dr Jolanta Kochana
Uniwersytet Jagielloński
Wydział Chemii
Zakład Chemii Analitycznej

ZAŁĄCZNIK 2

Autoreferat

I. Imię i nazwisko: Jolanta Kochana

II. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

Doktor nauk chemicznych – 2000 r., Uniwersytet Jagielloński, Wydział Chemii, rozprawa doktorska pt *„Modelowanie matematyczne procesów do celów kalibracji i optymalizacji metod miareczkowych"*, promotor: prof. dr hab. Andrzej Parczewski

III. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu

1989-1990	staż przeddoktorancki w Zakładzie Chemii Analitycznej, Wydział Chemii UJ
1990-1994	Środowiskowe Studia Doktoranckie na Wydziale Chemii UJ
1994-2003	asystent w Zakładzie Chemii Analitycznej, Wydział Chemii UJ
od 10.2003	adiunkt w Zakładzie Chemii Analitycznej, Wydział Chemii UJ

IV. Osiągnięcia wynikające z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz.U. nr 65, poz.595 ze zm.)

Osiągnięcie naukowe zgłoszone do postępowania habilitacyjnego stanowi cykl ośmiu publikacji, poniżej wymienionych, które zostały opublikowane w latach 2008-2012. Prace te, ujęte tytułem **"Nowe enzymatyczne czujniki elektrochemiczne w analizie środowiskowej i analizie żywności"**, posiadają sumaryczny współczynnik oddziaływania (Impact Factor) 18,349 oraz punktację MNiSW 208. Średnia wartość Impact Factor w przeliczeniu na jedną pracę wynosi 2,29.

[H1] **J. Kochana***, A. Gala, A. Parczewski, J. Adamski*, Titania sol - gel - derived tyrosinase - based amperometric biosensor for determination of phenolic compounds in water samples. Examination of interference effects*, Analytical and Bioanalytical Chemistry 391 (2008) 1275-1281.
[IF = 3,778; MNiSW = 32][1]

[H2] **J. Kochana***, P. Nowak, A. Jarosz-Wilkolazka, M. Bieroń, *Tyrosinase/laccase bienzyme biosensor for amperometric determination of phenolic compounds*, Microchemical Journal 89 (2008) 171-174.
[IF = 3,048; MNiSW = 27]

[H3] **J. Kochana***, J. Adamski, A. Parczewski, *A critical view on the phenol index as a measure of phenol compounds content in waters. Application of a biosensor*, Ecological Chemistry and Engineering S 19/3 (2012) 383-391.
[IF = 0,423; MNiSW = 13]

[H4] J. Adamski*, **J. Kochana**, *Polypyrrole Layers Electrodeposited from TRIS Buffer Solution as Matrix of Tyrosinase Biosensor*, Acta Chimica Slovenica 55/3 (2008) 623-626.
[IF = 1,328; MNiSW = 27]

[H5] J. Adamski*, P. Nowak, **J. Kochana**, *Simple sensor for the determination of phenol and its derivatives in water based on enzyme tyrosinase*, Electrochimica Acta 55 (2010) 2363-2367.
[IF = 3,642; MNiSW = 32][1]

[H6] J. Adamski, **J. Kochana***, *Meldola's Blue - doped titania sol-gel sensor for NADH determination*, Central European Journal of Chemistry 9/1 (2011) 185-191.
[IF = 1,073; MNiSW = 20]

[H7] **J. Kochana***, J. Adamski, *Detection of NADH and ethanol at a graphite electrode modified with titania sol-gel/Meldola's Blue/MWCNT/Nafion nanocomposite film*, Central European Journal of Chemistry 10/1 (2012) 224-231.
[IF = 1,073; MNiSW = 20]

[H8] **J. Kochana***, J. Kozak, A. Skrobisz, M. Woźniakiewicz, *Tyrosinase biosensor for benzoic acid inhibition-based determination with the use of a flow-batch monosegmented sequential injection system*, Talanta 96 (2012) 147-152.
[IF = 3,794; MNiSW = 32]

[1] IF – wartość współczynnika oddziaływania czasopisma ogłoszona za rok 2011; MNiSW – punktacja czasopisma według Ministerstwa Nauki i Szkolnictwa Wyższego; * - autor do korespondencji.

Oryginalne prace twórcze stanowiące podstawę przewodu habilitacyjnego związane są z czujnikami. Czujnik (sensor), według definicji IUPAC, jest urządzeniem umożliwiającym przekształcenie informacji o chemicznym składzie analizowanej próbki, np. o stężeniu analitu, na sygnał użyteczny analitycznie [1]. Sensor składa się z dwóch zasadniczych części: receptora i przetwornika. Receptor, selektywnie oddziałując z analitem, przekształca informację chemiczną w pewną formę energii, która następnie jest konwertowana przez przetwornik w nieselektywny sygnał użyteczny analitycznie (np. elektryczny, optyczny). Działanie receptora może opierać się na zjawiskach fizycznych (np. absorbancja promieniowania, przewodnictwo), chemicznych reakcjach z udziałem analitu lub na oddziaływaniach biochemicznych, w przypadku gdy elementem receptora jest materiał biologicznie aktywny (enzym, kultury bakterii, tkanki biologiczne, przeciwciała, nić DNA lub RNA). Czujniki zawierające unieruchomione w części receptorowej bioelementy nazywa się bioczujnikami.

