

Quantum Dot-modifizierte TiO₂-Strukturen für die Licht-gesteuerte Bioelektrokatalyse

Marc Riedel, Daniel Schäfer, Wolfgang J. Parak, Adrian Ruff, Wolfgang Schuhmann und Fred Lisdat*

Zusammenfassung

Die funktionale Kopplung von photoaktiven Nanostrukturen mit Enzymen stellt eine neue Strategie zum Aufbau lichtgesteuerter biohybrider Systeme dar. Hier sind Untersuchungen zusammengefasst, welche die effiziente Kontaktierung der FAD-abhängigen Glukosedehydrogenase (FAD-GDH) mit Hilfe eines Osmium-Redoxpolymers (P_{os}) an PbS-Quantum Dots (PbS QDs) zeigen, welche direkt auf dreidimensionalen TiO₂-Elektrodenstrukturen synthetisiert wurden. Diese biohybriden Strukturen erlauben die Licht-induzierte Oxidation von Glukose. Dazu wird zunächst ein Verfahren vorgestellt, bei welchem durch den Aufbau invers-opaler TiO₂ (IO-TiO₂) Strukturen hohe Bindungskapazitäten für die Integration von QDs, Redoxpolymer und Enzym erreicht werden. In Folge wird gezeigt wie elektrochemische Signalketten durch Licht gesteuert werden können, indem Ladungsträger in den QDs unter Beleuchtung erzeugt werden. Diese Aktivierung ermöglicht dann die Ausbildung einer Elektronentransferkaskade vom Enzym über das Redoxpolymer zu den QDs und final zur IO-TiO₂-Elektrode. Die resultierenden anodischen Photoströme können durch das Potential, die Lichtintensität und die Glukosekonzentration moduliert werden. So können in Anwesenheit von Glukose Photoströme von bis zu 207 μA/cm² und erste Oxidationssignale bereits bei einem Potential von -540 mV vs Ag/AgCl, 1 M KCl erhalten werden. Dies entspricht einem Potentialgewinn von über 500 mV im Vergleich zu nicht lichtsensitiven Elektroden. Das vorgestellte biohybride System kombiniert Vorteile einer großen Oberfläche (durch IO-TiO₂-Struktur), die effiziente Ladungsträgergenerierung und -trennung an der QD/TiO₂-Schnittstelle sowie die effiziente Kontaktierung von FAD-GDH mit den QDs mit Hilfe eines Redoxpolymers. Die Ergebnisse verdeutlichen das Potential dieser leistungsfähigen Photobioanode für die Sensorik und die Erzeugung von Energie aus Licht und Glukose.

Abstract

The combination of photoactive nanostructures with enzymes represents a new strategy for the construction of light-directed biohybrid systems. The study demonstrates the efficient linkage of FAD-dependent glucose dehydrogenase (FAD-GDH) to PbS quantum dot (QD)-sensitized inverse opal TiO₂ (IO-TiO₂) electrodes using an osmium redox polymer (P_{os}). How these biohybrid structures can oxidize glucose in a light-directed fashion is highlighted in detail. For this purpose, firstly a method for the construction of IO-TiO₂ electrodes is presented, which gives rise to high binding capacities for the integration of QDs, redox polymer and enzyme. It can be shown how electrochemical signal chains can be controlled with light, resulting in a generation of charge carriers within the QDs. The activation of the electron transfer cascade then allows for an electron transfer from the enzyme via the redox polymer to the QDs and finally to the IO-TiO₂ electrode. The resulting anodic photocurrents can be modulated by potential, light intensity and glucose concentration. In the presence of glucose, photocurrents of up to 207 μA/cm² can be generated and first electron withdrawal from the biocatalytic sugar oxidation already proceeds at a potential of -540 mV vs Ag/AgCl (1 M KCl). This corresponds to a potential gain of over 500 mV compared to light-insensitive electrodes. The proposed biohybrid system combines the advantages of a large surface area (IO-TiO₂), efficient charge carrier generation (PbS QDs) and separation at the TiO₂/QDs interface and the efficient linkage of FAD-GDH to the QDs using a redox polymer. This illustrates the potential of this powerful photobioanode for sensing and power supply.

1. Einführung

Photosynthetische Proteinkomplexe, die in der Lage sind katalytische Reaktionen unter Verwendung von Lichtenergie durchzuführen, gewinnen in den letzten Jahren zunehmend an Bedeutung in der interdisziplinären Forschung. Dabei stellt die Kopplung von nicht-Licht-sensitiven Enzymen mit künstlichen, Licht-sensitiven Materialien eine Strategie für den Aufbau funktioneller biohybrider Systeme dar, welche die biokatalytische Aktivität mit photophysikalischen Eigenschaften kombinieren (Efrati et al. 2016, Riedel et al. 2017b). Anwendungen solcher Systeme sind inzwischen für die Sensorik (Zhao et al. 2017), die Licht/Strom-Wandlung (Efrati et al. 2016, Sokol et al. 2016) oder für Licht-induzierte Transformationen chemischer Stoffe gezeigt worden (Mersch et al. 2015).

Die Einführung der Lichtempfindlichkeit bietet die Möglichkeit enzymatische Reaktionen Licht-gesteuert ein- und auszuschalten und somit Elektronentransferreaktionen an Elektroden-schnittstellen zu manipulieren. Dabei werden Elektronen-Loch-Paare in Licht-sensitiven Materialien durch die Beleuchtung mit geeigneter Energie erzeugt, wodurch Elektronentransferreaktionen vom Enzym über das Licht-sensitive Element zur Elektrode (anodische Richtung) oder umgekehrt in kathodischer Richtung induziert werden können. Ein interessanter Aspekt von Licht-induzierten Reaktionen stellt dabei die Möglichkeit dar, Reaktionen orts aufgelöst zu kontrollieren und somit auch die Analyse mehrerer Analyte auf einer Elektrode zu ermöglichen (Lisdat et al. 2013).

Der Aufbau von photoaktiven biohybriden Strukturen erfordert zunächst die Kontaktierung eines Licht-sensitiven Materials mit der Elektrodenoberfläche. Hierfür sind verschiedene Methoden bekannt, welche auf elektrostatischen Wechselwirkungen, Chemisorption oder kovalenten Bindungen beruhen (Yue et al. 2013). Neben Farbstoffen (Tel-Vered et al. 2010), Goldnanopartikeln (Zhang et al. 2015), Polymeren (Riedel & Lisdat 2018) oder Biomolekülen wie Photosystem I (Efrati et al. 2016, Ciornii et al. 2017), wer-

den meist Halbleiternanostrukturen wie Quantum Dots (QDs) (Riedel et al. 2017b) als photoaktive Materialien verwendet. Für QD-basierte Ansätze ergeben sich jedoch teilweise Limitationen hinsichtlich der Anwendung, welche auf Partikelaggregation (Aldana et al. 2001) und die Interaktionen von Enzymen mit strukturstabilisierenden Liganden zurückzuführen sind (Khalid et al. 2011). Ein Ausweg kann in der direkten Synthese der QDs auf dem Elektrodenmaterial gesehen werden, wie z.B. durch das „successive ionic layer adsorption and reaction“ (SILAR)-Verfahren (Pathan & Lokhande 2004). Hierbei kann auf stabilisierende Oberflächenliganden verzichtet und das QD Wachstum durch die Anzahl der Synthesesyklen leicht kontrolliert werden.

