

*De impact van buffers op de adsorptie van
globine in mesoporeus titania*

Masterproef ingediend tot het bekomen van de graad van Master in de Chemie

Academiejaar 2014-2015

Jacotte Brokken

Promotor: prof. dr. Vera Meynen

M.m.v.: Stefano Loreto

Dankwoord

Nog geen half jaar geleden startte ik deze thesis als afsluiter van mijn masteropleiding en mijn studententijd. Ik had nooit gedacht dat ik hier zou belanden in de geplande vijf jaar. Ik sluit dit hoofdstuk dan ook af met een immens gevoel van trots. Het is echter deze vijf jaar niet altijd even gemakkelijk geweest. Ik heb onderweg een paar redelijk moeilijke beslissingen moeten maken, maar ik heb de eindstreep desondanks gehaald. Dit had ik nooit alleen kunnen bereiken, vandaar wil ik een aantal mensen ontzettend hard bedanken. Eerst en vooral wil ik hier graag mijn dank betuigen aan niet alleen mijn ouders, maar aan mijn hele familie. Al 22 jaar lang begeleiden ze mij naar elke overwinning en ook nu staan zij als trouwe supporter aan de zijlijn. Ondanks alle stress die ik ze ongetwijfeld de afgelopen jaren heb bezorgd, hebben ze me steeds gemotiveerd om het beste van mezelf te geven.

Ik wil verder graag mijn medestudenten bedanken. We zijn in deze richting helaas met veel te weinig, maar dit heeft er wel voor gezorgd dat we gedurende deze vijf jaar echte vrienden zijn geworden. Ik zal nog lang met plezier terugdenken aan de fijne uren die we samen doorbrachten in de aula's van de universiteit, maar ook aan de uitjes die we op vrije momenten maakten. Bij uitbreiding wil ik bovendien alle personen bedanken die ik hier in Wilrijk heb leren kennen, nl. mijn vrienden uit het nachtleven en mijn vroegere kotgenoten. Bij jullie kon ik steeds mijn zinnen verzetten en genieten van welverdiende ontspanning. Verder wil ik één van hen graag bedanken voor het maken van de illustratie i.v.m. sorptiekinetiek, nl. Tom Janssens.

Eveneens zou ik mijn promotor prof. dr. Vera Meynen willen bedanken voor de goede raad en begeleiding. Ik zou bovendien prof. dr. Vera Meynen en prof. dr. Pegie Cool graag willen bedanken voor de warme ontvangst in hun onderzoeksgroep.

Ook prof. dr. Karolien De Wael ben ik dankbaar voor de tussentijdse meetings en nieuwe inzichten in de materie.

None of this would have been possible without my mentor Stefano Loreto. He was always there to teach me the needed information and provide me with good advice.

Last but not least wil ik dan ook de andere medewerkers van LADCA bedanken voor een ontzettend fijne kennismaking met het onderzoeksleven. Bedankt voor de hulp

tijdens mijn thesis: van het uitvoeren van metingen en delen van expertise, tot uitstekende raad en fijne gesprekken tijdens de middagpauzes.

Deze vijf jaar zijn werkelijk voorbij gevlogen. Er zijn veel momenten die ik me ongetwijfeld nog mijn hele leven zal herinneren, maar ik ontmoette vooral veel wonderbaarlijke mensen, die zeker en vast vrienden voor het leven zullen blijven.

Nogmaals dank aan iedereen die mijn pad kruiste!

Jacotte

Lijst met afkortingen

| | |
|--------|--|
| CPG | Gecontroleerd poreus glas |
| DRIFT | Diffuse reflectie infrarood fourier transform |
| DTA | Differentiaal van de thermogravimetriscche analyse |
| DTG | Afgeleide van de thermogravimetriscche analyse |
| FET | Veld-effect transistor |
| FT-IR | Fourier transform infrarood |
| Hb | Hemoglobine |
| Hepes | 4-(2-hydroxyethyl)-piperazine-1-ethaansulfonzuur |
| His | Histidine |
| IEP | Iso-elektrisch punt |
| M500 | Millennium PC500 titania (Cristal) |
| Mb | Myoglobine |
| P25 | P25 titania (Degussa-Hüls) |
| PBS | Fosfaatgebufferde zoutoplossing |
| TGA | Thermogravimetriscche analyse |
| Tris | Tris(hydroxymethyl)aminomethaan |
| UV-VIS | Ultraviolet-zichtbaar |
| RPM | Rotaties per minuut |

Lijst met figuren

| | |
|---|----|
| Figuur 1: Schematische weergave van het werkingsprincipe van biosensoren..... | 1 |
| Figuur 2: De primaire structuur van humaan myoglobine..... | 6 |
| Figuur 3: Tertiaire structuur van myoglobine met de Fe-porfyrine cofactor weergegeven in het rood (links). Reversibele binding van dizuurstof aan myoglobine (rechts)..... | 6 |
| Figuur 4: Structuurformules van hepes, tris en PBS. | 11 |
| Figuur 5: Poriegroottedistributie (desorptie) voor Millennium PC500, dat gecalcineerd werd bij 350 °C gedurende 6 uur. De afgeleide van het porievolume wordt weergegeven in functie van de poriestraal..... | 13 |
| Figuur 6: XRD-diffractogram van zowel het niet-gecalcineerde als het gecalcineerde Millennium PC500..... | 13 |
| Figuur 7: UV-VIS spectrum van Mb-oplossingen met een verschillende concentratie. | 17 |
| Figuur 8: UV-VIS spectrum van titania-oplossingen in 0,01 M trisbuffer. De absorbantie wordt weergegeven in functie van de golflengte voor drie stalen met verschillende centrifugetijd. | 17 |
| Figuur 9: Grafiek van de geadsorbeerde hoeveelheid Mb ($\mu\text{mol/g}$) op Millennium PC500 i.f.v. de tijd voor 0,01 M hepes-, tris- en PBS-buffer..... | 20 |
| Figuur 10: DRIFT-spectra voor Millennium PC500 met en zonder buffer. | 22 |
| Figuur 11: DRIFT-spectra van M500, Mb, een mengsel van M500 en hepesbuffer en geïncorporeerd M500 met hepesbuffer. | 22 |
| Figuur 12: IR-spectrum voor geïncorporeerde stalen met PBS-, tris- en hepesbuffer. | 24 |
| Figuur 13: TGA/DTG-spectra voor mengsels van M500 en PBS-, tris- en hepesbuffer. | 25 |
| Figuur 14: TGA/DTG-spectrum van geïncorporeerde stalen met tris-, hepes- en PBS-buffer. | 25 |
| Figuur 15: DTA-spectrum van geïncorporeerde stalen met tris-, hepes- en PBS-buffer. Aangeduide pieken/gebieden: geadsorbeerd water aan het titania-oppervlak (a), geadsorbeerd water aan de fosfaatmoleculen (b), myoglobine (c), vrijgekomen water uit de condensatie van Ti-OH groepen (d)..... | 27 |

| | |
|--|----|
| Figuur 16: Isothermen van zuiver M500 en mengsels van M500 met hepes-, tris- en PBS-buffer..... | 28 |
| Figuur 17: Isothermen van mengsels van M500 met hepes- tris- of PBS-buffer. Het trisstaal, het PBS-staal en een van de hepesstalen werden gedurende 16 uur ontgast bij kamertemperatuur. Het andere hepesstaal werd niet ontgast. | 28 |
| Figuur 18: Geadsorbeerde hoeveelheid Mb ($\mu\text{mol/g}$) i.f.v. de tijd voor geïncorporeerde stalen met tris en hepes als buffer en M500 en P25 als dragermateriaal. | 31 |
| Figuur 19: Geadsorbeerde hoeveelheid Mb ($\mu\text{mol/m}^2$) i.f.v. de tijd voor geïncorporeerde stalen met tris en hepes als buffer en M500 en P25 als dragermateriaal. | 31 |
| Figuur 20: Hoeveelheid geadsorbeerde Mb ($\mu\text{mol/g}$) i.f.v. de tijd voor geïncorporeerde stalen met 0,1 en 0,01 M trisbuffer. | 35 |
| Figuur 21: Isothermen van zuiver M500 en mengsels van M500 met 0,01 M tris en 0,1 M tris. | 35 |
| Figuur 22: DRIFT-spectra van geïncorporeerde stalen met 0,1 M tris-, 0,01 M tris- en 0,01 M hepesbuffer. | 37 |
| Figuur 23: DTG-spectra van mengsels van M500 en 0,1 en 0,01 M trisbuffer en geïncorporeerde stalen met deze buffers. | 37 |
| Figuur 24: Schematische weergave van de adsorptie van Mb aan M500 titania voor 0,01 M hepes, tris en PBS en 0,1 M tris. | 39 |
| Figuur 25: DRIFT-spectra van geïncorporeerde stalen met 0,01 M hepes, 0,01 M tris en 0,1 M tris. Deze stalen werden gecalcineerd bij 170 °C gedurende 1 minuut. Ter vergelijking is het spectrum van een niet-gecalcineerd staal met 0,01 M hepes toegevoegd. | 41 |
| Figuur 26: DRIFT-spectra van geïncorporeerde stalen met 0,01 M hepes, 0,01 M tris en 0,1 M tris. Deze stalen werden gecalcineerd bij 270 °C gedurende 1 minuut. Ter vergelijking is het spectrum van een niet-gecalcineerd staal met 0,01 M hepes toegevoegd. | 42 |
| Figuur 27: DRIFT-spectra van geïncorporeerde stalen met 0,01 M hepes, 0,01 M tris en 0,1 M tris. Deze stalen werden gecalcineerd bij 350 °C gedurende 1 minuut. Ter | |

| | |
|---|----|
| vergelijking is het spectrum van een niet-gecalcineerd staal met 0,01 M hepes toegevoegd. | 42 |
| Figuur 28: De geadsorbeerde hoeveelheid Mb ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$) i.f.v. de tijd voor geïncorporeerde stalen met 8, 10 en 15 mg M500 en 0,01 M hepes- en trisbuffer. | 44 |
| Figuur 29: TGA/DTG-spectra van geïncorporeerde stalen met 1 mg Mb per 4 ml 0,01 M hepesbuffer. Er werd 15 mg P25, 15 mg M500 of 8 mg M500 per 4 ml buffer gebruikt als dragermateriaal..... | 45 |
| Figuur 30: Overzicht van de DRIFT-spectra voor 8 en 15 mg geïncorporeerd M500 in 0,01 M hepes zonder calcinatie en na calcinatie bij 170, 270 en 350 °C..... | 48 |

Lijst met tabellen

| | |
|---|----|
| Tabel 1: Procentuele absorptie van stalen met tris, hepes en fosfaatbuffer in functie van de tijd. | 19 |
| Tabel 2: Berekening van het totaal geadsorbeerde oppervlak..... | 33 |
| Tabel 3: Procentuele absorptie van stalen met 0,01 M en 0,1 M trisbuffer in functie van de tijd. | 34 |

Inhoud

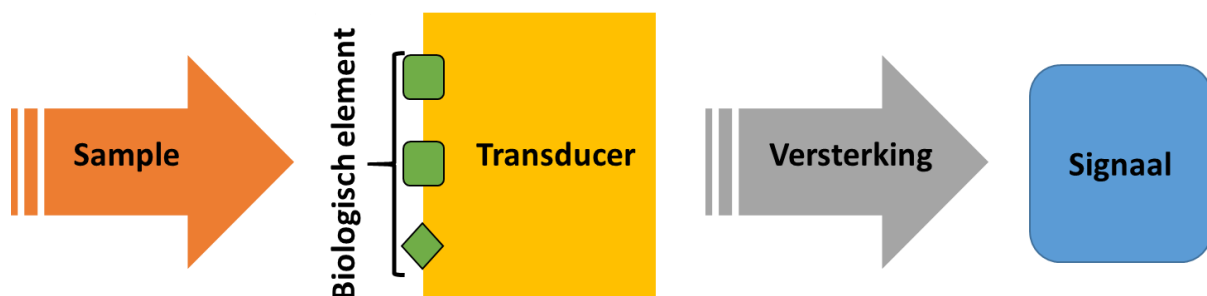
| | |
|---|-----|
| Dankwoord..... | I |
| Lijst met afkortingen..... | III |
| Lijst met figuren..... | IV |
| Lijst met tabellen..... | VI |
| Inhoud..... | VII |
| 1 Inleiding..... | 1 |
| 1.1 Situering van het onderzoek..... | 1 |
| 1.2 Eigenschappen van myoglobine..... | 4 |
| 1.3 Eigenschappen van titaniumdioxide..... | 7 |
| 1.4 Optimalisatie van de immobilisatie..... | 8 |
| 1.5 Doel..... | 10 |
| 2 Experimentele methoden..... | 12 |
| 2.1 Reagentia..... | 12 |
| 2.2 Immobilisatie van myoglobine op titania..... | 14 |
| 2.3 Karakterisatiemethoden..... | 14 |
| 2.3.1 UV-VIS..... | 14 |
| 2.3.2 DRIFT..... | 15 |
| 2.3.3 Stikstofsorptie..... | 16 |
| 2.3.4 Thermische analyse (TGA/DTG/DTA)..... | 16 |
| 3 Resultaten en discussie..... | 17 |
| 3.1 Optimalisatie van de experimentele condities..... | 17 |
| 3.1.1 Myoglobineconcentratie..... | 17 |
| 3.1.2 Centrifugetijd..... | 18 |
| 3.2 Invloed van het type buffer..... | 18 |
| 3.2.1 Invloed van de buffer op de stabiliteit van het myoglobine..... | 18 |

| | | |
|-------|--|-----|
| 3.2.2 | Invloed van de buffer op de incorporatie | 19 |
| 3.2.3 | Vergelijking tussen mesoporeus en niet-poreus titania als dragermateriaal 30 | |
| 3.3 | Invloed van de bufferconcentratie | 33 |
| 3.3.1 | Invloed van de bufferconcentratie op de stabiliteit van het myoglobine | 33 |
| 3.3.2 | Invloed van de bufferconcentratie op de incorporatie | 34 |
| 3.3.3 | Invloed van de buffer op de adsorptiekinetiek..... | 38 |
| 3.3.4 | Calcinatië-experiment (deel 1)..... | 39 |
| 3.4 | Invloed van de titaniamassa | 43 |
| 3.4.1 | Invloed van de titaniamassa op de incorporatie..... | 43 |
| 3.4.2 | Vergelijking tussen mesoporeus en niet-poreus titania als dragermateriaal 45 | |
| 3.4.3 | Calcinatië-experiment (deel 2)..... | 46 |
| 4 | Conclusie | 49 |
| 5 | Referenties | 51 |
| 6 | Nederlandse samenvatting | I |
| 7 | Engelse samenvatting | II |
| 8 | Wetenschapspopulariserende abstract..... | III |
| 9 | Appendix | 1 |
| a. | Karakterisatiemethoden | 1 |
| 1. | UV-VIS spectroscopie ^{1,2} | 1 |
| 2. | Thermogravimetrische analyse (TGA) ^{3,4} | 1 |
| 3. | Diffuse Reflectie Infrarood Fourier Transform Spectroscopie (DRIFT) ^{2,5} | 2 |
| 4. | Stikstofadsorptie en -desorptie ^{2,6,7} | 3 |
| 5. | Referenties bij appendix..... | 4 |

1 Inleiding

1.1 Situering van het onderzoek

Door de jaren heen zijn er verschillende technieken ontwikkeld voor de analyse van kleine moleculen zoals titrimetrie, spectroscopie, chemiluminescentie en elektrochemie¹. Er is echter gebleken dat deze laatste techniek opmerkelijke voordelen biedt t.o.v. de andere. Zo presteren elektrochemische sensoren beter wat betreft detectielimiet, stabiliteit, snelheid en reproduceerbaarheid. Ook het grote meetbereik, de hoge gevoeligheid en de hoge selectiviteit zijn voordelig^{2,3}. Daarnaast zijn elektrochemische sensoren herbruikbaar en eenvoudig op te slaan⁴. In het huidige onderzoek m.b.t. elektrochemie is de ontwikkeling van biosensoren een van de belangrijkste onderwerpen⁵. In een biosensor wordt een biologisch element (bv. cellen, micro-organismen, enzymen, antilichamen, nucleïnezuren,...) geïncorporeerd in een detectorelement (ook transducer genoemd) dat gebaseerd is op bv. potentiometrie, amperometrie of conductimetrie (Figuur 1).



Figuur 1: Schematische weergave van het werkingsprincipe van biosensoren.

Het bekomen signaal wordt vervolgens versterkt in bv. een microprocessor. Momenteel wordt actief onderzoek uitgevoerd naar biosensoren op nanoschaal. Dit heeft als voordeel dat niet alleen de detectielimiet kan verlaagd worden t.o.v. conventionele methodes, maar ook dat meerdere analyten simultaan geanalyseerd kunnen worden⁶. Deze twee voordelen kunnen anderzijds gerealiseerd worden door meer gevoelige transducers te gebruiken, zoals bijvoorbeeld microcantilevers of nanotube field-effect transistors (FETs).

De drijfveer voor dit onderzoek is het brede spectrum aan toepassingen. Vooral in de geneeskunde kunnen biosensoren interessant zijn voor bv. continue, in vivo metingen van drug-, proteïne- of metaboolconcentraties. Het bekendste voorbeeld van dergelijke sensoren is de reeds commercieel beschikbare glucosesensor voor diabetici. Deze sensor is echter nog volop in ontwikkeling. Een volgende stap is namelijk deze in te planten in het lichaam. In combinatie met een insulinepomp kan op deze manier diabetes op een geautomatiseerde wijze behandeld worden⁷. Maar ook de voedingsindustrie gaat erop vooruit met de ontwikkeling van biosensoren⁸. Dankzij deze techniek kunnen namelijk op een snelle en efficiënte wijze de houdbaarheid en kwaliteit bepaald worden. Kleine moleculen zoals waterstofperoxide en nitriet kunnen een belangrijke impact hebben op voeding wanneer ze in te hoge concentraties aanwezig zijn^{9,10}. Elektrochemische biosensoren bieden een eenvoudige en nauwkeurige methode om dit soort moleculen snel en kwantitatief te analyseren. Verder kunnen biosensoren ingezet worden bij de analyse van schadelijke stoffen zoals koolstofmonoxide of pesticiden. Tot slot kunnen ook analyses van biologische of chemische wapens versneld en vereenvoudigd worden dankzij deze technologie. Het immobiliseren van biomoleculen kan daarnaast gebruikt worden in andere toepassingen zoals bv. het gecontroleerd vrijstellen van geneesmiddelen¹¹. Op deze manier kan een betere correlatie verkregen worden tussen de gewenste drugconcentratie in het bloed en het werkelijke vrijstellingsprofiel van de gebruikte dosis¹². Daarnaast kan ook de gewenste locatie van vrijstelling beïnvloed worden. Ondanks de brede waaier aan toepassingen is het commercialiseren van biosensoren slechts in beperkte mate succesvol. Dit onder meer door de hoge kostprijs en de vaak complexe procedures¹³. Ook problemen i.v.m. stabiliteit, gevoeligheid en kwaliteit vertragen de groei van de biosensorproductie¹⁴.

In dit onderzoek werd specifiek gekozen voor proteïnen als biologisch element. Voor redoxactieve proteïnen bevindt het redoxactieve centrum zich in de heemgroep, die zich meestal diep in de molecule bevindt en dus moeilijk bereikbaar is⁹. Daarom verloopt de elektronentransfer van dergelijke proteïnen in oplossing vaak te traag. Ook irreversibele denaturatie kan optreden. Een mogelijke strategie om dit probleem

te omzeilen is het immobiliseren van deze moleculen op een dragermateriaal³. Dit resulteert in een verbetering wat betreft de elektronentransfer, de geleidingseigenschappen en de chemische en thermische stabiliteit van de moleculen^{8,11}. Daarnaast biedt het incorporeren op nanoporeuze materialen ook voordelen voor de efficiëntie van de biosensor zelf⁴. Door het grote oppervlak per massa poreus materiaal, kunnen meer biomoleculen geadsorbeerd worden in de buurt van het elektrode-oppervlak, wat een positief effect heeft op o.m. de elektronentransfer.

In huidig onderzoek werden reeds verschillende nanoporeuze metaaloxiden uitgetest als drager (MnO_2 , ZnO , ZnO_2 , Co_3O_4 , NiO , Fe_3O_4 , TiO_2 , SiO_2 , ...), dit omwille van hun groot oppervlak, goede biocompatibiliteit, eenvoudige bereiding en goede chemische en fysische stabiliteit⁹.

Voor een goede immobilisatie ter productie van een biosensor zijn drie factoren van belang: toepasbaarheid, betrouwbaarheid en mogelijkheid tot elektronentransport¹⁵. Met toepasbaarheid wordt bedoeld dat de immobilisatie van proteïnen niet resulteert in een daling in activiteit of stabiliteit t.o.v. de biomoleculen in oplossing. Om volledige functionaliteit van de uiteindelijke biosensor e.a. toepassingen te verzekeren, is het m.a.w. van groot belang dat het geïncorporeerde proteïne niet gedenateerd wordt. Denaturatie zorgt er immers voor dat de eigenschappen (zowel fysisch als chemisch) zullen wijzigen en interacties onmogelijk en/of onvoorspelbaar worden.

Betrouwbaarheid omvat de zuiverheid van de biomoleculen, alsook de specificiteit en stabiliteit (t.o.v. temperatuur, pH, ionsterkte en redoxpotentiaal). Wanneer een type molecule goed scoort wat betreft deze drie factoren, resulteert dit in een betere betrouwbaarheid van de biosensor.

Ten slotte is het in vele gevallen noodzakelijk dat de elektronen zich kunnen verplaatsen van de biologische component naar een versterker of microprocessor, die deze kan omzetten in het uiteindelijke signaal. Indien de gebruikte biomoleculen hiertoe niet in staat zijn, kan bv. ferroceen worden toegevoegd als transportmolecule.

Aangezien dit onderzoeksonderwerp een uitgebreide, multidisciplinaire kennis vereist van biochemie, elektrochemie en anorganische chemie, werd een

geconcentreerde onderzoeksactie (GOA) tot stand gebracht tussen vier verschillende onderzoeksgroepen: *Spectroscopy in Biophysics and Catalysis* (SIBAC), *Proteinscience, Proteomics & Epigenetic Signaling* (PPES), *Antwerp X-ray Analysis, Electrochemistry & Speciation* (AXES) en *Laboratory of Adsorption & Catalysis* (LADCA). Dit project omvat 5 doelstellingen:

1. De selectie, zuivering en karakterisatie van globines;
2. De karakterisatie van globines wat betreft hun redoxfunctie;
3. De synthese van mesoporeuze, anorganische materialen en globine-incorporatie (zonder organische modificatie);
4. De organische oppervlakmodificatie van de poreuze materialen en incorporatie van globines met als doel een sterkere adsorptie en behoud van proteïne-activiteit;
5. Het testen van de toepasbaarheid van de proteïnematrix door incorporatie in elektrochemische cellen.

Deze thesis past voornamelijk binnen onderzoeksdoelstelling 3: ‘de synthese van mesoporeuze, anorganische materialen en globine-incorporatie (zonder organische modificatie)’ en werd uitgevoerd in de onderzoeksgroep LADCA. De afzetting van myoglobine op het oppervlak van mesoporeus, commercieel titaniumdioxide werd bestudeerd. In de volgende hoofdstukken worden de eigenschappen van myoglobine en titaniumdioxide verder toegelicht.

1.2 Eigenschappen van myoglobine

In de natuur komen drie verschillende types proteïnen voor die verantwoordelijk zijn voor het transport en/of de opslag van zuurstof¹⁶. Deze proteïnen worden ook ‘*oxygen carriers*’ genoemd. Elk van deze types maakt gebruik van een of meer metaalionen, die na binding met zuurstof een oxidatie ondergaan. Tot het eerste type *oxygen carrier* behoort bv. hemocyanine. Dit proteïne bevat twee Cu⁺-ionen, welke direct gebonden zijn aan het proteïne, als bindingsite voor het O₂. Na interactie worden deze geoxideerd tot Cu²⁺ en ondergaat het dizuurstof een reductie tot O₂²⁻. Hemocyanine komt onder meer voor bij weekdieren of geleedpotigen.

