

2012•2013
FACULTEIT BEDRIJFSECONOMISCHE WETENSCHAPPEN
*master in de toegepaste economische wetenschappen:
handelsingenieur: technologie-, innovatie- en
milieumanagement*

Masterproef

Evaluatie van het valorisatiepotentieel van diamant gebaseerde multifunctionele nanolagen als 'smart biosurface' voor medische toepassingen

Promotor :
Prof. dr. Ward DE CEUNINCK
Prof.dr.ir Steven VAN PASSEL

Copromotor :
Prof. dr. Marc D'OLIESLAEGER

Anke Kupers

Masterproef voorgedragen tot het bekomen van de graad van master in de toegepaste economische wetenschappen: handelsingenieur, afstudeerrichting technologie-, innovatie- en milieumanagement

2012•2013

FACULTEIT BEDRIJFSECONOMISCHE WETENSCHAPPEN

*master in de toegepaste economische wetenschappen:
handelsingenieur: technologie-, innovatie- en
milieumanagement*

Masterproef

Evaluatie van het valorizatiepotentieel van diamant
gebaseerde multifunctionele nanolagen als 'smart
biosurface' voor medische toepassingen

Promotor :
Prof. dr. Ward DE CEUNINCK
Prof.dr.ir Steven VAN PASSEL

Copromotor :
Prof. dr. Marc D'OLIESLAEGER

Anke Kupers

*Masterproef voorgedragen tot het bekomen van de graad van master in de toegepaste
economische wetenschappen: handelsingenieur, afstudeerrichting technologie-, innovatie-
en milieumanagement*

WOORD VOORAF

Deze masterproef vormt het sluitstuk van mijn opleiding ‘Toegepaste Economische Wetenschappen: Handelsingenieur’ aan de Universiteit Hasselt. Als studente met afstudeerrichting Technologie, Innovatie en Milieumanagement vormt dit eindwerk voor mij een mooie combinatie van een technologisch, innovatief concept met de nodige economische aspecten. Deze combinatie heeft van dit finaal werkstuk een boeiende tocht gemaakt.

Graag zou ik enkele personen bedanken voor hun raad, hulp en ondersteuning tijdens het opstellen van deze masterproef. Als eerste wil ik mijn twee promotors bedanken. Prof dr. Ward De Ceuninck verdient een woord van dank voor het aanreiken van het onderwerp en voor de geboden ondersteuning en tijdige sturing. Prof dr. ir. Steven Van Passel verdient eveneens een woord van dank voor de economische raadgeving en de opbouwende kritiek bij de aanpak van dit werkstuk. Vervolgens wil ik ook dr. Veronique Vermeeren hartelijk danken. Zij bood me constante hulp tijdens mijn zoektocht naar de benodigde data en was ook nadien nog een grote hulp. Ook dr. Stoffel Janssens en Mohammed Sharif Murib wil ik danken voor het geven van de nodige technische informatie en data. Hun hulp was onmisbaar voor het opstellen van mijn economische analyse.

Tenslotte wil ik graag mijn ouders en mijn naaste omgeving bedanken. Zij boden me de nodige ondersteuning en motivatie om deze masterproef tot een goed einde te brengen. Zij hebben mij vijf jaar lang steeds onvoorwaardelijk gesteund en aangemoedigd. Hiervoor mijn grootste dank.

Anke Kupers

Mei, 2013

SAMENVATTING

Het gebruik van diamant in DNA sensoren is een nieuwe, veelbelovende techniek voor de opsporing van mutaties in genen. Deze nieuwe, op diamant gebaseerde methode voor mutatie screening maakt zowel gebruik van de beschikbare technologieën voor biosensoren als het ontluikende gebied van nanotechnologie. De ontwikkelingen omtrent deze nieuwe DNA sensor vinden plaats in het Instituut voor Materiaal Onderzoek (IMO) en staan op technologisch vlak reeds volledig op punt. Om echter de levensvatbaarheid en het potentieel op de biosensor markt na te gaan, is ook een meer economische en kostengerichte analyse vereist. Deze masterproef onderzoekt de economische piste van deze nieuwe, met diamant verrijkte DNA sensor.

Mutatiescreening laat toe dat ziektes en aandoeningen, al dan niet vroegtijdig, opgespoord kunnen worden. De diamant DNA sensor heeft dus ook een belangrijke maatschappelijke betekenis. Diamant gebaseerde nanolagen blijken niet alleen op het gebied van mutatiescreening uiterst toepasbaar te zijn, maar kunnen ook gebruikt worden in cardiovasculaire toepassingen. Het gebruik van diamant is dus een veelbelovende oplossing in verschillende medische deelgebieden.

De diamant gebaseerde DNA sensor is een biosensor. Biosensoren worden ontworpen om analytisch significante onderdelen te detecteren en zo op een snelle manier juiste en betrouwbare informatie hierover te verschaffen. Biosensoren genereren zeer vlot een bruikbare output voor onderzoek. De markt voor biosensoren en biochips kent sinds begin jaren 2000 een opmerkelijke groei. De mogelijkheid tot commercialisering van de met diamant verrijkte DNA sensor is dus realistisch en zal in de toekomst geconcretiseerd kunnen worden.

Nanotechnologie is een toepassingsgebied in de wetenschap dat werkt met materie op uiterst kleine schaal. De grootteorde in nanogebaseerde toepassingen gaat van één tot 100 nanometer, met één nanometer als een miljoenste van een millimeter. Nanotechnologieën worden de laatste jaren steeds meer toegepast en blijken een veelbelovende weg aan te geven in combinatie met biosensoren.

Nanostructuren en –toepassingen kunnen gebruikt worden met als doel het bereiken van medische voordelen. Nanogeneeskunde is een relatief nieuw gebied van wetenschap en technologie dat ingaat op deze voordelen. Nanogeneeskunde is als het ware het toepassingsgebied van nanotechnologie in de geneeskunde. Moderne medische en biologische apparaten vereisen oppervlaktes die niet enkel zeer hoge biocompatibiliteit bevatten, maar ook verschillende slimme medische functies kunnen coderen. Deze oppervlaktes worden dan smart biosurfaces genoemd. Onder andere het met diamant verrijkte oppervlak van de nieuwe DNA sensor is een dergelijke smart biosurface.

In het IMO wordt de diamant DNA sensor ontwikkeld met een koolstof gebaseerde coating, in het bijzonder nanokristallijn diamant. Dit nanogestructureerd diamant biedt veel van de eigenschappen van natuurlijk diamant aan in een dunne film. Biocompatibiliteit is een van de belangrijkste eigenschappen met het oog op DNA analyses. Synthetisch diamant wordt bijgevolg erkend als een extreem attractief materiaal voor het gebruik in biosensoren.

Een belangrijk deel van deze masterproef wordt besteed aan het bepalen van de economische haalbaarheid waarmee de investeringen in de met diamant verrijkte DNA sensor gepaard gaan. Naast de investeringskost die de onderzoeksinstelling of het bedrijf initieel oploopt, brengt een dergelijk project immers ook jaarlijks terugkerende uitgaven en inkomsten teweeg. De investeringsanalyse die hierop volgt, hanteert een maatstaf waarmee de rendabiliteit kan worden geëvalueerd. Deze maatstaf is de netto contante waarde (NCW). Bij het berekenen van de netto contante waarde in verschillende scenario's blijkt dat de nieuwe DNA analyse methode steeds economisch rendabel is in vergelijking met de huidige methodes. Hierin wordt de met diamant verbeterde DNA sensor vergeleken met de huidige methodes, de DGGE en de microarray methode.

Tot slot dient er ook rekening gehouden te worden met het feit dat de met diamant verbeterde DNA biosensor nog slechts in de ontwikkelings- en onderzoeksfase zit. Dit in tegenstelling tot de DGGE en microarray analyses. Deze zijn reeds commercieel gekende en gebruikte methodes. Naar de toekomst toe moet er aldus rekening gehouden worden met de effectieve lancering op de markt voor biochips en biosensoren en de marketingkosten en andere kosten die hiermee gepaard gaan.

Lijst met figuren

Figuur 3.1.1: nanoschaal	8
Figuur 4.2.1: nanokristallijn diamant	15
Figuur 5.2.1: CVD diamant	20
Figuur 5.3.1: hot filament CVD systeem – depositieruimte	22
Figuur 5.3.2: hot filament CVD systeem – gloeidraden	23
Figuur 6.1.1: basenparen DNA	25
Figuur 7.2.1: UV behandeling van het sample	30
Figuur 7.2.2: EDC behandeling van het sample	31
Figuur 7.2.3: detectie SNPs	31
Figuur 7.2.4: oppervlaktestructuren van het sample	32
Figuur 7.2.5: wasproces	33
Figuur 7.2.6: principe thermische read-out	33
Figuur 7.2.7: thermische read-out	34
Figuur 7.2.8: weerstand waterstof plasma	35
Figuur 7.2.9: weerstand waterstof plasma met vetzuren	35
Figuur 7.2.10: weerstand waterstof plasma met vetzuren en ssDNA	36
Figuur 7.2.11: weerstand waterstof plasma met vetzuren en dsDNA	36
Figuur 7.2.12: weerstand waterstof plasma met vetzuren en dsDNA met puntmutatie	37
Figuur 7.2.13: weerstand waterstof plasma met vetzuren en dsDNA met puntmutatie	37
Figuur 7.2.14: diamant DNA sensor	40
Figuur 7.3.1: terminatie van het oppervlak	41
Figuur 9.1.1: totale markt voor biosensoren wereldwijd in 2009	47
Figuur 9.1.2: grootte markt voor biosensoren in 2009 en verwachtingen tot 2016	47
Figuur 9.1.3: segmenten met percentage in de markt voor biosensoren	48
Figuur 11.1.1: formule voor de netto contante waarde	57
Figuur 11.2.3.1: verdisconteringsfactor	61

Lijst met tabellen

Tabel 4.1.1: eigenschappen van diamant.....	13
Tabel 10.1: siliciumwafer prijs per sample.....	53
Tabel 10.2: diamantgroei.....	53
Tabel 10.3: waterstof terminatie van het sample.....	54
Tabel 10.4: bewerkingskosten per sample.....	55
Tabel 10.5: totaalprijs per microarray analyse.....	56
Tabel 11.2.1: installatiekosten.....	59
Tabel 11.2.2.1: afschrijvingen per jaar.....	60
Tabel 11.3.1.1: materiaalkosten.....	63
Tabel 11.3.1.2: bewerkingskosten.....	63
Tabel 11.3.1.3: totale uitgaande kasstromen.....	64
Tabel 11.3.1.4: verdisconteerde netto kasstromen na belastingen.....	65
Tabel 11.3.1.5: verdisconteerde netto kasstromen voor jaar 1, 2 en 3.....	66
Tabel 11.3.1.6: jaarlijkse verdisconteerde netto kasstromen.....	67
Tabel 11.3.2.1: materiaalkosten.....	68
Tabel 11.3.2.2: bewerkingskosten.....	69
Tabel 11.3.2.3: totale uitgaande kasstromen.....	70
Tabel 11.3.2.4: verdisconteerde netto kasstromen na belastingen.....	71
Tabel 11.3.3.1: verdisconteerde netto kasstromen na belastingen.....	72
Tabel 11.3.3.2: verdisconteerde netto kasstromen na belastingen.....	73
Tabel 11.3.3.3: verdisconteerde netto kasstromen na belastingen.....	74
Tabel 11.4.1.1: materiaalkosten.....	76
Tabel 11.4.1.2: bewerkingskosten.....	76
Tabel 11.4.1.3: totale uitgaande kasstromen.....	77
Tabel 11.4.1.4: verdisconteerde netto kasstromen na belastingen.....	78
Tabel 11.4.2.1: materiaalkosten.....	79
Tabel 11.4.2.2: bewerkingskosten.....	80
Tabel 11.4.2.3: totale uitgaande kasstromen.....	80
Tabel 11.4.2.4: verdisconteerde netto kasstromen na belastingen.....	81
Tabel 11.4.3.1: verdisconteerde netto kasstromen na belastingen.....	83

Inhoud

WOORD VOORAF.....	i
SAMENVATTING	iii
Lijst met figuren.....	v
Lijst met tabellen.....	vi
HOOFDSTUK 1: HET PRAKTIJKPROBLEEM	1
1.1 Formulering van het praktijkprobleem	1
1.2 Centrale onderzoeksvraag en deelvragen.....	1
1.3 Onderzoeksmethodologie	2
HOOFDSTUK 2: BIOSENSOREN	3
2.1 Omkadering en technologie	3
2.2 Commercialisering.....	5
HOOFDSTUK 3: NANOTECHNOLOGIE	7
3.1 Nanobiotechnologie	7
3.2 Nanogeneeskunde.....	10
HOOFDSTUK 4: DIAMANT.....	13
4.1 Algemene eigenschappen	13
4.2 Synthetisch diamant en NCD.....	14
HOOFDSTUK 5: DIAMANTGROEI	17
5.1 Chemical Vapor Deposition (CVD).....	17
5.2 Microwave enhanced plasma CVD.....	20
5.3 Hot filament CVD.....	22
HOOFDSTUK 6: DNA	25
6.1 Algemene aspecten van DNA	25
6.2 PCR en amplificatie.....	27
HOOFDSTUK 7: DIAMANT DNA BIOSENSOR.....	29
7.1 Omkadering van de DNA sensor met diamant.....	29
7.2 Werkwijze van de biosensor met diamant.....	30
7.3 Stapsgewijs ontwikkelingsproces van de DNA sensor met diamant.....	39
7.4 Bewerkingsproces van de DNA biosensor met diamant	41
HOOFDSTUK 8: MICROARRAYS	43
8.1 Microarray methode	43
8.2 Voordelen en nadelen in vergelijking met diamant sensor	45
HOOFDSTUK 9: MARKT VOOR BIOSENSOREN.....	47

9.1 Totale globale biosensor markt.....	47
9.2 Markt voor moleculaire diagnostiek	49
9.3 Markt voor algemene genetische testen	50
9.4 Biochip en biosensor markt.....	51
9.5 Marktgroottes	52
HOOFDSTUK 10: KOSTENBEREKENING PER ANALYSE	53
HOOFDSTUK 11: INVESTERINGSANALYSE	57
11.1 Aanloop naar de investeringsanalyse.....	57
11.2 Investeringsanalyse diamant biosensor	59
11.2.1 Jaarlijkse kasstromen	59
11.2.2 Jaarlijkse afschrijvingsbedragen.....	60
11.2.3 Verdisconteringsfactor en vennootschapsbelasting.....	61
11.3 Scenario's in vergelijking met DGGE methode.....	62
11.3.1 Scenario 1: 1% van de markt	62
11.3.2 Scenario 2: 0,1% van de markt	68
11.3.3 Scenario 3: break even	72
11.4 Scenario's in vergelijking met microarray methode	75
11.4.1 Scenario 1: 1% van de markt	75
11.4.2 Scenario 2: slechts 1 run per jaar	79
11.4.3 Scenario 3: break even	83
Hoofdstuk 12: Conclusies	85
Algemeen.....	85
Kritische bemerkingen.....	86
Voorstellen voor verder onderzoek	87
Lijst van geraadpleegde werken.....	88
Lijst van geraadpleegde websites.....	91
BIJLAGEN	I

HOOFDSTUK 1: HET PRAKTIJKPROBLEEM

1.1 Formulering van het praktijkprobleem

Het doel van de masterproef is om na te gaan of er een toekomstig economisch draagvlak is voor diamantlagen in medische toepassingen. Deze diamantgebaseerde lagen zijn lagen op nanoniveau, dit wil zeggen in de grootteorde van 10^{-9} meter. In de masterproef zal er onderzocht worden of er een potentieel is voor deze lagen in applicaties in de medische sector, en in het specifiek in de sector van mutatie screening. Door waardebeoordeling en investeringsanalyses zal er gezocht worden naar de rendabiliteit en de mogelijkheid tot commercialisering van diamant verrijkte DNA sensoren.

1.2 Centrale onderzoeksvraag en deelvragen

De centrale onderzoeksvraag van deze masterproef luidt als volgt: “Wat is het valorisatiepotentieel van diamant gebaseerde nanolagen in medische toepassingen?”

Om de centrale onderzoeksvraag te beantwoorden, zal er in de masterproef een antwoord worden gezocht op de volgende deelvragen:

- 1) Wat zijn de huidige technologieën? Hebben diamantlagen een potentieel?
- 2) Wat zijn toepassingen van nanogebaseerde lagen in de medische sector en meer specifiek in medisch gerichte sensoren?
- 3) Wat is de value chain van deze medisch gerichte sensoren?

Eerst en vooral wordt er nagegaan welke huidige technologieën vandaag de dag spelen en wat de rol kan zijn van diamantlagen in huidige technologieën. Vervolgens wordt er gekeken naar het potentieel van nanolagen in de medische wereld. Ook de waardeketen van de met diamant verrijkte DNA sensor zal onderzocht moeten worden. Hierbij wordt het gehele productieproces nagegaan. Dit alles wordt geïllustreerd met cijfers.

Op basis van deze data wordt dan een investeringsmodel opgesteld en worden enkele scenario's uitgewerkt. Deze scenario's dienen tot het beantwoorden van de centrale onderzoeksvraag. Aan de hand van de investeringsanalyses en netto contante waarde bepalingen kan het valorisatiepotentieel in kaart gebracht worden.

1.3 Onderzoeksmethodologie

De onderzoeksmethodologie is opgedeeld in vier stappen:

1. Een literatuurstudie die de werking en voordelen van de DNA sensor met diamant zal bespreken. De bespreking zal voornamelijk gebeuren aan de hand van naslagwerken. In de literatuurstudie wordt zowel aandacht besteed aan de technologische aspecten, als het onderzoekstadium en de economische achtergrond.
2. De markten en marktgroottes van biosensoren en biochips
3. Een geïllustreerde prijsberekening voor één analyse. Deze prijsberekening bevat alle data per analyse. Deze kosten en opbrengsten data werden vergaard via persoonlijke contacten met het IMO, IMEC en BIOMED. Deze data worden later ook gebruikt in de investeringsanalyses.
4. Uitgewerkt investeringsanalyses. Hierbij wordt rekening gehouden met enkele assumpties en scenario's met betrekking tot de markt voor biochips en biosensoren.

De keuze van de onderzoeksmethodologie is gebaseerd op het boek *Research methods for business*, 2003. Hierin wordt gesteld dat onderzoeksstrategieën gecategoriseerd kunnen worden in twee groepen, deze gebaseerd op primaire gegevens en deze gebaseerd op secundaire gegevens. Primaire informatie bestaat uit gegevens die eigenhandig verzameld worden. Dit soort dataverzameling is mogelijk door bijvoorbeeld interviews en enquêtes af te nemen, of door focusgroepen en panelgesprekken te laten plaatsvinden. Secundaire bronnen daarentegen bevatten informatie die reeds beschikbaar is in statistische resultaten of documenten.

In de masterproef zullen bij aanvang vooral secundaire data aan bod komen, gezien het vergaren van primaire informatie heel wat specifiek en lastiger is. Op basis van een uitgebreide literatuurstudie zal de huidige markt voor nanolagen in medische applicaties in kaart gebracht moeten worden. Deze literatuurstudie is tot stand gekomen door het bestuderen van wetenschappelijke artikels die opgevraagd konden worden via onder andere wetenschappelijke zoekmachines, voornamelijk Ebscohost en Elsevier. Later in de masterproef worden primaire data gebruikt, aangezien het potentieel van een nieuwe, diamantgebaseerde applicatie gezocht wordt. Het vergaren van deze data gebeurde met de hulp van IMO, IMEC en BIOMED.

HOOFDSTUK 2: BIOSENSOREN

2.1 Omkadering en technologie

Volgens de definitie gegeven in het tijdschrift *Biosensors and Bioelectronics*, is een biosensor een analytisch apparaat dat biologische materialen bevat (zoals weefsels, micro organismen, organellen, cel receptoren, enzymen, immuno actieve componenten, nucleïnezuren, etc.) en dat direct contact maakt met een fysisch-chemische transducer of een transducerend macrosysteem. Deze laatste componenten kunnen optisch, elektrochemisch, thermometrisch, piëzo-elektrisch of magnetische apparaten zijn. Deze transducer produceert hetzij periodische hetzij continue analoge/digitale signalen die proportioneel zijn met de concentratie van een enkele verbinding of een groep van verbindingen. Biosensoren moeten ontworpen worden om analytisch significante moleculen, pathogenen en giftige onderdelen te detecteren om zo snelle, accurate en betrouwbare informatie te verschaffen over het te onderzoeken analyt (Luong et al., 2008). De minimale elementen van elke biosensor bevatten een moleculaire herkenningslaag en een signaal transducer die gekoppeld wordt aan het gepast uitlezingsapparaat. (Drummond et al., 2003)

Bij biosensoren kunnen we spreken van sensitiviteit en selectiviteit. De term sensitiviteit refereert naar de grootte van de respons van de sensor. Selectiviteit verwijst naar de mogelijkheid tot het antwoorden op de juiste veranderingen die plaatsvinden. Respons en sensitiviteit van de biosensor zijn afhankelijk van zowel de frequentie als de concentratie (Quershi et al., 2009). Naast sensitiviteit, selectiviteit en respons, is ook de immobilisatie van een receptor op het sensor oppervlak is van uiterst belang voor het design van een succesvolle biosensor analyse. Onder biosensoren horen uiteraard ook de implantbare apparaten. De betrouwbaarheid van deze implantbare systemen wordt dikwijls ondermijnd door verschillende factoren. Het succes van elk implantbaar apparaat hangt af van hun betrouwbaarheid en levensduur in het lichaam, "in vivo". Voor implantbare biosensoren is het gebied dat gerelateerd is aan vreemde lichaamsrespons veel uitdagender dan apparaat gerelateerde problemen. (Vaddiraju et al., 2010)

Sinds de ontdekking van biosensoren van het type Clark in de jaren '60, zijn de biosensor technologieën aanzienlijk gegroeid. Deze groei heeft plaatsgevonden zowel in termen van complexiteit, als bruikbaarheid en mogelijkheid om de commerciële markt te betreden. Het laatste decennium echter, is de groei enorm versneld door het ontluikende gebied van nanotechnologie (Quershi et al., 2009).

Als de grootte van een systeem daalt tot onder de 100 nanometer en in het bijzonder onder de 10 nanometer, komen er verschillende ongewone fysische en chemische fenomenen naar boven, zoals verbeterde plasticiteit, veranderingen in thermische en optische eigenschappen, verbeterde reactiviteit en katalytische activiteit, sneller elektronen/ionen transport, etc. (Vaddiraju et al., 2010)

Recente studies geven aan dat biosensoren verbeterd met nanotechnologie beloftevol zijn op heel wat gebieden. Zo blijken ze te zorgen voor winsten in stabiliteit, sensitiviteit, selectiviteit en nauwkeurigheid, bij zowel directe als indirecte opsporing. Nanomaterialen zoals koolstof nanotubes samen met nanopartikels (goud, platina, koper, etc.) zijn gerapporteerd om significant de detectie sensitiviteit te verbeteren en de immobilisatie van de biomolecule te faciliteren (Luong et al., 2008). Huang et al. (2010) schatten dat nanopartikel verbeterde biosensoren meer potentieel zullen hebben in de komende jaren dan andere nanomateriaal verbeterde biosensoren. De auteurs stellen dat nanomaterialen, in het bijzonder nanodeeltjes, een veelbelovende weg aangeven om het biologisch herkenninggebied te vergroten. Dit is omdat de hoge oppervlak/volume ratio van nanodeeltjes zorgt voor een groot aantal plaatsen die beschikbaar zijn voor molculaire interacties. Nanomaterialen kunnen bovendien bijdragen in zowel het biologisch herkenningselement van een biosensor als in de transducer, of zelfs in beide.

2.2 Commercialisering

Biosensoren gebaseerd op nanostructuur kunnen relatief duur zijn. Ze hebben hoge onderzoeks- en ontwikkelingskosten evenals productiekosten. Het is nu nog onzeker of de toegenomen geschiktheid van nanotechnologische biosensoren voldoende groot is om grote markten te openen en eveneens een snelle daling in kosten te veroorzaken. Hoewel de jaarlijkse globale besteding aan algemeen nanotechnologisch onderzoek ongeveer negen miljard dollar bedraagt, wordt slechts 39 miljoen geïnvesteerd in de analyse van de veiligheid van nanomaterialen in de mens en omgeving. (Luong et al., 2008)

Het commercialiseren van deze biosensor technologie blijkt echter heel wat moeilijker te gaan dan het genereren van onderzoek output. Levensvatbaarheid op de markt hangt af van de biosensor zelf. Succesvolle en commercieel levensvatbare biosensoren zullen enerzijds veelzijdig moeten zijn en anderzijds relatief goedkoop voor een uitgebreid gamma van toepassingen. De biosensoren zullen een voldoende grote levensduur moeten hebben. Bovendien moeten ze automatisering ondersteunen tegen een competitieve kost. Een sleutelvereiste in de commercialisering van biosensoren is dus de ontwikkeling van biosensoren die snel, gemakkelijk te gebruiken, en niet duur zijn. Hiervoor is ongetwijfeld een voorafgaande investering nodig die voldoende groot is om de onderzoeks- en ontwikkelingsinspanningen te ondersteunen. De industrie voor biosensoren wordt gedomineerd door enkele grote multinationale bedrijven met enorme bronnen van financiering voor technologische aanwinst en bevestiging. De toetreding tot de markt voor een nieuwe onderneming is zeer moeilijk tenzij een niche product ontwikkeld kan worden, en tenzij de onderneming vaste financiële bronnen heeft voor technologische ontwikkeling, demonstratie, validatie en marketing. (Luong et al., 2008) In overeenstemming met de resultaten van de trend groeimodellen in Huang et al. (2010) blijken de R&D activiteiten waarschijnlijk te groeien over de komende paar jaren. Bovendien tonen nanodeeltjes een groter potentieel om de prestaties van biosensoren te verbeteren dan andere nanogebaseerde materialen. Volgens Luong et al. (2008) is voor een nieuwe onderneming marktintreding in de biosensor industrie erg moeilijk, tenzij het om een niche product gaat waar een grote markt voor bestaat.

Luong et al. (2008) geven aan dat jaarlijks de wereldwijde investeringen in specifiek onderzoek naar en ontwikkeling van biosensoren worden geschat op zo een 300 miljoen Amerikaanse dollar. Als we gaan kijken naar uitgegeven publicaties en patenten, dient men op te merken dat beide fenomenaal zijn op het gebied van biosensor onderzoek. In de periode van 1984 tot 1990, waren er ongeveer 3000 wetenschappelijke publicaties en 200 patenten op biosensoren.

Hetzelfde aantal publicaties (zo een 3300) maar bijna het dubbel aan patent activiteiten (400 patenten) werden vastgesteld in de periode van 1991 tot 1997. Deze explosie van de nanobiotechnologie van 1998 tot 2004 had meer dan 6000 artikels en 1100 patenten, zowel uitgegeven als wachtend op toewijzing, voortgebracht.

De globale biosensor markt bedroeg 7,3 miljard dollar in het jaar 2003 en werd verwacht meer dan tien miljard dollar te bereiken tegen 2007 met de medische gezondheid gebied als de grootste sector. De wereldwijde markt voor biosensoren en andere bio elektronica, uitgezonderd medische sensoren, werd geschat te groeien van 6,1 miljard in 2004 tot 8,2 miljard in 2009. Wereldwijde medische biosensor verkopen bedroegen zeven miljard in 2004 en werden geschat 8,3 miljard te zijn tegen het einde van 2007 met meer dan 50 procent in Noord Amerika en 22 procent van de biosensor verkopen in Europa. Zoals verwacht, was de glucose biosensor de meest wijde gecommmercialiseerde van alle biosensoren.

Enzymen gebaseerde biosensoren zijn erg populair geweest met meer dan 2000 artikels gepubliceerd in de literatuur. Dit is waarschijnlijk te wijten aan de nood voor het monitoren van glucose in bloed en het gemak van de constructie van zulke biosensoren. Affiniteit biosensoren hebben aanzienlijk wat aandacht gekregen aangezien zij informatie verschaffen over de binding van antilichamen aan antigenen, cel receptoren aan hun liganden, DNA of RNA aan complementaire sequenties of nucleïnezuren en functionerende enzymatische trajecten (Luong et al., 2008)

HOOFDSTUK 3: NANOTECHNOLOGIE

3.1 Nanobiotechnologie

Nanobiotechnologie is gedefinieerd als een interdisciplinair veld van wetenschap dat de applicatie bestudeert van fijne-grootte biologische objecten (van nanoschaal, gaande van 1 tot 100 nanometer) om apparaten en systemen te ontwerpen van dezelfde grootte die voor nieuwe doeleinden de ongewone, gekende of voorheen ongekende effecten van het materiaal gebruiken. Analyse demonstreert dat de uiteindelijke doelen, benaderingen, oplossingsmethodes en applicaties van nanostructuren en biologische sensoren veel gemeen hebben (Reshetilov & Bezborodov, 2008). Nanobiotechnologie is een veld van wetenschap gericht op het ontwerpen van materialen, apparaten, en systemen. Deze bezitten bepaalde specifieke functies en zijn samengesteld uit nanoschaal elementen. Er moet rekening gehouden worden met het feit dat nanobiotechnologie in zijn essentie het gebied is dat nanotechnologie koppelt met biologie en geneeskunde. Op zijn beurt wordt nanotechnologie geïnterpreteerd als het onderzoeksveld gericht op het begrijpen en controleren van de processen die plaatsvinden in structuren met groottes die vallen in de range van 1 tot 100 nanometer, waar hun eigenschappen fundamenteel verschillen van de eigenschappen van de individuele atomen of moleculen in gewone macro objecten die ons omringen. (Nano.gov, z.d.)

Reshetilov en Bezborodov (2008) stellen dat volgens de essentie van een proces, een nieuw onderzoek enkel geïnterpreteerd kan worden als zijnde nano(bio)technologie als het:

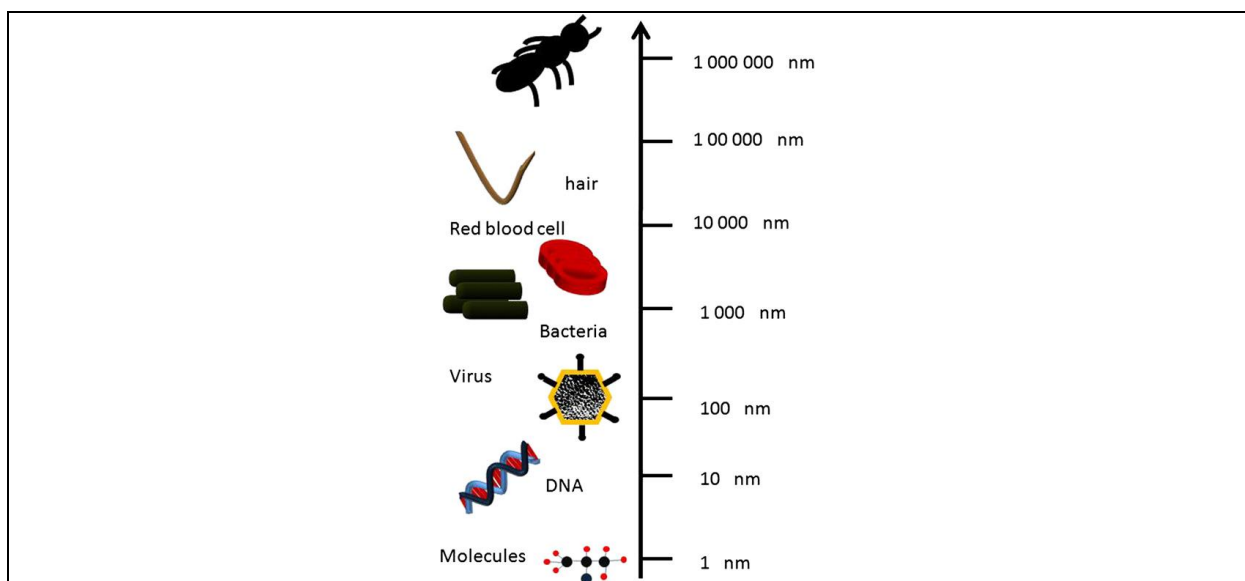
- Nanotechnologische concepten gebruikt evenals tools voor het bestuderen van basis funderingen van biologie of ontwikkelen van medische procedures;
- Engineering methodes voorstelt voor de constructie van biologische moleculen met de functies die essentieel verschillen van hun natuurlijke functies;
- Nanotechnologie tools en benaderingen zal gebruiken voor de manipulaties met het materiaal die verschillen van de hiervoor gekende synthetische of biochemische methodes die de laatste decennia toegepast zijn in de biologische praktijk.

