



Norges miljø- og  
biovitenskapelige  
universitet

**Masteroppgave 2020 30 stp**

Fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap

# **Immobilisering av peroksidase fra pepperrot på polyuretanmikropartikler syntetisert ved bruk av mikrobølgeraktor**

Immobilization of horseradish peroxidase on  
polyurethane microparticles synthesized using  
microwave reactor

**Anniken Løvig**

Kjemi og bioteknologi



## Forord

Det praktiske arbeidet i denne oppgaven ble utført ved kjemiavdelingen på fakultet for kjemi, bioteknologi og matvitenskap ved Norges miljø- og biovitenskapelige universitet.

Jeg vil starte med å takke veilederne mine professor Yngve Stenstrøm, Simen Antonsen, professor Morten Sørli og Lukas Rieder for å ha gitt meg denne oppgaven og alt som har fulgt med den: glede, interesse, frustrasjon og ikke minst stå på vilje. Tilbakemeldingene, veiledningen og tillitten deres har gitt meg den motivasjonen jeg trengte for å komme i mål og innse at jeg faktisk valgte riktig studieretning for seks år siden. Videre vil jeg takke professor Reidar Schüller for måling av partikkelstørrelse på mine dyrebare polyuretan mikropartikler og professor Vincent Eijsink for lån av bioteknologilaboratorier der det trengtes.

Takk til mine medstudenter på syntesegruppen for godt samhold og mye skravling, kaketirsdag vil bli dypt savnet. Det hadde ikke vært det samme uten dere. Spesielt takk til Siri Heggheim for godt samarbeid, gode diskusjoner og en herlig entusiasme.

Denne oppgaven er skrevet under veldig spesielle omstendigheter. Ryktene tilsa at det å skrive en master kom til å kreve takling av vanskelige situasjoner i form av følelser som optimisme og plutselig totalt nederlag. Og ryktene var sanne, men de sa ingenting om hvordan det er å takle en pandemi i tillegg. Det ga begrenset tid på både lab og med syntesegruppa, men de månedene vi fikk var helt supre.

Til slutt vil jeg takke familien min og gode venner for deres støtte og oppmuntring gjennom hele studietiden og spesielt de siste månedene.

Ås, juli 2020

Anniken Løvig

## Sammendrag

Polyuretan (PU) mikropartikler, fra polyvinylalkohol og heksametylendiisocyanat, ble syntetisert med mikrobølgeoppvarming i en Biotage Initiator +, Fourth Generation Microwave Synthesizer. PU mikropartiklene ble bekreftet med IR (Agilent Technologies 5500 Series FT-IR spektrofotometer) og  $^1\text{H}$  NMR (Bruker Ascend <sup>TM</sup> 400). Optimal syntese ble funnet til å være 2 minutter ved 170 °C i en 10-20 mL beholder som ga høyeste utbytte. Partikkelstørrelsen ble testet med laserdiffraksjon (masterziser 3000, Aero S) og viste en varierende størrelsesfordeling fra 2  $\mu\text{m}$  til 3080  $\mu\text{m}$ , men de største partiklene ser ut til å være klumping.

PU mikropartikler ble modifisert med gull-nanopartikler med absorpsjon. Peroksidase fra pepperrot (HRP) ble immobilisert via adsorpsjon og enzymaktivitet testet med pyrogallol enzymassay. Det ble ikke observert enzymaktivitet.

HRP ble immobilisert på PU mikropartikler uten gull-nanopartikler. PU mikropartikler ble syntetisert med varierende forhold PVA:HDI. Forhold på 1:20 ga høyeste immobiliseringsprosent på 80 %. Enzymaktiviteten ble forsøkt testet kvalitativt og kvantitativt. Kvalitativt ble bekreftet på grunnlag av fargeendring med pyrogallol-, amplex red- og ABTS enzymassay. Kvantitativ enzymaktivitet kunne ikke bekreftes. Immobilisert HRP viste aktivitet på grunnlag av fargeendring etter fem kjøringar med ABTS enzymassay. Immobilisering fungerte på opptil 90 dager gamle PU mikropartikler.

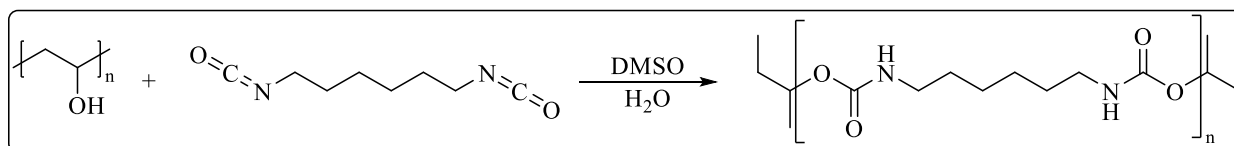
## **Abstract**

Polyurethane (PU) microparticles, from polyvinyl alcohol and hexamethylene diisocyanate, were synthesized with microwave heating employing a Biotage Initiator +, Fourth Generation Microwave Synthesizer. PU microparticles were characterized by IR (Agilent Technologies 5500 Series FT-IR spectrophotometer) and <sup>1</sup>H NMR (Bruker Ascend™ 400). Optimal conditions were found to be 2 min at 170 °C in a 10-20 mL container. Particle size were determined with laser diffraction (masterziser 3000, Aero S) and showed that the microparticles consist of particles with varying size distribution between 2 μm and 3080 μm. The larger particles are probably due to particle clumping.

PU microparticles were modified with gold nanoparticles with absorption. Horseradish peroxidase (HRP) was immobilized via adsorption. Enzyme activity was not observed.

HRP was immobilized onto PU microparticles without gold nanoparticles. The PU microparticles was synthesized using different ratios of PVA:HDI. A ratio of 1:20 gave the highest immobilization with a immobilization yield of 80 %. The enzyme activity was tested both qualitatively and quantitatively. Qualitative was confirmed on the basis of color change with pyrogallol, amplex red and 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) enzyme assay. Quantitatively this could not be confirmed. Immobilized HRP showed activity after five ABTS enzyme assays. PU microparticles was also shown to be usable, without losing activity, 90 days after synthesis.

## Grafisk Sammendrag



## Forkortelser

PU	Polyuretan
PU-Au-NP	Polyuretan-gull-nanopartikler
HDI	Heksametylendiisocyanat
MDI	4,4'-metylenbis (fenylisocyanat)
TDI	toluen 2,4-diisocyanat
PVA	Polyvinylalkohol
HRP	Peroksidase fra pepperrot
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat
ABTS	2,2'-Azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonicsyre)
DMSO	Dimetylsulfoksid

## Innholdsfortegnelse

Forord .....	i
Sammendrag .....	ii
Abstract.....	iii
Grafisk Sammendrag .....	iv
Forkortelser .....	iv
1. Introduksjon .....	1
1.1 Målet med oppgaven.....	1
1.2 Polymerer .....	2
1.2.1 Polymeriseringsmetoder .....	4
1.2.2 Polyuretan.....	6
1.2.3 Polyoler .....	9
1.2.4 Isocyanater.....	9
1.2.5 Kjedeforlengere .....	10
1.2.5 Immobilisering.....	10
1.2.5 Nanopartikler .....	11
1.2.6 Laserdiffraksjon .....	12
1.3 Mikrobølgeoppvarming .....	12
1.3.1 Mikrobølger .....	13
1.3.2 Dielektrisitet .....	14
1.3.3 Ikke-termisk mikrobølgeeffekt .....	16
1.3.4 Metodeutvikling.....	16
1.3.5 Polymersyntese ved bruk av mikrobølger .....	19
1.4 Proteiner.....	20
1.4.1 Aminosyrer .....	20
1.4.2 Peptider.....	21
1.4.3 Proteinstruktur .....	21
1.5 Enzymer .....	22
1.5.1 Peroksidaser.....	23
1.5.2 Immobilisering av enzymer .....	26
1.5.3 Elektroforese.....	27
1.5.3.2 Enzymassay .....	29
2. Resultater og diskusjon.....	31
2.1 Syntese av PU mikropartikler fra isocyanat HDI og polyol PVA og immobilisering av HRP ..	31

2.2 Immobilisering av HRP i citratbuffer og fosfatbuffer, og forsøk på måling av enzymaktiviteten med pyrogallol enzymassay.....	33
2.3 Immobilisering av HRP på PU-Au-NP og forsøk på måling av enzymaktiviteten med pyrogallol enzymassay .....	36
2.4 Forsøk på optimalisering av immobiliseringsmetoden med HRP på SDS-page og måling av enzymaktivitet .....	38
2.4.1 Økt mengde PU mikropartikler med til konstant konsentrasjon HRP og forsøk på måling av enzymaktivitet med amplex red enzymassay. ....	38
2.4.2 Økt mengde PU mikropartikler med konstant konsentrasjon HRP og forsøk på måling av enzymaktivitet med ABTS enzymassay.....	40
2.4.3 Forsøk på å finne metningspunktet mellom PU mikropartikler og HRP konsentrasjonen..	42
2.4.4 Syntese av PU mikropartikler med konstant mengde PVA og økt mengde HDI.....	44
2.5 Måling av størrelsen på PU mikropartiklene syntetisert med mikrobølger og med konvensjonell oppvarming. ....	47
2.6 Immobilisering av HRP på «gamle» PU mikropartikler. ....	49
2.7 Forsøk på bruk av immobilisert HRP på PU mikropartikler gjentatte ganger med ABTS enzymassay. ....	53
3. Veien videre .....	58
4. Konklusjon.....	59
5. Eksperimentelt.....	60
5.1 Syntese av PU mikropartikler.....	61
5.1.1 I mikrobølgereaktor.....	61
5.1.2 Med konvensjonell oppvarming .....	63
5.2 PU mikropartikler modifisert med Au-NP .....	65
5.3 Immobilisering av HRP med UV/vis deteksjon .....	65
5.4 Bestemmelse av partikkelstørrelsen til syntetisert PU mikropartikler .....	65
5.5 Immobilisering av HRP med SDS deteksjon .....	66
5.5.1 Reagenser .....	66
5.5.2 Økt mengde PU mikropartikler med konstant konsentrasjon HRP.....	67
5.5.3 PU mikropartikler med konstant mengde PVA og økt mengde HDI.....	67
5.6 Pyrogallol enzymassay.....	69
5.6.1 Mobilt HRP.....	69
5.6.2 Immobilisert HRP .....	70
5.7 Amplex red enzymassay .....	71
5.8 ABTS enzymassay.....	72
5.9 ABTS enzymassay med bruk av immobilisert HRP gjentatte ganger .....	73
5.9.1 Proteinfilterplate .....	73
5.9.2 Büchnertrakt .....	73



6. Referanser .....	74
7. Vedlegg.....	77
7.1 Syntese av PU mikropartikler.....	77
7.1.1 Mikrobølger .....	77
7.1.2 Konvensjonell oppvarming.....	78
7.2 Immobilisering av HRP på PU mikropartikler .....	79
7.2.1 Mikrobølger .....	79
7.2.2 PU-Au-NP .....	81
7.2.3 Citratbuffer og fosfatbuffer.....	81
7.3 Pyrogallol enzymassay .....	82
7.3.1 Førsøk på immobilisering med citrat buffer og fosfat buffer for å finne optimal konsentrasjon for assayet utført med mobilt HRP .....	82
7.3.2 Immobilisert HRP i citratbuffer .....	84
7.3.3 Immobilisert HRP på PU-Au-NP.....	84
7.4 SDS-page gelbilder .....	85
7.4.1 Økt mengde PU mikropartikler med konstant konsentrasjon HRP og forsøk på måling av enzymaktivitet med amplex red enzymassay. ....	85
7.5 Partikkelstørrelse .....	89
7.6 Måling av konsentrasjon og immobiliseringsprosent med Nanodrop.....	90
7.6.1 Forsøk å finne metningspunkt mellom PU mikropartikler og HRP konsentrasjonen. ....	90
7.6.2 Syntese av PU mikropartikler med konstant mengde PVA og økt mengde HDI.....	91
7.6.3 Immobilisering av HRP på «gamle» PU mikropartikler. ....	91
7.6.4. Forsøk på bruk av immobilisert HRP på PU mikropartikler gjentatte ganger med ABTS enzymassay. ....	92

# 1. Introduksjon

## 1.1 Målet med oppgaven

Polyuretaner (PU) har vist seg å være gode bærere for enzymer. Om PU mikropartikler syntetisert ved bruk av mikrobølger virker like bra, eller bedre, enn konvensjonell oppvarming skal testes. Det vil gjøres ved å immobilisere enzymet peroksidase fra pepperrot (HRP) på PU mikropartiklene. UV-spektroskopi skal benyttes for å se hvor mye som er bundet.

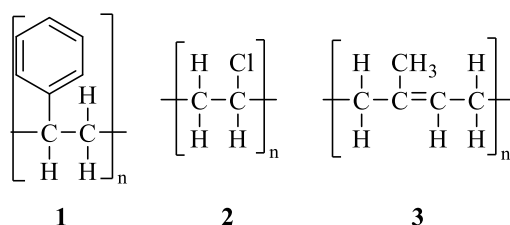
Videre er planen å kjøre et enzymassay for å teste aktiviteten til mobilt HRP mot immobilisert HRP. Det var også planer om å sammenligne vanlig PU mikropartikler med modifiserte PU-gull og PU- sølv nanopartikler (PU-Au/Ag-NP), som tidligere rapporter av Ramanaviciene *et al.*<sup>1</sup> med gode resultater.

Bruk av konvensjonelle oppvarmingsbetingelser krever mye energi og det er vanskelig å holde en stabil temperatur. Ved bruk av mikrobølgereaktor appliseres «varmen» direkte på løsningen og det kan antas at syntesen av PU fremskyndes og blir mer effektiv. Budriene *et al.*<sup>2</sup> har tidligere funnet ut at PU mikropartikler kan syntetiseres med konvensjonell oppvarming, mer spesifikt gradvis oppvarming til 120 grader. Hvis PU mikropartikler syntetisert med mikrobølger fremstilles under de samme betingelsene vil betingelsene endres for å optimalisere metoden ytterligere.

## 1.2 Polymerer

Naturlige polymerer har sitt opphav i planter og dyr og inkluderer forbindelser som DNA, polysakkarider og proteiner er forbindelser som går innunder den kategorien. Disse består av mindre deler, henholdsvis nukleotider, monosakkarider og aminosyrer. I motsetning til de naturlige polymerene, fremstilles syntetiske polymerer i laboratoriene og har gitt opphav til eksempelvis plast.<sup>3</sup>

Dagens forståelse av polymerer, bestående av et stort antall molekylære baseenheter bundet kovalent, ble foreslått i 1920 av H. Staudinger<sup>4</sup> i artikkelen *Über Polymerisation*.<sup>5</sup> Artikkelen baserte seg på tidligere eksperimenter relatert til polymerisering av isopren, syntese av polyoxymetylen og gummi-kjemi. Forbindelser som polystyren (**1**), polyvinylklorid (**2**) og naturlig gummi, *cis*-1,4-polyisopren (**3**), figur 1, ble presentert i artikkelen som polymerer. På gitt tidspunkt var ikke forskningsgrunnlaget godt nok til å anerkjennes.<sup>4</sup>



Figur 1. Strukturen til polystyren (**1**), polyvinylklorid (**2**) og *cis*-1,4-polyisopren (**3**).

I 1922 kom han med termen «makromolekyler» etter å ha gjennomført hydrogenering av naturgummi. Dette viste dannelse av en stor polymerkjede med enkeltbindinger bundet kovalent mellom monomerer, og ikke flyktige sykliske hydrokarboner som først antatt. I 1924 definerte han makromolekyler.<sup>4</sup> Bruk av ultrasentrifuger, membran osmometri og lys spredning for å bestemme molevekt kom i slutten av 1920-tallet. I 1930 årene ble makromolekyler anerkjent innen vitenskapen.<sup>4</sup>

I 1940 startet studier av radikal polymerisering og syntese av nylon. Dette var starten på en stor økning i industriell bruk av polymerer. Polymerforbindelser kan i dag bli funnet i alt fra klesproduksjon, bildekk og proteser i form av plast og elastomerer.<sup>6</sup>

Polymerer er store molekyler med molvekt høyere enn 5000 g/mol<sup>7</sup> som er bygd opp av repeterende strukturelle enheter kalt monomerer.<sup>3</sup> Monomerer er små molekyler med funksjonelle grupper<sup>8</sup> som danner kovalente bindinger. De repeteres gjennom hele polymerstrukturen.<sup>3</sup> Oligomerer er en kort kjede av monomerer med lavere molvekt.<sup>7</sup>




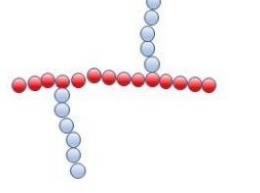
Størrelsen på polymeren bestemmes av polymeriseringsgraden. Polymeriseringsgraden er antall strukturelle enheter, inkludert endegruppene, i en ferdig polymer. Dette avhenger av både lengden på molekylet og molvekten. Når polymerkjeder fremstilles vil molekylene i en prøve ha varierende størrelser og middelverdier for polymeriseringsgraden og molvekt benyttes.<sup>8</sup>

Polymeriseringsgraden relateres til styrke og typisk materialkarakter når den er tilstrekkelig høy. Da regnes polymeren som høypolymer. Eksempelvis vil det for polyetylen være fra en polymeriseringsgrad på 500 og oppover. Lange, fleksible molekylkjeder som er relativt innfiltrert i hverandre gir høypolymeren materialeegenskapene sine.<sup>3,8</sup>

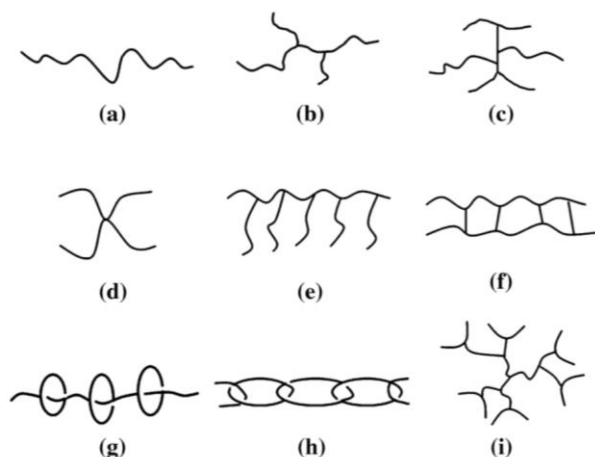
Det finnes flere typer polymerer: lineære, forgrenede og nettverkspolymerer. Flerfunksjonelle monomerer eller bireaksjoner kan danne forgrenede og nettverkspolymerer. Eksempelvis kan fornettede polymerer dannes ved å tverrbinde lineære eller forgrenede polymerer. Dette benyttes f. eks. ved vulkanisering av gummi og herding av ulike plasttyper.<sup>3</sup>

Fremstilles polymerene av kun en type monomer kalles de homopolymerer. Fremstilles polymerene av to eller flere ulike typer monomerer kalles de kopolymerer. Tabell 1 viser ulike kopolymerer.<sup>3</sup> PU er en kopolymer fordi det dannes fra to- eller flerverdige isocyanater og to- eller flerverdige polyoler.<sup>9</sup> Kopolymerer kan inneha andre egenskaper enn rene homopolymerer.<sup>3</sup>

*Tabell 1. Ulike kopolymerer.<sup>3</sup>*

	Tilfeldig kopolymer
	Blokk-kopolymer
	Periodisk kopolymer
	Podet kopolymer

Homopolymerer og kopolymerer kan opptre i ulike formasjoner som eksempelvis stjernepolymerer, stige-polymerer o.l., figur 2.<sup>8</sup>



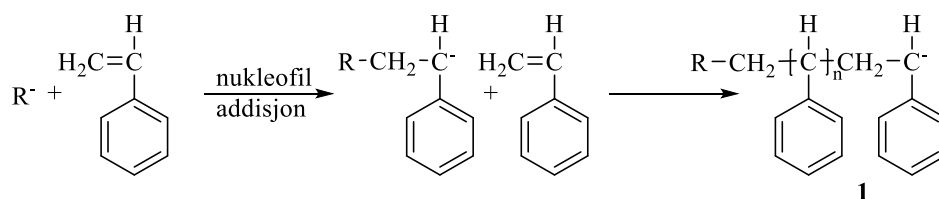
**Figur 2.** Ulike formasjoner av polymerer: (a) lineær, (b) forgrenet, (c) krysskoblet, (d) stjerne, (e) kam, (f) stige, (g) polyrotaxane, (h) polycatenane og (i) dendrimer.<sup>8</sup>

### 1.2.1 Polymeriseringsmetoder

Levende organismer fremstiller naturlige polymerer og syntetiske polymerer fremstilles på laboratorier som nevnt tidligere. I 1989 var den totale verdensproduksjonen av syntetiske polymerer, plastproduksjon, på 100 millioner tonn per år. I 2016 ble det registrert 335 millioner tonn per år.<sup>3</sup> Syntetiske polymerer er en blanding av forbindelser sammensatt av de samme repeterende enhetene med varierende molvekt. De kan forekomme som lineære kjeder med forgreninger. Fremstilling av polymerer foregår enten med kjedepolymerisering eller stegpolymerisering.<sup>6</sup>

#### 1.2.1.1 Kjedepolymerisering

Polymerer fremstilles ved at en type monomer gradvis festes til et aktivt senter på en voksende polymerkjede med et tydelige start, forplantning og stopp trinn.<sup>10</sup> Fremstilling av polystyren er et eksempel på en anionisk addisjons kjedepolymerisering. Nukleofile eller basiske reagenser, som alkalimetaller og organolittium forbindelser, starter polymeriseringen. Det er vanlig å bruke n-butyllitium, skjema 1.<sup>11</sup>



**Skjema 1.** Fremstilling av polystyren (1) fra n-butyllitium.

### 1.2.1.2 Stegpolymerisering

Polymerer fremstilles ved at av bi/poly-funksjonelle monomerer først danner dimerer, så trimerer osv. Polymerer med høy molekylmasse fremstilles gradvis etter mange steg.<sup>10</sup> Sammenlignet med kjedepolymerisering, som kun benytter en type monomer i kjedeforlengelsen, kan flere ulike monomeriske enheter benyttes i stegpolymerisering.<sup>12</sup>

Monomer + monomer => dimer

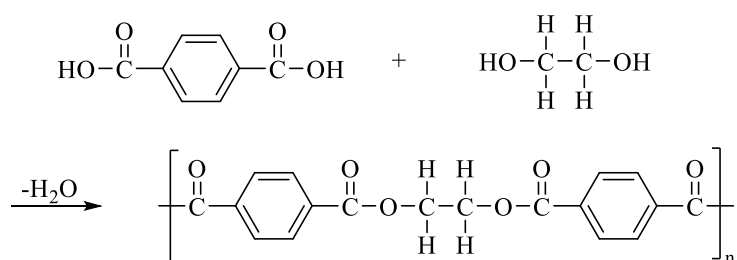
Dimer + monomer => trimer

Dimer + dimer => tetramer

Trimer + dimer => pentamer

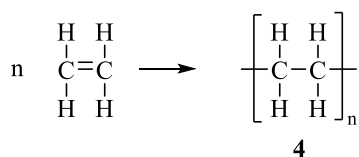
Trimer + trimer => hexamer

Stegpolymerisering kan foregå på to måter: steg-polykondensasjon- og steg-polyaddisjonsreaksjoner. Ved steg-polykondensasjon avspaltes et biprodukt, ofte et lite molekyl, eksempelvis vann, i hvert steg.<sup>10</sup> Fremstillingen av polyetylentereftalat er et godt eksempel på polykondensasjon. Det fremstilles fra tereftalsyre og etylenglykol og et vannmolekyl avspaltes, skjema 2. Polyetylentereftalat brukes i eksempelvis tekstilfibre og plastflasker.<sup>13</sup>



*Skjema 2. Steg-polykondensasjon av polyetylentereftalat fra tereftalsyre og etylenglykol.*

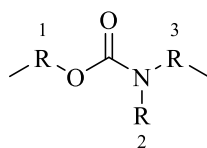
I motsetning til polykondensasjon skjer steg-polyaddisjon uten avspaltning av biprodukter.<sup>10</sup> Fremstilling av polyetylen (4) er et godt eksempel på polyaddisjon, skjema 3.<sup>14</sup> Polyetylen er råstoffet i PE-plast som er den mest brukte plasttypen. Omtrent 30 % av den totale plastproduksjonen i verden er produksjon av polyetylen.<sup>15</sup>



*Skjema 3. Steg-polyaddisjon av polyetylen (4) fra eten.*

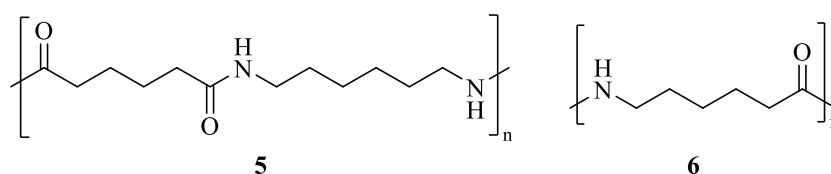
### 1.2.2 Polyuretan

Polymerer som inneholder flere karbamat-grupper, uretan, defineres som PUer, figur 3.<sup>16</sup>



Figur 3. Strukturen til karbamat-gruppen.

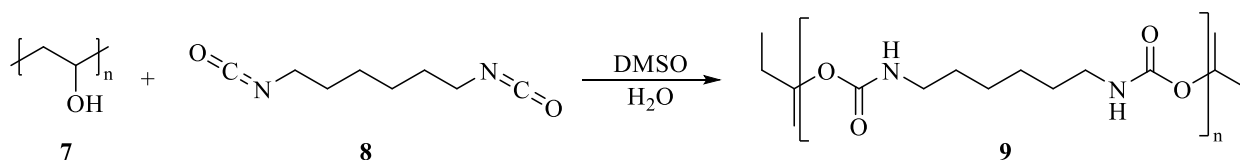
Første fremstilling av PU ble gjennomført av Otto Bayer i 1937.<sup>17</sup> Denne oppdagelsen var en respons på W. Carothers sitt arbeid med polyamider og fremstillingen av nylon 6,6 (5) hos DuPont. Bayer et al. syntetiserte nylon 6 (6), kjent som Perlon U fra alifatisk isocyanat og diamin, figur 4.<sup>18</sup>



Figur 4. Strukturen til nylon 6,6 (5) og nylon 6 (6).

Grunnet patenteringer fra DuPonts side, testet Bayer andre metoder med liknende materialer. En reaksjon mellom alifatisk isocyanat og glykol ga nye materialer, kjent som PU. PUer er stoffer som innehar egenskapene til gummi og metaller, i form av elastisitet, styrke og holdbarhet. De benyttes i maling, elastomerer, tøy, skum o.l.<sup>18</sup> PU kommer i mange former, eksempelvis skum, mikropartikler og mikrosfærer.<sup>19</sup>

Fremstilling av PU er en reaksjon mellom isocyanater og polyoler uten avspalting av vann. Det defineres som en polyaddisjon, skjema 4.<sup>18</sup>



Skjema 4. Syntese av PU mikropartikler (9) med polyaddisjon fra poly(vinylalkohol)(PVA) (7) og heksametylendiisocyanat (HDI) (8)

Hastigheten på reaksjonen avhenger av forskjellen i polariteten til monomerene. Polyoler er polare forbindelser med lav tetthet og isocyanater er ikke polare med høyere tetthet. For å øke hastigheten kan en katalysator benyttes. Metallkomplekser, eksempelvis dibutyltin dylarat, og aminforbindelser, eksempelvis dimetyletanolamin, brukes som metaller, men i mindre grad

grunnet giftigheten.<sup>16</sup> Andre forbindelser kan benyttes som kjedeforlengere. Dette gir en stor variasjon av PU typer med varierte mekaniske, termiske og kjemiske egenskaper. Bruk av ulike typer polyoler og isocyanater kan føre til forgreninger og kryssbindinger. Kryssbindinger dannes og fleksibiliteten endres i samsvar med endringer av molvekt og type monomer som benyttes. De intramolekulære kreftene påvirkes også av disse endringene.<sup>18</sup>

Polymeriseringsreaksjonen mellom isocyanater og polyoler eller aminer drives på grunn av den høye entalpian, 20-25 kcal/mol. Den gjør det mulig å danne høypolymere PUs raskt.<sup>17</sup>

#### 1.2.2.1 Nedbrytning av polyuretaner

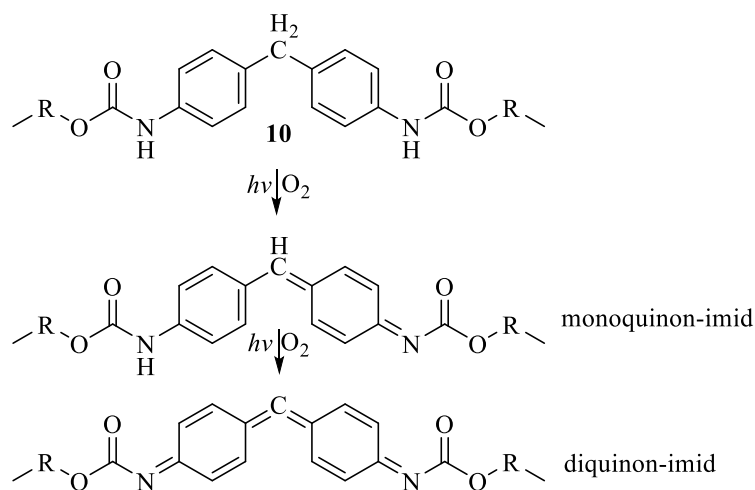
Nedbrytning av PUs påvirker utseende og de fysiske og mekaniske egenskapene. Vanlige tegn på nedbrytning er eksempelvis misfarging, sprøheten og klebrigheten til PUen. Nedbrytningen starter oftest på utsiden og gradvis penetrerer hoveddelen av polymeren. Mulige årsaker er varme (termisk nedbrytning), lys (fotonedbrytning), ioniserende stråling (strålingsnedbrytning), «*mechanical action*» eller angrep av sopp, bakterier, gjær, alger og deres enzymer (bionedbrytning).<sup>20</sup>

##### *1.2.2.1.1 Fotooksidasjon (fotonedbrytning)*

Nedbrytning forårsaket av oksygen og lysstråling kalles fotooksidasjon. Lyset absorberes av en kromoforgruppe i molekylet som reagerer med et foton med gitt energi. Det fører til en eksitert tilstand i molekylet. Skjer dette over en lengre periode kan det oppstå forskjellige kjemiske transformasjoner. Nedbrytning foregår lettere med oksygen til stede fordi oksygenet kan opptre som et fritt radikal. Dette medfører oksidativ nedbrytning, ofte til ustabile forbindelser eksempelvis hydroperoksid. Med eller uten oksygen tilstede kan det føre til: nedbrytning av hovedkjeden, dannelse av kryssbindinger, dannelse av dobbeltbindinger i hovedkjeden, dannelse av små molekyler eksempelvis karbondioksid, depolymerisering og fotohydrolyse.<sup>20</sup>

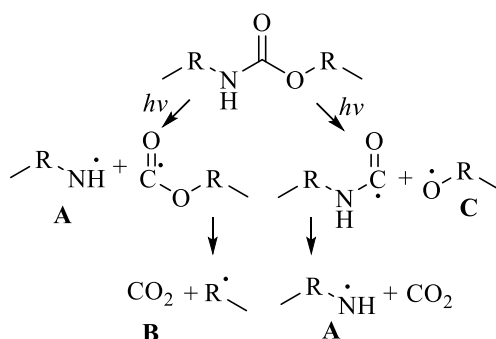
I 4,4'-metylenbis-(fenylisocyanat) (MDI) (**10**) og toluen-2,4-diisocyanat (TDI), aromatiske isocyanater, kan det skje en oksidasjon som gir en quinon-imid struktur. Monoquinon-imid er en sterk komofor som gir PU en gul farge. Videre oksidering til diquinon-imid gir en enda mørkere farge, skjema 5.<sup>21</sup>





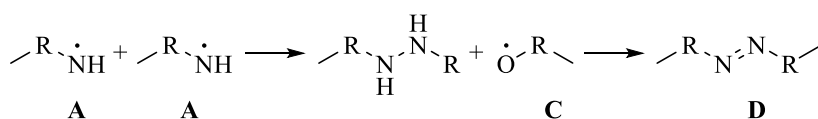
Skjema 5. Fotooksidasjon av MDI (10).

En annen type fotooksidasjon er nedbryting av polymer-hovedkjeden. Det er to bindinger i PU som er mottakelig for nedbryting: nitrogen-karbon-bindingen og karbon-oksygen ester bindingen. Brytning av bindingene gir reaktive radikaler.<sup>21</sup>



Skjema 6. Fotooksidasjon: nedbryting av polymer-hovedkjeden.

Forbindelse A, skjema 6, er en aminoradikal og forbindelse C er en alkoxyradikal. En reaksjon mellom to aminoradikaler og videre med et alkoxyradikal som gir diazoprodukter, forbindelse D, skjema 7.<sup>21</sup>

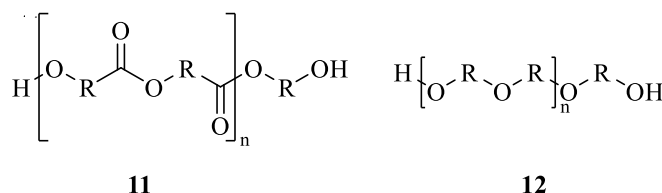


Skjema 7. Dannelse av diazoprodukter (D) fra to aminoradikaler (A) og et alkoxyradikal (C)

Diazoprodukter er kromoforer som også misfarger PU og gir de en brun farge. Dannelse av alkener og oksidasjon til aldehyder er også mulige kjemiske reaksjoner.<sup>21</sup>

### 1.2.3 Polyoler

En av hovedkomponentene i PU er polyol som påvirker de elastomeriske egenskapene. Polyol defineres som den myke delen av polymeren. De vanligste polyolene er polyester (11) og polyeter (12), figur 5.<sup>16</sup>

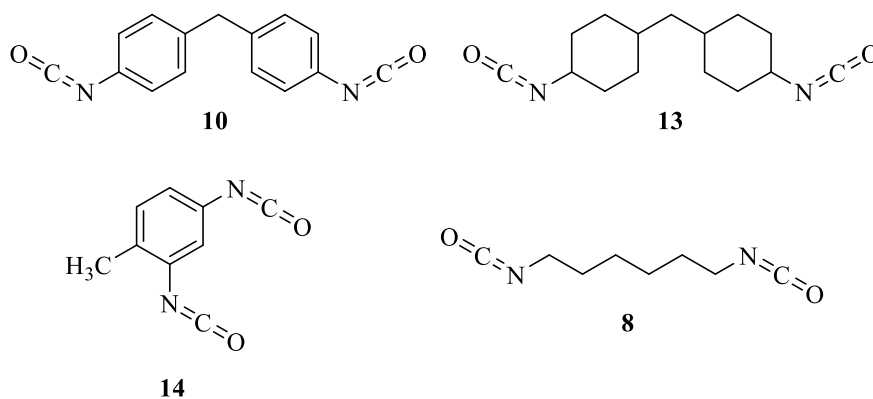


Figur 5. Strukturen til polyester (11) og polyeter (12)

Egenskapene til polyolen avhenger av molvekten. Lav molvekt gir en stivere polymerkjede og høy molvekt gir elastomere egenskaper.<sup>16</sup> Polyol tilfører hydroksylgrupper til polymeren og ved å endre mengden polyol kan egenskaper som løselighet og reaktivitet endres.<sup>16</sup> Generelt kan polyoler uttrykkes med  $\text{R}-(\text{OH})_n$ . R gruppen er en polymerenhet, eksempelvis polyester, med en molvekt som strekker seg fra 400 til 15.000 g/mol. Innholdet av OH-grupper er 56.100/OH eq. wt.<sup>17</sup>

### 1.2.4 Isocyanater

En annen hovedkomponent i PU er isocyanat som påvirker reaktiviteten og herdingsgraden. Isocyanat defineres som den harde monomeren.<sup>16</sup> Oftest brukes diisocyanater, enten alifatiske eller aromatiske, med en molvekt under 300 g/mol.<sup>17</sup> Aromatiske isocyanater er billigere og har høyere mekaniske egenskaper. Vanlige diisocyanater som benyttes er eksempelvis MDI (10), 4,4'-metylenbis-(cycloheksyl-isocyanat) (HMDI) (13), TDI (14) og HDI (8), figur 6.<sup>16</sup>



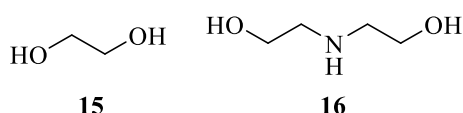
Figur 6. Strukturen til MDI (10), HMDI (13), TDI (14) og HDI (8).

