



**ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΔΗΜΟΚΡΑΤΙΑ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΠΟΛΥΤΕΧΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ
ΤΜΗΜΑ ΜΗΧΑΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΥΛΙΚΩΝ**

**ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΧΗΜΕΙΑ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ»**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ (Μ.Δ.Ε.)

**ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΕΩΝ ΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΙΚΩΝ ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ
ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΟΥ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ
ΜΕ ΟΞΕΙΔΑΣΗ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ**

**Ευαγγέλου Φωτεινή
Α.Μ. 339**

ΙΩΑΝΝΙΝΑ, 2022

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία (Μ.Δ.Ε.) εκπονήθηκε στο πλαίσιο των σπουδών για την απόκτηση του Διπλώματος Μεταπτυχιακών Σπουδών (Δ.Μ.Σ.) του Διατμηματικού Προγράμματος Σπουδών στη «Χημεία και Τεχνολογία των Υλικών» των Τμημάτων Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Χημείας και Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Το Δίπλωμα Μεταπτυχιακών Σπουδών (Δ.Μ.Σ) απονέμεται από το Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων (ΦΕΚ 1949/01.06.2018 τ. Β').

Εγκρίθηκε τηναπό την εξεταστική επιτροπή:

ΟΝΟΜΑΤΕΠΩΝΥΜΟ

ΒΑΘΜΙΑ

- 1. Δημήτριος Γουρνής**, Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Πολυτεχνικής Σχολής του Παν/μίου Ιωαννίνων, **Επιβλέπων**
- 2. Χαράλαμπος Σταμάτης**, Καθηγητής του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών της Πολυτεχνικής Σχολής του Παν/μίου Ιωαννίνων
- 3. Κωνσταντίνος Η. Σαλμάς**, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Πολυτεχνικής Σχολής του Παν/μίου Ιωαννίνων

ΥΠΕΥΘΥΝΗ ΔΗΛΩΣΗ

"Δηλώνω υπεύθυνα ότι η παρούσα διατριβή εκπονήθηκε κάτω από τους διεθνείς ηθικούς και ακαδημαϊκούς κανόνες δεοντολογίας και προστασίας της πνευματικής ιδιοκτησίας. Σύμφωνα με τους κανόνες αυτούς, δεν έχω προβεί σε ιδιοποίηση ξένου επιστημονικού έργου και έχω πλήρως αναφέρει τις πηγές που χρησιμοποίησα στην εργασία αυτή."

(Υπογραφή υποψηφίου)

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία (Μ.Δ.Ε.) εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών και στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων στο πλαίσιο των σπουδών για την απόκτηση του Διπλώματος Μεταπτυχιακών Σπουδών (Δ.Μ.Σ.) του Διατμηματικού Προγράμματος Σπουδών στην «Χημεία και Τεχνολογία των Υλικών» των Τμημάτων Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Χημείας και Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Θέλω, αρχικά, να εκφράσω τις βαθύτερες ευχαριστίες μου στον Καθηγητή Δημήτριο Γουρνή, επιβλέποντα της παρούσας μεταπτυχιακής εργασίας, για την επιστημονική καθοδήγηση και πολύτιμη βοήθειά του, την αμέριστη εμπιστοσύνη, την εμπύχωση και την ηθική συμπαράσταση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια του σπουδαστικού μου βίου στο Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων. Αγαπητέ Δάσκαλε ήσασταν το στήριγμά μου.

Ένα πολύ μεγάλο ευχαριστώ οφείλω στον Καθηγητή Χαράλαμπο Σταμάτη, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για την ευγενική φιλοξενία στο Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών του Πανεπιστημίου, την ευκαιρία που μου έδωσε να επεκτείνω την έρευνά μου στον τομέα της Βιοεπιστήμης και την ορθή καθοδήγησή του.

Ευχαριστώ πολύ, επίσης, τον κ. Κωνσταντίνο Η. Σαλμά, Επίκουρο Καθηγητή του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, μέλος της τριμελούς επιτροπής, για την υποστήριξή του.

Ιδιαίτερος θέλω να ευχαριστήσω τους Μεταδιδακτορικούς Ερευνητές Παναγιώτα Ζυγούρη, Κωνσταντίνο Σπύρου και Δρ. Νίκη Καρούτα για την πολύτιμη βοήθεια κατά την εκτέλεση της πειραματικής διαδικασίας καθώς και για τη διάθεση του χρόνου και των γνώσεών τους σε διάφορα στάδια της εργασίας.

Βαρύνουσας σημασίας ήταν η βοήθεια της Μεταδιδάκτορος Βασιλικής-Μιχαέλας Πατήλα, η οποία όχι μόνο συνέβαλε με την καθοδήγησή της στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας αλλά μου παρείχε αφειδώς τις γνώσεις και την εμπειρία της. Την ευχαριστώ θερμά.

Θα ήταν μεγάλη παράλειψη να μην αναφερθώ στην υποψήφια διδάκτορα Χριστίνα Αλαντζόγλου, την οποία και ευχαριστώ από καρδιάς για τη συνεχή στήριξή της και την αποφασιστική συμβολή της στην επίτευξη των πειραμάτων.

Επιπλέον, θέλω να ευχαριστήσω όλα τα μέλη του Εργαστηρίου Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών, όπως επίσης και τα μέλη του Εργαστηρίου Βιοτεχνολογίας, για τη βοήθεια και τις χρήσιμες συμβουλές τους και τις ωραίες συζητήσεις μας στο εργαστήριο.

Ακόμα, δεν θα μπορούσα να μην ευχαριστήσω εγκάρδια τους φίλους μου εκτός εργαστηρίου, Στέλλα, Κατερίνα, Εύη, Παρασκευή, Δέσποινα, Θωμαή, Κυριάκο, Τάσο, Ειρήνη, Νικόλα, Ιωάννα και άλλους πολλούς που βοήθησαν, ο καθένας με τον δικό του τρόπο, να συνεχίζω με αισιοδοξία.

Τέλος, το πιο μεγάλο ευχαριστώ το οφείλω στους γονείς μου, Νέστορα και Στυλιάνα, για την αγάπη, τη συμπαράσταση, τη συνεχή ενθάρρυνση και την οικονομική τους στήριξη, καθώς και στην αδερφή μου, Δήμητρα, για την αγάπη της και που ήταν πάντα στο πλευρό μου βοηθώντας με να ξεπερνά κάθε δυσκολία!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	7
B. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	9
B1 ΑΛΛΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ.....	9
B1.1 Διαμάντι.....	10
B1.2 Γραφίτης.....	11
B1.3 Φουλερένια.....	13
B1.4 Νανοσωλήνες άνθρακα.....	14
B2 ΓΡΑΦΕΝΙΟ.....	17
B2.1 Δομή του γραφενίου.....	18
B2.2 Σύνθεση του γραφενίου.....	18
B2.3 Ιδιότητες του γραφενίου.....	21
B2.4 Εφαρμογές του γραφενίου.....	23
B3 ΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ.....	24
B3.1 Σύνθεση του οξειδίου του γραφενίου.....	24
B3.2 Δομή του οξειδίου του γραφενίου.....	26
B3.3 Ιδιότητες του οξειδίου του γραφενίου.....	27
B3.4 Εφαρμογές του οξειδίου του γραφενίου.....	29
B3.5 Χημική τροποποίηση του οξειδίου του γραφενίου.....	30
B4 ΟΡΓΑΝΟΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΥΒΡΙΔΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ.....	34
B4.1 Γενικά.....	34
B4.2 Οξείδιο γραφενίου με ολεϋλαμίνη.....	36
B5 ENZYMA.....	37
B5.1 Γενικά.....	37
B5.2 Εφαρμογή ενζύμων σε βιοκαταλυτικές διεργασίες.....	38
B5.3 Ενζυμική Κινητική.....	40
B5.4 Κατάταξη-ονοματολογία.....	42
B5.5 Οξειδάση της γλυκόζης (GOx).....	43
B5.6 Νανοβιοτεχνολογία.....	45
B6 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ.....	57

B6.1	Περίθλαση ακτίνων-X (XRD)	57
B6.2	Θερμική ανάλυση (DTA/TGA)	59
B6.3	Φασματοσκοπία μέσου υπερύθρου (FT-IR)	60
Γ.	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ.....	62
Γ1	ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ - ΣΥΝΘΕΣΗ ΥΛΙΚΩΝ	62
Γ1.1	Χημικά αντιδραστήρια.....	62
Γ1.2	Σύνθεση οξειδίου του γραφενίου	63
Γ1.3	Σύνθεση οργανόφιλου οξειδίου του γραφενίου με ολεϋλαμίνη.....	64
Γ1.4	Σύνθεση υδρόφιλου παραγώγου από την οξειδωση/διάσπαση οξειδίου γραφενίου-ολεϋλαμίνης με $KMnO_4$	64
Γ2	ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΕΝΖΥΜΩΝ.....	65
Γ2.1	Βιομόρια.....	65
Γ2.2	Παρασκευή stock διαλυμάτων	66
Γ2.3	Ακινητοποίηση ενζύμου με φυσικό τρόπο (φυσική προσρόφηση).....	67
Γ2.4	Προσδιορισμός ενζυμικού φορτίου (% απόδοση ακινητοποίησης).....	68
Γ2.5	Μελέτη ενζυμικής δραστηριότητας	69
Γ2.6	Μελέτη ενζυμικής δραστηριότητας της ακινητοποιημένης GOx	70
Γ2.7	Προσδιορισμός κινητικών σταθερών K_m και V_{max}	70
Γ2.8	Προσδιορισμός κινητικών σταθερών ακινητοποιημένης GOx	71
Γ2.9	Μελέτη της ενζυμικής σταθερότητας των ενζύμων	71
Γ3	ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ & ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	72
Γ3.1	Περίθλαση ακτίνων-X (XRD).....	72
Γ3.2	Θερμικές μετρήσεις (DTA/TGA).....	73
Γ3.3	Φασματοσκοπία μέσου υπερύθρου (FT-IR)	73
Δ.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	74
Δ1	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ	74
Δ1.1	Ανάλυση διαγράμματος περίθλασης ακτίνων-X (XRD)	74
Δ1.2	Ανάλυση διαγράμματος θερμικής ανάλυσης (DTA/TGA).....	75
Δ1.3	Ανάλυση φασματοσκοπίας μέσου υπερύθρου (FT-IR)	76
Δ2	ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΟΡΓΑΝΟΦΙΛΩΝ ΚΑΙ ΥΔΡΟΦΙΛΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ ΜΕ ΟΛΕΪΛΑΜΙΝΗ (o-GO-OA ΚΑΙ h-GO-OA/ $KMnO_4$)	77

Δ2.1 Ανάλυση διαγραμμάτων περίθλασης ακτίνων-X (XRD)	77
Δ2.2 Ανάλυση φασμάτων μέσου υπερύθρου (FT-IR).....	79
Δ2.3 Ανάλυση διαγραμμάτων Θερμικής Ανάλυσης (DTA/TGA)	81
Δ3 ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΣΕ ΟΡΓΑΝΟΦΙΛΑ ΚΑΙ ΥΔΡΟΦΙΛΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ	83
Δ3.1 Απόδοση ακινητοποίησης.....	83
Δ3.2 Υπολογισμός κινητικών σταθερών	85
Δ3.3 Προσδιορισμός θερμοσταθερότητας της GOx	86
Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ.....	88
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	91
Ζ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	103
Η. ABSTRACT	104
Θ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	105

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η Νανοβιοτεχνολογία, η σύνδεση δηλαδή Βιοτεχνολογίας και Νανοτεχνολογίας, είναι ένας ραγδαία αναπτυσσόμενος και πολλά υποσχόμενος κλάδος της επιστήμης και της μηχανικής, στον οποίο εφαρμόζονται τα επιτεύγματα της Νανοτεχνολογίας για τη μελέτη βιολογικών συστημάτων και την ανάπτυξη καινοτόμων τεχνολογιών. Με αφετηρία τη νανοεπιστήμη, η νανοτεχνολογία είναι η μηχανική σχεδιασμού και κατασκευής λειτουργικών δομών που η μία τουλάχιστον διάστασή τους είναι μεταξύ 1-100 nm. Η αξιοποίηση της διαφορετικής συμπεριφοράς της ύλης στη νανομετρική κλίμακα οδήγησε στην παραγωγή νέων νανοϋλικών με αξιοσημείωτες φυσικοχημικές, ηλεκτρομαγνητικές και οπτικές ιδιότητες, τα οποία έχουν ως πεδία εφαρμογής ποικίλους βιομηχανικούς τομείς. Ωστόσο, η επιστήμη της βιολογίας ήταν αυτή που όχι μόνο αποτέλεσε πεδίο εφαρμογής αλλά και έμπνευσης, καθώς η ίδια μικροκλίμακα με τα βασικά βιολογικά συστήματα, όπως, λόγου χάρη, το κύτταρο, προσέφερε ένα σημαντικό πεδίο αναζήτησης δομών και λειτουργιών που προσομοιάζουν σε αυτές των «νανομηχανών», όπως, λόγου χάρη, τα ριβοσώματα που πολυμερίζουν τα αμινοξέα σε αλυσίδα επιλέγοντας κάθε φορά ένα από αυτά και ενώνοντάς τα με συγκεκριμένη σειρά.

Το «υλικό θαύμα», το γραφένιο, αποτελεί σίγουρα το πιο πολυσυζητημένο και καλύτερα μελετημένο από οποιοδήποτε άλλο υλικό τον 21^ο αιώνα. Πρόκειται για μία μορφή άνθρακα, ένα επίπεδο φύλλο με πάχος ίσο με ένα άτομο. Είναι σχεδόν διάφανο και αποτελεί πολύ καλό αγωγό ηλεκτρισμού και τον καλύτερο από όλα τα υπόλοιπα υλικά, αγωγό θερμότητας. Επιπλέον παρά το απειροελάχιστο πάχος του, είναι τόσο πυκνό, που ούτε το ήλιο, το μικρότερο άτομο αερίου, μπορεί να το διαπεράσει. Εξίσου σημαντικό με το γραφένιο είναι στις μέρες μας και το οξειδίο του γραφενίου, ένα φυλλόμορφο υλικό που παράγεται από την οξείδωση του γραφίτη και περιέχει σημαντική ποσότητα οξυγόνου υπό τη μορφή λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια των φύλλων του. Οι λειτουργικές αυτές ομάδες (HO, COOH και C-O-C) προσδίδουν στο οξειδίο του γραφενίου υδροφιλικότητα με αποτέλεσμα αυτό να διασπείρεται σε νερό καθώς και σε αρκετούς πολικούς οργανικούς διαλύτες. Από την άλλη η προσθήκη διαφόρων ομάδων στα φύλλα του οξειδίου του

γραφενίου μέσω ομοιοπολικών ή μη ομοιοπολικών δεσμών, έχει σαν αποτέλεσμα την παραγωγή χημικά τροποποιημένου οξειδίου του γραφενίου με σκοπό τη χρήση του υλικού σε πληθώρα εφαρμογών εξαιτίας των εξαιρετικών του ιδιοτήτων. Ανάμεσα στις εφαρμογές η χρήση τους ως φορείς ακινητοποίησης ενζύμων έχει προσελκύσει το ενδιαφέρον της επιστημονικής κοινότητας. Η ακινητοποίηση των ενζύμων μπορεί να οριστεί ως ο περιορισμός των μορίων του ενζύμου σε μια στερεή μήτρα/υποδομή διαφορετική από εκείνη στην οποία υπάρχουν το υπόστρωμα ή τα προϊόντα. Η ακινητοποίηση των ενζύμων σε νανοδομές άνθρακα -κυρίως νανοϋλικά μεγάλης επιφάνειας- υπερτερεί σε σχέση με την ακινητοποίησή τους σε συμβατικά υλικά, καθώς, χάρη στα πλεονεκτήματα των νανοϋλικών, όπως η ικανότητά τους να διευκολύνουν την κίνηση ηλεκτρονίων, η ομοιότητά τους σε μέγεθος με τα μόρια του ενζύμου, η αυξημένη ενεργή επιφάνειά τους που επιτρέπει την ακινητοποίηση περισσότερων ενζύμων, βελτιώνουν τις ενζυμικές ιδιότητες στα νανοβιοκαταλυτικά συστήματα, ιδιαίτερα όσον αφορά στην ενζυμική σταθερότητα και δραστικότητα.

Στην παρούσα εργασία έγινε μελέτη της ακινητοποίησης της οξειδάσης της γλυκόζης σε οργανόφιλα και υδρόφιλα παράγωγα του οξειδίου του γραφενίου. Πιο συγκεκριμένα, αρχικά παρασκευάστηκε οργανόφιλο οξύ του γραφενίου με ολεϋλαμίνη, και στη συνέχεια έγινε ανάπτυξη ενός υδρόφιλου παραγώγου το οποίο προέκυψε από την οξείδωση/διάσπαση οξειδίου γραφενίου-ολεϋλαμίνης με KMnO_4 . Τα δύο αυτά νανοδομικά συστήματα χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς για την ακινητοποίηση της οξειδάσης της γλυκόζης. Ακολούθησε μελέτη της ενζυμικής δραστικότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου η οποία περιελάμβανε προσδιορισμό του ενζυμικού φορτίου, υπολογισμό των κινητικών σταθερών καθώς και μελέτη της θερμοσταθερότητας του ενζύμου. Τα αρχικά υλικά χαρακτηρίστηκαν με ένα συνδυασμό πειραματικών τεχνικών συμπεριλαμβανομένων της περίθλασης ακτίνων-X (XRD), της φασματοσκοπίας μέσου υπέρυθρου (FTIR) και μετρήσεων θερμικής ανάλυσης (DTA/TGA).

B. ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

B1 ΑΛΛΟΤΡΟΠΙΚΕΣ ΜΟΡΦΕΣ ΤΟΥ ΑΝΘΡΑΚΑ

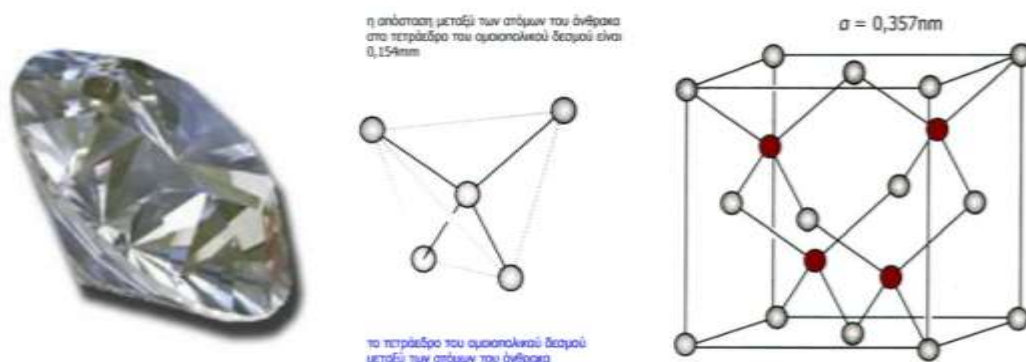
Ο άνθρακας, ένα από τα λίγα χημικά στοιχεία που είναι γνωστά από την αρχαιότητα, είναι το 4ο σε αφθονία χημικό στοιχείο (κατά μάζα) στο σύμπαν, μετά το υδρογόνο, το ήλιο και το οξυγόνο και είναι αδιαμφισβήτητα το πιο ενδιαφέρον στοιχείο του περιοδικού πίνακα μιας και αποτελεί τη βάση του DNA και ολόκληρης της ζωής πάνω στη γη. Στη φύση βρίσκεται είτε ελεύθερος με τη μορφή των γαιανθράκων, του διαμαντιού και του γραφίτη (φυσικοί άνθρακες) είτε με τη μορφή ενώσεων, κυρίως ανθρακικών αλάτων, όπως το ανθρακικό ασβέστιο (CaCO_3), και οξειδίων του άνθρακα, όπως το μονοξείδιο (CO) και το διοξείδιο του άνθρακα (CO_2). Με τη μορφή ενώσεων (αμινοξέα, πρωτεΐνες, υδατάνθρακες, λιπίδια, DNA, RNA) τον συναντάμε επίσης στους οργανισμούς και στα προϊόντα της αποσύνθεσής τους, όπως το πετρέλαιο, το φυσικό αέριο και το βιοαέριο. Διαθέτει τέσσερα μονήρη ηλεκτρόνια στην εξωτερική του στοιβάδα και για τον λόγο αυτό μπορεί να ενωθεί με άτομα άλλων στοιχείων και μπορεί να σχηματίσει αναρίθμητες οργανικές ενώσεις. Ένα άλλο χαρακτηριστικό του άνθρακα είναι ότι εμφανίζεται σε διάφορες αλλοτροπικές μορφές που είναι πολύ σταθερές χημικά και απαιτούν υψηλή θερμοκρασία για να αντιδράσουν με το οξυγόνο ή άλλα στοιχεία και ενώσεις.

Η ικανότητα ενός στοιχείου να σχηματίζει αλλοτροπικές μορφές δεν είναι αποκλειστικό χαρακτηριστικό του άνθρακα. Άλλα στοιχεία της τέταρτης ομάδας του περιοδικού πίνακα, όπως το πυρίτιο ή το γερμάνιο έχουν επίσης αυτή την ιδιότητα. Ωστόσο, ο άνθρακας είναι ιδιαίτερος ως προς τον αριθμό και την ποικιλία των αλλοτροπικών μορφών που σχηματίζει. Οι σημαντικότερες αλλοτροπικές μορφές του είναι:

B1.1 Διαμάντι

Τα διαμάντια είναι καθαρές μορφές άνθρακα που χρησιμοποιούνται ως πολύτιμοι λίθοι στην κατασκευή κοσμημάτων, στο κόψιμο του γυαλιού και στο τρύπημα σκληρών πετρωμάτων. Είναι ιδιαίτερης σημασίας μορφή άνθρακα καθώς χαρακτηρίζεται από εξαιρετικές ιδιότητες:

- Έχει την υψηλότερη θερμική αγωγιμότητα από οποιοδήποτε στερεό σε θερμοκρασία δωματίου, πέντε φορές μεγαλύτερη από αυτή του χαλκού
- Είναι ιδανικό οπτικό υλικό ικανό να μεταδώσει φως από το μακρύ υπέρυθρο μέχρι το υπεριώδες ενώ έχει ασυνήθιστα μεγάλο δείκτη διάθλασης
- Είναι με διαφορά το σκληρότερο γνωστό υλικό (10 στην κλίμακα σκληρότητας Mohs).



Σχήμα B1 Το διαμάντι και η κρυσταλλική δομή του

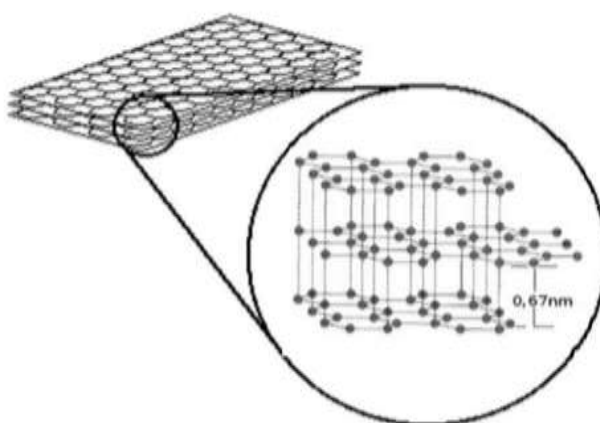
Στο διαμάντι κάθε άτομο άνθρακα ενώνεται με τα γειτονικά του μέσω υβριδικών sp^3 δεσμών σχηματίζοντας ένα κανονικό τετράεδρο με ίσες μεταξύ τους γωνίες (Σχήμα B1). Τα άτομα ισαπέχουν μεταξύ τους με μήκος δεσμού 0.154nm και ενέργεια 711kJ/mol. Ως αποτέλεσμα, το διαμάντι έχει μια τρισδιάστατη κρυσταλλική δομή. Η κρυσταλλική δομή του διαμαντιού μπορεί να αναπαρασταθεί από ένα εδροκεντρωμένο πλέγμα Bravais με βάση δύο όμοια άτομα στις θέσεις (0,0,0) και (1/4,1/4,1/4). Κάθε μοναδιαία κυψελίδα

διαμαντιού έχει επομένως 8 άτομα. Τέτοια δομή εκτός από το διαμάντι είναι κοινή και στους ημιαγωγούς, όπως το γερμάνιο ή το πυρίτιο. Επιπλέον, η πυκνότητα του, ίση με $3,515 \text{ g / cm}^3$, είναι μεγαλύτερη από αυτή του γραφίτη, ίση με $2,26 \text{ g / cm}^3$.

B1.2 Γραφίτης

Ο γραφίτης είναι ορυκτή πολυμορφική μορφή του άνθρακα. Η ονομασία του γραφίτη δόθηκε από τον Abraham Gottlob Werner το 1789 και προήλθε από το αρχαίο ελληνικό 'γράφειν' που σημαίνει να γράφεις, λόγω της χρήσης του στο μολύβι όπου κοινώς ονομάζεται μολυβδος (δεν πρέπει να συγχέεται με το μεταλλικό στοιχείο, μόλυβδος) (Ενωτιάδης, 2011).

Ακόμη, ο γραφίτης αποτελεί την πιο συνηθισμένη μορφή του άνθρακα αλλά και την πιο σταθερή δομή υπό κανονικές συνθήκες. Η δομή του σχηματίζεται όταν άτομα άνθρακα συνδέονται μεταξύ τους με ισχυρούς δεσμούς σχηματίζοντας έτσι ένα εξαγωνικό πλέγμα. Έτσι σχηματίζονται τα επίπεδα φύλλα γραφίτη που στέκονται παράλληλα το ένα πάνω στο άλλο δεμένα με ασθενείς δυνάμεις van der Waals (Σχήμα B2). Τα στρώματα άνθρακα στον γραφίτη είναι γνωστά ως στρώματα γραφενίου. Η δομή αυτή καθιστά τον γραφίτη μαλακό και του επιτρέπει να σχίζεται σε φυλλάκια (νιφάδες) πολύ εύκολα, ενώ οι συνήθεις σχηματισμοί του στη φύση είναι επίσης πλακώδεις. Εμφανίζεται, όμως, και σε στηλοειδείς, ακτινωτές και ακανόνιστες συμπαγείς μάζες.



Σχήμα B2 Η δομή του γραφίτη

Πιο συγκεκριμένα, στον γραφίτη κάθε άτομο άνθρακα συνδέεται ομοιοπολικά με τρία άτομα άνθρακα έτσι ώστε να σχηματίζεται τριγωνική γεωμετρία. Η γωνία μεταξύ του δεσμού αυτού είναι 120° . Κάθε άτομο άνθρακα στον γραφίτη έχει sp^2 υβριδισμό. Τρία από τα τέσσερα ηλεκτρόνια σθένους κάθε ατόμου άνθρακα χρησιμοποιούνται για τον σχηματισμό δεσμού με τρία άλλα άτομα άνθρακα, ενώ το τέταρτο ηλεκτρόνιο είναι ελεύθερο να κινηθεί μέσα στη δομή του γραφίτη. Βασικές τριγωνικές μονάδες ενώνονται ώστε να δώσουν βασικό εξαγωνικό δακτύλιο. Στον εξαγωνικό δακτύλιο, το μήκος δεσμού C-C είναι $1,42 \text{ \AA}$. Στον γραφίτη οι δακτύλιοι αυτοί σχηματίζουν επίπεδα, τα οποία είναι τοποθετημένα παράλληλα το ένα πάνω στο άλλο και μπορούν να ολισθαίνουν μεταξύ τους καθιστώντας έτσι τον γραφίτη ένα καλό λιπαντικό και υλικό για μολύβια. Η απόσταση μεταξύ αυτών των επιπέδων είναι $3,35 \text{ \AA}$ και συγκρατούνται μεταξύ τους μόνο με ασθενείς δυνάμεις van der Waals που παράγονται από απεντοπισμένους π -δεσμούς. Οι π -δεσμοί σχηματίζονται από το τέταρτο ηλεκτρόνιο κάθε ατόμου άνθρακα και απλώνονται ομοιόμορφα πάνω από όλα τα άτομα άνθρακα. Λόγω αυτού, ο γραφίτης άγει τον ηλεκτρισμό (Chung, 2002).

Οι ιδιότητες του γραφίτη συνοψίζονται ως εξής :

- κρυσταλλικό στερεό με χρώμα σκούρο γκρι και θαμπή μεταλλική λάμψη
- χημικά αδρανές υλικό, δηλαδή δεν αντιδρά με χημικά αντιδραστήρια, όπως οξέα, οργανικές ενώσεις, οξειδωτικά, κ.ά.
- μαλακό (τα φύλλα ολισθαίνουν μεταξύ τους) και αδιαφανές υλικό
- καλός αγωγός του ηλεκτρισμού
- καλό υλικό για λίπανση
- πυκνότητα $2,2 \text{ g/cm}^3$.

Όσον αφορά τις χρήσεις του γραφίτη είναι οι εξής:

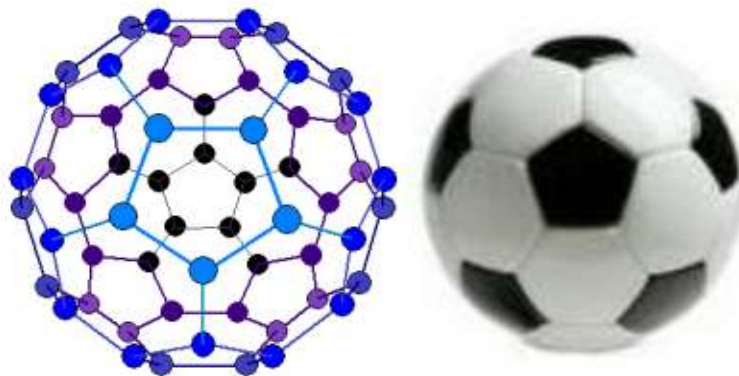
- ως λιπαντικό
- στην προετοιμασία ηλεκτροδίων, αφού άγει τον ηλεκτρισμό.
- ως μετριάστης στους πυρηνικούς αντιδραστήρες.

- λόγω της υψηλής θερμοκρασίας τήξης, χρησιμοποιείται σε χυτήρια για την παρασκευή χάλυβα υψηλής ποιότητας (Διαμαντή, 2014).

B1.3 Φουλερένια

Τα φουλερένια ανακαλύφθηκαν το 1985 από τους H. W. Kroto, J. R. Heath, S. C. O'Brien, R. F. Curl και R. E. Smalley (Kroto, 1988. Kroto et al., 1985), όπου το 1996 τιμήθηκαν με το Νόμπελ Χημείας για αυτή τους την ανακάλυψη. Αναφορές στα μόρια αυτά υπήρχαν από διάφορους ερευνητές και πριν το 1985, όμως δεν είχε δοθεί ιδιαίτερη προσοχή λόγω του ότι αυτές στερούνταν πειραματικών δεδομένων. Σε αντίθεση με το διαμάντι και τον γραφίτη όπου η δομή τους παράγεται από ένα εκτεταμένο τρισδιάστατο συνδυασμό των ατόμων άνθρακα που μπορεί θεωρητικά να λάβει απεριόριστη έκταση, τα φουλερένια διαθέτουν συγκεκριμένες διαστάσεις που καθορίζονται από τον αριθμό του κάθε μέλους της ομόλογης σειράς.

Τα φουλερένια αποτελούνται από ένα συνδυασμό πενταμελών και εξαμελών δακτυλίων. Λόγω των πενταμελών δακτυλίων τα φουλερένια εμφανίζουν καμπυλότητα, σε αντίθεση με τον γραφίτη, όπου η παρουσία μόνο εξαμελών δακτυλίων δεν του προσδίδει αυτή την ιδιότητα. Το μικρότερο, σταθερό και συγχρόνως το μεγαλύτερης αφθονίας φουλερένιο είναι το C_{60} (Buckminsterfullerene) που έχει σχήμα μπάλας ποδοσφαίρου (Σχήμα B3).



Σχήμα B3 Το C_{60} -Buckminsterfullerene και ίδιου σχήματος μπάλα ποδοσφαίρου

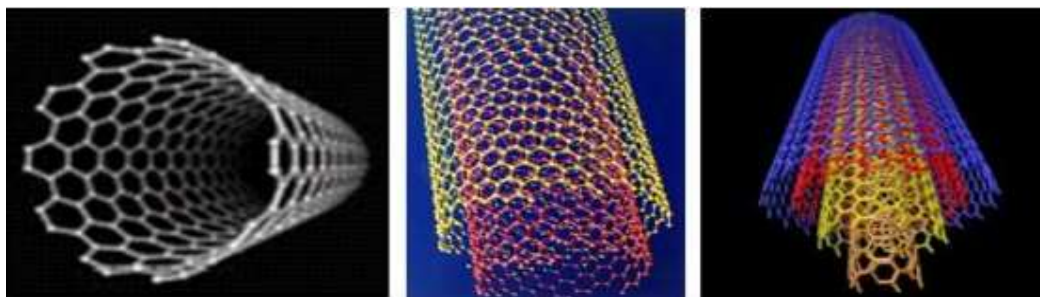
Η ανακάλυψη του C₆₀ ήταν στην ουσία ένα τυχαίο γεγονός: ο R. E. Smalley μελετούσε τον σχηματισμό συσσωματωμάτων κατά την εξάχνωση φύλλων γραφίτη με ακτινοβολία laser (Dietz et al., 1981). Ωστόσο το 1990 οι W. Krätschmer, L. D. Lamb, K. Fostiropoulos και D. R. Huffman (Krätschmer et al., 1990) απομόνωσαν για πρώτη φορά το C₆₀ και προχώρησαν σε χαρακτηρισμό του με φασματοσκοπία υπερύθρου και περίθλαση ακτινών X, κάτι το οποίο πυροδότησε το ενδιαφέρον των επιστημόνων και αποτέλεσε την απαρχή για την έρευνα στο πεδίο των φουλερενίων. Για την επίτευξη του σκοπού τους, η τεχνική που χρησιμοποίησαν βασίστηκε στη θέρμανση ράβδων γραφίτη σε υψηλές θερμοκρασίες υπό ατμόσφαιρα He κατάλληλης πίεσης και το προϊόν απομονώθηκε με εξάχνωση ή εκχύλιση με βενζόλιο (Krätschmer, Fostiropoulos & Huffman, 1990).

Ο συνδυασμός των μοναδικών δομικών, φυσικοχημικών και ηλεκτρονιακών ιδιοτήτων των φουλερενίων σε συνδυασμό με τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά των ομάδων που μπορούν να προστεθούν κατά τη χημική τροποποίησή τους μπορεί να οδηγήσει στην ανάπτυξη νέων υλικών με τεράστια δυναμική σε ευρέως διαδεδομένες και εντυπωσιακές τεχνολογικές και βιολογικές εφαρμογές (Tagmatarchis & Prato, 2004). Έχει παρασκευαστεί πλήθος οργανοφουλερενικών υλικών με ευοίωνες προοπτικές αναφορικά με εφαρμογές στη νανοτεχνολογία και τη βιοτεχνολογία. Όπως σε ηλεκτρονικές και οπτοηλεκτρονικές συσκευές (Komatsu et al., 1993), φωτοβολταϊκά (Sariciftci et al., 1992), LEDs (light emitting diodes), θερμοτροπικούς υγρούς κρυστάλλους, αισθητήρες, μέσα αποθήκευσης της πληροφορίας, καθώς και στη φωτοδιάσπαση του DNA, στην παρεμπόδιση της HIV πρωτεάσης (Bosi et al., 2003) και στην πυρηνική ιατρική.

B1.4 Νανοσωλήνες άνθρακα

Οι νανοσωλήνες άνθρακα (Carbon Nanotubes ή εν συντομία CNTs) ανακαλύφθηκαν το 1991 από τον Dr. Sumio Iijima (Iijima, 1991) ως προϊόν της εκκένωσης τόξου επάνω στα ηλεκτρόδια γραφίτη. Συγκεκριμένα παρατήρησε πως στα ηλεκτρόδια εναποτίθενται ίνες άνθρακα με εξωτερικές διαμέτρους μεταξύ 4-30 μm και μήκος περίπου 1 mm. Η δομή των ινών αυτών, που εμφάνιζαν υψηλό βαθμό γραφίτιοποίησης, αποτελούνταν από

κοίλους, διαδοχικούς, ομοαξονικούς γραφιτικούς κυλίνδρους διαφορετικής διαμέτρου, με τον στενότερο εξ αυτών να έχει διάμετρο που σε ορισμένες περιπτώσεις έφτανε και τα 2,2 nm. Ο ίδιος έδωσε στη νέα αυτή δομή την ονομασία «νανοσωλήνες άνθρακα» καθώς η διάμετρος των νέων αυτών υλικών ήταν της τάξης των νανομέτρων.



Σχήμα B4 Κατηγορίες νανοσωλήνων άνθρακα: μονού, διπλού και πολλαπλού τοιχώματος

Με βάση τον αριθμό των γραφιτικών τοιχωμάτων που τους απαρτίζουν, οι CNTs ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες (Σχήμα B4) :

- τους νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος (Single Wall Carbon Nanotubes ή εν συντομία SWCNTs),
- τους νανοσωλήνες άνθρακα διπλού τοιχώματος (Double Wall Carbon Nanotubes ή εν συντομία DWCNTs),
- τους νανοσωλήνες άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος (Multi Wall Carbon Nanotubes ή εν συντομία MWCNTs).

