

# Immobilisierung von Redoxenzymen auf nano- und polykristallinen Metalloberflächen

Dissertation

zur Erlangung des Grades des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III  
der Universität des Saarlandes

von

Diplom-Chemikerin  
Janine Gajdzik

Saarbrücken 2007

Tag des Kolloquiums: 29.01.2008  
Dekan: Prof. U. Müller  
Berichterstatter: Prof. Dr. R. Hempelmann  
Prof. Dr. F. Giffhorn

## Zusammenfassung

Die Funktionalisierung von Elektrodenoberflächen mit Biomolekülen spielt sowohl für analytische als auch präparative Anwendungen eine wichtige Rolle. Viele Enzyme, wie die Galaktit- und Sorbitol-Dehydrogenase (GatDH / SDH), benötigen zur Substratumsetzung das Cofaktorsystem  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , um ein Substrat zu oxidieren. Die elektrochemische Regenerierung des Cofaktors stellt eine Alternative zum klassischen Recycling dar und ermöglicht die enantiomerenreine Bildung eines Produktes. Hierzu wurden alle benötigten Bestandteile wie Redoxmediator, Cofaktor und Enzym auf die Elektrodenoberfläche immobilisiert und die elektrochemische Regenerierung des Cofaktor mittels cyclischer Voltammetrie untersucht. Des Weiteren wurde auch die elektrochemische Regenerierung des Cofaktors an einer mit Cystein modifizierten GatDH-Variante untersucht, welche durch Ausbildung einer Thiolatbindung direkt auf die Elektrode immobilisiert wird. Die Pyranose-2-Oxidase (P2Ox) katalysiert die regioselektive Oxidation von Polyhydroxyaldehyden zu Ketoaldosen, ermöglicht den Zugang zu pharmazeutisch relevanten Zuckerderivaten und wurde ebenfalls immobilisiert. Zur Erhöhung der aktiven Oberfläche wurden nanokristalline Elektroden mittels Pulstechnik bzw. durch galvanostatische Abscheidung hergestellt. Ferner sollten Platin-Inseln auf Au (111)-Oberflächen mit definiertem Abstand durch eine Kombination aus stromloser Abscheidung und Elektroabscheidung hergestellt werden, um eine anschließende Immobilisierung der P2Ox zu ermöglichen.

## Abstract

Functionalisation of electrode surfaces with biomolecules is important for analytical and preparative applications. Enzymes like galaktit- and sorbitol dehydrogenase (GatDH / SDH) need the cofactor system  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  in order to oxidise a substrate. The electrochemical regeneration of this cofactor describes an alternative to the classical recycling and allows the preparation of an enantiomerically pure product. For this reason all components were immobilized on the electrode surface as redox mediator, cofactor and enzyme and the electrochemical regeneration of the cofactor was investigated by cyclic voltammetry. In addition the electrochemical regeneration of the cofactor was investigated at a GatDH modified with cysteine which was immobilized on the electrode via the formation of a thiolat bond. Pyranose-2-oxidase (P2Ox) catalyses the regioselective oxidation of polyhydroxyaldehyde to an ketoaldose, permits the access to important pharmaceutical sugar derivatives and was also immobilized. Nanocrystalline electrodes prepared by pulse techniques or by galvanostatic deposition were used to enhance the active surface. Furthermore platinum islands should be produced on Au (111) by a combination of electroless and electrochemical deposition to enable a subsequent immobilisation of P2Ox.

# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1. EINLEITUNG</b> .....	<b>3</b>
<b>2. THEORETISCHER TEIL</b> .....	<b>6</b>
<b>2.1 Elektrochemische Charakterisierung</b> .....	<b>6</b>
2.1.1 Cyclische Voltammetrie.....	6
2.1.2 Chronoamperometrie und -potentiometrie.....	10
2.1.3 Impedanzspektroskopie.....	12
<b>2.2 Grundlagen der Enzyme</b> .....	<b>16</b>
2.2.1 Sorbitol- / Galaktit-Dehydrogenase (SDH / GatDH).....	20
2.2.2 Pyranose-2-Oxidase (P2Ox).....	23
<b>2.3 Klassische Regeneration des Cofaktors NAD<sup>+</sup> / NADH</b> .....	<b>25</b>
<b>2.4 Modifizierung von Elektroden zur Enzymimmobilisierung</b> .....	<b>29</b>
<b>2.5 Herstellung von nanokristallinen Elektrodenoberflächen</b> .....	<b>37</b>
2.5.1 Elektrochemische Abscheidung und Elementarschritte der Metallabscheidung.....	38
2.5.2 Wachstumsmodelle.....	40
<b>2.6 Kristallitgrößenbestimmung mittels Röntgendiffraktometrie (XRD)</b> .....	<b>42</b>
2.6.1 Scherrer-Verfahren.....	43
<b>2.7 Rasterelektronenmikroskopie (REM)</b> .....	<b>45</b>
<b>2.8 Rastertunnelmikroskopie (STM)</b> .....	<b>46</b>
<b>3. INSTRUMENTELLER TEIL</b> .....	<b>49</b>
<b>3.1 Cyclische Voltammetrie</b> .....	<b>49</b>
3.1.1 CV-50 W.....	49
3.1.2 PAR.....	49
<b>3.2 Elektrochemische Zellen</b> .....	<b>50</b>
<b>3.3 REM / STM</b> .....	<b>52</b>