Generelt kan isocyanater uttrykkes med  $\text{R}-(\text{NCO})_n$ . Innholdet av isocyanat er wt. %  $\text{NCO} = 4200/\text{NCO}$  eq. wt.<sup>17</sup>

### 1.2.5 Kjedeforlengere

Di-, tri- og høyere molvekt polyoler kan benyttes for å danne kryssbindinger, øke molvekten og forleng polymerkjeden. Det samme gjelder isocyanater med lav molvekt med to eller flere reaktive grupper som blir en del av hovedkjeden.<sup>17</sup>

Dioler, trioler, diaminer og alkanolaminer benyttes oftest som kjedeforlengere. De har en molvekt mindre enn 400 g/mol. Eksempler på forlengere er etylenglykol (**15**) og dietanolamin (**16**), figur 7.<sup>17</sup>



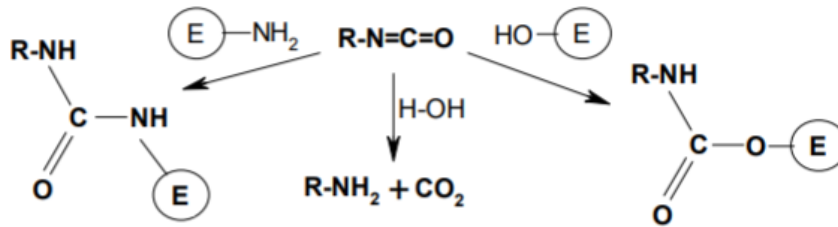
*Figur 7. Strukturen til etylenglykol (15) og dietanolamin (16)*

### 1.2.5 Immobilisering

PUer har vist seg å være gode bærere for enzymimmobilisering. Nitrogenet i isocyanatgruppene fra PU og amino- eller hydroksylgruppene fra enzymet reagerer og danner en kovalent binding. Ulike typer PUer kan benyttes til immobilisering eksempelvis skum, mikrosfærer og mikropartikler.<sup>19</sup>

Skumstrukturen dannes ved at gass, CO<sub>2</sub>, frigjøres samtidig med at stoffet polymeriseres og fornettes som gir en økning i volumet. Det produseres ulike typer skum: myke, stive og en blanding. I myke skumtyper brukes forbindelser med få hydroksylgrupper mens i stive skumtyper benyttes forbindelser med flere hydroksylgrupper for et tettere og stivere molekylært nettverk. Reaksjonen går fort og er over på noen minutter.<sup>22</sup>

Immobilisering av enzym på skum er attraktivt fordi det er lett å regulere størrelsen på porene, skummet er stabilt og produksjonen har lav kostnad. Størrelsene på porene avhenger av skumtypen som benyttes. Enzymet kan immobiliseres under syntese eller på bæreren via adsorpsjon eller innesperring. Ved immobilisering før syntese reagerer isocyanatet med en enzymløsning, skjema 8.<sup>19</sup>



Skjema 8. Immobilisering av enzym på PU skum. Fra v. kovalent binding via aminogruppene, dannelse av skum og kovalent binding via hydroksylgruppene.<sup>19</sup>

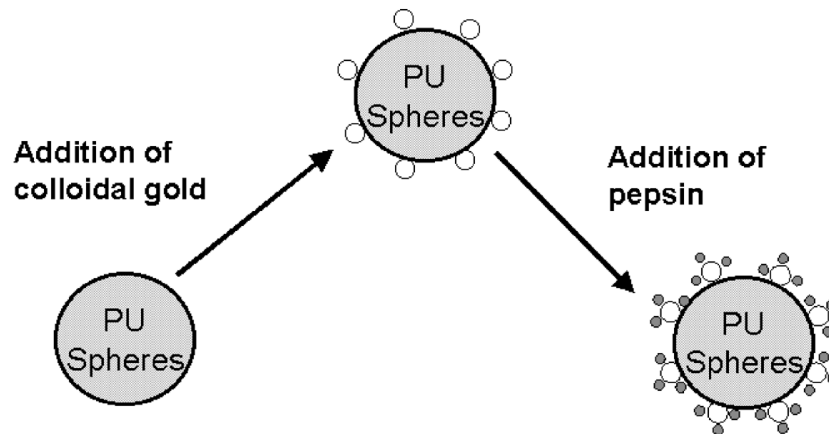
Mikropartikler har en størrelse fra 150 nm til 500  $\mu\text{m}$  i diameter. Pulver består av mikrosfærer med en partikkelstørrelse fra 1  $\mu\text{m}$  til 100  $\mu\text{m}$  og helst mellom 10  $\mu\text{m}$  og 50  $\mu\text{m}$ .<sup>2</sup> Som med skum binder enzymet seg til nitrogenet i isocyanat gruppene. Bruk av mikropartikler og mikrosfærer er fortsatt et nytt fenomen innen immobilisering av enzymer.<sup>19</sup>

### 1.2.5 Nanopartikler

En nanopartikkel består av et lite antall atomer og strekker seg fra 1 til 100 nm i diameter. Partiklene kan tilpasses forskjellig bruk som gjør dem anvendelige og nyttige innen flere fagområder, eksempelvis i overflatebehandlinger for økt motstand mot UV-ståling og katalyse av kjemiske reaksjoner.<sup>23</sup>

Nanopartikler bestående av edelmetaller er grundig studert og brukes innen mange områder og syntetiseres mye. En mye brukt syntese av Au/Ag-NP reduserer Au(I)/Ag(III) ioner til Au(0)/Ag(0) som videre samles til oligomeriske klynger. Disse klyngene fører til dannelsen av kolloidalt Au/Ag-NP.<sup>1</sup>

Immobilisering av biomolekyler, eksempelvis enzymer, ved bruk av nanopartikler kan dateres tilbake til tidlig 1980 tallet.<sup>24</sup> Forholdet mellom stort overflateareal og lite volum samt god biokompatibilitet og unike fysiske og kjemiske egenskaper har gitt gode resultater innen immobilisering.<sup>1</sup> Au-NPer er spesielt gode biokonjugater med proteiner fordi proteiner inneholder aminer og cystein som binder godt til gull kolloider. Nanopartiklene binder seg til PU mikropartiklene via nitrogener i polymerkjeden, figur 8. Fordeler med PU-Au-NP sammenlignet med mobilt enzym er eksempelvis høyere biokatalytisk effekt, betydelig forbedret temperatur og pH stabilitet og reproduserbarhet.<sup>24</sup>



Figur 8. Direkte påføring av Au-NP på PU mikropartikler og videre immobilisering av eksempelvis enzymet pepsin.<sup>24</sup>

### 1.2.6 Laserdiffraksjon

I 1908 skrev G. Mie en artikkel om lysspredning med dielektrisk absorberende sfæriske partikler.<sup>25</sup> Maxwells elektromagnetiske teori ble brukt som grunnlag for å beregne lysspredningen av partiklene. Mie klarte å vise sammenheng mellom endring av fargen på gull kolloider oppimot diameteren til gullsfærene<sup>25</sup> og bølgelengdene som viste forskjellige absorpsjonskurver.<sup>26</sup>

Laserdiffraksjon er en metode som kan benyttes for å måle partikkelstørrelse i løsninger eller tørre prøver. En laserstråle passerer gjennom en prøve med fordelte partikler som gir spredning av lys. Intensiteten til det spredte lyset måles. Store partikler sprer lys med små vinkler relativt til laserstrålen og små partikler sprer lys med store vinkler. Partikkelstørrelsen blir oppgitt som volum ekvivalent til sfærisk diameter. Partikler mellom 10 nm og 3.5 mm kan detekteres. Størrelsen til partiklene bestemmes ved bruk av Mie teorien om lysspredning.<sup>27</sup>

### **1.3 Mikrobølgeoppvarming**

I dag benyttes vanligvis konvensjonelle oppvarmingsmetoder som isomantel, varmeplate og oljebad til reaksjoner som krever varme. Dette er metoder som har vist seg å være lite effektive og tidkrevende. De baserer seg på oppvarming av beholderen først og videre oppvarming av løsningen. Varmeledningsevnen til beholderen blir en stor faktor og temperaturen på beholderen er markant høyere enn løsningen før termisk likevekt oppnås.<sup>28</sup>

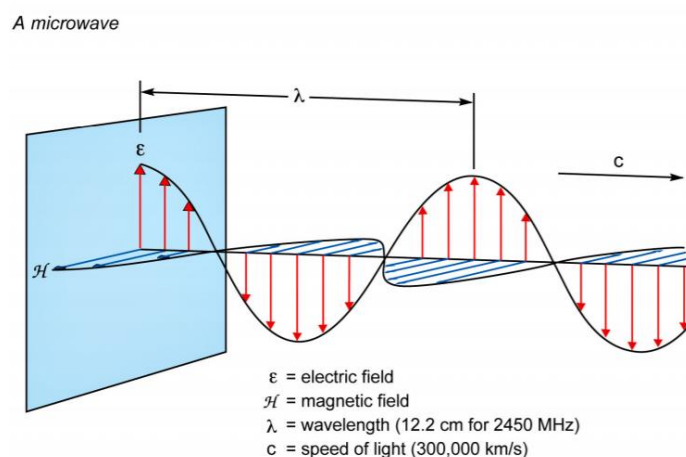
I 1986 kom den første publikasjonen om bruk av mikrobølgereaktor i en organisk syntese, «*microwave-assisted organic synthesis*» også kjent under forkortelsen MAOS. Flere artikler har siden blitt publisert med mikrobølger som oppvarmingsmetode.<sup>29</sup>

På slutten av 90-tallet oppstod det stor mistillit rundt bruken av mikrobølgeraktorer innen kjemien. Flere tok i bruk kjøkkenmikrobølgeovner som manglet parameterkontroll. I dag er det utformet eksperimentelle mikrobølgeovner som kjøres under nøye overvåkede forhold og bruk av mikrobølger som oppvarmingsmetode er økende.<sup>29</sup>

Bruk av mikrobølger har mange fordeler sammenlignet med konvensjonelle metoder, som: redusert reaksjonstid, økt utbytte, mer robust og mindre kontaminering grunnet færre reaksjonstrinn. Den største fordelen som gjør bruk av mikrobølger så interessant er hurtigheten. Reaksjoner som tidligere har tatt flere timer eller dager kan bli redusert til minutter. En av ulempene med eksperimentelle mikrobølgeraktorer er prisen, som sammenlignet med konvensjonelle oppvarmingsmetoder, er relativt høy. Dette begrenser tilgjengeligheten. En annen ulempe er volumkapasiteten. Den begrenses av beholderne som benyttes med mikrobølger.<sup>29</sup>

### 1.3.1 Mikrobølger

Elektromagnetiske bølger består av to forskjellige komponenter: det magnetiske feltet og det elektriske feltet, figur 9, som står vinkelrett på hverandre. Når formålet er oppvarming er det kun det elektriske feltet som er av relevans. Det gjelder organisk kjemi.<sup>28</sup>



Figur 9. Det magnetisk- og elektriske feltet i elektromagnetiskebølger.<sup>28</sup>

Mikrobølger er elektromagnetisk energi med en frekvens fra 0.3 til 300 GHz.<sup>28</sup> Dette området ligger mellom infrarøde bølger og radiobølger. For å hindre interferens med telefonnettet og lignende brukes en frekvens på 2.45 GHz for eksperimentelle mikrobølgeovner. Fotonet som dannes har en energi på 0.0016 eV og er for lav til å bryte molekylbindinger<sup>30</sup>, eksempelvis har bindingen i etan en energi på 3.91 eV.<sup>31</sup>

Mikrobølger påvirker ikke strukturen til molekylene og overfører energi med dielektrisk oppvarming. Aktiveringsenergien til et system er alltid den samme, hvis ikke eksempelvis et enzym katalyserer reaksjonen. Konvensjonelle oppvarmingsmetoder bruker tid for å oppnå en temperatur som tilsvarer nok energi for at reaksjonen kan starte. Dette kan medføre dannelse av uønskede biprodukter som har lavere aktiveringsenergi. Mikrobølger påvirker ikke aktiveringsenergien, men tilfører mye energi raskt for å overkomme det punktet sammenlignet med konvensjonell oppvarming.<sup>28</sup>

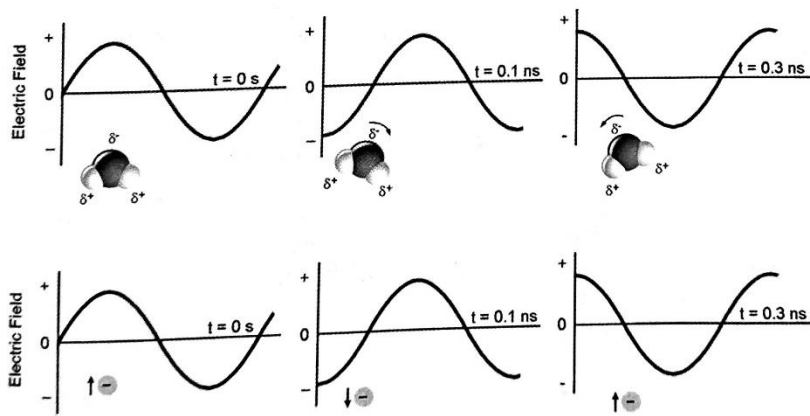
Mikrobølger og lys oppfører seg likt med hensyn til hvordan de reagerer med ulike typer materialer. De reflekteres av metaller og absorberes av noen dielektriske materialer mens andre materialer reagerer ikke. Keramikk og de fleste termoplastikk har lav dipol-forandring som gir dårligere absorberingsevne av mikrobølger.<sup>32</sup>

### 1.3.2 Dielektrisitet

I de fleste tilfeller er det den termiske effekten som skiller konvensjonell- og mikrobølgeoppvarming. Den termiske effekten baserer seg på økt reaksjonstemperatur som kan oppnås med mikrobølger. Spesifikke mikrobølgeeffekter er fenomener som er unike for mikrobølger på grunnlag av de dielektriske kreftene og er ikke mulig å oppnå med konvensjonell oppvarming.<sup>30</sup>

Mikrobølgene passerer gjennom beholderen og angriper molekylene direkte i løsningen. Dette medfører øyeblikkelig og jevn oppvarming av alt i løsningen grunnet varierende elektriske felt, kjent som høyfrekvensoppvarming.<sup>33</sup> Endringene i det elektriske feltet påvirker polariseringen i ikke-ledende/dielektriske stoffer.<sup>34</sup>

Molekylene prøver å sammenstille seg etter det elektriske feltet, figur 10. Det elektriske feltet endrer retning dobbelt så raskt som frekvensen til mikrobølgene. Dette medfører rask dipolrotasjon hos molekylene. Denne dipol rotasjonen gjør at molekylene støter i hverandre som skaper varme. Dette gjelder for både polare og ioniske stoffer.<sup>35</sup>



Figur 10. Det elektriske feltets påvirkning på polare og ioniske stoffer.<sup>30</sup>

Hvor effektiv mikrobølgeoppvarming er avhenger av de dielektriske egenskapene til stoffet ved en gitt frekvens og temperatur. Dette kan beskrives ved å regne ut tapsfaktoren,  $\delta$ .<sup>28</sup>

$$\tan \delta = \frac{\epsilon''}{\epsilon'}$$

Det dielektriske tapet,  $\epsilon''$ , er forårsaket av den elektriske energien som polariserer materialet og går over til varme. Det oppstår en faseforskjell mellom påtrykt spenning og polariseringen over tid.<sup>36</sup> Den dielektriske konstanten,  $\epsilon'$ , er graden av polarisering et molekyl får av det elektriske feltet. Gradene av mikrobølgeabsorpsjon i løsemidler defineres av om  $\tan \delta$  er høy  $> 0.5$ , medium  $0.1-0.5$  eller lav  $< 0.1$ .<sup>28</sup>

Andre fenomener påvirket av dielektriske egenskaper er overoppheting. Overoppheting oppstår i løsninger ved atmosfærisk trykk og fører til at løsningene oppnår temperaturer over kokepunktet. Sammenlignet med konvensjonell oppvarming der beholderen varmes opp først og overskuddsenergi frigis ved koking fra riper o.l. i glasset. Mikrobølger varmer opp løsningen direkte i beholderen som gir en relativ homogen varmeoverføring. Dette medfører temperaturer høyere enn kokepunktet, men det kan utjevnes med røring.<sup>30</sup>

Ulike stoffer som keramiske materialer og polymeriserte organiske forbindelser, eksempelvis forbindelse **1** og forbindelse **4**, gir små dielektriske tap. De benyttes som isolasjonsmaterialer i kondensatorer og kabler. I ikke elektrisk ledende stoffer kan dielektrisk tap fortsatt utnyttes til høyfrekvensoppvarming eksempelvis ved dannelsen av plastgjenstander.<sup>36</sup>



### 1.3.3 Ikke-termisk mikrobølgeeffekt

Ikke-termisk mikrobølgeeffekter er fenomener som ikke kan dekkes av definisjonene til termiske og spesifikke mikrobølgeeffekter. Det er muligens en direkte interaksjon mellom det elektriske feltet og spesifikke molekyler som fremskynder kjemiske reaksjoner. Videre forskning kreves for å kunne definere dette fenomenet og om det i det hele tatt eksisterer.<sup>30</sup>

### 1.3.4 Metodeutvikling

Formålet og hva man ønsker å oppnå med syntesen er med på å avgjøre hvilket instrument og beholder som er mest optimal. Det er i hovedsak to ulike instrumenter av mikrobølgenreaktorer: singelmodus og multimodus. Singelmodus-instrumenter er forbeholdt reaksjoner i mindre skala, fra 60  $\mu$ L til 50 mL, og brukes i hovedsak til å oppdage ukjente reaksjoner, metodeutvikling og reaksjons optimalisering. Multimodus instrumenter kan takle større kvantum, opptil 3 L, under forhold som tilsvarer en lukket beholder. Mengden kan økes hvis det benyttes en åpen beholder. Med åpen- og lukket beholder menes under hvilke forhold reaksjonen foregår.<sup>37</sup>

#### 1.3.4.1 Løsemiddel

Teknisk sett kan løsemiddelet som brukes i den originale metoden, konvensjonell oppvarming, brukes med mikrobølgeoppvarming. Det avhenger av dipolmomentet til løsningsmiddelet. Løsningsmidler med høyt dipolmoment gir raskere oppvarming, men lavt dipolmoment kan kompenseres for dersom reaktanten selv har høyt dipolmoment. Hvis løsningen ikke når rett temperatur innen kort tid, bør et annet løsningsmiddel benyttes. Valg av løsemiddel burde da baseres på  $\tan \delta$  verdien, tabell 2. Det burde bli tatt med i betraktningen om beholderen er åpen eller lukket for med økt trykk minsker behovet for en sterk absorbent.<sup>37</sup>

Tabell 2. Kokepunkt, dielektrisk konstant, dielektrisk tap, tapsfaktor og mikrobølgeabsorbans for ulike løsningsmidler.<sup>37</sup>

Solvent	bp (°C)	$\epsilon'$	$\epsilon''$	tan $\delta$	Microwave absorbance
Ethylene glycol	197	37.0	49.950	1.350	very good
Dimethylsulfoxide	189	45.0	37.125	0.825	good
Ethanol	78	24.3	22.866	0.941	good
Methanol	65	32.6	21.483	0.659	good
Water	100	80.4	9.889	0.123	medium
1-Methyl-2-pyrrolidone	204	32.2	8.855	0.275	medium
N,N-dimethylformamide	153	37.7	6.070	0.161	medium
1,2-Dichlorobenzene	180	9.9	2.772	0.280	medium
Acetonitrile	81	37.5	2.325	0.062	medium
Dichloromethane	40	9.1	0.382	0.042	low
Tetrahydrofuran	66	7.4	0.348	0.047	low
Toluene	110	2.4	0.096	0.040	very low

#### 1.3.4.2 Beholdere

Som nevnt er det to type beholdere som benyttes. Hovedkriteriet for valg av beholder er først og fremst temperaturen man ønsker å oppnå. Temperaturen i en åpen beholder begrenses av kokepunktet til løsningsmiddelet hvis reaksjonen kjøres ved atmosfæretrykk. En fordel er at reaksjoner blir varmet til reflux raskere ved bruk av mikrobølger sammenlignet med oljebad. Det forutsetter at løsningsmiddelet har høy tan- $\delta$  verdi. Etter oppnådd reflux vil ikke reaksjonen gå betydelig raskere. En annen fordel er at det er mindre risiko å operere under atmosfærisk trykk og man kan operere i større skala fordi vanlig laboratorieutstyr, som rundkolber, ikke kan benyttes i mikrobølgereaktorer.<sup>37</sup>

En lukket beholder endrer reaksjonsforholdene ved at trykket øker, tabell 3. Det gjør det mulig å oppnå høyere reaksjonstemperaturer. Løsningsmidler som tidligere har hatt relativt lave kokepunkt, eksempelvis diklormetan, kan ved bruk av en lukket beholder varmes opp til 100°C over originalt kokepunkt. Dette medført at reaksjonene skjer raskere og utbyttet blir høyere. I forhold til åpne beholdere, opererer man med mindre volum når trykk brukes. Ikke alle reaksjoner er egnet for lukkede beholdere fordi flyktige biprodukter ikke fjernes.<sup>37</sup>

Tabell 3. Kokepunkt for ulike løsemidler ved amfoterisk trykk vs trykk.<sup>37</sup>

Solvent		Temperature (°C)															
Name	bp (°C)	50	60	70	80	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200
N,N-dimethylformamide	153																
Toluene	110																
Water	100																
1,2-dichloroethane	83																
Acetonitrile	81																
Ethanol	78																
Ethyl acetate	77																
Hexane	69																
Tetrahydrofuran	65																
Methanol	65																
Acetone	56																
Dichloromethane	40																

#### 1.3.4.3 Reaksjonsbetingelser

Målet er først å optimalisere betingelsene for temperatur og tid. Arrhenius likning sier at hver økning på 10 °C vil halvere reaksjonstiden.<sup>37</sup>

$$k = Ae^{\frac{-E_a}{RT}}$$

Tabell 4 er basert på Arrhenius likningen og estimerer tiden en reaksjon vil ta med hensyn på konvensjonell oppvarming mot mikrobølgeoppvarming. Oljebadkjemi med gitt temperatur og tid kan lett overføres til mikrobølgeforhold ved å bruke Arrhenius. Når tidsparamteren skal settes kan «hold time» benyttes, som ekskluderer oppvarmingstiden. Bruk av «hold time» gjør forsøket mer reproducerbart, spesielt fra litenskala til storskala produksjon. Mikrobølgereaktoren kjøler ned løsningen raskt, hvis koblet til luft-kjøling, i forhold til konvensjonell oppvarming.<sup>37</sup>

Tabell 4. Estimering av tid og temperatur i henhold til Arrhenius likning.<sup>37</sup>

T (°C)	Times – change in field color represents change in unit (h/min/s)									
20	1	2	4	6	8	12	24	48	96	172
30	30	1	2	3	4	6	12	24	48	86
40	15	30	1	1.5	2	3	6	12	24	43
50	8	15	30	45	1	1.5	3	6	12	22
60	4	8	15	23	30	45	1.5	3	6	11
70	2	4	8	11	15	23	45	1.5	3	5
80	<del>56</del>	<del>2</del>	<del>4</del>	<del>6</del>	8	11	23	45	1.5	3
90	28	56	2	3	4	6	11	23	45	1
100	14	28	56	1	2	3	6	11	23	40
110	7	14	28	42	56	1	3	6	11	20
120	4	7	14	21	28	42	1	3	6	10
130	2	4	7	11	14	21	42	1	3	5
140	<del>53</del>	<del>2</del>	<del>4</del>	<del>5</del>	7	11	21	42	1	3
150	26	53	2	3	4	5	11	21	42	1
160	13	26	53	1	2	3	5	11	21	38
170	7	13	26	40	53	1	3	5	11	19
180	3	7	13	20	26	40	1	3	5	9
190	2	3	7	10	13	20	40	1	3	5
200	1	2	3	5	7	10	20	40	1	2
210		1	2	2	3	5	10	20	40	1
220			1	1	2	2	5	10	20	35
230					1	1	2	5	10	18
240						1	1	2	5	9
250								1	2	4

### 1.3.5 Polymersyntese ved bruk av mikrobølger

Polymerer har blitt studert nøye med bruk av dielektriske metoder grunnet deres bruk i elektrisk industri som isolatorer.<sup>32</sup> Prosessering av polymerer er muligens det området som har hatt størst fokus og utvikling med tanke på mikrobølgebruk, eksempelvis vulkanisering av gummi til dekk.<sup>38</sup>

Dipolmoment sier noe om egenskapene til dipolen og er et produkt av avstanden mellom ladningene og størrelsen på ladningen. En optimal dipol har en positiv og en negativ elektrisk ladning med lik størrelse.<sup>39</sup> Utregning av dipolmomentet til små molekyler er nokså lett fordi de har relativt konstante geometriske konfigurasjoner. Polymerer har muligheten for rotasjon av enkeltbånd i hovedkjeden og det kan forekomme rotasjoner i forgreninger. Konfigurasjonen til polymeren og antallet polare grupper bestemmer dipolmomentet.<sup>32</sup>

$$\mu = \sqrt{ng\mu_0}$$

Dipolmomentet avhenger av antall polare grupper i kjeden, n, dipolmomentet til hele den polare enheten,  $\mu_0$ , og forekomsten og graden av fleksibilitet i polymerkjeden, g. Teoretiske utregninger av g er en funksjon av energibarrieren som setter restriksjoner for rotasjon i hovedkjeden. Det har vist seg at polymerer har et veldig stort dipolmoment.<sup>32</sup>

Bruk av mikrobølger i polymersyntese har vist stor grad av renhet, hurtighet og utbytte, og har gitt bedre mekaniske- og termiske egenskaper i visse synteser. Eksempelvis herding av epoksyharpiks der pulserende mikrobølger forbedret de mekaniske egenskapene betraktelig. Molvekten og grad av forgreninger til produkter fremstilt med mikrobølger var sammenlignbare med produkter fremstilt med konvensjonell oppvarming.<sup>38</sup>

## 1.4 Proteiner

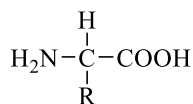
Dagens forståelse av proteiner som polypeptider ble oppdaget i 1902 av F. Hofmeister og E. Fischer. Fischer tok i bruk ordet polypeptid og Hofmeister konkluderte på en forelesning med at proteiner dannes ved kondensasjon av  $\alpha$ -aminosyrer bundet via den repeterende gruppen:  $-\text{CO}-\text{NH}-\text{CH}=\text{}$ .<sup>40</sup>

I 1926 bekreftet J. B. Sumner at enzymer er proteiner. Han fremstilte urease fra jackbønner i krystallinsk form.<sup>41</sup> I 1955 rapporterte F. Sanger aminosyresekvensen til hormonet insulin.<sup>40</sup> Dette etablerte teorien om at proteiner bestod av lineære polymerer bygget opp av aminosyrer. I 1958 fant M. Perutz og J. Kendrew en generell struktur til hval-myoglobin, liknende hemoglobin.<sup>40</sup>

Proteiner kan defineres som polymerer på bakgrunn av at de er bygd opp av flere små enheter,  $\alpha$ -aminosyrer, som er bundet kovalent. Det er 20 ulike  $\alpha$ -aminosyrer som forekommer i ulike rekkefølger og kombinasjoner.<sup>42</sup>

### 1.4.1 Aminosyrer

$\alpha$ -karbonet i alle aminosyrer består av fire forskjellige deler: en aminogruppe, en karboksylgruppe, ett proton og en sidekjede (R), figur 11.<sup>42</sup>



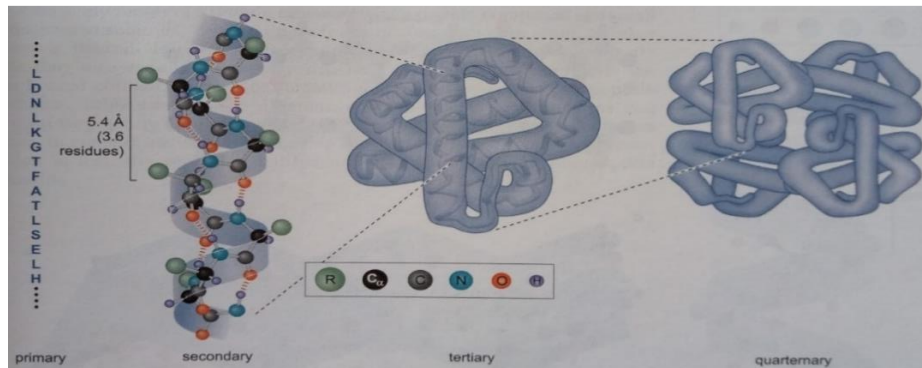
*Figur 11. Generell aminosyrestruktur.*

De ulike delene gjør  $\alpha$ -karbonet til et kiralt senter. Sidekjeden er unik for alle aminosyrer og gir hver aminosyre spesielle egenskaper som polaritet og størrelse. Polariteten avgjør løseligheten i vann og størrelsen påvirker pakkingen av proteinet.<sup>42</sup>



Tertiærstrukturen gir et mer foldet protein. Det dannes flere bindinger som eksempelvis hydrogenbindinger og hydrofobe bindinger grunnet fysiologiske forhold som frastøtning av vann. Stabiliteten til sekundær og tertiær nivåene avhenger av hverandre.<sup>42</sup>

Kvarternstrukturen er interaksjoner mellom tertiærstrukturene i proteiner som inneholder mer enn en polypeptidkjede.<sup>42</sup>



Figur 13. Nivåer av proteinstruktur med hemoglobin som eksempelprotein. Sekundærstrukturen er eksempel på  $\alpha$ -heliks.<sup>42</sup>

## 1.5 Enzymer

Proteiner som katalyserer biokjemiske reaksjoner kalles enzymer. Prosessene i cellene, som polymerisering av nukleotider for syntese av DNA og RNA, har spontane reaksjoner med lav reaksjonshastighet. Ved økt temperatur ville reaksjonene fungert fint, men organismene ville ikke tålt en slik påkjenning. Uten hjelp av enzymer som katalysatorer vil ikke organismene overleve.<sup>42</sup> Enzymene senker aktiveringsenergien til de kjemiske reaksjonene.<sup>44</sup>

Den tredimensjonale strukturen til enzymene gjør at de kan binde seg til substrater. De er spesifikke ovenfor hvilke reaksjoner de katalyserer og hvilke molekyler som kan bruke det aktive sete. Det aktive setet på enzymet (**E**) binder substratet (**S**) og danner et enzymsubstratkompleks (**ES**) som spaltes/dannes til et produkt (**P**), skjema 10.<sup>44</sup>



Skjema 10. Dannelse av produkt (**P**) fra enzym (**E**) og substrat (**S**).

Det aktive setet er tilpasset substratets struktur som gjør det mulig med mange svake bindinger, vanligvis ikke-kovalente. Det medfører at kun ett stoff eller en type atomgruppe i liknende stoffer kan benytte setet og kun en brøkdel av enzymet er viet til det aktive setet. Det aktive setet ligger som en lomme i proteinet. Foldingen til polypeptidet gjør at de aminosyrene som deltar i katalyseringen ikke ligger på rekke og rad i polypeptidkjeden, men er fordelt utover.<sup>44</sup>

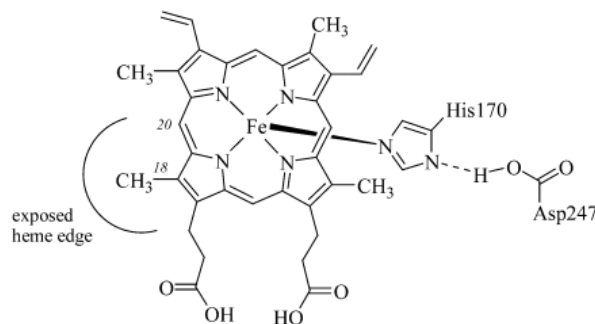


Enzymer kan inneholde uorganiske eller organiske grupper i eller ved det aktive setet som kalles kofaktorer. Disse er med på å øke den katalytiske aktiviteten. Metallioner, eksempelvis magnesium og jern, sitter i det aktive setet og er en del av katalysen eller som tilknytningspunkter. Koenzymer er organiske kofaktorer, eksempelvis metylkobilamin, som vanligvis overfører elektroner og/eller atomer og atomgrupper. Noen koenzymer er sterkt bundet og er en del av enzymet, da kalles de prostetiske grupper, eksempelvis hem.<sup>44</sup> Hem innehar et midtstilt jernatom som kan binde og avgi oksygen.<sup>45</sup>

Enzymaktiviteten påvirkes av temperaturen og surhetsgraden til løsningen. Økt temperatur øker hastigheten på reaksjonen opp til et visst punkt. Ved gitt punkt ødelegges enzymstrukturen, det denatureres. Surhetsgraden gjør at substrat, grupper i det aktive setet og grupper som deltar i katalysen kan ta imot eller avgi protoner. Den optimale surhetsgraden varierer fra enzym til enzym.<sup>44</sup>

### 1.5.1 Peroksidaser

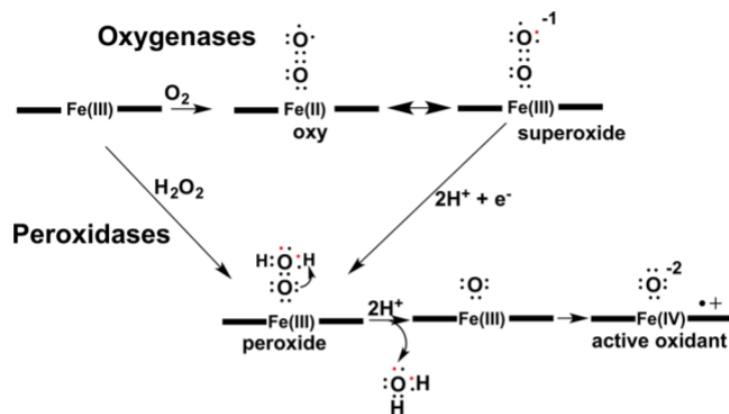
Enzymer med en hem-gruppe, figur 14, kan katalysere både reductive og oksidative reaksjoner.



*Figur 14. Hem-gruppen.<sup>46</sup>*

Det er to hovedgrupper med enzymer som inneholder hem gruppen: oksygenaser og peroksidaser. Oksygenaser bruker  $O_2$  og peroksidaser bruker  $H_2O_2$  for å oksidere ulike uorganiske og organiske stoffer, skjema 11.<sup>47, 46</sup> Som tidligere nevnt har hem-gruppen et midtstilt jernatom som kan binde og avgi oksygen.<sup>45</sup>





Skjema 11. Aktivering av oksygen og peroksid av hem enzymer.<sup>47</sup>

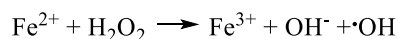
En generell reaksjon der substrat reagerer med hydrogenperoksid katalysert av peroksidase uttrykkes i skjema 12.



Skjema 12. Generell peroksidase reaksjon.

