



**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.)

**ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΚΑΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΝΑΝΟΒΙΟΚΑΤΑΛΥΤΙΚΩΝ
ΣΥΣΤΗΜΑΤΩΝ ΜΕ ΒΑΣΗ ΙΕΡΑΡΧΗΜΕΝΟΥΣ ΠΟΡΩΔΕΙΣ
ΑΝΘΡΑΚΕΣ**

Βασιλική-Μιχαέλα Πατήλα

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 στην «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 την **10/11/22** από την εξεταστική επιτροπή:

- 1. Δημήτριος Γουρνής**, Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Πολυτεχνικής Σχολής του Παν/μίου Ιωαννίνων, **Επιβλέπων**
- 2. Μιχαήλ Καρακασίδης**, Καθηγητής του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών της Πολυτεχνικής Σχολής του Παν/μίου Ιωαννίνων
- 3. Χαράλαμπος Σταμάτης**, Καθηγητής του Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών της Σχολής Επιστημών Υγείας 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."

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα μεταπτυχιακή εργασία εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Κεραμικών και Σύνθετων Υλικών του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, σε συνεργασία με το Εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τμήματος Βιολογικών Εφαρμογών και Τεχνολογιών, στα πλαίσια του Διατμηματικού Προγράμματος Μεταπτυχιακών Σπουδών «Χημεία και Τεχνολογία Υλικών».

Την επίβλεψη και καθοδήγηση της ερευνητικής μου εργασίας είχε ο Καθηγητής κ. Δημήτριος. Γουρνής, τον οποίο θα ήθελα να ευχαριστήσω από τα βάθη της καρδιάς μου για την ανάθεση της εργασίας, για την όλη εμπιστοσύνη που έχει δείξει στο πρόσωπό μου όλα αυτά τα χρόνια που συνεργαζόμαστε, για την πολύτιμη βοήθεια, συμβουλές αλλά και την ηθική συμπαράσταση που μου προσέφερε καθ' όλη τη διάρκεια της έως τώρα πορείας μου.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Μιχαήλ Καρακασίδη, μέλος της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής, για την επιστημονική συνδρομή που προσέφερε όποτε του ζητήθηκε, καθώς και τον Καθηγητή Χαράλαμπο Σταμάτη, για την αμέριστη εμπιστοσύνη που μου έχει δείξει στα τόσα χρόνια συνεργασίας μας και για την στήριξή του στην επιλογή μου για το συγκεκριμένο μεταπτυχιακό πρόγραμμα.

Εκφράζω ακόμη τις θερμές μου ευχαριστίες σε όλους όσους βοήθησαν με οποιοδήποτε τρόπο στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Ευχαριστώ πολύ την κα. Χ. Παπαχριστοδούλου, από το Τμήμα Φυσικής, για της μετρήσεις XRD.

Ιδιαίτερα ευχαριστώ τον μεταδιδάκτορα ερευνητή Δρ. Κωνσταντίνο Σπύρου, τόσο για την πολύτιμη πειραματική συνεισφορά του, ο οποίος έκανε τις μετρήσεις XPS και SEM και με βοήθησε σε όλες τις αναλύσεις των αποτελεσμάτων, όσο και για τη φιλία του, την καθοδήγηση και συμπαράστασή του καθ' όλη τη διάρκεια του μεταπτυχιακού (και όχι μόνο), καθώς και για την υπομονή του και όρεξή του να με βοηθήσει σε ό,τι τον χρειάστηκα. Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω επίσης και στη μεταδιδακτορική ερευνήτρια Δρ. Γιούλη Ζυγούρη, η οποία ήταν δίπλα μου τόσο πειραματικά όσο και φιλικά όποτε τη χρειάστηκα.

Δε θα μπορούσα να μην αναγνωρίσω τη μέγιστη συμβολή που είχε η Δρ. Ελένη Θώμου, η οποία, ούσα ταυτόχρονα φίλη μου και συνεργάτης μου, ήταν δίπλα μου από τα πρώτα βήματα της πειραματικής μου πορείας στο εργαστήριο και με βοήθησε αμέριστα σε ό,τι χρειάστηκα, και φυσικά με στήριζε με τη φιλία της σε όλους τους τομείς.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ στον Δρ. Νίκο Χαλμπέ, τόσο για τη βοήθεια του στα πειράματα και τις μετρήσεις AFM, όσο και για τη φιλική σχέση που αναπτύξαμε όλα αυτά τα χρόνια. Δε θα μπορούσα να παραλείψω σε καμία περίπτωση και τον αγαπημένο μου φίλο και υποψήφιο διδάκτορα Γιώργο Ασημακόπουλο, ο οποίος έκανε τις επισκέψεις μου στο εργαστήριο πιο ευχάριστες και με εμπιστεύτηκε με τη φιλία

του, όπως και την υπέροχη Δρ. Χριστίνα Γιώτη για την όμορφη σχέση που έχουμε όλα αυτά τα χρόνια, καθώς και για την ικανότητά της να μεταδίδει χαρά και αισιοδοξία.

Επιπλέον, ευχαριστώ θερμά όλα τα μέλη του εργαστηρίου, προηγούμενα και νυν, Νίκη Καρούτα, Mohammed Subrati, Θεοδόση Γιούση, Βικτώρια Σακαβίτση, Αναστασία Σπύρου, Σέβη Γκιουζέλ, Μαρία Μπαϊκούση, Κώστα Βασιλόπουλο, και Σουζάνα Παππά, πρώτα από όλα για τη φιλία και την παρέα τους, καθώς και για τη βοήθεια τους κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω θερμά τη συμφοιτήτρια και συνοδοιπόρο μου στο μεταπτυχιακό Κατερίνα Φερεντίνου, η οποία εκτός από φίλη, με βοήθησε να κατανοήσω και πολλά από τα μαθήματα του μεταπτυχιακού προγράμματος, καθώς ήταν άγνωστα λιμάνια για μένα, και χωρίς αυτή δεν ξέρω αν θα τα είχα βγάλει εις πέρας. Επιπλέον, ένα μεγάλο ευχαριστώ στην επίσης συμφοιτήτριά μου Φωτεινή Ευαγγέλου, τόσο για την υπέροχη συνεργασία μας κατά τη διάρκεια του μεταπτυχιακού, όσο και για την αλληλοσυμπάρσταση που είχαμε η μία στην άλλη κατά τη διάρκεια της συγγραφής της μεταπτυχιακής εργασίας. Τέλος, ευχαριστώ όπως πάντα όλους τους φίλους και συναδέλφους από το εργαστήριο Βιοτεχνολογίας του Τμήματος ΒΕΤ (Αλεξάνδρα, Ρένια, Πάνο, Έλενα, Αρχοντούλα, Χριστίνα, Γιώργο, Μυρτώ, Ματίνα, και Άγγελο), η αγάπη μου για αυτούς είναι απεριόριστη.

Και φυσικά ένα μεγάλο ευχαριστώ στο σύντροφό μου και την οικογένεια μου για την αμέριστη εμπιστοσύνη και στήριξη που μου δίνουν όλα αυτά τα χρόνια.

Τέλος, αφιερώνω αυτή τη μεταπτυχιακή εργασία στην κόρη μου Ωριάνα, η οποία ήταν αρχικά ο λόγος που καθυστέρησα στην διεκπεραίωσή της, αλλά τελικά ήταν και ο λόγος που με ώθησε να φέρω εις πέρας αυτό το κομμάτι της εκπαιδευτικής μου εμπειρίας.

Ιωάννινα, 2022

Μιχαέλα Πατήλα

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΜΕΡΟΣ Α' - ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
ΜΕΡΟΣ Β' – ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΥΠΟΒΑΘΡΟ	
B1 ΥΛΙΚΑ ΣΤΗ ΝΑΝΟΚΛΙΜΑΚΑ	7
B1.1 Εισαγωγή	7
B1.2 Νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα	7
B1.3 Νανοπορώδη υλικά με βάση τον άνθρακα	8
B2 ΙΕΡΑΡΧΗΜΕΝΟΙ ΠΟΡΩΔΕΙΣ ΑΝΘΡΑΚΕΣ	11
B2.1 Εισαγωγή	11
B2.2 Ιδιότητες των HPC	12
B2.3 Σύνθεση των HPC	13
<i>B2.3.1 Σύνθεση HPC με τη χρήση εκμαγείου</i>	13
<i>B2.3.2 Σύνθεση HPC μέσω πυρόλυσης-ενεργοποίησης</i>	17
<i>B2.3.3 Ανερχόμενες μέθοδοι σύνθεσης HPC</i>	19
B2.4 Ντοπάρισμα HPC με ετερο-άτομα	21
B2.5 Εφαρμογές των HPC	21
<i>B2.5.1 Υπερ-πυκνωτές</i>	21
<i>B2.5.2 Χωρικός απιονισμός</i>	22
<i>B2.5.3 Μπαταρίες λιθίου-θείου</i>	23
<i>B2.5.4 Δέσμευση διοξειδίου του άνθρακα</i>	23
B3 ENZYMA	25
B3.1 Εισαγωγή στα ένζυμα	25
B3.2 Πλεονεκτήματα ενζύμων	26
B3.3 Το ένζυμο κυτταρινάση	27
B3.4 Ακινητοποίηση ενζύμων σε νανοϋλικά	29
<i>B3.4.1 Μη ομοιοπολική ακινητοποίηση</i>	30
<i>B3.4.2 Ομοιοπολική ακινητοποίηση</i>	30
B4 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ	33
B4.1 Περίθλαση ακτίνων X (XRD)	33
B4.2 Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS)	35
B4.3 Φασματοσκοπία μέσου υπερύθρου (IR)	36
B4.4 Μετρήσεις ειδικής επιφάνειας – Ποροσιμετρία N₂	37
<i>B4.4.1 Μέθοδος BET</i>	39
<i>B4.4.2 Μέθοδος BJH</i>	39
B4.5 Ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM)	40
B4.6 Μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM)	41
B4.7 Θερμική ανάλυση (DTA/TGA)	42
ΜΕΡΟΣ Γ' – ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	
Γ1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ	43
Γ2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	45
Γ2.1 Σύνθεση μαγνητικού ιεραρχημένου πορώδους άνθρακα (HPCFe)	45
Γ2.2 Ακινητοποίηση ενζύμων στο HPCFe	45
<i>Γ2.2.1 Ομοιοπολική ακινητοποίηση ενζύμων στο HPCFe</i>	45
<i>Γ2.2.2 Μη ομοιοπολική ακινητοποίηση ενζύμων στο HPCFe</i>	46
<i>Γ2.2.3 Συν-ακινητοποίηση ενζύμων στο HPCFe</i>	46
Γ2.3 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας ακινητοποιημένων ενζύμων στο HPCFe	47

<i>Γ2.3.1 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηρότητας κυτταρινάσης</i>	47
<i>Γ2.3.2 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηρότητας β-γλυκοσιδάσης</i>	47
<i>Γ2.3.3 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηρότητας του συν-ακινητοποιημένου δι-ενζυμικού συστήματος</i>	48
Γ2.4 Προσδιορισμός ενζυμικής σταθερότητας των ακινητοποιημένων ενζύμων στο HPCFe	48
<i>Γ2.4.2 Προσδιορισμός ενζυμικής σταθερότητας κυτταρινάσης</i>	48
Γ2.5 Προσδιορισμός επαναχρησιμοποίησης των ακινητοποιημένων ενζύμων στο HPCFe	48
<i>Γ2.5.1 Προσδιορισμός επαναχρησιμοποίησης της ακινητοποιημένης κυτταρινάσης</i>	48
<i>Γ2.5.2 Προσδιορισμός επαναχρησιμοποίησης του συν-ακινητοποιημένου δι-ενζυμικού συστήματος</i>	49
Γ5 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ	51
Γ5.1 Περίθλαση ακτίνων X (XRD)	51
Γ5.2 Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων-X (XPS)	51
Γ5.3 Φασματοσκοπία μέσου υπέρυθρου (IR)	51
Γ5.4 Ποροσιμετρία προσρόφησης-εκρόφησης αζώτου	52
Γ5.5 Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM)	52
Γ5.6 Μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM)	52
Γ5.7 Θερμικές μετρήσεις (DTA/TGA)	53
ΜΕΡΟΣ Δ' - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
Δ1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ HPCFe	55
Δ2 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ HPCFe ΩΣ ΦΟΡΕΑΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΗ	61
Δ3 ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ HPCFe ΩΣ ΦΟΡΕΑΣ ΣΥΝ-ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΗ ΚΑΙ Β-ΓΛΥΚΟΣΙΔΑΣΗ	67
ΜΕΡΟΣ Ε' – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	73
ΜΕΡΟΣ ΣΤ' - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	77
ΜΕΡΟΣ Ζ – ΠΕΡΙΛΗΨΗ	83
ΜΕΡΟΣ Η' - ABSTRACT	85

ΜΕΡΟΣ Α' – ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα τελευταία χρόνια, η ανάγκη για την ανάπτυξη νέας γενιάς συσκευών αποθήκευσης πράσινης ενέργειας όπως οι υπερπυκνωτές, οι μπαταρίες ιόντων λιθίου και οι κυψέλες βιοκαυσίμων, όπως επίσης και για την ανάπτυξη καταλυτών που να δεσμεύουν περιβαλλοντικούς ρύπους, κρίνεται μέγιστη, και για το λόγο αυτό, ερευνητές από όλο τον κόσμο ψάχνουν υλικά που να μπορούν να αξιοποιηθούν προς αυτή την κατεύθυνση. Οι ιεραρχημένοι πορώδεις άνθρακες είναι ιδανικά υποψήφια υλικά για την κατασκευή αυτών των συσκευών και διατάξεων. Επιπλέον, η νανοβιοτεχνολογία, η επιστήμη η οποία συνδυάζει τη βιολογία με τη νανοτεχνολογία, έχει προσελκύσει το επιστημονικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια λόγω των σημαντικών εφαρμογών της σε διάφορους τομείς όπως στη δημιουργία βιοαισθητήρων και κυψελών βιοκαυσίμων, στη μεταφορά φαρμάκων και γονιδίων, στη μοριακή απεικόνιση, στη βιοαποκατάσταση και στη νανοβιοκατάλυση. Οι αλληλεπιδράσεις των βιομορίων με οργανωμένες νανοδομές όπως είναι τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα, διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη των παραπάνω εφαρμογών.

Σκοπός της παρούσας διπλωματικής ήταν η σύνθεση ενός νανοσύνθετου υλικού που θα συνδυάζει τις ιδιότητες και των δύο συστατικών του. Πιο συγκεκριμένα, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση μαγνητικού ιεραρχημένου πορώδη άνθρακα (HPCFe) μέσω πυρόλυσης και ενεργοποίησης με τη χρήση της τεχνικής εναπόθεσης χημικών ατμών (CVD). Το παραγόμενο νανοσύνθετο υλικό χαρακτηρίστηκε πλήρως με έναν συνδυασμό τεχνικών χαρακτηρισμού (XRD, FTIR, XPS, DTA/TG κ.α.) ενώ μελετήθηκε ως φορέας για την ακινητοποίηση ενζύμων και την εφαρμογή τους σε βιοτεχνολογικές διαδικασίες. Αναλυτικότερα, η διπλωματική αποτελείται από τρεις κύριες ενότητες.

Η πρώτη ενότητα αποτελεί το θεωρητικό μέρος στο οποίο επιχειρείται η ανάπτυξη και η ανάλυση, μέσα από την βιβλιογραφία, του ιεραρχημένου πορώδη άνθρακα, με έμφαση στις τεχνικές σύνθεσης αυτού του υλικού και τις εφαρμογές του. Επιπλέον, παρουσιάζεται μια συνοπτική ανάλυση της χρήσης των ενζύμων και των πλεονεκτημάτων ακινητοποίησης τους σε νανοϋλικά, με έμφαση στα ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα εργασία. Τέλος, αναφέρονται οι βασικές έννοιες των τεχνικών χαρακτηρισμού που χρησιμοποιήθηκαν για την μελέτη του νανοϋλικού και του νανοβιοκαταλύτη που συντέθηκαν.

Η επόμενη ενότητα αποτελεί το πειραματικό μέρος στο οποίο αναφέρονται αναλυτικά τα χημικά αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν και οι πειραματικές πορείες που ακολουθήθηκαν για την σύνθεση του νανοσύνθετου υλικού που προέκυψε από την παρούσα διπλωματική, καθώς και οι πειραματικές πορείες που ακολουθήθηκαν για τον προσδιορισμό των βιοκαταλυτικών χαρακτηριστικών των ακινητοποιημένων ενζύμων στο υλικό που συντέθηκε. Τέλος, παρατίθενται οι πειραματικές διατάξεις των οργάνων που χρησιμοποιήθηκαν για τον χαρακτηρισμό του υλικού και των νανοβιοκαταλυτών.

Η τελευταία κύρια ενότητα είναι η ανάλυση των αποτελεσμάτων που ξεκινά με τον αναλυτικό και πλήρη χαρακτηρισμό του μαγνητικού ιεραρχημένου πορώδη άνθρακα. Πιο συγκεκριμένα, παρουσιάζεται ο δομικός και μορφολογικός χαρακτηρισμός του νανοσύνθετου υλικού που προέρχεται από την τροποποίηση του ιεραρχημένου πορώδη άνθρακα με νανοσωματίδια σιδήρου. Το τελικό νανοσύνθετο (HPCFe) σχηματίστηκε μέσω της τεχνικής CVD.

Στη συνέχεια, περιγράφεται η χρήση του μαγνητικού ιεραρχημένου πορώδη άνθρακα ως φορέας για την ακινητοποίηση ενός ενζύμου, της κυτταρινάσης. Πιο συγκεκριμένα, προσδιορίστηκαν τα βιοκαταλυτικά χαρακτηριστικά του ακινητοποιημένου ενζύμου στο νανούλικό, ως προς τη σταθερότητά του σε ακραίες συνθήκες, καθώς και στη δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του σε διαδοχικούς καταλυτικούς κύκλους.

Τέλος, το νανοσύνθετο υλικό χρησιμοποιήθηκε για τη συν-ακινητοποίηση δύο ενζύμων. Και σε αυτή την περίπτωση μελετήθηκαν τα βιοκαταλυτικά χαρακτηριστικά του δι-ενζυμικού συστήματος.

Η διπλωματική ολοκληρώνεται με τα βασικά συμπεράσματα που προέκυψαν από την συγκεκριμένη μελέτη ενώ αναφέρονται οι προοπτικές καθώς και κάποιες νέες ιδέες για μελλοντική εργασία.

ΜΕΡΟΣ Β' – ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ
ΥΠΟΒΑΘΡΟ

B1 ΥΛΙΚΑ ΣΤΗ ΝΑΝΟΚΛΙΜΑΚΑ

B1.1 Εισαγωγή

Η νανοτεχνολογία είναι ένας επιστημονικός όρος που χρησιμοποιείται ευρύτατα τα τελευταία χρόνια και ορίζεται ως η επιστήμη, η μηχανική και τεχνολογία στη νανοκλίμακα, δηλαδή στην κλίμακα των διαστάσεων από 1-100 nm (10^{-9} m)¹. Με άλλα λόγια, οι λεγόμενες νανοεπιστήμες και η νανοτεχνολογία είναι η μελέτη και η χρήση εφαρμογών εξαιρετικά μικρών διαστάσεων σε πολλά επιστημονικά πεδία όπως η βιολογία, η φυσική, η χημεία, η επιστήμη των υλικών και οι μηχανικές επιστήμες. Ένα πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό της νανοτεχνολογίας είναι ότι η ύλη σε αυτή την κλίμακα διαστάσεων παρουσιάζει διαφορετική συμπεριφορά, λόγω της ενεργοποίησης διαφορετικών ιδιοτήτων, από ότι στη μακροκλίμακα. Η νανοβιοτεχνολογία είναι ένας αναδυόμενος τομέας που αποτελεί το συνδυασμό της βιοτεχνολογίας και της νανοτεχνολογίας, δηλαδή είναι ο τομέας που εφαρμόζει την νανοτεχνολογία στη μελέτη των βιολογικών συστημάτων και την ανάπτυξη καινοτόμων διεργασιών στον τομέα της βιοτεχνολογίας, είναι δηλαδή ένας κλάδος με πολλές πρακτικές εφαρμογές.

Τα νανοϋλικά είναι υλικά τα οποία έχουν μέγεθος 1-1000 nm και ταξινομούνται στις εξής ευρύτερες κατηγορίες:

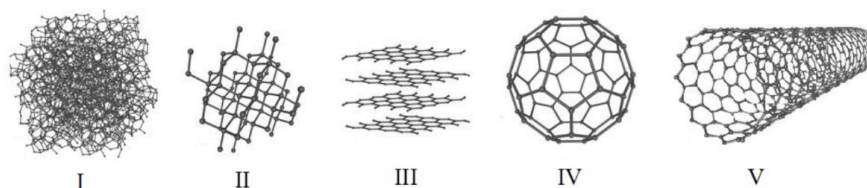
- νανοσωματίδια (nanoparticles)
- νανοπορώδη (nanoporous)
- νανοσωλήνες (nanotubes)
- νανοϊνες (nanofibres)
- νανοφιλμς (nanofilms)
- κράματα και διαλύματα νανοκρυστάλλων (nanocrystalline alloys and solids)
- νανοςύνθετα (nanocomposites)

Τα νανοϋλικά εμφανίζουν μοναδικές οπτικές, ηλεκτρονικές, μηχανικές ή/και μαγνητικές ιδιότητες και το κύριο τους πλεονέκτημα είναι η μεγάλη ειδική επιφάνειά τους, κάτι το οποίο σημαίνει πολύ υψηλή ενεργή επιφάνεια για κάθε είδους αλληλεπίδραση (φυσική, χημική ή βιολογική). Ένα ακόμα πλεονέκτημα τους είναι ότι έχουν την ικανότητα να μεταβάλλουν τις ιδιότητες τους σε σχέση με την μακροσκοπική τους μορφή (bulk), χωρίς να αλλάζει η χημική τους σύσταση. Για όλους τους παραπάνω λόγους χρησιμοποιούνται σε διάφορες εφαρμογές τη σημερινή εποχή. Μπορεί να είναι κοίλα ή/και συμπαγή και παρασκευάζονται από ένα πλήθος διαφορετικών υλικών.

B1.2 Νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα

Μία από τις ιδιαίτερες κατηγορίες νανοϋλικών που προσελκύουν σημαντικό ενδιαφέρον για επιστημονικές μελέτες είναι τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα. Ο άνθρακας είναι από τα πιο μεταβλητά στοιχεία του περιοδικού πίνακα όσον αφορά στον αριθμό, τον τύπο και την ισχύ των δεσμών που μπορεί να συνάψει. Ο άνθρακας μπορεί να υπάρξει σε διάφορες αλλότροπες μορφές: άμορφος άνθρακας, διαμάντι, γραφίτης και φουλερένια². Η γεωμετρία των συγκεκριμένων υλικών είναι

εντυπωσιακή, καθώς το ίδιο το άτομο μπορεί να δημιουργήσει υλικά που έχουν από 0 έως 3 διαστάσεις. Οι τυπικές δομές των υλικών αυτών παρουσιάζονται στο **Σχήμα B1.1**.



Σχήμα B1.1. Αλλότροπες μορφές του άνθρακα (I) άμορφος άνθρακας, (II) διαμάντι, (III) γραφίτης, (IV) φουλερένιο (C60) και (V) νανοσωλήνας άνθρακα (ανήκει στα φουλερένια).

Το ενδιαφέρον προς τα νανοϋλικά με βάση τον άνθρακα πηγάζει από τις μοναδικές ιδιότητες των συγκεκριμένων νανοϋλικών, καθώς και από το πλήθος εφαρμογών τους. Τα νανοϋλικά αυτά κατέχουν αυξημένη επιφάνεια ανά μονάδα όγκου που αξιοποιείται κατά την ακινητοποίηση βιομορίων στην επιφάνειά τους, εξαιρετική μηχανική σταθερότητα, λόγω των πολύ ισχυρών δεσμών άνθρακα-άνθρακα που σχηματίζουν, ηλεκτρική και θερμική αγωγιμότητα, η οποία εξαρτάται από τον υβριδισμό των ατόμων άνθρακα του νανοϋλικού και από τη δομή του, και ιδιαίτερες οπτικές ιδιότητες, αναλόγως του είδους του νανοϋλικού³.

B1.3 Νανοπορώδη υλικά με βάση τον άνθρακα

Τα νανοπορώδη υλικά με βάση τον άνθρακα (nanoporous carbon materials, NCM) αποτελούν εξέχουσες επιλογές σε τομείς όπως προσρόφηση και διαχωρισμός, αποθήκευση ενέργειας, και μετατροπή, λόγω των ιδιαίτερων φυσικοχημικών χαρακτηριστικών που παρουσιάζουν, όπως ρυθμιζόμενες παραμέτρους υφής (εμβαδόν επιφάνειας και πορώδες), και υψηλή θερμική και χημική σταθερότητα⁴. Από αυτή την άποψη, η ανάπτυξη των NCM που προέρχονται από βιομάζα/μη βιομάζα ή/και άλλα απόβλητα έχει λάβει ύψιστη προσοχή για την ενέργεια και για περιβαλλοντικές εφαρμογές. Ωστόσο, οι εγγενείς ιδιότητές τους όπως π.χ. η υδρόφοβη φύση τους και η χημική αδράνεια της επιφάνειας τους, αποτελούν εμπόδιο στην επέκταση των εφαρμογών τους σε περιοχές όπου η διαβροχή και οι λειτουργικές ομάδες στην επιφάνεια είναι οι απαραίτητες απαιτήσεις. Αυτό οδήγησε την έρευνα να εστιάσει στη λειτουργικότητα των NCM για τη βελτίωση της υδροφιλικότητας, της χημείας της επιφάνειας και των ηλεκτρονικών ιδιοτήτων τους. Η τροποποίηση των NCM δεν συνεπάγεται μόνο την τροποποίηση της επιφάνειας με διαφορετικές λειτουργικές ομάδες, αλλά και την ανάπτυξη διαφόρων ειδών σύνθετων δομών, όπως νανοσωματίδια ή βιολογικά μόρια που χρησιμοποιούνται για τον χειρισμό των ιδιοτήτων τους⁵. Η μετα-τροποποίηση των NCM με οργανικές λειτουργικές ομάδες ή ανόργανα νανοσωματίδια ή νανοφύλλα εντός της επιφάνειάς τους ή στα πορώδη κανάλια του, μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας κατάλληλες διαδρομές. Αυτές οι πρόσθετες ιδιότητες επεκτείνουν τις δυνατότητες εφαρμογής τους στους τομείς που καλύπτουν την ενέργεια, το περιβάλλον και την υγεία. Ως εκ τούτου, έχει διεξαχθεί εκτεταμένη έρευνα για την ανάπτυξη καινοτόμων προσεγγίσεων για το σχεδιασμό και

την κατασκευή αυτών των λειτουργικών νανοπορωδών υλικών άνθρακα (F-NCM) με προσαρμοσμένες ιδιότητες, τα οποία έχουν δείξει τεράστια επιτυχία σε μια ποικιλία εφαρμογών^{6,7}.

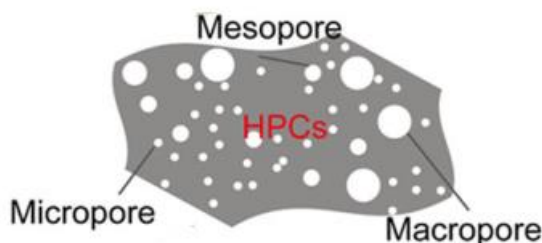
Τα νανοπορώδη υλικά άνθρακα έχουν αναπτυχθεί γρήγορα ως αποτελεσματικοί προσροφητές για διάφορες εφαρμογές περιβαλλοντικού ενδιαφέροντος, και η επιτυχία τους βασίζεται κυρίως στο χαμηλό κόστος, την υψηλή αποδοτικότητα, την υψηλή επιλεκτικότητα, την ευκολία τροποποίησης της επιφάνειας, την υψηλή επαναχρησιμοποίηση και τις χαμηλές ενεργειακές απαιτήσεις⁸. Αυτές οι ιδιότητες ευθύνονται για την υπεροχή των NCM στην απομάκρυνση ρύπων από υδατικό διάλυμα, σε σύγκριση με άλλες τεχνικές όπως η χημική καθίζηση, ιονανταλλαγή, ηλεκτροχημική εναπόθεση, αντίστροφη όσμωση, μικρο/νανοδιήθηση, κ.α. Τα υλικά αυτά διαθέτουν πόρους στο μέγεθος της νανοκλίμακας, οι οποίοι μπορούν εύκολα να μεταβληθούν μεταξύ μικρο- (0-2 nm) και μέσο (2-50 nm) τομέων, καθιστώντας τα ιδανικά υλικά για την επιλεκτική προσρόφηση του μεγαλύτερου μέρους των ανόργανων/οργανικών/ραδιενεργών ρύπων σε υδατικό διάλυμα ή για την επιλεκτική προσρόφηση ή/και μετατροπή οργανικών μορίων.

B2 ΙΕΡΑΡΧΗΜΕΝΟΙ ΠΟΡΩΔΕΙΣ ΑΝΘΡΑΚΕΣ

B2.1 Εισαγωγή

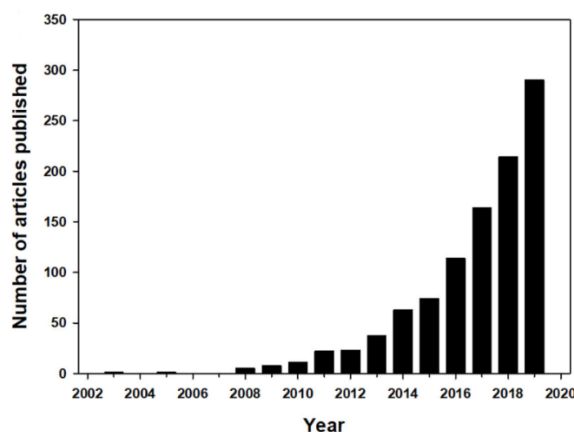
Η ανάπτυξη νέας γενιάς συσκευών αποθήκευσης πράσινης ενέργειας όπως οι υπερπυκνωτές, οι μπαταρίες ιόντων λιθίου και οι κυψέλες βιοκαυσίμων, έχει προσελκύσει έντονο ερευνητικό ενδιαφέρον τα τελευταία χρόνια⁹. Οι πορώδεις άνθρακες είναι ιδανικά υποψήφια υλικά για την κατασκευή αυτών των συσκευών.

Σύμφωνα με την IUPAC, οι πόροι μπορούν να διαιρεθούν σε τρεις κατηγορίες: μικροπόρους (διάμετρος πόρων < 2 nm), μεσοπόρους (2 nm ≤ διάμετρος πόρων ≤ 50 nm) και μακροπόρους (διάμετρος πόρων > 50 nm)^{10,11}. Οι μικροπόροι συμβάλλουν στην επίτευξη του μέγιστου χώρου για την αποθήκευση ιόντων και για αντιδράσεις μεταφοράς φορτίου κατά τη διάρκεια της διαδικασίας φόρτισης-εκφόρτισης, οι μεσοπόροι παρέχουν γρήγορες οδούς μεταφοράς μάζας προς την εσωτερική επιφάνεια, ενώ οι μακροπόροι μπορούν να λειτουργήσουν ως δεξαμενές ρυθμιστικού διαλύματος ιόντων για την ελαχιστοποίηση των αποστάσεων διάχυσης¹¹. Σε πολλές περιπτώσεις, μονοτροπικά μικρο-, μεσο- ή μακροπορώδη υλικά άνθρακα δεν μπορούν να ικανοποιήσουν τις ανάγκες τέτοιων εφαρμογών υψηλής απόδοσης. Έτσι, οι ιεραρχικοί πορώδεις άνθρακες (HPC) που διαθέτουν ταυτόχρονα ορθολογική πολυτροπική κατανομή μεγέθους πόρων, μικρο-, μεσο-, ή/και μακροπόρους (**Σχήμα B2.1**), έχουν προταθεί ως ιδανικά υλικά σε εφαρμογές αποθήκευσης ενέργειας¹².



Σχήμα B2.1. Αναπαράσταση της δομής των HPC.

