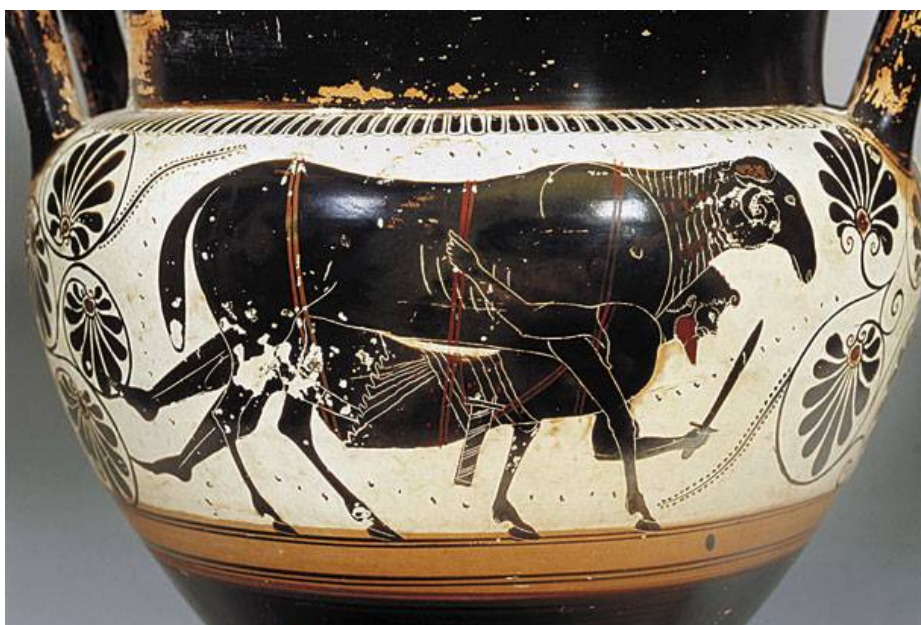


**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΙΩΑΝΝΙΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**Ανάπτυξη Εμπεδησιομετρικών Βιοαισθητήρων και Βιοαισθητήρων
Συντονισμού Επιφανειακών Πλασμονίων για τον Προσδιορισμό της
Πηκτικής Δύναμης της Πυτιάς
σε Πραγματικά Δείγματα**



Μαρία Παναγοπούλου
Χημικός – MSc

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΙΩΑΝΝΙΝΑ 2012

Ημερομηνία αίτησης της κ. Παναγοπούλου Μαρίας: 02/09/2008

Ημερομηνία ορισμού τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής Γ.Σ.Ε.Σ.: 17/10/2008

Μέλη τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής:

Επιβλέπων:

Προδρομίδης Μάμας, Επικουρος Καθηγητής

Μέλη:

Χανιωτάκης Νικόλαος, Καθηγητής

Ρούσης Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής

Ημερομηνία ορισμού θέματος: 17/10/2008

Θέμα: «Ανάπτυξη Εμπεδησιομετρικών Βιοαισθητήρων και Βιοαισθητήρων Συντονισμού Επιφανειακών Πλασμονίων για τον Προσδιορισμό της Πηκτικής Δύναμης της Πυτιάς σε Πραγματικά Δείγματα»

ΔΙΟΡΙΣΜΟΣ ΕΠΤΑΜΕΛΟΥΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗΣ Γ.Σ.Ε.Σ.: 21/12/2011

1. Προδρομίδης Μάμας, Επικουρος Καθηγητής
2. Χανιωτάκης Νικόλαος, Καθηγητής
3. Ρούσης Ιωάννης, Αναπληρωτής Καθηγητής
4. Κονιδάρη Κωνσταντίνα, Επίκουρος Καθηγήτρια
5. Σακκάς Βασίλης, Λέκτορας
6. Σταλίκας Κωνσταντίνος, Αναπληρωτής Καθηγητής
7. Νάνος Χρήστος, Λέκτορας

Έγκριση Διδακτορικής Διατριβής με βαθμό «Άριστα» στις 03/02/2012

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα διδακτορική διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Ιωαννίνων.

Η εργασία αποτελείται από δύο μέρη: το Θεωρητικό και το Πειραματικό. Το Θεωρητικό μέρος περιλαμβάνει τέσσερα κεφάλαια, στα οποία δίνονται γενικές εισαγωγικές έννοιες σχετικά i) με τη δομή των καζεϊνικών μικκυλίων και την αντίδραση αυτών με την πυτιά, ii) με τις τεχνικές φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης, συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων και μικροζυγού κρυστάλλου χαλαζία, iii) με τις μεθόδους ακινητοποίησης βιομορίων καθώς και iv) με την αρχή λειτουργίας των εμπεδησιομετρικών βιοαισθητήρων. Το Πειραματικό μέρος περιλαμβάνει δύο κεφάλαια. Στο πρώτο κεφάλαιο μελετήθηκε η ανάπτυξη εμπεδησιομετρικών βιοαισθητήρων βασισμένων σε ακινητοποιημένα συνθετικά μικκύλια καζεΐνης για τον προσδιορισμό της πηκτικής δύναμης της πυτιάς. Στο δεύτερο κεφάλαιο περιγράφεται η ανάπτυξη ηλεκτροχημικών και οπτικών (SPR) βιοαισθητήρων κ-καζεΐνης για τον προσδιορισμό της πηκτικής δύναμης της πυτιάς. Η βιβλιογραφία του θεωρητικού μέρους δίνεται ξεχωριστά από αυτή του πειραματικού, παρέχοντας στον αναγνώστη τη δυνατότητα ευκολότερης πρόσβασης.

Η απόδοση στα ελληνικά των διάφορων επιστημονικών όρων που αναφέρονται στη διατριβή, έγινε σύμφωνα με το Αγγλοελληνικό και Ελληνοαγγλικό Λεξικό Χημικών και Συγγενών με τη Χημεία Όρων (Κ.Η. Ευσταθίου, Αθήνα, 2005).

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς όλους όσους συνέβαλαν στην πραγματοποίηση αυτής της διατριβής.

Ιδιαίτερα θερμές ευχαριστίες εκφράζονται στον επιβλέποντά μου, Επίκουρο Καθηγητή κ. Μάμαντο Προδρομίδα για την αμέριστη συμπαράσταση, το μεγάλο ενδιαφέρον, τη βοήθεια και τις εύστοχες υποδείξεις του καθόλη τη διάρκεια εκπόνησης της παρούσας διδακτορικής διατριβής.

Επίσης ευχαριστώ θερμά και τα υπόλοιπα δύο μέλη της τριμελούς επιτροπής, τον Καθηγητή κ. Νικόλαο Χανιωτάκη για την πολύτιμη βοήθειά του καθώς και για τη φιλοξενία που μου προσέφερε στο Εργαστήριο Αναλυτικής Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης, για τη διεξαγωγή των πειραμάτων AFM και IR και τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Ιωάννη Ρούσση για τις εύστοχες υποδείξεις του και παρατηρήσεις του.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. κ. Γεώργιο Παναγιώτου, Ερευνητή Α' για τη φιλοξενία του στο Ερευνητικό Ινστιτούτο Μοριακής Ογκολογίας του Ερευνητικού Κέντρου Βιοϊατρικών Επιστημών «Αλέξανδρος Φλέμινγκ» για τη διεξαγωγή των πειραμάτων SPR.

Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να εκφράσω στον διδάκτορα του τμήματος Χημείας κ. Δημήτρη Στεργίου για τις πολύτιμες συμβουλές του και την άψογη συνεργασία μας, και στην διδάκτορα κα. Βίκη Βαμβακάκη για την πολύτιμη βοήθειά της κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων IR και AFM.

Θερμές ευχαριστίες εκφράζω επίσης στους συναδέλφους του Εργαστηρίου Αναλυτικής Χημείας για την αλληλεγγύη, την ηθική τους υποστήριξη, την άριστη συνεργασία και τις εποικοδομητικές συζητήσεις κατά τη διάρκεια της διατριβής.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου για την αμέριστη υποστήριξη και την ανεκτίμητη βοήθεια που μου παρείχαν σε όλη τη διάρκεια εκπόνησης της διατριβής αυτής.

Μαρία Α. Παναγοπούλου
Ιωάννινα, Δεκέμβρης 2011

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1⁰ – ΚΑΖΕΪΝΙΚΑ ΜΙΚΚΥΛΙΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΥΤΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΠΥΤΙΑ

1.1. ΓΕΝΙΚΑ	1
1.2. ΣΥΣΤΑΣΗ ΓΑΛΑΚΤΟΣ	2
1.3. ΜΙΚΚΥΛΙΑ ΚΑΖΕΪΝΗΣ	4
1.3.1. Σύσταση καζεϊνικών μικκυλίων	4
1.3.1. Κλάσματα καζεΐνης	6
1.3.2. Μοντέλα μικκυλίων καζεΐνης	8
1.4. ΠΥΤΙΑ	12
1.5. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΜΙΚΚΥΛΙΩΝ ΚΑΖΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΥΤΙΑ	15
1.5.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την αντίδραση	18
1.5.1.1. Επίδραση της θερμοκρασίας	18
1.5.1.2. Επίδραση της συγκέντρωσης χυμοσίνης	19
1.5.1.3. Επίδραση του pH	20
1.5.1.4. Επίδραση των ιόντων ασβεστίου	21
1.5.1.5. Επίδραση της προσθήκης NaCl	21
1.5.1.6. Θερμική κατεργασία του γάλακτος	21

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2⁰ – ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗΣ

ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ: Φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης, Συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων, Μικροζυγός κρυστάλλου χαλαζία

2.1. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗΣ ΕΜΠΕΔΗΣΗΣ	23
2.2. ΓΕΝΙΚΗ ΘΕΩΡΗΣΗ	24
2.3. Ο ΟΡΟΣ ΕΜΠΕΔΗΣΗ	28

2.4. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΝΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ	30
2.4.1. Κυματομορφές διέγερσης	30
2.4.2. Εύρος συχνοτήτων	32
2.5. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΕΜΠΕΔΗΣΗΣ	33
2.6. ΑΠΛΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΥΚΛΩΜΑΤΩΝ	34
2.7. ΚΑΤΑΝΕΜΗΜΕΝΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΥΚΛΩΜΑΤΩΝ	37
2.8. ΚΥΚΛΩΜΑ RANGLES	40
2.9. ΦΑΣΜΑΤΑ ΕΜΠΕΔΗΣΗΣ «ΣΥΝΘΕΤΩΝ» ΚΥΚΛΩΜΑΤΩΝ	46
2.10. ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΕΜΠΕΔΗΣΗΣ	49
2.11. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ	51
2.11.1. Αναλύτες απόκρισης συχνότητας	52
2.11.2. Ενισχυτές εγκλίδωσης	53
2.12. ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΩΝ ΠΛΑΣΜΟΝΙΩΝ	54
2.13. ΜΙΚΡΟΖΥΓΟΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΥ ΧΑΛΑΖΙΑ	60
2.13.1. Πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο	61
2.13.2 Αντίστροφο πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο	62

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3⁰ – ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ

3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	67
3.2. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ENZYMΩΝ	67
3.3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ	70
3.4. ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ	71
3.4.1. Προσρόφηση	71
3.4.2. Ενθυλάκωση σε ημιπερατά υλικά	72
3.4.3. Παγίδευση βιομορίων σε πηκτή πολυμερούς	73
3.5. ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ	74
3.5.1. Διασταυρούμενη σύνδεση	75
3.5.2. Ομοιοπολική σύνδεση	76
3.5.2.1. Μέθοδος καρβοδιϊμιδίου	78
3.5.2.2. Μέθοδος γλουταραλδεϋδης	81

3.6. ΑΥΤΟ-ΔΙΑΤΑΣΣΟΜΕΝΕΣ ΜΟΝΟΣΤΙΒΑΔΕΣ	83
3.6.1. Σύνδεση χρυσού-θειολών	83
3.6.1.1. Διάφοροι τύποι θειολών	87

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4⁰- ΕΜΠΕΔΗΣΙΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΕΣ

4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	91
4.2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΧΩΡΗΤΙΚΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ	93
4.3. ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΕΜΠΕΔΗΣΙΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ	97

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ 101

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1⁰ – ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΜΠΕΔΗΣΙΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΠΗΚΤΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ ΤΗΣ ΠΥΤΙΑΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	105
1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	106
1.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	109
1.2.1. Αντιδραστήρια	109
1.2.2. Παρασκευή συνθετικών μικκυλίων καζεΐνης	110
1.2.3. Πειραματική διάταξη	111
1.2.4. Σχηματισμός SAMs και ακινητοποίηση καζεϊνικών μικκυλίων	111
1.2.5. Πορεία εργασίας – Υπολογισμοί	113
1.2.6. Μέθοδος αναφοράς για τον υπολογισμό της πηκτικής δύναμης της πυτίας (μέθοδος Berridge)	114
1.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	115
1.3.1. Βιοαισθητήρες Au/TA/ACM	116

1.3.1.1. Μελέτες CV και EIS	119
1.3.1.2. Απόδοση βιοαισθητήρων Au/TA/ACM	122
1.3.2. Απόδοση βιοαισθητήρων Au/CYS/ACM	126
1.3.3. Απόδοση βιοαισθητήρων Au/DTSP/ACM	129
1.3.4. Μελέτες μικροσκοπίας ατομικής δύναμης	134
1.3.5. Μελέτες σε μικροζυγό κρυστάλλου χαλαζία	139
1.3.6. Μελέτες FT-IR	140
1.4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	143

**ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2⁰– ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΟΠΤΙΚΩΝ
(SPR) ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ Κ-ΚΑΖΕΪΝΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ
ΤΗΣ ΠΗΚΤΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ ΤΗΣ ΠΥΤΙΑΣ**

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	145
2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	146
2.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	147
2.2.1. Αντιδραστήρια	147
2.2.2. Πειραματική διάταξη	148
2.2.3. Κατασκευή ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων	148
2.2.4. Κατασκευή βιοαισθητήρων SPR	149
2.2.5. Πορεία εργασίας – Υπολογισμοί	150
2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ	150
2.3.1. Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες	152
2.3.1.1. Ακίνητοποίηση κ-καζεΐνης	152
2.3.1.2. Απόδοση ηλεκτροδίων Au/DTSP/k-CN	154
2.3.1.3. Βελτιστοποίηση πειραματικών μεταβλητών	157
2.3.2. Μελέτες SPR	161
2.3.3. Εφαρμογή των βιοαισθητήρων σε δείγματα πυτιάς	164
2.4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	166

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ	167
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	173
SUMMARY	175
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1 – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ	177
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2 – ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΑΜΙΝΟΞΕΕΩΝ	179
ΛΙΣΤΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ	181

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΚΑΖΕΪΝΙΚΑ ΜΙΚΚΥΛΙΑ ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΑΥΤΩΝ ΜΕ ΤΗΝ ΠΥΤΙΑ

1.1. ΓΕΝΙΚΑ

Η ιστορία του τυριού είναι μακρόχρονη και συνδέεται με την εξημέρωση των γαλακτοπαραγωγικών ζώων. Οι ρίζες της τυροκομίας δεν είναι γνωστές, πιστεύεται όμως, ότι το τυρί παρασκευάστηκε πριν από 12.000 χρόνια περίπου. Είναι πιθανό η παρασκευή του να έγινε εντελώς τυχαία, κατά τη μεταφορά του γάλακτος μέσα σε στομάχια νεαρών ζώων. Από τη μυθολογία ακόμα, λέγεται ότι οι θεοί έστειλαν τον Αρισταίο, γιο του Απόλλωνα, να διδάξει στους Έλληνες την τυροκομία [Lucey, 2002 – **Ιστότοπος 1**].

Καταγραφές για την παρασκευή και την κατανάλωση τυριού στην αρχαία Ελλάδα υπάρχουν πάρα πολλές, όπως από τον Αριστοτέλη, τον Πυθαγόρα και πολλούς άλλους αρχαίους συγγραφείς. Ήταν δε γνωστό τουλάχιστον από την εποχή του Ομήρου (8^ο π.χ. αιώνα), το τυρί που παρασκεύαζε ο Κύκλωπας Πολύφημος το οποίο θεωρείται ο πρόδρομος του τυριού φέτα. Μεταφέροντας το γάλα που συνέλλεγε από τα πρόβατά του, μέσα σε ασκούς από στομάχια ζώων, διαπίστωσε, ότι το γάλα έπηξε σε μια στερεά, εύγευστη και διατηρήσιμη μορφή. Στο μουσείο των Δελφών φυλάσσεται ένα αγαλματίδιο του 6^{ου} π.Χ. αιώνα που αναπαριστά την έξοδο του Οδυσσέα κρεμασμένο κάτω από το αγαπημένο κριάρι του Κύκλωπα.

Μετά από 12.000 χρόνια ο τρόπος παραγωγής του τυριού φέτα παραμένει ο ίδιος διαφέροντας μόνο σε τομείς, όπως η αυτοματοποίηση και η συσκευασία. Οι αρχαίοι

Έλληνες το προϊόν που προερχόταν από την πήξη του γάλακτος το έλεγαν "τυρί". Η ονομασία φέτα χρονολογείται από το 17^ο αιώνα και πιθανότατα αναφέρεται στην πρακτική κοπής του τυριού σε φέτες για να εισαχθεί στα βαρέλια. Η ονομασία αυτή επικράτησε οριστικά τον 19^ο αιώνα και από τότε χαρακτηρίζει το τυρί άλμης που παρασκευάζεται στην Ελλάδα, με συγκεκριμένη τεχνολογία από αιγοπρόβειο γάλα.

Στη διάρκεια του προηγούμενου αιώνα, η μαζική μετανάστευση Ελλήνων σε διάφορες χώρες και κυρίως στην Αυστραλία, τις Ηνωμένες Πολιτείες, τον Καναδά και τη Γερμανία. Με τον τρόπο αυτό δημιουργήθηκαν Ελληνικές κοινότητες, τα μέλη των οποίων διατήρησαν σε μεγάλο βαθμό τις διατροφικές τους συνήθειες. Έτσι δημιουργήθηκαν νέες αγορές για το τυρί σε διαφορετικά μέρη του κόσμου με αποτέλεσμα την ανάπτυξη ενός διεθνούς εμπορίου γύρω από τη φέτα [**Ιστότοπος 1**].

1.2. ΣΥΣΤΑΣΗ ΓΑΛΑΚΤΟΣ

Ως γάλα ορίζεται το λευκό, υποκίτρινο υγρό που βγαίνει από το μαστό των θηλέων θηλαστικών ζώων μετά τον τοκετό τους. Σύμφωνα με την Ελληνική νομοθεσία, γάλα είναι το απαλλαγμένο από πρωτόγαλα προϊόν που παίρνουμε από τους μαστούς γαλακτοφόρων ζώων μετά από ένα πλήρες, ολοκληρωτικό και χωρίς διακοπή άρμεγμα [**Qi, 2007 – Ιστότοπος 2**].

Το γάλα είναι μία τροφή υψηλής θρεπτικής αξίας. Περιέχει πολλά θρεπτικά συστατικά, μερικά από τα οποία είναι τόσο σπάνια και δεν υπάρχουν πουθενά αλλού στη φύση. Η υψηλή θρεπτική αξία του γάλακτος οφείλεται όχι μόνο στις πρωτεΐνες που περιέχει αλλά και σε άλλα απαραίτητα συστατικά, όπως είναι το ασβέστιο, ο φωσφόρος, διάφορες βιταμίνες, υδατάνθρακες, κ.ά. Για αυτό το λόγο το γάλα χρησιμοποιείται ως πρώτη, αλλά και μοναδική τροφή για τα νεογέννητα. Το γάλα από διάφορα είδη ζώων (αγελαδινό, πρόβειο, γίδινο) παρουσιάζει μόνο ποσοτικές διαφορές ως προς τη σύσταση [**Κεχαγιάς, 1997 – Horn, 2002 – Ιστότοπος 3**]. Τα κύρια συστατικά του γάλακτος παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.1.

Πίνακας 1.1. Κύρια συστατικά του αγελαδινού γάλακτος.

Συστατικά	Περιεκτικότητα (%)
Νερό	88
Λίπος	3,7
Πρωτεΐνες	3,2
Λακτόζη	4,7
Ανόργανα άλατα	0,75

Οι κυριότεροι παράγοντες που επηρεάζουν, ποσοτικά ή ποιοτικά, τη σύσταση του γάλακτος είναι [Κεχαγιάς, 1997]:

1. Το είδος και η φυλή του ζώου
2. Κληρονομικά χαρακτηριστικά
3. Ο αριθμός των αμέλξεων ανά εικοσιτετράωρο
4. Η περίοδος της ημέρας
5. Η σωματική κατάσταση του ζώου
6. Η διάρκεια της ξηρής περιόδου
7. Η συχνότητα των τοκετών
8. Ο οργανισμός
9. Η ηλικία του ζώου
10. Η κόπωση
11. Η υγιεινή κατάσταση του ζώου
12. Οι συνθήκες διατροφής του
13. Το στάδιο της γαλακτικής περιόδου
14. Η θερμοκρασία περιβάλλοντος
15. Ο τρόπος άμελξης
16. Η ηρεμία του ζώου

Το γάλα αποτελεί μια από τις σημαντικότερες πηγές πρωτεϊνών για τον άνθρωπο [Τσοχατζής, 2005]. Το πρωτεϊνικό κλάσμα του γάλακτος αποτελείται από ένα ετερογενές μίγμα, το οποίο αρχικά θεωρήθηκε ότι περιέχει τις πρωτεΐνες, καζεΐνη, γαλακταλβουμίνη και γαλακτοσφαιρίνες. Σύμφωνα με νεώτερες μελέτες, οι κύριες

πρωτεΐνες σε όλα τα είδη γάλακτος, (αγελαδινό, πρόβειο και κατσικίσιο) είναι η καζεΐνη, η β-λακτοσφαιρίνη, η α-λακταλβουμίνη, η αλβουμίνη ορού και οι ανοσοσφαιρίνες. Η σύνθεση αυτών (εκτός της αλβουμίνης και των ανοσοσφαιρινών) πραγματοποιείται στα επιθηλιακά κύτταρα του μαστικού αδένου από αμινοξέα που μεταφέρει το αίμα. Στο γάλα απαντούν και άλλες αζωτούχες ενώσεις (μη πρωτεϊνικό άζωτο 5%) π.χ. κρεατινίνη, κρεατίνη, ουρία, αμινοξέα, αμμωνία κ.λπ. [Τσοχατζής, 2005 – Κοντομηνάς –Farrell, 2006].

Ορός του γάλακτος ή τυρόγαλα ονομάζεται το θολό υποκίτρινο υγρό που παραμένει μετά την απομάκρυνση του λίπους και της καζεΐνης. Η τελευταία απομακρύνεται είτε με οξίνιση, είτε με την επίδραση της πυτιάς. Ο ορός του γάλακτος περιέχει διάφορα θρεπτικά συστατικά όπως πρωτεΐνες, και γαλακτοσάκχαρο. Οι πρωτεΐνες του ορού είναι οι γαλακταλβουμίνες και οι γαλακτοσφαιρίνες. Σύμφωνα με ηλεκτροφορητικές μεθόδους ανάλυσης, οι γαλακταλβουμίνες αποτελούνται από β-γαλακτογλοβουλίνη, α-γαλακταλβουμίνη και οροαλβουμίνη. Η γαλακταλβουμίνη λαμβάνεται από το τυρόγαλα με εξαλάτωση με θειϊκό μαγνήσιο. Η τελευταία απαντά σε ελάχιστα ποσά στο γάλα (μερικά χιλιοστόγραμμα ανά λίτρο γάλακτος), και σε αντίθεση με την καζεΐνη και τη γαλακταλβουμίνη, περιέχει γλυκίνη. Θέρμανση του γάλακτος οδηγεί σε καθίζηση τόσο της αλβουμίνης όσο και της σφαιρίνης και το λαμβανόμενο προϊόν αποτελεί την πρώτη ύλη της παρασκευής της μυζήθρας [Ηλιόπουλος, 1997 – Κοντομηνάς].

1.3. ΜΙΚΚΥΛΙΑ ΚΑΖΕΪΝΗΣ

1.3.1. Σύσταση καζεϊνικών μικκυλίων

Η ονομασία καζεΐνη προέρχεται από τη λατινική λέξη caseus, που σημαίνει τυρί, τα μικκύλιά της είναι ένα συσσωμάτωμα διαφορετικών κλασμάτων καζεϊνών και ανόργανου φωσφορικού ασβεστίου. Κατά αυτό τον τρόπο η φύση έχει δημιουργήσει ένα σύστημα πακεταρίσματος, που περιλαμβάνει υψηλές συγκεντρώσεις ασβεστίου και φωσφόρου, μέσα σε ένα υγρό (το γάλα), που ρέει εύκολα (χαμηλό ιξώδες). Απουσία των μικκυλίων τα ανόργανα συστατικά του γάλακτος θα καθίζαναν στον μαστικό αδένου, ενώ το πρωτεϊνικό τμήμα του γάλακτος θα είχε υψηλό ιξώδες. Συνεπώς τα μικκύλια αποτελούν ταυτόχρονα ένα μέσο ρευστοποίησης των πρωτεϊνών και διαλυτοποίησης του ασβεστίου

και του φωσφόρου. Με άλλα λόγια, η δημιουργία των μικκυλίων βοηθά στη μεταφορά πρωτεϊνών και ανόργανων συστατικών (Ca, P) από τη μητέρα στο νεογνό [Horne, 2002 – Qi, 2007 – Farrell, 1973, Gebhardt, 2006 – Farrell, 2006]. Η φύση έχει επίσης προνοήσει και για την αποσταθεροποίηση των μικκυλίων, προκειμένου να καλυφθούν οι διατροφικές ανάγκες των νεογνών. Η αποσταθεροποίηση των μικκυλίων πραγματοποιείται στα στομάχια τους, όπου υπάρχει το ένζυμο χυμοσίνη, η οποία υδρολύει την κ-καζεΐνη (ένα από τα κλάσματα καζεΐνης). Έτσι δημιουργείται ένας μαλακός θρόμβος, ο οποίος παραμένει στο στομάχι ανάλογα με το χρόνο που χρειάζεται για να γίνει η γαστρική πέψη, σε αντίθεση με το γάλα που ρέει γρήγορα, διευκολύνοντας την αφομοίωση των συστατικών του. Ένας ακόμα παράγοντας που αποσταθεροποιεί τα μικκύλια της καζεΐνης είναι η οξείδωση, η οποία πραγματοποιείται από τα υγρά του στομάχου, οδηγώντας επίσης στο σχηματισμό του σβόλου. Η ελεγχόμενη υδρόλυση της καζεΐνης χρησιμοποιείται από τις γαλακτοβιομηχανίες προκειμένου να παρασκευαστούν τα προϊόντα του γάλακτος. Ο μηχανισμός που οδηγεί στα συσσωματώματα των μικκυλίων της καζεΐνης, αναπτύσσεται εκτενώς στην παράγραφο 1.5 (σελ.15) [Horne, 2002 – Qi, 2007]. Η εκτεταμένη αποσταθεροποίηση της δομής των καζεϊνικών μικκυλίων και η μερική υδρόλυση των καζεϊνών, ελαττώνει την ποιότητα του γάλακτος και την απόδοση του γάλακτος σε τυρί [Τσοχατζής, 2005].

Στα μικκύλια των καζεϊνών περιέχεται περίπου το 78% του συνολικού αζώτου του γάλακτος. Σε αντίθεση με τα συνηθισμένα επιφανειοδραστικά, τα μικκύλια της καζεΐνης είναι ετερογενή και αποτελούνται από πέντε κλάσματα α_{s1} -, α_{s2} -, β - κ- και γ - σε ποσοστά 38%, 10%, 36%, 13 και 3% στο αγελαδινό γάλα. Τα μόρια αυτά παρουσιάζουν διαβάθμιση του υδρόφιλου χαρακτήρα τους, του συνολικού φορτίου, της περιεκτικότητας σε φωσφόρο και έχουν διαφορετική ικανότητα αλληλεπίδρασης με το ιόν του ασβεστίου, ενώ αλληλεπιδρούν μέσω υδρόφοβων και ηλεκτροστατικών δυνάμεων. Τα μικκύλια των καζεϊνών περιέχουν φωσφορικό οξύ, ασβέστιο και μικρή ποσότητα υδατανθράκων. 1 mM καζεΐνης γάλακτος δεσμεύει περίπου 10 mM φωσφορικού οξέος και οι αντίστοιχες φωσφορικές ομάδες δεσμεύουν με τη σειρά τους ιόντα ασβεστίου μέσω ισχυρών ιοντικών δεσμών. Αυτές οι αλληλεπιδράσεις {καζεΐνη- PO_4 - Ca^{2+} - PO_4 -καζεΐνη} είναι σημαντικές για το σχηματισμό των μικυλίων. Η σταθεροποίηση των καζεϊνών μέσα στο μικκύλιο επιτυγχάνεται με τις υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις και τα συμπλέγματα

ασβεστίου–φωσφορικών ομάδων, μέσω των καταλοίπων της σερίνης με το φωσφόρο. Περίπου το 93% της σύστασης των μικκυλίων είναι πρωτεϊνικής φύσεως, ενώ το 7% αντιστοιχεί στα ανόργανα συστατικά αυτών [Τσοχατζής, 2005 – Κοντομηνάς – Lucey, 2002 – Gebhardt, 2006 – Panouille, 2005– McMahon, 1984 – Semo, 2007]. Τα μικκύλια της καζεΐνης του γάλακτος έχουν σχήμα σχεδόν σφαιρικό και η διάμετρός τους ποικίλει από 50–500 nm (150 nm κατά μέσο όρο) [Ανυφαντάκης, 1994 – Semo, 2007 – Lycey, 2002]. Τα καζεϊνικά μικκύλια είναι εφυδατωμένα και τα σπογγοειδή τμήματά τους περιέχουν περίπου 3,7 g H₂O/g πρωτεΐνης. Ένα μικρό ποσοστό του νερού αυτού συνδέεται χημικά με την πρωτεΐνη, ενώ το υπόλοιπο εγκλωβίζεται στο μικκύλιο [McMahon, 1983].

1.3.1. Κλάσματα καζεΐνης.

Αρχικά, η καζεΐνη θεωρήθηκε ότι ήταν ομοιογενές σώμα, όμως ο Mellander επέτυχε, με την ηλεκτροφόρηση, να τη διαχωρίσει σε τρία κλάσματα τα οποία συμβόλισε με τα ελληνικά γράμματα α, β, γ. Το πρώτο έχει τη μεγαλύτερη ηλεκτροφορική κινητικότητα και το τελευταίο τη μικρότερη. Εκτός από τη διαφορετική ηλεκτροφορητική ικανότητα, που ανακλά τις διαφορές στη δομή τους, τα κλάσματα αυτά διαφέρουν και στη συμπεριφορά τους απέναντι στην πυτιά [Ανυφαντάκης, 1994].

Αρχικά απομονώθηκαν δυο κλάσματα, η α- και η κ-καζεΐνη, και αργότερα διαπιστώθηκε ότι και αυτά ήταν ετερογενή. Σχετικές μελέτες απέδειξαν ότι η α-καζεΐνη αποτελείται βασικά από την α_{s1}-καζεΐνη αλλά και από άλλες πρωτεΐνες σε μικρότερη αναλογία [Τσοχατζής, 2005]. Οι κύριες μορφές της α-καζεΐνης στο αγελαδινό γάλα είναι η α_{s1} και η α_{s2}. Η β-καζεΐνη είναι η κύρια πρωτεΐνη στο αγελαδινό γάλα, αλλά η δευτερεύουσα στο ανθρώπινο γάλα. Η κ-καζεΐνη δρα ως σταθεροποιητής του μικυλλίου, ενώ η γ-καζεΐνη προέρχεται από την πέψη των β-καζεϊνών και βρίσκεται στον αδένα.

Η α_{s1}-καζεΐνη (μοριακό βάρος 23,6 kD, 199 αμινοξικά κατάλοιπα) έχει δυο υδρόφοβες περιοχές στο μόριο της, οι οποίες περιέχουν και όλα τα κατάλοιπα της προλίνης. Η προλίνη είναι γνωστό ότι διαλύει τις δομές της και είναι πιθανόν η έλλειψη ευδιάκριτων δευτεροταγών δομών α-έλικας ή β-φύλλων να οφείλεται στο υψηλό ποσοστό των προλινών στην αλληλουχία της. Οι υδρόφοβες περιοχές διαχωρίζονται από

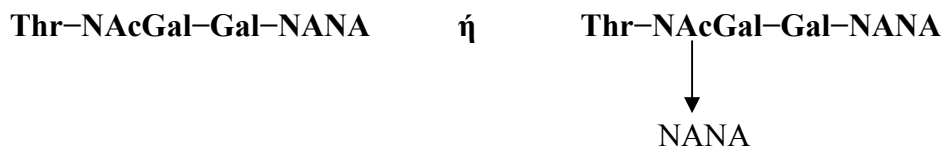
μια πολική περιοχή, η οποία βρίσκεται μεταξύ των καταλοίπων 43 και 80 και συνδέει το μόριο της α_{s1} με το υπόλοιπο μικκύλιο μέσω 8 φωσφορικών ομάδων. Το πολικό τμήμα στην α_{s1} -καζεΐνη περιέχει 12 καρβοξυλικά κατάλοιπα και είναι το πιο αρνητικά φορτισμένο τμήμα της πρωτεΐνης. Η α_{s1} -καζεΐνη μπορεί να κατακρημνιστεί ως ίζημα σε χαμηλά επίπεδα ασβεστίου.

Η α_{s2} -καζεΐνη έχει μοριακό βάρος 25 kD και αποτελείται από 199 αμινοξικά κατάλοιπα, εκ των οποίων τα 10 είναι κατάλοιπα προλίνης, ενώ στην πεπτιδική της αλυσίδα περιλαμβάνονται και δύο κατάλοιπα κυστεΐνης. Η α_{s2} μπορεί λόγω των δισουλφιδικών δεσμών να βρίσκεται με τη μορφή μονομερών ή διμερών. Όμοια με την α_{s1} -καζεΐνη κατακρημνίζεται παρουσία χαμηλών επιπέδων συγκέντρωσης ιόντων ασβεστίου και χαρακτηρίζεται ως η πιο υδρόφιλη καζεΐνη.

Η β -καζεΐνη έχει μοριακό βάρος 24 kD και αποτελείται από 209 αμινοξικά κατάλοιπα, εκ των οποίων τα 35 είναι κατάλοιπα προλίνης. Αποτελείται από μια ισχυρά αρνητικά φορτισμένη περιοχή N και μια απολική περιοχή. Είναι αμφιιτική πρωτεΐνη, η οποία δρα ως τασενεργό μόριο. Μπορεί να πολυμεριστεί ανάλογα με τη θερμοκρασία σε ένα μεγάλο πολυμερές στους 20 °C αλλά δεν πολυμερίζεται στους 4 °C. Είναι λιγότερο ευαίσθητη στην καταβύθιση με το ασβέστιο και περιέχει 5 mol φωσφορικών ομάδων ανά mol πρωτεΐνης [Τσοχατζής, 2005 – Lycey 2002 – Panoullie, 2005 – Farrell, 2006, –Fox – 1982 – Farell, 1973 – Slattery, 1976].

Η κ -καζεΐνη με μοριακό βάρος 19 kD, περιλαμβάνει 169 αμινοξικά κατάλοιπα στην πεπτιδική της αλυσίδα, εκ των οποίων τα 20 είναι κατάλοιπα προλίνης και δύο κυστεΐνης. Λόγω των καταλοίπων της κυστεΐνης είναι δυνατόν να υπάρξουν δισουλφιδικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ των Cys11–Cys11, Cys11–Cys88 και Cys88–Cys88 [Rasmusen, 1992– – Swaisgood, 1975– Swaisgood, 1964]. Είναι πολύ ανθεκτική στην κατακρήμνιση με ασβέστιο, λόγω του μικρού αριθμού των φωσφοσερινών στην αλληλουχία της, ενώ περιέχει μόνο ένα mol φωσφορικής ομάδας ανά mol πρωτεΐνης, και έτσι προστατεύει τις υπόλοιπες καζεΐνες από την κατακρήμνιση. Το ισοηλεκτρικό σημείο της κυμαίνεται από 4,47 έως 5,81. Επιπλέον είναι η μόνη καζεΐνη που περιέχει υδατάνθρακες, το ποσοστό των οποίων αυξάνει και τη σταθερότητα του μικκυλίου. Το υδατανθρακικό της τμήμα είναι δυνατό να αποτελείται από N-ακετυλονευραμικό οξύ (NANA), γαλακτόζη (Gal) και N-ακετυλογαλακτοζαμίνη (NAcGal) και υπάρχει ως

τρισακχαρίτης ή ως τετρασακχαρίτης [Τσοχατζής, 2005 – Lycey 2002 – – Holland, 2004 – Groves, 1992 – Farrell, 2006 – Fox, 1982, – Creamer, 1998 – Slattery, 1976].



Η κ-καζεΐνη περιέχει από 0 έως 5 mol N-ακετυλονευραμικό οξύ ανά mol πρωτεΐνης, ενώ ο αριθμός των μονοσακχαρικών αλυσίδων που μπορούν να συνδεθούν στο πεπτίδιο, (θέσεις Thr 133, Thr 131 Thr 135) κυμαίνεται από 0 έως 3 [Fox, 1982]

```

.....
MMKSFFLVLT.....ILALTLPLFG.....AQEQNQEQPI    RCEKDERFFS    DKIACYIPIQ    YVLSRYRSYG
LNYYQQKPVA  LINNQFLPYP  YYAKPAAVRS  PAQILQWQVL  SNTVPAKSCQ  AQPTTMARHP
HPHLSFMAIP  PKKNQDKTEI  PTINTIASGE  PTSTPTTEAV  ESTVATLEDS  PEVIESPPEI
NTVQVTSTAV
    
```

Σχήμα 1.1. Αλληλουχία της κ-καζεΐνης, μαζί με το πρόδρομο πεπτίδιο, εντός του πλαισίου (πηγή uniprot).

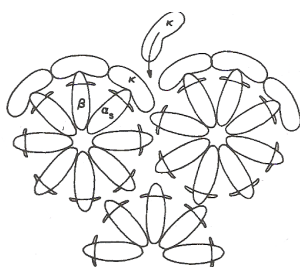
1.3.2. Μοντέλα μικκυλίων καζεΐνης

Από το 1965 αναπτύχθηκαν διάφορα μοντέλα πάνω στη δομή των μικυλίων των καζεϊνών, τα οποία μπορούν να καταταγούν σε τρεις βασικές κατηγορίες: α) μοντέλα επικάλυψης πυρήνα, β) μοντέλα εσωτερικής δομής και γ) μοντέλα υπομονάδων [Ανυφαντάκης 1994 – Farrell, 1973 – Qi, 2007 – Fox, 1982 – McMahon, 1998].

α) Μοντέλο Waugh (1965)

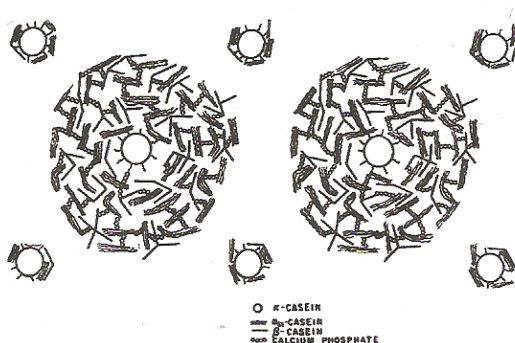
Σύμφωνα με το μοντέλο Waugh κάθε μικκύλιο καζεΐνης αποτελείται από έναν πυρήνα περιορισμένου μεγέθους, που περιλαμβάνει μονομερή των α_{s1} και β -καζεϊνών και στο φλοιό του, μικρές μονάδες που δημιουργούνται από την αλληλεπίδραση της α_s ή β -καζεΐνης με την κ-καζεΐνη απουσία ασβεστίου. Ο φλοιός καλύπτει ομοιόμορφα ολόκληρο τον πυρήνα και έχει προσανατολισμένες τις μονάδες που τον αποτελούν κατά

τέτοιο τρόπο ώστε το μακροπεπτίδιο την κ-καζεΐνης να είναι εκτεθειμένο. Καθώς το μακροπεπτίδιο είναι έντονα υδρόφιλο και έχει μεγάλη συγγένεια με τον ορό του γάλακτος, η τάση των επιφανειών των μικυλλίων να αλληλεπιδρούν είναι περιορισμένη. Περαιτέρω υπάρχει έντονη αλληλεπίδραση μεταξύ του υδρόφοβου para-κ τμήματος της κ-καζεΐνης και των α_{s1} και β -καζεϊνών σχηματίζοντας έτσι μικρές μονάδες στο περίβλημα του πυρήνα [Ανυφαντάκης, 1994 – McMahon 1998 – Dagleish, 2004].



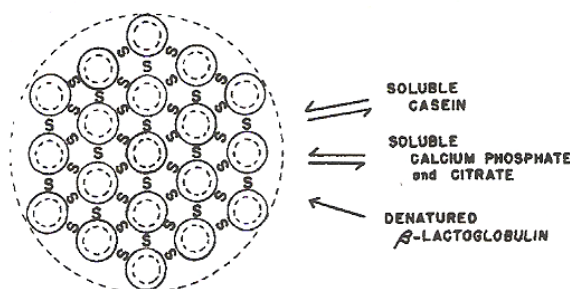
Σχήμα 1.2. α) Σχηματική απεικόνιση μοντέλου Waugh

Στην περίπτωση αυτή τα μικκύλια αποτελούνται από πολυμερή α_s - και β -καζεϊνών γύρω από ένα πυρήνα κ-καζεΐνης. Τα πολυμερή διατηρούνται μαζί με κolloειδές φωσφορικό ασβέστιο, ενώ η κ-καζεΐνη του πυρήνα, η οποία υπάρχει σε διαλυτή μορφή ενωμένη με μικρές ποσότητες α_s και β -καζεϊνών, δε σχετίζεται με τη σταθερότητα των μικκυλίων.



Σχήμα 1.2. β) Σχηματική απεικόνιση μοντέλου Waugh

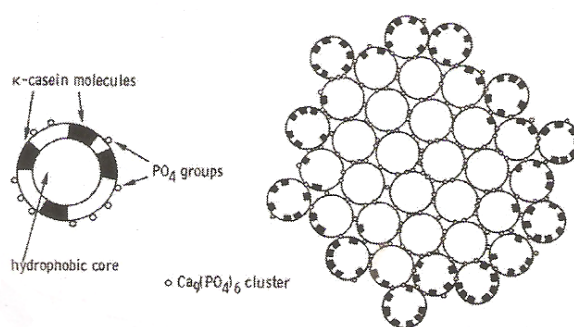
Σύμφωνα με το μοντέλο Μοιτ τα μικκύλια της καζεΐνης αποτελούνται από ένα αριθμό μικρών σφαιρικών μονάδων διαμέτρου $\approx 300 \text{ \AA}$ που σχηματίζονται με ένωση μονομερών α_{s1} -, β -, και κ -καζεϊνών δια μέσου ασβεστίου. Οι μονάδες αυτές ενώνονται με κολλοειδές φωσφορικό ασβέστιο και δημιουργούν τη μικκέλλα [Ανυφαντάκης, 1994 – Farrell, 1973 – McMahon 1998].



Σχήμα 1.2. γ) Σχηματική απεικόνιση μοντέλου Μοιτ.

δ) Μοντέλο Schmidt (1982)

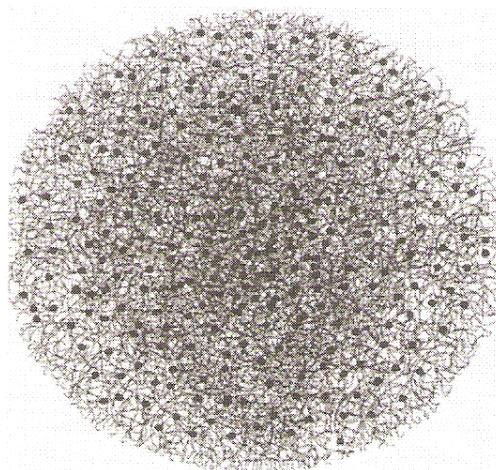
Σύμφωνα με το μοντέλο αυτό, τα μικκύλια σχηματίζονται με την αλληλεπίδραση διαφορετικών πρωτεϊνικών κλασμάτων παρουσία φωσφορικού ασβεστίου το οποίο εγκλωβίζεται στο εσωτερικό τους, ενώ η κ -καζεΐνη βρίσκεται στην επιφάνεια του μικκυλίου [Farrell, 2006 – Qi, 2007].



Σχήμα 1.3. α) Σχηματική απεικόνιση μοντέλου Schmidt

ε) Μοντέλο Holt (1988)

Σύμφωνα με το μοντέλο Holt το φωσφοπεπτιδικό κλάσμα της β-καζεΐνης προσδένεται με συσσωματώματα ασβεστίου-φωσφόρου σχηματίζοντας σταθερά νανοσύμπλοκα συγκεκριμένου μεγέθους και ξεχωριστής σύστασης. Χάρη στην αλληλεπίδραση αυτή οι δομές του φωσφορικού ασβεστίου δεν αναπτύσσονται τυχαία ή απότομα, και αποτελούν το κεντρικό κομμάτι της δομής των καζεϊνικών μικκυλίων. Ο σχηματισμός των παραπάνω νανοσωματιδίων αποτελεί την κινητήρια δύναμη για την πρόσδεση των πρωτεϊνών με τις φωσφορικές ομάδες, σχηματίζοντας ένα αντίστροφο μικκύλιο. Στη συνέχεια το υδρόφοβο τμήμα του μικκυλίου καλύπτεται από πρωτεΐνες στις οποίες προσδένεται επιπλέον ποσότητα φωσφορικού ασβεστίου μέχρι το κolloειδές να αποκτήσει ένα οριακό μέγεθος [Panouille, 2005 – McMahon 1998 – Gebhardt, 2006 – Farrell, 2006].

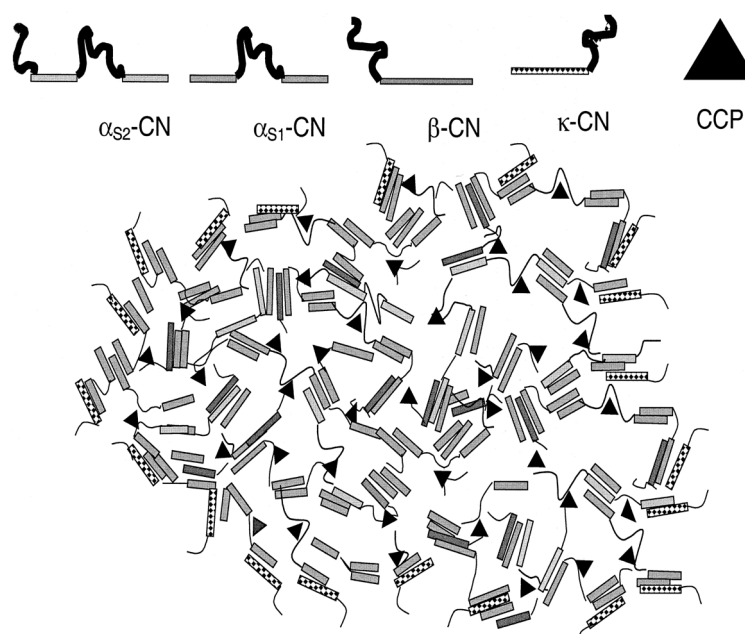


Σχήμα 1.3. β) Σχηματική απεικόνιση μοντέλου Schmidt

στ) Μοντέλο Horne (1989)

Το καζεϊνικό μοντέλο που προτάθηκε από τον Horne, μπορεί να θεωρηθεί πρόεκταση του μοντέλου Holt. Ο Horne μελέτησε τη χημεία της επιφάνειας των μεμονωμένων καζεϊνών και κατέληξε στο συμπέρασμα ότι οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των πρωτεϊνών

είναι μείζονος σημασίας. Σύμφωνα με τον Horne, η υδρόφιλη περιοχή των α_{s1} -, α_{s2} - και β -καζεΐνών, που έχουν πολλά κατάλοιπα φωσφοσερίνης στην πεπτιδική τους αλληλουχία, συνδέονται μεταξύ τους με φωσφορικό ασβέστιο. Οι α - και β -καζεΐνες παραμένουν στο εσωτερικό του μικκυλίου, ενώ η κ -καζεΐνη, βρίσκεται στο εξωτερικό. Τα C-τελικά άκρα της κ -καζεΐνης εκτείνονται στο διάλυμα σχηματίζοντας κατά αυτό τον τρόπο την εξωτερική τριχωτή στιβάδα (outer hairy layer). Η υδρόφιλη αυτή επιφάνεια αποτρέπει τη μη ελεγχόμενη ανάπτυξη του μικκυλίου, και το προστατεύει από περαιτέρω υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις [Panouille, 2005 – McMahon, 1998 – Gebhardt, 2006 – Dalgleish, 2004 – Farrell, 2006].



Σχήμα 1.3. γ) Σχηματική απεικόνιση μοντέλου Schmidt

1.4. ΠΥΤΙΑ

Η πυτιά είναι ένα φυσικό εκχύλισμα ενζύμων που χρησιμοποιείται για την παρασκευή τυριού. Περιέχει δύο βασικά συστατικά, τη χυμοσίνη, σε ποσοστό 70%, και την πεψίνη

σε ποσοστό 30% [Irigoyen, 2001]. Η χυμοσίνη, που είναι συνήθως γνωστή και ως πυτιά, είναι η σημαντικότερη πρωτεΐνάση που προκαλεί την πήξη του γάλακτος. Η ονομασία της χυμοσίνης χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά το 1840 από το Γάλλο φαρμακοποιό Jean-Baptist Beschamps. Το ένζυμο βρίσκεται στο τέταρτο στομάχι των νεαρών μόσχων, προβάτων, κατσικιών και άλλων θηλαστικών [Lucey, 2002 – Andren, 2002 – Anema, 2007].

Μέχρι τον 19^ο αιώνα, τα τυριά παρασκευάζονταν σε οικιακή κλίμακα χρησιμοποιώντας φρέσκα εκχυλίσματα από αποξηραμένα στομάχια μοσχαριών, τα οποία έλαβαν ως τροφή μόνο γάλα. Από το 1850 και μετά δημιουργήθηκαν μικρές βιομηχανίες γαλακτοκομικών προϊόντων, με αποτέλεσμα την αύξηση των απαιτήσεων σε ποσότητες πυτιάς. Έτσι η πυτιά στις μέρες μας λαμβάνεται από κατεψυγμένα στομάχια διαφόρων μηρυκαστικών ζώων, όπως μοσχάρια, κατσίκες και πρόβατα. Επίσης χρησιμοποιείται και πυτιά από χοιρινό (είτε μόνη της είτε αναμιγμένη με πυτιά μοσχαριού σε αναλογία 50:50), καθώς και πυτιά από κοτόπουλο. Η τελευταία χρησιμοποιείται κυρίως σε χώρες που επιβάλλονται περιορισμοί για θρησκευτικούς λόγους. Για την παρασκευή της πυτιάς τα στομάχια τεμαχίζονται και τοποθετούνται σε άλμη περιεκτικότητας 3–10% σε χλωριούχο νάτριο. Ακολουθεί ενεργοποίηση του προενζύμου σε pH στο 4,7 1–2 ώρες, ρύθμιση του pH στην τιμή 5,5, και διήθηση του εκχυλίσματος [Andren, 2002 – Irigoyen, 2001].

Πέραν από τις πυτιές ζωικής προέλευσης χρησιμοποιούνται επίσης πυτιές φυτικές ή μικροβιακής προέλευσης. Στην Πορτογαλία χρησιμοποιείται ευρέως πυτιά που προέρχεται από εκχύλιση των λουλουδιών του γαϊδουράγκαθου του γένους *Cynara cardunculus* [Andren, 2002 – Turhan, 1997 – Silva, 2003], ενώ τα παρασκευάσματα μικροβιακής προέλευσης προέρχονται κυρίως από τους μύκητες *Phizomucor miehie*, *Phizomucor pusillus* και *Cryphonectria parasitica* [Iwasaki, 1967 – Andren, 2002]. Τέλος, είναι δυνατή η παραγωγή χυμοσίνης με την τεχνολογία ανασυνδυασμού του DNA. Κατά αυτό τον τρόπο ενζυμικά παρασκευάσματα χυμοσίνης Β παράγονται από το μύκητα *Aspergillus niger* και από τη ζύμη *Kluyveromyces lactis* [Lucey, 2002 – Andren, 2002]. Εκτός από την προέλευσή τους οι πυτιές διαχωρίζονται επίσης ανάλογα με τη φυσική τους κατάσταση (υγρές, σκόνη, παστίλια, πάστα ακόμα και αποξηραμένα στομάχια ζώων) και τη δυναμικότητά τους [Ιστότοπος 4].

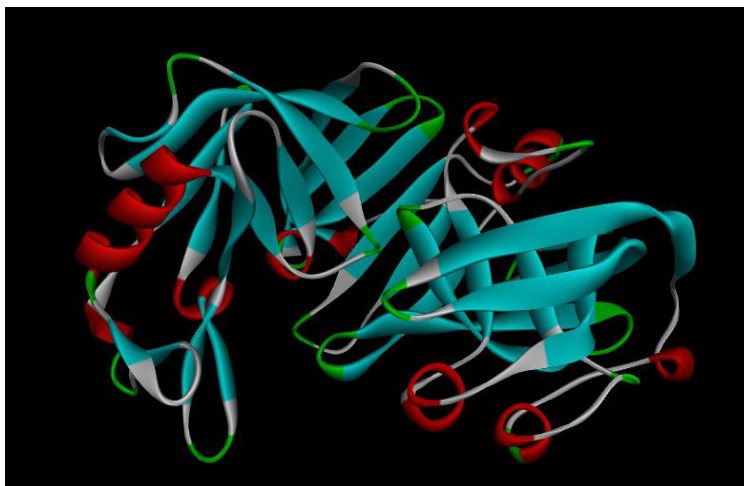
Η αναλογία της χυμοσίνης και της πεψίνης στα στομάχια των θηλαστικών, εξαρτάται τόσο από τη διατροφή όσο και από την ηλικία του ζώου. Από την 10^η μέχρι και την 20^η εβδομάδα της κύησης, ακόμα και κατά τη γέννηση του ζώου, η χυμοσίνη αποτελεί τη βασική πρωτεάση του στομάχου των μοσχारीών. Αν το ζώο εξακολουθεί να τρέφεται αποκλειστικά με γάλα μέχρι και 3 μηνών, το ποσοστό της χυμοσίνης φτάνει το 90%. Σε περίπτωση που δεν έχει απογαλακτιστεί μέχρι και σε ηλικία έξι μηνών το ποσοστό της χυμοσίνης φτάνει το 75%, ενώ μετά τον απογαλακτισμό η συγκέντρωση της χυμοσίνης μειώνεται σε ποσοστό 30%. Με την αύξηση της ηλικίας του ζώου, η συγκέντρωση της χυμοσίνης μειώνεται σταδιακά και στα ενήλικα ζώα άνω των 24 μηνών, η χυμοσίνη βρίσκεται σε ίχνη.

Η χυμοσίνη καθώς και άλλα ένζυμα που προκαλούν πήξη του γάλακτος ανήκουν στις όξινες (ασπαρτικές) πρωτεϊνάσες, οι οποίες χαρακτηρίζονται από υψηλή περιεκτικότητα σε δικαρβοξυλικά και υδροξυ-αμινοξέα και μικρή περιεκτικότητα σε βασικά αμινοξέα. Το μοριακό βάρος των ενζύμων αυτών κυμαίνεται από 30 μέχρι 40 kD. Η χυμοσίνη συγκεκριμένα αποτελείται από 327 αμινοξέα (Σχήμα 1.4), το μοριακό της βάρος φτάνει τα 35 kD, ενώ το ισοηλεκτρικό της σημείο είναι 4,6 [Andren, 2002].

.....
 MRCLVVLLAV FALSQGAIEIT RIPLYKKGKSL RKALKEHGILL EDFLQKQQYG ISSKYSGFGE
 VASVPLTNYL DSQYFGKIYL GTPPQEFTVL FDTGSSDFWV PSYCKSNAC KNHQRFDPK
 SSTFQNLGKR LSIHYGTGSM QGILGYDVT VSNIVDIQQT VGLSTQEPGD VFTYAEFDGI
 LGMAYPSLAS EYSIPVFDNM MNRHLVAQDL FSVYMDRNQ ESMLTLGAID PSYYYGSLHW
 VPVTQQYWQ FTVDSVTISG VVVACEGGCQ AILDGTGSKL VGPSSDILNI QQAIGATQNN
 YGEFDIDCDN LSYMPTVVFE INGKMYPLTP SAYTSQDQGF CTSGFQSENH SQKWILGDVF
 IREYYSVFDR ANNLVGLAKA I

Σχήμα 1.4. Αλληλουχία της χυμοσίνης μαζί με το πρόδρομο πεπτιδίο, εντός του πλαισίου (πηγή uniprot).

Όπως φαίνεται από την τρισδιάστατη απεικόνιση της χυμοσίνης στο Σχήμα 1.5 το μόριό της επιδεικνύει υψηλή ομοιογένεια. Διακρίνεται μια εκτεταμένη διάταξη Σχήμα 1.5, στην οποία βρίσκεται το ενεργό κέντρο του ενζύμου, όπου μπορούν να προσαρμοστούν επτά κατάλοιπα αμινοξέων της κ-καζεΐνης [Andren, 2002].



Σχήμα 1.5. Τρισδιάστατη απεικόνιση της χυμοσίνης (πηγή protein data bank, PDB)

Υπάρχουν δύο γενετικές παραλλαγές της χυμοσίνης. Συγκεκριμένα στη θέση 244 η χυμοσίνη A έχει ασπαρτικό οξύ, ενώ η χυμοσίνη B γλυκίνη. Λόγω αυτής της διαφοράς η χυμοσίνη A παρουσιάζει 25% μεγαλύτερη πηκτική ικανότητα ως προς τη B [Andren, 2002].

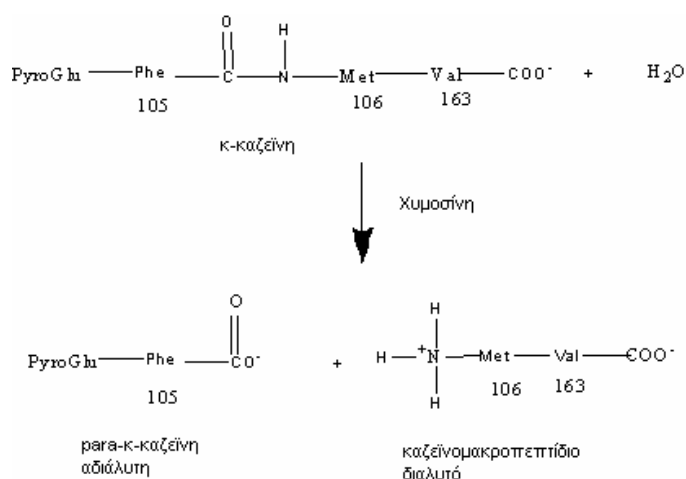
Ο όρος πηκτική δύναμη της πυτιάς αναφέρεται στον αριθμό των μερών του γάλακτος που υφίστανται πήξη από ένα μέρος πυτιάς στους 35 °C για 40 λεπτά. Ο προσδιορισμός της πηκτικής δύναμης της πυτιάς είναι απαραίτητος γιατί καθορίζει την εμπορική αξία της. Μέχρι σήμερα έχουν προταθεί διάφορες μέθοδοι και τεχνικές για τον προσδιορισμό της πηκτικής δύναμης, που βασίζονται στην αλλαγή του ιζώδους του γάλακτος ή στην ορατή πήξη του γάλακτος μετά την προσθήκη της πυτιάς. Λεπτομέρειες σχετικά με τον προσδιορισμό της πηκτικής δύναμης της πυτιάς δίνονται στο Πειραματικό Μέρος (σελ. 103).

1.5. ΑΝΤΙΔΡΑΣΗ ΜΙΚΚΥΛΙΩΝ ΚΑΖΕΪΝΗΣ ΜΕ ΤΗΝ ΠΥΤΙΑ

Η αντίδραση της καζεΐνης με την πυτιά χρησιμοποιείται ευρέως στις βιομηχανίες παρασκευής τυριού για την πήξη του γάλακτος και παρέχει σημαντικά πλεονεκτήματα συγκρινόμενη με την οξείδωση του γάλακτος. Με τη χρήση της πυτιάς η πήξη του

γάλακτος πραγματοποιείται σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα (της τάξεων των λεπτών) σε σχέση με αυτό απαιτείται με την οξείδωση του γάλακτος (της τάξεων των ωρών). Επίσης τα τυριά που παρασκευάζονται με τη χρήση της πυτιάς έχουν μεγαλύτερη συναίρεση σε σχέση με αυτά που παρασκευάζονται με απλή οξείδωση, και ως εκ τούτου τα τυριά αυτά περιέχουν μικρότερο ποσοστό υγρασίας [Lucey, 2002].

Η αλληλεπίδραση των μικκυλίων της καζεΐνης του γάλακτος με την πυτιά, πραγματοποιείται σε δύο στάδια. Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την **ενζυμική υδρόλυση**, ενώ κατά το δεύτερο στάδιο πραγματοποιείται η **συσσωμάτωση**. Κατά το πρώτο στάδιο, η πυτιά προσβάλλει το δεσμό Phe105–Met106, προς σχηματισμό της para κ–καζεΐνης (12 kD) και του διαλυτού μακροπεπτιδίου. Η para κ–καζεΐνη, η οποία φέρει θετικό φορτίο (pI>7) στο φυσιολογικό pH του γάλακτος παραμένει στα καζεϊνικά μικκύλια (τυρόπηγμα), ενώ το μακροπεπτίδιο που είναι διαλυτό αποβάλλεται στον ορό (τυρόγαλα). Η διαδικασία αυτή έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του συνολικού αρνητικού φορτίου των μικκυλίων και, κατά επέκταση, τη μείωση των απωστικών, ηλεκτροστατικής φύσης δυνάμεων, που αναπτύσσονται μεταξύ τους. Στη συνέχεια τα απογυμνωμένα–αποσταθεροποιημένα μικκύλια παρουσία των ιόντων του ασβεστίου, συσσωματώνονται σε ένα αργό στάδιο [Τσοχατζής, 2005 — Bringe, 1985 – Lucey, 2002 – Turhan, 1998 – Silva, 2003 – Najera, 2003 – Reid, 1997 – Laporte, 1998 – Anema, 2007 – Larsson, 1998 – Lagaude, 2004 – Kruif, 1999].



Σχήμα 1.6. Προσβολή του δεσμού 105Phe – 106Met.

Κατά τη διάρκεια των παραπάνω διαδικασιών, αρχικά, παρατηρείται μείωση του ιξώδους, εξαιτίας της μείωσης του μεγέθους των σωματιδίων. Στη συνέχεια το ιξώδες αυξάνεται απότομα, λόγω της συσσωμάτωσης των μικκυλίων. Η συσσωμάτωση των μικκυλίων μεταβάλλει τις μακροσκοπικές ιδιότητες του γάλακτος, όταν η κ-καζεΐνη έχει υδρολυθεί σε ποσοστό >85% [Lagaude, 2004 –Kruif, 1999 – Dalglish, 2004].

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, κατά το πρώτο στάδιο της αντίδρασης το υδρόφοβο C-τελικό άκρο της κ-καζεΐνης υδρολύεται και απομακρύνεται από τα μικκύλια στον ορό του γάλακτος. Το μακροπεπτίδιο αυτό ονομάζεται καζεϊνομακροπεπτίδιο (CMP), ενώ στην περίπτωση που είναι γλυκοσυλιωμένο, όταν δηλαδή περιλαμβάνει υδρογονάνθρακες, ονομάζεται γλυκομακροπεπτίδιο (GMP). Γενικά όλα τα είδη της πυτιάς υδρολύουν το δεσμό Phe105–Met106, με εξαίρεση την πυτιά που προέρχεται από το μικροοργανισμό *Cryphonectria parasitica*, η οποία υδρολύει το δεσμό Ser104–Phe105 [Lucey 2002].

Σύμφωνα με σχετικές μελέτες η κ-καζεΐνη προσεγγίζει το ενεργό κέντρο της χυμοσίνης μέσω του υδρόφοβου τμήματος της Leu103–Ile108. Στη συνέχεια τα αρνητικά φορτισμένα κατάλοιπα της χυμοσίνης αλληλεπιδρούν με τα θετικά φορτισμένα κατάλοιπα της κ-καζεΐνης (His98 με His102 και Ile108 με Lys112).

Η υδρόλυση της κ-καζεΐνης, αποτελεί μια αντίδραση πρώτης τάξης και η ταχύτητα της αντίδρασης δίνεται από τη σχέση:

$$\frac{-d[S]}{dt} = \frac{V_{\max}[S]}{K_m + [S]} \quad (1.1)$$

όπου [S], η συγκέντρωση του υποστρώματος, V_{\max} , η μέγιστη τιμή της ταχύτητας υδρόλυσης σε συγκεκριμένη συγκέντρωση υποστρώματος και K_m , η σταθερά Michaelis Menten. Οι τιμές K_m των μικκυλίων ποικίλουν από $1-5 \times 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$. Διαφορετικά αποτελέσματα κινητικής έχουν ληφθεί κατά την αλληλεπίδραση της πυτιάς με μεμονωμένη κ-καζεΐνη, πιθανόν λόγω της πιο εύκολης προσβολής αυτής από την πυτιά [Lucey, 2002 – Turhan, 2003].

Η κινητική της υδρόλυσης του δεσμού Phe105–Met106 επηρεάζεται από την συγκέντρωση του ενζύμου, τις θερμοκρασίες που έχει υποστεί το γάλα, το pH του

καθώς και από την ύπαρξη διαφόρων συστατικών που είτε βρίσκονται φυσικά στο γάλα είτε έχουν προστεθεί σε αυτό [Silva, 2003].

Η απελευθέρωση του μακροπεπτιδίου (γλυκομακροπεπτιδίου), έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του δυναμικού ζήτα του μικκυλίου κατά περίπου 5 έως 7 mV (περίπου 50%), και κατά επέκταση τη μείωση των ηλεκτροστατικών δυνάμεων μεταξύ των μικκυλίων που έχουν αντιδράσει με την πυτιά. Η μείωση του δυναμικού ζήτα οδηγεί στη μείωση της υδροδυναμικής διαμέτρου των μικκυλίων κατά περίπου 5 nm.