3.4	XRD .....	52
3.5	Oberflächenplasmonenresonanz (SPR).....	53
<b>4. MODIFIZIERUNG VON POLY- UND NANOKRISTALLINEN</b>		
<b>GOLDELEKTRODEN MIT SDH / GATDH .....</b>		<b>55</b>
4.1	Redoxmediator .....	57
4.2	Cofaktor .....	61
4.3	SDH / GatDH .....	64
4.3.1	Messung in Lösung .....	64
4.3.2	Immobilisierung auf die Elektrode .....	66
4.4	Nanokristallines Gold zur Enzymimmobilisierung .....	72
<b>5. MODIFIZIERUNG VON POLYKRISTALLINEN GOLDELEKTRODEN MIT</b>		
<b>GATDH-CYST .....</b>		<b>78</b>
<b>6. MODIFIZIERUNG VON GOLD- UND PLATINELEKTRODEN MIT P2OXB1H 88</b>		
6.1	Modifizierung von Goldelektroden mittels Thiolen zur Enzymimmobilisierung.....	91
6.2	Modifizierung von nanokristallinem Platin mit P2OxB1H mittels Elektropolymerisation von Tyramin .....	95
6.2.1	Herstellung der nanokristallinen Platinelektroden.....	95
6.2.2	Elektropolymerisation und Modifizierung mit P2OxB1H .....	101
<b>7. HERSTELLUNG VON PT-INSELN AUF AU(111) UND MODIFIZIERUNG MIT</b>		
<b>P2OXB1H.....</b>		<b>116</b>
7.1	Cyclische Voltammetrie von Au (111).....	118
7.2	Modifizierung mit Thiolalkanen und Platin .....	120
7.3	Immobilisierung von P2OxB1H.....	125
7.3.1	Elektrochemische und chemische Polymerabscheidung zur P2OxB1H-Immobilisierung .	126
7.3.2	Modifizierung der Pt-Inseln mit 4-Aminothiophenol zur Immobilisierung der P2OxB1H ...	132
<b>8. ZUSAMMENFASSUNG UND AUSBLICK .....</b>		<b>137</b>

<b>9. ANHANG</b> .....	<b>140</b>
<b>9.1 Literatur</b> .....	<b>140</b>
<b>9.2 Publikationen und Konferenzbeiträge</b> .....	<b>151</b>
9.2.1 Publikationen.....	151
9.2.2 Konferenzbeiträge.....	151
<b>9.3 Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>152</b>
<b>9.4 Verwendete Chemikalien und Enzyme</b> .....	<b>154</b>
<b>9.5 Zellaufbau und Skizzen</b> .....	<b>156</b>
<b>9.6 Danksagungen</b> .....	<b>158</b>



# 1. Einleitung

Die Anwendungen elektroanalytischer Methoden durch den Einsatz von Biosensoren in Bereichen wie klinischer Diagnostik, Umweltanalyse, zur Herstellung von Feinchemikalien oder wichtiger Zwischenprodukte in der Arzneimittelforschung werden heutzutage immer wichtiger.

Biosensoren werden im Allgemeinen als Detektoren definiert und bestehen aus einer direkten Kopplung zwischen einer biologischen Komponente (Rezeptor) und einem Signalumwandler (Transduktor).

Der erste Biosensor wurde bereits 1962 von Dr. L. Clark entwickelt [1, 2]. Dieser Sensor basiert auf einer Sauerstoffelektrode als Transduktor und dem Enzym Glucose-Oxidase, das zwischen zwei Membranen aufgebracht wurde. Anhand der Änderung der Sauerstoffkonzentration konnte somit die Glucosekonzentration bestimmt werden.