RH<sub>2</sub> er det reduserende substratet og RH· er det radikale produktet. Det reduserende substratet kan være aromatiske fenoler, fenoliske syrer, indoler, aminer og sulfonater.<sup>46</sup>

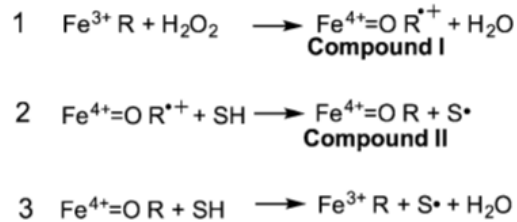
Reaksjonen mellom hydrogenperoksid og innskuddsmetaller kan danne giftige hydroksylradikaler via Fenton-reaksjonen, skjema 13.<sup>47</sup>



Skjema 13. Fenton-reaksjonen.

Hydroksylradikaler kan potensielt skade organismer i reaksjon med organiske forbindelser. For å unngå hydroksylradikaler i det aktive setet velger hem enzymet alltid heterolyse.<sup>47</sup>

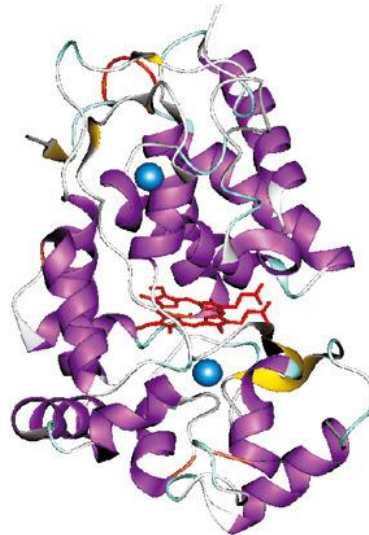
Katalysen skjer i hem-gruppen og involverer jern (III), skjema 14. Første steg baserer seg på at peroksidet fjerner et elektron fra jern og et fra R gruppen. Det dannes et radikal. I det andre steget gir substratet fra seg et elektron til forbindelse 1. I det siste steget reduserer et annet substrat jern (IV) tilbake til jern (III). Histidin som er bundet til jernet i hem gruppen fungerer som en syre-base katalysator. Den fremmer heterolyse.<sup>47</sup>



Skjema 14. Katalyse i hem-gruppen.<sup>47</sup>

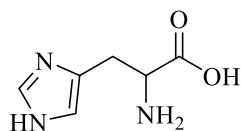
### 1.5.1.1 Peroksidase fra pepperrot

Peroksidase fra pepperrot (HRP), figur 15, benyttes eksempelvis i kliniske diagnoser og immunoassays. Dannelsen av radikaler viser en mulig funksjon i planter som påvirker de levende reaksjonene, eksempelvis biosyntese av lignin. Pepperrot inneholder flere unike peroksidase isoenzymer.<sup>46</sup> Isoenzymer er enzymer som har samme katalytiske funksjon, men ulik oppbygning.<sup>48</sup> C isoenzymet (HRP C) er den vanligste av isoenzymene og den som har blitt studert mest.<sup>46</sup>



Figur 15. Tredimensjonal representasjon av HRP C. Hem-gruppen er farget i rødt, kalsiumatomer er blå sfærer,  $\alpha$ -heliksene er lilla og  $\beta$ -platene er gule.<sup>46</sup>

HRP C består av en polypeptidkjede med 308 aminosyrer. Det er to metaller i HRP C, jern i hem-gruppen og to kalsium atomer. Disse er viktig for de strukturelle og funksjonelle aspektene i enzymet. Tap av kalsium atomer fører til nedsatt enzymaktivitet og termisk stabilitet. Dette kan oppdages spektroskopisk ved endringer i hem-miljøet. Den utsatte siden av hem gruppen, til venstre på figur 15, oksiderer aromatiske substrater. Histidin, figur 16, er bundet til hem-gruppen og fungerer som en stabilisator og syre-base katalysator.<sup>46</sup>



Figur 16. Strukturen til histidin.

Aminosyrene i enzymet påvirker stabiliteten, reaksjonsevnen og optimal surhetsgrad. Strukturen består av et flertall av  $\alpha$ -helikser, men den har små områder med  $\beta$ -plater.<sup>46</sup>

### 1.5.2 Immobilisering av enzymer

Immobilisering av enzymer ble først oppdaget i 1926. Immobilisering av enzymet invertase viste lignende aktivitet som mobilt enzym når det ble absorbert på en bærer. Dette funnet er grunnlaget for teknikkene som blir brukt i dag. I dag benyttes immobiliserte enzymer til kommersielt bruk. I matindustrien benyttes de i melkeprodukter og nedbryting av karbohydrater til monosakkarider. Helsevesen, farmasøytiske bedrifter og kjemisk industri benytter også immobiliserte enzymer i større grad.<sup>49</sup>

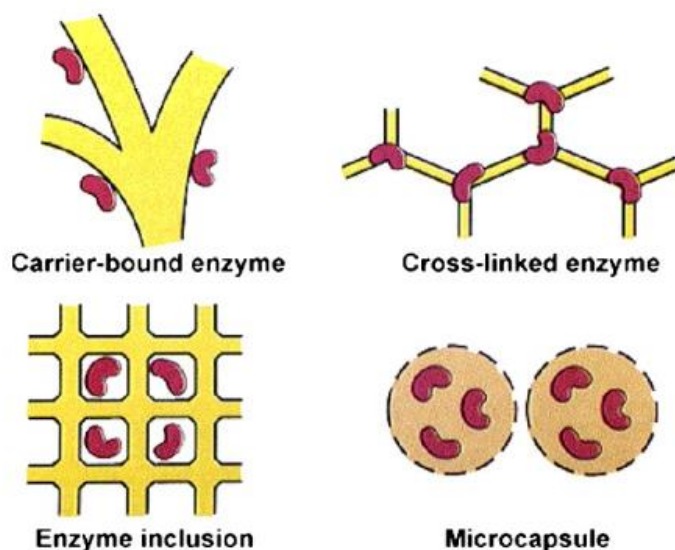
Immobilisering av enzymer er en metode der enzymet festes på eller i en bærer. Enzymer er vanligvis festet til cellulære cytoskjelett, membraner og organeller, som bæreren prøver å etterligne. Bæreren bør være biokompatibel og stabilisere strukturen til enzymet slik at de katalytiske aktivitetene blir ivaretatt. Immobiliserte enzymer er mer robuste og tåler bedre endringer i temperatur og pH sammenlignet med mobile enzymer som fort kan denatureres. Immobiliseringen gjør det enklere å isolere enzymet og benytte det flere ganger. Mobile enzymer er dyre og krevende å isolere og vaske sammenlignet med andre katalysatorer. Ulempene med immobiliserte enzymer er at de i gjennomsnitt har lavere aktivitet og høyere Michaelis-konstant fordi det er dårligere tilgang til substratet.<sup>49</sup>

Michaeliskonstanten ( $K_M$ ) brukes i å beregne hastigheten ( $V$ ) for enzymkatalyserte reaksjoner.  $K_M$  er lik den konsentrasjonen av substratet som gir halvparten av maksimal hastighet.  $V_{maks}$  er den høyeste hastigheten som er mulig å oppnå og  $S$  er substratkonsentrasjonen<sup>50</sup>

$$V = \frac{V_{maks} \times [S]}{K_M + [S]}$$

Ulike metoder benyttes for immobilisering av enzymer, figur 17. Den første er ikke kovalent adsorpsjon der enzymet fester seg på utsiden av et inert materiale. Den andre metoden er innesperring der enzymet fanges i et polymernetverk. Syntesen av polymeren skjer med enzymet til stede. Den tredje metoden er kovalentbinding mellom bæreren og enzymet, oftest

med funksjonelle grupper på enzymets overflate. Den siste metoden er biomolekylære interaksjoner mellom proteiner eller proteiner og små molekyler.<sup>49</sup>



Figur 17. Metoder for immobilisering av enzymer.<sup>49</sup>

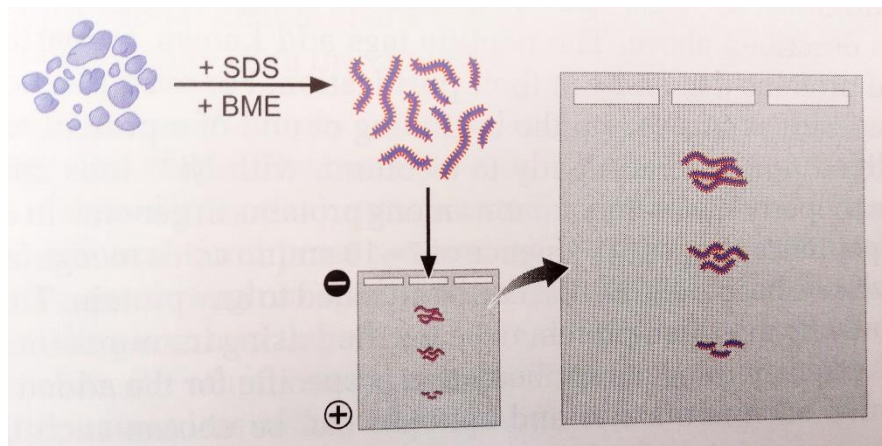
De ulike metodene har sine fordeler og ulemper avhengig av enzymet, substratet og produktet. Adsorpsjon er billig, effektivt og enkelt, men kan være reversibel. Kovalente binding og biomolekylære reaksjoner er effektive og stabile, men kan være dyre og påvirke enzymaktiviteten negativt. Innesperring kan påvirkes av diffusjonsproblemer.<sup>49</sup>

### 1.5.3 Elektroforese

Elektroforese er en prosess som bruker ladningen til partikler under påvirkning av et elektrisk felt til å analysere og separere kjemiske forbindelser. Ved et konstant elektrisk felt vil partiklene bevege seg med en konstant hastighet. Hastigheten påvirkes av feltstyrken, viskositeten til løsningen og partiklenes ladning, form og størrelse. Forskjellige partikler beveger seg med ulik hastighet ved elektroforese som gjør det mulig å separere eksempelvis proteiner i sammensatte blandinger.<sup>51</sup>

Elektroforese kan utføres i vann der det benyttes løste elektrolytter som kan holde en jevn surhetsgrad. Forbindelsene som skal separeres er da pH-avhengige.<sup>51</sup> Ved gelelektroforese benyttes en gel laget av agarose eller polyakrylamid som medium for forbindelsene, figur 18. Gelen har flere brønner der prøvene appliseres. Negativt ladete partikler vil bevege seg nedover gelen mot anoden. Porestørrelsen og konsentrasjon av gelmaterialet påvirker hastigheten til partiklene.<sup>52</sup>

Proteinene kan synliggjøres på gelen enten ved å farges med Coomassie brilliant blue eller ved bruk av UV. Coomassie brilliant blue binder seg til aminosyrene og farger de, deretter tas det bilde av gelen. UV baserer seg på fluorescensen til spesifikke aminosyrer som eksempelvis tryptofan.

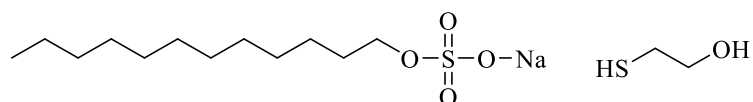


*Figur 18. Separasjon av proteiner på basis av molvekt på gelelektroforese.<sup>53</sup>*

Separering og identifisering av biomolekyler, eksempelvis peptider, proteiner og DNA, kan gjøres ved bruk av elektroforese. Dette er viktig innen fagområder som biokjemi, medisin og molekylærbiologi. For å bestemme molvekten til proteiner benyttes SDS-polyakrylamid gelelektroforese.<sup>51</sup>

### 1.5.3.1 SDS-polyakrylamid gelelektroforese

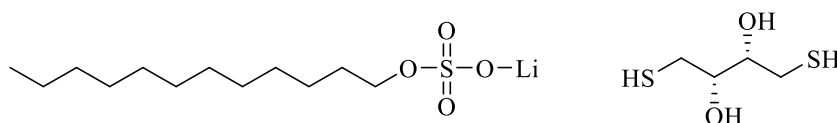
Proteiner er bygget opp av 20 ulike og unike aminosyrer. Aminosyrer har varierende polaritet, noen er positive mens andre kan være negative. Som nevnt tidligere er proteiner komplekse molekyler bestående av sekundære-, tertiære- og kvartærstrukturer. Ved å tilsette natriumdodecylsulfat (SDS) og et reduserende middel, som eksempelvis  $\beta$ -mercaptoetanol (BME), figur 19, denatureres proteinet.<sup>53</sup>



*Figur 19. Strukturen til SDS og BME.*

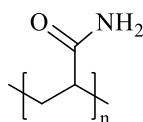
Proteinet denatureres fordi SDS, som er en overflateaktiv anion-detergent, bryter protein-protein og protein-fettbindinger.<sup>54</sup> SDS har en C<sub>12</sub> hale som gjennom hydrofobe interaksjoner binder med de ikke-polare områdene på proteinet. Det polare hodet gir en netto negativ ladning til hele komplekset.<sup>55</sup> BME reduserer disulfidbindingene mellom cysteiner ved å

forstyrre intramolekylære og intermolekylære bindinger mellom disse.<sup>53</sup> Ved denaturering omgjøres proteinet fra en kvartærstruktur til stive polypeptider.<sup>54</sup> Litium dodecylsulfat (LDS) kan substituere SDS spesielt ved lave temperaturer og dithiothreitol (DTT) kan erstatte BME, figur 20.<sup>56</sup>



Figur 20. Strukturen til LDS og DTT.

Det denaturerte proteinet dekket av SDS appliseres på polyakrylamid-gelen og kjøres ved en gitt spenning optimal for ønsket protein.<sup>54</sup> Polyakrylamid, figur 21, er et vannløselig polymer som danner en gel ved fornettede kopolymerer av akrylamid.<sup>57</sup>



Figur 21. Strukturen til polyakrylamid.

### 1.5.3.2 Enzymassay

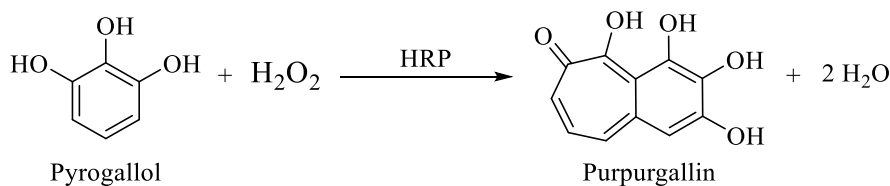
Enzymassay bestemmer mengde enzym i en prøve enten kvalitativt eller kvantitativt. Kvalitativbestemmelse blir gjennomført med en standard katalytisk reaksjon for det gitte enzymet. Resultatet er enten positivt eller negativt. Kvantitativbestemmelse avgjør innholdet av enzym i en prøve. Produktet akkumuleres i mengder over tid sammenlignet med den konstante enzymkonsentrasjonen. Dette gjør det mulig å måle aktiviteten og enzymkonsentrasjonen i en løsning.<sup>58</sup>

Enzymaktiviteten kan observeres ved fargeendring. For reproduserbarhet benyttes eksempelvis et spektrofotometer for å bestemme fargeintensiteten ved bruk av UV.<sup>58</sup> Beer-lamberts lov benyttes for å finne absorbansen til et stoff som er proporsjonal med konsentrasjonen. Stoffet må kunne absorbere elektromagnetiskstråling for å kunne benytte denne metoden.<sup>59</sup>

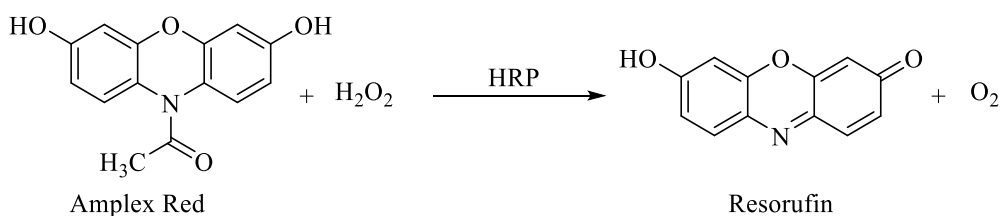
$$A = l \times c \times \varepsilon$$

A er absorbansen, l er lengden på kyvetten, c er molar konsentrasjon av forbindelsen og  $\varepsilon$  er molar absorptivitet som er unik for den kjemiske forbindelsen.<sup>59</sup> HRP har  $\varepsilon_{403\text{nm}}$  lik  $100\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ .

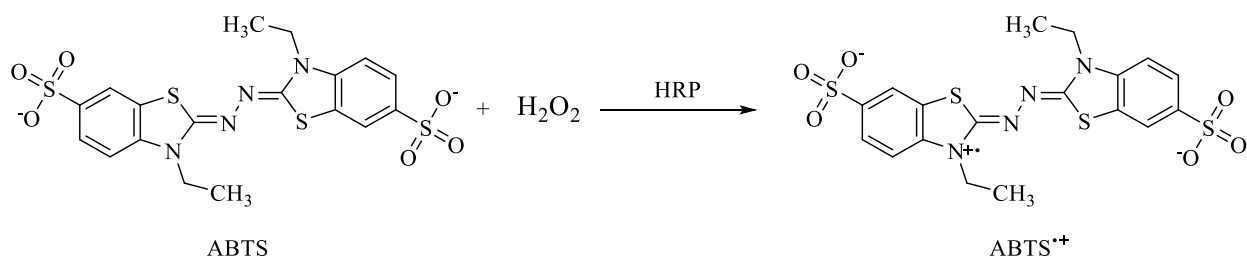
Substratet som brukes må gi en karakteristisk fargeendring som kan detekteres spektrofotometrisk.<sup>46</sup> Eksempler på enzymassayer for HRP er pyrogallol, amplex red og 2,2'-Azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), skjema 15, 16 og 17.



Skjema 15. Dannelse av purpurgallin fra pyrogallol og hydrogenperoksid med HRP som katalysator.



Skjema 16. Dannelse av resorufin fra amplex red og hydrogenperoksid med HRP som katalysator.

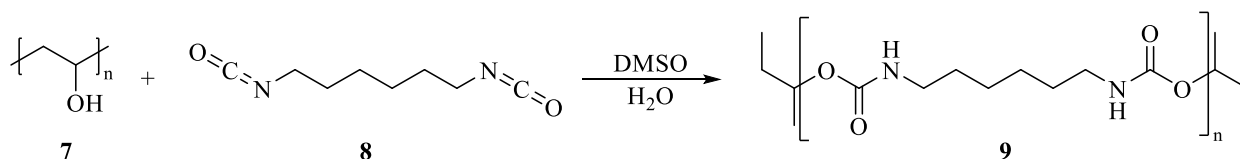


Skjema 17. Dannelse av ABTS<sup>•+</sup> fra ABTS og hydrogenperoksid med HRP som katalysator.

Disse standard enzymassayene er testet og brukt mye med mobilt enzym. Ved immobilisert enzym måles innholdet av enzym i løsningen før og etter immobilisering, dette er en unøyaktig metode. Å teste aktiviteten til immobilisert enzym mangler en god metode ved bruk av konvensjonell spektrofotometri grunnet bruken av en bærer. Det er vanskelig å måle konsentrasjonen av det aktive setet fordi det ikke er tilgjengelig for bruk av biokjemiske teknikker.<sup>60</sup>

## 2. Resultater og diskusjon

### 2.1 Syntese av PU mikropartikler fra isocyanat HDI og polyol PVA og immobilisering av HRP



Skjema 18. Syntese av PU mikropartikler (9) med polyaddisjon fra PVA (7) og HDI (8).

Budriene *et al.*<sup>2</sup> har tidligere utført syntese av PU mikropartikler med konvensjonell oppvarming som ga gode resultater, skjema 18. De samme betingelsene ble benyttet på første syntese med mikrobølger for å bekrefte at reaksjonen var mulig å gjennomføre i en mikrobølgereaktor. Dimetylsulfoksid (DMSO) ble benyttet som løsemiddel fordi den har tan  $\delta$ -verdi på 0.825. Det defineres som et godt løsningsmiddel med høy mikrobølgeabsorpsjon.

I syntese av PU mikropartikler ble det benyttet 0.026 g PVA og 0.43 g HDI. Syntesen av PU mikropartikler med mikrobølger i 90 minutter ga gode resultater med et utbytte på 0.759 g, tabell 5. Konvensjonell oppvarming (K-1) ga et utbytte på 4,803 g. Prøvene syntetisert i 90 minutter er sammenlignbar med K-1, når oppløst i 1:1 dietyler og aceton, i form av farge og synlige partikler. IR og <sup>1</sup>H NMR bekrefter at det samme produktet er fremstilt med begge metodene. Beholderen som ble brukt i mikrobølgereaktoren var 2-5 mL og mengden reagens var 1/6 av mengden benyttet med konvensjonell oppvarming. Å utføre syntesen med mikrobølger er ikke lønnsomt med de samme betingelsene som for konvensjonell oppvarming, så tiden må reduseres.

Prøvene syntetisert i 90 minutter har en fastere konsistens etter syntese sammenlignet med konvensjonell oppvarming. Det kan være forårsaket av reaksjonstiden og konstant temperatur i mikrobølgereaktoren. Mikrobølger appliserer energi rett i løsningen relativt momentant og holder en jevn og stabil temperatur gjennom hele prosessen, som kan føre til dannelsen av eventuelle forgreninger og nettverkspolymerer.

IR-spektrene av PU mikropartikler gir like signaler for syntese med mikrobølger og konvensjonell oppvarming. Signalet ved 3333 cm<sup>-1</sup> kan korrespondere med NH-gruppen i uretan bindingene. I regionen 2930 og 2852 cm<sup>-1</sup> kan det være CH<sub>2</sub>-gruppene i polypeptidkjeden. Signalet 1622 cm<sup>-1</sup> kan korrespondere med C=O i uretan bindingene. Det siste signalet, 1577 cm<sup>-1</sup>, kan være sekundæraminet -CONH- som er en del av uretan gruppen.



$^1\text{H}$  NMR-spektrene av PU mikropartiklene gir like signaler for syntese med mikrobølger og konvensjonell. De har en karakteristisk topp ved  $\delta$  2.55 som er DMSO. Toppene ved  $\delta$  1.35-1.05 kan indikere C-H gruppene i polypeptidkjeden. Protonene ved siden av nitrogenet og mulig vann kan være signalene ved  $\delta$  3.00-2.95. Spektrene for mikrobølge PU mikropartikler og konvensjonell PU mikropartikler viser samme grad av renhet.  $^{13}\text{C}$  NMR spektere ble tatt opp, men ga ingen tydelige signaler grunnet støy.

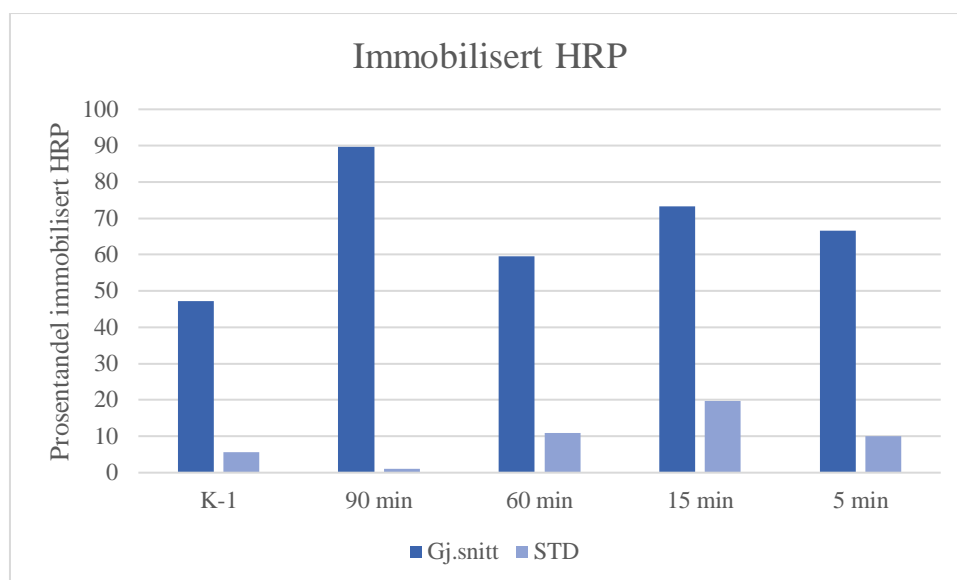
Videre forsøk baserte seg på å redusere tiden til syntesen. Det vil effektivisere prosessen og muligheten for mer utbytte basert på tid. Reaksjonene på 60 minutter, 15 minutter og 5 minutter ga sammenlignbare resultater som 90 minutter etter syntese og etter tilsetning av 1:1 dietyleter og aceton. Konsistensen på prøvene etter syntese ble mindre fast når reaksjonstiden ble kortere. På alle reaksjonene ble det benyttet «*hold time*» for et mer reproducerbart resultat.

Tabell 5. Syntese av PU mikropartikler med mikrobølger med endring av tids betingelsene og gjennomsnittlig utbytte av parallellene.

	AL-01,02,03	AL-04,05,06	AL-07,08	AL-09,10,11
Tid (min)	90	60	15	5
Gj.snitt. utbytte (g)	0.759	0.884	0.977	1.11

Prøvene ble homogenisert med morter, men PU mikropartikler syntetiser med mikrobølger hadde en synlig større variasjon av partikkelstørrelser etter homogenisering sammenlignet med konvensjonell oppvarming. Noen partikler klumpet seg, og andre var større flak som kan være forgreninger grunnet for lang syntesetid. PU mikropartiklene fra konvensjonell oppvarming liknet på pulver.

Immobilisering av HRP ble gjort med 0.05 g PU mikropartikler. Figur 22 viser at syntese i 90 minutter, 60 minutter, 15 minutter og 5 minutter har høyere immobiliseringsprosent sammenlignet med K-1. Siden  $^1\text{H}$  NMR viste lik grad av renhet kan årsaken være partikkelstørrelsen på PU mikropartiklene. Budriene *et al.*<sup>2</sup> rapporterte at PU mikropartikler mellom 10  $\mu\text{m}$  og 50  $\mu\text{m}$  hadde høyere immobiliseringsprosent. Det er mulig at uttaket av PU mikropartikler syntetisert med mikrobølger inneholder større andel optimale mikropartikler.



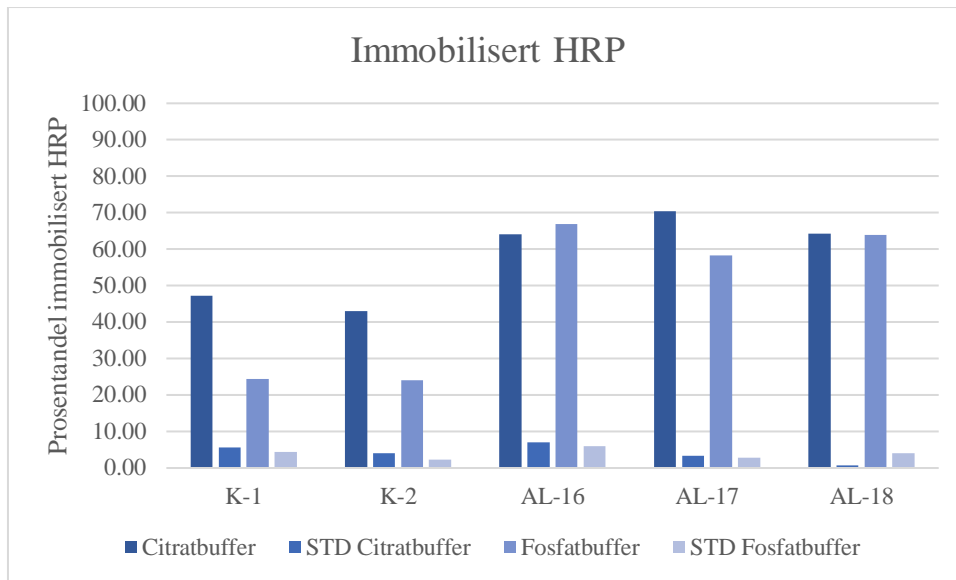
Figur 22. Gjennomsnittlig immobiliseringsprosent og standardavvik for de ulike tids betingelsene ved syntese av PU mikropartikler med mikrobølger.

## 2.2 Immobilisering av HRP i citratbuffer og fosfatbuffer, og forsøk på måling av enzymaktiviteten med pyrogallol enzymassay.

Immobilisering av HRP ble basert på Budriene *et al.*<sup>2</sup> sitt arbeid med enzymet maltogenase der de benyttet citratbuffer med pH 5. I beskrivelsen av pyrogallol enzymassayet benyttes fosfatbuffer med pH 6 for immobilisering. Enzymaktiviteten påvirkes av surhetsgraden til løsningen og for å optimalisere metoden ble begge bufferne testet på samme prøver.

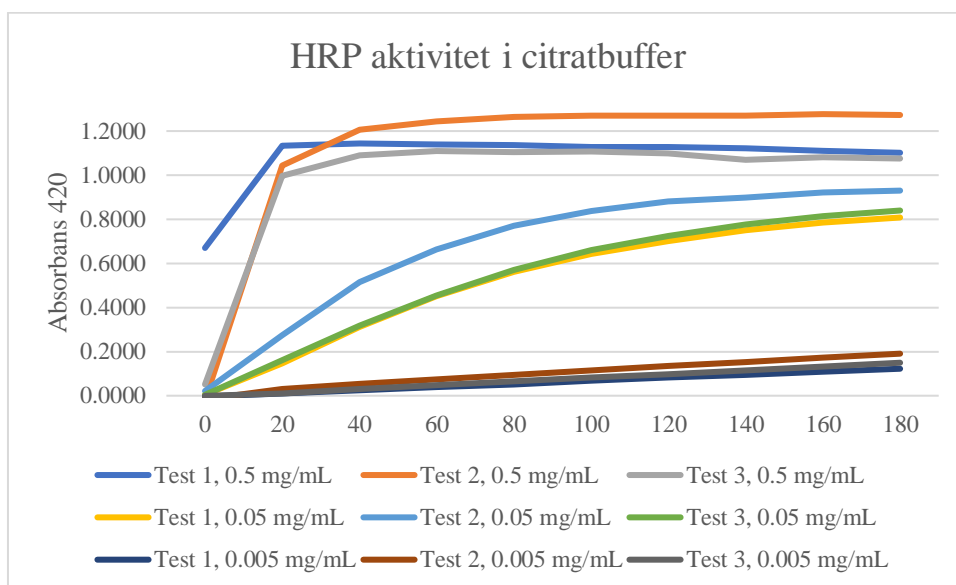
PU mikropartikler syntetisert i 15 minutter med mikrobølger ble benyttet fordi <sup>1</sup>H NMR spekteret viste en mer fullstendig reaksjon sammenlignet med prøvene syntetisert i 5 minutter. Utbyttet var sammenlignbart med de tidligere syntesene. Det ble også benyttet PU mikropartikler syntetisert med konvensjonell oppvarming (K-1 og K-2) for å kunne sammenligne med PU mikropartikler syntetisert med mikrobølger.

Figur 23 viser at citratbuffer i gjennomsnitt har høyere grad av immobilisering sammenlignet med fosfatbuffer. Den viser at K-1 og K-2 blir mer påvirket av endring av bufferen enn prøvene med PU mikropartikler syntetisert med mikrobølger, AL16, AL-17 og AL-18. Prøvene K-1 og K-2 har i gjennomsnitt en immobiliseringsprosent på 45 % i citratbuffer mot 24 % i fosfatbuffer. Surhetsgraden påvirker egenskapen til å ta imot eller avgi protoner som kan påvirke bindingsevnen mellom HRP og PU mikropartiklene.

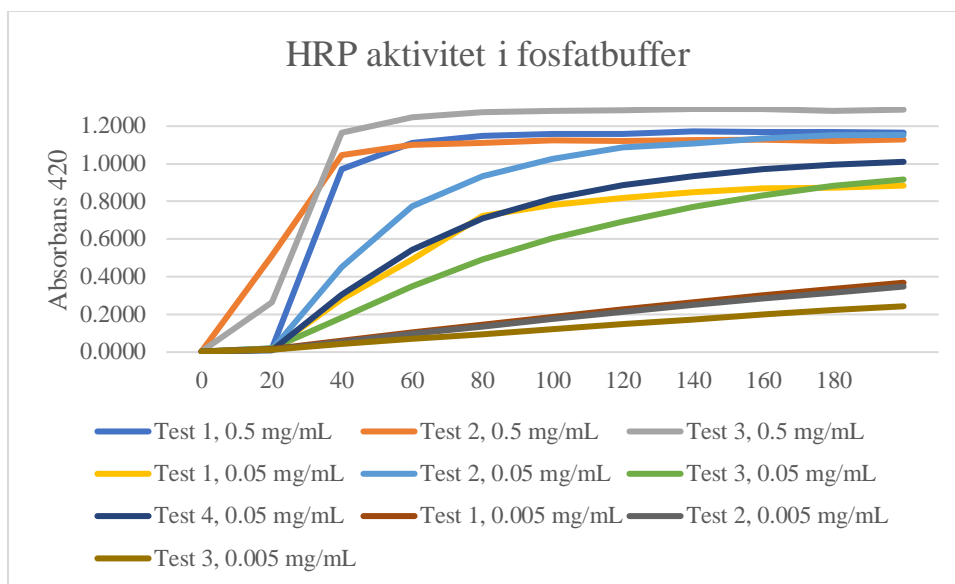


Figur 23. Immobilisert HRP i citratbuffer og fosfatbuffer.

Pyrogallol enzymassay ble benyttet for å teste enzymaktiviteten til HRP. Pyrogallol omgjøres til purpurgallin som har en karakteristisk gul farge. Dannelsen av purpurgallin detekteres spektrofotometrisk med UV/vis. Enzymassayet krever en endring i absorbansen på mellom 0.18-0.34 de første 20 sekundene av reaksjonen. Mobilt HRP i både citratbuffer og fosfatbuffer ble testet. Figur 24 og 25 viser begge at en enzymkonsentrasjon på 0.05 mg/ml gir ønsket endring i absorbansen de første 20 sekundene. Fosfatbufferen viste større variasjon i absorbans for parallellene og lavere gjennomsnittlig immobiliseringsprosent, så citratbuffer ble benyttet videre.



Figur 24. Måling av enzymaktiviteten til mobilt HRP i citratbuffer med UV/vis ved abs 420.

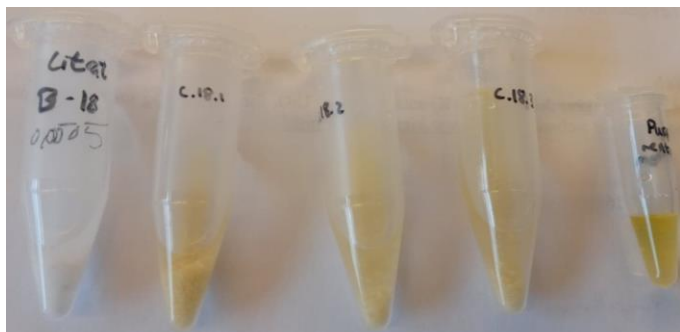


Figur 25. Måling av enzymaktiviteten til mobilt HRP i fosfatbuffer med UV7vis ved abs 420.

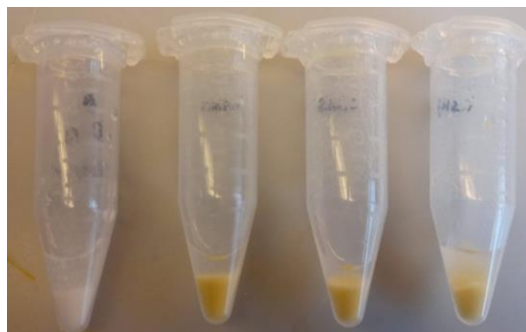
På bakgrunn av immobiliseringsprosenten ble prøvene AL-18 og K-1 i citratbuffer benyttet for å teste enzymaktiviteten til immobilisert HRP med pyrogallol enzymassay. For å starte reaksjonen må  $H_2O_2$  tilsettes prøven etterfulgt av homogenisering av løsningen. Homogenisering er spesielt viktig når partikler benyttes fordi de samler seg på bunnen av kyvetten. Dette kan påvirke reaksjonshastigheten fordi ikke alt enzymet er like tilgjengelig. Homogenisering av prøven og mikropartikler i løsningen medfører at reaksjonen ikke kan skje direkte i kyvetten fordi mikropartiklene endrer lysspredningen i løsningen som gir støy i spekteret. På grunnlag av dette ble det tatt uttak hvert minutt.