Μεταξύ των διαφόρων μεθόδων ανάπτυξης CNTs που έχουν αναφερθεί μέχρι σήμερα, οι τρεις πιο διαδεδομένες παραμένουν: α) Η **ηλεκτρική εκκένωση τόξου** που είναι η τεχνική με την οποία οι νανοσωλήνες παρήχθησαν για πρώτη φορά (Krätschmer et al., 1990). β) Η **εξάχνωση με laser** η οποία τροποποιήθηκε και χρησιμοποιήθηκε για την παραγωγή φουλερενίων και CNTs από τον Smalley και τους συνεργάτες του (Krätschmer et al., 1990. Thess et al., 1996). Η συγκεκριμένη μέθοδος έχει αρκετά πλεονεκτήματα όπως η υψηλή ποιότητα των παραγόμενων CNTs, ο έλεγχος της διαμέτρου τους και η διερεύνηση των δυναμικών παραμέτρων ανάπτυξή τους. γ) Η **καταλυτική χημική εναπόθεση ατμών** που αποτελεί, ίσως, την πιο διαδεδομένη μέθοδο σύνθεσης CNTs, κατά

την οποία ένας επιλεγμένος αέριος υδρογονάνθρακας αποσυντίθεται θερμικά παρουσία μεταλλικού καταλύτη. Γενικά, παρέχει τη δυνατότητα να ελεγχθούν και να προσαρμοσθούν πολλαπλές δομικές παράμετροι των συντιθέμενων CNTs όπως η διάμετρος (Li et al., 2004. Cheung et al., 2002) -και ως εκ τούτου η χειρικήτητα (Ago et al., 2005)- το μήκος (Zhao et al., 2006. Li et al., 2001) και η διευθέτησή τους (Li et al., 1996. Lee & Park, 2001).

Οι ιδιότητες των CNTs καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από τη σχεδόν μονοδιάστατη δομή τους και τη διευθέτηση του γραφιτικού πλέγματος κατά μήκος του διαμήκη άξονά τους. Οι μηχανικές ιδιότητες κατατάσσουν τους νανοσωλήνες άνθρακα ανάμεσα στα πιο ανθεκτικά και δύσκαμπτα υλικά με μεγάλη ελαστικότητα, εξαιτίας των δεσμών μεταξύ των ατόμων άνθρακα. Οι ηλεκτρικές ιδιότητες των νανοσωλήνων άνθρακα καθορίζονται από τον τρόπο που είναι δομημένα τα εξάγωνα στο πλέγμα του κυλίνδρου, δηλαδή από τον αριθμό των ελίκων των τοιχωμάτων στους MWNTs. Χαρακτηριστικό γνώρισμα των νανοσωλήνων είναι η μεγάλη θερμική σταθερότητα (Baughman, Zakhidov & De Heer, 2002). Επίσης, παρουσιάζουν μεγαλύτερη θερμική αγωγιμότητα από αυτή του διαμαντιού και του γραφίτη.

Μία ακόμη ιδιότητα των νανοσωλήνων άνθρακα είναι η μικρή χημική δραστηριότητα, η οποία οφείλεται στο ότι τα ηλεκτρόνια είναι απεντοπισμένα και όσο μεγαλώνει η επιφάνεια τόσο μειώνεται η δραστηριότητα, αφού μειώνεται και η πιθανότητα να βρεθεί θέση με θετικό φορτίο ώστε να γίνει δεσμός. Τέλος, οι νανοσωλήνες άνθρακα εμφανίζουν ελάχιστη ή καθόλου διαλυτότητα, γεγονός που οφείλεται στο μέγεθός τους, στη χαμηλή χημική δραστηριότητα αλλά και στην τάση που έχουν να σχηματίζουν μεταξύ τους συσσωματώματα.

Λόγω των ιδιοτήτων τους οι νανοσωλήνες άνθρακα βρίσκουν εφαρμογές ως:

- νανο-ανιχνευτές (nano-probes) και νανο-αισθητήρες (nano-sensors) (Bourlon et al., 2007. Tang et al., 2006).
- νανο-υλικά ενίσχυσης (nano-fillers) πολυμερικών, κεραμικών και μεταλλικών μητρών (Litina et al., 2006. Yamamoto et al., 2007)

- νανο-υλικά για ενεργειακές εφαρμογές (ηλεκτρόδια μπαταριών (Chen et al., 2007), υλικά αποθήκευσης υδρογόνου (Hirscher & Becher, 2003), κελιά καυσίμου (Liang et al., 2005),
- νανο-εκμαγεία (nano-templates) (Liao et al., 2007) για τη σύνθεση υβριδικών και μη νανοδομών
- νανο-υλικά για βιοτεχνολογικές εφαρμογές (Bianco, Kostarelos & Prato, 2005)
- νανο-υλικά για την κατασκευή διατάξεων εκπομπής ηλεκτρονίων (Kim, 2005).

B2 ΓΡΑΦΕΝΙΟ

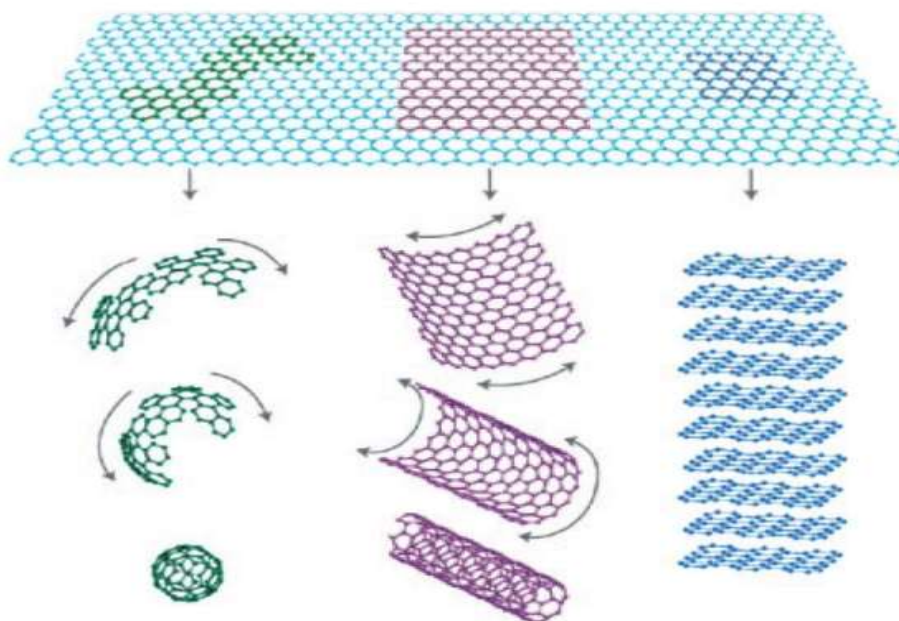
Το γραφένιο (Graphene) είναι ένα μονοατομικό φύλλο γραφίτη με πάχος μικρότερο από ένα εκατομμυριοστό του χιλιοστού. Ουσιαστικά είναι ένα ενιαίο στρώμα ατόμων άνθρακα που τακτοποιούνται σε ένα εξαγωνικό δικτυωτό πλέγμα. Αυτή η δομή δημιουργεί ένα πάρα πολύ ισχυρό δισδιάστατο υλικό, τόσο ισχυρό όσο διακόσιες φορές η αντοχή του χάλυβα καθιστώντας το γραφένιο το ανθεκτικότερο υλικό στη φύση.

Ο όρος γραφένιο επινοήθηκε το 1962 από τον Hans-Peter Boehm, σαν ένας συνδυασμός της ονομασίας του γραφίτη (graphite) με μία κατάληξη -ene, περιγράφοντας έτσι μονοστρωματικά φύλλα άνθρακα (Geim & Novoselov, 2007).. Το γραφένιο είναι γνωστό εδώ και αρκετές δεκαετίες (Boehm et al., 1962. Wintterlin & Bocquet, 2009. Van Bommel, Crombeen & Van Tooren, 1975. Lu et al., 1999.), η δυσκολία, όμως, της απομόνωσής του δεν άφηνε περιθώρια για τη μελέτη των εξαιρετικών του ιδιοτήτων καθώς και τη χρήση του σε διάφορες εφαρμογές.

Το 2004 ήταν η χρονιά που οι A. Geim και K. Novoselov (Novoselov et al., 2004) κατάφεραν να απομονώσουν ένα φύλλο γραφενίου και μελέτησαν τις ηλεκτρικές του ιδιότητες. Από τότε και μετά έγινε μια πραγματική επανάσταση στην επιστήμη για τη μελέτη αυτού του υλικού. Το 2010 οι δύο αυτοί επιστήμονες τιμήθηκαν με το βραβείο Νόμπελ Φυσικής.

B2.1 Δομή του γραφενίου

Το γραφένιο αποτελείται από ένα δισδιάστατο (2D) μονοατομικού πάχους φύλλο sp^2 υβριδισμένων ατόμων άνθρακα σε εξαγωγική διάταξη με πάχος μόλις 0.34 nm (Dong & Chen, 2010) και αποτελεί το βασικό δομικό στοιχείο του γραφίτη (3D), των νανοσωλήνων άνθρακα (1D) και των φουλερενίων (0D) (Σχήμα B5).

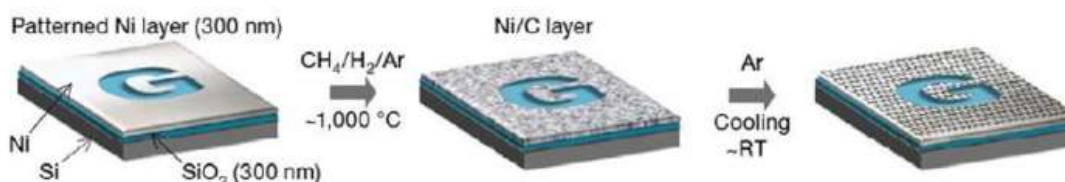


Σχήμα B5 Σχηματική απεικόνιση των διάφορων υπερδομών άνθρακα που σχηματίζονται από ένα φύλλο γραφενίου

B2.2 Σύνθεση του γραφενίου

Μεγάλο πλήθος τεχνικών και μεθόδων σύνθεσης του γραφενίου έχει αναπτυχθεί τα τελευταία χρόνια. Η πιο διάσημη και εύκολη μέθοδος για να παράγει κάποιος ένα ατομικό φύλλο γραφενίου είναι αυτή της *μικρομηχανικής αποφυλλοποίησης*. Σε αυτή τη μέθοδο, το αρχικό υλικό είναι ο υψηλού βαθμού διάταξης πυρολυτικός γραφίτης (highly ordered pyrolytic graphite, HOPG) από τον οποίο αποκολλάται με χρήση κολλητικής ταινίας ένα φύλλο γραφίτη και στη συνέχεια μεταφέρεται σε ένα υπόστρωμα πυριτίου για περαιτέρω μελέτη και εφαρμογή (Novoselov et al., 2004). Παρά την ευκολία αυτής της μεθόδου δεν

είναι δυνατόν να παραχθεί καλής ποιότητας και μεγάλου μεγέθους γραφένιο. Για τον λόγο αυτό έχουν γίνει εκτεταμένες έρευνες και προσπάθειες για μια πιο αποτελεσματική μέθοδο.



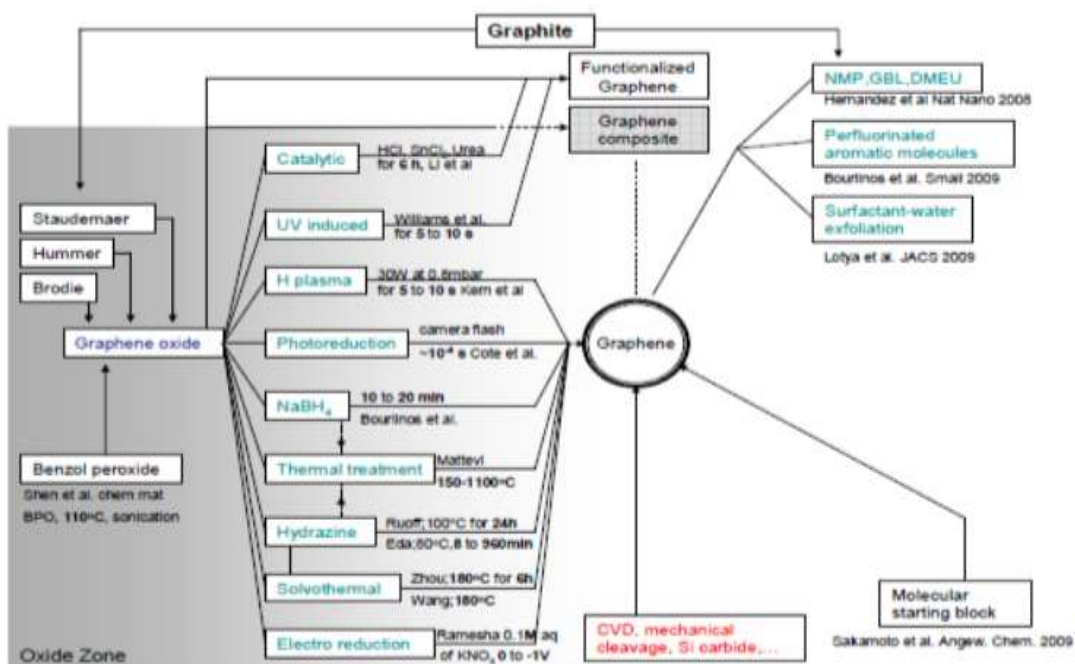
Σχήμα B6: Σύνθεση γραφενίου με τη μέθοδο της χημικής εναπόθεσης ατμών

Σημαντικές μελέτες έχουν γίνει για την παραγωγή του γραφενίου με τη μέθοδο της χημικής εναπόθεσης ατμών (CVD) με διαφορετικά υποστρώματα μετάλλων μετάπτωσης (Ni, Cu, Co και Ru) καθώς επίσης και με διαφορετικούς υδρογονάνθρακες (Σχήμα B6) (Reina et al., 2009. Kim et al., 2009). Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι με αυτή τη μέθοδο μπορεί να επιτευχθεί η λήψη ενός ή δύο φύλλων γραφενίου. Υπάρχει όμως ένα σημαντικό μειονέκτημα, τα παραγόμενα φύλλα γραφενίου δεν μπορούν να απομονωθούν-αποκολληθούν από το υπόστρωμα.

Από τις πιο διαδεδομένες μεθόδους που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή γραφενίου είναι η αναγωγή του οξειδίου του γραφενίου. Το οξύδιο του γραφενίου (Graphene Oxide) είναι ένα φυλλόμορφο υλικό που παράγεται από την οξείδωση του γραφίτη και περιέχει σημαντική ποσότητα οξυγόνου υπό τη μορφή λειτουργικών ομάδων (υδροξυ-, εποξυ-, καρβοξυ-ομάδες) στην επιφάνεια των φύλλων του (αναλύεται εκτενέστερα στο επόμενο κεφάλαιο). Η αναγωγή περιλαμβάνει χημικές ή και άλλες μεθόδους στις οποίες, έχουμε την αποχώρηση των ομάδων που περιέχουν οξυγόνο λαμβάνοντας έτσι φύλλα γραφενίου. Το γραφένιο που λαμβάνεται με αυτή τη μέθοδο περιέχει αρκετές ατέλειες στο γραφιτικό πλέγμα και υβριδισμένα sp^3 άτομα άνθρακα. Για την αποκατάσταση του γραφιτικού πλέγματος ακολουθούνται συνήθως διαδικασίες ανόπτησης σε υψηλή θερμοκρασία υπό κενό ή υπό ροή αέριων υδρογονανθράκων.

Άλλες τεχνικές με τις οποίες μπορούμε να παράγουμε από ένα μέχρι δέκα φύλλα γραφενίου είναι με επιταξιακή ανάπτυξη σε SiC ή σε μεταλλικά υποστρώματα (Berger et

al., 2004. Rollings et al., 2006. Sutter, Flege & Sutter, 2008.), με εκκένωση τόξου (Subrahmanyam et al., 2009. Li et al., 2010), ύστερα από τον κατά μήκος σχισμό των νανοσωλήνων άνθρακα πολλαπλού τοιχώματος με διάφορες τεχνικές (Kosynkin et al., 2009. Jiao et al., 2009. Cano-Marquez et al., 2009), με μια παραλλαγή της υδροθερμικής μεθόδου (solvothermal procedure) (Choucair, Thordarson & Stride, 2009) και με μετατροπή σκόνης νανοδιαμαντιού με θερμική κατεργασία (Andersson et al., 1998. Subrahmanyam et al., 2008). Επίσης έχει πραγματοποιηθεί χημική σύνθεση γραφενίου με τη μορφή κορδέλας-ταινίας (ribbon) (Yang et al., 2008). Απλή και αρκετά αποτελεσματική είναι η παραγωγή γραφενίου που προκύπτει από τη διασπορά του γραφίτη σε διάφορους διαλύτες (σήμερα οι δύο πιο διαδεδομένοι διαλύτες είναι το διμεθυλοφορμαμίδιο και η πυριδίνη) (Bourlinos et al., 2009. Liang et al., 2009). Τέλος, μονοατομικά υμένια γραφενίου έχουν αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας την τεχνική Langmuir-Blodgett (Cote, Kim & Huang, 2009. Gengler et al., 2010). Στο Σχήμα B7 παρουσιάζονται γραφικά σχεδόν όλες οι τεχνικές με τις οποίες έχει παραχθεί γραφένιο (Gengler, Spyrou & Rudolf, 2010).



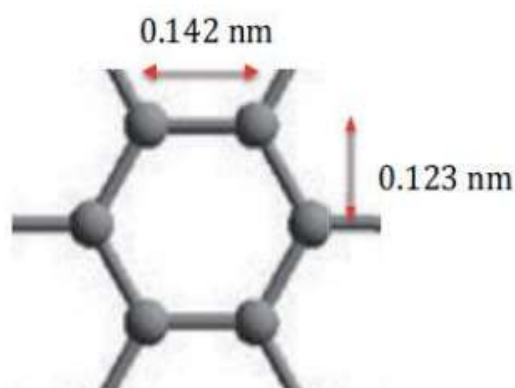
Σχήμα B7 Τεχνικές παραγωγής υψηλής ποιότητας γραφενίου

B2.3 Ιδιότητες του γραφενίου

Το γραφένιο είναι ένα υλικό με εξέχουσες ιδιότητες, γεγονός που το καθιστά συναρπαστικό τόσο για βασικές μελέτες όσο και για μελλοντικές εφαρμογές. Οι κύριες ιδιότητές του παρουσιάζονται παρακάτω.

➤ Φυσικές ιδιότητες

Η ειδική επιφάνεια του γραφενίου έχει βρεθεί θεωρητικά ότι είναι ($2.630 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$) (Chae et al., 2004), ενώ η τιμή που έχει μετρηθεί με τη μέθοδο Brunauer–Emmett–Teller (BET) σε δείγματα που έχουν παραχθεί με διάφορες τεχνικές κυμαίνεται από 270 μέχρι $1550 \text{ m}^2\text{g}^{-1}$ (Rao et al., 2009). Η πυκνότητά του έχει υπολογιστεί ίση με 0.77 mg m^{-2} εφόσον, κάθε εξαγωνική μονάδα του πλέγματος του γραφενίου περιλαμβάνει δύο άτομα άνθρακα και έχει εμβαδόν $0,052 \text{ nm}^2$ (Σχήμα B8).



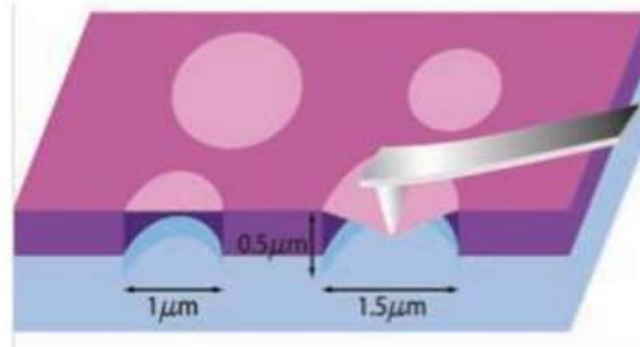
Σχήμα B8 Η μοναδιαία εξαγωνική μονάδα στο φύλλο του γραφενίου

➤ Οπτικές ιδιότητες

Το γραφένιο είναι σχεδόν διαφανές, έχει εξαιρετική οπτική διαπερατότητα 97,7% (απορροφά μόνο 2,3 % της έντασης του φωτός), ανεξάρτητα από το μήκος κύματος της οπτικής περιοχής. Η τιμή αυτή δίνεται από τον πολύ απλό τύπο $\pi \alpha$, όπου το $\alpha = e^2/\hbar c \approx 1/137$. Έτσι, υπάρχουν υπόνοιες ότι το γραφένιο δεν έχει χρώμα (Nair et al., 2008).

➤ **Μηχανικές ιδιότητες**

Για τον προσδιορισμό των μηχανικών ιδιοτήτων του γραφενίου έχει χρησιμοποιηθεί ένα νανοσκληρόμετρο μικροσκοπίου ατομικής δύναμης (Σχήμα Β9) και βρέθηκε ότι έχει μέτρο Ελαστικότητας 1.0 TPa και αντοχή σε θραύση 42 N m^{-2} .



Σχήμα Β9 Σχηματική απεικόνιση της μέτρησης των μηχανικών ιδιοτήτων ενός φύλλου γραφενίου με χρήση νανοσκληρόμετρου AFM

➤ **Ηλεκτρικές ιδιότητες**

Το γραφένιο είναι εντελώς διαφορετικό από τα περισσότερα συμβατικά τρισδιάστατα υλικά. Είναι ένα ημιμέταλλο ή μηδενικού χάσματος ημιαγωγός και παρουσιάζει αμφιπολικό φαινόμενο επίδρασης πεδίου όπου οι φορείς μεταφοράς φορτίου μπορούν να εναλλάσσονται μεταξύ ηλεκτρονίων και οπών (Novoselov et al., 2004), ενώ η κινητικότητα των φορέων αγωγιμότητας είναι $200\,000 \text{ cm}^2\text{v}^{-1}\text{s}^{-1}$ (Bolotin et al., 2008. Morozov et al., 2008).

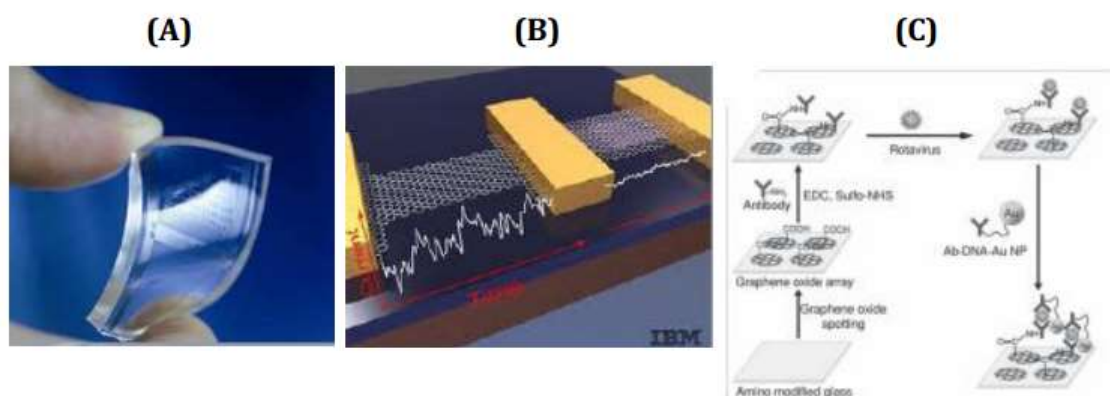
➤ **Θερμικές ιδιότητες**

Όλες οι αλλοτροπικές μορφές του άνθρακα εξαιτίας του ισχυρού δεσμού C-C παρουσιάζουν υψηλή θερμική αγωγιμότητα. Μέχρι πρόσφατα οι νανοσωλήνες άνθρακα μονού τοιχώματος παρουσίαζαν την υψηλότερη τιμή θερμικής αγωγιμότητας με $3500 \text{ Wm}^{-1} \text{ K}^{-1}$. Πλέον το γραφένιο κατέχει τα πρωτεία με την υψηλότερη τιμή που είναι περίπου $5000 \text{ Wm}^{-1} \text{ K}^{-1}$ (Balandin et al., 2008).

B2.4 Εφαρμογές του γραφενίου

Το γραφένιο εξαιτίας των εξαιρετικών του ιδιοτήτων είναι πολλά υποσχόμενο για πλήθος εφαρμογών:

- Στον χώρο της νανοηλεκτρονικής μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την κατασκευή εύκαμπτων ηλεκτρονικών διατάξεων (Σχήμα B10.A), ταχύτερων και μικρότερων τρανζίστορς με λιγότερη κατανάλωση ενέργειας και απώλεια θερμότητας σε σχέση με τα τρανζίστορ πυριτίου (Σχήμα B10.B) (Schedin et al., 2007. Mazdak, 2009).
- Επίσης ως διαφανή αγώγιμα ηλεκτρόδια για φωτοβολταϊκά συστήματα και διατάξεις υγρών κρυστάλλων (Li et al., 2009. Cai et al., 2009).
- Ως χημικοί αισθητήρες για την ανίχνευση μεμονωμένων μορίων αερίων (NO_2 , NH_3) ή ατόμων (Elias et al., 2009).
- Σε βιο-εφαρμογές για την κατασκευή βιο-διατάξεων για την ανίχνευση βακτηρίων και ως αισθητήρες DNA (Σχήμα B10.C) (Mohanty & Berry, 2008).. Επίσης έχει μελετηθεί και η αντιβακτηριδιακή δράση (Hu et al., 2010) για τη χρήση του σε διάφορα βιοϋλικά.
- Ο υψηλός λόγος επιφάνεια /μάζα το καθιστά κατάλληλο για την κατασκευή πυκνωτών με μεγάλη χωρητικότητα (Stoller et al., 2008) αλλά και για μπαταρίες (Li et al., 2011).
- Το γραφένιο αποτελεί το τέλειο υλικό για την κατασκευή σύνθετων υλικών υψηλής αντοχής (Wang et al., 2011. Terrones et al., 2011).



Σχήμα B10 Εφαρμογές γραφενίου σε (A) εύκαμπτες ηλεκτρονικές διατάξεις, (B) τρανζίστορ και (C) σχηματική αναπαράσταση μιας βιο-διάταξης

B3 ΟΞΕΙΔΙΟ ΤΟΥ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ

Το οξείδιο του γραφενίου (Graphite Oxide) είναι ένα φυλλόμορφο υλικό που παράγεται από την οξείδωση του γραφίτη (Brodie, 1859. Staudenmaier, 1898. Hummers & Offeman, 1958) και περιέχει σημαντική ποσότητα οξυγόνου υπό τη μορφή λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια των φύλλων του. Οι λειτουργικές αυτές ομάδες (HO, COOH και C-O-C) προσδίδουν στο οξείδιο του γραφενίου υδροφιλικότητα με αποτέλεσμα αυτό να διασπείρεται σε νερό καθώς και σε αρκετούς πολικούς οργανικούς διαλύτες. Liang et al., 2009. Paredes et al., 2008).

B3.1 Σύνθεση του οξειδίου του γραφενίου

Γενικά, ο γραφίτης εμφανίζεται με διαφορετικές μορφολογίες και η πιο συνηθισμένη για την καλύτερη οξείδωσή του είναι αυτή των “νιφάδων γραφίτη” (flake graphite) η οποία περιέχει έναν μεγάλο αριθμό εντοπισμένων ατελειών που εξυπηρετούν κατά τη διαδικασία οξείδωσης.

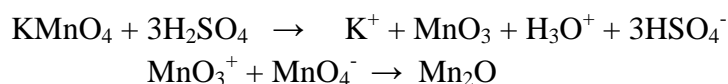
Η οξείδωση του γραφίτη, είχε γίνει αντιληπτή από το 1840 από τον C. Schafhaeutl (Schafhaeutl, 1840), ο οποίος μελετούσε τη συμπεριφορά διαφόρων μετάλλων, κυρίως του σιδήρου και των χυτοσιδήρων. Σε μία φιλοσοφική μελέτη του αναφέρει ότι ο γραφίτης σε επαφή με ισχυρό θειικό οξύ αλλάζει χρώμα και από γκριζόμαυρος γίνεται καφέ.

Το οξείδιο του γραφενίου συντέθηκε για πρώτη φορά το 1859 από τον B. C. Brodie (Brodie, 1859), ο οποίος μελετούσε τη δομή του γραφίτη. Η σύνθεση περιλαμβάνει την οξείδωση του γραφίτη με ‘ατμίζον’ νιτρικό οξύ (fuming HNO₃) και χλωριούχο κάλιο (KClO₃), ο χρόνος της αντίδρασης ήταν 3-4 ημέρες σε θερμοκρασία 60°C. Το αποτέλεσμα ήταν η αύξηση της μάζας του αρχικού υλικού (γραφίτη). Μετά από τέσσερις διαδοχικές χημικές κατεργασίες η αναλογία C : H : O προσδιορίστηκε ίση με 61,04 : 1,85 : 37,11, δηλαδή η ατομική αναλογία C: O είναι ~2,1. Το υλικό αυτό με μοριακό τύπο C_{21,9}H_{0,80}O_{1,00} μπορεί να διασπαρθεί σε νερό ή βασικό διάλυμα αλλά όχι σε όξινο μέσο. Έπειτα από θερμική κατεργασία στους 220°C, η αναλογία C : H : O μεταβάλλεται σε 80,13 : 0,58 : 19,29 και ο μοριακός τύπος σε C_{5,51}H_{0,48}O_{1,00}.

Μετά από 40 χρόνια, το 1899, ο L. Staudermaier (Staudenmaier, 1898) βελτίωσε τη μέθοδο του Brodie, χρησιμοποιώντας μίγμα οξέων θεικού και νιτρικού ($\text{H}_2\text{SO}_4/\text{HNO}_3$), σε αναλογία 2:1 v/v, επιτυγχάνοντας έτσι την οξείδωση του γραφίτη σε ένα μόνο στάδιο διατηρώντας την ατομική αναλογία C: O ~ 2,1 .

Σχεδόν 60 χρόνια μετά, το 1958, οι Hummers και Offeman (Hummers & Offeman, 1958) ανέπτυξαν έναν εναλλακτικό τρόπο οξείδωσης του γραφίτη χρησιμοποιώντας υπερμαγγανικό κάλιο (KMnO_4), νιτρικό νάτριο (NaNO_3) και πυκνό θεικό οξύ (H_2SO_4). Αυτή η διαδικασία απαιτούσε λιγότερο από 2 ώρες και χαμηλές θερμοκρασίες ($> 45^\circ\text{C}$) για την ολοκλήρωση της αντίδρασης.

Συμπερασματικά, έχουν ερευνηθεί και άλλες παρόμοιες μέθοδοι οξείδωσης του γραφίτη, αλλά αυτό που πρέπει να σημειωθεί είναι ότι η οξείδωση του γραφίτη εξαρτάται από τα οξειδωτικά, που λαμβάνουν μέρος στις αντιδράσεις, από το είδος γραφίτη και από τις συνθήκες αντίδρασης. Για να γίνουν κατανοητές οι αντιδράσεις που λαμβάνουν μέρος στην οξείδωση του γραφίτη, είναι πιο εύκολο να μελετήσουμε τις αντιδράσεις των οξειδωτικών μέσων που χρησιμοποιούνται κατά την αντίδραση της οξείδωσης. Οι Brodie και Staudenmaier χρησιμοποιούν το νιτρικό οξύ που χρησιμοποιείται ευρέως ως οξειδωτικό στην τροποποίηση επιφανειών με αρωματικούς δακτυλίους όπως οι νανοσωλήνες άνθρακα με τη δημιουργία ομάδων όπως καρβοξυλο-ομάδες με ταυτόχρονη απελευθέρωση αερίων $\text{NO}_2/\text{N}_2\text{O}_4$ (Lakshminarayanan, Toghiani & Pittman, 2004). Αντίθετα, στην μέθοδο του Hummers το υπερμαγγανικό κάλιο και το θειικό οξύ αντιδρούν μεταξύ τους παράγοντας το επτοξείδιο του μαγγανίου, όπως φαίνεται και στις παρακάτω αντιδράσεις, το οποίο θεωρείται ισχυρό οξειδωτικό μέσο όταν έρχεται σε επαφή με οργανικές ενώσεις

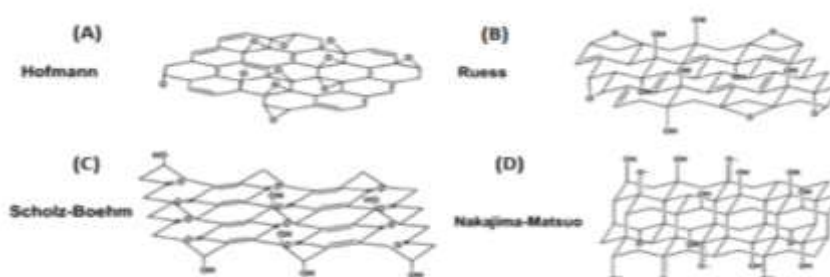


Αν και έχουν αναπτυχθεί και άλλες τροποποιημένες εκδοχές, οι παραπάνω μέθοδοι έχουν χρησιμοποιηθεί εκτενώς τα τελευταία χρόνια για τη σύνθεση του οξειδίου του γραφενίου (GO) από φυσικό γραφίτη.

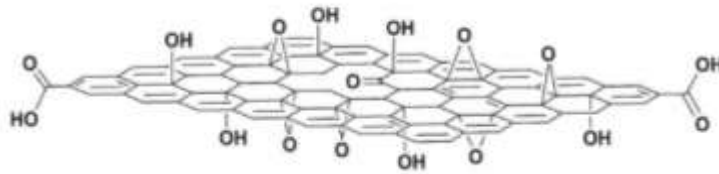
B3.2 Δομή του οξειδίου του γραφενίου

Η ακριβής χημική δομή του οξειδίου του γραφενίου υπήρξε το αντικείμενο συζήτησης για πάρα πολλά χρόνια. Ακόμα και τώρα δεν υπάρχει ένα αδιαμφισβήτητο δομικό μοντέλο εξαιτίας της πολυπλοκότητάς του και της μη στοιχειομετρικής του σύστασης από δείγμα σε δείγμα, καθώς επίσης και λόγω έλλειψης επακριβών αναλυτικών τεχνικών για τον χαρακτηρισμό αυτών των υλικών. Παρόλα αυτά, έχουν γίνει σημαντικές μελέτες με μεγάλη επιτυχία για την ανάλυση της δομής του.

Οι Hofmann και Holst (Hofmann & Holst, 1939) ήταν οι πρώτοι που πρότειναν ένα δομικό μοντέλο του οξειδίου του γραφενίου, στο οποίο υπάρχουν επόξυ ομάδες (C_2O) επάνω στο φύλλο του γραφίτη (Σχήμα B11.A). Μια παραλλαγή του μοντέλου αυτού προτάθηκε το 1946 από τον Ruess (Ruess, 1946) στο οποίο τοποθετούνται υδροξυλο-ομάδες κατά το μήκος των φύλλων GO. Με αυτό το μοντέλο επιβεβαιώνεται επιτυχώς το ποσοστό του υδρογόνου σύμφωνα με τη στοιχειομετρική ανάλυση, καθώς συμπεριλαμβάνει και την παρουσία υβριδισμένων ατόμων άνθρακα sp^3 σε σχέση με προηγούμενο μοντέλο που αποτελείται μόνο από sp^2 άτομα άνθρακα (Σχήμα B11.B). Το 1969, Scholz και Boehm (Scholz & Boehm, 1969) πρότειναν ένα μοντέλο με κετονο- και υδροξυλο-ομάδες, καθώς επίσης επέφεραν αλλαγές στο γραφιτικό πλέγμα όπως φαίνεται στο Σχήμα B11.C. Ένα ακόμα μοντέλο παρουσιάστηκε το 1994 από τους Nakajima και Matsuo (Nakajima & Matsuo, 1994). (Σχήμα B11.D).