Door interactie met biologische moleculen, dus op nanoschaal, opent nanotechnologie een zeer breed gebied van onderzoek en applicatie. Werkzaamheid op nanoschaal laat toe om fysische eigenschappen te benutten die verschillend zijn van de eigenschappen die geobserveerd kunnen worden op microschaal. De onderzochte diagnostische applicaties kunnen zowel voor *in vitro* als *in vivo* diagnoses overwogen worden. *In vitro* betreft voornamelijk de herkenning en concentratie van biomoleculen. *In vivo* daarentegen betreft voornamelijk contrastmiddelen voor beeldvorming. (Boisseau & Loubaton, 2011)

Nanobiotechnologie is een dus component van nanotechnologie. Het veld van nanobiotechnologie dat gerelateerd is aan de oplossing van medische problemen wordt nanogeneeskunde genoemd. Het is belangrijk om aandacht te besteden aan het feit dat twee nieuw verschenen wetenschappelijke richtingen – biosensor technologie en nanobiotechnologiën – zeer nauw verbonden zijn. Zoals de geschiedenis van de ontwikkeling omtrent biosensoren toont, vormen veel problemen die initieel typisch waren voor biosensor technologie later de basis voor nanogeneeskunde, zoals bijvoorbeeld DNA chips (Reshetilov & Bezborodov, 2008). Vanuit chronologisch standpunt, kan de biosensor technologie bijgevolg bekeken worden als de grondslag waarvan nanobiotechnologie zijn ontwikkeling is begonnen. Reshetilov en Bezborodov (2008) stellen dat nanobiotechnologie vandaag een breder veld is dan biosensor technologie, met referentie naar de doelen en de opgeloste problemen. Het contactpunt van deze twee technologieën is het gebruik van biologisch materiaal in het ontwerp van de verschillende apparaten.

Nanowetenschappen en nanotechnologieën impliceren het bestuderen van en het werken met materie op een uiterst kleine schaal. Eén nanometer is een miljoenste van een millimeter. Een enkele menselijke haar is ongeveer 80.000 nanometer dik. Daarvoor opereert nanogeneeskunde op dezelfde grootte schaal – rond de 100 nanometer of minder – als waarop biologische moleculen en structuren werken binnen levende cellen. De grootte van een typische proteïne ligt tussen de drie en tien nanometer, terwijl rode bloedcellen een standaard grootte hebben van 6.000 – 8.000 nanometer. In figuur 3.1.1 kunnen de grootte ordes van onder andere rode bloedcellen, moleculen en DNA vergeleken worden.

Figuur 3.1.1: nanoschaal



bron: IMO – prof dr. Patrick Wagner (2013)

Sommige fysische wetten zijn verschillend op nanoschaal. Dit kan voordelig zijn voor medische applicaties, of juist helemaal niet. Hieronder volgt een opsomming van deze fysische wetten:

De oppervlak/volume ratio van partikels wordt heel groot wanneer de grootte afneemt, zo dat nanopartikels een enorme oppervlakte hebben die geschikt is voor chemische interacties met biomoleculen bijvoorbeeld. Daarenboven is de (bio)chemische reactietijd veel korter, aangezien deze sterk afneemt met sample grootte. Bijgevolg zijn de analytische apparaten sneller en ook meer sensitief.

De uiterst kleine grootte van het sensing gedeelte van een (macro of micro) analytisch apparaat kan mogelijk geëxploiteerd worden voor miniaturisatie van het apparaat. Kleinere apparaten bieden een lager optreden en kunnen zelfs ingeplant worden in het lichaam.

Een ander voordeel van de ultra miniaturisatie van het sensing gedeelte ligt in het uiterst kleine formaat van het biologische sample dat vereist is voor de meting. Dit wordt een sleutel karakteristiek voor analyse van zeldzame samples, zoals bijvoorbeeld sommige biopsies.

Anderzijds vereist het meten van lage concentraties van biologische moleculen zoals sommige biomarkers in grote samples, zoals bijvoorbeeld bloed druppels, voorafgaande stappen voor het concentreren van deze moleculen. In een algemene manier zijn bio samples zoals urine, bloed, zweet of tranen micrometrisch. Dus verschillende sample preparatie stappen zijn vereist vóór de analyse.

Viscositeit wordt meer effectief op nanoschaal. De interactie met capillaire wanden wordt belangrijker, en het viscose effect domineert dat van zwaartekracht. Het gevolg is dat het nanovloeistoffen meer complex maakt dan microvloeistoffen.

3.2 Nanogeneeskunde

Nanogeneeskunde omvat een vrij recente set van technologieën, onderzoek startte ongeveer tien jaar geleden. De gemiddelde ontwikkelingstijd voor eender welke hightech ligt meestal tussen de tien en vijftien jaar. Nanotechnologie is zeker niet trager in zijn ontwikkeling dan eender welke andere moderne technologie (Boisseau en Loubaton, 2011). Nanogeneeskunde is een relatief nieuw gebied van wetenschap en technologie. De term wordt echter niet overal op dezelfde manier gedefinieerd en de interpretaties van de term variëren nogal. Hieronder volgen twee definities.

“The field of nanomedicine is the science and technology of diagnosing, treating and preventing disease and traumatic injury of relieving pain, and of preserving and improving human health, using molecular tools and molecular knowledge of the human body.”¹

“Nanomedicine is defined as the application of nanotechnology to health. It exploits the improved and often novel physical, chemical, and biological properties of materials at the nanometric scale. Nanomedicine has potential impact on the prevention, early and reliable diagnosis and treatment of diseases.”²

Volgens Boisseau en Loubaton (2011) mag het doel van nanogeneeskunde zeer breed gedefinieerd worden als de uitgebreide monitoring, controle, constructie, herstel, verdediging en verbetering van alle menselijk biologische systemen, werkend van het moleculaire niveau en gebruik makend van uitgebouwde apparaten en nanostructuren, uiteindelijk om medische benefits te bereiken. Een ander gebied dat een sterke ontwikkeling ondergaat zijn de nanomedicijnen. Doelgerichte drugaflevering wordt mogelijk door de ontwikkeling van nanodeeltjes. De actieve moleculen richten zich op zieke weefsels en ondertussen blijft het gezonde weefsel beschermd. Zo toonde doctoraatsstudente Rita Bosetti aan dat bestrijding van kanker met nanotechnologie kosteneffectiever is dan chemotherapie. Nog een applicatiegebied is de regeneratieve geneeskunde. Nanotechnologie laat toe biocompatibele materialen te ontwikkelen, die de celgroei ondersteunt in celtherapie.

Nanogeneeskunde is een grote industrie. Boisseau en Loubaton (2011) stellen dat het een industrie is met verkoopcijfers tegen de 6,8 miljard dollar in 2004, en met meer dan 200 bedrijven en 38 producten wereldwijd. Een minimum van 3,8 miljard dollar wordt jaarlijks geïnvesteerd in nanotechnologisch R&D. Als deze industrie blijft groeien, wordt er verwacht dat dit een significante impact zal hebben op de economie.

¹ European Science Foundation, Nanomedicine, an ESF–European Medical Research Councils (EMRC) forward look report, 2005

² European Technology Platform on Nanomedicine, Nanotechnology for Health, Vision paper and basis for a strategic research agenda for nanomedicine, EC Publication Office, September 2005

De globale markt voor nanogeneeskunde werd gevalueerd op 53 miljard dollar in 2009, en wordt geschat te groeien met een samengestelde jaarlijkse groei van 13,5% zodat het 100 miljard behaalt in 2014. (BCC Research, 2010)

We kunnen dus met zekerheid zeggen dat nanotechnologie grote beloftes biedt voor geneeskunde. Veel ligt echter nog in de toekomst. Moderne medische en biologische apparaten vereisen dus oppervlaktes die niet enkel zeer hoge biocompatibiliteit bevatten, maar ook verschillende 'slimme' medische functies kunnen coderen. (IMO, 2012) Onder deze medische functies verstaan we, zoals hierboven reeds besproken, onder andere drugaflevering, celgroei, etc. We spreken dan van 'smart biosurfaces'.

HOOFDSTUK 4: DIAMANT

4.1 Algemene eigenschappen

Natuurlijk diamant wordt al tweeduizend jaar gewaardeerd voor zijn voorkomen en de mechanische eigenschappen. Wetenschappelijk werk, zeker in de laatste 20 jaar, heeft aangetoond dat diamant vele verrassende en unieke eigenschappen heeft. Sommige van de extreme eigenschappen zijn al jaren bekend, maar andere zeer gewenste eigenschappen van diamant komen aan het licht door verbetering in controle van de synthese van diamant en dus verbetering in materiaalperfectie (Mainwood et al., 2009). De optische, mechanische en thermische eigenschappen van diamant zijn uitzonderlijk. De thermische geleidbaarheid overtreft zelfs die van koper. Bovendien kan diamant tegen agressieve omgevingen, ook met extreme pH waarden.

In tabel 4.4.1 hieronder kunnen de algemene eigenschappen van diamant geraadpleegd worden. We zien dat enkele van deze eigenschappen uitzonderlijk zijn.

Tabel 4.4.1: eigenschappen van diamant

Algemene eigenschappen van diamant		
Eigenschap	Waarde	Eenheid
Hardheid	10,000	kg/mm ²
Sterkte, rek	>1.2	Gpa
Sterkte, druk	>110	Gpa
Breeksterkte	400–800	MPa at < 1 mm dikte
Geluidssnelheid	18,000	m/sec
Dichtheid	3.52	g/cm ³
Young modulus	1200	GPa
Poisson ratio	0.2	dimensieloos
Atomaire dichtheid	1.77×10^{23}	atomen/cm ³
Thermische expansie coëfficiënt	1.1–5.0 (300-1300K)	ppm/K
Thermische conductiviteit	10–20	W/cm-K
Thermische schok paramater	30,000,000	W/m
Frictie coëfficiënt	0.05 (dry)	dimensieloos
Bandgap	5.45	eV
Weerstand	$10^{13} - 10^{16}$	Ohm-cm

bron: Sekidiamond (2013)

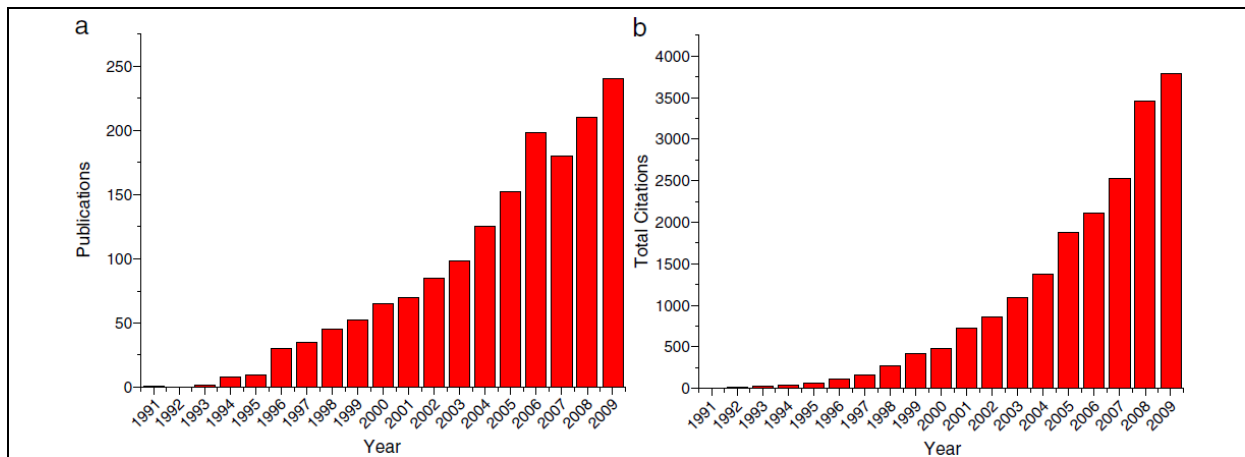
4.2 Synthetisch diamant en NCD

In het Instituut voor Materiaal Onderzoek (IMO) worden de meeste applicaties van biosensoren ontwikkeld met een koolstof gebaseerde coating. In het bijzonder spreken we van nanokristallijn diamant. Deze vorm van diamant is zeer biocompatibel en optisch transparant. Ook is nanokristallijn diamant mechanisch, biologisch en chemisch resistent. Door de kleine dimensies van nanokristallieten, neemt de relatie volume tot oppervlak dramatisch toe. Dit leidt tot een uitzonderlijk hoog aantal oppervlakte atomen, wat resulteert in verschillende fysische en chemische eigenschappen (Kloss et al., 2008). Nano kristallijn diamant (NCD) maakt ook de karakteristieken van de structuur minder gevoelig aan dikte variaties, die meestal het resultaat zijn van het fabricatie proces. NCD maakt de karakteristieken van de structuur ook meer attractief voor de verwezenlijking van echte biosensor applicaties, waar de mechanische robuustheid van de membraan structuur van cruciaal belang is. Diamanten films en partikels zijn interessant in zowel fundamentele als toegepaste wetenschappen dankzij hun extreme en in vele gevallen superieure eigenschappen. Nano gestructureerd diamant is uiterst aantrekkelijk, gezien het veel eigenschappen van bulk diamant aanbiedt in een dunne film pakket of kleine partikel vorm (Williams, 2011).

Synthetisch diamant werd herkend als een extreem attractief materiaal voor zowel (bio)chemische sensing als een interface voor biologische systemen. Synthetisch diamant heeft uitstekende elektrochemische eigenschappen, superieure chemische inertie en biocompatibiliteit. Recente vooruitgangen in de synthese van hoog geleidende, nanokristallijne, diamanten, dunne films en nanodraden hebben geleid tot een gehele nieuwe klasse van elektrochemische biosensoren en bio-inorganische interfaces. Daarenboven combineert het ook met de ontwikkeling van nieuwe chemische benaderingen tot het covalent hechten van biomoleculen op het diamant oppervlak. Dit heeft ook bijgedragen tot de vooruitgang van diamant gebaseerde biosensoren (Qureshi et al. 2009).

Het aantal publicaties en citaten van publicaties met het onderwerp van nanokristallijn diamant is enorm gestegen. In figuur 4.2.1 kan gezien worden dat het aantal publicaties omtrent nanokristallijn diamant enorm toeneemt, en er zijn geen tekens van vertraging. Williams (2011) vermeldt dat er meer dan 22.000 citaten over dit topic verschenen waren over de laatste 20 jaar, exclusief die publicaties die onder nanodiamant vielen en waarin andere gelijkaardige titels gegeven werden aan dezelfde familie van materialen. De reden van deze interesse in dunne films van hoge kwaliteit is voornamelijk de kost (Williams, 2011).

Figuur 4.2.1: nanokristallijn diamant



a) totaal aantal publicaties

b) totaal aantal citaten van publicaties

Bron: Williams (2011)

Recent is nanokristallijn diamant ontwikkeld in gesofisticeerde materialen met een wijde variëteit aan applicaties en terminologie. NCD films hebben korrelgroottes over het algemeen onder de 100 nanometer. Dankzij de relatieve korte aard van runs voor het groeien van nanokristallijn diamant en de dunne aard van deze films, zijn de nucleatie en de vroege stadia van groei absoluut kritiek in de productie van materiaal van hoge kwaliteit met lage oppervlakte ruwheid en pin-hole dichtheid. In het uiterste begin van een depositie run, is er een duurtijd waarin kleine diamantgroei plaatsvindt, genaamd de incubatie periode. Dit is te wijten aan de onvolledige bedekking van het substraat met de diamant nuclei, en koolstof zal zich verspreiden in het substraat tot dat ofwel een carbon/carbide diffusie grens wordt gevormd of de diamant nuclei voldoende lateraal gegroeid zijn om deze diffusie in het substraat te blokkeren. Op dit punt zal de film dikte evolueren met een significant snellere ratio en is de incubatie periode beëindigd. In het geval van nanokristallijn diamant zijn de eerste paar tientallen van nanometers van de film vaak een significant deel van de film en hebben deze zeker diepgaande implicaties op de ruwheid van het oppervlak. Lange incubatie periodes resulteren in het algemeen in dikkere SiC grensvlakken tussen het diamant en het silicium substraat. (Williams, 2011)

NARAYAN et al. (2006) stellen dat diamant gerelateerde materialen als zeer geschikt geacht worden als coatings op medische implantaten. Diamant heeft namelijk een hoge hardheid, lage frictie coëfficiënt, hoge corrosie weerstand, hoge slijtvastheid, hoge elektrische weerstand, hoge thermische geleidbaarheid, en een lage thermische expansie coëfficiënt.

HOOFDSTUK 5: DIAMANTGROEI

5.1 Chemical Vapor Deposition (CVD)

Nanokristallijne films worden gemakkelijk gegroeid door een van de conventionele diamant Chemical Vapor Deposition (CVD) processen. CVD laat de depositie van diamant toe op vreemde substraten en de productie van grote gebieden (Williams, 2011). CVD is een methode die kan gebruikt worden om synthetisch diamant te produceren. Dit gebeurt door het creëren van omstandigheden die nodig zijn voor de koolstof atomen in een gas om te settelen op een substraat in kristallijne vorm. Deze vorm van productie van diamanten heeft al heel wat aandacht gekregen in de materiaal wetenschappen omdat het toelaat vele nieuwe applicaties van diamant, die voorheen gezien werden als te moeilijk, economisch haalbaar te maken.

CVD diamantgroei vindt typisch plaats onder lage druk en omvat het invoeren van verschillende hoeveelheden van gassen in een kamer. Deze gassen voorzien energie en voorzien de condities die nodig zijn voor de groei van diamant op het substraat. De gassen bevatten altijd een koolstof bron en typisch bevatten ze ook waterstof. De gebruikte hoeveelheden echter kunnen erg verschillen, afhankelijk van het type van diamant dat gegroeid wordt. Energie bronnen omvatten onder andere hot filament, microwave enhanced plasma, etc. De energie bron is bedoeld om een plasma te genereren in dewelke de gassen worden afgebroken en meer ingewikkelde chemische reacties plaatsvinden. Door het gebruik van CVD kunnen diamanten films gegroeid worden over grote substraat oppervlakken met controle over de eigenschappen van het diamant dat wordt geproduceerd.

De groei van diamant direct op een substraat laat de toevoeging toe van veel van de belangrijke eigenschappen van diamant op andere materialen (Isberg et al., 2004). In elk geval moet de diamantgroei uiterst zorgvuldig uitgevoerd worden om zo de noodzakelijke adhesie te bereiken op het substraat.

De CVD groei methode laat toe dat men de eigenschappen van het geproduceerde diamant controleert. In het gebied van diamant groei, wordt het woord 'diamant' gebruikt als een beschrijving van eender welk materiaal dat voornamelijk bestaat van sp³ gebonden koolstof. Er zijn vele verschillende types van diamant hierin inbegrepen. Door het reguleren van proces paramaters kunnen vele verschillende materialen gemaakt worden die als diamant kunnen worden gezien.

De volgende parameters zijn in het bijzonder goed te reguleren: de geïntroduceerde gassen, maar ook de druk waaronder het systeem wordt geopereerd, de temperatuur van het diamant, en de methode die het plasma genereert (Isberg et al., 2004).

CVD diamant is dus een veelbelovend materiaal omwille van zijn biocompatibiliteit, durabiliteit, chemische inertie, en de koolstof compositie. De hoge sterkte van de C-C bindingen en eveneens de gevestigde biocompatibiliteit maken van diamant een uiterst aantrekkelijk substraat voor biosensor applicaties (Qureshi, 2010). May et al., (2010) stellen dat chemische vapor depositie (CVD) van diamant een rijpende technologie is, die vele commerciële applicaties begint te vinden in elektronica, snijgereedschap, medische coatings en optica.

Het CVD proces maakt, zo beschrijven May et al. (2010), meestal gebruik van de gasfase waarin een activatie plaats vindt van een gas mix, bestaande uit een kleine hoeveelheid van koolwaterstof in een overmaat waterstof. Een typische gas mix gebruikt enkele percentages CH_4 in H_2 , en afhankelijk van de groei condities, substraat eigenschappen en groeitijd, produceert deze mix polykristallijne films met graan groottes van 5 nanometer tot mm. Een boeiende conclusie van de studie van May et al. (2010) is dat ondanks de erg verschillende gas mixen, temperatuur en proces condities die gebruikt werden om de verschillende types diamant te deponeren, het groeiproces slechts gedomineerd is door twee soorten. De flux van CH_3 op het oppervlak bestuurt de groei ratio, terwijl de flux van atomisch waterstof de ratio controleert van alle oppervlakte reacties. De rol van alle andere koolwaterstof radicalen in het algemene groeiproces is minimaal, dit is te wijten aan hun verwaarloosbare concentraties op het oppervlak vergeleken met CH_3 .

De basis vereiste van alle CVD diamant groei technieken is het genereren van een overvloed aan atomair waterstof. Atomair waterstof geproduceerd door de activatie techniek reageert met het bron koolwaterstof en creëert daardoor een mix van koolwaterstoffen soorten die reactieve koolstof bevattende radicalen omvatten. Het atomaire waterstof abstrahert ook het waterstof van de CH oppervlakte, hierdoor voorziet het radicaal sites op het oppervlak voor koolstof bevattende radicalen om te adsorberen. Veel frequenter echter worden deze eenvoudigweg verplaatst met een ander waterstof atoom, te wijten aan de relatief hoge concentratie hiervan. Het is deze turnover van waterstof atomen die ook de geadsorbeerde koolstof soorten dehydrogeneert en hen incorporeert in het rooster. Atomair waterstof reageert ook met sp en sp^2 koolstof sites op het oppervlak en converteert hun in sp^3 koolstof. Dus, atomair waterstof is kritiek voor het CVD groei proces en de efficiëntie van de productie is een sleutel parameter in CVD apparaat ontwerp. Waterstof vormt een relatief grote concentratie van nanokristallijne diamant films. (Williams, 2011)

Nanokristallijn diamant is dus een diverse array van diamant materialen, best te onderscheiden door de gemiddelde korrelgrootte. Dit ene feature bepaalt bijna alle eigenschappen van de resulterende film, met grotere korrelgrootte materiaal dat zich meer gedraagt zoals bulk diamant en kleinere korrelgrootte materiaal dat zich meer gedraagt zoals diamond like carbon. Williams (2011) stelt dat de eigenschappen van NCD films afgestemd moeten worden op hun applicatie, en het meeste van dit afstellen omvat het controleren van de korrelgrootte.

5.2 Microwave enhanced plasma CVD

In het IMO maakt men gebruik van het micro wave enhanced plasma CVD systeem. De reactor is afkomstig van Seki diamond. Op de website is het volgende terug te vinden:

Gebaseerd op de best beschikbare microwave plasma technologie, worden Seki CVD reactoren gebruikt in zowel productie- als onderzoeksapplicaties voor verscheidene doeleinden. Met meer dan één miljoen operationele uren ingelogd in meer dan 200 sites, is de microwave plasma technologie een aantrekkelijke optie voor onderzoeks- en ontwikkelingswetenschappers die hun procesontwikkelingstijd proberen in te korten en om hunzelf te voorzien met compatibiliteit met andere wetenschappers en publicaties over de hele wereld. Seki's unieke, flexibele reactor en gepatenteerd microwave koppelend design laat microwave processing toe op hoge druk, medium druk en lage druk. Deze CVD systemen worden wereldwijd gebruikt om verschillende materialen te groeien dewelke carbon en gerelateerde materialen bevatten (diamant, nanokristallijn diamant, etc.) en niet carbon geavanceerde materialen GaN, SiC, etc. met recente toevoeging van Gallium oxide en silicium wiskers. In het bijzonder, de unieke en waardevolle eigenschappen van diamant exploiterend, worden Seki microwave plasma CVD reactoren gebruikt voor gereedschap coatings, thermisch management, SAW apparaten, etc. en voor verschillende nieuwe applicaties gebaseerd op nanokristallijn diamant. (Seki Diamond, 2013)

Figuur 5.2.1: CVD diamant



bron: Seki Diamond (2013)

Microwave plasma enhanced CVD is volgens Narayan (2006) een populaire techniek voor depositie van coatings, gezien het niet gelimiteerd is tot een vizerlijn depositie en het de mogelijkheid biedt voor depositie van coatings op diepe uitsparingen, complexe vormen, en andere drie dimensionele configuraties.

Er werd aangetoond in de studie van Narayan (2006) dat nanokristallijn diamant coatings, gemaakt met behulp van microwave enhanced plasma CVD, beschikken over voldoende hardheid, adhesie, en bloed compatibiliteit eigenschappen voor het gebruik in hartkleppen, vaattransplantaten, stents, en andere cardiovasculaire medische apparaten. De nanokristallijne diamant coatings toonden een goede adhesie aan tussen de coating en de onderliggende substraat en hoge hardheid waardes. Deze resultaten over nanokristallijne diamant coatings zouden de ontwikkeling moeten toelaten van verbeterde materialen. Niet enkel voor cardiovasculaire medische apparaten maar ook voor slijtvaste apparaten, corrosie bestendige apparaten en biosensoren. Het gebruik van nanokristallijne diamant coatings is dus volgens Narayan (2006) uiterst geschikt voor de DNA sensor die in deze masterproef wordt behandeld.

5.3 Hot filament CVD

Een andere CVD techniek is het hot filament CVD systeem. Dit systeem wordt gebruikt in het imec in Leuven. Gezien deze techniek zeer positief beoordeeld wordt en bovendien voor de toepassing van diamant in DNA sensoren de beste techniek blijkt volgens de wetenschappers in dit onderzoeksveld, zal in het verloop van de masterproef deze techniek als gangbaar systeem worden gebruikt. Indien er toch gerefereerd wordt naar een ander systeem, zal dit uitdrukkelijk vermeld worden.

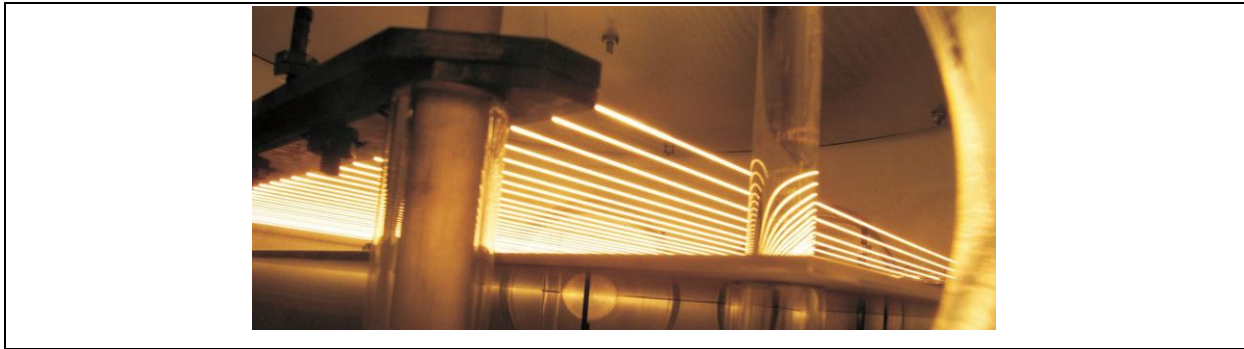
Figuur 5.3.1: hot filament CVD systeem – depositieruimte



bron: Seki Diamond (2013)

De eigenschappen van het hot filament CVD systeem zijn zeer gunstig. Het systeem zorgt voor consistente prestaties. Het vertoont exceptionele proces herhaalbaarheid en dikte uniformiteit over het hele gebied van depositie. Hot filament CVD heeft een hoge throughput. Dit wilt zeggen dat het een breed depositie gebied heeft, een grote kamerruimte en eveneens en snelle turnaround. Met dit systeem zijn er een grote waaier aan 2D en 3D applicaties mogelijk. De flexibele filamenten en interne fixturing accommodeert een variëteit aan substraat geometrieën. Ook verschillende coating diktes zijn mogelijk. Precieze procescontrole zorgt ervoor dat de morfologie van de diamant coating makkelijk aangepast kan worden. Dit kan een nano- of microkristallijne morfologie zijn. Ook is het systeem in staat om zowel ongedoteerde als geleidende, met boor gedoteerde, films te produceren. Bovendien werkt het systeem met een lage kost operatie en de MTBF (mean time between failures) is groter dan 500 uren. (Sekidiamond, 2013)

Figuur 5.3.2: hot filament CVD systeem – gloeidraden



bron: Sekidiamond (2013)

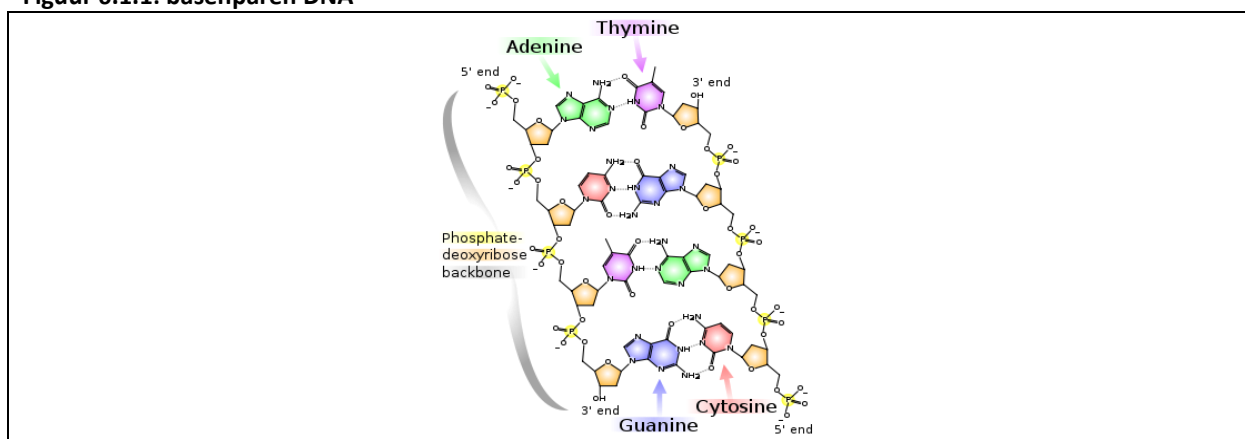
De ruimtevrije kamer en het brede depositie gebied kunnen negen 100mm, vier 150mm, twee 200mm of één 300mm wafer accommoderen (communicatie dr. Thomas Hantschel, april 2013). Wafers kunnen gepositioneerd worden onder of op de filamenten voor partikel controle. Het systeem laat de gebruiker toe om boor gedoteerde diamant coatings te produceren en zo dus elektrisch geleidende films te voorzien. Een optisch substraat koelend pak maakt het mogelijk om diamant coatings te produceren bij temperaturen lager dan 500 graden Celsius. Precieze procescontroles kunnen ultra gladde nanokristallijne diamanten coatings produceren of ruwere microkristallijne structuren. Film dikte kan gecontroleerd worden gaande van 100 nanometer tot 50 microns. Korrelgrootte kan gecontroleerd worden van minder dan 100 nanometer tot een grootte gelijk met de dikte van de film. Andere mogelijkheden in het proces zijn onder andere conforme coatings in twee of drie dimensies, en variërende niveaus van adhesie en nucleatie dichtheid. Gegradeerde laag depositie kan eveneens uitgevoerd worden door de korrelgroottes te laten alternen in een stapel met meervoudige lagen. (Sekidiamond, 2013)

HOOFDSTUK 6: DNA

6.1 Algemene aspecten van DNA

In het menselijk lichaam bevat elke cel twee strengen nucleair DNA. Dit kern DNA is verdeeld over 22 chromosomenparen en 2 geslachtschromosomen. Bij vrouwen zijn dit twee X chromosomen en bij mannen is dit een X chromosoom en een Y chromosoom. Van al deze chromosomenparen wordt de helft overgeërfd via de eicel van de moeder en de andere helft wordt overgeërfd via de zaadcel van de vader. De zaadcellen bevatten hetzij een X chromosoom, hetzij een Y chromosoom. De zaadcellen bepalen dus wat het geslacht van het kind zal zijn. Elke cel bevat niet alleen nucleair DNA, maar ook 1.000 tot 5.000 strengen mitochondriaal DNA. Dit DNA bevindt zich in aparte compartimenten, dit zijn de energiecentrales van de cel en worden mitochondriën genoemd. Dit mitochondriaal DNA wordt, in tegenstelling tot het kern DNA, enkel van de moeder overgeërfd. Zowel het nucleair als het mitochondriaal DNA kunnen gebruikt worden voor de eventuele genetische identificatie van ofwel personen ofwel biologische sporen. Voor het bepalen van het vaderschap kan echter enkel het kern DNA gebruikt worden. (UZ Leuven, 2013) DNA bestaat uit drie essentiële delen. Dit zijn fosfaatgroepen, desoxyribose (een suiker) en bases. De fosfaatgroepen en de desoxyribose suikers vormen de ruggengraat van het DNA. De structuur van het DNA is een dubbele helix. Dit zijn twee lange polymeren dewelke het DNA vormen. Deze twee strengen lopen in tegengestelde richting van elkaar. We kunnen dus stellen dat deze anti parallel zijn. De basekoppels die aanwezig zijn in het DNA vormen zich tot paren, zie figuur 6.1.1. Zo vormen Adenine en Thyminine een basenpaar. En Cytosine en Guanine vormen eveneens een basenpaar. De hiervoor vernoemde baseparen worden gestabiliseerd door waterstofbruggen. Het A-T paar heeft twee waterstofbruggen en het iets stabielere C-G paar heeft 3 waterstofbruggen. Alle DNA strengen in cellen zijn gestructureerd in chromosomen. Zo heeft elke cel zijn apart en verschillend DNA chromosoom.

Figuur 6.1.1: basenparen DNA



bron: IMO – prof dr. Patrick Wagner (2013)

Takahashi (2003) stelt dat er in het post genoom era, nieuwe types van DNA behandelingstechnieken vereist zijn voor een vast aantal van gen diagnoses gebaseerd op het vergelijken van DNA sequenties. CVD diamant is een excellent materiaal als een technische support van DNA diagnose.

