μελέτη του ενζύμου προέκυψαν ως εξής  $k_{2,2} = 9.4 \times 10^7 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_1 = 1258\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{1,2} = 110.4 \text{ s}^{-1}$ ,  $K_{1,M} = 0.088\text{M}$ ,  $k_{1,1} = 2401 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ ,  $k_{1,-1} = 101 \text{ s}^{-1}$
- Η μέθοδος των πεπερασμένων στοιχείων επαλήθευσε τα πειραματικά αποτελέσματα, με τις αποκλίσεις να υπολογίζονται από 20% και κάτω.
- Το  $E'$  Fe(III)/Fe(II) για το ένζυμο με τη χρήση ηλεκτροδίου πυρολυτικού άνθρακα και με ακινητοποίηση του ενζύμου με πεντανοθειόλη. Με την πρώτη μέθοδο, σε pH=8 το δυναμικό υπολογίστηκε -0.265 V vs SCE ενώ με τη δεύτερη -0.113 V vs SCE για το ίδιο pH. Επίσης, για ακινητοποιημένο το ένζυμο εξάχθηκε η εξάρτηση του δυναμικού του ενζύμου από το pH  $E'_0 = 0.0583\text{pH} + 0.3472$
- Μετά από 420 min εμφύσησης ηλεκτροδίου χρυσού σε αιθανολικό διάλυμα δωδεκανοθειόλης 0.1mM υπολογίστηκε με φασματομετρία ηλεκτροχημικής εμπέδισης επικάλυψη 74% και χωρητικότητα διπλοστοιβάδας  $21.36\mu\text{F}/\text{cm}^2$ , ενώ μέσω ηλεκτροχημικής εκρόφησης της δωδεκανοθειόλης σε αιθανολικό διάλυμα NaOH 1 M, εκτιμήθηκε η επιφανειακή συγκέντρωση δωδεκανοθειόλης  $5.8 \times 10^{-10} \text{ mol}/\text{cm}^2$
- Με χρήση ATR έγινε ταυτοποίηση της προσρόφησης τόσο της δωδεκανοθειόλης όσο και του ενζύμου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου του χρυσού ενώ με δοκιμασία με ABTS επιβεβαιώθηκε ότι το ένζυμο ήταν ενεργό αν και ακινητοποιημένο. Τέλος, με χρήση UV-Vis υπολογίστηκε η επιφανειακή συγκέντρωση ακινητοποιημένου ενζύμου  $3 \times 10^{-10} \text{ mol}/\text{cm}^2$
- Όσον αφορά στην εφαρμογή ως βιοαισθητήρα, για τη χρήση κυανού του μεθυλενίου οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας βρέθηκαν pH=8, δυναμικό

---

-300mV vs SCE, συγκέντρωση συνυποστρώματος 1 mM, υπό ανάδευση στις 200 στροφές ανά λεπτό, όριο ανίχνευσης για λόγο σήματος θόρυβο 2, 0.023 mM, όριο ποσοτικοποίησης 0.115 mM, μεγάλη σταθερότητα μέχρι τις 16 χρήσεις και μέγιστος χρόνος απόκρισης 5 s. Σχετικά με τη χρήση της κατεχόλης ως συνυπόστρωμα οι βέλτιστες συνθήκες λειτουργίας βρέθηκαν pH=7, δυναμικό -200mV vs SCE, συγκέντρωση συνυποστρώματος 1 mM, υπό ανάδευση στις 200 στροφές ανά λεπτό, όριο ανίχνευσης για λόγο σήματος θόρυβο 2, 0.033 mM, όριο ποσοτικοποίησης 0.163 mM, μεγάλη σταθερότητα μέχρι τις 15 χρήσεις και μέγιστος χρόνος απόκρισης 8 s. Συγκριτικά με τη βιβλιογραφία, παρατηρούνται μεγαλύτερα όρια ανίχνευσης σε σχέση με τους ήδη ανεπτυγμένους βιοαισθητήρες με βάση την HRP, όμως, πολύ μεγαλύτερη γραμμική περιοχή.

