

2019-
2020/
2020-
2021

Raport z przeprowadzonych prac badawczo - rozwojowych

polegających na opracowaniu prototypu multisensora
oznaczającego laktozę oraz metale ciężkie w próbkach
żywności.

PROF. DR HAB. EWA BULSKA

CENTRUM NAUK BIOLOGICZNO CHEMICZNYCH UNIWERSYTETU WARSZAWSKIEGO
Żwirki i Wigury 101; 02-089 Warszawa

1.	Spis treści	
1.	Cel badań.....	4
2.	Analiza problemu stanowiącego tematykę projektu	5
	Analiza problemu - laktoza	5
	Analiza problemu – metale ciężkie	6
3.	Aparatura i stosowane odczynniki	8
4.	Koncepcja kolorymetrycznego oznaczania laktozy w oparciu o reakcje enzymatyczne (I preprototyp)	11
	Główne założenia i cele	11
	Wybór enzymów rozkładających laktozę	13
	Sposób unieruchomienia enzymu.....	16
	Wykorzystanie pasków enzymatycznych do oznaczania glukozy.....	16
	Schemat i zasada działania I pre-prototypu sensora	17
	Próby wykorzystania pre-prototypu w próbkach żywności	19
	Usuwanie/obniżanie przed pomiarem początkowego stężenia glukozy	20
	Poszczególne elementy konstrukcyjne sensora.....	21
	Przygotowanie pasków detekcyjnych	23
	Wykrywanie zawartości laktozy w próbkach żywności	24
	Podsumowanie	27
5.	Koncepcja elektrochemicznego oznaczania laktozy w oparciu o nanostruktury złota (II preprototyp)	29
	Główne założenia i cele	29
	Otrzymanie nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami i ich charakterystyka fizykochemiczna.....	30
	Otrzymywanie nanocząstek złota na nanorurkach węglowych.....	31
	Charakterystyka elektrochemiczna układów katalitycznych	32
	Drugi pre-prototyp sensora oznaczania laktozy	35
	Wykrywanie laktozy w próbkach żywności	36
	Wpływ interferentów z próbek żywności.....	37
	Podsumowanie	39
6.	Koncepcja elektrochemicznego oznaczania laktozy w oparciu o układy enzymatyczne (III preprototyp)	41
	Główne założenia i cele	41
	Elektrody modyfikowane warstwami enzymatycznymi.....	42
	Elektroda modyfikowana oksydazą glukozy.....	42
	Procedura przygotowania zawiesiny modyfikującej.....	42

Charakterystyka elektrochemiczna elektrody modyfikowanej warstwą oksydazy glukozy.....	43
Elektroda modyfikowana oksydazą glukozy immobilizowaną na nośniku.....	44
Procedura przygotowania warstwy modyfikującej.....	44
Charakterystyka elektrochemiczna warstwy enzymatycznej immobilizowanej na nośniku węglowym MWNT/GOx	45
Trzeci pre-prototyp sensora oznaczania laktozy	50
Przygotowanie jednorazowej elektrody enzymatycznej.....	50
Test pre-prototypu w warunkach modelowych	52
Wykrywanie laktozy w próbkach żywności	55
Wpływ interferentów z próbek żywności.....	56
Podsumowanie	57
7. Koncepcja kolorymetrycznego oznaczania metali w oparciu o układy enzymatyczne i nanostruktury metali	59
Główne założenia i cele	59
Metody syntezy nanostrukturalnych układów metalicznych	59
Otrzymywanie nanocząstek złota stabilizowanych cytrynianami.....	60
Otrzymywanie nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami	60
Otrzymywanie nanocząstek srebra stabilizowanych żelatyną	61
Otrzymywanie nanocząstek srebra stabilizowanych alkoholem polivinylowym.....	61
Charakterystyka fizykochemiczna nanostruktur.....	62
Charakterystyka fizykochemiczna nanocząstek złota stabilizowanych cytrynianami.....	62
Charakterystyka fizykochemiczna nanocząstek złota stabilizowanych poliokso metalanami	64
Charakterystyka fizykochemiczna nanocząstek srebra stabilizowanych żelatyną.....	67
Charakterystyka fizykochemiczna nanocząstek złota stabilizowanych PVA.....	70
Wykorzystanie nanostruktur metalicznych do oznaczania metali ciężkich	72
Pierwszy pre-prototyp sensora oznaczania metali ciężkich	75
Wpływ interferentów z próbek żywności.....	78
Koncepcja kolorymetrycznego oznaczania metali w oparciu o układy enzymatyczne	79
Przygotowanie paska do kolorymetrycznego oznaczania metali	80
Podsumowanie	83
8. Koncepcja elektrochemicznego oznaczania metali ciężkich w oparciu o układy enzymatyczne...84	
Główne założenia i cele	84
Przygotowanie układów katalitycznych	84
Charakterystyka elektrochemiczna układów katalitycznych	84
Podsumowanie	89
9. Przygotowanie prototypów sensorów	90

Projekt silnika chemicznego	90
Prototyp silnika chemicznego.....	91
Projekt obudowy urządzenia prototypowego.....	92
Projekt elektroniczny jednostki centralnej urządzenia prototypowego	93
Schemat blokowy elementów jednostki centralnej.....	93
Projekt elektroniczny układu analogowego do czujników trójelektrodowych.....	95
Układ wzmacniacza wstępnego Front-end.....	95
Wygląd Prototypu	100
Budowa Prototypu	101
Połączenie jednostki bazowej z wymiennym kartridżem silnika chemicznego	102
Opis złącz:	102
Wygląd działających prototypów.....	104
10. Opis protokołu komunikacji Bluetooth.....	105
API – założenia protokołu komunikacyjnego.....	106
Elementy sterowania zewnętrznego.....	106
Dioda 1 - dioda RGB na panelu sygnalizacja stanu urządzenia. Dioda 2 - dioda RGB na panelu sygnalizacja wartości wyniku. Dioda 3,4,5 - trzy niezależnie sterowane diody boczne prawy bok urządzenia. Dioda 6,7,8 - trzy niezależnie sterowane diody boczne lewy bok	106
Komunikacja szeregową:.....	107
Opis komend sterujących	107
L: - sterowanie diodami	107
S: - Zapytanie o status	107
M: - sterowanie silnikami mieszania i sterowania komory	108
Procedura pomiaru:	109
11. Sterowanie za pomocą interfejsu http	110
12. Wykaz wybranych skrótów i symboli stosowanych w pracy ... Błąd! Nie zdefiniowano zakładki.	
Literatura:.....	112
Spis ilustracji	113
Spis Tabel.....	118

1. Cel badań

Opracowanie i wytwarzanie nowych materiałów bionanostrukturalnych bazujących na nanostrukturach metalicznych, węglowych oraz układach enzymatycznych, jak również zastosowanie ich do projektowania złożonych, kompozytowych układów sensorycznych stanowi przedmiot intensywnych badań pod kątem zastosowań przemysłowych, medycznych oraz związanych z ochroną zdrowia. Ogromny rozwój w obszarze bionanotechnologii podyktowany jest również rosnącymi potrzebami polepszenia jakości życia osób z nietolerancjami pokarmowymi. Dostępność do zaawansowanych rozwiązań technologicznych służy nie tylko poprawie stanu zdrowia, ale również zwiększeniu świadomości społecznej i kształtowaniu zachowań związanych z prewencją oraz utrzymywaniem organizmu w dobrej kondycji (*ang. self-care oraz self-management*). Jednocześnie trudno sobie wyobrazić technologię, której wdrożenie do ochrony zdrowia nie jest poprzedzone innowacyjnymi, interdyscyplinarnymi badaniami naukowymi oraz precyzyjną analizą bezpieczeństwa, skuteczności, jak również efektywności ekonomicznej.

Naczelnym celem naszego zespołu było więc opracowanie tanich (łatwo dostępnych), prostych w użyciu oraz precyzyjnych (wiarygodnych) sensorów laktozy oraz metali ciężkich, których zadaniem jest ochrona zdrowia osób z nietolerancją tego disacharydu oraz ochrona przed toksycznym działaniem ołowiu, rtęci i kadmu. Pragniemy również zwrócić uwagę na fakt, że naszym zadaniem jest, oprócz wprowadzenia konkretnego rozwiązania prozdrowotnego, wychodzenie naprzeciw oczekiwaniom najbardziej wymagającego rynku poprzez rozwijanie wiedzy i ciągłe doskonalenie opracowywanych przez nas technologii. W związku z powyższym prowadzone przez nas działania są wielotorowe, a w poszukiwaniu najlepszego rozwiązania pracowaliśmy jednocześnie nad kilkoma koncepcjami zarówno części receptorowej jak i przetwornikowej.

Celem badań prowadzonych w ramach niniejszego projektu było wytworzenie sensora oznaczającego laktozę oraz metale ciężkie w produktach spożywczych. Kluczowy etap prowadzonych prac naukowych dotyczył wytworzenia oraz scharakteryzowania materiałów stanowiących część czułą analitycznie sensora. Kolejny główny etap związany był natomiast z prowadzeniem prac eksperymentalnych zmierzających do zintegrowania części generującej sygnał analityczny z częścią odpowiadającą za jego przetworzenie. Cele pośrednie projektu zostały nakreślone i scharakteryzowane w opisie poprzedzającym każdy rozdział dotyczący prac eksperymentalnych poszczególnych etapów.

2. Analiza problemu stanowiącego tematykę projektu

Analiza problemu - laktoza

Żywność stanowi niezbędne źródło cennych i odżywczych dla organizmu substancji. Jednakże wraz ze składnikami odżywczymi produkty spożywcze mogą dostarczyć również substancje, które są szkodliwe i prowadzą do różnego typu schorzeń. Laktoza jest dwucukrem obecnym w mleku ssaków, z tego też powodu zwana jest również cukrem mlecznym. Metabolizm laktozy polega na hydrolizie tego disacharydu do cukrów prostych glukozy i galaktozy, które następnie wchłaniane są przez organizm. Jest ona rozkładana przez enzym laktazę w jelicie cienkim. Laktoza wywiera korzystny wpływ na organizm ze względu na fakt, iż zwiększa wchłanianie wapnia, magnezu i cynku. Ponadto przyczynia się do rozwoju korzystnych bakterii jelitowych. Jednakże u prawie 70% dorosłej populacji cukier ten nie jest prawidłowo metabolizowany wywołując szereg niepożądanych objawów. Alergia na laktozę wiąże się z reakcją układu odpornościowego na kontakt z tym alergenem. Nietolerancja laktozy jest bardzo powszechną i uciążliwą dolegliwością. O nietolerancji laktozy mówimy wówczas, gdy organizm posiada znacznie ograniczoną lub całkowicie zablokowaną zdolność do trawienia tego disacharydu. Niewystarczająca aktywność enzymu rozkładającego laktozę sprawia, że po spożyciu produktów mlecznych zawierających ten dwucukier pojawiają się nieprzyjemne dolegliwości ze strony układu pokarmowego. W zależności od stopnia nasilenia oraz ilości spożytych produktów zawierających cukier mleczny, u osób dotkniętych nietolerancją laktozy objawy pojawiają się w różnym czasie po zjedzeniu. Niewątpliwie wpływają one na samopoczucie oraz są przyczyną dolegliwości bólowych ze strony układu pokarmowego. Do najczęściej występujących objawów zaliczyć można: mdłości, kolki, bóle brzucha, biegunki i wzdęcia, a nawet skrócje żołądka oraz bóle głowy.

Nierozłożona laktoza zatrzymuje w jelicie wodę, ponadto ulega fermentacji. Fermentacja laktozy w jelicie przyczynia się do rozwoju nieprawidłowej flory bakteryjnej oraz produkcji gazów. Jednakże laktoza ze względu na walory smakowe oraz właściwości fizyczne i chemiczne jest szeroko stosowana w przemyśle spożywczym i farmaceutycznym. Jest rozpuszczalna w wodzie, nietoksyczna, chemicznie trwała. Ponadto jest związkiem niedrogim dlatego też często wykorzystywanym jako substancja pomocnicza, stosowana głównie w kapsułkach i tabletkach jako środek wypełniający. Ponadto źródłem laktozy są różnego rodzaju produkty mleczne.

Nietolerancji laktozy nie można wyleczyć. Należy wyeliminować z diety produkty ją zawierające lub przyjmować preparaty zawierające enzym laktazę. Pomimo, iż na rynku dostępne są produkty bez laktozowe, część z nich pomimo oznaczeń na opakowaniach zawiera ten cukier w swoim składzie. Na rynku brak jest urządzeń do monitorowania zawartości laktozy w produktach spożywczych. Dostępne metody to metody laboratoryjne, które niejednokrotnie wymagają kilkuetapowego przygotowania próbki do analizy, są czasochłonne, skomplikowane i oparte o zastosowanie substancji niebezpiecznych.

Dostępność sensorów umożliwiających szybkie i wiarygodne wykrycie laktozy w produktach spożywczych jest niezwykle pożądana ze względu na fakt, iż przepisy prawne z obszaru bezpieczeństwa żywności nie regulują jednoznacznie wymagań dotyczących oznaczenia produktów spożywczych w kontekście umieszczania na opakowaniach informacji o braku lub zmniejszonej zawartości laktozy. Jak wynika z opinii wydanej przez główny inspektorat sanitarny maksymalny dopuszczalny poziom laktozy w produktach „bezlaktozowych” może wynosić 0,01%. Powyższa opinia nie jest prawomocną regulacją i nie obliguje producentów do jej stosowania. W przypadku osób cierpiących na nietolerancję laktozy sytuacja jest jeszcze bardziej trudniejsza w przypadku sięgania po produkty o obniżonej zawartości laktozy. W przypadku tej grupy produktów spożywczych główny inspektor sanitarny informuje, że nie ma żadnych wytycznych prawnych na stosowanie takiego sformułowania. W tym obszarze konsumenci są szczególnie narażeni na nieuczciwość producentów. Tym bardziej możliwość kontroli składu spożywanych produktów w przypadku osób z nietolerancją laktozy jest szczególnie istotna, gdyż umożliwi monitorowanie i wiarygodną ocenę zawartości tego dwucukru w spożywanych posiłkach.

Analiza problemu - metale ciężkie

Do szkodliwych substancji znajdujących się w żywności, prócz składników pokarmowych, które stanowią alergeny niewątpliwie należą metale ciężkie. Substancje te wywierający negatywny wpływ na organizm i stanowią jedne z najniebezpieczniejszych dla zdrowia toksyn. Są to trucizny, które silnie oddziałują na organizm ludzki wywołując wiele ostrych i przewlekłych zatruc. Ze względu na stopień zagrożenia metale ciężkie można podzielić na kilka grup, a do najbardziej toksycznych zaliczane są ołów, rtęć i kadm. W opisie zaprezentowanym poniżej wyszczególniono tylko niektóre z poważnych zaburzeń wywoływanych na skutek oddziaływania organizmów żywych z tymi toksynami.

Rtęć (Hg) to jedna z najniebezpieczniejszych substancji, która powoduje poważne uszkodzenia na poziomie komórkowym oraz powoduje uszkodzenia mózgu.

Ołów (Pb) prowadzi do zaburzenia funkcji rozrodczych organizmu, porażenie mięśni, zaburzeń neurologicznych i psychicznych oraz zakłóca metabolizm wapnia.

Kadm (Cd) zakłóca metabolizm wapnia, fosforu i białek. Jest silnie rakotwórczy i teratogeny.

Metale ciężkie dostają się do organizmu na skutek oddychania zanieczyszczonym powietrzem, palenia papierosów oraz wraz ze spożywanymi posiłkami. Metale ciężkie nie są niezbędne do prawidłowego funkcjonowania organizmu i stanowią niepożądany składnik pokarmowy. Ich obecność w żywności wynika z faktu, iż kumulują się w różnych częściach roślin, jak również w organizmach zwierzęcych. Toksyczne metale gromadzą się przede wszystkim w naziemnych częściach w przypadku roślin takich jak: szczypior, sałata, por oraz nać pietruszki. Zanieczyszczenia przenikają również do gleby kumulując się w korzeniach między innymi buraków, selera i rzodkiewki.

Uprawy roślin przeznaczonych do spożycia często prowadzone są na terenach szczególnie skażonych i przy trasach komunikacyjnych. Skażona roślinność jest wielokrotnie przetwarzana stanowiąc półprodukty do produkcji pokarmów przeznaczonych dla ludzi lub fabrykacji pasz dla zwierząt. Ze względu na proces akumulacji metali ciężkich w cyklu pokarmowym dochodzi do ich zateżnienia i wzrostu szkodliwości produktów przetwarzanych w stosunku do pierwotnych upraw. Metale ciężkie akumulują się również w organizmach ludzi stanowiąc trudne do usunięcia toksyny. Na skutek spożywania skażonej metalami ciężkimi żywności istnieje więc ryzyko przekroczenia dopuszczalnych dla człowieka ilości i wystąpienia dolegliwości ze strony centralnych układów kontrolujących funkcje życiowe. Możliwość stwierdzenia obecności metali ciężkich w produktach spożywczych umożliwi więc kontrolę jakości spożywanego pokarmu pod kątem zawartości toksyn w żywności, a tym samym umożliwi w znacznym stopniu ilości te ograniczyć.

3. Aparatura i stosowane odczynniki

- ❖ pipety automatyczne, mini-wirówkę nablatową (na próbki typu Eppendorf 1,5 ml), termoblok, inkubator mikrobiologiczny,
- ❖ podstawowe szkło laboratoryjne i sprzęt laboratoryjny (zlewki, tryskawki, próbki do wirówki szykoobrotowej, pipety automatyczne, szkiełka zegarkowe).
- ❖ elektroda dyskowa z węgla szklanego (GC) o powierzchni 0,071 cm², CH Instruments, Inc. Austrin, USA
- ❖ wirująca elektroda dyskowa z węgla szklanego o powierzchni 0,237 cm² z pierścieniem platynowym, Pine Research Instrumentation, USA
- ❖ nasycona elektroda kalomelowa (Hg/Hg₂Cl₂/nas. KCl), Metron, Gliwice, Polska
- ❖ pręt grafitowy, Metron, Gliwice, Polska
- ❖ potencjostaty: CHI 760D oraz CHI 660B, CH Instruments Inc. Austrin, USA
- ❖ rotator do wirującej elektrody dyskowej, Pine Research Instrumentation, USA
- ❖ skaningowy mikroskop elektronowy, Zeiss Merlin, Niemcy. Mikroskop wyposażony w analizator EDS, XFlash Detector 5010, Bruker, Niemcy. Próbki materiałów nanostrukturalnych poddawanych analizie tą techniką osadzano na płytkach z węgla szklanego (GC).
- ❖ transmisyjny mikroskop elektronowy, Libra 120, Zeiss, Niemcy. Jako podłoże, na które nanoszono nanomateriały wykorzystano siatki niklowe, Agar Scientific, UK.
- ❖ spektrofotometri UV-Vis: Lambda 20 oraz Lambda 25, Perkin Elmer, USA
- ❖ Elektrody DropSense
- ❖ Spektrofotometr
- ❖ kwas fosfododekamolibdenowy, **H₃PMo₁₂O₄₀·nH₂O**, 99%, Fluka, Szwajcaria
- ❖ kwas tetrachlorozłotowy(III) (trójwodny), **HAuCl₄·3H₂O**, 99,9%, Aldrich, USA
- ❖ azotan(V) srebra, **AgNO₃** cz.d.a., Polskie Odczynniki Chemiczne (POCH), Gliwice, Polska
- ❖ borowodorek sodu, **NaBH₄**, 98%, Sigma-Aldrich, USA
- ❖ nadtlenuk wodoru, **H₂O₂** cz.d.a., 30%, CHEMPUR, Piekary Śląskie, Polska
- ❖ wodorofosforan(V) potasu (trójwodny), **K₂HPO₄·3H₂O**, 99%, Sigma, USA
- ❖ diwodorofosforan(V) potasu, **KH₂PO₄**, 98%, Sigma, USA
- ❖ wodorofosforan(V) sodu (trójwodny), **Na₂HPO₄·3H₂O**, 99%, Sigma, USA
- ❖ diwodorofosforan(V) sodu, **NaH₂PO₄**, 98%, Sigma, USA

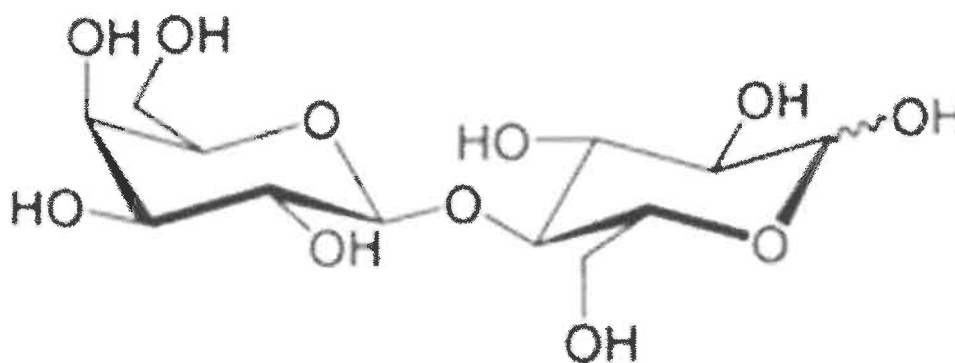
- ❖ kwas siarkowy(VI), H_2SO_4 cz.d.a., 96%, Polskie Odczynniki Chemiczne (POCh), Gliwice, Polska
- ❖ kwas chlorowodorowy, HCl cz.d.a., 35%, Polskie Odczynniki Chemiczne (POCh), Gliwice, Polska
- ❖ kwas azotowy(V), HNO_3 cz.d.a., 65%, Polskie Odczynniki Chemiczne (POCh), Gliwice, Polska
- ❖ wodorotlenek potasu, KOH cz.d.a., Polskie Chemiczne Odczynniki (POCh), Gliwice, Polska
- ❖ wodorotlenek sodu, NaOH cz.d.a., Polskie Chemiczne Odczynniki (POCh), Gliwice, Polska
- ❖ etanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ cz.d.a., 99,8%, Polskie Odczynniki Chemiczne (POCh), Gliwice, Polska
- ❖ glukoza, $\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$ cz.d.a., Polskie Odczynniki Chemiczne (POCh), Gliwice, Polska
- ❖ laktoza, $\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$ cz.d.a., Sigma-Aldrich, USA
- ❖ wielościennie nanorurki węglowe (średnica zewnętrzna: 10-30 nm, średnica wewnętrzna: 3-18 nm), Aldrich, USA. Nanorurki zostały poddane działaniu roztworów kwasów mineralnych: HCl oraz HNO_3 zgodnie z procedurą opisaną w rozdziale 10.1.1. w celu chemicznego oczyszczenia oraz funkcjonalizacji polarnymi grupami tlenowymi.
- ❖ tlenek glinu, Al_2O_3 (średnica ziaren 1-0,05 μm), Buehler, USA
- ❖ tlen wysokiej czystości (99.999%) Air products, sp. z o.o. Siewierz, Polska
- ❖ argon wysokiej czystości (99.999%) Air products, sp. z o.o. Oświęcim, Polska
- ❖ Nafion®, 5% roztwór w mieszaninie niższych alkoholi alifatycznych i wody, Ion Power, USA
- ❖ oksydaza glukozy, **GOx** *Aspergillus Niger*, Sigma-Aldrich, USA
- ❖ peroksydaza chrzanowa, **HRP**, Sigma-Aldrich, USA
- ❖ β -D-galaktozydaza, *Aspergillus oryzae*, Sigma-Aldrich, USA
- ❖ albumina wołowa, **BSA**, Sigma-Aldrich, USA
- ❖ aldehyd glutarowy, Sigma-Aldrich, USA
- ❖ jodek potasu, **KI** cz. d. a. Sigma-Aldrich, USA
- ❖ o-dianizydyna,
- ❖ 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside, $\text{C}_{14}\text{H}_{15}\text{BrClNO}_6$, Sigma-Aldrich, USA

- ❖ Heksacyjanożelazaian
- ❖ Kwas octowy
- ❖ Żelatyna spożywcza
- ❖ Alkohol poliwinylowy
- ❖ Kwas L-askorbinowy
- ❖ Chlorek sodu
- ❖ woda trójrotnie destylowana i dejonizowana przy użyciu systemu Mili-Q

4. Koncepcja kolorymetrycznego oznaczania laktozy w oparciu o reakcje enzymatyczne (I preprototyp)

Główne założenia i cele

Laktoza $C_{12}H_{22}O_{11}$ jest organicznym związkiem chemicznym z grupy węglowodanów. Zwana jest również cukrem mlecznym. Laktoza jest dwucukrem, a jedna cząsteczka tego disacharydu zbudowana jest z jednej cząsteczki D-glukozy i jednej D-galaktozy połączonych wiązaniem β -1,4-glikozydowym. Wzór strukturalny cząsteczki laktozy zaprezentowano na **Rysunku 1**.



Rysunek 1. Wzór cząsteczki laktozy [1].

Jest to substancja stała, bezbarwna, dobrze rozpuszczalna w wodzie, słabo rozpuszczalna w alkoholu.

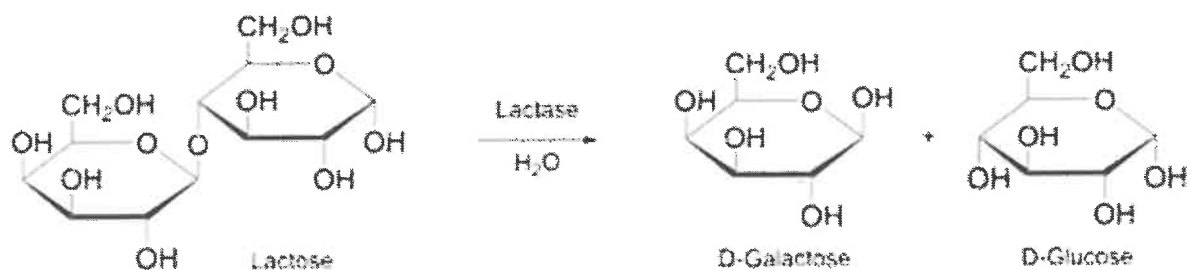
Laktoza występuje w mleku i produktach mlecznych. Zawartość laktozy w poszczególnych artykułach spożywczych zestawiono w **Tabeli 1**.

Tabela 1 Zawartość laktozy w 100 g wybranych produktów mlecznych [2].

Nazwa produktu Product	Laktoza Lactose content [g]	Laktoza Lactose content [g]
Mleko spożywcze 3,2% tłuszczu Whole milk	4,6	4,6
Mleko kobiece Breast milk	7,0	7,2
Mleko kozie Goat's milk	4,4	4,4
Mleko w proszku odtłuszczone Skimmed dry milk powder	51,0	52,9
Mleko zagęszczone niesłodzone Unsweetened condensed milk	9,4	8,5
Śmietanka kremowa 30% tłuszczu (48 %) Double cream	3,1	1,7
Śmietana 18% tłuszczu (23%) Single cream	3,6	2,2
Śmietana 12% tłuszczu Half and half cream	3,9	Bd.* Ndz*
Jogurt naturalny 2% tłuszczu Plain yogurt	4,6	4,7
Jogurt owocowy 1,5% tłuszczu Fruit yogurt	5,0	4,0
Kefir 2% tłuszczu Kefir	4,1	Bd. Ndz
Masłanka spożywcza 0,5 % tłuszczu Buttermilk	4,7	Bd. Ndz
Ser, Brie pełnotłusty Brie cheese	0,1	Ślad Trace
Ser, Camembert pełnotłusty Camembert cheese	0,1	Ślad Trace
Ser, Gouda tłusty Gouda cheese	0,1	Ślad Trace
Ser typu „Feta” Feta cheese	1,0	1,4
Ser twarogowy chudy Curd cheese, low fat	3,1	Bd. Ndz
Serek twarogowy homogenizowany pełnotłusty Cream cheese	2,0	Ślad Trace
Serek twarogowy ziarnisty Cottage cheese	3,3	3,1
Ser topiony Cheese spread	1,0	4,4
Lody smietankowe Ice cream dairy	4,4	5,2

*Bd. – brak danych
*Ndz – no data available

Laktoza na skutek działania enzymu β -D-galaktozydazy ulega hydrolizie do cukrów prostych D-glukozy i D-galaktozy. Zawartość laktozy w danej próbce może więc zostać określona na podstawie oznaczania ilości monosacharydów np. glukozy, które powstają na skutek enzymatycznego rozkładu tego disacharydu zgodnie ze schematem zamieszczonym na **Rysunku 2**.



Rysunek 2 Schemat reakcji rozkładu laktozy do glukozy i galaktozy [3].

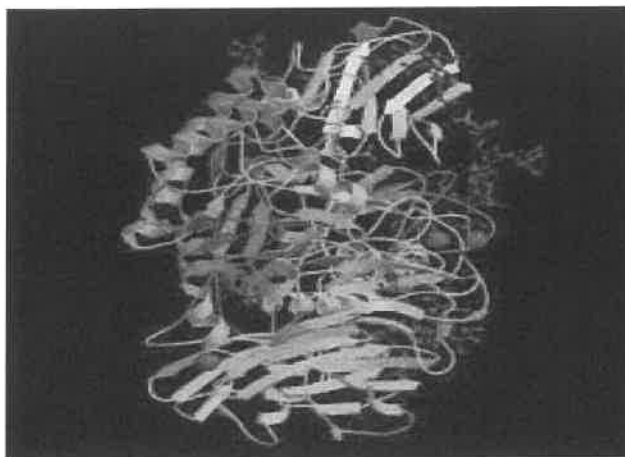
Próbki żywności stanowią skomplikowane materiały pomiarowe o bardzo złożonej i zmiennej matrycy. Początkowa zawartość cukrów w próbce zależy nie tylko od rodzaju produktu, ale również dla tego samego artykułu spożywczego waha się w zależności od serii, partii, czy źródła pochodzenia surowców. Dlatego też, oznaczanie zawartości laktozy na podstawie pomiaru ilości glukozy (lub galaktozy) jest pomiarem porównawczym. Porównanie odnosi się do pomiaru początkowej ilości glukozy w próbce oraz pomiaru jej zawartości po określonym czasie hydrolizy enzymatycznej prowadzącej do rozkładu laktozy na monosacharydy.

Celem badań przedstawionych w niniejszym rozdziale było dobranie odpowiednich układów enzymatycznych zastosowanych do oznaczania laktozy (tzn. rozkładu laktozy) oraz oznaczania glukozy. Ponadto dokonanie ich charakterystyki, określenie warunków pracy, sposobów unieruchomienia oraz ocena wpływu interferentów na ich aktywność katalityczną. Do zadań będących obszarem rozważań niniejszego rozdziału należy również przeniesienie zaproponowanych procedur oznaczania z układu modelowego na warunki rzeczywiste i przetestowanie ich na próbkach żywności.

Wybór enzymów rozkładających laktozę

Pomiar zawartości laktozy odbywa się na podstawie rozkładu cukru mlecznego do glukozy i galaktozy, następnie w kolejnym kroku na pomiarze zawartości glukozy.

Enzymem rozkładającym laktozę jest β -D-galaktozydaza zwana również laktazą. Katalizuje ona rozkład tego disacharydu poprzez rozerwanie wiązania glikozydowego. Strukturę tego enzymu zaliczanego do grupy hydrolaz, który wykazuje aktywność względem reakcji hydrolizy wiązań O-glikozydowych w β -D-galaktozydach przedstawiono na **Rysunku 3**.



Rysunek 3 Struktura przestrzenna β -D-galaktozydazy [4].

Nie jest to jednak jedyna aktywność tego enzymu, ponieważ β -D-galaktozydaza posiada również zdolność syntezy wiązań glikozydowych, na skutek czego prowadzi do powstania łańcuchów oligosacharydowych. Zarówno aktywność hydrolityczna, jak i transferazowa posiadają wspólny mechanizm, który przebiega wieloetapowo. Ostatecznie ostatni z etapów posiada decydujący wpływ, na to czy zachodzi reakcja hydrolizy czy transglikozylacji. Poszczególne kroki skomplikowanego mechanizmu hydrolizy/transglikozylacji można przedstawić zgodnie ze schematem zaprezentowanym na **Rysunku 4**.



Rysunek 4 Schemat mechanizmu działania β -D-galaktozydazy

Pierwsze dwa etapy zaprezentowanego powyżej mechanizmu obejmują w pierwszym kroku wiązanie cząsteczki laktozy oraz rozszczepienie tego disacharydu odbywające się z udziałem reszt aminokwasowych enzymu o znaczeniu katalitycznym.

W następstwie wyżej wspomnianych etapów cząsteczka glukozy opuszcza wnękę katalityczną, zaś reszta galaktozylova pozostaje związana z enzymem.

Jeżeli w ostatnim etapie przedstawionego mechanizmu funkcję akceptora pełni woda, uwolniona zostaje cząsteczka D-galaktozy. W przypadku gdy funkcję tą pełni cząsteczka cukru (laktoza lub jeden z produktów jej hydrolizy), powstaje galaktooligosacharyd. Niezależnie więc od mechanizmu działania enzymu w pierwszym wspólnym kroku dla obu wariantów powstaje cząsteczka glukozy. W związku z powyższym nasz wybór dotyczy oznaczania zawartości laktozy na podstawie pomiaru stężenia glukozy, a nie galaktozy. Niezależnie więc od przebiegu reakcji rozkładu dwucukru zawartość laktozy równa jest oznaczonej zawartości glukozy. Sposób pomiaru laktozy bazujący na detekcji galaktozy byłby bardziej podatny na wpływ interferentów, a tym samym wynik analizy obciążony byłby większym błędem.

Reakcją preferowaną przez β -D-galaktozydazę jest na ogół reakcja hydrolizy. Ponadto w celu ukierunkowania biegnących reakcji w kierunku hydrolizy, przy zminimalizowaniu aktywności transferazowej zaproponowane przez nas warunki dotyczące przygotowania próbek do analizy precyzują, iż muszą to być próbki o dużym stopniu rozcieńczenia roztworami wodnymi.

Właściwości enzymów różnią się w zależności od źródła ich pochodzenia. Wyboru odpowiedniego enzymu, pod kątem zastosowania do analizy próbek żywności dokonaliśmy biorąc pod uwagę optymalne warunki działania enzymu, niezbędne aktywatory oraz inhibitory. Przykładowe, rozważane źródła β -D-galaktozydazy wraz z odpowiadającymi im parametrami zestawiono w **Tabeli 2**.

Tabela 2 Informacje dotyczące źródeł pochodzenia β -D-galaktozydazy wraz z charakterystyką poszczególnych enzymów [5].

Source	Molecular weight ($\times 10^3$)	pH optimum ^a	Temperature operation range (C)	Activators	Ionic inhibitors ^b
<i>Aspergillus niger</i>	124	3.0-4.0	55-60	None needed	None
<i>Aspergillus oryzae</i>	90	5.0-6.2	50-55	None needed	None
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	228	6.5-7.3	35	K, Mg, Mn	Ca, Na
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	201	6.6	37	K, Mg, Mn	Ca, Na
<i>Escherichia coli</i>	464	7.2	40	Na, K, Mg	--
<i>Bacillus circulans</i>	240	6.0	60	None needed	--
<i>Bacillus subtilis</i>	88	6.5-7.0	50	None needed	--
<i>Bacillus pasteurianus</i>	116	5.8-6.4	65	Mg	--
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	540	6.2-6.6	55	Mg	--
<i>Streptococcus thermophilus</i>	464	7.1	55	Na, K, Mg	Ca

O wyborze β -D-galaktozydazy ze szczepu *Aspergillus Niger* oraz *Aspergillus Oryzae* zdecydował fakt, że nie wymagają one zastosowania aktywatora, którego wprowadzenie do układu pomiarowego generuje dodatkowe koszty oraz może prowadzić do zakłóceń pomiaru. Zakłóceń pomiaru na skutek oddziaływań o charakterze interferencji, z którymiś ze składników stanowiących część czułą analitycznie na glukozę. Ponadto enzymy wyselekcjonowane ze

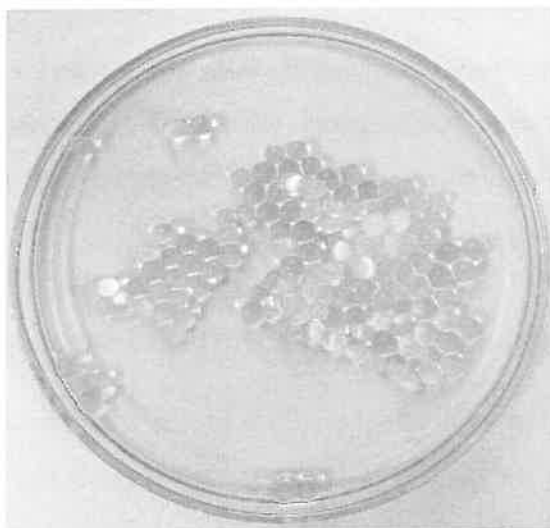
wspomnianych wyżej szczepów nie ulegają inhibicji w kontakcie z jonami Na^+ oraz Ca^{2+} , których obecność w żywności jest powszechna, szczególnie w przetworach mlecznych.

Sposób unieruchomienia enzymu

W zależności od konstrukcji sensora i zastosowanych zasad dotyczących pomiaru możliwe jest kilka rozwiązań dotyczących przechowywania/odizolowania enzymu w konkretnej przestrzeni reakcyjnej.

Zaproponowany przez nas sposób immobilizacji enzymu polega na jego inkapsulacji w otoczce z alginianu sodu. Proces przygotowania kapsułki obejmuje następujące po sobie etapy przygotowania wodnej zawiesiny alginianu wraz z enzymem oraz sieciowania otrzymanej zawiesiny jonami wapnia. Dodanie jonów wapnia do alginianu bogatego w monomery, fragmenty kwasu α -L-gulurynowego ze względu na duże powinowactwo do jonów wapnia powoduje powstanie żelu.

Obecność grup karboksylowych w strukturze alginianu wpływa na silną hydrofilowość utworzonego żelu, co ułatwia wnikanie roztworu do wnętrza kapsułki. Sieć przestrzenna żelu umożliwia pułapkowanie enzymu przy możliwości jednoczesnej dyfuzji substratów i produktów reakcji hydrolizy. Zdjęcie kapsułek z enzymem przedstawiono na **Rysunku 5**.

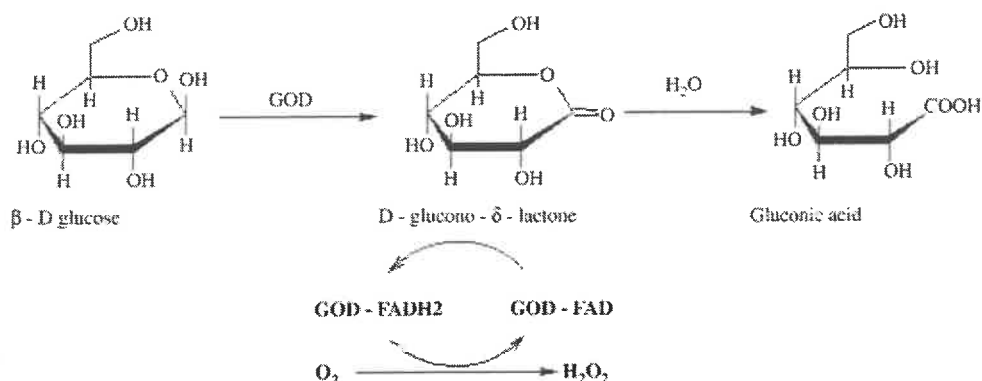


Rysunek 5 Kapsułki z alginianu sodu z β -D-galaktozydazą.

Wykorzystanie pasków enzymatycznych do oznaczania glukozy

Proces detekcji glukozy wykorzystujący oznaczenie kolorymetryczne bazuje na zastosowaniu dwóch enzymów. Pierwszy z enzymów to oksydaza glukozy, która katalizuje

reakcję utleniania glukozy, a proces ten można podzielić na dwa etapy zaprezentowane na Rysunku 6.



Rysunek 6 Schematyczne przedstawienie reakcji enzymatycznego utleniania glukozy [6].

Oksydaza glukozy (GOx) katalizuje utlenianie β-D-glukozy do D-glukono-δ-laktonu z wykorzystaniem tlenu cząsteczkowego jako akceptora elektronów dla tego enzymu, z jednoczesną produkcją nadtlenu wodoru w drugim etapie reakcji.

Do wykrycia nadtlenu wodoru wykorzystywany jest m. in. jodek potasu KI, który w reakcji ze wcześniej wspomnianym odczynnikiem ulega utlenieniu do brunatnego jodu. Reakcję tą można zapisać następującym równaniem $H_2O_2 + 2 I^- + 2 H^+ \rightarrow I_2 + 2 H_2O$. Reakcja utleniania chromogenu do produktu barwnego jest reakcją zmieniającą kolor pola reakcyjnego testu. Drugim enzymem stanowiącym składnik pola detekcyjnego jest peroksydaza chrzanowa służąca do przyspieszenia zachodzącej reakcji. W obecności glukozy pasek detekcyjny zabarwia się na kolor brązowo-żółty. W zależności od stężenia analitu zmienia się intensywność jego barwy.

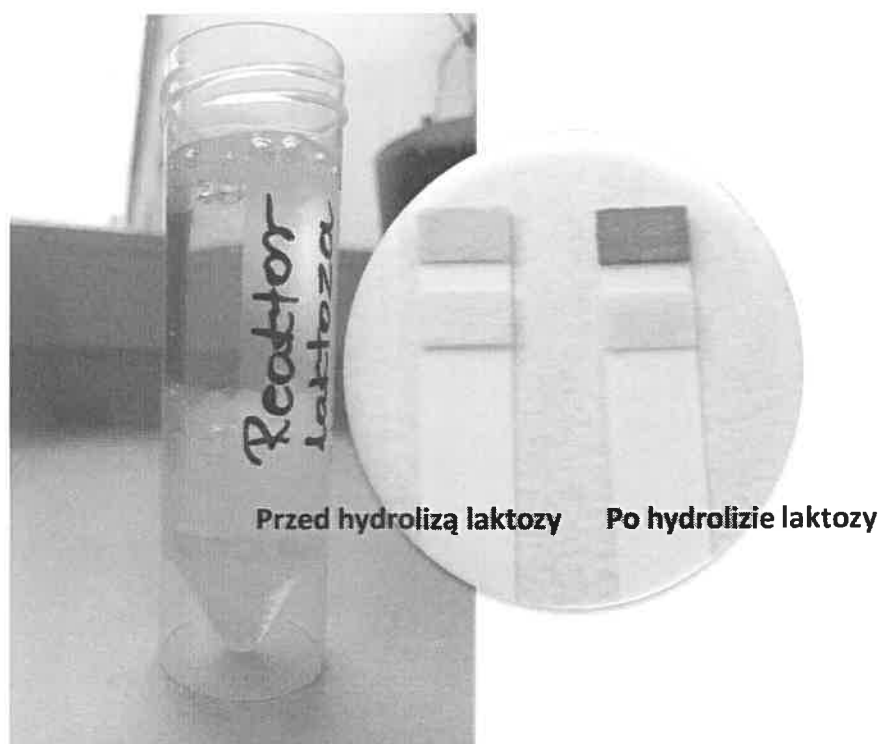
Schemat i zasada działania I pre-prototypu sensora

Schemat pre-prototypu obejmuje dwie części. Pierwsza z nich to naczynko (reaktor) do którego wprowadzana jest próbka żywności wraz z kapsułkami enzymatycznymi, druga część natomiast to paski do oznaczeń kolorymetrycznych, którymi pomiar wykonywany jest zaraz po umieszczeniu w naczynku próbki oraz po czasie 15 minut.

W celu wykrycia glukozy powstałej na skutek hydrolizy laktozy z wykorzystaniem komercyjnych pasków detekcyjnych oraz w celu sprawdzenia poprawności poczynionych przez nas założeń przeprowadziliśmy szereg następujących po sobie czynności.

1. Przygotowaliśmy roztwór laktozy o stężeniu 4.6% odpowiadający średniemu stężeniu laktozy w mleku krowim.
2. Dokonaliśmy pierwszego pomiaru stężenia glukozy za pomocą komercyjnie dostępnych pasków.
3. Unieruchomiliśmy enzym w kapsułkach.
4. Wprowadziliśmy enzym do roztworu laktozy i pozostawiliśmy na czas 15 min.
5. Po określonym czasie dokonaliśmy drugiego pomiaru zawartości glukozy z wykorzystaniem testu paskowego.

