

EFFEKT UNTERSCHIEDLICH SUBSTITUIERTER SULFONIERTER POLYANILINE AUF DEN ELEKTRONENTRANSFER MIT PYRROLOCHINOLINCHINON-ABHÄNGIGER GLUKOSEDEHYDROGENASE

David Sarauli, Chenggang Xu, Birgit Dietzel, Burkhard Schulz, Fred Lisdat

Zusammenfassung

Sulfonierte Polyaniline erwiesen sich bereits als geeignete Polymere für den Aufbau von Biosensoren. Aus diesem Grund setzten wir unterschiedlich substituierte Polymerformen für die Untersuchungen der direkten Elektronenübertragung zum Redoxenzym PQQ-GDH (Pyrrolochinolinon-abhängige Glukosedehydrogenase) ein. Dafür wurden zuerst neue Copolymere synthetisiert. Als Basis für die Synthesen wurden 2-Methoxyanilin-5-Sulfonsäure (MAS), 3-Aminobenzensulfonsäure (ABS), 3-Aminobenzoessäure (AB) und Anilin (AN) ausgewählt und deren Verhältnisse variiert. Alle Copolymere wurden hinsichtlich der direkten Reaktion mit PQQ-GDH untersucht. Diese Wechselwirkung wurde zunächst in Lösung, anschließend auch auf Elektroden beobachtet. Die Ergebnisse zeigen, dass nur die aus MAS- und AN-Einheiten bestehenden Copolymere in der Lage sind, mit dem Enzym in Lösung direkt zu interagieren, was wahrscheinlich dem Emeraldin Salz (ES) Redoxzustand des Polymers zuzuschreiben ist. Immobilisiert man die Polymere und das Enzym auf Kohlenstoffnanoröhrenbasierten Elektroden, generiert man direkte Bioelektrokatalyse auch im Falle der aus ABS/AB- und MAS/AB-Einheiten bestehenden Copolymere, die sich nach der Synthese im Pernigranilin Base (PB) Redoxzustand befinden. Im Gegensatz zur Situation in Lösung kann auf Elektroden das Potential zusätzlich genutzt werden, um Elektronen vom Enzym auf das Polymer zu übertragen. Solche Polymerbasierten Enzymelektroden besitzen Anwendungspotential in der Sensorik, aber auch in Biobrennstoffzellen.

Abstract

Sulfonated polyanilines have become promising building blocks in the construction of biosensors, and therefore we use here differently substituted polymer forms to investigate the role of their structural composition and properties in achieving a direct electron transfer with the redox enzyme pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase (PQQ-GDH). To this end, new copolymers containing different ratios of 2-methoxyaniline-5-sulfonic acid (MAS), 3-aminobenzenesulfonic acid (ABS) and 3-aminobenzoic acid (AB) units have been chemically synthesized. All polymers have been studied with respect to their ability to react directly with PQQ-GDH. This interaction has been monitored initially in solution, and subsequently on electrode surfaces. The results show that only copolymers with MAS and aniline units can directly accept electrons from PQQ-GDH in solution; the background can be mainly ascribed to the emeraldine salt redox state of the polymer, allowing rather easy reduction. However, when polymers and the enzyme are immobilized on the surface of carbon nanotube-containing electrodes, direct bioelectrocatalysis is also feasible in the case of copolymers composed of ABS/AB and MAS/AB, existing initially in pernigraniline base form. This verifies that a productive interaction of the enzyme with differently substituted polymers is feasible when the electrode potential can be used to drive the reaction towards the oxidation of the substrate-reduced enzyme. These results clearly demonstrate the potential of these polymer-based enzyme electrodes for the construction of biosensors and biofuel cells.

I. EINLEITUNG

Sulfonierte Polyaniline, die zur Klasse der konjugierten, leitfähigen Polymere gehören, gewannen in der letzten Zeit besondere Aufmerksamkeit auf Grund ihrer hohen Leitfähigkeit im Vergleich zu unsubstituierten Polyanilinen, ihrer verbesserten Löslichkeit, den elektrischen Eigenschaften und der Redoxaktivität in einem weiten pH-Bereich (Liao et al. 2012: 1570; Malinauskas 2004: 214; Pornputtkul et al. 2010: 9982; Yue et al. 1992: 4410). Darüber

hinaus wurden verschiedene Strategien der Funktionalisierung der Polymere durch Dotiersubstanzen oder die Copolymerisierung von Anilinen mit unterschiedlich substituierten Derivaten verfolgt, um Polymere mit besseren elektrokatalytischen Eigenschaften herzustellen, die als Bausteine in der Konstruktion von Biosensoren angewandt werden können (Hatchett et al. 2008: 746; Sassolas et al. 2012: 489; Wallace et al. 2002: 953; Wie et al. 2006: 839; Cosnier et al. 2011: 2146). Da viele Enzyme unter physio-

logischen Bedingungen aktiv sind, ist die Notwendigkeit der Verwendung von leitfähigen Polyanilininformen, die bei physiologischem pH nicht zu Isolatoren werden, von besonderer Wichtigkeit (Liao et al. 2012: 1570; MacDiarmid 2001: 2581; Tran et al. 2009: 1487).

Selbstdotierung kann besonders effektiv durch die Einbringung der Sulfongruppen in Polyanilin erreicht werden. Die selbstdotierten Polyaniline wurden bereits in folgenden

Bereichen eingesetzt und untersucht: (i) Mediator-vermittelte Katalyse von Oxidationsreaktionen unterschiedlicher Alkohole (Saio et al. 2010: 2177) sowie die Detektion von kleinen Molekülen wie Ochratoxin A (Muchindu et al. 2011: 122) oder Diazinon (Michira et al. 2011: 469); (ii) Bindungsreaktionen – z.B. Detektion der DNA-Hybridisierung (Du et al. 2010: 1022; Yang et al. 2011: 140) und (iii) Interaktion mit Redoxproteinen wie Cytochrom c (Zhang et al. 2006: 1107; Sarauli et al. 2012: 3848) und Hämoglobin (Zhou et al. 2005: 303). Darüber hinaus können die negativ geladenen Sulfonsäure-Gruppen die Immobilisierung von Proteinen/Enzymen in einzelne sowie multiple Schichtsysteme auf Elektroden durch elektrostatische Wechselwirkungen begünstigen. Tatsächlich ist bereits über einige Nanostrukturen mit Cytochrom c (Sarauli et al. 2012: 3848; Beissenhirtz et al. 2004: 4357; Oh et al. 2004: 307; Sarauli et al. 2010: 14271) und/oder Redoxenzymen wie Tyrosinase (Mangombo et al. 2010: 267), Glukose Oxidase (Lee et al. 2010: 74), Sulfitoxidase (Spricigo et al. 2008: 972) und Bilirubinoxidase (Dronov et al. 2008: 3000) berichtet worden.

Das Enzym Pyrrolochinolinchinon-abhängige Glukosedehydrogenase (PQQ-GDH) setzt Glukose und andere Aldosen in entsprechende Laktone um. Zudem ist dieses Enzym sauerstoffinsensitiv und katalytisch aktiv bei physiologischem pH. Diese Eigenschaften machen PQQ-GDH vielversprechend sowohl für die Anwendung in der Biosensorik (Oubrie 2003: 143; Tkac et al. 2009: 53; Durand et al. 2010: 750) als auch für die Konstruktion von Biobrennstoffzellen (Flexer et al. 2011: 5721; Göbel et al. 2011: 1240; Razumiene et al. 2003: 83; Tanne et al. 2010: 530). Auch wenn ein direkter Elektronentransfer zwischen PQQ-GDH und Elektroden schwer zu erreichen ist (Ivnitski et al. 2007: 1562; Okuda et al. 2004: 1562), wurde bereits über die mediatorfreie bioelektrokatalytische Umsetzung von Glukose berichtet (Flexer et al. 2011: 5721; Göbel et al. 2011: 1240; Ivnitski et al. 2007: 1562; Sarauli et al. 2012: 4615; Schubart et al. 2012: 224; Razumiene et al. 2006: 5150). Deshalb wurde PQQ-GDH für die Untersuchungen

des direkten Elektronentransfers mit unterschiedlich substituierten Polyanilinen ausgewählt.

