



ΣΧΟΛΗ ΧΗΜΙΚΩΝ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΕΜΠ  
Εργαστήριο Φυσικοχημείας και Εφαρμοσμένης  
Ηλεκτροχημείας  
Τομέας Επιστήμης και Τεχνικής των Υλικών

ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αξιοποίηση ενός οξειδωτικού ενζύμου  
τύπου λακκάσης  
για την ανίχνευση νευροδιαβιβαστών  
από ηλεκτροχημικό βιοαισθητήρα

*Κιάφη Σωτηρία*

*Υπεύθυνος Καθηγητής : Καραντώνης Αντώνης*

Σεπτέμβριος 2019

## Πρόλογος-Ευχαριστίες

Η παρούσα εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσικοχημείας και Εφαρμοσμένης Ηλεκτροχημείας του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου το ακαδημαϊκό έτος 2018-19.

Θα ήθελα σε πρώτη φάση να ευχαριστήσω τον αναπληρωτή καθηγητή Καραντώνη Αντώνη, που σε όλα τα βήματα της διπλωματικής εργασίας ήταν παρών στον εργαστήριο, έτοιμος να βοηθήσει και να δώσει συμβουλές όπου ήταν απαραίτητο. Τόσο ο κύριος Καραντώνης, όσο και τα μέλη του εργαστηρίου δημιουργούν ένα πολύ καλό κλίμα, ώστε ο καθένας να νιώθει ευπρόσδεκτος και ο χρόνος που χρειάζεται για την εργασία να περνά ευχάριστα και παράλληλα παραγωγικά. Σε κάθε δυσκολία από άποψη χειρισμού των οργάνων, έλλειψη μηχανημάτων και εργαστηριακών υλικών, κάποιος πάντα ήταν εκεί και έδινε λύση. Οπότε ένα μεγάλο «ευχαριστώ» ανήκει και σε όλα τα μέλη του εργαστηρίου, στον καθένα ξεχωριστά.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προσωπικά στον υποψήφιο διδάκτορα Ζουράρη Δημήτριο, ο οποίος στάθηκε πολύτιμος συνεργάτης σε όλη αυτή την πορεία, από την αρχή, μέχρι και το τέλος. Πάντα διαθέσιμος σε απορίες και κυρίως επινοητικός στις λύσεις που πρότεινε, ήταν ιδιαίτερα βοηθητικός σε θέματα εργαστηρίου, αλλά και πολύ καλή παρέα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τις φίλες μου, για την ευχάριστη διάθεση και ανοχή στα δράματα μου από την στιγμή της γνωριμίας μας, μέχρι και τώρα, και τους γονείς και τον αδελφό μου, που πάντα, χωρίς όρους, είναι εκεί παρέχοντας στήριξη και βοήθεια.

## Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετάται η οξειδοαναγωγική συμπεριφορά της επινεφρίνης, καθώς και οι οξειδοαναγωγικές ιδιότητες ενός ενζύμου τύπου λακκάσης που απομονώνεται από τον θερμόφιλο μύκητα *Myceliophthora thermophila*. Η μελέτη των ενώσεων αυτών γίνεται με τις μεθόδους της κυκλικής βολταμμετρίας CV και της βολταμμετρίας εναλλασσόμενου ρεύματος διαταραχής μεγάλου πλάτους με μετασχηματισμό Fourier (LA-FTacV). Οι δύο ουσίες μελετούνται τόσο μεμονομένα όσο και σε συνδυασμό, ενώ απώτερος σκοπός της έρευνας είναι να βρεθούν οι ιδανικές πειραματικές συνθήκες για τον προσδιορισμό της επινεφρίνης με χρήση του ενζύμου και η εφαρμογή του σε βιοαισθητήρα.

Η μέθοδος της LA-FTacV που χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία, είναι απαλλαγμένη από τα προβλήματα που ακολουθούν την κυκλική βολταμμετρία. Αντί για την κλασική επιβολή γραμμικά μεταβαλλόμενου με το χρόνο δυναμικού της κυκλικής βολταμμετρίας, επιβάλλεται ημιτονοειδής διαταραχή στο δυναμικό. Μετά από μαθηματική επεξεργασία με μετασχηματισμό Fourier και αντίστροφο μετασχηματισμό Fourier προκύπτει σήμα που είναι απαλλαγμένο από χωρητικά ρεύματα και θόρυβο. Η μέθοδος επίσης έχει τη δυνατότητα για μελέτη και θερμοδυναμικών μεγεθών, όπως είναι στην παρούσα περίπτωση το φαινόμενο πρότυπο δυναμικό  $E^{\circ}$ .

Έτσι λοιπόν, μελετάται η συμπεριφορά του ενζύμου, το οποίο ακινητοποιείται με πολυηλεκτρολύτη Nafion, και της επινεφρίνης ξεχωριστά, σε τρία διαφορετικά ηλεκτρόδια εργασίας: υαλώδους άνθρακα, χρυσού και πυρολυτικού άνθρακα. Αφού διαπιστώθηκε μετά από έλεγχο σε διαφορετικές τιμές συχνότητας και πλάτους ταλάντωσης, πως και οι δύο ουσίες συμπεριφέρονται καλύτερα μεμονομένα στο ηλεκτρόδιο του πυρολυτικού άνθρακα, η μελέτη του συστήματος των δύο έγινε σε αυτό. Έγινε επίσης έλεγχος και σε εύρος θερμοκρασίας από 25 μέχρι 50 °C, με βήμα 5. Για την λακκάση προσδιορίστηκε το  $E^{\circ}$  για διάφορες θερμοκρασίες. Για την επινεφρίνη πραγματοποιήθηκε μελέτη της οξειδοαναγωγής της και χαρτογράφηση του σήματός της σε διαφορετικές συνθήκες συχνότητας και πλάτους διαταραχής, καθώς και μελέτη της απευθείας ανίχνευσής της από το ηλεκτρόδιο εργασίας. Το σύστημα ακινητοποιημένης λακκάσης για την ανίχνευση της επινεφρίνης μελετήθηκε πάλι σε διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας και με διάφορες τιμές συχνότητας, ενώ έγινε και μελέτη για διάφορες τιμές pH. Τελικά διαπιστώθηκε ο καλύτερος συνδυασμός παραγόντων για προσδιορισμό της επινεφρίνης με χρήση του ενζύμου. Αυτός επιτυγχάνεται για συχνότητα  $f$  1 Hz, pH 4 και θερμοκρασία  $T$  30 °C. Τα αποτελέσματα της μεθόδου συγκρίνονται ως προς τα όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης με άλλα βιβλιογραφικά δεδομένα, όπου διαπιστώνονται τα πλεονεκτήματα της μεθόδου της LA-FTacV.

## Abstract

In this thesis, the redox behavior of epinephrine, as well as the redox properties of a laccase type enzyme, being isolated by the thermophile fungus *Myceliophthora Thermophila*, are being examined.

The study of these compounds is conducted with the use of cyclic voltammetry (CV) and large amplitude ac voltammetry (LA-FTacV). The two substances are being studied individually, as well as in conjunction, with the larger goal of this study being the pinpointing of ideal experimental conditions for identifying the epinephrine molecule, with the usage of the enzyme for biosensor applications.

The LA-FTacV method being used in this study is free of the problems that come with classic cyclic voltammetry. Other than using the classic dc enforcement which is typical for cyclic voltammetry, in this case a sinusoidal enforcement is also being used on the potential. The signal is being processed with Fourier transformation and after that, the capacity currents and the noise are eliminated. This method also has the potential for verifying other thermodynamic measurements, such as the apparent electrochemical potential  $E^{0'}$ .

The enzyme, immobilized by Nafion electrolyte, and the epinephrine are being studied individually on three different electrodes: glassy carbon, Au and pyrolytic carbon. Both these substances behave better on the pyrolytic carbon electrode, taking in consideration different conditions in amplitude and frequency. As a result, the combined system is being studied only on that electrode. The effect of the temperature is being examined in a spectrum between 25 and 50 °C, with a step of 5. For the enzyme, the apparent electrochemical potential  $E^{0'}$  was determined for varied values of temperature. The redox behavior of epinephrine is being examined and graphed through the molecule's signal in different conditions of amplitude and frequency and the direct detection from the working electrode is also being examined. Different values of pH are also being taken into consideration, so that the optimal conditions for the experiment are being met, these being 1 Hz, pH 4 and a temperature of 30 °C. The results of this method are being compared with papers for epinephrine detection and quantification from other methods, with the result being benefits of LA-FTacV getting highlighted.

## Πίνακας Περιεχομένων

Πρόλογος-Ευχαριστίες .....	ii
Περίληψη.....	iii
Abstract .....	iv
Πίνακας Σχημάτων .....	3
Κεφάλαιο 1 <sup>ο</sup> . Εισαγωγή.....	8
Λακκάσες.....	8
Χαρακτηρισμός Τύπων Χαλκού.....	9
Προέλευση .....	10
Καταλυτική ικανότητα.....	12
Σύστημα Λακκάσης - Μεσολαβητή.....	13
Φυσικοχημικές Ιδιότητες ενζύμου .....	13
Ισοένζυμα .....	15
Υποστρώματα .....	16
Ακινητοποίηση λακκάσης.....	16
Βιομηχανική παραγωγή .....	17
Εφαρμογές.....	19
Παραγωγή λακκάσης από <i>Myceliophthora thermophila</i> .....	25
Επινεφρίνη .....	27
Κυκλική Βολταμμετρία (CV) και Large amplitude ac voltammetry με μετασχηματισμό Fourier (LA-FTacV) .....	30
Κυκλική Βολταμμετρία (CV) .....	30
Μέθοδος LA-FTacV .....	32
Κεφάλαιο 2 <sup>ο</sup> : Πειραματικό Μέρος .....	39
Πειραματική Διάταξη .....	39
Πειραματική Διαδικασία.....	40
Προετοιμασία ηλεκτροδίων .....	40
Υπολογισμός της πραγματικής επιφάνειας του ηλεκτροδίου πυρολυτικού άνθρακα ..	41
Ακινητοποίηση και προσδιορισμός φαινόμενου πρότυπου $E^{0\prime}$ δυναμικού λακκάσης..	42
Μελέτη Επινεφρίνης .....	55
Σύστημα Ακινητοποιημένου Ενζύμου-Επινεφρίνης .....	70
Όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού της μεθόδου .....	84

Κεφάλαιο 3 <sup>ο</sup> : Συμπεράσματα.....	85
Προτάσεις για μελλοντική έρευνα.....	87
Βιβλιογραφία .....	88
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	93

## Πίνακας Σχημάτων

- Σχήμα 1: Κέντρα Χαλκού από τη λακκάση CotA από τον *B. Subtili* ..... 9
- Σχήμα 2: Σχηματική αναπαράσταση πλήρους οξειδωσης υποστρώματος από λακκάση[8] ..... 12
- Σχήμα 3: Πληροφορίες για το οξειδωαναγωγικό δυναμικό για διαφορετικά είδη λακκάσης[10] ..... 15
- Σχήμα 4: Σύγκριση των γονιδιακών αλληλουχιών των λακκασών I και II από τον *T. versicolor* και της IIIc από τον *C. Versicolor*[12]..... 16
- Σχήμα 5: Σχηματική αναπαράσταση βιοαισθητήρα ..... 24
- Σχήμα 6: Τρισδιάστατη δομή λακκάσης, εκφρασμένης από τον *Aspergillus orizae*, με γονίδιο από τη *Myceliophthora thermophila*[37]..... 26
- Σχήμα 7: Διδιάστατη δομή μορίου επινεφρίνης..... 27
- Σχήμα 8:Τρισδιάστατη δομή μορίου επινεφρίνης[PubChem]..... 28
- Σχήμα 9: Διδιάστατη δομή μορίου νορεπινεφρίνης..... 28
- Σχήμα 10. Διαγράμματα για το επιβαλλόμενο δυναμικό σε συνάρτηση με το χρόνο και για την συνάρτηση του δυναμικού με το ρεύμα για την τεχνική της κυκλικής βολταμετρίας [49] ..... 30
- Σχήμα 11: Αναπαράσταση κυματομορφής που χρησιμοποιείται στη μέθοδο FTacV [52] ..... 33
- Σχήμα 12: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας επεξεργασίας του σήματος με μετασχηματισμό Fourier από την LA-FtacV [51]..... 34
- Σχήμα 13: (α) Παράδειγμα κυκλικών βολταμμογραφημάτων δράσης ακινητοποιημένου οξειδοαναγωγικού ενζύμου συζευγμένο με αντίδραση από υπόστρωμα στον κύριο όγκο του διαλύματος για διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος απουσία χωρητικότητας (b) Ρυθμός αντίδρασης συναρτήσει της συκέντρωσης και διάγραμμα Lineweaver Burk (ενσωματωμένο σχήμα) ..... 37
- Σχήμα 14: Παράδειγμα κυκλικών βολταμμογραφημάτων δράσης ακινητοποιημένου οξειδοαναγωγικού ενζύμου συζευγμένο με αντίδραση από υπόστρωμα στον κύριο όγκο του διαλύματος για διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (a) απουσία χωρητικότητας (b) παρουσία χωρητικότητας..... 37
- Σχήμα 15: Παράδειγμα LA-FTacV βολταμμογραφημάτων δράσης ακινητοποιημένου οξειδοαναγωγικού ενζύμου συζευγμένο με αντίδραση από υπόστρωμα στον κύριο όγκο του διαλύματος για διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (a) σήμα πριν την επεξεργασία με μετασχηματισμό Fourier (b) 2<sup>η</sup> αρμονική (c) 3<sup>η</sup> αρμονική (d) 4<sup>η</sup> αρμονική (e) 5<sup>η</sup> αρμονική..... 38
- Σχήμα 16: Κυκλικά βολταμμογραφήματα σιδηροκυανιούχων ιόντων 5 mM με φέροντα ηλεκτρολύτη Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,1 M σε πυρολυτικό άνθρακα για διαφορετικές ταχύτητες σάρωσης 5 (μαύρο), 10 (κόκκινο), 20 (πράσινο), 50 (μπλε), 100 (κίτρινο) ..... 42

- Σχήμα 17: Διαφορετικές αναλογίες λακκάσης Nafion για συχνότητες  $f$  1 Hz ((a),(b)), 3 Hz((c),(d)), 5 Hz((e),(f)). Σε κάθε γράφημα η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί σε αναλογία λακκάσης-Nafion:10-0.5, η κόκκινη σε 10-1, η πράσινη σε 5-5, η μπλε σε 1-10 και η κίτρινη σε 20-0.5. .... 44
- Σχήμα 18: Για αναλογία λακκάσης-Nafion:10-1, σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα, διαφορετικές θερμοκρασίες απεικόνιση τρίτης αρμονικής. Για τα γραφήματα από (a) έως και (e) η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί στο 1 Hz, η κόκκινη στα 3 Hz και η πράσινη στα 5 Hz. Για το (f) η μαύρη γραμμή είναι για τους 30 °C, η κόκκινη για τους 35 °C, η πράσινη για τους 40 °C, η μπλε για τους 45 °C και η κίτρινη για τους 50 °C. .... 46
- Σχήμα 19: Διαφορετικές αναλογίες λακκάσης-Nafion για συχνότητες  $f$  1 Hz ((a),(b)), 3 Hz((c),(d)), 5 Hz((e),(f)) σε ηλεκτρόδιο χρυσού για πλάτος ταλάντωσης 200 mV. Σε κάθε γράφημα η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί σε αναλογία λακκάσης-Nafion:10-0.5, η κόκκινη σε 10-1, η πράσινη σε 5-5, η μπλε σε 1-10 και η κίτρινη σε 20-0.5. Η αριστερή στήλη αντιστοιχεί στην τρίτη αρμονική και η δεξιά στην πέμπτη ..... 47
- Σχήμα 20: Διαφορετικές αναλογίες λακκάσης-Nafion για συχνότητες  $f$  1 Hz ((a),(b)), 3 Hz((c),(d)), 5 Hz((e),(f)) σε ηλεκτρόδιο χρυσού για πλάτος ταλάντωσης 250 mV. Σε κάθε γράφημα η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί σε αναλογία λακκάσης-Nafion:10-0.5, η κόκκινη σε 10-1, η πράσινη σε 5-5, η μπλε σε 1-10 και η κίτρινη σε 20-0.5. Η αριστερή στήλη αντιστοιχεί στην τρίτη αρμονική και η δεξιά στην πέμπτη ..... 48
- Σχήμα 21: Για αναλογία λακκάσης-Nafion:5-5, σε ηλεκτρόδιο χρυσού, διαφορετικές θερμοκρασίες απεικόνιση τρίτης αρμονικής. Για τα γραφήματα από (a) έως και (e) η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί στο 1 Hz, η κόκκινη στα 3 Hz και η πράσινη στα 5 Hz. Για το (f) η μαύρη γραμμή είναι για τους 30°C, η κόκκινη για τους 35 °C, η πράσινη για τους 40 °C, η μπλε για τους 45 °C και η κίτρινη για τους 50°C. .... 49
- Σχήμα 22: Για ηλεκτρόδιο πυρολυτικού άνθρακα και σταθερή αναλογία λακκάσης-Nafion, διαφορετικά πλάτη ταλάντωσης με απεικόνιση τρίτης αρμονικής. Το (a) αντιστοιχεί σε A 100 mV, το (b) σε A 120 mV, το (c) σε A 150 mV, το (d) σε A 175 mV, το (e) σε A 200 mV, το (f) σε A 225 mV, ο (g) αντιστοιχεί σε A 250 mV και το (h) σε A 300 mV. Το γράφημα (i) αναπαριστά όλα τα γραφήματα σε ένα..... 51
- Σχήμα 23: Για ηλεκτρόδιο πυρολυτικού άνθρακα οι διάφορες αναλογίες ενζύμου-ακινητοποιητή για σταθερό πλάτος ταλάντωσης και λουπές παραμέτρους με απεικόνιση τρίτης αρμονικής. Το (a) αντιστοιχεί σε αναλογία λακκάσης-Nafion:10-0.5, το (b) σε 10-1, το (c) σε 5-5, το (d) σε 1-10, το (e) σε 20-0.5. Το (f) αντιστοιχεί στο συνολικό γράφημα, όπου η μαύρη γραμμή αντιστοιχίζεται σε αναλογία λακκάσης-Nafion:10-0.5, η κόκκινη σε 10-1, η πράσινη σε 5-5, η μπλε σε 1-10 και η κίτρινη σε 20-0.5. .... 52
- Σχήμα 24: Για αναλογία λακκάσης-Nafion:10-1, σε ηλεκτρόδιο πυρολυτικού άνθρακα, διαφορετικές θερμοκρασίες με απεικόνιση τρίτης αρμονικής. Για τα γραφήματα από (a) έως και (e) απεικονίζονται οι τρεις διαφορετικές ακινητοποιήσεις. Για το (f) η μαύρη γραμμή είναι για για τους 30 °C, η κόκκινη για τους 35 °C, η πράσινη για τους 40 °C, η μπλε για τους 45 °C και η κίτρινη για τους 50 °C. .... 53



- Σχήμα 25: Κυκλικά Βολταμμογραφήματα για την επινεφρίνη για τα δύο ηλεκτρόδια, χρυσού και υαλώδους άνθρακα. Αριστερά τα γραφήματα αφορούν το ηλεκτρόδιο χρυσού και δεξιά τον υαλώδη άνθρακα. Η πρώτη γραμμή είναι για ταχύτητα σάρωσης 20 mV/s, η δεύτερη για 50 mV/s και η τρίτη για 100 mV/s..... 56
- Σχήμα 26: Γράφημα για την επινεφρίνη σε ηλεκτρόδιο χρυσού (αριστερή στήλη) και υαλώδους άνθρακα (δεξιά στήλη). Απεικονίζεται σε κάθε γράφημα η τρίτη αρμονική όπως προκύπτει από την μέθοδο της LA-FTacV στους 25 °C. .... 56
- Σχήμα 27: Γράφημα για την επινεφρίνη σε ηλεκτρόδιο χρυσού(αριστερή στήλη) και υαλώδους άνθρακα(δεξιά στήλη). Απεικονίζεται σε κάθε γράφημα η τρίτη αρμονική όπως προκύπτει από την μέθοδο της LA-FTacV στους 50 °C. .... 57
- Σχήμα 28: Για ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα αναπαράσταση επινεφρίνης, διαφορετικά πλάτη ταλάντωσης. Το (a) αντιστοιχεί σε A 100 mV , το (b) σε A 150 mV, το γράφημα (c) σε 200 mV, το (d) σε 225 mV, το (e) σε 250 mV και το (f) σε 300 mV. Το (g) αναπαριστά όλα τα γραφήματα σε ένα. Η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί σε A 100 mV, η κόκκινη σε A 120 mV, η πράσινη σε A 200 mV, η μπλε σε A 225 mV, η κίτρινη σε A 250 mV και η καφέ σε A 300 mV. .... 59
- Σχήμα 29: Σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα αναπαράσταση επινεφρίνης για διαφορετικές συχνότητες. Το (a) αντιστοιχεί σε 3 Hz , το (b) σε 4 Hz, το γράφημα (c) σε 5 Hz, το (d) σε 6 Hz, το (e) σε 7 Hz και το (f) σε 8 Hz ..... 60
- Σχήμα 30: Σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα αναπαράσταση επινεφρίνης για διαφορετικές συχνότητες. Το (a) αντιστοιχεί σε 9 Hz και το (b) σε 10 Hz. Το γράφημα (c) αναπαριστά το σύνολο των διαφορετικών συχνοτήτων. Η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί σε 3 Hz, η κόκκινη σε 4 Hz, η πράσινη σε 5 Hz, η μπλε σε 6 Hz, η κίτρινη σε 7 Hz, η καφέ σε 8 Hz, η γκρι σε 9 Hz και η μωβ σε 10 Hz ..... 60
- Σχήμα 31: Τρίτη αρμονική για A 250 mV και f 10 Hz και v 20 mV/s Το (a) αντιστοιχεί σε 0.25 mM, το (b) σε 0.1 mM, το (c) σε 0.075 mM, το (d) σε 0.05 mM και το (e) σε 0.01 mM..... 61
- Σχήμα 32 : Για ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα αναπαράσταση τρίτης αρμονικής επινεφρίνης, διαφορετικά πλάτη ταλάντωσης στους 50 °C. Το (a) αντιστοιχεί σε A 100 mV , το (b) σε A 150 mV, το γράφημα (c) σε 200 mV, το (d) σε 225 mV, το (e) σε 250 mV και το (f) σε 300 mV. Το (g) αναπαριστά όλα τα γραφήματα σε ένα. Η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί σε A 100 mV, η κόκκινη σε A 120 mV, η πράσινη σε A 200 mV, η μπλε σε A 225 mV, η κίτρινη σε A 250 mV και η καφέ σε A 300 mV. .... 62
- Σχήμα 33: Σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα αναπαράσταση τρίτης αρμονικής επινεφρίνης για διαφορετικές συχνότητες στους 50 °C. Το (a) αντιστοιχεί σε 3 Hz , το (b) σε 4 Hz, το γράφημα (c) σε 5 Hz, το (d) σε 6 Hz, το (e) σε 7 Hz και το (f) σε 8 Hz. .... 63
- Σχήμα 34 : Σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα αναπαράσταση τρίτης αρμονικής επινεφρίνης για διαφορετικές συχνότητες στους 50 °C. Το (g) αντιστοιχεί σε 9 Hz και το (h) σε 10 Hz. Το γράφημα (i) αναπαριστά το σύνολο των διαφορετικών συχνοτήτων. Η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί σε 3 Hz, η κόκκινη σε 4 Hz, η πράσινη σε 5 Hz, η μπλε σε 6 Hz, η κίτρινη σε 7 Hz, η καφέ σε 8 Hz, η γκρι σε 9 Hz και η μωβ σε 10 Hz. .... 63

- Σχήμα 35: Τρίτη αρμονική για  $A$  225 mV και  $f$  9 Hz και  $v$  20 mV/s σε υαλώδη άνθρακα στους 50 °C. Το (a) αντιστοιχεί σε 0.25 mM, το (b) σε 0.1, το (c) σε 0.075, το (d) σε 0.05 και το (e) σε 0.01. .... 64
- Σχήμα 36: Για ηλεκτρόδιο πυρολυτικού άνθρακα αναπαράσταση επινεφρίνης, διαφορετικά πλάτη ταλάντωσης με απεικόνιση τρίτης αρμονικής. Το (a) αντιστοιχεί σε  $A$  100 mV, το (b) σε  $A$  150 mV, το γράφημα (c) σε 200 mV, το (d) σε 225 mV, το (e) σε 250 mV και το (f) σε 300 mV. Το (g) αναπαριστά όλα τα γραφήματα σε ένα. Η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί σε  $A$  100 mV, η κόκκινη σε  $A$  120 mV, η πράσινη σε  $A$  200 mV, η μπλε σε  $A$  225 mV, η κίτρινη σε  $A$  250 mV και η καφέ σε  $A$  300 mV. . 65
- Σχήμα 37: Σε ηλεκτρόδιο πυρολυτικού άνθρακα αναπαράσταση επινεφρίνης για διαφορετικές συχνότητες. Το (a) αντιστοιχεί σε 3 Hz, το (b) σε 4 Hz, το γράφημα (c) σε 5 Hz, το (d) σε 6 Hz, το (e) σε 7 Hz, το (f) σε 8 Hz, το (g) αντιστοιχεί σε 9 Hz και το (h) σε 10 Hz. Το γράφημα (i) αναπαριστά το σύνολο των διαφορετικών συχνοτήτων. Η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί σε 3 Hz, η κόκκινη σε 4 Hz, η πράσινη σε 5 Hz, η μπλε σε 6 Hz, η κίτρινη σε 7 Hz, η καφέ σε 8 Hz, η γκρι σε 9 Hz και η μωβ σε 10 Hz. .... 66
- Σχήμα 38 : Τρίτη αρμονική επινεφρίνης για  $f$  9 Hz,  $A$  250 mV και  $v$  20 mV/s. Το (a) αντιστοιχεί σε 0.25 mM, το (b) σε 0.1 mM, το (c) σε 0.075 mM, το (d) σε 0.05 mM και το (e) σε 0.025 mM και το (f) 0.01 mM ..... 67
- Σχήμα 39: Τρίτη αρμονική επινεφρίνης για  $f$  9 Hz,  $A$  250 mV και  $v$  20 mV/s. . Το (a) αντιστοιχεί σε 0.0075 mM, το (b) σε 0.005 mM, το (c) σε 0.0025 mM και το (d) σε 0.001 mM. .... 68
- Σχήμα 40: Σχέση έντασης πυκνότητας ρεύματος ως προς συγκέντρωση επινεφρίνης για τρίτη αρμονική  $f$  9 Hz,  $A$  250 mV και  $v$  20 mV/s..... 69
- Σχήμα 41: Σε πυρολυτικό οι προσθήκες για τις διαφορετικές αραιώσεις. Τα γραφήματα (a), (b) αφορούν την αραιώση 1/10, τα γραφήματα (c), (d) την 1/100 και τα (e), (f) την 1/200. Η αριστερή στήλη αφορά την τρίτη αρμονική και η δεξιά την πέμπτη..... 71
- Σχήμα 42: Ποσοστό αύξησης πυκνότητας ρεύματος στο σημείο κορεσμού ως προς τη συγκέντρωση. .... 72
- Σχήμα 43: Τα σχήματα όπως προκύπτουν αυτά για διαφορετικές τιμές της συχνότητας. Το (a) είναι για συχνότητα 2 Hz, το (b) για 1.75 Hz, το (c) για 1.5, το (d) για 1.25 Hz και το (e) για 1 Hz. .... 73
- Σχήμα 44: Σύστημα επινεφρίνης ενζύμου σε πυρολυτικό άνθρακα για θερμοκρασία 30 °C, το σύστημα για το ακινητοποιημένο ένζυμο με τις προσθήκες της επινεφρίνης. Η αριστερή στήλη απεικονίζει την τρίτη αρμονική και η δεξιά την πέμπτη. Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε διαφορετική ακινητοποίηση στις ίδιες κατα τα άλλα συνθήκες. .... 74
- Σχήμα 45: Σύστημα επινεφρίνης ενζύμου σε πυρολυτικό άνθρακα για θερμοκρασία 35 °C, το σύστημα για το ακινητοποιημένο ένζυμο με τις προσθήκες της επινεφρίνης. Η αριστερή στήλη απεικονίζει την τρίτη αρμονική και η δεξιά την πέμπτη. Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε διαφορετική ακινητοποίηση στις ίδιες κατα τα άλλα συνθήκες. .... 75

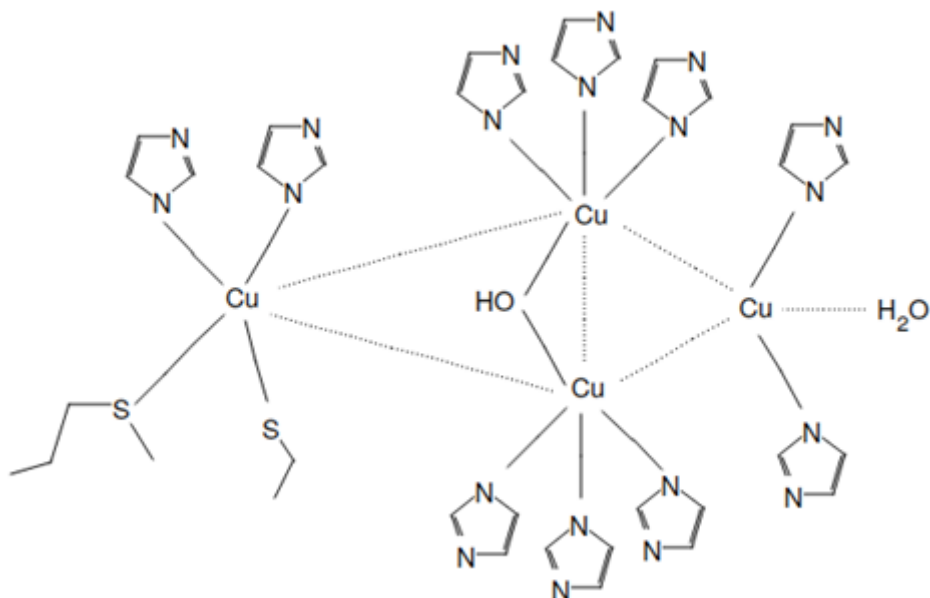
- Σχήμα 46: Σύστημα επινεφρίνης ενζύμου σε πυρολυτικό άνθρακα για θερμοκρασία 40 °C, το σύστημα για το ακινητοποιημένο ένζυμο με τις προσθήκες της επινεφρίνης. Η αριστερή στήλη απεικονίζει την τρίτη αρμονική και η δεξιά την πέμπτη. Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε διαφορετική ακινητοποίηση στις ίδιες κατά τα άλλα συνθήκες. .... 76
- Σχήμα 47: Σύστημα επινεφρίνης ενζύμου σε πυρολυτικό άνθρακα για θερμοκρασία 45 °C, το σύστημα για το ακινητοποιημένο ένζυμο με τις προσθήκες της επινεφρίνης. Η αριστερή στήλη απεικονίζει την τρίτη αρμονική και η δεξιά την πέμπτη. Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε διαφορετική ακινητοποίηση στις ίδιες κατά τα άλλα συνθήκες. .... 77
- Σχήμα 48: Σύστημα επινεφρίνης ενζύμου σε πυρολυτικό άνθρακα για θερμοκρασία 50 °C, το σύστημα για το ακινητοποιημένο ένζυμο με τις προσθήκες της επινεφρίνης. Η αριστερή στήλη απεικονίζει την τρίτη αρμονική και η δεξιά την πέμπτη. Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε διαφορετική ακινητοποίηση στις ίδιες κατά τα άλλα συνθήκες. .... 78
- Σχήμα 49: Σύστημα επινεφρίνης ενζύμου σε πυρολυτικό άνθρακα για θερμοκρασία 30 °C και pH 3, το σύστημα για το ακινητοποιημένο ένζυμο με τις προσθήκες της επινεφρίνης. Η αριστερή στήλη απεικονίζει την τρίτη αρμονική και η δεξιά την πέμπτη. Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε διαφορετική ακινητοποίηση στις ίδιες κατά τα άλλα συνθήκες. .... 79
- Σχήμα 50: Σύστημα επινεφρίνης ενζύμου σε πυρολυτικό άνθρακα για θερμοκρασία 30 °C και pH 3,5, το σύστημα για το ακινητοποιημένο ένζυμο με τις προσθήκες της επινεφρίνης. Η αριστερή στήλη απεικονίζει την τρίτη αρμονική και η δεξιά την πέμπτη. Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε διαφορετική ακινητοποίηση στις ίδιες κατά τα άλλα συνθήκες. .... 80
- Σχήμα 51: Σύστημα επινεφρίνης ενζύμου σε πυρολυτικό άνθρακα για θερμοκρασία 30 °C και pH 4, το σύστημα για το ακινητοποιημένο ένζυμο με τις προσθήκες της επινεφρίνης. Η αριστερή στήλη απεικονίζει την τρίτη αρμονική και η δεξιά την πέμπτη. Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε διαφορετική ακινητοποίηση στις ίδιες κατά τα άλλα συνθήκες. .... 81
- Σχήμα 52: Σύστημα επινεφρίνης ενζύμου σε πυρολυτικό άνθρακα για θερμοκρασία 30 °C και pH 4,5, το σύστημα για το ακινητοποιημένο ένζυμο με τις προσθήκες της επινεφρίνης. Η αριστερή στήλη απεικονίζει την τρίτη αρμονική και η δεξιά την πέμπτη. Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε διαφορετική ακινητοποίηση στις ίδιες κατά τα άλλα συνθήκες. .... 82
- Σχήμα 53: Ποσοστό αύξησης πυκνότητας ρεύματος ως προς (α) θερμοκρασία και (β) pH..... 83
- Σχήμα 54: Για pH 4,  $T$  30 °C,  $f$  5 Hz,  $v$  20 mV/s,  $A$  200 mV για διαφορετικές συγκεντρώσεις επινεφρίνης: 0 (μαύρο), 0.0625 (κόκκινο), 0.125 (πράσινο), 0.188 (μπλε), 0.250 (ματζέντα), 0.375 πορτοκαλί, 0.500 (καφέ), 0.625 (μωβ), 1.25 nM (κυανό) (β) Ποσοστό αύξησης πυκνότητας ρεύματος σε σημείο κορεσμού ως προς τη συγκέντρωση ..... 83

## Κεφάλαιο 1<sup>ο</sup>. Εισαγωγή

### Λακκάσες

Οι λακκάσες ανήκουν δομικά στην ομάδα των οξειδασών πολλαπλών χαλκών, αφού περιέχουν τέσσερις χαλκούς, κάτι που τους προσδίδει καταλυτικές ιδιότητες. Στη βιβλιογραφία συναντώνται και ως “Πράσινο Εργαλείο” ή “Πράσινος Καταλύτης”. Πρόσφατα η μελέτη τους έγινε πιο έντονη, αφού η ικανότητα τους για καταλυτικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές είναι σημαντική. Ιστορικά, το ένζυμο απομονώθηκε πρώτη φορά από το ιαπωνικό δέντρο *Rhus vernicifera*, στα τέλη του 19<sup>ου</sup> αιώνα, και πρόκειται για την πιο ευρέως μελετημένη λακκάση φυτικής προέλευσης. Η ανακάλυψη έγινε από τον Yoshida, ενώ οι Bertrand και Laborde συνέχισαν την έρευνα επιδεικνύοντας την παρουσία του ενζύμου στους μύκητες. Άλλες λακκάσες, που έχουν απασχολήσει σε μικρότερο βαθμό, είναι αυτές που προέρχονται από τα φυτά *Rhus succedanea*, *Acer pseudoplatanus*, *Pinus taeda*, *Populus euroamericana*, *Liriodendron tulipifera*, *Nicotiana tobacco*, *Ilolium perenne* και *Zea mays* [1-6].

Η περιοχή στη δομή που απασχολεί περισσότερο είναι αυτή που περιέχει τους χαλκούς. Οι λακκάσες περιέχουν τρία διαφορετικά είδη χαλκού, όπως παρατηρείται μέσω UV/Vis και φασματοσκοπίας EPR, ένα εκ των οποίων, προσφέρει στο ένζυμο χαρακτηριστικό μπλε χρώμα, ενώ η απουσία του συγκεκριμένου είδους χαλκού, οδηγεί σε λακκάσες που είναι κίτρινες ή λευκές. Σχετικά με την δομή, τα ένζυμα αυτά αποτελούνται από τέσσερα άτομα χαλκού στο κέντρο τους, τα οποία προσφέρουν την ικανότητα καταλυτικής δράσης. Πιο συγκεκριμένα, ένα άτομο χαλκού βρίσκεται στην θέση T1, όπου προσδένεται το υπόστρωμα. Από το συγκεκριμένο άτομο παίρνουν και οι λακκάσες το χαρακτηριστικό τους μπλε χρώμα. Τα υπόλοιπα τρία άτομα είναι στην περιοχή T2/T3, όπου γίνεται η αντίδραση με το μοριακό οξυγόνο. Οι θέσεις ονομάζονται T1, T2 και T3, όπου το T σημαίνει τύπος, όπως διαμορφώνονται εξαιτίας των φασματοσκοπικών τους ιδιοτήτων. Ο μηχανισμός της αντίδρασης που συμβαίνει με συμμετοχή του ενζύμου, δεν είναι δυνατόν να είναι ενός σταδίου. Προτείνεται λοιπόν, πως το ένζυμο μπορεί να λειτουργήσει στο ενδιάμεσο σαν «δεξαμενή» ηλεκτρονίων, προκειμένου στη συνέχεια να συνεισφέρει στην αντίδραση αναγωγής του οξυγόνου. Συνεπώς, η αντίδραση για την οποία γίνεται λόγος, δηλαδή αυτή μεταξύ μιας λακκάσης και ενός υποστρώματος, πρόκειται για οξείδωση μονού ηλεκτρονίου, κατά την οποία παράγεται ελεύθερη ρίζα. Το αρχικό προϊόν είναι ασταθές και μπορεί να εμπλακεί σε δευτερεύουσες αντιδράσεις, ενζυμικά καταλυώμενες ή μη [3,4].



Σχήμα 1: Κέντρα Χαλκού από τη λακκάση CotA από τον *B. Subtilis*

Στο Σχήμα 1 φαίνεται μια τυπική δομή λακκάσης, με τα τέσσερα μόρια χαλκού και το πως είναι αυτά δομημένα στις διαφορετικές θέσεις T1, T2/T3.

### Χαρακτηρισμός Τύπων Χαλκού

- T1: Παραμαγνητικός “Μπλε” Χαλκός

Ο συγκεκριμένος τύπος χαλκού, αναφέρθηκε και παραπάνω πως προσφέρει στο ένζυμο χαρακτηριστικό μπλε χρώμα, αφού γίνεται έντονη ηλεκτρονιακή ρόφηση εξαιτίας του δεσμού που έχει ο χαλκός με την κυστείνη. Έχοντας υψηλό δυναμικό ευνοείται η οξείδωση του υποστρώματος σε αυτή τη θέση, με απορρόφηση στα 610 nm. Ο τύπος 1 χαρακτηρίζεται από τριγωνικό συγχρονισμό, με μια κυστείνη και δύο ιστοιδίνες, και μια ακόμη θέση μεταβλητή. Οι λακκάσες από μύκητες έχουν σε αυτή τη θέση λευκίνη ή φαινυλαλανίνη. Θεωρείται πως η αξονική μεταβλητή θέση είναι και αυτή που καθορίζει το οξειδαναγωγικό δυναμικό, προσφέροντας μηχανισμό για καθορισμό της δραστηριότητας του [3,5,6].

- T2: Παραμαγνητικός “Κανονικός/Μη Μπλε” Χαλκός

Ο χαλκός σε αυτή τη θέση δεν διαθέτει ισχυρή απορροφητική ικανότητα στο φάσμα του ορατού. Εμφανίζει σύνηθες παραμαγνητικό φάσμα στο EPR. Τον συγκεκριμένο χαλκό τον χαρακτηρίζουν δύο ιστοιδίνες και η ευνοϊκή του θέση δίπλα στον T3 [5,6].

- T3: Διαμαγνητικό ζεύγος χαλκών (spin coupled)

Αυτό το διπύρρηνο κέντρο καθορίζεται από έξι ιστιδίνες και βρίσκεται σε οξειδωμένη μορφή, αφού φασματικά χαρακτηρίζεται από ηλεκτρονιακή απορρόφηση στα 330 nm. Δεν προσφέρει ERR σήμα, επειδή τα δύο άτομα χαλκού σε αυτή τη θέση δημιουργούν ισχυρό αντισιδηρομαγνητικό ζεύγος, εξαιτίας γέφυρας υδροξυλίων. Τα άτομα χαλκού σε αυτή τη θέση δημιουργούν τριπύρρηνο τριγωνικό σύμπλεγμα σε συνδυασμό με τον χαλκό στη θέση T2, στο οποίο και γίνεται η αναγωγή του οξυγόνου προς παραγωγή νερού. Το συγκεκριμένο ζεύγος που αντιστοιχεί στον T3 είναι κοινό και με άλλες πρωτεϊνικές ομάδες, όπως είναι οι τυροσινάσες και οι αιμοκυανίνες [3,5,6].

## Προέλευση

Οι λακκάσες παράγονται από φυτά και μύκητες, ενώ καταχωρούνται και είδη ενζύμου προερχόμενα από βακτήρια και έντομα. Γενικά η λειτουργία που θα έχει τελικά το ένζυμο εξαρτάται πολύ και από την πηγή παραγωγής του. Σχετικά με τις εφαρμογές, οι λακκάσες που εκφράζονται σε φυτικούς οργανισμούς συμμετέχουν σε λιγνοπολυμερικούς σχηματισμούς, ενώ τα ένζυμα αυτής της κατηγορίας από μύκητες εμφανίζουν μεγαλύτερο εύρος λειτουργιών, διαφορετικό σε σχέση με τις φυτικές λακκάσες. Ενδεικτικά αναφέρονται η μορφογέννηση σε μύκητες με κατάλυση του σχηματισμού εξωκυτταρικών ουσιών, η μείωση λιγνίνης και η μυκητιακή αλληλεπίδραση φυτού με παθογόνο, ενώ έχουν σημαντικό ρόλο σε περίπτωση περιβαλλοντικού στρες, όπου και υποθετικά συμβάλλουν στην σύνθεση διυδροξυναφθαλενικών μελανινών, οι οποίες είναι σκούρες πυκνές ουσίες πολυμερικής φύσης [1,3,5].

## Μύκητες

Συχνά εντοπίζεται δραστικότητα λακκάσης σε μύκητες, ενώ το ίδιο το ένζυμο έχει απομονωθεί από δεκάδες είδη. Η λακκάση λοιπόν, συμπεραίνεται πως εκφράζεται εξωκυττάρια σε πολλά είδη μυκήτων, με εκτενέστερη έρευνα να έχει γίνει στα ανώτερα είδη. Πέρα από τις λακκάσες που παράγονται από ανώτερους μύκητες, “δημοφιλείς” πηγές είναι οι ασκομύκητες *Myceliophthora thermophila* και *Chaetomium thermophilum* και ο γεόφιλος χυφομύκητας *Mycelia sterlia* [1,3].

Μια από τις κατηγορίες μυκήτων που φαίνεται να παράγει λακκάσες σε μεγάλο βαθμό είναι αυτή των ασκομυκήτων. Πολλά από τα είδη της κατηγορίας, όπως αυτοί που διασπούν το ξύλο (π.χ. *Trichoderma*) και μερικοί ασκομύκητες που συναντώνται στο χώμα (π.χ. *Aspergillus*) φαίνεται να παράγουν το ένζυμο. Επίσης φυτοπαθογενείς ασκομύκητες, όπως ο *Gaeumannomyces graminis* και ο *Magnaporthe grisea*. Ακόμη διάφοροι ασκομύκητες που εμπλέκονται στην φυσική καταστροφή του ξύλου, που διαθέτουν γενετικό υλικό παρόμοιο με βασιδιομύκητες, φαίνεται να είναι ικανοί να παράξουν το ένζυμο. Ενδεικτικά αναφέρονται τα δύο είδη από *Xylaria* sp. και το ένα από *Xylaria hypoxylon*, στα οποία έχει εντοπιστεί η

συγκεκριμένη οξειδωτική ικανότητα που χαρακτηρίζει τις λακκάσες. Παρατηρούνται επίσης δείγματα από ασκομύκητες φρέσκου νερού [1].

Ένα ακόμη σύνολο οργανισμών με ικανότητα έκφρασης λακκάσων που ανήκει στην ευρύτερη οικογένεια των μυκήτων είναι οι ζύμες. Εντοπίζονται και στους βασιδιομύκητες και στους ασκομύκητες. Μέχρι πρότινος λακκάσες είχαν εντοπιστεί στο ανθρώπινο παθογόνο *Cryptococcus neoformans*, η οποία, σαν βασιδιομυκητιακή ζύμη, παρέχει λακκάση για οξείδωση φαινολών και αμινοφαινολών, που δεν μπορεί ωστόσο να οξειδώσει την τυροσίνη. Το ένζυμο είναι ισχυρά προσδεδεμένο με το κυτταρικό περίβλημα και λειτουργεί προστατευτικά απέναντι σε διάφορα μυκητιακά είδη. Παρόμοιο γονίδιο εκφράζεται και από τον *Cryptococcus podzolicus*, ενώ υπάρχουν και ενδείξεις για περιορισμένη δράση σε άλλες ζύμες σήψης ξύλου. Δεν παρατηρείται έκφραση του γονιδίου για λακκάσες σε ζύμες ασκομυκητιακές, αλλά φαίνεται αυτό να εντοπίζεται στη Fet3p οξειδάση πολλαπλών χαλκών από τον *Saccharomyces cerevisiae*, τόσο σαν ακολουθία, όσο και σαν ομόλογη δομή [1,7].

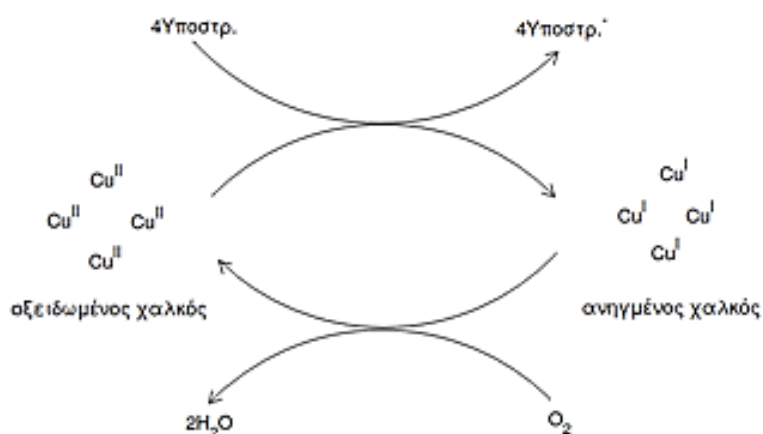
Άλλο είδος της ευρύτερης ομάδας το οποίο φαίνεται να εκφράζει λακκάσες είναι οι βασιδιομύκητες που ευθύνονται για το σάπισμα του ξύλου, και κάποιοι άλλοι σαπροτροφικοί, που εντοπίζονται στην αποσύνθεση των σκουπιδιών. Οι περισσότεροι εκ των μυκήτων λευκής σήψης εκφράζουν λακκάση σε κάποιο βαθμό, και επίσης το ένζυμο έχει απομονωθεί από αρκετούς εξ αυτών. Ακόμη σημειώνεται ότι παρότι συνήθως οι λακκάσες, όντας λιγνοκαταστρεπτικά ένζυμα, παράγονται εξωκυττάρια, στους μύκητες λευκής σήψης έχουν παρατηρηθεί περιπτώσεις όπου η έκφραση γίνεται και εσωκυττάρια, με ισόένζυμα παρόμοιου μοτίβου δραστηριότητας, πράγμα που εντοπίστηκε με ισοηλεκτρική συγκέντρωση, όπως διαπίστωσαν οι Blaiçh & Esser [1].

Έχουν γίνει προσπάθειες για εντοπισμό λακκάσης και σε βασιδιομύκητες καφέ σήψης, οι οποίοι δεν φαίνεται να έχουν την ικανότητα για έκφραση του ενζύμου, παρόλα αυτά εντοπίστηκαν παρόμοιες γενετικές ακολουθίες σε συγκεκριμένα στελέχη. Παρ' όλα αυτά, η παρουσία του γονιδίου δεν συνεπάγεται απαραίτητα και παραγωγή του ενζύμου, και σε πολλές περιπτώσεις η συχνότητα κατά την οποία βρίσκονταν τα γονίδια δεν είναι μεγάλη. Επιπλέον πολλές εκ των βιβλιογραφικών αναφορών περί δράσης λακκάσης γίνονται για μη συγκεκριμένο υπόστρωμα, όπως το ABTS, κάτι που τις καθιστά αμφισβητήσιμες. Εντοπίζονται όμως κάποιοι οργανισμοί της κατηγορίας που εκφράζουν το γονίδιο, όπως ο *Cantharellus cibarius*, ο *Lactarius piperatus* και ο *Russula delica* [1].

## Καταλυτική ικανότητα

Η καταλυτική διαδικασία που ακολουθείται από το ένζυμο αφορά και τους τέσσερις χαλκούς στο εσωτερικό του. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, μια τυπική αντίδραση αναγωγής μοριακού οξυγόνου σε νερό, ξεκινάει από τον χαλκό στην θέση T1, ο οποίος ανάγεται σε επαφή με το υπόστρωμα, οξειδώνοντας το, με το ηλεκτρόνιο του χαλκού να εισέρχεται σε ένα τριπύρρηνο σύμπλεγμα που προκύπτει από τους χαλκούς στις θέσεις T2/T3. Εκεί λαμβάνει χώρα και η αντίδραση με το οξυγόνο. Το υπεροξείδιο δεν εντοπίζεται κατά την διάρκεια της αντίδρασης σταθερής κατάστασης, αφού το οξυγόνο μετατρέπεται σε νερό. Η αντίδραση έχει άνω του ενός στάδια, αφού το υπόστρωμα του ενός ηλεκτρονίου είναι σε σύνδεση με το σύστημα των τεσσάρων [3,8].

