

Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο
Σχολή Χημικών Μηχανικών
Τομέας Επιστήμης και Τεχνικής Υλικών

Διπλωματική Εργασία

Ακίνητοποίηση βιολογικών μορίων σε
μορφοποιημένα ηλεκτρόδια με μεταλλικούς
αφρούς και νανοσύνθετα υλικά

Ευδού Ραφαέλα-Μοσχούλα
Επιβλέπων Καθηγητής: Καραντώνης Αντώνης

Αθήνα 2021

Πρόλογος

Η παρούσα διπλωματική εργασία εκπονήθηκε στο εργαστήριο Φυσικοχημείας και Εφαρμοσμένης Ηλεκτροχημείας του Εθνικού Μετσοβίου Πολυτεχνείου το ακαδημαϊκό έτος 2020-2021.

Αρχικά θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Αναπληρωτή Καθηγητή Καραντώνη Αντώνη για την ανάθεση του συγκεκριμένου θέματος. Ο κύριος Καραντώνης ήταν ουσιαστικά παρών καθ' όλη την διάρκεια της διπλωματικής και πρόθυμος να λύσει οποιοσδήποτε απορίες και να καταστήσει κατανοητό το αντικείμενο. Επίσης πάντα με περίσσιο διδακτικό ζήλο έθετε προβληματισμούς άξιους περεταίρω διερεύνησης που γεννούσαν ιδέες για πειραματική αναζήτηση και ανεξαρτήτου αποτελέσματος βοηθούσαν στην καλύτερη κατανόηση των πραγμάτων και συντελούσαν στην δημιουργία νέων διόδων σκέψης.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον μεταδιδακτορικό φοιτητή Ζουράρη Δημήτρη για την πολύτιμη συμβολή του στην κατάρτιση μου τόσο σε θέματα εργαστηρίου όσο και στο μελετώμενο αντικείμενο από την πρώτη μέρα. Πάντα με μεγάλη προθυμία να απαντήσει σε οποιοδήποτε ερώτημα, πολύ κατατοπιστικός και με ευρηματικές ιδέες και λύσεις για οποιοδήποτε θέμα και αν προέκυπτε στο εργαστήριο.

Ακόμη θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Αργυρούση Χρήστο και στα μέλη του εργαστηρίου Ανόργανης Χημείας και Τεχνολογίας για την ιδιαίτερη τους βοήθεια και τον χρόνο που αφιέρωσαν για την παρασκευή των νανοσύνθετων υλικών.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου για τις αξέχαστες αναμνήσεις που θα συντροφεύουν πάντα αυτά τα χρόνια και σαφώς του γονείς μου και τον αδελφό μου για την ατέρμονη και αμέριστη στήριξη και συμπαράσταση τους σε κάθε μου βήμα.

Περίληψη

Στην παρούσα διπλωματική εργασία τελείται η μελέτη από θερμοδυναμική και κινητική σκοπιά των οξειδοαναγωγικών ενζύμων λυτικές μονοξυγενάσες των πολυσακχαριτών (Lytic polysaccharide monoxygenases LPMOs). Συγκεκριμένα μελετάται η LPMO που ανήκει στην οικογένεια AA9 και καλείται Mt-LPMO9H.

Στην εισαγωγή γίνεται μνεία στα οξειδοαναγωγικά ένζυμα και στις δυνατότητες ηλεκτροχημικής μελέτης τους που συνοδεύεται με ποικίλες πληροφορίες για τις ιδιότητες και την δράση τους αλλά και διάφορα μειονεκτήματα. Γίνεται λόγος για τις προοπτικές που δίνει η ακινητοποίηση των ενζύμων για την ηλεκτροχημική μελέτη τους και παρουσιάζονται οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες τεχνικές ακινητοποίησης, συμπεριλαμβανομένων και αυτών που αξιοποιήθηκαν στην παρούσα ανάλυση. Ακολουθεί μια θεωρητική ανασκόπηση για τα ένζυμα LPMOs και τα βασικά δομικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά που εμφανίζουν. Ακολούθως εισάγονται οι βασικές έννοιες των ηλεκτροχημικών μεθόδων που χρησιμοποιούνται. Οι μέθοδοι αυτοί είναι η κυκλική βολταμετρία, η κυκλική βολταμετρία εναλλασσόμενου ρεύματος με μετασχηματισμό Fourier και η φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης.

Η μελλοντική χρήση των LPMOs σε διάφορες εφαρμογές προϋποθέτει την μελέτη και τον προσδιορισμό των θερμοδυναμικών και κινητικών τους σταθερών. Έτσι λοιπόν με την αρωγή της FTaCV ανάλυσης από τις κορυφές των αρμονικών που λαμβάνονται θα προσδιορισθεί πειραματικά το φαινόμενο δυναμικό του ακινητοποιημένου ενζύμου, δηλαδή του ενζύμου που έχει εγκλειστεί μέσα στην μήτρα νανοσύνθετου υλικού Co-f-MWCNTs και πολυηλεκτρολύτη Nafion. Ακολούθως για τον προσδιορισμό του φαινόμενου δυναμικού του ελεύθερου ενζύμου θα γίνει διόρθωση του προτύπου δυναμικού του ακινητοποιημένου με χρήση εμπειρικού τύπου. Ακολούθως θα γίνει ο προσδιορισμός της κινητικής σταθεράς k_0 του ενζύμου. Επίσης επαναλαμβάνονται τα πειράματα FTaCV ακινητοποιημένου ενζύμου MtLPMO9H σε νέα νανοσύνθετα υλικά Co-f-MWCNTs και Ni-f-MWCNTs με σκοπό την μελέτη της επίδρασης της μήτρας στην ηλεκτροχημική ανάλυση του ενζύμου.

Ακολουθεί η μελέτη της διεπιφανειακής συμπεριφοράς τις ιστιδίνης με ηλεκτρόδια νικελίου, κοβαλτίου και αφρού νικελίου, καθώς η ιστιδίνη εμφανίζει συγγένεια με μεταλλικά ιόντα καθιστώντας δυνατή την ακινητοποίηση. Η ιστιδίνη συμμετέχει στην σύνδεση των μεταλλικών ιόντων του ενεργού κέντρου στα διάφορα ένζυμα οπότε η συμπεριφορά της

μπορεί να φανερώσει την δυνητική συμπεριφορά του ενζύμου. Οι αναλύσεις αυτές θα γίνουν με φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης.

Abstract

In this dissertation, the study of the redox enzymes lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) is presented from a thermodynamic and kinetic perspective, using LPMO's, belonging to the AA9 family, named Mt-LPMO9H.

In the introduction, the electrochemical study capabilities of the redox enzymes are reviewed, as well as a variety of information on their properties, effects, and pitfalls. Further, discussion is conducted on the prospects for enzyme immobilization, and the most widely applied immobilization techniques, including those used in the present analysis. A theoretical review of LPMOs enzymes, basic structural and functional characteristics is followed by a detailed analysis of the basic concepts of the electrochemical methods used, which are Cyclic Voltammetry (CV), Fourier Transformation large amplitude alternating Current Voltammetry (FTaCV) and Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS).

The future use of LPMOs in various applications requires the study and determination of their thermodynamic and kinetic constants. FTaCV analysis from the peaks of the harmonics obtained, will experientially determine the formal potential of the immobilized enzyme, which is encapsulated in the matrix of nanocomposite material Co-f-MWCNTs and Nafion polyelectrolyte. Then, to determine the formal potential of the free enzyme, the standard potential of the immobilized one will be corrected using an empirical formula. Next, the kinetic constant k^0 of the enzyme will be determined. The FTaCV immobilized MtLPMO9H enzyme experiments in new nanocomposites Co-f-MWCNTs and Ni-f-MWCNTs are also repeated to study the effect of the matrix on the electrochemical analysis of the enzyme.

The following is the study of the interfacial behavior of histidine with Ni, Co and Ni -foam electrodes, as the former exhibits affinity for metal ions enabling immobilization. Histidine is involved in the binding of the active ion metal ions to the various enzymes so that its behavior can reveal the potential behavior of the enzyme. These analyzes will be performed by electrochemical impedance spectroscopy.

Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	12
1.1 Ηλεκτροχημική μελέτη ενζύμων.....	12
1.2 Μέθοδοι ακινητοποίησης ενζύμων.....	14
1.3 LPMOs.....	18
1.3.1 Οικογένειες LPMOs.....	19
1.3.2 Δομή.....	19
1.3.3 Μηχανισμοί.....	21
1.3.4 Τοποεκλεκτικότητα.....	25
1.3.5 Δότες ηλεκτρονίων.....	25
1.3.6 Μεταφορά ηλεκτρονίων κατά την κατάλυση.....	26
1.3.7 Αλληλεπίδραση και σύνδεση με υποστρώματα.....	27
1.3.8 Αυτό-απενεργοποίηση των LPMOs.....	27
1.3.9 Μέθοδοι Χαρακτηρισμού.....	28
1.3.10 Εφαρμογές LPMOs.....	29
1.3.11 Ιστιδίνη.....	30
1.4 Ηλεκτροχημικές Μέθοδοι.....	31
1.4.1 Κυκλική βολταμμετρία (CV).....	31
1.4.2 Κυκλική βολταμμετρία εναλλασσόμενου ρεύματος με μετασχηματισμό Fourier (FTaCV).....	39
1.4.3 Φασματοσκοπία Ηλεκτροχημικής Εμπέδησης (EIS).....	45
Βιβλιογραφία.....	48
2. Φαινόμενο δυναμικό ακινητοποιημένων και ελεύθερων ενζύμων.....	50
2.1 Επίδραση της μήτρας του πολυηλεκτρολύτη στο φαινόμενο δυναμικό.....	51
2.2 Πειραματικός προσδιορισμός του φαινομένου δυναμικού.....	55
2.3 Κυκλική βολταμμετρία (CV).....	56
2.4 Κυκλική βολταμμετρία εναλλασσόμενου ρεύματος με μετασχηματισμό Fourier (FtaCV).....	58
2.7 Διόρθωση φαινομένου δυναμικού ενζύμου μέσω συσχέτισης με οξειδοαναγωγικό είδος το φερροκενίου (ferrocene).....	63
Βιβλιογραφία.....	66
3. Ηλεκτροχημικός προσδιορισμός των κινητικών σταθερών του ενζύμου MtLPMO9H.....	67
3.1 Θεωρητικό υπόβαθρο.....	67
3.2 Πειραματική διαδικασία.....	73
3.3 Πειραματικός προσδιορισμός της k^0	77
3.4 Δοκιμές ακινητοποίησης του ενζύμου MtLPMO9H με νέα νανοσύνθετα Co-f-MWCNTs και Ni-f-MWCNTs.....	80

Βιβλιογραφία	84
4. Ηλεκτροχημική εμπέδηση ηλεκτροδίων νικελίου και κοβαλτίου παρουσία ιστιδίνης.....	85
4.1 Σύμπλοκα κοβαλτίου ιστιδίνης	85
4.2 Σύμπλοκα νικελίου ιστιδίνης	86
4.3 Πειραματικό μέρος.....	89
4.4 Φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης.....	90
4.5 Το μοντέλο.....	101
Βιβλιογραφία	105
5. Ηλεκτροχημική εμπέδηση αφρού νικελίου παρουσία ιστιδίνης.....	106
5.1 Πειραματική διαδικασία	107
5.2 Δυναμικό ανοικτού κυκλώματος.....	108
5.3 Φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης.....	109
5.4 Το μοντέλο.....	114
Βιβλιογραφία	118
6. Συμπεράσματα	119

Πίνακας Εικόνων

Σχήμα 1.1 Τεχνικές ακινητοποίησης ενζύμου [7].	15
Σχήμα 1.2 : Η τρισδιάστατη δομή μιας τυπικής LPMOs και του ενεργού της κέντρου στην πάνω εικόνα φαίνεται η κρυσταλλική της δομή ενώ στην κάτω το καταλυτικό ενεργό κέντρο μιας AA9 LPMOs.[11].	20
Σχήμα 1.3: Η δομή και το ενεργό κέντρο των διαφορετικών οικογενειών LPMOs, όπως φαίνεται στην πρώτη σειρά όλες εμφανίζουν έναν χαρακτηριστικό σύνδεσμο ιστιδίνης που αποτελείται από N-terminal ιστιστίνη, ένα εσωτερικό κατάλοιπο ιστιδίνης που συντονίζει το ιόν χαλκού(καφέ σφαίρα) και ένα κατάλοιπο τυροσίνης .Στην κάτω σειρά παρατηρείται ότι όλες εμφανίζουν αναδιπλώσεις της μορφής της ανοσοσφαιρίνης ,ωστόσο διαφοροποιούνται στην τοπολογία της επιφάνειάς τους (γκρι περίγραμμα),όπως προκύπτει από τους βρόγχους και τις έλικες που σχηματίζονται. [14].	21
Σχήμα 1.4: Μηχανισμός διάσπασης με χρήση συνυποστρώματος H ₂ O ₂ για την αποδόμηση πολυσακχαριτών. Συγκεκριμένα η LPMO-Cu(II) αρχικά ανάγεται σε LPMO-Cu(I), η οποία αντιδρά με το H ₂ O ₂ παρουσία υποστρώματος. Η αντίδραση εξαλείφει ένα μόριο νερού και παράγει το ενδιάμεσο είδος Cu(II)-OH το οποίο μπορεί να αποσπάσει ένα άτομο υδρογόνου από το υπόστρωμα , το είδος που σχηματίζεται ενώνεται με μια ρίζα του υποστρώματος με αποτέλεσμα την υδροξυλίωση του και την αναγέννηση του ενεργού κέντρου του ενζύμου Cu(I) [17].	22
Σχήμα 1.5: C1 και C4 τοποεκλεκτικότητα των LPMOs [9]	25
Σχήμα 1.6 Μόριο L-ιστιδίνης.	30
Σχήμα 1.7 Αντιδράσεις ισορροπίας ιστιδίνης.	31
Σχήμα 1.8: Σχηματική αναπαράσταση διαγράμματος δυναμικού συναρτήσε του χρόνου κατά την κυκλική βολταμετρία και κυκλικό βολταμμογράφημα οξειδοαναγωγικής αντίδρασης ενός ηλεκτρονίου. [21]	32
Σχήμα 1.9 Κυκλικά βολταμμογραφήματα αντιστρεπτής ημιαντιστρεπτής και αναντιστρεπτής δράσης [23]	33
Σχήμα 1.10 Μέθοδος FTaCV [21]	40
Σχήμα 1.11 Διάγραμμα Nyquist [27]	47
Σχήμα 1.12 Διαγράμματα Bode [27]	47
Σχήμα 2.1: Πτώσεις τάσεις σε ηλεκτρόδιο παρουσία μεμβράνης πολυηλεκτρολύτη	52
Σχήμα 2.2: Κυκλική βολταμετρία για διαφορετικές συγκεντρώσεις κατιόντων.	54
Σχήμα 2.3: Εξάρτηση του φαινόμενου δυναμικού από τη συγκέντρωση των κατιόντων.	55
Σχήμα 2.4: Κυκλικό βολταμμογράφημα ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMOs σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer με ταχύτητα σάρωσης 100 mV/s.	57
Σχήμα 2.5: Κυκλικά βολταμμογραφήματα ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMOs σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer με ταχύτητες σάρωσης 1,5,10,25,50,75,100 mV/s.	58
Σχήμα 2.6: 3η αρμονική ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMOs με Nafion σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης A ₀ =200 mV. Για επιβαλλόμενες συχνότητες 5,3 και 1 Hz η ταχύτητα σάρωσης που εφαρμόζεται είναι 5mV/s και για συχνότητες 0.5, 0.2 και 0.1 Hz οι ταχύτητες σάρωσης που εφαρμόζονται είναι 2.5, 1.25, 1 mV/s αντίστοιχα.	59
Σχήμα 2.7: 5η αρμονική ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMOs με Nafion σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης A ₀ =200 mV. Για επιβαλλόμενες συχνότητες 5,3 και 1 Hz η	

ταχύτητα σάρωσης που εφαρμόζεται είναι 5mV/s και για συχνότητες 0.5, 0.2 και 0.1 Hz οι ταχύτητες σάρωσης που εφαρμόζονται είναι 2.5, 1.25, 1 mV/s αντίστοιχα.....	59
Σχήμα 2.8: 3η αρμονική στρώματος Nafion απουσία ενζύμου σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης $A_0=200$ mV. Για επιβαλλόμενες συχνότητες 5,3 και 1 Hz η ταχύτητα σάρωσης που εφαρμόζεται είναι 5mV/s και για συχνότητες 0.5, 0.2 και 0.1 Hz οι ταχύτητες σάρωσης που εφαρμόζονται είναι 2.5, 1.25, 1 mV/s αντίστοιχα.....	60
Σχήμα 2.9: 5η αρμονική στρώματος Nafion απουσία ενζύμου σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης $A_0=200$ mV . Για επιβαλλόμενες συχνότητες 5,3 και 1 Hz η ταχύτητα σάρωσης που εφαρμόζεται είναι 5mV/s και για συχνότητες 0.5, 0.2 και 0.1 Hz οι ταχύτητες σάρωσης που εφαρμόζονται είναι 2.5, 1.25, 1 mV/s αντίστοιχα.....	61
Σχήμα 2.10: Κυκλικά βολταμμογραφήματα ελεύθερου ferrocene με tartrate buffer που έχει υποστεί διήθηση με ταχύτητες σάρωσης 10,25,50,75,100 mV/s.	64
Σχήμα 2.11: Κυκλικά βολταμμογραφήματα ελεύθερου είδους ferrocene με ακετυλονιτρίλιο και tartrate buffer με ταχύτητες σάρωσης 10,25,50,75,100 mV/s.....	65
Σχήμα 2.12: Κυκλικά βολταμμογραφήματα ακινητοποιημένου ferrocene με Nafion σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), με φέροντα ηλεκτρολύτη 0.1 M tartrate buffer pH=5 με ταχύτητες σάρωσης 10,25,50,75 mV/s.	65
Σχήμα 3.1: Πλάτος της κυρίαρχης κορυφής σε συνάρτηση με την κινητική σταθερά για την 3η (α) και την 5η (β) αρμονική. Τιμές παραμέτρων $\alpha = 0.5$, $\sigma = 1$ και α_0 από 1.947 (50/n mV στους 298 K) έως 11.683 (300/n mV στους 298 K) με βήμα 1.947 (50/n mV στους 298 K) από δεξιά προς τα αριστερά.....	70
Σχήμα 3.2: Εξάρτηση του δυναμικού της κυρίαρχης κορυφής από το πλάτος για $\alpha = 0.5$ και $\sigma = 1$. Η μεταβολή της α_0 είναι ίδια με αυτή του Σχ. 3.1.....	71
Σχήμα 3.3: Κανονικοποιημένη 3η αρμονική για $A_0 = 150$ mV και διαφορετικές τιμές συχνότητας.....	72
Σχήμα 3.4: Εξάρτηση του δυναμικού της κορυφής της 3ης αρμονική από τη συχνότητα, για $A_0 = 150$ mV.....	72
Σχήμα 3.5: Προσδιορισμός της k^0	72
Σχήμα 3.6: 3η αρμονική ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMO9H με Nafion σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης $A_0=200$ mV. Για επιβαλλόμενες συχνότητες 5,3 και 1 Hz η ταχύτητα σάρωσης που εφαρμόζεται είναι 5mV/s και για συχνότητες 0.5, 0.2 και 0.1 Hz οι ταχύτητες σάρωσης που εφαρμόζονται είναι 2.5, 1.25, 1 mV/s αντίστοιχα.....	74
Σχήμα 3.7: Κανονικοποιημένη 3η αρμονική ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMO9H με Nafion σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης $A_0=200$ mV. Για επιβαλλόμενες συχνότητες 5,3 και 1 Hz η ταχύτητα σάρωσης που εφαρμόζεται είναι 5mV/s και για συχνότητες 0.5, 0.2 και 0.1 Hz οι ταχύτητες σάρωσης που εφαρμόζονται είναι 2.5, 1.25, 1 mV/s αντίστοιχα.....	75
Σχήμα 3.8: 4η αρμονική ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMO9H με Nafion σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης $A_0=200$ mV. Για επιβαλλόμενες συχνότητες 5,3 και 1 Hz η ταχύτητα σάρωσης που εφαρμόζεται είναι 5mV/s και για	

συχνότητες 0.5, 0.2 και 0.1 Hz οι ταχύτητες σάρωσης που εφαρμόζονται είναι 2.5, 1.25, 1 mV/s αντίστοιχα.	75
Σχήμα 3.9: Κανονικοποιημένη 4η αρμονική ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMO9H με Nafion σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης $A_0=200$ mV. Για επιβαλλόμενες συχνότητες 5,3 και 1 Hz η ταχύτητα σάρωσης που εφαρμόζεται είναι 5mV/s και για συχνότητες 0.5, 0.2 και 0.1 Hz οι ταχύτητες σάρωσης που εφαρμόζονται είναι 2.5, 1.25, 1 mV/s αντίστοιχα.	76
Σχήμα 3.10: 5η αρμονική ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMO9H με Nafion σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης $A_0=200$ mV. Για επιβαλλόμενες συχνότητες 5,3 και 1 Hz η ταχύτητα σάρωσης που εφαρμόζεται είναι 5mV/s και για συχνότητες 0.5, 0.2 και 0.1 Hz οι ταχύτητες σάρωσης που εφαρμόζονται είναι 2.5, 1.25, 1 mV/s αντίστοιχα.	76
Σχήμα 3.11: Κανονικοποιημένη 5η αρμονική ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMO9H με Nafion σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης $A_0=200$ mV. Για επιβαλλόμενες συχνότητες 5,3 και 1 Hz η ταχύτητα σάρωσης που εφαρμόζεται είναι 5mV/s και για συχνότητες 0.5, 0.2 και 0.1 Hz οι ταχύτητες σάρωσης που εφαρμόζονται είναι 2.5, 1.25, 1 mV/s αντίστοιχα.	77
Σχήμα 3.12 Κανονικοποιημένο ύψος κορυφών 3 ^{ης} , 4 ^{ης} και 5 ^{ης} αρμονικής ακινητοποιημένου ενζύμου MtLPMO9H σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης $A_0=200$ mV σε διάφορες συχνότητες και ταχύτητες σάρωσης αντίστοιχα.	78
Σχήμα 3.13: Νομογραφήματα για 3η, 4η, 5η, 6η αρμονική για παράγοντα ασυμμετρίας $\alpha=0.5$	79
Σχήμα 3.14: Κυκλικό βολταμμογράφημα ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMOs σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer με ταχύτητα σάρωσης 50 mV/s.	82
Σχήμα 3.15: 5η αρμονική ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMOs με Nafion σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης $A_0=200$ mV. Για επιβαλλόμενες συχνότητες 5,3 και 1 Hz η ταχύτητα σάρωσης που εφαρμόζεται είναι 5mV/s.	82
Σχήμα 3.16: Κυκλικό βολταμμογράφημα ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMOs σε τροποποιημένο με Ni-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer με ταχύτητα σάρωσης 50 mV/s.	83
Σχήμα 3.17: 5η αρμονική ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMOs με Nafion σε τροποποιημένο με Ni-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης $A_0=200$ mV. Για επιβαλλόμενες συχνότητες 5,3 και 1 Hz η ταχύτητα σάρωσης που εφαρμόζεται είναι 5mV/s.	83
Σχήμα 4.1: Ηλεκτροχημική εμπέδηση σε 0 (μπλε) ,30 (κόκκινο) ,60 min (πορτοκαλί) ηλεκτροδίου κοβαλτίου σε διάλυμα με pH 4, απουσία ιστιδίνη.	93
Σχήμα 4.2: Ηλεκτροχημική εμπέδηση σε 0 (μπλε) ,30 (κόκκινο) ,60 min (πορτοκαλί) ηλεκτροδίου κοβαλτίου σε διάλυμα με pH 4, παρουσία ιστιδίνης.....	94
Σχήμα 4.3: Ηλεκτροχημική εμπέδηση σε 0 (μπλε) ,30 (κόκκινο) ,60 min (πορτοκαλί) ηλεκτροδίου κοβαλτίου σε διάλυμα με pH 8, απουσία ιστιδίνης.....	95
Σχήμα 4.4: Ηλεκτροχημική εμπέδηση σε 0 (μπλε) ,30 (κόκκινο) ,60 (πορτοκαλί), 90 min(μωβ) ηλεκτροδίου κοβαλτίου σε διάλυμα με pH 8, παρουσία ιστιδίνης.....	96

Σχήμα 4.5: Ηλεκτροχημική εμπέδηση σε 0 (μπλε) ,30 (κόκκινο) ,60 (πορτοκαλί), 90 min(μωβ) 120 min (πράσινο) ηλεκτροδίου νικελίου σε διάλυμα με pH 4, απουσία ιστιδίνης.	98
Σχήμα 4.6: Ηλεκτροχημική εμπέδηση σε 0 (μπλε) ,30 (κόκκινο) ,60 (πορτοκαλί), 90 min(μωβ) ηλεκτροδίου νικελίου σε διάλυμα με pH 4, παρουσία ιστιδίνης.	99
Σχήμα 4.7: Ηλεκτροχημική εμπέδηση σε 0 (μπλε) ,30 (κόκκινο) ,60 (πορτοκαλί), 90(μωβ) , 120 min (πράσινο) ηλεκτροδίου νικελίου σε διάλυμα με pH 8, παρουσία ιστιδίνης και 0 min (κίτρινο) απουσία ιστιδίνης.	100
Σχήμα 4.8: Ισοδύναμο κύκλωμα κοβαλτίου σε pH 4, απουσία και παρουσία ιστιδίνης και σε pH 8 παρουσία ιστιδίνης.	101
Σχήμα 4.9: Ισοδύναμο κύκλωμα κοβαλτίου σε pH 8 απουσία ιστιδίνης.	102
Σχήμα 4.10: Ηλεκτρόδιο κοβαλτίου σε pH 4 απουσία ιστιδίνης (μπλέ) και παρουσία ιστιδίνης (κόκκινο)	103
Σχήμα 4.11: Ηλεκτρόδιο κοβαλτίου σε pH 8 απουσία ιστιδίνης (μπλέ) και παρουσία ιστιδίνης (κόκκινο)	104
Σχήμα 5.1: Εικόνα αφρού νικελίου	106
Σχήμα 5.2: Μεταβολή του δυναμικού ανοικτού κυκλώματος ηλεκτροδίου αφρού νικελίου σε διάλυμα με pH 8, απουσία ιστιδίνης (κόκκινο), και παρουσία ιστιδίνης (μαύρο και μωβ).	108
Σχήμα 5.3: Ηλεκτροχημική εμπέδηση σε 0 (κόκκινο), 121 (μαύρο), 185 (μωβ), 277 (πράσινο), 370 (γαλάζιο) και 462 min (κίτρινο) ηλεκτροδίου αφρού νικελίου σε διάλυμα με pH 8, απουσία ιστιδίνης.	110
Σχήμα 5.4: Ηλεκτροχημική εμπέδηση σε 0 (κόκκινο), 96 (μαύρο), 188 (μωβ), 284 (πράσινο), 366 (γαλάζιο) και 467 min (κίτρινο) ηλεκτροδίου αφρού νικελίου σε διάλυμα με pH 8, παρουσία ιστιδίνης.	111
Σχήμα 5.5: Ηλεκτροχημική εμπέδηση σε 0 (κόκκινο), 97 (μαύρο), 200 (μωβ), 292 (πράσινο), 386 (γαλάζιο) και 487 min (κίτρινο) ηλεκτροδίου αφρού νικελίου σε διάλυμα με pH 8, παρουσία ιστιδίνης.	113
Σχήμα 5.6: Ισοδύναμο κύκλωμα αφρού νικελίου σε pH 8, απουσία και παρουσία ιστιδίνης.	114
Σχήμα 5.7: Διαγράμματα χωρητικότητας αντιστάσεων και χρονικής σταθεράς με τον χρόνο απουσία (κόκκινο) και παρουσία (μαύρο και μωβ) ιστιδίνης.	117

1. Εισαγωγή

1.1 Ηλεκτροχημική μελέτη ενζύμων

Ως οξειδοαναγωγικά ένζυμα ορίζονται οι πρωτεΐνες που καταλύουν την μεταφορά ηλεκτρονίων μέσω της αναγωγής ή της οξείδωσης υποστρωμάτων. Αυτή η ιδιότητα τους επιτρέπει την ηλεκτροχημική μελέτη τους, η οποία όμως δεν είναι πάντα εύκολη λόγω του μεγάλου μοριακού βάρους των οξειδοαναγωγικών ενζύμων και του γεγονότος ότι το ενεργό κέντρο των περισσότερων ενζύμων είναι «θαμμένο» στον κύριο όγκο τους και όχι εκτεθειμένο στην επιφάνεια της δομής τους καθιστώντας δύσκολη την ανάλυση [1].

Οι βολταμετρικές τεχνικές εμφανίζουν ποικίλα πλεονεκτήματα για την ανάλυση οξειδοαναγωγικών ενζύμων, καθώς διεξάγουν γρήγορες και άμεσες μετρήσεις των οξειδοαναγωγικών ιδιοτήτων των ενζύμων και μπορεί να εφαρμοσθεί ένα μεγάλο εύρος δυναμικών.

Είναι σημαντικό η πρωτεΐνη να συνδέεται στο ηλεκτρόδιο με κατάλληλο προσανατολισμό ώστε να γίνεται γρήγορη μεταφορά ηλεκτρονίων, να μην προκαλείται η μετουσίωσή της και να μην προσροφά άλλα μόρια που να παρεμποδίζουν την ηλεκτροδιακή επιφάνεια. Η επιτυχημένη λοιπόν διεξαγωγή των βολταμετρικών τεχνικών βασίζεται στην προετοιμασία και την τροποποίηση των ηλεκτροδίων. Η απόκριση του ρεύματος μπορεί να προέρχεται είτε από πρωτεϊνικά μόρια ελεύθερα στο διάλυμα, τα οποία μέσω κάποιας αντίδρασης διαχέονται προς την ηλεκτροδιακή επιφάνεια. Σε αυτή την περίπτωση η ανταλλαγή ηλεκτρονίων λαμβάνει χώρα μεταξύ της ηλεκτροδιακής επιφάνειας και του κύριου όγκου του διαλύματος. Είτε προέρχεται από μόρια τα οποία είναι ήδη ισχυρά συνδεδεμένα, πιθανώς προσροφημένα, στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια. Τα μόρια αυτά είναι ακινητοποιημένα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου με την μορφή ενός σταθερού, πορώδους φιλμ διευκολύνοντας την μεταφορά ηλεκτρονίων και διατηρώντας τα δομικά τους χαρακτηριστικά και τις ιδιότητες τους [2,3].

Διακρίνονται λοιπόν οι εξής περιπτώσεις ηλεκτροχημικής μελέτης των οξειδοαναγωγικών ενζύμων:

Η μεταφορά ηλεκτρονίων με την χρήση μεσολαβητή (mediator), ο οποίος διευκολύνει την μεταφορά των ηλεκτρονίων μεταξύ του ενζύμου και της ηλεκτροδιακής επιφάνειας. Συγκεκριμένα το υπόστρωμα, το ένζυμο και ο μεσολαβητής βρίσκονται ελεύθερα στο διάλυμα. Η ανηγμένη μορφή του υποστρώματος αντιδρά με την οξειδωμένη μορφή του

ενζύμου δίνοντας την οξειδωμένη μορφή του υποστρώματος και η ανηγμένη μορφή του ενζύμου. Ακολούθως η ανηγμένη μορφή του ενζύμου αντιδρά με την οξειδωμένη μορφή του μεσολαβητή δίνοντας την οξειδωμένη μορφή του ενζύμου και την ανηγμένη μορφή του μεσολαβητή. Τέλος ο μεσολαβητής οξειδώνεται στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια. Σε αυτή την περίπτωση η κατανάλωση του μεσολαβητή ανιχνεύεται ως ρεύμα που προκύπτει από την ηλεκτροχημική ανακύκλωσή του πάνω στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια [1,4]

Η άμεση μεταφορά ηλεκτρονίων από ένα ένζυμο ακινητοποιημένο πάνω στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια. Σε αυτή την περίπτωση το υπόστρωμα είναι ελεύθερο στο διάλυμα και η ανηγμένη του μορφή αντιδρά με την οξειδωμένη μορφή του ενζύμου με αποτέλεσμα να λαμβάνεται η οξειδωμένη μορφή του υποστρώματος και η ανηγμένη μορφή του ενζύμου. Στην συνέχεια το ένζυμο οξειδώνεται πάνω στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια που είναι ακινητοποιημένο. Οι αρχικές μελέτες άμεσης μεταφοράς ηλεκτρονίων παρουσίαζαν προβλήματα μετουσίωσης των ενζύμων και αναντιστρεπτότητας των δράσεων ωστόσο με την βελτίωση των μεθόδων ακινητοποίησης η πιο σημαντική παράμετρος που θα πρέπει να ικανοποιείται για την επιτυχία την άμεσης μεταφοράς ηλεκτρονίων είναι το ενεργό κέντρο του ενζύμου να βρίσκεται στην επιφάνεια του ενζύμου και να μην είναι θαμμένο στην κύριο όγκο του [1,2].

Η ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος είναι η κυκλική βολταμμετρία που εμφανίζει ωστόσο μερικά μειονεκτήματα όπως έλλειψη ευαισθησίας, διευρυμένες και παραμορφωμένες κορυφές για τον ακριβή προσδιορισμό των τιμών των δυναμικών, καθώς και υψηλά χωρητικά ρεύματα. Τα παραπάνω μειονεκτήματα απαντώνται και στην περίπτωση των ακινητοποιημένων ενζύμων. Συγκεκριμένα η διαφορά των κορυφών οξύνεται λόγω των πτώσεων τάσεως που λαμβάνουν χώρα ανάμεσα στην διεπιφάνειες ηλεκτροδίου και ακινητοποιημένου φιλμ και διαλύματος και ακινητοποιημένου φιλμ. Όσον αφορά τα χωρητικά ρεύματα στην περίπτωση των ακινητοποιημένων ενζύμων μπορεί να έχουν μεγαλύτερη επίδραση λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης των ενζύμων, γεγονός που ενέχει τον κίνδυνο της επικάλυψης την φαρανταϊκής απόκρισης. Για την αποφυγή των παραπάνω χρησιμοποιείται κυκλική βολταμμετρία εναλλασσόμενου ρεύματος με μετασχηματισμό Fourier (FTaCV), η οποία όπως και η κυκλική βολταμμετρία θα αναλυθούν σε επόμενη παράγραφο [1,4].

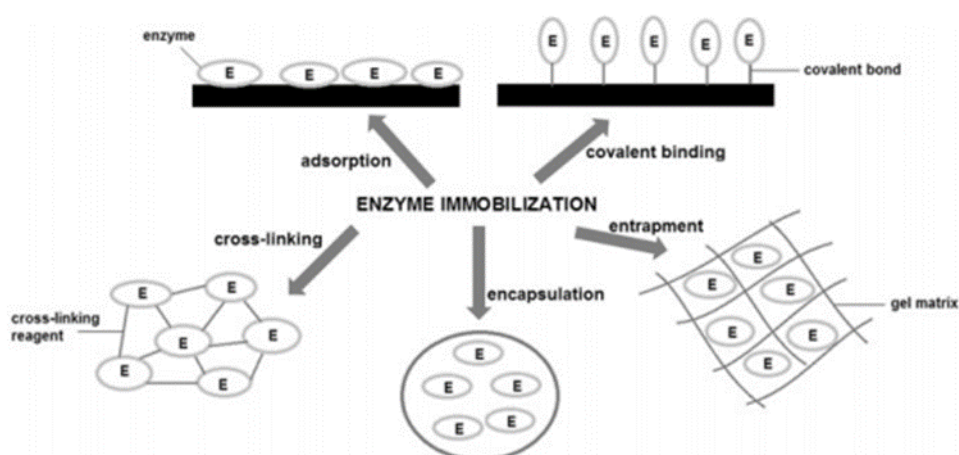
1.2 Μέθοδοι ακινητοποίησης ενζύμων

Τα ένζυμα αποτελούν πρωτεΐνες που καταλύουν βιοχημικές και χημικές αντιδράσεις. Αποτελούν καταλύτες με υψηλή καταλυτική δραστηριότητα εκλεκτικότητα και βιοαποικοδομησιμότητα και μπορούν να δράσουν σε ήπια pH, θερμοκρασίες και πιέσεις. Η μη δυνατή επαναχρησιμοποίησή τους όμως καθιστούσε την αξιοποίησή τους μη οικονομικά βιώσιμη. Αυτό το μειονέκτημα είναι δυνατόν να αντιμετωπιστεί με την ακινητοποίηση των ενζύμων. Οι τεχνικές ακινητοποίησης είναι ένα απαραίτητο στοιχείο για να επιτευχθεί η επαναχρησιμοποίηση των ενζύμων, θα πρέπει λοιπόν να είναι μια απλή διαδικασία και αν αυτό μπορεί να καταστεί δυνατό να μπορεί να στέκεται αρωγός στην βελτίωση των ιδιοτήτων των ενζύμων, όπως είναι η σταθερότητα των ενζύμων και η θερμική αντίσταση τους [5,6]. Ως ακινητοποίηση λοιπόν νοείται οποιαδήποτε τεχνική ικανή να επιτρέψει την επαναχρησιμοποίηση ή την συνεχόμενη χρήση του βιοκαταλύτη, γεγονός που κρίνεται απαραίτητο τόσο για τεχνικούς όσο και για οικονομικούς λόγους [5].

Τα ακινητοποιημένα βιομόρια έχουν εφαρμογές σε πολλούς κλάδους, όπως στην φαρμακευτική βιομηχανία, στην βιομηχανία τροφίμων στην διαχείριση αποβλήτων και αλλού. Γι' αυτό οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ακινητοποίηση θα πρέπει να διέπονται από απλότητα και ταχύτητα για να είναι αποτελεσματικές. Να μην απαιτούνται ειδικές κοστοβόρες συνθήκες για την τροποποίηση της επιφάνειας στην οποία λαμβάνει χώρα η ακινητοποίηση τους και η ακινητοποίηση να έχει μεγάλη διάρκεια ζωής για την επαναχρησιμοποίηση των ενζύμων που όπως αναφέρθηκε έχει μεγάλη σημασία. Πολύ σημαντικό κατά την ακινητοποίηση είναι να διατηρηθούν οι ιδιότητες και η λειτουργικότητα του βιομορίου, καθώς σε πολλές περιπτώσεις δομικές αλλαγές που λαμβάνουν χώρα κατά την ακινητοποίησή του συντελούν στην απενεργοποίησή του ή μπορεί να συμβεί ακινητοποίηση με λάθος προσανατολισμό που το συνδεδετικό υλικό της ακινητοποίησης να έχει υπερκαλύψει το ενεργό κέντρο του βιομορίου με αποτέλεσμα οι αναλύτες να μην έχουν πρόσβαση σε αυτό. Επίσης η ακινητοποίηση θα πρέπει να έχει τις προϋποθέσεις για να γίνει σε βιομηχανική κλίμακα πέρα από την εργαστηριακή για εφαρμογές μαζικής παραγωγής [7].

Όπως αναφέρθηκε η ακινητοποίηση των ενζύμων είναι μια πολύ σημαντική διαδικασία για την επαναχρησιμοποίηση και την αξιοποίηση και την ενίσχυση των καταλυτικών και άλλων τους ιδιοτήτων. Το ένζυμο πρέπει να ακινητοποιηθεί με τέτοιο τρόπο ώστε να εξασφαλισθεί η σταθερότητα του κατά την μέτρηση αλλά και η διατήρηση των φυσικοχημικών και καταλυτικών του ιδιοτήτων έπειτα από την ακινητοποίηση. Η ακινητοποίηση του βιομορίου στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια μπορεί να γίνει με προσρόφηση, παγίδευση, ομοιοπολική σύνδεση, ενθυλάκωση και οι σταυροδεσμοί [7]. Πέρα από τις τεχνικές ακινητοποίησης πολύ σημαντικό σκέλος αυτής είναι και οι βοηθητικοί φορείς, συνήθως χρησιμοποιούνται αδρανή πολυμερή και ανόργανα υλικά.

Ανάλογα με την αλληλεπίδραση του ενζύμου με τον βοηθητικό φορέα οι μέθοδοι ακινητοποίησης ενζύμων διακρίνονται σε φυσικές μεθόδους στις οποίες εντάσσεται η προσρόφηση και η παγίδευση, σε αυτές τις μεθόδους δεν λαμβάνουν χώρα ομοιοπολικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ενζύμου και του φορέα ακινητοποίησης. Αντίθετα στις χημικές μεθόδους κατατάσσονται η ομοιοπολική σύνδεση και οι σταυροδεσμοί. Στην παρούσα διπλωματική η ακινητοποίηση των ενζύμων γίνεται πάνω σε ηλεκτροδιακή επιφάνεια.



Σχήμα 1.1 Τεχνικές ακινητοποίησης ενζύμου [7].

- Προσρόφηση

Η προσρόφηση αποτελεί την πιο απλή και βολική μέθοδο ακινητοποίησης του ενζύμου στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια. Τελείται ή απευθείας στην επιφάνεια ή με την αρωγή ενός βοηθητικού υλικού αδιάλυτου στο νερό. Συγκεκριμένα γίνεται μια απόθεση του διαλύματος ενζύμου και βοηθητικού υλικού πάνω στην ηλεκτροδιακή επιφάνεια. Τα βοηθητικά υλικά που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι ιοντοεναλλακτικές ρητίνες, αλούμινα, πυριτία, πορώδεις γυαλί και κεραμικά. Τα ένζυμα προσροφούνται στις επιφάνειες των υλικών αυτών, μέσω ασθενών δυνάμεων van der Waals, ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων και υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων και στην συνέχεια τα η απομάκρυνση των μη προσροφημένων μορίων γίνεται με έκπλυση ή ακινητοποιούνται στους πόρους των μεσοπορώδων υλικών. Το βοηθητικό υλικό θα πρέπει να εμφανίζει συγγένεια με το ένζυμο και να μην καταστέλλει την δράση του επίσης δεν θα πρέπει να προσροφά προϊόντα της αντίδρασης ή παρεμποδιστές του ενζύμου. Παρά την απλότητα που εμφανίζει αυτή η τεχνική όσον αφορά στην οικονομική διεξαγωγή της, στις συνθήκες διεξαγωγής της και στην έλλειψη χρήσης χημικών καταστροφικών για το βιομόριο εμφανίζει και κάποια μειονεκτήματα με βασικότερο τις αδύναμες και αντιστρεπτές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ενζύμου και του βοηθητικού υλικού. Αυτές έχουν ως αποτέλεσμα την εκρόφηση του ενζύμου σε αλλαγές θερμοκρασίας, pH, συγκέντρωσης του υποστρώματος και ιοντικής ισχύος και τα ακινητοποιημένα ένζυμα να χαρακτηρίζονται από μικρή σταθερότητα.

- Παγίδευση

Η παγίδευση αποτελεί τον εγκλωβισμό του βιομορίου μέσα σε μήτρες κολλοειδούς πήγματος και πολυμερικές γέλες. Με αυτή την τεχνική επίσης αποφεύγεται η συσσωμάτωση των ενζύμων, τα οποία έχουν αυτή την τάση προκειμένου να μην μειωθεί η καταλυτική τους δράση. Αυτή η τεχνική είναι αρκετά απλή προς τον σχηματισμό του τροποποιημένου ηλεκτροδίου, καθώς προστίθενται ταυτόχρονα σε αυτό τα ένζυμα και τα πρόσθετα σε ένα ενιαίο στρώμα. Ως μήτρες για την παγίδευση μπορούν να χρησιμοποιηθούν η χιτοζάνη, το κολλαγόνο, το πολυακρυλαμίδιο, η πολυουρεθάνη, το αλγινικό ασβέστιο, η σιλικόνη. Τα ένζυμα παραμένουν μέσα στην μήτρα, ενώ τα υποστρώματα και τα προϊόντα μπορούν να απομακρυνθούν από αυτήν, γεγονός το οποίο μειώνει την έκπλυση του ενζύμου, βελτιώνει την σταθερότητα του και επιτρέπει την διεξαγωγή ενζυμικών αντιδράσεων. Εφόσον δεν απαιτείται ομοιοπολική σύνδεση μεταξύ ενζύμου και μήτρας, η δομή του ενζύμου

διατηρείται εξασφαλίζοντας την διατήρηση των υψηλών καταλυτικών ιδιοτήτων του. Η τεχνική αυτή εμφανίζει χαμηλό κόστος, υψηλή λειτουργική και αποθηκευτική σταθερότητα, είναι δυνατόν να ακινητοποιηθεί με αυτό τον τρόπο μεγάλη ποσότητα ενζύμου και εμφανίζουν επιπλέον μεγάλη θερμική και χημική σταθερότητα συγκρινόμενα με άλλες τεχνικές. Ωστόσο το αρνητικό της μεθόδου αυτής είναι ότι συμβαίνει διαρροή του ενζύμου και απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις μονομερούς και ενζύμου για τον πολυμερισμό και επίσης τα υψηλά φράγματα διάχυσης της μήτρας αποτρέπουν μακρομοριακά υποστρώματα να εισχωρήσουν στην δομή της. Πέρα από πολυμερικά δίκτυα για την παγίδευση ενζύμων τελευταία χρησιμοποιούνται και MOFs (Metal Organic Frameworks).