Σχήμα B11 Σχηματική απεικόνιση μερικών μοντέλων που έχουν προταθεί για τη δομή του οξειδίου του γραφενίου



Σχήμα B12 Το μοντέλο της δομής του οξειδίου του γραφενίου που προτάθηκε από τους Lerf και Klinowski

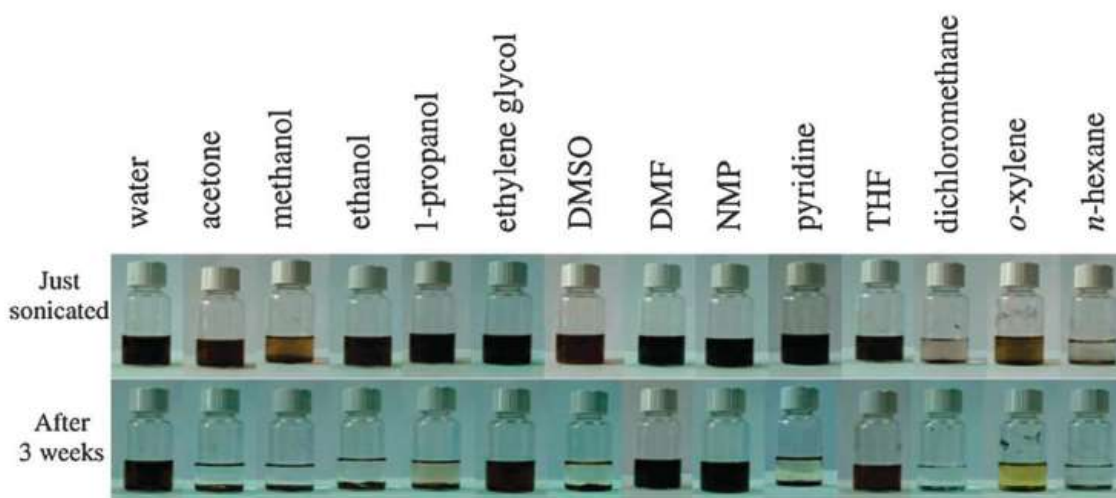
Οι Lerf και Klinowski έχουν δημοσιεύσει αρκετές εργασίες (He et al. 1996. Lerf et al. 1997. Lerf et al. 1998. He et al. 1998) πάνω στη δομή του οξειδίου του γραφενίου κάνοντας χρήση κυρίως της φασματοσκοπίας πυρηνικού μαγνητισμού (NMR). Στο Σχήμα B12 παρουσιάζεται το μοντέλο που προτείνουν, στο οποίο υπάρχουν υδροξυ-, εποξυ-και καρβοξυλ –ομάδες επάνω και στις άκρες του φύλλου, καθώς επίσης και άλλες ατέλειες που προέρχονται από το στάδιο της οξείδωσης. Οι ίδιοι πρότειναν ένα ελαφρώς παραλλαγμένο μοντέλο, που είναι το πλέον επικρατέστερο, στο οποίο οι εποξυ- ομάδες και υδροξυλομάδες βρίσκονται κατά μήκος του κάθε φύλλου και οι καρβοξυλικές ομάδες δημιουργούνται μόνο στα άκρα των φύλλων του υλικού.

B3.3 Ιδιότητες του οξειδίου του γραφενίου

Η δομή του οξειδίου του γραφενίου είναι αρκετά παρόμοια με αυτή των αργίλων (Gengler, Spyrou & Rudolf, 2010), οι οποίοι μοιράζονται μια σειρά από ιδιότητες, όπως αυτές της διόγκωσης (ενυδάτωσης) και της ένθεσης. Επίσης, η παρουσία των πολικών ομάδων στην επιφάνειά του, το καθιστά ένα εξαιρετικό υλικό που μπορεί να φιλοξενήσει ένα πλήθος από μόρια (οργανικά και ανόργανα) στον ενδοστρωματικό χώρο του, όπως αλυσίδες υδρογονανθράκων (Bourlinos et al. 2003), ιόντα μετάλλων μετάπτωσης (Dékány, Krüger-Grasser, & Weiss, 1998), πολυμερή και άλλα υδρόφιλα μόρια (Liu et al., 2008), παρασκευάζοντας έτσι υβριδικά υλικά, τα οποία είναι πολλά υποσχόμενα για διάφορες εφαρμογές και με ‘έξυπνες’ ιδιότητες.

Η διασπορά του οξειδίου του γραφενίου σε διάλυμα, είναι σημαντική για τον σχηματισμό των παράγωγων και εξαρτάται από το είδος του διαλύτη, αλλά και από την επιφανειακή τροποποίησή του, που συμβαίνει κατά τη διάρκεια της οξείδωσης. Μέχρι σήμερα έχει βρεθεί ότι όσο μεγαλύτερη είναι η πολικότητα της επιφάνειας, τόσο μεγαλύτερη θα είναι και η διασπορά (Paredes et al., 2008. Dreyer et al., 2010). Στο σχήμα που ακολουθεί (Σχήμα B13) παρουσιάζεται η αλληλεπίδραση του οξειδίου του γραφενίου σε νερό καθώς και σε άλλους διαλύτες. Αρχικά το οξείδιο του γραφενίου διασπείρεται σε 10 mL διαλύτη και εκτίθεται σε λουτρό υπερήχων για 1 ώρα και στη συνέχεια αφήνεται σε ηρεμία για 3 εβδομάδες.

Συμπερασματικά, το οξείδιο του γραφίτη είναι ένα παράγωγο του γραφίτη, που περιέχει ομάδες οξυγόνου (υδροξυ-, εποξυ- και καρβοξυλ- ομάδες), οι οποίες είναι ομοιοπολικά συνδεδεμένες πάνω στην επιφάνειά του, ενώ το υλικό αυτό συγκρατεί τη φυλλόμορφη δομή του με μεγαλύτερο ενδοστρωματικό χώρο από τον αρχικό γραφίτη, εξαιτίας της παρουσίας των μορίων του νερού ανάμεσα στα φύλλα του.



Σχήμα B13 Διασπορά οξειδίου του γραφενίου σε νερό και σε 13 οργανικούς διαλύτες (πάνω: αμέσως μετά την κατεργασία σε λουτρό υπερήχων, κάτω: 3 εβδομάδες σε ηρεμία μετά από την κατεργασία)

Όσον αφορά τις ηλεκτρικές ιδιότητες, το οξείδιο του γραφενίου λειτουργεί ως μονωτής της ηλεκτρικής αγωγιμότητας με τιμή περίπου $1 \times 10^{-9} \text{ S/cm}$ - $5 \times 10^{-3} \text{ S/cm}$

ανάλογα με το ποσοστό οξείδωσης, ενώ, καθώς ανάγεται προς γραφένιο και απομακρύνονται οι υδρόφιλες ομάδες, η ηλεκτρική αγωγιμότητα αυξάνεται από 3 έως 9 τάξεις μεγέθους και φτάνει στα 1.2 S/cm.

B3.4 Εφαρμογές του οξειδίου του γραφενίου

Το οξείδιο του γραφενίου χρησιμοποιείται για την παραγωγή γραφενίου σε μεγάλη κλίμακα. Όπως αναφέρθηκε και πιο πάνω το οξείδιο του γραφενίου μπορεί να αναχθεί προς γραφένιο. Παρόλο, που στο πλέγμα του υπάρχουν αρκετές ατέλειες (σε σχέση με το γραφένιο που προκύπτει από τη μικρομηχανική αποφυλλοποίηση) με αποτέλεσμα την υποβάθμιση των ιδιοτήτων του, η απόδοση του δίνει την δυνατότητα για την παρασκευή νέων υβριδικών υλικών με εξαιρετικές ιδιότητες.

Επίσης, το οξείδιο του γραφενίου μπορεί να εναποτεθεί υπό τη μορφή λεπτού υμενίου πάνω σε ένα οποιοδήποτε υπόστρωμα και στη συνέχεια να μετατραπεί σε γραφένιο (Stankovich, 2007). Με τον τρόπο αυτό, έχουμε τη δυνατότητα να παράγουμε διαφανή αγωγή υμένια.

Ευρύ είναι το φάσμα το εφαρμογών των νανοσύνθετων υλικών που παρασκευάζονται με πολυμερική μήτρα και οξείδιο του γραφενίου ως ενισχυτικό. Νανοσύνθετα από πολυμερή όπως πολυβινυλική αλκοόλη (Gómez-Navarro et al., 2007), πολυαιθυλενοξείδιο (Matsuo, Tahara & Sugie, 1996), πολυστυρένιο (Stankovich et al., 2006), πολυουρεθάνη (Kim, Miura & Macosko, 2010), πολυμεθακρυλικό μεθυλεστέρα (Das et al., 2009), έχουν ήδη μελετηθεί με διαφορετικές μεθόδους παρασκευής (διαλυμάτων, in-situ πολυμερισμό) και έχουν βελτιώσει σε σημαντικό βαθμό το μέτρο ελαστικότητας και την αντοχή σε εφελκυσμό.

Τέλος, το οξείδιο του γραφενίου έχει χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων (Wang et al., 2011), και έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για τη σύνθεση νέων αντικαρκινικών φαρμάκων (Liu et al., 2008).

B3.5 Χημική τροποποίηση του οξειδίου του γραφενίου

Το αντίστροφο της αναγωγής του οξειδίου του γραφενίου είναι η προσθήκη διαφόρων ομάδων στα φύλλα του οξειδίου του γραφενίου μέσω ομοιοπολικών ή μη ομοιοπολικών δεσμών, με αποτέλεσμα την παραγωγή χημικά τροποποιημένου οξειδίου του γραφενίου (chemically modified graphenes, CMGs), με σκοπό τη χρήση του υλικού σε πληθώρα εφαρμογών εξαιτίας των εξαιρετικών του ιδιοτήτων.

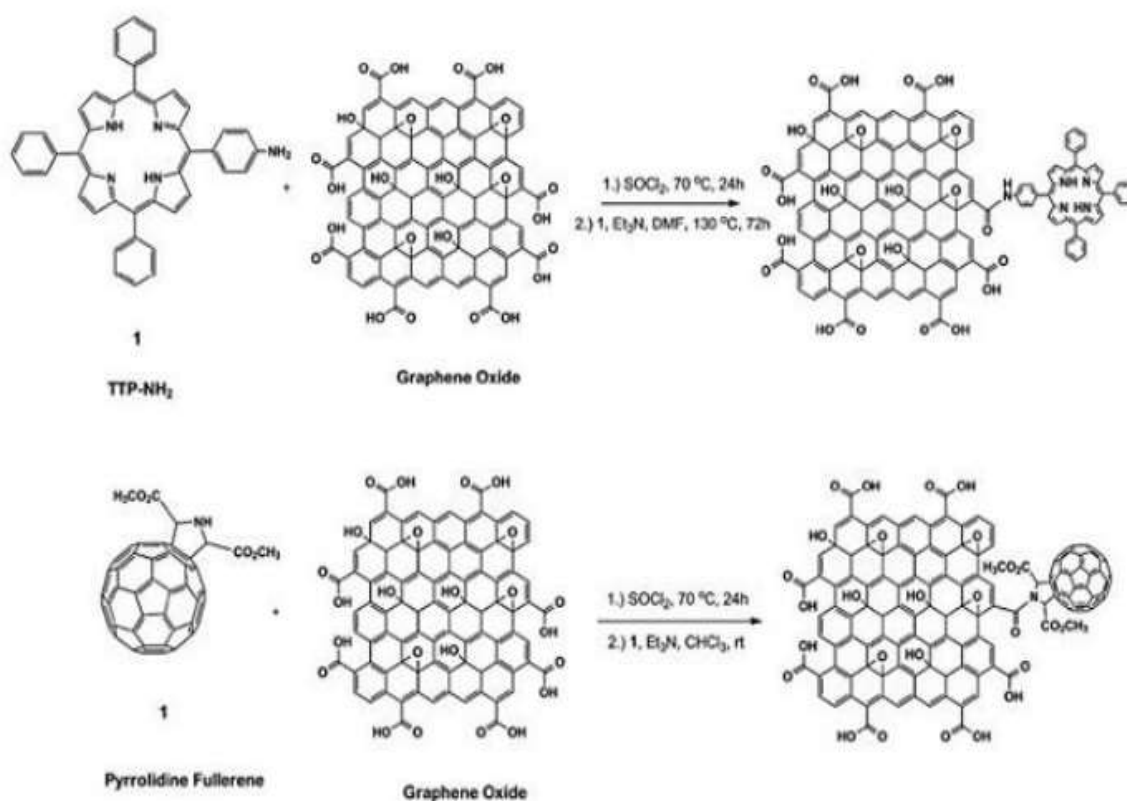
Οι χημικές πορείες που ακολουθούνται για την χημική τροποποίηση αυτών των δισδιάστατων νανο-δομών συνοψίζονται σε δυο κύριες κατηγορίες (Boukhalov & Katsnelson, 2009).

i. Προσκόλληση χημικών ομάδων στις λειτουργικές ομάδες των φύλλων του οξειδίου του γραφενίου μέσω δημιουργίας ομοιοπολικών δεσμών (covalent).

Στην επιφάνεια των φύλλων του οξειδίου του γραφενίου υπάρχουν λειτουργικές ομάδες οξυγόνου, όπως εποξυ- ομάδες, υδροξυλομάδες και καρβοξυλικές ομάδες (Dreyer et al., 2010). Η χημική τροποποίηση της επιφάνειας του οξειδίου του γραφενίου με διάφορα μόρια μπορεί να επιτευχθεί με διαφορετικούς τρόπους, εξαιτίας της ιδιότητας των μορίων να προσκολλώνται «επιλεκτικά» σε μία ή περισσότερες από τις λειτουργικές ομάδες του οξειδίου του γραφενίου (Dreyer et al., 2010) με τους εξής τρόπους:

▪ Ομοιοπολική σύνδεση οργανικών μορίων με τις καρβοξυλομάδες που έχουν αναπτυχθεί στις άκρες του οξειδίου του γραφενίου.

Μικρά οργανικά μόρια συνδέονται ομοιοπολικά με τις καρβοξυλικές ομάδες του οξειδίου του γραφενίου (Σχήμα B14). Αυτές οι αντιδράσεις σύζευξης συχνά απαιτούν την ενεργοποίηση των όξινων [acid] θέσεων. Με τη συνεχή προσθήκη νουκλεοφιλικών μορίων [αμίνες ή υδροξύλια] δημιουργούνται ομοιοπολικοί δεσμοί με τις ενεργές ομάδες των φύλλων του οξειδίου του γραφενίου μέσω των σχηματισμένων αμιδίων ή εστέρων (Chen et al., 2009).

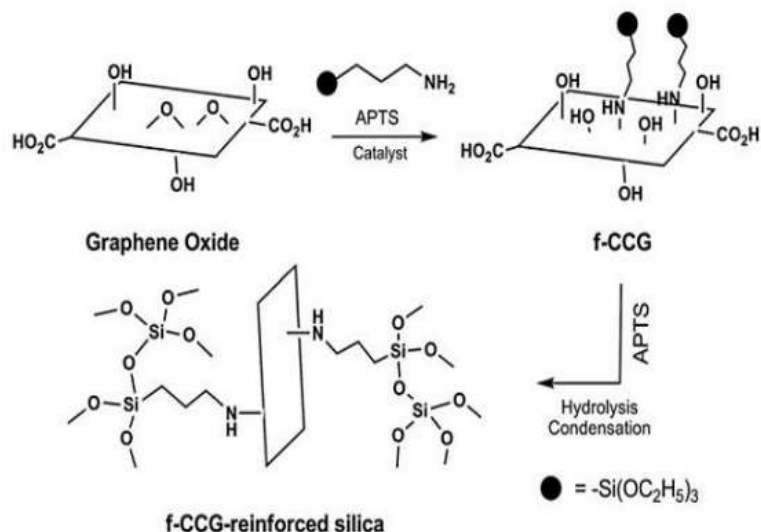


Σχήμα Β14 Ομοιοπολική σύνδεση της πορφυρίνης και φουλερενίων με τις καρβοξυλομάδες του οξειδίου του γραφενίου

▪ Αντίδραση πυρηνόφιλης αντικατάστασης (nucleophilic substitution reactions) μεταξύ των αμινο-ομάδων των οργανικών μορίων και των επόξυ-ομάδων που έχουν αναπτυχθεί στην επιφάνεια του οξειδίου του γραφενίου.

Οι ομάδες που κυριαρχούν σε τέτοιου είδους αντιδράσεις είναι οι επόξυ-ομάδες των φύλλων του οξειδίου του γραφενίου ως εξής: οι τερματικές αμινομάδες (-NH₂) διαφόρων οργανικών μορίων προσκολλώνται στα φύλλα του οξειδίου του γραφενίου μέσω αντιδράσεων διάνοιξης δακτυλίων (ring-opening reactions) των επόξυ ομάδων. Η μέθοδος έχει καθιερωθεί, σε σύγκριση με άλλες μεθόδους, ως η πιο υποσχόμενη για την παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων χημικά τροποποιημένου οξειδίου του γραφενίου, καθώς οι αντιδράσεις πυρηνόφιλης υποκατάστασης (nucleophilic substitution reactions), πραγματοποιούνται σε θερμοκρασία δωματίου και σε υδατικό μέσο. Όλοι οι τύποι αλειφαντικών και αρωματικών αμινών, αμινοξέων, αμινο-τερματικών βιομορίων, ιοντικών

υγρών, ενώσεις πολυμερών μικρού μοριακού βάρους και σιλανίων έχουν χρησιμοποιηθεί με αυτή τη μέθοδο για το σχηματισμό παραγώγων οξειδίου του γραφενίου (Σχήμα B15).



Σχήμα B15 Ομάδες σιλανίου συνδέονται ομοιοπολικά με τις επόξυ ομάδες του φύλλου του οξειδίου του γραφενίου σχηματίζοντας τελικά ένα οργανο-παράγωγο

(ii) Μη-ομοιοπολική (non-covalent) προσκόλληση πλήθους μορίων στην εξωτερική γραφιτική επιφάνεια των φύλλων

Η μη ομοιοπολική χημική τροποποίηση των φύλλων του οξειδίου του γραφενίου βασίζεται στη δημιουργία δεσμών van der Waals ή σε π-π αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ομάδων του φύλλου του οξειδίου του γραφενίου και πολυαρωματικών μορίων. Τέτοιου είδους δεσμοί δημιουργούνται ανάμεσα σε βιομόρια (Katz & Willner, 2004) ή αρωματικά πολυκυκλικά παράγωγα (Dreyer et al., 2010) και στα φύλλα του οξειδίου του γραφενίου μέσω π-π αλληλεπιδράσεων. Τα υλικά αυτά συχνά βρίσκουν βιολογικές και ιατρικές εφαρμογές.

B3.5.1 Επίδραση τροποποίησης στις ιδιότητες του οξειδίου του γραφενίου - Εφαρμογές τροποποιημένου οξειδίου του γραφενίου

Η ενδοστρωματική απόσταση ανάμεσα στα φύλλα του οξειδίου του γραφενίου μεγαλώνει μετά την ένθεση των οργανικών μορίων. Το 2003 οι Μπουρλίνοσ κ.ά. (Bourlinos et al. 2003), χρησιμοποίησαν μία σειρά αλειφατικών αμινών και αμινοξέων [$C_nH_{2n+1}NH_2$ ($n = 2, 4, 8, 12, 18$)] για την επιφανειακή τροποποίηση του οξειδίου του γραφενίου (Bourlinos et al. 2003). Τα οργανο-παράγωγα του οξειδίου του γραφενίου διασπείρονται σε οργανικούς διαλύτες. Η ανάλυση των ακτίνων $-X$ έδειξε ότι η ενδοστρωματική απόσταση των φύλλων του οξειδίου του γραφενίου είναι ανάλογη του μήκους της αλυσίδας των αμινών ενώ εξαρτάται και από τον προσανατολισμό τους. Ο προσανατολισμός των αλυσίδων συμβαίνει εξαιτίας της υδρόφιλης φύσης του οξειδίου του γραφενίου (Schafhaeutl, 1840). Αναλύσεις δείχνουν ότι τα αμινοξέα εμφανίζουν έναν επίπεδο προσανατολισμό ανάμεσα στα φύλλα οξειδίου του γραφενίου (Kuila et al., 2012).

Η τροποποίηση του οξειδίου του γραφενίου με οργανικά ή ανόργανα μόρια επιδρά στις μαγνητικές και ηλεκτρονικές ιδιότητες του γραφενίου καθώς λειτουργεί σαν δότης ή δέκτης ηλεκτρονίων με τα μόρια που εισέρχονται στον ενδοστρωματικό χώρο. Κατά την τροποποίηση αυξάνονται οι ατέλειες στο πλέγμα και πολλά από τα sp^2 άτομα άνθρακα μετατρέπονται σε sp^3 . Ο έλεγχος αυτός επιδρά στις ηλεκτρικές ιδιότητες καθιστώντας το ως ένα πολλά υποσχόμενο υλικό στον χώρο της νανοηλεκτρονικής (τρανζίστορ, αισθητήρες) (Sun et al., 2010).

Μία από τις πιο ελπιδοφόρες εφαρμογές του τροποποιημένου οξειδίου του γραφενίου είναι η κατασκευή αισθητήρων για τη διάγνωση ασθενειών (Liu et al., 2010). Ακόμη, έρευνες έχουν δείξει ότι η τροποποίηση του οξειδίου του γραφενίου μειώνει την τοξικότητα του γραφενίου το οποίο βρίσκει βιο-ιατρικές εφαρμογές (Wang et al., 2011). Ευρύ είναι το φάσμα των εφαρμογών των νανοςύνθετων υλικών του οξειδίου του γραφενίου με πολυμερική μήτρα, σαν υβριδικά υλικά με πολύ μεγάλη ηλεκτροχημική σταθερότητα (Lin et al., 2011).

B4 ΟΡΓΑΝΟΤΡΟΠΟΠΟΙΗΜΕΝΑ ΥΒΡΙΔΙΚΑ ΥΛΙΚΑ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ

B4.1 Γενικά

Το 1859 ο Benjamin C. Brodie περιέγραψε τη σύνθεση ενός υλικού που ονομάζεται οξείδιο του γραφενίου, ένα υλικό με υδροφιλική αναλογία προερχόμενο από τον υδρόφοβο γραφίτη. Για τη σύνθεσή του χρησιμοποίησε ‘ατμίζον’ νιτρικό οξύ (fuming HNO₃) και χλωριούχο κάλιο (KClO₃) με τα οποία προκλήθηκε οξείδωση του γραφίτη (Brodie, 1859). Από τότε έχουν περιγραφεί βελτιωμένες συνθετικές μέθοδοι οι οποίες αποφεύγουν τη χρήση εκρηκτικών χημικών (Dreyer et al., 2010). Κατά την τελευταία δεκαετία το GO έχει προσελκύσει μεγάλο ενδιαφέρον ως σύνθετο υλικό του γραφίτη επειδή προσφέρει εύκολη πρόσβαση σε μεγάλες ποσότητες της υψηλών απαιτήσεων κατηγορίας των γραφενίων, συγκεκριμένα, μετά τη μηχανική τους απομόνωση το 2004 (Novoselov et al., 2004).

Η ισχυρή οξείδωση του γραφιτικού πλέγματος έχει ως αποτέλεσμα να ανοίξουν τα φύλλα άνθρακα και τα ισχυρά οξειδωτικά οξέα να εισαχθούν μεταξύ των στρωμάτων. Αυτό συνεπάγεται τη διατάραξη της εκτεταμένης αρωματικής sp² γραφιτικής δομής δημιουργώντας τυχαίως διανεμημένες εξαμελείς αλειφατικές sp³ περιοχές, αρκετά κενά στα στρώματα της δομής και, επιπλέον, δημιουργώντας στα δύο βασικά επίπεδα και στα άκρα των φύλλων γραφίτη διάφορες ομάδες που περιέχουν οξυγόνο. Αυτές οι λειτουργικές ομάδες του GO είναι πολύ σημαντικές αφού παρέχουν τις απαραίτητες θέσεις για να ενισχύσουν τα συνδετικά και λειτουργικά χαρακτηριστικά του.

Έτσι, το GO μέσω του σχηματισμού καρβοξυλικών, φαινοξυ και υδροξυλικών ομάδων που είναι τοποθετημένες στις άκρες του γραφιτικού πλέγματος, αποκτά ιδιότητες ιοντοανταλλαγής μέσω των όξινων πρωτονίων τους, ενώ η παρουσία εποξυ, φαινοξυ και υδροξυλικών ομάδων στο εσωτερικό των στρωμάτων προσφέρουν τις απαραίτητες ενεργές θέσεις για εισαγωγή και χημική σύνδεση πολλών μοριακών οντοτήτων που μπορούν, για παράδειγμα, να ελέγξουν την υδροφιλικότητα ή την υδροφοβικότητα των δομών που προκύπτουν.

Από αυτή την άποψη, οι ιδιότητες του GO είναι ανάλογες με αυτές των αργίλων σμεκτίτη όπως είναι για παράδειγμα η διόγκωση, η ανταλλαγή ιόντων και η ένθεση

μορίων ανάμεσα στα φύλλα τους (intercalation), τα οποία είναι γνωστά εδώ και πολύ καιρό και έχουν μελετηθεί εκτενώς (Pinnavaia, 1983).

Από τα διάφορα είδη μοριακών επισκεπτών, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν η εισαγωγή και η χημική σύνδεση πρωτοταγών αλειφατικών αμινών ή μορίων που περιέχουν αμίνες (αμινοξέα και αμινοσιλοξάνες) στο βασικό επίπεδο του GO. Κατά αυτόν τον τρόπο είναι δυνατή η χημική τροποποίηση της επιφάνειας του GO έχοντας ως αποτέλεσμα είτε την παραγωγή εξαιρετικά επεξεργάσιμων νανοφύλλων γραφενίου σε υδατικό ή οργανικό μέσο είτε να προκύψουν δομές που έχουν μόνιμα ανοιχτά στρώματα, γνωστές ως υποστρωματικές δομές (Bourlinos et al. 2003).

Η χημική σύνδεση των πρωτοταγών αμινών με το στερεό GO πραγματοποιείται μέσω πυρηνόφιλων αντιδράσεων υποκατάστασης με τις εποξειδικές ομάδες που βρίσκονται εκτεθειμένες στην επιφάνειά του, ανοίγοντας τον εποξειδικό δακτύλιο ή μέσω συμπύκνωσης με φαινόξυ-ομάδες.

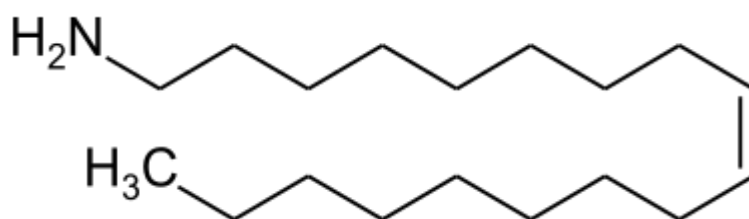
Όσον αφορά την ένθεση και σύνδεση των αλειφατικών ή αρωματικών διαμίνων στα στρώματα του GO υπάρχουν τρεις πιθανοί τρόποι στερέωσης:

- i) μόνο ένα άκρο αμίνης συνδέεται σε μια λειτουργική θέση,
- ii) και τα δύο αμινο-άκρα είναι στερεωμένα σε επόξυ-ομάδες του ίδιου στρώματος σε ένα βρόγχο διαμόρφωσης,
- iii) και οι δύο αμινομάδες συνδέονται σε λειτουργικές θέσεις γειτονικών στρωμάτων σχηματίζοντας γέφυρες που οδηγούν στον σχηματισμό υποστρωματικής δομής, με τις αλυσίδες υδρογονάνθρακα ή τους αρωματικούς δακτυλίους να λειτουργούν ως στήλες.

Αλκυλαμίνες με διάφορα μήκη αλκυλικών αλυσίδων έχουν μελετηθεί για παρεμβολή στο GO και αποδεικνύεται ότι παρεμβάλλονται αποτελεσματικά, αλλάζοντας, μάλιστα, την απόσταση μεταξύ των φύλλων του GO κατά διάφορα μεγέθη (Bourlinos et al. 2003. Matsuo et al. 2007. Yang et al. 2012).

B4.2 Οξείδιο γραφενίου με ολεϋλαμίνη

Στην παρούσα εργασία, για να καταστήσουμε το GO επεξεργάσιμο σε οργανικούς πολικούς διαλύτες χρησιμοποιήσαμε για την επιφανειακή τροποποίησή του την ολεϋλαμίνη ($C_{18}H_{35}NH_2$), μια πρωτοταγή αλκυλαμίνη μακράς αλυσίδας της οποίας η δομή δίνεται παρακάτω (Σχήμα B16). Η ολεϋλαμίνη είναι μια ακόρεστη λιπαρή αμίνη η οποία ως καθαρή ένωση είναι ένα διαυγές και άχρωμο υγρό.



Σχήμα B16: Η δομή της ολεϋλαμίνης

Η σύνδεση της ολεϋλαμίνης (OA) στα φύλλα του GO γίνεται με πυρινόφιλη υποκατάσταση, όπου η αμίνη της OA συνδέεται με τις εποξυομάδες που βρίσκονται στην επιφάνεια του GO. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η ανθρακική αλυσίδα της ολεϋλαμίνης, η οποία είναι οργανόφιλη, να είναι εκτεθειμένη. Συνεπώς, η τροποποίηση του GO με OA οδηγεί σε ένα οργανόφιλο στερεό, το οποίο διασπείρεται εύκολα σε οργανικούς πολικούς διαλύτες, παρέχοντας καφέ αιωρήματα. Η παρεμβολή της ολεϋλαμίνης ευνοείται από τις ελκτικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ομάδων αμίνης και των λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια του GO, ενώ δυνάμεις van der Waals μεταξύ των βασικών επιπέδων και των επαφών μεταξύ των υδρόφοβων ουρών αλκυλίου και του υδρόφιλου GO λειτουργούν έναντι της παρεμβολής. Αν και τα μόρια OA μπορεί να προτιμούν να προσκολλώνται στο GO υπό γωνία κλίσης ισχυρές δυνάμεις van der Waals μεταξύ των βασικών επιπέδων καθιστούν τα μόρια OA να ξαπλώνουν στα βασικά επίπεδα, με αποτέλεσμα μια μικρή αλλά ομοιόμορφη αύξηση στην απόσταση μεταξύ των φύλλων του GO. Οι αποστάσεις μεταξύ των φύλλων εξαρτώνται σε μεγάλο βαθμό από τις αναλογίες μάζας OA/GO, αυξάνοντας με το φορτίο OA προς την πλήρη αποφυλλοποίηση (Bourlinos et al. 2003).

B5 ENZYMA

B5.1 Γενικά

Τα ένζυμα είναι πρωτεΐνες που καταλύουν χημικές αντιδράσεις στους οργανισμούς. Για να δράσουν, το υπόστρωμα (αντιδρών) συνδέεται στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, το οποίο είναι διαμορφωμένο κατάλληλα ώστε να το υποδεχθεί. Το ένζυμο δρα ως καταλύτης και παράγεται το προϊόν της αντίδρασης. Τα ένζυμα υπερτερούν σε σχέση με άλλους καταλύτες χάρη στη μεγάλη καταλυτική ισχύ τους και στη μοναδική εξειδίκευσή τους για το υπόστρωμα και για το είδος της αντίδρασης. Συγκεκριμένα τα ένζυμα, περισσότερο από τους άλλους καταλύτες (10^6 - 10^{17} υψηλότερη ταχύτητα) (Σταμάτης, 2018), αυξάνουν την ταχύτητα μιας αντίδρασης μειώνοντας την ενέργεια ενεργοποίησής της. Τα ίδια δεν καταναλώνονται στις αντιδράσεις και έτσι η ποσότητά τους παραμένει σταθερή. Κατά τις ενζυμικές αντιδράσεις η θέση της χημικής ισορροπίας δεν αλλάζει, δηλαδή τα ένζυμα δεν αυξάνουν την απόδοση σε προϊόν μίας αντίδρασης, όμως, το ίδιο μόριο ενζύμου μπορεί να καταλύσει την ενζυμική μετατροπή χιλιάδων νέων μορίων υποστρώματος (αντιδρώντος) σε προϊόν. Τα ένζυμα παρουσιάζουν εξειδίκευση ως προς την αντίδραση που καταλύουν. Δηλαδή τα περισσότερα ένζυμα καταλύουν συγκεκριμένη αντίδραση. Σπάνιες είναι οι περιπτώσεις ενζύμων που καταλύουν δύο διαφορετικές αντιδράσεις του ίδιου ή διαφορετικού υποστρώματος (Ξαπλαντέρη, 2015).

Τα ένζυμα εμφανίζουν υψηλή εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα η οποία ποικίλει ως εξής:

- **απόλυτη εξειδίκευση:** το ένζυμο δρα μόνο σε ένα υπόστρωμα
- **υψηλή εξειδίκευση:** το ένζυμο δρα σε λίγα υποστρώματα με διαφορετική ταχύτητα αντίδρασης
- **χαμηλή εξειδίκευση:** το ένζυμο δρα σε ένα σχετικά μεγάλο αριθμό υποστρωμάτων με διαφορετική ταχύτητα αντίδρασης.

Τα ένζυμα χαρακτηρίζονται επίσης από **τοποεκλεκτικότητα** (regiospecificity), δηλαδή μπορούν να διακρίνουν και συγκεκριμένα τμήματα στα μόρια των υποστρωμάτων, καθώς και από **στερεοεκλεκτικότητα** (stereospecificity), διακρίνουν, δηλαδή, οπτικά

ισομερή επιτυγχάνοντας έτσι την κατάλυση αντιδράσεων που δύσκολα είναι δυνατές με κλασικές χημικές μεθόδους.

Κατά συνέπεια, ένζυμα που καταλύουν την αντίδραση ενός στερεοϊσομερούς έχουν **στερεοχημική εξειδίκευση** (λόγου χάρη, η οξειδάση L-αμινοξέων οξειδώνει L-αμινοξέα και όχι αμινοξέα που έχουν D-διαμόρφωση), ενώ ένζυμα που καταλύουν τη διάσπαση ενός είδους δεσμού έχουν **εξειδίκευση ως προς τον δεσμό**. Η τελευταία αποτελεί χαμηλή εξειδίκευση, καθώς υπόστρωμα αυτών των ενζύμων είναι πολλά μόρια που έχουν συγκεκριμένο είδος δεσμού (λόγου χάρη, οι φωσφατάσες είναι ένζυμα που υδρολύουν φωσφοεστερικούς δεσμούς που βρίσκονται σε ποικίλα υποστρώματα).

Η μεγάλη εξειδίκευση των ενζύμων στην κατάλυση συγκεκριμένων αντιδράσεων όπου συμμετέχουν συγκεκριμένα υποστρώματα, έχει ιδιαίτερη τεχνολογική σημασία. Αν και το υψηλό κόστος παραγωγής τους και η επισφαλής σταθερότητά τους όταν απομακρύνονται από τη φυσική πηγή είναι μειονεκτήματα που η αντιμετώπισή τους αποτελεί αντικείμενο έρευνας, τα οφέλη τους είναι σημαντικά καθώς με την εφαρμογή τους:

- ελαχιστοποιείται η εμφάνιση παραπροϊόντων
- μειώνονται οι πιθανότητες για παράπλευρες ανεπιθύμητες αντιδράσεις
- διευκολύνεται η απομόνωση του προϊόντος
- αυξάνεται η παραγωγικότητα μιας διεργασίας
- το κόστος είναι χαμηλό καθώς δρουν σε μη ενεργοβόρες συνθήκες που δεν απαιτούν ειδικό εξοπλισμό
- δεν επιβαρύνουν το περιβάλλον (Σταμάτης, 2018).

B5.2 Εφαρμογή ενζύμων σε βιοκαταλυτικές διεργασίες

B5.2.1 Βιοκατάλυση

Με τον όρο βιοτεχνολογία εννοούμε την εφαρμογή διάφορων βιολογικών λειτουργιών σε τεχνολογικό επίπεδο με στόχο τη βιομηχανική παραγωγή προϊόντων υψηλής προστιθέμενης αξίας. Ειδικότερα, αξιοποιούνται αντιδράσεις που

πραγματοποιούνται σε ζωντανά βακτήρια, φυτικά ή και ζωικά κύτταρα, ενζυμικές αντιδράσεις, αλλά και προϊόντα της βιομάζας από διάφορους μικροοργανισμούς. Οι βιοτεχνολογικές μετατροπές κατηγοριοποιούνται σε ποικίλες επιμέρους διεργασίες (ζύμωση, βιομετατροπές, ενζυμική κατάλυση), ανάλογα με τον αριθμό των απαραίτητων βημάτων και την πολυπλοκότητα των υποστρωμάτων. Οι βιομετατροπές και η ενζυμική κατάλυση συμπεριλαμβάνονται κάτω από τον γενικότερο όρο «βιοκατάλυση». Υπό αυτή την έννοια, βιοκαταλυτικές διεργασίες ορίζονται οι μετατροπές ενός ή περισσότερων υποστρωμάτων σε ένα ή περισσότερα προκαθορισμένα προϊόντα μέσω ενός ή περισσότερων ενζυμικά καταλυόμενων αντιδράσεων.

Η βιοτεχνολογία χωρίζεται σε τέσσερις βασικούς κλάδους:

- πράσινη βιοτεχνολογία, που αναφέρεται στη βιοτεχνολογία εφαρμοζόμενη στον αγροτικό τομέα
- μπλε βιοτεχνολογία, η οποία αφορά στις εφαρμογές της βιοτεχνολογίας σε υδάτινα συστήματα και υδρόβιους οργανισμούς
- κόκκινη βιοτεχνολογία, που αναφέρεται στη φαρμακευτική και ιατρική βιοτεχνολογία
- λευκή βιοτεχνολογία, που αναφέρεται στη βιομηχανική βιοτεχνολογία (Πατήλα, 2016).

Η βιομηχανική βιοτεχνολογία, γνωστή και ως «λευκή βιοτεχνολογία», αποτελεί τη σύγχρονη προσέγγιση για την επωφελή σύνθεση βιοχημικών, βιοϋλικών και βιοκαυσίμων από ανανεώσιμες πηγές, μέσω της χρήσης κυττάρων ή και απομονωμένων ενζύμων. Προσφέρει σημαντικά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών μεθόδων καθώς επιτρέπει την παραγωγή προϊόντων υψηλής αξίας και ενέργειας από ανανεώσιμες πηγές, με παράλληλο οικονομικό όφελος (Tang & Zhao, 2009).