(Bio)czujniki, łącząc funkcjonalność i uniwersalność z różnorodnością konstrukcyjną, spełniają wymogi stawiane współczesnym metodom analitycznym. Z tego powodu jest to bardzo prężnie rozwijająca się dziedzina chemii analitycznej.

Idealny (bio)czujnik jest niewielkim, prostym do skonstruowania, stosunkowo tanim urządzeniem umożliwiającym oznaczanie analitu bezpośrednio w próbce (bez jej dodatkowego przygotowania). Charakteryzuje się dobrą selektywnością, przy czym bioczujniki wykazują na ogół lepszą selektywność w porównaniu z czujnikami chemicznymi oraz znacznie wyższą czułość. Ważnymi zaletami (bio)czujników są krótki czasy odpowiedzi, stabilność operacyjna i długoterminowa, możliwość miniaturyzacji i automatyzacji oraz prowadzenia pomiarów *in situ*. Istotną zaletą stosowania (bio)czujników jest także minimalizacja ilości próbki potrzebnej do analizy.

Zasadniczym celem przeprowadzonych badań było opracowanie nowych prostych (bio)czujników elektrochemicznych odpowiadających wymogom współczesnej analityki, w szczególności środowiskowej oraz analityki żywności. Ze względu na coraz ostrzejsze wymagania stawiane tego typu analizom, konieczne staje się opracowanie czujników charakteryzujących się wysoką czułością oraz niską granicą wykrywalności, umożliwiających selektywne oznaczenie analitu bezpośrednio w badanej próbce.

Założenie badań zostało zrealizowane poprzez konstrukcję elektrochemicznych czujników enzymatycznych przeznaczonych do oznaczania zanieczyszczeń wód środowiskowych oraz do analizy napojów spożywczych. Skonstruowano (bio)czujniki do oznaczania związków fenolowych w wodach środowiskowych **(I)**, czujnik pozwalający na wyznaczanie zawartości NADH (dinukleotydu nikotynoamido-adeninowego) **(II)**, bioczujnik przeznaczony do oznaczania etanolu w napojach alkoholowych **(III)** oraz kwasu benzoesowego **(IV)** w napojach niealkoholowych.

Opracowanie nowego bioczujnika wymaga starannego zaplanowania składu matrycy unieruchamiającej (immobilizującej) element biologiczny w warstwie receptorowej. Matryca powinna być nie tylko kompatybilna i zapewniać odpowiednie warunki do zachowania wysokiej aktywności unieruchomionego bioelementu, ale również umożliwiać dyfuzję analitu do powierzchni biosensora oraz produktów reakcji elektrodowej w głąb analizowanego roztworu. Z tego powodu, badania nad konstrukcją (bio)czujników rozpoczynano od wyboru matrycy oraz optymalizacji jej składu. W celu udoskonalenia parametrów analitycznych czujników, kompozyty matrycowe stopniowo wzbogacano o dodatkowe składniki, takie jak nanorurki węglowe, Nafion czy mediator redoksowy. Dla skonstruowanych czujników wyznaczono

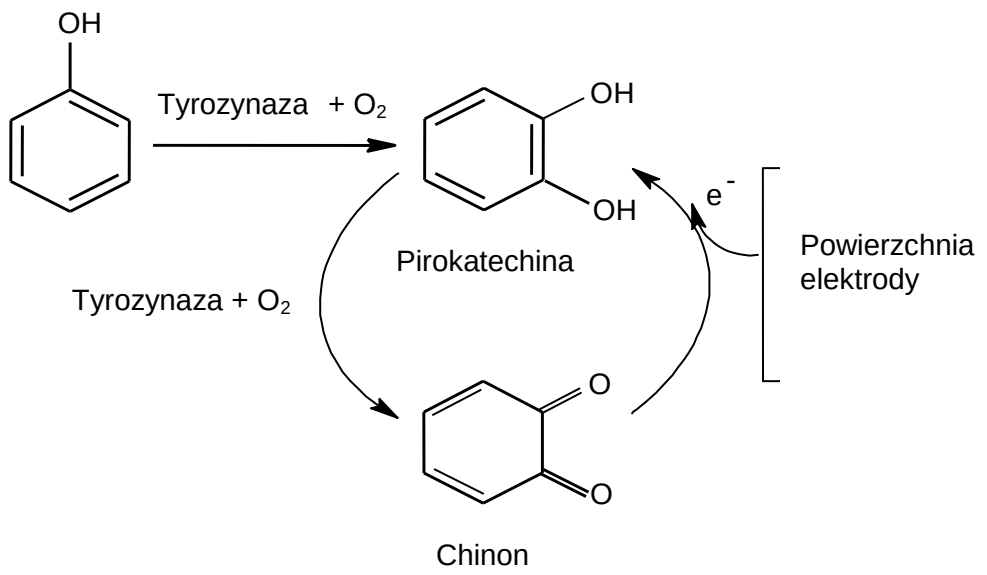
charakterystykę analityczną oraz badano potencjalne efekty interferencyjne pochodzące od matrycy próbki. W celu sprawdzenia funkcjonowania (bio)czujników oznaczano anality w próbkach rzeczywistych, materiale odniesienia lub prowadzono analizy w matrycach próbek rzeczywistych.