## Κεφάλαιο 10

# Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Όσον αφορά στη μελέτη της κινητικής του ενζύμου, κατ'αρχάς θα μπορούσε να γίνει περαιτέρω προσθήκη υπεροξειδίου του υδρογόνου έτσω ώστε να μελετηθεί και η κινητική της απενεργοποίησης του ενζύμου προς τη μορφή  $E_3$ . Επίσης μπορεί να γίνει χρήση διαφορετικού συνυποστρώματος αντι για το κυανό του μεθυλενίου, το οποίο κατά την οξειδοαναγωγή δε θα αποβάλλει ή δε θα προσλαμβάνει κατιόντα υδρογόνου, ή θα έχει αρκετά υψηλότερο πρότυπο δυναμικό, έτσι ώστε να μην υπάρχουν παρεμβολές στο λαμβανόμενο σήμα από την αναγωγή των υδρογονοκατιόντων στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Επίσης προτείνεται διεκπεραίωση των πειραμάτων σε ποτενσιοστάτη που θα καλύπτει και μικρότερα εύρη ρευμάτων έτσι ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν και μικρότερες ταχύτητες σάρωσης και να ληφθούν και πειραματικά τα θεωρητικά παραγόμενα από τη μέθοδο των πεπερασμένων στοιχείων αποτελέσματα. Επίσης μπορεί να γίνει και εφαρμογή της μεθοδολογίας αυτής και σε άλλα ένζυμα, προσαρμόζοντας κατάλληλα το μοντέλο του μηχανισμού έτσι ώστε να εξαχθούν οι κινητικές σταθερές.

Όσον αφορά την εφαρμογή του βιοαισθητήρα, μπορεί να γίνει ακινητοποίηση και με άλλες μεθόδους ή και με την ίδια, απλά με χρήση θειολών και να γίνει σύγκριση ως προς τη σταθερότητα και τα όρια ανίχνευσης. Επίσης, μπορεί να γίνει και αριστοποίηση ως προς το χρόνο παραμονής του ηλεκτροδίου μέσα στο ενζυμικό διάλυμα. Τέλος, μπορεί να γίνει και δοκιμή διαφορετικών συνυποστρωμάτων ή ακόμα και μελέτη ανίχνευσης φαινολικών ειδών.





# Βιβλιογραφία

- [1] E. Torres και M. Ayala, *Biocatalysis Based on Heme Peroxidases*, Berlin: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2010
- [2] N. Bansal και S. S. Kanwar, «Peroxidase(s) in Environment Protection,» *The Scientific World Journal*, τόμ. 2013, 2013
- [3] A. Fleischmann, M. Darsoe, D. Kirill, F. Wolfgang, B. Sinead, K. B. Axelsen, A. Bairock, D. Schomburg, K. F. Tipton και R. Apweiler, *IntEnz, the integrated relational enzyme database*, Nucleic Acids Research, τόμ. 32, αρ. Database Issue, 2004
- [4] E. E. Conn, . L. M. Kraemer, . L. . P.N. και . B. Vennesland, *The aerobic oxidation of reduced . E. E. Conn, . L. M. Kraemer, . L. . P.N. και . B. Vennesland, «The aerobic oxidation of reduced triphosphopyridine nucleotide by a wheat germ enzyme system* The Journal of Biological Chemistry, τόμ. 194, pp. 143-151, 1952.
- [5] J. M. Berg, J. L. Tymoczko, L. Stryer, *Βιοχημεία*, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης, 2012, Ηράκλειο Κρήτης
- [6] D. Koua, *New automatically built profiles for a better understanding of the peroxidase superfamily evolution*, University of Geneva, Geneva, 2008.
- [7] F. Passardi, . M. Zamocky, . J. Favet, . C. Jakopitsch, . C. Penel, . C. Obinger και . C. Dunand, *Phylogenetic distribution of catalase-peroxidases: are there patches of order in chaos?*, Gene, τόμ. 397, pp. 101-113, 2007
- [8] J. Everse, *Heme Proteins*, Encyclopedia of Biological Chemistry, 354–361, 2004
- [9] Daiyasu και Toh, *Molecular evolution of the myeloperoxidase family*, Journal of Molecular Evolution, τόμ. 51, pp. 433-445, 2000.
- [10] A. J. Bard, M. Stratmann και G. S. Wilson, *Encyclopedia of Electrochemistry: Bioelectrochemistry, Volume 9*, Wiley-VCH, 2002.
- [11] F. Ruiz Dueñas, S. Camarero, . M. Pérez Boada, M. Martínez και A. Martínez, *A new versatile peroxidase from Pleurotus*, Biochemical Society Transactions, τόμ. 29, pp. 116-122, 2001.