Zunächst wurden verschiedene Copolymere chemisch synthetisiert und charakterisiert. Zusammen mit einem bereits veröffentlichten Homopolymer sowie dem Kopolymer aus 2-Methoxyanilin-5-Sulfonsäure (MAS) und Anilin (AN) (Sarauli et al. 2012: 3848) wurden Copolymere herangezogen, die entweder aus MAS und 3-Aminobenzensulfonsäure (ABS) oder 3-Aminobenzoessäure (AB) Monomere bestehen (siehe Abb. 1). Alle diese Polymere wurden für die Untersuchungen des Elektronentransfers eingesetzt. Die Wechselwirkung mit dem Enzym wurde anfangs in Lösung, anschließend auf Oberflächen charakterisiert. Dafür wurden die Polymerfilme auf Buckypapier (zu Papierform gepresste mehrwändige Kohlenstoff-nanoröhren) immobilisiert. Der Einfluss der Polymerzusammensetzung auf die Effizienz des Elektronentransfers mit freier sowie gebundener PQQ-Glukose-dehydrogenase wird diskutiert.

II. EXPERIMENTELLER TEIL

Alle Chemikalien und Lösungsmittel wurden bei Sigma, Acros Organics und Fluka gekauft und ohne weitere Reinigungsprozeduren benutzt. sGDH (*Acinetobacter calcoaceticus*) wurde von der Roche Diagnostics GmbH zur Verfügung gestellt. Das Enzym wurde in *Escherichia coli* rekombinant exprimiert. PQQ wurde von Wako Pure Chemical Industries bezogen. 18 MΩ deionisiertes Wasser (Eschborn, Deutschland) wurde in allen Untersuchungen benutzt. Frisch destillierte Lösungsmittel wurden für alle chemischen Synthesen eingesetzt. Die Synthesestrategien sind in (Sarauli et al. 2013: 8290) beschrieben. Die Referenzelektrode Ag/AgCl; 1M KCl wurde in dieser Arbeit benutzt.

III. ERGEBNISSE UND DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, den Einfluss von unterschiedlich funktionalisierten sulfonierten Polyanilinen auf den Elektronentransfer mit dem Redoxenzym PQQ-GDH sowohl in Lösung als auch

im immobilisierten Zustand auf polymermodifizierten Elektroden zu evaluieren. Dafür wurden verschiedene Polymere eingesetzt (Abb. 1 und Tab. 1).

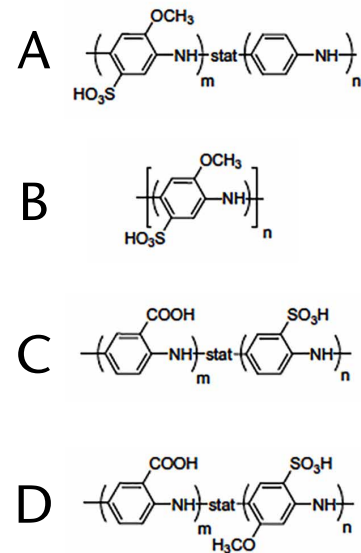


Abb. 1) Zusammensetzung der zu untersuchenden Polyanilin-Copolymere: A) Poly(2-Methoxyanilin-5-Sulfonsäure-co-Anilin) (PMSA1); B) Poly(2-Methoxyanilin-5-Sulfonsäure) (PMSA4); C) Poly(3-Aminobenzoessäure-co-3-Aminobenzen-sulfonsäure) (PABSA); D) Poly(3-Aminobenzoessäure-co-2-Methoxyanilin-5-Sulfonsäure).

Copolymere	Monomerverhältnisse		M _n [G/Mol]	M _w [G/Mol]
	m*	n*		
PMSA1	4.5	1	-	-
PMSA4				3680
PABSA1	1.1	1	12500	18700
PABSA2	1.8	1	11300	16700
PABMSA1	1	1.8	13400	15400
PABMSA2	2	1	12400	13500

Tab. 1) Zusammensetzung und Molmassen der zu untersuchenden Copolymere. m* und n* sind den Strukturformeln in Abb. 1 zu entnehmen.

SPEKTRALE CHARAKTERISIERUNG DER POLYMERE

Die IR- sowie NMR-Spektren von allen Polymeren wurden bereits veröffentlicht (Sarauli et al. 2012: 3848; Sarauli et al. 2013: 8290). Die UV-Vis-Spektren sind in der Abb. 2 dargestellt.

In der Abb. 2A sind die UV-Vis-Spektren von PMSA1- sowie PMSA4-Polymeren zusammengestellt. Die Anwesenheit von Methoxy- und Sulfongruppen am Anilinring beeinflusst die spektralen Eigenschaften sowie die strukturelle Konformation der Copolymer. Die gepufferten PMSA1 und PMSA4-Lösungen sind gelb-grün; die Spektren beinhalten sowohl eine deutliche Polaron-Bande bei 469 nm als auch eine eher schwächere Bande bei 320 nm ($\pi-\pi^*$ Übergang). Alle diese spektralen Eigenschaften charakterisieren den Emeraldin (ES) Zustand (gemischter Redoxzustand: siehe Pornputtkul et al. 2010: 9982).

Abb. 2B und 2C demonstrieren die UV-Vis Spektren von PABSA (siehe Abb. 1C) sowie PABMSA (siehe Abb. 1D). Hier konnten zwei signifikante Banden identifiziert werden: die intensivsten Banden bei 286-290 nm, die den $\pi-\pi^*$ Übergängen im Benzenoidring zuzuschreiben sind (B-Bande), aber auch die kleineren Banden bei 540-550 nm, die den Übergängen in Chinondiimin, Einheiten entsprechen (Q-Bande). Im Gegensatz zu PMSA1 und PMSA4 charakterisieren diese spektralen Eigenschaften den Pernigranilin (PB) Redoxzustand (vollständig oxidierte Form). Sowohl die als Peierls Übergang bezeichnete Q-Bande bei 540-550 nm (Albuquerque et al. 2000: 19; Mav-Golez et al. 2011: 1845) als auch das B/Q Extinktionsverhältnis $EB/EQ \approx 2.6 - 3.0$ deuten auf den PB Redoxzustand.