W niniejszym omówieniu pominęłam większość danych liczbowych, tabelki oraz rysunki. Można je znaleźć w załączonych publikacjach.

I. Nowe (bio)czujniki przeznaczone do oznaczania związków fenolowych

Związki fenolowe są często spotykanymi zanieczyszczeniami organicznymi wód powierzchniowych wprowadzanymi do środowiska głównie ze ściekami przemysłowymi (koksownie, gazownie, fabryki mas plastycznych i włókien syntetycznych, przemysł chemiczny oraz farmaceutyczny), oraz, w mniejszym stopniu, ze ściekami komunalnymi. Szkodliwe fenole należą do wysoce toksycznych, rakotwórczych oraz alergizujących substancji. Ich negatywny wpływ na organizmy żywe i środowisko zależy od ich stężenia, cech indywidualnych organizmu oraz dróg narażenia. Zgodnie z dyrektywą Komisji Europejskiej 76/464/EC za szczególnie szkodliwe dla środowiska naturalnego uznaje się siedem pochodnych fenolu (głównie chlorofenole), natomiast na liście Amerykańskiej Agencji Ochrony Środowiska (U.S. Environmental Protection Agency) znajduje się dwadzieścia jeden pochodnych fenolu (chloro-, metylo- oraz nitrofenole). Fenole w ilościach normalnie występujących w wodach nie są szkodliwe dla zdrowia, jednakże utrudniają proces uzdatniania wody. Zawierająca fenole woda uzdatniana związkami chlorowymi ma odrażający zapach i nieprzyjemny smak związany z obecnością chlorofenoli. Uniemożliwia to wykorzystanie jej do zasilania sieci wodociągowej, a usuwanie niekorzystnego zapachu i smaku stanowi duży problem w procesie uzdatniania wody.

Do oznaczania związków fenolowych zaproponowano kilka czujników elektrochemicznych bazujących głównie na tyrozynazie (oksydoreduktazie miedziowej). Tyrozynaza (EC 1.14.18.1) katalizuje hydroksylowanie monofenoli, a następnie utlenianie powstałych *o*-difenoli do *o*-chinonów [2]. Otrzymane *o*-chinony mogą redukować się na elektrodzie generując sygnał (natężenie prądu) umożliwiający elektrochemiczne oznaczanie związków fenolowych. Zasadę tego bioelektrochemicznego oznaczania związków fenolowych przedstawia rysunek 1.



Rys.1. Zasada elektrochemicznego oznaczania związków fenolowych z wykorzystaniem tyrozynazy

Spośród wielu możliwych sposobów immobilizacji do skonstruowania nowego amperometrycznego bioczujnika opartego na tyrozynazie **[H1]** wybrałam nanokompozyt zolowo-żelowy. Materiały zolowo-żelowe są atrakcyjnymi matrycami, ponieważ można je otrzymać w warunkach pokojowych, w związku z czym enzymy unieruchomione w takich matrycach zachowują swoją aktywność katalityczną [3]. W porównaniu z innymi matrycami cechują się wieloma zaletami, takimi jak immobilizacja dużej ilości biokomponentu, odporność chemiczna i termiczna, oraz prosty sposób przygotowania. Ponadto, podczas procesu typu zol-żel w strukturę zolu mogą łatwo wbudować się, poza elementami biologicznymi, również inne substancje, polepszające parametry czujników, np. mediatory redoksowe czy nanorurki węglowe. Najczęściej w konstrukcji bioczujników wykorzystywany jest zol krzemionkowy. Nie jest on jednak pozbawiony wad, takich jak kurczliwość i łamliwość [4], dlatego też poszukiwane są nowe matryce otrzymywane w procesie zol-żel.

Do immobilizacji enzymu tyrozynazy w konstruowanym biosensorze zastosowałam żel dwutlenku tytanu, otrzymany na drodze kwasowej hydrolizy izopropoksytytanianu. Optymalizacja konstrukcji bioczujnika oraz warunków pomiarowych obejmowała określenie masy unieruchamianego na elektrodzie enzymu, wyznaczenie pH elektrolitu podstawowego, potencjału elektrody roboczej oraz temperatury pomiaru. W stosunku do badanych związków fenolowych: katecholu, 4-krezolu, 4-chlorofenolu i 4-metylokatecholu, w optymalnych warunkach wyznaczono