Οι HPC μπορούν να συντεθούν από πρόδρομες ουσίες άνθρακα μέσω χημικής ενεργοποίησης και διαμόρφωσης με διαφορετικά υλικά, όπως λιγνίνη kraft¹³, πολυακρυλονιτρίλιο¹⁴, μίσχο βαμβακιού¹⁵, χιτοζάνη¹⁶, και πολυστυρένιο¹⁷. Τα δομικά χαρακτηριστικά των HPC, όπως υψηλό πορώδες, υψηλή επιφάνεια, μοναδική χημεία επιφάνειας πόρων και υψηλή ηλεκτρική αγωγιμότητα, μπορούν να αλλάξουν και να διαμορφωθούν αναλόγως με την εφαρμογή που καλούνται να εκτελέσουν. Λόγω όλων των παραπάνω ιδιαιτεροτήτων τους, οι δημοσιεύσεις που αφορούν στη σύνθεση και εφαρμογή των HPC αυξάνουν ανά τον χρόνο, όπως φαίνεται από το **Σχήμα B2.2**.



Γράφημα B2.2. Βιβλιομετρική ανάλυση δημοσιεύσεων από τη βάση δεδομένων SCOPUS σχετικά με τους HPC¹².

B2.2 Ιδιότητες των HPC

Οι μοναδικές ιδιότητες των HPC περιλαμβάνουν εξαιρετική ειδική επιφάνεια ($1354 \text{ m}^2 \text{ g}^{-1}$), αθροιστικό όγκο μεσοπορώδους ($48.6 \text{ cm}^3 \text{ g}^{-1}$), ομοιόμορφους μακροπόρους, 3D διασυνδεδεμένους μεσο- και/ή μικροπόρους, και ένα συνολικό καλά καθορισμένο σύστημα πόρων, το οποίο τους επιτρέπει να έχουν εξαιρετική απόδοση μεταφοράς μάζας, που σχετίζεται με τους μεγαλύτερους πόρους, και άφθονες θέσεις προσρόφησης, που σχετίζονται με τους μικρότερους πόρους. Επιπλέον, η υψηλή ειδική επιφάνεια και το όγκος των πόρων προωθούν τη μεταφορά μάζας και τις διαδικασίες προσρόφησης. Οι HPC λόγω του ότι περιέχουν πολλαπλά επίπεδα πόρων, παρουσιάζουν υψηλότερη ειδική επιφάνεια και όγκο πόρων από τα υλικά άνθρακα που περιλαμβάνουν μόνο ένα μέγεθος πόρων, καθώς όλοι οι χώροι των HPC μπορούν να αξιοποιηθούν πλήρως¹². Στον Πίνακα B2.1, συνοψίζονται οι ιδιότητες των HPC που στηρίζονται στην ύπαρξη του διαφορετικού πορώδους.

Πίνακας B2.1. Ιδιότητες των πόρων που απαρτίζουν τους HPC^{10,18,19}.

Μικροπορώδες	Μεσοπορώδες	Μακροπορώδες
Αυξημένη προσρόφηση οργανικών ρύπων	Μεγάλη ειδική επιφάνεια	Μεταφορά μάζας
Αυξημένη μεταφορά ιόντων	Ομοιόμορφο μέγεθος πόρων	Εύκολη και γρήγορη πρόσβαση ογκώδων αντιδραστηρίων/ενώσεων
Συμμετοχή στις αντιδράσεις μεταφοράς φορτίου	Μεγάλο όγκο πόρων	Υψηλή ικανότητα αποθήκευσης
Αυξάνουν την ειδική επιφάνεια	Διασυνδεδεμένα κανάλια πόρων για προσρόφηση	
	Καλή χημική αδράνεια και σταθερότητα	
	Παρέχουν τις θέσεις πρόσδεσης για τα φιλοξενούμενα μόρια	

B2.3 Σύνθεση των HPC

B2.3.1 Σύνθεση HPC με τη χρήση εκμαγείου

Η σύνθεση των HPC με τη χρήση εκμαγείων (templating methods) είναι μια από τις πιο συχνά και αποτελεσματικά χρησιμοποιούμενες μεθόδους σχεδιασμού, καθώς μπορεί να ελεγχθεί η κατανομή του μεγέθους πόρων του νανοϋλικού¹¹. Η μέθοδος αυτή αφορά στη διαδικασία όπου στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η εναπόθεση υλικών στις οπές ή στην επιφάνεια του εκμαγείου, τόσο με φυσικούς όσο και με χημικούς τρόπους, και σε δεύτερο στάδιο, πραγματοποιείται η αφαίρεση του εκμαγείου, ώστε να προκύψουν νανοϋλικά με συγκεκριμένη μορφολογία και μέγεθος. Οι αντιγραφόμενοι πόροι είναι τυπικά μακρο- και μεσοπόροι, καθώς περιορίζονται από τα μεγέθη των εκμαγείων. Μερικές φορές, μπορούν επίσης να ληφθούν μικροπόροι λόγω της απελευθέρωσης πτητικών ουσιών ή της συρρίκνωσης των πηγών άνθρακα. Μετα-ενεργοποίηση μπορεί επίσης να πραγματοποιηθεί ακολουθώντας μεθόδους εκμαγείων, για την ανάπτυξη μικροπόρων και την αύξηση της συνολικής ειδικής επιφάνειας.

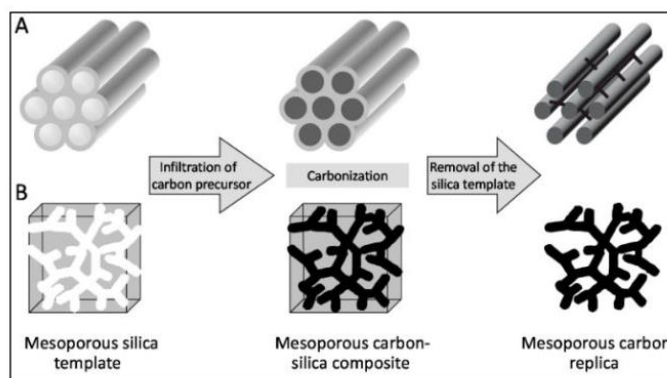
Μέσω αυτής της διαδικασίας μπορούν εύκολα να ελεγχθούν και να διαφοροποιηθούν τα δομικά χαρακτηριστικά των HPC. Η μέθοδος αυτή μπορεί να γίνει τόσο με τη χρήση «σκληρών» εκμαγείων (hard templates), τα οποία είναι γενικά άκαμπτα και συγκρατούνται μεταξύ τους από σταθερά ανόργανα στερεά, όπως για παράδειγμα μονόλιθοι πυριτίου, σφαιρίδια πυριτίου, CaCO_3 , Na_2CO_3 , $\text{nano-Fe}_2\text{O}_3$ κ.α., όσο και με τη χρήση «μαλακών» εκμαγείων (soft templates), που συνήθως είναι οργανικά πολυμερή όπως πολυστυρένιο, πολυουρεθάνιο, κ.α.. Σε αντίθεση με τα «σκληρά», τα «μαλακά» εκμαγεία μπορούν να αφαιρεθούν κατά τη διαδικασία της ανθρακοποίησης, και η χρήση επιβλαβών αντιδραστηρίων για τη χάραξη των εκμαγείων μπορεί να μειωθεί σε κάποιο βαθμό¹². Τέλος, ως εκμαγεία μπορούν να χρησιμοποιηθούν και τα λεγόμενα «βιο-εκμαγεία» (bio-templates), όπου η χρήση τους αποτελεί μια απλή, βιώσιμη, φιλική προς το περιβάλλον και κατάλληλη μέθοδο για μαζική παραγωγή HPC¹².

A. Σύνθεση HPC με τη χρήση σκληρού εκμαγείου

Η μέθοδος σκληρού εκμαγείου (Hard Templating) περιλαμβάνει τη χρήση ενός στερεού εκμαγείου. Συγκεκριμένα, το πιο σύνηθες είναι μια μεσοπορώδης σίλικα, η οποία θα λειτουργήσει έτσι ώστε να μπορέσει να αναπτυχθεί στο εσωτερικό του ένα άλλο στερεό, με στόχο την επίτευξη διατεταγμένης δομής, τόσο των πόρων, όσο και των κρυσταλλικών τοιχωμάτων (**Σχήμα B2.3**). Κατά τη διαδικασία αυτή ο βασικός στόχος είναι να πραγματοποιηθεί, επιτυχώς, η πλήρωση των πόρων του σκληρού εκμαγείου από το διάλυμα της προδρόμου ενώσεως²⁰. Η συγκεκριμένη μέθοδος είναι γνωστή για τη χρήση της στη δημιουργία πορωδών ανθράκων οι οποίοι εμφανίζουν οργανωμένη δομή¹¹. Για την παρασκευή τους, χρησιμοποιούνται διάφορες πηγές άνθρακα, με πιο συνηθισμένη εκείνη της ζάχαρης. Η πορεία του σκληρού εκμαγείου έχει να κάνει, αρχικά με την πηγή άνθρακα, η οποία εισχωρεί στο εσωτερικών πόρων

του εκμαγείου, ενώ στη συνέχεια για την απομάκρυνση του εκμαγείου ακολουθεί θερμική κατεργασία. Στο δεύτερο στάδιο, αυτό της θερμικής κατεργασίας οι θερμοκρασίες που μπορούν να αναπτυχθούν ενδέχεται να είναι υψηλές, χωρίς να επηρεαστεί η δομή (κατάρρευση), και ταυτόχρονα τα συντιθέμενα υλικά θα μπορούν να εμφανίσουν υψηλή κρυσταλλικότητα.

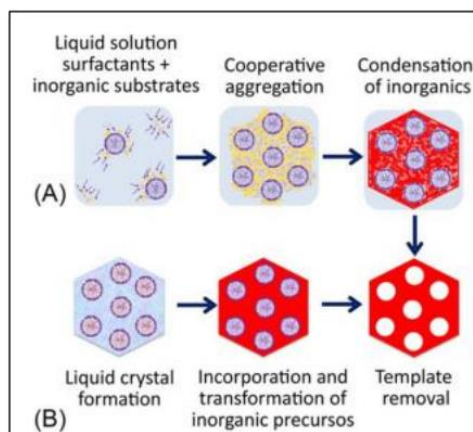
Η μέθοδος σκληρού εκμαγείου παρέχει ένα σημαντικό πλεονέκτημα σε σχέση με τις υπόλοιπες μεθόδους εκμαγείου στο ότι επικρατεί υψηλή πιστότητα, η οποία αφορά την ποιότητα και το μέγεθος των μικρο-, μέσο- και μακρο- πόρων. Παρόλα αυτά, ένα από τα κυριότερα μειονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι η χρήση σταθερών ανόργανων στερεών, τα οποία απαιτούν αυστηρή χρήση οξέων ή βάσεων για την απομάκρυνση του εκμαγείου, γεγονός το οποίο είναι χρονοβόρο και κατά συνέπεια η μέθοδος αυτή καθίσταται μη κατάλληλη για τη χρήση της σε παραγωγή μεγάλης κλίμακας. Επιπρόσθετα, κατά το «άδειασμα» των εκμαγείων μπορεί να προκύψει κατάρρευση μέρους της δομής των πόρων, γεγονός το οποίο επηρεάζει την απόδοση του προϊόντος. Αν σε κάποιο από τα εκμαγεία δεν πραγματοποιηθεί σωστό «γέμισμα», αυτό θα έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ασυνεχειών και ελαττωμάτων στη δομή των πόρων²¹. Τέλος, μεγάλος περιορισμός της συγκεκριμένης τεχνικής αποτελεί η έλλειψη πηγών πρότυπου υλικού, γεγονός που δρα ανασταλτικά στην ευρεία χρήση της.



Σχήμα B2.3. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου σκληρού εκμαγείου.

B. Σύνθεση HPC με τη χρήση μαλακού εκμαγείου

Η μέθοδος μαλακού εκμαγείου είναι η κύρια μέθοδος σύνθεσης μεσοπορωδών υλικών οργανωμένης δομής και έχει βελτιωθεί και τελειοποιηθεί μέσω δύο διαφορετικών συνθετικών στρατηγικών, τη συνεργατική αυτοσυναρμολόγηση και τη διαδικασία διαμόρφωσης υγρών κρυστάλλων (**Σχήμα B2.4**).



Σχήμα Β2.4. Σχηματική απεικόνιση της μεθόδου μαλακού εκμαγείου (Α: συνεργατική αυτοσυναρμολόγηση, Β) διαδικασία διαμόρφωσης υγρών κρυστάλλων).

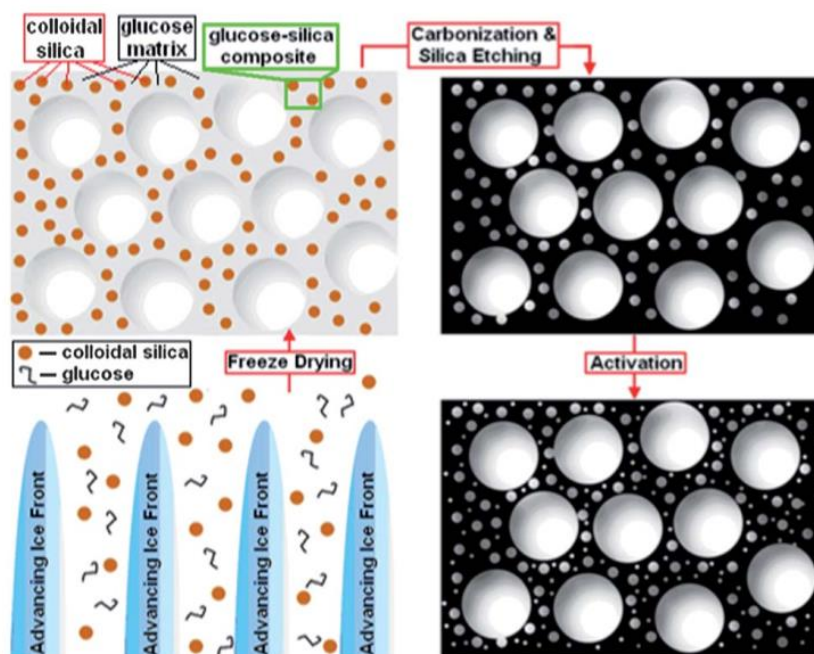
Η μέθοδος μαλακού εκμαγείου, σε σύγκριση με τη μέθοδο του σκληρού εκμαγείου, αποτελεί μια πιο εύκολη τεχνική. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας της χρήσης οργανικών τασιενεργών ενώσεων, ως εκμαγεία, τα οποία παρέχουν τη δυνατότητα σύνθεσης οργανωμένων εξαγωνικών ή κυβικών οργανοανθράκων πρόδρομων υλικών. Μετά την απομάκρυνση των εκμαγείων παρέχεται η δυνατότητα σύνθεσης οργανωμένης διάταξης πόρων του μεσοπορώδους υλικού. Κατά τη συγκεκριμένη διαδικασία, ως πηγή άνθρακα μπορεί να χρησιμοποιηθεί ζάχαρη, και συγκεκριμένα η σουκρόζη, και σαν εκμαγείο δύναται να χρησιμοποιηθεί κάποια πολυμερική ένωση²².

Υπάρχουν τέσσερα διαφορετικά στάδια σύνθεσης:

1. Ενσωμάτωση και αντίδραση του υλικού μέσω μιας επιφανειοδραστικής ουσίας, η οποία χρησιμοποιείται ως εκμαγείο.
2. Συσσωμάτωση των ουσιών σε περιορισμένο χώρο
3. Απομάκρυνση του εκμαγείου
4. Δημιουργία του μεσοπορώδους υλικού

Γ. Σύνθεση HPC με τη χρήση εκμαγείου πάγου

Η μέθοδος δημιουργίας εκμαγείου πάγου (Ice Template Method) συνιστά μία νέα συνθετική πορεία για την κατασκευή ιεραρχημένων πορωδών ανθράκων (HPC), η οποία ουσιαστικά αποτελεί μία τροποποιημένη προσέγγιση της τεχνικής του σκληρού εκμαγείου. Οι ιεραρχημένοι πορώδεις άνθρακες που συντίθενται μέσω αυτής της μεθόδου, διαθέτουν μεγάλες επιφάνειες, μεγάλους όγκους (ενδεικτικά 2096 m²/g και 11,4 cm³/g, αντίστοιχα) και το πιο σημαντικό κομμάτι αποτελεί η δημιουργία και ο συντονισμός των μακρο/μέσο/μικροπορωδών²³. Στο **Σχήμα Β2.5** παρουσιάζεται σχηματικά η μέθοδος της διαμόρφωσης του εκμαγείου πάγου.



Σχήμα B2.5. Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης HPC από πλαστικά απόβλητα, μέσω της τεχνικής διπλού προτύπου πάγου-πυριτίου²³.

Όπως φαίνεται στο παραπάνω Σχήμα, τα κολλοειδή νανοσωματίδια πυριτίου και τα μόρια γλυκόζης αποβάλλονται από τους αναπτυσσόμενους κρυστάλλους πάγου κατά τη στερεοποίηση του νερού, ως αποτέλεσμα της βύθισης του μείγματος στο υγρό άζωτο. Οι κρύσταλλοι πάγου απομακρύνονται κατά την εξάχνωση σε λυοφιλοποιητή, δημιουργώντας μακροπόρους μέσα στο σύνθετο ικρίωμα γλυκόζης-πυριτίου. Το ικρίωμα, στη συνέχεια, ακολουθεί την τεχνική της ανθρακοποίησης, με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός σύνθετου μακροπορώδους υλικού άνθρακα-πυριτίου. Οι μακροπόροι αποδεικνύεται ότι παραμένουν άθικτοι κατά τη διάρκεια της πυρόλυσης. Το επόμενο στάδιο περιλαμβάνει ένα διάλυμα υδροξειδίου του νατρίου (NaOH), το οποίο χρησιμοποιείται για τη «χάραξη» (etching), με στόχο την απομάκρυνση των νανοσωματιδίων πυριτίου από το σύνθετο υλικό και τη δημιουργία μεσοπόρων μέσα στο ικρίωμα (scaffold). Στη συνέχεια, η εισαγωγή των μικροπόρων πραγματοποιείται μέσω της διαδικασίας ενεργοποίησης με CO₂, η οποία ενισχύει περαιτέρω την επιφάνεια, το πορώδες και τον όγκο πόρων του υλικού, καθώς και το μέγεθος των κολλοειδών σωματιδίων^{24,25}. Η κατανομή των μεσοπόρων, όπως και η έκταση του μεσοπορώδους, θα μπορούσαν απλά να καθοριστούν με την επιλογή διαφορετικού μεγέθους νανοσωματιδίων πυριτίου ή διαφοροποιώντας την αναλογία της προδρόμου ενώσεως πυριτίου προς άνθρακα. Όσον αφορά το μικροπορώδες, θα μπορούσε να ελεγχθεί, αλλάζοντας τη διάρκεια της διαδικασίας ενεργοποίησης με CO₂, καθώς και το ρυθμό ροής του αερίου.

Η συνθετική προσέγγιση που ακολουθείται στη συγκεκριμένη μέθοδο ουσιαστικά συνδυάζει τη μέθοδο εκμαγείου πάγου, τη μέθοδο του σκληρού εκμαγείου, καθώς και τη φυσική ενεργοποίηση, με στόχο τη δημιουργία HPC, οι οποίοι αποτελούνται από ένα συνδυασμό μικρο-, μέσο- και μακρο- πόρων σε ένα μόνο υλικό.

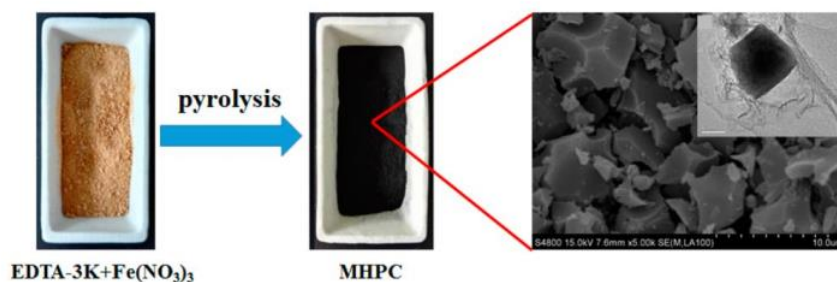
Επιπλέον, η τεχνική αυτή παρέχει ακριβή έλεγχο και δυνατότητα αλληλεπίδρασης όσον αφορά το μέγεθος και τον όγκο των πόρων και ειδικά για τους μεσοπόρους. Οι ιδιότητες των υλικών HPC που συντίθενται μέσω αυτής της οικονομικής μεθόδου του εκμαγείου πάγου και αναφέρθηκαν παραπάνω, έχουν σαν αποτέλεσμα την εξαιρετική απόδοση τους ως υλικά ηλεκτροδίων για υπερπυκνωτές και παρέχουν νέες εφαρμογές συμπεριλαμβανομένων των κυψελών καυσίμου²⁶.

B2.3.2 Σύνθεση HPC μέσω πυρόλυσης-ενεργοποίησης

Η πυρόλυση-ενεργοποίηση είναι η θεμελιώδης και η πιο εκτεταμένη χρησιμοποιούμενη μέθοδος για την παρασκευή HPC από απόβλητα και βιομάζα. Ο παράγοντας ενεργοποίησης μπορεί να οξειδώσει/αεριοποιήσει μερικώς τα υλικά άνθρακα ώστε να προωθήσει τη δημιουργία πόρων και να μετατρέψει τις λειτουργικές ομάδες στην επιφάνειά τους. Οι πόροι που μπορούν να προσαρμοστούν με την ενεργοποίηση χαρακτηρίζονται συνήθως ως μικροπόροι και μικροί μεσοπόροι¹¹. Για να ληφθούν οι HPC, το υλικό άνθρακα θα πρέπει να διαθέτει μια προσχεδιασμένη δομή που να αποτελείται από άφθονους μεσοπόρους και/ή μακροπόρους. Οι βιολογικοί οργανισμοί και οι ιστοί τους έχουν συνήθως φυσικά οργανωμένες ιεραρχικές δομές, ξεκινώντας από χημικές ουσίες σε οργανίδια και στη συνέχεια σε κύτταρα, ιστούς, και τελικώς σε έναν ολόκληρο οργανισμό²⁷.

Κατά τη διάρκεια της πυρόλυσης, τα υπολείμματα του άνθρακα και οι ανόργανες ενώσεις μπορούν να διατηρήσουν το αρχικό τους πλαίσιο, ενώ το νερό και οι πτητικές ουσίες απελευθερώνεται, σχηματίζοντας έτσι πόρους. Ανάλογα με τη φυσική δομή, μέσω απλής πυρόλυσης μπορούν να ληφθούν πολύπλοκα δίκτυα που σχηματίζονται από διασύνδεση πορωδών καναλιών. Οι πόροι που προκαλούνται από την πυρόλυση είναι κυρίως μακροπόροι και μεσοπόροι, οι οποίοι μπορούν να παρέχουν άφθονες θέσεις αντίδρασης για έναν παράγοντα ενεργοποίησης. Επομένως, το μικροπορώδες και η μεγάλη ειδική επιφάνεια μπορούν να επιτευχθούν περαιτέρω μέσω του συνεργατικού αποτελέσματος της ενεργοποίησης. Μερικές φορές η πυρόλυση και η ενεργοποίηση μπορούν να πραγματοποιηθούν ταυτόχρονα με θέρμανση ενός μείγματος πρώτης ύλης και ενός παράγοντα ενεργοποίησης¹¹. Επιπλέον, ανάλογα με τον παράγοντα ενεργοποίησης, οι μέθοδοι ενεργοποίησης χωρίζονται σε δύο τύπους: φυσικές και χημικές. Κατά τη φυσική ενεργοποίηση, η ενεργοποίηση λαμβάνει χώρα υπό οξειδωτική/αεριοποιητική ατμόσφαιρα σε υψηλή θερμοκρασία, παρουσία αέρα, O₂, CO₂ ή ατμού. Η χημική ενεργοποίηση χρησιμοποιεί διαβρωτικά χημικά ως παράγοντες ενεργοποίησης, όπως KOH, ZnCl₂ και H₃PO₄¹¹.

Ένα παράδειγμα της τεχνικής της πυρόλυσης-ενεργοποίησης είναι η επεξεργασία των HPC με νιτρικό σίδηρο (FeNO₃), αφού προηγουμένως δημιουργηθούν οι μικροπόροι μέσω ενεργοποίησης με κάποιο οξύ διαλύτη (π.χ. οξικό οξύ, ακετόνη), ώστε να προκύψουν τελικώς μαγνητικοί HPC (**Σχήμα B2.6**), καλύπτοντας αρκετό χώρο μέσα στους πόρους, (ελάττωση της ειδικής επιφάνειας), αλλά από την άλλη προσδίδοντας μαγνητικές ιδιότητες με όλα τα πλεονεκτήματα που αυτές επιφέρουν²⁸.



Γράφημα Β2.4. Σχηματική αναπαράσταση σχηματισμού των μαγνητικών HPC²⁸.

Δύο διαδικασίες εμπλέκονται στην τεχνική πυρόλυσης-ενεργοποίησης: η πυρόλυση για την παραγωγή μακροπορωδών και μεσοπορωδών δικτύων με χαμηλή ειδική επιφάνεια και μέγεθος πόρων, και η ενεργοποίηση του λαμβανόμενου ξυλάνθρακα (biochar) με φυσικές ή χημικές μεθόδους για την ανάπτυξη μικροπόρων και μικρών μεσοπόρων, βελτιώνοντας την ειδική επιφάνεια και το μέγεθος πόρων¹¹. Η δομή και οι ιδιότητες των παραγόμενων HPC εξαρτώνται από τη διαδικασία προετοιμασίας. Εκτός από τις συνθήκες της πυρόλυσης, αρκετοί παράγοντες στην διαδικασία ενεργοποίησης επηρεάζουν τις ιδιότητες των HPC, όπως ο τύπος και η ποσότητα του παράγοντα ενεργοποίησης (εκφραζόμενη ως η αδιάστατη αναλογία βάρους παράγοντα προς πρώτη ύλη ή ξυλάνθρακα) και η θερμοκρασία ενεργοποίησης.

Η προσαρμογή των πόρων μέσω της ενεργοποίησης ταξινομείται σε τέσσερις τύπους: (α) δημιουργία πόρων, (β) διεύρυνση πόρων, (γ) συνένωση πόρων και (δ) κατάρρευση πόρων¹¹. Η δημιουργία πόρων παράγει νέους μικροπόρους, δηλαδή η συνολική ειδική επιφάνεια του υλικού και η ειδική επιφάνεια των μικροπόρων αυξάνονται, ενώ η ειδική επιφάνεια των μεσοπόρων παραμένει αμετάβλητη και η αναλογία μεσοπόρων μειώνεται. Τόσο η διεύρυνση των πόρων όσο και η συνένωση πόρων μετατρέπουν τους μικροπόρους σε μεσοπόρους, με αποτέλεσμα τη μείωση της ειδικής επιφάνειας των μικροπόρων και αύξηση της ειδικής επιφάνειας των μεσοπόρων και της αναλογίας μεσοπόρων. Η διαφορά μεταξύ αυτών των δύο επιδράσεων είναι ότι η διεύρυνση των πόρων κάνει τους πόρους μεγαλύτερους, ενώ η συνένωση των πόρων σπάει το φυσικό υλικό μεταξύ παρακείμενων πόρων και τους συγχωνεύει σε ένα. Κατά τη διεύρυνση των πόρων, ο συνολικός αριθμός των πόρων παραμένει σταθερός αλλά ο πόρος διευρύνεται, έτσι η ειδική επιφάνεια και το μέγεθος των πόρων αυξάνεται. Κατά τη συνένωση πόρων, η θραύση του φυσικού δομικού υλικού μειώνει την ειδική επιφάνεια, αλλά το μέγεθος των πόρων εξακολουθεί να αυξάνει. Κατά τη διαδικασία κατάρρευσης πόρων σπάει η πορώδης δομή και φράζονται οι πόροι, μειώνοντας έτσι όλους τους δείκτες (ειδική επιφάνεια και μέγεθος πόρων).

Όσον αφορά στην επίδραση της ποσότητας του παράγοντα ενεργοποίησης, όταν αυξάνεται η ποσότητά του, και τα τέσσερα παραπάνω είδη των επιδράσεων ενισχύονται, αλλά σε διαφορετικούς βαθμούς. Χρησιμοποιώντας χαμηλές συγκεντρώσεις παράγοντα ενεργοποίησης, κυριαρχεί η δημιουργία πόρων και η μεγέθυνση των πόρων. Σαν αποτέλεσμα, η ειδική επιφάνεια και το μέγεθος των πόρων αυξάνονται, ενώ η διακύμανση της κατανομής μεσοπόρων εξαρτάται από τη σχετική

ισχύ της δημιουργίας πόρων και από τις επιπτώσεις της διεύρυνσης. Όταν η δόση του παράγοντα ενεργοποίησης είναι ιδιαίτερα υψηλή, το αποτέλεσμα δημιουργίας πόρων μπορεί να γίνει ακραίο, και η αντίδραση ενεργοποίησης μπορεί να προκαλέσει συνένωση πόρων ή ακόμη και κατάρρευση πόρων. Σε αυτή την περίπτωση, η ειδική επιφάνεια μειώνεται, ενώ το μέγεθος των πόρων και η αναλογία μεσοπόρων μπορεί είτε να αυξηθεί (λόγω συνένωσης πόρων) ή να μειωθεί (λόγω κατάρρευσης πόρων).

Η επίδραση της θερμοκρασίας ενεργοποίησης είναι παρόμοια με αυτή της ποσότητας του παράγοντα ενεργοποίησης. Υψηλές θερμοκρασίες οδηγούν σε αύξηση της ειδικής επιφάνειας, του μεγέθους των πόρων και της κατανομής των μεσοπόρων. Παρόλα αυτά, όταν η θερμοκρασία φτάσει ή/και ξεπεράσει ακραίες τιμές (π.χ. 900 °C), τότε η ειδική επιφάνεια και το μέγεθος των πόρων μειώνονται, ενώ η αναλογία κατανομής των μεσοπόρων αυξάνεται λόγω της συνένωσης και της κατάρρευσης των πόρων των οποίων το φαινόμενο συνένωσης πόρων ήταν κυρίαρχο²⁹.

B2.3.3 Ανερχόμενες μέθοδοι σύνθεσης HPC

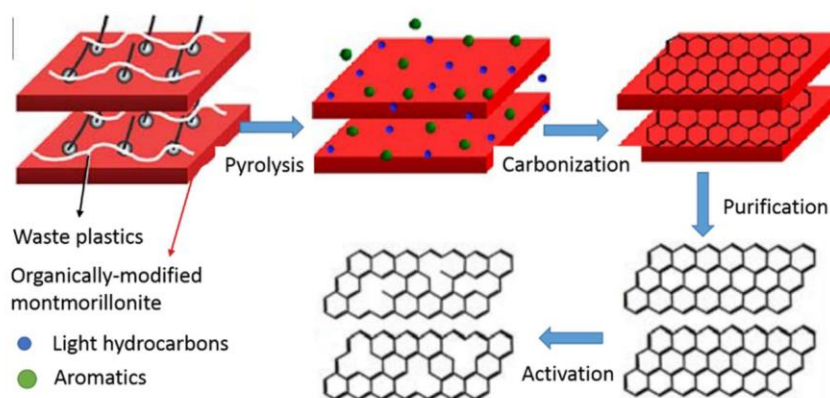
Εκτός από τις μεθόδους χρήσης προτύπων, έχουν διερευνηθεί και άλλες μέθοδοι για την παρασκευή HPC από μη δομημένα υλικά. Αυτές οι τεχνικές περιλαμβάνουν την υδροθερμική ενανθράκωση, την πυρόλυση ψεκάσμου, την εναπόθεση χημικών ατμών (CVD), και την αυτογενή απανθράκωση υπό πίεση.

Η υδροθερμική μέθοδος μπορεί να επιταχύνει την απανθράκωση της βιομάζας (που δρα ως πηγή άνθρακα) και πραγματοποιείται σε κλειστό σύστημα γεμάτο με νερό ή διάλυμα τα οποία λειτουργούν ως μέσα θέρμανσης, αντιδραστήρια και διαλύτες για υγρά προϊόντα. Ο παραγόμενο ξυλάνθρακας διαθέτει άφθονη περιεκτικότητα σε λειτουργικές ομάδες οξυγόνου. Ωστόσο, το πορώδες που προκύπτει είναι γενικά χαμηλό λόγω της περιορισμένης απελευθέρωσης πτητικών ουσιών. Ως πηγές άνθρακα κατά την υδροθερμική απανθράκωση χρησιμοποιούνται μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες και πολυσακχαρίτες. Οι σφαίρες άνθρακα των υλικών έχουν συνήθως κλίμακα υπο-μικρονίου, άρα τα κενά μεταξύ των σφαιρών μπορούν να θεωρηθούν ως μακροπόροι. Μετά τη διαδικασία ενεργοποίησης για την ανάπτυξη μικρο- και μεσοπόρων, το παραγόμενο σφαιρικό HPC δείχνει εξαιρετική απόδοση³⁰.