Tot het tweede type behoort o.a. hemerythrine. Dit proteïne bevat twee Fe²⁺-ionen als bindingssite. De zuurstofmolecule wordt gebonden aan een van de twee ionen als een hydroperoxide-ion (HO₂⁻). De ijzerionen zijn direct gebonden aan donoratomen in het proteïne en bevinden zich niet in een heemgroep. Hemerythrine komt voornamelijk voor in ongewervelde dieren. Bij zoogdieren en de meeste andere dieren komen *oxygen carriers* van het derde en laatste type voor. Deze proteïnen bevatten één of meerder heemgroepen, welke bestaan uit een Fe-porfyrine cofactor. Zuurstofmoleculen zullen telkens binden aan een Fe(II)-atoom, dat zich in deze cofactor bevindt. Dit ijzeratoom heeft een coördinatiegetal 5, aangezien het coördineert met de vier stikstofatomen van de porfyrine ring enerzijds, en het stikstofatoom van een nabijge histidinegroep anderzijds. Deze coördinatie is high spin. Bij binding met O₂ stijgt het coördinatiegetal echter tot 6 en wordt het complex low spin. Hierbij beweegt het gecoördineerde ijzeratoom in het vlak van de porfyrinering. Vervolgens wordt het Fe(II) geoxideerd tot Fe(III). Er treedt m.a.w. een elektronoverdracht op tussen ijzer en zuurstof. Deze reactie wordt weergegeven in Figuur 3. Een van de bekendste *oxygen carriers*, hemoglobine (Hb), behoort tot deze categorie. Dit proteïne komt voor in de rode bloedcellen en wordt gebruikt voor het zuurstoftransport van de longen naar de specifieke weefsels, waar de zuurstofmoleculen worden verbruikt en gereduceerd tot koolstofdioxide. Hemoglobine dat gebonden is aan zuurstof wordt ook oxyhemoglobine (HbO₂) genoemd. Analog is dan de gereduceerde vorm van hemoglobine, zonder gebonden zuurstof, deoxyhemoglobine (HHb). De omzetting van dizuurstof in koolstofdioxide gebeurt via volgende reacties:



De laatste reactie gebeurt erg snel, door het gebruik van koolzuuranhydrase als enzymatische katalysator.

Een andere, veel voorkomende *oxygen carrier* die tot dit type behoort, is myoglobine (Mb). Dit proteïne wordt gebruikt voor de opslag van zuurstofgas in de spiercellen.

De tertiaire structuur is quasi identiek aan de tertiaire structuur van een van de vier peptideketens in hemoglobine en wordt weergegeven in Figuur 3. Het is een monomeer proteïne, in tegenstelling tot hemoglobine, dat bestaat uit vier peptideketens en vier heemgroepen en dus tetrameer is¹⁸. Aangezien Mb één heemgroep bevat, kan het bijgevolg slechts één O₂-molecule opslaan.

Hoewel het uiteindelijke doel is om sensoren te synthetiseren o.b.v. neuroglobine (Nb), globine-12 (Glb-12) en globine-25 (Glb-25), werd in deze thesis uitsluitend myoglobine (Mb) gebruikt als proteïne, aangezien dit proteïne commercieel beschikbaar is en een hoge stabiliteit heeft. Daarnaast is uit de literatuur reeds voldoende informatie gekend over de fysische en chemische eigenschappen. Bovendien is myoglobine redoxactief en vertoont het intrinsieke peroxidase-activiteit, waardoor het als reducerend agent kan gebruikt worden³. Bijkomend onderzoek i.v.m. de eigenschappen van het Mb wordt echter simultaan uitgevoerd door de onderzoeksgroepen PPES en AXES. Uit metingen van de PPES-onderzoeksgroep is reeds gebleken dat Mb natief blijft bij een pH tussen 4,5 en 7,3.

1.3 Eigenschappen van titaniumdioxide

Zoals reeds aangehaald, is het van essentieel belang om de globines op een goede manier te immobiliseren. Op deze manier kan onder meer de stabiliteit en de elektroactiviteit verbeterd worden. Er werd specifiek gekozen voor adsorptie als immobilisatiemethode, aangezien hierbij geen reagentia worden gebruikt, een minimum activatie vereist is en weinig zuiveringsstappen nodig zijn¹⁵. Deze methode heeft bijgevolg een minimale impact op het myoglobine en is relatief eenvoudig uit te voeren¹⁹. Nadelig is echter wel dat de adsorptie beïnvloedbaar is door externe factoren zoals pH, temperatuur, ionsterkte en de aanwezigheid van andere producten die al dan niet interactie aangaan met het globine en/of het oppervlak. Daarnaast kan ook de activiteit dalen en kan eventueel contaminatie van het product optreden¹⁹. Daarom is het wenselijk dat een sterke interactie optreedt tussen drager en proteïne.

In dit project werd algemeen gekozen voor anorganische, mesoporeuze metaaloxiden als drager. In vergelijking met organische dragers voor biomoleculen, hebben deze materialen als voordeel dat ze thermisch en mechanisch stabiel zijn en ook beter

bestand zijn tegen een brede waaier aan solventen¹⁹. Verder bieden ze een aantal bijkomende voordelen t.o.v. andere anorganische dragers zoals sol-gels²⁰. Sol-gels hebben niet alleen een variabele poriegrootte, hun bereiding gebeurt ook onder relatief harde omstandigheden, welke kunnen resulteren in (gedeeltelijke) denaturatie van de proteïnen¹¹. Mesoporeuze metaaloxiden, daarentegen, hebben een groter specifiek oppervlak, waardoor ze een grotere adsorptiecapaciteit vertonen²¹. Verder beschikken ze over meer geordende poriën met een erg nauwe poriegroottedistributie. Deze factoren zijn van primair belang bij de adsorptie van biomoleculen aan poreuze materialen²². Bovendien kan de diameter van de poriën aangepast worden, wat hen uitermate geschikt maakt voor de immobilisatie van grotere moleculen. Hierdoor kan namelijk de poriediameter afgestemd worden op de diameter van de proteïnen. Voor de incorporatie van Mb is de meest ideale poriediameter minimum 4 nm gezien de dimensies van het molecuul¹¹. Wanneer de poriediameter de diameter van het proteïne benadert, kunnen de beste resultaten bekomen worden wat betreft activiteit en stabiliteit²⁰. Anderzijds zal de diffusie sterk gelimiteerd worden naarmate de poriegrootte de dimensies van de biomoleculen benadert.

In deze thesis werd specifiek voor titaniumdioxide, ook titania genoemd, gekozen omwille van de goede biocompatibiliteit, hoge geleidbaarheid en lage kost²³. Titaniumdioxide wordt reeds frequent gebruikt als additief in verf, tandpasta en cosmetica. De elektrische en band-gap eigenschappen van titaniumdioxide en andere metaaloxiden in het algemeen, zorgen voor een brede waaier aan mogelijke toepassingen²¹. Ook oppervlakmodificatie of dopering van titaniumdioxide is mogelijk om resp. een betere adsorptie of een meer betrouwbare sensor te verkrijgen²⁴.

1.4 Optimalisatie van de immobilisatie

Om een gunstige interactie te bekomen tussen drager en proteïne zijn drie factoren van belang²⁵: eigenschappen van de proteïnen, eigenschappen van het oppervlak en externe factoren.

Er werd gekozen om slechts één proteïne te gebruiken, nl. myoglobine, om zo deze invloedsfactor te beperken.

Als drager werd uitsluitend commercieel, niet-gemodificeerd titania gebruikt. Door slechts één dragermateriaal te gebruiken, kunnen afwijkingen door verschillen in

dragermateriaal worden verminderd. Op deze manier kon nagegaan worden wat de mogelijkheden zijn van dit relatief goedkope product, zonder te investeren in de aanmaak van titania met nauwe poriegrootten via templaatsynthese of bijkomende oppervlakmodificatie. Bovendien biedt het gebruik van commercieel titania het grote voordeel dat er voldoende en betrouwbare informatie gekend is over de specifieke fysische en chemische eigenschappen van het materiaal. Er werd gekozen voor Millennium PC500 als commercieel, mesoporeus titania. Daarnaast werden metingen uitgevoerd met het niet-poreuze, commercieel beschikbare P25 titaniumdioxide. Een vergelijking tussen beide dragermaterialen maakte het o.m. mogelijk om meer informatie in te winnen over de specifieke locatie van de proteïne-adsorptie.

De invloed van de drager uit zich m.a.w. vooral door de aan- of afwezigheid van poriën in het materiaal. Daarnaast geldt dat Millennium PC500 uit zuiver anatase titania bestaat, terwijl P25 ongeveer 20-25% rutile fase bevat. Dit verschil kan tevens een invloed hebben op de immobilisatie.

De belangrijkste invloedsfactoren in dit onderzoek zijn echter deze van externe oorsprong, nl. temperatuur, ionsterkte, zuurtegraad en buffersamenstelling. Een hogere temperatuur zal enerzijds zorgen voor meer adsorptie, maar anderzijds is een te hoge temperatuur nefast voor de proteïne-activiteit. Bijgevolg werd bij kamertemperatuur gewerkt. Ook de ionsterkte heeft een invloed op de adsorptie. Bij hoge ionsterkte worden elektrostatische interacties verhinderd tussen de deeltjes en zal het stapelen van de deeltjes met eenzelfde lading eenvoudiger zijn. Daarnaast kunnen de additieven die gebruikt worden om de ionsterkte te wijzigen, zelf interactie ondergaan met het oppervlak en/of met het Mb.

De zuurtegraad wordt best gelijkgesteld aan het iso-elektrisch punt (IEP) (7-7,3 voor Mb¹⁷). Bij deze waarde zijn alle proteïnemoleculen namelijk neutraal (wanneer een zuiver proteïne wordt gebruikt), waardoor elektrostatische interacties geminimaliseerd worden. In deze thesis is echter ook het iso-elektrisch punt van titaniumdioxide van belang, aangezien dit de elektrostatische interactie tussen proteïne en dragermateriaal kan beïnvloeden. Het iso-elektrisch punt van titania bedraagt ongeveer 6,2 en 7 resp. voor Millennium PC500 en P25²⁶. Bij een pH hoger dan het IEP is de netto lading van het oppervlak negatief. Als deze pH tevens lager is

dan het IEP van Mb, geldt dat Mb een netto positieve lading heeft, waardoor de interactie tussen titania en proteïne elektrostatich wordt gestimuleerd. Er werd bijgevolg specifiek gekozen voor pH 7, aangezien dit de grenswaarde is voor zowel Mb als titania. Wanneer op deze manier de netto ladingen tegengesteld zijn, is deze coulombische interactie de dominante drijfkracht van de adsorptie²⁰. Er valt echter op te merken dat het IEP onderhevig is aan de reactie-omstandigheden. Invloed van temperatuur, zuurtegraad of samenstelling van de oplossing kan deze waarde wijzigen. Daarnaast werd het Millennium PC500 gecalcineerd, waardoor de literatuurwaarde vermoedelijk niet behouden werd. Bovendien bevindt het IEP voor titania zich dermate dicht bij het IEP voor Mb dat de oppervlaklading, veroorzaakt door een hogere of lagere pH (resp. t.o.v. het IEP van titania en Mb) te laag is, om te resulteren in een coulombische interactie. Hoe dan ook blijft pH 7 de meest geschikte zuurtegraad voor het reactiemilieu, aangezien deze waarde het dichtst ligt bij het IEP van zowel titania als Mb.

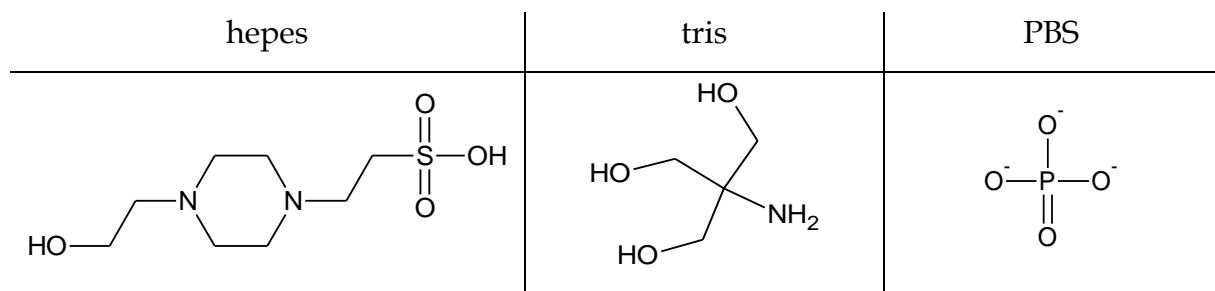
Bijgevolg is ook de buffersamenstelling van groot belang. Deze bepaalt niet alleen de pH van het reactiemengsel, maar beïnvloedt ook de stabiliteit van het Mb. Om een functionerende biosensor te creëren, is het essentieel dat de proteïnen tijdens en na incorporatie niet gedenatureerd worden. Het al dan niet succesvol immobiliseren zal bijgevolg ook bepaald worden door de buffersamenstelling. Bijkomend is het echter belangrijk de interactie van de buffermoleculen met het oppervlak zo goed mogelijk te kiezen. Interactie kan er namelijk voor zorgen dat de adsorptie van buffermoleculen competitief is met de adsorptie van proteïnen, wat nadelig is voor immobilisatie. Daarentegen bestaat ook de mogelijkheid dat de adsorptie van buffermoleculen kan beschouwd worden als een oppervlakmodificatie en immobilisatie van proteïnen bijgevolg gestimuleerd wordt. In deze thesis werd voornamelijk deze buffersamenstelling als externe invloedsfactor op de immobilisatie van proteïnen bestudeerd.

1.5 Doel

Het doel van deze thesis is na te gaan of en in welke mate de incorporatie van myoglobine op mesoporeus, commercieel titaniumdioxide beïnvloed wordt door de

buffersamenstelling. Zoals reeds aangehaald, is dit een essentiële invloedsfactor bij de immobilisatie van proteïnen op een dragermateriaal.

In samenspraak met de onderzoeksgroep PPES werden drie buffers uitgetest, aangezien deze in theorie de beste interactie zouden vertonen met zowel de proteïnen als het titania: hepes (4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethaansulfonzuur), tris (2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propaandiol of tris(hydroxymethyl)aminomethaan) en *phosphate buffered saline* of fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS) (Figuur 4).



Figuur 4: Structuurformules van hepes, tris en PBS.

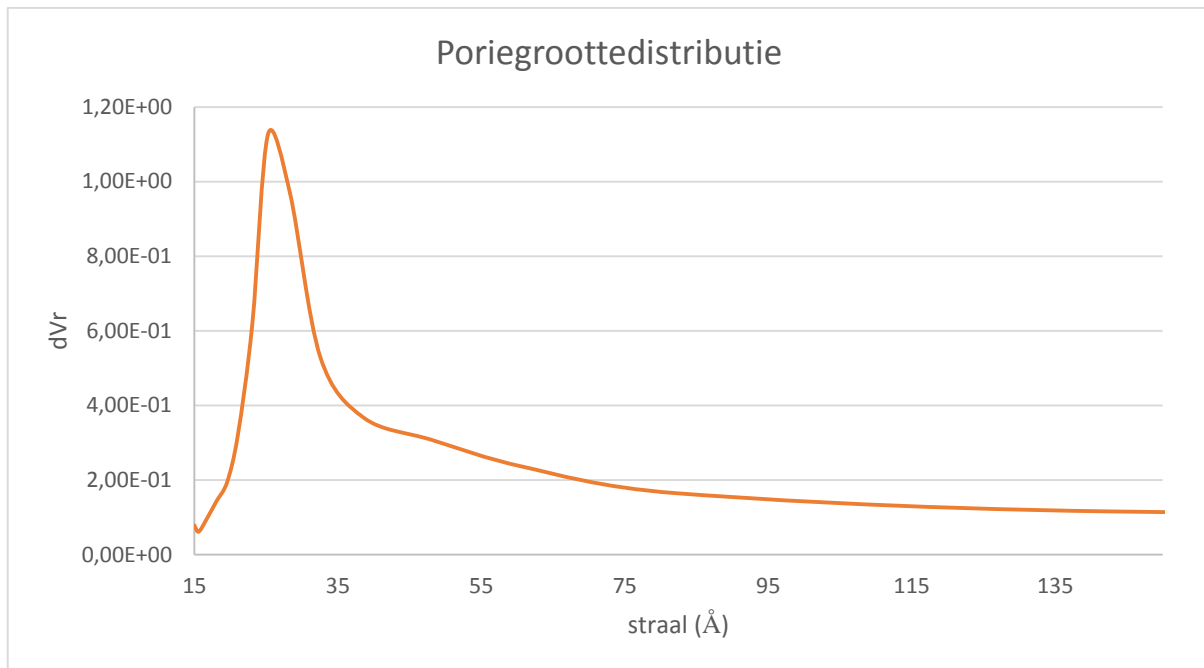
De hepesbuffer werd reeds in vorige experimenten bij LADCA gebruikt, wanneer andere eigenschappen van geïncorporeerde globines op dragermaterialen werden onderzocht. De andere twee buffers werden nog niet in het huidige onderzoek uitgetest. Tris en PBS worden echter frequent als buffer gebruikt in onderzoek voor proteïnen, aangezien ze zich rond de proteïnen kunnen schikken en op die manier denaturatieprocessen kunnen vertragen^{27,28}. Tris is daarnaast één van de meest gebruikte buffers bij staalvoorbereiding van biologische stalen zoals urine of bloed²⁹. Deze twee buffers zullen echter, in tegenstelling tot hepes, interageren met het titaniaoppervlak. Deze interactie kan een negatief effect hebben op de incorporatie, wanneer hierdoor de mogelijke bindingssites voor Mb worden beperkt. Anderzijds kan het ook een positieve invloed hebben, wanneer adsorptie van buffermoleculen resulteert in een gunstige modificatie van het oppervlak. Zo worden fosfaten, fosfonaten, fosfinaten en hun afgeleiden reeds frequent gebruikt als koppelmoleculen om organische groepen te binden aan metaaloxiden³⁰.

2 Experimentele methoden

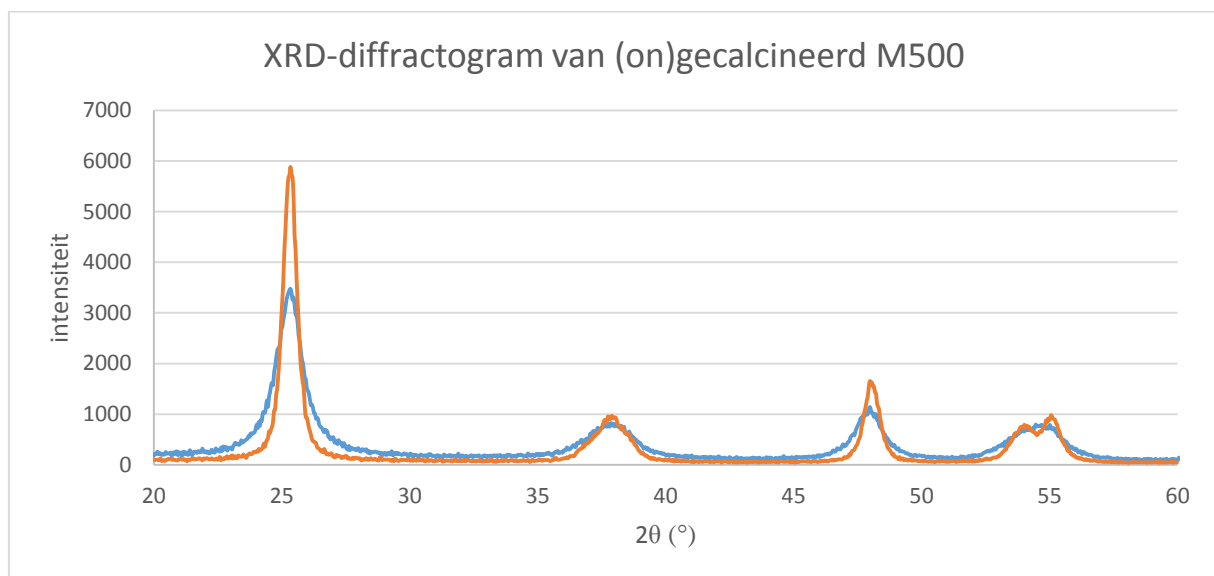
2.1 Reagentia

Er werd paardenhart myoglobine gebruikt, met een zuiverheid van minimum 90 %, aangekocht bij Sigma Aldrich. Het myoglobine werd gebruikt zonder bijkomende zuivering. Bij elke incorporatie werd een concentratie van 15 μM myoglobine in gedestilleerd water gehanteerd. Verder werden Millennium PC500 titania en P25 titania gebruikt, resp. aangekocht bij Cristal en Degussa-Hüls. Zonder thermische behandeling bevat het Millennium PC500 titania microporiën, die m.a.w. een diameter hebben die kleiner is dan de diameter van Mb. Na calcinatie bij 350 °C gedurende 6 uur zullen kleine poriën echter verdwijnen ter vorming van grotere poriën met een diameter in het mesoporiegebied³¹. Dit wordt weergegeven in Figuur 5 welke de poriegroottedistributie van het gecalcineerde M500 weergeeft. Hoewel deze distributie vrij breed is, bevindt het maximum zich net boven de diameter van Mb, wat de immobilisatie ervan ten goede komt.

Hoewel bij deze thermische behandeling ongeveer 60 % van het specifiek oppervlak verloren gaat, blijft het initiële porievolume behouden en verbetert de kristalliniteit van het titania. Dit wordt weergegeven in onderstaande XRD-diffractogram van Millennium PC500 vóór en na calcinatie bij 350 °C (Figuur 6). Na calcinatie stijgt de band bij $2\theta = 26^\circ$, wat betekent dat er meer anatase fase aanwezig is in het materiaal³². Verder duidt een hogere intensiteit ook op een stijging in deeltjesgrootte en een verbetering in kristalliniteit. Een hogere calcinatietemperatuur zal resulteren in grotere poriën en betere kristalliniteit, maar een verdere daling in specifiek oppervlak. Vandaar werd voor 350 °C als calcinatietemperatuur gekozen.



Figuur 5: Poriegroottedistributie (desorptie) voor Millennium PC500, dat gecalcineerd werd bij 350 °C gedurende 6 uur. De afgeleide van het porievolume wordt weergegeven in functie van de poriestraal.



Figuur 6: XRD-diffractogram van zowel het niet-gecalcineerde als het gecalcineerde Millennium PC500.

Temperatuursbehandeling van P25 titania heeft nagenoeg geen effect op het specifieke oppervlak en werd dan ook niet uitgevoerd.

Er werden drie verschillende buffers gebruikt: hepes, tris (Trizma® Base) en fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS), allen aangekocht bij Sigma Aldrich. Van elke buffer werd een 0,01 M oplossing in water bereid. Bijkomend bevat de PBS-oplossing

0,138 M NaCl en 0,0027 M KCl. Daarnaast werd een 0,1 M oplossing in water bereid van de trisbuffer. De pH van de buffers werd bijgesteld met 0,1 M HCl of 0,1 M NaOH tot pH 7.

2.2 Immobilisatie van myoglobine op titania

Voor elke incorporatie werden titania-suspensies (4 ml) met variërende concentratie bereid, welke gedurende enkele seconden gesoniceerd werden om een uniforme dispersie te verkrijgen³³. Tevens werd een 60 μ M Mb-oplossing bereid. Deze oplossingen werden gedurende een uur bewaard op een shaker met snelheid 300 rpm. Vervolgens werd met deze oplossingen een mengsel gemaakt van 3 ml titania- en 1 ml Mb-oplossing, zodanig dat de concentratie aan Mb tot 15 μ M werd gereduceerd. Dit mengsel werd gedurende minstens 30 uur bewaard op de shaker met eenzelfde snelheid. Op deze shaker werd tevens een 15 μ M oplossing van Mb in buffer, zonder titania, bewaard als referentie.

Het verloop van de incorporatie werd gedurende deze 30 uur op een aantal vastgelegde tijdstippen geanalyseerd m.b.v. UV-VIS-metingen. Hiervoor werd 1,5 ml van elk staal gedurende 10 minuten gecentrifugeerd met een snelheid van 4000 rpm. Vervolgens werd het supernatant geanalyseerd. Na deze metingen werd het supernatant opnieuw toegevoegd aan de centrifugerest en enkele seconden geschud tot opnieuw een suspensie werd verkregen. Deze suspensie werd vervolgens toegevoegd aan het overige staal, dat tijdens deze meting op de shaker bewaard werd. Geïncorporeerde stalen werden gefiltreerd, gewassen en gedroogd om vervolgens te analyseren in infrarood spectroscopie, thermogravimetrische analyse en stikstofsorptie.

