

Wydział Farmaceutyczny



Syntetyczne peptydy jako materiały do budowy czujników zapachu

Tomasz Wasilewski

ROZPRAWA DOKTORSKA

Wykonana w:

Katedra i Zakład Chemii Nieorganicznej

Gdański Uniwersytet Medyczny

Kierownik Katedry i Zakładu:

Prof. dr hab. n. farm. Wojciech Kamysz

Promotor:

Prof. dr hab. n. farm. Wojciech Kamysz

Drugi Promotor:

Dr hab. inż. Jacek Gębicki, prof. PG

Gdańsk 2019

Składam serdeczne podziękowania

***Panu Prof. dr. hab. n. farm. Wojciechowi Kamyszowi
Panu dr. hab. inż. Jackowi Gębickiemu, prof. PG***
*za przekazaną mi wiedzę, wszechstronne i życzliwe porady
w trakcie wykonywania badań i redagowania niniejszej pracy.*

Wszystkim Koleżankom i Kolegom,
*z którymi miałem przyjemność współpracować
za kreatywną atmosferę pracy i nieocenioną pomoc.*

W szczególny sposób pragnę podziękować
Bliskim i Rodzinie
za wsparcie, otuchę i nieustanną motywację.

SPIS TREŚCI

STRESZCZENIE.....	4
ABSTRACT.....	5
WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW.....	6
1. WPROWADZENIE.....	8
2. PROBLEMATYKA PORUSZANA W RAMACH ROZPRAWY DOKTORSKIEJ I ZREALIZOWANE CELE BADAWCZE	14
2.1. Stan wiedzy i perspektywy rozwoju bioczuJNIKÓW w analizie zapachÓw	15
2.2. Techniki otrzymywania i immobilizacji elementów receptorowych bioczuJNIKÓW inspirowanych biologicznymi systemami węchowymi	16
2.3. Optymalizacja techniki osadzania warstwy receptorowej na powierzchni przetwornika piezoelektrycznego typu mikrowaga kwarcowa.....	17
2.4. Określenie składu i długości łańcucha peptydu jako elementu receptorowego bioczuJNIka.....	20
2.5. Określenie podstawowych parametrów metrologicznych bioczuJNIKÓW względem substancji zapachowych z różnych klas związków	22
3. PODSUMOWANIE.....	26
4. WNIOSKI	28
5. LITERATURA	30
6. DOROBEK NAUKOWY	36
7. PUBLIKACJE NAUKOWE I OŚWIADCZENIA WSPÓŁAUTORÓW	41
7.1. Bioelectronic nose: current status and perspectives	41
7.2. Advances in olfaction-inspired biomaterials applied to bioelectronic noses.....	41
7.3. Evaluation of three peptide immobilization techniques on a QCM surface related to acetaldehyde responses in the gas phase.....	41
7.4. A highly selective biosensor based on peptide directly derived from the HarmOBP7 aldehyde binding site	41
7.5. Determination of long-chain aldehydes using a novel quartz crystal microbalance sensor based on a biomimetic peptide	41

STRESZCZENIE

Potencjał aplikacyjny bioczuJNIKÓW zapachu zWIĄZANY jest głównie z ich użytecznością w diagnostyce medycznej, kontroli jakości produktów żywnościowych, analityce i monitoringu środowiska, wykrywaniu substancji niebezpiecznych i innych branżach powiązanych z zapachami. Mimo niewątpliwych zalet dotychczas stosowanych, klasycznych metod analizy substancji lotnych, takich jak techniki olfaktometryczne i chromatografia gazowa, poszukiwane są nowe rozwiązania konstrukcyjne i aparaturowe, które niwelują niektóre niedogodności dotychczas stosowanych technik. Postęp w dziedzinie bioczuJNIKÓW zapachu zWIĄZANY jest przede wszystkim z rozwojem materiałów w zakresie elementów receptorowych bioczuJNIKÓW. Oprócz biologicznych elementów systemów węchowych, w bioczuJNIKACH zapachu wykorzystywane są struktury odwzorowujące ich sposób działania. Przykładem są syntetyczne peptydy, które projektowane są w taki sposób, aby po immobilizacji naśladować swoją strukturą i charakterystyką działania miejsca wiążące cząsteczki zapachowe w receptorach węchowych. Zastosowanie syntetycznych peptydów, jako elementów receptorowych stanowi obecnie jeden z trendów w rozwoju bioczuJNIKÓW zapachu. Jednak wciąż wymagane są badania podstawowe obejmujące optymalizację techniki osadzania, określenie wpływu długości i składu aminokwasowego łańcucha peptydu na powinowactwo do określonych ligandów. Wyniki badań modelowania molekularnego umożliwiły wyselekcjonowanie peptydów wykazujących powinowactwo do wybranej grupy związków zapachowych (aldehydy alifatyczne średnio- i długołańcuchowe). Synteza i opracowana technika osadzania peptydów na czujnikach piezoelektrycznych umożliwiła efektywną i powtarzalną konstrukcję bioczuJNIKÓW. Określona została zależność między rodzajem i długością łańcucha peptydowego, a wpływem na wiązanie ligandu. W celu weryfikacji modeli *in silico* dokowania receptor/ligand posłużono się danymi eksperymentalnymi. Określony został stopień powinowactwa peptydów do danych grup związków i podstawowe parametry skonstruowanych bioczuJNIKÓW. Opracowana technika immobilizacji zapewniła powtarzalną budowę bioczuJNIKA, umożliwiającą selektywną analizę aldehydów średnio- i długołańcuchowych.

Słowa kluczowe: czujniki; bioczuJNIKI; przetworniki piezoelektryczne; elektroniczny nos; bioelektroniczny nos; odoranty; białka wiążące odoranty; peptydy.

ABSTRACT

The applicatory potential of odour biosensors is related to their usefulness in medical diagnostics, food quality control, environmental monitoring and other industries where odorants are present. A milestone was discovery of genes coding receptor proteins, of the rhodopsin-like family interacting with a particular chemical substance. Biosensors or biosensor arrays, are devices that can soon become supplementary to the classic analytical techniques. Progress in the field of electronic analogues of the biological olfactory systems is closely related to the development of sensors' construction materials. Apart from typical biological components of the olfactory systems, the odour biosensors utilize structures mimicking biological materials such as synthetic peptides. The structure and characteristics of those materials are designed to simulate the binding sites in the olfactory receptors responsible for binding odorous molecules. An important issue in the construction of the biosensors is their lifetime and repeatability associated with effective immobilization. A peptide can be immobilized on the sensor's surface without the lipid bilayer. Additionally, the possibility of storage of peptides in refrigerator for a few months and stability of the immobilized sensitive layers make these materials the most suitable for implementation in commercial odorant biosensors. Research studies have been focused on characterization of the influence of the length and composition of peptides chain on biosensor detection parameters. The main purpose of this project was to investigate the occurrence of characteristic interactions between selected receptors (synthetic peptides) and ligands (odorant compounds). The current state of knowledge in the odorant biosensors with the active elements as synthetic peptides, is limited. The main challenge in peptide-based biosensors design is optimization of the effect of polypeptide chain length and composition on biosensors parameters. Implementation of this type of biological material as a sensor receptor layer allows determining the degree of affinity of selected peptides for particular groups of compounds and characterize peptide-based biosensor's main parameters. The developed immobilization technique enabled for reproducible construction of the biosensors, based on a biomimetic peptide, for selective analysis of medium- and long-chain aldehydes.

Key words: *sensors; biosensors; piezoelectric transducers; electronic nose; bioelectronic nose; odorants; odorant binding proteins; peptides.*

WYKAZ SKRÓTÓW I AKRONIMÓW

Skrót/Akronim	Termin angielski	Termin polski
<i>AC</i>	<i>Adenylyl Cyclase</i>	Cyklaza adenylova
<i>AFM</i>	<i>Atomic Force Microscope</i>	Mikroskop sił atomowych
<i>ATP</i>	<i>Adenosine-5'-Triphosphate</i>	Adenozyno-5'-trifosforan
<i>B-EN</i>	<i>Bioelectronic Nose</i>	Bioelektroniczny Nos
<i>cAMP</i>	<i>3',5'-cyclic Adenosine Monophosphate</i>	Cykliczny adenozyno-3',5'-monofosforan
<i>EN</i>	<i>Electronic Nose</i>	Elektroniczny Nos
<i>FET</i>	<i>Field Effect Transistor</i>	Tranzystor polowy
<i>GC</i>	<i>Gas Chromatography</i>	Chromatografia gazowa
<i>GDP</i>	<i>Guanosine-5'-diphosphate</i>	Guanozyno-5'-difosforan
<i>GTP</i>	<i>Guanosine-5'-triphosphate</i>	Guanozyno-5'-trifosforan
<i>Ano2 (channel)</i>	<i>Calcium-activated chloride channel Anoctamin-2</i>	Aktywowany jonami wapnia kanał chlorkowy anoktamin-2
<i>CNG (channel)</i>	<i>Cyclic Nucleotide-Gated Channel</i>	Kanał bramkowany cyklicznym nukleotydem
<i>LOD</i>	<i>Limit of Detection</i>	Granica wykrywalności
<i>ECD</i>	<i>Electron Capture Detector</i>	Detektor wychwytu jonów
<i>ECM (matrix)</i>	<i>Extracellular Matrix</i>	Macierz wewnątrzkomórkowa
<i>FID</i>	<i>Flame Ionisation Detector</i>	Detektor płomieniowo-jonizacyjny
<i>ICM (matrix)</i>	<i>Intracellular Matrix</i>	Macierz zewnątrzkomórkowa
<i>MS</i>	<i>Mass Spectrometry</i>	Spektrometria mas
<i>MEA</i>	<i>Microelectrode array</i>	Matryca mikroelektrod
<i>OBP</i>	<i>Odorant Binding Protein</i>	Białko wiążące odoranty
<i>OBPP</i>	<i>Odorant Binding Protein-derived Peptide</i>	Peptyd pochodzący z białka wiążącego odoranty
<i>OR</i>	<i>Olfactory Receptor</i>	Receptor węchowy
<i>OSNs</i>	<i>Olfactory Sensory Neurons</i>	Neurony receptorów węchowych
<i>PMP</i>	<i>Protein-Mimetic Peptide</i>	Peptyd odwzorowujący białko
<i>QCM</i>	<i>Quartz Crystal Microbalance</i>	Mikrowaga kwarcowa
<i>SAM</i>	<i>Self-Assembled Monolayer</i>	Samoorganizująca się monowarstwa
<i>SPR</i>	<i>Surface Plasmon Resonance</i>	Powierzchniowy rezonans plazmonowy

Skrót jedno-, trzyliterowy	Nazwa aminokwasu anglojęzyczna	Nazwa aminokwasu polskojęzyczna
<i>A, Ala</i>	<i>Alanine</i>	Alanina
<i>R, Arg</i>	<i>Arginine</i>	Arginina
<i>N, Asn</i>	<i>Asparagine</i>	Asparagina
<i>D, Asp</i>	<i>Aspartic acid</i>	Kwas asparaginowy
<i>C, Cys</i>	<i>Cysteine</i>	Cysteina
<i>E, Glu</i>	<i>Glutamic acid</i>	Kwas glutaminowy
<i>Q, Gln</i>	<i>Glutamine</i>	Glutamina
<i>G, Gly</i>	<i>Glycine</i>	Glicyna
<i>H, His</i>	<i>Histidine</i>	Histydyna
<i>I, Ile</i>	<i>Isoleucine</i>	Izoleucyna
<i>L, Leu</i>	<i>Leucine</i>	Leucyna
<i>K, Lys</i>	<i>Lysine</i>	Lizyna
<i>M, Met</i>	<i>Methionine</i>	Metionina
<i>F, Phe</i>	<i>Phenylalanine</i>	Fenylalanina
<i>P, Pro</i>	<i>Proline</i>	Prolina
<i>S, Ser</i>	<i>Serine</i>	Seryna
<i>T, Thr</i>	<i>Threonine</i>	Treonina
<i>W, Trp</i>	<i>Tryptophan</i>	Tryptofan
<i>Y, Tyr</i>	<i>Tyrosine</i>	Tyrozyna
<i>V, Val</i>	<i>Valine</i>	Walina