Η πυρόλυση με ψεκάσμο είναι μια σημαντική μέθοδος προετοιμασίας υλικών σε σκόνη. Ο πρόδρομος διαλύτης ψεκάζεται σε κλίβανο υψηλής θερμοκρασίας υπό αδρανή ατμόσφαιρα. Τα σταγονίδια αερολύματος ανθρακοποιούνται σε σφαιρίδια άνθρακα. Η ταχεία εξάτμιση του διαλύτη και η αποσύνθεση του πρόδρομου άνθρακα μπορεί να δημιουργήσουν άφθονο πορώδες στα σφαιρίδια άνθρακα³¹.

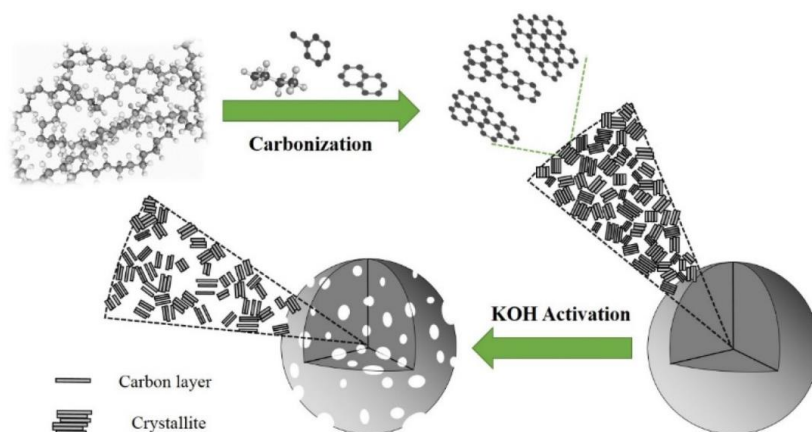
Οι παραπάνω μέθοδοι είναι κατάλληλες μόνο για πηγές που έχουν υπολειμματικό άνθρακα μετά την πυρόλυση. Ωστόσο, ορισμένα υλικά από απόβλητα, συμπεριλαμβανομένων των περισσότερων τύπων πλαστικών, αποσυντίθενται πλήρως σε πτητικές ουσίες, απαλλαγμένες από σταθερό άνθρακα.

Η μέθοδος CVD χρησιμοποιείται για τη σύνθεση HPC, χρησιμοποιώντας διάφορες πρόδρομες ενώσεις. Για παράδειγμα, ο Gong και οι συνεργάτες του συνέθεσαν πορώδη ναοφύλλα από απορρίμματα πλαστικών^{32,33}. Οργανικά τροποποιημένος μοντμοριλλονίτης (OMM) αναμίχθηκε με απόβλητα πλαστικά και το μίγμα χρησιμοποιήθηκε ως καταλύτης και «σκλήρο» πρότυπο υπόστρωμα (Σχήμα B2.7). Κατά τη διάρκεια της πυρόλυσης του μείγματος, τα πλαστικά αρχικά αποσυντέθηκαν σε μικρές ενώσεις υδρογονανθράκων. Στη συνέχεια, τα αέρια προϊόντα ανθρακώθηκαν καταλυτικά στην επιφάνεια του OMM μέσω πολυμερισμού³⁴. Το σύνθετο υλικό OMM/άνθρακα εκπλύθηκε χρησιμοποιώντας υδροφθορικό οξύ για την απομάκρυνση του OMM, και στη συνέχεια το υλικό ενεργοποιήθηκε με KOH. Σε αντίθεση με τις μεθόδους «σκλήρου» προτύπου υποστρώματος, οι πηγές άνθρακα που χρησιμοποιούνται στη μέθοδο CVD είναι σε αέρια μορφή και το πρότυπο έχει καταλυτική επίδραση στην ανάπτυξη υλικών άνθρακα.



Σχήμα B2.7. Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης HPC από πλαστικά απόβλητα, μέσω της τεχνικής CVD³².

Η μέθοδος ανθρακοποίησης-ενεργοποίησης αυτογενούς πίεσης αναπτύχθηκε από τον Zhang και την ομάδα του³⁵. Μέσω αυτής της μη-καταλυτικής τεχνικής δημιουργήθηκε ένα σφαιρικό HPC από πολυαιθυλένιο χαμηλής πυκνότητας. Κατά τη διαδικασία αυτογενούς πίεσης ανθρακοποίησης, η μη απανθρακωμένη πηγή άνθρακα απανθρακοποιήθηκε σε κλειστό αντιδραστήρα (Σχήμα B2.8). Τα μικρά προϊόντα μοριακής αποσύνθεσης δεν μπορούσαν να ξεφύγουν από τη ζώνη υψηλής θερμοκρασίας και περαιτέρω και συμπυκνώθηκαν σε σφαιρίδια άνθρακα κάτω από την ατμόσφαιρα των αποσυντιθέμενων προϊόντων και την αυτογενή πίεση. Τα σφαιρίδια άνθρακα που παραλήφθηκαν αποτελούνταν από μικρούς κρυσταλλίτες γραφίτη που χαραχτηκαν εύκολα από το KOH για να δημιουργήσουν ένα ιεραρχημένο πορώδες.



Σχήμα B2.8. Σχηματική αναπαράσταση της σύνθεσης HPC από χαμηλής πυκνότητας πολύ-αιθυλένιο, μέσω της τεχνητής ανθρακοποίησης αυτογενούς πίεσης³⁵.

B2.4 Ντοπάρισμα HPC με ετερο-άτομα

Το «ντοπάρισμα» (doping) είναι η υποκατάσταση ή η ομοιοπολική σύνδεση των ατόμων C στα πλαίσια άνθρακα με άλλου είδους άτομα/στοιχεία³⁶. Το ντοπάρισμα ετεροατόμων μπορεί να αλλάξει τις φυσικοχημικές και ηλεκτρονικές ιδιότητες των HPC και να βελτιώσει την απόδοσή του διάφορες εφαρμογές.

Το ντοπάρισμα με N είναι ιδιαίτερα επιλέξιμο, αφού το N και ο C έχουν παρόμοιο ατομικό μέγεθος και αριθμό ηλεκτρονίων σθένους, κάνοντας το N σχετικά πιο εύκολο να αντικαταστήσει το C στο πλέγμα άνθρακα. Κυρίως τρεις τύποι N υπάρχουν σε υλικά άνθρακα, το πυρρολικό, το πυριδινικό και το γραφιτικό (τεταρτοταγές) N³⁷. Η ηλεκτραρνητικότητα του N είναι μεγαλύτερη από αυτή του C, που μπορεί να αλλάξει την πόλωση της επιφάνειας. Επιπλέον, ο απεντοπισμός του φορτίου μπορεί να αυξήσει τη δραστηριότητα του N-ντοπαρισμένου HPC. Το O έχει μεγαλύτερο ατομικό μέγεθος και ισχυρότερη ηλεκτραρνητικότητα από το C. Επομένως, το ντόπινγκ ομοιοπολικού δεσμού, όπως π.χ. C=O, C-OH, C-O-C και COOH αποτελούν την κύρια διαμόρφωση και όχι ντοπάρισμα. Οι λειτουργικές ομάδες που περιέχουν O προσδίδουν στους HPC υψηλή δραστηριότητα και εξαιρετική υδροφιλικότητα. Η διαμόρφωση του S μέσω ντοπαρίσματος είναι κυρίως ομοιοπολική, όπως C-SH, C-S-C και C-SO₂-4, και μοιάζει με αυτό του O, αλλά σε αυτή την περίπτωση πόλωση του C-S είναι σχετικά ασθενέστερη, αφού οι ηλεκτραρνητικότητες του S και του C είναι παρόμοιες. Για υποκατάσταση μέσω ντοπαρίσματος μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν τα στοιχεία P (φώσφορος) και B (βόριο).

B2.5 Εφαρμογές των HPC

B2.5.1 Υπερ-πυκνωτές

Οι υπερ-πυκνωτές, ή αλλιώς ηλεκτροχημικοί πυκνωτές, θεωρούνται ως πολλά υποσχόμενες συσκευές αποθήκευσης και παροχής ενέργειας. Ένας υπερπυκνωτής αποτελείται από δύο συμμετρικά ηλεκτρόδια και έναν βυθισμένο διαχωριστή σε έναν

ηλεκτρολύτη. Ανάλογα με τον μηχανισμό αποθήκευσης ενέργειας, ένας υπερπυκνωτής μπορεί να ταξινομηθεί ως ηλεκτρικός πυκνωτής διπλής στρώσης (EDLC) ή ως ψευδοπυκνωτής. Ένας EDLC πυκνωτής βασίζεται στην ηλεκτροστατική προσρόφηση-εκρόφιση των ιόντων ηλεκτρολυτών στη διεπιφάνεια του ηλεκτρολύτη/ηλεκτροδίου, που υποκινείται από τη δύναμη Coulomb. Ο ψευδοπυκνωτής προκύπτει από γρήγορες αντιδράσεις οξειδοαναγωγής μεταξύ των λειτουργικών πομάδων της ηλεκτροδραστικής επιφάνειας³⁸.

Η απόδοση ενός EDLC πυκνωτή εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την πορώδη δομή των υλικών του ηλεκτροδίου. Οι μικροπόροι του υλικού συνεισφέρουν στη μεγάλη συνολική ειδική επιφάνεια και παρέχουν άφθονες τοποθεσίες για τον σχηματισμό του διπλού στρώματος. Οι μεσο- και μακροπόροι του υλικού μπορούν να αυξήσουν τον ρυθμό μεταφοράς των ιόντων ηλεκτρολυτών, μειώνοντας την αντίσταση μεταφοράς, και συμπύσσοντας τα μονοπάτια διάχυσης³⁹. Κατά συνέπεια, οι HPC μπορούν να βελτιώσουν σημαντικά τη χωρητικότητα και την απόδοση των υπερπυκνωτών.

Στην περίπτωση των ψευδοπυκνωτών, η ύπαρξη λειτουργικών ομάδων στην επιφάνεια του υλικού άνθρακα είναι ο πιο κρίσιμος παράγοντας. Το ντοπάρισμα με ετερο-άτομα είναι μια αποτελεσματική μέθοδος για τη βελτίωση της ψευδοχωρητικότητας. Οι ντοπαρισμένοι HPC με διάφορα ετερο-άτομα (O, N, S, P κ.λπ.) χρησιμοποιούνται ευρέως για την τροποποίηση των συσκευών⁴⁰. Εκτός από τη βελτίωση της ψευδοχωρητικότητας, το ντοπάρισμα με ετερο-άτομα μπορεί επίσης να αλλάξει την διαβροχή και αγωγιμότητα των υλικών άνθρακα⁴¹.

B2.5.2 Χωρικός απιονισμός

Ο χωρικός απιονισμός (capacitive deionization, CDI) είναι μια αναδυόμενη τεχνολογία για τον καθαρισμό του νερού και είναι ιδιαίτερα κατάλληλη για την επεξεργασία θαλασσινού και υφάλμυρου νερού⁴². Μια κυψέλη CDI είναι παρόμοια σε κατασκευή και μηχανισμό με έναν υπερπυκνωτή. Η κυψέλη CDI αποτελείται από δύο παράλληλα ηλεκτρόδια και έναν διαχωριστή. Όταν εφαρμόζεται τάση στα ηλεκτρόδια, τα ιόντα στο αλμυρό νερό μεταφέρονται προς στα ηλεκτρόδια, έσω της ανάπτυξης δυνάμεων Coulomb. Μέσω του σχηματισμού ενός ηλεκτρικού διπλού στρώματος και αντιδράσεων Faradic, τα ιόντα απορροφώνται και αποθηκεύονται στο υλικό των ηλεκτροδίων. Τα υλικά των ηλεκτροδίων που έχουν προσροφήσει τα ιόντα μπορούν να αναγεννηθούν όταν σταματήσει η τάση ή αντιστραφεί η πολικότητα. Σε σύγκριση με την εμπορική τεχνολογία αντίστροφης όσμωσης, το CDI χρειάζεται πολύ λιγότερη ηλεκτρική ενέργεια και χρησιμοποιεί μια απλή διάταξη⁴³.

Για να αυξηθεί η ικανότητα προσρόφησης και ο ρυθμός απομάκρυνσης μιας κυψέλης CDI, η συνολική ειδική επιφάνεια, η κατανομή του μεγέθους πόρων και οι λειτουργικές ομάδες στην επιφάνεια του υλικού που πληρούν το ηλεκτρόδιο, πρέπει να βελτιστοποιηθούν⁴⁴. Η μεγάλη ειδική επιφάνεια παρέχει άφθονο χώρο για την προσρόφηση ιόντων, αυξάνοντας την ικανότητα προσρόφησης. Οι μεσο- και

μακροπόροι μπορούν να συντομεύσουν την οδό μεταφοράς των ιόντων και να μειώσουν την αντίσταση της μεταφοράς ιόντων από το αλμυρό νερό στους μικροπόρους των υλικών που αποτελούν τα ηλεκτρόδια. Οι λειτουργικές ομάδες στην επιφάνεια του υλικού μπορούν να αντιδρούν και να προσροφούν ιόντα μέσω ενός μηχανισμού τύπου ψευδοπυκνωτή. Επιπλέον, αυτές λειτουργικές ομάδες μπορούν να αυξήσουν την υδροφιλικότητα του υλικού άνθρακα, διευκολύνοντας την επαφή των ιόντων με την εσωτερική επιφάνεια του υλικού⁴⁵. Για όλους αυτούς τους λόγους, είναι εμφανές ότι οι HPC αποτελούν μια εναλλακτική και ιδανική λύση για την επένδυση των ηλεκτροδίων σε μια διάταξη κυψέλης CDI.

B2.5.3 Μπαταρίες λιθίου-θείου

Στις μπαταρίες λιθίου-θείου, το μεταλλικό λίθιο χρησιμοποιείται ως άνοδος, ενώ το θείο χρησιμοποιείται ως κάθοδος. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης εκκένωσης, το μεταλλικό λίθιο οξειδώνεται και παράγει Li^+ φορτισμένο με ένα ηλεκτρόνιο. Στην άνοδο, το θείο δέχεται το ηλεκτρόνιο και παράγει θείο λιθίου⁴⁶. Μια μπαταρία λιθίου-θείου παρουσιάζει μία θεωρητική χωρητικότητα περίπου στα 1675 mAh/g, η οποία είναι πολύ μεγαλύτερη από τη θεωρητική βαρυμετρική χωρητικότητα της μπαταρίας ιόντων λιθίου με βάση το γραφιτικό άνθρακα, η οποία κυμαίνεται περίπου στα 370 mAh/g⁴⁷. Τα τελευταία χρόνια έχει πραγματοποιηθεί εκτενής έρευνα σε σχέση με τις μπαταρίες λιθίου-θείου, καθώς αποτελούν την επόμενη γενιά επαναφορτιζόμενων μπαταριών.

Ωστόσο, η χαμηλή αγωγιμότητα του θείου, η διάχυση των πολυσουλφιδικών διαλυτών και οι αλλαγές του όγκου κατά τη διάρκεια της ανακύκλωσης παρουσιάζουν πρακτικά προβλήματα στην εφαρμογή των μπαταριών λιθίου-θείου. Έτσι, τα ζητήματα αυτά μπορούν να οδηγήσουν σε χαμηλή χρήση των υλικών που περιλαμβάνουν τέτοιου είδους ηλεκτρόδια και ταυτόχρονα παρουσιάζουν χαμηλή ενεργειακή απόδοση και σύντομη διάρκεια ζωής. Για την επίλυση των παραπάνω προβλημάτων έχει αναπτυχθεί έρευνα, σχετική με τη χρήση των ιεραρχημένων πορωδών ανθράκων, ως πρόσθετα καθόδου των μπαταριών λιθίου-θείου, καθώς οι HPC παρουσιάζουν υψηλή αγωγιμότητα και υψηλή ειδική επιφάνεια και μπορούν έτσι να μεταφέρουν αποτελεσματικά ηλεκτρόνια στο θείο. Οι μικροπόροι που μπορούν να προσροφήσουν και να φιλοξενήσουν τα πολυσουλφίδια, αλλά και οι μεσοπόροι όχι μόνο μπορούν να περιορίσουν το διάλυμα των πολυσουλφιδίων, αλλά ταυτόχρονα είναι εφικτό να περιορίσουν την αλλαγή του όγκου του θείου⁴⁸. Επιπλέον, οι λειτουργικές ομάδες των ετεροατόμων (N, O, S, P και B) των HPC, μπορούν, επίσης, να ακινητοποιήσουν αποτελεσματικά τα πολυσουλφίδια, μέσω της χημικής προσρόφησης⁴⁹.

B2.5.4 Δέσμευση διοξειδίου του άνθρακα

Η κρίση της υπερθέρμανσης του πλανήτη και η κλιματική αλλαγή γίνονται όλο και πιο σοβαρές λόγω της μαζικής εκπομπής αερίων. Οι εκπομπές CO_2 είναι ένα κρίσιμο ζήτημα επειδή οι εκπομπές είναι αναπόφευκτες κατά την καύση ορυκτών καυσίμων για βιομηχανικές και ανθρώπινες δραστηριότητες⁵⁰. Η δέσμευση του CO_2

από ένα προσροφητή είναι πολύ απαραίτητη σε ανθρωπογενείς σημειακές πηγές⁵¹. Η φυσική προσρόφηση από ένα προσροφητικό υλικό εξαρτάται από τη συνολική ειδική επιφάνειά του, το μέγεθος και τον όγκο των πόρων.

Οι HPC επιδεικνύουν υψηλή απόδοση στη δέσμευση του CO₂, λόγω της υψηλής ειδικής επιφάνειας, του μεγάλου μεγέθους πόρων από την ύπαρξη των μικρο- και μεσοπόρων, και την ταχεία μεταφορά μάζας που διευκολύνεται από την παρουσία μεσο- και μακροπόρων⁵². Η υψηλή πολικότητα των μορίων CO₂ ευνοεί την επιλεκτική δέσμευσή του μέσω χημικής προσρόφησης. Η χημική προσρόφηση του CO₂ από τους HPC μπορεί να επιτευχθεί με την τεχνική του ντοπαρίσματος με ετερο-ατομα⁵³, εισάγοντας λειτουργικές ομάδες και αλλάζοντας έτσι το φορτίο της επιφάνειας των HPC, και συνεπώς αυξάνοντας αποτελεσματικά τη δυνατότητα προσρόφησης του CO₂.

B3 ENZYMA

B3.1 Εισαγωγή στα ένζυμα

Τα ένζυμα είναι απαραίτητα ενδοκυτταρικά ή εξωκυτταρικά πρωτεϊνικά συστατικά των μικροοργανισμών, των ζώων και των φυτών, καθώς συντονίζουν και καταλύουν πολύπλοκες κυτταρικές αντιδράσεις. Ουσιαστικά, ο ρόλος των ενζύμων είναι να μειώνουν την ενέργεια ενεργοποίησης που απαιτείται, ώστε να συμβεί σε συντομότερο χρονικό διάστημα μια βιολογική αντίδραση, δρώντας σε συγκεκριμένη ένωση ή ομάδα ενώσεων (υποστρώματα). Αυτό το επιτυγχάνουν είτε προσανατολίζοντας τα υποστρώματα ευνοϊκά, είτε δημιουργώντας θετικά και αρνητικά φορτία στο υπόστρωμα, είτε αλλάζοντας διαμόρφωση ώστε να εγκλωβίσουν το υπόστρωμα και να το οδηγήσουν σε μια μεταβατική κατάσταση. Κατά τη διάρκεια της αντίδρασης και στο πέρας αυτής, τα ένζυμα δεν υφίστανται καμία μόνιμη αλλαγή και ούτε επηρεάζουν το σημείο ισορροπίας της. Μερικά ένζυμα για να δράσουν χρειάζεται να συνδεθούν με κάποιον συμπράγοντα. Αυτός μπορεί να είναι ένα μεταλλικό ιόν ή ένα οργανικό μόριο που δεν συνδέεται μόνιμα με το ένζυμο (συνένζυμο) ή μια ένωση που συνδέεται ομοιοπολικά με το ένζυμο και παραμένει σε αυτό (προσθετική ομάδα).

Η εξειδίκευση και η καταλυτική ισχύς ενός ενζύμου είναι από τα βασικότερα χαρακτηριστικά του. Η εξειδίκευση ενός ενζύμου αφορά τόσο στην επιλογή των υποστρωμάτων όσο και στη φύση των αντιδράσεων που καταλύει. Κάθε ένζυμο, λοιπόν, φέρει συγκεκριμένα αμινοξέα που αναγνωρίζουν και προσδέουν το εκάστοτε υπόστρωμα και ονομάζονται αμινοξέα πρόσδεσης. Τα αμινοξέα πρόσδεσης βρίσκονται σε συγκεκριμένη, δομικά συντηρημένη περιοχή του ενζύμου, στο ενεργό κέντρο. Στην ίδια περιοχή βρίσκονται και τα καταλυτικά αμινοξέα, αυτά δηλαδή που ευθύνονται για την κατάλυση της αντίδρασης και συμμετέχουν στη διάσπαση ή και στον σχηματισμό δεσμών. Στη σύνδεση του ενζύμου με το υπόστρωμα λαμβάνουν χώρα ασθενείς δυνάμεις, όπως δυνάμεις van der Waals, υδροφοβικές αλληλεπιδράσεις, δεσμοί υδρογόνου και δυνάμεις ηλεκτροστατικής φύσεως.

Τα ένζυμα εξειδικεύονται τόσο ως προς την επιλογή των υποστρωμάτων όσο και στη φύση των αντιδράσεων που καταλύουν. Με βάση, λοιπόν, τη φύση των αντιδράσεων που καταλύουν, έχουν καταταχθεί από την Διεθνή Ένωση Βιοχημείας, ήδη από το 1961 σε 6 μεγάλες τάξεις, ενώ τον Αύγουστο του 2018 μία νέα 7η τάξη ανακοινώθηκε από την Διεθνή Ένωση Βιοχημείας και Μοριακής Βιολογίας (IUMMB) που είναι πλέον αρμόδια για την ονομασία των ενζύμων. Σε κάθε ένζυμο αντιστοιχεί ένας τετραψήφιος Κωδικός Ενζύμου EC x.x.x.x. (Enzyme Code), όπου το πρώτο ψηφίο δηλώνει την κατηγορία του ενζύμου. Στον **Πίνακα B3.1** παρουσιάζονται οι κατηγορίες ενζύμων, η φύση των αντιδράσεων και ορισμένα παραδείγματα ενζύμων.

Πίνακας Β3.1. Κατηγορίες ενζύμων βάσει της φύσης των αντιδράσεων που καταλύουν.

Κωδικός Ενζύμου	Κατηγορία Ενζύμου	Φύση αντιδράσεων
EC 1.x.x.x	Οξειδοαναγωγάσες	Οξείδωση και αναγωγή
EC 2.x.x.x	Τρανσφεράσες	Μεταφορά ατόμου ή ομάδας μεταξύ δύο μορίων
EC 3.x.x.x	Υδρολάσες	Διάσπαση διάφορων δεσμών με τη συμμετοχή νερού
EC 4.x.x.x	Λυάσες	Προσθήκη ομάδας σε διπλό δεσμό ή διάσπαση δεσμού και απόσπαση ομάδας μη υδρολυτικά
EC 5.x.x.x	Ισομεράσες	Ισομεριώσεις
EC 6.x.x.x	Λιγάσες ή Συνθετάσες	Δημιουργία νέων δεσμών μεταξύ δύο μορίων με διάσπαση ενός τριφωσφορικού νουκλεοζίτη
EC 7.x.x.x	Τρανσλοκάσες	Μεταφορά από την «περιοχή 1» στην «περιοχή 2»

B3.2 Πλεονεκτήματα ενζύμων

Τα ένζυμα εμφανίζουν πολλά πλεονεκτήματα και σε αυτά οφείλεται το μεγάλο εμπορικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον που παρουσιάζουν, καθώς και οι ευρείες χρήσεις τους σε πάρα πολλές βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Χάρη στα ένζυμα οι καταλυόμενες αντιδράσεις διεξάγονται σε ήπιες και περιβαλλοντικά φιλικές συνθήκες, μιας και δε χρειάζονται υψηλές θερμοκρασίες και πιέσεις ούτε ακραίες τιμές pH για να δράσουν. Αντίθετα, η διεξαγωγή των ίδιων αντιδράσεων με χημικές μεθόδους, συνήθως συνοδεύεται από την κατανάλωση μεγάλων ποσών ενέργειας, ενώ επίσης, πολλές φορές γίνεται χρήση τοξικών διαλυτών⁵⁴. Ακόμη, η εξειδίκευση, η τοποεκλεκτικότητα και η ενάντιο-εκλεκτικότητα των ενζύμων επιτρέπει την παραγωγή λιγότερων ή κανενός παραπροϊόντος, με αποτέλεσμα τα απόβλητα σε διάφορες διαδικασίες παραγωγής να ελαττώνονται. Επίσης, τα ένζυμα είναι βιοδιασπώμενα, αφού είναι πρωτεϊνικής φύσης και, συγκριτικά με τους χημικούς διαλύτες, δεν επιβαρύνουν το περιβάλλον. Τέλος, στη χρήση των ενζύμων προστίθεται και το πλεονέκτημα της απομόνωσης και επαναχρησιμοποίησης, μιας και φαίνεται πως αυτά είναι ικανά να διατηρούν την βιολογική τους δράση επανειλημμένα⁵⁴. Παρ' όλα αυτά όμως η χρήση των ενζύμων περιλαμβάνει και κάποιους περιορισμούς. Στον **Πίνακα Β3.2** παρουσιάζονται τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της χρήσης των ενζύμων.

Πίνακας Β3.2. Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της χρήσης ενζύμων.

Πλεονεκτήματα	Μειονεκτήματα
Μεγάλη δραστικότητα και ικανότητα επιτάχυνσης των αντιδράσεων (10^6 - 10^{17} υψηλότερη ταχύτητα)	Χαμηλή σταθερότητα σε ακραίες τιμές pH και θερμοκρασίας
Υψηλή εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα	Μειωμένη σταθερότητα, όταν απομακρυνθούν από την φυσική πηγή τους
Υψηλή τοπο- και στέreo-εκλεκτικότητα (διακρίνουν συγκεκριμένα τμήματα στα μόρια των υποστρωμάτων ή οπτικά ισομερή αντίστοιχα)	Μεγάλος χρόνος ανάπτυξης νέων βιοκαταλυτών
Υψηλή εναντιοεκλεκτικότητα	Χαμηλή ειδική ενεργότητα
Δεν αλλοιώνουν τα τελικά προϊόντα ή την ισορροπία μεταξύ αντιδρώντων και προϊόντων μιας αντίδρασης	Η καταλυτική τους δράση (αρκετές φορές) επηρεάζεται από την παρουσία συνενζύμου
Λειτουργούν σε ήπιες συνθήκες pH, θερμοκρασίας και πίεσης	Αναστολή από το ίδιο το υπόστρωμα ή το προϊόν
Είναι φιλικό προς το περιβάλλον και βιοαποικοδομίσιοι καταλύτες	Έχουν υψηλό κόστος παραγωγής

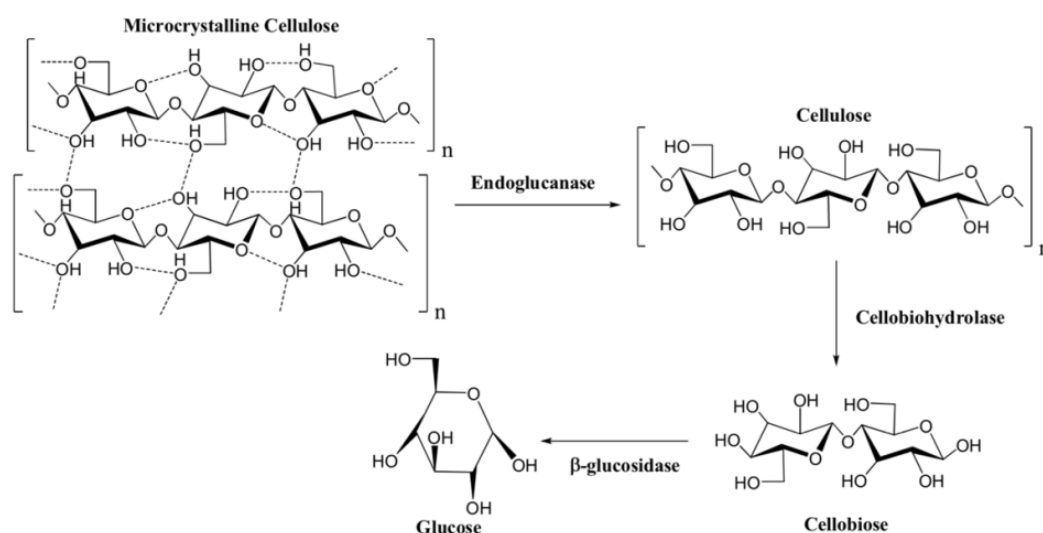
B3.3 Το ένζυμο κυτταρινάση

Η κυτταρινάση είναι ένα σύμπλεγμα τριών ενζύμων που καταλύει τη μετατροπή της κυτταρίνης σε γλυκόζη. Πιο συγκεκριμένα τα τρία ένζυμα από τα οποία αποτελείται είναι⁵⁵:

- *ενδοκυτταρινάσες* που επιτίθενται τυχαία και υδρολύουν τους δεσμούς που βρίσκονται στο εσωτερικό του μορίου σε άμορφες θέσεις δημιουργώντας ολιγοσακχαρίτες διαφορετικού μήκους. Μπορούν να καταλύσουν και τις κυτταροδεξτρίνες, το ενδιάμεσο προϊόν της της υδρόλυσης της κυτταρίνης, και να δώσουν κελλοβιόζη και γλυκόζη.
- *εξωκυτταρινάσες* που υδρολύουν 2-4 μονάδες διαδοχικά από τους ολιγοσακχαρίτες, δηλαδή τις νέες αλυσίδες που προέκυψαν από τις ενδοκυτταρινάσες, στα αναγωγικά και μη αναγωγικά άκρα τους απελευθερώνοντας τετρασακχαρίτες ή δισακχαρίτες όπως η κελλοβιόζη.
- β-γλυκοσιδάσες που υδρολύουν την κελλοβιόζη και τους άλλους βραχείς ολιγοσακχαρίτες που έχουν προκύψει από τις εξωκυτταρινάσες σε μόρια γλυκόζης.

Η πλήρης αποικοδόμηση της κυτταρίνης απαιτεί την συνεργιστική δράση των τριών παραπάνω ενζύμων τα οποία είναι συλλογικά γνωστά ως κυτταρινάση. Ο

μηχανισμός της υδρόλυσης της κυτταρίνης από αυτά τα ένζυμα έχει μελετηθεί εκτενώς. Η ενδογλουκανάση προσβάλλει τυχαία τους εσωτερικούς δεσμούς β-1,4 στην κυτταρίνη με αποτέλεσμα τη βραδεία απελευθέρωση αναγωγικών ομάδων. Η εξωγλουκανάση δίνει κελλοβιόζη από το αναγωγικό άκρο της κυτταρίνης και η β-γλυκοσιδάση υδρολύει την προκύπτουσα κελλοβιόζη σε D-γλυκόζη (Σχήμα B3.1)⁵⁶. Κατά τον μηχανισμό της αντίδρασης, η πιο ευρέως αποδεκτή υπόθεση είναι ότι οι ενδογλουκανάσες εκκινούν την επίθεση διαχωρίζοντας τυχαία τις αλυσίδες κυτταρίνης, δημιουργώντας εκτεθειμένα άκρα αλυσίδας από τα οποία οι εξωγλουκανάσες απομακρύνουν διαδοχικές μονάδες κελλοβιόζης. Εν τούτοις, η διατεταγμένη δομή της κυτταρίνης διατηρείται επίσης με δεσμούς υδρογόνου μεταξύ των αλυσίδων, έτσι ώστε αν οι γλυκοζιτικοί δεσμοί εντός της αλυσίδας που διασπώνται από τις ενδογλουκανάσες δρουν σαν μόνες, να μετασχηματίζονται ταχέως εκτός εάν δράσουν οι εξωγλουκανάσες. Επίσης, χωρίς τις τελευταίες να δρουν για τη διαλυτοποίηση των κατακερματισμένων εξωτερικών αλυσίδων επί της επιφάνειας, οι ενδογλουκανάσες στερούνται της πρόσβασης στις εσωτερικές αλυσίδες κυτταρίνης⁵⁷.