Otrzymane rezultaty zostały zaprezentowane poniżej na **Rysunku 7**.

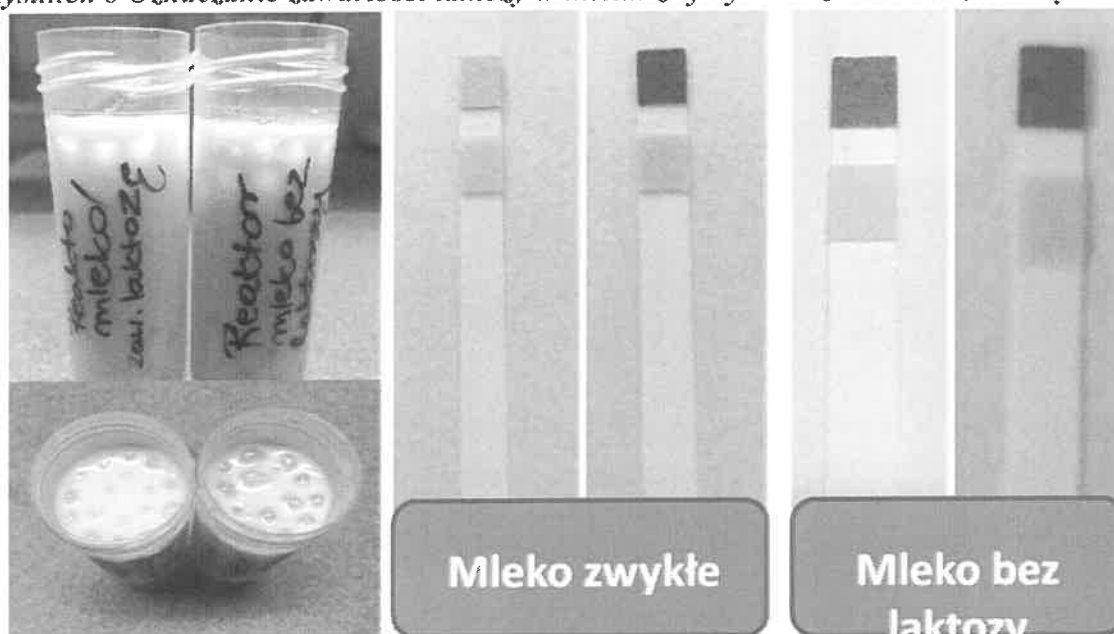


Rysunek 7 Układ reakcyjny rozkładu laktozy oraz widok pasków detekcyjnych przed i po reakcji hydrolizy.

Próby wykorzystania pre-prototypu w próbkach żywności

Analogiczne próby przeprowadzono na próbkach żywności (mleka zawierającego laktozę oraz mleka bez laktozy). W przypadku mleka zwykłego, zawierającego laktozę pomiar zawartości glukozy przed oraz po reakcji enzymatycznej hydrolizy za pomocą β -D-galaktozydazy wskazuje, iż w przypadku próbek o niskiej początkowej zawartości glukozy uzyskane różnice w zabarwieniu pola detekcyjnego umożliwiają jednoznacznie stwierdzenie obecności zwiększonej ilości glukozy, która odpowiada ilości zhydrolizowanej laktozy. Zmiana zabarwienia pola czulego analitycznie sensora paskowego zaprezentowana została na **Rysunku 8**. Rysunek ten prezentuje również kapsułkowane enzymy w próbkach badanej żywności.

Rysunek 8 Oznaczanie zawartości laktozy w mleku zwykłym oraz mleku bez laktozy.



Wyniki analizy

wskazują, iż w przypadku próbek o wysokiej początkowej zawartości glukozy ze względu na intensywne początkowe zabarwienie paska detekcyjnego pojawiają się trudności w określeniu ilości glukozy pochodzącej z rozkładu laktozy.

W związku z powyższym odrębne zagadnienie, podjęte w części badawczej stanowi opracowanie metody detekcji laktozy bazujące na wstępnym usunięciu początkowej glukozy obecnej w produktach spożywczych, co znacząco ułatwi dalszą identyfikację tego monosacharydu.

Usuwanie/obniżanie przed pomiarem początkowego stężenia glukozy

Rozważane podejście mające na celu obniżenie początkowej zawartości glukozy w próbkach żywności wymagało więc zaprojektowania odpowiedniej konstrukcji sensora tzw. sensora dwukomorowego, w którym w pierwszym naczyniu reakcyjnym usuwana jest glukoza pierwotnie obecna w próbce oraz powstający w trakcie tego procesu katalizowanego przez oksydazę glukozy nadtlenek wodoru. W tym celu wprowadziliśmy drugi obok oksydazy glukozy enzym, katalazę. Katalaza jest oksydoreduktazą katalizującą rozkład nadtlenu wodoru do wody oraz tlenu. Enzym ten został zamknięty w postaci mikrokapsulek enzymatycznych. W trakcie badań wykorzystano więc ponownie proces polimeryzacji oraz sieciowania warstwy nośnej prowadzony w obecności enzymów – oksydazy glukozy oraz katalazy. Oksydaza glukozy odpowiedzialna jest za proces utleniania glukozy do kwasu glukonowego, w trakcie którego wytwarzany jest nadtlenek wodoru. Nadtlenek wodoru usuwany jest ze środowiska reakcji za pomocą katalazy. Po procesie wstępnego usunięcia glukozy pierwotnie obecnej w próbce, w drugiej komorze sensora następuje właściwa reakcja enzymatycznego rozkładu laktozy do glukozy i galaktozy. Ilość laktozy jest więc oznaczana bezpośrednio na podstawie zawartości glukozy wykrywanej reflektometrycznie lub elektrochemicznie. Badania podjęte w ramach wprowadzenia rozwiązania konstrukcyjnego umożliwiającego usunięcie glukozy obecnej naturalnie w żywności obejmują również wybór odpowiednich materiałów stanowiących naczynia obu reaktorów, w których zachodzą reakcje enzymatyczne. Projekt sensora dwukomorowego wraz z krótkim opisem idei jego działania znajduje się na **Rysunku 9**.

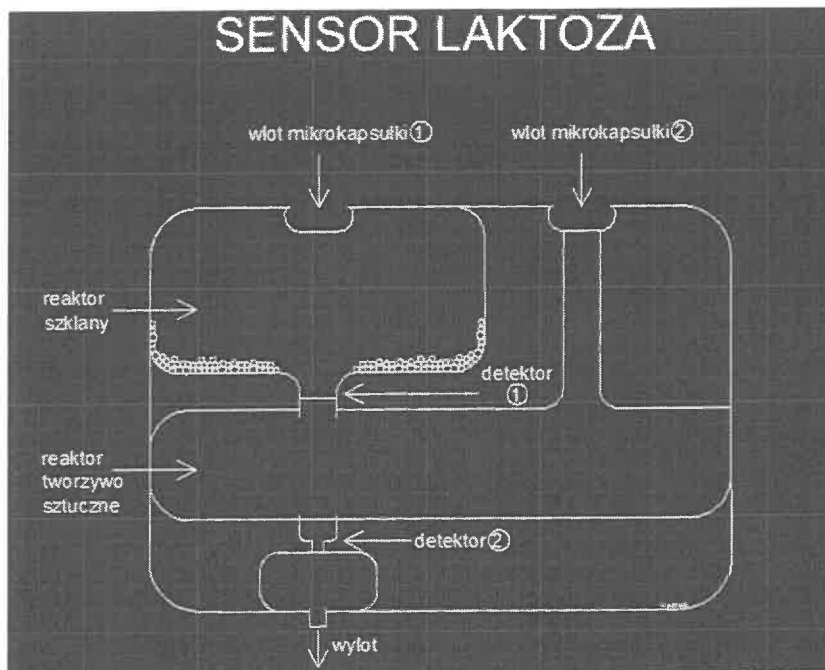
Wlot mikrokapsułki ① - zagłębienie do wprowadzania kapsulek rozkładających glukozę i nadtlenek wodoru oraz próbek żywności. Ewentualnie w tym miejscu można dodatkowo wkręcać młynek do mielenia próbek stałych.

Wlot mikrokapsułki ② - lej służący do wprowadzania kapsulek rozkładających laktozę na glukozę.

Detektor ① - detektor który mierzy zawartość glukozy i jeśli glukoza jest na odpowiednio niskim poziomie lub nie została wykryta umożliwia przelanie próbki do komory poniżej.

Detektor ② - detektor, który weryfikuje zawartość glukozy będącą wynikiem rozkładu laktozy.

Wloty powinny być na tyle szerokie, aby przez nie można wyrzucić kapsułki. Po pomiarze całe urządzenie powinno być przepłukane wodą, gdyż jest wielokrotnego użytku. Wymienne są tylko kapsułki enzymatyczne.



Rysunek 9 Schemat i zasada działania sensora dwukomorowego do oznaczania laktozy.

Poszczególne elementy konstrukcyjne sensora.

Wlot ① - miejsce wprowadzania kapsulek zawierających enzymy rozkładające glukozę do nadtlenku wodoru (oksydaza glukozy, katalaza). Jest to również otwór przez, który do detektora dostaje się próbka pokarmu. W przypadku pokarmów bardzo twardych w tej części powinien znajdować się młynek.

Komora 1, czyli reaktor szklany – konstrukcja tej komory ma na celu przyspieszenie rozkładu nadtlenu wodoru, który sam w sobie jest niekorzystny dla enzymów. Nadtlenek wodoru ulega rozkładowi w kontakcie ze szkłem, zwiększenie efektywności dekompozycji H_2O_2 osiąga się w wyniku pokrycia ścianek reaktora „nanostrukturalnym szkłem” nanokrzemionką SiO_2 . Jako efektywne materiały prowadzące do rozkładu nadtlenu wodoru wykorzystywane są również tlenki metali.

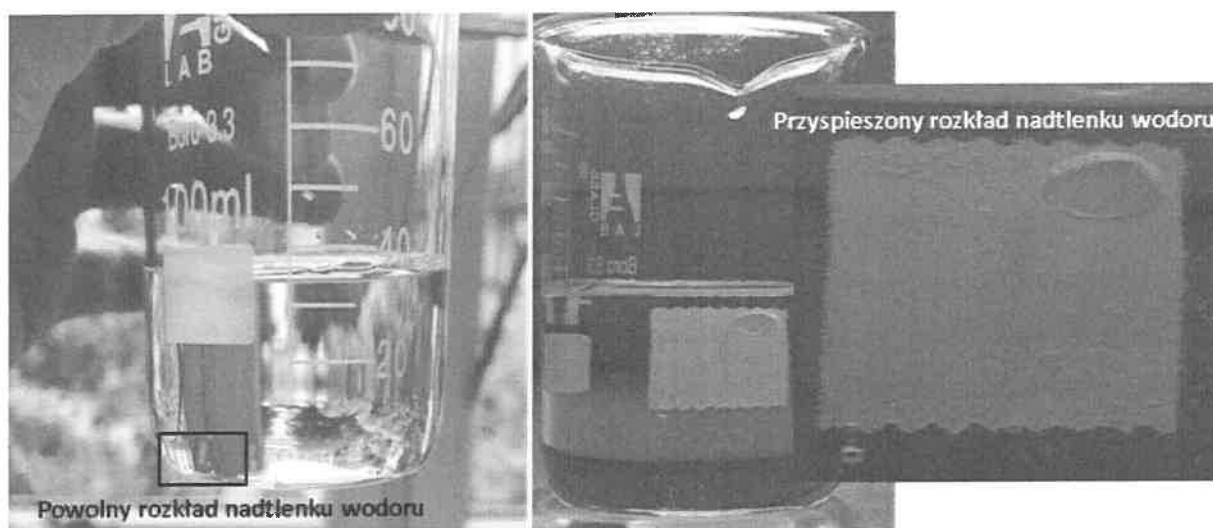
Detektor ① - Po upływie odpowiedniego czasu dokonywany jest pomiar (dokonywane są) pomiary kolorymetryczne zawartości glukozy w próbce. Odpowiednie wskazanie detektora umożliwia dalszą analizę próbki, która przedostaje się do komory 2 natomiast materiał enzymatyczny przeszkadzający (uniemożliwiający !) dalsze oznaczenie glukozy (zawartości laktozy) zostaje w komorze 1 i nie zaburza pomiaru.

Wlot ② - miejsce wprowadzania kapsulek zawierających enzymy rozkładające laktozę do glukozy i galaktozy, a w następnym kroku glukozę do nadtlenu wodoru, który w obecności peroksydazy chrzanowej daje reakcję barwną będącą podstawą oznaczenia.

Komora 2 – elementy konstrukcyjne komory nie powinny powodować rozkładu nadtlenu wodoru. Odczynnik ten przechowywany jest w pojemnikach z polietylenu, więc jest to optymalny materiał na element konstrukcyjny reaktora.

Detektor ② - wskazuje ostateczną zawartość glukozy, czyli laktozy w próbce.

W celu uzyskania jak najkrótszego czasu prowadzenia oznaczenia w sensorze zastosowano dodatkowe rozwiązanie mające na celu zwiększenie szybkości rozkładu nadtlenu wodoru. Efekt ten został osiągnięty poprzez naniesienie na ścianki komory reakcyjnej nanostrukturalnej krzemionki SiO₂. Zastosowane podejście wraz z wizualną oceną stopnia degradacji nadtlenu wodoru przedstawiono na **Rysunku 10**.



Rysunek 10 Zdjęcia obrazujące stopień rozkładu nadtlenu wodoru na powierzchni szklanej oraz powierzchni pokrytej dodatkowo nanostrukturalną krzemionką.

Próbki żywności stanowią niezwykle złożoną matrycę o zmiennym składzie również w zależności od partii i źródła pochodzenia produktów zastosowanych do jej wyprodukowania. Ze względu m. in. na obecność cukrów prostych w tak złożonej matrycy pomiar zawartości glukozy jest porównawczy. Przedstawione w powyższym opisie, jak również na **Rysunku 9** rozwiązanie konstrukcyjne zakłada, iż sensor jest wielokrotnego użytku, a po każdym zastosowaniu konieczne jest jego dokładne umycie.

Źle wyczyszczone przestrzenie reakcyjne urządzenia mogą prowadzić do wielu błędów pomiarowych. Najlepszym rozwiązaniem dla użytkownika jest więc możliwość korzystania z urządzenia z elementami jednorazowymi. Wymienne podjednostki zawierające część czułą analitycznie dają gwarancję wiarygodnego pomiaru. W związku z powyższym odeszliśmy od koncepcji reaktora dwukomorowego skupiając się na przygotowaniu pasków detekcyjnych, które umożliwią wykrycie mniejszych ilości glukozy niż paski dostępne w handlu.

Przygotowanie pasków detekcyjnych

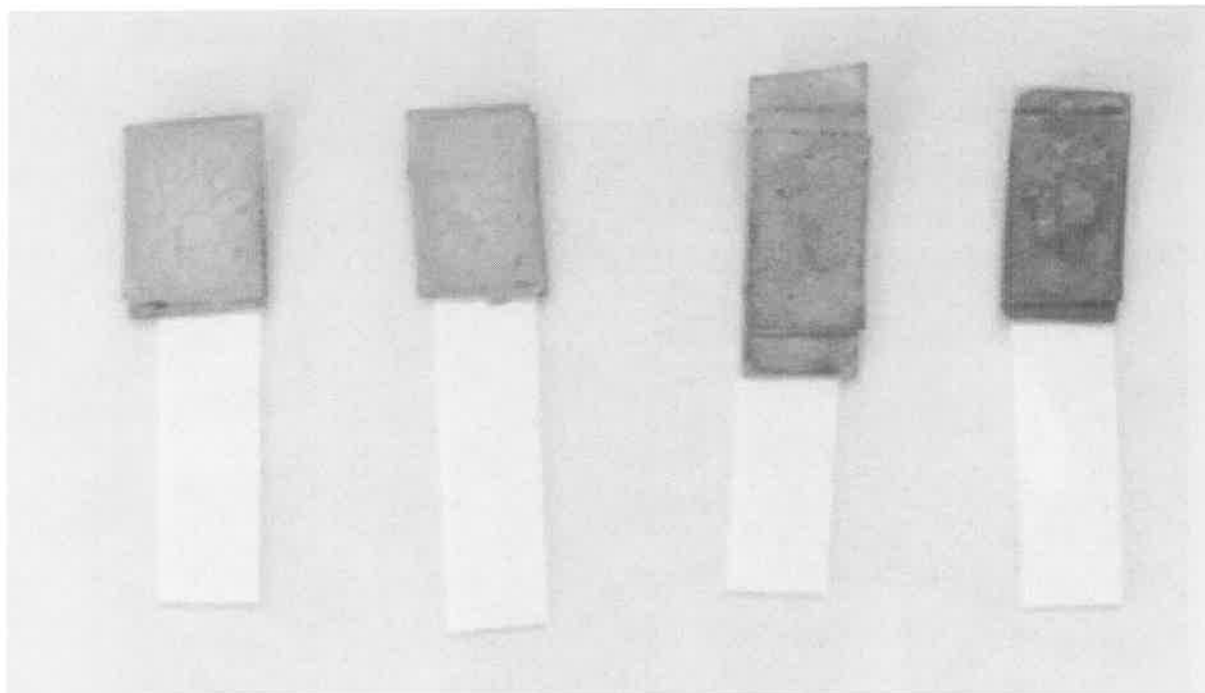
W związku z faktem, iż dostępne w handlu paski do oznaczeń kolorymetrycznych, przeznaczone do wykrywania glukozy służą jedynie do oznaczeń tego monosacharydu na poziomie powyżej 100 mg/dl przygotowaliśmy własne paski testowe umożliwiające oznaczanie niższych zawartości glukozy.

W tym celu wykorzystaliśmy bibułę nitrocelulozową, którą nasączaliśmy mieszaniną zawierającą oksydazę glukozy, peroksydazę chrzanową oraz barwnik o-dianizydynę lub w drugiej wersji jodek potasu. Trzy nasączone wyżej wymienionymi składnikami warstwy bibuły nitrocelulozowej sprasowaliśmy dodając niewielką ilość kleju. W przypadku wykorzystania jodku potasu przebieg reakcji jest analogiczny jak w przypadku komercyjnych pasków, których opis pod kątem zachodzących reakcji został przedstawiony na początku rozdziału. Drugim zaproponowanym przez nas barwnikiem była 3,3'-dimetoksybenzydyna. W przypadku rozwiązania bazującego na tym barwniku, następującą po sobie sekwencję procesów można zaprezentować następującym schematem.

(a) przekształcenie glukozy przez oksydazę glukozową w kwas glukonowy przy jednoczesnym wytworzeniu nadtlenu wodoru.

(b) redukcja nadtlenu wodoru przez peroksydazę w obecności o-dianizydyny, która na skutek utlenienia tworzy barwny produkt końcowy.

Otrzymane układy do kolorymetrycznej oceny stężenia glukozy zaprezentowano na **Rysunku 11**.



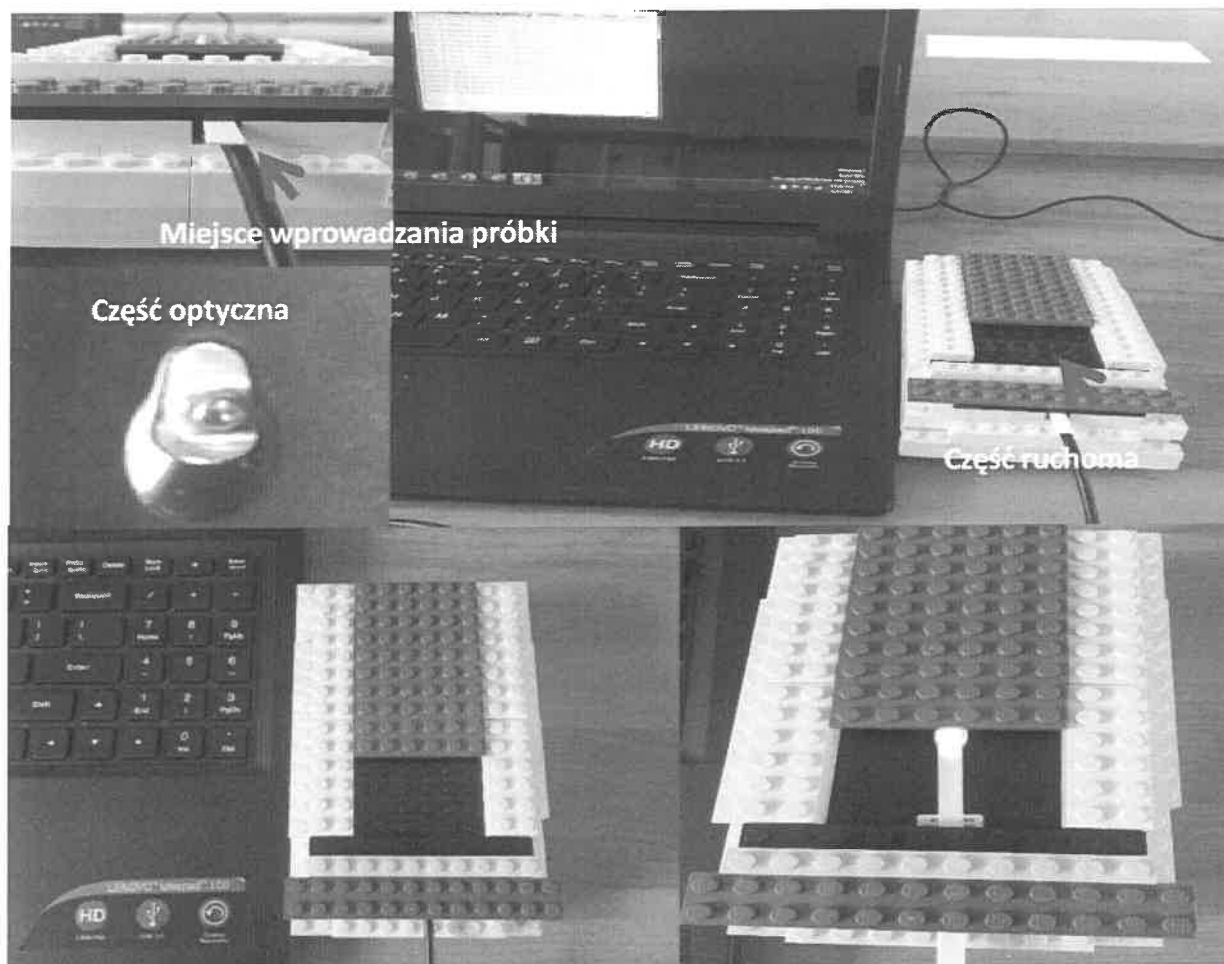
Rysunek 11 Paski do detekcji glukozy.

Przygotowane przez nas paski detekcyjne umożliwiają wykrywanie dwukrotnie mniejszych ilości glukozy niż produkt dostępny komercyjnie.

Wykrywanie zawartości laktozy w próbkach żywności

Pełen zestaw pomiarowy pre-prototyp wykorzystany przez nas do wykrywania laktozy w próbkach spożywczych składa się z części czułej analitycznie i z części optycznej. Zdjęcie pełnego pre-prototypu widoczne jest na **Rysunku 12**.

Próbka oświetlona została wbudowanym źródłem światła białego ciągłego o znanej charakterystyce barwowej. Za detektor posłużył komercyjny detektor charakterystycznych długości fal w zakresie 416-944 nm (w 3 zakresach i 12 podzakresach). Dane pomiarowe zawierające informacje o czasie pomiaru, temperaturze procesu oraz natężeniu poszczególnych wybranych zakresów barwowych przed i po reakcji. Dane pomiarowe z układu detekcyjnego przesyłane są za pomocą złącza USB bezpośrednio na komputer pomiarowy i są rejestrowane przez program terminalowy. Następnie przeprowadzone pomiary zostają zapisywane do plików csv. Dalsza obróbka danych następuje poprzez skrypty w programie Python.



Rysunek 12 Prototyp sensora optycznego do oznaczania zawartości laktozy w próbkach żywności.

Pomiar 1 - 04: 8:49:00									
62062.48	39851.82	41792.59	39040.25	20020.13	7476.32	31	5041		
62062.48	42121.1	41795.12	38018.28	20021.38	7477.27	31	5042		
62062.48	42122.43	41795.76	38043.24	20021.38	7477.27	31	5043		
62062.48	39840.51	41791.42	39012.29	20021.38	7476.92	31	5044		
62062.48	39853.82	41791.42	38019.28	20023.28	7477.27	31	5045		
62062.48	42123.76	41795.12	38021.28	20024.53	7476.22	31	5046		
62062.48	42118.45	41795.76	38041.24	20022.22	7477.27	31	5047		
62062.48	42119.78	41795.76	38014.29	20023.28	7476.32	31	5048		
62062.48	42117.12	41792.58	38043.24	20023.28	7477.27	31	5049		
62062.48	42022.05	41795.12	38020.28	20026.43	7477.27	31	5050		
62062.48	42118.45	41796.12	38021.38	20026.43	7476.92	31	5051		
62062.48	42118.45	41795.12	38020.28	20028.53	7478.22	31	5052		
62062.48	42044.18	41795.12	38040.28	20029.28	7477.27	31	5053		
62062.48	41967.44	41792.59	38043.24	20029.28	7477.27	31	5054		
62062.48	42119.78	41797.25	38051.28	20027.48	7477.27	31	5055		
62062.48	39845.18	41799.63	38052.27	20027.48	7477.27	31	5056		
62062.48	41927.44	41798.46	38045.29	20025.28	7476.92	31	5057		
62062.48	39857.87	41800.8	38053.27	20028.53	7477.27	31	5058		
62062.48	42119.48	41798.46	38021.38	20027.48	7476.92	31	5059		
62062.48	42119.48	41798.46	38023.27	20030.53	7477.27	31	5060		
62062.48	42117.12	41799.63	38051.28	20030.53	7477.27	31	5061		
62062.48	42111.81	41800.8	38024.27	20033.78	7477.27	31	5062		
62062.48	41413.68	41799.63	38027.27	20033.78	7477.27	31	5063		
62062.48	39843.85	41805.5	38052.27	20034.83	7477.27	31	5064		
62062.48	42109.16	41801.98	38051.28	20031.58	7477.27	31	5065		
62062.48	42109.16	41804.32	38026.27	20035.83	7477.27	31	5066		
62062.48	39833.67	41834.12	38029.25	20035.83	7477.27	31	5067		
62062.48	42114.47	41807.84	38056.22	20036.93	7477.27	31	5068		
62062.48	39841.2	41804.32	38030.26	20037.98	7476.22	31	5069		
62062.48	42110.49	41805.5	38027.27	20039.53	7476.22	31	5070		
62062.48	39805.37	41813.71	38022.28	20041.58	7476.51	31	5071		

Rysunek 13 Program Termite wykorzystany do zbierania danych.

Pre-prototyp testowano w następującej grupie produktów:

Produkty mleczne – mleko (zwykłe), mleko bez laktozy, napój mleczny, serek wiejski, ser mozzarella

Produkty roślinne – napój migdałowy, napój owsiany

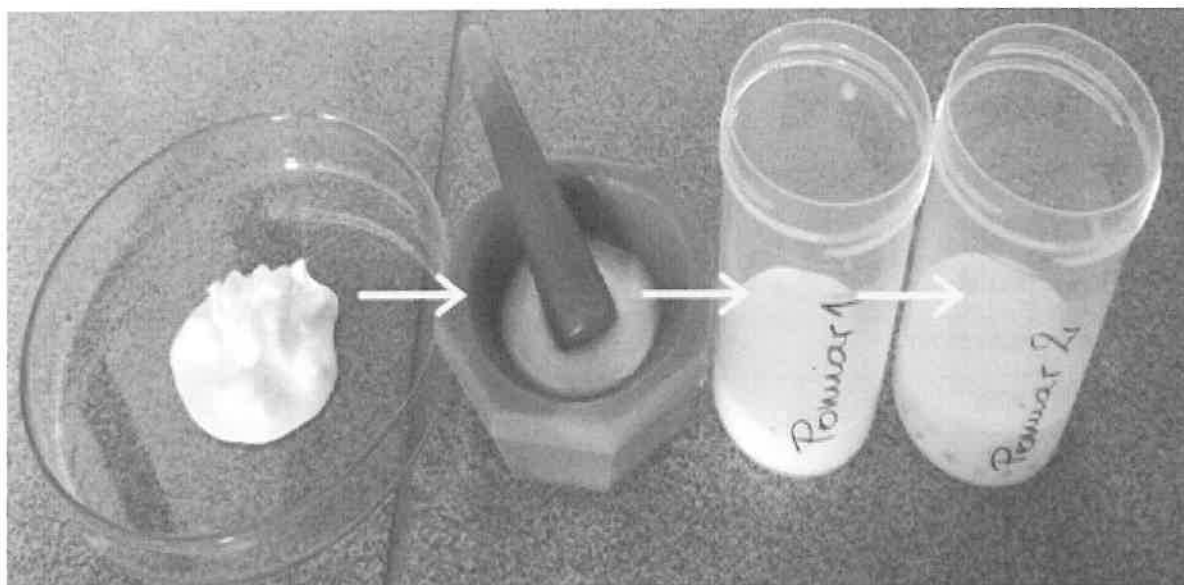
Soki – sok pomarańczowy, sok warzywny

W celu dokonania identyfikacji laktozy w badanych produktach spożywczych w pierwszym kroku analizy odpowiednio przygotowaliśmy próbki zgodnie z procedurą opisaną poniżej:

1. Pobranie niewielkiej ilości próbki
2. Zmielenie próbki w obecności 0.1 M buforu fosforanowego.

Mielenie prowadzono zarówno w przypadku próbek stałych, jak i ciekłych co umożliwiło dokładne wymieszanie próbki z roztworem buforowym. Procedurę analizy próbek prezentuje

Rysunek 14.



Rysunek 14 Procedura analizy próbek żywności.

Uzyskane rezultaty zestawiono w **Tabeli 3.**

Tabela 3 Zestawienie uzyskanych wyników dla różnych próbek żywności. „+” – obecność laktozy, „-” - brak laktozy, „”- nie stwierdzono ze względu na interferencje*

Nazwa produktu	Obecność laktozy
Mleko świeże 2% OSM Garwolin	+
Mleko wypasione UHT 3,2% Mlekovita	+
Mleko „bez laktozy” UHT 3,2% OSM w Łowiczu	*
Napój migdałowy UHT Alpro	-
Napój owsiany UHT GoVege	-
Napój mleczny o smaku bananowym Mullermilch	+
Serek wiejski	+
Sok pomarańczowy	-/*
Sok warzywny	*

Występujące interferencje spowodowane są zbyt wysokim początkowym stężeniem glukozy w próbce, które uniemożliwia z odpowiednią czułością wykrycie glukozy będącej produktem hydrolitycznego rozkładu laktozy. Ponadto zbyt intensywne zabarwienie produktu powoduje zmianę koloru pola detekcyjnego co fałszuje odczyt.

Podsumowanie

Zaproponowane przez nas podejście mające na celu identyfikację laktozy w produktach spożywczych jest rozwiązaniem prostym i bezpiecznym dla użytkownika. Ponadto rezultaty uzyskiwane w trakcie testów pre-prototypu wskazują dużą zgodność z analizą ICP-MS.

Przed wdrożeniem jednakże zaproponowana metoda identyfikacji laktozy w próbkach spożywczych wymaga pewnych modyfikacji i udoskonaleń związanych z wyeliminowaniem

wpływu interferentów. Znaczne ograniczenia zastosowania sensora zaobserwowaliśmy w obszarze detekcji glukozy w próbkach żywności zawierających wysokie, początkowe stężenia tego monosacharydu. Ponadto żywność bogata w naturalne i/lub sztuczne barwniki poprzez zakłócenie odczytu barwy powstającej na skutek właściwej reakcji enzymatycznej uniemożliwia uzyskanie wyniku. W związku z powyższym kierunek dalszych badań w zakresie eliminowania zakłócającego wpływu interferentów na pomiar powinien koncentrować się wokół zagadnień związanych z obniżaniem początkowej ilości glukozy w próbce przy zachowaniu jednorazowego charakteru pomiaru oraz na usuwaniu intensywnego zabarwienia wywołanego na skutek obecności barwników pochodzenia naturalnego i sztucznego.

5. Koncepcja elektrochemicznego oznaczania laktozy w oparciu o nanostruktury złota (II preprototyp)

Główne założenia i cele

Odmienną koncepcją zastosowaną w celu przygotowania sensora oznaczania laktozy jest wykorzystanie katalizatora nanostrukturalnego z detekcją elektrochemiczną. Nanostruktury w porównaniu z materiałami objętościowymi wykazują odmienne właściwości i charakteryzują się wzmożoną aktywnością katalityczną. Obok enzymów odrębną grupę, szeroko wykorzystywanych katalizatorów w procesie elektrootleniania glukozy stanowią metale m.in.: złoto. Natomiast nanostruktury niemetaliczne, głównie materiały węglowe są powszechnie stosowane jako nośniki dla bogatej gamy układów katalitycznych. Tak szerokie wykorzystanie matrycy węglowych w roli faz nośnych uwarunkowane jest ich: wysoką stabilnością fizykochemiczną, zadawalającą wytrzymałością mechaniczną, dobrym przewodnictwem elektronowym oraz silnym rozwinięciem powierzchni właściwej związanym m.in. z wysokim stopniem porowatości.

Celem badań przedstawionych w niniejszym rozdziale było otrzymanie układów katalitycznych do oznaczania laktozy bazujących na nanostrukturach złota, jak również dokonanie ich charakterystyki fizykochemicznej i elektrochemicznej. Ponadto określenie wpływu interferentów na ich aktywność w omawianym procesie, a tym samym ocena przydatności do zastosowań w próbkach żywności. Do zadań związanych z tematyką niniejszego rozdziału należało również przygotowanie materiałów hybrydowych bazujących na nanostrukturach złota osadzonych na nośnikach węglowych.

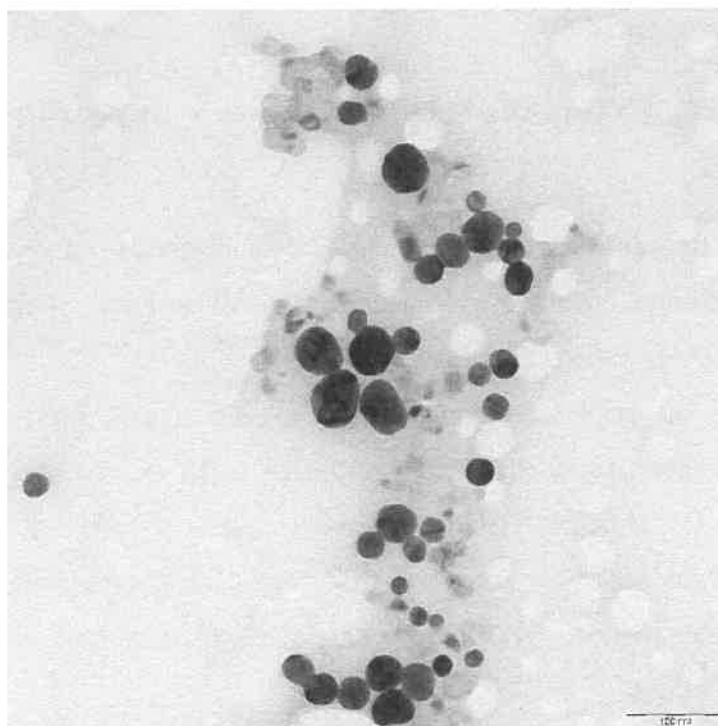
Pomiar zawartości laktozy odbywa się w oparciu o te same założenia, które stanowią podstawę działania sensora opisanego w **Rozdziale 4**. Enzym β -D-galaktozydaza rozkłada laktozę do glukozy i galaktozy. Oznaczanie glukozy dokonywane jest natomiast na drodze elektrochemicznej z wykorzystaniem katalizatora nanostrukturalnego stanowiącego przez materiał hybrydowy złożony z nanocząstek złota osadzonych na nośniku węglowym. Oznaczanie glukozy w próbce odbywa się dwukrotnie, po wprowadzeniu próbki na elektrodę i po enzymatycznej hydrolizie. Pomiar jest więc porównawczy.

Otrzymanie nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami i ich charakterystyka fizykochemiczna

Początkowy etap wytworzenia złotych nanostruktur obejmował przygotowanie wodnych roztworów borowodoru sodu (NaBH_4) o stężeniu $0,016 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ i kwasu fosfododekamolibdenowego ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) o stężeniu $0,0042 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ oraz zmieszanie ich w stechiometrycznej ilości. Powstały ciemnoniebieski roztwór heteropolibłękitu intensywnie mieszano i po upływie 5 minut dodano do niego 3 ml roztworu trójhydratu kwasu tetrachlorozłotowego(III) o stężeniu $0,0075 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Powstaniu nanostrukturalnego złota towarzyszyła zmiana ciemnoniebieskiej barwy mieszaniny na ciemnoczerwoną.

Po zakończeniu syntezy faza koloidalnego złota była na przemian odwirowywana i przemywana wodą destylowaną, procedurę oczyszczania powtórzono trójrotnie. Po zakończeniu opłukiwania nanocząstki złota zostały zatężone w wirówce do objętości 0,5 ml.

Charakterystyka mikroskopowa nanocząstek złota **AuNPs-PMo₁₂** została wykonana techniką transmisyjnej mikroskopii elektronowej. Otrzymane rezultaty są zgodne z analizą SEM, potwierdzając obecność jednorodnych, sferycznych nanostruktur złota o rozmiarach średnic mieszczących się w przedziale $28\div 47 \text{ nm}$. Obraz TEM nanocząstek złota modyfikowanych anionami $\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$ prezentuje **Rysunek 15**.



Rysunek 15 Obraz TEM nanocząstek złota modyfikowanych anionami $\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$.

Otrzymywanie nanocząstek złota na nanorurkach węglowych

Nanocząstki złota modyfikowane kwasem fosfododekamolibdenowym osadzone na wielościennych nanorurkach węglowych (MWNT/AuNPs-PMo₁₂) zostały zsyntezowane zgodnie z procedurą opisaną w uprzednim podrozdziale, jednakże w obecności nośnika węglowego. Jako nośnik wykorzystane zostały wielościenne nanorurki węglowe oczyszczone i poddane chemicznej funkcjonalizacji zgodnie z procedurą opisaną poniżej:

1. Poddanie nośnika węglowego godzinnemu oddziaływaniu stężonego kwasu solnego w temperaturze 85 °C. Etap ten prowadzi do rozpuszczenia pozostałości głównie żelaza.
2. Kilkukrotne przemywanie wodą destylowaną do momentu uzyskania obojętnego odczynu zawiesiny.
3. Poddanie nośnika węglowego ośmiogodzinnemu gotowaniu w 3 mol·dm⁻³ kwasie azotowym(V). Etap ten prowadzi do usunięcia w szczególności węglowych zanieczyszczeń oraz chemicznego utlenienia powierzchni arkuszy węglowych.
4. Kilkukrotne przemywanie wodą destylowaną do momentu uzyskania obojętnego odczynu oraz wysuszenie nośnika w atmosferze powietrza w temperaturze podwyższonej do 60°C.

Synteza układu MWNT/AuNPs-PMo₁₂ przebiegała w następujących zaprezentowanych poniżej etapach:

1. Nanorurki węglowe wprowadzone do wodnego roztworu heteropolikwasu fosfododekamolibdenowego o stężeniu 0,0042 mol·dm⁻³ poddane zostały działaniu ultradźwięków przez 1,5 godziny.
2. Następnie mieszanie zawiesiny danego nośnika zostało kontynuowane na mieszadle magnetycznym. Dodatek stechiometrycznej ilości świeżo przygotowanego wodnego roztworu borowodorku sodu o stężeniu 0,016 mol·dm⁻³ do zawiesiny nanorurek rozdyspergowanych w roztworze kwasu fosfododekamolibdenowego prowadzi do wytworzenia roztworu heteropolibłękitu, w którym mieszanie nośnika prowadzone było jeszcze 5 minut.
3. Kolejny etap polega na wkropleniu roztworu trójhydratu kwasu tetrachlorozłotowego(III) o stężeniu 7,1·10⁻⁴ mol·dm⁻³ do mieszaniny nanorurek i

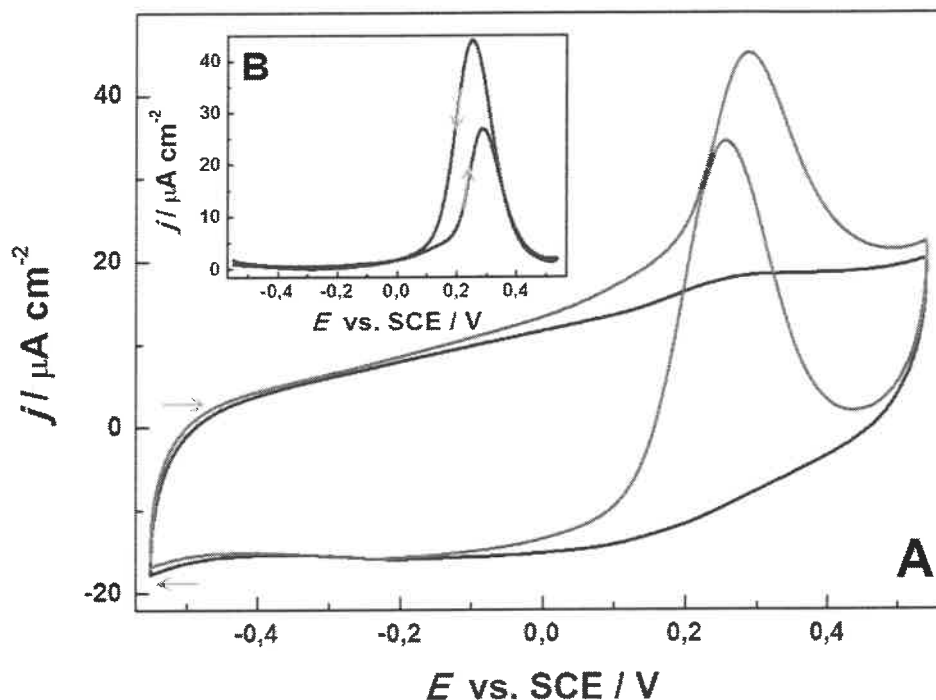
heteropolibłękitu fosfododekamolibdenowego. Intensywne mieszanie kontynuowano przez 30 minut.

4. W ostatnim kroku syntezy nośnik węglowy dekorowany nanocząstkami złota został oddzielony od roztworu za pomocą wirówki i trójrotnie przemyty wodą destylowaną.
5. Katalizator pozostawiono do wysuszenia w powietrzu (w temperaturze pokojowej).

Ilość HAuCl_4 zastosowana w trakcie syntezy została dobrana tak, aby wytworzyć metaliczne nanocząstki stanowiące 30% masowych katalizatora. Przemycanie wodą destylowaną prowadzone było w celu usunięcia nieprzereagowanych substratów oraz nanocząstek złota niezwiązanych z powierzchnią matrycy węglowej.