- Ομοιοπολική σύνδεση

Μια ιδιαίτερα δημοφιλής και διαδεδομένη τεχνική ακινητοποίησης είναι η ομοιοπολική σύνδεση μεταξύ ενζύμου και βοηθητικού υλικού. Επιτυγχάνεται με την δέσμευση των ενζύμων στην επιφάνεια της μήτρας μέσω ομοιοπολικών δεσμών με τις λειτουργικές ομάδες του ενζύμου. Οι ομοιοπολικοί δεσμοί είναι σταθεροί και αποτρέπουν την διαρροή του ενζύμου από την βοηθητική μήτρα, βελτιώνοντας την σταθερότητα των ακινητοποιημένων ενζύμων. Ωστόσο υπάρχει η πιθανότητα το ενεργό κέντρο του ενζύμου να απενεργοποιηθεί λόγω των χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα μεταξύ των μορίων του ενζύμου και της μήτρας μειώνοντας έτσι τις καταλυτικές του ιδιότητες. Επίσης απαιτείται η χρήση μεγάλης ποσότητας ενζύμου.

- Σταυροδεσμοί

Βασίζεται στις διαμοριακές αντιδράσεις κατά τις οποίες το ένζυμο σταυροσυνδέεται με την βοηθητική μήτρα με την αρωγή κάποιων παραγόντων, όπως γλουταραλδεΐδη, αιθυλένιο. Όπως και στην περίπτωση της ομοιοπολικής σύνδεσης έτσι και στους σταυροδεσμούς βελτιώνεται η σταθερότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου, καθώς και η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του ενζύμου. Με την τεχνική αυξάνεται η προσκόλληση του ενζύμου στην μήτρα διευκολύνοντας την ανταλλαγή ηλεκτρονίων. Ωστόσο ενέχει ο κίνδυνος μείωσης της δραστηριότητας του ενζύμου λόγω των χημικών μεταβολών που προκαλούν αλλαγές στην διαμόρφωση του ενζύμου. Επιπλέον με αυτή την τεχνική σταυροδέονται και ένζυμα μεταξύ τους σχηματίζοντας συσσωματώματα CLEAs (cross-linked enzyme aggregates), τα συσσωματώματα αυτά συντελούν στην προστασία των ενεργών κέντρων και στην διατήρηση των καταλυτικών ιδιοτήτων των ενζύμων [5,6,7].

Στην παρούσα μελέτη σαν βοηθητικό υλικό χρησιμοποιείται ο πολυηλεκτρολύτης Nafion, που αποτελεί μια πολυμερική ηλεκτρολυτική μεμβράνη μέσα στην οποία ακινητοποιείται το ένζυμο. Το Nafion δρα ως αγώγιμο υλικό μέσω του οποίου ενισχύονται οι σταυροδεσμοί, επομένως χρησιμοποιείται για την προσκόλληση της μεμβράνης που περιέχει το ένζυμο πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, αλλά και για την ενίσχυση που επιφέρει στη μεταφορά ηλεκτρονίων. Ακόμα γίνεται μελέτη της προσρόφησης της ιστιδίνης σε ηλεκτρόδια νικελίου, κοβαλτίου και αφρού νικελίου.

1.3 LPMOs

Οι λυτικές μονοξυγενάσες των πολυσακχαριτών (Lytic polysaccharide monoxygenases, LPMOs) είναι ένζυμα που εντοπίζονται στην πλειονότητα των μυκήτων και των βακτηρίων. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα τους είναι ότι το ενεργό τους κέντρο είναι εκτεθειμένο στην επιφάνεια τους και είναι ισχυρά συνδεδεμένο με ένα ιόν χαλκού Cu(II), το οποίο συντελεί στην κατάλυση της υδροξυλίωσης της κυτταρίνης, οδηγώντας στην διάσπαση των γλυκοζητικών δεσμών. Οι δεσμοί αυτοί βρίσκονται στους περισσότερους πολυσακχαρίτες στην Γη [8,9]. Αυτή η διαδικασία τελείται μέσω ενός οξειδωτικού μηχανισμού. Λόγω αυτής της ιδιότητας μπορούν να αξιοποιηθούν σε ποικίλες εφαρμογές στην φύση, όπως στην ανακύκλωση του άνθρακα στις βιομηχανίες, στην αποδόμηση της βιομάζας σε συνέργεια με άλλα υδρολυτικά ένζυμα με χαμηλότερο κόστος [10]. Ωστόσο επικείται ακόμα η περαιτέρω μελέτη τους για την βελτίωση της καταλυτικής τους δράσης αλλά και την ενίσχυση τους με σκοπό τη χρήση τους ως βιομηχανικούς βιοκαταλύτες, καθώς είναι αρκετά ευαίσθητα ένζυμα για να γίνει η χρήση τους σε βιομηχανικό επίπεδο [8].

1.3.1 Οικογένειες LPMOs

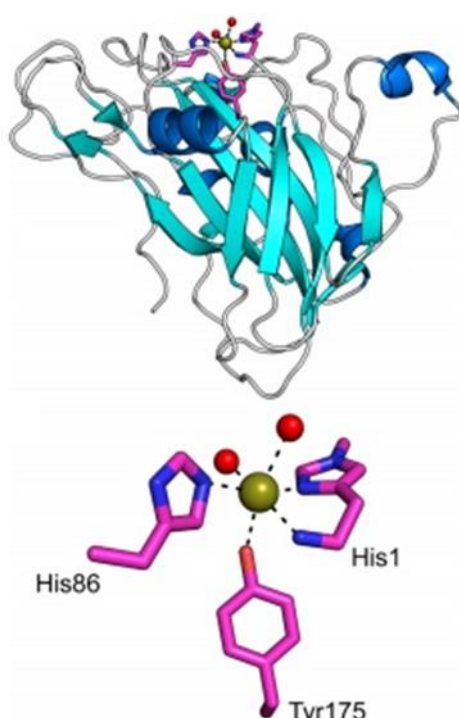
Οι LPMOs ταξινομούνται στην βάση δεδομένων CAZy εφόσον είναι carbohydrate-active ένζυμα. Έχουν χαρακτηριστεί ως Auxiliary Activities (AAs) και η κατηγοριοποίηση τους γίνεται με βάση της ομοιότητες τους σε 7 οικογένειες. Αυτές είναι οι AA9, AA10, AA11, AA12, AA13, AA14, AA15, AA16 [8,11]. Από τα παραπάνω οι AA14 βρίσκονται στους μύκητες filamentous fungi, οι AA15 εντοπίζονται κυρίως σε έντομα και ιούς και οι AA10 σε βακτήρια και άλλους οργανισμούς [12]. Οι οικογένειες των LPMOs που μελετώνται ευρέως είναι οι AA9 και AA10. Οι LPMOs που ανήκουν στην οικογένεια AA9 προέρχονται από τους μύκητες fungi και συγκεκριμένα από τον *Thermothelomyces thermophila* και είναι γνωστές και ως LPMO9s, εμφανίζουν καταλυτική δραστηριότητα σε ποικίλα υποστρώματα. Στην παρούσα μελέτη θα αξιοποιηθεί το ένζυμο MtLPMO9H [11].

1.3.2 Δομή

Παρά τις επιμέρους διαφορές που εμφανίζουν οι διαφορετικές οικογένειες LPMOs, η δομή τους ακολουθεί ένα μοτίβο που είναι ίδιο για το σύνολο των οικογενειών αυτών. Συγκεκριμένα ο καταλυτικός τομέας των LPMOs μοιάζει με την φμπρονεκτίνη τύπου III (fibronectin type III, FnIII) και την ανοσοσφαιρίνη (immunoglobulin ,Ig). Η δομή αυτών αποτελείται από 2 β-sandwiches που απαρτίζονται από 8 με 10 αντιπαράλληλες ίνες (β-strands) [13]. Βρόγχοι ποικίλων μεγεθών και ένας αριθμός από έλικες συνδέουν τις ίνες μεταξύ τους και δημιουργούν τις διαφοροποιήσεις στις επιφάνειες των LPMOs και επηρεάζουν την λειτουργία των ενζύμων αυτών όσον αφορά την αναγνώριση και την ανταπόκριση στα διάφορα υποστρώματα [8]. Για παράδειγμα τα ένζυμα της οικογένειας AA14 εμφανίζουν κάποιες ραβδώσεις στην επιφάνεια που είναι αποτέλεσμα δύο βρόχων. Αυτή η ιδιαιτερότητα στην επιφάνεια αυτών των ενζύμων τους δίνει την δυνατότητα συσχέτισης με εναλλακτικά υποστρώματα σε αντίθεση με άλλες οικογένειες ενζύμων, όπως αυτά που ανήκουν στην AA9. Τα περισσότερα ένζυμα αυτής της οικογένειας διαθέτουν επίπεδη επιφάνεια αλληλεπίδρασης [14].

Η επίπεδη επιφάνεια που αναφέρθηκε παραπάνω φιλοξενεί το ενεργό κέντρο των ενζύμων αυτών. Η επιφάνεια του ενεργού κέντρου σχηματίζεται συνήθως από εκτεταμένους βρόγχους που περιλαμβάνουν μικρές έλικες [9]. Το ενεργό τους κέντρο φέρει ιόν χαλκού το

οποίο συντονίζεται από 3 συνδέσμους αζώτου τα οποία παρέχονται από δύο κατάλοιπα ιστιδίνης, κάθε ένα από τα οποία καλείται N-terminal residue και σχηματίζουν συνολικά ένα σύνδεσμο ιστιδίνης σε σχήμα T (T-shaped histidine brace) [8]. Στην περίπτωση των LPMOs που προέρχονται από μύκητες, όπως αυτές της οικογένειας AA9 η N-terminal ιστιδίνη είναι N-methylated. Η μεθυλίωση του συνδέσμου της ιστιδίνης αυξάνει την σταθερότητα των ενζύμων αυτών. Σε αυτήν επίσης αποδίδονται αλλαγές στο σχήμα και στις ηλεκτρονικές ιδιότητες του ενεργού κέντρου καθώς και στον καταλυτικό ρόλο τους [9]. Επιπρόσθετα πέρα από την ιστιδίνη, δύο μόρια νερού σε απομακρυσμένη αξονική θέση, καθώς και τυροσίνη ή φαινυλανίνη σε εγγύς αξονικές θέσεις μπορούν να δράσουν ως σύνδεσμοι με το ιόν του χαλκού [8].



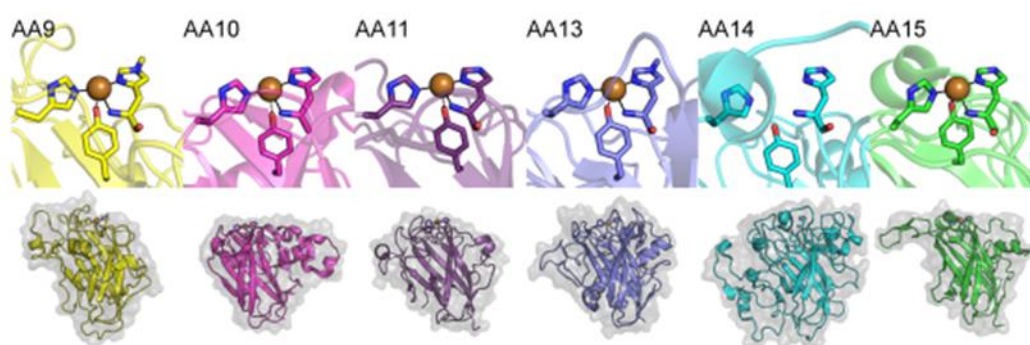
Σημα 1.2 : Η τρισδιάστατη δομή μιας τυπικής LPMOs και του ενεργού της κέντρου στην πάνω εικόνα φαίνεται η κρυσταλλική της δομή ενώ στην κάτω το καταλυτικό ενεργό κέντρο μιας AA9 LPMOs .[11]

Η ιδιαιτερότητα του ενεργού κέντρου των LPMOs που τις κάνει να υπερτερούν συγκριτικά με άλλα ένζυμα είναι ότι αυτό εντοπίζεται στην επιφάνεια τους και δεν είναι «θαμμένο» μέσα στον κύριο όγκο τους. Η τοπολογία αυτών των ενζύμων είναι πού σημαντική στο να καταλύσουν την υδροξυλίωση των γλυκοζιτικών δεσμών καλά οργανωμένων και μεγάλων επιφανειών πολυσακχαριτών, όπως είναι η κυτταρίνη και η χιτίνη.

Η δεύτερη σφαίρα συντονισμού είναι αυτή που ευθύνεται για τις διαφορές που εμφανίζουν οι διαφορετικές οικογένειες των LPMOs, αλλά και για τις διαφορές που εμφανίζουν τα ένζυμα που ανήκουν στην ίδια οικογένεια. Συγκεκριμένα αποτελείται απ' όλα τα κατάλοιπα

που βρίσκονται κοντά στο ιόν του χαλκού του ενεργού κέντρου του ενζύμου αλλά δεν αλληλεπιδρούν απευθείας με το ιόν χαλκού. Ωστόσο συντελούν στην διαμόρφωση του ενεργού κέντρου, βοηθούν και στον συντονισμό με τα συνυποστρώματα, επηρεάζουν τον προσανατολισμό του καταλυτικού κέντρου της LPMOs και συντελούν στην διαμόρφωση των ιδιοτήτων και των λειτουργιών των μεταλλοπρωτεϊνών. Η επιφάνεια η οποία συνδέεται με το υπόστρωμα ποικίλει σε μέγεθος και σχήμα. [8 ,9]

Συγκεκριμένα στην περίπτωση των οικογενειών των LPMOs που προέρχονται από των μύκητα fungi, η δεύτερη σφαίρα συντονισμού συντελεί στην αναγνώριση των κατάλοιπων της ιστιδίνης (His) και της γλουταμίνης (Gln), ως σημαντικών καταλοίπων για την ενεργοποίηση του οξυγόνου [15].



Σχήμα 1.3: Η δομή και το ενεργό κέντρο των διαφορετικών οικογενειών LPMOs, όπως φαίνεται στην πρώτη σειρά όλες εμφανίζουν έναν χαρακτηριστικό σύνδεσμο ιστιδίνης που αποτελείται από N-terminal ιστισίνη, ένα εσωτερικό κατάλοιπο ιστιδίνης που συντονίζει το ιόν χαλκού(καφέ σφαίρα) και ένα κατάλοιπο τυροσίνης .Στην κάτω σειρά παρατηρείται ότι όλες εμφανίζουν αναδιπλώσεις της μορφής της ανοσοσφαιρίνης ,ωστόσο διαφοροποιούνται στην τοπολογία της επιφάνειας τους (γκρι περίγραμμα),όπως προκύπτει από τους βρόγχους και τις έλικες που σχηματίζονται. [14]

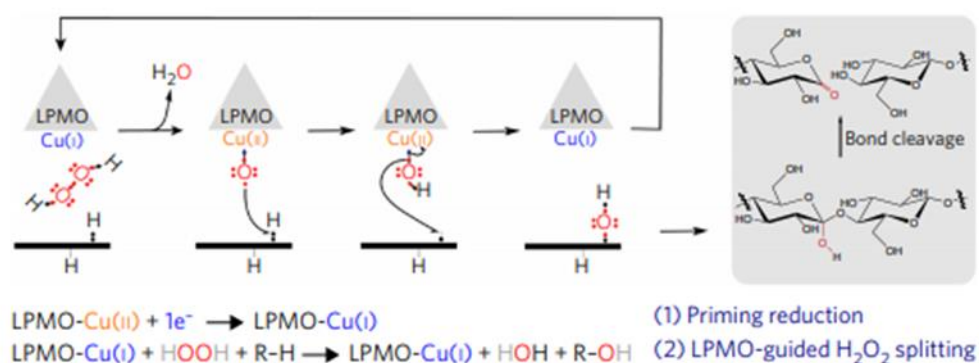
1.3.3 Μηχανισμοί

Το ενδιαφέρον με τις LPMOs είναι ότι ακολουθούν διαφορετικό μηχανισμό με διαφορετικά υποστρώματα, συνυποστρώματα και αναγωγικά είδη [14].

Έστω ότι το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται είναι η κυτταρίνη. Οι LPMOs διασπάνε του γλυκοζιτικούς δεσμούς στην κυτταρίνη με οξειδωτικό τρόπο, το οποίο είναι αδύνατον να επιτευχθεί από άλλα υδρολυτικά ένζυμα, συστατικά της κυτταρίνης. Αυτή η διαδικασία δημιουργεί ένα κενό στην κρυσταλλική επιφάνεια της κυτταρίνης και με την οξείδωση προκαλείται η αποδέσμευση ποικίλων οξειδωμένων μορφών ολιγοσακχαριτών διευκολύνοντας την δράση άλλων συστατικών της κυτταρίνης. Ο μηχανισμός της δράσης αυτής έχει ως εξής το ιόν του χαλκού ανάγει το μοριακό οξυγόνο (O₂), με την παρουσία ενός

εξωγενούς δότη ηλεκτρονίων, ακολούθως το οξυγόνο (O₂) που έχει αναχθεί εξαλείφει ένα υδρογόνο από το υπόστρωμα οδηγώντας έτσι στην διάσπαση του β-1,4-γλυκοζιτικού δεσμού [16].

Ο μηχανισμός της δράσης των LPMOs παραμένει ένα διφορούμενο θέμα. Γενικά όμως θεωρείται ότι για την καταλυτική δράση των LPMOs είναι απαραίτητο να υπάρχει ένα ιόν χαλκού συνδεδεμένο στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, ένα αναγωγικό είδος που να μπορεί να παρέχει δύο ηλεκτρόνια ανά καταλυτικό κύκλο και ένα συνυπόστρωμα με οξυγόνο. Αρχικά θεωρούνταν το O₂ ως ένα καλό συνυπόστρωμα για την διάσπαση των δεσμών του υποστρώματος με το οποίο αλληλοεπιδρά. Ωστόσο αυτό αναθεωρήθηκε και φάνηκε ότι υπεροξείδιο του υδρογόνου H₂O₂ είναι προτιμητέο συνυπόστρωμα [17]. Στην περίπτωση της υδροξυλίωσης της κυτταρίνης το H₂O₂ εμφανίζει το πλεονέκτημα ότι δεν χρειάζεται επιπλέον πρωτόνια και ηλεκτρόνια για να πραγματοποιηθεί η αντίδραση [15].



Σχήμα 1.4: Μηχανισμός διάσπασης με χρήση συνυποστρώματος H₂O₂ για την αποδόμηση πολυσακχαριτών. Συγκεκριμένα η LPMO-Cu(II) αρχικά ανάγεται σε LPMO-Cu(I), η οποία αντιδρά με το H₂O₂ παρουσία υποστρώματος. Η αντίδραση εξαλείφει ένα μόριο νερού και παράγει το ενδιάμεσο είδος Cu(II)-OH το οποίο μπορεί να αποσπάσει ένα άτομο υδρογόνου από το υπόστρωμα, το είδος που σχηματίζεται ενώνεται με μια ρίζα του υποστρώματος με αποτέλεσμα την υδροξυλίωση του και την αναγέννηση του ενεργού κέντρου του ενζύμου Cu(II) [17]

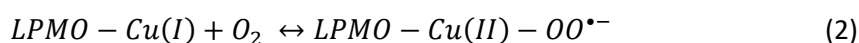
Θεωρώντας τώρα ως συνυπόστρωμα το O₂ και θα μελετηθεί αρχικά η περίπτωση το ενεργό κέντρο του ενζύμου LPMO συνδέεται στο O₂ πριν την σύνδεσή του με το υπόστρωμα και στην συνέχεια θα εξετασθεί η περίπτωση κατά την οποία το ενεργό κέντρο του ενζύμου αρχικά προσδένεται στο υπόστρωμα. Σε κάθε περίπτωση προηγείται η αναγωγή του χαλκού στο ενεργό κέντρο της LPMOs, καθώς αποδεικνύεται απαραίτητη για να λάβουν χώρα οι αντιδράσεις που θα ακολουθήσουν [1,15].

1^η περίπτωση: Σύνδεση ενεργού κέντρου LPMOs στο οξυγόνο πριν το υπόστρωμα

Αρχικά το ένζυμο ανάγεται από την οξειδωμένη του μορφή LPMO-Cu(II) στην ανηγμένη LPMO-Cu(I) με την αρωγή ενός εξωγενούς δότη ηλεκτρονίων.



Ακολουθεί η αντίδραση πρόσδεσης του οξυγόνου στην ανηγμένη μορφή του ενζύμου LPMO-Cu(I):



Τέλος η ρίζα που παράγεται από την παραπάνω αντίδραση συνδέεται με το υπόστρωμα RH:

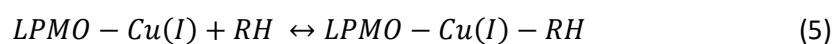


2^η περίπτωση: Σύνδεση ενεργού κέντρου LPMOs στο υπόστρωμα πριν το οξυγόνο

Αρχικά το ένζυμο ανάγεται από την οξειδωμένη του μορφή LPMO-Cu(II) στην ανηγμένη LPMO-Cu(I) με την αρωγή ενός εξωγενούς δότη ηλεκτρονίων.



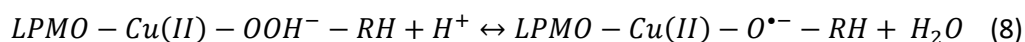
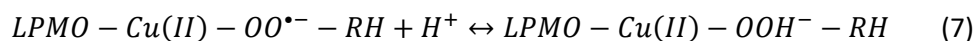
Ακολούθως το υπόστρωμα RH προσδένεται στην ανηγμένη μορφή του ενζύμου:



Τέλος το οξυγόνο προσδένεται στο σύνθετο προϊόν της παραπάνω αντίδρασης:

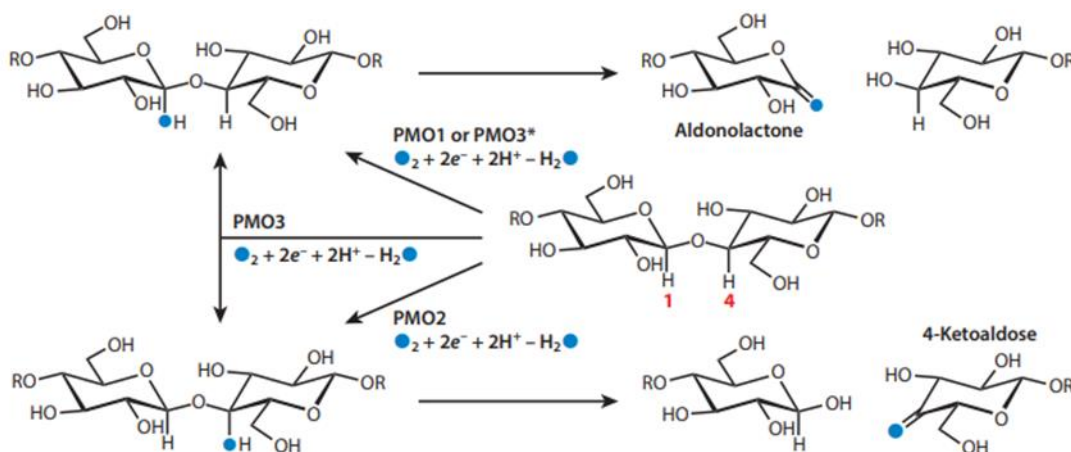


Παρατηρείται ότι όποια πορεία από τις παραπάνω και αν ακολουθηθεί το ενδιάμεσο προϊόν που σχηματίζεται είναι το ίδιο. Ωστόσο και μετά το σχηματισμό του ενδιάμεσου είδους $LPMO - Cu(II) - OO^{\bullet-} - RH$ έχουν προταθεί διάφορες πορείες για υδροξυλίωση του υποστρώματος, όλες αυτές οι πορείες απαιτούν έγκαιρη μεταφορά ηλεκτρονίων και πρωτονίων [9]. Η πιο πιθανή πορεία που ακολουθείται είναι αυτή κατά την οποία μετά την δημιουργία του παραπάνω ενδιάμεσου και την ταυτόχρονη προσθήκη δύο πρωτονίων πραγματοποιείται η εξάλειψη ενός μορίου νερού και ο σχηματισμός της ενδιάμεσης ρίζας $LPMO - Cu(II) - O^{\bullet-} - RH$. Στην συνέχεια η ενδιάμεση ρίζα που σχηματίζεται αποσπά ένα άτομο υδρογόνου και με μια γρήγορα υποβοηθούμενη από το νερό αντίδραση συνδέεται ξανά με το υπόστρωμα οδηγώντας στον σχηματισμό του προϊόντος R-OH και στην αναγέννηση του ενεργού κέντρου του ενζύμου.



1.3.4 Τοποεκλεκτικότητα

Οι LPMOs εμφανίζουν διαφορετικές τοποεκλεκτικότητες, αυτό πηγάζει από το γεγονός ότι μπορούν να οξειδώσουν τον άνθρακα της γλυκόζης στην κυτταρίνη τόσο στην θέση C1 όσο και στην θέση C4. Αποτέλεσμα αυτού είναι ο σχηματισμός οξειδωμένων αλλά και ανηγμένων μονομερών μετά το τέλος της υδρόλυσης. Συγκεκριμένα ανάλογα με την θέση που τελείται η οξείδωση οι LPMOs κατηγοριοποιούνται σε τρεις τύπους. Αναλυτικά σε αυτές που προκαλούν οξείδωση στην θέση C1 και παράγουν λακτόνη η οποία υδρολύεται σε αλδονικό οξύ, σε αυτές που προκαλούν οξείδωση στην θέση C4 και τον σχηματισμό 4-κετοαλδόζης. Τέλος υπάρχουν οι LPMOs που προκαλούν οξείδωση και στις δύο θέσεις C1 και C4 και οδηγούν σε διπλά οξειδωμένα παράγωγα [6,9]. Μάλιστα υπάρχει μια υποκατηγορία για τις τελευταίες LPMOs, που αφορά όμως μόνο αυτές που προέρχονται από μύκητες, αυτές έχουν χάσει την οξειδωτική δραστηριότητά τους στην θέση C4 και μπορούν να οξειδώσουν μόνο την θέση C1 [9].



Σχήμα 1.5: C1 και C4 τοποεκλεκτικότητα των LPMOs [9]

1.3.5 Δότες ηλεκτρονίων

Όπως προαναφέρθηκε για την έναρξη του καταλυτικού κύκλου των ενζύμων LPMOs είναι απαραίτητη η πρόσληψη ηλεκτρονίων του ενζύμου από έναν εξωτερικό δότη ηλεκτρονίων. Μερικοί χαμηλού μοριακού βάρους αναγωγικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται ως εξωγενείς πηγές ηλεκτρονίων είναι το ασκορβικό οξύ, η γλουτανοθειόνη, το φελουρικό οξύ, η κυστεΐνη, το γαλλικό οξύ και η λιγνίνη [18]. Συγκεκριμένα για την λιγνίνη πειράματα που είχαν διεξαχθεί με κομμάτια λιγνίνης υψηλού μοριακού βάρους (HMWL) και χαμηλού μοριακού βάρους (LMWL) είχαν πολύ μικρή ή καθόλου αποτελεσματικότητα ως δότες

ηλεκτρονίων της LPMOs. Ωστόσο στην περίπτωση συνδυασμένης χρήσης HWMML και LWML υπήρξε δραστική αύξηση στα ποσοστά του προϊόντος που λήφθηκε [19]. Επίσης ένας άλλος αποτελεσματικός δότης ηλεκτρονίων που χρησιμοποιείται το ένζυμο αφυδρογονάση της κελλοβιώζης και άλλα ένζυμα [1]. Τα ποικίλα αναγωγικά είδη που μπορούν να χρησιμοποιηθούν δεν επηρεάζουν μόνο την αποτελεσματικότητα της LPMOs αλλά και την δημιουργία διαφορετικών πιθανών παράπλευρων αντιδράσεων [11].

1.3.6 Μεταφορά ηλεκτρονίων κατά την κατάλυση

Όπως προαναφέρθηκε για την έναρξη του καταλυτικού κύκλου της LPMOs είναι απαραίτητη η μεταφορά δύο ηλεκτρονίων στο ιόν του χαλκού του ενεργού της κέντρου. Οι πηγές των ηλεκτρονίων είναι διάφοροι δότες όπως παρουσιάστηκαν στην παραπάνω παράγραφο. Πειράματα έχουν δείξει απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων από την ανηγμένη μορφή του ενζύμου, δότη ηλεκτρονίων, αφυδρογονάση της κελλοβιώζης στην οξειδωμένη μορφή της LPMOs. Επειδή η πρωτεϊνική επιφάνεια που φιλοξενεί το ενεργό κέντρο είναι επίπεδη είναι όντως πιθανό για τον χαλκό του ενεργού κέντρου να μπορεί να δέχεται ηλεκτρόνια όντας σε απευθείας επαφή με τον δότη ηλεκτρονίων. Ωστόσο κατά την διάρκεια της αντίδρασης η επιφάνεια του ενεργού κέντρου της LPMOs μπορεί να είναι καλυμμένη με το υπόστρωμα, για παράδειγμα την κυτταρίνη. Καθιστώντας δύσκολη έως και αδύνατη την απευθείας σύνδεση του ενεργού κέντρου με τους δότες ηλεκτρονίων, ιδίως όταν πρόκειται για μακρομόρια, όπως είναι η αφυδρογονάση της κελλοβιώζης. Σε αυτή την περίπτωση η μεταφορά ηλεκτρονίων είναι πιθανό να συμβαίνει μέσω πρωτεϊνικής βάσης σχηματιζόμενων μονοπατιών μεταφοράς ηλεκτρονίων.

Ένα τμήμα αποτελούμενο από κατάλοιπα πάνω στην δομή συνδέει την ιστιδίνη που συντονίζει το ενεργό κέντρο με την άλλη πλευρά της πρωτεΐνης, η οποία περιέχει μια επιφάνεια αλληλεπίδρασης με την αφυδρογονάση της κελλοβιώζης. Οι αποστάσεις μεταξύ αυτών των καταλοίπων κυμαίνονται στις τιμές των 3.5 με 4.5 Angstrom, καθιστώντας εφικτή την χρήση αυτού του δικτύου για μεταφορά ηλεκτρονίων. Σε αυτό το δίκτυο τα ηλεκτρόνια μεταφέρονται από την ιστιδίνη στον χαλκό διαμέσου μορίων νερού.

Η εξέταση της κρυσταλλικής δομής των LPMOs που προέρχονται από μύκητες φανέρωσε ένα άλλο πιθανό δίκτυο που περιλαμβάνει κατάλοιπα τυροσίνης, τρυπτοφάνης και ιστιδίνης και δημιουργεί πιθανές διόδους για την μεταφορά ηλεκτρονίων από το ενεργό κέντρο του ενζύμου στην επιφάνεια σύνδεσης με την αφυδρογονάση της κελλοβιώζης. Οι αποστάσεις

μεταξύ αυτών των καταλοίπων κυμαίνονται από 3 μέχρι 4 Angstrom, καθιστώντας και αυτό το δίκτυο ικανό για την διεξαγωγή της μεταφοράς ηλεκτρονίων. Στην περίπτωση των LPMOs που συνδέονται με υπόστρωμα χιτίνης μια επιφάνεια από κατάλοιπα τρυπτοφάνης και μεθειονίνης υποβοηθά την μεταφορά ηλεκτρονίων.

Στην περίπτωση των LPMOs που προέρχονται από βακτήρια η μεταφορά ηλεκτρονίων διαφέρει συγκριτικά με τις LPMOs που προέρχονται από μύκητες. Έχουν προταθεί κάποια πιθανά δίκτυα για τα οποία όμως δεν έχει ακόμα αποσαφηνιστεί αν μπορούν να σταθούν αρωγοί στην μεταφορά ηλεκτρονίων. Επομένως το πως πραγματοποιείται η μεταφορά ηλεκτρονίων στο ιόν χαλκού του ενεργού κέντρου των βακτηριακών LPMOs παραμένει ένα αδιευκρίνιστο κομμάτι [9].

1.3.7 Αλληλεπίδραση και σύνδεση με υποστρώματα

Ένα σημαντικό κομμάτι της μελέτης αυτών των ενζύμων είναι ο χαρακτηρισμός της ποικιλίας των υποστρωμάτων τους. Όλες οι οικογένειες των LPMOs εκτός από την AA13, φαίνεται να εμφανίζουν δραστηριότητα με β-1,4-συνδεδεμένα πολυμερή, όπως η κυτταρίνη ή N-ακετυλο-γλυκοζαμίνη, όπως η χιτίνη. Επίσης είναι γνωστή η δράση τους σε κρυσταλλικά υποστρώματα, όπως οι διαλυτοί πολυσακχαρίτες και οι ολιγοσακχαρίτες. [14] Επίσης εμφανίζουν καταλυτική δραστηριότητα σε ποικίλα υποστρώματα πέρα από αυτά που αναφέρθηκαν όπως ξυλάνη, γλυκάνη, ξυλογυλακάνη, γλυκομαννάνη [11].

1.3.8 Αυτό-απενεργοποίηση των LPMOs

Όπως έχει αναφερθεί οι LPMOs είναι αρκετά ευαίσθητα ένζυμα, καθώς ενέχει ο κίνδυνος αυτοκαταλυτικής οξειδωτικής απενεργοποίησής τους είτε χρησιμοποιείται ως συνυπόστρωμα το O_2 είτε το H_2O_2 . Τα κατάλοιπα που συντονίζουν το ενεργό κέντρο του χαλκού (Σχ. 1.1), ιδίως η ιστιδίνη καταστρέφονται μέσω της οξείδωσης. Αυτού του είδους η καταστροφή μπορεί να απελευθερώσει το ιόν του χαλκού από το ένζυμο στο διάλυμα. Αυτή η καταστροφή λαμβάνει χώρα όταν LPMO βρίσκεται στο διάλυμα σε ανηγμένη μορφή, όπου μπορεί να αντιδράσει με O_2 ή H_2O_2 απουσία υποστρώματος, το οποίο υπό κανονικές συνθήκες θα αποτελούσε στόχο των παραγόμενων ισχυρών οξυγονούχων ειδών. Επομένως γίνεται φανερό ότι αυτά τα παραγόμενα είδη αφού δεν υπάρχει υπόστρωμα θα αντιδράσουν

με κάτι άλλο, όπως με της πλευρικές αλυσίδες της πρωτεΐνης. Βελτίωση της αντίστασης των LPMOs στην απενεργοποίηση μπορεί να τελεσθεί με υποστρώματα υψηλότερης συγκέντρωσης παρουσία υδατανθρακικών μονάδων (carbohydrate-binding modules ,CBMs) με την επακολουθούμενη ανεπιθύμητη μείωση της σταθερότητας λόγω των περισσότερων καταλοίπων που συνεισφέρουν στην πρόσδεση του υποστρώματος. Ο βαθμός αυτοκαταλυτικής καταστροφής του ενεργού κέντρου του ενζύμου επηρεάζεται και από τον τύπο του υποστρώματος που συμμετέχει στον καταλυτικό κύκλο. Η πρόσδεση του υποστρώματος βοηθάει στον σχηματισμού του ενεργού κέντρου της LPMOs. Επομένως η πρόσδεση του υποστρώματος επιβάλλει τους περιορισμούς στο καταλυτικό κέντρο που οδηγείται σε ακριβή χωρικό προσανατολισμό για την αντίδραση με τα οξυγονωμένα είδη, που απαιτείται για την αντίδραση του υποστρώματος και τον περιορισμό της οξειδωσης και της μετέπειτα καταστροφής του ενζύμου.

Επομένως για να επιτευχθούν σταθερές αντιδράσεις που δεν ελλοχεύουν κίνδυνο ακινητοποίησης των ενζύμων είναι απαραίτητο να διαμορφωθούν συνθήκες , στις οποίες η ανηγμένη μορφή της LPMOs δεν θα βρίσκεται για πολύ απουσία υποστρώματος. Για να συμβεί αυτό θα πρέπει τα αντιδραστήρια να προστίθενται με την σωστή σειρά και οι συγκεντρώσεις των υποστρωμάτων να είναι όσο το δυνατόν υψηλότερες. [11]

1.3.9 Μέθοδοι Χαρακτηρισμού

Υπάρχουν ποικίλοι τρόποι να εκτιμηθεί η δραστηριότητα των LPMOs. Αρκετές μέθοδοι απαιτούν την επώαση της LPMOs με το αναγωγικό είδος και το υπόστρωμα που στην προκειμένη περίπτωση είναι κάποιος πολυσακχαρίτης που ακολουθείται από την ανάλυση του διαλυτού προϊόντος, συνήθως ενός οξειδωμένου ολιγοσακχαρίτη με φασματομετρία μάζας (MS), για πιο γρήγορες και απλές αναλύσεις και με υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPCL) για πιο σύνθετες αναλύσεις.

Παρόλο που η ανάλυση των προϊόντων με μέθοδο MS μπορεί να δώσει ποσοτικά αποτελέσματα για την ενζυμική δράση , ως επί το πλείστον παρέχει ποιοτικά αποτελέσματα, παρέχοντας έναν απλό και εύκολο τρόπο για την εκτίμηση της δραστηριότητας και της εξειδίκευσης του υποστρώματος. Οι μάζες των C1 και C4 οξειδωμένων προϊόντων είναι ίδιες αλλά παρόλα αυτά μπορούν να εξαχθούν πληροφορίες για την οξειδωτική τους

τοποεκλεκτικότητα. Όπως έχει αναφερθεί η οξείδωση στην θέση C4 οδηγεί στον σχηματισμό 4-κετοαλδόζης. Από την οξείδωση στην θέση C1 παράγεται λακτόνη που είναι σε ισορροπία με την μορφή του αλδονικού οξέος και είναι κυρίαρχο σε ουδέτερο pH. Το αλδονικό οξύ δίνει συνήθως χαρακτηριστικά κυρίαρχα σήματα κατά την ανάλυση MS λόγω του σχηματισμού αλάτων, συνήθως αλάτων νατρίου. Αυτά τα άλατα έχουν χαρακτηριστικές μάζες λόγω της παρουσίας δύο ιόντων νατρίου. Επομένως η απουσία από το φάσμα MS σημάτων που αντιστοιχούν σε αυτά τα άλατα δηλώνει ότι η οξείδωση λαμβάνει χώρα στην θέση C4.

Οι μέθοδοι HPLC που χρησιμοποιούνται για τον διαχωρισμό προϊόντων, όπως ολιγοσακχαρίτες που έχουν προκύψει από την οξείδωση στην θέση C1 είναι χρωματογραφία υδρόφιλης αλληλεπίδρασης (HILIC) με ανιχνευτή UV. Αντίστοιχα τα προϊόντα που προκύπτουν από την οξείδωση σε θέσεις C1 και C4 αλλά και τα διπλά οξειδωμένα σε θέσεις C1/C4 μπορούν να αναλυθούν με υψηλής απόδοσης χρωματογραφία ανταλλαγής ιόντων με παλμική αμπερομετρική ανίχνευση (HPAEC-PAD). Η μέθοδος αυτή παρέχει υψηλή ταχύτητα ανάλυσης, ευαισθησία και καλό διαχωρισμό προϊόντων [11].

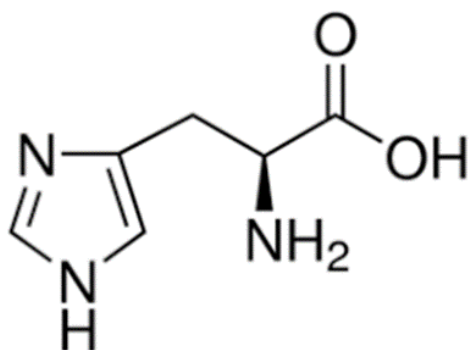
1.3.10 Εφαρμογές LPMOs

Οι LPMOs που προέρχονται από μύκητες είναι γνωστά και ως ένζυμα με δυνατότητες αποδόμησης υποστρωμάτων κυτταρίνης. Η κυτταρίνη είναι ένα άφθονο στην φύση βιοπολυμερές που θα μπορούσε να αποτελέσει πηγή ενέργειας για την παραγωγή χημικών και καυσίμων συντελώντας στην μείωση του οικονομικού και περιβαλλοντικού κόστους κατά την παραγωγή τους. Ωστόσο λόγω της δύσκολης διάσπασης της, η κυτταρινική βιομάζα είναι δύσκολο να αξιοποιηθεί ως πρώτη ύλη σε αυτές της εφαρμογές. Οι LPMOs επομένως δίνουν νέες προοπτικές προς την επίτευξη αυτού του σκοπού [20]. Ωστόσο παρά την ικανότητα που έχουν οι LPMOs να δρουν πάνω σε υψηλά κρυσταλλικά υποστρώματα, όταν κληθούν να αξιοποιηθούν σε εργοστασιακές εφαρμογές όπου απαιτούνται σκληρές επιβαλλόμενες συνθήκες ενέχει ο κίνδυνος να καταστραφούν οπότε υπάρχει η ανάγκη της βελτιστοποίησής τους [1]. Αν πραγματοποιηθεί αυτή θα μπορούν να αξιοποιηθούν και σε μεγάλη κλίμακα σε εφαρμογές που έχουν ήδη επισημανθεί κάποιες από αυτές είναι η ανακύκλωση του άνθρακα στις βιομηχανίες, η συμμετοχή τους στην αποδόμηση της βιομάζας σε συνέργεια με άλλα υδρολυτικά ένζυμα με χαμηλότερο κόστος καθώς και η βελτίωση της παραγωγής ανανεώσιμων χημικών και καυσίμων [8,9,10].

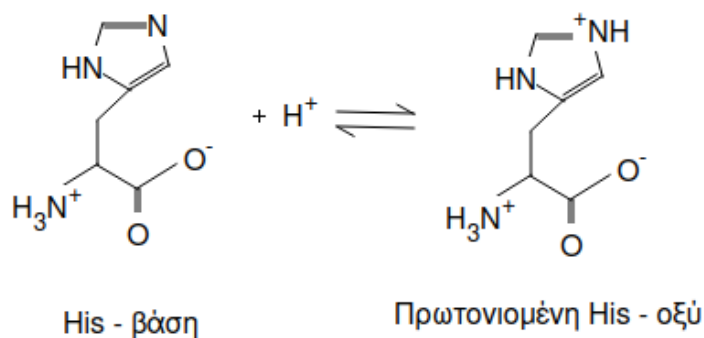
Οι LPMOs παρουσιάζονται ως αρωγοί στην υδρόλυση της βιομάζας όταν προστίθενται μαζί με άλλα ένζυμα που αποικοδομούν την βιομάζα, καθώς «χαράσσουν» την κρυσταλλική επιφάνεια της κυτταρίνης καθιστώντας την προσβάσιμη σε άλλα υλικά ώστε να δράσουν πάνω της [16]. Γενικά αυτά τα κοκτέιλ ενζύμων έχουν αυξημένη θερμική σταθερότητα. Η υψηλότερη σταθερότητα των ενζύμων επιτρέπει υψηλότερες θερμοκρασίες αντίδρασης, βελτιώνει την διαλυτότητα των αντιδρώντων και μειώνει τον κίνδυνο μικροβιακής μόλυνσης. Επομένως ένας επιδιωκόμενος στόχος είναι η αύξηση της θερμικής σταθερότητας των LPMOs.

1.3.11 Ιστιδίνη

Όπως έχει αναφερθεί η σημαντικότητα της ιστοιδίνης είναι ιδιαίτερη στην ενζυμική δράση καθώς συμμετέχει στην σύνδεση των μεταλλικών ιόντων στο ενεργό κέντρο του ενζύμου. Κατά την διερεύνηση λοιπόν της προσρόφησης ενζύμων σε διάφορα υποστρώματα είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος η μελέτη της διεπιφανειακής συμπεριφοράς της ιστοιδίνης με αυτά τα υποστρώματα. Παρακάτω φαίνεται το μόριο της ιστοιδίνης και οι αντιδράσεις ισορροπίας της σε όξινη και βασική μορφή.