1. WPROWADZENIE

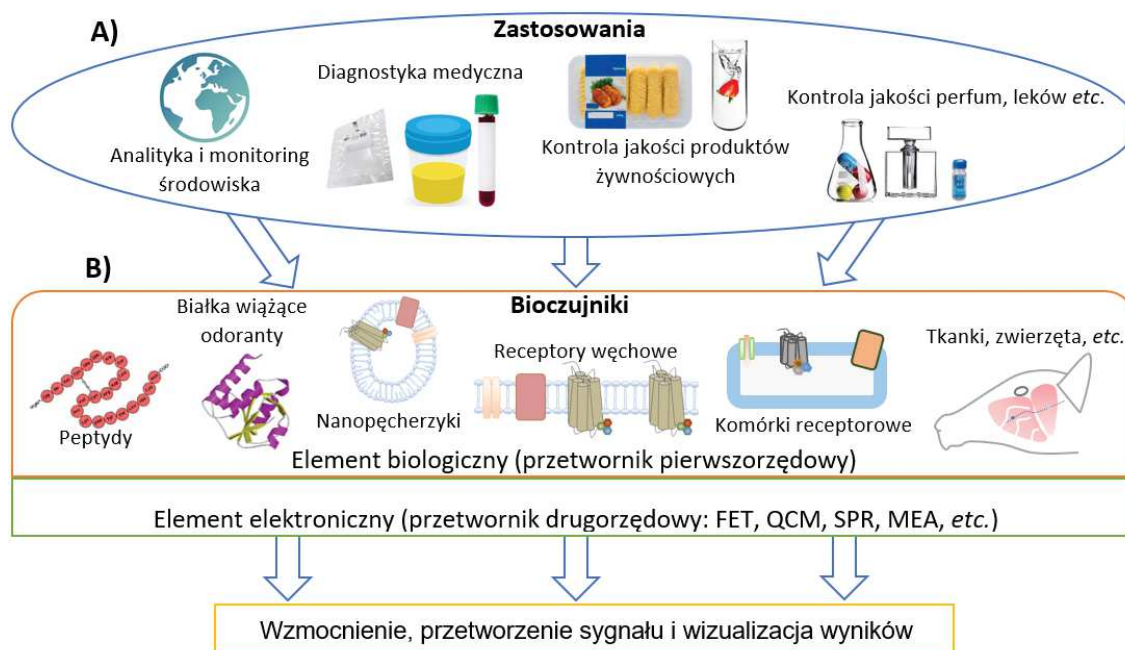
Tysiące lat ewolucji umożliwiły organizmom wykształcenie zmysłów i towarzyszących im mechanizmów wyróżniających się uniwersalnością, odpowiednią wydajnością, wrażliwością i tolerancją na przesylenie. Do podstawowych zmysłów człowieka zalicza się wzrok, słuch, dotyk, węch i smak [1]. Pierwsze trzy odpowiedzialne są za rozpoznawanie bodźców fizycznych, a dwa pozostałe bodźców chemicznych [2]. Zapachy mogą wywoływać emocje, wspomnienia, wpływać na aktywację autonomicznego układu nerwowego, a także kształtować odczucia węchowate i smakowe związane z produktami żywnościowymi i ich przydatnością do spożycia [3]. Według najnowszych badań, ludzki zmysł węchu jest w stanie reagować na ponad 1 bilion bodźców zapachowych [4], co akcentuje stopień jego skomplikowania i skłania do dalszego poszerzania prac badawczych nad percepcją zapachów [3], zwłaszcza na poziomie genetycznym. Przykładowo, człowiek posiada około 1000 genów receptorów węchowatych (OR) ale tylko około 390 koduje białka receptorów węchowatych, podczas gdy pozostałe to niekodujące pseudogeny [5], które według najnowszych wyników badań, mogą jednak potencjalnie determinować funkcjonowanie receptorów [6]. Rozwój wiedzy dotyczący ORs nie tylko przyspiesza badania nad podstawowymi mechanizmami węchowatymi ale także dynamizuje postęp w zakresie czujników inspirowanych biologicznymi systemami węchowatymi [7].

Aparat węchowaty człowieka zlokalizowany jest w jamie nosowej, której górna część zawiera nabłonek węchowaty [8,9]. Wykazano, że integracja wrażeń węchowatych z informacjami smakowymi może być inicjowana już na poziomie komórek receptorów smakowych [10], rozmieszczonych w brodawkach w nabłonku powierzchni języka. Cechą charakterystyczną systemu węchowatego jest to, iż receptory węchowate bezpośrednio połączone są ze strukturami w mózgu wchodzącymi w skład drogi węchowatej (Rysunek 1C) odpowiedzialnymi za rozpoznawanie zapachu, generowanie emocji i ich zapamiętywanie.

Schemat budowy narządów węchowatych oraz drogi węchowatej człowieka przedstawiono na Rysunku 1.

warunkujących powonienie w biologicznych układach węchowych [18,19], zaobserwować można znaczący postęp w dziedzinie analizy zapachów [20,21], związany m.in. ze stosowaniem do budowy czujników materiałów pochodzenia biologicznego [22]. Klasyczne metody analizy substancji gazowych opierają się głównie na wykorzystywaniu chromatografii gazowej sprzężonej ze spektrometrią mas (GC-MS) [23,24] i technik olfaktometrycznych [25]. Do urządzeń, które stają się ich uzupełnieniem, należą czujniki i bioczujniki substancji gazowych, które po połączeniu w matryce określane są w literaturze jako urządzenia z grupy elektronicznych nosów (EN) [26] i bioelektronicznych nosów (B-ENs) [27]. Materiały (również komercyjnie dostępne), wykorzystywane do konstrukcji czujników, pełniące funkcję warstwy chemoczułej, obejmują głównie półprzewodniki tlenków metali i polimery przewodzące [28]. Ich względnie niska stabilność i selektywność względem lotnych związków zapachowych, skłania do poszukiwania nowych materiałów receptorowych [22,29]. Podejmowane są próby odzwierciedlenia możliwości biologicznych układów węchowych poprzez implementację ich elementów w warstwie receptorowej bioczujników [27]. Potencjał aplikacyjny bioczujników zapachu związany jest m.in. z ich użytecznością w diagnostyce medycznej [30], kontroli jakości produktów żywnościowych [31], analityce i monitoringu środowiska [32], wykrywaniu substancji niebezpiecznych i wybuchowych [33], standaryzacji zapachów [34] oraz innych branżach związanych z zapachami [22,35–38]. Dokładniejsze odwzorowanie zmysłu węchu, poprzez implementację materiałów pochodzenia biologicznego, stosowanych w bioczujnikach zapachu, może znacznie poszerzyć spektrum ich zastosowań. Rozwój potencjału aplikacyjnego bioczujników zapachu związany jest głównie z pogłębianiem wiedzy nt. materiałów pełniących rolę funkcjonalnych warstw receptorowych bioczujników.

Przykłady zastosowań bioczujników zapachu oraz schemat ich budowy przedstawiono na Rysunku 2.



Rysunek 2. (A) Przykładowe zastosowania oraz (B) schemat elementów budowy bioczuJNIKÓW zawierających różnego typu biologiczne elementy receptorowe, które w połączeniu z odpowiednim przetwornikiem drugorzędowym i systemem przetwarzania sygnału umożliwiają analizę substancji lotnych.

Oprócz typowo biologicznych komponentów systemów węchowych [39], w bioczuJNIKACH zapachu wykorzystywane są struktury odwzorowujące materiały biologiczne, takie jak syntetyczne peptydy [40–42] będące obecnie w fazie dynamicznego rozwoju [27,43,44]. Projektowane są w ten sposób, aby naśladować swoją strukturą i charakterystyką działania miejsca wiążące cząsteczki zapachowe występujące w biologicznych systemach węchowych. Ustawicznie poszukiwane są sekwencje peptydów, które umożliwiłyby selektywną i specyficzną detekcję wybranych substancji gazowych. Zwłaszcza owadzie systemy węchowe [45,46] są inspiracją do opracowania bioczuJNIKÓW z elementem aktywnym pochodzenia biologicznego, np. wyizolowane narządy owadów [47–49]. Ze względu na trudności w interpretacji sygnałów i problemami ze stabilnością tego typu materiałów [48,50] coraz częstszym rozwiązaniem jest pozyskiwanie określonych białek receptorów zapachowych [51], [52] w odpowiednich systemach ekspresyjnych. Wyróżnić tutaj można specjalny typ białek wiążących odoranty (OBPs). Mogą one uczestniczyć w procesie wiązania ligandów i transporcie lub dezaktywacji sygnałów. OBPs nie są natomiast wymagane w toku dalszego przekazywania sygnału, z kompleksu OBP – ligand, gdyż ligand uwalniany jest po dotarciu do specyficznego receptora [53]. Wysokie stężenie tych białek w wydzielinie nosowej kręgowców sugeruje duże znaczenie w percepcji substancji

wonnych i istotny udział w wiązaniu ligandów [54]. Duża różnorodność oraz relatywnie wysoka stabilność części z tych białek sprawia, że są one coraz częściej wykorzystywane do konstrukcji bioczuJNIKÓW zapachu [55–57]. OBPs należą do kluczowych elementów systemów chemosensorycznych [58] i posiadają ogromny potencjał w rozwoju elementów receptorowych bioczuJNIKÓW do detekcji naturalnych i syntetycznych lotnych związków organicznych [59–66]. Należy nadmienić, że ich użyteczność w systemach bioelektronicznych dopiero zaczyna być rozwijana [57]. Trudności związane ze stosowaniem tego typu materiałów do budowy bioczuJNIKÓW dotyczą głównie metod ich produkcji i zachowania wymaganej stabilności [30]. Dlatego też opracowywane są podejścia metodologiczne i aparaturowe, oparte o wykorzystanie do budowy bioczuJNIKÓW syntetycznych odpowiedników naśladowujących działanie miejsc wiążących ligandy, które występują w OBPs i ORs. Wykorzystywanie komponentów białek, takich jak regiony specyficzne dla określonych ligandów, bądź syntetycznych peptydów należy do nowych trendów w analizie prostych cząsteczek zapachowych [43].

Pierwsze peptydy stosowane do wykrywania związków zapachowych, bazujące na receptorach węchowych psów, zostały opracowane pod koniec lat 90. [67]. Wybrane sekwencje peptydów zawierały od 9 do 14 reszt aminokwasowych. Przykładem mogą być dwa peptydy – orp61 i orp189, których przyłączenie do powierzchni przetwornika umożliwiło wykrywanie trimetyloaminy i amoniaku. Otworzyło to nową ścieżkę w dziedzinie analizy związków lotnych z wykorzystaniem bioczuJNIKÓW [43]. W wymienionych zastosowaniach charakterystyczne jest to, że do budowy czujnika konieczna jest znajomość wiążących par – receptorów zapachowych i odpowiednich ligandów, a nie mechanizmów przekazywania sygnału węchowego [68]. Białka receptorów zapachowych należą do grupy receptorów błonowych, dlatego ich stabilność konformacyjna silnie zależy od sposobu otrzymywania. Zachowanie wysokiej powtarzalności wytwarzania nie jest możliwe lub jest bardzo trudne do osiągnięcia [27,43]. Krótkołańcuchowe peptydy, nie muszą posiadać struktury trzeciorzędowej i błony lipidowej do efektywnego osadzenia na przetworniku i wiązania określonych ligandów [69,70]. Jeśli możliwe jest wyznaczenie specyficznego miejsca wiązania cząsteczki odoranta do receptora, to może zostać również ustalona sekwencja peptydu stanowiąca fragment danego receptora biorący udział w wiązaniu ligandu. Wykorzystanie takiego peptydu może podwyższyć specyficzność, powtarzalność i czułość biosensora. Ponadto sprowadza się to również do łatwiejszego określenia

sygnału wyjściowego i obniżenia kosztów produkcji [71]. Pomyślna implementacja peptydów w zakresie elementów receptorowych bioczuJNIKÓW wymaga badań podstawowych obejmujących m.in. optymalizację techniki osadzania, określenia wpływu długości i składu aminokwasowego łańcucha peptydu jak i podstawowych parametrów metrologicznych konstruowanych bioczuJNIKÓW. Zoptymalizowanie techniki osadzania peptydów na przetworniku drugorzędowym powinno umożliwić powtarzalną konstrukcję bioczuJNIKÓW substancji lotnych. Podstawę dysertacji doktorskiej stanowi próba optymalizacji techniki osadzania zaprojektowanych warstw receptorowych, które powinny wykazywać specyficzną wobec docelowej grupy związków oraz określenie podstawowych parametrów skonstruowanych bioczuJNIKÓW.

Wymienione powyżej zagadnienia zostały szczegółowo scharakteryzowane i szerzej opisane w cyklu publikacji naukowych składających się na realizację przewodu doktorskiego. Część teoretyczna pracy oparta jest na dwóch pracach przeglądowych:

- Wasilewski, T.; Gębicki, J.; Kamysz, W. Bioelectronic nose: Current status and perspectives. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *87*, 480–494;
- Wasilewski, T.; Gębicki, J.; Kamysz, W. Advances in olfaction-inspired biomaterials applied to bioelectronic noses. *Sensors Actuators B Chem.* **2018**, *257*, 511–537.

Trzy publikacje oryginalne, w których przedstawione zostały wyniki badań, stanowią część eksperymentalną pracy:

- Wasilewski, T.; Szulczyński, B.; Kamysz, W.; Gębicki, J.; Namieśnik, J. Evaluation of Three Peptide Immobilization Techniques on a QCM Surface Related to Acetaldehyde Responses in the Gas Phase. *Sensors* **2018**, *18*, 3942;
- Wasilewski, T.; Szulczyński, B.; Wojciechowski, M.; Kamysz, W.; Gębicki, J. A Highly Selective Biosensor Based on Peptide Directly Derived from the HarmOBP7 Aldehyde Binding Site. *Sensors* **2019**, *19*, 4284;
- Wasilewski, T.; Szulczyński, B.; Wojciechowski, M.; Kamysz, W.; Gębicki, J. Determination of Long-Chain Aldehydes Using a Novel Quartz Crystal Microbalance Sensor Based on a Biomimetic Peptide. *Microchem. J.* **2019**,

Wymienione publikacje naukowe, wraz z oświadczeniami współautorów, załączono chronologicznie w rozdziale 7.