Zur gezielten Anwendung von Biosensoren müssen alle an der Reaktion beteiligten Komponenten an der Elektrodenoberfläche immobilisiert vorliegen. Die Modifizierung der unterschiedlichen Elektrodenmaterialien wie z.B. Gold, Platin oder Glaskohlenstoff kann dabei auf verschiedene Arten erfolgen. Als Beispiel seien nur die kovalente Anbindung von Enzymen an so genannte Spacer oder die Einbettung in ein Polymernetzwerk erwähnt [3-5]. Zu beachten bei den einzelnen Immobilisierungsverfahren ist der Erhalt der katalytischen Aktivität des Biokatalysators.

Die wohl bekannteste Anwendung solch funktionalisierter Biokatalysatoren ist der Glucose-Biosensor im Bereich der klinischen Diagnostik. Hier stellen Biosensoren eine gute und einfache Alternative zu den herkömmlichen, oftmals schmerzhaften Methoden zur Bestimmung des Glucosespiegels bei Diabetes-Patienten dar. Dabei wird das Enzym Glucose-Oxidase in ein Polymernetzwerk mit darin verankerten Osmiumkomplexen gebunden [5-7]. Lediglich 300 nL Blut werden durch diesen Mikroculometer benötigt, um den Blutzuckerspiegel zu messen. Das bekannteste Messgerät stammt von Abbott Diabetes Care und ist wohl das zurzeit kleinste Glucose-Messgerät auf dem Markt (Free Style Flash®).

Eine weitere wichtige Anwendung von Sensoren dient zur Überwachung der Wasserqualität, die seit Anfang der 90er Jahre von der Firma Yellow Springs Instruments (YSI) zur Bestimmung und Kontrolle von industriellen Abwässern, Seen, Flüssen usw. entwickelt wurden. Bereits in den 70er Jahren arbeitete YSI erfolgreich mit Dr. L. Clark an dem ersten Biosensor [8]. Eine Entwicklung der Firma AromaScan führte 1994 zu der so genannten „elektronischen Nase“. Das Gerät basiert auf mehreren organischen leitenden Polymeren und ist in der Lage Gerüche zu klassifizieren. Die Prozessüberwachung in der Lebensmittel-, Getränke- und Parfümindustrie wird dadurch wesentlich erleichtert [9, 10]. Die Erkennung von Pestizidrückständen durch entsprechend funktionalisierte Elektroden im Bereich der Umweltanalytik stellt ebenfalls einen interessanten Bereich dar [9].

Durch die Arbeiten von Willner et al. [11, 12], Heller et al. [4, 13] und Leech et al. [14] findet der Einsatz von Biokatalysatoren auch im Bereich der Brennstoffzellen immer mehr Anklang. Diese so genannten Biobrennstoffzellen bestehen aus jeweils einer enzymmodifizierten Elektrode an Anoden- und Kathodenseite. Dadurch ist eine Separation zwischen Anoden- und Kathodenraum durch eine Membran aufgrund der Selektivität der Enzyme nicht mehr nötig, da nur das zu ihrem aktiven Zentrum passende Substrat umgesetzt wird.

All diese Anwendungsbereiche zielen jedoch oftmals auf eine Miniaturisierung der unterschiedlich funktionalisierten Elektroden hin, um z.B. in der klinischen Diagnostik implantierbare Systeme zur Bestimmung der Glucosekonzentration zu erhalten. Dazu werden z.B. so genannte Ultra-Mikro-Elektroden verwendet, bei denen die aktive Oberfläche durch Porosität erhöht ist [15].

Auch im Bereich der Arzneimittelforschung oder der Herstellung von Feinchemikalien werden mit Biokatalysatoren modifizierte Elektroden immer interessanter. Ein möglichst großer Umsatz im Durchflussbetrieb stellt bei diesen Anwendungen das gewünschte Ziel dar. Daher wird auch in diesen Bereichen auf die positiven Eigenschaften der Enzyme wie Selektivität und hohe Aktivität zurückgegriffen, um mit ihnen „sanfte Chemie“ zu betreiben [16]. Die konventionellen chemischen Syntheseverfahren zur Herstellung von Medikamenten aber auch von Feinchemikalien benötigen häufig organische Lösemittel, viele Aufreinigungsschritte und erhöhte Temperaturen. Außerdem zeigen sie eine geringere Selektivität vor allem für Moleküle mit Stereozentren, Bildung von Nebenprodukten und kleine Ausbeuten.

## 1. Einleitung

---

Die Modifizierung von Elektrodenoberflächen mit Biomolekülen zur stereoselektiven Produktion enantiomerenreiner Substanzen stellt hierbei eine geeignete und effektive Alternative dar.

