

Mykola M. Maidan, Włodzimierz A. Sibirny, Mykhailo V. Gonchar, Zbigniew Kotylak, Andrzej A. Sibirny

## Wykorzystanie biosensora elektrochemicznego do oznaczania metanolu w ściekach przemysłowych

Szerokie zastosowanie metanolu w przemyśle i jego toksyczność powodują konieczność analizy jego obecności, np. w ściekach przemysłowych. Znanych jest wiele elektrochemicznych biosensorów do analizy metanolu i etanolu [1–7]. Spośród nich przeważają przyrządy typu amperometrycznego, z zastosowaniem elektrod tlenowych lub nadtlenowych, działających jako przetworniki fizyczne, oraz oksydazy alkoholowej drożdży metylotroficznych jako selektywnego bioelementu [5–7]. W niniejszej pracy przedstawiono wyniki badań nad możliwością wykorzystania tego typu biosensora do oznaczania zawartości metanolu w ściekach przemysłowych.

### Materiały i metodyka badań

W badaniach wykorzystano 4-amino-5-hydrazyno-3-merkapt-1,2,4-triazol (AHMT), alginian sodu o niskiej lepkości oraz parafilm firmy Sigma (USA). Częściowo oczyszczony preparat oksydazy alkoholowej otrzymano przez wytrącenie siarczanem amonu z ekstraktów bezkomórkowych szczepu drożdży metylotroficznych *Hansenula polymorpha* K-105 [8]. Tak otrzymany preparat oczyszczono przy pomocy chromatografii z DEAE-celulozą [9]. Analizę enzymatyczno-chemiczną metanolu oraz obliczenie wyników przeprowadzono według własnej metodyki [10].

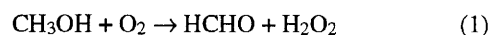
Badania przeprowadzono przy pomocy monitora tlenowego (Biological Oxygen Monitor, model 5300, Yellow Springs Instruments Co., USA), mającego platynową elektrodę YSI 5331. Preparat oksydazy alkoholowej rozcieńczono buforem tris-HCl ( $50 \text{ mmol/dm}^3$ ) o  $\text{pH}=7,5$  do aktywności równej 40 jednostek w  $1 \text{ cm}^3$  (40 U/ml). Ostrożnie wymieszano jedną objętość roztworu enzymu i trzy objętości 10% alginianu sodu nanosząc  $10 \mu\text{l}$  mieszaniny na powierzchnię elektrody z przyklejoną siateczką teflonową. Powierzchnię elektrody zanurzono w buforze tris-HCl ( $50 \text{ mmol/dm}^3$ ) o  $\text{pH}=7,5$  zawierającym chlorek wapnia ( $0,1 \text{ mol/dm}^3$ ) i pozostawiono, ciągle mieszając, na  $10\text{--}15 \text{ min}$  w celu wytworzenia żelu. Z góry przy pomocy pierścienia gumowego przyczepiono nad immobilizowanymi komórkami membranę polikarbonową. W przerwach pomiędzy pomiarami elektrodę przechowywano w buforze w temperaturze pokojowej.

Pomiary przeprowadzono w temperaturze  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , przetrzymując próbki w łaźni wodnej (YSI 5301). Zmianę sygnału spowodowaną dodaniem metanolu rejestrowano przy pomocy

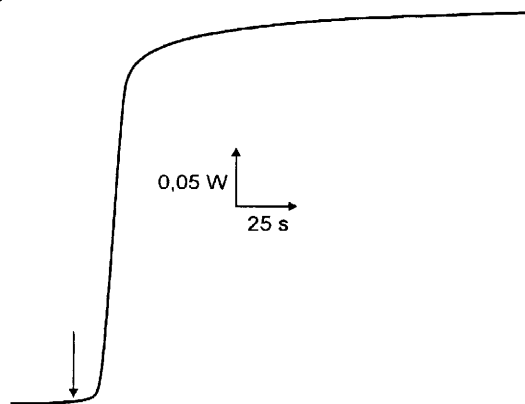
woltoamperomierza samopiszącego (B7-16A). Stężenia metanolu obliczono wykorzystując krzywą wzorcową otrzymaną przy pomocy pomiarów serii standardowych roztworów metanolu.

### Wyniki badań

Oksydaza alkoholowa jest enzymem wykorzystującym tlen w procesie utleniania metanolu według reakcji:



Reakcji analitycznej sensorów amperometrycznych towarzyszy pochłanianie tlenu. Przy obecności metanolu w komórcie sensora, działanie katalityczne oksydazy alkoholowej, immobilizowanej w żelu alginianu wapnia między membranami teflonową i polikarbonową, prowadzi do lokalnego zmniejszenia stężenia tlenu na czulej powierzchni sensora, powodując zmniejszenie natężenia prądu w elektrodzie Clarka. Typową krzywą odpowiedzi biosensora na metanol przedstawiono na rysunku 1.