parametry charakterystyki analitycznej, takie jak czułość, liniowość, granicę wykrywalności (LOD), powtarzalność, odtwarzalność, stabilność operacyjną oraz długoterminową. Ponieważ skonstruowany bioczujnik jest przeznaczony do analiz próbek wód środowiskowych, zbadałam wpływ potencjalnych interferentów na jego sygnał. Jako interferenty wybrałam jony obecne w wodach środowiskowych (Mg^{2+}, Ca^{2+}, HCO_3^-, Cl^-, SO_4^{2-}) oraz jon Cu^{2+}, dodawany (jako $CuSO_4$) na etapie przygotowania próbki wody do analizy. Eksperymenty przeprowadzono według ortogonalnego planu Placketta-Burmana [5]. Każdy z czynników występował na dwóch poziomach stężeń, z których wyższy odpowiadał (poza Cu^{2+}) maksymalnemu stężeniu interferenta w wodach II klasy czystości: Mg^{2+}: 8 i 40 mg/L (odpowiednio, dolny i górny poziom stężeń), Ca^{2+}: 30 i 155 mg/L, HCO_3^-: 100 i 800 mg/L, Cl^-: 100 i 300 mg/L oraz SO_4^{2-}: 50 i 200 mg/L [6]. W przypadku jonów Cu^{2+} niższy poziom oznaczał brak jonu w badanej matrycy, a wyższy odpowiadał ilości $CuSO_4$ koniecznej do utrwalenia próbki (260 mg/L). Stwierdzono, iż spośród badanych jonów obecność HCO_3^-, Cl^-, SO_4^{2-} oraz Cu^{2+} istotnie wpływa na sygnał biosensora, zarówno na poziomie istotności α = 0,01, jak i α = 0,05. Działanie biosensora sprawdzono oznaczając katechol w matrycach wody źródlanej oraz wód rzecznych, Wisły i Rudawy. Ze względu na stwierdzony efekt matrycy analizy prowadzono metodą dodatku wzorca. Opracowany bioczujnik charakteryzuje się bardzo wysoką czułością i niską granicą wykrywalności (w stosunku do katecholu, odpowiednio, $2 \cdot 10^3$ mA·L/mol i 0,09 μmol/L), dobrą powtarzalnością i odtwarzalnością, oraz dokładnością spełniającą wymogi analiz środowiskowych.

Ideą konstrukcji nowego amperometrycznego bioczujnika bienzymatycznego **[H2]** było stworzenie urządzenia do oznaczania jak najszerszej grupy związków fenolowych. Z tego powodu wykorzystano dwie oksydazy fenolowe różniące się specyficznością substratową: tyrozynazę i lakazę [7]. Badania były prowadzone na grupie fenoli, wśród których był związek fenolowy nie będący substratem tyrozynazy – 2,6-dimetoksyfenol, oraz związek fenolowy nie będący substratem lakazy – 4-tertbutylokatechol, co zostało sprawdzone na bioczujnikach monoenzymatycznych. W optymalnych warunkach pomiarowych wyznaczono charakterystyki analityczne (czułość, liniowość, granicę wykrywalności) w stosunku do wszystkich badanych związków fenolowych. Skonstruowany bioczujnik bienzymatyczny pozwala więc na oznaczanie szerszego spektrum analitów w stosunku do biosensora monoenzymatycznego. Ponadto charakteryzuje się dobrą czułością i niską granicą wykrywalności (w stosunku do katecholu, odpowiednio, 234 mA·L/mol i 0,13 μmol/L),

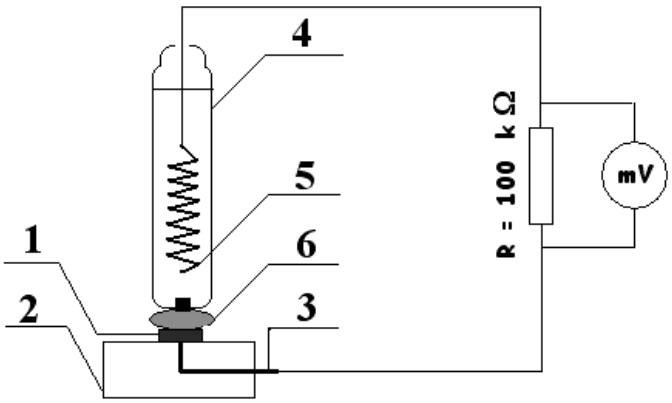
dobrą odtwarzalnością, oraz, dla niektórych związków fenolowych, szerszym zakresem liniowym w stosunku do biosensora monoenzymatycznego.

Opracowane biosensory były przeznaczone nie tylko do oznaczania poszczególnych związków fenolowych w wodach środowiskowych, ale też indeksu fenolowego – sumarycznego stężenia związków fenolowych reagujących jak fenol [6]. Celowe było podjęcie badań nad wpływem wzajemnym fenoli na indeks fenolowy **[H3]**. W badaniach uwzględniono związki fenolowe różniące się podstawnikami i ich położeniem w pierścieniu. Badania przeprowadzono według planów czynnikowych 2^4, 2^{4-1} oraz planu Placketta-Burmana. Wykazano, iż wpływ fenoli różniących się podstawnikami ($-OH^-$, $-Cl^-$ oraz $-CH_3$) oraz ich położeniem w stosunku do grupy hydroksylowej, na indeks fenolowy ma charakter addytywny. Zauważono rozbieżność pomiędzy wyznaczoną wartością indeksu fenolowego a sumaryczną zawartością związków fenolowych. Rozbieżność ta wynika z różnicy w czułości biosensora w stosunku do różnych fenoli oraz definicji indeksu fenolowego. Podobne zależności można zaobserwować podczas spektrofotometrycznego oznaczania indeksu fenolowego według Polskich Norm (PN-ISO 6439) [8].