Som tidligere nevnt tar pyrogallol enzymassayet utgangspunkt i at reaksjonen er optimal hvis endringen i absorbans er på mellom 0.18-0.34 de første 20 sekundene av reaksjonen. Denne endringen ble oppnådd når 10  $\mu$ L 0.05 mg/mL mobilt HRP ble tilsatt prøvene. Sluttkonsentrasjonen til immobilisert HRP er vanskelig å finne ut når den er festet til en bærer, så samme mengde ble tatt ut av en homogenisert prøve med immobilisert HRP som med mobilt HRP.

Figur 24 og 25 viser at enzymaktiviteten er eksponentiell og endrer seg raskt det første minuttet. Uttak hvert minutt gir ikke mulighet til å se endring i absorbansen de første 20 sekundene, så om endringen lå innenfor 0.18-0.34 kan ikke bekreftes og gir ikke et nøyaktig svar på enzymaktiviteten. Noen prøver viste nedgang i absorbans mellom 0 min og 1 min som viser at metoden ikke er optimal.



Figur 27. Pyrogallol enzymassay for prøve AL-18



Figur 26. Pyrogallol enzymassay for prøve K-1

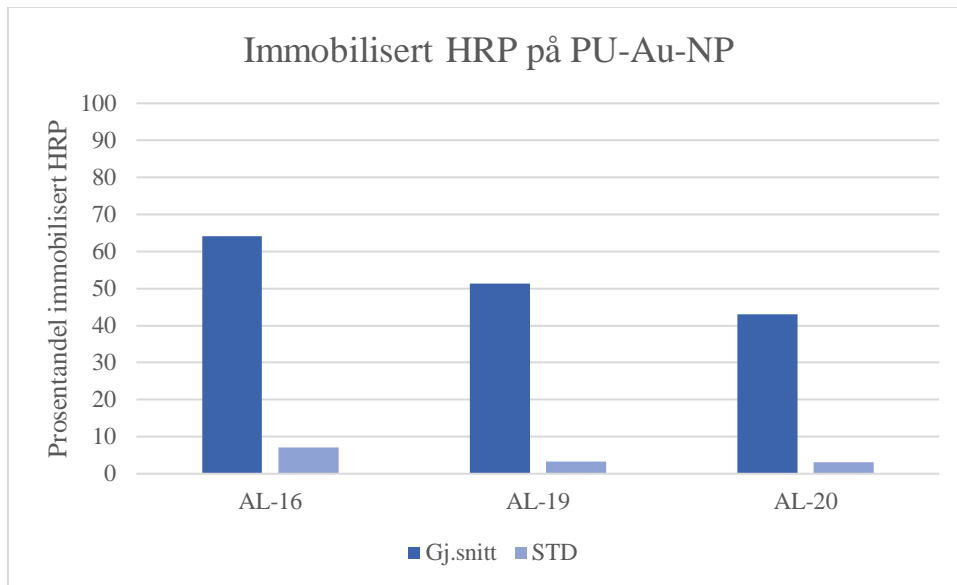
Prøvene viser en tydelig fargeendring fra blank til gul, figur 26 og 27, men det så ut til at mikropartiklene endret farge fra hvit til gul som kan bety at purpurgallin ble sittende fast på mikropartiklene. Fargeendring på mikropartiklene kan være forårsaket av endringer i det aktive setet til HRP da det ble immobilisert slik at produktet ikke frigis. Det kan antas at immobiliseringen fungerte, men kan ikke bekreftes. Citratbuffer ble benyttet i videre forsøk.

### 2.3 Immobilisering av HRP på PU-Au-NP og forsøk på måling av enzymaktiviteten med pyrogallol enzymassay

Ramanaviciene *et al.*<sup>1</sup> har tidligere immobilisert enzymer på PU-Au-NP som ga gode resultater. På grunnlag av dette ble det testet på PU mikropartikler syntetisert med mikrobølger.

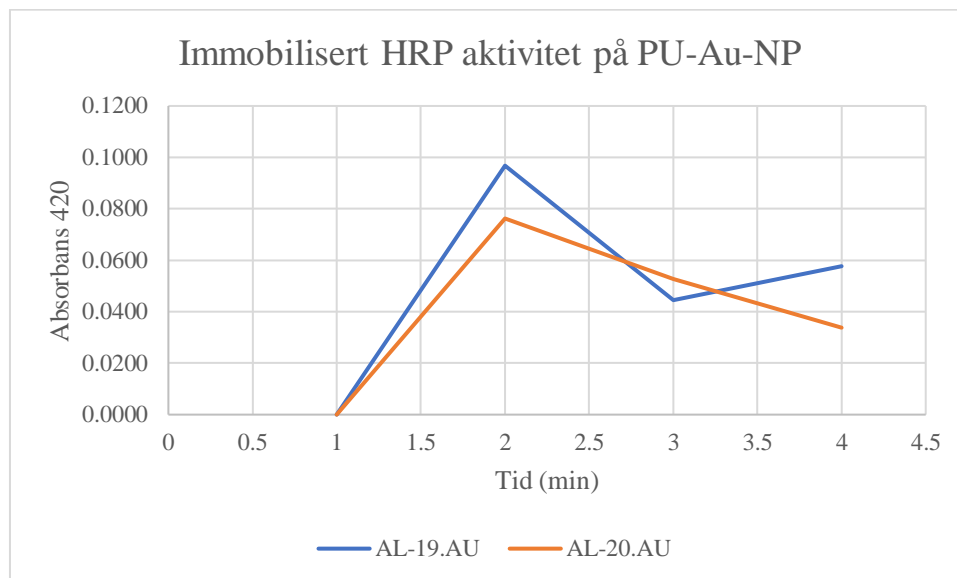
PU-Au-NP konjugatene viste fargeendring 10 minutter etter PU mikropartiklene ble tilsatt gull-løsningen. Løsningen fikk en lilla farge som tidligere rapportert av Ramanaviciene *et al.*<sup>1</sup>. På grunnlag av fargeendringen ble det antatt at det ble dannet PU-Au-NP konjugater. De ble filtrert og vasket med vann for videre immobilisering. Fargen vedvarte etter vasking.

Figur 28 viser at prosentandelen immobilisert HRP på modifiserte PU mikropartikler, AL-19 og AL-20, er lavere enn på ikke modifiserte PU mikropartikler, AL-16. Ramanaviciene *et al.*<sup>1</sup> benyttet Au-NP med forskjellig diameter der nanaopartiklene med en diameter på 13 nm viste bedre immobilisering. Diameteren på Au-NP ble ikke målt i dette forsøket. Det kan være mulig at størrelsen på nanopartiklene ikke var optimale som påvirket binding av HRP.



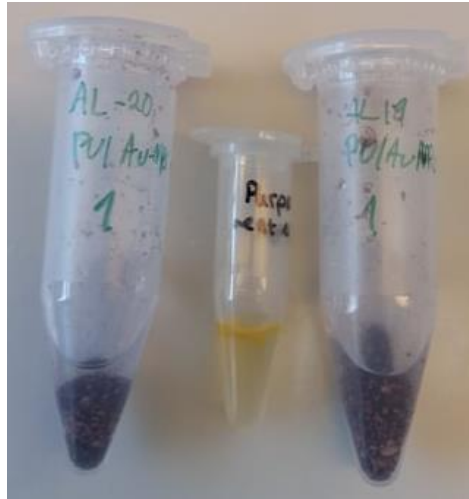
Figur 28. Prosentandel immobilisert HRP på PU mikropartikler og PU-Au-NP mikropartikler.

Videre ble enzymaktiviteten til PU-Au-NP testet med pyrogallol enzymassay. Figur 29 viser endring i absorbansen over tid. Endringen mellom 1 minutt og 2 minutter viser en negativ endring. Enzymaktivitet kunne ikke bekreftes med pyrogallol enzymassay.



Figur 29. Målt absorbans for pyrogallol enzymassay med PU-Au-NP.

Figur 30 viser ingen fargeendring i løsningen som indikerer at det ikke er enzymaktivitet. En mulig årsak kan være at bindingen mellom HRP og konjugatet ikke var sterk nok og HRP ble skylt vekk under vask. På grunn av tidsbegrensninger ble ikke flere forsøk gjennomført med PU-Au-NP konjugater.



Figur 30. Pyrogallol enzymassay for prøve AL-19 (h.) og AL-20 (v.).

## 2.4 Forsøk på optimalisering av immobiliseringsmetoden med HRP på SDS-page og måling av enzymaktivitet.

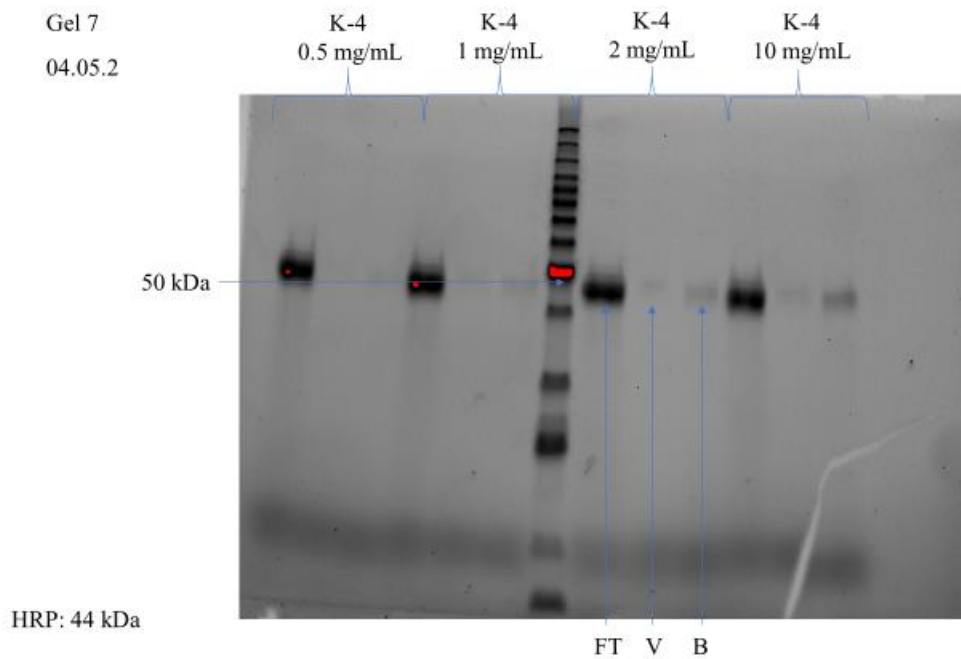
I 2.1.3 ble UV/vis benyttet for å måle hvor mye HRP som ble immobilisert på PU mikropartiklene. UV/vis tar utgangspunkt i forskjellen målt absorbans i supernatanten prøven med immobilisert HRP og prøven med mobilt HRP. Dette gir kun en omtrentlig immobiliseringsprosent fordi, som tidligere nevnt, det ikke er mulig å homogenisere prøven med immobilisert HRP grunnet mikropartiklene. På bakgrunn av dette ble SDS-page testet for å få en tydelig indikasjon på at immobiliseringen av HRP fungerte.

### 2.4.1 Økt mengde PU mikropartikler med til konstant konsentrasjon HRP og forsøk på måling av enzymaktivitet med amplex red enzymassay.

I første forsøk med immobilisering ble det benyttet 0.05 g PU mikropartikler for å immobilisere 1 mL, 5  $\mu$ M HRP. Dette var basert på Budriene *et al.* sin prosedyre. For å gjøre metoden enklere og mer nøyaktig ble det benyttet økt mengde PU mikropartikler i mg/mL og en konstant konsentrasjon HRP på 1 mg/mL, med en sluttkonsentrasjon på 0.5 mg/mL. Immobiliseringsprosessen ble gjennomført som i 2.1.

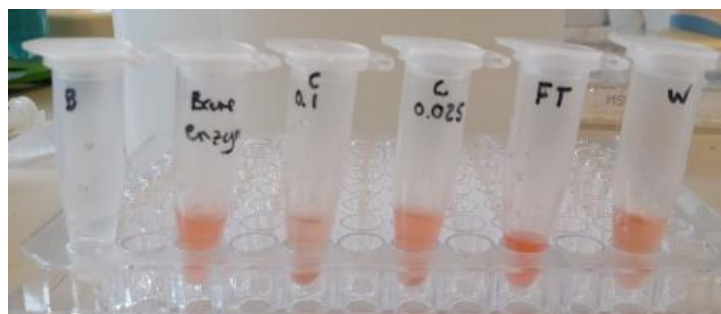
Det ble forsøkt flere immobiliseringer på både PU mikropartikler syntetisert med mikrobølger og PU mikropartikler syntetisert med konvensjonell oppvarming. PU mikropartikkelmengden var 0.25 mg/mL, 0.5 mg/mL, 1 mg/mL, 2 mg/mL og 10 mg/mL. Figur 31 viser gelbilde av prøve K-4 som er PU mikropartikler syntetisert med konvensjonell oppvarming. Prøve K-4 ble immobilisert med en PU mikropartikkelmengde på 10 mg/mL og var den eneste prøven som viste antydning til et bånd rundt 44kDa, som er der HRP forventes å ligge, i brønnen med bærer (B). Det kan antas at for lite PU mikropartikler, med en konstant konsentrasjon HRP, gir for få aktive NCO-grupper for enzymet til å binde seg i. På bakgrunn av dette og et tydelig bånd i

«flow through» (FT), som er mengden HRP som ikke festet seg til bæreren, ble neste immobilisering gjort med større mengder PU mikropartikler med samme konsentrasjon HRP.



Figur 31. Gelbilde for prøve K-4, 10 mg/mL

Grunnet fargeendring på PU mikropartiklene ved bruk av pyrogallol enzymassay ble enzymaktiviteten på prøve K-4 testet med amplex red enzymassay. Prøven viser en tydelig fargeendring fra blank til rosa, figur 32, men det så ut til at mikropartiklene endret farge fra hvit til rosa som kan bety at resorufin ble sittende fast på mikropartiklene. Fargeendring på mikropartiklene kan være, som med pyrogallol enzymassayet, forårsaket av endringer i det aktive setet til HRP da det ble immobilisert slik at produktet ikke frigis. Det kan antas at immobiliseringen fungerte, men kan ikke bekrefte.



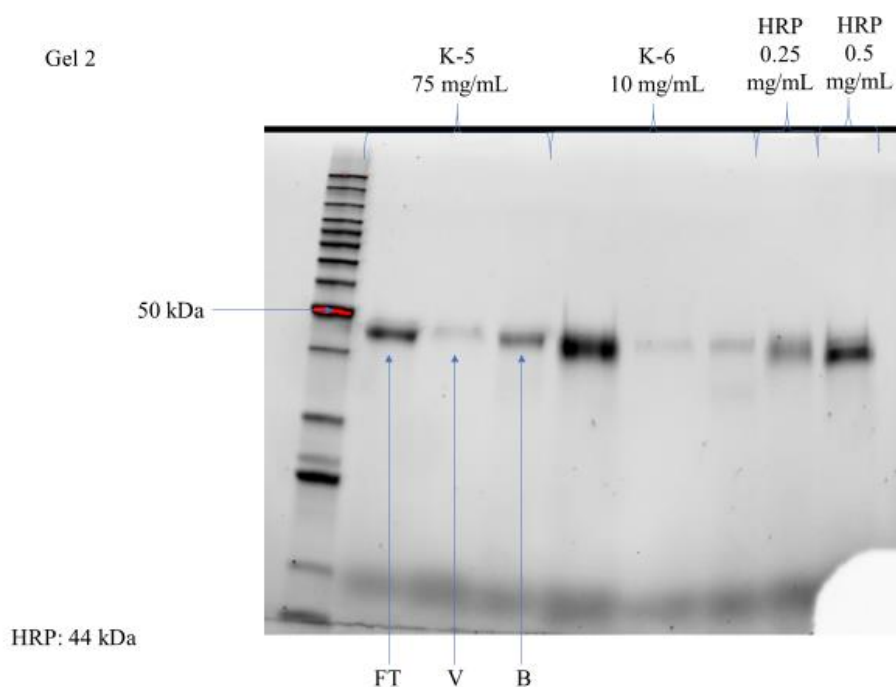
Figur 32. Amplex red enzymassay for prøve K-4, 10 mg/mL



#### 2.4.2 Økt mengde PU mikropartikler med konstant konsentrasjon HRP og forsøk på måling av enzymaktivitet med ABTS enzymassay.

Første forsøk med SDS-page som indikator på hvor mye HRP som ble immobilisert ga antydning til et bånd på prøven med 10 mg/mL PU mikropartikler syntetisert med konvensjonell oppvarming. På grunnlag av dette ble PU mikropartikler syntetisert med konvensjonell oppvarming brukt videre for å finne en mer optimal mengde PU mikropartikler med samme konsentrasjon HRP, på 1 mg/mL.

De ulike mengdene PU mikropartikler som ble testet var 10 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL og 75 mg/mL. Prøven K-5 med 75 mg/mL, figur 33, viser et tydelig bånd rundt 44 kDa sammenlignet med de andre konsentrasjonene. Det kan antas at økt mengde PU mikropartikler gir flere aktive NCO-grupper som kan danne flere bindinger med HRP og gi en høyere immobiliseringsprosent. På grunnlag av dette ble 75 mg/mL PU mikropartikler benyttet videre i forsøkene.



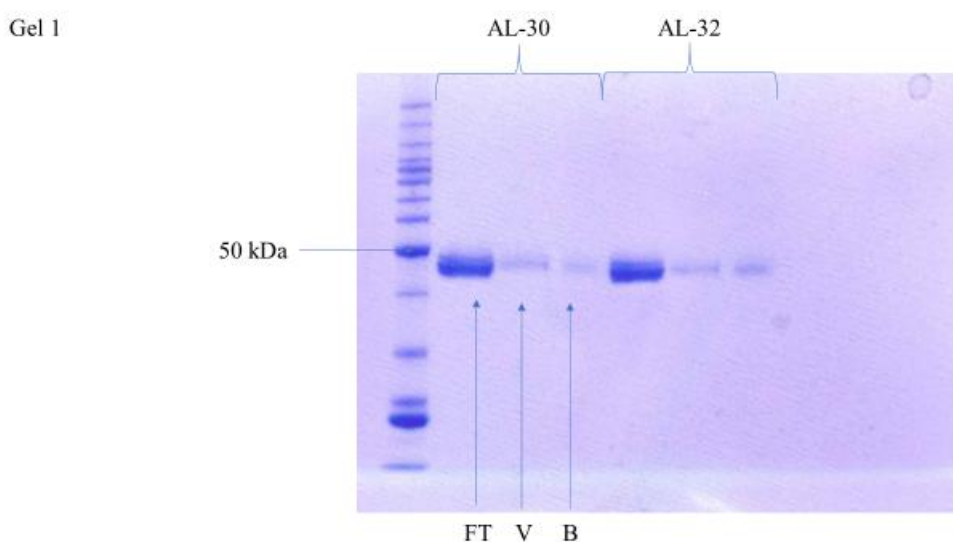
*Figur 33. Gelbilde for prøve K-5, 75 mg/mL.*

Etter gode resultater med 75 mg/mL PU mikropartikler syntetisert med konvensjonell oppvarming, ble samme mengde PU mikropartikler syntetisert med mikrobølger testet for immobilisering av HRP.

PU mikropartiklene ble syntetisert etter Arrhenius prinsippet. Sammenlignet med PU mikropartikler syntetisert konvensjonelt er mikropartiklene likere med hensyn på utseende og

følelsen ved homogenisering. Tidligere viste PU mikropartiklene syntetisert med mikrobølger tegn til å ha dannet forgreninger og dannelse av større flak som kan antas var større enn 500  $\mu\text{m}$ . På grunnlag av dette, og effektiviseringen, med kortere syntese tid, og relativt likt utbytte, ble PU mikropartikler syntetisert etter Arrhenius prinsippet benyttet videre i forsøkene.

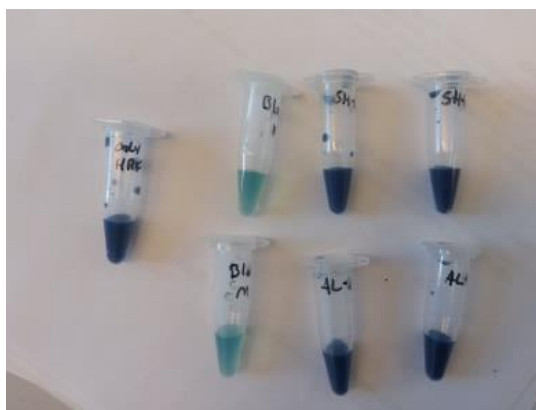
Prøvene AL-30 og AL-32 med 75 mg/mL, figur 33, viser antydning til bånd rundt 44 kDa. Sammenlignet med mindre konsentrasjoner PU mikropartikler, som ikke viste bånd ved 44 kDa, kan det indikere at immobilisering av HRP fungerte på PU mikropartikler syntetisert med mikrobølger når mengden PU mikropartikler økte.



HRP: 44 kDa

*Figur 34. Gelbilde for prøve AL-30 og AL-32.*

Grunnet fargingen av PU mikropartiklene ved bruk av amplex red enzymassay ble aktiviteten på prøve K-5 og AL-32 testet med ABTS enzymassay. Det så ikke ut som produktet ble sittende fast på PU mikropartiklene og ABTS enzymassayet ble benyttet i videre forsøk. Begge prøvene viser en tydelig fargeendring fra lys grønn til mørke blå, nesten sort, figur 34, så det kan antas at immobiliseringen fungerte, men kan ikke bekreftes.



Figur 35. ABTS enzymassay for prøve K-5(øverst) og AL-32(nederst).

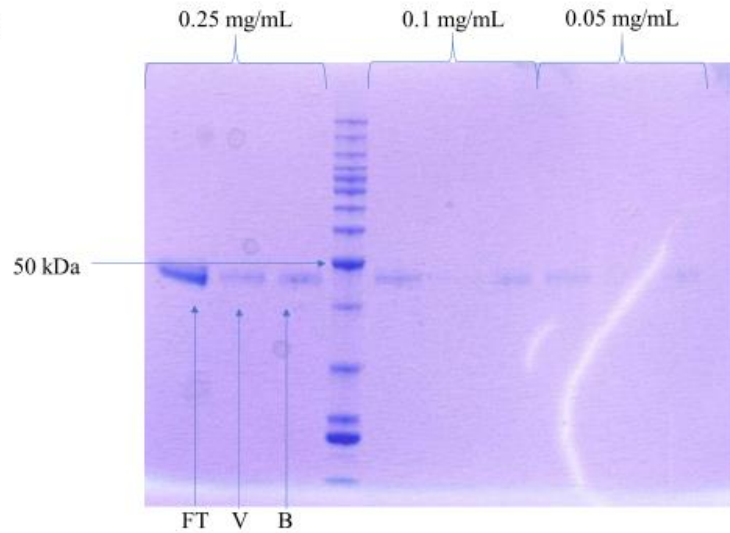
#### 2.4.3 Forsøk på å finne metningspunktet mellom PU mikropartikler og HRP konsentrasjonen.

Etter å ha økt mengden PU mikropartikler og holdt HRP konsentrasjonen konstant ble det forsøkt å finne et mulig metningspunkt i immobiliseringsprosessen. Tidligere gelbilder viste tydelige, sterke bånd rundt 44 kDa i brønnen med «flow through» (FT). Ved å minske HRP konsentrasjonen antas det at båndet i brønnen med FT blir svakere samtidig som det er et tydelig bånd i brønnen med immobilisert HRP.

Samme protokoll for immobilisering ble benyttet som i 2.1, men risting av prøven over natten ble testet for å øke det reaktive området med den hensikt å øke immobiliseringen. Den ene prøven ble satt i kjøleskap som tidligere og den andre ble satt i en Eppendorf ThermoMixer C ved 4 °C med risting. Gelbildene, figur 35 og 36, viser ingen markant forskjell i brønnen med immobilisert HRP, B.

Gelbildene viser ikke tydelige bånd i brønnene med immobilisert HRP som tidligere antatt. Hvis det var mulig å mette PU mikropartiklene ville brønnen med FT, vist et utydelig bånd. Det kan antas at reaksjonen kjører til en likevekt er oppnådd mellom PU mikropartiklene og HRP.

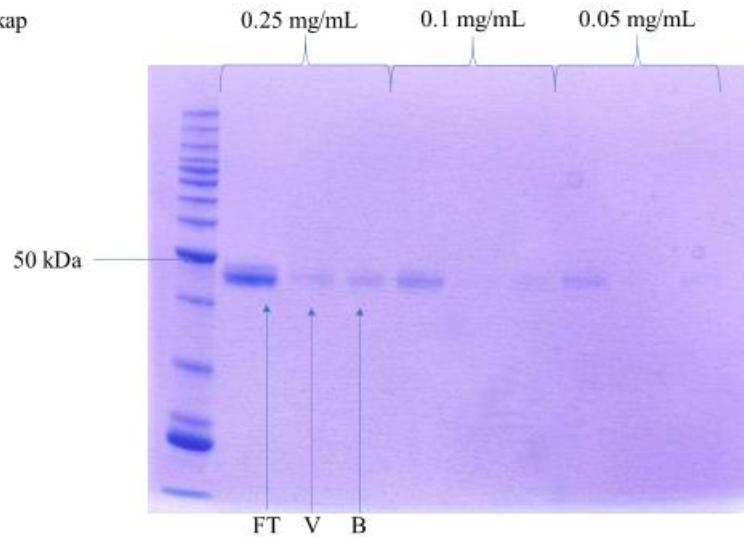
Gel 2, AL-32, risting



HRP: 44 kDa

*Figur 36. Gelbilde for prøve AL-32 med risting og minskende konsentrasjon HRP.*

Gel 1, AL-32, kjøleskap

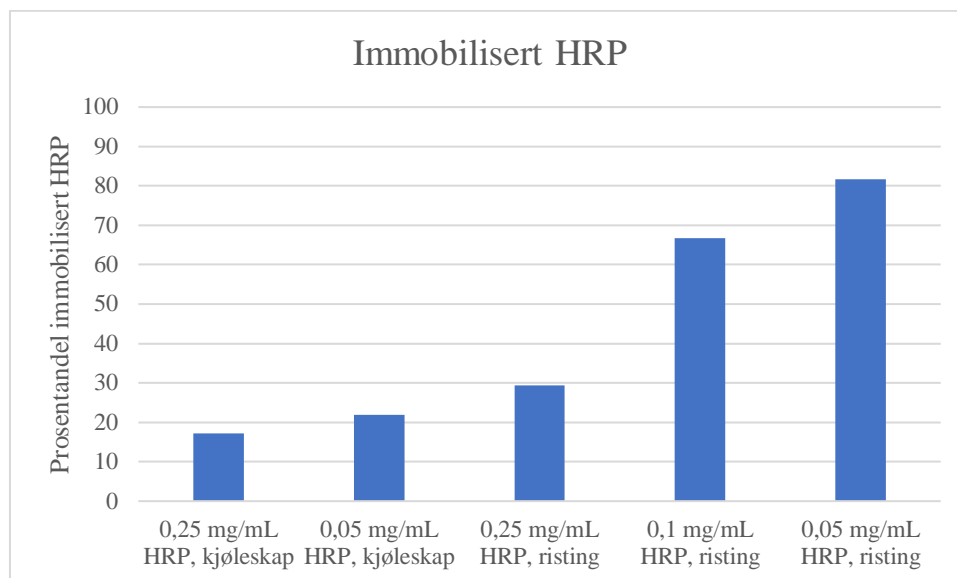


HRP: 44 kDa

*Figur 37. Gelbilde for prøve AL-32 i kjøleskap og minskende konsentrasjon HRP.*

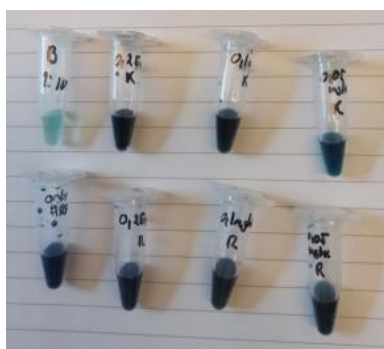
Nanodrop med UV/Vis ble benyttet for å regne ut en omtrentlig immobiliseringsprosent for alle prøvene fordi styrken på båndene på gelbildene ikke ga nok informasjon med tanke på immobiliseringsprosent. Sammenlignet med gelbildene, figur 36 og 37, var gjennomsnittlig immobiliseringsprosent for prøvene som ble ristet over natten høyere enn de som ble oppbevart i kjøleskapet, figur 38. På grunnlag av dette ble risting over natten benyttet for alle prøvene i

alle de resterende forsøkene. Bruk av Eppendorf ThermoMixer C gir også en mer repeterbar metode med tanke på at temperaturen er konstant og målbar.



Figur 38. Gjennomsnittlig immobiliseringsprosent målt med nanodrop for prøvene med konstant mengde PU mikropartikler og minskende konsentrasjon HRP.

Enzymaktiviteten til prøvene ble testet med ABTS enzymassay. Alle prøvene viser en tydelig fargeendring fra lys grønn til mørke blå, nesten sort, figur 39, så det kan antas at immobiliseringen fungerte, men kan ikke bekreftes.

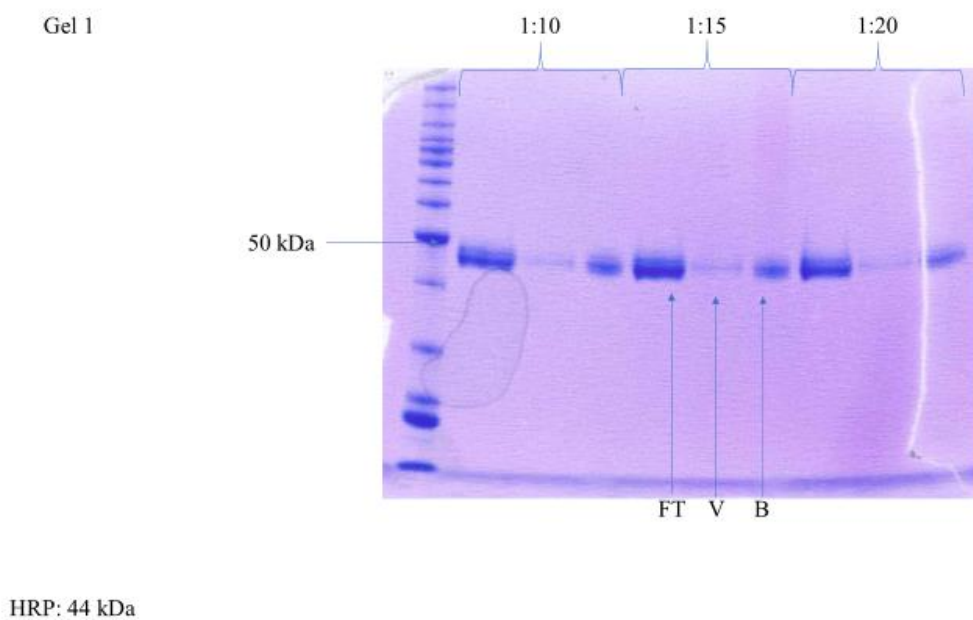


Figur 39. ABTS enzymassay for prøve AL-32 i kjøleskap(øverst) og med risting (nederst).

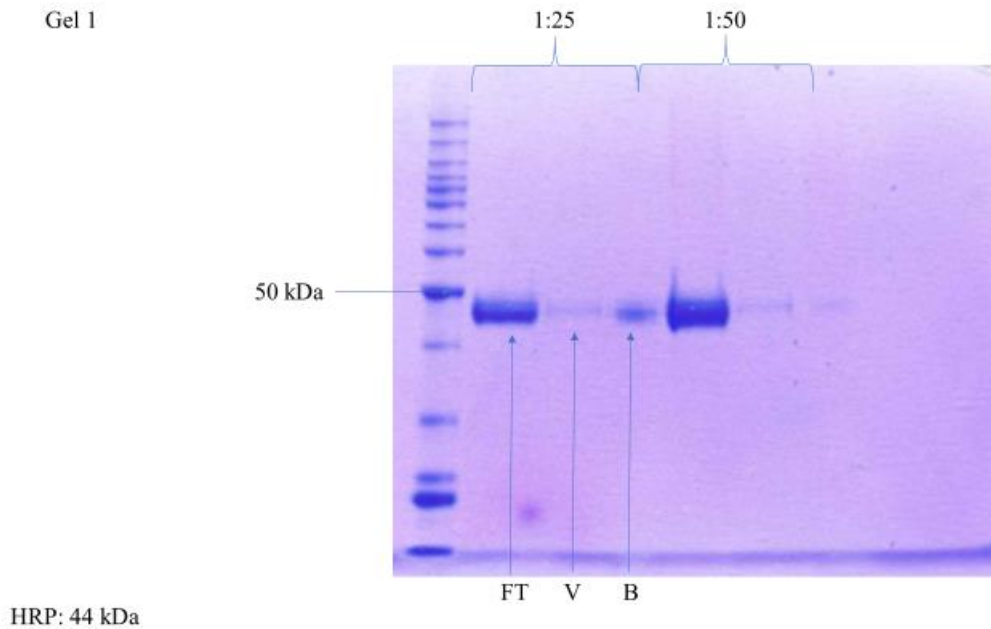
#### 2.4.4 Syntese av PU mikropartikler med konstant mengde PVA og økt mengde HDI.

På grunnlag av funnene om en mulig likevekt mellom PU mikropartiklene og HRP, ble det i videre forsøk benyttet 75 mg/mL PU mikropartikler og 1 mg/mL HRP. For å optimalisere immobiliseringen, med tanken om at flere aktive NCO-grupper vil øke immobiliseringen, ble forholdet mellom PVA og HDI endret. Tidligere PU mikropartikler er syntetisert med et forhold på 1:5 PVA og HDI. Det ble forsøkt å syntetisere PU mikropartikler med forhold på 1:10, 1:15, 1:20, 1:25 og 1:50 PVA og HDI.

Gelbildene, figur 40 og 41, viser god immobilisering i form av sterke tydelig bånd for prøvene med forhold på 1:10, 1:15 og 1:20 PVA og HDI i brønnene med immobilisert HRP (B). Det er mulig at et større antall aktive NCO-grupper, til en viss grad, binder mer HRP og gir en bedre immobiliseringsprosent. Prøvene med forhold på 1:25 og 1:50 PVA og HDI viser lite til ingen tegn på bånd. Dette kan styrke teorien om en mulig likevekt i den grad at selv med økte mengder NCO-grupper er konsentrasjonen HRP den samme. HRP konsentrasjonen kan være en begrensende faktor i immobiliseringsreaksjonen.