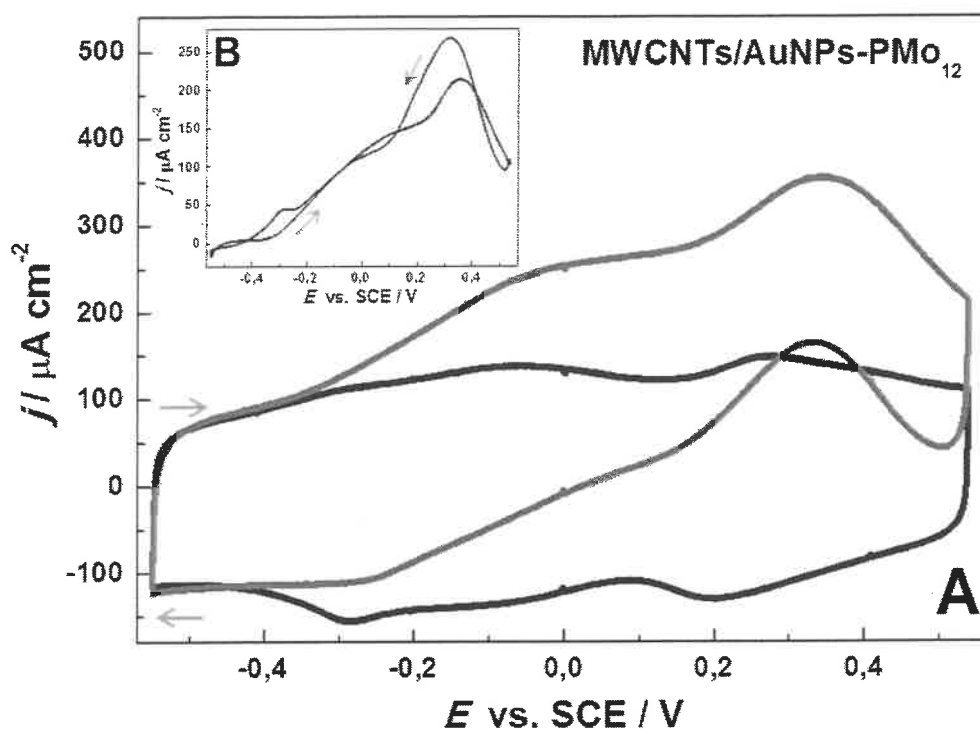
Charakterystyka elektrochemiczna układów katalitycznych

Dla przygotowanych materiałów katalitycznych w celu oceny aktywności katalitycznej w procesie elektrootleniania glukozy zarejestrowano krzywe woltamperometryczne w roztworze buforu fosforanowego o $\text{pH}=7$. Analiza krzywych woltamperometrycznych wskazuje, iż nanocząstki złota stanowią aktywny układ katalityczny w procesie elektrootleniania glukozy w środowisku buforu fosforanowego. Na krzywych prądowych zarejestrowanych w obecności glukozy widoczne są dwa piki związane z mechanizmem elektrootleniania glukozy. Dla nanostruktur tych uzyskano następujące maksymalne gęstości prądowe: $27 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Pik 1) oraz $44 \mu\text{A}/\text{cm}^2$ (Pik-2). Krzywe wolt amperometryczne dla nanostruktur **AuNPs-PMo₁₂** zaprezentowano na **Rysunku 16**.



Rysunek 16 Krzywe woltamperometryczne dla nanocząstek złota modyfikowanych monowarstwami fosfododekamolibdenianów naniesionych na elektrodę GC, zarejestrowane w roztworze buforu fosforanowego o pH=7 (-) oraz w roztworze buforu fosforanowego z dodatkiem glukozy o stężeniu $50 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (-) (A); Krzywa woltamperometryczna elektrootleniania glukozy po odjęciu prądów tła (B); Szybkość polaryzacji: $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

Następnie dla układu katalitycznego złożonego z nanostruktur złota modyfikowanych $\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$ osadzonych na nanorurkach węglowych zarejestrowano krzywe woltamperometryczne w roztworze buforu fosforanowego o pH=7 pozbawionego glukozy oraz w roztworze buforu zawierającego glukozę w stężeniu $50 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$. Krzywe te, jak również wartości gęstości prądów katalitycznych po odjęciu prądów tła zaprezentowano na **Rysunku 17**.



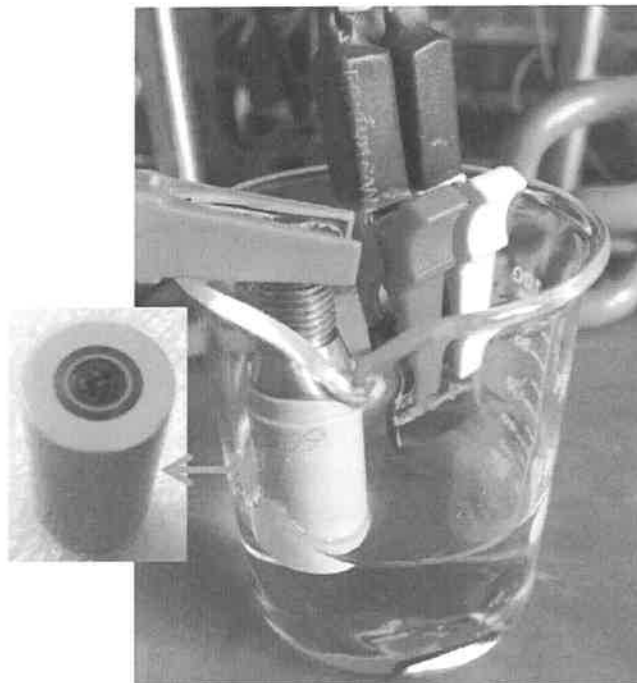
Rysunek 17 Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane dla warstwy nanocząstek złota osadzonych na nanorurkach węglowych (*MWCNTs/AuNPs-PMO₁₂*). Odpowiedź woltamperometryczna zarejestrowana w buforze fosforanowym o pH=7 (czarna krzywa) oraz w obecności glukozy o stężeniu 50 mmol·dm⁻³ (czerwona krzywa) (A); Prądy katalityczne utleniania glukozy (po odjęciu prądów tła) (B); Szybkość polaryzacji: 50 m·Vs⁻¹.

Dane woltamperometryczne uzyskane dla układu kompozytowego **MWCNTs/AuNPs-PMO₁₂** wskazują, iż jest on aktywny katalitycznie w procesie elektrotleniania glukozy. Na krzywej woltamperometrycznej zarejestrowanej w obecności tego monosacharydu widoczne są dwa piki z maksimum usytuowanym przy potencjałach 0,35 V (Pik 1) i 0,32 V (Pik 2) związane z procesem elektrotleniania glukozy.

Jak wynika z zaprezentowanych powyżej woltamperogramów osadzenie nanocząstek złota na matrycy nośnej skutkowało zwiększeniem aktywności katalitycznej układu **MWCNTs/AuNPs-PMO₁₂**, co wiązało się ze wzrostem generowanych gęstości prądów w rozważanym procesie elektrodowym. Obecność podłoża węglowego skutkowała więc wzmocnieniem sygnału prądowego. Wprowadzenie nanorurek węglowych jako nośnika dla nanokrystalitów złota, sprzyja więc uzyskaniu korzystnych właściwości przewodzących.

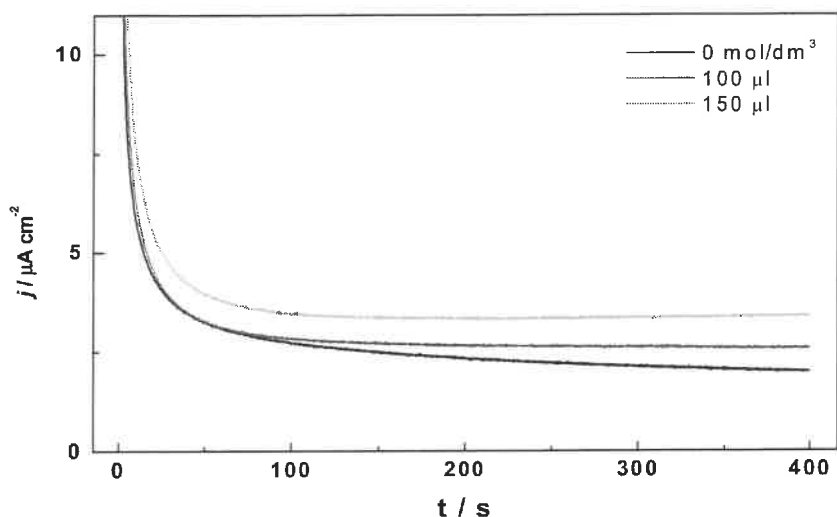
Drugi pre-prototyp sensora oznaczania laktozy

Drugi pre-prototyp sensora oznaczania glukozy opiera się na różnicowym pomiarze amperometrycznym prowadzonym w układzie dwuelektrodowym. W tym celu wykorzystaliśmy dwie elektrody węglowe oraz potencjostat CH Instruments. Schemat układu pomiarowego zaprezentowano na **Rysunku 18**.



Rysunek 18 Schemat układu pomiarowego wykorzystanego do oznaczania laktozy.

Katalizator ten wykorzystaliśmy w układzie modelowym w celu sprawdzenia poprawności przyjętych założeń. Zarejestrowaliśmy krzywe amperometryczne w roztworze pozbawionym glukozy oraz w roztworze zawierającym kolejne mikromolowe dodatki glukozy o stężeniu $1 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$. Kolejne dodatki glukozy doprowadzały jej stężenie w finalnym badanym roztworze do $2 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ po pierwszym dodatku natomiast do $3 \text{ mol} \cdot \text{dm}^{-3}$ po drugim dodatku. Uzyskane amperogramy dla układu **MWCNTs/AuNPs-PMo₁₂** zaprezentowano na **Rysunku 19**.



Rysunek 19 Krzywe amperometryczne zarejestrowane przy potencjale 0.5 V dla układu katalitycznego MWCNTs/AuNPs-PMO₁₂ przy braku glukozy (-) oraz w obecności glukozy o stężeniu 2 mol·dm⁻³ (-) oraz 3 mol·dm⁻³ (-).

W układzie modelowym kolejne dodatki glukozy skutkowały wzrostem gęstości prądowych co pozwalało na zidentyfikowanie wzrastającej ilości tego monosacharydu w naczynku pomiarowym. W związku z powyższym sensor ten został zaaplikowany do badania próbek docelowych w postaci produktów spożywczych.

Wykrywanie laktozy w próbkach żywności

Pre-prototyp posiadający część czułą analitycznie w postaci nanostruktur węglowych z nanocząstkami złota wykorzystaliśmy do badania próbek żywności. Analizie zostały poddane następujące produkty spożywcze: mleko, mleko bez laktozy, serek wiejski oraz sok pomarańczowy. Wyniki uzyskanej analizy zostały zestawione w **Tabeli 4**.

Tabela 4 Zestawienie uzyskanych wyników dla różnych próbek żywności. „+” – obecność laktozy, „-” - brak laktozy, „”- nie stwierdzono ze względu na interferencje.*

Nazwa produktu	Obecność laktozy
Mleko wypasione UHT 3,2%	-
Mlekovita	
Mleko „bez laktozy” UHT 3,2%	-
OSM w Łowiczu	
Serek wiejski	-
Sok pomarańczowy	+

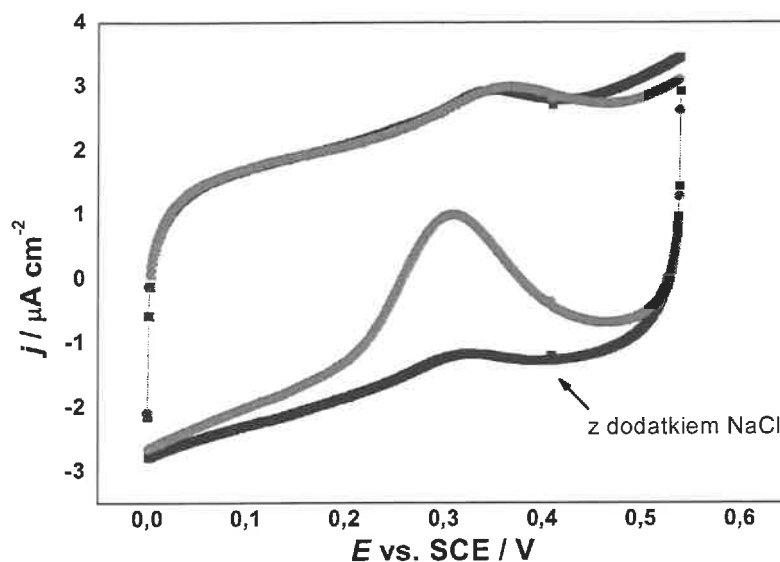
Wyniki pomiarów próbek żywności znacznie różnią się od rezultatów uzyskanych dla pre-prototypu scharakteryzowanego szczegółowo w **Rozdziale 4** oraz rezultatów otrzymanych na drodze analizy ICP-MS. Dostarczyły one jednak cennych informacji dotyczących wpływu interferencji pochodzących ze strony matrycy na ostateczne wskazania sensora.

Wpływ interferentów z próbek żywności

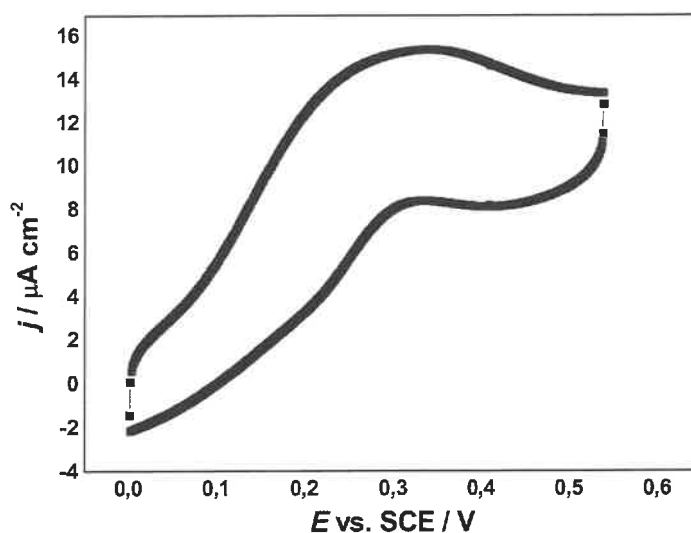
Dla układu katalitycznego stanowiącego przez materiał hybrydowy w postaci nanostruktur węglowych oraz nanokrystalitów złota MWNT/AuNPs-PMo₁₂ określiliśmy wpływ dwóch najczęściej występujących w żywności interferentów. Interferenty te to chlorek sodu oraz kwas L-askorbinowy, które są środkami konserwującymi oraz wzmacniaczami smaku.

Wpływ wyżej wymienionych substancji na część czułą analitycznie sensora zdiagnozowaliśmy na podstawie serii krzywych woltamperometrycznych zarejestrowanych dla procesu elektrootleniania glukozy przy braku oraz w obecności kolejnych dodatków substancji zakłócających sygnał analityczny. Rozważane w niniejszym podrozdziale krzywe woltamperometryczne zostały zaprezentowane na **Rysunku 20** oraz **21**.

Krzywe woltamperometryczne na **Rysunku 20** ilustrują zmianę uzyskiwanych wartości gęstości prądowych na skutek dodatku jonów chlorkowych (dodatek NaCl), natomiast krzywa woltamperometryczna na **Rysunku 21** przedstawia przebieg konkurencyjnego w stosunku do utleniania glukozy procesu, któremu ulega kwas L-askorbinowy.



Rysunek 20 Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane w buforze fosforanowym o $\text{pH}=7$ w obecności glukozy o stężeniu $50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ bez dodatku jonów chlorkowych (czerwona krzywa) oraz w obecności jonów chlorkowych (czarna krzywa) dla katalizatora $\text{GC}/\text{AuNPs-PMO}_{12}$; Szybkość zmiany potencjału: $50 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.



Rysunek 21 Krzywa woltamperometryczna zarejestrowane dla warstwy nanocząstek złota $\text{GC}/\text{AuNPs-PMO}_{12}$. Odpowiedź woltamperometryczna zarejestrowana w buforze fosforanowym o $\text{pH}=7$ w obecności glukozy o stężeniu $50 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ oraz kwasu L-askorbinowego o stężeniu $20 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$; Szybkość polaryzacji $50 \text{ m} \cdot \text{Vs}^{-1}$.

Krzywa woltamperometryczna zarejestrowana w elektrolicie zawierającym glukozę charakteryzuje się obecnością dwóch pików z maksimum usytuowanym przy potencjałach około 0.4 V (Pik 1) i 0.32 V (Pik 2), których nie obserwujemy natomiast na krzywej zarejestrowanej w roztworze buforu fosforanowego zawierającego dodatek jonów chlorkowych. Obecność dwóch pików jest charakterystyczna dla omawianego procesu gdyż pochodzenie pierwszego pików związane jest z oderwaniem atomu wodoru od węgla C₁ na skutek rozerwania wiązania C₁-H w cząsteczce glukozy. Drugi pik natomiast przypisany jest dalszemu utlenieniu powstałego na skutek dehydrogenacji glukozy rodnika do glukonolaktonu. Analiza krzywych woltamperometrycznych wskazuje, iż dodatek jonów chlorkowych na poziomie 2 mmol·dm⁻³ silnie hamuje utlenianie analizowanego monosacharydu, co przejawia się zanikiem pary pików związanej z procesami elektrodowymi glukozy.

W obecności kwasu L-askorbinowego o stężeniu 2.5-krotnie mniejszym niż stężenie glukozy dochodzi do całkowitego tłumienia prądów katalitycznych związanych z procesem utleniania glukozy na skutek generowania dużych gęstości prądowych procesu elektrotleniania kwasu L-askorbinowego. Procesy te przebiegają przy zbliżonych wartościach potencjałów dlatego też sygnały prądowe związane z procesami elektrotleniania obu związków nakładają się.

Podsumowanie

Nanostruktury złota ze względu na swoją wzmożoną aktywność katalityczną są układami, które nie wykazują wysokiej specyficzności substratowej. Ze względu na dużą reaktywność powierzchni mogą katalizować zarówno procesy elektrotleniania, jak i elektroredukcji wielu substancji, w tym tych stanowiących składniki produktów przeznaczenia spożywczego.

Kwas L-askorbinowy ze względu na podobieństwo strukturalne do glukozy z której powstaje zostaje utleniony do kwasu L-dehydroksyaskorbionowego. Proces ten zachodzi w zbliżonym zakresie potencjałów generując wyższe gęstości prądowe niż proces elektrotleniania glukozy prowadząc do nakładania się sygnałów.

Również obecność jonów chlorkowych powoduje zahamowanie procesu elektrotleniania glukozy. Obecność Cl⁻ prowadzi do konkurencyjnej reakcji kompleksowania złota w stosunku do procesu formowania się warstwy tlenków, która odgrywa kluczową rolę w procesie formowania rodnika z cząsteczki glukozy powstałego na skutek oderwania wodoru

sąsiadującego z grupą hydroksylową. Niepożądana reakcja konkurencyjna przebiega zgodnie z równaniem $Au + 4Cl^- \rightarrow AuCl_4 + 3e^-$

W związku z powyższym scharakteryzowany powyżej układ katalityczny może zostać wykorzystany do oceny zawartości laktozy w wąskiej grupie produktów spożywczych.

Przedstawione w niniejszym rozdziale badania wskazują nowy kierunek poszukiwań części czulej analitycznie w stronę układów bardziej odpornych na wspomniane interferenty.

6. Koncepcja elektrochemicznego oznaczania laktozy w oparciu o układy enzymatyczne (III preprototyp)

Główne założenia i cele

Zaproponowane podejście elektrochemicznego oznaczania laktozy, która w wyniku procesu hydrolizy ulega rozkładowi na glukozę i galaktozę polega na oznaczaniu glukozy. W przypadku pomiarów stężenia glukozy wykorzystuje się swoistość substratów immobilizowanych na elektrodach enzymów dla glukozy w połączeniu z układem przetwarzającym, który rozpoznaje zaistniałe zjawisko i zamienia je w mierzalny sygnał elektrochemiczny (rejestrwany jako zmiana potencjału elektrody lub natężenia płynącego prądu).

Jednym z enzymów wykorzystywanych do utleniania glukozy jest oksydaza glukozy, której bardziej precyzyjna charakterystyka została zaprezentowana w **Rozdziale 4**. Główne utrudnienie w przypadku stosowania GOx w roli katalizatora stanowi jednak tzw. „problem sprzęgania” (*ang. the coupling problem*). Centrum aktywne tego enzymu występuje głęboko w otoczce proteinowej. Otoczka białkowa wykazuje właściwości izolujące i utrudniające bezpośredni kontakt centrum aktywnego z elektrodą. W związku z powyższym pojawia się problem efektywnego przeniesienia elektronu natomiast zapewnienie dobrego przewodnictwa w układzie jest jednym z najistotniejszych problemów przy projektowaniu sensorów. W literaturze proponowanym rozwiązaniem jest wykorzystanie związków redoks o charakterze mediatorów, pośredniczących w przekazaniu elektronu pomiędzy centrum aktywnym biokatalizatora i podłożem elektrodowym [7,8]. Jako układy mediacyjne dla oksydazy glukozy zastosowane zostały heksacyjanożelaziany ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}/\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$).

Celem badań przedstawionych w niniejszym rozdziale jest dobór układu enzymatycznego charakteryzującego się możliwie największą selektywnością i aktywnością w procesie utleniania glukozy. Ponadto dokonanie charakterystyki zaproponowanych układów w warunkach modelowych oraz w warunkach rzeczywistych.

Elektrody modyfikowane warstwami enzymatycznymi

Pomiary elektrochemiczne mające na celu dokonanie analizy przydatności uzyskanych układów enzymatycznych w procesie elektrochemicznego oznaczania glukozy wykonano na wirującej elektrodzie dyskowej z węgla szklistego o powierzchni 0.247 cm^2 . W związku ze specyfiką pomiarów elektrochemicznych mających na celu określenie ilości glukozy, elektrokatalizator został unieruchomiony na elektrodzie.

Krzywe woltamperometryczne przedstawione w tym rozdziale zostały zarejestrowane względem nasyconej elektrody kalomelowej (SCE). Charakterystyki elektrochemicznej uzyskanych materiałów katalitycznych dokonano w roztworach buforu fosforanowego (pH=7) przy braku i w obecności glukozy. W serii eksperymentów elektrochemicznych zaprezentowanych w niniejszym rozdziale stężenia glukozy w roztworach buforowych różniły się w zależności od badanego układu. Pomiary prowadzono w roztworach zawierających rozpuszczony tlen, co odwzorowuje pomiary w próbkach i warunkach rzeczywistych.

Elektroda modyfikowana oksydazą glukozy

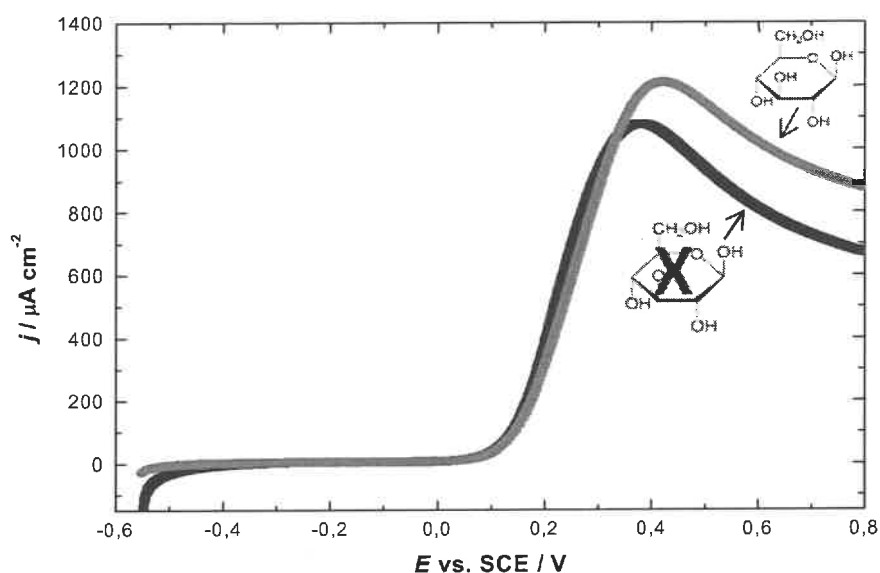
Jako katalizator enzymatyczny wykorzystany w procesie utleniania glukozy zaproponowaliśmy oksydazę glukozy (GOx). Transport elektronów pomiędzy centrum aktywnym enzymu a powierzchnią elektrody został ułatwiony poprzez wykorzystanie układu mediującego stanowiącego przez jony $[\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}]$, które ulegając odwracalnym procesom redoks pośredniczą w przekazaniu elektronu. Ze względu na strukturę samego enzymu proces ten jest znacząco ograniczony i wymaga odpowiedniego układu mediującego.

Procedura przygotowania zawiesiny modyfikującej

Procedura przygotowania zawiesiny enzymatycznej jest następująca: 2.5 mg oksydazy glukozy oraz 1 mg albuminy wołowej rozpuszczono w buforze fosforanowym o objętości 498 μl . Następnie do roztworu dodano 2 μl aldehydu glutarowego, całość dokładnie wymieszano doprowadzając do homogenicznej postaci. Z uzyskanego roztworu modyfikatora pobrano 10 μl i naniesiono na powierzchnię elektrody pracującej po czym pozostawiono do wyschnięcia.

Charakterystyka elektrochemiczna elektrody modyfikowanej warstwą oksydazy glukozy

Krzywe voltamperometryczne dla układu GC/GOx zarejestrowano w buforze fosforanowym o pH=7 przy braku i w obecności glukozy o stężeniu 50 mmol/dm³ oraz przy stężeniu mediatora wynoszącym 20 mmol/dm³. Zarejestrowane odpowiedzi voltamperometryczne zaprezentowano na **Rysunku 22**.



Rysunek 22 Krzywe voltamperometryczne oksydazy glukozy GOx na elektrodzie GC zarejestrowane w roztworze buforu fosforanowego o pH=7 (-) oraz w roztworze buforu fosforanowego z dodatkiem glukozy o stężeniu 50 mmol·dm⁻³ (-); Szybkość polaryzacji: 10 mV·s⁻¹, stężenie mediatora (Fe(CN)₆³⁻) 20 mmol·dm⁻³.

Dla oksydazy glukozy, na krzywej voltamperometrycznej zarejestrowanej jedynie w obecności mediatora (czarna krzywa) widoczny jest pik przy potencjale 0,38 V o maksymalnej wartości gęstości prądów katalitycznych 1077 μA/cm². Krzywa voltamperometryczna zarejestrowana w obecności glukozy (czerwona krzywa) posiada pik przy potencjale 0.42 V o maksymalnej wartości gęstości prądów katalitycznych 1223 μA/cm². Z analizy profilu voltamperometrycznego wynika, iż w obecności układu mediującego enzym ten pełni funkcję katalityczną w procesie utleniania glukozy. Enzym ten będzie stanowił również jeden z głównych składników materiałów biokatalitycznych zastosowanych przez nas jako modyfikator elektrod oznaczających laktozę.

Głównym czynnikiem, który limituje efektywne wykorzystanie enzymów w przypadku zastosowań komercyjnych jest obniżenie aktywności, rozumiane jako zmniejszenie wydajności katalizowanej przemiany, wynikające z wrażliwości tych cząsteczek na warunki środowiskowe przechowywania. W związku z powyższym układy enzymatyczne immobilizowaliśmy na odpowiednich nośnikach stanowiących między innymi przez materiały węglowe.

Elektroda modyfikowana oksydazą glukozy immobilizowaną na nośniku

Immobilizacja jest to proces polegający na związaniu enzymu ze stałym, nierozpuszczalnym w środowisku reakcji nośnikiem, przy jednoczesnym zachowaniu przez biokatalizator właściwości katalitycznych.

Jako nośnik dla białkowego układu katalitycznego zaproponowaliśmy materiały węglowe. Wybór ten podyktowany był faktem, iż są to materiały tworzące porowatą strukturę tym samym posiadają wysoko rozwiniętą powierzchnię, która prowadzi do zwiększenia obszaru aktywnego katalitycznego. Ponadto są to materiały dobrze przewodzące co ułatwia przekazanie ładunku w warstwach katalitycznych i jest niezwykle istotne z punktu widzenia oznaczeń elektrochemicznych.

Procedura przygotowania warstwy modyfikującej

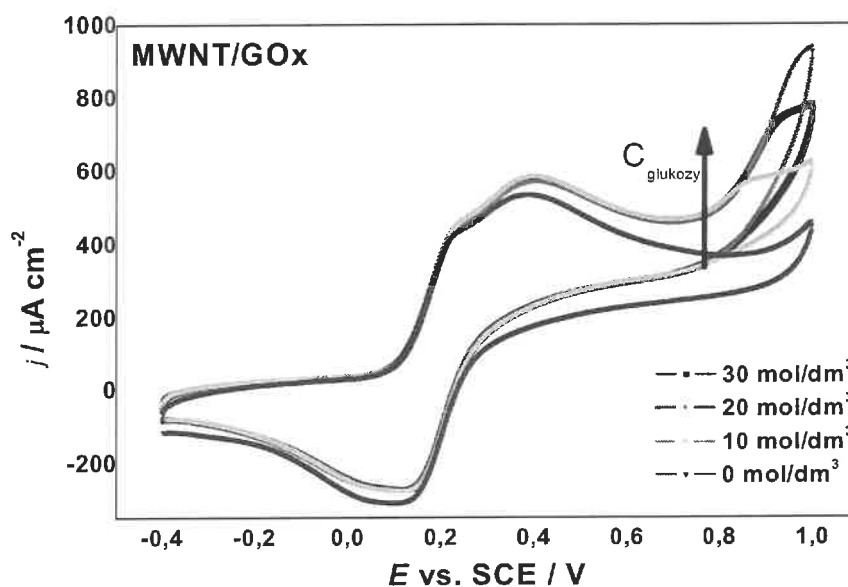
Wykorzystanie wielościennych nanorurek węglowych (MWCNTs) w funkcji fazy nośnej dla biokatalizatora poprzedzone było procedurą oczyszczania nośnika z zanieczyszczeń metalicznych przy ich jednoczesnej funkcjonalizacji. Proces ten szczegółowo został opisany w **Rozdziale 5**. Wytworzenie reaktywnych grup funkcyjnych na powierzchni ścian oraz krawędzi bocznych nośnika węglowego ma kluczowe znaczenie w procesie immobilizacji materiału enzymatycznego na podłożu węglowym.

Następnie 2 mg nanorurek węglowych wraz z 1 μl aldehydu glutarowego umieszczono w 0.5 ml buforu fosforanowego i poddano sonifikowaniu przez okres 20 min. Następnie dodano 10 mg oksydazy glukozy wraz z 499 μl buforu fosforanowego. Całość wymieszano i pozostawiono w lodówce na 12 h.

Po upływie określonego czasu na elektrodę naniesiono 10 μl przygotowanej zawiesiny na którą naniesiono warstwę Nafionu.

Charakterystyka elektrochemiczna warstwy enzymatycznej immobilizowanej na nośniku węglowym MWNT/GOx

Krzywe woltamperometryczne dla układu enzymatycznego osadzonego na podłożu węglowym zarejestrowano dla wzrastających w roztworze stężeń glukozy, stężenie mediatora $K_4[Fe(CN)_6]$ wynosiło 10 mM. Uzyskane rezultaty analizy woltamperometrycznej zaprezentowano na **Rysunku 23**.



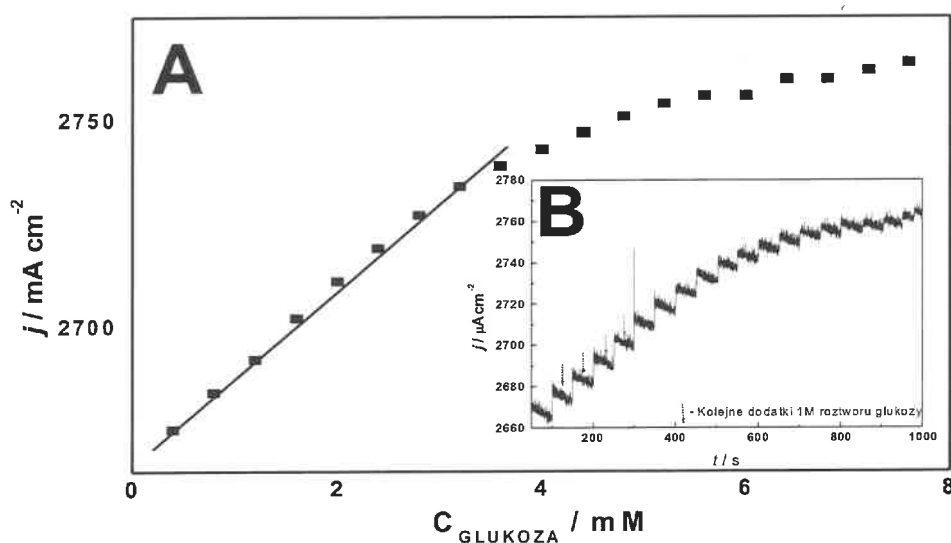
Rysunek 23 Krzywe woltamperometryczne uzyskane dla elektrody GC modyfikowanej oksydazą glukozy unieruchomioną na nośniku węglowym MWNT/GOx zarejestrowane w roztworze buforu fosforanowego o pH=7 (-) oraz w roztworze buforu fosforanowego z dodatkiem glukozy o stężeniu 10 mmol·dm⁻³ (-), 20 mmol·dm⁻³ (-) oraz mmol·dm⁻³ (-); Szybkość polaryzacji: 10 mV·s⁻¹, stężenie mediatora ($Fe(CN)_6^{4-}$) 10 mmol·dm⁻³.

Dane woltamperometryczne uzyskane dla układu biokatalitycznego wskazują, iż jest on aktywny katalitycznie w procesie elektROUTLENIA glukozy. Na krzywych woltamperometrycznych zarejestrowanych w obecności wzrastających stężeń tego monosacharydu obserwowany jest wzrost wartości gęstości prądów katalitycznych.

Przyłączenie katalizatora enzymatycznego do nierozpuszczalnego nośnika skutkuje znaczącym wydłużeniem aktywności tego enzymu. Po przeprowadzeniu powtórnych badań dla układu samego enzymu oraz dla układu po przeprowadzeniu procesu unieruchomienia, odnotowaliśmy wolniejszy spadek aktywności w przypadku modyfikatora elektrodowego zawierającego nanostrukturę węgla. Proces immobilizacji w matrycy węglowej wpływa

korzystnie na całą strukturę białkową poprzez jej stabilizację, co przekłada się na zwiększenie odporności enzymu na niekorzystne działanie czynników zewnętrznych. Z powyższych względów zaobserwowano wzrost właściwości katalitycznej enzymu w porównaniu z białkiem w formie natywnej.

Dla układu wykorzystującego immobilizowany na powierzchni elektrody enzym zarejestrowaliśmy również krzywe chronowoltamperometryczne. Krzywe te zostały zarejestrowane w warunkach konwekcyjno-dyfuzyjnego transportu glukozy do przestrzeni przyelektrodowej, który został osiągnięty dzięki wirowaniu elektrody z szybkością 1600 rpm w roztworze zawierającym wzrastające stężenia glukozy. Uzyskaną krzywą chronoamperometryczną przedstawia **Rysunek 24**.



Rysunek 24 Krzywa chronoamperometryczna elektrootleniania glukozy, zmierzona przy potencjale 0,3V dla enzymatycznych układów katalitycznych. Elektrolit podstawowy: bufor fosforanowy o pH=7; Szybkość wirowania elektrody: 1600 rpm.

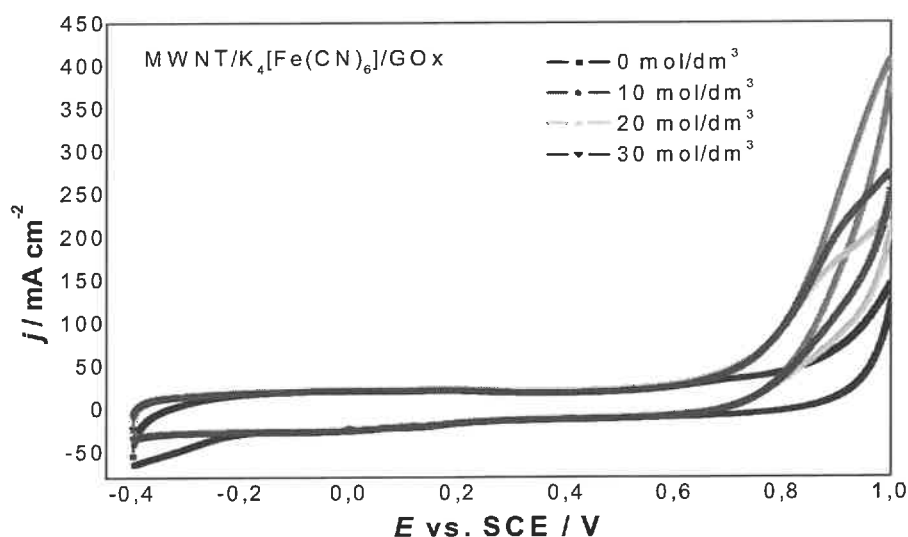
Z krzywej kalibracyjnej zaprezentowanej na **Rysunku 24 B** wyznaczono czułość oraz limit detekcji i granicę wykrywalności. Czułość wyznaczono jako nachylenie krzywej kalibracji. Granicę wykrywalności obliczono za pomocą wzoru: $3 \cdot \text{szum} / \text{czułość}$, przy czym wartości szumów stanowiły odchylenia standardowe gęstości prądów odczytanych z prostoliniowego zakresu krzywej.

Dla hybrydowego materiału katalitycznego złożonego z matrycy węglowej oraz układu enzymatycznego uzyskano następujące wartości parametrów analitycznych charakteryzujących

dany sensor: czułość – $21 \mu\text{A cm}^{-2} \text{ mM}^{-1}$, granica wykrywalności 0.15 mM i granica oznaczalności 0.26 mM .

Przedstawiony wariant pomiarowy dotyczył sytuacji gdy mediator znajdował się w roztworze. Przeprowadziliśmy również badania polegające na wprowadzeniu mediatora bezpośrednio w warstwę katalityczną. W tym celu materiał węglowy stanowiący nośnik materiału biologicznego poddano procedurze sonikowania w roztworze mediatora oraz pozostawiono na mieszadle na okres 12 godzin. Po upływie określonego czasu pobrano odpowiednią ilość zawiesiny węglowej dodając do niej oksydazę glukozy oraz aldehyd glutarowy, przy czym całość pozostawiono na czas 12 godzin w lodówce. Następnie z mieszaniny modyfikującej pobrano $10 \mu\text{l}$ i naniesiono na powierzchnię elektrody węglowej. Na warstwę katalityczną nałożono dodatkowo powłokę Nafionową sprzyjającą adhezji materiału do podłoża.

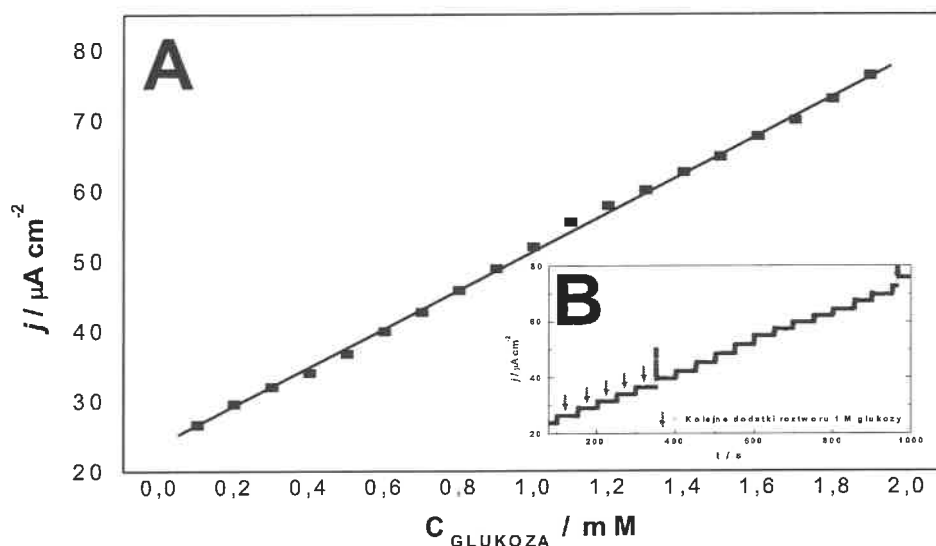
Charakterystyki elektrochemicznej wytworzonego układu dokonano za pomocą woltamperometrii cyklicznej w roztworze buforu fosforanowego o $\text{pH } 7$ w nieobecności analitu, jak również dla wzrastających stężeń glukozy. Otrzymane woltamperogramy dla hybrydowego materiału biokatalitycznego $\text{MWNT}/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{GOx}$ przedstawiono na **Rysunku 25**.



Rysunek 25 Krzywe woltamperometryczne uzyskane dla elektrody GC modyfikowanej oksydazą glukozy unieruchomioną na nośniku węglowym z zaadsorbowanym mediatorem $\text{MWNT}/\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]/\text{GOx}$ zarejestrowane w roztworze buforu fosforanowego o $\text{pH}=7$ (-) oraz w roztworze buforu fosf

Analiza krzywych woltamperometrycznych wskazuje, iż zaproponowany układ katalityczny charakteryzuje się aktywnością katalityczną w procesie utleniania glukozy. Wraz z kolejnymi dodatkami glukozy zaobserwowano wzrastające gęstości prądów elektROUTLENIA.

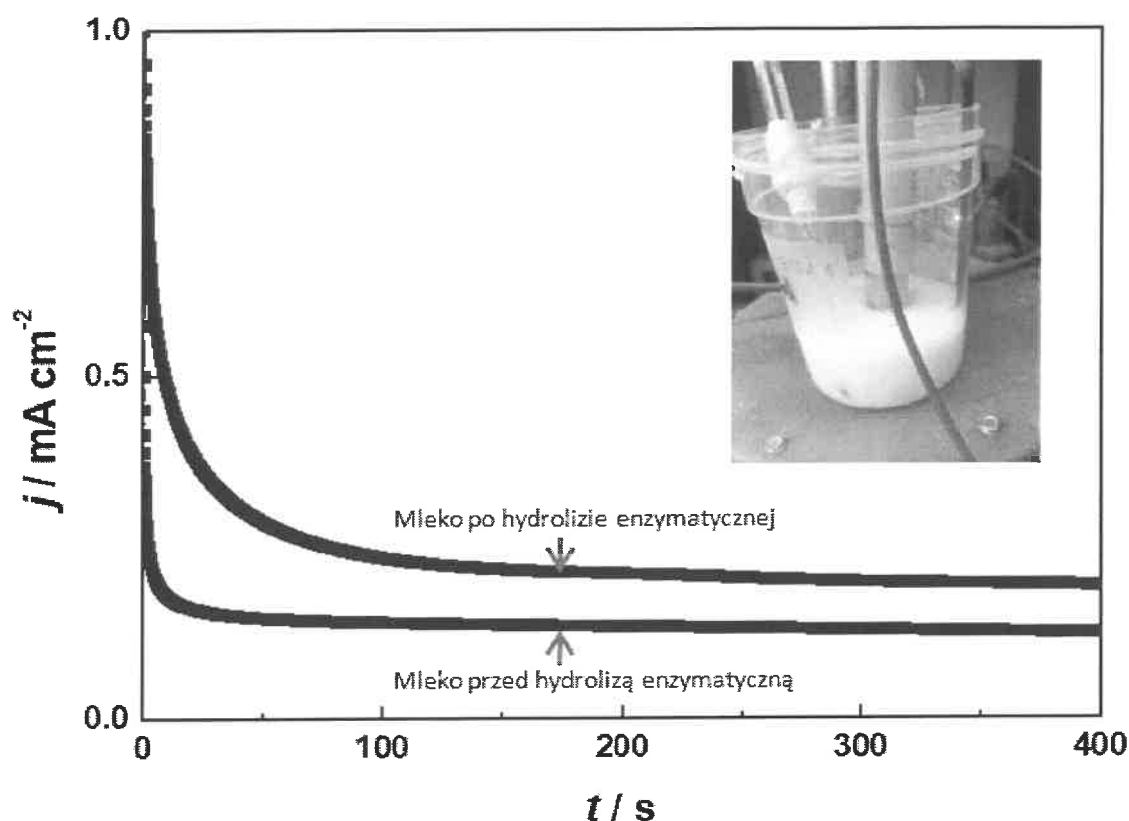
Dla omawianego układu katalitycznego zarejestrowano również krzywą chronoamperometryczną w warunkach wzrastającego stężenia glukozy i na tej podstawie wykreślono krzywą kalibracyjną. Otrzymane krzywe prezentuje **Rysunek 26**.



Rysunek 26 Krzywa chronoamperometryczna elektROUTLENIA glukozy, zmierzona przy potencjale 0,3V dla enzymatycznych układów katalitycznych. Elektrolit podstawowy: bufor fosforanowy o pH=7; Szybkość wirowania elektrody: 1600 rpm.