2. PROBLEMATYKA PORUSZANA W RAMACH ROZPRAWY DOKTORSKIEJ I ZREALIZOWANE CELE BADAWCZE

Podstawowym celem naukowym rozprawy doktorskiej jest zbadanie oddziaływań pomiędzy receptorami składającymi się z wyselekcjonowanych peptydów a analitami (lotnymi substancjami zapachowymi), w celu opracowania bioczuJNIKÓW zapachu. Poszerzenie możliwości aplikacyjnych bioczuJNIKÓW zapachu silnie związane jest z postępiem w zakresie rozwiązań konstrukcyjnych oraz materiałów biologicznych osadzanych na przetwornikach. Istnieje szczególnie duże zapotrzebowanie na badania podstawowe obejmujące optymalizację długości i składu łańcucha peptydowego. Kluczowe znaczenie w projektowaniu i konstrukcji bioczuJNIKÓW ma rodzaj elementu receptorowego, jak również technika sprzęgania z częścią przetwornikową, determinujące parametry metrologiczne bioczuJNIKÓW. Pomiary rzeczywistych mieszanin wzorcowych gazów umożliwiły potwierdzenie występowania charakterystycznych oddziaływań i oszacowanie parametrów metrologicznych otrzymanych bioczuJNIKÓW. Ich charakterystykę określono m.in. poprzez odpowiedzi bioczuJNIKÓW względem różnych klas związków zapachowych, w tym aldehydów średnio- i długołańcuchowych (powyżej pięciu atomów węgla w łańcuchu). Mając na uwadze użyteczność detekcji aldehydów w przyszłych zastosowaniach (wskaźniki starzenia tłuszczu i markery chorób układu oddechowego) zostały one wybrane jako wzorce na etapie projektowania bioczuJNIKÓW. Aldehydy długołańcuchowe są potencjalnymi markerami chorób układu oddechowego (wczesna diagnoza raka płuc w kondensatach wydychanego powietrza [72,73]) i zaburzeń metabolizmu [74]. Zakwalifikowano je również do grupy wskaźników procesów utleniania tłuszczu [75], gdzie wykorzystywany jest wzrost zawartości aldehydów lub ich stosunek ilościowy w badanej próbce, pozwalający określić stopień degradacji oleju. Wynikiem utleniania lipidów w olejach jest powstawanie licznych lotnych związków (pierwotne i wtórne produkty utleniania), m.in. aldehydów [76]. Przykładowo, nonanal można uznać za wskaźnik stabilności oksydacyjnej powstający w procesie autooksydacji olejów zwierających w swoim składzie duże ilości kwasu linolowego i linolenowego (olej rzepakowy, oliwa z oliwek) [77]. Aldehydy produkowane przez skórę są produktem peroksydacji lipidów i składają się na profil zapachowy człowieka, który określa ogólny stan higieny, jak i prawidłowość procesów metabolicznych zachodzących w organizmie [74].

2.1. Stan wiedzy i perspektywy rozwoju bioczujników w analizie zapachów

Dotychczasowa wiedza na temat biologicznego układu węchu, metod charakteryzowania i pozyskiwania materiałów inspirowanych systemami węchowymi, umożliwia ich wykorzystanie w bioczujnikach zapachu [56]. Osiągnięcia z dziedzin biologii, inżynierii genetycznej, biotechnologii i nanotechnologii dają możliwość konstruowania i wdrażania bioczujników i matryc bioczujników (B-ENs) do praktyki analitycznej i stosowania w różnego typu aplikacjach.

Historia, budowa, zasada działania, zastosowania oraz perspektywy rozwoju czujników, bioczujników zapachu i ich matryc przedstawiona została w publikacji:

- Wasilewski, T.; Gębicki, J.; Kamysz, W. Bioelectronic nose: Current status and perspectives. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *87*, 480–494.

Konwencjonalne techniki analizy zapachów, takie jak chromatografia gazowa i techniki olfaktometryczne, obarczone są różnymi niedogodnościami wynikającymi m.in. ze stopnia skomplikowania, czasu analizy oraz ceny. Skłania to do wdrażania nowych rozwiązań konstrukcyjno-aparaturowych, w których do analizy związków lotnych stosowane są bioczujniki. W ramach przygotowanej pracy podjęto próbę usystematyzowania wiedzy na temat analizy odorantów w różnego rodzaju matrycach z wykorzystaniem bioczujników i bioelektronicznych nosów. Przedstawiono ich historię w analizie substancji zapachowych, najnowsze osiągnięcia umożliwiające wykorzystanie w różnego typu zastosowaniach, nakreślono również potencjalne kierunki rozwoju. Dalszy rozwój tych urządzeń ukierunkowany jest głównie na opracowanie:

- metod otrzymywania i immobilizacji materiałów bioczułych na przetwornikach drugorzędowych,
- materiałów o wyższym powinowactwie do przetwornika, umożliwiających powtarzalne osadzenie i zwiększenie stabilności,
- bioczujników o wysokiej czułości, powtarzalności, specyficzności i krótszym czasie odpowiedzi,
- systemów czujnikowych generujących sygnały podobne do występujących w biologicznych odpowiednikach,
- bardziej przystępnych, zminiaturyzowanych systemów czujnikowych o niższych kosztach aparatury i analiz.

Struktura i funkcje biologicznego układu powonienia są inspiracją w konstrukcji urządzeń naśladujących zmysł węchu. Zbliżenie możliwości bioczuJNIKÓW zapachu, pod kątem czułości i selektywności, do naturalnych systemów węchowych jest jednym z priorytetów ich rozwoju. Poszerzanie wiedzy dotyczącej procesów odczytywania informacji zapachowych znacząco przyczynia się do poszerzania gamy dostępnych materiałów na bazie biologicznych komponentów.

2.2. Techniki otrzymywania i immobilizacji elementów receptorowych bioczuJNIKÓW inspirowanych biologicznymi systemami węchowymi

Wysoce rozwinięte systemy węchowe występują u większości eukariotów, od bezkręgowców po ssaki. Zazwyczaj charakteryzują się zdolnością do specyficznej i selektywnej identyfikacji substancji zapachowych [3,78]. Rozwój bioczuJNIKÓW realizowany jest przede wszystkim dzięki stosowaniu materiałów pochodzenia biologicznego. Kluczowe znaczenie w projektowaniu i konstrukcji bioczuJNIKÓW ma rodzaj elementu bioreceptorowego, sposób otrzymywania oraz technika sprzęgania z częścią przetwornikową. Rezultatem jest uzyskanie odpowiednio wysokich parametrów bioczuJNIKÓW, takich jak czułość, selektywność, specyficzność, *etc.*

Dotychczasowy stan wiedzy dotyczący metod otrzymywania, immobilizacji i właściwości materiałów, z których konstruowane są bioczuJNIKI zapachów, przedstawiono w pracy przeglądowej:

- Wasilewski, T.; Gębicki, J.; Kamysz, W. Advances in olfaction-inspired biomaterials applied to bioelectronic noses. *Sensors Actuators B Chem.* **2018**, 257.

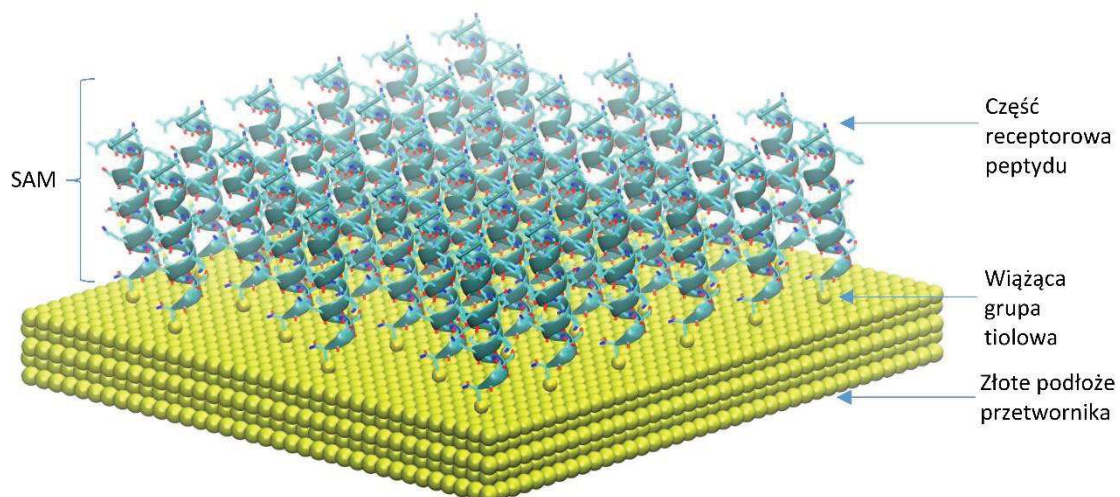
Przeprowadzone studium literaturowe umożliwiło stwierdzenie, że poszerzenie możliwości aplikacyjnych bioczuJNIKÓW silnie związane jest z postępowaniem w zakresie implementacji nowych materiałów biologicznych i optymalizacją technik otrzymywania stabilnych warstw bioczułych osadzanych na przetwornikach drugorzędowych. Do najbardziej perspektywicznych elementów bioczułych zaliczane są m.in. syntetyczne peptydy odwzorowujące charakterystyką działania białka receptorów węchowych (OR) i białka wiążące odoranty (OBPs). Specyficzne interakcje występujące między ligandem a receptorem możliwe są do odwzorowania dzięki znajomości sekwencji aminokwasowej białka i budowy układu centrum wiążącego. Umożliwia to wytypowanie peptydu jak najlepiej naśladującego miejsce wiązania w kieszeni zapachowej, odzwierciedlającego selektywność i powinowactwo względem wybranych odorantów.

Krytyczne omówienie stanu wiedzy w zakresie tematu proponowanego przewodu doktorskiego umożliwiło zaplanowanie badań własnych w celu rozszerzenia i weryfikacji stawianych hipotez. Pozytywne rezultaty zaplanowanych prac badawczych powinny przyczynić się do rozwoju tematyki czujnikowej, zwłaszcza w aspekcie technik immobilizacji i poszerzenia gamy peptydów naśladowujących naturalne receptory węchowe. W kolejnych publikacjach eksperymentalnych omówiono założenia metodologiczne, opis przebiegu i wyniki badań, które miały na celu konstrukcję bioczujników selektywnych wobec wybranej grupy związków.

2.3. Optymalizacja techniki osadzania warstwy receptorowej na powierzchni przetwornika piezoelektrycznego typu mikrowąga kwarcowa

Stosowanie elementów biologicznych jako materiałów do budowy warstwy receptorowej bioczujników może wiązać się z trudnościami w ich otrzymaniu i niezadowalającą stabilnością. Mając na uwadze łatwość syntezy peptydów poprzez modyfikację sekwencji i zmiany w łańcuchach bocznych aminokwasów można podwyższyć stopień powinowactwa do określonych odorantów (ligandów). W przypadku immobilizacji peptydu na powierzchni przetwornika możliwe jest jego osadzenie bez podwójnej warstwy lipidowej. Dodatkowo, możliwość przechowywania określonych peptydów przez kilka miesięcy i relatywnie wysoka stabilność immobilizowanej warstwy bioczułej powoduje, że mogą być one wykorzystane w komercyjnych bioczujnikach zapachu. Optymalizacja techniki immobilizacji zrealizowana została z wykorzystaniem krótkiego syntetycznego peptydu. Przetestowano trzy techniki: nanoszenia kropli, powlekania zanurzeniowego, powlekania obrotowego. Podstawowym celem każdej procedury immobilizacyjnej jest utrzymanie wysokiego powinowactwa warstwy receptorowej względem powierzchni przetwornika oraz zapewnienie efektywnego wiązania receptora z ligandem. Jedną z możliwości związania peptydu ze złotą powierzchnią przetwornika jest przyłączenie poprzez grupę tiolową łańcucha bocznego reszty cysteiny.

Schematyczne przedstawienie ułożenia warstwy peptydów na złotej powierzchni przetwornika drugorzędowego przedstawiono na Rysunku 3.



Rysunek 3. Schematyczne przedstawienie sposobu ułożenia samoorganizujących się monowarstw (SAM) peptydu na złotej powierzchni przetwornika QCM [79].

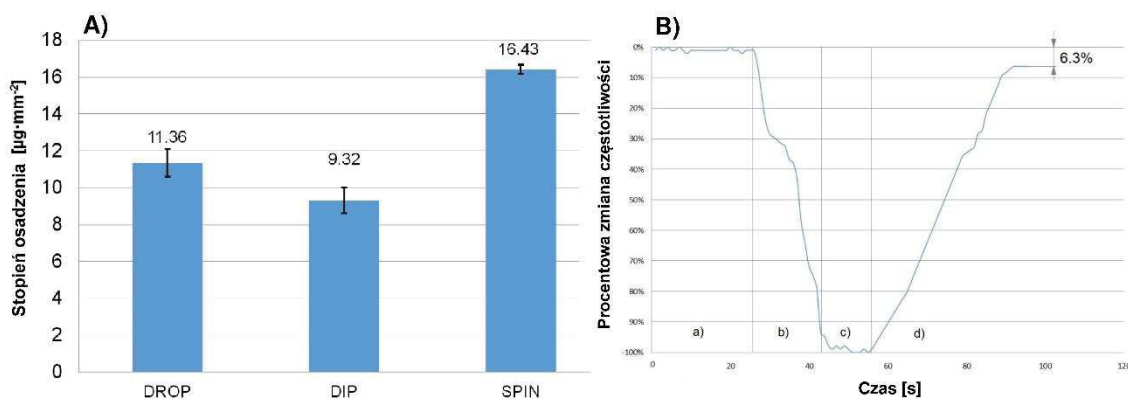
W wyniku dużego powinowactwa złota do siarki, tworzą się trwałe wiązania kowalencyjne. Biorąc pod uwagę prostą koncepcję budowy i ułatwioną obsługę, niskie koszty oraz krótki czas analizy, zdecydowano się na zastosowanie przetwornika piezoelektrycznego typu mikrowaga kwarcowa (QCM). Charakterystyczną cechą tego typu rezonatorów jest częstotliwościowy sygnał wyjściowy zależny od zmiany masy.

Optymalizacja parametrów osadzania peptydu na złotej powierzchni kryształów QCM z wykorzystaniem trzech różnych technik depozycji: nanoszenia kropli, powlekania obrotowego i powlekania zanurzeniowego przedstawiona została w publikacji:

- Wasilewski, T.; Szulczyński, B.; Kamysz, W.; Gębicki, J.; Namieśnik, J. Evaluation of Three Peptide Immobilization Techniques on a QCM Surface Related to Acetaldehyde Responses in the Gas Phase. *Sensors* **2018**, *18*, 3942.