De voorbije 15 jaren, zijn er veel technologische vooruitgangen gemaakt die ons voorzien van de benodigde tools om nieuwe technieken te ontwikkelen om bioherkenning en -interactie gebeurtenissen op solide apparaten en in oplossingen te monitoren. Gekoppeld met de mogelijkheid om features op solide substraten te fabriceren met nanoprecisie, offert biosensing onvoorafgaande mogelijkheden voor genetische screening en detectie. (Drummond et al., 2003) Alle moleculair gebaseerde biosensoren vertrouwen op zeer specifieke herkenningsevents om hun doel analieten te detecteren. De essentiële rol van de sensor is om een geschikt platform te voorzien dat de formatie van het probe DNA op zulke manier faciliteert dat het bindingsevent een gepast signaal triggert voor elektronische of thermische uitlezing (Drummond et al, 2003).

DNA is speciaal geschikt voor biosensing applicaties omdat de baseparen interacties tussen de complementaire sequenties zowel specifiek als robuust zijn. Kleine mutaties, vaak puntmutaties genoemd, in de paarvorming van het DNA kunnen ernstige gevolgen hebben. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) kunnen de oorzaak zijn van allerlei gezondheidsverstoringen. Zoals onder andere Xeroderma Pigmentosum, Alzheimer en borstkanker. (communicatie prof dr. Patrick Wagner, maart 2013) De met diamant verrijkte DNA sensor maakt het (vroeg)tijdig opsporen van een ziektebeeld mogelijk.

In een typische configuratie van de DNA sensor, wordt een enkelstreng probe sequentie geïmmobiliseerd in de herkenningslaag, waar basenparen interacties het doel DNA rekruteren op het oppervlak. De repetitieve essentiële uniforme structuur van het DNA maakt de verzameling op het herkenningsoppervlak goed gedefinieerd. Het is op deze interface dat de kritische dynamiek van doelvangst plaatsvindt om het herkenningssignaal te genereren. Drummond et al. (2003) stellen daarvoor dat het immobiliseren van nucleïnezuren probe sequenties in een voorspelbare manier, terwijl deze hun inherente affiniteit voor het target DNA behouden, cruciaal is voor de prestaties van de DNA sensor.

6.2 PCR en amplificatie

De technologie omtrent PCR laat toe om specifieke segmenten van het DNA te kopiëren, waardoor miljoenen kopieën van DNA ter beschikking kunnen worden gesteld voor verdere analyses. Verschillende genetische merkers die afkomstig zijn van het nucleair DNA kunnen simultaan geanalyseerd worden in één proefbuis. Hierdoor is er slechts weinig DNA vereist voor een onderzoek. Er wordt meestal gewerkt met één nanogram DNA, maar het is zelfs mogelijk om met minder een DNA profiel op te stellen. (UZ Leuven, 2013)

Na amplificatie van het DNA worden de verschillende DNA fragmenten rechtstreeks zichtbaar gemaakt na scheiding. Het mitochondriaal DNA wordt na de amplificatie met behulp van een enzymatisch proces gekarakteriseerd. Hierbij wordt de opeenvolging van de 4 bouwstenen, de nucleotiden A, T, C en G, zichtbaar gemaakt.

De PCR behandeling en amplificatie komen in hoofdstuk 7 en hoofdstuk 10 nogmaals aan bod.

HOOFDSTUK 7: DIAMANT DNA BIOSENSOR

7.1 Omkadering van de DNA sensor met diamant

Wenmackers et al. (2009) wijzen erop dat diamant zeer inert is in diverse chemische omgevingen, wat voordelig kan zijn voor de ontwikkeling van chemische sensors. Diamant blijkt een geschikt materiaal te zijn om te gebruiken in contact met menselijk bloed. Hoewel volledige biocompatibiliteit niet vereist is voor DNA sensoren, is deze eigenschap een belangrijke zaak voor zowel in vivo als in vitro biosensoren. Voor in vivo biosensoren zijn enkele algemene voordelen van implantaten bedekt met diamant coatings onder andere hoge biotolerantie, biocompatibiliteit, corrosie weerstand en bescherming tegen metalosis. Toekomstige in vivo biosensoren kunnen dus duidelijk een voordeel hebben door het gebruik van CVD diamant transducers, maar ook de in vitro DNA sensoren hebben hier baat bij. Wenmackers et al. (2009) concluderen dat de stabiliteit van CVD diamant een veelbelovende optie is om een in vivo biosensor te creëren, te wijten aan de biocompatibiliteit van diamant. Ook een herbruikbare biosensor voor in vitro applicatie, zoals een DNA sensor, is een veelbelovende optie. Afgezien van de laag dichtheid, is ook de DNA probe lengte een belangrijke factor die dient geoptimaliseerd te worden in de ontwikkeling van een DNA sensor.

Het algemene doel van het onderzoek naar diamant gebaseerde DNA sensoren is om een prototype biosensor te ontwikkelen voor diagnostische doeleinden, gebaseerd op DNA dat covalent gehecht is aan CVD diamant. Deze biosensor zou dezelfde sensitiviteit en specificiteit als de algemeen gebruikte methoden moeten hebben, zoals bijvoorbeeld microarrays. Liefst zou de detectie sneller moeten zijn (real-time) en goedkoper (label-free en bruikbaar door niet specialisten) dan deze conventionele methoden (Wenmackers et al., 2009). CVD diamant bedekte silicium wafers zijn in het bijzonder een zeer goed platform materiaal, gezien deze makkelijker te produceren zijn en goedkoper zijn dan een volledige diamant biosensor. Diamant biedt het meest stabiele oppervlak aan voor functionalisering, het meest wijde elektrochemisch venster en het laagste ruisniveau (Williams et al., 2011).

Het is aangetoond dat diamant het meest stabiele gefunctionaliseerde oppervlak heeft van alle halfgeleiders. Deze eigenschap kan van cruciaal belang zijn voor pathogeen detectie, immunosensing, toxine bewaking, stripping voltmetrie etc. (Wenmackers et al., 2009). Diamant vertoont ook lage frictie, extreme chemische stabiliteit en bio inertheid, aanpasbare bevochtigbaarheid aan de nanoschaal met simpele stabiele oppervlakte terminaties, en het meest wijde elektrochemische venster en laagste ruisniveau voor elektrochemische elektrodes.

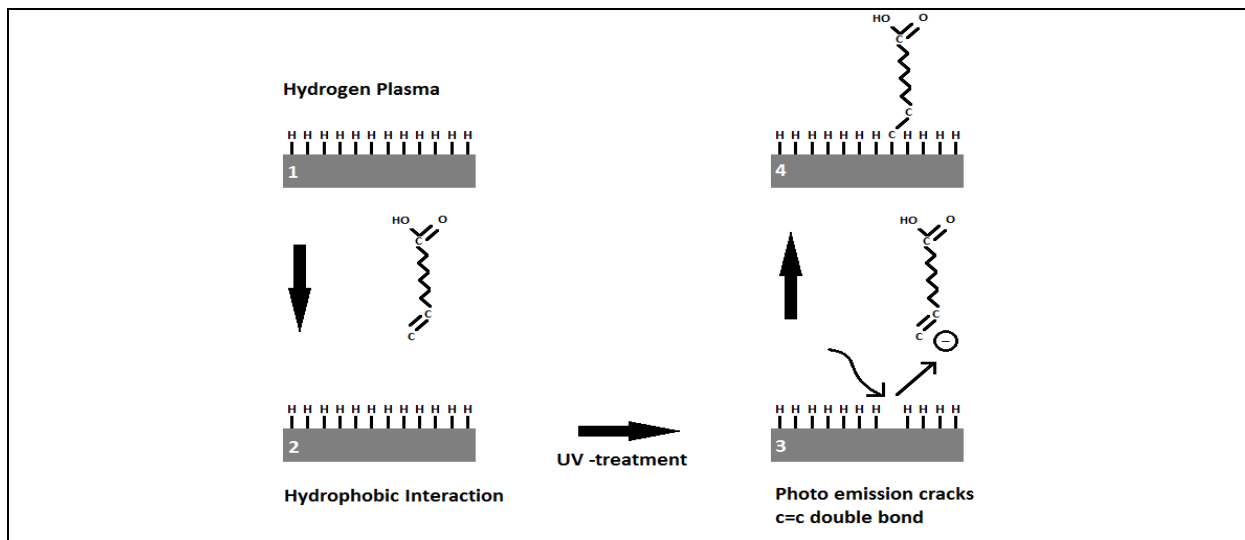
7.2 Werkwijze van de biosensor met diamant

Het doel van de met diamant verrijkte DNA sensor is voornamelijk het detecteren van puntmutaties in het DNA. Deze puntmutaties worden ook Single Nucleotide Polymorfisms (SNP's) genoemd, wanneer ze voorkomen bij meer dan 5% van de bevolking. Het zoeken naar en het vinden van deze puntmutaties wordt mutatie screening genoemd. Mutatie screening vormt een belangrijk deelgebied van de geneeskunde, aangezien het vroegtijdig ziektes en afwijkingen kan opsporen. De beoogde sensitiviteit van de DNA sensor is dus om te onderscheiden tussen volledig complementair doel ssDNA en één mismatch in het ssDNA. (Wenmackers et al., 2009) Hieronder volgt een sterk vereenvoudigde werkwijze van de detectie naar SNP's.

Allereerst moet het met diamant begroeide sample hetzij waterstof getermineerd hetzij zuurstof getermineerd worden. Deze laatste methode wordt oxidatie genoemd en kan gebeuren aan de hand van zuurstofplasma, ozon behandeling of natte chemische behandelingen. Hydrogenatie daarentegen gebeurt aan de hand van waterstofplasma en is daarenboven gunstiger, aangezien het zeer stabiel is in de omringende atmosfeer (Wenmackers et al., 2009). Er zal dus geopteerd worden voor de hydrogenatie van het sample.

Vervolgens moeten vetzuur crosslinkers aan het met waterstof behandelde diamant sample gekoppeld worden. Dit gebeurt aan de hand van UV behandeling van het sample. Het waterstofplasma vertoont een hydrofobe interactie. Als we hierop een UV behandeling toepassen, zal de dubbele koolstofbinding van het vetzuur breken. Het vetzuur kan zich vervolgens hechten aan het sample. In onderstaande figuur 7.2.1 zijn de verschillende stappen weergegeven.

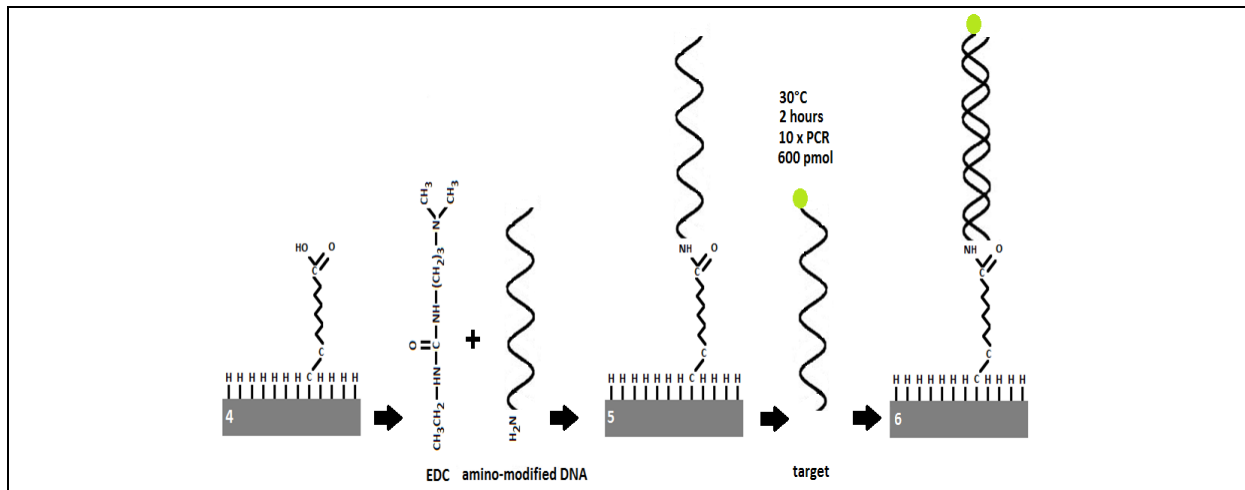
Figuur 7.2.1: UV behandeling van het sample



bron: IMO – prof dr. Patrick Wagner

Vervolgens moet het probe DNA gekoppeld worden aan het nanokristallijne oppervlak. Dit gebeurt aan de hand van een EDC reactie. Een EDC gemedieerde hechting van DNA aan nanokristallijn diamant leidt tot een covalente binding tussen dit DNA en het diamant oppervlak (Christiaens et al., 2006). De eerste stap in onderstaande figuur 7.2.2 is de EDC behandeling.

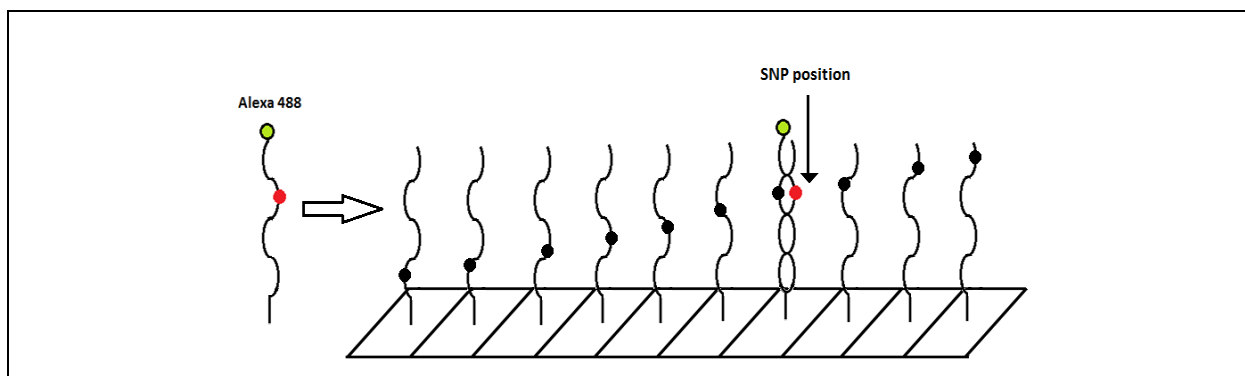
Figuur 7.2.2: EDC behandeling van het sample



bron: IMO – prof dr. Patrick Wagner

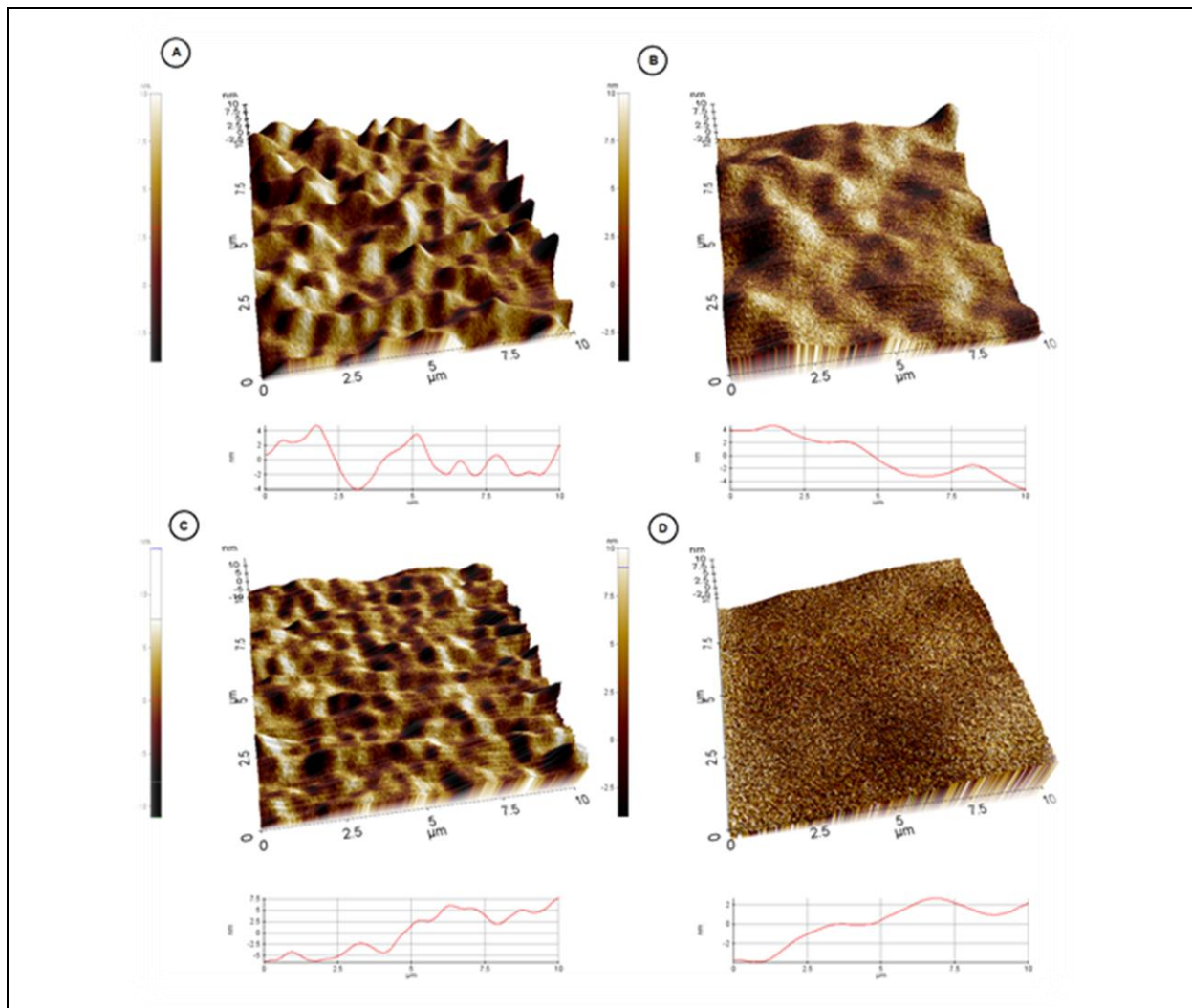
Het target DNA dient nu te worden gehybridiseerd met het probe DNA dat zich op het sensor oppervlak bevindt. De tweede stap in bovenstaande figuur 7.2.2 toont deze hybridisatie. Daar waar de basenparen niet matchen, zullen we bijgevolg spreken van een puntmutatie of SNP. Figuur 7.2.3 hieronder toont een dergelijke puntmutatie. Het is noodzakelijk om verschillende spots te hebben waarop enkelvoudige strengen DNA zijn bevestigd. Op deze manier kan de puntmutatie op een meer gestructureerde wijze gedetecteerd worden.

Figuur 7.2.2: detectie SNPs



bron: IMO – prof dr. Patrick Wagner

Figuur 7.2.4: oppervlaktestructuren van het sample

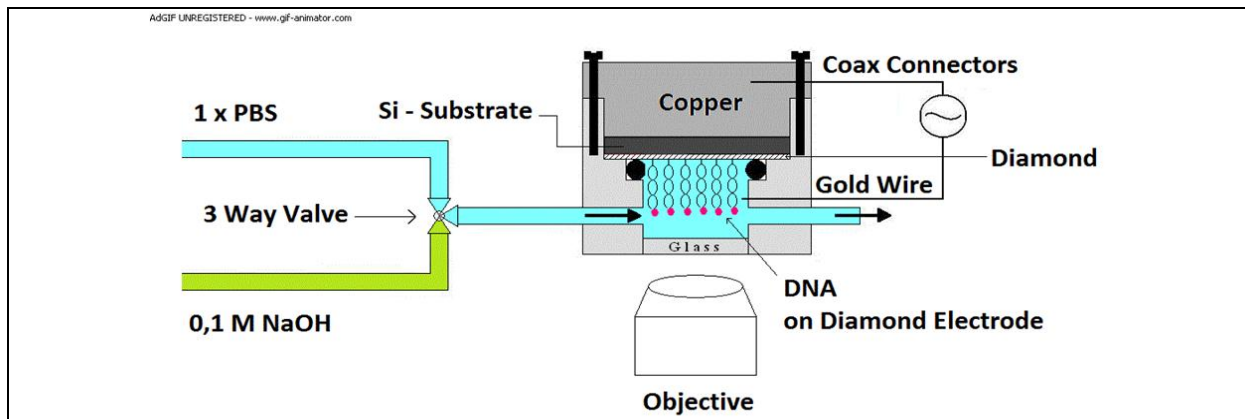


bron: IMO – prof dr. Patrick Wagner

Bovenstaande figuur 7.2.4 bevat afbeeldingen van de oppervlakken in de verschillende eerder vernoemde stadia. In afbeelding A zien we het oorspronkelijke polykristalijn diamant. Afbeelding B geeft het sample weer waarop de vetzuur linkers bevestigd zijn. Afbeelding C geeft het oppervlak van het sample weer nadat het probe DNA is bevestigd, dus na de EDC reactie. Tenslotte geeft afbeelding D weer hoe het oppervlak er uit ziet nadat de volledige hybridisatie met het target DNA heeft plaatsgevonden. We kunnen zien dat het oppervlak evolueert van een ruwe structuur naar een relatief glad oppervlak.

Vervolgens dient een chemische denaturatie van het sample te gebeuren. Dit wordt uitgevoerd aan de hand van een PCR behandeling en een PCR buffer. In onderstaande figuur 7.2.5 kan er gezien worden dat er een flow is van de wasvloeistoffen. Deze zullen de dubbele helix terug afwassen tot een enkelvoudige streng. Dit proces noemt met denaturatie of ontbinding.

Figuur 7.2.5: wasproces

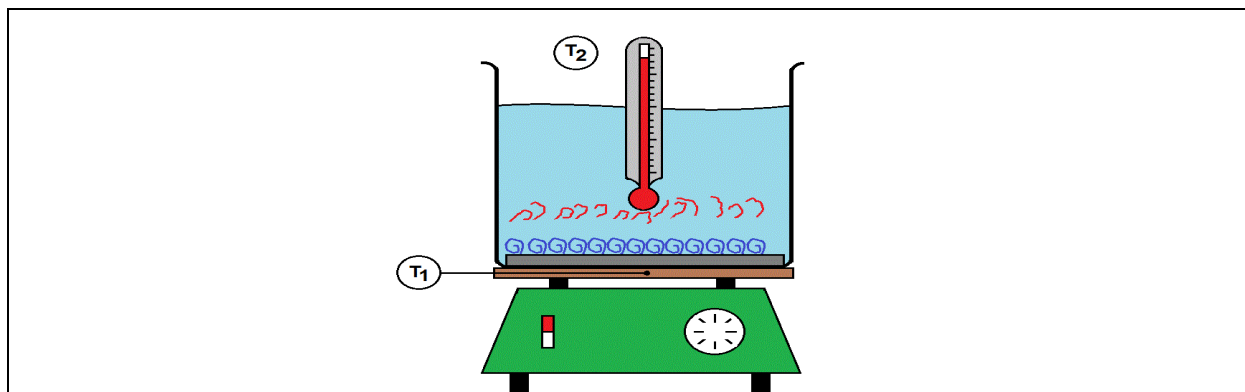


bron: IMO – prof dr. Patrick Wagner (2013)

Na de PCR behandeling kan het DNA geamplificeerd worden. Hierdoor kunnen er miljoenen kopieën van het desbetreffende DNA gebruikt worden voor verdere analyses.

Het uitlezen van de sensor kan op verschillende manieren gebeuren. Enerzijds is er de impedantie analyse, anderzijds is er de thermische methode. Eerst vernoemde methode maakt gebruik van impedantie analysators. De denaturatie wordt dan gemonitord tijdens een dubbele spoeling. De impedantie wordt vervolgens uitgezet ten opzichte van de tijd. Deze resultaten moeten echter nog verder geanalyseerd worden met wiskundige formules om de juiste conclusies te kunnen trekken. Dit wordt soms als tijdrovend ervaren. We zullen dan ook opteren voor de thermische methode. Bij het principe van thermische uitlezing wordt het principe van een kookpot gehanteerd. Enkelvoudig DNA gedraagt zich namelijk als een thermische isolator. Dubbel streng DNA daarentegen verhindert de transfer van thermische energie dan weer niet.

Figuur 7.2.6: principe thermische read – out

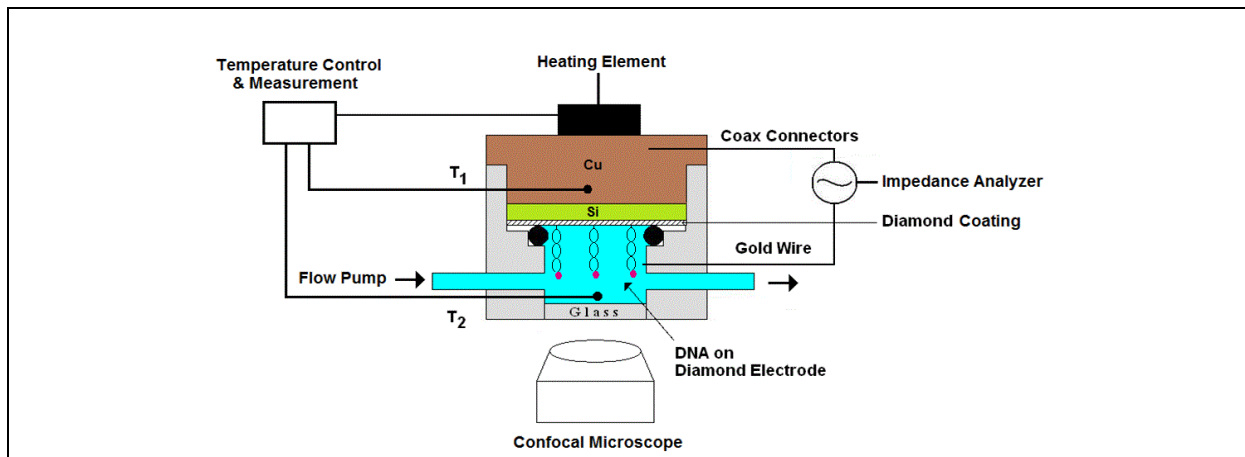


bron: IMO – prof dr. Patrick Wagner (2013)

Figuur 7.2.6 toont het principe van thermische uitlezing. We kunnen de temperatuur van de kookplaat, T_1 , vergelijken met de temperatuur in de vloeistof, T_2 . Indien deze temperatuur zeer verschillend is, kunnen we dus besluiten dat het DNA nog niet gehybridiseerd is. Indien de temperatuur in de vloeistof wel toeneemt, zal het target DNA hybridiseren met het probe DNA.

De technische versie van de thermische uitleesmethode ziet er als weergegeven in figuur 7.2.7 hieronder. Net als in de vorige figuur zien we de basiselementen terugkomen. Dit zijn het warmte element, wat zorgt voor temperatuur controle en meting, en het substraat waarop het DNA bevestigd is. Er kan opgemerkt worden dat de temperatuur T_1 gemeten wordt van het substraat en de temperatuur T_2 van de vloeistof met het DNA. Indien de temperatuur in de vloeistof toeneemt, hybridiseert het probe DNA met het target DNA.

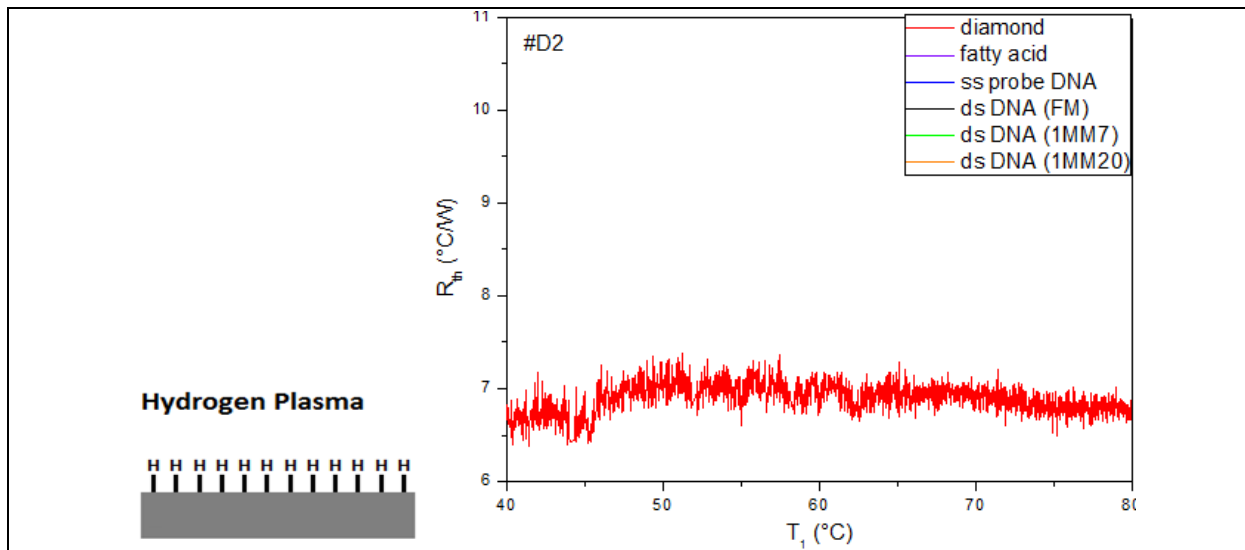
Figuur 7.2.7: thermische read – out



bron: IMO – prof dr. Patrick Wagner (2013)

Om een juiste analyse te kunnen uitvoeren in deze thermische methode, moet het begrip thermische weerstand aangehaald worden. Het is namelijk aan de hand van deze thermische weerstand dat we eventuele mutaties zullen kunnen opmerken. Hieronder volgt een stapsgewijze demonstratie van dit principe. We beginnen met de diamantlaag zelf. De weerstand is hieronder weergegeven.

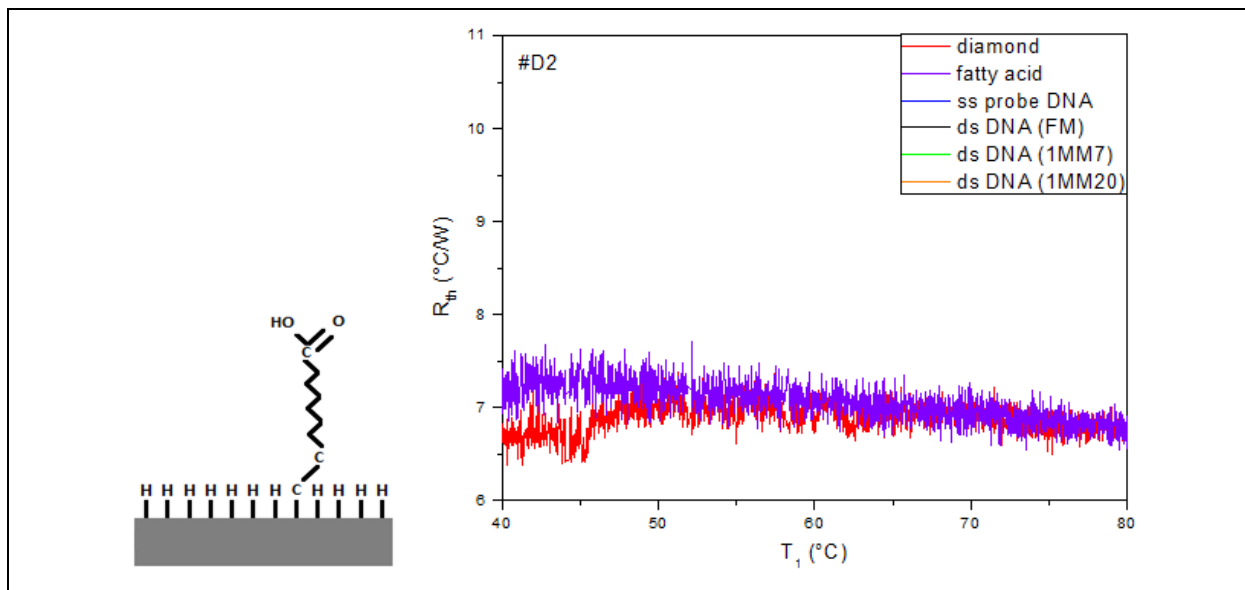
Figuur 7.2.8: weerstand waterstof plasma



bron: IMO – prof dr. Patrick Wagner (2013)

De volgende stap is het toevoegen van de vetzuur crosslinker. Er kan uit onderstaande figuur opgemerkt worden dat de thermische weerstand licht toeneemt.