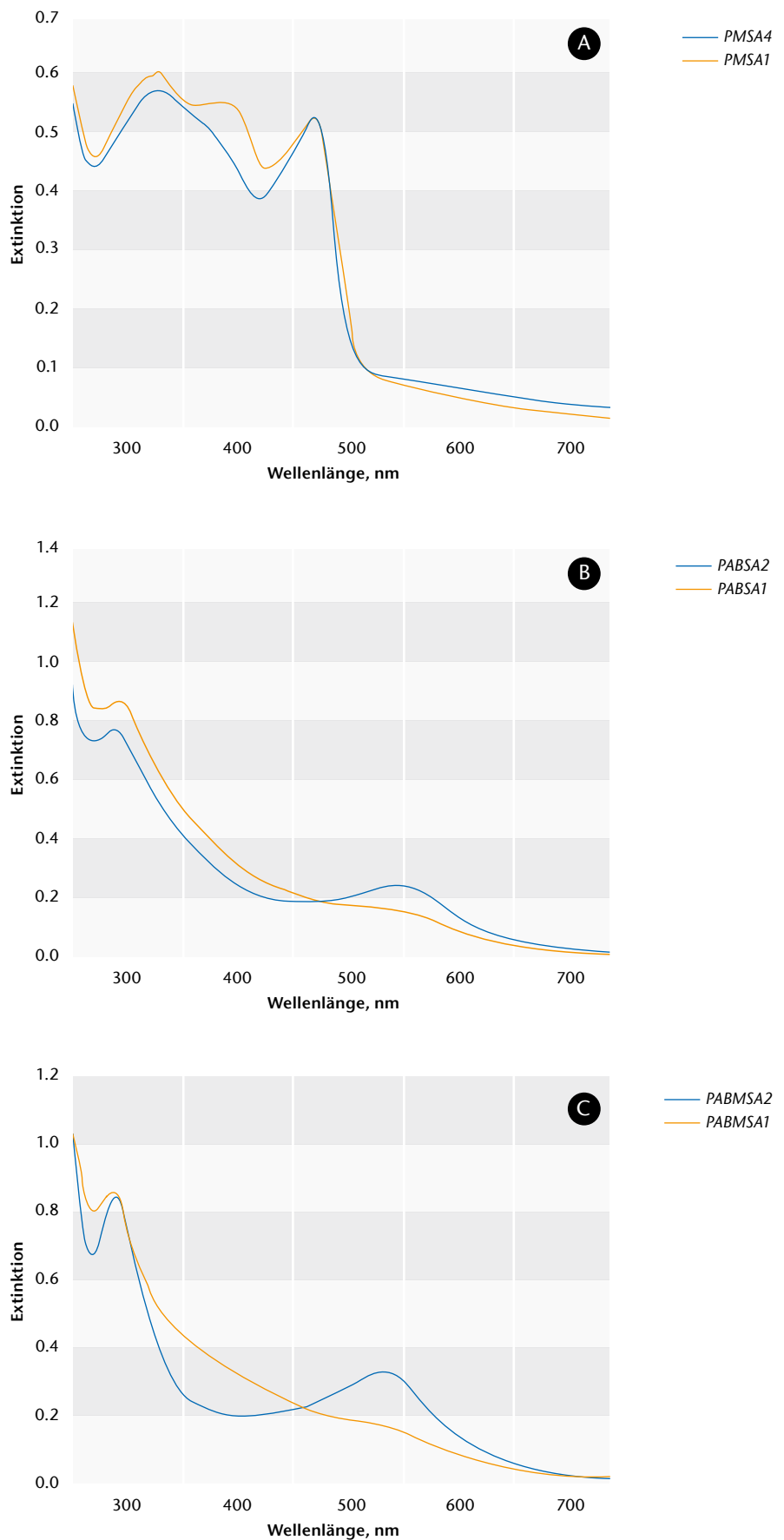


Abb.2) UV-Vis-Spektren der untersuchten Polymere. A) PMSA1 und PMSA4 (Abb. 1 A und B); B) PABSA1 und PABSA 2 (Abb. 1 C) und C) PABMSA1 und PABMSA2 (Abb. 1 D). Experimentelle Bedingungen: [Polymer]= 40 µg/ml, 5 MES + 1 mM CaCl2 Puffer, pH 7.

WECHSELWIRKUNG MIT PQQ-GDH IN LÖSUNG

Um den Elektronentransfer zwischen den Polymeren und dem Enzym in Lösung festzustellen, wurden UV-Vis-Messungen mit allen in Tab. 1 aufgelisteten Polymeren durchgeführt. Abb. 3 fasst die spektralen Änderungen an den PMSA1- (A) und PMSA4- (B) Polymeren nach der Zugabe von Substrat (Glukose) zu den jeweiligen Polymerlösungen mit PQQ-GDH zusammen. Aus der Abbildung ist ersichtlich, dass die Polymere

in Anwesenheit von Enzym und Substrat reduziert werden. Dies kann aus der Betrachtung der Peaks bei 344 nm und 408 nm geschlussfolgert werden (Pornputtkul et al 2010: 9982; Sarauli et al. 2012: 3848). Die Reduktion von PMSA1 und PMSA4 zeigt eindeutig, dass die Polymere als Reaktionspartner für die PQQ-GDH agieren. Erstaunlicherweise zeigen andere sulfonierte Polymere, die eine Karboxylgruppe

beinhalten, ein gegensätzliches Verhalten in Lösung. Die spektralen Änderungen nach der Zugabe von Substrat zu den Polymer/Enzym-Lösungen sind in der Abb. 4 dargestellt. Sowohl die Abb. 4A als auch 4B zeigen, dass keine Veränderungen an den Polymeren auftreten. Das Gleiche gilt auch für die zwei anderen Polymere (PABSA2 und PABMSA1), die hier nicht gezeigt werden.

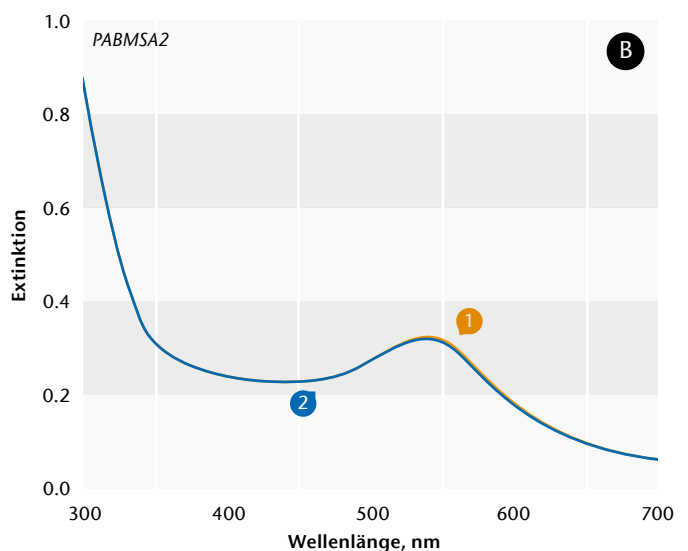
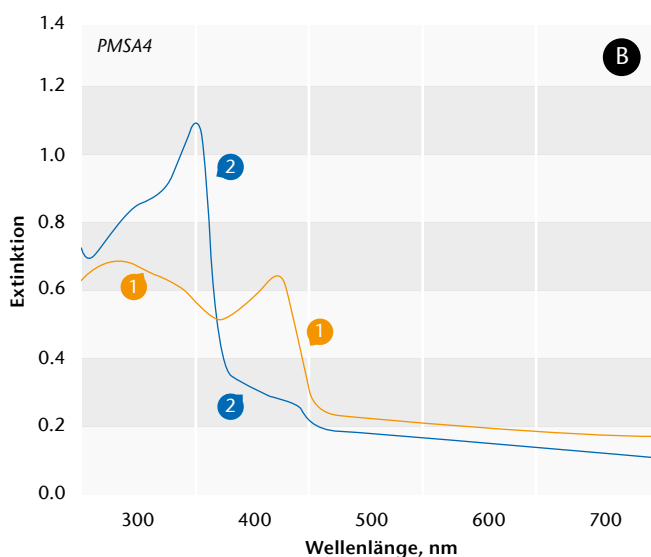
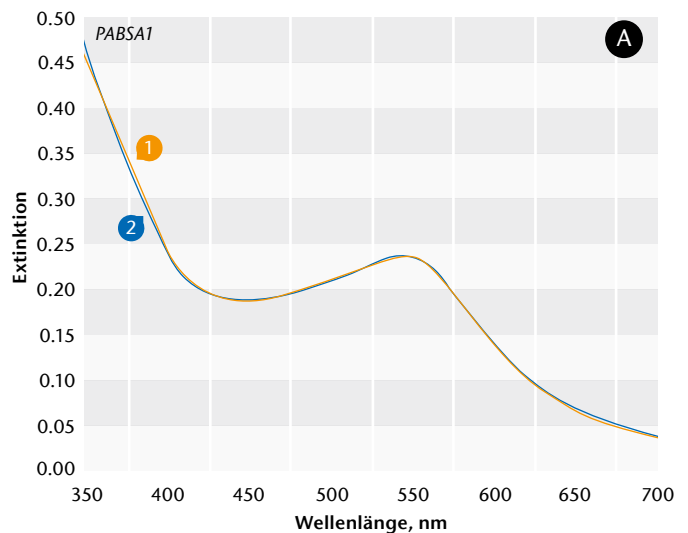
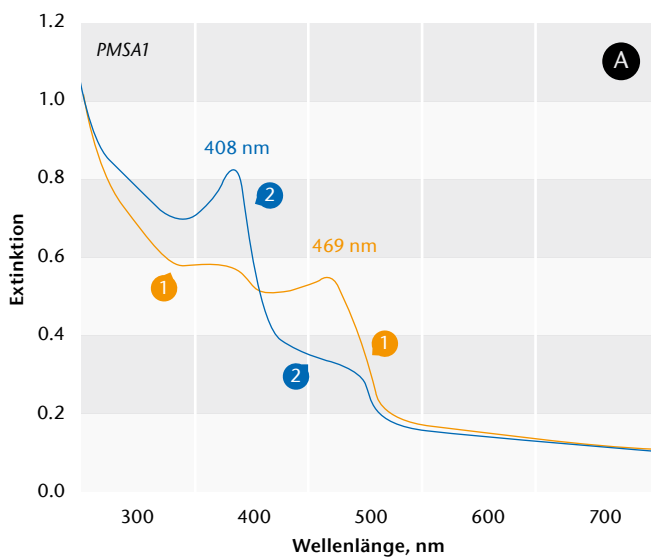