Stopień osadzenia warstwy receptorowej monitorowany był poprzez rejestrację zmian częstotliwości bioczuJNIKA odpowiadającej zmianom stopnia osadzenia (Rysunek 4A). Powinowactwo osadzonych warstw receptorowych względem gazu wzorcowego rejestrowano w postaci zmian częstotliwości.

Charakterystykę odpowiedzi bioczuJNIKA względem gazu wzorcowego przedstawiono na Rysunku 4B.



Rysunek 4. **A)** Porównanie stopnia osadzenia dla trzech technik osadzania peptydu na powierzchni QCM: DROP (casting) – powlekanie przez nanoszenie kropli, DIP (coating) – powlekanie zanurzeniowe, SPIN (coating) – powlekanie obrotowe. **B)** Przykładowa charakterystyka odpowiedzi bioczuJNIka zarejestrowana dla acetaldehydu: a) stabilizacja linii bazowej, b) dozowanie substancji gazowej, c) plateau sygnału (maksimum adsorpcji), d) płukanie gazem zerowym i powrót do warunków początkowych [80].

W oszacowaniu efektywności osadzenia peptydów (optymalizacja sekwencji peptydów przedstawiona została w Rozdziale 2.4.) na przetwornikach drugorzędowych posłużono się również zdjęciami z mikroskopu sił atomowych (AFM), które umożliwiły scharakteryzowanie warstw na złotej elektrodzie. Oddziaływanie cząsteczek zapachowych z częścią receptorową prowadziło do zmiany masy obserwowanej poprzez zmianę częstotliwości rejestrowanej z dokładnością do 1 Hz. Analiza i wyniki odpowiedzi bioczuJNIka względem wybranych gazów wzorcowych (acetaldehyd, toluen – kontrola negatywna) potwierdziły prawidłową immobilizację i wysoką czułość warstwy receptorowej względem pierwszego z gazów wzorcowych. Średni stopień osadzenia dla techniki powlekania zanurzeniowego (DIP) oszacowano na $9,32 \mu\text{g}\cdot\text{mm}^{-2}$. Pomimo faktu, że jest to wynik najniższy, ta technika prowadziła do uzyskania wysokiego stopnia jednorodności osadzenia, wysokiego powinowactwa, a także była powtarzalna. W związku z tym została wytypowana jako optymalna do konstrukcji kolejnych bioczuJNIków. Dodatkowo, dzięki zastosowaniu zamkniętej komory nasyconej gazem obojętnym (azot) ograniczono tworzenie wewnątrzcząsteczkowych mostków disulfidowych, umożliwiło to wydajniejsze tworzenie wiązania kowalencyjnego między łańcuchem bocznym cysteiny a złotą powierzchnią elektrody przetwornika QCM.

2.4. Określenie składu i długości łańcucha peptydu jako elementu receptorowego bioczuJNIKA

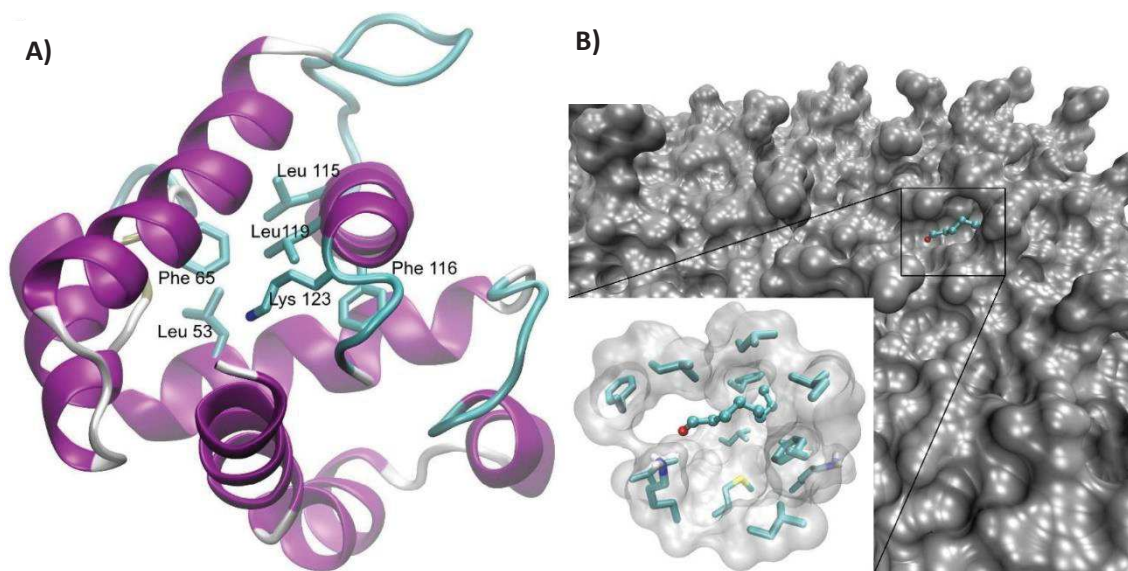
Różnorodne materiały pochodzenia biologicznego coraz częściej wykorzystywane są do budowy bioczuJNIKÓW [22]. W antenie, narządach jamy węchowej i innych strukturach chemosensorycznych owadów zlokalizowane są białka receptorowe odpowiedzialne za powonienie, m.in. OBPs. Wykazano, że część odorantów najpierw wiąże się z OBPs, które transportują je do ORs w neuronach receptorów węchowych (OSNs) [81]. Bardziej hydrofilowe odoranty są w stanie przeniknąć przez błonę śluzową lub limfę, z pominięciem OBPs, wiążąc się bezpośrednio z OR. Potwierdzono również, że OBPs pełnią funkcję zmiataczy (*ang. scavengers*) odorantów, gdy występują na wysokich poziomach stężeń [81]. Wykazują więc naturalną, wysoką specyficznosc wZględem określonych cząsteczek zapachowych. Duże rozpowszechnienie tych białek w biologicznych systemach węchowych sugeruje szerokie spektrum możliwych zastosowań w różnych aplikacjach biotechnologicznych [82].

Znając sekwencję aminokwasów danego białka wiążącego odoranty i budowę układu centrum wiążącego możliwe jest wytypowanie peptydu jak najlepiej odwzorowującego miejsce wiązania w kieszeni zapachowej OBP. Segmenty sekwencji aminokwasów nazywane peptydami odwzorowującym białko (PMPs) związane są ze specyficzną funkcją białka. Przy zachowaniu stabilności konformacji mogą odzwierciedlać ich sposób działania i efektywnie wiązać odpowiednie cząsteczki zapachowe. W literaturze segmenty białka nazywane są motywami (*ang. motif*) i mogą być określane z wykorzystaniem metod obliczeniowych. Zazwyczaj stosowane są peptydy, których liczba reszt aminokwasów znajduje się w przedziale od kilku do kilkunastu. Nie oznacza to, że struktury bardziej złożone nie mogą być wykorzystywane do budowy bioczuJNIKÓW, jednak efekt długości sekwencji musi być określony w celu uzyskania wymaganej wysokiej czułości i selektywności [83]. Na potrzeby projektowanego bioczuJNIKA zbudowany został *in silico* model bioczuJNIKA z peptydem odwzorowującym miejsce wiązania odorantów (OBPP), jako element receptorowy bioczuJNIKA. Następnie przeprowadzono symulacje dokowania ligandów wZględem receptora.

Wyniki badań wstępnych umożliwiły zaprojektowanie peptydów naśladujących miejsce wiązania aldehydów w białku HarmOBP7 występującym w czułkach ćmy *Helicoverpa armigera*. Zaproponowane białko jest selektywne w stosunku do aldehydów średnio- i długołańcuchowych [84,85]. Według danych literaturowych, wiązanie aldehydu w tym białku następuje przede wszystkim poprzez utworzenie zasady Schiffa, przez łańcuch boczny lizyny w odpowiedniej pozycji [84]. Miejsce wiązania dodatkowo stabilizowane jest oddziaływaniami elektrostatycznymi. Wytypowanie peptydów odwzorowujących miejsce wiązania ligandów w białku HarmOBP7 i wyniki ich dokowania przedstawiono w publikacji:

- Wasilewski, T.; Szulczyński, B.; Wojciechowski, M.; Kamysz, W.; Gębicki, J. A Highly Selective Biosensor Based on Peptide Directly Derived from the HarmOBP7 Aldehyde Binding Site. *Sensors* **2019**, *19*, 4284.

Określono wpływ długości łańcucha peptydu na stopień powinowactwa do określonych odorantów. Wygenerowany trójwymiarowy model białka HarmOBP7 posłużył do wyselekcjonowania peptydów odwzorowujących miejsce wiązania w kieszeni węchowej (Rysunek 5).



Rysunek 5. A) Wygenerowany trójwymiarowy model białka HarmOBP7 w oparciu o strukturę krystaliczną OBP1 (*Bombyx Mori*, PDBID: 1dqe). B) Przykład dokowania ligandu (oktanal) do receptora (OBPP3) [86].

Wyniki badań podstawowych umożliwiły oszacowanie stopnia powinowactwa określonych peptydów względem ligandów. Na C-końcu każdego peptydu dodana została reszta cysteiny (Cys, C), aby umożliwić ich immobilizację na przetworniku.

Do syntezy i osadzenia na przetworniku wyselekcjonowane zostały peptydy o następujących sekwencjach aminokwasów:

OBPP1: LEKKKKDC,

OBPP2: LFDSLTDLKC,

OBPP3: LFDSLTDLKKKMSEC,

OBPP4: KLLFDSLTDLKKKMSEC.

Wyniki symulacji dokowania ligand-receptor wykazały wyraźną tendencję najdłuższego z peptydów (OBPP4) w kierunku wiązania średnio- i długołańcuchowych aldehydów, m.in. oktanal, nonanal. Korelację pomiędzy obserwowaną odpowiedzią bioczuJNIKA (OBPP4) a wynikami obliczeń można zaobserwować jedynie w przypadku aldehydów zawierających powyżej pięciu atomów węgla w łańcuchu. Najprawdopodobniej jest to związane z przyjęciem przez krótszy peptyd dobrze zdefiniowanej struktury i faworyzowanym utworzeniem zasady Schiffa, bez dodatkowych specyficznych oddziaływań z receptorem, co wymyka się modelowi oddziaływań zaimplementowanemu w programie do oszacowania energii wiązania ligandów (Autodock 4.2) [87]. W przypadku peptydów OBPP3 i OBPP4 zaczynają pojawiać się stabilne hydrofobowe miejsca wiązania zdolne do wiązania niepolarnych części ligandów. Znajduje to odzwierciedlenie w zwiększonym powinowactwie ligandów zarówno w wynikach obliczeń, jak i eksperymentalnych odpowiedziach bioczuJNIKÓW, co zaprezentowane zostało w dalszych etapach badań.

2.5. Określenie podstawowych parametrów metrologicznych bioczuJNIKÓW względem substancji zapachowych z różnych klas związków

By zaszło wiązanie ligandu z receptorem konieczne jest przyjęcie przez receptor odpowiedniej struktury (drugo- a czasem nawet trzeciorzędowej). Peptydy posiadają strukturę drugorzędową, która często jest nieuporządkowana (*ang. random coil*). Związki zaplanowane do syntezy składają się od 8 do 17 aminokwasów. Po osadzeniu na przetworniku drugorzędowym peptydy przypuszczalnie występują w formie nieuporządkowanej [88]. W poprzednich pracach [42,46] wykazano, że peptyd osadzony na powierzchni czuJNIKA, po interakcji z ligandem przyjmuje odpowiednią strukturę zwijając się np. w alfa-helisę. Umożliwia to wiązanie cząsteczki zapachowej. Do przedstawienia ułożenia peptydu względem ligandu w przestrzeni wykonane zostały dokowania peptydu do wybranych związków zapachowych.

Wstępne symulacje dokowania ligandów do peptydu potwierdziły powinowactwo aldehydów do wygenerowanych komputerowo modeli. Oczekiwano potwierdzenia otrzymanych zależności metodami doświadczalnymi, poprzez konstrukcję bioczuJNIKÓW i pomiary względem rzeczywistych substancji zapachowych z wybranych grup związków. Symulacja komputerowa możliwych interakcji i powinowactwa ligandu do peptydu nie gwarantuje niestety, że podobne zależności występować będą podczas badań eksperymentalnych. Zważywszy na potencjalne różnice w wynikach modelowania molekularnego kolejnym etapem badań były pomiary rzeczywistych mieszanin wybranych gazów.

Synteza peptydów, konstrukcja bioczuJNIKÓW i charakterystyka podstawowych parametrów bioczuJNIKÓW przedstawione zostały w publikacji:

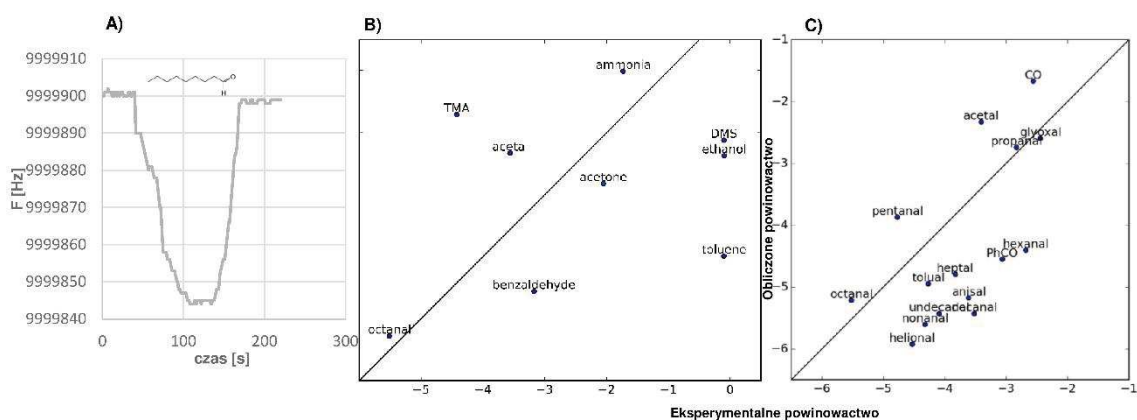
- Wasilewski, T.; Szulczyński, B.; Wojciechowski, M.; Kamysz, W.; Gębicki, J. A Highly Selective Biosensor Based on Peptide Directly Derived from the HarmOBP7 Aldehyde Binding Site. *Sensors* **2019**, *19*, 4284.