Für die Kontaktierung des biokatalytischen Elements (Enzym) mit dem Licht-schaltbaren Material (bspw. QDs) nutzten erste Ansätze die intrinsische katalytische Aktivität des photoaktiven Elements gegenüber enzymatischen Co-Substraten oder Produkten für den Nachweis von Enzymen oder Enzymsubstraten aus (Pardo-Yissar et al. 2003, Riedel et al. 2017a). Hingegen sind bisher nur wenige Beispiele bekannt, bei denen ein direkter oder Mediator-vermittelter Elektronentransfer zwischen dem Enzym und dem Licht-schaltbaren Material gezeigt werden konnte (Efrati et al. 2016, Riedel et al. 2017b, Riedel & Lisdat 2018, Tel-Vered et al. 2010). Die meisten dieser Ansätze zeichnen sich durch Limitationen wie bspw. einen begrenzten Wellenlängenbereich für die Anregung, geringe Licht/Strom-Wandlungseffizienz oder durch die Notwendigkeit frei diffundierender Mediatoren, aus.

Die Effizienz ist häufig auch durch eine unzureichende Ladungsträgerseparierung limitiert. In natürlichen Prozessen ist die Elektron-Loch-Trennung durch eine Kaskade an Elektronentransferschritten optimiert. Solche Signalwege zu imitieren ist Gegenstand nicht zuletzt auch dieser Publikation. Eine Strategie liegt in der Kombination verschiedener Halbleitermaterialien. So konnte bereits gezeigt werden, dass das Leitungsband von TiO_2 (Halbleiter mit großer Bandlücke) als Elektronen Falle für angeregte Elektronen eines zweiten Halbleiterma-

terials (QDs, Farbstoffe oder Polymere) dienen kann und somit eine Anwendung in Solarzellen oder photokatalytischen Systemen ermöglicht (Grätzel 2001).

Weitere Ansatzpunkte für eine Optimierung der Effizienz sind die Überwindung einer oftmals beobachteten inhomogenen Enzymorientierung sowie die Begrenzung der Enzymassemblierung auf eine Monoschicht. Verbesserungen können dabei durch die Einbettung des Enzyms in Redoxpolymere sowie im Weiteren durch deren Überführung in 3D-Elektrodenstrukturen erreicht werden (Sokol et al. 2016).

Die hier vorgestellte Arbeit zeigt eine neuartige, leistungsstarke Photobioanode für die Oxidation von Glukose, welche die Vorteile einer Multikomponenten-Halbleiterelektrode und die effiziente Kontaktierung der FAD-GDH mit QDs über ein Redoxpolymer (P_{Os}) in einer 3D Elektrode vereint. Es wird ein neues Verfahren zur Herstellung hierarchischer invers-opaler TiO_2 -Strukturen (IO-TiO_2) vorgestellt. Die Sensitivität für sichtbares Licht wird durch das Aufwachsen von PbS QDs auf der IO-TiO_2 Elektrode mit Hilfe eines SILAR Verfahrens sichergestellt. Abschließend wird FAD-GDH und das Redoxpolymer in die $\text{IO-TiO}_2|\text{PbS}$ Struktur integriert und das Potential der neuartigen Elektrodenarchitektur für den Licht-gesteuerten Elektronentransfer und die Oxidation von Glukose aufgezeigt.

2. Ergebnisse und Diskussion

Die artifizielle Signalkette besteht aus drei Hauptkomponenten: (1) Licht-aktive Komponente (TiO_2 Elektrode und PbS QDs), (2) elektronenleitende Komponente (Osmium-basiertes Redoxpolymer, P_{Os}) und (3) die biokatalytische Komponente (FAD-abhängige Glukosedehydrogenase, FAD-GDH). Unter Beleuchtung mit sichtbarem Licht wird die Signalkette aktiviert und Elektronen aus der enzymatischen Glukoseoxidation über P_{Os} auf die QDs und final zur TiO_2 -Elektrode transferiert, wodurch ein anodischer Photostrom erzeugt wird (siehe Abb. 1). Die TiO_2 /QD-Interaktion ist von entscheidender Bedeutung für die Funktionalität des gesamten Systems. In den QDs werden

zunächst Elektronen-Loch-Paare unter Beleuchtung generiert, woraufhin angeregte Elektronen der QDs in das Leitungsband der TiO₂-Elektrode injiziert und damit effizient von den Löchern separiert werden. Die Löcher wiederum können durch das vom Enzym reduzierte Polymer aufgefüllt werden. Somit fließt ein Glukose-abhängiger Photostrom. Wird die Lichtquelle abgeschaltet, sind keine freien Ladungsträger im Halbleiter vorhanden und die Signalkette ist unterbrochen. Somit ist das gesamte System durch die Bestrahlung mit Licht schaltbar.

2.1 Synthese und Charakterisierung der Licht-sensitiven Einheit

Die Licht-sensitive Einheit besteht aus TiO₂ und PbS QDs, welche nacheinander auf transparenten FTO Elektroden synthetisiert wurden (FTO – Fluor-dotiertes Zinnoxid). Dazu ist eine neue Methode etabliert worden, TiO₂ in makroporöser, invers-opaler Form herzustellen. TiO₂ wurde aufgrund seiner vorteilhaften energetischen Eigenschaften ausgewählt (Kamat, 2008). Des Weiteren wird angenommen, dass die makroporöse Struktur vorteilhaft für die Integration von größeren Mengen an Polymer und Enzym ist.