Σχήμα B3.1. Υδρόλυση της μικροκρυσταλλικής κυτταρίνης σε γλυκόζη από το σύμπλεγμα των τριών ενζύμων της κυτταρινάσης.

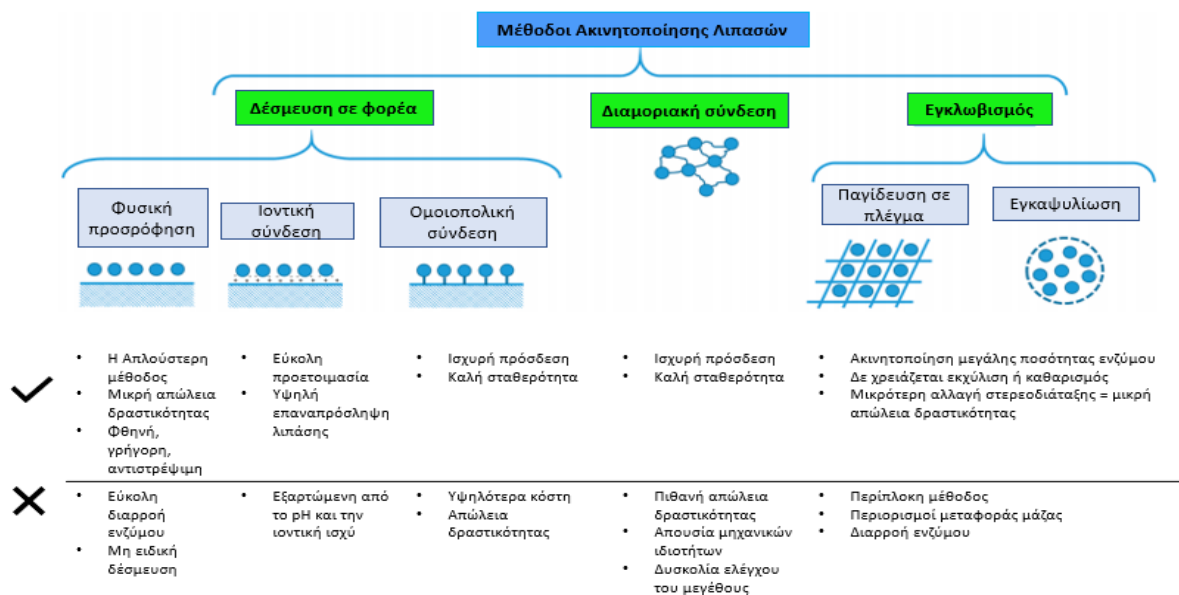
Υπάρχει πολύ υψηλός βαθμός συνεργασίας ανάμεσα στις εξωκυτταρινάσες και τις ενδοκυτταρινάσες. Τα προϊόντα τους, οι κυτταροδεξτράνες και η κελλοβιόζη είναι ανασταλτικά για την ενζυμική δραστηριότητα. Συνεργατική σχέση υπάρχει και ανάμεσα στα δύο είδη εξωκυτταρινάσων (τύπου I και II) που μαζί υδρολύουν τις αλυσίδες που δημιούργησαν οι ενδοκυτταρινάσες. Για την αποτελεσματική υδρόλυση της κυτταρίνης είναι απαραίτητη η παρουσία της β-γλυκοσιδάσης για να διασπάσει τους τελικούς γλυκοσιδικούς δεσμούς και να δώσει μόρια γλυκόζης. Αυτά τα τρία ένζυμα συνεργάζονται για την παραγωγή γλυκόζης από ένα αρχικό υπόστρωμα την κυτταρίνη μια διαδικασία που χαρακτηρίζεται ως αλυσιδωτή αντίδραση (cascade reaction)⁵⁷.

Κάθε τάξη κυτταρινάσης περιλαμβάνει διαφορετικές οικογένειες γλυκοϋδρολασών σύμφωνα με την ταξινόμηση της βάσης δεδομένων CAZy αλλά και

πολλές φορές περιέχουν και άλλες πρωτεΐνες όπως είναι ο λυτικός πολυσακχαρίτης μονοοξυγονάση και άλλες. Μπορούν να προκύψουν από βακτήρια, μύκητες, πρωτόζωα, φυτά και ζώα. Διάφορα γνωστά στελέχη βακτηρίων όπως τα αερόβια *Pseudomonas* και *Actinomycetes* (*Thermoactinomyces sp.*, *Thermomonospora curvata* and *Streptomyces sp.*), τα προαιρετικά αναερόβια *Bacillus* και *Cellulomonas* και τα αυστηρά αναερόβια *Clostridium* και μυκήτων όπως τα *Trichoderma reesei*, *Aspergillus niger*, *Trichoderma viride*, *Penicillium funiculosum* και *Penicillium oxalicum* αποτελούν πηγή κυτταρινάσης. Ανάλογα με την πηγή από την οποία προκύπτουν εμφανίζουν διαφορές ως προς το ισοηλεκτρικό σημείο, την απορρόφηση της κυτταρίνης, το μοριακό βάρος, την καταλυτική δραστηριότητα, την αλληλουχία κ.ά.. Περισσότερο στη βιομηχανία για την παραγωγή της βιοαιθανόλης και όχι μόνο, χρησιμοποιείται η κυτταρινάση από τον μύκητα *Trichoderma reesei* χάρη στην μεγαλύτερη απόδοση και παραγωγικότητα, στον υψηλότερο βαθμό καθαρότητας και στη διευκόλυνση της κρυστάλλωσης που το χαρακτηρίζει.

B3.4 Ακίνητοποίηση ενζύμων σε νανοϋλικά

Η ακίνητοποίηση ενός ενζύμου είναι ο περιορισμός των μορίων του ενζύμου πάνω ή/και μέσα σε ένα αδρανές υλικό στήριξης, έτσι ώστε να διατηρεί το πλήρες ή το μεγαλύτερο μέρος της βιοκαταλυτικής του δράσης⁵⁴. Αυτός ο γενικός ορισμός μπορεί να περιγραφεί με μια ποικιλία διαφορετικών τρόπων για την επίτευξη τέτοιων αλληλεπιδράσεων που θα δημιουργήσουν έναν σταθερό νανοβιοκαταλύτη, είτε με φυσικές, χημικές μεθόδους, ή με μεθόδους συγγένειας (Σχήμα B3.2). Μόλις επιτευχθεί η ακίνητοποίηση, υπάρχουν αρκετές τεχνικές για τη μελέτη της φύσης αυτών των αλληλεπιδράσεων, καθώς και του αποτελέσματος σχετικά με τη δομή και τη λειτουργικότητα των ενζύμων.



Σχήμα B3.2. Μέθοδοι ακίνητοποίησης ενζύμων σε νανοφορείς.

B3.4.1 Μη ομοιοπολική ακινητοποίηση

Η φυσική προσρόφηση σε νανοϋλικά ήταν μια από τις πρώτες μεθόδους που χρησιμοποιήθηκαν στην εμφάνιση της τεχνολογίας ακινητοποίησης ενζύμων, καθώς είναι πολύ απλή, βολική και με χαμηλό κόστος διαδικασία⁵⁴. Αυτή η διαδικασία βασίζεται σε μη ειδικές αλληλεπιδράσεις που σχηματίζονται μεταξύ του μορίου πρωτεΐνης και του νανοϋλικού, και δεν απαιτεί παράγοντες σύζευξης ή επιφανειακή επεξεργασία του φορέα. Κατά τη διαδικασία της ακινητοποίησης μέσω φυσικής προσρόφησης, εμπλέκονται όλα τα είδη αδύναμων αλληλεπιδράσεων, όπως ηλεκτροστατικές, υδρόφιλες, δεσμοί υδρογόνου και van der Waals, και εξαρτώνται τόσο από την επιφάνεια και τη χημεία του νανοφορέα, όσο και από τον τύπο των αμινοξέων που υπάρχουν στην επιφάνεια των ενζύμων⁵⁸.

Η μη ειδική δέσμευση ενός ενζύμου σε ένα νανοϋλικό μπορεί να οδηγήσει είτε σε διατήρηση της καταλυτικής του δράσης, διατηρώντας την τρισδιάστατη δομή του ή σε μαζική απώλεια της καταλυτικής απόδοσης λόγω διαμορφωτικών αλλαγών και μετουσίωσης της πρωτεΐνης⁵⁹, ανάλογα με το νανοϋλικό και το ένζυμο που χρησιμοποιούνται. Αυτή η μέθοδος συνήθως προτιμάται όταν χρησιμοποιούνται νανοφορείς με άφθονες φορτισμένες λειτουργικές ομάδες στην επιφάνειά τους, καθώς ο έλεγχος του ιοντικού περιβάλλοντος μπορούν έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία ισχυρών νανοβιοκαταλύτες. Η ιοντική δέσμευση παρέχει ισχυρές αλληλεπιδράσεις με τα ένζυμα, ανάλογα με τις ιδιότητες του νανοφορέα, και περιορίζει τις διαμορφωτικές αλλαγές στο μόριο του ενζύμου⁵⁸.

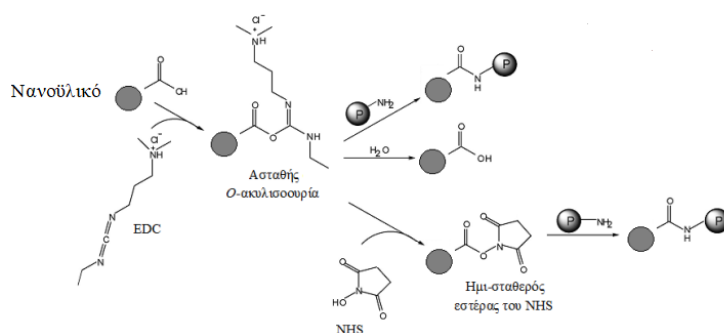
B3.4.2 Ομοιοπολική ακινητοποίηση

Η ομοιοπολική ακινητοποίηση βασίζεται στο σχηματισμό σταθερών χημικών δεσμών μεταξύ του νανοφορέα και του ενζύμου. Για το λόγο αυτό, η ύπαρξη χημικών ομάδων (π.χ. αμίνο-, καρβοξυλ-, υδροξυλ-, εποξυ- ομάδες, κ.λπ.) στην επιφάνεια των νανοϋλικών είναι υποχρεωτική για την πιθανή σύζευξη με το ένζυμο, αλλά είναι επίσης σημαντικό οι ομάδες στην επιφάνεια του ενζύμου που συμμετέχουν στον ομοιοπολικό δεσμό να μην είναι απαραίτητες για την καταλυτική του δράση⁵⁴. Κατά τη διαδικασία της ομοιοπολικής ακινητοποίησης, συνήθως απαιτείται η ενεργοποίηση του νανοϋλικού με δι-λειτουργικά αντιδραστήρια που παρέχουν περισσότερες θέσεις για τη σύνδεση των ενζύμων⁶⁰. Εν συντομία, υπάρχουν μερικά παραδοσιακά καθιερωμένα πρωτόκολλα για την ομοιοπολική ακινητοποίηση ενζύμων, π.χ. εποξυ- ενεργοποίηση, αμινο-ενεργοποίηση με γλουταραλδεΐδη, υδρόξυλ- ενεργοποίηση με βρωμιούχο κυανογόνο, και σύζευξη καρβοδιιμιδίου των καρβοξυλικών ομάδων, με επακόλουθη σύνδεση σε φαινολικές ή αμινομάδες των ενζύμων⁶¹.

Το κύριο πλεονέκτημα της ομοιοπολικής ακινητοποίησης είναι ότι, σε μια μεγάλη πληθώρα περιπτώσεων, η διάρκεια ζωής του βιοκαταλύτη παρατείνεται έναντι υψηλών θερμοκρασιών, μετουσιωτών, και οργανικών διαλυτών. Επιπλέον, σε σύγκριση με τη φυσική προσρόφηση, η ομοιοπολική ακινητοποίηση αποτρέπει τη διαρροή ενζύμου από τον νανοφορέα. Ωστόσο, η ομοιοπολική δέσμευση προκαλεί

συχνά εκτεταμένες αλλαγές στη διαμόρφωση των ενζύμων, με αποτέλεσμα την απώλεια της καταλυτική δράσης τους.

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, χρησιμοποιήθηκε ως ομοιοπολική μέθοδος ακινητοποίησης η μέθοδος της ενεργοποίησης με καρβοδιμίδια⁶². Κατά τη μέθοδο αυτή, οι ελεύθερες η αντίδραση σύζευξης που πραγματοποιείται αποτελείται από δύο συνεχόμενα βήματα (**Σχήμα B3.3**). Αρχικά, το καρβοδιμίδιο EDC (1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide) αντιδρά με τις ελεύθερες καρβοξυλ- ή/και υδροξύλ-ομάδες που βρίσκονται στην επιφάνεια του νανοϋλικού, προς σχηματισμό ενός ενδιάμεσου *O*-ακυλισοουρίας, το οποίο στη συνέχεια μπορεί να αντιδράσει με τις ελεύθερες αμινο-ομάδες των αμινοξέων που βρίσκονται στην επιφάνεια της πρωτεΐνης και να δημιουργήσει έναν αμιδικό δεσμό. Ωστόσο, το ενδιάμεσο αυτό της *O*-ακυλισοουρίας, είναι πολύ ασταθές και ευαίσθητο στην υδρόλυση. Για τον λόγο αυτό, η προσθήκη της ένωσης NHS (*N*-hydroxysuccinimide) είναι σημαντική και προτιμάται, καθώς σταθεροποιεί αυτό το ενδιάμεσο μετατρέποντας το σε έναν ημι-σταθερό εστέρα, το οποίο μπορεί σε επόμενο βήμα να αντιδράσει με τις ελεύθερες αμίνες του ενζύμου και να αυξήσει την αποτελεσματικότητα της σύζευξης, έως και 20 φορές⁶².



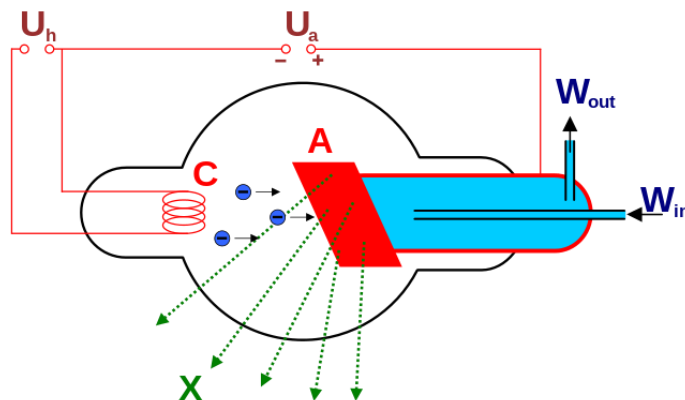
Σχήμα B3.3. Ομοιοπολική ακινητοποίηση πρωτεϊνών σε νανοϋλικά με τη χρήση καρβοδιμιδίου.

B4 ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΤΕΧΝΙΚΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ

B4.1 Περίθλαση ακτίνων X (XRD)

Οι ακτίνες X (Röntgen 1895) είναι ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία μήκους κύματος μεταξύ 10 nm-10 pm και παράγονται όταν μία δέσμη ηλεκτρονίων μεγάλης ταχύτητας προσπέσει σε έναν μεταλλικό στόχο. Η ονομασία «ακτίνες X» (δηλαδή άγνωστες), δόθηκε από την ερευνητική ομάδα του Roentgen, καθώς οι ακτίνες είχαν ξεκάθαρες ομοιότητες με το φως, αλλά δεν είχαν καμία παρόμοια ιδιότητα με αυτές της θεμελιώδους κυματικής οπτικής (πόλωση, περίθλαση, ανάκλαση και διάθλαση). Για τη σημαντική του ανακάλυψη τιμήθηκε με το πρώτο Νόμπελ Φυσικής το 1901.

Ο πιο συνηθισμένος τρόπος παραγωγής ακτίνων X είναι η πρόσκρουση ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας στην επιφάνεια ενός μετάλλου (στόχο) με μεγάλο ατομικό αριθμό (**Σχήμα B4.1**). Τα ηλεκτρόνια αυτά προσπίπτοντας στο στόχο διεγείρουν τα ηλεκτρόνια των εσωτερικών στοιβάδων του μετάλλου προκαλώντας την απόσπασή τους. Το «κενό» αυτό στην εσωτερική στοιβάδα του ατόμου καλύπτεται από ηλεκτρόνια υψηλότερων εξωτερικών ενεργειακά στοιβάδων. Η περίσσεια ενέργεια, δηλαδή η ενεργειακή διαφορά των δυο στοιβάδων, απελευθερώνεται με την εκπομπή ενός φωτονίου (ακτίνες X).



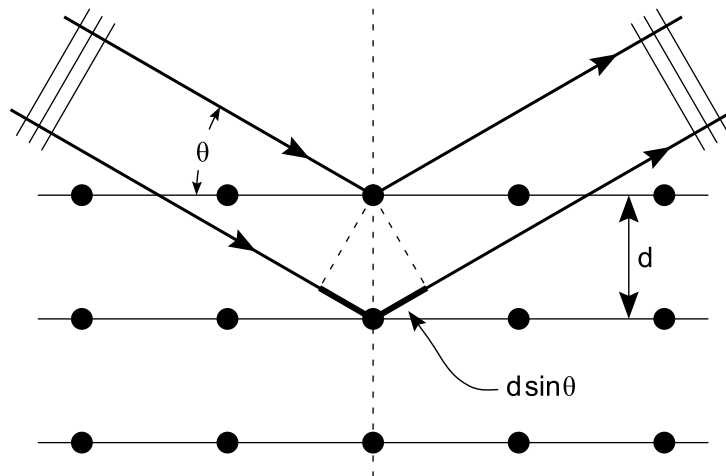
Σχήμα B4.1. Σχηματική αναπαράσταση ενός τρόπου παραγωγής ακτίνων X.

Το 1923 ο Max von Laue πρότεινε ότι το μήκος κύματος των ακτίνων X είναι της ίδιας τάξης μεγέθους με τις ενδοατομικές αποστάσεις στα κρυσταλλικά υλικά, με αποτέλεσμα οι κρύσταλλοι να δρουν ως φράγματα περίθλασης για τις ακτίνες X, όταν αυτές προσπίπτουν πάνω σε ένα κρυσταλλικό επίπεδο. Ένας ιδανικός κρύσταλλος αποτελείται από άτομα τα οποία είναι διευθετημένα στις τρεις διαστάσεις του χώρου, κατά ένα κανονικό και επαναλαμβανόμενο τρόπο, ορίζοντας κρυσταλλικά επίπεδα που χαρακτηρίζονται από τους δείκτες Miller ($h k l$). Καθώς η δέσμη των ακτίνων X προσκρούει στην κρυσταλλική επιφάνεια, ένα μέρος αυτής σκεδάζεται από τα άτομα που βρίσκονται επίπεδο της κρυσταλλικής επιφάνειας και ένα σημαντικό μέρος απορροφάται από τον κρύσταλλο. Η απαίτηση για να έχουμε συμβολή εκφράστηκε πρώτα από τον W. L. Bragg. Η περίθλαση συμβαίνει μόνο όταν η απόσταση ανάμεσα στα περιθλώμενα κύματα από διαδοχικά κρυσταλλικά επίπεδα είναι ακέραιο

πολλαπλάσιο του μήκους κύματος της ακτινοβολίας. Το φαινόμενο αυτό περιγράφεται από την εξής εξίσωση:

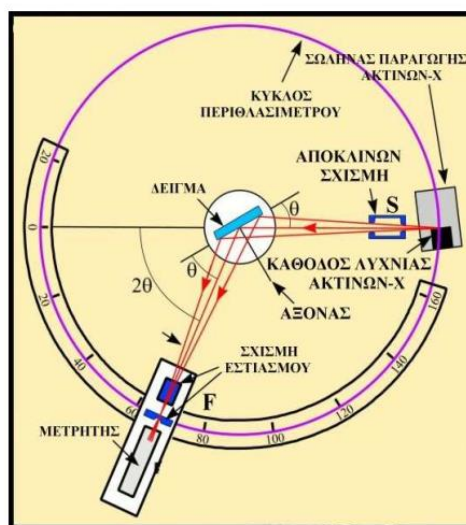
$$2d \sin\theta = n \lambda$$

Η παραπάνω εξίσωση είναι γνωστή ως νόμος του Bragg, όπου n είναι μικρός ακέραιος αριθμός που δηλώνει την τάξη της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας, d η απόσταση μεταξύ των επιπέδων στην εξεταζόμενη κρυσταλλική διεύθυνση, θ η γωνία πρόσπτωσης των ακτίνων X όπως φαίνεται στο **Σχήμα B4.2**.



Σχήμα B4.2. Πρόσπτωση των ακτίνων X στον κρύσταλλο.

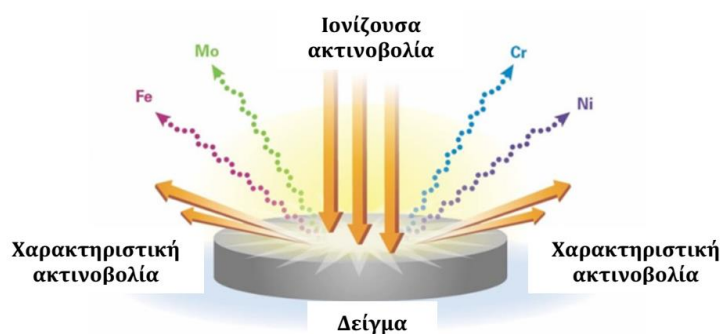
Ένα τυπικό περιθλασίμετρο αποτελείται από τα παρακάτω μέρη: ηλεκτρικό σύστημα υψηλής τάσης για την παραγωγή ακτίνων X , Λυχνία ακτίνων X , λεπτής γραμμικής εστίασης, γωνιόμετρο δύο κύκλων θ , 2θ με κοινό άξονα περιστροφής, κινητήρα κύκλων, μετρητική διάταξη, σύστημα μετατροπής ηλεκτρικού σήματος σε ψηφιακό, και ηλεκτρονικό σύστημα με ηλεκτρονικό υπολογιστή (**Σχήμα B4.3**).



Σχήμα B4.3. Διάταξη περιθλασιμέτρου.

B4.2 Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS)

Η φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων από ακτίνες X (XPS) είναι μη καταστρεπτική τεχνική και χρησιμοποιείται για τη χημική ανάλυση και την ταυτοποίηση της χημικής κατάστασης των στοιχείων στην επιφάνεια ενός νανοδομημένου υλικού. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ενεργειακή ανάλυση των ηλεκτρονίων, που εξάγονται κυρίως από εσωτερικές ηλεκτρονιακές στάθμες ατόμων του στερεού, όταν αυτό εκτίθεται σε ακτίνες X συγκεκριμένης ενέργειας. Στη φασματοσκοπία XPS το δείγμα εκτίθεται, υπό συνθήκες υπερ-υψηλού κενού, σε μία μονοχρωματική δέσμη ακτίνων X (ενέργειας $h\nu$) που προκαλεί φωτοϊονισμό και εκπομπή φωτοηλεκτρονίων. Το φάσμα XPS απεικονίζει το ενεργειακό φάσμα των εκπεμπόμενων φωτοηλεκτρονίων και αποτελείται από μία σειρά από διακριτές ταινίες που ανταποκρίνονται στις χαρακτηριστικές στοιβάδες της ηλεκτρονικής δομής του ατόμου (Σχήμα B4.4).



Σχήμα B4.4. Βομβαρδισμός του δείγματος με ιονίζουσα ακτινοβολία. Τα άτομα του δείγματος ιονίζονται σε εσωτερικά τροχιακά και στη συνέχεια αποδιεγείρονται εκπέμποντας χαρακτηριστική, για κάθε άτομο του περιοδικού πίνακα, ακτινοβολία ακτίνων X. Μέτρηση της ενέργειας και της έντασης των φωτονίων, επιτρέπει την ποιοτική και ποσοτική στοιχειακή ανάλυση του δείγματος.

Η κινητική ενέργεια E_k των εκπεμπόμενων φωτοηλεκτρονίων δίδεται από τη σχέση:

$$E_k = h\nu - E_b + \Delta\Phi$$

όπου $h=6.62 \times 10^{-23}$ Js η σταθερά του Planck, $\Delta\Phi$ η διαφορά του έργου εξόδου ανάμεσα στο στερεό και τον ανιχνευτή και E_b η ενέργεια δέσμευσης του φωτοηλεκτρονίου που προέρχεται από εσωτερική στοιβάδα (core electron). Όταν η επιφάνεια ενός στερεού εκτεθεί σε ακτίνες X κατάλληλης ενέργειας, το υλικό απορροφά διακριτά κβάντα ενέργειας με επακόλουθο την εκπομπή φωτοηλεκτρονίων. Η κατανομή της E_k αυτών (δηλ. το πλήθος των εκπεμπόμενων φωτοηλεκτρονίων συναρτήσει της κινητικής τους ενέργειας) δίνει πληροφορίες για το νανοδομημένο στερεό. Η εκπομπή του φωτοηλεκτρονίου γίνεται σε 3 στάδια:

- Στάδιο 1^ο: Απορρόφηση των ακτίνων X και διέγερση του ηλεκτρονίου από τη βασική στην τελική κατάσταση που βρίσκεται επάνω από τη στάθμη Fermi

- Στάδιο 2^ο Μεταφορά του ηλεκτρονίου στην επιφάνεια
- Στάδιο 3^ο Διαφυγή του ηλεκτρονίου στο κενό.

Αφού το φωτο-ηλεκτρόνιο δημιουργείται μέσα στο νανοϋλικό, η κυματοσυνάρτησή του φέρει πληροφορίες για το στερεό ακόμη και μετά την εκπομπή του στο κενό. Η χημική σύσταση της επιφάνειας προσδιορίζεται από τις σχετικές εντάσεις των κορυφών στο φάσμα XPS. Οι θέσεις και το σχήμα των γραμμών δίνει πληροφορίες για τη χημική κατάσταση των στοιχείων που ανιχνεύονται. Ειδικότερα, η ακριβής τιμή της ενέργειας σύνδεσης ενός ηλεκτρονίου εξαρτάται από την κατάσταση οξείδωσης του ατόμου και το τοπικό φυσικό και χημικό περιβάλλον γύρω από το άτομο. Ηλεκτρόνια από άτομα σε υψηλή κατάσταση οξείδωσης έχουν μεγαλύτερη ενέργεια σύνδεσης λόγω της επιπλέον αλληλεπίδρασης Coulomb ανάμεσα στο ηλεκτρόνιο και το ιονισμένο άτομο από το οποίο εκπέμπεται με αποτέλεσμα την εμφάνιση χημικής μετατόπισης.

B4.3 Φασματοσκοπία μέσου υπέρυθρου (IR)

Η υπέρυθη φασματοσκοπία (Infrared Spectroscopy, IR) θεωρείται σημαντική φασματοσκοπική τεχνική στην Οργανική Χημεία και στη Χημεία Υλικών, λόγω της ευκολίας λήψης φασμάτων και της σύγκρισής τους με φάσματα γνωστών οργανικών ενώσεων. Χρησιμοποιείται ευρύτατα κατά τη σύνθεση χημικών ενώσεων και για την πιστοποίηση της καθαρότητάς τους. Γενικά, όταν υπέρυθη ακτινοβολία προσπίπτει σε ένα υλικό, δύναται να το διαπεράσει, να σκεδαστεί ή να απορροφηθεί από αυτό. Η απορροφούμενη υπέρυθη ακτινοβολία συνήθως διεγείρει μόρια σε υψηλότερες στάθμες δόνησης, οι οποίες είναι κβαντισμένες. Για να επιτευχθεί αυτό πρέπει η ενέργεια της ακτινοβολίας να ισούται με τη διαφορά των δύο ενεργειακών δονητικών σταθμών.

Στην περιοχή υπέρυθρου του φάσματος της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας (IR) συμβαίνουν απορροφήσεις που οφείλονται σε δονήσεις ή κάμψεις των δεσμών των μορίων για ενώσεις με μόνιμη διπολική ροπή, που μεταβάλλεται κατά την παραμόρφωση του μορίου και απορροφούν ισχυρά στην περιοχή υπέρυθρου. Εκτός από τις δονήσεις και τις κάμψεις υπάρχουν και άλλα είδη παραμόρφωσης της δομής των μορίων, όπως όταν αυτό σείεται (wagging), κλυδωνίζεται (rocking), στρεβλώνεται (twisting), ή έχει ψαλιδωτή κίνηση (scissoring), κ.λπ.. Οι εκτάσεις δεσμών αναφέρονται στη μεταβολή του μήκους των δεσμών, ενώ οι δονήσεις κάμψης στη μεταβολή της γωνίας που σχηματίζουν οι δεσμοί. Ζώνες απορρόφησης μπορούν να προκύψουν και από άλλους τρόπους δόνησης, όπως είναι οι δονήσεις παραμόρφωσης, αιώρησης και συστροφής. Η ποσοτική σχέση μεταξύ της έντασης του φωτός που διαπερνά το δείγμα της ουσίας και τη συγκέντρωσή της στην παστίλια (πελέττα) δίνεται από τον νόμο Beer Lambert-Bouguer:

$$I = I_0 * e^{-acl}$$

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 παραπάνω σχέση, προκύπτει:

$$\log (I_0/I) = \varepsilon * c * l$$

Όπου ε είναι ο συντελεστής απόσβεσης. Ο νόμος ισχύει για μονοχρωματικό φως και για μικρές συγκεντρώσεις. Συνήθως, τα φασματοφωτόμετρα καταγράφουν το φάσμα σε γραμμική μορφή, όπου στην οριζόντια πλευρά έχουμε τις συχνότητες σε κυματαριθμούς και στην αριστερή κάθετη πλευρά έχουμε την % Διαπερατότητα (% Transmittance, T) ή Απορρόφηση (Absorbance, A):

$$A = \log (1/T) = \log (I_0/I) = \varepsilon * c * l$$

Η φασματοσκοπία IR χρησιμοποιείται κυρίως στην περιοχή $4000-650 \text{ cm}^{-1}$, ωστόσο αρκετά χρήσιμες πληροφορίες για τη δομή πολλών οργανικών ενώσεων μπορούμε να παρατηρήσουμε και στην περιοχή $400-10 \text{ cm}^{-1}$, που καλείται απώ υπέρυθρη (far infra-red). Η άπω υπέρυθρη περιοχή είναι η περιοχή της ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας όπου απορροφούν το δευτέριο, το τρίτιο, οι παραμορφώσεις του σκελετού οργανικών ενώσεων, οι δονήσεις στρέβλωσης του κορμού διαφόρων οργανικών ενώσεων, οι δονήσεις διαφόρων μοριακών δομών, οι δεσμοί υδρογόνου ($200-50 \text{ cm}^{-1}$) κ.λ.π. Στην περιοχή όμως αυτή η ευαισθησία του φασματοφωτομέτρου IR είναι περιορισμένη και οι εντάσεις των απορροφήσεων πολύ μικρές, με αποτέλεσμα ο "θόρυβος" να σκεπάζει τις ταινίες απορρόφησης. Η αδυναμία των κοινών φασματοφωτομέτρων IR (και άλλων μεθόδων φασματοσκοπίας) υπερνικήθηκε με τη φασματοσκοπία IR με μετασχηματισμό Fourier (Fourier Transform IR Spectroscopy, FTIR).