Η καταλυτική δράση των ενζύμων συνήθως περιγράφεται από την σταθερά Michaelis  $K_M$  και την σταθερά καταλυτικής αποτελεσματικότητας  $k_{cat}$ , οι οποίες έχουν μελετηθεί για αρκετές λακκάσες και διαπιστώνεται μεγάλη διασπορά για τις τιμές τους. Ειδικότερα για την  $K_M$ , οι τιμές είναι συνήθως κοντά στο 2.5  $\mu\text{M}$  και επηρεάζονται από την πηγή παραγωγής του ενζύμου και από το υπόστρωμα. Με σύγκριση τιμών της  $K_M$  προκύπτει επίσης το συμπέρασμα πως λακκάσες από διαφορετικά είδη έχουν τάσεις προτίμησης σε διαφορετικά υποστρώματα. Για την  $k_{cat}$ , ενώ διαπιστώνονται πολύ μεγάλες διαφορές μεταξύ των λακκασών στο ίδιο υπόστρωμα, για το ίδιο ένζυμο σε διαφορετικά υποστρώματα οι διαφορές είναι μικρότερες, λογικό αφού η συγκεκριμένη σταθερά ελέγχει και καθορίζει τον ρυθμό μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ ενζύμου και υποστρώματος [1,4,9].



Σχήμα 2: Σχηματική αναπαράσταση πλήρους οξείδωσης υποστρώματος από λακκάση[8]



## Σύστημα Λακκάσης - Μεσολαβητή

Συχνά η φύση του υποστρώματος μπορεί να επηρεάζει την οξείδωση του από το ένζυμο, είτε γιατί είναι πολύ μεγάλα τα δομικά του στοιχεία για να προσδεθεί το ένζυμο, είτε λόγω του υψηλού οξειδωαναγωγικού δυναμικού τους. Σύμφωνα με το γενικότερο χαρακτηριστικό των λιγνινολυτικών ενζύμων, οι λακκάσες οξειδώνουν αποκλειστικά φαινολικά κομμάτια λιγνίνης, αφού ο πολυσαγχαρίτης διαθέτει τυχαία πολυμερική φύση και επειδή το ίδιο το ένζυμο διακρίνεται από χαμηλό οξειδωαναγωγικό δυναμικό. Γι' αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται ενδιάμεσες ουσίες που έχουν υψηλότερο δυναμικό από το ένζυμο, έτσι ώστε να οξειδωθεί και το μη φαινολικό μέρος της λιγνίνης. Οι ουσίες αυτές είναι μικρές σε μέγεθος και λειτουργούν σαν φορείς ηλεκτρονίων. Τα ηλεκτρόνια, αφού γίνει η αρχική οξείδωση από το ένζυμο, η οποία παράγει ένα ισχυρό ενδιάμεσο, ο ενδιάμεσος φορέας απομακρύνεται από το ένζυμο και οξειδώνει το μέρος του υποστρώματος που δεν είχε την δυνατότητα να προσδεθεί. Ένα ακόμη προτέρημα που προσφέρεται με τη χρήση ενδιάμεσων φορέων είναι ότι δεν είναι απαραίτητη η αυστηρή σειρά αντιδράσεων που πρέπει να γίνουν. Πιο συγκεκριμένα, ένζυμο και πολυμερές δεν οφείλουν να αντιδράσουν σε συγκεκριμένη σειρά. Επιπλέον, μπορεί ο μηχανισμός οξείδωσης να γίνει από την ενδιάμεση ουσία, και επομένως να μην είναι εξαρτημένος από το ένζυμο, αυξάνοντας έτσι την επιφάνεια του υποστρώματος που είναι διαθέσιμο για αντίδραση. Τονίζεται πως προκειμένου να μελετηθεί με μεγαλύτερη ακρίβεια η δράση πρέπει να είναι γνωστός και ο μηχανισμός αυτής [4].

## Φυσικοχημικές Ιδιότητες ενζύμου

Γενικά, η γνώση σχετικά με τη δομή και τις φυσικοχημικές ιδιότητες του ενζύμου προέρχεται κυρίως από μελέτη καθαρών πρωτεϊνών. Οι περισσότερες εκ των μυκητιακών λακκασών είναι μονομερείς, διμερείς ή τετραμερείς γλυκοπρωτεΐνες. Πέρα από την ευρεία ετερογένεια των ενζύμων, το μοριακό βάρος μπορεί να πάρει τιμές μεταξύ 50-100 kDa, ενώ η χαρακτηριστική ομοιοπολική σύνδεση με υδατάνθρακα (10-45% της συνολικής μάζας του μορίου) προσδίδει στο ένζυμο θερμική σταθερότητα. Το ισοηλεκτρικό σημείο του ενζύμου εντοπίζεται κοντά σε pH 4. Σχετικά με το προφίλ που ακολουθούν οι μυκητιακές λακκάσες που σχετίζεται με τη δράση τους σε διαφορετικά pH, φαίνεται αυτό να επηρεάζεται από τις διαφορές που προκαλούνται από δύο διαφορετικές δραστηριότητες. Αυτές είναι η διαφορά στο οξειδοαναγωγικό δυναμικό, εξαιτίας της δράσης μεταξύ του υποστρώματος και του χαλκού T1, μιας και εκεί καθορίζεται ο ρυθμός με τον οποίο γίνεται η μεταφορά των ηλεκτρονίων, αλλά και από τον δεσμό υδροξειδίου με τους χαλκούς T2/T3, που ρυθμίζουν της δραστηριότητα σε υψηλότερα pH [3-5,9].

Το ένζυμο και η σταθερότητα του σε διαφορετικό περιβάλλον οξύτητας επηρεάζεται ιδιαίτερα από το είδος του υποστρώματος σε κάθε περίπτωση αντίδρασης. Γενικότερα η κατανομή για την δράση του ενζύμου είναι γκαουσιανή και επηρεάζεται πέρα από το υπόστρωμα που ήδη αναφέρθηκε, και από το οξυγόνο και από το ίδιο το ένζυμο. Η διαφορά του δυναμικού οξείδωσης μεταξύ του χαλκού στην T1 θέση και του υποστρώματος μπορεί να ευνοήσει την αντίδραση σε υψηλό

pH, αν το υπόστρωμα είναι κάποια φαινολική ένωση, αλλά το υδροξύλιο των χαλκών στις άλλες θέσεις επηρεάζει την δράση του ενζύμου, επειδή η μεταφορά των ηλεκτρονίων στο εσωτερικό του παρεμποδίζεται. Αυτά τα δύο φαινόμενα που συνυπάρχουν, επηρεάζουν το pH που δρουν τα διφασικά ένζυμα, και ως προς την σταθερότητα, αλλά και ως προς την ενεργότητα. Ως παράδειγμα αναφέρεται η λακκάση που παράγεται από τον μύκητα *Trametes modesta*, η οποία είναι ενεργή για pH 4 και σταθερή για pH 4.5, ενώ για pH 3 ο χρόνος ημιζωής της μειώνεται. Παρόμοια κατάσταση ισχύει και για την επίδραση της θερμοκρασίας. Από διαφορετικές έρευνες και για διαφορετικά μυκητιακά στελέχη φαίνεται πως για θερμοκρασίες μέχρι και τους 50 °C το ένζυμο είναι πλήρως λειτουργικό, και για χαμηλότερες θερμοκρασίες πιο σταθερό. Η συμπεριφορά σε υψηλότερες θερμοκρασίες ποικίλλει και είναι άμεσα εξαρτώμενη από το στέλεχος του μύκητα από το οποίο παράγεται η λακκάση. Συνήθως είναι σταθερές σε εύρος 30-50 °C και χάνουν γρήγορα την δραστηριότητά τους, όταν η θερμοκρασία ξεπεράσει τους 60 °C [4].

### Ηλεκτροχημικές Ιδιότητες

Στο παρελθόν, έχουν γίνει αναφορές για τα οξειδωαναγωγικά δυναμικά των χαλκών T1 και T3, οι οποίοι καθιστούν της ομοιότητα στον μηχανισμό κατάλυσης των αντιδράσεων από τις λακκάσες, άξιο προσοχής. Πληροφορίες από τη μελέτη του είδους *Rhus Vernicifera* και του *Corolius versicolor* αναφέρουν πως για το πρώτο είδος σε pH 7.5 ο χαλκός T1 έχει 434 mV και ο χαλκός T3 483 mV, ενώ για το δεύτερο είδος σε pH 5.5 ισχύει για τον T1 785 mV και για τον T3 782 mV. Έρευνες για άλλες μυκητιακές λακκάσες, και πιο συγκεκριμένα για αυτές από τα στελέχη *Polygorus pinsitus*, *Rhizoctonia solani*, *Myceliophthora thermophila*, *Scytalidium theJynophilum*, έχουν δώσει επίσης αποτελέσματα. Πιο συγκεκριμένα, οι λακκάσες από τα *Polygorus pinsitus* και *Rhizoctonia solani* έχουν δυναμικά μεταξύ 0.7 και 0.8 V (vs NHE). Άλλες οξειδάσες εμφανίζουν δυναμικά κοντά στο 0.5 V και έχει επίσης παρατηρηθεί πως το πιο υψηλό δυναμικό σχετίζεται και με την υψηλότερη δραστηριότητα του ενζύμου. Στο Σχήμα 3 απεικονίζονται τα υπόλοιπα δείγματα για τις ιδιότητες των ενζύμων που προέκυψαν από την ίδια έρευνα [10].

The redox potentials ( $E^\circ$ ) and kinetic parameters of the laccases at pH 5.3

Laccase	$E^\circ$ (V vs. NHE)	$g_{  }$	$A_{  }^a$	ABTS as the substrate		SGZ as the substrate	
				$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )	$K_m$ ( $\mu\text{M}$ )	$k_{\text{cat}}$ ( $\text{min}^{-1}$ )
PpL	0.79 $\pm$ 0.01 <sup>b</sup> 0.76 $\pm$ 0.01 <sup>c</sup>	2.19	92	58 $\pm$ 8	2700 $\pm$ 100	3.9 $\pm$ 0.5	3000 $\pm$ 100
RsL	0.73 $\pm$ 0.02 <sup>b</sup> 0.68 $\pm$ 0.01 <sup>d</sup>	2.21	85	52 $\pm$ 6	2500 $\pm$ 100	28 $\pm$ 4	550 $\pm$ 40
MtL	0.48 $\pm$ 0.01 <sup>e</sup> 0.45 $\pm$ 0.01 <sup>f</sup>			96 $\pm$ 5	440 $\pm$ 10	2.9 $\pm$ 0.4	1100 $\pm$ 250
StL	0.53 $\pm$ 0.02 <sup>e</sup> 0.48 $\pm$ 0.01 <sup>f</sup>	2.20	90	89 $\pm$ 14	45 $\pm$ 1	1.6 $\pm$ 0.2	43 $\pm$ 1
MvBO	0.49 $\pm$ 0.03 <sup>e</sup> 0.48 $\pm$ 0.01 <sup>f</sup>			76 $\pm$ 8	430 $\pm$ 10	47 $\pm$ 9	0.8 $\pm$ 0.1
RvL	0.44 <sup>g</sup>	2.30	38	39 $\pm$ 2	27 $\pm$ 1	64 $\pm$ 26	0.31 $\pm$ 0.08

$E^\circ$ ,  $K_m$ , and  $k_{\text{cat}}$  were measured in 8 mM Mes (pH 5.3) at 20°C.

<sup>a</sup>  $A_{||}$  in  $10^{-4} \text{ cm}^{-1}$ .

<sup>b</sup> Determined with Fe(bipyridyl)<sub>2</sub>Cl<sub>3</sub>/Fe(bipyridyl)<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub> couple.

<sup>c</sup> Determined with K<sub>3</sub>Mo(CN)<sub>6</sub>/K<sub>4</sub>Mo(CN)<sub>6</sub> couple.

<sup>d</sup> Determined with ABTS<sup>+</sup>/ABTS couple.

<sup>e</sup> Determined with NaI<sub>3</sub>/NaI couple.

<sup>f</sup> Determined with K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>/K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> couple.

<sup>g</sup> Value from [31].

Σχήμα 3: Πληροφορίες για το οξειδωαναγωγικό δυναμικό για διαφορετικά είδη λακκάσης[10]

## Ισοένζυμα

Οι μύκητες, από τους οποίους παράγονται οι λακκάσες, έχουν την ικανότητα να παράγουν και ισοένζυμα, τα οποία προέρχονται από ίδιο ή διαφορετικό γονίδιο, ενώ ο αριθμός τους εξαρτάται και ποικίλλει σε σχέση με το είδος του μύκητα παραγωγής. Τα ισοένζυμα εμφανίζουν διαφορετική συμπεριφορά όσον αφορά την σταθερότητα τους σε διαφορετικό pH και θερμοκρασία, αλλά και την ικανότητα τους να προσδένονται σε διαφορετικά υποστρώματα, ενώ σημειώνεται πως τα διαφορετικά ισοένζυμα επηρεάζουν την φυσιολογία και την συμπεριφορά ίδιων ή και διαφορετικών ειδών υπό διαφορετικές συνθήκες [4].

Αρκετά είδη ισοενζύμων λακκάσης έχουν βρεθεί σε είδη μυκήτων και σε περιπτώσεις, όπως αυτή των μυκήτων λευκής σήψης, ο ίδιος μύκητας παράγει περισσότερα του ενός ισοένζυμα. Σε αυτή την κατηγορία ανήκουν για παράδειγμα οργανισμοί, σαν τους *Phellinus igniarius*, *Leptoporus litschaueri*, *Polyporus brumalis*, *Stereum hirsutum*, *Panus stipticus*, *Pleurotus corticatus* και *P. ostreatus*, των οποίων το ισοηλεκτρικό σημείο εντοπίζεται μεταξύ 3 και 5 [11].

Ως παράδειγμα για τα ισοένζυμα των λακκάσων αναφέρεται η περίπτωση των ισοενζύμων από τον μύκητα *Trametes versicolor*, τα οποία συγκρίθηκαν μεταξύ τους ως προς την συμπεριφορά σε διαφορετικά υποστρώματα και ως προς την δραστηριότητα, με πολλές ομοιότητες, αλλά και διαφορές. Πιο συγκεκριμένα, η γονιδιακή αλληλουχία μοιάζει πολύ για τα δύο ισοένζυμα, όπως φαίνεται και στο Σχήμα 4, με ορισμένες διαφορές ωστόσο. Διαπιστώθηκε μεγάλη ομοιότητα ως προς την λειτουργία σε υποστρώματα, αλλά υπήρξαν διαφορές στον πολυμερισμό λιγνίνης [12].

Lac- case	Amino acid <sup>a</sup> at position:																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30
I	<u>Ala</u>	Ile	Gly	Pro	Val	Ala	<u>Ser</u>	Leu	<u>Val</u>	<u>Val</u>	<u>Ala</u>	Asn	Ala	<u>Pro</u>	Val	Ser	Pro	Asp	Gly	Phe	<u>Leu</u>	Arg	<u>Asp</u>	Ala	<u>Ile</u>	Val	Val	Asn	Gly	<u>Val</u>
II	Gly	Ile	Gly	Pro	Val	Ala	Asp	Leu	Thr	Ile	Thr	Asn	Ala	Ala	Val	Ser	Pro	Asp	Gly	Phe	Ser	Arg	Gln	Ala	Val	Val	Val	Asn	Gly	Gly
III <sup>b</sup>	Gly	Ile	Gly	Pro	Val	Ala	Asp	Leu	Thr	Ile	Thr	Asn	Ala	<u>Glu</u>	Val	Ser	Pro	Asp	Gly	<u>Leu</u>	Ser	Arg	Gln	Ala	Val	Val	Val	Asn	Gly	Gly

<sup>a</sup> The underlined amino acids differ from those in the laccase II sequences.

<sup>b</sup> From Iimura et al. (13).

Σχήμα 4: Σύγκριση των γονιδιακών αλληλουχιών των λακκασών I και II από τον *T. versicolor* και της IIIc από τον *C. Versicolor*[12]

## Υποστρώματα

Σχετικά με το υπόστρωμα, αναφέρθηκε και παραπάνω πως το ένζυμο χαρακτηρίζεται από την ποικιλία υποστρωμάτων στα οποία μπορεί να δράσει. Τα υποστρώματα μπορεί να είναι οργανικά και ανόργανα, ενώ ανάλογα με το είδος της λακκάσης διαμορφώνονται και οι κινητικές παράμετροι της αντίδρασης που εκτελείται, αφού επηρεάζεται η μέγιστη ταχύτητα, ενώ οι τιμές για την  $K_M$ , η οποία σαν σταθερά είναι ανεξάρτητη του pH, επηρεάζονται από το διαλυμένο οξυγόνο στο υπόστρωμα. Στα υποστρώματα αυτά εμπεριέχονται φαινόλες και πολυφαινόλες, αρωματικές αμίνες, λιγνίνη, ανόργανα ιόντα και αρυλ-διαμίνες. Η αντίδραση που συμβαίνει είναι ετερογενής, και εξαρτάται άμεσα από την πηγή προέλευσης του ενζύμου και το είδος της αντίδρασης με το υπόστρωμα. Σημειώνεται ακόμα πως η  $k_{cat}$  εξαρτάται από το pH. Η καταλυτική ικανότητα του ενζύμου, η οποία προσεγγίζεται μέσω του λόγου  $k_{cat}/K_m$ , σχετίζεται γραμμικά με τον χαλκό που βρίσκεται στην T1 θέση. Αυτό, γιατί όσο μεγαλύτερο το δυναμικό αυτού του χαλκού, τόσο ευνοείται και η καταλυτική ικανότητα[4,5].

## Ακίνητοποίηση λακκάσης

Η ακίνητοποίηση μιας οξειδοαναγωγικής πρωτεΐνης ή ενζύμου βοηθά, ώστε να μην γίνεται αργά η μακρομοριακή διάχυση, που σε άλλες περιπτώσεις, όπως όταν το είδος είναι ελεύθερο σε διάλυμα, είναι περιοριστικός παράγοντας. Επίσης με ακίνητοποίηση της ουσίας που μελετάται, ο μηχανισμός και τα θερμοδυναμικά και κινητικά δεδομένα του προβλήματος θεωρούνται πιο σίγουρα, ενώ πλέον η επιφάνεια γίνεται πιο εύκολα προσιτή από περισσότερες μεθόδους. Όταν το ένζυμο ακινητοποιείται αποκτά μεγαλύτερη ανθεκτικότητα και φαίνεται να είναι πιο ανεκτικό σε αλλαγές θερμοκρασίας και pH, αλλά και σε πολλαπλότητα χρήσεων. Για αυτό το λόγο η επιστημονική κοινότητα επενδύει σε νέους τρόπους ακινητοποίησης του ενζύμου, έτσι ώστε το τελικό αποτέλεσμα να είναι το καλύτερο δυνατό, και η βιοκατάλυση να εκτελείται στο μέγιστο. Γι' αυτό το λόγο πολλές τεχνικές και υποστρώματα έχουν μελετηθεί. Υποστρώματα, όπως διάφορα είδη πυρολυτικού άνθρακα, ο οποίος προσφέρει μεγάλη υποστήριξη, κεραμικά, αλλά και ίνες άνθρακα, προσφέρουν καλές συνθήκες για ακινητοποίηση του ενζύμου. Άλλου

είδους υπόστρωμα αποτελεί και το οξείδιο του πυριτίου [13,14].

Στην περίπτωση των βιοαισθητήρων η ακινητοποίηση προσφέρει τη δυνατότητα για καλύτερη λειτουργικότητα, με το ένζυμο να συνδέεται χημικά ή φυσικά με το φορέα, προσφέροντας έτσι καλύτερη διάρκεια ζωής, σταθερότητα και ικανότητα αποθήκευσης. Αφού βρίσκεται σε επαφή με τον φορέα, ο οποίος πρέπει να είναι σταθερός και με μηχανική αντοχή, οι ιδιότητες του ενζύμου, όπως είναι η θερμική αντοχή και η λειτουργία του σε διαφορετικές συνθήκες pH μπορεί να επηρεαστούν θετικά, χωρίς βέβαια να αποκλείεται η πιθανότητα για απώλεια της δραστικότητας της βιολογικής ουσίας [13].

Ένας από τους πιο εύκολους τρόπους για ακινητοποίηση είναι η ρόφηση, αφού είναι παράλληλα οικονομική και γρήγορη. Η μέθοδος αυτή δεν προσφέρει την καλύτερη δυνατή σταθερότητα και εύκολα μπορεί να γίνει εκρόφηση κατά την διάρκεια λειτουργίας. Άλλος ένας τρόπος για ακινητοποίηση είναι οι διασταυρούμενοι δεσμοί, όπου με ουσίες όπως διαμινιοεστέρες ή διαλδεύδες, επιτυγχάνονται ενδομοριακοί δεσμοί μεταξύ των μορίων του ενζύμου, με αποτέλεσμα ένα σύνθετο ένζυμο, το οποίο διαθέτει αντοχή σε ακραίες συνθήκες pH και θερμοκρασίας. Η μέθοδος απαιτεί μεγάλες ποσότητες ενζύμου και πρέπει οι συνθήκες κατά τις οποίες γίνεται η ακινητοποίηση να είναι συνεχώς ελεγχόμενες. Άλλη μέθοδος είναι αυτή της ενθυλάκωσης. Το ένζυμο εγκλωβίζεται σε σφαίρες, φτιαγμένες από μερικώς διαπερατό υλικό, π.χ. πολυμερή, ενώ επίσης μπορεί να γίνει ακινητοποίηση με εγκλωβισμό του ενζύμου με γέλη, κατά την οποία μέθοδο το ένζυμο παγιδεύεται σε πολυμερικό τζελ ή σε συνθετικό υλικό. Η επίδραση στη δομή του ενζύμου είναι μικρή, αλλά δημιουργείται πρόβλημα κατά τη χρήση, αφού λόγω ανομοιομορφίας της δομής της επιφάνειας και των πόρων, υπάρχει διαρροή ενζύμου [13].

## Βιομηχανική παραγωγή

Όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, οι λακκάσες μπορεί να παράγονται από φυτά, μύκητες, βακτήρια ή ακόμη και έντομα. Η διαδικασία για κάθε πηγή ποικίλλει και ανάλογα και με το “μέλος” της κάθε οικογένειας στο οποίο στηρίζεται η παραγωγή μπορεί να είναι διαφορετική η απόδοση, αλλά και το είδος του ενζύμου. Επίσης είναι σημαντικό να δίνεται σημασία κάθε φορά στις συνθήκες παραγωγής, αφού ακόμη και με μικρές διαφοροποιήσεις μπορεί να υπάρξει μεγαλύτερη παραγωγή του ενζύμου και να επιτευχθούν θετικές αλλαγές στις ιδιότητες αυτού [15].

Προκειμένου λοιπόν η διαδικασία να είναι επικερδής αναπτύσσονται τεχνικές, όπως η ζύμωση και η βελτιστοποίηση της με νέες τεχνικές, αλλά και με γενετικές τροποποιήσεις για μαζική παραγωγή. Με την ζύμωση, παρά τις απλές σχετικά συνθήκες, οι επιπλοκές με τις διατάξεις, όπως συμβαίνει και με την εφαρμογή των καινοτόμων τεχνικών, όπου ενδεχομένως χρειάζονται αλλαγές στις ήδη υπάρχουσες εγκαταστάσεις ή αγορά καινούριου εξοπλισμού, αλλά και τα διάφορα συστατικά, αυξάνουν το κόστος, ξεπερνώντας τον προβλεπόμενο προϋπολογισμό. Διαπιστώνεται λοιπόν το πόσο πλεονεκτεί η γενετική τροποποίηση έναντι των υπολοίπων τεχνικών [16].

Οι λακκάσες είναι ένζυμα που παράγονται γενικά κατά το δεύτερο μεταβολισμό. Οι παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή είναι το είδος της καλλιέργειας, το pH, η θερμοκρασία, η παρουσία θρεπτικού υλικού, αλλά και οι πηγές αζώτου και άνθρακα [15,16].

### *Ετερόλογη έκφραση και Τροποποίηση λακκασών*

Η ζήτηση για τις λακκάσες σε μεγάλες ποσότητες έστρεψε την προσοχή σε άλλες μορφές παραγωγής του ενζύμου, οικονομικά επικερδείς. Με την ετερόλογη έκφραση, υπάρχει η δυνατότητα για απομόνωση των λακκασών, ενώ επιτρέπεται επίσης ο διαχωρισμός του συγκεκριμένου ενζύμου από άλλα ισόζυμα. Σημειώνεται επίσης πως οι λακκάσες που μπορεί να εκφραστούν ετερόλογα, δύνανται να επεξεργαστούν σε επιπλέον βαθμό, με την προοπτική να αναβαθμιστούν και να εμπλουτιστούν οι ιδιότητές τους, όπως είναι η σταθερότητα και η καταλυτική τους δυνατότητα [17].

Παραδείγματα μυκήτων που χρησιμοποιούνται ως ετερόλογοι παραγωγοί είναι οι *Aspergillus oryzae* και *Trichoderma resei*, ενώ επίσης ευρέως χρησιμοποιούνται και οι μαγιές, με χαρακτηριστικές πηγές τη μεθυλιτροφική *Pichia pastoris* και τη *Yarrowia lipolytica* [17].

Προκειμένου να γίνει τροποποίηση των λακκασών, χρειάζονται τα κρυσταλλογραφικά δεδομένα ενεργών λακκασών, τα οποία όμως είναι περιορισμένα, αφού ελάχιστες λακκάσες έχουν μελετηθεί κρυσταλλογραφικά και έχουν δημοσιευθεί τα σχετικά αποτελέσματα. Με βάση λοιπόν αυτές τις περιορισμένες πληροφορίες έχουν προταθεί ιδέες για μεταλλάξεις στοχευμένα στην θέση των χαλκών, προκειμένου να γίνει μελέτη για το  $E^o$  και την καταλυτική δυνατότητα του ενζύμου. Συνήθως, από αυτές τις τοπικές μελέτες προκύπτουν μεταλλάξεις στην θέση T1 του χαλκού [17].

Για να αποφευχθούν τα προβλήματα που μπορεί να οφείλονται στον τυχαίο σχεδιασμό και τις ελλιπείς πληροφορίες, η στοχευμένη μοριακή εξέλιξη δίνει την λύση, με αποτέλεσμα να δύναται η παραγωγή ενζύμων με καινοφανείς ιδιότητες ακολουθώντας την τυπική μεθοδολογία της φυσικής εξέλιξης, τα βήματα της οποίας είναι η μετάλλαξη, ο ανασυνδυασμός και τελικά η φυσική επιλογή. Έτσι, τα τελικά καλύτερα και πιο ικανά ένζυμα της κάθε γενιάς επιλέγονται και χρησιμοποιούνται για την παραγωγή εκ νέου παρτίδας. Με αυτόν το τρόπο και με συνεχή συνδυασμό και δημιουργία νέων γενεών από ένζυμα με συγκεκριμένες ιδιότητες, προσφέρεται η δυνατότητα να μπορούν να ρυθμίζονται και να εμπλουτίζονται συγκεκριμένες ιδιότητες του οργανισμού. Προκειμένου να είναι πιο επικερδής η διαδικασία ποιοτικά και από άποψη χρόνου και χρήματος είναι η συνδυασμός κάθε φορά πολλαπλών ενζυμικών ιδιοτήτων [17].

## Εφαρμογές

Οι εφαρμογές των ενζύμων αυτών είναι πολλές και ποικίλλουν. Από βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον, τα τελευταία χρόνια η χρήση του ενζύμου έχει εξαπλωθεί εκτός εργαστηρίου σε βιομηχανικές μονάδες, όπου σαν καταλύτης συμμετέχει σε διαφορετικές διεργασίες βιοτεχνολογικού ενδιαφέροντος. Ενδεικτικά αναφέρεται η επεξεργασία εργοστασιακών λυμάτων σε πετροχημικές βιομηχανίες, εφαρμογές στη νανοκλίμακα, σταθεροποίηση ποτών και σύνθεση οργανικών πολυμερών. Ως καταλύτες, οι λακκάσες χρησιμοποιούνται στην φαρμακοβιομηχανία και σε κάποιες περιπτώσεις προστίθενται σαν συστατικά σε καλλυντικά. Από τη βιομηχανία χάρτου, μέχρι και τις εφαρμογές σε τρόφιμα, το βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον που έχει δημιουργηθεί για την λακκάση και την εφαρμογή της έχει ενδυναμωθεί από την διαπίστωση πως αυτή μπορεί να δράσει σε μεγάλη ποικιλία υποστρωμάτων, τα οποία έχουν την δυνατότητα της οξειδωσης μη φαινολικών ή φαινολικών συστατικών συγγενών με τη λιγνίνη, τα οποία δύσκολα ή και καθόλου δεν οξειδώνονται αποκλειστικά και μόνο με δράση του ενζύμου.

## Βαφές

Τόσο στη βιομηχανία χαρτιού, όσο και στην υφασμάτων, χρησιμοποιούνται τόνοι συνθετικών βαφών ετήσια, οι οποίες περιέχουν επιβλαβείς για το περιβάλλον ουσίες, μεταξύ των οποίων βρίσκονται νιτρικά και θειικά παράγωγα, τα οποία δύσκολα αποικοδομούνται σε αερόβιες συνθήκες. Κάποιες από τις ουσίες που χρησιμοποιούνται για τον αποχρωματισμό των βαφών αυτών, με παράδειγμα τις αζω-ρεδουκτάσες, μπορεί να είναι καρκινογόνες και μεταλλαξογόνες, ενώ δεν μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μεγάλο εύρος βαφών. Επίσης ως περιορισμός λειτουργεί και το αν η διαδικασία θα γίνει παρουσία ή μη αέρα. Προτείνονται γενικά συνδυασμοί μεθόδων, ενώ πρέπει να μελετάται και ο χημικός τύπος της βαφής. Γενικά έχουν μελετηθεί πολλές λακκάσες, κυρίως μυκητιακής προέλευσης ως προς την ικανότητα τους να διασπούν τις βαφές, με πολλές εφαρμογές, με αναφορές να ακολουθούν. Σημειώνεται πως συνθήκες, όπως η θερμοκρασία, η συγκέντρωση υποστρώματος και ο χρόνος της αντίδρασης, παίζουν πολύ σημαντικό ρόλο ως προς την επιλογή της λακκάσης που θα επιλεγεί [18-20].

## Βιομηχανία Χάρτου

Μέχρι πρότινος ο διαχωρισμός και η διάσπαση της λιγνίνης στον πολτό ξύλου γινόταν με χημικές ουσίες που έχουν βάση την χλωρίνη ή το οξυγόνο. Η λεύκανση χωρίς χλωρίνη χρησιμοποιώντας τη λακκάση σαν εφαρμογή ξεκίνησε το 1994 και η απολιγνοποίηση με οξυγόνο ως μέθοδος εισάχθηκε αργότερα σαν εναλλακτική συγκριτικά με πιο ρυπογόνες διεργασίες, παρ' όλα αυτά, η επεξεργασία με λακκάση δίνει προϊόντα ανώτερης ποιότητας, πιο λευκά, ενώ η διαδικασία είναι πιο ήπια και αφήνει τη δομή της κυτταρίνης ακέραιη. Σε συνεργασία με ενδιάμεσες ουσίες, και πάντα σχετικά με το είδος αυτών, μπορούν να λυθούν παράπλευρα προβλήματα, αφού προτέρημα της μεθόδου είναι πως η περιβαλλοντική επιβάρυνση περιορίζεται. Παρ' όλα αυτά σημειώνεται πως για το κάθε είδος ενδιάμεσης ουσίας

ισχύουν διαφορετικές οδηγίες ανακύκλωσης, χρήσης, κόστους και τοξικότητας, και ότι αυτό μπορεί να επηρεάσει την διαδικασία. Σε κάθε περίπτωση, με χρήση λακκάσης, αυξάνεται το ποσοστό πολτού, ενώ η όλη διαδικασία ενεργειακά είναι συμφέρουσα. Σχετικές εφαρμογές είναι η απομελάνωση και η αποχρωματοποίηση χαρτιού εκτύπωσης. Επιπλέον, το ένζυμο χρησιμοποιείται για δέσιμο σωματιδιακών, ινικών και χαρτικών πινάκων [19-22].

### *Βιομηχανία υφασμάτων*

Αντίστοιχα με την βιομηχανία χάρτου, έτσι και στην βιομηχανία υφασμάτων, οι λακκάσες χρησιμοποιούνται για λεύκανση του βαμβακιού. Πέρα από τα ενεργειακά, χημικά και οικονομικά οφέλη, το ένζυμο συνεισφέρει και σε ποιότητα προϊόντος. Οι λακκάσες βρίσκονται σε θέση να μπορούν να βοηθούν στον αποχρωματισμό βαφών σε σημείο όπου άλλα χημικά υστερούσαν, με αποτέλεσμα πολλές από τις μόνιμες διεργασίες να έχουν αντικατασταθεί από εφαρμογές με λακκάσες. Σε συνεργασία με κυτταρίνες, οι λακκάσες προσφέρουν την δυνατότητα για ξέβαμμα των τζιν υφασμάτων σε μεγάλη κλίμακα αποχρώσεων, ενώ μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν για να αυξήσουν την ποιότητα του βαψίματος, με πολλαπλές πατέντες να έχουν καταχωρηθεί σε αυτή την κατηγορία τα τελευταία χρόνια. Έχει επίσης αναγνωριστεί η ικανότητα του ενζύμου για καθαρισμό υφασμάτων και σε μείωση της μυρωδιάς που μπορεί να προσδίδεται στα υφάσματα, όταν αυτά πλένονται. Μια ακόμη ενδιαφέρουσα ιδέα, είναι αυτή σχετικά με την πατέντα που καταχωρήθηκε, όπου με χρήση LMS (σύστημα λακκάσης-μεσολαβητή) ενδυναμώνεται η ικανότητα του μαλλιού απέναντι στην συρρίκνωση, αλλά και η αποτοξικοποίηση αποβλήτων επίσης με χρήση συστήματος [19,23,24].

### *Βιομηχανία Τροφίμων*

Στην βιομηχανία τροφίμων, πολλά υποστρώματα για τις λακκάσες εισάγονται σε ποτά και φαγητά. Αυτό γιατί έτσι προσφέρεται η δυνατότητα για μεγαλύτερη σταθερότητα, ανθεκτικότητα, ποιότητα, αλλά και μείωση κόστους. Πέρα από ανιχνευτές για ύπαρξη οξυγόνου στις συσκευασίες, οι λακκάσες χρησιμοποιούνται στη μείωση αυτού στην περίπτωση των λαδιών ή άλλων τροφίμων προερχόμενων από φυτά, αφού έτσι βελτιώνεται η ποιότητα του τελικού προϊόντος. Και σε αυτή την περίπτωση η λακκάση χρησιμοποιείται για μείωση των οσμών, ενώ σημειώνονται περιπτώσεις, όπως αυτή του κακάο, όπου ο καρπός επεξεργάζεται με το ένζυμο για να βελτιωθεί οπτικά και γευστικά. Άλλες εφαρμογές είναι αυτές των μυκητιακών λακκασών σε βελτίωση του χρώματος σε προϊόντα τσαγιού και σε σχηματισμό γελών για συστατικά τροφίμων. Το ένζυμο βρίσκει επίσης χρήση όταν εισάγεται στη ζύμη, αφού δυναμώνει την δομή της γλουτένης και προσφέρει επίσης άμυνες εναντίον της οξειδωσης. Μια από τις πιο σημαντικές χρήσεις της λακκάσης στην βιομηχανία τροφίμων είναι ο ρόλος της στην σταθεροποίηση κρασιού. Όντας μίξεις πολλών διαφορετικών συστατικών, τα κρασιά και οι ζύμες αυτών είναι σημαντικό να μένουν απaráλλακτα όσων αφορά τα οργανοληπτικά τους χαρακτηριστικά, μετά από την επεξεργασία που υπόκεινται για την μείωση της πολυφαινόλης. Με χρήση λακκάσης φαίνεται να λαμβάνονται



ικανοποιητικά αποτελέσματα και για αυτό το σκοπό, αλλά και για σταθερότητα σε οξικό ενδιάμεσο. Έχουν επίσης παραχθεί βιοαισθητήρες με βάση τη λακκάση για ανίχνευση φαινολικών συστατικών σε κρασιά και μούστο. Στην ίδια κατηγορία με ζύμες, οι λακκάσες φαίνεται να βοηθούν στην αύξηση του χρόνου ζωής σε συσκευασία για τις μπίρες, ενώ και σε αυτή την περίπτωση η περίσσεια σε πολυφαινόλες μπορεί να περιοριστεί με προσθήκη του ενζύμου. Άλλο ένα παράδειγμα με χρήση λακκάσης στον τομέα με τις μπίρες είναι η βελτιστοποίηση του προϊόντος με ρύθμιση της θολότητας και της κροκίδωσης [19, 25-28].

### *Βιοεξυγίανση*

Οι λακκάσες φαίνεται να βρίσκουν πολλών τύπων εφαρμογές και στον τομέα της βιοεξυγίανσης. Από διάσπαση ανεπιθύμητων ουσιών, όπως είναι ρύποι και προϊόντα που προκύπτουν από παράπλευρες δράσεις, μέχρι και μείωση οσμών σε χώρους, όπως οι σκουπιδότοποι, οι λακκάσες δρουν αποτελεσματικά και με ελάχιστες αποθέσεις στο περιβάλλον. Το ένζυμο μπορεί επιπλέον να χρησιμοποιηθεί σε αντίδραση με ουσίες βαφής, οι οποίες γενικά διασπώνται δύσκολα από άλλα μέσα. Σχετικά παρόμοια εφαρμογή είναι και η αντίδραση με απόβλητα ύδατα που μπορεί να προέρχονται από εργοστάσια επεξεργασίας ελαιολάδων και πολτού. Στην ίδια κατηγορία εντάσσεται και η δράση των λακκασών με τα μολυσμένα χώματα. Το ένζυμο συμβάλλει στην οξείδωση των τοξικών ουσιών, τα οποία μπορεί να είναι ξενοβιοτικά PAHs, χλωροφαινόλες κ.α.. Τέτοιου είδους συστατικά συναντώνται και σε απόβλητα άλλων βιομηχανιών, παραδείγματα εκ των οποίων είναι αυτά για την επεξεργασία κάρβουνου και η παραγωγή οργανικών προϊόντων. Οι ακινητοποιημένες λακκάσες φαίνεται επίσης να είναι ιδιαίτερα χρήσιμες στην απομάκρυνση φαινολικών και χλωρισμένων φαινολικών ρύπων. Άλλες εφαρμογές είναι οι μετατροπή ουσιών σε διαφορετικές, από το ένζυμο. Ενδεικτικά αναφέρονται οι περιπτώσεις της 2,4,6-τριχλωροφαινόλης που μετατρέπεται σε 2,6-διχλωρο-1,4-υδροκινόλη και σε 2,6-διχλωρο-1,4-βενζοκινόνη και της ισοξαφλουτουόλης, που εντοπίζεται σε φυτά και χώματα στην μορφή του δικετονιτριλίου, η οποία είναι και η ενεργή μορφή του φυτοκτόνου, στην όξινη μορφή του. Επιπλέον, το ένζυμο βοηθά στην μείωση της συγκέντρωσης σε χώματα των συνθετικών ετεροκυκλικών ουσιών [19].

### *Οργανική σύνθεση*

Η ικανότητα των λακκασών να δρουν ως βιοκαταλύτες βρίσκει άμεση εφαρμογή και στην οργανική σύνθεση ουσιών. Σαν βιομηχανία, αυτή πάσχει από ακρίβεια πρώτων υλών, περιπλοκότητα βημάτων στις χημικές αντιδράσεις, αλλά και λόγω της τοξικότητας που χαρακτηρίζει τα αντιδραστήρια και τα παράπλευρα προϊόντα. Για άλλη μια φορά το ευρύ πεδίο υποστρωμάτων που μπορούν να χρησιμοποιηθούν από τις λακκάσες, τις καθιστά ιδιαίτερα ελκυστικές σαν εναλλακτική στο ήδη υπάρχον σύστημα, αφού επιπλέον προσφέρουν σταθερότητα στα υποστρώματα, αποτρέποντας παράπλευρες μη ενζυμικές αντιδράσεις, όπως είναι ο πολυμερισμός και η υδρογόνωση. Η δημιουργία ήπιου κλίματος σε αέρα χωρίς της προσθήκη  $H_2O_2$ , καθιστώντας τη διαδικασία του πολυμερισμού πολύ πιο φιλική προς το περιβάλλον, είναι μόνο μία από τις εφαρμογές που μπορούν να

εφαρμοστούν παρουσία λακκάσης. Παραδείγματα ουσιών που μπορεί να συντεθούν με λακκάσες, είναι πολλά και ποικίλα, και ξεκινούν από παραδοσιακές ιαπωνικές επικαλύψεις, τα πολυμερικά φιλμ *urushi*, μέχρι και τον πολυμερισμό του ακρυλαμιδίου, παρουσία ή μη μεσολαβητή. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, οι λακκάσες είναι ικανές να παράγουν φαινοτικά πολυμερή, ικανότητα που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε παραγωγή καυσίμου αιθανόλης από ανακυκλώσιμες πρώτες ύλες. Στην ίδια κατηγορία εντάσσεται και η παραγωγή νέων και αναβαθμισμένων οργανικών πολυμερών, που χάρη στις εμπλουτισμένες τους μηχανικές και ηλεκτροοπτικές ιδιότητες, μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως εντομοκτόνα, βαφές, ουσίες σε καλλυντικά κ.α.. έχουν ακόμη αναπτυχθεί τρόποι παραγωγής φλαβονοειδών και πολυμερών εμπλουτισμένων με φλαβονοειδή, τα οποία επιδεικνύουν πολύ καλή αντιοξειδωτική δράση [17,19].

### *Φαρμακοβιομηχανία*

Οι λακκάσες δίνουν την δυνατότητα για παραγωγή ουσιών με μεγάλη ζήτηση στον τομέα της φαρμακοβιομηχανίας. Αυτό γιατί οι ουσίες αυτές είναι αντιφλεγμονώδεις, μη τοξικές και αντιμικροβιακές, ή ενεργοί φορείς ατομικής φροντίδας. Ακριβώς επειδή έχουν αυτή την δυνατότητα για στοχευμένη θεραπεία χωρίς παράπλευρες επιπτώσεις, αλλά και επειδή είναι παραγμένες φυσικά, ουσίες που παράγονται με τη βοήθεια του ενζύμου μπορούν να βρουν μεγάλη εφαρμογή σαν αναισθητικά, αντιβιοτικά, ηρεμιστικά κ.α.. Χρησιμοποιούνται επίσης για την παραγωγή ουσιών, που μέχρι πρότινος η παραγωγή τους ήταν επιβλαβής για το περιβάλλον και τον οργανισμό.

Εκτός από την παραγωγή ουσιών, φαίνεται πως οι λακκάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν *in-situ* για παραγωγή ιωδίνης. Επίσης, μετά από έρευνες, έχει διαπιστωθεί πως διαφορετικά είδη λακκάσης μπορούν να δράσουν κατά διαφόρων ιών. Για παράδειγμα, λακκάση μπορεί να χρησιμοποιηθεί ενάντια στην αντίστροφη μεταγραφή του HIV-1, ενώ άλλη λακκάση χρησιμοποιήθηκε κατά της ακεροπλάσμηνειας. Παρόμοια εφαρμογή είναι και το σύστημα που έχει αναπτυχθεί, προκειμένου με λακκάση, να μπορούν να ανιχνευτούν άμεσα η κοδεΐνη και η μορφίνη σε φάρμακα.

Σχετικά με τις καλλυντικές ουσίες, οι λακκάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν έτσι ώστε να είναι πιο εύχρηστες και φιλικές προς τους καταναλωτές οι βαφές μαλλιών, ενώ πρόσφατα έχουν παρασκευαστεί ουσίες με πρωτεΐνες, οι οποίες χρησιμοποιούνται σαν λευκαντικές για το δέρμα ουσίες. Άλλες εφαρμογές είναι τα αποσμητικά, οδοντόκρεμες, μέντες και διαλύματα στόματος, σαπούνια και πάνες. Φαίνεται επίσης πως πρωτεϊνικά τροποποιημένες λακκάσες μπορούν να χρησιμοποιηθούν για μείωση της αλλεργιοπάθειας [19,29,30].

### *Βιοαισθητήρες*

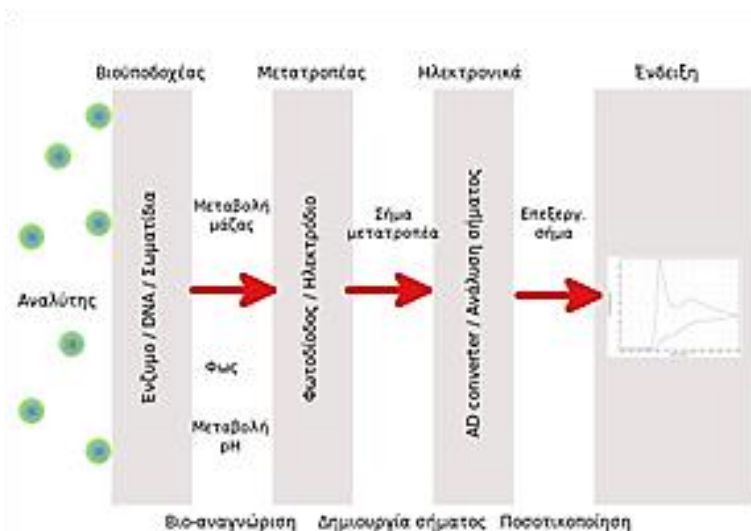
Οι βιοαισθητήρες, όντας ένας μηχανισμός που περιέχει βιολογικό υλικό, μπορεί να μετατρέψει βιοχημικό σήμα σε ένα ηλεκτρικό, ανάλογο της συγκέντρωσης του αναλύτη στο σύστημα, το οποίο και χρησιμοποιείται για ανίχνευση, μετάδοση και εύρεση πληροφοριών, που μπορεί να σχετίζονται με

αλλαγές, που μπορεί να είναι βιοχημικής, ή φυσιολογικής φύσης. Γενικότερα, ένας βιοαισθητήρας αποτελείται από πέντε βασικά σημεία: τον αναλύτη, τον αισθητήρα, το μετατροπέα, το ηλεκτρονικό σύστημα και την οθόνη απεικόνισης. Ο αναλύτης δεν είναι άλλος από την ουσία που χρειάζεται ανίχνευση. Ο αισθητήρας στην περίπτωση των βιοαισθητήρων είναι ένα μόριο που χρησιμοποιείται για την αναγνώριση του αναλύτη, και μπορεί να είναι ένζυμο, κύτταρα, αντισώματα κ.α.. Η διαδικασία παραγωγής σήματος από την αλληλεπίδραση του αναλύτη με τον βιοαποδοχέα ονομάζεται βιοαναγνώριση. Ο μετατροπέας μετατρέπει το αρχικό σήμα που λαμβάνει από τον αισθητήρα, που μπορεί να έχει για παράδειγμα τη μορφή φωτός, θερμότητας ή φόρτισης, και το μετατρέπει σε κάποιου είδους μετρήσιμο μέγεθος, μέσω της διαδικασίας της σήμανσης. Οι περισσότεροι εκ των μετατροπέων επιστρέφουν συνήθως οπτικό ή ηλεκτρικό σήμα ανάλογο της ποσότητας της αλληλεπίδρασης του συστήματος αναλύτη και βιοαισθητήρα. Το ηλεκτρονικό σύστημα λειτουργεί βοηθητικά, ώστε να γίνει η απεικόνιση του σήματος από το μετατροπέα. Αποτελείται από κυκλώματα και κάνει μετατροπές και ενισχύσεις ανάλογες της ψηφιακής μορφής όταν χρειάζεται. Το αποτέλεσμα που προκύπτει από το ηλεκτρικό κύκλωμα οπτικοποιείται στην οθόνη απεικόνισης του βιοαισθητήρα. Ανάλογα με την χρησιμότητα του βιοαισθητήρα η απεικόνιση του σήματος μπορεί να είναι γραφική, αριθμητική ή ακόμη και εικόνα. Μια αναπαράσταση βιοαισθητήρα με τα γενικά του χαρακτηριστικά απεικονίζεται στο Σχήμα 5. Διακρίνονται σε τρεις γενιές. Η πρώτη γενιά στηρίζεται στην χρήση του φυσικού οξυγόνου ως συνυπόστρωμα για την ανίχνευση υπεροξειδίου του υδρογόνου. Είναι απλοί στην χρήση και μπορούν να είναι μικροί σε μέγεθος. Παράδειγμα της γενιάς είναι ο καθετήρας YSI. Στη δεύτερη γενιά, οι βιοαισθητήρες είναι τεχνητοί με μερικώς τοξικούς μεσολαβητές ή νανουλικά, για να μεταφέρουν τα ηλεκτρόνια στο ηλεκτρόδιο, τα οποία στην πρώτη γενιά μεταφέρονταν με το οξυγόνο. Η τρίτη γενιά βιοαισθητήρων χρησιμοποιεί ένζυμα ή άλλες βιολογικές ουσίες για απευθείας μεταφορά των ηλεκτρονίων στο ηλεκτρόδιο, χωρίς δηλαδή να υπάρχουν ενδιάμεσα στάδια [31, 32].