Rys. 1. Krzywa wzorcową odpowiedzi biosensora (stężenie metanolu  $0,15 \text{ mmol/dm}^3$ )

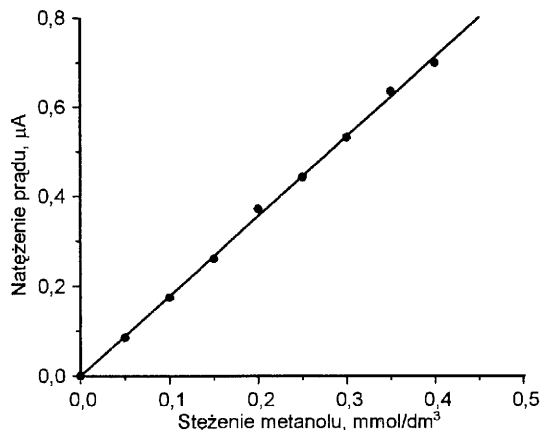
Sygnał osiągał poziom stacjonarny po dośięciu w biomembranie do równowagi procesów dyfuzji tlenu i metanolu, a jego wartość zależała od stężenia metanolu. Zależność natężenia prądu od stężenia metanolu w roztworze przedstawiono na rysunku 2. W granicach analizowanego zakresu stężeń metanolu, czas osiągnięcia maksymalnego poziomu sygnału wynosił  $0,2\text{--}0,7 \text{ min}$ .

W próbkach ścieków pobranych na oczyszczalni ścieków w Zakładach Azotowych w Kędzierzynie wykazano obecność metanolu (tab.1). Do celów porównawczych wykorzystano enzymatyczno-chemiczną metodę fotometrycznego oznaczania metanolu przy pomocy AHMT, który wiąże się z formaldehydem, wytworzonym z metanolu w reakcji katalizowanej przez oksydazę alkoholową [10].

Dr M. M. Maidan, doc. dr M. V. Gonchar, prof. dr hab. A. A. Sibirny: Akademia Nauk Ukrainy, Instytut Biologii Komórki, ul. Drahomanova 14/16, 79005 Lwów

Dr W. A. Sibirny: Politechnika Świętokrzyska, al. 1000-lecia Państwa Polskiego 7, 25–259 Kielce

Prof. dr hab. Z. Kotylak, prof. dr hab. A. A. Sibirny: Wyższa Szkoła Pedagogiczna, Instytut Biologii i Ochrony Środowiska, ul. T. Rejtana 16c, 35–310 Rzeszów



Rys. 2. Zależność sygnału biosensora od stężenia metanolu

Zaproponowana metoda biosensorowa pozwala na oznaczanie metanolu w obecności formaldehydu, chociaż formaldehyd także może utleniać się w reakcji katalizowanej przez oksydazę alkoholową. Tłumaczy się to znacznie niższym powinowactwem oksydazy alkoholowej do formaldehydu niż do metanolu. Dlatego też nawet trzykrotnie wyższe stężenie formaldehydu w stosunku do stężenia metanolu nie miało wpływu na dokładność oznaczenia metanolu przy pomocy zaproponowanej w pracy metody biosensorowej.

Tabela 1. Stężenia metanolu w próbkach z oczyszczalni ścieków w Zakładach Azotowych w Kędzierzynie

Miejsce poboru	Metanol <sup>1)</sup> mmol/dm <sup>3</sup>	Metanol <sup>2)</sup> mmol/dm <sup>3</sup>	Formaldehyd <sup>2)</sup> mmol/dm <sup>3</sup>
Osadnik wstępny	1,70	1,78	2,46
Komora napowietrzania	1,26	1,19	1,69
Osadnik wtórny	0	0	0,23
Staw ściekowy	0	0	0,11

<sup>1)</sup> z wykorzystaniem biosensora, <sup>2)</sup> z wykorzystaniem AHMT

Jak widać z danych zebranych w tabeli 1, wyniki analizy metanolu w ściekach przemysłowych metodą biosensorową były bardzo podobne do danych otrzymanych przy pomocy metody enzymatyczno-chemicznej z użyciem AHMT [10]. Innymi słowy, zastosowanie do analizy metanolu w próbkach ścieków przemysłowych dwóch różnych metod, biosensorowej i enzymatyczno-chemicznej, wykazało ich przydatność do rutynowej analizy tych ścieków. Biosensorowa metoda jest bardzo prosta w zastosowaniu, wymaga jedynie elektrody tlenowej oraz enzymu oksydazy alkoholowej. Ponieważ nadaje się ona do ciągłego monitorowania zawartości metanolu w ściekach, jej zastosowanie ma dużą przyszłość w przemyśle chemicznym. Dalsze badania będą poświęcone opracowaniu biosensorów zdolnych do równoległego oznaczania w ściekach przemysłowych zawartości nie tylko metanolu, lecz także formaldehydu.