2.3 Karakterisatiemethoden

2.3.1 UV-VIS

UV-VIS-metingen werden gebruikt om de voortgang van de immobilisatie na te gaan enerzijds en de stabiliteit van het Mb in oplossing anderzijds. Het spectrum van Mb vertoont twee duidelijke pieken in het ultraviolet gebied, nl. bij 280 en 410 nm. Deze pieken zijn respectievelijk afkomstig van een combinatie van de aromatische aminozuren met de heemgroep en de heemgroep alleen. De band bij 410 nm is de

meest intense en wordt de Soret band genoemd. Wanneer de conformatie van de heemgroep wordt gewijzigd (bv. door (gedeeltelijk) ontvouwen van het proteïne), zal de intensiteit van de Soret band verlagen en zal er ook een shift optreden naar een lagere golflengte³⁵. Daarnaast bevat het spectrum een minder intense band tussen 450 en 630 nm, welke de Q-band wordt genoemd³⁴. Deze band wordt beïnvloed door de oxidatietoestand van de heemgroep.

Wanneer het proteïne echter niet gedeneureerd wordt, kan de Soret band gebruikt worden om de concentratie ervan te bepalen. Met de Lambert-Beer wet: $A = \epsilon_{\lambda} \cdot b \cdot c$ kan immers de concentratie c in een cuvet met weglengte b berekend worden aan de hand van de absorbantie A en de molaire extinctiecoëfficiënt ϵ_{λ} bij een bepaalde golflengte λ . Bij 410 nm bedraagt deze $120.000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ ¹⁷.

Aangezien de Soretband zowel bij concentratie- als conformatieverandering een duidelijke wijziging zal ondergaan, werd uitsluitend het gebied rond deze band bestudeerd (350-600 nm).

Gedurende de incorporaties werden op regelmatige tijdstippen metingen uitgevoerd van het supernatant, alsook van de referentie Mb-oplossing met een *Nicolet Evolution 500* spectrometer.

2.3.2 DRIFT

Karakterisatie van proteïnen via Diffuse Reflectie Infrarood Fourier Transform (DRIFT) spectroscopie is niet evident, aangezien het spectrum verschillende overlappende pieken zal vertonen, waardoor veel informatie verborgen blijft. De gedetailleerde, chemische structuur van biomoleculen kan m.a.w. niet afgeleid worden uit een infraroodspectrum. Via DRIFT-metingen kan echter wel nagegaan worden of het proteïne al dan niet gedeneureerd wordt. Informatie over de hoofdketen wordt namelijk weergegeven in drie amidebanden, resp. voor de C=O rekvibratie ($\sim 1650 \text{ cm}^{-1}$), de N-H deformatie ($\sim 1550 \text{ cm}^{-1}$) en de NH buig- en CN rekvibraties ($1400 - 1200 \text{ cm}^{-1}$)^{36,37}. Wanneer deze banden min of meer ongewijzigd blijven t.o.v. het spectrum van zuiver myoglobine, kan er geconcludeerd worden dat de amidebinding ongebroken is en bijgevolg het proteïne grotendeels natief is gebleven⁸. Een brede piek rond 1650 cm^{-1} wijst op (gedeeltelijke) ontvouwing van de proteïnemoleculen³⁶. Controlemetingen met UV-VIS kunnen hier bevestiging geven.

De DRIFT-metingen werden uitgevoerd met een *Nicolet 6700 FTIR* spectrometer. Dit toestel gebruikt een He-Ne laser als interne kalibratie. De lucht in de infraroodcel wordt continu ververst met een droge luchtstroom. Hierdoor wordt interferentie van water en koolstofdioxide geminimaliseerd. KBr werd gebruikt als referentiestaal.

2.3.3 Stikstofsorptie

Om de porositeit van het materiaal na te gaan, werden stikstofsorptiemetingen uitgevoerd om zo de isotherm van het materiaal te bepalen. Hiervoor werden de stalen gedurende 16 uur ontgast bij kamertemperatuur met behulp van een Quantachrome Autosorb Degasser. Vervolgens werden ze gemeten in een Quantachrome Quadrasorb SI. Via de Brunauer - Emmett - Teller (BET) methode kon informatie verkregen worden over het specifiek oppervlak van het materiaal³⁸. Aan de hand van de Barrett - Joyner - Halenda (BJH) methode kon de poriegrootte en de distributie ervan berekend worden voor zowel adsorptie als desorptie.

2.3.4 Thermische analyse (TGA/DTG/DTA)

In thermogravimetrische analyse (TGA) wordt een staal onderworpen aan een gecontroleerd temperatuursprogramma in een gecontroleerde atmosfeer. Massaverlies of -winst wordt gemeten in functie van de temperatuur of de tijd³⁹.

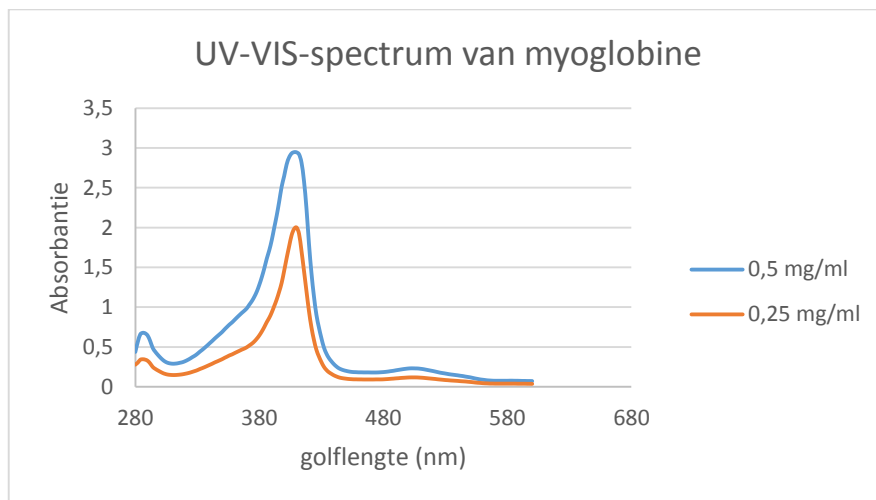
TGA-metingen werden uitgevoerd met een Mettler Toledo TGA/SDTA851 thermobalans. De stalen werden opgewarmd met een snelheid van 5 °C per minuut onder een O₂-stroom bij een temperatuurstijging van 30 tot 600 °C.

3 Resultaten en discussie

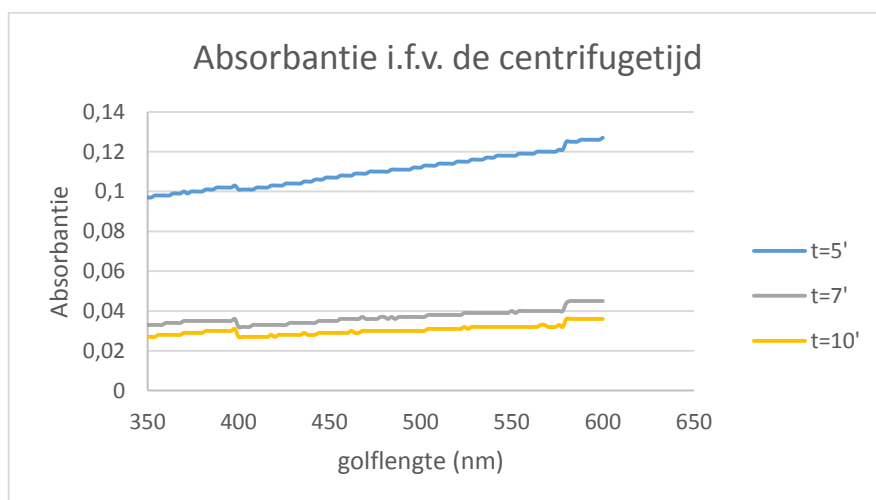
3.1 Optimalisatie van de experimentele condities

3.1.1 Myoglobineconcentratie

Er werd gekozen voor een myoglobineconcentratie van 15 μM (0,25 mg/ml), aangezien op deze manier een voldoende intense Soret band wordt bekomen. Bij hogere concentratie (bv. 0,5 mg/ml) zal de piek het lineaire detectiegebied van het UV-VIS-toestel echter overschrijden (Figuur 7). Een lagere concentratie ($< 0,25$ mg/ml) is ongunstig voor de incorporatie, aangezien dan de verhouding van de hoeveelheid Mb t.o.v. de hoeveelheid titania te laag is.



Figuur 7: UV-VIS spectrum van Mb-oplossingen met een verschillende concentratie.



Figuur 8: UV-VIS spectrum van titania-oplossingen in 0,01 M trisbuffer. De absorbantie wordt weergegeven in functie van de golflengte voor drie stalen met verschillende centrifugetijd.

3.1.2 Centrifugetijd

Om via UV-VIS-spectroscopie het verloop van de incorporatie na te gaan, werd uitsluitend het supernatant gemeten. Uit de concentratie van de initiële Mb-oplossing en de concentratie van het supernatant kan berekend worden hoeveel Mb geadsorbeerd is aan het oppervlak en zich m.a.w. niet meer in oplossing bevindt. Hiervoor is het van belang dat het bekomen supernatant zo min mogelijk titania bevat. Bij vorige experimenten werd voor incorporaties met hepes als buffer een centrifugetijd van vijf minuten gehanteerd. Aangezien in dit onderzoek ook twee andere buffers werden gebruikt, werd de meest geschikte centrifugetijd opnieuw experimenteel vastgesteld. De interactie tussen buffer, oppervlak en globine kan immers verschillen naar gelang een andere buffer wordt gebruikt. Afhankelijk van de interactie kan een andere centrifugetijd nodig zijn om een optimale scheiding te bekomen.

Om een geschikte centrifugetijd te vinden, werden voor elke buffer drie stalen bereid van 15 mg titania en 4 ml buffer. Deze stalen werden resp. gecentrifugeerd gedurende 5, 7 en 10 minuten. Vervolgens werd het supernatant gemeten in UV-VIS-spectroscopie. In Figuur 8 wordt de absorptantie weergegeven in functie van de golflengte voor elk van de drie stalen met 0,01 M tris als buffer. Hieruit blijkt dat het staal na vijf minuten centrifuge nog steeds een grote hoeveelheid titania bevat. Dit in tegenstelling tot de resultaten bekomen met hepes- en PBS-buffer. Wanneer deze twee buffers worden gebruikt, is een centrifugetijd van vijf minuten reeds voldoende om een minimaal achtergrondsignaal te verkrijgen. Voor 0,01 M tris is dit signaal echter het laagste na centrifuge gedurende tien minuten. Om alle stalen op een correcte manier te kunnen vergelijken met elkaar, werd besloten om voor elk staal, ongeacht de gebruikte buffer, een centrifugetijd van tien minuten toe te passen.

3.2 Invloed van het type buffer

3.2.1 Invloed van de buffer op de stabiliteit van het myoglobine

Een eerste eis die aan de buffer gesteld wordt, is dat deze een gunstige interactie vertoont met het myoglobine. Het is wenselijk dat de buffer de stabiliteit van de

natieve toestand zo lang mogelijk behoudt. Om deze interactie na te gaan, werden drie stalen bereid van 1 mg Mb in 4 ml 0,01 M buffer. Deze stalen werden gedurende 15 dagen gemeten in UV-VIS spectroscopie. In Tabel 1 wordt de procentuele absorptantie bij de Soret band (410 nm) weergegeven in functie van de tijd (in dagen) voor deze drie stalen.

Tabel 1: Procentuele absorptantie van stalen met tris, hepes en fosfaatbuffer in functie van de tijd.

| Tijd (dagen) | 0 | 1 | 2 | 3 | 7 | 10 | 15 |
|--------------|------|------|-------|-------|-------|-------|-------|
| tris | 100% | 100% | 100% | 100% | 97,5% | 95,0% | 95,0% |
| hepes | 100% | 100% | 99,5% | 98,1% | 48,2% | 17,5% | 15,2% |
| PBS | 100% | 100% | 100% | 100% | 97,3% | 96,2% | 96,2% |

Uit deze metingen blijkt het Mb sneller te denatureren wanneer hepes wordt gebruikt als buffer. De eerste tekenen van denaturatie zijn immers al zichtbaar na twee dagen. Na de zevende dag is in dit geval het Mb zodanig veranderd in conformatie, dat de intensiteit van de absorptantie gehalveerd is. Dit geldt echter niet wanneer tris of PBS wordt gebruikt als buffer. Een daling in intensiteit wordt pas waargenomen na zeven dagen en blijft zelfs na 15 dagen beperkt.

Kortom, van deze drie buffers zullen tris en PBS de natieve conformatie van het Mb het langst stabiel kunnen houden. Wanneer hepes gebruikt wordt, treedt er reeds denaturatie op na twee dagen. Het zou dus wenselijk zijn, mocht de incorporatie met PBS en tris als buffer minstens even vlot verlopen in vergelijking met hepes.

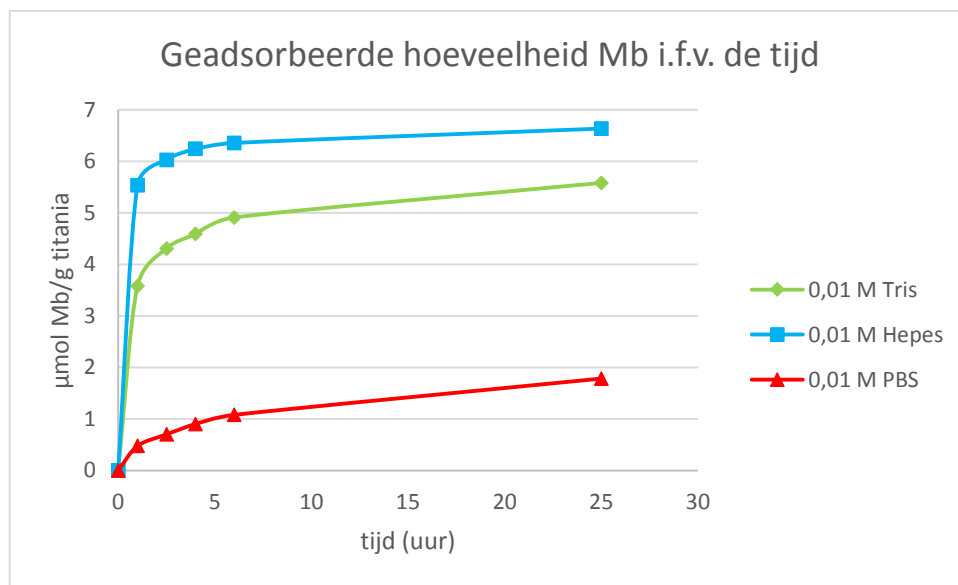
3.2.2 Invloed van de buffer op de incorporatie

Er werden incorporaties uitgevoerd met een gelijke titania- en myoglobineconcentratie en een verschillende buffer, nl. resp. 8 en 1 mg per 4 ml buffer. Zoals eerder vermeld, werden hepes-, tris- en fosfaatbuffer (PBS) gebruikt. Alle bufferoplossingen werden gebruikt met een concentratie van 0,01 M en een pH gelijk aan 7. Het verloop van de incorporatie in functie van de tijd werd opgevolgd door de oplossingen te meten in UV-VIS-spectroscopie. Bijkomende karakterisatie werd uitgevoerd met DRIFT, thermogravimetrische analyse en stikstofsorptie op de gefiltreerde stalen na incorporatie.

In Figuur 9 wordt de hoeveelheid geadsorbeerd myoglobine (uitgedrukt in $\mu\text{mol Mb}$ per gram titania) weergegeven in functie van de tijd voor de drie buffers. Uit deze

figuur blijkt dat de incorporatie het best verloopt met hepes, aangezien met deze buffer de grootste hoeveelheid myoglobine wordt geïncorporeerd. De trisbuffer haalt een aanvaardbare waarde, hoewel er een kinetische vertraging zichtbaar is tijdens het eerste uur van de incorporatie. Na 25 uur incorporatie is nog geen steady state waarneembaar, hoewel dit wel het geval is bij hepes.

Incorporatie met de fosfaatbuffer, daarentegen, is geen succes. Na 24 uur wordt slechts een vijfde van de maximale hoeveelheid geïmmobiliseerd. Er werd wel vastgesteld dat na zeven dagen een geadsorbeerde hoeveelheid van ca. 5 μmol per gram bereikt werd. Een incorporatie met fosfaatbuffer is m.a.w. mogelijk, maar duurt langer. Dit is vermoedelijk te wijten aan de interactie tussen buffer en proteïne en/of de interactie tussen buffer en titania. Deze factoren, of een combinatie ervan, kunnen de adsorptie opmerkelijk vertragen.



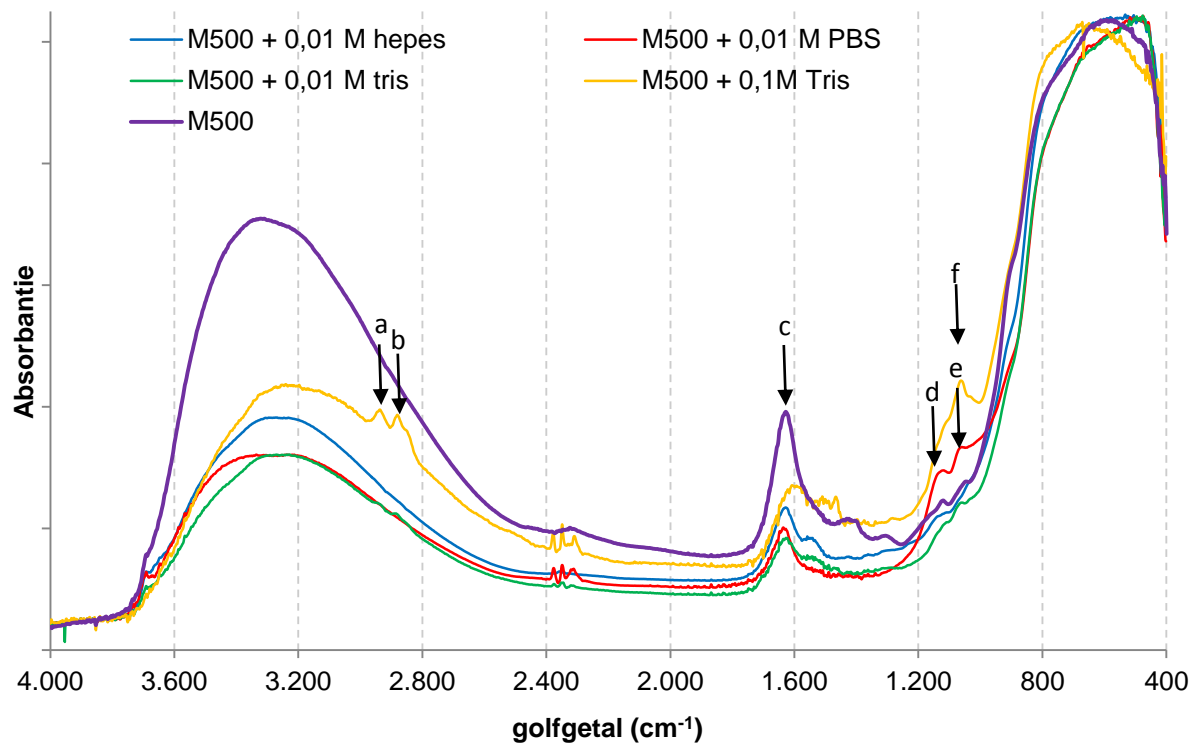
Figuur 9: Grafiek van de geadsorbeerde hoeveelheid Mb ($\mu\text{mol/g}$) op Millennium PC500 i.f.v. de tijd voor 0,01 M hepes-, tris- en PBS-buffer.

Een tweede manier om de invloed van de buffer op het myoglobine na te gaan, is via infraroodmetingen. In Figuur 10 wordt het DRIFT-spectrum weergegeven voor zuiver M500 en vier stalen van M500 met telkens een verschillende buffer, zijnde 0,01 M hepes, tris en PBS en 0,1 M tris. Het spectrum van dit laatste staal werd toegevoegd ter verduidelijking voor de banden in het spectrum met 0,01 M tris, daar deze een hogere intensiteit hebben naarmate de concentratie buffer stijgt.

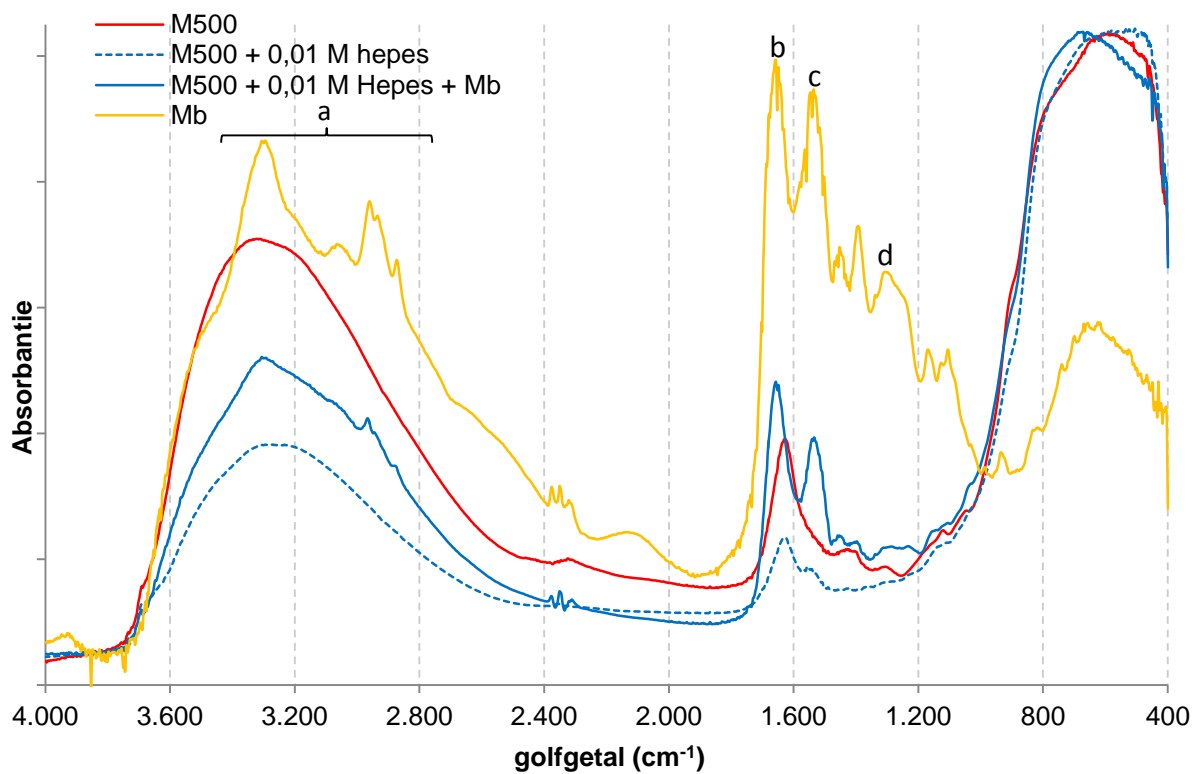
In het spectrum van zuiver M500 zijn drie intense banden zichtbaar. De brede band rond 3400 cm^{-1} en de band bij 1630 cm^{-1} zijn te wijten aan waterstofgebrugde OH-groepen door o.a. geadsorbeerd en moleculair water en geven resp. de OH rek- en buigvibratie weer³². De meest intense band bevindt zich tussen 850 en 400 cm^{-1} en is afkomstig van de Ti-O-Ti binding, welke primeert in het titaniarooster⁴⁰.

Het DRIFT-spectrum van het staal met hepes als buffer bevat dezelfde pieken, in tegenstelling tot de andere buffers. In het geval van trisbuffer verschijnt een band bij 2940 (a) en 2880 cm^{-1} (b), welke resp. de asymmetrische en symmetrische C-H rekvibratie weergeven⁴¹. Daarnaast bevat dit spectrum ook een band bij 1050 cm^{-1} (f) welke afkomstig is van de C-O-Ti rekvibratie. Dat deze band intenser is wanneer $0,1\text{ M}$ tris wordt gebruikt, wijst erop dat er meer bindingen gevormd worden tussen tris en titania. Dit kan enerzijds te wijten zijn aan de aanwezigheid van meer trismoleculen. Anderzijds kan deze stijging veroorzaakt worden door meerdere bindingen per trismolecule.