- [12] G. Battistuzzi, M. Borsari και J. A. Cowan, *Control of cytochrome c redox potential*, Journal of American Chemical Society, τόμ. 124, pp. 5315-5324, 2002.
- [13] G. Vanderkooi και E. Stotz, *Oxidation-reduction potentials of heme a hemochromes*, Journal of Biological Chemistry, τόμ. 241, pp. 3316-3323, 1966.
- [14] R. Kassner, *Theoretical model for the effects of local nonpolar heme environments on the redox potentials in cytochromes*, Journal of American Chemical Society, τόμ. 9, pp. 2674-2677, 1973.
- [15] G. Moore, G. Pettigrew και N. K. Rogers, *Factors influencing redox potentials of electron transfer proteins*, Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, τόμ. 83, pp. 4998-4999, 1986.
- [16] B. D. Malhotra and A. P. F. Turner, *Advances in Biosensors, Volume 5: Perspectives in Biosensors*, Amsterdam: Elsevier Science B.V, 2003.
- [17] S. A. Ozkan, J.-M. Kauffamn and P. Zuman, *Electrochemical Biosensors for Drug Analysis*, in *Electroanalysis in Biomedical and Pharmaceutical Sciences*, Berlin, Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 2015, pp. 141-181.
- [18] Lin XQ, Chen J, Chen ZH *Amperometric biosensor for hydrogen peroxide based on immobilization of horseradish peroxidase on methylene blue modified graphite electrode*. *Electroanalysis*, vol. 12, pp. 306-310, 2000
- [19] Tian F, Xu B, Zhu L, Zhu G, *Hydrogen peroxide biosensor with enzyme entrapped within electrodeposited polypyrrole based on mediated sol-gel derived composite carbon electrode*. *Analytical Chimica Acta*, vol. 443, 9-16, 2001
- [20] Lei CX, Wang H, Shen GL, Yu RQ, *Immobilization of enzymes on the nano- au film modified glassy carbon electrode for the determination of hydrogen peroxide and glucose* *Electroanalysis*, vol.16, pp736-740, 2004
- [21] Upadhyay AK, Ting TW, Chen SM *Amperometric biosensor for hydrogen peroxide based on coimmobilized horseradish peroxidase and methylene green in ormosils matrix with multiwalled carbon nanotubes*. *Talanta*, vol.79, pp 38-45, 2009
- [22] Senel MC, Cevik E, Abasıyanık MF *Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on covalent immobilization of horseradish peroxidase on ferrocene containing polymeric mediator*. *Sensoral Actuators B Chem*, vol. 145, pp 444-450, 2010
- [23] T. M. Cahn, *Biosensors*, London: Chapman & Hall and Masson, 1993.
- [24] J. Wang, *Electrochemical Glucose Biosensors*, *Chemical Review*, vol. 108, pp. 814-825, 2008.
- [25] M. B. Chaubey A., *Mediated Biosensors*, *Biosensors & Bioelectronics*, vol. 17, pp. 441-456, 2002.