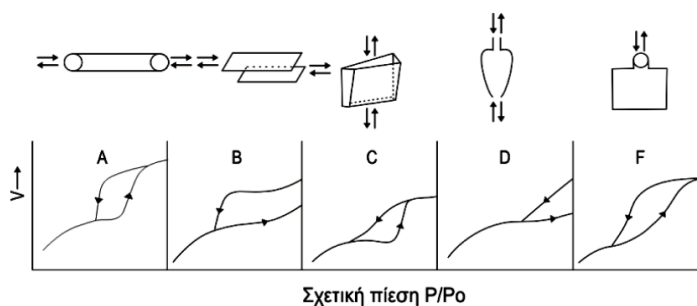
B4.4 Μετρήσεις ειδικής επιφάνειας – Ποροσιμετρία N_2

Υπάρχουν υλικά, φυσικά ή συνθετικά, που έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν (προσροφούν) πάνω στην επιφάνειά τους μόρια ή άτομα κάποιου αερίου ή υγρού. Για το λόγο αυτό χαρακτηρίζονται ως προσροφητικά υλικά. Η δέσμευση αυτή όταν οφείλεται σε ασθενείς δυνάμεις Van der Waals ($20-50 \text{ kJ/mole}$), ονομάζεται φυσική προσρόφηση, ενώ όταν δημιουργούνται ισχυροί χημικοί δεσμοί ($200-400 \text{ kJ/mole}$) μεταξύ των προσροφούμενων μορίων και των ατόμων της επιφάνειας του προσροφητικού υλικού, ονομάζεται χημική προσρόφηση.

Το φαινόμενο της προσρόφησης είναι επιφανειακό κι επομένως εξαρτάται άμεσα από την επιφάνεια του προσροφητικού. Όσο μεγαλύτερη είναι η επιφάνεια τόσο περισσότερη ποσότητα προσροφούμενου δεσμεύεται σε αυτή. Σαν επιφάνεια νοείται όχι τόσο η εξωτερική, όσο η εσωτερική επιφάνεια των πόρων του υλικού. Οι πόροι ταξινομούνται σε τρεις κατηγορίες ανάλογα με το μέγεθός τους: μακροπόροι (με διάμετρο $>50 \text{ nm}$), μεσοπόροι (με διάμετρο μεταξύ 2 και 50 nm) και μικροπόροι (με διάμετρο $<2 \text{ nm}$). Η διάμετρός τους καθορίζει το αν σε δεδομένα μόρια θα επιτραπεί ή όχι η προσρόφηση μέσα στους πόρους του υλικού.

Ο προσδιορισμός της επιφάνειας και του μεγέθους των πόρων ενός υλικού, περιλαμβάνει μια διαδικασία που βασίζεται στη φυσική προσρόφηση αδρανούς αερίου από την επιφάνεια του. Τα μόρια του αερίου προσροφώνται στην επιφάνεια στρωματικά, δηλαδή όταν καλυφθεί η επιφάνεια από ένα στρώμα μορίων του αερίου, αρχίζει να δημιουργείται δεύτερο πάνω σε αυτό κ.ο.κ.. Η επιφάνεια του υλικού εκτιμάται από το πρώτο στρώμα μορίων του αερίου που σχηματίζεται, μιας και το στρώμα αυτό είναι ανάλογο της εσωτερικής επιφάνειάς του, ενώ το μέγεθος των πόρων εκτιμάται από το συνολικό όγκο των μορίων που προσροφώνται.

Κατά την προσρόφηση της αέριας ουσίας (αέρια φάση) από το προσροφητικό υλικό (στερεή φάση), υφίσταται δυναμική ισορροπία μεταξύ των δύο φάσεων. Η ισορροπία αυτή εξαρτάται από τη θερμοκρασία του συστήματος, τη συγκέντρωση (ή τη μερική πίεση των ατμών) της ουσίας που δεν έχει προσροφηθεί και από την ποσότητα της ουσίας που έχει προσροφηθεί. Κατά συνέπεια, η ισορροπία μπορεί να δοθεί υπό μορφή διαφορετικών διαγραμμάτων ανάλογα με την παράμετρο που θεωρείται σταθερή. Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ισόθερμες καμπύλες οι οποίες δίνουν τον όγκο του προσροφημένου αερίου (ανά μονάδα μάζας προσροφητικού) συναρτήσει της πίεσεως, υπό σταθερή θερμοκρασία. Στα πορώδη υλικά, η ισόθερμη καμπύλη προσρόφησης-εκρόφησης, εμφανίζει έναν βρόχο υστέρησης. Η μορφή που έχει ο βρόχος αυτός εκφράζει τη γεωμετρική μορφή των πόρων (Σχήμα B4.5). Η φυσική εξήγηση του φαινομένου αυτού είναι ότι το προσροφούμενο εκροφάται σε μικρότερες τιμές P/P_0 από αυτές που απαιτούνται για την προσρόφησης του, δηλαδή οι πόροι γεμίζουν σε υψηλότερη σχετική πίεση από αυτή που αδειάζουν.



Σχήμα B4.5. Η γεωμετρική μορφή των πόρων ανάλογα με τη μορφή του βρόχου υστέρησης της ισόθερμης καμπύλης προσρόφησης-εκρόφησης.

Η φυσική προσρόφηση είναι φαινόμενο που εμφανίζεται σε οποιοδήποτε περιβαλλοντικές συνθήκες (πίεσης και θερμοκρασίας) αλλά είναι μετρήσιμο μόνο σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία. Κατά συνέπεια τα πειράματα μετρήσεων επιφάνειας και μεγέθους πόρων εκτελούνται σε πολύ χαμηλή θερμοκρασία, στη θερμοκρασία υγρού αζώτου (77 K σε ατμοσφαιρική πίεση). Η αρχή της μεθόδου μέτρησης έχει να κάνει με τη διαδοχική εισαγωγή στο δείγμα γνωστών ποσών αερίου αζώτου, σε θερμοκρασία 77 K. Το πορώδες στερεό προσροφά το αέριο και έτσι προκύπτει μεταβολή στο βάρος του υλικού και στη πίεση του αερίου. Μετά από κάποιο χρόνο η πίεση του αερίου παραμένει σταθερή και το βάρος του υλικού δεν αυξάνει. Το προσροφούμενο ποσό

αερίου υπολογίζεται από την πτώση της πίεσεως ή/και την αύξηση του βάρους του υλικού. Έχουν αναπτυχθεί θεωρητικά μοντέλα που οδηγούν στον προσδιορισμό της επιφάνειας ή αλλιώς της ειδικής επιφάνειας (η ανά μονάδα βάρους επιφάνεια) των υλικών και των πόρων των στερεών.

B4.4.1 Μέθοδος BET

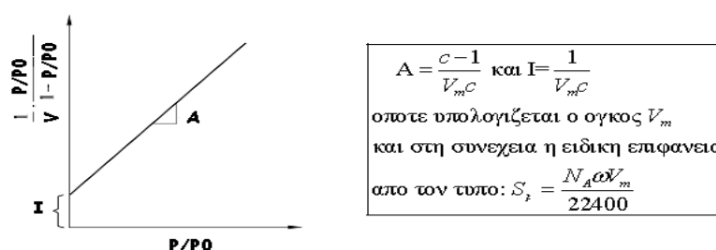
Η μέθοδος των Brunauer, Emmett και Teller (BET) είναι ένα επιτυχές μοντέλο που εξηγεί ικανοποιητικά πολλά πειραματικά αποτελέσματα και καλύπτει το σχηματισμό περισσότερων του ενός μονομοριακών στρωμάτων στην επιφάνεια του προσροφητικού. Η θεωρία αυτή είναι επέκταση της θεωρίας του Langmuir, η οποία προβλέπει το σχηματισμό ενός μόνο μονομοριακού στρώματος. Δεδομένου λοιπόν ότι δεν υπάρχει περιορισμός στο πλήθος των μονοστρωμάτων, τα μονοστρώματα δεν αλληλεπιδρούν μεταξύ τους και για κάθε μονόστρωμα ισχύει η εξίσωση του Langmuir:

$$\frac{1}{V} = \frac{1/P}{KV_m} + \frac{1}{V_m}$$

και προκύπτει η εξίσωση BET:

$$\frac{P}{V(P_0 - P)} = \frac{1}{V_m c} + \frac{c-1}{V_m c} \left(\frac{P}{P_0} \right)$$

Όπου P η μερική πίεση του προσροφούμενου, P₀ = η πίεση κορεσμού, V ο όγκος του προσροφημένου αερίου, V_m ο απαιτούμενος όγκος του αερίου για το σχηματισμό μονοστρώματος, και c σταθερά εκθετικά σχετιζόμενη με τη θερμότητα προσροφήσεως και τη λαθάνουσα θερμότητα συμπυκνώσεως. Η ειδική επιφάνεια υπολογίζεται μέσω γραφικής παράστασης (**Σχήμα B4.6**).



Σχήμα B4.6. Ένα παράδειγμα ισόθερμου BET, και η μέθοδος προσδιορισμού της ειδικής επιφάνειας, όπου N_A ο αριθμός Avogadro και ω η έκταση επιφάνειας που καταλαμβάνει προσροφώμενο ένα μόριο αερίου.

B4.4.2 Μέθοδος BJH

Από το φαινόμενο της υστέρησης στην ισόθερμη προσρόφησης–εκρόφησης προκύπτουν πληροφορίες για το μέγεθος (ακτίνα r_p, επιφάνεια S_p, όγκος V_p) και την κατανομή του μεγέθους των πόρων, με βάση τη μέθοδο των Barret, Joyner και Halenda

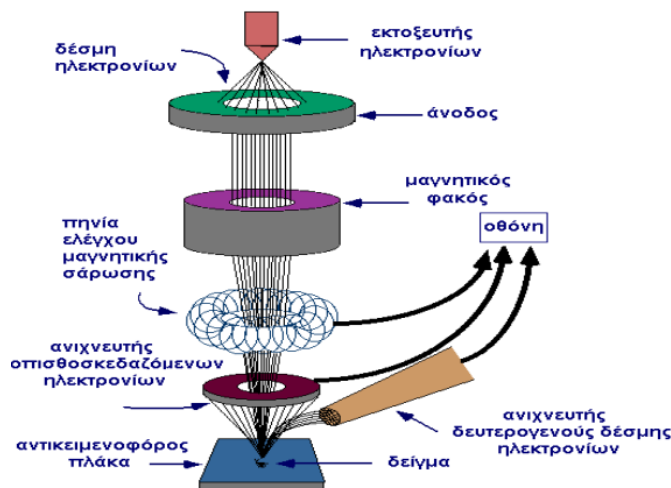
(BJH). Οι μακροπόροι προσδιορίζονται με ποροσιμετρία Hg και οι μεσοπόροι με ποροσιμετρία N₂. Στη ποροσιμετρία N₂ από την καμπύλη εκρόφησης και με βάση την εξίσωση του Kelvin προκύπτει η ακτίνα των πόρων συναρτήσει των πιέσεων της ισοθέρμου.

B4.5 Ηλεκτρονική Μικροσκοπία Σάρωσης

Με την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) λαμβάνονται πληροφορίες για τη μορφολογία και τοπογραφία της επιφάνειας των στερεών. Πρόκειται για τεχνική μικροσκοπίας με πολύ καλύτερη διακριτική ικανότητα σε σύγκριση με την οπτική μικροσκοπία γιατί χρησιμοποιεί δέσμη ηλεκτρονίων υψηλής ενέργειας. Η μεγέθυνση του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης κυμαίνεται από 100 έως 100000 φορές ανάλογα με το δείγμα. Επιπλέον το μικροσκόπιο συνήθως είναι εφοδιασμένο με ένα σύστημα ποσοτικής ανάλυσης (EDX) μιας περιορισμένης περιοχής του δείγματος. Έτσι υπάρχει η δυνατότητα προσδιορισμού της ετερογένειας των δειγμάτων. Το πεδίο εφαρμογών της μεθόδου εκτείνεται σε μεγάλο εύρος, από την βιοϊατρική έρευνα μέχρι την μελέτη υλικών.

Στο σαρωτικό ηλεκτρονικό μικροσκόπιο, κατά την εξέταση του δείγματος γίνεται παλινδρομική σάρωση της επιφάνειας του από μια εξαιρετικά εστιασμένη δέσμη ηλεκτρονίων και τα ηλεκτρόνια τα οποία σκεδάζονται από το δείγμα δίνουν τις πληροφορίες για τη μορφολογία του. Η δέσμη ηλεκτρονίων σαρώνει μια επιφάνεια σε ευθεία γραμμή, επιστρέφει αμέσως στην αρχική της θέση και μετατοπίζεται προς τα κάτω κατά ένα σταθερό διάστημα. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται έως ότου σαρωθεί η επιθυμητή περιοχή της επιφάνειας. Με τη διαδικασία αυτή λαμβάνονται από την επιφάνεια οπισθοσκεδαζόμενα και δευτερογενή ηλεκτρόνια. Έτσι λαμβάνεται σήμα που αντιστοιχεί στο δεδομένο σημείο της επιφάνειας και αποθηκεύεται στον υπολογιστή όπου τελικά μετατρέπεται σε εικόνα.

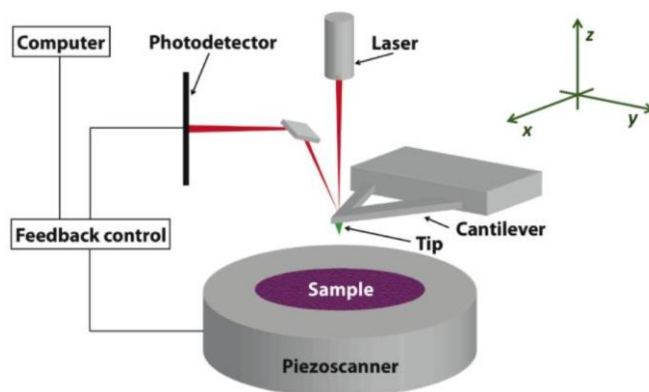
Στο **Σχήμα B4.7** παριστάνεται σχηματικά ο τρόπος λειτουργίας του σαρωτικού ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Η όλη διάταξη περικλείεται από έναν θάλαμο κενού. σύμφωνα με το σχήμα, αρχικά, παράγεται δέσμη ηλεκτρονίων με έναν εκτοξευτή ηλεκτρονίων. Η δέσμη αυτή, στη συνέχεια επιταχύνεται μέσω μιας ανόδου κι έπειτα συγκεντρώνεται και κατευθύνεται προς το δείγμα με τη βοήθεια φακών και μαγνητικών πεδίων. Τα δευτερογενή και οπισθοσκεδαζόμενα ηλεκτρόνια που προκύπτουν ανιχνεύονται με τη βοήθεια ανιχνευτών, μετατρέπονται σε σήματα και στέλνονται σε οθόνη παρόμοια με αυτή της τηλεόρασης όπου παράγεται η εικόνα.



Σχήμα B4.7. Σχηματική απεικόνιση του τρόπου λειτουργίας του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης.

B4.6 Μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM)

Το Μικροσκόπιο Ατομικών Δυνάμεων (Atomic Force Microscopy) δουλεύει στηριζόμενο στη σάρωση που εκτελεί μια λεπτή κεραμική ή από ημιαγώγιμο υλικό ακίδα, πάνω από μια επιφάνεια, κατά τον ίδιο περίπου τρόπο που η βελόνα ενός πικάπ σαρώνει τα αυλάκια ενός δίσκου βινυλίου. Η αιχμή της ακίδας τοποθετείται στην άκρη ενός μοχλοβραχίονα που μπορεί να ταλαντεύεται ενώ είναι στερεωμένος στο άλλο άκρο (Σχήμα B4.8). Καθώς η ακίδα έλκεται ή απωθείται από την επιφάνεια που σαρώνει, ο μοχλοβραχίονας αυτός αποκλίνει. Η σχετική κίνηση του δείγματος ως προς την ακίδα, στο επίπεδο xy αλλά και στον κατακόρυφο άξονα, ελέγχεται μέσω ενός σαρωτή πιεζοκρυστάλλου. Το μέγεθος της απόκλισης καταγράφεται από μια δέσμη λέιζερ η οποία ανακλάται σε αμβλεία γωνία από το άκρο του μοχλοβραχίονα που ταλαντώνεται. Το γράφημα της απόκλισης της δέσμης λέιζερ σε σχέση με τη θέση της ακίδας πάνω στην επιφάνεια του δείγματος, μας δίνει την ανάλυση της επιφάνειας σε όρη και κοιλάδες που περιέχει αυτή. Μας δίνει δηλαδή τη μορφολογία της επιφάνειας.



Σχήμα B4.8. Σχηματική αναπαράσταση της διάταξης AFM.

Το AFM μπορεί να δουλέψει με την ακίδα σε επαφή με το δείγμα (contact mode), είτε με την ακίδα να χτυπά ελαφρά την επιφάνεια (tapping mode). Τότε καταγράφονται οι μεταβολές που παρατηρούνται ως προς τη σκληρότητα της επιφάνειας ή ως προς την τάση προσκόλλησης της ακίδας στην επιφάνεια. Με τη μέθοδο της μικροσκοπίας ατομικής δύναμης, πετυχαίνουμε διακριτική ικανότητα επί της επιφανείας από Angstroms μέχρι μερικά μικρά του μέτρου. Η ακτίνα της ακίδας είναι της τάξης των 20 nm. Η δύναμη που ασκείται μεταξύ ακίδας και επιφάνειας είναι της τάξης των 10^{-11} έως 10^{-6} N.

B4.7 Θερμική ανάλυση (DTA/TGA)

Όταν μία ουσία θερμαίνεται υφίσταται μεταβολή της κατάστασης της, όπως για παράδειγμα αλλαγή φάσεως (τήξη, εξάτμιση κλπ) 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 θερμοβαρυτική ανάλυση (TGA). Όσον αφορά στη διαφορική θερμική ανάλυση (DTA), τόσο το εξεταζόμενο δείγμα όσο και το υλικό αναφοράς (που είναι συνήθως α-αλούμινα) υπόκεινται σε ένα ελεγχόμενο πρόγραμμα θέρμανσης ή ψύξης, το οποίο είναι συνήθως γραμμικό σε σχέση με το 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 την διάρκεια του φαινομένου αυτού η θερμοκρασία του δείγματος T_s εμφανίζεται μικρότερη από αυτήν της αναφοράς T_r , η οποία ακολουθεί την προγραμματισμένη θέρμανση.

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

ΜΕΡΟΣ Γ' – ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ

Γ1 ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ

Τα χημικά αντιδραστήρια, οι διαλύτες, τα οξέα, καθώς και τα ένζυμα, που χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των πειραμάτων της παρούσας εργασίας, παρατίθενται στον **Πίνακα Γ1.1**.

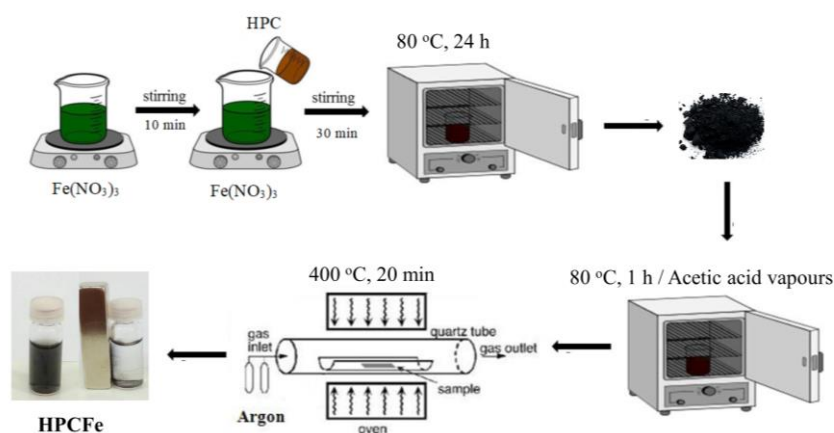
Πίνακας Γ1.1. Αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα διπλωματική εργασία.

HPC Hierarchical Porous Carbon	Ιεραρχημένοι Πορώδεις Άνθρακες (Δείγμα 4-1)
CH₃COOH Acetic acid anhydrous	Οξικό οξύ , καθαρότητας 100% από την Merck (1.00063.2511)
H₂O	Απεσταγμένο νερό
Fe(NO₃)₃ · 9H₂O Iron (III) nitrate nonahydrate	Νιτρικός σίδηρος , καθαρότητας 98+% από την Sigma-Aldrich (21,682-8)
KBr Potassium bromide	Βρωμιούχο κάλλιο , για φασματοσκοπία υπερύθρου, από την Merck (104907)
Cellulase Cellulase from <i>Trichoderma reesei</i> , ATCC 26921	Κυτταρινάση από <i>Trichoderma reesei</i> , από την Sigma-Aldrich (C2730)
bgl b-glucosidase from almonds	β-Γλυκοσιδάση από αμύγδαλα, από την Sigma-Aldrich (G0395)
C₁₀H₁₁NO₄ p-Nitrophenyl butyrate (pNPB)	Παρα-νιτροφαινυλ βουτυλεστέρας , καθαρότητας 98+% από την Sigma-Aldrich (N9876)
C₇H₄N₂O₇ 3,5-Dinitrosalicylic acid (DNSA)	3,5-Δινιτροσαλικυλικό οξύ , για το αντιδραστήριο DNSA, από την Sigma-Aldrich (D0550)
KNaC₄H₄O₆·4H₂O Potassium sodium tartrate tetrahydrate	Τρυγικό νατριούχο κάλιο , για το αντιδραστήριο DNSA, από την Sigma-Aldrich (S2377)
AVICEL PH-101 Microcrystalline cellulose	Μικροκρυσταλλική κυτταρίνη , από την Sigma-Aldrich (11365)
C₈H₁₆O₈ Carboxymethyl cellulose (CMC)	Καρβοξυμεθυλο-κυτταρίνη , από την Sigma-Aldrich (C5678)
C₆H₁₂O₆ D(+)-Glucose	D(+)-γλυκόζη , από την Sigma-Aldrich (G8270)
C₄H₅NO₃ N-Hydroxysuccinimide (NHS)	N-υδροξυσουκινιμίδιο , από την Sigma-Aldrich (130672)
C₈H₁₇N₃ · HCl N-(3-Dimethyl aminopropyl)-N-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC)	Χλωριδίο του 1-αιθυλο-3-(3-διμεθυλαμινοπροπυλο)καρβοδιιμιδίου , από την Sigma-Aldrich (03450)
C₈H₁₈N₂O₄S 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine-ethanesulfonic acid (HEPES)	4-(2-υδροξυαιθυλ)πιπεραζινο-1-αιθανοσουλφονικό οξύ , από την Sigma-Aldrich (H3375)

Γ2 ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

Γ2.1 Σύνθεση μαγνητικού ιεραρχημένου πορώδους άνθρακα (HPCFe)

Η αρχική σύνθεση των νανοσωματιδίων HPC έγινε στα πλαίσια προηγούμενων διπλωματικών, και πραγματοποιήθηκε σύμφωνα με τη βιβλιογραφία⁶³, τα οποία και αποτέλεσαν την αρχική πρώτη ύλη για τη σύνθεση του HPCFe. Για τη σύνθεση του HPCFe, 100 mg νιτρικού σιδήρου ($(\text{Fe}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O})$) διαλυτοποιήθηκαν σε 10 mL μεθανόλης. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 100 mg HPC στο διάλυμα νιτρικού σιδήρου και το μείγμα επώαστηκε σε θερμοκρασία δωματίου για 30 min, υπό μαγνητική ανάδευση. Προκειμένου να απομακρυνθεί η μεθανόλη, το μείγμα τοποθετήθηκε στους 80 °C για όλο το βράδυ. Η μαύρη σκόνη που προέκυψε εκτέθηκε σε ατμούς οξικού οξέος στους 80 °C για 1 h (ώστε να προκύψουν ομάδες οξυγόνου) και στη συνέχεια ξηράνθηκε στους 80 °C για 15 min προκειμένου να απομακρυνθεί η περίσσεια του οξικού οξέος που δεν προσροφήθηκε. Τέλος, το δείγμα πυρολύθηκε στους 400 °C για 20 min, με ρυθμό θέρμανσης 10 °C/min υπό ατμόσφαιρά αργού (Ar), οδηγώντας στη σύνθεση των υβριδικών νανοσωματιδίων **HPCFe**. Η πειραματική πορεία περιγράφεται σχηματικά στο παρακάτω σχήμα (Σχήμα Γ2.1).



Σχήμα Γ2.1. Σχηματική αναπαράσταση της πειραματικής πορείας που ακολουθήθηκε για την σύνθεση του HPCFe.

Γ2.2 Ακίνητοποίηση ενζύμων στο HPCFe

Γ2.2.1 Ομοιοπολική ακίνητοποίηση ενζύμων στο HPCFe

Το ένζυμο κυτταρινάση ακίνητοποιήθηκε ομοιοπολικά στο υβριδικό μαγνητικό νανοϋλικό HPCFe με τη βοήθεια παραγόντων σύζευξης όπως είναι το EDC και το NHS. Αυτοί οι παράγοντες μπορούν να συνδέσουν τις υδροξυλομάδες και καρβοξυλομάδες του νανουλικού με τις ελεύθερες αμινομάδες του ενζύμου. Αρχικά, 4 mg HPCFe μεταφέρθηκαν σε 6 mL διαλύματος HEPES (50 mM, pH 7.0) και το μείγμα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 30 min, ώστε να επιτευχθεί η διασπορά του νανουλικού. Μετά τη διασπορά του HPCFe, προστέθηκαν 1.2 mL υδατικού διαλύματος EDC (από αρχικό διάλυμα 10 mg mL⁻¹) και 2.3 mL υδατικού διαλύματος

NHS (από αρχικό διάλυμα 50 mg mL^{-1}) και ακολούθησε επώαση του μείγματος στους $30 \text{ }^\circ\text{C}$ για 30 min , υπό ανάδευση. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε εξωτερικό μαγνητικό πεδίο ώστε να συγκρατήσει το ενεργοποιημένο νανοϋλικό και να απομακρυνθεί η περίσσεια των EDC και NHS. Ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις, με διάλυμα HEPES (50 mM , $\text{pH } 7.0$), και πραγματοποιήθηκε επανα-διασπορά του ενεργοποιημένου HPCFe, σε 6 mL διαλύματος HEPES (50 mM , $\text{pH } 7.0$). Σε επόμενο βήμα, στο δείγμα του νανοϋλικού προστέθηκε 1 mL που περιείχε διαφορετικές ποσότητες του ενζύμου cellulase ($0.3\text{-}3 \text{ mg mL}^{-1}$) και το μείγμα επώαστηκε στους $30 \text{ }^\circ\text{C}$ για 1 h , υπό ανάδευση. Ο νανοβιοκαταλύτης που σχηματίστηκε συλλέχθηκε με την εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε για προσδιορισμό πρωτεϊνικού φορτίου, με τη μέθοδο Bradford⁶⁴. Για να απομακρυνθεί η περίσσεια του ενζύμου που δεν ακινητοποιήθηκε, ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα οξικών (100 mM , $\text{pH } 5.0$) και το δείγμα αφυδατώθηκε σε άνυδρο πήκτωμα πυριτίου (silica gel) στους $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Ο νανοβιοκαταλύτης επισημαίνεται ως **HPCFe-cellulase**.

Το ίδιο ακριβώς πρωτόκολλο χρησιμοποιήθηκε και στην περίπτωση του ενζύμου β-γλυκοσιδάση (bgl), με τη μόνη διαφορά ότι ως ρυθμιστικό διάλυμα χρησιμοποιήθηκε ρυθμιστικό διάλυμα κιτρικού-φωφορικού (100 mM , $\text{pH } 5.0$). Σε αυτή την περίπτωση, ο νανοβιοκαταλύτης επισημαίνεται ως **HPCFe-bgl**.

Γ2.2.2 Μη ομοιοπολική ακινητοποίηση ενζύμων στο HPCFe

Το ένζυμο cellulase ακινητοποιήθηκε μη ομοιοπολικά στο υβριδικό μαγνητικό νανοϋλικό HPCFe μέσω φυσικής προσρόφησης. Αρχικά, σε 3 mg HPCFe προστέθηκαν 5 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικών (100 mM , $\text{pH } 5.0$) και το μίγμα τοποθετήθηκε σε λουτρό υπερήχων για 30 min , ώστε να επιτευχθεί η διασπορά του νανοϋλικού. Μετά τη διασπορά του HPCFe, προστέθηκαν διαφορετικές ποσότητες του ενζύμου cellulase και το μίγμα επώαστηκε στους $30 \text{ }^\circ\text{C}$ για 1 h , υπό ανάδευση. Ο νανοβιοκαταλύτης που σχηματίστηκε συλλέχθηκε με την εφαρμογή εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Το υπερκείμενο αποθηκεύτηκε για προσδιορισμό πρωτεϊνικού φορτίου, με τη μέθοδο Bradford⁶⁴. Για να απομακρυνθεί η περίσσεια του ενζύμου που δεν ακινητοποιήθηκε, ακολούθησαν τρεις εκπλύσεις με διάλυμα ρυθμιστικού διαλύματος οξικών (0.1 M , $\text{pH } 5.0$) και το δείγμα αφυδατώθηκε σε άνυδρο πήκτωμα πυριτίου (silica gel) στους $4 \text{ }^\circ\text{C}$.

Γ2.2.3 Συν-ακινητοποίηση ενζύμων στο HPCFe

Τα ένζυμα κυτταρινάση και β-γλυκοσιδάση ακινητοποιήθηκαν ομοιοπολικά στο υβριδικό μαγνητικό νανοϋλικό HPCFe με τη βοήθεια των παραγόντων σύζευξης EDC και το NHS. Το πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν ίδιο με αυτό που περιγράφεται στην **Παράγραφο Γ2.2.1**, με τις εξής διαφορές:

- Το ρυθμιστικό διάλυμα που χρησιμοποιήθηκε για τη διαλυτοποίηση των ενζύμων ήταν το ρυθμιστικό διάλυμα οξικών (0.1 M και $\text{pH } 5.0$).
- Στο στάδιο προετοιμασίας των ενζύμων δημιουργήθηκαν δυο διαφορετικά διαλύματα για το κάθε ένζυμο. Πιο συγκεκριμένα, για το διάλυμα της β-γλυκοσιδάσης ζυγίστηκαν 2 mg ενζύμου και διαλυτοποιήθηκαν σε $500 \text{ }\mu\text{L}$

ρυθμιστικό διάλυμα οξικών (0.1 M και pH 5.0) και για το διάλυμα της κυτταρινάσης αναμίχθηκαν 250 μ L ρυθμιστικό διάλυμα οξικών (0.1 M και pH 5.0) με 250 μ L ενζύμου. Τα δύο διαφορετικά ενζυμικά διαλύματα αναμίχθηκαν προκειμένου ο τελικός όγκος για το ένζυμο να είναι 1 mL, όπως απαιτείται στο πρωτόκολλο.

Σε αυτή την περίπτωση, ο δι-ενζυμικός νανοβιοκαταλύτης επισημαίνεται ως **HPCFe-cellulase-bgl**.

G2.3 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας ακινητοποιημένων ενζύμων στο HPCFe

G2.3.1 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας κυτταρινάσης

Η δραστηριότητα της ελεύθερης και ακινητοποιημένης κυτταρινάσης προσδιορίστηκε χρησιμοποιώντας τη μέθοδο DNSA⁶⁵. Εν συντομία, 0.05 mL ενζύμου προστέθηκαν σε 0.45 mL διαλύματος 1% w/v CMC (διαλυμένο σε 0.1 M ρυθμιστικό διάλυμα οξικών, pH 5.0). Το μίγμα της αντίδρασης επώαστηκε για 15 λεπτά στους 50 °C. Στη συνέχεια, έγινε λήψη 0.25 mL από την αντίδραση και προστέθηκαν σε 0.25 mL DNSA, και το μίγμα τοποθετήθηκε σε υδατόλουτρο για βρασμό (100 °C) για 5 λεπτά. Μετά το πέρας του βρασμού, τα δείγματα μεταφέρθηκαν σε πάγο και προστέθηκαν 2 mL απεσταγμένου νερού στο καθένα. Ο σχηματισμός χρώματος για όλα τα δείγματα προσδιορίστηκε με μέτρηση της απορρόφησης στα 540 nm σε φασματοφωτόμετρο ορατού-υπεριώδους (UV-Vis) της εταιρείας Shimadzu (Τόκιο, Ιαπωνία). Οι τιμές απορρόφησης κάθε δείγματος μετατράπηκαν σε ποσότητα παραγόμενης γλυκόζης, χρησιμοποιώντας μια πρότυπη καμπύλη αναφοράς της γλυκόζης. Μία μονάδα (unit, U) δραστηριότητας ορίστηκε ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση 1 μ mol αναγωγικού σακχάρου ανά λεπτό.

Η δραστηριότητα της κυτταρινάσης μελετήθηκε επιπλέον για διαφορετικές τιμές pH, καθώς και για διαφορετικές θερμοκρασίες.