Polimery przewodzące, m.in. polipirol, należą do materiałów przydatnych przy konstrukcji bioczujników ze względu na wysokie przewodnictwo elektryczne, niski potencjał jonizacji oraz dużą wartość powinowactwa elektrycznego [9]. Cechy te są związane z występowaniem w ich strukturze zdelokalizowanych elektronów typu π wzdłuż łańcucha sprzężonych wiązań podwójnych. Stabilne chemicznie warstwy polipirolu można otrzymać na drodze elektroosadzania kontrolując grubość warstwy poprzez pomiar przepływającego ładunku. W ramach badań nad konstrukcją bioczujnika sprawdzono możliwość zastosowania w procesie elektroosadzania nowego elektrolitu podstawowego, buforu TRIS (roztwór chlorowodorku tris-(hydroksymetylo)-aminometanu) oraz znaleziono najlepsze parametry elektropolimeryzacji: stężenie elektrolitu podstawowego i monomeru, temperaturę procesu elektroosadzania oraz potencjał polaryzacji elektrody roboczej **[H4]**. Oszacowana w oparciu o doświadczenia stosunkowo wysoka czułość bioczujnika bazującego na tyrozynazie unieruchomionej na drodze fizycznej adsorpcji na warstwie polipirolu stanowi punkt wyjścia do dalszych badań nad konstrukcją tego typu czujnika.

Do oznaczania związków fenolowych przeznaczony jest nowatorski czujnik elektrochemiczny, w którym enzym nie jest unieruchomiony na elektrodzie **[H5]**. Jest on zbudowany z elektrody roboczej - dysku z węgla szklistego (GC- glassy

carbon), oraz przeciwelektrody (pełniącej równocześnie funkcję elektrody odniesienia) - elektrody chlorosrebrowej o dużej powierzchni, której elektrolit wewnętrzny stanowi nasycony roztwór chlorku potasu. W szczelinie pomiędzy elektrodami umieszcza się porcję (100 μL) analizowanego roztworu zawierającego elektrolit podstawowy, roztwór enzymu oraz analit. Oznaczenie polega na pomiarze spadku potencjału, związanego z prądem redukcji produktów reakcji enzymatycznej, na szeregowo włączonym w układ pomiarowy oporniku (100 kΩ). Uzyskaną zależność $i = f(t)$ poddaje się numerycznemu całkowaniu, uzyskując ostatecznie wartość ładunku elektrycznego, który przepłynął przez obwód podczas pomiaru (600 s). Schemat układu pomiarowego przedstawia poniższy rysunek.



Rys. 2. Schemat układu pomiarowego do oznaczania związków fenolowych za pomocą prostego czujnika elektrochemicznego; 1 - dysk GC, 2 - płytka z poli(metakrylanu metylu), 3 - drut Cu, 4 - szklany korpus przecielektrody wypełniony nasyconym roztworem KCl, 5 - drut Ag pokryty warstwą AgCl, 6 - kropla analizowanego roztworu (100 μL)

W zoptymalizowanych warunkach pomiarowych, obejmujących stężenie roztworu tyrozynazy, pH elektrolitu podstawowego, potencjał elektrody roboczej oraz szerokość szczeliny pomiędzy elektrodami, wyznaczono parametry charakterystyki analitycznej w stosunku do grupy badanych związków fenolowych: katecholu, 4-metylokatecholu, 4-tertbutylokatecholu, fenolu, 4-chlorofenolu, 2-tertbutylofenolu, 3-krezolu oraz 4-krezolu. W oparciu o doświadczenia sprawdzające efekt matrycy, przeprowadzone według planu Placketta-Burmana, analogicznie jak w badaniach [H1] stwierdzono, iż na poziomie istotności α = 0.01 tylko Cu^{2+} (górny i dolny poziom stężenia w planie, odpowiednio 0 i 260 mg/L), a dla α = 0.05 dodatkowo jony Ca^{2+} (30 i155 mg/L), HCO_3^- (100 i 800 mg/L) oraz Cl^- (100 i 300 mg/L) istotnie wpływają na

sygnał czujnika. Działanie sensora testowano oznaczając (metodą dodatku wzorca) indeks fenolowy w wodzie wodociągowej oraz badając odzysk w tej matrycy. Zaproponowany czujnik cechuje bardzo niska granica wykrywalności wynosząca dla katecholu 16,5 nmol/L oraz czułość rzędu 120 - 250 C·L/mol dla różnych związków fenolowych. Ponadto czujnik charakteryzuje się prostą i uniwersalną konstrukcją, pozwalającą na eliminację problemu zatrucia powierzchni elektrody produktami reakcji enzymatycznej oraz wymywania enzymu z kompozytu immobilizującego.