Η ιστορία τους ξεκινά το 1906 με τον M. Cremer, που διαπίστωσε πως η συγκέντρωση ενός οξέος είναι ανάλογη του ηλεκτρικού δυναμικού που δημιουργείται σε περιοχές του υγρού που βρίσκεται σε αντίθετες πλευρές μιας γυάλινης μεμβράνης. Κάποια χρόνια αργότερα, και με την ανακάλυψη της έννοιας του pH, το 1922 δημιουργήθηκε ηλεκτρόδιο για μετρήσεις του pH από τον W.S. Hughes. Στο ενδιάμεσο διάστημα αυτών των δύο γεγονότων έγιναν προσπάθειες για ακινητοποίηση ενζύμου, κάτι που σαν γνώση χρησιμοποιήθηκε αργότερα, με την δημιουργία του πρώτου ουσιαστικά βιοαισθητήρα το 1956 για ανίχνευση υδρογόνου, ο οποίος αναπτύχθηκε από τον Leland C. Clark, που έμεινε γνωστός ως ο πατέρας των βιοαισθητήρων. Ο ίδιος έφτιαξε κάποια χρόνια μετά ένα αμπερομετρικό ηλεκτρόδιο με ένζυμο, το οποίο ανίχνευε γλυκόζη το 1962, και το 1969 ο πρώτος ποτενσιομετρικός βιοαισθητήρας χρησιμοποιήθηκε για ανίχνευση ουρίας. Από εκεί και έπειτα, το 1975 έγινε η πρόταση για τον πρώτο εμπορικό βιοαισθητήρα και ο τομέας αυτός βρήκε μεγάλη ανάπτυξη [31].

Λόγω της εξειδικευμένης του λειτουργίας, ένας βιοαισθητήρας εμφανίζει μεγάλες δυνατότητες, αφού πλεονεκτεί σε ευαισθησία, μεταφορά, ακρίβεια ανάλυσης και επιτόπου χρήση. Είναι ακόμη ιδιαίτερα εύχρηστοι και βρίσκουν εφαρμογή, όπως έχει ήδη αναφερθεί παραπάνω, σε μεγάλο εύρος βιομηχανικών

διεργασιών. Γι' αυτό ερευνήθηκε και η χρήση των λακκασών σε βιοαισθητήρες με επιτυχία.



Σχήμα 5: Σχηματική αναπαράσταση βιοαισθητήρα

Σε σχέση με παραδοσιακές μεθόδους ανίχνευσης, οι βιοαισθητήρες λακκάσης παρέχουν πλεονέκτημα χρόνου και κόστους, σταθερότητας και πληθώρας υποστρωμάτων, on-line και in-situ χρήσης, ενώ οι αντιδράσεις μεταφοράς ηλεκτρονίων δεν απαιτούν συμπαραγόντα (cofactor). Έχουν αναπτυχθεί αισθητήρες για ανίχνευση γλυκόζης, αρωματικών αμινών και φαινολικών συστατικών, αλλά και για ανοσολογία. Η κατάλυση που στηρίζεται στο ένζυμο αυτό, χρησιμοποιείται για να εντοπίσει άλλα ένζυμα, ενώ δύναται ο εντοπισμός ανοσοχημικών, ιστοχημικών, κυτοχημικών ή πυρηνοοξικών ουσιών με πρόσδεση του ενζύμου σε άλλο μόριο. Επίσης, με ακινητοποίηση λακκάσης στην κάθοδο κελιών καυσίμου παράγεται ενέργεια, που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε μικρά συστήματα. Έχουν ακόμη παρασκευαστεί οπτικοί αισθητήρες, οι οποίοι στηρίζονται στο γεγονός πως κατά την ενζυμική κατάλυση από λακκάσες, προκύπτουν ενδιάμεσες ουσίες που διαθέτουν η κάθε μία διαφορετικές φασματικές ιδιότητες, που μπορούν να εντοπιστούν και να χρησιμοποιηθούν. Παρασκευάζονται επίσης θερμικοί αισθητήρες με βάση τη λακκάση, οι οποίοι με έλεγχο της διακύμανσης της ενθαλπίας διαπιστώνουν αλλαγές στην συγκέντρωση διαφορετικών χημικών ειδών. Σχετικά με τα κελιά καυσίμου, έχοντας την δυνατότητα για παράγωγή ενέργειας, η δυνατότητα να μειωθούν σε μέγεθος είναι ιδιαίτερα ελκυστική, αφού ο λόγος μετατροπής/χρήσης της ενέργειας θα αυξηθεί, ενώ θα μειωθούν οι περιβαλλοντικές επιπτώσεις. Περιγράφονται περιπτώσεις για εμφύτευση ηλεκτροχημικών κελιών, τα οποία μπορούν να χρησιμοποιηθούν για ιατρικές εφαρμογές, τα οποία έχουν ακινητοποιημένη λακκάση στην κάθοδο [13,19].

Η δράση των ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων στηρίζεται στη ανταλλαγή ηλεκτρονίων κατά τη διάρκεια της ενζυμικής κατάλυσης. Ο αναλύτης βρίσκεται στο διάλυμα και συμμετέχει στην αντίδραση που γίνεται στην επιφάνεια του

ηλεκτροδίου, δίνοντας σήμα σε σχέση με το ηλεκτρόδιο αναφοράς. Το είδος του ηλεκτροχημικού αισθητήρα σχετίζεται άμεσα με την μετρούμενη ιδιότητα, με αποτέλεσμα να γίνεται λόγος για τέσσερα είδη: αγωγιμομετρικός, ποτενσιομετρικός και βολταμετρικός/αμπερομετρικός. Οι αγωγιμομετρικοί μετρούν αλλαγές στη χωρητικότητα μεταξύ ζεύγους μεταλλικών ηλεκτροδίων, οι οποίες προκύπτουν από τη δράση του ενζύμου. Οι ποτενσιομετρικοί σχετίζονται με τον καθορισμό διαφοράς δυναμικού μεταξύ ενός δείκτη και ενός ηλεκτροδίου αναφοράς, ή μεταξύ δύο ηλεκτροδίων αναφοράς, τα οποία διαχωρίζονται από μεμβράνη. Οι βολταμετρικοί/αμπερομετρικοί χρησιμοποιούνται για να εντοπίζουν τις αλλαγές του ρεύματος στο ηλεκτρόδιο εργασίας, οι οποίες σχετίζονται με την άμεση οξειδωση των προϊόντων του βιολογικού είδους [13].

### Παραγωγή λακκάσης από *Myceliophthora thermophila*

Ο *Myceliophthora thermophila*, ή αλλιώς *Sporotrichum thermophile*, απομονώνεται από το χώμα και το αυτοθερμαινόμενο κομπόστ. Εντάσσεται στους ασκομύκητες και πιο συγκεκριμένα αρχικά ταξινομήθηκε υπό το γένος *Chrysosporium*, και έπειτα υπό το δικό του όνομα. Πρώτη αναφορά στον μύκητα έγινε από τον Arinís. Πρόκειται για έναν ισχυρό μύκητα, ο οποίος συνθέτει ένα σύνολο ενζύμων, τα οποία χρησιμοποιούνται για την διάσπαση του κυτταρικού τοιχώματος. Υπάρχει επίσης η προοπτική για να χρησιμοποιηθεί ο μύκητας προς παραγωγή βιοκαυσίμων και χημικών, από πρώτη ύλη λιγνικά κατάλοιπα. Έχει αποικίες ανοιχτού καφέ χρώματος με μορφή πούδρας ή ακόμη και ελαφρώς κοκκώδους και μη συγκεκριμένα όρια. Όπως γίνεται σαφές και από το όνομα του, ο μύκητας είναι θερμοφίλος και το εύρος θερμοκρασιών, στο οποίο γίνεται η ανάπτυξη του, είναι 25 με 55 °C [33-35].

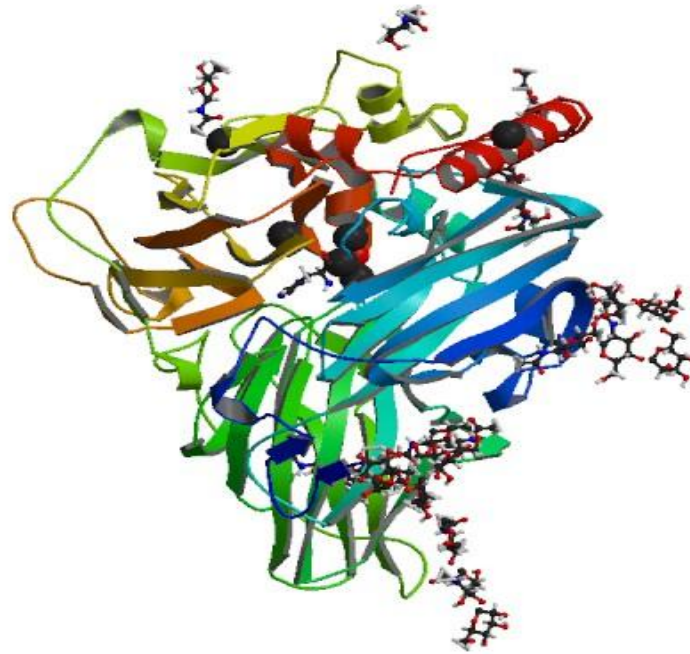
Το γονιδίωμα της *Myceliophthora thermophila* απομονώθηκε και μελετήθηκε, δίνοντας έτσι την δυνατότητα για έρευνα των ενζύμων που είναι υπεύθυνα για την διάσπαση της λιγνοκυτταρικής μάζας, και μπορεί να είναι κυτταρίνες, ημικυτταρίνες κ.α.. Το 38.7 Mbp γονιδίωμα του μύκητα αποτελείται από 7 χρωμοσώματα, που αποτελούνται από συνολικά 9500 γονίδια [34].

Από το DNA του μύκητα μπορεί να απομονωθεί γονίδιο που αφορά την παραγωγή εξωκυττάριας λακκάσης, που ανήκει στην ομόλογη σειρά των υπολοίπων λακκάσων, που γίνεται να απομονωθούν από μυκητιακή πηγή. Ο μύκητας διαθέτει πολλά χαρακτηριστικά που τον καθιστούν ελκυστικό για τους βιοτεχνολόγους, και ιδιαίτερα το γένος ATCC 42464 [34,35].

Οι εξωκυττάριας λακκάσες που απομονώνονται από αυτήν είναι θερμοσταθερές, με μεγάλη δραστηριότητα κατόπιν έκφρασης σε διαφορετικούς ξενιστές. Ένας από τους πιο ευρέως χρησιμοποιημένους ξενιστές είναι ο *Aspergillus oryzae*. Η διαδικασία περιλαμβάνει την τροποποίηση του ξενιστή. Αφότου γίνει η τροποποίηση μελετάται η ικανότητα του ξενιστή να εκφράζει το επιθυμητό ένζυμο και στην συνέχεια επιλέγεται αποικία, προκειμένου η διεργασία να μελετηθεί πιο συγκεκριμένα και να βρεθούν τρόποι να αυξηθούν οι ποσότητες [34,36].

Πιο συγκεκριμένα για λακκάση που παράγεται από το μύκητα αυτό, η οποία παρουσιάζεται στο Σχήμα 6, αυτή έχει χαρακτηριστεί ως οξειδοοδουκτάση. Το

ένζυμο εκφράστηκε από τον *Aspergillus oryzae*. Στον κρύσταλλο δημιουργείται ένα διμερές με το φαινολικό υπόστρωμα, ενώ από τον τρόπο που έχει γίνει αυτό συμπεραίνεται πως η ενεργή δομή του ενζύμου είναι μονομερής και συμφωνεί με στοιχεία που υπάρχουν για άλλες λακκάσες από ασκομύκητες και με την κανονική μορφή των μυκητιακών λακκασών [37].



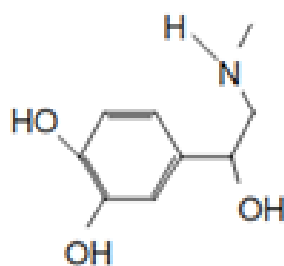
Σχήμα 6: Τρισδιάστατη δομή λακκάσης, εκφρασμένης από τον *Aspergillus oryzae*, με γονίδιο από τη *Myceliophthora thermophila*[37]

## Επινεφρίνη

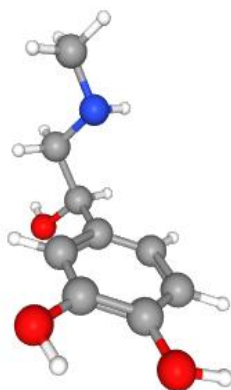
Οι λακκάσες, αναφέρθηκε και παραπάνω, πως μπορούν να δράσουν με ένα ευρύ πλαίσιο υποστρωμάτων και πως βρίσκουν μεγάλη εφαρμογή στον τομέα των βιοαισθητήρων. Δεδομένου αυτών των δύο στοιχείων, μπορεί να αναπτυχθεί βιοαισθητήρας για ανίχνευση επινεφρίνης, όπου αυτή θα λειτουργεί σαν υπόστρωμα και θα οξειδώνεται σε αντίδραση με την λακκάση. Η επινεφρίνη θα έχει δηλαδή τον ρόλο του αναλύτη. Η ανίχνευση της επινεφρίνης κρίνεται απαραίτητη, αφού πέρα από ένδειξη για την εξέλιξη ασθενειών, όπως η νόσος Parkinson, αλλαγές στις συγκεντρώσεις της επινεφρίνης μπορεί να είναι ενδεικτικές δράσης φαρμάκων, αφού αυτή χορηγείται σε αρκετές περιπτώσεις, όπως για παράδειγμα σε περιστατικά αναφυλαξίας. Συνεπώς η ανίχνευση της σε ίχνη μπορεί να βρει μεγάλη εφαρμογή στον τομέα των ιατρικών επιστημών.

Η επινεφρίνη, ή αλλιώς αδρεναλίνη, είναι μια ορμόνη, με χαρακτηριστικές δράσεις στο καρδιαγγειακό σύστημα. Εκκρίνεται σε περιπτώσεις κινδύνου ή φόβου, για άμεση αντίδραση, είναι δηλαδή νευροδιαβιβαστική ουσία. Χαρακτηρίζεται φαρμακευτικά ως συμπαθομιμητικός φορέας και όντας σημαντική μεταβολική ορμόνη, σχετίζεται άμεσα με την αποθήκευση ενέργειας με τη μορφή γλυκόζης και ελεύθερων λιπαρών οξέων, σε περίπτωση φυσικής δραστηριότητας ή υπογλυκαιμίας. Είναι μια άλφα και βήτα αδρενεργή ουσία με ευρύ θεραπευτικό πλαίσιο [38-41].

Ως προς τα γενικά χαρακτηριστικά της ουσίας, αυτή έχει τύπο  $C_9H_{13}NO_3$  και ανήκει στην ομάδα των Κατεχολαμινών, αφού στο μόριο της εντοπίζεται βενζολικός δακτύλιος με δύο υδροξύλια. Η διδιάστατη και τρισδιάστατη δομή του μορίου απεικονίζονται στο Σχήμα 7 και 8 αντίστοιχα.



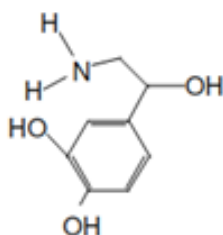
Σχήμα 7: Διδιάστατη δομή μορίου επινεφρίνης



Σχήμα 8:Τρισδιάστατη δομή μορίου επινεφρίνης[PubChem]

Εκκρίνεται σε περιπτώσεις με οξύ στρες, με σκοπό την προετοιμασία του οργανισμού για αντίδραση, προκειμένου αυτός να επιβιώσει. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει διάφορες φυσικές, νευρικές και ενδοκρινικές αλλαγές για άμεση γενική αντίδραση. Η δράση της σχετίζεται με την αγγειοσυστολή, την αντίδραση των μυών και την κίνηση του αίματος. Σχετίζεται δομικά με τη νορεπινεφρίνη, με διαφορές στη μεθυλική ομάδα που βρίσκεται στην πλευρική αλυσίδα του αζώτου [42,43].

Η νορεπινεφρίνη, ή αλλιώς νοραδρεναλίνη, ορίζεται ως νευροδιαδραστική ουσία, η οποία καθορίζει τη δραστηριότητα των νευρωνικών και μη κυττάρων. Διαθέτει πολλές πηγές στον εγκέφαλο, με την κυριότερη να είναι ο locus coeruleus. Η συγκεκριμένη περιοχή, που εμπλέκεται με νοραδρενεργική σηματοδότηση, απελευθερώνει την ουσία σε περιοχές εγκεφαλικών κυττάρων, μέσω μη διασταυρούμενων κισών, ώστε τελικά ο locus coeruleus να χαρακτηρίζεται ως οικουμενικός ρυθμιστής του εγκεφάλου, ακόμη και αν υπάρχει κάποια επιλεκτικότητα στην έκκριση για να είναι συγκεκριμένες οι αντιδράσεις του εγκεφάλου. Παράλληλα κατέχει σημαντικό ρόλο στην άμεση ρύθμιση των φλοιωδών κυκλωμάτων και τον μεταβολισμό της κυτταρικής ενέργειας και επίσης συμμετέχει στην αργή επιδιόρθωση της πλαστικότητας των νεύρων και της φλεγμονής. Όπως και η επινεφρίνη είναι κατεχολαμίνη. Ως προς τα πιο γενικά χαρακτηριστικά της ουσίας, αυτή έχει τύπο  $C_8H_{11}NO_3$ . Είναι στερεή και οι κρύσταλλοι της είναι μικροί και άχρωμοι. Η διδιάστατη δομή του μορίου παρουσιάζεται στο Σχήμα 9 [44,45].



Σχήμα 9: Διδιάστατη δομή μορίου νορεπινεφρίνης



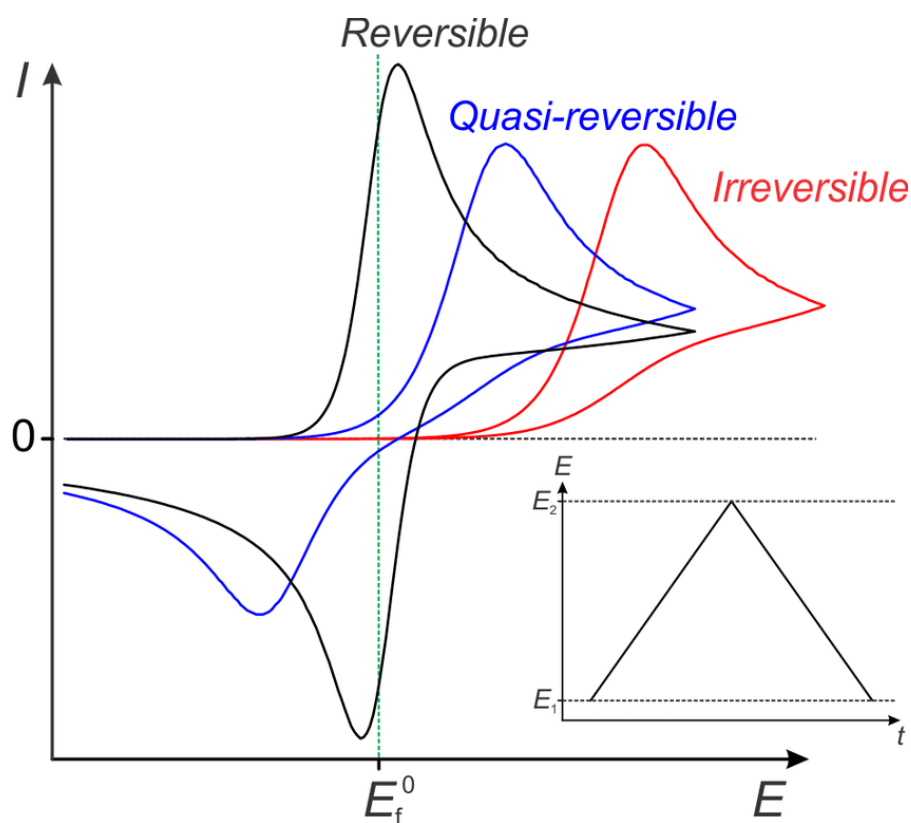
Πρώτη φορά η επινεφρίνη απομονώθηκε το 1899 από τον John Abel, ενώ το 1901 την ανακάλυψε και ο Jokichi Takamine, ο οποίος μάλιστα της έδωσε το όνομα "Adrenalin". Στον κύκλο των Βρετανών ψυχολόγων ήταν γνωστή ως "adrenaline". Λίγα χρόνια αργότερα στο εργαστήριο του Langley, ο Elliot διερεύνησε τον τρόπο έκκρισης της ουσίας και το 1946, από τον von Euler, διαπιστώθηκε πως η νορεπινεφρίνη είναι νευροδιαβαστική ουσία.

Πιο αναλυτικά, πρώτος ο Abel απομόνωσε ένα έκκριμα, το οποίο είναι μονοβενζολικό, το οποίο στη συνέχεια μετέτρεψε σε ένα κρυσταλλικό ένυδρο μόριο επινεφρίνης, το οποίο όμως διέφερε από το αρχικό δείγμα. Αυτό το ένυδρο μόριο οδήγησε τον Takamine στην καθαρή επινεφρίνη. Παράλληλα, ο Langley ασχολήθηκε με τα συμπαθητικά νεύρα και το 1904, στο ίδιο εργαστήριο, ο Elliot έκανε την έρευνα του σχετικά με την δράση της επινεφρίνης, και το πώς αυτή μπορεί να λειτουργήσει ως διεγερτικό, όταν αυτό χρειάζεται. Τον ίδιο χρόνο, ο καθένας ξεχωριστά, συνέθεσαν επινεφρίνη ο Stolz και ο Dakin. Τα επόμενα χρόνια έγιναν αρκετές έρευνες και μελέτες γύρω από τα νεύρα και τις ουσίες που τα διεγείρουν σε θηλαστικά και έγιναν και συγκρίσεις με τις αντίστοιχες ουσίες που παράγονται από το ανθρώπινο σώμα. Έτσι, στηριζόμενος σε όλα τα προηγούμενα, ο von Euler έκανε τις απαραίτητες συνδέσεις και διαπίστωσε την ιδιότητα της νορεπινεφρίνης να δρα επίσης σαν νευροδιαβαστική ουσία. Δύο χρόνια μετά, ο Ahlquist συνέκρινε τις δύο ουσίες και κατέληξε πως η διαφορά στην δράση έγκειται στην ύπαρξη δύο τύπων αισθητήριων νεύρων για αυτές, τα οποία ονόμασε άλφα και βήτα [46].

## Κυκλική Βολταμετρία (CV) και Large amplitude ac voltammetry με μετασχηματισμό Fourier (LA-FTacV)

### Κυκλική Βολταμετρία (CV)

Η κυκλική βολταμετρία (CV), αποτελεί μια ευρέως χρησιμοποιούμενη ηλεκτροχημική τεχνική, η οποία παρέχει πληροφορίες σχετικά με την οξειδωαναγωγική δράση ουσιών, αλλά και τα θερμοδυναμικά και κινητικά τους χαρακτηριστικά. Ακόμη μπορεί να χρησιμοποιηθεί για μελέτη αντιδράσεων που εμπλέκεται μεταφορά ηλεκτρονίων και για να διαπιστωθεί η αντιστρεπτότητα μιας αντίδρασης και ο μηχανισμός της. Το δυναμικό επιβάλλεται γραμμικά σε σχέση με το χρόνο με τη μορφή που απεικονίζεται στο Σχήμα 10 [47,48].



Σχήμα 10. Διαγράμματα για το επιβαλλόμενο δυναμικό σε συνάρτηση με το χρόνο και για την συνάρτηση του δυναμικού με το ρεύμα για την τεχνική της κυκλικής βολταμετρίας [49]

Στο Σχήμα 10 παρατηρείται πως το δυναμικό εφαρμόζεται γραμμικά μεταξύ δύο τιμών. Η πρώτη τιμή είναι η αρχική και γενικά ορίζεται σαν  $E_{init}(E_1)$  και η τελική τιμή είναι αυτή στο μέγιστο, ή αλλιώς  $E_{fin}(E_2)$ . Ισχύει πως οι καθοδικές σαρώσεις αντιστοιχούν σε αναγωγικές δράσεις και οι ανοδικές σε οξειδώσεις. Η κλίση του κάθε τμήματος είναι ίδια, ισούται με τη διαφορά του δυναμικού ως προς το χρόνο και είναι σταθερή. Η κλίση αυτή αντιστοιχεί στην ταχύτητα σάρωσης που έγινε το

πείραμα, σημαντικό μέγεθος για τη μέθοδο, αφού δηλώνει το πόσο γρήγορα γίνεται η σάρωση για το επιβαλλόμενο δυναμικό. Αυτή συμβολίζεται με  $v$  και μετράται σε μονάδες δυναμικού προς τον χρόνο. Τυπικά μπορεί να πάρει τιμές από mV/s μέχρι και V/s. Για τα αντιστρεπτά συστήματα – δηλαδή αυτά για τα οποία η κινητική είναι πάρα πολύ γρήγορη και το αργό στάδιο είναι η διάχυση- η σχέση της ταχύτητας σάρωσης με το ρεύμα των κορυφών δίνεται από την εξίσωση των Randles-Sevcik [47,48,50]. Η σχέση αυτή ισχύει για τον πρώτο κύκλο κάθε σάρωσης στην περίπτωση του ελεύθερου ηλεκτροχημικού είδους και εφόσον η ουσία υπάρχει μόνο στη μία από τις δύο ηλεκτροενεργές μορφές της μέσα στο διάλυμα πριν ξεκινήσει η σάρωση.

Στο Σχήμα 10 απεικονίζεται επίσης η συνάρτηση του επιβαλλόμενου δυναμικού με το ρεύμα. Οι περιπτώσεις όπως φαίνεται είναι τρεις: η αντιστρεπτή αντίδραση, η ημιαντιστρεπτή και η μη αντιστρεπτή. Γενικότερα το σχήμα αυτό με τις τρεις παραστάσεις ονομάζεται κυκλικό βολταμμογράφημα. Οι παράγοντες που επηρεάζουν τη μορφολογία ενός τέτοιου διαγράμματος είναι η επιφάνεια του ηλεκτροδίου, η μεταφορά μάζας, η οποία θεωρείται πως γίνεται μόνο με διάχυση, και η ταχύτητα μεταφοράς φορτίου. Για τις πλήρως αντιστρεπτές αντιδράσεις η μεταφορά φορτίου είναι αντιστρεπτή, που σημαίνει πως η κινητική εξαρτάται κυρίως από τη διάχυση. Ένα αντιστρεπτό σύστημα λέγεται και Νερστιανό, αφού στα συστήματα αυτά ισχύει η εξίσωση του Nernst. Όταν εμπλέκεται και η μεταφορά φορτίου στο σύστημα, τότε η ταχύτητα της μεταφοράς έχει μικρότερες τιμές από αυτές σε ένα αντιστρεπτό σύστημα, με αποτέλεσμα να γίνεται λόγος για ημιαντιστρεπτές δράσεις [47,48].

Για ελεύθερο ηλεκτροχημικό είδος και πλήρως αντιστρεπτό σύστημα, ισχύει η εξίσωση του Nernst:

$$E = E^{\circ} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{\text{Ox}}}{C_{\text{Red}}} \quad (1)$$

Όπου  $E$  το δυναμικό,  $E^{\circ}$  το πρότυπο δυναμικό του είδους,  $R$  η σταθερά των αερίων,  $T$  η θερμοκρασία,  $n$  ο αριθμός ηλεκτρονίων που εμπλέκονται στην αντίδραση,  $C_{\text{Ox}}$  η συγκέντρωση του οξειδωμένου είδους και  $C_{\text{Red}}$  η συγκέντρωση του ανηγμένου είδους.

Για ένα τυπικό πείραμα κυκλικής βολταμμετρίας για ελεύθερο είδος, θεωρείται οριζόντια κίνηση ιόντων προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου, επηρεαζόμενη αποκλειστικά από τη διάχυση, με μηδενική συγκέντρωση ανηγμένου είδους για χρόνο  $t = 0$  s, ενώ η συγκέντρωση στον όγκο του διαλύματος είναι ίση με την αρχική συγκέντρωση οξειδωμένου είδους. Η αντίδραση θεωρείται πως γίνεται γρήγορα. Εφαρμόζεται γραμμικά αρνητικό δυναμικό και ξεκινάει η αναγωγή του είδους Ox. Το ρεύμα φτάνει σε μια μέγιστη τιμή  $I_{pc}$ , που αντιστοιχεί σε συγκεκριμένη τιμή  $E_{pc}$ . Με μείωση της συγκέντρωσης του οξειδωμένου είδους, μειώνεται και το ρεύμα. Όταν το δυναμικό πάρει την τιμή του  $E_{fin}$ , τότε αντιστρέφεται και η φορά σάρωσης προς την ανοδική κατεύθυνση και ξεκινά η οξείδωση. Το ρεύμα φτάνει τη μέγιστη τιμή του  $I_{pa}$ , και αντίστοιχα το δυναμικό έχει την τιμή  $E_{pa}$ . Ο κύκλος κλείνει για τιμή δυναμικού ίση με την αρχική. Για αυτή την περίπτωση, προκειμένου να ισχύει το κριτήριο της αντιστρεπτότητας, ισχύει πως:  $\Delta E_p \geq 58/n$ . Η αντιστρεπτότητα ευνοείται για μικρές τιμές ταχύτητας σάρωσης, κάτι που συμβαίνει για μικρές τιμές του  $k^{\circ}$ , όπου  $k^{\circ}$  σταθερά για κινητική ανταλλαγής ηλεκτρονίων [47,48,50].

Για τα ρεύματα ισχύει πως επηρεάζονται από την κίνηση του

ηλεκτροχημικού είδους και από την αντίδραση μεταφοράς των ηλεκτρονίων. Με βάση αυτό για την αναγωγή και την οξείδωση ισχύουν οι ακόλουθες δύο σχέσεις αντίστοιχα, οι οποίες επηρεάζονται από το δυναμικό [50].

$$k_f = k^0 \exp\left(\frac{-anF}{RT}(E - E^{o'})\right) \quad (2) \quad \text{και} \quad k_r = k^0 \exp\left(\frac{(1-a)nF}{RT}(E - E^{o'})\right) \quad (3)$$

Για ακινητοποιημένο ηλεκτρονιακό είδος ισχύει πως στις κορυφές ταυτίζονται οι συγκεντρώσεις. Επίσης ισχύει πως  $E_{pa}=E_{pc}=E^0$ . Το  $i$  των κορυφών δίνεται από τη σχέση:

$$i_p = FSG_0 \frac{Fv}{4RT} \quad (4)$$

Όταν αυξάνεται η ταχύτητα σάρωσης ενδέχεται να επηρεαστεί η αντιστρεπτικότητα.

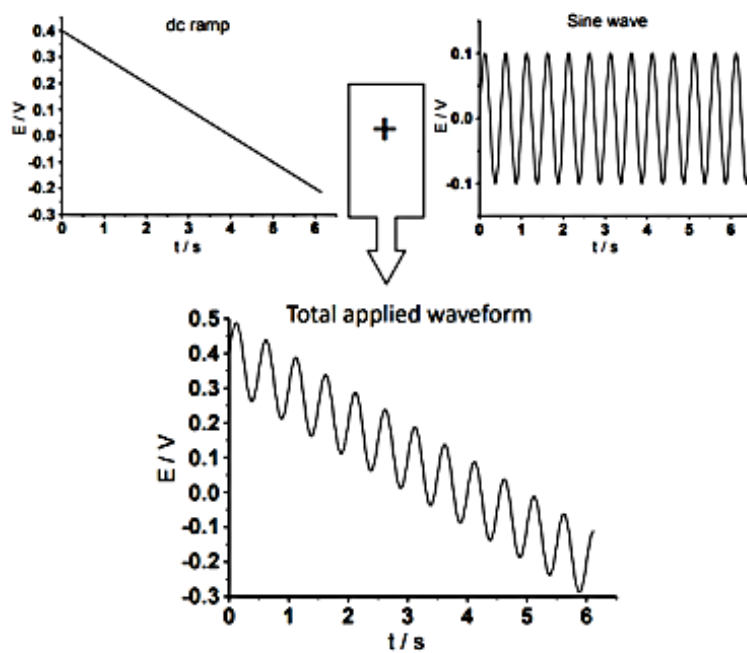
### Μέθοδος LA-FTacV

Η μέθοδος της FTacV αποτελεί μορφή της κλασσικής κυκλικής βολταμμετρίας, που είναι μια εκ των πιο ευρέως χρησιμοποιούμενων ηλεκτροχημικών μεθόδων, αφού είναι απλή στη χρήση και δίνει πολύ καλή εικόνα για το μελετώμενο σύστημα. Την συνοδεύουν προβλήματα, όμως, όπως είναι η χωρητικότητα και η αντίσταση του διαλύματος. Επιπλέον η εξάρτηση της από την ταχύτητα σάρωσης, εμφανίζει το μειονέκτημα ότι για τη μελέτη συστημάτων όπου απαιτείται αύξηση της ταχύτητας σάρωσης υπάρχει παρεμβολή μη φαρανταϊκών ρευμάτων.

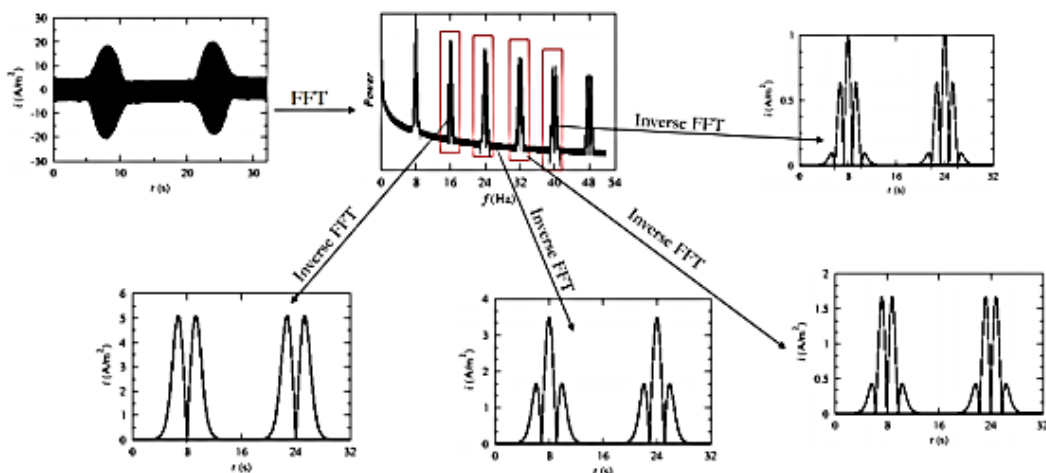
Σε μία προσπάθεια επίλυσης τέτοιων προβλημάτων, αναπτύχθηκε μέθοδος που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις μικρών συγκεντρώσεων, που συνεπώς δεν θα επικαλύπτεται η απόκριση τους από τα χωρητικά ρεύματα. Έτσι, επιβάλλεται ημιτονοειδής διαταραχή συχνότητας  $f$  και πλάτος ταλάντωσης  $A$  στην σταθερή γραμμική συνάρτηση που ισχύει για τη μεταβολή του δυναμικού κατά την κυκλική βολταμμετρία, με αποτέλεσμα να λαμβάνεται τελικά μια διαφοροποιημένη συνάρτηση για το ρεύμα, που δύναται να δεχθεί επεξεργασία και τελικά, με μετασχηματισμό Fourier και στη συνέχεια αντίστροφο μετασχηματισμό Fourier, να δώσει καθαρό φαρανταϊκό σήμα. Οι περιοχές ενδιαφέροντος επιλέγονται πάνω στο ενεργειακό φάσμα ή σε πεδίο συχνότητας που προκύπτει από τα δεδομένα ρεύματος σε σχέση με το χρόνο και σε αυτά τα επιλεγμένα σημεία γίνεται ο μετασχηματισμός. Ο μετασχηματισμός του σήματος αποτελεί και ένα από τα πιο σημαντικά στοιχεία της μεθόδου, αφού δίνει την δυνατότητα για άμεσο διαχωρισμό των απευθείας και των εναλλασσόμενων ρευμάτων στο πεδίο του χρόνου. Η μέθοδος μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις όπως αυτές των οξειδοαναγωγικών πρωτεϊνών για να ξεχωρίσει τα επιθυμητά φαρανταϊκά ρεύματα από τα υπόλοιπα που τα υπερκαλύπτουν. Η μέθοδος, χρησιμοποιώντας την ημιτονοειδή διαταραχή στο επιβαλλόμενο δυναμικό, και μετρώντας έπειτα την ac απόκριση σαν δράση του σταθερού δυναμικού και της εφαρμοζόμενης διαταραχής με την γωνιακή συχνότητα, δίνει πληροφορίες για θερμοδυναμικά και κινητικά δεδομένα, καθιστώντας έτσι μια πολύ δυναμική προσέγγιση στην μελέτη διεργασιών σε ηλεκτρόδιο [51-53].

Η διαδικασία επεξεργασίας του σήματος συνίσταται στα παρακάτω βήματα συνοπτικά και αναπαρίσταται γραφικά στα Σχήματα 11 και 12.

- Επιβολή ημιτονοειδούς διαταραχής της μορφής  $A\sin(2\pi ft)$  στο γραμμικά με το χρόνο μεταβαλλόμενο δυναμικό, όπου  $A$  το πλάτος της διαταραχής και  $f$  η συχνότητα της διαταραχής.
- Μετασχηματισμός Fourier στο προκύπτον σήμα ρεύματος ως προς το χρόνο.
- Αντίστροφος μετασχηματισμός Fourier στα ακέραια πολλαπλάσια της εφαρμοζόμενης συχνότητας διαταραχής  $f$ , ώστε να προκύψουν τα αντίστοιχα βολταμογράφημα (αρμονικές). Το βολταμογράφημα που αντιστοιχεί σε αντίστροφο μετασχηματισμό για συχνότητα  $f$  είναι η πρώτη αρμονική, αυτό που αντιστοιχεί σε συχνότητα  $2f$  είναι η δεύτερη αρμονική κ.ο.κ..



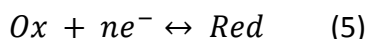
Σχήμα 11: Αναπαράσταση κυματομορφής που χρησιμοποιείται στη μέθοδο FTacV [52]



Σχήμα 12: Σχηματική αναπαράσταση της διαδικασίας επεξεργασίας του σήματος με μετασχηματισμό Fourier από την LA-FtAcV [51]

Μέσω των εξισώσεων που ισχύουν για την κάθε αρμονική ως προς το εφαρμοζόμενο ρεύμα, και λαμβάνοντας υπόψη τις κινητικές παραμέτρους, η ημιαναλυτική λύση συγκρίνεται με την αριθμητική για το συνολικό πρόβλημα αρχικών τιμών και τα κύρια μεγέθη που θα απασχολήσουν είναι το μέγιστο των κορυφών για την κάθε αρμονική, το πλάτος στο μισό του μεγίστου για τις περιττές και το μέγιστο δυναμικό για τις άρτιες, ενώ η μέθοδος φαίνεται να μην επηρεάζεται από το ρυθμό σάρωσης. Όσον αφορά στις αρμονικές που προκύπτουν, είναι δύσκολο να ληφθεί αξιοποιήσιμο σήμα μετά την πέμπτη αρμονική, τόσο λόγω των χαμηλών εντάσεων των ρευμάτων, όσο και λόγω της πολυπλοκότητας των σημάτων, ενώ δεν κρίνεται και απαραίτητο, αφού η χωρητικότητα έχει απομακρυνθεί θεωρητικά μέχρι εκείνη την αρμονική. Κατ' επέκταση, η πρώτη αρμονική συχνά δεν μελετάται, αφού δεν δίνει πληροφορίες για την δράση του οξειδωαναγωγικού είδους και επιπλέον την επηρεάζουν, ακόμη και κατόπιν επεξεργασίας, τα χωρητικά ρεύματα. Οι αρμονικές ανώτερες της δεύτερης είναι ανεξάρτητες των ρευμάτων υπόβαθρου (background currents) [51,52].

Για ελεύθερο ηλεκτροχημικό είδος, θεωρείται πως υπάρχει ελεύθερη πρόσβαση του είδους στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, στην οποία αντιδρούν επιφανειακά χωρίς να λαμβάνει χώρα προσρόφηση στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, η κίνηση γίνεται μόνο με διάχυση μέσα στον ηλεκτρολύτη, ο οποίος είναι στάσιμος και επίσης η χωρητικότητα θεωρείται ανεξάρτητη του δυναμικού. Για μια απλή αντίδραση ενός σταδίου θεωρείται πως η αντίδραση είναι τύπου:



Θεωρώντας πως η κίνηση προκαλείται μόνο μέσω διάχυσης και πως το αναγωγικό είδος δεν υπάρχει καθόλου αρχικά στο διάλυμα, του οποίου η συγκέντρωση είναι ίση με αυτή του οξειδωτικού είδους, και πως η συγκέντρωση του αναγωγικού εμφανίζεται μόνο στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, ξεκινάει η σάρωση από την αρχική τιμή δυναμικού μέχρι την αντίστροφη. Η σάρωση γίνεται γραμμικά και της επιβάλλεται ημιτονοειδής διαταραχή, με αποτέλεσμα η σχέση που ισχύει για

το δυναμικό κάθε χρονική στιγμή να δίνεται από την εξίσωση:

$$E(t) = E_1 - vt_R + v|t - t_R| + A\sin 2\pi ft \quad (6)$$

Όπου το  $t$  ανήκει στο διάστημα  $[0, 2t_R]$ , με  $t_R = \frac{E_{\text{init}} - E_R}{v}$ .

Στην περίπτωση, λοιπόν, που η αντίδραση είναι πλήρως αντιστρεπτή, με τη σταθερά ανταλλαγής ηλεκτρονίων,  $k^\circ$ , να έχει μεγάλη τιμή, οι αρμονικές έχουν ξεκάθαρη και συμμετρική μορφή. Αν όμως θεωρηθεί πως η αντίδραση είναι ημιαντιστρεπτή, με  $k^\circ$  μικρότερο σε σχέση με πριν και πιο εύκολο στον προσδιορισμό, αφού το ρεύμα είναι ευαίσθητο σε αυτό, παρατηρείται πως η συμμετρία εξαρτάται άμεσα από τον συντελεστή παράγοντα συμμετρίας  $\alpha$ , με βαθμιαία αύξηση της ευαισθησίας με αύξηση του αριθμού της αρμονικής. Αυτό καθιστά τις μεγαλύτερες αρμονικές χρήσιμες στον προσδιορισμό κινητικών μεγεθών για το ηλεκτρόδιο [51-53].

Κομμάτι των εξισώσεων που περιγράφουν το πρόβλημα είναι και η κατάλυση. Αφού μελετήθηκε το πρόβλημα, όμως, διαπιστώθηκε πως η κατάλυση να μην αυξάνει το μέγεθος του ρεύματος, αλλά η συνεισφορά της μειώνεται με την αύξηση του αριθμού των αρμονικών και θεωρείται πως μπορεί να πάψει να έχει ισχύ, εφόσον ο αριθμός της αρμονικής μεγαλώσει αρκετά, ή η συχνότητα που χρησιμοποιείται είναι επαρκώς μεγάλη [52].

#### *Εξάρτηση από διάφορους παράγοντες*

Για τη μέθοδο της LA-FTacV οι παράγοντες που χρησιμοποιούνται για την βελτίωση του σήματος είναι το πλάτος της ταλάντωσης  $A$  και η συχνότητα  $f$ , ενώ φαίνεται αυτή να είναι ανεξάρτητη της ταχύτητας σάρωσης.

Κατά αντιστοιχία με την κυκλική βολταμετρία, η συχνότητα παίζει τον αντίστοιχο ρόλο στην LA-FTacV με αυτόν που έχει η ταχύτητα σάρωσης στην κυκλική. Αυτό υποδηλώνει σχέση των δύο, χωρίς να υπάρχει συγκεκριμένη φόρμουλα. Κρίνεται όμως απαραίτητο για συγκεκριμένες τιμές ταχύτητας να είναι μεγάλες και οι συχνότητες για να μπορεί να ισχύει η συνθήκη περί ανεξαρτησίας. Ισχύει πως μέχρι και για την πέμπτη αρμονική, η σχέση που πρέπει να τηρείται, προκειμένου η μέθοδος να μην εξαρτάται από την ταχύτητα σάρωσης, και με δεδομένο πως η αντίδραση είναι αντιστρέψιμη, είναι:

$$f \geq 0.77 \frac{n F}{RT} v \quad (7)$$

Το πλάτος της ταλάντωσης που σχετίζεται με την ημιτονοειδή διαταραχή που επιβάλλεται στο σήμα παίζει σημαντικό ρόλο και επηρεάζει άμεσα τα βασικά μεγέθη που μελετάει η μέθοδος. Έχει γραμμική σχέση τόσο με το δυναμικό των κορυφών για τις άρτιες αρμονικές, όσο και με το πλάτος στο μισό των μεγίστων, με προϋπόθεση ωστόσο αυτό να είναι μεγάλο [51].

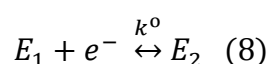
Φαίνεται επίσης πως ο αριθμός  $n$  των ηλεκτρονίων που εμπλέκονται στην

αντίδραση είναι ένας παράγοντας που επηρεάζει την μέθοδο, και πιο συγκεκριμένα το δυναμικό των κορυφών, το πλάτος στο μέσο του μεγίστου και το ύψος των κορυφών. Παρατηρούνται επίσης διαφορές ως προς την ενίσχυση με αλλαγή του αριθμού των ηλεκτρονίων, με την περιοχή της ενίσχυσης για την περίπτωση του ενός ηλεκτρονίου να είναι μεταξύ των 80 και των 220 mV και για τα δύο ηλεκτρόνια αυτή να περιορίζεται μεταξύ των 20 και των 150 mV [51].

Για τις αρμονικές ισχύει πως το μέγιστο των βασικών κορυφών σε αυτές εμφανίζει σιγμοειδή σχέση με την διαταραχή του πλάτους, ενώ εξαρτάται γραμμικά με τη ρίζα της συχνότητας και την συγκέντρωση στο διάλυμα [51].

### Σύζευξη της μεθόδου με ενζυμικές καταλυτικές δράσεις

Έστω ένα ένζυμο στην οξειδωμένη του μορφή  $E_1$ , ακινητοποιημένο σε ηλεκτροδιακή επιφάνεια, ανάγεται στην ανηγμένη του μορφή  $E_2$  με μία κινητική σταθερή ανταλλαγής ηλεκτρονίων  $k^o$  :

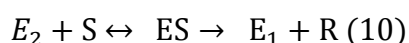


και ο ρυθμός  $r_{\text{redox}}$  της αντίδρασης όπως αυτή εμφανίζεται στη Σχέση 8 περιγράφεται από τη Σχέση 9:

$$r_{\text{redox}} = k^o \left( \Gamma_{E_2} e^{\frac{(1-a)F}{RT}(E-E^o)} - \Gamma_{E_1} e^{\frac{-aF}{RT}(E-E^o)} \right) \quad (9)$$

όπου  $\Gamma_{E_1}$  η επιφανειακή συγκέντρωση της οξειδωμένης μορφής του ενζύμου,  $\Gamma_{E_2}$  η επιφανειακή συγκέντρωση της ανηγμένης μορφής του ενζύμου,  $a$  ο παράγοντας συμμετρίας,  $F$  η σταθερά του Faraday,  $T$  η θερμοκρασία,  $E$  το εφαρμοζόμενο δυναμικό, και  $E^o$  το πρότυπο δυναμικό του ενζύμου.

Έστω υπόστρωμα  $S$  στον κύριο όγκο του διαλύματος που διαχέεται προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου και αντιδρά με την ανηγμένη μορφή του ενζύμου προς προϊόν  $R$  ακολουθώντας μηχανισμό Michaelis Menten, όπου η οξειδωμένη μορφή του ενζύμου αναγεννάται (Σχέση 10).

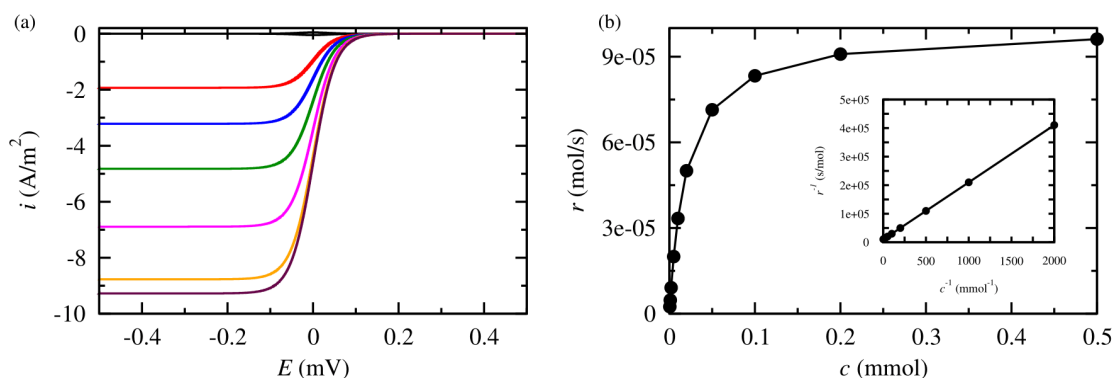


Εάν το σύστημα αυτό μελετηθεί με κυκλική βολταμετρία, παρατηρώντας την μεταφορά ηλεκτρονίων μεταξύ ενζύμου και ηλεκτροδίου, καθώς προστίθεται υπόστρωμα το κυκλικό βολταμογράφημα λαμβάνει μία σιγμοειδή μορφή. Διαιρώντας την πυκνότητα ρεύματος αυτή που θα προκύψει με  $nF$ , όπου  $n$  ο αριθμός των μεταφερόμενων ηλεκτρονίων, προκύπτει ο ρυθμός σε mol/s και αν γίνει γραφική παράσταση ως προς τη συγκέντρωση του υποστρώματος, παρατηρείται συμπεριφορά τύπου Michaelis Menten (Σχήμα 13). Το πρόβλημα όμως που προκύπτει σε πραγματικά συστήματα είναι αυτό της χωρητικότητας που υπερκαλύπτει το σήμα και δεν είναι ευκρινής η καταλυτική δράση (Σχήμα 14).