## Podsumowanie

Opracowano amperometryczny biosensor zawierający oksydazę alkoholową, jako bioelement selektywny oraz monitor tlenowy, jako przetwornik fizyczny. Enzym został wyizolowany ze specjalnie przygotowanego szczepu drożdży metylotroficznych, nie wykazujących aktywności katalazowej. Przetestowano możliwość wykorzystania tego typu biosensora do oznaczania zawartości metanolu w ściekach przemysłowych. Czułość metody wynosiła 0,03 mmol/dm<sup>3</sup>, a czas osiągnięcia maksymalnego poziomu sygnału – 0,2+0,7 min.

## LITERATURA

1. E. V. PLOTKIN, I. J. HIGGINS, H. A. O. HILL: Methanol dehydrogenase biochemical cell and alcohol detector. *Biotech. Lett.*, 1981, Vol. 3, No. 3, pp. 187–192.
2. T. D. GIBSON, J. R. WOODWARD: Automated determination of ethanol using the enzyme alcohol oxidase. *Anal. Proc.*, 1986, Vol. 23, pp. 360–362.
3. Y. SEKINE, M. SUZUKI, E. TAMIYA, I. KARUBE: A highly selective methanol determination system based on chemiluminescence using flow injection analysis. *Biotechnology & Bioengineering*, 1990, Vol. 33, pp. 252–258.
4. J. ZHAO, R. BUCK: An all-solid-state amperometric ethanol sensor. *Biosensors & Bioelectronics*, 1991, Vol. 6, pp. 681–687.
5. C. VERDUIN, J. P. van DIJKEN, W. A. SCHEFFERS: A simple, sensitive, and accurate alcohol electrode. *Biotechnology & Bioengineering*, 1986, Vol. XXV, pp. 1049–1055.
6. J. K. PARK, H. J. YEE, S. T. KIM: Amperometric biosensor for determination of ethanol vapor. *Biosensors & Bioelectronics*, 1995, Vol. 10, pp. 587–594.
7. M. V. GONCHAR, M. M. MAIDAN, O. M. MOROZ, T. R. WOODWARD, A. A. SIBIRNY: Microbial O<sub>2</sub>- and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- electrode sensors for alcohol assays based on the use of permeabilized mutant yeast cells as the sensitive bioelements. *Biosensors and Bioelectronics*, 1998, Vol. 13, pp. 945–952.
8. M. V. GONCHAR, G. P. KSHEMINSKAYA, N. M. HLADAREVSKA, A. A. Sibirny: Catalase-minus mutant of methylotrophic yeast *Hansenula polymorpha* impaired in alcohol oxidase synthesis. *Mat. konf. "Genetics of respiratory enzymes in yeasts"*, Karpacz 1990, ss. 222–228.
9. H. SALM, H. SCHUTTE, M. R. KULA: Alcohol oxidase from *Candida boidinii*. *Methods in Enzymology*, 1982, Vol. 89, pp. 424–428.
10. J. BIEŃ, W. SYBIRNY, A. SYBIRNY, N. MAIDAN, M. GONCHAR: Nowa enzymatyczno-chemiczna metoda oznaczania formaldehydu i metanolu w ściekach przemysłowych. *Inżynieria i Ochrona Środowiska*, 1999, t. 2, nr 3–4, ss. 323–331.

## Assessing the Applicability of the Electrochemical Biosensor to the Methanol Assay of Industrial Wastewater

The amperometric biosensor developed for the purpose of the study involved alcohol oxidase as a selective element and an oxygen monitor as a physical signal transducer. The enzyme was isolated from a mutant strain of methylotrophic yeast defective in catalase activity (the strain had also been grown for the needs of our study). The investigations substantiated the

utility of the biosensor in methanol determinations. The wastewater under test was made up of the effluents from the Kędzierzyn Chemical Plant. The sensitivity of the method and the interval for the development of maximal output was 0.03 mmol/dm<sup>3</sup> and 0.2 to 0.7 minutes, respectively.