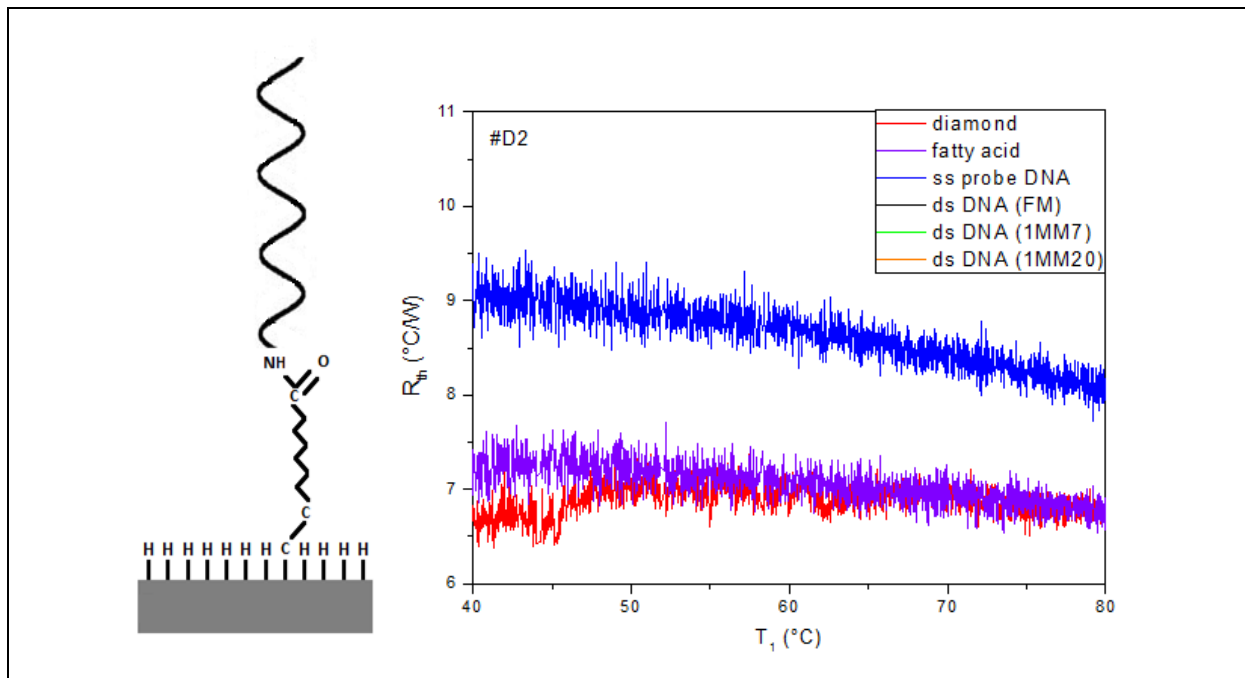
Figuur 7.2.9: weerstand waterstof plasma met vetzuren



bron: IMO – prof dr. Patrick Wagner (2013)

Vervolgens wordt de enkelvoudige probe DNA aangekoppeld. Er kan duidelijk opgemerkt worden in onderstaande figuur dat de thermische weerstand aanzienlijk toeneemt. De bovenstaande opmerking dat ssDNA isolerend werkt, is hierbij in praktijk bewezen.

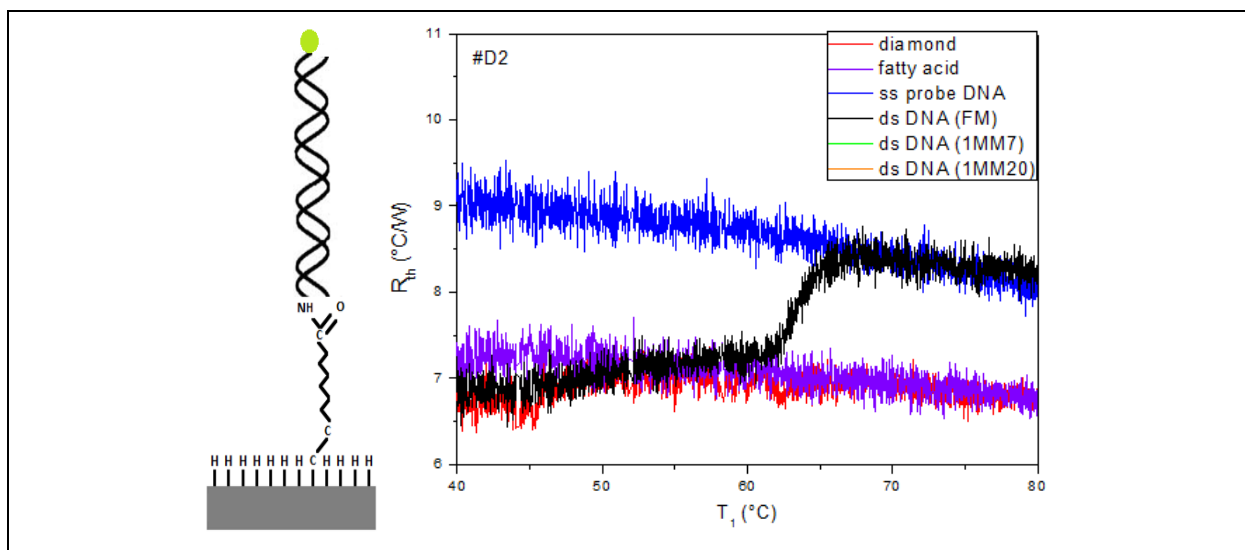
Figuur 7.2.10: weerstand waterstof plasma met vetzuren en ssDNA



bron: IMO – prof dr. Patrick Wagner (2013)

Tenslotte dient het complementaire target DNA aangekoppeld te worden. In het eerste stadium, wanneer de temperatuur nog laag is door het isolerende enkelstrengige DNA, halveert de thermische weerstand. In het tweede stadium, wanneer het probe DNA hybridiseert met het target DNA en dus de temperatuur toeneemt, zal de thermische weerstand eveneens terug toenemen. Van zodra de hybridisatie plaatsvindt, is er dus als het ware een knippunt in de thermische weerstand.

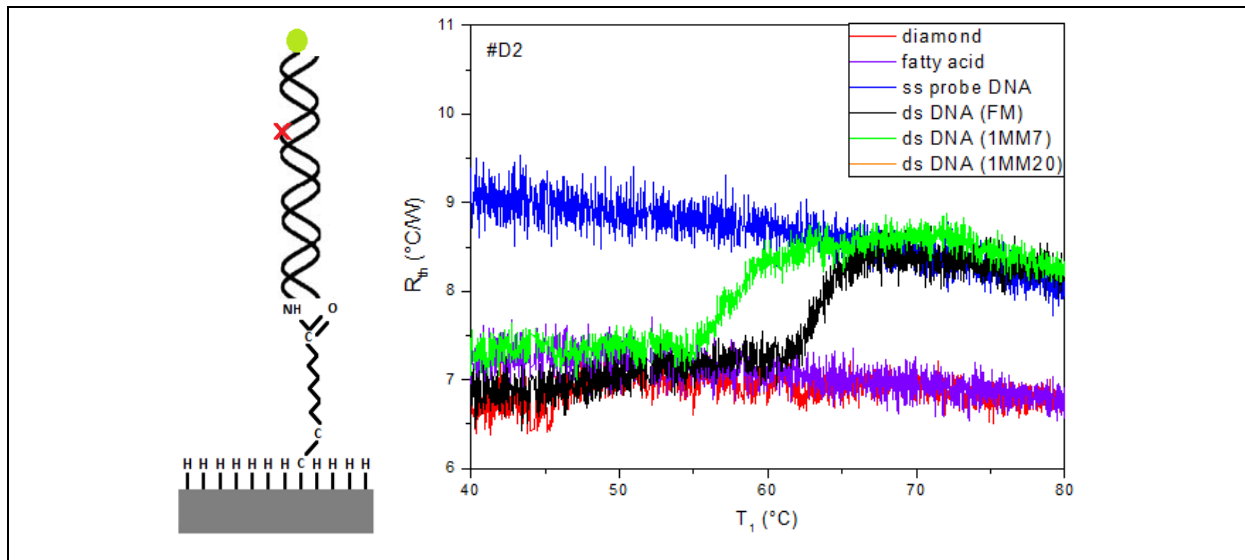
Figuur 7.2.11: weerstand waterstof plasma met vetzuren en dsDNA



bron: IMO – prof dr. Patrick Wagner (2013)

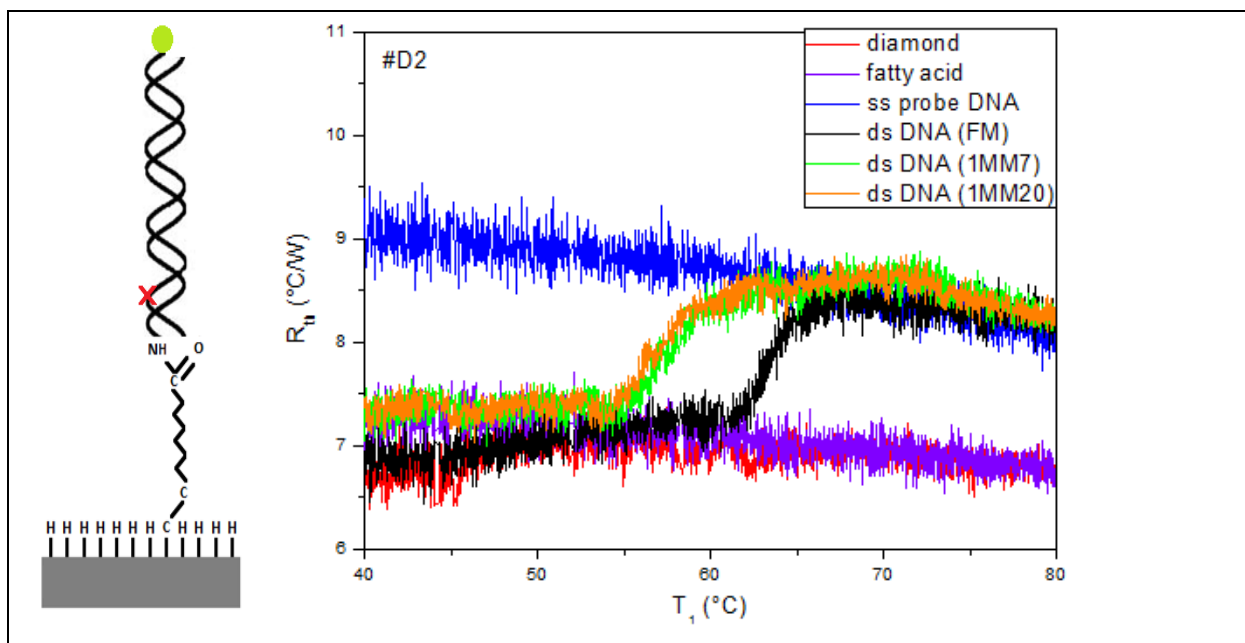
Bij puntmutaties in het DNA, kan er opgemerkt worden dat het hierboven besproken knikpunt in de thermische weerstand verschuift naar een lagere temperatuur. Dit wordt geïllustreerd door de groene lijn in figuur 7.2.12 hieronder.

Figuur 7.2.12: weerstand waterstof plasma met vetzuren en dsDNA met puntmutatie



bron: IMO – prof dr. Patrick Wagner (2013)

Figuur 7.2.13: weerstand waterstof plasma met vetzuren en dsDNA met puntmutatie



bron: IMO – prof dr. Patrick Wagner (2013)

Uit bovenstaande figuren 7.2.12 en 7.2.13 kan er duidelijk opgemerkt worden dat indien er een mutatie plaatsvindt in het dsDNA, er een verschuiving plaatsvindt in het knikpunt van de thermische weerstand.

Samenvattend kan er gesteld worden dat DNA dat puntmutatie(s) bevat minder stabiel is. Het heeft ook een lagere smelttemperatuur tijdens het opwarmen. Ook de dissociatie door chemische stoffen, zoals bijvoorbeeld NaOH, gebeurt sneller. De hierboven beschreven methode geeft dynamische informatie. Dit wil zeggen dat er een soort van real time monitoring kan plaatsvinden. Een ander sterk punt van de methode is dat deze geen gebruik maakt van fluorescerende labels. De microarray methode, die in het volgende hoofdstuk aan bod komt, gebruikt dit echter wel. Eveneens is de thermische methode te verkiezen omwille van flexibiliteit. Hiermee wordt bedoeld dat het onderzoek of de analyse niet enkel beperkt wordt tot de reeds bekende mutaties. Tot slot is de thermische apparatuur die gebruikt wordt voor het uitlezen van de resultaten herbruikbaar.

7.3 Stapsgewijs ontwikkelingsproces van de DNA sensor met diamant

De basiscomponent van de DNA sensor met diamant is een silicium wafer. Dit is een standaard wafer van 2 inch silicium. Hierop zal het diamant aan de hand van de CVD techniek, besproken in hoofdstuk 5, gegroeid worden. Uit één zulke wafer, kunnen 10 diamantchips gehaald worden.

Een tweede stap in het creëren van de sensor, is het groeien van diamant. Het nanokristallijn diamant dat gevormd wordt, is CVD nanokristallijn diamant (NCD). In dit groeiproces is er nanodiamant poeder nodig, evenals waterstofgas en methaangas. Het nanokristallijn poeder is de basis grondstof voor het groeien van het diamant. De gassen zijn vereist in het opdamp proces. De juiste opdamp temperatuur is eveneens een belangrijke vereiste. Voor het groeien van diamant zijn er drie apparaten die het meest gebruikt worden. Een eerste methode is microwave enhanced plasma CVD, uitvoerig besproken in sectie 5.2. Dit apparaat is aanwezig op IMO. Het nadeel van dit toestel is echter dat het plasma bolvormig is, wat niet altijd praktisch is. Het waterstofplasma dat gevormd wordt, verbetert de chemische reactie. De depositie kan bovendien op lagere temperaturen gebeuren. Een tweede methode is het lineair antenne systeem. Dit systeem is gelijkaardig aan het eerst vernoemde, maar kan grotere oppervlakken groeien. IMO zal dit in de toekomst gebruiken naast de huidige apparatuur. Een derde methode is hot filament CVD, wat reeds uitvoerig besproken werd in sectie 5.3. Dit blijkt vanuit verschillende standpunten het beste systeem te zijn. IMEC maakt dan ook gebruik van deze apparatuur. Hierbij wordt een hete gloeidraad gebruikt. Deze gloeidraden ontleden de gassen die gebruikt worden in het proces en zo kan de depositie plaatsvinden.

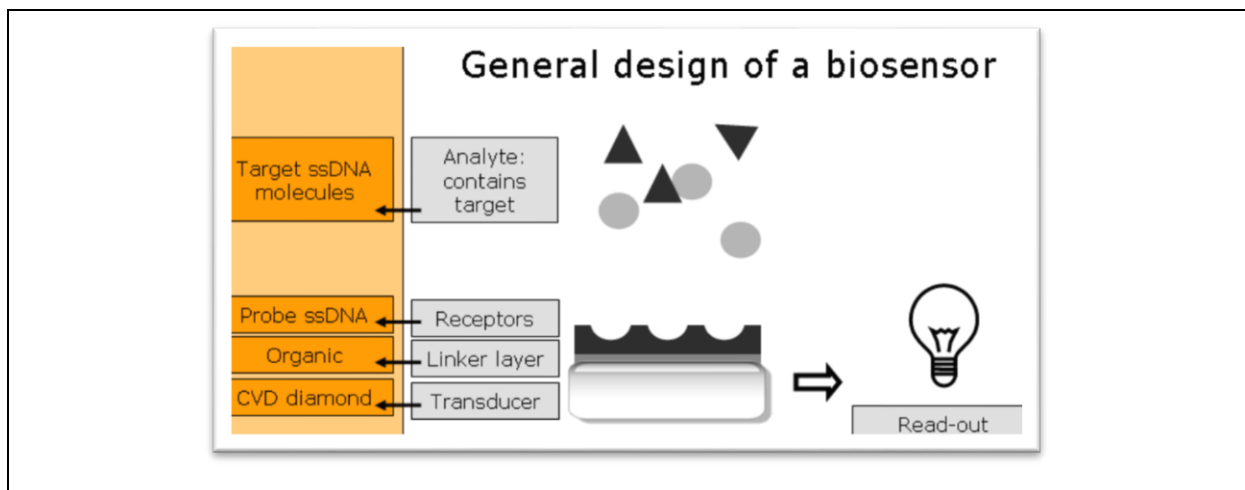
Vervolgens worden de verkregen samples hetzij zuurstof getermineerd, hetzij waterstof getermineerd. Zoals reeds kort besproken in sectie 7.2, hanteren beide mogelijkheden tot terminatie de nodige vetzuren en maken ze gebruik van UV behandeling. In het waterstof getermineerde proces wordt er eerst gedurende twintig minuten gehydroneerd. Daarna vindt een incubatie plaats van twintig uren in vetzuren. Vervolgens wordt het sample behandeld met UV licht. Tenslotte wordt er een half uur tot een uur afgewassen. In het zuurstof getermineerd proces worden vetzuurkorrels opgelost in een solvent. Dit wordt toegepast op het sample. Hierna wordt het sample onder een UV ozon lamp geplaatst. Dit zorgt voor creatie van een extra zuurstofatoom waardoor het oppervlak zuurstof getermineerd is.

De hierop volgende stap betreft de aankoppeling van het probe DNA. Hierbij vindt een EDC behandeling plaats en wordt er gebruik gemaakt van was vloeistoffen. EDC staat voor 1-ethyl-3-[3-dimethylaminopropyl]carbodiimide. De EDC behandeling zorgt voor de aankoppeling van het probe DNA op het nanokristallijne diamant oppervlak.

De was vloeistoffen worden gebruikt om het sample af te spoelen na de aankoppeling van het DNA. Zo worden eventuele onzuiverheden verwijderd van het sample. Hybridisatie met target DNA volgt op de aankoppeling van het probe DNA. In deze stap wordt eerst patiënten DNA geëxtraheerd. Hiervoor zijn enkele buffers en oplossingen vereist. Deze extractie vereist kennis en heel wat werk. Hierna vindt een PCR plaats, waarop tenslotte een amplificatie volgt. Hierbij worden de DNA bases met behulp van scheikundige producten geamplificeerd. Vervolgens wordt de PCR gezuiverd aan de hand van een was vloeistof. Tenslotte vindt denaturatie plaats met behulp van een buffer.

Als laatste stap in het proces is de sensor cel zelf. Dit kan ofwel de nodige impedimetrische apparatuur zijn, ofwel de nodige thermische apparatuur. Zoals eerder besproken, zal er geopteerd worden voor de thermische meetcel.

Figuur 7.2.14: diamant DNA sensor



bron: Wenmackers et al. (2009)

Om kort samen te vatten wat in voorgaande secties besproken werd, geeft bovenstaande figuur het algemene ontwerp weer voor de met diamant verrijkte DNA sensor. De basiselementen van elke biosensor kunnen duidelijk onderscheiden worden. De transducer is het CVD diamant. Deze bevat het probe ssDNA. Het analiet is het target ssDNA en dient gekoppeld te worden aan het probe DNA. De read-out is een bijkomend systeem bij de biosensor en bestaat in het geval van de diamant DNA sensor uit thermische uitlees apparatuur.

7.4 Bewerkingsproces van de DNA biosensor met diamant

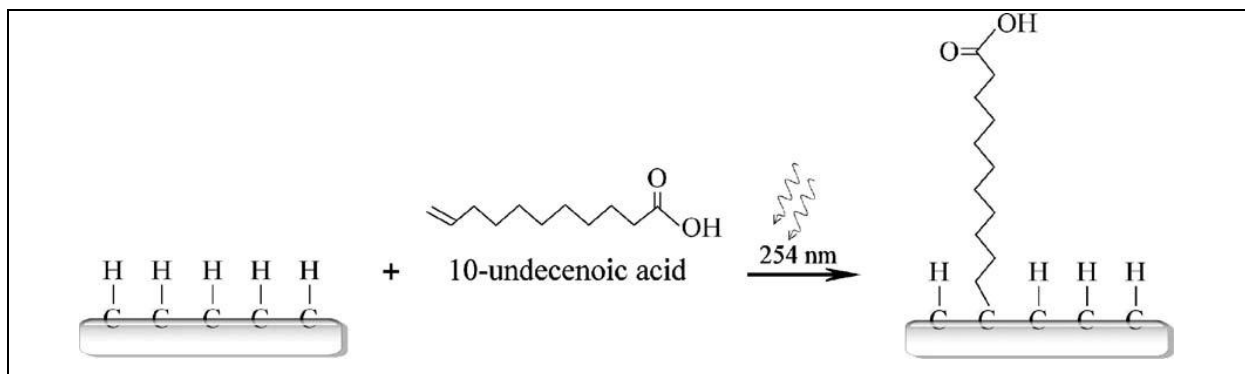
Hieronder volgt een uiteenzetting van het bewerkingsproces dat de met diamant verrijkte DNA sensor ondergaat, volgens Christiaens et al. (2006).

De oppervlaktes van de diamanten samples werden bedekt met 10 undeceenzuur en vervolgens verlicht voor 20 uren met 254 nm licht van een Philips 4W lamp, gemonteerd in een glove box onder een beschermende stikstof atmosfeer. De samples werden gespoeld met 10% SDS, een anionisch detergent, en met gedistilleerd water.

De COOH groepen op het diamant oppervlak werden getransformeerd door gebruik van EDC in tussenproducten die gemakkelijk reageren met de NH₂ groepen op de gelabelde PCR amplicons. De OH groep (een slechte vertrekkende groep) van de COOH groep wordt getransformeerd tot een betere vertrekkende groep door het gebruik van het EDC reagens, dat een onstabiel tussenproduct vormt. Hierna resulteert een zuur gekatalyseerde nucleofiele substitutie met amino aangepast DNA in een netto amide verbinding tussen het vetzuur en het dsDNA. Zie figuur 7.3.1 onderaan.

De NCD oppervlaktes werden geïncubeerd, met een drup van een mix van het gelabeld NH₂ aangepast dsDNA en EDC in een MES oplossing, voor twee uur op vier graden Celsius. De NCD samples werden in een gesloten container geplaatst met een drup van water omsloten, om verdamping te voorkomen. Niet covalent gebonden DNA werd verwijderd van de diamanten samples door grondig te wassen met de PBS buffer. Om de NCD samples te wassen, werden deze ondergedompeld in een PBS buffer en vervolgens continu geschud voor vijf minuten. Dit werd elf maal herhaald. Voor de twaalfde en laatste was stap, werd PBS op het oppervlak aangebracht, verzameld en verwijderd na vijf minuten.

Figuur 7.3.1: terminatie van het oppervlak



bron: Christiaens et al. (2006)

Een volgende stap in het proces uitgevoerd door Christiaens et al. (2006) betreft de denaturatie en dehybridisatie van het sample. De COOH aangepaste NCD samples die behandeld werden met een gelabelde NH₂ aangepaste dsDNA oplossing, werden gebruikt in een denaturatie en rehybridisatie experiment. Om het geïmmobiliseerde dsDNA te denatureren, werd NaOH geplaatst op de behandelde diamanten oppervlaktes op kamertemperatuur voor vijf minuten. Dit NaOH, dat de gelabelde gedenateerde strengen bevat, werd verzameld door eenvoudigweg een drup van NaOH te pipetteren van het oppervlak en te neutraliseren met HCl. De samples werden vervolgens ondergedompeld in kokend water voor één minuut, om er zeker van te zijn dat al het dsDNA dat aan het oppervlak gebonden is, gedenateerd zou zijn. Rehybridisatie van het ssDNA dat nog aanwezig is op de diamanten oppervlakken werd uitgevoerd door de samples onder te dompelen voor dertig minuten op 59 graden Celsius in een hybridisatie buffer dat een overmaat bevat van complementair DNA, dat voorheen werd gedenateerd voor 5 minuten op 95 graden Celsius. De samples werden daarna grondig gewassen met PBS, zoals voorheen beschreven.

De resultaten uit Christiaens et al. (2006) wijzen aan dat DNA covalent gebonden was door het gebruik van EDC hechtingsprotocollen. Er was inderdaad ssDNA aanwezig op het oppervlak van de EDC behandelde kralen na opeenvolgende denaturatie stappen. Er bleek geen DNA aanwezig te zijn op het oppervlak van kralen die behandeld werden zonder EDC. Bovenstaande resultaten geven dus bijgevolg een covalente binding aan tussen het DNA en NCD.

Vergeleken met andere methodes voor de aanhechting van biomoleculen op diamanten oppervlakken, heeft deze methode verschillende voordelen. Ten eerste zijn er vele moleculen met NH₂ groepen. Proteïnen (enzymen, antilichamen) bevatten NH₂ groepen zowel aan het amino uiteinde als in sommige aminozuur residuen. Wanneer echter de EDC crosslinker gebruikt wordt bij deze moleculen, voorziet de methode een korte en eenvoudige link tussen het DNA en het diamant oppervlak, aangezien er geen deel van het EDC is achtergelaten in de finale linker molecule. De EDC methode voorkomt dus ongewenste nevenreacties. Daarenboven zal deze specifieke en sensitieve DNA gebaseerde biosensor worden geïntegreerd in een elektrisch of thermisch uitlezing systeem, dewelke de metingen zal faciliteren en versnellen (Christiaens et al., 2006).

HOOFDSTUK 8: MICROARRAYS

8.1 Microarray methode

Kennis van de structuur van het menselijk genoom, zo stellen Villaseñor-Park en Ortega-Loayza (2013), opent de deuren naar het bestuderen van de werkelijke functies van specifieke genen, wat noodzakelijk is in het begrijpen van gezondheid en ziekte. DNA microarrays zijn een techniek die het begrijpen van het genoom van structuur tot functie vooruithelpt. Voor het grootste deel bevat elke cel in het lichaam een complete set van identiek DNA. Wat een bepaalde cel verschillend maakt van een andere is dat enkel bepaalde genen actief zijn, of uitgedrukt zijn, binnen de cel. De informatie omvat in het DNA in een gegeven cel is getranscribeerd in messenger RNA (mRNA), wat vervolgens vertaald wordt in proteïnen die de cel toelaten te bestaan en te functioneren. Zieke cellen kunnen foutief werken omdat deze de noodzakelijke genen niet uitdrukken, de verkeerde genen uitdrukken, of ongepaste hoeveelheden van een benodigd gen uitdrukken. De mogelijkheid om deze abnormaliteiten te detecteren biedt onderzoekers de sleutel tot informatie die gebruikt kan worden om ziektes te diagnosticeren en managen.

In microarrays worden tienduizenden DNA sequenties (of zelfs grotere aantallen van oligonucleotiden) gerangschikt in een gekende en ordelijke manier (dus array) op een kleine, vaste support structuur of microchip. De target sample dient te binden met de array. Als een gen in het sample uitgedrukt is, zal zijn mRNA binden, of hybridiseren, met zijn complementair probe DNA op de chip. De array wordt dan gescand, en verschaft zowel kwalitatieve als kwantitatieve informatie over de functie van de specifieke genen. DNA microarrays laten simultane en parallelle determinatie van de expressie van talrijke genen toe en dus zijn ze een sterk hulpmiddel in laboratoria, zo stellen Villaseñor-Park en Ortega-Loayza (2013). In de meeste gevallen is het doel, of dat wat hoort te hybridiseren met de probe, het mRNA. Dit wordt geëxtraheerd van het tissue en gelabeld met ofwel een fluorescente kleurstof ofwel een radioactieve isotoop. Het gebruik van verschillende fluorophoren faciliteert directe, parallelle vergelijking tussen verschillende tissue types. Deze techniek zou, bijvoorbeeld, gelijktijdige vergelijking kunnen toelaten van gekend ziek versus normaal tissue (Villaseñor-Park & Ortega-Loayza, 2013).

Een van de fundamentele voordelen van biosensoren, zo stellen Assibi et al. (2009), is hun inherente mogelijkheid om in parallel gebruikt te worden om gelijktijdig een groot aantal van elkaar verschillende analieten te detecteren in een enkel sample.

DNA microarrays hebben genoom-wijde kwantitatieve analyse van gen expressie en grote schaal SNP ontdekking en genotypering mogelijk gemaakt. Microarrays hebben een potentieel om verschillende analyses te accommoderen met enkel een test format. Er zijn ontelbare variaties van microarrays in relatie met oppervlakken, probe depositie, inclusie van microfluidics, detectie methode etc. (Petrik, z.d.).

De accuraatheid en dynamische range van microarray systemen beantwoorden niet aan de strenge vereisten van vele biotechnologische applicaties, zoals bijvoorbeeld moleculaire diagnostiek en forensiek. Microarrays worden volgens Assibi et al. (2009) gezien als semi kwantitatieve platformen en zijn het meest geschikt voor applicaties zoals gehele genoom gen expressie profilering, waar parallelisme het meest imperatieve criterium is. De detectie dynamische range van microarrays verbeteren, kan niet alleen de prestatie verbeteren van bestaande high throughput systemen, maar ook de adoptie van microarrays faciliteren in opkomende high performance applicaties.

Assibi et al. (2009) stellen vast dat het hybridisatie proces in microarrays, gelijkaardig aan eender welke affiniteit gebaseerde biosensor, een kinetisch stochastisch proces is en een niet-lineaire functie van tijd, analiet concentratie en reactie kinetica. Er wordt geargumenteed dat de huidige methode van analyse in microarrays, i.e. analiet kwantificatie op basis van een enkel data punt van het hybridisatie (binding) proces, niet alleen vatbaar is voor geluid en systematische fouten, maar ook incapabel is om voldoende informatie te verschaffen voor systemen die bestaan uit analieten met een zeer hoog concentratie verschil. Real-time meting van hybridisatie events en analiet kwantificatie gebaseerd op de snelheid van de hybridisaties kunnen een alternatief zijn en zelfs een te verkiezen oplossing (Assibi et al., 2009). De verbeterde prestatie van real-time microarrays vergeleken met conventionele analyse methoden is zeer veelbelovend.

Samenvattend kan er dus gesteld worden dat DNA microarrays toelaten dat het gehele genoom bestudeerd wordt in één keer. De techniek is vrij eenvoudig, met weinig hands-on werk. Bovendien bieden microarrays kwalitatieve en kwantitatieve vergelijking aan van gen expressie tussen verschillende cellen (Villaseñor-Park & Ortega-Loayza, 2013).

Er zijn echter ook enkele beperkingen. Ongepast geselecteerde controles kunnen niet relevante resultaten opleveren. Bovendien halen Villaseñor-Park en Ortega-Loayza (2013) de kosten aan. Hoewel de kosten tegenwoordig afnemen, zijn ze hoog geweest tot op vandaag.

8.2 Voordelen en nadelen in vergelijking met diamant sensor

Hieronder volgen enkele voordelen van de diamant gebaseerde methode ten opzichte van micro array DNA analyse:

- 1) Men heeft geen fluorescerende labels nodig in de met diamant verrijkte toepassingen.
- 2) Het elektrisch of thermisch uitmeten van de diamanten biosensor is veel goedkoper dan de optische uitlezing die vereist is bij microarray analyses.
- 3) De hybridisatiefase in het ontwikkelingsproces is veel korter bij de diamanten biosensor. Deze fase duurt hier slechts twee uur, in vergelijking met de benodigde 16 uren bij microarray analyses.
- 4) De DNA sensor met diamant laat real time monitoring toe.
- 5) In de met diamant verrijkte biosensor kan er gebruik gemaakt worden van lange DNA fragmenten. Dit kunnen ongeveer 150 basenparen zijn. Dit is in contrast met de 25 tot 40 basenparen bij microarray analyse.

Er zijn echter ook enkele nadelen verbonden met de diamant methode ten opzichte van micro array:

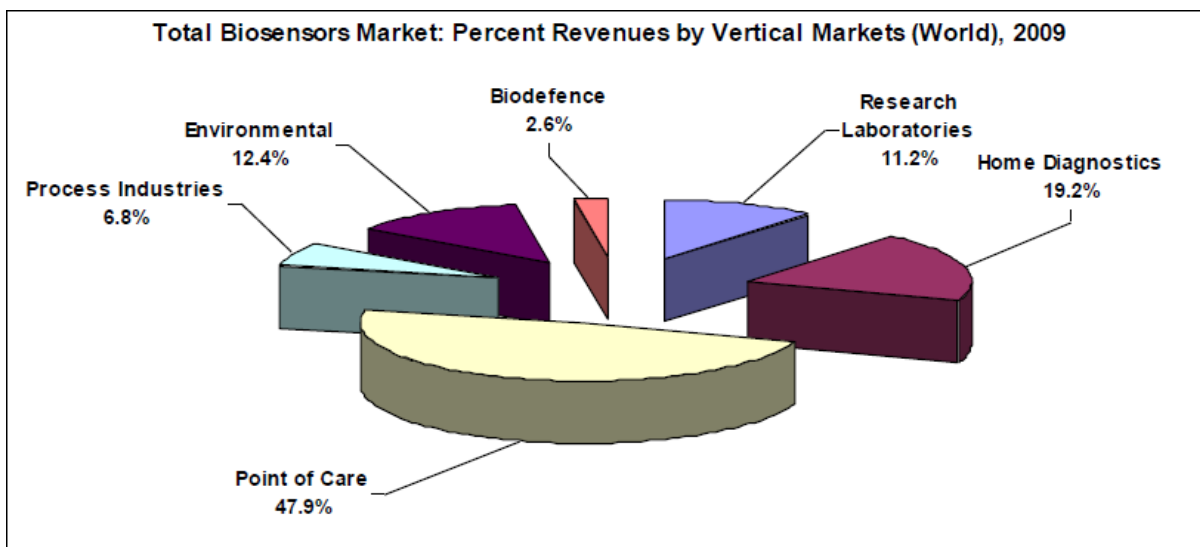
- 1) Er is nog geen array (2x2) mogelijk in de DNA sensor met diamant. Microarrays maken echter gebruik van tien duizenden micrometer spotjes.
- 2) Een microspotter kost 60 000 euro.
- 3) Er is een lopend FWO project dat onderzoekt of het mogelijk is om een array elektrisch en/of thermisch uit te lezen.