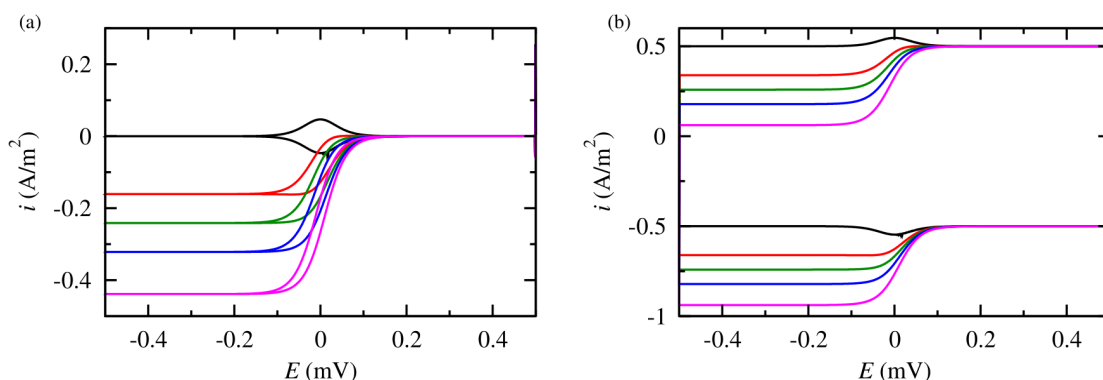
Μία εναλλακτική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε αυτήν την περίπτωση είναι αυτή της LA-FTacV, στην οποία καθώς σε υψηλές αρμονικές εξαλείφονται τα χωρητικά ρεύματα. Στο Σχήμα 15 παρουσιάζεται ένα παράδειγμα LA-FTacV για σύστημα ακινητοποιημένο σε επιφάνεια ηλεκτροδίου, το οποίο αντιδρά με ουσία στον κύριο όγκο του διαλύματος ακολουθώντας κινητική Michaelis Menten όπως περιγράφεται παραπάνω και για την περίπτωση της κυκλικής βολταμετρίας. Έχει



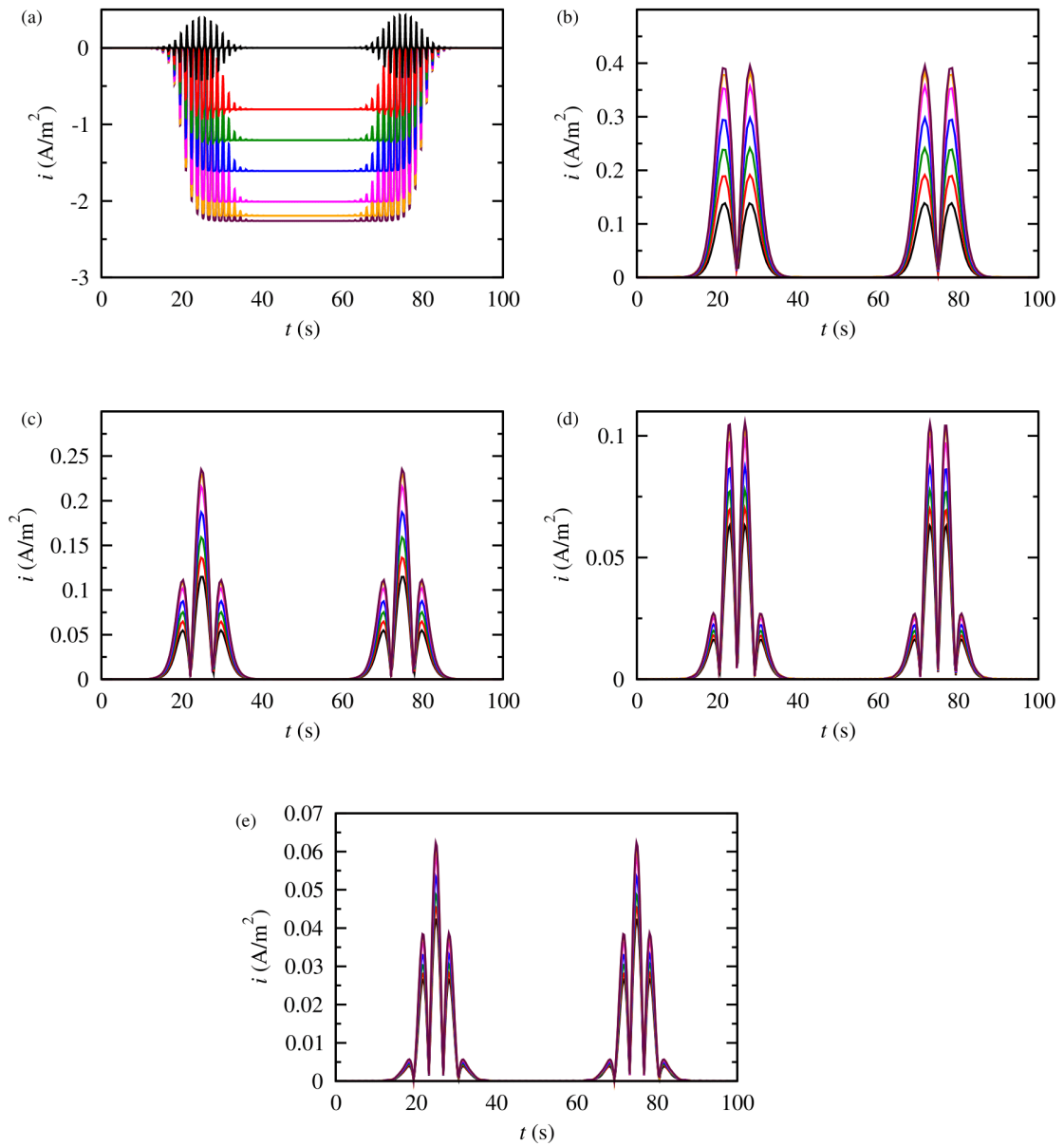
αγνοηθεί η χωρητικότητα στο παρόν παράδειγμα. Στις αρμονικές, όπως αυτές προκύπτουν, παρουσιάζεται αύξηση των οξειδωτικών και των αναγωγικών κορυφών και όχι σιγμοειδείς καμπύλες όπως στην περίπτωση της κυκλικής βολταμμετρίας. Επίσης παρατηρείται ότι με την αύξηση της τάξης της αρμονικής η αύξηση της έντασης του σήματος μειώνεται με αύξηση της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Συνεπώς μία μεθοδολογία που θα μπορούσε να αναπτυχθεί στη συγκεκριμένη περίπτωση είναι η παρακολούθηση της αύξησης της κύριας κορυφής για την τρίτη αρμονική όπου και η αύξηση του σήματος είναι ικανοποιητική και σε συνθήκη συστήματα έχει εξαλειφτεί η χωρητικότητα.



**Σχήμα 13:** (α) Παράδειγμα κυκλικών βολταμμογραφημάτων δράσης ακινητοποιημένου οξειδοαναγωγικού ενζύμου συζευγμένο με αντίδραση από υπόστρωμα στον κύριο όγκο του διαλύματος για διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος απουσία χωρητικότητας (β) Ρυθμός αντίδρασης συναρτήσει της συγκέντρωσης και διάγραμμα Lineweaver Burk (ενσωματωμένο σχήμα)



**Σχήμα 14:** Παράδειγμα κυκλικών βολταμμογραφημάτων δράσης ακινητοποιημένου οξειδοαναγωγικού ενζύμου συζευγμένο με αντίδραση από υπόστρωμα στον κύριο όγκο του διαλύματος για διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (α) απουσία χωρητικότητας (β) παρουσία χωρητικότητας



Σχήμα 15: Παράδειγμα LA-FTacV βολταμμογραφημάτων δράσης ακινητοποιημένου οξειδοαναγωγικού ενζύμου συζευγμένο με αντίδραση από υπόστρωμα στον κύριο όγκο του διαλύματος για διαφορετικές συγκεντρώσεις υποστρώματος (a) σήμα πριν την επεξεργασία με μετασχηματισμό Fourier (b) 2<sup>η</sup> αρμονική (c) 3<sup>η</sup> αρμονική (d) 4<sup>η</sup> αρμονική (e) 5<sup>η</sup> αρμονική

## Κεφάλαιο 2<sup>ο</sup>: Πειραματικό Μέρος

### Πειραματική Διάταξη

Για την εκτέλεση των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν:

- Ποτενσιοστάτης της EG&G INSTRUMENTS 362, για την ρύθμιση των περισσότερων εκ των μεταβλητών των πειραμάτων και της μεθόδου. Οι μεταβλητές που ρυθμίζονται μέσω του Ποτενσιοστάτη για την μέθοδο της Κυκλικής Βολταμμετρίας είναι τα αρχικά και τελικά δυναμικά ( $E_{initial}$  και  $E_{final}$  αντίστοιχα), η ταχύτητας σάρωσης  $v$  (mV/s), το Current Range και η πολλαπλότητα των κύκλων. Για την LA-FTacV χρησιμοποιούνται όλες οι παραπάνω παράμετροι και ορίζεται ένας ο κύκλος του συστήματος.
- Παλμογράφος/γεννήτρια της RIGOL, μοντέλο DS1074Z Plus, ο οποίος εκτός από μέσο απεικόνισης, λειτουργεί στην περίπτωση της LA-FTacV και ως γεννήτρια. Μέσω αυτού επιβάλλεται στο σύστημα η ημιτονοειδής διαταραχή που απαιτείται από την μέθοδο και παράλληλα ορίζονται οι μεταβλητές συχνότητα  $f$ (Hz) και πλάτος ταλάντωσης  $A$  (mV).
- Ηλεκτρόδια εργασίας, αναφοράς και αντίθετο:
  1. Στην παρούσα χρησιμοποιήθηκαν τρία είδη ηλεκτροδίων για να γίνει χαρακτηρισμός και μετρήσεις: υαλώδους άνθρακα (Glassy Carbon), χρυσού (Au) και πυρολυτικού άνθρακα (Pyrolytic Carbon), εκ των οποίων ο υαλώδης άνθρακας είναι εμπορίου, και τα χρυσού και πυρολυτικού άνθρακα κατασκευάστηκαν στο εργαστήριο σε μορφή ηλεκτροδίου από εμπορικό σύρμα Χρυσού και κομμάτι πυρολυτικού άνθρακα. Και για τα δύο ηλεκτρόδια χρησιμοποιήθηκε θερμοσκληρυνόμενη ρητίνη εμπορίου και γυάλινοι σωλήνες. Για το ηλεκτρόδιο χρυσού, σε άκρο σύρματος χαλκού 1.5 mm dia και καθαρότητας 99,9% Alfa Aesar, το οποίο είναι μέσα στο γυάλινο σωλήνα συνδέεται με το χρυσό και το όλο σύστημα(εσωτερικό του γυάλινου σωλήνα) πληρώνεται με ρητίνη, έτσι ώστε να μην είναι δυνατή η διαβροχή του εσωτερικού. Για το ηλεκτρόδιο πυρολυτικού άνθρακα χρησιμοποιήθηκε στέλεχος άνθρακα μέσα σε γυάλινο σωλήνα, στην άκρη του οποίου στερεώθηκε, έτσι ώστε να βρίσκονται σε επαφή οι δύο άνθρακες, πλακίδιο πυρολυτικού άνθρακα. Η σύνδεση των δύο έγινε με ρητίνη.
  2. Ως ηλεκτρόδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε ηλεκτρόδιο Ag/AgCl (KCl saturated), για το οποίο ισχύει +197 vs NHE.
  3. Για αντίθετο ηλεκτρόδιο χρησιμοποιήθηκε σύρμα πλατίνας.
- Σύστημα υπερήχων για καθαρισμό ηλεκτροδίων
- Πεχάμετρο, για παρασκευή ρυθμιστικού διαλύματος
- Θερμαινόμενη πλάκα και θερμομέτρο, για θερμοστάτηση λουτρού
- Υαλικά, μαγνήτες ανάδευσης και πιπέτες ακριβείας

- Ηλεκτρονικός Υπολογιστής, για ρύθμιση προγραμμάτων CV και LA-FTacV και για επεξεργασία δεδομένων

## Πειραματική Διαδικασία

### Προετοιμασία ηλεκτροδίων

Για τον καθαρισμό των ηλεκτροδίων εργασίας υαλώδους άνθρακα και χρυσού ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία:

1. Ξέπλυμα του ηλεκτροδίου με διπλά απεσταγμένο νερό
2. Σε ειδικό πανάκι(rad), τρίψιμο αρχικά με σκόνη αλούμινας 0,3 μm
3. Ξέπλυμα του ηλεκτροδίου με διπλά απεσταγμένο νερό
4. Σε ειδικό πανάκι(rad), τρίψιμο αρχικά με σκόνη αλούμινας 0,05 μm
5. Ξέπλυμα του ηλεκτροδίου με διπλά απεσταγμένο νερό
6. Υπέρηχοι για περίπου 5 min και έπειτα στέγνωμα με βαμβάκι

Για τον γενικό καθαρισμό του ηλεκτροδίου του Πυρολυτικού Άνθρακα:

1. Ξέπλυμα του ηλεκτροδίου με διπλά απεσταγμένο νερό
2. Σε ειδικό πανάκι(rad), τρίψιμο αρχικά με σκόνη αλούμινας 0,3 μm
3. Ξέπλυμα του ηλεκτροδίου με διπλά απεσταγμένο νερό
4. Υπέρηχοι για περίπου 5 min και έπειτα στέγνωμα με διηθητικό χαρτί

Για τον πυρολυτικό άνθρακα δεν κρίνεται απαραίτητο να γίνει περαιτέρω επεξεργασία με αλούμινα μικρότερης κοκκομετρίας, αφού από τα αρχικά πειράματα, που δεν περιέχονται στην παρούσα εργασία, φάνηκε να μην υπάρχει επιπλέον επίδραση στα σήματα που τελικά λαμβάνονται.

Ειδικότερα για το κάθε ηλεκτρόδιο ξεχωριστά, προηγείται καθαρισμός με επεξεργασία με διαλύματα, καθώς έχει διαπιστωθεί ότι η περαιτέρω επεξεργασία με πόλωση ή/και κυκλική σάρωση σε όξινα διαλύματα επηρεάζει τα παρατηρούμενα ρεύματα απουσία της υπό ανάλυση ουσίας.

Πιο συγκεκριμένα για το ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα:

1. Πόλωση στα -2.5 V σε διάλυμα  $H_2SO_4$ , για χρονική διάρκεια 10 min
2. Γενικός καθαρισμός, όπως αυτός περιγράφηκε παραπάνω
3. Τυφλό πείραμα σε διάλυμα  $Na_2SO_4$ , με πλάτος ταλάντωσης 150 mV,  $f$  5 Hz και  $v$  20 mV/s
4. Γενικός καθαρισμός

Για το ηλεκτρόδιο χρυσού:

1. Κυκλική σάρωση μεταξύ 600 mV και 1500 mV (vs Ag/AgCl (KCl saturated)) και 20 mV/s
2. Γενικός καθαρισμός, όπως αυτός περιγράφηκε παραπάνω

Για το ηλεκτρόδιο πυρολυτικού άνθρακα:

1. Πόλωση στα -2.5 V σε διάλυμα  $HClO_4$ , για χρονική διάρκεια 10 min
2. Γενικός καθαρισμός, όπως αυτός περιγράφηκε παραπάνω

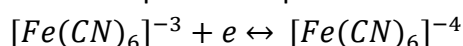
3. Τυφλό πείραμα σε διάλυμα NaClO<sub>4</sub>, με πλάτος ταλάντωσης 150 mV,  $f$  5 Hz και  $\nu$  20 mV/s
4. Γενικός καθαρισμός, όπως αυτός περιγράφηκε παραπάνω

Οι σκόνες αλούμινας που χρησιμοποιήθηκαν είναι από την εταιρία eDAQ. Για την επεξεργασία του υαλώδους άνθρακα με όξινο διάλυμα χρησιμοποιήθηκε H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, αντί για HClO<sub>4</sub>, για την αποφυγή προσρόφησης χλωριόντων πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Για την περίπτωση του πυρολυτικού άνθρακα θεωρήθηκε ότι δεν υπάρχει προσρόφηση χλωριόντων.

### Υπολογισμός της πραγματικής επιφάνειας του ηλεκτροδίου πυρολυτικού άνθρακα

Για τον υπολογισμό της πραγματικής επιφάνειας του ηλεκτροδίου πυρολυτικού άνθρακα, η οποία είναι πορώδης και συνεπώς απαιτεί προσέγγιση της της γεωμετρικής επιφάνειας, σε αντίθεση με τα ηλεκτρόδια υαλώδους άνθρακα και χρυσού, γίνονται κυκλικά βολταμμογραφήματα με συνθήκες:  $E_{initial}$  600 mV,  $E_{final}$  -200 mV και  $\nu$  5, 10, 20, 50, 100 mV/s. Σαν μέσο χρησιμοποιείται διάλυμα K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> 5mM σε Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0.1M για φέροντα ηλεκτρολύτη. Πριν από κάθε πείραμα γίνεται πόλωση στα 600 mV. Η πόλωση γίνεται για μερικά δευτερόλεπτα, ώστε να εξασφαλιστεί η οξειδωση των ανηγμένων ειδών στο διάλυμα και να ξεκινήσει το πείραμα μόνο με την οξειδωμένη μορφή του χημικού είδους. Τα αποτελέσματα επεξεργάζονται και γίνεται υπολογισμός της επιφάνειας.

Η αντίδραση που γίνεται είναι η ακόλουθη:

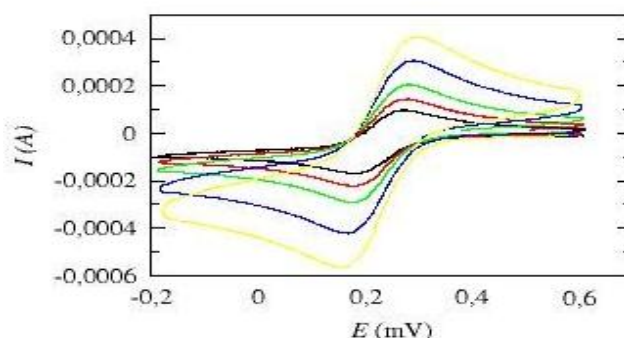


Για τον υπολογισμό της επιφάνειας του ηλεκτροδίου χρησιμοποιείται η εξίσωση των Randles-Sevcik [50], για τους 25 °C:

$$I_p = (2.69 \cdot 10^5) n^{3/2} A D_o^{1/2} C \nu^{1/2}$$

Θεωρώντας πως η αντίδραση αυτή γίνεται στους 25 °C, με συντελεστή διάχυσης  $D_o$  0,896  $10^{-5}$  cm<sup>2</sup>/s, αριθμό ηλεκτρονίων που ανταλλάσσονται ίσο με 1, συγκέντρωση διαλύματος ίση με 0.005 M και ταχύτητα σάρωσης να παίρνει τιμές 5, 10, 20, 50, 100 mV/s, προσεγγίζονται τα καθοδικά ρεύματα σε απόλυτη τιμή, η πραγματική επιφάνεια του ηλεκτροδίου αυτού βρίσκεται ίση με 0,000048 m<sup>2</sup> ή 0,48 cm<sup>2</sup>. Ο υπολογισμός γίνεται έτσι ώστε για το συγκεκριμένο ηλεκτρόδιο να χρησιμοποιηθεί πυκνότητα ρεύματος στα αποτελέσματα. Η διαφορά των κορυφών οξειδωσης και αναγωγής είναι ελαφρώς παραπάνω από 58 mV και η δράση υπεισέρχεται στην περιοχή της ημιαντιστρεπτότητας, όμως, εφόσον στην κυκλική βολταμμετρία η ένταση της κορυφής στην ημιαντιστρεπτή ζώνη κοντά στην αντιστρεπτή δεν έχει πολύ σημαντική απόκλιση από αυτήν στην αντιστρεπτή, χρησιμοποιείται παρ'αυτά. Η ημιαντιστρεπτότητα των σιδηροκυανιούχων ιόντων οφείλεται, είτε στην κινητική των σιδηροκυανιούχων πάνω στην επιφάνεια του

πυρολυτικού άνθρακα, είτε σε επίδραση της πτώσης τάσης λόγω της μεγάλης επιφάνειας του ηλεκτροδίου.



Σχήμα 16: Κυκλικά βολταμμογραφήματα σιδηροκυανιούχων ιόντων 5 mM με φέροντα ηλεκτρολύτη  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  0,1 M σε πυρολυτικό άνθρακα για διαφορετικές ταχύτητες σάρωσης 5 (μαύρο), 10 (κόκκινο), 20 (πράσινο), 50 (μπλε), 100 (κίτρινο)

### Ακίνητοποίηση και προσδιορισμός φαινόμενου πρότυπου $E'$ δυναμικού λακκάσης

Σε πρώτη φάση διερευνήθηκε το σύστημα με κυκλική βολταμμετρία. Η λακκάση που χρησιμοποιήθηκε ονομάζεται *TtLMCO1*, από το θερμόφιλο μύκητα *Thermothelomyces thermophila*, άλλο όνομα του *M. Thermophila*, και εκφράζεται στον *P.Pastoris* [54]. Για γνωστή αναλογία (ενδεικτικά Lac-Naf:5  $\mu\text{L}$ -5  $\mu\text{L}$ ) και παραμέτρους  $\nu$  20 mV/s,  $E_{\text{initial}}$  800 mV και  $E_{\text{final}}$  -400 mV, έγινε ένα αρχικό κυκλικό βολταμμογράφημα, έτσι ώστε οπτικά να διαπιστωθεί εάν εμφανίζεται κάποια ευκρινής κορυφή στα όρια αυτά με την κυκλική βολταμμετρία. Τα αποτελέσματα δεν κρίνεται σκόπιμο να παρουσιαστούν αφού δεν υπήρξε κάποιο αξιόλογο εύρημα. Στην συνέχεια ακολουθεί η διαδικασία με LA-FTacV. Στην φάση του χαρακτηρισμού χρησιμοποιείται ρυθμιστικό διάλυμα pH 5 οξικού οξέος-οξικού νατρίου, που αποτελείται από glacial οξικό οξύ 99-100% a.r. 0.5 M με άνυδρο οξικό νάτριο συγκέντρωσης 0.5 M. Τα διαλύματα, αφού παρασκευαστούν ξεχωριστά, αναμειγνύονται ανάλογα και με χρήση πεχάμετρου προσδιορίζεται με ακρίβεια το pH του διαλύματος.

Για τα πειράματα με LA-FTacV, αφού πρώτα γίνει ο καθαρισμός του ηλεκτροδίου, με τον τρόπο που έχει αναφερθεί παραπάνω, αυτό στερεώνεται κατάλληλα και σε πρώτο στάδιο γίνεται αναζήτηση για την κατάλληλη αναλογία Λακκάσης-Nafion, ώστε το σήμα να είναι όσο το δυνατόν εντονότερο. Από το μείγμα, το οποίο παρασκευάζεται κάθε φορά για συγκεκριμένη αναλογία, λαμβάνονται συνολικά 5  $\mu\text{L}$  με πιπέτα ακριβείας και η ποσότητα ακινητοποιείται πάνω σε στεγνό ηλεκτρόδιο. Οι αναλογίες που μελετήθηκαν είναι:

Πίνακας 1 Αναλογίες λακκάσης-Nafion για την ακινητοποίηση

***Αναλογίες Λακκάσης-Nafion(μL-μL)***

<b>10-0,5</b>
<b>10-1</b>
<b>5-5</b>
<b>1-10</b>
<b>20-0,5</b>

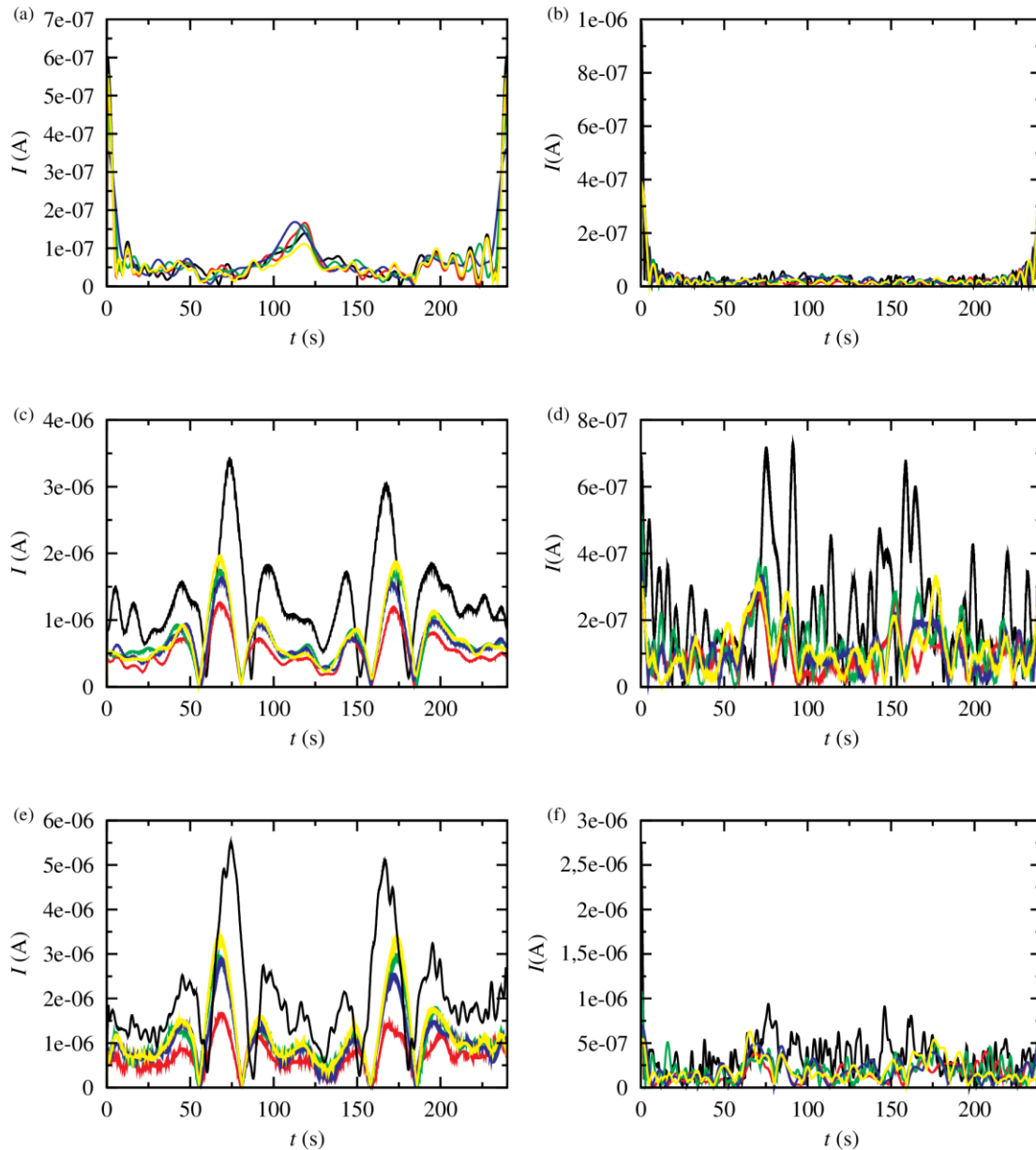
Για το κάθε ηλεκτρόδιο θεωρήθηκαν διαφορετικά αρχικά και τελικά δυναμικά, καθώς το κάθε ηλεκτρόδιο εμφανίζει διαφορετικό αποτύπωμα απουσία του ενζύμου και διαφορετικά όρια λειτουργίας που μπορούν να επηρεάσουν τις μετρήσεις, ενώ η ταχύτητα σάρωσης πήρε τιμές 10 ή 20 mV/s. Οι ταχύτητες σάρωσης θεωρείται ότι δεν παίζουν κάποιο ρόλο στα πειράματα αρκεί να διατηρείται το κριτήριο ανεξαρτησίας τους. Το πλάτος ταλάντωσης και η συχνότητα ρυθμίζονταν από τον παλμογράφο.

***Ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα:***

Πίνακας 2 Πειραματικές συνθήκες για ακινητοποιημένη λάκκάση σε υαλώδη άνθρακα

<b>Άνω όριο δυναμικού(mV)</b>	800
<b>Κάτω όριο δυναμικού (mV)</b>	-400
<b>A (mV)</b>	200
<b>f (Hz)</b>	1, 3, 5

Αφού βρέθηκε η βέλτιστη αναλογία ενζύμου Nafion, έγιναν πειράματα με θερμοστατούμενο λουτρό για θερμοκρασίες 30, 35, 40, 45 και 50 °C. Έγιναν τρεις ακινητοποιήσεις για συχνότητα 3 Hz και μία ακινητοποίηση για συχνότητες 1 και 5 Hz.



Σχήμα 17: Διαφορετικές αναλογίες λακκάσης Nafion για συχνότητες  $f$  1 Hz ((a),(b)), 3 Hz((c),(d)), 5 Hz((e),(f)). Σε κάθε γράφημα η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί σε αναλογία λακκάσης-Nafion:10-0.5, η κόκκινη σε 10-1, η πράσινη σε 5-5, η μπλε σε 1-10 και η κίτρινη σε 20-0.5.

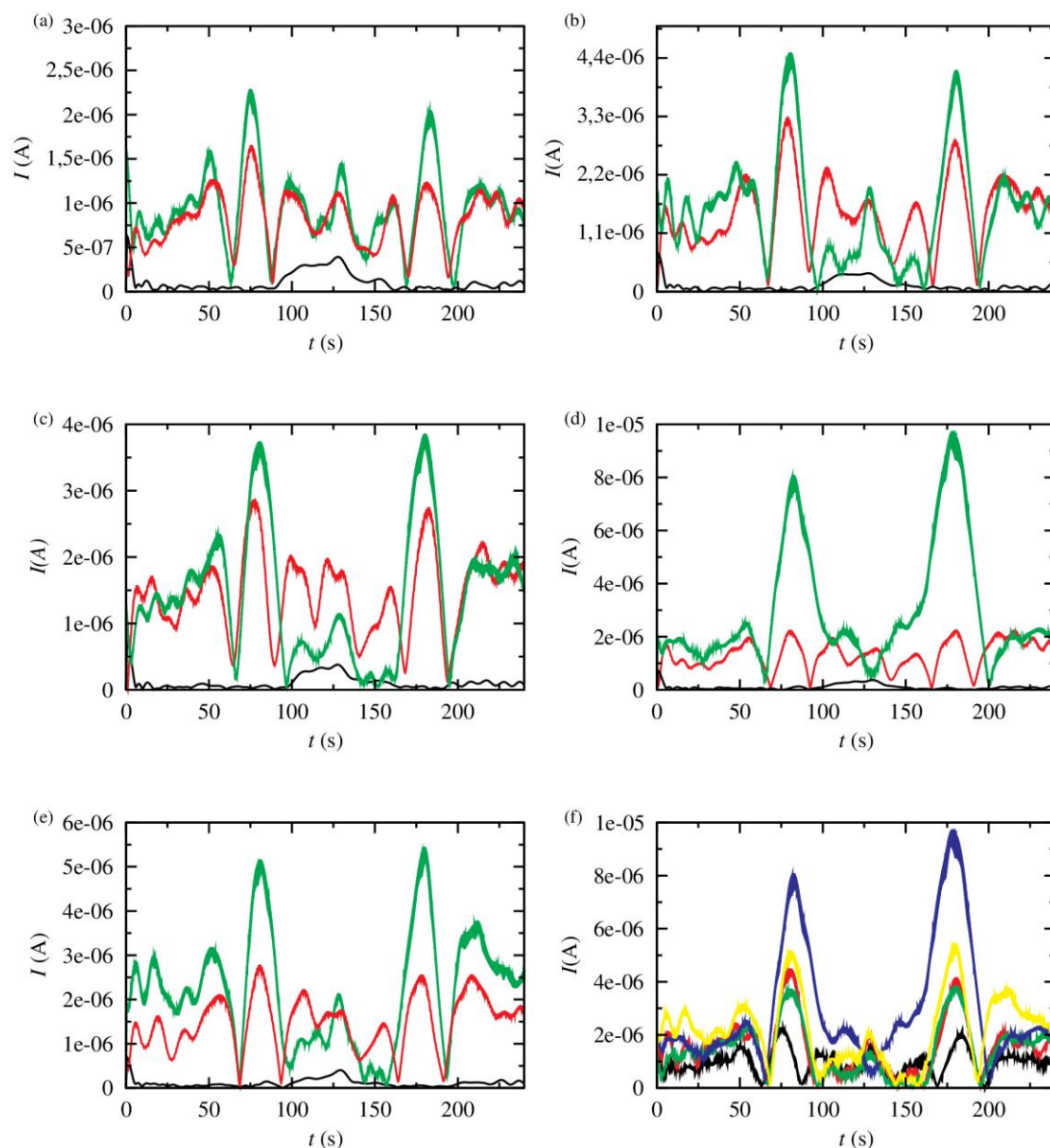
Στο Σχήμα 17 η κάθε σειρά αναλογεί σε μια συχνότητα και η κάθε στήλη σε διαφορετική αρμονική. Η αριστερή στήλη αντιστοιχεί στην τρίτη αρμονική και η δεξιά στην πέμπτη. Οι συνθήκες για το συγκεκριμένο διάγραμμα είναι  $v$  10 mV/s,  $A$  200 mV. Λόγω θορύβου που δυσχεραίνει την ανάλυση, παρατηρείται δυσκολία σε προσέγγιση της πέμπτης αρμονικής για το συγκεκριμένο ηλεκτρόδιο. Τα αποτελέσματα που δίνονται για την τρίτη αρμονική είναι ικανοποιητικά, ενώ φαίνεται πως το καλύτερο σήμα σε ένταση λαμβάνεται για συχνότητα 5 Hz. Σχετικά με την καλύτερη δυνατή αναλογία, διαπιστώνεται πως ενώ φαινομενικά η αναλογία 10-0.5 δίνει καλύτερο σήμα, αυτή ξεφεύγει αρκετά από τις άλλες αναλογίες, με



τελικά μεγάλη πιθανότητα σφάλματος. Για αυτόν τον λόγο, επιλέγεται η δεύτερη καλύτερη αναλογία σαν βέλτιστη, η οποία είναι λακκάσης-Nafion:10-1.

Στο Σχήμα 18, τα γραφήματα από (a) έως και (e) αντιστοιχούν στις διαφορετικές θερμοκρασίες και το (f) προκύπτει για το σύνολο των διαφορετικών θερμοκρασιών για συχνότητα 5 Hz. Αυτό γιατί φαίνεται πως δίνει τα καλύτερα σήματα από τις τρεις διαφορετικές συχνότητες που μελετήθηκαν. Παρατηρείται πως με την αύξηση της θερμοκρασίας το ένζυμο φαίνεται να λειτουργεί και καλύτερα, όπως ήταν αναμενόμενο, αφού με αύξηση της θερμοκρασίας, αυξάνει και η σταθερά της ταχύτητας για μεταφορά ηλεκτροδίων μεταξύ ενζύμου και ηλεκτροδίου. Αυτό βέβαια εξαρτάται και από την γενικότερη συμπεριφορά του ενζύμου με την αύξηση της θερμοκρασίας και με το αν αυτό αποδομείται με αυτήν, κάτι το οποίο δεν αναμένεται λόγω του μύκητα από τον οποίο παράχθηκε, ο οποίος ήταν θερμοφίλος. Η συχνότητα 1 Hz δεν δίνει καλά αποτελέσματα, ενώ από τις τρεις ακινητοποιήσεις που έγιναν για συχνότητα ίση με 3 Hz τελικά επιλέχθηκε να απεικονιστεί για σύγκριση μόνο μία από αυτές, η οποία κρίθηκε πιο αξιόπιστη.

Παρατηρείται πως η καλύτερη δυνατή αναλογία για τις συνθήκες που ισχύουν στο συγκεκριμένο ηλεκτρόδιο είναι η αναλογία λακκάσης-Nafion:10-1 και A 200mV. Η καλύτερη δυνατή συχνότητα είναι αυτή των 5 Hz. Και παρατηρείται ακόμη πως η καλύτερη δυνατή θερμοκρασία είναι οι 45 °C.



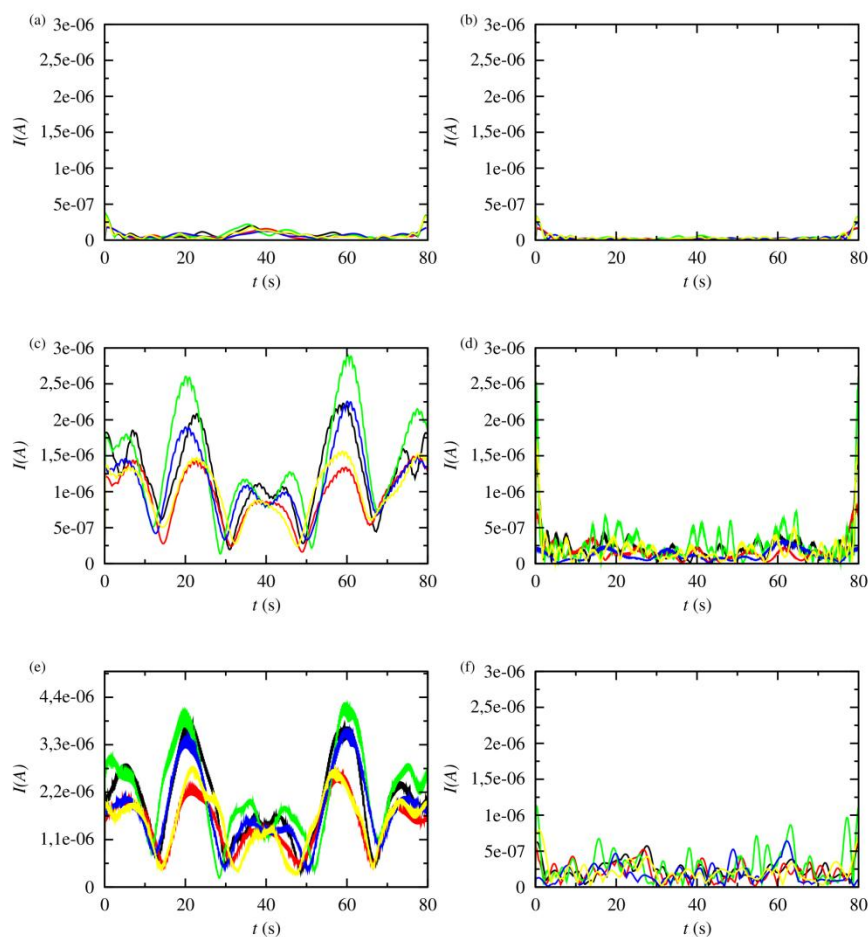
Σχήμα 18: Για αναλογία λακκάσης-Nafion:10-1, σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα, διαφορετικές θερμοκρασίες απεικόνιση τρίτης αρμονικής. Για τα γραφήματα από (a) έως και (e) η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί στο 1 Hz, η κόκκινη στα 3 Hz και η πράσινη στα 5 Hz. Για το (f) η μαύρη γραμμή είναι για τους 30 °C, η κόκκινη για τους 35 °C, η πράσινη για τους 40 °C, η μπλε για τους 45 °C και η κίτρινη για τους 50 °C.

### Ηλεκτρόδιο Χρυσού

Πίνακας 3 Πειραματικές συνθήκες για ακινητοποιημένη λακκάση σε ηλεκτρόδιο χρυσού

Άνω όριο δυναμικού(mV)	700
Κάτω όριο δυναμικού (mV)	-100
A (mV)	200, 250
f (Hz)	1, 3, 5

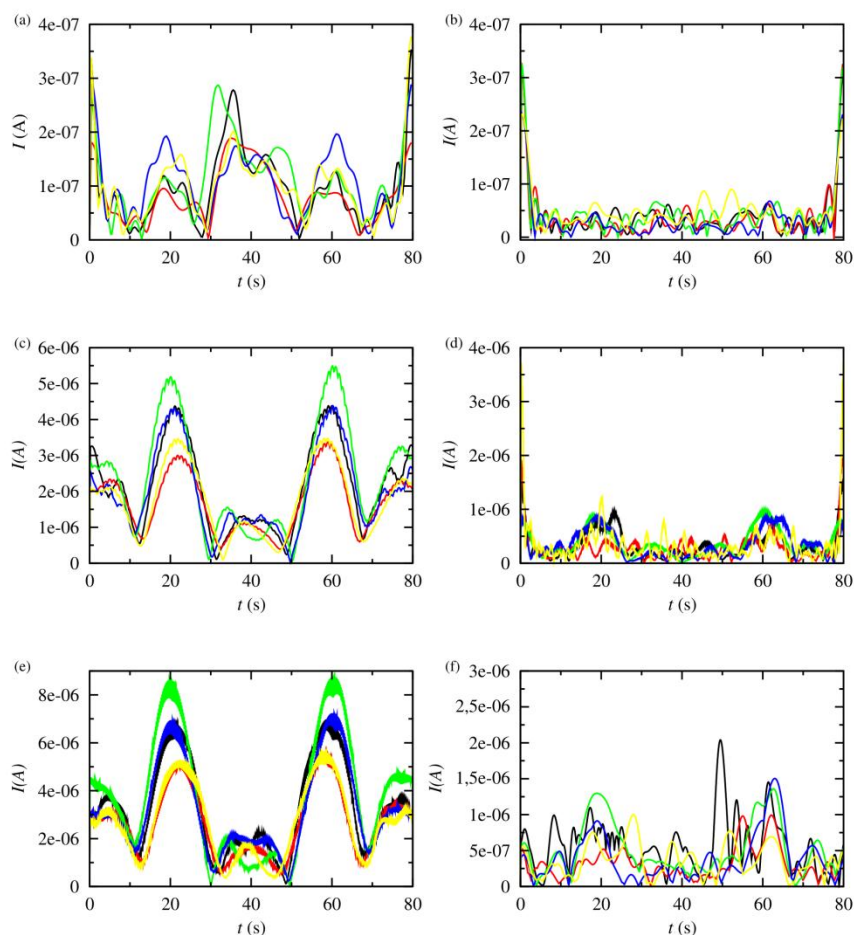
Με βάση τα πειράματα που έγιναν σε ηλεκτρόδιο χρυσού προκύπτουν τα ακόλουθα δύο διαγράμματα για διαφορετικό πλάτος ταλάντωσης (200 και 250 mV) και τρεις διαφορετικές τιμές συχνότητας (1,3 και 5 Hz). Οι μετρήσεις έγιναν για ταχύτητα σάρωσης 20 mV/s.



**Σχήμα 19:** Διαφορετικές αναλογίες λακκάσης-Nafion για συχνότητες  $f$  1 Hz ((a),(b)), 3 Hz((c),(d)), 5 Hz((e),(f)) σε ηλεκτρόδιο χρυσού για πλάτος ταλάντωσης 200 mV. Σε κάθε γράφημα η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί σε αναλογία λακκάσης-Nafion:10-0.5, η κόκκινη σε 10-1, η πράσινη σε 5-5, η μπλε σε 1-10 και η κίτρινη σε 20-0.5. Η αριστερή στήλη αντιστοιχεί στην τρίτη αρμονική και η δεξιά στην πέμπτη

Στο Σχήμα 19 παρουσιάζονται η τρίτη και η πέμπτη αρμονική για λακκάση ακινητοποιημένη σε ηλεκτρόδιο χρυσού για διαφορετικές συχνότητες και αναλογίες ενζύμου-Nafion. Στα σχήματα a, c και e αντιστοιχεί η τρίτη αρμονική ενώ στα υπόλοιπα η πέμπτη. Το πιο έντονο σήμα εμφανίζεται για αναλογία λακκάσης-Nafion 5 προς 5 στην τρίτη αρμονική, ενώ δεν λήφθηκαν ικανοποιητικά αποτελέσματα στην πέμπτη αρμονική, όπου δεν υπάρχει ευκρινές σήμα. Το Σχήμα 20 δηλώνει το ίδιο με

πλάτος ταλάντωσης 250 mV. Φαίνεται πως αυτή η τιμή του πλάτους δίνει καλύτερα αποτελέσματα, οπότε κρίνεται καλύτερη επιλογή για την συνέχεια των πειραμάτων με τη θερμοκρασία.

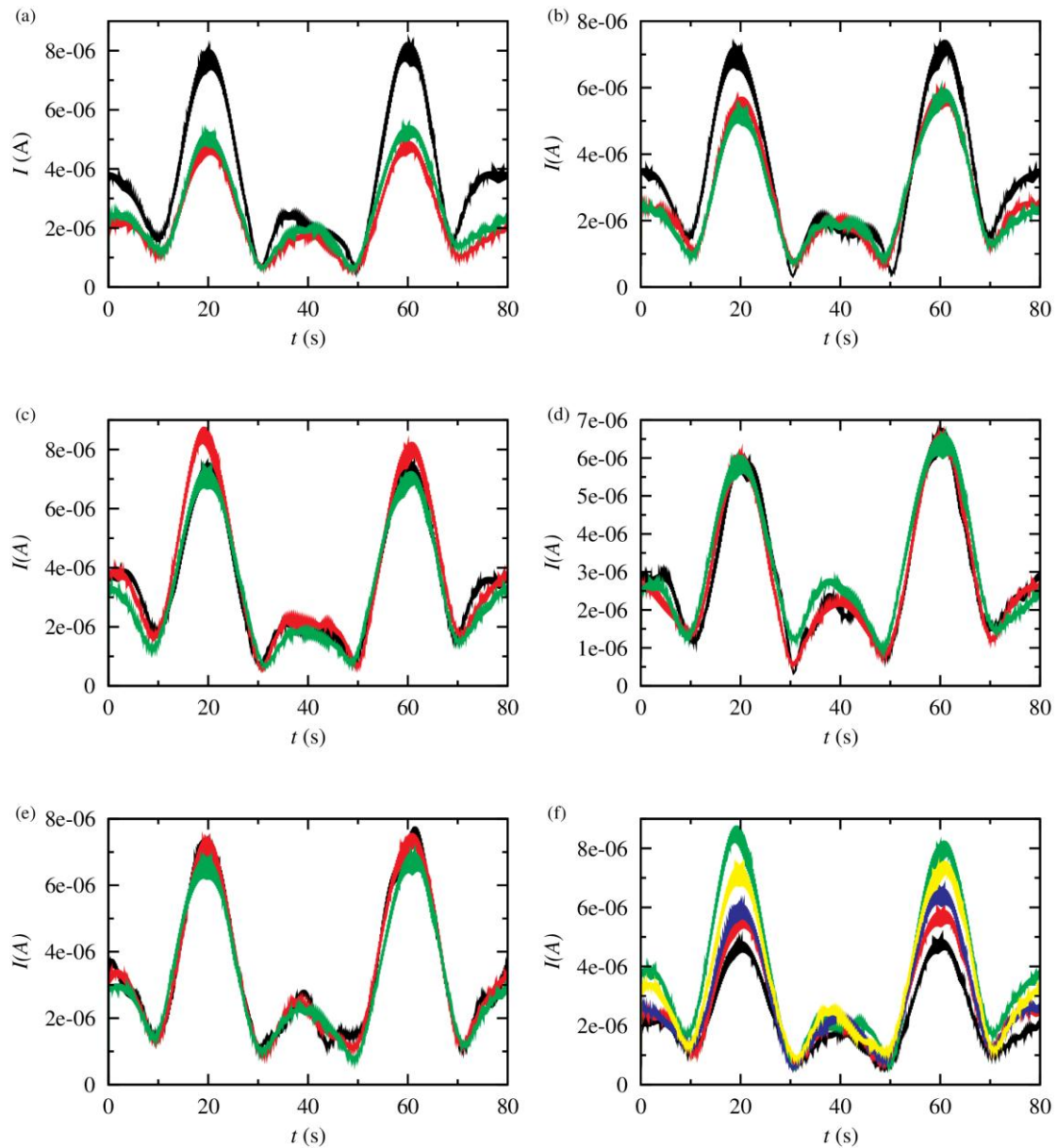


Σχήμα 20: Διαφορετικές αναλογίες λακκάσης-Nafion για συχνότητες  $f$  1 Hz ((a),(b)), 3 Hz((c),(d)), 5 Hz((e),(f)) σε ηλεκτρόδιο χρυσού για πλάτος ταλάντωσης 250 mV. Σε κάθε γράφημα η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί σε αναλογία λακκάσης-Nafion:10-0.5, η κόκκινη σε 10-1, η πράσινη σε 5-5, η μπλε σε 1-10 και η κίτρινη σε 20-0.5. Η αριστερή στήλη αντιστοιχεί στην τρίτη αρμονική και η δεξιά στην πέμπτη

Στο Σχήμα 21 για τα διαγράμματα από (a) έως και (e) φαίνονται τα σήματα από τρεις διαφορετικές ακινητοποιήσεις στις ίδιες συνθήκες θερμοκρασίας. Το τελευταίο διάγραμμα (f) παρουσιάζει τις πιο ενδεικτικές κορυφές εκ των επιμέρους θερμοκρασιών συγκεντρωτικά. Φαίνεται πως το καλύτερο σήμα λαμβάνεται για θερμοκρασία ίση με 40 °C. Τελικά, για ηλεκτρόδιο χρυσού, η προτεινόμενη επιλογή μεταβλητών είναι για αναλογία ακινητοποίησης λακκάσης-Nafion:5-5,  $f$  5 Hz,  $A$  250 mV και  $T$  40°C.

Όπως φαίνεται και από τα παραπάνω σχήματα παρατηρείται πρόβλημα με την λήψη σήματος για αρμονικές ανώτερες της τρίτης. Η κατάσταση εμφανίζεται βελτιωμένη με το ηλεκτρόδιο χρυσού, αλλά και πάλι δεν μπορεί να ληφθεί

συγκεκριμένη πληροφορία με ασφάλεια, μιας και για πιο αξιόπιστες πληροφορίες για θερμοδυναμικά δεδομένα λαμβάνονται για αρμονικές υψηλότερης τάξης. Επίσης φαίνεται να υπάρχει θέμα με τον θόρυβο του συστήματος.