Dla hybrydowego materiału katalitycznego złożonego z matrycy węglowej, GOx oraz mediatora zaadsorbowanego w warstwie przyelektrodowej uzyskano następujące wartości parametrów analitycznych charakteryzujących dany sensor: czułość – $27 \mu\text{A cm}^{-2} \text{mM}^{-1}$, granica wykrywalności 0.066 mM i granica oznaczalności 0.11 mM.

Przygotowaną elektrodę enzymatyczną zastosowaliśmy również do oznaczania zawartości laktozy w próbkach żywności. Seria wyników uzyskanych dla eksperymentów elektrochemicznych przeprowadzonych w próbkach mleka zaprezentowana została na **Rysunku 27**.



Rysunek 27 Krzywe amperometryczne elektrouhleniania glukozy, zmierzone przy potencjale 0.9V dla enzymatycznego układu katalitycznego MWNT/GOx. Elektrolit podstawowy: próbka mleka przed oraz po hydrolizie enzymatycznej za pomocą β -galaktozydazy. Próbka rozcieńczona za pomocą buforu fosforanowego o pH = 7 w stosunku 1:1; Stężenie mediatora 10 mmol·dm³.

Próbkę mleka przed pomiarem rozcieńczono dwukrotnie za pomocą roztworu buforu fosforanowego, a następnie wykonano dwa pomiary amperometryczne prądów utleniania glukozy. Pierwszy pomiar wykonano dla świeżo przygotowanej próbki, która nie została zhydrolizowana za pomocą enzymu rozkładającego laktozę. Drugi pomiar wykonano po upływie 15 min. W tym czasie enzym β -galaktozydaza na skutek hydrolizy wiązania glikozydowego rozkładał laktozę do glukozy, obecność laktozy w produktach spożywczych wiąże się więc ze wzrastającym stężeniem glukozy, co przejawia się wzrostem gęstości prądów utleniania tego monosacharydu. W powyższym przypadku odnotowaliśmy wzrost wartości prądu katalitycznego utleniania glukozy, co związane jest z obecnością laktozy w badanej próbce. Mleko poddane analizie stanowiła porcja mleka krowiego, a zawartość laktozy w tej próbce została również potwierdzona na drodze pomiarów spektrofotometrycznych.

Uzyskane rezultaty wskazują, iż oba zaproponowane przez nas układy katalityczne wykorzystane w procesie utleniania glukozy są efektywne i mogą zostać wykorzystane jako materiał elektrodowy w projektowanym sensorze.

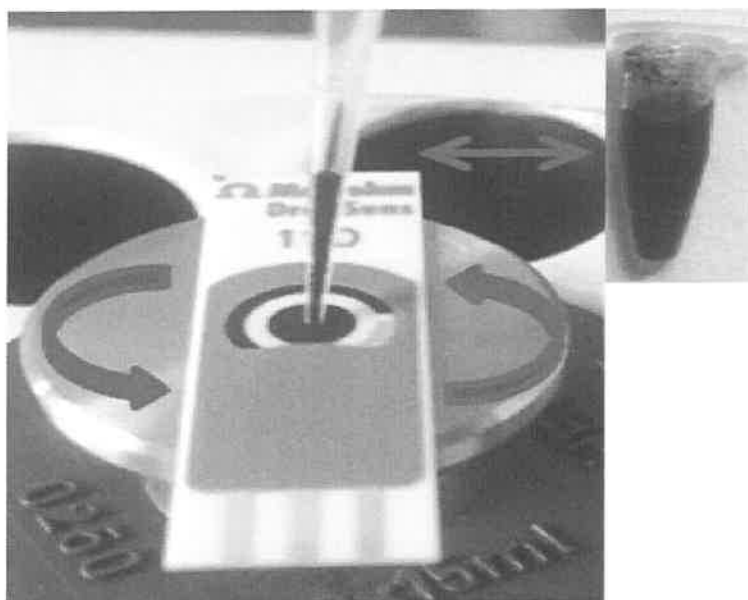
Pomiary elektrochemiczne realizowany były w roztworze buforowym o stosunkowo dużej pojemności 50 ml, co prowadzi w układzie do ograniczeń związanych z dyfuzją analitu do powierzchni elektrody. Rozwiązanie konstrukcyjne sensora pozwoliło na wyeliminowanie tego problemu poprzez pomiar w niewielkiej kropli roztworu o pojemności max. 50 μ l. Ponadto jednorazowy charakter pomiaru pozwolił na wyeliminowanie problemu związanego z wyciekami mediatora z warstwy katalitycznej.

Trzeci pre-prototyp sensora oznaczania laktozy

Przygotowanie pre-prototypu sensora laktozy rozpoczęto od przygotowania jednorazowej elektrody enzymatycznej. W tym celu układ elektrod walcowych z węgla szklistego zastąpiono elektrodą płytkową firmy Drop Sense. Elektroda ta stanowi układ trójelektrodowy złożony z elektrody pracującej, odniesienia oraz pomocniczej. W celu przygotowania pre-prototypu wykorzystano również kolektor tej firmy.

Przygotowanie jednorazowej elektrody enzymatycznej

Procedura przygotowania warstwy katalitycznej stanowiącej modyfikator elektrody jest analogiczna do procedury przygotowania warstwy katalitycznej wykorzystanej do charakterystyki elektrochemicznej wytworzonych układów. Procedura ta ze szczegółami została zaprezentowana w **Rozdziale 6**. Mediator stanowił część warstwy modyfikatora i został zaadsorbowany w warstwie węglowej. Inna natomiast została zastosowana procedura nanoszenia materiału na elektrodę. Metodą, która została użyta do nanoszenia warstw biomodyfikatora, był spin-coating, czyli powlekanie wirowe. W trakcie wirowania elektrody na środek obszaru stanowiącego część pracującą elektrody nakropiono warstwę materiału modyfikującego. Metoda ta służy do powlekania płaskich powierzchni cienką warstwą, która na skutek działania siły odśrodkowej jest równomierna. Proces przygotowania elektrod enzymatycznych ilustruje **Rysunek 28**.



Rysunek 28 Elektroda Drop Sense podczas modyfikacji matrycą węglową zawierającą biokatalizator.

Tak przygotowane elektrody umieszczano w specjalnie przystosowanym kolektorze zawierającym złącze krawędziowe stanowiące holder umożliwiający połączenie elektrody z potencjostatem, ponadto podtrzymujący elektrodę w pozycji horyzontalnej dodatkowo stabilizując ją tak, iż możliwe jest nakropienie na jej powierzchnię 50 μ l roztworu elektrolitu podstawowego. Zdjęcie pre-prototypu wykorzystanego do badań próbek żywności prezentuje

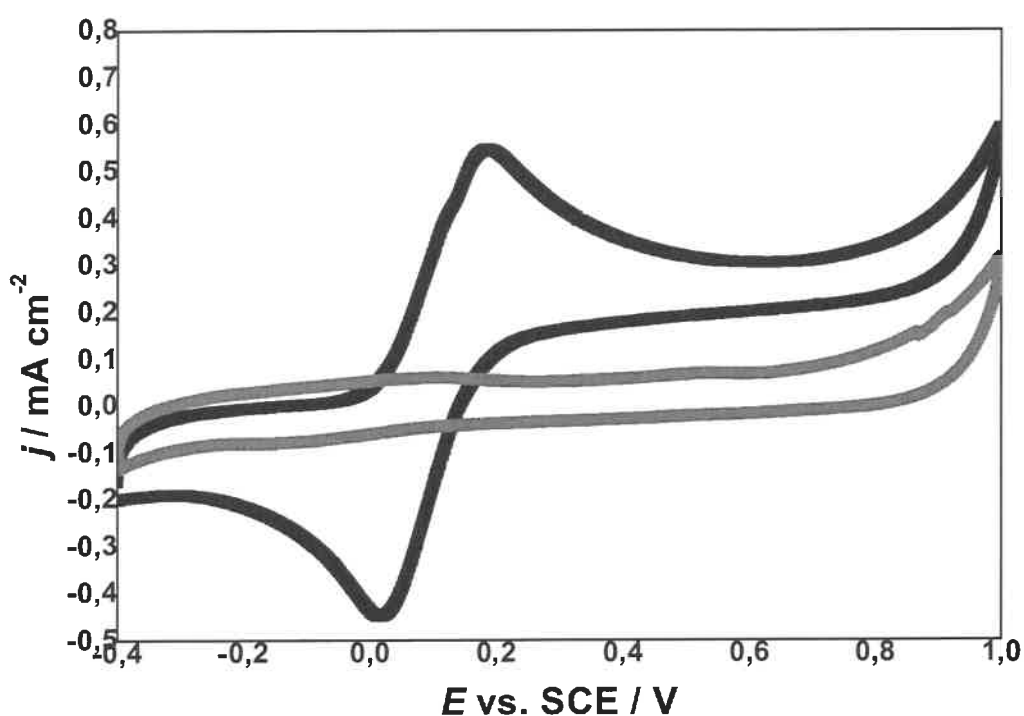
Rysunek 29.



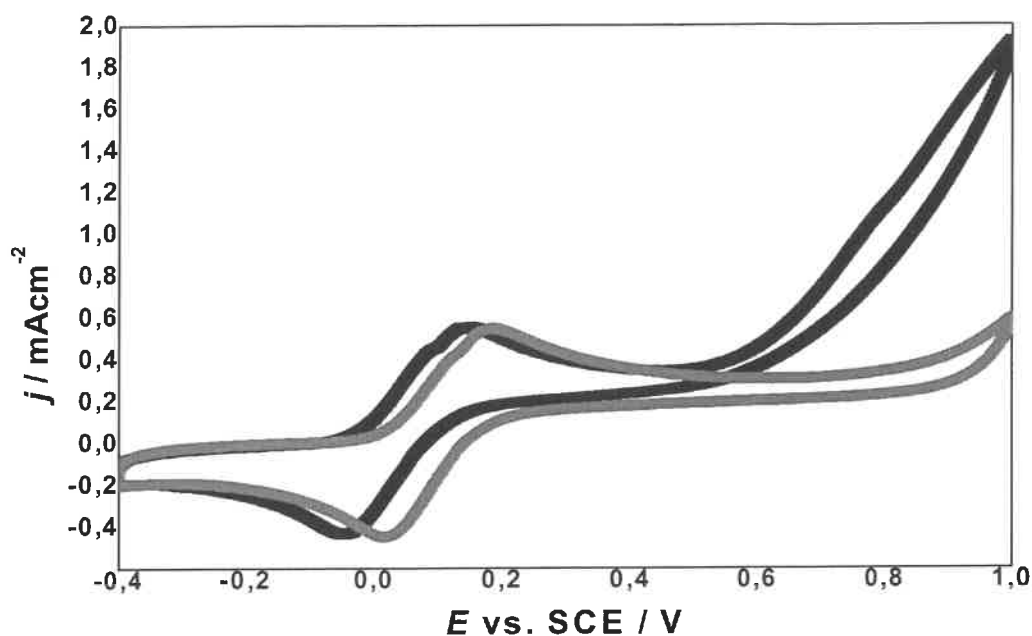
Rysunek 29 Pre-prototyp do badania zawartości glukozy w próbkach.

Test pre-prototypu w warunkach modelowych

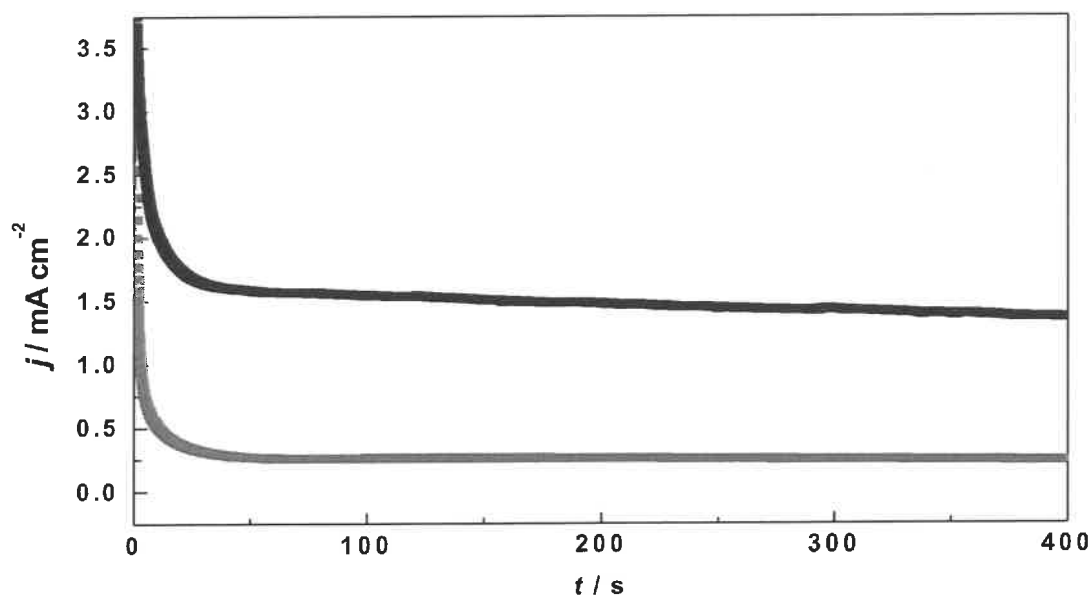
Test pre-prototypu rozpoczęto od dokonania charakterystyki elektrochemicznej elektrody jednorazowej umieszczonej w specjalnym holderze w warunkach ograniczonej objętości elektrolitu podstawowego. W tym celu przygotowaliśmy roztwór buforu fosforanowego bez dodatku oraz z dodatkiem glukozy warunkującym finalne stężenie tego monosacharydu na poziomie 50 mM. W skład roztworu elektrolitu wchodził również mediator o stężeniu 10 mM. Zarejestrowane krzywe uzyskane dla układu elektrod jednorazowych zaprezentowano na **Rysunkach 30-32**.



Rysunek 30 Krzywe woltamperometryczne uzyskane dla elektrody jednorazowej modyfikowanej oksydazą glukozy unieruchomioną na nośniku węglowym MWNT/GOx zarejestrowane w roztworze buforu fosforanowego o pH=7 (-) oraz w roztworze buforu fosforanowego z dodatkiem mediatora ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$) o stężeniu $10 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (-), Szybkość polaryzacji: $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.



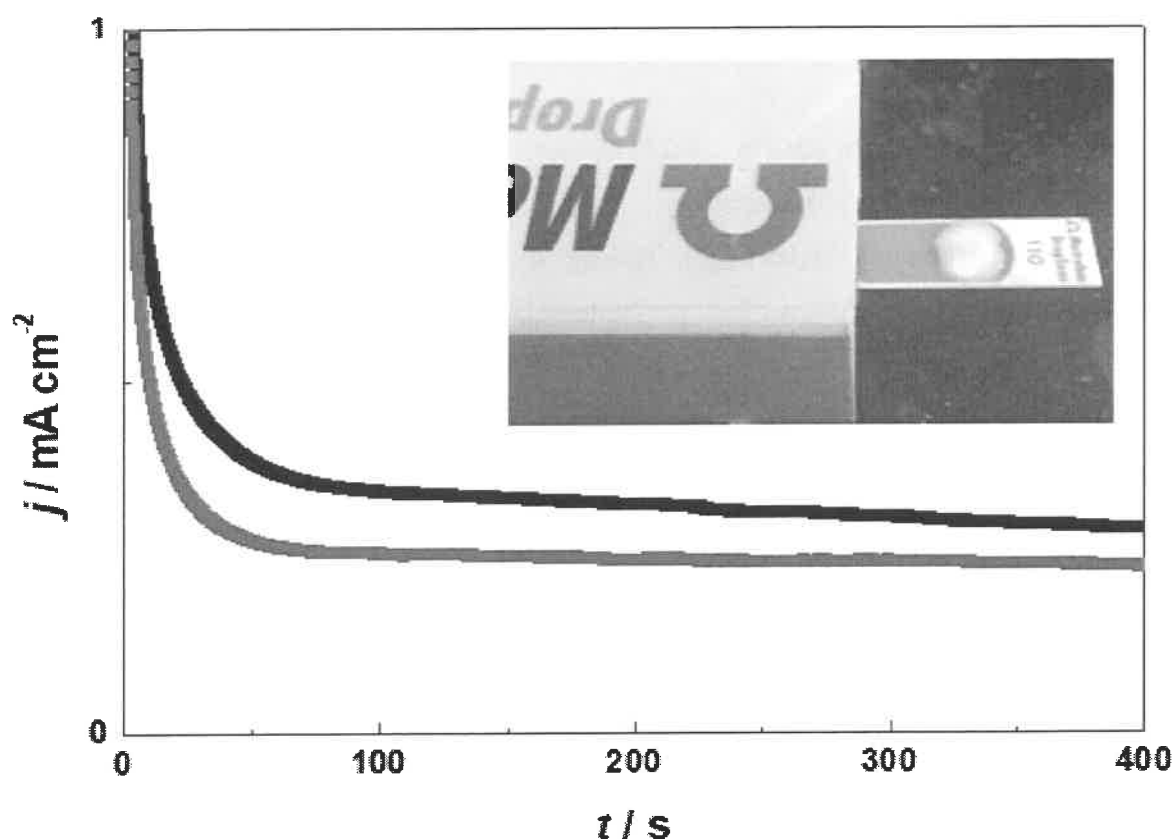
Rysunek 31 Krzywe woltamperometryczne uzyskane dla elektrody jednorazowej modyfikowanej oksydazą glukozy unieruchomioną na nośniku węglowym MWNT/GOx zarejestrowane w roztworze buforu fosforanowego o pH=7 (-) oraz w roztworze buforu fosforanowego z dodatkiem glukozy o stężeniu $50 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (-); Szybkość polaryzacji: $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, stężenie mediatora ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$) $10 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$.



Rysunek 32 Krzywe amperometryczne elektROUTLENIA glukozy, zmierzone przy potencjale 0.9 V dla enzymatycznego układu katalitycznego MWNT/GOx w buforze fosforanowym o pH=7(-) oraz w roztworze buforu fosforanowego z dodatkiem glukozy o stężeniu $50 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (-); Stężenie mediatora $10 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Prócz analizy w warunkach modelowych przygotowaną elektrodę enzymatyczną wykorzystaliśmy do oceny zawartości laktozy w próbce rzeczywistej, którą stanowiło mleko krowie. W tym celu zarejestrowaliśmy krzywe amperometryczne w roztworze mleka przed hydrolizą enzymatyczną oraz po hydrolizie. Uzyskane krzywe amperometryczne przedstawione są na **Rysunku 33**.

Przygotowanie próbki do analizy polegało na jej rozcieńczeniu buforem fosforanowym o pH=7 w stosunku 1:1. Próbka została również wzbogacona o mediator, którego dodatek gwarantował stężenie w próbce na poziomie $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^3$. Drugiego pomiaru zawartości glukozy dokonaliśmy po 15 minutach hydrolizy enzymatycznej prowadzonej z wykorzystaniem β -galaktozydazy, która należy do grupy hydrolaz rozkładających laktozę na glukozę i galaktozę.



Rysunek 33 Krzywe amperometryczne elektrootleniania glukozy, zmierzone przy potencjale 0.9V dla enzymatycznego układu katalitycznego MWNT/GOx. Elektrolit podstawowy: próbka mleka przed oraz po hydrolizie enzymatycznej za pomocą β -galaktozydazy. Próbka rozcieńczona za pomocą buforu fosforanowego o pH=7 w stosunku 1:1; Stężenie mediatora $10 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^3$.

Przygotowane układy katalityczne posłużyły do oceny zawartości laktozy zarówno w układzie modelowym, jak i próbkach żywności. Analiza uzyskanych wartości prądowych wskazuje, że na drodze zaproponowanej metody stanowiącej podstawę działania sensora można zidentyfikować obecność laktozy w próbce. Ponadto przygotowanie próbki do analizy nie wymaga specjalnych procedur. Produkt spożywczy w przypadku gdy nie występuje w postaci płynnej należy rozdrobnić oraz zmieszać z roztworem buforu fosforanowego. W układzie sensora powinien znajdować się również układ mediujący dla oksydazy glukozy.

Wykrywanie laktozy w próbkach żywności

Pre-prototyp sensora zastosowaliśmy również do wykrywania laktozy w próbkach żywności.

Pre-prototyp testowano w następującej grupie produktów:

Produkty mleczne – mleko (zwykłe), mleko bez laktozy, napój mleczny, serek wiejski, ser mozzarella

Produkty roślinne – napój migdałowy, napój owsiany

Soki – sok pomarańczowy, sok warzywny

W celu dokonania identyfikacji laktozy w badanych produktach spożywczych w pierwszym kroku analizy odpowiednio przygotowaliśmy próbki zgodnie z procedurą opisaną poniżej:

1. Pobranie niewielkiej ilości próbki
2. Zmielenie próbki w obecności 0.1 M buforu fosforanowego oraz mediatora.

Mielenie prowadzono zarówno w przypadku próbek stałych, jak i ciekłych co umożliwiło dokładne wymieszanie próbki z roztworem buforowym oraz dokładne rozpuszczenie mediatora. Uzyskane rezultaty przedstawiono w **Tabeli 5**.

Tabela 5 Zestawienie uzyskanych wyników dla różnych próbek żywności. „+” – obecność laktozy, „-” - brak laktozy.

Nazwa produktu	Obecność laktozy
Mleko świeże 2% OSM Garwolin	+
Mleko wypasione UHT 3,2% Mlekovita	+
Mleko „bez laktozy” UHT 3,2% OSM w Łowiczu	-
Napój migdałowy UHT Alpro	-
Napój owsiany UHT GoVege	-
Napój mleczny o smaku bananowym Mullermilch	+
Serek wiejski	+
Sok pomarańczowy	-
Sok warzywny	-

Uzyskane rezultaty wskazują na dużą zgodność wyników z analizą ICP-MS. Wytworzony pre-prototyp sensora pozwala na wykrycie laktozy w próbkach spożywczych. Ponadto zaproponowana metoda nie wymaga specjalnego przygotowania próbki do analizy co znacznie upraszcza rozwiązania konstrukcyjne prototypu.

Wpływ interferentów z próbek żywności

Biorąc pod uwagę złożoną matrycę stanowiącą przez próbki spożywcze, jak również analizy przeprowadzone dla wcześniejszych układów sensorycznych określiliśmy wpływ różnych interferentów na wskazania sensora.

W pierwszym kroku zweryfikowaliśmy wpływ jonów chlorkowych. Jony chlorkowe są składnikiem występującym w naturalnym środowisku działania enzymów.

Obecność anionów Cl^- w stężeniu występującym w próbkach spożywczych nie powoduje więc dezaktywacji enzymu i umożliwia wykonanie analizy. O mało inwazyjnym wpływie chlorków świadczy również szereg analiz wykonanych przez nas w próbkach rzeczywistych. Ponadto krótki czas wykonywania analizy uniemożliwia długotrwałe oddziaływanie jonów Cl^- na biokatalizator dlatego też dodatek tych jonów do analizowanych próbek nie powodował dezaktywacji enzymu.

Analizie poddaliśmy również działanie kolejnego czynnika jakim jest kwas L-askorbinowy na wyniki oznaczeń uzyskiwanych na drodze zastosowania układu enzymatycznego, jako części czulej analitycznie sensora. W związku z powyższym rejestrowaliśmy proces elektrootleniania glukozy w układzie modelowym przy kolejnych dodatkach kwasu L-askorbinowego. W przypadku gdy stężenia kwasu L-askorbinowego w porównaniu ze stężeniem glukozy w próbce są niskie kwas L-askorbinowy nie ma wpływu na wynik oznaczenia. W sytuacji gdy stężenie tego dodatku jest na poziomie stężenia glukozy procesy elektrodowe kwasu L-askorbinowego, które występują w tym samym zakresie potencjałów co procesy elektrodowe utleniania glukozy zaczynają tłumić właściwy sygnał analityczny.

Podsumowanie

Zaproponowany przez nas element czuły na glukozę stanowi enzym- oksydaza glukozy, który osadzony został na nośniku węglowym. Immobilizowany enzym charakteryzuje się większą trwałością, aktywnością oraz odpornością na warunki środowiskowe w porównaniu z enzymem, który znajduje się w bezpośrednim kontakcie z elektrodą. Ponadto ze względu na dobre przewodnictwo materiałów węglowych oraz ich porowatą strukturę, która prowadzi do znacznego rozwinięcia powierzchni, nośnik ten ułatwia przekazanie elektronu w warstwie oraz pozwala na równomierne rozseparowanie enzymu na powierzchni elektrody co w efekcie prowadzi do zwiększenia otrzymywanych gęstości prądowych. Efektywne przekazanie elektronu w warstwie realizowane jest również przy udziale mediatora – heksacyjanożelazianu II potasu. Zastosowanie mediatorów niesie ze sobą wiele korzyści, m. in. pomiary są praktycznie mniej zależne od stężenia tlenu, potencjał enzymatycznej elektrody pracującej jest zdeterminowany przez potencjał utleniania mediatora, użycie mediatora z niskim potencjałem utleniania zapobiega interferencjom ze strony niepożądanych substancji a także jeśli utlenienie zredukowanego mediatora nie wymaga protonów, to powoduje, że elektroda z enzymem staje się względnie niewrażliwa na zmiany pH. Układy biokatalityczne stanowią katalizatory, które

wykazują wysoką specyficzną substratową. W związku z powyższym układ MWNT/GOx charakteryzuje się najmniejszym wpływem interferentów w porównaniu do układów katalitycznych scharakteryzowanych we wcześniejszych rozdziałach niniejszego opracowania. Katalityczny układ enzymatyczny bazujący na oksydazie glukozy został wykorzystany do przygotowania jednorazowych elektrod enzymatycznych, które zostały zastosowane do wykrywania laktozy w próbkach żywności.

7. Koncepcja kolorymetrycznego oznaczania metali w oparciu o układy enzymatyczne i nanostruktury metali

Główne założenia i cele

Metale ciężkie stanowią silne toksyny, które są niezwykle szkodliwe nawet w niewielkich ilościach. Mechanizm ich działania na organizmy żywe w zależności od metalu jest różny, a ich toksyczność i niebezpieczeństwo związane jest między innymi z faktem, iż denaturują/dezaktywują enzymy, które odpowiadają za wiele szlaków metabolicznych. Zaburzenie funkcji enzymatycznych na skutek oddziaływania z metalami ciężkimi zostało wykorzystane przez nas do wykrywania obecności metali ciężkich w próbkach.

Ponadto do detekcji metali ciężkich wykorzystywane są nanostruktury metaliczne. Miniaturyzacja rozmiarów metali skutkuje pojawieniem się intensywnych barw w roztworach ich koloidów, za co odpowiada zjawisko oscylacji plazmonów powierzchniowych. W obecności jonów metali ciężkich na skutek przesunięcia pasma absorpcji w kierunku większych długości fali dochodzi do zmiany barwy roztworów koloidów zawierających nanocząstki, co stanowi podstawę detekcji. Zjawisko oscylacji plazmonów powierzchniowych zostało wykorzystane przez nas do opracowania sensora kolorymetrycznego.

Celem badań przedstawionych w niniejszym rozdziale było dobranie odpowiednich układów nanostrukturalnych oraz enzymatycznych zastosowanych do wykrywania metali ciężkich. Ponadto określenie warunków pracy sensora, sposobu unieruchomienia enzymów oraz ocena wpływu interferentów na ich aktywność katalityczną zaproponowanych układów. Do zadań będących obszarem rozważań niniejszego rozdziału należało również opracowanie metody syntezy struktur nanometalicznych oraz dokonanie ich charakterystyki fizykochemicznej.

Metody syntezy nanostrukturalnych układów metalicznych

W poniższym podrozdziale zaprezentowaliśmy szczegółowo metody otrzymywania różnych układów nanostrukturalnych, zarówno nanostrukturalnego złota, jak i nanostrukturalnego srebra. Ze względu na reaktywność powierzchni nanocząstki ulegają

naturalnej tendencji do aglomeracji. W związku z powyższym zaproponowaliśmy kilka różnych metod przygotowania nanostruktur warunkujących różnorodną morfologię, rozmiar oraz rodzaj warstwy modyfikującej. Nanostruktury tych samych metali różnią się pomiędzy sobą rodzajem warstwy stabilizującej. Natura oddziaływań pomiędzy rdzeniem nanocząstki a warstwą modyfikatora może mieć różny charakter i decyduje o stabilności nanomateriału, jak również przydatności do danych celów analitycznych. W celu wybrania najbardziej czułego układu przygotowaliśmy szerokie spektrum nanostruktur różniących się charakterystyką i właściwościami.

Otrzymywanie nanocząstek złota stabilizowanych cytrynianami

Podstawą procedury syntezy nanostruktur złota stabilizowanych cytrynianami (**AuNPs-Ct**) jest wykorzystanie kwasu tetrachlorozłotowego (HAuCl_4) w roli prekursora nanostruktur złota oraz kwasu cytrynowego ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$) jako reduktora i stabilizatora. Proces syntezy nanostruktur obejmuje przygotowanie 100 ml 1 mM roztworu prekursora oraz utrzymanie go w temperaturze wrzenia przy jednoczesnym intensywnym mieszaniu. Kolejny etap polega na otrzymaniu 8 ml 40 mM roztworu kwasu cytrynowego, który wprowadzany jest do wrzącego roztworu prekursora. Proces mieszania roztworu reduktora i prekursora kontynuowano przez 2 h. Proces wytwarzania materiału nanostrukturalnego związany jest ze zmianą koloru mieszaniny modyfikującej z jasnożółtej na intensywnie czerwoną. Następnie uzyskane nanostruktury złota oczyszczano z pozostałości nieprzereagowanych substratów poprzez trójkrotne odwirowywanie i przemywanie wodą destylowaną.

Otrzymywanie nanocząstek złota stabilizowanych fosfododekamolibdenianami

Nanocząstki złota stabilizowane kwasem fosfododekamolibdenowym (**AuNPs-PMo₁₂**) zostały zsyntezowane zgodnie z procedurą przedstawioną w literaturze [1]. Metoda ta polega na redukcji prekursora, którym jest kwas tetrachlorozłotowy(III) (HAuCl_4) za pomocą heteropolibłękitu fosfododekamolibdenowego ($\text{H}_3[\text{H}_4\text{P}(\text{Mo}^{\text{V}})_4(\text{Mo}^{\text{VI}})_8\text{O}_{40}]$).

Szczegółowy opis syntezy nanostruktur (**AuNPs-PMo₁₂**) został zaprezentowany w **Rozdziale 5**.

Otrzymywanie nanocząstek srebra stabilizowanych żelatyną

Nanocząstki srebra stabilizowane żelatyną (**AgNPs-gel**) zostały zsyntezowane zgodnie z przedstawioną poniżej procedurą. Ta jednofazowa metoda syntezy polega na redukcji prekursora, którym jest azotan (V) srebra (AgNO_3) za pomocą glukozy ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$).

Początkowy etap wytworzenia srebrnych nanostruktur obejmował przygotowanie wodnych roztworów azotanu (V) srebra o stężeniu $0.01 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$, glukozy o stężeniu $0.5 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ oraz 0.5% żelatyny. Następnie roztwór prekursora i reduktora zmieszano w stosunku molowym 0.00008:0.0035, pozostawiając mieszaninę na mieszadle magnetycznym przez czas 25 min i utrzymując w temperaturze 80°C . W kolejnym kroku do roztworu reagentów wprowadzono dodatek żelatyny, a mieszanie kontynuowano przez okres 12 h. Powstaniu nanostrukturalnego srebra towarzyszyło zabarwienie mieszaniny reagentów na kolor żółto-herbaciany. Po upływie określonego czasu powstały roztwór koloidalnego srebra odwirowano trójrotnie i przemyto wodą destylowaną w celu oczyszczenia z pozostałości nieprzereagowanych substratów.

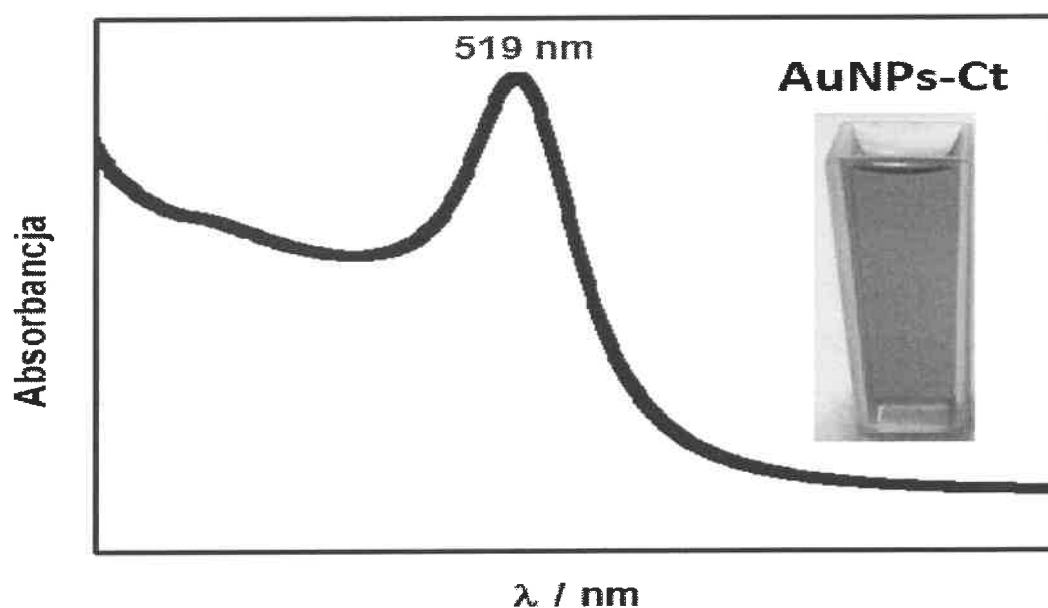
Otrzymywanie nanocząstek srebra stabilizowanych alkoholem poliwinyłowym

Procedura przygotowania nanocząstek srebra stabilizowanych alkoholem poliwinyłowym (**AgNPs-PVA**) jest jednofazowa. W pierwszym kroku otrzymywanie nanocząstek polega na przygotowaniu mieszaniny prekursora, czyli azotanu (V) srebra o stężeniu 0.01 M oraz 1 ml dodatku nasyconego roztworu alkoholu poliwinyłowego. Komponenty stanowiące przez prekursor i stabilizator poddano mieszanemu przez okres 2h wprowadzając niewielki dodatek amoniaku w celu zakwaszenia mieszaniny modyfikującej. Następnie kroplami dodawano roztwór reduktora stanowiącego przez borowodorek sodu NaBH_4 do momentu uzyskania żółto-herbacianego zabarwienia roztworu. Ostatni etap przygotowania materiału nanostrukturalnego polegał na jego oczyszczeniu poprzez trójkrotne, naprzemienne przepłukiwanie wodą destylowaną i odwirowywanie na wirówce.

Charakterystyka fizykochemiczna nanostruktur

Charakterystyka fizykochemiczna nanocząstek złota stabilizowanych cytrynianami

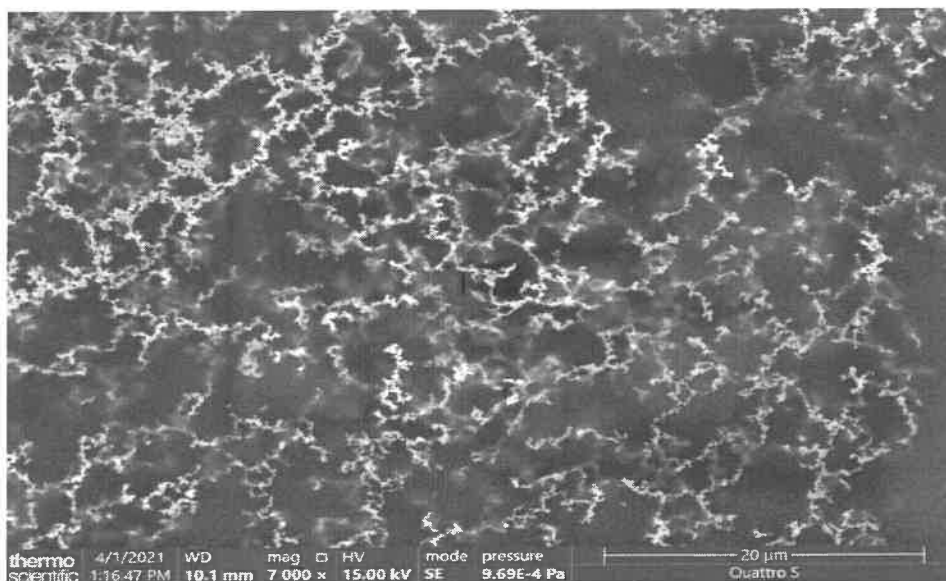
Cenne narzędzie analityczne stosowane w badaniu nanomateriałów stanowi spektrofotometria UV-Vis, zwłaszcza w odniesieniu do sposobu weryfikacji obecności nanostrukturalnych form metali na podstawie charakterystycznych pasm absorpcji, związanych z występowaniem powierzchniowego rezonansu plazmonowego. Dla koloidu nanostruktur złota stabilizowanych cytrynianami **AuNPs-Ct** zarejestrowano widmo w zakresie UV-Vis zaprezentowane na **Rysunku 34**.



Rysunek 34 Widmo UV-Vis zarejestrowane dla wodnego roztworu nanocząstek złota modyfikowanych cytrynianami oraz zdjęcie koloidu (AuNPs-Ct).

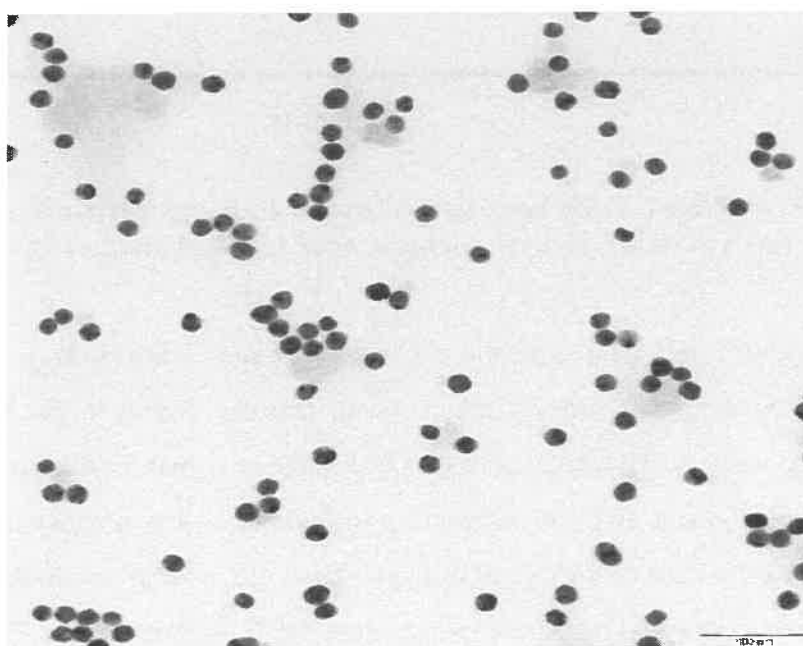
Maksimum absorpcji znajduje się przy 519 nm, wartość ta jest charakterystyczna dla powierzchniowego rezonansu plazmonowego cząstek o kształcie sfer. Na zarejestrowanym widmie silne, dobrze wykształcone pasmo absorpcyjne o maksimum położonym przy około 520 nm przypisane jest zlokalizowanemu, powierzchniowemu rezonansowi plazmonowemu. Rezonans ten odpowiada kolektywnym oscylacjom elektronów swobodnych z orbitali 6s w paśmie przewodnictwa nanocząstek złota. Przebieg i kształt widma UV-Vis wskazują na wysoki stopień dyspersji nanokatalizatora (**AuNPs-Ct**) przy braku tendencji do samoorganizowania się w rozbudowane aglomeraty.

Analiza SEM otrzymanego materiału nanostrukturalnego została zaprezentowana na **Rysunku 35**.



Rysunek 35 Obraz SEM nanocząstek złota modyfikowanych cytrynianami.

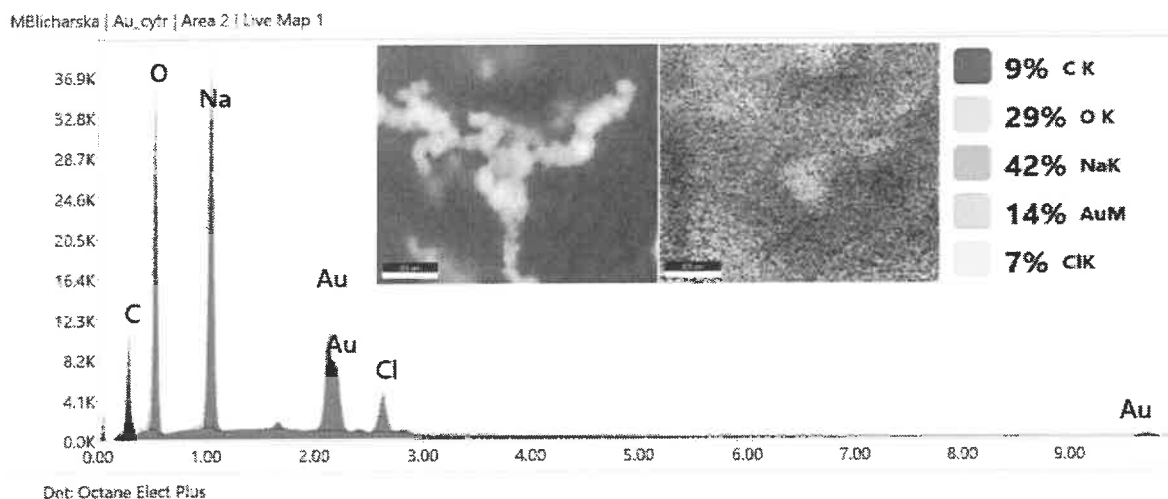
Wyniki uzyskane na drodze wykorzystania skaningowej mikroskopii elektronowej wskazują na obecność materiału nanostrukturalnego, który otrzymano na drodze zaproponowanej syntezy. Dogłębnej analizy morfologii nanokrystalitów Au dokonano za pomocą techniki TEM, a uzyskany obraz zaprezentowano na **Rysunku 36**.



Rysunek 36 Obraz TEM nanocząstek złota modyfikowanych cytrynianami.

Analiza morfologii nanocząstek złota wykonana techniką TEM wskazuje, iż fazę rozproszoną stanowią jednorodne cząstki sferyczne o średnicach ok. 30 nm. Monodispersyjne nanostruktury charakteryzuje ponadto wąski rozrzut rozmiaru nanocząstek mieszczący się w granicach 25÷36 nm. Analiza mikroskopowa wskazuje również, iż nanokrystaliny Au nie wykazują tendencji do tworzenia aglomeratów.

Dla określonego obszaru próbki wykonano również analizę pierwiastkową, uzyskane widmo wraz z odwzorowaniem analizowanego obszaru zaprezentowano na **Rysunku 37**.



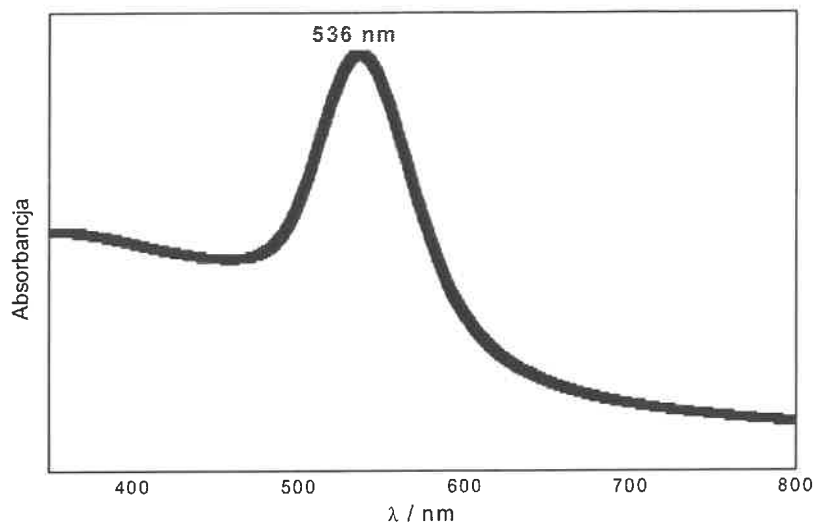
Rysunek 37 Profil składu chemicznego nanocząstek złota modyfikowanych cytrynianami wraz z odwzorowaniem dystrybucji atomów w warstwie.