HOOFDSTUK 9: MARKT VOOR BIOSENSOREN

9.1 Totale globale biosensor markt

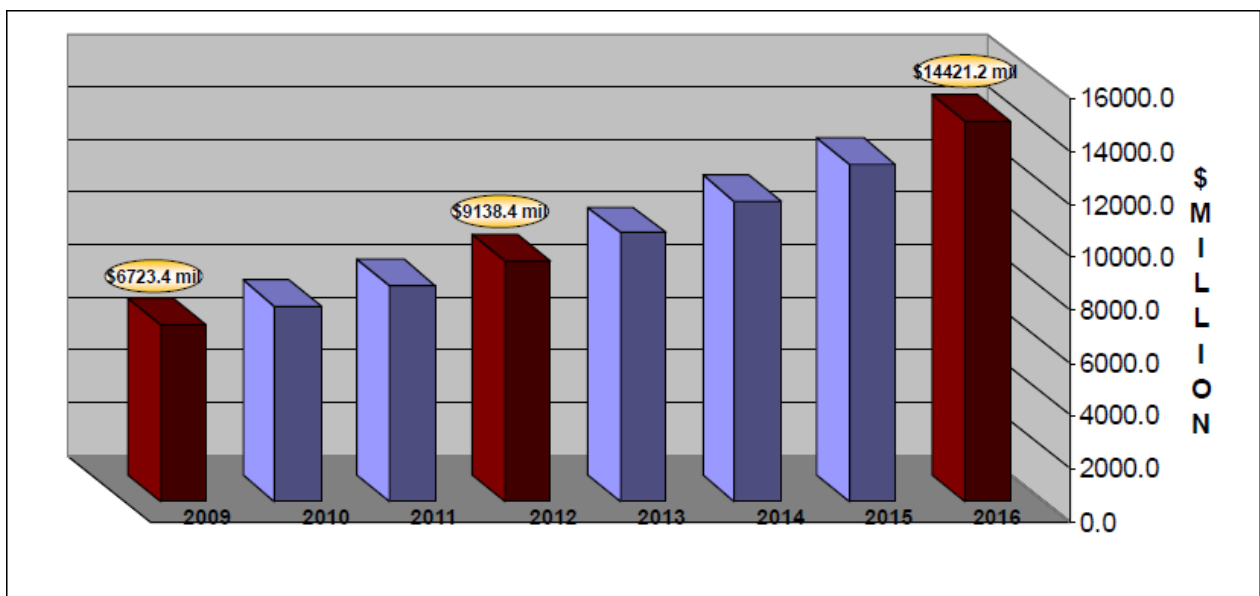
Onderstaande figuur toont de globale markt voor biosensoren in het jaar 2009. De biosensoren zijn onderverdeeld in sectoren. Zo kunnen we volgende sectoren met bijhorende percentages onderscheiden: de procesindustrie vertegenwoordigt 6,8% van de markt, milieu 12,4%, biodefensie 2,6%, onderzoekslaboratoria 11,2%, thuisdiagnostica 19,2% en ten slotte vertegenwoordigt point of care 47,9% van de totale markt.

Figuur 9.1.1: totale markt voor biosensoren wereldwijd in 2009



bron: Frost & Sullivan (2009)

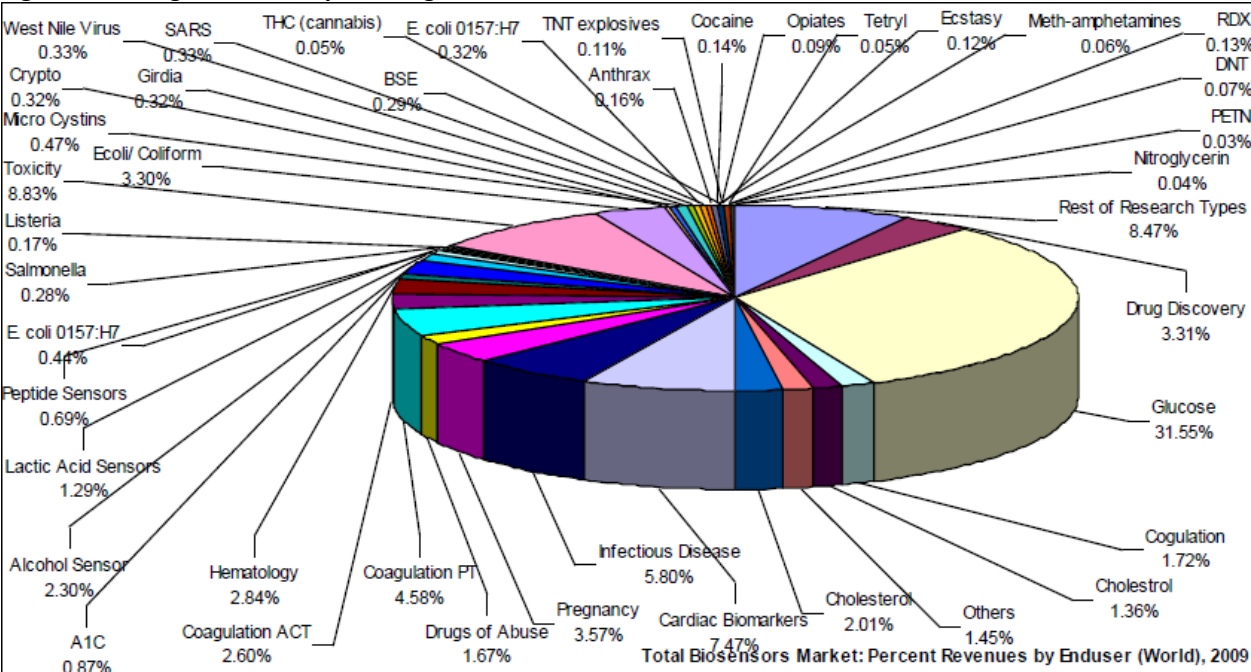
Figuur 9.1.2: grootte markt voor biosensoren in 2009 en verwachtingen tot 2016



bron: Frost & Sullivan (2009)

Frost & Sullivan stellen vast, zoals af te lezen valt uit bovenstaande figuur, dat de totale markt voor biosensoren in het jaar 2009 een bedrag had bereikt van 6.723,4 miljoen dollar. In 2012 werd dit geschat op 9.138,4 miljoen dollar en tegen het jaar 2016 zou dit 14.421,2 miljoen dollar moeten bereiken. In onderstaande figuur zien we de verdeling per segment van de totale markt voor biosensoren. Er is duidelijk te zien dat glucose sensoren het grootste deel van de markt vertegenwoordigen, goed voor zo een 31,5%. Deze leider wordt gevolgd door giftigheid met 8,8%, onderzoek types met 8,47% en cardiovasculaire biomarkers met 7,47%.

Figuur 9.1.3: segmenten met percentage in de markt voor biosensoren



Bron: Frost & Sullivan (2009)

9.2 Markt voor moleculaire diagnostiek

Moleculair diagnostische test zijn een nieuwe golf van technologie die genetische informatie analyseren. In het bijzonder zoeken de testen voor genetische mutaties of niveaus van bepaald genetisch materiaal (dewelke uniek een kanker of virus identificeren, bijvoorbeeld) wat een invloed kan hebben op de waarschijnlijkheid tot het krijgen een ziekte, hulp in de diagnose van een ziekte of infectie, of wat de respons op behandelingen kan verbeteren. De markt voor moleculaire diagnostiek is een breed segment, welke het screenen van bloed, het testen van besmettelijke ziektes, genetische testen en oncologische testen inhoudt. Moleculaire diagnostiek heeft ook de eigenschap om nieuwe benaderingen op therapie te leiden, door het mogelijk te maken voor dokters om hun therapeutische strategie op maat te maken voor elk individu, gebaseerd op genetische informatie. (Universal Biosensors, Future Opportunities, 2013)

De markt voor moleculaire diagnostiek wordt vandaag gewaardeerd op meer dan 5 miljard Amerikaanse dollar wereldwijd en wordt verwacht jaarlijks te groeien met meer dan 15%. Er wordt een continue groei geanticipeerd in dit gebied, te wijten aan:

- Een verouderende populatie en meer kans op een incident of een chronische ziekte;
- Een nood aan eerdere diagnose en snellere behandeling om de gezondheidskosten te reduceren;
- Een verbeterd begrip van menselijke genetische make-up (en hoe onregelmatigheden te identificeren);
- Vooruitgangen in chemie en instrumentatie technologie.

9.3 Markt voor algemene genetische testen

Aangezien de grondslag van het bieden van superieure gezondheidszorg ligt in de diagnose, presenteren genetische testen een zeer attractief segment in de moleculaire diagnostiek markt. Genetisch testen is een gesofisticeerde vorm van medisch testen voor de identificatie van de kleinste verandering in chromosomen, genen of proteïnen die geassocieerd zijn met erfelijke aandoeningen. Het resultaat van zulke testen kan een verdachte genetische conditie bevestigen of zelfs uitsluiten. Het kan de arts helpen met een betere precisie naar het bepalen van de kansen van een persoon op het ontwikkelen of overdragen van een genetische aandoening. Verschillende honderden genetische tests worden actueel gebruikt en er worden er nog meer ontwikkeld. (Report Linker, Global Genetic Testing Market Analysis, 2013)

De wereldwijde markt voor genetische testen ondergaat actueel een sterk groei traject en dit wordt vooral ondersteund door factoren zoals verouderende populatie, toenemend aantal incidenten voor genetische aandoeningen en een stijgend bewustzijn. In 2010 bedroeg deze markt voor genetische testen wereldwijd een geschat cijfer van ongeveer anderhalf miljard dollar, wat verwacht wordt tegen 2015 zo een vier miljard dollar bereikt te hebben. Met name de genetische testen voor kanker zijn wellicht een van de snelst groeiende segmenten, aangezien de privé sector en de wetenschappelijke gemeenschap actief aan het participeren zijn in oncologie specifieke toepassingsgebieden. (Report Linker, Global Genetic Testing Market Analysis, 2012)

9.4 Biochip en biosensor markt

De biochip markt kan gekarakteriseerd worden per type: DNA microarray, proteïne microarray, emerging microarray, labo-op-een-chip. Maar deze kan ook gekarakteriseerd worden per functie: gen expressie, genotypering, micro-RNA, epigenetica, sequentie vangst. Evenals per onderzoek en ontwikkeling van de eindgebruiker: onderzoeks- en ontwikkelingstools, drug ontdekking, en ontwikkeling, diagnostica, opeenvolging. De markt voor biochip gebaseerde diagnostische producten markeert een omvangrijk toekomstig marktsegment voor biochips.

BBC Research heeft de biochip industry reeds onderzocht in 2009. Sinds 2009 hebben er veel industriële allianties en overnames plaatsgevonden, die de competitieve dynamica veranderen. Daarenboven zijn er biochip gebaseerde diagnostica gelanceerd, evenals de volgende generatie opvolgsystemen. Tezelfdertijd hebben vele markt segmenten invloed ondervonden van de vertraging in de genoom-wijde associatie markt. Aangezien de dynamica van de industrie aan het veranderen is en gezien er markt shifts optreden in deze industrie, is het tijd dat de biochip business herbekeken wordt. (Report Linker, Global Biochip Markets: Microarrays and Lab-on-a-Chip, 2011)

Het is belangrijk om op de hoogte te blijven van de belangrijkste biochip platformen. Dit zijn DNA microarrays, proteïne arrays, en labo-op-een-chip. DNA microarrays zijn een gevestigde technologie, die substantiële opbrengsten genereert. Proteïne microarrays krijgen langzaamaan meer prominentie in de markt. Labo-op-een-chip apparaten zijn ook bezig aan een snelle vooruitgang in belangrijke farmaceutische en diagnostische marktsegmenten.

9.5 Marktgroottes

GLOBALE MARKTGROOTTE BIOCHIP MARKT

Wereldwijd bedroeg de grootte van de markt voor biochips 3,5 miljard dollar in 2010. In 2011 bedroeg deze 3,9 miljard dollar. Tegen het jaar 2016 wordt de markt geschat op een grootte van 9,6 miljard dollar. Dit levert een samengesteld jaarlijks groeipercentage van 19,5% op. (Report Linker, Global Biochip Markets: Microarrays and Lab-on-a-Chip, 2011)

GLOBALE MARKTGROOTTE DIAGNOSTIEK MARKT

De globale marktgrootte van diagnostica bedroeg in 2010 zo een 1,05 miljard dollar. In 2011 was dit al gestegen naar 2 miljard dollar. Dit is een enorme jaarlijkse toename. In 2016 zou de diagnostica markt 4,1 miljard dollar moeten bedragen. Het samengesteld jaarlijks groeipercentage is hier dus 28,2%. De markt voor diagnostica is dus ingesteld voor een hoge groei. (Report Linker, Global Biochip Markets: Microarrays and Lab-on-a-Chip, 2011)

GLOBALE MARKTGROOTTE TOOLS MARKET

De tools markt voor biochips zal een vertraagde groei kennen, omwille van de ontwikkeling en verzadiging van sommige markt segmenten, inclusief gen expressie analyse en SNP genotypering. Deze tools markt zal bijgevolg groeien met een samengesteld jaarlijks groeipercentage van 8,4% voor de periode 2011 – 2016. Tegen het einde van deze periode zal de marktgrootte 2,7 miljard dollar bereiken. (Report Linker, Global Biochip Markets: Microarrays and Lab-on-a-Chip, 2011)

HOOFDSTUK 10: KOSTENBEREKENING PER ANALYSE

Als de kosten per sensor of eerder per analyse berekend moeten worden, is het belangrijk dat alle materialen, apparaten en bewerkingen op het sample in rekening worden gebracht. Om niets over het hoofd te zien, werd er samengewerkt met post doctoraat werknemers, professoren en doctoraatstudenten uit zowel het Instituut voor Materiaal Onderzoek (IMO), IMEC, als het BIOMED. Minutieus werd elke stap in het proces van het ontwikkelen van een diamant gebaseerde biosensor nagegaan, evenals de analyse van DNA met deze sensor. Een bespreking van de kosten volgt hieronder. De verschillende stappen in het proces, zes in totaal, zijn hierboven reeds uitvoerig besproken. Elke stap wordt nu minder technisch maar economisch uitgebreider onder de loep genomen.

1. De silicium wafer. Deze is het substraat waarop de diamantgroei zal plaatsvinden. De kostprijs van zulke wafers bedraagt 75 euro per stuk. Uit één wafer van twee inch Si kunnen tien samples gehaald worden. Dit geeft een kost van 7,5 euro per sample.

Tabel 10.1: siliciumwafer prijs per sample

	prijs per wafer	benodigde hoeveelheid wafer per sample	prijs/sensor
siliciumwafer	75	0,1	€ 7,50

bron: prof dr. Patrick Wagner en dr. Stoffel Janssens (IMO, 2013)

2. Het groeien van diamant. Hierbij is nanodiamant poeder één van de benodigheden. Voor 200 ml diamant poeder wordt 1.000 euro betaald. Met deze hoeveelheid kunnen 300 diamantfilms gegroeid worden op substraten van 2 inch Si. De kost per sensor voor dit nanodiamant poeder bedraagt bijgevolg 0,33 euro.

Tabel 10.2: diamantgroei

diamantgroei	sccm	prijs per ml of fles	prijs per sccm	benodigde hoeveelheid per sensor per ml	prijs/sensor
nano diamant poeder		€ 5,00		0,067	€ 0,333
methaangas	10.000.000	€ 1.259,00	€ 0,0001259	2,083	€ 0,0002622917
waterstofgas	10.000.000	€ 180,00	€ 0,0000180	83,333	€ 0,0015

bron: dr. Stoffel Janssens (IMO, 2013)

Ook de gassen zijn belangrijk in deze stap. Er worden twee gassen gebruikt, dit zijn waterstofgas en methaangas. Als eerste is waterstof vereist. Een gasfles met als inhoud tien miljoen kubieke centimeter (10.000.000 sccm) kost 180 euro.

Dit waterstofgas wordt toegevoegd in de reactor met een flow van 500 sccm per minuut. Bovendien duurt een run 30 minuten. Per run kunnen er 180 chips bezet worden. De kostprijs per sensor van het waterstofgas bedraagt bijgevolg 0,0015 euro. Een gasfles van 10.000.000 sccm methaangas kost 1.259 euro per fles. Dit gas wordt toegevoegd met een flow van 5 tot 20 sccm per minuut. Als gemiddelde dus 12,5 sccm per minuut. De kostprijs van methaangas bedraagt dus 0,0003 euro per sensor. Een fles boor houdend gas kost 2.165 euro. Maar aangezien eerder gekozen is voor de thermische uitlezing in plaats van impedimetrische uitlezing, zal dit niet verder uitgerekend worden. Onder deze tweede stap hoort ook de opdamp apparatuur thuis. Het lineair antenne systeem, dat nieuw werd aangekocht door het IMO, werd geschat op 400.000 tot 500.000 euro. Het hot filament systeem, aanwezig op IMEC, werd geschat op een kostprijs van 600.000 tot 650.000 euro. De running kost van deze machines wordt geschat op 200 tot 600 euro per run. Er zal dus voor een gemiddelde van 400 euro gerekend worden voor de running kost. Per chip komt dit neer op een bedrag van 2,22 euro. De running kost wordt in hoofdstuk 11 in rekening gebracht onder de bewerkingskosten, dit zijn variabele kosten en dus afhankelijk van het aantal runs. Voor een meer gedetailleerde bespreking en meer uitgebreide berekening van de kosten van deze eerste twee stappen, wordt verwezen naar BIJLAGE 1.

3. Het waterstofplasma. Dit is echter onderdeel van de reacties in de opdamp apparatuur en zal dus niet apart in kaart worden gebracht.
4. De terminatie van het oppervlak van het sample. Deze is hetzij zuurstof getermineerd, hetzij waterstof getermineerd. Zoals voorheen reeds besproken, maken beide methodes gebruik van vetzuren en een UV behandeling. Gezien waterstof terminatie het meest wordt uitgevoerd en bovendien de laagste kost bevat, zal enkel deze methode verder besproken worden. Voor de kostprijs berekening van beide methodes, wordt er gerefereerd naar BIJLAGE 2. Waterstof terminatie maakt gebruik van vetzuren. Voor een hoeveelheid van 100 ml betaalt men 11,2 euro. Per sensor is vijf microliter vetzuur nodig. Ook een UV lamp van 4W is nodig, dewelke ongeveer 300 uren meegaat. Per sensor heeft men deze 20 uren nodig. De totale kostprijs van deze waterstof terminatie bedraagt 0,72 euro per sample.

Tabel 10.3: waterstof terminatie van het sample

waterstof terminatie van het sample	prijs per uur of ml	benodigde hoeveelheid per sensor per uur of ml	Prijs per sensor
UV lamp 4W (300h)	€ 0,036	20	€ 0,7227
fatty acids	€ 0,112	0,005	€ 0,0006

Bron: Mohammed Sharif Murib (IMO, 2013)

5. De aankoppeling, het wassen, de amplificatie en het denatureren van het sample. Dit is een zeer uitgebreide processtap en bevat heel wat bewerkingen. Ten eerste is er de aankoppeling van het probe DNA. Hierop wordt een EDC behandeling uitgevoerd. De totale kost per sensor van deze aankoppeling bedraagt 0,43 euro.

Vervolgens wordt het sample afgewassen met PBS en SSC. Deze was kost per sample bedraagt 0,04 euro. De extractie van het patiënten DNA uit het bloed heeft een totale kostprijs van 4,21 euro per sensor. Voor een meer gedetailleerde kostenverdeling van deze extractie wordt er doorverwezen naar BIJLAGE 3.

De PCR op het patiënten DNA bedraagt 19,03 euro per sample. Hierna volgt de lineaire amplificatie. De kost hiervan per sensor is 81,15 euro per sensor. De kost van de was vloeistoffen, zoals natrium chloride en SSC, na de buffer denaturatie bedraagt 0,14slkg3 euro. De totale kostprijs van de biochemische behandelingen in stap vijf is bijgevolg 119,33 euro. Voor de volledige uitwerking van de kosten is er een doorverwijzing naar BIJLAGE 3.

Tabel 10.4: bewerkingskosten per sample

	Prijs per ml, per g of per nmol	benodigde hoeveelheid per sensor per ml, per g of per nmol	Prijs per sensor
aankoppeling	€ 25,22360	1,001	€ 0,42800
wasvloeistoffen	€ 0,00370	10	€ 0,03909
extractie	€ 1.980,18020	69,102	€ 4,20833
PCR			€ 19,03118
amplificatie			€ 81,15420
zuiveren PCR			€ 14,46910
wasvloeistoffen	€ 0,05554	0,0131775	€ 0,00028
TOTAAL			€ 119,33017

bron: dr. Veronique Vermeeren (BIOMED, 2013)

6. Het uitlezen van het sample. Dit omvat dus de sensorcel zelf. Er zijn, zoals eerder besproken, twee methodes voor het uitlezen van de sensor. De read-out kan impedimetrisch zijn of thermisch. Gezien de thermische uitlezing heel wat eenvoudiger is, wordt er geopteerd voor deze methode. Thermische uitlees apparatuur heeft een kost van ongeveer 2.500 euro. Deze apparatuur kan echter sensor na sensor gebruikt worden. Dit is dus geen kost per sensor, maar zal als installatiekost behandeld worden in volgend hoofdstuk.

Indien nu de kostprijs per sensor in alle voorgaande stappen vergeleken wordt, dient er opgemerkt te worden dat de grootste gevoeligheid in de totale kostprijs in stap vijf ligt. In het bijzonder bij de PCR en de lineaire amplificatie. De totale kost van deze twee bewerkingen alleen bedraagt 100,18 euro. Met deze hoge bewerkingskosten dient ook in het volgende hoofdstuk rekening gehouden te worden. De gevoeligheid in de verschillende scenario's omtrent de investeringsanalyse zal bijgevolg voornamelijk bij de bewerkingskosten van de sensor liggen.

Wanneer de totale kostprijs van twee andere DNA analyse methodes bestudeerd wordt, namelijk de DGGE en micro array analyse, is er een groot verschil op te merken tussen deze twee. De vraagprijs voor een DNA analyse met de DGGE bedraagt 220 euro. Voor een microarray komt dit neer op 1.994 euro. Dit is een verschil in kostprijs van 1.774 euro. Wanneer het aanzienlijke verschil tussen de twee methodes in beschouwing genomen wordt, mag er echter niet vergeten worden dat een microarray een hele array aan spots kan bevatten. Terwijl een DGGE analyse en ook de diamant analyse slechts uit enkele spots bestaan. Voor de DGGE methode en de met diamant verrijkte DNA analyse moet er dus een meer uitgebreide amplificatie plaatsvinden. Er wordt onderzocht op het IMO of het mogelijk is om de diamant sensor ook de voorzien van een hele array met spots (communicatie prof dr. Patrick Wagner, maart 2013). Een tweede oorzaak van de duurdere kost van de microarray analyse is het gebruik van fluorescerende middelen. Microarray analyse maakt gebruik van fluorescentie in het analyseren van het DNA. Dit drijft de kostprijs aanzienlijk de hoogte in (communicatie dr. Veronique Vermeeren, april 2013). DGGE en diamant DNA analyse maken geen gebruik van deze fluorophoren.

Tabel 10.5: totaalprijs per microarray analyse

Microarray	prijs
chip	€ 770
hybridisatiekit	€ 455
DNA isolatie uit bloed	€ 4
PCR	€ 150
amplificatie	€ 600
spoeling	€ 15
TOTAAL	€ 1.994

bron: dr. Veronique Vermeeren (BIOMED, 2013)

HOOFDSTUK 11: INVESTERINGSANALYSE

11.1 Aanloop naar de investeringsanalyse

Om de economische rendabiliteit van de investering in de biosensor met diamant voor DNA analyse te bepalen, zal gebruik gemaakt worden van de netto contante waarde. De netto contante waarde wordt berekend voor het hele investeringsproject. Deze evaluatiemaatstaf vergelijkt alle toekomstige kasstromen die het project omtrent de biosensor zal genereren met de oorspronkelijke investeringsuitgave. De beslissingsregel die met de netto contante waarde gepaard gaat, houdt in dat het investeringsproject slechts economisch verantwoord kan worden uitgevoerd indien de bekomen netto contante waarde groter is dan nul. Om de netto contante waarde te berekenen, zal gebruik worden gemaakt van de volgende formule:

Figuur 11.1.1: formule voor de netto contante waarde

$$NCW_r = \sum_{t=1}^n [(1-b) * (O_t - Q_t) + b * \widehat{A}_t] * A_{t-r} - I_0$$

bron: Mercken (2010)

Om de netto contante waarde van het project te bepalen, zal dus stap voor stap de formule gevolgd moeten worden. Allereerst geeft de formule aan dat de jaarlijkse netto kasstromen moeten worden berekend. Dit kan door de opbrengsten in jaar t te verminderen met de kosten in jaar t: $(O_t - Q_t)$. Er dient echter ook rekening te worden gehouden met de impact van positieve netto cash flows op de winstbelasting. Deze winstbelasting dient jaarlijks betaald te worden door het bedrijf of de instelling aan de overheid. Wanneer de netto kasstromen die in een bepaald jaar t door het project gerealiseerd worden, groter zijn dan nul, duidt dit op een toename van de inkomsten van het bedrijf ten opzichte van de uitgaven. Ook de vennootschapsbelasting die moet worden betaald, zal bijgevolg toenemen. Deze bijkomende belastingsuitgave wordt verrekend door de jaarlijkse netto kasstromen te vermenigvuldigen met $(1-b)$. Eventuele negatieve netto kasstromen zorgen daarentegen voor een daling van de bedrijfswinst. Dit is dus een verminderde belastingsuitgave en kan eveneens in rekening worden gebracht aan de hand van de factor $(1-b)$. In deze investeringsanalyse zal het Belgische tarief van de vennootschapsbelasting worden gebruikt. Dit bedraagt 33,99% en dit wordt voorgesteld door b in de formule.

De afschrijvingen van de onderneming zijn geen uitgaven en kunnen dus geen kasstromen veroorzaken. Toch zullen deze afschrijvingen een effect uitoefenen op de netto contante waarde die het investeringsproject kan behalen. Afschrijvingen zijn immers boekhoudkundige kosten die leiden tot minder winst van de onderneming en dus ook tot een verminderde vennootschapsbelasting die moet worden betaald op de winst en minder uitgaande kasstromen (Mercken, 2010). Dit principe heeft een positieve invloed op de netto contante waarde van het project en wordt het 'belastingschild van de afschrijvingen' genoemd. De grootte van dit belastingschild wordt bepaald door de term $(b^*(\hat{A}_t))$. Dit belastingschild hangt dus ook af van de gekozen methode waarmee het afschrijvingsbedrag jaarlijks wordt vastgelegd. Voor dit investeringsproject zal de lineaire methode gehanteerd worden. De lineaire methode houdt in dat de onderneming jaarlijks een constant percentage van de aanschafwaarde van het activum afschrijft gedurende het verloop van de economische levensduur (Mercken, 2010). Jaarlijks zal bijgevolg 10% van de aanschafwaarde van de installaties afgeschreven worden.

Om de juiste conclusies aangaande de economische rendabiliteit van de nieuwe DNA sensor te kunnen trekken, moeten de verschillende kasstromen die het project doorheen de jaren genereert op een correcte manier met elkaar vergeleken kunnen worden. Omdat een euro vandaag meer waard is dan een euro die op een toekomstig tijdstip zal worden ontvangen, zullen de kasstromen moeten worden verdisconteerd met de factor A_{t-r} . Deze factor geeft weer hoeveel één te ontvangen euro in jaar t op dit moment waard is. In deze berekening gaat men uit van de verdisconteringsfactor. Door deze verdiscontering zullen de netto kasstromen doorheen de verschillende jaren op een tijdsequivalente basis kunnen worden beschouwd. De gehanteerde discontovoet in de investeringsanalyse bedraagt 15%.

Een voorlaatste stap in de formule, is het sommeren van de jaarlijkse, verdisconteerde netto kasstromen. Dit wordt weergegeven in de formule met het symbool $\sum_{t=1}^n$. Met deze sommatie dient enkel nog het initiële aanschafbedrag I_0 in mindering te worden gebracht. Dit is de finale stap in het uitrekenen van de netto contante waarde van het investeringsproject.

11.2 Investeringsanalyse diamant biosensor

11.2.1 Jaarlijkse kasstromen

De eerste stap om de netto contante waarde van het investeringsproject te kunnen berekenen, is het bepalen van de jaarlijkse netto kasstromen die zich gedurende de beschouwde duurtijd van 10 jaar zullen voordoen. De uitgaande kasstromen komen eerst aan bod. Deze kasstromen bestaan uit installatiekosten, onderhoudskosten, materiaalkosten en bewerkingskosten. De installatiekosten zijn een eenmalige investeringsuitgave. De onderhoudskosten zijn jaarlijkse uitgaande kasstromen, maar blijven constant over de jaren heen.

Het aanschafbedrag van de installaties wordt weergegeven in onderstaande tabel 11.2.1. Er kan afgelezen worden dat de totale aanschafwaarde van de benodigde apparatuur dus € 634.730 bedraagt. Meer gedetailleerde informatie is te vinden in bijlage 4. Volgens de wetenschappers in het IMO en IMEC hebben deze apparaten allen een vrij lange levensduur. Om de economische relevantie te kunnen behouden, wordt de assumptie gemaakt van een levensduur van tien jaar.

Tabel 11.2.1: installatiekosten

Apparatuur	Aanschafbedrag
HFCVD systeem	€ 625.000
glove box	€ 7.000
UV toestel	€ 230
thermische apparatuur	€ 2.500
TOTALE INSTALLATIEKOSTEN	€ 634.730

data bron: dr. Stoffel Janssens, Mohammed Sharif Murib (IMO, 2013)

De onderhoudskosten zijn vaste kosten. Deze worden verondersteld elk jaar 5% te bedragen van de aanschafkosten van de apparatuur (communicatie prof dr. Ward De Ceuninck, mei 2013). Jaarlijks zal deze onderhoudskost dus € 31.736,50 (= € 634.730 * 0,05) bedragen.

De materiaalkosten zijn variabele kosten. Deze bevatten de kosten voor de siliciumwafers, de UV lampen, het waterstofgas, het methaangas, het diamant poeder, en de vetzuren. Deze kosten zijn echter variabel per jaar. De materiaalkosten zijn namelijk afhankelijk van het aantal chips dat jaarlijks geproduceerd wordt. De omvang van deze materiaalkosten zullen dus apart besproken worden in de verschillende scenario's die verder in dit hoofdstuk volgen. De bewerkingskosten zijn eveneens variabele jaarlijkse kosten. Deze bewerkingskosten omvatten de extractie van het patiënten DNA, de aankoppeling van het DNA, de wasvloeistoffen, de PCR behandeling, en de amplificatie. Ook deze kosten zullen verder in dit hoofdstuk per scenario nader bekeken worden.

11.2.2 Jaarlijkse afschrijvingsbedragen

Allereerst dient de afschrijvingstermijn te worden bepaald van de installaties waarover eerder sprake was. Volgens de wetenschappers in het IMO en IMEC is de levensduur van deze apparatuur vrij groot, soms zelfs tot 40 jaar. Om toch voldoende economische en financiële relevantie te behouden, zal er echter gekozen worden voor een meer gangbare afschrijvingstermijn. Bovendien zorgt een kortere afschrijvingstermijn er ook voor dat het belastingschild van de afschrijvingen groter wordt. Hierdoor neemt de netto contante waarde toe. Hoe sneller er afgeschreven kan worden, hoe beter (Mercken, 2010). Een afschrijvingsperiode van 10 jaar wordt bijgevolg gekozen. Dit wil echter niet zeggen dat de onderneming na tien jaar geen gebruik meer zal maken van de apparatuur. De lineaire methode zal toegepast worden om het jaarlijkse afschrijvingsbedrag te bepalen. Zoals eerder vermeld, houdt de lineaire methode in dat de onderneming jaarlijks een constant percentage van de aanschafwaarde van het activum afschrijft gedurende het verloop van de economische levensduur (Mercken, 2010).

Het afschrijvingsbedrag zal jaarlijks 10% van de aanschafkosten bedragen. Dit is een bedrag van € 63.473 per jaar, af te lezen uit tabel 11.2.2.1.

Tabel 11.2.2.1: afschrijvingen per jaar

Apparatuur	Aanschafbedrag	Afschrijving per jaar
HFCVD systeem	€ 625.000	€ 62.500
glove box	€ 7.000	€ 700
UV toestel	€ 230	€ 23
thermische apparatuur	€ 2.500	€ 250
TOTALE KOST	€ 634.730	€ 63.473

Deze afschrijvingen dienen echter nog verminderd te worden met de belastingen. Zoals vermeld in paragraaf 11.1 wordt dit het belastingschild van de afschrijvingen genoemd. Dit wordt berekend door de jaarlijkse afschrijving te vermenigvuldigen met b. Dit is het Belgische belastingspercentage en bedraagt 33,99%. Het belastingschild van de afschrijvingen zal dus jaarlijks € 21.574,47 (= 0,3399 * €63.473) bedragen. Dit belastingschild wordt in verder alle scenario's toegepast in de berekeningen van de netto contante waarde.