Η φύση των ελκτικών δυνάμεων που αναπτύσσονται κατά την συσσωμάτωση των μικκυλίων δεν είναι απόλυτα γνωστή, πιστεύεται όμως παρόλα αυτά ότι κατά τη διαδικασία αυτή αναπτύσσονται δυνάμεις Van der Waals, συζεύξεις μέσω γεφυρών ασβεστίου, και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις. Τα αποσταθεροποιημένα μικκύλια συσσωματώνονται μόνο κατά την παρουσία ιόντων ασβεστίου, δεδομένης της παρουσίας ενός ελαχίστου αριθμού μικκυλίων και σε θερμοκρασία >18 °C. Κατά τη θρόμβωση του γάλακτος κάτω από φυσιολογικές συνθήκες pH και συγκέντρωσης ενζύμου, δεν παρατηρείται αύξηση του ιξώδους, αν η φάση της υδρόλυσης δεν φτάσει τουλάχιστον το 87%. Κατά τη φάση αυτή υπάρχει αλληλοεπικάλυψη μεταξύ του σταδίου της υδρόλυσης και του σταδίου της συσσωμάτωσης, ενώ η έκταση αυτής εξαρτάται από τη θερμοκρασία, τη συγκέντρωση του ενζύμου και το pH. Ο βαθμός υδρόλυσης της κ-καζεΐνης που απαιτείται για τη συσσωμάτωση των μικκυλίων είναι πιθανόν να οφείλεται στην παρουσία και των άλλων καζεϊνών. Αρχικά δημιουργούνται μικρές γραμμικές αλυσίδες μικκυλίων, οι οποίες στη συνέχεια συσσωματώνονται προκειμένου να σχηματίσουν μια συμπαγή μάζα. Οι πιο βασικοί παράγοντες που επηρεάζουν την αντίδραση των μικκυλίων με την πυτιά, περιγράφονται κατωτέρω [Lucey, 2002].

1.5.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την αντίδραση

1.5.1.1. Επίδραση της θερμοκρασίας

Η βέλτιστη θερμοκρασία για τη συσσωμάτωση του γάλακτος από πυτιά μοσχαριού σε τιμή pH 6,6 είναι περίπου 45 °C, αλλά τόσο η τιμή του pH, όσο και η τιμή της θερμοκρασίας ποικίλουν ανάλογα με τον τύπο της πυτιάς. Ο συντελεστής θερμοκρασίας

(Q 10 – αύξηση του ρυθμού αντίδρασης κατά την αύξηση της θερμοκρασίας κατά 10 °C) της ενζυμικής φάσης είναι περίπου 2 και η αντίδραση δε λαμβάνει χώρα σε θερμοκρασίες <0 °C. Ο συντελεστής θερμοκρασίας για το στάδιο συσσωμάτωσης είναι 11–16, ενώ σε θερμοκρασίες <15 °C η αντίδραση πραγματοποιείται πολύ αργά.

$$Q(10) = \frac{R_2}{R_1} \left(\frac{10}{T_2 - T_1} \right) \quad (1.2)$$

όπου R_1 και R_2 : ρυθμός αντίδρασης για την θερμοκρασία T_1 και T_2 αντίστοιχα

Η βέλτιστη θερμοκρασία συσσωμάτωσης, στην οποία τα ζελατινοποιημένα μικκύλια (έχουν αποκτήσει υψηλό ιξώδες) παραμένουν σταθερά είναι οι 30–35 °C. Η παρατεταμένη αποθήκευση του γάλακτος σε χαμηλές θερμοκρασίες, πριν την αλληλεπίδραση με την πυτιά, συνήθως οδηγεί σε ένα πιο μαλακό συσσωμάτωμα λόγω της αποσύνδεσης της β-καζεΐνης από το μικκύλιο, Αντίθετα η παστερίωση του γάλακτος πριν από την παρασκευή του τυριού, οδηγεί στη δημιουργία σκληρού συσσωματώματος [Lucey, 2002 – Najera, 2003].

1.5.1.2. Επίδραση της συγκέντρωσης χυμοσίνης

Η επίδραση της συγκέντρωσης της χυμοσίνης στο χρόνο συσσωμάτωσης του γάλακτος έχει περιγραφεί με διάφορες εξισώσεις. Μια από τις ευρέως χρησιμοποιούμενες είναι η εξίσωση Holter, που περιγράφει την αντίστροφη σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης της χυμοσίνης και του χρόνου συσσωμάτωσης.

$$CT = \left(\frac{K}{[E]} \right) + A \quad (1.3)$$

όπου CT, ο χρόνος συσσωμάτωσης, K, A σταθερές και [E], η συγκέντρωση του ενζύμου. Ο χρόνος συσσωμάτωσης αποτελεί το συνολικό χρόνο και των δύο σταδίων. Η σταθερά A της εξίσωσης Holter αντικατοπτρίζει το χρόνο που χρειάζεται για τη φάση της συσσωμάτωσης. Από την Holter προκύπτει ότι αύξηση της συγκέντρωσης του ενζύμου

οδηγεί στη μείωση της ταχύτητας συσσωμάτωσης, εξαιτίας του υψηλότερου βαθμού υδρόλυσης της κ-καζεΐνης. Τα διαγράμματα Holter δεν είναι γραμμικά, όταν η συγκέντρωση του ενζύμου είναι πολύ μεγάλη ή όταν η τιμή του pH ή η θερμοκρασία μεταβάλλονται [Lucey, 2002 – Najera, 2003].

1.5.1.3. Επίδραση του pH

Η επίδραση του pH στην αντίδραση της χυμοσίνης με τα μικκύλια της καζεΐνης συνδέεται τόσο με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μικκυλίων, καθώς και αυτών με τη χυμοσίνη [Larsson, 1999 – Roos 2000]. Κατά τη διαδικασία της πήξης λαμβάνουν μέρος διάφοροι τύποι αλληλεπιδράσεων όπως ηλεκτροστατικές, υδρόφοβες, υδρόφιλες, καθώς και μεταβολές στη διαμόρφωση των πρωτεϊνικών μορίων. Η ισχυρή εξάρτηση της προσρόφησης της χυμοσίνης, ανάλογα με την τιμή pH, είναι ενδεικτική της σημασίας των αλληλεπιδράσεων ηλεκτροστατικής φύσης ανάμεσα στη θετικά φορτισμένη para κ-καζεΐνη ($pI > 7$) και στο αρνητικά φορτισμένο μόριο της χυμοσίνης ($pI \approx 4.6$). [Larsson, 1998 – Larsson, 1999]. Αυτό εξηγεί και την υψηλότερη προσρόφηση της χυμοσίνης, σε μικκύλια που έχουν μεγαλύτερη συγκέντρωση κ-καζεΐνης (και συνεπώς para κ-καζεΐνης). Επιπλέον, η προσρόφηση της χυμοσίνης από τα μεμονωμένα μόρια της κ-καζεΐνης είναι μεγαλύτερη όταν το pH κυμαίνεται από 6,8 με 7,2, ενώ για χαμηλότερες τιμές pH (5,2 με 6), η έλξη μεταξύ της χυμοσίνης και των καζεϊνών α_s και β είναι μεγαλύτερη. [Larsson, 1999].

Γενικότερα, μείωση της τιμής pH του γάλακτος προκαλεί μείωση του χρόνου πήξης, εξαιτίας της μείωσης των ηλεκτροστατικών απώσεων [Lucey, 2002]. Η μείωση του pH από την τιμή 7,0 στην τιμή 5,2, προκαλεί μείωση του χρόνου συσσωμάτωσης, ενώ το βέλτιστο pH κυμαίνεται από 5,1 έως 5,3. Περαιτέρω η μείωση της τιμής pH προκαλεί αύξηση της ταχύτητας θρόμβωσης. Ενώ για τιμές pH μικρότερες του 5, η συσσωμάτωση των μικκυλίων δεν είναι αποτελεσματική [Najera, 2003].

1.5.1.4. Επίδραση των ιόντων ασβεστίου

Η συγκέντρωση των ιόντων ασβεστίου δεν επηρεάζει την ενζυμική φάση άμεσα, παρόλα αυτά, η προσθήκη χλωριούχου ασβεστίου έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του pH του γάλακτος, και συνεπώς την επιτάχυνση της αντίδρασης της υδρόλυσης. Πρέπει να αναφερθεί ωστόσο ότι η προσθήκη ασβεστίου ($<50 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) μειώνει το χρόνο συσσωμάτωσης, ακόμα και σε σταθερή τιμή pH. Περαιτέρω προσθήκη CaCl_2 αυξάνει το βαθμό σκληρότητας των ζελατινοποιημένων μικκυλίων, λόγω της ανάπτυξης γεφυρών ασβεστίου και κατά επέκταση της συνεπαγόμενης μείωσης του αριθμού των φορτισμένων ομάδων στην επιφάνεια των μικκυλίων. Παρουσία υψηλότερων συγκεντρώσεων χλωριούχου ασβεστίου (για παράδειγμα $>0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$) παρατηρείται μείωση της σταθερότητας του ζελατινοποιημένου γάλακτος, πιθανόν λόγω της αύξησης της αποτελεσματικής θετικής επιφάνειας των μικκυλίων, ενώ σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των $0,3 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ παρατηρείται αύξηση του χρόνου συσσωμάτωσης. [Lucey, 2002 – Najera, 2003 – McMahon, 1984].

1.5.1.5. Επίδραση της προσθήκης NaCl

Η προσθήκη χλωριούχου νατρίου, εκτός από τη μεταβολή του pH, επηρεάζει και άλλους παράγοντες. Για τιμές μεγαλύτερες των $0,01 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$, η ταχύτητα της αντίδρασης υδρόλυσης μειώνεται, πιθανόν λόγω της αναστολής των ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων που λαμβάνουν χώρα προκειμένου να επιτευχθεί ο σχηματισμός του συμπλόκου χυμοσίνης-κ-καζεΐνης στο ενεργό κέντρο αυτής [Lucey, 2002]. Περαιτέρω η αύξηση της συγκέντρωσης του χλωριούχου νατρίου έχει ως αποτέλεσμα την μερική διαλυτοποίηση των μικκυλίων (πιθανώς λόγω της ανταλλαγής/αντικατάστασης των ιόντων του νατρίου με το ασβέστιο) [Lucey, 2002 – Famelart, 1999].

1.5.1.6. Θερμική κατεργασία του γάλακτος

Η θερμική κατεργασία του γάλακτος σε θερμοκρασίες $>70 \text{ }^\circ\text{C}$, επηρεάζει σημαντικά τη διαδικασία συσσωμάτωσης. Η θέρμανση του γάλακτος έχει ως αποτέλεσμα το

σχηματισμό ενός συμπλόκου μεταξύ των μετουσιωμένων πρωτεϊνών του ορού (κυρίως της β-λακτοσφαιρίνης) και της κ-καζεΐνης, μέσω δεσμών ανταλλαγής θειόλης-δισουλφιδίων μεταξύ των ελεύθερων θειολών των μετουσιωμένων πρωτεϊνών και των δισουλφιδικών δεσμών της κ-καζεΐνης. Όσο αυξάνεται η θερμοκρασία κατεργασίας του γάλακτος, πριν από την παρασκευή τυριού, τόσο η ταχύτητα της συσσωμάτωσης μειώνεται, πιθανόν λόγω της πιο δύσκολης προσβολής του δεσμού Phe105-Met106. Επιπλέον η θερμική κατεργασία μειώνει και την ταχύτητα συσσωμάτωσης [Lucey, 2002 – Anema, 2007 – Anema, 2007]. Σε ορισμένες μελέτες έχει αναφερθεί ότι η θερμική κατεργασία του γάλακτος επηρεάζει ελάχιστα την αντίδραση υδρόλυσης, ενώ η φάση της συσσωμάτωσης μειώνεται παρουσία των μετουσιωμένων πρωτεϊνών. Ορισμένα αποτελέσματα της θερμικής επεξεργασίας, σε περίπτωση που είναι ήπια, μπορούν να αντιστραφούν με προσθήκη ιόντων ασβεστίου ή με μείωση του pH [Lucey, 2002 – Anema, 2007]

”

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΜΕΛΕΤΗΣ ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ

*Φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης,
Συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων,
Μικροζυγός κρυστάλλου χαλαζία*

2.1. ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΗΣ ΕΜΠΕΔΗΣΗΣ

Η Φασματοσκοπία Ηλεκτροχημικής Εμπέδησης (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS), παρέχει πληροφορίες για την κινητική και το μηχανισμό διαφόρων ηλεκτροχημικών συστημάτων και χρησιμοποιείται ευρέως στη μελέτη διάβρωσης των μετάλλων, στην επιστήμη των ημιαγωγών, στην ανάπτυξη βιοχημικών πυκνωτών και εμπεδησιομετρικών βιοαισθητήρων, στην ανάπτυξη εκλεκτικών ηλεκτροδίων ιόντων, στη μελέτη οργανικών ηλιακών κυψελίδων, στην έρευνα και ανάπτυξη ηλεκτρικών στοιχείων και μπαταριών, στον έλεγχο της ποιότητας επιστρώσεων (βερνίκια, λάκες, χρώματα), στη μελέτη φαινομένων διάβρωσης, στη μελέτη της αλληλεπίδρασης φαρμάκων – πρωτεϊνών κ.ά.

Η Φασματοσκοπία Ηλεκτροχημικής Εμπέδησης συνίσταται στη διαταραχή ενός συστήματος που βρίσκεται σε ισορροπία ή στατική κατάσταση, με την εφαρμογή ενός ημιτονικού σήματος και στην ταυτόχρονη παρακολούθηση της χρονικής ή συχνοτικής απόκρισης του συστήματος ως προς το αίτιο της διαταραχής. Ως παράδειγμα αναφέρεται η μέτρηση του εναλλασσόμενου ρεύματος που διαρρέει ένα ηλεκτροχημικό σύστημα μετά την εφαρμογή σε αυτό ενός σήματος εναλλασσόμενης τάσης. Οι κυματομορφές διέγερσης είναι συνήθως μικρού πλάτους (τυπικά 5–10 mV), ώστε η απόκριση του

συστήματος να θεωρείται γραμμική και ο ρυθμός αποκατάστασης του συστήματος να είναι ανάλογος της εφαρμοζόμενης διαταραχής.

Διεγέρσεις αυτής της έντασης θεωρούνται κατά κανόνα αβλαβείς και επιτρέπουν στο υπό μελέτη σύστημα να διατηρεί τις αρχικές του ιδιότητες. Με αυτό τον τρόπο μειώνονται οι πιθανότητες εξαγωγής εσφαλμένων συμπερασμάτων λόγω μεταβολής ή καταστροφής του συστήματος από την τεχνική μέτρησης. Η συμπεριφορά μιας πρωτεΐνης ως προς ένα φάρμακο, η αλληλεπίδραση μεταξύ βιομορίων (αντίσωμα – αντιγόνο) κ.ά. αποτελούν παραδείγματα όπου η μετρούμενη ιδιότητα διαφοροποιείται σημαντικά ανάλογα με την τιμή της εφαρμοζόμενης διαφοράς δυναμικού.

Σημαντικό πλεονέκτημα της EIS είναι η δυνατότητα προσομοίωσης του υπό μελέτη ηλεκτροχημικού συστήματος με ένα ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα. Η διεπιφάνεια ηλεκτροδίου/ηλεκτρολύτη είναι τυπικά ανάλογη προς ένα ηλεκτρικό κύκλωμα, το οποίο αποτελείται από ένα συνδυασμό ηλεκτρικών στοιχείων (εξαρτήματα ηλεκτρικών κυκλωμάτων) όπως αντιστάσεις, πυκνωτές και πηνία. Σε ένα ηλεκτροχημικό στοιχείο, η (αργή) κινητική μιας ηλεκτροδιακής αντίδρασης, οι (αργές) χημικές αντιδράσεις που λαμβάνουν χώρα και τα φαινόμενα διάχυσης, μπορούν να παρεμποδίζουν τη ροή ηλεκτρονίων και ως εκ τούτου, μπορούν να θεωρηθούν ανάλογα με ωμικές, χωρητικές, ή επαγωγικές αντιστάσεις δηλαδή ηλεκτρικά στοιχεία, τα οποία μπορούν να παρεμποδίζουν τη ροή ηλεκτρονίων σε ένα κύκλωμα εναλλασσόμενου ρεύματος.

2.2. ΓΕΝΙΚΗ ΘΕΩΡΗΣΗ

Η θεωρία της φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης περιγράφει την απόκριση ενός κυκλώματος σε ένα σήμα εναλλασσόμενου ρεύματος ή τάσης ως συνάρτηση της συχνότητας. Σε ένα κύκλωμα συνεχούς ρεύματος (μια μερική περίπτωση εναλλασσόμενου ρεύματος, με συχνότητα 0 Hz) η αντίσταση του κυκλώματος καθορίζεται από το νόμο του Ohm, ο οποίος συνδέει το ρεύμα I (ampere), το οποίο διαρρέει τον αγωγό, με την τάση V (volt), που εφαρμόζεται στα άκρα του αγωγού, σύμφωνα με την ακόλουθη εξίσωση:

$$V = I R \quad (2.1)$$

όπου R , η αντίσταση του αγωγού σε Ohm (Ω). Σε ένα κύκλωμα συνεχούς ρεύματος, η ωμική αντίσταση είναι το μόνο στοιχείο που παρεμποδίζει τη ροή των ηλεκτρονίων. Σε ένα κύκλωμα εναλλασσόμενου ρεύματος, όπου η συχνότητα είναι μη μηδενική, η ανάλογη εξίσωση είναι:

$$V_{ac} = I_{ac} Z \quad (2.2)$$

Τα μεγέθη V_{ac} και I_{ac} ορίζονται ανάλογα ως εναλλασσόμενη τάση και εναλλασσόμενο ρεύμα αντίστοιχα, ενώ το Z ορίζεται ως εμπέδηση (*σύνθετη αντίσταση*) και αποτελεί το ισοδύναμο μέγεθος της ωμικής αντίστασης σε ένα κύκλωμα εναλλασσόμενου ρεύματος. Στα κυκλώματα εναλλασσόμενου ρεύματος, η εμπέδηση είναι ίση με το πηλίκο της εφαρμοζόμενης εναλλασσόμενης τάσης προς το παραγόμενο εναλλασσόμενο ρεύμα:

$$Z = V_{ac} / I_{ac} = V_{(t)} / I_{(t)} \quad (2.3)$$

Η εμπέδηση μετρείται επίσης σε Ohm και εκφράζει τη συνολική αντίσταση όλων των στοιχείων του κυκλώματος στην κίνηση των ηλεκτρονίων. Στα κυκλώματα εναλλασσόμενου ρεύματος, εκτός από τις αντιστάσεις, στοιχεία όπως οι πυκνωτές και τα πηνία παρεμποδίζουν επίσης τη ροή των ηλεκτρονίων.

Η στιγμιαία τιμή της εναλλασσόμενης τάσης που εφαρμόζεται σε ένα κύκλωμα δίνεται από την εξίσωση:

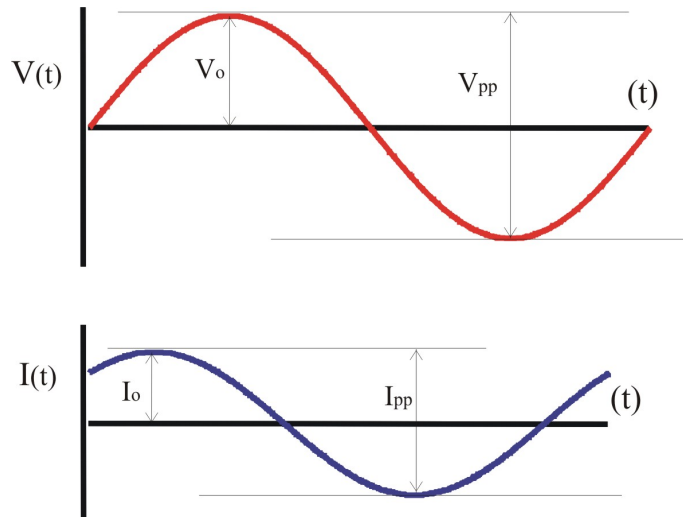
$$V_{(t)} = V_0 \sin(\omega t) \quad (2.4)$$

Αντίστοιχα, η στιγμιαία τιμή του εναλλασσόμενου ρεύματος που διαρρέει το κύκλωμα περιγράφεται από την εξίσωση:

$$I_{(t)} = I_0 \sin(\omega t + \varphi) \quad (2.5)$$

όπου V_0 , η τάση κορυφής ή πλάτος τάσης, I_0 , το ρεύμα κορυφής ή πλάτος ρεύματος (Σχήμα 2.1), ω , η γωνιακή ταχύτητα ή κυκλική συχνότητα, η οποία είναι ίση με $2\pi f$ (όπου f η συχνότητα σε hertz) και φ , η φάση σε radians.

Η τιμή από κορυφή σε κορυφή ή διακορυφή είναι το μήκος της μέγιστης διαδρομής τιμών του σήματος και στα ημιτονικά σήματα, οι τιμές τάσεις από κορυφή σε κορυφή, V_{pp} , και ρεύματος, I_{pp} είναι προφανώς διπλάσιες από τις αντίστοιχες τιμές κορυφής, V_0 και I_0 αντίστοιχα.



Σχήμα 2.1. Χαρακτηριστικά μεγέθη για την κυματομορφή (Α) εναλλασσόμενης τάσης και (Β) εναλλασσόμενου ρεύματος.

Η ενεργός τιμή (V_{ef}) ενός περιοδικού σήματος τάσης ή έντασης ισοδυναμεί με την τιμή του αντιστοίχου συνεχούς σήματος, που εάν εφαρμοζόταν ένα καθαρά ωμικό φορτίο, θα παρείχε την ίδια ισχύ (π.χ. υπό μορφή θερμότητας). Η ενεργός τιμή τάσης οποιουδήποτε περιοδικού σήματος, στο οποίο η μεταβολή τάσης στη διάρκεια μιας περιόδου T περιγράφεται γενικά από τη συνάρτηση $V(t)$, περιγράφεται από την εξίσωση:

$$V_{ef} = \sqrt{\frac{1}{T} \int_0^T V(t)^2 dt} \quad (2.6)$$

και ειδικά για ημιτονικά περιοδικά σήματα ισούται με την τιμή:

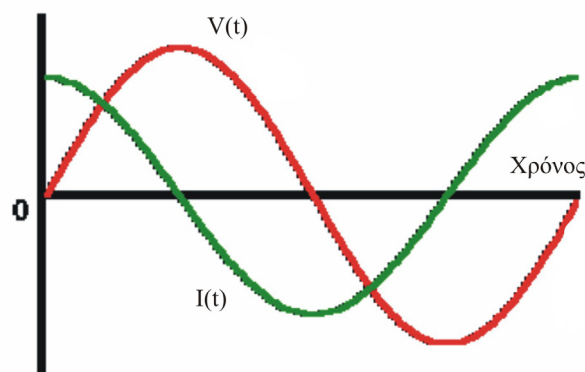
$$V_{ef} = \frac{V_o}{\sqrt{2}} = 0,707 V_0 \quad (2.7)$$

Αντίστοιχα, η ενεργός τιμή ρεύματος, ισούται με:

$$I_{ef} = 0,707 I_0 \quad (2.8)$$

Λόγω της μορφής των παραπάνω εξισώσεων που περιγράφουν τις ενεργές τιμές τάσης και ρεύματος ονομάζονται συνήθως μέσες τετραγωνικές τιμές ((root-mean-square values, rms).

Σε ένα απλό κύκλωμα πηγής ημιτονικού σήματος και αντίστασης, οι κυματομορφές εναλλασσόμενης τάσης και ρεύματος παρουσιάζουν μέγιστες και ελάχιστες τιμές την ίδια χρονική στιγμή. Αντίθετα, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.2, για την περίπτωση ενός κυκλώματος ημιτονικού σήματος και ενός πυκνωτή, οι κυματομορφές της εφαρμοζόμενης εναλλασσόμενης τάσης, $V(t)$, και του παραγόμενου εναλλασσόμενου ρεύματος, $I(t)$, εμφανίζουν μέγιστα σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, εξαιτίας της διαφορετικής γωνίας φάσης ή διαφοράς φάσης μεταξύ των αντίστοιχων περιστρεφόμενων διανυσμάτων. Το ρεύμα προηγείται σε φάση ως προς την τάση κατά 90° ή (ισοδύναμα) η τάση καθυστερεί σε φάση ως προς το ρεύμα κατά 90° .

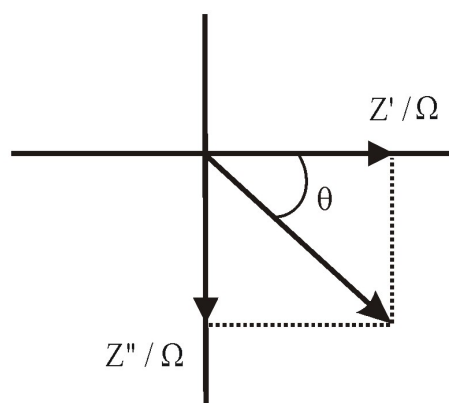


Σχήμα 2.2. Κυματομορφές εναλλασσόμενης τάσης και ρεύματος σε ένα κύκλωμα ημιτονικής πηγής και ενός πυκνωτή.

2.3. Ο ΟΡΟΣ ΕΜΠΕΔΗΣΗ

Η εμπέδηση σε ένα σύνθετο κύκλωμα, π.χ. ενός εναλλασσόμενου κυκλώματος αντίστασης και πυκνωτή σε σειρά (R-C), δεν μπορεί να υπολογισθεί με απλή πρόσθεση της ωμικής αντίστασης R και της χωρητικής αντίστασης X_C . Και οι δύο αντιστάσεις έχουν τις ίδιες μονάδες και συνολικά εκφράζουν την αντίσταση του συγκεκριμένου τμήματος του κυκλώματος στη διέλευση του ρεύματος, ωστόσο η δράση τους δεν είναι ταυτόχρονη. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, στην ωμική αντίσταση το ρεύμα είναι ανάλογο της τάσης οποιαδήποτε χρονική στιγμή, δηλαδή ρεύμα και τάση δεν εμφανίζουν διαφορά φάσης, ενώ στη χωρητική αντίσταση, η τάση καθυστερεί σε φάση ως προς το ρεύμα κατά 90° .

Για διευκόλυνση της ανάλυσης σύνθετων κυκλωμάτων, η εμπέδηση (Z) εκφράζεται ως *μυγαδική ποσότητα*. Η ωμική αντίσταση αποτελεί το πραγματικό μέρος της μυγαδικής ποσότητας (Z_{real} ή $Z' - \text{in phase}$), ενώ η χωρητική αντίσταση, με αρνητικό πρόσημο, αποτελεί το φανταστικό ($-Z_{\text{im}}$ ή $Z'' - \text{out of phase}$) μέρος. Στο Σχήμα 2.3 απεικονίζεται η παράσταση της εμπέδησης στο πεδίο των μυγαδικών αριθμών. Η επαγωγική αντίσταση, $X_L = 2\pi fL$, λόγω της παρουσίας ενός πηνίου στο κύκλωμα, θεωρείται ως φανταστικό μέρος με θετικό πρόσημο επειδή σε κυκλώματα πηγής ημιτονικής τάσης-καθαρά επαγωγικού φορτίου, το ρεύμα καθυστερεί σε φάση ως προς την τάση κατά 90° . Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι με εξαίρεση κάποιες περιπτώσεις που εξετάζονται στην § 2.9, η συνεισφορά της επαγωγικής αντίστασης στη μελέτη ηλεκτροχημικών συστημάτων είναι δευτερευούσης σημασίας.



Σχήμα 2.3. Μυγαδική παράσταση της εμπέδησης κυκλώματος εναλλασσόμενου ρεύματος.

Η εμπέδηση Z , ως μιγαδική ποσότητα εκφράζεται με τη σχέση

$$Z = Z' + j Z'' \quad (2.9)$$

όπου, j είναι η φανταστική μονάδα με τη γνωστή ιδιότητα $j \cdot j = -1$

Το μέτρο της εμπέδησης είναι ίσο με το μέτρο του μιγαδικού αριθμού

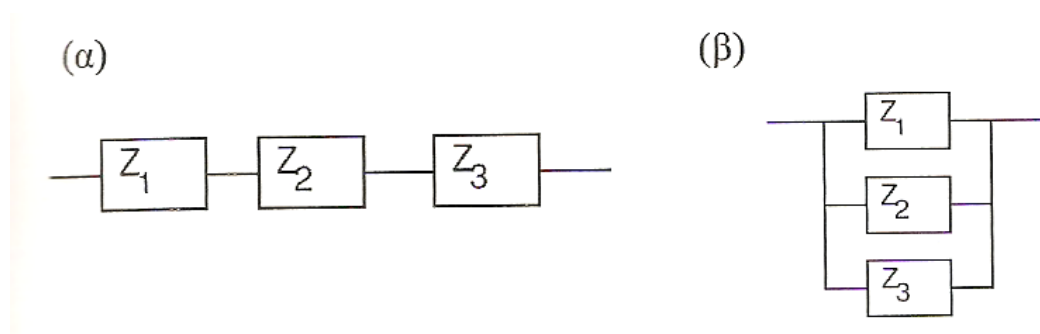
$$|Z| = \sqrt{Z'^2 + Z''^2} \quad (2.10)$$

και η γωνία θ αποδίδει τη διαφορά φάσης τάσης-ρεύματος και δίδεται από τη σχέση:

$$\tan \theta = Z'' / Z' \quad (2.11)$$

Συνεπώς, το μέγεθος της εμπέδησης περιγράφεται είτε από τις τιμές για το φανταστικό και πραγματικό μέρος αυτής, Z'' και Z' , είτε από το μέτρο της συνολικής εμπέδησης και τη διαφορά φάσης, θ . Για να προσδιοριστεί η συνολική εμπέδηση ενός κυκλώματος, συνδυάζονται οι τιμές εμπέδησης των επιμέρους στοιχείων. Για στοιχεία τα οποία συνδέονται σε σειρά (Σχήμα 2.4α), η εμπέδηση ισούται με το διανυσματικό άθροισμα των επιμέρους τιμών εμπέδησης.

$$Z_{ολ} = Z_1 + Z_2 + Z_3 \quad (2.12)$$



Σχήμα 2.4. Επιμέρους στοιχεία εμπέδησης συνδεδεμένα (α) σε σειρά και (β) παράλληλα.

Στην περίπτωση παράλληλης σύνδεσης (Σχήμα 2.4β) η έκφραση της συνολικής εμπέδησης γίνεται πιο περίπλοκη. Σ' αυτές τις περιπτώσεις είναι ευκολότερο να γίνουν υπολογισμοί χρησιμοποιώντας την ηλεκτρική αγωγιμότητα, το αντίστροφο μέγεθος της εμπέδησης, το οποίο συμβολίζεται με Y και μετρείται σε siemens (S). Έτσι, η συνολική αγωγιμότητα ισούται με το άθροισμα των αντίστοιχων τιμών για τα στοιχεία που βρίσκονται σε παράλληλη σύνδεση και ισχύει:

$$\frac{1}{Z_{ολ}} = \frac{1}{Z_1} + \frac{1}{Z_2} + \frac{1}{Z_3} \quad (2.13)$$

2.4. ΣΧΕΔΙΑΣΜΟΣ ΕΝΟΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΟΣ ΕΙΣ

2.4.1. Κυματομορφές διέγερσης

Το ημιτονικό σήμα διέγερσης μπορεί να επιβληθεί στο υπό μελέτη ηλεκτροχημικό σύστημα είτε αυτούσιο (π.χ εφαρμογή σήματος διέγερσης ± 10 mV rms), είτε να τοποθετηθεί πάνω σε ένα σταθερό (dc) σήμα (π.χ dc \pm rms). Η τιμή αυτή dc αναφέρεται ως τάση ή ρεύμα πόλωσης, αντίστοιχα. Η παρουσία και κατά επέκταση η τιμή του σταθερού σήματος επιλέγεται ανάλογα με το στόχο του πειράματος. Ως παράδειγμα αναφέρεται η εφαρμογή σταθερής τάσης ίσης με το κανονικό δυναμικό ενός οξειδοαναγωγικού ζεύγους, το οποίο προστίθεται στο διάλυμα του ηλεκτρολύτη σε πειράματα φαρανταϊκής ηλεκτροχημικής φασματοσκοπίας εμπέδησης προκειμένου να αυξήσουμε την ευαισθησία των μετρήσεων. Έτσι, οι μετρήσεις εμπέδησης μπορούν να διεξαχθούν είτε ποτενσιοστατικά (σε μια συγκεκριμένη τιμή εφαρμοζόμενης τάσης) είτε γαλβανοστατικά (σε μια συγκεκριμένη τιμή εφαρμοζόμενου ρεύματος). Εναλλακτικά, οι μετρήσεις εμπέδησης μπορούν επίσης να γίνουν και στην τάση ανοικτού κυκλώματος (open circuit potential, OCP), όπου το κύκλωμα δε διαρρέεται από ρεύμα ($I = 0$). Στην τελευταία περίπτωση όμως απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή, αφού η τιμή OCP ενδέχεται να μεταβληθεί κατά τη διάρκεια του πειράματος λόγω αστάθειας του υπό μελέτη συστήματος. Σε τέτοιες περιπτώσεις η τιμή OCP πρέπει να μετρείται σε κάθε συχνότητα ή εναλλακτικά, οι μετρήσεις να πραγματοποιηθούν γαλβανοστατικά σε μηδενικό ρεύμα.

Η διαταραχή του υπό μελέτη συστήματος μπορεί να γίνει με την εφαρμογή ενός ή πολλαπλών (5 ή 15) ημιτονικών σημάτων. Στις τεχνικές μονού ημιτονικού σήματος (single-sine techniques) εφαρμόζεται ένα σήμα μικρού πλάτους, καθορισμένης συχνότητας και μετρείται η απόκριση, η οποία χρησιμοποιείται για να καθοριστούν οι εντός (πραγματική) και εκτός-φάσης (φανταστική) συνιστώσες της ολικής εμπέδησης. Οι τεχνικές μονού ημιτονικού σήματος παράγουν δεδομένα υψηλής ποιότητας, ωστόσο, είναι σχετικά αργές (κυρίως στις χαμηλές συχνότητες) με αποτέλεσμα να καθίσταται χρονοβόρα η συνολική μέτρηση.

Οι τεχνικές πολλαπλών ημιτονικών σημάτων (multi-sine techniques) χρησιμοποιούν ένα ταχύ μετασχηματισμό Fourier (Fast Fourier Transform), ο οποίος παράγει ψηφιακά ένα συνδυασμό από διαφορετικές διεγέρσεις ημιτονικού σήματος, κάθε μια σε διαφορετική συχνότητα και χαρακτηριστικά φάσης. Η κυματομορφή εφαρμόζεται στο υπό εξέταση στοιχείο παράγοντας μια σύνθετη κυματομορφή απόκρισης. Ο υπολογιστής αναλύει την απόκριση αυτή και εξάγει τις πληροφορίες εμπέδησης για καθεμία από τις διακριτές συχνότητες του σήματος διέγερσης. Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα των τεχνικών πολλαπλών ημιτονικών σημάτων είναι η υψηλή ταχύτητα μέτρησης. Παρόλα αυτά παρουσιάζουν και σημαντικά μειονεκτήματα, όπως ευαισθησία σε αρμονικές παραμορφώσεις και φαινόμενα φασματικής παράλλαξης (aliasing). Φαινόμενα φασματικής παράλλαξης παρατηρούνται όταν η ταχύτητα δειγματοληψίας είναι χαμηλή. Σε αυτές τις περιπτώσεις συλλέγεται, ανά κύκλο, μικρός αριθμός δεδομένων (σημείων) με αποτέλεσμα την εμφάνιση ενός ημιτονικού σήματος διέγερσης υψηλής συχνότητας ως σήμα χαμηλής συχνότητας και ο βελτιωμένος λόγος σήματος προς θόρυβο (signal-to-noise ratio, S/N).

Μικρές τιμές διαταραχής (<5 mV) μπορεί να προκαλέσουν «θορυβώδη» σήματα, ενώ μεγάλες τιμές σήματος διαταραχής (>15 mV) μπορεί να οδηγήσουν σε καταστροφή της συνθήκης γραμμικότητας. Τα περισσότερα ηλεκτροχημικά συστήματα είναι συνήθως γραμμικά για εντάσεις διαταραχής 5–10 mV.

Το εύρος των μετρούμενων τιμών εμπέδησης καθορίζεται από τα τεχνικά χαρακτηριστικά του ποτενσιοστάτη/γαλβανοστάτη. Η υψηλότερη μετρούμενη εμπέδηση καθορίζεται από την εμπέδηση εισόδου του οργάνου. Για παράδειγμα, εάν η εμπέδηση εισόδου του οργάνου είναι 200 GOhm (η τιμή αυτή λαμβάνεται όταν δεν υπάρχει

σύνδεση των καλωδίων του με την ηλεκτροχημική κυψελίδα), η εμπέδηση του μετρούμενου στοιχείου θα πρέπει να είναι μικρότερη της εμπέδησης εισόδου του οργάνου σε όλες τις συχνότητες λήψης του φάσματος.

Αντίθετα, η ελάχιστη τιμή της μετρούμενης εμπέδησης καθορίζεται από την αυτεπαγωγή των καλωδίων, η οποία είναι ανάλογη της συχνότητας. Συνεπώς η εμπέδηση του υπό μελέτη συστήματος θα πρέπει να είναι μεγαλύτερη της παράσιτης αυτεπαγωγής.

2.4.2. Εύρος συχνοτήτων

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, ένα φάσμα εμπέδησης συνίσταται από τις τιμές εμπέδησης του υπό μελέτη συστήματος σε διάφορες τιμές συχνοτήτων. Η περιοχή συχνοτήτων θα πρέπει να είναι η ευρύτερη δυνατή, έτσι ώστε να ληφθούν υπόψη όλες οι χρονοσταθερές (τ) του συστήματος [$\tau = RC$ σε second: $(1 \text{ ohm}) \times (1 \text{ farad}) = (1 \text{ volt}) / (1 \text{ ampere}) \times (1 \text{ coulomb}) / (1 \text{ volt}) = 1 \text{ coulomb} / \text{ampere} = (1 \text{ ampere} / \text{second}) / (1 \text{ ampere}) = 1 \text{ second}$]. Ωστόσο, στην πράξη η μέγιστη τιμή συχνότητας καθορίζεται από το εύρος φασματικής ζώνης (bandwidth) του ποτενσιοστάτη, παράγοντες που σχετίζονται με το υπό μελέτη σύστημα και την απόκριση του ηλεκτροδίου αναφοράς. Σε υψηλές συχνότητες το ηλεκτρόδιο αναφοράς μπορεί να παρουσιάσει προβλήματα με αποτέλεσμα τη λήψη «παράλογων» φασμάτων ή διαφορών φάσης που δεν μπορούν να ερμηνευθούν. Το εύρος συχνοτήτων στα περισσότερα εμπορικά διαθέσιμα όργανα είναι 1MHz – 10 μ Hz, αν και για τη περίπτωση των βιοαισθητήρων η μελέτη του συστήματος σε συχνότητες >100 kHz δεν παρουσιάζει πρακτικό ενδιαφέρον.

Ο χρόνος που απαιτείται για τη μέτρηση της εμπέδησης σε μια συχνότητα είναι αντιστρόφως ανάλογος της συχνότητας ($t = 1/f$) αυτής με αποτέλεσμα οι μετρήσεις, σε χαμηλές συχνότητες, να είναι ιδιαίτερα χρονοβόρες. Συνεπώς, σε συστήματα τα οποία μεταβάλλονται με το χρόνο (π.χ. λόγω διάβρωσης) το κατώτερο όριο συχνοτήτων επιλέγεται έτσι ώστε να διασφαλίζεται η λήψη αξιόπιστων μετρήσεων. Στις περισσότερες ηλεκτροχημικές μελέτες τα εμπεδησιομετρικά φάσματα λαμβάνονται στην περιοχή συχνοτήτων 100 kHz – 0,1 Hz.

2.5. ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΑ ΕΜΠΕΔΗΣΗΣ

Ένα φάσμα εμπέδησης μπορεί να απεικονιστεί γραφικά με διαφόρους τύπους διαγραμμάτων, προκειμένου να εξαχθούν αριθμητικά δεδομένα για τη συνολική εμπέδηση, Z , το πραγματικό και το φανταστικό μέρος αυτής Z' , και Z'' αντίστοιχα, τη διαφορά φάσης, θ , την αντίσταση του διαλύματος, R_s , την αντίσταση μεταφοράς φορτίου, R_{ct} , ή την αντίσταση πόλωσης, R_p τη χωρητικότητα της ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας, C_{dl} , και να προκύψει μια σαφής εικόνα της ηλεκτροχημικής συμπεριφοράς του υπό μελέτη συστήματος για ένα συγκεκριμένο εύρος συχνοτήτων. Διαγράμματα του τύπου:

- $Z'' = f(Z')$,
- $Z' = f(\omega Z'')$,
- $Y' = f(Y)$,
- $Y'/\omega = f(Y/\omega)$,
- $Z', -Z'' = f(f)$,
- $\log |Z|, -\text{phase} = f[\text{Log}(f)]$,
- $Z', -Z'' = f[\text{spr}(\omega)]$ κ.ά.

μπορούν να δημιουργηθούν εύκολα με τη βοήθεια των λογισμικών πακέτων επεξεργασίας δεδομένων, με τα οποία είναι εφοδιασμένοι οι περισσότεροι ηλεκτροχημικοί αναλυτές. Σημειώνεται ότι τα παραπάνω διαγράμματα προκύπτουν από τα δεδομένα του αυτού φάσματος. Οι ευρύτερα χρησιμοποιούμενες απεικονίσεις φασμάτων εμπέδησης είναι το διάγραμμα Nyquist και το διάγραμμα Bode.

Στο διάγραμμα Nyquist, $-Z'' = f(Z')$, απεικονίζεται το φανταστικό μέρος της εμπέδησης ως προς το πραγματικό μέρος σε κάθε συχνότητα διέγερσης. Κατά κανόνα, σε ένα διάγραμμα Nyquist οι δύο άξονες είναι ισομήκεις, ωστόσο, σε αρκετές περιπτώσεις για λόγους ευκρινείας η παρουσίαση διαγραμμάτων Nyquist γίνεται με άνισους άξονες. Σημαντικό μειονέκτημα στη χρήση του διαγράμματος Nyquist αποτελούν: α) η μη διακριτή απεικόνιση του φάσματος στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων, αφού οι μεγάλες τιμές εμπέδησης στην περιοχή των χαμηλών συχνοτήτων καθορίζουν την κλίμακα των αξόνων, β) η αδυναμία άμεσης αντιστοίχισης συχνοτήτας – εμπέδησης και γ) η αδυναμία άμεσου υπολογισμού της χωρητικότητας του συστήματος.

Στο διάγραμμα Bode απεικονίζονται δύο καμπύλες: η $\text{Log } |Z| = f[\text{Log}(f)]$, και η $-\theta = f[\text{Log}(f)]$ και, ως εκ τούτου, είναι δυνατή η άμεση ανάγνωση των τιμών της απόλυτης

τιμής της εμπέδησης, $|Z|$ και της διαφοράς φάσης θ , συνάρτηση της συχνότητας. Επίσης, επειδή οι άξονες $|Z|$ και f είναι λογαριθμικοί η απεικόνιση των τιμών $|Z|$ για μεγάλο εύρος συχνοτήτων είναι ευκρινής. Αυτό είναι σημαντικό πλεονέκτημα ιδίως, όταν η εμπέδηση του συστήματος εξαρτάται έντονα από τη συχνότητα, όπως στην περίπτωση ενός ηλεκτροχημικού πυκνωτή.

Επίσης, η χρήση του διαγράμματος Bode ενδείκνυται όταν υπάρχει διασπορά μεταξύ των μετρούμενων τιμών εμπέδησης. Αυτό παρατηρείται κυρίως στις μικρές συχνότητες, όπου ο χρόνος που απαιτείται για τη μέτρηση της εμπέδησης είναι μεγάλος (π.χ. σε $f = 1$ mHz είναι $1/10^{-3}$ s ή 1000 s) και πιθανόν, εντός αυτού του διαστήματος το υπό μελέτη στοιχείο να μην είναι σταθερό (μελέτες διάβρωσης).




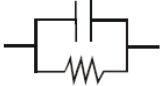
Σχηματική απεικόνιση των παραπάνω διαγραμμάτων για διάφορα απλά [(R), (C), (RC)], σύνθετα κυκλώματα (κύκλωμα Randles) και ηλεκτροχημικές διεργασίες (π.χ. διάβρωση επικαλύψεων) δίνονται στις παραγράφους που ακολουθούν.

2.6. ΑΠΛΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΥΚΛΩΜΑΤΩΝ

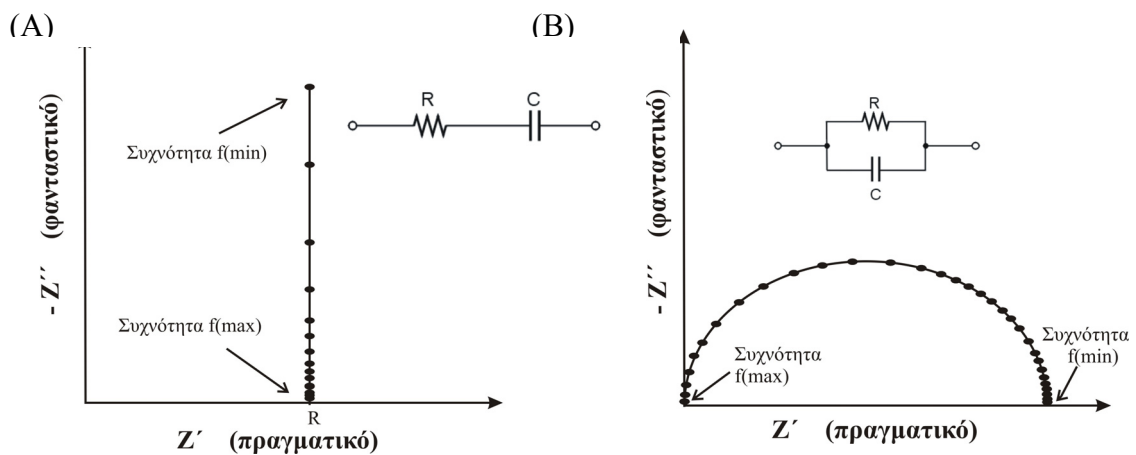
Μια κοινή μέθοδος για την ερμηνεία των φασμάτων εμπέδησης αποτελεί η προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων με ισοδύναμα ηλεκτρικά κυκλώματα. Τα κυκλώματα αυτά συνίσταται από απλά στοιχεία όπως αντιστάσεις, πυκνωτές, καθώς επίσης και από κατανεμημένα στοιχεία (distributed elements), όπως το στοιχείο σταθερής φάσης (constant phase element, CPE) και η εμπέδηση Warburg, W.

Όπως φαίνεται στον Πίνακα 2.1, η εξίσωση εμπέδησης για μια ωμική αντίσταση δεν έχει φανταστικό μέρος και ως εκ τούτου, η τιμή της μετρούμενης εμπέδησης είναι ανεξάρτητη από τη συχνότητα. Έτσι όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.5.A, η τιμή της μετρούμενης εμπέδησης είναι σταθερή και ίση με την τιμή της αντίστασης για όλο το εύρος συχνοτήτων. Αντίθετα, η εμπέδηση ενός πυκνωτή δεν έχει πραγματικό μέρος και το φανταστικό της μέρος εκφράζεται συναρτήσει της χωρητικότητας και της συχνότητας του ημιτονικού σήματος (Πίνακας 2.1).

Πίνακας 2.1. Απλά στοιχεία κυκλωμάτων και οι εξισώσεις εμπέδησης αυτών.

Στοιχείο κυκλώματος	Εξίσωση εμπέδησης
	$Z = R + 0j$ $j = \sqrt{-1}$
	$Z = 0 - j / \omega C$ $\omega = 2\pi f$
	$Z = 0 + j \omega L$ $\omega = 2\pi f$
	$Z = \frac{R}{1 + \omega^2 C^2 R^2} - \frac{j \omega C R^2}{1 + \omega^2 C^2 R^2}$

Έτσι, στο φάσμα ενός τέτοιου κυκλώματος οι τιμές εμπέδησης για κάθε μετρούμενη συχνότητα βρίσκονται στο φανταστικό άξονα ($-Z''$) και η μετρούμενη τιμή εμπέδησης είναι αντιστρόφως ανάλογη της συχνότητας διέγερσης (Σχήμα 2.5.B). Συνεπώς, σε υψηλές συχνότητες ένας πυκνωτής δρα σαν βραχυκύκλωμα και η εμπέδηση του τείνει στο μηδέν, ενώ σε χαμηλές συχνότητες η εμπέδηση τείνει στο άπειρο και δρα σαν ένα ανοικτό κύκλωμα.

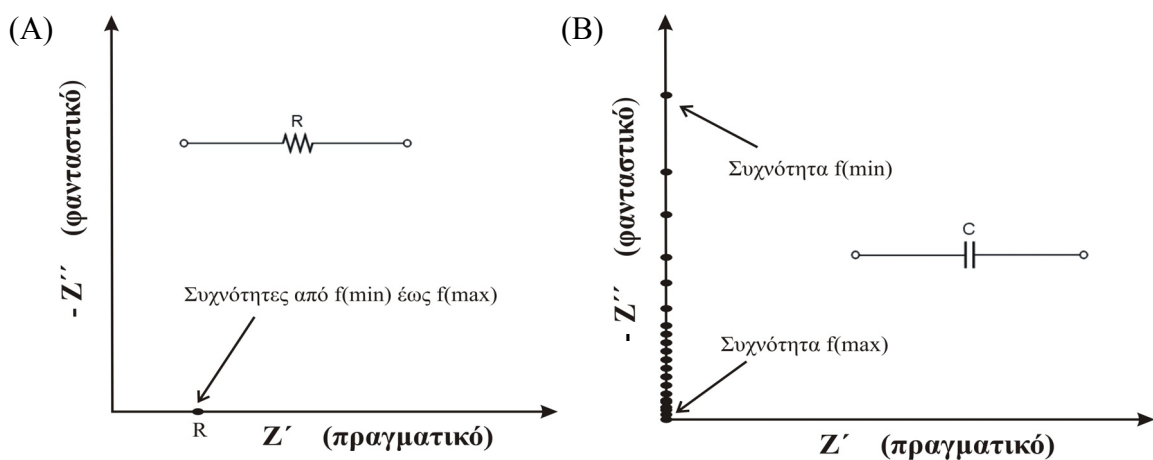


Σχήμα 2.5. Διάγραμμα Nyquist για (A) μια αντίσταση R και (B) έναν πυκνωτή C. Κάθε σημείο στα διαγράμματα Nyquist αντιπροσωπεύει την τιμή εμπέδησης σε μια συχνότητα μέτρησης.

Σε ένα κύκλωμα που αποτελείται από μια αντίσταση και έναν πυκνωτή σε σειρά, η συνολική εμπέδηση δίνεται από την εξίσωση 2.14:

$$Z = R - \frac{j}{\omega C} \quad (2.14)$$

Σύμφωνα με την εξίσωση 2.14, σε υψηλές συχνότητες το φανταστικό μέρος της εμπέδησης μηδενίζεται και η τιμή της συνολικής εμπέδησης ισούται με την τιμή της αντίστασης, ενώ για μικρότερες συχνότητες το φανταστικό μέρος της εμπέδησης παύει να είναι αμελητέο και μειώνει την τιμή της συνολικής εμπέδησης. Σε αυτήν την περίπτωση, το διάγραμμα Nyquist αποτελείται από μια ευθεία παράλληλη με τον άξονα Z' , η οποία τέμνει τον άξονα Z' σε σημείο αριθμητικά ίσο με την τιμή της ωμικής αντίστασης (Σχήμα 2.6.A).



Σχήμα 2.6. Διαγράμματα Nyquist για μια αντίσταση R και έναν πυκνωτή C συνδεδεμένα (A) σε σειρά και (B) παράλληλα.

Εάν τα παραπάνω στοιχεία συνδεθούν παράλληλα, η εξίσωση της εμπέδησης γίνεται πιο πολύπλοκη (Πίνακας 2.1) και στην περίπτωση αυτή το φάσμα εμπέδησης στο διάγραμμα Nyquist εμφανίζεται ως ένα ημικόκλιο με αρχή την αρχή των αξόνων, ενώ η

τιμή της αντίστασης πόλωσης ή μεταφοράς φορτίου βρίσκεται από την τομή του φάσματος με τον άξονα του πραγματικού μέρους της εμπέδησης στις χαμηλές συχνότητες διέγερσης (Σχήμα 2.6.B). Ισούται δηλαδή με τη διάμετρο του σχηματιζόμενου ημικυκλίου.

Εάν τώρα στο ένθετο κύκλωμα στο Σχήματος 2.6.B, προσθέσουμε σε σειρά μια αντίσταση R , σε αναλογία με όσα παρατηρήσαμε στην περίπτωση των κυκλωμάτων 2.5.B και 2.5.A, το ημικύκλιο θα μετατοπιστεί κατά τόσα Ohm στον πραγματικό άξονα, όσα και η ονομαστική τιμή της προστιθέμενης αντίστασης. Το κύκλωμα που θα προκύψει, $R(RC)$, ονομάζεται κύκλωμα Randles και περιγράφεται αναλυτικά στην § 2.8.

Όσον αφορά την εμπέδηση μιας επαγωγικής αντίστασης, αυτή είναι ανάλογη της συχνότητας (Πίνακας 2.1) και έτσι λαμβάνει μεγάλες τιμές σε υψηλές τιμές συχνότητας, ενώ, σε χαμηλές συχνότητες, συμπεριφέρεται σα βραχυκύκλωμα. Όπως και στους πυκνωτές, μια επαγωγική αντίσταση έχει μόνο φανταστικό μέρος εμπέδησης, όμως στην περίπτωση αυτή το ρεύμα προηγείται σε φάση ως προς την τάση (μεταβολή φάσης $+90^\circ$). Όπως και στους πυκνωτές, μια επαγωγική αντίσταση έχει μόνο φανταστικό μέρος εμπέδησης, όμως στην περίπτωση αυτή, επειδή το ρεύμα προηγείται σε φάση ως προς την τάση (μεταβολή φάσης $+90^\circ$), η όποια συνισφορά της στην εμπέδηση του κυκλώματος που περιέχεται, να καταγραφεί στο θετικό τμήμα του φανταστικού άξονα (§2.9, Σχήμα 2.16). Η εμφάνιση επαγωγικής αντίστασης μπορεί να αποδοθεί σε φυσικοχημικές διεργασίες που λαμβάνουν χώρα στο υπό μελέτη σύστημα κατά τη διάρκεια των μετρήσεων. Όμως, η φύση των διεργασιών αυτών και ο μηχανισμός παραγωγής επαγωγικής αντίστασης δεν είναι απόλυτα κατανοητός. Συνήθως, η εμφάνιση επαγωγικής αντίστασης δηλώνει σφάλματα κατά τη μέτρηση, τα οποία οφείλονται στη μη-ομοιόμορφη κατανομή του ρεύματος, στην επαγωγική αντίσταση των καλωδίων, στην αργή απόκριση του ηλεκτροδίου αναφοράς ή ακόμη και στη μη-ιδανική λειτουργία του ποτενσιοστάτη.

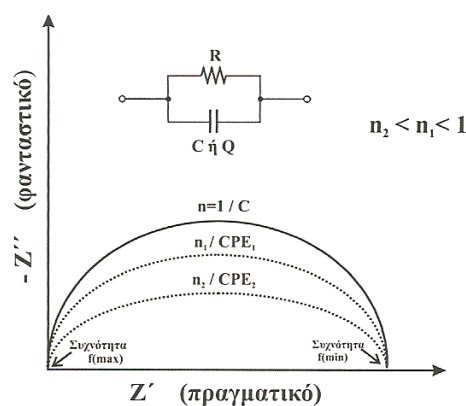
2.7. ΚΑΤΑΝΕΜΗΜΕΝΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΚΥΚΛΩΜΑΤΩΝ

Το στοιχείο σταθερής φάσης χρησιμοποιείται, συχνά, αντί ενός ιδανικού πυκνωτή για την περιγραφή ενός ηλεκτροχημικού πυκνωτή (ηλεκτρική διπλοστοιβάδα) και

αποτελείται από διακλαδιζόμενες ομάδες πυκνωτών ή/και αντιστάσεων που είναι συνδεδεμένες σε σειρά ή παράλληλα. Εκφράζει την τραχύτητα των υπό μελέτη επιφανειών (ηλεκτρόδιο), την έλλειψη ομοιογένειας στην κύρια μάζα μιας επικάλυψης με την οποία έχει τροποποιηθεί το ηλεκτρόδιο. Πρακτικά χρησιμοποιείται ως «εργαλείο» για την ευκολότερη προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων με ένα ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα και δικαιολογεί την εξάρτηση της χωρητικότητας ενός ηλεκτροχημικού πυκνωτή από τη συχνότητα. Υπενθυμίζεται ότι η χωρητικότητα ενός πυκνωτή C, εξαρτάται από τα γεωμετρικά χαρακτηριστικά των οπλισμών, το πάχος του διηλεκτρικού υλικού και τη διηλεκτρική σταθερά του τελευταίου και είναι ανεξάρτητη της συχνότητας. Η εμπέδηση του στοιχείου σταθερής φάσης Q δίνεται από τη εξίσωση

$$Z = -\frac{j}{(\omega Q)^n} \quad (2.15)$$

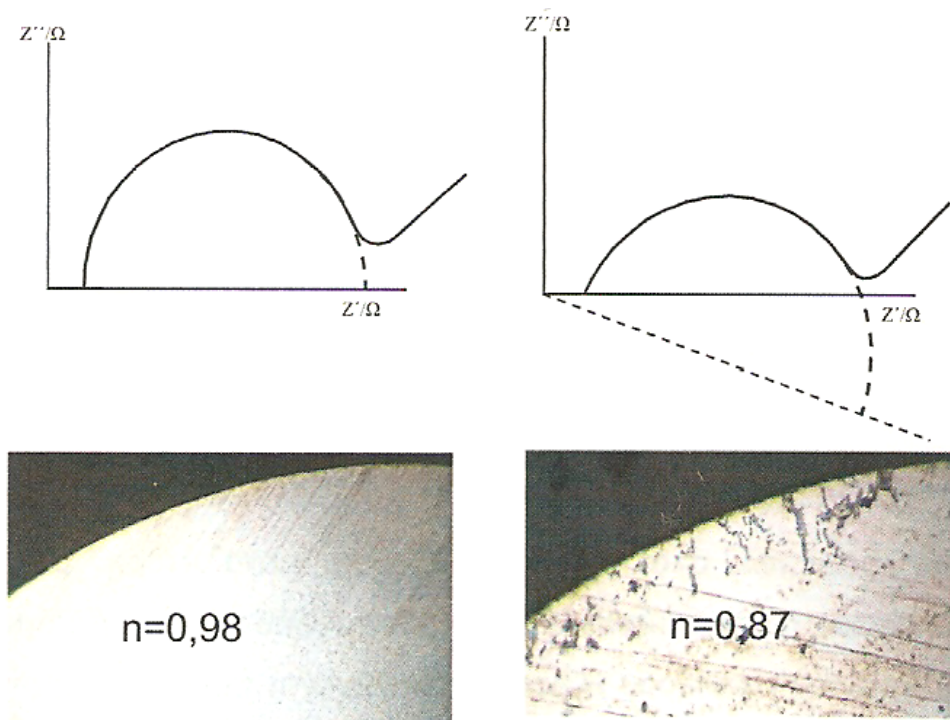
Ο εκθέτης n της παραπάνω εξίσωσης χρησιμοποιείται ως μέτρο της απόκλισης του εξεταζόμενου συστήματος από την ιδανική χωρητική συμπεριφορά Σε ιδανικά επίπεδα ηλεκτρόδια ο εκθέτης n ισούται με 1 και η τιμή Q ισοδυναμεί με τη χωρητικότητα C ενός ιδανικού πυκνωτή. Σε πραγματικά ηλεκτροχημικά στοιχεία ο εκθέτης n λαμβάνει τιμές $0,5 < n < 1$. Από τα φάσματα του Σχήματος 2.7 είναι εμφανές ότι όσο μικραίνει η τιμή του εκθέτη n τόσο αυξάνεται η παραμόρφωση του ημικυκλικού διαγράμματος $Z'' = f(Z')$. Όσο μεγαλύτερη είναι η ανομοιογένεια της επιφάνειας των ηλεκτροδίων, τόσο μικρότερη είναι η τιμή του εκθέτη n.



Σχήμα 2.7. Επίδραση της τιμής του εκθέτη n στα φάσματα εμπέδησης ενός κυκλώματος RC σε παράλληλη σύνδεση.

Αντίστοιχα, η παραμόρφωση του φάσματος εμπέδησης είναι μεγαλύτερη και το κέντρο του κύκλου μετατοπίζεται όλο και πιο χαμηλά, κάτω από τον άξονα του πραγματικού μέρους της εμπέδησης (Σχήμα 2.8).

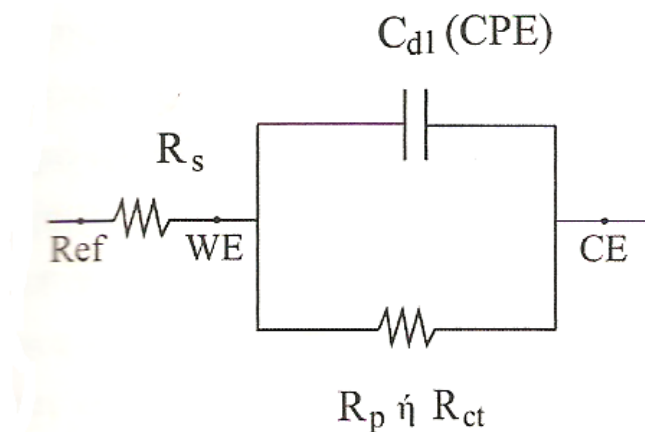
Η ευθεία γραμμή μετά το ημικύκλιο οφείλεται σε φαινόμενα διάχυσης τα οποία περιγράφονται με την αντίσταση Warburg (W). Σε πολλές ηλεκτροχημικές διεργασίες η μεταφορά ιόντων από την κύρια μάζα του ηλεκτρολύτη στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου, δηλαδή η διέλευση των ιόντων μέσω της στιβάδας διάχυσης, αποτελεί το αργό στάδιο της συνολικής διεργασίας και κατά συνέπεια, το μετρούμενο ρεύμα ελέγχεται από φαινόμενα διάχυσης. Για την περιγραφή τέτοιων φαινομένων, στο αντίστοιχο ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα χρησιμοποιείται το στοιχείο Warburg (W). Σε ηλεκτροχημικά συστήματα που ελέγχονται πλήρως από τη διάχυση, η παρατηρούμενη διαφορά φάσης είναι 45° , δηλαδή η συμπεριφορά της εμπέδησης Warburg βρίσκεται ανάμεσα σε αυτή μιας αντίστασης (διαφορά φάσης 0°) και ενός πυκνωτή (διαφορά φάσης 90°), όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.8



Σχήμα 2.8. Διαγράμματα Nyquist ηλεκτροχημικών κυκλωμάτων R(RC) με διαφορετικές τιμές για τον εκθέτη n και οι εικόνες των αντίστοιχων επιφανειών.

2.8. ΚΥΚΛΩΜΑ Randles

Το κύκλωμα Randles είναι ένα από τα ευρέως χρησιμοποιούμενα ισοδύναμα κυκλώματα για την περιγραφή διαφόρων φυσικών διεργασιών ή χημικών αντιδράσεων που λαμβάνουν χώρα στη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου–ηλεκτρολύτη. Το κύκλωμα Randles αποτελείται από μια αντίσταση (R_s) σε σειρά με ένα σύστημα πυκνωτή/αντίστασης, σε παράλληλη σύνδεση, όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.9. Η R_s εκφράζει την ωμική αντίσταση του φέροντα ηλεκτρολύτη μεταξύ των ηλεκτροδίων εργασίας (We) και αναφοράς (Ref). Η R_p , εκφράζει την αντίσταση πόλωσης, όταν οι μετρήσεις γίνονται απουσία κάποιου οξειδοαναγωγικού ζεύγους στο διάλυμα μέτρησης, ενώ παρουσία ενός οξειδοαναγωγικού ζεύγους αναφερόμαστε στην αντίσταση μεταφοράς–φορτίου, R_{ct} , η οποία εκφράζει τη φαρανταϊκή αντίδραση που λαμβάνει χώρα στη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου–ηλεκτρολύτη. Τέλος, το στοιχείο C_{dl} (ή CPE) περιγράφει τη χωρητικότητα της ηλεκτρικής διπλοστοιβάδας.

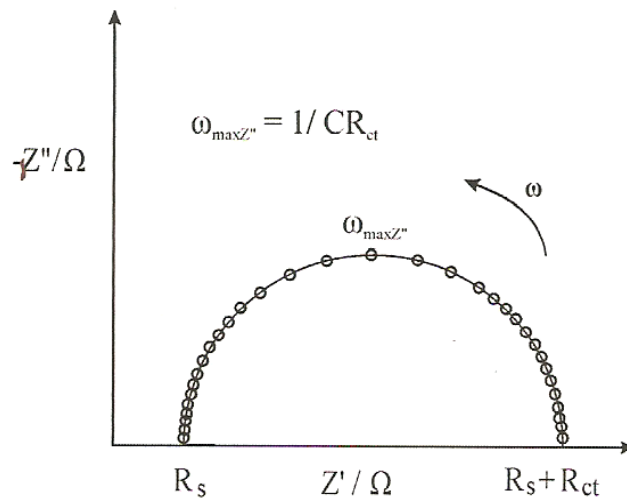


Σχήμα 2.9. Κύκλωμα Randles. Τα Ref, WE και CE αναφέρονται στα ηλεκτρόδια αναφοράς, εργασίας και στο αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο αντίστοιχα.

Σε υψηλές συχνότητες, ο πυκνωτής ενεργεί ως βραχυκύκλωμα απομακρύνοντας την αντίσταση R_p από το κύκλωμα. Αντίθετα, στις πολύ χαμηλές συχνότητες ο πυκνωτής δρα

ως ανοικτό κύκλωμα και ουσιαστικά παύει να υπάρχει το κύκλωμα. Σε αυτήν την περίπτωση, η εμπέδηση του κυκλώματος Randles είναι ο συνδυασμός δύο αντιστάσεων R_s και R_p σε σειρά.