Oszacowanie czułości biosensorów na bazie OBPPs przeprowadzone zostało z wykorzystaniem gazów na różnych poziomach stężeń. Poprawność przygotowania mieszanin wzorcowych w workach typu Tedlar[®] sprawdzono z wykorzystaniem chromatografii gazowej sprzężonej z odpowiednimi detektorami (ECD, FID). Selektywność odpowiedzi bioczuJNIKA na związki zapachowe: aldehyd octowy, aldehyd benzoesowy, oktanal, etanol, aceton, siarczek dimetylu, trimetyloamina, toluen, zarejestrowano z wykorzystaniem skonstruowanego systemu dozowania frakcji lotnych opartego na systemie pomp niskociśnieniowych

Dodatkowo, określono specyficzność bioczuJNIKA względem związków z grupy aldehydów. Przetestowano odpowiedź bioczuJNIKA względem 15 substancji gazowych: aldehydów alifatycznych – formaldehyd, aldehyd octowy, propanal, pentanal, heksanal, heptanal, oktanal, nonanal, dekanal, undekanal; dialdehydów – glioksal; aldehydów aromatycznych – aldehyd benzoesowy, aldehyd 4-metylobenzoesowy, aldehyd 4-metoksybenzoesowy (aldehyd anyżowy), 2-metylo-3-(3,4)-metylenodioksyfenylopropanal (helional). Wyniki badań przedstawione zostały w pracy:

- Wasilewski, T.; Szulczyński, B.; Wojciechowski, M.; Kamysz, W.; Gębicki, J. Determination of Long-Chain Aldehydes Using a Novel Quartz Crystal Microbalance Sensor Based on a Biomimetic Peptide. *Microchem. J.* **2019**.

Na Rysunku 6A przedstawiono przykładową odpowiedź bioczuJNIKA na jeden z aldehydów długołańcuchowych (nonanal) i korelację wyników obliczeniowych z eksperymentalnymi (Rysunek 6B i 6C).



Rysunek 6. A) Odpowiedź bioczuJNIKA OBPP4 w stosunku do nonanal w stężeniu 14 ppm w fazie gazowej. Korelacja wyników obliczeniowych i eksperymentalnych powinowactwa bioczuJNIKA OBPP4 w stosunku do substancji: B) z różnych klas związków zapachowych, C) aldehydów [79,86].

Opracowana technika osadzania peptydów na powierzchni złotej elektrody QCM umożliwiła powtarzalną konstrukcję bioczuJNIków. Przeprowadzono pomiary odpowiedzi względem wybranych gazów i przetworzono wygenerowane sygnały warstwy receptorowej na sygnały użyteczne analitycznie. Imobilizacja peptydu na przetworniku drugorzędowym i testy wobec przygotowanych mieszanin gazowych umożliwiły korelację i weryfikację wyników *in silico*. Zaprojektowany *in silico* model peptydu – OBPP4 umożliwił selektywną detekcję wybranych związków. Osadzenie peptydu na prostym przetworniku piezoelektrycznym umożliwiło oszacowanie podstawowych parametrów skonstruowanych bioczuJNIków i wytypowanie bioczuJNIKA z elementem aktywnym OBPP4 jako najodpowiedniejszego do analizy aldehydów powyżej pięciu atomów węgla w łańcuchu.

Podstawowe parametry bioczuJNIKA OBPP4 w stosunku do docelowej grupy związków zaprezentowano w Tabeli 1.

Tabela 1. Porównanie podstawowych parametrów otrzymanych eksperymentalnie i wyniku dokowania molekularnego względem aldehydów [79].

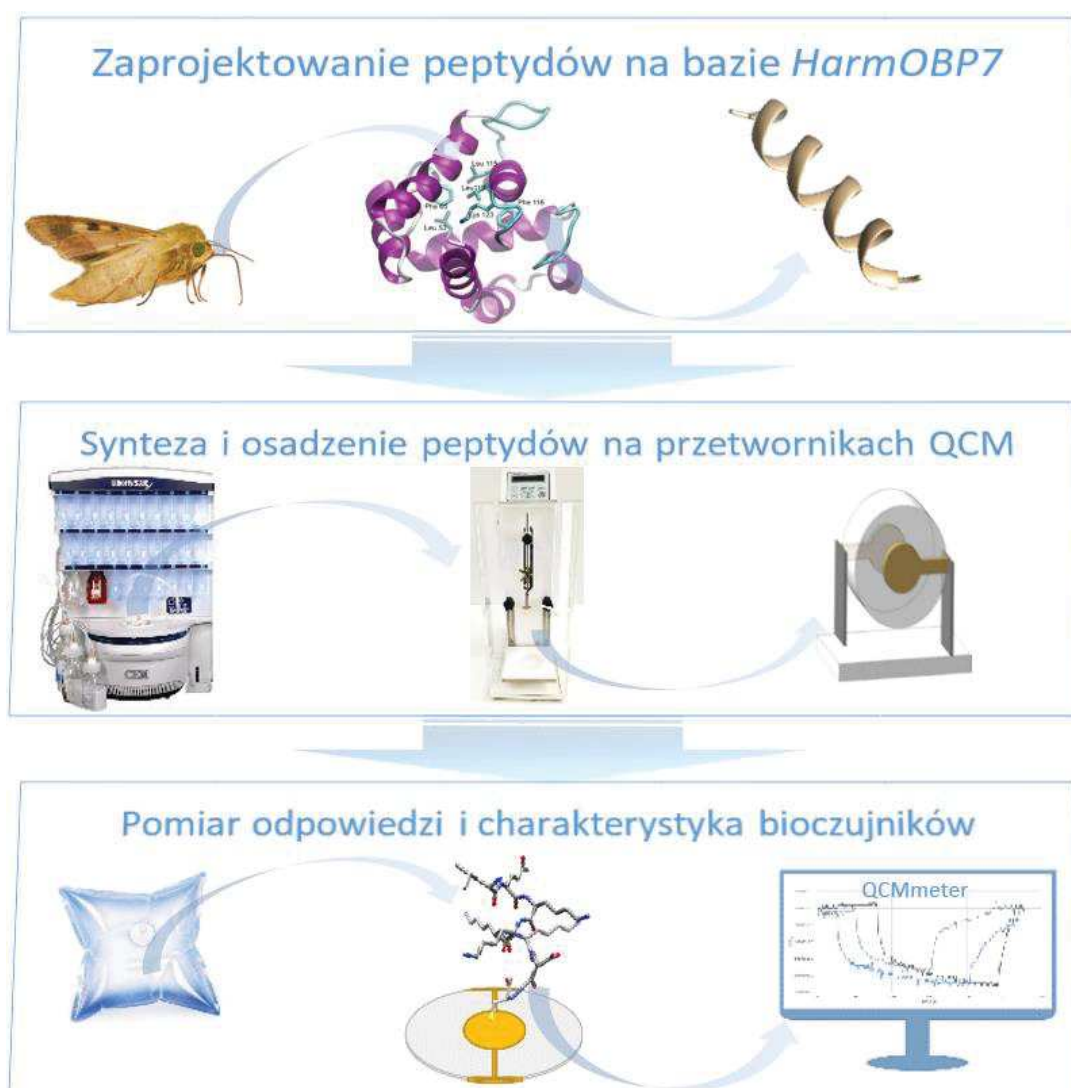
Związek	Powinowactwo [kcal/mol]	Czułość [Hz/ppm]	R ²	LOD [ppm]
Formaldehyd	-1,67	0,01	0,94	965
Acetaldehyd	-2,33	0,03	0,99	327
Glioksal	-2,60	0,01	0,92	> 1500
Propanal	-2,74	0,02	0,94	1032
Pentanal	-3,87	0,18	0,98	343
Heksanal	-4,41	0,03	0,99	186
Heptanal	-4,80	0,07	0,99	202
Oktanal	-5,22	0,70	0,99	114
Nonanal	-5,61	1,29	0,98	14
Dekanal	-5,50	0,07	0,99	144
Undekanal	-5,43	0,11	0,97	213
Benzaldehyd	-4,55	0,02	0,95	454
p-Toludehyd	-4,95	0,10	0,99	265
p-Anisaldehyd	-5,18	0,05	0,99	267
Helional	-5,93	0,77	0,99	69

Testowany bioczujnik wykazał selektywną odpowiedź na związki z grupy aldehydów średnio- i długołańcuchowych (oktanal, dekanal, undekanal, nonanal, helional). Najniższą granicę wykrywalności (LOD) zarejestrowano dla nonanal (14 ppm, Rysunek 6A) i niską czułość w stosunku do związków spoza grupy aldehydów (Rozdział 3.4). Wyniki symulacji *in silico* wiązania przykładowych związków lotnych z modelami proponowanych bioczujników dobrze korelują z wynikami rzeczywistych eksperymentów, co umożliwi w przyszłości wstępną selekcję peptydów odpowiednich jako potencjalne warstwy receptorowe bioczujników, wykazujące powinowactwo do określonej grupy związków chemicznych. W załączonych publikacjach przedstawione zostały również pozostałe parametry, m.in. stabilność, powtarzalność, czas odpowiedzi, czas życia, wpływ wilgotności na odpowiedzi bioczujnika. Porównano skonstruowany bioczujnik z modelami opracowanymi przez inne zespoły badawcze, gdzie granica oznaczalności wyznaczona została na podobnym poziomie stężeń (1 - 80 ppm) [89] i przedstawiono możliwości wykorzystania analogicznego bioczujnika w analizie aldehydów jako składników kompozycji zapachowej ciała [90].

3. PODSUMOWANIE

Celem prowadzonych w ramach rozprawy doktorskiej badań podstawowych było określenie występowania powinowactwa między częścią receptorową (wyselekcjonowane peptydy) a ligandami (lotne substancje zapachowe). Konstrukcja bioczuJNIKÓW zapachu, gdzie elementem aktywnym są syntetyczne peptydy, umożliwiła weryfikację modelu *in silico* określającego stopień powinowactwa zaprojektowanych peptydów względem gazów wzorcowych. Rezultatem opracowania techniki osadzania peptydów na powierzchni czujników piezoelektrycznych była konstrukcja bioczuJNIKÓW z warstwą receptorową charakteryzującą się wysoką stabilnością i powtarzalnością.

Główne etapy pracy doktorskiej przedstawione zostały na Rysunku 7.



Rysunek 7. Schematyczne przedstawienie etapów pracy składających się na zaprojektowanie części receptorowej, konstrukcję bioczuJNIKÓW i charakterystykę parametrów metrologicznych.

Na podstawie dostępnych baz danych i metod obliczeniowych zaprojektowano a następnie zsyntezowano peptydy potencjalnie specyficzne wobec wybranej grupy związków (aldehydy średnio- i długołańcuchowe), które należą m.in. do wskaźników stopnia degradacji olejów. Określenie długości i sekwencji łańcucha peptydu umożliwiło konstrukcję bioczuJNIKA o określonych parametrach metrologicznych, specyficznego wobec aldehydów długołańcuchowych. Przedstawienie występowania powinowactwa między odorantami a peptydami odwzorowującymi miejsca aktywne białek wiążących odoranty zrealizowano metodami obliczeniowymi modelowania molekularnego. Wyniki badań *in silico*, powinowactwa ligandu do peptydu nie gwarantowały jednak, że podobne zależności występować będą w odniesieniu do warunków rzeczywistych. Ze względu na potencjalne różnice w wynikach modelowania molekularnego względem modelu doświadczalnego kolejnym etapem badań były pomiary gazowych mieszanin wzorcowych wybranych związków i określenie podstawowych parametrów skonstruowanych bioczuJNIKÓW. Planowany jest etap badań ukierunkowany na poprawę parametrów bioczuJNIKA poprzez modyfikacje zarówno części receptorowej, jak i przetwornika drugorzędowego. Zastosowanie elementów stabilizujących strukturę peptydu (łączniki, mostki disulfidowe), zmiana przetwornika (FET) i/lub jego modyfikacja (nanocząstki ZnO, Au, *etc.*), powinny umożliwić dodatkową poprawę parametrów bioczuJNIKA. Dodatkowo, w fazie projektu są etapy budowy oraz kalibracji urządzenia złożonego z matrycy bioczuJNIKÓW.