In der vorliegenden Arbeit sollen die Enzyme Galaktit- und Sorbitol-Dehydrogenase auf Goldelektroden immobilisiert werden. Diese Enzyme benötigen zur Substratumsetzung das Cofaktorsystem  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ , dass für jede Oxidation bzw. Reduktion in stöchiometrischen Mengen zugegeben werden muss. Dies stellt somit eine Kostenfrage dar, die auf konventionelle Weise durch Regenerierung des Cofaktors mit Hilfe eines zweiten Enzyms Laktat- bzw. Formiat-Dehydrogenase - je nach katalysierter Reaktion - gelöst wird. Im Fall der Laktat-Dehydrogenase entsteht ein zweites Produkt (Laktat), welches vom eigentlichen Produkt isoliert werden muss. Eine Alternative stellt die elektrochemische Regenerierung des Cofaktors dar, durch Immobilisierung von  $\text{NAD}^+$  und Enzym an entsprechend funktionalisierten Goldelektroden. Zudem soll die Substratoxidation einer neuen Variante der Galaktit-Dehydrogenase anhand der elektrochemischen Regenerierung des Cofaktors untersucht werden. Diese GatDH ist mit Cysteingruppen modifiziert und wird durch Ausbildung einer Thiolatbindung direkt auf polykristalline Goldoberflächen immobilisiert.

Die Immobilisierung von Pyranose-2-Oxidase (P2Ox) auf funktionalisierten Gold- und Platinoberflächen ist ein weiteres Ziel dieser Arbeit. Das Enzym katalysiert die regioselektive Oxidation von Polyhydroxyaldehyden zu Ketoaldosen und ermöglicht somit den Zugang zu pharmazeutisch relevanten Zuckerderivaten. Ferner sollen Platin-Inseln auf Au(111)-Oberflächen mit definiertem Abstand durch eine Kombination aus stromloser Abscheidung und Elektroabscheidung hergestellt werden. Diese Oberflächen sollen entsprechend modifiziert werden, um eine anschließende Immobilisierung der P2Ox zu ermöglichen und elektrochemisch zu untersuchen. Zur Erhöhung der aktiven Oberfläche werden nanokristalline Platin- bzw. Goldelektroden durch elektrochemische Abscheidung hergestellt, mit den einzelnen Enzymen modifiziert und die Ergebnisse der elektrochemischen Untersuchungsmethoden mit polykristallinen funktionalisierten Elektrodenoberflächen verglichen.

## 2. Theoretischer Teil

### 2.1 *Elektrochemische Charakterisierung*

#### 2.1.1 **Cyclische Voltammetrie**

Die Cyclovoltammetrie stellt eine wichtige elektrochemische Messmethode zur Untersuchung von elektroaktiven Reaktionen in Bereichen wie Elektrochemie, Anorganik, Organik oder Biochemie dar. Diese Methode hat sich in den letzten mehr als fünfzehn Jahren aufgrund ihrer Einfachheit, Vielseitigkeit und geringen Zeitaufwändigkeit mehr und mehr etabliert und die Polarographie nahezu verdrängt [17-19]. Mittels der cyclischen Voltammetrie können Aussagen über das elektrochemische und kinetische Verhalten einer redoxaktiven Spezies gemacht werden. Auch können Aussagen getroffen werden über die Eigenschaften von elektroaktiven Elektrodenoberflächen (z.B. Brennstoffzellenkatalysatoren) oder aber elektrochemische Abscheidungen näher untersucht werden.

Bei dem resultierenden Voltammogramm wird eine Messgröße (Strom) in Abhängigkeit von einem Potential untersucht. Die Messanordnung besteht in der Regel aus einer Dreielektrodenschaltung mit einer Arbeits- (AE), einer Gegen- (GE) und einer Bezugselektrode (BE). Zur Vermeidung des so genannten RI-Drops, wird die BE sehr nahe an die AE herangeführt (Haber-Luggin-Kapillare).

Das Potential der Arbeitselektrode wird zwischen einer Potentialober- und Potentialuntergrenze bei konstanter Vorschubgeschwindigkeit zeitlich linear geändert (Abbildung 2-1) und der resultierende Strom zwischen AE und GE gemessen, wobei das Potential der AE gegen das einer BE vorgegeben wird.