Σχήμα 1.6 Μόριο L-ιστιδίνης.



Σχήμα 17. Αντιδράσεις ισορροπίας ιστοιδίνης.

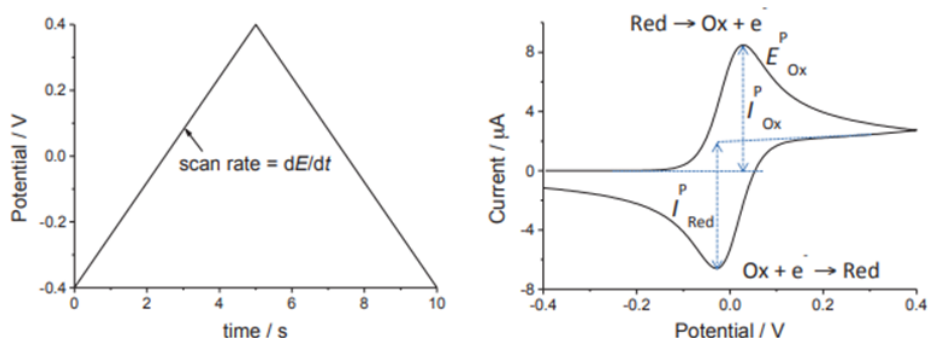
Όπως φαίνεται από την παραπάνω αντίδραση η ιστοιδίνη δύναται να συμπλοκοποιηθεί σε βασικό pH καθώς σε αυτή την περίπτωση το άζωτο του ιμιδαζολικού δακτυλίου της είναι ελεύθερο. Το άζωτο αυτό είναι που συμμετέχει στον συντονισμό του ενεργού κέντρου της LPMOs.

1.4 Ηλεκτροχημικές Μέθοδοι

1.4.1 Κυκλική βολταμμετρία (CV)

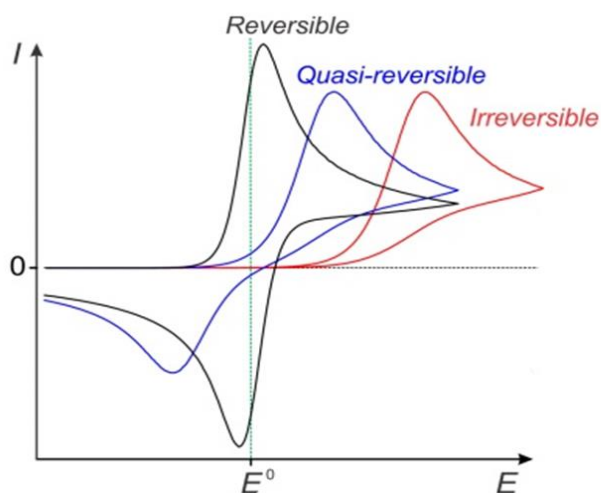
Η κυκλική βολταμμετρία αποτελεί την πλέον διαδεδομένη και ευρύτερα χρησιμοποιούμενη μέθοδο ηλεκτροχημικής ανάλυσης οξειδοαναγωγικών αντιδράσεων λόγω της απλότητας στην διεξαγωγή της και την ποικιλία των πληροφοριών που παρέχει. Συγκεκριμένα μέσω αυτής μπορεί να ελεγχθεί αν μια αντίδραση είναι αντιστρεπτή ή όχι, καθώς και ο μηχανισμός της αντίδρασης μέσω της μεταφοράς ηλεκτρονίων που λαμβάνει χώρα. Ακόμα μπορούν να προσδιορισθούν οι κινητικές και θερμοδυναμικές σταθερές των οξειδοαναγωγικών δράσεων. Στην κυκλική βολταμμετρία επιβάλλονται δυναμικά από την τιμή E_{init} μέχρι την τιμή E_{rev} στο ηλεκτρόδιο εργασίας, σε δεδομένη ταχύτητα σάρωσης. Η οξειδοαναγωγική δράση λαμβάνει χώρα κατά την γραμμική σάρωση μεταξύ των δύο δυναμικών και το ηλεκτρολυτικό διάλυμα που θα επιλεγεί θα πρέπει να εμφανίζει ηλεκτροχημική σταθερότητα σε αυτό το εύρος δυναμικών. Η δράση που αναφέρθηκε ακολουθείται από την αντίστροφη της δράση δηλαδή από την σάρωση των δυναμικών από την τιμή E_{rev} στην τιμή E_{init} με την ίδια ταχύτητα σάρωσης. Το αποτέλεσμα είναι ένα διάγραμμα των ρευμάτων που

αντιστοιχούν στα στιγμιαία επιβαλλόμενα δυναμικά κατά την σάρωση, το οποίο καλείται κυκλικό βολταμμογράφημα.



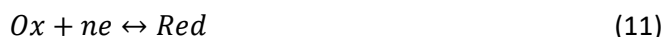
Σχήμα 1.8: Σχηματική αναπαράσταση διαγράμματος δυναμικού συναρτήσει του χρόνου κατά την κυκλική βολταμμετρία και κυκλικό βολταμμογράφημα οξειδοαναγωγικής αντίδρασης ενός ηλεκτρονίου. [21]

Στα σχήματα που φαίνονται παραπάνω (Σχ. 1.8) οι συμβολισμοί αντιπροσωπεύουν τα εξής: όπου E_{Ox}^P το δυναμικό της οξειδωτικής κορυφής, E_{Red}^P το δυναμικό της αναγωγικής κορυφής, I_{Ox}^P το ρεύμα της οξειδωτικής κορυφής και I_{Red}^P το ρεύμα της καθοδικής κορυφής. Η ανοδική κορυφή που εμφανίζεται στις θετικές τιμές ρεύματος αντιστοιχεί σε οξειδωτικές δράσεις ενώ η καθοδική κορυφή που εμφανίζεται στις αρνητικές τιμές ρεύματος αντιστοιχεί σε αναγωγικές δράσεις. Το σχήμα και η θέση που λαμβάνει το κυκλικό βολταμμογράφημα ποικίλει εξαρτώμενο από διάφορους παράγοντες όπως οι ταχύτητες σάρωσης, η συγκέντρωση του φέροντα ηλεκτρολύτη, το υλικό και η γεωμετρία της επιφάνειας του ηλεκτροδίου, η μεταφορά μάζας, η παρουσία άλλων χημικών ειδών ελεύθερων στο ηλεκτρολυτικό διάλυμα ή ακινητοποιημένων στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και η μεταφορά φορτίου. [21,22,23] Έτσι ανάλογα με το πόσο συμμετρικά ή παραμορφωμένα είναι τα κυκλικά βολταμμογραφήματα μπορούν οι αντιδράσεις να κατηγοριοποιηθούν σε αντιστρεπτές, ημιαντιστρεπτές και μη αντιστρεπτές, όπως ακριβώς φαίνεται στο παρακάτω σχήμα (Σχ. 1.9).



Σχήμα 1.9 Κυκλικά βολταμμογραφήματα αντιστρεπτής ημιαντιστρεπτής και αναντιστρεπτής δράσης [23]

Έστω μια οξειδοαναγωγική αντίδραση της μορφής



Όταν αυτό το σύστημα βρίσκεται σε θερμοδυναμική ισορροπία οι δύο δράσεις γίνονται με τον ίδιο ρυθμό επομένως το καθοδικό και το ανοδικό ρεύμα είναι ίσα κατά απόλυτη τιμή επομένως το συνολικό ρεύμα που διαρρέει το σύστημα είναι μηδενικό. Σε αυτή την περίπτωση μπορεί να προσδιορισθεί το δυναμικό του ηλεκτροδίου από την εξής σχέση:

$$E_{eq} = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_{Ox}^*}{C_{Red}^*} \quad (12)$$

Η παραπάνω σχέση αποτελεί την εξίσωση του Nerst, όπου E^0 το πρότυπο δυναμικό της αντίδρασης, C_{Ox}^* και C_{Red}^* οι συγκεντρώσεις των ειδών Ox και Red στο διάλυμα, F η σταθερά Faraday, R η παγκόσμια σταθερά των αερίων και n ο αριθμός ηλεκτρονίων που ανταλλάσσονται.

Σε περίπτωση που στο σύστημα εφαρμοστεί δυναμικό διαφορετικό από το E_{eq} αρνητικότερο ή θετικότερο του συνεπώς θα ευνοείται περισσότερο η αναγωγή ή η οξείδωση αντίστοιχα. Σε αυτή την περίπτωση τα ρεύματα δεν θα είναι ίσα κατά απόλυτη τιμή όπως προηγουμένως. Επίσης λόγω του ότι λαμβάνει χώρα οξειδοαναγωγική αντίδραση οι συγκεντρώσεις της οξειδωμένης και της ανηγμένης μορφής κοντά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου θα μεταβάλλονται συνεχώς. Επομένως για την πυκνότητα ρεύματος θα ισχύει η σχέση:

$$i = i^0 \left[\frac{C_R}{C_R^*} e^{\frac{(1-a)nF}{RT}(E-E_{eq})} - \frac{C_O}{C_O^*} e^{-\frac{anF}{RT}(E-E_{eq})} \right] \quad (13)$$

Η παραπάνω σχέση διαιρεμένη με την πυκνότητα ρεύματος ανταλλαγής και με δεδομένο ότι η τιμή της πυκνότητας ρεύματος ανταλλαγής είναι πολύ μεγαλύτερη από την πυκνότητα ρεύματος εξ αιτίας της πολύ μεγάλης ταχύτητας της οξειδοαναγωγής το πηλίκο τους θα τείνει στο μηδέν όποτε έπειτα από πράξεις προκύπτει η σχέση:

$$E = E^0 + \frac{RT}{nF} \ln \frac{C_O}{C_R} \quad (14)$$

Παρατηρείται ότι η σχέση που συσχετίζει το δυναμικό του ηλεκτροχημικού κελιού με το πρότυπο δυναμικό και τις συγκεντρώσεις των οξειδωμένων και ανηγμένων ειδών είναι ίδια με την εξίσωση του Nerst στην ισορροπία με την μόνη διαφορά ότι σε αυτή εμπλέκονται οι συγκεντρώσεις των ειδών στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και όχι στην όγκο του διαλύματος. Τα ηλεκτροχημικά συστήματα που διέπονται από αυτή την σχέση καλούνται αντιστρεπτά ή Νερστιανά. Η σχέση αυτή παρέχει πολλές πληροφορίες προβλέποντας πως θα ανταποκριθεί το σύστημα σε αλλαγές των συγκεντρώσεων των ειδών στο διάλυμα αλλά και αλλαγές του επιβαλλόμενου δυναμικού του ηλεκτροδίου. Έστω ότι στην παραπάνω αντίδραση εφαρμόζεται δυναμικό αρνητικότερο του δυναμικού ισορροπίας και γίνεται σάρωση στις καθοδικές τιμές, τότε παρατηρείται η αναγωγή του είδους Ox σε Red τοπικά στο ηλεκτρόδιο. Επομένως μειώνεται το είδος Ox σταδιακά και παρατηρείται η κορυφή του καθοδικού ρεύματος (I_{Red}^p) σε δυναμικό (E_{Red}^p). Η κορυφή εμφανίζεται όταν οι συγκεντρώσεις των δύο ειδών είναι ίσες. Ο κύριος όγκος του διαλύματος κοντά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου περιέχει τα ανηγμένα Red είδη, που απαρτίζουν μια στιβάδα την στιβάδα διάχυσης η οποία όλο και μεγαλώνει μειώνοντας την συγκέντρωση του είδους Ox στο ηλεκτρόδιο. Επομένως καθώς γίνεται η σάρωση σε αρνητικότερα δυναμικά ο ρυθμός διάχυσης των ειδών Ox από το διάλυμα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου μικραίνει με αποτέλεσμα την μείωση του ρεύματος μετά την προσέγγιση της μέγιστης τιμής του. Όταν το δυναμικό φτάσει στην τιμή E_{med} αντιστρέφεται η φορά σάρωσης προς τα ανοδικά ρεύματα με αποτέλεσμα να λαμβάνει χώρα η οξείδωση του είδους Red σε Ox και τα δυναμικά γίνονται θετικά. Επομένως και σε αυτή την αντίστροφη δράση παρατηρείται κορυφή ανοδικού ρεύματος (I_{Ox}^p) για δυναμικό (E_{Ox}^p). Η σάρωση ολοκληρώνεται μέχρι το δυναμικό να λάβει την αρχική τιμή E_{init} . [2,5]

Κυκλική βολταμετρία για ακινητοποιημένο είδος στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου

Για μια απλή οξειδοαναγωγική αντίδραση θεωρώντας ότι τα είδη που οξειδώνονται και ανάγονται είναι ακινητοποιημένα πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου



Όπου Ox η οξειδωμένη μορφή του ενζύμου, Red η αναγόμενη μορφή του ενζύμου, n ο αριθμός των ηλεκτρονίων που ανταλλάσσονται. Επιπλέον ως k_c ορίζεται η κινητική σταθερά καθοδικής δράσης και k_a η κινητική σταθερά ανοδικής δράσης. Από τον νόμο Butler-Volmer προκύπτουν οι εξής σχέσεις για τις σταθερές του ρυθμού:

$$k_c = k^0 e^{-\frac{anF}{RT}(E-E^0)} \quad (16)$$

$$k_a = k^0 e^{\frac{(1-a)nF}{RT}(E-E^0)} \quad (17)$$

Όπου k^0 η πρότυπη κινητική σταθερά και a ο παράγοντας ασυμμετρίας.

Η σχέση εξάρτησης ρεύματος δυναμικού έχει ως εξής:

$$i = FS\Gamma^0 \frac{e^{\frac{F}{RT}(E-E^0)}}{\left(1 + e^{\frac{F}{RT}(E-E^0)}\right)^2} \quad (18)$$

Όπου i η πυκνότητα ρεύματος που διαρρέει την ηλεκτροδιακή επιφάνεια, F η σταθερά του Faraday, S η επιφάνεια του ηλεκτροδίου, Γ^0 η ολική επιφανειακά συγκέντρωση του ενζύμου, T η απόλυτη θερμοκρασία, E το δυναμικό του ηλεκτροδίου και E^0 το πρότυπο δυναμικό οξειδοαναγωγής του ενζύμου.

Για αντιστρεπτό σύστημα η ένταση της κορυφής της πυκνότητας ρεύματος δίνεται από την σχέση:

$$i_p = FSI^0 \frac{Fv}{4RT} \quad (19)$$

Όπου v η ταχύτητα σάρωσης. Το δυναμικό που αντιστοιχεί στην κορυφή αυτή αποτελεί το πρότυπο δυναμικό του ακινητοποιημένου ενζύμου.

Ενώ για μη αντιστρεπτή δράση η κορυφή της πυκνότητας ρεύματος δίνεται από την σχέση:

$$i_p = 0.368FSI^0 \frac{Fv}{RT} \quad (20)$$

Όσο το σύστημα απομακρύνεται από την αντιστρεπτή κατάσταση η καθοδική κορυφή οδηγείται προς τα αρνητικότερα δυναμικά ενώ η ανοδική κορυφή προς τα θετικότερα, αυτή η συμπεριφορά υποδεικνύεται και από τις παρακάτω σχέσεις:

$$E_{p,c} = E^0 + \frac{RT}{aF} \ln \frac{RT}{aF} \frac{k^0}{v} \quad (21)$$

$$E_{p,a} = E^0 + \frac{RT}{(1-a)} \ln \frac{RT}{aF} \frac{k^0}{v} \quad (22)$$

Όπου $E_{p,c}$ το δυναμικό που αντιστοιχεί στην καθοδική κορυφή και $E_{p,a}$ το δυναμικό που αντιστοιχεί στην ανοδική κορυφή του βολταμμογραφήματος.

Κυκλική βολταμετρία για ελεύθερο είδος στο διάλυμα

Θεωρείται πάλι οξειδοαναγωγική αντίδραση με τα είδη που οξειδώνονται και ανάγονται αυτή την φορά να είναι ελεύθερα στο διάλυμα.



Στην περίπτωση των ελεύθερων ειδών πέρα από την αντίδραση θα πρέπει να ληφθεί υπ όψιν και η διάχυση. Όπου k^0 η ετερογενής κινητική σταθερά.

Θεωρώντας κινητική τύπου Buttlar-Volmer η έκφραση του ρεύματος θα είναι η εξής:

$$i = Fk^0 \left(c_R e^{\frac{(1-a)F}{RT}(E-E^0)} - c_{Ox} e^{\frac{-aF}{RT}(E-E^0)} \right) \quad (24)$$

Όπου c_R η συγκέντρωση του ανηγμένου είδους και c_{Ox} η συγκέντρωση του οξειδωμένου είδους.

Στην περίπτωση αντιστρεπτής δράσης η κορυφή της πυκνότητας ρεύματος προσδιορίζεται από την σχέση:

$$i_p = 0.446FSC^0 \sqrt{D} \sqrt{\frac{Fv}{RT}} \quad (25)$$

Όπου D ο συντελεστής διάχυσης και C^0 η συγκέντρωση των ηλεκτροχημικών ειδών στο διάλυμα.

Το δυναμικό που αντιστοιχεί στην παραπάνω κορυφή πυκνότητας ρεύματος υπαγορεύεται από την σχέση:

$$E_p = E^0 - 1.11 \frac{RT}{F} \quad (26)$$

Όσο το σύστημα απομακρύνεται από την αντιστρεπτότητα τα δυναμικά των κορυφών της πυκνότητας ρεύματος για την καθοδική και την ανοδική δράση αντίστοιχα δίνονται από τις εξής σχέσεις:

$$E_{p,c} = E^0 - 0.78 \frac{RT}{aF} + \frac{RT}{aF} \ln \left(k^0 \sqrt{\frac{RT}{aFvD}} \right) \quad (27)$$

$$E_{p,a} = E^0 + 0.78 \frac{RT}{aF} + \frac{RT}{(1-a)F} \ln \left(k^0 \sqrt{\frac{RT}{(1-a)FvD}} \right) \quad (28)$$

Στην περίπτωση του Νερστιανού συστήματος η καθοδική και η ανοδική καμπύλη που αποτυπώνονται στο κυκλικό βολταμογράφημα είναι συμμετρικές και εμφανίζουν της μέγιστες κορυφές τους για δυναμικά $E_{p,a}$ και $E_{p,c}$ αντίστοιχα. Το σύστημα αυτό είναι αντιστρεπτό αν ισχύει η εξής σχέση για την διαφορά δυναμικού των κορυφών:

$$\Delta E_p = E_{p,a} - E_{p,c} = \frac{58}{n} mV \quad (29)$$

η οποία αποτελεί το κριτήριο αντιστρεπτότητας.

Σε αυτή την περίπτωση το πρότυπο δυναμικό του συστήματος υπολογίζεται από την σχέση:

$$E^0 = \frac{E_{p,a} + E_{p,c}}{2} \quad (30)$$

Στην περίπτωση που η μεταφορά φορτίου είναι αργή και δυσχεραίνεται η αντίδραση μεταφοράς ηλεκτρονίων απαιτούνται πιο αρνητικά δυναμικά για να παρατηρηθεί η αναγωγή και αντίστοιχα πιο θετικά για να παρατηρηθεί η οξείδωση προκαλώντας μια όξυνση της

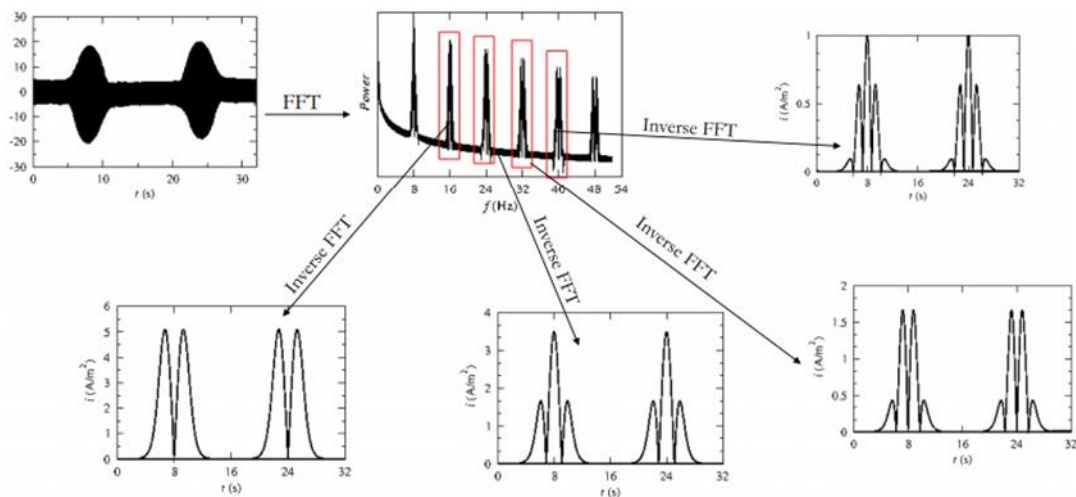
διαφοράς δυναμικού ανάμεσα στις κορυφές. Αν αυτή η όξυνση υπερβεί το όριο που τέθηκε παραπάνω το ηλεκτροχημικό σύστημα που εξετάζεται είναι αναντίστρεπτο. [22]

1.4.2 Κυκλική βολταμμετρία εναλλασσόμενου ρεύματος με μετασχηματισμό Fourier (FTaCV)

Η μέθοδος FTaCV αναπτύχθηκε με σκοπό την αντιμετώπιση των μειονεκτημάτων που συνδέονταν με την μέθοδο της κυκλικής βολταμμετρίας. Η μέθοδος αυτή πάρα το γεγονός ότι είναι η πιο διαδεδομένη ηλεκτροχημική τεχνική λόγω της απλότητας της και της μεγάλης της ακρίβειας όσον αφορά τον προσδιορισμό θερμοδυναμικών και κινητικών παραμέτρων των μελετώμενων συστημάτων συνοδεύεται και από κάποια μειονεκτήματα. Αυτά συνοψίζονται στην συνεισφορά της χωρητικότητας και στην αντίσταση του διαλύματος. Συγκεκριμένα όταν η επίδραση της αντίστασης είναι σημαντική δυσχεραίνεται η εξαγωγή της κινητικής του ηλεκτροδίου πειραματικά. Για την αντιμετώπιση του προβλήματος που επιφέρει η αντίσταση στην μέτρηση της κινητικής του ηλεκτροδίου μιας γρήγορης διεργασίας με κυκλική βολταμμετρία αυξάνεται η τιμή της ταχύτητας σάρωσης. Γεγονός που μειώνει τον χρόνο της μέτρησης επιτυγχάνοντας σχετικά αργή διεργασία συγκριτικά με τον χρόνο μέτρησης. Ωστόσο σε πολύ υψηλές ταχύτητες σάρωσης η συνεισφορά του χωρητικού ρεύματος γίνεται κυρίαρχη υπερκαλύπτοντας το φαρανταϊκό ρεύμα. Τα παραπάνω οδηγούν σε παραμορφώσεις και μεγάλες αποκλίσεις από την αντιστρεπτότητα των κυκλικών βολταμμογραφήματων που λαμβάνονται, καθώς και σε λάθη κατά τον προσδιορισμό των κινητικών και θερμοδυναμικών παραμέτρων. Ιδίως στις περιπτώσεις που τα προς ανάλυση δείγματα είναι βιολογικά και οργανικά μόρια με χαμηλές συγκεντρώσεις ή φαρανταϊκή απόκριση που δίνουν δεν είναι αρκετά έντονη ώστε να μην υπερκαλυφθεί από τα χωρητικά ρεύματα.

Η ανάπτυξη της FTaCV καλείται να λύσει τα μειονεκτήματα που παρουσιάστηκαν παραπάνω. Κατά την μέθοδο αυτή επιβάλλεται στο σύστημα ημιτονοειδής διαταραχή σταθερής συχνότητας f και πλάτους ταλάντωσης A στην σταθερή γραμμική συνάρτηση του δυναμικού dc απόκριση συναρτήσει του χρόνου που λαμβάνεται κατά την κυκλική βολταμμετρία και δίνει μια εναλλακτική μορφή ac απόκριση του συνολικού ρεύματος συναρτήσει του χρόνου. Αυτό το γράφημα με μετασχηματισμό Fourier μετατρέπεται σε ενεργειακό φάσμα με κορυφές (θυσάνους) να αντιστοιχούν σε διαφορετικούς τομείς συχνοτήτων. Στο τέλος λαμβάνονται βολταμμογραφήματα, τα οποία καλούνται αρμονικές. Η μορφή των αρμονικών λαμβάνεται επιλέγοντας τους τομείς συχνοτήτων που εμφανίζονται τα ακέραια πολλαπλάσια της εφαρμοζόμενης συχνότητας της επιβαλλόμενης διαταραχής όπως παρουσιάζονται στο

προαναφερθέν ενεργειακό φάσμα. Σε κάθε ένα από αυτά τα ακέραια πολλαπλάσια αυτά εφαρμόζεται αντίστροφος μετασχηματισμός Fourier και λαμβάνονται τα αντίστοιχα βολταμμογράφημα. Συγκεκριμένα το βολταμμογράφημα που προκύπτει από τον αντίστροφο μετασχηματισμό της συχνότητας f αποτελεί την πρώτη αρμονική, αυτό που προκύπτει από τον αντίστροφο μετασχηματισμό της συχνότητας $2f$ αποτελεί την δεύτερη αρμονική και με αντίστοιχο τρόπο υπολογίζονται και οι υπόλοιπες αρμονικές. Όσον αφορά τις περιττές αρμονικές εμφανίζουν μία κυρίαρχη κορυφή ενώ οι άρτιες εμφανίζουν οι ίδιες κυρίαρχες κορυφές. Στις υψηλότερες αρμονικές που προκύπτουν από την ανάλυση παρατηρείται εξάλειψη της χωρητικής απόκρισης και λήψη καθαρών φαρανταϊκών αποκρίσεων, κάτι που είναι πολύ χρήσιμο στην περίπτωση που μελετώνται οξειδοαναγωγικές πρωτεΐνες, στις οποίες οι φαρανταϊκές αποκρίσεις επικαλύπτονται από τις χωρητικές. Επίσης η ταχύτητα σάρωσης φαίνεται να μην έχει ιδιαίτερη επίδραση στην διεξαγωγή της μεθόδου. Κατά την ανάλυση η πρώτη αρμονική δεν λαμβάνεται υπόψιν, καθώς δεν δίνει σημαντικές πληροφορίες για την οξειδοαναγωγική δράση δεδομένου ότι ακόμα στα σήματα που λαμβάνονται είναι κυρίαρχο το χωρητικό ρεύμα. Αντίθετα η εξαγωγή δεδομένων και σταθερών που γίνεται κυρίως από την πέμπτη αρμονική με γνώμονα ότι σε αυτή την αρμονική όλες οι χωρητικές αποκρίσεις έχουν εξαλειφθεί. Επίσης για αρμονικές υψηλότερες της πέμπτης το σήμα που λαμβάνεται δεν είναι τόσο έντονο, καθώς η αύξηση των αρμονικών συνοδεύεται από μείωση της έντασης του σήματος, κάτι που δυσχεραίνει την χρήση των αρμονικών αυτών για περαιτέρω ανάλυση και καταδεικνύει την ιδανικότητα της πέμπτης αρμονικής γι' αυτό τον σκοπό. [21,44]



Σχήμα 1.10 Μέθοδος FTaCV [21]

FTaCV για ελεύθερο είδος

Θεωρώντας οξειδοαναγωγική αντίδραση ελευθέρου στο διάλυμα ηλεκτροχημικού είδους στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Για την απλή αντίδραση ενός σταδίου ισχύει:



Επιπρόσθετα θεωρείται ότι όλη η επιφάνεια του ηλεκτροδίου είναι προσβάσιμη στα ηλεκτροχημικά είδη του διαλύματος και η καλυπτικότητα της επιφάνειας είναι μηδενική. Κατά την δράση αυτή δεν τελείται προσρόφηση των ηλεκτροχημικών ειδών αλλά διάχυση των μέσα στον ηλεκτρολύτη. Επίσης η χωρητικότητα της ηλεκτροχημικής διπλοστιβάδας είναι ανεξάρτητη του δυναμικού.

Η σχέση του δυναμικού συναρτήσει του χρόνου φαίνεται παρακάτω:

$$E(t) = E_I - vt_R + v|t - t_R| + A_0 \sin 2\pi ft \quad (32)$$

Όπου ο όρος $E(t)$ αντιστοιχεί στις τιμές δυναμικού του ηλεκτροδίου για δεδομένη ταχύτητα σάρωσης, ξεκινώντας από αρχική τιμή δυναμικού την τιμή E_I , που αντιστοιχεί σε δυναμικό θετικότερο του προτύπου δυναμικού E^0 και καταλήγει στην τιμή του δυναμικού E_R , η οποία είναι πιο αρνητική από την τιμή του προτύπου δυναμικού. Ο χρόνος που αντιστοιχεί στην στιγμή που το δυναμικό προσεγγίζει την τιμή E_R ισούται με:

$$t_R = \frac{E_I - E_R}{v} \quad (33)$$

Μετά την χρονική στιγμή t_R συνεχίζει η σάρωση του δυναμικού μέχρι την αρχική τιμή του E_I , ενώ σε αυτό επιβάλλεται μια διαταραχή συγκεκριμένης συχνότητας f και πλάτους ταλάντωσης A_0 , όπως φαίνεται και στον παραπάνω τύπο.

FTaCV για ακινητοποιημένο είδος

Για μια απλή οξειδοαναγωγική αντίδραση θεωρώντας ότι τα είδη που οξειδώνονται και ανάγονται είναι ακινητοποιημένα πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου



Όπου Ox η οξειδωμένη μορφή του ενζύμου, Red η ανηγμένη μορφή του ενζύμου, n ο αριθμός των ηλεκτρονίων που ανταλλάσσονται. Επιπλέον ως k_c ορίζεται η κινητική σταθερά καθοδικής δράσης και k_a η κινητική σταθερά ανοδικής δράσης. Από τον νόμο Butler-Volmer προκύπτουν οι εξής σχέσεις για τις σταθερές του ρυθμού:

$$k_c = k^0 e^{-\frac{anF}{RT}(E-E^0)} \quad (35)$$

$$k_a = k^0 e^{\frac{(1-a)nF}{RT}(E-E^0)} \quad (36)$$

Όπου k^0 η πρότυπη κινητική σταθερά και a ο παράγοντας ασυμμετρίας.

Θεωρώντας Γ_{Ox} και Γ_{Red} τις επιφανειακές συγκεντρώσεις οξειδωμένου και ανηγμένου είδους αντίστοιχα προκύπτει ο εξής ρυθμός της παραπάνω δράσης:

$$r = k_c \Gamma_{Ox} - k_a \Gamma_{Red} \quad (37)$$

Ακόμα από το ισοζύγιο μάζας και το νόμο Faraday αντίστοιχα προκύπτουν:

$$\Gamma^0 = \Gamma_{Ox} + \Gamma_{Red} \quad (38)$$

$$\frac{d\Gamma_{Ox}}{dt} = \frac{i_F}{F} \quad (39)$$

Επομένως,

$$\Gamma^0 = \Gamma_{Ox}(t) + \Gamma_{Red}(t) \quad (40)$$

Με βάση την παραπάνω σχέση, η σχέση του ρυθμού (37) γίνεται:

$$r = k_c \Gamma_{Ox} - k_a \Gamma_{Ox}(1 - \theta) \quad (41)$$

Όπου θ η καλυπτικότητα της επιφάνειας που ισούται με $\theta = \frac{\Gamma_{Ox}}{\Gamma^0}$

Επίσης ισχύει,

$$\frac{d\Gamma_{Ox}}{dt} = -r \quad (42)$$

$$\frac{d\theta}{dt} = -k_c \theta + k_a(1 - \theta) \quad (43)$$

Από τις σχέσεις (39) και (41) ισχύει: $i_F = -nFr$ (44)

Άρα η (44) μέσω της (43) δίνει: $i_F = nF\Gamma^0[k_a(1 - \theta) - k_c\theta]$ (45)

Θεωρώντας κινητική τύπου Butler-Volmer για το ρεύμα θα ισχύει:

$$i_F = nF\Gamma^0 k^0 \left[(1 - \theta) e^{\frac{(1-a)F}{RT}(E-E^0)} - \theta e^{\frac{(1-a)F}{RT}(E-E^0)} \right] \quad (46)$$

Σε ένα πείραμα κυκλικής βολταμμετρίας όπου το δυναμικό θα ξεκινάει από μια αρχική τιμή θα σαρώνεται γραμμικά σε πιο καθοδικά δυναμικά με συγκεκριμένη ταχύτητα σάρωσης μέχρι την χρονική στιγμή t_R . Σε αυτή την περίπτωση το επιβαλλόμενο δυναμικό θα είναι:

$$E = E_I - vt_R + v|t - t_R| \quad (47)$$

Στην περίπτωση της FTaCV λαμβάνει χώρα η επιβολή μιας ημιτονοειδούς διαταραχής συγκεκριμένης συχνότητας f και πλάτους ταλάντωσης A . Επομένως η σχέση που δίνει το δυναμικό θα είναι η εξής:

$$E = E_I - vt_R + v|t - t_R| + A\sin 2\pi ft \quad (48)$$

Οι δύο παράγοντες που επιτρέπουν την επέμβαση τους κατά την διεξαγωγή της FTaCV με σκοπό την βελτίωση των ηλεκτροχημικών σημάτων που λαμβάνονται είναι το πλάτος ταλάντωσης A και η συχνότητα f . Συγκεκριμένα η συχνότητα κατέχει τον ίδιο ρόλο με αυτόν της ταχύτητας σάρωσης στην κυκλική βολταμμετρία και γι' αυτό υποτίθεται ότι η μέθοδος είναι ανεξάρτητη της ταχύτητας σάρωσης. Η συχνότητα θα πρέπει να είναι υψηλή για συγκεκριμένες τιμές ταχύτητας σάρωσης προκειμένου να εξασφαλίζεται η ανεξαρτησία. Η συσχέτιση λοιπόν μεταξύ συχνότητας και ταχύτητας σάρωσης, ώστε η μέθοδος να είναι ανεξάρτητη της ταχύτητας σάρωσης μέχρι την πέμπτη αρμονική είναι:

$$f \geq 0.77 \frac{nF}{RT} v \quad (49)$$

Με την εξάλειψη της συνεισφοράς της ταχύτητας σάρωσης στην μέθοδο οι παράμετροι του πλάτους ταλάντωσης και του αριθμού των ηλεκτρονίων επηρεάζουν τα αποτελέσματα της μεθόδου όπως το ύψος και το δυναμικό των κορυφών που καταγράφονται. Συγκεκριμένα για μεγαλύτερο αριθμό ηλεκτρονίων $n=2$ για ίδιο πλάτος ταλάντωσης παρατηρείται μεγαλύτερη ενίσχυση του λαμβανόμενου σήματος.

Η εφαρμογή της σχέσης αυτής έχει προαπαιτούμενο για τις επιλεγμένες αυτές τιμές f και ν η αντίδραση να είναι αντιστρεπτή, απουσία αντιστάσεως και χωρητικού ρεύματος. Σε περίπτωση όχι τόσο μεγάλης κινητικής σταθεράς και ημιαντιστρεπτής αντιδράσεως το μέγεθος των κύριων κορυφών μειώνεται και το σχήμα των αρμονικών αλλοιώνεται κάτι που οπτικοποιείται περισσότερο σε μεγαλύτερες αρμονικές. Στην περίπτωση αναντίστρεπτης αντίδρασης οι αρμονικές δεν ομοιάζουν ούτε σε μορφή αλλά ούτε και σε σχήμα με αυτές της αντιστρεπτής αντίδρασης καθώς η αντίσταση επηρεάζει το σχήμα των μεγαλύτερων αρμονικών. Η σχέση μεταξύ της ταχύτητας σάρωσης και της συχνότητας καθορίζει τον αριθμό των αρμονικών που θα ληφθούν από το ενεργειακό φάσμα [1].

1.4.3 Φασματοσκοπία Ηλεκτροχημικής Εμπέδησης (EIS)

Η φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης αποτελεί μια διαδεδομένη ηλεκτροχημική τεχνική εδώ και αρκετά χρόνια συνίσταται στην μέτρηση της εμπέδησης ηλεκτροχημικών σημάτων και στην παρατήρηση της εξάρτησης της από την συχνότητα που επιτυγχάνεται με την μελέτη της απόκρισης του μελετώμενου συστήματος όταν σε αυτό επιδρά ένα περιοδικό σήμα που μπορεί να είναι είτε ηλεκτρικό ρεύμα είτε δυναμικό μικρής εντάσεως. Τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από την ηλεκτροχημική εμπέδηση δίνουν πληροφορίες για την ηλεκτροχημική επιφάνεια την δομή της και τις αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα σε αυτή [26]

Η εμπέδηση δεν ορίζεται μόνο στα διακριτά συστήματα αλλά και στα αυθόρμητη ως το πηλίκο του μετασχηματισμού Fourier του ηλεκτρικού δυναμικού ως προς τον μετασχηματισμό Fourier του ηλεκτρικού ρεύματος:

$$Z(s) = \frac{F(E(t))}{F(i(t))} \quad (50)$$

Όπου s είναι ένας μιγαδικός αριθμός $s = \nu + j\omega$. Οι μετασχηματισμοί Fourier ανάγουν το σύστημα από διαφορικές εξισώσεις σε μια απλούστερη μορφή που μοιάζει με τον νόμο του Ohm έχοντας υποτεθεί συνθήκες σταθερότητας και γραμμικότητας του συστήματος.

Η εμπέδηση αποτελεί μιγαδική συνάρτηση συνεπώς μπορεί να γραφεί ως εξής:

$$Z(j\omega) = Re(Z) + jIm(Z) \quad (51)$$

Οι δύο συνιστώσες της παραπάνω εξίσωσης είναι οι:

$$\operatorname{Re}(Z) = Z' = |Z| \cos(\varphi) \quad \text{και} \quad \operatorname{Im}(Z) = Z'' = |Z| \sin \varphi$$

Όπου η φάση δίνεται από την σχέση:

$$\varphi = \tan^{-1} \left(\frac{Z''}{Z'} \right) \quad (52)$$

και το μέτρο,

$$|Z| = \sqrt{Z'^2 + Z''^2} \quad (53)$$

Συνήθως η μέτρηση της γίνεται με την εφαρμογή ενός δυναμικού στο ηλεκτροχημικό κελί και μετέπειτα την μέτρηση του ρεύματος μέσα σε αυτό. Συγκεκριμένα επιβάλλεται δυναμικό ως μία ημιτονοειδής διέγερση:

$$E(t) = E_0 \sin(\omega t) \quad (54)$$

Με την σχέση που συνδέει την γωνιακή συχνότητα ω με την συχνότητα f να είναι $f = \frac{\omega}{2\pi}$

Η απόκριση του ρεύματος που μετράται ισούται με:

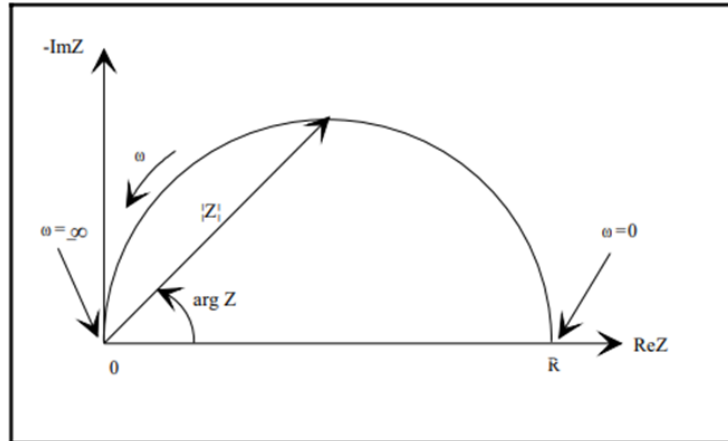
$$i(t) = i_0 \sin(\omega t + \varphi) \quad (55)$$

Όπου φ η διαφορά φάσης μεταξύ του δυναμικού και του ρεύματος

Με βάση τα παραπάνω η σχέση (1) μετασχηματίζεται στην παρακάτω σχέση:

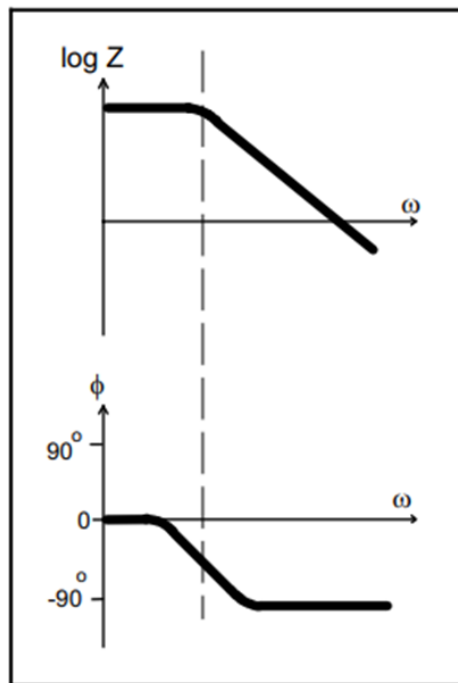
$$Z(j\omega) = \frac{E_0}{i_0} \quad (56)$$

Οπτικοποιημένα τα αποτελέσματα που παρέχει η ηλεκτροχημική εμπέδηση είναι τα διαγράμματα Nyquist τα οποία είναι διαγράμματα του φανταστικού μέρους της εμπέδησης στον άξονα των y και του πραγματικού στον άξονα x . Ένα παράδειγμα για την περίπτωση μιας απλής οξειδοαναγωγικής αντίδρασης παρουσιάζεται στο σχήμα 1.11.



Σχήμα 1.11 Διάγραμμα Nyquist [27]

Επίσης λαμβάνονται και τα διαγράμματα Bode που αναπαριστούν τον δεκαδικό λογάριθμο του μέτρου της εμπέδησης και την φάση συναρτήσει του δεκαδικού λογαρίθμου της γωνιακής ταχύτητας αντίστοιχα. Τα διαγράμματα Bode που αντιστοιχούν στο σχήμα Nyquist του Σχ 1.11 φαίνονται στο Σχ.1.12



Σχήμα 1.12 Διαγράμματα Bode [27]

Ένα από τα πλεονεκτήματα που παρέχει η φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης είναι κατά την μελέτη των ηλεκτροχημικών ιδιοτήτων συστημάτων είναι η σύνδεση της συμπεριφοράς του πραγματικού συστήματος με αυτή ενός ισοδύναμου κυκλώματος που απαρτίζεται από διακριτά ηλεκτρικά συστατικά. [28]

Βιβλιογραφία

1. Zouraris, Dimitrios. "Electrochemical study of redox enzymes and their utilization on modified electrodes." (2021).
2. Armstrong, Fraser A. "Applications of voltammetric methods for probing the chemistry of redox proteins." *Bioelectrochemistry of biomacromolecules*. Birkhäuser Basel, 1997. 205-255.
3. Armstrong, Fraser A. "Probing metalloproteins by voltammetry." *Bioinorganic chemistry* (1990): 137-221.
4. Léger, Christophe, and Patrick Bertrand. "Direct electrochemistry of redox enzymes as a tool for mechanistic studies." *Chemical Reviews* 108.7 (2008): 2379-2438.
5. Guisan, Jose M. "New opportunities for immobilization of enzymes." *Immobilization of Enzymes and Cells*. Humana Press, Totowa, NJ, 2013. 1-13.
6. Liu, Dong-Mei, Juan Chen, and Yan-Ping Shi. "Advances on methods and easy separated support materials for enzymes immobilization." *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 102 (2018): 332-342.
7. Štěpánková, Šárka, and Katarína Vorčáková. "Cholinesterase-based biosensors." *Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry* 31.sup3 (2016): 180-193
8. Forsberg, Zarah, et al. "Engineering lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs)." *Methods in Enzymology* 644 (2020): 1-34
9. Beeson, William T., et al. "Cellulose degradation by polysaccharide monoxygenases." *Annual review of biochemistry* 84 (2015): 923-946.
10. Moreau, Céline, et al. "Lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs) facilitate cellulose nanofibrils production." *Biotechnology for biofuels* 12.1 (2019): 1-13.
11. Eijsink, Vincent GH, et al. "On the functional characterization of lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs)." *Biotechnology for biofuels* 12.1 (2019): 1-16
12. Kadowaki, Marco AS, et al. "Functional characterization of a lytic polysaccharide monoxygenase from the thermophilic fungus *Myceliophthora thermophila*." *PloS one* 13.8 (2018): e0202148.
13. Span, Elise A., and Michael A. Marletta. "The framework of polysaccharide monoxygenase structure and chemistry." *Current opinion in structural biology* 35 (2015): 93-99.
14. Tandrup, Tobias, et al. "Recent insights into lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs)." *Biochemical Society Transactions* 46.6 (2018): 1431-1447.
15. Bertini, Luca, et al. "Catalytic mechanism of fungal lytic polysaccharide monoxygenases investigated by first-principles calculations." *Inorganic chemistry* 57.1 (2018): 86-97.
16. Singhanian, Reeta Rani, et al. "Role and significance of lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs) in lignocellulose deconstruction." *Bioresource Technology* (2021): 125261.
17. Bissaro, Bastien, et al. "Oxidative cleavage of polysaccharides by monocopper enzymes depends on H₂O₂." *Nature chemical biology* 13.10 (2017): 1123-1128.
18. Kracher, Daniel, et al. "Extracellular electron transfer systems fuel cellulose oxidative degradation." *Science* 352.6289 (2016): 1098-1101.
19. Westereng, Bjørge, et al. "Enzymatic cellulose oxidation is linked to lignin by long-range electron transfer." *Scientific reports* 5.1 (2015): 1-9.
20. Quinlan, R. Jason, et al. "Insights into the oxidative degradation of cellulose by a copper metalloenzyme that exploits biomass components." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108.37 (2011): 15079-15084.
21. Guo, Si-Xuan, Alan M. Bond, and Jie Zhang. "Fourier transformed large amplitude alternating current voltammetry: principles and applications." *Review of Polarography* 61.1 (2015): 21-32.