Die IO-TiO₂-Elektroden wurden mittels eines Templat-Verfahrens erzeugt, bei welchem durch ein „spin coating“-Prozess eine Mischung aus Latex beads und TTIP (Titaniumtetrakisopropoxide) auf planarem FTO schichtweise aufgetragen wird. In einem nachfolgenden Sinterschritt bei 450 °C werden die Latex beads verbrannt, so dass ein invers-opales TiO₂ Netzwerk entsteht. Die Morphologie der Strukturen wurde mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops untersucht (siehe Abb. 1). Die Kavitäten besitzen einen Durchmesser von ~650 nm und sind untereinander mit Kanälen unterschiedlicher Größe verbunden. Die etablierte Methode ermöglicht zudem die Einstellung der Strukturhöhe durch aufeinanderfolgende Abscheidungsschritte, gefolgt von einem abschließenden Sinterprozess. Bis zu 8 Schichten mit einer einheitlichen Morphologie und einer Höhe von maximal $9 \pm 0,7 \mu\text{m}$ konnten auf diese Weise präpariert werden. Dabei erfolgt der Schichtzuwachs im Bereich

zwischen 2 und 8 Schichten nahezu linear ($1,2 \pm 0,1 \mu\text{m}$ pro Schicht) ohne Anzeichen einer Limitierung. Untersuchungen der optischen Eigenschaften der Strukturen mittels UV/Vis Spektroskopie zeigen eine hohe Transparenz, welche ebenfalls linear mit der Anzahl der Schichten abnimmt.

(Jasieniak et al. 2011). Dem folgend ist der Energieeintrag durch Bestrahlung mit sichtbarem Licht groß genug um die Anregung von Elektronen ins Leitungsband des Halbleiters zu bewirken (Hyun et al. 2008). Chronoamperometrische Untersuchungen bestätigen den erfolgreichen Aufbau der IO-TiO₂|PbS

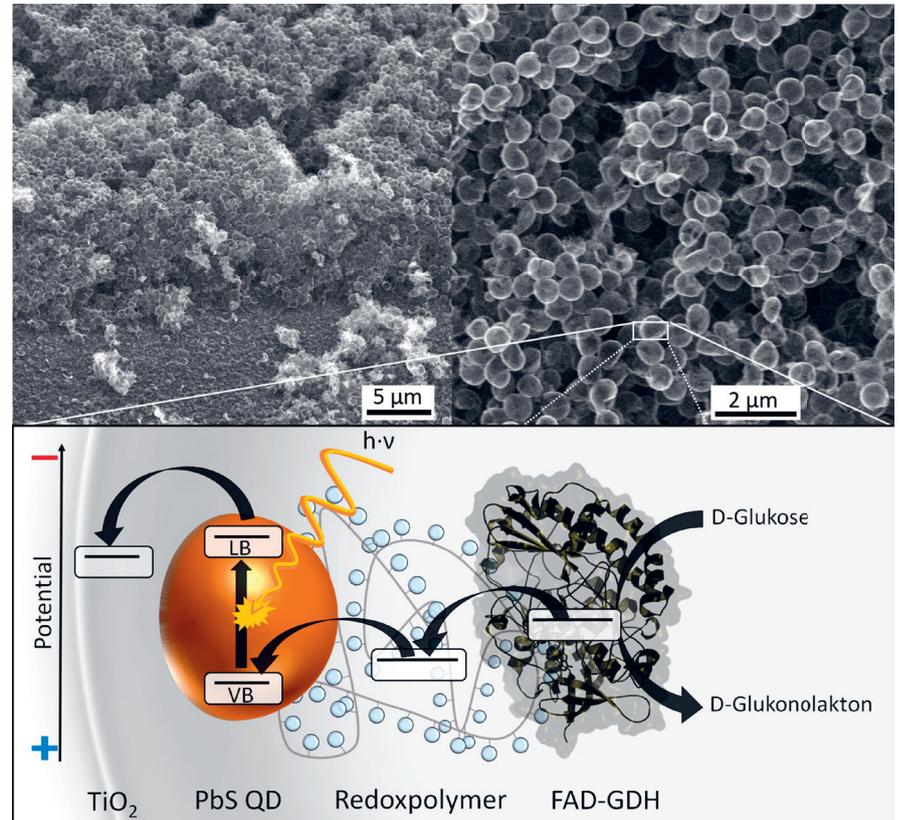


Abb. 1) REM-Aufnahme einer IO-TiO₂-Elektrode Links: Winkel 45°, 2500x, 30 kV, rechts: Draufsicht, 8000x, 30 kV) sowie schematische Darstellung der Elektronentransferschritte in der Licht-gesteuerten Signalkaskade und der energetischen Niveaus von TiO₂, PbS QDs, dem Redoxpolymer P_{ox} und FAD-GDH. (VB = Valenzband, LB = Leitungsband).

Die Abscheidung von PbS QDs mittels eines SILAR-Verfahrens wurde anschließend untersucht. Das Halbleitermaterial PbS wurde dabei aufgrund seiner Sensitivität für Licht sichtbarer Wellenlängen gewählt. Zur Abscheidung wird die Elektrode abwechselnd in Lösungen mit Pb²⁺ sowie S²⁻ Ionen getaucht. Dieser Zyklus wird 4-fach wiederholt, wobei die Anzahl der Zyklen das Wachstum der QDs bestimmt und damit die Größe der Partikel steuert. Eine erfolgreiche Synthese ist zunächst an der Kolorierung der Struktur von weiß zu braun zu erkennen. HR-TEM Messungen bestätigen das Wachstum von QDs mit einer Größe zwischen 3 und 4 nm. Gemäß Jasieniak et al. sind damit Bandlücken in der Größenordnung zwischen 1,92 bis 1,47 eV zu erwarten

Elektrode durch die Ausbildung eines anodischen Photostroms unter Bestrahlung mit sichtbarem Licht (>400 nm).

2.2 Integration der biokatalytischen Komponente

Als Enzym dient FAD-GDH von *Aspergillus sp.* welche die Oxidation von D-Glukose zu D-Glukonolaktone katalysiert. Die Kontaktierung des Enzyms erfolgt mit einem Poly(1-vinylimidazole-co-allylamine)-Os(bipy)₂Cl-Redoxpolymer (P_{ox}), welches bereits mehrfach eine gute Interaktion mit verschiedenen Biokatalysatoren gezeigt hat (Efrati et al. 2016, Sokol et al. 2016). Weitere vorteilhafte Eigenschaften von P_{ox} sind das für diese Anwendung günstige Redoxpotential und seine chemischen