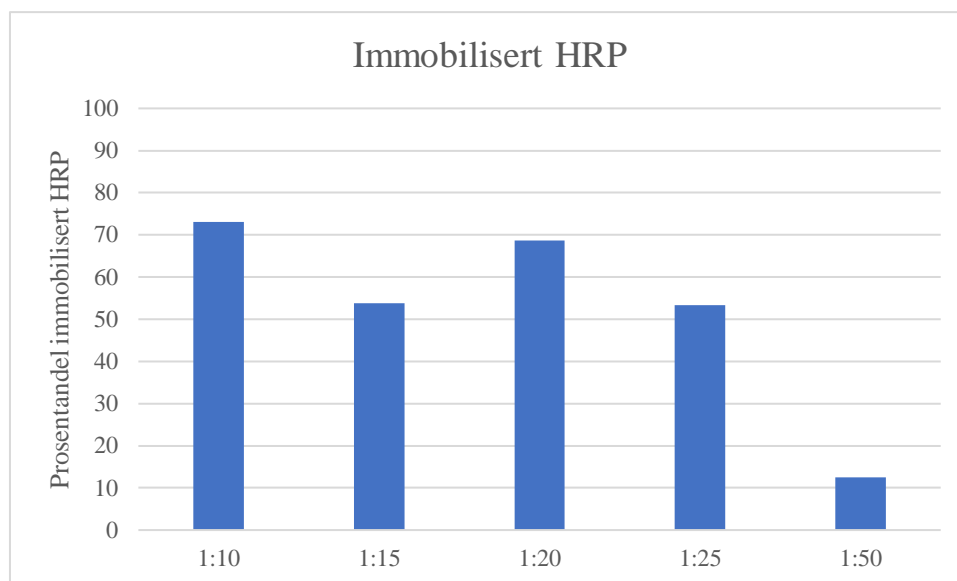


*Figur 40. Gelbilde for prøve 1:5, 1:10 og 1:20.*



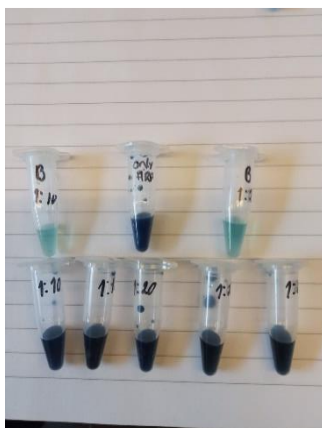
*Figur 41. Gelbilde for prøve 1:25 og 1:50.*

Nanodrop med UV/Vis ble benyttet for å regne ut en omtrentlig immobiliseringsprosent for alle prøvene. Immobiliseringsprosenten, figur 42, kan bekrefte det gelbildene viste for prøvene med forhold på 1:10, 1:20 og 1:50 PVA og HDI, at det kan antas at HRP ble immobilisert på PU mikropartiklene. Prøvene med forhold på 1:15 og 1:25 har sammenlignbare immobiliseringsprosenter, men gelbildene kan tolkes som at 1:15 forholdet hadde bundet mer.



*Figur 42. Gjennomsnittlig immobiliseringsprosent målt med nanodrop for prøvene med ulikt forhold PVA og HDI.*

Enzymaktiviteten til prøvene ble testet med ABTS enzymassay. Alle prøvene viser en tydelig fargeendring fra lys grønn til mørke blå, nesten sort, figur 43, så det kan antas at immobiliseringen fungerte, men kan ikke bekrefte.



Figur 43. ABTS enzymassay for prøvene 1:10 (v.) til 1:50 (h.)

## 2.5 Måling av størrelsen på PU mikropartiklene syntetisert med mikrobølger og med konvensjonell oppvarming.

Etter flere forsøk på syntetisering av PU mikropartikler med mikrobølger og konvensjonell oppvarming og immobilisering av HRP med varierende resultater, ble partikkelstørrelsen på PU mikropartiklene målt. Det ble benyttet et grovfilter for å få en mer homogen løsning. Grovfilteret, figur 44, viser tydelig at PU mikropartikler syntetisert med mikrobølger i 15 minutter og 120 °C inneholder store partikler som kan antas er større enn 500 µm. Større partikler kan være dannelse av lengre polymerer og kopolymerer på grunn av syntese tiden. De andre prøvene med PU mikropartikler syntetisert med mikrobølger var syntetisert i 2 minutter og 170 °C, med ulikt forhold mellom PVA og HDI.

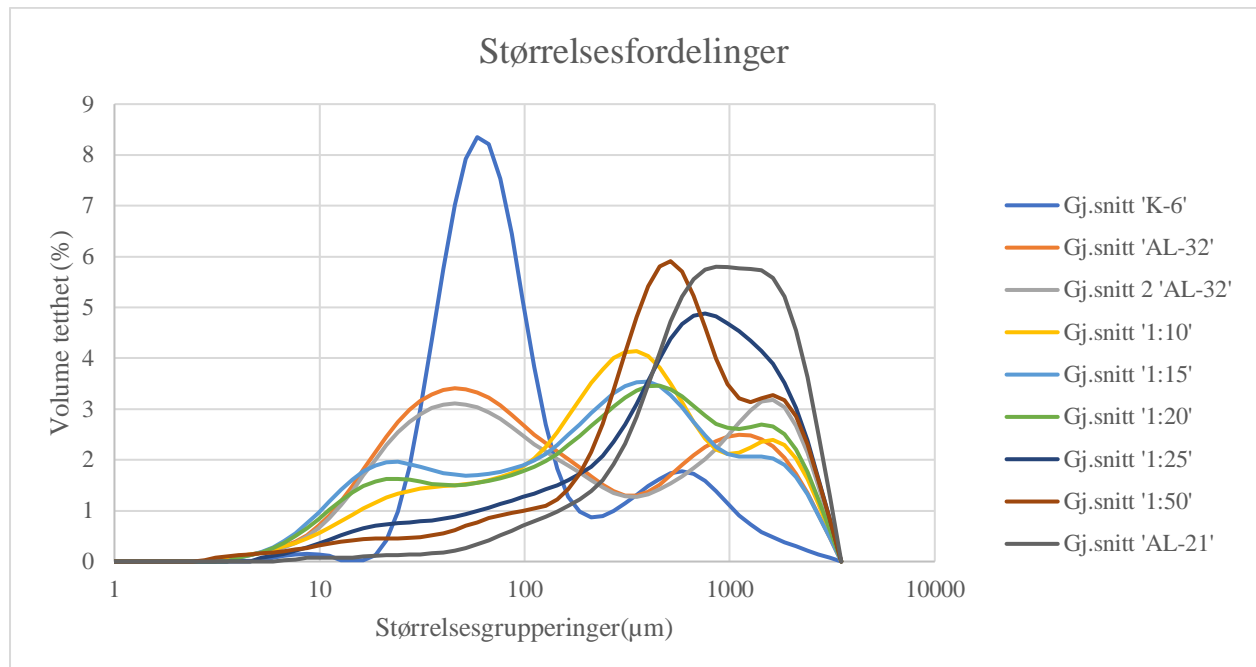


Figur 44. Grovfilter med PU mikropartikler syntetisert med mikrobølger, AL-21

Partiklene som gikk gjennom grovfilteret ble målt med laserdiffraskjon. Som antatt viser figur 45 at PU mikropartikler syntetisert med mikrobølger inneholder en større andel store partikler sammenlignet med konvensjonell oppvarming. PU mikropartikler syntetisert med mikrobølger har sett og følte grovere ut etter homogenisering med morter. Det kunne vært en fordel å filtrert mikropartiklene mer før immobilisering for å sile ut de største partiklene før uthenting til immobilisering, men på grunn av tidsbegrensninger ble ikke dette testet.



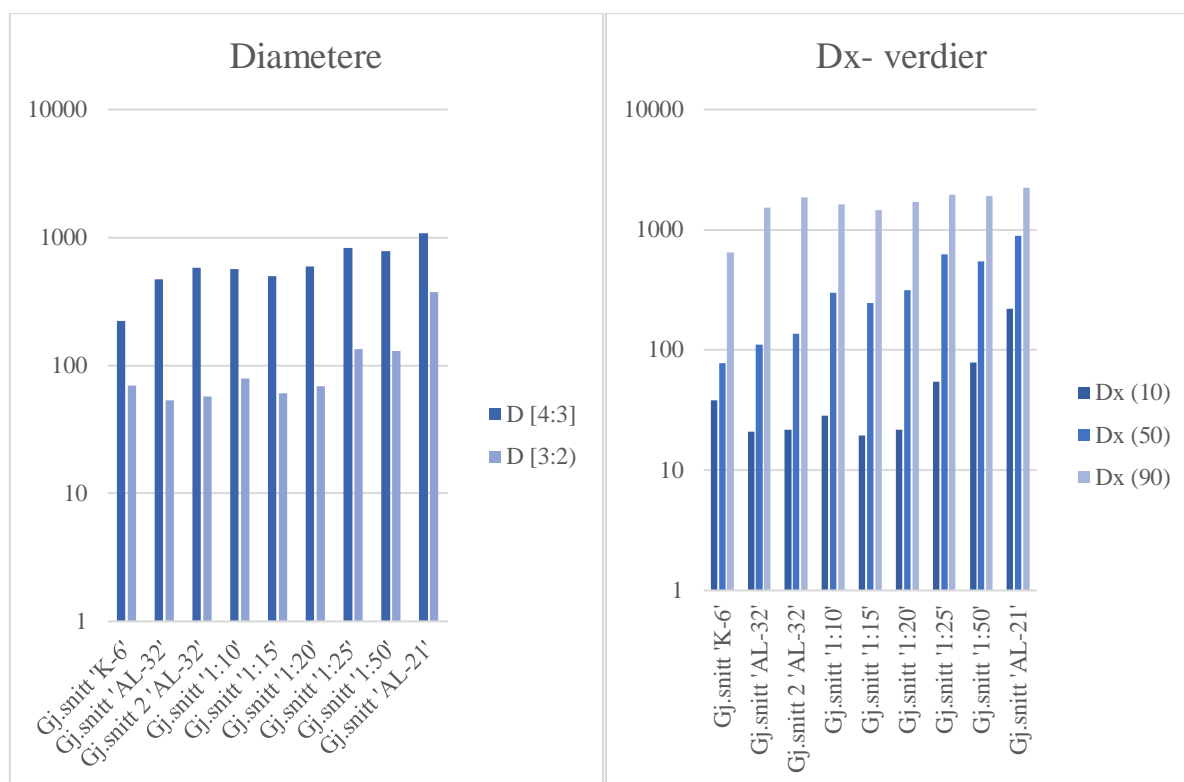
Figur 45 viser at PU mikropartikler syntetisert med mikrobølger samtidig har en større andel små partikler, ned til 3  $\mu\text{m}$ , sammenlignet med PU mikropartikler syntetisert med konvensjonell oppvarming. Budriene *et al.*<sup>2</sup> rapporterte at mikropartikler mellom 10  $\mu\text{m}$  og 50  $\mu\text{m}$  viste høyest immobiliseringsprosent. Dette kan forklare høyere immobiliseringsprosent i visse prøver med PU mikropartikler syntetisert med mikrobølger sammenlignet med konvensjonell oppvarming. Uttaket av PU mikropartikler kan ha inneholdt større mengder optimale partikler i visse prøver.



Figur 45. Størrelsesfordeling av PU mikropartikler.

Jo høyere middelveiden er jo flere store partikler er det i prøven. Ønskede mikropartikler er mellom 1  $\mu\text{m}$  til 100  $\mu\text{m}$  og optimalt mellom 10  $\mu\text{m}$  til 50  $\mu\text{m}$ . En optimal middelveidi vil da være rundt 25  $\mu\text{m}$ . Figur 46 viser at ingen av prøvene har en ønsket middelveidi på 25  $\mu\text{m}$ , uavhengig om det baserer seg på volum eller areal. Den laveste middelveiden, med hensyn på areal, er for prøve AL-32 med 53.7  $\mu\text{m}$ . Prøve AL-21 skiller seg ut med tydelig høyere middelveidier enn de andre prøvene. Den er syntetisert ved 120  $^{\circ}\text{C}$  i 15 minutter, i forhold til de andre mikrobølgeprøvene som er syntetisert ved 170  $^{\circ}\text{C}$  i 2 minutter. Dette stemmer overens med teorien om bruk av mikrobølger i organisk syntese. Prøve K-6 syntetisert med konvensjonell oppvarming har, sammenlignet med de andre prøvene syntetisert med mikrobølger, partikler med lavere diameter uavhengig av areal eller volum. Det kan stemme overens med hvordan prøvene med PU mikropartikler har sett ut med tanke på at PU mikropartikler syntetisert med konvensjonell oppvarming har hatt en finere konsistens med ingen tegn til større deler.

Dx verdien angir x vol% av partiklene mindre enn Dx verdien. Eksempelvis betyr Dx (90) D90 verdien at 90 vol% av partiklene er mindre eller lik denne diameteren. Figur 47 viser at prøvene AL-32, 1:10, 1:15 og 1:20 har flere partikler under Dx(10) enn de andre. Det er mulig at det kan være årsaken til bedre immobilisering hvis uttaket har inneholdt flere av disse partiklene.



Figur 46. Volum midlet diameter (D[4:3]) og areal midlet diameter (D[3,2]).

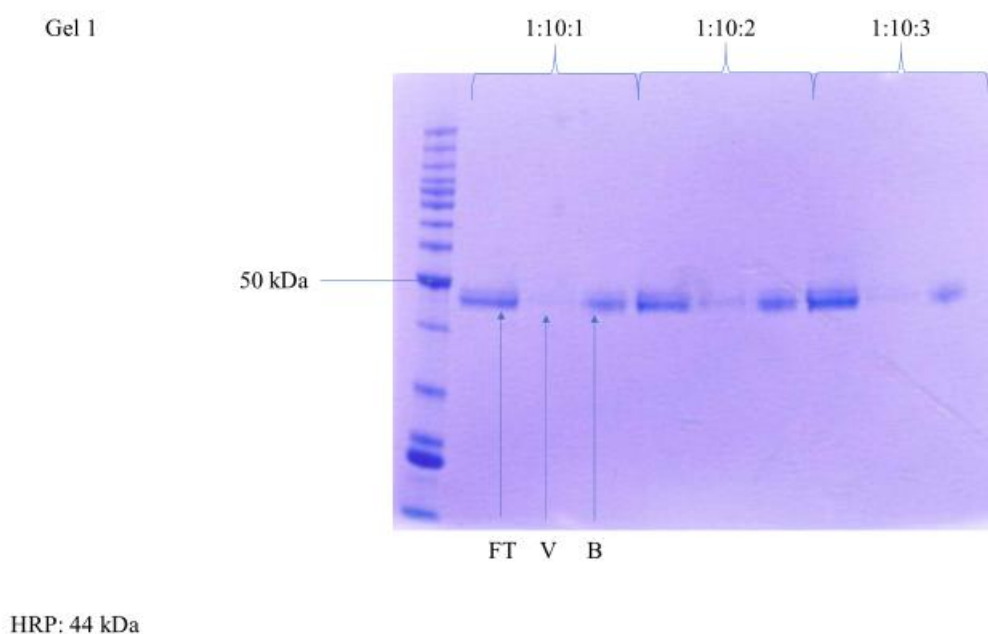
Figur 47. x vol% av partiklene mindre enn Dx verdien.

## 2.6 Immobilisering av HRP på «gamle» PU mikropartikler.

Burdiene *et al.*<sup>2</sup> spesifiserte at nylig syntetiserte PU mikropartikler måtte benyttes til immobilisering av enzymet. PU kan settes for faktorer som medfører nedbrytning av forbindelsen, eksempelvis oksidasjon og misfarging, hvis det ikke oppbevares korrekt. Dette kan medføre at antallet aktive NCO-grupper minsker og immobiliseringen av enzym ikke blir optimal. På grunnlag av dette ble «gamle» PU mikropartikler testet som bærere for immobilisering av HRP. Hvis «gamle» PU mikropartikler kan benyttes, sparer det tid og krefter og gjør prosessen mer attraktiv.

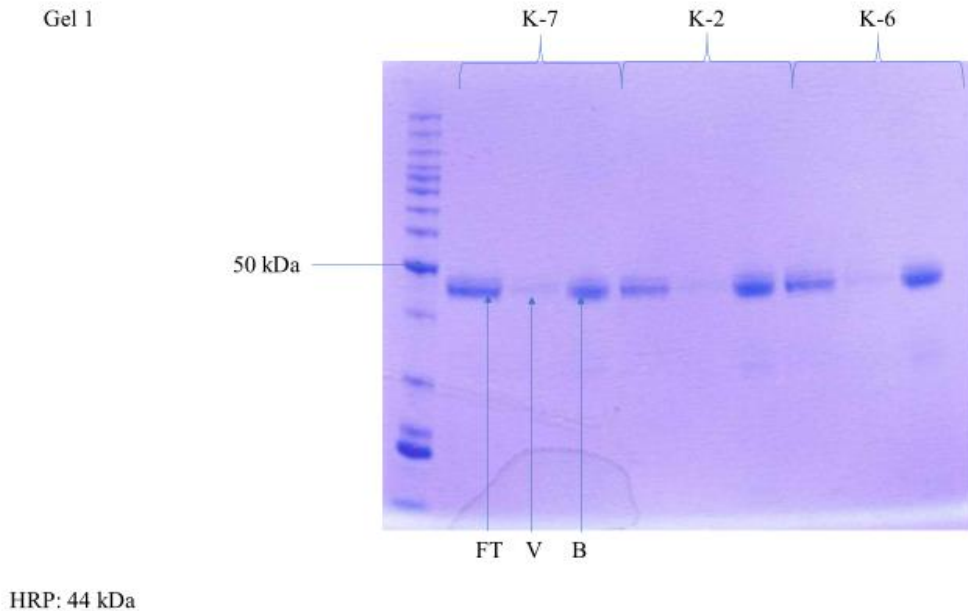
Først ble prøven med forhold på 1:10 PVA og HDI brukt som bærer, en uke etter syntese med mikrobølger. Det ble benyttet 75 mg/mL PU mikropartikler mot 1 mg/mL HRP. PU mikropartiklene viste ikke tegn til misfarging før immobilisering og det kan antas at de ikke hadde blitt utsatt for fotooksidasjon. Figur 48 viser et tydelig bånd i brønningen med bærer for

prøvene 1:10, 1 og 1:10, 2 rundt 44 kDa. Noe svakere for prøve 1:10, 3. Dette kan være grunnet uttaket av mikropartikler, der mer optimale størrelser ble brukt for de to andre parallellene. Vaske trinnet, V, har utydelige bånd for alle parallellene. Det kan antas at immobiliseringen fungerte og at HRP ble bundet til PU mikropartiklene.



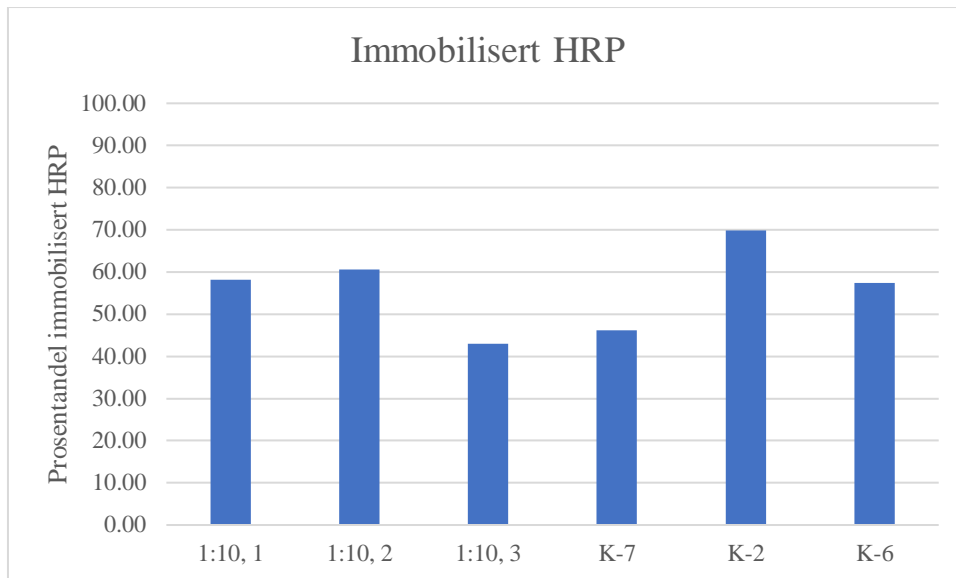
*Figur 48. Gelbilde for prøve 1:10, én uke gamle PU mikropartikler.*

En uke gamle PU mikropartikler fungerte godt med tanke på båndene på gelen. På grunnlag av dette ble det videre testet å immobilisere HRP på PU mikropartikler som var fem måneder gamle syntetisert med konvensjonell oppvarming. Ingen av PU mikropartikkelprøvene viste tegn til misfarging og det kan antas at de ikke hadde blitt utsatt for fotooksidasjon. Figur 49 viser et sterkt tydelig bånd for bæreren, B, rundt 44 kDa for alle prøvene. Vaske trinnet, V, har utydelige bånd for alle parallellene. Det kan tolkes som at immobiliseringen fungerte og at HRP ble festet godt.



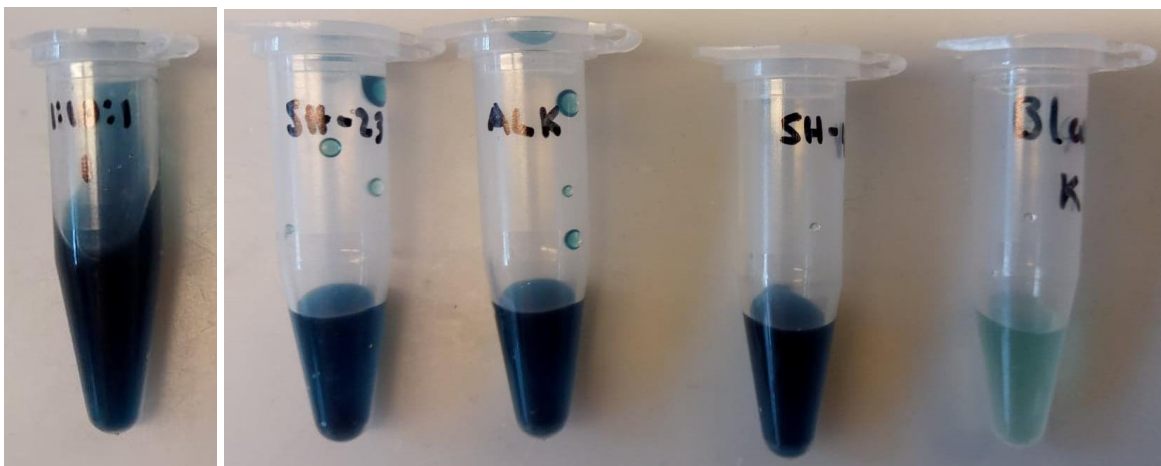
*Figur 49. Gelbilde for prøve K-7, K-2 og K-6, fem måneder gamle PU mikropartikler.*

Nanodrop med UV/Vis ble benyttet for å regne ut en omtrentlig immobiliseringsprosent for alle prøvene, figur 50. Prøve 1:10,2 viser høyest immobiliseringsprosent på 60 % av PUene syntetisert med mikrobølger. Uken før hadde den samme prøvene en immobiliseringsprosent på 73 %. Det er mulig at PU mikropartiklene hadde startet å oksidere slik at antallet aktive NCO-grupper minsket, eller at uttaket av PU mikropartiklene inneholdt mindre optimale størrelser. Prøve K-2 viser høyest immobiliseringsprosent, av PU mikropartiklene syntetisert med konvensjonell oppvarming, på 70 %. Den samme prøven ble brukt som bærer for fem måneder siden og hadde da en immobiliseringsprosent på 43 %. Den ble benyttet rett etter syntetisering så oksidering kan ses bort ifra. En mulig årsak på forskjellen i immobiliseringsprosent er også her uttak av mikropartikler.



*Figur 50. Gjennomsnittlig immobiliseringsprosent målt med nanodrop for prøvene med gamle PU mikropartikler.*

Enzymaktiviteten på en uke gamle PU mikropartikler og fem måneder gamle PU mikropartikler ble testet med ABTS enzymassay. Alle prøvene viste en tydelig fargeendring fra lys grønn til mørke blå, nesten sort, figur 51 og 52, så det kan antas at immobiliseringen fungerte, men kan ikke bekreftes.



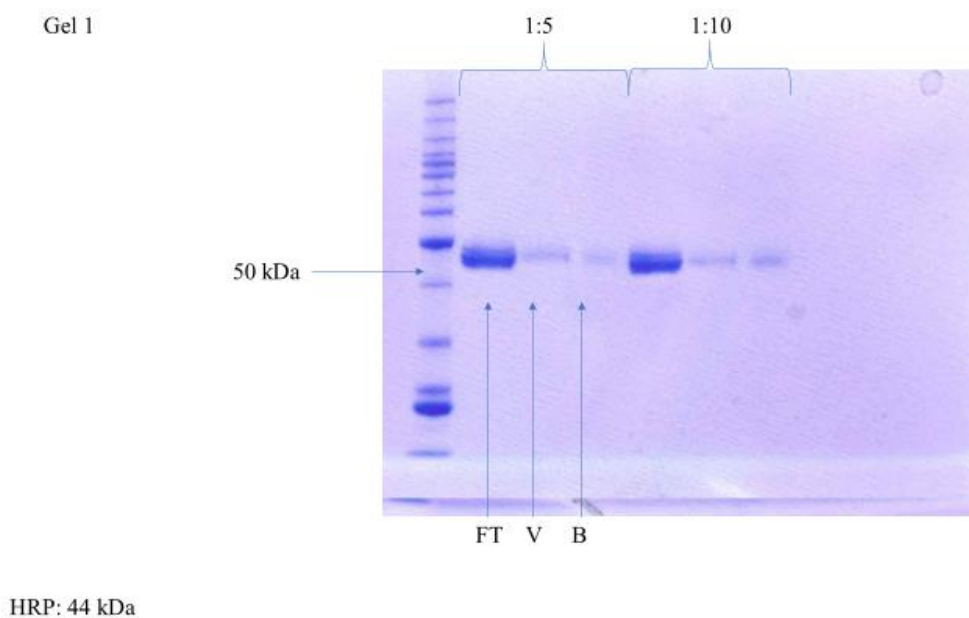
*Figur 51. ABTS enzymassay for prøve 1:10 gamle PU mikropartikler.*

*Figur 52. ABTS enzymassay for prøve K-7, K-2 og K-6 gamle PU mikropartikler.*

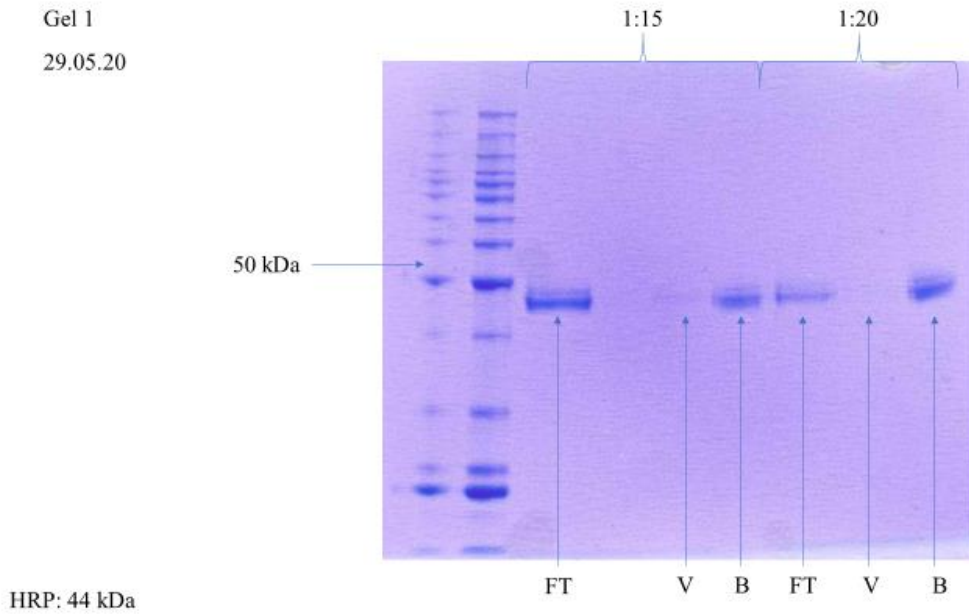
## 2.7 Forsøk på bruk av immobilisert HRP på PU mikropartikler gjentatte ganger med ABTS enzymassay.

En av hovedgrunnene til å immobilisere enzymer er for å kunne bruke de samme enzymene flere ganger og lett ekstrahere de fra løsninger.

I immobiliseringsprosessen ble samme protokoll benyttet som i 2.4.4. Gelbildene, figur 53 og 54, viser tydelige bånd immobilisering for forholdet på 1:20 PVA og HDI, noe mindre for forholdene på 1:5, 1:10 og 1:15. Dette kan være grunnet forskjellen i antall aktive NCO-grupper ved økt mengde HDI.



*Figur 53. Gelbilde for prøve 1:5 og 1:10.*



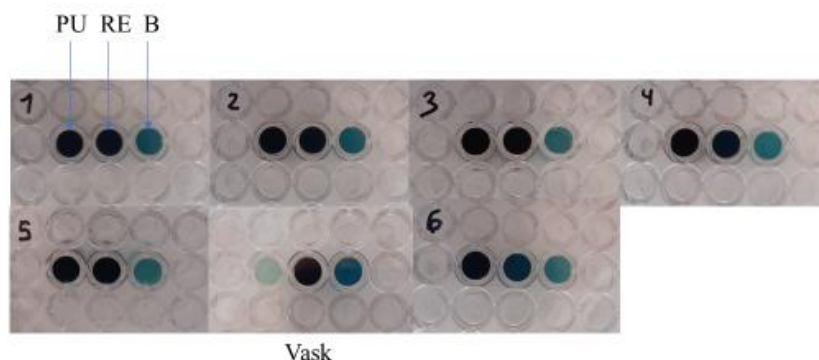
*Figur 54. Gelbilde for prøve 1:15 og 1:20.*

Nanodrop med UV/Vis ble benyttet for å regne ut en omtrentlig immobiliseringsprosent for alle prøvene. Immobiliseringsprosenten, figur 55, bekrefter det gelbildene viser, at forholdet på 1:20 hadde høyest immobilisering av HRP. Sammenlignet med de tidligere prøvene er ikke immobiliseringen konsekvent fordi prøven med forhold på 1:10 hadde tidligere en immobiliseringsprosent på 73 %, men nå kun 53 %. Det samme gjelder prøven med forhold på 1:5. Prøven med forhold på 1:15 har sammenlignbare resultater med den forrige immobiliseringen. Forholdet med 1:20 hadde tidligere en immobiliseringsprosent på 69 %, men hadde nå en økning til 80 %. Det kan antas at uttaket av partiklene er årsaken til differansen.



Figur 55. Gjennomsnittlig immobiliseringsprosent målt med nanodrop for prøvene 1:5 til og med 1:20.

For å teste om immobilisert HRP kan benyttes i flere reaksjoner ble det først kjørt et ABTS enzymassay i proteinfilterbrønn med HRP immobilisert på PU mikropartikler syntetisert med mikrobølger med et forhold på 1:5 PVA og HDI. Enzymassayet ble kjørt først fem ganger etter hverandre uten vask mellom hver runde. Figur 56 viser at immobilisert HRP (PU) og mobilt HRP (RE) begge reagerer og gir en mørk blå, nesten sort farge. Teoretisk sett skulle brønnen med mobilt HRP vist samme farge som blanken, B. Årsaken til fargeendring i brønnen med mobilt HRP er at det rene enzymet satte seg fast i filteret. Etter den femte reaksjonen ble brønnene vasket med buffer. Reaksjon nummer seks, figur 56, viser hint til fargeendring i brønnen med RE. Dette kan være en indikator på at immobilisert HRP fungerer gjentatte ganger sammenlignet med RE. Vasking mellom hver reaksjon og et filter som mobilt HRP ikke setter seg fast i kan være en bedre strategi for å forbedre metoden.



Figur 56. ABTS enzymassay i proteinfilter for prøve 1:5.

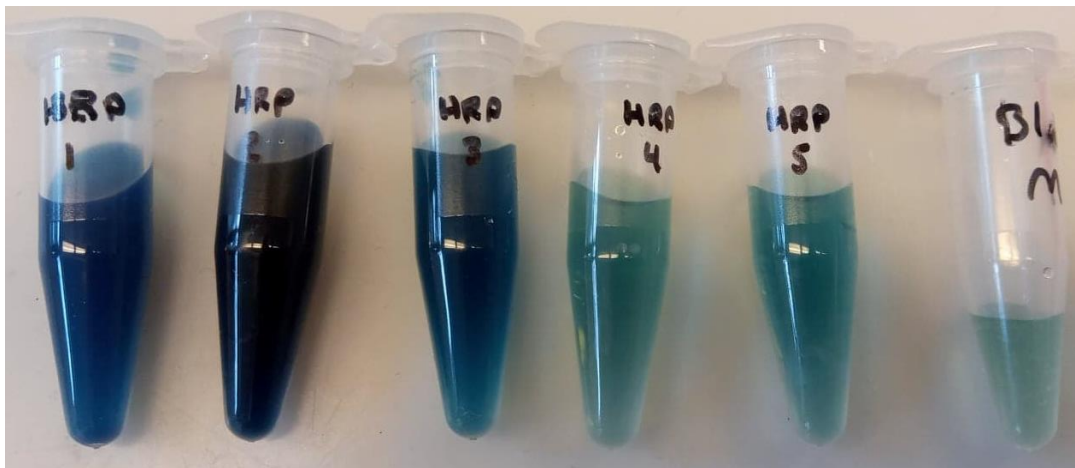


Etter å ha testet ABTS enzymassay i proteinfILTERBRØNN ble det samme testet i en Büchner trakt.

I Büchner-trakten ble det først gjennomført ABTS enzymassay med mobilt HRP. Figur 57 viser at mobilt HRP satte seg fast i filteret som med proteinfILTERBRØNNEN. Mellom hver reaksjon ble det vasket med buffer flere ganger for å prøve å fjerne restene av mobilt HRP. Figur 57 viser at det fungerte til en viss grad, men bekrefter at denne metoden med dette filteret ikke er optimal. Prøve to til fem, figur 58, skal teoretisk sett være sammenlignbare med blank prøven siden det ikke skal være HRP tilstede for å katalysere reaksjonen.

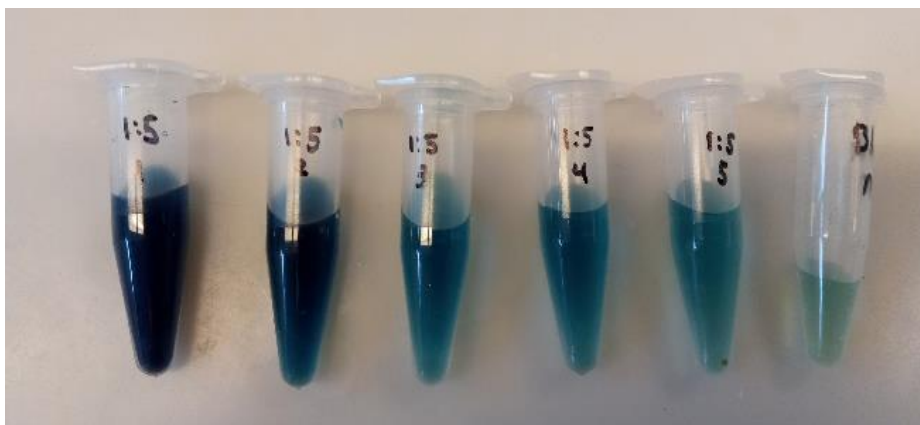


Figur 57. Büchner trakt filter med rent HRP sittende fast i filteret.



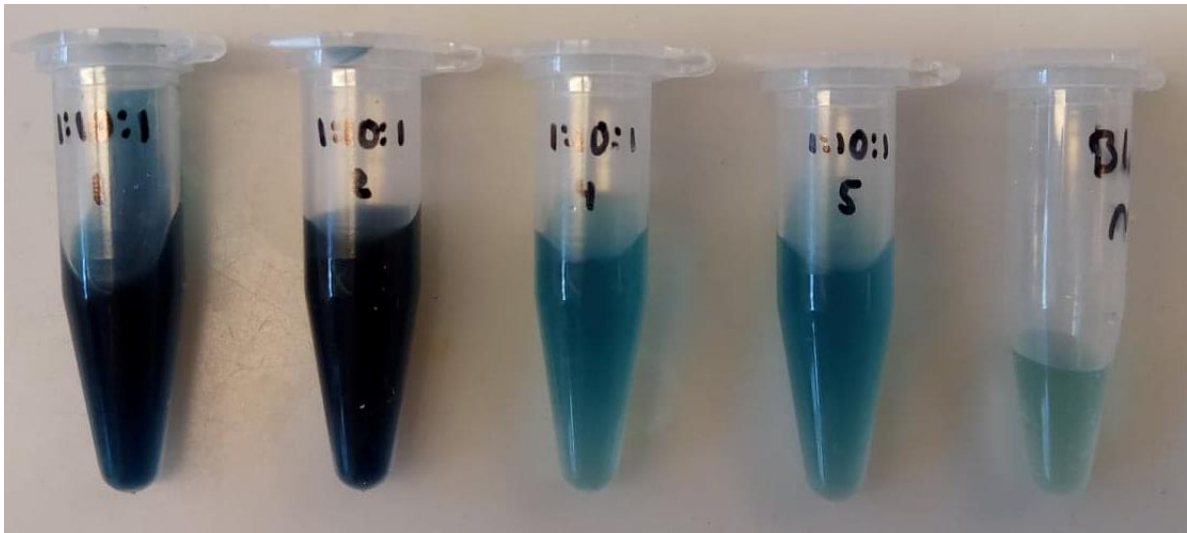
Figur 58. ABTS enzymassay for mobilt HRP i Büchner trakt fem ganger.