22. Elgrishi, Noémie, et al. "A practical beginner's guide to cyclic voltammetry." *Journal of chemical education* 95.2 (2018): 197-206.
23. Lee, Junqiao. *Electrochemical sensing of oxygen gas in ionic liquids on screen printed electrodes*. Diss. Curtin University, 2014.
24. Zouraris, D., and A. Karantonis. "Large amplitude ac voltammetry: Chief observables for a reversible reaction of free electroactive species." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 847 (2019): 113245.
25. $3\pi\chi$
26. Lasia, Andrzej. "Electrochemical impedance spectroscopy and its applications." *Modern aspects of electrochemistry*. Springer, Boston, MA, 2002. 143-248.
27. Instruments, Gamry. "Basics of electrochemical impedance spectroscopy." G. *Instruments, Complex impedance in Corrosion* (2007): 1-30.
28. Barsoukov, Evgenij, and J. Ross Macdonald. "Impedance Spectroscopy Theory, Experiment, and." *Applications, 2nd ed.*(Hoboken, NJ: John Wiley & Sons, Inc., 2005) (2005).

2. Φαινόμενο δυναμικό ακινητοποιημένων και ελεύθερων ενζύμων

Η ιδιαιτερότητα των ενζύμων της οικογένειας LPMOs αλλά και άλλων οξειδοαναγωγικών ενζύμων είναι ότι το ενεργό τους κέντρο που περιέχει χαλκό δεν βρίσκεται στο εσωτερικό της δομής τους αλλά στην επιφάνεια τους [1,2]. Το γεγονός αυτό καθιστά δυνατή την άμεση ηλεκτροχημική μελέτη αυτών των ενζύμων, την μελέτη του καταλυτικού τους μηχανισμού και την πιθανή αξιοποίηση τους σε βιοκαταλυτικές διαδικασίες [1,3], χωρίς τη χρήση μεσολαβητή (mediator). Για την αξιοποίηση, λοιπόν, των ενζύμων αυτών σε διάφορες εφαρμογές είναι απαραίτητη η εύρεση πληροφοριών, όπως τα πρότυπα ή φαινόμενα δυναμικά και οι κινητικές τους παράμετροι. Ένας απλός τρόπος για την μελέτη της κινητικής των ενζύμων αυτών είναι με την επίτευξη άμεσης μεταφοράς ηλεκτρονίων (direct electron transfer) μεταξύ του ενζύμου και της ηλεκτροδιακής επιφάνειας. Αρχικά λοιπόν, θα ελεγχθεί αν μπορεί να λάβει χώρα η άμεση μεταφορά ηλεκτρονίων με ένα απλό σύστημα ακινητοποίησης (ή εγκλεισμού) του ενζύμου με πολυηλεκτρολύτη Nafion σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα το οποίο έχει τροποποιηθεί με νανοσύνθετα υλικά A. Αυτή η ακινητοποίηση καθίσταται δυνατή λόγω της συγγένειας που παρουσιάζει η ιστιδίνη με μεταλλικά ιόντα, όπως τα ιόντα κοβαλτίου. Στην περίπτωση αυτή, το φαινόμενο δυναμικού που θα προσδιορισθεί πειραματικά θα είναι αυτό του *ακινητοποιημένου* ενζύμου, δηλαδή του ενζύμου που είναι εγκλεισμένο στην μήτρα του νανοσύνθετου υλικού και του πολυηλεκτρολύτη. Στην περίπτωση που μας ενδιαφέρει η τιμή του φαινόμενου δυναμικού του *ελεύθερου* ενζύμου, δηλαδή του ενζύμου σε διάλυμα συγκεκριμένης σύστασης και pH, θα πρέπει να γίνει διόρθωση του πρότυπου δυναμικού του ακινητοποιημένου ενζύμου. Να σημειωθεί ότι εν γένει στην περίπτωση των οξειδοαναγωγικών ενζύμων η άμεση μεταφορά ηλεκτρονίων είναι δύσκολο να επιτευχθεί, και αυτό οφείλεται στην απόσταση μεταξύ του ενεργού κέντρου του ενζύμου και την ηλεκτροδιακής επιφάνειας. Ωστόσο στην περίπτωση των LPMOs αυτή η δυσκολία εξομαλύνεται καθώς το ενεργό τους κέντρο βρίσκεται στην επιφάνεια τους και όχι «θαμμένο» στο κύριο όγκο τους [4].

2.1 Επίδραση της μήτρας του πολυηλεκτρολύτη στο φαινόμενο δυναμικό

Ας υποθέσουμε ότι ένα χημικό είδος Ox είναι ακινητοποιημένο στην επιφάνεια ενός ηλεκτροδίου, μέσω μίας μεμβράνης πολυηλεκτρολύτη. Το χημικό είδος μπορεί να αναχθεί προς Red σύμφωνα με την αντίδραση,



με πρότυπη σταθερά ταχύτητας k^0 . Κάθε χρονική στιγμή, οι επιφανειακές συγκεντρώσεις [mol/cm^2] της οξειδωμένης και ανηγμένης μορφής θα συνδέονται με τη σχέση,

$$\Gamma^0 = \Gamma_{\text{Ox}}(t) + \Gamma_{\text{red}}(t) \quad (2)$$

όπου Γ^0 η αρχική επιφανειακή συγκέντρωση του ακινητοποιημένου είδους.

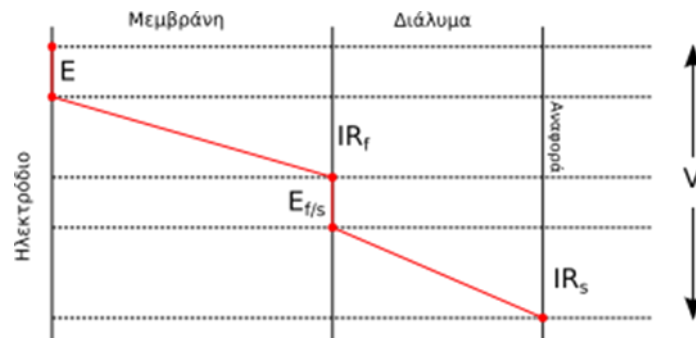
Για $n = 1$, η πυκνότητα ρεύματος της οξειδοαναγωγής αντίδρασης (φαρανταϊκό ρεύμα), i_F [A/cm^2], θα συνδέεται με το ρυθμό μεταβολής της συγκέντρωσης του είδους Ox μέσω του νόμου του Faraday, δηλαδή,

$$\frac{d\Gamma^0}{dt} = \frac{i_F}{F} \quad (3)$$

Τέλος, αν θεωρήσουμε ότι η κινητική ακολουθεί τον νόμο των Butler-Volmer, τότε για το φαρανταϊκό ρεύμα ισχύει,

$$i_F = Fk^0 \left[(\Gamma^0 - \Gamma_{\text{Ox}}) e^{\frac{(1-a)F}{RT}(E-E^0)} - \Gamma_{\text{Ox}} e^{\frac{-aF}{RT}(E-E^0)} \right] \quad (4)$$

όπου a ο παράγοντας συμμετρίας, E το δυναμικό του ηλεκτροδίου και E^0 το φαινόμενο δυναμικό.



Σχήμα 2.1: Πτώσεις τάσεις σε ηλεκτρόδιο παρουσία μεμβράνης πολυηλεκτρολύτη

Προκειμένου να προσδιορισθεί το φαινόμενο δυναμικό E^0 μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τεχνική της κυκλικής βολταμετρίας. Σύμφωνα με την τεχνική αυτή, στο ηλεκτρόδιο εφαρμόζεται ένα γραμμικά μεταβαλλόμενο δυναμικό V (ως προς ένα ηλεκτρόδιο αναφοράς) και καταγράφεται το ρεύμα που ρέει από το σύστημα. Από τις κορυφές του βολταμμογραφήματος που προκύπτει, προσδιορίζεται το φαινόμενο δυναμικό.

Το πρόβλημα όμως είναι ότι στις παραπάνω σχέσεις δεν εμφανίζεται το εφαρμοζόμενο δυναμικό V αλλά το δυναμικό του ηλεκτροδίου E . Για να συσχετισθούν αυτά τα δύο μεγέθη θα πρέπει να εισαχθεί ένα μοντέλο, όπως αυτό που παρουσιάζεται στο Σχ. 2.1. Στο μοντέλο αυτό θεωρούμε ότι το ηλεκτρόδιο είναι καλυμμένο από μία μεμβράνη, εντός της οποίας βρίσκεται το οξειδοαναγωγικό ζεύγος. Επίσης, μεταξύ του ορίου της μεμβράνης και του ηλεκτροδίου αναφοράς μεσολαβεί ηλεκτρολυτικό διάλυμα. Εφαρμόζοντας τον 2ο νόμο του Kirchhoff,

$$V = E + IR_f + E_{f/s} + IR_s \quad (5)$$

όπου R_f η ωμική αντίσταση της μεμβράνης, R_s η ωμική αντίσταση του ηλεκτρολυτικού διαλύματος, I το ολικό ρεύμα και $E_{f/s}$ η πτώση τάσης στη διεπιφάνεια μεμβράνης και ηλεκτρολυτικού διαλύματος. Συνεπώς, για το ολικό ρεύμα ισχύει,

$$I = \frac{V - E - E_{f/s}}{R_f + R_s} \quad (6)$$

Αν θεωρήσουμε ότι η διεπιφάνεια μεμβράνης και διαλύματος είναι πάντα σε ισορροπία, τότε το δυναμικό $E_{f/s}$ θα είναι,

$$E_{f/s} = \frac{RT}{F} \ln \left(\frac{c_{+,o}}{c_{+,i}} \right) \quad (7)$$

όπου $c_{+,o}$ και $c_{+,i}$ η (σταθερή) συγκέντρωση των κατιόντων εκτός και εντός της μεμβράνης, αντίστοιχα.

Τέλος, το συνολικό ρεύμα i που ρέει στο σύστημα θα οφείλεται τόσο στη φαρανταϊκή δράση όσο και στις χωρητικές ιδιότητες του ηλεκτροδίου. Συνεπώς, από τον 1ο νόμο του Kirchhoff,

$$I = I_f + I_C \quad (8)$$

ή, ισοδύναμα,

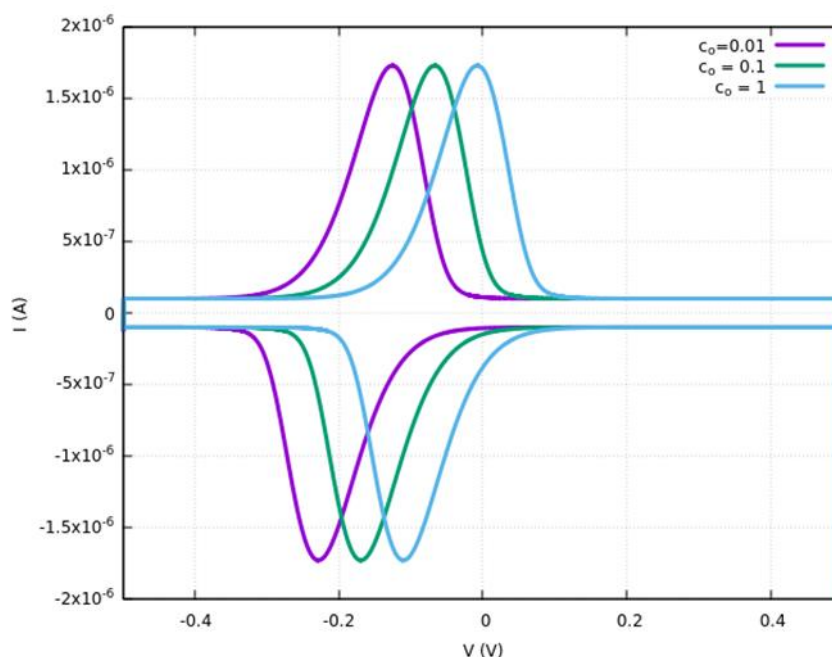
$$C \frac{dE}{dt} = I - I_f \quad (9)$$

όπου C η χωρητικότητα του ηλεκτροδίου. Συνδυάζοντας τις Εξ. (6) και (9) προκύπτει, μία διαφορική εξίσωση για το (άγνωστο) δυναμικό του ηλεκτροδίου,

$$C \frac{dE}{dt} = \frac{V - E - E_{f/s}}{R_f + R_s} - A i_f \quad (10)$$

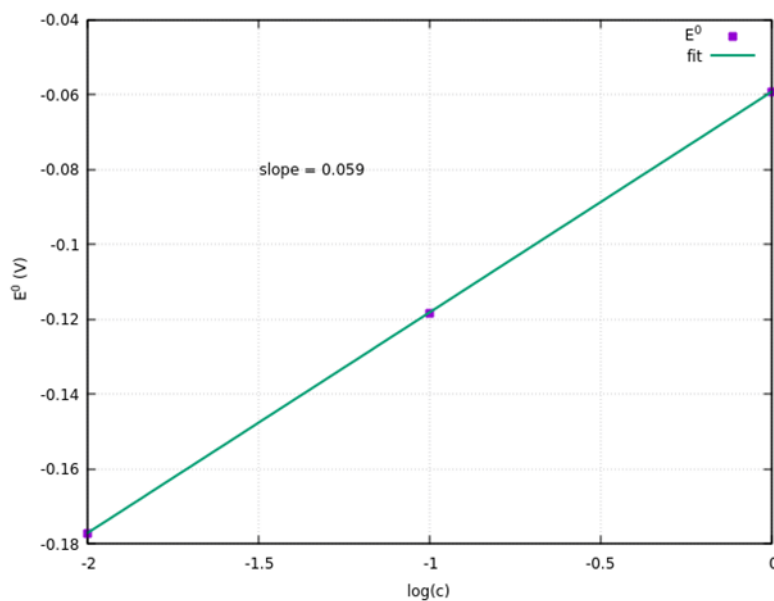
όπου A η επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Το κυκλικό βολταμογράφημα προκύπτει ολοκληρώνοντας τις Εξ. (3) και (10), αριθμητικά. Είναι ενδιαφέρον ότι το κυκλικό βολταμογράφημα θα εξαρτάται από τον λόγο των κατιόντων εντός και εκτός της

μεμβράνης, Εξ. (7) και ειδικότερα με τη συγκέντρωση των κατιόντων στο διάλυμα (θεωρώντας ότι η συγκέντρωσή τους εντός της μεμβράνης είναι δεδομένη).



Σχήμα 2.2: Κυκλική βολταμμετρία για διαφορετικές συγκεντρώσεις κατιόντων.

Στο Σχ. 2.2 παρουσιάζονται τρία κυκλικά βολταμμογραφήματα για διαφορετικές συγκεντρώσεις [mol/cm^3] κατιόντων στο διάλυμα. Για τον υπολογισμό έχουν χρησιμοποιηθεί οι παρακάτω τιμές: $A = 1 \text{ cm}^2$, $\nu = 0.01 \text{ V/s}$, $\Gamma^0 = 10^{-6} \text{ mol}/\text{cm}^2$, $R_f + R_s = 10 \text{ } \Omega$, $c_{+,i} = 10 \text{ mol}/\text{cm}^3$, $k^0 = 1 \text{ s}^{-1}$, $\alpha = 0.5$, $C = 10^{-4} \text{ F}$ και $E^0 = 0 \text{ V}$. Παρατηρούμε ότι αν και το φαινόμενο δυναμικό είναι 0V, τα κυκλικά βολταμμογραφήματα είναι μετατοπισμένα προς καθοδικότερες (αρνητικότερες) τιμές, ειδικά αν η συγκέντρωση των κατιόντων στο διάλυμα είναι χαμηλή. Καθώς η συγκέντρωση αυξάνει, το βολταμμογράφημα τείνει σε ανοδικότερες τιμές και η προσδιοριζόμενη τιμή του φαινόμενου δυναμικού πλησιέστερα της πραγματικής.



Σχήμα 2.3: Εξάρτηση του φαινομένου δυναμικού από τη συγκέντρωση των κατιόντων.

Στο Σχ. 2.3 παρουσιάζεται η εξάρτηση του E^0 από τη συγκέντρωση των κατιόντων στο διάλυμα, όπως αυτό θα προσδιορίζονταν από την ανοδική κορυφή. Παρατηρούμε ότι αύξηση της συγκέντρωσης οδηγεί σε τιμή πλησιέστερα της πραγματικής. Αυτή η θεωρητική ανάλυση θα χρησιμοποιηθεί παρακάτω για τον προσδιορισμό του φαινομένου δυναμικού του ελεύθερου ενζύμου.

2.2 Πειραματικός προσδιορισμός του φαινομένου δυναμικού

Για την διεξαγωγή των βολταμετρικών πειραμάτων χρησιμοποιείται σύστημα τριών ηλεκτροδίων. Εκ των οποίων το ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC) χρησιμοποιείται ως ηλεκτρόδιο εργασίας, ως αντίθετο ηλεκτρόδιο χρησιμοποιείται ένα σύρμα πλατίνας και ως ηλεκτρόδιο αναφοράς ένα ηλεκτρόδιο $\text{Ag}|\text{AgCl}$ (KCl sat.). Ως φέροντας ηλεκτρολύτης χρησιμοποιήθηκαν περίπου 5mL ρυθμιστικού διαλύματος που αποτελείται από 4.1015 g οξικού νατρίου 0.5M στα οποία έχουν προστεθεί περίπου 2 mL οξικού οξέος 0.5 M με σκοπό να γίνει η ρύθμιση του pH του ρυθμιστικού διαλύματος στην τιμή pH6. Τα βολταμετρικά πειράματα διεξήχθησαν σε ποτενσιοστάτη συνδεδεμένο με μια γεννήτρια στην οποία επιλέγονται οι μεταβλητές της συχνότητας f και του πλάτους ταλάντωσης A , και επιβάλλει στο σύστημα ημιτονοειδή διαταραχή για να γίνει η ανάλυση με την μέθοδο FTaCV. Όλα τα διαλύματα απαερόνωνται πριν την έναρξη των πειραμάτων για περίπου 5 min, έτσι ώστε να αποφευχθεί η αναγωγή του οξυγόνου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και να μην

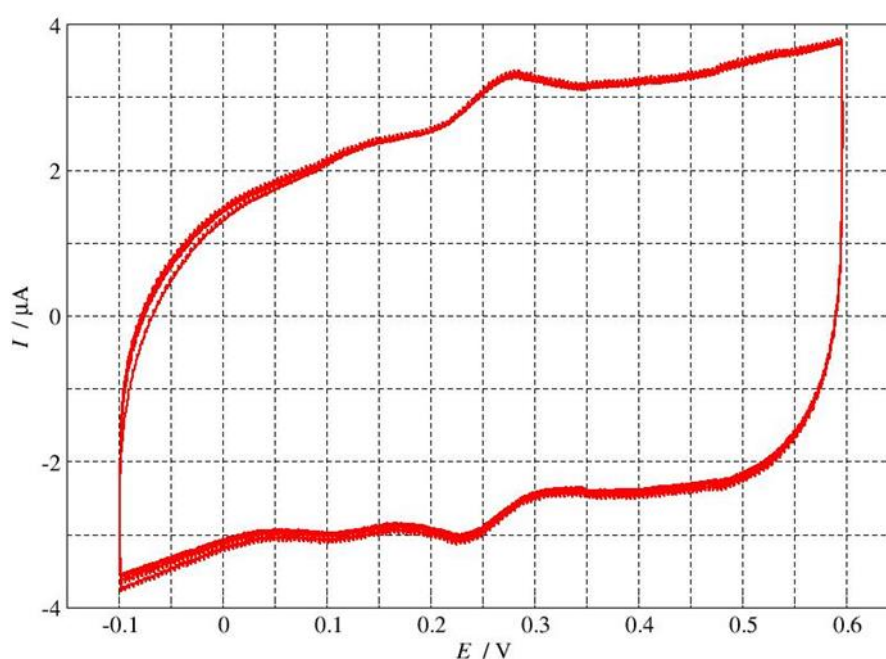
δημιουργηθεί κάποια ανεπιθύμητη αντίδραση μεταξύ οξυγόνου και ενζύμου. Επιπλέον, και κατά την διάρκεια των πειραμάτων το αέριο άζωτο διαχέεται πάνω από την επιφάνεια του ηλεκτρολυτικού διαλύματος.

Το ηλεκτρόδιο του υαλώδους άνθρακα καθαρίζεται σε βελουδίνου ύφασμα με την χρήση πάστας 0.05 μm Al_2O_3 , ξεπλένεται με απιονισμένο νερό και αφήνεται να στεγνώσει. Ακολούθως 2 μL του διαλύματος μήτρας (0.005g Co-f-MWCNTs διαλυμένα σε 0.5mL πολυηλεκτρολύτη Nafion) ενζύμου τοποθετούνται πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου του υαλώδους άνθρακα και αφήνονται να στεγνώσουν. Οι αναλογίες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του παραπάνω διαλύματος είναι 2 μL διαλύματος Co-f-MWCNTs και 8 μL ενζύμου MtLPMO9H. Ακολούθως γίνεται έλεγχος του τροποποιημένου ηλεκτροδίου με κυκλική βολταμμετρία σε σύστημα τριών ηλεκτροδίων με ταχύτητα σάρωσης 100 mV/s και φέροντα ηλεκτρολύτη acetate buffer, για να διαπιστωθεί ότι όντως έλαβε χώρα η ακινητοποίηση του ενζύμου.

2.3 Κυκλική βολταμμετρία (CV)

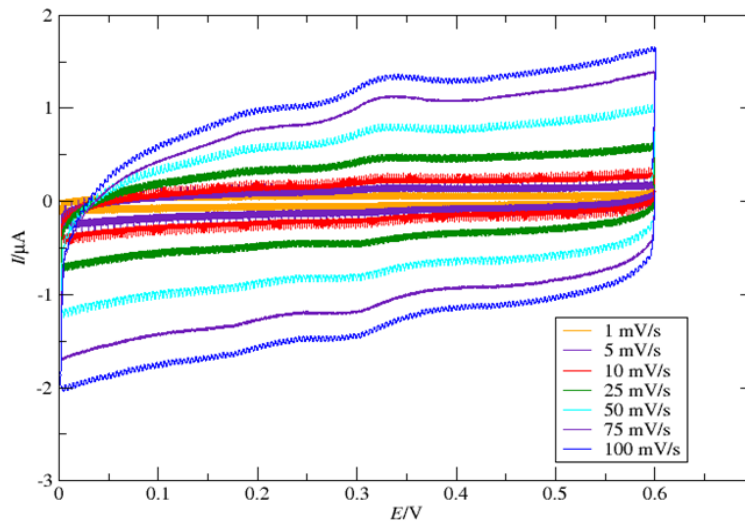
Η κυκλική βολταμμετρία είναι η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την εύρεση προτύπων δυναμικών και κινητικών παραμέτρων. Ωστόσο στην περίπτωση μέτρησης ενζύμων η χαμηλή συγκέντρωση του ενζύμου σε συνδυασμό με τα υψηλά χωρητικά ρεύματα δυσχεραίνουν την ανάλυση, καθώς εξ αιτίας αυτών των παραμέτρων δεν λαμβάνονται έντονες κορυφές φαρανταϊκού ρεύματος για την περαιτέρω ανάλυση. Παρακάτω (Σχ. 2.4) παρουσιάζεται το κυκλικό βολταμμογράφημα ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMO9H . Οι μετρήσεις της κυκλικής βολταμμετρίας διεξήχθησαν σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer, με επιβαλλόμενα δυναμικά $E_{\text{init}}= 800$ mV και $E_{\text{rev}}=-600$ mV. Παρατηρείται ότι εμφανίζονται δύο οξειδοαναγωγικές κορυφές. Η οξειδωτική κορυφή εμφανίζεται στα 279.8 mV και η αναγωγική κορυφή εμφανίζεται περίπου στα 221.25 mV. Παρατηρείται λοιπόν ότι οι κορυφές που προκύπτουν από το κυκλικό βολταμμογράφημα δεν είναι τόσο έντονες, ώστε να υποστηρίξουν την περαιτέρω ανάλυση. Επίσης, η διαφορά του δυναμικού των κορυφών είναι 58.55 mV, έναντι της τιμής του μηδενός που θα αναμένονταν για μία αντιστρεπτή οξειδοαναγωγή ακινητοποιημένου είδους. Ακόμα στο σήμα εμφανίζεται έντονη η χωρητική συνεισφορά. Η χωρητικότητα μπορεί να είναι υπεύθυνη για την μεγάλη διαφορά μεταξύ των οξειδοαναγωγικών κορυφών, καθώς και για την μετατόπιση του κυκλικού βολταμμογραφήματος. Παρατηρώντας και τα κυκλικά βολταμμογραφήματα για

διαφορετικές τιμές ταχυτήτων σάρωσης φαίνεται ότι για υψηλές ταχύτητες σάρωσης η χωρητική συνεισφορά του ηλεκτροδίου παραμορφώνει τα κυκλικά βολταμμογραφήματα ενώ για χαμηλές ταχύτητες σάρωσης παρατηρείται μείωση τόσο της χωρητικής όσο και της φαρανταϊκής συνεισφοράς καθώς οι οξειδοαναγωγικές κορυφές γίνονται λιγότερο έντονες. Όλα τα παραπάνω οδηγούν σε επισφαλή συμπεράσματα σχετικά με την απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων και την εξαγωγή του πρότυπου δυναμικού. Κρίνεται λοιπόν απαραίτητη η εύρεση άλλης μεθόδου για την επιβεβαίωση της απευθείας μεταφοράς ηλεκτρονίων μεταξύ του ενζύμου και της επιφάνειας του ηλεκτροδίου αλλά και για τον μετέπειτα προσδιορισμό του πρότυπου δυναμικού.



Σχήμα 2.4: Κυκλικό βολταμμογράφημα ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMOs σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer με ταχύτητα σάρωσης 100 mV/s.

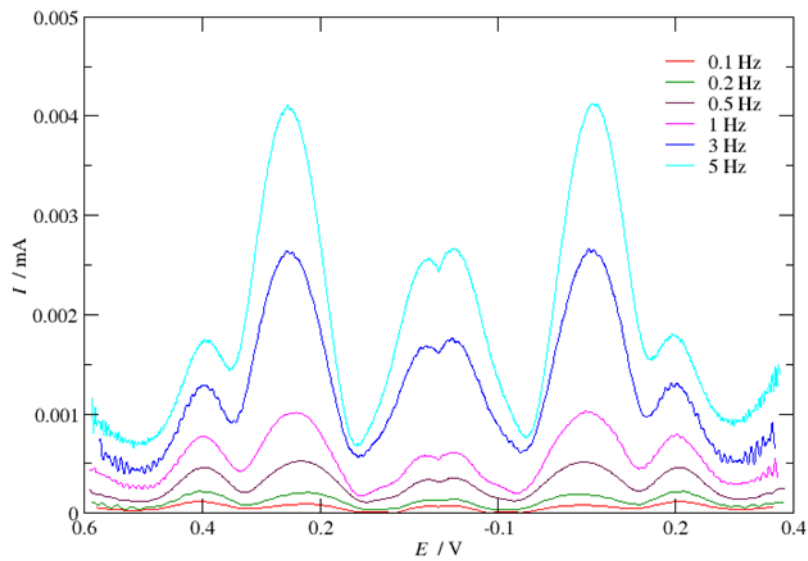
Στο Σχ. 2.5 παρουσιάζονται τα βολταμμογραφήματα για διάφορες ταχύτητες σάρωσης, όπου φαίνεται ότι ακόμα και σε χαμηλές ταχύτητες σάρωσης ο προσδιορισμός των κορυφών είναι δύσκολος.



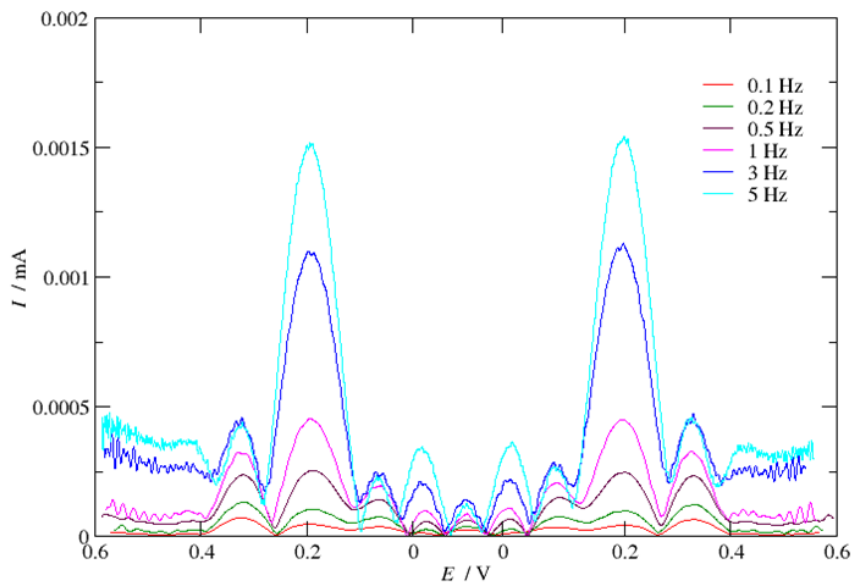
Σχήμα 2.5: Κυκλικά βολταμμογραφήματα ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMOs σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer με ταχύτητες σάρωσης 1,5,10,25,50,75,100 mV/s.

2.4 Κυκλική βολταμμετρία εναλλασσόμενου ρεύματος με μετασχηματισμό Fourier (FTaCV)

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω η κυκλική βολταμμετρία στην περίπτωση ανάλυσης ενζύμων υστερεί, λόγω χαμηλών συγκεντρώσεων των ενζύμων και λόγω υψηλών χωρητικών ρευμάτων που υπερκαλύπτουν τις φαρανταϊκές αποκρίσεις. Για την αντιμετώπιση αυτών των προβλημάτων και την λήψη φαρανταϊκού σήματος απαλλαγμένου από την χωρητική συνεισφορά χρησιμοποιείται η μέθοδος FTaCV. Η μέθοδος FTaCV συνοψίζεται στην επιβολή ημιτονοειδούς διαταραχής στο σύστημα, σταθερής συχνότητας f και υψηλού πλάτους ταλάντωσης A [5]. Οι αρμονικές λαμβάνονται από την αριθμητική ανάλυση του βολταμμογραφήματος που προκύπτει, και στοχεύει στην απομόνωση των επιμέρους βολταμμογραφημάτων, με αντίστροφο μετασχηματισμό Fourier, που αντιστοιχούν σε κάθε αρμονική. Λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης των ενζύμων, η επιβολή σχετικά υψηλού πλάτους ταλάντωσης είναι απαραίτητη ώστε να ενταθεί το μέγεθος της βολταμμετρικής απόκρισης και να ληφθεί επαρκής αριθμός αρμονικών. Επίσης στις υψηλότερες αρμονικές η συνεισφορά του χωρητικού ρεύματος τείνει να εξαλειφθεί και επίσης έχει επιτευχθεί η αντιστρεπτότητα [6]. Επομένως τα πειράματα εκτελούνται σε πλάτος ταλάντωσης 200 mV και σε διάφορες συχνότητες. Τα επιβαλλόμενα δυναμικά είναι $E_{init}= 600$ mV και $E_{rev}=-100$ mV και οι ταχύτητες σάρωσης ποικίλουν ανάλογα με την συχνότητα που εφαρμόζεται.

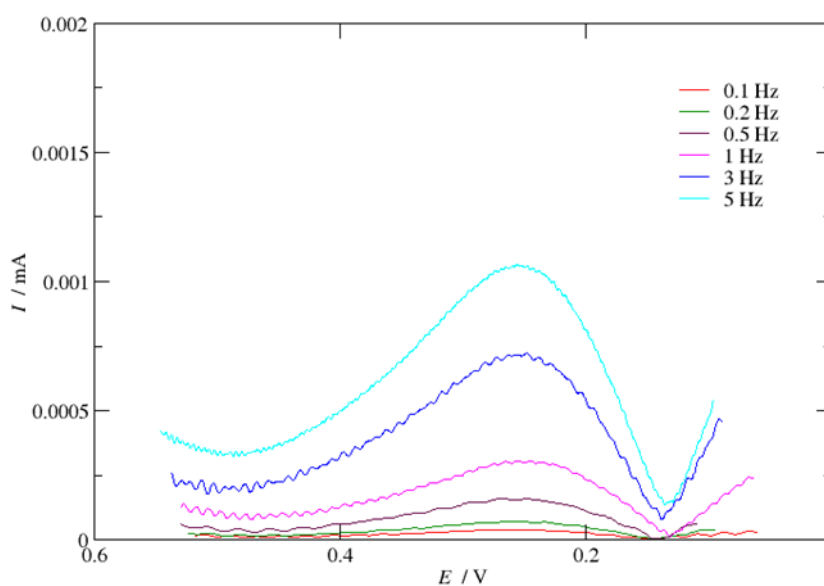


Σχήμα 2.6: 3η αρμονική ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMOs με Nafion σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης $A_0=200$ mV. Για επιβαλλόμενες συχνότητες 5,3 και 1 Hz η ταχύτητα σάρωσης που εφαρμόζεται είναι 5mV/s και για συχνότητες 0.5, 0.2 και 0.1 Hz οι ταχύτητες σάρωσης που εφαρμόζονται είναι 2.5, 1.25, 1 mV/s αντίστοιχα.

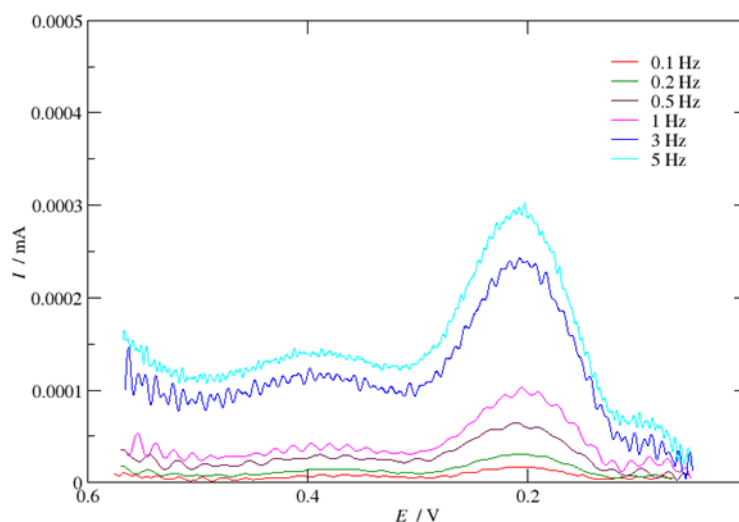


Σχήμα 2.7: 5η αρμονική ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMOs με Nafion σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης $A_0=200$ mV. Για επιβαλλόμενες συχνότητες 5,3 και 1 Hz η ταχύτητα σάρωσης που εφαρμόζεται είναι 5mV/s και για συχνότητες 0.5, 0.2 και 0.1 Hz οι ταχύτητες σάρωσης που εφαρμόζονται είναι 2.5, 1.25, 1 mV/s αντίστοιχα.

Λαμβάνονται τα βολταμμογραφήματα και έπειτα από κατάλληλη επεξεργασία, η οποία γίνεται σε πρόγραμμα που έχει αναπτυχθεί στο εργαστήριο λαμβάνονται οι αρμονικές, όπως φαίνεται στις παραπάνω εικόνες. Δίνονται παραπάνω η 3^η (Σχ. 2.6) και η 5^η (Σχ. 2.7) αρμονική για πλάτος ταλάντωσης 200 mV και για διάφορες συχνότητες, όπως φαίνεται με την αύξηση της συχνότητας αυξάνεται και το μέγεθος των κορυφών. Επίσης είναι φανερό ότι στην περίπτωση της 5^{ης} αρμονικής έχει εξαλειφθεί το χωρητικό ρεύμα συγκριτικά με την 3^η αρμονική. Ωστόσο και στις δύο περιπτώσεις οι κορυφές είναι έντονες και ξεκάθαρες και πιστοποιείται η ύπαρξη ενζύμου και μετέπειτα δυνατότητα μελέτης του, γεγονός που οπτικοποιείται και με τα παρακάτω αντιπαρατιθέμενα διαγράμματα αναφοράς (Σχ. 2.8-2.9). Στα διαγράμματα αυτά έχει αφεθεί να στεγνώσει πάνω στο ηλεκτρόδιο του υαλώδους άνθρακα ποσότητα 2 μ L Nafion χωρίς την παρουσία ενζύμου. Στα διαγράμματα φαίνονται οι μέγιστες κορυφές για την 3^η και την 5^η αρμονική απουσία ενζύμου, οι οποίες δεν είναι καλώς ορισμένες και δεν μοιάζουν ούτε σε μορφή αλλά ούτε και σε ένταση με τις αντίστοιχες μέγιστες κορυφές παρουσία του ενζύμου.



Σχήμα 2.8: 3η αρμονική στρώματος Nafion απουσία ενζύμου σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης $A_0=200$ mV. Για επιβαλλόμενες συχνότητες 5,3 και 1 Hz η ταχύτητα σάρωσης που εφαρμόζεται είναι 5mV/s και για συχνότητες 0.5, 0.2 και 0.1 Hz οι ταχύτητες σάρωσης που εφαρμόζονται είναι 2.5, 1.25, 1 mV/s αντίστοιχα.



Σχήμα 2.9: 5η αρμονική στρώματος Nafion απουσία ενζύμου σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης $A_0=200$ mV. Για επιβαλλόμενες συχνότητες 5,3 και 1 Hz η ταχύτητα σάρωσης που εφαρμόζεται είναι 5mV/s και για συχνότητες 0.5, 0.2 και 0.1 Hz οι ταχύτητες σάρωσης που εφαρμόζονται είναι 2.5, 1.25, 1 mV/s αντίστοιχα.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα φαίνεται να καθίσταται δυνατή η απευθείας μεταφορά ηλεκτρονίων για την ακινητοποιημένη MtLPMOs πάνω σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα με την αρωγή πολυηλεκτρολύτη Nafion, άρα είναι δυνατός και ο προσδιορισμός των πρότυπων δυναμικών. Για αρμονικές περιττού αριθμού, το πρότυπο δυναμικό αντιστοιχεί στην τιμή δυναμικού της μέγιστης και πιο έντονης κορυφής. Ενώ για τις αρμονικές άρτιου αριθμού το πρότυπο δυναμικό αντιστοιχεί στην τιμή του ελάχιστου δυναμικού που βρίσκεται ανάμεσα στις 2 πιο έντονες κορυφές. Οι τιμές των οξειδωτικών και αναγωγικών δυναμικών φαίνονται στον παρακάτω πίνακα (Πιν. 2.1). Έπειτα ο προσδιορισμός του προτύπου δυναμικού του ενζύμου γίνεται με τον υπολογισμό της μέσης τιμής του οξειδωτικού και του αναγωγικού δυναμικού.

Πίνακας 2.1: Δυναμικά οξειδωτικής και αναγωγικής κορυφής, διαφορά μεταξύ των κορυφών και φαινόμενο δυναμικό ακινητοποιημένου ενζύμου MtLPMO9H

E_{Ox} (mV)	E_{Red} (mV)	$ E_{Red}-E_{Ox} $ (mV)	E'_{app} (mV)
198.73	199.09	0.39	198.89

Για μια καλύτερη προσέγγιση της τιμής του προτύπου δυναμικού του ελεύθερου ενζύμου, που είναι και το επιθυμητό να βρεθεί θα αξιοποιηθεί ο τύπος:

$$E'_{app} = E^{o'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{c_{+,o}}{c_{+,i}} - 2.303 \frac{RT}{nF} pH$$

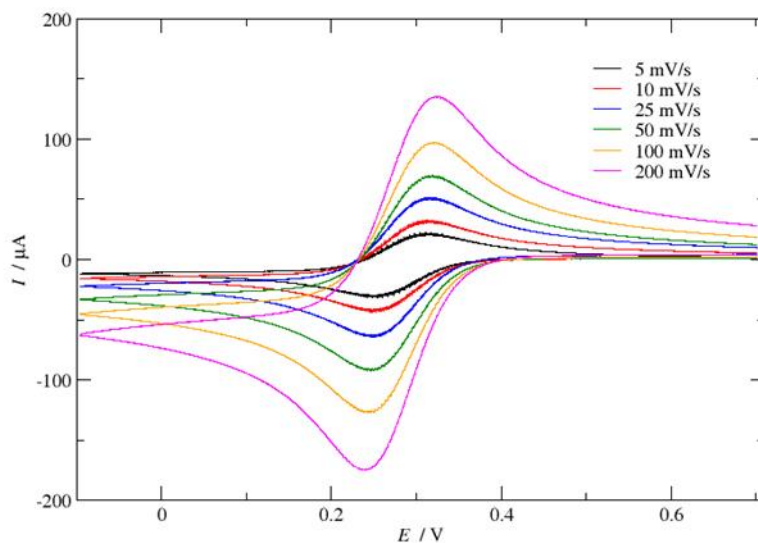
Όπου $c_{+,o}$ και $c_{+,i}$ η συγκέντρωση των κατιόντων του φέροντα ηλεκτρολύτη στο διάλυμα και του πολυηλεκτρολύτη αντίστοιχα. Η συγκέντρωση $c_{+,i}$ θεωρείται σταθερή και ίση με την συγκέντρωση των θειικών ομάδων $[SO_3^-]$ μέσα στον πολυηλεκτρολύτη. Το μέσο μοριακό βάρος του πολυηλεκτρολύτη Nafion είναι 5×10^5 g/mol, και η μοριακή συγκέντρωση στα 5% w/v υπολογίζεται ίση με 1×10^{-4} M, το οποίο θεωρείται ίσο με $c_{+,i}$. Ο φέροντας ηλεκτρολύτης που χρησιμοποιείται είναι acetate buffer 0.5 M με pH 6. Λαμβάνοντας υπ όψιν ότι τα πειράματα εκτελούνται σε θερμοκρασία περιβάλλοντος και ότι το δυναμικό E'_{app} αναφέρεται στο πρότυπο δυναμικό του ακινητοποιημένου ενζύμου. Το διορθωμένο πρότυπο δυναμικό για το ελεύθερο ένζυμο έπειτα από τις πράξεις θα είναι ίσο με 335.51 mV. Παρατηρείται ότι η τιμή του διορθωμένου φαινόμενου δυναμικού ελεύθερου ενζύμου που προκύπτει από την εμπειρική σχέση είναι σε καλή συμφωνία με την διορθωμένη τιμή φαινόμενου δυναμικού που προκύπτει από συσχέτιση, η οποία ισούται με 334.54 mV, όπως θα αναλυθεί παρακάτω.