Rezultaty uzyskane za pomocą techniki mikroanalizy powierzchni dla zawiesiny AuNPs-Ct, wskazują na obecność oprócz atomów złota również atomów tlenu oraz węgla, które wchodziły w skład cząsteczek cytrynianów stanowiących modyfikator nanostruktur Au.

Charakterystyka fizykochemiczna nanocząstek złota stabilizowanych polioksometalanami

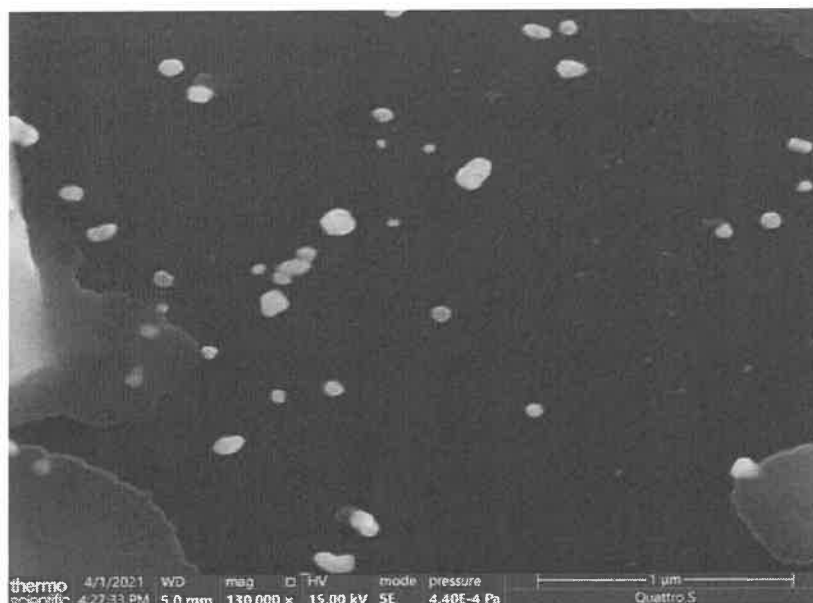
Na zarejestrowanym dla nanocząstek złota stabilizowanych polioksometalanami (AuNPs-PMo₁₂) widmie UV-Vis silne, dobrze wykształcone pasmo absorpcyjne o maksimum położonym przy około 530 nm przypisane jest zlokalizowanemu, powierzchniowemu rezonansowi plazmonowemu. Rezonans ten odpowiada kolektywnym oscylacjom elektronów swobodnych z orbitali 6s w paśmie przewodnictwa nanocząstek złota, co jest charakterystyczne

dla formy złota o rozmiarach w skali nano. Widmo UV-Vis nanostruktur AuNPs-PMo₁₂ przedstawiono na **Rysunku 38**.



Rysunek 38 Widmo UV-Vis nanocząstek złota stabilizowanych poliokso metalanami.

Dla nanocząstek AuNPs-PMo₁₂ dokonano analizy morfologii za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej. Uzyskany tą techniką obraz przedstawiono na **Rysunku 39**.

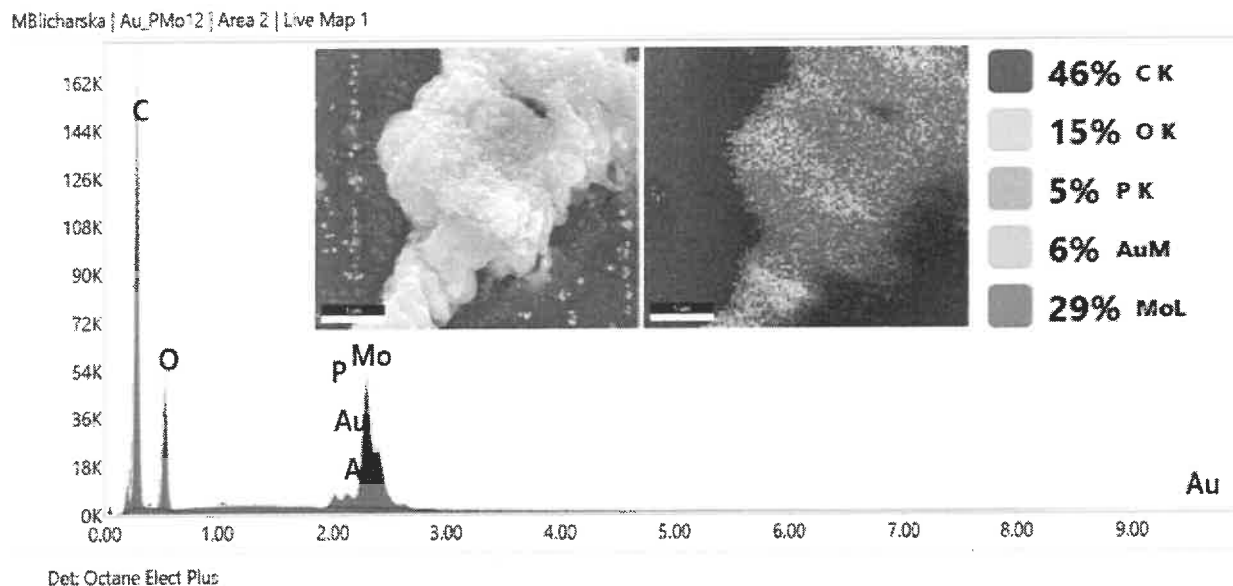


Rysunek 39 Obraz SEM nanostruktur złota modyfikowanych anionami PMo₁₂O₄₀³⁻.

Wynik analizy SEM, podobnie jak analiza UV-Vis potwierdza obecność nanostruktur **AuNPs-PMo₁₂**. Otrzymane nanocząstki złota charakteryzują się niewielkim rozrzutem rozmiaru ziaren w granicach 28÷50 nm, przy czym w przewodzie występowały struktury o średnicach wynoszących 34 nm.

Charakterystyka mikroskopowa nanocząstek złota **AuNPs-PMo₁₂** została wykonana również techniką transmisyjnej mikroskopii elektronowej TEM. Otrzymane rezultaty są zgodne z analizą SEM, potwierdzając obecność jednorodnych, sferycznych nanostruktur złota o rozmiarach średnic mieszczących się w przedziale 28÷50 nm. Obraz TEM nanocząstek złota modyfikowanych anionami PMo₁₂O₄₀³⁻ prezentuje **Rysunek 15**.

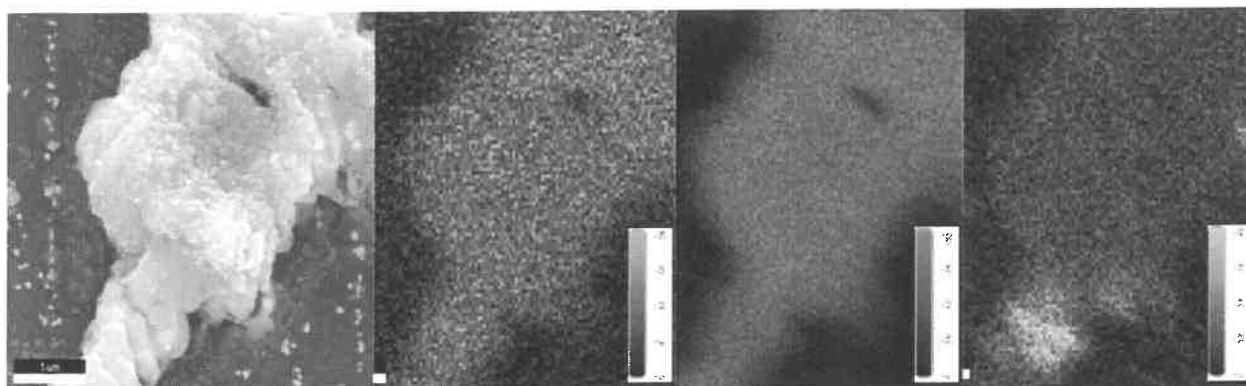
Metoda dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (**EDS, ang. X-ray Energy Dispersive Spectroscopy**) została wykorzystana w celu identyfikacji pierwiastków wchodzących w skład zsyntezowanych nanostruktur **AuNPs-PMo₁₂** oraz do sporządzenia map tych pierwiastków obejmujących ich rozłożenie w badanym obszarze próbki. Za pomocą techniki mikroanalizy powierzchni potwierdzono obecność zaadsorbowanych monowarstw PMo₁₂O₄₀³⁻ na powierzchniach nanocząstek złota, co prezentuje **Rysunek 40**. Sygnały widoczne na widmie EDS pochodzą bowiem od fosforu, molibdenu, tlenu oraz złota.



Rysunek 40 Profil składu chemicznego nanocząstek złota modyfikowanych fosfododekamolibdenianami (AuNPs-PMo₁₂).

Dla danego fragmentu próbki odwzorowanie profilu składu chemicznego wskazało również równomierne rozłożenie atomów złota oraz molibdenu. Profil składu chemicznego

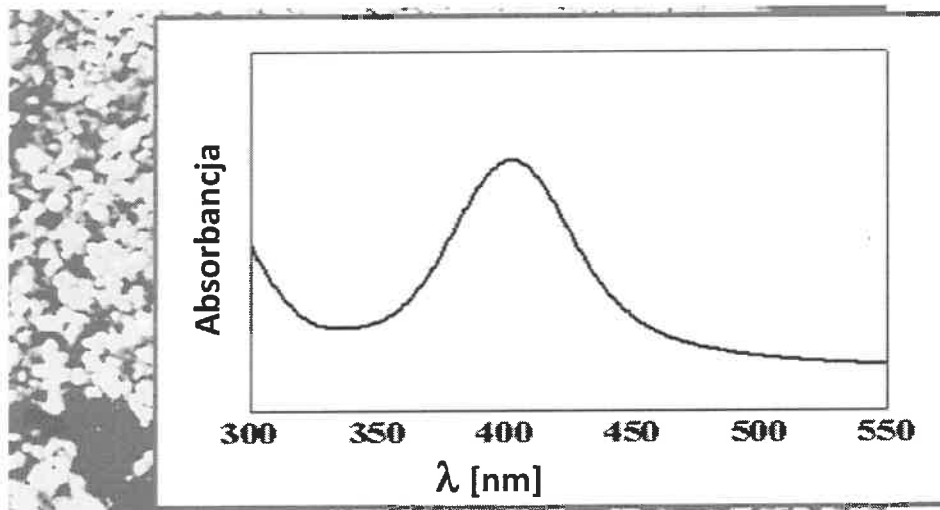
nanocząstek złota modyfikowanych fosfododekamolibdenianami (EDS) wraz z odwzorowaniem rozłożenia atomów Au oraz Mo w warstwie prezentuje **Rysunek 41**.



Rysunek 41 Odwzorowaniem dystrybucji atomów Au oraz Mo w warstwie.

Charakterystyka fizykochemiczna nanocząstek srebra stabilizowanych żelatyną

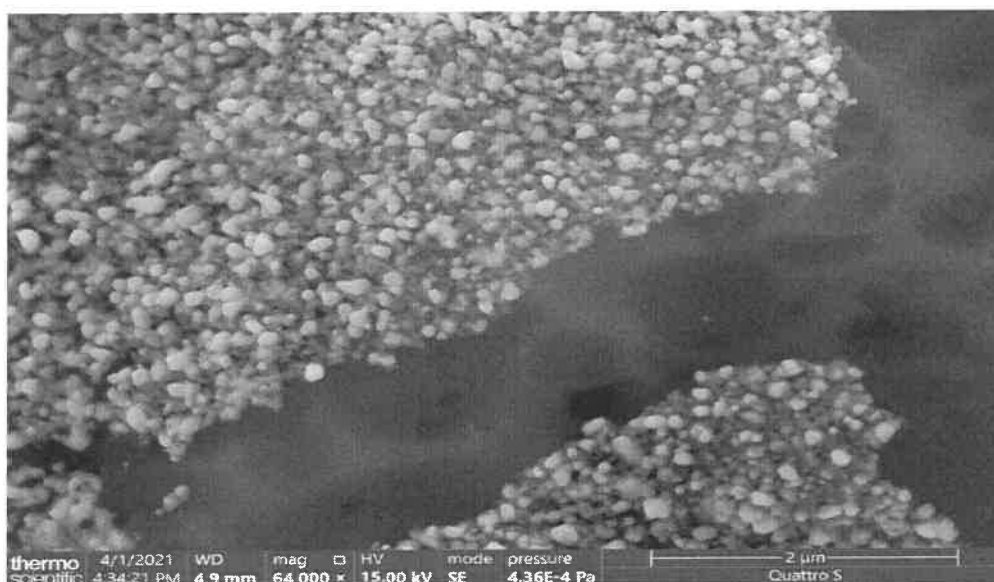
Obecność nanostruktur srebra AgNPs-gel została potwierdzona za pomocą spektrofotometrii UV-Vis, a uzyskane rezultaty prezentuje **Rysunek 42**.



Rysunek 42 Rysunek 42. Widmo UV-Vis nanocząstek srebra stabilizowanych żelatyną.

Na zarejestrowanym widmie silne, dobrze wykształcone pasmo absorpcyjne o maksimum położonym przy około 430 nm przypisane jest zlokalizowanemu, powierzchniowemu rezonansowi plazmonowemu. Analiza UV-Vis potwierdza więc, że na drodze zaproponowanej przez nas syntezy otrzymano materiał nanoskopowy w postaci nanostruktur srebra.

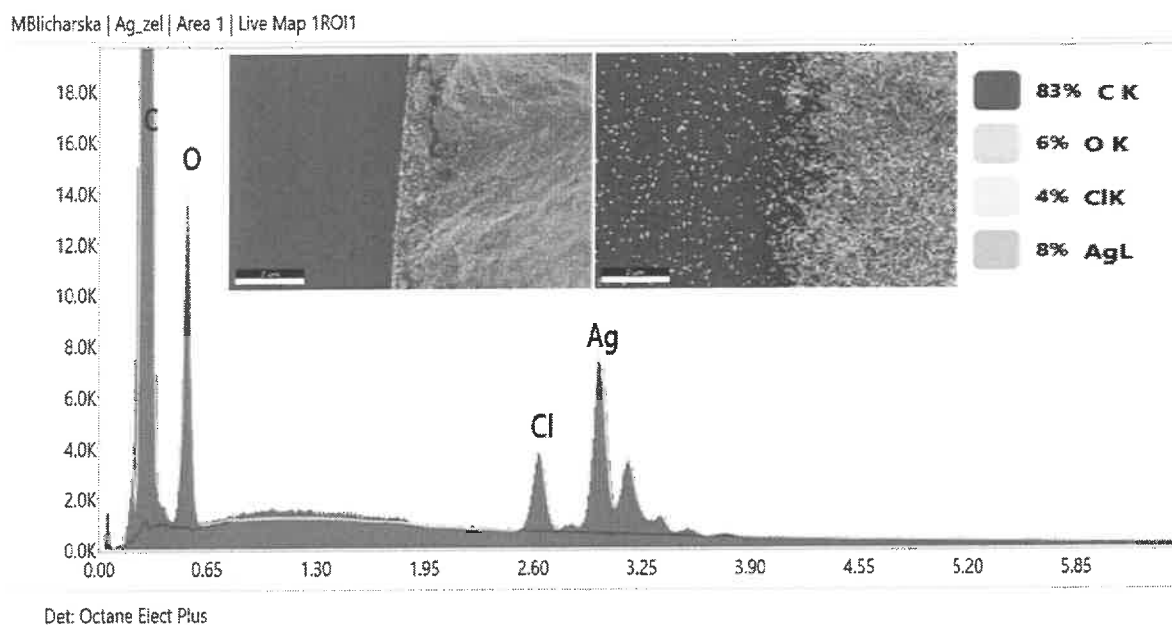
W celu potwierdzenia obecności nanostrukturalnej formy srebra oraz do oceny kształtu i rozmiaru otrzymanych krystalitów Ag wykorzystano mikroskopię elektronową. Jest to przydatna i powszechna technika służąca do charakterystyki powierzchni, obszarów przypowierzchniowych, składu chemicznego oraz struktury materiałów o budowie nanometrycznej, dlatego też została zaproponowana przez nas do określenia uwarunkowań morfologicznych nanostruktur **AgNPs-gel**. Charakterystyka mikroskopowa finalnego produktu syntezy, wykonana za pomocą skaningowej mikroskopii elektronowej potwierdziła obecność nanostruktur **AgNPs-gel**, a otrzymany obraz SEM zaprezentowano na **Rysunku 43**.



Rysunek 43 Rysunek 43. Obraz SEM nanostruktur srebra modyfikowanych żelatyną.

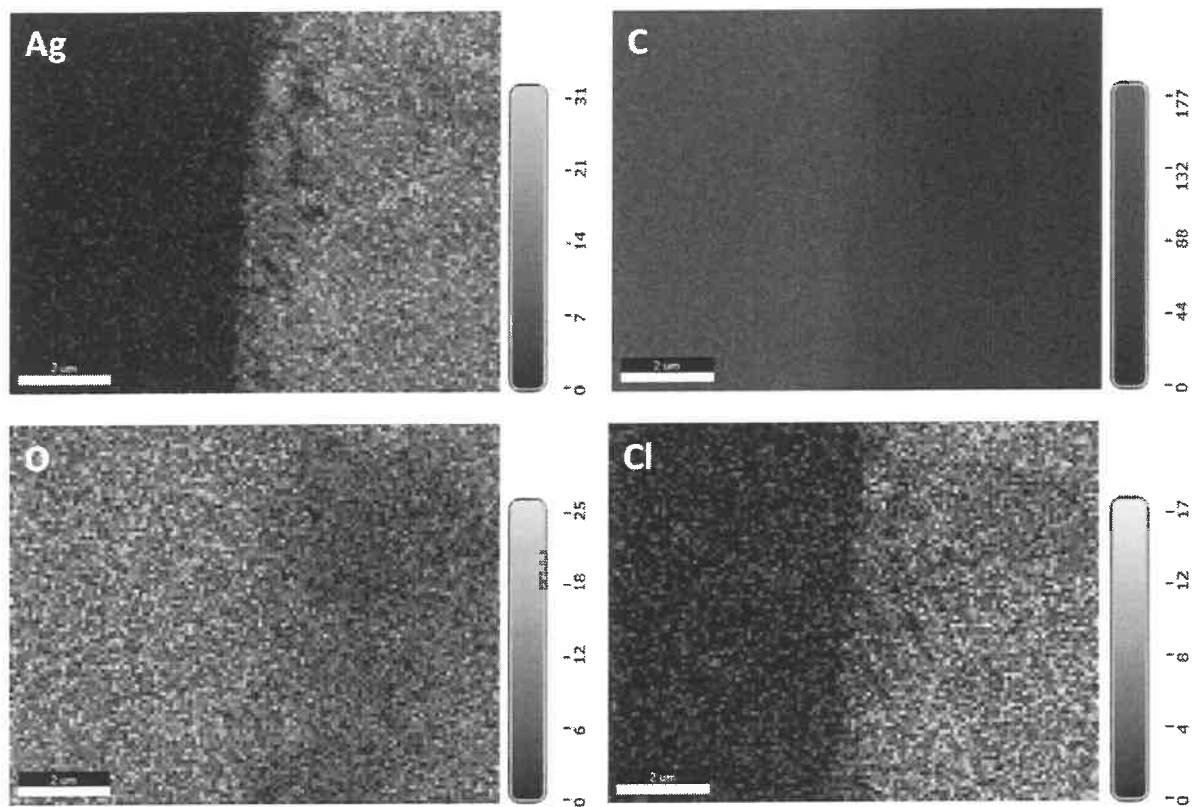
Otrzymane nanocząstki srebra charakteryzują się pseudosferycznymi kształtami oraz niewielkim rozrzutem rozmiaru ziaren w granicach 25÷45 nm, przy czym w przewodzie występowały struktury o średnicach wynoszących 34 nm.

Metoda dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego (**EDS**, ang. *X-ray Energy Dispersive Spectroscopy*) została wykorzystana w celu identyfikacji pierwiastków wchodzących w skład otrzymanego materiału nanostrukturalnego **AgNPs-gel** oraz do sporządzenia map tych pierwiastków obejmujących ich rozłożenie w badanym obszarze próbki. Uzyskane widmo EDS wraz z fotograficzną dokumentacją analizowanego obszaru próbki przedstawiono na **Rysunku 44**.



Rysunek 44 Profil składu chemicznego nanocząstek srebra modyfikowanych żelatyną (AgNPs-gel) wraz z odwzorowaniem dystrybucji poszczególnych atomów w warstwie.

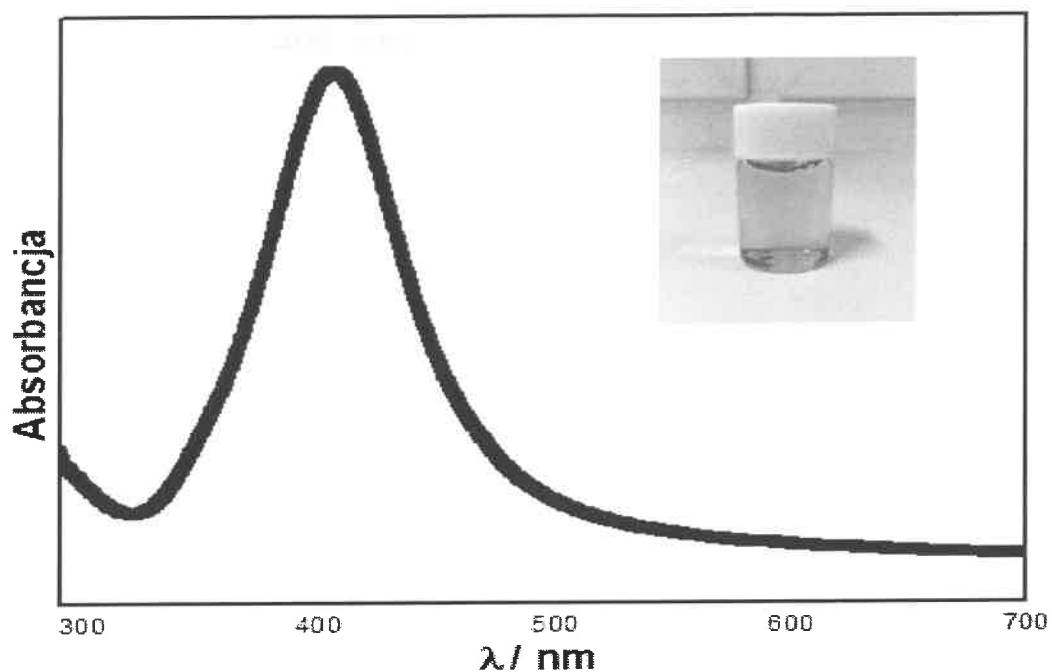
Sygnaly widoczne na widmie EDS pochodzą od srebra, węgla, tlenu oraz chloru. Dla danego fragmentu próbki odwzorowanie profilu składu chemicznego wskazało równomierne rozłożenie atomów srebra pokrywające się z obszarem pokrycia podłoża materiałem nanostrukturalnym. Widmo EDS wskazuje również na dużą zawartość w próbce węgla, co spowodowane jest wykorzystaniem w analizie jako podkładu dobrze przewodzącego węgla szklanego (*ang. Glassy Carbon*) GC. Ponadto zawartość węgla, tlenu oraz chloru pochodzi z materiału organicznego wykorzystanego jako modyfikator nanocząstek. Przeprowadzona analiza składu chemicznego wykazała ponadto, iż uzyskany materiał nanostrukturalny nie został zanieczyszczony żadnymi domieszkami, które mogą wpływać na proces oznaczania analitów. Odwzorowanie rozłożenia atomów w warstwie AgNPs-gel prezentuje **Rysunek 45**.



Rysunek 45 Odzworowaniem dystrybucji atomów Ag, C, O oraz Cl w warstwie.

Charakterystyka fizykochemiczna nanocząstek złota stabilizowanych PVA

Analiza wykonana metodą UV-Vis potwierdza otrzymanie materiału nanostrukturalnego, a maksimum absorpcji usytuowane przy około 430 nm związane jest ze zjawiskiem rezonansu plazmonowego. Widmo UV-Vis zarejestrowane dla nanocząstek AuNPs-PVA zaprezentowane jest na **Rysunku 46**.



Rysunek 46 Widmo UV-Vis zarejestrowane dla nanocząstek srebra modyfikowanych alkoholem polivinylovym oraz zdjęcie koloidu (AgNPs-PVA).

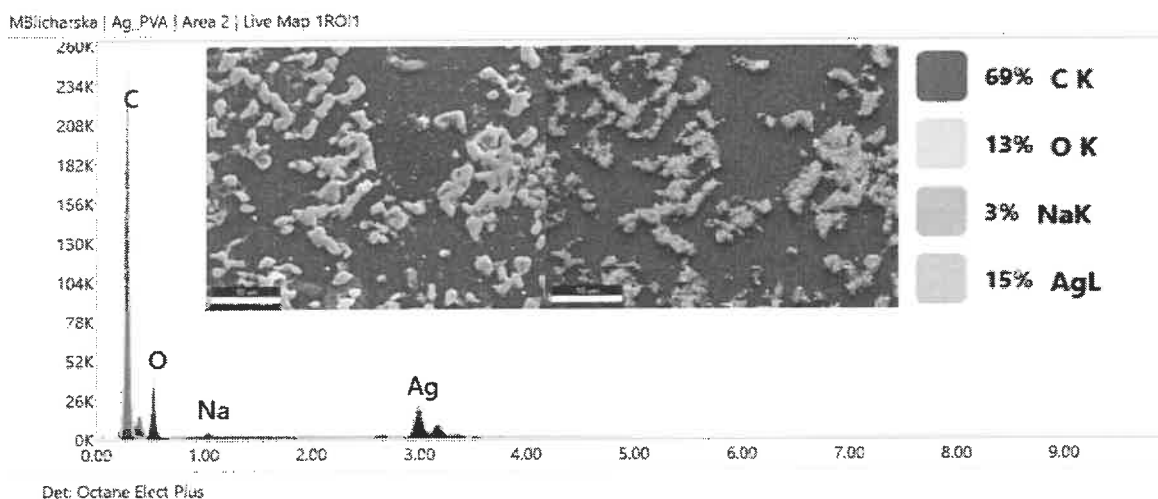
Wyniki analizy mikroskopowej prezentuje **Rysunek 47**.



Rysunek 47 Obraz TEM nanocząstek srebra stabilizowanych PVA.

Uzyskany na drodze analizy mikroskopowej obraz wskazuje, że otrzymane nanostruktury charakteryzują się pseudosferycznym kształtem oraz rozmiarem w zakresie 20÷60 nm.

Metoda dyspersji energii promieniowania rentgenowskiego została wykorzystana w celu identyfikacji pierwiastków wchodzących w skład otrzymanego materiału nanostrukturalnego AgNPs-PVA oraz do sporządzenia map pierwiastków. Uzyskane widmo EDS wraz z fotograficzną dokumentacją analizowanego obszaru próbki przedstawiono na **Rysunku 48**.



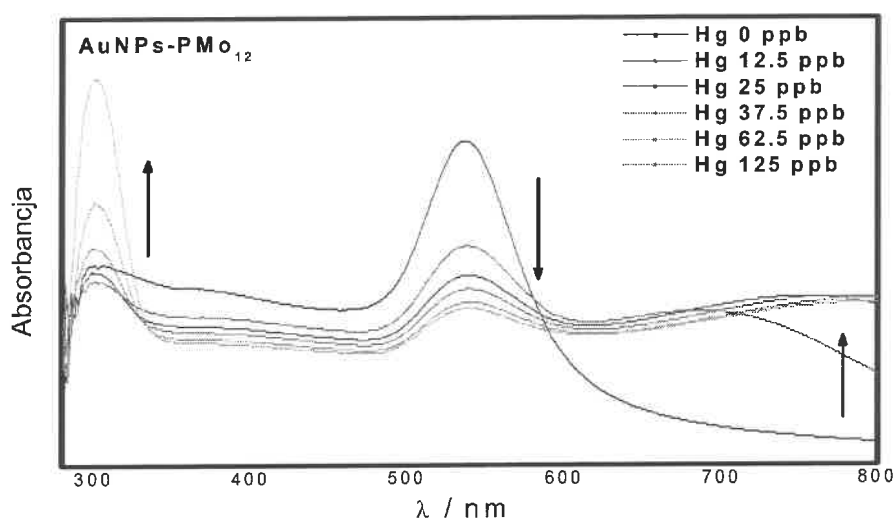
Rysunek 48 Profil składu chemicznego nanocząstek srebra modyfikowanych alkoholem polivinylowym (AgNPs-PVA) wraz z odwzorowaniem dystrybucji poszczególnych atomów w warstwie.

Sygnaly widoczne na widmie EDS pochodzą od srebra, węgla oraz tlenu wchodzących w skład stabilizatora. Dla danego fragmentu próbki odwzorowanie profilu składu chemicznego wskazało ponadto równomierne rozłożenie atomów Ag pokrywające się z obszarem pokrycia podłoża materiałem nanostrukturalnym.

Wykorzystanie nanostruktur metalicznych do oznaczania metali ciężkich

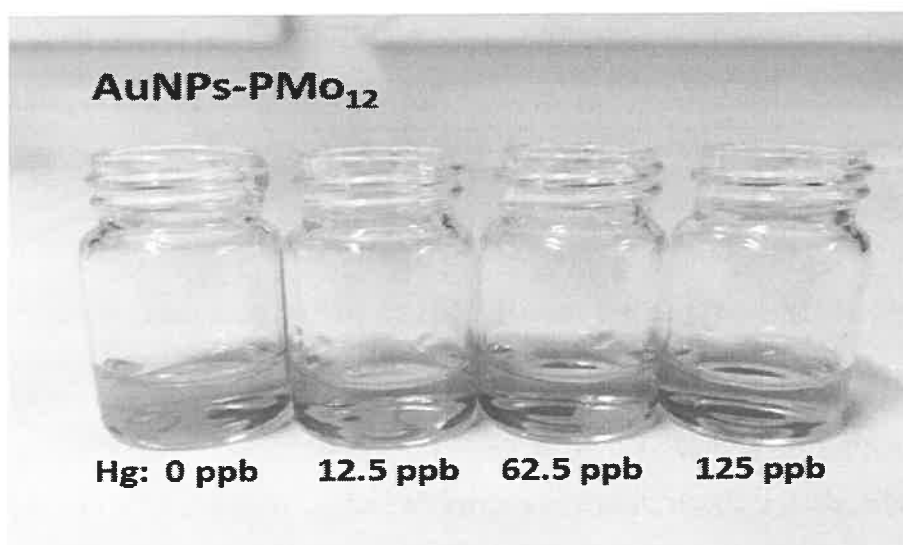
Wytworzone przez nas nanostruktury zostały wykorzystane do oznaczania metali ciężkich takich jak ołów, rtęć i kadm. W niniejszym podrozdziale zaprezentowaliśmy wyniki badań dla najbardziej czułego układu nanostrukturalnego. Układem tym są nanocząstki złota stabilizowane heteropolikwasami AuNPs-PMO₁₂. Analizy przydatności otrzymanych nanokrystalitów do konstrukcji sensora dokonaliśmy z wykorzystaniem spektrofotometrii UV-Vis.

Zmianę widma absorpcji nanostruktur złota AuNPs-PMo₁₂ pod wpływem kolejnych dodatków wzorca rtęci warunkujących wzrastające stężenie jonów tego metalu w roztworze badanym prezentuje **Rysunek 49**.



Rysunek 49 Widma UV-Vis zarejestrowane dla nanocząstek złota (AuNPs-PMo₁₂) przy kolejnych dodatkach roztworu rtęci warunkujących stężenia końcowe w kuwecie pomiarowej (-) 12.5 ppb, (-) 25 ppb, (-) 37.5 ppb, (-) 62.5 ppb oraz (-) 125 ppb.

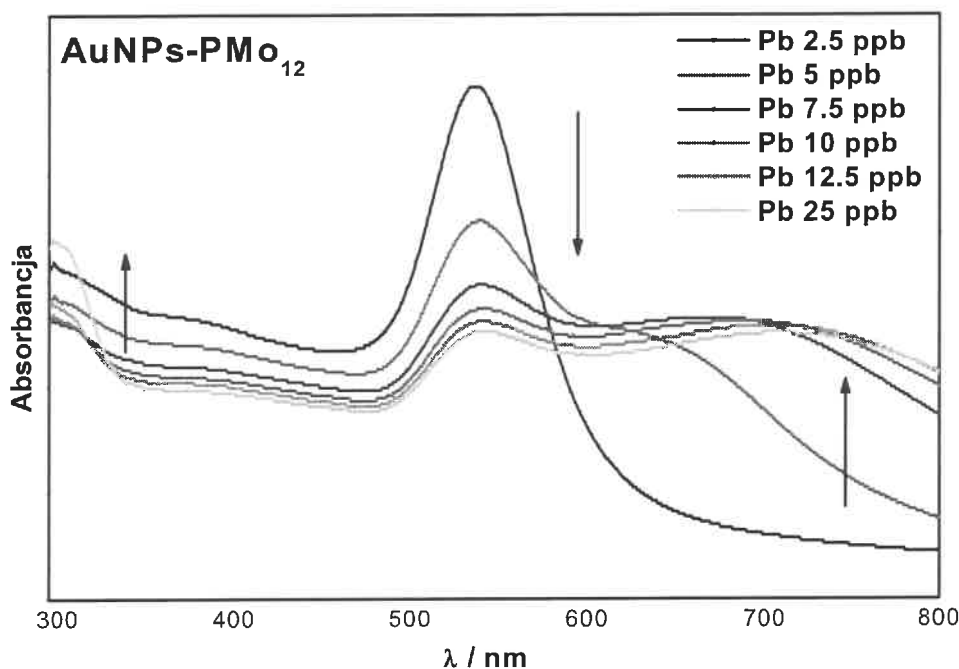
Zmianę zabarwienia roztworu koloidalnego złota pod wpływem dodatku jonów rtęci prezentuje **Rysunek 50**.



Rysunek 50 Zdjęcie koloidu nanostruktur AuNPs-PMo₁₂ przy dodatku roztworu wzorcowego rtęci warunkującego jej różne stężenie.

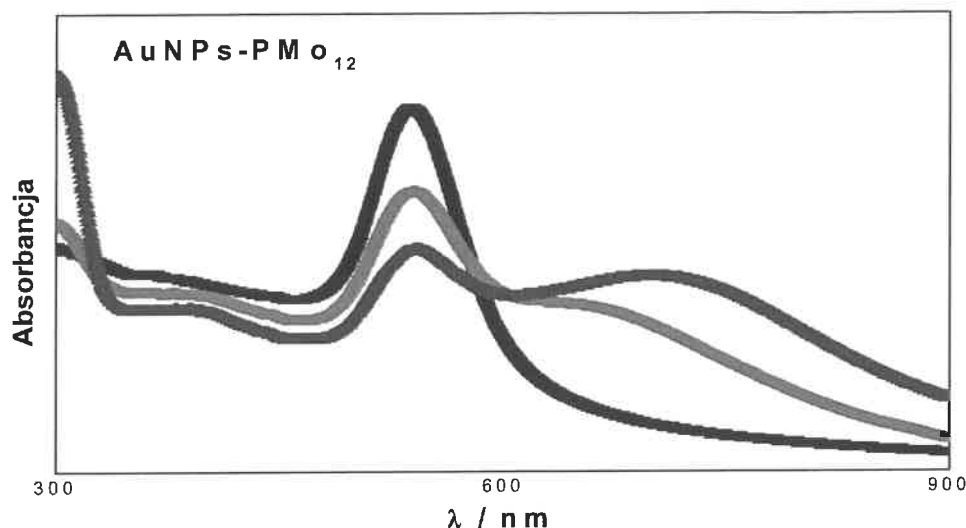
Wzrastające stężenie rtęci powoduje przesunięcie pasma absorpcji nanostruktur złota w kierunku większych długości fali. Bezpośrednio związane jest to ze zmianą barwy omawianego koloidu z czerwono-różowej na fioletowo-niebieską.

Analizę z wykorzystaniem techniki UV-Vis sporządzono również dla koloidalnego złota w obecności kolejnych dodatków roztworu wzorcowego zawierającego ołów. Uzyskane wyniki prezentuje **Rysunek 51**.



Rysunek 51 Widma UV-Vis zarejestrowane dla nanocząstek złota (AuNPs-PMo₁₂) przy kolejnych dodatkach roztworu ołów warunkujących stężenia końcowe w kuwecie pomiarowej (-) 2.5 ppb, (-) 5 ppb, (-) 7.5 ppb, (-) 10 ppb, (-) 12.5 ppb oraz (-) 25 ppb.

Nanostruktury złota charakteryzowały się najmniejszą czułością na obecność jonów kadmu. Wyniki analizy UV-Vis przeprowadzonej w obecności tego metalu ciężkiego zaprezentowano na **Rysunku 52**.



Rysunek 52 Widma UV-Vis zarejestrowane dla nanocząstek złota (AuNPs-PMO₁₂) przy kolejnych dodatkach roztworu kadmu warunkujących stężenia końcowe w kuwecie pomiarowej (-) 12.5 ppb, (-) 25 ppb, (-) 37.5 ppb.

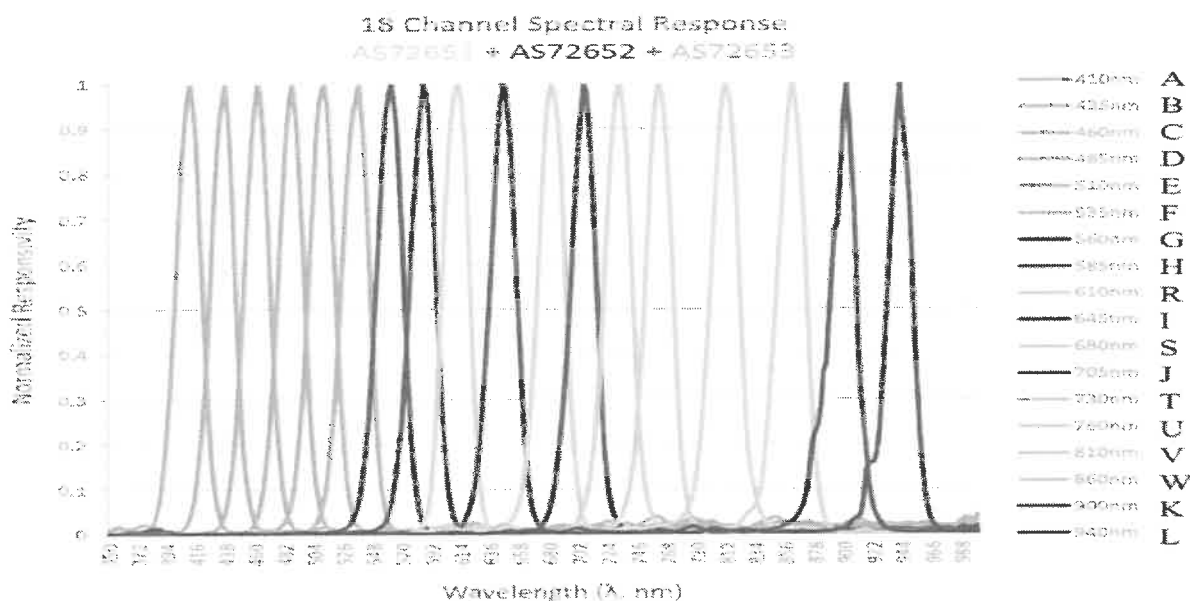
Pierwszy pre-prototyp sensora oznaczania metali ciężkich

W ramach prac opracowano system elektroniczny oparty na mikroprocesorze ATMEGA328 oraz układzie detekcji AS7265x umożliwiający badanie spektroskopowej zmiany odczytu próbki w zakresie spektrum od 372 do 944 nm. System przystosowany został do badania materiałów transparentnych. Zdjęcie części czulej optycznie zaprezentowano na **Rysunku 53**.



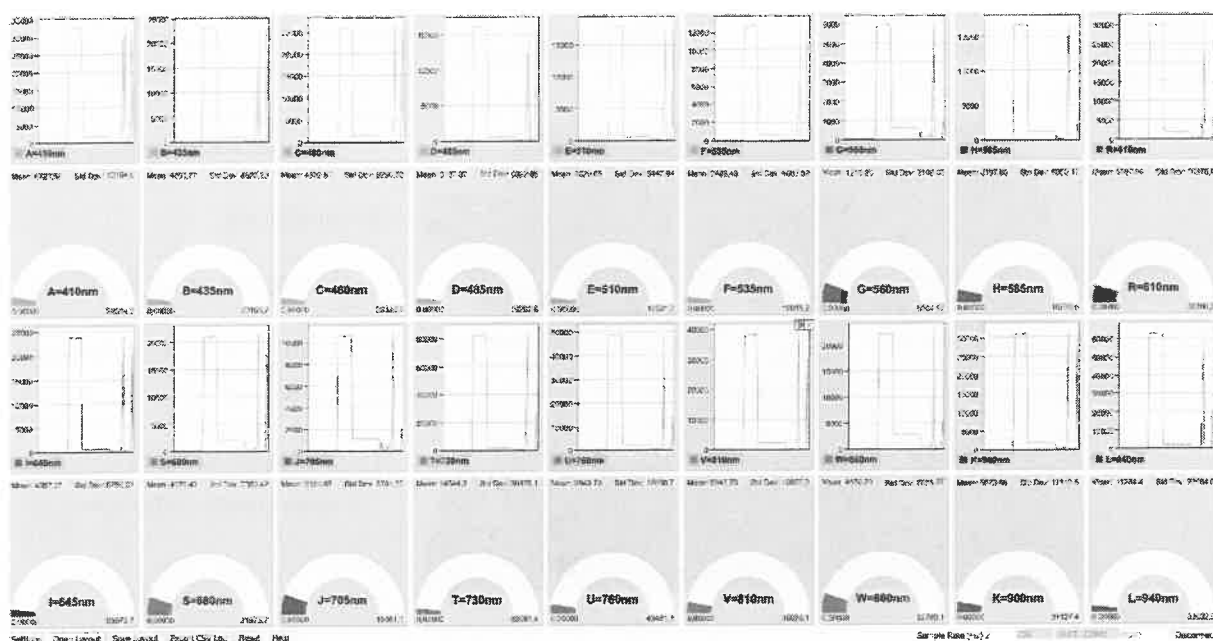
Rysunek 53 System detekcji barwowej transparentny do badania próbek płynnych.

Układ ten umożliwia niezależną jednoczesną detekcję spektroskopową dla 18 kanałów.

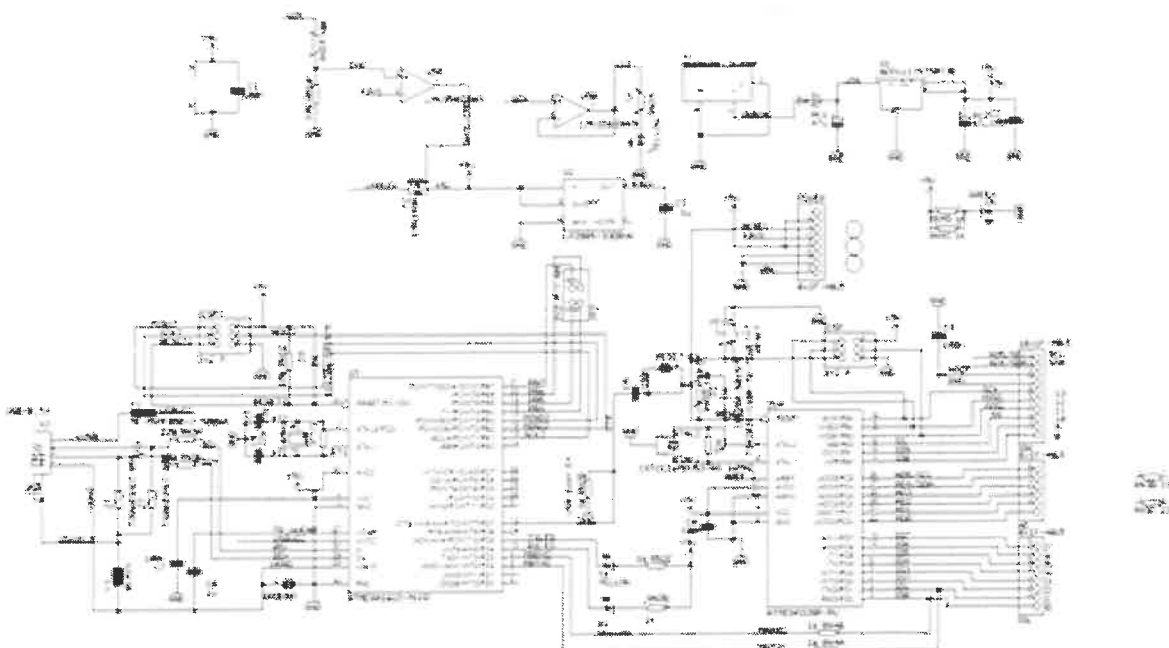


Rysunek 54 System transparentny do badania próbek płynnych dla detekcji glukozy – zakresy analizowanych długości fal barwnych.