Συνεπώς, τόσο σε υψηλές όσο και σε χαμηλές τιμές συχνοτήτων, το κύκλωμα Randles συμπεριφέρεται πρωτίστως ως αντίσταση. Με άλλα λόγια, σε αυτές τις τιμές συχνοτήτων το φανταστικό μέρος της εμπέδησης είναι πολύ μικρό ή δε λαμβάνεται υπόψη, η γωνία φάσης πλησιάζει τις 0° και η συνολική εμπέδηση του κυκλώματος δεν εξαρτάται από τη συχνότητα. Στις ενδιάμεσες τιμές συχνοτήτων, η χωρητικότητα του πυκνωτή επιδρά σημαντικά στη μετρούμενη εμπέδηση, το κύκλωμα αποκτά χωρητική συμπεριφορά, η γωνία φάσης λαμβάνει υψηλότερες τιμές $0^\circ < \theta \leq 90^\circ$ και η συνολική εμπέδηση του κυκλώματος εξαρτάται από τη συχνότητα. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.10, σε υψηλές συχνότητες (>100 kHz), η εμπέδηση του κυκλώματος οφείλεται εξολοκλήρου στην ωμική αντίσταση, R_s , ενώ σε μικρές τιμές συχνότητας (τυπικά <1 Hz), η εμπέδηση του κυκλώματος ισούται με $(R_s + R_p)$.

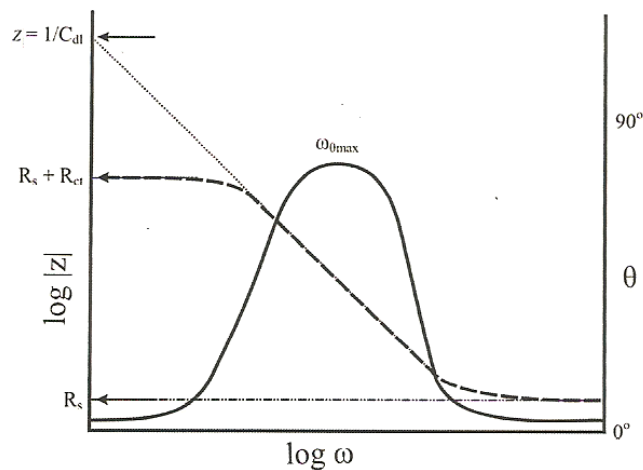


Σχήμα 2.10. Διάγραμμα Nyquist για ένα κύκλωμα Randles.

Έτσι, η τιμή της R_s βρίσκεται από την πρώτη τομή του φάσματος με τον άξονα της πραγματικής εμπέδησης, ενώ η διάμετρος του ημικυκλίου ισούται με την R_p . Επιπρόσθετα, αν είναι γνωστή η συχνότητα ($\omega_{\max Z''}$) στο ανώτερο σημείο του φάσματος,

για το οποίο παρατηρείται μέγιστη τιμή για τη φανταστική εμπέδηση, είναι δυνατό να υπολογιστεί η χρονοσταθερά, $\tau = RC$, του κυκλώματος.

Αντίστοιχα, για το κύκλωμα Randles, το διάγραμμα Bode έχει τη μορφή του Σχήματος 2.11, το οποίο, όπως έχει αναφερθεί στην § 2.5 (σελ. 33), παρέχει άμεσες πληροφορίες για τη συχνότητα και τη φάση του υπό μελέτη συστήματος.



Σχήμα 2.11. Διάγραμμα Bode για ένα κύκλωμα Randles, όπου (—) φάση, (---) εμπέδηση.

Οι τιμές R_p ή R_{ct} και R_s υπολογίζονται επίσης εύκολα και από τα διαγράμματα Bode. Σε υψηλές συχνότητες, η εμπέδηση του συστήματος οφείλεται αποκλειστικά στην R_s , η οποία μπορεί εύκολα να υπολογιστεί από την προέκταση της καμπύλης εμπέδησης στον άξονα $\text{Log}|Z|$. Ομοίως, ο όρος $\text{Log}(R_s + R_{ct})$ μπορεί να υπολογιστεί προεκρίνοντας το τμήμα της καμπύλης εμπέδησης στην περιοχή χαμηλών συχνοτήτων στον άξονα $\text{Log}|Z|$.

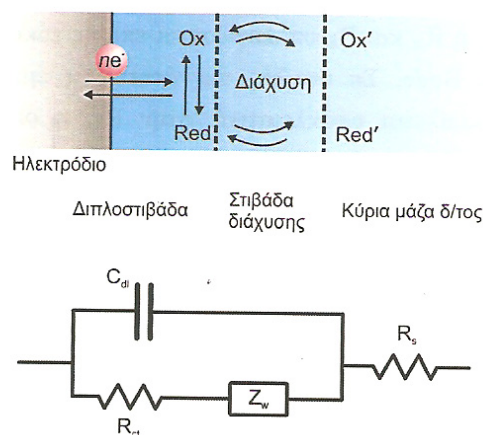
Σε ενδιάμεσες τιμές συχνοτήτων, η καμπύλη $\text{Log}|Z| = f[\text{Log}(\omega)]$ είναι ευθεία γραμμή με κλίση -1 και η συνολική εμπέδηση του συστήματος ελέγχεται από τη χωρητική αντίσταση. Ισχύει δηλαδή $Z_c = \frac{-j}{\omega C}$. Προεκτείνοντας την ευθεία αυτή στον άξονα $\text{Log}|Z|$, για $\text{Log}(\omega) = 0$ ($\omega = 2\pi f = 1 \hat{=} f = 0,16 \text{ Hz}$), είναι δυνατός ο υπολογισμός της C_{dl} σύμφωνα με την εξίσωση 2.16. Προϋπόθεση για την ισχύ των παραπάνω είναι ο λόγος των R_s, R_{ct} να είναι >100 .

$$\begin{aligned}
 \text{Log}|Z| &= \text{Log} \frac{1}{\omega C} = \\
 &= -\text{Log}(\omega C) \\
 &= -\text{Log}(\omega) - \text{Log}(C) \\
 &= -\text{Log}(2\pi f) - \text{Log}(C) \Rightarrow |Z_{(f=0,16\text{Hz})}| = \frac{1}{C}
 \end{aligned}
 \tag{2.16}$$

Το διάγραμμα Bode παρέχει επίσης πληροφορίες για τη γωνία φάσης, θ . Σε υψηλές και χαμηλές τιμές συχνότητας, όπου η συμπεριφορά του κυκλώματος είναι κυρίως ωμική, η γωνία φάσης είναι σχεδόν μηδενική, ενώ σε ενδιάμεσες τιμές συχνότητας, η θ λαμβάνει τιμές ανάλογα με τον όρο Z'' . Η τιμή $\omega_{\theta_{\max}}$, αποτελεί τη συχνότητα στην οποία η φάση λαμβάνει τη μέγιστη τιμή της και βρίσκεται από το μέγιστο της καμπύλης $\theta = f(\text{Log } \omega)$ όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.11. Χρησιμοποιώντας την τιμή αυτή, η τιμή της C_{dl} μπορεί να υπολογιστεί σύμφωνα με την εξίσωση 2.17:

$$\omega_{\theta_{\max}} = \sqrt{\left(1 + \frac{R_{ct}}{R_s}\right) \left(\frac{1}{C_{dl} R_{ct}}\right)}
 \tag{2.17}$$

Στο σημείο αυτό πρέπει να σημειωθεί ότι η συχνότητα αυτή δεν είναι η ίδια με τη συχνότητα στην οποία το διάγραμμα Nyquist στο Σχήμα 2.10 παρουσιάζει μέγιστο.



Σχήμα 2.12. Το φαινόμενο της διάχυσης και το αντίστοιχο ισοδύναμο κύκλωμα Randles

Στις διεργασίες που λαμβάνει χώρα μεταφορά ιόντων ή ηλεκτρενεργών ουσιών (Σχήμα 2.12) από την κύρια μάζα του ηλεκτρολύτη προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου, η συμπεριφορά των υπό μελέτη ηλεκτροχημικών συστημάτων εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από τη διάχυση των παραπάνω σωματιδίων προς και από το ηλεκτρόδιο. Όπως αναφέρθηκε, σε αυτή την περίπτωση για την προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων εισάγεται το στοιχείο Warburg και το αντίστοιχο κύκλωμα Randles φαίνεται στο Σχήμα 2.12.

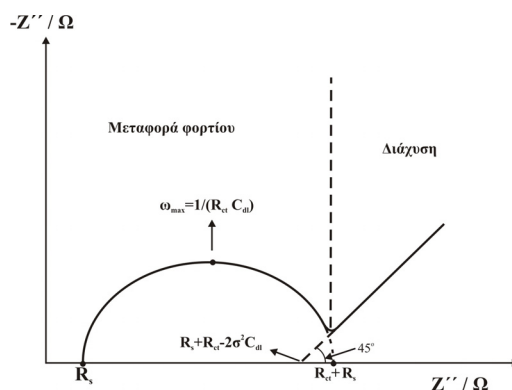
Σε ηλεκτροχημικά συστήματα που ελέγχονται πλήρως από τη διάχυση, η εμπέδηση Warburg, Z_w , δίνεται από την εξίσωση 2.18:

$$Z_w = \frac{\sigma(1-j)}{\sqrt{\omega}} \quad (2.18)$$

όπου σ , ο συντελεστής Warburg, από τον οποίο μπορεί να υπολογιστεί ο συντελεστής διάχυσης των ηλεκτρενεργών σωματιδίων, σύμφωνα με την εξίσωση 2.19:

$$\sigma = \frac{RT}{F^2 z^2 c A \sqrt{2D}} \quad (2.19)$$

όπου R η παγκόσμια σταθερά των αερίων, F η σταθερά Faraday, z το φορτίο του σωματιδίου, c η συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη, A η επιφάνεια του ηλεκτροδίου και D ο μέσος συντελεστής διάχυσης των σωματιδίων.



Σχήμα 2.13. Διάγραμμα Nyquist για ένα κύκλωμα Randles με διάχυση.

Ο συντελεστής Warburg, σ , μπορεί επίσης να υπολογιστεί γραφικά, προεκτείνοντας την ευθεία γραμμή με κλίση 1 (45°) στο Σχήμα 2.13, στο οποίο απεικονίζεται το φάσμα εμπέδησης για το κύκλωμα του Σχήματος 2.12.

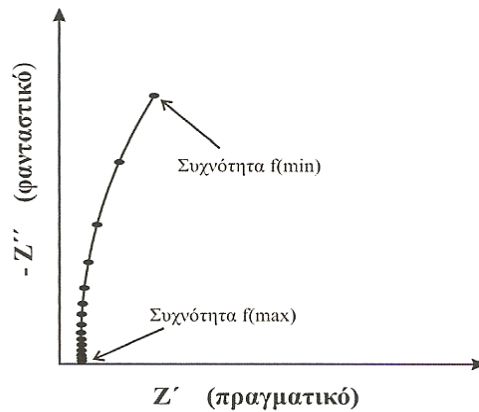
Το διάγραμμα Nyquist του Σχήματος 2.13 αποτελεί μια τυπική μορφή φάσματος φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης μιας διεπιφάνειας ηλεκτροδίου–ηλεκτρολύτη, στην οποία η επιφάνεια του ηλεκτροδίου έχει τροποποιηθεί με ένα λεπτό υμένιο ενός ημιαγωγίου ή διηλεκτρικού υλικού. Προκειμένου να λάβουμε ένα «καλοσχηματισμένο», συμμετρικό δηλαδή, ημικύκλιο ώστε να είναι εφικτή η προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων με κάποιο, σχετικά απλό, ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα (π.χ. το κύκλωμα Randles) και, κατά συνέπεια, εύκολη η εξαγωγή αριθμητικών δεδομένων για τα επιμέρους στοιχεία του, οι μετρήσεις μπορούν να πραγματοποιηθούν παρουσία ενός οξειδοαναγωγικού ζεύγους (π.χ. σιδηρικού ανιούχο/σιδηροκυανιούχο κάλιο, $[\text{Ru}(\text{NH}_2)_6]^{2+/3+}$ ή $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$) εφαρμόζοντας σταθερή τάση ίση με το κανονικό δυναμικό αναγωγής του. Με την προσθήκη του οξειδοαναγωγικού ζεύγους στο φέροντα ηλεκτρολύτη, επιτυγχάνεται η λήψη μικρών τιμών R_{ct} σε σχετικά μεγάλες τιμές συχνότητας (π.χ. 1–10 Hz) οπότε η καμπύλη εμπέδησης «καμπυλώνει» εύκολα και είναι συμμετρική. Απουσία του οξειδοαναγωγικού ζεύγους, η «καμπύλωση» του φάσματος, είτε δεν είναι δυνατή, είτε συμβαίνει σε πολύ μικρότερες τιμές συχνότητας (π.χ. 1–10 mHz) επιμηκύνοντας έτσι σημαντικά το χρόνο που απαιτείται για τη λήψη του φάσματος. Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε στην § 2.5 (σελ. 33), οι μετρήσεις σε πολύ χαμηλές τιμές συχνότητας ενδέχεται να είναι λιγότερο επαναλήψιμες.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.13, το διάγραμμα Nyquist χωρίζεται σε δύο μέρη. Ένα ημικύκλιο στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων και μια ευθεία γραμμή στην περιοχή χαμηλών συχνοτήτων. Στη διαχωριστική γραμμή αυτών των δύο περιοχών εντοπίζεται γραφικά (συνήθως με πολύ καλή ακρίβεια) η R_{ct} . Το καμπύλο τμήμα περιγράφει μια διαδικασία όπου η ταχύτητα μεταφοράς φορτίου είναι το αργό στάδιο, αυτό που καθορίζει το μετρούμενο ρεύμα, ενώ αντίθετα, στην περιοχή χαμηλών συχνοτήτων, η όλη διαδικασία ελέγχεται από τη διάχυση του οξειδοαναγωγικού ζεύγους προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου, όπου και πραγματοποιείται η αντίδραση μεταφοράς φορτίου. Συνεπώς, για δεδομένες πειραματικές συνθήκες, η τιμή της R_{ct} ή αντίστοιχα η διάμετρος του

ημικυκλίου $R_s R_{ct}$ (υπενθυμίζεται ότι η R_s εκφράζει την αντίσταση του φέροντα ηλεκτρολύτη και ως εκ τούτου για το ίδιο διάλυμα μέτρησης παραμένει σταθερή) αποτελεί μέτρο της ευκολίας πρόσβασης του οξειδοαναγωγικού ζεύγους στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Επομένως, εάν η επιφάνεια του ηλεκτροδίου έχει τροποποιηθεί με κάποιο υμένιο, η τιμή της R_{ct} μπορεί να μας δώσει πληροφορίες σχετικά με το ποσοστό επικάλυψης του ηλεκτροδίου ή το διηλεκτρικό χαρακτήρα της επικάλυψης. Αναφερόμενοι σε μια συγκεκριμένη επικάλυψη (σε αυτή την περίπτωση μπορούμε να θεωρήσουμε ότι η διηλεκτρική σταθερά του υλικού της επικάλυψης παραμένει σταθερή κατά τη διάρκεια της μελέτης) οι τιμές της R_{ct} είναι ανάλογες του ποσοστού επικάλυψης της επιφάνειας του ηλεκτροδίου. Μείωση της R_{ct} από μια δεδομένη αρχική τιμή αποδίδεται στην εκρόφιση ή την αποδόμηση της επικάλυψης (στην τελευταία περίπτωση η διηλεκτρική σταθερά του υλικού ενδέχεται να μεταβληθεί), ενώ αύξηση της R_{ct} από μια δεδομένη αρχική τιμή αποδίδεται στην ενίσχυση (διόγκωση) της επικάλυψης, λόγω π.χ. της πρόσδεσης κάποιων ουσιών πάνω στο αρχικά σχηματιζόμενο υμένιο. Ομοίως, αντιδράσεις υβριδοποίησης νουκλεϊνικών οξέων, δηλαδή αλληλεπίδραση συμπληρωματικών αλυσίδων DNA, μπορούν να ανιχνευτούν και να προσδιοριστούν ποσοστικά με μετρήσεις φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης.

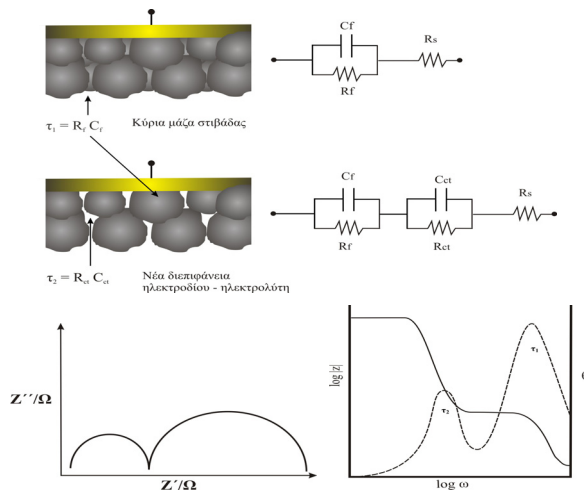
2.9. ΦΑΣΜΑΤΑ ΕΜΠΕΔΗΣΗΣ «ΣΥΝΘΕΤΩΝ» ΚΥΚΛΩΜΑΤΩΝ

Στο Σχήμα 2.14 παρουσιάζεται το φάσμα εμπέδησης ενός ηλεκτροδίου τροποποιημένου με μια διηλεκτρική (μονωτική) στιβάδα, το οποίο βρίσκεται σε διάλυμα ηλεκτρολύτη. Το συγκεκριμένο φάσμα εμπέδησης, το οποίο μπορεί να περιγραφεί με ένα κύκλωμα ανάλογο του κυκλώματος Randles, δεν παρουσιάζεται ως ημικύκλιο, αλλά ως μια κυρτή γραμμή, η οποία καταδεικνύει μια έντονα χωρητική συμπεριφορά. Με άλλα λόγια, η εμπεδησιομετρική συμπεριφορά του συστήματος καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό από τη χωρητικότητα της διηλεκτρικής στιβάδας. Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη παράγραφο, παρουσία κάποιου οξειδοαναγωγικού ζεύγους στο διάλυμα του ηλεκτρολύτη, θα αναμέναμε τη λήψη μιας πιο καμπύλης γραμμής, η οποία θα προσέγγιζε περισσότερο τη μορφή του ημικυκλίου.



Σχήμα 2.14. Διάγραμμα Nyquist ηλεκτροδίου τροποποιημένου με διηλεκτρική στιβάδα.

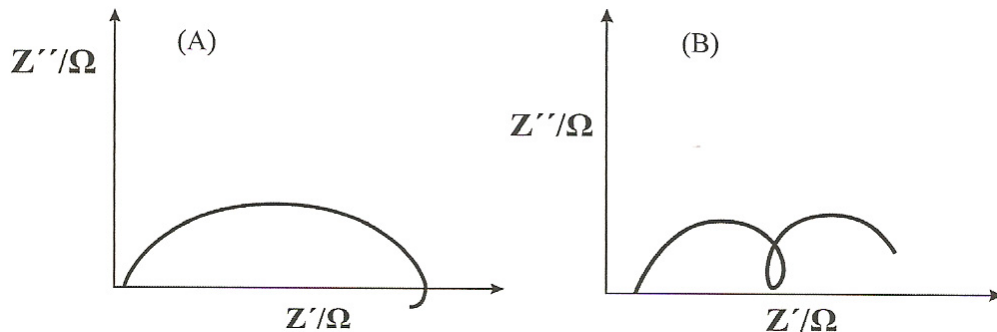
Φάσματα εμπέδησης με δύο σταθερές χρόνου ($\tau=RC$) (Σχήμα 2.15) είναι τυπικά για μεταλλικές επιφάνειες, οι οποίες έχουν καλυφθεί με πορώδη μονωτικά υμένα, τα οποία αποδομούνται με το χρόνο (π.χ. λόγω φαινομένων διάβρωσης).



Σχήμα 2.15. (Α) Σχηματική αναπαράσταση της διάβρωσης της στιβάδας πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου και τα αντίστοιχα ισοδύναμα ηλεκτρικά κυκλώματα. (Β) Διαγράμματα Nyquist και Bode για σύστημα με δύο χρονοσταθερές τ_1 και τ_2 .

Το ένα ημικύκλιο (περιοχή υψηλών συχνοτήτων) εκφράζει την κύρια συμπαγή μάζα της στιβάδας $[R_f/C_f]$, ενώ το άλλο ημικύκλιο (περιοχή χαμηλών συχνοτήτων) αποδίδεται στην πρόσβαση του ηλεκτρολύτη στη μεταλλική επιφάνεια. Συγκεκριμένα, η ύπαρξη ή η δημιουργία πόρων και η εις βάθος ανάπτυξης τους (π.χ. κατά την αποδόμηση μονωτικών υμενίων), επιτρέπει τη διείσδυση του ηλεκτρολύτη κάτω από το αντίστοιχο υμένιο και τελικά, τη δημιουργία μιας νέας διεπιφάνειας ηλεκτροδίου–ηλεκτρολύτη. Η νέα αυτή διεπιφάνεια γίνεται αντιληπτή με την εμφάνιση ενός δεύτερου ημικυκλίου στις χαμηλές συχνότητες και μπορεί να προσομοιωθεί με ένα επιπλέον παράλληλο συνδυασμό αντίστασης/πυκνωτή $[R_{ct}/C_{dl}]$ στο ισοδύναμο κύκλωμα.

Έχουν αναφερθεί επίσης περιπτώσεις φασμάτων εμπέδησης που μπορούν να παρουσιάζουν επαγωγικούς βρόχους (inductive loops), τα οποία μπορούν να προσομοιωθούν με ισοδύναμα κυκλώματα που περιέχουν εκτός των άλλων και επαγωγικές αντιστάσεις. Οι επαγωγικοί βρόχοι εμφανίζονται όταν το φανταστικό μέρος της εμπέδησης είναι θετικό ($Z'' > 0$.)



Σχήμα 2.16. Παραδείγματα διαγραμμάτων Nyquist συστήματα με επαγωγικούς βρόχους (A) σε χαμηλές και (B) σε ενδιάμεσες συχνότητες.

Ένας επαγωγικός βρόχος μπορεί να συσχετιστεί με φαινόμενα διάβρωσης ή μηχανισμούς μεταφοράς (πλευρική κίνηση – διάχυση – προσρόφιση σε πορώδεις επιφάνειες. Η παρουσία επαγωγικών βρόχων μπορεί επίσης να οφείλεται στην ανάπτυξη

κρυστάλλων από διαλύματα αλάτων και στη διαδικασία πυρήνωσης αυτών. Η μετακίνηση των προσροφούμενων ιόντων από τους αναπτυσσόμενους πυρήνες κρυστάλλωσης, μπορεί να προκαλέσει τη δημιουργία αντίστροφου ρεύματος στο κύκλωμα και στην εμφάνιση επαγωγικού βρόχου. Στη βιβλιογραφία έχουν αναφερθεί παραδείγματα αντιδράσεων με αλληλουχίες/ενδιάμεσα σωματίδια που παρουσιάζουν επαγωγικούς βρόχους κυρίως σε χαμηλές συχνότητες (Σχήμα 2.16.A). Τέλος, η παρουσία επαγωγικών βρόχων σε ενδιάμεσες συχνότητες (Σχήμα 2.16.B) μπορεί να αποδοθεί στην εκρόφιση σωματιδίων από την επιφάνεια του ηλεκτροδίου κατά τη διεξαγωγή του πειράματος ή στην προσρόφιση ενδιάμεσων προϊόντων, τα οποία παράγονται κατά τη διεξαγωγή των μετρήσεων, στην υπό μελέτη επιφάνεια.

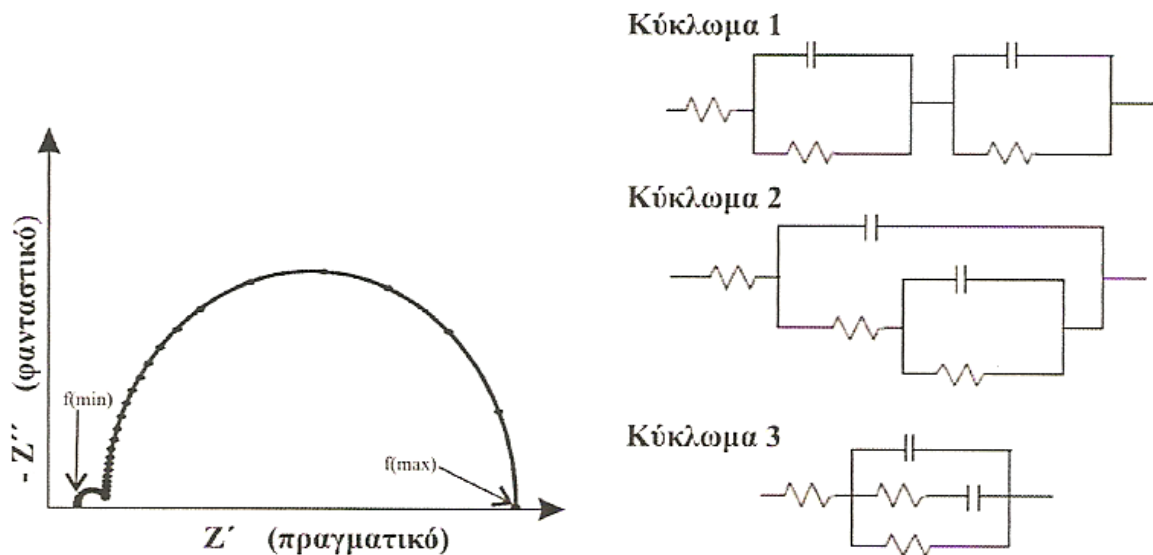
2.10. ΠΡΟΣΟΜΟΙΩΣΗ ΦΑΣΜΑΤΩΝ ΕΜΠΕΔΗΣΗΣ

Η προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων εμπέδησης με ένα ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα γίνεται με χρήση κατάλληλων λογισμικών, τα οποία βασίζονται στον αλγόριθμο Boukamp. Σύμφωνα με τον κώδικα περιγραφής κυκλωμάτων (Circuit Description Code), το κύκλωμα Randles R_s , C_{dl} και R_{ct} (Σχήμα 2.9) γράφεται ως $R(C[RW])$. Τα στοιχεία εντός παρενθέσεων είναι συνδεδεμένα παράλληλα, ενώ τα στοιχεία εντός αγκυλών είναι συνδεδεμένα σε σειρά.

Ο αλγόριθμος που χρησιμοποιείται μεταβάλλει τις τιμές των προτεινόμενων στοιχείων, ώσπου να επιτευχθεί η καλύτερη δυνατή προσαρμογή των θεωρητικών τιμών στα πειραματικά δεδομένα. Η καταλληλότητα ενός προτεινόμενου ισοδύναμου κυκλώματος εκτιμάται με την τιμή χ^2 , η οποία εκφράζει την απόκλιση των πειραματικών τιμών από αυτές που λαμβάνονται κατά την προσομοίωση. Όσο μικρότερη είναι η τιμή χ^2 τόσο καλύτερη είναι η προσομοίωση των φασμάτων εμπέδησης και πρακτικά τιμές $\chi^2 < 10^{-3}$ χαρακτηρίζουν μια ικανοποιητική προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων.

Όμως, κατά την προσαρμογή και προσομοίωση των μετρούμενων φασμάτων εμπέδησης με ισοδύναμο ηλεκτρικά κυκλώματα, σε πολλές, αν όχι στις περισσότερες περιπτώσεις, υπάρχουν περισσότερα από ένα ισοδύναμα κυκλώματα που είναι σε θέση να περιγράψουν το υπό μελέτη σύστημα. Με άλλα λόγια, ένα ισοδύναμο κύκλωμα το οποίο παρέχει μια καλή προσαρμογή των δεδομένων ενός φάσματος δεν αντιπροσωπεύει

απαραίτητα και το ορθό ηλεκτρικό κύκλωμα. Δηλαδή δεν υπάρχει μοναδική αντιστοιχία μεταξύ φάσματος εμπέδησης και ισοδύναμου ηλεκτρικού κυκλώματος. Για αυτό το λόγο, για τον προσδιορισμό του κατάλληλου ισοδύναμου ηλεκτρικού κυκλώματος είναι χρήσιμη, αν όχι απαραίτητη, η εκ των προτέρων γνώση κάποιων βασικών φυσικών και χημικών διεργασιών που αναμένεται να λαμβάνουν χώρα στο υπό μελέτη σύστημα. Προς χάριν αστεϊσμού, αναφέρεται ένας «εμπειρικός κανόνας» που λέει ότι «με άπειρες παραμέτρους μπορείς να προσομοιάσεις και έναν ελέφαντα». Το ουσιαστικό μήνυμα αυτού του κανόνα είναι ότι από χημικής πλευράς, πολύ περισσότερο από αναλυτικής πλευράς – αφού η προσομοίωση των φασμάτων εμπέδησης αποσκοπεί στην εξαγωγή αριθμητικών δεδομένων για τα επιμέρους στοιχεία και στη χρήση αυτών για τον ποσοτικό προσδιορισμό αναλυτών– η προσομοίωση φασμάτων με πολύπλοκα ισοδύναμα ηλεκτρικά κυκλώματα δεν παρουσιάζει πρακτικό ενδιαφέρον. Στόχος μας είναι η προσομοίωση των φασμάτων να επιτυγχάνεται με όσο το δυνατό πιο απλά κυκλώματα (λιγότερες παραμέτρους), ώστε η αντιστοίχιση των επιμέρους στοιχείων του κυκλώματος με φυσικές ή χημικές διεργασίες που πραγματοποιούνται στο υπό μελέτη σύστημα να είναι ουσιαστική και, από χημικής ή αναλυτικής πλευράς, αξιοποιήσιμη.



Σχήμα 2.17. Διάγραμμα Nyquist και πιθανά ισοδύναμα κυκλώματα.

Παράδειγμα της μη μονοσήμαντης σχέσης μεταξύ ενός φάσματος εμπέδησης και του ορθού ισοδύναμου ηλεκτρικού κυκλώματος φαίνεται στο Σχήμα 2.17. Στο φάσμα εμπέδησης του παραδείγματος διακρίνονται καθαρά δύο ημικύκλια τα οποία μπορούν να προσομοιωθούν με κυκλώματα δύο χρονοσταθερών. Ωστόσο, οι δύο αυτές χρονοσταθερές είναι δυνατό να προκύψουν συνδυάζοντας αντιστάσεις και πυκνωτές με τρεις διαφορετικούς τρόπους όπως φαίνεται στα αντίστοιχα προτεινόμενα ισοδύναμα ηλεκτρικά κυκλώματα.

2.11. ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ

Οι διατάξεις που χρησιμοποιούνται για τη μέτρηση της εμπέδησης ενός συστήματος περιλαμβάνουν μια γεννήτρια, η οποία παράγει την (ημιτονική) διαταραχή και διακρίνονται στους αναλύτες απόκρισης συχνότητας (Frequency Response Analyzers, FRA) και στους ανιχνευτές φάσης, αφού διαφέρουν ως προς τον τρόπο ανάλυσης και επεξεργασίας της απόκρισης του συστήματος,

Πίνακας 2.2. Σύγκριση αναλυτών απόκρισης συχνότητας και ενισχυτών εγκλείδωσης.

Ενισχυτές Εγκλείδωσης	Αναλυτές Απόκρισης Συχνότητας
<u>Πλεονεκτήματα</u>	<u>Πλεονεκτήματα</u>
Υψηλή ευαισθησία	Γρήγορη ανάλυση
Αποτελεσματική απομάκρυνση θορύβου υποβάθρου	Ευρεία κλίμακα συχνοτήτων
Ελαχιστοποίηση της αρμονικής παραμόρφωσης	Απομάκρυνση αρμονικών παραμορφώσεων και dc συνιστωσών
Αποτελεσματική ελάττωση θορύβου dc	Απευθείας έξοδος σε μια εξωτερική συσκευή καταγραφής
Σχετικά χαμηλό κόστος	Σχετικά εύκολες αυτοματοποιημένες μετρήσεις
<u>Μειονεκτήματα</u>	<u>Μειονεκτήματα</u>
Περιορισμένη κλίμακα συχνοτήτων	Υψηλό κόστος
Αργές μετρήσεις	Περιορισμένη απομάκρυνση θορύβου υποβάθρου
Δυσκολία αυτοματοποίησης των μετρήσεων	Περιορισμένη ευαισθησία

Στον Πίνακα 2.2 φαίνονται συγκριτικά τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα των αναλυτών απόκρισης συχνότητας και των ενισχυτών εγκλειδωσης (lock-in amplifiers), ενώ στις επόμενες παραγράφους δίνεται μια σύντομη περιγραφή της αρχής λειτουργίας της κάθε διάταξης. Η συμπερίληψη των ενισχυτών εγκλειδωσης στους ανιχνευτές φάσης γίνεται κατανοητή στη συνέχεια κατά την παρουσίαση του τρόπου λειτουργίας τους.

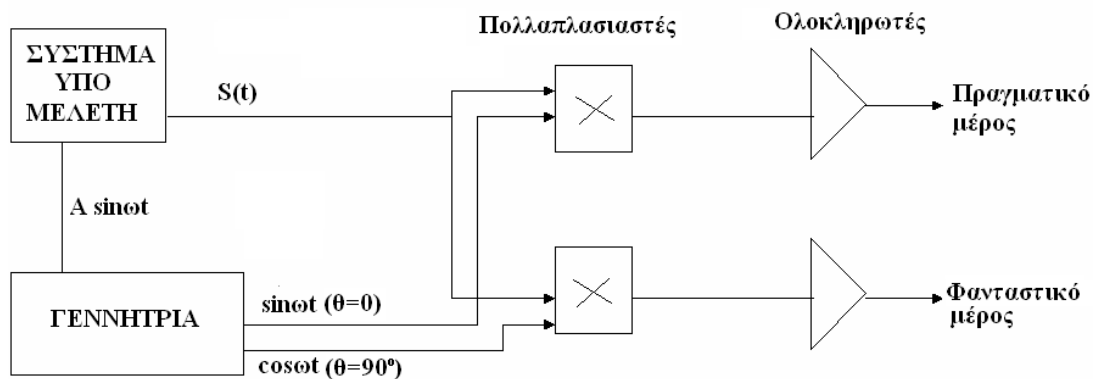
2.11.1. Αναλυτές απόκρισης συχνότητας

Ο FRA είναι ένας ψηφιακός αποδιαμορφωμένος (demodulated) μετρητής εμπέδησης με συχνότητα μεταβαλλόμενη κατά βήματα. Μετρά την εμπέδηση ενός συστήματος συσχετίζοντας την απόκριση αυτού με δύο ταυτόχρονα σήματα αναφοράς, ένα που είναι σε φάση ($\theta = 0^\circ$) και ένα που βρίσκεται σε διαφορά φάσης 90° με το ημιτονικό κύμα διέγερσης. Ο FRA περιέχει μια γεννήτρια που εφαρμόζει ένα ημιτονικό ή τετραγωνικού παλμού σήμα διέγερσης στο υπό μελέτη σύστημα, ενώ ο έλεγχος της συχνότητας και του τύπου του σήματος γίνεται μέσω υπολογιστή. Η γεννήτρια παράγει την κυματομορφή διέγερσης, η οποία εφαρμόζεται στο μετρούμενο σύστημα και ταυτόχρονα στέλνεται σε ένα από τα κανάλια μέτρησης.

Η γεννήτρια παράγει επίσης μια δεύτερη κυματομορφή, μετατοπισμένη σε φάση κατά 90° ως προς την κυματομορφή διέγερσης και τη στέλνει σε ένα δεύτερο κανάλι μέτρησης. Το σήμα απόκρισης του κυκλώματος $[S(t)]$ στέλνεται και στα δύο κανάλια μέτρησης και πολλαπλασιάζεται με την παραγόμενη κυματομορφή (Σχήμα 2.17).

Η διέγερση του συστήματος ενδέχεται να εισάγει θόρυβο στο σήμα απόκρισης, ο οποίος μπορεί να επικαλύπτει τη βασική απόκριση αυτού ως προς το σήμα διέγερσης. Για αυτό το λόγο, τα δύο κανάλια μέτρησης στέλνονται σε ολοκληρωτές, οι οποίοι απομακρύνουν το dc θόρυβο και την αρμονική παραμόρφωση από το σήμα.

Ένας FRA μπορεί να παράγει και να μετρά σήματα σε ευρεία κλίμακα συχνοτήτων, για παράδειγμα από 0,1 μHz ως 1 MHz (το ανώτερο όριο της κλίμακας συχνοτήτων καθορίζεται από το εύρος φασματικής ζώνης του ποτενσιοστάτη με τον οποίο είναι συνδεδεμένος ο FRA) και να εξαλείφει το θόρυβο από την κυματομορφή απόκρισης με τη βοήθεια ενός ολοκληρωτή

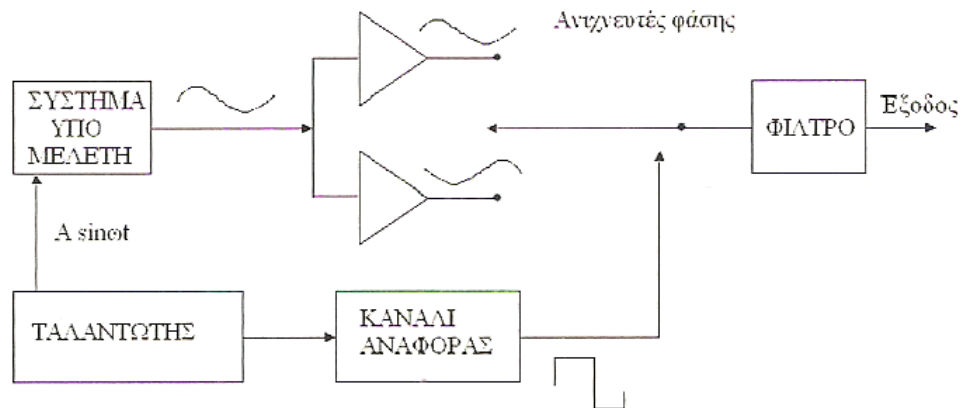


Σχήμα 2.17. Απλοποιημένο διάγραμμα ενός αναλυτή απόκρισης συχνότητας.

. Τέλος, οι αναλύτες απόκρισης συχνότητας σε συνδυασμό με το κατάλληλο λογισμικό επιτρέπουν τη διεξαγωγή αυτοματοποιημένων μετρήσεων και την άμεση και εύκολη λήψη των τιμών εμπέδησης σε μια εξωτερική συσκευή καταγραφής, π.χ. με τη μορφή διαγραμμάτων Nyquist ή Bode, ενώ μπορούν ακόμη να χρησιμοποιηθούν για τη λήψη φασμάτων εμπέδησης υπό γαλβανικό έλεγχο. Σε αυτήν την περίπτωση, η διαταραχή του συστήματος, σε κάθε εφαρμοζόμενη συχνότητα, οφείλεται σε ένα ρεύμα ταλάντωσης, μικρής έντασης.

2.11.2. Ενισχυτές εγκλίδωσης

Ο ενισχυτής εγκλίδωσης είναι ένα ειδικού τύπου βολτόμετρο εναλλασσόμενου ρεύματος, το οποίο χρησιμοποιεί έναν ανιχνευτή φάσης και μετρά με ακρίβεια την ένταση ενός σήματος χαμηλής στάθμης, που επισκιάζεται από το θόρυβο υπόβαθρο. Η ικανότητα ενός ενισχυτή εγκλίδωσης να ανακτήσει σήματα μέσα από θορύβους εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, ωστόσο ακόμα και ένας απλός ενισχυτής αυτού του τύπου, μπορεί να μετρήσει σήματα που επισκιάζονται από θόρυβο 20.000 φορές μεγαλύτερο από το πλάτος του σήματος.



Σχήμα 2.18. Απλοποιημένο διάγραμμα ενός ενισχυτή εγκλειδώσης.

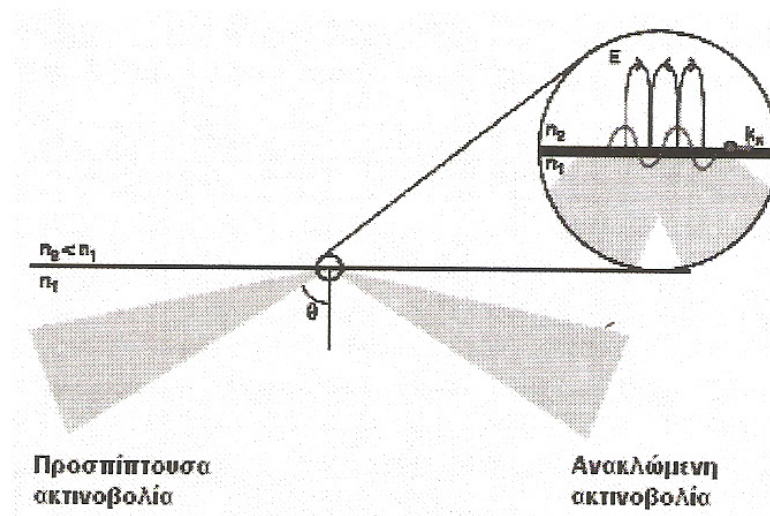
Οι ενισχυτές εγκλειδώσης χρησιμοποιούν έναν ανιχνευτή φάσης για να συγχρονίσουν το μετρούμενο σήμα με το σήμα αναφοράς, τόσο στη συχνότητα όσο και στη φάση. Μέγιστη έξοδος θα προκύψει όταν αυτά τα δύο σήματα συγχρονιστούν, ενώ αν το μετρούμενο σήμα μετατοπιστεί σε φάση σε σχέση με το σήμα αναφοράς, αυτό μπορεί να μην εμφανιστεί στην έξοδο. Το σχηματικό διάγραμμα ενός ενισχυτή εγκλειδώσης φαίνεται στο Σχήμα 2.18.

2.12. ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΟΣ ΕΠΙΦΑΝΕΙΑΚΩΝ ΠΛΑΣΜΟΝΙΩΝ

Ο συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων (Surface Plasmon Resonance, SPR) είναι μια ευαίσθητη οπτική τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μελέτη επιφανειακών φαινομένων πάνω σε ένα λεπτό στρώμα μετάλλου. Η τεχνική βασίζεται στην ύπαρξη ενός παροδικού ηλεκτρομαγνητικού πεδίου πάνω στην επιφάνεια του μετάλλου και στη μέτρηση της μεταβολής του δείκτη διάθλασης του διαλύτη εγγύς της μεταλλικής επιφάνειας, λόγω π.χ. της σύνδεσης ενός αντιγόνου με το ειδικό προς αυτό αντίσωμα το οποίο βρίσκεται ακινητοποιημένο στη μεταλλική επιφάνεια.

Η εφαρμογή της SPR βασίζεται στην αλληλεπίδραση των ηλεκτρομαγνητικών κυμάτων του προσπίπτοντος, μονοχρωματικού, γραμμικά πολωμένου φωτός και των ελεύθερων ηλεκτρονίων (νέφος ευκίνητων ηλεκτρονίων) που βρίσκονται στην επιφάνεια του μεταλλικού αγωγού.

Προκειμένου να περιγράψουμε το φαινόμενο SPR, είναι χρήσιμο να ορίσουμε πρώτα το φαινόμενο της ολικής (εσωτερικής) ανάκλασης (total internal reflection). Όταν μια ακτίνα φωτός, η οποία διαδίδεται μέσω ενός υλικού με υψηλό δείκτη διάθλασης n_1 (π.χ. κρύσταλλος χαλαζία), φτάσει στη διεπιφάνεια με ένα υλικό με μικρότερο δείκτη διάθλασης, n_2 (π.χ. νερό), με γωνία πρόσπτωσης $\theta > \theta_c$, όπου θ_c η κρίσιμη ή οριακή γωνία, το φως αντανακλάται πλήρως.



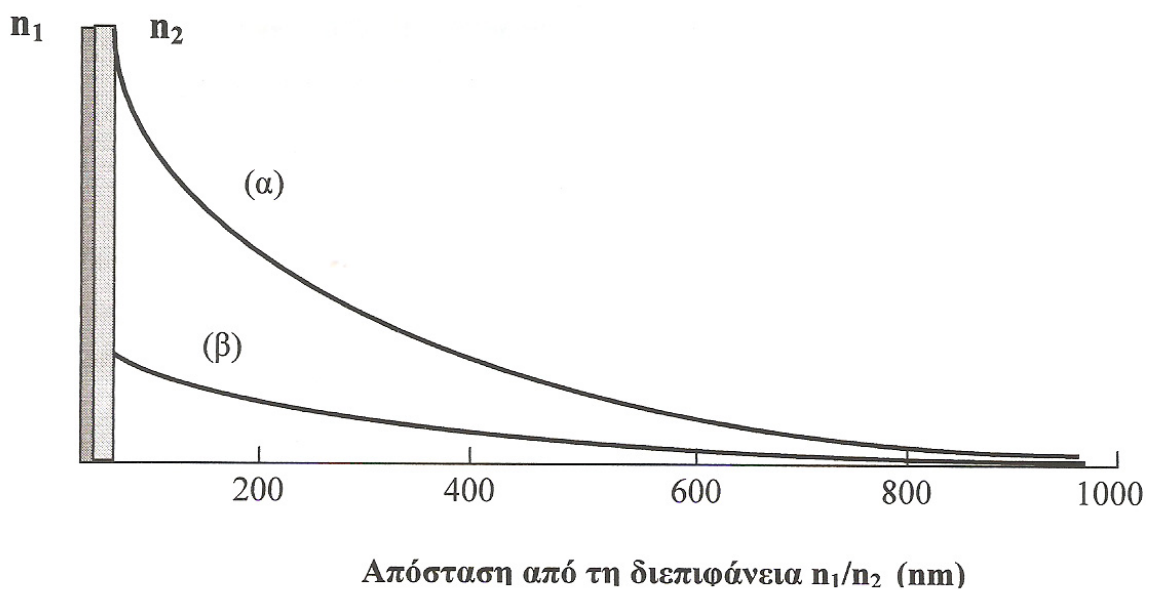
Σχήμα 2.19. Εσωτερική ολική ανάκλαση μονοχρωματικής ακτινοβολίας σε μια διεπιφάνεια με δείκτες διάθλασης n_1 και n_2 , όπου $n_1 > n_2$. Η ερμηνεία του ανύσματος k_x δίνεται παρακάτω.

Αυτό σημαίνει ότι το φως που προσπίπτει πάνω στη διεπιφάνεια των δύο μέσων, δεν μπορεί να εισχωρήσει στο υλικό με το μικρότερο δείκτη διάθλασης, παγιδεύεται στο υλικό με το μεγαλύτερο δείκτη διάθλασης και ανακλάται εξ ολοκλήρου εσωτερικά της διεπιφάνειας.

Μολονότι η ολικά ανακλώμενη ακτινοβολία διατηρεί στο ακέραιο την αρχική της ενέργεια, μια συνιστώσα του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου του φωτός διαπερνά το μέσο με το χαμηλό δείκτη διάθλασης δημιουργώντας ένα παροδικό ηλεκτρομαγνητικό πεδίο

(Σχήμα 2.19), το πλάτος του οποίου μειώνεται εκθετικά, με την αύξηση της απόστασης από τη διεπιφάνεια (Σχήμα 2.20).

Όταν μια στρώση χρυσού (50 nm) τοποθετηθεί εντός του παροδικού πεδίου, τότε τα ελεύθερα ηλεκτρόνια του χρυσού στη διεπιφάνεια με το υλικό χαμηλού δείκτη διάθλασης, τα οποία καλούνται επιφανειακά πλασμόνια (surface plasmons) διεγείρονται και προκαλούν ενίσχυση της έντασης του παροδικού πεδίου όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.20.



Σχήμα 2.20. Μείωση του παροδικού πεδίου συναρτήσει της απόστασης από τη διεπιφάνεια στερεού/διαλύματος, (α) παρουσία και (β) απουσία του φιλμ χρυσού.

Το άνυσμα διάδοσης (propagation vector) ή κυματόνυσμα των επιφανειακών πλασμονίων (wave-vector of the surface plasmons), k_{sp} , το οποίο κινείται κατά μήκος του αγωγού παράλληλα της διεπιφάνειας με το υλικό χαμηλού δείκτη διάθλασης μπορεί να περιγραφεί με την εξίσωση 2.20

$$k_{sp} = (2\pi/\lambda)[n_{Au}^2 n_2^2 / (n_{Au}^2 + n_2^2)]^{1/2} \quad (2.20)$$

όπου λ , το μήκος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας με το κενό και n_{Au}^2 , n_2^2 οι δείκτες διάθλασης της μεταλλικής επιφάνειας και του διαλύματος εγγύς της μεταλλικής επιφάνειας (εντός του παροδικού πεδίου, δηλαδή σε απόσταση < 400 nm) αντίστοιχα.

Αντίστοιχα, το άνυσμα διάδοσης της προσπίπτουσας ακτινοβολίας, k_x , το οποίο κινείται παράλληλα του k_{sp} , ισούται με

$$k_x = (2\pi/\lambda)n_1 \sin(\theta) \quad (2.21)$$

Σύμφωνα με την εξίσωση 2.21, η τιμή του k_x εξαρτάται από τη γωνία πρόσπτωσης του φωτός (ή της τιμής του μήκους κύματος). Για μια συγκεκριμένη τιμή του ανύσματος k_x (η γωνία πρόσπτωσης $\theta = \theta_{sp}$) όπου $k_x = k_{sp}$, έχουμε το φαινόμενο του συντονισμού των επιφανειακών πλασμονίων (μέγιστη απορρόφηση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας). Η γωνία θ_{sp} ονομάζεται γωνία συντονισμού και σε αυτή τη γωνία η καμπύλη της έντασης της ανακλώμενης ακτινοβολίας ως προς την γωνία πρόσπτωσης, $R(\theta) = f(\theta)$, παρουσιάζει ελάχιστο. (Σχήμα 2.21).

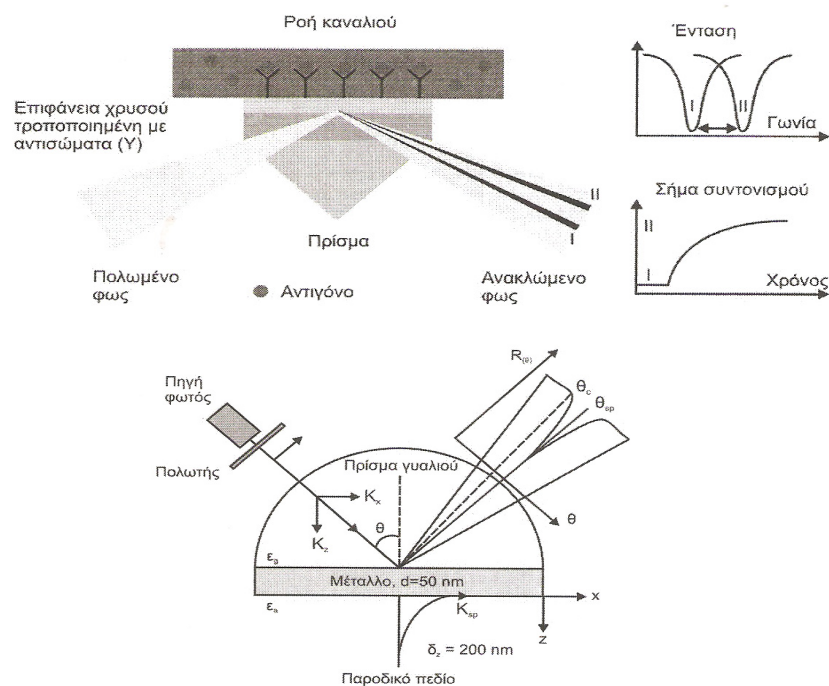
Σύμφωνα με την εξίσωση 2.20, η τιμή του k_{sp} , εξαρτάται από τον n_2 , αφού ο n_{Au} είναι ένας σταθερός μιγαδικός αριθμός ($-10.92 + i1.49$, $\lambda = 620$ nm). Μεταβολή του n_2 και κατ'επέκταση μεταβολή του k_{sp} παρατηρείται όταν στην επιφάνεια του διαλύματος (για ένα ρυθμιστικό διάλυμα $n \approx 1$) εισέλθει μια πρωτεΐνη ($n \approx 1,33$), ως αποτέλεσμα π.χ. της σύνδεσης ενός αντιγόνου στο ειδικό αντίσωμα το οποίο έχει ακινητοποιηθεί στην επιφάνεια του χρυσού. Σε αυτή την περίπτωση (Σχήμα 2.21), αλλάζει η γωνία συντονισμού και αυτή η μεταβολή ($\Delta\theta_{sp}$) χρησιμοποιείται ως μέτρο της συγκέντρωσης του αντιγόνου.

Παρακάτω αναφέρεται η αρχή λειτουργίας διαφόρων εμπορικών αναλυτών SPR και συγκεκριμένα ο μηχανισμός ελέγχου της γωνίας πρόσπτωσης.

1. Biacore (Pharmacia). Χρησιμοποιείται μια συγκλίνουσα ακτίνα φωτός, η οποία παράγει έναν μεγάλο αριθμό προσπίπτουσών και ανακλώμενων γωνιών και η γωνία συντονισμού εμφανίζεται στη φωτοδίοδο ως σκοτεινή κηλίδα. Πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι δε χρειάζονται μηχανικά μέρη για τον έλεγχο της γωνίας πρόσπτωσης.

2. ESPRIT (Eco Chemie). Η γωνία πρόσπτωσης μεταβάλλεται χρησιμοποιώντας ένα δονούμενο καθρέπτη (Σχήμα 2.22). Το πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι ότι σε σύντομο χρονικό διάστημα μπορεί να μετρηθεί ένα εύρος γωνιών περίπου 4°

3. SURPLUS (μ-Analytical Systems). Η επιφάνεια χαλαζία/χρυσού τοποθετείται πάνω σε κινούμενη βάση Όπως αναφέρεται παραπάνω, ο έλεγχος της γωνίας της προσπίπτουσας ακτινοβολίας με μηχανικά μέρη μειώνει σημαντικά την ακρίβεια στη μέτρηση του δείκτη διάθλασης.

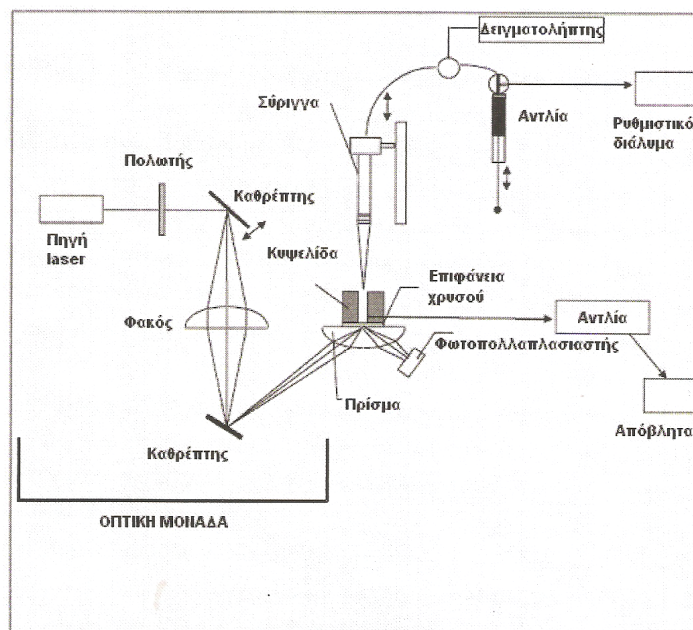


Σχήμα 2.21. Αρχή λειτουργίας του φαινομένου SPR και μεταβολή της γωνίας συντονισμού κατά την προσρόφηση του αντιγόνου στο ακινητοποιημένο αντίσωμα.

Τέλος σε αναλύτες οι οποίο χρησιμοποιούν οπτικές ίνες, αντί της γωνίας πρόσπτωσης μεταβάλλεται το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας.

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, το φαινόμενο SPR παρατηρείται σε μέταλλα των οποίων τα ηλεκτρόνια συμπεριφέρονται σαν αέριο ελεύθερων ηλεκτρονίων (plasma), εννοώντας ότι οι κινήσεις τους είναι ανεξάρτητες του φορτίου τους Αυτό περιορίζει την επιλογή του μετάλλου σε υλικά όπως ο χρυσός, ο χαλκός, ο άργυρος, το παλλάδιο και το αλουμίνιο. Το πάχος του μεταλλικού στρώματος εξαρτάται από τις οπτικές σταθερές του υλικού και από το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας. Στους περισσότερους αναλύτες SPR το μήκος κύματος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας είναι 670 nm και το βέλτιστο πάχος της μεταλλικής επιφάνειας περίπου 50 nm.

Υπάρχει μια γραμμική σχέση ανάμεσα στη ποσότητα της δεσμευμένης πρωτεΐνης και της μεταβολής στη γωνία συντονισμού, Η ευαισθησία της μεθόδου σε ένα συγκεκριμένο διαλύτη εξαρτάται από την ευαισθησία του οργάνου στον υπολογισμό της μεταβολής της γωνίας συντονισμού. Ενδεικτικά, η δέσμευση 1 ng πρωτεΐνης σε επιφάνεια 1 mm² χρυσού προκαλεί μεταβολή της γωνίας συντονισμού κατά 0,12 μοίρες ή αντίστοιχα μεταβολή του δείκτη διάθλασης του διαλύματος κατά 0,001. Δεδομένου ότι η διακριτική ικανότητα των περισσότερων εμπορικών αναλυτών SPR είναι 0,02 m^ο και 5×10^{-7} αντίστοιχα το όριο ανίχνευσης της μεθόδου μπορεί να φτάσει το 1 pg αναλυτή.



Σχήμα 2.22. Σχηματική απεικόνιση του αναλυτή ESPRIT.

Η ευαισθησία της μεθόδου εξαρτάται επίσης από το μοριακό βάρος (ουσιαστικά τον όγκο) του αναλυτή. Αν το μοριακό βάρος του αναλυτή είναι μικρότερο από 5 kD τότε η αλλαγή του δείκτη διάθλασης και κατ'επέκταση η μεταβολή της γωνίας συντονισμού είναι πολύ μικρή και δεν μπορεί να μετρηθεί με ακρίβεια. Το βάθος διείσδυσης του παροδικού κύματος 300 – 400 nm καθορίζει επίσης το μέγεθος των μορίων που μπορούν να μελετηθούν, Για μόρια μεγαλύτερα από 400 nm είναι δυνατή μόνο η ποιοτική παρακολούθηση της αλληλεπίδρασης με την επιφάνεια του αισθητήρα.

2.13. ΜΙΚΡΟΖΥΓΟΣ ΚΡΥΣΤΑΛΛΟΥ ΧΑΛΑΖΙΑ

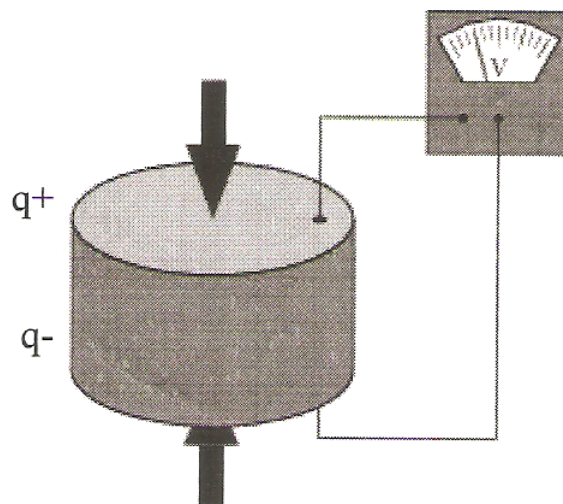
Η τεχνική του μικροζυγού κρυστάλλου χαλαζία (Quartz Crystal Microbalance, QCM) είναι μια ιδιαίτερα ευαίσθητη τεχνική που χρησιμοποιείται για τη μέτρηση της μεταβολής της μάζας πάνω σε ένα κρύσταλλο χαλαζία, ο οποίος λειτουργεί ως χώρος ενίσχυσης ηχητικών κυμάτων σε πραγματικό χρόνο. Η αρχή λειτουργίας της τεχνικής βασίζεται στη μεταβολή της συχνότητας δόνησης του κρυστάλλου χαλαζία, οι πλευρές του οποίου έχουν επικαλυφθεί με λεπτές στρώσεις χρυσού (ηλεκτρόδια) μέσω των οποίων εφαρμόζεται μια εναλλασσόμενη ηλεκτρική τάση. Στη συνέχεια, το συνθετικό υλικό κρυστάλλου χαλαζία – ηλεκτροδίων χρυσού θα αναφέρεται ως κρύσταλλος QCM. Η ευαισθησία της μεθόδου QCM είναι περίπου 10^6 φορές μεγαλύτερη από αυτήν ενός αναλυτικού ζυγού (0,1 mg) αφού μπορεί να παρέχει αναλυτικά χρήσιμες μεταβολές σήματος για μεταβολές βάρους μικρότερες από 1 ng/cm^{-2} . Αυτό σημαίνει ότι η τεχνική QCM μπορεί να μετρήσει μεταβολές μάζας που αντιστοιχούν στην επικάλυψη μιας επιφάνειας με μια απλή μονοστιβάδα μορίων ή ατόμων. Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με τη δυνατότητα παρακολούθησης της εξεταζόμενης διεργασίας σε πραγματικό χρόνο, καθιστούν τη μέθοδο QCM ιδιαίτερα χρήσιμη σε εφαρμογές όπως:

- Την επικάλυψη επιφανειών με λεπτά υμένια
- Την αλληλεπίδραση των υμενίων με διάφορες ουσίες και τη σταθερότητα αυτών σε συγκεκριμένες συνθήκες.
- Την ανάπτυξη βιοαισθητήρων βασισμένων σε αλληλεπίδρασης αντιγόνου-αντισώματος.
- Την παρακολούθηση του υβριδισμού νουκλεϊνικών οξέων

- Την κινητική φαρμάκων και την αλληλεπίδραση αυτών με πρωτεΐνες, κ.ά.

2.13.1. Πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο

Σύμφωνα με το πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο, το οποίο πήρε το όνομα από την ελληνική λέξη πιέζω, η ελαστική παραμόρφωση ορισμένων κρυστάλλων, π.χ. ενός πλακιδίου χαλαζία κομμένου κατά ορισμένες κρυσταλλογραφικές διευθύνσεις, η οποία προκύπτει κατά την εφαρμογή μηχανικής πίεσης στα άκρα του και μάλιστα, η επιφανειακή πυκνότητα του φορτίου είναι ανάλογη της ασκούμενης πίεσης.



Σχήμα 2.23. Πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο. Κατά την πίεση του κρυστάλλου το ηλεκτρόμετρο δείχνει τάση.

Το πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο εμφανίζεται σε μη κεντροσυμμετρικά υλικά δηλαδή, τα οποία κρυσταλλώνονται σε ομάδες χώρου που δεν έχουν κέντρο συμμετρίας, Πέραν του χαλαζία, το κρυσταλλικό πλέγμα του οποίου αποτελείται από τετράεδρα SiO_2 , πιεζοηλεκτρικότητα εμφανίζουν το τρυγικό καλιονάτριο και ο τουρμαλίνης, εντούτοις δε χρησιμοποιούνται σε εφαρμογές QCM.

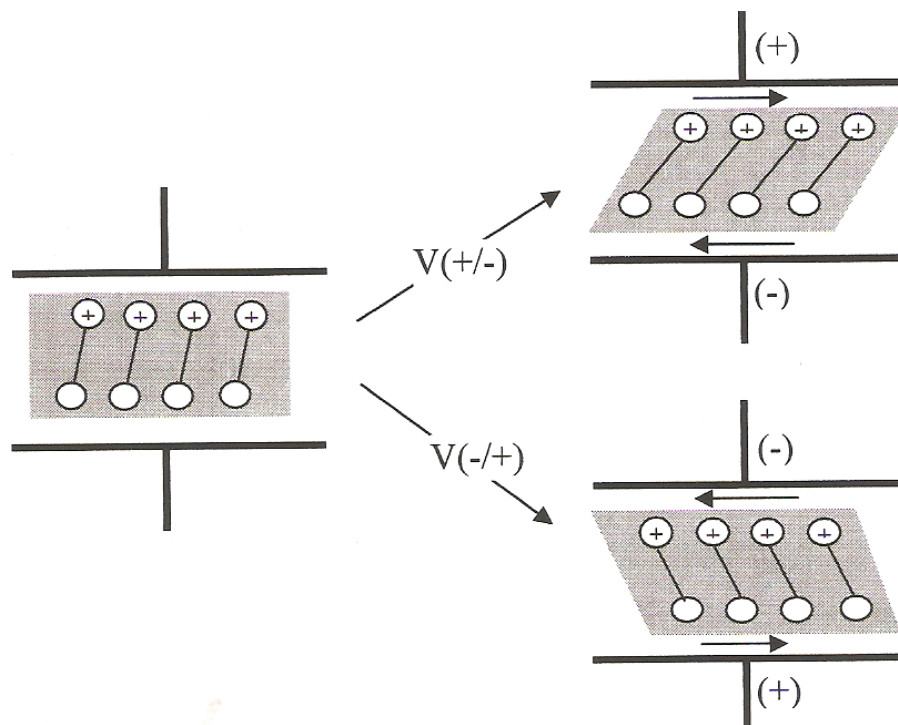
Ο προσανατολισμός των ατόμων στο κρυσταλλικό πλέγμα ενός μη κεντροσυμμετρικού υλικού οδηγεί στην εμφάνιση δίπολων και στη δημιουργία ενός

άξονα πολικότητας. Τα φορτία που δημιουργούνται με την άσκηση μηχανικής πίεσης στις επιφάνειες του κρυστάλλου (Σχήμα 2.23) οφείλονται στη μετατόπιση των διπόλων ως αποτέλεσμα της επαναδιευθέτησης των ατόμων στο κρυσταλλικό πλέγμα.

2.13.2 Αντίστροφο πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η αρχή λειτουργίας της μεθόδου βασίζεται στο αντίστροφο πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο, το οποίο ανακαλύφθηκε το 1880 από τους αδερφούς Jacques και Pierre Curie.