2.7 Διόρθωση φαινόμενου δυναμικού ενζύμου μέσω συσχέτισης με οξειδοαναγωγικό είδος το φερροκενίου (ferrocene)

Προκειμένου να γίνει η διόρθωση του φαινόμενου δυναμικού του ακινητοποιημένου ενζύμου στο φαινόμενο δυναμικό που αντιστοιχεί στο ελεύθερο στο διάλυμα ένζυμο, αξιοποιείται το φερροκενίου (ferrocene) ως οξειδοαναγωγικό είδος αναφοράς για να γίνει η συσχέτιση με το ένζυμο. Το ηλεκτρολυτικό διάλυμα που θα διεξαχθούν τα πειράματα είναι ρυθμιστικό διάλυμα (tartrate buffer) 0.1 M και με pH 5, το οποίο παρασκευάζεται με την διάλυση 1.4111 g τρυγικού νατρίου (sodium tartrate) σε 20 mL απιονισμένου νερού και την μετέπειτα προσθήκη περίπου 1 mL τρυγικού οξέος (tartaric acid) με σκοπό την ρύθμιση της τιμής του pH του παραπάνω διαλύματος στην τιμή 5. Η ρύθμιση του διαλύματος γίνεται σε αυτή την τιμή με σκοπό να διαμορφωθούν οι ίδιες συνθήκες με αυτές που χρησιμοποιούνται κατά την ανάλυση του ακινητοποιημένου ενζύμου.

Για της μετρήσεις παρασκευάζεται διάλυμα κορεσμένο σε φερροκενίου, το οποίο γίνεται με την προσθήκη μικρής ποσότητας φερροκενίου σε 1 mL ρυθμιστικού διαλύματος, ακολουθεί φυγοκέντριση και διήθηση του διαλύματος αυτού με φίλτρο πόρων 0.22 μm. Ακολουθεί κυκλική βολταμμετρία στο ελεύθερο αυτό διάλυμα. Στον Σχ. 2.10 πιστοποιείται όντως η οξειδοαναγωγική δράση του φερροκενίου σε διάφορες ταχύτητες σάρωσης.

Ακολούθως 0.0056 g φερροκενίου 15 mM διαλύονται σε 2 mL ακετυλονιτρίλιου γίνεται αραιώση του παραπάνω διαλύματος 1:2 και λαμβάνονται 0.5 mL του αραιωμένου διαλύματος και αναμειγνύονται με 4.5 mL ρυθμιστικού διαλύματος. Ακολουθούν πειράματα κυκλικής βολταμμετρίας στο ελεύθερο είδος του διαλύματος που παρασκευάστηκε (Σχ. 2.11). Η διάλυση του φερροκενίου σε ακετυλονιτρίλιο είναι προτιμητέα συγκριτικά με την παραπάνω περίπτωση γιατί το φερροκενίου είναι διαλυτό στο ακετυλονιτρίλιο με αποτέλεσμα να αυξάνεται η συγκέντρωση του στο μετρούμενο διάλυμα και να λαμβάνονται εντονότερα σήματα προς ανάλυση όπως φαίνεται στο Σχ. 2.11.



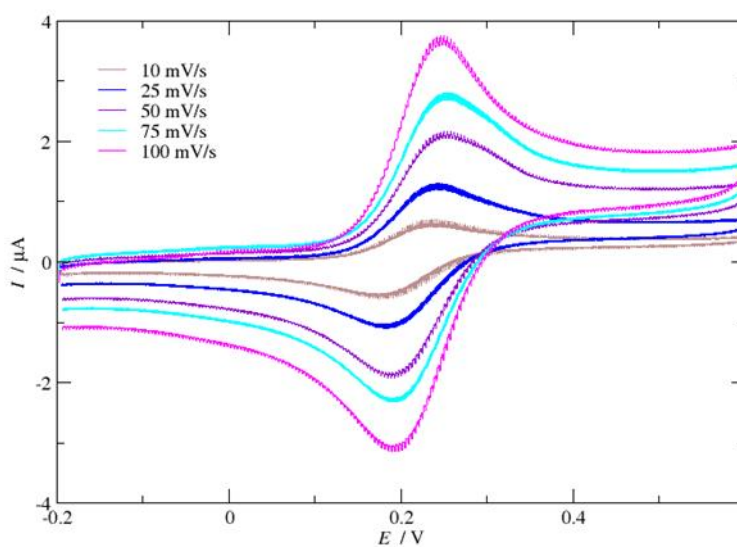
Σχήμα 2.10: Κυκλικά βολταμμογραφήματα ελεύθερου ferrocene με tartrate buffer που έχει υποστεί διήθηση με ταχύτητες σάρωσης 10,25,50,75,100 mV/s.

Για την ακινητοποίηση του φερροκενίου στο ηλεκτρόδιο του υαλώδους άνθρακα λαμβάνονται 5 μL από το παραπάνω διάλυμα που περιέχει φερροκένιο και ακετυλονιτρίλιο πριν την αραιώση του και αφήνονται να στεγνώσουν πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας. Ακολούθως 5 μL Nafion τοποθετούνται πάνω από το υμένιο αυτό και αφήνονται να στεγνώσουν. Αυτό συντελεί στην καλύτερη ακινητοποίηση του φερροκενίου και ακολουθεί κυκλική βολταμμετρία στο ακινητοποιημένο είδος με την χρήση του ρυθμιστικού διαλύματος ως ηλεκτρολυτικό διάλυμα Σχ. 2.12.

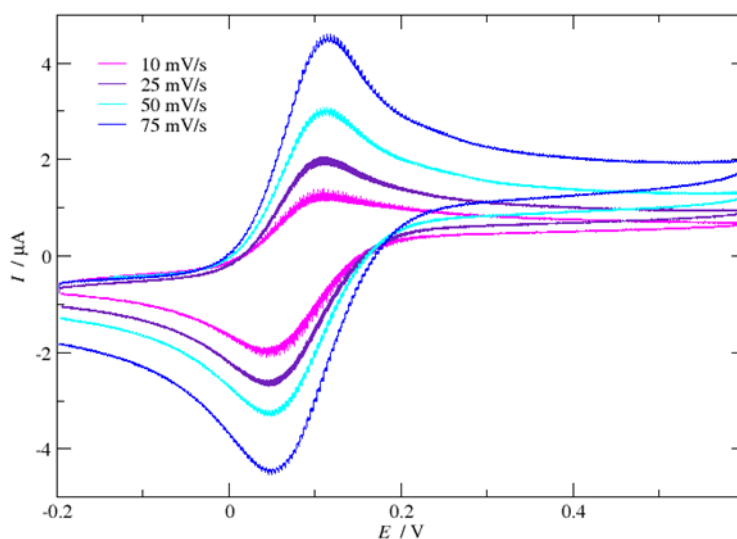
Τα πειράματα κυκλικής βολταμμετρίας για το ελεύθερο και για το ακινητοποιημένο είδος διεξάγονται όπως και στην περίπτωση του ενζύμου σε σύστημα τριών ηλεκτροδίων. Εκ των οποίων το ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC) χρησιμοποιείται ως ηλεκτρόδιο εργασίας, ως αντίθετο ηλεκτρόδιο χρησιμοποιείται ένα σύρμα πλατίνας και ως ηλεκτρόδιο αναφοράς ένα ηλεκτρόδιο $\text{Ag}|\text{AgCl}$ (KCl sat.). Οι μετρήσεις εκτελούνται σε διαφορετικές τιμές ταχύτητας σάρωσης.

Έπειτα από υπολογισμούς για την περίπτωση του ελεύθερου είδους τα κυκλικά βολταμμογραφήματα του οποίου φαίνονται στο Σχ. 2.11 η τιμή του φαινόμενου δυναμικού προκύπτει ίση με 215.3 mV. Στην περίπτωση που το φερροκένιο είναι ακινητοποιημένο στον πολυηλεκτρολύτη Nafion το δυναμικό λαμβάνει την τιμή 79.65 mV. Επομένως οι τιμές των δυναμικών ελεύθερου και ακινητοποιημένου είδους στην περίπτωση του φερροκενίου έχουν μια διαφορά της τάξεως των 135.65 mV. Χρησιμοποιώντας αυτή την συσχέτιση ως αναφορά

στην περίπτωση που το οξειδοαναγωγικό είδος είναι το ένζυμο προκύπτει ότι για την πειραματικά μετρούμενη τιμή του προτύπου δυναμικού του ακινητοποιημένου ενζύμου, η οποία είναι 198.89 mV, η διορθωμένη τιμή του φαινόμενου δυναμικού του ελεύθερου ενζύμου με βάση την συσχέτιση θα ανέρχεται στην τιμή 334.54 mV.



Σχήμα 2.11: Κυκλικά βολταμμογραφήματα ελεύθερου είδους ferrocene με ακετυλονιτρίλιο και tartrate buffer με ταχύτητες σάρωσης 10,25,50,75,100 mV/s.



Σχήμα 2.12: Κυκλικά βολταμμογραφήματα ακινητοποιημένου ferrocene με Nafion σε ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), με φέροντα ηλεκτρολύτη 0.1 M tartrate buffer pH=5 με ταχύτητες σάρωσης 10,25,50,75 mV/s.

Βιβλιογραφία

1. Zouraris, D., et al. "Direct electron transfer of lytic polysaccharide monooxygenases (LPMOs) and determination of their formal potentials by large amplitude Fourier transform alternating current cyclic voltammetry." *Bioelectrochemistry* 124 (2018): 149-155.
2. Span, Elise A., and Michael A. Marletta. "The framework of polysaccharide monooxygenase structure and chemistry." *Current opinion in structural biology* 35 (2015): 93-99.
3. Tarasevich, M. R. "Bioelectrocatalysis." *Comprehensive Treatise of Electrochemistry*. Springer, Boston, MA, 1985. 231-295.
4. Zouraris Dimitrios. "Electrochemical study of redox enzymes and their utilization on modified electrodes." (2021).
5. Bond, Alan M., et al. "Changing the look of voltammetry." *Analytical chemistry* 77.9 (2005): 186-A.
6. O'Mullane, Anthony P., et al. "Higher harmonic large-amplitude fourier transformed alternating current voltammetry: analytical attributes derived from studies of the oxidation of ferrocenemethanol and uric acid at a glassy carbon electrode." *Analytical chemistry* 80.12 (2008): 4614-4626.

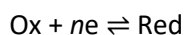
3. Ηλεκτροχημικός προσδιορισμός των κινητικών σταθερών του ενζύμου MtLPMO9H

Οι LPMOs αποτελούν οξειδοαναγωγικά ένζυμα. Η αξιοποίηση τους είναι σχετικά εύκολο να καταστεί δυνατή λόγω του ότι το ενεργό τους κέντρο δεν βρίσκεται στο εσωτερικό της δομής τους αλλά μπορεί να εντοπιστεί στην επιφάνεια τους, γεγονός που καθιστά εφικτή την ακινητοποίηση τους στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου με σκοπό την απευθείας ανταλλαγή ηλεκτρονίων και την μελέτη τους [1,2]. Για να μπορέσει να πραγματοποιηθεί όμως η μελέτη τους θα πρέπει να έχουν προσδιοριστεί κινητικές και θερμοδυναμικές πληροφορίες που σχετίζονται με την αλληλεπίδραση του ενζύμου με την επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Παρακάτω θα υπολογισθεί η κινητική σταθερά της δράσης (k^0). Η μέθοδος που θα αξιοποιηθεί για την μελέτη του ακινητοποιημένου ενζύμου LPMOs είναι η FTaCV. Η μέθοδος αυτή υπερτερεί έναντι της κυκλικής βολταμετρίας στην περίπτωση που εξετάζονται ένζυμα, καθώς η μικρή συγκέντρωση των ενζύμων σε συνδυασμό με τα υψηλά χωρητικά ρεύματα που υπερκαλύπτουν τα φαρανταϊκά, δυσχεραίνουν την ανάλυση με κυκλική βολταμετρία, γεγονός που αντιμετωπίζεται με την FTaCV, η οποία εξαλείφει την χωρητική συνεισφορά. Επίσης στην FTaCV η οξειδοαναγωγική απόκριση είναι απομονωμένη από άλλους παράγοντες, οι οποίοι μπορούν να επηρεάσουν το σήμα, και έτσι δίνουν πιο ακριβείς πληροφορίες για τον μηχανισμό και κινητικές και θερμοδυναμικές πληροφορίες σε περίπτωση χαμηλών συγκεντρώσεων, όπως είναι αυτές των ενζύμων [3,4].

3.1 Θεωρητικό υπόβαθρο

Στην παράγραφο αυτή θα γίνει μία παρουσίαση της προτεινόμενης πειραματικής μεθοδολογίας προσδιορισμού της κινητικής σταθεράς οξειδοαναγωγής ακινητοποιημένου ενζύμου. Η μεθοδολογία υλοποιείται με την τεχνική FTaCV, και έχει προταθεί θεωρητικά [2], ενώ δεν έχει γίνει ως αυτή την στιγμή κάποια προσπάθεια πειραματικής εφαρμογής της.

Ας θεωρήσουμε την αντίδραση,



όπου Ox και Red η οξειδωμένη και ανηγμένη μορφή του ακινητοποιημένου ενζύμου, αντίστοιχα, και n το πλήθος των ηλεκτρονίων που ανταλλάσσονται. Ας συμβολίσουμε την αρχική συγκέντρωση του Ox ως Γ^0 . Ας θεωρήσουμε επίσης ότι οι κινητικές σταθερές της αναγωγής και της οξείδωσης ακολουθούν τον νόμο των Butler-Volmer:

$$k_c = k^0 e^{-\frac{\alpha n F}{RT} (E - E^0)} \quad (1)$$

$$k_a = k^0 e^{\frac{(1-\alpha) n F}{RT} (E - E^0)} \quad (2)$$

όπου k^0 η πρότυπη κινητική σταθερά, E το δυναμικό του ηλεκτροδίου και E^0 , το φαινόμενο δυναμικό. Το (αδιάστατο) βολταμμογράφημα εναλλασσόμενου ρεύματος (FTacV) συχνότητας f και πλάτους A_0 θα είναι,

$$\psi(\tau) = \psi_f(\tau) + \psi_c(\tau) \quad (3)$$

όπου ο πρώτος όρος αφορά τη συνεισφορά των φαρανταϊκών ρευμάτων και ο δεύτερος των χωρητικών ρευμάτων λόγω της χωρητικότητας C του ηλεκτροδίου. Η σχέση του αδιάστατου ρεύματος ψ και της πυκνότητας ρεύματος είναι,

$$\psi = \frac{i}{nF\Gamma^0 f}$$

και η σχέση αδιάστατου χρόνου με το χρόνο,

$$\tau = t f$$

Η φαρανταϊκή συνιστώσα του βολταμμογραφήματος δίνεται από τη σχέση,

$$\psi_f(\tau) = -k \left[e^{(1-\alpha)\xi(\tau)} \int_0^\tau \psi_f(s) ds + e^{-\alpha\xi(\tau)} \left(1 + \int_0^\tau \psi_f(s) ds \right) \right] \quad (4)$$

ενώ η χωρητική συνιστώσα,

$$\psi_c = \mu \xi'(\tau) \quad (5)$$

όπου,

$$\xi = \frac{nF}{RT} (E - E^0)$$

το αδιάστατο δυναμικό,

$$k = \frac{k^0}{f} \quad (6)$$

η αδιάστατη κινητική σταθερά και

$$\mu = \frac{RTC}{n^2 F^2 \Gamma^0}$$

η αδιάστατη χωρητικότητα. Κατά την εφαρμογή της μεθόδου FTacV το δυναμικό μεταβάλλεται σύμφωνα με τη σχέση,

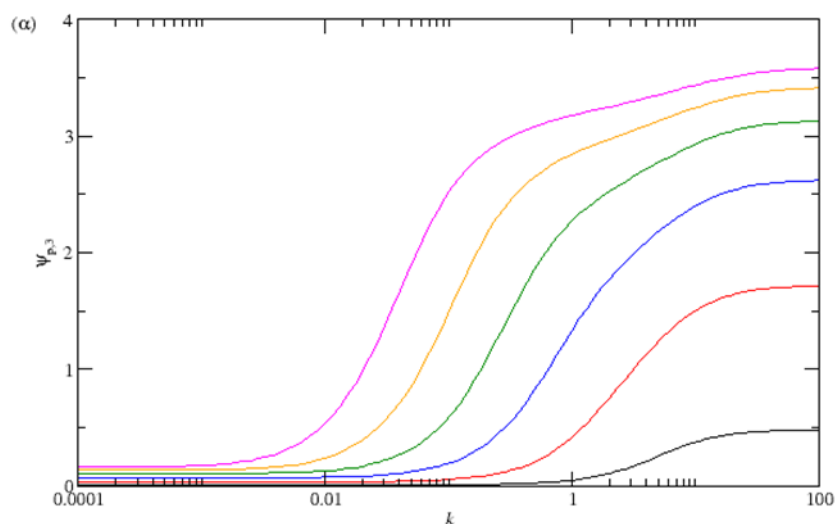
όπου $a_0 = nFA_0/RT$ το αδιάστατο πλάτος της διαταραχής και $\sigma = nFv/RTf$ η αδιάστατη ταχύτητα σάρωσης. Το βολταμμογράφημα που αντιστοιχεί το h πολλαπλάσιο της συχνότητας προκύπτει εφαρμόζοντας το φίλτρο $w_h(\tau)$, δηλαδή,

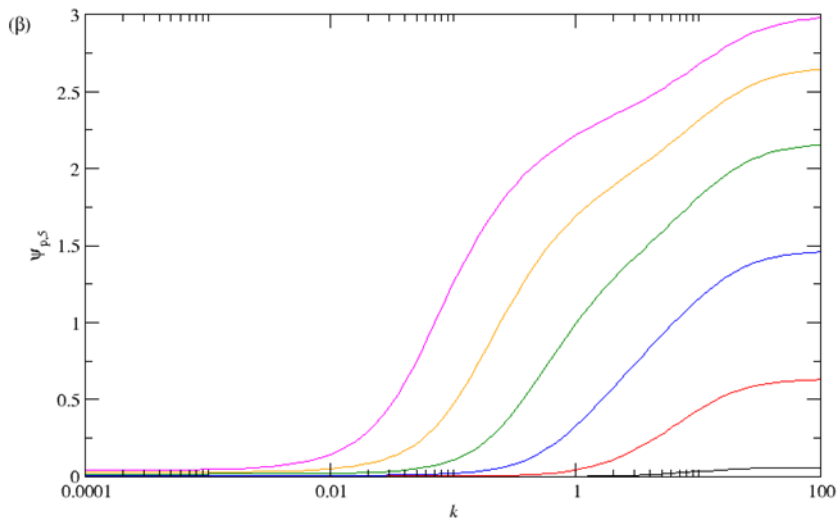
$$\hat{\psi}_h(\tau) = \psi * w_h(\tau) \quad (7)$$

όπου ο αστερίσκος συμβολίζει τη συνέλιξη. Τέλος, η h -αρμονική του φιλτραρισμένου βολταμμογραφήματος προκύπτει με μετασχηματισμό Hilbert,

$$\psi_h(\tau) = |\hat{\psi}_h + jH(\hat{\psi}_h)| \quad (8)$$

Εφόσον μία μέτρηση FTacV εκτελεσθεί υπό συνθήκες ανεξαρτησίας από την ταχύτητα σάρωσης, η h -αρμονική εξαρτάται μόνο από ένα πειραματικό μέγεθος, το a_0 και δύο κινητικές σταθερές, την k και την a .

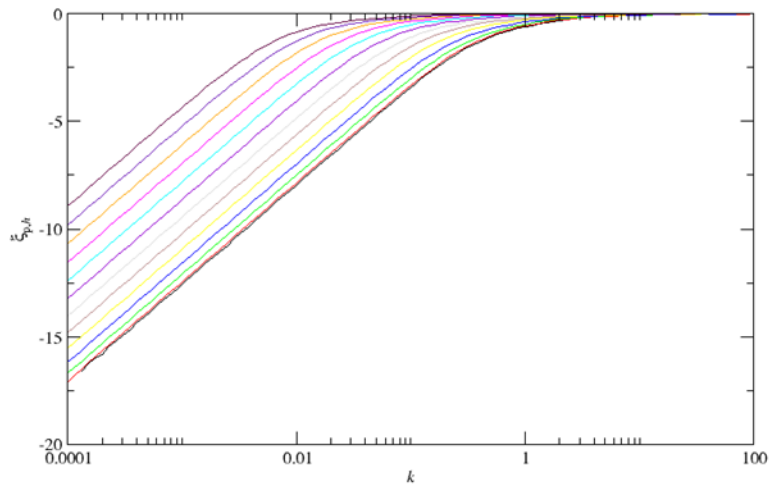




Σχήμα 3.1: Πλάτος της κυρίαρχης κορυφής σε συνάρτηση με την κινητική σταθερά για την 3η (α) και την 5η (β) αρμονική. Τιμές παραμέτρων $\alpha = 0.5$, $\sigma = 1$ και α_0 από 1.947 (50/n mV στους 298 K) έως 11.683 (300/n mV στους 298 K) με βήμα 1.947 (50/n mV στους 298 K) από δεξιά προς τα αριστερά.

Από την παραπάνω ανάλυση προκύπτει ότι χαρακτηριστικές τιμές των αρμονικών θα καθορίζονται αποκλειστικά από τις δύο κινητικές σταθερές και την ένταση της διαταραχής. Αν επιλεγεί ως χαρακτηριστική τιμή το πλάτος της κυρίαρχης κορυφής της αρμονικής $\psi_{p,h}$ τότε η εξάρτηση είναι αυτή που παρουσιάζεται στα ενδεικτικά διαγράμματα του Σχήματος 3.1 για δύο αρμονικές, την 3η και την 5η. Παρακάτω θα παρουσιασθεί ένα παράδειγμα χρήσης αυτών των γραφημάτων για τον προσδιορισμό της k .

Η εξάρτηση του δυναμικού όπου εμφανίζεται η κυρίαρχη κορυφή $\xi_{p,h}$, παρουσιάζεται στο Σχ. 3.2. Από την ανάλυση των διαγραμμάτων αυτών προκύπτει ότι κλίση στο γραμμικό τμήμα είναι ίση με $2.303/\alpha$. Συνεπώς, από την κλίση μπορεί να προσδιορισθεί ο παράγοντας συμμετρίας.

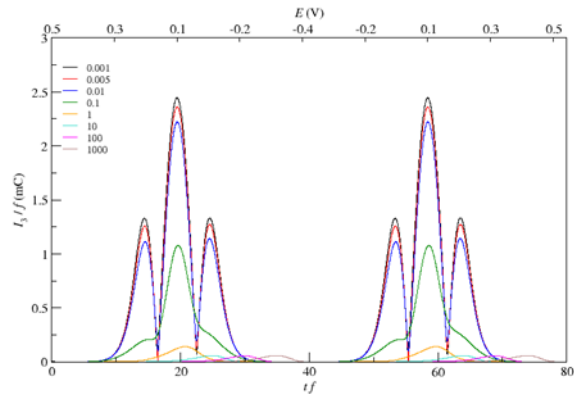


Σχήμα 3.2: Εξάρτηση του δυναμικού της κυρίαρχης κορυφής από το πλάτος για $\alpha = 0.5$ και $\sigma = 1$. Η μεταβολή της α_0 είναι ίδια με αυτή του Σχ. 3.1.

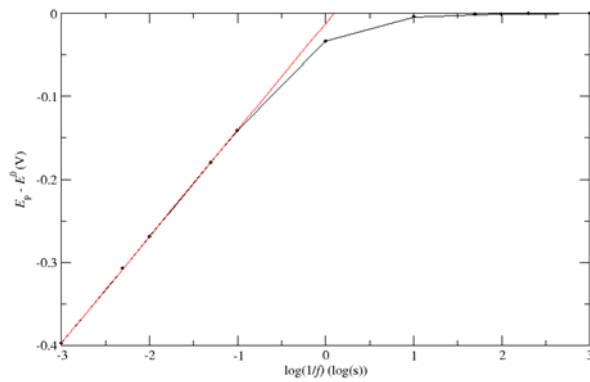
Η διαδικασία προσδιορισμού των κινητικών σταθερών θα παρουσιασθεί μέσω ενός παραδείγματος για $n = 1$. Ως πρώτο βήμα, καταγράφονται οι αρμονικές για διαφορετικές τιμές της συχνότητας της διαταραχής. Ένα τυπικό παράδειγμα για την 3^η αρμονική παρουσιάζεται στο Σχ. 3.3, όπου $A_0 = 150$ mV. Να παρατηρηθεί ότι στο διάγραμμα αυτό, η αρμονική παρουσιάζεται κανονικοποιημένη, δηλαδή διαιρεμένη με τη συχνότητα f . Το ίδιο συμβαίνει για τον χρόνο που είναι πολλαπλασιασμένος με τη συχνότητα. Για μεγάλες τιμές της συχνότητας η αντίδραση είναι αναντίστρεπτη, για ενδιάμεσες τιμές είναι ημι-αντιστρεπτή ενώ για μικρές τιμές είναι αντιστρεπτή. Η οριακή τιμή του μεγίστου της κυρίαρχης κορυφής στο παράδειγμα αυτό είναι 2.44 mC. Καλούμε την τιμή αυτή $I_{p,rev}/f$.

Από τις καμπύλες του Σχ. 3.2, προσδιορίζεται το δυναμικό της κορυφής για διαφορετικές τιμές της συχνότητας. Στο Σχ. 3.3 παρατηρούμε ότι για χαμηλές τιμές της συχνότητας, η εξάρτηση είναι γραμμική. Η κλίση της γραμμικής εξάρτησης είναι 0.1285 (κόκκινη καμπύλη). Συνεπώς, ο παράγοντας συμμετρίας θα είναι $\alpha = \ln(10)RT/(0.1285F) = 0.46$, στους 298 K.

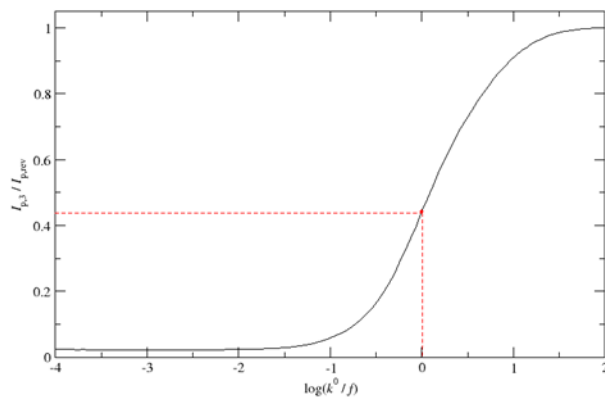
Τέλος, επιλέγεται μία ημι-αντιστρεπτή αρμονική και προσδιορίζεται το πλάτος της κυρίαρχης κορυφής. Παρατηρούμε ότι για $f = 0.1$ Hz (πράσινη καμπύλη), το πλάτος είναι 0.442. Η τιμή αυτή χρησιμοποιείται στο διάγραμμα του Σχ. 3.5 για τον προσδιορισμό της k^0 που προκύπτει ίση με 0.1 s^{-1} .



Σχήμα 3.3: Κανονικοποιημένη 3η αρμονική για $A_0 = 150 \text{ mV}$ και διαφορετικές τιμές συχνότητας.



Σχήμα 3.4: Εξάρτηση του δυναμικού της κορυφής της 3ης αρμονική από τη συχνότητα, για $A_0 = 150 \text{ mV}$.



Σχήμα 3.5: Προσδιορισμός της k^0 .

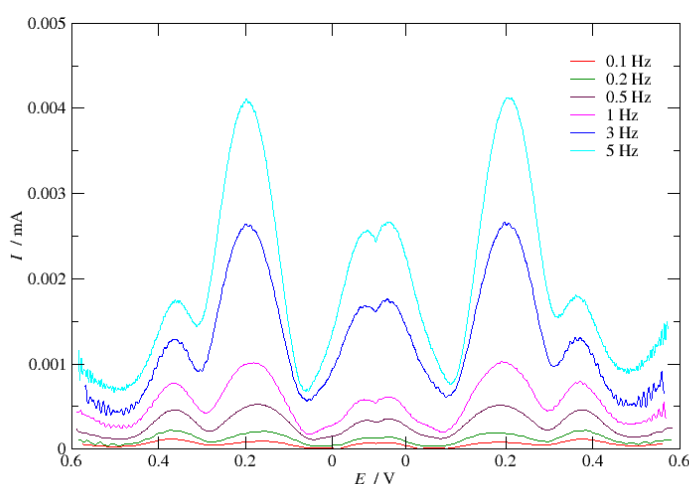
3.2 Πειραματική διαδικασία

Για την διεξαγωγή των βολταμετρικών πειραμάτων χρησιμοποιείται σύστημα τριών ηλεκτροδίων. Εκ των οποίων το ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC) χρησιμοποιείται ως ηλεκτρόδιο εργασίας, ως αντίθετο ηλεκτρόδιο χρησιμοποιείται ένα σύρμα πλατίνας και ως ηλεκτρόδιο αναφοράς ένα ηλεκτρόδιο Ag|AgCl (KCl sat). Ως φέροντας ηλεκτρολύτης χρησιμοποιήθηκαν περίπου 5mL ρυθμιστικού διαλύματος (acetate buffer) 0.5M και με pH 6. Επίσης για την ανάλυση χρησιμοποιήθηκε ποτενσιοστάτης (Scanning Potentiostat Model 362 της EG & G Instruments, Princeton Applied Research) συνδεδεμένος με ηλεκτρονικό υπολογιστή. Η επιφάνεια του ηλεκτροδίου υαλώδους άνθρακα τροποποιείται με Co-f-MWCNTs, με σκοπό την ακινητοποίηση του ενζύμου MtLPMO9H. Η παρασκευή των σύνθετων υλικών Co-f-MWCNTs στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας και ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία. Αρχικά μετρήθηκαν 1 g εμπορικής σκόνης νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλών τοιχωμάτων (MWCNTs) (Hongwu Material item No: C933-MC, China) και σε αυτά προστέθηκαν 150 mL οξικού οξέος 20% v/v με σκοπό την ενεργοποίηση της σκόνης. Το διάλυμα τοποθετήθηκε σε μαγνητικό αναδευτήρα σε θερμοκρασία 200 °C ταχύτητα ανάδευσης 2 rpm, μέχρι να πραγματοποιηθεί η εξάτμιση του διαλύτη, συντελώντας σε περαιτέρω ενεργοποίηση. Το υλικό που παραλαμβάνεται από αυτή τη διαδικασία αφήνεται για 24 h στο πυριατήριο, ώστε να ξηρανθεί. Η σκόνη που παραλαμβάνεται έπειτα από αυτή τη διαδικασία υποβάλλεται σε φυγοκέντρηση με απιονισμένο νερό για 4 φορές έως ότου να απομακρυνθεί το οξύ άρα γίνεται ταυτόχρονος έλεγχος του pH. Οι ενεργοποιημένοι εμπορικοί MWCNTs (f-MWCNTs) που παραλαμβάνονται αφήνονται στο πυριατήριο σε θερμοκρασία 100°C, ώστε να ξηρανθούν. Ακολούθως η ποσότητα των f-MWCNTs αναμειγνύεται με 18 mL απιονισμένου νερού και 0.4227 g (CH₃COO)₂Co·4H₂O. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να αποτεθούν 10 άτομα% Co στους f-MWCNTs και υποβάλλεται το διάλυμα αυτό σε υπερήχους χαμηλών συχνοτήτων (20 Hz) και σε ισχύ 70 W με την χρήση του οργάνου υπερήχων Hielscher (UIP500hd) για 1 h. Το διάλυμα αφήνεται να ξηρανθεί όπως περιγράφηκε παραπάνω για 24 h στους 100°C και παραλαμβάνεται το τελικό υλικό που είναι Co-f-MWCNTs. Τα σύνθετα υλικά που παρασκευάστηκαν αποθηκεύονται σε ξηραντήρα σε θερμοκρασία δωματίου.

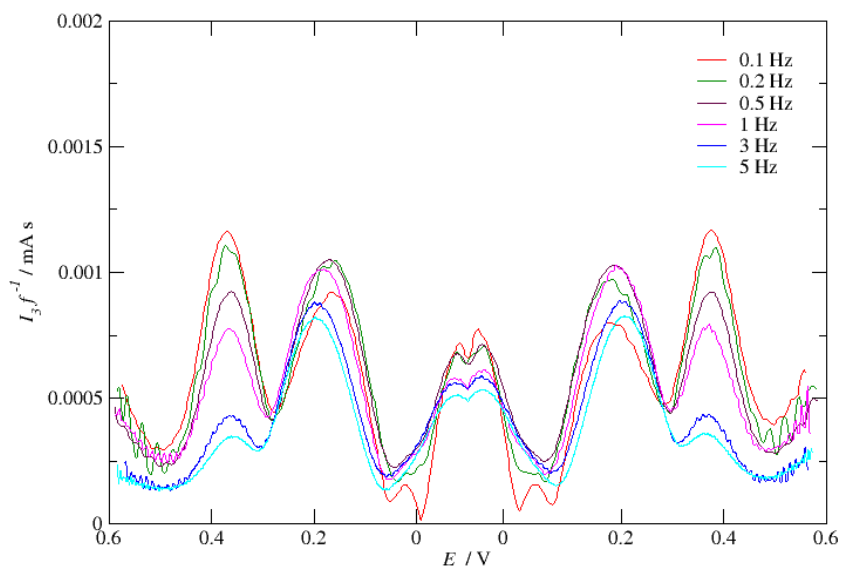
Η διαδικασία της ακινητοποίησης περιλαμβάνει την ανάμειξη 2μL μήτρας με 8μL ενζύμου MtLPMOs. Η μήτρα περιλαμβάνει 0.005g Co-f-MWCNTs διαλυμένα σε 0.5mL πολυηλεκτρολύτη Nafion το οποίο υποβάλλεται για 15min σε σύστημα υπερήχων με σκοπό

την δημιουργία αιωρήματος. Το ηλεκτρόδιο του υαλώδους άνθρακα καθαρίζεται σε βελούδινου ύφασμα με την χρήση πάστας $0.05 \mu\text{m Al}_2\text{O}_3$, ξεπλένεται με απιονισμένο νερό και αφήνεται να στεγνώσει. Ακολούθως 2μL του διαλύματος μήτρας ενζύμου τοποθετούνται πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου του υαλώδους άνθρακα και αφήνονται να στεγνώσουν.

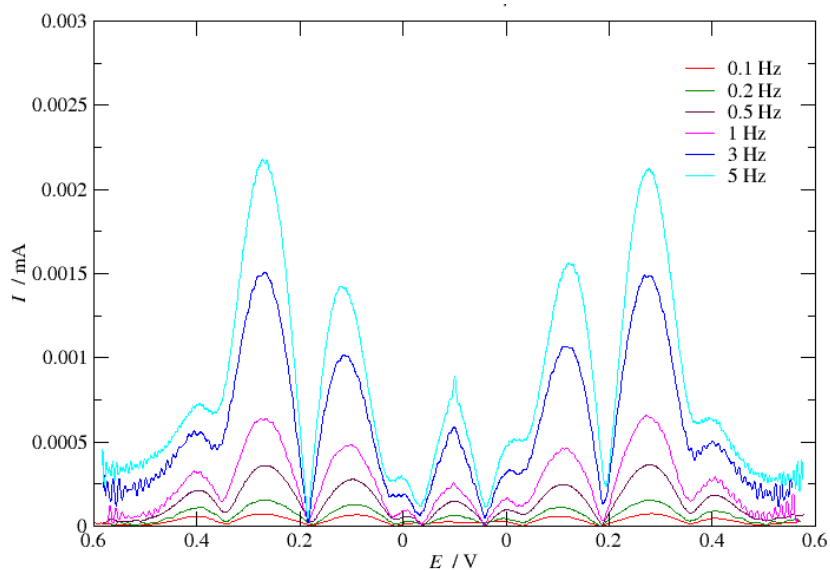
Από τα διαγράμματα των Σχ. 3.6 – 3.11 που παρατίθενται παρακάτω προκύπτει το συμπέρασμα ότι η ακινητοποίηση του ενζύμου με την χρήση της συγκεκριμένης μήτρας όντως δίνει καλές φαρανταϊκές αποκρίσεις και μάλιστα χωρίς την επιβολή ιδιαίτερα μεγάλων τιμών πλατών ταλάντωσης και συχνότητων. Οι μετρήσεις εκτελούνται για πλάτος ταλάντωσης $A_0 = 200\text{mV}$ και για συχνότητες 5, 3, 1, 0.5, 0.2, 0.1 Hz. Η ταχύτητα σάρωσης ρυθμίζεται ανάλογα για κάθε συχνότητα. Παρατηρείται στην 5^η αρμονική (Σχ. 3.10) ότι για μεγαλύτερες συχνότητες παρουσιάζεται ένα ημιαντιστρεπτό σύστημα, ενώ με την μείωση των συχνοτήτων το σήμα που λαμβάνεται αντικατοπτρίζει ένα αντιστρεπτό σύστημα. Αυτό είναι φανερό στις κανονικοποιημένες με την συχνότητα αρμονικές (Σχ. 3.11), όπου στην περίπτωση της κανονικοποιημένης 5^{ης} αρμονικής παρατηρείται ότι για την συχνότητα 0.2 Hz επιτυγχάνεται η αντιστρεπτότητα, καθώς δεν εμφανίζεται περαιτέρω αύξηση στην κύρια κορυφή της αρμονικής. Με παρόμοιο τρόπο και στις περιπτώσεις της 3^{ης} (Σχ. 3.6 και 3.7) και της 4^{ης} (Σχ. 3.8 και 3.9) αρμονικής για υψηλές συχνότητες τα σήματα ανταποκρίνονται σε ένα ημιαντιστρεπτό σύστημα, ενώ όπως φαίνεται και στις κανονικοποιημένες αρμονικές η αντιστρεπτότητα επιτυγχάνεται για την τιμή της συχνότητας 0.2 Hz.



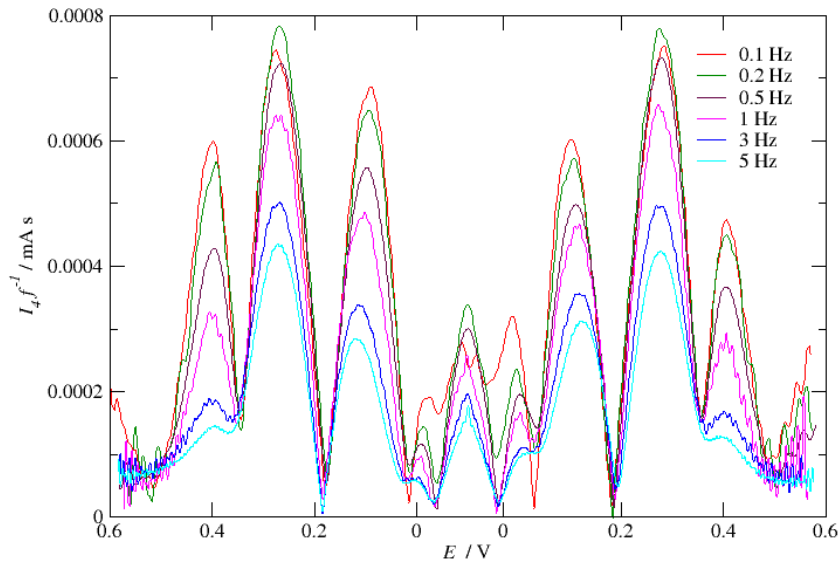
Σχήμα 3.6: 3η αρμονική ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMO9H με Nafion σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης $A_0=200 \text{ mV}$. Για επιβαλλόμενες συχνότητες 5,3 και 1 Hz η ταχύτητα σάρωσης που εφαρμόζεται είναι 5mV/s και για συχνότητες 0.5, 0.2 και 0.1 Hz οι ταχύτητες σάρωσης που εφαρμόζονται είναι 2.5, 1.25, 1 mV/s αντίστοιχα.



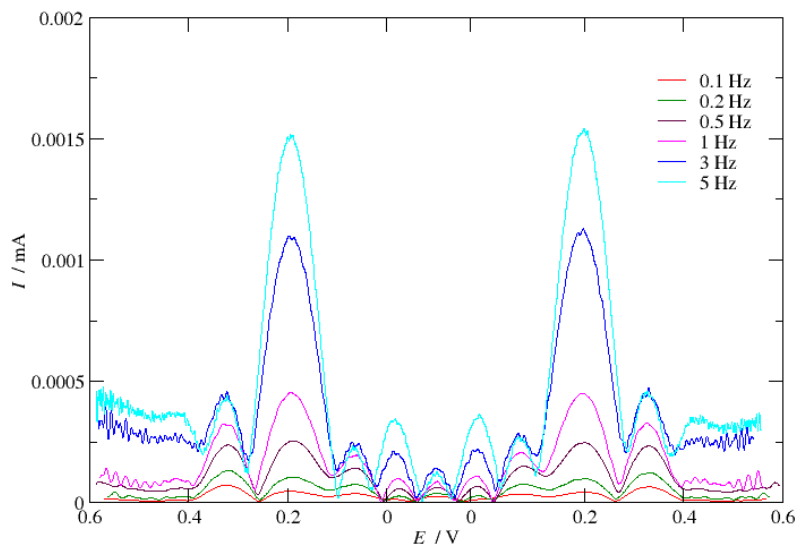
Σχήμα 3.7: Κανονικοποιημένη 3η αρμονική ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMO9H με Nafion σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης $A_0=200$ mV. Για επιβαλλόμενες συχνότητες 5,3 και 1 Hz η ταχύτητα σάρωσης που εφαρμόζεται είναι 5 mV/s και για συχνότητες 0.5, 0.2 και 0.1 Hz οι ταχύτητες σάρωσης που εφαρμόζονται είναι 2.5, 1.25, 1 mV/s αντίστοιχα.



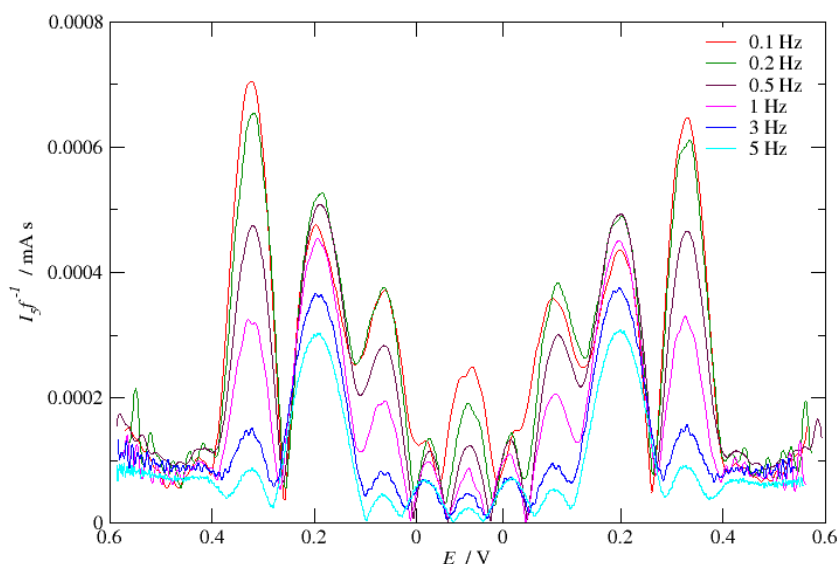
Σχήμα 3.8: 4η αρμονική ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMO9H με Nafion σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης $A_0=200$ mV. Για επιβαλλόμενες συχνότητες 5,3 και 1 Hz η ταχύτητα σάρωσης που εφαρμόζεται είναι 5 mV/s και για συχνότητες 0.5, 0.2 και 0.1 Hz οι ταχύτητες σάρωσης που εφαρμόζονται είναι 2.5, 1.25, 1 mV/s αντίστοιχα.



Σχήμα 3.9: Κανονικοποιημένη 4η αρμονική ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMO9H με Nafion σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης $A_0=200$ mV. Για επιβαλλόμενες συχνότητες 5,3 και 1 Hz η ταχύτητα σάρωσης που εφαρμόζεται είναι 5 mV/s και για συχνότητες 0.5, 0.2 και 0.1 Hz οι ταχύτητες σάρωσης που εφαρμόζονται είναι 2.5, 1.25, 1 mV/s αντίστοιχα.



Σχήμα 3.10: 5η αρμονική ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMO9H με Nafion σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης $A_0=200$ mV. Για επιβαλλόμενες συχνότητες 5,3 και 1 Hz η ταχύτητα σάρωσης που εφαρμόζεται είναι 5 mV/s και για συχνότητες 0.5, 0.2 και 0.1 Hz οι ταχύτητες σάρωσης που εφαρμόζονται είναι 2.5, 1.25, 1 mV/s αντίστοιχα.



Σχήμα 3.11: Κανονικοποιημένη 5η αρμονική ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMO9H με Nafion σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης $A_0=200$ mV. Για επιβαλλόμενες συχνότητες 5,3 και 1 Hz η ταχύτητα σάρωσης που εφαρμόζεται είναι 5mV/s και για συχνότητες 0.5, 0.2 και 0.1 Hz οι ταχύτητες σάρωσης που εφαρμόζονται είναι 2.5, 1.25, 1 mV/s αντίστοιχα.