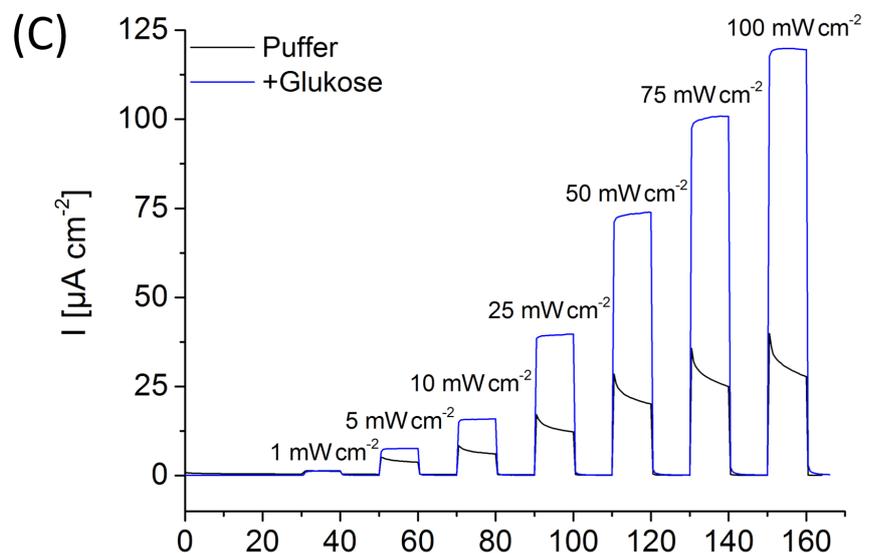
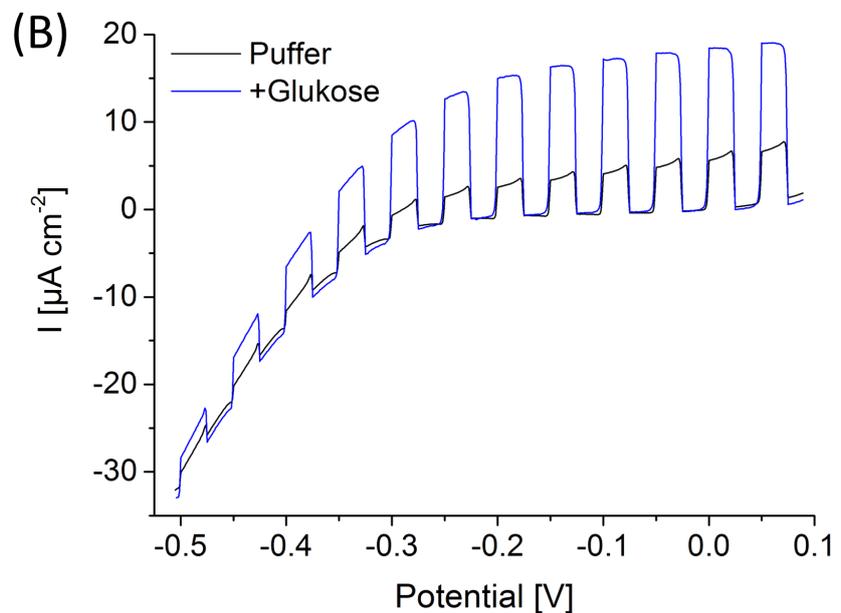
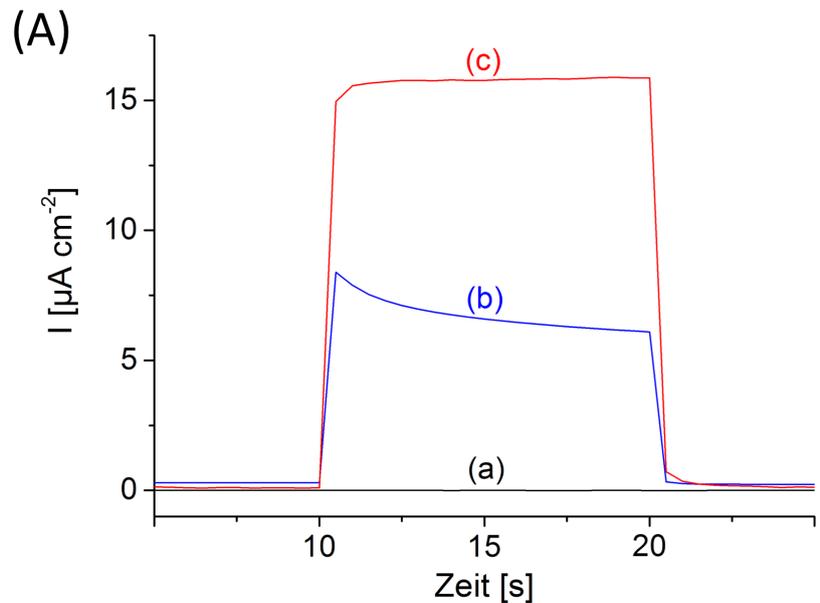
Eigenschaften. So ist P_{Os} bei neutralen pH positiv geladen (Amino- und Imidazolgruppen) und kann so gut mit dem negativ geladenen Enzym (pI 4.4) elektrostatisch wechselwirken. Der Elektronentransport innerhalb des Polymers funktioniert über einen *Hopping*-Mechanismus zwischen den Os-Redoxzentren.

Für die Integration des Polymers und Enzyms wird eine P_{Os} /FAD-GDH-Mischung auf IO-TiO₂|PbS Elektroden unter Lichtausschluss assembliert. In Abb. 2A sind die Photoströme einer solchen IO-TiO₂|PbS| P_{Os} |FAD-GDH Elektrode mit und ohne Glukose gezeigt. Während im Puffer anodische Ströme von $8,2 \pm 2 \mu A/cm^2$ gemessen werden, ist in Anwesenheit von 10 mM Glukose eine annähernde Verdopplung des Stroms auf $17 \pm 2,4 \mu A/cm^2$ zu beobachten. Es werden keine Dunkelströme festgestellt, was die blockierende Wirkung der TiO₂-Schicht unter Lichtausschluss zeigt. Alle Kontrollmessungen unterstützen die in Abb. 1 aufgezeigten Elektronentransferschritte. Die Analyse von IO-TiO₂ Elektroden ohne QDs, Polymer und Enzym zeigt, dass keine direkte Oxidation von Glukose an der Elektrode stattfindet. Des Weiteren geben weder IO-TiO₂|PbS| P_{Os} Elektroden ohne Enzym noch IO-TiO₂|PbS|FAD-GDH Elektroden ohne Polymer ein Signal nach Zugabe von Glukose. Dies bestätigt die Annahme, dass die QDs Glukose nicht direkt oxidieren können, sondern FAD-GDH und P_{Os} notwendig sind, um die katalytischen Aktivität bereitzustellen und die effiziente Kontaktierung mit der IO-TiO₂|PbS Elektrode zu garantieren.

Abb. 2) (A) Photochromoamperometrische Messung 4-schichtiger IO-TiO₂-Elektroden: (a) blanke IO-TiO₂-Elektrode; (b) IO-TiO₂|PbS| P_{Os} |FAD-GDH Elektrode in Puffer; (c) IO-TiO₂|PbS| P_{Os} |FAD-GDH Elektrode nach Zugabe von 10 mM Glukose (Beleuchtung/Weißlichtquelle: 10 s bis 20 s; 10 mW/cm²; 0 mV vs Ag/AgCl (1 M KCl); 5 mM HEPES pH 7).