Het spectrum met PBS, ten slotte, bevat twee extra banden, nl. bij 1116 (d) en 1060 cm^{-1} (e). De aanwezigheid van deze pieken duidt op een verlaging in symmetrie van het PO_4^{3-} -ion³². Dit ion heeft in oplossing een symmetrie T_d en zou slechts 1 band bevatten in het gebied tussen 900 en 1200 cm^{-1} . De aanwezigheid van deze tweede piek wijst op een verlaging in symmetrie tot C_{3v} of C_{2v} ⁴². Dit bewijst m.a.w. dat het PBS adsorbeert aan het oppervlak.



Figuur 10: DRIFT-spectra voor Millennium PC500 met en zonder buffer.

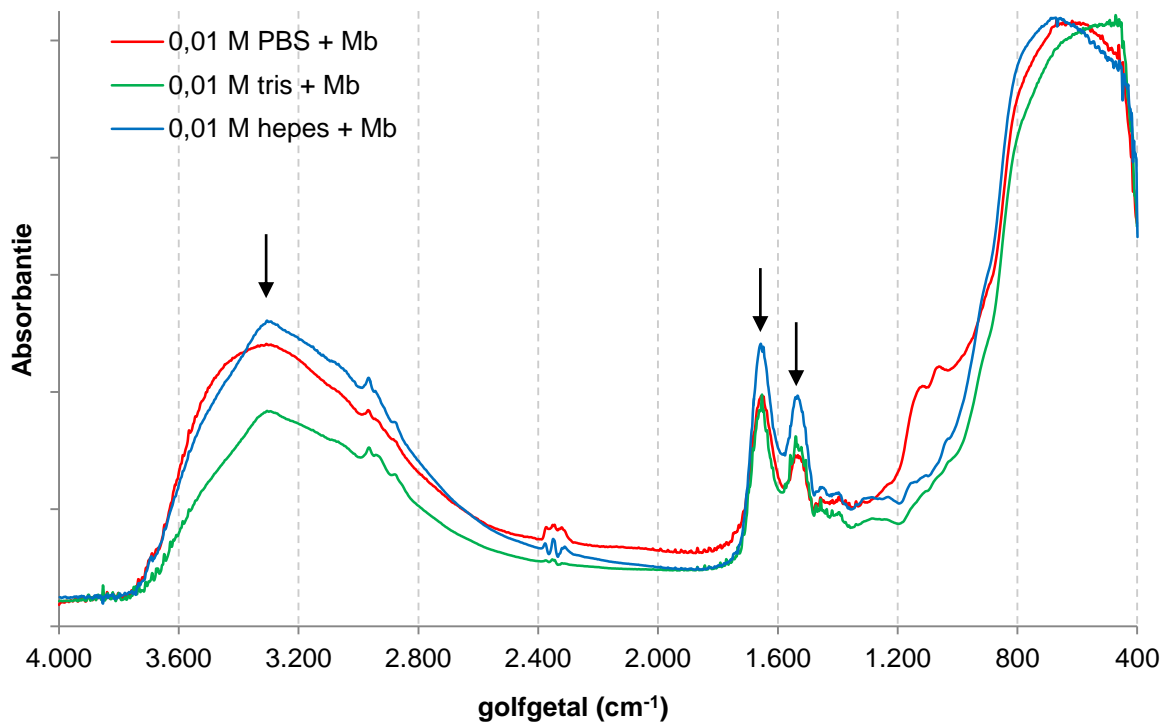


Figuur 11: DRIFT-spectra van M500, Mb, een mengsel van M500 en hepesbuffer en geïncorporeerd M500 met hepesbuffer.

In Figuur 11 worden de genormaliseerde DRIFT-spectra weergegeven voor zuiver myoglobine, zuiver Millennium PC500 (M500) titania en geïncorporeerd titania met hepes als buffer.

Het spectrum van Mb is moeilijker te ontleden, daar het verschillende overlappende pieken bevat. Toch kunnen enkele belangrijke signalen onderscheiden worden. Het gebied tussen 3300 en 2900 cm^{-1} (a) is te wijten aan NH rekvibratie. Dit signaal is onafhankelijk van de conformatie van het myoglobine. De piek bij 3305 cm^{-1} in het spectrum van de geïncorporeerde stalen bevestigt dan ook de aanwezigheid van Mb in deze stalen³⁶. De pieken die echter de meeste informatie geven over de conformatie van Mb bevinden zich rond 1650 (b) en 1550 cm^{-1} (c) en worden resp. amideband I en II genoemd zoals reeds aangehaald werd in het hoofdstuk 'Experimentele methoden'. Beide banden zijn onafhankelijk van de zijketens van het globine; ze worden uitsluitend bepaald door de secundaire structuur van het proteïne. Een derde amideband (amide III) bevindt zich rond 1300 cm^{-1} (d) en is afhankelijk van zowel de zijketens als de conformatie⁴³.

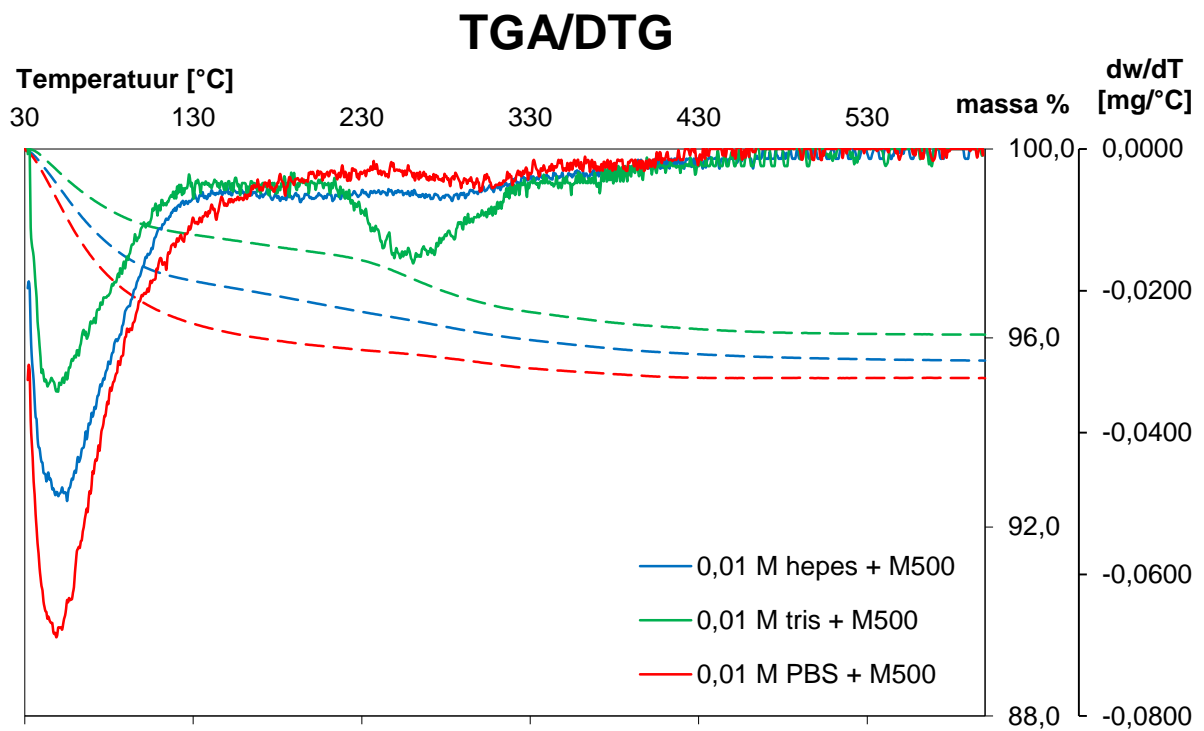
Aangezien in het spectrum van de geïncorporeerde stalen alle banden, op amideband I en II na, een bijzonder lage intensiteit hebben in het gebied tussen 1700 en 1200 cm^{-1} , zullen enkel deze twee banden als referentie gebruikt worden voor het bepalen van de conformatie van Mb. Wanneer deze banden scherp blijven en er geen shift optreedt na incorporatie, kan geconcludeerd worden dat het Mb niet gedeneureerd is.



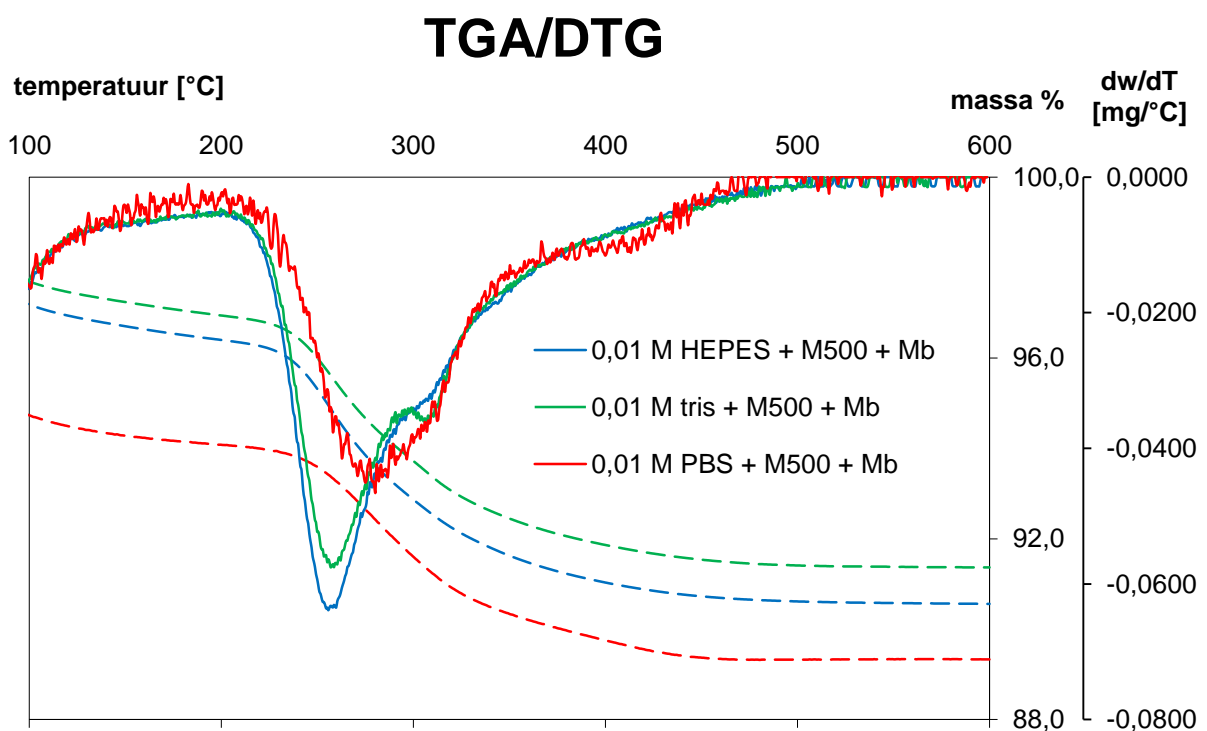
Figuur 12: IR-spectrum voor geïncorporeerde stalen met PBS-, tris- en hepesbuffer.

Figuur 12 toont de DRIFT-spectra van geïncorporeerd Millennium PC500 met eenzelfde titania- en myoglobineconcentratie, maar verschillende buffer. De aanwezigheid van het Mb wordt bevestigd door de band bij 3305 cm^{-1} en de twee amidebanden (I en II), alle drie aangeduid in Figuur 12. Deze eerste band is echter minder intens voor 0,01 M PBS, wat bevestigt dat er met deze buffer minder Mb geïmmobiliseerd kan worden, zoals reeds bleek uit de UV-VIS-metingen. De amidebanden I en II bevinden zich bij hetzelfde golfgetal als voor zuiver Mb en zijn relatief scherp. Er kan bijgevolg geconcludeerd worden dat het Mb in geen van de gevallen gedeneureerd is na immobilisatie.

Naast de metingen in DRIFT, werden de gefiltreerde stalen ook gekarakteriseerd in TGA. De TGA/DTG-spectra van stalen met de drie buffers en zonder Mb worden weergegeven in Figuur 13. Voor elk staal werd 15 mg M500 gebruikt per 4 ml buffer. Uit het spectrum van het staal met trisbuffer blijkt een massaverlies op te treden bij 260 °C . De geadsorbeerde buffermoleculen worden bij deze temperatuur verwijderd. In de spectra voor de andere buffers is dergelijke band niet zichtbaar. Voor hepesbuffer is dit vermoedelijk omdat alle buffermoleculen werden verwijderd bij filtratie en wassen van de stalen.



Figuur 13: TGA/DTG-spectra voor mengsels van M500 en PBS-, tris- en hepesbuffer.



Figuur 14: TGA/DTG-spectrum van geïncorporeerde stalen met tris-, hepes- en PBS-buffer.

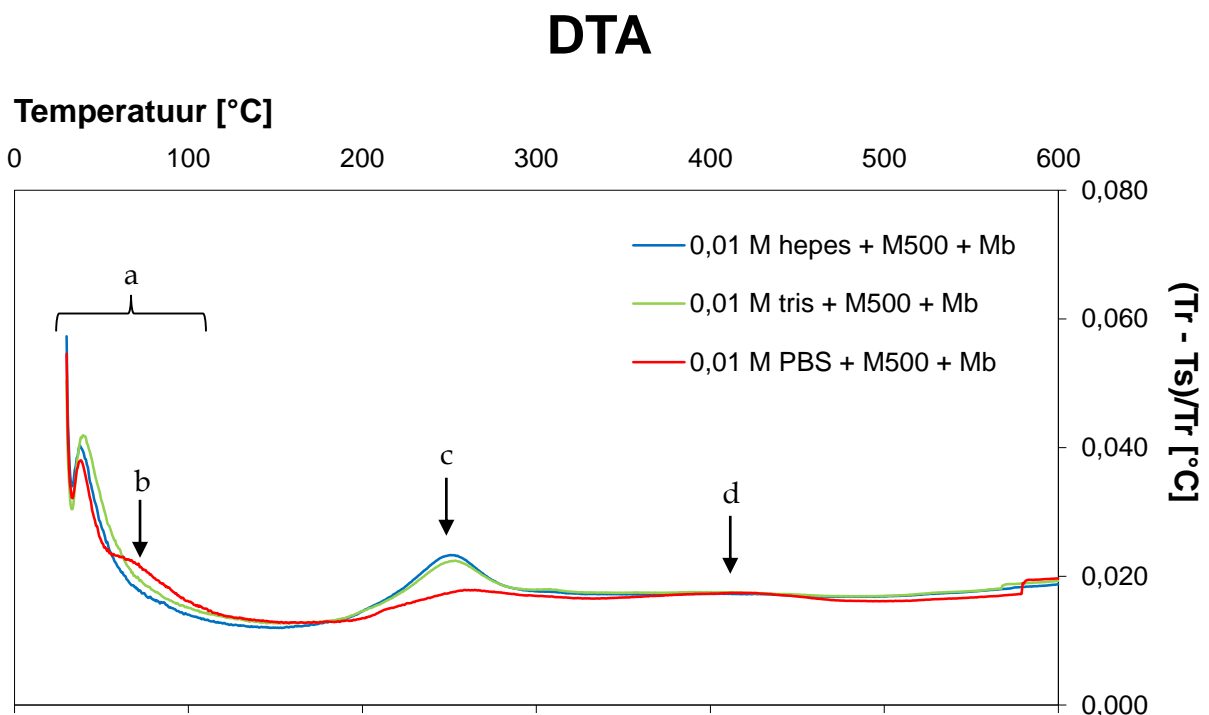
Dit wordt tevens bevestigd in het DRIFT-spectrum van M500 met hepes, dat geen bijkomende pieken bevat t.o.v. het spectrum van M500 alleen. In het geval van PBS kan dit niet gezegd worden. Vermoedelijk worden de fosfaatmoleculen pas bij een temperatuur hoger dan 600 °C verwijderd.

Vervolgens werden TGA-metingen uitgevoerd van geïncorporeerde stalen. Er werd telkens 15 mg M500 en 1 mg Mb gebruikt per 4 ml buffer. Er wordt volgend TGA/DTG-spectrum bekomen (Figuur 14). Voor hepes en tris geldt dat het Mb wordt verwijderd bij ongeveer 260 °C. Bijkomend is er echter een tweede piek (bij 300 °C) voor het staal met trisbuffer. De oorzaak van deze piek werd meer in detail bestudeerd door stalen te calcineren tot net voor en net na de temperaturen die overeenkomen met deze pieken en vervolgens infraroodmetingen uit te voeren. De resultaten van dit experiment worden in het onderdeel i.v.m. bufferconcentratie besproken.

Het spectrum voor PBS vertoont echter een aantal verschillen in vergelijking met de andere buffers. Zo wordt het Mb verwijderd bij een hogere temperatuur en is het massaverlies lager. Uit UV-VIS is reeds gebleken dat minder Mb geïncorporeerd kan worden wanneer PBS wordt gebruikt, wat het lagere massaverlies verklaart. Daarnaast bevat dit spectrum een tweede, zij het nog kleinere, massaverlies rond 430 °C. Deze piek is niet zichtbaar in het spectrum zonder Mb, wat betekent dat deze vermoedelijk bepaald wordt door het Mb. Het Mb wordt bijgevolg bij een andere temperatuur verwijderd, wat duidt op een verschillende binding in vergelijking met hepes en tris. Dit verschil kan veroorzaakt worden door de solvatatiemantel van PBS rond Mb enerzijds en/of de adsorptie van PBS aan het titania-oppervlak anderzijds.

Daarnaast werd ook het DTA-spectrum voor de geïncorporeerde stalen berekend (Figuur 15). A.d.h.v. dit spectrum kan aangetoond worden of massaverlies te wijten is aan een transitiefase in het titania. Aangezien dit DTA-spectrum uitsluitend pieken bevat welke afkomstig zijn van het verwijderen van water (< 100 °C) (a) en Mb (260 °C) (c), kan geconcludeerd worden dat het massaverlies niet gecorreleerd is aan een transitiefase. Verder blijkt uit dit spectrum opnieuw dat het staal met PBS verschilt van de andere twee, aangezien de intensiteit van de piek bij 260 °C veel lager is enerzijds, en anderzijds een twee bijkomende pieken zichtbaar zijn, nl. bij ca. 75 °C (b) en 400 °C (d). De intensiteit van de piek bij 260 °C (c) is vermoedelijk lager omdat de adsorptie

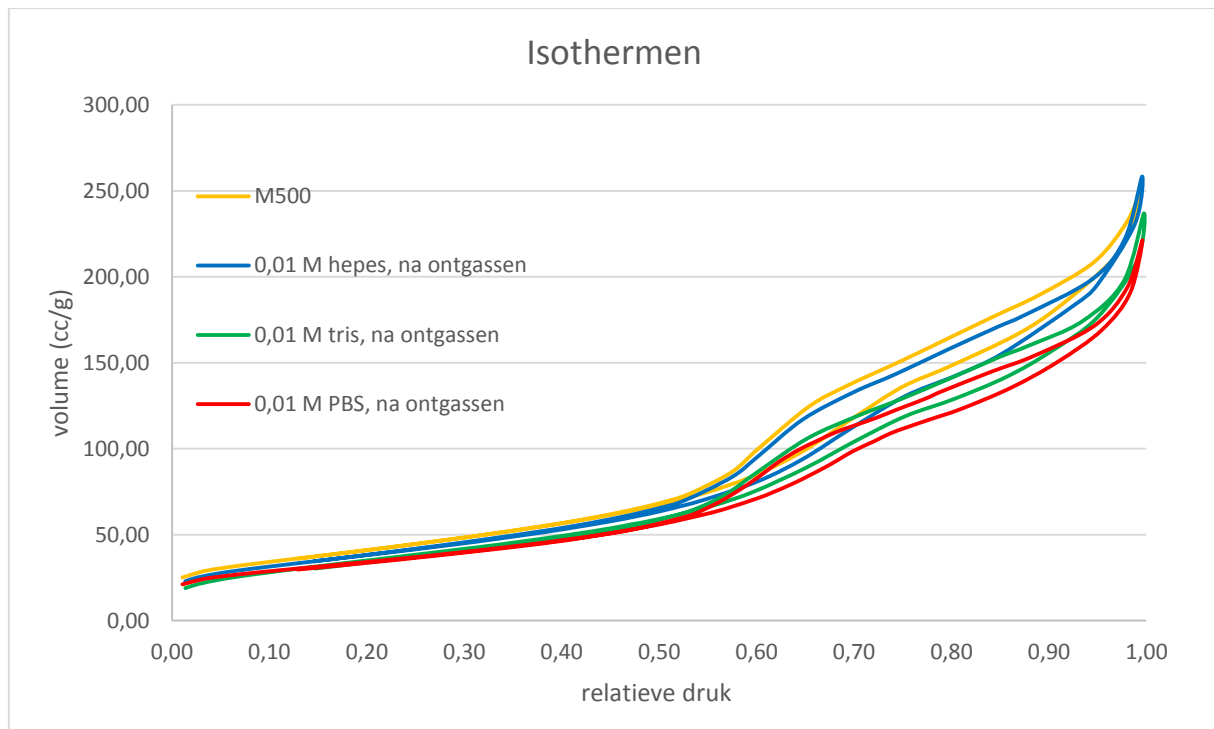
van de Mb-moleculen fysisch is. Hierdoor veroorzaakt het verwijderen van Mb geen exotherme piek in het DTA-spectrum. De aanwezigheid van de piek bij 75 °C (b) kan te wijten zijn aan het verwijderen van geadsorbeerde moleculen op de fosfaatgroepen. Deze interactie zal immers anders zijn dan deze tussen water en het titania-oppervlak. Ten slotte bevat het DTA-spectrum voor het staal met PBS een weinig intense, brede piek bij 400 °C (d). Deze piek is mogelijk te wijten aan de condensatie van de Ti-OH groepen, welk resulteert in het vrijkomen van water⁴⁴.



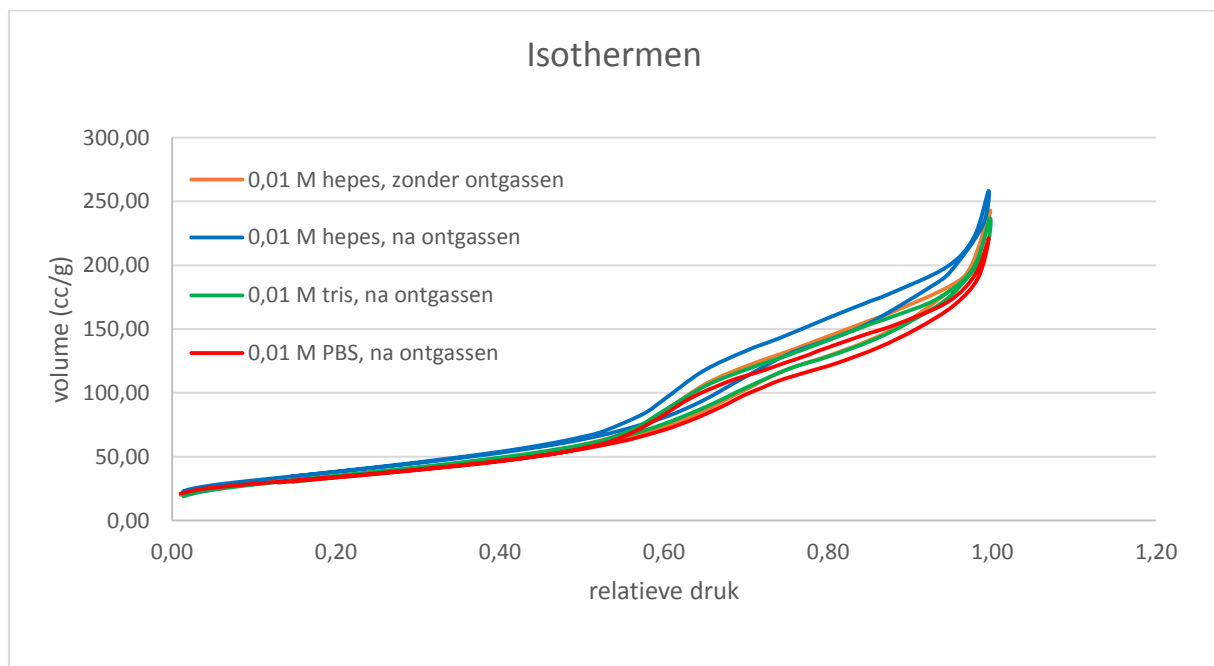
Figuur 15: DTA-spectrum van geïncorporeerde stalen met tris-, hepes- en PBS-buffer. Aangeduide pieken/gebieden: geadsorbeerd water aan het titania-oppervlak (a), geadsorbeerd water aan de fosfaatmoleculen (b), myoglobine (c), vrijgekomen water uit de condensatie van Ti-OH groepen (d).