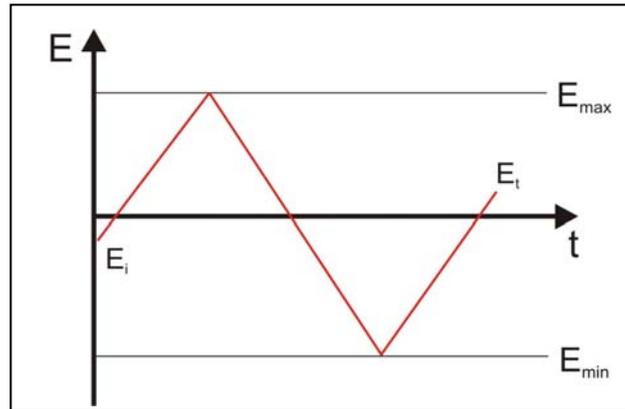
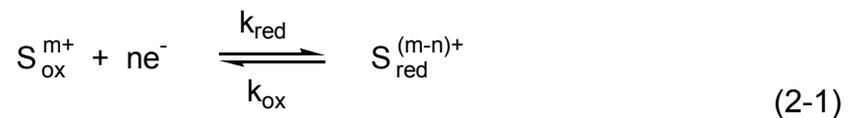


Abbildung 2-1: zeitlicher Verlauf des Elektrodenpotentials

Für eine einfache reversible Redoxreaktion, wie z.B. Hexacyanoferrat (III), der Form



wird das in Abbildung 2-2 dargestellte Cyclovoltammogramm (CV) erhalten.

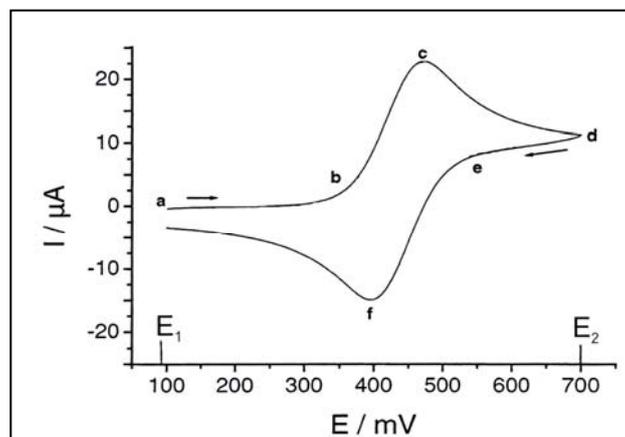


Abbildung 2-2: Aufbau eines Cyclovoltammogramms

Beginnend bei einem Startpotential  $E_1$  wird das angelegte Potential in positiver Richtung (Pfeil) mit konstanter Vorschubgeschwindigkeit  $v$  geändert. Erreicht das Elektrodenpotential den Bereich der Oxidation (b), so steigt der oxidative anodische Strom aufgrund des Stoffumsatzes an bis am anodischen Peakmaximum (c) die Konzentration an der Oberfläche null wird, da alle Moleküle sofort umgesetzt werden.

Der Strom fällt bis zum Umkehrpunkt  $E_2$  (d) ab, da die umgebende Lösung an  $S_{\text{red}}$  verarmt. An diesem Punkt kehrt sich die Polarisierung um und es fließt ein reduktiver kathodischer Strom. Wird ein ausreichend negatives Potential erreicht, beginnt die Reduktion zu  $S_{\text{red}}$  (e) bis am kathodischen Peakmaximum (f) die Elektrodenoberfläche verarmt und der Strom sinkt wieder bis der Umkehrpunkt  $E_1$  (a) erreicht wird. Somit wird die charakteristische Peakform eines reversiblen Prozesses erhalten.

Aufgrund des Verbrauchs des Reaktanden an der Elektrodenoberfläche (Punkte (c) und (f)) kommt es zu einer schnelleren Diffusion und Stromförderung, gemäß

$$I = n \cdot F \cdot A \cdot D \cdot \left. \frac{dc}{dx} \right|_{x=0} \quad (2-2)$$

mit  $n$  als Anzahl übertragener Elektronen,  $F$  der Faradaykonstante,  $A$  der Elektrodenfläche,  $D$  dem Diffusionskoeffizienten und  $x$  dem Abstand von der Elektrodenoberfläche. Der Konzentrationsgradient  $dc/dx$  steigt bis zur Konzentration null rasch an und fällt aufgrund des Wachsens der Diffusionsschicht wieder ab, so dass sowohl  $dc/dx$  als auch der Strom ein Maximum durchlaufen [20].

Dabei hängt die Form der Cyclovoltammogramme von den einzelnen Elektrodenvorgängen ab. Es wird dabei zwischen reversiblen [21, 22], diffusionskontrollierten [21, 22] und irreversiblen Reaktionen [22] sowie quasi-reversiblen Reaktionen [23] unterschieden. Außerdem können sowohl die Adsorption an die Elektrodenoberfläche eine Rolle spielen als auch der Lösungswiderstand und die kapazitiven Effekte.