(B) Chopped-Light-Voltammetrie einer 4-schichtigen IO-TiO₂|PbS| P_{Os} |FAD-GDH Elektrode mit und ohne 10 mM Glukose. (Weißlichtquelle; 10 mW/cm²; Potential vs Ag/AgCl (1 M KCl); 5 mV/s; 5 mM HEPES pH 7).

(C) Photochromoamperometrische Messung einer 4-schichtigen IO-TiO₂|PbS| P_{Os} |FAD-GDH Elektrode bei unterschiedlichen Lichtintensitäten mit und ohne 10 mM Glukose. (0 mV vs Ag/AgCl (1 M KCl); 5 mM HEPES pH 7).



Im Weiteren zeigen sogenannte *chopped-light* Messungen einen anodischen Photostrom im gesamten untersuchten Potentialbereich zwischen -500 mV bis 0 mV (vs Ag/AgCl, 1 M KCl). Unter allen Potentialbedingungen ist eine signifikante Zunahme des Photostroms bei Zugabe von 10 mM Glukose zu beobachten (Abb. 2B). Eine deutliche Abhängigkeit des Photostroms von der Lichtintensität ist gleichfalls zu beobachten. Im Bereich zwischen 1 auf 100 mW/cm² nimmt der Photostrom mit steigender Lichtintensität zu und erreicht maximale Signale von 40,1 ± 6,4 μA/cm² in Puffer und 114,5 ± 3,7 μA/cm² in Anwesenheit von Glukose (Abb. 2C). Wellenlängenabhängige Untersuchungen zeigen im gesamten sichtbaren Wellenlängenbereich zwischen 400 und 700 nm signifikante Glukose-abhängige Photoströme.

Bei Langzeitmessungen unter Substratzusatz zeigt sich die exzellente Stabilität der biohybriden Strukturen, welche innerhalb von 30 min keinen signifikanten Signalabfall verzeichnen. Wie angestrebt, ist durch das Einbetten des Enzyms im Redoxpolymer ein stabilisierender Zustand eingetreten, der das Ablösen des Enzyms während der Messung verhindert.

2.3 Leistungscharakterisierung der IO-TiO₂|PbS|P_{os}|FAD-GDH Elektroden

Um die Leistungsfähigkeit der biohybriden Strukturen eingehender zu untersuchen, sind zunächst konzentrationsabhängige Messungen durchgeführt worden. In Abb. 3 ist der Verlauf des Photostroms in Abhängigkeit von der Glukosekonzentration dargestellt. Die IO-TiO₂|PbS|P_{os}|FAD-GDH Elektroden weisen ein erstes sichtbares Signal von 0,61 ± 0,19 μA/cm² bei einer Konzentration von 10 μM Glukose auf, welches bis auf 29,2 ± 2,8 μA/cm² bei einer Konzentration von 100 mM Glukose ansteigt. Der Photostrom erhöht sich linear im Bereich zwischen 10 und 200 μM Glukose und erreicht dabei eine Sensitivität von 31 μA/mM·cm². Die Konzentrationsabhängigkeit folgt der Michaelis-Menten-Kinetik und es kann ein apparenter K_m-Wert von 2,9 ± 0,5 mM bestimmt werden. Dieser ist kleiner als der vom Enzym in Lösung, jedoch vergleichbar

zu früheren elektrochemischen Untersuchungen mit immobilisiertem Enzym (Zafar et al. 2012, Milton et al. 2015). Verglichen mit anderen photoelektrochemischen Sensoren für Glukose ist die hier vorgestellte IO-TiO₂|PbS|P_{os}|FAD-GDH Elektrode sensitiver, hat einen größeren dynamischen Messbereich und verzichtet auf frei diffundierende Co-Substrate oder Redoxmediatoren (Metzger et al. 2016, Riedel et al. 2017b, Tel-Vered et al. 2010).

Um die Anwendbarkeit der hier entwickelten biohybriden Struktur in Photobiobrennstoffzellen zu untersuchen, wurde die maximale Leistung in Anwesenheit von 100 mM Glukose bestimmt. Die Aufzeichnung der Strom-Spannungskurve unter kontinuierlicher Beleuchtung führt zu einer maximalen Stromdichte von 207 ± 17 μA/cm² und einem Open-Circuit-Potential (OCP) von -540 ± 14 mV vs Ag/AgCl (1 M KCl). Die maximale Leistungsdichte

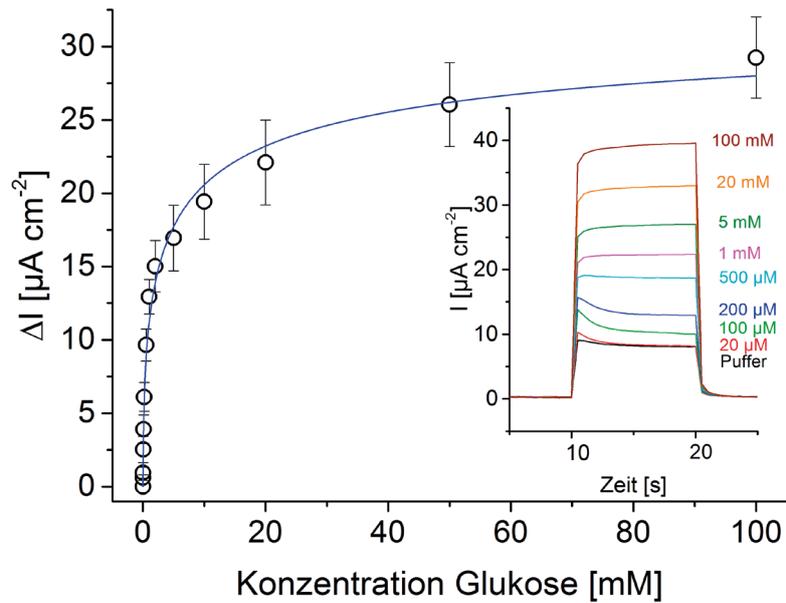


Abb. 3) Änderung der Photostromdichte ΔI bzw. photochronoamperometrische Messung (Einschub) von 8-schichtigen IO-TiO₂|PbS|P_{os}|FAD-GDH Elektroden bei Zugabe verschiedener Glukosekonzentrationen. (Weißlichtquelle 10 s Intervall; 10 mW/cm²; 0 mV vs Ag/AgCl (1 M KCl); 5 mM HEPES pH 7).