Videre ble Büchner-trakt metoden testet med immobilisert HRP på PU mikropartikler syntetisert med mikrobølger med forhold på 1:5 PVA og HDI. Det ble vasket med buffer mellom hver reaksjon. Figur 59 viser at immobilisert HRP kan brukes gjentatte ganger, men at aktiviteten avtar når prøvene blir kjørt like lengde.



Figur 59. ABTS enzymassay for prøve 1:5 i Büchner trakt fem ganger med samme immobiliserte HRP.

Til slutt ble Büchner-trakt metoden testet med immobilisert HRP på «gamle» PU mikropartikler syntetisert med mikrobølger med forhold på 1:10 PVA og HDI. Figur 59 viser et sammenlignbart resultat som med ny syntetisert PU, figur 60, enzymaktiviteten avtar for hver reaksjon. En mulig årsak kan være at filteret ikke er optimalt for hverken mobilt HRP eller PU mikropartikler. Mobilt HRP setter seg fast og PU mikropartiklene går muligens gjennom filteret. Andre filtere og mulig andre metoder må testes videre for å optimalisere metoden.



*Figur 60. ABTS enzymassay for prøve 1:10, 1, en uke «gamle» PU mikropartikler med samme immobiliserte HRP.*

### 3. Veien videre

PUer er veldig allsidige forbindelser som kan modifiseres og endres for å oppnå optimale mekaniske, termiske og kjemiske egenskaper til et gitt bruk. Syntese av PU mikropartikler ble gjort med en konstant mengde PVA og økt mengde HDI. Flere aktive NCO-grupper tilsier at mer enzym kan feste seg til bæreren. For å finne det optimale forholdet kreves videre testing. Det er mulig at kortere kjeder eller flere OH-grupper også kan øke immobiliseringsprosenten. MDI og TDI er i tidligere forsøk benyttet som isocyanater i fremstillingen av PU mikropartikler. De er aromatiske isocyanater som er billige og har høyere mekaniske egenskaper. Å teste disse i syntesen av PU mikropartikler for så å immobilisere HRP kan være av interesse og kan muligens gi høyere immobiliseringsprosent.

Forholdet mellom konsentrasjonen HRP og mengde PU mikropartikler ble testet med tanken om et mulig metningspunkt for å maksimere utbyttet av immobiliseringen. Mange enzymer er kostbare som er en av hovedårsakene til interessen for immobilisering på en bærer, med hensikt om å gjenbruke enzym. Å finne et optimalt forhold mellom mengde HRP og mengde PU må testes videre, i sammenheng med syntesen av PU med ulike forhold polyol og isocyanat.

Den største utfordringen med immobilisering av HRP var å teste enzymaktiviteten. HRP er et velkjent enzym som det finnes mange og gode måter å teste enzymaktiviteten på. I denne oppgaven ble tre enzymassayer testet: pyrogallol, amplex red og ABTS. Det var i hovedsak to problemer som krever mer tid og testing for å kunne måle enzymaktiviteten til immobilisert HRP. Det første er en sikker metode for å finne mengden immobilisert HRP som tilsvarer mengden mobilt HRP i assayet og det andre er en måte å gjennomføre assayet på med gode resultater. Enzymaktiviteten er avgjørende for hvor nyttig det er å immobilisere enzymer på en bærer.

Enzymer har betingelser for optimal aktivitet. Det er mulig HRP ikke er et optimalt enzym for å immobiliseres og at testing av immobilisering på PU mikropartikler syntetisert med mikrobølger hadde gitt høyere immobiliseringsprosent med et annet enzym. Et annet enzym kan muligens binde seg bedre og det aktive setet kan være lettere tilgjengelig for substrat.

## 4. Konklusjon

PU mikropartikler, fra PVA og HDI, ble syntetisert med mikrobølger med gode resultater. Optimal syntese ble funnet til å være 2 min, 170 °C i en 10-20 mL beholder som ga høyeste utbytte på 3.132 g. Sammenlignet med konvensjonell oppvarming som bruker 90 minutter på syntesen, sett bort ifra oppvarming og nedkjøling, ga høyest utbytte på 7.199 g. Dette bekrefter at bruk av mikrobølger til syntese av PU mikropartikler er mer effektivt og lønnsomt.

Partikkelstørrelsen ble testet med laserdiffraksjon og viste en varierende størrelsesfordeling fra 2 µm til 3080 µm. På bakgrunn av varierende immobiliseringsprosenter for liknende prøver kan det antas at partikkelstørrelser mellom 10 µm og 50 µm som Budriene *et al.*<sup>2</sup> rapporterte, er mer optimale. PU mikropartikler syntetisert med mikrobølger viste større andel optimale partikler, men det avhenger av uttaket ved immobilisering. Bedre homogenisering med filtrering kan bedre uttaket.

PU mikropartikler ble modifisert med Au-NP med absorpsjon. HRP ble immobilisert via adsorpsjon, det ga ingen resultater. Videre testing må gjøres, men grunnet tidsbegrensning ble optimalisering av immobiliseringsprosessen uten modifiseringer prioritert.

HRP ble immobilisert på PU mikropartikler, syntetisert med varierende forhold PVA:HDI. Forhold på 1:20 med 75 mg/mL PU mikropartikler og 1 mg/mL HRP ga høyeste immobiliseringsprosent på 80 %. Budriene *et al.*<sup>2</sup> sitt arbeid med immobilisering av maltogenase på PU mikropartikler viste høyeste immobiliseringsprosent på 98 %. HRP er mulig ikke et optimalt enzym for immobilisering. Forsøket på å finne metningspunkt ble avkreftet, og det antas at det er en likevekt mellom konsentrasjonen til HRP og mengden PU mikropartikler.

Enzymaktiviteten ble forsøkt testet kvalitativt og kvantitativt. Kvalitativt ble bekreftet på grunnlag av fargeendring med pyrogallol-, amplex red- og ABTS enzymassay. Kvantitativ enzymaktivitet kunne ikke bekreftes. Immobilisert HRP viste aktivitet på grunnlag av fargeendring etter fem kjøring med ABTS enzymassay. Immobilisering av HRP fungerte på opptil 90 dager gamle PU mikropartikler.

## 5. Eksperimentelt

Reaksjoner som ble syntetisert med konvensjonell oppvarming ble utført under N<sub>2</sub>-atmosfære.

Alle reagensene og løsemidlene var av teknisk kvalitet og ble benyttet uten videre rensing.

Mikrobølgeraktoren som ble benyttet var en Biotage Initiator+, Fourth Generation Microwave Synthesizer.

UV/vis spekter (250nm-650nm)(190-1100nm) ble tatt opp med The Biochrom Libra S32 PC spektrofotometer og (190-850 nm) NanoDrop One Microvolume spektrofotometer.

IR spekter ble tatt opp med Agilent Technologies 5500 Series FT-IR spektrofotometer.

NMR spekter ble tatt opp med Bruker Ascend™ 400 ved 400 MHz for <sup>1</sup>H NMR og ved 100 MHz for <sup>13</sup>C NMR.

Partikkelstørrelse ble bestemt med Mastersizer 3000, Aero S.

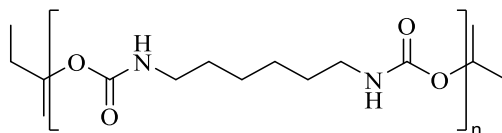
Inkubering og kjøling ble gjort med en Eppendorf ThermoMixer C.

UV gelbilder ble tatt med Bio Rad Gel Doc EZ System.

## 5.1 Syntese av PU mikropartikler

Metodene som ble benyttet er basert på tidligere arbeid av Budriene *et al.* <sup>2</sup>

### 5.1.1 I mikrobølgereaktor



PVA (0.026 g, 0.0031 mol), HDI (0.43 g, 0.0062 mol), DMSO (4.17 mL) og vann (0.041 mL) ble tilsatt en 2-5 mL beholder med magnet. Beholderen ble forseglet og kjørt i mikrobølgereaktoren med parameterne vist i tabell 6.

Tabell 6. Innstillinger for syntese av PU mikropartikler i mikrobølgereaktoren..

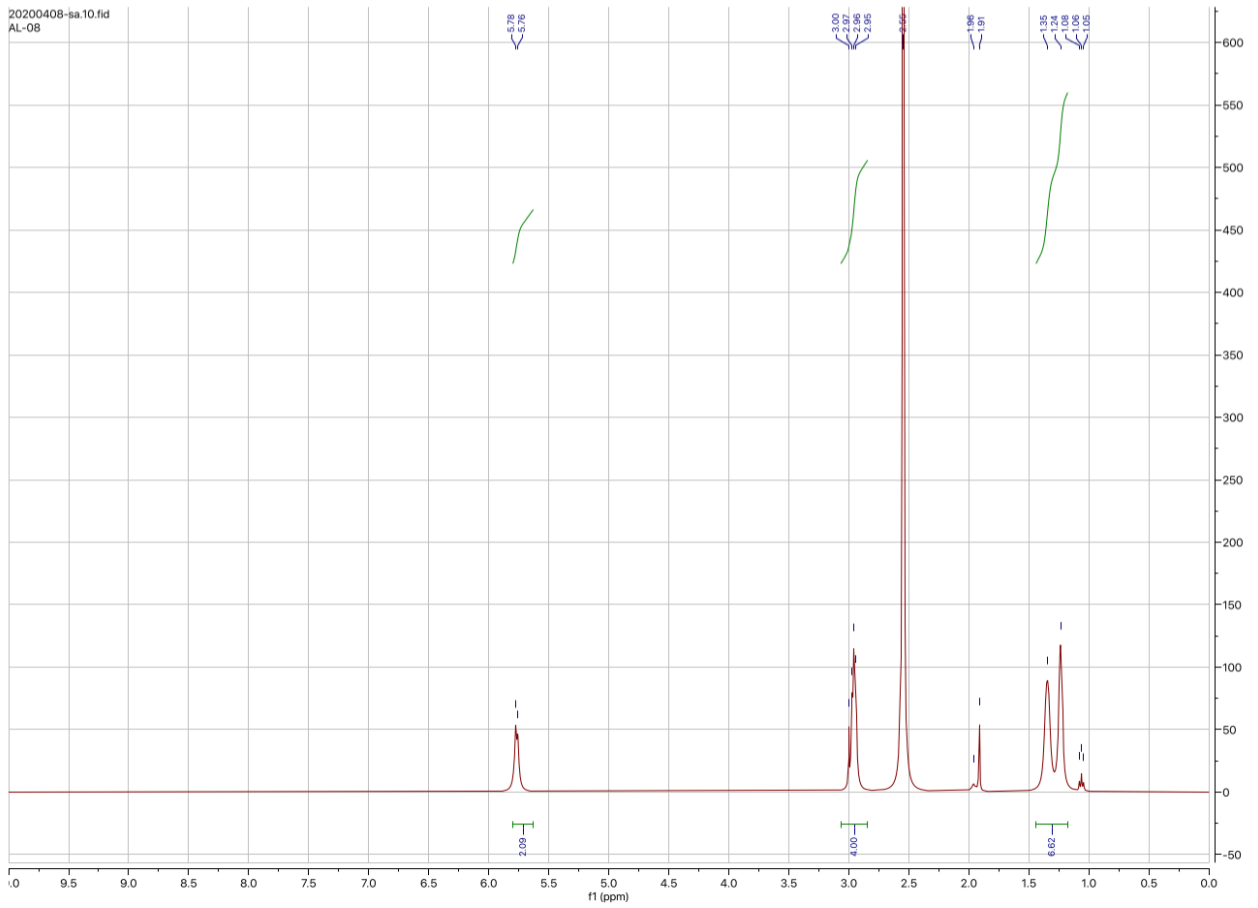
Time	15 min	Vial type	2-5 mL
Temperature	120°C	Absorption	High
Pressure	Off	Fixed hold time	On
Pre-stirring	20 s		

Beholderen ble avkjølt til romtemperatur og stoffet ble overført til en 100 mL erlenmayerkolbe. En blanding av aceton (50 mL) og dietyleter (50 mL), PU mikropartiklene ble plassert i kjøleskap til kald, evt over natten. Dagen etter ble PU mikropartiklene filtrert og tørket i eksikator.

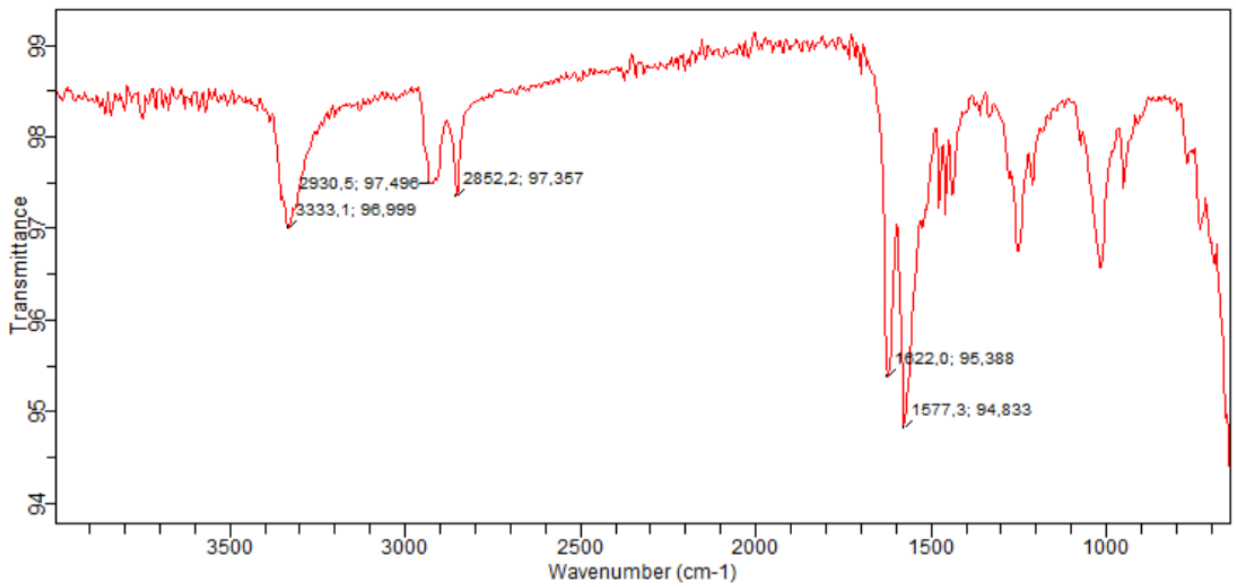
Utbytte: 0.9042 g

<sup>1</sup>H NMR (400MHz): δ 5.78 – 5.76, δ 3.00 – 2.95, δ 2.55, δ 1.35-1.05

IR: 3333, 2930, 2852, 1622, 1577 cm<sup>-1</sup>

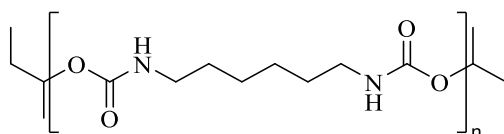


Figur 61.  $^1\text{H}$  NMR spekter av prøve AL-05.



Figur 62. IR-spekter av prøve AL-05.

### 5.1.2 Med konvensjonell oppvarming



PVA (0.155 g, 0.0031 mol), HDI (2.6 g, 0.0155 mol), DMSO (25 mL) og vann (0.25 mL) ble tilsatt i en trehalset rundkolbe med magnet, termometer og reflux med nitrogen. Løsningen ble forsiktig varmet opp til 120 °C i oljebad og holdt på 120 °C i 90 minutter. Løsningen ble avkjølt til romtemperatur og overført til en 250 mL Erlenmeyr-kolbe. En blanding av aceton (100 mL) og dietyleter (100 mL) ble tilsatt løsningen og satt i kjøleskap over natten. Dagen etter ble PU mikropartiklene filtrert og tørket i eksikator.

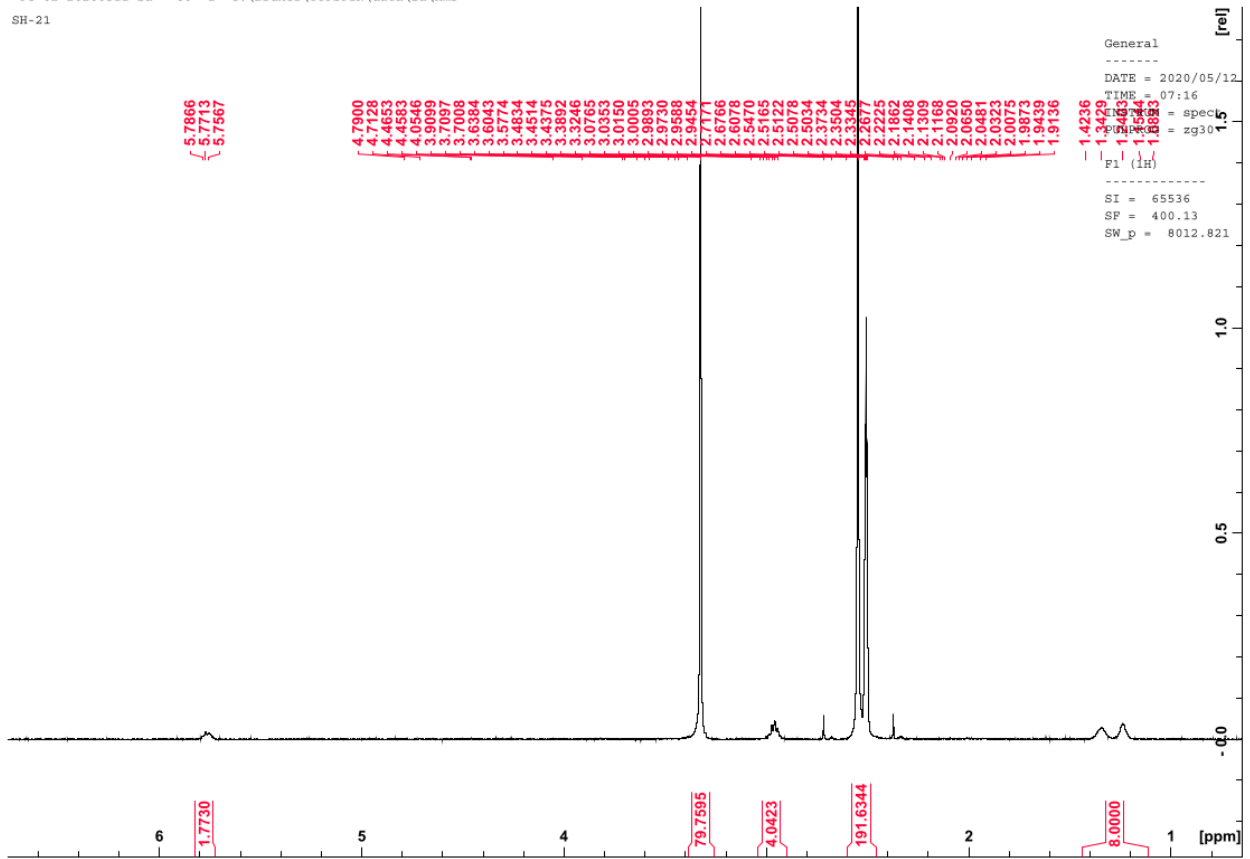
Utbytte: 6.5579 g

$^1\text{H NMR}$ :  $\delta$  5.79 – 5.76,  $\delta$  3.00 – 2.95,  $\delta$  2.55,  $\delta$  1.4-1.08

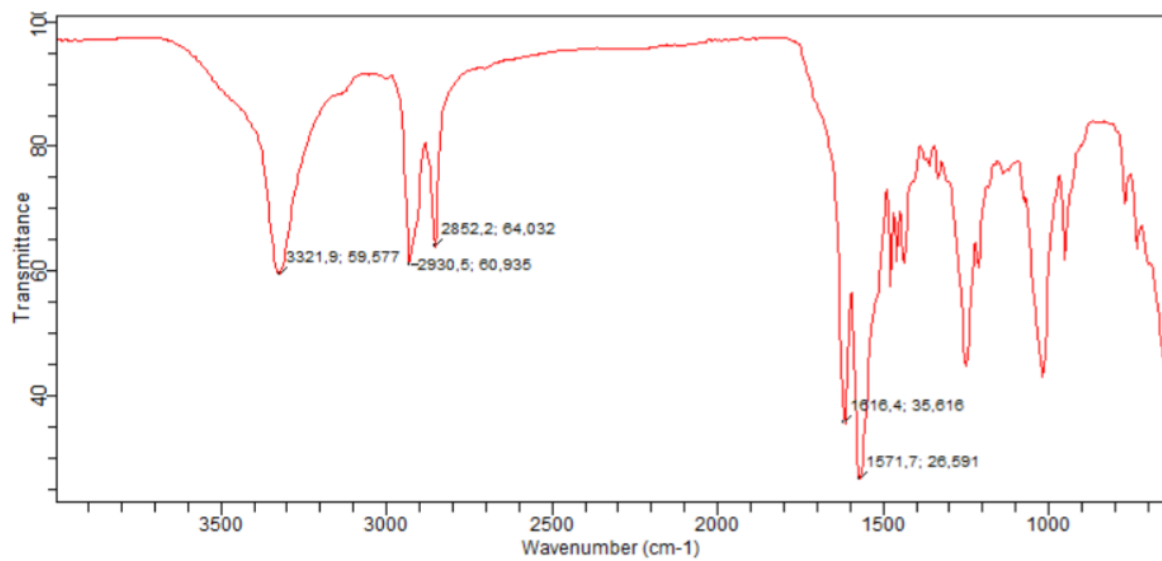
IR: 3321, 2930, 2852, 1616, 1571  $\text{cm}^{-1}$



\*PU-02 20200511-sa" 60 1 C:\Bruker\TOPSPIN\data\sa\nmr  
SH-21



Figur 63.  $^1\text{H}$  NMR spekter av prøve K-4.



Figur 64. IR-spekter av prøve K-1.

## 5.2 PU mikropartikler modifisert med Au-NP

Metoden som ble benyttet er basert på tidligere arbeid av Ramanaviciene *et al.*<sup>1</sup>

Det ble laget en løsning på 20 mL med natriumcitrat (6.8 mM) og tanninsyre (7.35  $\mu$ M) og en løsning med HAuCl<sub>4</sub> (80 mL, 0.3175 mM) løst i vann. Løsningene ble varmet opp til 60 °C i vannbad med magnetrøring. Ved 60 °C ble løsningene overført til samme rundkolbe og videre varmet til 100 °C med magnetrøring. Løsningen kokte i 2 minutter. Videre ble 0.5 g PU mikropartikler tilsatt og kokt i 10 minutter før blandingen ble avkjølt til romtemperatur. PU-Au-NP konjugatene ble filtrert og vasket med vann for videre immobilisering.

## 5.3 Immobilisering av HRP med UV/vis deteksjon

Metodene som ble benyttet er basert på tidligere arbeid av Budriene *et al.*<sup>2</sup>

Det ble laget en stamløsning med citratbuffer (1.5 mL, 0.1 M, pH 5.0) og mobilt HRP (3.25 mg) til en konsentrasjon på 50  $\mu$ M. Stamløsningen ble fortynnet til 10 mL 5 $\mu$ M. Videre ble det laget 3 paralleller med enzymløsning (1 mL, 5  $\mu$ M) og PU mikropartikler (0.05 g) i eppendorfrør. Prøvene ble inkubert (30 min, 40 °C, 90 rpm) og satt i kjøleskap over natten. Dagen etter ble UV/vis spekter tatt opp ved 403 nm og 600 nm.

## 5.4 Bestemmelse av partikkelstørrelsen til syntetisert PU mikropartikler

En toppet spiseskje av prøven med PU mikropartikler ble overført til en grovsil med en åpning på 1.5 mm. Prøven ble kjørt med innstillingene i tabell 7.

Tabell 7. Innstillinger for måling av partikkelstørrelse med Malvern Masterziser 3000.

Materiale	PVA powder
Refractive index	1.395
Absorption index	0.1
Particle type	Non-spherical
Analysis type	General purpose

## 5.5 Immobilisering av HRP med SDS deteksjon

Metoden som ble benyttet for immobilisering er basert på tidligere arbeid av Budriene *et al.*<sup>2</sup>

### 5.5.1 Reagenser

Proteinstandard: BenchMark Protein Ladder

NuPAGE LDS Sample Buffer (4X)

NuPAGE Sample Reducing Agent (10X)

NuPAGE™ 10%, Bis-Tris, 1.0 mm, Mini Protein Gel, 10-well

MOPS SDS Running Buffer

#### 5.5.1.1 Konsentrert SDS-buffer

Sample buffer (1000 µL) og sample reducing agent (400 µL) ble blandet til et sluttvolum på 1400 µL.

#### 5.5.1.2 SDS-buffer

Sample buffer (500 µL), sample reducing agent (200 µL) og vann (1300 µL) ble blandet til et sluttvolum på 2000 µL.

#### 5.5.1.3 Fargeløsning

Coomassie Brilliant Blue (0.5 g), etanol absolutt (50 mL), konsentrert eddiksyre (50 mL) og vann (400 mL) ble blandet til et sluttvolum på 500 mL.

#### 5.5.1.5 Avfargingsløsning

Etanol absolutt (100 mL), konsentrert eddiksyre (75 mL) og vann (825 mL) ble blandet til et sluttvolum på 1000 mL.

### 5.5.2 Økt mengde PU mikropartikler med konstant konsentrasjon HRP.

Det ble laget en løsning med citratbuffer (12 mL, 0.1 M, pH 5.0) og HRP (12 mg) til en konsentrasjon på 1 mg/mL. Ulike konsentrasjoner av PU mikropartikler, i henhold til tabell 8, med citratbuffer ble preparert. Prøvene ble inkubert (30 min, 40 °C, 90 rpm) og satt i kjøleskap over natten.

*Tabell 8. Konsentrasjoner PU mikropartikler og mobilt HRP.*

PU (mg/mL)	HRP (mg/mL)
10	1
2	1
1	1
0.5	1
0.25	1
0	1

#### 5.5.2.1 Gel elektroforese

Dagen etter ble immobilisert PU rensert med citratbuffer i en proteinfilterplate. PU mikropartiklene ble tilsatt SDS-buffer (200 µL) og overført til eppendorfrør. «Flow through» og vask ble pipetert (16 µL) over i eppendorfrør og tilsatt konsentrert SDS-buffer (9 µL). Prøvene ble denaturet ved 95 °C i 10 minutter. Prøvene ble applisert på gel og kjørt.

### 5.5.3 PU mikropartikler med konstant mengde PVA og økt mengde HDI

Det ble laget en løsning med citratbuffer (12 mL, 0.1 M, pH 5.0) og HRP (12 mg) til en konsentrasjon på 1 mg/mL. Syntetiserte PU mikropartikler, i henhold til tabell 9, med citratbuffer ble preparert med en sluttkonsentrasjon på 1 mg/mL. Prøvene ble inkubert med risting (30 min, 40 °C, 1000 rpm) og ristet over natten (4 °C, 1000 rpm).

*Tabell 9. Typer PU mikropartikler.*

PVA (mol)	HDI (mL, mol)	PU	HRP (mg/mL)
0.0031	0.0155	1:5	1
0.0031	0.031	1:10	1
0.0031	0.0465	1:15	1
0.0031	0.062	1:20	1
0.0031	0.0775	1:25	1
0.0031	0.155	1:50	1

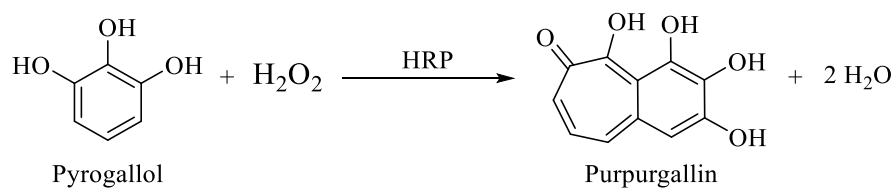
### 5.5.3.1 Gel elektroforese

Dagen etter ble immobilisert PU rensset med citratbuffer i en proteinfilterplate. PU mikropartiklene ble tilsatt SDS-buffer (200  $\mu$ L) og overført til eppendorfrør. «Flow through» og vask ble pipetert (16  $\mu$ L) over i eppendorfrør og tilsatt konsentrert SDS-buffer (9  $\mu$ L). Prøvene ble denaturert ved 95 °C i 10 minutter.

Gelen (NuPAGE™ 10% Bis-Tris Gel 1.0 mm x 10-well) ble satt i kjørekammeret og fylt med MOPS SDS Running Buffer i indre bufferkammer først og halvfullt i det ytre kammeret. Proteinstandard (6  $\mu$ L) og prøvene (18  $\mu$ L) ble applisert i brønnene. Gelen ble kjørt i 50 minutter ved 200 V.

Gelen ble overført til en plastboks og dekket med omtrent 100mL fargeløsning og kjørt 1 minutt i mikrobølgeovn. Boksen ble inkubert i 5 minutter på ristebrett. Fargeløsningen ble helt av og gelen vasket med vann før omtrent 100mL avfargingsløsning ble tilsatt og kjørt 1 minutt i mikrobølgeovn. Boksen ble inkubert i 5 -10 minutter på ristebrett. Avfargingstrinnet ble gjentatt til båndene ble tydelige. Gelen ble oppbevart i vann før bilde ble tatt.

## 5.6 Pyrogallol enzymassay



### 5.6.1 Mobilt HRP

Vann, citratbuffer (0.1 M, pH 5), peroxidløsning (0.5 M) og pyrogallolløsning (50 mg/mL) ble tilsatt i fire eppendorfrør i henhold til tabell 10.

Tabell 10. Reagenser til pyrogallol enzymassay.

Reagens	Blank (µL)	Test 1 (µL)	Test 2 (µL)	Test 3 (µL)
Vann	210	210	210	210
Buffer	32	32	32	32
Peroxid løsning	16	16	16	16
Pyrogallol løsning	32	32	32	32

HRP (0.5 mg/mL) og citratbuffer ble tilsatt preparerte eppendorfrør i henhold til tabell 11.

Tabell 11. Reagenser for å starte pyrogallol enzymassay.

Reagens	Blank (µL)	Test 1 (µL)	Test 2 (µL)	Test 3 (µL)
Buffer	10	-	-	-
Enzym	-	10	10	10

UV/vis spekter ble tatt opp ved 420 nm og 600 nm hvert 20 sekund i 3 minutter. Endringen i A<sub>420</sub> mellom 0 og 20 sekunder skal ligge mellom 0.18 og 0.34. Enzymkonsentrasjonen ble tilpasset i henhold til dette.

Samme metode ble benyttet med fosfatbuffer.

### 5.6.2 Immobilisert HRP

Konsentrasjonen på immobilisert HRP ble funnet, deretter totalvolumet for å oppnå en konsentrasjon på 0.05 mg/mL og tilslutt mengde buffer som måtte tilsettes.

$$c = (0.213 \text{ mg/mL}/100) \times 64.02 = 0.136 \text{ mg/mL}$$

$$C1: 0.05 \text{ mg/mL} \quad C2: 0.136 \text{ mg/mL} \quad V1: \text{Antar volum PU lik 1}$$

$$V_2 = \frac{V_1 \cdot C_1}{C_2} = \frac{1 \cdot 0.05 \text{ mg/mL}}{0.136 \text{ mg/mL}} = 2.73 \text{ mL}$$

$$2.73 \text{ mL} - 1 = 1.73 \text{ mL}$$

Vann, citratbuffer (0.1 M, pH 6), peroxidløsning (0.5 M) og pyrogallolløsning (50 mg/mL) ble tilsatt i fire eppendorfrør i henhold til tabell 12.

*Tabell 12. Reagenser til pyrogallol enzymassay.*

Reagens	Blank (µL)	Test 1 (µL)	Test 2 (µL)	Test 3 (µL)
Vann	210	210	210	210
Buffer	32	32	32	32
Peroxid løsning	16	16	16	16
Pyrogallol løsning	32	32	32	32

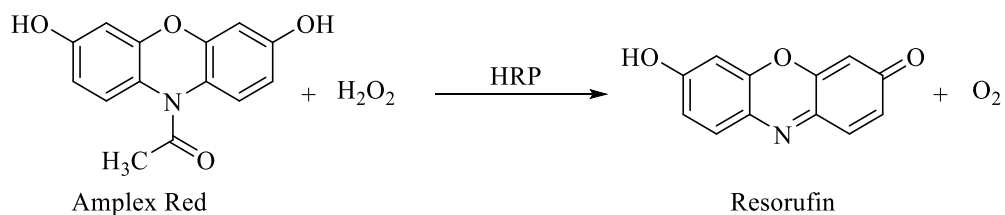
Reaksjonsløsningen ble tilsatt i beholderne til immobilisert HRP (0.05mg/mL) og citratbuffer ble tilsatt preparerte eppendorfrør i henhold til tabell 13.

*Tabell 13. Reagenser for å starte pyrogallol enzymassay.*

Reagens	Blank (µL)	Test 1 (µL)	Test 2 (µL)	Test 3 (µL)
Buffer	10	-	-	-
Enzym	-	10	10	10

UV/vis spekter ble tatt opp ved 420 nm og 600 nm hvert minutt i 3 minutter. Endringen i A420 mellom 0 og 20 sekunder skal ligge mellom 0.18 og 0.34. Enzymkonsentrasjonen ble tilpasset i henhold til dette.

## 5.7 Amplex red enzymassay



Amplex red (10 mM), immobilisert HRP og citratbuffer (0.1 M, pH 6) ble tilsatt eppendorfrør, i henhold til tabell 14, til et sluttvolum på 250  $\mu\text{L}$ . Blankprøven bestod av citratbuffer rene PU mikropartikler.

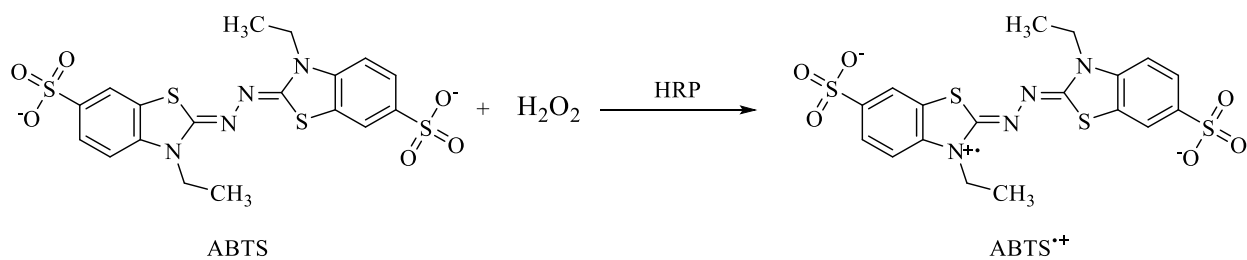
*Tabell 14. Reagenser for amplex red enzymassay.*

Reagens	Blank ( $\mu\text{L}$ )	HRP ( $\mu\text{L}$ )	FT ( $\mu\text{L}$ )	Vask ( $\mu\text{L}$ )	0.1 mg/mL immobilisert PU
Amplex red	2.5	2.5	2.5	2.5	2.5
Enzym	-	25	100	222.5	222.5
Buffer	222.5	197.5	122.5	-	-
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	25	25	25	25	25

Alle prøvene ble tilsatt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (500  $\mu\text{M}$ ) i henhold til tabell 14. Fargeendring ble observert.