Bei der diffusionskontrollierten Reaktion (ungehemmter Ladungsdurchtritt) kommen ein schneller heterogener Ladungstransfer (*Butler-Volmer-Gleichung*) sowie die Diffusion als geschwindigkeitsbestimmender Schritt (2. *Ficksches Gesetz*) zum tragen.

Der Peakstrom wird in diesem Fall als Funktion der Scangeschwindigkeit  $v$  wiedergegeben und durch die *Randles-Sevcik-Gleichung* beschrieben:

$$I_{\text{Pak}} = -2,69 \cdot 10^5 \cdot \sqrt{n^3} \cdot A \cdot \sqrt{D_0} \cdot [O]_0 \cdot \sqrt{v} \quad (2-3)$$

mit  $n$  als Anzahl übertragener Elektronen,  $A$  der Elektrodenfläche,  $D$  dem Diffusionskoeffizienten,  $[O]_0$  der Konzentration und  $v$  der Scangeschwindigkeit.

Der Strom verhält sich proportional zur Quadratwurzel der Scangeschwindigkeit. Des Weiteren ergibt sich zwischen Oxidations- und Reduktionspeak eine Differenz von  $57/n$  mV.

Bei irreversiblen Reaktionen dagegen bestimmt der Durchtrittsfaktor  $\alpha$  die Form der Cyclovoltammogramme als Vorfaktor, da in diesem Fall der Strom durch den Ladungstransfer kontrolliert wird:

$$I_{Peak} = -2,99 \cdot 10^5 \cdot n \cdot \sqrt{\alpha \cdot n_a} \cdot A \cdot \sqrt{D_0} \cdot [O]_0 \cdot \sqrt{v} \quad (2-4)$$

mit  $n_a$  als Anzahl übertragener Elektronen im geschwindigkeitsbestimmenden Schritt, wobei der Strom mit der Quadratwurzel aus  $v$  ansteigt.

Bei quasireversiblen Reaktionen ist die Peakdifferenz umso größer (bis zu mehreren 100 mV), je kleiner die Geschwindigkeitskonstanten sind. In diesem Fall bestimmen sowohl Massen- als auch Ladungstransfer den Strom. Die Geschwindigkeitskonstante lässt sich aus dem Peakpotentialabstand mittels der Arbeitskurve nach *Nicholson* [23-25] ermitteln.

Reversible, adsorptionskontrollierte Reaktionen treten z.B. bei Deckschichten auf und folgen der *Langmuir-Isotherme*:

$$I_{Peak} = \frac{n^2 \cdot F^2}{4 \cdot R \cdot T} \cdot A \cdot \Gamma_0^* \cdot v \quad (2-5)$$

mit  $F$  der Faradaykonstante,  $R$  der idealen Gaskonstante,  $T$  der Temperatur,  $A$  der Fläche,  $\Gamma_0^*$  als Sättigungsmenge oxidierter Spezies und der Scangeschwindigkeit  $v$ .

Lösungswiderstände können durch gut leitende Elektrolyte und eine Haber-Luggin-Kapillare vermieden werden. Außer Faraday'schen Anteilen spielt auch die Doppelschichtkapazität eine Rolle, die von Faktoren wie der Konzentration, der elektrochemischen Oberfläche und dem Elektrodenpotential abhängt und sich zu

$$I_{cap} = C(U) \cdot v \quad (2-6)$$

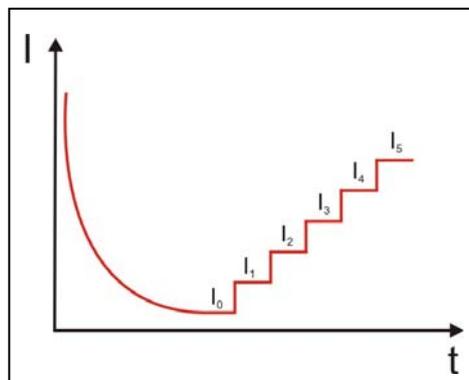
ergibt. Der kapazitive Strom steigt linear mit der Scangeschwindigkeit  $v$  an.

### 2.1.2 Chronoamperometrie und -potentiometrie

Bei der Amperometrie handelt es sich um eine zur Voltammetrie ähnliche Messmethode. Während bei der Voltammetrie die Spannung zeitlich variiert wird, wird bei der Amperometrie der Strom an der Arbeitselektrode bei einem zeitlich konstanten Potential gemessen.