Interdyscyplinarność założonych badań zaowocowała współpracą z lokalnymi i zagranicznymi jednostkami badawczymi. Etapy obliczeniowe modelowania molekularnego realizowano dzięki współpracy z Katedrą Technologii Leków i Biochemii Politechniki Gdańskiej (dr hab. inż. Marek Wojciechowski, prof. PG). Charakterystykę filmów warstw receptorowych osadzonych na przetwornikach QCM wykonywano z wykorzystaniem mikroskopu AFM w Katedrze Elektrochemii, Korozji i Inżynierii Materiałowej Politechniki Gdańskiej (dr hab. inż. Artur Zieliński, prof. PG). Generowanie mieszanin wzorcowych i pomiary odpowiedzi bioczuJNIKÓW wykonywano we współpracy z Katedrą Inżynierii Procesowej i Technologii Chemicznej Politechniki Gdańskiej (dr hab. inż. Jacek Gębicki, prof. PG). Dalszy rozwój bioczuJNIKÓW realizowany jest we współpracy z Uniwersytetem Tor Vergata w Rzymie, Sensors Group: Department of Electronic Engineering; Department of Chemical Science and Technology (prof. Corrado Di Natale).

4. WNIOSKI

Przedstawione studium literaturowe (publikacje: 7.1. i 7.2.) stworzyło możliwość zdefiniowania krytycznych aspektów w rozwoju bioczujników zapachu (rozdziały: 2.1., 2.2.) i nakreślenia planu badań wraz z optymalnym sposobem realizacji. W trakcie realizacji poszczególnych zadań, które wynikają z planu badawczego rozprawy doktorskiej, podjęto próbę konstrukcji bioczujników selektywnych wobec aldehydów. Rezultatem optymalizacji parametrów procesu osadzania peptydów i porównania trzech technik osadzania warstwy receptorowej na przetworniku drugorzędowym jest opracowana, powtarzalna technika immobilizacji, powlekania zanurzeniowego w komorze wypełnionej gazem obojętnym. Realizację tego zadania badawczego przedstawiono w rozdziale 2.3. i publikacjach 7.3. i 7.4. Aby uzyskać odpowiednie parametry bioczujnika, w tym selektywność wobec aldehydów, konieczne było opracowanie modelowego elementu receptorowego. Za pomocą odpowiednich baz danych oraz programów do modelowania molekularnego wyselekcjonowano białko selektywne wobec aldehydów i przełożono tę selektywność na zaprojektowane peptydy. Wyniki symulacji modeli *in silico* pozwoliły na określenie sekwencji peptydów potencjalnie selektywnych wobec aldehydów średnio- i długołańcuchowych. Realizacja tego zadania badawczego przedstawiona została w rozdziale 2.4. i publikacji 7.4. W celu weryfikacji wyników modelowania molekularnego kolejnym etapem badań były pomiary rzeczywistych mieszanin gazowych wybranych związków lotnych. Dzięki konstrukcji bioczujników i testom wobec przygotowanych mieszanin gazowych oszacowano podstawowe parametry metrologiczne bioczujników i zweryfikowano modele obliczeniowe. Odnosząc się do wysokiego stopnia korelacji prawdopodobnie możliwe będzie mniej skomplikowane określanie sekwencji peptydów, selektywnych względem wybranych grup związków. Konstrukcja bioczujników z wykorzystaniem opracowanej techniki immobilizacji umożliwiła wytypowanie bioczujnika z elementem aktywnym OBPP4, wykazującego wysoką selektywność wobec aldehydów średnio- i długołańcuchowych, m.in. nonanal. Realizację tego zadania badawczego przedstawiono w rozdziale 2.5. i publikacjach 7.4. i 7.5. Połączenie badań eksperymentalnych z modelowaniem komputerowym umożliwiło opracowanie podstaw metody do tworzenia modeli naturalnych receptorów dla zróżnicowanych ligandów.

Realizacja założonych badań umożliwiła uzyskanie wyników, które stanowią podstawę rozprawy doktorskiej. Za najważniejsze osiągnięcia naukowe niniejszej dysertacji uważam:

- Zaprojektowanie peptydów odwzorowujących miejsce wiązania aldehydów w białku HarmOBP7 z wykorzystaniem technik obliczeniowych i symulacje dokowań ligandów względem receptora;
- Opracowanie optymalnej techniki immobilizacji peptydów na powierzchni przetwornika drugorzędowego oraz charakterystyka osadzonych warstw;
- Określenie podstawowych parametrów metrologicznych skonstruowanych bioczujników, tj. czułość, selektywność, LOD;
- Eksperymentalną weryfikację modeli obliczeniowych;
- Konstrukcję bioczujnika selektywnego względem aldehydów średnio- i długołańcuchowych.

Rezultatem zoptymalizowania techniki immobilizacji jest efektywne osadzanie warstw receptorowych na złotych powierzchniach przetworników piezoelektrycznych. Technika powlekania zanurzeniowego w zamkniętej komorze nasyconej gazem umożliwi powtarzalną konstrukcję i rozwój bioczujników, co realizowane jest w dalszych etapach badań zawartych w otrzymanym grancie Preludium. Wykorzystanie peptydów stanowiących fragmenty właściwego białka receptorowego pozwoliło na uzyskanie modelu naśladującego naturalny receptor. Skorelowane wyniki teoretyczne i doświadczalne potwierdziły wysoką selektywność skonstruowanego bioczujnika względem średnio- i długołańcuchowych aldehydów alifatycznych. Wyniki badań oraz kluczowe osiągnięcia potwierdzają możliwość projektowania warstw receptorowych przy użyciu przedstawionych metod obliczeniowych oraz konstrukcję bioczujników selektywnych względem wybranych grup związków. Prognozowany jest dalszy rozwój bioczujników i systemów bioczujnikowych w celu implementacji do analizy próbek rzeczywistych.

5. LITERATURA

1. Wang, P.; Liu, Q. *Bioinspired Smell and Taste Sensors*; Wang, P., Liu, Q., Wu, C., Hsia, K. J., Eds.; Springer Netherlands: Dordrecht, 2015; ISBN 978-94-017-7332-4.
2. Wasilewski, T.; Kamysz, W.; Gębicki, J. Bioelectronic tongue: Current status and perspectives. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, doi:10.1016/j.bios.2019.111923.
3. McGann, J. P. Poor human olfaction is a 19th-century myth. *Science (80-.).* **2017**, *356*, doi:10.1126/science.aam7263.
4. Bushdid, C.; Magnasco, M. O.; Vosshall, L. B.; Keller, A.; Keller, A.; Freeman, J.; Simoncelli, E.; Gilbert, A.; Grebe, T.; Stock, J.; Malnic, B.; Godfrey, P.; Buck, L.; Masaoka, K.; Berns, R.; Fairchild, M.; Abed, F. M.; Mollon, J.; Secundo, L.; Snitz, K.; Sobel, N.; Spors, H.; Albeanu, D.; Murthy, V.; Rinberg, D.; Uchida, N.; Wachowiak, M.; Friedrich, R.; Wandell, B.; Weiss, T.; Snitz, K.; Yablonka, A.; Khan, R.; Gafsou, D.; Schneidman, E.; Sobel, N.; Zimmerman, A.; Bai, L.; Ginty, D. Humans Can Discriminate More than 1 Trillion Olfactory Stimuli. *Science (80-.).* **2014**, *343*, 1370–1372, doi:10.1126/science.1249168.
5. Nei, M.; Niimura, Y.; Nozawa, M. The evolution of animal chemosensory receptor gene repertoires: roles of chance and necessity. *Nat. Rev. Genet.* **2008**, *9*, 951–963, doi:10.1038/nrg2480.
6. Prieto-Godino, L. L.; Rytz, R.; Bargeton, B.; Abuin, L.; Arguello, J. R.; Peraro, M. D.; Benton, R. Olfactory receptor pseudo-pseudogenes. *Nature* **2016**, *539*, 93–97, doi:10.1038/nature19824.
7. Son, M.; Park, T. H. The bioelectronic nose and tongue using olfactory and taste receptors: Analytical tools for food quality and safety assessment. *Biotechnol. Adv.* **2018**, *36*, 371–379, doi:10.1016/j.biotechadv.2017.12.017.
8. Stockhorst, U.; Pietrowsky, R. Olfactory perception, communication, and the nose-to-brain pathway. *Physiol. Behav.* 2004, *83*, 3–11.
9. Pinto, J. M. Olfaction. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2011**, *8*, 46–52, doi:10.1513/pats.201005-035RN.
10. Malik, B.; Elkaddi, N.; Turkistani, J.; Spielman, A. I.; Ozdener, M. H. Mammalian Taste Cells Express Functional Olfactory Receptors. *Chem. Senses* **2019**, *44*, 289–301, doi:10.1093/chemse/bjz019.
11. Ward, R. J.; Milligan, G. Analysis of Function of Receptor–G-Protein and Receptor–RGS Fusion Proteins. In *Receptor Signal Transduction Protocols*; Humana Press: New Jersey; Vol. 259, pp. 225–248.
12. Zou, Z.; Li, F.; Buck, L. B. Odor maps in the olfactory cortex. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **2010**, *107*, 17451, doi:10.1073/pnas.1000897107.
13. Dougherty, D. P.; Wright, G. A.; Yew, A. C. Computational model of the cAMP-mediated sensory response and calcium-dependent adaptation in vertebrate olfactory receptor neurons. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2005**, *102*, 10415–20, doi:10.1073/pnas.0504099102.
14. Kurahashi, T.; Yau, K. W. Co-existence of cationic and chloride components in odorant-induced current of vertebrate olfactory receptor cells. *Nature* **1993**, *363*, 71–4, doi:10.1038/363071a0.
15. Matthews, H. R.; Reisert, J. Calcium, the two-faced messenger of olfactory transduction

- and adaptation. *Curr. Opin. Neurobiol.* **2003**, *13*, 469–475, doi:10.1016/S0959-4388(03)00097-7.
16. Buck, L. B. Unraveling the sense of smell (Nobel lecture). *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **2005**, *44*, 6128–6140, doi:10.1002/anie.200501120.
 17. Buck, L. B. The search for odorant receptors. *Cell* **2004**, *116*, S117–S120, doi:10.1016/S0092-8674(04)00051-0.
 18. Zhang, X.; De la Cruz, O.; Pinto, J. M.; Nicolae, D.; Firestein, S.; Gilad, Y. Characterizing the expression of the human olfactory receptor gene family using a novel DNA microarray. *Genome Biol.* **2007**, *8*, R86, doi:10.1186/gb-2007-8-5-r86.
 19. Takeuchi, H.; Sakano, H. Neural map formation in the mouse olfactory system. *Cell. Mol. Life Sci.* **2014**, *71*, 3049–3057.
 20. Kissinger, P. T. Biosensors - A perspective. *Biosens. Bioelectron.* **2005**, *20*, 2512–2516.
 21. Dong, S.; Chen, X. Some new aspects in biosensors. *Rev. Mol. Biotechnol.* **2002**, *82*, 303–323.
 22. Wasilewski, T.; Gębicki, J.; Kamysz, W. Advances in olfaction-inspired biomaterials applied to bioelectronic noses. *Sensors Actuators B Chem.* **2018**, *257*, 511–537, doi:10.1016/j.snb.2017.10.086.
 23. Moldoveanu, S.; David, V. Modern Sample Preparation for Chromatography. In *Modern Sample Preparation for Chromatography*; Elsevier, 2015; pp. 131–189 ISBN 9780444543196.
 24. Cajka, T. Gas chromatography-time-of-flight mass spectrometry in food and environmental analysis. *Compr. Anal. Chem.* **2013**, *61*, doi:10.1016/B978-0-444-62623-3.00012-5.
 25. Brattoli, M.; de Gennaro, G.; de Pinto, V.; Loiotile, A. D.; Lovascio, S.; Penza, M. Odour detection methods: Olfactometry and chemical sensors. *Sensors* **2011**, *11*, 5290–5322, doi:10.3390/s110505290.
 26. Zhang, X.; Cheng, J.; Wu, L.; Mei, Y.; Jaffrezic-Renault, N.; Guo, Z. An overview of an artificial nose system. *Talanta* **2018**, *184*, 93–102, doi:10.1016/j.talanta.2018.02.113.
 27. Wasilewski, T.; Gębicki, J.; Kamysz, W.; Jacek, G.; Kamysz, W. Bioelectronic nose: Current status and perspectives. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *87*, 480–494, doi:10.1016/j.bios.2016.08.080.
 28. Hu, W.; Wan, L.; Jian, Y.; Ren, C.; Jin, K.; Su, X.; Bai, X.; Haick, H.; Yao, M.; Wu, W. Electronic Noses: From Advanced Materials to Sensors Aided with Data Processing. *Adv. Mater. Technol.* **2019**, *4*, 1–38.
 29. Valle, M. Bioinspired sensor systems. *Sensors* **2011**, *11*, 10180–10186, doi:10.3390/s111110180.
 30. Sung, J. H.; Ko, H. J.; Park, T. H. Piezoelectric biosensor using olfactory receptor protein expressed in Escherichia coli. *Biosens. Bioelectron.* **2006**, *21*, 1981–6, doi:10.1016/j.bios.2005.10.002.
 31. Di Pietrantonio, F.; Benetti, M.; Cannatà, D.; Verona, E.; Palla-Papavlu, A.; Fernández-Pradas, J. M.; Serra, P.; Staiano, M.; Varriale, A.; D’Auria, S. A surface acoustic wave bio-electronic nose for detection of volatile odorant molecules. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *67*, 516–523, doi:10.1016/j.bios.2014.09.027.