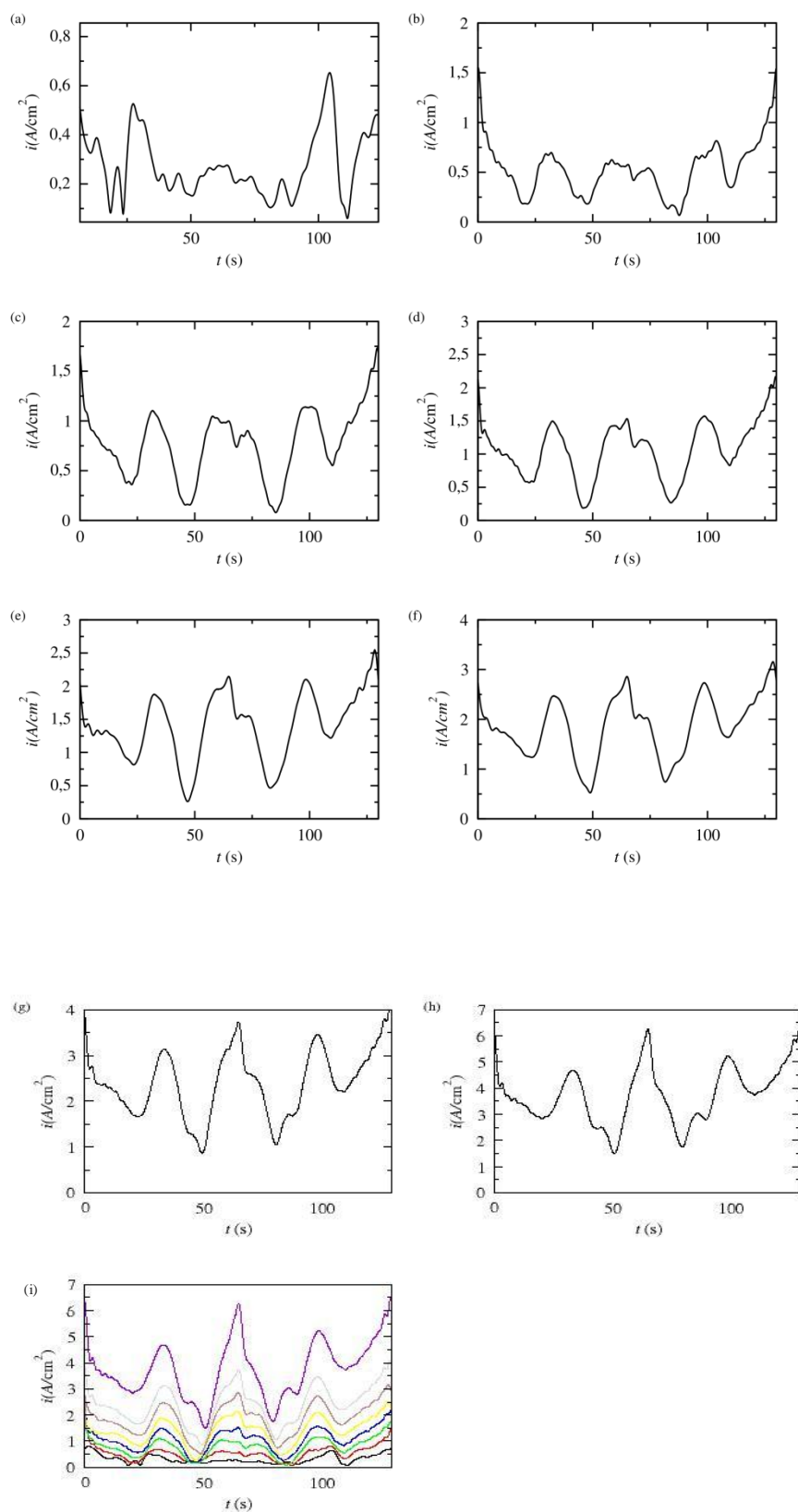
Σχήμα 21: Για αναλογία λακκάσης-Nafion:5-5, σε ηλεκτρόδιο χρυσού, διαφορετικές θερμοκρασίες απεικόνιση τρίτης αρμονικής. Για τα γραφήματα από (a) έως και (e) η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί στο 1 Hz, η κόκκινη στα 3 Hz και η πράσινη στα 5 Hz. Για το (f) η μαύρη γραμμή είναι για τους 30 °C, η κόκκινη για τους 35 °C, η πράσινη για τους 40 °C, η μπλε για τους 45 °C και η κίτρινη για τους 50 °C.

### *Ηλεκτρόδιο Πυρολυτικού Άνθρακα*

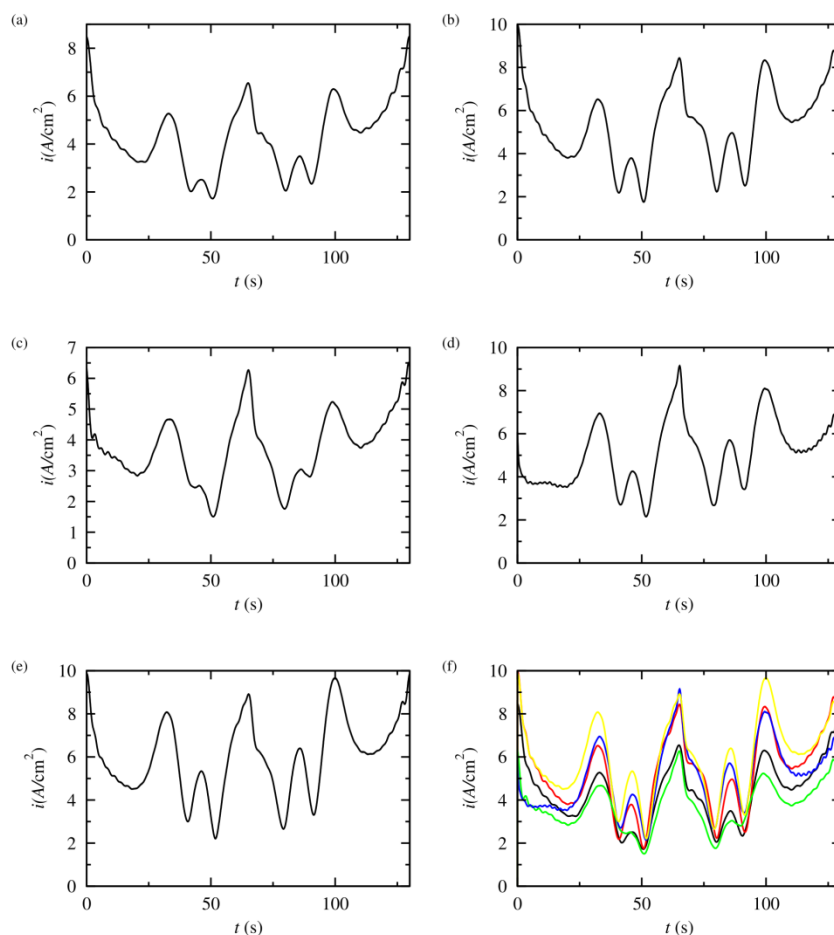
Ενώ για τα δύο πρώτα ηλεκτρόδια η μελέτη ξεκίνησε με έρευνα για την ιδανική αναλογία, στην περίπτωση του πυρολυτικού άνθρακα αρχικά μελετήθηκε για γνωστή αναλογία 5-5 το βέλτιστο πλάτος ταλάντωσης, για τιμές  $f$  5 Hz,  $v$  20mV/s, άνω όριο δυναμικού 1000 mV, κάτω όριο δυναμικού -300 mV και τιμές πλάτους ταλάντωσης 100, 120, 150, 175, 200, 225, 250 και 300 mV. Αφού βρέθηκε το βέλτιστο πλάτος, γίνεται η ανάλυση για την καλύτερη δυνατή αναλογία και έπειτα με βάση τον βέλτιστο συνδυασμό γίνονται και τα πειράματα για τις θερμοκρασίες. Γίνονται τρεις ακινητοποιήσεις για κάθε θερμοκρασία, ενώ η συχνότητα θεωρείται σταθερή και ίση με 5 Hz, γιατί παρατηρήθηκε ήδη από τα προηγούμενα πειράματα με άλλα ηλεκτρόδια πως για αυτή την συνθήκη λαμβάνεται καλύτερο σήμα. Για τα πειράματα με τις θερμοκρασίες το άνω όριο δυναμικού και το κάτω όριο δυναμικού είχαν τιμή 800 mV και -400 mV αντίστοιχα. Όλα τα πειράματα έγιναν με ταχύτητα σάρωσης  $v$  20 mV/s.

Για κάθε σειρά πειραμάτων σε κάθε ηλεκτρόδιο, τα αρχεία επεξεργάζονται με πρόγραμμα που μέσω μετασχηματισμού Fourier δίνει τις επιθυμητές αρμονικές για την εξαγωγή των αποτελεσμάτων. Τα αποτελέσματα τοποθετούνται σε διαγράμματα και συγκρίνονται, ώστε κάθε φορά να επιλέγεται η τιμή της παραμέτρου που συγκρίνεται, ως η καλύτερη δυνατή. Μέσω υπολογισμών προσεγγίζεται και το  $E^0$  για τις βέλτιστες συνθήκες, αλλά και για κάθε θερμοκρασία, ώστε να φανεί η εξάρτηση αυτού με την συγκεκριμένη μεταβλητή του συστήματος.

Παρατηρείται πως με αύξηση του πλάτους ταλάντωσης, όπως ήταν και αναμενόμενο, το σήμα θα βελτιωνόταν, και μάλιστα σε πολύ ικανοποιητικό βαθμό. Ακόμη φαίνεται η αναγωγή του οξυγόνου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, από την ενδιάμεση απότομη κορυφή που παρατηρείται σε όλα τα σχήματα, στο κέντρο περίπου του  $x$  άξονα. Διατηρείται λοιπόν η τελευταία περίπτωση σαν συνθήκη, όπου το  $A$  300 mV.



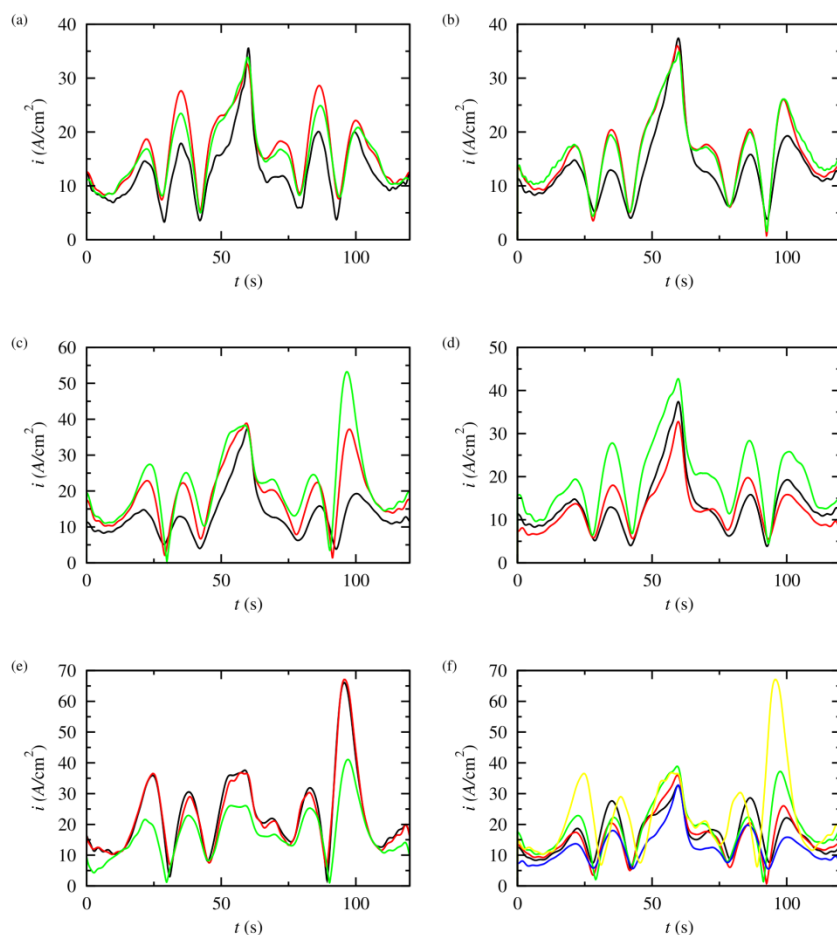
Σχήμα 22: Για ηλεκτρόδιο πυρολυτικού άνθρακα και σταθερή αναλογία λακκάσης-Nafion, διαφορετικά πλάτη ταλάντωσης με απεικόνιση τρίτης αρμονικής. Το (a) αντιστοιχεί σε A 100 mV, το (b) σε A 120 mV, το (c) σε A 150 mV, το (d) σε A 175 mV, το (e) σε A 200 mV, το (f) σε A 225 mV, ο (g) αντιστοιχεί σε A 250 mV και το (h) σε A 300 mV. Το γράφημα (i) αναπαριστά όλα τα γραφήματα σε ένα



Σχήμα 23: Για ηλεκτρόδιο πυρολυτικού άνθρακα οι διάφορες αναλογίες ενζύμου-ακίνητοποιητή για σταθερό πλάτος ταλάντωσης και λοιπές παραμέτρους με απεικόνιση τρίτης αρμονικής. Το (a) αντιστοιχεί σε αναλογία λακκάσης-Nafion:10-0.5, το (b) σε 10-1, το (c) σε 5-5, το (d) σε 1-10, το (e) σε 20-0.5. Το (f) αντιστοιχεί στο συνολικό γράφημα, όπου η μαύρη γραμμή αντιστοιχίζεται σε αναλογία λακκάσης-Nafion:10-0.5, η κόκκινη σε 10-1, η πράσινη σε 5-5, η μπλε σε 1-10 και η κίτρινη σε 20-0.5.

Το πείραμα αυτό έγινε για σταθερές συνθήκες  $A$  300 mV και  $f$  5 Hz. Και σε αυτή την περίπτωση, όπως και στον υαλώδη άνθρακα, σαν βέλτιστη αναλογία θα διατηρηθεί η λακκάσης-Nafion:10-1, για τον ίδιο λόγο. Ακολουθούν τα αποτελέσματα για τις θερμοκρασίες.





Σχήμα 24: Για αναλογία λακκάσης-Nafion:10-1, σε ηλεκτρόδιο πυρολυτικού άνθρακα, διαφορετικές θερμοκρασίες με απεικόνιση τρίτης αρμονικής. Για τα γραφήματα από (a) έως και (e) απεικονίζονται οι τρεις διαφορετικές ακινητοποιήσεις. Για το (f) η μαύρη γραμμή είναι για τους 30 °C, η κόκκινη για τους 35 °C, η πράσινη για τους 40 °C, η μπλε για τους 45 °C και η κίτρινη για τους 50 °C.

Από τις τρεις ακινητοποιήσεις που έγιναν για κάθε θερμοκρασία φαίνεται πως ήταν όλες ικανοποιητικές και παρεμφερείς. Για το τελευταίο σχήμα επιλέχθηκαν οι κόκκινες κορυφές των υπολοίπων, και από εκεί προκύπτει πως το μείγμα λειτουργεί καλύτερα στους 30 °C.

Τελικά για τον πυρολυτικό άνθρακα, οι καλύτερες συνθήκες είναι αναλογία μείγματος λακκάσης-Nafion:10-1,  $A = 300 \text{ mV}$ ,  $f = 5 \text{ Hz}$  και  $T = 30 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Τελικά, για το ηλεκτρόδιο πυρολυτικού άνθρακα, επειδή είχε πιο καθαρό σήμα και πιο σαφή απεικόνιση για τις αρμονικές που είναι ανώτερες της τρίτης, υπολογίζεται για την λακκάση το  $E^{0'}$ . Αυτό υπολογίζεται για την βέλτιστη συνθήκη,

αλλά και για όλες τις τιμές της θερμοκρασίας, ώστε να φανεί η εξάρτηση του με αυτή. Ακολουθεί πίνακας για τα αποτελέσματα.

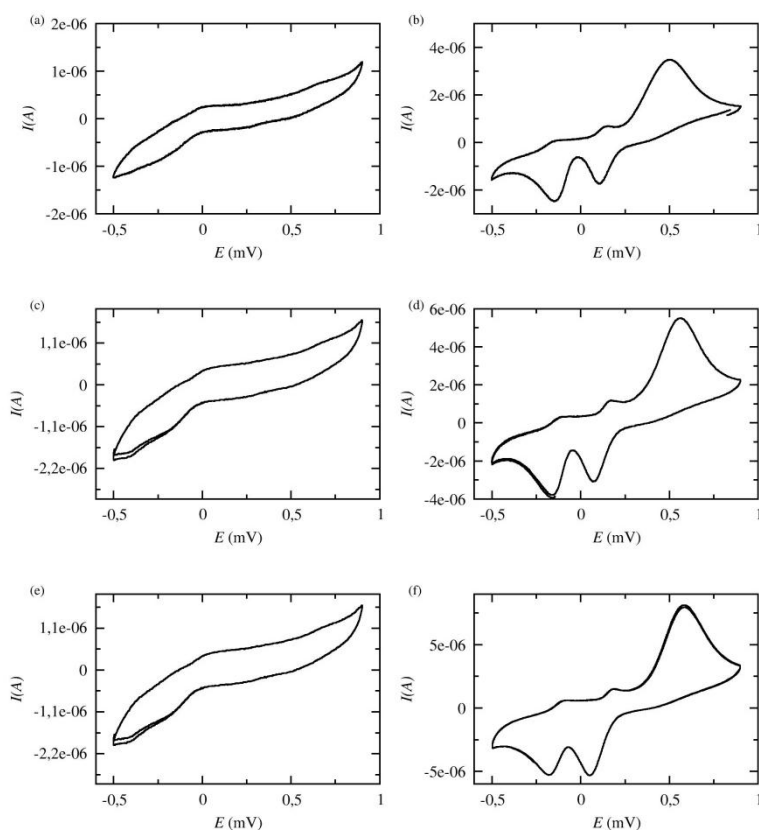
Πίνακας 4: Τα  $E^o$  για το σύστημα του ακινητοποιημένου ενζύμου σε πυρολυτικό άνθρακα

$T(^{\circ}C)$	$E_{red}(mV)$	$E_{ox}(mV)$	$E^o'(mV)$	$E^o'_{fin}(mV)$	<i>M.O.</i>	<i>Std.Div.</i>
25	110.0	116.2	113.1	113.1	-	-
	97.7	121.9	109.8	115.3		
30	99.4	127.2	113.3	118.8	119.5	4.6
	100.3	137.7	119.0	124.5		
35	104.4	129.9	117.2	128.2		
	101.4	126.3	113.9	124.9	127.4	2.2
40	108.3	127.8	118.0	129.0		
	93.3	123.3	108.3	124.8		
45	83.4	112.5	97.9	114.5	115.8	8.3
	81.6	101.9	91.7	108.2		
50	58.7	109.2	83.9	105.9		
	90.5	112.3	101.4	123.4	119.5	12.1
50	93.9	120.7	107.3	129.3		
	60.7	79.2	69.9	97.4		
50	70.9	59.8	65.4	92.9	97.9	5.4
	83.6	68.5	76.1	103.6		

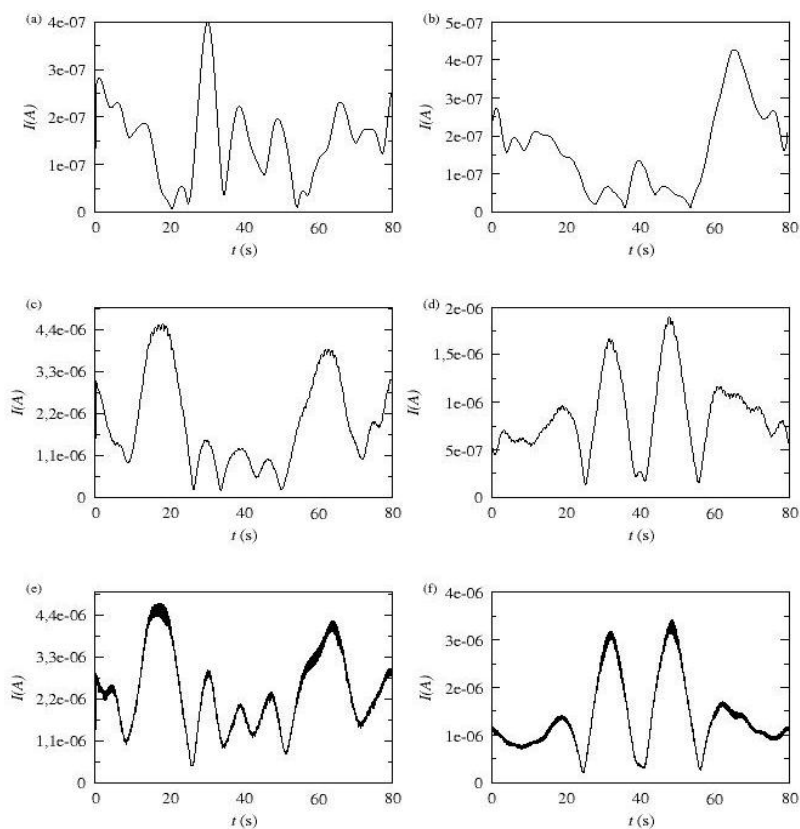
Για την κάθε θερμοκρασία έγινε η διόρθωση που χρειάζεται όσον αφορά την εξάρτηση με την θερμοκρασία και επιπλέον έγινε μέσος όρος και τυπική απόκλιση για την περίπτωση των θερμοκρασιών που έγιναν τριπλές ακινητοποιήσεις. Φαίνεται πως τα αποτελέσματα είναι συναφή με άλλα αποτελέσματα που προκύπτουν για άλλες λακκάσες, κατατάσσοντας το ένζυμο στις λακκάσες χαμηλού δυναμικού. Επίσης το χαμηλό σχετικά δυναμικό της λακκάσας, μπορεί να δώσει μια επεξήγηση για το περιορισμένο σχετικά εύρος υποστρωμάτων που έχει το ένζυμο αυτό σε σχέση με λακκάσες της βιβλιογραφίας [54].

## Μελέτη Επινεφρίνης

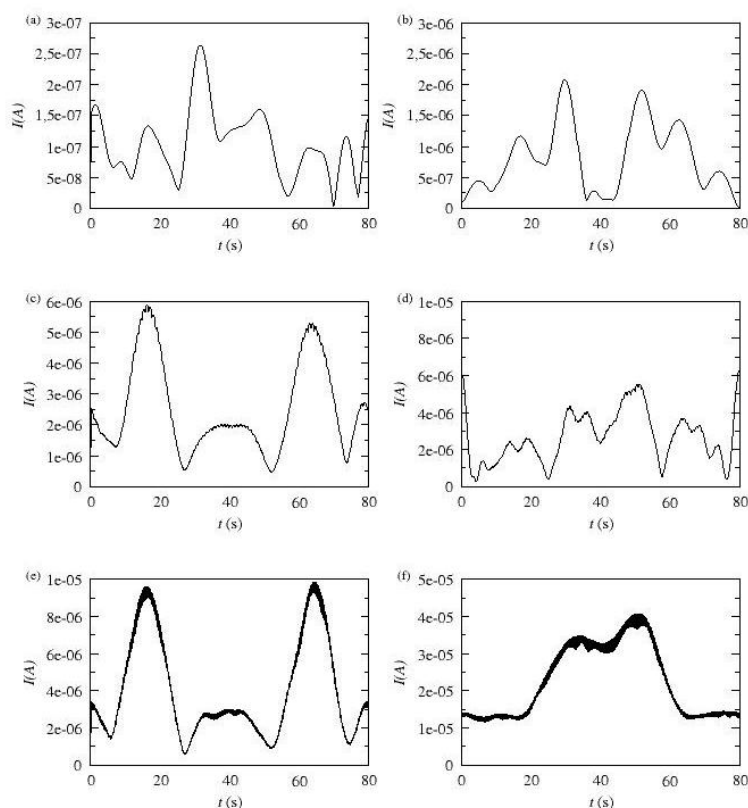
Για την επινεφρίνη έγιναν σειρές μετρήσεων και για τα τρία προαναφερθέντα ηλεκτρόδια. Αρχικά μελετήθηκε η συμπεριφορά της με κυκλική βολταμμετρία και LA-FTacV στον υαλώδη άνθρακα και στο ηλεκτρόδιο χρυσού. Τα πειράματα έγιναν για ταχύτητες σάρωσης ίσες με 20, 50 και 100 mV/s και κάτω όριο δυναμικού -400 mV και άνω όριο δυναμικού 800 mV όσον αφορά την κυκλική βολταμμετρία και για την LA-FTacV οι συνθήκες είναι  $A$  250 mV,  $\nu$  20 mV/s, άνω όριο δυναμικού 700 mV και κάτω όριο δυναμικού -100 mV, ενώ σε πρώτη φάση η συχνότητα έλαβε τιμές 1, 3 και 5 Hz. Σκοπός των πειραμάτων LA-FTacV είναι η ανίχνευση της επινεφρίνης σε όσο το δυνατό πιο χαμηλά όρια επιτρέπει η μέθοδος απουσία ενζύμου ή κάποιας άλλης ουσίας που μπορεί να ενίσχυε τη δράση. Για αυτό και επιλέχθηκε η ευκρινής κορυφή της επινεφρίνης από τα κυκλικά βολταμμογραφήματα και απομονώθηκε η περιοχή δυναμικών γύρω από αυτήν για τα πειράματα της LA-FTacV. Αφού διαπιστώθηκε ότι η επινεφρίνη δίνει πιο ευκρινές σήμα στο ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα, συνεχίστηκε ο χαρακτηρισμός της ουσίας με αυτό το ηλεκτρόδιο.



Σχήμα 25: Κυκλικά Βολταμμογραφήματα για την επινεφρίνη για τα δύο ηλεκτρόδια, χρυσού και υαλώδους άνθρακα. Αριστερά τα γραφήματα αφορούν το ηλεκτρόδιο χρυσού και δεξιά τον υαλώδη άνθρακα. Η πρώτη γραμμή είναι για ταχύτητα σάρωσης 20 mV/s, η δεύτερη για 50 mV/s και η τρίτη για 100 mV/s.



Σχήμα 26: Γράφημα για την επινεφρίνη σε ηλεκτρόδιο χρυσού (αριστερή στήλη) και υαλώδους άνθρακα (δεξιά στήλη). Απεικονίζεται σε κάθε γράφημα η τρίτη αρμονική όπως προκύπτει από την μέθοδο της LA-FTacV στους 25 °C.



**Σχήμα 27:** Γράφημα για την επινεφρίνη σε ηλεκτρόδιο χρυσού(αριστερή στήλη) και υαλώδους άνθρακα(δεξιά στήλη). Απεικονίζεται σε κάθε γράφημα η τρίτη αρμονική όπως προκύπτει από την μέθοδο της LA-FTacV στους 50 °C.

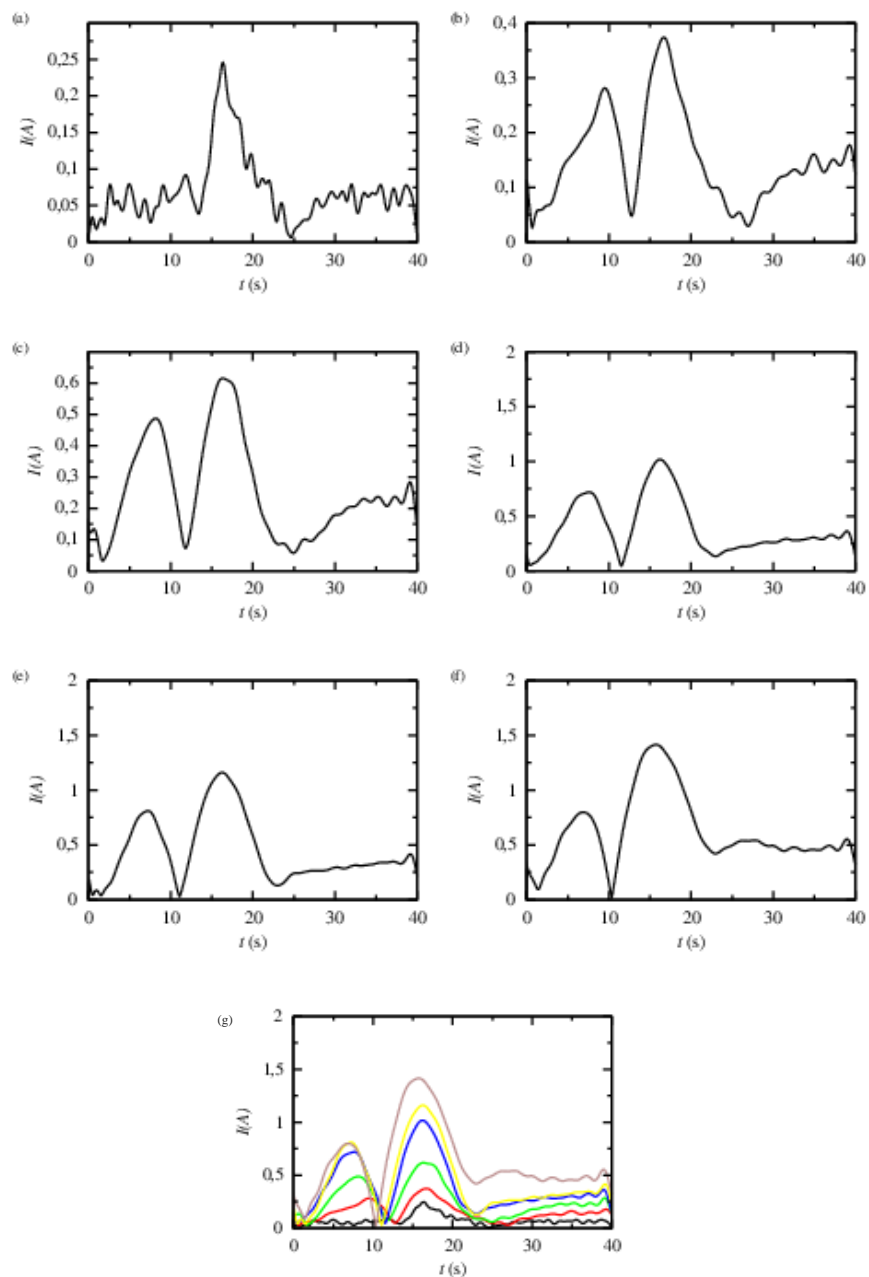
Στο Σχήμα 25 παρουσιάζονται κυκλικά βολταμμογραφήματα της επινεφρίνης σε ηλεκτρόδιο χρυσού και σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα. Στη περίπτωση του χρυσού δεν υπάρχουν ευκρινείς κορυφές ενώ στην περίπτωση του υαλώδους άνθρακα λαμβάνεται κυκλικό βολταμμογράφημα το οποίο συμφωνεί με αυτά που δίνονται στη βιβλιογραφία. Η εξέχουσα κορυφή περίπου στα 500 mV στα βολταμμογραφήματα στο ηλεκτρόδιο του υαλώδους άνθρακα αντιστοιχεί στην οξειδωση της επινεφρίνης και αποτελεί την κορυφή κύριου ενδιαφέροντος γύρω από την οποία θα πραγματοποιηθούν τα πειράματα της LA-FTacV.

Στο Σχήμα 26, η αριστερή στήλη αντιστοιχεί στο ηλεκτρόδιο χρυσού και η δεξιά στο ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα για θερμοκρασία 25 °C. Η πρώτη σειρά αντιστοιχεί σε συχνότητα 1 Hz, η δεύτερη σε 3 Hz και η τρίτη σε 5 Hz. Για τους 50 °C ισχύει το ίδιο, που απεικονίζεται στο Σχήμα 27. Φαίνεται ότι απουσιάζει η κανονικότητα που αντιστοιχεί σε μία αντιστρεπτή οξειδοαναγωγική δράση, το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η ανίχνευση της επινεφρίνης χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση και η αύξηση του σήματος δε θα αντιστοιχεί στην μεθολογία ότι αυξάνοντας το πλάτος και τη συχνότητα θα ενισχύεται το σήμα. Από αυτά τα διαγράμματα παρατηρείται πως η LA-FTacV για το χρυσού δίνει πιο ευκρινή αποτελέσματα, αλλά από τα κυκλικά γραφήματα γίνεται πολύ καλύτερη και ευκρινής ανάλυση της συμπεριφοράς της επινεφρίνης στον υαλώδη άνθρακα. Ο

υαλώδης άνθρακας δίνει εξίσου ευκρινές σήμα στην LA-FTacV, αλλά μικρότερης έντασης. Συνδυαστικά όμως και με το κυκλικό βολταμμογράφημα, προτιμάται το ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα για να συνεχιστούν τα πειράματα, προκειμένου να μπορούν να συνδυάζονται οι δύο μέθοδοι σε ικανοποιητικό βαθμό και να λαμβάνονται ολοκληρωμένα αποτελέσματα. Ακόμη κρίνεται πως το ηλεκτρόδιο χρυσού δίνει αμφίβολα σήματα, τα οποία ενδέχεται να μην ανήκουν στην μελετώμενη ουσία, αλλά σε κάποιο οξειδίο που σχηματίζεται. Συνεπώς λαμβάνοντας υπόψη τους παραπάνω λόγους, η ανάλυση συνεχίζεται μόνο για τα άλλα δύο ηλεκτρόδια, που φαίνεται να εμφανίζουν βιβλιογραφικά προβλεπόμενα αποτελέσματα.

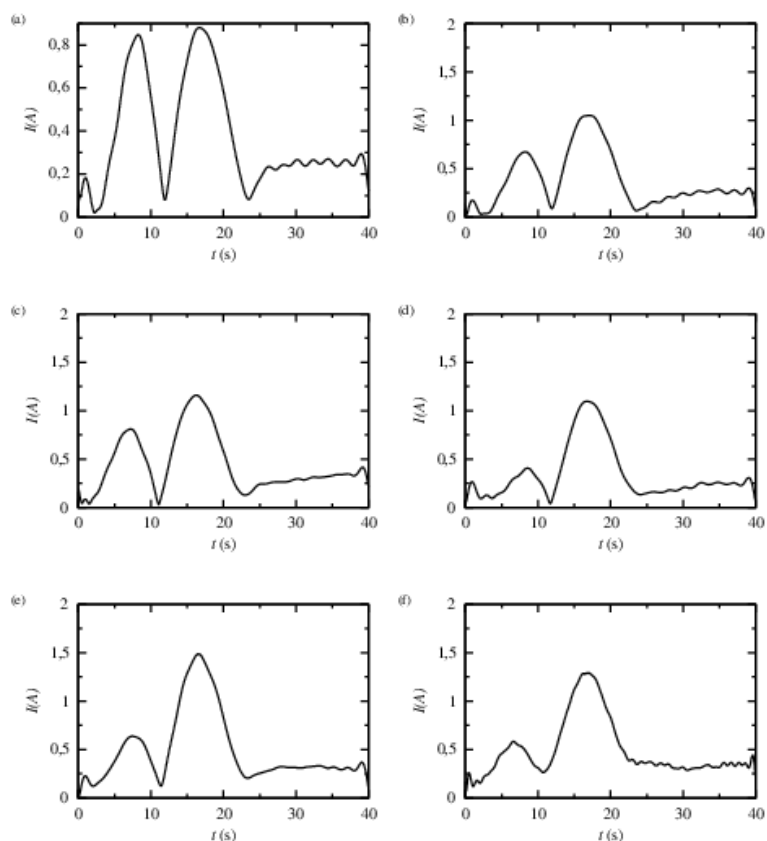
Αρχικά με LA-FTacV και συνθήκες C 0.5 mM, κάτω όριο δυναμικού 0 mV, άνω όριο δυναμικού 800 mV και  $v$  20 mV/s μελετήθηκε η συμπεριφορά της ουσίας με διαφορετικά πλάτη ταλάντωσης, που πήραν τιμές 100, 150, 200, 225, 250 και 300 mV με σταθερή συχνότητα 5 Hz. Αφού βρέθηκε το βέλτιστο πλάτος, έγιναν μετρήσεις για την συχνότητα, η οποία έλαβε τιμές 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 και 10 Hz. Με τον καλύτερο συνδυασμό τελικά μελετήθηκε η ουσία με το ηλεκτρόδιο ως προς το όριο ανίχνευσης αυτής με αραιώση κάθε φορά του διαλύματος με αραιό ρυθμιστικό διάλυμα οξικού οξέος/οξικού νατρίου με pH 5, μέσα στο οποίο είναι ήδη διαλυμένη η επινεφρίνη. Η συγκέντρωση πήρε τιμές 0.25, 0.1, 0.075, 0.05, 0.025 και τελικά 0.01 mM. Για την κάθε συγκέντρωση έγιναν τρεις μετρήσεις. Τα πειράματα αυτά έγιναν για θερμοκρασίες 25 °C και 50 °C. Ανάμεσα στα σετ μετρήσεων γινόταν καθαρισμός του ηλεκτροδίου.

Έτσι, από τα πειράματα με την FTacV για τον υαλώδη άνθρακα και για την πρώτη φάση με την μελέτη του πλάτους ταλάντωσης προκύπτει το Σχήμα 28. Από τα διαγράμματα αυτά παρατηρείται πως το καλύτερο σήμα λαμβάνεται για τα 300 mV, αλλά επειδή και τα 250 mV δίνουν αξιόλογο σήμα και για αποφυγή εμφάνισης άλλων δράσεων στο ηλεκτρόδιο λόγω υψηλού πλάτους διαταραχής, επιλέγονται αυτά σαν τιμή για να συνεχιστεί η διαδικασία, ως μια μέση λύση, προκειμένου να μην γίνονται οριακές ερμηνείες.

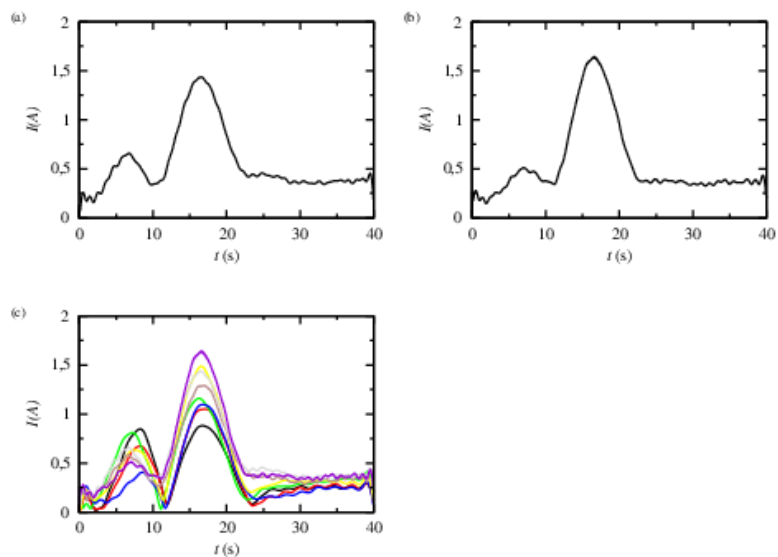


Σχήμα 28: Για ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα αναπαράσταση επινεφρίνης, διαφορετικά πλάτη ταλάντωσης. Το (a) αντιστοιχεί σε A 100 mV , το (b) σε A 150 mV, το γράφημα (c) σε 200 mV, το (d) σε 225 mV, το (e) σε 250 mV και το (f) σε 300 mV. Το (g) αναπαριστά όλα τα γραφήματα σε ένα. Η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί σε A 100 mV, η κόκκινη σε A 120 mV, η πράσινη σε A 200 mV, η μπλε σε A 225 mV, η κίτρινη σε A 250 mV και η καφέ σε A 300 mV.

Ακολουθούν τα διαγράμματα για τις διαφορετικές συχνότητες στα Σχήματα 29 και 30. Φαίνεται πως όλες οι συχνότητες δίνουν καλό σήμα, αλλά επιλέγεται αυτή των 10 Hz ως η βέλτιστη.

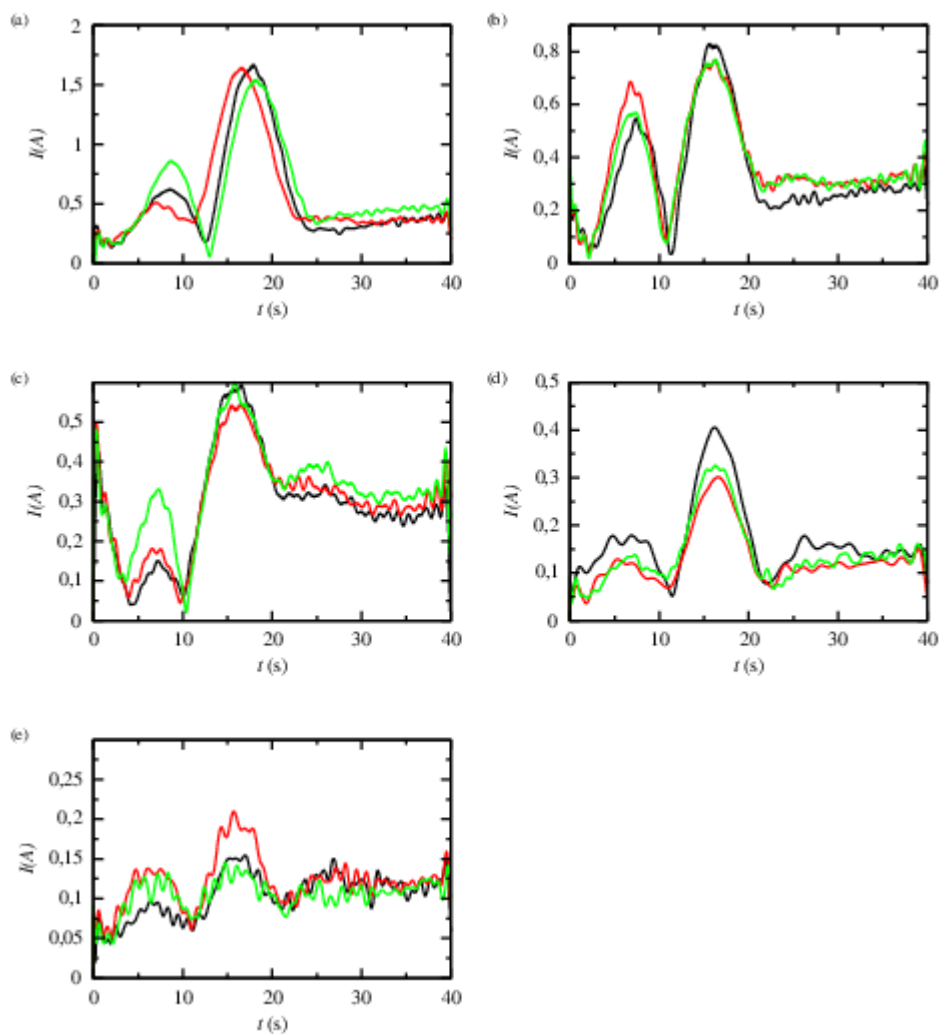


Σχήμα 29: Σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα αναπαράσταση επινεφρίνης για διαφορετικές συχνότητες. Το (a) αντιστοιχεί σε 3 Hz, το (b) σε 4 Hz, το γράφημα (c) σε 5 Hz, το (d) σε 6 Hz, το (e) σε 7 Hz και το (f) σε 8 Hz



Σχήμα 30: Σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα αναπαράσταση επινεφρίνης για διαφορετικές συχνότητες. Το (a) αντιστοιχεί σε 9 Hz και το (b) σε 10 Hz. Το γράφημα (c) αναπαριστά το σύνολο των διαφορετικών συχνοτήτων. Η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί σε 3 Hz, η κόκκινη σε 4 Hz, η πράσινη σε 5 Hz, η μπλε σε 6 Hz, η κίτρινη σε 7 Hz, η καφέ σε 8 Hz, η γκρι σε 9 Hz και η μωβ σε 10 Hz

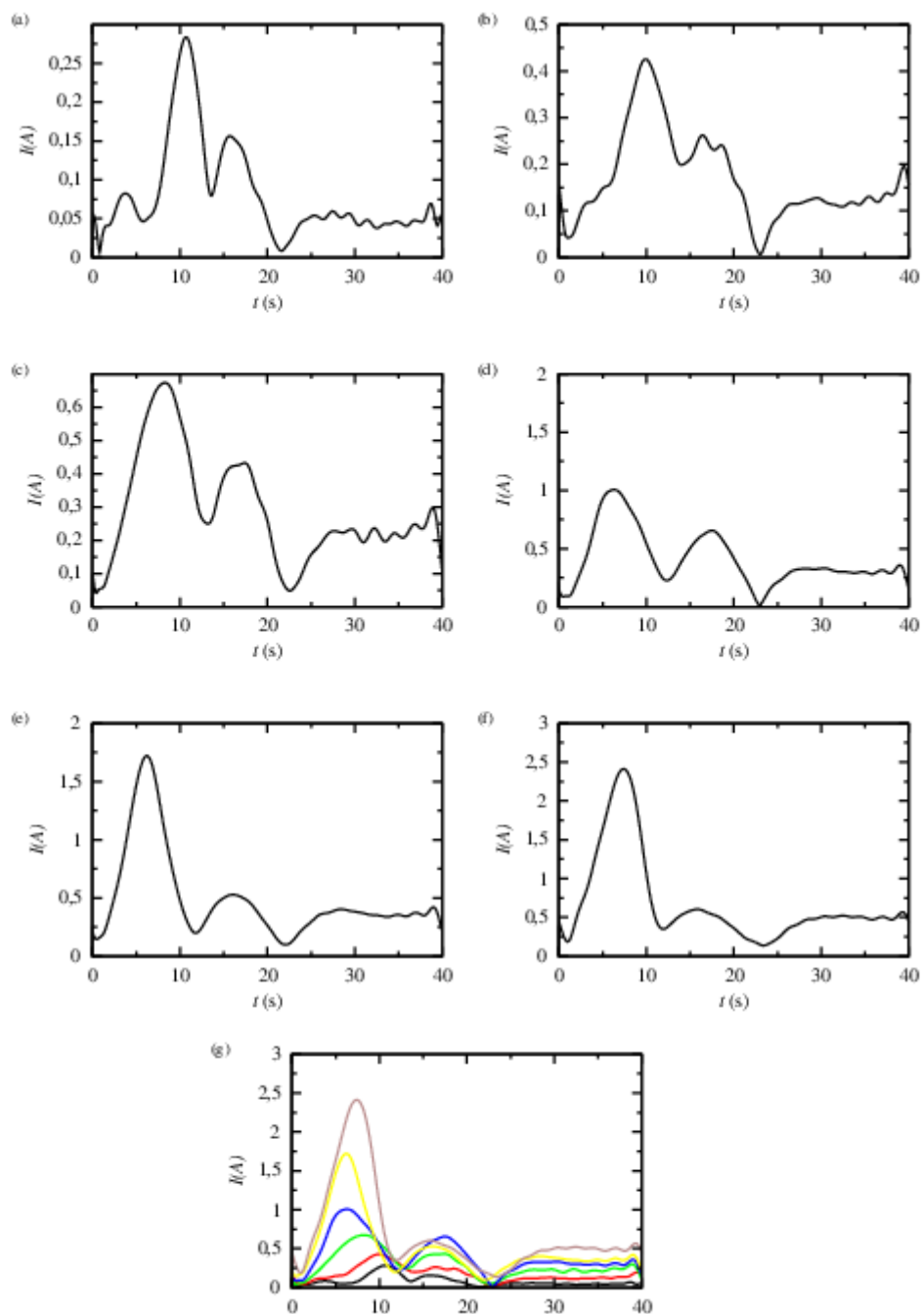




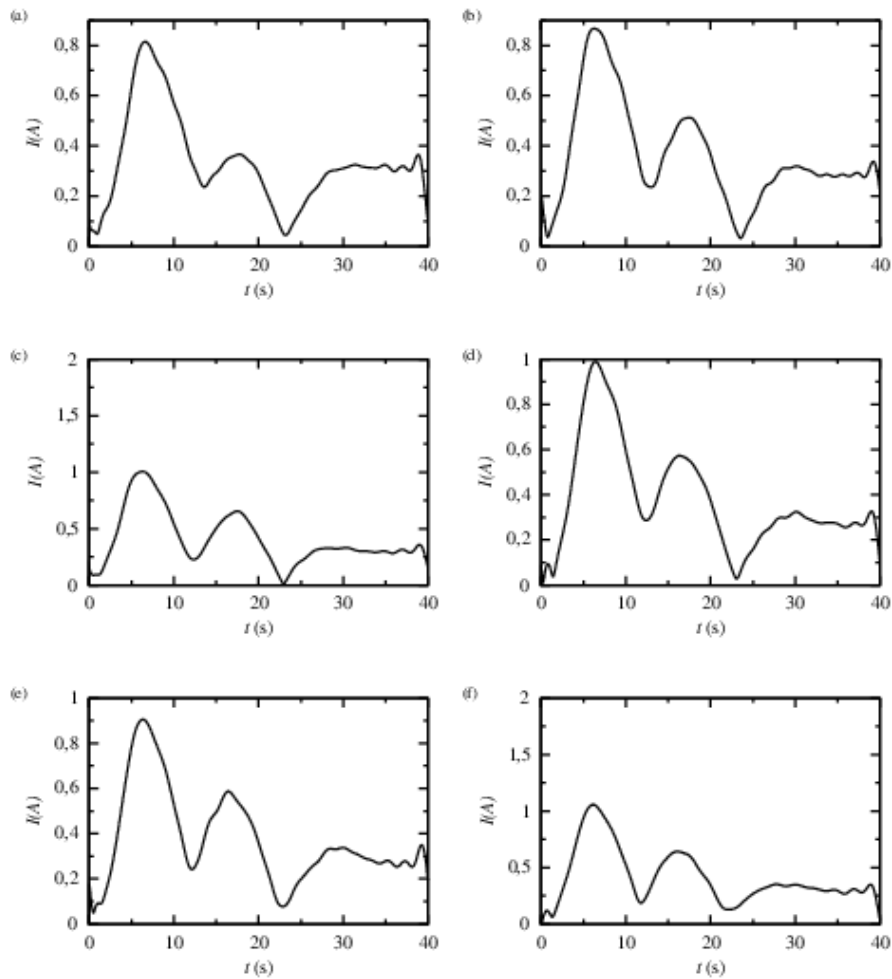
Σχήμα 31: Τρίτη αρμονική για  $A$  250 mV και  $f$  10 Hz και  $v$  20 mV/s Το (a) αντιστοιχεί σε 0.25 mM, το (b) σε 0.1 mM, το (c) σε 0.075 mM, το (d) σε 0.05 mM και το (e) σε 0.01 mM

Φαίνεται πως το όριο ανίχνευσης μπορεί να φτάσει αρκετά χαμηλά, δίνοντας σχετικά ευκρινή σήματα. Με βάση λοιπόν όλα τα παραπάνω γραφήματα, η επινεφρίνη δίνει πολύ καλό σήμα για το ηλεκτρόδιο του υαλώδους άνθρακα, τόσο με CV, όσο και με LA-FTacV, και ειδικά με συνθήκες 10 Hz και 250 mV για την συγκεκριμένη μέθοδο τα σήματα που είναι ανιχνεύσιμα αντιστοιχούν ακόμη και σε 0,01 mM στους 25 °C. Για τους 50 °C ακολουθούν τα αντίστοιχα διαγράμματα.