Anwendung findet dieses Prinzip z.B. bei der Sauerstoffbestimmung in Bereichen der Industrie und Umweltanalytik (Clark-Sensor). Hierbei wird gelöster Sauerstoff bei einem konstanten Potential reduziert und registriert.

Ein anderer Anwendungsbereich findet sich in der medizinischen Diagnostik durch Verwendung so genannter Glucosesensoren [7, 26, 27]. Dabei wird die Arbeitselektrode mit dem entsprechenden Enzym Glucose-Oxidase modifiziert, welches selektiv mit dem zu analysierenden Stoff Glucose bei einem konstanten Potential zu den Produkten Gluconsäure und Wasserstoffperoxid reagiert. Amperometrisch wird die Zunahme der Wasserstoffperoxidkonzentration detektiert (Abbildung 2-3). Wahlweise kann auch die Abnahme der Sauerstoffkonzentration detektiert werden, je nach eingestelltem Potential.



**Abbildung 2-3:** amperometrische Messung der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration

Bei der Chronoamperometrie wird bei einem konstanten Potential der Strom als Funktion der Zeit gemessen. Bei dem ersten Potential  $E_0$  findet noch kein Umsatz statt. Zum Zeitpunkt  $t=0$  erfolgt der Potentialsprung auf den neuen zeitlich konstanten Wert  $E_1$ , bei dem eine Oxidation oder Reduktion vonstatten geht und ein Strom  $I$  fließt (Abbildung 2-4 (a)).

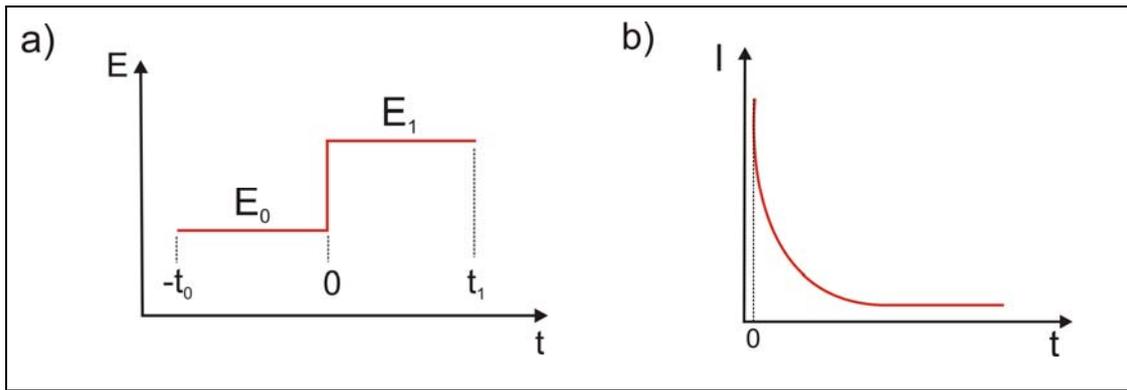


Abbildung 2-4: Potentialsprung bei Chronoamperometrie (a) und Strom-Zeit-Verlauf (b)

Während des Stromflusses dringt die Diffusionsschicht immer mehr in das Innere des Elektrolyten, so dass es zu einem Stromabfall mit der Zeit kommt (Abbildung 2-4 (b)). Dieser zeitliche Verlauf wird durch die *Cottrell-Gleichung* beschrieben:

$$I = \frac{n \cdot F \cdot A \cdot \sqrt{D}}{\sqrt{\pi \cdot t}} \cdot c \quad (2-7)$$

Die Gleichung erfasst dabei lediglich den Diffusionsstrom, also den Bereich, in dem die geschwindigkeitsbestimmende Komponente durch die Diffusion beschrieben wird [20, 24].

Die Chronopotentiometrie verhält sich analog zur Chronoamperometrie, jedoch wird hier das Potential E registriert, während der Strom I konstant gehalten wird (Abbildung 2-5), d.h. das Konzentrationsgefälle stellt sich auf einen konstanten Betrag ein.