Abb. 3) UV-Vis-Spektren von PMSA1 (A) und PMSA4 (B) in Abwesenheit (1) sowie Anwesenheit vom Substrat Glukose. Experimentelle Bedingungen: [Polymer]= 40 µg/ml, 5 MES + 1 mM CaCl₂ Puffer, pH 7.

Abb. 4) UV-Vis-Spektren von PABSA1 (A) und PABMSA2 (B) in Abwesenheit (1) sowie Anwesenheit vom Substrat Glukose. Experimentelle Bedingungen: [Polymer]= 40 µg/ml, 5 MES + 1 mM CaCl₂ Puffer, pH 7.

Um dieses Verhalten besser zu verstehen, wurden alle Polymere mit Natriumdithionit chemisch reduziert. Abb. 5 präsentiert ein Diagramm, in welchem die Menge an Reduktionsmittel aufgetragen wurde, die für die vollständige Reduktion notwendig ist. Anhand dieser Auftragung kann geschlussfolgert werden, dass PMSA1 und PMSA4 im Vergleich zu den anderen Polymeren leichter zu reduzieren sind. Das ist auf die verschiedenen Redoxzustände der Polymere nach der Synthese (ES und PB) zurückzuführen.

Um festzustellen, welche experimentellen Bedingungen für den Elektronentransfer mit PQQ-GDH am besten geeignet sind, wurden spektrophotometrische Messungen bei unterschiedlichen pH-Werten durchgeführt. Die pH-abhängigen Reduktionsgeschwindigkeiten für PMSA1 und PMSA4 bei 408 nm sind in der Abb. 6 zu sehen. Die Abhängigkeit zeigt, dass die Reduktion der Polymere in einem breiten pH-Bereich möglich ist; die höchsten Geschwindigkeiten wurden jedoch für beide Polymere bei pH 6 gemessen. Dies ist eine gute Übereinstimmung mit bereits bekannten Daten für das katalytische Verhalten der PQQ-GDH mit 2.6-Dichlorophenol-indolphenol als Elektronenakzeptor (Anthony 2001: 757; Dokter et al. 1986: 163). Es kann hier geschlussfolgert werden, dass die Reaktion mit den Polymeren eher durch das Aktivitätsmuster des Enzyms und nicht durch den Elektronenaustausch zwischen dem Biomolekül und den Polymeren dominiert wird. Deshalb wurden alle weiteren elektrochemischen Untersuchungen bei pH 6 durchgeführt.

Das Verhalten wurde nun an unmodifizierten Goldelektroden elektrochemisch untersucht. Abb. 7 zeigt die zyklischen Voltammogramme von PMSA1- und PMSA4-Lösungen, die sowohl PQQ-GDH als auch Glukose beinhalten. Das elektrochemische Signal von PASA1 allein (Voltammogramm (1) in Abb. 7A) zeigt ein deutliches Redoxpaar mit dem formalen Potential ~ 0.18 V vs. Ag/AgCl und eine schwächere Redoxumwandlung bei ~ 0.05 V vs. Ag/AgCl. Bei PMSA4 (Abb. 7B) sind die Redoxpaare eher schwächer zu sehen, haben dennoch ähnliche Potential-

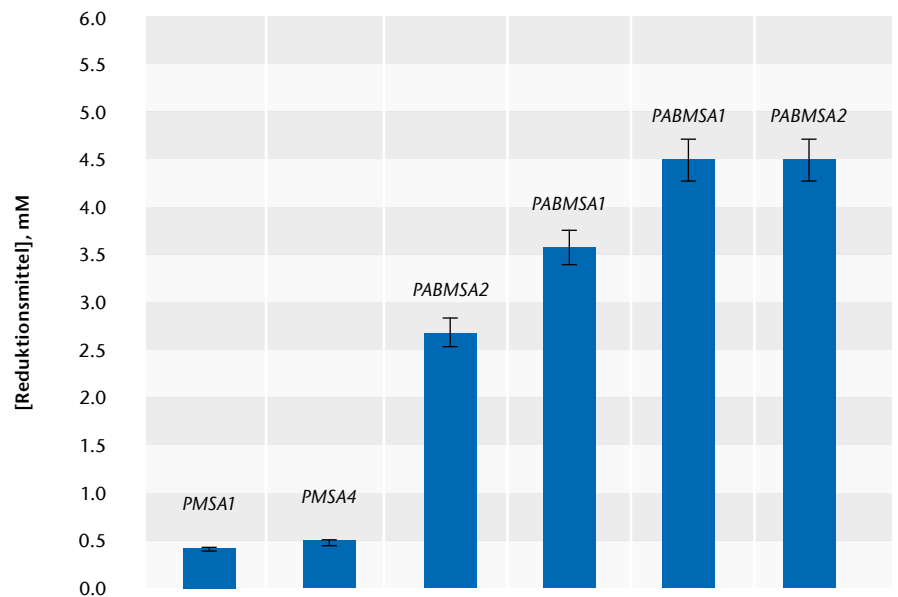


Abb. 5) Notwendige Menge an Reduktionsmittel Natriumdithionit für die vollständige Reduktion der Polymere (gemessen mit UV-Vis). Experimentelle Bedingungen: [Polymer] = 40 µg/ml, 5 MES + 1 mM CaCl₂ Puffer, pH 7.