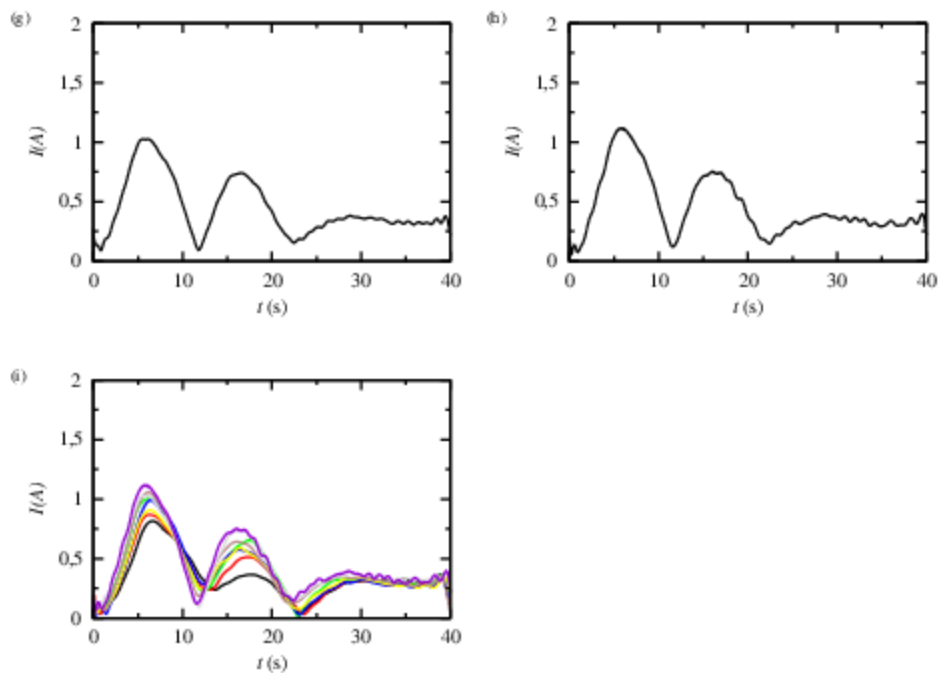
Κατ' αντιστοιχία με τα πειράματα για τους 25 °C, και σε αυτή την περίπτωση επιλέγεται αρχικά το πλάτος ταλάντωσης. Ικανοποιητικά αποτελέσματα λαμβάνονται για τα 225, 250 και 300 mV, όποτε επιλέγεται το μικρότερο από τα τρία σαν τιμή, δηλαδή τα 225 mV, για να συνεχιστούν οι μετρήσεις για τις κλιμακούμενες συχνότητες.



Σχήμα 32 : Για ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα αναπαράσταση τρίτης αρμονικής επινεφρίνης, διαφορετικά πλάτη ταλάντωσης στους 50 °C. Το (a) αντιστοιχεί σε  $A = 100$  mV, το (b) σε  $A = 150$  mV, το γράφημα (c) σε  $A = 200$  mV, το (d) σε  $A = 225$  mV, το (e) σε  $A = 250$  mV και το (f) σε  $A = 300$  mV. Το (g) αναπαριστά όλα τα γραφήματα σε ένα. Η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί σε  $A = 100$  mV, η κόκκινη σε  $A = 120$  mV, η πράσινη σε  $A = 200$  mV, η μπλε σε  $A = 225$  mV, η κίτρινη σε  $A = 250$  mV και η καφέ σε  $A = 300$  mV.

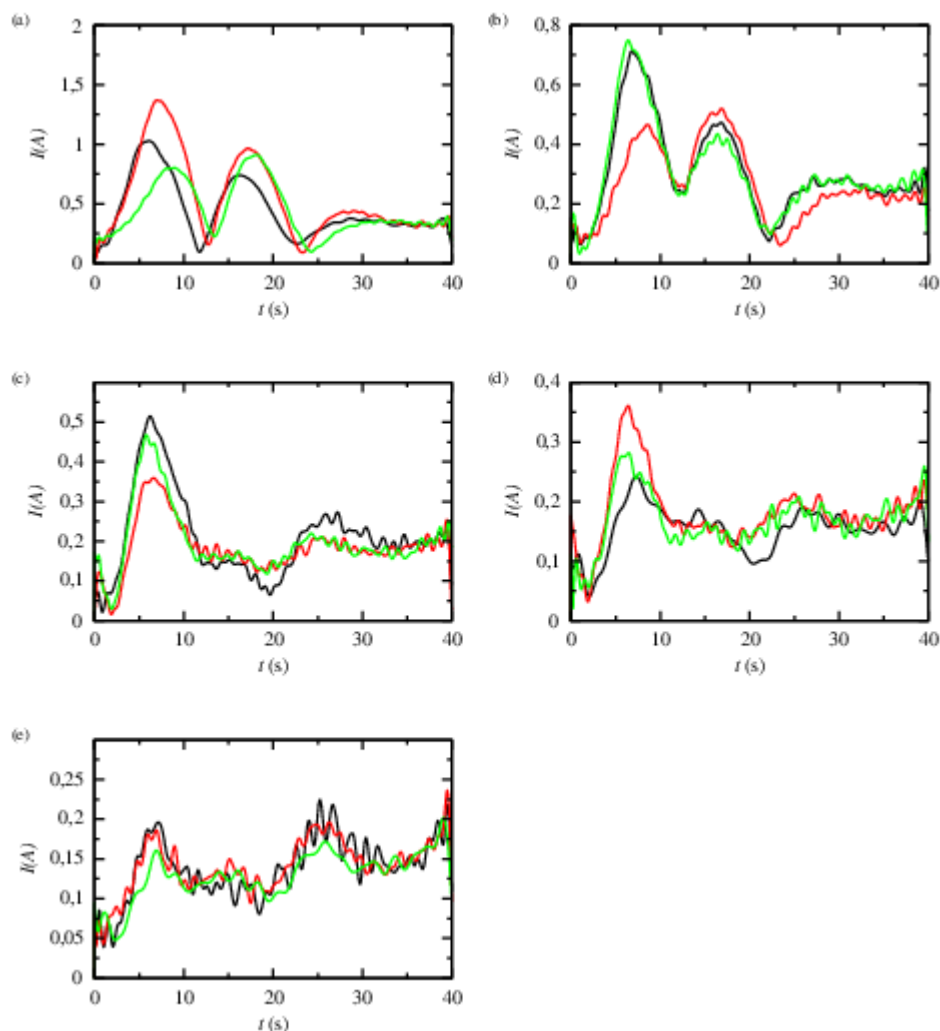


Σχήμα 33: Σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα αναπαράσταση τρίτης αρμονικής επινεφρίνης για διαφορετικές συχνότητες στους 50 °C. Το (a) αντιστοιχεί σε 3 Hz , το (b) σε 4 Hz, το γράφημα (c) σε 5 Hz, το (d) σε 6 Hz, το (e) σε 7 Hz και το (f) σε 8 Hz.



Σχήμα 34 : Σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα αναπαράσταση τρίτης αρμονικής επινεφρίνης για διαφορετικές συχνότητες στους 50 °C. Το (g) αντιστοιχεί σε 9 Hz και το (h) σε 10 Hz. Το γράφημα (i) αναπαριστά το σύνολο των διαφορετικών συχνοτήτων. Η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί σε 3 Hz, η κόκκινη σε 4 Hz, η πράσινη σε 5 Hz, η μπλε σε 6 Hz, η κίτρινη σε 7 Hz, η καφέ σε 8 Hz, η γκρι σε 9 Hz και η μωβ σε 10 Hz.

Φαίνεται πως όλες οι μεγαλύτερες συχνότητες δίνουν παρεμφερή αποτελέσματα, οπότε σαν συχνότητα αναφοράς επιλέγονται τα 9 Hz. Σχετικά με τις χαμηλές συγκεντρώσεις για 9 Hz και 225 mV τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 39.



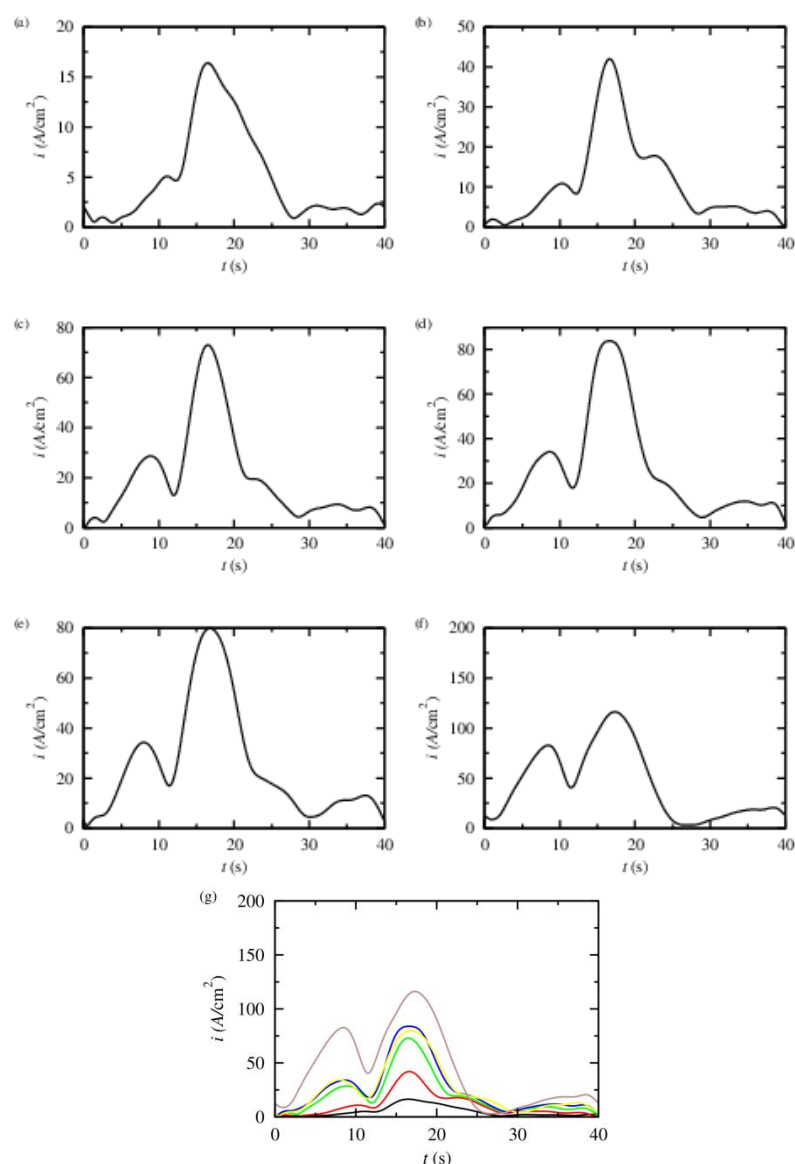
Σχήμα 35: Τρίτη αρμονική για  $A$  225 mV και  $f$  9 Hz και  $v$  20 mV/s σε υαλώδη άνθρακα στους 50 °C. Το (a) αντιστοιχεί σε 0.25 mM, το (b) σε 0.1, το (c) σε 0.075, το (d) σε 0.05 και το (e) σε 0.01.

Φαίνεται πως το όριο ανίχνευσης είναι το ίδιο αξιόλογο, ανεξάρτητα της θερμοκρασίας. Παρ' όλα αυτά φαίνεται να ενισχύεται παράπλευρη δράση στη συγκεκριμένη θερμοκρασία, μιας και η πρώτη κορυφή που συναντάται στα αριστερά των γραφημάτων φαίνεται να ενισχύεται σε όλες τις σειρές πειραμάτων για μεγαλύτερη θερμοκρασία. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε αντίδραση του οξυγόνου, μιας και σε αυτή τη φάση το σύστημα δεν είναι απαερωμένο, ενώ γίνονται δύο δράσεις από το ίδιο το μόριο της επινεφρίνης, με συνέπεια να χάνεται η κανονικότητα. Η συγκεκριμένη εργασία δεν αποσκοπεί στην μελέτη συγκεκριμένα της επινεφρίνης και του μηχανισμού της, αλλά στην ηλεκτροανλυτική της

ανίχνευση, οπότε τα όρια που επιλέγονται είναι αυτά στα οποία το σήμα είναι πιο εύκολα διαχειρίσιμο.

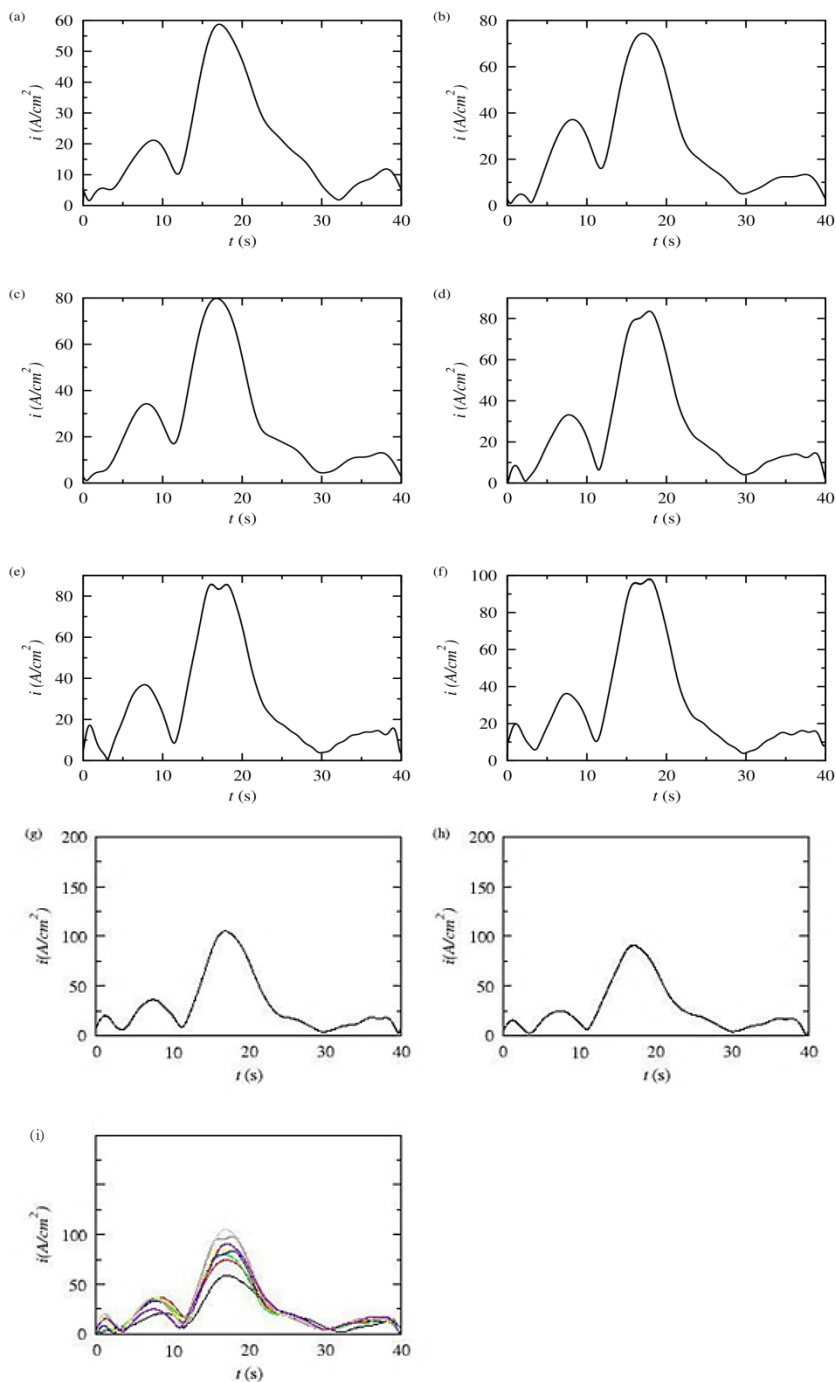
Ανάλυση της επινεφρίνης έγινε και με το ηλεκτρόδιο του πυρολυτικού άνθρακα. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε είναι κοινή και οι συνθήκες που χρησιμοποιήθηκαν ίδιες, με συμπληρωματικές μετρήσεις για το όριο ανίχνευσης, όπου η συγκέντρωση πήρε επιπλέον τιμές 0,0075, 0,005, 0,0025 και 0,001 mM. Για τον πυρολυτικό άνθρακα δεν έγιναν πειράματα στους 50 °C, μιας και φάνηκε από τον υαλώδη άνθρακα πως δεν ήταν απαραίτητο.

Για τον πυρολυτικό άνθρακα και το πρώτο σετ μετρήσεων για τα πλάτη ταλάντωσης στους 25 °C στο Σχήμα 36.



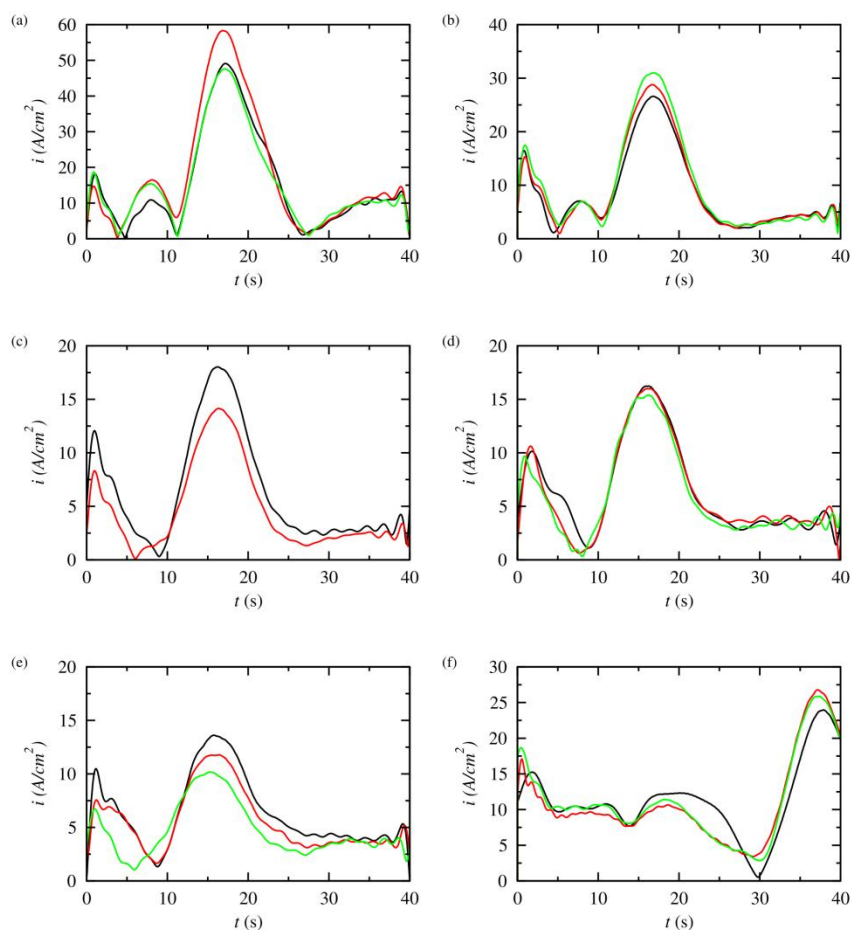
Σχήμα 36: Για ηλεκτρόδιο πυρολυτικού άνθρακα αναπαράσταση επινεφρίνης, διαφορετικά πλάτη ταλάντωσης με απεικόνιση τρίτης αρμονικής. Το (a) αντιστοιχεί σε A 100 mV, το (b) σε A 150 mV, το γράφημα (c) σε 200 mV, το (d) σε 225 mV, το (e) σε 250 mV και το (f) σε 300 mV. Το (g) αναπαριστά όλα τα γραφήματα σε ένα. Η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί σε A 100 mV, η κόκκινη σε A 120 mV, η πράσινη σε A 200 mV, η μπλε σε A 225 mV, η κίτρινη σε A 250 mV και η καφέ σε A 300 mV.

Όπως και στην πάνω περίπτωση με τον υαλώδη άνθρακα, έτσι και με τον πυρολυτικό, για τα μεγάλα πλάτη ταλάντωσης τα αποτελέσματα είναι αξιόλογα. Για τους ίδιους λόγους, επιλέγεται και σε αυτή τη φάση η μέση λύση, τα 250 mV, για την συνέχεια των πειραμάτων. Οι διαφορετικές συχνότητες παρουσιάζονται στο Σχήμα 41:

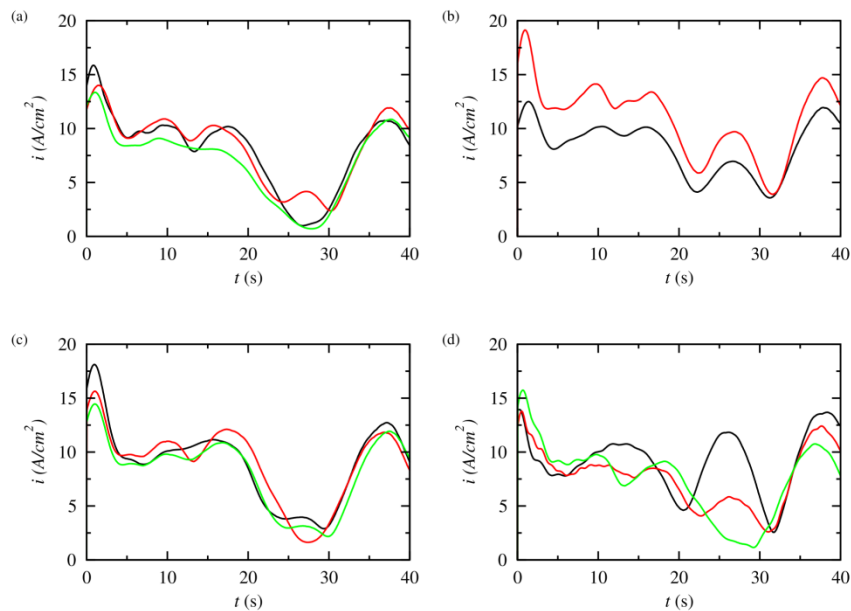


Σχήμα 37: Σε ηλεκτρόδιο πυρολυτικού άνθρακα αναπαράσταση επινεφρίνης για διαφορετικές συχνότητες. Το (a) αντιστοιχεί σε 3 Hz , το (b) σε 4 Hz, το γράφημα (c) σε 5 Hz, το (d) σε 6 Hz, το (e) σε 7 Hz, το (f) σε 8 Hz, το (g) αντιστοιχεί σε 9 Hz και το (h) σε 10 Hz. Το γράφημα (i) αναπαριστά το σύνολο των διαφορετικών συχνοτήτων. Η μαύρη γραμμή αντιστοιχεί σε 3 Hz, η κόκκινη σε 4 Hz, η πράσινη σε 5 Hz, η μπλε σε 6 Hz, η κίτρινη σε 7 Hz, η καφέ σε 8 Hz, η γκρι σε 9 Hz και η μωβ σε 10 Hz.

Και για τον πυρολυτικό άνθρακα επιλέγονται τα 9 Hz, όπως και στον υαλώδη άνθρακα. Παρατηρείται μοτίβο όσων αφορά την συμπεριφορά των δύο ηλεκτροδίων που έχουν σαν βάση τον άνθρακα και για τις δύο ουσίες που μελετήθηκαν, το ένζυμο και την επινεφρίνη. Επιπλέον ακολουθούν τα γραφήματα, που σχετίζονται με το όριο ανίχνευσης.



Σχήμα 38 : Τρίτη αρμονική επινεφρίνης για  $f$  9 Hz,  $A$  250 mV και  $v$  20 mV/s. Το (a) αντιστοιχεί σε 0.25 mM, το (b) σε 0.1 mM, το (c) σε 0.075 mM, το (d) σε 0.05 mM και το (e) σε 0.025 mM και το (f) 0.01 mM

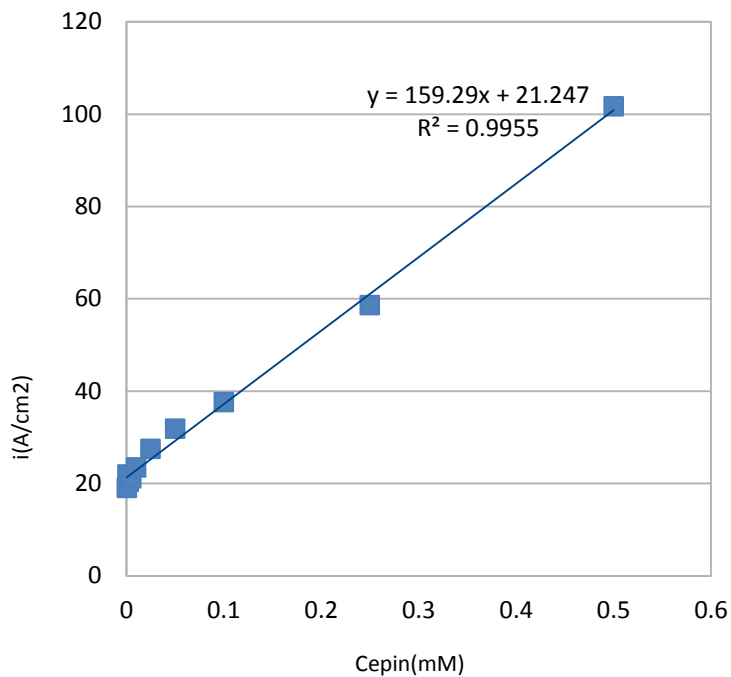


Σχήμα 39: Τρίτη αρμονική επινεφρίνης για  $f$  9 Hz,  $A$  250 mV και  $v$  20 mV/s. . Το (a) αντιστοιχεί σε 0.0075 mM, το (b) σε 0.005 mM, το (c) σε 0.0025 mM και το (d) σε 0.001 mM.

Παρατηρείται πως και για πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις από αυτές που μελετώνται στον υαλώδη άνθρακα, το σήμα που λαμβάνεται είναι ανιχνεύσιμο, και μάλιστα σε πολύ ικανοποιητικό βαθμό.

Σημειώνεται πως για τον πυρολυτικό άνθρακα και την επιφάνεια που έχει ήδη υπολογιστεί παραπάνω, όλα τα διαγράμματα που έχουν γίνει, είναι για πυκνότητα ρεύματος και πως απεικονίζεται μόνο το πρώτο μέρος του πειράματος της οξείδωσης της επινεφρίνης, αφού αυτό θα μελετηθεί και στην συνέχεια, με παρουσία του ενζύμου. Επίσης δεν έγινε προσπάθεια για μελέτη και εύρεση του  $E^{0'}$  της επινεφρίνης, μιας και αυτή έχει μηχανισμό με δύο δράσεις και επομένως απαιτείται συνδυασμός και μοντελοποίηση και των δύο για να εξαχθεί αποτέλεσμα, κάτι το οποίο δεν αφορά την παρούσα εργασία.





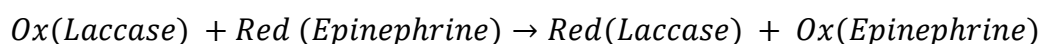
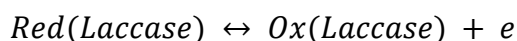
Σχήμα 40: Σχέση έντασης πυκνότητας ρεύματος ως προς συγκέντρωση επινεφρίνης για τρίτη αρμονική  $f$  9 Hz,  $A$  250 mV και  $v$  20 mV/s

Στο Σχήμα 44 παρουσιάζεται η σχέση έντασης πυκνότητας ρεύματος ως προς συγκέντρωση επινεφρίνης για τρίτη αρμονική  $f$  9 Hz,  $A$  250 mV και  $v$  20 mV/s. Παρατηρείται γραμμική σχέση με συγκέντρωση και η ανιχνεύσιμη συγκέντρωση φτάνει μέχρι τα 10  $\mu$ M. Σε πιο χαμηλές συγκεντρώσεις, τα σήματα που λαμβάνονται δεν είναι αξιοποιήσιμα όπως αυτά φαίνονται στα Σχήματα 38 και 39.

## Σύστημα Ακίνητοποιημένου Ενζύμου-Επινεφρίνης

Αφού τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν, διαπιστώθηκε ότι καλύτερη συνολικά συμπεριφορά έχουν οι μελετώμενες ουσίες με τον πυρολυτικό άνθρακα. Το σήμα που λαμβάνεται είναι καλό και για αρμονικές ανώτερες της τρίτης, ενώ ελαχιστοποιείται ο θόρυβος και η επίδραση αυτού στο σύστημα. Με δεδομένο αυτό, τα πειράματα συνεχίζονται μόνο με αυτό το ηλεκτρόδιο.

Η αντίδραση που θα λάβει χώρα είναι αυτή της οξειδωσης του μορίου της επινεφρίνης από το ένζυμο και είναι ενός ηλεκτρονίου. Το ίδιο το ένζυμο βρίσκεται ακίνητοποιημένο με Nafion πάνω στο ηλεκτρόδιο. Αρχικά πραγματοποιείται πόλωση σε δυναμικό αρνητικότερο του πρότυπου δυναμικού του ενζύμου, ώστε να αναχθεί όλη η ποσότητα που βρίσκεται πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Στη συνέχεια, κατά την ανοδική σάρωση του δυναμικού, το ακίνητοποιημένο ένζυμο αρχίζει να οξειδώνεται δίνοντας ηλεκτρόνια στο ηλεκτρόδιο. Καθώς το ένζυμο οξειδώνεται, αντιδρά με την επινεφρίνη που είναι σε ανηγμένη μορφή μέσα στο διάλυμα. Η αλληλουχία δράσεων που παρατηρείται από την έναρξη της σάρωσης του δυναμικού και μετά είναι:



Παρατηρείται πως τελικά ξαναπροκύπτει η ανηγμένη μορφή του ενζύμου. Με αύξηση της συγκέντρωσης της επινεφρίνης μέσα στο διάλυμα παρατηρείται και αύξηση της έντασης των κορυφών από την θεωρία, μέχρι μια συγκεκριμένη τιμή υποστρώματος. Αυτή η αύξηση των κορυφών μελετάται και από το σύστημα.

Σε πρώτη φάση το σύστημα μελετάται αναγνωριστικά και γίνονται μετρήσεις για αρχικό όγκο ρυθμιστικού 20 ml, αναλογία ενζύμου-ακίνητοποιητή:10-1,  $f$  2 Hz,  $A$  300 mV,  $v$  20 mV/s,  $E_{\text{initial}}$  -300 mV και  $E_{\text{final}}$  600 mV. Έγιναν μετρήσεις για αρχική συγκέντρωση διαλύματος επινεφρίνης 0,5 mM και αραιώσης αυτού 1/10, 1/100 και 1/200. Αρχικά, γίνεται η ακίνητοποίηση του ενζύμου πάνω στο ηλεκτρόδιο. Με έτοιμο πλέον το ηλεκτρόδιο, γίνεται απαέρωση του συστήματος με αέριο  $N_2$  για πέντε λεπτά, ώστε να μην υπάρχει οξυγόνο στο σύστημα. Αφού περάσει αυτή η χρονική διάρκεια, το σύστημα πολώνεται για μερικά δευτερόλεπτα και στη συνέχεια ακολουθεί τυφλό πείραμα. Στη συνέχεια γίνονται διαδοχικές προσθήκες διαλύματος επινεφρίνης ώστε κάθε φορά να γίνεται μέτρηση με συνολικό όγκο επινεφρίνης στο σύστημα ίσο με 0.5, 1, 1.5, 2, 3, 4, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 και 45  $\mu$ l. Λαμβάνονται αξιόλογα αποτελέσματα και για την αραιώση 1/200, οπότε η ανάλυση συνεχίζει με αυτή.

Το πείραμα αυτό συνεχίζεται με την παραλλαγή της μεταβλητής της συχνότητας. Όλες οι παράμετροι είναι σταθερές και η πορεία του συστήματος παραμένει η ίδια, με την συχνότητα κάθε φορά να λαμβάνει τιμή 1, 1.25, 1.5 και

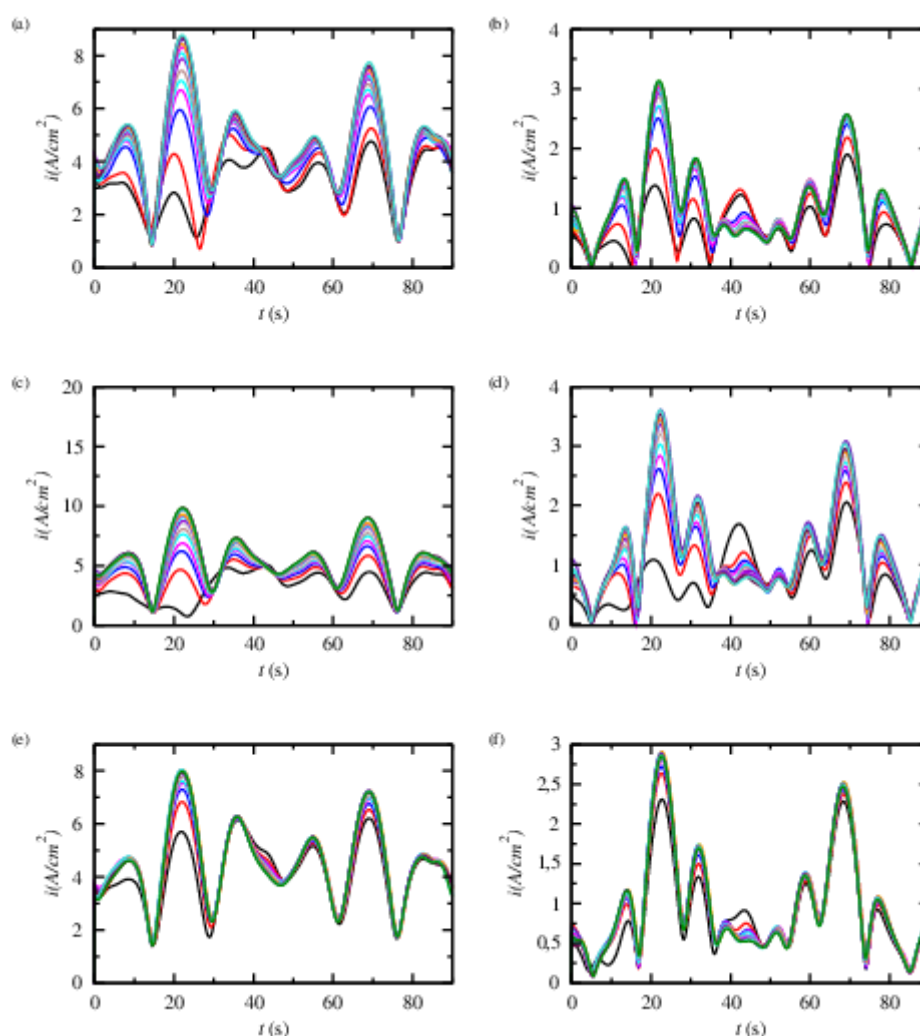
1.75. Γίνεται μελέτη των αποτελεσμάτων και επιλέγεται η τιμή της συχνότητας με την οποία θα συνεχιστούν τα πειράματα σαν βέλτιστη. Στην προκειμένη επιλέγεται η τιμή 1 Hz.

Το πείραμα συνεχίζεται για διαφορετικές θερμοκρασίες, με τρεις ακινητοποιήσεις ανά θερμοκρασία. Οι τιμές που μελετήθηκαν ήταν 30, 35, 40, 45 και 50 °C. Με την επιλογή της βέλτιστης θερμοκρασίας μελετήθηκε και η επιρροή που έχει στο σύστημα το pH, για τιμές αυτού 3, 3.5, 4, 4.5 και 5.

Για τις επιλεγμένες καλύτερες συνθήκες pH και T γίνονται τυφλά πειράματα σε απαερωμένα σύστημα με ακινητοποιημένα ένζυμο, για στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

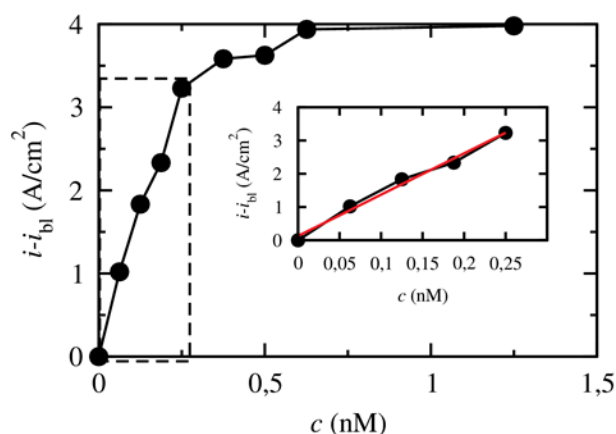
Το μέρος αυτό αφορά τα πειράματα που έγιναν για το σύστημα ακινητοποιημένου ενζύμου με την επινεφρίνη και το πώς μπορεί να γίνει ανίχνευση αυτής, μέσω μελέτης της αύξησης της ποσότητας του ενζύμου.

Για την πρώτη φάση με τις διαφορετικές αραιώσεις, ακολουθεί σχετικό Σχήμα 41.



Σχήμα 41: Σε πυρολυτικό οι προσθήκες για τις διαφορετικές αραιώσεις. Τα γραφήματα (a), (b) αφορούν την αραιώση 1/10, τα γραφήματα (c), (d) την 1/100 και τα (e), (f) την 1/200. Η αριστερή στήλη αφορά την τρίτη αρμονική και η δεξιά την πέμπτη.

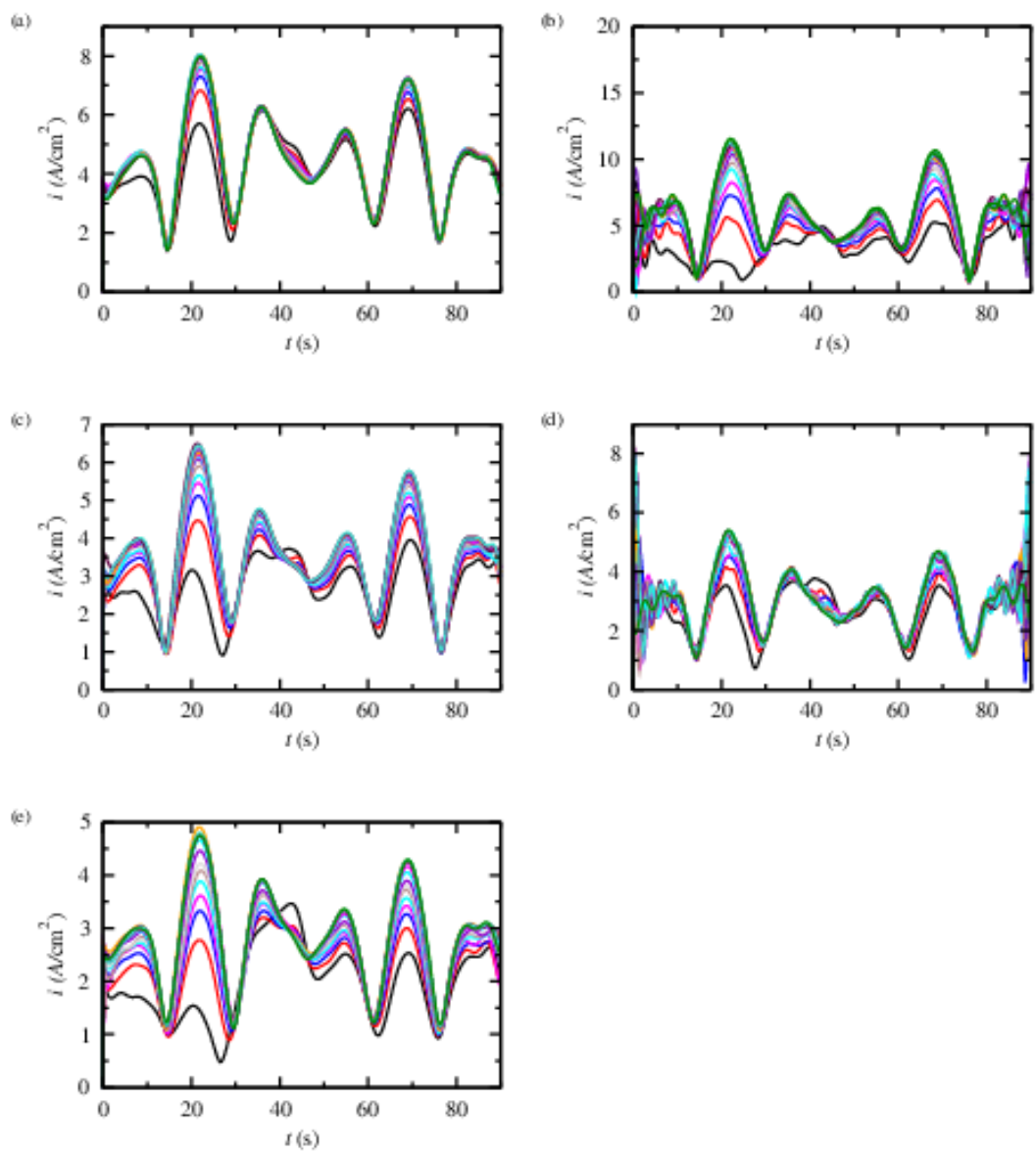
Με βάση το παραπάνω πείραμα προκύπτει το εξής διάγραμμα, στο οποίο απεικονίζεται η σχέση της τιμής της επινεφρίνης που υπάρχει τελικά στο διάλυμα μετά τις προσθήκες με την τιμή της έντασης του ρεύματος που δίνεται από την το μέγιστο των διαγραμμάτων.



Σχήμα 42: Ποσοστό αύξησης πυκνότητας ρεύματος στο σημείο κορεσμού ως προς τη συγκέντρωση.

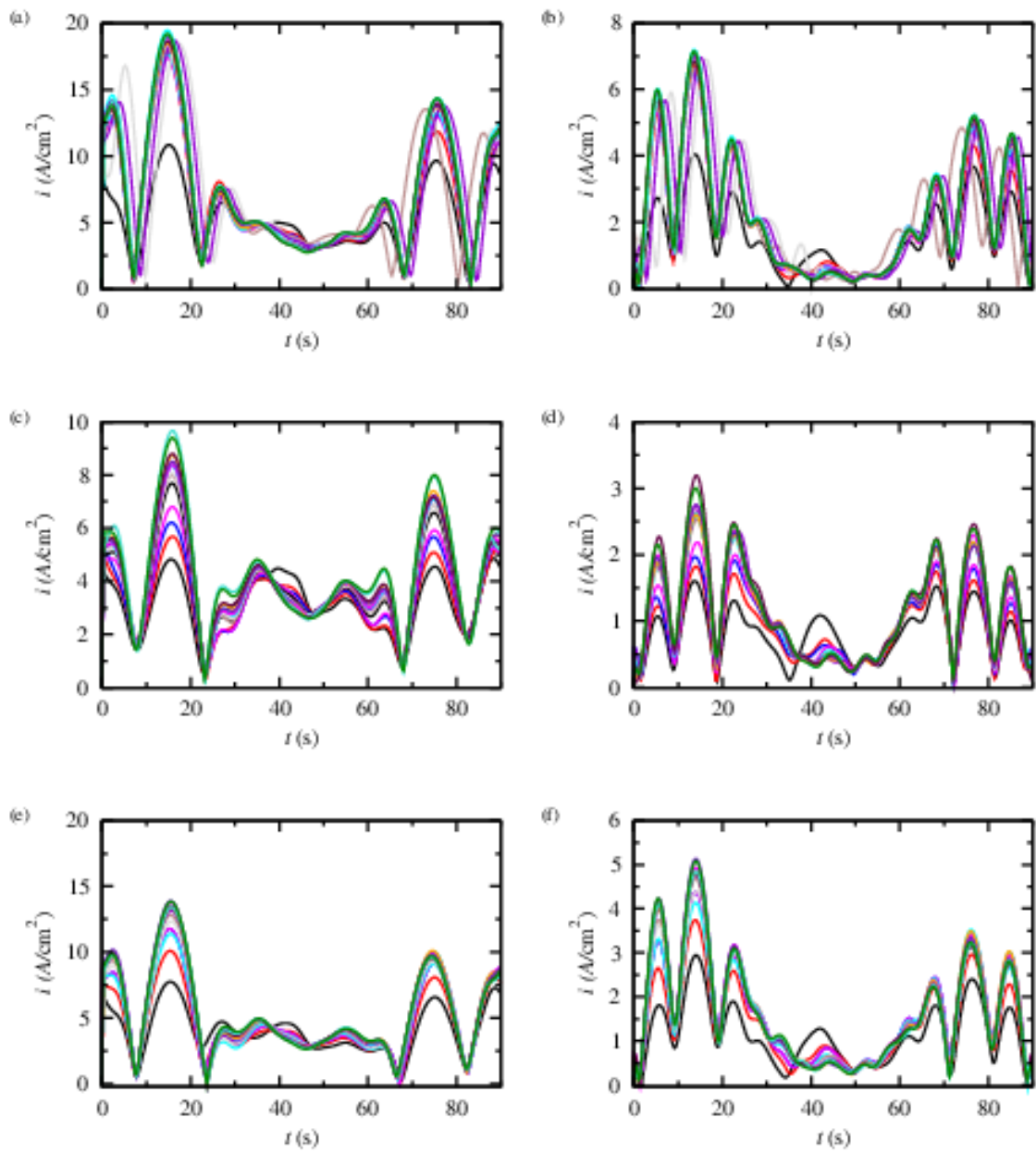
Στο Σχήμα 42 παρουσιάζεται η μεταβολή της πυκνότητας ρεύματος αφαιρώντας την ένταση της κύριας κορυφής του τυφλού από την ένταση της κύριας κορυφής για κάθε συγκέντρωση επινεφρίνης. Οι συγκεντρώσεις που παρουσιάζονται είναι 0, 0.0625, 0.125, 0.188, 0.250, 0.375, 0.500, 0.625 και 1.25 nM. Στο ένθετο σχήμα υπάρχει η γραμμική περιοχή που εκτείνεται από τα 0.0625 έως τα 0.250 nM και ο κορεσμός ξεκινάει για συγκέντρωση 0.625 nM. Η γραμμικότητα που παρατηρείται είναι ικανοποιητική ( $R^2$  0.994) παρά το ότι η περιοχή είναι σχετικά στενή. Ο κορεσμός που εμφανίζεται ήδη σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις υποδηλώνει την ισχυρή συγγένεια του ενζύμου με το υποστρώμα καθώς και την ευαισθησία στον εντοπισμό της δράσης ενός ενζύμου που είναι ακινητοποιημένο σε μία ηλεκτροδιακή επιφάνεια και πραγματοποιείται απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων.

Από την στιγμή που η ποσότητα της επινεφρίνης είναι ανιχνεύσιμη για την αραιώση του αρχικού διαλύματος 1/200, οι μετρήσεις συνεχίζονται με αυτή τη συνθήκη. Παρατηρείται ακόμη πως ήδη για πολύ μικρό όγκο προσθήκης, γρήγορα το σύστημα έρχεται σε κορεσμό, όπως φαίνεται από τα σήματα που από ένα συγκεκριμένο όγκο και έπειτα ταυτίζονται. Ακολουθούν τα σχήματα για τις διάφορες συχνότητες.