## 5.8 ABTS enzymassay



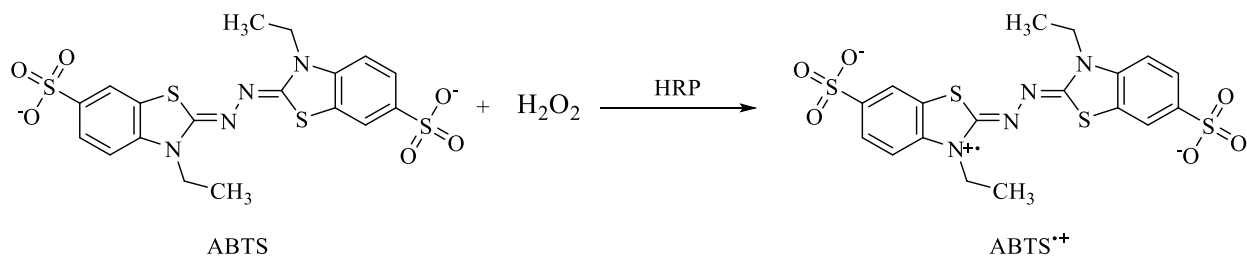
ABTS (9.1 mM), citratbuffer (0.1 M, pH 5), og immobilisert HRP (1 mg/mL) ble tilsatt eppendorfrør i henhold til tabell 15. Blankprøven bestod av citratbuffer med rene PU mikropartikler.

*Tabell 15. Reagenser for ABTS enzymassay.*

Reagens	Blank (μL)	Test (μL)
9.1 mM ABTS	290	290
Citrat buffer	5	-
HRP	-	5
0.3 % H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10	10

Alle prøvene ble tilsatt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0.3 %) i henhold til tabell 15. Fargeendring ble observert.

## 5.9 ABTS enzymassay med bruk av immobilisert HRP gjentatte ganger



### 5.9.1 Proteinfilterplate

PU mikropartikler (5 µL, 0.5 mg/mL), mobilt HRP (5 µL, 0.5 mg/mL) og immobilisert HRP (5 µL, 0.5 mg/mL) ble pipetert i brønner på en proteinfilterplate. Brønnene ble tilsatt ABTS (290 µL, 9.1 mM) og H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 µL, 0.3 %). Etter 4 minutter ble prøvene filtrert. Brønnene ble vasket med citratbuffer (300 µL, 1 M, pH 5) og prosessen gjentatt fem ganger. Fargeendring ble observert.

### 5.9.2 Büchnertrakt

PU mikropartikler (15 µL, 0.5 mg/mL), mobilt HRP (15 µL, 0.5 mg/mL) og immobilisert HRP (15 µL, 0.5 mg/mL) ble pipetert over i büchnertrakter med filterstørrelse D3. Büchnertraktene ble tilsatt ABTS (870 µL, 9.1 mM) og H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30 µL, 0.3 %). Etter 3 minutter ble prøvene filtrert. Brønnene ble vasket med citratbuffer (300 µL, 1 M, pH 5) og prosessen gjentatt fem ganger. Fargeendring ble observert.

## 6. Referanser

1. Kochane, T., Budriene, S., Miasojedovas, S., Ryskevici, N., Straksys, A., Maciulyte, S., Ramanaviciene, A., Polyurethane-gold and polyurethane-silver nanoparticles conjugates for efficient immobilization of maltogenase. *Colloids Surf. A*. **2017**, *532*, 436-443.
2. Budriene, S., Romaskevici, T., Pielichowski, K., Pielichowski, J., Synthesis and characterization of polyurethane microspheres and their application for immobilization of maltogenase. *Polym. Adv. Technol.* **2006**, *18*, 67-71.
3. Ore, S., Stori, A. Polymerer. <https://snl.no/polymerer> (accessed 30.03.2020).
4. Mülhaupt, R., Hermann Staudinger and the Origin of Macromolecular Chemistry. *Angew. Chem.* **2004**, *433* (9), 1054-1063.
5. Staudinger, H., Über Polymerisation. *Polym. Chem.* **1920**, *53* (6), 1073-1085.
6. Naka, K., Monomers, Oligomers, Polymers, and Macromolecules (Overview). In *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*, Kobayashi, S.; Müllen, K., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2015**; pp 1295-1300.
7. Rudin, A., *The Elements of Polymer Science and Engineering: An Introductory Text and Reference for Engineers and Chemists*. Academic Press: **1999**; p 510.
8. Su, W. F., Principles of Polymer Design and Synthesis. Springer, Berlin, Heidelberg: **2013**; pp 1-8.
9. Polyuretaner. <https://snl.no/polyuretaner> (accessed 30.03.2020).
10. Donovan, B. R., Patton, D. L., Step Polyaddition Polymerizations, an Overview. In *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*, Kobayashi, S., Müllen, K., Ed. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2015**; pp 2268-2273.
11. Ishizone, T.; Goseki, R., Anionic Addition Polymerization (Fundamental). In *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*, Kobayashi, S.; Müllen, K., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2015**; pp 23-33.
12. Odian, G., Principles of Polymerization. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey: **2004**; pp 1-7.
13. Ore, S., Klepp, I. G., Helseth, L. E. Polyester. <https://snl.no/polyester> (accessed 07.04.2020).
14. Ore, S., Helseth, L.E. Polymerisasjon. <https://snl.no/polymerisasjon> (accessed 25.04.2020).
15. Ore, S., Stori, A. Polyetylen. <https://snl.no/polyetylen> (accessed 25.04.2020).
16. Rahman, M. M.; Rabbani, M. M.; Saha, J. K., Polyurethane and Its Derivatives. In *Functional Polymers*, Jafar Mazumder, M. A.; Sheardown, H.; Al-Ahmed, A., Eds. Springer International Publishing: Cham, **2019**; pp 225-240.
17. Barksby, N.; Dormish, J. F.; Haider, K. W., Polyurethane Synthesis. In *Encyclopedia of Polymeric Nanomaterials*, Kobayashi, S.; Müllen, K., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2015**; pp 2091-2103.
18. Melo, J. A., Cavaco, L.I., *Polyurethane : Properties, Structure and Applications*. New York: Nova Science Publishers, Inc: **2012**.
19. Romaškevič, T., Budrienė, S., Pielichowski, K., Pielichowski, J., Application of polyurethane-based materials for immobilization of enzymes and cells: a review. *Chemija* **2006**, *17* (4), 74-89.
20. Feldman, D., Polymer Weathering: Photo-Oxidation. *Journal of Polymers and the Environment* **2002**, *10* (4), 163-173.
21. Szycher, M., Szycher's handbook of polyurethanes. CRC Press LLC: **1999**; pp 2.09-2.11.
22. Ore, S. Polyuretanskumplast. <https://snl.no/polyuretanskumplast> (accessed 29.06.2020).

23. Skare, M. O. Nanopartikkel. <https://snl.no/nanopartikkel> (accessed 24.04.2020).
24. Phadtare, S.; Kumar, A.; Vinod, V. P.; Dash, C.; Palaskar, D. V.; Rao, M.; Shukla, P. G.; Sivaram, S.; Sastry, M., Direct Assembly of Gold Nanoparticle “Shells” on Polyurethane Microsphere “Cores” and Their Application as Enzyme Immobilization Templates. *Chemistry of Materials* **2003**, *15* (10), 1944-1949.
25. Wriedt, T., Mie Theory: A Review. In *The Mie Theory: Basics and Applications*, Hergert, W.; Wriedt, T., Eds. Springer Berlin Heidelberg: Berlin, Heidelberg, **2012**; pp 53-71.
26. Bateman, H., The mathematical analysis of electrical and optical wave-motion on the basis of maxwell's equations. Cambridge University Press: **1915**; pp 58-59.
27. Panalytical., M. Mastersizer 3000: Smarter particle sizing brochure. <https://www.malvernpanalytical.com/en/products/product-range/mastersizer-range/mastersizer-3000> (accessed 19.06.2020).
28. Hayes, B. L., Microwave Synthesis: Chemistry at the Speed of Light. CEM Publishing: **2002**; pp 11-25.
29. Kappe, C. O., Dallinger, D., Murphree, S., Practical microwave synthesis for organic chemists: strategies, instruments, and protocols. Wiley-VCH, Weinheim: **2009**; pp 1-5.
30. Kappe, C. O., Dallinger, D., Murphree, S., Practical microwave synthesis for organic chemists: strategies, instruments, and protocols. Wiley-VCH, Weinheim: **2009**; pp 11-42.
31. Kalescky, R., Kraka, E., Cremer, D., Identification of the Strongest Bonds in Chemistry. *J. Phys. Chem. A* **2013**, *117* (36), 8981-8995.
32. Loupy, A., Microwaves in organic synthesis. Wiley-VCH, Weinheim: **2006**; pp 1-57.
33. Lied, F. Høyfrekvensoppvarming. <https://snl.no/h%C3%B8yfrekvensoppvarming> (accessed 23.03.2020).
34. Sandstad, J. Dielektrikum. <https://snl.no/dielektrikum> (accessed 20.03.2020).
35. Tipler, P. A., Mosca, G., Physics for Scientists and Engineers. W.H. Freeman and Company: **2008**; pp 1040-1041.
36. Dielektrisk tap. [https://snl.no/dielektrisk\\_tap](https://snl.no/dielektrisk_tap) (accessed 20.03.2020).
37. Kappe, C. O., Dallinger, D., Murphree, S., Practical microwave synthesis for organic chemists: strategies, instruments, and protocols. Wiley-VCH, Weinheim: **2009**; pp 161-200.
38. Loupy, A., Microwaves in organic synthesis. Wiley-VCH, Weinheim: **2006**; pp 653-684.
39. Sandstad, J. Dipol. <https://snl.no/dipol> (accessed 07.04.2020).
40. Fruton, J. S., Proteins, Enzymes, Genes: The Interplay of Chemistry and Biology. New Haven, Conn: Yale University: 1999; pp 171-219.
41. Yoo, Y. J.; Feng, Y.; Kim, Y. H.; Yagonia, C. F. J., Introduction. In *Fundamentals of Enzyme Engineering*, Yoo, Y. J.; Feng, Y.; Kim, Y.-H.; Yagonia, C. F. J., Eds. Springer Netherlands: Dordrecht, 2017; pp 3-12.
42. Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., og Losick, R. M., Molecular Biology of the Gene. 7 ed.; Pearson Education Inc.: 2014; pp 121-143.
43. Gåbøl-Undersrud, E. Proteiner. <https://snl.no/proteiner> (accessed 12.06.2020).
44. Hauge, J. G., Vaaje-Kolstad, G., Kierulf, P. Enzymer. <https://snl.no/enzymer> (accessed 19.06.2020).
45. Evensen, S. A. Hem. <https://sml.snl.no/hem> (accessed 19.06.2020).
46. Veitch, N. C., Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme. *Phytochemistry* **2004**, *65* (3), 249-259.
47. Poulos, T. L., Heme Enzyme Structure and Function. *Chemical Reviews* **2014**, *114* (7), 3919-3962.
48. Hauge, J. G. Isoenzymer. <https://snl.no/isoenzymer> (accessed 19.06.2020).

49. Homaei, A. A.; Sariri, R.; Vianello, F.; Stevanato, R., Enzyme immobilization: an update. *J Chem Biol* **2013**, *6* (4), 185-205.
50. Hauge, J. G. Enzymkinetikk. <https://snl.no/enzymkinetikk> (accessed 22.06.2020).
51. Jacobsen, E. Elektroforese. <https://snl.no/elektroforese> (accessed 12.06.2020).
52. . Gelelektroforese 2011.  
<https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/g/gelelektrofor.html>  
(accessed 12.06.2020).
53. Watson, J. D., Baker, T. A., Bell, S. P., Gann, A., Levine, M., og Losick, R. M., *Molecular Biology of the Gene*. 7 ed.; Pearson Education Inc.: 2014; p 176.
54. . SDS-polyakrylamid gelelektroforese 2014.  
<https://www.mn.uio.no/ibv/tjenester/kunnskap/plantefys/leksikon/s/sds.html> (accessed 11.06.2020).
55. Pavlova, A. S., Dyudeeva, E.S., Kupryushkin, M.S., Amirkhanov, N.V., Pyshnyi, D.V. og Pyshnaya, I.A., SDS-PAGE procedure: Application for characterization of new entirely uncharged nucleic acids analogs. *Electrophoresis* **2018**, *39* (4), 670-674.
56. Cleland, W. W., Dithiothreitol, a new protective reagent for SH groups. *Biochemistry* **1964**, *3*, 480-482.
57. Polyakrylamid. <https://snl.no/polyakrylamid> (accessed 12.06.2020).
58. Bisswanger, H., Enzyme assays. *Perspect. Sci.* **2014**, *1* (1-6), 41-55.
59. Beers lov. [https://snl.no/Beers\\_lov](https://snl.no/Beers_lov) (accessed 20.06.2020).
60. Singh, P., Morris, H., Tivanski, A. V., Kohen, A., Determination of concentration and activity of immobilized enzymes. *Anal. Biochem.* **2015**, *484*, 169-172.

## 7. Vedlegg

### 7.1 Syntese av PU mikropartikler

#### 7.1.1 Mikrobølger

Tabell 16. Syntese av PU mikropartikler med mikrobølger.

1:5 PVA:HDI			Mikro		
Batch	PVA (g)	Beholder (mL)	Tid (min)	Temperatur (°C)	Vekt (g)
AL-01	0.0272	2-5	90	120	0.710
AL-02	0.0258	2-5	90	120	0.799
AL-03	0.0253	2-5	90	120	0.769
AL-04	0.0268	2-5	60	120	0.913
<b>AL-05</b>	0.0260	2-5	60	120	0.904
AL-06	0.0262	2-5	60	120	0.836
AL-07	0.0262	2-5	15	120	1.032
AL-08	0.0270	2-5	15	120	0.923
AL-09	0.0261	2-5	5	120	1.115
AL-10	0.0260	2-5	5	120	1.266
AL-11	0.0266	2-5	5	120	0.957
AL-16	0.0262	2-5	15	120	0.724
AL-17	0.0299	2-5	15	120	0.645
AL-18	0.0269	2-5	15	120	0.687
AL-19	0.0255	2-5	15	120	0.748
AL-20	0.0254	2-5	15	120	0.708
AL-21	0.0264	2-5	15	120	0.648
AL-22	0.0251	2-5	3	170	0.413
AL-23	0.0261	2-5	5.3	160	0.654
AL-24	0.0269	2-5	11	150	0.614
AL-25	0.0256	2-5	2	120	0.331
AL-26	0.0262	2-5	7	120	0.294
AL-30	0.0262	2-5	3	170	0.785
AL-32	0.0784	10-20	2	170	3.132
AL-33	0.0772	10-20	2	170	1.548
PVA:HDI			Mikro		
Batch	PVA (g)	Beholder (mL)	Tid (min)	Temp (°C)	Vekt (g)
1:10	0.0785	10-20	2	170	1.536
1:15	0.0776	10-20	2	170	1.439
1:20	0.0778	10-20	2	170	1.541
1:25	0.0774	10-20	2	170	1.999
1:50	0.0519	10-20	2	170	0.770
Batch	PVA (g)	Beholder (mL)	Tid (min)	Temp (°C)	Vekt (g)
1:05	0.0776	10-20	2	170	2.192
1:10	0.0780	10-21	2	170	2.854
1:15	0.0775	10-22	2	170	2.805
1:20	0.0788	10-23	2	170	1.831

### 7.1.2 Konvensjonell oppvarming

*Tabell 17. Syntese av PU mikropartikler med konvensjonell oppvarming.*

1:5 PVA:HDI		
Batch	PVA (g)	Vekt (g)
K-1	0.172	4.803
K-2	0.166	5.735
K-3	0.159	7.199
K-4	0.163	6.558
K-5	0.156	6.511
K-6	0.156	6.122
K-7	0.161	3.869

## 7.2 Immobilisering av HRP på PU mikropartikler

### 7.2.1 Mikrobølger

Tabell 18. Målt absorbans med UV/vis av supernatanten til immobilisert HRP og utregning av immobiliseringsprosent samt konsentrasjonen til HRP.

Batch	Parallell	Abs 403	Abs 600	Justert 403	C (µM)	Immobil (%)	Gj.snitt	STD	C enzym i PU(µM)	mL			
AL-01	1.1	0.0206	-0.0107	-0.0118	0.03244	0.3244	0.1104	88.96	89.76	3.60	0.189	3.79	2.79
	1.2	0.0348	-0.0033	-0.0045	0.03929	0.3929	0.1337	86.63			0.185	3.69	2.69
AL-02	1.3	0.0274	0.0100	0.0088	0.01853	0.1853	0.0631	93.69			0.200	3.99	2.99
	2.1	0.0483	0.0188	0.0177	0.03056	0.3056	0.1040	89.60	88.66	1.40	0.191	3.82	2.82
	2.2	0.0405	0.0037	0.0025	0.03802	0.3802	0.1294	87.06			0.185	3.71	2.71
AL-03	2.3	0.0339	0.0037	0.0026	0.03134	0.3134	0.1067	89.33			0.190	3.81	2.81
	3.1	0.0289	0.0067	0.0055	0.02338	0.2338	0.0796	92.04	90.77	1.14	0.196	3.92	2.92
	3.2	0.0333	0.0046	0.0035	0.02985	0.2985	0.1016	89.84			0.191	3.83	2.83
Batch	3.3	0.0442	0.0172	0.0161	0.02813	0.2813	0.0958	90.42			0.193	3.85	2.85
	Parallell	Abs 403	Abs 600	Justert 403	C (µM)	Immobil (%)	Gj.snitt	STD	C enzym i PU(µM)	mL			
	Blank	0.0000	0.00031										
	Enzym	0.2558	0.00991		2.5579								
AL-04	4.1	0.0950	0.02967	0.01976	0.0753	0.7525	0.2942	70.58	70.73	7.86	0.150	3.01	2.01
	4.2	0.0903	0.00549	-0.00441	0.0948	0.9476	0.3704	62.96			0.134	2.68	1.68
	4.3	0.2605	0.21583	0.20592	0.0546	0.5458	0.2134	78.66			0.168	3.35	2.35
AL-05	5.1	0.1215	0.02451	0.01461	0.1068	1.0684	0.4177	58.23	51.30	6.11	0.124	2.48	1.48
	5.2	0.1463	0.02571	0.01580	0.1305	1.3051	0.5102	48.98			0.104	2.09	1.09
	5.3	0.1392	0.01271	0.00280	0.1364	1.3639	0.5332	46.68			0.099	1.99	0.99
AL-06	6.1	0.1124	0.01110	0.00119	0.1112	1.1121	0.4348	56.52	56.76	2.69	0.120	2.41	1.41
	6.2	0.1067	0.01320	0.00330	0.1034	1.0344	0.4044	59.56			0.127	2.54	1.54
	6.3	0.1107	0.00341	-0.00649	0.1172	1.1716	0.4580	54.20			0.115	2.31	1.31



Tabell 19. Målt absorbanse med UV/vis av supernatanten til immobilisert HRP og utregning av immobiliseringsprosent samt konsentrasjonen til HRP.

Batch	Parallell	Abs 403	Abs 600		Justert 403	C (µM)		Immobil (%)	Gj.snitt	STD	C enzym i PU(µM)	mL	
	Blank	-0.0002	-0.00116										
	Enzym	0.2674	0.00697			2.6742							
AL-07	7.1	0.0891	0.02027	0.0133	0.0758	0.7582	0.2835	71.65	71.56	4.72	0.153	3.05	2.05
	7.2	0.0831	0.02655	0.0196	0.0636	0.6356	0.2377	76.23			0.162	3.25	2.25
	7.3	0.0894	0.00757	0.0006	0.0888	0.8882	0.3321	66.79			0.142	2.85	1.85
AL-08	8.1	0.0580	-0.00006	-0.0070	0.0650	0.6504	0.2432	75.68	74.87	0.97	0.161	3.22	2.22
	8.2	0.0574	-0.00212	-0.0091	0.0665	0.6649	0.2486	75.14			0.160	3.20	2.20
	8.3	0.0681	0.00496	-0.0020	0.0701	0.7009	0.2621	73.79			0.157	3.14	2.14
AL-09	10.1	0.0853	-0.01107	-0.0180	0.1034	1.0335	0.3865	61.35	70.29	9.58	0.131	2.61	1.61
	10.2	0.0610	0.01554	0.0086	0.0524	0.5239	0.1959	80.41			0.171	3.43	2.43
	10.3	0.0769	0.00123	-0.0057	0.0826	0.8263	0.3090	69.10			0.147	2.94	1.94
AL-10	11.1	0.0615	-0.00446	-0.0114	0.0729	0.7291	0.2726	72.74	71.99	0.74	0.155	3.10	2.10
	11.2	0.0691	0.00113	-0.0058	0.0749	0.7493	0.2802	71.98			0.153	3.07	2.07
	11.3	0.0652	-0.00472	-0.0117	0.0769	0.7685	0.2874	71.26			0.152	3.04	2.04
AL-11	12.1	0.0975	-0.01056	-0.0175	0.1150	1.1502	0.4301	56.99	57.41	0.66	0.121	2.43	1.43
	12.2	0.1093	0.00147	-0.0055	0.1148	1.1477	0.4292	57.08			0.122	2.43	1.43
	12.3	0.0985	-0.00638	-0.0133	0.1119	1.1187	0.4183	58.17			0.124	2.48	1.48

## 7.2.2 PU-Au-NP

Tabell 20. Målt absorbans med UV/vis av supernatanten til immobilisert HRP på PU-Au-NP og utregning av immobiliseringsprosent samt konsentrasjonen til HRP.

Parallell	Abs 403	Abs 500		Justert 403 C (µM)		Immob (%)	Gj.snitt	SDT	C enzym i PU(µM)		mL	
buffer	0.0229	0.0216										
CB(bare HRP)	0.3348	0.0222			3.3483							
AL.19.1	0.1765	0.0032	0.0032	0.1733	1.7331	0.5176	48.24	51.26	3.29	0.103	2.05	1.05
AL.19.2	0.1493	-0.0021	-0.0021	0.1514	1.5145	0.4523	54.77			0.117	2.33	1.33
AL.19.3	0.1579	-0.0069	-0.0069	0.1648	1.6484	0.4923	50.77			0.108	2.16	1.16
AL.20.1	0.1752	-0.0064	-0.0064	0.1816	1.8159	0.5423	45.77	43.07	3.18	0.097	1.95	0.95
AL.20.2	0.1934	-0.0090	-0.0090	0.2024	2.0239	0.6045	39.55			0.084	1.69	0.69
AL.20.3	0.1752	-0.0127	-0.0127	0.1879	1.8792	0.5612	43.88			0.093	1.87	0.87

## 7.2.3 Citratbuffer og fosfatbuffer

Tabell 21. Målt absorbans med UV/vis av supernatanten til immobilisert HRP i citratbuffer og utregning av immobiliseringsprosent samt konsentrasjonen til HRP.

Batch	Parallell	Abs 403	Abs 600		Justert 403 C (µM)		Immob (%)	Gj.snitt	STD	C enzym i PU(µM)		mL	
	buffer	-0.0012	-0.0020										
	CB (bare HRP)	0.2743	-0.0001			2.7425							
K-1	C.1.1	0.2316	0.1044	0.1045	0.1271	1.2712	0.4635	53.65	47.23	5.62	0.114	2.29	1.29
	C.1.2	0.2721	0.1207	0.1208	0.1514	1.5135	0.5519	44.81			0.095	1.91	0.91
	C.1.3	0.2091	0.0533	0.0534	0.1557	1.5570	0.5677	43.23			0.092	1.84	0.84
K-2	C.2.1	0.2224	0.0780	0.0780	0.1444	1.4436	0.5264	47.36	43.06	4.13	0.101	2.02	1.02
	C.2.2	0.1861	0.0191	0.0192	0.1670	1.6696	0.6088	39.12			0.083	1.67	0.67
	C.2.3	0.1771	0.0198	0.0199	0.1572	1.5719	0.5732	42.68			0.091	1.82	0.82
C.AL-16	C.16.1	0.0787	-0.0179	-0.0178	0.0965	0.9648	0.3518	64.82	64.10	7.06	0.138	2.76	1.76
	C.16.2	0.1051	-0.0138	-0.0137	0.1188	1.1876	0.4330	56.70			0.121	2.42	1.42
	C.16.3	0.0645	-0.0158	-0.0157	0.0802	0.8017	0.2923	70.77			0.151	3.01	2.01
C.AL-17	C.17.1	0.0913	0.0194	0.0195	0.0718	0.7178	0.2617	73.83	70.36	3.37	0.157	3.14	2.14
	C.17.2	0.0620	-0.0199	-0.0198	0.0818	0.8183	0.2984	70.16			0.149	2.99	1.99
	C.17.3	0.0838	-0.0066	-0.0065	0.0903	0.9027	0.3292	67.08			0.143	2.86	1.86
C.AL-18	C.18.1	0.1274	0.0286	0.0287	0.0987	0.9869	0.3598	64.02	64.23	0.75	0.136	2.73	1.73
	C.18.2	0.0897	-0.0101	-0.0101	0.0998	0.9980	0.3639	63.61			0.135	2.71	1.71
	C.18.3	0.1033	0.0074	0.0075	0.0958	0.9582	0.3494	65.06			0.139	2.77	1.77

Tabell 22. Målt absorbans med UV/vis av supernatanten til immobilisert HRP i fosfatbuffer og utregning av immobiliseringsprosent samt konsentrasjonen til HRP.

Batch	Parallell	Abs 403	Abs 600		Justert 403 C (µM)		Immob (%)	Gj.snitt	STD	C enzym i PU(µM)		mL	
	buffer	0.0014											
	CB(bare HRP)	0.2996	0.0087			2.9957							
P.K-1	P.1.1	0.4557	0.2262	0.2175	0.2382	2.3815	0.7950	20.50	24.36	4.41	0.044	0.87	-0.13
	P.1.2	0.3892	0.1684	0.1598	0.2294	2.2941	0.7658	23.42			0.050	1.00	0.00
	P.1.3	0.3492	0.1457	0.1370	0.2122	2.1218	0.7083	29.17			0.062	1.24	0.24
P.K-2	P.2.1	0.2989	0.0724	0.0637	0.2352	2.3520	0.7851	21.49	24.06	2.26	0.046	0.92	-0.08
	P.2.2	0.3075	0.0915	0.0828	0.2247	2.2471	0.7501	24.99			0.053	1.06	0.06
	P.2.3	0.3047	0.0908	0.0822	0.2226	2.2255	0.7429	25.71			0.055	1.10	0.10
P.16	P.16.1	0.2762	0.1721	0.1635	0.1127	1.1271	0.3762	62.38	66.92	6.07	0.133	2.66	1.66
	P.16.2	0.2922	0.1947	0.1860	0.1062	1.0615	0.3544	64.56			0.138	2.75	1.75
	P.16.3	0.2647	0.1949	0.1862	0.0785	0.7847	0.2620	73.80			0.157	3.14	2.14
P.17	P.17.1	0.2843	0.1719	0.1632	0.1211	1.2107	0.4042	59.58	58.32	2.78	0.127	2.54	1.54
	P.17.2	0.2890	0.1786	0.1699	0.1191	1.1912	0.3976	60.24			0.128	2.57	1.57
	P.17.3	0.2389	0.1131	0.1044	0.1344	1.3440	0.4487	55.13			0.117	2.35	1.35
P.18	P.18.1	0.5422	0.4300	0.4213	0.1209	1.2087	0.4035	59.65	63.86	4.06	0.127	2.54	1.54
	P.18.2	0.6991	0.6112	0.6025	0.0966	0.9657	0.3224	67.76			0.144	2.89	1.89
	P.18.3	0.6887	0.5900	0.5814	0.1074	1.0736	0.3584	64.16			0.137	2.73	1.73

## 7.3 Pyrogallol enzymassay

### 7.3.1 Førstøk på immobilisering med citrat buffer og fosfat buffer for å finne optimal konsentrasjon for assayet utført med mobilt HRP

Tabell 23. Målt absorbans med UV/vis av mobilt HRP i citratbuffer under pyrogallol enzymassay.

0,5 mg/mL	Gj.snittlig endring etter 20 sek:			0.8241			
sekunder	Blank	Test 1		Test 2		Test 3	
blank	0.0263	0.0263		0.0263		0.0263	
0	-0.0059	0.6699		-0.0199		0.0513	
20	-0.0097	1.1325	0.4626	1.0431	1.0630	0.9979	0.9466
40	-0.0074	1.1437		1.2050		1.0901	
60	-0.0053	1.1405		1.2450		1.1094	
80	-0.0047	1.1365		1.2655		1.1050	
100	-0.0038	1.1290		1.2704		1.1063	
120	-0.0033	1.1285		1.2711		1.0974	
140	-0.0026	1.1214		1.2710		1.0710	
160	-0.0026	1.1091		1.2767		1.0802	
180	-0.0026	1.1023		1.2715		1.0766	
0,05 mg/mL	Gj.snittlig endring etter 20 sek:			0.1846			
sekunder	Blank	Test 1		Test 2		Test 3	
blank	0.0044	0.0044		0.0044		0.0044	
0	-0.0039	0.0046		0.0213		0.0040	
20	0.0108	0.1462	0.1416	0.2752	0.2539	0.1624	0.1584
40	0.0250	0.3117		0.5139		0.3176	
60	0.0389	0.4525		0.6645		0.4550	
80	0.0520	0.5604		0.7712		0.5717	
100	0.0668	0.6423		0.8360		0.6610	
120	0.0817	0.7024		0.8805		0.7243	
140	0.0952	0.7507		0.8998		0.7763	
160	0.1091	0.7851		0.9207		0.8136	
180	0.1222	0.8080		0.9299		0.8397	
0,005 mg/mL	Gj.snittlig endring etter 20 sek:			0.0237			
sekunder	Blank	Test 1		Test 2		Test 3	
blank	0.0044	0.0044		0.0044		0.0044	
0	-0.0017	-0.0039		-0.0157		-0.0007	
20	0.0008	0.0108	0.0147	0.0297	0.0455	0.0103	0.0109
40	0.0029	0.0250		0.0526		0.0295	
60	0.0052	0.0389		0.0733		0.0467	
80	0.0073	0.0520		0.0936		0.0645	
100	0.0092	0.0668		0.1142		0.0815	
120	0.0114	0.0817		0.1336		0.0980	
140	0.0130	0.0952		0.1530		0.1156	
160	0.0148	0.1091		0.1713		0.1313	
180	0.0167	0.1222		0.1906		0.1495	

Tabell 24. Målt absorbans med UV/vis av mobil HRP i fosfatbuffer under pyragollol enzymassay.

0,5 mg/mL	Gj.snittlig endring etter 20 sek:			0.7946					
sekunder	Blank	Test 1		Test 2		Test 3			
blank	0.0034	0.0034		0.0034		0.0034			
0	-0.0633	0.0204		0.5111		0.2652			
20	-0.0536	0.9704	0.9500	1.0462	0.5351	1.1641	0.8989		
40	-0.0496	1.1114		1.1008		1.2487			
60	-0.0472	1.1484		1.1122		1.2739			
80	-0.0457	1.1572		1.1258		1.2800			
100	-0.0444	1.1571		1.1220		1.2847			
120	-0.0426	1.1723		1.1261		1.2898			
140	-0.0416	1.1686		1.1291		1.2908			
160	-0.0401	1.1685		1.1224		1.2801			
180	-0.0391	1.1649		1.1295		1.2894			
0,05 mg/mL	Gj.snittlig endring etter 20 sek:			0.2331					
sekunder	Blank 1	Test 1		Test 2		Test 3		Test 4	
blank	0.0034	0.0034		0.0034		0.0034		0.0034	
0	0.0034	0.0177		0.0118		0.0189		0.0084	
20	0.0116	0.2804	0.2627	0.4527	0.4408	0.1824	0.1635	0.3067	0.2983
40	0.0178	0.4935		0.7748		0.3506		0.5427	
60	0.0227	0.7237		0.9330		0.4918		0.7107	
80	0.0271	0.7816		1.0276		0.6030		0.8156	
100	0.0321	0.8195		1.0881		0.6942		0.8863	
120	0.0368	0.8496		1.1088		0.7714		0.9330	
140	0.0408	0.8692		1.1338		0.8325		0.9707	
160	0.0493	0.8741		1.1529		0.8821		0.9943	
180	0.0525	0.8845		1.1532		0.9168		1.0106	
0,005 mg/mL	Gj.snittlig endring etter 20 sek:			0.0385					
sekunder	Blank	Test 1		Test 2		Test 3			
blank	0.0034	0.0034		0.0034		0.0034			
0	0.0046	0.0152		0.0144		0.0144			
20	0.0870	0.0615	0.0463	0.0531	0.0387	0.0450	0.0305		
40	0.0112	0.1032		0.0975		0.0705			
60	0.0143	0.1446		0.1351		0.0959			
80	0.0161	0.1862		0.1747		0.1232			
100	0.0175	0.2269		0.2124		0.1489			
120	0.0203	0.2648		0.2493		0.1735			
140	0.0218	0.3034		0.2843		0.1985			
160	0.0232	0.3374		0.3165		0.2222			
180	0.0253	0.3685		0.3482		0.2434			

### 7.3.2 Immobilisert HRP i citratbuffer

Tabell 25. Målt absorbans med UV/vis av immobilisert HRP i citratbuffer under pyragollol enzymassay.

0,05 mg/mL								
Min	Blank							
	Abs 420	Abs 600						
blank	0.0012	0.0012						
0	-	-						
1	0.0385	0.0334						
2	0.0030	-0.0045						
3	-0.0003	-0.0118						
Min	AL-18.1		AL-18.2		AL-18.3			
	Abs 420	Abs 600	Abs 420	Abs 600	Abs 420	Abs 600		
blank	0.0012	-0.0012	0.0012	-0.0012	0.0012	-0.0012		
0	0.1449	0.1447	0.3922	0.3974	0.4879	0.4848		
1	0.6593	0.6152	0.2064	0.2026	1.0764	0.9840		
2	0.5710	0.5085	1.0634	0.9909	1.0235	0.9510		
3	0.7233	0.6730	1.0944	1.0276	1.2108	1.1080		
Min	K-1.1		K-1.2		K-1.3			
	Abs 420	Abs 600	Abs 420	Abs 600	Abs 420	Abs 600		
blank	0.0012	-0.0012	0.0012	-0.0012	0.0012	-0.0012		
0	0.1572	0.1102	0.3104	0.2091	0.2201	0.1619		
1	1.5454	1.2623	1.8280	1.3956	1.6243	1.2680		
2	1.6340	1.3307	1.9996	1.4834	1.6994	1.3368		
3	1.5996	1.3076	2.0271	1.5174	1.8520	1.4130		

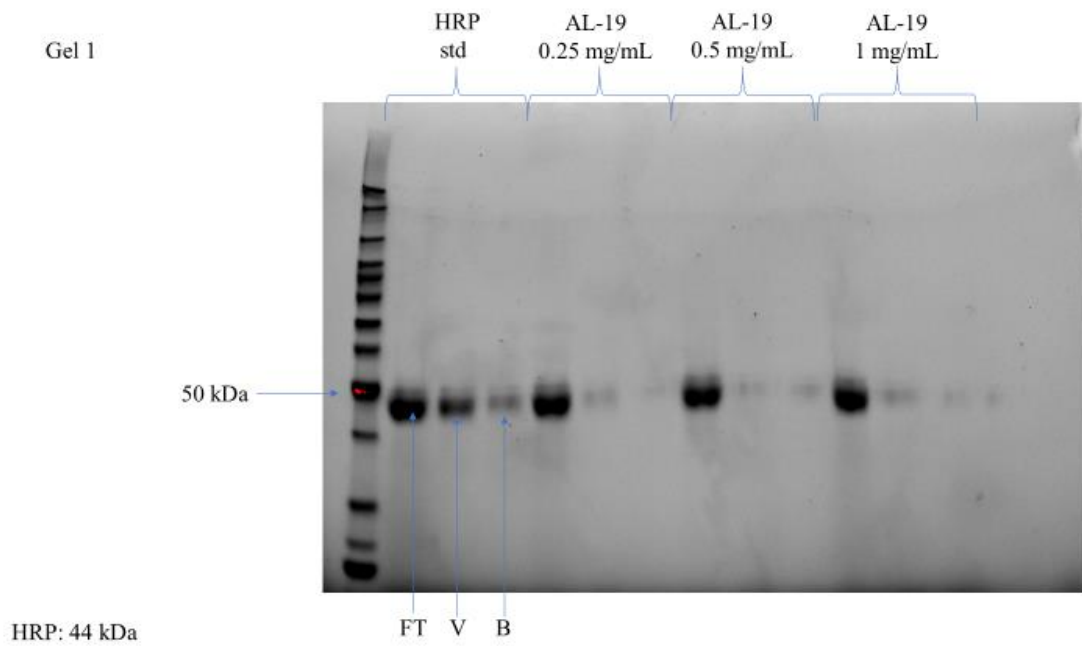
### 7.3.3 Immobilisert HRP på PU-Au-NP

Tabell 26. Målt absorbans med UV/vis av immobilisert HRP på PU-AU-NP under pyragollol enzymassay.