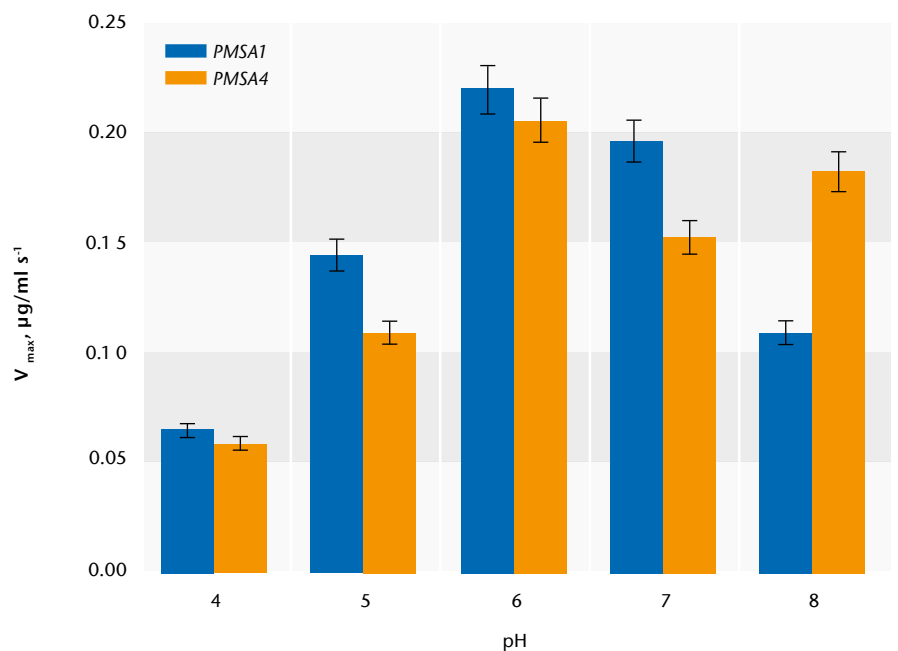


Abb. 6) pH-abhängige Reduktionsgeschwindigkeiten V_{max} für PMSA1 und PMSA4 in Anwesenheit von PQQ-GDH und Glukose (gemessen mit UV-Vis). Experimentelle Bedingungen: [Polymer] = 40 µg/ml, [PQQ-GDH] = 10 µM, [Glukose] = 5 mM, 5 MES + 1 mM CaCl₂ Puffer.

werte. Durch die Zugabe von Enzym in Lösung (Voltammogramme (2) in Abb. 7) sind keine deutlichen Veränderungen feststellbar.

GDH mit 2.6-Dichlorophenol-indolphenol als Elektronenakzeptor (Anthony 2001: 757; Dokter et al. 1986: 163). Es kann hier geschlussfolgert werden, dass die Reaktion mit den Polymeren eher durch das Aktivitätsmuster des Enzyms und nicht durch den Elektro-

naustausch zwischen dem Biomolekül und den Polymeren dominiert wird. Deshalb wurden alle weiteren elektrochemischen Untersuchungen bei pH 6 durchgeführt.

Das Verhalten wurde nun an unmodifizierten Goldelektroden elektrochemisch untersucht. Abb. 7 zeigt die zyklischen Voltammogramme von PMSA1- und PMSA4-Lösungen, die sowohl PQQ-GDH als auch Glukose be-

inhalten. Das elektrochemische Signal von PASA1 allein (Voltammogramm (1) in Abb. 7A) zeigt ein deutliches Redoxpaar mit dem formalen Potential ~ 0.18 V vs. Ag/AgCl und eine schwächere Redoxumwandlung bei ~ 0.05 V vs. Ag/AgCl. Bei PMSA4 (Abb. 7B) sind die Redoxpaare eher schwächer zu sehen, haben dennoch ähnliche Potentialwerte. Durch die Zugabe von Enzym in Lösung (Voltammogramme (2) in Abb. 7) sind keine deutlichen Veränderungen feststellbar.

Allerdings ändert sich die Situation drastisch durch die Zugabe von Glukose (Voltammogramme (3): signifikante bioelektrokatalytische Ströme erscheinen für beide Polymere ($\Delta I \approx 3$ μ A bei 0.4 V). Dieser Prozess startet bei $E \sim 0$ V vs. Ag/AgCl. Die Messungen bestätigen den Befund aus den spektrophotometrischen Studien, nämlich dass die Polymere in der Lage sind, die Elektronen vom substrat-reduzierten Enzym aufzunehmen. Darüber hinaus können die Elektronen weiter zur Elek-

trode transportiert werden. Da dieser Prozess bei einem relativ niedrigeren Potential beginnt, muss das Polymer nicht vollständig oxidiert sein, um einen Elektronentransfer einzugehen.

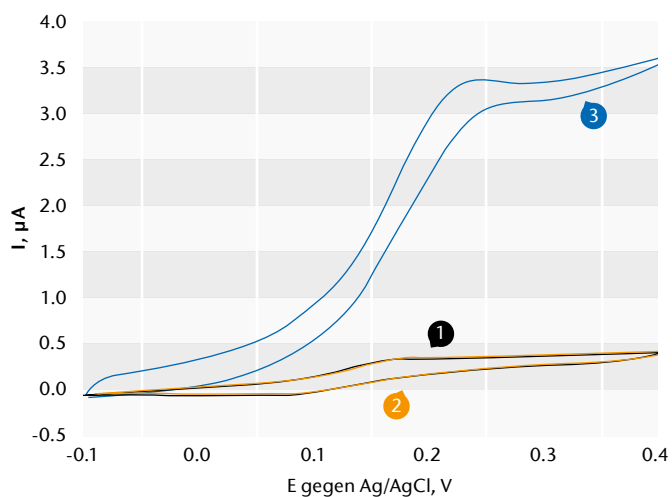
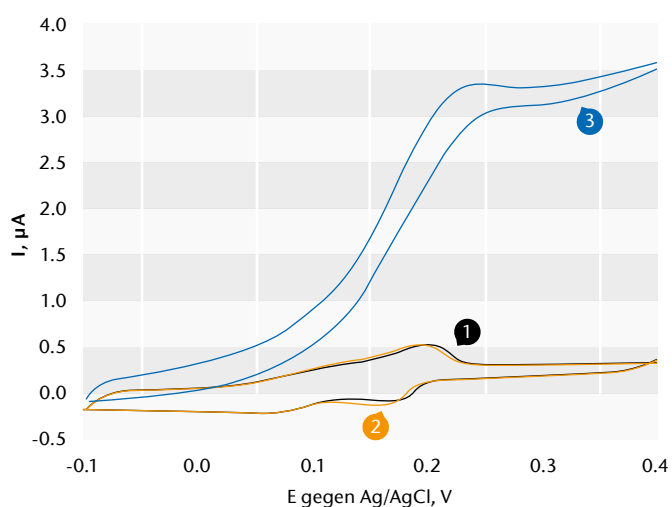


Abb. 7) Zyklische Voltammogramme von (A) PMSA1- und (B) PMSA4-Polymerlösungen ohne Enzym (1), mit Enzym (2) und mit Enzym und Glukose (3). Experimentelle Bedingungen: [Polymer] = 200 μ g/ml, [PQQ-GDH] = 10 μ M, [Glukose] = 5 mM, 5 MES + 1 mM CaCl₂ Puffer, pH 6.