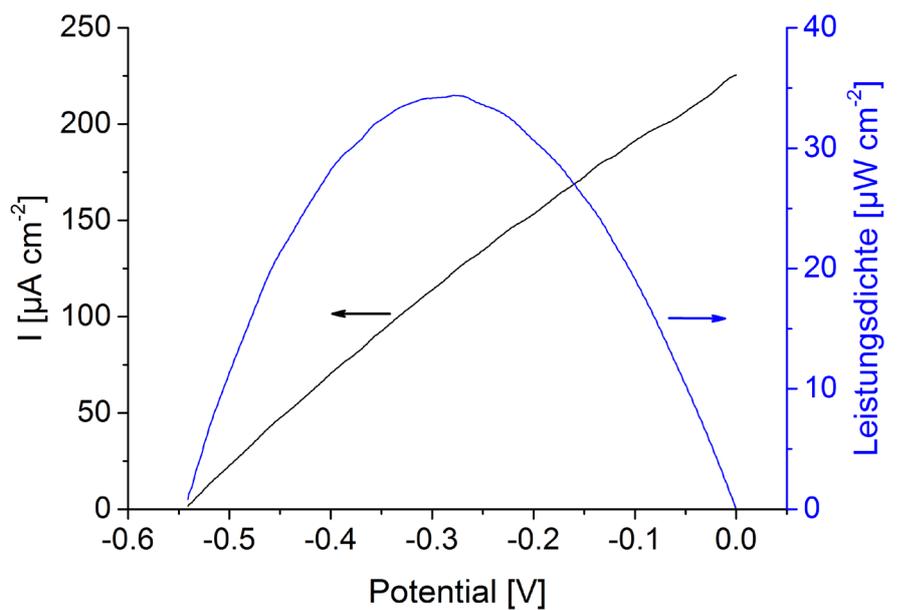


Abb. 4) Strom- und Leistungsdichte einer 8-schichtigen IO-TiO₂|PbS|P_{os}|FAD-GDH Elektrode in Abhängigkeit vom Potential und unter kontinuierlicher Beleuchtung mit 100 mW/cm² in Gegenwart von 100 mM Glukose. (Arbeits Elektrode: biohybride Elektrode, Gegenelektrode: Platindraht, Referenzelektrode: Ag/AgCl (1 M KCl); Weißlichtquelle; 100 mW/cm²; Potential vs Ag/AgCl (1 M KCl); 5 mV/s; 5 mM HEPES pH 7).

von $31,3 \pm 2,7 \mu\text{W}/\text{cm}^2$ ist bei $-287 \pm 80 \text{ mV vs Ag/AgCl (1 M KCl)}$ zu verzeichnen (Abb. 4). Diese Ergebnisse zeigen die hohe Leistungsfähigkeit der Photobioanode für die Oxidation von Glukose, was der vorteilhaften Kombination der Licht-sensitiven Entität mit der hohen biokatalytischen Aktivität des Enzyms zuzuschreiben ist. Es ist als außerordentlicher Erfolg zu bewerten, dass es erstmalig gelungen ist, bei einem so niedrigen Potential Elektronen von der biokatalytischen Reaktion zu gewinnen. Im Gegensatz dazu zeigen planare $\text{FTO}|\text{P}_{\text{O}_2}|\text{FAD-GDH}$ Elektroden (ohne TiO_2 und PbS QDs, d.h. ohne Lichtsensitivität) erst ab einem Potential von $+50 \text{ mV vs Ag/AgCl (1 M KCl)}$ einen biokatalytischen Stromfluss. Es ist also eine gravierende Verbesserung der Potentialbedingungen durch die $\text{IO-TiO}_2|\text{PbS}|\text{P}_{\text{O}_2}|\text{FAD-GDH}$ Elektrodenarchitektur und die Licht-gesteuerte Arbeitsweise der Elektrode erreicht worden. Langzeitexperimente mit Glukose in Lösung und unter Beleuchtung mit $100 \text{ mW}/\text{cm}^2$ zeigen, dass eine Ladung von $220 \text{ mC}/\text{cm}^2$ innerhalb von 30 min übertragen wird. Der kumulative Photostrom ist unter diesen Bedingungen in Anwesenheit von Glukose um mehr als das 70-fache größer als in früheren Studien mit Licht-sensitiven Komponenten und Enzymen auf planaren Elektroden (Efrati et al. 2016, Riedel et al. 2017b, Tel-Vered et al. 2010), und 5-fach größer als im Fall von 3D-Elektroden (Riedel & Lisdat 2018). Dies kann der gesteigerten Oberfläche der IO-TiO_2 Strukturen, der effizienten Ladungsträgergenerierung und -trennung an der $\text{IO-TiO}_2|\text{PbS}$ Grenzfläche sowie der effektiven Kontaktierung des Enzyms mit den QDs über das Redoxpolymer zugeschrieben werden. Somit ermöglicht die in dieser Arbeit entwickelte Architektur den Zugang zu einer insgesamt verbesserten Photobioanode und stellt einen Fortschritt hinsichtlich der Entwicklung Licht-gesteuerter Biosensoren sowie von Licht/Strom- und Licht/Chemikalien-wandelnder biohybrider Systeme dar.

3. Fazit

Zusammenfassend konnte hier ein neues Konzept für die Kontaktierung biokatalytischer Reaktionen mit einer Licht-gesteuerten QD-Elektroden-Struktur

vorgestellt werden. Dabei wurde zunächst eine Methode zum Aufbau von invers-opalen TiO_2 Strukturen etabliert, welche die Steuerung der Schichtdicke ermöglicht und im Weiteren die Integration von PbS QDs, eines Redoxpolymers sowie FAD-GDH erlaubt. Unter Beleuchtung werden Elektronen-Loch-Paare innerhalb der PbS QDs erzeugt und die Elektronen am TiO_2 -Interface separiert. Die zurückgelassenen Löcher werden durch die Oxidation des Redoxpolymers aufgefüllt. Durch den biokatalytischen Umsatz von Glukose wird P_{O_2} regeneriert, so dass die photoelektrochemische Reaktion mit Ladungsträgern versorgt wird und es zur Ausbildung eines erhöhten Photostroms kommt. Das biohybride System kann dabei durch die Modulation des Potentials, der Lichtintensität und der Glukosekonzentration kontrolliert werden. Ein Glukose-abhängiger Photostrom ist im Bereich zwischen $10 \mu\text{M}$ und 100 mM Glukose zu beobachten. Bereits bei einem negativen Potential von $-540 \text{ mV vs Ag/AgCl, 1 M KCl}$ konnten Elektronen aus der biokatalytischen Reaktion gewonnen werden, was den Weg für den Aufbau einer hochleistungsfähigen photobioelektrochemischen Zelle mit Glukose als Brennstoff ebnet. Da hier die photophysikalischen Eigenschaften der $\text{IO-TiO}_2|\text{PbS}$ Elektrode zur Ladungsträgerzeugung und -trennung mit der effizienten Kontaktierung einer spezifischen enzymatischen Reaktion über ein Redoxpolymer so gewinnbringend kombiniert werden können, liefert dieser Ansatz die Grundlage für die effiziente Kontaktierung anderer Biokatalysatoren für die Licht-gesteuerte Detektion bzw. die Energiegewinnung aus Licht und enzymatischen Substraten.