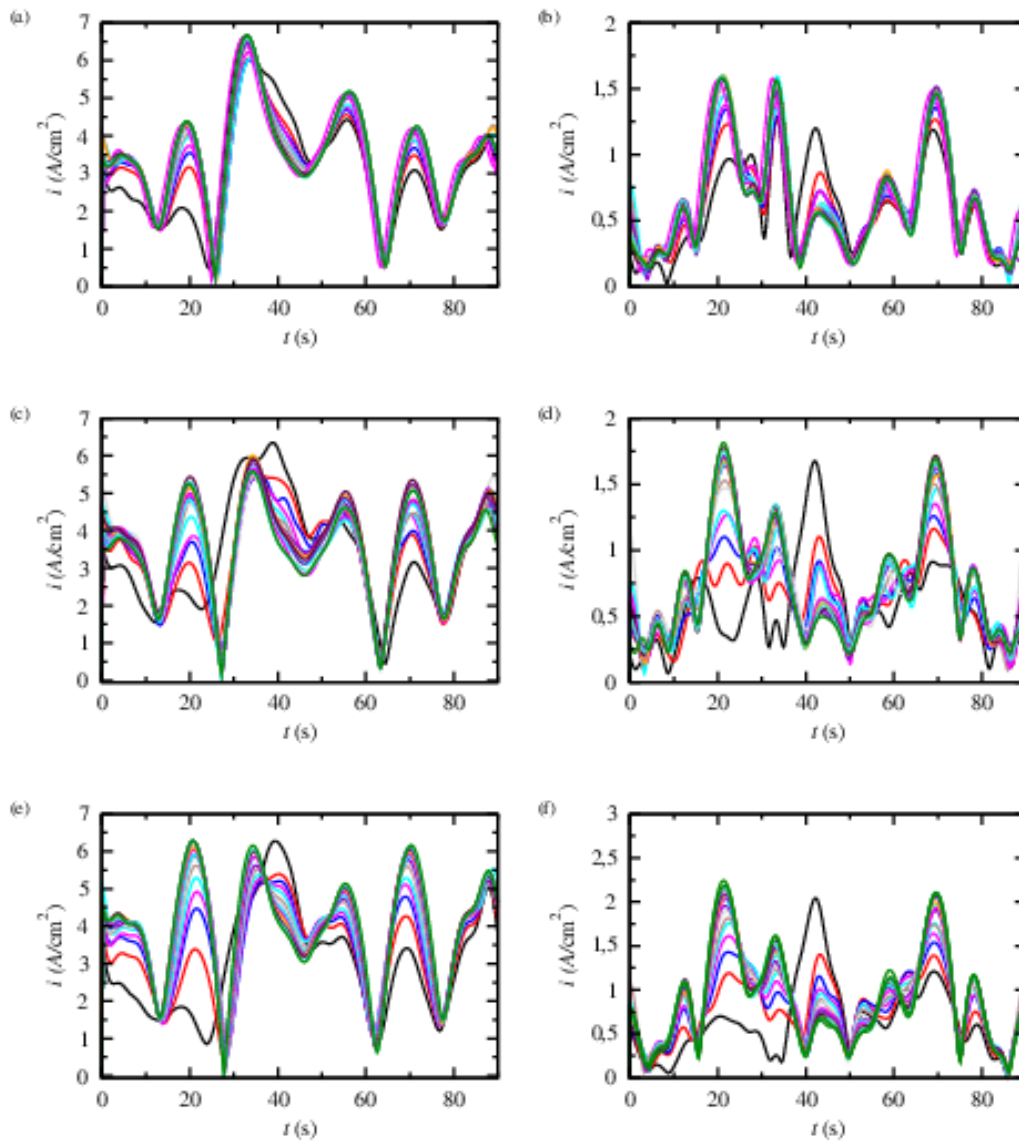


Σχήμα 43: Τα σχήματα όπως προκύπτουν αυτά για διαφορετικές τιμές της συχνότητας. Το (a) είναι για συχνότητα 2 Hz, το (b) για 1.75 Hz, το (c) για 1.5, το (d) για 1.25 Hz και το (e) για 1 Hz.

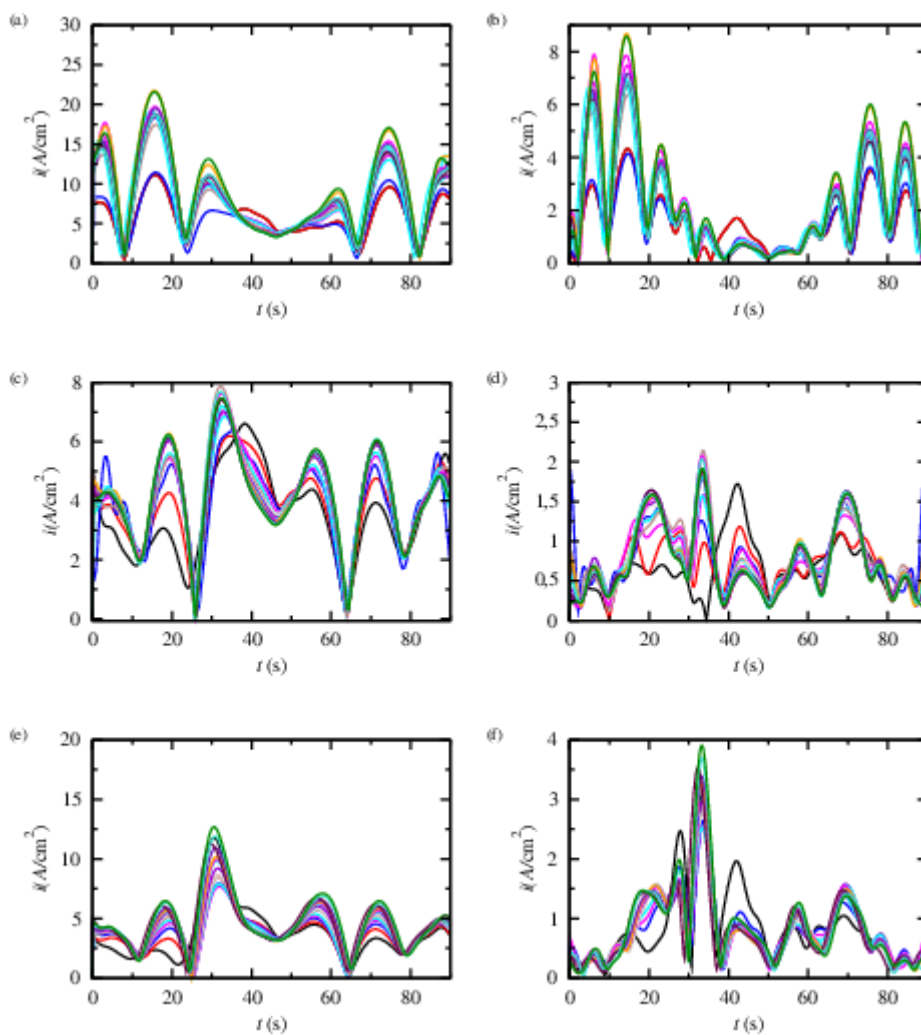
Κατόπιν ανάλυσης των αποτελεσμάτων γίνεται επιλογή της συχνότητας 1 Hz για την συνέχεια των πειραμάτων. Για αυτή την δεδομένη συχνότητα γίνονται πειράματα με τριπλές ακινητοποιήσεις για κάθε τιμή θερμοκρασίας. Ακολουθούν τα σχετικά σχήματα.



Σχήμα 44: Σύστημα επινεφρίνης ενζύμου σε πυρολυτικό άνθρακα για θερμοκρασία 30 °C, το σύστημα για το ακινητοποιημένο ένζυμο με τις προσθήκες της επινεφρίνης. Η αριστερή στήλη απεικονίζει την τρίτη αρμονική και η δεξιά την πέμπτη. Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε διαφορετική ακινητοποίηση στις ίδιες κατα τα άλλα συνθήκες.

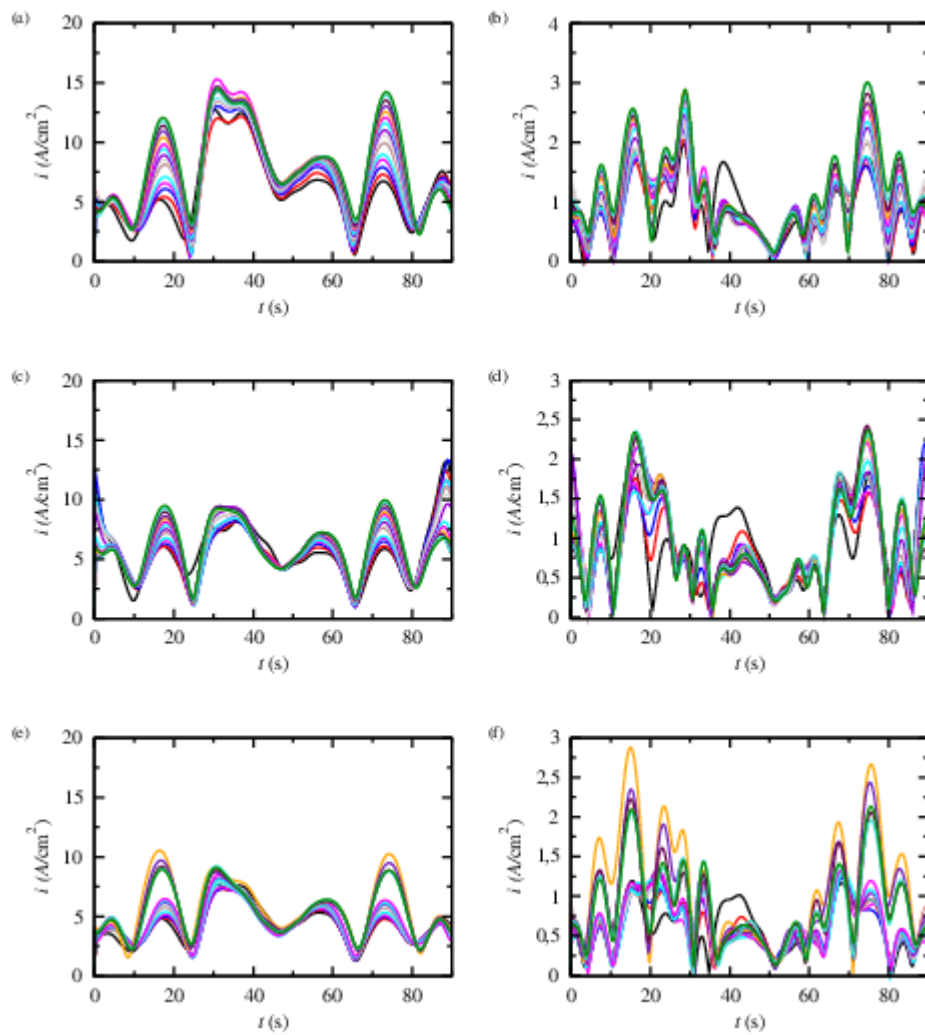


Σχήμα 45: Σύστημα επινεφρίνης ενζύμου σε πυρολυτικό άνθρακα για θερμοκρασία 35 °C, το σύστημα για το ακινητοποιημένο ένζυμο με τις προσθήκες της επινεφρίνης. Η αριστερή στήλη απεικονίζει την τρίτη αρμονική και η δεξιά την πέμπτη. Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε διαφορετική ακινητοποίηση στις ίδιες κατα τα άλλα συνθήκες.

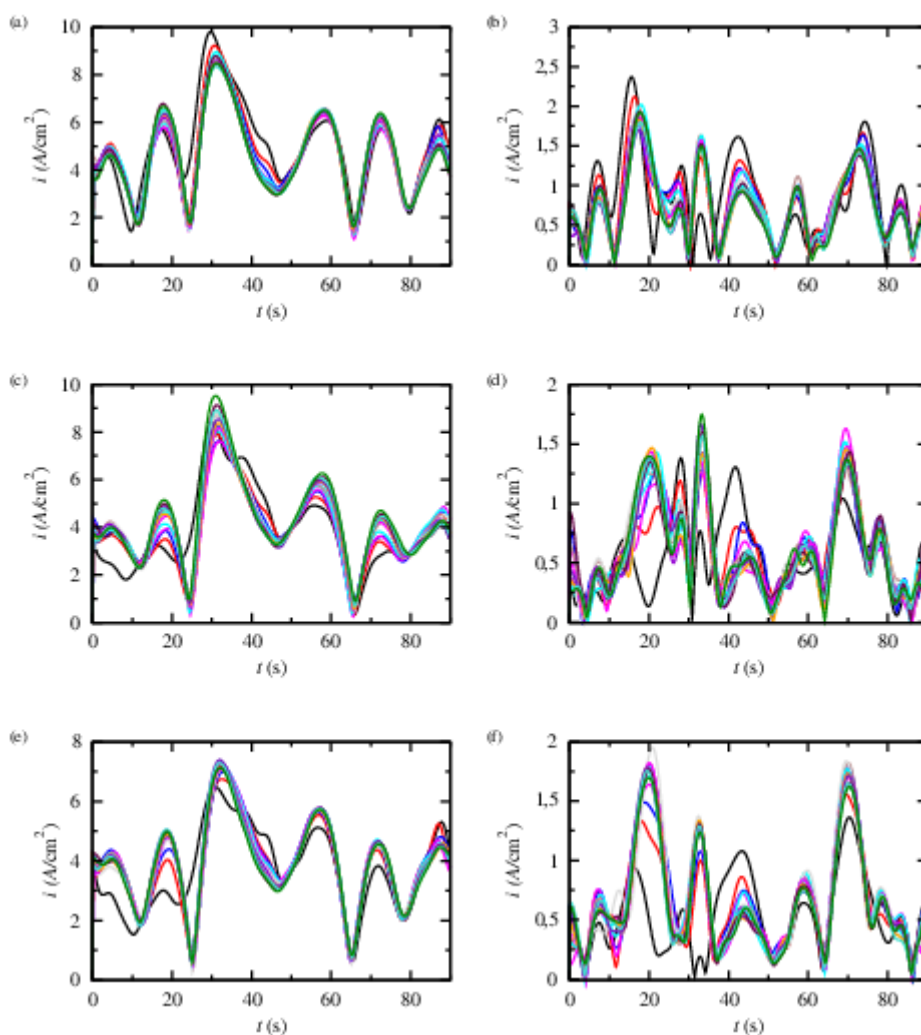


Σχήμα 46: Σύστημα επινεφρίνης ενζύμου σε πυρολυτικό άνθρακα για θερμοκρασία 40 °C, το σύστημα για το ακινητοποιημένο ένζυμο με τις προσθήκες της επινεφρίνης. Η αριστερή στήλη απεικονίζει την τρίτη αρμονική και η δεξιά την πέμπτη. Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε διαφορετική ακινητοποίηση στις ίδιες κατα τα άλλα συνθήκες.



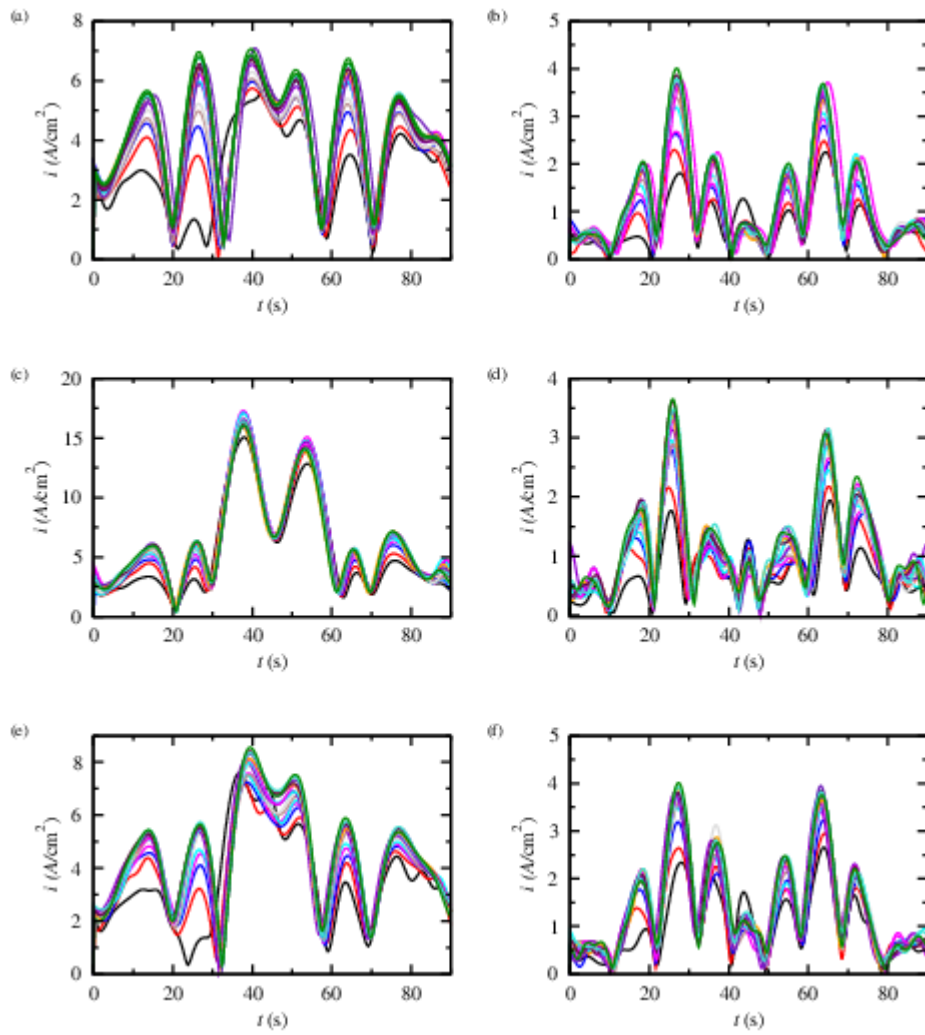


Σχήμα 47: Σύστημα επινεφρίνης ενζύμου σε πυρολυτικό άνθρακα για θερμοκρασία 45 °C, το σύστημα για το ακινητοποιημένο ένζυμο με τις προσθήκες της επινεφρίνης. Η αριστερή στήλη απεικονίζει την τρίτη αρμονική και η δεξιά την πέμπτη. Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε διαφορετική ακινητοποίηση στις ίδιες κατά τα άλλα συνθήκες.

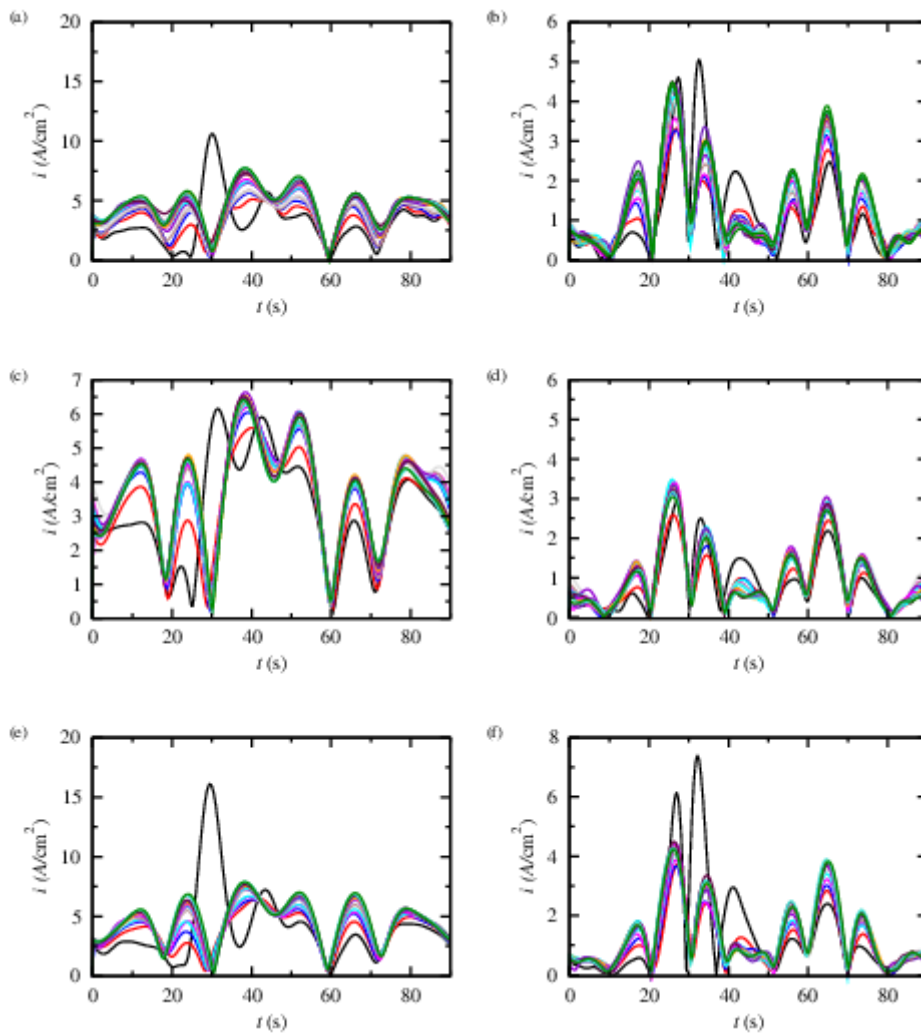


Σχήμα 48: Σύστημα επινεφρίνης ενζύμου σε πυρολυτικό άνθρακα για θερμοκρασία 50 °C, το σύστημα για το ακινητοποιημένο ένζυμο με τις προσθήκες της επινεφρίνης. Η αριστερή στήλη απεικονίζει την τρίτη αρμονική και η δεξιά την πέμπτη. Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε διαφορετική ακινητοποίηση στις ίδιες κατά τα άλλα συνθήκες.

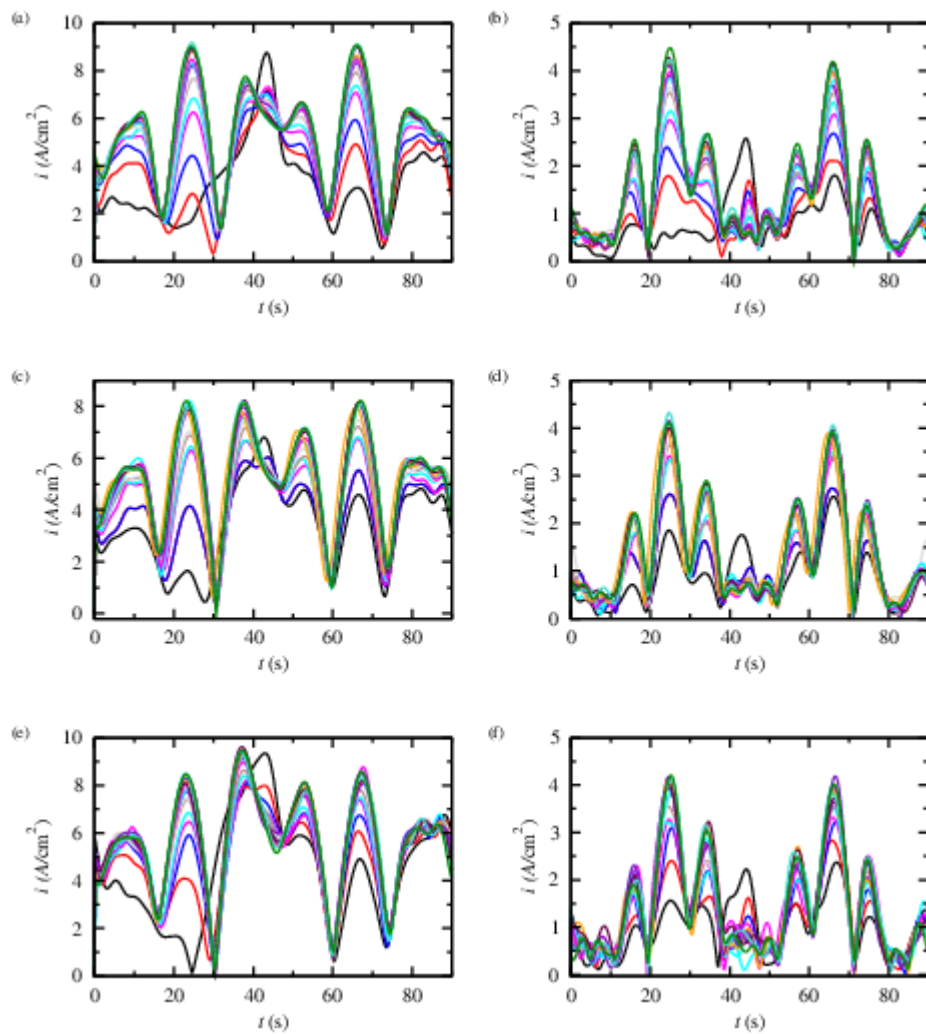
Με βάση τις θερμοκρασίες όπως απεικονίζονται, αλλά και τις αποτέμνουσες όπως προκύπτουν από τα στοιχεία του κάθε γραφήματος, επιλέγεται σαν καλύτερη η θερμοκρασία των 30 °C. Αυτό γιατί φαίνεται το σύστημα να είναι πιο σταθερό σε αυτή τη θερμοκρασία, ενώ παράπλευρες δράσεις, σαν αυτή του οξυγόνου, φαίνεται να ελαχιστοποιούνται, δίνοντας παράλληλα πολύ σαφή εικόνα του συστήματος και καθαρές κορυφές, ακόμη και για την πέμπτη αρμονική. Με δεδομένο αυτό, για διαφορετικά pH, μελετάται η συμπεριφορά του συστήματος στους 30 °C.



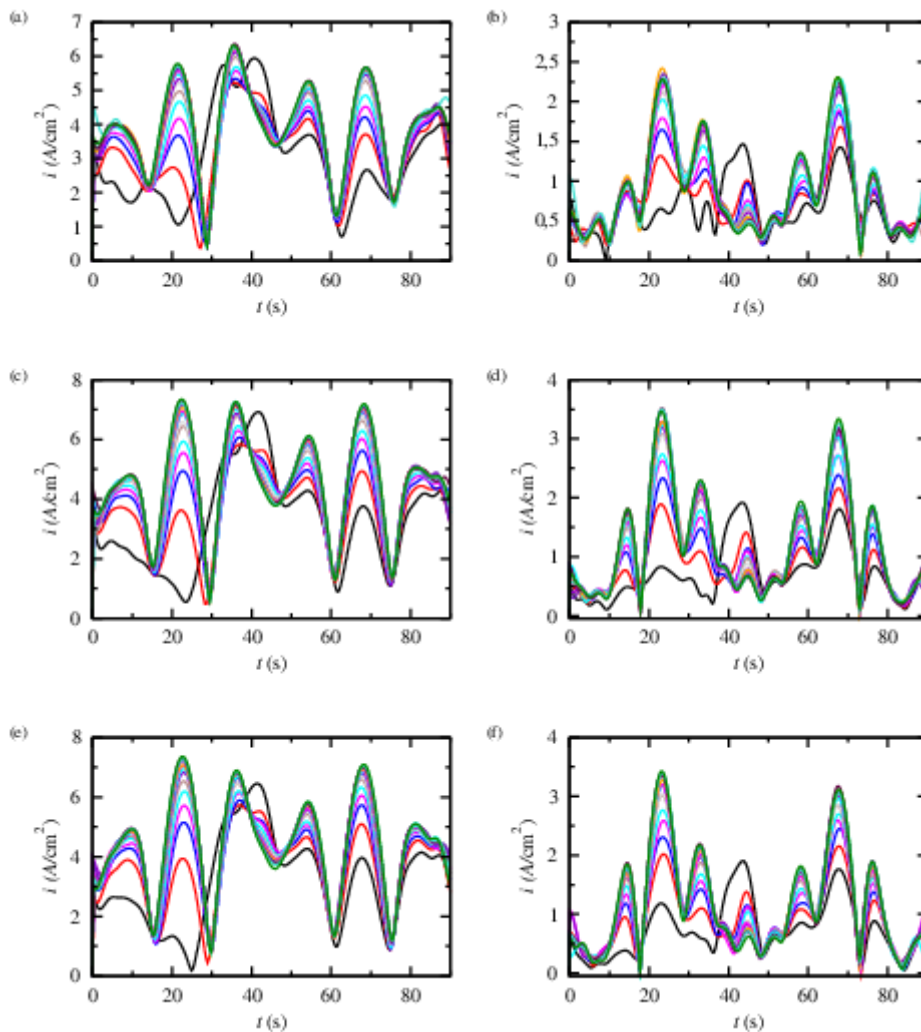
Σχήμα 49: Σύστημα επινεφρίνης ενζύμου σε πυρολυτικό άνθρακα για θερμοκρασία 30 °C και pH 3, το σύστημα για το ακινητοποιημένο ένζυμο με τις προσθήκες της επινεφρίνης. Η αριστερή στήλη απεικονίζει την τρίτη αρμονική και η δεξιά την πέμπτη. Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε διαφορετική ακινητοποίηση στις ίδιες κατά τα άλλα συνθήκες.



Σχήμα 50: Σύστημα επινεφρίνης ενζύμου σε πυρολυτικό άνθρακα για θερμοκρασία 30 °C και pH 3,5, το σύστημα για το ακινητοποιημένο ένζυμο με τις προσθήκες της επινεφρίνης. Η αριστερή στήλη απεικονίζει την τρίτη αρμονική και η δεξιά την πέμπτη. Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε διαφορετική ακινητοποίηση στις ίδιες κατα τα άλλα συνθήκες.



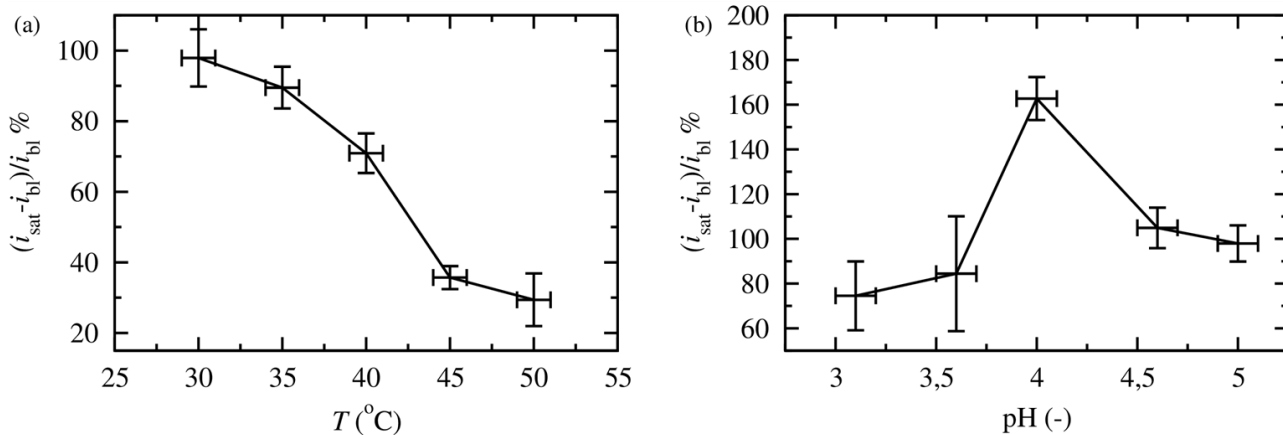
Σχήμα 51: Σύστημα επινεφρίνης ενζύμου σε πυρολυτικό άνθρακα για θερμοκρασία 30 °C και pH 4, το σύστημα για το ακινητοποιημένο ένζυμο με τις προσθήκες της επινεφρίνης. Η αριστερή στήλη απεικονίζει την τρίτη αρμονική και η δεξιά την πέμπτη. Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε διαφορετική ακινητοποίηση στις ίδιες κατά τα άλλα συνθήκες.



Σχήμα 52: Σύστημα επινεφρίνης ενζύμου σε πυρολυτικό άνθρακα για θερμοκρασία 30 °C και pH 4,5, το σύστημα για το ακινητοποιημένο ένζυμο με τις προσθήκες της επινεφρίνης. Η αριστερή στήλη απεικονίζει την τρίτη αρμονική και η δεξιά την πέμπτη. Η κάθε σειρά αντιστοιχεί σε διαφορετική ακινητοποίηση στις ίδιες κατα τα άλλα συνθήκες.

Παρατηρώντας τα παραπάνω σχήματα και θεωρώντας πως το Σχήμα 44 αντιστοιχεί σε pH 5 για την ίδια κατηγορία θερμοκρασίας, παρατηρείται πως για pH 4 επιτυγχάνεται, κατόπιν επεξεργασίας των αποτελεσμάτων, η καλύτερη γραμμικότητα. Έτσι προκύπτει ο καλύτερος συνδυασμός για το σύστημα οι 30 °C και pH 4. Για τη σύγκριση, αυτό που λήφθηκε υπόψιν ήταν η ποσοστιαία μεταβολή της πυκνότητας ρεύματος στο σημείο κορεσμού της αύξησής της ως προς το τυφλό.

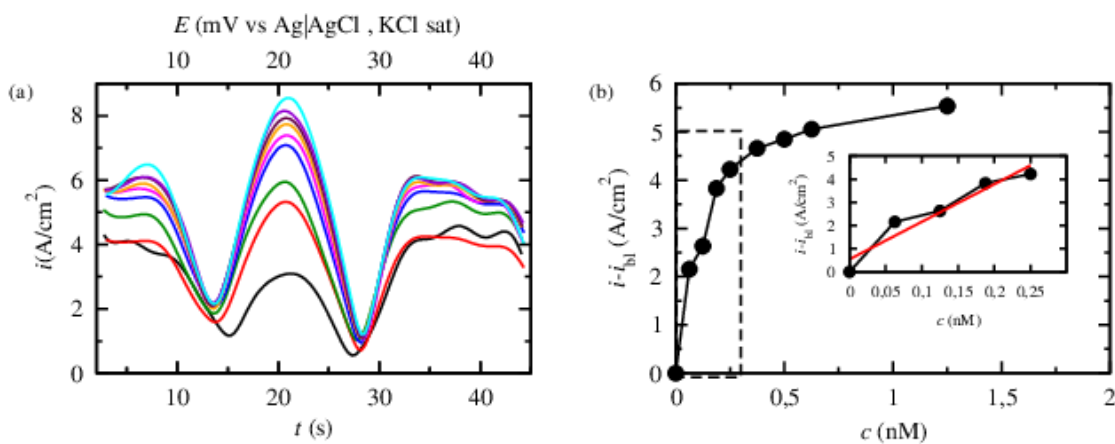
Στο Σχήμα 53 παρουσιάζεται η ποσοστιαία αυτή αύξηση ως προς το pH και ως προς τη θερμοκρασία και βρίσκεται ότι η μέγιστη ποσοστιαία μεταβολή είναι για pH 4 και T 30 °C



Σχήμα 53: Ποσοστό αύξησης πυκνότητας ρεύματος ως προς (α) θερμοκρασία και (β) pH

Στις βέλτιστες συνθήκες τα αποτελέσματα από τα πειράματα παρουσιάζονται στο Σχήμα 54. Οι συγκεντρώσεις που παρουσιάζονται είναι 0, 0.0625, 0.125, 0.188, 0.250, 0.375, 0.500, 0.625 και 1.25 nM. Η γραμμική περιοχή παραμένει από 0.0625 έως 0.250 nM και η ευαισθησία υπολογίζεται από την κλίση της γραμμικής περιοχής ίση με 16.19 A/(cm<sup>2</sup> nM). Το R<sup>2</sup> είναι 0.996. Η εξίσωση τελικά έχει την μορφή:

$$y = 16.19x + 0.012$$



Σχήμα 54: Για pH 4, T 30 °C, f 5 Hz, v 20 mV/s, A 200 mV για διαφορετικές συγκεντρώσεις επινεφρίνης: 0 (μαύρο), 0.0625 (κόκκινο), 0.125 (πράσινο), 0.188 (μπλε), 0.250 (ματζέντα), 0.375 πορτοκαλί, 0.500 (καφέ), 0.625 (μωβ), 1.25 nM (κυανό) (β) Ποσοστό αύξησης πυκνότητας ρεύματος σε σημείο κορεσμού ως προς τη συγκέντρωση

Ήδη διαπιστώθηκε πως η γραμμική περιοχή δεν είναι ιδιαίτερα μεγάλη, παρ' όλα αυτά, για την επινεφρίνη και τις ποσότητες της που μελετούνται στην παρούσα εργασία, με χρήση της μεθόδου αυτής παρατηρείται μεγάλη ευαισθησία και το όριο ανίχνευσης της ουσίας είναι πολύ μικρό, όπως θα αναλυθεί και παρακάτω. Όλα αυτά χαρακτηρίζονται ως προτερήματα της μεθόδου, μιας και τόσο μικρές ποσότητες μπορούν να ανιχνευθούν σε σημαντικές πυκνότητες ρεύματος. Όμως, η μέθοδος δεν είναι η πιο καλή επιλογή για ποσοτικοποίηση υψηλής συγκέντρωσης

διαλύματος επινεφρίνης, αφού όπως ειπώθηκε και παραπάνω, η γραμμική περιοχή είναι περιορισμένη.

Η σταθερότητα δεν ερευνήθηκε εκτενέστερα, αλλά το ηλεκτρόδιο προετοιμάζεται γρήγορα και οικονομικά. Χρησιμοποιούνται μικρές ποσότητες ενζύμου και προτείνεται κάθε φορά πριν το κάθε σύνολο μετρήσεων το ηλεκτρόδιο να προετοιμάζεται με ένα καινούριο στρώμα ακινητοποιημένου ενζύμου.

### Όρια ανίχνευσης και ποσοτικού προσδιορισμού της μεθόδου

Σχετικά με τη μέθοδο και το όριο ανίχνευσης (LOD) και ποσοτικού προσδιορισμού (LOQ), έγινε μια σειρά με τυφλά δείγματα ακινητοποιημένου ενζύμου για τους 30 °C προκειμένου αυτό να προσδιοριστεί. Τα όρια αυτά κρίνεται απαραίτητο να προσδιοριστούν, μιας και δίνουν πληροφορίες για την μέθοδο και κρίνουν το κατά πόσο αυτή ανιχνεύει μικρές συγκεντρώσεις και τις ποσοτικοποιεί.

Για την περίπτωση αυτή, οι εξισώσεις που χρησιμοποιούνται είναι:

$$LOD = 3 \cdot s/m \text{ και } LOQ = 10 \cdot s/m$$

Όπου  $s$  η τυπική απόκλιση του σήματος των τυφλών και  $m$  η κλίση της καμπύλης αναφοράς για τον ιδανικό συνδυασμό που προτείνεται. Το 3 στην πρώτη περίπτωση αφορά σφάλμα δεύτερου τύπου, όπου η πιθανότητα να υπάρχει σφάλμα είναι ίση με 0,135 %.

Επομένως για τη χρησιμοποιούμενη μέθοδο, για λόγο σήματος προς θόρυβο ίσο με 3, βάσει της τυπική απόκλισης του τυφλού (0.12 A/cm<sup>2</sup>), το όριο ανίχνευσης υπολογίζεται:

$$LOD = 0.022 \text{ nM}$$

Και το όριο ποσοτικοποίησης:

$$LOQ = 0.074 \text{ nM}$$

Το τόσο μικρό όριο ανίχνευσης θεωρείται ισχυρό στοιχείο για τη μέθοδο, μιας και με αύξησης του ρεύματος σε τυφλά διαλύματα, η επινεφρίνη μπορεί να ανιχνευθεί ακόμη και σε τόσο μικρές ποσότητες. Τα αποτελέσματα συγκρίνονται με αυτά που προκύπτουν από άλλες μεθόδους και αναφέρονται στην περίπτωση της επινεφρίνης και παρατηρείται πως το όριο ανίχνευσης είναι μια τάξη μεγέθους μικρότερο από τα πιο χαμηλά που βρέθηκαν από την βιβλιογραφική αναζήτηση [55-66].



## Κεφάλαιο 3<sup>ο</sup>: Συμπεράσματα

Μέσω της μεθόδου της LA-FTacV έγινε χαρακτηρισμός του ενζύμου με ενεργότητα λακκάσης που απομονώθηκε από τον μύκητα *Myceliophthora thermophila* και ακόμη μελετήθηκε ως προς της συμπεριφορά του το μόριο της επινεφρίνης. Επίσης ερευνήθηκε το κοινό σύστημα των δύο ουσιών αυτών με την ίδια μέθοδο, με σκοπό να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε βιοαισθητήρα για ανίχνευση της επινεφρίνης.

Αρχικά, για το ένζυμο, το οποίο ακινητοποιείται με Nafion, μετά από μελέτη του σε τρία διαφορετικά ηλεκτρόδια (υαλώδους άνθρακα, χρυσού και πυρολυτικού άνθρακα), σε αρκετές θερμοκρασίες και για τρεις τιμές συχνότητας (1, 3, 5 Hz), διαπιστώθηκε πως αυτό λειτουργεί καλύτερα για το ηλεκτρόδιο του πυρολυτικού άνθρακα και σε θερμοκρασία 30 °C. Το pH του ηλεκτρολύτη που χρησιμοποιήθηκε για την μέτρηση είναι ελαφρώς όξινο. Το  $E^{\circ}$  του ενζύμου για τους 25 °C υπολογίστηκε ίσο με 113.1 mV.

Η επινεφρίνη φαίνεται να έδωσε εξίσου καλά αποτελέσματα για τον πυρολυτικό άνθρακα. Με τη μέθοδο της LA-FTacV φαίνεται πως η ουσία μπορεί να ανιχνευθεί ακόμη και σε πολύ μικρές ποσότητες μέσα στο διάλυμα, μέχρι κάποιες συγκεκριμένες συγκεντρώσεις της τάξης των  $\mu\text{M}$ , από τις οποίες και έπειτα το σήμα που λήφθηκε δεν είναι αξιοποιήσιμο. Δεν μελετήθηκε η δράση της ουσίας σε πολλές θερμοκρασίες, μιας και δεν κρίθηκε απαραίτητο, αφού άλλωστε αυτή εντοπίζεται σε συγκεκριμένες θερμοκρασίες και φάνηκε και στα διαγράμματα για τους 50 °C πως δεν παρατηρείται μεγάλη διαφορά στο σήμα, αλλά επιπρόσθετα γίνεται περιπλοκή των σημάτων. Το  $E^{\circ}$  για την επινεφρίνη δεν υπολογίστηκε, μιας και η δράση της δεν είναι τόσο απλή όσο αυτή του ενζύμου, αφού γίνεται σε περισσότερα από ένα στάδια.

Από την μελέτη του συνολικού απαερωμένου συστήματος του ακινητοποιημένου ενζύμου με την επινεφρίνη, μετά από μελέτη θερμοκρασιών και διαφόρων τιμών pH, βρέθηκε από τη γραμμικότητα του σήματος πως ο καλύτερος συνδυασμός γίνεται για θερμοκρασία 30 °C και τιμή pH 4. Όπως παρατηρήθηκε, το σύστημα ακόμη και με πολύ μικρές προσθήκες διαλύματος επινεφρίνης, έρχεται γρήγορα σε κορεσμό, δηλώνοντας την πολύ καλή συγγένεια που έχει το ένζυμο σε συνδυασμό με την επινεφρίνη σαν υπόστρωμα. Με χρήση λακκάσης φαίνεται πως μπορεί να γίνει ανίχνευση του αναλύτη και σε πολύ μικρότερες τιμές συγκέντρωσης από αυτές στην περίπτωση που μελετάται αποκλειστικά αυτός. Το σύστημα με το ένζυμο ακινητοποιημένο πάνω στο ηλεκτρόδιο έχει πολύ καλή γραμμικότητα, σε περιορισμένη όμως περιοχή, και είναι ικανό να εντοπίσει την επινεφρίνη γρήγορα. Ακόμη η μέθοδος φαίνεται να έχει χαμηλότερο όριο ανίχνευσης συγκριτικά με άλλες μεθόδους. Το όριο ποσοτικοποίησης προσδιορίστηκε ίσο με 0.074 nM. Η

ανίχνευση της γίνεται ακόμη και σε ίχνη, αφού το όριο ανίχνευσης ισούται με 0.022 nM, κάτι που θεωρείται σαφές πλεονέκτημα της μεθόδου.

Τέλος, η μέθοδος φαίνεται να λειτουργεί πολύ καλά για το συγκεκριμένο σύστημα, είναι οικονομική και όχι ιδιαίτερα απαιτητική από άποψη συνθηκών (π.χ. δεν απαιτεί απομονωμένο σύστημα). Η ποσότητα του ενζύμου που χρησιμοποιείται κάθε φορά είναι πολύ μικρή.

## Προτάσεις για μελλοντική έρευνα

Δεδομένου του πόσο καλά λειτούργησε η επινεφρίνη με τη λακκάση σαν σύστημα, θα μπορούσαν να μελετηθούν και υπό διαφορετικές συνθήκες. Για παράδειγμα, η ακινητοποίηση του ενζύμου θα μπορούσε να γίνει με άλλον ακινητοποιητή, αντί του Nafion, και να συγκρίνονταν αργότερα τα όρια ανίχνευσης. Κάποιος άλλος ακινητοποιητής θα μπορούσε να είναι μια άλλη ουσία πολυμερικής φύσης. Μια ακόμη πρόταση είναι η επιπλέον έρευνα για συνδυασμό της επινεφρίνης με άλλη ουσία, όπως για παράδειγμα με τη L-Dopa, πρόδρομο μόριο της ντοπαμίνης, που είναι επίσης κατεχολαμίνη, και ο εντοπισμός τους σε διάλυμα χρησιμοποιώντας τη λακκάση.

Επιπλέον, θα μπορούσε να μετρηθεί ο χρόνος και οι συνθήκες που μπορεί να χρησιμοποιηθεί κάθε φορά ένα φρέσκο στρώμα ακινητοποιημένου ενζύμου και το πόσο αυτά μπορεί να επηρεαστούν, αλλά και να βελτιωθούν με ρύθμιση άλλων παραμέτρων του πειράματος. Αυτό για να μελετηθεί και εκτενέστερα η εφαρμογή σε βιοαισθητήρα, ώστε αυτή να γίνει απλότερη και εμπορικά αξιοποιήσιμη.

Η ίδια η λακκάση, δεδομένου του εύρους υποστρωμάτων με τα οποία μπορεί να λειτουργήσει, θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί με αυτό το ηλεκτρόδιο και για μελέτη με άλλες ουσίες, οι οποίες σε αντίδραση με το ένζυμο θα οξειδώνονταν.

## Βιβλιογραφία

- [1] Petr Baldrian. “Fungal laccases-occurrence and properties”, *FEMS Microbiology Reviews*, 30, 215 (2006).
- [2] Harald Claus, G. Faber and H. König. “Laccases: structure, reactions, distribution”, *Micron*, 35, 93 (2004).
- [3] O.V. Morozova, G.P. Shumakovic, M. A. Gorbacheva, S. V. Shleev, and A. I. Yaropolov. “Blue” laccases”, *Biokhimiya*, 72, 1396 (2007).
- [4] Adinarayana Kunamneni, Susana Camarero, Carlos García-Burgos, Francisco J Plou, Antonio Ballesteros and Miguel Alcalde. “Fungal laccase-a versatile enzyme for biotechnological applications”, *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, ed. A. Méndez-Vilas, pp. 233 (2007)
- [5] A. I. Yaropolov, O.V. Skorobogat’ko, S. S. Vartanov, S. D. Varfolomeyev. “Laccase: Properties, Catalytic Mechanism, and Applicability”, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 49, 257 (1994).
- [6] Komal Agrawal, Venkatesh Chaturvedi and Pradeep Verma. “Fungal laccase discovered but yet undiscovered”, *Bioresources and Bioprocessing*, 5, 4 (2018).
- [7] Jia Yang, Wenjuan Li, Tzi Bun Ng, Xiangzhen Deng, Juan Lin and Xiuyun Ye. “Laccases: Production, Expression Regulation, and Applications in Pharmaceutical Biodegradation”, *Frontiers in Microbiology*, 8, 832 (2017).
- [8] Pankaj Kumar Chaurasia, Rama Shanker, Singh Yadav, Sudha Yadava. “A review on mechanism of laccase action”, *Research and Reviews in Biosciences*, 7, 66 (2013).
- [9] Feng Xu. “Effects of Redox Potential and Hydroxide Inhibition on the pH Activity Profile of Fungal Laccases”, *The Journal of Biology Chemistry*, 272, 924 (1997).
- [10] Feng Xu, Woonsup Shin, Stephen H. Brown, Jill A. Wahleithner, Uma M. Sundaram, Edward I. Solomon. “A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability”, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1292, 303 (1996).
- [11] R. M. Berka, P. Schneider, E. J. Golightly, S. H. Brown, M. Madden, K. M. Brown, T. Halkier, K. Mondorf, F. XU. “Characterization of the gene encoding an extracellular laccase of *Myceliophthora thermophila* and analysis of the recombinant enzyme expressed in *Aspergillus oryzae*”, *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 3151 (1997).
- [12] M. G. Paice, I. D. Reid, P. Lanthier, M. Yaguchi and R. Bourbonnais. “Lignin Oxidation by Laccase Isozymes from *Trametes versicolor* and Role of the Mediator 2,29-Azinobis(3-Ethylbenzothiazoline-6-Sulfonate) in Kraft Lignin Depolymerization”, *Applied and Environmental Biotechnology*, 61, 1876 (1995).
- [13] Melissa M. Rodriguez-Delgado, Gibran S. Aleman-Nava, Jose Manuel Rodriguez-Delgado, Graciano Dieck-Assad, Sergio Omar Martinez-Chapa,

- Damia Barcelo, Roberto Parra. "Laccase-based biosensors for detection of phenolic compounds", *Trends in Analytical Chemistry*, 74, 21 (2015).
- [14] H. Adamson, A. M. Bond, A. Parkin. "Probing biological redox chemistry with large amplitude fourier transformed ac voltammetry", *Chemical Communications*, 53 9519 (2017).
- [15] Shraddha, Ravi Shekher, Simran Sehgal, Mohit Kamthania, and Ajay Kumar. "Laccase: Microbial Sources, Production, Purification, and Potential Biotechnological Applications", *Enzyme Research*, 2011, 217861 (2011).
- [16] Khushal Brijwani, Anne Rigdon, Praveen V. Vadlani. "Fungal laccases: Production, Function, and Applications in Food Processing", *Enzyme Research*, 149748 (2010).
- [17] Adinarayana Kunamneni, Susana Camarero, Carlos Garcia-Burgs, Francisco J plou, Antonio Ballesteros and Miguel Alcade. "Engineering and Applications of fungal laccases for organic synthesis", *Microbial Cell Factories*, 7, 32 (2008).
- [18] H.Claus, G. Faber, H. Koenig. "Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases", *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 672 (2002).
- [19] Adinarayana Kunamneni, Francisco J. Plou, Antonio Ballesteros and Miguel Alcalde. "Laccases and their applications: a patent review", *Recent Patents on Biotechnology*, 2, 10 (2008).
- [20] Susana Camarero, David Ibarra, Ángel T.Martínez, Javier Romero, Ana Gutiérrez, José C.del Río. "Paper pulp delignification using laccase and natural mediators", *Enzyme and Microbial Technology*, 40, 1264 (2007).
- [21] Antar Puneet Virk Prince Sharma Neena Capalash. "Use of laccase in pulp and paper industry", *Biotechnology Progress*, 28, 21 (2012).
- [22] Susana Camarero, Olga García, Teresa Vidal, José Colom, José C del Río, Ana Gutiérrez, José Mgras, Rebeca Monje, María J Martínez, Ángel T Martínez. "Efficient bleaching of non-wood high-quality paper pulp using laccase-mediator system", *Enzyme and Microbial Technology*, 35, 113 (2004).
- [23] Rim Khlifi, Lassaad Belbahri, Steve Woodward, Mariem Ellouz, Abdelhafidh Dhouib, Sami Sayadi, Tahar Mechich. "Decolourization and detoxification of textile industry wastewater by the laccase-mediator system", *Journal of Hazardous Materials*, 175, 802 (2010).
- [24] Susana Rodríguez Couto and José Luis Toca-Herrera. "Laccases in the textile industry", *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1, 115 (2006).
- [25] Rosana Cminussi, Gláucia Mpastore, Nelson Durán. "Potential applications of laccase in the food industry", *Trends in Food Science & Technology*, 13, 205 (2002).
- [26] Johann F. Osma, José L. Toca-Herrera, and Susana Rodríguez-Couto. "Uses of Laccases in the Food Industry", *Enzyme Research*, 2010, 918761 (2010).
- [27] M.R.Montereali, L. DellaSeta, W.Vastarella, R.Pilloton. "A disposable Laccase-Tyrosinase based biosensor for amperometric detection of phenolic compounds in must and wine", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 64, 189 (2010).
- [28] Gurpreet Singh Dhillon, Surinder Kaur, Satinder Kaur Brar, Mausam Verma. "Flocculation and Haze Removal from Crude Beer Using In-House Produced Laccase from *Trametes versicolor* Cultured on Brewer's Spent Grain", *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60, 32, 7895 (2012).