11.2.3 Verdisconteringsfactor en vennootschapsbelasting

De NCW zal worden bepaald aan de hand van de formule die voorgesteld werd in figuur 11.1.1. De jaarlijkse netto kasstromen en de afschrijvingsbedragen zijn respectievelijk gedeeltelijk en volledig in kaart gebracht. Er zal eveneens rekening moeten worden gehouden met het effect dat de vennootschapsbelasting uitoefent op deze netto kasstromen. De kasstromen zullen bijgevolg verdisconteerd dienen te worden aan de hand van de discontovoet. Deze bedraagt 15%. De verdisconteringsfactor wordt voor elk jaar t berekend aan de hand van volgende formule:

Figuur 11.2.3.1: verdisconteringsfactor

$A_{t-r} = \frac{1}{(1+r)^n}$	alternatieve notatie:	$A_{t-r} = (1+r)^{-n}$
-------------------------------	-----------------------	------------------------

bron: Mercken (2010)

In deze investeringsanalyse zal de Belgische vennootschapsbelastingvoet worden gehanteerd om de netto kasstromen na belastingen, voorgesteld door $(1 - b) * (O_t - Q_t)$, te bepalen. Het Belgische belastingstarief is meerbepaald gelijk aan 33,99%.

De netto contante waarde die wordt bekomen kan ofwel positief zijn, ofwel negatief. Indien de NCW positief is, zal de investering zichzelf als het ware terugverdienen. Indien deze echter negatief is, dan wil dit zeggen dat de toekomstige kasstromen, de uitgaven van de initiële investering niet kunnen dekken. Het zal dan niet interessant zijn om de investeringsuitgaven te maken.

11.3 Scenario's in vergelijking met DGGE methode

Hieronder volgen enkele scenario's waarin de met diamant verrijkte DNA sensor vergeleken zal worden met de huidige DGGE methode. Er zullen drie scenario's uitgewerkt worden. Een eerste scenario zal zich richten op 1% van de markt. Een tweede scenario zal 0,1% van de markt beogen. Het derde en laatste scenario zal een break-even situatie nagaan. Dit is een situatie waarin de NCW nul bedraagt. Er wordt dus noch winst, noch verlies gemaakt.

11.3.1 Scenario 1: 1% van de markt

In het eerste scenario wordt er verondersteld dat er met de diamant verrijkte DNA sensor 1% van de markt kan worden bereikt. De doelmarkt is de eerder vernoemde tools markt voor biochips. Deze wordt verwacht een grootte van 2,7 miljard Amerikaanse dollar te bereiken. In euro's uitgedrukt, is dit 2,09 miljard euro (wisselkoers via De Tijd). Indien we 1% van de markt beogen, zou dit een jaarlijkse omzet opleveren van 20,9 miljoen euro. Dit is dus een uiterst positief scenario. Voor één DGGE analyse wordt 220 euro aangerekend. Indien we de omzet van 20,9 miljoen euro delen door de prijs van 220 euro, bekomen we de afzet. Dit scenario zou dus 95.000 (20,9 miljoen / 220) analyses per jaar opleveren. Er moet echter niet alleen met het aantal chips rekening gehouden worden, maar ook met het aantal machine runs per jaar. Eén run kan maximaal 180 chips opleveren. Er kan geopteerd worden om minder dan 180 chips per run te laten begroeien met diamant, maar dit levert geen maximale opbrengst van de machine. Bijgevolg zal er dus gewerkt worden met gehele aantallen van machine runs. Om 95.000 chips te produceren zullen er exact 527,78 runs (95.000 / 180) nodig zijn. Dit wordt afgerond op 528 runs. Dit heeft 95.040 biochips als resultaat. Met dit cijfer kunnen we bijgevolg de investeringsanalyse vervolledigen.

Uitgaande kasstromen

In paragraaf 11.2.1 werden de kasstromen besproken. Deze kasstromen omvatten installatiekosten, onderhoudskosten, materiaalkosten en bewerkingskosten. Deze laatste twee konden echter nog niet uitgewerkt worden, gezien hiervoor de afzet vereist was. Hierboven is er een afzet bekomen van 95.040 analyses per jaar. De materiaalkosten bestaan uit siliciumwafers, diamantpoeder, waterstofgas, methaangas, UV lampen en vetzuren. In onderstaande tabel 11.3.1.1 zijn de totale materiaalkosten weergegeven voor 95.040 analyses. Voor een meer gedetailleerde uitwerking van de materiaalkosten, wordt er verwezen naar bijlage 5.

Tabel 11.3.1.1: materiaalkosten

Materiaal	Kost per jaar
Siliciumwafer	€ 712.800
Diamantpoeder	€ 31.680
Waterstofgas	€ 4.730
Methaangas	€ 827
UV lamp	€ 316,53
Vetzuren	€ 53,22
TOTAAL	€ 750.407,31

Data bron: dr. Stoffel Janssens en Mohammed Sharif Murib (IMO, 2013)

De bewerkingskosten omvatten de extractie van het patiënten DNA, de aankoppeling, een eerste reeks was vloeistoffen, de PCR behandeling, de amplificatie, en een tweede reeks was vloeistoffen. In onderstaande tabel kunnen de totale bewerkingskosten voor een afzet van 95.040 chips afgelezen worden. Zie ook bijlage 5.

Figuur 11.3.1.2: bewerkingskosten

Bewerking	Kost per jaar
aankoppeling	€ 38.016,00
wasvloeistoffen	€ 3.801,60
extractie patiënten DNA	€ 399.168,00
PCR	€ 1.805.760,00
amplificatie	€ 7.712.496,00
wasvloeistoffen	€ 1.378.080,00
werkingskost per run	€ 211.200,00
TOTAAL	€ 11.548.521,60

Data bron: dr. Veronique Vermeeren (BIOMED, 2013)

Inkomende kasstromen

Gezien de met diamant verrijkte DNA sensor zich nog slechts in het stadium van onderzoek en ontwikkeling bevindt, is het niet mogelijk om al inkomsten in kaart te brengen. De sensor is namelijk nog niet op de markt gebracht, en kan dus nog geen opbrengsten genereren. De opbrengsten zullen bijgevolg in kaart gebracht worden als de vermeden kosten (communicatie prof dr. Steven Van Passel, april 2013). De vermeden kosten zijn de kosten die anders uitgegeven moesten worden aan een DGGE analyse. De inkomende kasstromen kunnen aldus berekend worden aan de hand van de eerder berekende afzet en de prijs per analyse van de DGGE methode. Indien de prijs vermenigvuldigd wordt met de afzet, wordt de omzet bekomen.

Dit is het totale bedrag aan verkopen in een jaar. Dit levert ruwweg 20,91 miljoen euro (= 95.040 analyses * € 220 per analyse) op. Dit is in overeenstemming met bedrag dat bekomen werd bij de berekening van het percentage van 1% van de markt. De totale inkomende kasstromen per jaar, of dus de vermeden kosten per jaar, komen op een totaal bedrag van 20,9088 miljoen euro.

Netto jaarlijkse kasstromen

Aan de hand van de jaarlijkse inkomende en uitgaande kasstromen kunnen nu de netto jaarlijkse kasstromen berekend worden. Dit wordt berekend door de jaarlijkse opbrengsten te verminderen met de jaarlijkse kosten. De inkomende kasstroom bedroeg jaarlijks, zoals hierboven beschreven, 20,9088 miljoen euro. In onderstaande tabel 11.3.1.3 kunnen de totale uitgaande kasstromen afgelezen worden.

Tabel 11.3.1.3: Totale uitgaande kasstromen

uitgaande kasstromen	kost per jaar
onderhoud	€ 31.736,50
materiaal	€ 750.407,31
bewerking	€ 11.548.521,60
TOTAAL	€ 12.330.665,41

De netto jaarlijkse kasstromen ($O_t - Q_t$) bedragen: € 20.908.800 – € 12.330.665,41 = € 8.578.134,59
 Zoals besproken onder paragraaf 11.1 dienen de jaarlijkse netto kasstromen verminderd te worden met de belastingsuitgave. Dit gebeurt aan de hand van de factor $(1 - b)$. Eveneens besproken in paragraaf 11.1, is b gelijk aan 33,99%. Dit is de Belgische vennootschapsbelasting. De netto kasstroom na belastingen $(1 - b) * (O_t - Q_t)$ bedraagt: $(1 - 0,3399) * € 8.789.334,59 = € 5.662.426,64$

Netto Contante Waarde

De inkomende kasstromen, de uitgaande kasstromen, de netto jaarlijkse kasstromen na belastingen en het belastingschild van afschrijvingen werden reeds in de voorgaande paragrafen toegelicht en berekend. Bovendien kwamen de vennootschapsbelasting, de discontovoet en de verdisconteringsfactor ook reeds aan bod. Alle vereiste gegevens zijn dus beschikbaar om over te gaan tot de werkelijke investeringsanalyse, het berekenen van de netto contante waarde.

Tabel 11.3.1.4: verdisconteerde netto kasstromen na belastingen

Jaar	netto kasstroom na belastingen	belastingenschild van afschrijvingen	verdisconteringsfactor	Verdisconteerde netto kasstroom na belastingen
1	€ 5.662.426,64	€ 21.574,47	86,96%	€ 4.942.609,66
2	€ 5.662.426,64	€ 21.574,47	75,61%	€ 4.297.921,45
3	€ 5.662.426,64	€ 21.574,47	65,75%	€ 3.737.323,00
4	€ 5.662.426,64	€ 21.574,47	57,18%	€ 3.249.846,08
5	€ 5.662.426,64	€ 21.574,47	49,72%	€ 2.825.953,12
6	€ 5.662.426,64	€ 21.574,47	43,23%	€ 2.457.350,54
7	€ 5.662.426,64	€ 21.574,47	37,59%	€ 2.136.826,55
8	€ 5.662.426,64	€ 21.574,47	32,69%	€ 1.858.110,05
9	€ 5.662.426,64	€ 21.574,47	28,43%	€ 1.615.747,87
10	€ 5.662.426,64	€ 21.574,47	24,72%	€ 1.404.998,14
Σ				€ 28.526.686,46

Uit bovenstaande tabel 11.3.1.4 kunnen de verdisconteerde kasstromen voor de tien jaren afgelezen worden. Om echter de netto contante waarde van het project te kunnen berekenen, moeten deze jaarlijkse verdisconteerde netto kasstromen na belastingen gesommeerd worden en nadien verminderd worden met de initiële investeringskost. In bovenstaande tabel 11.3.1.4 is de sommatie reeds weergegeven. Deze bedraagt € 28.526.686,46. Dit bedrag moet verminderd worden met de investeringsuitgave in jaar 0. Deze bestond uit de installaties, eerder besproken in paragraaf 11.2.1. De installatiekosten bedroegen € 634.730 in totaal. Indien nu de gesommeerde kasstromen verminderd worden met deze initiële investeringsuitgave, wordt er uiteindelijk een netto contante waarde van € 27.882.956,46 (= € 28.526.686,46 – € 634.730) bekomen. Voor een meer gedetailleerde en uitgewerkte berekening van de investeringsanalyse en de netto contante waarde in dit scenario, wordt er verwezen naar bijlage 6.

De netto contante waarde geeft een zeer positief resultaat aan en wijst op een rendabel investeringsproject. Het is bijgevolg economisch verantwoord om de investeringen in de met diamant verrijkte DNA sensor te maken. De netto contante waarde ligt zelfs zeer hoog. Dit scenario zal dan ook beschouwd worden als een erg gunstig scenario.

Indien er 528 runs op jaarbasis uitgevoerd worden, komt dit overeen met een draaitijd van 264 uren per jaar. Als er wordt verondersteld dat de machine 2 uur, dus 4 runs, per werkdag kan draaien, betekent dit dat er 132 dagen per jaar zijn waarop de machine zal draaien.

Alternatieve methode NCW

De netto contante waarde kan ook op een alternatieve manier berekend worden. Hierbij worden de netto jaarlijkse kasstromen verminderd met het jaarlijkse afschrijvingsbedrag. De winst voor belastingen is dan bekomen. Op dit bedrag wordt het belastingspercentage berekend. De winst voor belastingen dient vervolgens verminderd te worden met de belastingen. Hierbij moet echter het afschrijvingsbedrag terug opgeteld worden. Zoals vermeld in sectie 11.2.2 zijn afschrijvingen namelijk noch kosten, noch opbrengsten. Eerder werd het afschrijvingsbedrag in mindering gebracht, dus het wordt nu terug opgeteld. De verklaring voor deze tweestapsprocedure ligt in het feit dat de afschrijvingen in mindering dienen te worden gebracht opdat het belastingspercentage op het juiste bedrag berekend kan worden. De belastingen dienen enkel betaald te worden op de netto jaarlijkse kasstromen, uitgezonderd de afschrijvingen. Door eerst de jaarlijkse afschrijvingen af te trekken en uiteindelijk weer op te tellen, gebeurt deze winstbelasting op een correcte wijze.

Indien bovenstaande procedure juist is uitgevoerd, wordt de winst na belastingen bekomen. Deze moet jaarlijks verdisconteerd worden. Dit gebeurt op simultane wijze als in de vorige methode. De winst na belastingen wordt dus vermenigvuldigd met de verdisconteringsfactor. Deze wordt weergegeven in figuur 11.3.2.1 In onderstaande tabel wordt de alternatieve methode ter illustratie weergegeven voor de eerste drie jaren van het investeringsproject. De volgende jaren verlopen simultaan, maar zijn terug te vinden in bijlage 6.

Figuur 11.3.1.5: verdisconteerde netto kasstromen voor jaar 1, 2 en 3

	Jaar 1	Jaar 2	Jaar 3
onderhoudskosten	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737
materiaalkosten	€ 750.407,31	€ 750.407,31	€ 750.407,31
bewerkingskosten	€ 11.548.521,60	€ 11.548.521,60	€ 11.548.521,60
totale uitgaande kasstroom	€ 12.330.665,41	€ 12.330.665,41	€ 12.330.665,41
vermeden kosten	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00
totale inkomende kasstroom	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00
Netto jaarlijkse kasstroom	€ 8.578.134,59	€ 8.578.134,59	€ 8.578.134,59
afschrijvingen installaties	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00
winst voor belastingen	€ 8.514.662	€ 8.514.662	€ 8.514.662
belastingen	€ 2.894.133	€ 2.894.133	€ 2.894.133
winst na belastingen	€ 5.684.001	€ 5.684.001	€ 5.684.001
afschrijvingen installaties	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00
verdisconteerde jaarlijkse netto kasstromen	€ 4.942.609,66	€ 4.297.921,45	€ 3.737.323,00

Figuur 11.3.1.6: jaarlijkse verdisconteerde netto kasstromen

Jaar	verdisconteerde netto kasstroom
1	€ 4.942.609,66
2	€ 4.297.921,45
3	€ 3.737.323,00
4	€ 3.249.846,08
5	€ 2.825.953,12
6	€ 2.457.350,54
7	€ 2.136.826,55
8	€ 1.858.110,05
9	€ 1.615.747,87
10	€ 1.404.998,14
Σ	€ 28.526.686,46

In bovenstaande figuur wordt de sommatie van de totale verdisconteerde jaarlijkse netto kasstromen weergegeven. Deze som bedraagt € 28.526.686,46. Er kan opgemerkt worden dat dit hetzelfde bedrag was als datgene dat werd berekend in de vorige methode. De conclusie is dat beide methodes ook dezelfde netto contante waarde zullen opleveren. De methodes zijn bijgevolg gelijkwaardig. In de volgende scenario's zal steeds de eerste methode gebruikt worden. De tweede methode is in elk scenario wel uitgewerkt en gebruikt als toetsing van het resultaat.

11.3.2 Scenario 2: 0,1% van de markt

In het tweede scenario wordt er verondersteld dat er met de diamant verrijkte DNA sensor 0,1% van de markt kan worden bereikt. De doelmarkt is ook in dit scenario de eerder vernoemde tools markt voor biochips. Deze wordt verwacht een grootte van 2,7 miljard Amerikaanse dollar te bereiken. In euro's uitgedrukt, is dit 2,09 miljard euro (wisselkoers via De Tijd). Indien we dus 0,1% van de markt beogen, zou dit een omzet opleveren van 2,09 miljoen euro. Voor één DGGE analyse wordt 220 euro aangerekend. Indien we de omzet van 2,09euro delen door de prijs van 220 euro, bekomen we de afzet. Dit scenario zou dus 9.500 (2,09 miljoen / 220) analyses per jaar opleveren. Met dit cijfer kunnen we bijgevolg de investeringsanalyse vervolledigen. Elke run levert 180 chips op. Voor een jaarlijkse afzet van 9.500 chips, zullen er dus 52,78 runs moeten plaatsvinden. Dit wordt afgerond op 53 runs, waarbij er 9.540 chips worden geproduceerd.

Uitgaande kasstromen

In paragraaf 11.2.1 werden de kasstromen besproken. Deze kasstromen omvatten installatiekosten, onderhoudskosten, materiaalkosten en bewerkingskosten. Deze laatste twee konden echter nog niet uitgewerkt worden, gezien hiervoor de afzet vereist was. Hierboven is er een afzet bekomen van 9.540 analyses per jaar. De materiaalkosten bestaan uit siliciumwafers, diamantpoeder, waterstofgas, methaangas, UV lampen en vetzuren. In onderstaande tabel 11.3.2.1 zijn de totale materiaalkosten weergegeven voor 9.540 analyses. Voor een meer gedetailleerde uitwerking van de materiaalkosten, wordt er verwezen naar bijlage 7.

Tabel 11.3.2.1: materiaalkosten

Materiaal	Kost per jaar
Siliciumwafer	€ 71.550
Diamantpoeder	€ 3.180
Waterstofgas	€ 4.730
Methaangas	€ 827
UV lamp	€ 316,53
Vetzuren	€ 5,34
TOTAAL	€ 80.609,43

Data bron: dr. Stoffel Janssens en Mohammed Sharif Murib (IMO, 2013)

De bewerkingskosten omvatten de extractie van het patiënten DNA, de aankoppeling, een eerste reeks wasvloeistoffen, de PCR behandeling, de amplificatie, en een tweede reeks wasvloeistoffen. In onderstaande tabel 11.3.2.2 kunnen de totale bewerkingskosten voor een afzet van 9.540 chips afgelezen worden. Een meer gedetailleerde bespreking van de bewerkingskosten, kan teruggevonden worden in bijlage 7.

Figuur 11.3.2.2: bewerkingskosten

Bewerking	Kost per jaar
aankoppeling	€ 3.816,00
wasvloeistoffen	€ 381,60
extractie patiënten DNA	€ 40.068,00
PCR	€ 181.260,00
amplificatie	€ 774.171,00
wasvloeistoffen	€ 138.330,00
werkingskost per run	€ 21.200,00
TOTAAL	€ 1.138.026,60

Data bron: dr. Veronique Vermeeren (BIOMED, 2013)

Inkomende kasstromen

Gezien de met diamant verrijkte DNA sensor zich nog slechts in het stadium van onderzoek en ontwikkeling bevindt, is het niet mogelijk om al inkomsten in kaart te brengen. De sensor is namelijk nog niet op de markt gebracht, en kan dus nog geen opbrengsten genereren. De opbrengsten zullen bijgevolg in kaart gebracht worden als de vermeden kosten (communicatie prof dr. Steven Van Passel, april 2013). De vermeden kosten zijn de kosten die anders uitgegeven moesten worden aan een DGGE analyse. De inkomende kasstromen kunnen aldus berekend worden aan de hand van de eerder berekende afzet en de prijs per analyse van de DGGE methode. Indien de prijs vermenigvuldigd wordt met de afzet, wordt de omzet bekomen. Dit is het totale bedrag aan verkopen in een jaar. Dit levert ruwweg 2,0988 miljoen euro (= 9.540 analyses * € 220 per analyse) op. Dit is in overeenstemming met bedrag dat bekomen werd bij de berekening van het percentage van 1% van de markt. De totale inkomende kasstromen per jaar, of dus de vermeden kosten per jaar, komen op een totaal bedrag van 2,0988 miljoen euro.

Netto jaarlijkse kasstromen

Aan de hand van de jaarlijkse inkomende en uitgaande kasstromen kunnen nu de netto jaarlijkse kasstromen berekend worden. Dit wordt berekend door de jaarlijkse opbrengsten te verminderen met de jaarlijkse kosten. De inkomende kasstroom bedroeg jaarlijks, zoals hierboven beschreven, 2,0988 miljoen euro. In onderstaande tabel 11.3.2.3 kunnen de totale uitgaande kasstromen afgelezen worden.

Tabel 11.3.2.3: Totale uitgaande kasstromen

uitgaande kasstromen	kost per jaar
onderhoud	€ 31.736,50
materiaal	€ 80.609,43
bewerking	€ 1.159.226,60
TOTAAL	€ 1.271.572,53

De netto jaarlijkse kasstromen ($O_t - Q_t$) bedragen: € 2.098.800 – € 1.271.572,53 = € 827.227,47
Zoals besproken onder paragraaf 11.1 dienen de jaarlijkse netto kasstromen verminderd te worden met de belastingsuitgave. Dit gebeurt aan de hand van de factor $(1 - b)$. Eveneens besproken in paragraaf 11.1, is b gelijk aan 33,99%. Dit is de Belgische vennootschapsbelasting. De netto kasstroom na belastingen $(1 - b) * (O_t - Q_t)$ bedraagt: $(1 - 0,3399) * € 848.427,47 = € 546.052,85$

Netto Contante Waarde

De inkomende kasstromen, de uitgaande kasstromen, de netto jaarlijkse kasstromen na belastingen en het belastingschild van afschrijvingen werden reeds in de voorgaande paragrafen toegelicht en berekend. Bovendien kwamen de vennootschapsbelasting, de discontovoet en de verdisconteringsfactor ook al aan bod. Alle vereiste gegevens zijn dus beschikbaar om over te gaan tot de werkelijke investeringsanalyse, het berekenen van de netto contante waarde.

Tabel 11.3.2.4: verdisconteerde netto kasstromen na belastingen

Jaar	netto kasstroom na belastingen	belastingsschild van afschrijvingen	verdisconteringsfactor	verdisconteerde netto kasstroom na belastingen
1	€ 546.052,85	€ 21.574,47	86,96%	€ 493.588,98
2	€ 546.052,85	€ 21.574,47	75,61%	€ 429.207,81
3	€ 546.052,85	€ 21.574,47	65,75%	€ 373.224,18
4	€ 546.052,85	€ 21.574,47	57,18%	€ 324.542,76
5	€ 546.052,85	€ 21.574,47	49,72%	€ 282.211,10
6	€ 546.052,85	€ 21.574,47	43,23%	€ 245.400,96
7	€ 546.052,85	€ 21.574,47	37,59%	€ 213.392,14
8	€ 546.052,85	€ 21.574,47	32,69%	€ 185.558,38
9	€ 546.052,85	€ 21.574,47	28,43%	€ 161.355,11
10	€ 546.052,85	€ 21.574,47	24,72%	€ 140.308,79
Σ				€ 2.848.790,20

Uit bovenstaande tabel 11.3.2.4 kunnen de verdisconteerde kasstromen voor de tien jaren afgelezen worden. Om echter de netto contante waarde van het project te kunnen berekenen, moeten deze jaarlijkse verdisconteerde netto kasstromen na belastingen gesommeerd worden en nadien verminderd worden met de initiële investeringskost. In bovenstaande tabel is de sommatie reeds weergegeven. Deze bedraagt € 2.848.790,20. Dit bedrag moet verminderd worden met de investeringsuitgave in jaar 0. Deze bestond uit de installaties, eerder besproken in paragraaf 11.2.1. De installatiekosten bedroegen € 634.730 in totaal. Indien nu de gesommeerde kasstromen verminderd worden met deze initiële investeringsuitgave, wordt er uiteindelijk een netto contante waarde van € 2.214.060,20 (= € 2.848.790,20 – € 634.730) bekomen. Deze positieve NCW wijst op een economisch haalbare situatie. Voor een meer gedetailleerde en uitgewerkte berekening van de investeringsanalyse en de netto contante waarde in dit scenario, wordt er verwezen naar bijlage 8.

Indien er 53 runs op jaarbasis uitgevoerd worden, komt dit overeen met een draaitijd van 26,5 uren per jaar. Als er wordt verondersteld dat de machine 2 uur, dus 4 runs, per werkdag kan draaien, betekent dit dat er 13 dagen per jaar zijn waarop de machine zal draaien. Dit is een laag aantal dagen, en wordt dus als zeer haalbaar beschouwd.

11.3.3 Scenario 3: break even

In het derde scenario wordt er verondersteld dat er met de diamant verrijkte DNA sensor een break even netto contante waarde bereikt wordt. Indien er geëxperimenteerd wordt via trial and error met het aantal jaarlijkse runs van de machine, blijkt er een schakelpunt te liggen tussen twaalf en dertien runs op jaarbasis. Er kan geopteerd worden om minder dan 180 chips per run te laten begroeien met diamant, zodat er exact uitgerekend kan worden op welk aantal chips het break even punt ligt. Maar minder dan 180 chips per depositie levert geen maximale opbrengst van de machine. Bijgevolg zal er dus gewerkt worden met gehele aantallen van machine runs.

Deelscenario 1: twaalf runs per jaar

In het geval dat er twaalf runs per jaar plaatsvinden, worden er 2.160 chips geproduceerd. De materiaalkosten, bewerkingskosten en vermeden kosten, dus opbrengsten, zullen drastisch afnemen ten opzichte van de vorige scenario's. Indien er slechts twaalf runs per jaar worden uitgevoerd, worden volgende netto verdisconteerde kasstromen na belastingen bekomen:

Tabel 11.3.3.1: verdisconteerde netto kasstromen na belastingen

Jaar	netto kasstroom na belastingen	belastingsschild van afschrijvingen	verdisconteringsfactor	verdisconteerde netto kasstroom na belastingen
1	€ 104.429,01	€ 21.574,47	86,96%	€ 109.568,24
2	€ 104.429,01	€ 21.574,47	75,61%	€ 95.276,73
3	€ 104.429,01	€ 21.574,47	65,75%	€ 82.849,33
4	€ 104.429,01	€ 21.574,47	57,18%	€ 72.042,90
5	€ 104.429,01	€ 21.574,47	49,72%	€ 62.646,00
6	€ 104.429,01	€ 21.574,47	43,23%	€ 54.474,78
7	€ 104.429,01	€ 21.574,47	37,59%	€ 47.369,38
8	€ 104.429,01	€ 21.574,47	32,69%	€ 41.190,76
9	€ 104.429,01	€ 21.574,47	28,43%	€ 35.818,05
10	€ 104.429,01	€ 21.574,47	24,72%	€ 31.146,13
Σ				€ 632.382,31

De netto contante waarde kan nu berekend worden door de som van de verdisconteerde netto kasstromen na belastingen te verminderen met het initiële investeringsbedrag. Indien deze som verminderd wordt met de installatiekosten, wordt het volgende bekomen: € 632.382,31 – € 634.730 = € - 2.347,69 als NCW. Een negatieve netto contante waarde betekent dat het investeringsproject verworpen moet worden. Dit wil zeggen dat de investering aldus niet rendabel is in de toekomst. De gehele NCW berekening is terug te vinden in bijlage 9.

Deelscenario 2: dertien runs per jaar

Indien er echter dertien runs per jaar worden uitgevoerd, worden er 2.340 chips geproduceerd. De kasstromen kunnen afgelezen worden uit tabel 11.3.3.2 hieronder. De materiaalkosten, bewerkingskosten en vermeden kosten, evenals het berekenen van de netto kasstromen na belastingen en het belastingschild van afschrijvingen, zijn geheel terug te vinden in bijlage 10.

Tabel 11.3.3.2: verdisconteerde netto kasstromen na belastingen

Jaar	netto kasstroom na belastingen	belastingschild van afschrijvingen	verdisconteringsfactor	verdisconteerde netto kasstroom na belastingen
1	€ 115.200,32	€ 21.574,47	86,96%	€ 118.934,60
2	€ 115.200,32	€ 21.574,47	75,61%	€ 103.421,39
3	€ 115.200,32	€ 21.574,47	65,75%	€ 89.931,65
4	€ 115.200,32	€ 21.574,47	57,18%	€ 78.201,43
5	€ 115.200,32	€ 21.574,47	49,72%	€ 68.001,25
6	€ 115.200,32	€ 21.574,47	43,23%	€ 59.131,52
7	€ 115.200,32	€ 21.574,47	37,59%	€ 51.418,71
8	€ 115.200,32	€ 21.574,47	32,69%	€ 44.711,92
9	€ 115.200,32	€ 21.574,47	28,43%	€ 38.879,93
10	€ 115.200,32	€ 21.574,47	24,72%	€ 33.808,64
Σ				€ 686.441,04

Vervolgens kan de netto contante waarde opnieuw berekend worden. De som van alle verdisconteerde netto kasstromen na belastingen wordt verminderd met de initiële investeringskost. Dit is de kost van de installaties, die in totaal € 634.730 bedroeg. De netto contante waarde wordt als volgt berekend: $\sum_{t=1}^n [(1 - b) * (O_t - Q_t) + b * \widehat{A}_t] * A_{t-r} - I_0$. Als dit ingevuld wordt met de bekomen resultaten, resulteert dit in het volgende: € 686.441,04 – € 634.730 = € 13.554,18 als NCW. Deze positieve netto contante waarde bevestigt dat het investeringsproject rendabel is. Dit komt overeen met de eerder gemaakte stelling dat het break even niveau ligt op 13 machine runs per jaar.

Werkelijke break even

In de voorgaande uitwerking van de scenario's werd telkens geopteerd voor een geheel aantal machine runs. Omwille van de maximale productie, werd steeds voor 180 chips per run gekozen. Indien echter dit aantal chips per run gemodereerd wordt, kan er een meer precieze break even waarde bekomen worden. Via trial and error werd nagegaan welk aantal chips de kleinste positieve netto contante waarde opleverde. Dit bleek een aantal van 2.168 chips te zijn.

Tabel 11.3.3.3: verdisconteerde netto kasstromen na belastingen

Jaar	netto kasstroom na belastingen	belastingenschild van afschrijvingen	verdisconteringsfactor	verdisconteerde netto kasstroom na belastingen
1	€ 104.907,73	€ 21.574,47	86,96%	€ 109.984,53
2	€ 104.907,73	€ 21.574,47	75,61%	€ 95.638,72
3	€ 104.907,73	€ 21.574,47	65,75%	€ 83.164,10
4	€ 104.907,73	€ 21.574,47	57,18%	€ 72.316,61
5	€ 104.907,73	€ 21.574,47	49,72%	€ 62.884,01
6	€ 104.907,73	€ 21.574,47	43,23%	€ 54.681,75
7	€ 104.907,73	€ 21.574,47	37,59%	€ 47.549,35
8	€ 104.907,73	€ 21.574,47	32,69%	€ 41.347,26
9	€ 104.907,73	€ 21.574,47	28,43%	€ 35.954,14
10	€ 104.907,73	€ 21.574,47	24,72%	€ 31.264,47
				€ 634.784,92

De netto contante waarde wordt als volgt berekend: $\sum_{t=1}^n [(1 - b) * (O_t - Q_t) + b * \widehat{A}_t] * A_{t-r} - I_0$. Als dit ingevuld wordt met de bekomen resultaten, resulteert dit in het volgende: € 634.784,92 – € 634.730 = € 54,92 als NCW. Dit is een positieve netto contante waarde en wijst bijgevolg op een positief en rendabel investeringsproject.

Besluit break even

Uit voorgaande deelscenario's kan er besloten worden dat er een break even punt wordt bereikt indien er 13 machine runs per jaar gedaan worden. Indien er gespecificeerd wordt naar het aantal chips per jaar, ligt het break even punt op 2.168 chips.

Een aantal runs van 13 per jaar, omvat een machine run tijd van 6,5 uur per jaar. Dit is extreem laag. Er kan dus besloten worden dat het investeringsproject uiterst rendabel is. Het is dus met zekerheid economisch verantwoord om de investering in de met diamant verrijkte DNA sensor aan te gaan.

11.4 Scenario's in vergelijking met microarray methode

Hieronder volgen enkele scenario's waarin de met diamant verrijkte DNA sensor vergeleken zal worden met de huidige microarray methode. Er zullen drie scenario's uitgewerkt worden. Een eerste scenario zal zich richten op 1% van de markt, zoals in het eerste scenario in sectie 11.3. Een tweede scenario zal de haalbaarheid van het investeringsproject nagaan bij het minimale aantal machine runs per jaar. Een derde scenario zal het break even punt achterhalen en uitwerken.