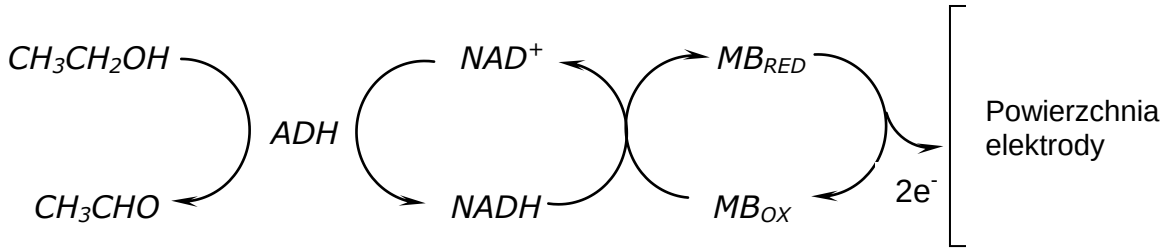
II. Czujnik przeznaczony do oznaczania NADH

Dinukleotyd nikotynoamidoadeninowy (NAD^+) jest kofaktorem około 300 dehydrogenaz [10]. Zasada działania nowego amperometrycznego sensora do oznaczania NADH **[H6]**, opiera się na rejestracji prądu utleniania NADH w obecności mediatora redoksowego, błękitu Meldola. Modyfikacja elektrody mediatorem unieruchomionym na elektrodzie za pomocą zolu dwutlenku tytanu miała na celu obniżenie potencjału utleniania NADH, który, w przypadku stosowania konwencjonalnych elektrod (platynowej, węglowej czy złotej), wymaga wysokiego nadpotencjału, nawet powyżej 1 V [11]. Stosowanie tak wysokich potencjałów pomiarowych stwarza potencjalne możliwości utleniania innych elektroaktywnych składników analizowanych próbek.

W optymalizacji konstrukcji czujnika i warunków prowadzenia pomiaru uwzględniono pH elektrolitu podstawowego, potencjał elektrody roboczej oraz stężenie mediatora w zolu tytanowym. Wyznaczono charakterystykę analityczną sensora: czułość, liniowość, granicę wykrywalności, odtwarzalność, powtarzalność oraz stabilność operacyjną. Zbadano również wpływ potencjalnych interferentów (glukozy, kwasu askorbinowego oraz acetonu) na sygnał czujnika. Opracowany czujnik umożliwia oznaczanie kofaktora NADH z wysoką czułością (12,5 mA·L/mol), w szerokim zakresie stężeń (90-2300 μmol/L), z dobrą powtarzalności i odtwarzalnością oraz, przede wszystkim, przy niskim potencjale elektrody roboczej (-50 mV), co znacznie ogranicza możliwość interferencji składników matrycy próbki w przypadku analizy próbek rzeczywistych.

III. Bioczujnik przeznaczony do oznaczania etanolu w napojach

Skonstruowany biosensor do oznaczania etanolu w napojach alkoholowych **[H7]** opiera się na dehydrogenazie alkoholowej, ADH, która w obecności kofaktora, NAD^+, katalizuje reakcję utleniania alkoholu do aldehydu. Zasada oznaczenia opiera się na detekcji NADH powstałego w wyniku enzymatycznego utleniania etanolu. Punktem startowym badań był opracowany wcześniej czujnik do oznaczania NADH [H6]. W nowym bioczujniku dehydrogenaza alkoholowa była unieruchamiana w żelu dwutlenku tytanu modyfikowanym mediatorem redoksowym - błękitem Meldola, wielościennymi nanorurkami węglowymi (MWCNTs) oraz Nafionem. Na poniższym rysunku przedstawiono zasadę tego bioelektrochemicznego oznaczania etanolu.



Rys. 3. Zasada elektrochemicznego oznaczania etanolu z wykorzystaniem dehydrogenazy alkoholowej (ADH) za pomocą elektrody modyfikowanej mediatorem redoksowym, błękitem Meldola (MB)

Nanorurki węglowe (multiwall carbon nanotubes, MWCNTs) dzięki swoim wyjątkowym właściwościom, takim jak doskonałe przewodnictwo elektryczne, duża powierzchnia właściwa oraz odporność chemiczna i mechaniczna, są stosunkowo szeroko wykorzystywanym składnikiem matryc immobilizujących bioczujników [12]. Nafion jest syntetycznym kopolimerem Teflonu i pochodnej kwasu sulfonowego, który dzięki swojej biokompatybilności, zdolności do rozpraszania nanorurek węglowych (wykazują tendencję do agregacji w roztworach) oraz ograniczania wymywania enzymu z matrycy jest wykorzystywany w konstrukcji czujników do modyfikowania powierzchni elektrody [13,14].