4. Methoden

4.1 Materialien

[N-(2-hydroxyethyl)piperazine-N-(2-ethansulfonic acid)] (99.5%; HEPES), D-Glukose, Fluor-dotiertes Zinnoxid-beschichtete Glassträger ($7 \Omega \text{ cm}^{-1}$; FTO), Blei(II)nitrat (99.999%; $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$), Ammoniumsulfidlösung (20% in H_2O ; $(\text{NH}_4)_2\text{S}$), Polystyrenlatexpartikel (LBs, Durchmesser $0,8 \mu\text{m}$) and Titanium-tetraisopropoxid (97%; TTIP) wurden von Sigma Aldrich (Steinheim,

Germany) bezogen. Poly(1-vinylimidazole-co-allylamine)-Os(bipy)₂Cl-Redoxpolymer wurde wie zuvor publiziert selbst synthetisiert (Badura et al. 2008). Die FAD-abhängige Glukosedehydrogenase (*Aspergillus sp.*) wurde bei SEKISUI CHEMICAL erworben.

4.2 Aufbau von IO-TiO_2 -Elektroden

Zuerst wurden FTO-beschichtete Glasobjektträger nacheinander in entionisiertem Wasser, Isopropanol und Aceton für jeweils 15 Minuten unter Ultraschallbehandlung gereinigt und vor der weiteren Verwendung getrocknet. Eine Mischung aus $100 \text{ mg}/\text{ml}$ Latex Beads (LB; $0,8 \mu\text{m}$ Durchmesser) und $100 \text{ mg}/\text{ml}$ Titan-tetraisopropoxid (TTIP) wurde in Isopropanol hergestellt. Dafür wurden $200 \mu\text{L}$ wässrige $100 \text{ mg}/\text{ml}$ LB Dispersion mit $800 \mu\text{L}$ Ethanol gemischt und bei 25.000 g für 8 min zentrifugiert (um das Wasser zu entfernen). Der Überstand wurde verworfen und das LB-Pellet wurde in 1 ml Ethanol resuspendiert, gefolgt von einem zweiten Zentrifugationsschritt bei 25.000 g für 8 min. Nach Entfernen des Überstandes wurde das Pellet in einem Ultraschallbad für 5 min in $180 \mu\text{L}$ Isopropanol suspendiert. Anschließend wurden $20 \mu\text{L}$ TTIP schnell zu der LB-Suspension gegeben und erneut für 5 min mit Ultraschall behandelt. $6 \mu\text{L}$ der LB/TTIP-Mischung (pro Schicht) wurden auf den gereinigten FTO-Objektträger über ein „spin coating“-Verfahren mit einer Rotationsgeschwindigkeit von 80 rps aufgebracht. Die Elektrodenfläche wurde dann auf $0,071 \text{ cm}^2$ begrenzt, indem das überflüssige Material weggewischt wurde. Die vorbereiteten Elektroden wurden bei 450°C unter Raumluft für 2 h gesintert, was zu den finalen IO-TiO_2 -Elektroden führte.

4.3 Synthese von PbS Quantum Dots

Die PbS-QDs wurden direkt auf den IO-TiO_2 -Elektroden mit einem SILAR-Ansatz synthetisiert (Pathan & Lokhande 2004). Dazu wurden die Elektroden abwechselnd für jeweils 1 min in wässrigem $0,02 \text{ M}$ Bleinitrat bzw. wässrigem $0,02 \text{ M}$ Ammoniumsulfid getaucht. Um ungebundene Ionen zu entfernen, wurden die Elektroden zwischen den Abscheidungsschritten sorgfältig mit entionisiertem Wasser und Ethanol

gespült. Es wurden IO-TiO₂|PbS Elektroden mit 4 Zyklen (4x Pb²⁺ und 4x S²⁻) nach diesem Verfahren hergestellt.

4.4 Assemblierung von Redoxpolymer und Enzym

Es wurden 4 µl einer Mischung aus 5 mg/ml Poly(1-vinylimidazol-co-allylamin)-Os-(bipy)₂Cl-Redoxpolymer und 5 mg/ml FAD-GDH in 5 mM HEPES Puffer (pH 7) auf eine IO-TiO₂|PbS-Elektrode gegeben und für 15 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde die modifizierte Elektrode intensiv mit Puffer gespült, um ungebundenes Material zu entfernen.

4.5 REM und HR-TEM Experimente

Rasterelektronenmikroskopische (REM) Messungen wurden mit einem JSM-6510 von JEOL bei einer Beschleunigungsspannung von 30 kV mit einer 2.500-fachen und 8.000-fachen Vergrößerung durchgeführt. Die Schichthöhe der IO-TiO₂-Elektrode wurde durch Abkratzen eines Teils der Struktur und Aufzeichnen des IO-Films unter einem Winkel von 45° mit einer 2.500-fachen Vergrößerung bestimmt. HR-TEM-Messungen wurden mit einem FEI TITAN 80-300 Transmissionselektronenmikroskop (TEM) durchgeführt.

4.6 Photoelektrochemische Experimente

Photoelektrochemische Messungen wurden mit einer integrierten photoelektrochemischen Arbeitsstation von Zahner (Deutschland) durchgeführt, welche sich aus einem Potentiostaten für die Lichtsteuerung und einem zweiten Potentiostaten (Zennium) für die elektrochemische Kontrolle zusammensetzt. Für die Beleuchtung wurde, sofern nicht anders angegeben, eine Weißlichtquelle (410-800 nm) verwendet. Alle elektrochemischen Experimente wurden in einer selbstgebauten elektrochemischen Zelle in einer Drei-Elektroden-Anordnung durchgeführt (IO-TiO₂-Arbeitselektrode, Platindraht als Gegenelektrode und Ag/AgCl, (1 M KCl) Referenzelektrode).

5. Danksagung

Wir bedanken uns für die Unterstützung dieser Forschung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (DFG Li 706/8-1 und Pa 794/15-1).