B5.2.2 Εφαρμογή ενζύμων στη βιοτεχνολογία

Η χρήση των ενζύμων σε σχέση με τους χημικούς καταλύτες παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα, με αποτέλεσμα οι ενζυμικές βιομετατροπές να είναι σε πολλές περιπτώσεις ο προτεινόμενος τρόπος παραγωγής προϊόντων υψηλής αξίας. Παρ' όλα αυτά όμως η χρήση των ενζύμων περιλαμβάνει και κάποιους περιορισμούς. Λόγω της εκτενούς έρευνας πάνω στην ενζυμική βιοτεχνολογία, έχουν αναπτυχθεί τεχνικές με σκοπό τον

περιορισμό των μειονεκτημάτων της χρήσης ενζύμων και τη βελτιστοποίηση των καταλυτικών χαρακτηριστικών τους. Για παράδειγμα, οι τεχνικές της τεχνολογίας του ανασυνδυασμένου DNA καθιστούν εφικτή την παραγωγή ενζύμων από μικροοργανισμούς που είναι δύσκολο να καλλιεργηθούν σε εργαστηριακές συνθήκες, μέσω της έκφρασης συγκεκριμένων γονιδίων σε κύτταρα-ξενιστές. Επιπλέον, ο ορθολογικός σχεδιασμός πρωτεϊνών και η κατευθυνόμενη εξέλιξη μπορούν να επέμβουν στη δομή του ενεργού κέντρου των ενζύμων και να δημιουργήσουν βιομόρια με επιθυμητές ιδιότητες, τόσο ως προς την εξειδίκευσή τους σε ένα συγκεκριμένο υπόστρωμα όσο και ως προς το εύρος των ενώσεων που μπορούν να φιλοξενήσουν στο ενεργό τους κέντρο (Bornscheuer & Kazlauskas, 2004). Τέλος, η ακινητοποίηση ενζύμων σε διάφορους φορείς μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα τη βελτίωση της σταθερότητάς τους έναντι μετουσιωτικών παραγόντων, όπως η υψηλή θερμοκρασία και πίεση, οι ακραίες τιμές pH και ο χρόνος παραμονής τους σε ένα διάλυμα (Kim, Jay & Ping, 2006).

B5.3 Ενζυμική Κινητική

Η σχέση που συνδέει την αρχική ταχύτητα μιας ενζυμικής αντίδρασης με τη συγκέντρωση του υποστρώματος δίνεται από την εξίσωση Michaelis-Menten:

$$V_0 = \frac{V_{\max} [S]}{K_m + [S]}$$

Η αριθμητική τιμή της σταθεράς K_m είναι σημαντική, για μια σειρά από λόγους, όπως:

α) Αποτελεί μέτρο της συγγένειας του υποστρώματος με το ένζυμο - όσο πιο μεγάλη είναι η τιμή της K_m , τόσο μεγαλύτερη συγκέντρωση υποστρώματος απαιτείται για να επιτευχθεί το ήμισυ της μέγιστης ταχύτητας, δηλαδή τόσο πιο μικρή είναι η ικανότητα του υποστρώματος να αντιδράσει με το ένζυμο.

β) Παρέχει μια προσεγγιστική τιμή της ενδοκυτταρικής συγκέντρωσης του υποστρώματος. Δεν έχει φυσιολογική έννοια η συγκέντρωση του υποστρώματος, αν είναι κατά πολύ μεγαλύτερη από την τιμή της σταθεράς K_m ($[S] \gg K_m$), καθώς στην περίπτωση αυτή η ταχύτητα της αντίδρασης θα ήταν πολύ κοντά στην τιμή της V_{max} , γεγονός που θα σήμαινε ότι η ταχύτητα θα παρέμενε αμετάβλητη σε αλλαγές της συγκέντρωσης του υποστρώματος. Παράλληλα, σε συνθήκες τέτοιες, όπου $[S] \ll K_m$, η ταχύτητα της αντίδρασης θα ήταν κατά πολύ μικρότερη της μέγιστης ταχύτητας και το μεγαλύτερο μέρος της καταλυτικής δραστηριότητας του ενζύμου θα παρέμενε ανεκμετάλλευτο.

γ) Μέσω της διερεύνησης της επίδρασης διαφόρων παραγόντων στη σταθερά K_m , είναι δυνατός ο προσδιορισμός αλλοστερικών τροποποιητών για το συγκεκριμένο ένζυμο.

δ) Η γνώση της τιμής της σταθεράς K_m επιτρέπει την επιλογή της κατάλληλης συγκέντρωσης του υποστρώματος κατά τον προσδιορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας (enzyme assay).

ε) Η τιμή της σταθεράς K_m αποτελεί μέτρο της συγγένειας εναλλακτικών υποστρωμάτων για το συγκεκριμένο ένζυμο, καθώς τα υποστρώματα με την υψηλότερη τιμή του λόγου V_{max}/K_m τροποποιούνται αποτελεσματικότερα από το ένζυμο.

Η μέγιστη ταχύτητα της αντίδρασης V_{max} αντιστοιχεί στο γινόμενο της σταθεράς k_2 και της ολικής συγκέντρωσης του ενζύμου $[E]_t$. Η σταθερά k_2 είναι εκείνη που κυρίως ρυθμίζει την όλη ταχύτητα της ενζυμικής αντίδρασης, μια και η δημιουργία του συμπλόκου ES είναι ταχύτερη, ενώ η εμφάνιση των προϊόντων είναι μια πιο αργή διαδικασία. Η k_2 μπορεί να θεωρηθεί ως η καταλυτική σταθερά της αντίδρασης και διεθνώς συμβολίζεται ως k_{cat} . Ισχύει δε η εξίσωση $V_{max} = k_{cat} [E]_t$.

Η k_{cat} (με μονάδα μέτρησης τον αντίστροφο χρόνο, $1/t$) αντιστοιχεί στον χρόνο που απαιτείται, ώστε ένα μόριο ενζύμου να μετατρέψει ένα μόριο υποστρώματος. Γι' αυτό και η k_{cat} καλείται και αριθμός ανακύκλησης ή αριθμός μετατροπής (turnover number). Όταν η ολική ποσότητα του ενζύμου $[E]_t$ ισούται με τη μονάδα, τότε $V_{max} = k_{cat}$, γι' αυτό και ο όρος αριθμός ανακύκλησης αποδίδεται πολλές φορές και στη V_{max} (Σταμάτης, 2018).

B5.4 Κατάταξη-ονοματολογία






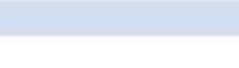
Το 1961, η Διεθνής Ένωση Βιοχημείας (IUB) σε συνεργασία με τη Διεθνή Επιτροπή Ενζύμων (Commission on Enzymes) και η Επιτροπή Βιοχημικής Ορολογίας των IUB και IUPAC (Διεθνής Ένωση Καθαρής και Εφαρμοσμένης Χημείας) υιοθέτησαν επίσημα τους κανόνες συστηματικής κατάταξης και ονοματολογίας των ενζύμων, σύμφωνα με τους οποίους τα ένζυμα κατατάχθηκαν σε 6 κύριες τάξεις (classes), ανάλογα με τη φύση των αντιδράσεων που καταλύουν (Σχήμα B17), έτσι διακρίνουμε τις:

1. Οξειδοοξειδοκτάσες ή οξειδοαναγωγάσες. Ένζυμα που καταλύουν την οξείδωση/αναγωγή του υποστρώματος
2. Τρανσφεράσες. Ένζυμα που καταλύουν τη μεταφορά ομάδων
3. Υδρολάσες. Ένζυμα που καταλύουν υδρολυτικές διασπάσεις δεσμών στο υπόστρωμα
4. Λυάσες. Ένζυμα που καταλύουν τη μη υδρολυτική διάσπαση δεσμών με σχηματισμό διπλού δεσμού ή την προσθήκη ομάδας σε διπλό δεσμό
5. Ισομεράσες. Ένζυμα που καταλύουν ενδομοριακές μεταβολές στο υπόστρωμα
6. Λιγάσες. Ένζυμα που καταλύουν το σχηματισμό δεσμών με ταυτόχρονη διάσπαση ATP ως δότη ενέργειας

Κάθε ένζυμο έχει έναν κωδικό αριθμό, που αποτελείται από το ακρωνύμιο EC (αρχικά της Enzyme Commission) συνοδευόμενο από 4 αριθμούς που καθορίζουν κατά σειρά:

- την τάξη
- τη φύση του δότη
- τον δέκτη ή τη μεταφερόμενη ομάδα
- την εξειδίκευση (υπόστρωμα).

Εκτός από τον κωδικό αριθμό, για κάθε ένζυμο καθορίστηκε μια συστηματική ονομασία (systematic name), που περιλαμβάνει όλα τα αντιδρώντα σώματα, μεταφερόμενες ομάδες, κ.λπ., με τελευταίο το όνομα της κύριας τάξης και υιοθετήθηκαν επίσημα ως "συνιστώμενες ονομασίες" (recommended names), οι καθιερωμένες ήδη εμπειρικές ονομασίες, είτε αυτούσιες, είτε με κάποιες τροποποιήσεις (Σταμάτης, 2018).

<p>EC 1.x.x.x Οξειδοαναγωγάσες Αναγωγή-Οξείδωση</p> 	<p>Οξειδάσες: Χρησιμοποιούν O₂ ως δέκτη ηλεκτρονίων αλλά δεν το ενσωματώνουν στο υπόστρωμα Δεϋδρογονάσες: Χρησιμοποιούν άλλα μόρια (όχι O₂) ως δέκτη ηλεκτρονίων Οξυγονάσες: Ενσωματώνουν απευθείας το οξυγόνο στο υπόστρωμα Υπεροξειδάσες: Χρησιμοποιούν H₂O₂ ως δέκτη ηλεκτρονίων</p>
<p>EC 2.x.x.x Τρανσφεράσες Απλή αντικατάσταση</p> 	<p>Μεθυλοτρανσφεράσες: Μεταφέρουν μια μεθυλ-ομάδα μεταξύ των υποστρωμάτων Αμινοτρανσφεράσες: Μεταφέρουν μια αμινο-ομάδα από ένα αμινοξύ σε ένα κετόξύ Κινάσες: Μεταφέρουν μια φωσφορική ομάδα από ATP στο υπόστρωμα Φωσφορυλάσες: Μεταφέρουν μια φωσφορική ομάδα από ανόργανο φώσφορο στο υπόστρωμα</p>
<p>EC 3.x.x.x Υδρολάσες Διπλή αντικατάσταση</p> 	<p>Λιπάσες: Υδρολύουν τριγλυκερίδια Πρωτεάσες: Υδρολύουν πεπτιδικούς δεσμούς Γλυκοσιδάσες: Υδρολύουν γλυκοσιδικούς δεσμούς Κιτταρινάσες, Αμιλάσες: Υδρολύουν γλυκοσιδικούς δεσμούς σε πολυσακχαρίτες</p>
<p>EC 4.x.x.x Λυάσες Διάσπαση</p> 	<p>Αποκαρβοξυλάσες: Παράγουν CO₂ μέσω αντιδράσεων διάσπασης Αλδολάσες: Παράγουν αλδεύδες μέσω αντιδράσεων διάσπασης Ενθάσες: Συνδέουν δύο μόρια χωρίς τη συμμετοχή ATP</p>
<p>EC 5.x.x.x Ισομεράσες Ισομερίωση</p> 	<p>Μουτάσες: Καταλύουν την ενδομοριακή μεταφορά ομάδων Ρυκεμάσες: Καταλύουν αντιδράσεις ρακεμίωσης (μετατροπή του L οπτικού αντιποδα ενός υποστρώματος σε D οπτικό αντιποδα)</p>
<p>EC 6.x.x.x Λιγάσες Σύνθεση</p> 	<p>Καρβοξυλάσες: Καταλύουν αντιδράσεις καρβοξυλίωσης χρησιμοποιώντας CO₂ ως υπόστρωμα Ενθθάσες: Συνδέουν δύο υποστρώματα με την ταυτόχρονη υδράλυση ενός πυροσταφυλικού δεσμού στο μόριο του ATP</p>

Σχήμα B17 Κατηγοριοποίηση των ενζύμων και χαρακτηριστικά παραδείγματα

B5.5 Οξειδάση της γλυκόζης (GOx)

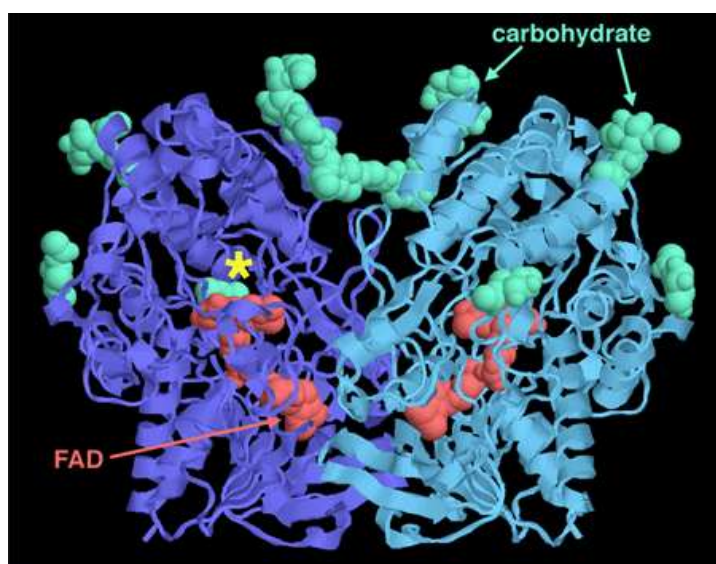
B5.5.1 Εισαγωγή

Η οξειδάση της γλυκόζης (GOx) είναι ένα σημαντικό φλαβονοένζυμο (για τη δράση της είναι απαραίτητο το συνένζυμο FAD) που χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της γλυκόζης σε φυσιολογικά υγρά και βιολογικά δείγματα. Το ένζυμο παράγεται από ορισμένα είδη μικροοργανισμών και εντόμων. Οι μέλισσες παράγουν οξειδάση της γλυκόζης στους υποφαρυγγικούς αδένες τους, η οποία στη συνέχεια μεταβιβάζεται στο μέλι και αποτελεί το φυσικό χημικό συντηρητικό του μελιού. Καθώς το υπεροξειδίο του

υδρογόνου που παράγεται από τη δράση του ενζύμου είναι βακτηριοκτόνο, η οξειδάση της γλυκόζης χρησιμοποιείται συχνά για τον σκοπό αυτό (π.χ. ως πρόσθετο σε οδοντόπαστες, σε τρόφιμα όπως το γιαούρτι) (Σταμάτης, 2018).

B5.5.2 Δομή της οξειδάσης της γλυκόζης

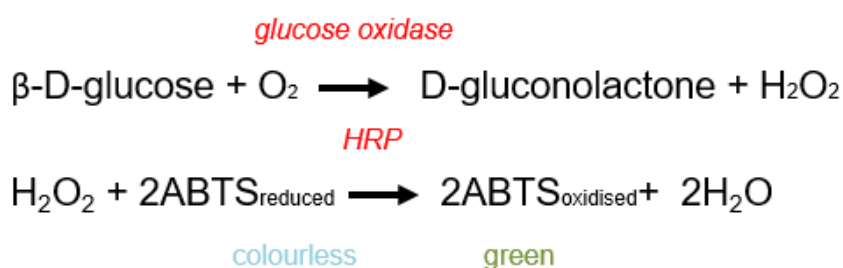
Η πρωτεΐνη αυτή είναι ένα διμερές δύο ταυτόσημων υπομονάδων με μοριακό βάρος 160,000 Da. Το διμερές περιέχει δύο δισουλφιδικούς δεσμούς, δύο ελεύθερες ομάδες σουλφυδρυλίου και δύο μόρια FAD, μη ομοιοπολικά συνδεδεμένα με το ένζυμο. Το διμερές αυτό χαρακτηρίζεται επίσης από υψηλό βαθμό εντοπισμού αρνητικών φορτίων επί της επιφάνειας του ενζύμου. Οι συμπαραγόνοτες φλαβίνης είναι υπεύθυνοι για τις οξειδοαναγωγικές ιδιότητες του ενζύμου. Σε μετουσιωτικές συνθήκες, οι υπομονάδες της GOD διαχωρίζονται συνοδευόμενες από την απώλεια του συμπαραγόνοτα FAD (Gouda et al., 2003). Όσον αφορά την πρωτοταγή δομή του ενζύμου πρόκειται για μια απλή πολυπεπτιδική αλυσίδα με 583 αμινοξικά κατάλοιπα σε κάθε μονομερές (Leskonac et al., 2005). Στη δευτεροταγή δομή κάθε μονομερές αποτελείται από 17 α-έλικες και 30 β-πτυχωτές επιφάνειες (Σχήμα B18) (Ciaurriz, Bravo & Hamad-Schifferli, 2014)



Σχήμα B18 Δομή της GOx με τις δύο υπομονάδες να απεικονίζονται με σκούρο και ανοιχτό μπλε, ενώ το συνένζυμο FAD με ροζ

B5.5.3 Μηχανισμός αντίδρασης

Η οξειδάση της γλυκόζης (β -D-glucose:oxygen-oxidoreductase, EC 1.1.3.4) από τον μύκητα *Aspergillus niger*, είναι μια φλαβονοπρωτεΐνη που καταλύει την οξείδωση της β -D-γλυκόζης σε D-γλυκονο-δ-λακτόνη (γλυκονικό οξύ) και υπεροξείδιο του υδρογόνου, χρησιμοποιώντας το μοριακό οξυγόνο ως δέκτη ηλεκτρονίων (Pluschkell, Hellmuth & Rinas, 1996. Hatzinikolaou & Macris, 1995). Η αντίδραση αυτή μπορεί να διαιρεθεί σε ένα αναγωγικό και ένα οξειδωτικό στάδιο (Σχήμα B19). Στο αναγωγικό ημίχρονο της αντίδρασης, η GOD καταλύει την οξείδωση της β -D-γλυκόζης σε D-γλυκονο-δ-λακτόνη, η οποία υδρολύεται σε γλυκονικό οξύ. Στη συνέχεια, η οξειδωμένη φλαβινομάδα (FAD) του GOD λαμβάνει δύο υδρογόνα και ανάγεται σε FADH₂. Στην οξειδωτική ημιαντίδραση, το ανηγμένο GOD επαναοξειδώνεται από το οξυγόνο για την παραγωγή H₂O₂. Το H₂O₂ διασπάται από την καταλάση (CAT) και παράγει νερό και οξυγόνο (Bankar et al., 2009).



Σχήμα B19 Αντίδραση οξείδωσης της γλυκόζης από την οξειδάση της γλυκόζης

B5.6 Νανοβιοτεχνολογία

B5.6.1 Εισαγωγή

Η Νανοβιοτεχνολογία, η σύνδεση δηλαδή Βιοτεχνολογίας και Νανοτεχνολογίας, είναι ένας ραγδαία αναπτυσσόμενος και πολλά υποσχόμενος κλάδος της επιστήμης και της μηχανικής, στον οποίο εφαρμόζονται τα επιτεύγματα της Νανοτεχνολογίας για τη μελέτη βιολογικών συστημάτων και την ανάπτυξη καινοτόμων τεχνολογιών.

Με αφετηρία τη νανοεπιστήμη, η νανοτεχνολογία είναι η μηχανική σχεδιασμού και κατασκευής λειτουργικών δομών που η μία τουλάχιστον διάστασή τους είναι μεταξύ 1-100nm. Η αξιοποίηση της διαφορετικής συμπεριφοράς της ύλης στη νανομετρική κλίμακα οδήγησε στην παραγωγή νέων νανοϋλικών με αξιοσημείωτες φυσικοχημικές, ηλεκτρομαγνητικές και οπτικές ιδιότητες, τα οποία έχουν ως πεδία εφαρμογής ποικίλους βιομηχανικούς τομείς. Ωστόσο, η επιστήμη της βιολογίας ήταν αυτή που όχι μόνο αποτέλεσε πεδίο εφαρμογής αλλά και έμπνευσης, καθώς η ίδια μικροκλίμακα με τα βασικά βιολογικά συστήματα, όπως, λόγω χάρη, το κύτταρο, προσέφερε ένα σημαντικό πεδίο αναζήτησης δομών και λειτουργιών που προσομοιάζουν σε αυτές των «νανομηχανών», όπως, λόγω χάρη, τα ριβοσώματα που πολυμερίζουν τα αμινοξέα σε αλυσίδα επιλέγοντας κάθε φορά ένα από αυτά και ενώνοντάς τα με συγκεκριμένη σειρά. Και στη νανοτεχνολογία απλά μόρια ή νανοδομές συναρμολογούνται ακολουθώντας συγκεκριμένους κανόνες (Σταμάτης, 2018).

Ο συνδυασμός και η αλληλεπίδραση της νανοτεχνολογίας και της μοριακής βιολογίας έχει ως αποτέλεσμα καινοτόμες πολυλειτουργικές συσκευές και συστήματα για τη βελτίωση των ερευνητικών μεθόδων βιοανάλυσης, όπως νανοσωλήνες, νανοσωματίδια, νανοπόρους και νανοϊνες, ανοίγοντας τον δρόμο για την εφαρμογή νέων και αποτελεσματικότερων διαγνωστικών και θεραπευτικών μεθόδων. Για παράδειγμα, η νανοβιοτεχνολογία έχει ανοίξει νέες προοπτικές με τη χρήση νανοϋλικών με ενισχυμένες ή ελεγχόμενες ιδιότητες για την καλύτερη απεικόνιση ιστών και οργάνων, την αποκατάσταση ακρωτηριασμών, ασθενειών του κεντρικού νευρικού συστήματος, την ανάπτυξη νανosuσκευών για την εφαρμογή στοχευμένων θεραπειών για την αντιμετώπιση του καρκίνου κ.ά.

B5.6.2 Ακίνητοποίηση ενζύμων

Η ακίνητοποίηση των ενζύμων μπορεί να οριστεί ως ο περιορισμός των μορίων του ενζύμου σε μια στερεή μήτρα/υποδομή διαφορετική από εκείνη στην οποία υπάρχουν το υπόστρωμα ή τα προϊόντα. Αυτό επιτυγχάνεται με την προσκόλληση των ενζύμων σε

κάποιο κατάλληλο υλικό στήριξης. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι τα μόρια του υποστρώματος και τα προϊόντα που σχηματίζονται πρέπει να κινούνται ελεύθερα μέσα και έξω από τη φάση στην οποία είναι περιορισμένα τα ένζυμα. Διάφορα υλικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μήτρα ή σύστημα υποστήριξης για την ακινητοποίηση των ενζύμων, γενικά αδρανή πολυμερή και ανόργανα υλικά. Η ιδανική μήτρα φορέα θα πρέπει να έχει τις ακόλουθες ιδιότητες: i) να είναι οικονομική, ii) να είναι αδρανής, (iii) σταθερότητα, (iv) φυσική αντοχή, (v) ικανότητα ενίσχυσης της ενζυμικής εξειδίκευσης/δραστηριότητας, (vi) δυνατότητα αναγέννησης, (vii) ικανότητα μείωσης της αναστολής του προϊόντος, και (viii) ικανότητα αποτροπής της μη ειδικής προσρόφησης και της βακτηριακής μόλυνσης. Οι περισσότερες μήτρες διαθέτουν μόνο ορισμένες από τις ιδιότητες, ως εκ τούτου, η επιλογή της μήτρας φορέα για την ακινητοποίηση ενζύμων πρέπει να είναι επιλέγεται με βάση τις ιδιότητες και τους περιορισμούς των μητρών (Sirisha, Jain & Jain, 2016).

B5.6.3 Ακινητοποίηση ενζύμων σε νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα

Παράδειγμα της αλληλεπιδραστικής σύνδεσης νανοτεχνολογίας και βιολογίας είναι η νανοβιοκατάλυση, δηλαδή η ακινητοποίηση των ενζύμων σε νανοδομές -κυρίως νανοϋλικά μεγάλης επιφάνειας- η οποία υπερτερεί σε σχέση με την ακινητοποίησή τους σε συμβατικά υλικά, καθώς, χάρη στα πλεονεκτήματα των νανοϋλικών, όπως οι μαγνητικές ιδιότητές τους, η ικανότητά τους να διευκολύνουν την κίνηση ηλεκτρονίων, η ομοιότητά τους σε μέγεθος με τα μόρια του ενζύμου, η αυξημένη ενεργή επιφάνειά τους που επιτρέπει την ακινητοποίηση περισσότερων ενζύμων, βελτιώνουν τις ενζυμικές ιδιότητες στα νανοβιοκαταλυτικά συστήματα, ιδιαίτερα όσον αφορά στην ενζυμική σταθερότητα και δραστηριότητα (Σταμάτης, 2018).

Τα νανοϋλικά που υπερτερούν στη βιοκατάλυση ως φορείς ακινητοποίησης ενζύμων είναι αυτά που έχουν ως βάση τον άνθρακα (CBNs) και συγκεκριμένα τα παράγωγα του γραφενίου και οι νανοσωλήνες άνθρακα. Στα πλεονεκτήματά τους έναντι άλλων νανοϋλικών ή συμβατικών υλικών, συγκαταλέγονται:

➤ η αυξημένη ενεργή επιφάνειά τους που επιτρέπει την ακινητοποίηση περισσότερων ενζυμικών μορίων, με συνέπεια την αυξημένη ενζυμική δραστηριότητα ανά μονάδα βάρους σε σχέση με άλλα συμβατικά υλικά.

➤ η χημική σύσταση της επιφάνειάς τους η οποία μπορεί να επηρεάσει τις αλληλεπιδράσεις με τα ένζυμα και να επιδράσει στην ακινητοποίηση όπως και στη διαμόρφωση των ακινητοποιημένων ενζύμων.

Επιπλέον, τα παράγωγα του γραφενίου και οι νανοσωλήνες άνθρακα μπορούν να συντεθούν με τρόπο ώστε να φέρουν επιθυμητές ιδιότητες, όπως συγκεκριμένες διαστάσεις και ομάδες στην επιφάνειά τους (π.χ. μέσω οξείδωσης της επιφάνειας ή χημικής τροποποίησης των οξυγονούχων ομάδων) (Πατήλα, 2016)..

B5.6.4 Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα ακινητοποίησης ενζύμων

Το ενδιαφέρον για τα ακινητοποιημένα ένζυμα πηγάζει από το γεγονός ότι η τεχνολογία αυτή, γενικά, προσφέρει ορισμένες δυνατότητες, όπως:

- αύξηση της σταθερότητας του ενζύμου
- εύκολο και άμεσο έλεγχο της αντίδρασης, με απλή προσθήκη ή αφαίρεση ενζύμου
- εύκολη και άμεση παραλαβή προϊόντος, εφόσον ένζυμο και προϊόν βρίσκονται σε διαφορετικές φάσεις (ετερογενές σύστημα)
- οικονομία, διότι μετά το πέρας της αντίδρασης χρησιμοποιείται το ίδιο ένζυμο πολλές φορές ακόμη, και
- δυνατότητα συνεχούς λειτουργίας της βιοκαταλυτικής αντίδρασης.

Η τεχνολογία ακινητοποιημένων ενζύμων παρουσιάζει σημαντικές δυνατότητες και καταξιωμένες βιομηχανικές εφαρμογές και αποκτά ιδιαίτερη σημασία στις περιπτώσεις βιοκαταλυτών που έχουν υψηλό κόστος (Κλώνης, 2014).

Παρά τα πολλά πλεονεκτήματα σημαντικά είναι και τα μειονεκτήματα που παρουσιάζονται κατά την ακινητοποίηση των ενζύμων.

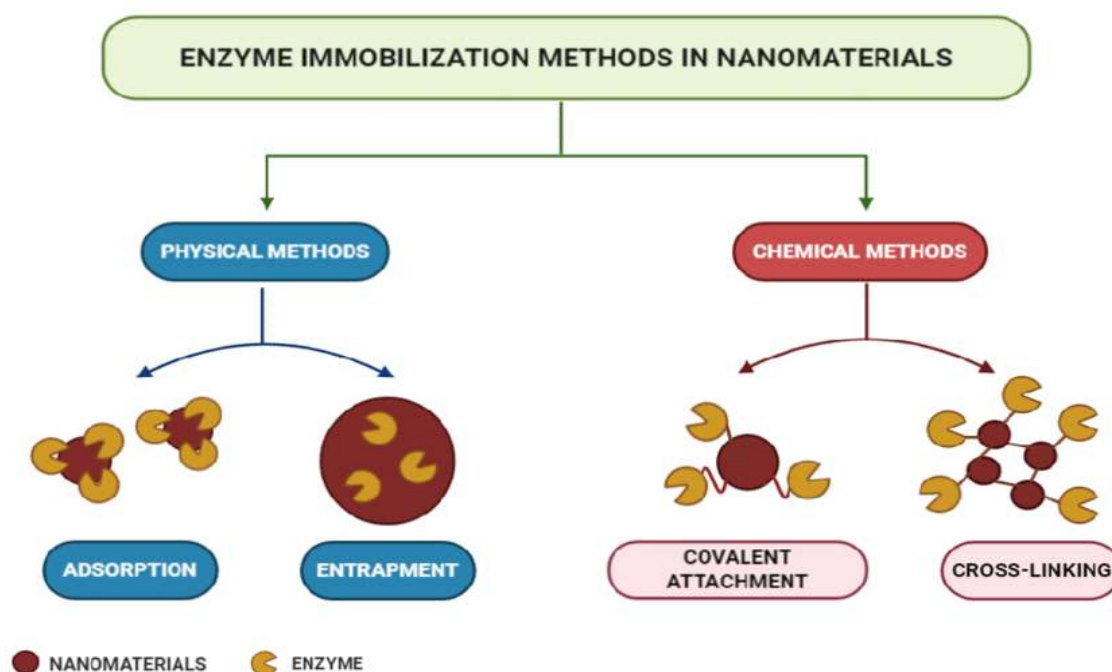
1. Επίδραση της ακινητοποίησης στα μοριακά χαρακτηριστικά του ενζύμου:

- Μεταβολές στη στερεοδιάταξη: Τα χρησιμοποιούμενα κατά την ακινητοποίηση χημικά είναι δυνατόν να αντιδράσουν κατά τρόπο μη αναστρέψιμο και με ομάδες της ενεργού περιοχής, με αποτέλεσμα την αδρανοποίηση του ενζύμου. Επίσης, το μόριο ακινητοποιημένου ενζύμου, συνήθως, δεσμεύεται στον φορέα σε περισσότερα από ένα σημεία. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του βαθμού ελευθερίας του βιομορίου για στερεοδιατακτικές μεταβολές κατά την καταλυτική αντίδραση.
 - Στερεοχημικοί περιορισμοί: Οφείλονται στο γεγονός ότι η δομή του φορέα βρίσκεται, υποχρεωτικά, πολύ κοντά στο ακινητοποιημένο ένζυμο και, γενικά, επηρεάζει το τελευταίο είτε σταθεροποιώντας τη δομή του ενζύμου και αυξάνοντας τη λειτουργική του σταθερότητα, είτε επηρεάζοντας τη φαινομενική ενζυμική δραστηριότητα.
 - Λειτουργική σταθερότητα: Είναι δυνατόν η παρατηρούμενη σταθερότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου να είναι φαινομενική και να υπάρχει λειτουργική σταθερότητα και όχι σταθεροποίηση του μορίου.
2. Επίδραση της ακινητοποίησης στα κινητικά χαρακτηριστικά του ενζύμου:
- Φαινόμενα κατανομής: Εμφανίζονται ως αποτέλεσμα ανάπτυξης απωστικών ή ελκτικών δυνάμεων μεταξύ μορίων και φορέα, οδηγώντας, αντίστοιχα, σε μείωση ή σε αύξηση της συγκέντρωσης των συγκεκριμένων μορίων στο ενζυμικό μικροπεριβάλλον, γεγονός το οποίο επηρεάζει την έκβαση της ενζυμικής αντίδρασης.
 - Φαινόμενα περιορισμού διάχυσης: Οφείλονται στην παρεμπόδιση της ελεύθερης διάχυσης μορίων λόγω της φυσικής παρουσίας του φορέα, γεγονός που οδηγεί, προχωρώντας προς το εσωτερικό του φορέα, σε βαθμιαία μείωση της συγκέντρωσης υποστρώματος στο ενζυμικό μικροπεριβάλλον, με αντίστοιχη αύξηση της συγκέντρωσης του προϊόντος.
3. Επίδραση της ακινητοποίησης στην αναστολή ενζυμικής αντιδράσεως:
- Φαινόμενα κατανομής αναστολέα του ενζύμου έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση ή την αύξηση της επίδρασής του στην ενζυμική αντίδραση, ανάλογα με το εάν αυτός, αντίστοιχα, απωθείται ή έλκεται από τον φορέα (Κλώνης, 2014)..

B5.6.5 Τεχνικές ακινητοποίησης ενζύμων

Η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου ακινητοποίησης είναι ένα πολύ κρίσιμο μέρος της διαδικασίας ακινητοποίησης, καθώς παίζει τον μεγαλύτερο ρόλο στον καθορισμό της ενζυμικής δραστηριότητας και των χαρακτηριστικών σε μια συγκεκριμένη αντίδραση.

Οι μέθοδοι ακινητοποίησης μπορούν να χωριστούν σε δύο γενικές κατηγορίες, τις φυσικές και τις χημικές μεθόδους (Σχήμα B20). Οι φυσικές μέθοδοι χαρακτηρίζονται από ασθενέστερες, μονοσθενείς αλληλεπιδράσεις, όπως δεσμοί υδρογόνου, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, δυνάμεις van der Waals, δεσμοί συγγένειας, ιοντική σύνδεση του ενζύμου με το υλικό στήριξης ή μηχανική συγκράτηση του ενζύμου μέσα στο υλικό στήριξης. Οι χημικές μέθοδοι χαρακτηρίζονται από τον σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών μεταξύ του ενζύμου και του φορέα ακινητοποίησης. Ωστόσο, καμία μέθοδος δεν είναι ιδανική για όλα τα μόρια ή τους σκοπούς, λαμβάνοντας υπόψη την εγγενώς πολύπλοκη φύση της πρωτεϊνικής δομής (Mohamad et al., 2015).



Σχήμα B20 Σχηματική απεικόνιση των τεχνικών ακινητοποίησης ενζύμων

B5.6.5.1 Φυσικές μέθοδοι

➤ Μη ομοιοπολική ακινητοποίηση – φυσική προσρόφηση

Η μη ειδική σύνδεση μέσω της φυσικής προσρόφησης αποτελεί μια εύκολη διαδικασία που αυξάνει την αποτελεσματικότητα της ακινητοποίησης χωρίς να διαταράσσει την επιφάνεια του νανοϋλικού (Li et al., 2013. Mesarič et al., 2013). Συνήθως η διαδικασία που ακολουθείται περιλαμβάνει αρχικά τη διασπορά του νανοϋλικού στο μέσο ακινητοποίησης, στη συνέχεια την προσθήκη του ενζύμου και έπειτα την επώαση του μίγματος για συγκεκριμένη χρονική περίοδο. Ένας άλλος τρόπος που αφορά στην περίπτωση σύνθεσης βιοαισθητήρων είναι να αφήνεται ένα διάλυμα του ενζύμου να στεγνώσει στις επιφάνειες των ηλεκτροδίων. Και στις δύο περιπτώσεις τελικό στάδιο αποτελεί η ανάκτηση του βιοκαταλύτη ή βιοαισθητήρα μέσω διαδοχικών βημάτων ξεπλύματος (Πατήλα, 2016. Mohamad et al., 2015).

Στις αλληλεπιδράσεις που αναπτύσσονται μεταξύ των ενζύμων και των νανοϋλικών κατά τη διαδικασία της ακινητοποίησης, σημαντικό ρόλο παίζει τόσο η χημική σύσταση της επιφάνειας του νανοϋλικού όσο και η γεωμετρία του. Η προσρόφηση σε νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα (carbon based nanomaterials-CBNs) μπορεί να πραγματοποιηθεί μέσω ασθενών μη ειδικών δυνάμεων, όπως οι van der Waals, οι υδρόφοβες ή π-π αλληλεπιδράσεις και οι δεσμοί υδρογόνου. Πιο συγκεκριμένα, ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις μπορούν να αναπτυχθούν μεταξύ των φορτισμένων ομάδων των τροποποιημένων CBNs και του πρωτεϊνικού μορίου επηρεάζοντας την απόδοση ακινητοποίησης. Από την άλλη μεριά, οι υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις που δημιουργούνται μεταξύ της υδρόφοβης επιφάνειας του νανοϋλικού και των υδρόφοβων αμινοξέων στην επιφάνεια του ενζύμου, μπορούν επίσης να παίξουν σημαντικό ρόλο κατά τη διαδικασία της μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης (Πατήλα, 2016).. Τέλος, δυνάμεις έλξης (π-π αλληλεπιδράσεις) μπορούν επίσης να δημιουργηθούν, κατά τη διαδικασία της φυσικής προσρόφησης μεταξύ των αρωματικών δακτυλίων της επιφάνειας των νανοϋλικών και των αρωματικών αμινοξέων που εκτίθενται στην επιφάνεια του ενζύμου.