11.4.1 Scenario 1: 1% van de markt

In het eerste scenario wordt er verondersteld dat er met de diamant verrijkte DNA sensor 1% van de markt kan worden bereikt. De doelmarkt is de eerder vernoemde tools markt voor biochips. Deze wordt verwacht een grootte van 2,7 miljard Amerikaanse dollar te bereiken. In euro's uitgedrukt, is dit 2,09 miljard euro (wisselkoers via De Tijd). Indien we 1% van de markt beogen, zou dit een omzet opleveren van 20,9 miljoen euro. Voor één microarray analyse wordt 1.994 euro aangerekend. Indien we de omzet van 20,9 miljoen euro delen door de prijs van 1.994 euro, bekomen we de afzet. Dit scenario zou dus 10.481,4 (20,9 miljoen / 1.994) analyses per jaar opleveren, afgerond dus 10.482 chips. Er moet echter niet alleen met het aantal chips rekening gehouden worden, maar ook met het aantal machine runs per jaar. Eén run kan 180 chips opleveren. Om 10.482 chips te produceren zullen er dus 58,23 runs (10.482 / 180) nodig zijn. Dit wordt afgerond op 59 runs. Dit heeft 10.620 biochips als resultaat. Met dit cijfer kunnen we bijgevolg de investeringsanalyse vervolledigen.

Uitgaande kasstromen

In paragraaf 11.2.1 werden de kasstromen besproken. Deze kasstromen omvatten installatiekosten, onderhoudskosten, materiaalkosten en bewerkingskosten. Deze laatste twee konden echter nog niet uitgewerkt worden, gezien hiervoor de afzet vereist was. Hierboven is er een afzet bekomen van 10.620 chips per jaar. De materiaalkosten bestaan uit siliciumwafers, diamantpoeder, waterstofgas, methaangas, UV lampen en vetzuren. In onderstaande tabel 11.4.1 zijn de totale materiaalkosten weergegeven voor 10.620 analyses. Voor een meer gedetailleerde uitwerking van de materiaalkosten, wordt er verwezen naar bijlage 11.

Tabel 11.4.1.1: materiaalkosten

Materiaal	Kost per jaar
Siliciumwafer	€ 79.650
Diamantpoeder	€ 3.540
Waterstofgas	€ 4.730
Methaangas	€ 827
UV lamp	€ 316,53
Vetzuren	€ 5,95
TOTAAL	€ 89.070,04

Data bron: dr. Stoffel Janssens en Mohammed Sharif Murib (IMO, 2013)

De bewerkingskosten omvatten de extractie van het patiënten DNA, de aankoppeling, een eerste reeks was vloeistoffen, de PCR behandeling, de amplificatie, en een tweede reeks was vloeistoffen. In onderstaande tabel 11.4.1.2 kunnen de totale bewerkingskosten voor een afzet van 10.620 chips afgelezen worden.

Figuur 11.4.1.2: bewerkingskosten

Bewerking	Kost per jaar
aankoppeling	€ 4.248,00
wasvloeistoffen	€ 424,80
extractie patiënten DNA	€ 44.604,00
PCR	€ 201.780,00
amplificatie	€ 861.813,00
wasvloeistoffen	€ 153.990,00
werkingskost per run	€ 23.600,00
TOTAAL	€ 1.290.459,80

Data bron: dr. Veronique Vermeeren (BIOMED, 2013)

Inkomende kasstromen

Gezien de met diamant verrijkte DNA sensor zich nog slechts in het stadium van onderzoek en ontwikkeling bevindt, is het niet mogelijk om al inkomsten in kaart te brengen. De sensor is namelijk nog niet op de markt gebracht, en kan dus nog geen opbrengsten genereren. De opbrengsten zullen bijgevolg in kaart gebracht worden als de vermeden kosten (communicatie prof dr. Steven Van Passel, april 2013). De vermeden kosten zijn de kosten die anders uitgegeven moesten worden aan een microarray analyse. De inkomende kasstromen kunnen aldus berekend worden aan de hand van de eerder berekende afzet en de prijs per analyse van de microarray methode. Indien de prijs vermenigvuldigd wordt met de afzet, wordt de omzet bekomen.

Dit is het totale bedrag aan verkopen in een jaar. Dit levert 21,176 miljoen euro (= 10.620 analyses * € 1.994 per analyse) op. Dit is in benadering in overeenstemming met bedrag dat bekomen werd bij de berekening van het percentage van 1% van de markt. De totale inkomende kasstromen per jaar, of dus de vermeden kosten per jaar, komen op een totaal bedrag van 21,176 miljoen euro.

Netto jaarlijkse kasstromen

Aan de hand van de jaarlijkse inkomende en uitgaande kasstromen kunnen nu de netto jaarlijkse kasstromen berekend worden. Dit wordt berekend door de jaarlijkse opbrengsten te verminderen met de jaarlijkse kosten. De inkomende kasstroom bedroeg jaarlijks, zoals hierboven beschreven, 21,176 miljoen euro. In onderstaande tabel 11.4.1.3 kunnen de totale uitgaande kasstromen afgelezen worden.

Tabel 11.4.1.3: totale uitgaande kasstromen

uitgaande kasstromen	kost per jaar
onderhoud	€ 31.736,50
materiaal	€ 89.070,04
bewerking	€ 1.290.459,80
TOTAAL	€ 1.411.266,34

De netto jaarlijkse kasstromen ($O_t - Q_t$) bedragen: € 21.176.280 – € 1.411.266,34 = € 19.765.013,66
 Zoals besproken onder paragraaf 11.1 dienen de jaarlijkse netto kasstromen verminderd te worden met de belastingsuitgave. Dit gebeurt aan de hand van de factor $(1 - b)$. Eveneens besproken in paragraaf 11.1, is b gelijk aan 33,99%. Dit is de Belgische vennootschapsbelasting. De netto kasstroom na belastingen $(1 - b) * (O_t - Q_t)$ bedragen: $(1 - 0,3399) * € 19.765.013,66 = € 13.046.885,52$

Netto Contante Waarde

De inkomende kasstromen, de uitgaande kasstromen, de netto jaarlijkse kasstromen na belastingen en het belastingschild van afschrijvingen werden reeds in de voorgaande paragrafen toegelicht en berekend. Bovendien kwamen de vennootschapsbelasting, de discontovoet en de verdisconteringsfactor ook al aan bod. Alle vereiste gegevens zijn dus beschikbaar om over te gaan tot de werkelijke investeringsanalyse, het berekenen van de netto contante waarde.

Tabel 11.4.1.4: verdisconteerde netto kasstromen na belastingen

Jaar	netto kasstroom na belastingen	belastingenschild van afschrijvingen	verdisconteringsfactor	verdisconteerde netto kasstroom na belastingen
1	€ 13.046.885,52	€ 21.574,47	86,96%	€ 11.363.878,25
2	€ 13.046.885,52	€ 21.574,47	75,61%	€ 9.881.633,26
3	€ 13.046.885,52	€ 21.574,47	65,75%	€ 8.592.724,58
4	€ 13.046.885,52	€ 21.574,47	57,18%	€ 7.471.934,41
5	€ 13.046.885,52	€ 21.574,47	49,72%	€ 6.497.334,27
6	€ 13.046.885,52	€ 21.574,47	43,23%	€ 5.649.855,89
7	€ 13.046.885,52	€ 21.574,47	37,59%	€ 4.912.918,17
8	€ 13.046.885,52	€ 21.574,47	32,69%	€ 4.272.102,75
9	€ 13.046.885,52	€ 21.574,47	28,43%	€ 3.714.871,96
10	€ 13.046.885,52	€ 21.574,47	24,72%	€ 3.230.323,44
Σ				€ 65.587.576,99

Uit bovenstaande tabel 11.4.1.4 kunnen de verdisconteerde kasstromen voor de tien jaren afgelezen worden. Om echter de netto contante waarde van het project te kunnen berekenen, moeten deze jaarlijkse verdisconteerde netto kasstromen na belastingen gesommeerd worden en nadien verminderd worden met de initiële investeringskost. De netto contante waarde wordt berekend volgens de formule weergegeven in figuur 11.1.1.

In bovenstaande tabel 11.4.1.4 is de sommatie reeds weergegeven. Deze bedraagt € 65.587.576,99. Dit bedrag moet verminderd worden met de investeringsuitgave in jaar 0. Deze bestond uit de installaties, eerder besproken in paragraaf 11.2.1. De installatiekosten bedroegen € 634.730 in totaal. Indien nu de gesommeerde kasstromen verminderd worden met deze initiële investeringsuitgave, wordt er uiteindelijk een netto contante waarde van € 64.952.846,99 (= € 65.587.576,99 – € 634.730) bekomen. Dit is een zeer positief resultaat. Het is bijgevolg economisch verantwoord het investeringsproject aan te gaan. Voor een meer gedetailleerde en uitgewerkte berekening van de investeringsanalyse en de netto contante waarde in dit scenario, wordt er verwezen naar bijlage 12.

Indien er 59 runs op jaarbasis uitgevoerd worden, komt dit overeen met een draaitijd van 29,5 uren per jaar. Als er wordt verondersteld dat de machine 2 uur, dus 4 runs, per werkdag kan draaien, betekent dit dat er 15 dagen per jaar zijn waarop de machine zal draaien. Dit is zeer haalbaar.

11.4.2 Scenario 2: slechts 1 run per jaar

In het voorgaande scenario werd een uiterst hoge netto contante waarde bekomen. Om een extremum te stellen, zal vervolgens een scenario uitgewerkt worden waarin er slechts één machine run per jaar plaatsvindt. Eén machine run produceert 180 chips. Met dit aantal zal het scenario uitgewerkt kunnen worden.

Uitgaande kasstromen

In paragraaf 11.2.1 werden de kasstromen besproken. Deze kasstromen omvatten installatiekosten, onderhoudskosten, materiaalkosten en bewerkingskosten. Deze laatste twee konden echter nog niet uitgewerkt worden, gezien hiervoor de afzet vereist was. Hierboven is er een afzet bekomen van 180 chips per jaar. De materiaalkosten bestaan uit siliciumwafers, diamantpoeder, waterstofgas, methaangas, UV lampen en vetzuren. In onderstaande tabel 11.4.2.1 zijn de totale materiaalkosten weergegeven voor 180 analyses. Voor een meer gedetailleerde uitwerking van de materiaalkosten, wordt er verwezen naar bijlage 13.

Tabel 11.4.2.1: materiaalkosten

Materiaal	Kost per jaar
Siliciumwafer	€ 1.350
Diamantpoeder	€ 60
Waterstofgas	€ 4.730
Methaangas	€ 827
UV lamp	€ 316,53
Vetzuren	€ 0,10
TOTAAL	€ 7.284,19

data bron: dr. Stoffel Janssens en Mohammed Sharif Murib (IMO, 2013)

De bewerkingskosten omvatten de extractie van het patiënten DNA, de aankoppeling, een eerste reeks was vloeistoffen, de PCR behandeling, de amplificatie, en een tweede reeks was vloeistoffen. In onderstaande tabel 11.4.2.2 kunnen de totale bewerkingskosten voor een afzet van 180 chips afgelezen worden.

Tabel 11.4.2.2: bewerkingskosten

Bewerking	Kost per jaar
aankoppeling	€ 72,00
wasvloeistoffen	€ 7,20
extractie patiënten DNA	€ 756,00
PCR	€ 3.420,00
amplificatie	€ 14.607,00
wasvloeistoffen	€ 2.610,00
werkingskost per run	€ 400,00
TOTAAL	€ 21.872,20

data bron: dr. Veronique Vermeeren (BIOMED, 2013)

Inkomende kasstromen

Gezien de met diamant verrijkte DNA sensor zich nog slechts in het stadium van onderzoek en ontwikkeling bevindt, is het niet mogelijk om al inkomsten in kaart te brengen. De sensor is namelijk nog niet op de markt gebracht, en kan dus nog geen opbrengsten genereren. De opbrengsten zullen bijgevolg in kaart gebracht worden als de vermeden kosten (communicatie prof dr. Steven Van Passel, april 2013). De vermeden kosten zijn de kosten die anders uitgegeven moesten worden aan een microarray analyse. De inkomende kasstromen kunnen aldus berekend worden aan de hand van de eerder berekende afzet en de prijs per analyse van de microarray methode. Indien de prijs vermenigvuldigd wordt met de afzet, wordt de omzet bekomen. Dit is het totale bedrag aan verkopen in een jaar. Dit levert 358.920 euro (= 180 analyses * € 1.994 per analyse) op. Dit zijn de totale inkomende kasstromen per jaar, of dus de vermeden kosten per jaar.

Netto jaarlijkse kasstromen

Aan de hand van de jaarlijkse inkomende en uitgaande kasstromen kunnen nu de netto jaarlijkse kasstromen berekend worden. Dit wordt berekend door de jaarlijkse opbrengsten te verminderen met de jaarlijkse kosten. De inkomende kasstroom bedroeg jaarlijks, zoals hierboven beschreven, 358.920 euro. In onderstaande tabel 11.4.2.3 kunnen de totale uitgaande kasstromen afgelezen worden.

Tabel 11.4.2.3: totale uitgaande kasstromen

uitgaande kasstromen	kost per jaar
onderhoud	€ 31.736,50
materiaal	€ 7.284,19
bewerking	€ 21.872,20
TOTAAL	€ 60.892,89

De netto jaarlijkse kasstromen ($O_t - Q_t$) bedragen: € 358.920 – € 60.892,89= € 298.027,11
 Zoals besproken onder paragraaf 11.1 dienen de jaarlijkse netto kasstromen verminderd te worden met de belastingsuitgave. Dit gebeurt aan de hand van de factor $(1 - b)$. Eveneens besproken in paragraaf 11.1, is b gelijk aan 33,99%. Dit is de Belgische vennootschapsbelasting. De netto kasstroom na belastingen $(1 - b) * (O_t - Q_t)$ bedragen: $(1 - 0,3399) * € 298.027,11 = € 196.727,69$

Netto Contante Waarde

De inkomende kasstromen, de uitgaande kasstromen, de netto jaarlijkse kasstromen na belastingen en het belastingschild van afschrijvingen werden reeds behandeld in de voorgaande paragrafen. Bovendien kwamen de vennootschapsbelasting, de discontovoet en de verdisconteringsfactor ook reeds aan bod. De benodigde gegevens zijn dus beschikbaar om over te gaan tot het berekenen van de netto contante waarde.

Tabel 11.4.2.4: verdisconteerde netto kasstromen na belastingen

Jaar	netto kasstroom na belastingen	belastingschild van afschrijvingen	verdisconteringsfactor	verdisconteerde netto kasstroom na belastingen
1	€ 196.727,69	€ 21.574,47	86,96%	€ 189.827,97
2	€ 196.727,69	€ 21.574,47	75,61%	€ 165.067,80
3	€ 196.727,69	€ 21.574,47	65,75%	€ 143.537,22
4	€ 196.727,69	€ 21.574,47	57,18%	€ 124.814,97
5	€ 196.727,69	€ 21.574,47	49,72%	€ 108.534,76
6	€ 196.727,69	€ 21.574,47	43,23%	€ 94.378,05
7	€ 196.727,69	€ 21.574,47	37,59%	€ 82.067,87
8	€ 196.727,69	€ 21.574,47	32,69%	€ 71.363,37
9	€ 196.727,69	€ 21.574,47	28,43%	€ 62.055,10
10	€ 196.727,69	€ 21.574,47	24,72%	€ 53.960,96
Σ				€ 1.095.608,07

Uit bovenstaande tabel 11.4.2.4 kunnen de verdisconteerde kasstromen voor de tien jaren afgelezen worden. Om echter de netto contante waarde van het project te kunnen berekenen, moeten deze jaarlijkse verdisconteerde netto kasstromen na belastingen gesommeerd worden en nadien verminderd worden met de initiële investeringskost. De netto contante waarde wordt bijgevolg als volgt berekend: $\sum_{t=1}^n [(1 - b) * (O_t - Q_t) + b * \widehat{A}_t] * A_{t-r} - I_0$.

In bovenstaande tabel is de sommatie reeds weergegeven. Deze bedraagt € 1.095.608,07. Dit bedrag moet verminderd worden met de investeringsuitgave in jaar 0. Deze bestond uit de installaties, eerder besproken in paragraaf 11.2.1. De installatiekosten bedroegen € 634.730 in totaal. Indien nu de gesommeerde kasstromen verminderd worden met deze initiële investeringsuitgave, wordt er uiteindelijk een netto contante waarde van € 460.878,07 (= € 1.095.608,07 – € 634.730) bekomen. Voor een meer gedetailleerde en uitgewerkte berekening van de investeringsanalyse en de netto contante waarde in dit scenario, wordt er verwezen naar bijlage 14.

Dit is een positief resultaat, ondanks het feit dat er slechts één run per jaar zou plaatsvinden. Het investeren in een DNA sensor met diamant blijkt bijgevolg economisch uiterst verantwoord te zijn.

11.4.3 Scenario 3: break even

In de voorgaande uitwerking van de scenario's werd telkens geopteerd voor een geheel aantal machine runs. Omwille van een maximale productie, werd steeds voor 180 chips per run gekozen. Indien echter dit aantal chips per run gemodereerd wordt, kan er een meer precieze break even waarde bekomen worden. Via trial and error werd nagegaan welk aantal chips de kleinste positieve netto contante waarde opleverde. Dit bleek een aantal van 106 chips te zijn.

In onderstaande tabel 11.4.3.1 kunnen de jaarlijkse verdisconteerde netto kasstromen na belastingen afgelezen worden.

Tabel 11.4.3.1: verdisconteerde netto kasstromen na belastingen

Jaar	netto kasstroom na belastingen	belastingenschild van afschrijvingen	verdisconteringsfactor	verdisconteerde netto kasstroom na belastingen
1	€ 105.644,20	€ 21.574,47	86,96%	€ 110.624,93
2	€ 105.644,20	€ 21.574,47	75,61%	€ 96.195,59
3	€ 105.644,20	€ 21.574,47	65,75%	€ 83.648,34
4	€ 105.644,20	€ 21.574,47	57,18%	€ 72.737,69
5	€ 105.644,20	€ 21.574,47	49,72%	€ 63.250,16
6	€ 105.644,20	€ 21.574,47	43,23%	€ 55.000,14
7	€ 105.644,20	€ 21.574,47	37,59%	€ 47.826,21
8	€ 105.644,20	€ 21.574,47	32,69%	€ 41.588,01
9	€ 105.644,20	€ 21.574,47	28,43%	€ 36.163,49
10	€ 105.644,20	€ 21.574,47	24,72%	€ 31.446,51
Σ				€ 638.481,08

De netto contante waarde wordt bijgevolg berekend volgens de formule weergegeven in figuur 11.1.1. Indien de gesommeerde jaarlijkse verdisconteerde netto kasstromen na belasting van € 638.481,08 dus verminderd worden met het investeringsbedrag bedrag van € 634.730, wordt er een NCW bekomen van € 3.751,08. Voor een meer gedetailleerde en uitgewerkte berekening van de investeringsanalyse in dit scenario, wordt er verwezen naar bijlage 15. De break even waarde in dit scenario heeft een positieve waarde. De werkelijke break even ligt dus op 106 chips. Dit komt overeen met minder dan één run per jaar. In vergelijking met de microarray analyses blijkt de investering in de met diamant verrijkte DNA sensor vanuit economisch standpunt zeer gunstig te zijn.

Hoofdstuk 12: Conclusies

Algemeen

De technische aspecten van de met diamant verrijkte DNA sensor wijzen erop dat deze biosensor technologie geheel op punt staat. Op het IMO zijn reeds patenten binnengehaald met betrekking tot de diamant DNA sensor. Het blijkt een solide en betrouwbare sensor te zijn, die voldoende selectiviteit en sensitiviteit kan behalen. Ook de uitleesmethode is zeer eenvoudig en levert effectieve resultaten.

Bovendien zijn de medische voordelen die bereikt kunnen worden met de diamant DNA sensor aanzienlijk. Allereerst zorgt het gebruik van diamant ervoor dat de sensor zeer biocompatibel is met het lichaam en zo uiterst geschikt is voor toepassingen in de medische sector. Bovendien kan er met de diamant DNA sensor dezelfde analyse uitgevoerd worden als met huidige methodes in het gebied van mutatie screening, zoals bijvoorbeeld DGGE en microarray. Het opsporen van ziektes, al dan niet vroegtijdig, is zeker in de toekomst een onmisbare tak van de geneeskunde. Aangezien het aantal gevallen van kanker, maar ook andere ziektes, steeds toeneemt, is er dus een beloftevolle toekomst weggelegd voor de met diamant verrijkte DNA sensor.

Als het economische potentieel van de sensor onder de loep genomen wordt, dient er opgemerkt te worden dat de investeringen in de diamant DNA sensor enorm rendabel blijken te zijn. Indien de netto contante waarde uitgerekend wordt met als toetsingsbasis de DGGE methode, blijkt deze positief te zijn zodra er een aantal runs bereikt wordt van 13 per jaar. Er wordt dan een NCW bekomen van dertienduizend euro. Als er verder gespecificeerd wordt naar het aantal break even runs, is dit een NCW van vijftig euro voor 2.168 chips per jaar. De andere twee uitgewerkte scenario's in sectie 11.3 blijken eveneens te wijzen op een uiterst rendabele investering, met respectievelijk 28 miljoen euro bij 1% marktaandeel en 2 miljoen bij 0,1% marktaandeel. Wanneer de microarray methode als toetsingsbasis gehanteerd wordt, ligt deze drempelwaarde of dit minimum aantal runs nog heel wat lager. Zo blijkt dat 1 run per jaar al een zeer positieve NCW oplevert van bijna een half miljoen euro. Er dient hier echter wel opgemerkt te worden dat de diamant DNA sensor zich nog slechts in het onderzoeks- en ontwikkelingsstadium bevindt. De sensor is nog niet op de markt gebracht en kan dus niet worden beschouwd als een commerciële methode. De twee huidige methodes, DGGE en microarray, zijn dit echter wel. De vergelijkingsbasis is dus niet geheel gelijkwaardig.

Kritische bemerkingen

Er dienen echter nog heel wat kritische bemerkingen gemaakt te worden met betrekking tot de economische analyses die werden uitgevoerd in deze masterproef.

Hierboven werd reeds vermeld dat de diamant DNA sensor zich in het onderzoeksstadium bevindt. Het is niet mogelijk om het commerciële verhaal in kaart te brengen, aangezien de sensor nog niet op de markt is gebracht. De sensor heeft bijgevolg nog geen echte opbrengsten kunnen genereren, waardoor er in de investeringsanalyses gebruik werd gemaakt van vermeden kosten. Er dient echter wel rekening gehouden te worden met het feit dat de vermeden kosten de kosten inhielden van de huidige methodes. De DGGE en microarray methode zijn reeds gangbare methodes, en de prijs per analyse die wordt gevraagd, bevat dus ook een winstmarge. De vergelijkingsbasis is dus een ruwe maatstaf, wat niet vergeten mag worden bij het interpreteren van de resultaten van de netto contante waarde berekeningen.

De marketingkosten bij de lancering van de biosensor op de markt, zijn niet in kaart gebracht. Deze kosten zijn voorlopig nog onbekend. Maar indien deze hoog liggen, kunnen ze een aanzienlijk effect hebben op de investeringsanalyses. De netto contante waardes zijn in de uitgewerkte scenario's steeds erg positief gebleken. Indien daar een substantiële marketingkost bijkomt, kunnen de netto contante waardes aanzienlijk dalen.

De vergaarde kosten- en opbrengstendata die werd gebruikt voor de investeringsanalyses is voor een groot deel gebaseerd op schattingen en gemiddeldes. Dit moet men in acht houden bij het interpreteren van de resultaten. Dit kan ervoor zorgen dat de bekomen cijfers soms niet helemaal overeenkomen met het werkelijk bedrag. Bovendien zijn de scenario's waarin een bepaald marktpercentage werd verondersteld, gebaseerd op assumpties. Het marktaandeel van de DNA sensor met diamant is nog onbekend, en dus onzeker. De toekomst zal verder uitwijzen wat het werkelijke percentage zal zijn.

Tot slot enkele aspecten die niet in kaart zijn gebracht in de investeringsanalyses. De subsidies waarmee het IMO wordt gesteund, zijn niet ingebracht in de analyse. Dit om een meer algemene bespreking te kunnen hanteren, die eventueel ook van toepassing kan zijn op andere bedrijven of instellingen. De manpower kost is slechts gedeeltelijk opgenomen in de analyses. Gezien het nog erg onzeker was hoeveel deze in elke stap specifiek zou bedragen, is het voorlopig enkel meegenomen in de bewerkingskosten. Voor de volledigheid dient dit in de toekomst in zijn geheel opgenomen te worden.

Voorstellen voor verder onderzoek

De masterproef wordt afgesloten met enkele suggesties voor verder onderzoek. Er zijn namelijk nog heel wat paden die bewandeld kunnen worden in de toekomst.

Een eerste suggestie omvat implementatie van de diamant DNA sensor op de markt. Er kan verder onderzocht worden welke marketingkosten er dienen aangegaan te worden. Ook kan er onderzocht worden wat het werkelijke marktaandeel zal bedragen van de met diamant verrijkte DNA sensor. Er dient eveneens een winstmarge ingevoerd te worden als de sensor commercieel wordt gemaakt. Ook moet het huidig proces een upscaling ondergaan naar een werkelijke productie unit, een bewerkingsafdeling e.d. Indien het een commerciële aangelegenheid wordt, zullen de huidige omstandigheden aangepast moeten worden. Er kan nagegaan worden welke effecten dit op de rendabiliteit van de investering heeft.

Een volgende suggestie heeft betrekking op het toepassingsgebied van de met diamant verrijkte DNA sensor. Voorlopig wordt deze toegepast in het gebied van mutatie screening. Er kan nagegaan worden of de mogelijkheden verbreed kunnen worden, zodat de diamant DNA sensor bijvoorbeeld ook gebruikt kan worden in het gebied van identificatieonderzoek. Zo kunnen de toepassingsmogelijkheden toenemen, waardoor de DNA sensor eventueel verschillende marktsegmenten kan aanspreken. Dit is materie voor verder onderzoek.

Ongetwijfeld zal er in de toekomst een vervolg komen aan het verhaal van de met diamant verrijkte DNA sensor. Hetzij als onderzoekstoepassing, hetzij als marktgerichte DNA analyse.

Lijst van geraadpleegde werken

Blau, N., et al. (2010). "Phenylketonuria." *The Lancet* 376(9750): 1417-1427.

Boisseau, P., en Loubaton, B. (2011). "Nanomedicine, nanotechnology in medicine." *Comptes rendus Physique* 12 (2011) 620–636

Calladine, C. R., et al. (2004). "Understanding DNA: the molecule & how it works."

Christiaens, P., et al. (2006). "EDC-mediated DNA attachment to nanocrystalline CVD diamond films." *Biosens Bioelectron* 22(2): 170-177.

Drummond, T. G., et al. (2003). "Electrochemical DNA sensors." *Nat Biotechnol* 21(10): 1192-1199.

Hassibi, A., et al. (2009). "Real-time DNA microarray analysis." *Nucleic Acids Res* 37(20): e132.

Huang, L. et al. (2010). "Identifying the emerging roles of nanoparticles in biosensors." *Journal of Business Chemistry*, 7 (1).

Isberg, J., et al. (2004). "Single crystal diamond for electronic applications." *Diamond and Related Materials* 13, 320–324.

Janssens, S. (z.d.). PHD Thesis: nanocrystalline diamond.

Kloss, F. R., et al. (2008). "Commercial developments of nano-crystalline diamond — Two prototypes as case studies." *Diamond and Related Materials* 17(7-10): 1089-1099.

Kraussa, A. R., et al. (2001). "Ultrananocrystalline diamond thin films for MEMS and moving mechanical assembly devices." *Diamond and Related Materials* 10, 1952 – 1961.

Luong, J. H., et al. (2008). "Biosensor technology: technology push versus market pull." *Biotechnol Adv* 26(5): 492-500.

Mainwood, A., et al. (2009). "Science's gem: diamond science 2009." *Journal of Physics: Condensed Matter* 21(36): 360301.

May, P. W., et al. (2010). "Simulations of chemical vapor deposition diamond film growth using a kinetic Monte Carlo model and two-dimensional models of microwave plasma and hot filament chemical vapor deposition reactors." *Journal of Applied Physics* 108(11): 114909.

Mercken, R. (2010). "De investeringsbeslissing. Een beleidsgerichte analyse." Antwerpen: Garant.

Narayan, R.J., et al. (2006). "Microstructural and biological properties of nanocrystalline diamond coatings." *Diamond & Related Materials* 15, 1935–1940.

Petrik, J. (z.d.). "Protein Microarrays for Blood Typing and Testing."

Quershi, A., et al. (2009). "A new nanocrystalline diamond-based biosensor for the detection of cardiovascular risk markers." *Procedia Chemistry* 1(1): 1079-1082.

Qureshi, A. et al. (2009). "Review on carbon-derived, solid-state, micro and nano sensors for electrochemical sensing applications." *Diamond and Related Materials*, Volume 18, Issue 12, 1401–1420.

Qureshi, A., et al. (2010). "Nanocrystalline diamond film for biosensor applications." *Diamond and Related Materials* 19, 457–461.

Raedts, M. en C. Masui (2007). "Van vraag tot tekst: praktische leidraad voor literatuurverslagen." Leuven: Acco

Reshetilov, A. N. en A. M. Bezbzorodov (2011). "Nanobiotechnology and biosensor research." *Applied Biochemistry and Microbiology* 44(1): 1-5.

Severinghaus, J. W., et al. (1986). "History of blood gas analysis. IV. Leland Clark's oxygen electrode." *Journal of Clinical Monitoring*, Volume 2, Issue 2, pp 125-139.

Sun Lee, W. en J. Yu (2005). "Comparative study of thermally conductive fillers in underfill for the electronic components." *Diamond and Related Materials* 14(10): 1647-1653.

Takahashi, K., et al. (2003). "DNA preservation using diamond chips." *Diamond and Related Materials* 12(3-7): 572-576.

Thusu, R. (2010). "Strategic Research and Development Offer New Perspective for the Biosensors Market." Frost & Sullivan.

Vaddiraju, S., et al. (2010). "Emerging synergy between nanotechnology and implantable biosensors: a review." *Biosens Bioelectron* 25(7): 1553-1565.

Villasenor-Park, J. en A. G. Ortega-Loayza (2013). "Microarray technique, analysis, and applications in dermatology." *J Invest Dermatol* 133(4): e7.

Wang, D. G., et al. (z.d.). "Large-Scale Identification, Mapping, and Genotyping of Single-Nucleotide Polymorphisms in the Human Genome."

Wenmackers, S., et al. (2009). "Diamond-based DNA sensors: surface functionalization and read-out strategies." *physica status solidi (a)* 206(3): 391-408.

Williams, O. A. (2011). "Nanocrystalline diamond." *Diamond and Related Materials* 20(5-6): 621-640.

Williams, O. A. (z.d.). "The Diamond Nano-Balance."