G2.3.2 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας β -γλυκοσιδάσης

Η δραστηριότητα β -γλυκοσιδάσης προσδιορίστηκε καταγράφοντας φωτομετρικά την αντίδραση υδρόλυσης του 4-νιτροφαινυλ- β -D-γλυκοπυρανοζιδίου (pNPG), το οποίο μετατρέπεται σε γλυκόζη και στο έγχρωμο (κίτρινο) προϊόν 4-νιτροφαινόλη (pNP), στα 405 nm. Σε μια τυπική διαδικασία το μείγμα της αντίδρασης περιέχει 100 μ L του νανοβιοκαταλύτη HPCFe-bgl (τελικής συγκέντρωσης 0.1 mg/mL), και 900 μ L pNPG (τελικής συγκέντρωσης 2 mM). Το μίγμα pNPG και ενζύμου επώαστηκε για 10 min στους 50 °C και στις 750 rpm. Μετά το πέρας των 10 min για να τερματίσει η αντίδραση προστέθηκαν 500 μ L από διάλυμα 10 % w/v ανθρακικού νατρίου (Na_2CO_3) 10% w/v. Στη συνέχεια ακολούθησε φυγοκέντρηση για 5 min στις 12,000 rpm και φωτομέτρηση στα 410 nm (Spectrophotometer Shimadzu, UV-1601) και προσδιορίστηκε η δραστηριότητα της β -γλυκοσιδάσης μέσω της συγκέντρωσης του pNP και την χρήση κατάλληλης πρότυπης καμπύλης. Ένα Unit (U) β -γλυκοσιδάσης

ορίζεται ως η ποσότητα του ενζύμου που απαιτείται για την απελευθέρωση ενός μολε pNP ανά λεπτό στις δεδομένες πειραματικές συνθήκες.

Γ2.3.3 Προσδιορισμός ενζυμικής δραστηριότητας του συν-ακινητοποιημένου δι-ενζυμικού συστήματος

Το πρωτόκολλο για τη μέτρηση της δραστηριότητας των ομοιοπολικά συν-ακινητοποιημένων ενζύμων, κυτταρινάση και β-γλυκοσιδάση, στο HPCFe ήταν ίδιο με αυτό που περιγράφεται στην **Παράγραφο Γ2.3.1** με μόνη διαφορά ότι το ενζυμικό διάλυμα είχε τελική συγκέντρωση 1 mg/mL συν-ακινητοποιημένων ενζύμων.

Η δραστηριότητα του συν-ακινητοποιημένου δι-ενζυμικού συστήματος μελετήθηκε επιπλέον για διαφορετικές τιμές pH, καθώς και για διαφορετικές θερμοκρασίες.

Γ2.4 Προσδιορισμός ενζυμικής σταθερότητας των ακινητοποιημένων ενζύμων στο HPCFe

Γ2.4.2 Προσδιορισμός ενζυμικής σταθερότητας κυτταρινάσης

Η σταθερότητα της ελεύθερης και της ακινητοποιημένης κυτταρινάσης σε μελετήθηκε επωάζοντας τα ένζυμα σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών (0.1 M, pH 5.0) για διαφορετικά χρονικά διαστήματα, στους 50 °C, απουσία του υποστρώματος CMC. Ο προσδιορισμός της εναπομείνουσας δραστηριότητας έγινε με τη χρήση του πρωτοκόλλου DNSA, όπως περιεγράφηκε στην **Παράγραφο Γ2.3.1**.

Η σταθερότητα της κυτταρινάσης μελετήθηκε επιπλέον για διαφορετικές θερμοκρασίες.

Γ2.5 Προσδιορισμός επαναχρησιμοποίησης των ακινητοποιημένων ενζύμων στο HPCFe

Γ2.5.1 Προσδιορισμός επαναχρησιμοποίησης της ακινητοποιημένης κυτταρινάσης

Για την μελέτη επαναχρησιμοποίησης του ναοβιοκαταλύτη HPCFe-cellulase χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση υδρόλυσης της κυτταρίνης Avicel PH101. Αρχικά, 2 mg ακινητοποιημένου ενζύμου προστέθηκαν σε 2 mL ρυθμιστικού διαλύματος οξικών (0.1 M, pH 5.0), που περιείχε 3 mg ml⁻¹ Avicel PH101 και επώαστηκε στους 50 °C. Μετά από κάθε καταλυτικό κύκλο (24 ώρες ενζυμικής υδρόλυσης), η ακινητοποιημένη κυτταρινάση διαχωρίστηκε και ανακτήθηκε χρησιμοποιώντας εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, εκπλύθηκε με ρυθμιστικού διαλύματος οξικών (0.1 M, pH 5.0) και επαναλήφθηκε ο νέος καταλυτικός κύκλος με φρέσκο διάλυμα Avicel. Τα συνολικά αναγωγικά σάκχαρα προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο DNSA, όπως περιεγράφηκε στην **Παράγραφο Γ2.3.1**. Η δραστηριότητα της ακινητοποιημένης κυτταρινάσης στον πρώτο καταλυτικό κύκλο αντιπροσώπευε την 100% δραστηριότητα. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

Γ2.5.2 Προσδιορισμός επαναχρησιμοποίησης του συν-ακίνητοποιημένου δι-εζυμικού συστήματος

Για την μελέτη επαναχρησιμοποίησης του νανοβιοκαταλύτη HPCFe-cellulase χρησιμοποιήθηκε η αντίδραση υδρόλυσης της CMC. Το πρωτόκολλο για τη μελέτη των κύκλων επαναχρησιμοποίησης των συν-ακίνητοποιημένων ενζύμων, κυτταρινάση και β-γλυκοσιδάση, σε HPC-Fe ήταν ίδιο με αυτό που περιγράφεται στην **Παράγραφο Γ2.3.1** με μόνη διαφορά ότι το ενζυμικό διάλυμα ήταν συγκέντρωσης 0.5 mg/mL συν-ακίνητοποιημένων ενζύμων. Το συν-ακίνητοποιημένο δι-ενζυμικό σύστημα διαχωρίστηκε και ανακτήθηκε χρησιμοποιώντας εξωτερικό μαγνητικό πεδίο, εκπλύθηκε με ρυθμιστικό διάλυμα οξικών (0.1 M, pH 5.0) και επαναλήφθηκε ο νέος καταλυτικός κύκλος με φρέσκο διάλυμα CMC. Η δραστηριότητα των συν-ακίνητοποιημένων ενζύμων στον πρώτο καταλυτικό κύκλο αντιπροσώπευε την 100% δραστηριότητα. Όλα τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν εις διπλούν.

Γ5 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ ΚΑΙ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΔΙΑΤΑΞΕΙΣ ΤΩΝ ΟΡΓΑΝΩΝ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΥ

Για τη σύνθεση των υλικών χρησιμοποιήθηκαν οι ακόλουθες εργαστηριακές συσκευές: θερμαινόμενοι αναδευτήρες της εταιρείας Velp Scientifica, φυγόκεντρος Z 206 A της εταιρείας HERMLE, πυριαντήριο Venticell της εταιρείας MMM (Medcenter Einrichtungen GmbH), αναλυτικός ζυγός ακριβείας 0.1 mg Kern-770, λουτρό υπερήχων (Sonication) της εταιρείας Branson, αναδευτήρας Vortex-Genie της εταιρείας Scientific Industries.

Για τον χαρακτηρισμό των υλικών και των ακινητοποιημένων ενζύμων σε νανοϋλικά χρησιμοποιήθηκαν οι τεχνικές περίθλαση ακτίνων X, θερμικές μετρήσεις DTA/TGA, φασματοσκοπίες μέσου υπερύθρου, φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X, μετρήσεις προσρόφησης-εκρόφησης N₂, ηλεκτρονικές μικροσκοπίες σάρωσης και ατομικής δύναμης.

Γ5.1 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 δευτερολέπτων το κάθε βήμα. Τα δείγματα τα οποία βρίσκονται υπό την μορφή σκόνης αλέστηκαν σε γουδί από αχάτη και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε γυάλινο δειγματοφορέα και πιέστηκαν ώστε η επιφάνεια να είναι επίπεδη.

Γ5.2 Φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων-X (XPS)

Τα φάσματα XPS ελήφθησαν σε συνθήκες υπέρ-υψηλού κενού με ένα SPECS GmbH στο Τμήμα Φυσικής του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Το όργανο είναι εξοπλισμένο με μία μονοχρωματική πηγή ακτίνων-X MgK α ($h\nu = 1253.6 \text{ eV}$) κι έναν ημισφαιρικό αναλυτή Phoibos-100. Τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε υποστρώματα πυριτίου και παρέμειναν σε υψηλό κενό πριν τοποθετηθούν στο θάλαμο μέτρησης. Η πίεση ρυθμίστηκε στα $5 \cdot 10^{-10} \text{ mbar}$, η ενεργειακή ανάλυση στα 1.18eV και η γωνία πρόσπτωσης του φωτοηλεκτρονίου στις 45° . Όλα τα φάσματα καταγράφηκαν με μέσο όρο 3 σαρώσεων, με ενεργειακό βήμα 0.05 eV και χρόνο παραμονής 1 sec. Η ανάλυση των φασμάτων και ο διαχωρισμός των κορυφών έγινε με το λογισμικό Winspec, το οποίο αναπτύχθηκε στο Laboratoire Interdisciplinaire de Spectroscopie Electronique του Πανεπιστημίου του Namur, στο Βέλγιο.

Γ5.3 Φασματοσκοπία μέσου υπερύθρου (IR)

Τα φάσματα μέσου υπερύθρου με μετασχηματισμό Fourier, καταγράφηκαν στην περιοχή $4000\text{-}400 \text{ cm}^{-1}$ σε 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 $400\text{-}4000 \text{ cm}^{-1}$ με

διακριτική ικανότητα 4 cm^{-1} . Τα δείγματα 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 αυτόν τον τρόπο αποφεύγονται φαινόμενα σκέδασης, τα οποία επιδρούν αρνητικά στην ποιότητα του φάσματος. Στη συνέχεια, το μίγμα των κόκκων τοποθετήθηκε σε καλούπι και συμπιέστηκε μονοαξονικά (7 N) με υδραυλική πρέσα Specac, ώστε να δημιουργηθεί συμπιεσμένο δισκίο διαμέτρου 1 cm και ύψους 1-1.5 mm.

Γ5.4 Ποροσιμετρία προσρόφησης-εκρόφησης αζώτου

Οι ισόθερμες προσρόφησης – εκρόφησης αζώτου (N_2) καταγράφηκαν σε θερμοκρασία υγρού αζώτου (77 K) με το ποροσίμετρο Thermo Finnigan Sorptomatic62 1990 του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η ειδική επιφάνεια των δειγμάτων προσδιορίστηκε με την μέθοδο BET (Brunauer – Emmett - Teller) χρησιμοποιώντας τα σημεία προσρόφησης σε σχετικές πιέσεις P/P0 από 0.01 έως 1. Από τα σημεία εκρόφησης της ισόθερμης καμπύλης υπολογίστηκε το μέγεθος των πόρων και η κατανομή του μεγέθους των πόρων με την μέθοδο BJH (Barret – Joyner - Halenda). Όλα τα δείγματα, πριν υποβληθούν στις μετρήσεις ειδικής επιφάνειας, απαερώθηκαν σε θερμοκρασία 120 °C για 18 ώρες σε υψηλό κενό (10^{-6} mbar).

Γ5.5 Εικόνες ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (SEM)

Η μορφολογία της επιφάνειας των δειγμάτων προσδιορίστηκε με ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης εκπομπής πεδίου (Field Emission Scanning Electron Microscopy, FE-SEM) χρησιμοποιώντας ηλεκτρονικό μικροσκόπιο SEM Zeiss Gemini 500 (Oberkochen, Germany) του Τμήματος Επιστήμης και Μηχανικής Υλικών, του Πανεπιστημίου Cornell (Αμερική). Πριν την ανάλυση SEM τα δείγματα τοποθετήθηκαν σε ταινία άνθρακα διπλή όψης και ψεκάστηκαν-επικαλύφθηκαν με άνθρακα. Η στοιχειακή σύσταση των δειγμάτων μελετήθηκε με φασματοσκοπία ενεργειακής διασποράς (SEM/EDX).

Γ5.6 Μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM)

Οι εικόνες AFM ελήφθησαν με μικροσκόπιο ατομικής δύναμης Bruker Multimode Nanoscope 3D του Τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Η τεχνική που χρησιμοποιήθηκε για την λήψη των εικόνων ήταν αυτή της περιοδικής επαφής (Tapping Mode). Χρησιμοποιήθηκαν ακίδες πυριτίου τύπου TAP300-G συχνότητας $<10 \text{ nm}$ και σταθερά δύναμης $\sim 20\text{--}75 \text{ N m}^{-1}$. Τα δείγματα που μετρήθηκαν εναποτέθηκαν σε υποστρώματα πυριτίου (Si-wafers). Για την παρασκευή τους πραγματοποιήθηκε εναπόθεση του αντίστοιχου αιωρήματος στο πλακίδιο πυριτίου ($\sim 1 \times 1 \text{ cm}$) και ξήρανση σε θερμοκρασία περιβάλλοντος.

Γ5.7 Θερμικές μετρήσεις (DTA/TGA)

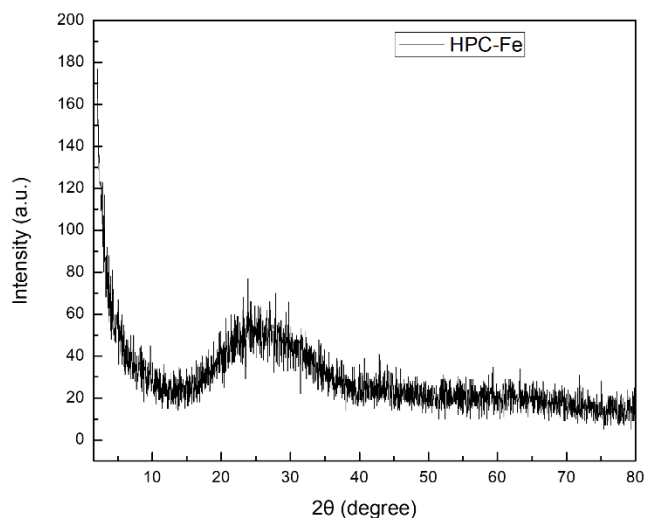
Για τις μετρήσεις θερμικής ανάλυσης (DTA) και θερμοβαρυτομετρικής ανάλυσης (TGA) χρησιμοποιήθηκε η συσκευή Perkin-Elmer Pyris-Diamond του τμήματος Μηχανικών Επιστήμης Υλικών του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων. Για τις μετρήσεις χρησιμοποιήθηκαν ~5 mg από τα δείγματα, που τοποθετήθηκαν σε χωνευτήρι πλατίνας στο ένα σκέλος του θερμοζυγού ενώ στο άλλο σκέλος χρησιμοποιήθηκε ως δείγμα αναφοράς καθαρή σκόνη αλούμινας. Η ταχύτητα αύξησης της θερμοκρασίας ήταν 10 °C/min σε ατμόσφαιρα αέρα.

ΜΕΡΟΣ Δ' - ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Δ1 ΣΥΝΘΕΣΗ ΚΑΙ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΜΟΣ HPCFe

Στην παρούσα διπλωματική εργασία, πραγματοποιήθηκε η σύνθεση του σύνθετου νανοϋλικού HPCFe. Η συγκεκριμένη σύνθεση επιλέχθηκε ώστε να δημιουργηθεί ένα σύνθετο υλικό που θα συνδυάζει τις ιδιότητες των δύο συστατικών του. Οι HPC επιλέχθηκαν ως αρχικό υλικό λόγω των πλεονεκτημάτων που επιφέρει η δομή τους, όπως μεγάλη ειδική επιφάνεια, παρουσία μεσο-, μακρο- και μικρο-πορώδους, ενώ ο σίδηρος επιλέχθηκε ώστε να προσδώσει στο τελικό σύνθετο υλικό μαγνητικές ιδιότητες, που θα διευκόλυναν την εφαρμογή του. Αρχικά, το σύνθετο νανοϋλικό HPCFe χαρακτηρίστηκε με διάφορες τεχνικές ώστε να προσδιοριστούν τα δομικά χαρακτηριστικά και οι ιδιότητές του.

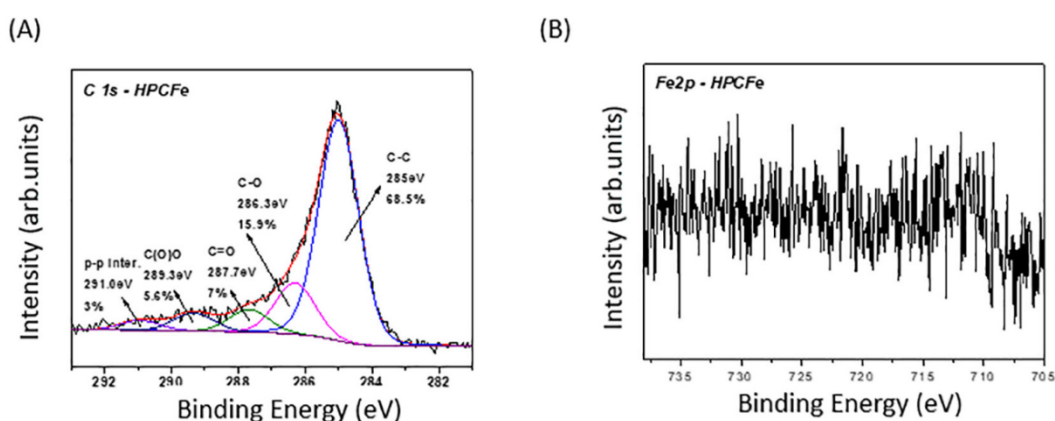
Από τις μετρήσεις περίθλασης ακτίνων X (XRD) του HPCFe σε γωνίες $2\theta=2^\circ-80^\circ$ προέκυψε το **Σχήμα Δ1.1**. Όπως μπορεί να παρατηρηθεί, το γράφημα που προκύπτει παρουσιάζει μια ευρεία κορυφή περίθλασης με επίκεντρο περίπου τις 25° που μπορεί να αποδοθεί στο επίπεδο πλέγματος άνθρακα, υποδεικνύοντας την άμορφη φύση του άνθρακα που σχηματίζεται. Αν και δεν φαίνονται ξεκάθαρα στο γράφημα, υπάρχουν δύο ακόμα μικρές κορυφές περίθλασης με επίκεντρο περίπου τις 42° και 60° , οι οποίες, λόγω της πολύ χαμηλής έντασης δεν μπορούν να ταυτοποιηθούν με τη βάση δεδομένων, αλλά μπορούν να αποδοθούν στην παρουσία πολύ μικρού μεγέθους νανοσωματιδίων Fe που σχηματίζονται κατά τη διαδικασία πυρόλυσης, μέσω της καρβοθερμικής αναγωγής του $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ υπό αδρανή ατμόσφαιρα, σε συμφωνία με προηγούμενες μελέτες στην υπάρχουσα βιβλιογραφία⁶⁶.



Σχήμα Δ1.1. Διάγραμμα περίθλασης ακτίνων-X του HPCFe.

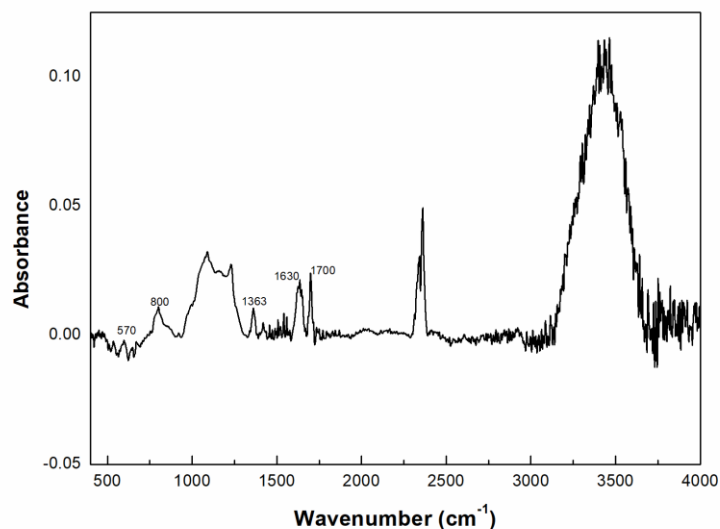
Στο **Σχήμα Δ1.2** παρατίθενται τα φάσματα XPS του HPCFe. Αρχικά αναλύθηκε το φάσμα του HPCFe στην περιοχή C1s (**Γράφημα Δ1.2^A**) το οποίο αποτελείται από τέσσερις κορυφές με ενέργειες δέσμευσης στα 285.0, 286.3, 287.7, 289.3 και 291.3 eV. Η πρώτη κορυφή στα 285.0 eV αντιπροσωπεύει τους δεσμούς άνθρακα-άνθρακα (C-C) του πλέγματος που δημιουργούν οι πόροι και κατέχει το μεγαλύτερο ποσοστό (68.5%) του συνολικού εμβαδού της κορυφής του άνθρακα. Οι

τρεις κορυφές στα 286.3, 287.7, 289.3 προέρχονται από τους δεσμούς του άνθρακα με το οξυγόνο (C-O, C=O, C(O)O, αντίστοιχα) που υπάρχουν στο πλέγμα του πορώδους νανοϋλικού και έχουν συνολική συνεισφορά 28.5%, αποδεικνύοντας έτσι την ύπαρξη λειτουργικών ομάδων οξυγόνου που έχουν ενσωματωθεί στο νανοϋλικό λόγω της κατεργασίας του με το οξικό οξύ. Τέλος, η κορυφή στα 291.0 eV αντιπροσωπεύει την ύπαρξη π-π αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων του νανοϋλικού, αλλά η συνεισφορά τους στο φάσμα είναι αμελητέα (3%). Στο **Σχήμα Δ1.2^B** παρουσιάζεται η επισκόπηση του φάσματος Fe2p, το οποίο και αποδεικνύει την παρουσία σιδήρου στο πλέγμα του πορώδους HPC.



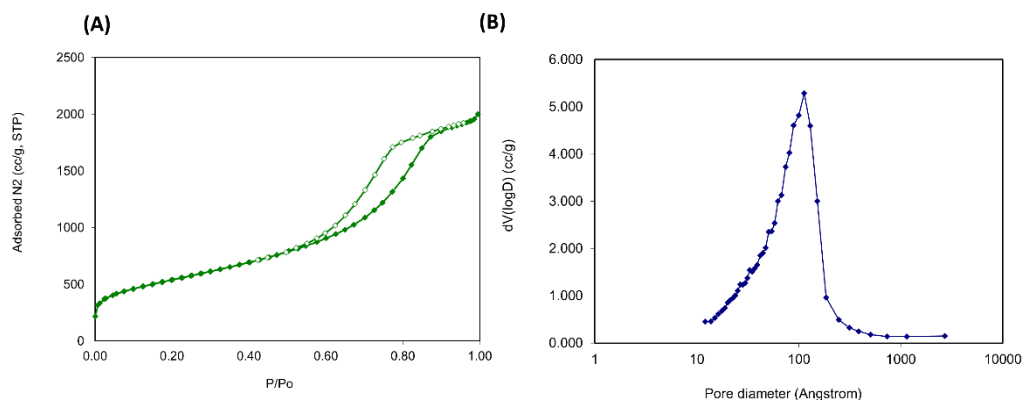
Σχήμα Δ1.2. Φάσμα φωτοεκπομπής ακτίνων Χ των A) C1s, και B) Fe2p του νανοϋλικού HPCFe.

Το συντιθέμενο σύνθετο νανοϋλικό χαρακτηρίστηκε με φασματοσκοπία υπερέθρου με μετασχηματισμό Fourier (FTIR) και το φάσμα που καταγράφηκε παρουσιάζεται στο **Σχήμα Δ1.3**. Η ασθενής ζώνη που παρατηρείται στα 1363 cm^{-1} στο φάσμα του HPCFe αποδίδεται στις αρωματικές C=C δονήσεις του νανοϋλικού, ενώ οι ζώνες στα 1630 και στα 1700 cm^{-1} προκύπτουν από τις δονήσεις έκτασης C=O, λόγω της παρουσίας καρβοξυλομάδων⁶⁷. Η ευρεία ζώνη στην περιοχή της $1000\text{--}1260\text{ cm}^{-1}$ αντιστοιχεί σε δονήσεις έκτασης των C-OH ομάδων, ενώ η ζώνη στα 3500 cm^{-1} αντιστοιχεί σε O-H δονήσεις έκτασης των υδροξυλ- ή καρβοξυλικών ομάδων⁶⁷. Τέλος, οι ζώνες στους 570 και 800 cm^{-1} μπορούν να αποδοθούν στις δονήσεις έκτασης των δεσμών Fe-O^{68,69}.



Σχήμα Δ1.3. Φάσμα FTIR του νανοϋλικού HPCFe.

Η ειδική επιφάνεια και τα πορώδη χαρακτηριστικά του HPCFe μελετήθηκαν με την χρήση ποροσιμετρίας αζώτου στους 77 Κ. Στο **Σχήμα Δ1.4^A** παρουσιάζονται οι ισόθερμες προσρόφησης και εκρόφησης του HPCFe. Η ισόθερμος εκρόφησης βρίσκεται πάνω από την ισόθερμο προσροφήσεως λόγω του ότι το προσροφώμενο εκροφάται σε μικρότερες τιμές P/P₀, από αυτές που απαιτούνται για την προσρόφησης του, που σημαίνει ότι οι πόροι θα πληρούνται σε υψηλότερη σχετική πίεση από αυτή που θα αδειάζουν. Επιπλέον, στο **Σχήμα Δ1.4^B** παρουσιάζεται η κατανομή των πόρων (PSD), όπου φαίνεται ότι το HPCFe παρουσιάζει διάμετρο πόρων ~100 Å, δηλαδή ~10 nm.



Σχήμα Δ1.4. A) Ισόθερμος καμπύλη προσρόφησης(•) και εκρόφησης (◦) του HPCFe, και B) κατανομή μεγέθους πόρων του HPCFe.

Επιπλέον, στον **Πίνακα Δ1.1** παρουσιάζονται τα χαρακτηριστικά του σύνθετου νανοϋλικού HPCFe. Για λόγους σύγκρισης παρουσιάζονται επίσης οι τιμές για τους HPC πριν την εισαγωγή των μαγνητικών σωματιδίων σιδήρου. Όπως φαίνεται από τον **Πίνακα Δ1.1**, ο όγκος των πόρων στο νανοϋλικό HPCFe μειώνεται από 9.0 σε 3.5

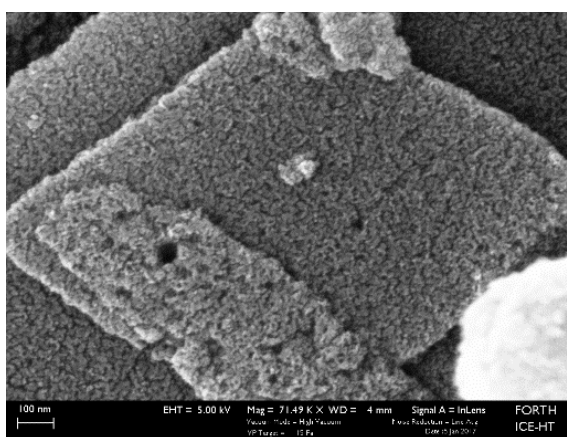
cm³/g, αποτέλεσμα που επιδεικνύει ότι υπάρχει ακόμα ελεύθερος χώρος (~87% κατ' όγκο) στο HPCFe που μπορεί να καλυφθεί περαιτέρω με μαγνητικά νανοσωματίδια. Επιπλέον, η ειδική επιφάνεια (SSA) μειώνεται μόνο κατά 20% (από 2432 σε 1938 m²/g), αφήνοντας επίσης χώρο για την καλύτερη διασπορά/φόρτωση των μαγνητικών νανοσωματιδίων. Αξίζει να σημειωθεί ότι η ύπαρξη Fe(NO₃)₃ παίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο του μεγέθους των μακροπόρων, και επομένως, η αύξηση της συγκέντρωσης του Fe(NO₃)₃ μπορεί να μειώσει το μέγεθος των μακροπόρων, όπως έχει αναφερθεί βιβλιογραφικά⁷⁰. Τέλος, η ειδική επιφάνεια των μικροπόρων μειώνεται κατά ~2.6 φορές μετά την προσθήκη των νανοσωματιδίων σιδήρου, αποτέλεσμα που καταδεικνύει την ύπαρξη πολύ μικρού μεγέθους νανοσωματιδίων τα οποία εισχωρούν στους μικροπόρους του ανθρακικού πλέγματος.

Πίνακας Δ1.1. Χαρακτηριστικά υφής του HPCFe.

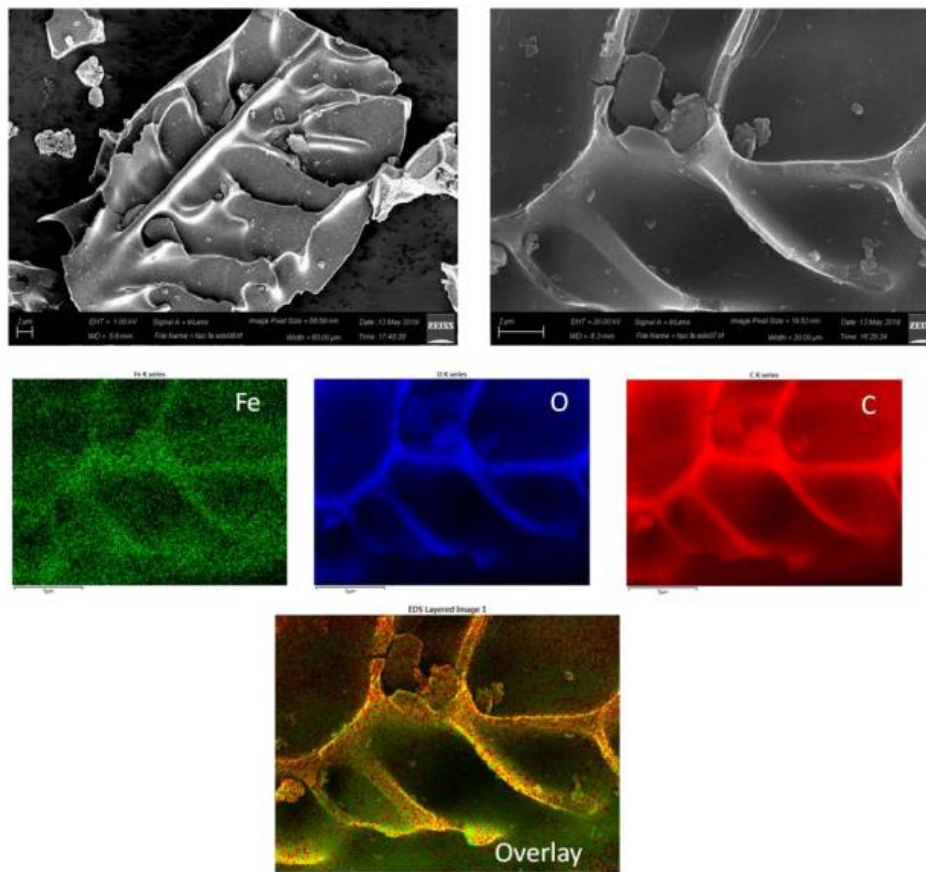
Sample	BET SSA [m ² /g]	BJH adsorption pore volume	Total pore volume at P/P ₀ ~0.995	t-plot micropore SSA
HPC-neat ¹	2432	9.0 cm ³ /g	9.3 cm ³ /g	415 m ² /g
HPCFe	1938	3.5 cm ³ /g	3.1 cm ³ /g	161 m ² /g

¹ παρατίθενται για σύγκριση οι τιμές που αφορούν στους HPC πριν της εισαγωγή των νανοσωματιδίων σιδήρου.

Περισσότερες πληροφορίες μπορούν να ληφθούν με απευθείας απεικόνιση της κατανομής του σιδήρου σε μεμονωμένα νανოსύνθετα σωματίδια χρησιμοποιώντας FE-SEM και στοιχειακή χαρτογράφηση. Από την εικόνα SEM που παρουσιάζεται στο **Σχήμα Δ1.5^A**, επιβεβαιώνεται η πορώδης δομή του νανοϋλικού HPCFe, η οποία έχει τη χαρακτηριστική μορφολογία σπόγγου. Επιπλέον, εικόνες SEM του HPCFe με διαφορετικές μεγεθύνσεις απεικονίζονται στο **Σχήμα Δ1.5^B** (γκρίζες εικόνες) και αποκαλύπτουν τη μορφολογία μακροπόρων 1–10 μm. Η κατανομή των στοιχείων άνθρακα, οξυγόνου και σιδήρου στο HPCFe αξιολογήθηκε μέσω των έγχρωμων χαρτών που προέκυψαν με τη χρήση φασματοσκοπίας ακτίνων X ενεργειακής διασποράς (EDX), και απέδειξαν μια εξαιρετικά ομοιογενή κατανομή των σωματιδίων σιδήρου στο υλικό άνθρακα.