Tot slot werden deze stalen gekarakteriseerd in stikstofsorptie om de invloed van de aanwezige buffer op de poriestructuur te evalueren. Hiervoor werden stalen met uitsluitend titania en buffer gedurende 16 uur ontgast bij kamertemperatuur en vervolgens gemeten. De isothermen van Millennium PC500 titania met en zonder buffer worden weergegeven in Figuur 16. De resultaten van deze metingen bevestigen dat voor PBS en tris chemisorptie optreedt, in tegenstelling tot hepes. Ondanks ontgassing is het porievolume van deze twee stalen kleiner dan dat van zuiver M500.

Het porievolume van het ontgaste staal met hepesbuffer benadert echter dat van zuiver M500.



Figuur 16: Isothermen van zuiver M500 en mengsels van M500 met hepes-, tris- en PBS-buffer.



Figuur 17: Isothermen van mengsels van M500 met hepes- tris- of PBS-buffer. Het trisstaal, het PBS-staal en een van de hepesstalen werden gedurende 16 uur ontgast bij kamertemperatuur. Het andere hepesstaal werd niet ontgast.

Wanneer echter metingen werden uitgevoerd van een hepesstaal dat niet ontgast werd, werd een gelijkaardig porievolume bekomen als dat van ontgaste tris- en PBS-stalen (Figuur 17). Dit doet veronderstellen dat de hepesmoleculen adsorberen aan het titania-oppervlak, maar louter fysisch. Hierdoor hinderen ze de adsorptie van Mb niet of slechts op een verwaarloosbare manier, zoals reeds uit meetresultaten van UV-VIS spectroscopie is gebleken.

De isothermen van M500 met tris en PBS bevestigen dat er echter wel een interactie optreedt tussen deze buffers en het titania-oppervlak, die sterker is dan wanneer hepes wordt gebruikt. Uit UV-VIS-spectroscopie is nochtans gebleken dat de hoeveelheid geadsorbeerd Mb drastisch verschilt voor beide buffers. In het geval van PBS kan dit het resultaat zijn van een combinatie van twee limitaties. Een eerste limitatie is deze onder invloed van de diffusie. PBS interageert immers met het Mb, wat o.m. de stabiliteit van het proteïne verbetert. De PBS-mantel die hierbij gevormd wordt, kan echter de immobilisatie bemoeilijken omdat de proteïnediameter hierdoor vergroot. Bovendien kan de aanwezigheid van PBS het aggregeren van de proteïnen stimuleren, wat ook nefast is voor de diffusie. Daarnaast resulteert de interactie met het titania-oppervlak in een verkleining van de poriën wat diffusie binnenin de poriën bemoeilijkt. Een tweede factor is de adsorptie limitatie. Deze wordt beïnvloed door de beschikbare bindingssites in zowel het titania als het Mb. Uit de isotherm van PBS en M500 is gebleken dat de fosfaatgroepen interageren met het oppervlak. Mogelijks is deze groep geen goede bindingssite voor het proteïne. Hoe meer fosfaatgroepen m.a.w. aan het titania-oppervlak gebonden zijn, hoe minder sites er beschikbaar zijn waarop het Mb wel kan adsorberen. Een bijkomende adsorptie limitatie kan optreden wanneer de eerder genoemde PBS-mantel ervoor zorgt dat de bindingssites op het Mb afgeschermd worden en hierdoor adsorptie bemoeilijkt wordt. De combinatie van deze diffusie en adsorptie limitaties, zal ervoor zorgen dat de kinetiek van de adsorptie vertraagd wordt.

Wanneer trisbuffer gebruikt wordt, zal tevens interactie optreden tussen buffer en proteïne met diffusie en adsorptie limitaties als gevolg, analoog met PBS. Het grote verschil is echter de interactie met het oppervlak. Hoewel deze interactie ook resulteert in een diffusie limitatie door het verkleinde porievolume, vindt er geen (of in mindere

mate) adsorptie limitatie plaats t.g.v. deze interactie. Het tris kan namelijk op twee manieren binden met het oppervlak: via de hydroxylgroepen of via de aminogroep. In het DRIFT-spectrum van M500 en tris verschijnt echter een band bij 1050 cm^{-1} , welke bewijst dat een C-O-Ti binding wordt gevormd. Vermoedelijk bindt het tris dus via één of meer hydroxylgroepen aan het oppervlak, waardoor het titania wordt gemodificeerd met aminogroepen. De verbeterde adsorptie kan bijgevolg een resultaat zijn van de betere interactie tussen de proteïnen en de aminogroep, t.o.v. de hydroxylgroep in het titania zelf. De adsorptie limitatie die optreedt bij PBS, is hier dus in mindere mate aanwezig.

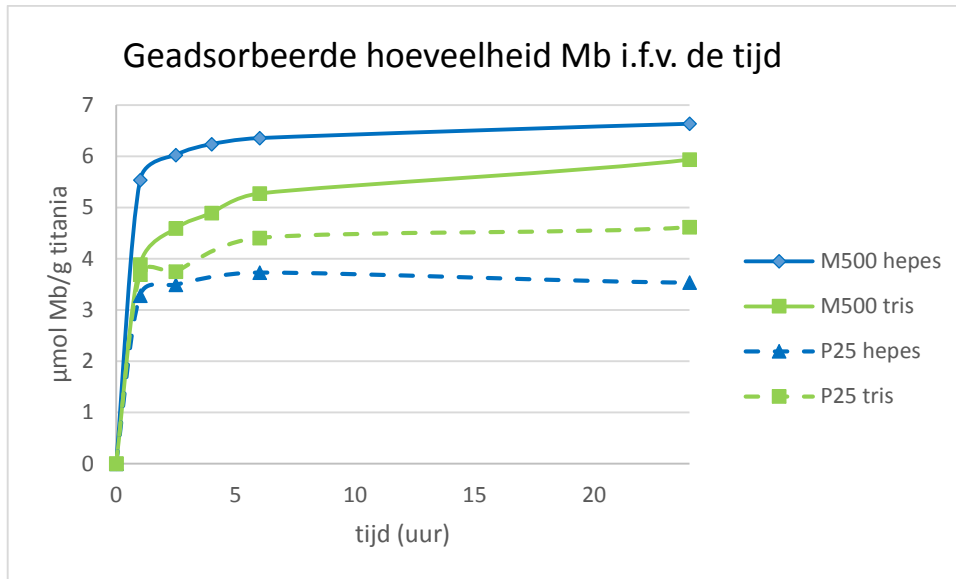
3.2.3 Vergelijking tussen mesoporeus en niet-poreus titania als dragermateriaal

Vervolgens werden incorporaties uitgevoerd met 0,01 M hepes of tris en P25 titania als dragermateriaal. Met behulp van deze metingen werd enerzijds de adsorptie van tris meer in detail bestudeerd en werd anderzijds getracht een onderscheid te maken tussen de adsorptie aan het externe oppervlak en de adsorptie in de poriën. P25 heeft een lager specifiek oppervlak dan Millennium PC500 titania (resp. 60 en $122\text{ m}^2/\text{g}$). Indien al het specifiek oppervlak in M500 wordt benut, zou met andere woorden moeten blijken dat per gram titania ongeveer twee keer meer myoglobine geadsorbeerd wordt t.o.v. de adsorptie op P25 titania.

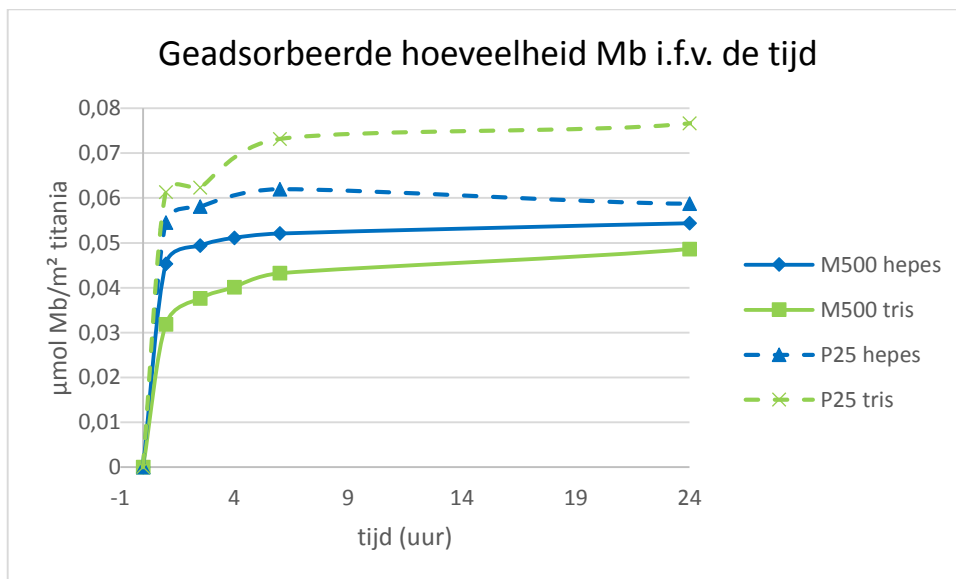
De metingen met P25 titania werden uitsluitend uitgevoerd om meer informatie te bekomen over het adsorptiegedrag. Van P25 wordt immers verwacht dat het weinig meerwaarde biedt als dragermateriaal in de uiteindelijke biosensor, aangezien het geen aanleiding kan geven tot het mogelijke positieve effect van de incorporatie in poriën op de stabiliteit van de biomoleculen.

In Figuur 18 wordt de geadsorbeerde hoeveelheid Mb, uitgedrukt in $\mu\text{mol Mb}$ per gram titania, weergegeven in functie van de tijd. Er werd 8 mg titania gebruikt per 4 ml buffer. In elk staal werd een Mb-concentratie van $15\text{ }\mu\text{M}$ gehanteerd.

Wanneer de geadsorbeerde hoeveelheid op deze manier wordt uitgedrukt, blijkt opnieuw dat hepes de beste buffer is. Daarnaast blijkt dat er meer Mb geadsorbeerd wordt per gram in het geval van Millennium titania, in vergelijking met het non-poreuze P25 titania. Dit bewijst dat er weldegelijk adsorptie plaatsvindt in de poriën.



Figuur 18: Geadsorbeerde hoeveelheid Mb ($\mu\text{mol/g}$) i.f.v. de tijd voor geïncorporeerde stalen met tris en hepes als buffer en M500 en P25 als dragermateriaal.



Figuur 19: Geadsorbeerde hoeveelheid Mb ($\mu\text{mol/m}^2$) i.f.v. de tijd voor geïncorporeerde stalen met tris en hepes als buffer en M500 en P25 als dragermateriaal.

Verder kan echter geconcludeerd worden dat het volledige porievolume niet benut wordt, aangezien de geadsorbeerde hoeveelheid in M500 niet het dubbele bedraagt van deze in P25. Vermoedelijk wordt slechts aan het eerste deel van de poriën geadsorbeerd, wat de toegang tot de rest van de poriën verhindert.

Daarnaast blijkt uit deze figuur dat voor beide dragers de geadsorbeerde hoeveelheid Mb met hepesbuffer vanaf zes uur constant blijft. Wanneer tris wordt gebruikt in

combinatie met P25, geldt hetzelfde. De combinatie van tris met M500 levert echter na zes uur een blijvende stijging op. Dit bewijst dat de kinetiek voor beide buffers verschilt. De adsorptie is diffusie gelimiteerd wanneer tris wordt gebruikt als buffer, daar de trismoleculen zowel de omvang van het Mb vergroten door een solvatatiemantel, als ook het porievolume verkleinen. Omwille van dit laatste is het diffusie-effect enkel zichtbaar wanneer poreus materiaal wordt gebruikt.

Wanneer de hoeveelheid geadsorbeerd Mb echter wordt uitgedrukt in $\mu\text{mol Mb per m}^2$ titania, wordt Figuur 19 verkregen.

Hieruit blijkt dat tris de beste buffer is wanneer P25 wordt gebruikt als dragermateriaal. Bovendien laat P25 een betere belading toe per m^2 oppervlak. Dit is te wijten aan de beschikbaarheid van het specifieke oppervlak. In het geval van M500 is slechts een gedeelte van de poriën beschikbaar, waardoor er gemiddeld minder globines per m^2 worden geïmmobiliseerd. Wanneer m.a.w. een niet-poreus materiaal wordt gebruikt, heeft het modificerend effect van de trisbuffer een grotere impact. Daar het specifiek oppervlak van dit materiaal beter bereikbaar is, wordt de adsorptiekinetiek immers niet vertraagd door diffusielimitaties. Wanneer echter een poreuze drager wordt gebruikt in combinatie met tris als buffer, wordt het beschikbaar oppervlak en porievolume beperkt door de interactie tussen tris en titania alvorens de globines worden toegevoegd. Hoe dan ook blijkt uit deze figuur dat adsorptie met trisbuffer beter verloopt dan met hepesbuffer in het geval van niet-poreus titania. De interactie tussen buffer en oppervlak hebben in dit geval een positieve invloed op de belading. Bijgevolg kan nagegaan worden of een verhoging van trisconcentratie ook een verhoging van de adsorptie betekent. Dit wordt besproken in het volgende onderdeel.

Bijkomend kan uit de incorporaties met P25 en M500 berekend worden of er al dan niet een monolaag wordt gevormd bij adsorptie van Mb. Hiervoor werd enerzijds het totale specifiek oppervlak van 8 mg titania berekend. Anderzijds werd berekend welk oppervlak 1 mg Mb maximaal kan bezetten. De resultaten van deze berekeningen zijn samengevat in Tabel 2.

Tabel 2: Berekening van het totaal geadsorbeerde oppervlak.

| | P25 | M500 |
|---|--------|------|
| Specifiek oppervlak (m²/g) | 60,192 | 122 |
| Totale specifiek oppervlak voor 8,0 mg (m²) | 0,48 | 0,98 |
| Oppervlak van 1,0 mg Mb (m²) | | 0,43 |
| Procentuele adsorptie in het geval van monolaagadsorptie | 90 % | 44 % |

Uit deze berekeningen blijkt dat monolaagadsorptie aan P25 mogelijk is wanneer 8 mg titania wordt gebruikt. Er werd echter verondersteld dat de Mb-moleculen minimale repulsie ondervinden. Daarnaast werden de Mb-moleculen bij benadering beschouwd als perfecte sferen met een diameter van 4 nm.

Voor incorporatie in M500 wordt minder dan de helft van het specifieke oppervlak bezet. Dit is onder meer te wijten aan de moeilijk bereikbare delen van de poriën, welke ook door de buffer worden beïnvloed. Interactie tussen buffer en oppervlak zal immers het beschikbare porievolume doen dalen.

3.3 Invloed van de bufferconcentratie

3.3.1 Invloed van de bufferconcentratie op de stabiliteit van het myoglobine

Een verandering in bufferconcentratie kan een positieve impact hebben op de stabiliteit van het myoglobine. Daarnaast kan deze verhoging resulteren in een verhoogde modificatie van het oppervlak, welke bij hoge concentratie mogelijk ook nadelig kan zijn. Ten slotte kan er ook een verdere vermindering van de bereikbaarheid worden veroorzaakt in poreuze materialen zoals hierboven werd aangetoond. Daarom werd experimenteel onderzocht of een incorporatie beter zou verlopen in 0,1 M trisbuffer. Er werd specifiek voor deze buffer gekozen, aangezien uit de vorige experimenten is gebleken dat een incorporatie met 0,01 M fosfaatbuffer reeds moeizaam gaat en een incorporatie met 0,01 M hepes daarentegen al zo goed als maximaal verloopt. Het gebruik van de trisbuffer zorgt echter voor bijzondere resultaten. Enerzijds blijkt het immobiliseren moeizamer te verlopen wanneer poreus materiaal wordt gebruikt. Anderzijds heeft deze buffer een positieve impact bij adsorptie op niet-poreus materiaal.

Bijgevolg was enkel het wijzigen van de concentratie van de trisbuffer interessant.

Net zoals in het vorige onderdeel i.v.m. de invloed van de buffer zelf, werd ook met deze nieuwe buffer nagegaan gedurende welke tijd de native conformatie van Mb in oplossing bewaard kon worden. Dit experiment leverde gelijkaardige resultaten op als deze voor 0,01 M tris. Deze worden weergegeven in Tabel 3.

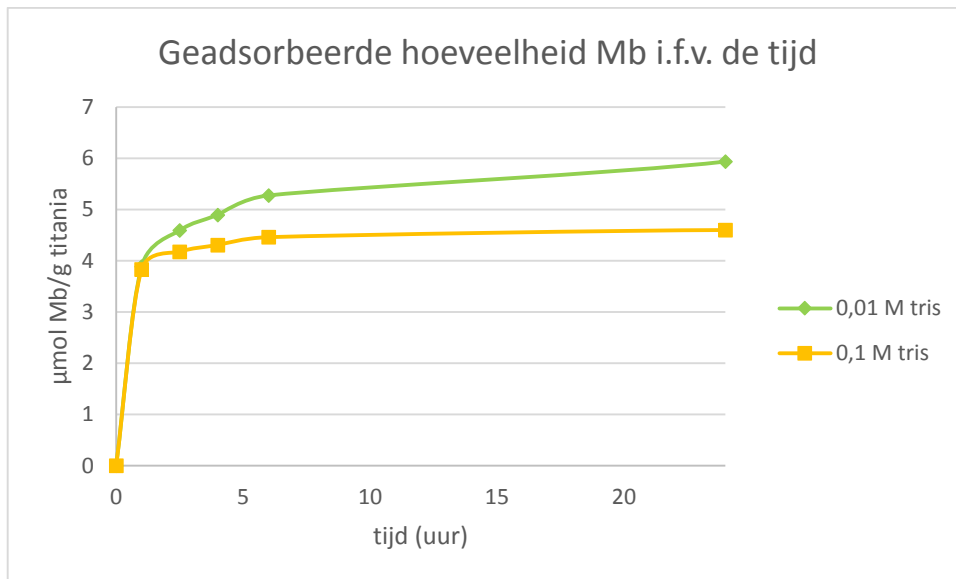
Tabel 3: Procentuele absorptie van stalen met 0,01 M en 0,1 M trisbuffer in functie van de tijd.

| Tijd (dagen) | 0 | 1 | 2 | 3 | 7 | 10 | 15 |
|--------------|------|-------|------|------|-------|-------|-------|
| tris 0,01 M | 100% | 100% | 100% | 100% | 97,5% | 95,0% | 95,5% |
| tris 0,1 M | 100% | 99,6% | 100% | 100% | 96,5% | 96,3% | 96,3% |

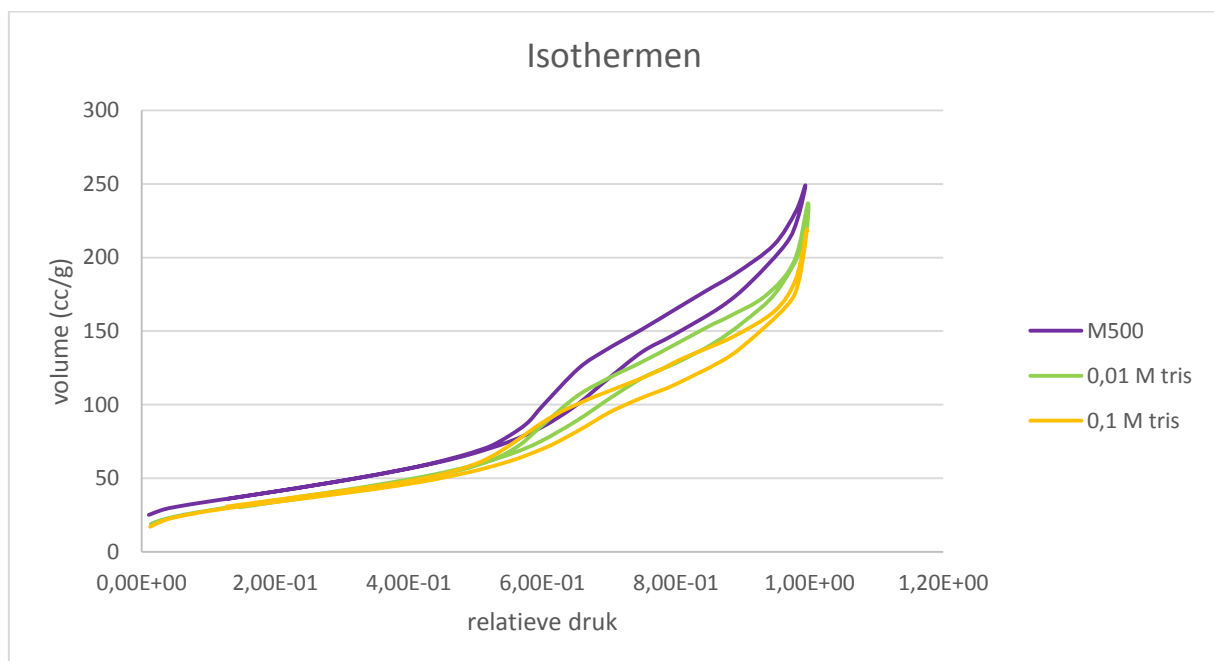
3.3.2 Invloed van de bufferconcentratie op de incorporatie

In Figuur 20 worden de incorporaties met 0,1 en 0,01 M trisbuffer vergeleken, beide voor 8 mg M500 titania en 1 mg myoglobine per 4 ml buffer. Hieruit blijkt dat de incorporatie even snel gebeurt bij beide bufferconcentraties, maar dat het titania sneller verzadigd is wanneer 0,1 M trisbuffer wordt gebruikt en het dus minder myoglobine zal immobiliseren.

De oorzaak hiervan wordt o.m. weergegeven in de isotherm van M500 met 0,1 M tris (Figuur 21). Het porievolume is kleiner bij hogere trisconcentratie, aangezien er meer trismoleculen in de poriën geadsorbeerd worden. Hierdoor wordt de toegang tot de poriën zo goed als volledig versperd, waardoor immobilisatie van het Mb uitsluitend kan plaatsvinden op het externe oppervlak.

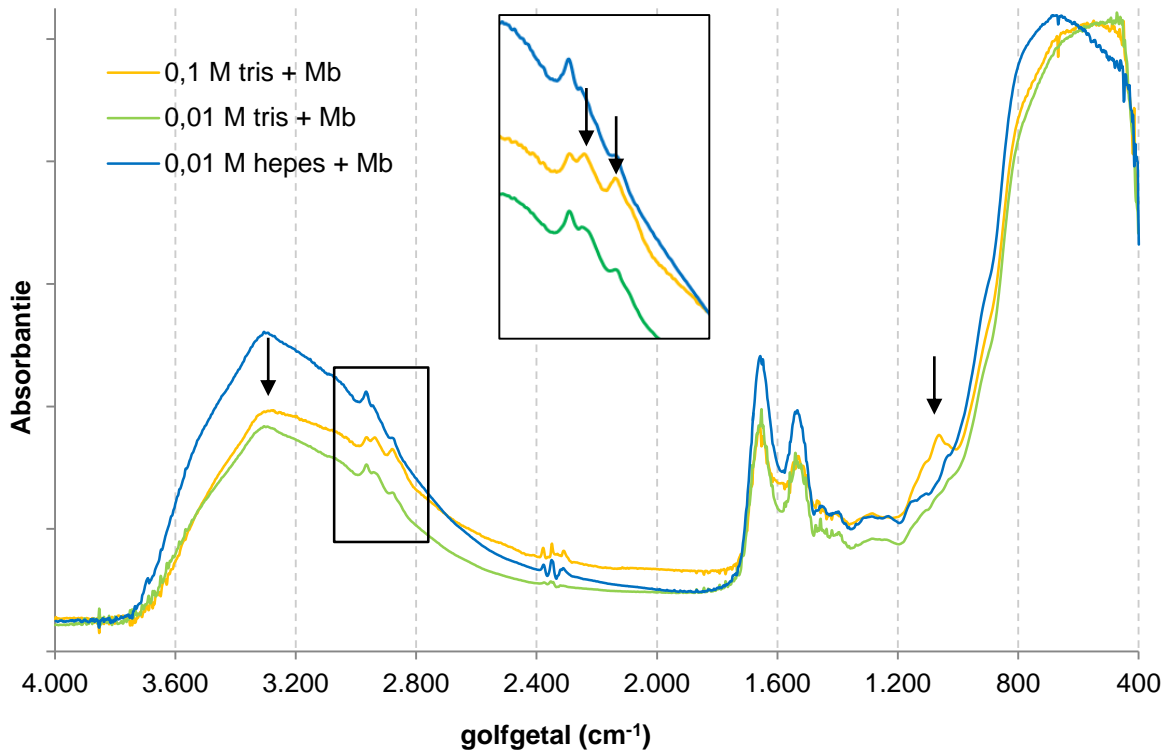


Figuur 20: Hoeveelheid geadsorbeerde Mb ($\mu\text{mol/g}$) i.f.v. de tijd voor geïncorporeerde stalen met 0,1 en 0,01 M trisbuffer.