Odczyt zmian barwnych możliwy do analizy statystycznej przenoszony jest za pomocą danych z każdego zakresu osobno. Umożliwiło to wybór najbardziej charakterystycznego zakresu barwowego, co zaprezentowano na Rysunku 55.



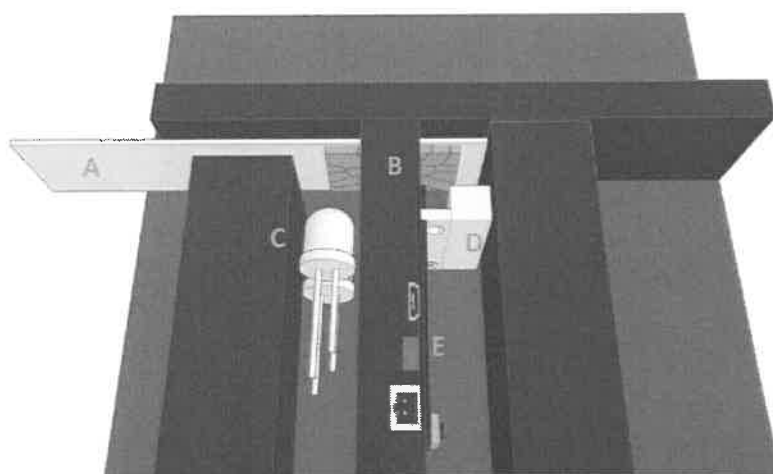
Rysunek 55 Program do analiza sygnału przy detekcji spektroskopowej – zakresy analizowanych częstotliwości fali.



Rysunek 56 Schemat układu płyty bazowej do której podłączony został układ do detekcję spektroskopowej. Komunikacja z komputerem PC odbywa się za pomocą złącza USB.

Do złącza I2C układu mikroprocesorowego podłączony został układ AS72652.

Kolejną przebadana możliwością detekcji zmian barwowych był układ działający na zasadzie odbiciowej. Schemat układu elektronicznego pozostał bez zmian jedynie zmienił się sposób oświetlenia próbki i umieszczenia układu detekcji.



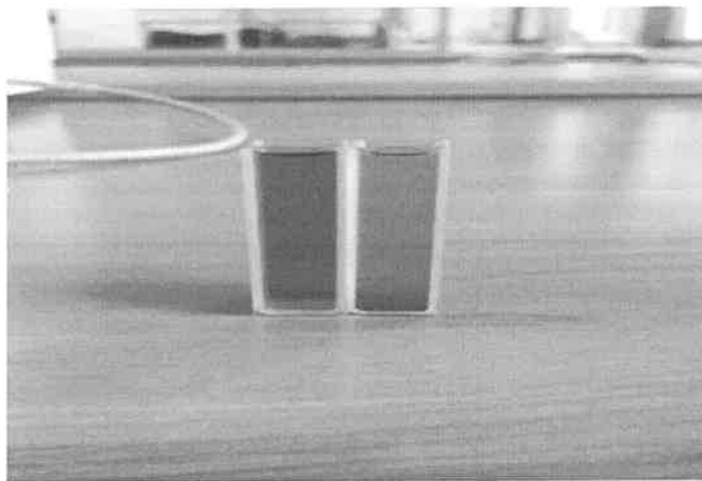
- A – komora paska testowego,
- B – przesłona,
- C – źródło światła, diody LED,
- D – detektor pasmowy składowej barwnej,
- E – przetwornik ADC i układ sterowania systemem USB.

Rysunek 57 Schemat poglądowy oraz widok sensora odbiciowego systemu spektroskopowego wykorzystywanego do detekcji zmian odpowiedzi próbki w obecności glukozy.

Wpływ interferentów z próbek żywności

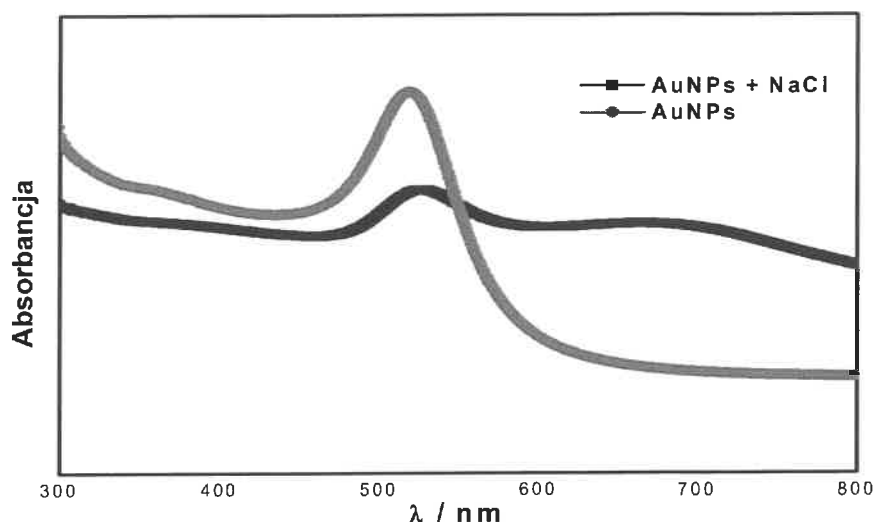
Próbki żywności stanowią niezwykle złożoną matrycę. Prócz związków chemicznych naturalnie występujących w żywności, w produktach przetwarzanych znajdują się celowo wprowadzane dodatki, których zadaniem jest przedłużać trwałość, poprawiać smak oraz konsystencję żywności. W przypadku analizy produktów spożywczych powoduje to dodatkowe trudności, gdyż substancje te mogą stanowić interferenty znacząco komplikujące sposób oznaczania. Substancje konserwujące stanowią jedną z grup dodatków do żywności, czyli substancji które nie są naturalnymi składnikami żywności. Jednym z najczęściej wykorzystywanych konserwantów w przemyśle spożywczym jest chlorek sodu (NaCl), który stanowi jednocześnie wzmacniacz smaku. W celu określenia wpływu różnych czynników na proces oznaczania metali ciężkich za pomocą nanostruktur metali zbadaliśmy wpływ chlorku sodu na wynik analizy.

Dodatek 24 μl 1.3 mM roztworu NaCl wprowadzony do próbki zawierającej nanocząstki złota powoduje zmianę barwy koloidu z czerwonego na fioletowy. Zmiana koloru nanocząstek złota wywołana na skutek dodatku chlorku sodu zaprezentowana jest na **Rysunku 58**.



Rysunek 58 Kolor koloidu nanocząstek złota AuNPs-Ct bez dodatku i z dodatkiem NaCl.

Dla roztworów zaprezentowanych na **Rysunku 58** zarejestrowano również widma UV-Vis. Widma te zostały zaprezentowane na **Rysunku 59**.



Rysunek 59 Widma UV-Vis zarejestrowane dla nanostruktur złota bez i w obecności dodatku NaCl.

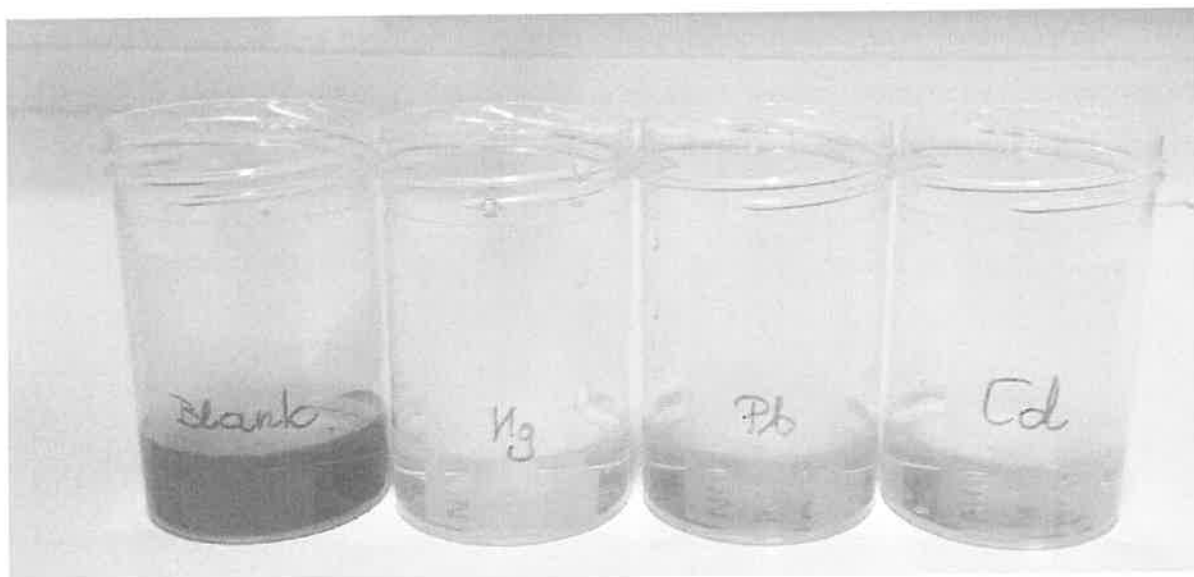
W przypadku sferycznych nanocząstek złota przesunięcie pasma absorpcji w kierunku większych długości fali następuje wraz ze wzrostem rozmiaru nanokrystalitów, co prezentuje **Rysunek 59**. Podobny efekt związany z przesunięciem batochromowym obserwowany jest przy tworzeniu większych agregatów i aglomeratów nanocząstek, wiąże się to również ze zmianą koloru roztworu koloidu złota z czerwonego na fiolet. Podobne rezultaty uzyskano w przypadku nanostruktur stabilizowanych różnymi typami warstw stabilizujących.

Koncepcja kolorymetrycznego oznaczania metali w oparciu o układy enzymatyczne

W przypadku oznaczania aktywności układów enzymatycznych wykorzystywane są różne substraty dla enzymów, które na drodze odpowiednich reakcji katalizowanych przez enzym ulegają przekształceniu w substancje barwne. Metale ciężkie ze względu m.in. na zdolność denaturacji białek prowadzą do degradacji struktur enzymatycznych co skutkuje częściowym lub całkowitym spadkiem ich aktywności. W związku z powyższym zdenaturowane enzymy charakteryzujące się spadkiem aktywności, czyli mniej efektywnie katalizują przemiany chromogenów, w efekcie prowadząc do uzyskania roztworów tych substancji o niższej intensywności barwy. Powyższe zjawisko zostało przez nas wykorzystane do skonstruowania paska do wizualnej detekcji metali ciężkich.

Przygotowanie paska do kolorymetrycznego oznaczania metali

Metale ciężkie stanowią inhibitory wielu enzymów prowadząc do ich dezaktywacji. Wpływ metali ciężkich (Hg, Pb, Cd) na aktywność enzymatyczną został określony m. in. przy użyciu β -galaktozydazy, która prócz hydrolizy wiązania glikozydowego hydrolizuje także syntetyczne chromogenne substraty. Jeden z takich substratów to 5-bromo-4-chloro-3-indolilo- β -D-galaktopiranozyd (X-Gal). Jest to substancja bezbarwna, która w obecności β -D-galaktozydazy hydrolizuje do dwóch produktów, 5-bromo-4-chloro-3-hydroksyindolu i galaktozy. 5-bromo-4-chloro-3-hydroksyindol na skutek dalszych przekształceń prowadzi do utworzenia pochodnej indygo o barwie niebieskiej. Reakcja ta została wykorzystana do określenia wpływu rtęci, kadmu oraz ołowiu na aktywność katalityczną lakazy. Uzyskane rezultaty przedstawiono na Rysunku . Roztwór w próbce, w której znajdował się tylko enzym oraz chromogeny substrat, po chwili czasu zabarwił się na kolor niebieski, co świadczy o obecności β -D-galaktozydazy katalizującej reakcję hydrolizy. W pozostałych próbkach enzym poddano początkowo inkubacji wraz z roztworami odpowiednich metali ciężkich przez czas 10 minut. Po tym czasie do roztworów wprowadzono syntetyczny substrat X-Gal. Uzyskane wyniki przedstawiono na **Rysunku 60**.

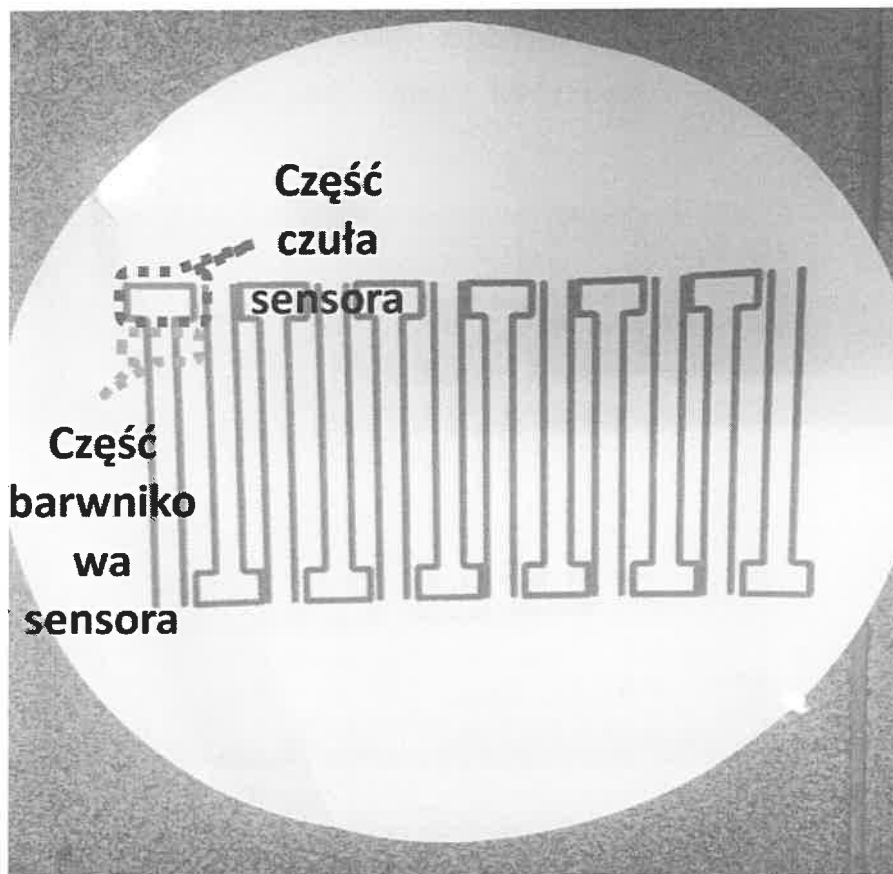


Rysunek 60 Zdjęcie przedstawiające zabarwienie roztworów w obecności jonów metali ciężkich.

Jak przedstawiają uzyskane rezultaty, intensywne niebieskie zabarwienie utrzymuje się jedynie w próbce, w której nie ma dodatku w postaci soli metalu ciężkiego. W pozostałych próbkach do których wprowadzono dodatki w postaci jonów rtęci, ołowiu i kadmu obserwuje się stopniowy bądź całkowity zanik barwy. Całkowity jej zanik odnotowano w próbce, w której początkowa inkubacja enzymu odbywała się w obecności jonów rtęci. Osłabienie natężenia barwy w stosunku do próbki bez zawartości metali ciężkich zaobserwowano po początkowej inkubacji w obecności jonów ołowiu i kadmu.

Dezaktywacja enzymu prowadzi do utraty przez niego zdolności katalizowania reakcji przekształcania substratu w produkt. W zależności od stopnia dezaktywacji zanik ten może być całkowity lub częściowy. Na skutek dezaktywacji β -D-galaktozydaza traci zdolność hydrolizy 5-bromo-4-chloro-3-indolilo- β -D-galaktopiranozydu, w związku z powyższym intensywność tworzenia niebieskiego produktu finalnego procesu jest coraz mniejsza, prowadząc do zmniejszenia stopnia intensyfikacji barwy roztworu lub do jej całkowitego zaniku. Wyselekcjonowane metale (Hg, Pb oraz Cd) stanowią inhibitory dla β -D-galaktozydazy, co przejawia się w osłabieniu intensywności koloru w próbce z ołowiem i kadmem oraz całkowitego zaniku barwy dla próbki inkubowanej w obecności rtęci. Uzyskane wyniki świadczą również o tym, iż rtęć charakteryzuje się największą toksycznością w stosunku do analizowanego enzymu.

Na podstawie przeprowadzonych analiz zaproponowaliśmy wykorzystanie enzymu do skonstruowania kolorymetrycznego paska do detekcji metali ciężkich. **Rysunek 61** prezentuje zdjęcie gotowych układów detekcyjnych.



Rysunek 61 Zdjęcie pasków do detekcji kolorymetrycznej metali ciężkich.

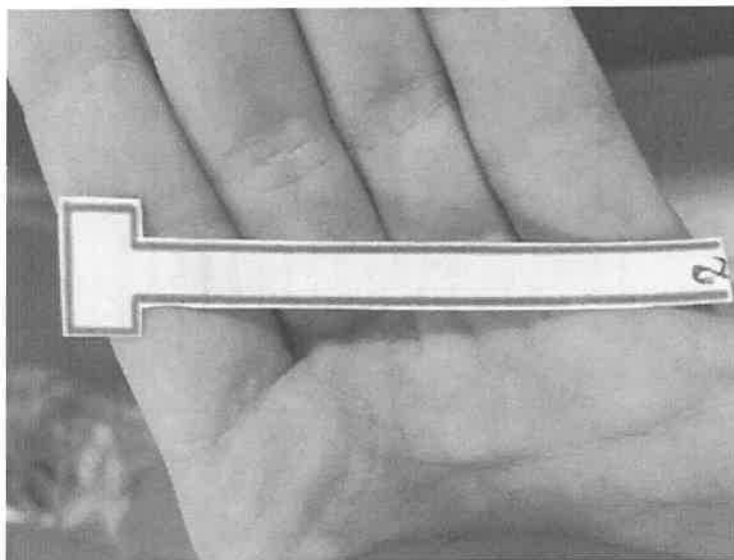
Poszczególne etapy przygotowania paska zostały zaprezentowane poniżej.

1. Na podłożu stanowiącym przez celulozowe filtry membranowe wydrukowano hydrofobowe linie stanowiące granice paska detekcyjnego (do druku wykorzystano specjalny wosk).
2. Na górną część zaznaczoną czerwoną ramką, czyli na tzw. część detekcyjną naniesiono enzym poprzez nakrapianie jego zawiesiny w buforze octanowym o pH 4.5.
3. Paski pozostawiono do wyschnięcia.
4. Na dolną część zaznaczoną niebieską ramką, czyli na tzw. część barwnikową naniesiono barwnik poprzez nakrapianie.
5. Paski pozostawiono do wyschnięcia.

Czas inkubacji próbki w części czulej sensora wynosi ok. 10 minut.

Po tym czasie należy wprowadzić roztwór buforu u dołu paska, który siłami kapilarnymi porusza się ku polu części barwnikowej zabierając ze sobą barwnik, który w przypadku

zachowania aktywności enzymu może ulegać reakcji w części czulej sensora, powodując w efekcie jego zabarwienie. Zdjęcie paska wykorzystanego do detekcji zaprezentowano na **Rysunku 62**.



Rysunek 62 Zdjęcie testu paskowego po analizie.

W przypadku przeniesienia analizy z roztworu na pasek nitrocelulozowy, intensywności uzyskiwanych barw są o wiele niższe. Skutkuje to koniecznością zwiększenia stężeń stosowanych odczynników. Ponadto nitroceluloza silnie adsorbuje barwnik 5-Bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranosid.

Podsumowanie

Na drodze przeprowadzonych badań przygotowaliśmy układy detekcyjne służące do wykrywania metali ciężkich w próbkach żywności. Układy wykorzystujące nanostrukturalne złoto charakteryzują się dużą czułością, jednakże są również podatne na interferenty, co ogranicza ich wykorzystanie do wąskiej i wyselekcjonowanej grupy żywności.

Układy bazujące na enzymach SA mniej podatne na interferencje ze strony matrycy jednakże ze względu na strukturę substratu wykorzystanego dla enzymów intensywności barwy uzyskiwane na pasku nitrocelulozowym są o wiele niższe niż w roztworach wodnych.

8. Koncepcja elektrochemicznego oznaczania metali ciężkich w oparciu o układy enzymatyczne

Główne założenia i cele

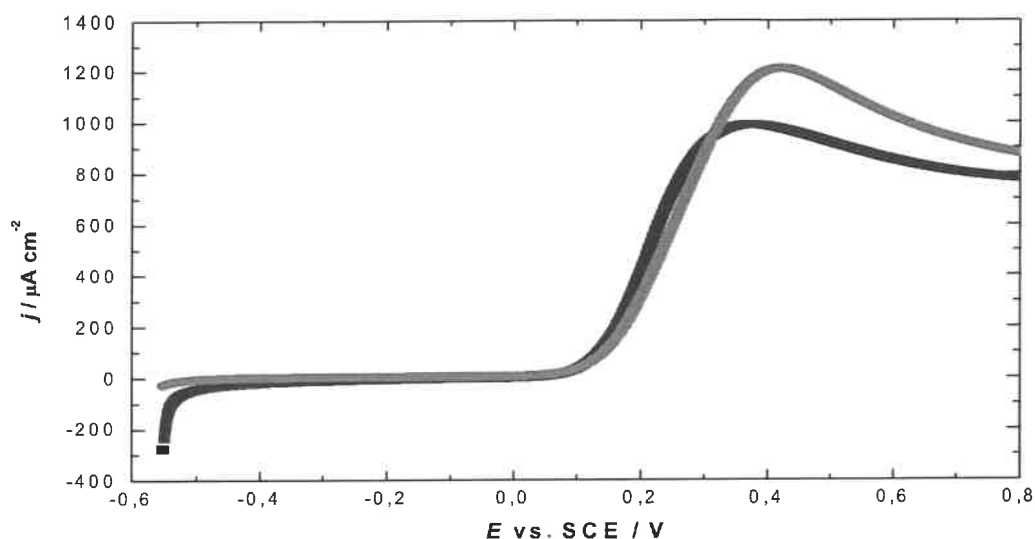
W celu określenia zawartości metali ciężkich w próbkach żywności zaproponowaliśmy układy enzymatyczne, a proces ich wykrywania bazuje na spadku aktywności katalitycznej danego enzymu.

Przygotowanie układów katalitycznych

Do oznaczania metali ciężkich zostały wykorzystane układy enzymatyczne zastosowane w funkcji elektrokatalizatora do oznaczania glukozy. Jako elektrokatalizator zastosowano oksydazę glukozy, utleniającą glukozę zgodnie z reakcją scharakteryzowaną w poprzednim rozdziale. Wstępnej oceny skuteczności proponowanego rozwiązania dokonano na wirującej elektrodzie dyskowej z węgla szklanego.

Charakterystyka elektrochemiczna układów katalitycznych

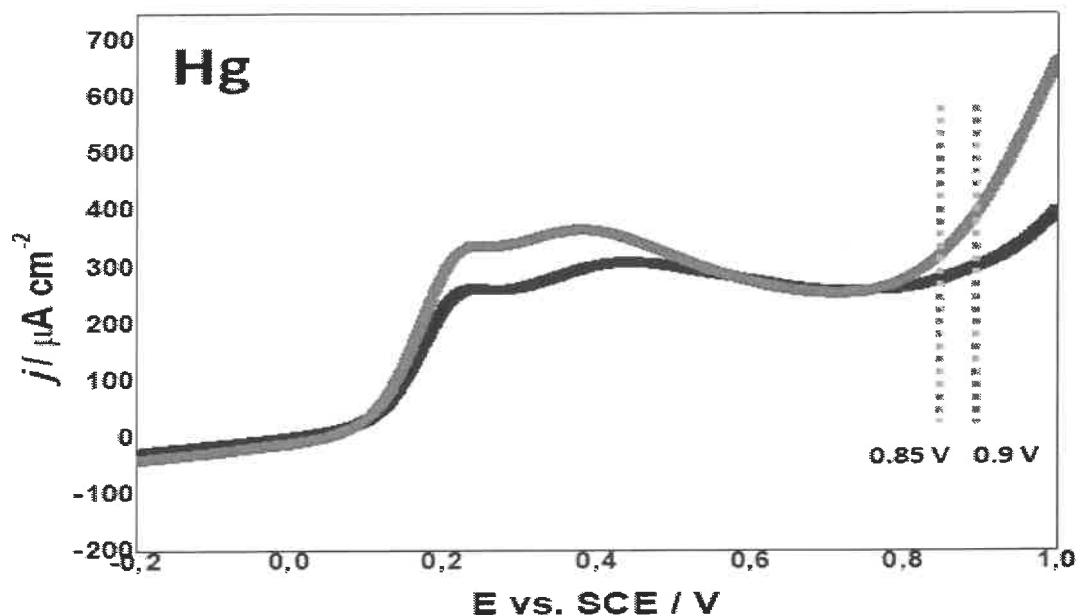
Na powierzchnie elektrody pracującej naniesiono enzym, a następnie zarejestrowano krzywe w roztworze buforu fosforanowego zawierającego glukozę. Następnie na powierzchnię elektrody z węgla szklanego nakropiono roztwór zawierający jony rtęci i pozostawiono na 10 min. Po upływie określonego czasu krzywe woltamperometryczne zarejestrowano ponownie w roztworze glukozy. Otrzymane rezultaty umieszczono na **Rysunku 63**.



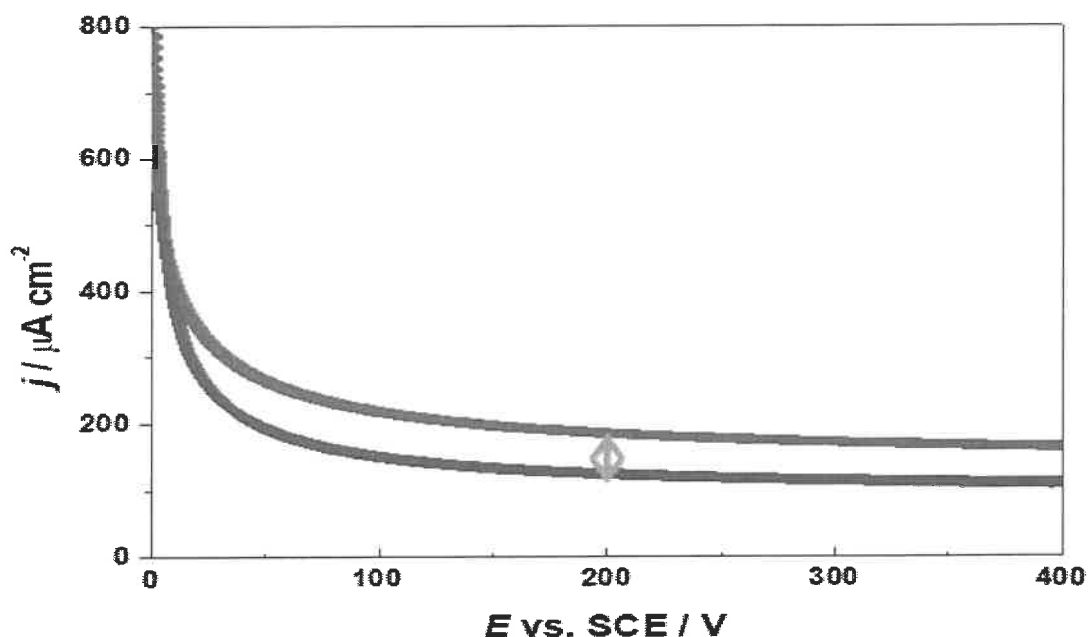
Rysunek 63 Krzywe voltamperometryczne oksydazy glukozy GOx na elektrodzie GC zarejestrowane w roztworze buforu fosforanowego o pH=7 z dodatkiem glukozy o stężeniu $50 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ przed inkubacją w roztworze metalu ciężkiego (-) oraz po inkubacji (-); Szybkość polaryzacji: $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, stężenie mediatora ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$) $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

Jak wskazują uzyskane wyniki w obecności jonów rtęci aktywność katalityczna enzymu ulega osłabieniu. Jony rtęci pełnią funkcję inhibitora, a uzyskiwane prądy katalitycznego utleniania glukozy ulegają osłabieniu. Wyższe wartości gęstości prądów katalitycznego utlenienia zarejestrowane przed inkubacją wskazują, że aktywność enzymu ulega osłabieniu na skutek jego zatrucia przez rtęć.

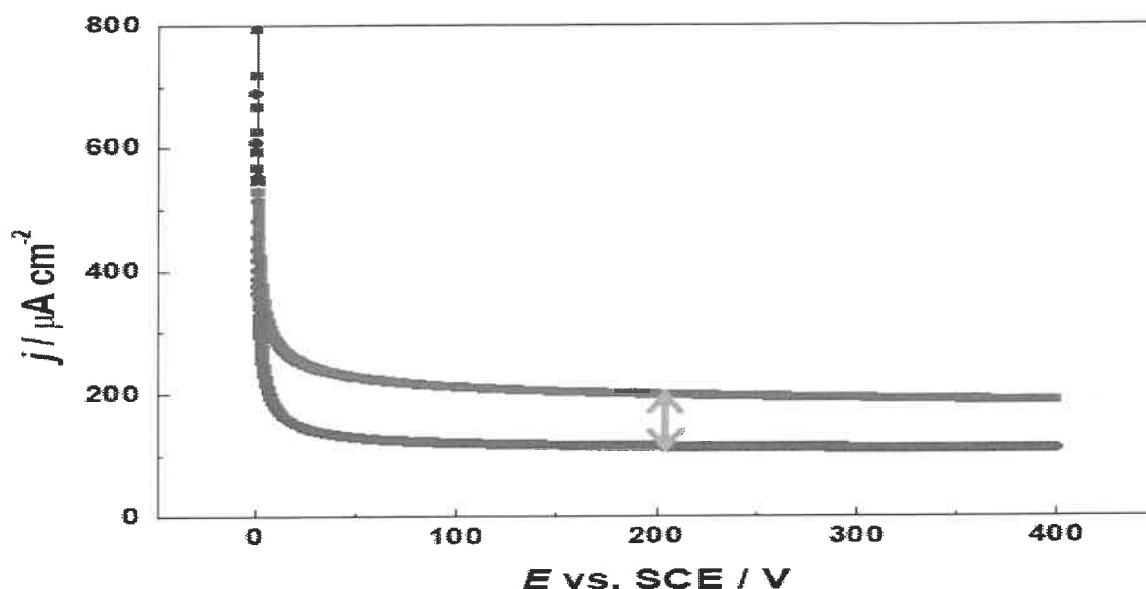
Powyższe obserwacje zaowocowały serią eksperymentów elektrochemicznych przeprowadzonych w obecności jonów rtęci, ołowiu i kadmu. Krzywe volt amperometryczne i amperometryczne na podstawie, których oceniono przydatność danych układów do wykrywania metali ciężkich zaprezentowano na **Rysunkach 64-69**.



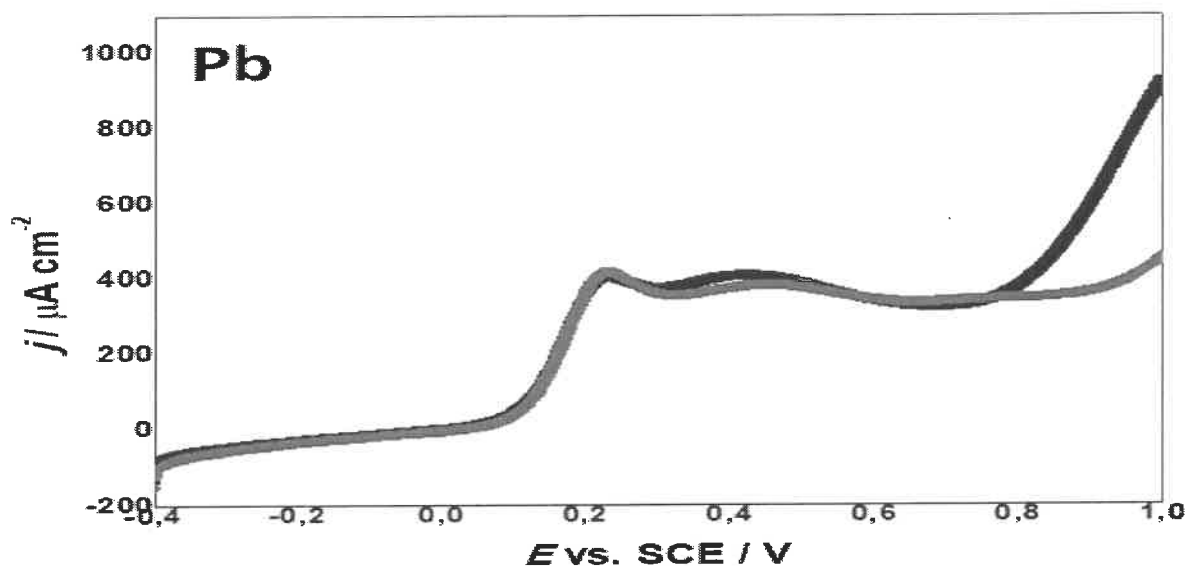
Rysunek 64 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane dla układu MWNT/GOx na elektrodzie GC zarejestrowane w roztworze buforu fosforanowego o pH=7 z dodatkiem glukozy o stężeniu $50 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ przed inkubacją w roztworze metalu ciężkiego (-) oraz po inkubacji (-); Szybkość polaryzacji: $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, stężenie mediatora ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$) $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$.



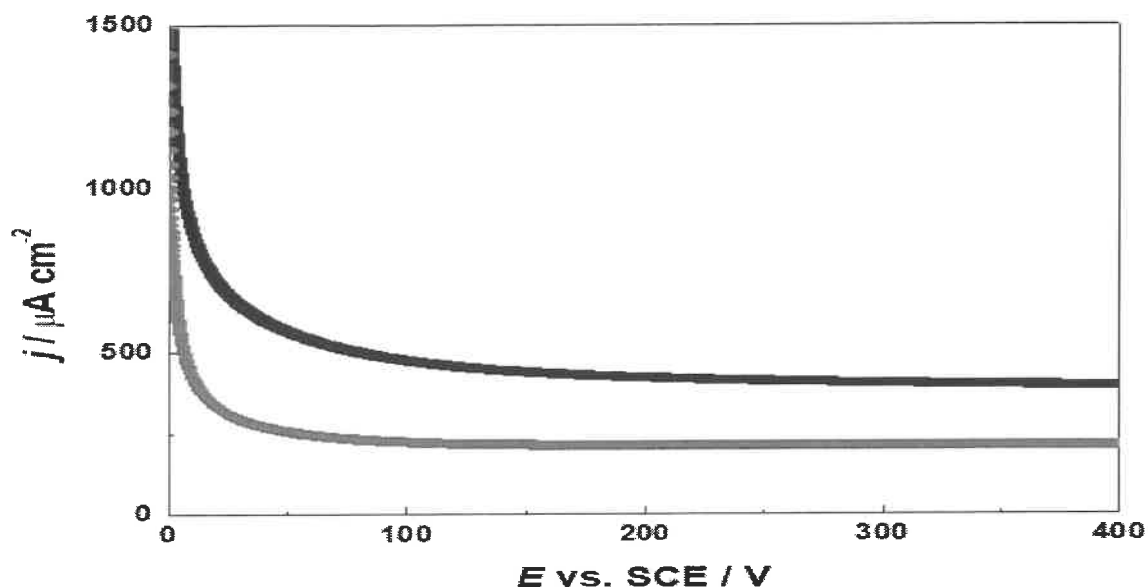
Rysunek 65 . Krzywe amperometryczne elektroustleniania glukozy, zmierzone przy potencjale 0.85V dla enzymatycznego układu katalitycznego MWNT/GOx. Elektrolit podstawowy: bufor fosforanowy zawierający glukozę o stężeniu $50 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ przed inkubacją w roztworze metalu ciężkiego (-) oraz po inkubacji (-); Szybkość polaryzacji: $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, stężenie mediatora ($\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$) $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$.



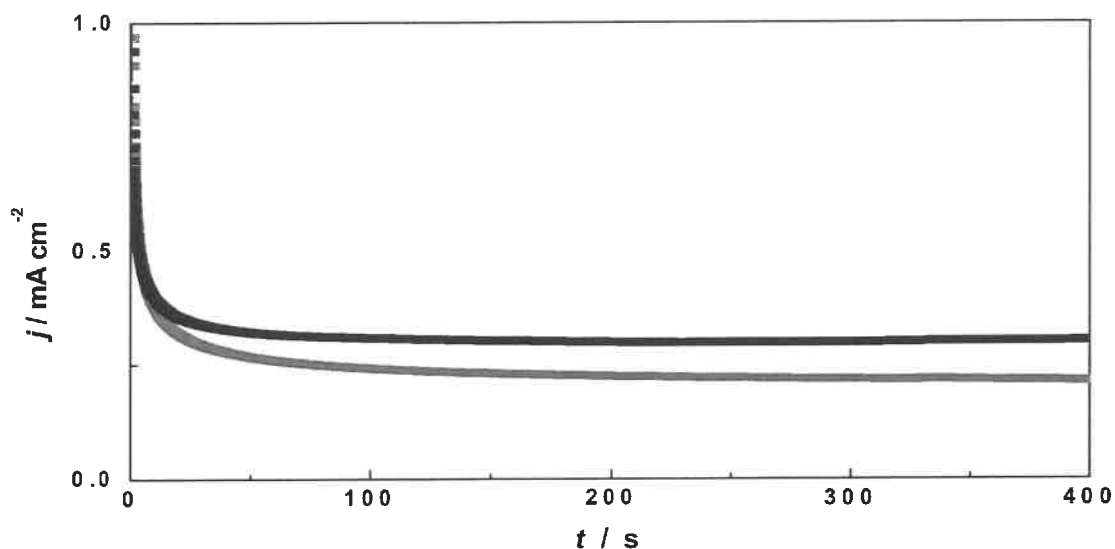
Rysunek 66 Krzywe amperometryczne elektrouhleniania glukozy, zmierzone przy potencjale 0.9V dla enzymatycznego układu katalitycznego MWNT/GOx. Elektrolit podstawowy: bufor fosforanowy zawierający glukozę o stężeniu $50 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ przed inkubacją w roztworze metalu ciężkiego (-) oraz po inkubacji (-); Szybkość polaryzacji: $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, stężenie mediatora $(\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-})$ $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$.



Rysunek 67 Krzywe woltamperometryczne zarejestrowane dla układu MWNT/GOx na elektrodzie GC zarejestrowane w roztworze buforu fosforanowego o $\text{pH}=7$ z dodatkiem glukozy o stężeniu $50 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ przed inkubacją w roztworze metalu ciężkiego (-) oraz po inkubacji (-); Szybkość polaryzacji: $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, stężenie mediatora $(\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-})$ $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$.



Rysunek 68 Krzywe amperometryczne elektrouhleniania glukozy, zmierzone przy potencjale 0.85V dla enzymatycznego układu katalitycznego MWNT/GOx. Elektrolit podstawowy: bufor fosforanowy zawierający glukozę o stężeniu $50 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ przed inkubacją w roztworze metalu ciężkiego (-) oraz po inkubacji (-); Szybkość polaryzacji: $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, stężenie mediatora $(\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-})$ $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$.



Rysunek 69 Krzywe amperometryczne zarejestrowane dla układu MWNT/GOx na elektrodzie GC zarejestrowane w roztworze buforu fosforanowego o $\text{pH}=7$ z dodatkiem glukozy o stężeniu $50 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ przed inkubacją w roztworze metalu ciężkiego (-) oraz po inkubacji (-); Szybkość polaryzacji: $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$, stężenie mediatora $(\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-})$ $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$.

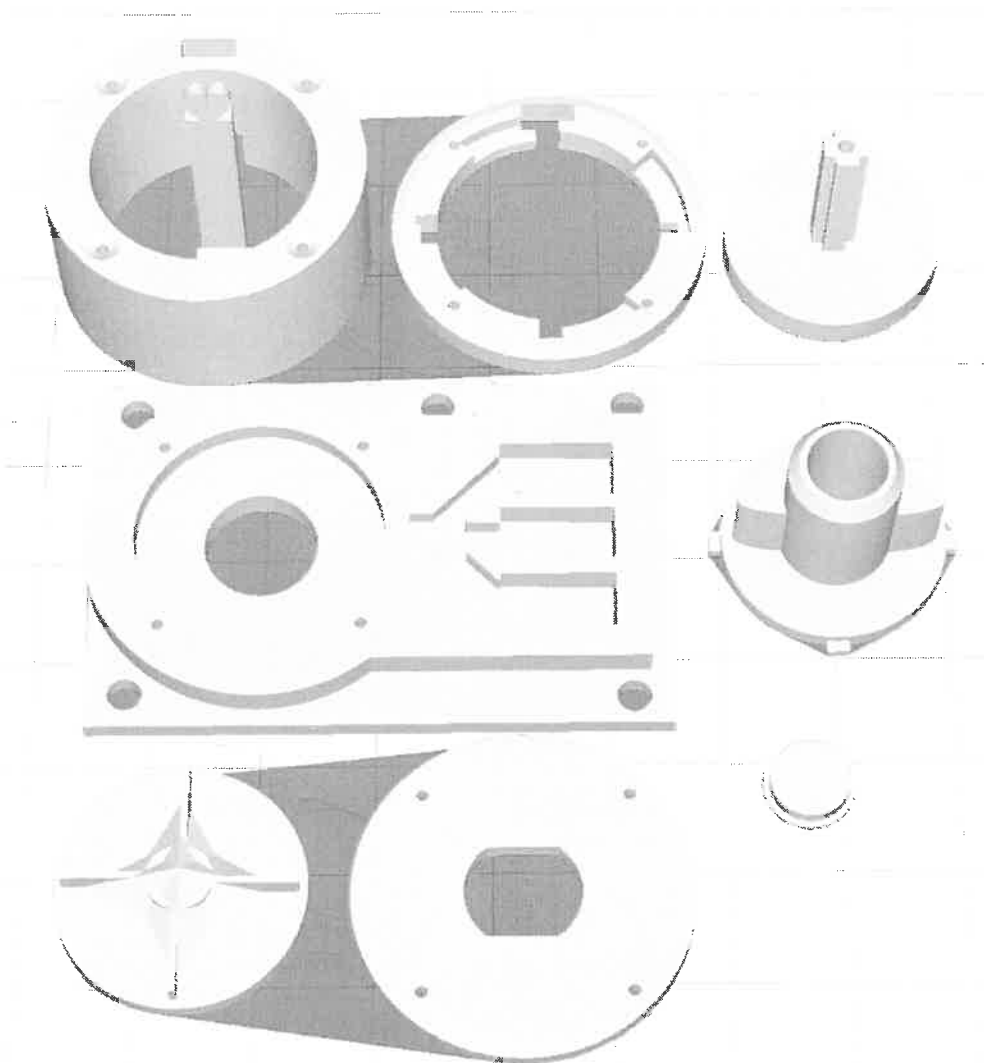
Podsumowanie

W serii eksperymentów elektrochemicznych zaobserwowaliśmy dezaktywację enzymów na skutek inkubacji w roztworach zawierających metale ciężkie. Dezaktywacja, a tym samym spadek aktywności metalu prowadzi do spadku gęstości generowanych prądów w układzie. Opracowany system pomiarowy może zostać zastosowany w projekcie.