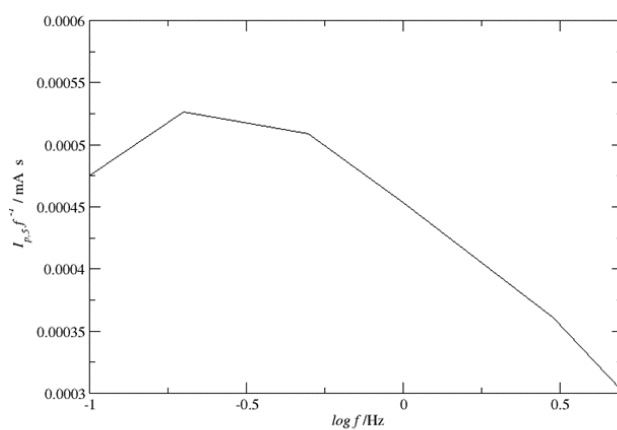
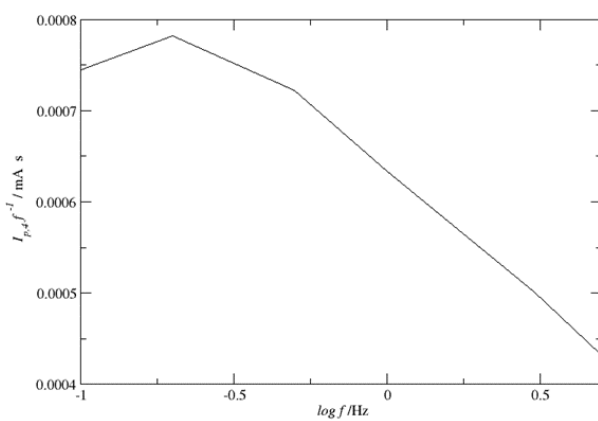
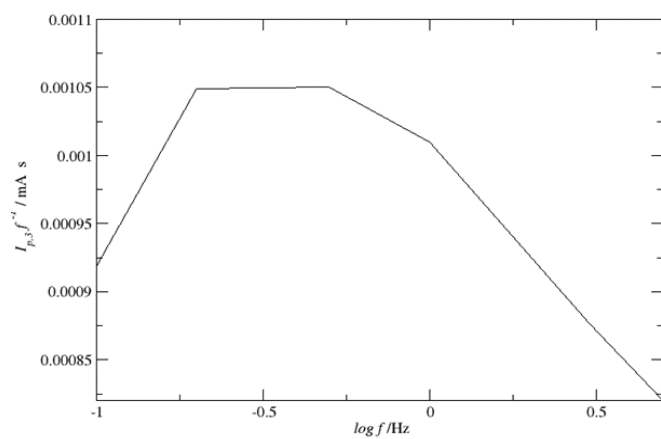
3.3 Πειραματικός προσδιορισμός της k^0

Για την εξαγωγή της κινητικής σταθεράς k^0 με την αρωγή της μεθόδου FTaCV θα ακολουθηθεί η εξής διαδικασία.

Αρχικά γίνεται η υπόθεση ότι η επιφάνεια του ηλεκτροδίου A και η αρχική επιφανειακή συγκέντρωση των αντιδρώντων ειδών Γ^0 είναι άγνωστα. Επίσης ο αριθμός των ηλεκτρονίων που ανταλλάσσονται είναι ίσος με $n = 1$. Τα πειράματα έχουν διεξαχθεί για δυο διαφορετικά πλάτη ταλάντωσης σε διάφορες συχνότητες και από την ανάλυση και την επεξεργασία των βολταμμογραφημάτων προέκυψαν ποικίλες αρμονικές.

Ο παράγοντας ασυμμετρίας α θα θεωρηθεί ίσος με 0.5.

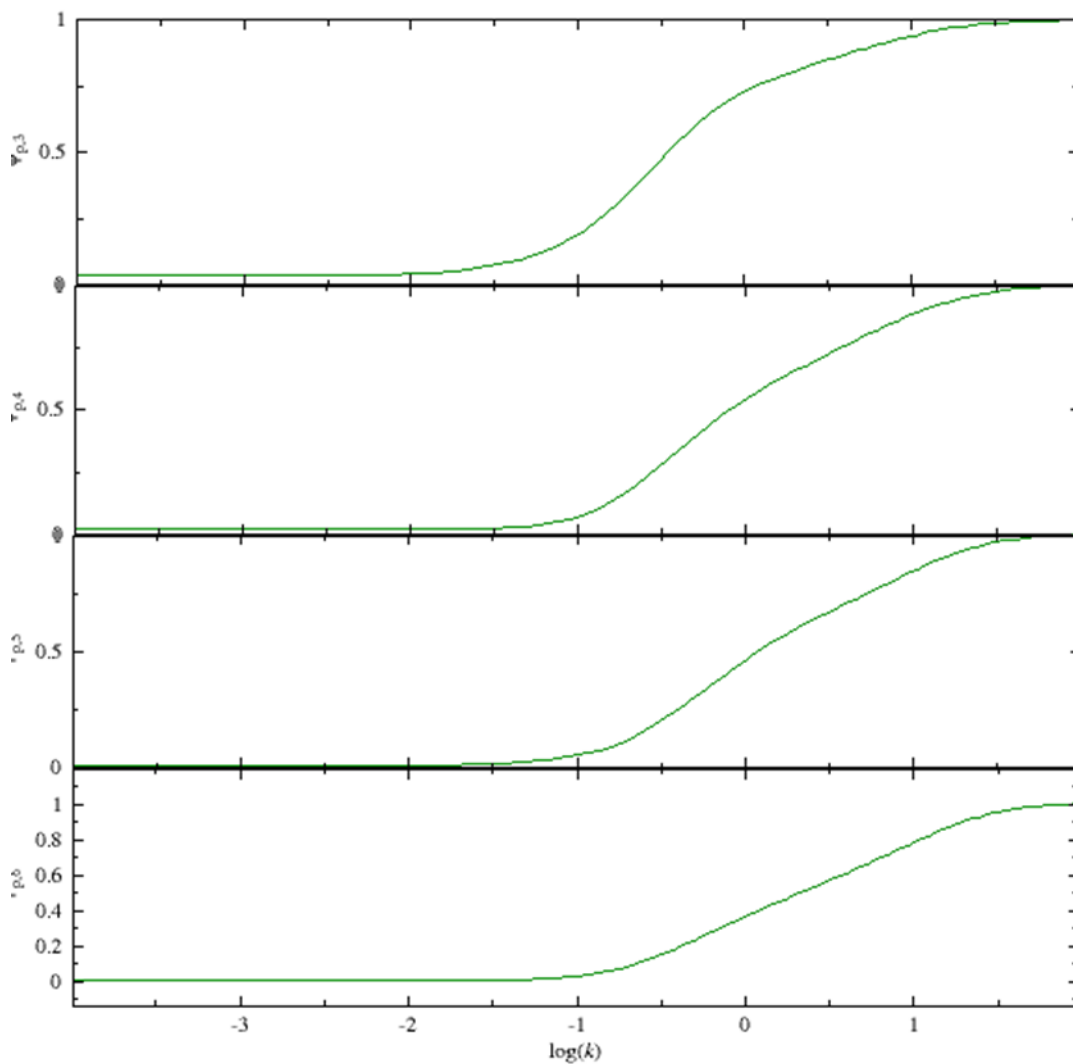
Αρχικά προσδιορίζεται η ποσότητα $I_{p,rev}/f$, όταν το σύστημα φτάνει στην αντιστρεπτότητα. Συμπληρωματικά με την ανάλυση που έγινε παραπάνω παρατίθενται και τα διαγράμματα που παρουσιάζουν την εξάρτηση του ύψους των κανονικοποιημένων κορυφών από την συχνότητα Σχ. 3.12 προκύπτει ότι το πλάτος του ύψους της κύριας κορυφής εμφανίζεται σε συχνότητα 0.2 Hz υποδεικνύοντας ότι η αντιστρεπτότητα επιτυγχάνεται σε αυτό το σημείο.



Σχήμα 3.12. Κανονικοποιημένο ύψος κορυφών 3^{ης}, 4^{ης} και 5^{ης} αρμονικής ακινητοποιημένου ενζύμου MtLPMO9H σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης $A_0=200$ mV σε διάφορες συχνότητες και ταχύτητες σάρωσης αντίστοιχα.

Ακολούθως επιλέγεται μια ημιαντιστρεπτή αρμονική και γίνεται ο υπολογισμός του λόγου $I_{p,h}/I_{p,hrev}$, όπου $I_{p,h}$ η κανονικοποιημένη κορυφή ρεύματος για ημιαντιστρεπτή αρμονική και $I_{p,hrev}$ η κανονικοποιημένη κορυφή ρεύματος για τη αντιστρεπτή αρμονική σε συγκεκριμένα A_0 και α .

Έπειτα από τους υπολογισμούς των λόγων $I_{p,h}/I_{p,hrev}$ για τις διάφορες αρμονικές και επιλέγοντας ως συχνότητα ημιαντιστρεπτής κορυφής αυτή των 5 Hz και αντιστρεπτής, όπως προαναφέρθηκε αυτή των 0.2 Hz, από τα νομογραφήματα $I_{p,h}/I_{p,hrev} - \log(k^0 f^1)$ θα προκύψει η σταθερά k^0 (Σχ. 3.13 και Πιν. 3.1).



Σχήμα 3.13.: Νομογραφήματα για 3η, 4η, 5η, 6η αρμονική για παράγοντα ασυμμετρίας $\alpha=0.5$

Πίνακας 3.1: Τιμές για τον προσδιορισμό της κινητικής σταθεράς

	3 ^η αρμονική	4 ^η αρμονική	5 ^η αρμονική
$I_{p,h}/I_{p,hrev}$	0.78	0.55	0.57
$\log(k^\circ f^{-1})$	0.19	0.06	0.27
$k^\circ (s^{-1})$	7.89	5.83	9.29

Για πλάτος ταλάντωσης $A_0 = 0.2$ V από τις τιμές των σταθερών για τις επιμέρους αρμονικές προκύπτει ότι η κινητική σταθερά ισούται με $k^0 = 7.67$ s⁻¹.

3.4 Δοκιμές ακινητοποίησης του ενζύμου MtLPMO9H με νέα νανοσύνθετα Co-f-MWCNTs και Ni-f-MWCNTs

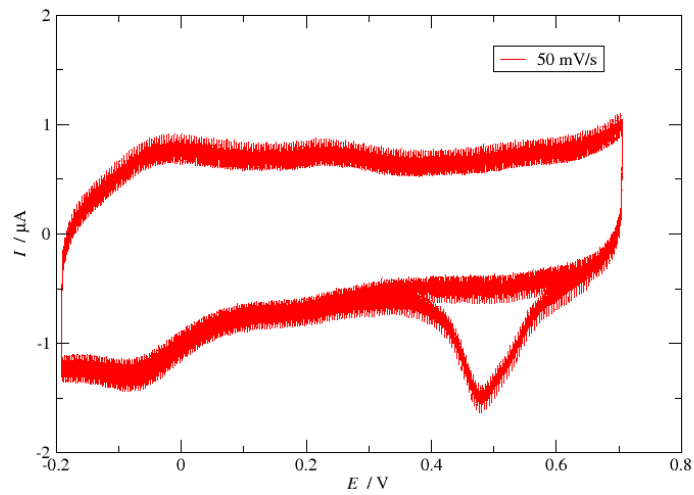
Προκειμένου να μελετηθεί η επίδραση της μήτρας που χρησιμοποιείται για την ακινητοποίηση της MtLPMO9H θα επαναληφθούν τα πειράματα που διεξήχθησαν και παραπάνω με την χρήση νέων νανοσυνθέτων υλικών Co-f-MWCNTs και Ni-f-MWCNTs. Τα νανοσύνθετα υλικά παρασκευάστηκαν στο Εργαστήριο Ανόργανης Χημείας, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2. Για την διεξαγωγή των βολταμετρικών πειραμάτων χρησιμοποιείται σύστημα τριών ηλεκτροδίων. Εκ των οποίων το ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC) χρησιμοποιείται ως ηλεκτρόδιο εργασίας, ως αντίθετο ηλεκτρόδιο χρησιμοποιείται ένα σύρμα πλατίνας και ως ηλεκτρόδιο αναφοράς ένα ηλεκτρόδιο Ag|AgCl (KCl sat.). Ως φέροντας ηλεκτρολύτης χρησιμοποιήθηκαν περίπου 5mL ρυθμιστικού διαλύματος που αποτελείται από 4.1015 g οξικού νατρίου 0.5M στα οποία έχουν προστεθεί περίπου 2 mL οξικού οξέος 0.5 M με σκοπό να γίνει η ρύθμιση του pH του ρυθμιστικού διαλύματος στην τιμή pH = 6. Τα βολταμετρικά πειράματα διεξήχθησαν σε ποτενσιοστάτη συνδεδεμένο με μια γεννήτρια στην οποία επιλέγονται οι μεταβλητές της συχνότητας f και του πλάτους ταλάντωσης A , και επιβάλλει στο σύστημα ημιτονοειδή διαταραχή για να γίνει η ανάλυση με την μέθοδο FTaCV. Όλα τα διαλύματα απαερόνωνται πριν την έναρξη των πειραμάτων για περίπου 5 min.

Το ηλεκτρόδιο του υαλώδους άνθρακα καθαρίζεται σε βελούδινου ύφασμα με την χρήση πάστας 0.05 μm Al₂O₃, ξεπλένεται με απιονισμένο νερό και αφήνεται να στεγνώσει. Ακολούθως 2mL του διαλύματος μήτρας (0.005g Co-f-MWCNTs και Ni-f-MWCNTs αντίστοιχα

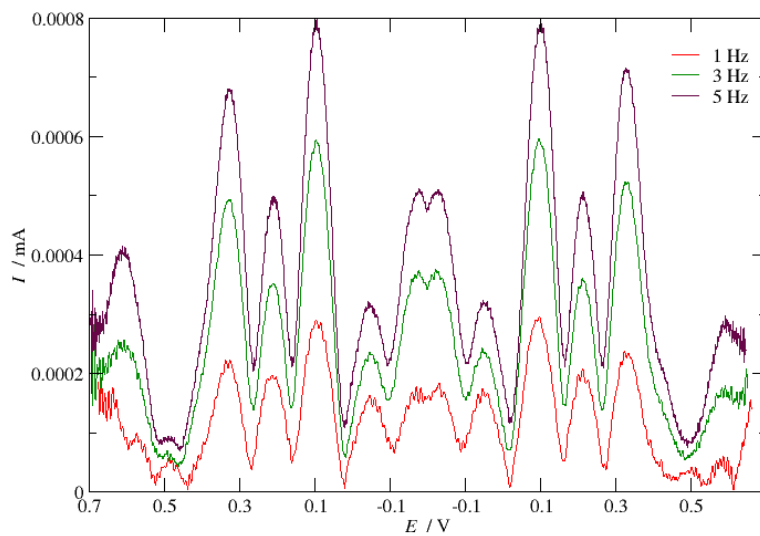
διαλυμένα σε 0.5mL πολυηλεκτρολύτη Nafion) ενζύμου τοποθετούνται πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου του υαλώδους άνθρακα και αφήνονται να στεγνώσουν. Οι αναλογίες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του παραπάνω διαλύματος είναι 2 μ L διαλύματος Co-f-MWCNTs και Ni-f-MWCNTs αντίστοιχα και 8 μ L ενζύμου MtLPMO9H. Ακολούθως γίνεται έλεγχος του τροποποιημένου ηλεκτροδίου με κυκλική βολταμετρία σε σύστημα τριών ηλεκτροδίων με ταχύτητα σάρωσης 50 mV/s και φέροντα ηλεκτρολύτη acetate buffer, για να διαπιστωθεί ότι όντως έλαβε χώρα η ακινητοποίηση του ενζύμου.

Παρατηρώντας τα κυκλικά βολταμογραφήματα Σχ 3.14 και 3.16 στην περίπτωση που ως μήτρα χρησιμοποιείται νανοσύνθετο υλικό Co-f-MWCNTs και Ni-f-MWCNTs αντίστοιχα φαίνεται μια έντονη καθοδική κορυφή που εμφανίζεται σε δυναμικό 482 mV, αυτή η κορυφή αποδίδεται στους νανοσωλήνες άνθρακα που αποτελούν συστατικό υλικό της μήτρας. Στο Σχ. 3.14 μπορούν να εντοπισθούν και δύο ακόμα αμυδρές οξειδοαναγωγικές κορυφές που μπορούν να αποδοθούν στο ακινητοποιημένο ένζυμο. Απεναντίας στο Σχ. 3.16 δεν μπορούν να διακριθούν οξειδοαναγωγικές κορυφές γεγονός που μπορεί να σημαίνει ότι η συγκέντρωση του ενζύμου συγκριτικά με το υλικό της μήτρας είναι πολύ μικρή και έχει υπερκαλυφθεί στο ακινητοποιημένο φιλμ.

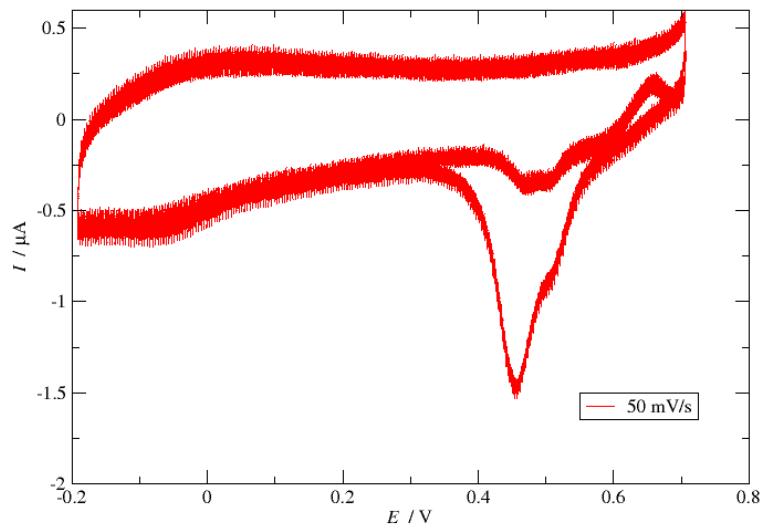
Προχωρώντας στα αποτελέσματα των 5^{ω} αρμονικών που λαμβάνονται από την ανάλυση FTaCV Σχ 3.15 και 3.17 στην περίπτωση που ως μήτρα χρησιμοποιείται νανοσύνθετο υλικό Co-f-MWCNTs και Ni-f-MWCNTs αντίστοιχα, φαίνεται ότι δεν είναι ικανοποιητικά για την περαιτέρω αξιοποίηση και εξαγωγή θερμοδυναμικών και κινητικών πληροφοριών. Συγκεκριμένα στο Σχ. 3.15 λαμβάνεται μεν έντονο σήμα κορυφών ωστόσο η μορφή της αρμονικής που λαμβάνεται δεν ομοιάζει με την τυπική μορφή $5^{\text{ης}}$ αρμονικής, καθώς υπάρχει έντονος θόρυβος και δεν μπορεί να γίνει ο προσδιορισμός την κυρίαρχης κορυφής. Στο Σχ. 3.17 η αρμονική παρουσιάζεται φαίνεται να μην έχει έντονες και καλώς ορισμένες κορυφές αυτό αποδίδεται στην απουσία του ενζύμου ή στην παρουσία του αλλά σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση επίσης υπάρχει μια έντονη κορυφή στα 0 mV, η οποία παρατηρείται και στην αρμονική του σχήματος 3.15 αλλά σε αυτή την περίπτωση υπερκαλύπτει κάθε άλλο σήμα που αποδίδεται στον θόρυβο. Επομένως φαίνεται η σύσταση της μήτρας να κατέχει πολύ σημαντικό ρόλο στην ακινητοποίηση και την μετέπειτα μελέτη του ενζύμου.



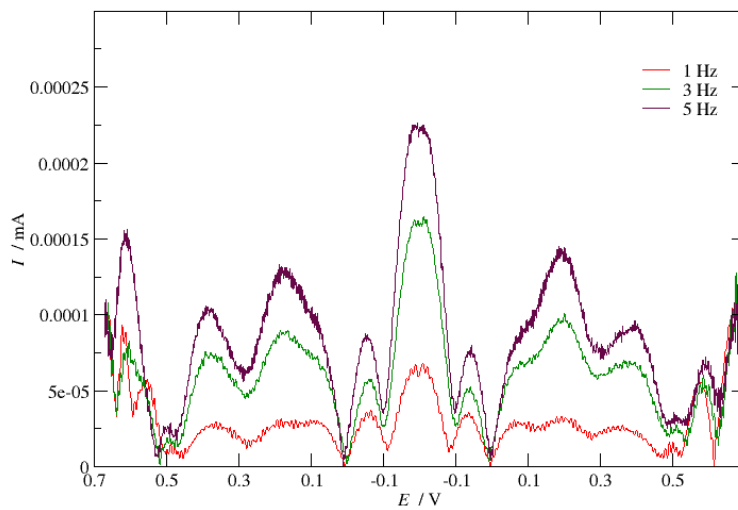
Σχήμα 3.14: Κυκλικό βολταμογράφημα ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMOs σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer με ταχύτητα σάρωσης 50 mV/s.



Σχήμα 3.15: 5η αρμονική ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMOs με Nafion σε τροποποιημένο με Co-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης $A_0=200$ mV. Για επιβαλλόμενες συχνότητες 5,3 και 1 Hz η ταχύτητα σάρωσης που εφαρμόζεται είναι 5mV/s.



Σχήμα 3.16: Κυκλικό βολταμμογράφημα ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMOs σε τροποποιημένο με Ni-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer με ταχύτητα σάρωσης 50 mV/s.



Σχήμα 3.17: 5η αρμονική ακινητοποιημένου ενζύμου Mt-LPMOs με Nafion σε τροποποιημένο με Ni-f-MWCNTs ηλεκτρόδιο υαλώδους άνθρακα (GC), σε φέροντα ηλεκτρολύτη 0.5 M acetate buffer πλάτος ταλάντωσης $A_0=200$ mV. Για επιβαλλόμενες συχνότητες 5,3 και 1 Hz η ταχύτητα σάρωσης που εφαρμόζεται είναι 5mV/s.

Βιβλιογραφία

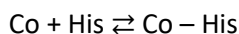
1. Zouraris, Dimitrios, et al. "Exploitation of Enzymes for the Production of Biofuels: Electrochemical Determination of Kinetic Parameters of LPMOs." *Applied Sciences* 11.11 (2021): 4715.
2. Zouraris, D., and A. Karantonis. "Determination of kinetic and thermodynamic parameters from large amplitude Fourier transform ac voltammetry of immobilized electroactive species." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 876 (2020): 114729.
3. Zouraris, D., et al. "Direct electron transfer of lytic polysaccharide monoxygenases (LPMOs) and determination of their formal potentials by large amplitude Fourier transform alternating current cyclic voltammetry." *Bioelectrochemistry* 124 (2018): 149-155.
4. Fleming, Barry D., et al. "Detailed analysis of the electron-transfer properties of azurin adsorbed on graphite electrodes using dc and large-amplitude Fourier transformed ac voltammetry." *Analytical chemistry* 79.17 (2007): 6515-6526.

4. Ηλεκτροχημική εμπέδηση ηλεκτροδίων νικελίου και κοβαλτίου παρουσία ιστιδίνης

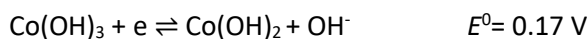
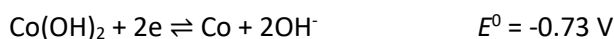
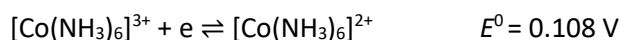
Η L-ιστιδίνη αποτελεί ένα από τα φυσικά αμινοξέα και διαδραματίζει σημαντικό ρόλο σε ποικίλες βιολογικές διεργασίες. Η σημαντικότητα της ιστιδίνης είναι ιδιαίτερη στην ενζυμική δράση καθώς συμμετέχει στην σύνδεση των μεταλλικών ιόντων στην πρωτεΐνη. Κατά την διερεύνηση λοιπόν της προσρόφησης πρωτεϊνών σε διάφορα υποστρώματα είναι ιδιαίτερου ενδιαφέροντος η μελέτη της διεπιφανειακής συμπεριφοράς της ιστιδίνης με αυτά τα υποστρώματα [1]. Στο κεφάλαιο αυτό θα μελετηθεί η πιθανή αλληλεπίδραση της ιστιδίνης με κοβάλτιο και νικέλιο.

4.1 Σύμπλοκα κοβαλτίου ιστιδίνης

Το ιόν του κοβαλτίου, Co(II), σχηματίζει σύμπλοκα με το μόριο της ιστιδίνης (His), και ειδικότερα με μέσω των αζώτων του ιμιδαζολικού δακτυλίου. Σκοπός των πειραμάτων που θα παρουσιασθούν είναι να διαπιστωθεί αν η ιστιδίνη μπορεί να προσροφηθεί στην επιφάνεια ηλεκτροδίου κοβαλτίου, δηλαδή αν η παρακάτω αντίδραση είναι εφικτή,

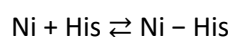


Για το κοβάλτιο, οι παρακάτω ισορροπίες είναι γνωστές:

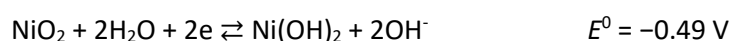


4.2 Σύμπλοκα νικελίου ιστιδίνης

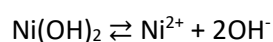
Το ιόν του νικελίου, Ni(II), σχηματίζει σύμπλοκα με το μόριο της ιστιδίνης (His), και ειδικότερα με μέσω των αζώτων του ιμιδαζολικού δακτυλίου. Σκοπός των πειραμάτων που θα παρουσιασθούν είναι να διαπιστωθεί αν η ιστιδίνη μπορεί να προσροφηθεί στην επιφάνεια στοιχειακού νικελίου, δηλαδή αν η παρακάτω αντίδραση είναι εφικτή,



Για το νικέλιο, οι παρακάτω ισορροπίες είναι γνωστές:



Αν αντιστρέψουμε τρίτη αντίδραση και την αθροίσουμε στην πρώτη, προκύπτει η αντίδραση διάστασης (διάλυσης) του υδροξειδίου του νικελίου,



της οποίας το γινόμενο διαλυτότητας K_{sp} μπορεί να προσδιορισθεί από τα πρότυπα δυναμικά καθώς,

$$\Delta G^0 = -\Delta G_3^0 + \Delta G_1^0 = 2 \times 96485 \times (-0.257) - 2 \times 96485 \times (-0.72) = 89345.11 \text{ J/mol}$$

Το γινόμενο διαλυτότητας του υδροξειδίου του νικελίου στους 25 °C θα είναι,

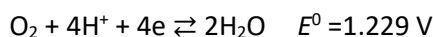
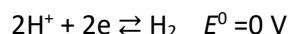
$$K_{sp} = e^{\frac{-\Delta G^0}{RT}} = e^{\frac{-89345.11}{8.414 \times 298}} = 2.18 \times 10^{-16}$$

Παρατηρούμε ότι το υδροξείδιο του νικελίου είναι εξαιρετικά δυσδιάλυτο καθώς έχει πολύ χαμηλό γινόμενο διαλυτότητας. Το pH στο οποίο συμβαίνει η ισορροπία ιόντων δισθενούς νικελίου και υδροξειδίου του νικελίου προσδιορίζεται από τη σχέση,

$$pH = 14 + \frac{1}{2} \log \left(\frac{K_{sp}}{c} \right)$$

Έτσι, για συγκέντρωση ιόντων νικελίου 10^{-6} mol/L, η ισορροπία παρατηρείται σε pH 9.17, ενώ για συγκεντρώσεις 10^{-4} mol/L, 10^{-2} mol/L και 1 mol/L, η ισορροπία παρατηρείται σε pH 8.17, 7.17 και 6.17, αντίστοιχα.

Επίσης, σε υδατικό διάλυμα, παρουσία οξυγόνου, οι παρακάτω αντιδράσεις είναι πιθανές,



Αν θεωρήσουμε ότι η πίεση των αερίων είναι 1 atm, τότε η εξάρτηση του ηλεκτροδιακού δυναμικού των αντιδράσεων αυτών από το pH στους 25°C θα είναι,

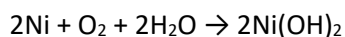
$$E_1 = -0.059pH$$

$$E_2 = 1.229 - 0.059pH$$

ενώ, η εξάρτηση του ηλεκτροδιακού δυναμικού της αντίδρασης παθητικοποίησης του νικελίου προς υδροξείδιο του νικελίου από το pH είναι,

$$E_{Ni(OH)_2/Ni} = -0.72 + 0.059 \times 14 - 0.059pH = 0.106 - 0.059pH$$

Συνεπώς, σε pH 8, τα αντίστοιχα ηλεκτροδιακά δυναμικά είναι, $E_1 = 0.473 \text{ V}$, $E_2 = 0.757 \text{ V}$ και $E_{\text{Ni(OH)}_2/\text{Ni}} = 0.366 \text{ V}$. Παρατηρούμε ότι η μόνη αντίδραση που είναι θερμοδυναμικά επιτρεπτή αυτή του νικελίου με το διαλυμένο οξυγόνο, δηλαδή,

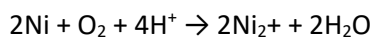


η οποία θα συμβεί εφόσον η συγκέντρωση του ιόντων του δισθενούς νικελίου είναι τέτοια ώστε το μπορεί να σχηματισθεί το υδροξείδιο του νικελίου, πχ 10^{-2} mol/L . Στην περίπτωση αυτή, το δυναμικό ανοικτού κυκλώματος θα είναι ένα μικτό δυναμικό με τιμή ανοδικότερη των 0.366 V , δηλαδή ανώτερη των -0.563 V ως προς $\text{Ag}|\text{AgCl} (\text{KCl sat.})$.

Στην περίπτωση που η συγκέντρωση των ιόντων νικελίου δεν είναι επαρκώς υψηλή ώστε να είναι επιτρεπτός ο σχηματισμός του υδροξειδίου, τότε υποψήφια αντίδραση είναι αυτή της οξείδωσης του νικελίου προς τα ιόντα του, η οποία είναι ανεξάρτητη του pH, με ηλεκτροδιακό δυναμικό,

$$E_{\text{Ni}^{2+}/\text{Ni}} = -0.257 + 0.0128 \ln c_{\text{Ni}^{2+}}$$

Το ηλεκτροδιακό δυναμικό της αντίδρασης αυτής για συγκέντρωση ιόντων νικελίου 10^{-6} mol/L είναι -0.434 V και καθίσταται θετικότερο για υψηλότερες τιμές της συγκέντρωσης αυτής. Παρατηρούμε και πάλι ότι σε pH 8, η μόνη αντίδραση που είναι θερμοδυναμικά επιτρεπτή αυτή του νικελίου με το διαλυμένο οξυγόνο, δηλαδή,



η οποία, όμως, δεν οδηγεί σε παθητικοποίηση αλλά ενεργή ηλεκτροδιάλυση (διάβρωση του νικελίου). Στην περίπτωση αυτή, το δυναμικό ανοικτού κυκλώματος θα είναι ένα μικτό δυναμικό με τιμή ανοδικότερη των -0.434 V (για υποθετική συγκέντρωση ιόντων νικελίου ίση με 10^{-6} mol/L), δηλαδή ανώτερη των -0.631 V ως προς $\text{Ag}|\text{AgCl} (\text{KCl sat.})$. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να σημειωθεί ότι, εφόσον η αντίδραση αναγωγής στην επιφάνεια του νικελίου είναι

αυτή του οξυγόνου, τότε αναμένεται τοπική αύξηση του pH καθώς τα υδρογονοκατιόντα συμμετέχουν ως αντιδρώντα στην αντίδραση αυτή.

4.3 Πειραματικό μέρος

Για την διεξαγωγή των πειραμάτων ηλεκτροχημικής εμπέδησης θα αξιοποιηθεί ένα σύστημα τριών ηλεκτροδίων. Ως ηλεκτρόδια εργασίας θα χρησιμοποιηθούν τα ηλεκτρόδια νικελίου και κοβαλτίου, ως αντίθετο ηλεκτρόδιο θα χρησιμοποιηθεί ένα ηλεκτρόδιο άνθρακα και ως ηλεκτρόδιο αναφοράς ένα ηλεκτρόδιο Ag|AgCl (KCl sat). Όλες οι μετρήσεις έγιναν σε συνθήκες ανοιχτού κυκλώματος.

Εγκιβωτισμός σύρματος κοβαλτίου

Για την διεξαγωγή των μετρήσεων με το ηλεκτρόδιο κοβαλτίου προηγείται ο εγκιβωτισμός ηλεκτροδίου κοβαλτίου σε εμπορική ρητίνη Versocit-2. Για τον σχηματισμό της ρητίνης αναμειγνύονται 2 μέρη Versocit-2 powder (dibenzoyl peroxide, methyl methacrylate) προς 1 μέρος Versocit-2 liquid (tetrahydrofurfuryl-2-methacrylate, 2-hydroxypropyl-methacrylate). Στην συνέχεια εμβαπτίζεται το σύρμα κοβαλτίου μέσα στην ρητίνη που παρασκευάστηκε έως ότου στεγνώσει η ρητίνη.

Η ηλεκτροχημική ανάλυση χρησιμοποιεί δύο διαφορετικά ηλεκτρολυτικά διαλύματα. Για μια σειρά πειραμάτων ως φέροντας ηλεκτρολύτης χρησιμοποιείται το ρυθμιστικό διάλυμα acetate buffer το οποίο παρασκευάζεται έπειτα από την διάλυση 4.1015 g οξικού νατρίου 0.5M σε απιονισμένο νερό και την προσθήκη οξικού οξέος 0.5M με σκοπό την ρύθμιση του pH του διαλύματος στην τιμή 4. Τα υπόλοιπα πειράματα διεξάγονται σε φέροντα ηλεκτρολύτη Tris-HCl 200 mM. Για την παρασκευή διαλύματος Tris-HCl (200 mM) διαλύονται 2.4228 g Trizma® base (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol) σε 50 mL νερού και έπειτα γίνεται στάγδην προσθήκη πυκνού υδροχλωρίου μέχρι να γίνει ρύθμιση του pH στην τιμή 8 και ακολούθως προστίθεται νερό μέχρι το διάλυμα να φράσει τα 100 mL.

Πέρα από τις ηλεκτροχημικές αναλύσεις που γίνονται χρησιμοποιώντας τα παραπάνω ηλεκτρολυτικά διαλύματα, διεξάγονται και πειράματα που σε μέρος αυτών των διαλυμάτων έχει διαλυθεί ποσότητα ιστιδίνης. Συγκεκριμένα σε 15 mL Tris-HCl και acetate buffer διαλύονται αντίστοιχα 0.01164 g L-histidine (5 mM).

Επομένως εκτελούνται πειραματικές μετρήσεις ηλεκτροχημικής εμπέδησης με την αρωγή του Palm Sens. Συγκεκριμένα εμβαπτίζεται το σύστημα τριών ηλεκτροδίων με ηλεκτρόδιο εργασίας το ηλεκτρόδιο νικελίου σε περίπου 15 mL ηλεκτρολυτικού διαλύματος Tris-HCl απουσία ιστιδίνης ξεκινάει ένας κύκλος επαναλαμβανόμενων στον χρόνο εμπειδήσεων ανά 10 min περίπου σε δυναμικό ανοιχτού κυκλώματος. Στην συνέχεια το σύστημα τριών ηλεκτροδίων ξεπλένεται και τελείται και καθαρισμός του ηλεκτροδίου εργασίας με γυαλόχαρτο (δες) και το σύστημα εμβαπτίζεται στο ηλεκτρολυτικό διάλυμα Tris-HCl αυτή την φορά παρουσία ιστιδίνης και επαναλαμβάνεται όπως πριν ο κύκλος επαναλαμβανόμενων εμπειδήσεων με χρονικά διαστήματα αναμονής τα 10 min. Η ίδια διαδικασία επαναλαμβάνεται για το σύστημα των τριών ηλεκτροδίων με ηλεκτρόδιο εργασίας αυτό του νικελίου και για φέροντα ηλεκτρολύτη acetate buffer απουσία και παρουσία ιστιδίνης. Τέλος η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβάνεται για το σύστημα των τριών ηλεκτροδίων με ηλεκτρόδιο εργασίας αυτό του κοβαλτίου και για τους δύο φέροντες ηλεκτρολύτες διαδοχικά απουσία και παρουσία ιστιδίνης

4.4 Φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης

Τα ενδεικτικά φάσματα ηλεκτροχημικής εμπέδησης ηλεκτροδίου κοβαλτίου σε pH 4 απουσία ιστιδίνης φαίνονται στο Σχήμα 4.1. Στα σχήματα αυτά, τα σύμβολα αφορούν πειραματικά σημεία ενώ οι συνεχείς καμπύλες την προσομοίωση (που θα συζητηθεί στην επόμενη παράγραφο). Από τα διαγράμματα Nyquist κατά την εμβάπτιση του ηλεκτροδίου δηλώνεται η ύπαρξη δύο χρονικών σταθερών, η πρώτη αντιπροσωπεύει την χωρητικότητα της διπλοστιβάδας του ηλεκτροδίου ενώ η δεύτερη που εμφανίζεται σε χαμηλές συχνότητες την επαγωγή λόγω προσρόφησης κάποιου είδους.

Τα ενδεικτικά φάσματα ηλεκτροχημικής εμπέδησης ηλεκτροδίου κοβαλτίου σε pH 4 παρουσία ιστιδίνης φαίνονται στο Σχήμα 4.2. Στα σχήματα αυτά, τα σύμβολα αφορούν

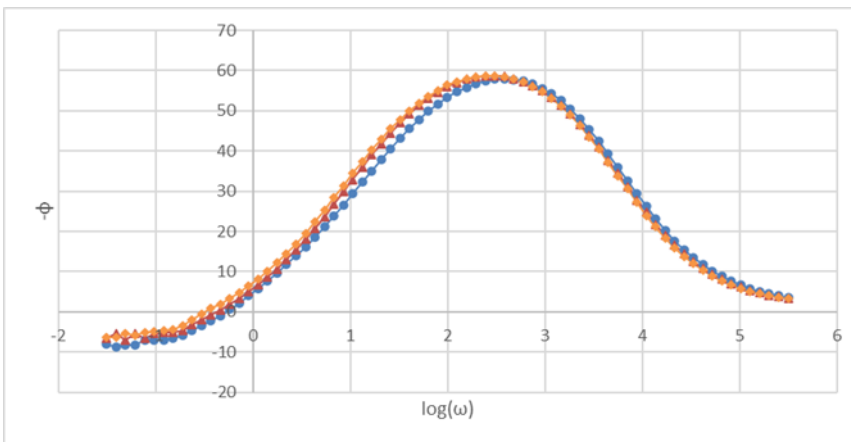
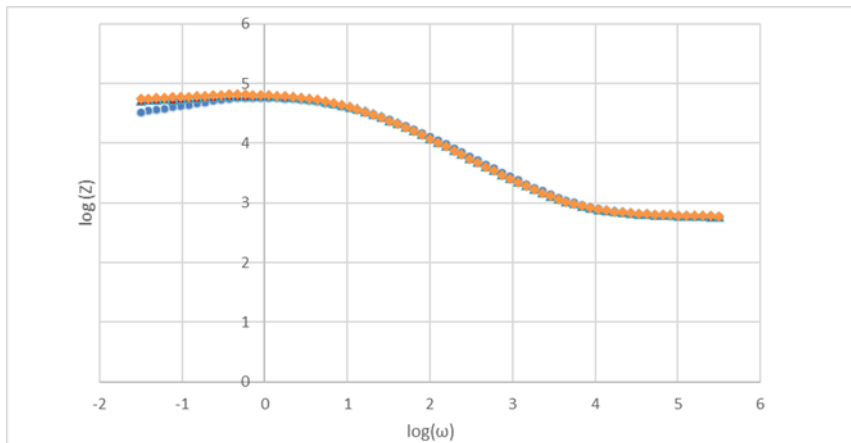
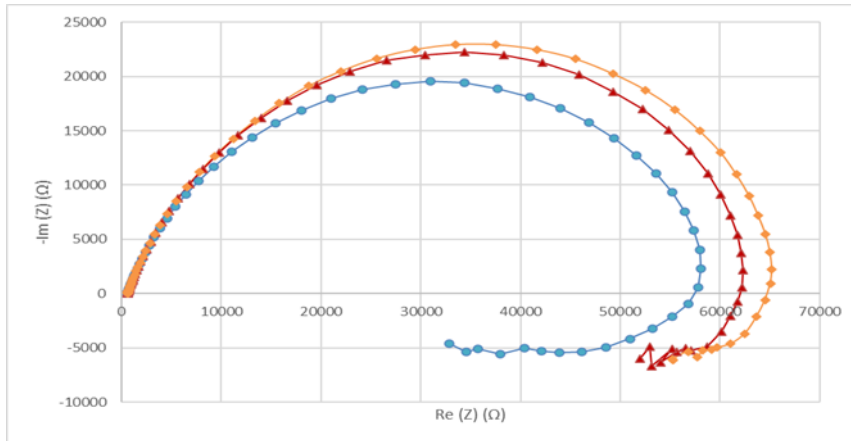
πειραματικά σημεία ενώ οι συνεχείς καμπύλες την προσομοίωση (που θα συζητηθεί στην επόμενη παράγραφο). Από τα διαγράμματα Nyquist κατά την εμβάπτιση του ηλεκτροδίου δηλώνεται η ύπαρξη δύο χρονικών σταθερών, η πρώτη αντιπροσωπεύει την χωρητικότητα της διπλοστιβάδας του ηλεκτροδίου ενώ η δεύτερη που εμφανίζεται σε χαμηλές συχνότητες την επαγωγή λόγω προσρόφησης κάποιου είδους. Ωστόσο δεν είναι ασφαλές να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι αυτό το είδος είναι η ιστιδίνη γιατί η μορφή των διαγραμμάτων τόσο απουσία όσο και παρουσία ιστιδίνης είναι όμοια. Επίσης συγκρίνοντας τα ποσοτικά χαρακτηριστικά συναρτήσεως του χρόνου παρουσία και απουσία ιστιδίνης, που προκύπτουν από την προσομοίωση με το ισοδύναμο κύκλωμα Σχ. 4.10 η ουσιαστική διαφορά εμφανίζεται μόνο στην χωρητικότητα. Συγκεκριμένα παρουσία ιστιδίνης η χωρητικότητα φαίνεται να διπλασιάζεται με την πάροδο του χρόνου, τα υπόλοιπα μεγέθη της αντίστασης οξειδοαναγωγής R_{ct} αλλά και τα μεγέθη που αφορούν την κινητική της προσρόφησης R_o και L , μένουν πρακτικά σταθερά γεγονός που δεν θα έπρεπε να συμβαίνει αν διαδραματιζόταν προσρόφηση διαφορετικών ειδών παρουσία και απουσία ιστιδίνης.

Τα ενδεικτικά φάσματα ηλεκτροχημικής εμπέδησης ηλεκτροδίου κοβαλτίου σε pH 8 απουσία ιστιδίνης φαίνονται στο Σχήμα 4.3. Στα σχήματα αυτά, τα σύμβολα αφορούν πειραματικά σημεία ενώ οι συνεχείς καμπύλες την προσομοίωση (που θα συζητηθεί στην επόμενη παράγραφο). Στο διάγραμμα Nyquist δηλώνεται η ύπαρξη τουλάχιστον τριών χρονικών σταθερών που ανταποκρίνονται σε τρεις διεργασίες με διαφορετικούς ρυθμούς, η πρώτη αντιστοιχεί στην χωρητικότητα του ηλεκτροδίου, η δεύτερη στην επαγωγή λόγω προσρόφησης κάποιου χημικού είδους και η τρίτη στην χωρητικότητα λόγω προσρόφησης ενός δεύτερου χημικού είδους. Η τρίτη διεργασία φαίνεται να μην ολοκληρώνεται και πιθανόν να αντιστοιχεί στο μετασχηματισμό του πρώτου προσροφημένου είδους σε ένα δεύτερο. Αυτή η συμπεριφορά εμφανίζεται για αρχικούς χρόνους και σε χαμηλές συχνότητες εμφανίζεται. Ωστόσο στις εμπεδήσεις που ακολουθούν το δεύτερο στάδιο φαίνεται να εξαλείφεται και να παραμένει το τρίτο, δηλαδή μόνο το δεύτερο προσροφημένο είδος. Στο αλκαλικό pH που διεξάγονται οι μετρήσεις είναι όντως πιθανό να λαμβάνονται οξυγονωμένα είδη, υδροξείδια και οξείδια ως προϊόντα των παραπάνω προσροφήσεων.