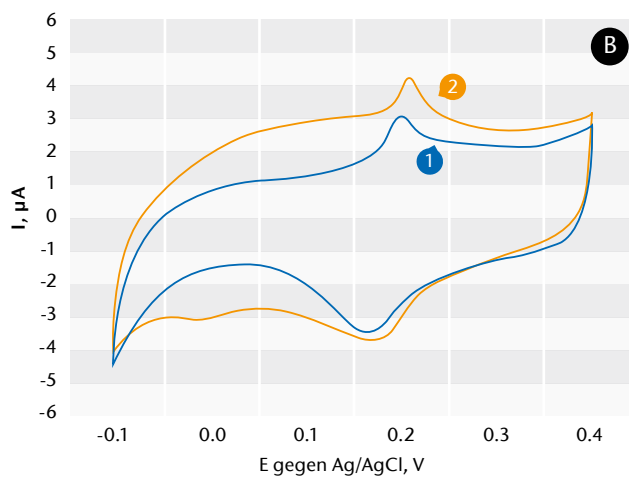
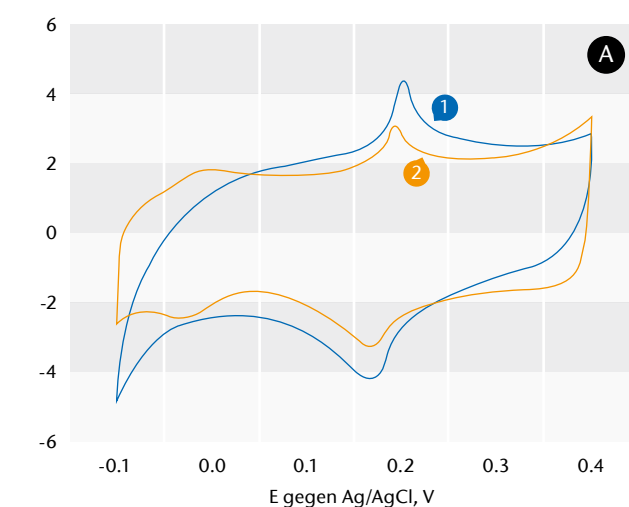


Abb. 8) Zyklische Voltammogramme von Buckypapierelektroden: (A) PMSA1-Polymerfilme (1) und PMSA1-PQQ-GDH-Filme (2); (B) PMSA4-Polymerfilme (1) und PMSA4-PQQ-GDH-Filme (2). Experimentelle Bedingungen: Scanrate 5 mV/s, 5 MES + 1 mM CaCl₂ Puffer, pH 6.

DIREKTER ELEKTRONENTRANSFER MIT PQQ-GDH AUF ELEKTRODEN

Für den nächsten biosensorisch relevanten Anwendungsschritt wurde ein kohlenstoff-nanoröhrenhaltiges Material – Buckypapier - als Oberfläche ausgewählt. Der Grund dafür ist die große und nanostrukturierte Oberfläche, die für die Konstruktion von Enzymelektroden gut geeignet ist (Ahmadalinezhad et al. 2011: 287; Chatterjee et al. 2012: 302; Hussein et al. 2011: 4133).

Zunächst wurden die Filme von PMSA1 und PMSA4 aus wässriger und gepufferter Polymerlösung auf Buckypapier abgeschieden, anschließend wurden

Abb. 9 fasst die zyklischen Voltammogramme von Buckypapier-PMSA1-PQQ-GDH- und Buckypapier-PMSA4-PQQ-GDH-Elektroden in Anwesenheit von Glukose zusammen. Es ist ersichtlich, dass ein signifikanter bioelektrokatalytischer Strom in Anwesenheit von Glukose erscheint ($\Delta I \approx 15 \mu\text{A}$ bei 0.4 V für beide Elektroden). Dieser Strom beginnt bei $E = -0.025 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl und ist konzentrationsabhängig (siehe Einfügung in der Abb. 9). Die Bioelektrokatalyse zeigt deutlich, dass ein Elektronentransfer zwischen dem Redoxzentrum des Enzyms und der Elektrode erreicht werden kann. Um Wechselwirkungen zwischen der PQQ-GDH und den Kohlenstoffnano-

immobilisiert, danach das Enzym aufgebracht und anschließend das elektrochemische Verhalten der Elektroden in Anwesenheit von Glukose untersucht. Die Ergebnisse sind in der Abb. 10 zusammengefasst. Aus den Voltammogrammen ist ersichtlich, dass in beiden Fällen eine Bioelektrokatalyse beobachtet werden kann. Die Intensitäten der bioelektrokatalytischen Ströme sind zwar kleiner als die PMSA1 und PMSA4 modifizierten Elektroden (PABSA1: $\Delta I \approx 5-6 \mu\text{A}$ und PABMSA2: $\Delta I \approx 11-12 \mu\text{A}$ bei 0.4 V), dennoch deutlich größer als die Ströme von unmodifiziertem Buckypapier. Die Bioelektrokatalyse erscheint trotz der Tatsache, dass diese Polymere keine direkte

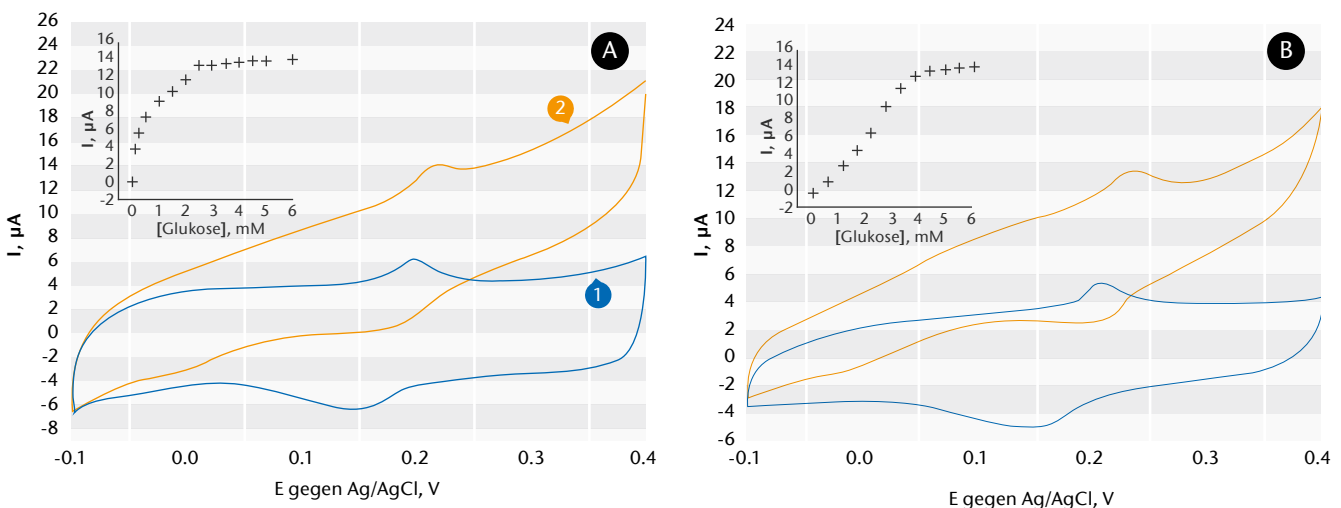


Abb. 9) Zyklische Voltammogramme von Polymer-Enzym-Filmen auf Buckypapier-Elektroden: (A) PMSA1-PQQ-GDH und (B) PMSA4-PQQ-GDH Filme in Abwesenheit (1) sowie Anwesenheit von Glukose (2); Die Einfügung: das konzentrations-abhängige katalytische Verhalten bei $E = 0.4 \text{ V}$. Experimentelle Bedingungen: Scanrate 5 mV/s , $[\text{Glukose}] = 5 \text{ mM}$, $5 \text{ MES} + 1 \text{ mM CaCl}_2$ Puffer, $\text{pH } 6$.