9. Przygotowanie prototypów sensorów

Projekt silnika chemicznego

Prototyp silnika chemicznego umożliwi przetestowanie komory mieszalnikowej wraz z systemem napędowym i systemem rozlewania substancji czynnej z buforem do poszczególnych komór testowych.



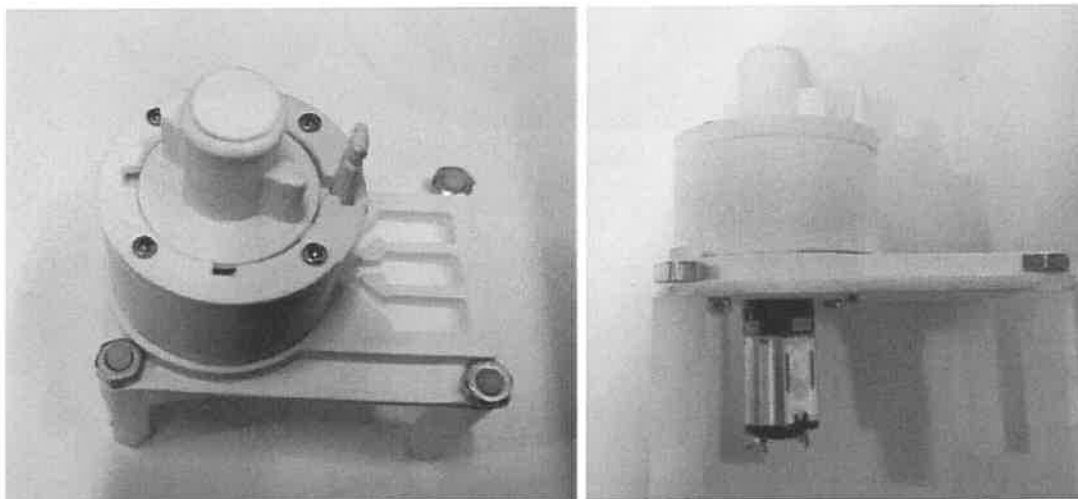
Rysunek 70 Elementy składowe prototypu silnika chemicznego

Prototyp silnika chemicznego

Prototyp silnika chemicznego składa się z następujących elementów:

1. Podstawy komory mieszalnikowej wraz z komorami enzymatycznymi
2. Obudowę komory mieszalnikowej wraz z zaczepem mocującym (2a).
3. Pokrywę górną komory mieszalnikowej (3a) wraz z dociskiem komory enzymatycznej (3b) i wieczkiem górnym (3c).
4. Mieszadło połączonego do silnika wraz z przekładnią.
5. Mocowanie silnika

Do budowy prototypu wykorzystano silnik Silnik sub-micro 136:1 500 obr/min 0,6 kg*cm - Pololu 2358



Rysunek 71 Wygląd kompletnego prototypu silnika chemicznego

Po napełnieniu komory badanym produktem i zmieszaniu z buforem następuje mieszanie substancji. Po zmieszaniu optymalny czas mieszania został określony na 60 sek. Za pomocą dźwigni można rozlać roztwór do 3 komór, komory wzorcowej, komory z enzymem laktazy, komory do badania metali ciężkich. Komora silnika zostanie zaimplementowana do wymiennych wkładów testowych.

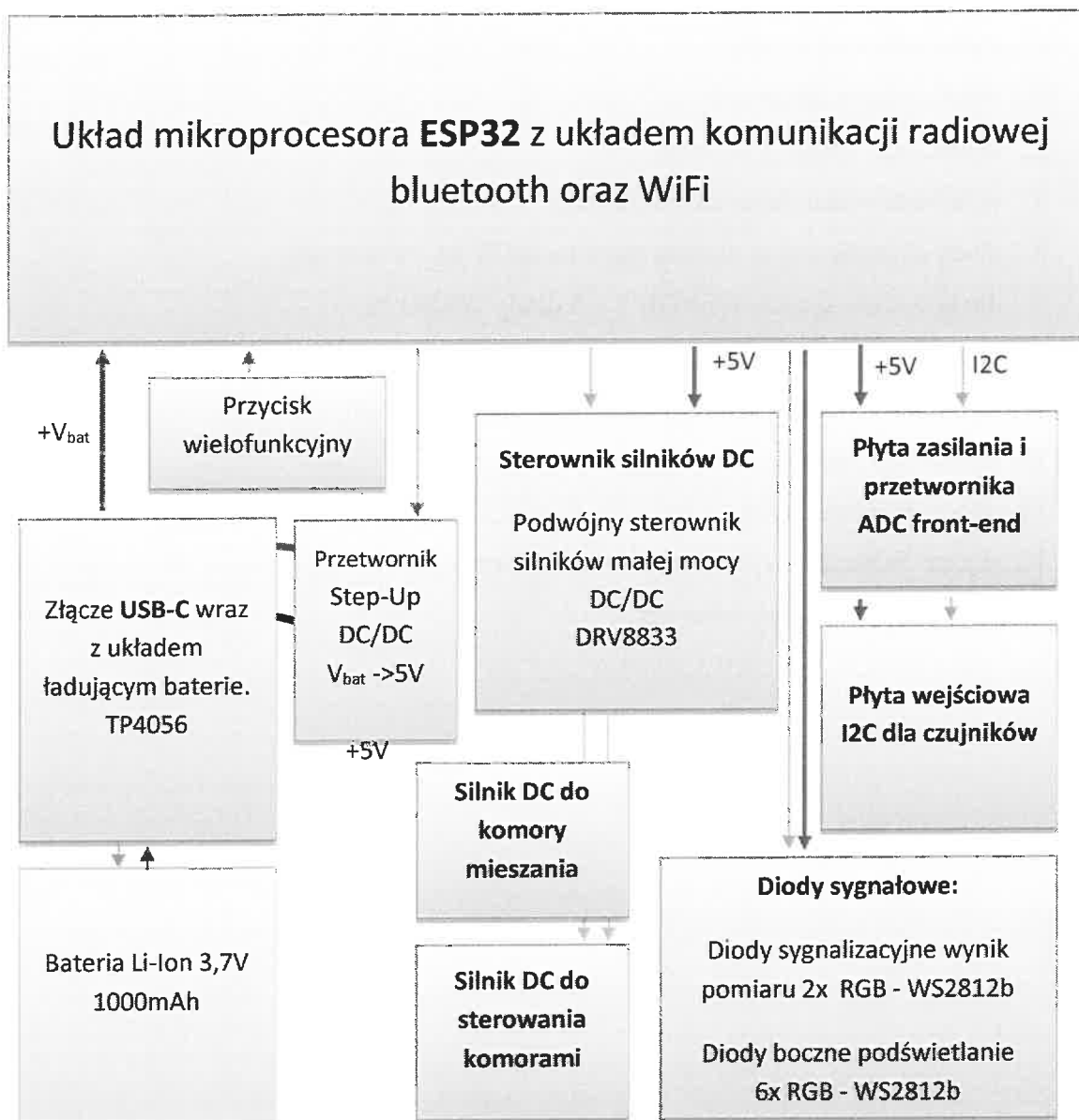
Projekt obudowy urządzenia prototypowego

Jednostka centralnej zawiera w sobie następujących elementy:

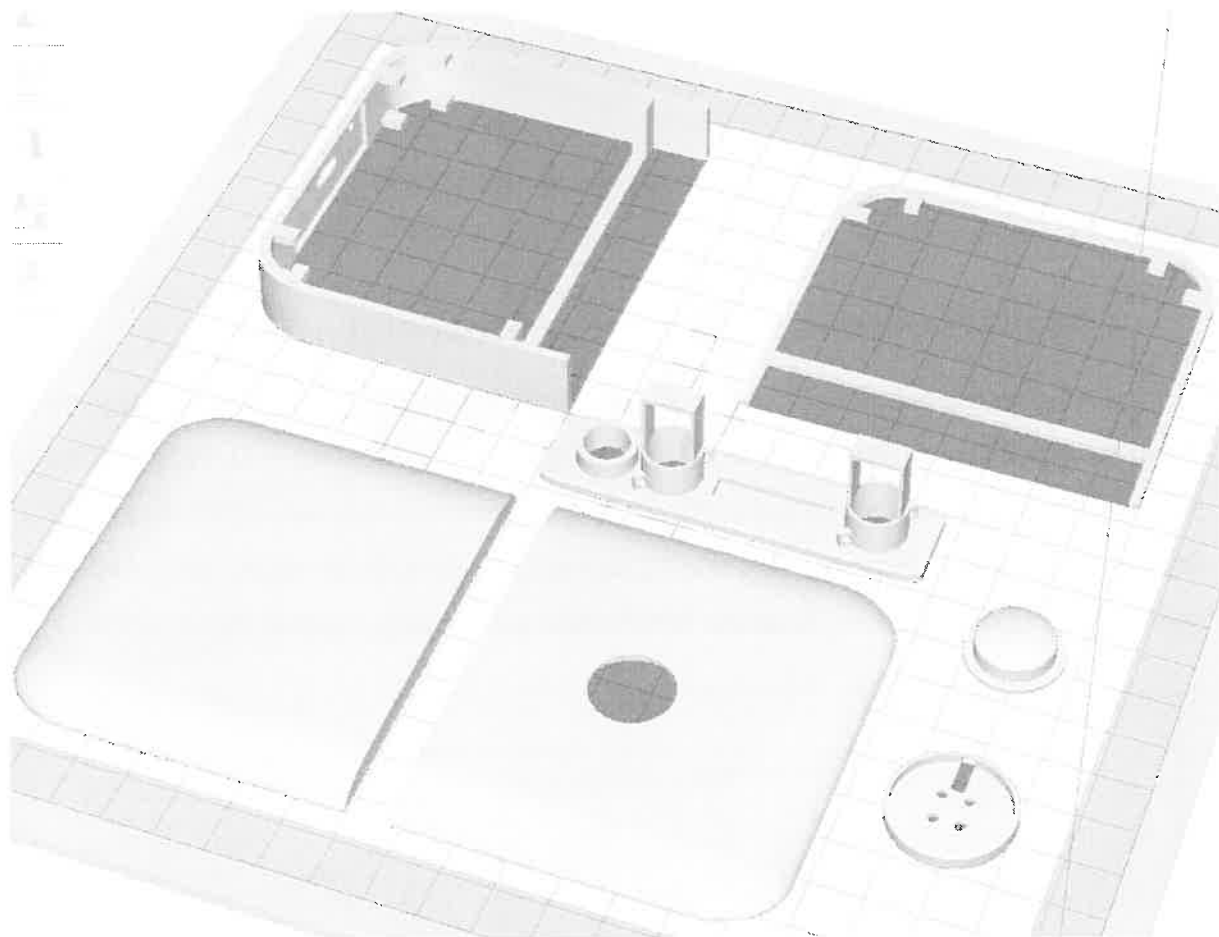
1. układ sterujący zawierający mikroprocesor ESP32;
2. układ sterownika USB;
3. układ radiowy Bluetooth;
4. akumulator Li-Ion 1000mAh;
5. układ ładowania akumulatora Li-Ion;
6. diody sygnalizacyjne wyniku pomiaru RGB 2x - WS2812b;
7. diody boczne sygnałowe RGB 2 x 3 diody WS2812b;
8. silnik komory mieszającej;
9. silnik sterującego przełączaniem komór pomiarowych;
10. sterownika silników mostka typu H I2C;
11. układu pomiaru temperatury z interfejsem I2C;
12. złącza dla wejściowych danych z układów pomiarowych;
13. układu pomiarowego front-ent;

Projekt elektroniczny jednostki centralnej urządzenia prototypowego

Schemat blokowy elementów jednostki centralnej



Rysunek 72 Schemat blokowy układu centralnego z mikroprocesorem i komunikacją bluetooth.



Rysunek 73 Elementy składowe prototypu jednostki głównej

Drukowane elementy jednostki centralnej utrzymują w jednej obudowie wszystkie elementy składowe:

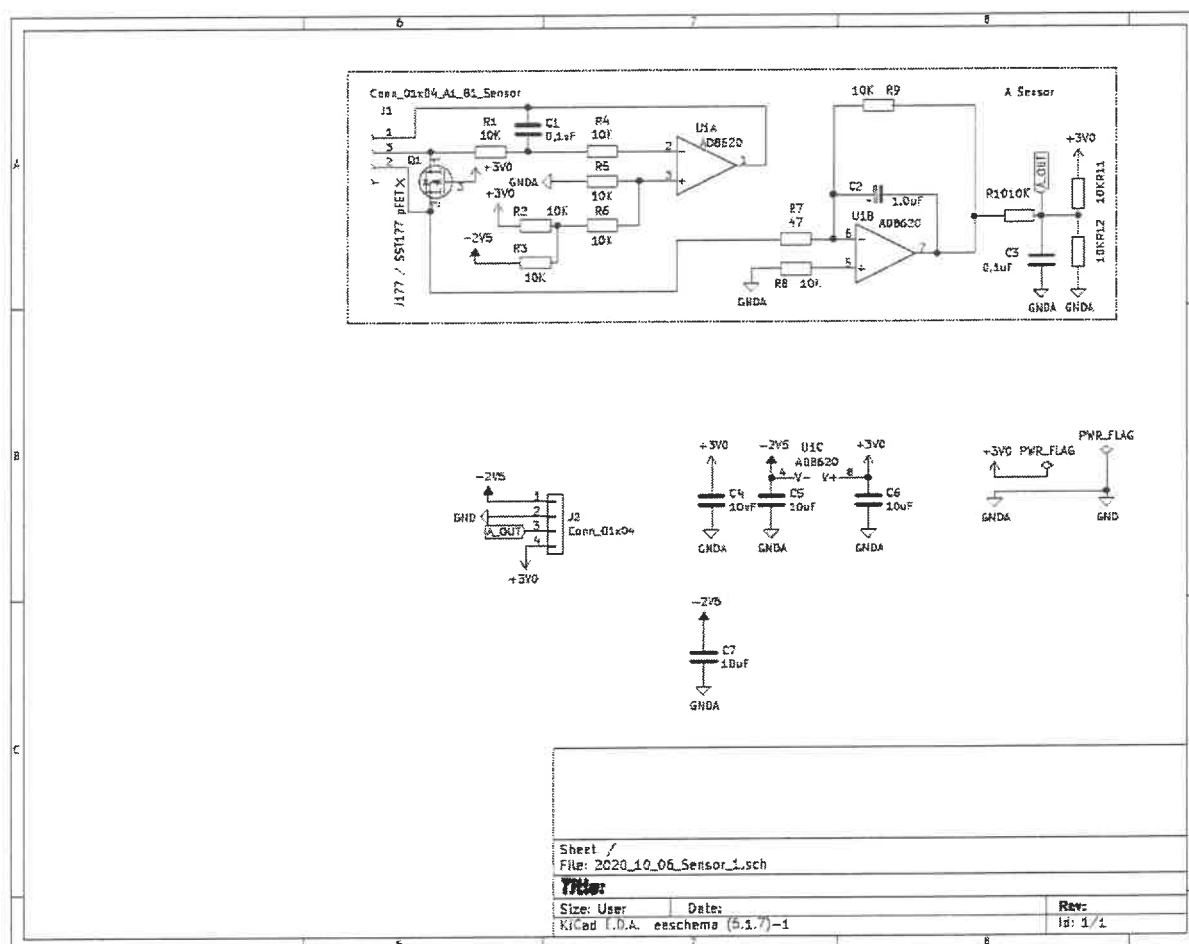
1. obudowa dolna z mocowaniem na płaską baterię Li-Ion o pojemności 1000mAh;
2. obudowa górna z mocowaniem przycisku funkcyjnego 2a, oraz 2 diod sygnalizacyjnych WS2812b (2b);
3. głowica przycisku wielofunkcyjnego do montażu z mikroswitchem DIP 5x5mm oraz pokrywka dolna do utrzymywania mikroswitcha i wyprowadzeniem kablowym;
4. obudowa centralna z wyprowadzonym wejściem ładowania i programowania USB (4a);
5. Pasek sygnałowy boczny. Pasek o wysokości 1,5mm znajdujący się na spodniej i górnej części obudowy umożliwiający podświetlenie boczne systemu pomiarowego za pomocą diod RGB - WS2812b. Po każdej stronie urządzenia umocowane są po 3 niezależnie sterowane diody świecące umożliwiające przekazywanie informacji świetlnych w trakcie pomiaru;
6. Podstawka naboju pomiarowego wyposażona w 2 dwukierunkowe silniki sterujące z mikro przekładnią do obrotów młynka w komorze mieszającej oraz otwierania

poszczególnych zaworów sterujących wpuszczających preparat z buforem do kolejnych etapów pomiaru.

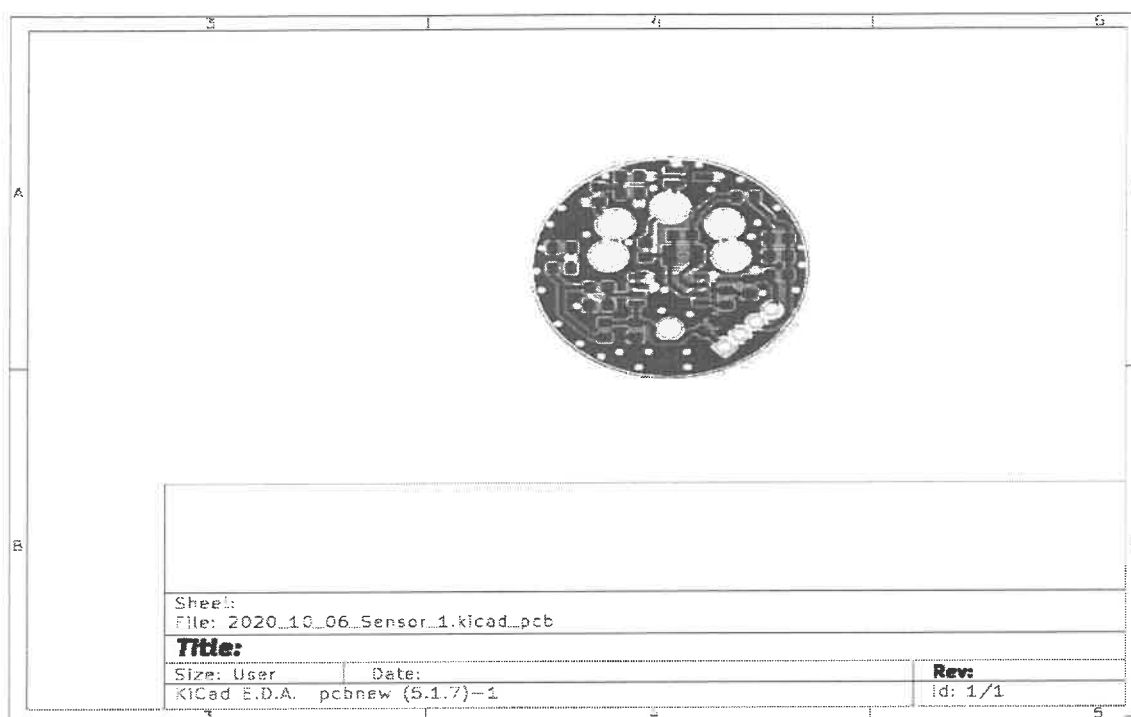
Projekt elektroniczny układu analogowego do czujników trójelektrodowych.

Układ wzmacniacza wstępnego Front-end

Układ wzmacniacza niskoszumnego 1-go stopnia dla sensora trójelektrodowego oparty został na wzmacniaczu operacyjnym AD8620 firmy Analog Devices. AD8620 jest bardzo precyzyjnym wzmacniaczem z wejściem JFET z ultraniskim napięciem offsetowym i niskim dryfem napięciowym. Jego główne cechy bardzo niski szum napięcia i prądu, bardzo niski prąd polaryzacji wejściowej i szerokie pasmo bardzo dobrze wpływają na parametry systemu.



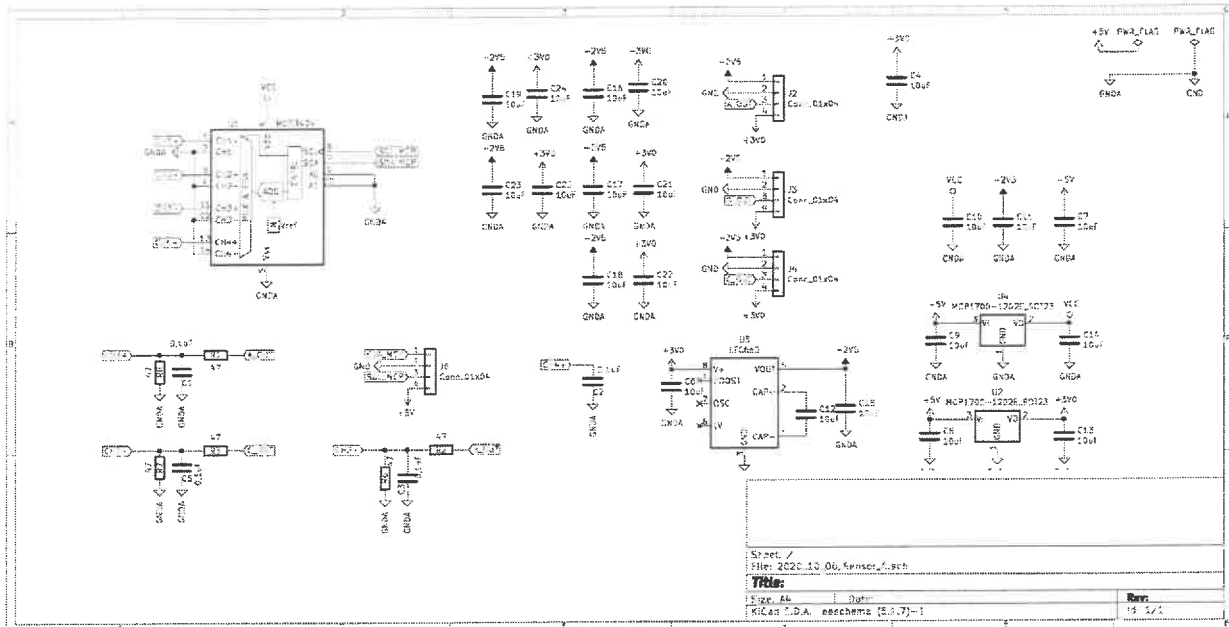
Rysunek 74 Schemat układu wejściowego front-end dla sensora 3-elektrodowego.



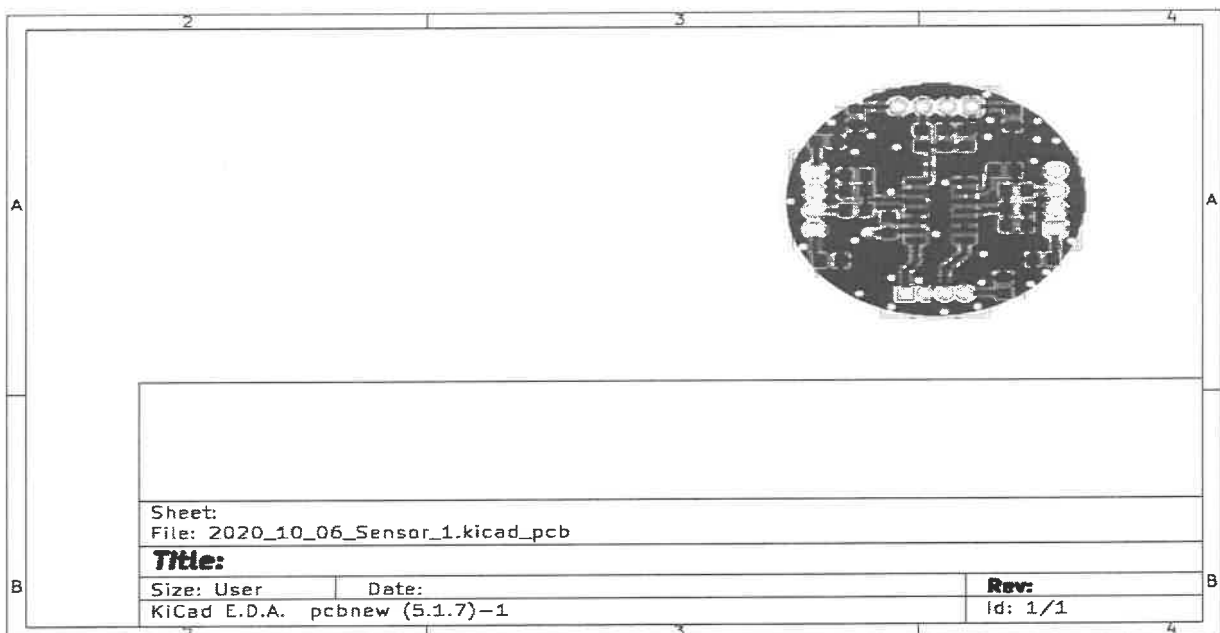
Rysunek 75 Projekt płytki PCB układu wejściowego front-end dla sensora 3-elektrodowego.

Płytkę układu front-end do poprawnego działania wymaga jeszcze dwóch dodatkowych układów. Zasilacza stabilizowanego napięcia symetrycznego +3V, -3V oraz płytki przetwornika ADC przetwarzający napięcie wyjściowe z układu analogowego AD8620 na postać cyfrową. Układ generowania napięcia ujemnego oparty został na układzie LTC660. Umożliwiający generowanie napięcia ujemnego o ok. 0,5V niższego niż napięcie zasilania. Z uwagi, że układ zasilany jest z baterii o użytecznym napięciu zasilania 3.1V- 4,2V do generowania napięcia zasilającego układ front-ent wykorzystywany jest przetwornik DC/DC STEP-UP +5V, który następnie jest stabilizowany do +3.0V i służy do generowania -2,5V. Kluczowym układem wpływającym na dokładność wskazań jest również układ przetwornika ADC – analogowo cyfrowego. Przekształca on napięcie wyjściowe ze wzmacniacza operacyjnego na wartość cyfrową. MCP3424 to niskoszumny i cechujący się bardzo wysoką dokładnością i rozdzielczością 18-bitowy przetwornik analogowo-cyfrowy delta-sigma ($\Delta\Sigma$ A/D) firmy Microchip. Może on konwertować sygnał analogowy na cyfrowy z rozdzielczością 262144 poziomów. Co daje pomiar różnicy napięć na poziomie do 7,8uV. W zakresie pomiarowym od 0-2,048V. Układ podłączony jest do magistrali I2C układu centralnego umożliwiając wykonywanie do 3 pomiarów na sekundę. Z powodu na duży wpływ temperatury na działanie układu front-end.

Do cyfrowej kompensacji i kalibracji pomiaru wykorzystany został cyfrowy termometr działający również z wykorzystaniem interfejsu I2C układ BMP280 firmy Bosh. Umożliwia on łatwy pomiar temperatury oraz ciśnienia atmosferycznego. Przy niewielkiej modyfikacji oprogramowania może zostać również wykorzystany w produkcyjnej wersji tańszy układ DS18B20 firmy Dallas jako cyfrowy czujnik temperatury, bez pogorszenia parametrów funkcjonalnych systemu pomiarowego.

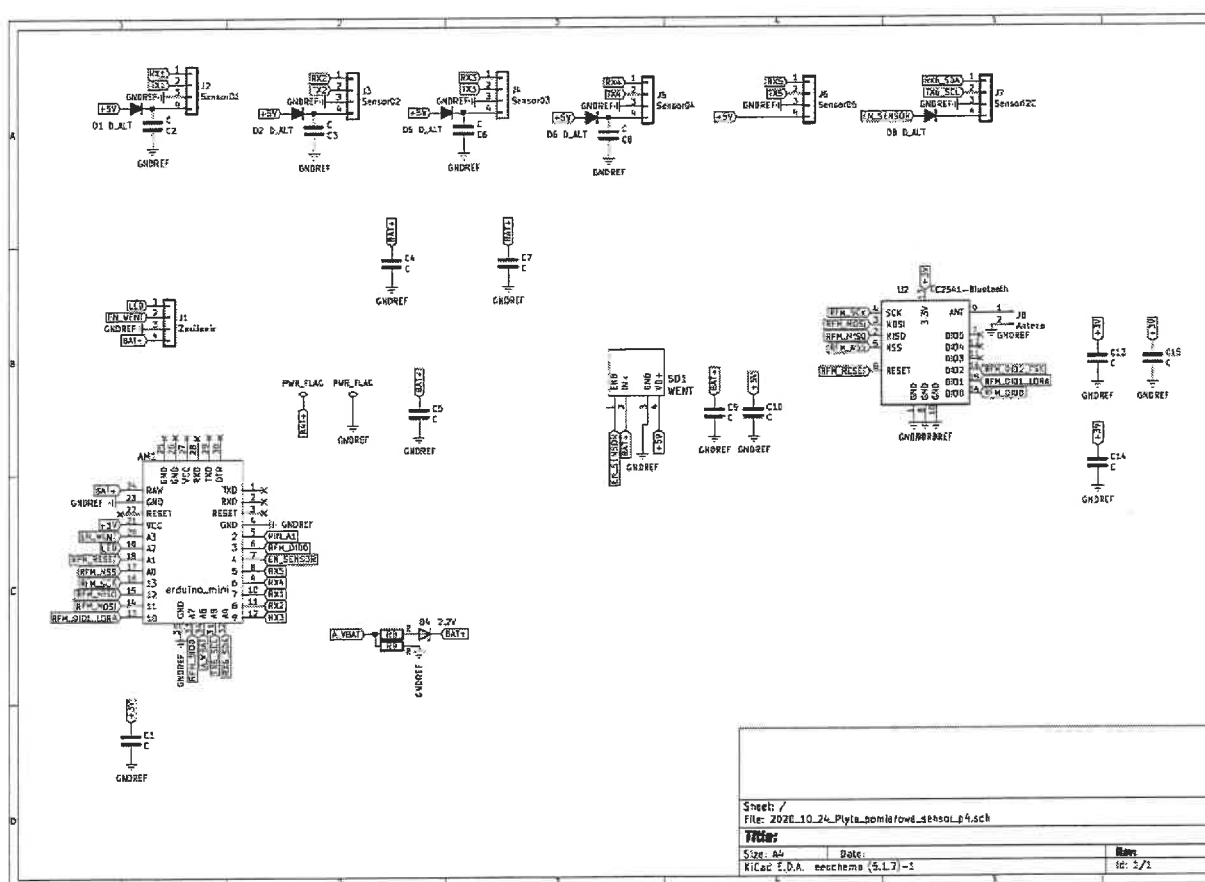


Rysunek 76 Schemat zasilającego płytkę front-ent z przetwornikiem ADC.

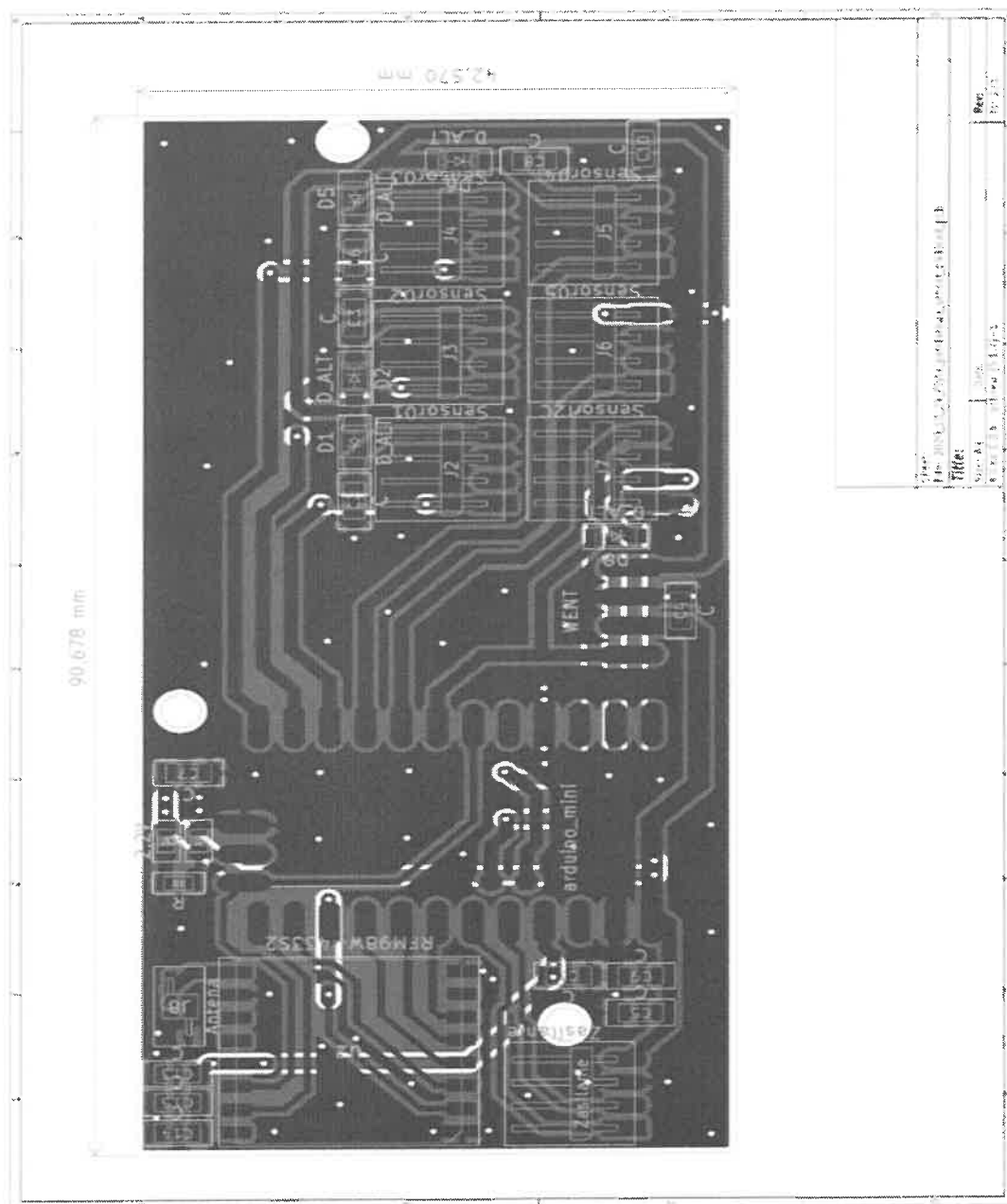


Rysunek 77 Płyta drukowana zasilania i przetwornika ADC front-end.

Do testowania działania silnika chemicznego oraz kalibracji układów front-end zaprojektowany został układ sterownika front-end umożliwiający działanie do 6 oddzielnych układów analogowych oraz zapewniający transmisje bezprzewodową z systemem sterującym PC lub telefonem z systemem Android. Moduł ten oparty został o popularny mikroprocesor ATMEGA328 w wersji zasilanej 3,3V i zegarem 8MHz. Posiada on sprzętowy sterownik I2C do jednoczesnej komunikacji z 6 układami front-end oraz magistralę SPI do komunikacji z układem radiowym RF. Oprogramowanie układu zostało napisane z wykorzystaniem oprogramowania środowiska IDE Arduino. Komunikacja przewodowa odbywa się za pomocą złącza USB za pomocą układu FT232.

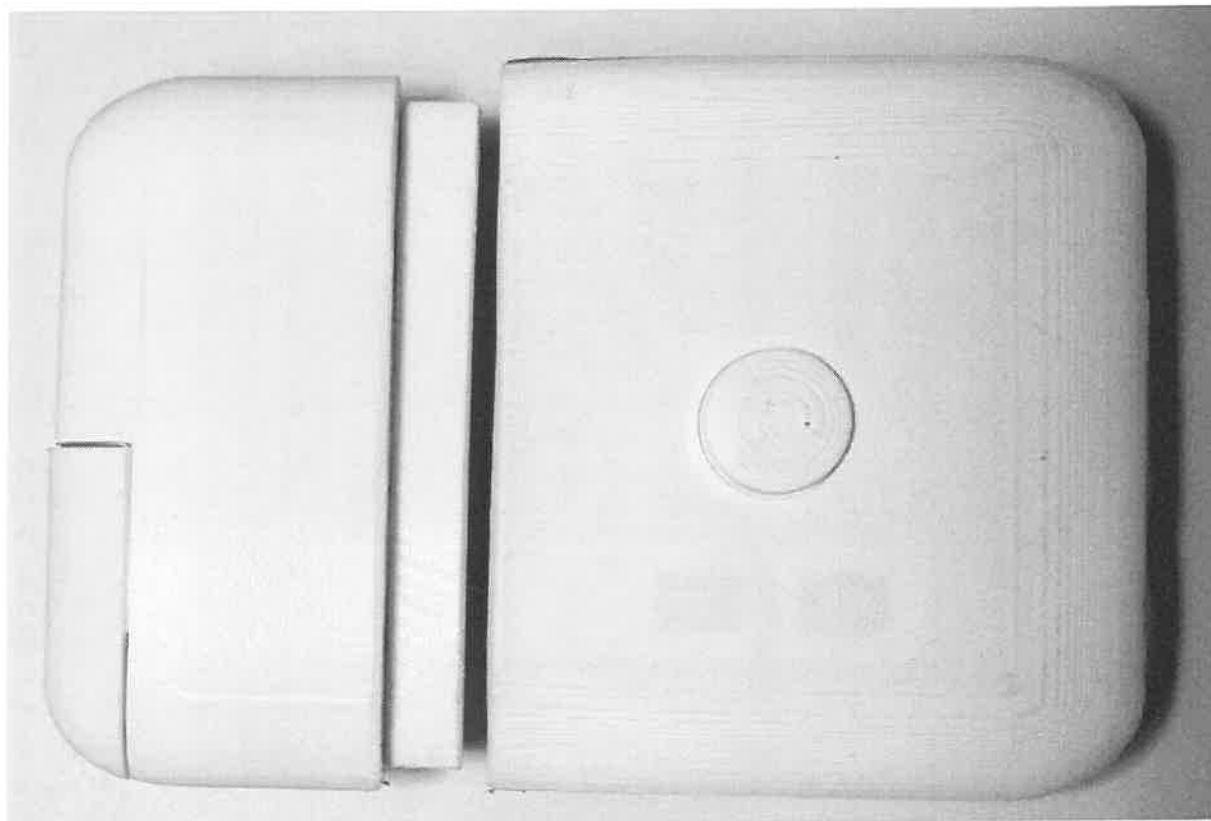


Rysunek 78 Schemat płyty kalibracyjnej układów front-end umożliwiająca podłączenie do 6 układów pomiarowych z komunikacją I2C.



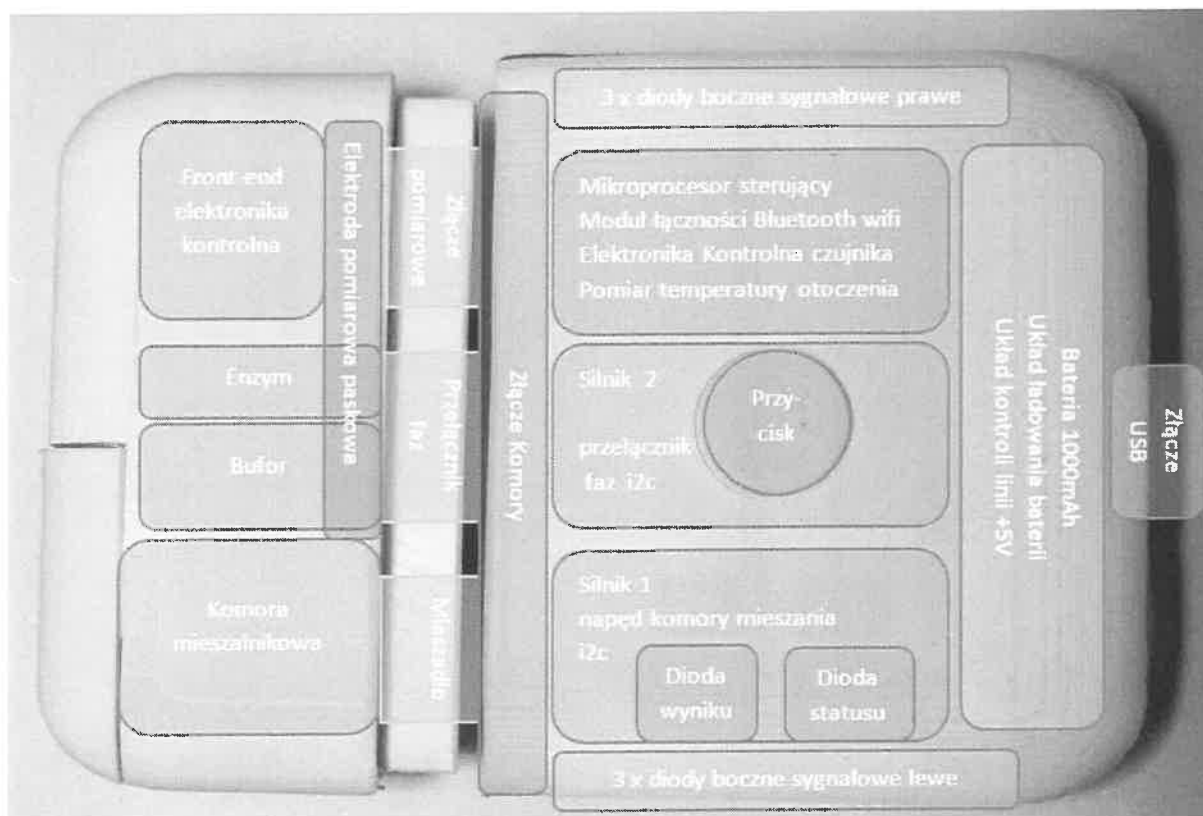
Rysunek 79 Płyta drukowana PCB płyty kalibracyjnej układów front-end umożliwiająca podłączenie do 6 układów pomiarowych z komunikacją I2C.

Wygląd Prototypu



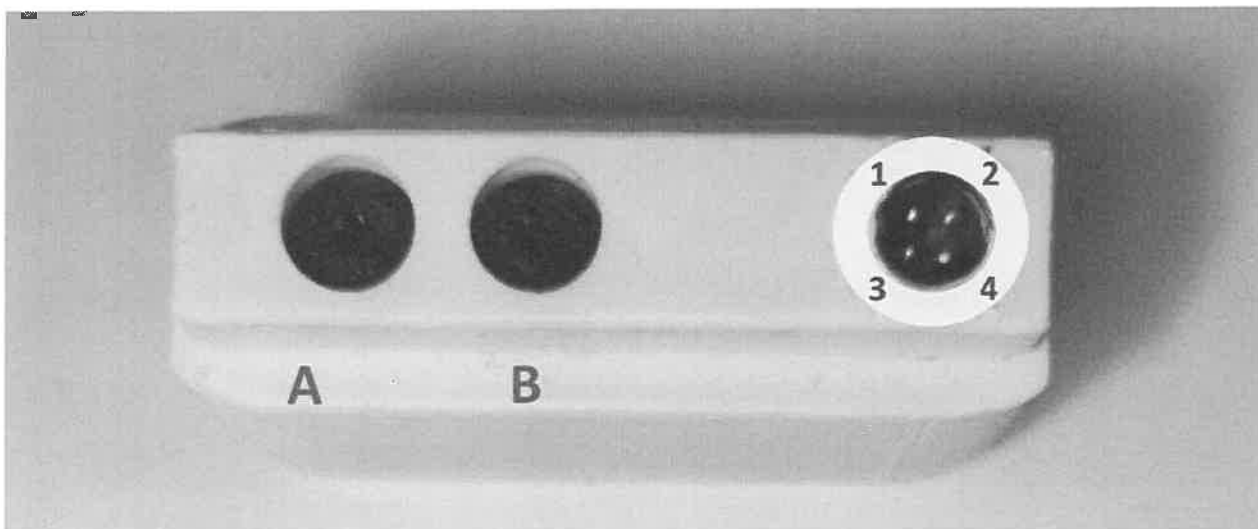
Rysunek 80 Prototyp systemu pomiarowego Kartridż silnika chemicznego oraz jednostka bazowa.

Budowa Prototypu



Rysunek 81 Elementy składowe kompletnego systemu pomiarowego.