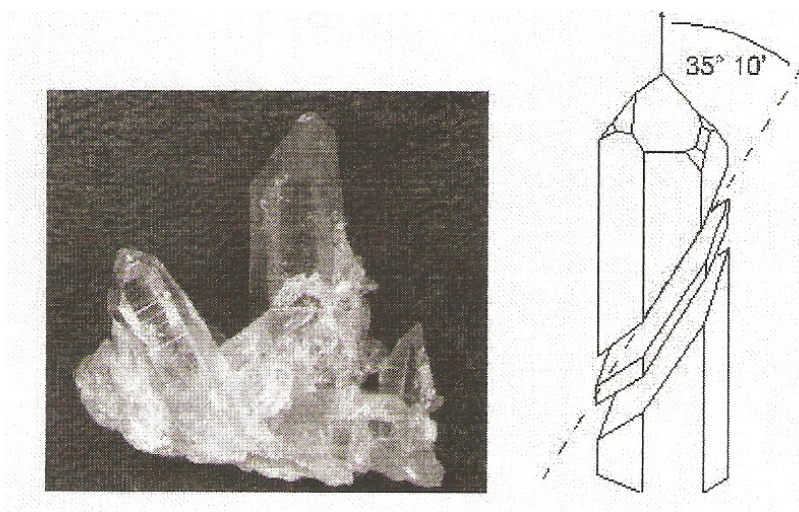
Αμέσως μετά την αρχική τους ανακάλυψη, οι αδερφοί Curie απέδειξαν πειραματικά το αντίστροφο πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο, σύμφωνα με το οποίο η εφαρμογή ηλεκτρικής τάσης στα άκρα ενός κρυστάλλου QCM προκαλεί τη μηχανική παραμόρφωση του κρυστάλλου. Η διατμητική κίνηση ενός κρυστάλλου φαίνεται στο Σχήμα 2.24.



Σχήμα 2.24. Σχηματική αναπαράσταση της διατμητικής κίνησης κρυστάλλου χαλαζία. Η εναλλαγή της πολικότητας της V_{ac} στα άκρα του κρυστάλλου προκαλεί τη δόνηση του κρυστάλλου στην κατεύθυνση που δείχνουν τα βέλη.

Λόγω της συμμετρίας και της ελαστικότητας του κρυστάλλου χαλαζία, η παραμόρφωση του υλικού για μια τάση συγκεκριμένης πολικότητας θα είναι ίση και αντίθετης κατεύθυνσης με αυτήν που θα προκληθεί κατά την αναστροφή της πολικότητας της εφαρμοζόμενης τάσης (V_{ac}). Έτσι, με εφαρμογή εναλλασσόμενης τάσης στα άκρα του κρυστάλλου μπορούμε να προκαλέσουμε τη δόνηση αυτού με διεύθυνση παράλληλη στην επιφάνεια του κρυστάλλου

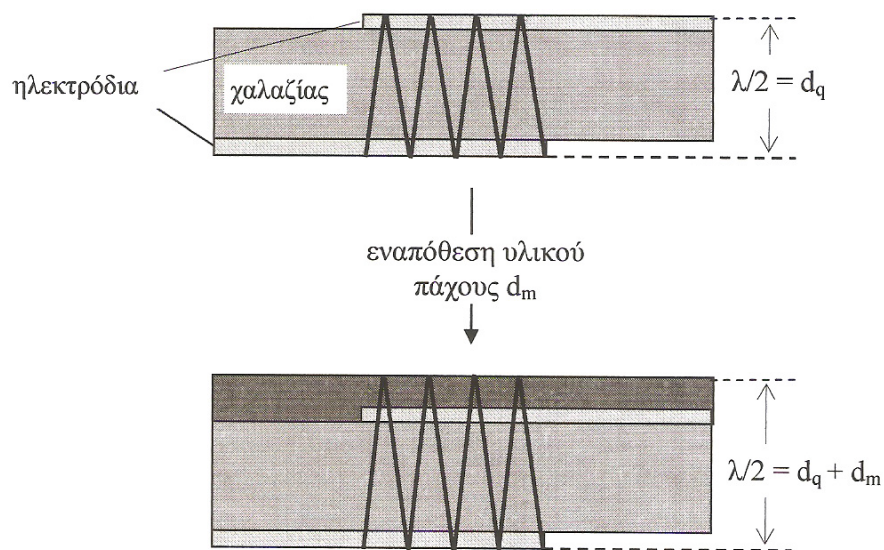
Όπως γίνεται κατανοητό από τα παραπάνω, η παραμόρφωση του κρυστάλλου εξαρτάται από τη συμμετρία του κρυστάλλου, τη μορφή και τον προσανατολισμό του εφαρμοζόμενου πεδίου και επιπλέον, από τη γωνία κοπής του κρυστάλλου. Η παραπάνω συμπεριφορά παρατηρείται μόνο σε πλακίδια κρυστάλλου τα οποία έχουν κοπεί υπό γωνία 35.1° , ως προς τον άξονα x της ράβδου χαλαζία (Σχήμα 2.25). Τα πλακίδια αυτά ονομάζονται «AT» (AT-cut quartz crystals) και χρησιμοποιούνται ευρέως σε εφαρμογές QCM διότι παρουσιάζουν σχεδόν μηδενική ολίσθηση της συχνότητας δόνησης σε θερμοκρασίες κοντά στη θερμοκρασία περιβάλλοντος.



Σχήμα 2.25. Κρύσταλλος χαλαζία και κόψιμο AT.

Αποτέλεσμα της διαμητικής δόνησης κίνησης του κρυστάλλου είναι η ανάπτυξη ενός εγκάρσιου ακουστικού κύματος (transverse acoustic wave) το οποίο διαδίδεται, μεταξύ των επιφανειών του κρυστάλλου QCM. Όταν το μήκος κύματος (λ) του ηχητικού

κύματος λάβει τιμή ίση με το διπλάσιο του πάχους του κρυστάλλου QCM ($\lambda = 2d_q$) τότε έχουμε την εμφάνιση ενός στάσιμου κύματος, όπου οι επιφάνειες των ηλεκτροδίων αποτελούν τις κοιλίες του κύματος. Σε αυτήν την κατάσταση συντονισμού, η συχνότητα του ακουστικού κύματος δίνεται από την εξίσωση 2.22, όπου u_{tr} είναι η εγκάρσια ταχύτητα του ήχου μέσα στον ΑΤ-κρυστάλλου χαλαζία ($3,34 \times 10^4 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$). Θεωρούμε ότι η ταχύτητα του ήχου στα ηλεκτρόδια χρυσού είναι η ίδια και ότι το πάχος τους είναι μικρό σε σχέση με αυτό του κρυστάλλου.



Σχήμα 2.26. Σχηματική αναπαράσταση της διάδοσης του εγκάρσιου ηχητικού κύματος στον κρύσταλλο QCM πριν και μετά την εναπόθεση ενός υλικού.

Όπως γίνεται αντιληπτό και από το Σχήμα 2.26, κατά την εναπόθεση ενός υλικού πάνω στην επιφάνεια του κρυστάλλου QCM το μήκος του ακουστικού κύματος γίνεται μεγαλύτερο, λόγω της αύξησης του πάχους στο συνθετικό υλικό, με αποτέλεσμα τη μείωση της συχνότητας δόνησης του κρυστάλλου. Η παραπάνω συνθήκη προϋποθέτει ότι το ακουστικό κύμα διαδίδεται μεταξύ της διεπιφάνειας του κρυστάλλου QCM και της στιβάδας του εναποτιθέμενου υλικού και ότι η διατμητική παραμόρφωση είναι συνεχόμενη κατά μήκος της διεπιφάνειας αυτής.

Σύμφωνα λοιπόν με τα παραπάνω, η μεταβολή του πάχους του κρυστάλλου QCM ($\Delta_d = dm$), οδηγεί στη μεταβολή της μετρούμενης συχνότητας δόνησης (Δ_f). Με κατάλληλες αντικαταστάσεις στις εξισώσεις 2.22 και 2.23 και εκφράζοντας τη μεταβολή του πάχους ως μεταβολή της επιφανειακής πυκνότητας, ($\Delta_d = \Delta_m / \rho_q A$), προκύπτει η εξίσωση Sauerbrey (εξίσωση 2.24).

$$f_0 = u_{tr} / 2d_q = [(\mu_q / \rho_q)^{1/2}] / 2d_q \quad (2.22)$$

$$\Delta_f / f_0 = -\Delta_d / d_q = -2f_0 \Delta_d / u_{tr} \quad (2.23)$$

$$\Delta_f = -2f_0^2 \Delta_m / A (\mu_q \rho_q)^{1/2} \quad (2.24)$$

όπου

Δ_f , η μετρούμενη μεταβολή της συχνότητας,

f_0 , η συχνότητα του κρυστάλλου QCM πριν την εναπόθεση του υλικού,

Δ_m , η μεταβολή της εναποτιθέμενης μάζας,

A , η ενεργός επιφάνεια του κρυστάλλου QCM,

ρ_q , η πυκνότητα του χαλαζία και

μ_q , το μέτρο διάτμησης

Από την εξίσωση Sauerbrey φαίνεται ότι η ευαισθησία της μεθόδου είναι ανάλογη της συχνότητας δόνησης του κρυστάλλου. Στους περισσότερους εμπορικούς αναλύτες οι ονομαστικές συχνότητες των κρυστάλλων QCM είναι 5 και 10 MHz. Το πάχος ενός κρυσταλλικού χαλαζία είναι 334 μm , ενώ η στιβάδα πάχους 100 nm εφαρμόζεται μετά την επικάλυψη του κρυστάλλου με Cr ή Ti (πάχος 10 nm) προκειμένου να αυξηθεί η πρόσφυση του χρυσού πάνω στον κρύσταλλο χαλαζία. Η συχνότητα δόνησης του κρυστάλλου QCM επηρεάζεται επίσης από την τραχύτητα των ηλεκτροδίων χρυσού και το ιξώδες του διαλύματος εργασίας. Σε εφαρμογές QCM σε διαλύματα, παράγοντες όπως η πυκνότητα (ρ) και το ιξώδες (η) του διαλύματος πρέπει να λαμβάνονται υπόψη, αφού η αλληλεπίδραση του κρυστάλλου με το διάλυμα εργασίας προκαλεί μείωση της τιμής f_0 σύμφωνα με την εξίσωση 2.25.

$$\Delta f = -f_0^{3/2} [(\eta_s \rho_s) / (\text{προσανατολισμό}_{q\mu q})]^{1/2} \quad (2.25)$$

Η ευαισθησία της μεθόδου QCM, για κρύσταλλο $f_0 = 5$ MHz, είναι $56,6 \cdot \text{Hz} \cdot \text{cm}^2 \cdot \mu\text{g}^{-1}$, ενώ η διακριτικότητα του οργάνου στη μέτρηση της συχνότητας είναι περίπου 1 Hz. Σύμφωνα με τα παραπάνω, η ελάχιστη μετρούμενη μεταβολή μάζας, δηλαδή η μεταβολή της συχνότητας κατά 1 Hz, είναι 18 ng cm^{-2} ($1 \times 10^{-6} / 55,6$), δηλαδή, η ηλεκτραπόθεση πυκνής μονοστιβάδας μολύβδου ($320 \cdot \text{ng} \cdot \text{cm}^{-2}$) θα εγείρει μια σημαντική μεταβολή σήματος περίπου 18 Hz. Αντίστοιχα, για κρύσταλλο $f_0 = 10$ MHz, η ελάχιστη μετρούμενη μεταβολή μάζας είναι $4 \text{ ng} \cdot \text{cm}^{-2}$ και η αναμενόμενη μεταβολή σήματος για το συγκεκριμένο παράδειγμα 80 Hz [**Προδρομίδης, 2010**].

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ

3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

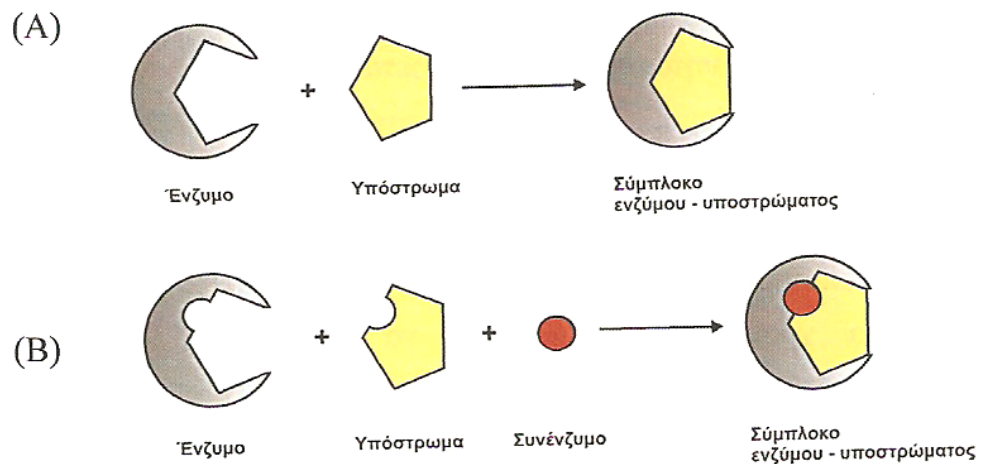
Ο όρος «ακίνητοποίηση» αναφέρεται στη δέσμευση διαλυτών βιομορίων [ένζυμα, αντιγόνα, αντισώματα, νουκλεϊνικά οξέα, πεπτίδια, ορμόνες] ή ακόμα και ολόκληρων βακτηρίων, κυττάρων, ιστών κ.ά., σε αδρανή αδιάλυτα υλικά, με τέτοιο τρόπο, ώστε τα ακίνητοποιημένα βιομόρια να διατηρούν τη δραστηκότητά τους για μεγάλο χρονικό διάστημα και να υπάρχει η δυνατότητα χρησιμοποίησής τους σε πολλές αναλύσεις. Τα βιομόρια φέρουν ένα αριθμό ενεργών ομάδων, οι οποίες χρησιμοποιούνται για τη δέσμευση και την ακίνητοποίησή τους πάνω σε στερεά υποστρώματα. Κατά τη διαδικασία της ακίνητοποίησης ενδέχεται να παρατηρηθούν κάποιες αλλαγές στη συμπεριφορά των βιομορίων, ανάλογα με το είδος βιομορίου, τον τύπο του υλικού στήριξης και τη μέθοδο ακίνητοποίησης.

3.2. ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗ ENZYMΩΝ

Τα ένζυμα είναι πρωτεϊνικά μόρια που συνίστανται από τα είκοσι βασικά αμινοξέα και καταλύουν τις αντιδράσεις του μεταβολισμού των ζωντανών οργανισμών. Οι βιοκαταλύτες αυτοί αυξάνουν σε μεγάλο βαθμό την ταχύτητα των βιοχημικών αντιδράσεων, παρουσιάζουν υψηλή εξειδίκευση ως προς το υπόστρωμα ή το χημικό

δεσμό που καταλύουν, χρησιμοποιούνται σε μικρές ποσότητες. Γενικά, τα ένζυμα μειώνουν την ενέργεια ενεργοποίησης (E_a) των βιοχημικών αντιδράσεων, χωρίς όμως να επηρεάζουν την καθαρή ποσότητα της ελεύθερης ενέργειας (ΔG°) της αντίδρασης την οποία καταλύουν και πρακτικά μένουν αμετάβλητοι μετά το πέρας της ενζυμικής αντίδρασης.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.1.A, ο μηχανισμός της ενζυμικής δράσης είναι τύπου κλειδαριάς–κλειδιού. Σε αρκετές περιπτώσεις, η δράση των ενζύμων εξαρτάται από την παρουσία προσθετικών ομάδων, δηλαδή μορίων μικρού μοριακού βάρους, τα οποία ονομάζονται συνένζυμα (Σχήμα 3.1.B). Το ενεργό κέντρο του ενζύμου, στο οποίο οφείλεται η καταλυτική του δραστηριότητα, είναι η περιοχή που προσδένεται το υπόστρωμα (και το συνένζυμο, όπου χρειάζεται), και σχηματίζεται με κατάλληλη διαμόρφωση της πεπτιδικής αλυσίδας στο χώρο.

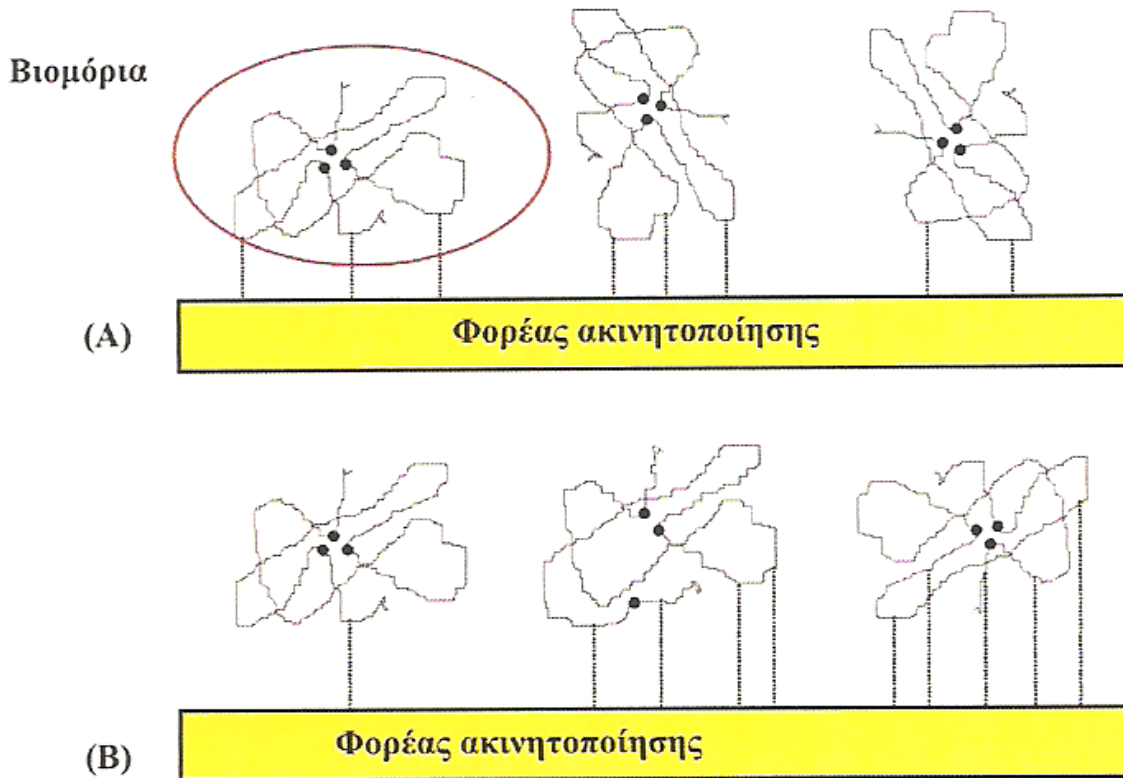


Σχήμα 3.1. Μηχανισμός ενζυμικής δράσης κλειδαριάς–κλειδιού (A) ενζύμου–υποστρώματος και (B) ενζύμου–συνενζύμου υποστρώματος.

Η ενζυμική δραστηριότητα εξαρτάται από τη θερμοκρασία, το pH και την ιοντική ισχύ του διαλύματος εργασίας, καθώς επίσης από την παρουσία σε αυτό κάποιων ιόντων ή

στοιχείων που δρουν ως «ενεργοποιητές» ή «αναστολείς». Αύξηση της θερμοκρασίας μέχρι μιας βέλτιστης τιμής προκαλεί αύξηση της ταχύτητας των ενζυμικών αντιδράσεων, ενώ σε υψηλότερες θερμοκρασίες υπάρχει κίνδυνος μετουσίωσης των πρωτεϊνών λόγω καταστροφής της τριτοταγούς τους δομής. Επιπλέον, οι μεταβολές στην κατανομή των φορτίων των αμινοξέων ανάλογα με την τιμή του pH και την ιοντική ισχύ του διαλύματος εργασίας, καθιστούν τα ένζυμα λειτουργικά σε στενή περιοχή pH.

Σημαντικό ρόλο στην καταλυτική δράση, στην εξειδίκευση και στη γενικότερη συμπεριφορά των ακινητοποιημένων ενζύμων παίζει και η μέθοδος ακινητοποίησης αυτών σε διάφορα υλικά στήριξης.



Σχήμα 3.2. Πιθανές διαμορφώσεις ακινητοποιημένων ενζύμων. Η δραστηριότητα των βιομορίων επηρεάζεται από (A) τον προσανατολισμό των πρωτεϊνικών μορίων και (B) την ακαμψία σύνδεσης.

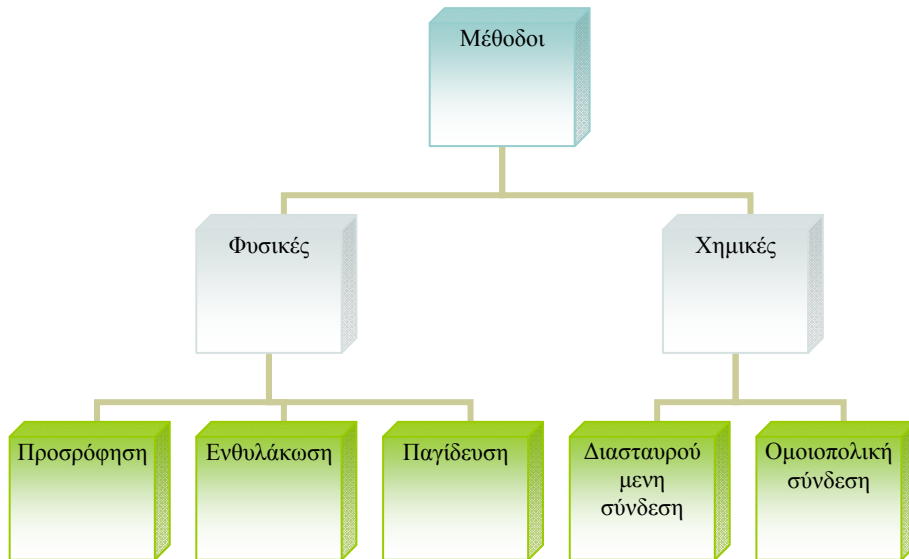
Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.2.A, σε κάποιες περιπτώσεις, εξαιτίας δομικών αλλαγών και στερεοχημικών παρεμποδίσεων, που οφείλονται στον τρόπο ακινητοποίησης των ενζυμικών μορίων, τα μόρια του υποστρώματος δεν μπορούν να προσεγγίσουν το ενεργό κέντρο του ενζύμου με αποτέλεσμα τη μερική ή ολική απώλεια της καταλυτικής δραστηριότητας των τελευταίων. Επιπλέον, η ακινητοποίηση των πρωτεϊνικών μορίων, ανάλογα με τον τύπο του φορέα ακινητοποίησης, τη μέθοδο ακινητοποίησης, το περιβάλλον ακινητοποίησης, αλλά και το είδος του βιομορίου, μπορεί να οδηγήσει σε αύξηση της ακαμψίας τους, μειώνοντας, και σε αυτήν την περίπτωση, τη δραστηριότητά τους (Σχήμα 3.2.B). Γενικά, το ακινητοποιημένο βιομόριο είναι δυνατό να οδηγηθεί σε μια ανενεργή διαμόρφωση λόγω μερικής ή ολικής δέσμευσης του ενεργού του κέντρου ή λόγω μείωσης της ικανότητας πρόσβασης του υποστρώματος σε αυτό. Όπως γίνεται κατανοητό από τα παραπάνω, η επιλογή της κατάλληλης μεθόδου ακινητοποίησης είναι θεμελιώδους σημασίας για τη διατήρηση της βιολογικής δραστηριότητας των ακινητοποιημένων βιομορίων, και κατά συνέπεια, της δυνατότητας επαναχρησιμοποίησης αυτών σε όσες το δυνατό περισσότερες αναλύσεις.

3.3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΒΙΟΜΟΡΙΩΝ

Οι μέθοδοι ακινητοποίησης διακρίνονται σε φυσικές ή χημικές (Σχήμα 3.3). Στις φυσικές μεθόδους περιλαμβάνονται η προσρόφηση σε ένα μη υδατοδιαλυτό φορέα, η ενθυλάκωση σε ημιπερατά υλικά και η παγίδευση σε πηκτή πολυμερούς, ενώ στις χημικές μεθόδους, περιλαμβάνονται η διασταυρούμενη σύνδεση των βιομορίων και η ομοιοπολική σύνδεση σε ενεργοποιημένο αυτών σε κάποιο φορέα ακινητοποίησης, ο οποίος φέρει κατάλληλες ομάδες πρόσδεσης, μέσω χημικού δεσμού.

Κατά κανόνα, οι φυσικές μέθοδοι ακινητοποίησης μεταβάλλουν σε μικρότερο βαθμό τη δραστηριότητα των ακινητοποιημένων βιομορίων σε σύγκριση με τις χημικές, αφού στις τελευταίες, η ισχυρή σύνδεση των βιομορίων με το υλικό στήριξης, οδηγεί συχνά στην τροποποίηση της διαμόρφωσης τους. Αντίθετα, στις φυσικές μεθόδους η δομή των ακινητοποιημένων βιομορίων επηρεάζεται σε μικρότερο βαθμό λόγω της ασθενούς σύνδεσης των βιομορίων με το φορέα ακινητοποίησης. Ωστόσο, ο παραπάνω

διαχωρισμός των μεθόδων ακινητοποίησης σε φυσικές και χημικές είναι συμβατικός, διότι στις περισσότερες περιπτώσεις η ακινητοποίηση των βιομορίων πραγματοποιείται με συνδυασμό τεχνικών και, ως εκ τούτου δεν είναι σαφής η διάκριση μεταξύ τους.



Σχήμα 3.3. Συμβατικός διαχωρισμός μεθόδων ακινητοποίησης βιομορίων.

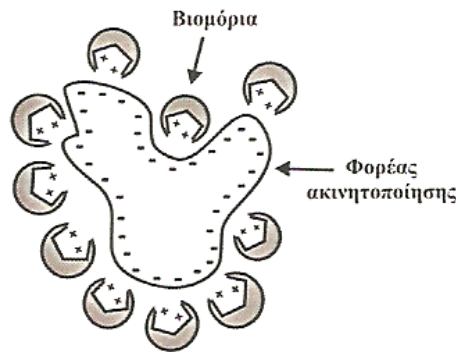
3.4. ΦΥΣΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

3.4.1. Προσρόφηση

Η προσρόφηση βιομορίων σε μη υδατοδιαλυτούς φορείς (Σχήμα 3.4) συνιστά την πιο απλή μέθοδο ακινητοποίησης και πραγματοποιείται με ανάμιξη ενός αραιού διαλύματος του βιομορίου με το υλικό στήριξης για κάποιο χρονικό διάστημα. Η προσρόφηση οφείλεται κυρίως σε ιοντικές / πολικές, ή υδρόφοβες / αρωματικές αλληλεπιδράσεις μεταξύ του βιομορίου και του φορέα ακινητοποίησης.

Οι ηλεκτροστατικές δυνάμεις μεταξύ του υλικού στήριξης και των βιομορίων επηρεάζονται σε μεγάλο βαθμό από τις αλλαγές του pH ή της ιοντικής ισχύος. Αυτό είναι και το σημαντικότερο μειονέκτημα της μεθόδου, αφού οποιαδήποτε αλλαγή του pH

εργασίας μπορεί να οδηγήσει στην εκρόφιση του ακινητοποιημένου βιομορίου. Για την προσρόφιση πρωτεϊνών έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα υλικά όπως οξείδια μετάλλων, άνθρακας, ιονταλλακτικές ρητίνες (R_4N^+ ή $R-SO_3^-$), κεραμικά και αργιλοπυριτικά υλικά, κ.ά.



Σχήμα 3.4. Σχηματική απεικόνιση ακινητοποίησης βιομορίων με προσρόφιση.

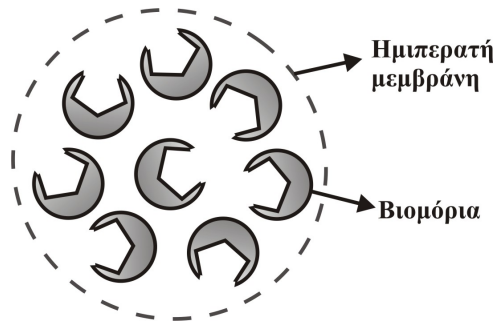
Παράδειγμα προσρόφισης λόγω ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων αποτελεί η ακινητοποίηση αβιδίνης στο οξείδιο του τιτανίου σε pH 8,0. Σε αυτή την τιμή pH η αβιδίνη, (pI = 10,5), είναι θετικά φορτισμένα, ενώ το TiO_2 με σημείο μηδενικού φορτίου μεταξύ 4,8 – 6,1 φέρει αρνητικά φορτία, με αποτέλεσμα την ηλεκτροστατικής φύσης δέσμευση της αβιδίνης πάνω στο οξείδιο του τιτανίου.

3.4.2. Ενθυλάκωση σε ημιπερατά υλικά.

Κατά την ενθυλάκωση βιομορίων με διάχυση σε ημιπερατές αδρανείς μεμβράνες, τα βιομόρια εγκλωβίζονται σε συγκεκριμένο χώρο εντός του υλικού στήριξης και λόγω της ασθενούς σύνδεσής τους με το φορέα ακινητοποίησης, η συμπεριφορά τους είναι παρόμοια με αυτήν που έχουν σε διαλυτή μορφή (Σχήμα 3.5).

. Με την τεχνική αυτή διατηρείται σε μεγάλο βαθμό η βιολογική δράση των ακινητοποιημένων μορίων, ενώ η εκρόφιση αυτών σε αλλαγή θερμοκρασίας, pH και ιοντικής ισχύος είναι αμελητέα. Επιπρόσθετα, η μεμβράνη λειτουργεί ως φράγμα και

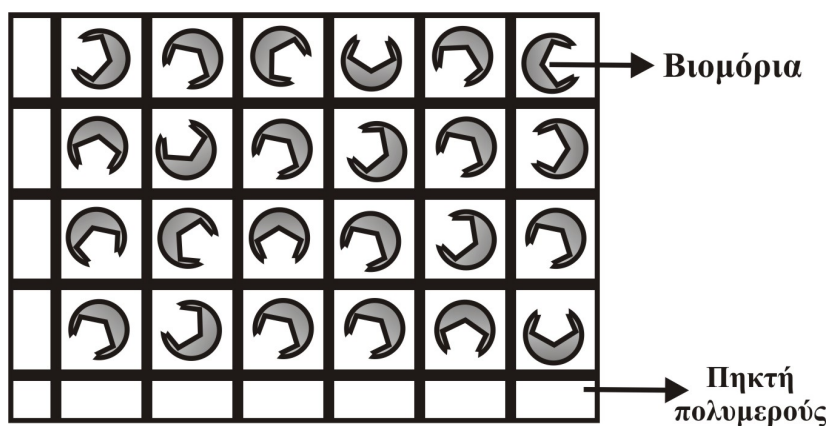
προστατεύει τις ακινητοποιημένες ουσίες από μετουσίωση και μολύνσεις. Ωστόσο, σε κάποιες περιπτώσεις, ανάλογα με το πορώδες του υλικού στήριξης, παρατηρείται εκρόφηση των ακινητοποιημένων μορίων



Σχήμα 3.5. Σχηματική απεικόνιση ακινητοποίησης βιομορίων με ενθυλάκωση.

3.4.3. Παγίδευση βιομορίων σε πηκτή πολυμερούς

Μια ακόμα φυσική μέθοδος ακινητοποίησης βιομορίων είναι η παγίδευση σε πηκτή πολυμερούς. Τα βιομόρια εμπεριέχονται σε ένα διάλυμα μονομερούς και παγιδεύονται στο τρισδιάστατο πλέγμα που δημιουργείται κατά τον πολυμερισμό των τελευταίων κάτω από συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες (Σχήμα 3.6).



Σχήμα 3.6. Σχηματική απεικόνιση ακινητοποίησης βιομορίων με παγίδευση.

Κατά την παγίδευση σε πηκτή πολυμερούς, η βιολογική δραστηριότητα των ακινητοποιημένων βιομορίων επηρεάζεται ελάχιστα, όπως και στις άλλες φυσικές μεθόδους, αφού δε σχηματίζονται χημικοί δεσμοί μεταξύ των ακινητοποιημένων μορίων και του πολυμερούς. Ωστόσο, συχνά παρατηρείται εκρόφιση των βιομορίων από τους πόρους της πηκτής του πολυμερούς, ιδιαίτερα κατά τις πρώτες χρήσεις του τροποποιημένου υλικού. Η εκρόφιση των βιολογικών ουσιών από την πηκτή του πολυμερούς είναι δυνατόν να περιοριστεί, είτε με κατάλληλο έλεγχο του πορώδους του πλέγματος κατά τη διάρκεια του πολυμερισμού, είτε μέσω διασταυρούμενης σύνδεσης των βιομορίων με κατάλληλα αντιδραστήρια διασύνδεσης ή διασταύρωσης (cross-linking reagents).

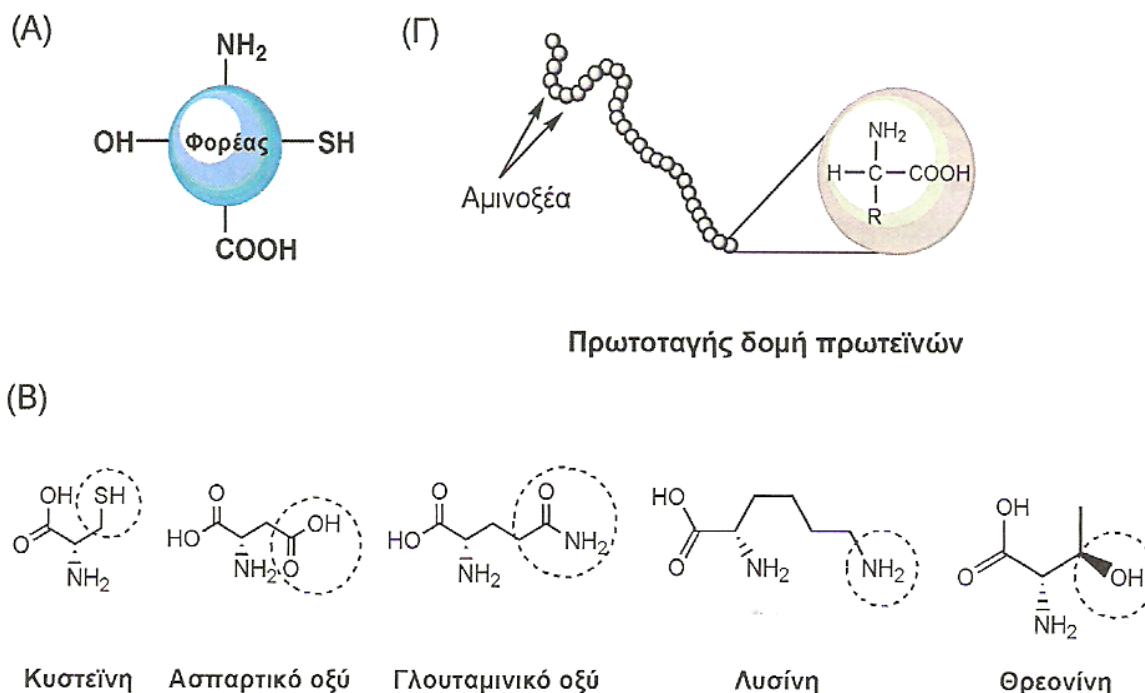
Μειονέκτημα της παραπάνω μεθόδου αποτελεί η περιορισμένη διάχυση των αναλυτών προς τα ακινητοποιημένα βιομόρια, η οποία οδηγεί στη δημιουργία αισθητήρων με χαμηλές ταχύτητες αντίδρασης και μεγάλους χρόνους απόκρισης. Στην παραπάνω μέθοδο χρησιμοποιούνται υλικά όπως πολυακρυλαμίδιο, σφαιρίδια αλγινικού ασβεστίου, πολυβινυλοαλκοόλη, πολυτυραμίνη και διάφορα αγωγίμα πολυμερή (πολυανιλίνη, πολυπυρρόλιο κ.ά).

3.5. ΧΗΜΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΑΚΙΝΗΤΟΠΟΙΗΣΗΣ

Στις χημικές μεθόδους, η ακινητοποίηση των βιομορίων πραγματοποιείται μέσω χημικών δεσμών μεταξύ διάφορων δραστικών ομάδων που υπάρχουν στα βιομόρια και κατάλληλων ενεργών ομάδων που υπάρχουν ή δημιουργούνται στο φορέα ακινητοποίησης.

Τα αμινοξέα φέρουν διάφορες ενεργές ομάδες μέσω των οποίων γίνεται η πρόσδεση των πρωτεϊνών στο φορέα. Παραδείγματα ενεργών ομάδων αποτελούν η θειόλη της κυστεΐνης, η πρωτοταγής αμινομάδα της λυσίνης, η υδροξυλομάδα της θρεονίνης και της σερίνης και η καρβοξυλομάδα του ασπαρτικού και του γλουταμινικού οξέος. Στο Σχήμα 3.7 φαίνονται οι κυριότερες δραστικές ομάδες των υλικών στήριξης ($-NH_2$, $-COOH$, $-SH$, $-OH$) στις οποίες μπορούν να προσδεθούν τα βιομόρια μέσω των διαφόρων ενεργών ομάδων των αμινοξέων ($-NH_2$, $-COOH$, $-SH$, $-OH$). Οι διάφορες ενεργές

ομάδες του υλικού στήριξης καθορίζουν τη μέθοδο ακινητοποίησης, δηλαδή τα αντιδραστήρια και τις συνθήκες που θα χρησιμοποιηθούν.

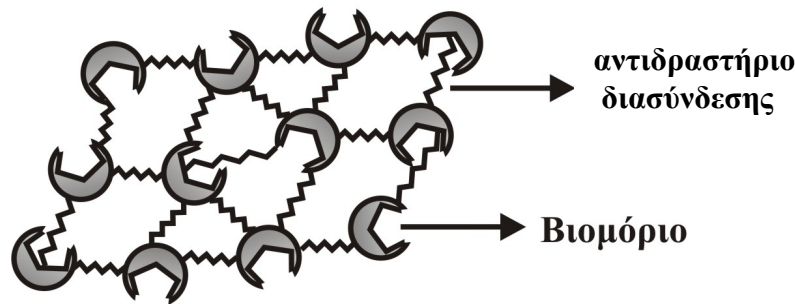


Σχήμα 3.7. Δραστικές ομάδες (Α) στο υλικό στήριξης και (Β) (εντός των κύκλων) στα μόρια των αμινοξέων, τα οποία αποτελούν τα πρωτεϊνικά μόρια (π.χ. ένζυμα, αντισώματα), όπως φαίνεται στο (Γ).

3.5.1. Διασταυρούμενη σύνδεση

Η ακινητοποίηση βιομορίων με διασταυρούμενη σύνδεση είναι μια αρκετά γρήγορη και απλή μέθοδος, η οποία όπως αναφέρθηκε παραπάνω, σε πολλές περιπτώσεις συνδυάζεται με τις μεθόδους προσρόφησης και παγίδευσης προκειμένου να περιοριστεί η εκρόφιση του βιομορίου από το υλικό ακινητοποίησης. Ουσιαστικά, η διασταυρούμενη σύνδεση έπεται της προσρόφησης ή της παγίδευσης των βιομορίων και αποσκοπεί στη

δημιουργία ενός σύνθετου πλέγματος μεγαλομορίων το οποίο λόγω μεγέθους συγκρατείται καλύτερα πάνω ή μέσα στον φορέα ακινητοποίησης (Σχήμα 3.8).



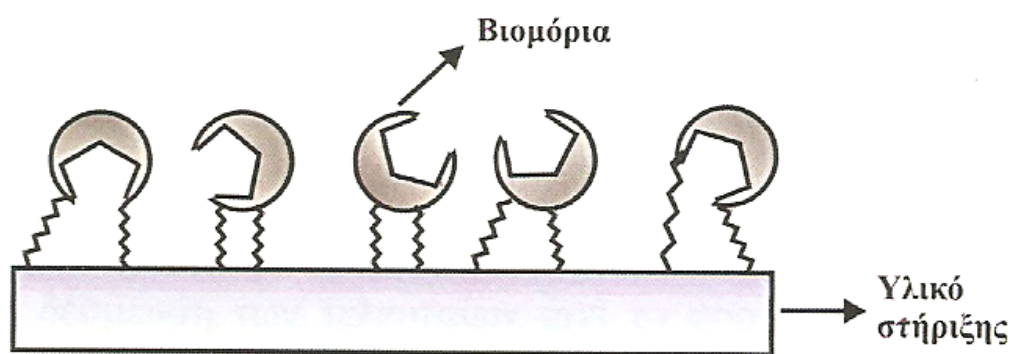
Σχήμα 3.8. Σχηματική απεικόνιση διασταυρούμενης σύνδεσης βιομορίων.

Για την επιτυχή διασύνδεση των βιομορίων απαιτείται κατάλληλη ρύθμιση διάφορων παραμέτρων όπως το pH, η ιοντική ισχύς του διαλύματος ακινητοποίησης, η συγκέντρωση των αντιδραστηρίων, ο χρόνος αντίδρασης κ.ά. Το πιο δημοφιλές αντιδραστήριο διασταυρούμενης σύνδεσης είναι η γλουταραλδεΐδη, η οποία σε πολλές περιπτώσεις συνδυάζεται με μια πρωτεΐνη φορέα, όπως η αλβουμίνη (§3.5.2.2.). Μειονέκτημα της μεθόδου αποτελεί η ενδεχόμενη ευαισθησία των βιομορίων στα αντιδραστήρια διασύνδεσης, λόγω των χημικών μεταβολών που υφίστανται τα ενεργά κέντρα αυτών.

3.5.2. Ομοιοπολική σύνδεση

Η μέθοδος συνίσταται στην πρόσδεση των βιομορίων σε μη υδατοδιαλυτά υλικά στήριξης μέσω ομοιοπολικών δεσμών. Πριν την ομοιοπολική σύνδεση, η επιφάνεια του υλικού στήριξης ενεργοποιείται με αποτέλεσμα να αναπτύσσονται σε αυτή διάφορες δραστικές ομάδες. Η ομοιοπολική σύνδεση του βιομορίου με το υλικό στήριξης γίνεται είτε απευθείας ή, τις περισσότερες φορές, μέσω ενός διλειτουργικού αντιδραστηρίου, το οποίο έχει ήδη συνδεθεί με την επιφάνεια του υλικού στήριξης. (Σχήμα 3.9). Ο όρος

δिलειτουργικό αντιδραστήριο (bifunctional reagent), χρησιμοποιείται εναλλακτικά του όρου αντιδραστήριο διασύνδεσης ή διασταύρωσης για την ακινητοποίηση βιομορίων με ομοιοπολική σύνδεση.



Σχήμα 3.9. Σχηματική απεικόνιση ακινητοποίησης βιομορίων με ομοιοπολική σύνδεση.

Τα δилειτουργικά αντιδραστήρια διακρίνονται σε ετερο- και ομο-δिलειτουργικά, ανάλογα με το αν φέρουν όμοιες ή διαφορετικές δραστικές ομάδες. Τα ετερο-δिलειτουργικά αντιδραστήρια χρησιμοποιούνται σπανιότερα, κυρίως λόγω υψηλού κόστους. Τα πιο συνηθισμένα ομοδिलειτουργικά αντιδραστήρια είναι η γλουταραλδεΐδη, η διαζωβενζιδίνη, ο δις-(N-υδροξυηλεκτριμιδυλο)-διθειοδιπροπιονικός εστέρας και το εξαμεθυλενο-δισ(ιωδοακεταμίδιο).

Κατά κανόνα, η ομοιοπολική σύνδεση είναι μια μη αντιστρεπτή πορεία ακινητοποίησης και τα ακινητοποιημένα βιομόρια παρουσιάζουν αυξημένη (μηχανική) αντοχή, ακόμη και κατά τη μεταβολή συνθηκών όπως το pH, και η ιοντική ισχύς του διαλύματος εργασίας, ο διαλύτης και η θερμοκρασία. Μειονεκτήματα της μεθόδου, όπως και στην περίπτωση της διασταυρούμενης σύνδεσης, αποτελεί η μερική ή ολική απώλεια της αρχικής δραστικότητας των βιομορίων λόγω των αντιδράσεων σύνδεσης. Ως προς τις φυσικές μεθόδους ακινητοποίησης, η ομοιοπολική σύνδεση υστερεί σε απλότητα, αφού οι αντιδράσεις ενεργοποίησης των υλικών στήριξης είναι χρονοβόρες και σε ορισμένες περιπτώσεις απαιτούν τη χρήση αντιδραστηρίων υψηλού κόστους.

Στη βιβλιογραφία αναφέρονται διάφοροι μέθοδοι ομοιοπολικής σύνδεσης βιομορίων χρησιμοποιώντας ένα μεγάλο αριθμό αντιδραστηρίων για την ενεργοποίηση του φορέα ακινητοποίησης και τη σύνδεση των βιομορίων σε αυτόν. Στη συνέχεια του κεφαλαίου παρουσιάζονται μερικές από τις ευρύτερα χρησιμοποιούμενες μεθόδους, αφού η καταγραφή όλων των μεθόδων ομοιοπολικής σύνδεσης είναι πρακτικά δύσκολη. Πρέπει να σημειωθεί ότι οι μέθοδοι αυτές δεν αναφέρονται σε κάποιο συγκεκριμένο υλικό στήριξης αλλά στις “εξωτερικές” του ομάδες ($-NH_2$, $-COOH$, $-OH$, $-SH$) και, κατά συνέπεια, μπορούν να εφαρμοστούν σε κάθε υλικό στήριξης που φέρει αυτές τις ομάδες είτε φυσικά ή μετά από κατεργασία με κατάλληλα αντιδραστήρια.

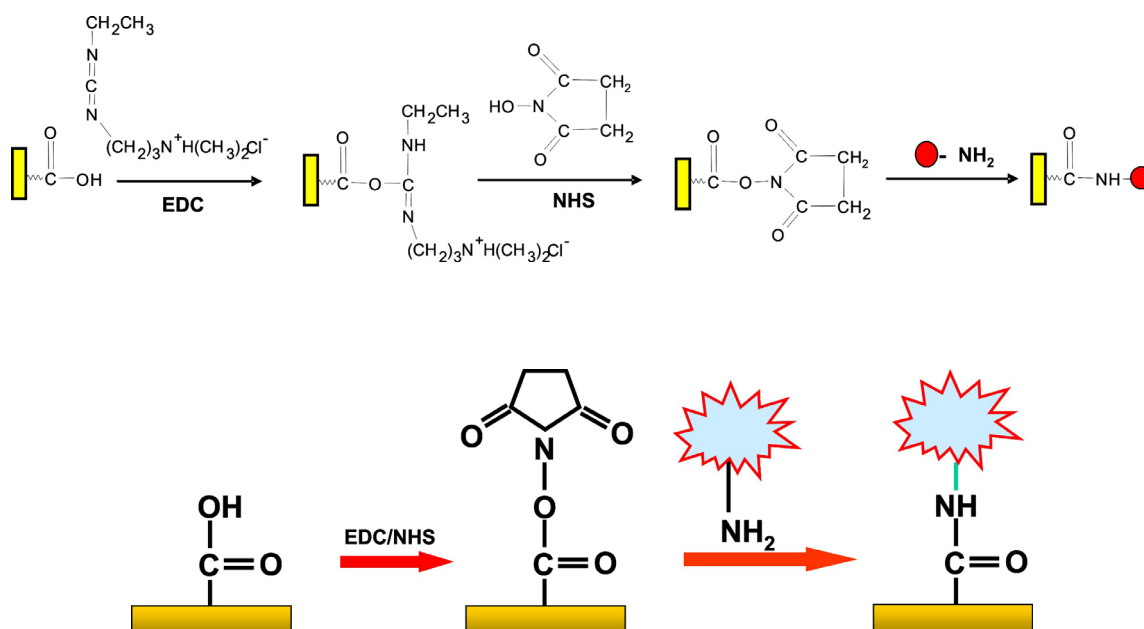
3.5.2.1. Μέθοδος καρβοδιϊμιδίου

Το πιο δημοφιλές καρβοδιϊμίδιο είναι το υδατοδιαλυτό N-αιθυλο-N'-(3-διμεθυλοαμινοπροπυλο)καρβοδιϊμίδιο (EDC), το οποίο αντιδρά με τις καρβοξυλικές ομάδες του υλικού στήριξης σχηματίζοντας ενεργά ενδιάμεσα τα οποία στη συνέχεια αντιδρούν με τις πρωτοταγείς αμινομάδες των βιομορίων δημιουργώντας σταθερούς αμιδικούς δεσμούς (Σχήμα 3.10).

Η αντίδραση ενεργοποίησης έχει μέγιστη απόδοση στην περιοχή pH 4,5–6,0, όπου και ολοκληρώνεται σε χρονικό διάστημα λίγων λεπτών. Σύμφωνα με σχετικές μελέτες σε κάθε κύκλο ενεργοποίησης ενεργοποιείται περίπου το 1/3 του συνολικού πληθυσμού των καρβοξυλομάδων και ως εκ τούτου, σε αρκετές περιπτώσεις συστήνεται, η επανάληψη της αντίδρασης ενεργοποίησης προκειμένου να επιτύχουμε, τελικά, υψηλά ποσοστά ακινητοποίησης. Ωστόσο, τα αμινο-ενεργά ενδιάμεσα που σχηματίζονται είναι αρκετά ασταθή, ιδίως σε αλκαλικά ή ουδέτερα υδατικά διαλύματα και υδρολύονται εύκολα αναγεννώντας τις καρβοξυλομάδες.

Λόγω της αστάθειας των αμινο-ενεργών ενδιάμεσων, η ενεργοποίηση των καρβοξυλομάδων με EDC γίνεται παρουσία N-υδροξυηλεκτριμιδίου (NHS). Παρουσία NHS οι ελεύθερες καρβοξυλικές ομάδες του υλικού ακινητοποίησης μετατρέπονται σε εστέρες του NHS, η σταθερότητα των οποίων εξαρτάται από το pH και την περιεκτικότητα σε νερό του μέσου αντίδρασης.

Δεδομένου ότι τις περισσότερες φορές αναφερόμαστε σε υδατικά διαλύματα, ο χρόνος ημιζωής των εστέρων του NHS και κατά συνέπεια ο διαθέσιμος χρόνος για την ακινητοποίηση του βιομορίου στο υλικό ενεργοποίησης καθορίζεται από το pH του διαλύματος ακινητοποίησης και κυμαίνεται από 4–5 ώρες σε pH 7, 1 ώρα σε pH 8 και μόλις 10 λεπτά σε pH 8,6. Η αντίδραση των εστέρων του NHS με πρωτοταγείς αμινομάδες ευνοείται σε αλκαλικές τιμές pH. Σε τιμές pH 8–8,4, η αντίδραση πραγματοποιείται σε λίγα λεπτά και η όλη πορεία ακινητοποίησης δεν επηρεάζεται από το βραχύ χρόνο ημιζωής των ενεργών ενδιάμεσων στη συγκεκριμένη περιοχή pH.



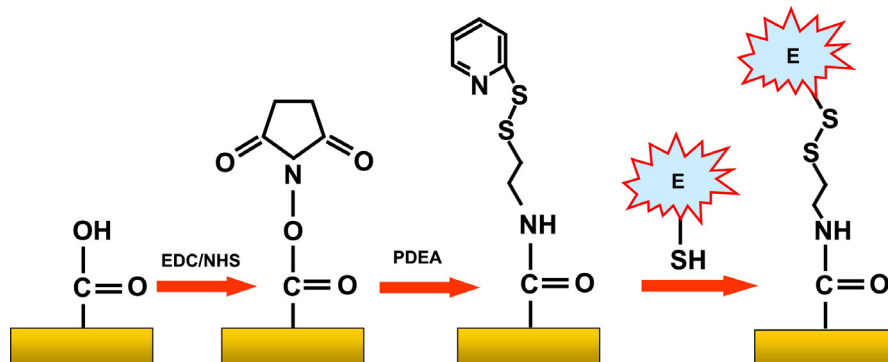
Σχήμα 3.10. Αντιδράσεις–Σχηματική απεικόνιση ακινητοποίησης βιομορίων μέσω καρβοδιιμιδίων παρουσία NHS.

Στην περίπτωση των βιομορίων, καθοριστικό ρόλο για την επιτυχή δέσμευση των τελευταίων έχει το φορτίο του βιομορίου και οι αντίστοιχες δυνάμεις, ηλεκτροστατικής φύσης, που αναπτύσσονται με την αρνητικά φορτισμένη επιφάνεια ($R-COO^-$) του υλικού ακινητοποίησης. Βάσει ενός εμπειρικού κανόνα τα υψηλότερα ποσοστά ακινητοποίησης λαμβάνονται σε $pH = pI - 0,5$, όπου το βιομόριο να είναι θετικά φορτισμένο και μέσω

ελκτικών δυνάμεων, μπορεί εύκολα να προσεγγίσει την επιφάνεια ακινητοποίησης και να αντιδράσουν οι πρωτοταγείς αμινομάδες του με τους εστέρες NHS. Όταν αυτό δεν είναι δυνατό, όπως στην περίπτωση όξινων πρωτεϊνών, τότε η ακινητοποίηση επιχειρείται από διαλύματα υψηλής ιοντικής ισχύς (π.χ. 1 M NaCl), όπου λόγω της παρουσίας υψηλής συγκέντρωσης αντισταθμιστικών ιόντων, η ισχύς των απωστικών δυνάμεων μεταξύ του υλικού στήριξης και του βιομορίου είναι σημαντικά μειωμένη

Μετά την αντίδραση ακινητοποίησης ακολουθούν εκπλύσεις με το ρυθμιστικό διάλυμα ακινητοποίησης, ενώ για την απενεργοποίηση των ενεργών NHS εστέρων που δεν έχουν αντιδράσει με το βιομόριο χρησιμοποιούνται ουσίες, οι οποίες φέρουν πρωτοταγείς αμίνες, όπως γλυκίνη, αιθανολαμίνη κ.λ.π. Οι αντιδράσεις και η σχηματική απεικόνιση της ακινητοποίησης βιομορίων μέσω καρβοδιϊμιδίων παρουσία NHS φαίνεται στο Σχήμα 3.10.

Οι ενεργοποιημένες με EDC/NHS καρβοξυλικές ομάδες του υλικού στήριξης μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν έμμεσα για την ακινητοποίηση βιομορίων, μέσω ενός σουλφιδρικού (-SH) άκρου, παρουσία 2-(2-πυριδινυλοδιθειο)αιθαναμίνης (PDEA). Τα διάφορα στάδια μιας τέτοιας πορείας ακινητοποίησης φαίνονται στο Σχήμα 3.11.



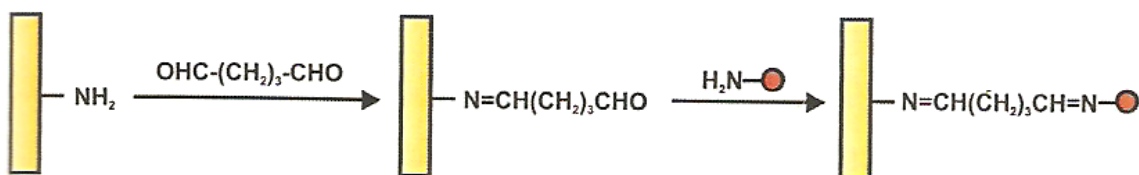
Σχήμα 3.11. Σχηματική απεικόνιση ακινητοποίησης βιομορίων με EDC/NHS και PDEA.

Αυτή η παραλλαγή της μεθόδου είναι ιδιαίτερα χρήσιμη σε περιπτώσεις πρωτεϊνών που περιέχουν υψηλά ποσοστά κυστεΐνης, βιομορίων όπου λόγω έλλειψης αμινομάδων

δεν είναι εφικτή η ακινητοποίηση μέσω αμιδικού δεσμού (π.χ. μικρά πεπτίδια) ή σε περιπτώσεις ανεπαρκούς πρόσδεσης των βιομορίων αυτών (π.χ. όξινης πρωτεΐνης). Τέλος, μετά τη δέσμευση των βιομορίων η περίσσεια των δισουλφιδικών δεσμών απενεργοποιείται με διάλυμα κυστεΐνης.

3.5.2.2. Μέθοδος γλουταραλδεΐδης

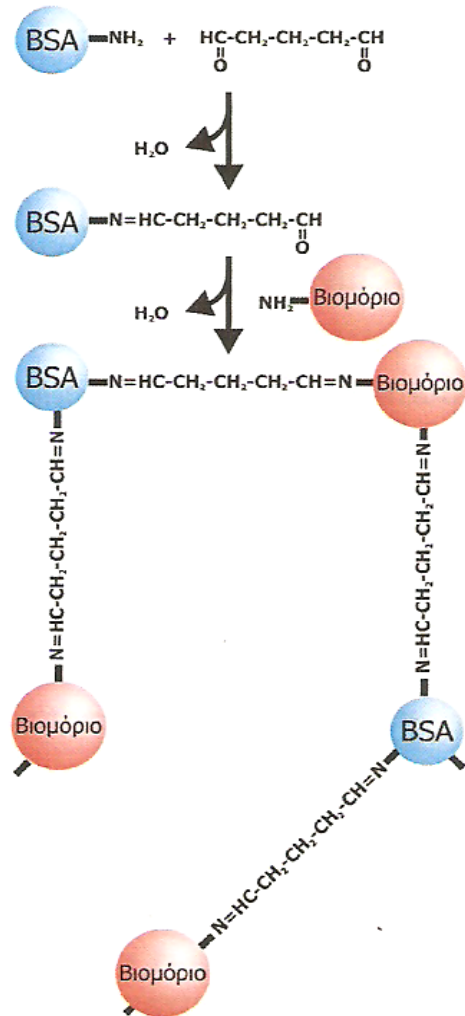
Η γλουταραλδεΐδη είναι ένα ομοδιλειτουργικό αντιδραστήριο, το οποίο, μέσω των καρβοξυλομάδων που φέρει στα δύο του άκρα, δρα ως γέφυρα μεταξύ του φορέα ακινητοποίησης και βιομορίων που φέρουν πρωτοταγείς αμινομάδες. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.12, η σύνδεση των βιομορίων με το φορέα ακινητοποίησης γίνεται μέσω του σχηματισμού βάσεων Schiff. Η ομοιοπολική σύνδεση βιομορίων–φορέα ακινητοποίησης μέσω γλουταραλδεΐδης ενισχύει τη σταθερότητα του συστήματος, ωστόσο σε κάποιες περιπτώσεις παρατηρείται μείωση της αρχικής δραστηριότητας των ακινητοποιημένων βιομορίων.



Σχήμα 3.12. Σχηματική απεικόνιση ακινητοποίησης βιομορίων με γλουταραλδεΐδη.

Η γλουταραλδεΐδη, όπως και οι περισσότερες αλδεΐδες, είναι επιρρεπής στην οξείδωση από το οξυγόνο του ατμοσφαιρικού αέρα ακόμη και σε θερμοκρασία περιβάλλοντος. Έτσι, τα υδατικά διαλύματα αυτής, ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους και τις συνθήκες αποθήκευσης, μπορούν εύκολα να πολυμεριστούν και να μετατραπούν σε μείγματα από μονομερή μόρια γλουταραλδεΐδης και πολυμερή μόρια αυτής, τα οποία

αντιδρούν με τα βιομόρια με διαφορετικούς τρόπους, επηρεάζοντας την ποιότητα της ακινητοποίησης.



Σχήμα 3.13. Σχηματική απεικόνιση ακινητοποίησης βιομορίων με γλουταραδεϋδή παρουσία BSA.

Η ενεργοποίηση του υλικού στήριξης μπορεί να γίνει είτε με διάλυμα γλουταραλδεϋδης είτε παρουσία ατμών αυτής. Η τελευταία περίπτωση χρησιμοποιείται κυρίως για τη διεξαγωγή της ακινητοποίησης (ενεργοποίηση υλικού και δέσμευση βιομορίων) σε ένα στάδιο. Σε αυτή την περίπτωση, το διάλυμα του βιομορίου τοποθετείται πάνω υλικό ακινητοποίησης και όλη η διάταξη τοποθετείται σε θάλαμο

κορεσμένο με αμιούς γλουταραλδεϋδης. Όπως γίνεται αντιληπτό σε αυτή την περίπτωση αναπτύσσονται ομοιοπολικοί δεσμοί και μεταξύ των ακινητοποιημένων βιομορίων.

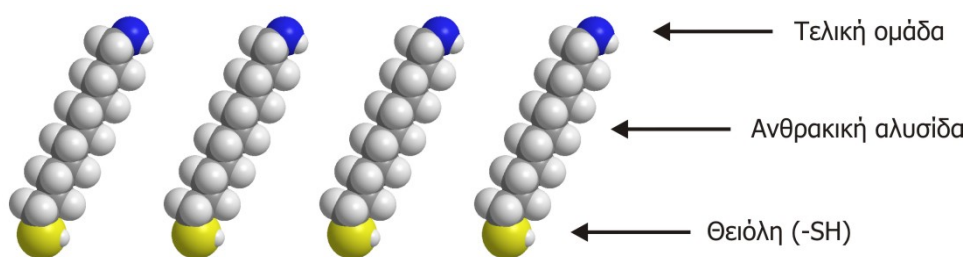
Μια σύνθετη μέθοδος ακινητοποίησης με γλουταραλδεϋδη αποτελεί η δημιουργία πλέγματος μεταξύ του προς ακινητοποίηση (ειδικού) βιομορίου και ενός άλλου (μη ειδικού) βιομορίου, π.χ. αλβουμίνης (Σχήμα 3.13). Ουσιαστικά τα δύο πρώτα στάδια της δημιουργίας του πλέγματος εκτελούνται ταυτόχρονα. Η δημιουργία του πρωτεϊνικού πλέγματος BSA–ειδικού ενζύμου αυξάνει την ευκαμψία του ακινητοποιημένου ενζύμου και κατά συνέπεια διευκολύνεται η πρόσβαση του υποστρώματος σε αυτό. Επίσης, μέσω του πλέγματος BSA–ειδικού ενζύμου μειώνεται ο αριθμός των μορίων του ενζύμου που ενώνονται απευθείας, μέσω χημικού δεσμού, με το υλικό στήριξης. Για τους παραπάνω λόγους και σύμφωνα με σχετικές συγκριτικές μελέτες η παρουσία της αλβουμίνης συμβάλει στη αύξηση της δραστηριότητας και του χρόνου ζωής του ακινητοποιημένου βιομορίου.

3.6. ΑΥΤΟ–ΔΙΑΤΑΣΣΟΜΕΝΕΣ ΜΟΝΟΣΤΙΒΑΔΕΣ

3.6.1. Σύνδεση χρυσού–θειολών

Οι αυτοδιατασσόμενες μονοστιβάδες θειολών (self-assembled monolayers, SAMs) είναι κρυσταλλικά χημειοροφημένα υμένα που σχηματίζονται σε στερεό υπόστρωμα από την αυθόρμητη οργάνωση των μορίων τους. Τα μόρια προσδένονται στο υπόστρωμα από τις ομάδες των θειολών και οργανώνονται με τέτοιο τρόπο, ώστε οι τελικές (ενεργές) ομάδες να αιωρούνται στην εξωτερική πλευρά της μονοστιβάδας (Σχήμα 3.17). Τα δύο άκρα, θειόλη και τελική ομάδα χωρίζονται μεταξύ τους από μια ανθρακική αλυσίδα. Αυτοδιατασσόμενες μονοστιβάδες σχηματίζονται κυρίως από μόρια οργανοθειϊκών ενώσεων όπως θειόλες και δισουλφίδια, σε υποστρώματα όπως ο χρυσός, ο άργυρος, ο λευκόχρυσος και ο υδράργυρος. Στις αρχές τις δεκαετίας του '80 οι Nuzzo και Allara ήταν οι πρώτοι που ασχολήθηκαν με την κατανόηση της οργάνωσης αυτοδιατασσόμενων μονοστιβάδων θειολών σε επιφάνειες χρυσού. Παρά το γεγονός ότι έχουν γίνει πολλές μελέτες σχετικά με τη χημειορόφηση των θειολών πάνω σε διάφορα μέταλλα, το ενδιαφέρον των ερευνητών επικεντρώθηκε στις επιφάνειες χρυσού. Η καταλληλότητα

του χρυσού οφείλεται στην απουσία σταθερών οξειδίων και στον εύκολο καθαρισμό της επιφάνειάς του, στη χημική αδράνεια και, κυρίως στην ισχυρή αλληλεπίδραση του με το θείο. Η υψηλή τιμή της ενέργειας του δεσμού Au-S ($145\text{--}188 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), συγκρίσιμη με αυτή του ομοιοπολικού δεσμού (π.χ. C-I $218 \text{ KJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), οδηγεί, σε σχεδόν, μη αντιστρέψιμες προσροφήσεις.



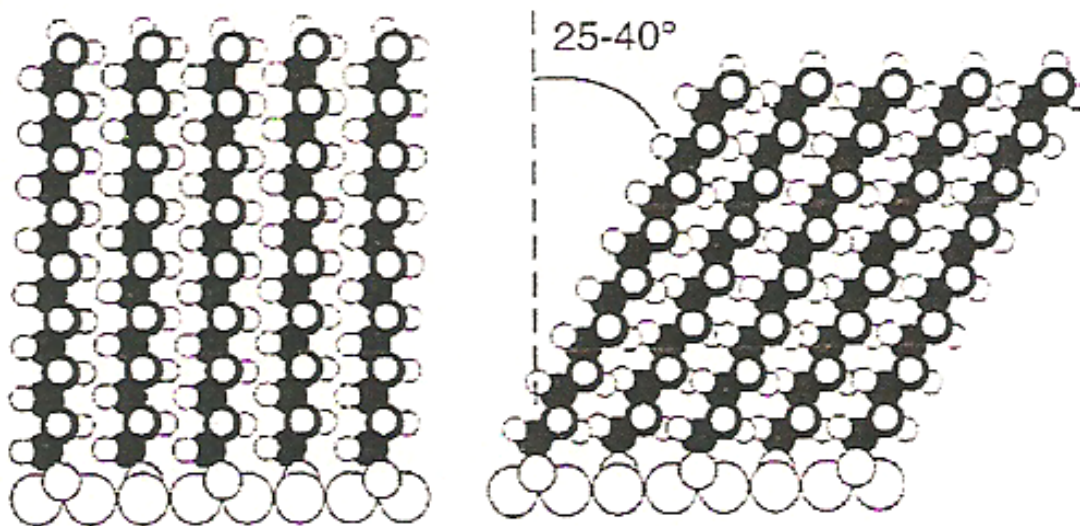
Σχήμα 3.17. Μόρια θειόλης.

Τα πλεονεκτήματα της παραπάνω τεχνικής είναι πολλά και περιλαμβάνουν: α) τη δημιουργία ομοιόμορφων μονομοριακών στιβάδων με σχετικά καλή επαναληψιμότητα, β) την ευκολία στο χειρισμό τους, γ) τη διατήρηση της ευκαμψίας των αυτοδιατασσόμενων μορίων και δ) τη δυνατότητα τροποποίησης των τελικών τους άκρων με διάφορες μεθόδους και αντιδραστήρια.