- [26] F. Scheller and F. Schubert, *Physicochemical. Biochemical and Technological Fundamentals of Biosensors*, in *Techniques and Instrumentation in Analytical Chemistry*, Volume 11: Biosensors, Amsterdam, Elsevier Science Publications, B.V., 1992, pp. 7-82.
- [27] X. Zhang, H. Ju and J. Wang, *Electrochemical Sensors, Biosensors and Their Biomedical Applications*, Oxford: Elsevier Inc., 2008.
- [28] J.-Z. Xu, J.-J. Zhu, Q. Wu, Z. Hu and H.-Y. Chen, *An Amperometric Biosensor Based on the Coimmobilization of Horseradish Peroxidase and Methylene Blue on a Carbon Nanotubes Modified Electrode*, *Electroanalysis*, vol. 15, no. 3, pp. 219-224, 2003.
- [29] A. Ulman, *Formation and structure of Self-Assembled Monolayers*, *Chemical Reviews*, vol. 96, pp. 1533-1554, 1996.
- [30] F. Schreiber, *Structure and growth of self assembling monolayers*, *Progress in Surface Science*, vol. 65, pp. 151-256, 2000
- [31] T. Y. R. Kondo and K. Uosaki, *Self-Assembled Monolayer (SAM)*, in *Organized Organic Ultrathin Films, Fundamentals and Applications*, Wiley-YCH, 2012, pp. 7-42.
- [32] C. Love, L. Estroff, J. Kriebel, R. Nuzzo and G. Whitesides, *Self-Assembled Monolayers of Thiolates on Metals as a Form of nanotechnology*, *Chemical Reviews*, vol. 105, pp. 1103-1169, 2005.
- [33] C. Cericat, M. E. Vela, G. Benitez and R. c. Salvarezza, *Surface characterization of sulfur and alkanethiol self-assembled monolayers on Au(111)*, *Journal of Physics Condensed Matter*, vol. 18, no. 48, 2006.
- [34] J.-G. Lee, J. Lee and J. T. Yates, *Nondissociative Chemisorption of Methanethiol on Ag(110): A Critical Result for Self-Assembled Monolayers*, *Journal Of American Chemical Society*, vol. 126, no. 2, pp. 440-441, 2004.
- [35] A. A. Curioni and H. Gronbeck, *Density functional theory approach to thiols and disulfides on gold: Au(111) surface and clusters*, *International Journal of Quantum Chemistry*, vol. 80, no. 4-5, pp. 598-608, 2000.
- [36] F. Schreiber, *Self-assembled monolayers: from 'simple' model systems to biofunctionalized interfaces*, *Journal Of Physics: Condensed Matter*, vol. 16, no. 28, 2004.
- [37] G. A. Edwards, J. Bergen and M. D. Porter, *Chemically Modified Electrodes*, in *Handbook of Electrochemistry*, New Mexico, Elsevier Science, 2007, pp. 300-305.
- [38] A. Eberhardt, P. Fenter and P. Eisenberg, *Growth kinetics in self-assembling monolayers: a unique adsorption mechanism*, *Surface Science*, vol. 397, pp. 285-290, 1998.
- [39] D. K. Schwartz, *Mechanism and kinetics of self-assembled monolayer formation*, *Annual Review of Physical Chemistry*, vol. 52, pp. 107-137, 2011.