Połączenie jednostki bazowej z wymiennym kartridżem silnika chemicznego



Rysunek 82 Wygląd złącz przyłączeniowych elementu wymiennego systemu pomiarowego.

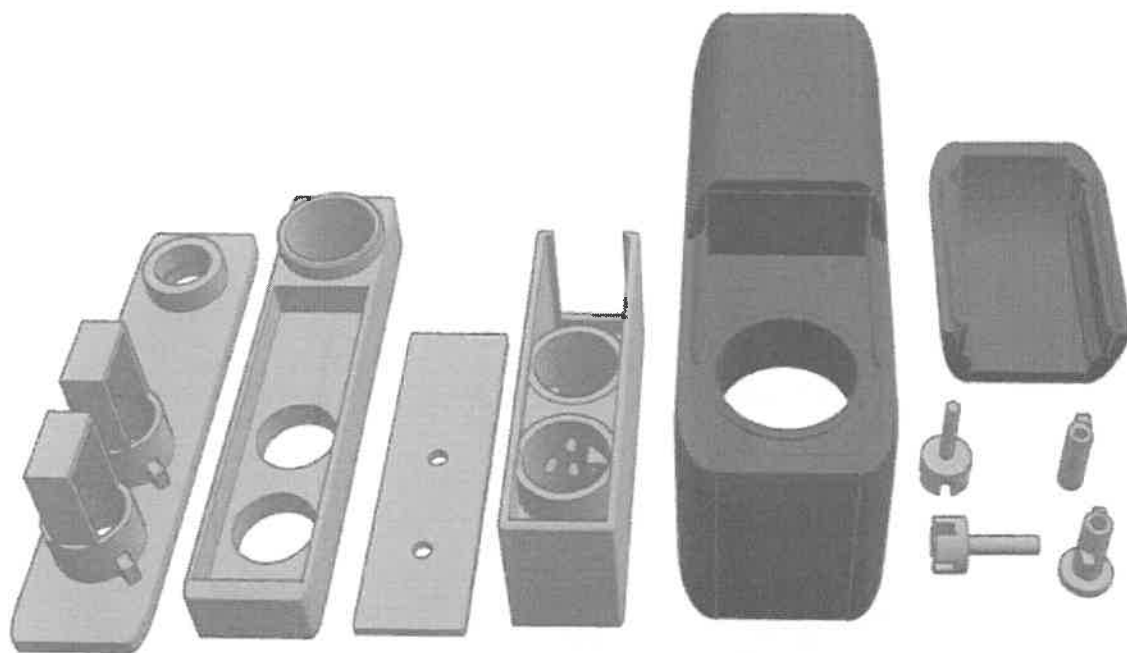
Opis złącz:

- 1 – zasilanie +BAT,
- 2 – wyjście detektora podłączenia komory,
- 3 – masa układu,
- 4 – wyjście pomiarowe,

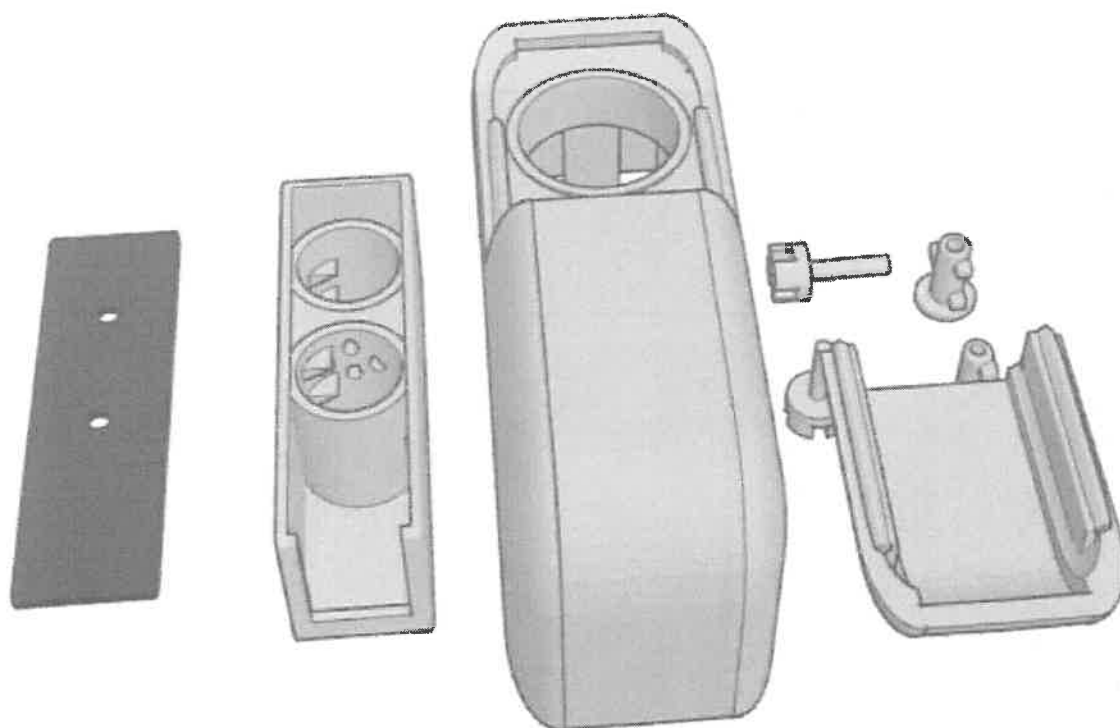


Rysunek 83 Wygląd elementów połączeniowych modułu centralnego.

- A – zamontowany teleskopowo silnik napędu komory mieszalnika,
- B – zamontowany teleskopowo silnik napędu przełączania stanu detektora komory,
- C – złącze pomiarowe DIN-4, do podłączenia zestawu pomiarowego.

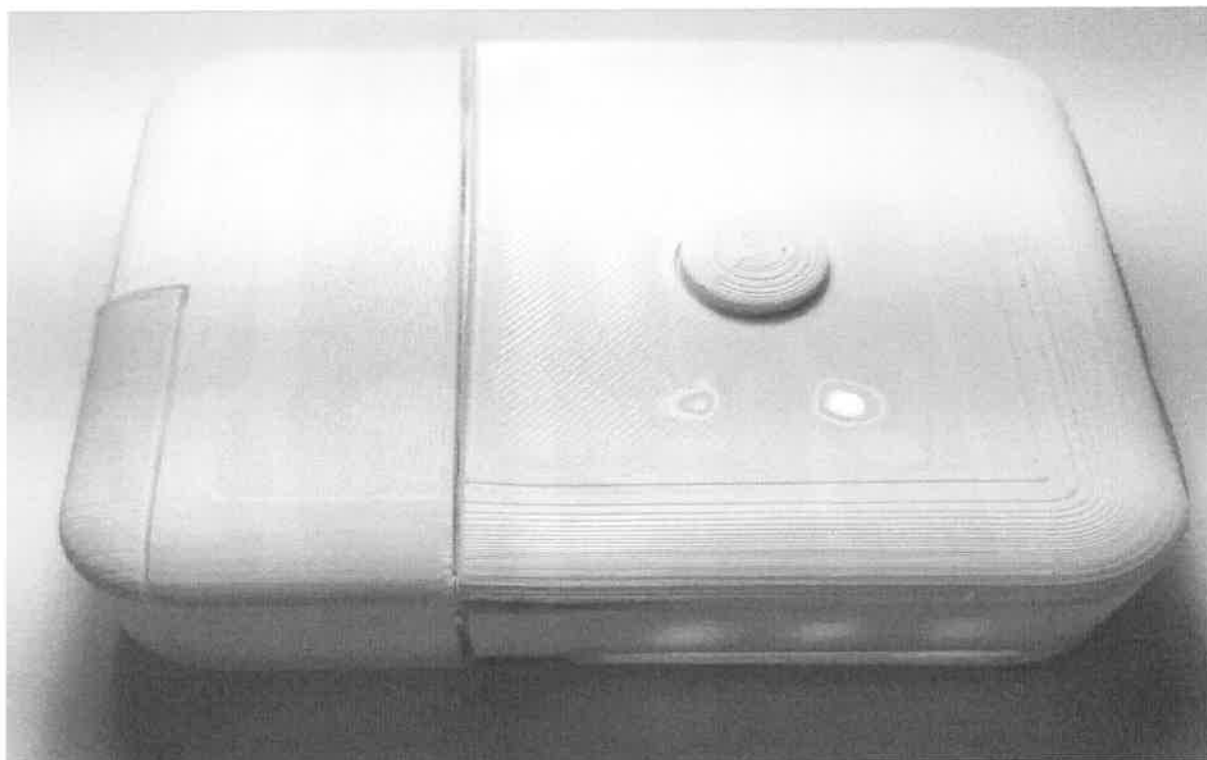


Rysunek 86 Wygląd poszczególnych elementów komory mieszania.

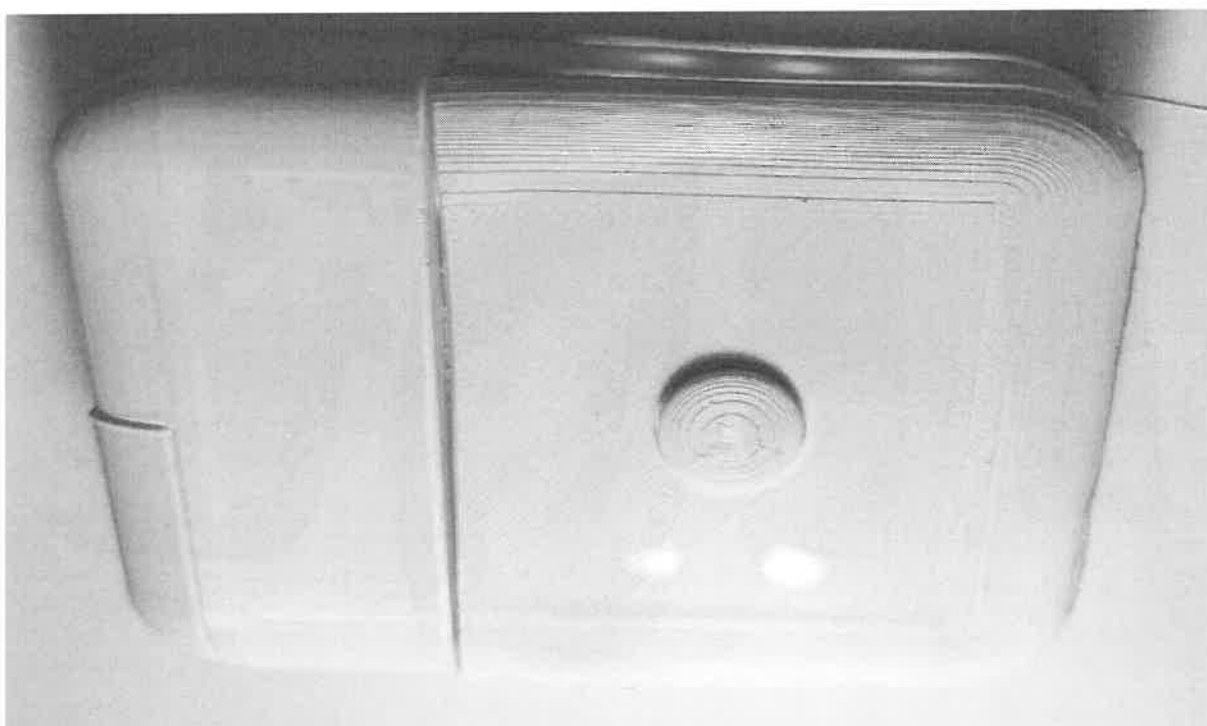


Rysunek 87 Podkładka teflonowa zapewniająca szczelność komory mieszania.

Wygląd działających prototypów



Rysunek 84 Wygląd działającego czujnika podczas testów.



Rysunek 85 Wygląd działającego czujnika LED pomiar ok

10. Opis protokołu komunikacji Bluetooth

API – założenia protokołu komunikacyjnego

Transmisja pomiędzy czujnikiem pomiarowym, a telefonem z wykorzystaniem standardu Bluetooth 4.2.

Transmisja typu Master-Slave odbywać się będzie za pomocą terminala szeregowego.

Testy Czujnik - aplikacja Serial Bluetooth Terminal.

Testy Aplikacji - z wykorzystaniem interfejsu http:// lub portu szeregowego.

Elementy sterowania zewnętrznego

Diody LED RGB - Każda dioda sterowana niezależnie. Kolor określany za pomocą 3 liczb R [0-255], G[0-255], B[0-255] do sterowania przesyłana jest liczba w kodzie szesnastkowym (R255, G255, B255) to 0xfffff.

Dioda 1 - dioda RGB na panelu sygnalizacja stanu urządzenia.

Dioda 2 - dioda RGB na panelu sygnalizacja wartości wyniku.

Dioda 3,4,5 - trzy niezależnie sterowane diody boczne prawy bok urządzenia.

Dioda 6,7,8 - trzy niezależnie sterowane diody boczne lewy bok

Przycisk STER. Stan Przycisku - naciśnięcie i zwolnienie przycisku wymusza wysłanie statusu.

Czujnik Temperatury - podaje aktualna temperaturę urządzenia.

Motor 1 - silnik do mieszania mieszanki w komorze. Obroty sterowane - Lewo; Prawo.

Motor 2 - silnik do sterowania otwarciem poszczególnych komór - przełączenie kolejnego kroku procesu następuje po 2s pracy silnika w prawo. Przed uruchomieniem zalecana 1s pracy w lewo - dopasowanie do zacisków sterowania komory.

Czas pracy - zegar czasu pracy od włączenia.

Czujnik wolumetryczny - przekazuje informacje o prądzie rozdzielczość nA (wyniki analizy).

Bateria - podaje stopień naładowania baterii w V - 3,3-4,2V (5V podłączenie zewnętrznego ładowania)

Komunikacja szeregową:

Każde polecenie zaczyna się od znaku nowej linii. Zakończenie wiersza poleceń kody **CRLF** (szesnastkowo 0x0D i 0x0A) w przykładach **<CRLF>**. Oddzielenie argumentów “,” , znak dziesiętny “.”. Wszystkie litery duże. Polecenia wykonywane są zaraz po otrzymaniu.

Ogólna struktura komend:

Komenda:Parametry,Parametry<CRLF>

Komendy:

L: - sterowanie diodami

S: - Zmiana statusu.

C: - Sterowanie czujnikiem

M: - sterowanie silnikami

Opis komend sterujących

L: - sterowanie diodami

L:kolor diody1,kolor diody2,kolor diody3,kolor diody4,kolor diody5,kolor diody6,kolor diody7,kolor diody8<CRLF>

Przykład Komendy:

L:FFFFFF,FFFFFF,FFFFFF,FFFFFF,FFFFFF,FFFFFF,FFFFFF,FFFFFF<CRLF> - zapalenie wszystkich diod na biało.

L:FF0000,FF0000,FF0000,FF0000,FF0000,FF0000,FF0000,0000FF<CRLF> - zapalenie wszystkich diod na czerwono.

Brak odpowiedzi Czujnika. Polecenie wykonywane natychmiast.

S: - Zapytanie o status

S:Parametr1<CRLF>

0 - normalna praca;

4 - wyłącz silniki i diody LED;

9- wyłącz urządzenie (rozłączenie transmisji).

1,2,3,5,6,7,8 - po przyszłego wykorzystania.

Przykład Komendy:

S:0<CRLF> Kontynuacja normalnej pracy.

Wysłanie statusu wymusza przesłanie statusu od urządzenia.

S:[tryb pracy],[czas ms od włączenia],[stan przycisku],[napięcie baterii],[wynik_pomiaru_Glukozy],[temperatura],[Motor1],[Motor2]<CRLF>

Parametry zwracane

[tryb pracy] - Odpowiedź zgodna z przesłanym **Parametr1**.

[czas ms od włączenia] - czas od włączenia, liczba podana w zapisie dziesiętnym np. 123434 (123s434ms).

[stan przycisku] - 0 wyłączony, 1 naciśnięty.

[napięcie baterii] - napięcie w postaci liczby dziesiętnej z kropkami, np 4.1 (4.1V)

[wynik_pomiaru_Glukozy] - liczba od 0 do 4096 - określająca aktualne wskazanie czujnika pomiarowego.

[temperatura] - temperatura układu pomiarowego do kalibracji (np. 23.2).

[Motor1] - stan silnika mieszania [0 - wyłączony, 1-obroty prawe, 2-obroty lewe]

[Motor2] - stan silnika sterowania [0 - wyłączony, 1-obroty prawe, 2-obroty lewe]

Przykład odpowiedzi:

S:0,123126,0,4.1,1024,23.0,1,0<CRLF>

0 - Odpowiedź zgodna z przesłanym **Parametr1**;

123126 - liczba ms od włączenia 123s126ms);

0 - 0 wyłączony, 1 naciśnięty;

4.1 - napięcie w postaci liczby dziesiętnej z kropkami, np 4.1 (4.1V);

1024 - aktualne wskazanie czujnika pomiarowego;

23.0 - temperatura układu pomiarowego do kalibracji (np. 23.2);

1 - stan silnika mieszania 1-obroty prawe;

0 - stan silnika sterowania 0 - wyłączony;

Status jest wysyłany samoczynnie po 2s od ostatniej komendy.

M: - sterowanie silnikami mieszania i sterowania komory

M:parametrSilnik1,parametrSilnik2<CRLF>

[Motor1] - stan silnika mieszania [0 - wyłączony, 1-obroty prawe, 2-obroty lewe]

[Motor2] - stan silnika sterowania [0 - wyłączony, 1-obroty prawe, 2-obroty lewe]

Przykład Komendy:

M:0,0 - wyłączenie silników;

M:1,0 - włączenie silnika mieszania obroty prawe (normalne podczas mieszania).

Przykład Komendy:

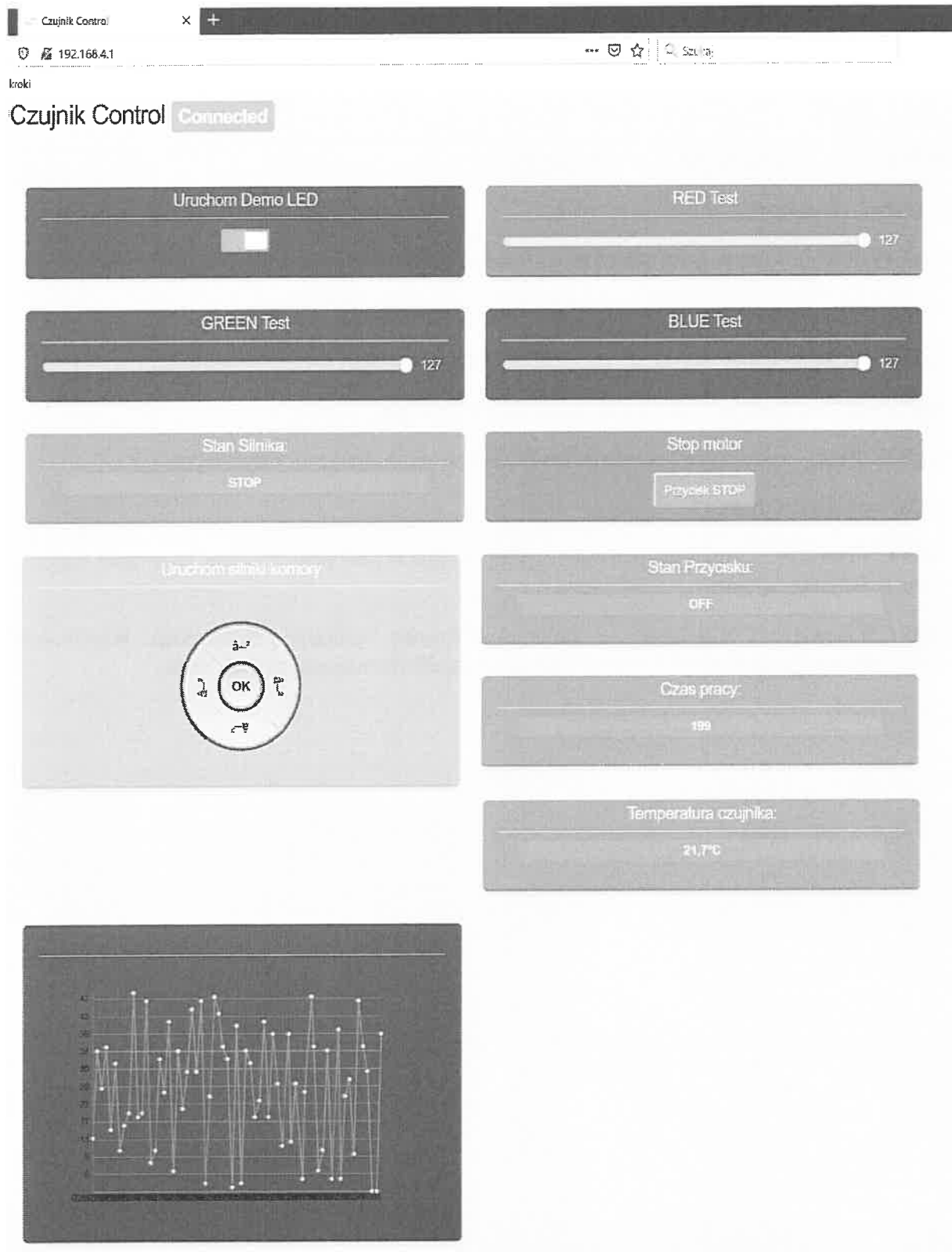
W odpowiedzi czujnik prześle status. Polecenie wykonywane natychmiast.

Procedura pomiaru:

Procedura pomiaru zastosowana podczas testów pomiaru. Procedura może być modyfikowana za pomocą oprogramowania sterującego za pomocą interfejsu bluetooth.

0. Motor2:ON2 - kalibracja pozycji silnika 2 - czas 1s. Motor2:OFF.
- 1. Rozpoczęcie mieszania. Motor1 ON1, Obroty prawe. Czas 20s.**
- 2. Motor 1:OFF, Motor2:ON1 2 sek. (pomiar kalibracyjny).**
- 3. Motor1 ON2, Pomiar po 5 sekundach.**
- 4. Motor1 OFF, Motor2:ON1 2 sekundy. (do komory enzymatycznej).**
- 5. Motor1 ON2, czas 15 sekund. Motor1 OFF, Pomiar po 90 sekundach.**
- 6. Analiza wyników, gotowość do wyłączenia systemu lub powtórzenia pomiaru.**

11. Sterowanie za pomocą interfejsu http



Rysunek 88 Wygląd sterowania za pomocą interfejsu HTTP

12. Załączniki

Wykaz wybranych skrótów i symboli stosowanych w pracy

MWCNTs – wielościenne nanorurki węglowe;

AuNPs – nanocząstki złota;

AuNPs-PMo₁₂ – nanocząstki złota modyfikowane kwasem fosfododekamolibdenowym;

AuNPs-Ct – nanocząstki złota modyfikowane cytrynianami;

AgNPs-PMo₁₂ – nanocząstki srebra modyfikowane kwasem fosfododekamolibdenowym;

AgNPs-gel – nanocząstki srebra modyfikowane żelatyną;

AgNPs-PVA – nanocząstki srebra modyfikowane alkoholem polivinyłowym;

GOx – oksydaza glukozy

MWCNTs/GOx – funkcjonalizowane grupami tlenowymi wielościenne nanorurki węglowe wraz z oksydazą glukozy;

MWCNTs/K₄[Fe(CN)₆]/GOx – funkcjonalizowane grupami tlenowymi wielościenne nanorurki węglowe wraz z oksydazą glukozy i zaadsorbowanym mediatorem;

Literatura:

[1] <https://www.toppr.com/guides/chemistry-formulas/lactose-formula/>

[2]

[3] S. Bhattacharjee, D. Sarker, Kinetic Study of Enzymatic Hydrolysis of Lactose in Whey, *International Journal of Chemical Engineering Research*, 9 (2017) 2, 223-228.

[4] S. K. Ghosh, A. Pandey, S. Arora, V. D. Dwivedi, Comparative modeling and docking studies of β -galactosidase from *Aspergillus Niger*, *Netw Model Anal Health Inform Bioinforma* 2 (2013), 297–302.

[5] P. S. Panesar, S. Kumari, R. Panesar, Potential Applications of Immobilized β -Galactosidase in Food Processing Industries, *Enzyme Research*, 2010, doi:10.4061/2010/473137.

[6] S.B. Bankar, M.V. Bule, S.R. Singhal, L. Ananthanarayan, *Biotechnol. Adv.*, 27 (2009) 489.

[7] S.A. Neto, J.C. Forti, A.R. De Andrade, *Electrocatal.*, 1 (2010) 87.

[8] R.A. Bullen, T.C. Arnot, J.B. Lakeman, F.C. Walsh, *Biosens. Bioelectron.*, 21 (2006) 2015.

Spis ilustracji

Rysunek 1. Wzór cząsteczki laktozy [1].	11
Rysunek 2 Schemat reakcji rozkładu laktozy do glukozy i galaktozy [3].	13
Rysunek 3 Struktura przestrzenna β -D-galaktozydazy [4].	14
Rysunek 4 Schemat mechanizmu działania β -D-galaktozydazy	14
Rysunek 5 Kapsułki z alginianu sodu z β -D-galaktozydazą.	16
Rysunek 6 Schematyczne przedstawienie reakcji enzymatycznego utleniania glukozy [6].	17
Rysunek 7 Układ reakcyjny rozkładu laktozy oraz widok pasków detekcyjnych przed i po reakcji hydrolizy.	18
Rysunek 8 Oznaczanie zawartości laktozy w mleku zwykłym oraz mleku bez laktozy.	19
Rysunek 9 Schemat i zasada działania sensora dwukomorowego do oznaczania laktozy.	21
Rysunek 10 Zdjęcia obrazujące stopień rozkładu nadtlenu wodoru na powierzchni szklanej oraz powierzchni pokrytej dodatkowo nanostrukturalną krzemionką.	22
Rysunek 11 Paski do detekcji glukozy.	24
Rysunek 12 Prototyp sensora optycznego do oznaczania zawartości laktozy w próbkach żywności.	25
Rysunek 13 Program Termite wykorzystany do zbierania danych.	25
Rysunek 14 Procedura analizy próbek żywności.	26
Rysunek 15 Obraz TEM nanocząstek złota modyfikowanych anionami $\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$.	30
Rysunek 16 Krzywe voltamperometryczne dla nanocząstek złota modyfikowanych monowarstwami fosfododekamolibdenianów naniesionych na elektrodę GC, zarejestrowane w roztworze buforu fosforanowego o $\text{pH}=7$ (-) oraz w roztworze buforu fosforanowego z dodatkiem glukozy o stężeniu $50 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (-) (A); Krzywa voltamperometryczna elektrotleniania glukozy po odjęciu prądów tła (B); Szybkość polaryzacji: $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.	33
Rysunek 17 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane dla warstwy nanocząstek złota osadzonych na nanorurkach węglowych (MWCNTs/AuNPs- PMo_{12}). Odpowiedź voltamperometryczna zarejestrowana w buforze fosforanowym o $\text{pH}=7$ (czarna krzywa) oraz w obecności glukozy o stężeniu $50 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (czerwona krzywa) (A); Prądy katalityczne utleniania glukozy (po odjęciu prądów tła) (B); Szybkość polaryzacji: $50 \text{ m}\cdot\text{Vs}^{-1}$.	34
Rysunek 18 Schemat układu pomiarowego wykorzystanego do oznaczania laktozy.	35
Rysunek 19 Krzywe amperometryczne zarejestrowane przy potencjale 0.5 V dla układu katalitycznego MWCNTs/AuNPs- PMo_{12} przy braku glukozy (-) oraz w obecności glukozy o stężeniu $2 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (-) oraz $3 \text{ mol}\cdot\text{dm}^{-3}$ (-).	36
Rysunek 20 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane w buforze fosforanowym o $\text{pH}=7$ w obecności glukozy o stężeniu $50 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ bez dodatku jonów chlorkowych (czerwona krzywa) oraz w obecności jonów chlorkowych (czarna krzywa) dla katalizatora GC/AuNPs- PMo_{12} ; Szybkość zmiany potencjału: $50 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.	38
Rysunek 21 Krzywa voltamperometryczna zarejestrowane dla warstwy nanocząstek złota GC/AuNPs- PMo_{12} . Odpowiedź voltamperometryczna zarejestrowana w buforze fosforanowym o $\text{pH}=7$ w obecności glukozy o stężeniu $50 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$ oraz kwasu L-askorbinowego o stężeniu $20 \text{ mmol}\cdot\text{dm}^{-3}$; Szybkość polaryzacji $50 \text{ m}\cdot\text{Vs}^{-1}$.	38
Rysunek 22 Krzywe voltamperometryczne oksydazy glukozy GOx na elektrodzie GC zarejestrowane w roztworze buforu fosforanowego o $\text{pH}=7$ (-) oraz w roztworze buforu fosforanowego z dodatkiem	

glukozy o stężeniu 50 mmol·dm ⁻³ (-); Szybkość polaryzacji: 10 mV·s ⁻¹ , stężenie mediatora (Fe(CN) ₆ ³⁻) 20 mmol·dm ⁻³	43
Rysunek 23 Krzywe voltamperometryczne uzyskane dla elektrody GC modyfikowanej oksydazą glukozy unieruchomioną na nośniku węglowym MWNT/GOx zarejestrowane w roztworze buforu fosforanowego o pH=7 (-) oraz w roztworze buforu fosforanowego z dodatkiem glukozy o stężeniu 10 mmol·dm ⁻³ (-), 20 mmol·dm ⁻³ (-) oraz mmol·dm ⁻³ (-); Szybkość polaryzacji: 10 mV·s ⁻¹ , stężenie mediatora (Fe(CN) ₆ ⁴⁻) 10 mmol·dm ⁻³	45
Rysunek 24 Krzywa chronoamperometryczna elektrotleniania glukozy, zmierzona przy potencjale 0,3V dla enzymatycznego układów katalitycznych. Elektrolit podstawowy: bufor fosforanowy o pH=7; Szybkość wirowania elektrody: 1600 rpm.....	46
Rysunek 25 Krzywe voltamperometryczne uzyskane dla elektrody GC modyfikowanej oksydazą glukozy unieruchomioną na nośniku węglowym z zaadsorbowanym mediatorem MWNT/K4[Fe(CN)6]/GOx zarejestrowane w roztworze buforu fosforanowego o pH=7 (-) oraz w roztworze buforu fosf.....	47
Rysunek 26 Krzywa chronoamperometryczna elektrotleniania glukozy, zmierzona przy potencjale 0,3V dla enzymatycznego układów katalitycznych. Elektrolit podstawowy: bufor fosforanowy o pH=7; Szybkość wirowania elektrody: 1600 rpm.....	48
Rysunek 27 Krzywe amperometryczne elektrotleniania glukozy, zmierzone przy potencjale 0.9V dla enzymatycznego układu katalitycznego MWNT/GOx. Elektrolit podstawowy: próbka mleka przed oraz po hydrolizie enzymatycznej za pomocą β-galaktozydazy. Próbkę rozcieńczoną za pomocą buforu fosforanowego o pH = 7 w stosunku 1:1; Stężenie mediatora 10 mmol·dm ³	49
Rysunek 28 Elektroda Drop Sense podczas modyfikacji matrycą węglową zawierającą biokatalizator.	51
Rysunek 29 Pre-prototyp do badania zawartości glukozy w próbkach.	51
Rysunek 30 Krzywe voltamperometryczne uzyskane dla elektrody jednorazowej modyfikowanej oksydazą glukozy unieruchomioną na nośniku węglowym MWNT/GOx zarejestrowane w roztworze buforu fosforanowego o pH=7 (-) oraz w roztworze buforu fosforanowego z dodatkiem mediatora (Fe(CN) ₆ ⁴⁻) o stężeniu 10 mmol·dm ⁻³ (-), Szybkość polaryzacji: 10 mV·s ⁻¹	52
Rysunek 31 Krzywe voltamperometryczne uzyskane dla elektrody jednorazowej modyfikowanej oksydazą glukozy unieruchomioną na nośniku węglowym MWNT/GOx zarejestrowane w roztworze buforu fosforanowego o pH=7 (-) oraz w roztworze buforu fosforanowego z dodatkiem glukozy o stężeniu 50 mmol·dm ⁻³ (-); Szybkość polaryzacji: 10 mV·s ⁻¹ , stężenie mediatora (Fe(CN) ₆ ⁴⁻) 10 mmol·dm ⁻³	53
Rysunek 32 Krzywe amperometryczne elektrotleniania glukozy, zmierzone przy potencjale 0.9V dla enzymatycznego układu katalitycznego MWNT/GOx w buforze fosforanowym o pH=7(-) oraz w roztworze buforu fosforanowego z dodatkiem glukozy o stężeniu 50 mmol·dm ⁻³ (-); Stężenie mediatora 10 mmol·dm ³	53
Rysunek 33 Krzywe amperometryczne elektrotleniania glukozy, zmierzone przy potencjale 0.9V dla enzymatycznego układu katalitycznego MWNT/GOx. Elektrolit podstawowy: próbka mleka przed oraz po hydrolizie enzymatycznej za pomocą β-galaktozydazy. Próbkę rozcieńczoną za pomocą buforu fosforanowego o pH=7 w stosunku 1:1; Stężenie mediatora 10 mmol·dm ³	54
Rysunek 34 Widmo UV-Vis zarejestrowane dla wodnego roztworu nanocząstek złota modyfikowanych cytrynianami oraz zdjęcie koloidu (AuNPs-Ct).....	62
Rysunek 35 Obraz SEM nanocząstek złota modyfikowanych cytrynianami.....	63

Rysunek 36 Obraz TEM nanocząstek złota modyfikowanych cytrynianami.	63
Rysunek 37 Profil składu chemicznego nanocząstek złota modyfikowanych cytrynianami wraz z odwzorowaniem dystrybucji atomów w warstwie.	64
Rysunek 38 Widmo UV-Vis nanocząstek złota stabilizowanych polioksometalanami.	65
Rysunek 39 Obraz SEM nanostruktur złota modyfikowanych anionami $\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}^{3-}$	65
Rysunek 40 Profil składu chemicznego nanocząstek złota modyfikowanych fosfododekamolibdenianami (AuNPs-PMo_{12}).	66
Rysunek 41 Odwzorowaniem dystrybucji atomów Au oraz Mo w warstwie.	67
Rysunek 42 Rysunek 42. Widmo UV-Vis nanocząstek srebra stabilizowanych żelatyną.	67
Rysunek 43 Rysunek 43. Obraz SEM nanostruktur srebra modyfikowanych żelatyną.	68
Rysunek 44 Profil składu chemicznego nanocząstek srebra modyfikowanych żelatyną (AgNPs-gel) wraz z odwzorowaniem dystrybucji poszczególnych atomów w warstwie.	69
Rysunek 45 Odwzorowaniem dystrybucji atomów Ag, C, O oraz Cl w warstwie.	70
Rysunek 46 Widmo UV-Vis zarejestrowane dla nanocząstek srebra modyfikowanych alkoholem polivinylowym oraz zdjęcie koloidu (AgNPs-PVA).	71
Rysunek 47 Obraz TEM nanocząstek srebra stabilizowanych PVA.	71
Rysunek 48 Profil składu chemicznego nanocząstek srebra modyfikowanych alkoholem polivinylowym (AgNPs-PVA) wraz z odwzorowaniem dystrybucji poszczególnych atomów w warstwie.	72
Rysunek 49 Widma UV-Vis zarejestrowane dla nanocząstek złota (AuNPs-PMo_{12}) przy kolejnych dodatkach roztworu rtęci warunkujących stężenia końcowe w kuwecie pomiarowej (-) 12.5 ppb, (-) 25 ppb, (-) 37.5 ppb, (-) 62.5 ppb oraz (-) 125 ppb.	73
Rysunek 50 Zdjęcie koloidu nanostruktur AuNPs-PMo_{12} przy dodatku roztworu wzorcowego rtęci warunkującego jej różne stężenie.	73
Rysunek 51 Widma UV-Vis zarejestrowane dla nanocząstek złota (AuNPs-PMo_{12}) przy kolejnych dodatkach roztworu ołów warunkujących stężenia końcowe w kuwecie pomiarowej (-) 2.5 ppb, (-) 5 ppb, (-) 7.5 ppb, (-) 10 ppb, (-) 12.5 ppb oraz (-) 25 ppb.	74
Rysunek 52 Widma UV-Vis zarejestrowane dla nanocząstek złota (AuNPs-PMo_{12}) przy kolejnych dodatkach roztworu kadmu warunkujących stężenia końcowe w kuwecie pomiarowej (-) 12.5 ppb, (-) 25 ppb, (-) 37.5 ppb.	75
Rysunek 53 System detekcji barwowej transparentny do badania próbek płynnych.	75
Rysunek 54 System transparentny do badania próbek płynnych dla detekcji glukozy – zakresy analizowanych długości fal barwnych.	76
Rysunek 55 Program do analiza sygnału przy detekcji spektroskopowej – zakresy analizowanych częstotliwości fali.	76
Rysunek 56 Schemat układu płyty bazowej do której podłączony został układ do detekcję spektroskopowej. Komunikacja z komputerem PC odbywa się za pomocą złącza USB.	77
Rysunek 57 Schemat poglądowy oraz widok sensora odbiciowego systemu spektroskopowego wykorzystywanego do detekcji zmian odpowiedzi próbki w obecności glukozy.	77
Rysunek 58 Kolor koloidu nanocząstek złota AuNPs-Ct bez dodatku i z dodatkiem NaCl.	78
Rysunek 59 Widma UV-Vis zarejestrowane dla nanostruktur złota bez i w obecności dodatku NaCl.	79
Rysunek 60 Zdjęcie przedstawiające zabarwienie roztworów w obecności jonów metali ciężkich.	80
Rysunek 61 Zdjęcie pasków do detekcji kolorymetrycznej metali ciężkich.	82
Rysunek 62 Zdjęcie testu paskowego po analizie.	83

Rysunek 63 Krzywe voltamperometryczne oksydazy glukozy GOx na elektrodzie GC zarejestrowane w roztworze buforu fosforanowego o pH=7 z dodatkiem glukozy o stężeniu 50 mmol·dm ⁻³ przed inkubacją w roztworze metalu ciężkiego (-) oraz po inkubacji (-); Szybkość polaryzacji: 10 mV·s ⁻¹ , stężenie mediatora (Fe(CN) ₆ ³⁻) 20 mmol·dm ⁻³	85
Rysunek 64 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane dla układu MWNT/GOx na elektrodzie GC zarejestrowane w roztworze buforu fosforanowego o pH=7 z dodatkiem glukozy o stężeniu 50 mmol·dm ⁻³ przed inkubacją w roztworze metalu ciężkiego (-) oraz po inkubacji (-); Szybkość polaryzacji: 10 mV·s ⁻¹ , stężenie mediatora (Fe(CN) ₆ ³⁻) 20 mmol·dm ⁻³	86
Rysunek 65 . Krzywe amperometryczne elektrotleniania glukozy, zmierzone przy potencjale 0.85V dla enzymatycznego układu katalitycznego MWNT/GOx. Elektrolit podstawowy: bufor fosforanowy zawierający glukozę o stężeniu 50 mmol·dm ⁻³ przed inkubacją w roztworze metalu ciężkiego (-) oraz po inkubacji (-); Szybkość polaryzacji: 10 mV·s ⁻¹ , stężenie mediatora (Fe(CN) ₆ ³⁻) 20 mmol·dm ⁻³	86
Rysunek 66 Krzywe amperometryczne elektrotleniania glukozy, zmierzone przy potencjale 0.9V dla enzymatycznego układu katalitycznego MWNT/GOx. Elektrolit podstawowy: bufor fosforanowy zawierający glukozę o stężeniu 50 mmol·dm ⁻³ przed inkubacją w roztworze metalu ciężkiego (-) oraz po inkubacji (-); Szybkość polaryzacji: 10 mV·s ⁻¹ , stężenie mediatora (Fe(CN) ₆ ³⁻) 20 mmol·dm ⁻³	87
Rysunek 67 Krzywe voltamperometryczne zarejestrowane dla układu MWNT/GOx na elektrodzie GC zarejestrowane w roztworze buforu fosforanowego o pH=7 z dodatkiem glukozy o stężeniu 50 mmol·dm ⁻³ przed inkubacją w roztworze metalu ciężkiego (-) oraz po inkubacji (-); Szybkość polaryzacji: 10 mV·s ⁻¹ , stężenie mediatora (Fe(CN) ₆ ³⁻) 20 mmol·dm ⁻³	87
Rysunek 68 Krzywe amperometryczne elektrotleniania glukozy, zmierzone przy potencjale 0.85V dla enzymatycznego układu katalitycznego MWNT/GOx. Elektrolit podstawowy: bufor fosforanowy zawierający glukozę o stężeniu 50 mmol·dm ⁻³ przed inkubacją w roztworze metalu ciężkiego (-) oraz po inkubacji (-); Szybkość polaryzacji: 10 mV·s ⁻¹ , stężenie mediatora (Fe(CN) ₆ ³⁻) 20 mmol·dm ⁻³	88
Rysunek 69 Krzywe amperometryczne zarejestrowane dla układu MWNT/GOx na elektrodzie GC zarejestrowane w roztworze buforu fosforanowego o pH=7 z dodatkiem glukozy o stężeniu 50 mmol·dm ⁻³ przed inkubacją w roztworze metalu ciężkiego (-) oraz po inkubacji (-); Szybkość polaryzacji: 10 mV·s ⁻¹ , stężenie mediatora (Fe(CN) ₆ ³⁻) 20 mmol·dm ⁻³	88
Rysunek 70 Elementy składowe prototypu silnika chemicznego	90
Rysunek 71 Wygląd kompletnego prototypu silnika chemicznego	91
Rysunek 72 Schemat blokowy układu centralnego z mikroprocesorem i komunikacją bluetooth.....	93
Rysunek 73 Elementy składowe prototypu jednostki głównej	94
Rysunek 74 Schemat układu wejściowego front-end dla sensora 3-elektrodowego.....	95
Rysunek 75 Projekt płytki PCB układu wejściowego front-end dla sensora 3-elektrodowego.....	96
Rysunek 76 Schemat zasilającego płytkę front-ent z przetwornikiem ADC.....	97
Rysunek 77 Płyta drukowana zasilania i przetwornika ADC front-end.....	97
Rysunek 78 Schemat płyty kalibracyjnej układów front-end umożliwiającą podłączenie do 6 układów pomiarowych z komunikacją I2C.....	98
Rysunek 79 Płyta drukowana PCB płyty kalibracyjnej układów front-end umożliwiającą podłączenie do 6 układów pomiarowych z komunikacją I2C.....	99
Rysunek 80 Prototyp systemu pomiarowego Kartridż silnika chemicznego oraz jednostka bazowa.....	100
Rysunek 81 Elementy składowe kompletnego systemu pomiarowego.....	101
Rysunek 82 Wygląd złącz przyłączeniowych elementu wymiennego systemu pomiarowego.....	102
Rysunek 83 Wygląd elementów połączeniowych modułu centralnego.....	103

Rysunek 84 Wygląd działającego czujnika podczas testów.....	104
Rysunek 85 Wygląd działającego czujnika LED pomiar ok	104
Rysunek 86 Wygląd poszczególnych elementów komory mieszania.	105
Rysunek 87 Podkładka teflonowa zapewniająca szczelność komory mieszania.	105
Rysunek 88 Wygląd sterowania za pomocą interfejsu HTTP	110

Spis Tabel

Tabela 1 Zawartość laktozy w 100 g wybranych produktów mlecznych [2].	12
Tabela 2 Informacje dotyczące źródeł pochodzenia β -D-galaktozydazy wraz z charakterystyką poszczególnych enzymów [5].	15
Tabela 3 Zestawienie uzyskanych wyników dla różnych próbek żywności. „+” – obecność laktozy, „-” - brak laktozy, „*”- nie stwierdzono ze względu na interferencje	27
Tabela 4 Zestawienie uzyskanych wyników dla różnych próbek żywności. „+” – obecność laktozy, „-” - brak laktozy, „*”- nie stwierdzono ze względu na interferencje	37
Tabela 5 Zestawienie uzyskanych wyników dla różnych próbek żywności. „+” – obecność laktozy, „-” - brak laktozy.	56