Οι στιβάδες που σχηματίζονται έχουν ορισμένη σύσταση, καλή οργάνωση και διηλεκτρική σταθερά περίπου ίση με 2,8. Το πάχος τους βρίσκεται στην κλίμακα των Angstroms, ανάλογα με το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας και είναι σταθερά σε ατμοσφαιρικές συνθήκες.

Ο σχηματισμός των αυτοδιατασσόμενων μονοστιβάδων θειολών λαμβάνει χώρα σε δύο φάσεις. Αρχικά τα μόρια των θειολών προσροφούνται γρήγορα εξαιτίας της ισχυρής αλληλεπίδρασης μεταξύ χρυσού και θείου, και στη συνέχεια ακολουθεί μια πιο αργή φάση κατά την οποία τα δεσμευμένα σωματίδια κινούνται παράλληλα στην επιφάνεια του χρυσού, οργανώνονται, βαθμιαία σταθεροποιούνται και δημιουργούν κρυσταλλικά

υμένα. Κατά τη δεύτερη φάση, τα μόρια των θειολών διατάσσονται παράλληλα στην επιφάνεια του χρυσού λόγω αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων των θειολών. Οι αλληλεπιδράσεις αυτές αποδίδονται σε πλευρικές μη δεσμικές δυνάμεις, μεταξύ των ανθρακικών αλυσίδων, όπως van der Waals, στερεοχημικές, απωστικές και ηλεκτροστατικές. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.18, τα μόρια των θειολών είναι διατεταγμένα με κλίση $25 - 40^\circ$. Ο προσανατολισμός αυτός καθορίζεται από την απόσταση του δεσμού Au-S και τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ανθρακικών αλυσίδων των θειολών.



Σχήμα 3.18. Προσανατολισμός αυτοδιατασσόμενων μονοστιβάδων θειολών σε επιφάνεια χρυσού.

Ανάλογα με το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας οι αλκανοθειόλες του τύπου $\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-\text{X}$ σχηματίζουν στιβάδες με αγώγιμες ($n < 5$), ημιαγώγιμες ($6 < n < 10$) ή μονωτικές ($n > 11$) ιδιότητες. Γενικά, η δέσμευση των θειολών με 15–16 άτομα άνθρακα δημιουργούν πολύ σταθερές στιβάδες σε υδατικό περιβάλλον. Αντίθετα, στιβάδες θειολών με μικρότερες ανθρακικές αλυσίδες ($n < 6$) παρουσιάζουν μειωμένη σταθερότητα και σταδιακά εκροφούνται κατά την παραμονή τους σε υδατικά διαλύματα. Η

συμπεριφορά αυτή εξηγεί, ως ένα βαθμό, την αυξημένη αγωγιμότητα και τα ασταθή σήματα υποβάθρου που παρατηρούνται σε SAMs θειολών με μικρές ανθρακικές αλυσίδες.

Η συνολική ποιότητα των συγκροτήσεων μετάλλου/SAMs εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό και από τη μορφολογία και την καθαρότητα της ενεργής επιφάνειας του ηλεκτροδίου. Σταθερές και επαναλαμβανόμενες μονοστιβάδες προκύπτουν χρησιμοποιώντας τέλεια καθαρισμένες, ιδανικά επίπεδες, σε ατομικό επίπεδο επιφάνειες. Έτσι, πριν την ανάπτυξη SAMs επιβάλλεται ο επιμελής καθαρισμός της επιφάνειας χρυσού. Οι ιδιότητες των SAMs εξαρτώνται από πολλές παραμέτρους, όπως η θερμοκρασία, η καθαρότητα της θειόλης, ο χρησιμοποιούμενος διαλύτης, ο χρόνος επώασης, το pH του διαλύματος της θειόλης και τέλος το υλικό και η ποιότητα του υποστρώματος.

Τα διαλύματα των θειολών δεν είναι σταθερά, αφού παρουσία οξυγόνου τα ελεύθερα μόρια των θειολών διμερίζονται, σχηματίζοντας δισουλφιδικούς δεσμούς. Όμως, η ύπαρξη δισουλφιδικών δεσμών δεν αποτρέπει το σχηματισμό SAMs, γιατί κατά την επαφή των διμερών αυτών με την επιφάνεια του μετάλλου (κυρίως χρυσού, υδραργύρου) παρατηρείται, ακαριαία, αναγωγική διάσπαση του δισουλφιδικού δεσμού και προσρόφηση των προκύπτουσών θειολών στην επιφάνεια στη μεταλλική επιφάνεια. Ωστόσο, η κινητική του σχηματισμού SAMs είναι πιο αργή παρουσία δισουλφιδικών ενώσεων.

Ο πιο κατάλληλος και διαδεδομένος διαλύτης για την παρασκευή SAMs είναι η αιθανόλη, κυρίως για θειόλες που περιέχουν έως και 18 ομάδες μεθυλενίου ($n = 18$). Για θειόλες με μεγαλύτερες ανθρακικές αλυσίδες ($n > 18$), που έχουν την τάση να καταβυθίζονται, πιο κατάλληλοι διαλύτες θεωρούνται διαλύτες όπως το εξάνιο, ο διμεθυλαιθέρας ή το τετραυδροφουράνιο. Τέλος, για μικρές θειόλες όπως η κυστεΐνη, η μερκαπτοαιθανόλη και το μερκαπτοπροπιονικό οξύ, χρησιμοποιούνται ως επί το πλείστον υδατικά διαλύματα.

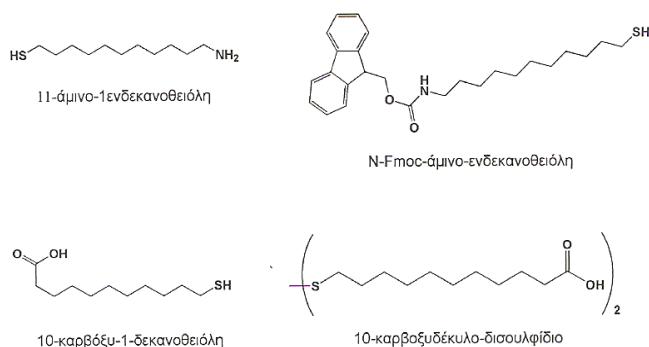
Για την παρασκευή βιοαισθητήρων χρησιμοποιούνται επίσης μίγματα δύο θειολών, που διαφέρουν ως προς το μήκος της ανθρακικής αλυσίδας $[\text{HS}-(\text{CH}_2)_m-\text{X}]$ και $[\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-\text{X}]$ ή ως προς την τελική ομάδα $[\text{HS}-(\text{CH}_2)_m-\text{X}]$ και $[\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-\text{Y}]$ ή και ως προς τα δύο $[\text{HS}-(\text{CH}_2)_m-\text{X}]$ και $[\text{HS}-(\text{CH}_2)_n-\text{Y}]$. Η σύσταση του μίγματος επηρεάζει τόσο τη διαμόρφωση της μονοστιβάδας, όσο και την καταλληλότητα της προκύπτουσας

επιφάνειας ακινητοποίησης. Ανάλογα με το είδος των θειολών στο μίγμα και του λόγου των συγκεντρώσεων τους μπορούμε να ρυθμίσουμε τον πληθυσμό των ενεργών ομάδων, την μεταξύ τους απόσταση, το συνολικό φορτίο της επιφάνειας και, τέλος την υδροφιλικότητα της επιφάνειας του φορέα ακινητοποίησης.

3.6.1.1. Διάφοροι τύποι θειολών

Για την ανάπτυξη βιοαισθητήρων επιλέγουμε θειόλες οι οποίες φέρουν κατάλληλες ενεργές ομάδες ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$, εστέρες ηλεκτρικού οξέος, μόρια βιοτίνης κ.ά.), οι οποίες, σύμφωνα με όσα αναφέρθηκαν στις προηγούμενες παραγράφους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την ακινητοποίηση βιομορίων.

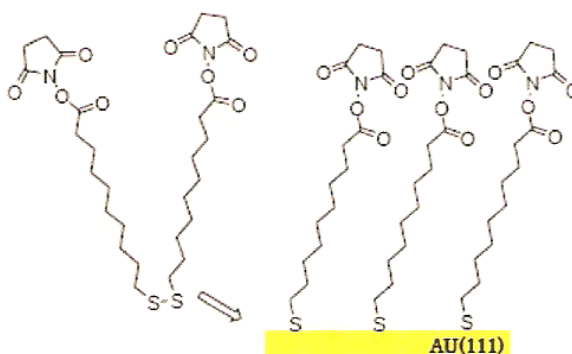
Οι αμινοαλκανοθειόλες, όπως η 11-αμινο-1-ενδεκανόλη, (Σχήμα 3.19), χρησιμοποιούνται για την τροποποίηση χρυσού με πρωτοταγείς αμινομάδες. Ένα πρόβλημα κατά την ανάπτυξη SAM θειολών με πολικές τελικές ομάδες ($-\text{COOH}$, $-\text{NH}_2$, $-\text{OH}$) είναι η αλληλεπίδραση των μορίων των θειολών στο διάλυμα με τα ακινητοποιημένα μόρια (Au-SR) και η δημιουργία ενός δευτέρου επιπέδου θειολών, το οποίο συγκρατείται με δεσμούς υδρογόνου (π.χ. $\text{Au-SRNH}_2 \cdots \text{H}_2\text{NR-SH}$). Για την αποτροπή αυτού του φαινομένου η ανάπτυξη SAM θειολών με πολικές τελικές ομάδες γίνεται παρουσία βοηθητικών ομάδων (στην περίπτωση HS-R-NH_2 η ανάπτυξη SAMs γίνεται παρουσία τριαιθυλαμίνης, η οποία στο τέλος απομακρύνεται με εκπλύσεις με οξύ).



Σχήμα 3.19. Συντακτικοί τύποι διαφόρων θειολών.

Εναλλακτικά μπορούν να χρησιμοποιηθούν κατάλληλα τροποποιημένα μόρια θειόλης, όπως η 9-φθορενυλο-μεθοξυ-καρβονυλο (Fmoc) αμινοαλκανοθειόλη. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.19, η αμινομάδα προστατεύεται από την Fmoc-ομάδα, η οποία μετά την ανάπτυξη της μονοστιβάδας απομάκρυνεται με εμβάπτιση των τροποποιημένων ηλεκτροδίων σε μίγμα πιπεριδίνης / ακετονιτριλίου.

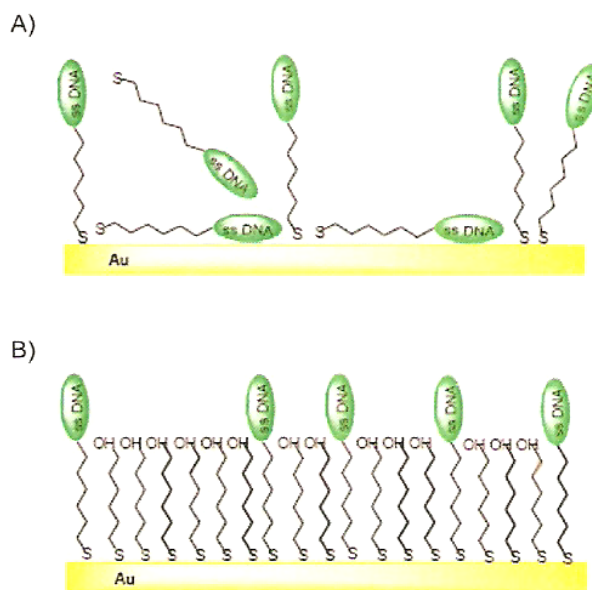
Οι καρβοξυαλκανοθειόλες, όπως η 10-καρβοξυ-1-δεκανο θειόλη, (Σχήμα 3.19), χρησιμοποιούνται αντίστοιχα για την τροποποίηση του χρυσού με καρβοξυλομάδες. Όπως αναφέρθηκε στην παράγραφο 3.5.2.1 (σελ.78), οι καρβοξυλομάδες μετατρέπονται σε υδροξυηλεκτριμιδοεστέρες, οι οποίοι είναι ιδιαίτερα δραστικοί με τις πρωτοταγείς αμινομάδες των βιομορίων. Τα καρβοξυαλκανοδισουλφίδια (Σχήμα 3.19) είναι οξειδωμένες ενώσεις, πιο σταθερές και λιγότερο δύσσομες από τις θειόλες και χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη παρόμοιων αυτοδιατασσόμενων μονοστιβάδων με τις καρβοξυαλκανοθειόλες.



Σχήμα 3.20. Ανάπτυξη SAM DSU.

Ενώσεις ανάλογες των καρβοξυαλκυλοδισουλφιδίων, όπως ο δις-(N-υδροξυηλεκτριμιδυλο)-διθειοδιενδεκανοϊκός εστέρας, DSU, χρησιμοποιούνται επίσης για την τροποποίηση της επιφάνειας του χρυσού με αμινο-ενεργές θέσεις (Σχήμα 3.20). Σημαντικό πλεονέκτημα στη χρήση των παραπάνω θειολών αποτελεί η αποφυγή ενδιάμεσων σταδίων ενεργοποίησης του υλικού στήριξης.

των ακινητοποιημένων βιομορίων.



Σχήμα 3.21. Ακίνητοποίηση βιομορίων DNA (A) χωρίς και (B) με 6-υδροξυ-1-εξανοθειόλη.

Τέλος, διάφορες υδροξυαλκανοθειόλες, όπως η 11-υδροξυ-1-ενδεκανοθειόλη, η 8-υδροξυ-1-οκτανοθειόλη, και η 6-υδροξυ-1-εξανοθειόλη χρησιμοποιούνται σε μίγματα θειολών ως αντιδραστήρια αραίωσης για τον έλεγχο της πυκνότητας των ενεργών θέσεων στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου ή για το μπλοκάρισμα των κενών θέσεων στην επιφάνεια του χρυσού μειώνοντας έτσι τη μη ειδική δέσμευση μορίων κατά την εφαρμογή των βιοαισθητήρων σε πραγματικά δείγματα. Επίσης, χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση του προσανατολισμού. Ο ρόλος τους γίνεται κατανοητός στο Σχήμα 3.21. Παρουσία, 6-υδροξυ-1-εξανοθειόλης, τα ακινητοποιημένα μόρια DNA, τα οποία συνδέονται με την επιφάνεια του χρυσού μέσω ισχυρών δεσμών (Au-S) και ασθενών δεσμών (Au-N) αποκτούν κατάλληλο προσανατολισμό, ενώ όσα συνδέονται μόνο με ασθενείς δεσμούς (Au-N) εκροφούνται στο διάλυμα.

Επίσης για την ακινητοποίηση βιομορίων έχουν χρησιμοποιηθεί SAMs από διαλύματα ή μίγματα θειολών που φέρουν αζιδομάδες, όπως η 1-αζιδοενδεκανο-11-θειόλη. Μια άλλη κατηγορία θειολών, οι οποίες χρησιμοποιούνται κυρίως για την ανάπτυξη χημικών

αισθητήρων είναι οι φερροκενυλοαλκανοθειόλες, οι οποίες τροποποιούν τις επιφάνειες χρυσού εισάγοντας ηλεκτροχημικώς ενεργά μόρια **[Προδρομίδης, 2010]**.

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΕΜΠΕΔΗΣΙΟΜΕΤΡΙΚΟΙ ΒΙΟΑΣΘΗΤΗΡΕΣ

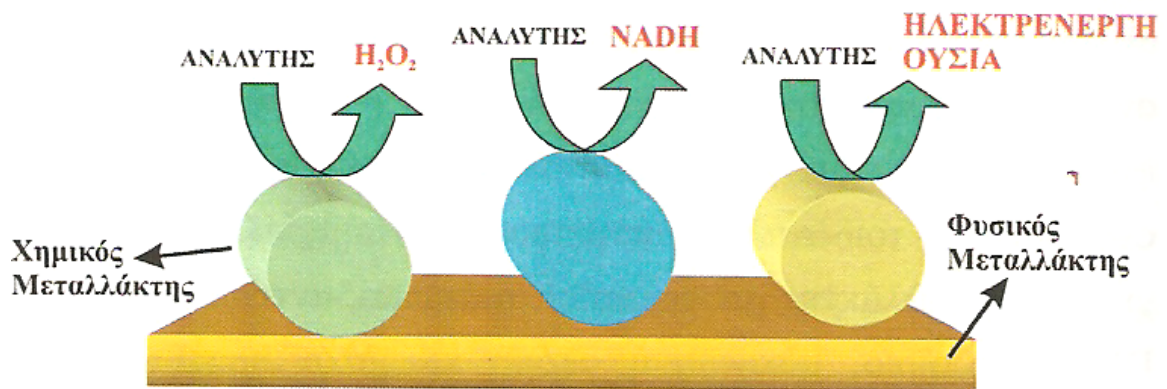
4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σύμφωνα με ένα γενικά αποδεκτό ορισμό «Βιοαισθητήρας ονομάζεται το σύστημα δύο μεταλλακτών, ενός χημικού και ενός φυσικού, οι οποίοι βρίσκονται σε επαφή και μετατρέπουν τη συγκέντρωση του αναλύτη σε μετρούμενο σήμα» (Σχήμα 4.1). Ο χημικός μεταλλάκτης μπορεί να είναι ένζυμο, αντιγόνο/αντίσωμα, DNA, βακτήριο, μύκητας ή ακόμα και ολόκληρος ιστός. Οι φυσικοί μεταλλάκτες είναι συνήθως ηλεκτρόδια στερεής κατάστασης οπτικές ίνες, πιεζοηλεκτρικοί κρύσταλλοι, ή θερμίστορες. Η χρήση βιολογικών ουσιών, βιολογικών παραγώγων ή βιομιμητικών υλικών ως στοιχείων ανάγνωσης, παρέχει τη δυνατότητα εκλεκτικής αλληλεπίδρασης του βιοαισθητήρα με τον αναλύτη-στόχο παρουσία (μεγάλου αριθμού) άλλων ενώσεων με παρόμοια δομή.

Η τεχνολογία των βιοαισθητήρων προσφέρει αρκετά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους ανάλυσης. Κατά κανόνα, οι βιοαισθητήρες είναι μεταλλάκτες ή συσκευές μικρού μεγέθους, παρουσιάζουν υψηλή εκλεκτικότητα και γρήγορη απόκριση, είναι απλοί στη χρήση, δηλαδή χρησιμοποιούνται άμεσα χωρίς να απαιτείται κάποια ιδιαίτερη προκατεργασία του δείγματος και σε συνδυασμό με μια φορητή οργανολογία χαμηλού κόστους, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε αναλύσεις πεδίου, *in vivo* αναλύσεις ή ως εμφυτεύματα, για τη συνεχή παρακολούθηση διαφόρων αναλυτών.

Επιπρόσθετα, στους περισσότερους βιοαισθητήρες η δέσμευση ή γενικότερα η αλληλεπίδραση του αναλύτη με το ακινητοποιημένο βιομόριο ανιχνεύεται άμεσα χωρίς τη χρήση ιχνηθετών ή ενδεικτικών αντιδράσεων. Με άλλα λόγια ένας βιοαισθητήρας

είναι εξ ορισμού, μια αυτόνομη, ολοκληρωμένη αναλυτική συσκευή, η οποία μπορεί να χρησιμοποιηθεί απευθείας σε ένα δείγμα χωρίς να απαιτείται προσθήκη αντιδραστηρίων. Μολονότι κάποιοι από τους βιοαισθητήρες που αναφέρονται στη βιβλιογραφία δεν ικανοποιούν πλήρως αυτές τις απαιτήσεις, ωστόσο σε γενικές γραμμές έχουν αναπτυχθεί και αναπτύσσονται αισθητήρες για την ανάλυση (βιο)μορίων, με ενδιαφέρον στην κλινική χημεία, στη χημεία τροφίμων και στη χημεία περιβάλλοντος.



Σχήμα 4.1. Σχηματική απεικόνιση ενός βιοαισθητήρα.

Ανάλογα με τη μετρούμενη ιδιότητα, οι βιοαισθητήρες διακρίνονται σε οπτικούς, ποτενσιομετρικούς, αμπερομετρικούς, συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων, θερμικούς, πιεζοηλεκτρικούς ή μικροζυγού κρυστάλλου χαλαζία και χωρητικούς ή εμπεδησιομετρικούς (Πίνακας 4.1).

Τέλος, βάσει του τύπου του (ακίνητοποιημένου) βιομορίου που αναγνωρίζει τον αναλύτη-στόχο, οι βιοαισθητήρες μπορούν να χαρακτηριστούν ως:

(α) *αισθητήρες συγγένειας*, όπως στην περίπτωση αντιδράσεων αντισώματος-αντιγόνου και υβριδισμού DNA. Ανάλογα με τη μετρούμενη ιδιότητα, η παρακολούθηση της αλληλεπίδρασης του αναλύτη με το βιοαισθητήρα μπορεί να γίνει είτε άμεσα (σε ένα στάδιο χωρίς τη χρήση ενζυμικών ή άλλων ιχνηθετών) είτε έμμεσα (σε περισσότερα από ένα στάδια με τη βοήθεια ενζυμικών ή άλλων ιχνηθετών).

(β) *ενζυμικοί αισθητήρες*. Σύμφωνα με τον ορισμό που δόθηκε στην αρχή του κεφαλαίου, η αλληλεπίδραση του αναλύτη με ένα ή περισσότερα ένζυμα, τα οποία

βρίσκονται ακινητοποιημένα στο φυσικό μεταλλάκτη, οδηγεί στην παραγωγή σήματος, το οποίο συσχετίζεται με τη συγκέντρωση του αναλύτη στο δείγμα. Η ανάλυση του δείγματος πραγματοποιείται άμεσα, σε ένα στάδιο.

Πίνακας 4.1. Κατηγορίες βιοαισθητήρων με βάση τη μετρούμενη ιδιότητα.

Έιδος βιοαισθητήρων	Μετρούμενη ιδιότητα
Ποτενσιομετρικοί	Διαφορά δυναμικού υπό μηδενικό ρεύμα
Αμπερομετρικοί	Ρεύμα υπό σταθερή διαφορά δυναμικού
Οπτικοί	Απορρόφηση, φθορισμός, φωταύγεια, κ.ά.
Συντονισμού επιφανειακών πλασμονίων	Μεταβολή δείκτη διάθλασης
Θερμικοί	Θερμότητα από βιοχημική αντίδραση
Πιεζοηλεκτρικοί	Μεταβολή ιδιοσυχνότητας κρυστάλλου χαλαζία
Χωρητικοί ή Εμπεδησιομετρικοί	Μεταβολή συχνότητας ή εμπέδησης

4.2. ΒΑΣΙΚΕΣ ΑΡΧΕΣ ΧΩΡΗΤΙΚΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ

Η λειτουργία των εμπεδησιομετρικών βιοαισθητήρων βασίζεται και μπορεί να εξηγηθεί ικανοποιητικά με το μοντέλο του βιοχημικού πυκνωτή. Ένας πυκνωτής αποτελείται από δύο αγωγικούς οπλισμούς, οι οποίοι διαχωρίζονται από ένα διηλεκτρικό υλικό, ενώ η χωρητικότητα του είναι ανάλογη της μεταξύ τους απόστασης. Αυτό που προσπαθεί να επιτύχει είναι η προσομοίωση της συμπεριφοράς της διεπιφάνειας του ηλεκτροδίου/ηλεκτρολύτη, δηλαδή ενός ηλεκτροχημικού πυκνωτή με αυτήν ενός πυκνωτή.

Ένας ηλεκτρολυτικός πυκνωτής συνίσταται από το ηλεκτρόδιο εργασίας, το οποίο λειτουργεί ως ένας εκ των οπλισμών του πυκνωτή, το διηλεκτρικό και τον ηλεκτρολύτη, ο οποίος αντιπροσωπεύει το δεύτερο οπλισμό του πυκνωτή. Το διηλεκτρικό του ηλεκτρολυτικού πυκνωτή είναι μια μονωτική ως επί το πλείστον στιβάδα, η οποία αναπτύσσεται στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας και φέρει έναν (βιο)υποδοχέα

εκλεκτικό ως προς τον αναλύτη-στόχο, με αποτέλεσμα την (εκλεκτική) αλληλεπίδραση του αναλύτη-στόχου με την τροποποιημένη επιφάνεια του ηλεκτροδίου εργασίας.

Στους ηλεκτροχημικούς πυκνωτές ή εφεξής χωρητικούς βιοαισθητήρες η αλληλεπίδραση μεταξύ βιομορίων γίνεται αντιληπτή λόγω της μεταβολής της διηλεκτρικής σταθεράς ή της αύξησης του πάχους της διηλεκτρικής διπλοστιβάδας στη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου-ηλεκτρολύτη. Σε ιδανικές συνθήκες, η διαμόρφωση αυτή προσομοιάζει τη συμπεριφορά ενός πυκνωτή, ως προς την ικανότητα του τελευταίου να αποθηκεύει φορτία, και η χωρητικότητα του μπορεί να περιγραφεί από την εξίσωση

$$C = \frac{\varepsilon_0 \varepsilon A}{d} \quad (4.1)$$

όπου

ε , η διηλεκτρική σταθερά του μέσου μεταξύ των οπλισμών

ε_0 , η διαπερατότητα του κενού ($8,85419 \text{ pFm}^{-1}$)

A , η επιφάνεια των οπλισμών (m^2)

και d , το πάχος της μονωτικής στιβάδας (m).

Κατά τη δέσμευση του αναλύτη στον εκλεκτικό υποδοχέα αναμένεται μείωση της συνολικής χωρητικότητας, εξαιτίας της αύξησης της απόστασης μεταξύ των οπλισμών, θεωρώντας ότι η διηλεκτρική σταθερά του μέσου δε μεταβάλλεται. Το όλο φαινόμενο μπορεί να αναπαρασταθεί από δύο πυκνωτές σε σειρά, έναν εσωτερικό, που αντιστοιχεί στη διηλεκτρική στιβάδα (C_{dl}) και έναν εξωτερικό, που αντιστοιχεί στη στιβάδα του βιομορίου (C_{bm}) ή, μετά την εμβάπτιση του βιοαισθητήρα στο διάλυμα του αναλύτη, στο σύμπλοκο του ακινητοποιημένου βιομορίου αναγνώρισης με τον αναλύτη (Σχήμα 4.2β).

Στην περίπτωση αυτή, η συνολική χωρητικότητα δίνεται από την εξίσωση:

$$\frac{1}{C_t} = \frac{1}{C_{dl}} + \frac{1}{C_{bm}} \quad (4.2)$$

ή

$$C_t = \frac{C_{dl}^2}{C_{dl} + C_{bm}} \quad (4.3)$$

ενώ η μερική παράγωγος της συνολικής χωρητικότητας προς την C_{bm} δίνεται από τη σχέση:

$$\frac{(\delta C_t)}{(\delta C_{bm})} = \frac{C_{dl}^2}{(C_{dl} + C_{bm})^2} \quad (4.4)$$

Σύμφωνα με την παραπάνω εξίσωση, η ευαισθησία ενός βιοαισθητήρα, εξαρτάται εκτός των άλλων παραμέτρων, από την τιμή της χωρητικότητας της διηλεκτρικής στιβάδας. Για μεγάλες τιμές C_{dl} η εξίσωση 4.4 τείνει στη μονάδα, δηλαδή η μεταβολή της χωρητικότητας λόγω της δέσμευσης του αντιγόνου στη στιβάδα του αντισώματος θα παράγει μέγιστη μεταβολή του μετρούμενου σήματος. Σύμφωνα με την εξίσωση 4.1, υψηλές τιμές χωρητικότητας παρέχουν λεπτές στιβάδες από υλικά με μεγάλη διηλεκτρική σταθερά.

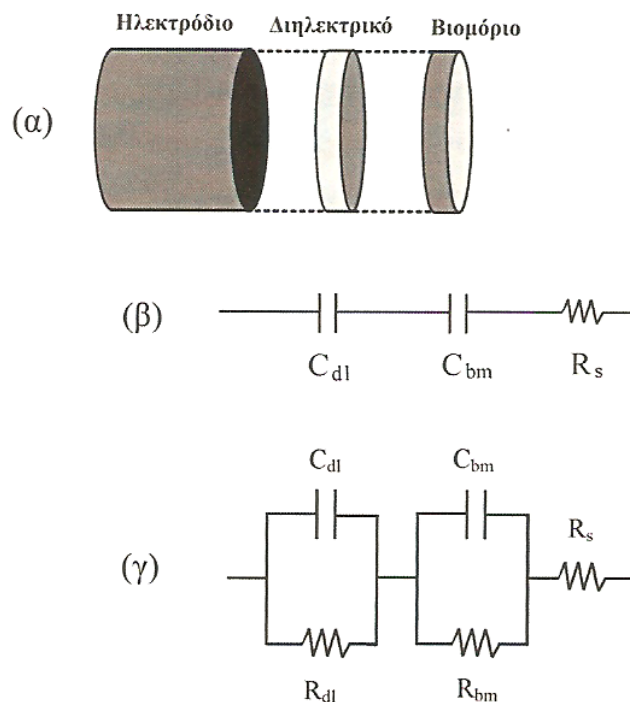
Η διηλεκτρική σταθερά πρέπει ακόμα να πληρεί τις εξής προϋποθέσεις, προκειμένου να προκύψει ένας επιτυχής βιοαισθητήρας:

- να είναι δυσδιάλυτη σε υδατικό περιβάλλον
- να έχει κατάλληλη διηλεκτρική συμπεριφορά
- να είναι συμπαγής (χωρίς οπές, οι οποίες βραχυκυκλώνουν το σύστημα)
- να έχει ικανοποιητική μηχανική αντοχή και
- να φέρει κατάλληλες δραστικές ομάδες (π.χ. $-NH_2$, $-OH$, $-COOH$) για την ακινητοποίηση του βιουποδοχέα ή κατάλληλη διαμόρφωση (πλέγμα πολυμερούς) για τη φυσική παγίδευση αυτού.

Η διηλεκτρική σταθερά συνήθως περιγράφεται ως στοιχείο σταθερής φάσης, μαθηματικά ίσο με: $CPE = (1/Q)^{-1} (j\omega)^{-n}$, όπου $j=(-1)^{1/2}$ Η CPE όπως το ορίσαμε στην § 2.8. Το στοιχείο CPE εκφράζει την απόκλιση της χωρητικής συμπεριφοράς της στιβάδας ως προς αυτή ενός ιδανικού πυκνωτή, η οποία οφείλεται στην ανομοιογένεια της επιφάνειας του ηλεκτροδίου. Αν και η φυσική υπόσταση του στοιχείου σταθερής φάσης δεν είναι σαφής, αυτό χρησιμοποιείται ευρέως για την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων σε ένα ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα. Στην πράξη, η παρουσία του στοιχείου σταθερής φάσης αντί ενός πυκνωτή σημαίνει ότι η παρατηρούμενη

χωρητικότητα του συστήματος εξαρτάται από τη συχνότητα και εκφράζεται συναρτήσει αυτής.

Η διηλεκτρική συμπεριφορά του ακινητοποιημένου βιομορίου είναι μια ακόμα σημαντική παράμετρος στην ανάπτυξη των βιοαισθητήρων εμπέδησης. Τα πρωτεϊνικά μόρια που βρίσκονται κάτω από ένα ηλεκτρικό πεδίο συμπεριφέρονται σα διηλεκτρικά υλικά, με διηλεκτρική σταθερά ~ 20 . Ωστόσο, τα πρωτεϊνικά μόρια δεν έχουν κατάλληλο διηλεκτρικό χαρακτήρα, λόγω της κίνησης ιόντων και μορίων νερού από το διάλυμα του ηλεκτρολύτη, μέσα και γύρω από αυτά, η οποία προκαλεί «βραχυκύκλωση» του συστήματος. Για την αντιμετώπιση του παραπάνω προβλήματος έχει προταθεί η κάλυψη της βιοστιβάδας με μη αγώγιμα πολυμερή, όπως για παράδειγμα πολυαιθυλενογλυκόλη, ωστόσο η χρήση των πολυμερών αυτών έχει αποδειχθεί αναποτελεσματική, αφού μπλοκάρει επίσης και τις ενεργές ομάδες (αντιγονικές περιοχές) των βιομορίων.



Σχήμα 4.2. Αναπαράσταση χωρητικού βιοαισθητήρα (α) και τα ισοδύναμα ηλεκτρικά κυκλώματα στην περίπτωση ιδανικής (β) και μη ιδανικής (γ) συμπεριφοράς. Εφόσον όλο το ρεύμα περνά μέσα από την αντίσταση του διαλύματος του ηλεκτρολύτη, η αντίσταση αυτή συνδέεται σε σειρά με το υπόλοιπο κύκλωμα.

Σύμφωνα με τα παραπάνω, οι αποκλίσεις που παρατηρούνται στη χωρητική συμπεριφορά του ηλεκτροχημικού πυκνωτή της διηλεκτρικής διπλοστιβάδας (C_{dl}) και του ηλεκτροχημικού πυκνωτή του βιομορίου (C_{bm}), ως προς την ιδανική συμπεριφορά ενός πυκνωτή, μπορούν να απεικονιστούν με την εισαγωγή μιας ωμικής αντίστασης παράλληλα συνδεδεμένης σε κάθε ηλεκτροχημικό πυκνωτή, όπως φαίνεται στο Σχήμα 4.2γ. Σε αυτήν την περίπτωση, αντί της χωρητικότητας συνιστάται η μέτρηση της εμπέδησης (συνολική ωμική και χωρητική αντίσταση στην κίνηση ενός φορτίου κατά μήκος του κυκλώματος) της διεπιφάνειας ηλεκτροδίου/ηλεκτρολύτη.

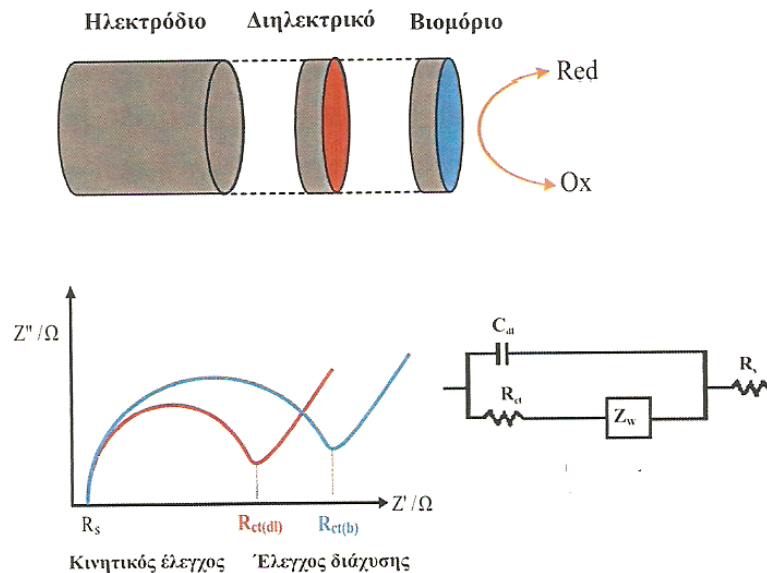
4.3. ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΕΜΠΕΔΗΣΙΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ

Με βάση τη φύση του μετρούμενου σήματος, οι εμπεδησιομετρικοί βιοαισθητήρες μπορούν να ταξινομηθούν στις εξής δύο βασικές κατηγορίες:

(α) στους χωρητικούς (capacitive) αισθητήρες, όπου η επιφάνεια του ηλεκτροδίου είναι πλήρως καλυμμένη από τη διηλεκτρική στιβάδα και ολόκληρη η συγκρότηση του αισθητήρα συμπεριφέρεται σα μονωτής. Η μεταβολή του χωρητικού ρεύματος μετρείται υπό την επίδραση μιας ημιτονικής τάσης μικρής έντασης και σε χαμηλές συχνότητες διέγερσης συνήθως 10 – 100 Hz. Στους αισθητήρες αυτού του τύπου οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων αναμένεται να προκαλέσουν μείωση της μετρούμενης χωρητικότητας ή αντίστοιχα αύξηση της εμπέδησης, αφού τα λιγότερο πολικά μόρια αντικαθιστούν τα πολικά μόρια νερού στη διεπιφάνεια ηλεκτροδίου/ηλεκτρολύτη. Επιπλέον, όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη παράγραφο, η αλληλεπίδραση μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων (π.χ. σύζευξη αντισώματος – αντιγόνου) αυξάνει το πάχος της βιοχημικής στιβάδας και κατ'επέκταση την απόσταση μεταξύ των δύο οπλισμών του ηλεκτροχημικού πυκνωτή (ηλεκτρόδιο εργασίας – ηλεκτρολύτης).

(β) στους φαρανταϊκούς (faradic) εμπεδησιομετρικούς βιοαισθητήρες, όπου η επιφάνεια του ηλεκτροδίου είναι μερικώς ή πλήρως καλυμμένη από μια μη μονωτική στιβάδα ή μερικώς καλυμμένη από μια μονωτική στιβάδα. Στην περίπτωση αυτή, η επιφάνεια του ηλεκτροδίου καταλύει την οξειδωση ή την αναγωγή ενός οξειδοαναγωγικού ζεύγους που υπάρχει στο μετρούμενο διάλυμα. Στους φαρανταϊκούς αισθητήρες η μετρούμενη παράμετρος είναι η αντίσταση μεταφοράς φορτίου, δηλαδή το

πραγματικό μέρος της εμπέδησης σε χαμηλές τιμές συχνότητας, συνήθως 0,1–1,0 Hz. Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ πρωτεϊνικών μορίων προκαλούν αύξηση της τιμής της αντίστασης μεταφοράς φορτίου, καθώς η φαρανταϊκή αντίδραση παρεμποδίζεται όλο και περισσότερο, όσο η επιφάνεια του ηλεκτροδίου που καταλύει την οξειδοαναγωγική αντίδραση καλύπτεται από τα πρωτεϊνικά μόρια (Σχήμα 4.3). Γενικά, οι φαρανταϊκοί εμπεδησιομετρικοί βιοαισθητήρες παρουσιάζουν υψηλότερη ευαισθησία σε σχέση με τους χωρητικούς, ωστόσο, τα σωματίδια του οξειδοαναγωγικού ζεύγους ενδέχεται να μειώσουν τη σταθερότητα και τη δραστικότητα της ενεργής επιφάνειας του ηλεκτροδίου.



Σχήμα 4.3. Αναπαράσταση φαρανταϊκού εμπεδησιομετρικού βιοαισθητήρα, το ισοδύναμο κύκλωμα και η αύξηση της αντίστασης μεταφοράς φορτίου κατά την πρόσδεση των βιομορίων.

Όπως αναφέρθηκε και στη θεωρία της φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης, δύο σημαντικές παράμετροι που επηρεάζουν τις μετρήσεις και ακολούθως την απόδοση

των εμπεδησιομετρικών βιοαισθητήρων είναι η διαφορά δυναμικού (dc) που εφαρμόζεται στο ηλεκτρόδιο εργασίας και η τιμή της συχνότητας (ή η περιοχή συχνοτήτων) που πραγματοποιούνται οι μετρήσεις. Τυπικά, η μέτρηση της εμπέδησης της διεπιφάνειας ηλεκτροδίου/ηλεκτρολύτη μπορεί να πραγματοποιηθεί σε μεγάλο εύρος τιμών ηλεκτρικής τάσης. Ωστόσο, τόσο ο σχηματισμός των συμπλόκων μεταξύ αντισωμάτων και αντιγόνων, όσο και ο προσανατολισμός αυτών στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου επηρεάζονται από την τιμή της εφαρμοζόμενης ηλεκτρικής τάσης, αφού οι πρωτεΐνες είναι φορτισμένα σωματίδια. Όσον αφορά στις εφαρμοζόμενες συχνότητες, έχει ήδη αναφερθεί (§ 2.4.2, σελ. 32) ότι σε πολύ χαμηλές συχνότητες ($f < 1$ mHz) οι μετρήσεις είναι χρονοβόρες και λιγότερο αξιόπιστες, ενώ σε πολύ υψηλές συχνότητες ($f > 1$ MHz) η επαγωγή του ηλεκτροχημικού στοιχείου και των καλωδίων σύνδεσης συνεισφέρουν στο φάσμα εμπέδησης. Συνεπώς, το τμήμα των φασμάτων εμπέδησης που ελέγχεται κυρίως από τις επιφανειακές ιδιότητες των τροποποιημένων ηλεκτροδίων βρίσκεται στην περιοχή συχνοτήτων από 100 kHz έως 0,01 Hz.

Η σύνδεση μεταξύ αντιγόνου – αντισώματος είναι πολύ ισχυρή με αποτέλεσμα, στις περισσότερες περιπτώσεις να μην είναι δυνατή η επαναχρησιμοποίηση των βιοαισθητήρων. Οι διαδικασίες αναγέννησης της ενεργής τους επιφάνειας (δηλαδή λύση του συμπλόκου αντισώματος – αντιγόνου) περιλαμβάνουν τη χρήση ρυθμιστικών διαλυμάτων χαμηλού ($< 3,0$) ή υψηλού ($> 9,0$) pH, υψηλής ιοντικής ισχύς ή μη πολικών υδατοδιαλυτών διαλυτών, τα οποία κατά κανόνα μειώνουν τη δραστηριότητα της ακινητοποιημένης βιοστιβάδας και τη σταθερότητα της εσωτερικής (π.χ. διηλεκτρικής) στιβάδας.

Γενικά, οι εμπεδησιομετρικοί βιοαισθητήρες έχουν χαμηλά όρια ανίχνευσης, αν και για παρόμοιους τύπους βιοαισθητήρων οι αναφερόμενες τιμές στη βιβλιογραφία διαφέρουν σημαντικά. Αυτή η απόκλιση οφείλεται εν μέρει στο μοριακό βάρος (όγκος) των βιομορίων-στόχων και στις διαφορετικές σταθερές σύνδεσης (k_f) μεταξύ των υπό μελέτη ανοσοχημικών ζευγών [Προδρομίδης, 2010].

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

- Anema, S.G., Lee, S. K., Klostermeyer, H., «Effect of pH at heat treatment on the hydrolysis of k-casein and the gelation of skim milk by chymosin», *Food Science and Technology*, **2007**, 40, 99-106.
- Andrén A., «Rennets and coagulants», In *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Eds., Academic Press, San Diego, **2002**, 281–286.
- Bringe, N.A., Kinsella, J.E., «Inhibition of Chymosin and the Coagulation of Para-Casein Micelles by Anions», *J.Dairy Sci.*, **1986**, 69, 965–970.
- Creamer, L. K., Plowman, J.E., Liddell, J., Smith, M. H., Hill, J. P., «Micelle Stability: k-Casein Structure and Function», *J. Dairy Sci.*, **1998**, 81, 3004–3012.
- Dalgleish, D.G., «Casein micelles as colloids. Surface structures and stabilities», *J. Dairy Sci.*, **1998**, 81, 3013–3018.
- Dalgleish, D.G., Spagnuolo, P.A., Goff, H. D., «A possible structure of the casein micelle based on the high-resolution field emission-scanning electron microscopy», *Int. Dairy J.*, **2004**, 14, 1025–1031.
- Famelart, M.H., Graet, Y.L., Raulot, K., «Casein micelle dispersions into water, NaCl and CaCl₂: physicochemical characteristics of micelles and rennet coagulation», *Int Dairy J.*, **1999**, 9, 293–297.
- Farrell, H.M., Malin, E.L., Brown, E. M., Qi, P.X., «Casein micelle structure. What can be learned from milk synthesis and structural biology?», *Colloid Interface Sci.*, **2006**, 11, 135–147.
- Farrell, H.M., «Models for Casein Micelle Formation», *J. Dairy Sci.*, **1973**, 56, 1995–2006.
- Fox, P.F., Mulvihill, D.M., «Milk proteins: molecular, colloidal and functional properties», *J. Dairy Sci.*, **1982**, 49, 679–693.

- Gebhardt, R., Doster, W., Friedrich, J., Kulozik, U., «Size distribution of pressure-decomposed casein micelles studied by dynamic light scattering and AFM», *Eur. Biophys J.*, **2006**, 35, 503–509.
- Groves, M.L., Dower, H.J., Farrell, H.M., «Reexamination of the polymeric distributions of casein isolated from bovine milk», *J. Protein Chem.*, **1992**, 11, 21–28.
- Horne, D. S., «Caseins, micellar structure», In *Encyclopedia of Dairy Sciences*, Eds., Academic Press, San Diego, **2002**, 1902–1909.
- Holland, J. W., Deeth, H. C., Alewood, P. F., «Proteomic analysis of κ-casein micro-heterogeneity», *Proteomics*, **2004**, 4, 743–752.
- Irigoyen, A.; Izco, J.M.; Ibanez, F.C.; Torre, P., «Influence of rennet milk-clotting activity on the proteolytic and sensory characteristics of an bovine cheese», *Food Chem.*, **2001**, 72, 137–144.
- de Kruif, C.G., «Casein micelle interactions», *Int. Dairy J.*, **1999**, 9 183–188.
- Laporte, M.F., Martel, R., Paquin, P., «The near-infrared optic probe for monitoring rennet coagulation in cow's milk», *Int Dairy Journal*, **1998**, 8, 659–666.
- Larsson, K.I.; Andrén, A., «Affinity between chymosin and individual caseins at varying pH-values», *Int. Dairy J.* **1997**, 7, 615–618.
- Larsson, K.I.; Andrén, A., «Interactions between chymosin and individual or micellar caseins», *Int. Dairy J.* **1999**, 9, 381–382.
- Lagaude, A., Fernandez L., Cuq J., Marchesseau S., «Characterization of curd formation during the rennet coagulation of milk by an optical microscopic method», *Int. Dairy J.*, **2004**, 14, 1033–1039.
- Lucey, J.A., «Rennet coagulation of milk», In *Encyclopedia of Dairy Sciences*; Eds.; Academic Press: San Diego, **2002**, 286–293.
- Martin, A.H.; Goff, H.D.; Smith, A.; Dalgleish, D.G., «Immobilization of casein micelles for probing their structure and interactions with polysaccharides using scanning electron microscopy (SEM)», *Food Hydrocol.* **2006**, 20, 817–824.
- McMahon, D.J.; Brown, R.J., «Composition, structure and integrity of casein micelles: A review», *J. Dairy Sci.* **1984**, 67, 499–512.

- McMahon, D.J.; Brown, R.J., «Rethinking casein micelle structure using electron microscopy», *J. Dairy Sci.* **1998**, 81, 2985–2993.
- Nájera, A.I.; de Renobales, M., Barron, L., «Effect of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentration on the rennet clotting properties of milk, a multifactorial study», *J.R. Food Chem.*, **2003**, 80, 345–352.
- Reid, J. R., Coolbear, T., Ayers, J.S., Coolbear, K.P., «The action of chymosin on κ-casein and its macropeptide: Effect of pH and analysis of products of secondary hydrolysis», *Int. Dairy J.*, **1997**, 7, 559–569.
- de Roos, A., Geurts, T.J., Walstra, P., «The association of chymosin with artificial casein micelles», *Int. Dairy J.*, **2000**, 10, 225–232.
- Panouille, M., Nicolai, T., Benyahia, L., Durand, D., «Aggregation and gelation of casein sub-micelles», *Food colloids:interactions, microstructure and processing*, **2005**, 194–207.
- Qi, P.X., «Casein micelle structure: the past and the present», *Lait*, **2007**, 87, 363–383.
- Rasmussen, L.K., Hojpur, P., Petersen, T.E., «The multimeric structure and disulfide-bonding pattern of bovine κ-casein», *Eur. J. Biochem*, **1992**, 207, 215–222.
- Semo, E., Kesselman, E., Danino, D., Livney, Y.D., «Casein micelle as a natural nano-capsular vehicle for nutraceuticals», *Food Hydrocolloids*, **2007**, 21, 936–942.
- Silva, S. V., Allmere, T., Malcata, F.X., Andren A., «Comparative studies on the gelling properties of cardosins extracted from *Gynara cardunculus* and chymosin on cow's skim milk», *Int. Dairy J.*, **2003**, 13, 559–564.
- Slattery, C. W., «Review: Casein Micelle Structure; An Examination of Models», *J. Dairy Science*, **1976**, 59, 1547–1556.
- Swaisgood, H., «Primary sequence of kappa-casein», *J. Dairy Science*, **1974**, 58, 583–592.
- Swaisgood, H., Brunner, J., Lillevik, H., «Physical parameters of κ-casein from cows' milk», *Biochem.*, **1964**, 3, 1616–1623.

- Turhan, M., Mutlu, M., «Kinetics of k-casein/immobilized chymosin hydrolysis», *Enzyme and Microbial Tech.*, **1998**, 22, 342–347.
- Ανυφαντάκης, Μ.,Ε., *Μέθοδοι Εξετάσεων του Γάλακτος και των Προϊόντων του*, **1992**, 87–88, Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Πειραιάς.
- Ηλιόπουλος, Γ., *Χημεία τροφίμων*, **1997**, 3, 182–184, Ο.Ε.Δ.Β., Αθήνα.
- Κεχαγιάς, Χ., *Τεχνολογία γάλακτος & Γαλακτοκομικών προϊόντων*, **1997**, 2, 18–26, Τ.Ε.Ι., Αθήνα.
- Κοντομηνάς, Μ., Βουδούρης Ε., *Χημεία Τροφίμων*, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- Προδρομίδης, Μ., *Ηλεκτροχημικοί Αισθητήρες και Βιοαισθητήρες*, **2010**, Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων.
- Τσοχατζής, Ε., *Μελέτη και διαχωρισμός πρωτεϊνών του γάλακτος και έλεγχος νοθείας με πρωτεΐνες σόγιας και άλατα καζεϊνών*, Πτυχιακή εργασία, **2007**, Αριστοτέλιο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.

Ηλεκτρονικές τοποθεσίες

- [1] www.fetaelassonas.gr/feta-tyri/istoria
- [2] <http://medlab.cs.uoi.gr/dairyzoom/kefalaio011.htm>
- [3] <http://www.mednutrition.gr/content/view/818/147>
- [4] <http://www.bioren.biz>

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΕΜΠΕΔΗΣΙΟΜΕΤΡΙΚΩΝ ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΠΗΚΤΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ ΤΗΣ ΠΥΤΙΑΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται η ανάπτυξη ενός βιοαισθητήρα για τον προσδιορισμό της πηκτικής δύναμης της πυτιάς. Η κατασκευή των βιοαισθητήρων βασίστηκε στην ακινητοποίηση συνθετικών μικκυλίων καζεΐνης (ACM, artificial casein micelles) πάνω στην επιφάνεια ηλεκτροδίων χρυσού, που αρχικά τροποποιήθηκαν με αυτοδιατασσόμενες μονοστιβάδες διαφόρων θειολών (self-assembled monolayers, SAMs) (θειοκτικό οξύ, δις-(N-υδροξυηλεκτριμιδυλο)-διθειοδιπροπιονικός εστέρας και κυστεαμίνη) και στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα πυτιάς. Η μέθοδος βασίζεται στη μεταβολή της αντίστασης μεταφοράς φορτίου (R_{ct} , charge-transfer resistance) της διεπιφάνειας των ηλεκτροδίων Au/θειόλη/ACM με το διάλυμα του ηλεκτρολύτη, παρουσία του οξειδοαναγωγικού ζεύγους σιδηρι-/σιδηροκυανιούχων ιόντων. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των ακινητοποιημένων ACM με τη χυμοσίνη είχε ως αποτέλεσμα την αποδόμηση των αρνητικά φορτισμένων μικκυλίων και τη μετατροπή τους σε ουδέτερες βιοδομές, οδηγώντας έτσι σε αύξηση της ροής του οξειδοαναγωγικού ζεύγους από το διάλυμα του ηλεκτρολύτη στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Η αλληλεπίδραση

αυτή οδηγεί στη μείωση της R_{ct} . Οι παράμετροι που βελτιστοποιήθηκαν αφορούσαν στη συγκέντρωση των μικκυλίων, στο χρόνο αντίδρασης, στη συγκέντρωση της πυτιάς και στο pH του διαλύματος εργασίας. Πέραν των πειραμάτων φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS) πραγματοποιήθηκαν και πειράματα κυκλικής βολταμετρίας (Cyclic Voltammetry, CV), φασματοσκοπίας υπερύθρου (Fourier Transform, Infrared Spectroscopy FT-IR), μικροσκοπία ατομικής δύναμης (Atomic Force Microscopy, AFM), μικροσκοπία ηλεκτρονιακής σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) και μικροζυγού κρυστάλλου χαλαζία (Quartz Crystal Microbalance, QCM), πριν και μετά την αντίδραση με πυτιά. Τέλος, οι παραπάνω βιοαισθητήρες χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της πηκτικής δύναμης της πυτιάς σε εμπορικά σκευάσματα στερεής ή υγρής πυτιάς. Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν με την προτεινόμενη μέθοδο ως προς αυτά της μεθόδου αναφοράς, η οποία βασίζεται στη οπτική παρατήρηση της πήξης του γάλακτος, προκύπτει ότι η μεταβολή της αντίστασης μεταφοράς φορτίου είναι ανάλογη της πηκτικής δύναμης της πυτιάς.

1.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όπως έχει αναφερθεί και στο θεωρητικό μέρος (σελ. 5), η καζεΐνη (CN) είναι φωσφοπρωτεΐνη που βρίσκεται στο γάλα και αντιστοιχεί περίπου στο 80% των συνολικών πρωτεϊνών. Τα βασικά κλάσματα της καζεΐνης στο αγελαδινό γάλα είναι η α_{s1} , η α_{s2} , η β και η κ -καζεΐνη, τα οποία περιέχονται σε ποσοστό 38, 10, 40 και 12% αντίστοιχα [Qi, 2007]. Τα κλάσματα αυτά συνδέονται με σημαντικές ποσότητες φωσφορικού ασβεστίου, σχηματίζοντας έτσι περίπου σφαιρικές κολλοειδείς δομές με διάμετρο από 50 έως 500 nm [Fox, 2003]. Το χαρακτηριστικό γνώρισμα όλων των καζεϊνών του γάλακτος είναι η χαμηλή διαλυτότητά τους σε pH 4,6.

Η πυτιά είναι ένα φυσικό σύμπλεγμα ενζύμων που παράγεται στο στομάχι των θηλαστικών ζώων και χρησιμοποιείται ευρέως στην παρασκευή τυριού από γάλα [Lucey, 2002]. Η πηκτική της ικανότητα βασίζεται στην ιδιότητά της να προκαλεί αποσταθεροποίηση των καζεϊνικών μικκυλίων. Το ένζυμο που ευθύνεται για την ιδιότητα αυτή είναι η χυμοσίνη (pI \approx 4,6). Η ακριβής ποσότητα της χυμοσίνης εξαρτάται τόσο από

την προέλευση της πυτιάς (αγελάδα, πρόβατο, κατσίκι, κοτόπουλο, καμήλα, ή άλλες μη ζωικές πηγές), όσο και από την ηλικία του ζώου [Guinee, 1992]. Οι συνήθεις αναλογίες χυμοσίνης και πεινίνης είναι 70% και 30% αντίστοιχα.

Η πήξη του γάλακτος προς σχηματισμό τυριού είναι δυνατό να διαχωριστεί σε δύο στάδια. Στο πρώτο στάδιο πραγματοποιείται η ενζυμική υδρόλυση της κ-καζεΐνης και στο δεύτερο στάδιο η συσσωμάτωση των καζεϊνικών μικκυλίων. Τα παραπάνω στάδια δεν είναι απόλυτα διακριτά μετά την πήξη του γάλακτος και συνήθως, κυρίως κατά το αρχικό στάδιο της πήξης, λαμβάνουν χώρα παράλληλα. Κατά τη διάρκεια του πρώτου σταδίου, η χυμοσίνη υδρολύει το δεσμό Phe105–Met106 στην κ-καζεΐνη οδηγώντας έτσι στο σχηματισμό του διαλυτού γλυκομακροπεπτιδίου (GMP, κατάλοιπα 106–169), το οποίο απομακρύνεται στον ορό του γάλακτος, και του αδιάλυτου τμήματος (para κ-καζεΐνη), το οποίο παραμένει προσδεμένο στα καζεϊνικά μικκύλια και είναι θετικά φορτισμένο στο φυσιολογικό pH του γάλακτος ($pI > 7$) [Qi, 2007 – Fox, 2003 – Lycey, 2002 – Larsson, 1999]. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του αρνητικού φορτίου των μικκυλίων και συνεπώς και των ηλεκτροστατικής φύσης απωστικών δυνάμεων, οι οποίες συγκρατούν τα μικκύλια στο διάλυμα. Ως συνέπεια, τα καζεϊνικά μικκύλια πλησιάζουν μεταξύ τους και συσσωματώνονται. Η φύση των δυνάμεων που λαμβάνουν χώρα δεν είναι πλήρως κατανοητή, παρόλα αυτά πιστεύεται ότι μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται συζεύξεις μεταξύ γεφυρών ασβεστίου, δυνάμεις van der Waals και υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις.

Ο προσδιορισμός της πηκτικής δύναμης της πυτιάς αποτελεί μια παράμετρο με σημαντικό επιστημονικό, τεχνολογικό και εμπορικό ενδιαφέρον. Η πρώτη δημοσίευση σχετικά με τον προσδιορισμό της πηκτικής δύναμης της πυτιάς έγινε στα τέλη του 19^{ου} αιώνα από τον Soxlet και βασίστηκε στην οπτική παρατήρηση της πήξης του γάλακτος [Soxlet, 1877]. Από τότε, αναπτύχθηκαν διάφορες μέθοδοι που σχετίζονταν με την οπτική παρατήρηση της πήξης του γάλακτος [Sommer, 1935 – Kunitz, 1935 – Berridge, 1952]. Αν και οι παραπάνω μέθοδοι χρησιμοποιούνται ως σήμερα σε ελέγχους ρουτίνας μειονεκτούν ως προς την ακρίβειά τους. Αυτό οφείλεται στο ότι η οπτική παρατήρηση εμπεριέχει ένα τυχαίο σφάλμα, ειδικά όταν πραγματοποιείται σε διαφορετικά εργαστήρια και από διαφορετικούς παρατηρητές. Ορισμένα από αυτά τα μειονεκτήματα ξεπεράστηκαν με τη χρήση της μεθόδου IDF/ISO Standard ISO

11815/IDF 157:2007, που χρησιμοποιεί μια πυτιά πηκτικής δύναμης $1000 \text{ IMCU} \cdot \text{g}^{-1}$ (IMCU, international milk clotting units, διεθνείς μονάδες πηκτικής δύναμης), ως υλικό αναφοράς [**Joint IDF, 2007**].

Επιπλέον έχουν αναφερθεί μέθοδοι που στηρίζονται στη μέτρηση του ιξώδους του γάλακτος μετά την προσθήκη της πυτιάς [**Scott-Blair, 1963 – Richardson, 1971 – Kopelman, 1976**], φασματοφωτομετρικές μέθοδοι, που στηρίζονται στη μέτρηση της απορρόφησης των προϊόντων της αντίδρασης με την πυτιά [**Friedenthal, 1981**], καθώς και άλλες μέθοδοι που βασίζονται στη μέτρηση της ηλεκτρικής αγωγιμότητας [**Green, 1977**] ή της θολερότητας [**Robitaille, 2004**]. Το 1980 αναπτύχθηκε, για πρώτη φορά, μια συσκευή με την εμπορική ονομασία Formagraph [**Foss, 1980 – McMahon, 1982**]. Η αρχή λειτουργίας της συσκευής αυτής στηρίζεται στην κίνηση ενός μικρού εκκρεμούς, που εμβαπτίζεται σε αναδευόμενα δείγματα γάλακτος, στα οποία έχει γίνει προσθήκη πυτιάς. Η μεταβολή της θέσης του εκκρεμούς κατά τη διαδικασία της πήξης του γάλακτος προσδιορίζεται από την εκτροπή του φωτός, που εκπέμπεται από μια πηγή. Στη συνέχεια η συσκευή Formagraph αντικαταστάθηκε από τον αναλυτή Optigraph (Ysebaert, France) [**Ιστότοπος 1**], η αρχή λειτουργίας του οποίου βασίζεται στη μέτρηση της έντασης του φωτός, το οποίο διέρχεται μέσα από ένα δείγμα γάλακτος κατά τη διάρκεια της πήξης. Σύμφωνα με μια πρόσφατη μελέτη τα αποτελέσματα που λαμβάνονται από τις παραπάνω συσκευές βρίσκονται σε καλή συμφωνία μεταξύ τους [**Kubarsepp, 2005**].

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η ανάπτυξη μιας οικονομικής μεθόδου, εύκολης στη χρήση, που να στηρίζεται στη σύγχρονη τεχνολογία των βιοασθητήρων. Για το λόγο αυτό τα παρασκευασθέντα μικκύλια καζεΐνης ακινητοποιήθηκαν πάνω σε ηλεκτρόδια χρυσού, τα οποία είχαν τροποποιηθεί με αυτοδιατασσόμενες μονοστιβάδες θειολών. Η πηκτική δύναμη της πυτιάς υπολογίστηκε με μετρήσεις φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης. Ως μέτρο για τον υπολογισμό της πηκτικής δύναμης της πυτιάς χρησιμοποιήθηκε η αντίσταση μεταφοράς φορτίου.

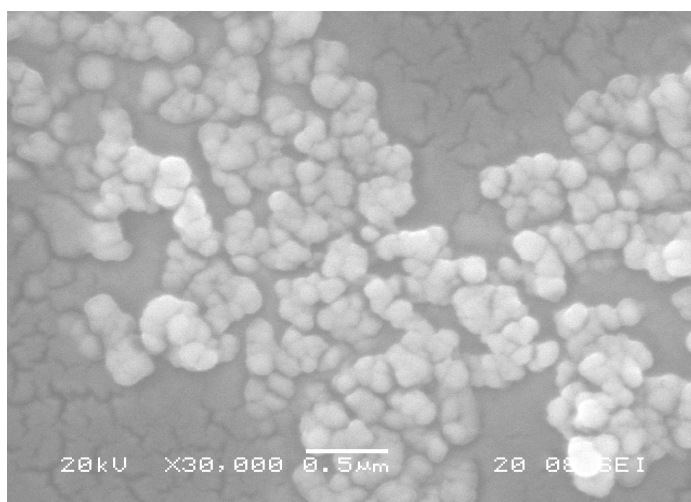
1.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1.2.1. Αντιδραστήρια

Τα συνθετικά μικκύλια που χρησιμοποιήθηκαν για την κατασκευή των βιοαισθητήρων παρασκευάστηκαν σύμφωνα με το πρωτόκολλο που περιγράφεται στην παράγραφο 1.2.2 (σελ.109). Το καζεϊνικό νάτριο, το θειοκτικό οξύ (TA \geq 99,0%), ο δις-(N-υδροξυηλεκτριμιδυλο) -διθειοδιπροπιονικός εστέρας (DTSP \geq 99,0%), η κυστεαμίνη (CYS \geq 99,0%), η λυσίνη (\geq 99,0%), και η γλουταραλδεΐδη (GA, ~25% v/v σε νερό, η οποία φυλάσσεται σε σκοτεινόχρωμα φιαλίδια στους 4 °C, υπό ατμόσφαιρα αργού) αγοράστηκαν από την εταιρία Sigma. Το N-αιθυλο-N'-(3-διμεθυλοαμινοπροπυλο)καρβοδιϊμίδιο (EDC \geq 99,0%), το N-υδροξυηλεκτριμιδίο (NHS \geq 97,9%), το ιμιδαζόλιο (99,0%), η δ-λακτόνη του D-(+)-γλυκονικού οξέος (\geq 99,0%), η απόλυτη αιθανόλη (95%), το σιδηροκυανιούχο κάλιο (99,0%), και το σιδηρικού κυανιούχο κάλιο (99,0%), ήταν προϊόντα της εταιρίας Merk. Όλα τα υπόλοιπα αντιδραστήρια ήταν προϊόντα των εταιριών Merk και Sigma. Καθόλη τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε δισαπασταγμένο νερό. Τα διαλύματα της πυτιάς παρασκευάζονταν λίγο πριν τη χρησιμοποίησή τους με διαλυτοποίηση ή αραίωση κατάλληλων ποσοτήτων στερεής ή υγρής πυτιάς, αγελαδινής ή/και μοσχαρίσιας (Ηπειρωτοπούλα, Hansen) καθώς και μικροβιακής προέλευσης (Danisco), σε διάλυμα 20 mM ιμιδαζολίου, pH 5 – 6,5. Τα δείγματα της υγρής πυτιάς (Hansen, Danisco) αναμίχθηκαν με ισόποσους όγκους 40 mM ιμιδαζολίου, pH 5, το οποίο ρυθμίστηκε με 0,1 N υδροχλωρικό οξύ. Ως διάλυμα έκπλυσης και παρακαταθήκης κατά την ακινητοποίηση των μικκυλίων στις τροποποιημένες επιφάνειες χρυσού, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 20 mM ιμιδαζολίου pH 6,5. Η ενεργοποίηση των αμινομάδων στα τροποποιημένα ηλεκτρόδια χρυσού με κυστεαμίνη έγινε με διάλυμα γλουταραλδεΐδης 2,5% v/v σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM φωσφορικών pH 7.

1.2.2. Παρασκευή συνθετικών μικκυλίων καζεΐνης

Τα συνθετικά μικκύλια της καζεΐνης (ACM) παρασκευάζονταν κάθε εβδομάδα σύμφωνα με μια πατενταρισμένη μέθοδο [Melachouris, 1992]. Συγκεκριμένα, 6,3 g καζεϊνικού νατρίου διαλύθηκαν, αρχικά, σε 50 mL δισαπεσταγμένου νερού σε θερμοκρασία 55 °C. Ακολούθησε ανάδευση για περίπου 6 – 7 ώρες, μέχρι του σχηματισμού ενός ομοιογενούς θολού διαλύματος. Στη συνέχεια, αφού η θερμοκρασία του διαλύματος έφτασε τους 37 °C προστέθηκαν αργά 4,58 mL υδατικού διαλύματος 0,87 mM CaCl₂ υπό συνεχή ανάδευση σε διάστημα > 20 λεπτά. Κατόπιν ακολούθησε στάγδην προσθήκη 2,98 mL υδατικού διαλύματος 17,1% w/v K₂HPO₄ και 1,8% w/v NaOH υπό συνεχή ανάδευση για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 6 λεπτών. Το μείγμα παρέμεινε υπό συνεχή ανάδευση για 3 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ πριν από τη χρήση του αφέθηκε σε ηρεμία για τουλάχιστον 12 ώρες στους 4 °C. Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφέρουμε ότι το μέγεθος των συνθετικών μικκυλίων της καζεΐνης εξαρτάται τόσο από το χρόνο προσθήκης των αντιδραστηρίων όσο και από τη σειρά της προσθήκης αυτών [Knoop, 1979]. Τα μικκύλια που παρασκευάστηκαν σύμφωνα με την παραπάνω μέθοδο είχαν μέγεθος περίπου 250 nm, όπως προκύπτει από την παρατήρηση αυτών με μικροσκοπία ηλεκτρονιακής σάρωσης (Σχήμα 1.1).