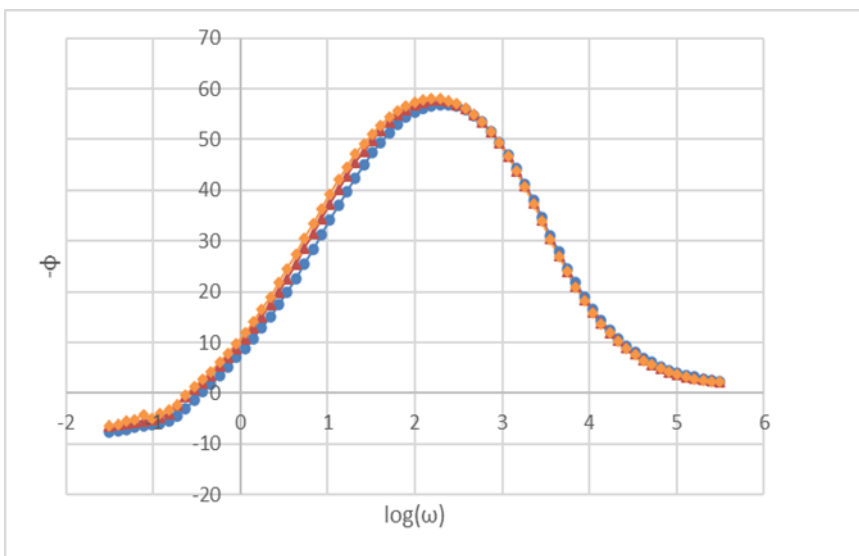
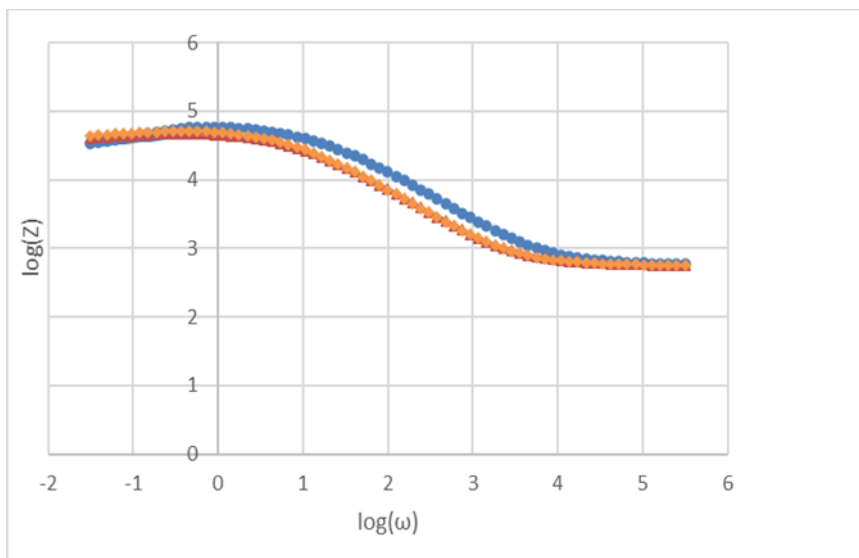
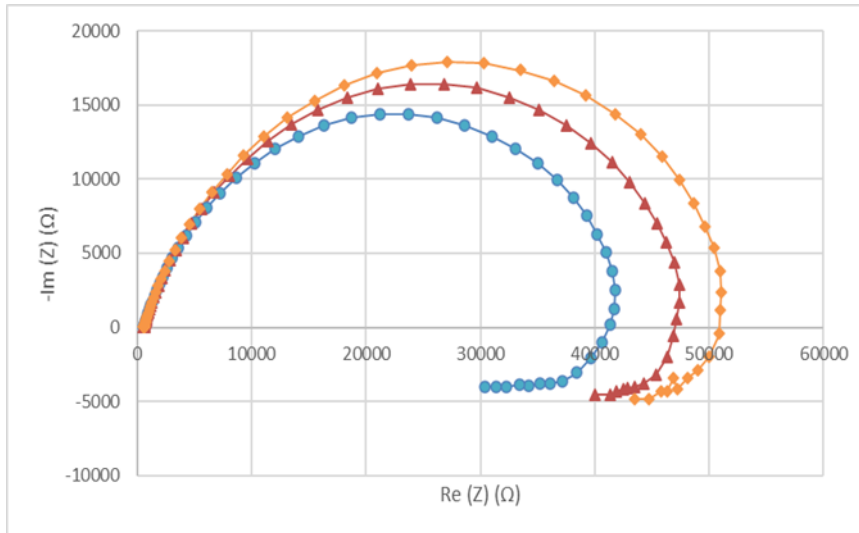
Τα ενδεικτικά φάσματα ηλεκτροχημικής εμπέδησης ηλεκτροδίου κοβαλτίου σε pH 8 παρουσία ιστιδίνης φαίνονται στο Σχήμα 4.4. Στα σχήματα αυτά, τα σύμβολα αφορούν πειραματικά σημεία ενώ οι συνεχείς καμπύλες την προσομοίωση (που θα συζητηθεί στην επόμενη παράγραφο). Η μορφή των διαγραμμάτων Nyquist που λαμβάνεται δηλώνει την ύπαρξη προσρόφησης. Συγκεκριμένα στο σχήμα φαίνεται ότι πέρα από την πρώτη χρονική σταθερά που αντιστοιχεί στην χωρητικότητα του ηλεκτροδίου, σε χαμηλές συχνότητες εμφανίζεται και μια δεύτερη χρονική σταθερά που αντιστοιχεί σε επαγωγή λόγω προσρόφησης, και οπτικοποιείται με τον σχηματισμό ενός δεύτερου ημικυκλίου, το οποίο διατηρείται στον χρόνο. Δεδομένου ότι λαμβάνονται δραστικά διαφορετικά αποτελέσματα παρουσία ιστιδίνης συγκριτικά με αυτά που λαμβάνονται απουσία ιστιδίνης εξάγεται το συμπέρασμα ότι το χημικό είδος το οποίο προσροφάται είναι η ιστιδίνη. Η προσρόφηση της ιστιδίνης στο ηλεκτρόδιο κοβαλτίου είναι πιθανό να γίνεται με δύο τρόπους είτε απευθείας στο κοβάλτιο είτε στην οξυγονωμένη του μορφή εμποδίζοντας την προσρόφηση του δεύτερου είδους που παρατηρήθηκε απουσία ιστιδίνης.

Ανατρέχοντας στην ποσοτική μελέτη των μεγεθών της εμπέδησης του ισοδύναμου κυκλώματος με τον χρόνο παρουσία ιστιδίνης Σχ. 4.11 Στην περίπτωση που η επιφάνεια παθητικοποιείται λόγω του σχηματισμού οξειδίων έχει μικρότερη αντίσταση συγκριτικά με την περίπτωση όπου καθίσταται ευγενέστερη από την προσρόφηση σε αυτήν κάποιου είδους που αποτρέπει την παθητικοποίησης

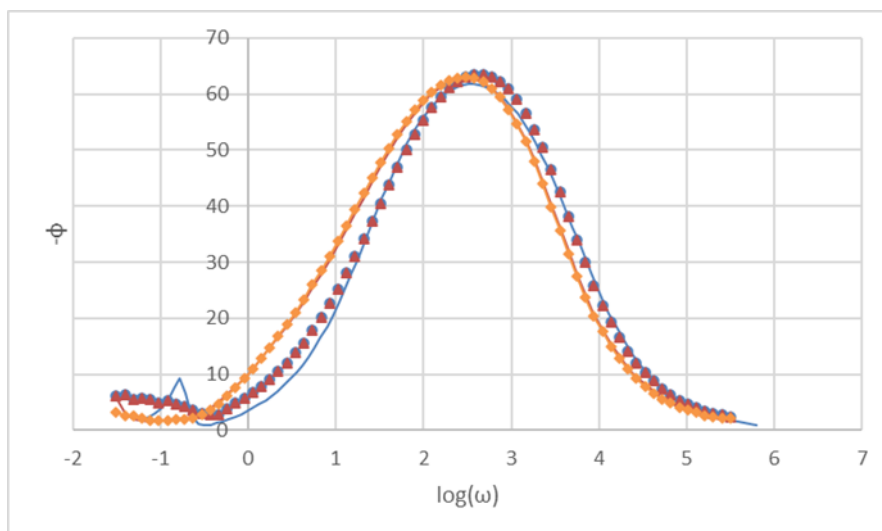
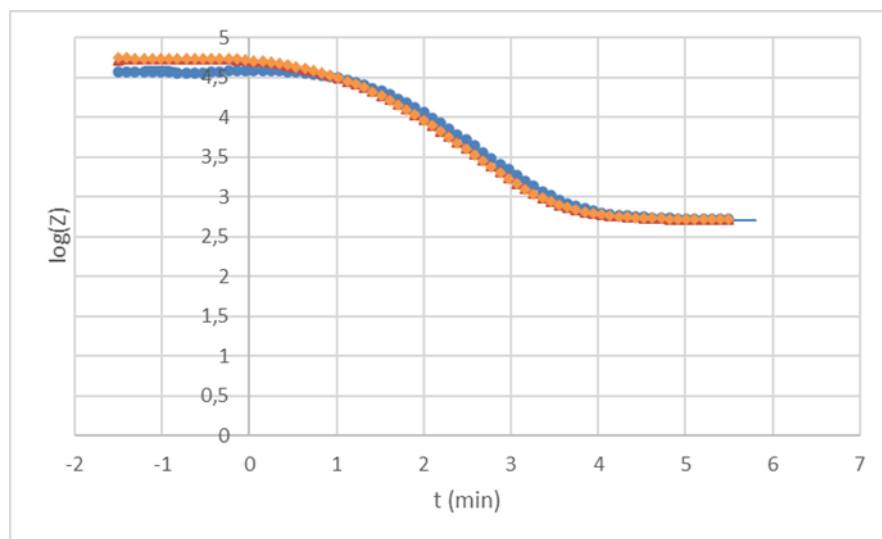
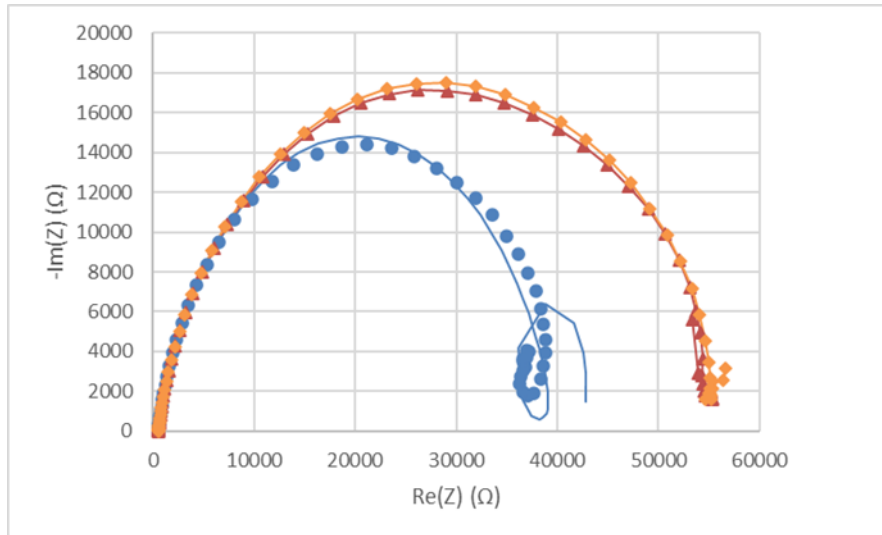
ή της. Αλλά γενικά και στις δύο περιπτώσεις σε αρχικούς χρόνους έχει μια αυξητική τάση ενώ για επόμενους χρόνους μειώνεται και τείνει να σταθεροποιηθεί στην αρχική της τιμή.



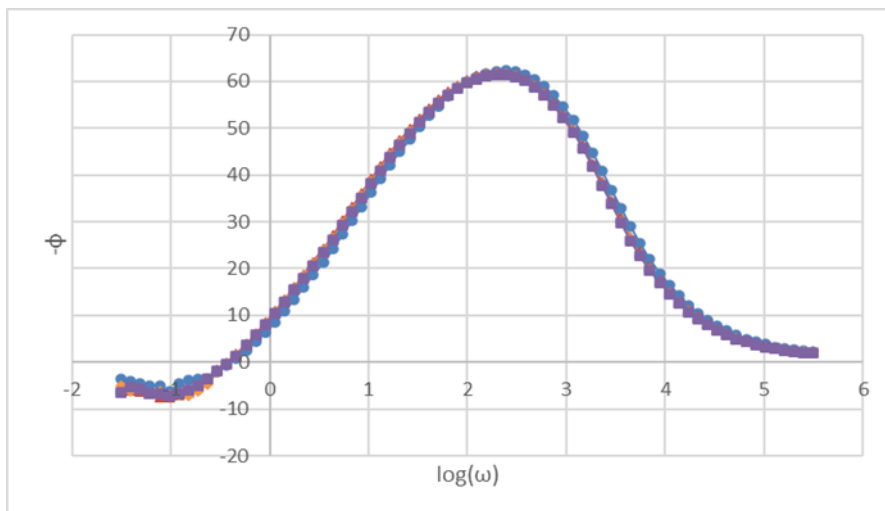
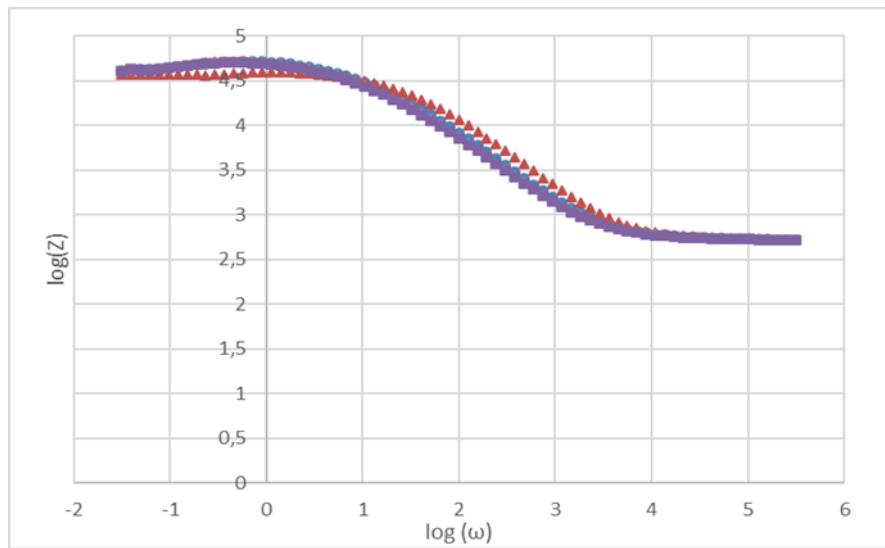
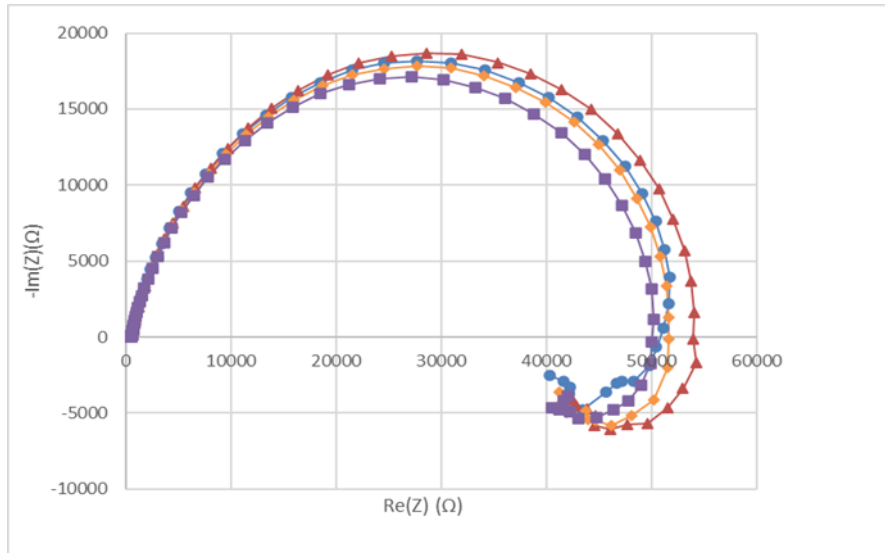
Σχήμα 4.1: Ηλεκτροχημική εμπέδωση σε 0 (μπλε), 30 (κόκκινο), 60 min (πορτοκαλί) ηλεκτροδίου κοβαλτίου σε διάλυμα με pH 4, απουσία ιστιδίνη.



Σχήμα 4.2: Ηλεκτροχημική εμπέδηση σε 0 (μπλε), 30 (κόκκινο), 60 min (πορτοκαλί) ηλεκτροδίου κοβαλτίου σε διάλυμα με pH 4, παρουσία ιστιδίνης.



Σχήμα 4.3: Ηλεκτροχημική εμπέδηση σε 0 (μπλε), 30 (κόκκινο), 60 min (πορτοκαλί) ηλεκτροδίου κοβαλτίου σε διάλυμα με pH 8, απουσία ιστιδίνης.

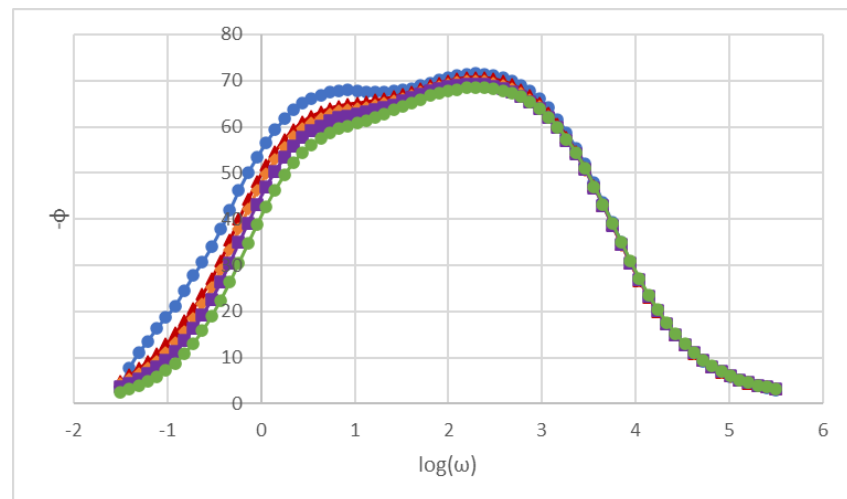
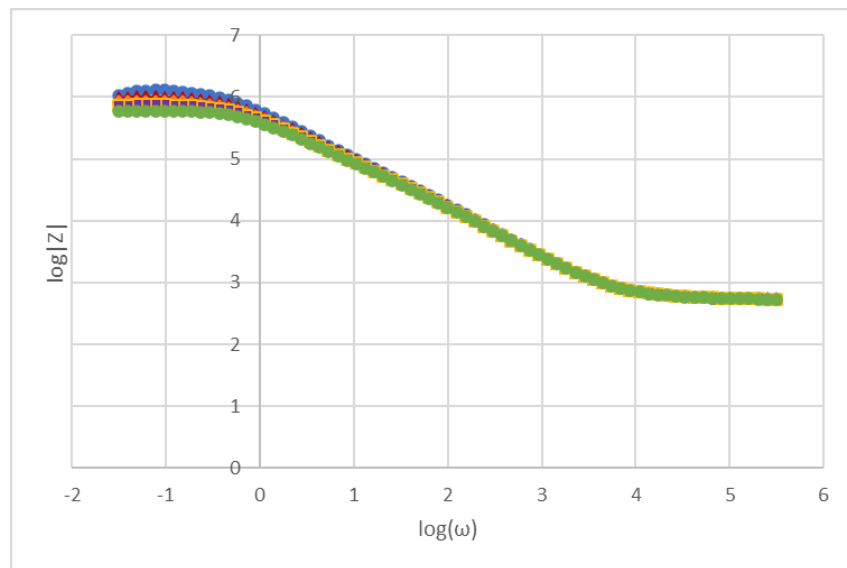
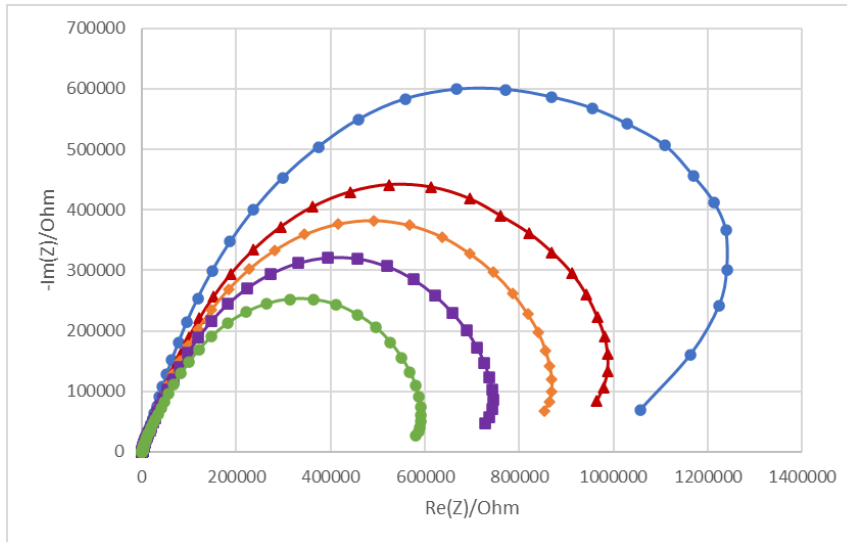


Σχήμα 4.4: Ηλεκτροχημική εμπέδηση σε 0 (μπλε), 30 (κόκκινο), 60 (πορτοκαλί), 90 min(μωβ) ηλεκτροδίου κοβαλτίου σε διάλυμα με pH 8, παρουσία ιστιδίνης.

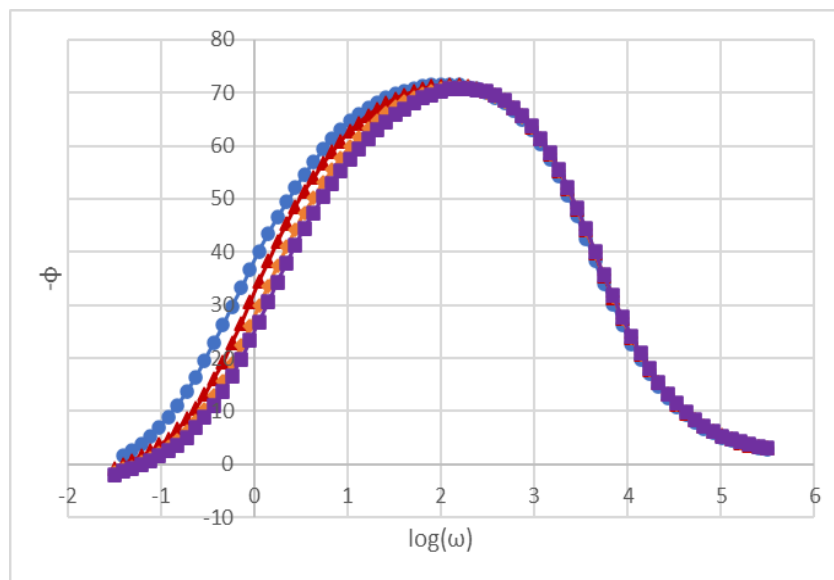
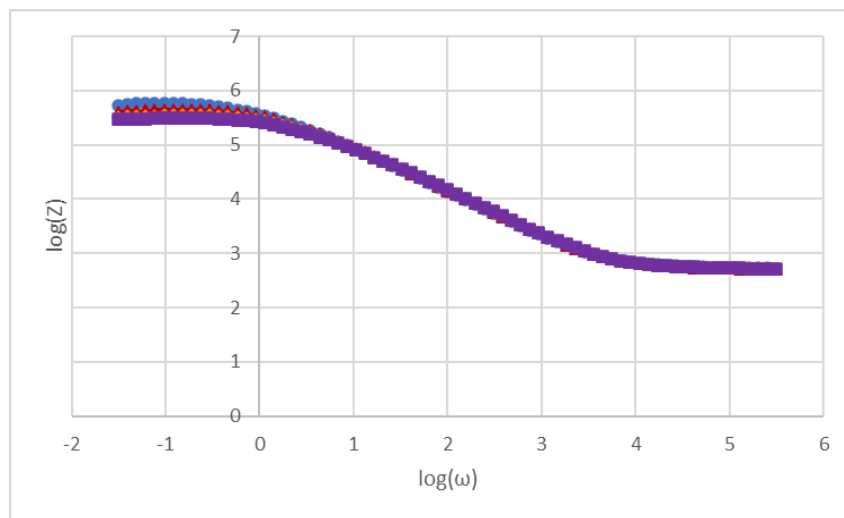
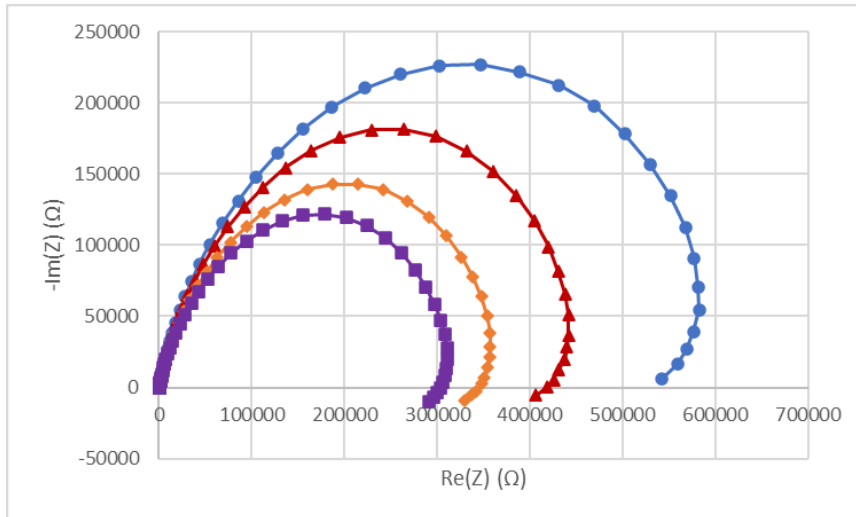
Τα ενδεικτικά φάσματα ηλεκτροχημικής εμπέδησης ηλεκτροδίου νικελίου σε pH 4 απουσία ιστιδίνης φαίνονται στο Σχήμα 4.5. Οι καμπύλες που παρουσιάζονται αποτελούν πειραματικά σημεία. Παρατηρώντας τα διαγράμματα Nyquist φαίνεται η ύπαρξη μιας χρονικής σταθεράς, ωστόσο στις χαμηλές συχνότητες φαίνεται ότι η καμπύλες τείνουν να σχηματίσουν την μορφή που υποδηλώνει προσρόφηση, σε περίπτωση που η σάρωση συνεχιζόταν σε χαμηλότερες συχνότητες η προσρόφηση θα οπτικοποιούνταν πιο έντονα.

Τα ενδεικτικά φάσματα ηλεκτροχημικής εμπέδησης ηλεκτροδίου νικελίου σε pH 4 παρουσία ιστιδίνης φαίνονται στο Σχήμα 4.6. Οι καμπύλες που παρουσιάζονται αποτελούν πειραματικά σημεία. Παρατηρώντας τα διαγράμματα Nyquist φαίνεται εντονότερη τάση για προσρόφηση σε χαμηλές συχνότητες.

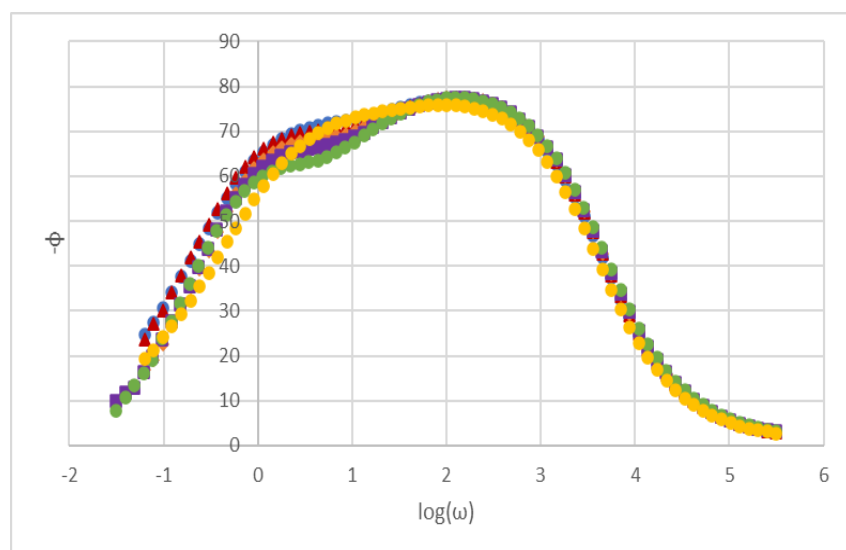
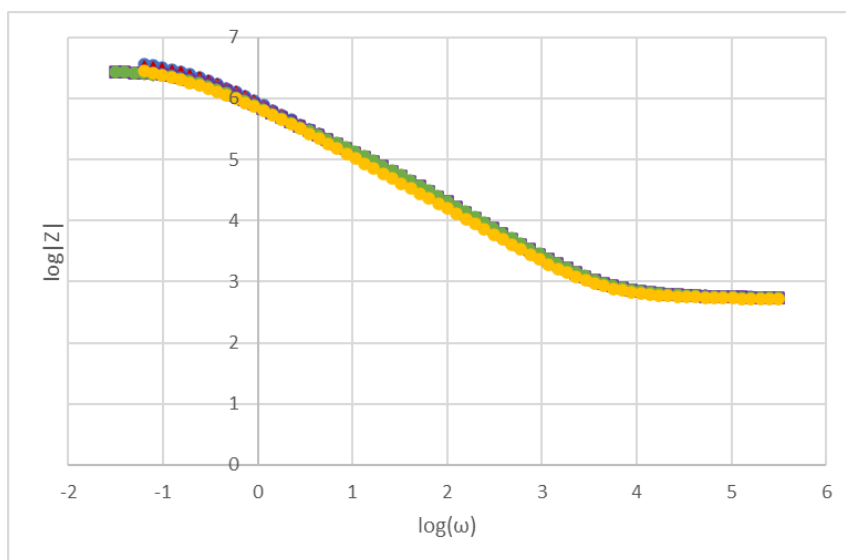
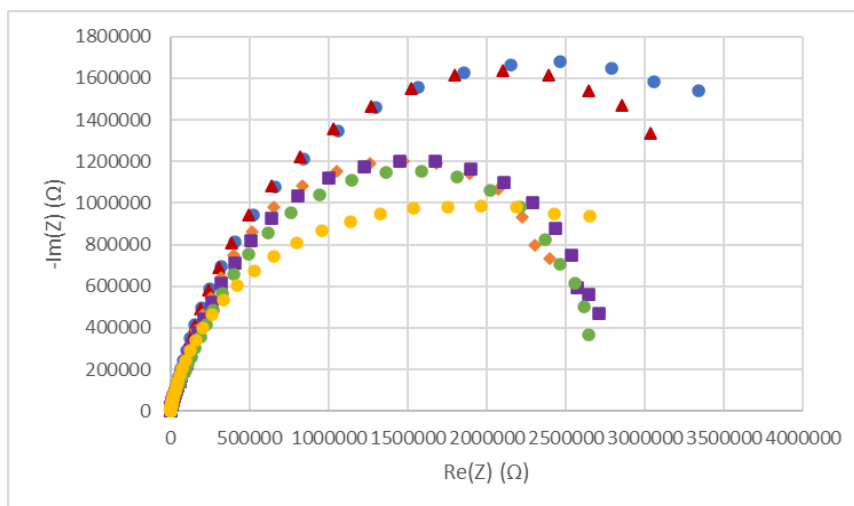
Τα ενδεικτικά φάσματα ηλεκτροχημικής εμπέδησης ηλεκτροδίου νικελίου σε pH 8 απουσία και παρουσία ιστιδίνης φαίνονται στο Σχήμα 4.7. Εκ πρώτης, τόσο από το διάγραμμα Nyquist όσο και από τα διαγράμματα Bode φαίνεται ότι κατά την εμφάνιση εμφανίζεται μόνο μία χρονική σταθερά. Επίσης παρατηρείται αύξηση στην χωρητικότητα για τις μετρήσεις παρουσία ιστιδίνης συγκριτικά με αυτήν απουσία ιστιδίνης. Ωστόσο για της μετρήσεις παρουσία ιστιδίνης παρατηρείται μείωση της χωρητικότητας με την πάροδο του χρόνου.



Σχήμα 4.5: Ηλεκτροχημική εμπέδηση σε 0 (μπλε), 30 (κόκκινο), 60 (πορτοκαλί), 90 min(μωβ) 120 min (πράσινο) ηλεκτροδίου νικελίου σε διάλυμα με pH 4, απουσία ιστιδίνης.



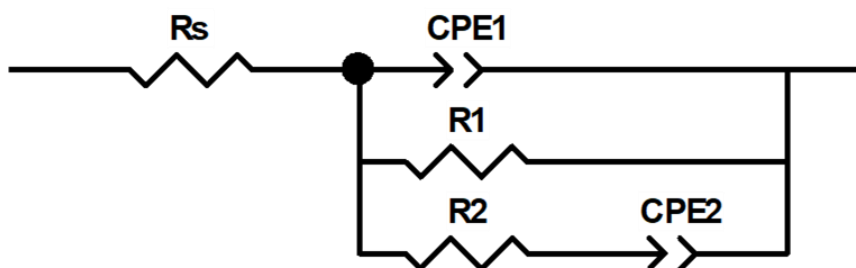
Σχήμα 4.6: Ηλεκτροχημική εμπέδηση σε 0 (μπλε), 30 (κόκκινο), 60 (πορτοκαλί), 90 mHz (μωβ) ηλεκτροδίου νικελίου σε διάλυμα με pH 4, παρουσία ιστιδίνης.



Σχήμα 4.7: Ηλεκτροχημική εμπέδηση σε 0 (μπλε) ,30 (κόκκινο) ,60 (πορτοκαλί) , 90(μωβ) , 120 min (πράσινο) ηλεκτροδίου νικελίου σε διάλυμα με pH 8, παρουσία ιστιδίνης και 0 min (κίτρινο) απουσία ιστιδίνης.

4.5 Το μοντέλο

Για την περιγραφή του συστήματος στην περίπτωση κοβαλτίου σε pH 4, απουσία και παρουσία ιστιδίνης και σε pH 8 παρουσία ιστιδίνης θα θεωρηθεί ότι το ηλεκτρόδιο κοβαλτίου συμπεριφέρεται ως μη ιδανικός πυκνωτής CPE1 , παράλληλα με το σύστημα που αντιπροσωπεύει την προσρόφηση χημικού είδους και περιλαμβάνει μια αντίσταση οξειδοαναγωγής R1, παράλληλα με ένα μη ιδανικό πηνίο CPE2. Το όλο σύστημα βρίσκεται σε σειρά με μια αντίσταση ηλεκτρολυτικού διαλύματος Rs.



Σχήμα 4.8: Ισοδύναμο κύκλωμα κοβαλτίου σε pH 4, απουσία και παρουσία ιστιδίνης και σε pH 8 παρουσία ιστιδίνης.

Η εμπέδηση του πυκνωτή θα προσομοιασθεί με ένα στοιχείο σταθερής φάσης (constant phase element),

$$Z_c = \frac{1}{C(j\omega)^n}$$

Όπου $\omega=2\pi f$ η κυκλική συχνότητα, $j = \sqrt{-1}$ και n ο παράγοντας που εισάγει την μη ιδανικότητα. Για $n=1$ το ηλεκτρόδιο έχει ιδιότητες ιδανικού πυκνωτή. Οι μονάδες του παράγοντα C είναι $S \cdot s^n$ και καθίστανται μονάδες χωρητικότητας $[F=S \cdot s]$ όταν $n=1$.

Ο όρος R1 αφορά την αντίσταση μεταφοράς φορτίου λόγω των φαρανταϊκών δράσεων, R_{ct} ,

$$Z_{ct} = R_{ct}$$

Ο όρος CPE2 αφορά την προσρόφηση για την εμπέδηση του πηνίου ισχύει :

$$Z_L = j\omega L$$

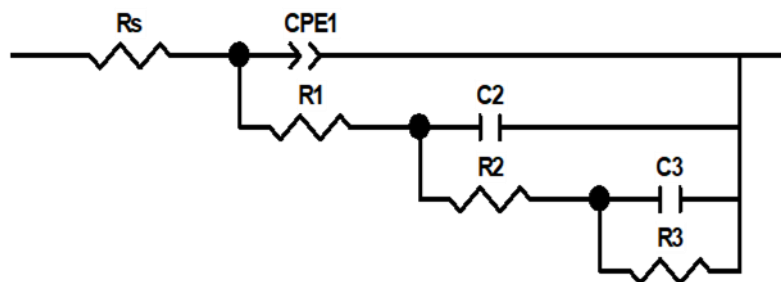
Η εμπέδηση για την προσρόφηση του συστήματος είναι:

$$Z_F = \frac{Z_{ct}Z_o + Z_L Z_{ct}}{Z_{ct} + Z_L + Z_o}$$

Άρα η συνολική εμπέδηση θα είναι ίση με:

$$Z = \frac{Z_F Z_C}{Z_F + Z_C} + R_s$$

Για την περιγραφή του συστήματος στην περίπτωση ηλεκτροδίου κοβαλτίου σε pH 8 απουσία ιστιδίνης θα θεωρηθεί ότι το ηλεκτρόδιο κοβαλτίου συμπεριφέρεται ως μη ιδανικός πυκνωτής CPE1, που βρίσκεται παράλληλα με μια οξειδοαναγωγική αντίσταση R1 καθώς και παράλληλα με ένα σύστημα ενός πυκνωτή C2 και μιας παράλληλης σε αυτόν αντίστασης R2 που περιγράφουν την πρώτη προσρόφηση. Παράλληλα στον πυκνωτή C2 βρίσκεται ένα σύστημα ενός τρίτου πυκνωτή C3 και μίας αντίστασης R3 που περιγράφουν την δεύτερη προσρόφηση. Το όλο σύστημα βρίσκεται σε σειρά με μια αντίσταση ηλεκτρολυτικού διαλύματος Rs.

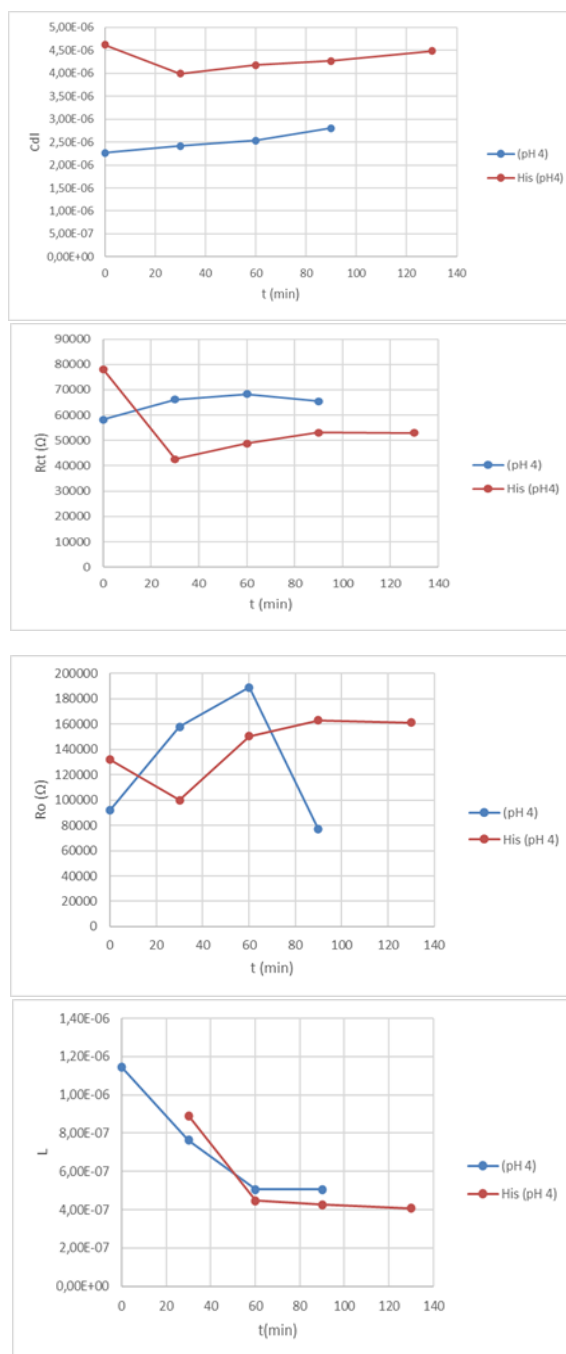


Σχήμα 4.9: Ισοδύναμο κύκλωμα κοβαλτίου σε pH 8 απουσία ιστιδίνης.

Για την περιγραφή του παραπάνω συστήματος υπάρχει πλήθος ισοδύναμων κυκλωμάτων που μπορεί να το αντιπροσωπεύσει. Στην περίπτωση αυτή που εξετάστηκε προσεγγίζεται το πηνίο στο οποίο αποδίδεται η προσρόφηση με την επιβολή αρνητικής τιμής στην αντίσταση R2 και αρνητικής τιμής στην χωρητικότητα C2, που είναι ισοδύναμα με την χρήση ενός πηνίου [2].

Στο Σχ 4.10 παρουσιάζονται οι εξαρτήσεις των στοιχείων του ισοδύναμου κυκλώματος στην περίπτωση ηλεκτροδίου κοβαλτίου και διαλύματος με pH 4, όπως αναφέρθηκε παρατηρούμε

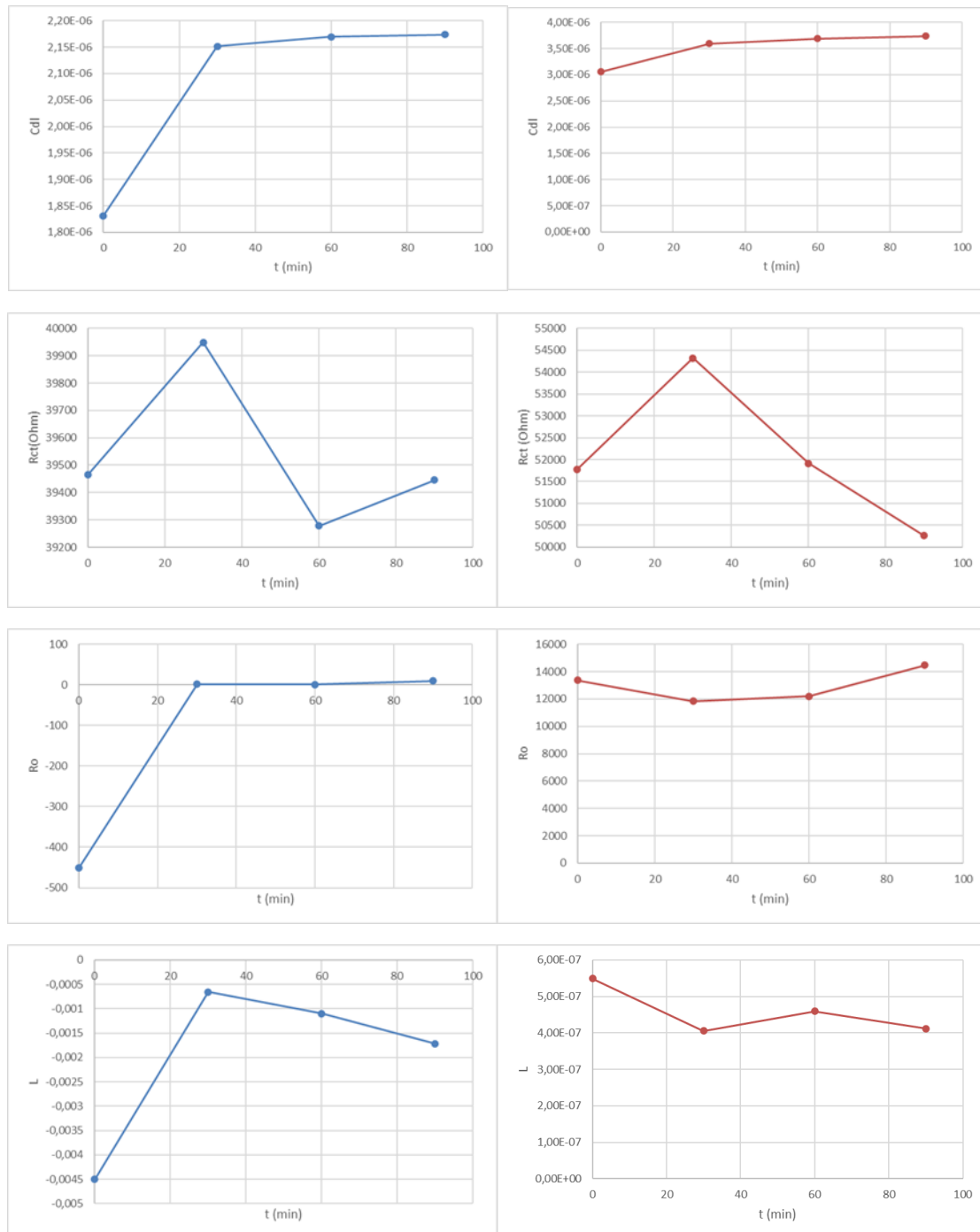
αντίστοιχες τάσεις στις μεταβολές των μεγεθών στον χρόνο, ενώ η μόνη σημαντική διαφορά φαίνεται να εμφανίζεται στην τιμή της χωρητικότητας του ηλεκτροδίου.