Lijst van geraadpleegde websites

Core competence diamond coating. Opgevraagd op 20 maart, 2013, via <http://www.kometgroup.com/en/plus-navigation/plus/diamond-coating.html>

DNA-identificatieonderzoek. Opgevraagd op 7 april, 2013, via <http://www.uzleuven.be/forensische-geneeskunde/dna-identificatieonderzoek>

Future Opportunities. Opgevraagd op 14 april, 2013, via <http://www.universalbiosensors.com/Products/Future-Opportunities.aspx>

Global Genetic Testing Market Analysis. RNCOS. (2012). Opgevraagd op 1 mei, 2013, via <http://www.reportlinker.com/p0588171-summary/Global-Genetic-Testing-Market-Analysis.html>

Global Biochip Markets: Microarrays and Lab-on-a-Chip. BCC Research. (2011). Opgevraagd op 1 mei, 2013, via <http://www.reportlinker.com/p0170497-summary/Global-Biochip-Markets-Microarrays-and-Lab-on-a-Chip.html>

Hot Filament CVD Systems. Opgevraagd op 20 maart, 2013, via <http://www.sekidiamond.com/hot-filament/index.html>

Microwave Plasma CVD Systems and Sources. Opgevraagd op 20 maart, 2013, via <http://www.sekidiamond.com/microwave-plasma/index.html>

BIJLAGEN

BIJLAGE 1

				prijs per wafer		benodigde hoeveelheid wafer per sample	prijs/sensor
siliciumwafer				75		0,1	7,5
1 wafer	2 inch	10 chips					
diamantgroei			sccm	prijs per ml of fles	prijs per sccm	benodigde hoeveelheid/sensor per ml	prijs/sensor
nano diamant poeder				5		0,06666667	0,333333333
methaangas	ck gaz		10000000	1259	0,0001259	2,083333333	0,000262292
waterstofgas	air liquide	B50 liter gas	10000000	180	0,000018	83,33333333	0,0015
boorhoudend gas	messer		10000000	2165	0,0002165		
opdamp apparatuur	lineair antenne systeem			400 tot 500 k			
	hot filament			600 tot 650 k			
		9 * 100mm per run					
		4 * 150mm per run					
		1 * 200mm per run					
		1 * 300mm per run					

BIJLAGE 2

zuurstof terminatie van de sample	bedrijf		prijs per ml of g	benodigde hoeveelheid/sensor per ml of g	prijs/sensor
succinic anhydride	sigma aldrich		0,498	0,04 tot 0,16 (gemiddeld 0,10)	0,049800
acetonitrile (solvent)	sigma aldrich		0,38	2	0,760000
OF					
tolueen	sigma aldrich		0,349	2	0,698000
UV-ozon lamp		5000 uren	275		
UV-ozon toestel			2300		
waterstof terminatie van de sample	bedrijf		prijs per uur of ml	benodigde hoeveelheid/sensor per uur of ml	prijs/sensor
UV lamp 4W (300h)	sigma aldrich		0,036133333	20	0,722667
UV toestel			230 euro	20	
fatty acids	sigma aldrich		0,112	0,005	0,000560
					0,723227

BIJLAGE 3

Materiaal (eenheid van hoeveelheid)	bedrijf	artikelnummer	Prijs per ml, per g of per nmol	benodigde hoeveelheid/sensor per ml, per g of per nmol	Prijs/ sensor (euro)
Probe DNA (nmol)					0,379200
EDC (g)			25,2	0,001	0,025200
MES (ml)			0,0236	1	0,023600
1xPBS (20 ml)					0,002129
2xSSC/0,5%SDS (10 ml)			0,0036956	10	0,036956
<i>DNA extractie uit 10 ml bloed</i>					
1x hemolyse buffer (ml)			0,00044679	50	0,022234
lysis buffer (ml)			0,000423596	3	0,001271
proteïnase K (g)			1980	0,002	3,960000
proteïnase K oplossing (ml)			0,00632389	1	0,006324
20% SDS			0,12518	0,1	0,012518
verzadigde NaCl oplossing			0,003059	1	0,003059
water verzadigde chloroform			0,0408	4	0,163200
ethanol	VWR	20.821.321	0,003972	10	0,039720
<i>PCR exon op patiënten DNA</i>					
<i>Lineaire amplificatie (600 pmol output nodig)</i>					
Sephadex (g)					14,4691
10x PCR buffer (14 µl is sowieso te verwaarlozen)					0,000000
0,2x SSC (5 ml)					0,000000
NaCl (g)			0,00874	0,008766	0,000077
C6H5O7.3Na.2H2O (g)			0,0468	0,0044115	0,000206
Totale prijs					119,330174

<i>Probe DNA (0,3 nmol)</i>		aantal DNA bases			
vast gedeelte: 5' amino modifier	IDT			0,3 nmol (1,2% van 25 nmol)	0,2160
variabel gedeelte	IDT		80	0,00204	0,3 nmol (1,2% van 25 nmol)
Prijs voor 300 pmol (euro)					0,3792
<i>1xPBS (20 ml)</i>					
NaCl (g)	VWR	27810364		0,00874	0,1508
Na2HPO4 (g)	VWR	102495D		0,0398	0,0142
KH2PO4 (g)	VWR	26936293		0,0615	0,004
Prijs voor 20 ml (euro)					0,002129
<i>1x hemolysebuffer (100 ml)</i>					
NH ₄ Cl	VWR	1011425000		0,042	0,829
KHCO ₃	VWR	0889-500G		0,0622	0,1
EDTA	VWR	20302293		0,0927	0,0034299
Prijs voor 100 ml (euro)					0,0444679

Lysis buffer (100 ml)						
Tris	GE	17132101		0,12922	0,12	0,0155064
NaCl	VWR	27810364		0,00874	2,33	0,0203642
EDTA	VWR	20302293		0,0927	0,07	0,006489
Prijs voor 100 ml (euro)						0,0423596
Proteinase K oplossing (100 ml)						
SDS	GE	17131301		0,6259	1	0,6259
EDTA	VWR	20302293		0,0927	0,07	0,006489
Prijs voor 100 ml (euro)						0,632389
SDS 20 % (100 ml)						
SDS	GE	17131301		0,6259	20	12,518
Prijs voor 100 ml (euro)						12,518
verzadigde NaCl oplossing (100 ml)						
NaCl	VWR	27810364		0,00874	35	0,3059
Prijs voor 100 ml (euro)						0,3059
Water verzadigde chloroform (80 ml)						
Chloroform	VWR	1024456010		0,0544	60	3,264
Prijs voor 80 ml (euro)						3,264
2xSSC/0,5%SDS (100 ml)						
NaCl (g)	VWR	27810364		0,00874	1,7532	0,015323
C6H5O7.3Na.2H2O (g)	VWR	27.833.260		0,0468	0,8823	0,041292
SDS (g)	GE	17131301		0,6259	0,5	0,312950
Prijs voor 100 ml (euro)						0,369565
PCR exon op patiënten DNA						
			aantal DNA bases		hoeveelheid voor mix voor 70 rxn's	
10x PCR buffer (prijs zit in de Taq prijs)						
Forward primer (pmol)			20	0,00476	0,7 nmol (2,8% van 25 nmol)	0,0952
Reverse primer (pmol)			20	0,00476	0,7 nmol (2,8% van 25 nmol)	0,0952
Taq polymerase	Roche	1435094		0,269154	70	18,84078
Prijs voor 70 rxns (euro)						19,03118
					hoeveelheid voor 1200 rxn's	
Exosap (rxn's)	Isogen	78201		0,692	1200	830,4
Lineaire amplificatie (600 pmol output nodig)						
			aantal DNA bases		hoeveelheid voor 300 rxn's	
10x PCR buffer (prijs zit in de Taq prijs)						
forward primer (pmol)			20	0,0204	3000 (12% van 25000 pmol)	0,408
Taq polymerase	Roche	1435094		0,269154	300	80,7462
Prijs voor 300 rxn's (euro)						81,1542
					hoeveelheid voor 150 tubes	
Sephadex (g)	VWR	17-0043-02		2,57	5,63	14,4691

BIJLAGE 4

installatiekosten

HFCVD systeem	€ 625.000
verbruik	4 kWh per sccm
duurtijd 1 run	30 min
aantal runs op jaarbasis	1 runs
	wafers (2 inch
depositie per run	18 Si)
	180 chips
chips op jaarbasis	180 chips

glove box	€ 7.000
levensduur	∞

UV toestel	€ 230,00
-------------------	-----------------

thermische apparatuur	€ 2.500,00
------------------------------	-------------------

TOTALE INSTALLATIEKOSTEN	€ 634.730
---------------------------------	------------------

BIJLAGE 5

materiaalkosten

siliciumwafer	€ 75
aantal chips per wafer	10
aantal wafers op jaarbasis	9504
waferprijs per jaar	€ 712.800

diamantpoeder	€ 1.000
aantal chips per portie	3000
diamantporties op jaarbasis	31,68
diamantpoeder prijs per jaar	€ 31.680,00

UV lamp	€ 10,84
levensduur in uren	300
levensduur in dagen	12,5
UV lampen per jaar	29,2
UV kost per jaar	€ 316,53

vetzuren	€ 11,20
aantal chips per portie	20000
vetzuren per jaar	4,752
vetzuren kost per jaar	€ 53,22

waterstofgas	€ 180
verbruik (sccm per min)	500
inhoud fles (sccm)	10000000
levensduur fles in minuten	20000
levensduur fles in dagen	14
waterstof flessen per jaar	26
waterstof kost per jaar	€ 4.730

methaangas	€ 1.259
verbruik (sccm per min)	12,50
inhoud fles (sccm)	10000000,00
levensduur fles in minuten	800000,00
levensduur fles in dagen	555,56
methaan flessen per jaar	0,657
methaan kost per jaar	€ 827,16

TOTALE MATERIAALKOSTEN	€ 750.407,31
-----------------------------------	---------------------

bewerkingskosten

aankoppeling	€ 38.016,00
wasvloeistoffen	€ 3.801,60
extractie patiënten DNA	€ 399.168,00
PCR	€ 1.805.760,00
amplificatie	€ 7.712.496,00
wasvloeistoffen	€ 1.378.080,00
werkingskosten per run	€ 211.200,00
TOTAAL	€ 11.548.521,60

BIJLAGE 6

NETTO CONTANTE WAARDE												
vennootschapsbelasting	34%											
discontovoet	15%											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
installatiekosten	€ -634.730											
onderhoudskosten		€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737
materiaalkosten		€ 750.407,31	€ 750.407,31	€ 750.407,31	€ 750.407,31	€ 750.407,31	€ 750.407,31	€ 750.407,31	€ 750.407,31	€ 750.407,31	€ 750.407,31	€ 750.407,31
bewerkingskosten		€ 11.548.521,60	€ 11.548.521,60	€ 11.548.521,60	€ 11.548.521,60	€ 11.548.521,60	€ 11.548.521,60	€ 11.548.521,60	€ 11.548.521,60	€ 11.548.521,60	€ 11.548.521,60	€ 11.548.521,60
totale uitgaande kasstroom		€ 12.330.665,41	€ 12.330.665,41	€ 12.330.665,41	€ 12.330.665,41	€ 12.330.665,41	€ 12.330.665,41	€ 12.330.665,41	€ 12.330.665,41	€ 12.330.665,41	€ 12.330.665,41	€ 12.330.665,41
afschrijvingen installaties		€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00
vermeden kosten		€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00
totale inkomende kasstroom		€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00
Netto jaarlijkse kasstroom	€ -634.730	€ 8.578.134,59	€ 8.578.134,59	€ 8.578.134,59	€ 8.578.134,59	€ 8.578.134,59	€ 8.578.134,59	€ 8.578.134,59	€ 8.578.134,59	€ 8.578.134,59	€ 8.578.134,59	€ 8.578.134,59
netto kasstroom na belastingen		€ 5.662.426,64	€ 5.662.426,64	€ 5.662.426,64	€ 5.662.426,64	€ 5.662.426,64	€ 5.662.426,64	€ 5.662.426,64	€ 5.662.426,64	€ 5.662.426,64	€ 5.662.426,64	€ 5.662.426,64
belastingsschild van afschrijvingen		€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47
verdisconteerde netto kasstroom		€ 4.942.609,66	€ 4.297.921,45	€ 3.737.323,00	€ 3.249.846,08	€ 2.825.953,12	€ 2.457.350,54	€ 2.136.826,55	€ 1.858.110,05	€ 1.615.747,87	€ 1.404.998,14	
NETTO CONTANTE WAARDE		€ 27.891.956,46										

INVESTERINGSANALYSE											
vennootschapsbelasting	34%										
discontovoet	15%										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
installatiekosten	€ -634.730										
onderhoudskosten		€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737
materiaalkosten		€ 750.407,31	€ 750.407,31	€ 750.407,31	€ 750.407,31	€ 750.407,31	€ 750.407,31	€ 750.407,31	€ 750.407,31	€ 750.407,31	€ 750.407,31
bewerkingskosten		€ 11.548.521,60	€ 11.548.521,60	€ 11.548.521,60	€ 11.548.521,60	€ 11.548.521,60	€ 11.548.521,60	€ 11.548.521,60	€ 11.548.521,60	€ 11.548.521,60	€ 11.548.521,60
totale uitgaande kasstroom		€ 12.330.665,41	€ 12.330.665,41	€ 12.330.665,41	€ 12.330.665,41	€ 12.330.665,41	€ 12.330.665,41	€ 12.330.665,41	€ 12.330.665,41	€ 12.330.665,41	€ 12.330.665,41
afschrijvingen installaties		€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00
vermeden kosten		€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00
totale inkomende kasstroom		€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00	€ 20.908.800,00
Netto jaarlijkse kasstroom	€ -634.730	€ 8.578.135	€ 8.578.135	€ 8.578.135	€ 8.578.135	€ 8.578.135	€ 8.578.135	€ 8.578.135	€ 8.578.135	€ 8.578.135	€ 8.578.135
winst voor belastingen		€ 8.514.662	€ 8.514.662	€ 8.514.662	€ 8.514.662	€ 8.514.662	€ 8.514.662	€ 8.514.662	€ 8.514.662	€ 8.514.662	€ 8.514.662
belastingen		€ 2.894.133	€ 2.894.133	€ 2.894.133	€ 2.894.133	€ 2.894.133	€ 2.894.133	€ 2.894.133	€ 2.894.133	€ 2.894.133	€ 2.894.133
winst na belastingen		€ 5.684.001	€ 5.684.001	€ 5.684.001	€ 5.684.001	€ 5.684.001	€ 5.684.001	€ 5.684.001	€ 5.684.001	€ 5.684.001	€ 5.684.001
verdisconteerde jaarlijkse netto winst	€ -634.730	€ 4.942.609,66	€ 4.297.921,45	€ 3.737.323,00	€ 3.249.846,08	€ 2.825.953,12	€ 2.457.350,54	€ 2.136.826,55	€ 1.858.110,05	€ 1.615.747,87	€ 1.404.998,14

BIJLAGE 7

materiaalkosten

siliciumwafer	€ 75
aantal chips per wafer	10
aantal wafers op jaarbasis	954
waferprijs per jaar	€ 71.550

diamantpoeder	€ 1.000
aantal chips per portie	3000
diamantporties op jaarbasis	3,18
diamantpoeder prijs per jaar	€ 3.180,00

UV lamp	€ 10,84
levensduur in uren	300
levensduur in dagen	12,5
UV lampen per jaar	29,2
UV kost per jaar	€ 316,53

vetzuren	€ 11,20
aantal chips per portie	20000
vetzuren per jaar	0,477
vetzuren kost per jaar	€ 5,34

waterstofgas	€ 180
verbruik (sccm per min)	500
inhoud fles (sccm)	10000000
levensduur fles in minuten	20000
levensduur fles in dagen	14
waterstof flessen per jaar	26
waterstof kost per jaar	€ 4.730

methaangas	€ 1.259
verbruik (sccm per min)	12,50
inhoud fles (sccm)	10000000,00
levensduur fles in minuten	800000,00
levensduur fles in dagen	555,56
methaan flessen per jaar	0,657
methaan kost per jaar	€ 827,16

TOTALE MATERIAALKOSTEN	€ 80.609,43
-------------------------------	--------------------

bewerkingskosten

aankoppeling	€ 3.816,00
wasvloeistoffen	€ 381,60
extractie patiënten DNA	€ 40.068,00
PCR	€ 181.260,00
amplificatie	€ 774.171,00
wasvloeistoffen	€ 138.330,00
werkingskost per run	€ 21.200,00
TOTAAL	€ 1.159.226,60

BIJLAGE 8

NETTO CONTANTE WAARDE												
vennootschapsbelasting	34%											
discontovoet	15%											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
installatiekosten	€ -634.730											
onderhoudskosten		€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737
materiaalkosten		€ 80.609,43	€ 80.609,43	€ 80.609,43	€ 80.609,43	€ 80.609,43	€ 80.609,43	€ 80.609,43	€ 80.609,43	€ 80.609,43	€ 80.609,43	€ 80.609,43
bewerkingskosten		€ 1.159.226,60	€ 1.159.226,60	€ 1.159.226,60	€ 1.159.226,60	€ 1.159.226,60	€ 1.159.226,60	€ 1.159.226,60	€ 1.159.226,60	€ 1.159.226,60	€ 1.159.226,60	€ 1.159.226,60
totale uitgaande kasstroom		€ 1.271.572,53	€ 1.271.572,53	€ 1.271.572,53	€ 1.271.572,53	€ 1.271.572,53	€ 1.271.572,53	€ 1.271.572,53	€ 1.271.572,53	€ 1.271.572,53	€ 1.271.572,53	€ 1.271.572,53
afschrijvingen installaties		€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00
vermeden kosten		€ 2.098.800,00	€ 2.098.800,00	€ 2.098.800,00	€ 2.098.800,00	€ 2.098.800,00	€ 2.098.800,00	€ 2.098.800,00	€ 2.098.800,00	€ 2.098.800,00	€ 2.098.800,00	€ 2.098.800,00
totale inkomende kasstroom		€ 2.098.800,00	€ 2.098.800,00	€ 2.098.800,00	€ 2.098.800,00	€ 2.098.800,00	€ 2.098.800,00	€ 2.098.800,00	€ 2.098.800,00	€ 2.098.800,00	€ 2.098.800,00	€ 2.098.800,00
Netto jaarlijkse kasstroom	€ -634.730	€ 827.227,47	€ 827.227,47	€ 827.227,47	€ 827.227,47	€ 827.227,47	€ 827.227,47	€ 827.227,47	€ 827.227,47	€ 827.227,47	€ 827.227,47	€ 827.227,47
netto kasstroom na belastingen		€ 546.052,85	€ 546.052,85	€ 546.052,85	€ 546.052,85	€ 546.052,85	€ 546.052,85	€ 546.052,85	€ 546.052,85	€ 546.052,85	€ 546.052,85	€ 546.052,85
belastingsschild van afschrijvingen		€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47
verdisconteerde netto kasstroom		€ 493.588,98	€ 429.207,81	€ 373.224,18	€ 324.542,76	€ 282.211,10	€ 245.400,96	€ 213.392,14	€ 185.558,38	€ 161.355,11	€ 140.308,79	
NETTO CONTANTE WAARDE		€ 2.214.060,20										

BIJLAGE 9

NETTO CONTANTE WAARDE											
vennootschapsbelasting	34%										
discontovoet	15%										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
installatiekosten	€ -634.730										
onderhoudskosten		€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737
materiaalkosten		€ 22.795,30	€ 22.795,30	€ 22.795,30	€ 22.795,30	€ 22.795,30	€ 22.795,30	€ 22.795,30	€ 22.795,30	€ 22.795,30	€ 22.795,30
bewerkingskosten		€ 262.466,40	€ 262.466,40	€ 262.466,40	€ 262.466,40	€ 262.466,40	€ 262.466,40	€ 262.466,40	€ 262.466,40	€ 262.466,40	€ 262.466,40
totale uitgaande kasstroom		€ 316.998,20	€ 316.998,20	€ 316.998,20	€ 316.998,20	€ 316.998,20	€ 316.998,20	€ 316.998,20	€ 316.998,20	€ 316.998,20	€ 316.998,20
afschrijvingen installaties		€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00
vermeden kosten		€ 475.200,00	€ 475.200,00	€ 475.200,00	€ 475.200,00	€ 475.200,00	€ 475.200,00	€ 475.200,00	€ 475.200,00	€ 475.200,00	€ 475.200,00
totale inkomende kasstroom		€ 475.200,00	€ 475.200,00	€ 475.200,00	€ 475.200,00	€ 475.200,00	€ 475.200,00	€ 475.200,00	€ 475.200,00	€ 475.200,00	€ 475.200,00
Netto jaarlijkse kasstroom	€ -634.730	€ 158.201,80	€ 158.201,80	€ 158.201,80	€ 158.201,80	€ 158.201,80	€ 158.201,80	€ 158.201,80	€ 158.201,80	€ 158.201,80	€ 158.201,80
netto kasstroom na belastingen		€ 104.429,01	€ 104.429,01	€ 104.429,01	€ 104.429,01	€ 104.429,01	€ 104.429,01	€ 104.429,01	€ 104.429,01	€ 104.429,01	€ 104.429,01
belastingsschild van afschrijvingen		€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47
verdisconteerde netto kasstroom		€ 109.568,24	€ 95.276,73	€ 82.849,33	€ 72.042,90	€ 62.646,00	€ 54.474,78	€ 47.369,38	€ 41.190,76	€ 35.818,05	€ 31.146,13
NETTO CONTANTE WAARDE		-€ 2.347,69									

BIJLAGE 10

NETTO CONTANTE WAARDE												
vennootschapsbelasting	34%											
discontovoet	15%											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
installatiekosten	€ -634.730											
onderhoudskosten		€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737
materiaalkosten		€ 24.205,40	€ 24.205,40	€ 24.205,40	€ 24.205,40	€ 24.205,40	€ 24.205,40	€ 24.205,40	€ 24.205,40	€ 24.205,40	€ 24.205,40	€ 24.205,40
bewerkingskosten		€ 284.338,60	€ 284.338,60	€ 284.338,60	€ 284.338,60	€ 284.338,60	€ 284.338,60	€ 284.338,60	€ 284.338,60	€ 284.338,60	€ 284.338,60	€ 284.338,60
totale uitgaande kasstroom		€ 340.280,50	€ 340.280,50	€ 340.280,50	€ 340.280,50	€ 340.280,50	€ 340.280,50	€ 340.280,50	€ 340.280,50	€ 340.280,50	€ 340.280,50	€ 340.280,50
afschrijvingen installaties		€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00
vermeden kosten		€ 514.800,00	€ 514.800,00	€ 514.800,00	€ 514.800,00	€ 514.800,00	€ 514.800,00	€ 514.800,00	€ 514.800,00	€ 514.800,00	€ 514.800,00	€ 514.800,00
totale inkomende kasstroom		€ 514.800,00	€ 514.800,00	€ 514.800,00	€ 514.800,00	€ 514.800,00	€ 514.800,00	€ 514.800,00	€ 514.800,00	€ 514.800,00	€ 514.800,00	€ 514.800,00
Netto jaarlijkse kasstroom	€ -634.730	€ 174.519,50	€ 174.519,50	€ 174.519,50	€ 174.519,50	€ 174.519,50	€ 174.519,50	€ 174.519,50	€ 174.519,50	€ 174.519,50	€ 174.519,50	€ 174.519,50
netto kasstroom na belastingen		€ 115.200,32	€ 115.200,32	€ 115.200,32	€ 115.200,32	€ 115.200,32	€ 115.200,32	€ 115.200,32	€ 115.200,32	€ 115.200,32	€ 115.200,32	€ 115.200,32
belastingsschild van afschrijvingen		€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47
verdisconteerde netto kasstroom		€ 118.934,60	€ 103.421,39	€ 89.931,65	€ 78.201,43	€ 68.001,25	€ 59.131,52	€ 51.418,71	€ 44.711,92	€ 38.879,93	€ 33.808,64	
NETTO CONTANTE WAARDE		€ 51.711,04										

BIJLAGE 11**materiaalkosten**

siliciumwafer	€ 75
aantal chips per wafer	10
aantal wafers op jaarbasis	1062
waferprijs per jaar	€ 79.650

diamantpoeder	€ 1.000
aantal chips per portie	3000
diamantporties op jaarbasis	3,54
diamantpoeder prijs per jaar	€ 3.540,00

UV lamp	€ 10,84
levensduur in uren	300
levensduur in dagen	12,5
UV lampen per jaar	29,2
UV kost per jaar	€ 316,53

vetzuren	€ 11,20
aantal chips per portie	20000
vetzuren per jaar	0,531
vetzuren kost per jaar	€ 5,95

waterstofgas	€ 180
verbruik (sccm per min)	500
inhoud fles (sccm)	10000000
levensduur fles in minuten	20000
levensduur fles in dagen	14
waterstof flessen per jaar	26
waterstof kost per jaar	€ 4.730

methaangas	€ 1.259
verbruik (sccm per min)	12,50
inhoud fles (sccm)	10000000,00
levensduur fles in minuten	800000,00
levensduur fles in dagen	555,56
methaan flessen per jaar	0,657
methaan kost per jaar	€ 827,16

TOTALE MATERIAALKOSTEN	€ 89.070,04
-----------------------------------	--------------------

BIJLAGE 12

NETTO CONTANTE WAARDE												
vennootschapsbelasting	34%											
discontovoet	15%											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
installatiekosten	€ -634.730											
onderhoudskosten		€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737
materiaalkosten		€ 89.070,04	€ 89.070,04	€ 89.070,04	€ 89.070,04	€ 89.070,04	€ 89.070,04	€ 89.070,04	€ 89.070,04	€ 89.070,04	€ 89.070,04	€ 89.070,04
bewerkingskosten		€ 1.290.459,80	€ 1.290.459,80	€ 1.290.459,80	€ 1.290.459,80	€ 1.290.459,80	€ 1.290.459,80	€ 1.290.459,80	€ 1.290.459,80	€ 1.290.459,80	€ 1.290.459,80	€ 1.290.459,80
totale uitgaande kasstroom		€ 1.411.266,34	€ 1.411.266,34	€ 1.411.266,34	€ 1.411.266,34	€ 1.411.266,34	€ 1.411.266,34	€ 1.411.266,34	€ 1.411.266,34	€ 1.411.266,34	€ 1.411.266,34	€ 1.411.266,34
afschrijvingen installaties		€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00
vermeden kosten		€ 21.176.280,00	€ 21.176.280,00	€ 21.176.280,00	€ 21.176.280,00	€ 21.176.280,00	€ 21.176.280,00	€ 21.176.280,00	€ 21.176.280,00	€ 21.176.280,00	€ 21.176.280,00	€ 21.176.280,00
totale inkomende kasstroom		€ 21.176.280,00	€ 21.176.280,00	€ 21.176.280,00	€ 21.176.280,00	€ 21.176.280,00	€ 21.176.280,00	€ 21.176.280,00	€ 21.176.280,00	€ 21.176.280,00	€ 21.176.280,00	€ 21.176.280,00
Netto jaarlijkse kasstroom	€ -634.730	€ 19.765.013,66	€ 19.765.013,66	€ 19.765.013,66	€ 19.765.013,66	€ 19.765.013,66	€ 19.765.013,66	€ 19.765.013,66	€ 19.765.013,66	€ 19.765.013,66	€ 19.765.013,66	€ 19.765.013,66
netto kasstroom na belastingen		€ 13.046.885,52	€ 13.046.885,52	€ 13.046.885,52	€ 13.046.885,52	€ 13.046.885,52	€ 13.046.885,52	€ 13.046.885,52	€ 13.046.885,52	€ 13.046.885,52	€ 13.046.885,52	€ 13.046.885,52
belastingsschild van afschrijvingen		€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47
verdisconteerde netto kasstroom		€ 11.363.878,25	€ 9.881.633,26	€ 8.592.724,58	€ 7.471.934,41	€ 6.497.334,27	€ 5.649.855,89	€ 4.912.918,17	€ 4.272.102,75	€ 3.714.871,96	€ 3.230.323,44	
NETTO CONTANTE WAARDE		€ 64.952.846,99										

BIJLAGE 13

materiaalkosten

siliciumwafer	€ 75
aantal chips per wafer	10
aantal wafers op jaarbasis	18
waferprijs per jaar	€ 1.350

UV lamp	€ 10,84
levensduur in uren	300
levensduur in dagen	12,5
UV lampen per jaar	29,2
UV kost per jaar	€ 316,53

waterstofgas	€ 180
verbruik (sccm per min)	500
inhoud fles (sccm)	10000000
levensduur fles in minuten	20000
levensduur fles in dagen	14
waterstof flessen per jaar	26
waterstof kost per jaar	€ 4.730

diamantpoeder	€ 1.000
aantal chips per portie	3000
diamantporties op jaarbasis	0,06
diamantpoeder prijs per jaar	€ 60,00

vetzuren	€ 11,20
aantal chips per portie	20000
vetzuren per jaar	0,009
vetzuren kost per jaar	€ 0,10

methaangas	€ 1.259
verbruik (sccm per min)	12,50
inhoud fles (sccm)	10000000,00
levensduur fles in minuten	800000,00
levensduur fles in dagen	555,56
methaan flessen per jaar	0,657
methaan kost per jaar	€ 827,16

TOTALE MATERIAALKOSTEN	€ 7.284,19
-----------------------------------	-------------------

BIJLAGE 14

NETTO CONTANTE WAARDE											
vennootschapsbelasting	34%										
discontovoet	15%										
	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
installatiekosten	€ -634.730										
onderhoudskosten		€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737
materiaalkosten		€ 7.284,19	€ 7.284,19	€ 7.284,19	€ 7.284,19	€ 7.284,19	€ 7.284,19	€ 7.284,19	€ 7.284,19	€ 7.284,19	€ 7.284,19
bewerkingskosten		€ 21.872,20	€ 21.872,20	€ 21.872,20	€ 21.872,20	€ 21.872,20	€ 21.872,20	€ 21.872,20	€ 21.872,20	€ 21.872,20	€ 21.872,20
totale uitgaande kasstroom		€ 60.892,89	€ 60.892,89	€ 60.892,89	€ 60.892,89	€ 60.892,89	€ 60.892,89	€ 60.892,89	€ 60.892,89	€ 60.892,89	€ 60.892,89
afschrijvingen installaties		€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00
vermeden kosten		€ 358.920,00	€ 358.920,00	€ 358.920,00	€ 358.920,00	€ 358.920,00	€ 358.920,00	€ 358.920,00	€ 358.920,00	€ 358.920,00	€ 358.920,00
totale inkomende kasstroom		€ 358.920,00	€ 358.920,00	€ 358.920,00	€ 358.920,00	€ 358.920,00	€ 358.920,00	€ 358.920,00	€ 358.920,00	€ 358.920,00	€ 358.920,00
Netto jaarlijkse kasstroom	€ -634.730	€ 298.027,11	€ 298.027,11	€ 298.027,11	€ 298.027,11	€ 298.027,11	€ 298.027,11	€ 298.027,11	€ 298.027,11	€ 298.027,11	€ 298.027,11
netto kasstroom na belastingen		€ 196.727,69	€ 196.727,69	€ 196.727,69	€ 196.727,69	€ 196.727,69	€ 196.727,69	€ 196.727,69	€ 196.727,69	€ 196.727,69	€ 196.727,69
belastingsschild van afschrijvingen		€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47
verdisconteerde netto kasstroom		€ 189.827,97	€ 165.067,80	€ 143.537,22	€ 124.814,97	€ 108.534,76	€ 94.378,05	€ 82.067,87	€ 71.363,37	€ 62.055,10	€ 53.960,96
NETTO CONTANTE WAARDE		€ 460.878,07									

BIJLAGE 15

NETTO CONTANTE WAARDE												
vennootschapsbelasting	34%											
discontovoet	15%											
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
installatiekosten	€ -634.730											
onderhoudskosten		€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737	€ 31.737
materiaalkosten		€ 6.704,48	€ 6.704,48	€ 6.704,48	€ 6.704,48	€ 6.704,48	€ 6.704,48	€ 6.704,48	€ 6.704,48	€ 6.704,48	€ 6.704,48	€ 6.704,48
bewerkingskosten		€ 12.880,30	€ 12.880,30	€ 12.880,30	€ 12.880,30	€ 12.880,30	€ 12.880,30	€ 12.880,30	€ 12.880,30	€ 12.880,30	€ 12.880,30	€ 12.880,30
totale uitgaande kasstroom		€ 51.321,28	€ 51.321,28	€ 51.321,28	€ 51.321,28	€ 51.321,28	€ 51.321,28	€ 51.321,28	€ 51.321,28	€ 51.321,28	€ 51.321,28	€ 51.321,28
afschrijvingen installaties		€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00	€ 63.473,00
vermeden kosten		€ 211.364,00	€ 211.364,00	€ 211.364,00	€ 211.364,00	€ 211.364,00	€ 211.364,00	€ 211.364,00	€ 211.364,00	€ 211.364,00	€ 211.364,00	€ 211.364,00
totale inkomende kasstroom		€ 211.364,00	€ 211.364,00	€ 211.364,00	€ 211.364,00	€ 211.364,00	€ 211.364,00	€ 211.364,00	€ 211.364,00	€ 211.364,00	€ 211.364,00	€ 211.364,00
Netto jaarlijkse kasstroom	€ -634.730	€ 160.042,72	€ 160.042,72	€ 160.042,72	€ 160.042,72	€ 160.042,72	€ 160.042,72	€ 160.042,72	€ 160.042,72	€ 160.042,72	€ 160.042,72	€ 160.042,72
netto kasstroom na belastingen		€ 105.644,20	€ 105.644,20	€ 105.644,20	€ 105.644,20	€ 105.644,20	€ 105.644,20	€ 105.644,20	€ 105.644,20	€ 105.644,20	€ 105.644,20	€ 105.644,20
belastingsschild van afschrijvingen		€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47	€ 21.574,47
verdisconteerde netto kasstroom		€ 110.624,93	€ 96.195,59	€ 83.648,34	€ 72.737,69	€ 63.250,16	€ 55.000,14	€ 47.826,21	€ 41.588,01	€ 36.163,49	€ 31.446,51	
NETTO CONTANTE WAARDE		€ 3.751,08										

Auteursrechtelijke overeenkomst

Ik/wij verlenen het wereldwijde auteursrecht voor de ingediende eindverhandeling:

Evaluatie van het valorizatiepotentieel van diamant gebaseerde multifunctionele nanolagen als 'smart biosurface' voor medische toepassingen

Richting: **master in de toegepaste economische wetenschappen: handelsingenieur-technologie-, innovatie- en milieumanagement**

Jaar: **2013**

in alle mogelijke mediaformaten, - bestaande en in de toekomst te ontwikkelen - , aan de Universiteit Hasselt.

Niet tegenstaand deze toekenning van het auteursrecht aan de Universiteit Hasselt behoud ik als auteur het recht om de eindverhandeling, - in zijn geheel of gedeeltelijk -, vrij te reproduceren, (her)publiceren of distribueren zonder de toelating te moeten verkrijgen van de Universiteit Hasselt.

Ik bevestig dat de eindverhandeling mijn origineel werk is, en dat ik het recht heb om de rechten te verlenen die in deze overeenkomst worden beschreven. Ik verklaar tevens dat de eindverhandeling, naar mijn weten, het auteursrecht van anderen niet overtreedt.

Ik verklaar tevens dat ik voor het materiaal in de eindverhandeling dat beschermd wordt door het auteursrecht, de nodige toelatingen heb verkregen zodat ik deze ook aan de Universiteit Hasselt kan overdragen en dat dit duidelijk in de tekst en inhoud van de eindverhandeling werd genotificeerd.

Universiteit Hasselt zal mij als auteur(s) van de eindverhandeling identificeren en zal geen wijzigingen aanbrengen aan de eindverhandeling, uitgezonderd deze toegelaten door deze overeenkomst.

Voor akkoord,

Kupers, Anke