W ramach badań nad konstrukcją bioczujnika najpierw wybrano najlepsze parametry konstrukcyjne sensora do oznaczania NADH. W tym celu wyznaczono optymalną ilość MWCNTs przypadającą na elektrodę oraz stosunki objętościowe zolu

tytanowego do Nafionu w matrycy immobilizującej. Dla tak skonstruowanego czujnika wyznaczono czułość sygnału w stosunku do NADH, zakres liniowy pracy czujnika oraz granicę wykrywalności. Modyfikacja elektrody za pomocą MWCNTs i Nafionu znacznie polepszyła charakterystykę analityczną czujnika w porównaniu z wcześniej opracowanym [H6]. Następnie, w celu opracowania konstrukcji bioczujnika do oznaczania etanolu wyznaczono najkorzystniejszą ilość enzymu przypadającą na elektrodę, pH elektrolitu podstawowego, potencjał elektrody roboczej oraz temperaturę pomiaru. W optymalnych warunkach wyznaczono charakterystykę analityczną biosensora (czułość, liniowość, granicę wykrywalności, powtarzalność, odtwarzalność oraz stabilność operacyjną). Pracę bioczujnika sprawdzono oznaczając analit w rzeczywistych próbkach napojów alkoholowych: winie, likierze i wódce. Opracowany biosensor umożliwia oznaczanie etanolu z wysoką czułością 2,24 mA·L/mol, oraz w szerokim zakresie stężeń 0,05-1,1 mmol/L (napoje alkoholowe muszą być przed analizą odpowiednio rozcieńczone).

IV. Bioczujnik przeznaczony do oznaczania kwasu benzoesowego

Kwas benzoesowy (E210) jest konserwantem żywności (napojów gazowanych, przetworów owocowych, warzywnych), kosmetyków oraz leków zapobiegającym ich mikrobiologicznemu, enzymatycznemu i chemicznemu rozkładowi [15]. Zastosowanie konserwantu w wyższym niż dopuszczalne stężenie, może nie tylko obniżać wartość smakową żywności, ale również działać szkodliwie na organizmy żywe. Monitorowanie zawartości kwasu benzoesowego jest więc istotne z punktu widzenia nie tylko jakości produktu, ale i jego bezpiecznego stosowania.

Zasada działania amperometrycznego biosensora **[H8]** do oznaczania kwasu benzoesowego w napojach opiera się na inhibicji aktywności katalitycznej tyrozynazy pod wpływem kwasu benzoesowego: po dodaniu porcji analitu obserwuje się spadek sygnału bioczujnika proporcjonalny do stężenia kwasu benzoesowego.

W skonstruowanym nowym bioczujniku tyrozynaza była unieruchomiona w żelu dwutlenku tytanu zmodyfikowanym wielościennymi nanorurkami węglowymi oraz Nafionem. Badania podjęte nad konstrukcją bioczujnika objęły wybór najlepszych warunków pomiarowych: potencjału elektrody roboczej, temperatury pomiaru oraz stężenia substratu tyrozynazy – katecholu. Dla opracowanego bioczujnika wyznaczono charakterystykę analityczną (czułość, liniowość, granicę wykrywalności, powtarzalność,

odtwarzalność oraz stabilność operacyjną), a jego działanie sprawdzono analizując próbki syntetyczne, materiał referencyjny (cola drink) oraz próbkę rzeczywistą napoju. Oznaczenia były prowadzone z wykorzystaniem układu wstrzykowo-sekwencyjnego z monosegmentowaniem strumienia. Skonstruowany bioczujnik charakteryzuje się wysoką czułością 1,06 A·L/mol oraz niską granicą wykrywalności 0,03 μmol/L.

Z prezentowaną tematyką związana jest przygotowywana publikacja J. Adamski, J. Kochana, P. Nowak, A. Parczewski *„On the electrochemical biosensing of phenolic compounds in wines"* przedstawiająca zastosowanie nowatorskiego czujnika elektrochemicznego opartego na tyrozynazie do oznaczania związków fenolowych w winach.

Reasumując, do najważniejszych osiągnięć i elementów nowości naukowej wynikających z przeprowadzonych badań, w których uczestniczyłam odgrywając w nich znaczącą lub wiodąca rolę, zaliczam:

- ✓ konstrukcję i opracowanie nowych amperometrycznych biosensorów enzymatycznych oraz nowatorskiego enzymatycznego czujnika elektrochemicznego, bazujących na oksydazach fenolowych, umożliwiających oznaczanie szeregu związków fenolowych na poziomach stężeń odpowiadających wymogom analizy środowiskowej (0,1 μmol/L),
- ✓ wykazanie możliwości wykorzystania skonstruowanych (bio)sensorów do oznaczania indeksu fenolowego wód środowiskowych,
- ✓ konstrukcję i opracowanie nowego amperometrycznego czujnika umożliwiającego, dzięki zastosowaniu mediatora redoksowego, oznaczanie NADH przy niskim potencjale elektrody roboczej (-50mV),
- ✓ konstrukcję i opracowanie nowego bioczujnika opartego na dehydrogenazie alkoholowej, unieruchamianej w żelu dwutlenku tytanu modyfikowanym nanorurkami węglowymi oraz Nafionem, do oznaczania etanolu w napojach alkoholowych,
- ✓ konstrukcję i opracowanie nowego bioczujnika opartego na inhibicji aktywności katalitycznej tyrozynazy, immobilizowanej w matrycy żelu dwutlenku tytanu modyfikowanym nanorurkami węglowymi oraz Nafionem, przeznaczonego do oznaczania kwasu benzoesowego w napojach bezalkoholowych.