Σχήμα 4.10: Ηλεκτρόδιο κοβαλτίου σε pH 4 απουσία ιστιδίνης (μπλέ) και παρουσία ιστιδίνης (κόκκινο)

Στο σχήμα 4.11 παρουσιάζονται οι μεταβολές των τιμών των στοιχείων του ισοδύναμου κυκλώματος για ηλεκτρόδιο κοβαλτίου σε pH , συγκρίνοντας τις μεταβολές των μεγεθών

στον χρόνο παρουσία και απουσία ιστιδίνης παρατηρούμε σημαντικές διαφορές σχεδόν σε όλα τα μεγέθη, καθώς φαίνεται ότι η επιφάνεια τροποποιείται διαφορετικά παρουσία ιστιδίνης στο διάλυμα. Οι διαφορές αυτές αποτελούν μια έμμεση ένδειξη ότι η ιστιδίνη μπορεί να προσροφηθεί στην επιφάνεια του κοβαλτίου όταν το pH του διαλύματος είναι αλκαλικό.



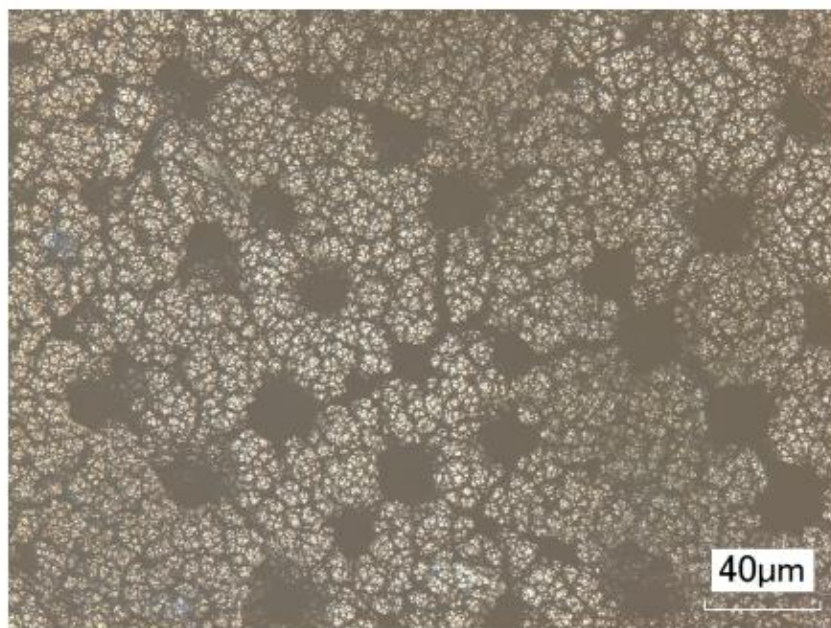
Σχήμα 4.11: Ηλεκτρόδιο κοβαλτίου σε pH 8 απουσία ιστιδίνης (μπλέ) και παρουσία ιστιδίνης (κόκκινο)

Βιβλιογραφία

1. Martusevičius, Saulius, et al. "Adsorption of L-histidine on copper surface as evidenced by surface-enhanced Raman scattering spectroscopy." *Vibrational Spectroscopy* 10.2 (1996): 271-280.
2. A. Lacia, *Electrochemical impedance spectroscopy and its applications*, Springer, 2014

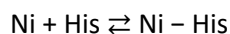
5. Ηλεκτροχημική εμπέδηση αφρού νικελίου παρουσία ιστιδίνης

Οι αφροί νικελίου αποτελούν πορώδη υλικά με μεγάλη ειδική επιφάνεια και η κατασκευή τους εργαστηριακά είναι αρκετά σύντομη, εύκολη και οικονομική [1]. Επιπλέον οι μεταλλικοί αφροί νικελίου παρουσιάζουν ως υλικά εξαιρετική ομοιομορφία, μικρό βάρος, υψηλή μηχανική αντοχή, αντίσταση στην διάβρωση, είναι αδρανή υλικά και εμφανίζουν υψηλή μαγνητική θερμική και ηλεκτρική αγωγιμότητα [2][3]. Μάλιστα λόγω της μεγάλης ειδικής τους επιφάνειας αποτελούν υποσχόμενο υλικό για ποικίλες εφαρμογές, σε αισθητήρες [4], ως καταλύτες [5], ως ηλεκτρόδια για υπερπυκνωτές [6]. Υπάρχουν διάφορες μέθοδοι για την παραγωγή μεταλλικών αφρών ωστόσο οι ηλεκτροχημικές υπερτερούν για οικονομικούς αλλά και για περιβαλλοντικούς λόγους. Στο Σχ. 5.1 παρουσιάζεται μια χαρακτηριστική εικόνα αφρού νικελίου η οποία έχει προκύψει μετά από 60 s ηλεκτρόλυσης και πυκνότητα ρεύματος 1.3 A/cm^2 [7]



Σχήμα 5.1: Εικόνα αφρού νικελίου

Το ιόν του νικελίου, Ni(II) , σχηματίζει σύμπλοκα με το μόριο της ιστιδίνης (His), και ειδικότερα με μέσω των αζώτων του ιμιδαζολικού δακτυλίου. Σκοπός των πειραμάτων που θα παρουσιασθούν είναι να διαπιστωθεί αν η ιστιδίνη μπορεί να προσροφηθεί στην επιφάνεια στοιχειακού νικελίου του οποίου βρίσκεται σε μορφή αφρού, δηλαδή αν η παρακάτω αντίδραση είναι εφικτή,



Εμπεριστατωμένη ανάλυση σχετικά με τον σχηματισμό συμπλόκων ιστιδίνης νικελίου έχει γίνει στην παράγραφο 4.2.

5.1 Πειραματική διαδικασία

Η παραγωγή των μεταλλικών αφρών νικελίου γίνεται γαλβανοστατικά, με την επιβολή σταθερού ρεύματος 23.6 mA για 30 sec. Ως ηλεκτρόδιο εργασίας χρησιμοποιείται εγκιβωτισμένο ηλεκτρόδιο νικελίου, στο οποίο λαμβάνει χώρα η αναγωγή, ενώ η οξειδωση γίνεται σε ηλεκτρόδιο χαλκού. Ως φέροντας ηλεκτρολύτης χρησιμοποιείται διάλυμα NiSO_4 0.12 M NaCl 1.5 M. Τα δύο ηλεκτρόδια που χρησιμοποιούνται πριν την απόθεση έχουν καθαριστεί πολύ καλά.

Για την παρασκευή διαλύματος Tris-HCl (200 mM) διαλύονται 2.4228 g Trizma® base (2-Amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol) σε 50 mL νερού και έπειτα γίνεται στάγδην προσθήκη πυκνού υδροχλωρίου μέχρι να γίνει ρύθμιση του pH στην τιμή 8 και ακολούθως προστίθεται νερό μέχρι το διάλυμα να φράσει τα 100 mL.

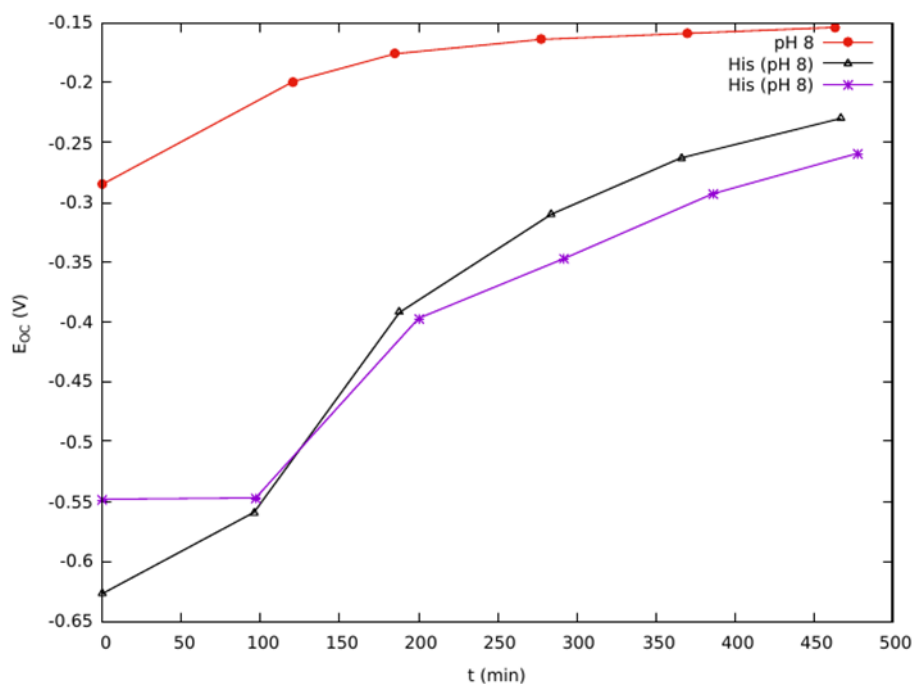
Τέλος για την παρασκευή διαλύματος Tris-HCl-histidine σε 15 mL διαλύματος Tris-HCl (200 mM) διαλύονται 0.01164 g L-histidine (5 mM).

Ακολούθως το ηλεκτρόδιο που φέρει τον μεταλλικό αφρό νικελίου υποβάλλεται σε μια σειρά εμπεδησεων. Συγκεκριμένα χρησιμοποιείται ένα σύστημα τριών ηλεκτροδίων ως ηλεκτρόδιο εργασίας χρησιμοποιείται το ηλεκτρόδιο που φέρει τον μεταλλικό αφρό νικελίου, ως ηλεκτρόδιο αναφοράς χρησιμοποιείται ένα ηλεκτρόδιο Ag|AgCl σε κορεσμένο διάλυμα KCl και ως αντίθετο ηλεκτρόδιο ένα ηλεκτρόδιο άνθρακα. Αρχικά το σύστημα αυτό των τριών ηλεκτροδίων εμβαπτίζεται σε 10mL φέροντα ηλεκτρολύτη Tris-HCl (200 mM) και υποβάλλεται σε σειρά εμπεδησεων ανά μια ώρα για συνολικά 5 ώρες ως προς ανοιχτό κύκλωμα. Στην συνέχεια επαναλαμβάνεται η ίδια διαδικασία με μόνη διαφορά την χρήση διαλύματος Tris-HCl στο οποίο έχει διαλυθεί ιστιδίνη ως φέροντα ηλεκτρολύτη.

5.2 Δυναμικό ανοικτού κυκλώματος

Στο Σχ. 5.2 παρουσιάζεται η μεταβολή του δυναμικού ανοικτού κυκλώματος (μικτού δυναμικού) ηλεκτροδίου αφρού νικελίου σε διάλυμα με pH 8, απουσία (κόκκινο) και παρουσία (μαύρο και μοβ) ιστιδίνης. Οι καμπύλες παρουσία ιστιδίνης αφορούν επανάληψη του ίδιου πειράματος για ίδια σύσταση διαλύματος αλλά ηλεκτρόδιο αφρού ιστιδίνης που προέκυψε από διαφορετικές συνθέσεις στις ίδιες συνθήκες.

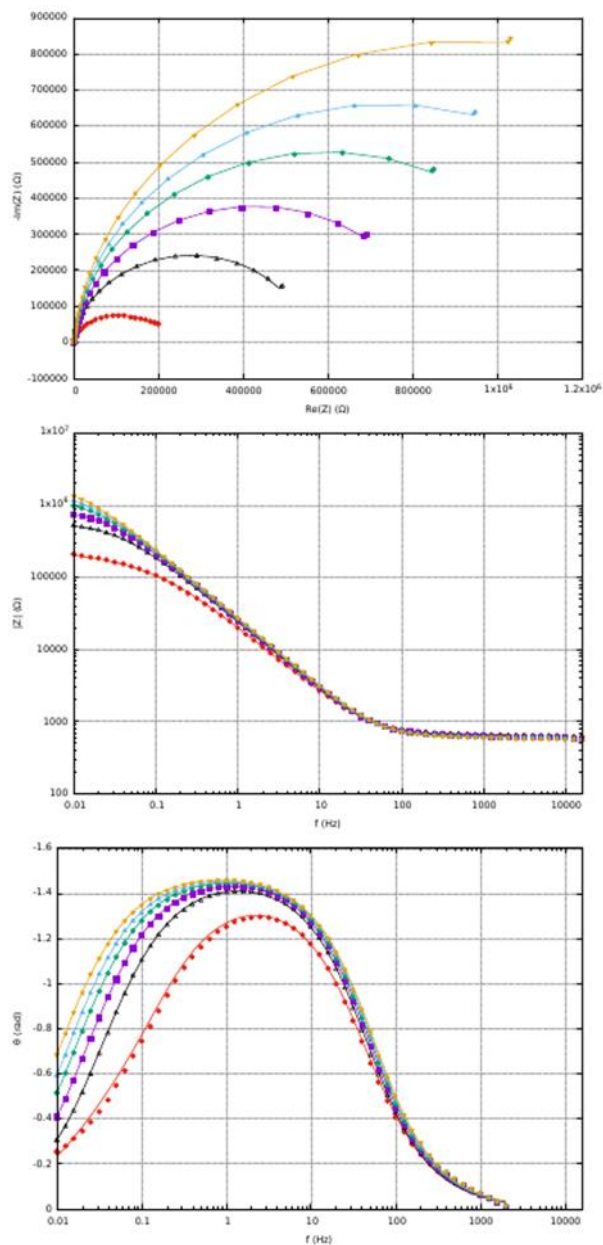
Από το σχήμα αυτό διαπιστώνεται ότι η συμπεριφορά του ηλεκτροδίου αφρού νικελίου σε διάλυμα pH 8 απουσία ιστιδίνης διαφέρει από αυτήν παρουσία ιστιδίνης. Στην πρώτη περίπτωση του δυναμικού ανοικτού κυκλώματος κατά την εμβάπτιση είναι -0.285 V και τείνει σχετικά αργά προς ανοδικότερες τιμές. Αντίθετα, παρουσία ιστιδίνης, το δυναμικό ανοικτού κυκλώματος κατά την εμβάπτιση είναι κατά πολύ καθοδικότερο (-0.627 V και -0.548 V) και τείνει προς ανοδικότερες τιμές με την πάροδο του χρόνου. Τα συμπεράσματα από τις εξαρτήσεις αυτές θα πρέπει να εξαχθούν με κάθε επιφύλαξη, αλλά εκ πρώτης φαίνεται ότι απουσία ιστιδίνης το ηλεκτρόδιο αφρού νικελίου φέρεται ως παθητικοποιημένο (σχηματισμός υδροξειδίου του νικελίου) ενώ παρουσία ιστιδίνης ως ενεργό ηλεκτρόδιο που σταδιακά καθίσταται ευγενέστερο, ίσως λόγω της προσρόφησης της ιστιδίνης στην επιφάνεια του νικελίου.



Σχήμα 5.2: Μεταβολή του δυναμικού ανοικτού κυκλώματος ηλεκτροδίου αφρού νικελίου σε διάλυμα με pH 8, απουσία ιστιδίνης (κόκκινο), και παρουσία ιστιδίνης (μαύρο και μοβ).

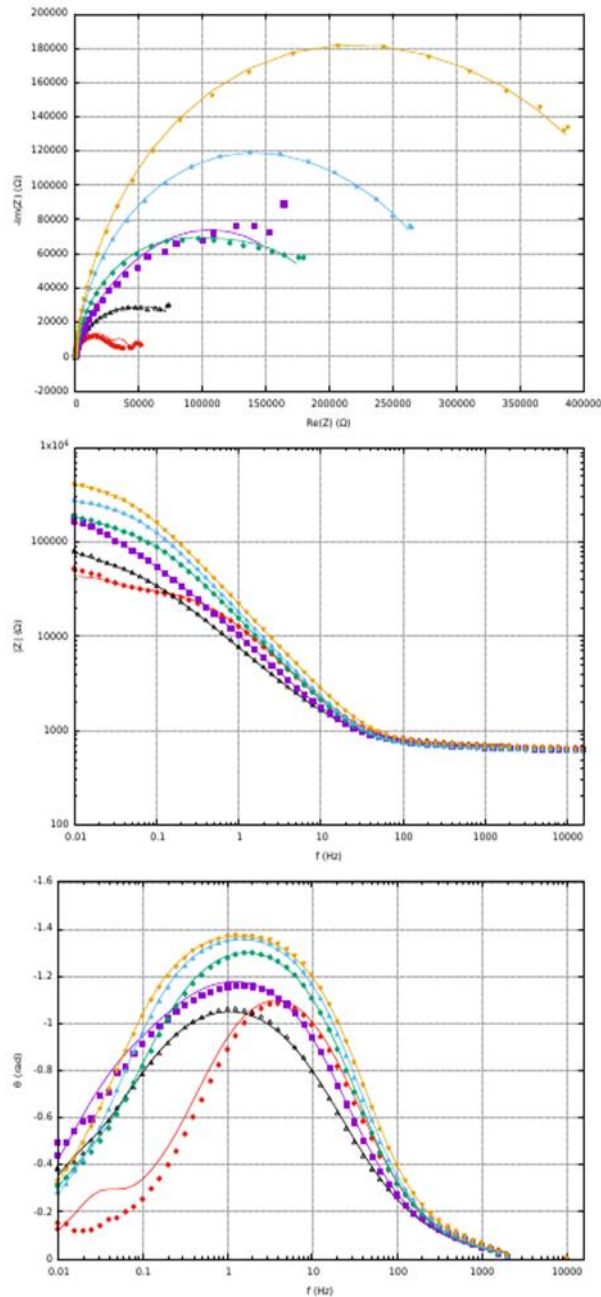
5.3 Φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης

Τα φάσματα ηλεκτροχημικής εμπέδησης ηλεκτροδίου αφρού νικελίου σε pH 8 απουσία ιστιδίνης παρουσιάζονται στο Σχ. 5.3. Στα σχήματα αυτά, τα σύμβολα αφορούν πειραματικά σημεία ενώ οι συνεχείς καμπύλες την προσομοίωση (που θα συζητηθεί στην επόμενη παράγραφο). Εκ πρώτης, τόσο από το διάγραμμα Nyquist όσο και από τα διαγράμματα Bode φαίνεται ότι κατά την εμπάπτιση εμφανίζεται μόνο μία χρονική σταθερά. Για υψηλές συχνότητες καταγράφεται η τιμή της αντίστασης του διαλύματος, περίπου 600 Ω, ενώ για ενδιάμεσες συχνότητες μη ιδανική χωρητική συμπεριφορά καθώς η φάση διαφέρει κατά πολύ από την τιμή $\pi/2$. Για χαμηλές συχνότητες τείνει να καταγραφεί μία επιπλέον αντίσταση που σχετίζεται με τις φαρανταϊκές δράσεις στο ηλεκτρόδιο. Με την πάροδο του χρόνου η χωρητικότητα μειώνεται και αυξάνει η αντίσταση των φαρανταϊκών δράσεων. Δεν εμφανίζεται άμεση ένδειξη προσρόφησης στο εύρος τιμών των συχνοτήτων που εφαρμόστηκαν, δηλ. δεύτερη χρονική σταθερά.



Σχήμα 5.3: Ηλεκτροχημική εμπέδηση σε 0 (κόκκινο), 121 (μαύρο), 185 (μολβ), 277 (πράσινο), 370 (γαλάζιο) και 462 mg/L (κίτρινο) ηλεκτροδίου αφρού νικελίου σε διάλυμα με pH 8, απουσία ιστιδίνης.

Τα φάσματα ηλεκτροχημικής εμπέδησης ηλεκτροδίου αφρού νικελίου σε pH 8 παρουσία ιστιδίνης παρουσιάζονται στο Σχ. 5.4. Στα σχήματα αυτά, τα σύμβολα αφορούν πειραματικά σημεία ενώ οι συνεχείς καμπύλες την προσομοίωση (που θα συζητηθεί στην επόμενη παράγραφο).



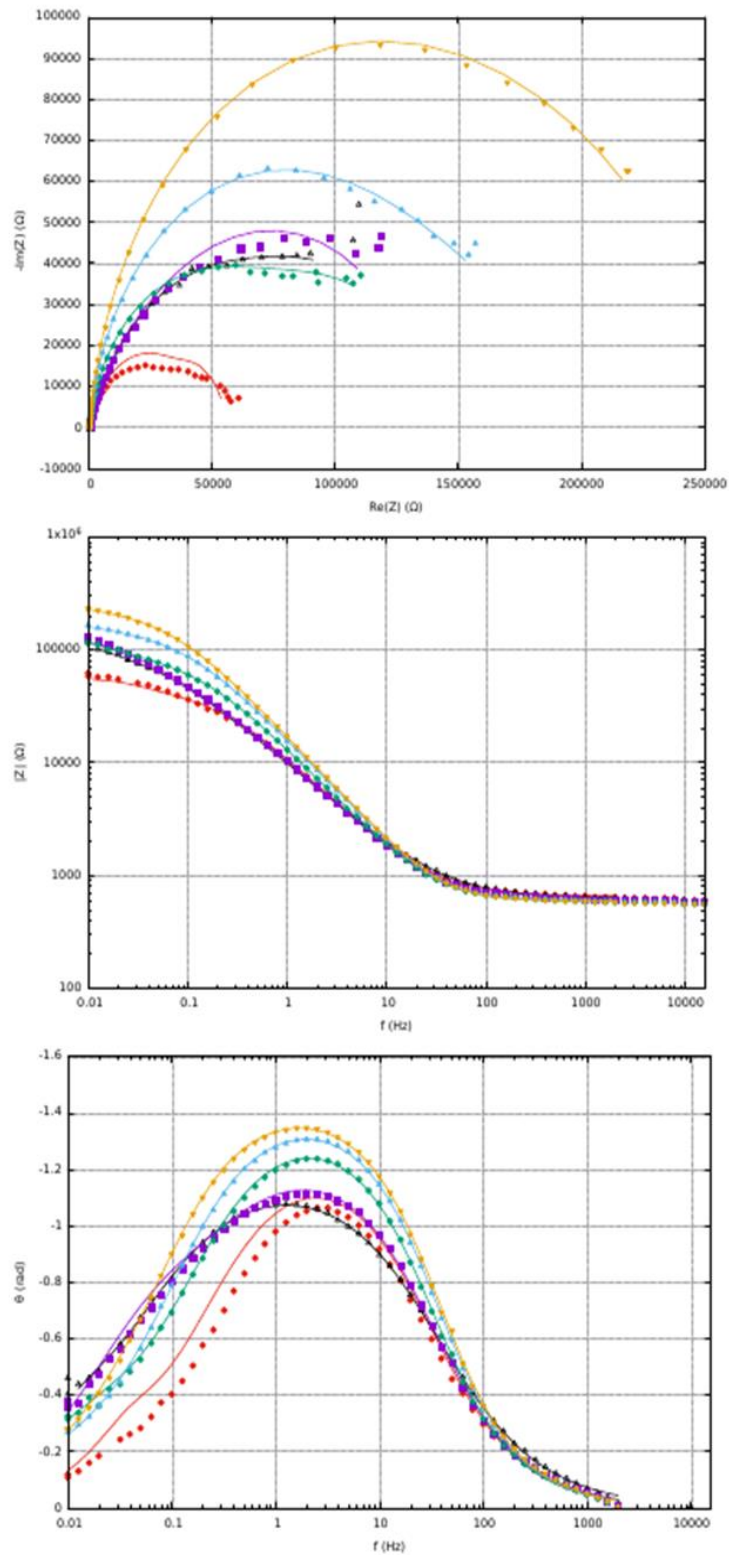
Σχήμα 5.4: Ηλεκτροχημική εμπέδηση σε 0 (κόκκινο), 96 (μαύρο), 188 (μολ), 284 (πράσινο), 366 (γαλάζιο) και 467 μM (κίτρινο) ηλεκτροδίου αφρού νικελίου σε διάλυμα με pH 8, παρουσία ιστιδίνης.

Εκ πρώτης, τόσο από το διάγραμμα Nyquist όσο και από τα διαγράμματα Bode φαίνεται ότι κατά την εμφάνιση εμφανίζεται μόνο μία χρονική σταθερά, εκτός ίσως από τις πολύ χαμηλές συχνότητες σε αρχικούς χρόνους. Για υψηλές συχνότητες καταγράφεται η τιμή της αντίστασης του διαλύματος, περίπου 600 Ω , ενώ για ενδιάμεσες συχνότητες μη ιδανική χωρητική συμπεριφορά καθώς η φάση διαφέρει κατά πολύ από την τιμή $\pi/2$. Για χαμηλές

συχνότητες τείνει να καταγραφεί μία επιπλέον αντίσταση που σχετίζεται με τις φαρανταϊκές δράσεις στο ηλεκτρόδιο. Με την πάροδο του χρόνου η χωρητικότητα αυξομειώνεται ενώ αυξάνεται η αντίσταση των φαρανταϊκών δράσεων. Δεν εμφανίζεται σαφής ένδειξη προσρόφησης στο εύρος τιμών των συχνοτήτων που εφαρμόστηκαν, δηλ. δεύτερη χρονική σταθερά.

Επανάληψη των ιδίων πειραμάτων αλλά για νέο αφρό νικελίου σε pH 8 παρουσία ιστιδίνης παρουσιάζονται στο Σχ. 5.5. Στα σχήματα αυτά, τα σύμβολα αφορούν πειραματικά σημεία ενώ οι συνεχείς καμπύλες την προσομοίωση (που θα συζητηθεί στην επόμενη παράγραφο). Εκ πρώτης, τόσο από το διάγραμμα Nyquist όσο και από τα διαγράμματα Bode φαίνεται ότι κατά την εμβάπτιση εμφανίζεται μόνο μία χρονική σταθερά, εκτός ίσως από τις πολύ χαμηλές συχνότητες σε αρχικούς χρόνους. Για υψηλές συχνότητες καταγράφεται η τιμή της αντίστασης του διαλύματος, περίπου 600 Ω, ενώ για ενδιάμεσες συχνότητες μη ιδανική χωρητική συμπεριφορά καθώς η φάση διαφέρει κατά πολύ από την τιμή $\pi/2$. Για χαμηλές συχνότητες τείνει να καταγραφεί μία επιπλέον αντίσταση που σχετίζεται με τις φαρανταϊκές δράσεις στο ηλεκτρόδιο. Με την πάροδο του χρόνου η χωρητικότητα αυξομειώνεται ενώ αυξάνεται η αντίσταση των φαρανταϊκών δράσεων. Δεν εμφανίζεται σαφής ένδειξη προσρόφησης στο εύρος τιμών των συχνοτήτων που εφαρμόστηκαν, δηλ. δεύτερη χρονική σταθερά.

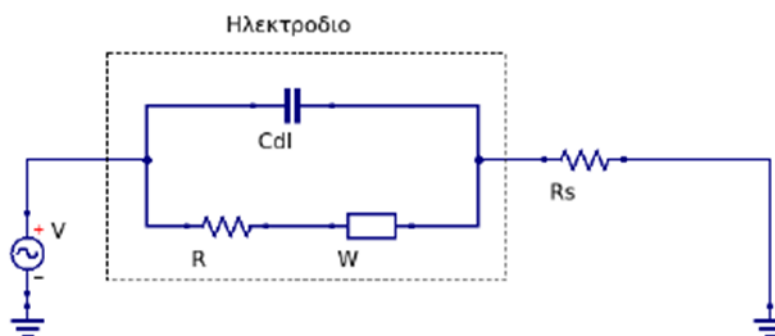
Οι πιθανές διαφορές αυτές θα ποσοτικοποιηθούν με την κατάλληλη προσομοίωση.



Σχήμα 5.5: Ηλεκτροχημική εμπέδηση σε 0 (κόκκινο), 97 (μαύρο), 200 (μοβ), 292 (πράσινο), 386 (γαλάζιο) και 487 min (κίτρινο) ηλεκτροδίου αφρού νικελίου σε διάλυμα με pH 8, παρουσία ιστιδίνης.

5.4 Το μοντέλο

Οι αφροί νικελίου έχουν πορώδη δομή και στις συνθήκες ηλεκτρόλυσης που χρησιμοποιήθηκαν, οι πόροι αναμένεται να έχουν διάμετρο περίπου 50 μm και ύψος περίπου 50 έως 80 μm [7]. Για την περιγραφή του συστήματος θα θεωρήσουμε ότι το ηλεκτρόδιο του αφρού νικελίου φέρεται ως μη ιδανικός πυκνωτής με διαρροή, σε σειρά με μία (ωμική) αντίσταση του ηλεκτρολυτικού διαλύματος R_s , βλ. Σχ. 5.6.



Σχήμα 5.6: Ισοδύναμο κύκλωμα αφρού νικελίου σε pH 8, απουσία και παρουσία ιστιδίνης.

Η εμπέδηση του πυκνωτή θα προσομοιασθεί με ένα στοιχείο σταθερής φάσης (constant phase element),

$$Z_c = \frac{1}{c(j\omega)^n} \quad (1)$$

όπου $\omega = 2\pi f$ η κυκλική συχνότητα, $j = (-1)^{1/2}$ και n ο παράγοντας που εισάγει τη μη ιδανικότητα. Για $n = 1$ το ηλεκτρόδιο έχει ιδιότητες ιδανικού πυκνωτή. Οι μονάδες του παράγοντα C είναι $S s^n$ και καθίστανται μονάδες χωρητικότητας [$F = S s$] όταν $n = 1$.

Η διαρροή (παράλληλη με τον μη ιδανικό πυκνωτή) θα θεωρηθεί ότι αποτελείται από δύο όρους σε σειρά. Ο πρώτος όρος αφορά την αντίσταση μεταφοράς φορτίου λόγω των φαρανταϊκών δράσεων, R_{ct} ,

$$Z_{ct} = R_{ct} \quad (2)$$

Ο δεύτερος αφορά τη διάχυση των συστατικών (διαλυμένο οξυγόνο, ιστιδίνη κλπ) εντός των πόρων του ηλεκτροδίου, μήκους L (Στην παράγραφο αυτή το L συμβολίζει το μήκος των πόρων και όχι την επαγωγή). Θα θεωρήσουμε ότι η διάχυση συμβαίνει κυρίως εντός των πόρων (είναι εντοπισμένη) και τότε η εμπέδηση της διάχυσης θα είναι,

$$Z_W = R_D \frac{\tan(\sqrt{j\omega\tau_D})}{\sqrt{j\omega\tau_D}} \quad (3)$$

όπου,

$$\tau_D = \frac{L^2}{D}$$

και,

$$R_D = \frac{k(E)R_{ct}L}{D}$$

όπου D ο συντελεστής διάχυσης και $k(E)$ η κινητική σταθερά της φαρανταϊκής δράσης. Συνεπώς, η εμπέδηση της διαρροής του συστήματος θα είναι,

$$Z_F = R_{ct} + Z_W \quad (4)$$

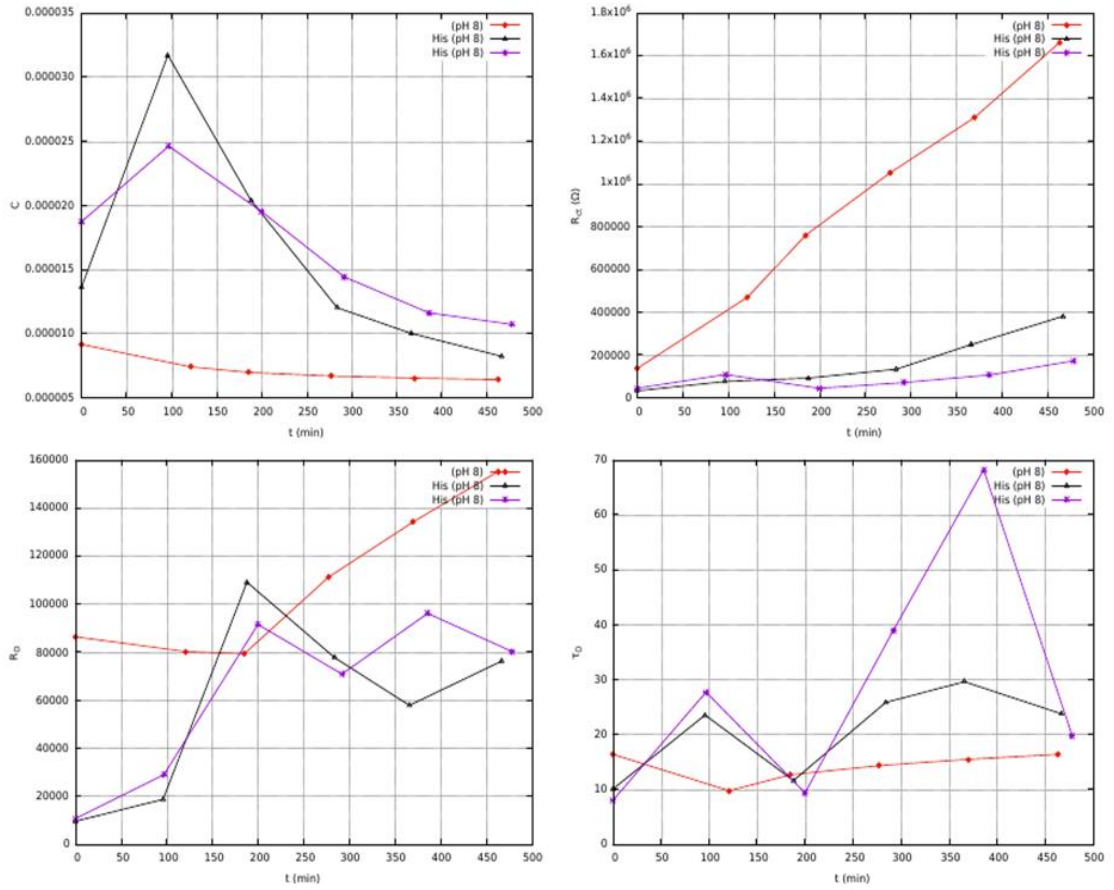
και η συνολική εμπέδηση,

$$Z = \frac{Z_F Z_C}{Z_F + Z_C} + R_s \quad (5)$$

Εφόσον από τα διαγράμματα Nyquist δεν μπορούσαν από την μορφή τους να εξαχθούν πληροφορίες για την ύπαρξη προσρόφησης παρουσία ιστιδίνης θα παρατηρηθεί η εξαρτήση των μεγεθών της χωρητικότητας, της αντίστασης και της χρονικής σταθεράς της διάχυσης από τον χρόνο παρουσία και απουσία ιστιδίνης. Απουσία ιστιδίνης η χωρητικότητα φαίνεται να μειώνεται με τον χρόνο, τείνοντας να προσεγγίσει μια σταθερή τιμή, κάτι που σημαίνει ότι η επιφάνεια του ηλεκτροδίου παθητικοποιείται μη μπορώντας να προσροφήσει κάποιο είδος, ένδειξη του οποίου θα ήταν η αύξηση στην χωρητικότητα. Ωστόσο παρουσία ιστιδίνης υπάρχει αρχικά μια μεγάλη αύξηση στην χωρητικότητα γεγονός που όπως αναφέρθηκε αποτελεί καλή ένδειξη για την προσρόφηση της ιστιδίνης, που ακολουθείται από μείωση της με την πάροδο του χρόνου

Σε αντίθεση με την χωρητικότητα, η οποία μειώνεται απουσία ιστιδίνης η αντίσταση εμφανίζει έντονη αύξηση, αυτό συμβαίνει γιατί με την πάροδο του χρόνου λαμβάνει χώρα η παθητικοποίηση της επιφάνειας του ηλεκτροδίου και επομένως αυξάνεται η αντίσταση στην περαιτέρω παθητικοποίησή του. Όταν τα πειράματα διεξάγονται παρουσία ιστιδίνης έχει πάλι μια αυξητική τάση με την πάροδο του χρόνου αλλά σε πολύ χαμηλότερες τιμές συγκριτικά με αυτές που παρουσιάζονται για την καμπύλη απουσία ιστιδίνης. Αυτό σημαίνει ότι η ιστιδίνη πιθανώς προσροφάται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου αφρού νικελίου, καθιστώντας την ευγενέστερη και πιο ανθεκτική στην παθητικοποίηση.

Παρατηρούμε λοιπόν ότι όλα τα μεγέθη παρουσία και απουσία ιστιδίνης διαφέρουν δραστικά, επομένως το ηλεκτρόδιο αφρού νικελίου ανταποκρίνεται διαφορετικά στο ηλεκτρολυτικό διάλυμα παρουσία ιστιδίνης κάτι που σημαίνει την προσρόφηση της ιστιδίνης μέσα στην πορώδη δομή του αφρού.



Σχήμα 5.7: Διαγράμματα χωρητικότητας αντιτάσεων και χρονικής σταθεράς με τον χρόνο απουσία (κόκκινο) και παρουσία (μαύρο και μωβ) ιστιδίνης.

Βιβλιογραφία

1. Rosado, Pedro C., et al. "Immobilization of His-tagged proteins on NiO foams for recyclable enzymatic reactors." *Applied Surface Science* 537 (2021): 147848.
2. Khairy, Mohamed, and Sherif A. El-Safty. "Promising supercapacitor electrodes based immobilization of proteins onto macroporous Ni foam materials." *Journal of Energy Chemistry* 24.1 (2015): 31-38.
3. Pierozynski, Boguslaw, Tomasz Mikolajczyk, and Ireneusz M. Kowalski. "Hydrogen evolution at catalytically-modified nickel foam in alkaline solution." *Journal of Power Sources* 271 (2014): 231-238
4. Wang, Li, et al. "Hierarchical NiO superstructures/foam Ni electrode derived from Ni metal-organic framework flakes on foam Ni for glucose sensing." *Electrochimica Acta* 174 (2015): 846-852
5. Eugénio, S., et al. "Nanostructured 3D metallic foams for H₂O₂ electroreduction." *International Journal of Hydrogen Energy* 41.32 (2016): 14370-14376
6. Della Noce, Rodrigo, et al. "One-step process to form a nickel-based/carbon nanofoam composite supercapacitor electrode using Na₂SO₄ as an eco-friendly electrolyte." *RSC advances* 6.19 (2016): 15920-15928.
7. Χρήστος Μπισσάνης, «Χωρητικές ιδιότητες ηλεκτροχημικών συστημάτων για ενεργειακές εφαρμογές», Ιούνιος 2021

6. Συμπεράσματα

Έγινε ο προσδιορισμός με την τεχνική της FTaCV, καθώς αυτή υπερτερεί σε σύγκρισή με την κυκλική βολταμετρία στην ανάλυση ενζύμων όπου τα μεγάλα χωρητικά ρεύματα επικαλύπτουν της μικρές φαρανταϊκές αποκρίσεις που προκύπτουν λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης των ενζύμων. Στην συνέχεια γίνεται η διόρθωση του δυναμικού ώστε να βρεθεί το φαινόμενο δυναμικό του ελεύθερου ενζύμου το οποίο βρίσκεται ίσο με 335.51 mV. Ο υπολογισμός γίνεται με την χρήση του εμπειρικού τύπου:

$$E'_{app} = E^{o'} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{c_{+,o}}{c_{+,i}} - 2.303 \frac{RT}{nF} pH$$

Για τον έλεγχο των αποτελεσμάτων που προκύπτουν από τον εμπειρικό τύπο γίνεται διόρθωση του φαινόμενου δυναμικού του οξειδοαναγωγικού είδους φερροκενίου προκειμένου να γίνει συσχετισμός με το ένζυμο. Προκύπτει ότι το φαινόμενο δυναμικό ελεύθερου και ακινητοποιημένου φερροκενίου εμφανίζει διαφορά 135.65 mV. Επομένως με βάση αυτή την διαφορά στην περίπτωση του ελευθέρου ενζύμου το φαινόμενο δυναμικό προκύπτει ίσο με 334.54 mV που όπως φαίνεται είναι σε πολύ καλή συμφωνία με την τιμή που προκύπτει από τον εμπειρικό τύπο.

Ακολούθως γίνεται ο υπολογισμός της κινητικής σταθεράς k^0 , αυτή βρίσκεται ίση με $7.67s^{-1}$

Η σύσταση της μήτρας μέσα στην οποία γίνεται ο εγκλεισμός του ενζύμου έχει καθοριστικό ρόλο για την ακινητοποίηση του ενζύμου, καθώς ενέχει κίνδυνος να υπερκαλύπτει την απόκριση του ενζύμου δυσχεραίνοντας την ανάλυση.

Στην περίπτωση του ηλεκτροδίου κοβαλτίου σε ηλεκτρολυτικό διάλυμα με pH 4 παρατηρείται δεύτερη χρονική τόσο παρουσία όσο και απουσία ιστιδίνης. Το γεγονός αυτό δεν συντελεί στην εξαγωγή ασφαλών συμπερασμάτων για την προσρόφηση της ιστιδίνης και στην συμπληρωματική ανάλυση διαφόρων μεγεθών στον χρόνο η ουσιαστική διαφορά εμφανίζεται μόνο στο μέγεθος της χωρητικότητας της διπλοστιβάδας.

Στην περίπτωση του ηλεκτροδίου κοβαλτίου σε ηλεκτρολυτικό διάλυμα με pH 8 απουσία ιστιδίνης εμφανίζονται τρεις χρονικές σταθερές ενώ παρουσία ιστιδίνης εμφανίζονται δύο χρονικές σταθερές οδηγώντας στο συμπέρασμα ότι λαμβάνει χώρα η προσρόφηση της ιστιδίνης.

Στην περίπτωση του ηλεκτροδίου νικελίου σε ηλεκτρολυτικό διάλυμα με pH 4 εμφανίζεται τάση για προσρόφηση τόσο παρουσία όσο και απουσία ιστιδίνης οδηγώντας σε επισφαλή συμπεράσματα για την προσρόφηση της ιστιδίνης. Ενώ στην περίπτωση του ηλεκτροδίου νικελίου σε ηλεκτρολυτικό διάλυμα με pH 8 εμφανίζεται μόνο μια χρονική σταθερά που υποδηλώνει ότι δεν εμφανίζεται προσρόφηση.

Στην περίπτωση ηλεκτροδίου αφρού νικελίου σε ηλεκτρολυτικό διάλυμα με pH 8 απουσία και παρουσία ιστιδίνης δεν υπάρχει σαφής ένδειξη προσρόφησης λόγω της εμφάνισης μιας χρονικής σταθεράς. Ωστόσο κατά την μελέτη της μεταβολής διαφόρων μεγεθών που προκύπτουν από το ισοδύναμο κύκλωμα σε σχέση με τον χρόνο φαίνονται δραστικές διαφορές απουσία και παρουσία ιστιδίνης. Συγκεκριμένα είναι πιθανό η ιστιδίνη να προσροφάται στον αφρό νικελίου και να καθιστά την επιφάνεια ανθεκτική στην παθητικοποίηση. Κάτι που επιβεβαιώνεται από την μεγάλη αύξηση της χωρητικότητας παρουσία ιστιδίνης και την μικρότερη αντίσταση στην οξειδοαναγωγή συγκριτικά με αυτή απουσία ιστιδίνης.

Τα αποτελέσματα που προκύπτουν από την προσρόφηση της ιστιδίνης στα διάφορα ηλεκτρόδια είναι ελπιδοφόρα για την μελλοντική μελέτη της ακινητοποίησης των ενζύμων σε αυτές τις συνθήκες, τουλάχιστον στις περιπτώσεις που εμφανίζεται σαφής ένδειξη προσρόφησης.