Σε γενικές γραμμές, η ακινητοποίηση ενζύμων μέσω της τεχνικής της φυσικής προσρόφησης είναι αρκετά απλή και μπορεί να έχει μεγαλύτερες εμπορικές δυνατότητες

λόγω της απλότητας, του χαμηλού κόστους και της διατήρησης υψηλής ενζυμικής δραστηριότητας, καθώς και της δέσμευσης ενζύμων χωρίς χημικές ουσίες. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η παραγωγικότητα των κυττάρων δεν επηρεάζεται, αλλά η μέθοδος αυτή έχει μερικά μειονεκτήματα, για παράδειγμα, είναι αρκετά επιρρεπής σε αλλαγές υπό ορισμένες συνθήκες, όπως το pH, η θερμοκρασία και η ιοντική ισχύς του ρυθμιστικού διαλύματος. Ο φυσικός δεσμός είναι γενικά πολύ αδύναμος για να κρατήσει το ένζυμο σταθερό στον φορέα και είναι επιρρεπής στην έκπλυση του ενζύμου. Η έκπλυση του ενζύμου μπορεί να ενισχυθεί περαιτέρω όταν υποβάλλεται σε βιομηχανικές συνθήκες υψηλών συγκεντρώσεων αντιδρώντων και προϊόντων και υψηλής ιοντικής ισχύος, με αποτέλεσμα την πιθανή μόλυνση του υποστρώματος (Mohamad et al., 2015).

➤ **Εγκλωβισμός ενζύμων**

Η μέθοδος αυτή αναφέρεται στον περιορισμό των βιοκαταλυτών σε έναν φορέα από όπου εμποδίζεται η έξοδος των μορίων του βιοκαταλύτη, επιτρέποντας τη διέλευση των υποστρωμάτων και των προϊόντων (Σταμάτης, 2018). Ο φορέας αυτός μπορεί να είναι είτε ένα πολυμερικό δίκτυο είτε το εσωτερικό ινών είτε δομές ημιπερατών μεμβρανών. Η μέθοδος επιτρέπει τη δυνατότητα τροποποίησης του φορέα ακινητοποίησης με προοπτική τη δημιουργία ενός βέλτιστου μικροπεριβάλλοντος για το ένζυμο, όπως βέλτιστο pH.

Ο λόγος του μεγέθους των ακινητοποιημένων σωματιδίων προς το μέγεθος των πόρων του υλικού στήριξης είναι κρίσιμος παράγοντας για την ακινητοποίηση καθώς επηρεάζει την κατεύθυνση της προσρόφησης (η προσρόφηση μπορεί να γίνει μόνο εξωτερικά αν οι πόροι είναι πολύ μικροί και το αντίστροφο). Διάφορα πολυμερή υλικά όπως το αλγινικό, το κολλαγόνο, το πολυακρυλαμίδιο, η ζελατίνη και η πολυουρεθάνη, έχουν χρησιμοποιηθεί για την ενθυλάκωση και τον εγκλωβισμό ενζύμων.

Μειονεκτήματα της μεθόδου αποτελούν η πιθανότητα διαρροής του ενζύμου που μπορεί να συμβεί όταν οι πόροι της μήτρας στήριξης είναι πολύ μεγάλοι, η απενεργοποίηση κατά την ακινητοποίηση, η χαμηλή ικανότητα μεταφοράς μάζας και η τριβή του υλικού στήριξης κατά τη χρήση (Mohamad et al., 2015).

➤ Ακίνητοποίηση μέσω συγγένειας

Η ακίνητοποίηση μέσω αντιδράσεων συγγένειας, στηρίζεται στην αρχή της συμπληρωματικότητας μεταξύ των βιομορίων, η οποία αποτελεί και το βασικότερο πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου (Πατήλα, 2016). Εκμεταλλευόμενη την εκλεκτικότητα συγκεκριμένων αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα σε όλες σχεδόν τις βιολογικές διεργασίες των ζωντανών οργανισμών, η ακίνητοποίηση επιτυγχάνεται με δύο τρόπους: είτε η μήτρα είναι προσυνδεδεμένη με μια συγγενική ουσία για το ένζυμο-στόχο είτε το ένζυμο είναι συζευγμένο με ένα άλλο μόριο το οποίο αναπτύσσει συγγένεια προς τη μήτρα (Datta, Christena & Rajaram, 2013). Μερικά παραδείγματα τέτοιων περιπτώσεων είναι ένα αντίσωμα με το αντιγόνο του, η λεκτίνη με τις ελεύθερες αλυσίδες σακχαριτών ή γλυκοζυλιωμένων μορίων, τα νουκλεϊκά οξέα με τις πρωτεΐνες που δεσμεύουν νουκλεϊκά οξέα, οι ορμόνες και οι υποδοχείς τους, η αβιδίνη με τη βιοτίνη και άλλα. Η χρήση της τεχνικής αυτής έχει αναφερθεί σε περιπτώσεις τροποποίησης του οξειδίου του γραφενίου με διάφορα αντισώματα ή πρωτεΐνες για την αναγνώρισή του από αντιγόνα ή νουκλεϊκά οξέα αντίστοιχα (Σταμάτης, 2018. Πατήλα, 2016).

B5.6.5.2 Χημικές μέθοδοι

➤ Ομοιοπολική ακίνητοποίηση

Η μέθοδος ομοιοπολικής ακίνητοποίησης βασίζεται στη σύνδεση του ενζύμου με τον φορέα ακίνητοποίησης μέσω της δημιουργίας ισχυρού ομοιοπολικού δεσμού οδηγώντας στη δημιουργία ενός ισχυρού νανοβιοκαταλύτη και στην αποφυγή της πρωτεϊνικής διαρροής, δηλαδή της σταδιακής αποκόλλησης των πρωτεϊνικών μορίων από την επιφάνεια του φορέα ακίνητοποίησης (Σταμάτης, 2018), για ευρύ φάσμα pH και θερμοκρασιών.

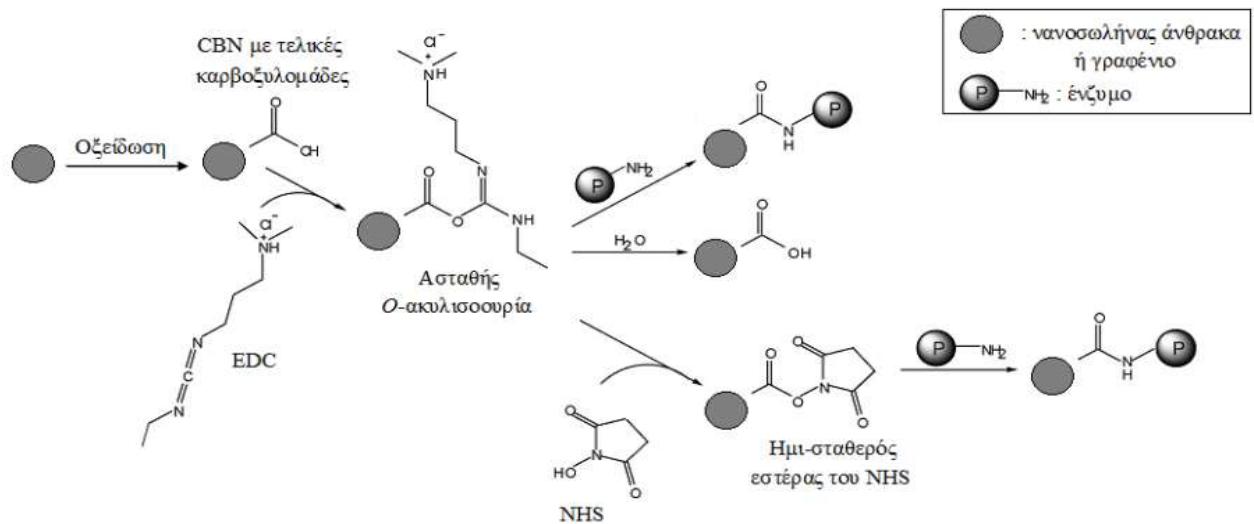
Ο δεσμός σχηματίζεται συνήθως μεταξύ λειτουργικών ομάδων που υπάρχουν στην επιφάνεια του φορέα και λειτουργικών ομάδων που ανήκουν σε κατάλοιπα αμινοξέων

στην επιφάνεια του ενζύμου. Ορισμένες λειτουργικές ομάδες αμινοξέων είναι κατάλληλες για συμμετοχή στον σχηματισμό ομοιοπολικών δεσμών. Αυτές που συμμετέχουν συχνότερα είναι η αμινομάδα (NH*) της λυσίνης ή της αργινίνης, η υδροξυλομάδα (OH) της σερίνης ή της θρεορίνης, η σουλφυδρυλομάδα (SH) της κυστεΐνης (Bickerstaff 1997) και του ασπαρτικού και του γλουταμινικού οξέος η καρβοξυλική ομάδα (CO*H) και ομάδες ιμιδαζολίου και φαινολικές ομάδες (Mohamad et al., 2015).

Για τη δημιουργία δεσμών μεταξύ των ενζύμων και των νανοϋλικών με βάση τον άνθρακα, πραγματοποιείται χημική τροποποίηση των τελευταίων με την προσθήκη λειτουργικών ομάδων στην επιφάνειά τους οι οποίες ευνοούν τη διαδικασία σύνδεσης. Η προσέγγιση αυτή απαιτεί την παρουσία ενός χημικού παράγοντα που δρα ως γέφυρα μεταξύ των τελικών λειτουργικών ομάδων του τροποποιημένου νανοϋλικού και των πλευρικών αλυσίδων των αμινοξέων που βρίσκονται στην επιφάνεια του ενζύμου (Σταμάτης, 2018).

▪ **Ομοιοπολική ακινητοποίηση με χρήση EDC/NHS**

Η πιο κοινή προσέγγιση που εφαρμόζεται σε νανοϋλικά που περιέχουν στην επιφάνειά τους ελεύθερες καρβοξυλομάδες, όπως το οξείδιο του γραφενίου, στηρίζεται στη χρήση ενός καρβοδιιμιδίου, όπως το 1-αιθυλ-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο) καρβοδιιμίδιο (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide, EDC) και του N-υδροσουκινιμίδιο (Nhydroxysuccinimide, NHS). Η αντίδραση σύζευξης που πραγματοποιείται αποτελείται από δύο συνεχόμενα βήματα (Σχήμα B21). Αρχικά, το EDC αντιδρά με την καρβοξυλομάδα του νανοϋλικού προς σχηματισμό ενός ενδιάμεσου O-ακυλισοουρίας, το οποίο στη συνέχεια μπορεί να αντιδράσει με μια αμινομάδα και να δημιουργήσει ένα αμιδικό δεσμό. Ωστόσο, το ενδιάμεσο της O-ακυλισοουρίας που σχηματίζεται είναι πολύ ασταθές και ευαίσθητο στην υδρόλυση. Για αυτόν τον λόγο, η προσθήκη του NHS είναι σημαντική και προτιμάται, καθώς σταθεροποιεί αυτό το ενδιάμεσο μετατρέποντάς το σε ένα ημι-σταθερό NHS-εστέρα, που μπορεί να αντιδράσει με αμίνες και να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της σύζευξης (Σταμάτης, 2018. Πατήλα, 2016).

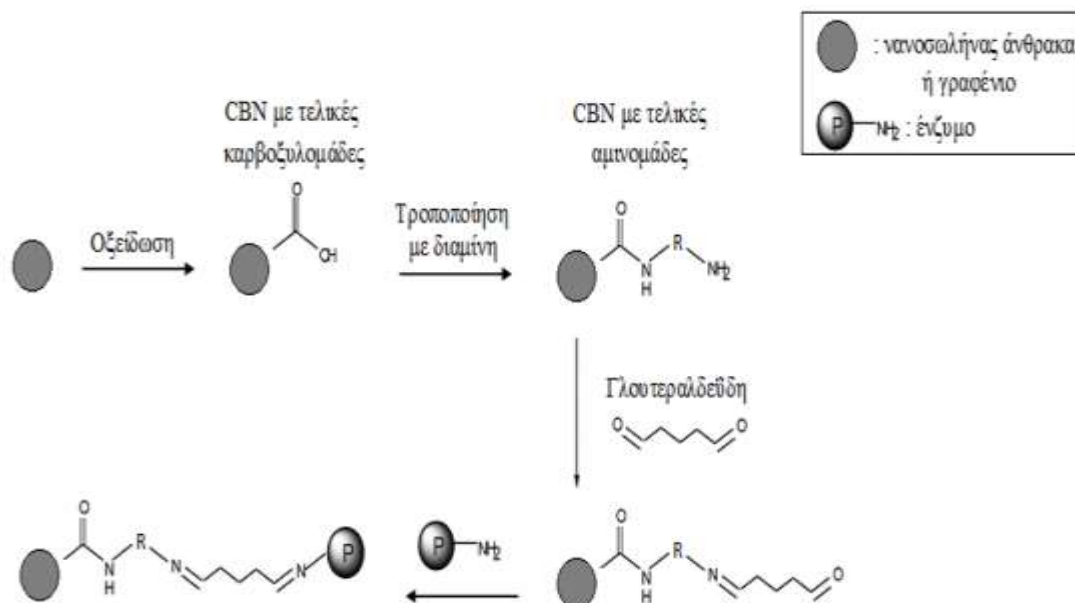


Σχήμα B21 Σύνδεση ενζύμων με νανοϋλικά που περιέχουν καρβοξυλομάδες με βάση τον άνθρακα μέσω της χρήσης EDC, παρουσία ή απουσία NHS

▪ **Ομοιοπολική ακινητοποίηση με χρήση γλουτεραλδεΐδης-διασταυρούμενη σύνδεση**

Μια εναλλακτική προσέγγιση ομοιοπολικής ακινητοποίησης αποτελεί η διασταυρούμενη (ή σταυρωτή) σύνδεση. Τα διασταυρωμένα ένζυμα ως μέθοδος ακινητοποίησης παρουσιάστηκαν τη δεκαετία του 1960 από τους Quijcho και Richards για τη διασταυρούμενη καρβοξυπεπτιδάση και από τον Habeeb για τη διασταυρούμενη θρυψίνη (Lee & Au-Duong, 2018). Τεχνικά, η διασταύρωση πραγματοποιείται με τον σχηματισμό διαμοριακών διασταυρούμενων δεσμών μεταξύ των ελεύθερων αμινομάδων που υπάρχουν στην επιφάνεια των τροποποιημένων νανοϋλικών και των καταλοίπων λυσίνης που βρίσκονται στην επιφάνεια του ενζυμικού μορίου με τη βοήθεια δι- ή πολυλειτουργικών αντιδραστηρίων. Η πιο κοινή ένωση για τη διασύνδεση αμινομάδων, λόγω της διαλυτότητάς της σε υδατικούς διαλύτες και της ικανότητάς της να σχηματίζει σταθερούς ομοιοπολικούς δεσμούς, είναι η γλουτεραλδεΐδη, μια ουσία οικονομική και εύκολα διαθέσιμη σε μεγάλες ποσότητες (Mohamad et al., 2015. Sirisha, Jain & Jain, 2016). Κατά τη διαδικασία της διασύνδεσης, οι ελεύθερες αμινομάδες του τροποποιημένου υποστρώματος (νανοϋλικού) ενεργοποιούνται από τη γλουτεραλδεΐδη και στη συνέχεια οι ελεύθερες κετο-ομάδες διασυνδέονται με τις αμινομάδες του ενζύμου μέσω σχηματισμού μιας βάσης Schiff (Σχήμα B22). Η εφαρμογή της μεθόδου αυτής προϋποθέτει την ύπαρξη αμινομάδων στην επιφάνεια του νανοϋλικού. Για τον λόγο αυτό,

τα ήδη οξειδωμένα νανοϋλικά τροποποιούνται με διάφορες διαμίνες ώστε να προκύψουν τροποποιημένα νανοϋλικά που φέρουν ελεύθερες αμινομάδες (Σταμάτης, 2018. Πατήλα, 2016).



Σχήμα Β22 Σύνδεση ενζύμων με νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα που περιέχουν αμινομάδες μέσω της χρήσης γλουτεραλδεΐδης

Όπως στην περίπτωση νανοϋλικών με τελικές καρβοξυλομάδες και αμινομάδες, έτσι και σε άλλες περιπτώσεις νανοϋλικών με διαφορετικού είδους τελικές λειτουργικές ομάδες, έχουν αναπτυχθεί τεχνικές για την ακινητοποίηση πρωτεϊνών. Νανοϋλικά με τελικές υδροξυλομάδες όπως, επίσης, και νανοϋλικά που περιέχουν στην επιφάνειά τους ελεύθερες θειολομάδες μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως φορείς ακινητοποίησης εφαρμόζοντας για την ενεργοποίησή τους ενώσεις όπως σουλφονυλ-αλογονίδια και προπιονικό εστέρα, αντίστοιχα (Σταμάτης, 2018. Πατήλα, 2016).

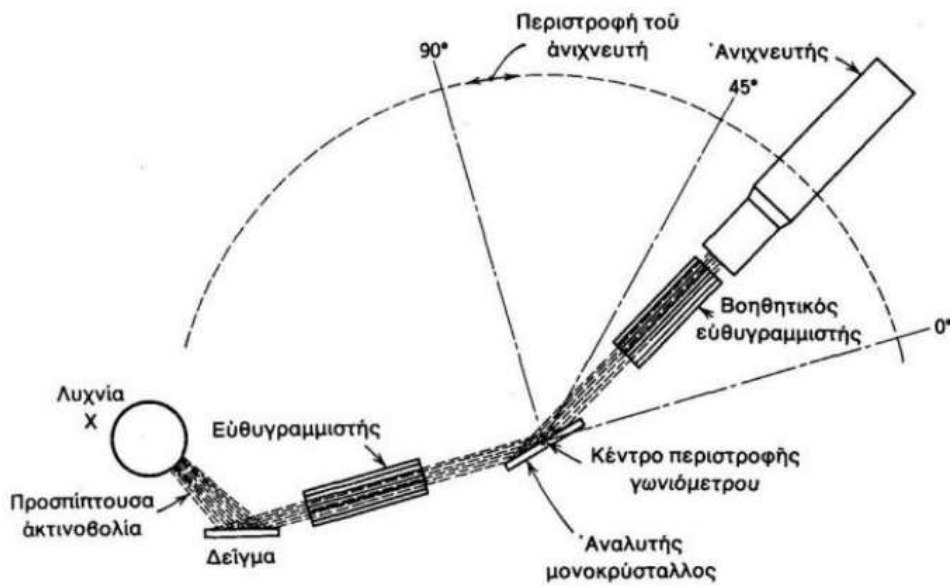
Παρόλο που η διασταύρωση είναι μια διαδικασία με ελάχιστη πρωτεϊνική διαρροή, μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η αναπόφευκτη απώλεια δραστηριότητας που προκύπτει από την αλλαγή της δομικής διαμόρφωσης του ενζύμου λόγω της διασύνδεσης με διασταυρούμενους δεσμούς (Lee & Au-Duong, 2018).

B6 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ

B6.1 Περίθλαση ακτίνων-X (XRD)

Οι ακτίνες-X είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία και αποτελούν τμήμα του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Το μήκος κύματος λ της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας και η συχνότητα του ν , συνδέονται με τη σχέση: $c = \lambda \nu$. Τα μήκη κύματος των ακτίνων-X εκτείνονται στην περιοχή μεταξύ 0.1\AA και 10 nm . Η κυματική θεωρία της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας επιτρέπει την ερμηνεία φαινομένων όπως η περίθλαση, η σκέδαση, η ανάκλαση και η διάθλαση.

Η λυχνία ακτίνων-X είναι διάταξη η οποία παράγει ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία στην περιοχή των ακτίνων-X. Ένα νήμα (κάθοδος) θερμαίνεται εφαρμόζοντας τάση, της τάξης των μερικών Volt, στα άκρα του. Το θερμαινόμενο νήμα προκαλεί θερμοϊονική εκπομπή ηλεκτρονίων. Η ροή αυτή των ηλεκτρονίων, η οποία κατευθύνεται από το νήμα στην άνοδο στόχο, οφείλει να είναι ιδιαίτερα σταθερή και καλά ελεγχόμενη. Το ηλεκτρικό αυτό ρεύμα (ροή ηλεκτρονίων) είναι της τάξης των mA. Μια διαφορά τάσης αρκετών kV εφαρμόζεται μεταξύ του νήματος (κάθοδος) και του στόχου (άνοδος) η οποία χρησιμεύει ως δυναμικό επιτάχυνσης των ηλεκτρονίων. Τα ηλεκτρόνια χτυπούν τον στόχο με μέγιστη κινητική ενέργεια, ίση με τη διαφορά δυναμικού που εφαρμόζεται μεταξύ ανόδου και καθόδου. Όταν τα ηλεκτρόνια υψηλής ενέργειας προσπίπτουν στην επιφάνεια της ανόδου παράγονται ακτίνες-X. Το μέγιστο της ισχύος (~ 99%) καταναλώνεται ως θερμότητα καθιστώντας αναγκαία τη ψύξη της λυχνίας ακτίνων-X. Το φάσμα εκπομπής φωτονίων ακτίνων-X μετράται με τη χρήση κρυσταλλικού φασματοσκοπίου ακτίνων-X, τα σημαντικότερα μέρη του οποίου είναι η πηγή των ακτίνων-X, ο κρύσταλλος-στόχος, ο ανιχνευτής των φωτονίων ακτίνων-X και ο γωνιομετρικός κύκλος (Σχήμα B23).



Σχήμα Β23 Διάταξη μέτρησης περίθλασης ακτίνων-Χ

Φωτόνια ακτίνων-Χ που εκπέμπονται από τη λυχνία προσπίπτουν στον κρύσταλλο στόχο. Τα κρυσταλλικά στερεά αποτελούνται από κανονικά διατεταγμένα άτομα ή μόρια. Καθώς το μήκος κύματος των φωτονίων με ενέργεια της τάξης των 10 KeV, είναι λίγο μικρότερο από τις αποστάσεις μεταξύ των ατόμων ή των μορίων στα στερεά, ο κρύσταλλος δρα ως ένα είδος φράγματος περίθλασης. Επειδή ο κρύσταλλος έχει τρεις διαστάσεις τα φαινόμενα περίθλασης είναι πιο έντονα από ότι στην περίπτωση δισδιάστατου φράγματος. Για ορισμένες σχετικές θέσεις κρυστάλλου, ανιχνευτή και δέσμης ακτίνων-Χ, όλα τα άτομα συμβάλλουν εποικοδομητικά στην περίθλαση. Το φαινόμενο αυτό αποκαλείται περίθλαση Bragg. Η εξίσωση

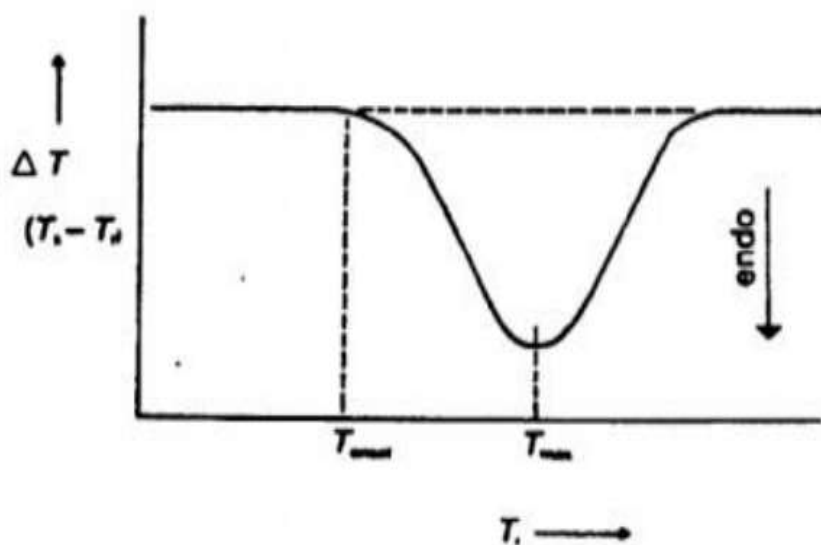
$$n\lambda = 2 d \sin\theta \text{ (όπου } n = 1,2,3,4\dots)$$

είναι γνωστή σαν εξίσωση Bragg. Στην παραπάνω εξίσωση συνδέονται τα n , λ , d και θ που αντιστοιχούν στην τάξη των μεγίστων περίθλασης, στο μήκος κύματος των ακτίνων-Χ, στην απόσταση μεταξύ δύο διαδοχικών κρυσταλλογραφικών επιπέδων και στη γωνία πρόσπτωσης ανάκλασής τους.

B6.2 Θερμική ανάλυση (DTA/TGA)

Όταν μία ουσία θερμαίνεται υφίσταται μεταβολή της κατάστασής της, όπως για παράδειγμα αλλαγή φάσεως (τήξη, εξάτμιση κ.λπ.) και διάσπαση. Τέτοιες μεταβολές συνοδεύονται σχεδόν πάντα από μεταβολές στη θερμοκρασία ή (και) τη μάζα του δείγματος και μελετώνται χρησιμοποιώντας μία ή περισσότερες από τις τεχνικές θερμικής ανάλυσης. Τα φαινόμενα που λαμβάνουν χώρα κατά τη θερμική ανάλυση ενός δείγματος χωρίζονται σε δύο κατηγορίες, φυσικά και χημικά. Ορισμένες από τις σημαντικές τεχνικές θερμικής ανάλυσης είναι η διαφορική θερμική ανάλυση (DTA) και η θερμοβαρυντική ανάλυση (TGA). Όσον αφορά στη διαφορική θερμική ανάλυση (DTA), τόσο το εξεταζόμενο δείγμα όσο και το υλικό αναφοράς (που είναι συνήθως αλούμινα) υπόκεινται σε ένα ελεγχόμενο πρόγραμμα θέρμανσης ή ψύξης, το οποίο είναι συνήθως γραμμικό σε σχέση με τον χρόνο. Αρχικά, υπάρχει μία μηδενική θερμοκρασιακή διαφορά μεταξύ δείγματος και υλικού αναφοράς, εφόσον το δείγμα δεν υπόκειται σε καμία φυσική ή χημική μεταβολή. Εάν ωστόσο λαμβάνει χώρα οποιαδήποτε διεργασία, τότε ανάμεσα στο δείγμα και το υλικό αναφοράς αναπτύσσεται μια θερμοκρασιακή διαφορά ΔT .

Κατά τη διάρκεια μίας ενδόθερμης μεταβολής, όταν δηλαδή το δείγμα τήκεται ή εφυδατώνεται, η θερμοκρασία του δείγματος είναι κατώτερη από αυτήν του υλικού αναφοράς. Αυτή η κατάσταση είναι μεταβατική, διότι με την ολοκλήρωση της διεργασίας το δείγμα αποκτά εκ νέου μηδενική θερμοκρασιακή διαφορά, συγκρινόμενο με το υλικό αναφοράς. Έστω ότι μία ενδόθερμη διεργασία λαμβάνει χώρα στον χώρο S (όπου ισχύει $\Delta H > 0$, όπως στην τήξη). Κατά τη διάρκεια του φαινομένου αυτού η θερμοκρασία του δείγματος T_s εμφανίζεται μικρότερη από αυτήν της αναφοράς T_r , η οποία ακολουθεί την προγραμματισμένη θέρμανση. Εάν η διαφορά θερμοκρασίας $\Delta T = T_s - T_r$ καταγραφεί συναρτήσει του T_r , λαμβάνεται καμπύλη όμοια με αυτή του Σχήματος B24.



Σχήμα B24 Τυπική καμπύλη του DTA

Όσον αφορά τη θερμοβαρυτική ανάλυση (TGA), μεταβάλλεται η μάζα κατά τον θερμικό μετασχηματισμό, δηλαδή με τη βοήθεια κατάλληλης συσκευής υπολογίζεται η μεταβολή του βάρους κατά την αύξηση της θερμοκρασίας, σε περιπτώσεις οξείδωσης, διάσπασης κ.λπ..

B6.3 Φασματοσκοπία μέσου υπέρυθρου (FT-IR)

Η υπέρυθη φασματοσκοπία είναι μια από τις σημαντικότερες φασματοσκοπικές τεχνικές με πολλές εφαρμογές στη Χημεία και στην Επιστήμη Υλικών. Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για τον χαρακτηρισμό των υλικών, την πιστοποίηση της καθαρότητας των χημικών ουσιών, καθώς επίσης για την παροχή πληροφοριών όσον αφορά στη μοριακή δομή και το περιβάλλον μιας ένωσης ή ενός υλικού. Γενικά, όταν υπέρυθη ακτινοβολία προσπίπτει σε ένα υλικό, μπορεί να το διαπεράσει, να σκεδαστεί ή να απορροφηθεί από αυτό. Η απορροφημένη υπέρυθη ακτινοβολία συνήθως διεγείρει μόρια σε υψηλότερες στάθμες δόνησης, που είναι κβαντισμένες. Αυτό παρατηρείται όταν η ενέργεια της ακτινοβολίας είναι ίση με τη διαφορά δύο ενεργειακών δονητικών σταθμών.

Στην περιοχή υπέρυθρου του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας ένα μόριο είναι δυνατόν να δονείται με περισσότερους από ένα τρόπους, γεγονός που καθιστά

ιδιαίτερα πολύπλοκη τη συνολική κίνηση των ατόμων. Έτσι, παρατηρούνται απορροφήσεις που οφείλονται σε εκτάσεις και κάμψεις των δεσμών των μορίων. Ζώνες απορρόφησης προκύπτουν και από άλλους τρόπους δόνησης, όπως είναι οι δονήσεις έκτασης ή τάσης (stretch), που είναι μεταβολές στο μήκος των δεσμών, παραμόρφωσης (deformation), κάμψης (bending), δηλαδή μεταβολές στη γωνία που σχηματίζουν οι δεσμοί, αιώρησης (rocking) και συστροφής (twisting). Ένα μη γραμμικό μόριο, το οποίο αποτελείται από N άτομα, δονείται με 3N - 6 διαφορετικές βασικές δονήσεις (3N - 5 αν το μόριο είναι γραμμικό).

Η ποσοτική σχέση μεταξύ της έντασης του φωτός, που διαπερνά το δείγμα της ουσίας και η συγκέντρωσή της στην παστίλια (πελέττα) δίνεται από τον νόμο Beer-Lambert-Bouguer:

$$I = I_0 e^{-acl} \quad (\text{B6.1})$$

όπου I_0 : η ένταση της ακτινοβολίας που πέφτει στο δείγμα, c : η συγκέντρωση, l : το πάχος του δείγματος και a : ο συντελεστής απορρόφησης. Λογαριθμίζοντας την εξίσωση (B6.1) μπορεί να μετατραπεί σε:

$$\log I_0 / I = \epsilon cl \quad (\text{B6.2})$$

όπου ϵ : ο συντελεστής απόσβεσης.

Ο νόμος ισχύει μόνο για μονοχρωματικό φως και για μικρές συγκεντρώσεις. Εφόσον στα φάσματα καταγράφεται συνήθως η διαπερατότητα συναρτήσει της συχνότητας, σε κυματάρθμους, η εξίσωση (B6.2) μπορεί να γραφεί ώστε να δίνεται η διαπερατότητα (T) ή η απορρόφηση (A):

$$A = \log(1/T) = \log(I_0/I) = \epsilon c l \quad (\text{B6.3})$$

Για την περιγραφή των βασικών δονήσεων ενός μορίου και τον υπολογισμό των συχνοτήτων που αναμένονται, πρέπει να είναι γνωστή η συμμετρία του μορίου, καθώς επίσης οι ατομικές μάζες και οι δυνάμεις που ασκούνται μεταξύ των ατόμων. Αυτή η διαδικασία μπορεί να γίνει με τη λεγόμενη φυσική ανάλυση των συντεταγμένων (normal-coordinated analysis). Στην πράξη, η μοριακή δομή είναι άγνωστη και το φάσμα υπερύθρου χρησιμοποιείται για να την εκτιμήσει.

Γ. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Γ1 ΧΗΜΙΚΑ ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ - ΣΥΝΘΕΣΗ ΥΛΙΚΩΝ

Γ1.1 Χημικά αντιδραστήρια

Τα χημικά αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων για τη σύνθεση των νανοϋλικών είναι τα εξής:

Αντιδραστήρια:

- Γραφίτης >98%, (Fluka)
- Χλωρικό κάλιο (KClO₃), 99% (Alfa)
- Ολεϋλαμίνη (C₁₈H₃₇N)
- Υπερμαγγανικό Κάλιο (KMnO₄)
- Βρωμιούχο τετραβουτυλαμμώνιο (C₁₆H₃₆BrN)
- Όξινο ανθρακικό νάτριο (NaHCO₃)

Οξέα - Βάσεις:

- Νιτρικό οξύ (HNO₃), 65% (March)
- Θεικό οξύ (H₂SO₄), 95-97% (Aldrich)
- Υδροξείδιο του Νατρίου (NaOH) (Merck)

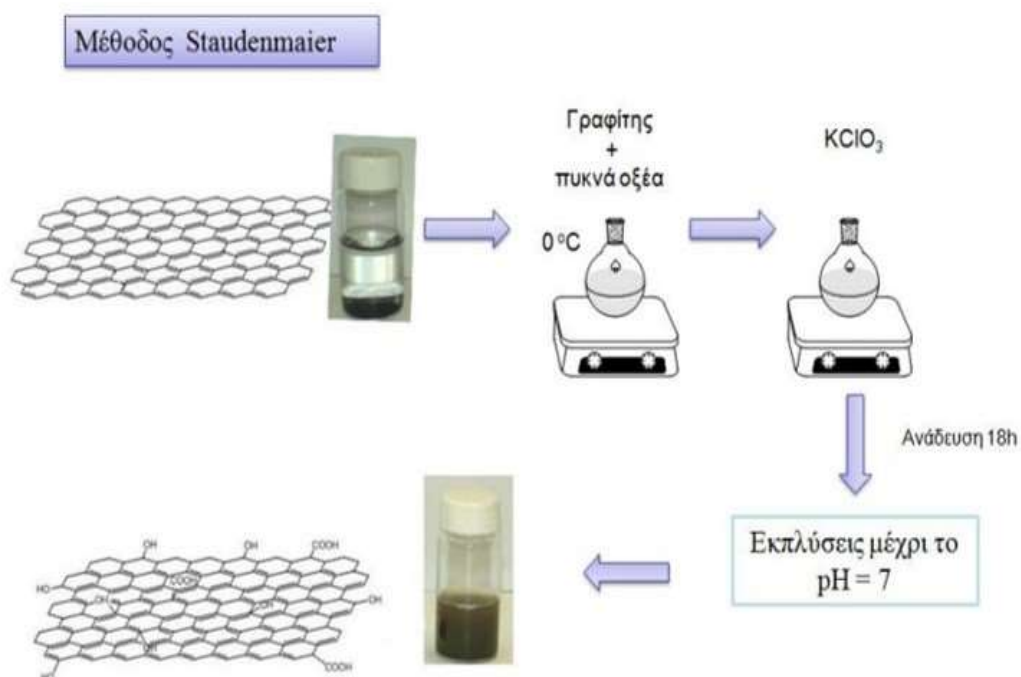
Διαλύτες:

- Νερό απεσταγμένο (H₂O)
- Αιθανόλη (C₂H₅OH)
- Χλωροφόρμιο (CHCl₃)
- Κυκλοεξάνιο (C₆H₁₂)

Γ1.2 Σύνθεση οξειδίου του γραφενίου

Για τη σύνθεση του οξειδίου του γραφενίου τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν ήταν γραφίτης, θειικό οξύ, νιτρικό οξύ, χλωρικό κάλιο και ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο νερό.

Στο Σχήμα Γ1 φαίνεται η πειραματική πορεία που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση του οξειδίου του γραφενίου (GO)



Σχήμα Γ1 Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε για τη σύνθεση του οξειδίου του γραφενίου (GO)

Πιο αναλυτικά, σε μία σφαιρική φιάλη, τοποθετημένη σε λουτρό με πάγο, προστέθηκαν 1g γραφίτη, 20mL HNO₃ 65% κ.β. και 40ml πυκνό H₂SO₄ 95-97% κ.β. και ακολούθησε ανάδευση για 30 min στους 0°C. Μετά το πέρας του χρόνου, προστέθηκαν σε πολύ μικρές δόσεις 20g KClO₃ 99% κ.β. και το μίγμα αφέθηκε για ανάδευση για 18-20h. Ακολούθησε αραίωση του μίγματος, το οποίο έχει πάρει μια πράσινη απόχρωση, με 1L

απεσταγμένο H₂O και ανάδευση για 30min. Στη συνέχεια, το ίζημα συλλέχθηκε μετά από φυγοκεντρήσεις και εκπλύσεις με H₂O που έγιναν έως ότου το pH του μίγματος να φτάσει περίπου την τιμή 6-7. Συνολικά πραγματοποιήθηκαν 6 εκπλύσεις και φυγοκεντρήσεις στις 6000rpm για 10min. Τέλος, το στερεό (οξειδίο του γραφενίου, GO) απλώθηκε σε γυαλί και αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου.

Γ1.3 Σύνθεση οργανόφιλου οξειδίου του γραφενίου με ολεϋλαμίνη

Για τη σύνθεση του δείγματος οξειδίου του γραφενίου με ολεϋλαμίνη (**o-GO-OA**), ως αντιδραστήρια χρησιμοποιήθηκαν οξειδίο του γραφενίου και ολεϋλαμίνη, ενώ ως διαλύτες αιθανόλη και απεσταγμένο νερό.