- [40] J.-M. Saveant, *Elements of Molecular and Biomolecular Electrochemistry*, New Jersey: John Wiley & Sons, 2006.
- [41] N. Anicet, C. Bourdillon, C. Demaille, J. Moiroux and J.-M. Saveant, *Catalysis of the electrochemical oxidation of glucose by glucose oxidase and a single electron cosubstrate: kinetics in viscous solutions*, Journal of Electroanalytical Chemistry, vol. 410, no. 2, pp. 199-202, 1996.
- [42] C. Bourdillon, C. Demaille, J. Moiroux and J.-M. Saveant, *New insights into the enzymic catalysis of the oxidation of glucose by native and recombinant glucose oxidase mediated by electrochemically generated one-electron redox cosubstrates*, Journal of the American Chemical Society, vol. 115, no. 1, pp. 1-10, 1993.
- [43] Q. Chi, J. Zhang, A. J. E.T. and J. Ulstrup, *Ordered Assembly and Controlled Electron Transfer of the Blue Copper Protein Azurin at Gold (111) Single-Crystal Substrates*, Journal of Physical Chemistry B, vol. 105, pp. 4669-4679, 2001
- [44] M. M. Walczak, D. D. Popenoe, R. S. Deinhammer, B. D. Lamp, C. Chung and B. D. Porter, *Reductive Desorption of Alkanethiolate Monolayers at Gold: A Measure of Surface Coverage*, Langmuir, vol. 7, pp. 2687-2693, 1991
- [45] T. Kakiuchi, H. Usui, D. Hobara and M. Yamamoto, *Voltammetric Properties of Reductive Desorption of Alkanethiol Self Assembled Monolayers from a Metal Surface*, Langmuir, vol. 18, pp. 5231-5238, 2002.
- [46] J. A. Williams and C. B. Gorman, *Alkanethiol Reductive Desorption from Self-Assembled Monolayers on Gold, Platinum and Palladium Substrates*, Journal of Physical Chemistry C, vol. 111, pp. 12804-12810, 2007.
- [47] K. Sun, B. Jiang and X. Jiang, *Electrochemical desorption of self-assembled monolayers and its application in surface chemistry and cell biology*, Journal of Electroanalytical Chemistry, vol. 656, pp. 223-230, 2011.
- [48] Blandford C F, Armstrong, F A, *The pyrolytic graphite surface as an enzyme substrate: microscopic and spectroscopic studies*, Journal of Solid State Electrochemistry, vol. 10, pp 826-832
- [49] Scott D L, Paddock R M, Bowden E F, *The electrocatalytic enzyme function of adsorbed cytochrome c peroxidase on pyrolytic graphite*, Journal of Electroanalytical Chemistry, vol 341, pp 307-321
- [50] G. Wang, J.-J. Xu, H.-Y. Chen and Z. H. Lu, *Amperometric hydrogen peroxide biosensor with sol-gel/chitosan network-like film as immobilization matrix*, Biosensors and Bioelectronics, vol. 18, no. 4, pp. 335-343, 2003.
- [51] L. Lu, X. Zhang, Z. Wu, H. Shuangyan, G. Shen and R. Yu, *A MgO Nanoparticles Composite Matrix-Based Electrochemical Biosensor for Hydrogen Peroxide with High Sensitivity*, Electroanalysis, vol. 22, no. 4, pp. 471-477, 2010.

- 
- [52] C. Lei, S. Hu, N. Gao, G. Shen and R. Yu, *An amperometric hydrogen peroxide biosensor based on immobilizing horseradish peroxidase to a nano-Au monolayer supported by sol-gel derived carbon ceramic electrode*, *Bioelectrochemistry*, vol. 65, no. 1, pp. 33-39, 2004.
- [53] L. Wang and E. Wang, *A novel hydrogen peroxide sensor based on horseradish peroxidase immobilized on colloidal Au modified ITO electrode*, *Electrochemistry Communications*, vol. 6, pp. 225-229, 2004.
- [54] H. Zhong, R. Yuan, Y. Chai, W. Li, Y. Zhang and C. Wang, *Amperometric biosensor for hydrogen peroxide based on horseradish peroxidase onto gold nanowires and TiO<sub>2</sub> nanoparticles*, *Bioprocess Biosystems Engineering*, vol. 34, pp. 932-930, 2011.
- [55] L. Qian and X. Yang, *Composite film of carbon nanotubes and chitosan for preparation of amperometric hydrogen peroxide biosensor*, *Talanta*, vol. 68, pp. 721-727, 2006.
- [56] Ahammad, S. A. J. *Hydrogen Peroxide Biosensors Based on Horseradish Peroxidase and Hemoglobin*, *Biosensors & Bioelectronics*, S9, 2013
- [57] X. Cheng, L. Challier, A. Etcheberry, V. Noel, H. Perez *The ABTS-HRP System as an Alternative Method to RRDE for the Determination of the Selectivity of the Oxygen Reduction Reaction*, *International Journal of Electrochemical Science*, vol. 7, pp 6247-6264, 2012
- [58] A. J. Bard, I. Rubenstein *Electroanalytical Chemistry: A series of advances, Volume 19*, Marcel Decker Inc., New York, 1996