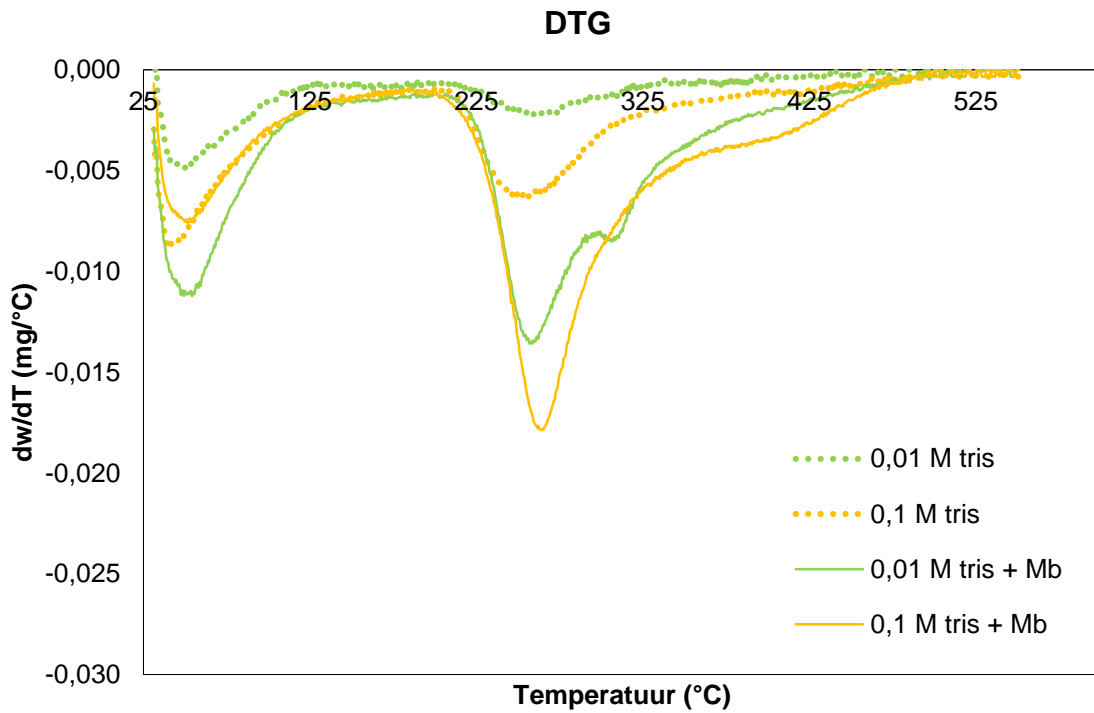


Figuur 21: Isothermen van zuiver M500 en mengsels van M500 met 0,01 M tris en 0,1 M tris.

Deze theorie wordt tevens bevestigd in het DRIFT-spectrum van het geïncorporeerde staal met 0,1 M trisbuffer (Figuur 22). Dit spectrum bevat namelijk een intensere piek bij 1050 cm^{-1} wat duidt op meer C-O-Ti bindingen in vergelijking met 0,01 M trisbuffer. Aangezien ook de pieken bij 2940 en 2880 cm^{-1} in intensiteit stijgen, betekent dit, dat er meer trismoleculen gebonden zijn aan het oppervlak en niet dat het tris via meer hydroxylgroepen aan het oppervlak gebonden is dan bij 0,01 M. Ten slotte is de intensiteit van de band bij 3305 cm^{-1} lager, wat bewijst dat er minder Mb aanwezig is. Figuur 23 geeft het DTG-spectrum weer van stalen met 0,1 en 0,01 M trisbuffer, zowel met als zonder Mb. In tegenstelling tot het staal met 0,01 M tris vertoont dat met 0,1 M tris geen piek rond $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ in het DTG-spectrum. Er is reeds gebleken dat het verschil in geadsorbeerde hoeveelheid Mb tussen 0,01 M en 0,1 M te wijten is aan het al dan niet adsorberen in de poriën. Dat de piek bij $300\text{ }^{\circ}\text{C}$ enkel in het staal met 0,01 M tris verschijnt, kan erop wijzen dat deze piek veroorzaakt wordt door de proteïnen in de poriën. Verder bevat het spectrum van 0,1 M een schouder rond $400\text{ }^{\circ}\text{C}$, welke niet verschijnt in de andere stalen. De oorzaak van deze piek werd nagegaan door het staal te calcineren tot net voor deze piek en vervolgens te meten in DRIFT. Op deze manier kon bekeken worden of deze piek al dan niet afkomstig is van het Mb. Kortom, een lagere bufferconcentratie zal er voor zorgen dat een maximale hoeveelheid proteïne geïmmobiliseerd kan worden. Deze concentratie mag echter niet te laag zijn, aangezien de buffer dan zijn noodzakelijke werking verliest. De gebruikte hoeveelheid van 0,01 M buffer is voorlopig dus optimaal. Bijkomend onderzoek kan uitwijzen of een concentratie lager dan 0,01 M al dan niet betere resultaten levert, maar dit werd tijdens deze thesis niet uitgevoerd.



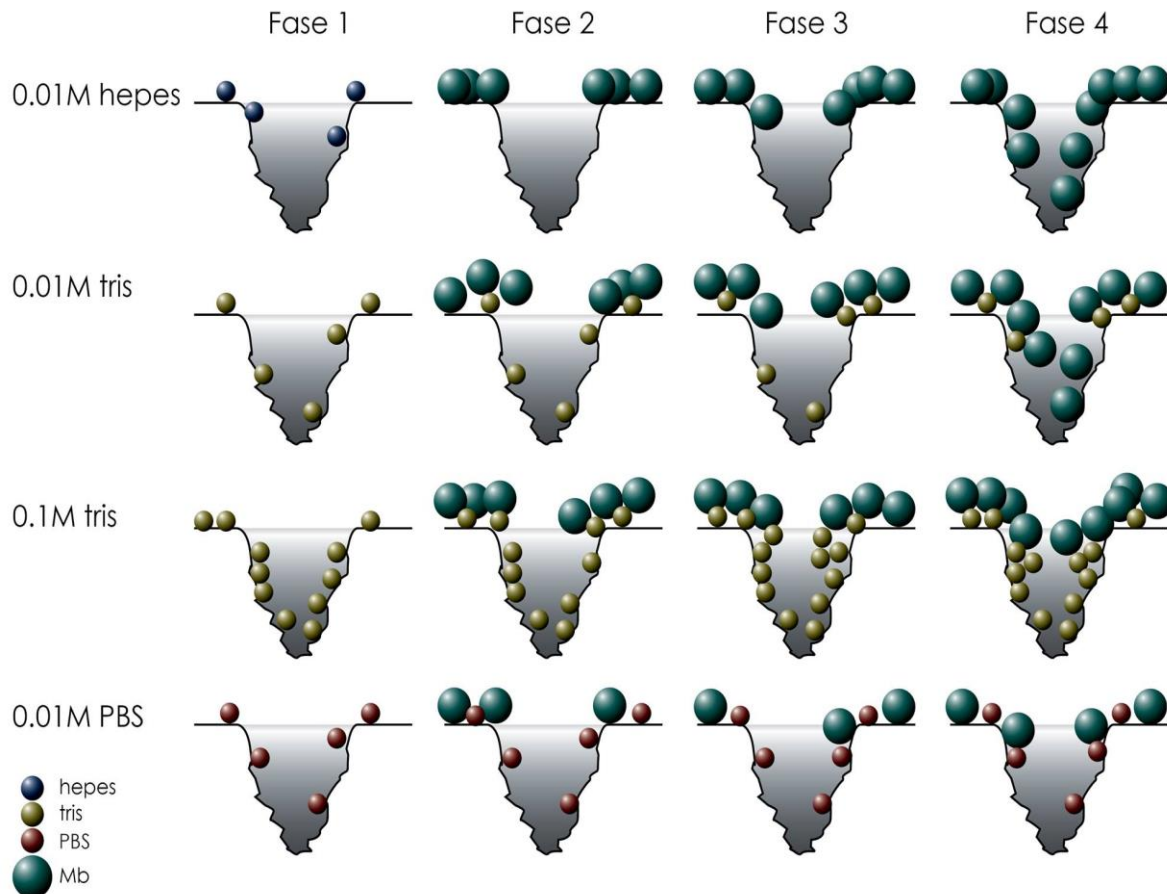
Figuur 22: DRIFT-spectra van geïncorporeerde stalen met 0,1 M tris-, 0,01 M tris- en 0,01 M hepesbuffer.



Figuur 23: DTG-spectra van mengsels van M500 en 0,1 en 0,01 M trisbuffer en geïncorporeerde stalen met deze buffers.

3.3.3 Invloed van de buffer op de adsorptiekinetiek

Uit bovenstaande resultaten kan vervolgens de kinetiek van de adsorptie afgeleid worden voor elk van de vier buffers. Er kan gezegd worden dat deze verloopt in vier fases. In Figuur 24 wordt de adsorptie weergegeven voor 8 mg titania en 1 mg Mb per 4 ml bufferoplossing. In de eerste fase wordt nog geen Mb toegevoegd zodat eerst en vooral een interactie optreedt tussen buffer en titania. Voor PBS en tris zal deze interactie sterker zijn dan voor hepes. Wanneer vervolgens het Mb wordt toegevoegd, zullen de PBS- en trismoleculen aanwezig blijven op het oppervlak, terwijl de hepesmoleculen grotendeels zullen desorberen. Tijdens deze tweede fase wordt alleen het externe oppervlak bezet. Daar deze bindingssites eenvoudig bereikbaar zijn, gebeurt deze fase snel. De hoeveelheid geadsorbeerd Mb is min of meer gelijk voor alle buffers, behalve voor PBS omwille van de redenen die werden aangehaald in 3.2.2. Tijdens een derde fase adsorbeert het Mb aan de ingang van de poriën. Deze adsorptie gebeurt op een langzamere wijze dan in fase 2, aangezien dit oppervlak moeilijker bereikbaar is en de adsorptie bijgevolg diffusie gelimiteerd is. Tijdens een vierde en laatste fase kan het Mb verder diffunderen in de poriën. Deze diffusie wordt veroorzaakt door de mechanische kracht die inwerkt op het Mb, aangezien het tijdens de incorporatie wordt bewaard op een shaker met snelheid 300 rpm. Deze fase gebeurt niet wanneer 0,1 M tris wordt gebruikt, aangezien de poriën ontoegankelijk zijn voor het Mb door de geadsorbeerde buffermoleculen. Tijdens deze laatste fase kan echter niet het volledige porie-oppervlak bezet worden, omdat de poriën in M500 titania eerder trechtersvormig zijn. Dit is gebleken uit stikstofsorptiemetingen, aangezien de poriediameter voor de desorptie kleiner is dan deze voor adsorptie (resp. 5,0 en 6,4 nm voor zuiver M500). Vanaf een bepaalde poriediepte kan de diameter dus gelijk zijn aan of kleiner zijn dan de diameter van het Mb.



Figuur 24: Schematische weergave van de adsorptie van Mb aan M500 titania voor 0,01 M hepes, tris en PBS en 0,1 M tris.

3.3.4 Calcinatië-experiment (deel 1)

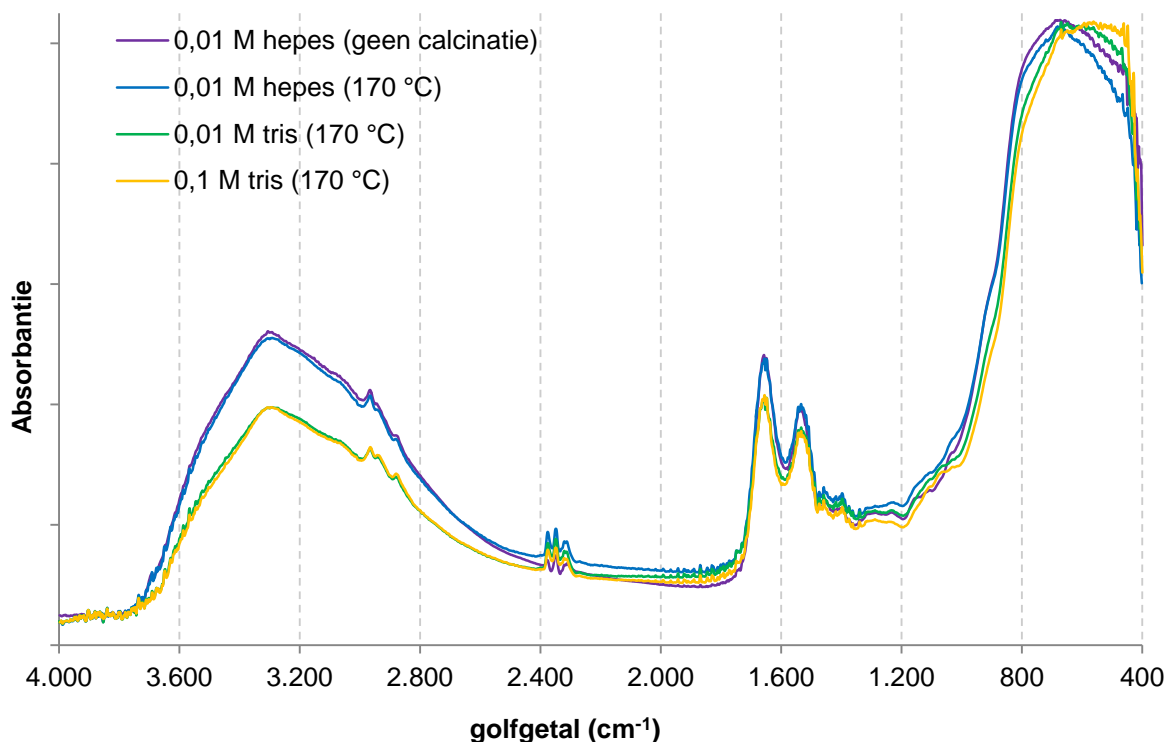
Om meer informatie te verkrijgen over de locatie van de proteïne-adsorptie (aan het externe of het porie-oppervlak), werden calcinatiëen uitgevoerd bij specifieke temperaturen, die gekozen werden o.b.v. het DTG-spectrum. Dit experiment werd uitgevoerd op 4 verschillende stalen. Drie ervan bestaan uit 15 mg Millennium PC500 titania, 4 ml buffer (0,01 M hepes, 0,1 M tris of 0,01 M tris) en 1 mg Mb. Het vierde bevat slechts 8 mg titania per 4 ml hepesbuffer en 1 mg Mb. De resultaten van dit laatste staal worden in het vierde en laatste onderdeel 'invloed van de titaniëmassa' besproken.

Elk van de stalen werd opgesplitst in drie. Deze drie stalen werden gecalcineëerd tot resp. 170, 270 en 350 °C. De stalen werden gedurende 1 minuut bij deze temperatuur gehouden en vervolgens tot kamertemperatuur afgekoeld. Het opwarmen van de stalen gebeurde met 10 °C per minuut. Deze temperaturen werden zo gekozen dat een infraroodspectrum kon genomen worden van het staal vóór de piek in het DTG-

spectrum, tussen de twee pieken in het geval van 0,01 M tris, en na de piek. Deze laatste temperatuur biedt bovendien de mogelijkheid om na te gaan wat de schouder veroorzaakt rond 400 °C in het DTG-spectrum van 0,1 M tris. Na calcinatie werden de stalen afgekoeld tot kamertemperatuur en gemeten in infrarood spectroscopie. De verkregen spectra kunnen meer informatie geven over de conformatie van de proteïnen enerzijds en het al dan niet verwijderen van de proteïnen anderzijds.

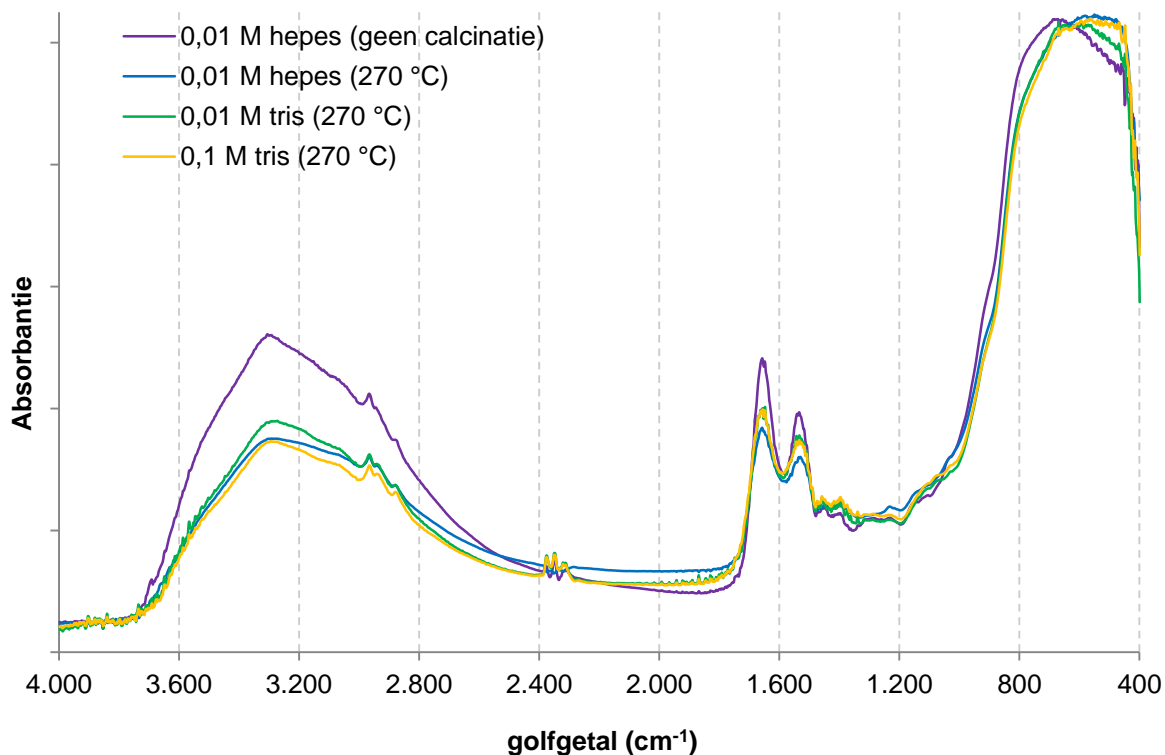
In het geval van denaturatie zullen de amidebanden I en II verbreden en dalen in intensiteit. Wanneer het myoglobine echter volledig verwijderd wordt, zullen ook andere karakteristieke pieken verdwijnen of dalen in intensiteit, zoals de piek bij 3305 cm^{-1} .

In Figuur 25 worden de DRIFT-spectra weergegeven voor elk van de drie stalen, na calcinatie bij 170 °C. Geen van de drie stalen bevat gedenameerd Mb, aangezien de amidebanden I en II nog steeds even intens zijn als in Figuur 22. Dit spectrum bevestigt m.a.w. wat te zien is in het DTG-spectrum van deze stalen, namelijk dat bij 170 °C nog geen massaverlies optreedt. De piek bij 1050 cm^{-1} , welke te wijten is aan de C-O-Ti rekvibratie, verdwijnt echter in het geval van 0,1 M tris, wat erop kan wijzen dat trismoleculen via minder hydroxylgroepen gebonden zijn aan het oppervlak, maar nog niet volledig loskomen, daar er bij 170 °C geen massaverlies wordt waargenomen in TGA. Wat ook een mogelijke verklaring is voor het verdwijnen van deze piek, is dat een deel van de trismoleculen wel degelijk wordt verwijderd, maar het massaverlies verwaarloosbaar klein is t.o.v. het verlies van de Mb-moleculen en dus niet zichtbaar is in het DTG-spectrum. De trismoleculen hebben dan ook een veel lagere molaire massa dan het myoglobine.

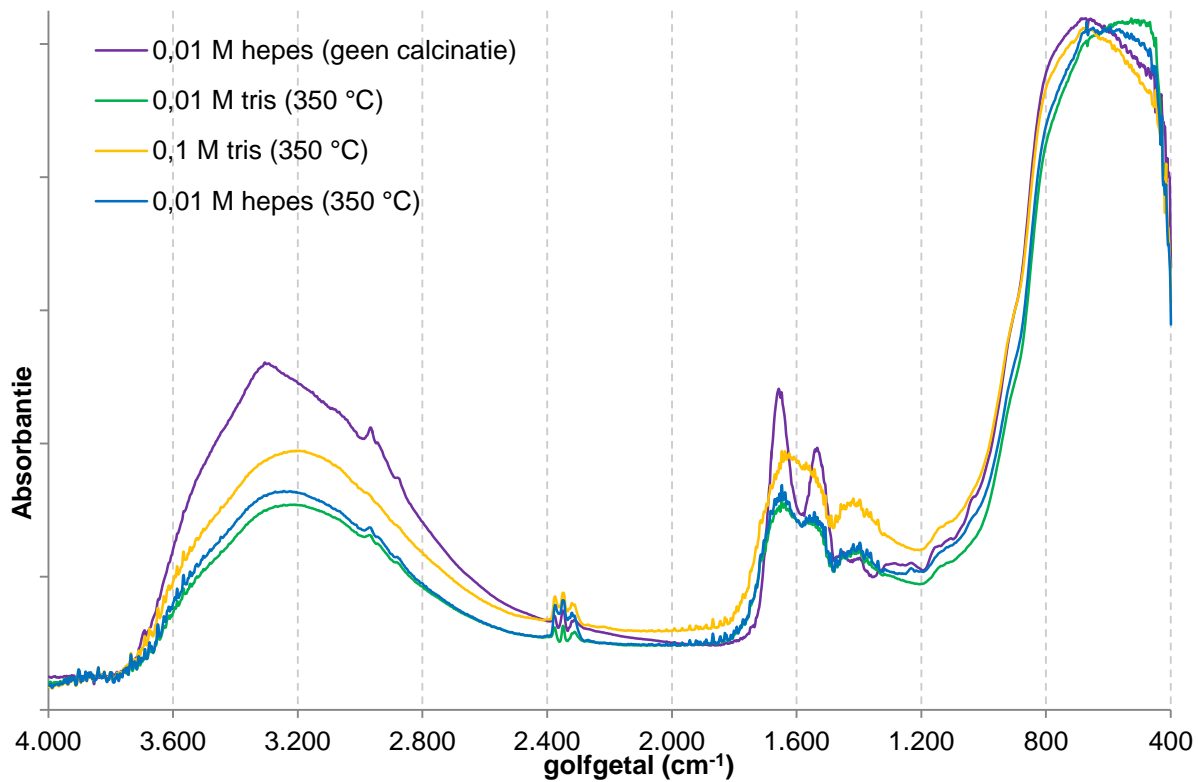


Figuur 25: DRIFT-spectra van geïncorporeerde stalen met 0,01 M hepes, 0,01 M tris en 0,1 M tris. Deze stalen werden gecalcineerd bij 170 °C gedurende 1 minuut. Ter vergelijking is het spectrum van een niet-gecalcineerd staal met 0,01 M hepes toegevoegd.

In Figuur 26 worden de DRIFT-spectra weergegeven voor elk van de drie stalen na calcinatie bij 270 °C. De amidebanden I en II en de band bij 3305 cm^{-1} zijn minder intens voor het staal met 0,01 M hepes in vergelijking met het vorige spectrum. Tijdens calcinatie bij 270 °C zal een deel van Mb gedenatureerd of verwijderd zijn. Voor de andere twee buffers geldt echter dat er geen opvallende verschillen te zien zijn met het vorige spectrum. Er werd m.a.w. geen Mb verwijderd of gedenatureerd. Dit kan enerzijds verklaard worden door de hogere stabiliteit van het Mb in deze buffers. Anderzijds kan het te wijten zijn aan de Mb-moleculen die zich in de poriën bevinden en zo gestabiliseerd worden. Dit geldt echter alleen voor 0,01 M tris, daar bij 0,1 M geen adsorptie in de poriën kan plaatsvinden door porievernauwing na interactie met de buffer.