Συγκεκριμένα, σε ένα ποτήρι ζέσεως προστέθηκε 1 g GO το οποίο διαλύθηκε σε 500ml απιονισμένο H₂O και αφέθηκε για ανάδευση για 24h. Μετά το πέρας των ωρών, ελέγχθηκε και ρυθμίστηκε το pH του GO να είναι περίπου 7. Για τη ρύθμιση του pH προστέθηκε διάλυμα όξινο ανθρακικού νατρίου (NaHCO₃) συγκέντρωσης 0,1M, η σύνθεση του οποίου έγινε με διάλυση 0,42 g NaHCO₃ σε 50mL απεσταγμένου H₂O. Αφότου ελέγχθηκε το pH, αναμίχθηκαν 2 g (2.46 mL) ολεϋλαμίνης και 166 mL αιθανόλης και το διάλυμα προστέθηκε στο ποτήρι ζέσεως με το GO όπου και αφέθηκε για ανάδευση για 24 ώρες. Η ανάμιξη των δύο διαλυμάτων γίνεται στάγδιν. Μετά το πέρας του 24ώρου, γίνεται 1 φυγοκέντρηση στα 4000 rpm για 15 min και εν συνεχεία, 1 έκπλυση με διάλυμα που περιέχει 50 mL H₂O απεσταγμένο και 50 mL αιθανόλη. Τελειώνοντας, το δείγμα απλώθηκε με αιθανόλη σε ύαλο και αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου (κωδικός δείγματος **o-GO-OA**).

Γ1.4 Σύνθεση υδρόφιλου παραγώγου από την οξείδωση/διάσπαση οξειδίου γραφενίου-ολεϋλαμίνης με KMnO₄

Τα αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για τη σύνθεση του **h-GO-OA/KMnO₄** ήταν GO-OA, υπερμαγγανικό κάλιο, βρωμιούχο τετραβουτυλαμμώνιο (καταλύτης

μεταφοράς φάσης) και NaOH, ενώ ως διαλύτες χρησιμοποιήθηκαν χλωροφόρμιο, κυκλοεξανίο, αιθανόλη και απεσταγμένο νερό.

Αρχικά, διαλύθηκαν 150 mg GO-OA σε 13.33 mL χλωροφόρμιο. Στη συνέχεια, σε μία σφαιρική φιάλη διαλύθηκαν 150 mg KMnO₄ σε 33.33 mL κυκλοεξανίο και αφέθηκαν για ανάδευση με θέρμανση υπό αναρροή (reflux) στους 50-60 °C. Μετά από λίγη ώρα προστέθηκαν 916.66 mg βρωμιούχο τετραβουτυλαμμώνιο. Μόλις διαλύθηκε το KMnO₄ προστέθηκε το GO-OA στη φιάλη και αφέθηκε σε θέρμανση στους 80°C και υπό ανάδευση για 3 ώρες. Μετά το πέρας των ωρών, κλείσαμε τη θέρμανση ώστε η θερμοκρασία να πέσει σε T δωματίου. Έπειτα, σε ένα ποτήρι ζέσεως διαλύθηκαν 500 mg NaOH σε 20 ml H₂O, προστέθηκε το διάλυμα στη σφαιρική φιάλη στο reflux και αυξήσαμε τη θερμοκρασία στους 80°C όπου αφέθηκε για ανάδευση για 2 ώρες. Τέλος, αφού κλείσαμε πάλι τη θερμοκρασία και περιμέναμε να φτάσει το δείγμα σε θερμοκρασία δωματίου, ακολούθησε 1 φυγοκέντρηση στα 6000 rpm για 30 min και το δείγμα απλώθηκε σε γυαλί με 10mL H₂O και 10mL αιθανόλης, όπου αφέθηκε να στεγνώσει σε θερμοκρασία δωματίου (κωδικός δείγματος **h-GO-OA/KMnO₄**).

Γ2 ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ENZYMΩΝ

Γ2.1 Βιομόρια

Τα βιομόρια, τα χημικά αντιδραστήρια και οι διαλύτες που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια των πειραμάτων για την ακινητοποίηση των ενζύμων στα νανοϋλικά είναι τα εξής:

Ενζυμα

- Οξειδάση της γλυκόζης (GOx) από τον μύκητα *Aspergillus niger*, SIGMA (135.000 U/g)
- Υπεροξειδάση χρένου (HRP), SIGMA (156 U/mg)

Υποστρώματα

- Διαμμωνιακό άλας του 2,2'-αζινο-δισ(3-αιθυλοβενζοθειαζολινο-6-σουλφονικού οξέος) (ABTS) >98% [HPLC], SIGMA
- D-(+)-Γλυκόζη (C₆H₁₂O₆), (Sigma)

Διαλύτες

- Νερό υψηλής καθαρότητας δισαπεσταγμένο (dH₂O-HPLC Grade)

Υδατικά διαλύματα

- Υδατικό διάλυμα φωσφορικών 0.05 M, pH 7 (Phosphate Buffer)

Λοιπά αντιδραστήρια

- Αντιδραστήριο Bradford (Coomassie Brilliant Blue G-250), Sigma

Γ2.2 Παρασκευή stock διαλυμάτων

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων στην παρούσα μεταπτυχιακή εργασία παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα stock διαλύματα:

- Υδατικό διάλυμα HRP 0.5 mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer: 0.05 M, pH 7)
- Υδατικό διάλυμα HRP 3.3 μg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer: 0.05 M, pH 7)
- Υδατικό διάλυμα ABTS συγκέντρωσης 20 mM σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer: 0.05 M, pH 7)
- Υδατικό διάλυμα γλυκόζης συγκέντρωσης 1 M σε νερό υψηλής καθαρότητας (HPLC)
- Υδατικό διάλυμα γλυκόζης συγκέντρωσης 0.1 M σε νερό υψηλής καθαρότητας (HPLC)
- Υδατικό διάλυμα ακινητοποιημένης GOx στο GO 1 mg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer: 0.05 M, pH 7)
- Υδατικό διάλυμα ακινητοποιημένης GOx στο o-GO-OA συγκέντρωσης 1 mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer: 0.05 M, pH 7)
- Υδατικό διάλυμα ακινητοποιημένης GOx στο h-GO-OA/KMnO₄ συγκέντρωσης 1 mg/ml σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών (Phosphate Buffer: 0.05M, pH 7)

Γ2.3 Ακίνητοποίηση ενζύμου με φυσικό τρόπο (φυσική προσρόφηση)

Γ2.3.1 Ακίνητοποίηση οξειδάσης της γλυκόζης σε οξείδιο του γραφενίου

Για την ακίνητοποίηση οξειδάσης της γλυκόζης σε οξείδιο του γραφενίου, αρχικά, διασπάρθηκαν 3 mg οξειδίου γραφενίου με τη βοήθεια υπερήχων (bath sonicator, Transsonic 460/H, Elma) για 10 min σε 3 mL ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών αλάτων (phosphate buffer) (0.05 M, pH 7.0). Παράλληλα ζυγίστηκαν 3 mg οξειδάσης της γλυκόζης και διαλύθηκαν σε 1 mL phosphate buffer (0.05 M, pH 7.0). Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε ανάμιξη των δύο διαλυμάτων ώστε ο συνολικός τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 4 mL. Το μίγμα τοποθετήθηκε σε επωαστήρα και αφέθηκε υπό ανάδευση για επώαση στους 30°C για 1h, ώστε το ένζυμο να ακίνητοποιηθεί στην επιφάνεια του νανοϋλικού. Ακολούθησε μία φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 min. Από το υπερκείμενο που προέκυψε, συλλέχθηκε και φυλάχθηκε 1ml για μέτρηση πρωτεϊνικού φορτίου (μέθοδος Bradford) και ενζυμικής δραστηριότητας. Τέλος, το τελικό ίζημα αφέθηκε για ξήρανση σε ξηραντήρα με silica gel στους 4°C όπου και διατηρήθηκε έως τη χρησιμοποίησή του.

Γ2.3.2 Ακίνητοποίηση οξειδάσης της γλυκόζης σε o-GO-OA

Για την ακίνητοποίηση οξειδάσης της γλυκόζης σε o-GO-OA, αρχικά, διασπάρθηκαν 3mg οξειδίου γραφενίου με τη βοήθεια υπερήχων (bath sonicator, Transsonic 460/H, Elma) για 10 min σε 3 mL phosphate buffer (0.05 M, pH 7.0). Έπειτα προστέθηκε 1 mL ενζυμικού διαλύματος (3 mg GOx σε 1mL phosphate buffer 0.05 M, pH 7.0), έτσι ώστε ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 4 mL. Το μίγμα τοποθετήθηκε σε επωαστήρα και αφέθηκε υπό ανάδευση για επώαση στους 30°C για 1h, ώστε να γίνει ακίνητοποίηση του ενζύμου στην επιφάνεια του νανοϋλικού. Ακολούθησε μία φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 min. Από το σχηματιζόμενο υπερκείμενο, συλλέχθηκε και φυλάχθηκε 1ml για μέτρηση πρωτεϊνικού φορτίου (μέθοδος Bradford) και

ενζυμικής δραστηριότητας. Τέλος, το τελικό ίζημα αφέθηκε για ξήρανση σε ξηραντήρα με silica gel στους 4°C όπου και διατηρήθηκε έως τη χρησιμοποίησή του.

Γ2.3.3 Ακίνητοποίηση οξειδάσης της γλυκόζης σε h-GO-OA/KMnO₄

Για την ακίνητοποίηση οξειδάσης της γλυκόζης σε h-GO-OA/KMnO₄, αρχικά, διασπάρθηκαν 3 mg οξειδίου γραφενίου με τη βοήθεια υπερήχων (bath sonicator, Transsonic 460/H, Elma) για 10 min σε 3 mL phosphate buffer (0.05 M, pH 7.0). Έπειτα προστέθηκαν 1 mL ενζυμικού διαλύματος (3 mg GOx σε 1 mL phosphate buffer 0.05 M, pH 7.0), έτσι ώστε ο τελικός όγκος του διαλύματος να είναι 4 mL. Το μίγμα τοποθετήθηκε σε επωαστήρα και αφέθηκε υπό ανάδευση για επώαση στους 30°C για 1h, ώστε να γίνει ακίνητοποίηση του ενζύμου στην επιφάνεια του νανοϋλικού. Ακολούθησε μία φυγοκέντρηση στις 12000 rpm για 10 min. Από το σχηματιζόμενο υπερκείμενο, συλλέχθηκε και φυλάχθηκε 1 ml για μέτρηση πρωτεϊνικού φορτίου (μέθοδος Bradford) και ενζυμικής δραστηριότητας. Τέλος, το τελικό ίζημα αφέθηκε για ξήρανση σε ξηραντήρα με silica gel στους 4°C όπου και διατηρήθηκε έως τη χρησιμοποίησή του.

Γ2.4 Προσδιορισμός ενζυμικού φορτίου (% απόδοση ακίνητοποίησης)

Το πρωτόκολλο Bradford βασίζεται στην πρόσδεση της χρωστικής Coomassie Brilliant Blue G-250 (αντιδραστήριο Bradford) στο πρωτεϊνικό μόριο. Στην ελεύθερή της μορφή η χρωστική έχει χρώμα κόκκινο και μέγιστο απορρόφησης στα 465 nm, ενώ μετά την πρόσδεσή της στην πρωτεΐνη το μέγιστο απορρόφησης της χρωστικής μετατοπίζεται στα 595 nm αποδίδοντας σύμπλοκο μπλε χρώματος (Bradford, 1976).

Με τη μέθοδο αυτή επιτυγχάνεται ο προσδιορισμός του ποσοστού της πρωτεΐνης που δεν έχει ακίνητοποιηθεί στο νανοϋλικό αλλά έμεινε στο υπερκείμενο. Κατ' επέκταση είναι εφικτό να υπολογιστεί το ποσοστό ακίνητοποιημένου ενζύμου (απόδοση ακίνητοποίησης). Ο ποσοτικός προσδιορισμός της πρωτεΐνης γίνεται με βάση πρότυπη καμπύλη αναφοράς

που υπολογίστηκε με την πρωτεΐνη αλβουμίνη από ορό βοδιού (Bovine Serum Albumin, BSA).

Η διαδικασία μέτρησης απαιτεί την ανάμιξη 800 μl διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford και 200 μl υπερκάθαρο νερό (τυφλό δείγμα) σε ένα eppendorf tube. Σε ένα δεύτερο eppendorf tube γίνεται ανάμιξη 800 μl διαλύματος αντιδραστηρίου Bradford, 150 μl υπερκάθαρο νερό και 50 μl από το υπερκείμενο που είχε φυλαχθεί στο πέρας των φυγοκεντρήσεων μετά την ακινητοποίηση του ενζύμου στο ναουϊλικό. Ακολουθεί ήπια ανάδευση και επώαση για 10 min σε θερμοκρασία δωματίου ώστε να ολοκληρωθεί η διαδικασία πρόσδεσης. Τέλος, πραγματοποιείται φωτομέτρηση στα 595 nm (Spectrophotometer Shimadzu, UV-1601) και επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Η εξίσωση πρότυπης καμπύλης που χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό ενζυμικού φορτίου με βάση τη συγκέντρωση αλβουμίνης ήταν η εξής:

$$y = 0.0288 x$$

όπου y η απορρόφηση του δείγματος στα 595 nm και x η συγκέντρωση πρωτεΐνης σε μg/ml.

Η ποσότητα της πρωτεΐνης στο διάλυμα δηλαδή η επί τοις εκατό απόδοση (α%) υπολογίζεται μέσω του τύπου:

$\alpha = 100 \cdot \frac{\text{Ποσότητα πρωτεΐνης που ακινητοποιήθηκε}}{\text{Ποσότητα πρωτεΐνης στο διάλυμα πριν την ακινητοποίηση}}$

Γ2.5 Μελέτη ενζυμικής δραστηριότητας

Η μελέτη της δραστηριότητας της οξειδάσης της γλυκόζης (GOx) βασίζεται στην αντίδραση σύζευξης της με το ένζυμο υπεροξειδάση χρένου (HRP). Πιο συγκεκριμένα, η GOx χρησιμοποιεί τη γλυκόζη ως υπόστρωμα την οποία και μετατρέπει σε D-γλυκονο-δ-λακτόνη και υπεροξείδιο του υδρογόνου. Εν συνεχεία, η HRP χρησιμοποιεί το υπεροξείδιο του υδρογόνου με σκοπό τη μετατροπή του ABTS σε ABTS+.

Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας γίνεται με μέτρηση της αύξησης της απορρόφησης κατά τη διάρκεια της αντίδρασης οξείδωσης του ABTS. Η απορρόφηση του

ABTS+ μετρήθηκε σε Elisa plate Reader στα 405 nm. Τιμές απορρόφησης λαμβάνονται κάθε 1 min για συνολικό χρονικό διάστημα 5 min. Οι μετρήσεις πραγματοποιούνται εις τριπλούν.

Γ2.6 Μελέτη ενζυμικής δραστηριότητας της ακινητοποιημένης GOx

Για τον προσδιορισμό της δραστηριότητας της ακινητοποιημένης GOx η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν η μέτρηση της απορρόφησης του ABTS+, στα 405nm. Έγινε λήψη φασμάτων σε φωτόμετρο Shimadzu ανά 30sec και για συνολικό χρονικό διάστημα 5 min, στους 37 °C. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν εις τριπλούν. Χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα φωσφορικών 0.05M, pH=7. Οι ποσότητες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

- phosphate buffer 613μL
- 5μL ακινητοποιημένη GOx (από stock 1mg/ml)
- 32μL ελεύθερη HRP (από stock 0,5 μg/ml)
- 250μL γλυκόζη (από stock 1M)
- 100μL ABTS 100μL (από stock 20mM).

Η αντίδραση αυτή έγινε για κάθε περίπτωση, δηλαδή για GO-GOx, GO-OA-GOx και GO-OA/KMnO4-GOx. Ακολούθησαν μετρήσεις για 10μL ακινητοποιημένης GOx με phosphate buffer 608μL (οι υπόλοιπες ποσότητες παρέμειναν οι ίδιες).

Γ2.7 Προσδιορισμός κινητικών σταθερών Km και Vmax

Πραγματοποιήθηκε μελέτη της κινητικής του ενζύμου GOx με χρήση διαφορετικών συγκεντρώσεων υποστρώματος γλυκόζης. Ακολούθησε ο προσδιορισμός της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης για κάθε συγκέντρωση, όπως αυτή υπολογίζεται από την κλίση του γραμμικού τμήματος της καμπύλης αύξησης της απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου για την εκάστοτε αντίδραση. Ο υπολογισμός των σταθερών Km, Vmax έγινε με το πρόγραμμα GraphPad Prism 5.03.

Γ2.8 Προσδιορισμός κινητικών σταθερών ακινητοποιημένης GOx

Η μελέτη της κινητικής του ακινητοποιημένου ενζύμου οξειδάση της γλυκόζης πραγματοποιήθηκε στους 37 °C. Ως υπόστρωμα σε όλες τις περιπτώσεις χρησιμοποιήθηκε η γλυκόζη και pH=7 (phosphate buffer 50 mM). Για κάθε συγκέντρωση υποστρώματος λαμβάνονταν τιμές απορρόφησης του οξειδωμένου ABTS στα 405 nm. Μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε 1 sec για συνολικό χρονικό διάστημα 5 min. Ακολούθησε ο προσδιορισμός της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης για κάθε συγκέντρωση, όπως αυτή υπολογίζεται από την κλίση του γραμμικού τμήματος της καμπύλης αύξησης της απορρόφησης του ABTS+ συναρτήσει του χρόνου. Όλες οι μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν στο φωτόμετρο Shimadzu, συνδεδεμένο με υδατόλουτρο. Για την ακινητοποιημένη GOx, προστίθεται 2.5 ή 50 μg/ml ακινητοποιημένου ενζύμου (για το GO-OA/KMnO₄ ή τα GO, GO-OA, αντίστοιχα), 100μl ελεύθερη HRP, 125μl ABTS, γλυκόζη με εύρος τελικής συγκέντρωσης 0-25 mM και phosphate buffer μέχρι ο συνολικός τελικός όγκος της αντίδρασης να είναι 1 ml

Γ2.9 Μελέτη της ενζυμικής σταθερότητας των ενζύμων

Η σταθερότητα των ενζύμων προσδιορίστηκε βάσει της αρχικής ταχύτητας της αντίδρασης, όπως αυτή υπολογίζεται από την κλίση του γραμμικού τμήματος της καμπύλης της αύξησης (ή μείωσης στην περίπτωση της καταλάσης) της απορρόφησης συναρτήσει του χρόνου. Ως 100% ορίζεται η δραστηριότητα των ενζύμων σε χρόνο μηδέν, δηλαδή πριν ξεκινήσει η επώαση του τελικού μίγματος, και με την οποία συγκρίνεται η δραστηριότητα μετά από την επώαση σε συγκεκριμένη θερμοκρασία για το κάθε ένζυμο

Γ2.9.1 Μελέτη ενζυμικής σταθερότητας της GOx ελεύθερης και ακινητοποιημένης

Για τη μελέτη της σταθερότητας ακινητοποιημένης GOx πραγματοποιήθηκε η εξής διαδικασία:

Παρασκευάστηκαν δύο διαλύματα τελικού όγκου 1 mL το καθένα, στα οποία περιεχόταν ακινητοποιημένη GOx τελικής συγκέντρωσης 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10 μL). Τα διαλύματα παρασκευάστηκαν με phosphate buffer (50mM, pH 7). Έπειτα, τοποθετήθηκαν σε thermoshaker στους 37 °C και στους 60 °C υπό ανάδευση στα 600 rpm. Ανά συγκεκριμένα χρονικά διαστήματα (0 h, 1 h, 4 h, 24 h) γινόταν δειγματοληψία και μέτρηση της δραστηριότητας του ενζύμου μέσω της οξειδωσης του ABTS. Ο προσδιορισμός της δραστηριότητας ξεκινάει με την προσθήκη 20 mM ABTS (100 μL), 1M γλυκόζης (250 μL) και HRP τελικής συγκέντρωσης 0,5 mg/MI (32 μL)

Γ3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ & ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ

Για τον χαρακτηρισμό των υλικών χρησιμοποιήθηκαν οι εξής τεχνικές: περίθλαση ακτίνων-X, θερμικές μετρήσεις DTA/TGA, φασματοσκοπίες μέσου υπερύθρου.

Γ3.1 Περίθλαση ακτίνων-X (XRD)

Η περίθλαση ακτίνων-X σκόνης πραγματοποιήθηκε με το περιθλασίμετρο D8 Advance Bruker του τμήματος Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, χρησιμοποιώντας σύστημα μονοχρωμάτορα περιθλωμένης δέσμης και ακτινοβολία Cu με $\lambda_{\text{Cu}} = 1,54 \text{ \AA}$. Τα διαγράμματα περίθλασης καταγράφηκαν σε εύρος γωνιών (2θ) από 2° έως 80°, με βήμα 0.02° και με χρόνο 2 sec το κάθε βήμα. Τα δείγματα τα οποία βρίσκονται υπό τη μορφή σκόνης αλέστηκαν σε γουδί από αχάτη και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε γυάλινο δειγματοφορέα και πιέστηκαν ώστε η επιφάνεια να είναι επίπεδη. Τα υπόλοιπα δείγματα μετρήθηκαν σε μορφή λεπτών υμενίων. Για την παρασκευή τους πραγματοποιήθηκε εναπόθεση του αντίστοιχου αιωρήματος σε γυάλινο πλακίδιο (2.5x2.5 cm) και ξήρανση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος

Γ3.2 Θερμικές μετρήσεις (DTA/TGA)

Για τις μετρήσεις θερμικής ανάλυσης (DTA) και θερμοβαρυτομετρικής ανάλυσης (TGA) χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Perkin Elmer Pyris Diamond του τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν ~5 mg από τα δείγματα, που τοποθετήθηκαν σε χωνευτήρι πλατίνας στο ένα σκέλος του θερμοζυγού ενώ στο άλλο σκέλος χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα αναφοράς καθαρή σκόνη αλούμινας. Η ταχύτητα αύξησης της θερμοκρασίας ήταν 5 °C/min σε ατμόσφαιρα αέρα.

Γ3.3 Φασματοσκοπία μέσου υπερύθρου (FT-IR)

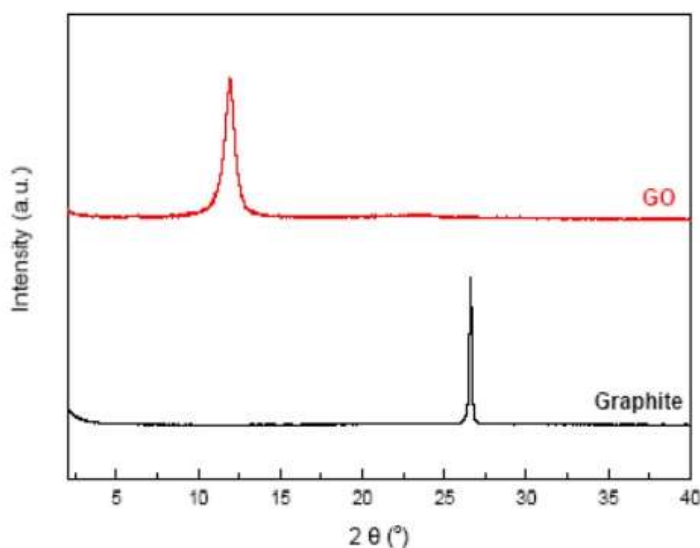
Τα φάσματα μέσου υπερύθρου, καταγράφηκαν στην περιοχή 4000-400 cm^{-1} με Fouriertransform (FT) φασματόμετρο Perkin-Elmer GX του τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Τα τελικά φάσματα είναι ο μέσος όρος 32 φασμάτων, που μετρήθηκαν στην περιοχή 400-4000 cm^{-1} με διακριτική ικανότητα 2 cm^{-1} . Τα δείγματά ήταν σε στερεή μορφή κι έτσι χρησιμοποιήθηκε η τεχνική των συμπιεσμένων διαφανών δισκίων KBr. Κάθε δισκίο παρασκευάστηκε ως εξής: Αναμίχθηκε σκόνη δείγματος (περίπου 5% κ.β.) και σκόνη KBr (95% κ.β.) σε γουδί από αχάτη μέχρι να σχηματιστεί ομοιογενές μίγμα λεπτόκοκκης σκόνης. Η άλεση των δύο συστατικών πρέπει να είναι παρά πολύ καλή ώστε τα σωματίδια να αποκτήσουν μέγεθος μικρότερο του μήκους κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας από την πηγή του οργάνου. Με αυτό το τρόπο αποφεύγονται φαινόμενα σκέδασης, τα οποία επιδρούν αρνητικά στην ποιότητα του φάσματος. Στη συνέχεια το μίγμα των κόνεων τοποθετήθηκε σε καλούπι και συμπιέστηκε μονοαξονικά (10 N) με υδραυλική πρέσα Specac, ώστε να δημιουργηθεί συμπιεσμένο δισκίο διαμέτρου 1 cm και ύψους 1-1,5 mm.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Δ1 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ

Δ1.1 Ανάλυση διαγράμματος περίθλασης ακτίνων-X (XRD)

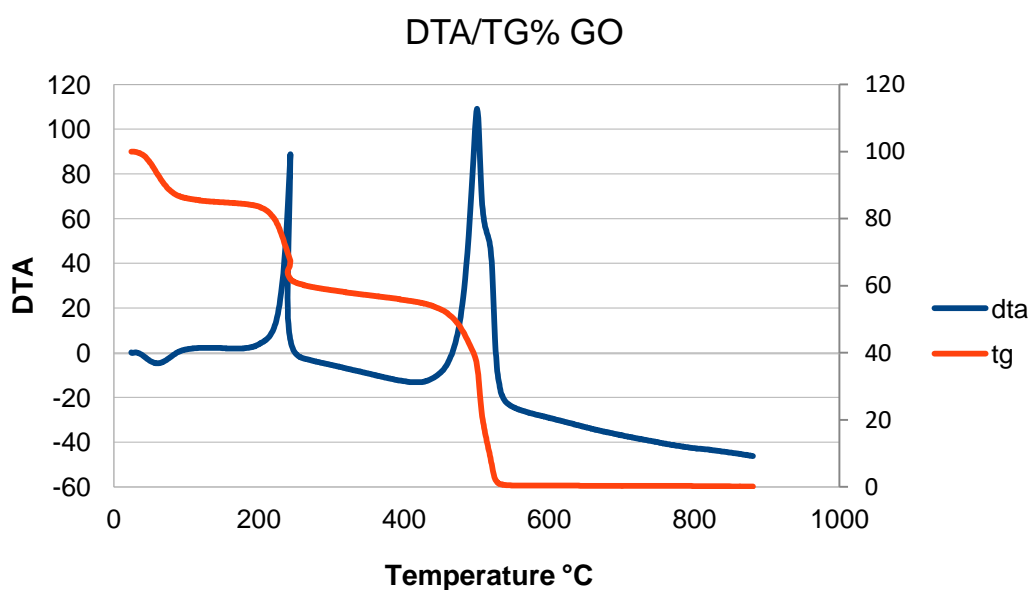
Από τις μετρήσεις περίθλασης ακτίνων X του γραφίτη (G) και του οξειδίου του γραφενίου (GO) προέκυψαν τα διαγράμματα που παρουσιάζονται στο Σχήμα Δ1 Στο διάγραμμα του γραφίτη εμφανίζεται μία οξεία κορυφή σε γωνία $2\theta=26.7^\circ$ που αντιστοιχεί στη 002 ανάκλαση των γραφιτικών δομών. Με βάση τον νόμο του Bragg, η 002 ανάκλαση αντιστοιχεί σε κρυσταλλική απόσταση $d_{002}=3.3 \text{ \AA}$ και εκφράζει την απόσταση μεταξύ δύο γραφιτικών φύλλων¹³⁰. Μετά τη χημική οξείδωση του γραφίτη προς σχηματισμό του οξειδίου του γραφενίου (GO) εμφανίζεται η κύρια ανάκλαση 001 σε γωνία $2\theta = 11.5^\circ$ με απόσταση $d_{001} = 7.7 \text{ \AA}$. Γνωρίζοντας το πάχος ενός φύλλου από το οξείδιο του γραφίτη (6.1 \AA) μπορούμε να υπολογίσουμε την απόσταση του ενδοστρωματικού χώρου $L= d_{001}-6.1 \text{ \AA}= 1.6 \text{ \AA}$.



Σχήμα Δ1 Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων-X του γραφίτη (Graphite) και του οξειδίου του γραφενίου (GO)

Δ1.2 Ανάλυση διαγράμματος θερμικής ανάλυσης (DTA/TGA)

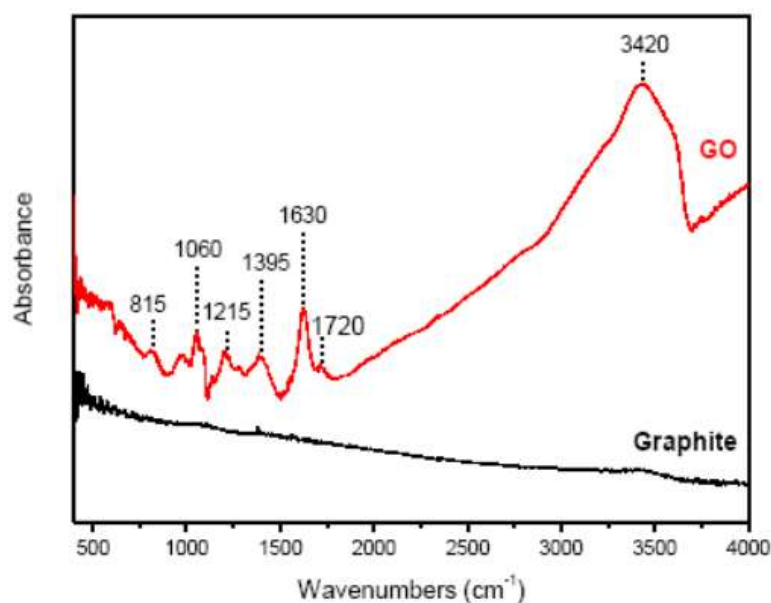
Η θερμική συμπεριφορά του οξειδίου του γραφενίου μελετήθηκε με διαφορική θερμική ανάλυση (DTA) και με θερμοβαρυτομετρική ανάλυση (TG). Στο Σχήμα Δ2 παρουσιάζονται τα θερμογραφήματα DTA/TG του οξειδίου του γραφενίου (GO) στον αέρα. Στην καμπύλη διαφορικής θερμικής ανάλυσης για το οξείδιο του γραφενίου παρατηρούνται δύο εξώθερμες κορυφές στους 240°C και 500°C. Η πρώτη οφείλεται στη θερμική αποσύνθεση των λειτουργικών ομάδων που περιέχουν οξυγόνο αποδίδοντας διοξείδιο του άνθρακα και νερό και αντιστοιχεί σε απώλεια μάζας ~30% κ.β. Η δεύτερη αντιστοιχεί κυρίως στην καύση του γραφιτικού πλέγματος με απώλεια μάζας ~58% κ.β., ενώ για θερμοκρασίες μέχρι τους 120°C έχουμε μια απώλεια μάζας ~12% κ.β. που αντιστοιχεί στο φυσικά προσροφημένο νερό (Bourlinos et al., 2003).



Σχήμα Δ2 Διαγράμματα θερμικής ανάλυσης (DTA/TG) του οξειδίου του γραφενίου (GO)

Δ1.3 Ανάλυση φασματοσκοπίας μέσου υπερέυθρου (FT-IR)

Τα δομικά χαρακτηριστικά του γραφίτη (G) και του οξειδίου του γραφενίου (GO) μελετήθηκαν με φασματοσκοπία υπερέυθρου FT-IR (Σχήμα Δ3). Ο γραφίτης δεν απορροφά στο υπερέυθρο και για αυτόν τον λόγο στο φάσμα του δεν διακρίνεται καμία κορυφή. Στο οξύδιο του γραφενίου εμφανίζονται αρκετές κορυφές οι οποίες προέρχονται από τις δονήσεις των ομάδων οξυγόνου του υλικού ενώ οι δονήσεις του δεσμού C=C εξαιτίας του γραφιτικού πλέγματος εντοπίζεται στα 1630 cm^{-1} . Πιο συγκεκριμένα, η κορυφή στα 3420 cm^{-1} αποδίδεται στις δονήσεις έκτασης των υδροξυλίων των -C-OH αλλά και του νερού που υπάρχει στο δείγμα υπό μορφή υγρασίας (Bourlinos et al., 2003). Οι κορυφές στα 1720 cm^{-1} και στα 1060 cm^{-1} προέρχονται από τις δονήσεις έκτασης των δεσμών -C=O και C-O αντίστοιχα, των καρβοξυλομάδων. Οι δονήσεις παραμόρφωσης των υδροξυλίων των ομάδων -C-OH εντοπίζονται στα 1395 cm^{-1} (Acik et al., 2011). Τέλος, οι κορυφές στα 815 cm^{-1} και στα 1215 cm^{-1} αποδίδονται στις δονήσεις των δεσμών C-O και C-O-C των εποξυ-ομάδων (Oh et al., 2010).



Σχήμα Δ3 Φάσματα υπερέυθρου του γραφίτη (Graphite) και του οξειδίου του γραφενίου (GO)

Δ2 ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ ΟΡΓΑΝΟΦΙΛΩΝ ΚΑΙ ΥΔΡΟΦΙΛΩΝ ΠΑΡΑΓΩΓΩΝ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ ΜΕ ΟΛΕΪΛΑΜΙΝΗ (o-GO-OA ΚΑΙ h-GO-OA/KMnO₄)

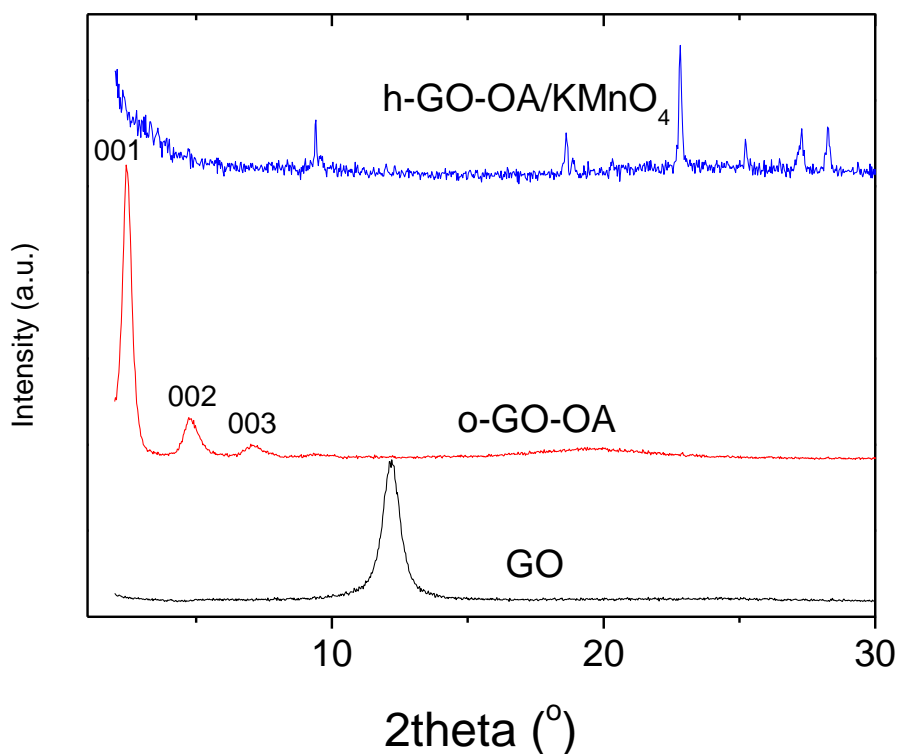
Δ2.1 Ανάλυση διαγραμμάτων περίθλασης ακτίνων-X (XRD)

Στο Σχήμα Δ4 παρουσιάζονται τα διαγράμματα περίθλασης ακτίνων-X του οξειδίου του γραφενίου (GO), του οργανόφιλου οξειδίου του γραφενίου με ολεϋλαμίνη (o-GO-OA) και του υδρόφιλου παραγώγου μετά την οξείδωση/διάσπαση οξειδίου γραφενίου-ολεϋλαμίνης με υπερμαγγανικό κάλιο (h-GO-OA/KMnO₄). Το περιθλασίγραμμα του o-GO-OA εμφανίζει μετατόπιση της 001 του GO σε μικρότερες γωνίες και πιο συγκεκριμένα σε γωνία 2θ ίση με $2,46^\circ$. Αυτή αντιστοιχεί σε d_{001} απόσταση ίση με $35,9 \text{ \AA}$. Αν θεωρήσουμε ότι το πάχος του φύλλου του GO είναι $6,1 \text{ \AA}$ τότε ο ενδοστρωματικός χώρος είναι ίσος με $L = 35,9 - 6,1 = 29,8 \text{ \AA}$. Η τεράστια αυτή αύξηση επιβεβαιώνει την επιτυχή ένθεση της ολεϋλαμίνης στον ενδοστρωματικό χώρο του γραφενικού φυλλόμορφου υλικού. Μάλιστα τα μόρια της ολεϋλαμίνης φαίνεται ότι κάθονται υπό γωνία (σχεδόν κάθετα) ανάμεσα στα φύλλα του οξειδίου του γραφενίου. Επιπλέον, η ύπαρξη ανακλάσεων μεγαλύτερης τάξης, όπως η (002), (003) κ.λπ. υποδεικνύει ότι το υβριδικό σύστημα βρίσκεται σε υψηλή τάξη με τα φύλλα του δισδιάστατου υλικού να βρίσκονται παράλληλα το ένα με το άλλο.