- [29] Brinch DS, Pedersen PB. "Toxicological studies on Laccase from *Myceliophthora thermophila* expressed in *Aspergillus oryzae*.", *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 35, 296 (2002).
- [30] L.Lloret, G.Eibes, M.T. Moreira, G.Feijoo, J.M. Lema. "On the use of a high-redox potential laccase as an alternative for the transformation of non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs)", *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 97, 233 (2013).
- [31] Nikhil Bhalla, Pawan Jolly, Nello Formisano, and Pedro Estrela. "Introduction to biosensors", *Essays in Biochemistry*, 60, 1 (2016).
- [32] J. Wang. «Electrochemical Glucose Biosensors», *Chemical Review*, 108, 814 (2008).
- [33] Deanna A.Sutton, Michael G. Rinaldi, Stephen E. Sanche. "Dematiaceous fungi" in *Clinical Mycology (Second Edition)*, Elias J. Anaissie, Michael R. McGinnis, Michael A. Pfaller, pp. 333 (2009).
- [34] Anthi Karnaouri, Evangelos Topakas, Io Antonopoulou, Paul Christakopoulos. "Genomic insights into the fungal lignocellulolytic system of *Myceliophthora thermophila*", *Frontiers in Microbiology* 5,281 (2014).
- [35] Jing Xu, Jingen Li, Liangcai Lin, Qian Liu, Wenliang Sun, Bangquan Huang, Chaoguang Tian. "Development of genetic tools for *Myceliophthora thermophila*", *BMC Biotechnology*, 15, 35 (2015).
- [36] Zofia Olempska-Bier. "Laccase from *Myceliophthora Thermophila* expressed in *Aspergillus Oryzae*", *FAO Chemical and Technical Assessment*, 61st JECFA (2004).
- [37] Heidi A. Ernst, Lise J. Jørgensen, Christian Bukh, Klaus Piontek, Dietmar A. Plattner, Lars H. Østergaard, Sine Larsen, Morten J. Bjerrum, "A comparative structural analysis of the surface properties of asco-laccases", *PLoS One*. 13, e0206589 (2018).
- [38] Simons FE. "Epinephrine (adrenaline) in the first-aid, out-of-hospital treatment of anaphylaxis.", *Novartis Found Symp.* 2004;257:228-43; discussion 243-7, 276-85. (2004).
- [39] Sherwin RS, Saccà L. «Effect of epinephrine on glucose metabolism in humans: contribution of the liver.», *American Journal of Physiology*, 247, E157 (1984).
- [40] Laurie Kelly McCorry. "Physiology of the Autonomic Nervous System", *American Journal of Pharmaceutical Education* 71,78 (2007).
- [41] Gerald Kessler, Jacob Friedman. «Metabolism of Fatty Acids and Glucose», *Circulation*. 98, 1350 (1998)
- [42] T. R. Elliot. "The action of Adrenalin", *Journal of Physiology* 32,401 (1905).
- [43] Marcel Goldenberg. "Adrenal Medullary Function", *The American Journal of Medicine*, 10, 627 (1951).
- [44] Gary B. Glavin. "Stress and Brain Noradrenaline: A Review", *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 9, 233 (1985).
- [45] John O'Donnell, Douglas Zeppenfeld, Evan McConnell, Salvador Pena, Maiken Nedergaard. "Norepinephrine: A Neuromodulator That Boosts the Function of Multiple Cell Types to Optimize CNS Performance", *Neurochemical Research*, 37, 2496 (2012).
- [46] M.R. Bennett. "One hundred years of adrenaline: the discovery of autoreceptors", *Clinical Autonomic Research*, 9, 145 (1999).

- [47] Noemie Elgrishi, Kelley J. Rountree, Brian D. McCarthy, Eric S. Rountree, Thomas T. Eisenhart, and Jillian L. Dempsey. "A Practical Beginner's Guide to Cyclic Voltammetry", *Journal of Chemical Education*, 95,197 (2018).
- [48] F.Scholz. "Electroanalytical Methods-Guide to Experiments and Applications", Springer, pp. 46
- [49] Junqiao Lee. "Electrochemical Sensing of Oxygen Gas in Ionic Liquids on Screen Printed Electrodes", PhD Thesis, Curtin University (2014).
- [50] Gary A. Mabbott. "An introduction to cyclic voltammetry", *Journal of Chemical Education*, 60,697 (1983).
- [51] D. Zouraris, A. Karantonis. "Large amplitude ac voltammetry: Chief observables for a reversible reaction of free electroactive species", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 847, 113245 (2019).
- [52] S.-X. Guo, A. M. Bond, J. Zhang. "Fourier transformed large amplitude alternating current voltammetry: Principles and applications", *Review of Polarography* 61, 21 (2015).
- [53] D. J. Gavaghan, A. M. Bond. "A complete numerical simulation of the techniques of alternative current linear sweep and cyclic voltammetry: analysis of a reversible process by conventional and fast Fourier transform methods", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 480, 133 (2000).
- [54] Anastasia Zerva, Efthymia Koutroufina, Ioanna Kostopoulou, Anastasia Detsi, Evangelos Topakas. "A novel thermophilic laccase-like multicopper oxidase from *Thermothelomyces thermophila* and its application in the oxidative cyclization of 2',3,4-trihydroxychalcone", *New Biotechnology*, 49, 10 (2019).
- [55] Tan-Phat Huynh, Chandra Bikram K.C., Wojciech Lisowski, Francis D'Souza, and Wlodzimierz Kutner. "Molecularly imprinted polymer of bis(2,2-bithienyl)methanes for selective determination of adrenaline", *Bioelectrochemistry*, 93, 37 (2013).
- [56] Soundappan Thiagarajan, Rong-Feng Yang, and Shen-Ming Chen. "Palladium nanoparticles modified electrode for the selective detection of catecholamine neurotransmitters in presence of ascorbic acid" *Bioelectrochemistry*, 75, 163 (2009).
- [57] Gabriel J. Mattos, Jaqueline T. Moraes, Eduardo C.M. Barbosa, Pedro H.C. Camargo, Robert F.H. Dekker, Aneli M. Barbosa-Dekker, and Elen R. Sartori. "Laccase stabilized on -d-glucan films on the surface of carbon black/gold nanoparticles: A new platform for electrochemical biosensing", *Bioelectrochemistry*, 129,116 (2019).
- [58] Rajendra N. Goyal and Sunita Bishnoi. "Simultaneous determination of epinephrine and norepinephrine in human blood plasma and urine samples using nanotubes modified edge plane pyrolytic graphite electrode", *Talanta*, 84,78 (2011).
- [59] Tony Thomas, Ronald J. Mascarenhas, Ozma J. D' Souza, Simon Detriche, Zineb Mekhalif, and Praveen Martis. "Pristine multi-walled carbon nanotubes/sds modified carbon paste electrode as an amperometric sensor for epinephrine". *Talanta*, 125,352 (2014).
- [60] P. Hernandez, I. Snchez, F. Patn, and L. Hernandez. "Cyclic voltammetry determination of epinephrine with a carbon fiber ultramicroelectrode", *Talanta*, 46, 985 (1998).

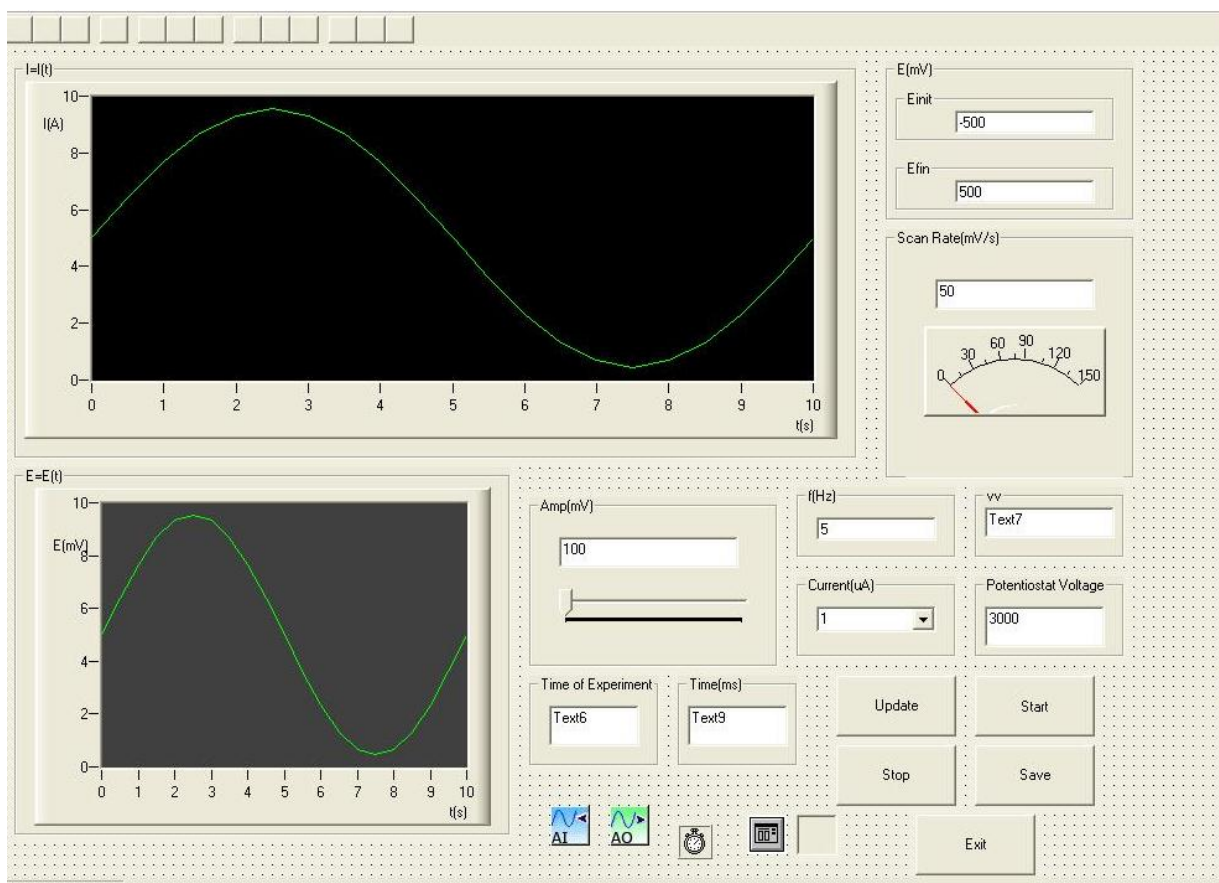
- [61] Lina Zou, Yinfeng Li, Shaokui Cao, and Baoxian Ye. "Gold nanoparticles/polyaniline langmuirblodgett film modified glassy carbon electrode as voltammetric sensor for detection of epinephrine and uric acid", *Talanta*, 117,333 (2013).
- [62] Sheng Fu Wang, Dan Du, and Qi-Chao Zou. "Electrochemical behavior of epinephrine at l-cysteine self-assembled monolayers modified gold electrode", *Talanta*, 57,687 (2002).
- [63] Tran Duy Thanh, Jayaraman Balamurugan, Nguyen Thanh Tuan, Hun Jeong, Seung Hee Lee, Nam Hoon Kim, and Joong Hee Lee. "Enhanced electrocatalytic performance of an ultrafine apt nanoalloy framework embedded in graphene towards epinephrine sensing", *Biosensors and Bioelectronics*, 89,750 (2017).
- [64] Nileshi Saraf, Eric R. Woods, Madison Pepler, and Sudipta Seal. "Highly selective aptamer based organic electrochemical biosensor with pico-level detection", *Biosensors and Bioelectronics*, 117,40 (2018).
- [65] F. Valentini, E. Ciambella, V. Conte, L. Sabatini, N. Ditaranto, F. Cataldo, G. Palleschi, M. Bonchio, F. Giacalone, Z. Syrgiannis, and M. Prato. "Highly selective detection of epinephrine at oxidized singlewall carbon nanohorns modified screen printed electrodes", *Biosensors and Bioelectronics*, 59,94 (2014).
- [66] Isabela Aparecida de Araujo Andreotti, Luiz Otvio Orzari, Jssica Rocha Camargo, Ronaldo Censi Faria, Luiz Humberto Marcolino-Junior, Marcio Fernando Bergamini, Alexandre Gatti, and Bruno C. Janegitz. "Disposable and flexible electrochemical sensor made by recyclable material and low cost conductive ink.", *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 840,109 (2019).



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Στα πλαίσια της διπλωματικής εργασίας αναπτύχθηκαν δύο ξεχωριστά προγράμματα, με σκοπό να γίνει πιο εύκολη και απλή η δειγματοληψία. Τα προγράμματα αναπτύχθηκαν σε λογισμικό VISUAL BASIC VB6, και είναι προγραμματισμένα έτσι ώστε να είναι εύκολα στο χειρισμό για τον οποιονδήποτε χρήστη. Ο κώδικας των δύο προγραμμάτων παρατίθεται ξεχωριστά στο Παράρτημα.

### 1<sup>ο</sup> Πρόγραμμα



Σχήμα Π 1. Επιφάνεια χρήστη για το 1<sup>ο</sup> Πρόγραμμα

Όπως φαίνεται και από το παραπάνω Σχήμα, η επιφάνεια του χρήστη αποτελείται από δύο διαγράμματα, περιοχές για την εισαγωγή χαρακτηριστικών μεγεθών, απαραίτητων για το πρόγραμμα, εργαλεία προκειμένου να ενεργοποιούνται λειτουργίες της κάρτας που είναι συνδεδεμένη με τον ηλεκτρονικό υπολογιστή, ένα εικονίδιο απαραίτητο για το χρονόμετρο και κουμπιά για τις ξεχωριστές λειτουργίες του προγράμματος.

Πιο αναλυτικά:

- Τα κουμπιά:

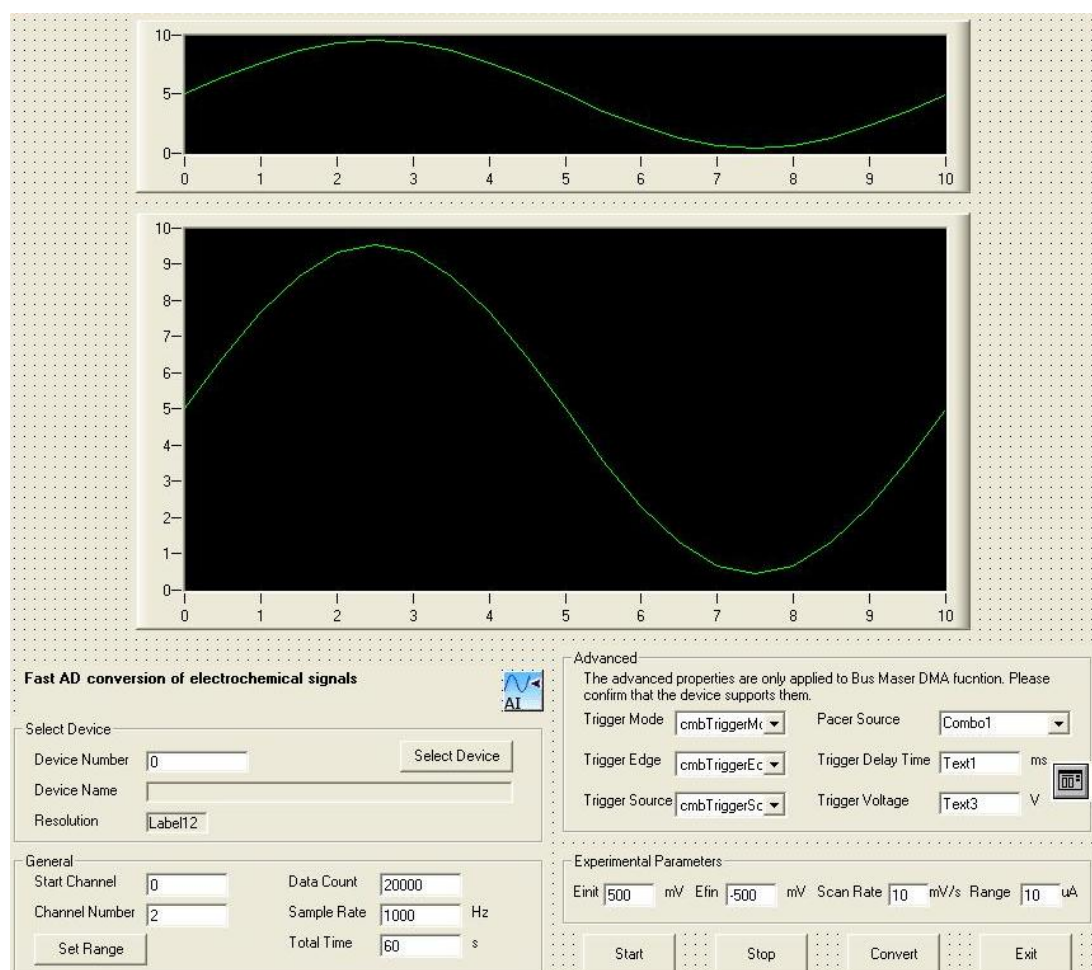
- 1) Το κουμπί Update πατιέται αφού έχουν πρώτα συμπληρωθεί τα κουτιά κειμένου και ενημερώνει το δεύτερο γράφημα και το πλαίσιο με τον συνολικό χρόνο του πειράματος Time of Experiment. Επίσης μηδενίζει τον δεύτερο Timer.
- 2) Το κουμπί Start πατιέται μετά το Update και θέτει σε λειτουργία τον πρώτο timer.
- 3) Για παύση του πειράματος, είτε τυχαία είτε μετά τη λήξη του πειράματος πατιέται το κουμπί Stop.
- 4) Το κουμπί Save χρησιμοποιείται αφού έχει τελειώσει το πείραμα για αποθήκευση των δεδομένων που λήφθηκαν. Αποθηκεύονται τρεις στήλες στο αρχείο που προκύπτει: η πρώτη είναι ο χρόνος σε ms, η δεύτερη για το E σε mV και η τρίτη για το I σε mV.
- 5) Με το κουμπί Exit κλείνει γενικά το πρόγραμμα.
  - Στο μεγαλύτερο διάγραμμα απεικονίζεται η καμπύλη δειγματοληψίας για την σχέση  $I=f(t)$ . Η απεικόνιση αυτή γίνεται μετά το πέρας της μέτρησης, διότι διαπιστώθηκε πρόβλημα με την μνήμη του υπολογιστή, αν η διεργασία αυτή γίνεται σε πραγματικό χρόνο πειράματος. Στο δεύτερο διάγραμμα ενημερώνεται η μορφή που θα έχει η συνάρτηση που θα επιβάλλει στο δείγμα ο ποτενσιοστάτης, όταν πατηθεί το κουμπί Update.
  - Στις διάφορες περιοχές κειμένου εισάγονται τα απαραίτητα μεγέθη για ένα ηλεκτροχημικό πείραμα. Πρόκειται για τα Einit, Efin, Scan Rate, Amplitude, Current Range, Frequency,  $w(2*\pi*f)$ (χρήσιμο για την συνάρτηση που χρησιμοποιείται) και Potensiostat Voltage, το οποίο πρόκειται για ένα σταθερό δυναμικό το οποίο υπολογίζεται αφού ο χρήστης εισάγει τα παραπάνω μεγέθη. Το Potensiostat Voltage χρησιμοποιήθηκε έτσι ώστε να ασκείται σωστά η επιβαλλόμενη συνάρτηση και να είναι δυνατόν, χωρίς την χρήση παλμογράφου να γίνονται μετρήσεις και σε αρνητικά δυναμικά. Η τιμή που υπολογίζεται σε αυτό το πεδίο μεταφέρεται και στο παράθυρο του Einit του Ποτενσιοστάτη.
  - Τα εικονίδια AI,AO χρησιμοποιούνται για να ενεργοποιούνται τα κανάλια Input και Output αντίστοιχα της κάρτας. Το εικονίδιο της λίστας είναι απαραίτητο για την λειτουργία του κουμπιού Save, όπως απαιτείται από τον δημιουργό της γλώσσας προγραμματισμού.
  - Το πρόγραμμα χρησιμοποιεί δύο διαφορετικά ρολόγια προκειμένου να κάνει τις μετρήσεις του. Το πρώτο που τίθεται σε ισχύ είναι αυτό με το εικονίδιο, το οποίο δρα για συνολικό χρόνο πέντε δευτερολέπτων. Η λογική πίσω από αυτόν τον timer είναι το να έχει ο χρήστης τον απαιτούμενο χρόνο, ώστε αφού έχει πατήσει το κουμπί Start να πατήσει και το κουμπί CELL του Ποτενσιοστάτη. Για αυτόν τον σκοπό θεωρείται ο χρόνος των πέντε δευτερολέπτων αρκετός. Ο δεύτερος timer ξεκινάει μετά το πέρας των πέντε δευτερολέπτων και σύμφωνα με αυτόν αποθηκεύονται και οι μετρήσεις. Απεικονίζεται στο πεδίο Time καθ' όλη την διάρκεια του πειράματος.

Η λογική χρήσης αυτού του προγράμματος είναι να μπορεί να χρησιμοποιηθεί σαν γεννήτρια και παλμογράφος παράλληλα με παράλληλη χρήση ενός Ποτενσιοστάτη. Προκειμένου να λειτουργήσει απαιτείται απλά να είναι πατημένο του κουμπί του Ποτενσιοστάτη προκειμένου αυτός να παίρνει την τιμή του Einit, στο οποίο το πεδίο έχει ενημερωθεί η τιμή του από το Potensioestat Voltage. Ακόμη ρυθμίζεται το Current Range και ο κύκλος πρέπει να είναι Single.

Τα προβλήματα με το πρόγραμμα αυτό είναι η αδιοριστία με την οποία λαμβανόταν ο χρόνος και κατ' επέκταση τα υπόλοιπα δεδομένα και ο ελλιπής όγκος δεδομένων, ο οποίος είχε επίδραση στην ακρίβεια του πειράματος. Προκειμένου λοιπόν να είναι πιο σίγουρες οι μετρήσεις το πρόγραμμα αφέθηκε προσωρινά και χρησιμοποιήθηκε άλλο πρόγραμμα.

## 2<sup>ο</sup> Πρόγραμμα:

Το πρόγραμμα αυτό αναπτύχθηκε σαν λύση του πρώτου.



Σχήμα Π 2. Επιφάνεια χρήση για το 2<sup>ο</sup> Πρόγραμμα

Όπως φαίνεται υπάρχουν πολλά κοινά σημεία με το πρώτο πρόγραμμα, τα οποία είναι στο σημείο των Πειραματικών Παραμέτρων. Ανεξάρτητα όμως από αυτά, παρατηρούνται αρκετές επιπλέον περιοχές.

- Τα κουμπιά:

- 1) Παρατηρείται πως και σε αυτό το πρόγραμμα υπάρχουν κουμπιά Start, Stop και Exit. Η λειτουργία για το κάθε κουμπί είναι ακριβώς η ίδια, εκτός από την επιπλέον λειτουργία του κουμπιού Start, το οποίο με το πάτημα του δημιουργεί ο αρχείο πριν την έναρξη της μέτρησης για καταγραφή των δεδομένων.
- 2) Το κουμπί Convert
- 3) Το κουμπί Set Range είναι για την ρύθμιση του Range μέσα στην οποία γίνεται η μέτρηση, και για αυτήν την περίπτωση είναι -1,25-1,25 V και για τα δύο κανάλια από τα οποία λαμβάνονται δεδομένα.

- Το νούμερο συσκευής, από την οποία πρέπει να λαμβάνονται τα δεδομένα, επιλέγεται από την περιοχή Select Device.
- Στο πεδίο των γενικών ρυθμίσεων ο χρήστης ορίζει από πόσα κανάλια θέλει να λάβει δεδομένα. Στην περίπτωση του πειράματος αυτού τα κανάλια αυτά είναι δύο, ένα για το δυναμικό και ένα για το ρεύμα. Στην συνέχεια ο χρήστης ορίζει το Sample Rate του πειράματος, επιδρώντας έτσι στον όγκο δειγματοληψίας. Μια ενδεικτική τιμή για το πεδίο αυτό είναι 2000. Το πεδίο του Data Count ενημερώνεται αυτόματα μέσω της σχέσης  $\text{Data Count} = \text{Sample Rate} * \text{Total Time}$ , όπου Total Time είναι ο χρόνος του πειράματος, όπως έχει ήδη υπολογιστεί από τις πειραματικές παραμέτρους.
- Το πεδίο Advanced δεν χρησιμοποιήθηκε στα πλαίσια του πειράματος. Πρόκειται για επιπλέον εργαλεία για πιο σύνθετες δειγματοληψίες.
- Το πρώτο διάγραμμα είναι για την αναπαράσταση της σχέσης  $E=f(t)$  και το δεύτερο για την σχέση  $I=f(t)$ . Τα δύο αυτά διαγράμματα ενημερώνονται μετά το τέλος της μέτρησης.

Το πρόγραμμα αυτό χρησιμοποιεί και Παλμογράφο σαν γεννήτρια και Ποτενσιοστάτη. Από τον Παλμογράφο ρυθμίζεται η ημιτονοειδής διαταραχή, το πλάτος της ταλάντωσης και η συχνότητα και επιβάλλονται απευθείας στον Ποτενσιοστάτη. Σε αυτόν επίσης ρυθμίζονται οι τιμές για τα Einit, Efin, Current Range και Sample Rate. Με το που επιλεχθεί το κουμπί Start, πατιέται το CELL για πόλωση του συστήματος και ύστερα με την αποθήκευση του ονόματος του καινούριου αρχείου πατιέται το Run για να ξεκινήσει η μέτρηση. Με το τέλος του πειράματος και την ενημέρωση των διαγραμμάτων, ο χρήστης κλείνει και τον Ποτενσιοστάτη.

Το δεύτερο πρόγραμμα υστερεί στο θέμα των επιπλέον μηχανημάτων και στο ότι δεν έχει προβλεπόμενο χρόνο ανταπόκρισης για να έχει χρόνο ο χρήστης να πατήσει τα απαιτούμενα κουμπιά χωρίς να χάσει σημεία μέτρησης. Όμως, εξαιτίας της δυνατότητας για μεγάλη ακρίβεια δειγματοληψίας και σιγουριά για τον χρόνο

που γίνονται οι μετρήσεις, κρίνεται καλύτερη και πιο ασφαλής επιλογή για την εκτέλεση των πειραμάτων της FtaCV.

- *Κώδικας για το πρώτο πρόγραμμα*

```
Private Declare Function OSWinHelp% Lib "user32" Alias "WinHelpA" (ByVal hwnd&, ByVal HelpFile$, ByVal wCommand%, dwData As Any)
'Dim nAllInitialTickCount As Long
'Private Declare Function GetTickCount Lib "kernel32" () As Long
Private Sub Check1_Click()
End Sub
Private Sub AdvAI1_OnTerminate(digitalArray As Variant, analogArray As Variant, ByVal DataCount As Long)
End Sub
Private Sub AdvHiResTimerCtl1_TimerEvent(ByVal Key As String)
Timer1.Enabled = False
kkk = 0
t = t + AdvHiResTimerCtl1.Interval("timer 0")
Text9.Text = t
omega = Val(Text7.Text)
tr = Val(Text6.Text) / 2
If t / 1000 < tr Then
    potout = Abs(Val(Text10.Text)) + Val(Text2.Text) + scanrate * t / 1000 + Val(Text4.Text) * Sin(omega * t / 1000)
End If
If t / 1000 >= tr Then
    potout = Abs(Val(Text10.Text)) + 2 * Val(Text3.Text) - Val(Text2.Text) - scanrate * t / 1000 + Val(Text4.Text) * Sin(omega * t / 1000)
End If
If t / 1000 >= 2 * tr Then
    potout = Abs(Val(Text10.Text)) + Val(Text2.Text)
End If
AdvAO1.DataAnalog = potout / 1000
voltage = AdvAI1.AcquireScanChannelData(True)
idx = idx + 1
'Current (Ampere)
Y(idx) = voltage(0) * 0.000001 * Val(Combo1.Text)
'Potential (V)
z(idx) = (potout - Abs(Val(Text10.Text))) / 1000
'Time (s)
X(idx) = t / 1000
End Sub
Private Sub AdvKnob1_PointerValueChanged(ByVal Pointer As Long, Value As Variant)
Text5.Text = AdvKnob1.Value
End Sub
Private Sub Combo1_Change()
End Sub
Private Sub Command1_Click()
AdvAO1.ChannelExportStart = 0
AdvAO1.ChannelExportCount = 1
AdvGraph1.ClearData
    AdvGraph1.Plots.RemoveAll
AdvAI1.ChannelScanStart = 1
    AdvAI1.ChannelScanCount = 1
    AdvAI1.SetValueRange 0, -1.25, 1.25
Timer1.Enabled = True
nAllInitialTickCount = GetTickCount
End Sub
Private Sub Command2_Click()
AdvGraph1.Plots(0).PlotXvsY X, Y
AdvHiResTimerCtl1.Enabled("timer 0") = False
'MsgBox (UBound(x))
End Sub
```

```

Private Sub Command3_Click()
t = 0
idx = 0
Text6.Text = Abs(2 * (Text3.Text - Text2.Text) / Text5.Text)
Text7.Text = 2 * 3.14 * Text1.Text
omega = Text7.Text
ttot = Text6.Text
AdvGraph2.Axes(0).AutoScale = True
AdvGraph2.Axes(0).AutoScale = True
AdvGraph2.Axes(1).AutoScale = True
AdvGraph2.Axes(1).AutoScale = True
AdvGraph2.ClearData
AdvGraph2.ChartLength = 0
If Val(Text3.Text) > Val(Text2.Text) Then
scanrate = Abs(Text5.Text)
Else
scanrate = -Abs(Text5.Text)
End If
tr = Val(Text6.Text) / 2
i = -1
For t = 0 To 2 * tr Step 2 * tr / 3000
i = i + 1
texp(i) = t
If t < tr Then
pot(i) = Val(Text2.Text) + scanrate * t + Val(Text4.Text) * Sin(omega * t)
End If
If t >= tr Then
pot(i) = 2 * Val(Text3.Text) - Val(Text2.Text) - scanrate * t + Val(Text4.Text) * Sin(omega * t)
End If
Next t
AdvGraph2.PlotXvsY texp, pot
If Val(Text2.Text) > Val(Text3.Text) Then
Text10.Text = Val(Text3.Text) - 1 * Val(Text4.Text)
Else
Text10.Text = Val(Text2.Text) - 1 * Val(Text4.Text)
End If
End Sub
Private Sub Command4_Click()
Unload Me
End Sub
Private Sub Command5_Click()
CommonDialog1.ShowSave
FileParamOut = CommonDialog1.FileName
Open FileParamOut For Output As #1
For i = 0 To idx
Write #1, X(i), z(i), Y(i)
For k = 0 To AdvAI1.ChannelScanCount - 1
Write #1, potout(k, k);
Next k
Write #1,
Next i
Close #1
End Sub
Private Sub Form_Load()
Dim texp(0 To 3000) As Single
Dim pot(0 To 3000) As Single
Dim ttot As Single
Dim boundaryLow As Double
Dim boundaryHigh As Double
Me.Left = GetSetting(App.Title, "Settings", "MainLeft", 1000)
Me.Top = GetSetting(App.Title, "Settings", "MainTop", 1000)
Me.Width = GetSetting(App.Title, "Settings", "MainWidth", 6500)

```

```

    Me.Height = GetSetting(App.Title, "Settings", "MainHeight", 6500)
    Text6.Text = Abs(2 * (Text3.Text - Text2.Text) / Text5.Text)
Text7.Text = 2 * 3.14 * Text1.Text
ttot = Text6.Text
tr = Val(Text6.Text) / 2
AdvGraph2.Axes(0).AutoScale = True
AdvGraph2.Axes(0).AutoScale = True
AdvGraph2.Axes(1).AutoScale = True
AdvGraph2.Axes(1).AutoScale = True
AdvGraph2.ClearData
AdvGraph2.ChartLength = 0
i = -1
For t = 0 To 2 * tr Step 2 * tr / 3000
i = i + 1
texp(i) = t
If t < tr Then
    pot(i) = Val(Text2.Text) + Val(Text5.Text) * t + Val(Text4.Text) * Sin(31 * t)
    End If
    If t >= tr Then
        pot(i) = 2 * Val(Text3.Text) - Val(Text2.Text) - Val(Text5.Text) * t + Val(Text4.Text) * Sin(31 * t)
        End If
    Next t
AdvGraph2.PlotXvsY texp, pot
AdvAO1.DeviceNumber = 1
AdvAI1.DeviceNumber = 1
End Sub
Private Sub Form_Unload(Cancel As Integer)
    Dim i As Integer
    'close all sub forms
    For i = Forms.Count - 1 To 1 Step -1
        Unload Forms(i)
    Next
    If Me.WindowState <> vbMinimized Then
        SaveSetting App.Title, "Settings", "MainLeft", Me.Left
        SaveSetting App.Title, "Settings", "MainTop", Me.Top
        SaveSetting App.Title, "Settings", "MainWidth", Me.Width
        SaveSetting App.Title, "Settings", "MainHeight", Me.Height
    End If
End Sub
Private Sub List1_Click()
End Sub
Private Sub OLE1_Updated(Code As Integer)
End Sub
Private Sub StatusBar3_PanelClick(ByVal Panel As MSComctlLib.Panel)
End Sub
Private Sub Frame2_DragDrop(Source As Control, X As Single, Y As Single)
End Sub
Private Sub Slider1_Click()
Text4.Text = Slider1.Value / 100
End Sub
Private Sub tbToolBar_ButtonClick(ByVal Button As MSComctlLib.Button)
    On Error Resume Next
    Select Case Button.Key
        Case "New"
            'ToDo: Add 'New' button code.
            MsgBox "Add 'New' button code."
        Case "Open"
            mnuFileOpen_Click
        Case "Save"
            mnuFileSave_Click
        Case "Print"
            mnuFilePrint_Click
    End Select
End Sub

```

```

Case "Cut"
    mnuEditCut_Click
Case "Copy"
    mnuEditCopy_Click
Case "Paste"
    mnuEditPaste_Click
Case "Bold"
    'ToDo: Add 'Bold' button code.
    MsgBox "Add 'Bold' button code."
Case "Italic"
    'ToDo: Add 'Italic' button code.
    MsgBox "Add 'Italic' button code."
Case "Underline"
    'ToDo: Add 'Underline' button code.
    MsgBox "Add 'Underline' button code."
Case "Align Left"
    'ToDo: Add 'Align Left' button code.
    MsgBox "Add 'Align Left' button code."
Case "Center"
    'ToDo: Add 'Center' button code.
    MsgBox "Add 'Center' button code."
Case "Align Right"
    'ToDo: Add 'Align Right' button code.
    MsgBox "Add 'Align Right' button code."
End Select
End Sub
Private Sub mnuHelpAbout_Click()
    MsgBox "Version " & App.Major & "." & App.Minor & "." & App.Revision
End Sub
Private Sub mnuHelpSearchForHelpOn_Click()
    Dim nRet As Integer
    If Len(App.HelpFile) = 0 Then
        MsgBox "Unable to display Help Contents. There is no Help associated with this project.", vbInformation, Me.Caption
    Else
        On Error Resume Next
        nRet = OSWinHelp(Me.hwnd, App.HelpFile, 261, 0)
        If Err Then
            MsgBox Err.Description
        End If
    End If
End Sub
Private Sub mnuHelpContents_Click()
    Dim nRet As Integer

    'if there is no helpfile for this project display a message to the user
    'you can set the HelpFile for your application in the
    'Project Properties dialog
    If Len(App.HelpFile) = 0 Then
        MsgBox "Unable to display Help Contents. There is no Help associated with this project.", vbInformation, Me.Caption
    Else
        On Error Resume Next
        nRet = OSWinHelp(Me.hwnd, App.HelpFile, 3, 0)
        If Err Then
            MsgBox Err.Description
        End If
    End If
End Sub
Private Sub mnuViewWebBrowser_Click()
    'ToDo: Add 'mnuViewWebBrowser_Click' code.
    MsgBox "Add 'mnuViewWebBrowser_Click' code."
End Sub

```



```

Private Sub mnuViewOptions_Click()
    'ToDo: Add 'mnuViewOptions_Click' code.
    MsgBox "Add 'mnuViewOptions_Click' code."
End Sub
Private Sub mnuViewRefresh_Click()
    'ToDo: Add 'mnuViewRefresh_Click' code.
    MsgBox "Add 'mnuViewRefresh_Click' code."
End Sub
Private Sub mnuViewStatusBar_Click()
    mnuViewStatusBar.Checked = Not mnuViewStatusBar.Checked
    sbStatusBar.Visible = mnuViewStatusBar.Checked
End Sub
Private Sub mnuViewToolbar_Click()
    mnuViewToolbar.Checked = Not mnuViewToolbar.Checked
    tbToolBar.Visible = mnuViewToolbar.Checked
End Sub
Private Sub mnuEditPasteSpecial_Click()
    'ToDo: Add 'mnuEditPasteSpecial_Click' code.
    MsgBox "Add 'mnuEditPasteSpecial_Click' code."
End Sub
Private Sub mnuEditPaste_Click()
    'ToDo: Add 'mnuEditPaste_Click' code.
    MsgBox "Add 'mnuEditPaste_Click' code."
End Sub
Private Sub mnuEditCopy_Click()
    'ToDo: Add 'mnuEditCopy_Click' code.
    MsgBox "Add 'mnuEditCopy_Click' code."
End Sub
Private Sub mnuEditCut_Click()
    'ToDo: Add 'mnuEditCut_Click' code.
    MsgBox "Add 'mnuEditCut_Click' code."
End Sub
Private Sub mnuEditUndo_Click()
    'ToDo: Add 'mnuEditUndo_Click' code.
    MsgBox "Add 'mnuEditUndo_Click' code."
End Sub
Private Sub mnuFileExit_Click()
    'unload the form
    Unload Me
End Sub
Private Sub mnuFileSend_Click()
    'ToDo: Add 'mnuFileSend_Click' code.
    MsgBox "Add 'mnuFileSend_Click' code."
End Sub
Private Sub mnuFilePrint_Click()
    'ToDo: Add 'mnuFilePrint_Click' code.
    MsgBox "Add 'mnuFilePrint_Click' code."
End Sub
Private Sub mnuFilePrintPreview_Click()
    'ToDo: Add 'mnuFilePrintPreview_Click' code.
    MsgBox "Add 'mnuFilePrintPreview_Click' code."
End Sub
Private Sub mnuFilePageSetup_Click()
    On Error Resume Next
    With dlgCommonDialog
        .DialogTitle = "Page Setup"
        .CancelError = True
        .ShowPrinter
    End With
End Sub
Private Sub mnuFileProperties_Click()
    'ToDo: Add 'mnuFileProperties_Click' code.

```

```

    MsgBox "Add 'mnuFileProperties_Click' code."
End Sub
Private Sub mnuFileSaveAll_Click()
    'ToDo: Add 'mnuFileSaveAll_Click' code.
    MsgBox "Add 'mnuFileSaveAll_Click' code."
End Sub

Private Sub mnuFileSaveAs_Click()
    'ToDo: Add 'mnuFileSaveAs_Click' code.
    MsgBox "Add 'mnuFileSaveAs_Click' code."
End Sub
Private Sub mnuFileSave_Click()
    'ToDo: Add 'mnuFileSave_Click' code.
    MsgBox "Add 'mnuFileSave_Click' code."
End Sub
Private Sub mnuFileClose_Click()
    'ToDo: Add 'mnuFileClose_Click' code.
    MsgBox "Add 'mnuFileClose_Click' code."
End Sub
Private Sub mnuFileOpen_Click()
    Dim sFile As String
    With dlgCommonDialog
        .DialogTitle = "Open"
        .CancelError = False
        'ToDo: set the flags and attributes of the common dialog control
        .Filter = "All Files (*.*)|*.*"
        .ShowOpen
        If Len(.FileName) = 0 Then
            Exit Sub
        End If
        sFile = .FileName
    End With
    'ToDo: add code to process the opened file
End Sub
Private Sub mnuFileNew_Click()
    'ToDo: Add 'mnuFileNew_Click' code.
    MsgBox "Add 'mnuFileNew_Click' code."
End Sub
Private Sub Toolbar1_ButtonClick(ByVal Button As MSComctlLib.Button)
End Sub
Private Sub Text6_Change()
End Sub
Private Sub Timer1_Timer()
    potout = Abs(Val(Text10.Text)) + Val(Text2.Text)
    AdvAO1.DataAnalog = potout / 1000
    kkk = kkk + 1
    If kkk = 5 Then
        AdvHiResTimerCtl1.Enabled("timer 0") = True
        AdvHiResTimerCtl1.Interval("timer 0") = 10
    End If
End Sub

```

- *Κώδικας για το δεύτερο πρόγραμμα*

```

Private Sub AdvGraph1_ChartFileFinished(ByVal sampleCount As Long)
    MsgBox "Data read: " + Str(sampleCount)
End Sub
Private Sub cmdConvert_Click()

```

```

Dim FileName As String
Dim CookedFile As String
With CommonDialog1
    .FileName = "AIRawdata.dat"
    .Filter = "Advantech AI data File(*.dat)|*.dat|All Files(*.*)|*.*"
    .CancelError = True
    .DefaultExt = ".dat"
End With
On Error GoTo FileErr
CommonDialog1.ShowOpen
FileName = CommonDialog1.FileName
CookedFile = Replace(FileName, ".dat", ".txt")
'Convert the data from digital to analog
AdvAI1.ConvertDigitalFileToAnalog FileName, CookedFile, "%9.7f" & Chr(9), Chr(10)
frmDisplay.Show , Me
frmDisplay.RichTextBox1.LoadFile CookedFile, 1
Exit Sub
FileErr:
Exit Sub
Errhandler:
MsgBox Err.Description
End Sub
Private Sub cmdExit_Click()
Unload Me
End Sub
Private Sub cmdRange_Click()
If AdvAI1.DeviceNumber < 0 Then
MsgBox "Please select an AI device."
Exit Sub
End If
Dim dlgGainRange As New dlgGainRange
dlgGainRange.Show vbModal, Me
End Sub
Private Sub cmdSelectDevice_Click()
On Error GoTo ErrHandle
'Select device
AdvAI1.SelectDevice
txtDeviceNumber.Text = AdvAI1.DeviceNumber
labDeviceName.Caption = AdvAI1.DeviceName
labResolution.Caption = AdvAI1.Resolution
Exit Sub
ErrHandle:
MsgBox AdvAI1.LastErrorMessage
End Sub
Private Sub cmdStart_Click()
Dim count As Long
Dim voltage0() As Single
Dim voltage1() As Single
Dim elapsedtime() As Single
Dim k As Long
Dim m As Long
On Error GoTo FileDlgErr
Dim FileName As String
Dim CookedFile As String
With CommonDialog1
    .FileName = "AIRawdata.dat"
    .Filter = "Advantech AI data File(*.dat)|*.dat|All Files(*.*)|*.*"
    .CancelError = True
    .DefaultExt = ".dat"
End With
CommonDialog1.ShowSave
On Error GoTo Errhandler

```

```

count = txtCount.Text
'Set the FAI parameters
AdvAI1.TraceTriggerMode = cmbTriggerMode.ListIndex
AdvAI1.TraceTriggerEdge = cmbTriggerEdge.ListIndex
AdvAI1.TraceTriggerSource = cmbTriggerSource.ListIndex
AdvAI1.DataPacerSource = cmbPacerSource.ListIndex
AdvAI1.TraceTriggerDelayTime = CDb(txtTriggerDelayTime.Text)
AdvAI1.TraceTriggerValue = CDb(txtTriggerVoltage.Text)
AdvAI1.ChannelScanStart = txtStartChan.Text
' Set scan channel count before set the sample rate
AdvAI1.ChannelScanCount = txtChanNumber.Text
AdvAI1.DataSampleRate = txtSampleRate.Text
FileName = CommonDialog1.FileName
'Engage the FAI with synchronous mode
count = AdvAI1.AcquireBulkDataToFile(count, FileName, 0, True)
' Retrieve the actual sample rate
txtSampleRate.Text = AdvAI1.DataSampleRate
txtCount.Text = count
CookedFile = Replace(FileName, ".dat", ".txt")
'Convert the data from digital to analog
AdvAI1.ConvertDigitalFileToAnalog FileName, CookedFile, "%9.7f" & Chr(9), Chr(10)
' frmDisplay.Show , Me
' frmDisplay.RichTextBox1.LoadFile CookedFile, 1
' Read cooked file
m = Int(CLng(count) / 2#)
ReDim voltage0(m)
ReDim voltage1(m)
ReDim elapsedtime(m)
Open CookedFile For Input As #1
i = -1
' Do While EOF(1) = False
For i = 1 To m
'   i = i + 1
Input #1, voltage0(i), voltage1(i)
Next i
' Loop
Close #1
' Write cooked file with time as addition column
Open CookedFile For Output As #2
For k = 1 To m
elapsedtime(k) = (k - 1) * Val(txtChanNumber.Text) / Val(txtSampleRate.Text)
voltage1(k) = voltage1(k) * txtCR.Text
Write #2, elapsedtime(k), voltage0(k), voltage1(k)
Next k
Close #2
AdvGraph1.PlotXvsY elapsedtime, voltage1
AdvGraph2.PlotXvsY elapsedtime, voltage0
Exit Sub
FileDlgErr:
Exit Sub
Errhandler:
MsgBox AdvAI1.LastErrorMessage
AdvAI1.StopAcquireBulkData (0)
End Sub
Private Sub cmdStop_Click()
'Stop the FAI with default waiting time
AdvAI1.StopAcquireBulkData (0)
End Sub
Private Sub SetProperties()
'Update UI components' content
txtDeviceNumber.Text = AdvAI1.DeviceNumber
labDeviceName.Caption = AdvAI1.DeviceName

```

```

labResolution.Caption = AdvAI1.Resolution
cmbTriggerMode.ListIndex = AdvAI1.TraceTriggerMode
cmbTriggerEdge.ListIndex = AdvAI1.TraceTriggerEdge
cmbTriggerSource.ListIndex = AdvAI1.TraceTriggerSource
cmbPacerSource.ListIndex = AdvAI1.DataPacerSource
txtTriggerDelayTime.Text = Str(AdvAI1.TraceTriggerDelayTime)
txtTriggerVoltage.Text = Str(AdvAI1.TraceTriggerValue)
txtSampleRate.Text = AdvAI1.DataSampleRate
txtStartChan.Text = AdvAI1.ChannelScanStart
txtChanNumber.Text = AdvAI1.ChannelScanCount
End Sub
Private Sub Ein_DragDrop(Source As Control, X As Single, Y As Single)
End Sub
Private Sub Command3_Click()
Text5.Text = 2 * (Abs(Val(Text2.Text)) + Abs(Val(Text3.Text))) / Val(Text4.Text)
End Sub
Private Sub Form_Load()
cmbTriggerMode.AddItem ("None")
cmbTriggerMode.AddItem ("Post")
cmbTriggerMode.AddItem ("Delay")
cmbTriggerEdge.AddItem ("Rising edge")
cmbTriggerEdge.AddItem ("Falling edge")
cmbTriggerSource.AddItem ("Digital")
cmbTriggerSource.AddItem ("AI or AI0")
cmbTriggerSource.AddItem ("AI1")
cmbTriggerSource.AddItem ("AI2")
cmbTriggerSource.AddItem ("AI3")
cmbPacerSource.AddItem ("Internal")
cmbPacerSource.AddItem ("External (Ext CLK 0)")
cmbPacerSource.AddItem ("External clock 1")
' Calculate the experimental time
txtTime.Text = 2 * Abs(txtEinit.Text - txtEfin.Text) / txtSR.Text
' Calculate total number of points for all channels
txtCount.Text = txtTime.Text * txtSampleRate.Text
SetProperties
AdvAI1.DeviceNumber = 0
AdvAI1.SetValueRange 0, -1.25, 1.25
AdvAI1.SetValueRange 1, -1.25, 1.25
End Sub
Private Sub txtEfin_LostFocus()
txtTime.Text = 2 * Abs(txtEinit.Text - txtEfin.Text) / txtSR.Text
End Sub
Private Sub txtEinit_LostFocus()
txtTime.Text = 2 * Abs(txtEinit.Text - txtEfin.Text) / txtSR.Text
End Sub
Private Sub txtSampleRate_Change()
txtCount.Text = txtTime.Text * txtSampleRate.Text
End Sub
Private Sub txtSampleRate_LostFocus()
txtTime.Text = 2 * Abs(txtEinit.Text - txtEfin.Text) / txtSR.Text
End Sub
Private Sub txtSR_LostFocus()
txtTime.Text = 2 * Abs(txtEinit.Text - txtEfin.Text) / txtSR.Text
End Sub
Private Sub txtTime_Change()
txtCount.Text = txtTime.Text * txtSampleRate.Text
End Sub

```