Figuur 26: DRIFT-spectra van geïncorporeerde stalen met 0,01 M hepes, 0,01 M tris en 0,1 M tris. Deze stalen werden gecalcineerd bij 270 °C gedurende 1 minuut. Ter vergelijking is het spectrum van een niet-gecalcineerd staal met 0,01 M hepes toegevoegd.



Figuur 27: DRIFT-spectra van geïncorporeerde stalen met 0,01 M hepes, 0,01 M tris en 0,1 M tris. Deze stalen werden gecalcineerd bij 350 °C gedurende 1 minuut. Ter vergelijking is het spectrum van een niet-gecalcineerd staal met 0,01 M hepes toegevoegd.

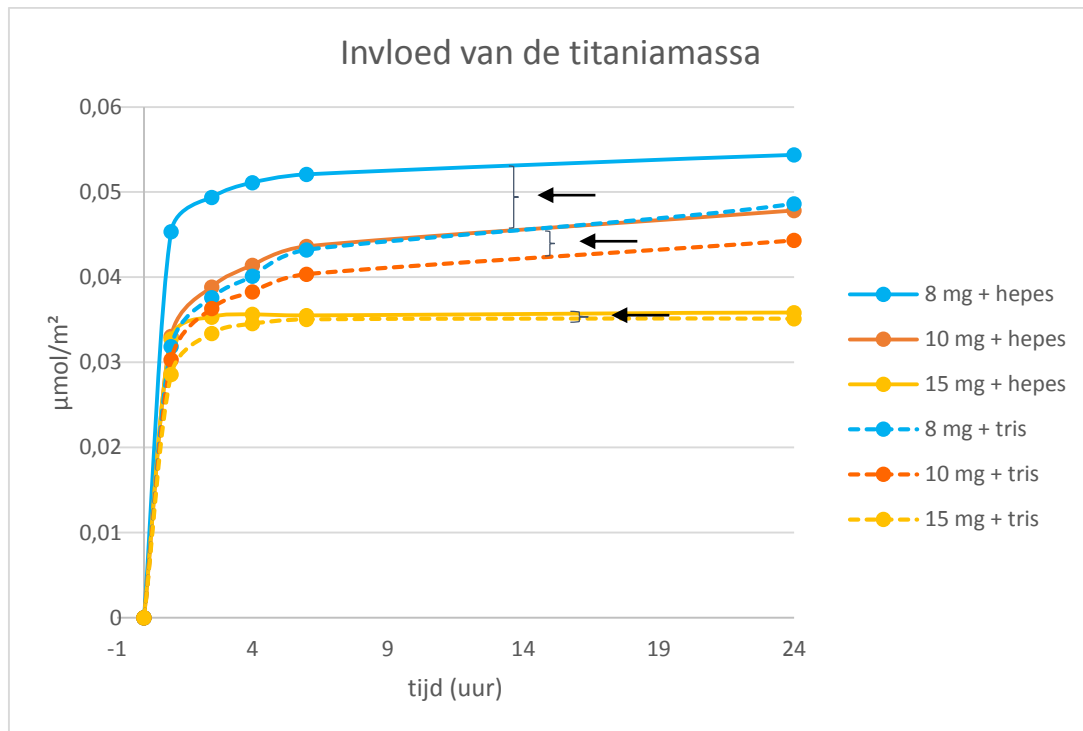
In Figuur 27 worden tot slot de DRIFT-spectra weergegeven na calcinatie bij 350 °C. In dit geval treedt wel verbreding op van de amidebanden en verdwijnt ook de piek bij 3305 cm⁻¹. Er is bijgevolg nog meer Mb verwijderd. Het resterende Mb is gedenatureerd. Ook verschijnt er rond het gebied van amideband III (1400 – 1200 cm⁻¹) een brede piek, die nog niet zichtbaar was in de vorige spectra. Aangezien deze piek ook onderhevig is aan conformationele veranderingen, bewijst dit opnieuw dat het nog aanwezige Mb gedenatureerd is. Verder geldt dat in het spectrum van 0,1 M tris zowel de karakteristieke pieken voor de trismoleculen zelf als deze voor het Mb in de regio rond 3000 cm⁻¹ verdwenen zijn. Uit deze spectra kan m.a.w. geen verklaring gevonden worden voor de band bij 400 °C die dit staal in het DTG-spectrum heeft, in tegenstelling tot de andere.

3.4 Invloed van de titaniamassa

3.4.1 Invloed van de titaniamassa op de incorporatie

Uit de vorige metingen is gebleken dat zowel 0,01 M hepes als 0,01 M tris veelbelovend zijn als buffer bij de incorporatie van Mb op M500. Vervolgens werd voor deze buffers onderzocht wat de meest ideale massa M500 is voor een optimale incorporatie. Met optimaal wordt bedoeld dat er een maximale hoeveelheid Mb kan geadsorbeerd worden per m² specifiek oppervlak. Hierdoor is de kans groter dat niet alleen het externe oppervlak, maar ook het porie-oppervlak wordt bezet.

Om dit experimenteel na te gaan werden incorporaties uitgevoerd met een constante myoglobineconcentratie van 15 µM en variërende titaniamassa. Deze experimenten werden zowel met hepes als tris uitgevoerd, beide met een concentratie van 0,01 M. In Figuur 28 wordt de geadsorbeerde hoeveelheid Mb weergegeven in µmol per m² titania voor elk van de massa's en beide buffers. De massa van titania wordt weergegeven in mg per 4 ml bufferoplossing.



Figuur 28: De geadsorbeerde hoeveelheid Mb ($\mu\text{mol}/\text{m}^2$) i.f.v. de tijd voor geïncorporeerde stalen met 8, 10 en 15 mg M500 en 0,01 M hepes- en trisbuffer.

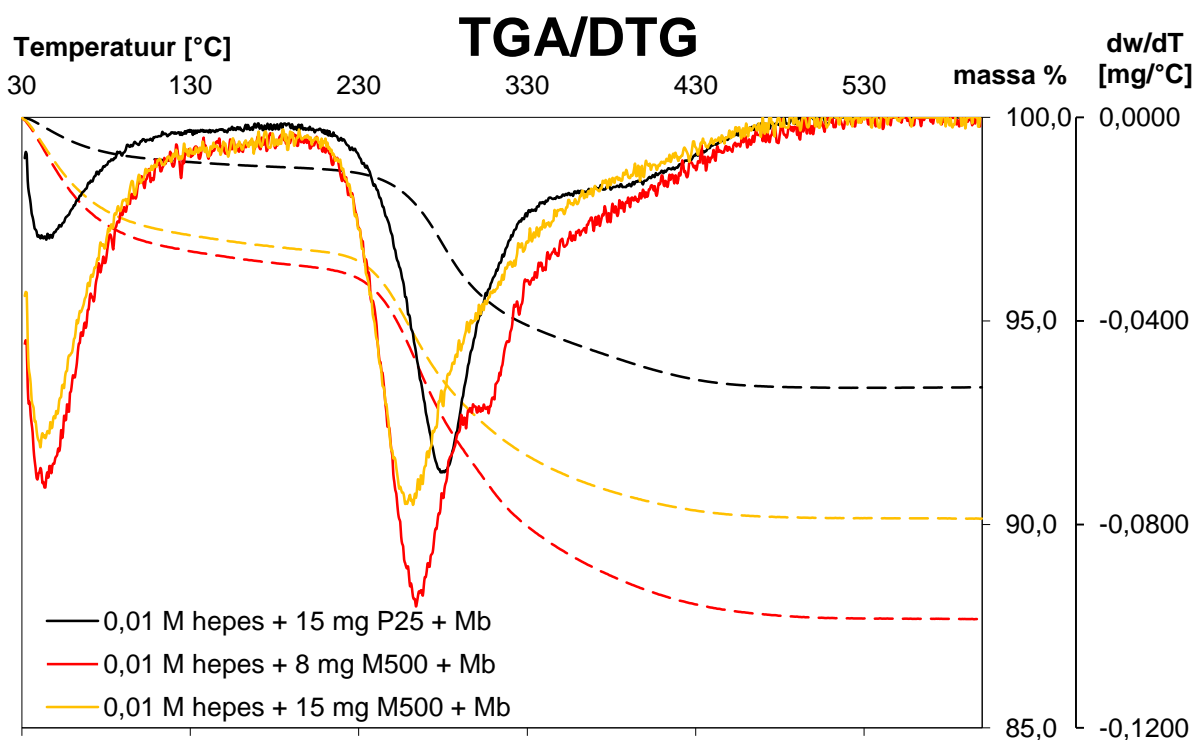
Uit dit experiment blijkt enerzijds dat de hoeveelheid geadsorbeerd Mb per m^2 titania maximaal is, wanneer een lagere titaniamassa wordt gebruikt. Op deze manier is er voldoende Mb aanwezig in oplossing om niet alleen het externe oppervlak, maar ook de poriën te bezetten. De geadsorbeerde hoeveelheid Mb bij een titaniamassa van 15 mg blijft na 6 uur reeds constant voor beide buffers. De kinetiek van deze adsorptie stopt bijgevolg al na de tweede fase, nl. de adsorptie aan het extern oppervlak. Er is immers voldoende extern titania-oppervlak aanwezig om al het Mb te immobiliseren. De invloed van de buffer is bij elke titaniamassa merkbaar. Er geldt bij elke massa dat het gebruik van hepes resulteert in een hogere adsorptie, hoewel het verschil met tris kleiner wordt naarmate de titaniamassa stijgt. De vertraagde kinetiek bij tris wordt immers verklaard door de vernauwing van de poriën. Aangezien bij hogere titaniamassa meer extern oppervlak aanwezig is en bijgevolg minder Mb in de poriën zal adsorberen, wordt deze invloed minder belangrijk.

Bij 15 mg titania per mg Mb kan m.a.w. uit dit experiment geconcludeerd worden dat het Millennium PC500 zich als 'niet-poreus' zal gedragen, daar uitsluitend het externe oppervlak wordt bezet. Er is echter reeds gebleken uit experimenten met het niet-

poreuze P25 titania dat op die manier een adsorptie van 0.08 en 0.06 $\mu\text{mol Mb}$ per m^2 titania kan bekomen worden voor resp. 0,01 M tris en hepes, in tegenstelling tot de 0.04 $\mu\text{mol Mb}$ per m^2 titania die in dit geval met M500 wordt bekomen voor beide buffers. Dit verschil kan te wijten zijn aan de samenstelling van het titania oppervlak in beide materialen. Zo is het oppervlak van M500 vermoedelijk iets grilliger dan van P25, waardoor adsorptie aan dit laatste materiaal eenvoudiger verloopt. Om dit mogelijks te bewijzen, werden vervolgens TGA-metingen uitgevoerd van beide materialen.

3.4.2 Vergelijking tussen mesoporeus en niet-poreus titania als dragermateriaal

Er werden drie stalen gemeten. Elk van de stalen bevat eenzelfde Mb-concentratie (15 μM) en eenzelfde buffer, nl. 0,01 M hepes. Als dragermateriaal werd 8 mg M500, 15 mg M500 en 15 mg P25 gebruikt per 4 ml buffer.



Figuur 29: TGA/DTG-spectra van geïncorporeerde stalen met 1 mg Mb per 4 ml 0,01 M hepesbuffer. Er werd 15 mg P25, 15 mg M500 of 8 mg M500 per 4 ml buffer gebruikt als dragermateriaal.

Wanneer de DTG-spectra van 15 mg M500 en P25 worden vergeleken met elkaar (Figuur 29), valt op dat de temperatuur waarbij het Mb wordt verwijderd, verschilt

voor beide, nl. 260 °C en 270 °C voor M500 en P25 respectievelijk. Dit bevestigt de theorie die in 3.4.1 werd aangehaald. De interactie met het Mb zal voor elk van de materialen verschillend zijn, wat vermoedelijk te wijten is aan een verschil in oppervlakstructuur. Dit verschil zorgt er bijgevolg voor dat beide materialen een verschillende hoeveelheid Mb zullen immobiliseren. Dit is ook te zien aan het percentage massaverlies in bovenstaande TGA-spectra.

Wanneer echter 8 mg M500 wordt gebruikt, verschijnen twee pieken in het DTG-spectrum (260 °C en 300 °C). Dit spectrum is analoog aan dat van 15 mg M500 in 0,01 M trisbuffer. Van dit laatste spectrum is reeds verondersteld, dat de tweede piek afkomstig is van de proteïnen in de poriën. Vermoedelijk geldt voor 8 mg M500 en 0,01 M hepes hetzelfde. Om deze veronderstelling te bevestigen, werd het calcinatiëxperiment in 3.3.4 ook uitgevoerd op stalen met 8 mg M500, ter vergelijking met 15 mg M500, beide in 0,01 M hepes.

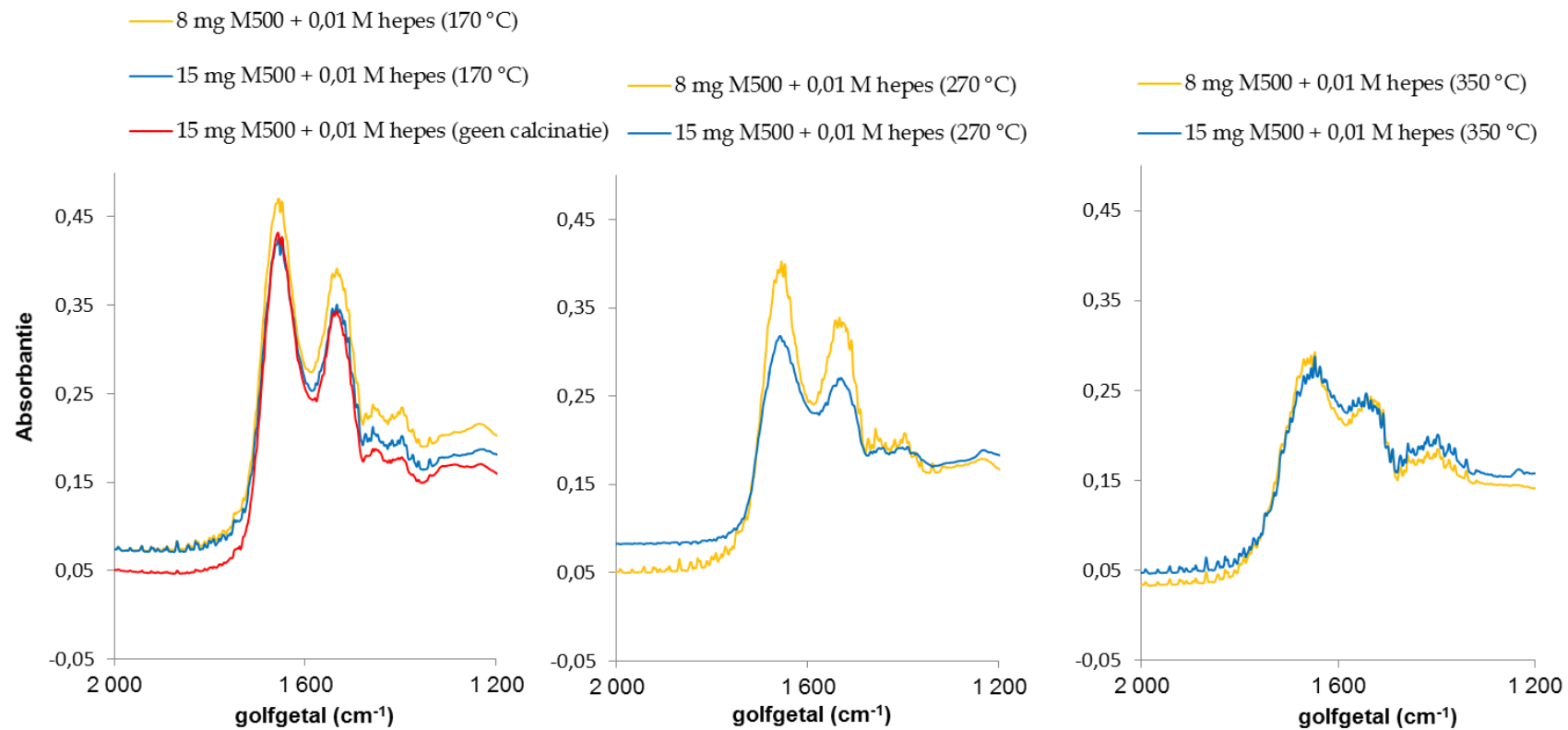
3.4.3 Calcinatiëxperiment (deel 2)

Voor dit experiment werden stalen bereid van 15 of 8 mg M500, 1 mg Mb en 4 ml 0,01 M hepesbuffer. Deze werden vervolgens gefiltreerd, gewassen en gedroogd. Het verkregen poeder werd opgesplitst in drie. Elk van deze drie stalen werd gecalcineerd tot resp. 170, 270 en 350 °C. De stalen werden gedurende 1 minuut bij deze temperatuur gehouden en vervolgens tot kamertemperatuur afgekoeld. Het opwarmen van de stalen gebeurde met 10 °C per minuut. Deze temperaturen werden zo gekozen dat een infraroodspectrum kon genomen worden van het staal vóór de piek in het DTG-spectrum, tussen de twee pieken in het geval van 8 mg M500, en na de piek. Na calcinatië werden de stalen afgekoeld tot kamertemperatuur en gemeten in infrarood spectroscopie. De verkregen spectra kunnen meer informatie geven over de conformatie van de proteïnen enerzijds en het al dan niet verwijderen van de proteïnen anderzijds.

In Figuur 30 wordt een overzicht weergegeven van de DIRFT-spectra van de geïncorporeerde stalen van 8 en 15 mg M500 in 0,01 M hepes met en zonder calcinatië. Aangezien de grootste verandering in de spectra optreedt tussen 2000 en 1200 cm^{-1} , wordt in deze figuur uitsluitend dit deel weergegeven. In deze spectra zijn enkele belangrijke eigenschappen van de twee stalen zichtbaar. Het aanwezige Mb wordt bij

170 °C nog niet gedenateerd. Dit blijkt uit de DRIFT-spectra voor de stalen zonder en met calcinatie, welke min of meer gelijk zijn in intensiteit. Na calcinatie bij 270 °C daalt de intensiteit van de amidebanden wel, maar uitsluitend voor het staal met 15 mg titania. Het andere staal blijft relatief ongewijzigd. Dit bewijst dat de tweede piek in het DTG-spectrum wel degelijk afkomstig is van de proteïnen. In het spectrum van de gecalcineerde stalen met trisbuffer bleef de intensiteit eveneens constant na 270 °C, maar voor 0,01 M en 0,1 M tris. Zowel de trisbuffer zelf als het immobiliseren in de poriën heeft m.a.w. een positief effect op de stabiliteit van de geïmmobiliseerde proteïnen.

Na calcinatie bij 350 °C zijn beide spectra echter grotendeels identiek. Deze temperatuur bevindt zich immers voorbij de tweede piek in het DTG-spectrum. Er is in beide stalen evenveel Mb gedenateerd of verwijderd.



Figuur 30: Overzicht van de DRIFT-spectra voor 8 en 15 mg geïncorporeerd M500 in 0,01 M hepes zonder calcinatie en na calcinatie bij 170, 270 en 350 °C.

4 Conclusie

In deze thesis werd getracht de invloed van de buffersamenstelling na te gaan op de incorporatie van myoglobine (Mb) in commercieel beschikbaar titaniumdioxide. Hiervoor werden drie buffers gebruikt, nl. hepes, PBS en tris. Van deze laatste buffer werden tevens verschillende concentraties uitgetest. A.d.h.v. karakterisatie met UV-VIS, TGA, DRIFT, stikstofsorptie en immobilisatie-experimenten werden de parameters bepaald voor een optimale immobilisatie, d.w.z. waarbij het Mb (ook) in de poriën wordt geadsorbeerd. Enerzijds kan 0,01 M tris gebruikt worden als buffer, in combinatie met een titaniamassa tussen 8 en 15 mg en 1 mg Mb per 4 ml buffer. Anderzijds kan 0,01 M hepes gebruikt worden, maar enkel met 8 mg titania en 1 mg Mb per 4 ml buffer, aangezien bij deze buffer uitsluitend met deze titaniamassa incorporatie in de poriën mogelijk is. Het voordeel aan hepes is dat de incorporatie sneller verloopt, aangezien deze uitsluitend adsorptie gelimiteerd is. Met tris daarentegen wordt de adsorptie vertraagd door diffusie limitaties, welke te wijten zijn aan interactie tussen tris en Mb enerzijds en tris en titania anderzijds. Het voordeel aan tris is echter dat het Mb, zowel in oplossing, als geïmmobiliseerd, langer stabiel blijft. Immobilisatie met PBS als buffer bleek echter niet succesvol, daar met deze buffer zowel adsorptie als diffusie limitaties de immobilisatie vertragen en/of verhinderen. Ook het verhogen van de concentratie trisbuffer heeft een negatieve impact, door toenemende diffusie limitaties veroorzaakt door een verhoogde adsorptie van de buffermoleculen in de poriën. Het is dus belangrijk om het volledige “immobilisatiesysteem” inclusief buffer mee in rekening te brengen bij het ontwikkelen van biosensoren en hun voor- en nadelen af te wegen.

Toekomstig onderzoek kan uitwijzen of opschaling van deze incorporaties mogelijk is. Daarnaast kunnen deze resultaten gebruikt worden om het verkregen geïncorporeerde materiaal te testen in elektrochemische toepassingen. Ook is het nuttig om deze incorporaties uit te voeren op gesynthetiseerd titania, aangezien op deze manier een scherpere poriegroottedistributie en controleerbare poriegrootte kan bekomen worden. In gesynthetiseerd titania kan tevens de ratio van porie-oppervlak t.o.v. extern oppervlak verhoogd worden, waardoor de proteïnen voornamelijk in de

poriën zullen adsorberen. In een volgende fase van dit onderzoek kunnen tevens andere halfgeleidende metaaloxides uitgetest worden, zoals bv. tindioxide.

5 Referenties

1. Yu, J. & Ju, H. Amperometric biosensor for hydrogen peroxide based on hemoglobin entrapped in titania sol-gel film. *Anal. Chim. Acta* **486**, 209–216 (2003).
2. Faridbod, F., Gupta, V. K. & Zamani, H. A. *Electrochemical Sensors and Biosensors 2012*. **2011**, (2011).
3. Canbay, E., Şahin, B., Kıran, M. & Akyilmaz, E. MWCNT–cysteamine–Nafion modified gold electrode based on myoglobin for determination of hydrogen peroxide and nitrite. *Bioelectrochemistry* **101**, 126–131 (2015).
4. Mandal, S. S., Navratna, V., Sharma, P., Gopal, B. & Bhattacharyya, A. J. Titania nanotube-modified screen printed carbon electrodes enhance the sensitivity in the electrochemical detection of proteins. *Bioelectrochemistry* **98**, 46–52 (2014).
5. Zhang, X., Ju, H. & Wang, J. in *Electrochemical Sensors, Biosensors and their Biomedical Applications* xxi–xxii (Elsevier Inc., 2008).
6. Justin Gooding, J. Nanoscale biosensors: Significant advantages over larger devices? *Small* **2**, 313–315 (2006).
7. Schaepelynck, P. *et al.* Advances in pump technology: Insulin patch pumps, combined pumps and glucose sensors, and implanted pumps. *Diabetes Metab.* **37**, S85–S93 (2011).
8. Miyahara, M., Vinu, A. & Ariga, K. Adsorption myoglobin over mesoporous silica molecular sieves: Pore size effect and pore-filling model. *Mater. Sci. Eng. C* **27**, 232–236 (2007).
9. Guo, C., Hu, F., Li, C. M. & Shen, P. K. Direct electrochemistry of hemoglobin on carbonized titania nanotubes and its application in a sensitive reagentless hydrogen peroxide biosensor. *Biosens. Bioelectron.* **24**, 819–824 (2008).
10. Turdean, G. L. & Szabo, G. Nitrite detection in meat products samples by square-wave voltammetry at a new single walled carbon nanotubes – myoglobin modified electrode. *Food Chem.* **179**, 325–330 (2015).
11. Chaudhary, Y. S., Manna, S. K., Mazumdar, S. & Khushalani, D. Protein encapsulation into mesoporous silica hosts. *Microporous Mesoporous Mater.* **109**, 535–541 (2008).
12. Gupta, P., Vermani, K. & Garg, S. Hydrogels: From controlled release to pH-responsive drug delivery. *Drug Discov. Today* **7**, 569–579 (2002).