Σχήμα 1.1. Εικόνα SEM συνθετικών μικκυλίων της καζεΐνης.

1.2.3. Πειραματική διάταξη

Τα πειράματα φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης και κυκλικής βολταμετρίας πραγματοποιήθηκαν με τον ηλεκτροχημικό αναλυτή PGSTAT12/FRA2 (Metrohm Autolab, Eco Chemie BV, Ολλανδία), σε μια κυψελίδα τριών ηλεκτροδίων. Τα ηλεκτρόδια χρυσού χρησιμοποιήθηκαν ως ηλεκτρόδια εργασίας, ενώ ως αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο χρησιμοποιήθηκε ένα σπειροειδές σύρμα λευκοχρύσου. Ως ηλεκτρόδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε ένα ηλεκτρόδιο Ag/AgCl/3 M KCl (IJ Cambia, UK) και εφεξής όλες οι τιμές ηλεκτρικής τάσης αναφέρονται ως προς το ηλεκτρόδιο αυτό.

Η καταγραφή των φασμάτων εμπέδησης πραγματοποιήθηκε στην περιοχή συχνοτήτων από 10^{-1} – 10^5 Hz, με εφαρμογή μιας ημιτονικής διαταραχής 10 mV (rms), πάνω σε τάση συνεχούς ρεύματος +0,200 V. Όλες οι μετρήσεις διεξήχθησαν σε διάλυμα 5 mM σιδηρι-/σιδηροκυανιούχων (1+1 v/v) παρουσία 100 mM KCl σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM ιμιδαζολίου pH 6,5, σε θερμοκρασία δωματίου.

Τα πειράματα FT-IR πραγματοποιήθηκαν με τη χρήση ενός οπτικού φασματοφωτομέτρου εφοδιασμένου με μικροσκόπιο διακριτικής ικανότητας 10 μm (Thermo-Electron) πάνω στις τροποποιημένες επιφάνειες χρυσού. Η τοπογραφία της επιφάνειας των τροποποιημένων επιφανειών χρυσού με τα μικύλλια της καζεΐνης, πριν και μετά την αντίδραση με την πυτιά, πραγματοποιήθηκε με φασματοσκοπία ατομικής δύναμης χρησιμοποιώντας τη διάταξη Nanoscope IIIA της εταιρίας Digital Instruments.

Οι εικόνες SEM πάρθηκαν σε ένα μικροσκόπιο σάρωσης ηλεκτρονίων JEOL JSM – 5600. Τα πειράματα QCM πραγματοποιήθηκαν με κρύσταλλο χαλαζία-χρυσού 9 MHz σε μικροζυγό κρυστάλλου χαλαζία της εταιρίας Maxtek (USA).

1.2.4. Σχηματισμός SAMs και ακινητοποίηση καζεϊνικών μικκυλίων

Τα ηλεκτρόδια χρυσού με ενεργό επιφάνεια 2 mm κατασκευάστηκαν με το εμπορικό kit EasyCon (EasyCon Hellas, Metrohm Autolab). Πριν από τη χρήση τους, τα ηλεκτρόδια λειάνθηκαν με εναιώρημα λεπτόκοκκου Al_2O_3 (μέγεθος κόκκων 0,01 μm) και τοποθετήθηκαν σε λουτρό υπερήχων σε δισαπεσταγμένο ύδωρ για τρία λεπτά. Μετά τη λείανση, οι επιφάνειες χρυσού καθαρίστηκαν με εμβάπτιση σε μείγμα 1+1+5 v/v 25%

$\text{NH}_4\text{OH} + 30\% \text{H}_2\text{O}_2 + \text{H}_2\text{O}$ για δέκα λεπτά, εκπλύθηκαν επιμελώς με διασπασμένο ύδωρ και άνυδρη αιθανόλη και ξηράθηκαν. Η ακινητοποίηση των μικκυλίων της καζεΐνης πραγματοποιήθηκε σε τρεις διαφορετικά τροποποιημένες επιφάνειες χρυσού, όπως περιγράφεται παρακάτω.

Αρχικά τα ηλεκτρόδια χρυσού τροποποιήθηκαν με αυτοδιατασσόμενες στιβάδες θειοκτικού οξέος. Τα ηλεκτρόδια χρυσού εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα 1 mM θειοκτικού οξέος σε καθαρή αιθανόλη σε σκοτεινό θάλαμο για 20 ώρες και σε θερμοκρασία δωματίου. Τα τροποποιημένα ηλεκτρόδια εκπλύθηκαν επιμελώς με αιθανόλη (3×5 min), ξηράθηκαν με ρεύμα αργού και εμβαπτίστηκαν για 15 λεπτά υπό ανάδευση σε μίγμα 0,2 M EDC, 0,05 M NHS, 0,1 M MOPS pH 5 και 0,5 M NaCl, το οποίο παρασκευάζονταν με την ανάμιξη ίσων όγκων των παραπάνω διαλυμάτων πριν από κάθε ενεργοποίηση. Οι ενεργοποιημένες επιφάνειες εκπλένονταν επιμελώς στο ίδιο διάλυμα και εμβαπτιζόνταν σε 1 mL διαλύματος μικκυλίων [αδιάλυτο, 1+1, 1+2, 1+4, 1+8 v/v σε διάλυμα 0,2 M NaCl pH 6,5 και 1+4 v/v σε διάλυμα 0,2 M NaCl pH 5,6] για τουλάχιστον 12 ώρες σε συνθήκες ελεγχόμενης υγρασίας. Η ρύθμιση του pH σε τιμή 5,6 πραγματοποιήθηκε με προσθήκη κατάλληλης ποσότητας δ-λακτόνης του D-(+)-γλυκονικού οξέος.

Η ανάπτυξη αυτοδιατασσόμενων στιβάδων κυστεαμίνης έγινε με εμβάπτιση των ηλεκτροδίων χρυσού σε διάλυμα 10 ή 20 mM κυστεαμίνης σε αιθανόλη για 20 ώρες. Ακολούθησαν επιμελείς εκπλύσεις με αιθανόλη, στη συνέχεια τα ηλεκτρόδια χρυσού ξηράθηκαν με ρεύμα αργού και εμβαπτίστηκαν απευθείας σε απαερωμένο διάλυμα 2,5% v/v γλουταραλδεϋδης σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM φωσφορικών pH 7 για μια ώρα υπό ανάδευση. Στη συνέχεια τα ηλεκτρόδια εκπλύθηκαν αρκετές φορές με το ίδιο ρυθμιστικό διάλυμα για την απομάκρυνση της φυσικά προσροφημένης γλουταραλδεϋδης. Η ακινητοποίηση των καζεϊνικών μικκυλίων πραγματοποιήθηκε επιστάζοντας 1 mL διαλύματος των τελευταίων, με τη βοήθεια ενός πλαστικού σωλήνα, πάνω στην επιφάνεια του χρυσού για τουλάχιστον 12 ώρες σε συνθήκες ελεγχόμενης υγρασίας.

Τέλος, τα ηλεκτρόδια χρυσού τροποποιήθηκαν με αυτοδιατασσόμενες στιβάδες DTSP. Τα ηλεκτρόδια χρυσού εμβαπτίστηκαν σε 2 mM ή 5 mM DTSP σε ακετόνη για 4 ώρες. Τα ηλεκτρόδια εκπλύθηκαν επιμελώς με αιθανόλη και ξηράθηκαν σε ρεύμα αργού. 1 mL διαλύματος καζεϊνικών μικκυλίων [αδιάλυτου και μείγματος 1 + 4 v/v με 0,2 M NaCl,

pH 6,5] ακινητοποιήθηκε με τη βοήθεια ενός πλαστικού σωλήνα πάνω στην επιφάνεια του χρυσού για τουλάχιστον 12 ώρες σε συνθήκες ελεγχόμενης υγρασίας.

Μετά την ακινητοποίηση των μικκυλίων της καζεΐνης σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις τα ηλεκτρόδια εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα 0,1 M λυσίνης, προκειμένου να απενεργοποιηθούν οι εναπομείνασες αμινο-ενεργές ομάδες. Ακολούθησαν εκπλύσεις ($3 \times 10 \text{ min}$) με διάλυμα 20 mM ιμιδαζολίου pH 6,5 για την απομάκρυνση της περίσσειας των φυσικά προσροφημένων μικκυλίων.

Προκειμένου να αυξήσουμε τη σταθερότητα των ακινητοποιημένων μικκυλίων τα ηλεκτρόδια Au/TA/ACM εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα 2,5% v/v γλουταραλδεΐδης σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 6,5 και στη συνέχεια εκπλύθηκαν επιμελώς ($4 \times 10 \text{ min}$) σε 20 mM ιμιδαζολίου, pH 6,5. Η τροποποίηση αυτή αφορά στη διεξαγωγή συγκεκριμένων πειραμάτων βλέπε Σχήμα 1.6 στη σελ. 126.

1.2.5. Πορεία εργασίας – Υπολογισμοί

Για τον προσδιορισμό της πηκτικής δύναμης της πυτιάς οι βιοαισθητήρες εμβαπτίστηκαν σε διαλύματα πυτιάς (0,1 – 0,4% w/v) σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5 – 6,5 για διαφορετικούς χρόνους επώασης, στους 37 °C. Ακολούθησαν εκπλύσεις με διάλυμα 20 mM ιμιδαζολίου pH 5 και στη συνέχεια οι βιοαισθητήρες μεταφέρθηκαν στην κυψελίδα μέτρησης. Όλα τα πειράματα βελτιστοποίησης των παραμέτρων πραγματοποιήθηκαν με το εμπορικό σκεύασμα «Ηπειρωτοπούλα».

Σε όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, η σχετική μεταβολή του σήματος πριν και μετά την αντίδραση των βιοαισθητήρων με την πυτιά, εκφραζόμενη ως $\Delta S (\%) = \{ [R_{ct} (\text{μετά την εμβάπτιση στην πυτιά}) - R_{ct} (\text{πριν την εμβάπτιση στην πυτιά})] / R_{ct} (\text{πριν την εμβάπτιση στην πυτιά}) \} \times 100$, λήφθηκε ως μέτρο της πηκτικής δύναμης της πυτιάς. Αντίστοιχα, η σχετική μεταβολή ($R_{ct}^{\text{Au/thiol/ACM}} / R_{ct}^{\text{Au/thiol}} \times 100$) χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο για την εκτίμηση της ακινητοποίησης των μικκυλίων της καζεΐνης στα ηλεκτρόδια Au/TA, Au/DTSP και Au/CYS. Στα ηλεκτρόδια Au/TA/ACM οι τιμές R_{ct} αντιστοιχούν στο πραγματικό μέρος της εμπέδησης στα 0,1 Hz, αφού η προσομοίωση των αντίστοιχων διαγραμμάτων Nyquist με το πρότυπο κύκλωμα Randles ή άλλα ισοδύναμα ηλεκτρικά κυκλώματα με δύο χρονοσταθερές ($\tau = RC$) δεν ήταν ικανοποιητική. Το γεγονός αυτό

υποδεικνύει ότι η υπό μελέτη διεπιφάνεια είναι πιο πολύπλοκη. Από την άλλη πλευρά, στους βιοαισθητήρες Au/CYS/ACM και Au/DTSP/ACM οι τιμές R_{ct} υπολογίστηκαν με τη βοήθεια του λογισμικού GPES (Eco Chemie) μετά την προσομοίωση των πειραματικών δεδομένων με το κύκλωμα Randles $R_s(Q_{dl}[R_{ct}W])$ [Prodromidis, 2010].

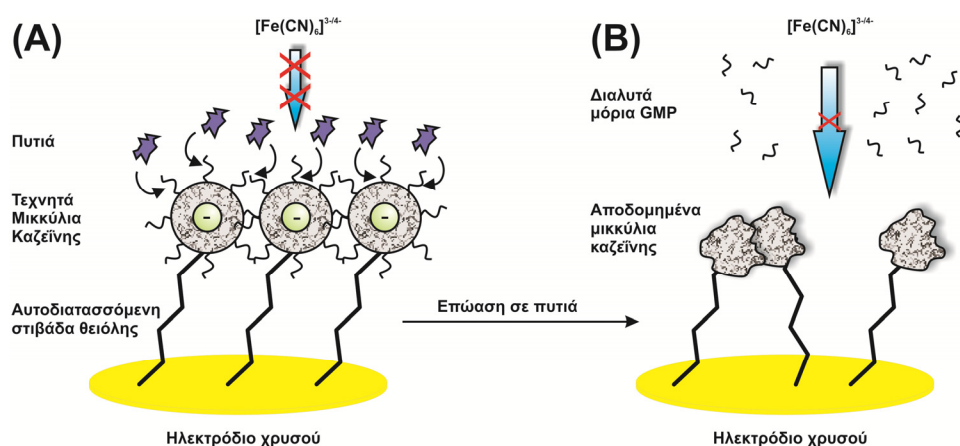
1.2.6. Μέθοδος αναφοράς για τον υπολογισμό της πηκτικής δύναμης της πυτιάς (μέθοδος Berridge)

Ζυγίζονται 120 g σκόνης άπαχου γάλακτος και διαλύονται προσεκτικά σε 1 λίτρο διαλύματος 0,01 M χλωριούχου ασβεστίου. Στη συνέχεια το μείγμα τοποθετείται για 20 ώρες στο ψυγείο. Από το παρασκευασθέν γάλα λαμβάνονται 100 mL δείγματος και μεταφέρονται σε ένα ποτήρι ζέσης, το οποίο τοποθετείται σε υδατόλουτρο στους 35 °C. Στη συνέχεια προστίθενται 5 mL από το διάλυμα της πυτιάς (250 mg/100 mL) και το μίγμα ανακατεύεται προσεκτικά. Αμέσως μετά την προσθήκη της πυτιάς αρχίζει η χρονομέτρηση. Αρχικά το γάλα έχει το φυσιολογικό του ιξώδες και αφήνει ένα συνεχές φιλμ πάνω στη βυθισμένη σπάτουλα. Λίγο πριν την πήξη του γάλακτος το ιξώδες αυξάνεται και αμέσως εμφανίζονται μικροί κόκκοι πηγμένου γάλακτος. Στο σημείο αυτό η χρονομέτρηση διακόπτεται και σημειώνεται ο χρόνος που χρειάστηκε για την πήξη του γάλακτος. Αν ο χρόνος είναι λιγότερος από τέσσερα λεπτά τότε, στην περίπτωση της υγρής πυτιάς, το δείγμα αραιώνεται με απεσταγμένο νερό ώστε 1 mL της αραιωμένης πυτιάς να πήξει 100 mL γάλακτος σε 4 – 6 λεπτά. Στην περίπτωση αυτή το αποτέλεσμα που προκύπτει από την παρακάτω εμπειρική σχέση πολλαπλασιάζεται με το συντελεστή αραιώσης. Αν το δείγμα είναι στερεό, διαλύεται σε απεσταγμένο νερό, έτσι ώστε 1 mL του διαλύματος να πήξει 100 mL γάλακτος στον παραπάνω χρόνο. Η πηκτική δύναμη εκφράζεται υπό μορφή κλάσματος με αριθμητή 1 και παρανομαστή το αποτέλεσμα που προκύπτει από την εμπειρική σχέση.

$$\text{Πηκτική δύναμη} = \frac{[\text{Ποσότητα Γάλακτος (mL)}] \times 2400}{[\text{Ποσότητα Πυτιάς (mL)}] \times [\text{Χρόνος Πήξης (s)}]}$$

1.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η αντίδραση με την πυτιά έχει ως αποτέλεσμα την αποδόμηση των αρνητικά φορτισμένων μικκυλίων (Σχήμα 1.2.A) της καζεΐνης και το σχηματισμό αποδομημένων ουδέτερων δομών. Όσον αφορά στη μετρούμενη ιδιότητα, δηλαδή την αντίσταση μεταφοράς φορτίου, η αντίδραση αυτή έχει ως αποτέλεσμα: (i) την εξουδετέρωση του αρνητικού ηλεκτρικού φορτίου των μικκυλίων μειώνοντας έτσι τις απωστικές δυνάμεις ηλεκτροστατικής φύσεως που αναπτύσσονται μεταξύ αυτών και των αρνητικά φορτισμένων ιόντων του οξειδοαναγωγικού ζεύγους και (ii) τη μερική συσσωμάτωση των μικκυλίων της καζεΐνης (Σχήμα 1.2.B), η οποία οδηγεί στην αύξηση της ελεύθερης επιφάνειας του ηλεκτροδίου.



Σχήμα 1.2. Σχηματική απεικόνιση των ηλεκτροδίων Au/SAM/ACMs πριν και μετά την αντίδραση με πυτιά.

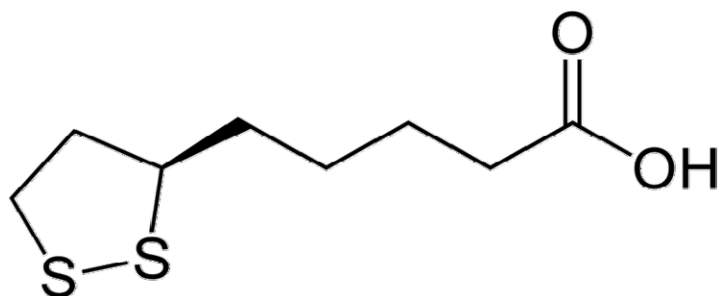
Και οι δύο παραπάνω μεταβολές έχουν ως αποτέλεσμα την αύξηση της ροής του οξειδοαναγωγικού ζεύγους στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου (αύξηση της αντίδρασης μεταφοράς φορτίου) και συνεπώς τη μείωση του R_{ct} . Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφερθεί ότι η συσσωμάτωση πραγματοποιείται μεταξύ των γειτονικά ακινητοποιημένων μικκυλίων.

Γενικά, η ακινητοποίηση της στιβάδας αναγνώρισης (προσανατολισμός των θέσεων σύνδεσης του αναλύτη και προσβασιμότητα του αναλύτη σε αυτές) αποτελεί καθοριστικό

παράγοντα για τη λειτουργία των βιοαισθητήρων, καθώς επηρεάζει σε σημαντικό βαθμό τόσο την ευαισθησία όσο και την εκλεκτικότητα αυτών. Ως εκ τούτου η τροποποίηση των ηλεκτροδίων χρυσού έγινε με τρεις διαφορετικούς τύπους αυτοδιατασσόμενων στιβάδων θειολών, οι οποίες διαφέρουν τόσο στο φορτίο των εξωτερικών τους ομάδων [θειοκτικό οξύ: αρνητικά φορτισμένες καρβοξυλικές ομάδες, DTSP: ουδέτερα φορτισμένη και κυστεαμίνη: θετικά φορτισμένες αμινομάδες] όσο και στη μέθοδο ενεργοποίησης αυτών προκειμένου να επιτευχθεί η χημική ακινητοποίηση των μορίων της στιβάδας αναγνώρισης. Παρακάτω αναφέρονται λεπτομερώς οι μέθοδοι που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των αντίστοιχων βιοαισθητήρων.

1.3.1. Βιοαισθητήρες Au/TA/ACM

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.3 το θειοκτικό οξύ φέρει δραστικές ομάδες ($-COOH$), οι οποίες χρησιμοποιούνται για την ακινητοποίηση βιομορίων μέσω των πρωτοταγών $-NH_2$ με το σχηματισμό σταθερών (αμιδικού τύπου) ομοιοπολικών δεσμών.



Σχήμα 1.3. Θειοκτικό οξύ.

Κατά την αντίδραση του θειοκτικού οξέος με το χρυσό, πραγματοποιείται καταλυτική αναγωγή του δισουλφιδικού δεσμού ($-S-S$) σε $-SH$, οι οποίες δεσμεύονται σταθερά στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Λόγω του αρνητικού φορτίου που φέρουν οι εξωτερικές $-COOH$ παρατηρείται μείωση της ικανότητας των, επίσης αρνητικά φορτισμένων,

βιομορίων (συνθετικά μικκύλια καζεΐνης) να προσεγγίσουν στην επιφάνεια της στιβάδας, μειώνοντας κατά αυτό τον τρόπο τις πιθανότητες χημικής πρόσδεσης.

Ως εκ τούτου η ακινητοποίηση πρωτεϊνικών μορίων, με τη μέθοδο του καρβοδιϊμιδίου ευνοείται σε τιμές $\text{pH} < \text{pI} - 0,5$, όπου pI το ισοηλεκτρικό σημείο της πρωτεΐνης.

Από την άλλη πλευρά, η αντίδραση ενεργοποίησης των ελεύθερων καρβοξυλικών ομάδων είχε ικανοποιητική απόδοση στην περιοχή $\text{pH} 4,7 - 6$, όπου και διεξάγεται σε χρονικό διάστημα λίγων λεπτών. Σύμφωνα με σχετικές μελέτες σε κάθε κύκλο ενεργοποίησης, ενεργοποιείται περίπου το 30 – 40% του συνολικού πληθυσμού των καρβοξυλομάδων και συνεπώς η επιφάνεια των ενεργοποιημένων στιβάδων θειοκτικού οξέος φέρει, ακόμη, αρνητικό φορτίο. Σε τιμές pH μικρότερες από το ισοηλεκτρικό τους σημείο οι πρωτεΐνες φέρουν θετικό φορτίο, οπότε λόγω της ανάπτυξης ηλεκτροστατικών ελκτικών δυνάμεων μπορούν να πλησιάσουν πιο αποτελεσματικά την επιφάνεια της αρνητικά φορτισμένης στιβάδας του θειοκτικού οξέος. Σύμφωνα με προηγούμενες μελέτες το pH του διαλύματος ακινητοποίησης αποτελεί σημαντική παράμετρο για την επιτυχή ακινητοποίηση των μικκυλίων της καζεΐνης πάνω σε επιφάνειες χρυσού που είχαν τροποποιηθεί με τη θειόλη 11–μερκαπτοενδεκανικό οξύ [Uricanu, 2004 – Martin, 2006].

Η χαμηλή διαλυτότητα των καζεϊνικών μικυλίων σε τιμές pH κοντά στο ισοηλεκτρικό τους σημείο δεν επέτρεπε την ικανοποιητική ακινητοποίηση τους στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων. Για το λόγο αυτό στο εναιώρημα ακινητοποίησης προστέθηκε διάλυμα NaCl . Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφέρουμε ότι τα ιόντα νατρίου είναι δυνατόν να ανταλλάσσονται με τα ιόντα ασβεστίου που υπάρχουν στα μικκύλια της καζεΐνης οδηγώντας έτσι στην αποσταθεροποίηση των μικκυλίων. Έτσι σύμφωνα με βιβλιογραφικά δεδομένα το εναιώρημα των ACM αραιώθηκε με διάλυμα NaCl συγκέντρωσης 0,2 M [McMahon, 1984]. Η σταθερότητα των μικκυλίων στο παραπάνω διάλυμα επιβεβαιώθηκε και με πειράματα FT–IR που περιγράφονται στην παράγραφο 1.3.6 (σελ.140).

Χρησιμοποιώντας ως μέτρο σύγκρισης τη μεταβολή R_{ct} ($\Delta R_{\text{ct}}\% = R_{\text{ctAu/TA/ACM}} / R_{\text{ctAu/TA}} \times 100$), η ακινητοποίηση των ACM στα ηλεκτρόδια Au/TA/ACM δοκιμάστηκε

με αδιάλυτο εναιώρημα ACM και μετά την αραιώση αυτού με διάλυμα 0,2 M NaCl ή δισαπεσταγμένου νερού σε αναλογίες 1+1, 1+2 και 1+4 v/v.

Πίνακας 1.1. Δόμηση διαφορετικών συγκροτήσεων ηλεκτροδίων Au/TA/ACM. Η αποτίμηση της πορείας ακινητοποίησης για κάθε εναιώρημα μικκυλίων καζεΐνης στα τροποποιημένα ηλεκτρόδια Au/TA, υπολογίστηκε βάση των τιμών R_{ct} , πριν και μετά την ακινητοποίηση. Η τιμή R_{ct} των τροποποιημένων ηλεκτροδίων Au/TA λήφθηκε ως 100%.

Δόμηση διαφορετικών συγκροτήσεων ηλεκτροδίων	ΔR_{ct} (%)
Ηλεκτρόδια Au/TA	100
Ηλεκτρόδια Au/TA μετά την ακινητοποίηση των μικκυλίων	
Αδιάλυτα ACMs	120
1+1 v/v ACM + DDW, pH 6,5, 24 h	150
1+1 v/v ACM + 0,2 M NaCl, pH 6,5, 24 h	175
1+2 v/v ACM + 0,2 M NaCl, pH 6,5, 24 h	400
1+4 v/v ACM + 0,2 M NaCl, pH 6,5, 24 h	450
1+2 v/v ACM + 0,2 M NaCl, pH 5,6, 24 h	470
1+4 v/v ACM + 0,2 M NaCl, pH 5,6, 24 h	550

Από τα δεδομένα στον Πίνακα 1.1 φαίνεται ότι η υψηλότερη απόδοση ακινητοποίησης επιτεύχθηκε στην περίπτωση του μίγματος ACM + 0,2 M NaCl 1+4 v/v. Το χλωριούχο νάτριο ως ηλεκτρολύτης έχει την ικανότητα να αντισταθμίζει το αρνητικό φορτίο των καζεϊνικών μικκυλίων μειώνοντας έτσι την ισχύ των απωστικών δυνάμεων μεταξύ του φορέα ακινητοποίησης και των βιομορίων. Ως εκ τούτου, αυξάνεται ο αριθμός των μικκυλίων που πλησιάζουν στην επιφάνεια των τροποποιημένων ηλεκτροδίων χρυσού και παρατηρείται αύξηση του ποσοστού ακινητοποίησης. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, τα ιόντα νατρίου αντικαθιστούν τα ιόντα ασβεστίου που περιέχονται στα καζεϊνικά μικκύλια. Για το λόγο αυτό εναιωρήματα μεγαλύτερων αραιώσεων 1+8 v/v ACM + 0,2 M NaCl δε συμπεριλήφθηκαν στην παραπάνω μελέτη. Τα εναιωρήματα αυτά δεν είναι

σταθερά με το χρόνο και αποβάλλουν στερεά μικκύλια μετά από παραμονή 1 – 2 ημερών στους +4 °C [Gaucheron, 2000 – Famelart,1999]. Αντίθετα τα μίγματα 1+2 και 1+4 v/v ACM + 0,2 M NaCl είναι σταθερά με το χρόνο και όπως φαίνεται από τα φάσματα FT-IR στην παράγραφο 1.3.6 (σελ.140) η τριτοταγής δομή των μικκυλίων παραμένει σταθερή.

Στα εναιωρήματα 1+2 και 1+4 v/v ACM + 0,2 M NaCl η μείωση του pH από 6,5 σε 5,6 είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση της απόδοσης της ακινητοποίησης των μικκυλίων, καθώς κατά αυτόν τον τρόπο επιτυγχάνεται επιπλέον μείωση των ηλεκτροστατικών απωστικών δυνάμεων μεταξύ των μικκυλίων και της αυτοδιατασσόμενης μονοστιβάδας του θειοκτικού οξέος [Uricanu, 2004 – Martin, 2006].

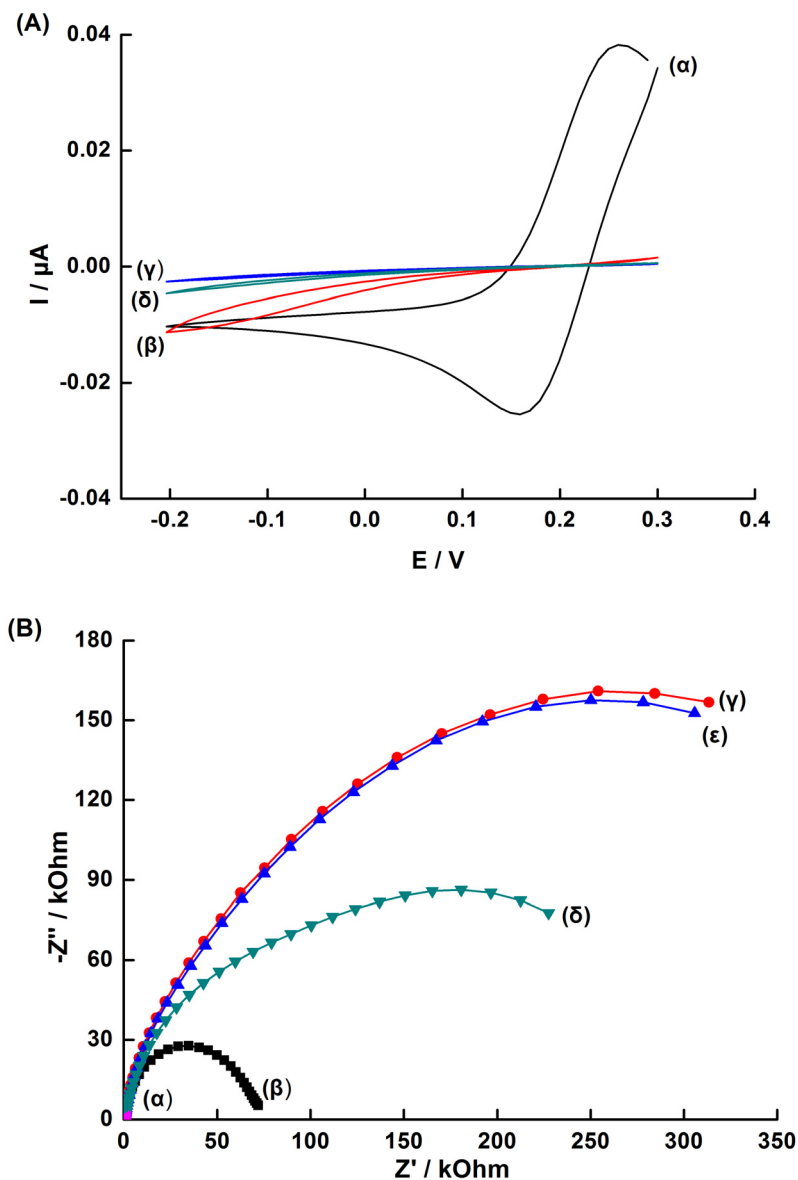
Εναλλακτικά, η ακινητοποίηση των μικκυλίων της καζεΐνης δοκιμάστηκε με ηλεκτροαπόθεση, προκειμένου και πάλι να μειωθούν οι ηλεκτροστατικές απωστικές δυνάμεις μεταξύ της ακινητοποιημένης στιβάδας της θειόλης και των βιομορίων. Η ηλεκτροαπόθεση έγινε σε κυψελίδα τριών ηλεκτροδίων για μία ώρα με την εφαρμογή τάσης 300 mV σε εναιώρημα 1+1 v/v σε 0,2 M NaCl. Η απόδοση ακινητοποίησης ήταν σχετικά υψηλή, ($\Delta S(\%) = 250\%$) και σχεδόν αμετάβλητη για μεγαλύτερους χρόνους ηλεκτροαπόθεσης. Σύμφωνα με τα παραπάνω αποτελέσματα, το υψηλότερο ποσοστό ακινητοποίησης παρατηρήθηκε στο μίγμα 1+4 v/v ACM + 0,2 M NaCl, σε pH 6,5, και 5,6.

1.3.1.1. Μελέτες CV και EIS

Τα διάφορα στάδια τροποποίησης των ηλεκτροδίων χρυσού και το στάδιο εφαρμογής των βιοαισθητήρων σε δείγματα πυτιάς εξετάστηκαν με πειράματα φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης και κυκλικής βολταμμετρίας.

Στο Σχήμα 1.4.A παρουσιάζονται τα διαγράμματα κυκλικής βολταμμετρίας που ελήφθησαν παρουσία του οξειδοαναγωγικού ζεύγους σιδηρο-/σιδηρικούανιούχων ιόντων με ταχύτητα σάρωσης $100 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$. Όπως προκύπτει από τη μορφή των κυκλικών βολταγραφημάτων, ο σχηματισμός της στιβάδας του θειοκτικού οξέος πάνω στο ηλεκτρόδιο του χρυσού, έχει ως αποτέλεσμα την παρεμπόδιση της ηλεκτροχημικής

αντίδρασης και γι' αυτό το λόγο τόσο η κορυφή της οξειδωσης όσο και της αναγωγής εξαφανίζονται (καμπύλη $\alpha \rightarrow \beta$).



Σχήμα 1.4. (A) Κυκλικά βολταμμογραφήματα και (B) διαγράμματα Nyquist των βιοαισθητήρων Au/TA/ACM στα διάφορα στάδια κατασκευής και αντίδρασης (α) ηλεκτρόδια χρυσού, (β) ηλεκτρόδια Au/TA, (γ) βιοαισθητήρες Au/TA/ACM, (δ) οι βιοαισθητήρες μετά την επώαση για 2 ώρες στους $37^{\circ}C$ σε διάλυμα πυτιάς 0,2 % w/v σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5 και (ε) σε διάλυμα 20 mM ιμιδαζολίου pH 5, που χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό.

Η ακινητοποίηση των μικκυλίων της καζεΐνης, πάνω στην επιφάνεια των ηλεκτροδίων Au/TA οδήγησε στην περαιτέρω μείωση αυτών των δύο κορυφών, καθώς η αντίδραση μεταφοράς φορτίου στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου περιορίζεται ακόμα περισσότερο λόγω της μείωσης της ελεύθερης ενεργής επιφάνειας του χρυσού. Επιπλέον οι απωστικές δυνάμεις που αναπτύσσονται μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων ιόντων του οξειδοαναγωγικού ζεύγους σιδηρο-/σιδηρικού ανιούχων ιόντων και των μικκυλίων μειώνουν περαιτέρω τη ροή των ιόντων του οξειδοαναγωγικού ζεύγους προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου και οδηγούν σε περαιτέρω μείωση της κινητικής της αντίδρασης μεταφοράς φορτίου. Μετά την αντίδραση των μικκυλίων της καζεΐνης με την πυτιά, η μείωση του αρνητικού φορτίου των μικκυλίων επιφέρει αύξηση της ροής του οξειδοαναγωγικού ζεύγους προς την επιφάνεια των ηλεκτροδίων [Qi, 2007 – Fox, 2003 – Lycey, 2002 – Anema, 2007 – Larsson, 1999]. Οι μεταβολές τόσο στο φορτίο όσο και στο μέγεθος της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης μετά την αντίδραση αυτή οδηγούν στην εμφάνιση ενός κυκλικού βολταμμογραφήματος ανάμεσα σε αυτά που παρατηρούνται στην περίπτωση των τροποποιημένων ηλεκτροδίων Au/TA και των τροποποιημένων Au/TA/ACM.

Στο Σχήμα 1.4.B παρουσιάζεται μια αντίστοιχη μελέτη με μετρήσεις φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης. Το γυμνό ηλεκτρόδιο χρυσού παρουσιάζεται στα φάσματα αυτά ως ένα πολύ μικρό ημικύκλιο, ενδεικτικό της γρήγορης κινητικής της αντίδρασης μεταφοράς φορτίου από το διάλυμα του ηλεκτρολύτη στην ενεργό επιφάνεια του ηλεκτροδίου, το οποίο ακολουθείται από τη γραμμή διάχυσης (Σχήμα 1.4.Bα). Σύμφωνα με όσα έχουν αναφερθεί στο θεωρητικό μέρος (σελ. 45), στην περίπτωση αυτή η εμπέδηση ελέγχεται από φαινόμενα διάχυσης στο μεγαλύτερο τμήμα της κλίμακας των εφαρμοζόμενων συχνοτήτων. Όπως φαίνεται στα Σχήματα 1.4.Bβ και 1.4.Bγ, μετά το σχηματισμό τόσο της αυτοδιατασσόμενης στιβάδας της θειόλης όσο και μετά τη δημιουργία της στιβάδας των ακινητοποιημένων μικκυλίων, η αντίσταση μεταφοράς φορτίου αυξάνεται (αύξηση της διαμέτρου των αντίστοιχων ημικυκλίων). Στις δύο αυτές περιπτώσεις η κινητική της οξειδοαναγωγικής αντίδρασης μειώνεται τόσο λόγω της κατάληψης των άλλοτε κενών θέσεων του ηλεκτροδίου από τις παραπάνω στιβάδες, όσο και λόγω των απωστικών δυνάμεων που αναπτύσσονται μεταξύ των αρνητικά φορτισμένων ιόντων του οξειδοαναγωγικού ζεύγους και των αρνητικά φορτισμένων

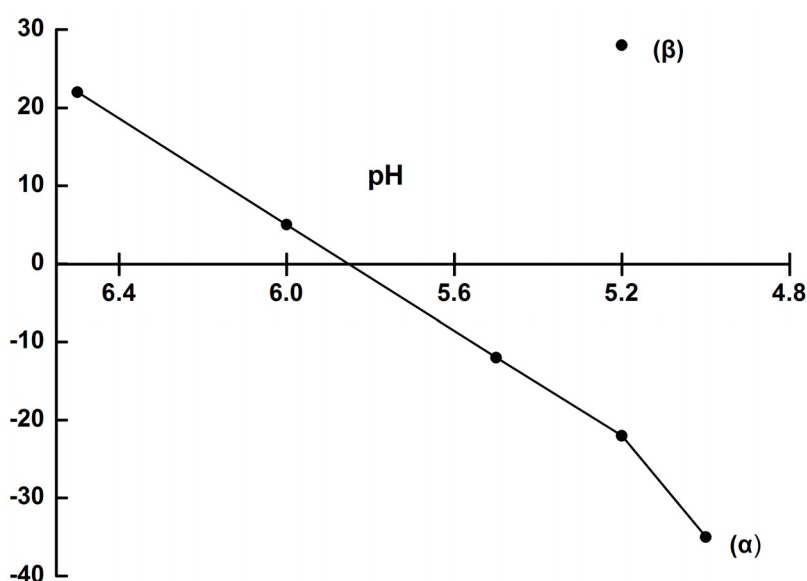
μορίων του θειοκτικού οξέος και των μικκυλίων. Μετά την αντίδραση με την πυτιά παρατηρείται μείωση της R_{ct} (μείωση της διαμέτρου του ημικυκλίου) λόγω της αύξησης της διάχυσης του οξειδοαναγωγικού ζεύγους στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Η αύξηση της ροής του οξειδοαναγωγικού ζεύγους οφείλεται (i) στη μείωση του καθαρού αρνητικού φορτίου των μικκυλίων και (ii) στην αύξηση των καναλιών πρόσβασης του οξειδοαναγωγικού ζεύγους προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου, λόγω της συσσωμάτωσης των γειτονικών (ακίνητοποιημένων) μικκυλίων. Μικρή μείωση της αντίστασης μεταφοράς φορτίου παρατηρήθηκε επίσης μετά την επώαση των βιοαισθητήρων στο διάλυμα του τυφλού (1.4.Βε). Η μείωση αυτή αποδίδεται στη μερική εκρόφιση των ακίνητοποιημένων μικκυλίων από την επιφάνεια των βιοαισθητήρων στο διάλυμα του ηλεκτρολύτη.

1.3.1.2. Απόδοση βιοαισθητήρων Au/TA/ACM

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, μετά την απογύμνωση των μικκυλίων της καζεΐνης, η συσσωμάτωση των μικκυλίων ευνοείται τόσο σε χαμηλές τιμές pH όσο και από την παρουσία ιόντων ασβεστίου [Lucey, 2002 – Najera, 2003 – McMahan, 1984]. Τόσο η μείωση της τιμής του pH όσο και η παρουσία ιόντων ασβεστίου έχουν ως αποτέλεσμα τη μείωση του αρνητικού φορτίου των βιομορίων που αλληλεπιδρούν, δηλαδή της χυμοσίνης και των καζεϊνικών μικκυλίων. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα η χυμοσίνη να πλησιάζει πιο εύκολα την κ-καζεΐνη και έτσι να επιτυγχάνεται πιο αποτελεσματικά, το σπάσιμο του δεσμού Phe105–Met106 [Fox, 2003]. Η αντίδραση αυτή σε πραγματικά διαλύματα γάλακτος ξεκινάει σε τιμή pH 6,4 [Anema, 2005].

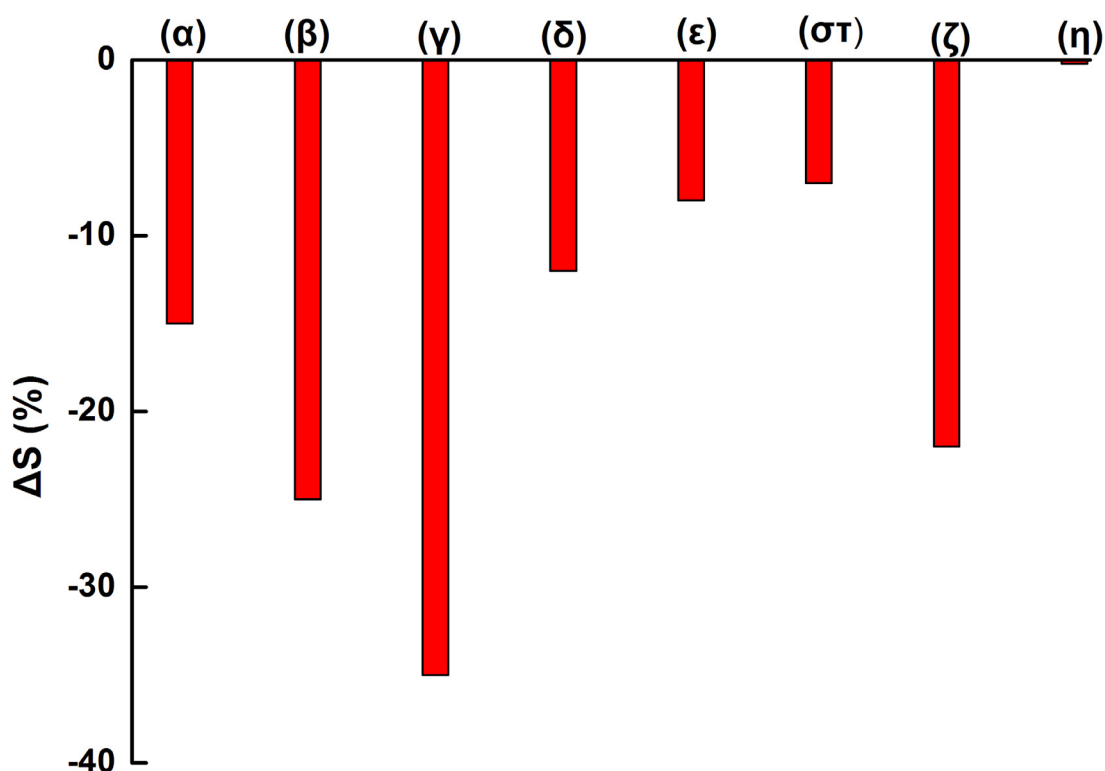
Προκειμένου να εξετάσουμε την επίδραση των παραπάνω παραμέτρων στην περίπτωση που τα μικκύλια είναι χημικώς προσδεμένα πάνω στην τροποποιημένη επιφάνεια του χρυσού, μελετήσαμε τη συμπεριφορά των βιοαισθητήρων στην περιοχή pH 6,5 – 5 καθώς και παρουσία 5 mM CaCl_2 στο διάλυμα της αντίδρασης. Σε όλες τις περιπτώσεις τα ακίνητοποιημένα μικκύλια επώαστηκαν σε διάλυμα πυτιάς 0,2% w/v σε 20 mM ιμιδαζολίου για 2 ώρες στους 37 °C. Σύμφωνα με τα δεδομένα που απεικονίζονται στο Σχήμα 1.5 στην περιοχή pH από 6,5 έως 5,8, δεν παρατηρήθηκε μείωση του μετρούμενου σήματος $\Delta S(\%)$. Αντίθετα παρατηρήθηκε αύξηση της

μετρούμενης εμπέδησης. Ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και κατά την επώαση των βιοαισθητήρων στο ρυθμιστικό διάλυμα. Μείωση της μετρούμενης εμπέδησης παρατηρήθηκε σε τιμές $\text{pH} < 5,8$ και απουσία ιόντων Ca^{2+} . Μάλιστα, η παρατηρούμενη μεταβολή του σήματος αυξάνεται (αύξηση της ευαισθησίας της μεθόδου) αυξανόμενης της οξύτητας του διαλύματος της αντίδρασης. Μέγιστη μεταβολή του παρατηρούμενου σήματος παρατηρήθηκε σε $\text{pH} 5$. Παρουσία 5 mM χλωριούχου ασβεστίου ($\text{pH} 5,5$), η αντίσταση μεταφοράς φορτίου όχι μόνο δεν μειώθηκε αλλά αντιθέτως παρουσίασε μεγάλη αύξηση ($\Delta S\% = +28$). Ίδια συμπεριφορά παρατηρήθηκε και κατά τη διεξαγωγή τυφλών πειραμάτων στις ίδιες συνθήκες. Είναι πιθανό σε αυτή την τιμή pH , τα ιόντα ασβεστίου να συσσωματώνουν τα μικύλια της καζεΐνης προκαλώντας αύξηση της αντίστασης μεταφοράς φορτίου [Fox, 2003 – Lucey, 2002 – Gaucheron, 2000]. Παρόλα αυτά, ο ακριβής μηχανισμός που οδήγησε στην αύξηση της τιμής της αντίστασης μεταφοράς φορτίου, τόσο στο τυφλό όσο και κατά την αντίδραση, δεν είναι απόλυτα κατανοητός.



Σχήμα 1.5. Επίδραση του pH στη συμπεριφορά των βιοαισθητήρων Au/TA/ACM μετά την επώαση αυτών σε διάλυμα 0,2% w/v πυτιάς σε διάλυμα 20 mM ιμιδαζολίου στους 37 °C για 2 ώρες (α) απουσία και (β) παρουσία 5 mM CaCl_2 .

Στη συνέχεια μελετήθηκε η συμπεριφορά των βιοαισθητήρων Au/TA/ACM σε διαφορετικούς χρόνους αντίδρασης, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις πυτιάς, παρουσία διαφορετικών ρυθμιστικών διαλυμάτων καθώς επίσης και μετά την κατεργασία των ακινητοποιημένων μικκυλίων με γλουταραλδεΐδη, η οποία σύμφωνα με τη βιβλιογραφία σταθεροποιεί τα μικκύλια [Carroll, 1968]. Το pH του διαλύματος αντίδρασης σε όλες τις παραπάνω περιπτώσεις είχε ρυθμιστεί στην τιμή 5 με υδροχλωρικό οξύ.



Σχήμα 1.6. Μεταβολή της αντίστασης μεταφοράς φορτίου $\Delta S(\%)$, για τους βιοαισθητήρες Au/TA/ACM μετά από επώαση i) σε διάλυμα πυτιάς 0,2% w/v σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5 στους 37 °C για (α) 30, (β) 60 και (γ) 120 λεπτά αντίστοιχα ii) επώαση σε (γ) 0,2, (δ) 0,1 και (ε) 0,4 % w/v διαλύματα πυτιάς σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5 στους 37 °C αντίστοιχα iii) για 2 ώρες στους 37 °C σε 0,2 % w/v διαλύματα πυτιάς pH 5 σε 20 mM (γ) ιμιδαζολίου, (στ) HEPES και (ζ) MOPS και (η) μετά από σταθεροποίηση των ακινητοποιημένων μικκυλίων με γλουταραλδεΐδη.

Αρχικά μελετήθηκε ο χρόνος επώασης των βιοαισθητήρων στο διάλυμα της πυτιάς. Οι βιοαισθητήρες επώαστηκαν σε διάλυμα πυτιάς 0,2% w/v σε 20 mM ιμιδαζολίου στους 37 °C για 30, 60 και 120 λεπτά. Στην περίπτωση αυτή παρατηρήθηκε ότι η μεταβολή σήματος αυξάνεται (σε απόλυτες τιμές) από -15% (Σχήμα 1.6α) σε -35% (Σχήμα 1.6γ) για χρόνους επώασης 30 και 120 λεπτά αντίστοιχα. Σύμφωνα με τα παραπάνω δεδομένα η κινητική της αντίδρασης μεταξύ της χυμοσίνης και των ακινητοποιημένων μικκυλίων είναι μάλλον αργή.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η εξάρτηση του λαμβανομένου σήματος από τη συγκέντρωση της πυτιάς στο διάλυμα της αντίδρασης. Στην περίπτωση αυτή εξετάστηκαν τρεις συγκεντρώσεις 0,1, 0,2 και 0,4% w/v σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5. Μέγιστη μεταβολή σήματος παρατηρήθηκε παρουσία 0,2% w/v πυτιάς (Σχήμα 1.6γ). Η παρατηρούμενη μείωση του σήματος παρουσία 0,4% w/v πυτιάς (Σχήμα 1.6ε), πιθανά να οφείλεται στην προσρόφηση της πυτιάς πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Σε αυτή την περίπτωση έλαβαν χώρα δύο ανταγωνιστικά φαινόμενα: η μείωση του σήματος λόγω της μείωσης του φορτίου της καζεΐνης και της συσσωμάτωσης των απογυμνωμένων μικκυλίων και η αύξηση της αντίστασης μεταφοράς φορτίου λόγω της (φυσικής) προσρόφησης της πυτιάς. Όπως προκύπτει από τα παραπάνω αποτελέσματα η εφαρμογή του προτεινόμενου βιοαισθητήρα σε πυκνά διαλύματα πυτιάς (>0,2%) είναι εφικτή μόνο εάν προηγηθεί μπλοκάρισμα των μη ειδικών θέσεων πρόσδεσης πάνω στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.

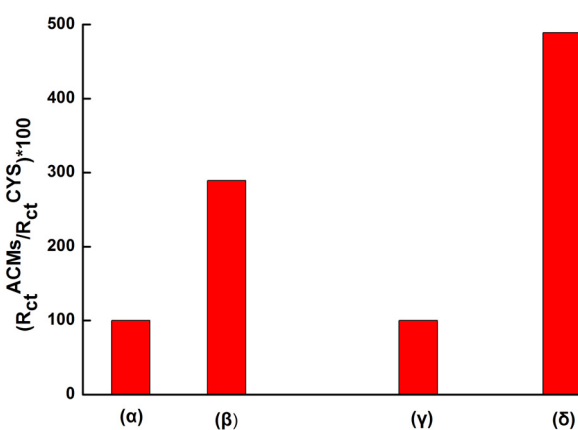
Ακολούθησε η μελέτη της επίδρασης της σύστασης του ρυθμιστικού διαλύματος στην απόδοση των βιοαισθητήρων. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία [Uricanu, 2004 – Martin 2006] το ρυθμιστικό διάλυμα του ιμιδαζολίου σταθεροποιεί τα ακινητοποιημένα μικκύλια της καζεΐνης. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.6, οι βιοαισθητήρες παρουσιάζουν την υψηλότερη απόδοση στο ρυθμιστικό διάλυμα ιμιδαζολίου. Στο αντίστοιχο τυφλό πείραμα (απουσία πυτιάς), η μεταβολή του σήματος ήταν μόλις -3%. Στην περίπτωση των ρυθμιστικών διαλυμάτων Hepes και Mops, οι αντίστοιχες τιμές για τα τυφλά πειράματα ήταν +30% και +25%.

Προκειμένου να επιβεβαιώσουμε ότι η μεταβολή της αντίστασης μεταφοράς φορτίου οφείλονταν στην αντίδραση της πυτιάς με την ακινητοποιημένη καζεΐνη τα ακινητοποιημένα μικκύλια εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα γλουταραλδεϋδης [Carroll 1968].

Η κατεργασία των ακινητοποιημένων μικκυλίων της καζεΐνης με γλουταραλδεύδη, έχει ως αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση τους [Uricanu 2004], λόγω της ανάπτυξης ενδομοριακών αλληλεπιδράσεων μεταξύ των μορίων καζεΐνης και της γλουταραλδεύδης με το σχηματισμό βάσεων Schiff, μεταξύ των αλδευδικών ομάδων της γλουταραλδεύδης και των πρωτοταγών αμινών στα καζεϊνικά μικκύλια. Αξιοσημείωτη στην περίπτωση αυτή ήταν η αύξηση της αντίστασης μεταφοράς φορτίου στα 1,2 MOhm (τα δεδομένα δεν παρουσιάζονται) ως προς την τιμή των 325 kOhm (Σχήμα 1.5) που παρατηρήσαμε πριν από την κατεργασία των ηλεκτροδίων Au/TA/ACM με γλουταραλδεύδη. Μετά την αντίδραση με πυτιά η μεταβολή της αντίστασης μεταφοράς φορτίου ήταν μόλις -3% (Σχήμα 1.6η), στοιχείο που καταδεικνύει τη σταθεροποίηση των μικκυλίων μετά την κατεργασία τους με γλουταραλδεύδη.

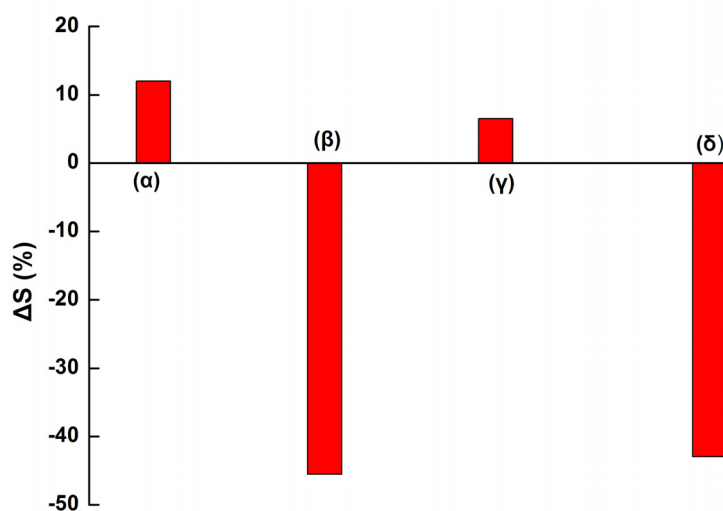
1.3.2. Απόδοση βιοαισθητήρων Au/CYS/ACM

Η επόμενη θειόλη που εξετάστηκε ήταν η κυστεαμίνη. Η ανάπτυξη της αυτοδιατασσόμενης στιβάδας της κυστεαμίνης εξετάστηκε σε δύο συγκεντρώσεις 10 mM και 20 mM. Από τα αποτελέσματα στο Σχήμα 1.7 είναι εμφανές ότι το μεγαλύτερο ποσοστό ακινητοποίησης επιτεύχθηκε όταν η συγκέντρωση της θειόλης ήταν 20 mM.



Σχήμα 1.7. Σχετική μεταβολή σήματος των ηλεκτροδίων (α) Au/10 mM CYS και (γ) Au/20 mM CYS, τα οποία λήφθησαν ως 100%, μετά την εμφάνισή τους (β) και (δ) σε εναιώρημα ACM, αντίστοιχα.

Προκειμένου να εξετάσουμε την καταλληλότητα των παραπάνω βιοαισθητήρων για τον προσδιορισμό της πηκτικής δύναμης της πυτιάς, τα ακινητοποιημένα μικκύλια επώαστηκαν για 2 ώρες σε διάλυμα 0,2% w/v πυτιάς σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5 για 2 ώρες στους 37 °C. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφέρουμε ότι χρησιμοποιήθηκαν οι βέλτιστες συνθήκες του προαναφερθέντα βιοαισθητήρα (Au/TA/ACM) προκειμένου τα αποτελέσματα να είναι συγκρίσιμα. Η μεταβολή της αντίστασης μεταφοράς φορτίου στην περίπτωση των βιοαισθητήρων Au/CYS/ACM είναι παρόμοια με αυτήν των βιοαισθητήρων Au/TA/ACM [$\Delta S(\%) = -45\%$ (Σχήμα 1.8β) και $\Delta S(\%) = -35\%$ (Σχήμα 1.5) αντίστοιχα].

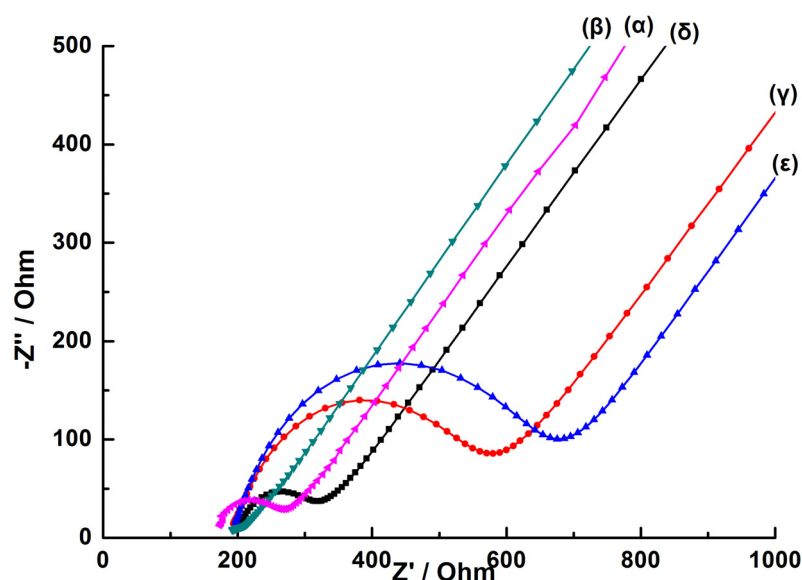


Σχήμα 1.8. Μεταβολή της αντίστασης μεταφοράς φορτίου $\Delta S(\%)$ στους βιοαισθητήρες Au/CYS/ACM μετά την επώαση τους σε διάλυμα 20 mM ιμιδαζολίου [(α) Au/10 mM CYS/ACM, (γ) Au/20 mM CYS/ACM], (β) και (δ) μετά την επώαση των παραπάνω ηλεκτροδίων σε διάλυμα πυτιάς 0,2% w/v σε 20 mM ιμιδαζολίου, pH 5 για δύο ώρες στους 37 °C.

Η βασική διαφορά μεταξύ των ηλεκτροδίων Au/TA και Au/CYS εντοπίζεται στη μορφή των διαγραμμάτων Nyquist. Συγκεκριμένα, σε αντίθεση με τα τροποποιημένα ηλεκτρόδια με θειοκτικό οξύ, τα ηλεκτρόδια με κυστεαμίνη παρουσιάζουν μικτή

συμπεριφορά. Η εμπέδηση του συστήματος ελέγχεται από την αντίδραση μεταφοράς φορτίου στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων και από τη διάχυση του οξειδοαναγωγικού ζεύγους στην περιοχή χαμηλών συχνοτήτων (Σχήμα 1.9).

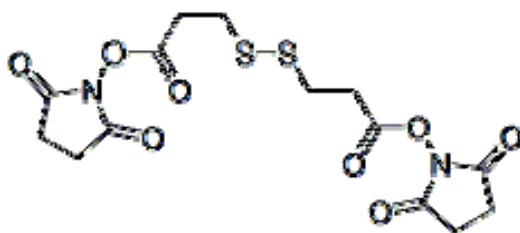
Αυτό έχει ως αποτέλεσμα το υπό μελέτη σύστημα να μπορεί να περιγραφεί με ένα ισοδύναμο ηλεκτρικό κύκλωμα Randles, στο οποίο έχει εισαχθεί το στοιχείο Warburg (σελ. 45). Οι μεταβολές των διαγραμμάτων Nyquist που παρατηρούνται στα διάφορα στάδια κατασκευής και αντίδρασης του βιοαισθητήρα είναι ίδιες με αυτές που περιγράφηκαν και στην περίπτωση των βιοαισθητήρων Au/TA. Μια ακόμα αξιοσημείωτη διαφορά μεταξύ των βιοαισθητήρων αυτών αφορά στην τάξη μεγέθους την αντίστασης μεταφοράς φορτίου. Στην περίπτωση των βιοαισθητήρων Au/CYS/ACM, είναι μόλις μερικές εκατοντάδες Ohm, λόγω της ηλεκτροστατικής έλξης των αρνητικά φορτισμένων ιόντων του οξειδοαναγωγικού ζεύγους και των θετικά φορτισμένων $-NH_3^+$ της αυτοδιατασσόμενης στιβάδας της κυστεαμίνης



Σχήμα 1.9. Διαγράμματα Nyquist των βιοαισθητήρων Au/10 mM CYS/ACM σε διάφορα στάδια κατασκευής και αντίδρασης. (α) ηλεκτρόδια χρυσού, (β) ηλεκτρόδια Au/CYS, (γ) βιοαισθητήρες Au/CYS/ACM, (δ) οι βιοαισθητήρες μετά την επώαση τους για 2 ώρες στους 37 °C σε διάλυμα πυτιάς 0,2 % w/v σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5 και (ε) σε διάλυμα 20 mM ιμιδαζολίου pH 5, που χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό.

1.3.3. Απόδοση βιοαισθητήρων Au/DTSP/ACM

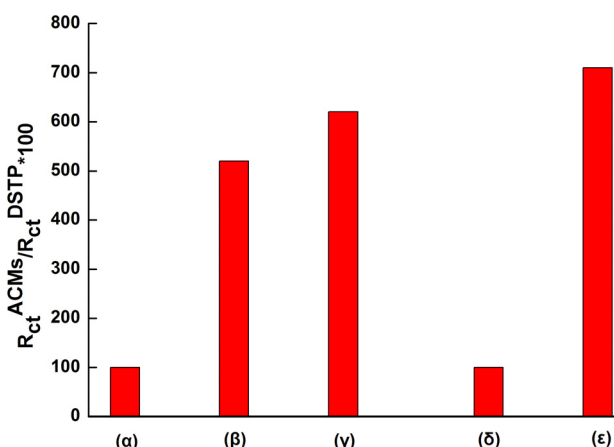
Τέλος, η κατασκευή των προτεινόμενων βιοαισθητήρων δοκιμάστηκε επί ηλεκτροδίων χρυσού μετά την τροποποίησή τους με το αντιδραστήριο DTSP (Σχήμα 1.10). Όπως έχει αναφερθεί, παρουσία χρυσού παρατηρείται καταλυτική αναγωγή του δεσμού –S–S– με ταυτόχρονο σχηματισμό αυτοδιατασσόμενων στιβάδων της θειόλης (N–υδροξυηλεκτριμιδυλο)–θειοπροπιονικού εστέρα.



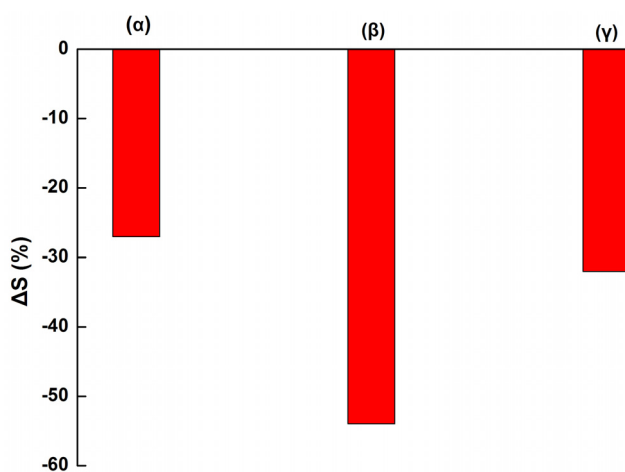
Σχήμα 1.10. Δομή DTSP

Ως προς τις προηγούμενες αυτοδιατασσόμενες στιβάδες θειοκτικού οξέος και κυστεαμίνης, οι στιβάδες (N–υδροξυηλεκτριμιδυλο)–θειοπροπιονικού εστέρα παρουσιάζουν διάφορα πλεονεκτήματα, όπως κατάλληλη υδροφιλικότητα και άμεση αλληλεπίδραση των τελικών N–υδροξυηλεκτριμιδυλο ομάδων με τις αμινομάδες των βιομορίων. Ως εκ τούτου δεν απαιτείται η χρήση αντιδραστηρίων σύζευξης ή αντιδραστηρίων ενεργοποίησης, με αποτέλεσμα το στάδιο κατασκευής των βιοαισθητήρων να γίνεται πιο εύκολο [Wagner, 1996].

Αρχικά τα ηλεκτρόδια χρυσού τροποποιήθηκαν με διάλυμα θειόλης συγκέντρωσης 2 και 5 mM, ενώ η ακινητοποίηση πραγματοποιήθηκε με συνθετικά μικκύλια καζεΐνης που δεν είχαν αραιωθεί ή είχαν αραιωθεί σε αναλογία 1+4 v/v με διάλυμα 0,2 M χλωριούχου νατρίου. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.11, η ακινητοποίηση της καζεΐνης παρουσιάζει καλύτερη απόδοση στην περίπτωση που το εναιώρημα των μικκυλίων δεν είναι αραιωμένο. Ως 100% λαμβάνεται η R_{ct} των ηλεκτροδίων Au/DTSP.



Σχήμα 1.11. Σχετική μεταβολή σήματος των ηλεκτροδίων (α) Au/2 mM DTSP και (δ) Au/5 mM DTSP, τα οποία λήφθησαν ως 100%, μετά την εμβάπτισή τους σε εναιώρημα ACM ή ACM + 0,2 M NaCl (1+4) ν/ν (β) Au/2 mM DTSP/ACM+0,2 M NaCl (1+4) ν/ν, (γ) Au/2mM DTSP/ACM και (ε) Au/5 mM DTSP/ACM.

