

Warszawa, 15.12.2015

mgr Anna Jabłońska
Pracownia Elektrochemii
Zakład Chemii Fizycznej
Wydział Chemii Uniwersytetu Warszawskiego

AUTOREFERAT ROZPRAWY DOKTORSKIEJ PT.

Supramolekularne żele i nanostruktury polimerowe jako podłoże dla enzymów

Tytuł w jęz. angielskim: Supramolecular polymeric gels and nanostructures
as a support for enzymes

Promotor: dr hab. Barbara Pałys, prof. UW

Potrzeba wykrywania, ilościowego oznaczania i monitorowania wielu związków chemicznych w środowisku przekłada się na duże zainteresowanie biosensorami, a badania nad nimi prowadzone są nieustannie na szeroką skalę. Szczególnym zainteresowaniem cieszą się biosensory enzymatyczne - ze względu na wyjątkową selektywność pomiarów i wysoką czułość. Jednak ograniczeniem dla ich zastosowań jest niewystarczająca trwałość i powtarzalność wyników oraz nieustannie pojawiające się nowe potrzeby analityczne. Dlatego optymalizacja tych układów, np. poprzez dobór odpowiedniego podłoża do unieruchamiania enzymów, ma tak duże znaczenie i skłania do poszukiwania nowych materiałów usprawniających działania biosensorów.

Doskonałymi kandydatami do tego celu wydają się być polimery przewodzące. Niemal jednocześnie z odkryciem tych tworzyw pod koniec lat 70-tych XX wieku zaczęło się ich wykorzystanie do konstrukcji biosensorów. Świetnie przewodzą prąd, niektóre bardzo dobrze pośredniczą w przeniesieniu elektronów pomiędzy centrum aktywnym enzymu a elektrodą - zwłaszcza jeśli strukturalnie są podobne do substratów enzymatycznych. Co więcej, kontakt pomiędzy enzymem a podłożem polimerowym nie zależy od orientacji cząsteczki białka. Wymagania te, według mojej oceny, mogły spełniać nanorurki i hydrożele z polimerów przewodzących. Nanostrukturalne materiały posiadają bardzo dobrze rozwiniętą powierzchnię, umożliwiającą unieruchomienie dużych ilości enzymu. Ich przewodnictwo jest często znacznie wyższe w porównaniu do wartości uzyskiwanych dla zwykłych filmów polimerowych. Natomiast żele, dzięki zawartości wody w swojej porowatej strukturze,

ułatwiają dyfuzję, usprawniając wnikanie enzymu w warstwę i jego wiązanie wewnątrz trójwymiarowej sieci. Również dyfuzja analitu przez liczne pory materiału wypełnione rozpuszczalnikiem ulega znacznej poprawie.

Główny cel badań przeprowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej stanowiło wytworzenie i scharakteryzowanie biosensorów opartych na enzymach unieruchomionych w warstwach nanorurek i hydrożeli polimerowych oraz poszerzenie stanu wiedzy w dziedzinie biokatalizy z użyciem warstw przewodzących. Wykorzystanymi polimerami były: polianilina (PANI) – charakteryzująca się dobrą stabilnością środowiskową i elektrochemiczną, oraz poli(3,4-etylenodioksytyofen) (PEDOT), który cechuje wyśmienite przewodnictwo, nie zależące - w odróżnieniu od PANI - od pH środowiska reakcji.

Pierwsza część badań dotyczyła scharakteryzowania hydrożeli supramolekularnych otrzymanych w wyniku prostej syntezy chemicznej monomeru przewodzącego (aniliny lub 3,4-etylenodioksytyofenu) i czynnika sieciującego, jakim był polistyrenosulfonian (PSS). Syntezę przeprowadziłam w roztworach o dwóch różnych wartościach pH – w HCl (pH=0) oraz, po raz pierwszy, w buforze fosforanowym (pH=5.0). Do wyjaśnienia różnic między otrzymanymi próbkami, wynikającymi z odmiennych warunków syntezy, użyłam spektroskopii w podczerwieni oraz rezonansowej spektroskopii Ramana. Widma pokazały, że hydrożele PANI-PSS posiadają pasma charakterystyczne dla pierścieni fenazynowych. Pierścienie fenazynowe mogą łączyć sąsiednie łańcuchy PANI - są zatem czynnikiem sieciującym PANI. Jednak w zależności od pH syntezy struktury te różnią się między sobą. Dla obu próbek udowodniłam występowanie pierścieni sieciujących – powstających przez połączenie monomerów w sekwencji *tail-head-tail*. Dodatkowo, dla hydrożelu wytworzonego w łagodniejszych warunkach, wykazałam obecność fenazyn powstających według mechanizmu *head-to-head*. Tym samym potwierdziłam, że układ wytwarzany w łagodniejszym środowisku posiada mieszaninę różnych struktur fenazynowych, co nie było dotychczas opisane w literaturze. Natomiast badanie żeli PEDOT-PSS przy pomocy spektroskopii Ramana nie ujawniło żadnych różnic. Przyczyną podobieństwa widm może być fakt, że linia lasera wzbudza rezonansowo te same, przewodzące struktury w próbkach.