13. Ivnitski, D., Abdel-Hamid, I., Atanasov, P. & Wilkins, E. Biosensors for detection of pathogenic bacteria. *Biosens. Bioelectron.* **14**, 599–624 (1999).
14. Mongra, a. C. Commercial Biosensors : An outlook. *J. Acad. Indus. Res.* **1**, 310–312 (2012).
15. Barker, S. A. in *Biosensors Fundamentals and Applications* (eds. Turner, A. P. F., Karube, I. & Wilson, G. S.) 85 – 99 (Oxford University Press, 1987).
16. Atkins, P. *et al.* Inorganic Chemistry X-ray stuff. *Inorg. Chem.* 223–226 (2009).
17. Essa, H., Magner, E., Cooney, J. & Hodnett, B. K. Influence of pH and ionic strength on the adsorption, leaching and activity of myoglobin immobilized onto ordered mesoporous silicates. *J. Mol. Catal. B Enzym.* **49**, 61–68 (2007).
18. Stoker, H. S. *General, Organic, and Biological Chemistry.* (Brooks Cole, 2010).
19. Satyawali, Y. *et al.* Characterization and analysis of the adsorption immobilization mechanism of β -galactosidase on metal oxide powders. *RSC Adv.* **3**, 24054 (2013).
20. Xian, Y. *et al.* Encapsulation hemoglobin in ordered mesoporous silicas: Influence factors for immobilization and bioelectrochemistry. *Electrochem. commun.* **9**, 142–148 (2007).
21. Dai, Z. & Ju, H. Bioanalysis based on nanoporous materials. *TrAC - Trends Anal. Chem.* **39**, 149–162 (2012).
22. Asano, T., Tsuru, K., Hayakawa, S. & Osaka, A. Bilirubin adsorption property of sol-gel-derived titania particles for blood purification therapy. *Acta Biomater.* **4**, 1067–1072 (2008).
23. Sun, J. Y., Huang, K. J., Zhao, S. F., Fan, Y. & Wu, Z. W. Direct electrochemistry and electrocatalysis of hemoglobin on chitosan-room temperature ionic liquid-TiO₂-graphene nanocomposite film modified electrode. *Bioelectrochemistry* **82**, 125–130 (2011).
24. Comini, E., Galstyan, V., Faglia, G., Bontempi, E. & Sberveglieri, G. Highly conductive titanium oxide nanotubes chemical sensors. *Microporous Mesoporous Mater.* **208**, 165–170 (2015).
25. Rabe, M., Verdes, D. & Seeger, S. Understanding protein adsorption phenomena at solid surfaces. *Adv. Colloid Interface Sci.* **162**, 87–106 (2011).
26. Gummy, D. *et al.* Catalytic activity of commercial of TiO₂ powders for the abatement of the bacteria (*E. coli*) under solar simulated light: Influence of the isoelectric point. *Appl. Catal. B Environ.* **63**, 76–84 (2006).

27. Gibbs, J. *Optimizing the Immobilization of Protein and Other Biomolecules*. (2001).
28. Meersman, F., Smeller, L. & Heremans, K. Comparative Fourier transform infrared spectroscopy study of cold-, pressure-, and heat-induced unfolding and aggregation of myoglobin. *Biophys. J.* **82**, 2635–2644 (2002).
29. Gäb, J., John, H., Melzer, M. & Blum, M. M. Stable adducts of nerve agents sarin, soman and cyclosarin with TRIS, TES and related buffer compounds- Characterization by LC-ESI-MS/MS and NMR and implications for analytical chemistry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **878**, 1382–1390 (2010).
30. Guerrero, G., Mutin, P. H. & Vioux, a. Anchoring of phosphonate and phosphinate coupling molecules on titania particles. *Chem. Mater.* **13**, 4367–4373 (2001).
31. Ribbens, S. *et al.* Systematic evaluation of thermal and mechanical stability of different commercial and synthetic photocatalysts in relation to their photocatalytic activity. *Microporous Mesoporous Mater.* **156**, 62–72 (2012).
32. Samantaray, S. K. & Parida, K. Studies on anion-promoted titania 3. Effect of concentration and source of phosphate ion, method of preparation, and activation temperature on redox, acid-base, textural and catalytic properties of titania. *J. Mol. Catal. A Chem.* **176**, 151–163 (2001).
33. Kadam, D. M. *et al.* Preparation and characterization of whey protein isolate films reinforced with porous silica coated titania nanoparticles. *J. Food Eng.* **117**, 133–140 (2013).
34. Kholodenko, Y., Volk, M., Gooding, E. & Hochstrasser, R. M. Energy dissipation and relaxation processes in deoxy myoglobin after photoexcitation in the Soret region. *Chem. Phys.* **259**, 71–87 (2000).
35. Anderson, a B. & Robertson, C. R. Absorption spectra indicate conformational alteration of myoglobin adsorbed on polydimethylsiloxane. *Biophys. J.* **68**, 2091–2097 (1995).
36. Barth, A. Infrared spectroscopy of proteins. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1767**, 1073–1101 (2007).
37. Chen, X. D., Wang, Z., Liao, Z. F., Mai, Y. L. & Zhang, M. Q. Roles of anatase and rutile TiO₂ nanoparticles in photooxidation of polyurethane. *Polym. Test.* **26**, 202–208 (2007).
38. Sing, K. The use of nitrogen adsorption for the characterisation of porous materials. *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* **187-188**, 3–9 (2001).

39. Brown, M. E. & Gallagher, P. K. in *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry* (eds. Brown, M. E. & Gallagher, P. K.) **5**, 1–12 (Elsevier B.V., 2008).
40. Barboux-Doeuff, S. & Sanchez, C. Synthesis and Characterization of Titanium Oxide-Based Gels Synthesized from Acetate Modified Titanium Butoxide Precursors. *Mat. Res. Bull.* **29**, 1–13 (1994).
41. Stuart, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*. (John Wiley & Sons Ltd, 2004).
42. Adler, H. H. Infrared spectra of phosphate minerals: symmetry and substitutional effects in the pyromorphite series. *Am. Mineral.* **49**, 1002–1015 (1964).
43. Kaiden, K., Matsui, T. & Tanaka, S. Study of the Amide III Band by FT-IR Spectrometry of the Secondary Structure of Albumin, Myoglobin and gamma-Globulin. *Appl. Spectrosc.* **41**, 180–184 (1987).
44. Rubio, J., Oteo, J. L., Villegas, M. & Duran, P. Characterization and Sintering Behaviour of Submicrometre Titanium Dioxide Spherical Particles Obtained by Gas-Phase Hydrolysis of Titanium Tetrabutoxide. *J. Mater. Sci.* **32**, 643–652 (1997).
45. Nijhuis, T. A., Visser, T. & Weckhuysen, B. M. The role of gold in gold-titania epoxidation catalysis. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **44**, 1115–1118 (2005).

6 Nederlandse samenvatting

Een van de meest recente en veelbelovende technieken voor de analyse van kleine moleculen is de biosensor. In een biosensor wordt een biologisch element geïncorporeerd in een detectorelement, dat gebaseerd is op bv. potentiometrie. Wanneer proteïnen als biologisch element worden gekozen, zijn er echter twee problemen: enerzijds is het redoxactieve centrum moeilijk bereikbaar, daar het zich in de heemgroep bevindt. Anderzijds kan irreversibele denaturatie optreden. Beide nadelen kunnen echter verholpen worden door het proteïne te immobiliseren. In dit onderzoek werd gekozen voor mesoporeus titaniumdioxide als drager. Dit materiaal is biocompatibel en heeft een hoge geleidbaarheid. Daarnaast kan de poriediameter aangepast worden aan de diameter van de proteïnes, waardoor de activiteit en stabiliteit van de proteïnen geoptimaliseerd worden. Aangezien de stabiliteit van zowel de proteïnen als het geïncorporeerde complex pH-afhankelijk is, is het gebruik van een buffer niet alleen noodzakelijk maar ook een belangrijke invloedsfactor. De buffermoleculen kunnen immers met het dragermateriaal interageren en zo de adsorptie al dan niet positief beïnvloeden.

Het doel van dit onderzoek is de invloed van de buffer na te gaan bij de immobilisatie van myoglobine op mesoporeus titania. Hiervoor werden drie buffers uitgetest nl. hepes (4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethaansulfonzuur), tris (tris(hydroxymethyl)aminomethaan) en fosfaatgebufferde zoutoplossing (PBS). Stalen voor, tijdens en na de incorporatie werden geanalyseerd in UV-VIS, DRIFT, TGA en stikstofadsorptie.

Hieruit kan geconcludeerd worden dat PBS geen goede buffer is, daar deze te sterk interageert met drager en proteïne. Hepes en tris zijn echter wel geschikte buffers, aangezien ze resp. niet en gunstig met het titania interageren. Met hepes kan de adsorptie sneller verlopen, maar treedt incorporatie in de poriën slechts op bij lage titaniamassa. Voor tris geldt dat de adsorptie diffusie gelimiteerd is, maar incorporatie in de poriën minder afhankelijk is van de titaniamassa en het Mb langer stabiel blijft.

7 Engelse samenvatting

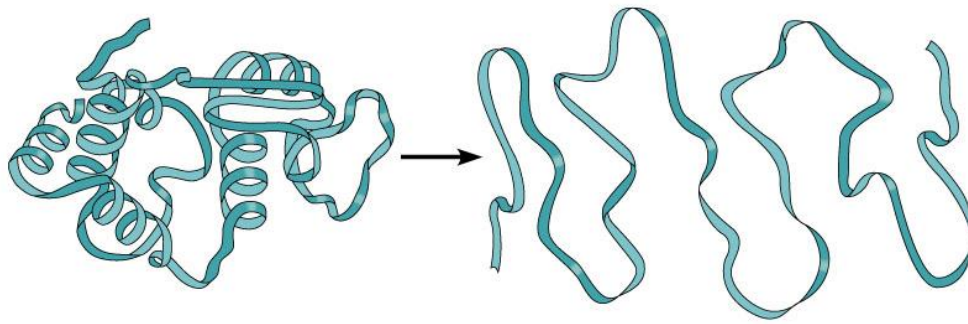
One of the most promising techniques for analyzing small molecules, is the biosensor. In a biosensor, a biological component is incorporated in a transducer, which is based on e.g. potentiometry. When proteins are used as biological element, two difficulties occur: on the one hand the redox active center is situated in the heme group and therefore poorly accessible. On the other hand the proteins can be irreversibly denatured. However, both disadvantages disappear when these proteins are immobilized onto an inorganic carrier, such as titanium dioxide. This biocompatible material has high conductivity and an adaptable pore size. This makes it possible to adjust the pore size to the size of the protein, which improves protein stability and activity. Both proteins and incorporated complex are pH-dependent, which makes the use of a buffer not only a necessity but an important impact factor as well, since these buffer molecules can interact with the surface. This interaction can however have a positive impact on the protein adsorption.

The main goal of this thesis was to determine the influence of the type of buffer on the immobilization of myoglobin on mesoporous titania. Three buffers were tested: hepes (4-(2-hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid), tris (2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol and phosphate buffered saline (PBS). Samples before and after incorporation were measured in UV-VIS, DRIFT, TGA and nitrogen sorption.

The results of these experiments show that PBS is the worst buffer, due to its strong interaction with both Mb and titania. Hepes caused the highest amount of adsorbed Mb, since this buffer doesn't interact with protein or surface. Incorporation in the pores, however, was only possible for lower titania mass. This was not the case for tris, since pore adsorption occurred in each sample. Moreover trismolecules interact positively with both Mb and titania.

8 Wetenschapspopulariserende abstract

Proteïnen zijn complexe, maar bijzonder interessante moleculen, die niet alleen in het lichaam hun nut bewijzen. Zo kunnen ze ook gebruikt worden in biosensoren om bv. H_2O_2 te detecteren in voeding. Het grote nadeel aan het gebruik van proteïnen is echter dat ze sterk beïnvloed worden door externe factoren zoals temperatuur en zuurtegraad. Als je een proteïne beschouwt als een opgerold bolletje touw, zorgen ongunstige omstandigheden ervoor dat dit bolletje zal afrollen (figuur 1). Dit proces heet denaturatie en zorgt ervoor dat de eigenschappen van het proteïne zullen veranderen. Om denaturatie tegen te gaan, kan het proteïne echter geïmmobiliseerd worden op een dragermateriaal.

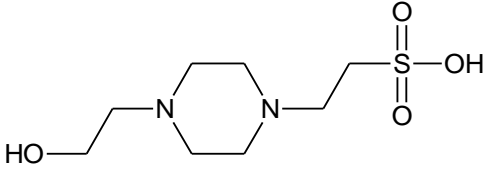
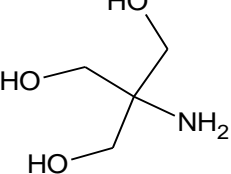
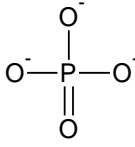


Figuur 1: Schematisch voorstelling van denaturatie van een proteïne.

Het doel van dit onderzoek was om na te gaan welke buffer het meest geschikt is om dergelijke immobilisatie uit te voeren. Een buffer houdt de zuurtegraad van een oplossing constant. De buffermoleculen mogen echter niet ongunstig interageren met de drager of het Mb.

Er werden drie buffers uitgetest bij de immobilisatie van het proteïne myoglobine (Mb) op TiO_2 , nl. hepes-, tris- en fosfaatbuffer (tabel 2).

Tabel 1: Structuurformules van hepes-, tris- en fosfaatbuffer.

| hepesbuffer | trisbuffer | fosfaatbuffer |
|---|--|---|
|  |  |  |

A.d.h.v. verschillende karakterisatietechnieken is gebleken dat de grootste hoeveelheid Mb geïmmobiliseerd kan worden met hepesbuffer, maar het Mb langer stabiel blijft met trisbuffer.

9 Appendix

a. Karakterisatiemethoden

1. UV-VIS spectroscopie^{1,2}

Metingen met UV-VIS spectroscopie zijn gebaseerd op de Lambert-Beer wet. Via deze wet kan de concentratie van een bepaalde stof in oplossing bepaald worden, door deze te exciteren met behulp van ultraviolet of zichtbaar licht. Een cuvet met gekende weglengte b (cm) wordt bestraald met invallend licht met een intensiteit I_0 . Vervolgens wordt de intensiteit I van het uitredende licht gemeten. Het quotiënt van beide wordt de transmissie T genoemd. Het negatief logaritme van de transmissie is de absorptantie A . Deze laatste waarde is volgens de Lambert-Beer wet gelijk aan het product van de concentratie c (M), de weglengte b (cm) en de molaire extinctiecoëfficiënt ϵ_λ (M⁻¹.cm⁻¹).

$$\frac{I}{I_0} = T \quad (1)$$

$$-\log T = -\log \frac{I}{I_0} = A \quad (2)$$

$$A = \epsilon_\lambda \cdot b \cdot c \quad (3)$$

Een voorwaarde voor het succesvol uitvoeren van UV-VIS spectroscopie is echter dat de te meten stof ultraviolet of zichtbaar licht absorbeert. Indien dit niet het geval is, zal excitatie niet kunnen optreden.

Om het verlies door reflectie aan het oppervlak van de cuvetten te compenseren, wordt parallel een referentiecuvet gemeten. Deze cuvet, die eenzelfde weglengte heeft, bevat enkel en alleen het zuivere oplosmiddel.

2. Thermogravimetrische analyse (TGA)^{3,4}

Thermische analyse heeft als doel na te gaan hoe de eigenschappen van het staal beïnvloed worden wanneer het staal wordt opgewarmd of afgekoeld. Bij thermogravimetrische analyse wordt specifiek de massa van het staal beschouwd. De

variatie ervan kan uitgezet worden in functie van de tijd (isothermal mode) of in functie van de temperatuur (scanning mode).

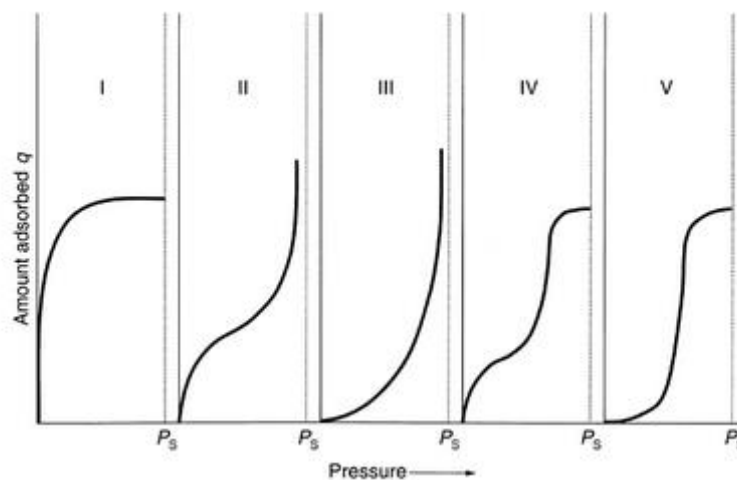
De belangrijkste elementen van een TGA zijn de microbalans, de oven, geprogrammeerde software en een computer of dataverwerker. Door de temperatuur volgens een lineair verloop op te drijven, zal er massaverlies optreden in het staal. Het staal wordt continu gemeten, zodat het massaverlies kan uitgezet worden in functie van de temperatuur. Deze reactie gebeurt onder gecontroleerde atmosfeer. Er zijn ruwweg twee categorieën te onderscheiden: interactieve en non-interactieve atmosfeer. Tevens kan de druk aangepast worden. Het doel van TGA-metingen is het karakteriseren van de decompositie, de thermische stabiliteit en de kinetiek van fysicochemische processen van de stalen.

3. Diffuse Reflectie Infrarood Fourier Transform Spectroscopie (DRIFT)^{2,5}

DRIFT is een variatie op infrarood spectroscopie, een techniek die gebruikt kan worden om de informatie te winnen over de bindingstypes in een molecule. Hiervoor worden een of meerdere overgangen gemeten bij energieën (golftallen) die overeenkomen met het verschil tussen twee gekwantiseerde vibratieniveaus. Het bekomen IR-spectrum bevat de absorbantie of transmissie in functie van het golftal. Een vast sample wordt verdund in KBr-poeder. De infraroodcel reflecteert straling naar het poeder en verzamelt vervolgens de gereflecteerde energie. DRIFT-metingen zijn gebaseerd op de absorptie en diffuse verstrooiing van IR-straling. Wanneer een staal frequenties absorbeert, zal het verstrooide licht bij deze frequenties een energietekort vertonen. In een DRIFT-spectrum wordt de verhouding tussen de gereflecteerde straling en de ingestuurde straling weergegeven. Deze verhouding geeft m.a.w. weer hoeveel straling geabsorbeerd wordt door het staal. DRIFT-spectroscopie maakt gebruik van een Michelson Interferometer om parallelle meting van de gereflecteerde straling mogelijk te maken. Het hieruit bekomen interferogram wordt vervolgens via Fouriertransformatie omgezet in een transmissiespectrum.

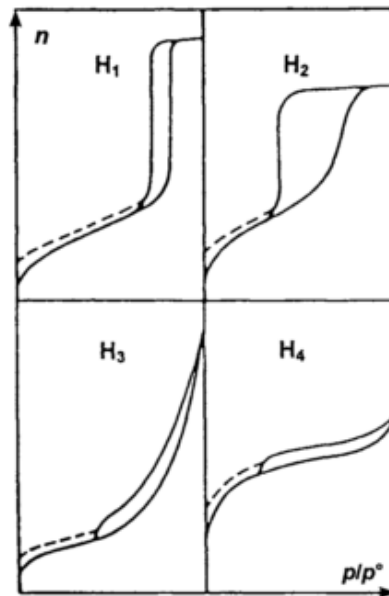
4. Stikstofadsorptie en -desorptie^{2,6,7}

Met behulp van stikstofadsorptie- en -desorptiemetingen bij 77 Kelvin is het mogelijk om niet alleen poriestraal en -volume experimenteel te bepalen, maar ook het specifieke oppervlak van het materiaal. Hiervoor worden respectievelijk de BHJ (Barrett-Joyner-Halenda)- en BET (Brunauer-Emmett-Teller)-berekeningen gebruikt. Ondanks de leeftijd van beide methodes (resp. in 1951 en 1938 gepubliceerd) worden ze nog steeds beschouwd als standaardmethodes. De BET-methode is gebaseerd op een vereenvoudigd model van fysisorptie, meer bepaald het 'ideal localised monolayer'-model. Volgens dit model bestaat elk oppervlak uit equivalente sites waaraan willekeurig geadsorbeerd wordt. Deze adsorptie wordt niet beïnvloed door naburige geadsorbeerde moleculen en er is geen sprake van laterale interacties tussen de geadsorbeerde moleculen. Vanaf de tweede laag gedragen alle lagen zich als een vloeistof. Aangezien dit model veraf staat van de werkelijkheid, is het slechts van toepassing op een klein gedeelte van de isotherm, meestal tot een relatieve druk van 0,30. Via de BET-methode wordt de monolaag capaciteit n_m berekend. Aan de hand van n_m kan vervolgens het specifieke oppervlak $a(\text{BET})$ berekend worden. Bijkomend kan via de BET-methode de C-constante bepaald worden. Deze parameter geeft meer informatie over de interactie tussen adsorbens en adsorbaat. Een C-waarde van 80 tot 150 duidt op de aanwezigheid van goed gedefinieerde monolagen op mesoporeus of non-poreus materiaal.



De poriegrootte en -distributie kan bepaald worden met behulp van de BJH-methode en a.d.h.v. de isotherm. Een isotherm wordt verkregen wanneer een oppervlak wordt

gemeten over een breed relatief drukgebied. Er wordt een onderscheid gemaakt tussen vijf verschillende types van adsorptie-isothermen (I-V). Bij verlagen van de druk, treedt gasdesorptie op. Voor types I t/m III is de desorptie-isotherm gelijk aan de adsorptie-isotherm. Voor type IV en V (mesoporeuze materialen) is dit echter niet het geval. Bijgevolg ontstaat er een hysteresislus in de isotherm. IUPAC onderscheidt vier types (H1-H4), weergegeven in onderstaande figuur.



Stikstofsorptiemetingen bij 77 K zijn geschikt voor zowel routineuze kwaliteitscontroles als metingen van nieuwe materialen. De metingen kunnen zowel continu als discontinu uitgevoerd worden, hoewel via deze eerste methode meer details zichtbaar kunnen worden. Bij voorkeur wordt dan ook deze methode gebruikt. Er wordt specifiek gekozen voor 77 Kelvin aangezien bij deze temperatuur de gelokaliseerde adsorptieprocessen geminimaliseerd worden, waardoor condensatie van het gas in de poriën van het substraat mogelijk wordt. Alvorens sorptiemetingen uit te voeren, kan ervoor gekozen worden om de stalen eerst te ontgassen. Hierdoor worden fysisch geadsorbeerde moleculen verwijderd en worden drastische veranderingen o.i.v. veroudering of oppervlakmodificatie vermeden. Ontgassen gebeurt meestal door een vacuüm aan te leggen.

5. Referenties bij appendix

1. Perkampus, H.-H. *UV-VIS Spectroscopy and Its Applications*; Springer-Verlag: Berlijn, 1992.
2. Aerts, S., Masterthesis, Universiteit Antwerpen, 2013.
3. Brown, M.E. *Handbook of Thermal Analysis and Calorimetry*; Elsevier B.V.: Amsterdam, 2008.
4. Brown, M. E. *Introduction to Thermal Analysis: Techniques and Applications*; Kluwer Academic Publishers: Dordrecht, 2001.
5. Stuart, B. *Infrared Spectroscopy: Fundamentals and Applications*; Wiley: New-York, 2004.
6. Rouquerol, F.; Rouquerol, J.; Sing, K.; *Adsorption by Powders and Porous Solids*; Academic Press: Groot-Brittannië, 1999.
7. Sing, K.; The use of nitrogen adsorption for the characterization of porous materials. *Colloids Surf. A* **2001**, 187 - 188, 3 - 9.