32. Schott, M.; Wehrenfennig, C.; Gasch, T.; Vilcinskas, A. Insect antenna-based biosensors for in situ detection of volatiles. In *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*; 2013; Vol. 136, pp. 101–122 ISBN 0724-6145 (Print)r0724-6145 (Linking).
33. Gao, K.; Li, S.; Zhuang, L.; Qin, Z.; Zhang, B.; Huang, L.; Wang, P. In vivo bioelectronic nose using transgenic mice for specific odor detection. *Biosens. Bioelectron.* **2018**, *102*, 150–156, doi:10.1016/j.bios.2017.08.055.
34. Son, M.; Lee, J. Y.; Ko, H. J.; Park, T. H. Bioelectronic Nose : An Emerging Tool for Odor Standardization. *Trends Biotechnol.* **2017**, *35*, 301–307, doi:10.1016/j.tibtech.2016.12.007.
35. Son, M.; Cho, D. G.; Lim, J. H.; Park, J.; Hong, S.; Ko, H. J.; Park, T. H. Real-time monitoring of geosmin and 2-methylisoborneol, representative odor compounds in water pollution using bioelectronic nose with human-like performance. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *74*, 199–206, doi:10.1016/j.bios.2015.06.053.
36. Lim, J. H.; Park, J.; Ahn, J. H.; Jin, H. J.; Hong, S.; Park, T. H. A peptide receptor-based bioelectronic nose for the real-time determination of seafood quality. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *39*, 244–249, doi:10.1016/j.bios.2012.07.054.
37. Ahn, J. H.; Lim, J. H.; Park, J.; Oh, E. H.; Son, M.; Hong, S.; Park, T. H.; Ho, J.; Hyun, J.; Park, J.; Hae, E.; Son, M.; Hong, S.; Hyun, T. Screening of target-specific olfactory receptor and development of olfactory biosensor for the assessment of fungal contamination in grain. *Sensors Actuators, B Chem.* **2015**, *210*, 9–16, doi:10.1016/j.snb.2014.12.060.
38. Lee, S. H.; Lim, J. H.; Park, J.; Hong, S.; Park, T. H. Bioelectronic nose combined with a microfluidic system for the detection of gaseous trimethylamine. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *71*, 179–185, doi:10.1016/j.bios.2015.04.033.
39. Sankaran, S.; Khot, L. R.; Panigrahi, S. Biology and applications of olfactory sensing system: A review. *Sensors Actuators, B Chem.* **2012**, *171–172*, 1–17, doi:10.1016/j.snb.2012.03.029.
40. Mascini, M.; Del Carlo, M.; Compagnone, D.; Cozzani, I.; Tiscar, P. G.; Mpamhanga, C. P.; Chen, B. Piezoelectric sensors based on biomimetic peptides for the detection of Heat Shock Proteins (HSPs) in mussels. In *Analytical Letters*; 2006; Vol. 39, pp. 1627–1642.
41. Compagnone, D.; Fusella, G. C.; Del Carlo, M.; Pittia, P.; Martinelli, E.; Tortora, L.; Paolesse, R.; Di Natale, C. Gold nanoparticles-peptide based gas sensor arrays for the detection of food aromas. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *42*, 618–625, doi:10.1016/j.bios.2012.10.096.
42. Son, M.; Kim, D.; Kang, J.; Lim, J. H.; Lee, S. H.; Ko, H. J.; Hong, S.; Park, T. H. Bioelectronic Nose Using Odorant Binding Protein-Derived Peptide and Carbon Nanotube Field-Effect Transistor for the Assessment of Salmonella Contamination in Food. *Anal. Chem.* **2016**, *88*, 11283–11287, doi:10.1021/acs.analchem.6b03284.
43. Barbosa, A. J. M.; Oliveira, A. R.; Roque, A. C. A. Protein- and Peptide-Based Biosensors in Artificial Olfaction. *Trends Biotechnol.* **2018**, *36*, 1244–1258, doi:10.1016/j.tibtech.2018.07.004.
44. Kwon, O. S.; Song, H. S.; Park, T. H.; Jang, J. Conducting Nanomaterial Sensor Using Natural Receptors. *Chem. Rev.* **2019**, *119*, 36–93, doi:10.1021/acs.chemrev.8b00159.
45. Brito, N. F.; Moreira, M. F.; Melo, A. C. A. A look inside odorant-binding proteins in insect chemoreception. *J. Insect Physiol.* **2016**, *95*, 51–65, doi:10.1016/j.jinsphys.2016.09.008.

46. Sankaran, S.; Panigrahi, S.; Mallik, S. Odorant binding protein based biomimetic sensors for detection of alcohols associated with Salmonella contamination in packaged beef. *Biosens. Bioelectron.* **2011**, *26*, 3103–3109, doi:10.1016/j.bios.2010.07.122.
47. Mitsuno, H.; Sakurai, T.; Namiki, S.; Mitsuhashi, H.; Kanzaki, R. Novel cell-based odorant sensor elements based on insect odorant receptors. *Biosens. Bioelectron.* **2015**, *65*, 287–294, doi:10.1016/j.bios.2014.10.026.
48. Fernández-Grandon, G. M.; Girling, R. D.; Poppy, G. M. Utilizing insect behavior in chemical detection by a behavioral biosensor. *J. Plant Interact.* **2011**, *6*, 109–112, doi:10.1080/17429145.2010.544778.
49. Carey, A. F.; Carlson, J. R. Insect olfaction from model systems to disease control. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2011**, *108*, 12987–95, doi:10.1073/pnas.1103472108.
50. Wehrenfennig, C.; Schott, M.; Gasch, T.; Düring, R. A.; Vilcinskas, A.; Kohl, C. D. On-site airborne pheromone sensing. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 6389–6403.
51. Lim, J. H.; Park, J.; Oh, E. H.; Ko, H. J.; Hong, S.; Park, T. H. Nanovesicle-Based Bioelectronic Nose for the Diagnosis of Lung Cancer from Human Blood. *Adv. Healthc. Mater.* **2014**, *3*, 360–366, doi:10.1002/adhm.201300174.
52. Jang, J. Ultrasensitive Flexible Graphene Based Field-Effect Transistor (FET)- Type Bioelectronic Nose. *Nano Lett.* **2012**, *12*, 5082–5090, doi:dx.doi.org/10.1021/nl301714x.
53. Fan, J.; Francis, F.; Liu, Y.; Chen, J. L.; Cheng, D. F. An overview of odorant-binding protein functions in insect peripheral olfactory reception. *Genet. Mol. Res.* **2011**, *10*, 3056–3069.
54. Pelosi, P. The role of perireceptor events in vertebrate olfaction. *Cell. Mol. Life Sci.* **2001**, *58*, 503–509, doi:10.1007/PL00000875.
55. Malhotra, B. D.; Singhal, R.; Chaubey, A.; Sharma, S. K.; Kumar, A. Recent trends in biosensors. *Curr. Appl. Phys.* **2005**, *5*, 92–97, doi:10.1016/j.cap.2004.06.021.
56. Du, L.; Wu, C.; Liu, Q.; Huang, L.; Wang, P. Recent advances in olfactory receptor-based biosensors. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *42*, 570–580, doi:10.1016/j.bios.2012.09.001.
57. Pelosi, P.; Zhu, J.; Knoll, W. Odorant-Binding Proteins as Sensing Elements for Odour Monitoring. *Sensors* **2018**, *18*, 3248, doi:10.3390/s18103248.
58. Pelosi, P.; Zhou, J. J.; Ban, L. P.; Calvello, M. Soluble proteins in insect chemical communication. *Cell. Mol. Life Sci.* **2006**, *63*, 1658–1676, doi:10.1007/s00018-005-5607-0.
59. Di Pietrantonio, F.; Cannatà, D.; Benetti, M.; Verona, E.; Varriale, A.; Staiano, M.; D’Auria, S.; Auria, S. D.; Pietrantonio, F. Di; Cannat, D.; Di Pietrantonio, F.; Cannatà, D.; Benetti, M.; Verona, E.; Varriale, A.; Staiano, M.; D’Auria, S. Detection of odorant molecules via surface acoustic wave biosensor array based on odorant-binding proteins. *Biosens. Bioelectron.* **2013**, *41*, 328–334, doi:10.1016/j.bios.2012.08.046.
60. Persaud, K. C. Biomimetic Olfactory Sensors. **2013**, *12*, 3108–3112.
61. Khadka, R.; Aydemir, N.; Carraher, C.; Hamiaux, C.; Colbert, D. An ultrasensitive electrochemical impedance-based biosensor using insect odorant receptors to detect odorants. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *126*, 207–213, doi:10.1016/j.bios.2018.10.043.
62. Hurot, C.; Brenet, S.; Buhot, A.; Barou, E.; Belloir, C.; Briand, L. Highly sensitive olfactory biosensors for the detection of volatile organic compounds by surface plasmon

- resonance imaging. *Biosens. Bioelectron.* **2019**, *123*, 230–236, doi:10.1016/j.bios.2018.08.072.
63. Kotlowski, C.; Larisika, M.; Guerin, P. M.; Kleber, C.; Kröber, T.; Mastrogiacomo, R.; Nowak, C.; Pelosi, P.; Schütz, S.; Schwaighofer, A.; Knoll, W. Chemical Fine discrimination of volatile compounds by graphene-immobilized odorant-binding proteins. *Sensors Actuators B. Chem.* **2018**, *256*, 564–572, doi:10.1016/j.snb.2017.10.093.
 64. Boyle, S. M.; McNally, S.; Ray, A. Expanding the olfactory code by in silico decoding of odor-receptor chemical space. *Elife* **2013**, doi:10.7554/eLife.01120.001.
 65. Dimitratos, S. D.; Hommel, A. S.; Konrad, K. D.; Simpson, L. M.; Wu-woods, J. J.; Woods, D. F. Biosensors to Monitor Water Quality Utilizing Insect Odorant-Binding Proteins as Detector Elements. **2019**, 1–15.
 66. Tuccori, E.; Persaud, K. C. Pheromone Detection Using Odorant Binding Protein Sensors. In *2019 IEEE International Symposium on Olfaction and Electronic Nose (ISOEN)*; IEEE, 2019; pp. 1–3.
 67. Wu, T.; Lo, Y. Synthetic peptide mimicking of binding sites on olfactory receptor protein for use in ‘ electronic nose .’ *J. Biotechnol.* **2000**, *80*, 63–73, doi:10.1016/S0168-1656(00)00228-5.
 68. Man, O.; Gilad, Y.; Lancet, D. Prediction of the odorant binding site of olfactory receptor proteins by human-mouse comparisons. *Protein Sci.* **2004**, *13*, 240–54, doi:10.1110/ps.03296404.
 69. Kodadek, T. Development of protein-detecting microarrays and related devices. *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 295–300.
 70. Farrar, D.; West, J. E.; Busch-Vishniac, I. J.; Yu, S. M. Fabrication of polypeptide-based piezoelectric composite polymer film. *Scr. Mater.* **2008**, *59*, 1051–1054, doi:10.1016/j.scriptamat.2008.07.022.
 71. Lu, H. H.; Rao, Y. K.; Wu, T. Z.; Tzeng, Y. M. Direct characterization and quantification of volatile organic compounds by piezoelectric module chips sensor. *Sensors Actuators, B Chem.* **2009**, *137*, 741–746, doi:10.1016/j.snb.2009.01.060.
 72. Fuchs, P.; Loeseken, C.; Schubert, J. K.; Miekisch, W. Breath gas aldehydes as biomarkers of lung cancer. *Int. J. Cancer* **2010**, *126*, 2663–2670, doi:10.1002/ijc.24970.
 73. Sánchez, C.; Santos, J.; Lozano, J. Use of Electronic Noses for Diagnosis of Digestive and Respiratory Diseases through the Breath. *Biosensors* **2019**, *9*, 35, doi:10.3390/bios9010035.
 74. Manevski, N.; Balavenkatraman, K. K.; Bertschi, B.; Swart, P.; Walles, M.; Camenisch, G.; Schiller, H.; Kretz, O.; Ling, B.; Wettstein, R.; Schaefer, D. J.; Pognan, F.; Wolf, A.; Litherland, K. Aldehyde Oxidase Activity in Fresh Human Skin. *Drug Metab. Dispos.* **2014**, *42*, 2049–2057, doi:10.1124/dmd.114.060368.
 75. ben Hammouda, I.; Freitas, F.; Ammar, S.; Da Silva, M. D. R. G.; Bouaziz, M. Comparison and characterization of volatile compounds as markers of oils stability during frying by HS–SPME–GC/MS and Chemometric analysis. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2017**, doi:10.1016/j.jchromb.2017.10.063.
 76. Choe, E.; Min, D. B. Mechanisms and factors for edible oil oxidation. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* **2006**.