Drugim z podjętych problemów badawczych było zbadanie mechanizmów zachodzących reakcji enzymatycznych celem poznania i zrozumienia oddziaływania między związanym białkiem a matrycą oraz przyszłego zmodyfikowania skonstruowanych biosensorów. Jako enzymów modelowych użyłam ureazy i peroksydazy chrzanowej (HRP). Zbadałam aktywność HRP związanej w matrycach z nanorurek PANI oraz hydrożeli PANI-PSS i PEDOT-PSS stosując metody elektrochemiczne – woltamperometrię cykliczną

i chronoamperometrię. Porównując wyniki uzyskane dla nanorurek i żelu PANI wykazałam uzyskanie lepszego sygnału analitycznego dla żelu supramolekularnego. Powiązałam to z obecnością fenazy w sekwencji *head-to-head* oraz dużą zawartością wody w strukturze żelu, która ułatwia dyfuzję zarówno enzymu jak i cząsteczek analitu. Badałam także wpływ termicznego sieciowania nanorurek PANI na ich właściwości. Wykazałam, że HRP unieruchomiona na nanorurkach nieusieciowanych charakteryzuje się znacznie lepszą czułością na nadtlenek wodoru w porównaniu do enzymu unieruchomionego na nanorurkach usieciowanych. Zaobserwowane różnice wytłumaczyłam większą hydrofilowością nanorurek nieusieciowanych. Ponadto, przeprowadzone pomiary dowiodły, że PANI nawet w pH w zakresie 6.0-7.0 jest elektroaktywna - ze względu na przewodnictwo jonowego i protonowe. To drugie jest szczególnie ważne, ponieważ jony wodorowe odgrywają kluczową rolę w mediowaniu procesu z udziałem HRP.

W ramach tego problemu badawczego zbadalam aktywność HRP także w układach z PEDOT-PSS jako podłożem. Na podstawie uzyskanych wyników stwierdziłam, że HRP unieruchomiona w warstwie żelu PEDOT-PSS (synteza w pH=5.0) wykazuje najlepszą uzyskiwaną czułość pomiarów – z powodu wyższego przewodnictwa PEDOT niż PANI. Natomiast na podłożu polimeryzowanym w HCl nie zaobserwowałam żadnej reakcji. W tym przypadku kluczową rolę odgrywa morfologia próbki i większa zawartość wody w jej strukturze. Zauważyłam, że widmo próbki otrzymanej w roztworze o pH=5.0 jest zdominowane przez intensywne pasma IRAVs świadczące o przewodzie formy przewodzącej polimeru w tym układzie.

Dzięki przeprowadzonym eksperymentom zaproponowałam mechanizmy reakcji HRP unieruchomionej na podłożach z nanorurek oraz hydrożeli polimerowych. Udowodniłam, że dla układu z matrycą PEDOT-PSS w zachodzącym procesie następuje bezpośrednie przeniesienie elektronu pomiędzy enzymem a powierzchnią elektrody. W przypadku warstw z nanorurek bądź żelu PANI wykazano, że biegnący proces enzymatyczny jest mediowany przez polimer, a jego przebieg ściśle zależy od ilości protonów w środowisku reakcji.

Aktywność ureazy sprawdzałam jedynie w warstwach hydrożelu PANI-PSS. Mechanizm zachodzącej reakcji jest bardziej skomplikowany niż prosta kompensacja ładunku podczas utleniania lub redukcji PANI. Wciąganiu dodatnio naładowanych jonów NH_4^+ prawdopodobnie towarzyszy przeniesienie protonu pomiędzy polimerem a jonem amoniowym. Wyższa zawartość wody w strukturze żelu syntezowanego w pH=5.0 znacznie ułatwia dyfuzję enzymu i jego unieruchomienie w matrycy. Reakcja, na której oparłam

działanie biosensora z ureazą, jest unikalna dla PANI; z warstwami PEDOT nie zachodzi, ponieważ polimer ten nie tworzy wiązań wodorowych z jonami NH_4^+ .

Uzyskane w ramach rozprawy doktorskiej wyniki badań pozwoliły na zaproponowanie mechanizmów reakcji dwóch enzymów (ureazy i HRP) unieruchamianych w warstwach nanorurek i hydrożeli polimerowych. Charakterystyka użytych materiałów pozwala na wysunięcie wniosku, że stworzyłam biosensory o dobrej czułości i dużym zakresie liniowości pomiarów.

Wyniki badań będące podstawą mojej pracy doktorskiej zostały opublikowane w czasopismach o zasięgu międzynarodowym: w *Electrochimica Acta* oraz w *Journal of Physical Chemistry C*. Kolejna z prac poświęconych opisywanej tematyce została wysłana do czasopisma *Bioelectrochemistry*, a pozostałe są w przygotowaniu.