Opracowane nowe czujniki amperometryczne oparte na tyrozynazie unieruchamianej w żelu dwutlenku tytanu oraz nowatorski czujnik elektrochemiczny, w którym enzym nie był immobilizowany na elektrodzie roboczej, charakteryzują się dobrymi parametrami analitycznymi, pod względem czułości oraz granicy wykrywalności przewyższają one część biosensorów opisanych w literaturze, w niektórych przypadkach nawet o kilka rzędów wielkości. Najmniej korzystnym parametrem bioczujników wykorzystujących matryce żelu dwutlenku tytanu jest ich stosunkowo słaba stabilność długoterminowa, po 2-3 tygodniach przechowywania tracą one 40-50% swojej początkowej aktywności. Może to być związane zarówno z wymywaniem enzymu z warstwy unieruchamiającej, jak również z przebiegiem procesu jego denaturacji. Nie umniejsza to jednak ich przydatności, a to z powodu łatwego przygotowania sensorów. Zarówno nowe bioczujniki jak i czujnik enzymatyczny umożliwiają oznaczanie analitów w próbkach rzeczywistych z precyzją i dokładnością spełniającą wymogi analizy środowiskowej i analizy żywności. Po przeprowadzeniu badań związanych z przygotowaniem próbki oraz z ewentualnymi efektami matrycy, zaproponowane czujniki mogą być zaadoptowane do analizy innych typów próbek, przykładowo, do oznaczania związków fenolowych w ściekach, wyznaczania zawartości etanolu w próbach biologicznych (krwi, ślinie), oznaczania kwasu benzoesowego w kosmetykach czy środkach farmaceutycznych. Czujnik przeznaczony do oznaczania NADH może być wykorzystany w konstrukcji wielu bioczujników opartych na dehydrogenazach wymagających dinukleotydu nikotynoamidoadeninowego jako kofaktora. Bioczujnik przeznaczony do oznaczania alkoholu może być przystosowany do analizy procesowej, przykładowo do badania procesów fermentacji alkoholowej.

Zaproponowane (bio)czujniki stanowią punkt wyjścia do opracowania nowych tanich urządzeń tego typu bazujących na sprawdzonych konstrukcjach oraz do rozwijania nowych metod analitycznych. Podkreślić należy, iż zaproponowana detekcja elektrochemiczna zaliczana jest do metod szybkich, tanich oraz charakteryzujących się wysoką czułością.

Obecnie, we współpracy z innymi ośrodkami naukowymi, kontynuuję badania związane z czujnikami elektrochemicznymi. Prowadzę badania nad opracowaniem sensora pojemnościowego opartego na zjawisku elektrostrykcji samoorganizujących się monowarstw tiolowych osadzonych na elektrodach złotych. Moje prace ukierunkowane są również na sprawdzenie możliwości wykorzystania nanoprętów polipirolu jako matrycy unieruchamiającej w bioczujnikach.

W przyszłości swoją działalność naukową wiążę z (bio)czujnikami. Planuję dalsze prace nad opracowaniem sensora pojemnościowego. Moje badania będą również ukierunkowane na poszukiwanie nowych materiałów nanokompozytowych, które mogą być wykorzystane jako matryce w biosensorach.

Bibliografia

[1] A. Hulanicki, S. Głąb, F. Ingman, *Pure Appl. Chem.* 63 (1991) 1247-1250.

[2] N. Duran, M.A. Rosa, A. D'Annibale, L. Gianfreda, *Enzyme Mikrob. Technol.* 31 (2003) 907-931.

[3] J. Wang, *Anal. Chim. Acta* 399 (1999) 21–27.

[4] J. Yu, H. Ju, *Anal. Chim. Acta* 486 (2003) 209–216.

[5] R.J. Plackett, J. P. Burman, *Biometrica* 33 (1946) 305-325.

[6] W. Hermanowicz, *Fizykochemiczne metody badanie wody i ścieków*, Arkady Warszawa, 1999.

[7] J. Kulys, R. Vidziunaite, *Biosens. Bioelectron.* 18 (2003) 319-325.

[8] M.B. Ettinger, C.C. Ruchhoft, R. Lishka, *Anal Chem.* 23/12 (1951)1783-1788.

[9] B.D. Malhorta, A. Chaubey, S.P. Singh, *Anal. Chim. Acta* 578(2006) 59-74.

[10] L. Zhu, J. Zhai, R. Yang, Ch. Tian, L. Guo, *Biosens. Bioelectron.* 22 (2007) 2768-2773.

[11] C.R. Raj, S.Behera, *Biosens. Bioelectron.* 21 (2005) 949-956.

[12] P. Yanez-Sedeno, J. Riu, J.M. Pingarron, F.X. Rius, *Trends Anal. Chem.* 29 (2010) 939–953.

[13] O. Demkiv, O. Smutok, S. Paryzhak, G. Gayda, Y. Sultanov, D. Guschin, H. Shkil, W. Schuhman, M. Gonchar, *Talanta* 76 (2008) 837–846.

[14] Ch. Hu, S. Hu, J. Sens., 2009, DOI: 10.1155/2009/187615

[15] S.A.V. Tfouni, M.C.F. Toledo, *Food Control* 13 (2002) 117–123.

Jolanta Kochana