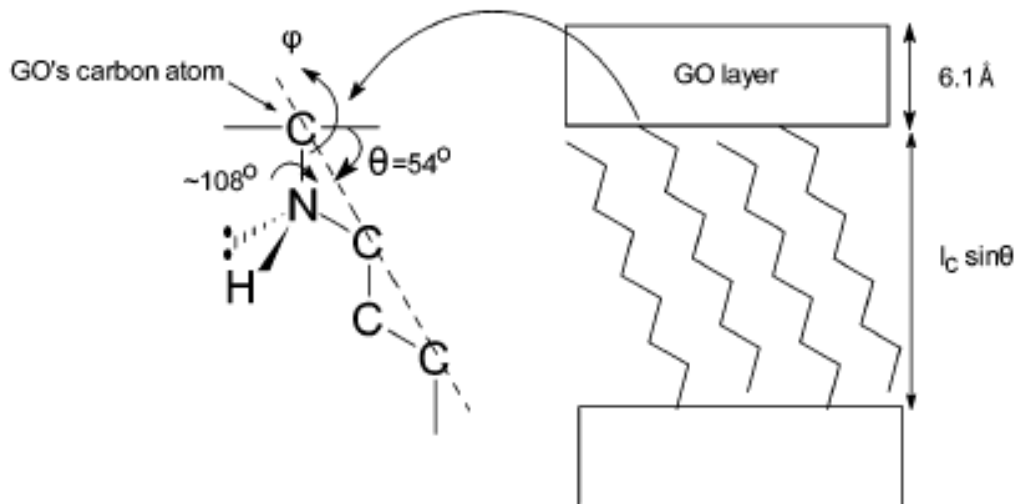
Στο Σχήμα Δ5 παρουσιάζεται ο τρόπος με τον οποίο τα μόρια της ολεϋλαμίνης διευθετούνται εντός του ενδοστρωματικού χώρου του GO (Bourlinos et al., 2003). Η κλίση θ που θα έχουν τα μόρια της αμίνης ως προς το επίπεδο του γραφενικού πλέγματος καθορίζεται από το άτομο του αζώτου και μπορεί να γραφτεί ως $\theta=90^\circ - \varphi$, όπου φ είναι η γωνία που καθορίζεται από τα τροχιακά sp^3 του αζώτου που αποκλίνουν κατά 108° , άρα η γωνία φ στο ισοσκελές τρίγωνο είναι 36° και ως εκ τούτου $\theta = 54^\circ$. Κατά συνέπεια, η d_{001} δίνεται από την ακόλουθη εξίσωση: $d_{001} = 6.1 + l_c \sin \theta$, όπου 6.1 είναι το πάχος του φύλλου του GO, l_c το μήκος της αλυσίδας των υδρογονανθράκων της αμίνης [$l_c (\text{\AA}) = 1.5 + 1.265 (n-1)$, n είναι ο αριθμός των ατόμων άνθρακα]. Κάνοντας τους υπολογισμούς βρίσκουμε ότι $l_c = 23.0 \text{ \AA}$, επομένως $d_{001} = 29.1 \text{ \AA}$. Βλέπουμε ότι το προτεινόμενο μοντέλο είναι κοντά αλλά δεν συμφωνεί απόλυτα με την πειραματική τιμή ($35,9 \text{ \AA}$). Η απόκλιση

οφείλεται στο γεγονός ότι το μοντέλο περιγράφει κυρίως γραμμικές αλκυλαμίνες (π.χ. δωδεκυλαμίνη, οκτυλαμίνη κ.λπ.) και όχι ακόρεστες αμίνες όπως η ολεϋλαμίνη που περιέχει ένα διπλό δεσμό ανάμεσα στο ένατο και δέκατο άτομο άνθρακα.

Μετά την οξείδωση του υβριδικού οξειδίου γραφενίου-ολεϋλαμίνη με KMnO_4 η τάξη που έχει το φυλλόμορφο υλικό χάνεται και μάλιστα η 001 ανάκλαση δεν είναι καθόλου ορατή, γεγονός που υποδηλώνει ότι το σύστημα έχει πλήρως αποφυλλοποιηθεί. Αντιθέτως εμφανίζονται οξείες κορυφές οι οποίες οφείλονται σε άλατα που προέρχονται από τη χρήση του υπερμαγγανικού καλίου και τα οποία παρέμειναν μετά την οξείδωση της ολεϋλαμίνης.



Σχήμα Δ4 Διαγράμματα περίθλασης ακτίνων-X οξειδίου του γραφενίου (GO), οργανόφιλου οξειδίου του γραφενίου με ολεϋλαμίνη (o-GO-OA) και υδρόφιλου παραγώγου μετά την οξείδωση/διάσπαση οξειδίου γραφενίου-ολεϋλαμίνης με υπερμαγγανικό κάλιο (h-GO-OA/ KMnO_4)



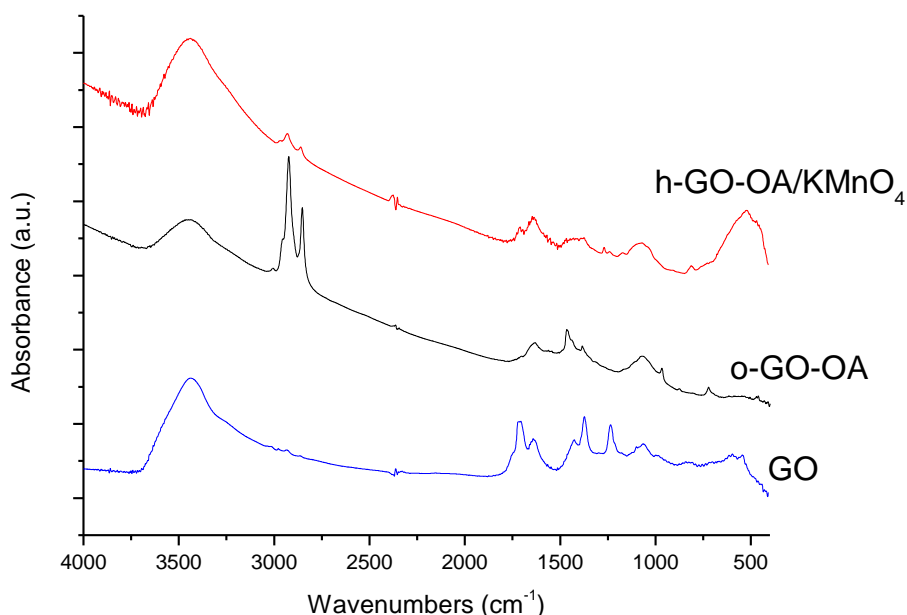
Σχήμα Δ5 Μοντέλο του τρόπου διεύθετησης των μορίων της ολεϋλαμίνης εντός των φύλλων του οξειδίου του γραφενίου

Δ2.2 Ανάλυση φασμάτων μέσου υπερύθρου (FT-IR)

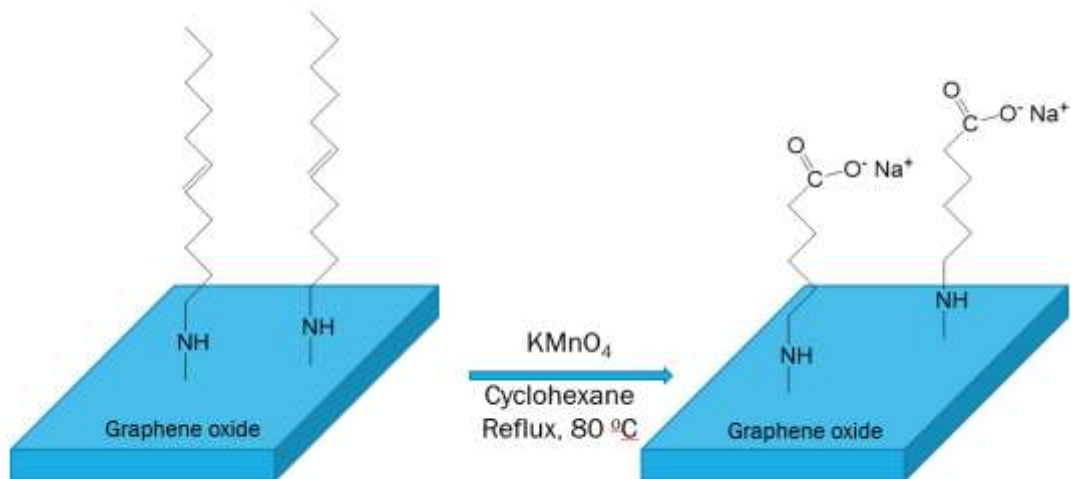
Στο Σχήμα Δ6 παρουσιάζονται τα φάσματα μέσου υπερύθρου (FTIR) του οξειδίου του γραφενίου (GO), του οργανόφιλου οξειδίου του γραφενίου με ολεϋλαμίνη (o-GO-OA) και του υδρόφιλου παραγώγου μετά την οξειδωση/διάσπαση οξειδίου γραφενίου-ολεϋλαμίνης με υπερμαγγανικό κάλιο (h-GO-OA/KMnO₄). Στο φάσμα του οργανικά τροποποιημένου οξειδίου του γραφενίου (o-GO-OA), εμφανίζεται η κορυφή στους 1060 cm⁻¹ που αντιστοιχεί στις δονήσεις τάσης του δεσμού C-O που υπάρχει στο φύλλο του οξειδίου του γραφίτη. Οι κορυφές στους 1450 cm⁻¹ και 1550 cm⁻¹ οφείλονται στις δονήσεις κάμψης των δεσμών N-H και -CH₂- αντίστοιχα, του μορίου της ολεϋλαμίνης (Herrera-Alonso et al., 2007). Τέλος, στους 2840 cm⁻¹ και 2940 cm⁻¹ οφείλονται στις συμμετρικές και ασύμμετρες δονήσεις τάσης των μεθυλομάδων, επιβεβαιώνοντας την επιτυχή ένθεση της οργανικής ένωσης στα φύλλα του οξειδίου του γραφενίου. Μετά την οξειδωση του υβριδικού οξειδίου γραφενίου-ολεϋλαμίνη με KMnO₄ οι εντάσεις των κορυφών στους 2840 cm⁻¹ και 2940 cm⁻¹ (συμμετρικές και ασύμμετρες δονήσεις τάσης των μεθυλομάδων) μειώνονται γεγονός που είναι λογικό αν σκεφτούμε ότι η αλυσίδα ολεϋλαμίνης οξειδώνεται και σπάει στο σημείο που βρίσκεται ο διπλός δεσμός (ανάμεσα

στο ένατο και δέκατο άτομο άνθρακα), οδηγώντας στη δημιουργία καρβοξυλομάδων και μειώνοντας τον αριθμό των μεθυλενομάδων κατά πολύ στο υβριδικό υλικό. Η παρουσία μάλιστα στο φάσμα μίας νέας κορυφής στους 1715 cm^{-1} επιβεβαιώνει τη δημιουργία και ύπαρξη των καρβοξυλομάδων. Τέλος, η κορυφή στους 1630 cm^{-1} οφείλεται σε δονήσεις κάμψης των δεσμών N-H που παραμένουν μετά την οξείδωση με υπερμαγγανικό κάλιο.

Στο Σχήμα Δ7 παρουσιάζεται σχηματικά μία αναπαράσταση της δημιουργίας υδρόφιλου παραγώγου μετά την οξείδωση/διάσπαση οξειδίου γραφενίου-ολεϋλαμίνης (o-GO-OA) με υπερμαγγανικό κάλιο (h-GO-OA/KMnO₄), όπου φαίνεται η διάσπαση του διπλού δεσμού ανάμεσα στο ένατο και δέκατο άνθρακα της ολεϋλαμίνης και η δημιουργία καρβοξυλομάδων.



Σχήμα Δ6 Φάσματα μέσου υπέρυθρου (FT-IR) οξειδίου του γραφενίου (GO), οργανόφιλου οξειδίου του γραφενίου με ολεϋλαμίνη (o-GO-OA) και υδρόφιλου παραγώγου μετά την οξείδωση/διάσπαση οξειδίου γραφενίου-ολεϋλαμίνης με υπερμαγγανικό κάλιο (h-GO-OA/KMnO₄)



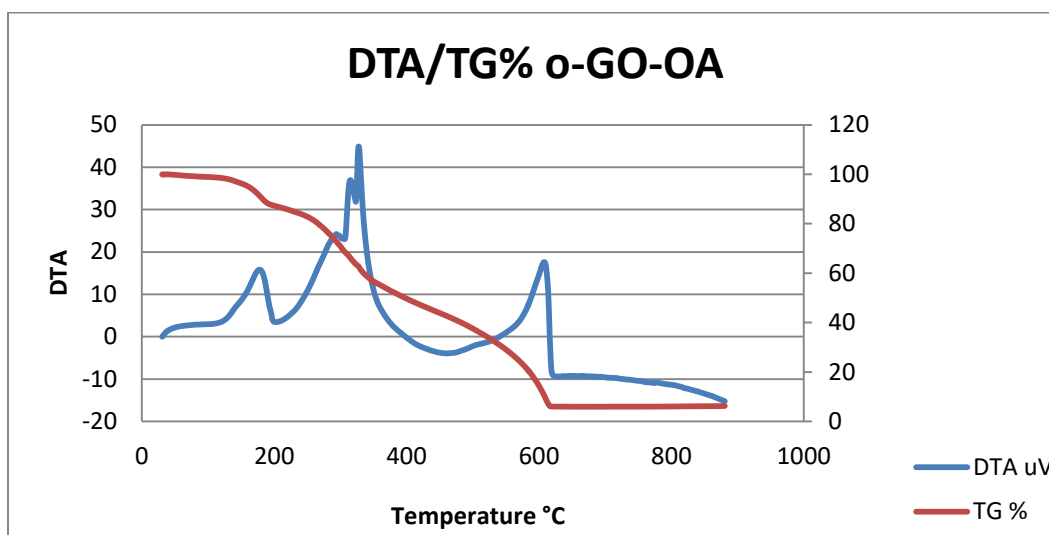
Σχήμα Δ7 Σχηματική αναπαράσταση δημιουργίας υδρόφιλου παραγώγου μετά την οξείδωση/διάσπαση οξειδίου γραφενίου-ολεϋλαμίνης (o-GO-OA) με υπερμαγγανικό κάλιο (h-GO-OA/KMnO₄)

Δ2.3 Ανάλυση διαγραμμάτων Θερμικής Ανάλυσης (DTA/TGA)

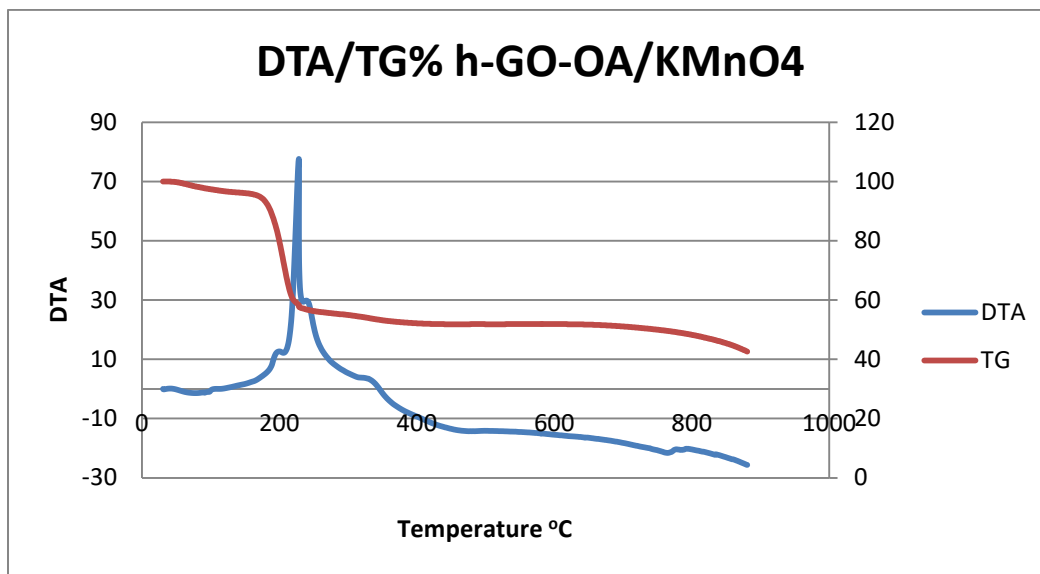
Στο Σχήματα Δ8 και Δ9 παρουσιάζονται οι καμπύλες διαφορικής θερμικής ανάλυσης (DTA) και θερμοβαρτομετρικής ανάλυσης (TG) του οργανόφιλου οξειδίου του γραφενίου με ολεϋλαμίνη (o-GO-OA) και του υδρόφιλου παραγώγου μετά την οξείδωση/διάσπαση οξειδίου γραφενίου-ολεϋλαμίνης με υπερμαγγανικό κάλιο (h-GO-OA/KMnO₄), αντίστοιχα. Στην καμπύλη διαφορικής θερμικής ανάλυσης για το οργανικά τροποποιημένο οξύδιο του γραφενίου με ολεϋλαμίνη (o-GO-OA) παρατηρούμε τρεις εξώθερμες κορυφές στους 180 °C, 330 °C και 600 °C. Η πρώτη οφείλεται στη θερμική αποσύνθεση των λειτουργικών ομάδων που περιέχουν οξυγόνο όπως στην περίπτωση του GO και είναι ελαφρώς σε χαμηλότερη θερμοκρασία, με απώλεια μάζας ~24% κ.β. Η δεύτερη στους 330 °C οφείλεται στην καύση της οργανικής ένωσης (ολεϋλαμίνη) που έχει εντεθεί και αντιστοιχεί σε απώλεια μάζας ~40% κ.β. Ενώ η τελευταία με απώλεια μάζας ~33% κ.β. οφείλεται στην καύση του γραφενικού πλέγματος. Για θερμοκρασίες μέχρι τους 120 °C έχουμε μια πολύ μικρή απώλεια μάζας (μικρότερη του 3% κ.β.) που αντιστοιχεί

στο φυσικά προσροφημένο νερό, γεγονός που επιβεβαιώνει τη χαμηλή υδροφιλικότητα (άρα υψηλή οργανοφιλικότητα) του υβριδικού υλικού.

Στην καμπύλη διαφορικής θερμικής ανάλυσης για το υδρόφιλο παράγωγο μετά την οξείδωση/διάσπαση οξειδίου γραφενίου-ολεϋλαμίνης με υπερμαγγανικό κάλιο (h-GO-OA/KMnO₄) παρατηρούμε μία ενιαία απώλεια μάζας από τους 200 °C έως τους 900 °C που οφείλεται τόσο στην θερμική αποσύνθεση των λειτουργικών ομάδων που περιέχουν οξυγόνο όσο και στην καύση της οργανικής ένωσης (μέρος από την οξειδωμένη ολεϋλαμίνη) και αντιστοιχεί σε απώλεια μάζας ~50% κ.β. Για θερμοκρασίες μέχρι τους 120 °C έχουμε μια σχετικά μεγαλύτερη απώλεια μάζας (περίπου 8% κ.β.) που αντιστοιχεί στο φυσικά προσροφημένο νερό, γεγονός που επιβεβαιώνει την υψηλή υδροφιλικότητα του τελικού υβριδικού υλικού.



Σχήμα Δ8 Διάγραμμα θερμικής ανάλυσης (DTA/TGA) οργανόφιλου οξειδίου του γραφενίου με ολεϋλαμίνη (o-GO-OA)



Σχήμα Δ9 Διάγραμμα θερμικής ανάλυσης (DTA/TGA) υδρόφιλου παραγώγου μετά την οξειδωση/διάσπαση οξειδίου γραφενίου-ολεϋλαμίνης με υπερμαγγανικό κάλιο (h-GO-OA/KMnO₄)

Δ3 ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΟΞΕΙΔΑΣΗΣ ΤΗΣ ΓΛΥΚΟΖΗΣ ΣΕ ΟΡΓΑΝΟΦΙΛΑ ΚΑΙ ΥΔΡΟΦΙΛΑ ΠΑΡΑΓΩΓΑ ΤΟΥ ΟΞΕΙΔΙΟΥ ΤΟΥ ΓΡΑΦΕΝΙΟΥ

Δ3.1 Απόδοση ακινητοποίησης

Κατά τη μη ομοιοπολική ακινητοποίηση μέσω φυσικής προσρόφησης, δημιουργούνται διαφόρων τύπων αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ενζύμου και του νανοφορέα, όπως ηλεκτροστατικές, υδρόφοβες, van der Waals, δεσμοί υδρογόνου κ.ά.. Η απόδοση της ακινητοποίησης μπορεί να επηρεάζεται από ένα είδος αυτών των αλληλεπιδράσεων ή από το άθροισμα τους.

Το ένζυμο οξειδάση της γλυκόζης (GOx) ακινητοποιήθηκε μη ομοιοπολικά (μέσω φυσικής προσρόφησης) στην επιφάνεια των νανοϋλικών o-GO-OA και h-GO-OA/KMnO₄.

Η απόδοση της ακινητοποίησης για το κάθε ακινητοποιημένο ένζυμο παρουσιάζεται στον παρακάτω Πίνακα.

Πίνακας Δ1 Απόδοση ακινητοποιημένης GOx στην επιφάνεια των νανοϋλικών

Νανοϋλικό	Απόδοση ακινητοποίησης (%)	Ταχύτητα (Abs/min)
GO	62.7	0.084
o-GO-OA	61.8	0.079
h-GO-OA/KMnO₄	52.8	0.132

Με βάση τα δεδομένα του Πίνακα Δ1, μπορούμε να παρατηρήσουμε αρχικά ότι η GOx ακινητοποιείται επιτυχώς και στα τρία νανοϋλικά. Τη μεγαλύτερη απόδοση ακινητοποίησης την εμφανίζει το GO με ποσοστό 62,7%, ακολουθεί το o-GO-OA με 61,8%, και τελευταίο το h-GO-OA-KMnO₄ με 52,8%. Η διαφορά στην απόδοση της ακινητοποίησης στα διάφορα νανοϋλικά μπορεί να επηρεάζεται από διάφορους παράγοντες. Κατά τη μη ομοιοπολική ακινητοποίηση μέσω φυσικής προσρόφησης, δημιουργούνται διάφορου τύπου αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ενζύμου και του νανοφορέα, όπως ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις, υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις, van der Waals, δεσμοί υδρογόνου κ.α.. Η απόδοση της ακινητοποίησης μπορεί να επηρεάζεται από ένα είδος αυτών των αλληλεπιδράσεων ή από το άθροισμα όλων αυτών (κάποιες σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με άλλες). Με βάση τα αποτελέσματα δεν είναι δυνατό να εξαχθεί κάποιο συμπέρασμα για το βάρος των αλληλεπιδράσεων αυτών καθώς απαιτούνται μετρήσεις με εξειδικευμένες τεχνικές όπως η φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων-X (XPS) και η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR).

Επιπλέον των παραπάνω, η ακινητοποίηση εξαρτάται από πολλούς ακόμα παράγοντες που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη και να συνεκτιμώνται με την εκάστοτε απόδοση κάθε φορά. Σε αυτούς ανήκουν η τιμή του pH, η αναλογία ενζύμου – νανοϋλικού κατά την ακινητοποίηση, ο χρόνος επώασης του νανοϋλικού με το ένζυμο και η θερμοκρασία.

Όσον αφορά στην ταχύτητα της ακινητοποιημένης GOx, παρατηρείται ότι για το GO και o-GO-OA η ταχύτητα είναι παρόμοια, ενώ στην περίπτωση του h-GO-OA/KMnO₄, η ταχύτητα του ακινητοποιημένου ενζύμου είναι σχεδόν διπλάσια. Το αποτέλεσμα αυτό έχει

ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς στο νανοϋλικό αυτό το ένζυμο παρουσίασε τη χαμηλότερη απόδοση ακινητοποίησης, όπως σχολιάστηκε παραπάνω. Φαίνεται λοιπόν, πως ενώ δεν ακινητοποιείται όλη η ποσότητα της GOx, παρόλα αυτά, αυτή η ποσότητα που ακινητοποιείται είναι άκρως δραστική.

Δ3.2 Υπολογισμός κινητικών σταθερών

Οι κινητικές σταθερές της ελεύθερης και ακινητοποιημένης GOx προσδιορίστηκαν από τις αρχικές ταχύτητες της αντίδρασης οξειδωσης του ABTS σε διαφορετικές συγκεντρώσεις γλυκόζης. Σε όλες τις περιπτώσεις, η ταχύτητα τόσο των ελεύθερων όσο και των ακινητοποιημένων ενζύμων ακολουθεί κινητική Michaelis-Menten. Οι κινητικές σταθερές παρουσιάζονται στον Πίνακα Δ2, ενώ στο Παράρτημα παρατίθενται τα διαγράμματα Michaelis-Menten για κάθε περίπτωση.

Πίνακας Δ2 Προσδιορισμός φαινομενικών κινητικών σταθερών της ελεύθερης και ακινητοποιημένης GOx

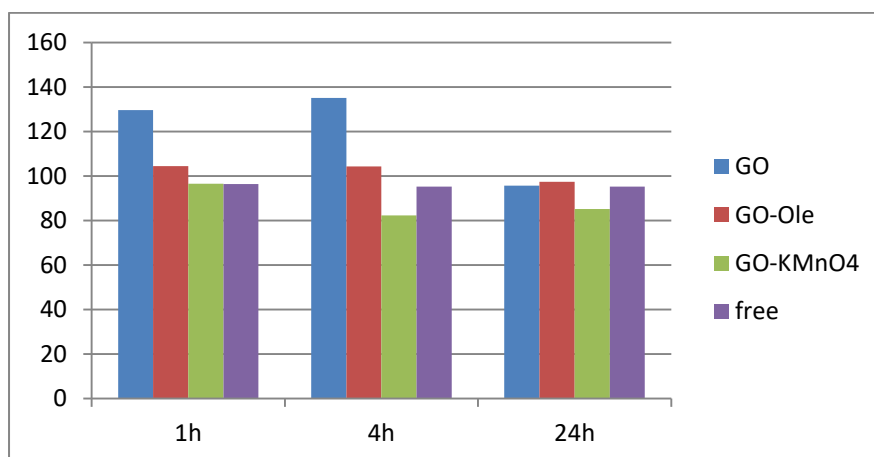
Ακινητοποίηση	V_{max} (μM/min)	K_m (mM)
Ελεύθερη GOx	13.81 ± 0.48	2.79 ± 0.26
GO-GOx	5.80 ± 0.16	4.81 ± 0.38
o-GO-OA-GOx	10.14 ± 0.51	9.53 ± 1.1
h-GO-OA/KMnO₄-GOx	1.85 ± 0.16	5.63 ± 1.1

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα του Πίνακα Δ2, παρατηρείται ότι στις περιπτώσεις των ακινητοποιημένων νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων η τιμή της σταθεράς K_m αυξάνεται. Η αύξηση της τιμής K_m υποδηλώνει ότι τα ακινητοποιημένα ένζυμα έχουν μια φαινομενικά χαμηλότερη συγγένεια για το υπόστρωμα σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να αποδοθεί στη στερική παρεμπόδιση του ενεργού κέντρου από το υπόστρωμα ή στην απώλεια της ευκαμψίας του ενζύμου που απαιτείται για τη

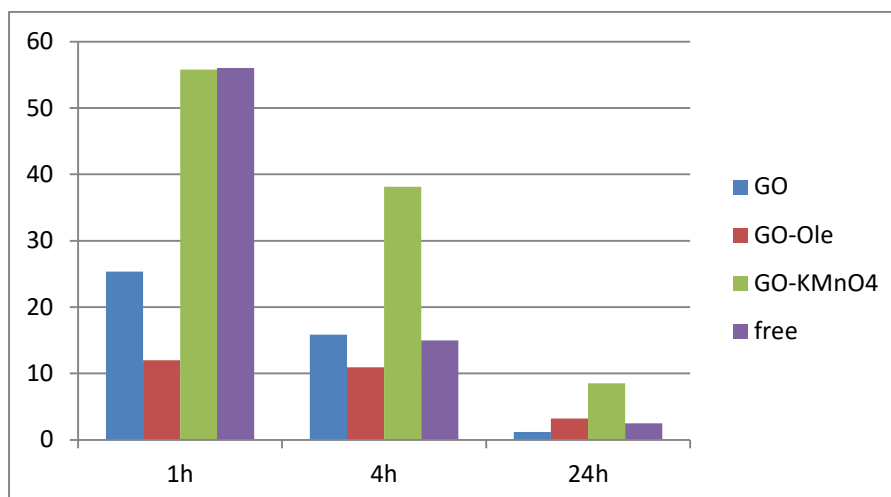
σύνδεση του υποστρώματος, αλλαγές που πιθανώς να οφείλονται στην ακινητοποίηση του ενζύμου (Singh & Verma, 2013). Επιπλέον, διαφοροποιήσεις παρατηρούνται και στην τιμή της V_{max} , όπου παρουσιάζει μείωση μετά την ακινητοποίηση. Αυτό έχει αποδειχθεί και σε έρευνα στην οποία η GOx ήταν ακινητοποιημένη σε GO (Zhou et al., 2012). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ένζυμο ενδέχεται να υποστεί αλλαγές στη διαμόρφωσή του κατά την ακινητοποίηση, γεγονός που μπορεί να οδηγήσει σε περιορισμένη πρόσβαση στο υπόστρωμα, και κατά συνέπεια σε αλλαγές στις τιμές των κινητικών σταθερών. Εντυπωσιακό είναι το αποτέλεσμα ότι η ακινητοποιημένη GOx παρουσιάζει V_{max} πολύ κοντά στο ελεύθερο ένζυμο. Ταυτόχρονα όμως η K_m της έχει αυξηθεί κατά 3.5 φορές περίπου. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει πως η GOx έχει ακινητοποιηθεί με τέτοιο τρόπο που ενώ φαίνεται πως η διαμόρφωσή της έχει αλλάξει τη συγγένεια προς το υπόστρωμα, ίσως όμως τα ενεργά κέντρα, που παραμένουν δραστικά ως προς αυτό, δρουν με μεγαλύτερη απόδοση.

Δ3.3 Προσδιορισμός θερμοσταθερότητας της GOx

Η ελεύθερη και ακινητοποιημένη GOx μελετήθηκαν ως προς τη σταθερότητά τους, σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες για χρονικό διάστημα έως και 24 h, και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στα Διαγράμματα των Σχημάτων Δ3 και Δ4.



Σχήμα Δ3 Μελέτη σταθερότητας της ελεύθερης και ακινητοποιημένης GOx στους 37 °C. Οι τυπικές αποκλίσεις (error bars) ήταν πολύ μικρές, για αυτό δεν είναι ευδιάκριτες στο διάγραμμα.



Σχήμα Δ4 Μελέτη σταθερότητας της ελεύθερης και ακινητοποιημένης GOx στους 60 °C. Οι τυπικές αποκλίσεις (error bars) ήταν πολύ μικρές, για αυτό δεν είναι ευδιάκριτες στο διάγραμμα.

Με βάση τα αποτελέσματα από τα διαγράμματα των Σχημάτων Δ3 και Δ4, φαίνεται πως στη θερμοκρασία 37 °C (Διάγραμμα Σχήματος Δ3) όλα τα δείγματα είναι σταθερά και η εναπομένουσα δραστικότητα τους δεν πέφτει κάτω από το 80%. Αντίθετα, κατά τη μελέτη σταθερότητας στους 60 °C (Διάγραμμα Σχήματος Δ4), στη 1 h επώασης η δραστικότητα της ακινητοποιημένης GOx στο GO και στο o-GO-OA, πέφτει κάτω από το 24%, ενώ η ελεύθερη και η ακινητοποιημένη GOx στο h-GO-OA/KMnO₄ διατηρούν έως και το 56% της αρχικής τους δραστικότητας. Παρόμοια εικόνα παρατηρείται και μετά από επώαση 4 ωρών, όπου το νανοϋλικό h-GO-OA/KMnO₄ προσδίδει τη μεγαλύτερη σταθερότητα στο ένζυμο. Μετά από 24 ώρες επώασης, η εναπομείνουσα δραστικότητα τόσο του ακινητοποιημένου ενζύμου όσο και της ελεύθερης GOx, μειώνεται δραματικά, παρόλα αυτά οι ακινητοποιημένες μορφές διατηρούν, σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις, σε μεγαλύτερο ποσοστό τη δραστικότητά τους σε σχέση με την ελεύθερη μορφή του ενζύμου. Η μείωση στην εναπομένουσα δραστικότητα πιθανώς να οφείλεται στη θερμική απενεργοποίηση του ενζύμου λόγω διαχωρισμού του FAD από το ένζυμο (Gouda et al., 2003). Ο σχηματισμός αλληλεπιδράσεων μεταξύ του ενζύμου και των νανοϋλικών κατά την ακινητοποίηση, προσφέρει θερμική προστασία και έτσι μειώνει τον ρυθμό ενζυμικής μετουσίωσης σε υψηλές θερμοκρασίες, όπως έχει επίσης αναφερθεί στη βιβλιογραφία (Chen et al., 2018).

Ε. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Στην παρούσα εργασία έγινε μελέτη της ακινητοποίησης της οξειδάσης της γλυκόζης σε οργανόφιλα και υδρόφιλα παράγωγα του οξειδίου του γραφενίου. Πιο συγκεκριμένα, αρχικά παρασκευάστηκε οργανόφιλο οξείδιο του γραφενίου με ολεϋλαμίνη, και στη συνέχεια έγινε ανάπτυξη ενός υδρόφιλου παραγώγου το οποίο προέκυψε από την οξείδωση/διάσπαση οξειδίου γραφενίου-ολεϋλαμίνης με KMnO_4 . Τα δύο αυτά νανοδομικά συστήματα χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς για την ακινητοποίηση της οξειδάσης της γλυκόζης. Ακολούθησε μελέτη της ενζυμικής δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου η οποία περιελάμβανε προσδιορισμό του ενζυμικού φορτίου, υπολογισμό των κινητικών σταθερών καθώς και μελέτη της θερμοσταθερότητας του ενζύμου. Τα αρχικά υλικά χαρακτηρίστηκαν με ένα συνδυασμό πειραματικών τεχνικών συμπεριλαμβανομένων της περίθλασης ακτίνων-X (XRD), της φασματοσκοπίας μέσου υπερύθρου (FTIR) και μετρήσεων θερμικής ανάλυσης (DTA/TGA).

Τα αποτελέσματα περίθλασης ακτίνων-X επιβεβαίωσαν την επιτυχή ένθεση της ολεϋλαμίνης στον ενδοστρωματικό χώρο του γραφενικού φυλλόμορφου υλικού. Μάλιστα τα μόρια της ολεϋλαμίνης φαίνεται ότι κάθονται υπό γωνία (σχεδόν κάθετα) ανάμεσα στα φύλλα του οξειδίου του γραφενίου. Επιπλέον, η ύπαρξη ανακλάσεων μεγαλύτερης τάξης, όπως η (002), (003) κ.λπ. υποδεικνύει ότι το υβριδικό σύστημα βρίσκεται σε υψηλή τάξη με τα φύλλα του δισδιάστατου υλικού να βρίσκονται παράλληλα το ένα με το άλλο. Μετά την οξείδωση του υβριδικού οξειδίου γραφενίου-ολεϋλαμίνης με KMnO_4 η τάξη που έχει το φυλλόμορφο υλικό χάνεται και μάλιστα η 001 ανάκλαση δεν είναι καθόλου ορατή, γεγονός που υποδηλώνει ότι το σύστημα έχει πλήρως αποφυλλοποιηθεί. Τα αποτελέσματα μέσου υπερύθρου (FTIR) επιβεβαιώνουν με την σειρά τους την επιτυχή ένθεση της οργανικής ένωσης στα φύλλα του οξειδίου του γραφενίου, ενώ μετά την οξείδωση του υβριδικού οξειδίου γραφενίου-ολεϋλαμίνης με KMnO_4 η αλυσίδα ολεϋλαμίνης οξειδώνεται και σπάει στο σημείο που βρίσκεται ο διπλός δεσμός (ανάμεσα στο ένατο και δέκατο άτομο άνθρακα), οδηγώντας στη δημιουργία καρβοξυλομάδων και μειώνοντας τον αριθμό των μεθυλενομάδων κατά πολύ στο τελικό υβριδικό υλικό. Τέλος, τα αποτελέσματα διαφορικής θερμικής ανάλυσης (DTA) και θερμοβαρυτομετρικής ανάλυσης

(TG) δείχνουν ότι στο αρχικό υλικό η ολεϋλαμίνη αποτελεί το ~40% κ.β. του υβριδικού υλικού ενώ το υλικό δείχνει χαμηλή υδροφιλικότητα (άρα υψηλή οργανοφιλικότητα). Αντίθετα το υλικό μετά την οξείδωση εμφανίζει υψηλή υδροφιλικότητα.