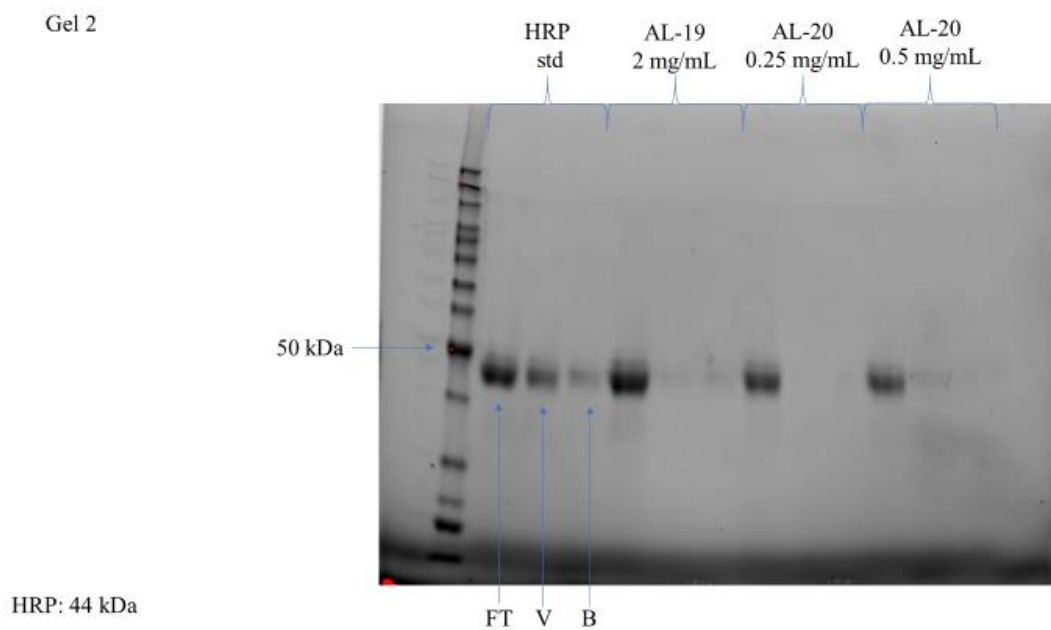
0,05 mg/mL			
Min	Blank	AL-19.AU	AL-20.AU
blank	-0.0018	-0.0018	-0.0018
1	0.0242	0.0968	0.0763
2	0.0298	0.0445	0.0528
3	0.0367	0.0577	0.0337

## 7.4 SDS-page gelbilder

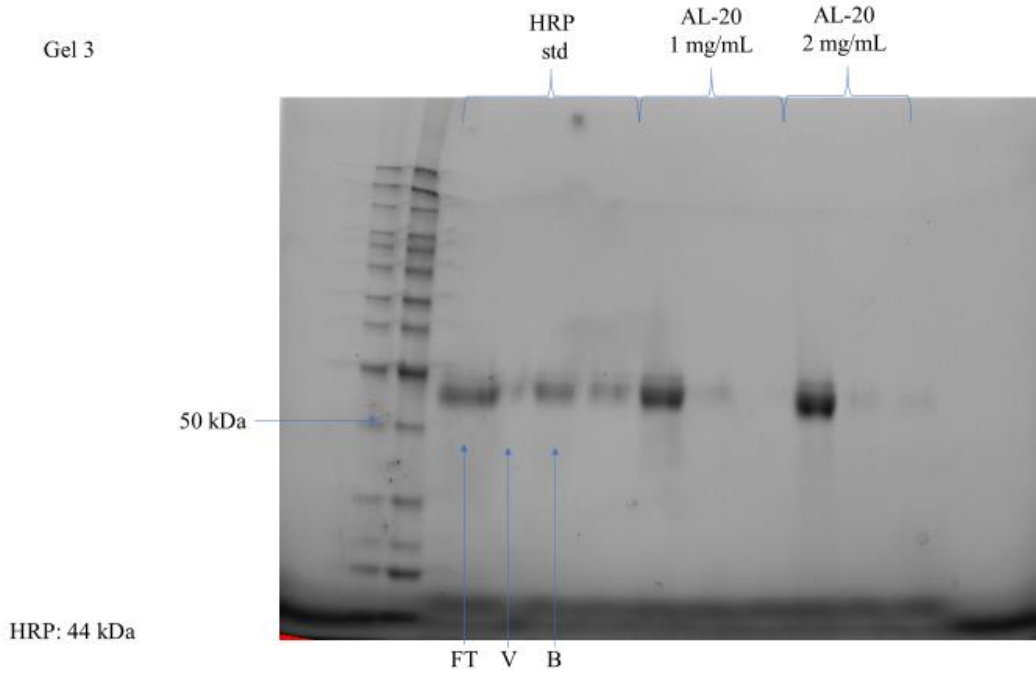
### 7.4.1 Økt mengde PU mikropartikler med konstant konsentrasjon HRP og forsøk på måling av enzymaktivitet med amplex red enzymassay.



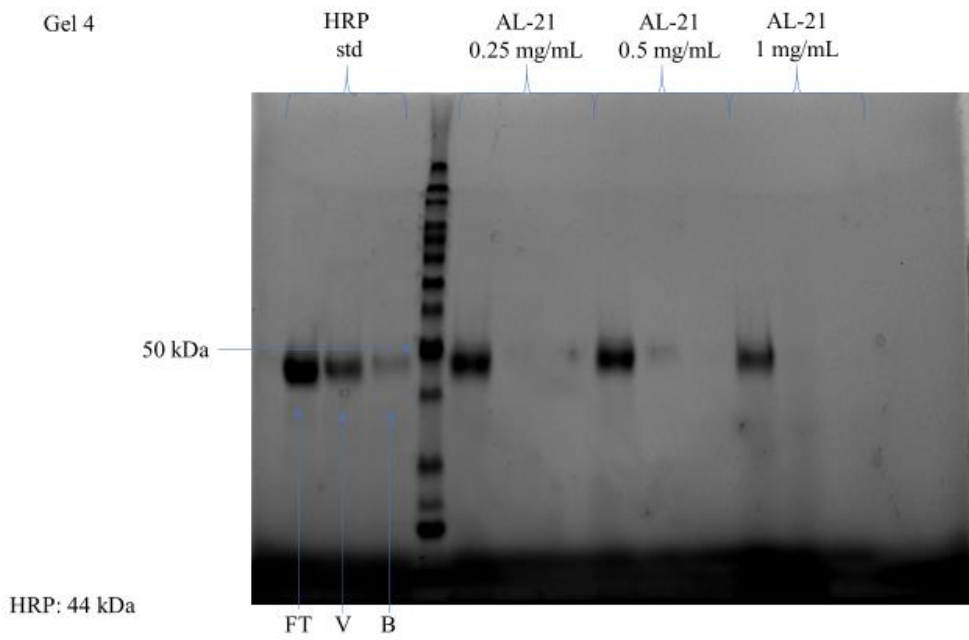
Figur 65. Gelbilde for prøve AL-19.



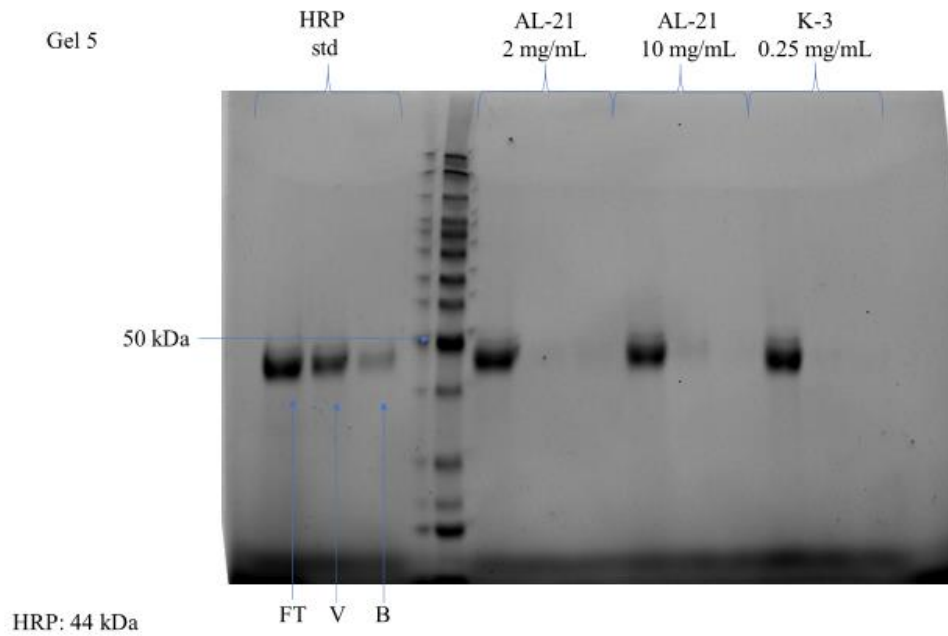
Figur 66. Gelbilde for prøve AL-19 og AL-20.



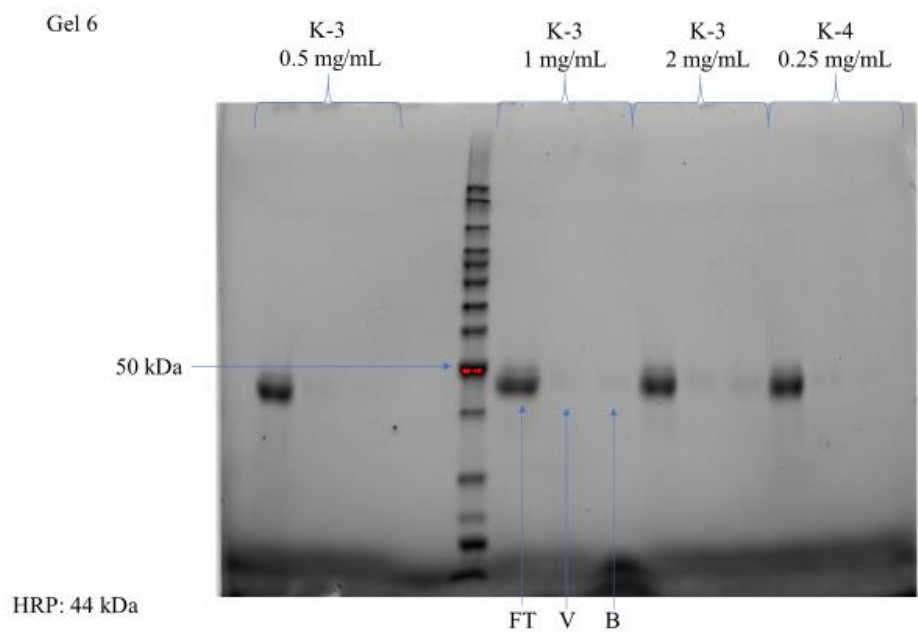
*Figur 67. Gelbilde for prøve AL-20.*



*Figur 68. Gelbilde for prøve AL-21.*

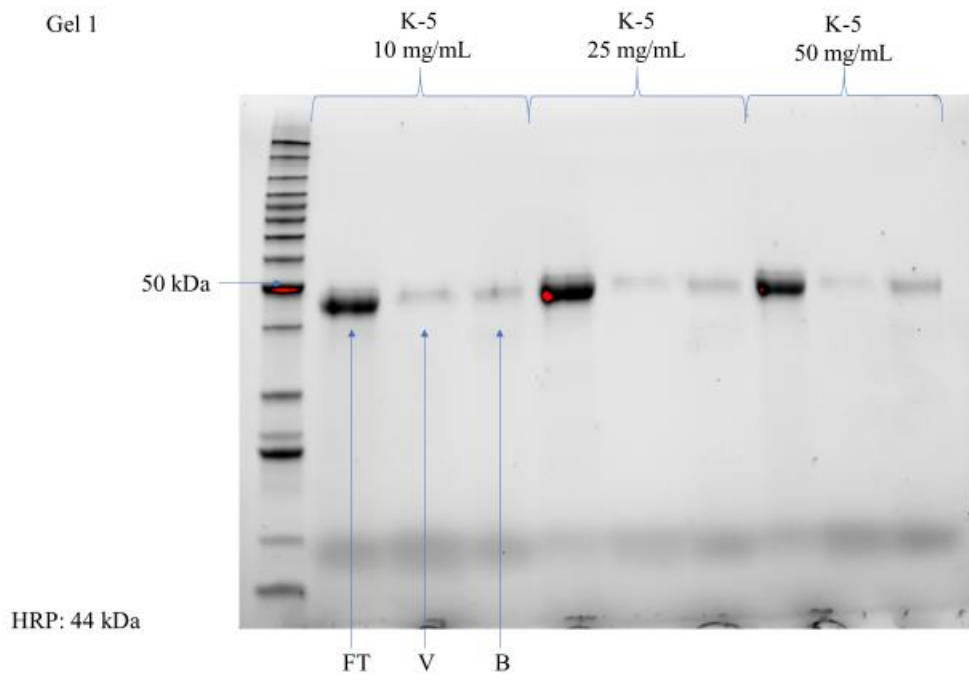


*Figur 69. Gelbilde for prøve AL-21 og K-3.*

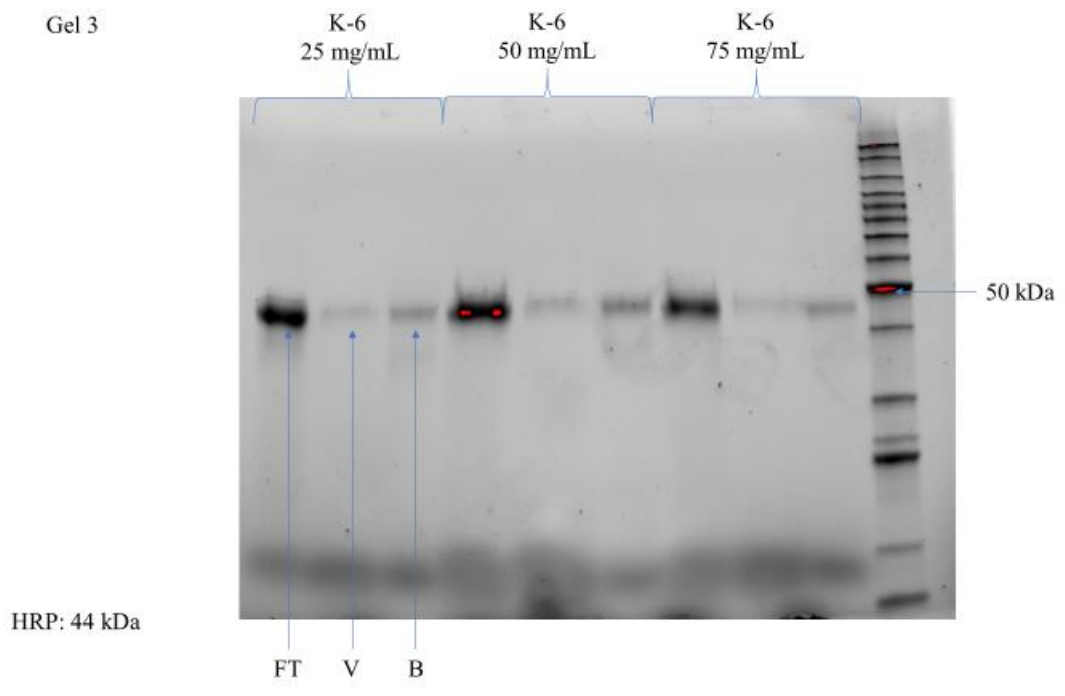


*Figur 70. Gelbilde for prøve K-3 og K-4.*





Figur 71. Gelbilde for prøve K-5.



Figur 72. Gelbilde for prøve K-6.

## 7.5 Partikkelstørrelse

Tabell 27. Dx-verdiene, D[4:3] og D[3:2] til PU mikropartikkel prøver.

Prøve	Dx (10)	Dx (50)	Dx (90)	D [4:3]	D [3:2]
Gj.snitt 'K-6'	38.3	77.6	649	222	69.9
Gj.snitt 'AL-32'	21	111	1530	469	53.7
Gj.snitt 2 'AL-32'	21.7	137	1860	581	57.5
Gj.snitt '1:10'	28.4	300	1630	564	79.4
Gj.snitt '1:15'	19.5	247	1460	501	60.6
Gj.snitt '1:20'	21.8	314	1710	596	68.8
Gj.snitt '1:25'	54.5	622	1940	826	134
Gj.snitt '1:50'	78.9	545	1910	780	129
Gj.snitt 'AL-21'	221	890	2220	1080	374

Tabell 28. Partikkelstørrelsesgrupperinger. Fra 0.01 til 2.42 var det ingen partikler.

Prøve	2.75	3.12	3.55	4.03	4.58	5.21	5.92	6.72	7.64	8.68	9.86	11.2	12.7
Gj.snitt 'K-6'	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.01	0.08	0.11	0.14	0.15	0.14	0.11	0.03
Gj.snitt 'AL-32'	0	0	0.08	0.1	0.14	0.18	0.23	0.3	0.39	0.52	0.7	0.91	1.18
Gj.snitt 2 'AL-32'	0	0.01	0.07	0.1	0.13	0.17	0.22	0.28	0.37	0.49	0.66	0.86	1.11
Gj.snitt '1:10'	0	0	0.08	0.11	0.14	0.18	0.24	0.3	0.37	0.45	0.55	0.67	0.79
Gj.snitt '1:15'	0	0	0	0.08	0.12	0.19	0.28	0.4	0.56	0.75	0.96	1.19	1.41
Gj.snitt '1:20'	0	0	0	0.08	0.12	0.18	0.26	0.36	0.5	0.66	0.83	1.02	1.2
Gj.snitt '1:25'	0	0	0	0	0	0.08	0.11	0.15	0.21	0.28	0.35	0.43	0.51
Gj.snitt '1:50'	0.03	0.08	0.1	0.12	0.14	0.16	0.18	0.2	0.24	0.27	0.31	0.35	0.39
Gj.snitt 'AL-21'	0	0	0	0	0	0	0	0.03	0.04	0.07	0.07	0.07	0.07
	<b>14.5</b>	<b>16.4</b>	<b>18.7</b>	<b>21.2</b>	<b>24.1</b>	<b>27.4</b>	<b>31.1</b>	<b>35.3</b>	<b>40.1</b>	<b>45.6</b>	<b>51.8</b>	<b>58.9</b>	<b>66.9</b>
	0.02	0.02	0.12	0.42	0.98	1.85	3	4.36	5.75	7.01	7.92	8.35	8.21
	1.48	1.81	2.15	2.46	2.74	2.98	3.16	3.29	3.37	3.41	3.39	3.33	3.22
	1.39	1.7	2	2.29	2.54	2.75	2.9	3.02	3.08	3.11	3.09	3.04	2.94
	0.92	1.05	1.16	1.26	1.34	1.39	1.43	1.46	1.48	1.5	1.52	1.55	1.6
	1.61	1.78	1.89	1.95	1.96	1.92	1.87	1.8	1.74	1.71	1.69	1.7	1.73
	1.36	1.49	1.58	1.63	1.63	1.61	1.57	1.53	1.51	1.5	1.51	1.55	1.59
	0.59	0.65	0.7	0.73	0.75	0.77	0.79	0.81	0.84	0.88	0.93	0.99	1.06
	0.42	0.44	0.45	0.45	0.45	0.46	0.48	0.51	0.56	0.62	0.7	0.77	0.85
	0.08	0.1	0.11	0.12	0.13	0.14	0.14	0.16	0.18	0.21	0.27	0.34	0.42
	<b>76</b>	<b>86.4</b>	<b>98.1</b>	<b>111</b>	<b>127</b>	<b>144</b>	<b>163</b>	<b>186</b>	<b>211</b>	<b>240</b>	<b>272</b>	<b>310</b>	<b>352</b>
	7.53	6.45	5.14	3.83	2.69	1.83	1.27	0.98	0.87	0.9	1	1.14	1.31
	3.07	2.89	2.69	2.5	2.33	2.17	2.02	1.85	1.68	1.51	1.38	1.3	1.3
	2.81	2.65	2.48	2.31	2.16	2.02	1.89	1.75	1.6	1.46	1.35	1.28	1.27
	1.66	1.74	1.86	2.03	2.26	2.54	2.86	3.19	3.51	3.78	4	4.12	4.14
	1.76	1.82	1.89	1.99	2.12	2.29	2.49	2.7	2.92	3.12	3.31	3.45	3.53
	1.64	1.7	1.77	1.86	1.98	2.12	2.29	2.47	2.67	2.86	3.05	3.22	3.36
	1.13	1.2	1.27	1.34	1.42	1.5	1.6	1.72	1.87	2.08	2.35	2.69	3.1
	0.91	0.96	1	1.04	1.1	1.22	1.42	1.73	2.15	2.71	3.37	4.1	4.81
	0.51	0.61	0.7	0.79	0.88	0.98	1.09	1.22	1.38	1.6	1.91	2.32	2.85

Tabell 29 Partikkelstørrelsesgrupperinger fortsettelse.

Prøve	400	454	516	586	666	756	859	976	1110	1260	1430	1630	1850
Gj.snitt 'K-6'	1.48	1.63	1.74	1.78	1.73	1.59	1.38	1.14	0.91	0.73	0.58	0.48	0.38
Gj.snitt 'AL-32'	1.37	1.51	1.7	1.9	2.09	2.25	2.37	2.46	2.49	2.48	2.41	2.27	2.04
Gj.snitt 2 'AL-32'	1.32	1.42	1.54	1.68	1.84	2.01	2.22	2.47	2.73	2.97	3.15	3.18	3.03
Gj.snitt '1:10'	4.04	3.82	3.5	3.13	2.75	2.42	2.2	2.11	2.14	2.24	2.35	2.39	2.29
Gj.snitt '1:15'	3.54	3.45	3.27	3.03	2.75	2.48	2.26	2.12	2.06	2.06	2.06	2.03	1.9
Gj.snitt '1:20'	3.45	3.46	3.39	3.25	3.06	2.87	2.71	2.63	2.61	2.65	2.69	2.66	2.51
Gj.snitt '1:25'	3.55	3.99	4.38	4.67	4.84	4.88	4.82	4.69	4.53	4.35	4.15	3.89	3.52
Gj.snitt '1:50'	5.42	5.81	5.91	5.7	5.23	4.61	3.99	3.49	3.21	3.14	3.21	3.27	3.18
Gj.snitt 'AL-21'	3.47	4.11	4.72	5.21	5.55	5.74	5.8	5.79	5.77	5.76	5.73	5.58	5.21
	<b>2100</b>	<b>2390</b>	<b>2710</b>	<b>3080</b>	<b>3500</b>								
	0.3	0.22	0.14	0.07	0								
	1.73	1.35	0.92	0.47	0								
	2.67	2.14	1.49	0.76	0								
	2.03	1.63	1.13	0.58	0								
	1.66	1.32	0.91	0.47	0								
	2.2	1.76	1.22	0.62	0								
	3.02	2.38	1.63	0.83	0								
	2.86	2.31	1.6	0.82	0								
	4.55	3.63	2.51	1.28	0								

## 7.6 Måling av konsentrasjon og immobiliseringsprosent med Nanodrop

### 7.6.1 Forsøk å finne metningspunkt mellom PU mikropartikler og HRP konsentrasjonen.

Tabell 30. Målt absorbans med UV/vis nanodrop av FT og V til immobilisert HRP med ulike konsentrasjoner og utregning av immobiliseringsprosent.

	Abs 403nm	Abs 403nm	Abs 403nm	Gj.snitt	STD	Konsentrasjon (mmol/L)	Konsentrasjon (mmol/mL)	Konsentrasjon (mg/mL)
0,5 mg/mL	0.820	0.840		0.830	0.00830	0.00000830	0.365	0.1826
0,2 mg/mL	0.240	0.240		0.240	0.00240	0.00000240	0.106	0.0528
0,1 mg/mL	0.120	0.170		0.145	0.00145	0.00000145	0.064	0.0319
0,25 mg/mL HRP, kjøleskap	0.340	0.350	0.340	0.343	0.00343	0.00000343	0.151	0.0315
0,1 mg/mL HRP, kjøleskap	0.130	0.120	0.130	0.127	0.00127	0.00000127	0.056	-0.0029
0,05 mg/mL HRP, kjøleskap	0.050	0.050	0.070	0.057	0.00057	0.00000057	0.025	0.0070
0,25 mg/mL HRP, risting	0.300	0.300	0.280	0.293	0.00293	0.00000293	0.129	0.0535
0,1 mg/mL HRP, risting	0.050	0.040	0.030	0.040	0.00040	0.00000040	0.018	0.0352
0,05 mg/mL HRP, risting	0.010	0.010	0.020	0.013	0.00013	0.00000013	0.006	0.0260
0,25 mg/mL HRP, kjøleskap FT	0.010	0.000	-0.010	0.000	0.00000	0.00000000	0.000	0.0315
0,1 mg/mL HRP, kjøleskap FT	-0.020	-0.010	-0.030	-0.020	-0.00020	-0.00000020	-0.009	0.0059
0,05 mg/mL HRP, kjøleskap FT	-0.020	-0.030	-0.040	-0.030	-0.00030	-0.00000030	-0.013	0.0202
0,25 mg/mL HRP, risting FT	-0.010	-0.010	0.000	-0.007	-0.00007	-0.00000007	-0.003	0.0565
0,1 mg/mL HRP, risting FT	-0.030	-0.030	-0.030	-0.030	-0.00030	-0.00000030	-0.013	0.0484
0,05 mg/mL HRP, risting FT	-0.040	-0.030	-0.010	-0.027	-0.00027	-0.00000027	-0.012	0.0378

Tabell 31. Fortsettelse av tabell 30.

	Konsentrasjon (mg/mL)	HRP i FT	Differanse 0,5 mg/mL og prøve	HRP i mg	mgHRP/mgPU	% Immobilisert
0,5 mg/mL	0.1826					
0,2 mg/mL	0.0528					
0,1 mg/mL	0.0319					
0,25 mg/mL HRP, kjøleskap	0.0315	0.0315		0.063	0.000841	17
0,1 mg/mL HRP, kjøleskap	-0.0029	-0.0029		-0.006	-0.000078	-6
0,05 mg/mL HRP, kjøleskap	0.0070	0.0070		0.014	0.000186	22
0,25 mg/mL HRP, risting	0.0535	0.0535		0.107	0.001428	29
0,1 mg/mL HRP, risting	0.0352	0.0352		0.070	0.000939	67
0,05 mg/mL HRP, risting	0.0260	0.0260		0.052	0.000694	82
0,25 mg/mL HRP, kjøleskap FT	0.0315					
0,1 mg/mL HRP, kjøleskap FT	0.0059					
0,05 mg/mL HRP, kjøleskap FT	0.0202					
0,25 mg/mL HRP, risting FT	0.0565					
0,1 mg/mL HRP, risting FT	0.0484					
0,05 mg/mL HRP, risting FT	0.0378					

### 7.6.2 Syntese av PU mikropartikler med konstant mengde PVA og økt mengde HDI.

Tabell 32. Målt absorbans med UV/vis nanodrop av FT og V til immobilisert HRP med økt mengde HDI i forhold til konstant mengde PVA og utregning av immobiliseringsprosent.

	Abs 403nm	Abs 403nm	Abs 403nm	Gj.snitt	STD	Konsentrasjon (mmol/L)	Konsentrasjon (mmol/mL)	Konsentrasjon (mg/mL)
0,5 mg/mL	0.82	0.84		0.830		0.00830	0.00000830	0.365
0,2 mg/mL	0.24	0.24		0.240		0.00240	0.00000240	0.106
0,1 mg/mL	0.12	0.17		0.145		0.00145	0.00000145	0.064
1:10	0.23	0.21	0.23	0.223	0.0115	0.00223	0.00000223	0.098
1:15	0.38	0.38	0.39	0.383	0.0058	0.00383	0.00000383	0.169
1:20	0.28	0.29	0.21	0.260	0.0436	0.00260	0.00000260	0.114
1:25	0.39	0.38	0.39	0.387	0.0058	0.00387	0.00000387	0.170
1:50	0.74	0.72	0.72	0.727	0.0115	0.00727	0.00000727	0.320
1:10 FT	0.01	0.00	-0.02	-0.003	0.0153	-0.00003	-0.00000003	-0.001
1:15 FT	0.00	-0.01	-0.02	-0.010	0.0100	-0.00010	-0.00000010	-0.004
1:20 FT	0.01	0.00	-0.01	0.000	0.0100	0.00000	0.00000000	0.000
1:25 FT	-0.01	-0.02	-0.02	-0.017	0.0058	-0.00017	-0.00000017	-0.007
1:50 FT	-0.02	-0.05	-0.03	-0.033	0.0153	-0.00033	-0.00000033	-0.015

Tabell 33. Fortsettelse av tabell 32.

	Konsentrasjon (mg/mL)	HRP i FT og V	Differanse 0,5 mg/mL og prøve	HRP i mg	mgHRP/mgPU	% Immobilisert	
0,5 mg/mL	0.365						
0,2 mg/mL	0.106						
0,1 mg/mL	0.064						
1:10	0.098	0.098		0.267	0.534	0.0071	73
1:15	0.169	0.169		0.197	0.393	0.0052	54
1:20	0.114	0.114		0.251	0.502	0.0067	69
1:25	0.170	0.170		0.195	0.390	0.0052	53
1:50	0.320	0.320		0.045	0.091	0.0012	12
1:10 FT	-0.001						
1:15 FT	-0.004						
1:20 FT	0.000						
1:25 FT	-0.007						
1:50 FT	-0.015						

### 7.6.3 Immobilisering av HRP på «gamle» PU mikropartikler.

Tabell 34. Målt absorbans med UV/vis nanodrop av FT og V til immobilisert HRP på «gamle» PU mikropartikler og utregning av immobiliseringsprosent.

	Abs 403nm	Abs 403nm	Abs 403nm	Gj.snitt	STD	Konsentrasjon (mmol/L)	Konsentrasjon (mmol/mL)	Konsentrasjon (mg/mL)
0,5 mg/mL	0.820	0.840		0.830		0.00830	0.00000830	0.365
0,2 mg/mL	0.240	0.240		0.240		0.00240	0.00000240	0.106
0,1 mg/mL	0.120	0.170		0.145		0.00145	0.00000145	0.064
1:10, 1	0.290	0.270	0.250	0.270	0.0200	0.00270	0.00000270	0.119
1:10, 2	0.240	0.260	0.300	0.267	0.0306	0.00267	0.00000267	0.117
1:10, 3	0.390	0.430	0.450	0.423	0.0306	0.00423	0.00000423	0.186
K-7	0.370	0.400	0.400	0.390	0.0173	0.00390	0.00000390	0.172
K-2	0.190	0.220	0.220	0.210	0.0173	0.00210	0.00000210	0.092
K-6	0.290	0.310	0.300	0.300	0.0100	0.00300	0.00000300	0.132
1:10, 1, FT	0.090	0.070	0.070	0.077	0.0115	0.00077	0.00000077	0.034
1:10, 2, FT	0.080	0.070	0.030	0.060	0.0265	0.00060	0.00000060	0.026
1:10, 3, FT	0.050	0.070	0.030	0.050	0.0200	0.00050	0.00000050	0.022
K-7	0.060	0.050	0.060	0.057	0.0058	0.00057	0.00000057	0.025
K-2	0.040	0.040	0.040	0.040	0.0000	0.00040	0.00000040	0.018
K-6	0.040	0.070	0.050	0.053	0.0153	0.00053	0.00000053	0.023

Tabell 35. Fortsettelse av tabell 34.

	Konsentrasjon (mg/mL)	HRP i FT og V	Differanse 0,5 mg/mL og prøve	HRP i mg	mgHRP/mgPU		% Immobilisert
0,5 mg/mL	0.365						
0,2 mg/mL	0.106						
0,1 mg/mL	0.064						
1:10, 1	0.119	0.15	0.21	0.43	0.0057	0.58	58
1:10, 2	0.117	0.14	0.22	0.44	0.0059	0.61	61
1:10, 3	0.186	0.21	0.16	0.31	0.0042	0.43	43
K-7	0.172	0.20	0.17	0.34	0.0045	0.46	46
K-2	0.092	0.11	0.26	0.51	0.0068	0.70	70
K-6	0.132	0.16	0.21	0.42	0.0056	0.57	57
1:10, 1, FT	0.034						
1:10, 2, FT	0.026						
1:10, 3, FT	0.022						
K-7	0.025						
K-2	0.018						
K-6	0.023						

#### 7.6.4. Forsøk på bruk av immobilisert HRP på PU mikropartikler gjentatte ganger med ABTS enzymassay.

Tabell 36. Målt absorpsjon med UV/vis nanodrop av FT og V til immobilisert HRP med økt mengde HDI i forhold til konstant mengde PVA og utregning av immobiliseringsprosent.

	Abs 403nm	Abs 403nm	Abs 403nm	Gj.snitt	STD	Konsentrasjon (mmol/L)	Konsentrasjon (Konsentrasjon (mg/mL)
0,5 mg/mL	0.820	0.840		0.83		0.00830	0.00000830
0,2 mg/mL	0.240	0.240		0.24		0.00240	0.00000240
0,1 mg/mL	0.120	0.170		0.15		0.00145	0.00000145
1:5	0.270	0.280	0.240	0.26	0.021	0.00263	0.00000263
1:10	0.300	0.310	0.330	0.31	0.015	0.00313	0.00000313
1:15	0.300	0.320	0.280	0.30	0.020	0.00300	0.00000300
1:20	0.110	0.140	0.160	0.14	0.025	0.00137	0.00000137
1:5 FT	0.060	0.080	0.090	0.08	0.015	0.00077	0.00000077
1:10 FT	0.100	0.080	0.060	0.08	0.020	0.00080	0.00000080
1:15 FT	0.070	0.080	0.040	0.06	0.021	0.00063	0.00000063
1:20 FT	0.050	0.030	0.020	0.03	0.015	0.00033	0.00000033

Tabell 37. Fortsettelse av tabell 36.

	Konsentrasjon (mg/mL)	HRP i FT og V	Differanse 0,5 mg/mL og prøve	HRP i mg	mgHRP/mgPU		% Immobilisert
0,5 mg/mL	0.365						
0,2 mg/mL	0.106						
0,1 mg/mL	0.064						
1:5	0.116	0.150	0.22	0.43	0.0057	0.59	59
1:10	0.138	0.173	0.19	0.38	0.0051	0.53	53
1:15	0.132	0.160	0.21	0.41	0.0055	0.56	56
1:20	0.060	0.075	0.29	0.58	0.0077	0.80	80
1:5 FT	0.034						
1:10 FT	0.035						
1:15 FT	0.028						
1:20 FT	0.015						



**Norges miljø- og biovitenskapelige universitet**  
Noregs miljø- og biovitenskapelige universitet  
Norwegian University of Life Sciences

Postboks 5003  
NO-1432 Ås  
Norway