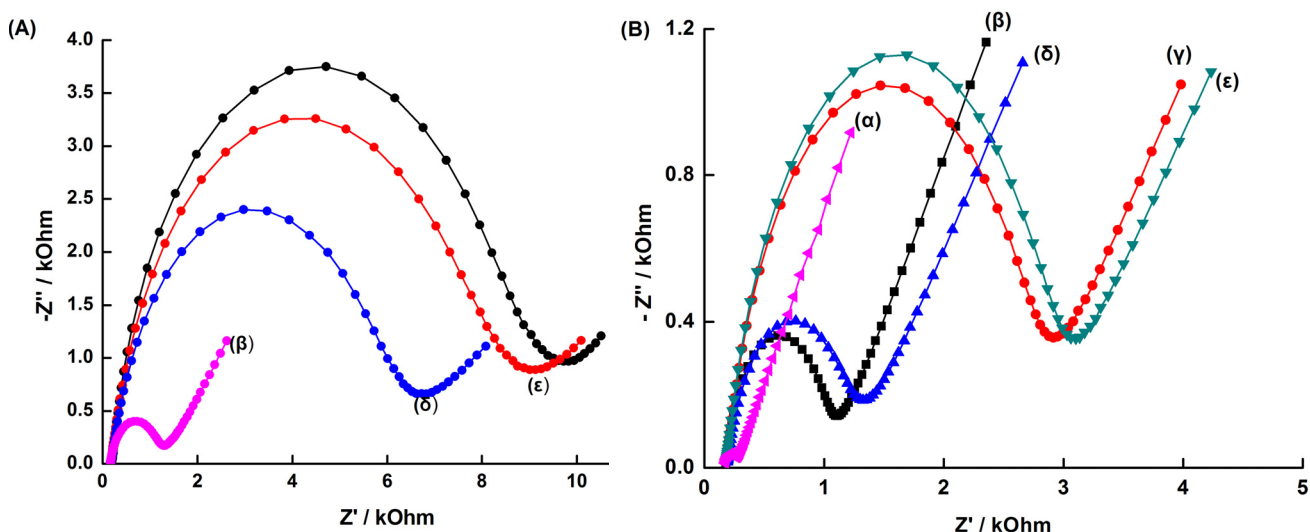


Σχήμα 1.12. Μεταβολή της αντίστασης μεταφοράς φορτίου ΔS (%), σε διάλυμα πυτιάς 0,2% w/v σε 20 mM ιμιδαζολίου, pH 5 για δύο ώρες στους 37 °C (α) Au/2 mM DTSP/ACM + NaCl (1+4), (β) Au/2 mM DTSP/ACM και (γ) Au/5 mM DTSP/ACM.

Στη συνέχεια εξετάστηκε η εμπεδησιμετρική συμπεριφορά των πλήρως τροποποιημένων βιοαισθητήρων Au/DTSP/ACM μετά την επώασή τους σε διάλυμα

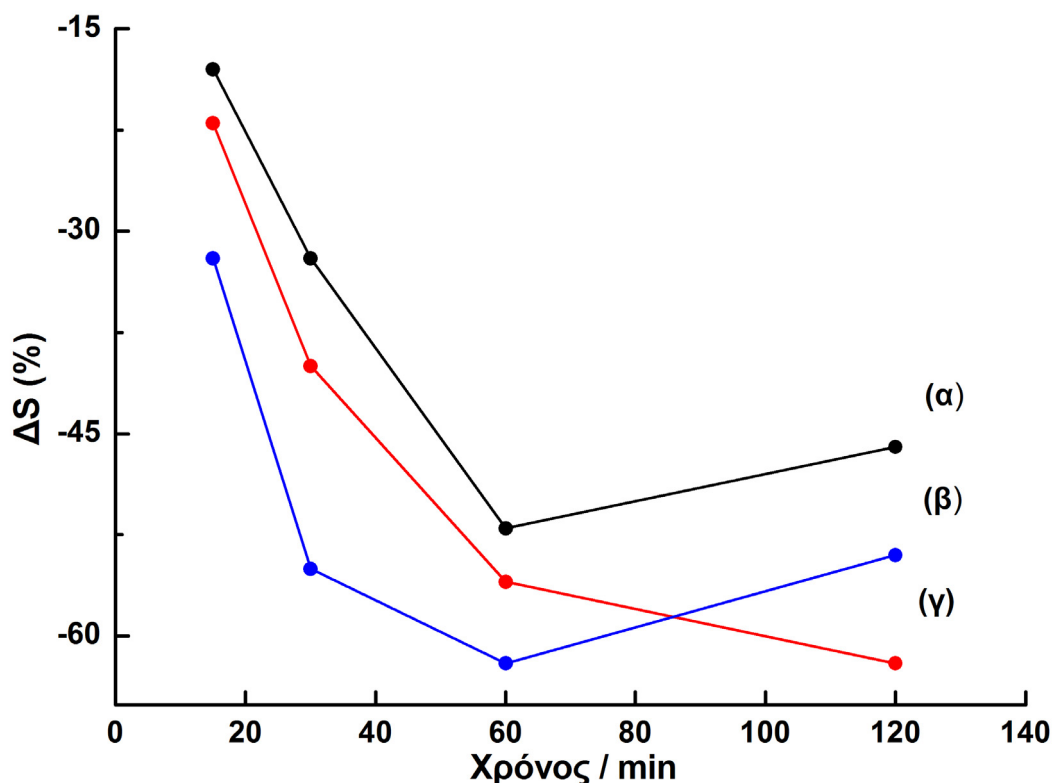
πτυάς συγκέντρωσης 0,2% w/v σε 20 mM ιμιδαζολίου για δύο ώρες σε pH 5 στους 37 °C. Τα αποτελέσματα της αντίδρασης ήταν καλύτερα στην περίπτωση που η συγκέντρωση της θειόλης ήταν 2 mM και τα μικκύλια είχαν ακινητοποιηθεί από μη αραιωμένο διάλυμα (Σχήμα 1.12).

Τα διάφορα στάδια κατασκευής του βιοαισθητήρα μελετήθηκαν με μετρήσεις φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης. Η εμπεδησιομετρική συμπεριφορά των ηλεκτροδίων χρυσού που είχαν τροποποιηθεί με 5 και 2 mM DTSP φαίνεται στα Σχήματα 1.13.A και 1.13.B αντίστοιχα.



Σχήμα 1.13.A. Διάγραμμα Nyquist των βιοαισθητήρων Au/5mM DTSP/ACM) σε διάφορα στάδια κατασκευής και αντίδρασης. (α) ηλεκτρόδια χρυσού, (β) ηλεκτρόδια Au/DTSP, (γ) βιοαισθητήρες Au/DTSP/ACM, (δ) οι βιοαισθητήρες μετά από επώαση για 2 ώρες στους 37 °C σε 0,2 % w/v διαλύματος πτυιάς σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5 και (ε) σε διάλυμα 20 mM ιμιδαζολίου pH 5, που χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό

Στη συνέχεια μελετήθηκε η συμπεριφορά των βιοαισθητήρων Au/2 mM DTSP/ACM σε διάφορες συγκεντρώσεις πτυιάς (0,05, 0,1 και 0,2% w/v) και χρόνους επώασης (15 – 120 min) (Σχήμα 1.14).



Σχήμα 1.14. Απόδοση των βιοαισθητήρων Au/2 mM DTSP/ACM σε (α) 0,05, (β) 0,1, (γ) 0,2 % w/v διαλύματα πυτιάς σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5 στους 37 °C, για διαφορετικούς χρόνους επώασης.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.14, η απόδοση των βιοαισθητήρων αυξάνεται με την αύξηση της συγκέντρωσης πυτιάς από 0,05 σε 0,2% w/v και για χρόνους επώασης μέχρι 60 λεπτά. Για μεγαλύτερους χρόνους επώασης, πέραν ότι οι χρόνοι αυτοί δεν είναι πρακτικοί για αναλύσεις ρουτίνας, η ευαισθησία των βιοαισθητήρων δεν αυξάνεται. Αντίθετα η μεταβολή $\Delta S(\%)$ παρουσιάζει, σε απόλυτες τιμές, μικρή μείωση. Αυτό μπορεί να οφείλεται στη φυσική προσρόφιση της πυτιάς στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου για παρατεταμένους χρόνους επώασης. Επιπλέον, όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.14, η απόδοση των βιοαισθητήρων είναι ικανοποιητική ακόμα και για 15 λεπτά επώασης. Σε σύγκριση με τους βιοαισθητήρες Au/TA/ACM, οι βιοαισθητήρες Au/DTSP/ACM παρουσιάζουν καλύτερη απόδοση για μικρότερους χρόνους. Συγκεκριμένα μετά την επώαση 30 λεπτών,

στους βιοαισθητήρες που είχαν τροποποιηθεί με θειοκτικό οξύ η μεταβολή της αντίστασης μεταφοράς φορτίου ήταν μόλις -15%, ενώ στην περίπτωση των βιοαισθητήρων DTSP, η αντίστοιχη μεταβολή σήματος ήταν -55%. Σημαντική είναι επίσης και η παρατηρούμενη μεταβολή σήματος για χρόνους επώασης 15 λεπτά, η οποία ήταν -32%.

Οι προτεινόμενοι βιοαισθητήρες εξετάστηκαν περαιτέρω σε διαφορετικά δείγματα πυτιάς σε υγρή και στερεή μορφή. Οι παρατηρούμενες μεταβολές του σήματος συγκρίθηκαν με την πηκτική δύναμη της πυτιάς, όπως αυτή υπολογίστηκε με τη μέθοδο Berridge (παράγραφος 1.2.6., σελ.114) [Berridge, 1952].

Πίνακας 1.2. Εφαρμογή των βιοαισθητήρων Au/DTSP/ACM σε δείγματα πυτιάς. Στις ηλεκτροχημικές μετρήσεις η τυπική απόκλιση είναι 9–16%, για αριθμό δειγμάτων $n = 3$.

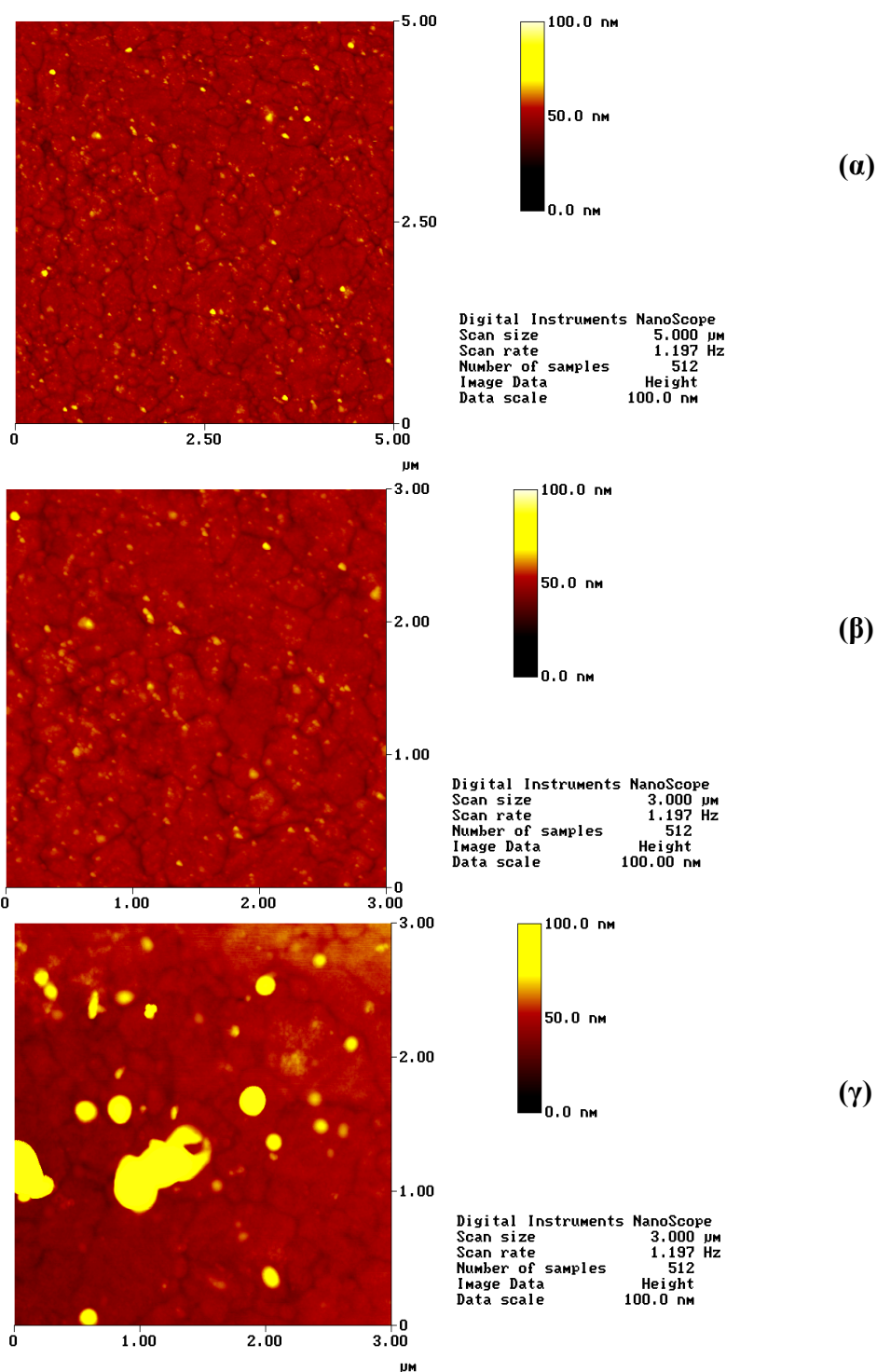
Δείγματα	Χρόνος επώασης (min)	Πηκτική δύναμη (Berridge)	Προτεινόμενοι Βιοαισθητήρες $\Delta S(\%)$
Hansen (1+1 v/v)	15	1:36.600	-24
Danisco (1+1 v/v)	15	1:61.900	-51
Hansen (0,05% w/v)	15	1:130.000	-44
Ηπειρ/πούλα (0,05% w/v)	15	1:48.500	-12
Hansen (0,2% w/v)	5	1:130.000	-42
Ηπειρ/πούλα (0,2% w/v)	5	1:48.500	-14

Όπως φαίνεται από τα δεδομένα του Πίνακα 1.2, οι παρατηρούμενες μεταβολές της αντίστασης μεταφοράς φορτίου είναι ανάλογες της πηκτικής δύναμης της πυτιάς, η οποία υπολογίστηκε με τη μέθοδο Berridge και πιστοποιούν την ικανότητα των προτεινόμενων βιοαισθητήρων να προσδιορίσουν την πηκτική δύναμη της πυτιάς σε υγρά και στερεά δείγματα. Επειδή δεν ήταν δυνατή η άμεση αντιστοίχιση των τιμών ΔR_{ct} με τις αντίστοιχες τιμές της πηκτικής δύναμης της πυτιάς, που υπολογίστηκε με τη μέθοδο Berridge, ως κριτήριο για την καταλληλότητα των προτεινόμενων βιοαισθητήρων

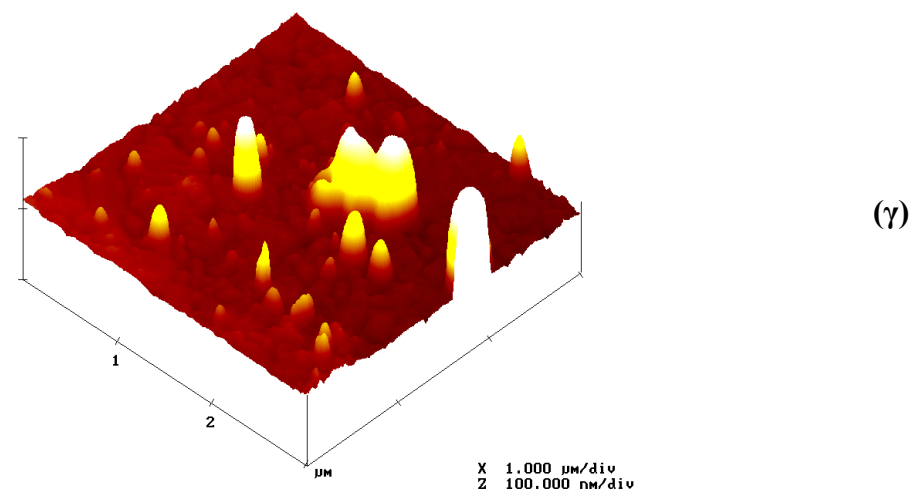
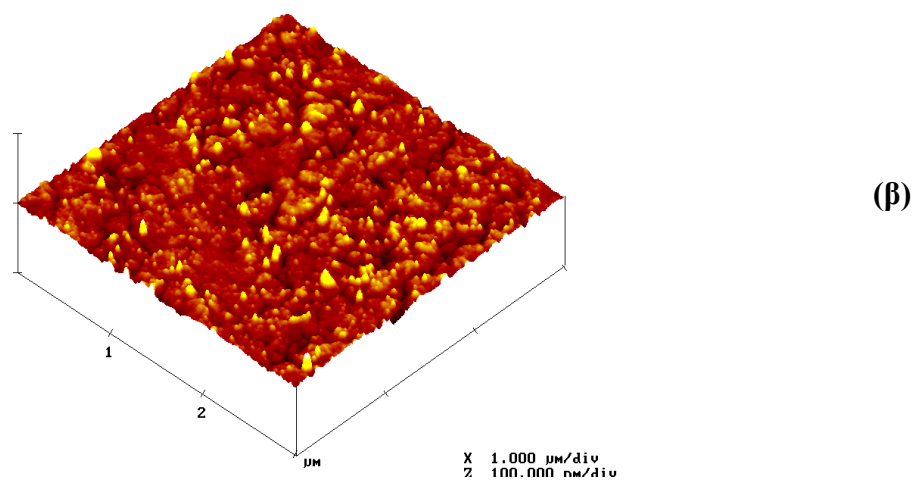
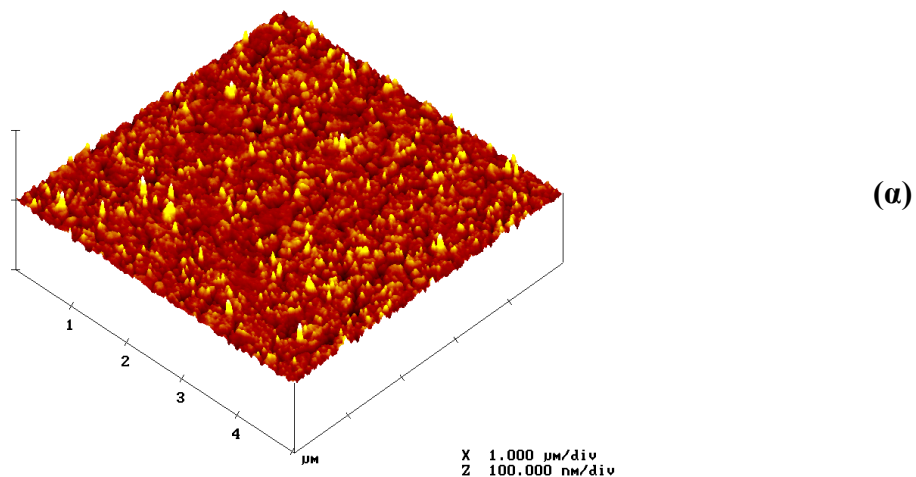
χρησιμοποιήθηκε ο λόγος των αντίστοιχων μεταβολών σημάτων στα στερεά και υγρά δείγματα. Σύμφωνα με τη μέθοδο Berridge οι λόγοι αυτοί είναι $61.900/36.600 = 1,7$ για τα δείγματα υγρής πυτιάς και $130.000/48.500 = 2,7$ για τα δείγματα στερεής πυτιάς. Οι αντίστοιχοι λόγοι, όπως προκύπτουν από τις μεταβολές της R_{ct} με τους προτεινόμενους βιοαισθητήρες είναι 2,1 και 3,7 αντίστοιχα.

1.3.4. Μελέτες μικροσκοπίας ατομικής δύναμης

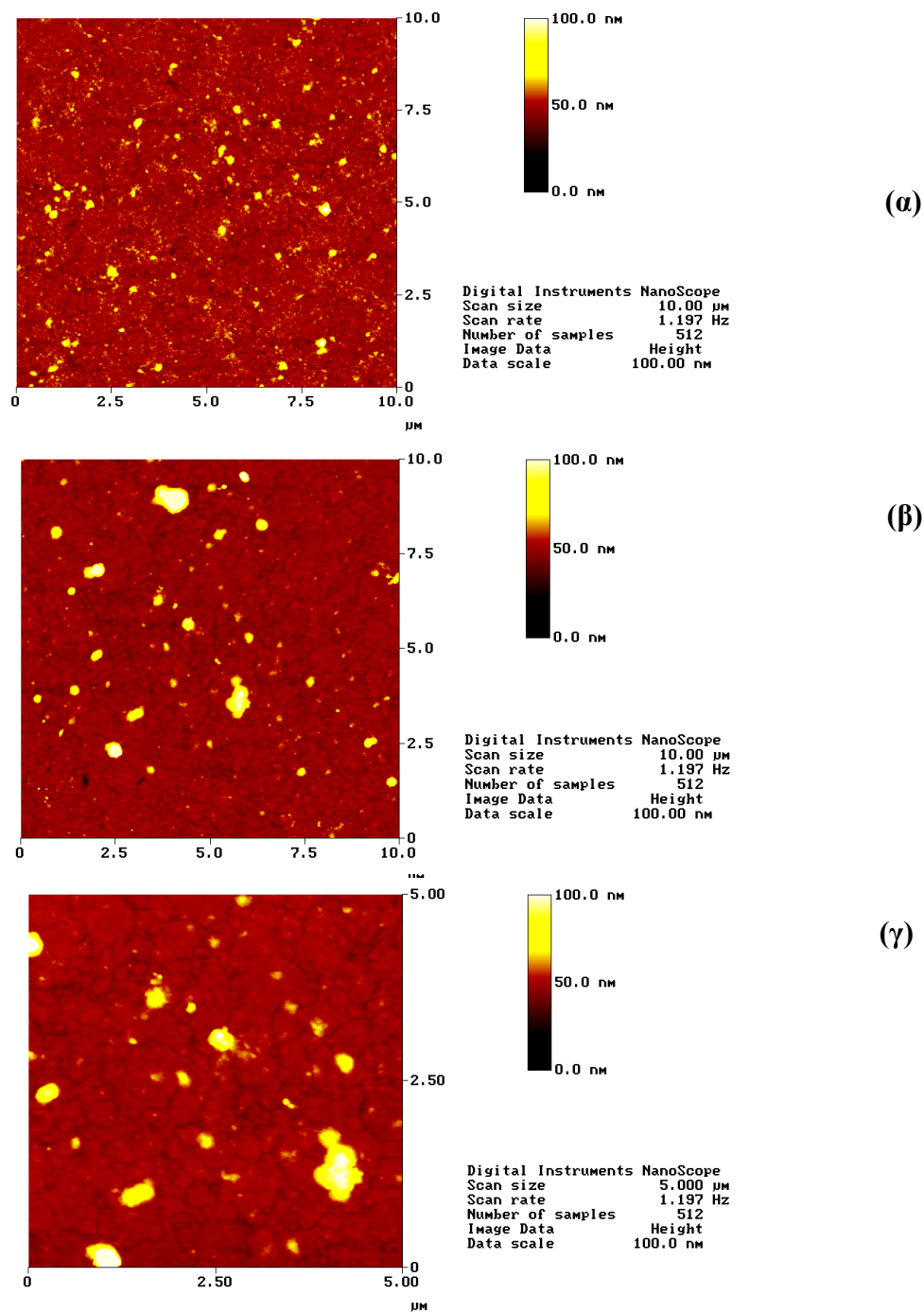
Από τις εικόνες AFM της τοπογραφίας των υπό μελέτη τροποποιημένων επιφανειών χρυσού στα σχήματα 1.15, 1.16, 1.17 και 1.18 φαίνεται ξεκάθαρα ότι μετά την αντίδραση με την πυτιά τα γειτονικά χημικά προσδεμένα μικκύλια συσσωματώνονται και σχηματίζουν ογκώδεις πυλώνες ύψους μέχρι 100 nm σύμφωνα με όσα έχουν αναφερθεί στο Θεωρητικό Μέρος (σελ. 15) και στην Περιγραφή της λειτουργίας των βιοαισθητήρων (σελ. 115, Σχήμα 1.2).



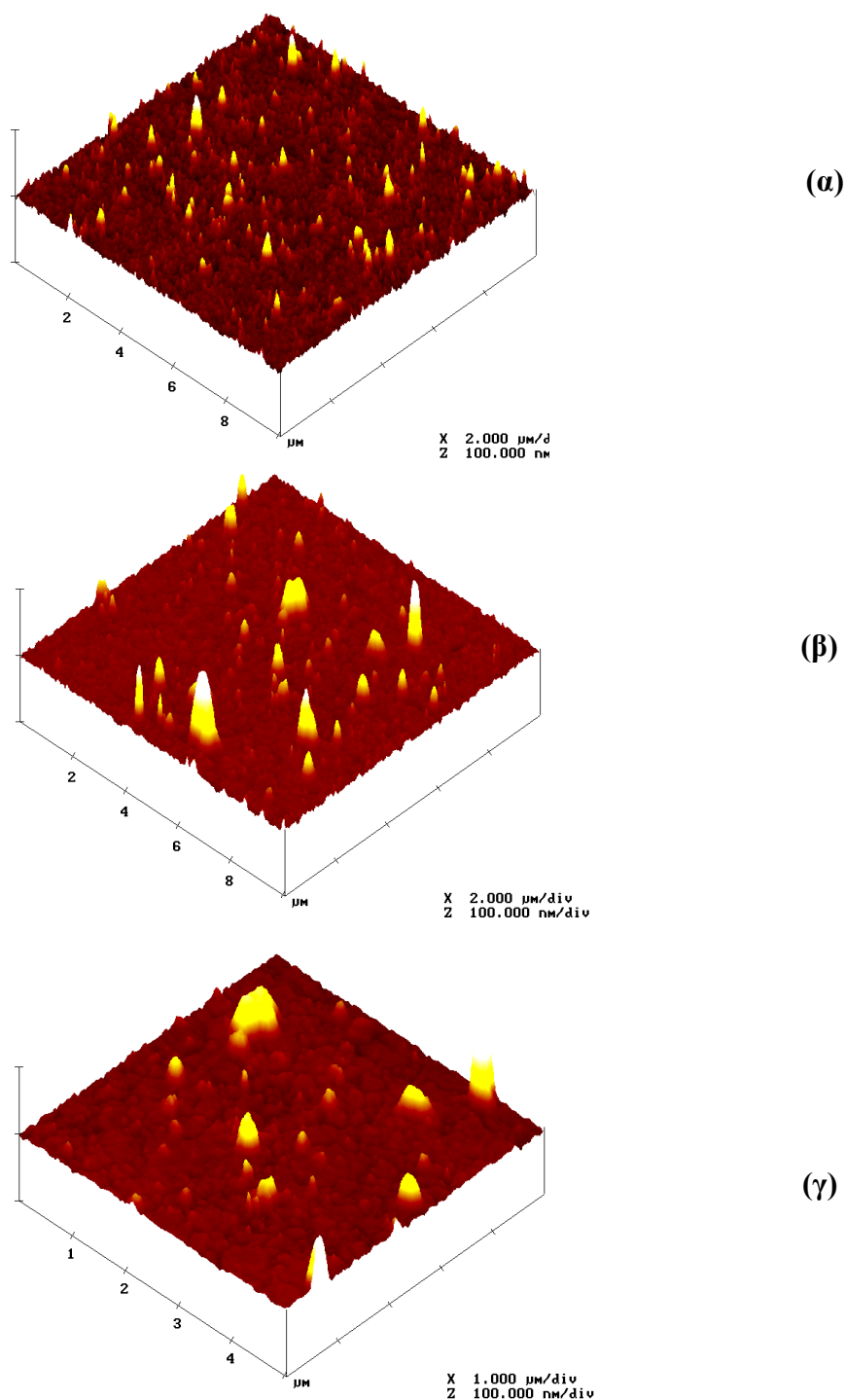
Σχήμα 1.15. Εικόνες AFM των ηλεκτροδίων Au/TA/ACM (α), (β) πριν και (γ) μετά την επώαση τους σε διάλυμα 0,2% w/v πτυιάς σε 20 mM μιδαζολίου pH 5 για 2 ώρες στους 37 °C.



Σχήμα 1.16. Τρισδιάστατες εικόνες AFM των ηλεκτροδίων Au/TA/ACM (α), (β) πριν και (γ) μετά την επώαση τους σε διάλυμα 0,2% w/v πυτιάς σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5 για 2 ώρες στους 37 °C.



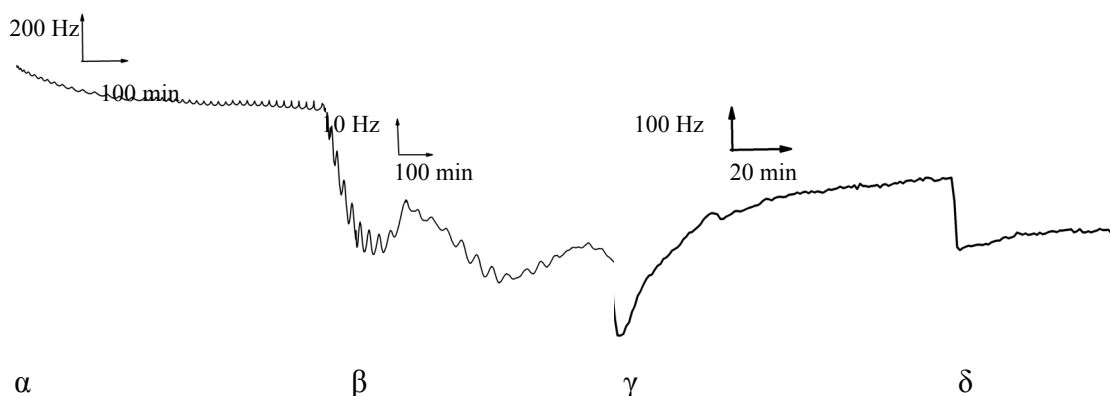
Σχήμα 1.17. Εικόνες AFM των ηλεκτροδίων Au/DTSP/ACM (α), (β) πριν και (γ) μετά την επώαση τους σε διάλυμα 0,2% w/v πυτυάς σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5 για 2 ώρες στους 37 °C.



Σχήμα 1.18. Τρισδιάστατες εικόνες AFM των ηλεκτροδίων Au/DTSP/ACM (α), (β) πριν και (γ) μετά την επώαση τους σε διάλυμα 0,2% w/v πτυιάς σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5 για 2 ώρες στους 37 °C.

1.3.5. Μελέτες σε μικροζυγό κρυστάλλου χαλαζία

Πέραν των ηλεκτροχημικών μελετών, τα διάφορα στάδια κατασκευής των βιοαισθητήρων Au/TA/ACM και η συμπεριφορά αυτών σε διάλυμα πυτιάς μελετήθηκαν και με την τεχνική μικροζυγού κρυστάλλου χαλαζία. Η ανάπτυξη της αυτοδιατασσόμενης στιβάδας θειοκτικού οξέος, η ακινητοποίηση των μικκυλίων της καζεΐνης και η αλληλεπίδραση αυτών με διάλυμα πυτιάς πραγματοποιήθηκε σε διάταξη ροής με τη βοήθεια περισταλτικής αντλίας και ταχύτητα ροής 0,5 mL/min. Κατά την αντίδραση χρησιμοποιήθηκε 0,1% w/v διαλύματος πυτιάς σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5, στους 37 °C. Σύμφωνα με το αντίστροφο πιεζοηλεκτρικό φαινόμενο, η μείωση της μάζας πάνω στην επιφάνεια του τροποποιημένου κρυστάλλου χαλαζία οδηγεί στην αύξηση της συχνότητας ταλάντωσης αυτού.



Σχήμα 1.19. Μελέτες QCM για το βιοαισθητήρα Au/TA/ACM: (α) TA, (β) TA/ACM, (γ) TA/ACM μετά τη διέλευση διαλύματος πυτιάς 0,1% w/v σε ιμιδαζόλιο pH 5, στους 37 °C (δ) έκπλυση με ιμιδαζόλιο pH 5 στους 37 °C.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.19, μετά την ανάπτυξη της στιβάδας του θειοκτικού οξέος και την ακινητοποίηση της καζεΐνης παρατηρήθηκε μείωση της συχνότητας, λόγω της αύξησης της μάζας πάνω στον κρύσταλλο. Μετά την αντίδραση με την πυτιά παρατηρήθηκε αύξηση της συχνότητας δόνησης λόγω της μείωσης της μάζας των

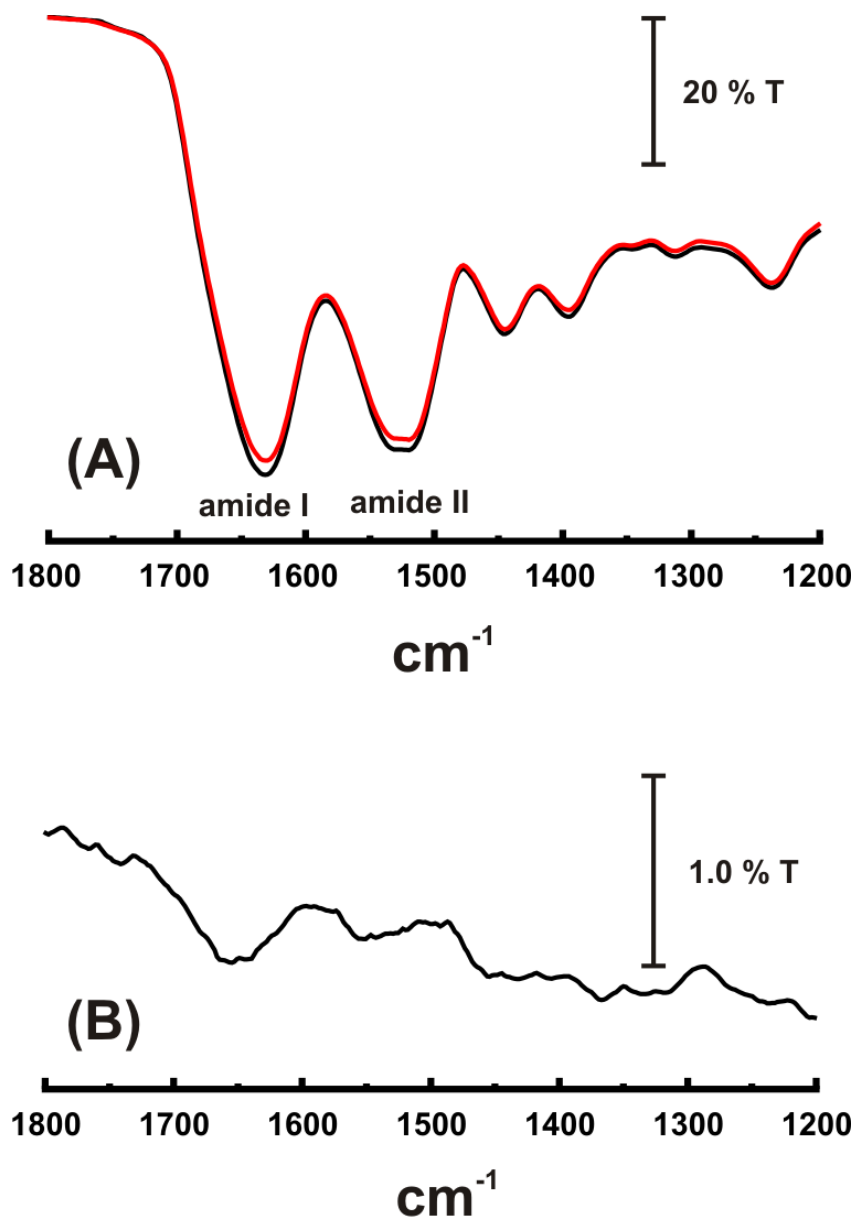
ακινητοποιημένων μικκυλίων της καζεΐνης, όπως προκύπτει από τη σχάση του δεσμού Phe105–Met106 της κ–καζεΐνης των μικκυλίων και την απομάκρυνση του γλυκομακροπεπτιδίου από τα ακινητοποιημένα μικκύλια στο διάλυμα του φορέα.

1.3.6. Μελέτες FT–IR

Κατά τη μελέτη των βιοαισθητήρων με φασματοσκοπία υπερόυθρου αρχικά ελέγξαμε την επίδραση της αραίωσης του εναιωρήματος των μικκυλίων της καζεΐνης με το διάλυμα NaCl (το οποίο είχε επιλεγεί για την ακινητοποίηση των μικκυλίων της καζεΐνης) στην τρισδιάστατη δομή αυτής. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 1.20α, οι ταινίες απορρόφησης των αμιδικών δεσμών I και II στο εναιώρημα 1+4 v/v ACM + 0,2 M NaCl συμπίπτουν απόλυτα με αυτές που καταγράφησαν με το αδιάλυτο εναιώρημα, στοιχείο που υποδηλώνει ότι στη συγκεκριμένη αραίωση δεν παρατηρείται μεταβολή στην τρισδιάστατη δομή της καζεΐνης [Lui, 2009].

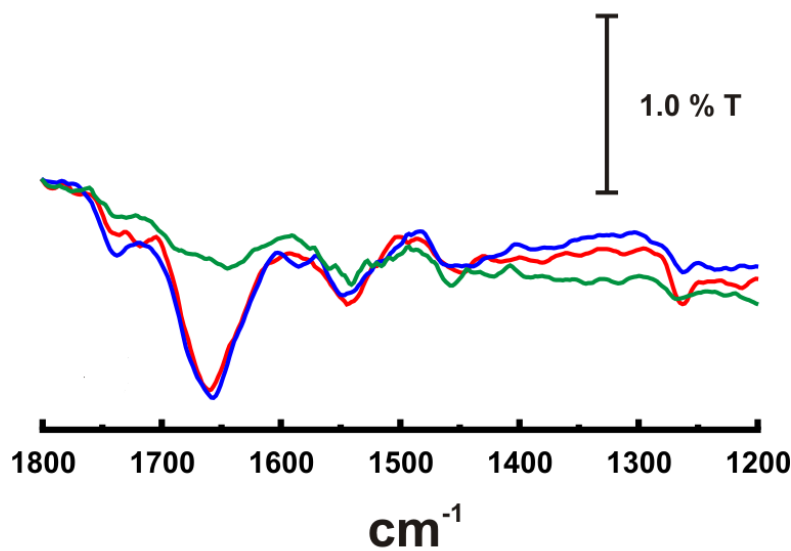
Τα μικκύλια που είχαν ακινητοποιηθεί πάνω στις τροποποιημένες με θειοκτικό οξύ και DTSP επιφάνειες χρυσού, μελετήθηκαν περαιτέρω πριν και μετά την επώαση των αντίστοιχων βιοαισθητήρων σε διάλυμα πυτιάς. Συγκεκριμένα λήφθησαν φάσματα IR μετά την επώαση των βιοαισθητήρων στο ρυθμιστικό διάλυμα εργασίας (τυφλό) για 2 ώρες στους 37 °C και μετά την επώαση τους σε διάλυμα πυτιάς 0,2% w/v σε 20 mM ιμιδαζολίου για 2 ώρες στους 37 °C. Τα φάσματα λήφθησαν στην περιοχή 400 – 4000 cm⁻¹, παρόλα αυτά, για λόγους ευκρίνειας παρουσιάζεται η περιοχή 1200 – 1800 cm⁻¹ στην οποία απορροφούν οι αμιδικοί δεσμοί I και II. Στο Σχήμα 1.20β παρουσιάζεται το φάσμα των ακινητοποιημένων μικκυλίων, το οποίο παρουσιάζει μεγάλη ομοιότητα με αυτό του εναιωρήματος των μικκυλίων της καζεΐνης (Σχήμα 1.20α). Το στοιχείο αυτό υποδηλώνει ότι παρόλο που τα μικκύλια της καζεΐνης ακινητοποιούνται με χημικό δεσμό πάνω στις επιφάνειες του χρυσού, η τρισδιάστατη δομή τους παραμένει ουσιαστικά αμετάβλητη. Η μόνη ευκρινής διαφορά μεταξύ των δύο φασμάτων αφορά στην ένταση της διαπερατότητας, που στην περίπτωση των ακινητοποιημένων μικκυλίων είναι σαφώς μικρότερη λόγω της μικρής ποσότητας του ακινητοποιημένου υλικού. Επιπλέον παρατηρήθηκε μια ελαφρά μετατόπιση των αμιδικών δεσμών I και II κατά 27

κυματάριθμους, η οποία πιθανόν οφείλεται στη χημική αντίδραση των μικκυλίων με την ακινητοποιημένη θειόλη.



Σχήμα 1.20. Φάσματα IR (A) αδιάλυτου εναιωρήματος μικκυλίων (μαύρη γραμμή) και μείγματος 1+4 ν/ν ACM + 0,2 M NaCl (κόκκινη γραμμή), σε pH 6,5 (B) ακινητοποιημένων μικκυλίων πάνω σε τροποποιημένες επιφάνειες χρυσού με DTSP.

Συγκεκριμένα στα φάσματα IR των ακινητοποιημένων μικκυλίων της καζεΐνης πάνω στις τροποποιημένες επιφάνειες χρυσού με DTSP και TA, εμφανίζονται οι χαρακτηριστικές ταινίες απορρόφησης του αμιδικού δεσμού I, που οφείλονται στη δόνηση των δεσμών C=O και C–N στους 1660 και 1655 cm^{-1} αντίστοιχα. Εμφανείς είναι επίσης οι ταινίες απορρόφησης που οφείλονται στον αμιδικό δεσμό II λόγω της δόνησης των δεσμών C–N και N–H στους 1549 και 1544 κυματαρίθμους αντίστοιχα.



Σχήμα 1.21. Φάσματα ακινητοποιημένων μικκυλίων πάνω σε τροποποιημένες χρυσού με TA πριν (κόκκινη γραμμή) και μετά την επώαση τους σε διάλυμα πυτιάς 0,2 % w/v για δύο ώρες στους 37 °C σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5 (πράσινη γραμμή) και σε διάλυμα 20 mM ιμιδαζολίου pH 5, που χρησιμοποιήθηκε ως τυφλό (μπλε γραμμή).

Κατά τη σύγκριση των φασμάτων των ακινητοποιημένων μικκυλίων Au/TA/ACM, πριν και μετά την αντίδραση με πυτιά, παρατηρείται μείωση της έντασης των κορυφών του αμιδικού δεσμού I, η οποία οφείλεται στη μερική ελάττωση της δομής α-έλικας, λόγω της συσσωμάτωσης των μικκυλίων της καζεΐνης [Dousseau, 1990]. Η μείωση αυτή συνοδεύεται από την εμφάνιση δύο ώμων στους 1620 και 1680 κυματαρίθμους, οι οποίοι αποδίδονται σε ενδομοριακές αλληλεπιδράσεις των β-φύλλων, αν και η διαδικασία της συσσωμάτωσης είναι πιο πολύπλοκη από τη μετατροπή της διαμόρφωσης της α-έλικας σε διαμόρφωση β-φύλλων. Λόγω της μικρής συγκέντρωσης των ακινητοποιημένων

μικκυλίων της καζεΐνης, οι μεταβολές αυτές δεν είναι έντονες και ουσιαστικά εμφανίζονται ως δύο ασύμμετρες κορυφές γύρω από τους 1660 κυματάριθμους [Dong 2000]. Οι κορυφές που αφορούν στους αμιδικούς δεσμούς II (1550 cm^{-1}) και II' (1480 cm^{-1}) δεν παρέχουν ξεκάθαρα αποτελέσματα, λόγω του υψηλού θορύβου και της μικρής έντασης του σήματος.

Μετά την επώαση των βιοαισθητήρων στο διάλυμα του τυφλού δεν παρατηρήθηκαν μεταβολές στις κορυφές των φασμάτων στοιχείο που καταδεικνύει ότι στην περίπτωση αυτή η δευτεροταγής δομή της καζεΐνης δε μεταβάλλεται.

1.4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται η ανάπτυξη εμπεδησιομετρικών βιοαισθητήρων πάνω σε ηλεκτρόδια χρυσού, τα οποία είχαν τροποποιηθεί με αρνητικά, θετικά και ουδέτερα φορτισμένες μονοστιβάδες θειολών, για τον προσδιορισμό της πηκτικής δύναμης της πυτιάς. Οι βιοαισθητήρες Au/DTSP/ACM παρουσίασαν μεγαλύτερη ευαισθησία και η αντίδραση με την πυτιά ήταν πιο γρήγορη, σε σχέση με τους βιοαισθητήρες Au/TA/ACM και Au/CYS/ACM.
- Οι προτεινόμενοι βιοαισθητήρες Au/DTSP/ACM δοκιμάστηκαν επιτυχώς σε διάφορα σκευάσματα πυτιάς σε υγρή και στερεή μορφή. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η μεταβολή της αντίστασης μεταφοράς φορτίου πριν και μετά την αντίδραση με την πυτιά είναι ανάλογη της πηκτικής δύναμης.
- Οι προτεινόμενοι βιοαισθητήρες παρέχουν ασφαλή συμπεράσματα για την πηκτική δύναμη της πυτιάς, ακόμα και σε χρόνους επώασης 5 λεπτών. Το χαρακτηριστικό αυτό είναι πολύ σημαντικό για την πιθανή χρήση των βιοαισθητήρων σε αναλύσεις ρουτίνας.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΗΛΕΚΤΡΟΧΗΜΙΚΩΝ ΚΑΙ ΟΠΤΙΚΩΝ (SPR) ΒΙΟΑΙΣΘΗΤΗΡΩΝ Κ-ΚΑΖΕΪΝΗΣ ΓΙΑ ΤΟΝ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟ ΤΗΣ ΠΗΚΤΙΚΗΣ ΔΥΝΑΜΗΣ ΤΗΣ ΠΥΤΙΑΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο δεύτερο κεφάλαιο της παρούσας διατριβής περιγράφεται η ανάπτυξη ηλεκτροχημικών και οπτικών (SPR) βιοαισθητήρων κ-καζεΐνης (κ-CN) για τον προσδιορισμό της πηκτικής δύναμης της πυτιάς. Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες αναπτύχθηκαν πάνω σε ηλεκτρόδια χρυσού, τα οποία είχαν τροποποιηθεί με DTSP, ενώ οι βιοαισθητήρες SPR πάνω σε επιφάνειες χρυσού τροποποιημένες με καρβοξυμεθυλιομένη δεξτράνη. Και στους δύο τύπους βιοαισθητήρων, η κ-καζεΐνη, ακινητοποιήθηκε με χημικό τρόπο πάνω στις επιφάνειες χρυσού. Στους ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ακινητοποιημένων μορίων της κ-καζεΐνης και της χυμοσίνης (το δραστικό ένζυμο της πυτιάς), μελετήθηκε με μετρήσεις κυκλικής βολταμμετρίας (Cyclic Voltammetry, CV), παλμικής διαφορικής βολταμμετρίας (Differential Pulse Voltammetry, DPV) και φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS). Όλες οι προαναφερθείσες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν παρουσία ισομοριακού μίγματος σιδηρι-/σιδηροκυανιούχων ιόντων

στο διάλυμα μέτρησης. Όμοια με όσα αναφέρθηκαν στο 1^ο πειραματικό κεφάλαιο κατά την αντίδραση της κ-καζεΐνης με την πυτιά, διασπάται ο δεσμός Phe105–Met106, στο μόριο της κ-καζεΐνης, παράγοντας το διαλυτό γλυκομακροπεπτιδίο, το οποίο απομακρύνεται στο διάλυμα του ηλεκτρολύτη και τη θετικά φορτισμένη (pI>7) αδιάλυτη παρα κ-καζεΐνη, η οποία παραμένει στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Η μείωση του αρνητικού φορτίου, πάνω στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα, σε συνδυασμό με τη μερική χημική αποδόμηση της στιβάδας αναγνώρισης, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ροής του οξειδοαναγωγικού ζεύγους, από το διάλυμα του ηλεκτρολύτη στην επιφάνεια του χρυσού και συνεπώς την αύξηση της ηλεκτροκατάλυσης του οξειδοαναγωγικού ζεύγους στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Τα πειράματα SPR πραγματοποιήθηκαν απουσία του οξειδοαναγωγικού ζεύγους ενώ οι παρατηρούμενες μεταβολές στη γωνία συντονισμού των επιφανειακών πλασμονίων οφείλονται στη μεταβολή της μάζας της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης. Μετά τη βελτιστοποίηση των πειραματικών παραμέτρων, οι παραπάνω βιοαισθητήρες χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία για τον προσδιορισμό της πηκτικής δύναμης της πυτιάς σε πραγματικά δείγματα στερεής και υγρής μορφής.

2.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Προσπαθώντας να απλοποιήσουμε την κατασκευή και να βελτιώσουμε την απόδοση του βιοαισθητήρα για τον προσδιορισμό της πηκτικής δύναμης της πυτιάς, ο οποίος βασίστηκε στην ακινητοποίηση συνθετικών μικκυλίων της καζεΐνης, η μελέτη μας επικεντρώθηκε στην επανασχεδίαση της ενεργούς βιοστιβάδας και συγκεκριμένα στην αντικατάσταση των συνθετικών μικκυλίων της καζεΐνης με κ-καζεΐνη. Σύμφωνα με όσα έχουν αναφερθεί παραπάνω η κ-καζεΐνη είναι ένα από τα τέσσερα κλάσματα των μικκυλίων, η οποία αντιδρά με τη χυμοσίνη και είναι υπεύθυνη για την πήξη του γάλακτος. Με τη χρήση μόνο αυτού του κλάσματος, καταφέραμε να υπερνικήσουμε προβλήματα, όπως (α) τη μικρή διάρκεια συντήρησης των μικκυλίων της καζεΐνης (περίπου μια εβδομάδα) [Panouille, 2005], και (β) την εξάρτηση της απόκρισης των βιοαισθητήρων από το μέγεθος των μικκυλίων. Επίσης παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση στην επαναληψιμότητα των μετρήσεων. Η σχετική τυπική απόκλιση της μεθόδου από 9 – 16% στην περίπτωση των βιοαισθητήρων μικκυλίων καζεΐνης μειώθηκε

σε <5%. Το στοιχείο αυτό αποτελεί σημαντικό πλεονέκτημα για τη χρήση των βιοαισθητήρων σε αναλύσεις ρουτίνας. Σημαντικό δε πλεονέκτημα για την ενδεχόμενη χρήση των προτεινόμενων βιοαισθητήρων σε αναλύσεις ρουτίνας αποτέλεσε η μείωση του χρόνου αντίδρασης (επώαση στο διάλυμα πυτιάς) των βιοαισθητήρων από 15 σε 5 λεπτά. Τέλος, οι προτεινόμενοι βιοαισθητήρες Au/DTSP/k-CN δοκιμάστηκαν επιτυχώς σε εμπορικά σκευάσματα στερεής και υγρής πυτιάς τόσο με μετρήσεις φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης όσο και με μετρήσεις παλμική διαφορικής βολταμμετρίας. Ομοίως, οι βιοαισθητήρες SPR δοκιμάστηκαν επιτυχώς για τον προσδιορισμό της πηκτικής δύναμης της πυτιάς.

2.2. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

2.2.1. Αντιδραστήρια

Ο δις-(N-υδροξυηλεκτριμιδυλο)-διθειοδιπροπιονικός εστέρας (DTSP $\geq 99,0\%$), η κ-καζεΐνη (λυοφιλοποιημένη σκόνη από μοσχαρίσιο γάλα $\geq 70\%$), η προνάση E (πρωτεάση τύπου XIV από το στρεπτομύκητα *griseus*) και η μη-ιοντική επιφανειοδραστική ουσία πολυοξυαιθυλενο(20)σορβιτόλη (αντιδραστήριο tween twenty, P20) αγοράστηκαν από την εταιρεία Sigma. Το σιδηροκυανιούχο κάλιο και το σιδηρικούανιούχο κάλιο αγοράστηκαν από την εταιρεία Merk. Το φωσφορικό νάτριο, το N-υδροξυηλεκτριμιδίο (NHS $\geq 97,9\%$), το βρωμοοξικό οξύ, το μιδαζόλιο (99,0%), το HEPES και το διαλυτό καρβοδιϊμίδιο EDC ($\geq 99,0\%$), αγοράστηκαν από την εταιρεία Fluka. Όλα τα άλλα χημικά αντιδραστήρια αγοράστηκαν από τις εταιρείες Merk και Sigma. Καθόλη τη διάρκεια των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε δισαπεσταγμένο νερό. Τα διαλύματα της πυτιάς παρασκευάζονταν λίγο πριν τη χρήση τους με προσθήκη κατάλληλων ποσοτήτων στερεής πυτιάς, αγελαδινής ή/και μοσχαρίσιας, (Ηπειρωτοπούλα, Hansen) σε διάλυμα 20 mM μιδαζολίου, σε pH 5. Τα διαλύματα υγρής πυτιάς (Hansen, Danisco) παρασκευάστηκαν με ανάμειξη των δειγμάτων με διάλυμα μιδαζολίου 26,7 mM, σε αναλογία 1+3 v/v. Σε όλες τις περιπτώσεις η ρύθμιση του pH έγινε με διάλυμα 0,1 M HCl.

2.2.2. Πειραματική διάταξη

Τα πειράματα κυκλικής βολταμετρίας (CV), φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης (EIS) και παλμικής διαφορικής βολταμετρίας (DPV) πραγματοποιήθηκαν με τον ηλεκτροχημικό αναλύτη PGSTAT12/FRA2 (Metrohm Autolab, Ολλανδία), σε μια κυψελίδα τριών ηλεκτροδίων. Τα ηλεκτρόδια χρυσού χρησιμοποιήθηκαν ως ηλεκτρόδια εργασίας, ενώ ως αντισταθμιστικό ηλεκτρόδιο χρησιμοποιήθηκε ένα σπειροειδές σύρμα λευκοχρυσού. Ως ηλεκτρόδιο αναφοράς χρησιμοποιήθηκε ένα ηλεκτρόδιο Ag/AgCl/3 M KCl (IJ Cambia, UK) και εφεξής όλες οι τιμές ηλεκτρικής τάσης αναφέρονται στο ηλεκτρόδιο αυτό. Η καταγραφή των φασμάτων εμπέδησης πραγματοποιήθηκε στην περιοχή συχνοτήτων 10^{-1} – 10^5 , με την εφαρμογή μιας ημιτονικής διαταραχής 10 mV (rms), πάνω σε τάση συνεχούς ρεύματος +0,200 V. Τα φάσματα DPV καταγράφηκαν στο παράθυρο δυναμικού 0.0 – 0.4 V, με τις ακόλουθες συνθήκες: ύψος παλμού 50 mV, διάρκεια παλμού 60 ms και περίοδο 150 ms. Η ταχύτητα σάρωσης στα πειράματα κυκλικής βολταμετρίας ήταν $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$. Όλες οι μετρήσεις διεξήχθησαν σε διάλυμα 5 mM σιδηρο-/σιδηρικυανιούχων (1+1 v/v) παρουσία 100 mM KCl σε ρυθμιστικό διάλυμα 50 mM ιμιδαζολίου pH 6,5, σε θερμοκρασία δωματίου. Τα πειράματα SPR, πραγματοποιήθηκαν με τον αναλύτη SPR Biacore 300A (Biacore Life Sciences, Σουηδία) 4-καναλιών με κυψελίδα συνεχούς ροής, και συσσωματωμένο σύστημα ροής για τις εκπλύσεις και τη μεταφορά του δείγματος και των αντιδραστηρίων.

2.2.3. Κατασκευή ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων

Τα ηλεκτρόδια χρυσού κατασκευάστηκαν, καθαρίστηκαν και τροποποιήθηκαν με 2 mM DTSP σύμφωνα με τη μεθοδολογία που περιγράφεται στην παράγραφο 1.2.4, (σελ.111).

Οι τροποποιημένες επιφάνειες χρυσού εμβαπτίστηκαν σε 300 μL διαλύματος κ-καζεΐνης 1 mg/mL σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 5,5 για τουλάχιστον 12 ώρες. Τέλος, τα ηλεκτρόδια Au/DTSP/k-CN, εκπλύθηκαν σε διάλυμα φωσφορικού οξέος pH 5,5 ($3 \times 10 \text{ min}$), υπό συνεχή ανάδευση, προκειμένου να απομακρυνθούν τα φυσικά προσροφημένα πρωτεϊνικά μόρια.

2.2.4. Κατασκευή βιοαισθητήρων SPR

Τα μόρια της κ-καζεΐνης ακινητοποιήθηκαν πάνω σε πλακίδια χρυσού CM5 (καρβοξυμεθυλιομένη δεξτράνη), μετά την αναγέννηση της επιφάνειας τους σε διάλυμα προνάσης E (1 mg mL^{-1} σε 20 mM διαλύματος φωσφορικών σε 150 mM χλωριούχου νατρίου, pH 7,2) για >12 ώρες σε θερμοκρασία δωματίου. Στη συνέχεια εκπλύθηκαν επιμελώς με δισαπεσταγμένο νερό, και εμβαπτίστηκαν όλο το βράδυ σε πρόσφατα παρασκευασμένο διάλυμα 1 M βρωμοοξικού οξέος σε 2 M καυστικού νατρίου, σε θερμοκρασία δωματίου [Chatelier, 1995]. Τέλος, τα πλακίδια CM5 εκπλύθηκαν επιμελώς με δισαπεσταγμένο νερό και ξηράθηκαν σε ρεύμα αργού.

Πριν την ακινητοποίηση της κ-καζεΐνης τα πλακίδια CM5 εγκλιματίστηκαν με ρυθμιστικό διάλυμα HBS-EP (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.05% επιφανειοδραστικού P20, pH διαλύματος 7,4). Στη συνέχεια, για την ακινητοποίηση της πρωτεΐνης χρησιμοποιήθηκε μια σειρά αντιδραστηρίων, τα οποία μεταφέρθηκαν στην επιφάνεια των πλακιδίων CM5 μέσω του αυτόματου δειγματολήπτη και του συστήματος ροής. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκαν τα παρακάτω διαλύματα: (i) διάλυμα ίσων όγκων 0,05 M NHS και 0,2 M EDC σε ρυθμιστικό διάλυμα HBS-EP για την ενεργοποίηση της επιφάνειας της καρβοξυλομεθυλιομένης δεξτράνης, (ii) διάλυμα της πρωτεΐνης, το οποίο προέκυψε από την ανάμειξη του αρχικού διαλύματος A [όπου A: $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ κ-καζεΐνης σε μείγμα 1 + 4 v/v 100 mM διαλύματος οξικού νατρίου pH 5,5 + 10 mM διαλύματος οξικού νατρίου pH 4] με 10 mM οξικού νατρίου pH 4 σε αναλογία 1+10 και διήθηση από ηθμό 0,22 μm (iii) διάλυμα 0,1 M αιθανολαμίνης σε HBS-EP για την απενεργοποίηση των ενεργοποιημένων εστερομάδων και τέλος (iv) διάλυμα HBS-EP για την απομάκρυνση των μη χημικά προσδεμένων μορίων κ-καζεΐνης. Η κινητή φάση καθόλη τη διάρκεια των μετρήσεων ήταν το HBS-EP, ενώ η θερμοκρασία παρέμενε σταθερή στους 25 °C, με τη χρήση θερμοστάτη. Πριν τη χρήση του το διάλυμα του φορέα απαερώθηκε και διηθήθηκε με ηθμό 0,22 μm .

Εναλλακτικά τα πλακίδια CM5 αναγεννήθηκαν με ακτινοβολία UV (365 nm) σε ατμόσφαιρα όζοντος για 15 λεπτά. Στη συνέχεια τα πλακίδια εμβαπτίστηκαν σε μίγμα 1+1+5 v/v 25% NH_4OH + 30% H_2O_2 + H_2O για δέκα λεπτά, εκπλύθηκαν επιμελώς με δισαπεσταγμένο ύδωρ, άνυδρη αιθανόλη και ξηράθηκαν. Πάνω στα πλακίδια χρυσού

εναποτέθηκε όγκος 0,8 mL διαλύματος 2 mM DTSP σε ακετόνη για 2 ώρες σε κλειστό θάλαμο κορεσμένο με ατμούς ακετόνης. Τα πλακίδια εκπλύθηκαν επιμελώς με ακετόνη και ξηράνθηκαν σε ρεύμα αργού. Η ακινητοποίηση της κ-καζεΐνης πραγματοποιήθηκε με επίσταξη 1 mL διαλύματος 1 mg/ml κ-καζεΐνης σε 20 mM μιδαζολίου pH 7 για τουλάχιστον 12 ώρες. Ακολούθησαν εκπλύσεις του πλακιδίου CM5 με 20 mM μιδαζολίου pH 7.

2.2.5. Πορεία εργασίας – Υπολογισμοί

Τα ηλεκτρόδια Au/DTSP/k-CN επώαστηκαν σε διαλύματα πυτιάς σε 20 mM μιδαζολίου pH 5 για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, και σε θερμοκρασίες 25, 30 και 37 °C. Ακολούθησαν εκπλύσεις με ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 5 και στη συνέχεια τα ηλεκτρόδια μεταφέρθηκαν στην κυψελίδα μέτρησης.

Οι τιμές R_{ct} στα φάσματα φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης αντιστοιχούν στο πραγματικό μέρος της εμπέδησης στα 0,1 Hz. Στα πειράματα αυτά η σχετική μεταβολή του σήματος πριν και μετά την αντίδραση με την πυτιά, εκφράζεται ως ΔS (%) = $\{ [R_{ct} (\text{μετά την εμφύσηση στην πυτιά}) - R_{ct} (\text{πριν την εμφύσηση στην πυτιά})] / R_{ct} (\text{πριν την εμφύσηση στην πυτιά}) \} \times 100$ και χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο της πηκτικής ικανότητας της πυτιάς. Κατά έναν αντίστοιχο τρόπο η σχετική μεταβολή του ρεύματος της κορυφής οξειδωσης των σιδηροκυανιούχων στις καμπύλες DPV, χρησιμοποιήθηκε ως μέτρο της πηκτικής δύναμης της πυτιάς, $[\Delta S (\%) = \{ [I_p (\text{μετά την εμφύσηση στην πυτιά})] - [I_p (\text{πριν την εμφύσηση στην πυτιά})] \} / I_p \times 100]$.

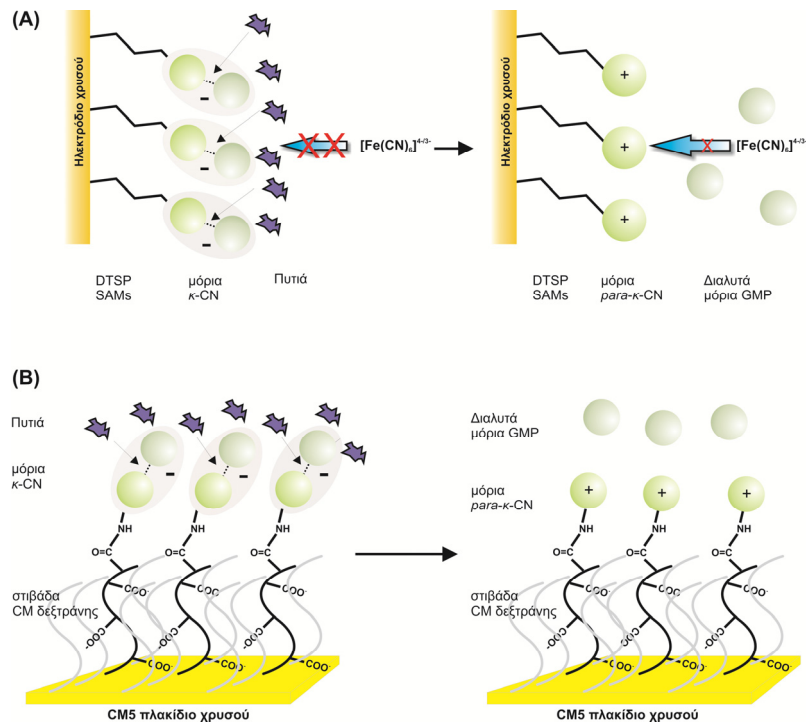
Στα πειράματα SPR, η πηκτική δύναμη της πυτιάς εκφράζεται με τη μεταβολή της γωνίας SPR (σε μονάδες RU) πριν και μετά την αντίδραση με πυτιά. Η εισαγωγή των δειγμάτων έγινε με τη βοήθεια του αυτόματου δειγματολήπτη και του συστήματος συνεχούς ροής.

2.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΚΑΙ ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όμοια με όσα αναφέρθηκαν στην περίπτωση των βιοαισθητήρων Au/DTSP/ACM, κατά τη δράση της χυμοσίνης στο δεσμό Phe105–Met106, δημιουργείται το διαλυτό

γλυκομακροπεπτίδιο, το οποίο απομακρύνεται στο διάλυμα του ηλεκτρολύτη και η θετικά φορτισμένη ($pI > 7$) *para*-κ-καζεΐνη, που παραμένει στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου (Σχήμα 2.1.A).

Η μείωση του αρνητικού φορτίου, πάνω στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα, σε συνδυασμό με τη μερική χημική αποδόμηση της επιφάνειας, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ροής του οξειδοαναγωγικού ζεύγους, από το διάλυμα του ηλεκτρολύτη στην επιφάνεια του χρυσού και συνεπώς την αύξηση της ηλεκτροδιακής αντίδρασης μεταφοράς φορτίου των σιδηρο-/σιδηρικουανιούχων ιόντων στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου.



Σχήμα 2.1. Σχηματική απεικόνιση (A) των ηλεκτροδίων Au/DTSP/k-CN και (B) των πλακιδίων CM5/ k-CN πριν και μετά την αντίδραση με πυτιά.

Αντίθετα, στα πειράματα SPR, τα οποία πραγματοποιήθηκαν απουσία του οξειδοαναγωγικού ζεύγους, οι παρατηρούμενες μεταβολές των γωνιών SPR οφείλονται

στην ελάττωση της μάζας της ακινητοποιημένης κ-καζεΐνης, λόγω της αποκοπής του γλυκομακροπεπτιδίου (Σχήμα 2.1.B).