Κατά τη μη ομοιοπολική ακινητοποίηση της οξειδάσης της γλυκόζης στα δύο νανοϋλικά μέσω φυσικής προσρόφησης, δημιουργούνται διαφόρων τύπων αλληλεπιδράσεις μεταξύ του ενζύμου και του νανοφορέα, όπως ηλεκτροστατικές, υδρόφοβες, van der Waals, δεσμοί υδρογόνου κ.ά.. Η απόδοση της ακινητοποίησης μπορεί να επηρεάζεται από ένα είδος αυτών των αλληλεπιδράσεων ή από το άθροισμά τους. Τη μεγαλύτερη απόδοση ακινητοποίησης την εμφανίζει το GO με ποσοστό 62,7%, ακολουθεί το o-GO-OA με 61,8%, και τελευταίο το h-GO-OA-KMnO₄ με 52,8%. Η απόδοση της ακινητοποίησης μπορεί να επηρεάζεται από ένα είδος αυτών των αλληλεπιδράσεων ή από το άθροισμα όλων αυτών (κάποιες σε μεγαλύτερο βαθμό σε σχέση με άλλες). Όσον αφορά στην ταχύτητα της ακινητοποιημένης GOx, παρατηρείται ότι για το GO και o-GO-OA η ταχύτητα είναι παρόμοια, ενώ στην περίπτωση του h-GO-OA/KMnO₄, η ταχύτητα του ακινητοποιημένου ενζύμου είναι σχεδόν διπλάσια. Το αποτέλεσμα αυτό έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον καθώς στο νανοϋλικό αυτό το ένζυμο παρουσίασε τη χαμηλότερη απόδοση ακινητοποίησης. Φαίνεται λοιπόν, πως ενώ δεν ακινητοποιείται όλη η ποσότητα της GOx, παρόλα αυτά, αυτή η ποσότητα που ακινητοποιείται είναι άκρως δραστική.

Επιπλέον στις περιπτώσεις των ακινητοποιημένων νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων η τιμή της σταθεράς K_m αυξάνεται. Η αύξηση της τιμής K_m υποδηλώνει ότι τα ακινητοποιημένα ένζυμα έχουν μια φαινομενικά χαμηλότερη συγγένεια για το υπόστρωμα σε σχέση με το ελεύθερο ένζυμο. Αυτό το αποτέλεσμα μπορεί να αποδοθεί στη στερική παρεμπόδιση του ενεργού κέντρου από το υπόστρωμα ή στην απώλεια της ευκαμψίας του ενζύμου που απαιτείται για τη σύνδεση του υποστρώματος, αλλαγές που πιθανώς να οφείλονται στην ακινητοποίηση του ενζύμου. Εντυπωσιακό είναι το αποτέλεσμα ότι η ακινητοποιημένη GOx παρουσιάζει V_{max} πολύ κοντά στο ελεύθερο ένζυμο. Ταυτόχρονα όμως η K_m της έχει αυξηθεί κατά 3.5 φορές περίπου. Το αποτέλεσμα αυτό υποδεικνύει πως η GOx έχει ακινητοποιηθεί με τέτοιο τρόπο που ενώ φαίνεται πως η διαμόρφωσή της έχει αλλάξει τη συγγένεια προς το υπόστρωμα, ίσως όμως τα ενεργά κέντρα, που παραμένουν δραστικά ως προς αυτό, δρουν με μεγαλύτερη απόδοση.

Από τη μελέτη θερμοσταθερότητας φαίνεται ότι όλα τα δείγματα είναι σταθερά και η εναπομένουσα δραστηκότητά τους δεν πέφτει κάτω από το 80%. Κατά τη μελέτη σταθερότητας στους 60°C, στη 1 h επώασης η δραστηκότητα της ακινητοποιημένης GOx στο GO και στο o-GO-OA, πέφτει κάτω από το 24%, ενώ η ελεύθερη και η ακινητοποιημένη GOx στο h-GO-OA/KMnO₄ διατηρούν έως και το 56% της αρχικής τους δραστηκότητας. Παρόμοια εικόνα παρατηρείται και μετά από επώαση 4 ωρών, όπου το νανοϋλικό h-GO-OA/KMnO₄ προσδίδει τη μεγαλύτερη σταθερότητα στο ένζυμο. Μετά από 24 ώρες επώασης, η εναπομείνουσα δραστηκότητα τόσο του ακινητοποιημένου ενζύμου όσο και της ελεύθερης GOx, μειώνεται δραματικά, παρόλα αυτά οι ακινητοποιημένες μορφές διατηρούν, σχεδόν σε όλες τις περιπτώσεις, σε μεγαλύτερο ποσοστό τη δραστηκότητα τους σε σχέση με την ελεύθερη μορφή του ενζύμου.

Μελλοντικά, αναμένεται να γίνουν μετρήσεις φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων ακτίνων-X (XPS) και πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού (NMR) για την μελέτη των αλληλεπιδράσεων του ενζύμου με τα νανοϋλικά. Τέλος τα νανοϋλικά αναμένεται να δοκιμαστούν ως φορείς ακινητοποίησης και άλλων ενζύμων για τη δημιουργία νέων βιοκαταλυτικών συστημάτων.

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνόγλωσση

Διαμαντή, Ε. (2014). *Νέα νανοπορόδη υλικά με βάση το γραφένιο: σύνθεση, χαρακτηρισμός και μελέτη ιδιοτήτων. Διδακτορική διατριβή, Σχολή Θετικών Επιστημών. Τμήμα Μηχανικών της Επιστήμης Υλικών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.*

Ενωτιάδης, Α. (2011). *Σύνθεση και χαρακτηρισμός καινοτόμων νανοσύνθετων πολυμερικών μεμβρανών ως ηλεκτρολύτες κελιών καυσίμου. Διδακτορική διατριβή, Σχολή Επιστημών και Τεχνολογιών. Τμήμα Μηχανικών Επιστήμης Υλικών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα.*

Κλώνης Ι., (2014). *Ενζυμική Βιοτεχνολογία, 3^η αναθεωρημένη έκδοση. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Κρήτης.*

Ξαπλαντέρη, Μ. (2015). Ένζυμα. Στο Σπηλιόπουλος, Ι., Βάκρος, Ι., & Ξαπλαντέρη, Μ.. *Χημεία [Προπτυχιακό εγχειρίδιο]*, <https://hdl.handle.net/11419/915>.

Πατήλα, Β.-Μ. (2016). *Ανάπτυξη νέων βιοκαταλυτικών συστημάτων μέσω της ακινητοποίησης ενζύμων σε νανοδομικά υλικά. Σχολή Επιστημών Υγείας. Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών. Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.*

Σταμάτης, Χ. (2018). *Ενζυμική βιοτεχνολογία με στοιχεία νανοβιοτεχνολογίας. Τμήμα Βιολογικών Εφαρμογών και τεχνολογιών, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.*

Ξενόγλωσση

Acik, M., Lee, G., Mattevi, C., Pirkle, A., Wallace, R. M., Chhowalla, M., ... & Chabal, Y. (2011). The role of oxygen during thermal reduction of graphene oxide studied by infrared absorption spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry C*, 115(40), 19761-19781.

Ago, H., Imamura, S., Okazaki, T., Saito, T., Yumura, M., & Tsuji, M. (2005). CVD growth of single-walled carbon nanotubes with narrow diameter distribution over fe/mgo catalyst and their fluorescence spectroscopy. *The Journal of Physical Chemistry B*, 109, (20), 10035-10041.

Andersson, O. E., Prasad, B. L. V., Sato, H., Enoki, T., Hishiyama, Y., Kaburagi, Y., ... & Bandow, S. (1998). Structure and electronic properties of graphite nanoparticles. *Physical Review B*, 58, (24), 16387.

- Balandin, A. A., Ghosh, S., Bao, W., Calizo, I., Teweldebrhan, D., Miao, F., & Lau, C. N. (2008). Superior thermal conductivity of single-layer graphene. *Nano Letter*, 8, 902-907.
- Bankar, S. B., Bule, M. V., Singhal, R. S., & Ananthanarayan, L. (2009). Glucose oxidase—an overview. *Biotechnology advances*, 27, (4), 489-501.
- Baughman, R. H., Zakhidov, A. A., & De Heer, W. A. (2002). Carbon nanotubes--the route toward applications. *Science*, 297, (5582), 787-792.
- Berger, C., Song, Z., Li, T., Li, X., Ogbazghi, A. Y., Feng, R., ... & De Heer, W. A. (2004). Ultrathin epitaxial graphite: 2D electron gas properties and a route toward graphene-based nanoelectronics. *Journal of Physical Chemistry B*, 108, (52), 19912-19916.
- Bianco, A., Kostarelos, K., & Prato, M. (2005). Applications of carbon nanotubes in drug delivery. *Current Opinion in Chemical Biology*, 9, (6), 674-679.
- Bickerstaff, G. F. (1997). Immobilization of enzymes and cells. Some practical considerations. Στο *Immobilization of Enzymes and Cells* (GF Bickerstaff, επιμ.), 1-11.
- Boehm, H. P., Clauss, A., Fischer, G. O., & Hofmann, U. (1962). Das adsorptionsverhalten sehr dünner kohlenstoff-folien. *Z. Anorg. Allg. Chem.*, 316, 119-127.
- Bolotin, K. I., Sikes, K. J., Jiang, Z., Klima, M., Fudenberg, G., Hone, J., ... & Stormer, H. L. (2008). Ultrahigh electron mobility in suspended graphene. *Solid State Communications*, 146, (9-10), 351-355.
- Bornscheuer, U. T. & Kazlauskas, R. J. (2004). Catalytic promiscuity in biocatalysis: using old enzymes to form new bonds and follow new pathways. *Angewandte Chemie International Edition*, 43, (45), 6032-6040.
- Bosi, S., Da Ros, T., Spalluto, G., & Prato, M. (2003). Fullerene derivatives: An attractive tool for biological applications. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 38, (11-12), 913-923.
- Boukhvalov, D. W. & Katsnelson, M. I. (2009). Chemical functionalization of graphene. *Journal of Physics-Condensed Matter*, 21, (34).
- Bourlinos, A. B., Georgakilas, V., Zboril, R., Steriotis, T. A., & Stubos, A. K. (2009). Liquid-phase exfoliation of graphite towards solubilized graphenes. *Small*, 5, (16), 1841-1845.

Bourlinos, A. B., Gournis, D., Petridis, D., Szabó, T., Szeri, A., & Dékány, I. (2003). Graphite oxide: chemical reduction to graphite and surface modification with primary aliphatic amines and amino acids. *Langmuir* 19 (15), 6050-6055.

Bourlon, B., Wong, J., Mikó, C., Forró, L., & Bockrath, M. (2007). A nanoscale probe for fluidic and ionic transport. *Nat Nano*, 2, (2), 104-107.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical biochemistry*, 72(1-2), 248-254.

Brodie, B. C. (1859). On the atomic weight of graphite. *Proceedings of the Royal Society of London*, 10, (11), 249-259.

Cai, W., Zhu, Y., Li, X., Piner, R. D., & Ruoff, R. S. (2009). Large area few-layer graphene/graphite films as transparent thin conducting electrodes. *Applied Physics Letters*, 95, (12).

Cano-Marquez, A. G., Rodriguez-Macias, F. J., Campos-Delgado, J., Espinosa-González, C. G., Tristán-López, F., Ramírez-González, D., ... & Vega-Cantú, Y. I. (2009). Ex-MWNTs: Graphene sheets and ribbons produced by lithium intercalation and exfoliation of carbon nanotubes. *Nano Letters*, 9, (4), 1527- 1533.

Chae, H. K., Siberio-Pérez, D. Y., Kim, J., Go, Y., Eddaoudi, M., Matzger, A. J., ... & Yaghi, O. M. (2004). A route to high surface area, porosity and inclusion of large molecules in crystals. *Nature*, 427, (6974), 523-527.

Chen, Q., Liu, D., Wu, C., Yao, K., Li, Z., Shi, N., ... & Gates, I. D. (2018). Co-immobilization of cellulase and lysozyme on amino-functionalized magnetic nanoparticles: an activity-tunable biocatalyst for extraction of lipids from microalgae. *Bioresource technology*, 263, 317-324.

Chen, X., Li, Z., Zhou, H., Wang, T., Qin, J., & Inokuchi, M. (2007). The intercalation of C60-containing PEO into layered MnPS3. *Polymer*, 48, (11), 3256-3261.

Chen, Y., Zhang, X., Yu, P., & Ma, Y. (2009). Stable dispersions of graphene and highly conducting graphene films: A new approach to creating colloids of graphene monolayers. *Chemical Communications*, (30), 4527-4529.

Cheung, C. L., Kurtz, A., Park, H., & Lieber, C. M. (2002). Diameter-controlled synthesis of carbon nanotubes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 106, (10), 2429-2433.

- Choucair, M., Thordarson, P., & Stride, J. A. (2009). Gram-scale production of graphene based on solvothermal synthesis and sonication. *Nature Nanotech*, 4, 30-33.
- Chung, D. (2002). Composite materials research laboratory, State University of New York at Buffalo. *Journal of Materials Science*, 37, 1-15.
- Ciaurriz, P., Bravo, E., & Hamad-Schifferli, K. (2014). Effect of architecture on the activity of glucose oxidase/horseradish peroxidase/carbon nanoparticle conjugates. *Journal of colloid and interface science*, 414, 73-81.
- Cote, L. J., Kim, F., & Huang, J. (2009). Langmuir-blodgett assembly of graphite oxide single layers. *Journal of the American Chemical Society*, 131, (3), 1043-1049.
- Das, B., Prasad, K. E., Ramamurty, U., & Rao, C. N. R. (2009). Nano-indentation studies on polymer matrix composites reinforced by few-layer graphene. *Nanotechnology*, 20, (12).
- Datta, S., Christena, L. R., & Rajaram, Y. R. S. (2013). Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, 3(1), 1-9.
- Dékány, I., Krüger-Grasser, R., & Weiss, A. (1998). Selective liquid sorption properties of hydrophobized graphite oxide nanostructures. *Colloid and Polymer Science*, 276, (7), 570-576.
- Dietz, T. G., Duncan, M. A., Powers, D. E., & Smalley, R. E. (1981). Laser production of supersonic metal cluster beams. *Journal of Chemical Physics*, 74, (11), 6511-6512.
- Dong, L. X. & Chen, Q. (2010). Properties, synthesis, and characterization of graphene. *Frontiers of Materials Science in China*, 4, (1), 45-51.
- Dreyer, D. R., Park, S., Bielawski, C. W., & Ruoff, R. S. (2010). The chemistry of graphene oxide. *Chemical Society reviews*, 39, (1), 228-240.
- Elias, D. C., Nair, R. R., Mohiuddin, T. M. G., Morozov, S. V., Blake, P., Halsall, M. P., ... & Novoselov, K. S. (2009). Control of graphene's properties by reversible hydrogenation: Evidence for graphane. *Science*, 323, (5914), 610-613.
- Gengler, R. Y., Veligura, A., Enotiadis, A., Diamanti, E. K., Gournis, D., Józsa, C., ... & Rudolf, P. (2010). Large-yield preparation of high-electronic-quality graphene by a langmuir-schaefer approach. *Small*, 6, (1), 35-39.
- Gengler, R. Y., Spyrou, K., & Rudolf, P. (2010). A roadmap to high quality chemically prepared Graphene. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 43, (37).

- Geim, A. K. & Novoselov, K. S. (2007). The rise of graphene. *Nature Mater*, 6, 183-191.
- Gómez-Navarro, C., Weitz, R. T., Bittner, A. M., Scolari, M., Mews, A., Burghard, M., & Kern, K. (2007). Electronic Transport Properties of Individual Chemically Reduced Graphene Oxide Sheets. *Nano Letters*, 7, (11), 3499-3503.
- Gouda, M. D., Singh, S. A., Rao, A. A., Thakur, M. S., & Karanth, N. G. (2003). Thermal inactivation of glucose oxidase: Mechanism and stabilization using additives. *Journal of Biological Chemistry*, 278, (27), 24324-24333.
- Hatzinikolaou, D. G. & Macris, B. J. (1995). Factors regulating production of glucose oxidase by *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology*, 17, (6), 530-534.
- He, H., Klinowski, J., Forster, M., & Lerf, A. (1998). A new structural model for graphite oxide. *Chemical Physics Letters*, 287, (1-2), 53-56.
- He, H., Riedl, T., Lerf, A., & Klinowski, J. (1996). Solid-state NMR studies of the structure of graphite oxide. *Journal of Physical Chemistry*, 100, (51), 19954-19958.
- Herrera-Alonso, M., Abdala, A. A., McAllister, M. J., Aksay, I. A., & Prud'homme, R. K. (2007). Intercalation and stitching of graphite oxide with diaminoalkanes. *Langmuir*, 23(21), 10644-10649.
- Hirscher, M. & Becher, M. (2003). Hydrogen storage in carbon nanotubes. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 3, (1-2), 3-17.
- Hofmann, U. & Holst, R. (1939). *Ber. Dtsch. Chem. Ges*, 72, 754-771.
- Hummers Jr, W. S. & Offeman, R. E. (1958). Preparation of graphitic oxide. *Journal of the American Chemical Society*, 80, (6), 1339.
- Hu, W., Peng, C., Luo, W., Lv, M., Li, X., Li, D., ... & Fan, C. (2010). Graphene-Based Antibacterial Paper. *ACS Nano*, 4, (7), 4317- 4323.
- Iijima, S. (1991). Helical microtubules of graphitic carbon. *Nature*, 354, (6348), 56-58.
- Katz, E. & Willner, I. (2004). Biomolecule-Functionalized Carbon Nanotubes: Applications in Nanobioelectronics. *ChemPhysChem*, 5, (8), 1084-1104.
- Kim, J., Jay, W. G., & Ping, W. (2006). Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical engineering science*, 61, (3), 1017-1026.

- Kim, K. S., Zhao, Y., Jang, H., Lee, S. Y., Kim, J. M., Kim, K. S., ... & Hong, B. H. (2009). Large-scale pattern growth of graphene films for stretchable transparent electrodes. *Nature*, 457, (7230), 706-710.
- Kim, H., Miura, Y., & Macosko, C. W. (2010). Graphene/polyurethane nanocomposites for improved gas barrier and electrical conductivity. *Chemistry of Materials*, 22, (11), 3441-3450.
- Kim, S. (2005). Vacuum gauges with emitters based on carbon nanotubes. *Technical Physics Letters*, 31, (7), 597-599.
- Komatsu, K., Murata, Y., Sugita, N., Takeuchi, K. I., & Wan, T. S. (1993). Use of naphthalene as a solvent for selective formation of the 1/1 diels-alder adduct of c-60 with anthracene. *Tetrahedron Letters*, 34, (52), 8473-8476.
- Kosynkin, D. V., Higginbotham, A. L., Sinitskii, A., Lomeda, J. R., Dimiev, A., Price, B. K., & Tour, J. M. (2009). Longitudinal unzipping of carbon nanotubes to form graphene nanoribbons. *Nature*, 458, (7240), 872-876.
- Krätschmer, W., Fostiropoulos, K., & Huffman, D. R. (1990). The Infrared and Ultraviolet-Absorption Spectra of Laboratory-Produced Carbon Dust - Evidence for the presence of the c-60 molecule. *Chemical Physics Letters*, 170, (2 3), 167-170.
- Krätschmer, W., Lamb, L. D., Fostiropoulos, K. H. D. R., & Huffman, D. R. (1990). Solid C60: a new form of carbon. *Nature*, 347, (6291), 354-358.
- Kroto, H. (1988). Space, stars, C60, and soot. *Science*, 242, (4882), 1139-1145.
- Kroto, H. W., Heath, J. R., O'Brien, S. C., Curl, R. F., & Smalley, R. E. (1985). C60: Buckminsterfullerene. *Nature*, 318, (6042), 162-163.
- Kuila, T., Bose, S., Mishra, A. K., Khanra, P., Kim, N. H., & Lee, J. H. (2012). Chemical functionalization of graphene and its applications. *Prog. Mater. Sci.*, 57, (7), 1061-1105.
- Jiao, L., Zhang, L., Wang, X., Diankov, G., & Dai, H. (2009). Narrow graphene nanoribbons from carbon nanotubes. *Nature*, 458, (7240), 877-880.
- Lakshminarayanan, P. V., Toghiani, H., & Pittman Jr, C. U., (2004). Nitric acid oxidation of vapor grown carbon nanofibers. *Carbon*, 42, (12-13), 2433-2442.
- Lee, C. K., & Au-Duong, A. N. (2018). Enzyme immobilization on nanoparticles: recent applications. *Emerging areas in Bioengineering*, 1, 67-80.

Lerf, A., He, H., Forster, M., & Klinowski, J. (1998). Structure of graphite oxide revisited. *Journal of Physical Chemistry B*, 102, (23), 4477-4482.

Lerf, A., He, H., Riedl, T., Forster, M., & Klinowski, J. (1997). ¹³C and ¹H MAS NMR studies of graphite oxide and its chemically modified derivatives. *Solid State Ionics*, 101-103, (PART 1), 857-862.

Leskovac, V., Trivić, S., Wohlfahrt, G., Kandrač, J., & Peričin, D. (2005). Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: the mechanism of action with molecular oxygen, quinones, and one-electron acceptors. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 37, (4), 731-750.

Lee, C. J., Park, J. (2001). Growth model for bamboolike structured carbon nanotubes synthesized using thermal chemical vapor deposition. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105, (12), 2365-2368.

Liang, Y., Wu, D., Feng, X., & Müllen, K. (2009). Dispersion of graphene sheets in organic solvent supported by ionic interactions. *Advanced Materials*, 21, (17), 1679-1683.

Liang, Y., Zhang, H., Yi, B., Zhang, Z., & Tan, Z. (2005). Preparation and characterization of multi-walled carbon nanotubes supported PtRu catalysts for proton exchange membrane fuel cells. *Carbon*, 43, (15), 3144-3152.

Liao, S., Xu, G., Wang, W., Watari, F., Cui, F., Ramakrishna, S., & Chan, C. K. (2007). Self-assembly of nano-hydroxyapatite on multi-walled carbon nanotubes. *Acta Biomaterialia*, 3, (5), 669-675.

Li, N., Wang, Z., Zhao, K., Shi, Z., Gu, Z., & Xu, S. (2010). Large scale synthesis of N-doped multi-layered graphene sheets by simple arc-discharge method. *Carbon*, 48, (1), 255-259.

Li, Q., Fan F., Wang Y., Feng W., & Ji P. (2013). Enzyme immobilization on carboxyl-functionalized graphene oxide for catalysis in organic solvent. *Ind. Eng. Chem. Res.*, 52, 6343–6348.

Li, W. Z., Xie, S. S., Qian, L. X., Chang, B. H., Zou, B. S., Zhou, W. Y., ... & Wang, G. (1996). Large-scale synthesis of aligned carbon nanotubes. *Science*, 274, (5293), 1701-1703.

Li, Y., Kim, W., Zhang, Y., Rolandi, M., Wang, D., & Dai, H. (2001). Growth of single-walled carbon nanotubes from discrete catalytic nanoparticles of various sizes. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105, (46), 11424- 11431.

- Li, Y., Wang, J., Li, X., Geng, D., Li, R., & Sun, X., (2011). Superior energy capacity of graphene nanosheets for a nonaqueous lithium-oxygen battery. *Chemical Communications*, 47, (33), 9438-9440.
- Li, Y., Zhang, X., Shen, L., Luo, J., Tao, X., Liu, F., & Van Tendeloo, G. (2004). Controlling the diameters in large-scale synthesis of single-walled carbon nanotubes by catalytic decomposition of CH₄. *Chemical Physics Letters*, 398, (1-3), 276-282.
- Li, X., Zhu, Y., Cai, W., Borysiak, M., Han, B., Chen, D., ... & Ruoff, R. S. (2009). Transfer of large-area graphene films for high-performance transparent conductive electrodes. *Nano Letters*, 9, (12), 4359-4363.
- Lin, Z., Liu, Y., Yao, Y., Hildreth, O. J., Li, Z., Moon, K., & Wong, C. P. (2011). Superior Capacitance of Functionalized Graphene. *Journal of Physical Chemistry C*, 115, (14), 7120-7125.
- Litina, K., Miriouni, A., Gournis, D., Karakassides, M. A., Georgiou, N., Klontzas, E., ... & Avgeropoulos, A. (2006). Nanocomposites of polystyrene-b-polyisoprene copolymer with layered silicates and carbon nanotubes. *European Polymer Journal*, 42, (9), 2098-2107.
- Liu, Z., Robinson, J. T., Sun, X., & Dai, H. (2008). PEGylated nanographene oxide for delivery of water-insoluble cancer drugs. *Journal of the American Chemical Society*, 130, (33), 10876-10877.
- Liu, Y., Yu, D., Zeng, C., Miao, Z., & Dai, L. (2010). Biocompatible Graphene Oxide-Based Glucose Biosensors. *Langmuir*, 26, (9), 6158-6160.
- Lu, X., Yu, M., Huang, H., & Ruoff, R. S. (1999). Tailoring graphite with the goal of achieving single sheets. *Nanotechnology*, 10, 269-272
- Matsuo, Y., Miyabe, T., Fukutsuka, T., & Sugie, Y. (2007). Preparation and characterization of alkylamine-intercalated graphite oxides. *Carbon*, 45, (5), 1005-1012.
- Matsuo, Y., Tahara, K., & Sugie, Y. (1996). Synthesis of poly(ethylene oxide)-intercalated graphite oxide. *Carbon*, 34, (5), 672-674.
- Mazdak, T. (2009). Trends in graphene research. *Materials Today*, 12, (10), 34-37.
- Mesarič T., Baweja L., Drašler B., Drobne D., Makovec D., Dušak P., Dhawan A., & Sepčič K., (2013). Effects of surface curvature and surface characteristics of carbon-based nanomaterials on the adsorption and activity of acetylcholinesterase. *Carbon*, 62, 222-232.

- Mohamad, N. R., Marzuki, N. H. C., Buang, N. A., Huyop, F., & Wahab, R. A. (2015). An overview of technologies for immobilization of enzymes and surface analysis techniques for immobilized enzymes. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 29, (2), 205–220.
- Mohanty, N. & Berry, V. (2008). Graphene-based single-bacterium resolution biodevice and DNA transistor: Interfacing graphene derivatives with nanoscale and microscale biocomponents. *Nano Letters*, 8, (12), 4469-4476.
- Morozov, S. V., Novoselov, K. S., Katsnelson, M. I., Schedin, F., Elias, D. C., Jaszczak, J. A., & Geim, A. K. (2008). Giant intrinsic carrier mobilities in graphene and its bilayer. *Physical Review Letters*, 100, (1).
- Nair, R. R., Blake, P., Grigorenko, A. N., Novoselov, K. S., Booth, T. J., Stauber, T., ... & Geim, A. K. (2008). Fine structure constant defines visual transparency of graphene. *Science*, 320, (5881), 1308.
- Nakajima, T. & Matsuo, Y. (1994). Formation process and structure of graphite oxide. *Carbon*, 32, (3), 469-475.
- Novoselov, K. S. (2007). Detection of individual gas molecules adsorbed on graphene. *Nature Materials*, 6, (9), 652-655.
- Novoselov, K. S., Geim, A. K., Morozov, S. V., Jiang, D. E., Zhang, Y., Dubonos, S. V., ... & Firsov, A. A., (2004). Electric field effect in atomically thin carbon films. *Science*, 306, (5696), 666-669.
- Oh, J., Lee, J. H., Koo, J. C., Choi, H. R., Lee, Y., Kim, T., ... & Nam, J. D. (2010). Graphene oxide porous paper from amine-functionalized poly (glycidyl methacrylate)/graphene oxide core-shell microspheres. *Journal of Materials Chemistry*, 20(41), 9200-9204.
- Paredes, J. I., Villar-Rodil, S., Martínez-Alonso, A., & Tascon, J. M. (2008). Graphene oxide dispersions in organic solvents. *Langmuir*, 24, 10560-10564.
- Pinnavaia, T.J., (1983). Intercalated clay catalysts. *Science*, 220, 365-371.
- Pluschkell, S., Hellmuth, K. & Rinas, U. (1996). Kinetics of glucose oxidase excretion by recombinant *Aspergillus niger*. *Biotechnology and Bioengineering*, 51, (2), 215-220.
- Rao, C. E. E., Sood, A. E., Subrahmanyam, K. E., & Govindaraj, A. (2009). Graphene: The New Two-Dimensional Nanomaterial. *Angewandte Chemie-International Edition*, 48, (42), 7752-7777.

Reina, A., Jia, X., Ho, J., Nezich, D., Son, H., Bulovic, V., ... & Kong, J. (2009). Large area, few-layer graphene films on arbitrary substrates by chemical vapor deposition. *Nano Letters*, 9, (1), 30-35.

Rollings, E., Gweon, G. H., Zhou, S. Y., Mun, B. S., McChesney, J. L., Hussain, B. S., ... & Lanzara, A. (2006). Synthesis and characterization of atomically thin graphite films on a silicon carbide substrate. *Journal of Physics and Chemistry of Solids*, 67, (9-10), 2172- 2177.

Ruess, G. (1946). Uber das Graphitoxhydroxyd (Graphitoxyd). *Monatshefte fur Chemie*, 76, (3-5), 381-417.

Sariciftci, N. S., Smilowitz, L., Heeger, A. J., & Wudl, F. (1992). Photoinduced electron transfer from a conducting polymer to buckminsterfullerene. *Science*, 258, (5087), 1474-1476.

Schafhaeutl, C., (1840). On the combination of carbon with silicon and iron, and other metals, forming the different species of cast iron, steel, and malleable iron. *Phil. Mag.*, 16, 570-590.

Schedin, F., Geim, A. K., Morozov, S. V., Hill, E. W., Blake, P., Katsnelson, M. I., &

Scholz, W. & Boehm, H. P. (1969). Untersuchungen am Graphitoxid. VI. Betrachtungen zur Struktur des Graphitoxids. *Zeitschrift für anorganische und allgemeine Chemie*, 369, (3- 6), 327-340.

Singh, J., & Verma, N. (2013). Glucose oxidase from *Aspergillus niger*: Production, characterization and immobilization for glucose oxidation. *Adv. Appl. Sci. Res*, 4(3), 250-257.

Sirisha, V. L., Jain, A. & Jain, A. (2016). Enzyme immobilization: an overview on methods, support material, and applications of immobilized enzymes. *Advances in food and nutrition research*, 79, 179-211.

Stankovich, S. (2007). Synthesis of graphene-based nanosheets via chemical reduction of exfoliated graphite oxide. *Carbon*, 45, 1558-1565.

Stankovich, S., Dikin, D. A., Dommett, G. H., Kohlhaas, K. M., Zimney, E. J., Stach, E. A., ... & Ruoff, R. S. (2006). Graphene-based composite materials. *Nature*, 442, (7100), 282-286.

Staudenmaier, L. (1898). Verfahren zur Darstellung der Graphitsaure. *Ber. Deut. Chem. Ges.*, 31, 1481.

- Stoller, M. D., Park, S., Zhu, Y., An, J., & Ruoff, R. S. (2008). Graphene-Based ultracapacitors. *Nano Letters*, 8, (10), 3498-3502.
- Subrahmanyam, K. S., Panchakarla, L. S., Govindaraj, A., & Rao, C. N. R. (2009). Simple method of preparing graphene flakes by an arc-discharge method. *The Journal of Physical Chemistry C*, 113, (11), 4257-4259.
- Subrahmanyam, K. S., Vivekchand, S. R. C., Govindaraj, A., & Rao, C. N. R. (2008). A study of graphenes prepared by different methods: characterization, properties and solubilization. *Journal of Materials Chemistry*, 18, (13), 1517-1523.
- Sun, Z., Kohama, S. I., Zhang, Z., Lomeda, J. R., & Tour, J. M. (2010). Soluble graphene through edge-selective functionalization. *Nano Research*, 3, (2), 117-125.
- Sutter, P. W., Flege, J. I., & Sutter, E. A. (2008). Epitaxial graphene on ruthenium. *Nature Mater.* 7, 406-411.
- Tagmatarchis, N., Prato, M. (2004). Organdullerene materials. Στο Fullerene-Based Materials: *Structures and Properties*, , Vol. 109, 1-39.
- Tang, X., Bansaruntip, S., Nakayama, N., Yenilmez, E., Chang, Y. L., & Wang, Q. (2006). Carbon Nanotube DNA Sensor and Sensing Mechanism. *Nano Letters*, 6, (8), 1632-1636.
- Tang, W. L. & Zhao, H. (2009). Industrial biotechnology: tools and applications. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 4 (12), 1725-1739.
- Terrones, M., Martín, O., González, M., Pozuelo, J., Serrano, B., Cabanelas, J. C., ... & Baselga, J. (2011). Interphases in graphene polymer-based nanocomposites: Achievements and challenges. *Advanced Materials*, 23, (44), 5302-5310.
- Thess, A., Lee, R., Nikolaev, P., Dai, H., Petit, P., Robert, J., & Smalley, R. E. (1996). Crystalline ropes of metallic carbon nanotubes. *Science*, 273, (5274), 483-487.
- Van Bommel, A. J., Crombeen, J. E., & Van Tooren, A. (1975). Leed and Auger-Electron Observations of Sic (0001) Surface. *Surface Science*, 48, (2), 463-472.
- Wang, X., Yang, H., Song, L., Hu, Y., Xing, W., & Lu, H. (2011). Morphology, mechanical and thermal properties of graphene-reinforced poly(butylene succinate) nanocomposites. *Composites Science and Technology*, 72, (1), 1-6.
- Wang, Y., Li, Z., Wang, J., Li, J., & Lin, Y. (2011). Graphene and graphene oxide: Biofunctionalization and applications in biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 29, (5), 205-212

Wang, K., Ruan, J., Song, H. et al., (2011). Biocompatibility of Graphene Oxide. *Nanoscale Research Letters*, 6

Winterlin, J. & Bocquet, M. L. (2009). Graphene on metal surfaces. *Surface Science*, 603, (10-12), 1841-1852.

Yamamoto, G., Yokomizo, K., Omori, M., Sato, Y., Jeyadevan, B., Motomiya, K., ... & Tohji, K. (2007). Polycarbosilane-derived SiC/single-walled carbon nanotube nanocomposites. *Nanotechnology*, 18, (14).

Yang, K., Liang, S., Zou, L., Huang, L., Park, C., Zhu, L., ... & Wang, H. (2012). Intercalating oleylamines in graphite oxide. *Langmuir*, 28, (5), 2904-2908.

Yang, X., Dou, X., Rouhanipour, A., Zhi, L., Räder, H. J., & Müllen, K., (2008). Two-dimensional graphene nanoribbons. *Journal of the American Chemical Society*, 130, (13), 4216- 4217

Zhao, N., He, C., Jiang, Z., Li, J., & Li, Y. (2006). Fabrication and growth mechanism of carbon nanotubes by catalytic chemical vapor deposition. *Materials Letters*, 60, (2), 159-163.

Zhou, L., Jiang, Y., Gao, J., Zhao, X., Ma, L., & Zhou, Q. (2012). Oriented immobilization of glucose oxidase on graphene oxide. *Biochemical engineering journal*, 69, 28-31.

Z. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία έγινε μελέτη της ακινητοποίησης της οξειδάσης της γλυκόζης σε οργανόφιλα και υδρόφιλα παράγωγα του οξειδίου του γραφενίου. Πιο συγκεκριμένα, αρχικά παρασκευάστηκε οργανόφιλο οξείδιο του γραφενίου με ολεϋλαμίνη, και στη συνέχεια έγινε ανάπτυξη ενός υδρόφιλου παραγώγου το οποίο προέκυψε από την οξείδωση/διάσπαση οξειδίου γραφενίου-ολεϋλαμίνης με KMnO_4 . Τα δύο αυτά νανοδομικά συστήματα χρησιμοποιήθηκαν ως φορείς για την ακινητοποίηση της οξειδάσης της γλυκόζης. Ακολούθησε μελέτη της ενζυμικής δραστηριότητας του ακινητοποιημένου ενζύμου η οποία περιλάμβανε προσδιορισμό του ενζυμικού φορτίου, υπολογισμό των κινητικών σταθερών καθώς και μελέτη της θερμοσταθερότητας του ενζύμου. Τα αρχικά υλικά χαρακτηρίστηκαν με ένα συνδυασμό πειραματικών τεχνικών συμπεριλαμβανομένων της περίθλασης ακτίνων-X (XRD), της φασματοσκοπίας μέσου υπέρυθρου (FTIR) και μετρήσεων θερμικής ανάλυσης (DTA/TGA).

H. ABSTRACT

In this work, the immobilization of glucose oxidase in organophilic and hydrophilic derivatives of graphene oxide was studied. More specifically, organophilic graphene oxide with oleylamine was first prepared, and then a hydrophilic derivative was developed which resulted from the oxidation/decomposition of graphene oxide-oleylamine with KMnO_4 . These two nanostructured systems were used as carriers/supports to immobilize glucose oxidase. This was followed by a study of the enzyme activity of the immobilized enzyme which included determination of the enzyme load, calculation of the kinetic constants as well as a study of the thermostability of the enzyme. The starting materials were characterized by a combination of experimental techniques including X-ray diffraction (XRD), mid-infrared spectroscopy (FTIR) and thermal analysis (DTA/TGA) measurements.

Θ. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Παρακάτω παρατίθενται τα γραφήματα Michaelis-Menten για τις κινητικές μελέτες της ελεύθερης και ακινητοποιημένης GOx σε GO, o-GO-OA και h-GO-OA/KMnO₄.