diese Filme voltammetrisch untersucht (Voltammogramme (1) in Abb. 8). Als Nächstes wurde darauf das Enzym durch Adsorption aus konzentrierter Lösung immobilisiert (Voltammogramme (2) in Abb. 8). Zwei Redoxpaare können im letzten Fall detektiert werden: deutliche Redoxumwandlungen der Polymere bei $E = +0.18 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl zusammen mit schwächeren Redoxpaaren bei $E = -0.025 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl, die der adsorbierten PQQ-GDH zuzuschreiben sind (da sie nur dann erscheinen, wenn das Enzym immobilisiert ist - Vergleich (1) und (2) in der Abb. 8A und 8B). Das formale Potential ($E \sim -0.025 \text{ V}$ vs. Ag/AgCl) stimmt mit bereits veröffentlichten Daten für immobilisierte PQQ-GDH ungefähr überein (Göbel et al. 2011: 1240; Ivnitski et al. 2007: 1562).

röhren zu evaluieren, wurden Messungen auch ohne Polymer durchgeführt. Der bioelektrokatalytische Strom erscheint auch ohne Polymerfilm, jedoch ist seine Intensität deutlich geringer ($\Delta I \approx 3 \mu\text{A}$ bei 0.4 V). So kann man definitiv schlussfolgern, dass die Anwesenheit des Polymers auf der Elektrode die Intensität der Bioelektrokatalyse deutlich steigert. Der Grund dafür ist in erster Linie die optimale Oberfläche, auf der sich das Enzym vorteilhaft orientieren kann, aber auch die hohe Dichte an Andockstellen für das Enzym.

Auch wenn der Elektronentransfer zwischen PQQ-GDH- und PABSA- sowie PABMSA-Polymeren in Lösung nicht beobachtet werden konnte, wurden die Polymere auf Buckypapier

Wechselwirkung mit dem Enzym in Lösung eingehen. Diese Messungen bestätigen die Idee, dass der ursprüngliche Redoxzustand der Polymere einen Einfluss auf den Elektronentransfer mit Biomolekülen hat. Offensichtlich liegt hier kein chemisches „Missfit“ in den Eigenschaften der Polymere in Bezug auf eine Interaktion mit dem Enzym vor und das Potential kann als zusätzliches Mittel benutzt werden, um die Reaktion zur Elektrode zu steuern. Das Startpotential, ab welchem der elektrokatalytische Strom beobachtet werden kann, ist in guter Übereinstimmung mit den Redox-eigenschaften des Enzym-gebundenen PQQ. Man kann auch feststellen, dass keine hohen Potentiale notwendig sind, um die Elektronen aus der bioelektrokata-

lytischen Oxidation der Zuckermoleküle zu „sammeln“. Diese Ergebnisse sind interessant und demonstrieren, dass die Untersuchungen in Lösung nur erste Hinweise auf die Auswahl geeigneter Polymere liefern. Weitere Faktoren beeinflussen die erfolgreiche Konstruktion von mediatorfreien Enzymelektroden. Auch die Oberfläche

ist hierfür von besonderer Wichtigkeit. Die polymermodifizierte Kohlenstoffnanoröhren-basierte Buckypapieroberfläche bietet offensichtlich ein für die Bindung der Biomoleküle geeignetes Interface. Nichtsdestotrotz soll hier auch erwähnt werden, dass die zwei Polymere, die eine direkte Wechselwirkung mit dem Enzym in

Lösung eingehen, auch die effizienteste Bioelektrokatalyse auf Buckypapier zeigen.

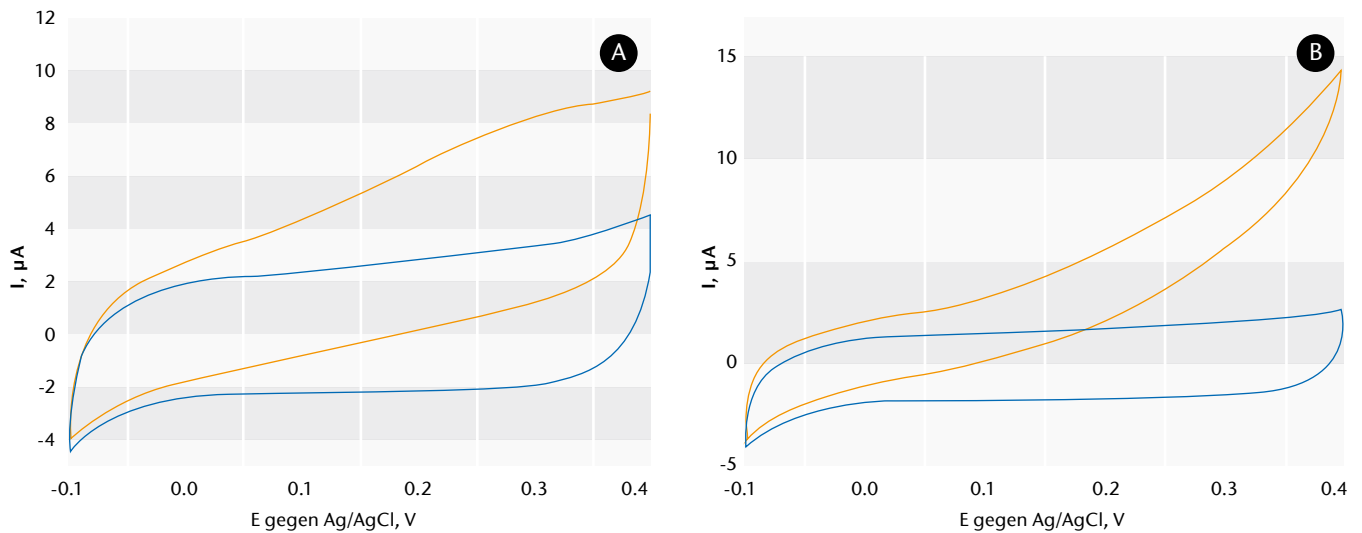


Abb. 10) Zyklische Voltammogramme von Polymer-Enzym-Filmen auf Buckypapier-Elektroden: (A) PABSA1-PQQ-GDH und (B) PABMSA2-PQQ-GDH Filme in Abwesenheit (1) sowie Anwesenheit von Glukose (2); Experimentelle Bedingungen: Scanrate 5 mV/s, [Glukose] = 5 mM, 5 MES + 1 mM CaCl₂ Puffer, pH 6.

III. SCHLUSSFOLGERUNG

Chemisch synthetisierte sulfonierte Polyanilin-Copolymere, die aus verschiedenen Monomer-Bausteinen aufgebaut sind, können nach der Synthese in unterschiedlichen Redoxzuständen vorliegen. Die Copolymere, die nur zusätzliche Methoxygruppen am sulfonierten Anilinring besitzen, befinden sich in einem gemischten Redoxzustand (ES). Sie können direkt mit dem Enzym PQQ-GDH in Lösung reagieren. Der Elektronentransfer wurde sowohl spektrophotometrisch als auch elektrochemisch nachgewiesen. Die letztere Methode zeigte die Generierung von bioelektrokatalytischen Strömen in Anwesenheit vom Substrat Glukose beginnend bei Potentialen oberhalb des enzymgebundenen PQQs. Die Karboxylgruppen-tragenden Polymere befanden sich dagegen im vollständig oxidierten Zustand (PB). Sie sind nicht in der Lage, Elektronen mit dem Enzym in Lösung auszutauschen. Wenn diese Polymere aber auf Kohlenstoffnanoröhren-basierten Buckypapier-Elektroden immobilisiert werden, kann man eine direkte Bioelektrokatalyse beobachten. Das heißt, dass das modifizierte Buckypapier auf Grund seiner hohen Oberfläche ein für biosensorische Zwecke gut geeignetes Interface bildet. Diese Ergebnisse sind wichtig für ein besseres Verständnis von Faktoren, die die Effektivität der Interaktion von Enzymen mit Elektroden beeinflussen, aber auch für praktische Anwendungen wie z.B. die Kopplung von Enzymen an Anoden in Biobrennstoffzellen.