2.3.1. Ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες

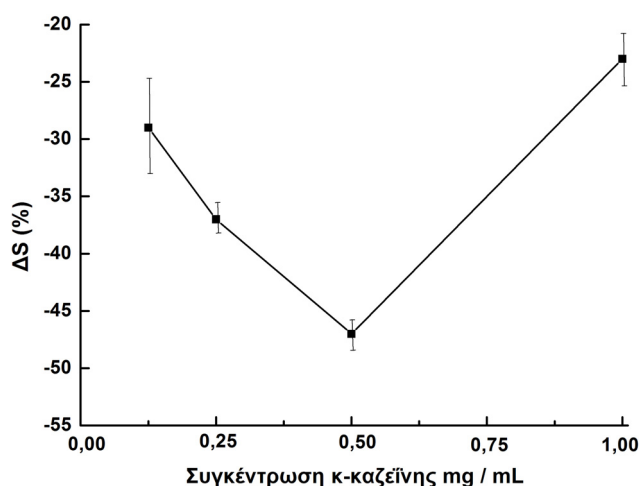
2.3.1.1. Ακινητοποίηση κ-καζεΐνης

Η κ-καζεΐνη (χωρίς το πρόδρομο πεπτίδιο, σελ. 8) αποτελείται από 169 πεπτίδια και το μοριακό της βάρος είναι 19 kD [Groves, 1992]. Στα αρχικά πειράματα ακινητοποίησης τα διαλύματα της κ-καζεΐνης παρασκευάστηκαν σε ιμιδαζόλιο και η ακινητοποίηση πραγματοποιήθηκε πάνω σε επιφάνειες χρυσού, τροποποιημένες με αυτοδιατασσόμενες μονοστιβάδες DTSP. Τα πλεονεκτήματα στη χρήση του DTSP έχουν αναφερθεί στη σελ.131 [Wagner, 1996]. Παρόλο που κατά την ακινητοποίηση των μικκυλίων της καζεΐνης το ιμιδαζόλιο αποτέλεσε το πιο κατάλληλο ρυθμιστικό διάλυμα, κατά την ακινητοποίηση της κ-καζεΐνης δεν παρατηρήθηκε ανάλογη συμπεριφορά. Όπως φαίνεται από τα δεδομένα του Πίνακα 2.1, στην περιοχή pH 5 – 6,5, η διαλυτότητα της κ-καζεΐνης στο ρυθμιστικό διάλυμα του ιμιδαζολίου είναι περιορισμένη, ενώ σε pH 7, οι βιοαισθητήρες δεν ήταν λειτουργικοί. Αντίθετα, η κ-καζεΐνη διαλύθηκε αποτελεσματικά παρουσία ρυθμιστικού διαλύματος φωσφορικών και οι βιοαισθητήρες ήταν λειτουργικοί. Μέγιστη μεταβολή σήματος, μετά την αντίδραση με πυτιά, παρατηρήθηκε σε pH 5,5. Η παρατηρούμενη εξάρτηση της λειτουργικότητας των βιοαισθητήρων από το pH του διαλύματος ακινητοποίησης πιθανόν να συνδέεται με την αναδιαμόρφωση του πρωτεϊνικού μορίου σε αυτές τις τιμές pH, καθώς και στον πολυμερισμό του. Στο σημείο αυτό πρέπει να αναφέρουμε ότι η κ-καζεΐνη, στη φυσική της μορφή, αποτελείται από μονομερείς πολυπεπτιδικές αλυσίδες, οι οποίες εξαιτίας των δισουλφιδικών ενδομοριακών δεσμών μεταξύ των Cys11-Cys11, Cys11-Cys88 και Cys88-Cys88, πολυμερίζονται και, σε ορισμένες περιπτώσεις, εμφανίζονται ακόμα και ως δεκαμερή [Swaisgood, 1964 – Swaisgood, 1975 – Rasmussen, 1992].

Πίνακας 2.1. Επίδραση της σύστασης και του pH του διαλύματος ακινητοποίησης στη συμπεριφορά των βιοαισθητήρων Au/DTSP/k–CN. Η συγκέντρωση του διαλύματος ακινητοποίησης ήταν $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$. Οι βιοαισθητήρες επώαστηκαν σε διάλυμα πυτιάς 0,2% w/v (Hansen) σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5 για 5 λεπτά στους 37°C .

pH	20 mM ιμιδαζολίου	20 mM φωσφορικών
5	Χαμηλή διαλυτότητα	Χαμηλή διαλυτότητα
5,5	Χαμηλή διαλυτότητα	$-22,7 \pm 1,5$
6	Χαμηλή διαλυτότητα	$-8 \pm 5,0$
7	+10	+4

Προσπαθώντας να εξηγήσουμε την επίδραση του pH στην περιοχή 5–7 στη λειτουργικότητα των βιοαισθητήρων θα μπορούσαμε να υποθέσουμε ότι τόσο το pH του διαλύματος ακινητοποίησης, όσο και η σωματιδιακή φύση του ρυθμιστικού διαλύματος, επηρεάζουν, σε κάποιο βαθμό, τον πολυμερισμό του πρωτεϊνικού μορίου και ως αποτέλεσμα αυτού, επηρεάζεται η πρόσβαση της χυμοσίνης στον πεπτιδικό δεσμό Phe105–Met106 στα ακινητοποιημένα μόρια της κ–καζεΐνης.



Σχήμα 2.2. Μεταβολή της αντίστασης μεταφοράς φορτίου $\Delta S(\%)$ στους βιοαισθητήρες Au/DTSP/k–CN, μετά την επώαση τους σε διάλυμα πυτιάς 0,2% w/v (Hansen, στερεή) σε 20 mM ιμιδαζολίου για 5 λεπτά στους 37°C .

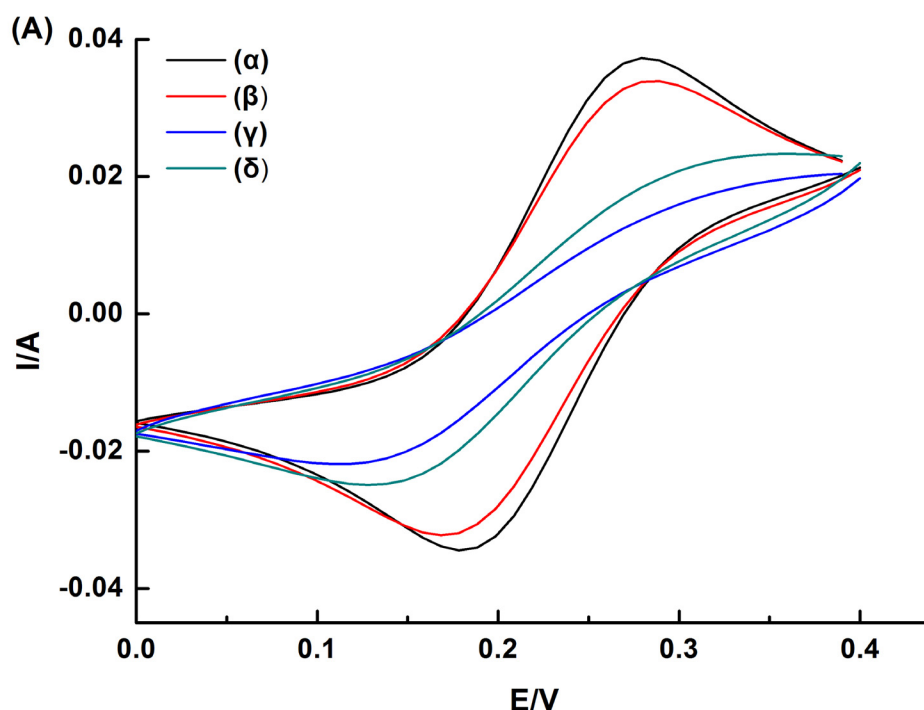
Η επίδραση της συγκέντρωσης του διαλύματος ακινητοποίησης στην απόδοση των βιοαισθητήρων Au/DTSP/k-CN μελετήθηκε στην περιοχή συγκεντρώσεων 0,125 – 1 mg·mL⁻¹ κ-καζεΐνης σε ρυθμιστικό διάλυμα φωσφορικών pH 5,5. Στη μελέτη αυτή ως κριτήριο για την επιλογή της βέλτιστης συγκέντρωσης αποτέλεσε η ευαισθησία των αντίστοιχων βιοαισθητήρων μετά την επώασή τους σε διάλυμα 0,2% w/v πυτιάς (Hansen) σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5 για 5 λεπτά στους 37 °C .

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.2, οι βιοαισθητήρες παρουσίασαν βέλτιστη απόδοση στην περίπτωση που το διάλυμα ακινητοποίησης της κ-καζεΐνης είχε συγκέντρωση 0,5 mg·mL⁻¹. Για μικρότερες συγκεντρώσεις η απόδοση των βιοαισθητήρων είναι μειωμένη, προφανώς λόγω της μικρής ποσότητας της ακινητοποιημένης κ-καζεΐνης, ενώ η παρατηρούμενη μείωση της απόδοσης των βιοαισθητήρων στην τιμή 1 mg·mL⁻¹ πιθανόν να οφείλεται σε στερεοχημικές παρεμποδίσεις που λαμβάνουν χώρα μεταξύ του ενεργού κέντρου της κ-καζεΐνης και της χυμοσίνης.

2.3.1.2. Απόδοση ηλεκτροδίων Au/DTSP/k-CN

Τα πειράματα κυκλικής βολταμμετρίας, φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης και παλμική διαφορικής βολταμμετρίας στα διάφορα στάδια κατασκευής και απόκρισης των βιοαισθητήρων απεικονίζονται στο Σχήμα 2.3. Στο Σχήμα 2.3.A παρουσιάζονται τα διαγράμματα κυκλικής βολταμμετρίας παρουσία του οξειδοαναγωγικού ζεύγους σε ταχύτητα σάρωσης 50 mV·s⁻¹. Ο σχηματισμός της αυτοδιατασόμενης μονοστιβάδας του DTSP, έχει ως αποτέλεσμα μια μικρή μείωση στις κορυφές οξείδωσης και αναγωγής, στοιχείο που υποδεικνύει ότι κάτω από τις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες (2 mM DTSP και 2 ώρες επώασης) η στιβάδα του DTSP δεν περιορίζει σημαντικά την αντίδραση μεταφοράς φορτίου από το διάλυμα στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Αντίθετα η ακινητοποίηση της κ-καζεΐνης (λόγω του όγκου της πρωτεΐνης) μειώνει σημαντικά την ένταση των κορυφών οξειδοαναγωγής. Επιπλέον, κατά την ακινητοποίηση της κ-καζεΐνης, σχηματίζεται μια αρνητικά φορτισμένη στιβάδα, η οποία επίσης απωθεί τα αρνητικά φορτισμένα σωματίδια του οξειδοαναγωγικού ζεύγους. Μετά την αντίδραση με την πυτιά, σχηματίζεται η θετικά φορτισμένη para κ-καζεΐνη και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του συνολικού αρνητικού φορτίου της επιφάνειας των

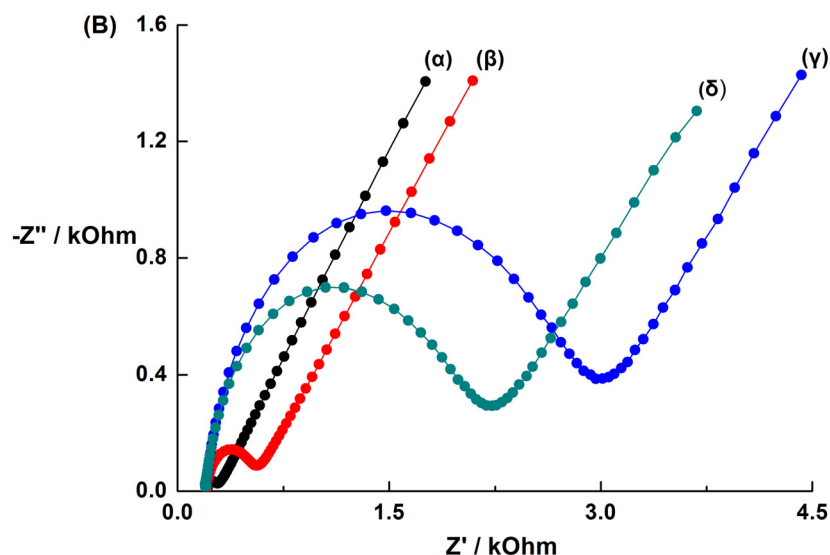
βιοαισθητήρων και συνεπώς την αύξηση της ροής του οξειδοαναγωγικού ζεύγους προς την επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Το φαινόμενο αυτό οδηγεί σε αύξηση της έντασης των κορυφών της οξειδοαναγωγικής αντίδρασης και το κυκλικό βολταμμογράφημα στο στάδιο αυτό εμφανίζεται ανάμεσα στα κυκλικά βολταμμογραφήματα των ηλεκτροδίων Au/DTSP και Au/DTSP/k-CN.



Σχήμα 2.3.A. Κυκλικά βολταμμογραφήματα στα διάφορα στάδια κατασκευής και χρήσης των βιοαισθητήρων Au/DTSP/k-CN, (α) γυμνά ηλεκτρόδια, (β) ηλεκτρόδια Au/DTSP, (γ) βιοαισθητήρες Au/DTSP/k-CN και (δ) οι βιοαισθητήρες μετά την επώαση τους σε διάλυμα πυτιάς 1+3 ν/ν (Hansen, υγρή) + 26,6 ιμιδαζόλιο pH 5 για 5 λεπτά στους 37 °C.

Αντίστοιχα με τα πειράματα κυκλικής βολταμμετρίας, στις μελέτες φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης (Σχήμα 2.3.B) παρατηρήθηκε προοδευτική αύξηση της

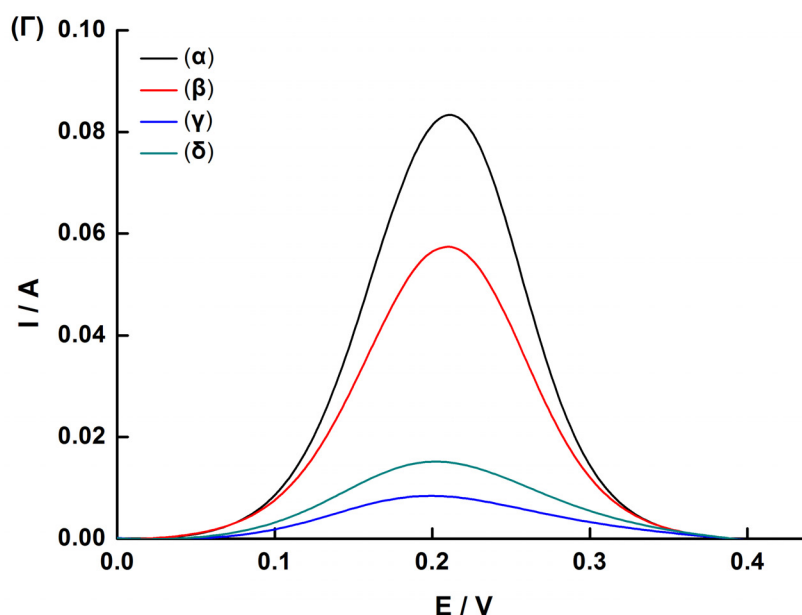
αντίστασης μεταφοράς φορτίου από 0,29 kOhm στα γυμνά ηλεκτρόδια σε 0,56 και 2,99 kOhm στα ηλεκτρόδια Au/DTSP και Au/DTSP/κ-καζεΐνη, αντίστοιχα. Μετά την αντίδραση με την πυτιά παρατηρήθηκε μείωση της αντίστασης μεταφοράς φορτίου στα 2,22 kOhm. Η σταδιακή αύξηση της αντίστασης μεταφοράς φορτίου οφείλεται στη σταδιακή επικάλυψη της επιφάνειας του ηλεκτροδίου, η οποία έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση της ροής του οξειδοαναγωγικού ζεύγους από το διάλυμα του ηλεκτρολύτη στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Η ακινητοποίηση της κ-καζεΐνης αυξάνει την αντίσταση μεταφοράς φορτίου, τόσο λόγω του μεγέθους όσο και του αρνητικού της φορτίου. Μετά την αντίδραση με την πυτιά, και στην περίπτωση αυτή, η δημιουργία της θετικά φορτισμένης para κ-καζεΐνης οδηγεί στη μείωση της αντίστασης μεταφοράς φορτίου.



Σχήμα 2.3.B. Διαγράμματα Nyquist στα διάφορα στάδια κατασκευής και χρήσης των βιοαισθητήρων Au/DTSP/κ-CN (α) γυμνά ηλεκτρόδια, (β) ηλεκτρόδια Au/DTSP, (γ) βιοαισθητήρες Au/DTSP/κ-CN και (δ) οι βιοαισθητήρες μετά την επώαση τους σε διάλυμα πυτιάς 1+3 v/v (Hansen, υγρή) + 26,6 μιδαζόλιο pH 5 για 5 λεπτά στους 37 °C.

Η σταδιακή κατασκευή του βιοαισθητήρα μελετήθηκε και με πειράματα παλμικής διαφορικής βολταμετρίας (Σχήμα 2.3Γ). Η ένταση της κορυφής στα 0,2 V, οφείλεται

στην οξείδωση των σιδηροκυανιούχων κατά την ανοδική σάρωση από 0,0 σε 0,4 V. Στην περίπτωση αυτή η ένταση του ρεύματος της ανοδικής κορυφής μεταβάλλεται αντίστροφα, συγκρινόμενη με τα αντίστοιχα μεγέθη στα πειράματα κυκλικής βολταμμετρίας και φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης. Ειδικότερα στα διάφορα στάδια κατασκευής του βιοαισθητήρα παρατηρείται μείωση των τιμών ρεύματος από 83,4 μA στο γυμνό ηλεκτρόδιο σε 57,4 και 8,5 μA για τα ηλεκτρόδια Au/DTSP και Au/DTSP/k-CN αντίστοιχα. Μετά την αντίδραση με την πυτιά παρατηρείται αύξηση της τιμής του ρεύματος στα 15,2 μA .



Σχήμα 2.3.Γ. Πειράματα DPV στα διάφορα στάδια κατασκευής και χρήσης των βιοαισθητήρων Au/DTSP/k-CN (α) γυμνά ηλεκτρόδια, (β) ηλεκτρόδια Au/DTSP, (γ) βιοαισθητήρες Au/DTSP/k-CN και (δ) οι βιοαισθητήρες μετά την επώαση τους σε διάλυμα πυτιάς 1+3 v/v (Hansen, υγρή) + 26,6 μιδαζόλιο pH 5 για 5 λεπτά στους 37 °C.

2.3.1.3. Βελτιστοποίηση πειραματικών παραμέτρων

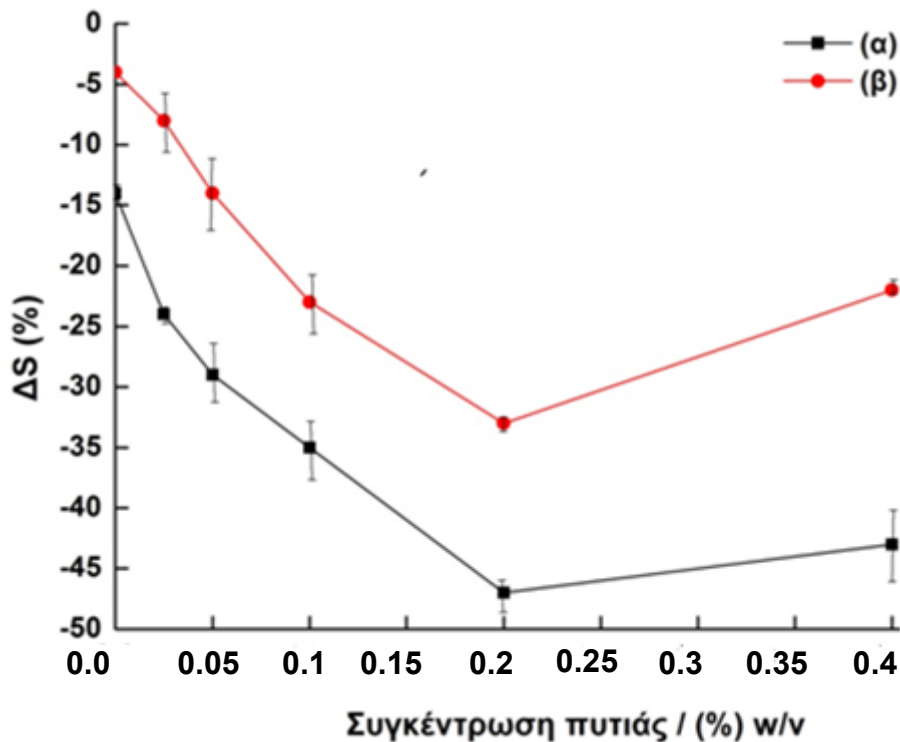
Η επίδραση του pH της αντίδρασης καθώς και η επίδραση της θερμοκρασίας επώασης, μελετήθηκαν σε συγκέντρωση πυτιάς 0,2 w/v σε διάλυμα 20 mM μιδαζολίου

και χρόνο αντίδρασης 5 λεπτά (Πίνακας 2.2). Όπως φαίνεται από τα δεδομένα του Πίνακα 2.2 σε pH 6, η απόκριση του βιοαισθητήρα είναι σχεδόν μηδενική. Σε pH 6,5 η μεταβολή της αντίστασης μεταφοράς φορτίου είναι θετική και προφανώς η μεταβολή αυτή του σήματος δε συνδέεται με την αντίδραση μεταξύ της χυμοσίνης και των ακινητοποιημένων μορίων της κ-καζεΐνης. Πιθανά να οφείλεται στην επαναδιευθέτηση των ακινητοποιημένων μορίων της κ-καζεΐνης ή στη φυσική προσρόφηση της πυτιάς πάνω στην επιφάνεια των βιοαισθητήρων.

Πίνακας 2.2. Μεταβολή σήματος των βιοαισθητήρων Au/DTSP/k-CN μετά την επώαση τους σε διάλυμα πυτιάς 0,2% w/v (Hansen) σε 20 mM ιμιδαζολίου για 5 λεπτά σε διαφορετικές τιμές pH και θερμοκρασίες επώασης. Ως τυφλό, χρησιμοποιήθηκε διάλυμα 20 mM ιμιδαζολίου.

pH	Θερμοκρασία, °C	Μετά την αντίδραση με την πυτιά	Μετά την επώαση σε διάλυμα 20 mM ιμιδαζολίου
6,5	37	+20	–
6	37	–3	–
5,5	37	–28 ± 7	–
5,2	37	–34 ± 1	–17 ± 5
5	37	–47 ± 1	–14 ± 0
5	30	–33 ± 0.5	–4 ± 1
5	25	–17 ± 1	–3,5 ± 0,5

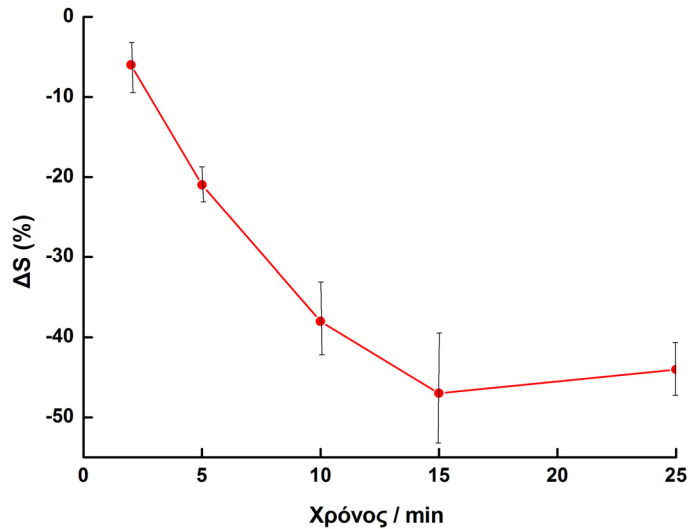
Από τα δεδομένα του παραπάνω πίνακα συμπεραίνουμε ότι η αλληλεπίδραση της κ-καζεΐνης με τη χυμοσίνη ευνοείται σε τιμές pH από 5 έως 5,5, ενώ υψηλότερες αποκρίσεις παρατηρήθηκαν σε τιμές pH 5 και 5,2. Σύμφωνα όμως με τις τιμές που παρατηρήθηκαν σε διάλυμα 20 mM ιμιδαζολίου απουσία πυτιάς (τυφλό) στις αντίστοιχες τιμές pH, φαίνεται ότι ένα ποσοστό της μείωσης του σήματος οφείλεται στη θερμική κατεργασία των ακινητοποιημένων κ-καζεϊνών.



Σχήμα 2.4. Καμπύλες βαθμονόμησης των βιοαισθητήρων Au/DTSP/k-CN στους (α) 30 °C και (β) 37 °C μετά την επώαση τους σε διαλύματα διαφορετικής συγκέντρωσης πυτιάς (Hansen) σε 20 mM ιμιδαζολίου για 5 λεπτά.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η απόδοση των βιοαισθητήρων στην περιοχή συγκεντρώσεων 0 – 0,4% w/v πυτιάς σε 20 mM ιμιδαζολίου στους 30 και 37 °C. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.4, η μεταβολή του σήματος είναι ανάλογη της συγκέντρωσης της πυτιάς. Για συγκεντρώσεις πυτιάς >0,2%, παρατηρείται μείωση της μεταβολής του σήματος, η οποία πιθανόν οφείλεται στη φυσική προσρόφιση της πυτιάς πάνω στις επιφάνειες των βιοαισθητήρων. Ως εκ τούτου για την εφαρμογή των βιοαισθητήρων σε συγκεντρώσεις πυτιάς >0,2% είναι απαραίτητο το μπλοκάρισμα των μη-ειδικών θέσεων πρόσδεσης πάνω στην επιφάνεια των βιοαισθητήρων. Από τη σύγκριση της απόδοσης των βιοαισθητήρων στους 30 και 37 °C είναι φανερό ότι η αύξηση της θερμοκρασίας δεν αυξάνει την ευαισθησία των βιοαισθητήρων. Η διαφορά του σήματος παραμένει σχεδόν

σταθερή σε όλη την περιοχή συγκεντρώσεων (0 – 0,2%) και ίση με αυτή που παρατηρήθηκε στο τυφλό πείραμα, απουσία πυτιάς (0%).



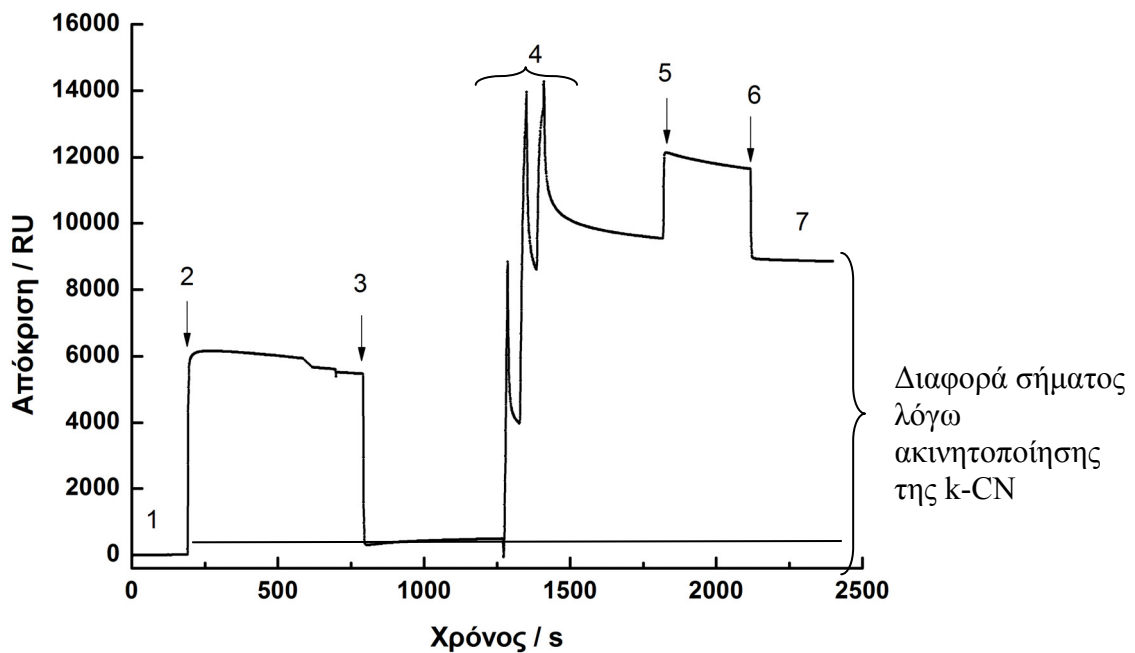
Σχήμα 2.5. Μεταβολή της αντίστασης μεταφοράς φορτίου των βιοαισθητήρων Au/DTSP/k-CN για διαφορετικούς χρόνους επώασης, σε διάλυμα 0,1% w/v πυτιάς (Hansen) σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5 στους 30 °C.

Περαιτέρω μελετήθηκε η επίδραση του χρόνου επώασης στο διάστημα 2–25 min στην απόδοση των βιοαισθητήρων παρουσία πυτιάς 0,1% w/v. Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.5, η απόδοση των βιοαισθητήρων αυξάνεται σχεδόν γραμμικά με το χρόνο επώασης, μέχρι τα 15 λεπτά. Για χρόνους επώασης μεγαλύτερους από 15 λεπτά, η μεταβολή της αντίστασης μεταφοράς φορτίου δεν αυξάνεται περαιτέρω.

Στο σημείο αυτό αξίζει να αναφέρουμε ότι από τη σύγκριση των βιοαισθητήρων Au/DTSP/k-CN, με τους αντίστοιχους των μικκυλίων καζεΐνης, προκύπτει ότι η αντίδραση στους πρώτους πραγματοποιείται πολύ πιο γρήγορα. Συγκεκριμένα, η απόκριση των βιοαισθητήρων κ-καζεΐνης παρουσιάζει πλατό στα 15 λεπτά, ενώ οι αντίστοιχοι των μικκυλίων στα 30 λεπτά. Η διαφορά αυτή πιθανά οφείλεται στην υψηλότερη προσβασιμότητα της χυμοσίνης στο δεσμό Phe105–Met106.

2.3.2. Μελέτες SPR

Η τεχνική SPR αποτελεί μια από τις πιο σημαντικές τεχνικές στην ανάπτυξη βιοαισθητήρων αφού παρέχει τη δυνατότητα άμεσης και συνεχούς παρακολούθησης της αλληλεπίδρασης μεταξύ (βιο)μορίων, μικρούς χρόνους απόκρισης και υψηλή ευαισθησία. Βασικό μειονέκτημα της τεχνικής αποτελεί το υψηλό κόστος των τροποποιημένων επιφανειών χρυσού (SPR gold chips) και για αυτό το λόγο τα πειράματά μας, πραγματοποιήθηκαν σε CM5 SPR chips που αναγεννήθηκαν σύμφωνα με τη μέθοδο των Chatelier et al [Chatelier, 1995]. Η απόκριση του αναλύτη στα διάφορα στάδια κατασκευής του αισθητήρα, τα οποία αναλύονται λεπτομερώς στην παράγραφο 2.2.4, (σελ. 149) παρουσιάζονται στο Σχήμα 2.6.

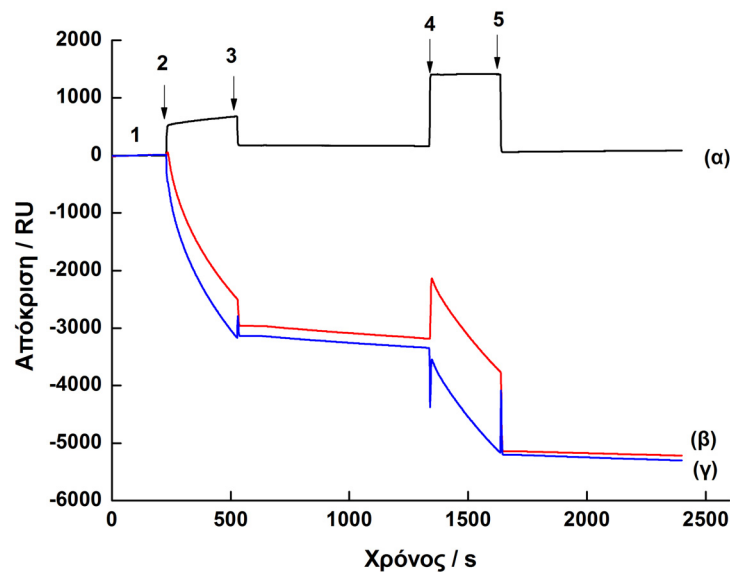


Σχήμα 2.6. Κατασκευή των βιοαισθητήρων CM5/k-CN πάνω σε αναγεννημένα CM5 SPR chips χρυσού: (1) γραμμή βάσης (2) ενεργοποίηση της καρβοξυμεθυλιομένης δεξτράνης με EDC/NHS, (3) ρυθμιστικό διάλυμα HBS-EP, (4) διαδοχική προσθήκη του πρωτεϊνικού διαλύματος και του διαλύματος έκπλυσης ΠΔ/ΔΕ/ΠΔ/ΔΕ/ΠΔ/ΔΕ (5) ρυθμιστικό διάλυμα HBS-EP, (6) απενεργοποίηση των αμινο-ενεργών εστέρων με αιθανολαμίνη, (7) ρυθμιστικό διάλυμα HBS-EP.

Η μεταβολή του σήματος μεταξύ της γραμμής βάσης και μετά την ακινητοποίηση της κ-καζεΐνης [διαφορά σήματος μεταξύ των σημείων (1) και (7)] πιστοποιούν την καταλληλότητα των αναγεννημένων CM5 SPR chips ως πλατφόρμας ακινητοποίησης. Η καμπύλη SPR στο σημείο 4, το οποίο αναφέρεται στην ακινητοποίηση της κ-CN, έχει τη μορφή αυτή λόγω της εναλλαγής στην προσθήκη του πρωτεϊνικού διαλύματος (ΠΔ) και του διαλύματος έκπλυσης (ΔΕ).

Στη συνέχεια ακολούθησε η διέλευση μιας σειράς διαλυμάτων προς το SPR chip αναφοράς (CM5, Σχήμα 2.7, καμπύλη α) και το SPR chip εργασίας (CM5/k-CN, Σχήμα 2.7, καμπύλη β) με την ακόλουθη σειρά:

- (1) 20 mM ιμιδαζολίου pH 5,
- (2) 0,2% w/v πυτιάς (Ηπειρωτοπούλα) σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5,
- (3) 20 mM ιμιδαζολίου pH 5,
- (4) 0,1% w/v πυτιάς (Ηπειρωτοπούλα) σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5,
- (5) 20 mM ιμιδαζολίου pH.



Σχήμα 2.7. Μεταβολή σήματος στο SPR chip CM5 αναφοράς (καμπύλη α) και στο SPR chip CM5 εργασίας (καμπύλη β) μετά την προσθήκη (1) 20 mM ιμιδαζολίου pH 5, (2) 0,2% w/v πυτιάς (Ηπειρωτοπούλα) σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5, (3) 20 mM ιμιδαζολίου pH 5, (4) 0,1% w/v πυτιάς (Ηπειρωτοπούλα) σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5, (5) 20 mM ιμιδαζολίου pH. Η καμπύλη γ προκύπτει από την άθροιση των δύο καμπυλών.

Από τις μεταβολές του σήματος, όπως παρουσιάζονται αναλυτικά στο Σχήμα 2.7 μπορούμε να συμπεράνουμε:

α) Η προσθήκη διαλύματος πυτιάς στα μη-τροποποιημένα CM5 SPR chip (καμπύλη α) δεν προκαλεί μεταβολή του σήματος. Το γεγονός αυτό δείχνει ότι τα αναγεννημένα CM5 SPR chip διατηρούν την άριστη συμπεριφορά των CM5 SPR chip όσον αφορά στη χαμηλή επιδεικτικότητα τους σε φαινόμενα μη ειδικής προσρόφησης.

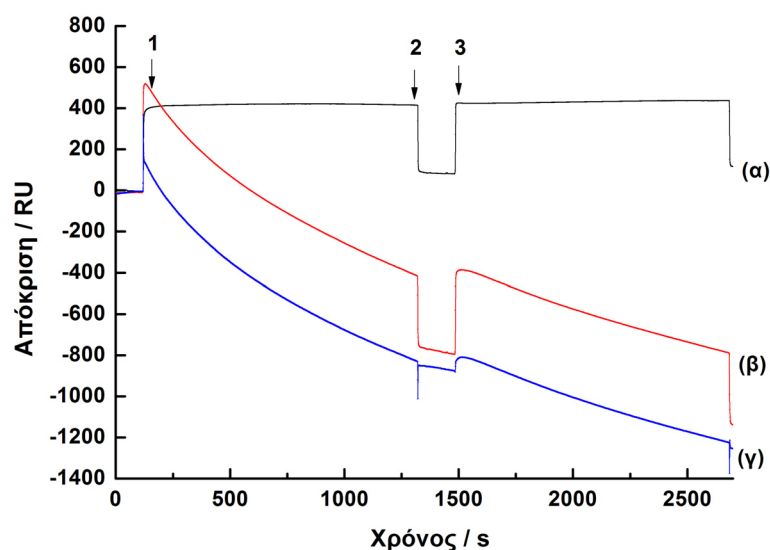
(β) Ιδιαίτερα ενθαρρυντική ήταν και η συμπεριφορά των τροποποιημένων CM5/k-CN SPR chips όσον αφορά στη δυνατότητα χρησιμοποίησης αυτών για παραπάνω από ένα δείγματα. Οι παρατηρούμενες μεταβολές σήματος ($\Delta RU_{3-2} = -3324,35$ για 0,2% v/v και $\Delta RU_{5-4} = -1806,23$ για 0,1% v/v πυτιάς) είναι ενδεικτικές της εξάρτησης του σήματος από τη συγκέντρωση του αναλύτη.

Παρόλα αυτά για την πλήρη αποτίμησή της δυνατότητας επαναχρησιμοποίησης των SPR chip, πρέπει να διεξαχθούν εκτεταμένες μελέτες, οι οποίες αποτελούν μελλοντικό στόχο των συνεργαζόμενων ερευνητικών ομάδων.

Εναλλακτικά της μεθόδου Chatelier, η αναγέννηση των CM5 SPR chips πραγματοποιήθηκε με την έκθεσή τους σε όζον και ακτινοβολία UV, όπως περιγράφεται εκτενώς στην παράγραφο 2.2.4 (σελ.149). Για την αποτίμηση της συμπεριφοράς των συγκεκριμένων SPR chips ακολούθησε η διέλευση μιας σειράς διαλυμάτων, προς το SPR chip αναφοράς (CM5, Σχήμα 2.8, καμπύλη α) και το SPR chip εργασίας (CM5/DTSP/k-CN, Σχήμα 2.8 καμπύλη β) με την ακόλουθη σειρά:

- (1) 0,2% w/v πυτιάς (Ηπειρωτοπούλα) σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5
- (2) 20 mM ιμιδαζολίου pH 5
- (3) 0,2% w/v πυτιάς (Ηπειρωτοπούλα) σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5.

Όπως φαίνεται στο Σχήμα 2.8, μετά την αλληλεπίδραση της κ-καζεΐνης με τη χυμοσίνη παρατηρείται μείωση του σήματος, λόγω της απομάκρυνσης του γλυκομακροπεπτιδίου από την επιφάνεια χρυσού στο διάλυμα. Τέλος και οι δύο τύποι SPR chips δοκιμάστηκαν σε εμπορικά δείγματα υγρής και στερεής πυτιάς.



Σχήμα 2.8. Μεταβολή σήματος στα CM5 SPR chip, τα οποία αναγεννήθηκαν με O_3/UV και τροποιώθηκαν με το αντιδραστήριο DTSP: CM5 αναφοράς (καμπύλη α) και CM5/DTSP/k-CN εργασίας (καμπύλη β) μετά την προσθήκη (1) 0,2% w/v πυτιάς (Ηπειρωτοπούλα) σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5, (2) 20 mM ιμιδαζολίου pH 5, (3) 0,2% w/v πυτιάς (Ηπειρωτοπούλα) σε 20 mM ιμιδαζολίου pH 5. Η καμπύλη γ προκύπτει από την άθροιση των δύο καμπυλών.

2.3.3. Εφαρμογή των βιοαισθητήρων σε δείγματα πυτιάς

Οι προτεινόμενοι ηλεκτροχημικοί και SPR βιοαισθητήρες εξετάστηκαν περαιτέρω σε διάφορα εμπορικά δείγματα πυτιάς σε υγρή και στερεή μορφή. Η απόδοση των βιοαισθητήρων Au/DTSP/k-CN μελετήθηκε με τις τεχνικές EIS και DPV στους 30 °C και σε θερμοκρασία δωματίου (25 °C), ενώ στις μετρήσεις SPR, η θερμοκρασία διατηρήθηκε σταθερή στους 25 °C, με τη χρήση θερμοστάτη. Οι μεταβολές των σημάτων μετά την αντίδραση με την πυτιά συγκρίθηκαν με τα αποτελέσματα της μεθόδου Berridge [Berridge, 1950], η οποία περιγράφεται εκτενώς στην παράγραφο 1.2.6 (σελ.114). Προκειμένου να καταστεί δυνατή η άμεση σύγκριση των αποτελεσμάτων των προτεινόμενων βιοαισθητήρων με αυτά της μεθόδου αναφοράς, πρέπει να προηγηθεί βαθμονόμηση των μετρούμενων μεταβολών του σήματος των βιοαισθητήρων με ικανοποιητικό αριθμό πρότυπων δειγμάτων. Τέτοιες μελέτες ήταν πέρα του σκοπού της διατριβής, τουλάχιστον όσον αφορά στο στάδιο ανάπτυξης των βιοαισθητήρων, και ως εκ

τούτου η αξιοπιστία των μετρήσεων αποτιμήθηκε με τη σύγκριση του λόγου της πηκτικής δύναμης του κάθε τύπου δείγματος, όπως προσδιορίστηκε με τη μέθοδο αναφοράς, με τον αντίστοιχο λόγο των σημάτων που καταγράφησαν με τους προτεινόμενους βιοαισθητήρες.

Πίνακας 2.3. Εφαρμογή των ηλεκτροχημικών βιοαισθητήρων σε διαφορετικά δείγματα τυτιάς.

Δείγματα	Μέθοδος Berridge	Λόγος σημάτων	EIS (30 °C) ΔS(%) ^[α]	Λόγος σημάτων	EIS (25 °C) ΔS(%) ^[α]	Λόγος σημάτων	DPV (30 °C) ΔS(%) ^[α]	Λόγος σημάτων
Danisco 1+3 v/v	61.900	1,7	-41 ± 5	1,8	-35 ± 5	2,6	103 ±15	1,3
Hansen 1+3 v/v	36.600		-23 ± 2		-14 ± 3		79±12	
Hansen 0,1% w/v	130.000	2,7	-23 ± 1	2,6	-13 ± 1	2,2	54±10	1,9
Ηπειρο-τοπούλα 0,1% w/v	48.500		-9 ± 1		-6 ± 1		28±10	

[α] τιμές ± σχετική απόκλιση (n=3).

Πίνακας 2.4. Εφαρμογή των βιοαισθητήρων SPR σε διαφορετικά δείγματα τυτιάς.

Δείγματα	Μέθοδος Berridge	Λόγος σημάτων	SPR (25°C) ΔRU (%) (Chatelier)	Λόγος σημάτων	SPR (25°C) ΔRU (%) (UV-O ₃)	Λόγος σημάτων
Danisco 1+3 v/v	61.900	1,7	-6.37	3,2	-3.79	1,7
Hansen 1+3 v/v	36.600		-2.02		-2.27	
Hansen 0,1%w/v	130.000	2,7	-6.23	2,1	-3.68	1,1
Ηπειρ/πούλα 0,1% w/v	48.500		-2.97		-3.27	

Όπως φαίνεται από τα αποτελέσματα στους Πίνακες 2.3 και 2.4, οι μεταβολές των τιμών ΔS αντικατοπτρίζουν την πηκτική δύναμη των διαφόρων δειγμάτων πυτιάς. Χρησιμοποιώντας ως κριτήριο το λόγο των λαμβανομένων σημάτων για κάθε είδος δείγματος, οι εμπεδησιμετρικοί βιοαισθητήρες παρουσιάζουν την πιο αξιόπιστη συμπεριφορά και επιπλέον την καλύτερη επαναληψιμότητα, μικρότερη από 5%. Το τελευταίο στοιχείο είναι πολύ σημαντικό για την ενδεχόμενη χρήση των εμπεδησιμετρικών βιοαισθητήρων σε πειράματα ρουτίνας.

2.4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Στο κεφάλαιο αυτό περιγράφεται η ανάπτυξη ηλεκτροχημικών και οπτικών (SPR) βιοαισθητήρων κ-καζεΐνης για τον προσδιορισμό της πηκτικής δύναμης της πυτιάς. Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες αναπτύχθηκαν πάνω σε ηλεκτρόδια χρυσού, τα οποία είχαν τροποποιηθεί με DTSP, ενώ οι βιοαισθητήρες SPR πάνω σε επιφάνειες χρυσού τροποποιημένες με καρβοξυλιωμένη δεξτράνη.
- Οι προτεινόμενοι βιοαισθητήρες δοκιμάστηκαν επιτυχώς για τον προσδιορισμό της πηκτικής δύναμης της πυτιάς σε διάφορα εμπορικά σκευάσματα σε στερεή και υγρή μορφή. Οι λαμβανόμενες μεταβολές σήματος αντικατοπτρίζουν την πηκτική δύναμη της πυτιάς, όπως αυτή προσδιορίστηκε με τη μέθοδο Berridge.
- Τα αποτελέσματα της μελέτης έδειξαν ότι η φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης είναι πιο αξιόπιστη και επαναλήψιμη τεχνική συγκρινόμενη με τη παλμική διαφορική βολταμμετρία και την τεχνική SPR.
- Σε σύγκριση με τους βιοαισθητήρες που στηρίζονται στα συνθετικά μικκύλια της καζεΐνης, οι βιοαισθητήρες Au/DTSP/k-CN παρουσιάζουν υψηλότερη ευαισθησία, μικρότερους χρόνους απόκρισης και καλύτερη επαναληψιμότητα.
- Οι βιοαισθητήρες SPR που κατασκευάστηκαν πάνω σε αναγεννημένα πλακίδια CM5 χρησιμοποιήθηκαν επιτυχώς για τον προσδιορισμό της πηκτικής δύναμης της πυτιάς στους 25 °C.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΥ ΜΕΡΟΥΣ

- Anema, S.G., Lee, S. K., Klostermeyer H., «Effect of pH at heat treatment on the hydrolysis of κ -casein and the gelation of skim milk by chymosin», *Food Science and Technology*, **2007**, 40, 99–106.
- Andren, A., Roginski H., Fox, P.F., Fuquay, J.W., «Rennets and coagulants», (Eds) In *Encyclopedia of Dairy Sciences*; Academic Press: San Diego, **2002**, 281–286.
- Berggren, C., Bjarna, B., Johansson, G., «Capacitive biosensors», *Electroanalysis*, **2001**, 13 173–180.
- Berridge, N.J., «Some observations on the determination of the activity of rennet», *Analyst*, **1952**, 77, 57b–62.
- Chatelier, R.C., Gengenbach, T.R., Griesser, H.J., Brighamburke, M., O’Shannessy, D.J., «A General Method to Recondition and Reuse Biacore Sensor Chips Fouled with Covalently Immobilized Protein/Peptide», *Anal. Biochem.*, **1995**, 229,112–118.
- Carroll, R.J.; Thompson, M.P.; Nutting, G.C., «Glutaraldehyde fixation of casein micelles for electron microscopy», *J. Dairy Sci.*, **1968**, 51, 1903–1908.
- Dong, A.; Randolph, T.W., Carpenter, J.F., «Entrapping Intermediates of Thermal Aggregation in α -Helical Proteins with Low Concentration of Guanidine Hydrochloride», *J. Biol. Chem.*, **2000**, 275, 27689–27693.
- Dousseau, F.; Pezolet, M., «Determination of the Secondary Structure Content of Proteins in Aqueous Solutions from Their Amide I and Amide II Infrared Bands. Comparison between Classical and Partial Least-Squares Methods», *Biochemistry*, **1990**, 29, 8771–8779.
- Famelart, M.H., Le Graet, Y., Raulot, K., «Casein micelle dispersions into water NaCl, CaCl₂: Physicochemical characteristics of micelles and rennet coagulation», *Int. Dairy J.*, **1999**, 9, 293–297.

- Fox, P.F., McSweeney, P.L.H., (Eds.), *Advanced Dairy Chemistry Volume 1: Proteins, Parts A&B*; 3rd edition, Springer, New York, **2003**.
- Foss & Co. *Instruction Manual for Formagraph 20-40-60-80-100*; Foss & Co.: Helleruprej-DK 2900, Hellerup, Denmark, **1980**.
- Friedenthal, M., Siimer, E., Köstner, A., «Rennet action on skim milk», *J. Dairy Sci.*, **1981**, 64, 342–345.
- Gaucheron, F., Le Graet, Y., Briard, V., «Effect of NaCl addition on the mineral equilibrium of concentrated and acidified casein micelles», *Milchwissenschaft* **2000**, 55, 82–86.
- Green, M. L., «Reviews on the progress of dairy science: milk coagulants», *J. Dairy Res.*, **1977**, 44, 159–188.
- Groves, M.L., Dower, H.J., Farrell, H.M., «Reexamination of the Polymeric Distributions of k-casein Isolated from bovine milk», *J. Protein Chem.*, **1992**, 11, 21–28.
- Guan, J.G., Miao, Y.Q., Zhang, Q.J., «Impedimetric Biosensors», *J. Biosci. Bioeng.*, **2004**, 97, 219–226.
- Guinee, T.P, Wilkinson, M.G., «Rennet coagulation and coagulation of rennet cheese manufacture», *J. Soc. Dairy Technol.*, **1992**, 45, 94–104.
- International Dairy Federation (1997). *Bovine rennets*. «Determination of total milk-clotting activity», International IDF Standard 157A., Brussels, Belgium.
- Irigoyen, A., Izco, J.M., Ibanez, F.C., Torre, P., «Influence of rennet milk-clotting activity on the proteolytic and sensory characteristics of an bovine cheese», *Food Chem.*, **2001**, 72, 137–144.
- Knoop, A.-M., Knoop, E., Wiechen, A., «Sub-structure of synthetic casein micelles», *J. Dairy Res*, **1979**, 46, 347–350.
- Kopelman, I.J., Cogan, U., «Determination of clotting power of milk clotting enzymes», *J. Dairy Sci.*, **1976**, 59, 196–199.
- Kübarsepp I.V.I; Henno M.; Kärt O., Tupasela T., «A comparison of the methods for determination of the rennet coagulation properties of milk», *Acta Agric. Scand., Sect. A-Anim. Sci.*, **2005**, 55, 145–148.

- Kunitz, M., «A method for determining the rennet activity of chymo–trypsin», *J. Gen. Physiol.*, **1935**, 18, 459–466.
- Larsson, K.I., Andrén, A., «Interactions between chymosin and individual or micellar caseins», *Int. Dairy J.*, **1999**, 9, 381–382.
- Lucey, J.A., «Rennet coagulation of milk», In *Encyclopedia of Dairy Sciences* Eds., Academic Press: San Diego, **2002**, 286–293.
- X. Liu, P.A., Duckworth, D.K., Wong, Y., «Square wave voltammetry versus electrochemical impedance spectroscopy as a rapid detection technique at electrochemical immunosensors», *Biosens. Bioelectron.*, **2010**, 25, 1467–1473.
- Liu, Y., Guo, R., «The interaction between casein micelles and gold nanoparticles», *J. Colloid Interface Sci.*, **2009**, 332, 265–269.
- de Man, J.M., Batra, S.C., «Measurement of the rennet clotting time of milk with an automatic clot–timer», *Dairy Ind.*, **1964**, 29, 32–33.
- Martin, A.H., Goff, H.D., Smith, A., Dalgleish, D.G., «Immobilization of casein micelles for probing their structure and interactions with polysaccharides using scanning electron microscopy (SEM)», *Food Hydrocol.*, **2006**, 20, 817–824.
- McMahon, D.J., Brown, R.J., «Evaluation of Formagraph for comparing rennet solutions», *J. Dairy Sci.*, **1982**, 65, 1639–1642.
- McMahon, D.J., Brown, R.J., «Composition, structure and integrity of casein micelles: A review», *J. Dairy Sci.*, **1984**, 67, 499–512.
- Melachouris, N., Moffitt, K.R., Rasilewicz, C.E., Tonner, G.F., «Reformed casein micelles», *United States Patent 5173322*, **1992**.
- Nájera, A.I., de Grenobies, M., Barron, L., «Effects of pH, temperature, CaCl₂ and enzyme concentrations on the rennet–clotting properties of milk. A multifactorial study», *J.R. Food Chem.*, **2003**, 80, 345–352.
- Panouille, M., Nicolai, T., Benyahia, L., Durand, D., «Aggregation and gelation of casein sub–micelles», *Food colloids: interactions, microstructure and processing*, **2005**, 194–207.
- Prodromidis, M.I., «Impedimetric immunosensors – A review», *Electrochim. Acta*, **2010**, 55, 4227–4233.

- Qi, P.X., «Casein micelle structure: the past and the present», *Lait*, **2007**, 87, 363–383.
- Rasmussen, L.K., Hojrup, P., Petersen, T.E., «The multimeric structure and disulfide–bonding pattern of bovine κ–casein», *Eur. J. Biochem.*, **1992**, 207, 215–222.
- Richardson, G.H., Gandhi, N.R., Divatia, M.A., Ernstrom., C.A., «Continuous curd tension measurements during milk coagulation», *J. Dairy Sci.*, **1971**, 54, 182–186.
- Robitaille, G., Giroux, H.J., Britten, M., «Turbidity method to monitor the kinetics of rennet-induced coagulation of milk using a microplate reader», *Milchwissenschaft*, **2004**, 59, 479–482.
- Scott-Blair, G.W.; Burnett, J., «A simple method for detecting an early stage in coagulation of renneted milk», *J. Dairy Res.*, **1963**, 30, 383–390.
- Sommer, H.H., Matsen, H., «The relation of mastitis to rennet coagulability and curd strength of milk», *J. Dairy Sci.*, **1935**, 18, 741–749.
- Soxhlet, F., «Die Darstellung haltbarer Labflussigkeiten», *Milchzeitung*, **1877**, 6, 497–501.
- Swaisgood, H.E., Brunner, J.R., Lillevik, H.A., «Physical parameters of κ–casein from cows’ milk», *Biochemistry*, **1964**, 3, 1616–1623.
- Swaisgood, H., «Primary sequence of κ–casein», *J. Dairy Sci.*, **1975**, 58, 583–592.
- Uricanu, V.I.; Duits, M.H.G.; Mellema, J., «Hierarchic networks of casein proteins: an elasticity study based on AFM experiments», *Langmuir*, **2004**, 20, 5079–5090.
- Wagner, P., Hegner, M., Kernen, P., Zaugg, F., Semenza, G., «Covalent immobilization of native biomolecules onto Au(111) via N–hydroxysuccinimide ester functionalized self-assembled monolayers for scanning probe microscopy», *Biophys. J.*, **1996**, 70, 2052–2066.
- Walstra, P., «On the stability of casein micelles», *J. Dairy Sci.*, **1990**, 73, 1965–1979.

Ηλεκτρονικές τοποθεσίες

- [1] Ysebaert, <http://www.ysebaert.com/ysebaert/optigraphuk.htm>

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο 1^ο κεφάλαιο της παρούσας διατριβής περιγράφεται η ανάπτυξη ενός βιοαισθητήρα για τον προσδιορισμό της πηκτικής δύναμης της πυτιάς. Η κατασκευή των βιοαισθητήρων βασίστηκε στην ακινητοποίηση συνθετικών μικκυλίων καζεΐνης (ACM, artificial casein micelles) πάνω στην επιφάνεια ηλεκτροδίων χρυσού, που αρχικά τροποποιήθηκαν με αυτοδιατασσόμενες μονοστιβάδες διαφόρων θειολών (self-assembled monolayers, SAMs) (θειοκτικό οξύ, δις-(N-υδροξυηλεκτριμιδυλο)-διθειοδιπροπιονικός εστέρας και κυστεαμίνη) και στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα πυτιάς. Η μέθοδος βασίζεται στη μεταβολή της αντίστασης μεταφοράς φορτίου (R_{ct} , charge-transfer resistance) της διεπιφάνειας των ηλεκτροδίων Au/θειόλη/ACM με το διάλυμα του ηλεκτρολύτη, παρουσία του οξειδοαναγωγικού ζεύγους σιδηρι-/σιδηροκυανιούχων ιόντων. Η αλληλεπίδραση μεταξύ των ακινητοποιημένων ACM με τη χυμοσίνη είχε ως αποτέλεσμα την αποδόμηση των αρνητικά φορτισμένων μικκυλίων και τη μετατροπή τους σε ουδέτερες βιοδομές, οδηγώντας έτσι σε αύξηση της ροής του οξειδοαναγωγικού ζεύγους από το διάλυμα του ηλεκτρολύτη στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Η αλληλεπίδραση αυτή οδηγεί στη μείωση της R_{ct} . Οι παράμετροι που βελτιστοποιήθηκαν αφορούσαν στη συγκέντρωση των μικκυλίων, στο χρόνο αντίδρασης, στη συγκέντρωση της πυτιάς και στο pH του διαλύματος εργασίας. Πέραν των πειραμάτων φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης (Electrochemical Impedance Spectroscopy, EIS) πραγματοποιήθηκαν και πειράματα κυκλικής βολταμμετρίας (Cyclic Voltammetry, CV), φασματοσκοπίας υπερύθρου (Fourier Transform, Infrared Spectroscopy, FT-IR), μικροσκοπία ατομικής δύναμης (Atomic Force Microscopy, AFM), μικροσκοπία ηλεκτρονιακής σάρωσης (Scanning Electron Microscopy, SEM) και μικροζυγού κρυστάλλου χαλαζία (Quartz Crystal Microbalance, QCM), πριν και μετά την αντίδραση με πυτιά. Τέλος, οι παραπάνω βιοαισθητήρες χρησιμοποιήθηκαν για τον προσδιορισμό της πηκτικής δύναμης της πυτιάς σε εμπορικά σκευάσματα στερεής ή υγρής πυτιάς. Από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων που ελήφθησαν με την προτεινόμενη μέθοδο ως προς αυτά της μεθόδου

αναφοράς, η οποία βασίζεται στη οπτική παρατήρηση της πήξης του γάλακτος, προκύπτει ότι η μεταβολή της αντίστασης μεταφοράς φορτίου είναι ανάλογη της πηκτικής δύναμης της πυτιάς.

Στο δεύτερο κεφάλαιο της διατριβής περιγράφεται η ανάπτυξη ηλεκτροχημικών και οπτικών (SPR) βιοαισθητήρων κ-καζεΐνης (κ-CN) για τον προσδιορισμό της πηκτικής δύναμης της πυτιάς. Οι ηλεκτροχημικοί βιοαισθητήρες αναπτύχθηκαν πάνω σε ηλεκτρόδια χρυσού, τα οποία είχαν τροποποιηθεί με DTSP, ενώ οι βιοαισθητήρες SPR πάνω σε επιφάνειες χρυσού τροποποιημένες με καρβοξυμεθυλιομένη δεξτράνη. Και στους δύο τύπους βιοαισθητήρων, η κ-καζεΐνη, ακινητοποιήθηκε με χημικό τρόπο πάνω στις επιφάνειες χρυσού. Στους ηλεκτροχημικούς βιοαισθητήρες οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των ακινητοποιημένων μορίων της κ-καζεΐνης και της χυμοσίνης (το δραστικό ένζυμο της πυτιάς), μελετήθηκε με μετρήσεις κυκλικής βολταμμετρίας (Cyclic Voltammetry, CV), παλμικής διαφορικής βολταμμετρίας (Differential Pulse Voltammetry, DPV) και φασματοσκοπίας ηλεκτροχημικής εμπέδησης (Electrochemical Impedance Spectrometry, EIS). Όλες οι προαναφερθείσες μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν παρουσία ισομοριακού μίγματος σιδηρι-/σιδηροκυανιούχων ιόντων στο διάλυμα μέτρησης. Όμοια με όσα αναφέρθηκαν στο 1^ο πειραματικό κεφάλαιο κατά την αντίδραση της κ-καζεΐνης με την πυτιά, διασπάται ο δεσμός Phe105-Met106, στο μόριο της κ-καζεΐνης, παράγοντας το διαλυτό γλυκομακροπεπτίδιο, το οποίο απομακρύνεται στο διάλυμα του ηλεκτρολύτη και τη θετικά φορτισμένη (pI>7) αδιάλυτη παρα κ-καζεΐνη, η οποία παραμένει στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Η μείωση του αρνητικού φορτίου, πάνω στην επιφάνεια του βιοαισθητήρα, σε συνδυασμό με τη μερική χημική αποδόμηση της στιβάδας αναγνώρισης, έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση της ροής του οξειδοαναγωγικού ζεύγους, από το διάλυμα του ηλεκτρολύτη στην επιφάνεια του χρυσού και συνεπώς την αύξηση της ηλεκτροκατάλυσης του οξειδοαναγωγικού ζεύγους στην επιφάνεια του ηλεκτροδίου. Τα πειράματα SPR πραγματοποιήθηκαν απουσία του οξειδοαναγωγικού ζεύγους ενώ οι παρατηρούμενες μεταβολές στη γωνία συντονισμού των επιφανειακών πλασμονίων οφείλονται στη μεταβολή της μάζας της ακινητοποιημένης πρωτεΐνης. Μετά τη βελτιστοποίηση των πειραματικών παραμέτρων οι παραπάνω βιοαισθητήρες χρησιμοποιήθηκαν με επιτυχία για τον προσδιορισμό της πηκτικής δύναμης της πυτιάς σε πραγματικά δείγματα στερεής και υγρής μορφής.

SUMMARY

Cheese production is relied upon the action of rennet (a mixture of chymosin and pepsin) onto casein micelles of milk. For the first time, the monitoring of this interaction with Electrochemical Impedance Spectroscopy (EIS) was used to develop a faradic impedimetric biosensor for the assessment of the clotting activity of rennet, using hexacyanoferrate(II)/(III) couple as a redox probe. Gold electrodes were modified with self-assembled monolayers of different thiols (thioctic acid, dithiobis-*N*-succinimidyl propionate and cysteamine), and (artificial) casein micelles were immobilized on the modified gold surfaces. The proposed method is based on the measurement of charge-transfer resistance (R_{ct}) changes attributed to the degradation of the negatively charged immobilized casein micelles by rennet to neutral biostructures. This action results in the increase of the flux of the redox probe, which exists in the bulk solution, to the surface of the electrode and, consequently, in the decrease of R_{ct} . Experimental parameters such as the micelle loading, the reaction time, the concentration of rennet and the working pH, were optimized. Besides EIS measurements, cyclic voltammetry, FT-IR, and AFM experiments were also performed before and after the interaction of the immobilized micelles with rennet. Finally, the proposed biosensors were successfully tried to various commercial samples

This thesis also describes the development of kappa-casein (k-CN)-based electrochemical and surface plasmon resonance (SPR) biosensors for the assessment of the clotting activity of rennet. Electrochemical biosensors were developed over gold electrodes modified with a self-assembled monolayer of dithiobis-*N*-succinimidyl propionate, while SPR measurements were performed on regenerated carboxymethylated dextran gold surfaces. In both type of biosensors, k-CN molecules were immobilized onto modified gold surfaces through covalent bonding. In electrochemical biosensors, interactions between the immobilized k-CN molecules and chymosin (the active component of rennet) were studied by performing cyclic voltammetry, differential pulsed voltammetry, and electrochemical impedance spectroscopy measurements, using

hexacyanoferrate(II)/(III) couple as a redox probe. k-CN is cleaved by rennet at Phe105–Met106 bond, producing a soluble glycomacropeptide, which released to the electrolyte, and the positively charged ($pI > 7$) insoluble *para-k*-casein molecule, which remain attached to the surface of the electrode. The so induced reduction of the net negative charge of the sensing surface, along with the partial degradation of the sensing layer, results in an increase of the flux of the redox probe, which exist in the solution, and consequently, to signal variations, which are associated with the increased electrocatalysis of the hexacyanoferrate(II)/(III) couple on the gold surface. SPR experiments were performed in the absence of the redox probe and the observed SPR angle alterations are solely attributed to the structural changes of the sensing layer. Various experimental variables were investigated and under the selected conditions the proposed biosensors were successfully tried for various commercial powder or liquid samples.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 1 – ΑΡΚΤΙΚΟΛΕΞΑ

ACM	συνθετικά μικκύλια καζεΐνης
AFM	μικροσκοπία ατομικής δύναμης
CMP	καζεΐνομακροπεπτίδιο
CV	κυκλική βολταμμετρία
CYS	κυστεαμίνη
DPV	παλμική διαφορική βολταμμετρία
DTSP	δις-(N-υδροξυηλεκτριμιδυλο) –διθειοδιπροπιονικός εστέρας
EDC	N-αιθυλο –N'-(3-διμεθυλοαμινοπροπυλο)καρβοδιϊμίδιο
EIS	φασματοσκοπία ηλεκτροχημικής εμπέδησης
FT-IR	φασματοσκοπία υπερύθρου
GMP	γλυκομακροπεπτίδιο
k-CN	κ-καζεΐνη
NHS	N-υδροξυλοηλεκτριμίδιο
QCM	μικροζυγός κρυστάλλου χαλαζία
SAMs	αυτοδιατασσόμενες στιβάδες θειολών
SEM	μικροσκοπία ηλεκτρονιακής σάρωσης
SPR	συντονισμός επιφανειακών πλασμονίων
TA	θειοκτικό οξύ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ 2 – ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ ΑΜΙΝΟΞΕΩΝ

Αλανίνη	Ala	A
Αλυσίνη	Aly	
Αργινίνη	Arg	R
Ασπαραγίνη	Asn	N
Ασπαραγινικό οξύ	Asp	D
Βαλίνη	Val	V
Γλουταμίνη	Gln	Q
Γλουταμινικό οξύ	Glu	E
Γλυκίνη	Gly	G
Θρεονίνη	Thr	T
Θρυπτοφάνη	Trp	W
Ισολευκίνη	Ile	I
Ιστιδίνη	His	H
Κυστεΐνη	Cys	C
Λευκίνη	Leu	L
Λυσίνη	Lys	K
Μεθειονίνη	Met	M
Προλίνη	Pro	P
Πυρρολυσίνη	Pyl	
Σεληνοκυστεΐνη	Sec	
Σερίνη	Ser	S
Τυροσίνη	Tyr	Y
Υδροξυπρολίνη	Hpr	
Φαινυλαλανίνη	Phe	F

ΛΙΣΤΑ ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΩΝ ΕΡΓΑΣΙΩΝ

1. «Impedimetric Biosensor for the Assessment of the Clotting Activity of Rennet», Maria A. Panagopoulou, Dimitrios V. Stergiou, Ioannis G. Roussis, Mamas I. Prodromidis*, *Analytical Chemistry*, **2010**, 82, 8629–8636.

2. «Kappa-casein based electrochemical and surface plasmon resonance biosensors for the assessment of the clotting activity of rennet», Maria A. Panagopoulou, Dimitrios V. Stergiou, Ioannis G. Roussis, George Panayotou, Mamas I. Prodromidis*, *Analytica Chimica Acta*, **2012**, 712, 132–137.

Αφιέρωμα στην ενότητα News/Research profile του περιοδικού *Analytical Chemistry* της ACS

Τίτλος: Electrochemical impedance spectroscopy says «cheese»

Συντάκτης: Rajendrani Mukhopadhyay

Στοιχεία έκδοσης : **2010**, 82 (21), 8756–8756