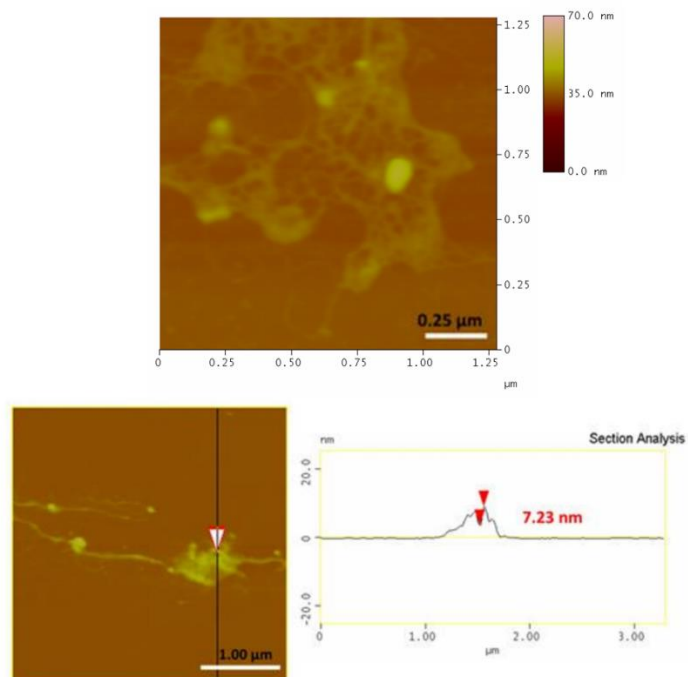


Σχήμα Δ1.5^A. Εικόνα FE-SEM του HPCFe με μεγέθυνση 100 μm.



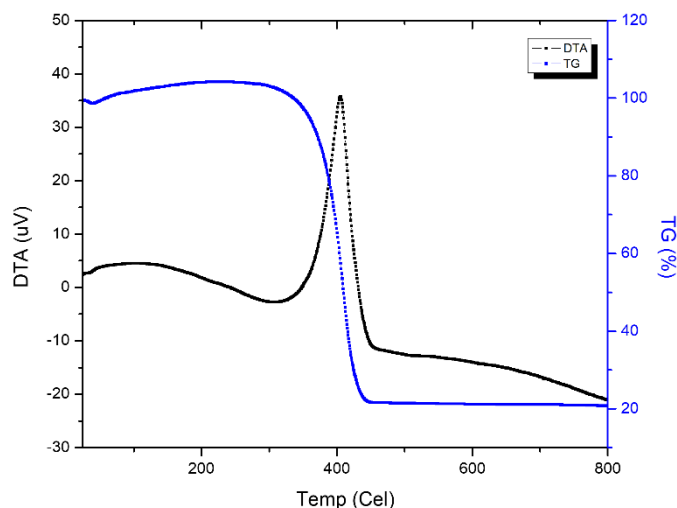
Σχήμα Δ1.5^B. Εικόνες FE-SEM του HPCFe (μεγέθυνση 2 μm), και EDS έγχρωμοι χάρτες κατανομής άνθρακα (κόκκινο), οξυγόνου (μπλε) και σιδήρου (πράσινο), και υπέρθεση αυτών.

Η μελέτη των μορφολογικών χαρακτηριστικών απομονωμένων HPCFe πραγματοποιήθηκε με λήψη εικόνων AFM. Μια αντιπροσωπευτική εικόνα από ένα σωματίδιο HPCFe παρουσιάζεται στο **Σχήμα Δ1.6** (επάνω). Οι εικόνες AFM των HPCFe επιβεβαιώνουν την ύπαρξη ενός σχηματισμένου δικτύου άνθρακα. Η μορφολογία σπόγγου είναι χαρακτηριστική του ιεραρχημένου πορώδους άνθρακα. Επιπλέον, η τοπογραφική εικόνα του υβριδικού συστήματος HPCFe, όπως αποκαλύπτεται από την ανάλυση της εγκάρσιας τομής, παρουσιάζεται στο **Σχήμα Δ1.6** (κάτω), από όπου και παρατηρείται η ύπαρξη σωματιδίων στην επιφάνεια του νανοϋλικού, με μέγιστο μέγεθος του νανοσωματιδίου στα 7.23 nm, αποδεικνύοντας την επιτυχή ενσωμάτωση μαγνητικών νανοσωματιδίων στον πορώδη άνθρακα.



Σχήμα Δ1.6. Εικόνες AFM του HPCFe.

Η θερμική συμπεριφορά του HPCFe μελετήθηκε με διαφορική θερμική ανάλυση (DTA) και με θερμοβαρτομετρική ανάλυση (TG). Στο **Σχήμα Δ1.7** παρουσιάζονται τα θερμογραφήματα DTA/TG του νανοϋλικού στον αέρα. Παρατηρείται ότι στους 350 °C περίπου εμφανίζεται η θερμική αποσύνθεση του πλέγματος άνθρακα του HPC. Επιπλέον, περίπου το 20% της υπολειμματικής μάζας οφείλεται στα νανοσωματίδια σιδήρου που υπάρχουν στο πλέγμα του άνθρακα.



Γράφημα Δ1.7. Διάγραμμα θερμικής ανάλυσης (DTA/TG) του HPCFe.

Δ2. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ HPCFe ΩΣ ΦΟΡΕΑΣ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΟΥ ΕΝΖΥΜΟΥ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΗ

Το νανοϋλικό HPCFe χρησιμοποιήθηκε ως φορέας για την ομοιοπολική και μη ομοιοπολική ακινητοποίηση του ενζύμου cellulase ώστε να αναπτυχθεί ένα σταθερό νανοβιοκαταλυτικό σύστημα (HPCFe-cellulase). Το ένζυμο ακινητοποιήθηκε ομοιοπολικά πάνω στο νανοϋλικό μέσω της χημείας EDC/NHS, όπως περιεγράφηκε στην *Παράγραφο Γ2.2.1*, και μη ομοιοπολικά μέσω φυσικής προσρόφησης, όπως περιεγράφηκε στην *παράγραφο Παράγραφο Γ2.2.2*. Στον **Πίνακα Δ.2.1** παρουσιάζονται τα αποτελέσματα της απόδοσης ακινητοποίησης, καθώς και η υδρολυτική δράση της ακινητοποιημένης κυτταρινάσης στο HPCFe, σε διάφορες αναλογίες μάζας ενζύμου προς νανοϋλικό.

Η υψηλότερη απόδοση ακινητοποίησης παρατηρήθηκε στην περίπτωση της ομοιοπολικής ακινητοποίησης. Κατά τη διαδικασία της μη ομοιοπολικής ακινητοποίησης, το μέσο ακινητοποίησης έχει pH 5.0, στο οποίο το ένζυμο παρουσιάζει σχεδόν μηδενικό φορτίο ($pI=4.9$)⁶⁷. Η έλλειψη φορτίου στο ενζυμικό μόριο μειώνει την ανάπτυξη ισχυρών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων μεταξύ του νανοϋλικού και του ενζύμου, και άρα μειώνει την ικανότητα πρόσδεσης. Η αποτελεσματικότητα της ακινητοποίησης φαίνεται επίσης ότι εξαρτάται από την αναλογία μάζας κυτταρινάσης:νανοϋλικού. Η δέσμευση της κυτταρινάσης στο HPCFe ήταν υψηλότερη σε χαμηλές αναλογίες μάζας ενζύμου:νανοϋλικού, ενώ μειώθηκε με την αύξηση της ποσότητας του ενζύμου. Αυτό το αποτέλεσμα θα μπορούσε να αποδοθεί στον υψηλό κορεσμό της επιφάνειας του HPCFe, εμποδίζοντας περισσότερα μόρια ενζύμου να συνδεθούν στο νανοϋλικό⁷¹. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για ακινητοποιημένη κυτταρινάση στο οξειδίο του γραφενίου⁷².

Πίνακας Δ2.1. Αποτελεσματικότητα ακινητοποίησης και υδρολυτική δράση της ακινητοποιημένης κυτταρινάσης στο HPCFe.

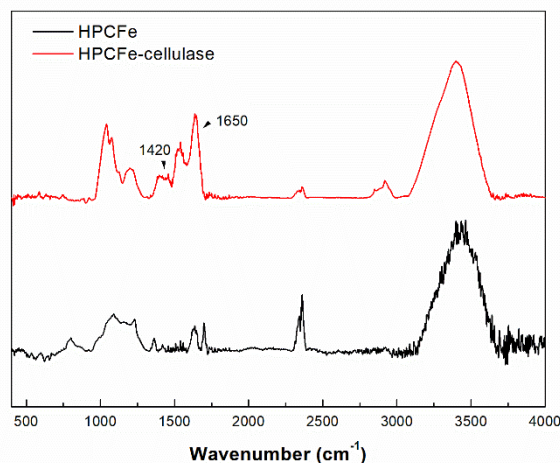
Αναλογία μάζας cellululase:HPCFe (mg:mg)	Μη ομοιοπολική ακινητοποίηση		Ομοιοπολική ακινητοποίηση	
	Απόδοση ακινητοποίησης (%)	Δραστηκότητα (U mg ⁻¹)	Απόδοση ακινητοποίησης (%)	Δραστηκότητα (U mg ⁻¹)
0.24	74	0.43	96	0.70
0.38	70	0.49	96	0.92
0.52	63	0.60	85	1.12
0.74	61	0.68	84	1.35
1.00	59	0.68	81	1.35

Σε αντίθεση με την απόδοση ακινητοποίησης, η δραστηκότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου αυξήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε υψηλότερος λόγος μάζας ενζύμου:νανοϋλικού, ενώ στην περιοχή κορεσμού (0.5–1.0 mg ενζύμου/mg νανοϋλικού), η ενζυμική δραστηκότητα παρέμεινε η ίδια. Η μεγάλη ποσότητα ακινητοποιημένου ενζύμου μπορεί να εμποδίσει τη σύνδεση του υποστρώματος στο ενεργό κέντρο του ενζύμου, προκαλώντας στερικές παρεμποδίσεις μεταξύ των

πρωτεϊνικών μορίων, οδηγώντας σε μια ισορροπία μεταξύ της σχέσης ενζυμικής δραστηριότητας-μάζας⁷³.

Τα παραπάνω αποτελέσματα έδειξαν ότι η ομοιοπολικά ακινητοποιημένη κυτταρινάση στο HPCFe είναι καλύτερη από τη μη ομοιοπολικά ακινητοποιημένη, τόσο ως προς την αποτελεσματικότητα δέσμευσης, όσο και ως προς την καταλυτική δραστηριότητα, επομένως τα επόμενα πειράματα διεξήχθησαν με την ομοιοπολικά ακινητοποιημένη κυτταρινάση (HPCFe-cellulase).

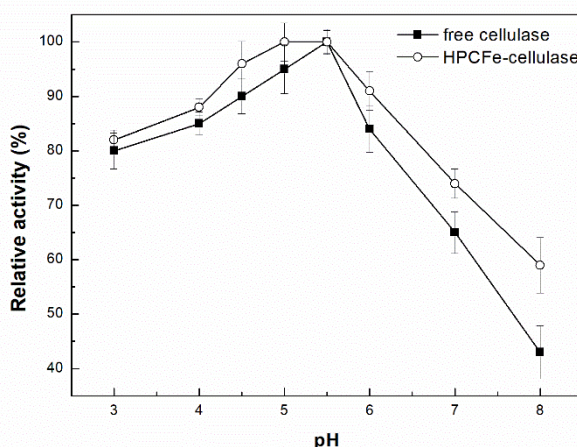
Η ακινητοποίηση της κυτταρινάσης στο HPCFe επιβεβαιώθηκε μέσω της φασματοσκοπίας FTIR. Στο **Σχήμα Δ2.1**, παρουσιάζονται τα φάσματα FTIR του HPCFe και της ομοιοπολικά ακινητοποιημένης κυτταρινάσης στο HPCFe. Η επιβεβαίωση της παρουσίας της κυτταρινάσης στο HPCFe προκύπτει από την εμφάνιση μιας ζώνης στα 1650 cm^{-1} που αποδίδεται σε δονήσεις έκτασης των C=O δεσμών του ενζύμου και αντιστοιχεί στη ζώνη Amide I⁷⁴. Η ασθενής κορυφή στα 1420 cm^{-1} προκύπτει από πολλές συντεταγμένες μετατοπίσεις του κορμού της πρωτεΐνης και αντιστοιχεί στη ζώνη Amide III⁷⁵, ενώ η κορυφή στα 1030 cm^{-1} οφείλεται σε δονήσεις έκτασης των C-N δεσμών από τις αμινομάδες του ενζύμου⁶⁷. Η ισχυρή κορυφή στα 3400 cm^{-1} αντιπροσωπεύει τις δονήσεις έκτασης O-H, ενώ οι αδύναμες ζώνες στην περιοχή των $2830\text{--}2960\text{ cm}^{-1}$ οφείλονται σε ασύμμετρες και συμμετρικές δονήσεις έκτασης των ομάδων -CH_2 της πεπτιδικής αλυσίδας της πρωτεΐνης⁷⁵.



Σχήμα Δ2.1. Φάσματα FTIR του νανοϊλικού HPCFe και της ομοιοπολικά ακινητοποιημένης κυτταρινάσης στο HPCFe.

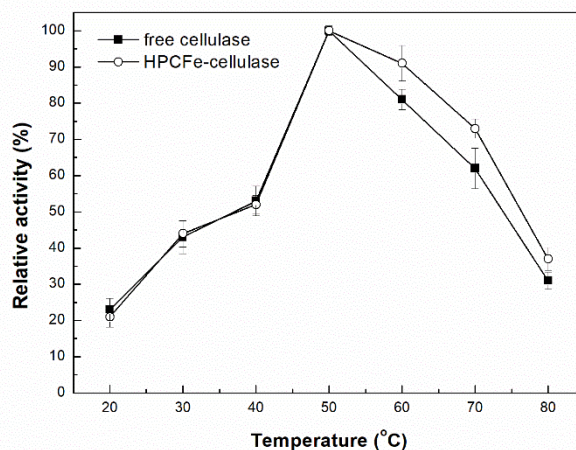
Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η επίδραση της τιμής του pH του διαλύματος της αντίδρασης στην καταλυτική δράση της κυτταρινάσης. Όπως φαίνεται από το **Σχήμα Δ2.2**, τόσο η ελεύθερη όσο και η HPCFe-cellulase παρουσίασαν την υψηλότερη καταλυτική δράση σε $\text{pH}=5.5$. Η δραστηριότητα και των δύο μορφών του ενζύμου μειώθηκε σταδιακά με την αύξηση του pH, ωστόσο, η HPCFe-cellulase εμφάνισε μεγαλύτερη σχετική δραστηριότητα σε όλες τις δοκιμασμένες τιμές pH σε σύγκριση με το ελεύθερο ένζυμο, γεγονός που καταδεικνύει ότι η ακινητοποιημένη κυτταρινάση

προσαρμόστηκε καλύτερα στις αλλαγές του pH από ότι το ελεύθερο ένζυμο. Είναι γνωστό ότι η ακινητοποίηση της κυτταρινάσης σε νανοϋλικά αυξάνει την ακαμψία του ενζύμου και το προστατεύει από διαμορφωτικές αλλαγές που προκαλούνται από αλλαγές στο ιοντικό περιβάλλον⁷⁶. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί για την ακινητοποιημένη κυτταρινάση σε μαγνητικά νανοσωματίδια χιτοζάνης⁷⁷. Η HPCFe-cellulase διατήρησε πάνω από το 70% της μέγιστης δραστηρότητάς της σε διαφορετικές τιμές pH (μεταξύ 3.0 και 7.0), ποσοστό σημαντικά υψηλότερο σε σύγκριση με αυτό που παρατηρήθηκε όταν το ίδιο ένζυμο ακινητοποιήθηκε σε άλλα μαγνητικά νανοσωματίδια⁷¹.



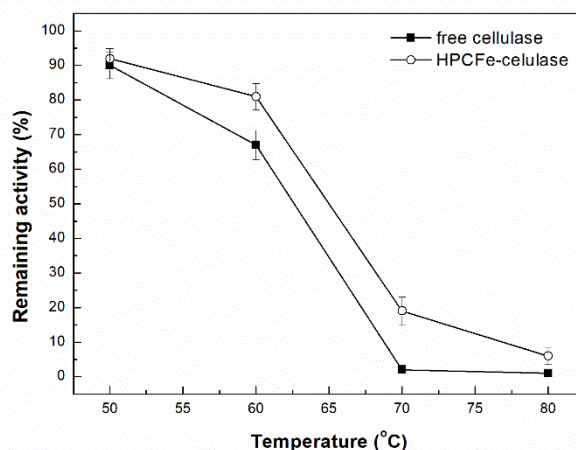
Σχήμα Δ2.2. Επίδραση του pH στη δραστηρότητα της ελεύθερης και ακινητοποιημένης κυτταρινάσης στο HPCFe.

Η δράση της ελεύθερης και της HPCFe-cellulase διερευνήθηκε επίσης σε αυξανόμενες θερμοκρασίες, από 20 έως 80°C, σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών με τιμή pH=5.0. Από το **Σχήμα Δ2.3** φαίνεται ότι η ελεύθερη και η ομοιοπολικά ακινητοποιημένη κυτταρινάση εμφάνισαν υψηλότερη δραστηρότητα στους 50 °C, ενώ η ενεργότητα και των δύο μορφών μειώθηκε σε θερμοκρασίες άνω των 50 °C. Ωστόσο, η HPCFe-cellulase εμφάνισε περίπου 15% υψηλότερη σχετική δραστηρότητα από την ελεύθερη κυτταρινάση στους 60 °C και 70 °C, αποτέλεσμα που υποδεικνύει ότι η διαδικασία ακινητοποίησης βελτιώνει τη θερμική ανθεκτικότητα του ενζύμου, προστατεύοντας τα μόρια πρωτεΐνης από τη θερμική απενεργοποίηση, όπως έχει αναφερθεί και σε προηγούμενες μελέτες⁷¹.



Σχήμα Δ2.3. Επίδραση της θερμοκρασίας στη δραστικότητα της ελεύθερης και ακινητοποιημένης κυτταρινάσης στο HPCFe.

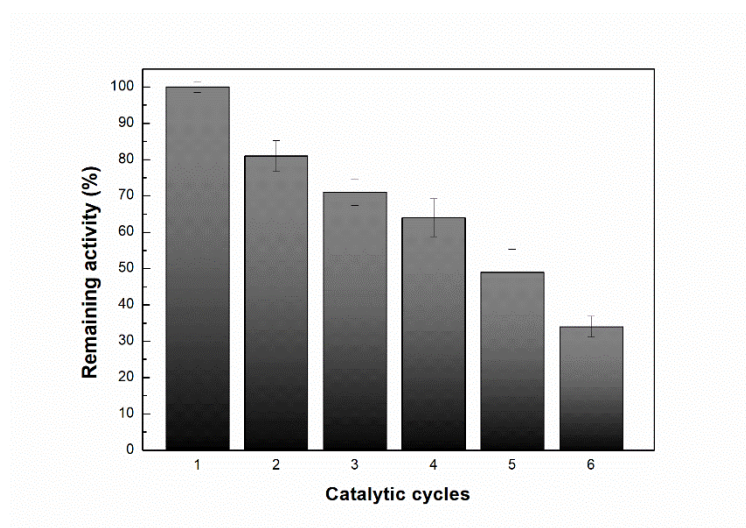
Η θερμική σταθερότητα και των δύο μορφών του ενζύμου διερευνήθηκε μετά από 5 ώρες επώασης σε ρυθμιστικό διάλυμα οξικών (0,1 M, pH 5.0) σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Από το **Σχήμα Δ2.4** παρατηρείται ότι η δραστικότητα της ελεύθερης και ακινητοποιημένης κυτταρινάσης μειώθηκε με την αύξηση της θερμοκρασίας επώασης. Και οι δυο μορφές των ενζύμων μπόρεσαν να διατηρήσουν σημαντικό μέρος της αρχικής τους δραστικότητας μετά από επώαση στους 60 °C, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες η ελεύθερη κυτταρινάση απενεργοποιήθηκε σχεδόν εντελώς. Φαίνεται λοιπόν πως η ομοιοπολική ακινητοποίηση στο νανοϋλικό HPCFe έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη ενός πιο σταθερού βιοκαταλύτη.



Σχήμα Δ2.4. Θερμοσταθερότητα της της ελεύθερης και ακινητοποιημένης κυτταρινάσης στο HPCFe, μετά από 5 ώρες επώαση σε διάφορες θερμοκρασίες.

Τέλος, διερευνήθηκε η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης της ακινητοποιημένης κυτταρινάσης μέσω της υδρόλυσης του Avicel PH-101. Η χρήση του HPCFe ως φορέας ακινητοποίησης προσφέρει το πλεονέκτημα του εύκολου

διαχωρισμού, ανάκτησης και επαναχρησιμοποίησης του ακινητοποιημένου ενζύμου με την εφαρμογή ενός εξωτερικού μαγνητικού πεδίου. Από το **Σχήμα Δ2.5** μπορεί να φανεί ότι η HPCFe-cellulase ήταν σε θέση να καταλύσει την υδρόλυση του υποστρώματος Avicel PH-101 έως και 6 διαδοχικούς κύκλους αντίδρασης, με συνολικό χρόνο λειτουργίας 144 ώρες, αποτέλεσμα που δείχνει την ικανότητα του νανοβιοκαταλύτη να διατηρεί ένα μέρος της ενεργότητάς του κάτω από σχετικά σκληρές συνθήκες αντίδρασης. Η λειτουργική σταθερότητα της ακινητοποιημένης κυτταρινάσης μειώθηκε μετά από κάθε καταλυτικό κύκλο, αλλά διατηρήθηκε περίπου στο 35% μετά από έξι κύκλους αντίδρασης χρήσης. Η μείωση της λειτουργικής σταθερότητας της HPCFe-cellulase μετά από διαδοχικούς κύκλους αντίδρασης θα μπορούσε να αποδοθεί σε διάφορους παράγοντες, όπως η μετουσίωση της κυτταρινάσης, η απώλεια του ενός συστατικού του συμπλόκου κυτταρινάσης/νανοϋλικού, και/ή η πιθανή προσρόφηση των παραγόμενων προϊόντων στους πόρους του HPCFe που θα μπορούσε να επηρεάσει την καταλυτική συμπεριφορά του ακινητοποιημένου ενζύμου⁷⁶.



Σχήμα Δ2.5. Λειτουργική σταθερότητα της HPCFe-cellulase για την υδρόλυση της Avicel PH101, σε pH 5.0, στους 50 °C, (24 ώρες επώασης για κάθε κύκλο αντίδρασης). Η μέγιστη (100%) ενζυμική δραστηριότητα αντιστοιχεί στη δραστηριότητα του ενζύμου που μετρήθηκε στον πρώτο κύκλο αντίδρασης.

Δ3. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΟΥ HPCFe ΩΣ ΦΟΡΕΑΣ ΣΥΝ-ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΕΝΖΥΜΩΝ ΚΥΤΤΑΡΙΝΑΣΗ ΚΑΙ Β-ΓΛΥΚΟΣΙΔΑΣΗ

Το νανοϋλικό HPCFe χρησιμοποιήθηκε ως φορέας για την ομοιοπολική συν-ακίνητοποίηση των ενζύμων κυτταρινάση (cellulase) και β-γλυκοσιδάση (bgl). Όπως ήδη αναφέρθηκε στην **Παράγραφο Β3.3**, η κυτταρινάση είναι στην ουσία ένα σύμπλοκο τριών ενζύμων, ένα εκ των οποίων είναι η β-γλυκοσιδάση. Στις αντιδράσεις που καταλύει η κυτταρινάση, το τελικό βήμα το καταλύει η β-γλυκοσιδάση. Για το λόγο αυτό, κρίθηκε ενδιαφέρον να μελετηθεί αν τα βιοκαταλυτικά χαρακτηριστικά της κυτταρινάσης μπορούν να ενισχυθούν εάν συν-ακίνητοποιηθεί με τη β-γλυκοσιδάση (ως επιπλέον ενίσχυση της δράσης της).

Αρχικά, κρίθηκε σκόπιμο να δοκιμαστεί αν η bgl ακίνητοποιείται επιτυχώς στο HPCFe. Τα αποτελέσματα της ακίνητοποίησης παρουσιάζονται στον **Πίνακα Δ3.1**. Όπως παρατηρείται, το ένζυμο ακίνητοποιείται επιτυχώς στο σύνθετο νανοϋλικό με απόδοση ακίνητοποίησης 87.3%. Το ότι η β-γλυκοσιδάση εμφανίζει υψηλή απόδοση ακίνητοποίησης στο HPCFe είναι αναμενόμενο εφόσον τα νανοσωματίδια αυτά είναι πορώδη, και άρα έχουν μεγάλη ειδική επιφάνεια ενισχύοντας την καλή ακίνητοποίηση των ενζύμων σε αυτά. Τέλος, η ακίνητοποιημένη bgl στο HPCFe παρουσίασε ειδική ενεργότητα ίση με 1 U/mg, η οποία βρέθηκε να είναι χαμηλότερη από αυτή του ελεύθερου ενζύμου (4.6 U/mg), αποτέλεσμα που οφείλεται στη διαδικασία της ομοιοπολικής ακίνητοποίησης. Είναι γνωστό ότι τα ακίνητοποιημένα ένζυμα στις περισσότερες περιπτώσεις εμφανίζουν μειωμένη δράση σε σχέση με τις ελεύθερες μορφές τους, λόγω των αλληλεπιδράσεων που δημιουργούνται κατά την ακίνητοποίηση^{54,61}. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές πολλές φορές μπορεί να προκαλέσουν την αναδιάταξη ή/και αποδιάταξη του ενζύμου και να μειώσουν έτσι τη δραστηριότητα του⁵⁴.

Πίνακας Δ3.1. Αποτελεσματικότητα ακίνητοποίησης και υδρολυτική δράση της ακίνητοποιημένης β-γλυκοσιδάσης στο HPCFe.

Ένζυμο	Απόδοση ακίνητοποίησης (%)	Δραστηριότητα (U/mg)
HPCFe-bgl	87.3	0.1

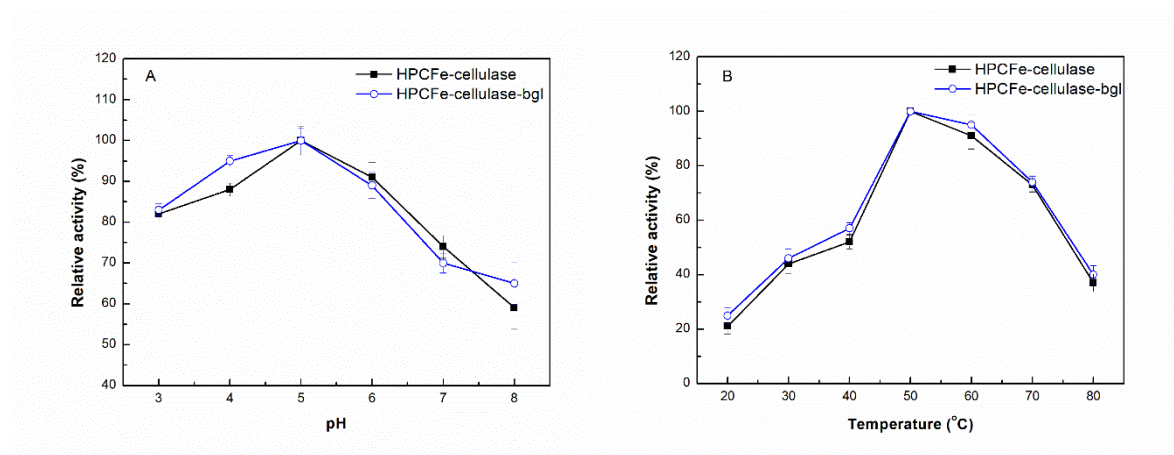
Εφόσον λοιπόν επιβεβαιώθηκε ότι η bgl ακίνητοποιείται επιτυχώς στο HPCFe, προχωρήσαμε στη συν-ακίνητοποίηση της κυτταρινάσης και της β-γλυκοσιδάσης στο νανοσύνθετο υλικό. Η δραστηριότητα του συν-ακίνητοποιημένου συστήματος κυτταρινάση:β-γλυκοσιδάση, με αναλογία μάζας 1:1, μελετήθηκε με τον ίδιο ακριβώς τρόπο όπως μελετήθηκε και η ακίνητοποιημένη κυτταρινάση (**Παράγραφος Γ2.3.2**). Τα αποτελέσματα της δραστηριότητας του δι-ένζυμικού συστήματος παρουσιάζονται στον **Πίνακα Δ3.2**. Από τον πίνακα προκύπτει ότι το σύστημα HPCFe-cellulase-bgl παρουσιάζει χαμηλότερη δραστηριότητα σε σχέση με το σύστημα HPCFe-cellulase. Αυτό μπορεί να οφείλεται στο ότι το πρωτόκολλο της δραστηριότητας δεν βελτιστοποιήθηκε ώστε να προλάβουν τα ένζυμα να δράσουν με την καλύτερη δυνατή απόδοση. Ακόμα, η δραστηριότητα θα μπορούσε να αυξηθεί εάν άλλαζε η αρχική

αναλογία των δύο ενζύμων κατά τη διαδικασία συν-ακινητοποίησης. Τέλος, είναι πιθανό, τα προϊόντα που παράγονται στην περίπτωση του δι-ενζυμικού συστήματος να παραμένουν στους πόρους του HPCFe με αποτέλεσμα να συσσωρεύονται και τελικώς να προκαλούν αναστολή στη δράση των δύο ενζύμων.

Πίνακας Δ3.2. Σύγκριση της δραστηριότητας των ακινητοποιημένων και συν-ακινητοποιημένων ενζύμων.

Ένζυμο	Δραστηριότητα (U/mg)
HPCFe-Cellulase	1.70
HPCFe-Cellulase-bgl	0.75

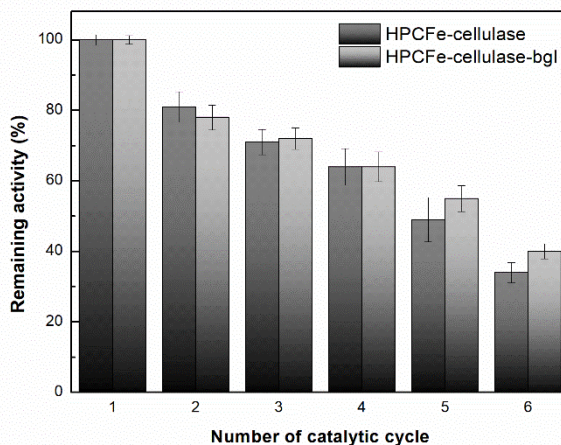
Στη συνέχεια, διερευνήθηκε η επίδραση του pH του διαλύματος της αντίδρασης, και η θερμοκρασία διεξαγωγής της αντίδρασης, στην καταλυτική δράση των δύο νανοσυστημάτων. Όπως μπορεί να παρατηρηθεί, το δι-ενζυμικό σύστημα παραμένει πιο σταθερό από την απλά ακινητοποιημένη κυτταρινάση για πιο όξινες τιμές pH, ενώ στις βασικές τιμές pH τα δύο συστήματα έχουν παρόμοια συμπεριφορά, με το δι-ενζυμικό σύστημα να εμφανίζει καλύτερα αποτελέσματα στις ακραίες τιμές (Σχήμα Δ3.1^A). Παρόμοια εικόνα παρατηρείται και στην περίπτωση της επίδρασης της θερμοκρασίας (Σχήμα Δ3.1^B), όπου το δι-ενζυμικό σύστημα διατηρεί σε μεγαλύτερο βαθμό τη δραστηριότητα του σε αυξανόμενες θερμοκρασίες. Και στις δύο περιπτώσεις, φαίνεται πως το HPCFe προστατεύει τα ακινητοποιημένα ένζυμα σε συνθήκες αποδιάταξης, βοηθώντας τα να διατηρήσουν τις καταλυτικές τους ιδιότητες ακόμα και σε ακραίες συνθήκες λειτουργίας.