DANKSAGUNG

Wir bedanken uns beim BMBF Deutschland (Projekt: 03IS22011) für die finanzielle Unterstützung.

LITERATUR

Ahmadalinezhad A, Wu GS, Chen AC. *Biosens Bioelectron* 2011;30:287-93.

Albuquerque JE, Mattoso LHC, Balogh DT, Faria RM, Masters JG, MacDiarmid AG. *Synth Met* 2000;113:19-22.

Anthony C. *Antioxid Redox Signal* 2001;3:757-74.

Beissenhirtz MK, Scheller FW, Stocklein WFM, Kurth DG, Mohwald H, Lisdat F. *Angew Chem-Int Edit* 2004;43:4357-60.

Chatterjee S, Chen AC. *Biosens Bioelectron* 2012;35:302-7. Cosnier S, Holzinger M. *Chem Soc Rev* 2011;40:2146-56.

Dokter P, Frank J, Duine JA. *Biochem J* 1986;239:163-7.

Dronov R, Kurth DG, Moehwald H, Scheller FW, Lisdat F. *Communication in a protein stack: Angew Chem-Int Edit* 2008;47:3000-3.

Du M, Yang T, Jiao K. *Talanta* 2010;81:1022-7.

Durand F, Stines-Chaumeil C, Flexer V, Andre I, Mano N. *Biochem Biophys Res Commun* 2010; 402:750-4.

Flexer V, Durand F, Tsujimura S, Mano N. *Anal Chem* 2011;83:5721-7.

Göbel G, Schubart IW, Scherbahn V, Lisdat F. *Electrochem Commun* 2011;13:1240-3.

Hatchett DW, Josowicz M. *Chem Rev* 2008;108:746-69.

Hussein L, Rubenwolf S, von Stetten F, Urban G, Zengerle R, Krueger M, et al. *Biosens Bioelectron* 2011;26:4133-8.

Ivnitski D, Atanassov P, Apblett C. *Electroanalysis* 2007;19:1562-8.

Lee KP, Komathi S, Nam NJ, Gopalan AI. *Microchem J* 2010;95:74-9.

Liao YZ, Strong V, Chian W, Wang X, Li XG, Kaner RB. *Macromolecules* 2012;45:1570-9.

MacDiarmid AG. *Angew Chem-Int Edit* 2001;40:2581-90.

Malinauskas A. *J Power Sources* 2004;126:214-20.

Mangombo ZA, Baker P, Iwuoha E, Key D. *Microchim Acta* 2010;170:267-73.

Mav-Golez I, Pahovnik D, Blaha M, Zigon M, Vohlidal J. *Synth Met* 2011;161:1845-55.

Michira I, Akinyeye R, Baker P, Iwuoha E. *Int J Polym Mater* 2011;60:469-89.

Muchindu M, Iwuoha E, Pool E, West N, Jahed N, Baker P, et al. *Electroanalysis* 2011;23:122-8.

Noll T, Noll G. *Chem Soc Rev* 2011;40:3564-76.

Oh SY, Oh IS, Choi JW. *Mater Sci Eng C-Biomimetic Supramol Syst* 2004;24:307-9.

Okuda J, Sode K. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;314:793-7.

Oubrie A. *BBA-Proteins Proteomics* 2003;1647:143-51.

Pornputtkul Y, Strounina EV, Kane-Maguire LAP, Wallace GG. *Macromolecules* 2010;43:9982-9.

Razumiene J, Vilkanauskyte A, Gureviciene V, Laurinavicius V, Roznyatovskaya NV, Ageeva YV, et al. *J Organomet Chem* 2003;668:83-90.

Razumiene J, Vilkanauskyte A, Gureviciene V, Barkauskas J, Meskys R, Laurinavicius V. *Electrochimica Acta* 2006;51:5150-6.

Saio D, Amaya T, Hirao T. *Adv Synth Catal* 2010;352:2177-82.

Sarauli D, Tanne J, Xu CG, Schulz B, Trnkova L, Lisdat F. *Phys Chem Chem Phys* 2010;12:14271-7.

Sarauli D, Xu CG, Dietzel B, Stiba K, Leimkuhler S, Schulz B, et al. *Soft Matter* 2012;8:3848-55.

Sarauli D, Riedel M, Wettstein C, Hahn R, Stiba K, Wollenberger U, et al. *J Mater Chem* 2012;22:4615-8.

Sarauli D, Xu CG, Dietzel B, Schulz B, Lisdat F. *acta Biomaterialia* 2013; 9:8290-8298

Sassolas A, Blum LJ, Leca-Bouvier BD. *Biotechnol Adv* 2012;30:489-511.

Schubart IW, Göbel G, Lisdat F. *Electrochimica Acta* 2012;82:224-32.

Sprigco R, Dronov R, Rajagopalan KV, Lisdat F, Leimkuhler S, Scheller FW, et al. *Soft Matter* 2008;4:972-8.

Tanne C, Göbel G, Lisdat F. *Biosens Bioelectron* 2010;26:530-5.

Tkac J, Svitel J, Vostiar I, Navratil M, Gemeiner P. *Bioelectrochemistry* 2009;76:53-62.

Tran HD, Li D, Kaner RB. *Adv Mater* 2009;21:1487-99.

Wallace GG, Kane-Maguire LAP. *Adv Mater* 2002;14:953-60.

Wei D, Ivaska A. *Chem Anal* 2006;51:839-52.

Yang T, Feng YY, Zhang W, Ma SY, Jiao K. *J Electroanal Chem* 2011;656:140-6.

Yue J, Gordon G, Epstein AJ. *Polymer* 1992;33:4410-8.

Zhang L, Jiang X, Niu L, Dong SJ. *Biosens Bioelectron* 2006;21:1107-15.

Zhou B, Sun RG, Hu XF, Wang LH, Wu HP, Song SP, et al. *Int J Mol Sci* 2005;6:303-10.

AUTOREN

Dr. rer. nat. David Sarauli
Biosystemtechnik, TH Wildau
Bahnhofstr. 1, 15745 Wildau
david.sarauli@th-wildau.de

Dr. Chenggang Xu
UP Transfer GmbH
Am Neuen Palais 10, D14469 Potsdam
xucg@physik.hu-berlin.de

Birgit Dietzel
Institut für Dünnschichttechnologien und
Mikrosensorik Technologies e. V.
Kantstr. 55, 14513 Teltow
B.Dietzel@gmx.net

Dr. Burkhard Schulz
Universität Potsdam, Institut für Chemie
Karl-Liebknecht-Straße 24-25, 14476 Potsdam
buschu@uni-potsdam.de

Prof. Fred Lisdat
Biosystemtechnik, TH Wildau
Bahnhofstr. 1, 15745 Wildau
flisdat@th-wildau.de