LITERATUR

Aldana J, Wang YA, Peng X (2001) Photochemical Instability of CdSe Nanocrystals Coated by Hydrophilic Thiols. *J. Am. Chem. Soc.* 123: 8844–8850. doi:10.1021/ja016424q

Badura A, Guschin D, Esper B, Kothe T, Neugebauer S, Schuhmann W, Rögner, M (2008) Photo-Induced Electron Transfer Between Photosystem 2 via Cross-linked Redox Hydrogels. *Electroanalysis* 20: 1043–1047. doi:10.1002/elan.200804191

Ciornii D, Riedel M, Stieger KR, Feifel SC, Hejazi M, Lokstein H, Zouni A, Lisdat F (2017) Bioelectronic Circuit on a 3D Electrode Architecture: Enzymatic Catalysis Interconnected with Photosystem I. *J. Am. Chem. Soc.* 139: 16478–16481. doi:10.1021/jacs.7b10161

Efrati A, Lu CH, Michaeli D, Nechushtai R, Alsaoub S, Schuhmann W, Willner I (2016) Assembly of photo-bioelectrochemical cells using photosystem I-functionalized electrodes. *Nat. Energy* 1: 15021. doi:10.1038/nenergy.2015.21

Grätzel M (2001) Photoelectrochemical cells. *Nature* 414: 338–344. doi:10.1038/35104607

Hyun BR, Zhong YW, Bartnik AC, Sun L, Abruña HD, Wise FW, Goodreau JD, Matthews JR, Leslie TM, Borrelli NF (2008) Electron Injection from Colloidal PbS Quantum Dots into Titanium Dioxide Nanoparticles. *ACS Nano* 2: 2206–2212. doi:10.1021/nn800336b

Jasieniak J, Califano M, Watkins SE (2011) Size-Dependent Valence and Conduction Band-Edge Energies of Semiconductor Nanocrystals. *ACS Nano* 5: 5888–5902. doi:10.1021/nn201681s

Kamat PV (2008) Quantum Dot Solar Cells. Semiconductor Nanocrystals as Light Harvesters. *J. Phys. Chem. C* 112: 18737–18753. doi:10.1021/jp806791s

Khalid W, El Helou M, Murböck T, Yue Z, Montenegro JM, Schubert K, Göbel G, Lisdat F, Witte G, Parak WJ (2011) Immobilization of Quantum Dots via Conjugated Self-Assembled Monolayers and Their Application as a Light-Controlled Sensor for the Detection of Hydrogen Peroxide. *ACS Nano* 5: 9870–9876. doi:10.1021/nn2035582

Lisdat F, Schäfer D, Kapp A (2013) Quantum dots on electrodes – new tools for bioelectroanalysis. *Anal. Bioanal. Chem.* 405: 3739–3752. doi:10.1007/s00216-013-6789-1

Mersch, D., Lee, C.-Y., Zhang, J.Z., Brinkert, K., Fontecilla-Camps, J.C., Rutherford, A.W., Reisman, E., 2015. Wiring of Photosystem II to Hydrogenase for Photoelectrochemical Water Splitting. *J. Am. Chem. Soc.* 137: 8541–8549. <https://doi.org/10.1021/jacs.5b03737>

Metzger TS, Chandaluri CG, Tel-Vered R, Shenhar R, Willner I (2016) Donor/Acceptor-Modified Electrodes for Photoelectrochemical and Photobioelectrochemical Applications. *Adv. Funct. Mater.* 26: 7148–7155. doi:10.1002/adfm.201602790

Milton RD, Hickey DP, Abdellaoui S, Lim K, Wu F, Tan B, Minter SD (2015) Rational design of quinones for high power density biofuel cells. *Chem. Sci.* 6: 4867–4875. doi:10.1039/C5SC01538C

Pardo-Yissar V, Katz E, Wasserman J, Willner I (2003) Acetylcholine Esterase-Labeled CdS Nanoparticles on Electrodes: Photoelectrochemical Sensing of the Enzyme Inhibitors. *J. Am. Chem. Soc.* 125: 622–623. doi:10.1021/ja028922k

Pathan HM, Lokhande CD (2004) Deposition of metal chalcogenide thin films by successive ionic layer adsorption and reaction (SILAR) method. *Bull. Mater. Sci.* 27: 85–111. doi:10.1007/BF02708491

Sokol KP, Mersch D, Hartmann V, Zhang JZ, Nowaczyk M, Rögner M, Ruff A, Schuhmann W, Plumeré N, Reisman E (2016) Rational wiring of photosystem II to hierarchical indium tin oxide electrodes using redox polymers. *Energy Environ. Sci.* 9: 3698–3709. doi:10.1039/C6EE01363E

Riedel M, Hölzel S, Hille P, Schörmann J, Eickhoff M, Lisdat F, 2017a. InGaN/GaN nanowires as a new platform for photoelectrochemical sensors – detection of NADH. *Biosens. Bioelectron.* 94: 298–304. doi:10.1016/j.bios.2017.03.022

Riedel M, Sabir N, Scheller FW, Parak WJ, Lisdat F (2017b) Connecting quantum dots with enzymes: mediator-based approaches for the light-directed read-out of glucose and fructose oxidation. *Nanoscale* 9: 2814–2823. doi:10.1039/C7NR00091J

Riedel M, Lisdat F (2018) Integration of Enzymes in Poly-aniline-Sensitized 3D Inverse Opal TiO₂ Architectures for Light-Driven Biocatalysis and Light-to-Current Conversion. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 10: 267–277. doi:10.1021/acsami.7b15966

Tel-Vered R, Yildiz HB, Yan YM, Willner I (2010) Plugging into Enzymes with Light: Photonic “Wiring” of Enzymes with Electrodes for Photobiofuel Cells. *Small* 6: 1593–1597. doi:10.1002/smll.201000296

Yue Z, Lisdat F, Parak WJ, Hickey SG, Tu L, Sabir N, Dorfs D, Bigall NC (2013) Quantum-Dot-Based Photoelectrochemical Sensors for Chemical and Biological Detection. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 5: 2800–2814. doi:10.1021/am3028662

Zafar MN, Beden N, Leech D, Sygmond C, Ludwig R, Gorton L (2012) Characterization of different FAD-dependent glucose dehydrogenases for possible use in glucose-based biosensors and biofuel cells. *Anal. Bioanal. Chem.* 402: 2069–2077. doi:10.1007/s00216-011-5650-7

Zhang J, Tu L, Zhao S, Liu G, Wang Y, Wang Y, Yue Z (2015) Fluorescent gold nanoclusters based photoelectrochemical sensors for detection of H₂O₂ and glucose. *Biosens. Bioelectron. Special Issue: BIOSENSORS 2014* (67): 296–302. doi:10.1016/j.bios.2014.08.037

Zhao WW, Xu JJ, Chen HY (2017) Photoelectrochemical enzymatic biosensors. *Biosens. Bioelectron.* 92: 294–304. doi:10.1016/j.bios.2016.11.009

AUTOREN

Dr. Marc Riedel
Dipl. Ing. (FH) Daniel Schäfer
Prof. Dr. Fred Lisdat
Biosystemtechnik
Technische Hochschule Wildau

Prof. Dr. Wolfgang J. Parak
Universität Hamburg

Dr. Adrian Ruff
Prof. Dr. Wolfgang Schuhmann
Ruhr-Universität Bochum

E-Mail für Korrespondenz:
fred.lisdat@th-wildau.de