Σχήμα Δ3.1. Επίδραση A) του pH και B) της θερμοκρασίας στη δραστηριότητα της ακινητοποιημένης κυτταρινάσης στο HPCFe και του δι-ενζυμικού συστήματος.

Τέλος, μελετήθηκε η δυνατότητα επαναχρησιμοποίησης του δι-ενζυμικού νανοσυστήματος, σε σύγκριση με την απλά ακινητοποιημένη κυτταρινάση. Από το Σχήμα Δ3.2 μπορεί να παρατηρηθεί ότι στους τέσσερις πρώτους κύκλους αντίδρασης, δεν υπάρχουν εμφανείς διαφορές στην εναπομείνασα δραστηριότητα των δύο νανοσυστημάτων. Παρόλα αυτά, στον 5^ο και 6^ο κύκλο αντίδρασης φαίνεται πως το

HPCFe-cellulase-bgl διατηρεί σε μεγαλύτερο βαθμό τη δραστικότητα του από ότι το HPCFe-cellulase. Αυτή η διαφορά μπορεί να οφείλεται στο ότι ο συνδυασμός των δύο ενζύμων, μαζί με τη σταθερότητα που προσδίδει το ίδιο το νανοϋλικό, δημιουργεί ένα σταθερό σύστημα που μπορεί να διατηρήσει την υδρολυτική ικανότητα για αρκετούς συνεχόμενους καταλυτικούς κύκλους.



Σχήμα Δ3.2. Επαναχρησιμοποίηση της ακινητοποιημένης κυτταρινάσης στο HPCFe και του δι-ενζυμικού συστήματος.

ΜΕΡΟΣ Ε' – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η παρούσα ερευνητική εργασία είχε σαν βασικούς στόχους την παρασκευή και τον χαρακτηρισμό ενός νανοσύνθετου υλικού, του μαγνητικού ιεραρχημένου πορώδους άνθρακα, το οποίο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί σε μία ποικιλία εφαρμογών όπως την αποθήκευση αερίων και ενέργειας, την κατάλυση, την μεταφορά φαρμάκων, την ακινητοποίηση ενζύμων, κτλ. Το παραγόμενο υλικό χαρακτηρίστηκε με ένα συνδυασμό τεχνικών, όπως περίθλαση ακτίνων X (XRD), θερμική ανάλυση (DTA/TGA), φασματοσκοπία μέσου υπερύθρου (IR), φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS), ποροσιμετρία N₂, ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης (SEM/EDX), και μικροσκοπία ατομικής δύναμης (AFM). Σε δεύτερο βήμα, το νανοσύνθετο υλικό χρησιμοποιήθηκε ως φορέας για την ακινητοποίηση ενζύμων, όπου μελετήθηκαν τα βιοκαταλυτικά χαρακτηριστικά του τελικού νανοβιοκαταλύτη, ως προς την ενεργότητα, σταθερότητα και επαναχρησιμοποίηση του.

Στο πρώτο μέρος αυτής της εργασίας περιεγράφηκε η επιτυχής σύνθεση του μαγνητικού πορώδους άνθρακα (HPCFe), το οποίο αποτελεί το βασικό υλικό της παρούσας διπλωματικής εργασίας. Η σύνθεσή του περιλαμβάνει την αρχική ανάμιξη του ιεραρχημένου πορώδη άνθρακα με νιτρικό σίδηρο, την μετέπειτα κατεργασία του με ατμούς οξικού οξέος, και τέλος, την τοποθέτηση του στη CVD ώστε να σχηματιστούν τα νανοσωματίδια σιδήρου στην επιφάνειες και τους πόρους του υλικού.

Το νανοσύνθετο υλικό χαρακτηρίστηκε μέσω περίθλασης ακτίνων X (XRD), από όπου προέκυψε μια κορυφή στις 25° που αποδίδεται στο επίπεδο πλέγματος άνθρακα, υποδεικνύοντας την άμορφη φύση του άνθρακα που σχηματίζεται, όσο και μέσω φασματοσκοπίας IR όπου διακρίνονται όλες οι χαρακτηριστικές ομάδες του πορώδη άνθρακα. Από τις μετρήσεις φασματοσκοπίας φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X (XPS) επιβεβαιώθηκε η σύσταση του νανοσύνθετου υλικού, καθώς και η παρουσία των νανοσωματιδίων σιδήρου. Όπως αποδείχθηκε από την ποροσιμετρία αζώτου στην οποία υποβλήθηκε το δείγμα, το πορώδες του ιεραρχημένου άνθρακα επηρεάζεται μετά την εισαγωγή των νανοσωματιδίων σιδήρου (από 9.0 σε 3.5 cm³/g), ενώ η ειδική επιφάνεια παραμένει περίπου στα ίδια επίπεδα (από 2432 σε 1938 m²/g). Η πορώδης δομή του νανοϋλικού HPCFe, η οποία έχει τη χαρακτηριστική μορφολογία σπόγγου επιβεβαιώθηκε με τον μορφολογικό χαρακτηρισμό στον οποίο υποβλήθηκε με τη λήψη εικόνων SEM και AFM, ενώ ένα πολύ σημαντικό στοιχείο προέκυψε από την θερμική ανάλυση του δείγματος, καθώς το HPCFe εμφανίζει σταθερότητα μέχρι τους ~350 °C σε αντίθεση με τα περισσότερα υλικά άνθρακα που δεν μπορούν να είναι λειτουργικά πέρα από τους 300 °C.

Στη συνέχεια, το νανοσύνθετο υλικό HPCFe χρησιμοποιήθηκε ως φορέας για την ακινητοποίηση του ενζύμου κυτταρινάση. Παρατηρήθηκε ότι η κυτταρινάση ακινητοποιείται επιτυχώς με όλες τις μεθόδους πάνω στο νανοϋλικό, εμφανίζοντας απόδοση ακινητοποίησης έως και 96%, ενώ επίσης παρατηρήθηκε ότι η δραστηριότητα του ακινητοποιημένου ενζύμου αυξήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκε υψηλότερος λόγος μάζας ενζύμου:νανοϋλικού, ενώ στην περιοχή κορεσμού (0.5–1.0 mg ενζύμου/mg

νανοϋλικού), η ενζυμική δραστηριότητα παρέμεινε η ίδια. Η ακινητοποίηση της κυτταρινάσης στο HPCFe επιβεβαιώθηκε μέσω της φασματοσκοπίας IR, όπου εμφανίστηκαν οι χαρακτηριστικές ζώνες των περιοχών Amide I και III. Επιπλέον, το ακινητοποιημένο ένζυμο εμφάνισε μεγαλύτερη σχετική δραστηριότητα σε όλες τις δοκιμασμένες τιμές pH, καθώς και τις τιμές θερμοκρασίας, σε σύγκριση με το ελεύθερο ένζυμο, γεγονός που καταδεικνύει ότι η ακινητοποιημένη κυτταρινάση προσαρμόστηκε καλύτερα στις αλλαγές του pH και της θερμοκρασίας από ότι το ελεύθερο ένζυμο. Και οι δυο μορφές των ενζύμων μπόρεσαν να διατηρήσουν σημαντικό μέρος της αρχικής τους δραστηριότητας μετά από επώαση στους 60 °C, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες η ελεύθερη κυτταρινάση απενεργοποιήθηκε σχεδόν εντελώς, ενώ το ακινητοποιημένο ένζυμο παρέμεινε πιο σταθερό. Επίσης, η λειτουργική σταθερότητα της ακινητοποιημένης κυτταρινάσης μειώθηκε μετά από κάθε καταλυτικό κύκλο, αλλά διατηρήθηκε περίπου στο 35% μετά από έξι συνεχόμενους κύκλους αντίδρασης.

Τέλος, το νανοςύνθετο υλικό HPCFe χρησιμοποιήθηκε ως φορέας για την συν-ακινητοποίηση των ενζύμων κυτταρινάση και β-γλυκοσιδάση, όπου φάνηκε ότι το τελικό δι-ενζυμικό νανοβιοκαταλυτικό σύστημα παρέμεινε πιο σταθερό από την απλά ακινητοποιημένη κυτταρινάση για πιο όξινες τιμές pH, ενώ στις βασικές τιμές pH τα δύο συστήματα είχαν παρόμοια συμπεριφορά, με το δι-ενζυμικό σύστημα να εμφανίζει καλύτερα αποτελέσματα στις ακραίες τιμές. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν και στην περίπτωση της επίδρασης της θερμοκρασίας, όπου το δι-ενζυμικό σύστημα διατήρησε σε μεγαλύτερο βαθμό τη δραστηριότητα του σε αυξανόμενες θερμοκρασίες. Τέλος, το δι-ενζυμικό σύστημα παρουσίασε καλύτερη λειτουργική σταθερότητα μετά από έξι συνεχόμενους καταλυτικούς κύκλους.

Συμπερασματικά λοιπόν, το νανοςύνθετο υλικό HPCFe συνδυάζει τις ιδιότητες και των δύο συστατικών του (πορώδες και μαγνητισμός) γεγονός που το καθιστά ιδιαίτερα χρήσιμο για ένα εύρος εφαρμογών, ενώ μπορεί επιτυχώς να χρησιμοποιηθεί ως φορέας για την ακινητοποίηση ενζύμων και την περαιτέρω ανάπτυξη νανοβιοκαταλυτικών συστημάτων που βρίσκουν εφαρμογή σε διάφορα πεδία.

Παρόλα αυτά, το πεδίο αυτό είναι ακόμα πολλά υποσχόμενο και χρειάζεται να συνεχιστεί η έρευνα πάνω στις δυνατότητες που μπορούν να παρουσιάσουν αυτά τα νανοϋλικά. Πιο συγκεκριμένα, ως επόμενο βήμα θα μπορούσε να είναι ο περαιτέρω χαρακτηρισμός του νανοϋλικού ώστε να πάρουμε πληροφορίες ως προς τις μαγνητικές του ιδιότητες. Η φασματοσκοπία Mössbauer θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για να ελεγχθεί το είδος των σχηματιζόμενων οξειδίων του σιδήρου, ενώ η φασματοσκοπία EPR θα μπορούσε να μας δώσει πληροφορίες για τις μαγνητικές ιδιότητες του σιδήρου και του είδους μαγνητισμού. Επιπλέον, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν ως αρχικά υλικά ιεραρχημένοι πορώδεις άνθρακες με διαφορετικά μεγέθη πόρων, ώστε να δούμε ποιος είναι ο βέλτιστος συνδυασμός με τα νανοσωματίδια σιδήρου.

Όπως αναλύθηκε και στην Ενότητα Β (Θεωρητικό Υπόβαθρο), οι HPC μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε εφαρμογές με πολύ υψηλό ερευνητικό,

περιβαλλοντικό και βιομηχανικό ενδιαφέρον. Το νανοσύνθετο υλικό HPCFe, χάρη στη σταθερότητα, την υψηλή ειδική επιφάνεια, τα διαφορετικά μεγέθη πόρων, την υδροφιλικότητα και τον μεγάλο αριθμό επιφανειακών ομάδων που περιέχουν οξυγόνο, αποτελεί ιδανικό υποψήφιο για χρήση σε διάφορες περιβαλλοντικές (δέσμευση CO₂), ενεργειακές, καταλυτικές και βιο-ιατρικές εφαρμογές.

Η ενέργεια αποτελεί αναμφισβήτητα μια από τις μεγαλύτερες ανησυχίες του 21^{ου} αιώνα. Η αναγκαιότητα για επαρκείς πηγές ενέργειας καθαρής καύσης αλλά και τη σταθεροποίηση εκπομπών διοξειδίου του άνθρακα, που παράγονται από την καύση ορυκτών καυσίμων και επηρεάζουν την ανθρώπινη υγεία, είναι υψηλής σημασίας για την υγεία των ανθρώπων και το μέλλον του πλανήτη μας. Για αυτούς τους λόγους, η ανάπτυξη υλικών ικανών να προσροφούν επαρκή ποσότητα μορίων αερίων, έχει προξενήσει παγκόσμιο ενδιαφέρον. Οι ιεραρχημένοι πορώδεις άνθρακες, λόγω των εξαιρετικών του ιδιοτήτων, θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την δέσμευση CO₂. Η επιπλέον τροποποίηση του HPC με νανοσωματίδια σιδήρου, προσφέρει τη δυνατότητα της εύκολης ανάκτησης και επαναχρησιμοποίησης του υλικού, με αποτέλεσμα να διευκολύνει τις διεργασίες και να μειώνει το κόστος τους.

Το HPCFe που αναπτύχθηκε στα πλαίσια αυτής της εργασίας, θα μπορούσε να βρει εφαρμογή και στον περιορισμό ρυπαντών που βρίσκονται στο νερό και στο έδαφος. Τα λύματα των βιομηχανιών περιέχουν πολύ μεγάλες ποσότητες ουσιών (φαινολικές ενώσεις, πολυκυκλικούς αρωματικούς υδρογονάνθρακες, χρωστικές κ.α.), οι οποίες όταν συσσωρεύονται αποτελούν μεγάλο πρόβλημα για το περιβάλλον και για τον άνθρωπο. Έτσι λοιπόν, εκμεταλλευόμενοι την πορώδη δομή του υλικού αυτού, και συνδυάζοντάς το με ένζυμα που στοχεύουν κατευθείαν αυτές τις ρυπαντικές ουσίες, θα μπορούσαν να αναπτυχθούν συστήματα για τον καθαρισμό των βιομηχανικών λυμάτων.

ΜΕΡΟΣ ΣΤ' - ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Kuchibhatla, S. V. N. T., Karakoti, A. S., Bera, D. & Seal, S. One dimensional nanostructured materials. *Prog. Mater. Sci.* **52**, 699–913 (2007).
2. Mostofizadeh, A., Li, Y., Song, B. & Huang, Y. Synthesis, properties, and applications of low-dimensional carbon-related nanomaterials. *J. Nanomater.* **2011**, 685081 (2011).
3. Cha, C., Shin, S. R., Annabi, N., Dokmeci, M. R. & Khademhosseini, A. Carbon-Based Nanomaterials: Multifunctional Materials for Biomedical Engineering. *ACS Nano* **7**, 2891–2897 (2013).
4. Joseph, S. *et al.* Recent Advances in Functionalized Nanoporous Carbons Derived from Waste Resources and Their Applications in Energy and Environment. *Adv. Sustain. Syst.* **5**, 1–30 (2021).
5. Sang, L. C., Vinu, A. & Coppens, M. O. General description of the adsorption of proteins at their iso-electric point in nanoporous materials. *Langmuir* **27**, 13828–13837 (2011).
6. Cramer, A. J. & Cole, J. M. Removal or storage of environmental pollutants and alternative fuel sources with inorganic adsorbents: Via host-guest encapsulation. *J. Mater. Chem. A* **5**, 10746–10771 (2017).
7. Bennett, J. A., Wilson, K. & Lee, A. F. Catalytic applications of waste derived materials. *J. Mater. Chem. A* **4**, 3617–3637 (2016).
8. Singh, G. *et al.* A review on the synthesis and applications of nanoporous carbons for the removal of complex chemical contaminants. *Bull. Chem. Soc. Jpn.* **94**, 1232–1257 (2021).
9. Fu, R. W. *et al.* Hierarchical porous carbons: design, preparation, and performance in energy storage. *Xinxing Tan Cailiao/New Carbon Mater.* **26**, 171–179 (2011).
10. Guo, T. *et al.* Hierarchically Porous Organic Materials Derived From Copolymers: Preparation and Electrochemical Applications. *Polym. Rev.* **59**, 149–186 (2019).
11. Zhou, X. L., Zhang, H., Shao, L. M., Lü, F. & He, P. J. Preparation and Application of Hierarchical Porous Carbon Materials from Waste and Biomass: A Review. *Waste and Biomass Valorization* **12**, 1699–1724 (2021).
12. Zhang, M. *et al.* Engineered/designer hierarchical porous carbon materials for organic pollutant removal from water and wastewater: A critical review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **51**, 2295–2328 (2021).
13. Liu, Y. N., Zhang, J. N., Wang, H. T., Kang, X. H. & Bian, S. W. Boosting the electrochemical performance of carbon cloth negative electrodes by constructing hierarchically porous nitrogen-doped carbon nanofiber layers for all-solid-state asymmetric supercapacitors. *Mater. Chem. Front.* **3**, 25–31 (2019).

14. Sun, M. *et al.* Nitrogen-rich hierarchical porous carbon nanofibers for selective oxidation of hydrogen sulfide. *Fuel Process. Technol.* **191**, 121–128 (2019).
15. Li, Z. *et al.* High-energy quasi-solid-state supercapacitors enabled by carbon nanofoam from biowaste and high-voltage inorganic gel electrolyte. *Carbon N. Y.* **149**, 273–280 (2019).
16. Liu, H. *et al.* 3D hierarchical porous-structured biochar aerogel for rapid and efficient phenicol antibiotics removal from water. *Chem. Eng. J.* **368**, 639–648 (2019).
17. Xu, F. *et al.* Engineering pore ratio in hierarchical porous carbons towards high-rate and large-volumetric performances. *Microporous Mesoporous Mater.* **282**, 205–210 (2019).
18. Flexer, V., Brun, N., Destribats, M., Backov, R. & Mano, N. A novel three-dimensional macrocellular carbonaceous biofuel cell. *Phys. Chem. Chem. Phys.* **15**, 6437–6445 (2013).
19. García, A., Nieto, A., Vila, M. & Vallet-Regí, M. Easy synthesis of ordered mesoporous carbon containing nickel nanoparticles by a low temperature hydrothermal method. *Carbon N. Y.* **51**, 410–418 (2013).
20. Jiao, F. *et al.* Synthesis of ordered mesoporous NiO with crystalline walls and a bimodal pore size distribution. *J. Am. Chem. Soc.* **130**, 5262–5266 (2008).
21. Kim, M. H., Kim, K. B., Park, S. M. & Roh, K. C. Hierarchically structured activated carbon for ultracapacitors. *Sci. Rep.* **6**, 2–7 (2016).
22. Kamat, P. V. Boosting the efficiency of quantum dot sensitized solar cells through modulation of interfacial charge transfer. *Acc. Chem. Res.* **45**, 1906–1915 (2012).
23. Estevez, L. *et al.* A facile approach for the synthesis of monolithic hierarchical porous carbons-high performance materials for amine based CO₂ capture and supercapacitor electrode. *Energy Environ. Sci.* **6**, 1785–1790 (2013).
24. Deville, S., Viazzi, C. & Guizard, C. Ice-structuring mechanism for zirconium acetate. *Langmuir* **28**, 14892–14898 (2012).
25. Gutiérrez, M. C., Ferrer, M. L., Mateo, C. R. & Monte, F. Del. Freeze-drying of aqueous solutions of deep eutectic solvents: A suitable approach to deep eutectic suspensions of self-assembled structures. *Langmuir* **25**, 5509–5515 (2009).
26. Estevez, L. *et al.* Hierarchically Porous Graphitic Carbon with Simultaneously High Surface Area and Colossal Pore Volume Engineered via Ice Templating. *ACS Nano* **11**, 11047–11055 (2017).
27. Fratzl, P. & Weinkamer, R. Nature's hierarchical materials. *Prog. Mater. Sci.* **52**, 1263–1334 (2007).
28. Dai, J. *et al.* Fe₃C/Fe/C Magnetic Hierarchical Porous Carbon with Micromesopores for Highly Efficient Chloramphenicol Adsorption :

- Magnetization , Graphitization, and Adsorption Properties Investigation. *Ind. Eng. Chem. Res.* **57**, 3510–3522 (2018).
29. Konikkara, N., Kennedy, L. J. & Vijaya, J. J. Preparation and characterization of hierarchical porous carbons derived from solid leather waste for supercapacitor applications. *J. Hazard. Mater.* **318**, 173–185 (2016).
 30. Tekin, K., Karagöz, S. & Bektaş, S. A review of hydrothermal biomass processing. *Renew. Sustain. Energy Rev.* **40**, 673–687 (2014).
 31. Song, Y. *et al.* Hierarchical porous carbon spheres derived from larch sawdust via spray pyrolysis and soft - templating method for supercapacitors. *SN Appl. Sci.* **1**, 1–10 (2019).
 32. Gong, J. *et al.* Sustainable conversion of mixed plastics into porous carbon nanosheets with high performances in uptake of carbon dioxide and storage of hydrogen. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **2**, 2837–2844 (2014).
 33. Gong, J. *et al.* Converting real-world mixed waste plastics into porous carbon nanosheets with excellent performance in the adsorption of an organic dye from wastewater. *J. Mater. Chem. A* **3**, 341–351 (2015).
 34. Gong, J. *et al.* Upcycling waste polypropylene into graphene flakes on organically modified montmorillonite. *Ind. Eng. Chem. Res.* **53**, 4173–4181 (2014).
 35. Zhang, H., Zhou, X. L., Shao, L. M., Lü, F. & He, P. J. Hierarchical Porous Carbon Spheres from Low-Density Polyethylene for High-Performance Supercapacitors. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **7**, 3801–3810 (2019).
 36. Wang, X. *et al.* Heteroatom-doped graphene materials: Syntheses, properties and applications. *Chem. Soc. Rev.* **43**, 7067–7098 (2014).
 37. Sheng, Z. *et al.* Catalyst-free synthesis of nitrogen-doped graphene via thermal annealing graphite oxide with melamine and its excellent electrocatalysis. *ACS nanoletters* **5**, 4350–4358 (2011).
 38. Bonaccorso, F. *et al.* Graphene, related two-dimensional crystals, and hybrid systems for energy conversion and storage. *Science (80-.)*. **347**, (2015).
 39. Dutta, S., Bhaumik, A. & Wu, K. C. W. Hierarchically porous carbon derived from polymers and biomass: Effect of interconnected pores on energy applications. *Energy Environ. Sci.* **7**, 3574–3592 (2014).
 40. Chen, W. *et al.* Fast microwave self-activation from chitosan hydrogel bead to hierarchical and O, N co-doped porous carbon at an air-free atmosphere for high-rate electrodes material. *Carbohydr. Polym.* **219**, 229–239 (2019).
 41. Han, B., Cheng, G., Wang, Y. & Wang, X. Structure and functionality design of novel carbon and faradaic electrode materials for high-performance capacitive deionization. *Chem. Eng. J.* **360**, 364–384 (2019).
 42. Anderson, M. A., Cudero, A. L. & Palma, J. Capacitive deionization as an electrochemical means of saving energy and delivering clean water.

- Comparison to present desalination practices: Will it compete? *Electrochimica Acta* vol. 55 3845–3856 (2010).
43. Burn, S. *et al.* Desalination techniques - A review of the opportunities for desalination in agriculture. *Desalination* **364**, 2–16 (2015).
 44. Zhao, S. *et al.* Creating 3D Hierarchical Carbon Architectures with Micro-, Meso-, and Macropores via a Simple Self-Blowing Strategy for a Flow-through Deionization Capacitor. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **8**, 18027–18035 (2016).
 45. Chen, L. F., Huang, Z. H., Liang, H. W., Gao, H. L. & Yu, S. H. Three-dimensional heteroatom-doped carbon nanofiber networks derived from bacterial cellulose for supercapacitors. *Adv. Funct. Mater.* **24**, 5104–5111 (2014).
 46. Manthiram, A., Fu, Y., Chung, S., Zu, C. & Su, Y. Rechargeable Lithium – Sulfur Batteries. *Chem. Rev.* **114**, 11751–11787 (2014).
 47. Sun, M. H. *et al.* Applications of hierarchically structured porous materials from energy storage and conversion, catalysis, photocatalysis, adsorption, separation, and sensing to biomedicine. *Chem. Soc. Rev.* **45**, 3479–3563 (2016).
 48. Wang, T. *et al.* Bacteria-Derived Biological Carbon Building Robust Li-S Batteries. *Nano Lett.* **19**, 4384–4390 (2019).
 49. Xia, L., Song, Z., Zhou, L., Lin, D. & Zheng, Q. Nitrogen and oxygen dual-doped hierarchical porous carbon derived from rapeseed meal for high performance lithium–sulfur batteries. *J. Solid State Chem.* **270**, 500–508 (2019).
 50. Scott, V., Gilfillan, S., Markusson, N., Chalmers, H. & Haszeldine, R. S. Last chance for carbon capture and storage. *Nat. Clim. Chang.* **3**, 105–111 (2013).
 51. Markewitz, P. *et al.* Worldwide innovations in the development of carbon capture technologies and the utilization of CO₂. *Energy Environ. Sci.* **5**, 7281–7305 (2012).
 52. Chen, W. *et al.* Template-free and fast one-step synthesis from enzymatic hydrolysis lignin to hierarchical porous carbon for CO₂ capture. *Microporous Mesoporous Mater.* **280**, 57–65 (2019).
 53. Mane, S., Li, Y. X., Liu, X. Q. & Sun, L. B. Development of High Yielded Sn-Doped Porous Carbons for Selective CO₂ Capture. *ACS Sustain. Chem. Eng.* **7**, 10383–10392 (2019).
 54. Gkantzou, E. *et al.* Trends in the development of innovative nanobiocatalysts and their application in biocatalytic transformations. *Biotechnol. Adv.* **51**, 107738 (2021).
 55. Rai, M. *et al.* Emerging role of nanobiocatalysts in hydrolysis of lignocellulosic biomass leading to sustainable bioethanol production. *Catal. Rev. - Sci. Eng.* **61**, 1–26 (2019).

56. Husain, Q. Nanomaterials Immobilized Cellulolytic Enzymes and their Industrial Applications: A Literature Review. *Nanomater. Immobil. Cellulolytic Enzym. their Ind. Appl. A Lit. Rev. JSM Biochem Mol Biol* **4**, 1029 (2017).
57. Bhardwaj, N., Kumar, B., Agrawal, K. & Verma, P. Current perspective on production and applications of microbial cellulases: a review. *Bioresources and Bioprocessing* vol. 8 95–129 (2021).
58. Cipolatti, E. P. *et al.* Nanomaterials for biocatalyst immobilization-state of the art and future trends. *RSC Adv.* **6**, 104675–104692 (2016).
59. Homaei, A. A., Sariri, R., Vianello, F. & Stevanato, R. Enzyme immobilization: An update. *J. Chem. Biol.* **6**, 185–205 (2013).
60. Zucca, P. & Sanjust, E. Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: Methods and mechanisms. *Molecules* **19**, 14139–14194 (2014).
61. Pavlidis, I. V., Patila, M., Bornscheuer, U. T., Gournis, D. & Stamatis, H. Graphene-based nanobiocatalytic systems: recent advances and future prospects. *Trends Biotechnol.* **32**, 312–20 (2014).
62. Gao, Y. & Kyrtziz, I. Covalent immobilization of proteins on carbon nanotubes using the cross-linker 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide - A critical assessment. *Bioconjug. Chem.* **19**, 1945–1950 (2008).
63. Estevez, L. *et al.* A facile approach for the synthesis of monolithic hierarchical porous carbons – high performance materials for amine based CO₂ capture and supercapacitor electrode. *Energy Environ. Sci.* **6**, 1785–1790 (2013).
64. Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248–254 (1976).
65. Ghose, T. K. Measurement of cellulase activities. *Pure Appl. Chem.* **59**, 257–268 (1987).
66. Gao, X., Liu, R., Ma, J. & Zhang, H. Z. Z. Combined dual-metal templates for fabrication of magnetic hierarchical porous carbon for highly efficient removal of 4-nitrophenol. *J. Porous Mater.* **23**, 157–164 (2016).
67. Papadopoulou, A., Zarafeta, D., Galanopoulou, A. P. & Stamatis, H. Enhanced catalytic performance of *Trichoderma reesei* cellulase immobilized on magnetic hierarchical porous carbon nanoparticles. *Protein J.* **38**, 640–648 (2019).
68. Orfanakis, G. *et al.* Hybrid nanomaterials of magnetic iron nanoparticles and graphene oxide as matrices for the immobilization of β -glucosidase: Synthesis, characterization, and biocatalytic properties. *Front. Mater.* **5**, 1–11 (2018).
69. Giannakopoulou, A. *et al.* Development of a four-enzyme magnetic nanobiocatalyst for multi-step cascade reactions. *Catalysts* **9**, 995 (2019).

70. Siyasukh, A., Chimupala, Y. & Tonanon, N. Preparation of magnetic hierarchical porous carbon spheres with graphitic features for high methyl orange adsorption capacity. *Carbon N. Y.* **134**, 207–221 (2018).
71. Abraham, R. E., Verma, M. L., Barrow, C. J. & Puri, M. Suitability of magnetic nanoparticle immobilised cellulases in enhancing enzymatic saccharification of pretreated hemp biomass. *Biotechnol. Biofuels* **7**, 1–12 (2014).
72. Gao, J. *et al.* Rapid Immobilization of Cellulase onto Graphene Oxide with a Hydrophobic Spacer. *Catalysts* **8**, 180 (2018).
73. Jordan, J., Kumar, C. S. S. R. & Theegala, C. Preparation and characterization of cellulase-bound magnetite nanoparticles. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **68**, 139–146 (2011).
74. Patila, M. *et al.* Graphene oxide derivatives with variable alkyl chain length and terminal functional groups as supports for stabilization of cytochrome c. *Int. J. Biol. Macromol.* **84**, 227–235 (2016).
75. Patila, M. *et al.* Preparation and biochemical characterisation of nanoconjugates of functionalized carbon nanotubes and cytochrome c. *Nanomedicine Res. J.* **3**, 10–18 (2018).
76. Ungurean, M., Paul, C. & Peter, F. Cellulase immobilized by sol-gel entrapment for efficient hydrolysis of cellulose. *Bioprocess Biosyst. Eng.* **36**, 1327–1338 (2013).
77. Zang, L. *et al.* Preparation of magnetic chitosan nanoparticles as support for cellulase immobilization. *Ind. Eng. Chem. Res.* **53**, 3448–3454 (2014).

ΜΕΡΟΣ Ζ – ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα ερευνητική διπλωματική εργασία πραγματοποιήθηκε σύνθεση και χαρακτηρισμός ενός σύνθετου νανοϋλικού. Αναλυτικότερα, αναπτύχθηκε ένα νανοςύνθετο υλικό ιεραρχημένου πορώδη άνθρακα μέσω της εισαγωγής νανოსωματιδίων σιδήρου, ούτως ώστε να επιτευχθεί η σύνθεση ενός υλικού κατάλληλου για χρήση σε διάφορες ενεργειακές, καταλυτικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Πραγματοποιήθηκε χαρακτηρισμός του συντιθέμενου σύνθετου νανοϋλικού με έναν συνδυασμό τεχνικών χαρακτηρισμού που περιλάμβανε την περίθλαση ακτίνων X, την θερμική ανάλυση, την φασματοσκοπία μέσου υπερύθρου, τη φασματοσκοπία φωτοηλεκτρονίων ακτίνων X, την ποροσιμετρία N₂, την ηλεκτρονική μικροσκοπία σάρωσης, και την μικροσκοπία ατομικής δύναμης. Επιπλέον, το υβριδικό νανοϋλικό χρησιμοποιήθηκε ως φορέας τόσο για την ακινητοποίηση ενός ενζύμου με μεγάλο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον, όσο και για τη δημιουργία ενός δι-ενζυμικού συστήματος μέσω της συν-ακινητοποίησης δύο ενζύμων. Τα νανοβιοκαταλυτικά συστήματα που παρασκευάστηκαν μελετήθηκαν ως προς τις βιοχημικές τους ιδιότητες.

ΜΕΡΟΣ Η' – ABSTRACT

The aim of this diploma thesis was focused on the synthesis and characterization of a composite nanomaterial for the development of nanobiocatalytic systems. More specifically, a magnetic hierarchical porous carbon nanocomposite material was developed through the introduction of iron nanoparticles onto its structure, to achieve the synthesis of a material suitable for use in various energy, catalytic and biotechnological applications. Complete characterization of the synthesized composite nanomaterial was performed with a combination of characterization techniques, including X-ray diffraction, thermal analysis, infrared spectroscopy, X-ray photoelectron spectroscopy, N₂ porosimetry, scanning electron microscopy, and atomic force microscopy. In addition, the composite nanomaterial was used as a support both for the immobilization of an enzyme of great biotechnological interest, and for the creation of a bi-enzymatic system through the co-immobilization of two enzymes. The prepared nanobiocatalytic systems were studied for their biochemical properties.