77. Cao, J.; Deng, L.; Zhu, X.-M.; Fan, Y.; Hu, J.-N.; Li, J.; Deng, Z.-Y. Novel Approach To Evaluate the Oxidation State of Vegetable Oils Using Characteristic Oxidation Indicators. *J. Agric. Food Chem.* **2014**, *62*, 12545–12552, doi:10.1021/jf5047656.
78. Philpott, C. M.; Bennett, a; Murty, G. E. A brief history of olfaction and olfactometry. *J. Laryngol. Otol.* **2008**, *122*, 657–62, doi:10.1017/S0022215107001314.
79. Wasilewski, T.; Szulczyński, B.; Wojciechowski, M.; Kamysz, W.; Gębicki, J. Determination of Long-Chain Aldehydes Using a Novel Quartz Crystal Microbalance Sensor Based on a Biomimetic Peptide. *Microchem. J.* **2019**, 104509, doi:10.1016/j.microc.2019.104509.
80. Wasilewski, T.; Szulczyński, B.; Kamysz, W.; Gębicki, J.; Namieśnik, J. Evaluation of Three Peptide Immobilization Techniques on a QCM Surface Related to Acetaldehyde Responses in the Gas Phase. *Sensors* **2018**, *18*, 3942, doi:10.3390/s18113942.
81. Bianchi, F.; Flisi, S.; Careri, M.; Riboni, N.; Resimini, S.; Sala, A.; Conti, V.; Mattarozzi, M.; Taddei, S.; Spadini, C.; Basini, G.; Grolli, S.; Cabassi, C. S.; Ramoni, R. Vertebrate odorant binding proteins as antimicrobial humoral components of innate immunity for pathogenic microorganisms. *PLoS One* **2019**, *14*, e0213545, doi:10.1371/journal.pone.0213545.
82. Sun, J. S.; Xiao, S.; Carlson, J. R. The diverse small proteins called odorant-binding proteins. *Open Biol.* **2018**, *8*, 180208, doi:10.1098/rsob.180208.
83. Liu, Q.; Wang, J.; Boyd, B. J. Peptide-based biosensors. *Talanta* **2015**, *136*, 114–127, doi:10.1016/j.talanta.2014.12.020.
84. Sun, Y.-L.; Huang, L.-Q.; Pelosi, P.; Wang, C.-Z. A Lysine at the C-Terminus of an Odorant-Binding Protein is Involved in Binding Aldehyde Pheromone Components in Two *Helicoverpa* Species. *PLoS One* **2013**, *8*, e55132, doi:10.1371/journal.pone.0055132.
85. Li, Z.-Q.; Zhang, S.; Luo, J.-Y.; Cui, J.-J.; Ma, Y.; Dong, S.-L. Two Minus-C odorant binding proteins from *Helicoverpa armigera* display higher ligand binding affinity at acidic pH than neutral pH. *J. Insect Physiol.* **2013**, *59*, 263–272, doi:10.1016/j.jinsphys.2012.12.004.
86. Wasilewski, T.; Szulczyński, B.; Wojciechowski, M.; Kamysz, W.; Gębicki, J. A Highly Selective Biosensor Based on Peptide Directly Derived from the HarmOBP7 Aldehyde Binding Site. *Sensors* **2019**, *19*, 4284, doi:10.3390/s19194284.
87. Wojciechowski, M. Simplified AutoDock force field for hydrated binding sites. *J. Mol. Graph. Model.* **2017**, *78*, 74–80, doi:10.1016/j.jmkgm.2017.09.016.
88. Diociaiuti, M.; Gaudiano, M. C.; Malchiodi-Albedi, F. The slowly aggregating salmon Calcitonin: A useful tool for the study of the amyloid oligomers structure and activity. *Int. J. Mol. Sci.* **2011**, *12*, 9277–9295, doi:10.3390/ijms12129277.
89. Daneshkhah, A.; Vij, S.; Siegel, A. P.; Agarwal, M. Polyetherimide/carbon black composite sensors demonstrate selective detection of medium-chain aldehydes including nonanal. *Chem. Eng. J.* **2019**, 123104, doi:10.1016/j.cej.2019.123104.
90. Jha, S. K.; Hayashi, K. Polyacrylic acid polymer and aldehydes template molecule based MIPs coated QCM sensors for detection of pattern aldehydes in body odor. *Sensors Actuators B Chem.* **2015**, *206*, 471–487, doi:10.1016/j.snb.2014.09.102.

6. DOROBEK NAUKOWY

Publikacje z listy JCR:

1. Kupska, M.; Wasilewski, T.; Jędrkiewicz, R.; Gromadzka, J.; Namieśnik, J. Determination of Terpene Profiles in Potential Superfruits. *Int. J. Food Prop.* **2016**, *19*, 2726–2738,
(Impact Factor) IF: 1,427; (Punktacja) MNiSW: 70; Cytowania: 5.
2. Wasilewski, T.; Gębicki, J.; Kamysz, W. Prospects of ionic liquids application in electronic and bioelectronic nose instruments. *TrAC Trends Anal. Chem.* **2017**, *93*, 23–36,
IF: 7,030; MNiSW: 50; Cytowania: 14.
3. Kubica, P.; Vacchina, V.; Wasilewski, T.; Reynaud, S.; Szpunar, J.; Lobinski, R. Rapid ion-exchange matrix removal for a decrease of detection limits in the analysis of salt-rich reservoir waters for fluorobenzoic acids by liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.* **2017**, *409*, 871–879,
IF: 3,307; MNiSW: 70; Cytowania: 0.
4. Wasilewski, T.; Gębicki, J.; Kamysz, W.; Jacek, G.; Kamysz, W. Bioelectronic nose: Current status and perspectives. *Biosens. Bioelectron.* **2017**, *87*, 480–494,
IF: 8,173; MNiSW: 40; Cytowania: 46.
5. Szulczyński, B.; Wasilewski, T.; Wojnowski, W.; Majchrzak, T.; Dymerski, T.; Namieśnik, J.; Gębicki, J. Different Ways to Apply a Measurement Instrument of E-Nose Type to Evaluate Ambient Air Quality with Respect to Odour Nuisance in a Vicinity of Municipal Processing Plants. *Sensors* **2017**, *17*, 2671,
IF: 2,475; MNiSW: 30; Cytowania: 15.
6. Wasilewski, T.; Gębicki, J.; Kamysz, W. Advances in olfaction-inspired biomaterials applied to bioelectronic noses. *Sensors Actuators B Chem.* **2018**, *257*, 511–537,
IF: 6,393; MNiSW: 40; Cytowania: 20.

7. Wasilewski, T.; Szulczyński, B.; Kamysz, W.; Gębicki, J.; Namieśnik, J. Evaluation of Three Peptide Immobilization Techniques on a QCM Surface Related to Acetaldehyde Responses in the Gas Phase. *Sensors* **2018**, *18*, 3942, IF: 3,031; MNiSW: 30; Cytowania: 3.
8. Wasilewski, T.; Migoń, D.; Gębicki, J.; Kamysz, W. Critical review of electronic nose and tongue instruments prospects in pharmaceutical analysis. *Anal. Chim. Acta* **2019**, *1077*, 14–29, IF: 5,256; MNiSW: 100; Cytowania: 3.
9. Wasilewski, T.; Szulczyński, B.; Wojciechowski, M.; Kamysz, W.; Gębicki, J. A Highly Selective Biosensor Based on Peptide Directly Derived from the HarmOBP7 Aldehyde Binding Site. *Sensors* **2019**, *19*, 4284, IF: 3,031; MNiSW: 100; Cytowania: 1.
10. Wasilewski, T.; Szulczyński, B.; Wojciechowski, M.; Kamysz, W.; Gębicki, J. Determination of Long-Chain Aldehydes Using a Novel Quartz Crystal Microbalance Sensor Based on a Biomimetic Peptide. *Microchem. J.* **2019**, IF: 3,206; MNiSW: 70; Cytowania: 0.
11. Wasilewski, Kamysz, W.; Gębicki, J. Bioelectronic Tongue: Current Status and Perspectives. *Biosens. Bioelectron.* **2020**, IF: 9,518; MNiSW: 140; Cytowania: 0.

Rozdziały w książkach:

1. Wasilewski, T.; Chapter 10: Ionic liquids in gas sensors and biosensors; Ionic Liquids as Green Solvents; Green Sustainable Process for Chemical and Environmental Engineering and Science 1st Ed., Inamuddin, D.; Boddula R., Asiri A.M. (Eds.); Elsevier, Netherlands, AE Amsterdam, **2020**, pp. 462. ISBN:9780128195420.

∑ Impact Factor: 52,847* ∑ Cytowania: 110 Indeks Hirscha: 5****

* wg JCR z roku opublikowania prac, ** wg Scopus z dnia: 01.12.2019

Publikacje spoza listy JCR:

1. Wasilewski, T.; Kupska, M.; Namieśnik, J. Rozwój technik ekstrakcji z wykorzystaniem wirującego elementu sorpcyjnego. *Anal. Nauk. i Prakt.* **2014**, *2*, 10–15.
2. Wasilewski, T.; Kupska, M.; Jędrkiewicz, R.; Gromadzka, J.; Namieśnik, J. Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana ultradźwiękami, cz. I - Podstawy teoretyczne. *Anal. Nauk. i Prakt.* **2014**, *4*, 4–7.
3. Wasilewski, T.; Kupska, M.; Jędrkiewicz, R.; Gromadzka, J.; Namieśnik, J. Ekstrakcja za pomocą rozpuszczalnika wspomagana ultradźwiękami, cz. II – Zastosowania. *Anal. Nauk. i Prakt.* **2015**, *4*, 4–7.
4. Wasilewski, T.; Lewkowska, P.; Dymerski, T.; Namieśnik, J. Zastosowanie elektronicznego nosa w analizie zanieczyszczeń środowiska. *Anal. Nauk. i Prakt.* **2015**, *2*, 70–77.
5. Wasilewski, T. Nowoczesne narzędzia analizy zapachów - elektroniczny nos. *Laborant* **2017**, *3*, 4–13.

Konferencje naukowe:

1. Kupska, M.; Wasilewski, T.; Gromadzka, J.; Namieśnik, J. Determination of Terpene Profile in Cape Gooseberry (*Physalis peruviana L.*) with Use of HS-SPME/GC×GC-TOFMS Method. 9th ISC ‘Modern Analytical Chemistry’; 23-24.09.2013, Praga, Czechy, plakat.
2. Wasilewski, T.; Kupska, M.; Lewkowska, P.; Dymerski, T.; Namieśnik, J. Determination of terpenes profile in four potential superfruits with the use of HS-SPME/GC×GC-TOF-MS procedure. Monitoring of odour nuisance using electronic nose technology. 8th Franco Spanish Workshop on Bio-Inorganic Analytical Chemistry; 7-10.07.2014, Pau, Francja, wystąpienie ustne.
3. Wasilewski, T.; Gębicki, J.; Kamysz, W. Bioelektroniczny nos jako nowoczesne narzędzie w analizie substancji zapachowych. XXIV Konferencja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego z OML Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego; 9-10.2016, Gdańsk, Polska, wystąpienie ustne.

4. Wasilewski, T.; Kamysz, W. Prototyp bioczuJNIKA na bazie peptydu odwzorowujĄcego miejsce wiĄzania aldehydów w receptorze HarmOBP7. Chemistry for Agriculture; 25-28.11.2018, Karpacz, Polska, plakat.
5. Wasilewski, T.; Kaplińska, N.; Jakubaszek, W.; Kamysz, W. Ocena trzech technik osadzania peptydu odwzorowujĄcego miejsce wiĄzania aldehydów w receptorze HarmOBP7 na złotej elektrodzie czujnika piezoelektrycznego. Konferencja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego z OML XXV Konferencja Naukowa Wydziału Farmaceutycznego z OML; 7-8.12.2018, Gdańsk, Polska, plakat.
6. Wasilewski, T.; Szulczyński, B.; Wojciechowski, M.; Kamysz, W.; Gębicki, J. BioczuJNIK piezoelektryczny na bazie peptydów odwzorowujĄcych miejsce wiĄzania aldehydów w białku HarmOBP7. IAKOŚ 2019: IV Interdyscyplinarna Akademicka Konferencja Ochrony Środowiska; 5- 7.04.2019, Gdańsk, Polska, plakat (II miejsce).
7. Wasilewski, T.; Szulczyński, B.; Wojciechowski, M.; Kamysz, W. A highly selective piezoelectric biosensor based on peptide directly derived from HarmOBP7 aldehyde binding site. 25th Polish Peptide Symposium; 8- 12.09.2019, Wojanów, Polska, plakat.

Stypendia i nagrody:

- The development of interdisciplinary doctoral studies at the Gdansk University of Technology in modern technologies scholarship for PhD students, 2014/2015.
- Stypendium doktorskie dla pracowników GUMed, 2018/2019,
- Nagroda Naukowa II Stopnia Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, 12.2018,
- Nagroda Naukowa I Stopnia Rektora Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego, 12.2019,
- Nagroda w Konkursie PAN w Gdańsku na najlepszą pracę twórczą opublikowaną w 2017 roku w kat. nauk technicznych, 18.06.2018.

Staż naukowe:

- Lifelong Learning Program Erasmus+ at research centre: l'Université de Pau et des Pays de l'Adour (UPPA) in the Laboratory of Bio-Inorganic, Analytical and Environmental Chemistry (Laboratoire de Chimie Bio-Inorganique Analytique et Environment, CNRS-UPPA UMR5254), Pau, Francja, 01.07 – 31.12.2014.

Przyznane granty:

- Narodowe Centrum Nauki, Preludium 17, 2019/33/N/ST5/01517, ST5, 2020-2021, „Ocena charakterystyki oddziaływań syntetycznych peptydów odwzorowujących miejsce wiązania aldehydów w białku HarmOBP7 (Evaluation of characteristic interactions of synthetic peptides derived from HarmOBP7 aldehyde binding site)”, Opiekun: Prof. dr hab. Wojciech Kamysz, Kierownik: Tomasz Wasilewski.

Recenzje w czasopismach z listy JCR:

- Biosensors and Bioelectronics,
- Biosensors,
- Biotechnology Advances,
- Food Control,
- IEEE Access,
- International Journal of Automation and Computing,
- Materials,
- Molecules (Topic Editor),
- Nanomaterials,
- Royal Society of Chemistry Advances.

7. PUBLIKACJE NAUKOWE I OŚWIADCZENIA WSPÓLAUTORÓW

7.1. Bioelectronic nose: current status and perspectives

PDF:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956566316308375?via%3Dihub>

7.2. Advances in olfaction-inspired biomaterials applied to bioelectronic noses

PDF:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0925400517319871>

7.3. Evaluation of three peptide immobilization techniques on a QCM surface related to acetaldehyde responses in the gas phase

PDF:

<https://www.mdpi.com/1424-8220/18/11/3942>

7.4. A highly selective biosensor based on peptide directly derived from the HarmOBP7 aldehyde binding site

PDF:

<https://www.mdpi.com/1424-8220/19/19/4284>

7.5. Determination of long-chain aldehydes using a novel quartz crystal microbalance sensor based on a biomimetic peptide

PDF:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0026265X19331248?via%3Dihub>