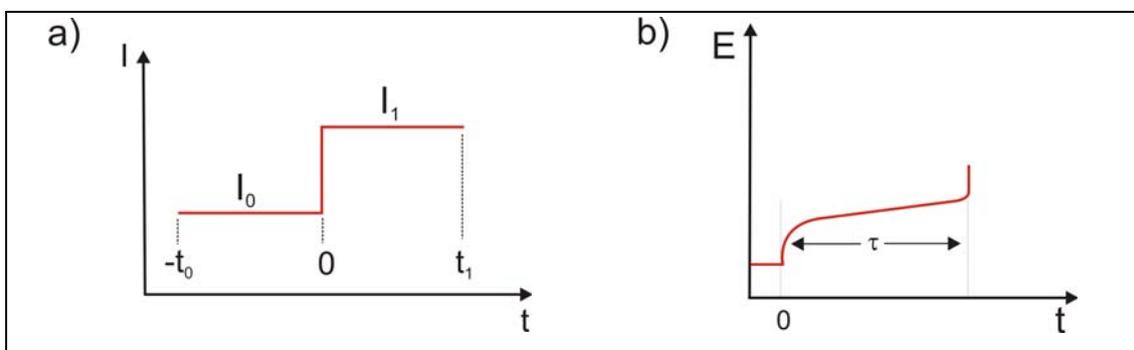


Abbildung 2-5: Potentialsprung bei Chronopotentiometrie (a) und Potential-Zeit-Verlauf (b)

Mit zunehmender Zeit sinkt die Konzentration, so dass der Strom nicht mehr konstant gehalten werden kann (Transitionszeit) und es zu einer Potentialverschiebung kommt, damit eine weitere elektrochemische Reaktion erfolgen kann.

Damit ergibt sich für die Konzentration an der Elektrodenoberfläche ( $c^s$ ) unter Berücksichtigung von  $c^s=0$ , die *Sand-Gleichung* [20, 24]

$$j \cdot \sqrt{\tau} = \frac{1}{2} \cdot n \cdot F \cdot \sqrt{\pi \cdot D} \cdot c^0 \quad (2-8)$$

mit  $n$  der Anzahl an Elektronen,  $F$  der Faradaykonstante und  $D$  dem Diffusionskoeffizienten.

### 2.1.3 Impedanzspektroskopie

Mit Hilfe der Impedanzspektroskopie lassen sich einfach und schnell Informationen über die Frequenzabhängigkeit von Widerständen und Kapazitäten erhalten, wie dem Elektrolyt-, Durchtritts- und Diffusionswiderstand oder aber der Doppelschicht- und Diffusionskapazität. Auch der Einfluss von adsorbierten Spezies lässt sich mittels der Impedanzspektroskopie anhand der geänderten Widerstände untersuchen. Einen Nachteil dieser Methode stellen jedoch die Komplexität des zu ermittelnden Ersatzschaltbildes und die damit verbundene mögliche Fehlinterpretation aufgrund der Unübersichtlichkeit dar [20].

Als Messanordnung dient eine Dreielektrodenanordnung, bei der zwischen AE und BE ein konstantes Potential eingestellt wird, während zwischen AE und GE hochohmig der Strom gemessen wird. Die Amplitude beträgt 1mV - 200 mV, sollte jedoch möglichst klein gehalten werden, da die Strom-Spannungscharakteristik nur bei kleinen Potentialvariationen proportionales Verhalten zeigt.

Im Folgenden sollen die beiden Grenzfälle der durchtrittsbestimmten Reaktion und der diffusionsbestimmten Reaktion mit raschem Ladungsdurchtritt betrachtet werden. Das einfachste Modell wird durch die durchtrittsbestimmte Reaktion nach folgendem Schaltbild beschrieben:

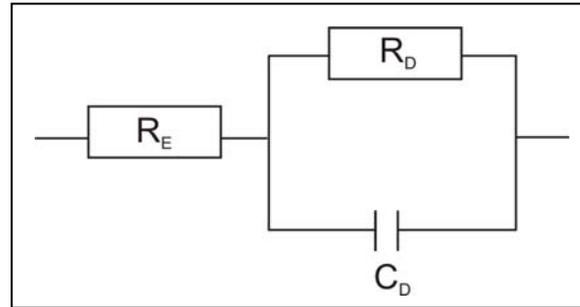


Abbildung 2-6: Ersatzschaltbild einer durchtrittsbestimmten Reaktion

Die Impedanz berechnet sich aus

$$Z = Z_{Re} + Z_P \quad (2-9)$$

mit  $Z_p$  als Parallelimpedanz, nach Erweiterung mit der komplex Konjugierten, um den Nenner rational zu machen zu

$$Z = R_E + \frac{R_D - i \cdot \omega \cdot R_D^2 \cdot C_D}{1 + \omega^2 \cdot R_D^2 \cdot C_D^2} \quad (2-10)$$

mit den frequenzunabhängigen Ohm'schen Widerständen  $R_E$  und  $R_D$ , der frequenzabhängigen Doppelschichtkapazität  $C_D$  sowie der Kreisfrequenz  $\omega$ .

Zur graphischen Auftragung werden die in Abbildung 2-7 dargestellten Nyquist- und Bode-Plots verwendet.

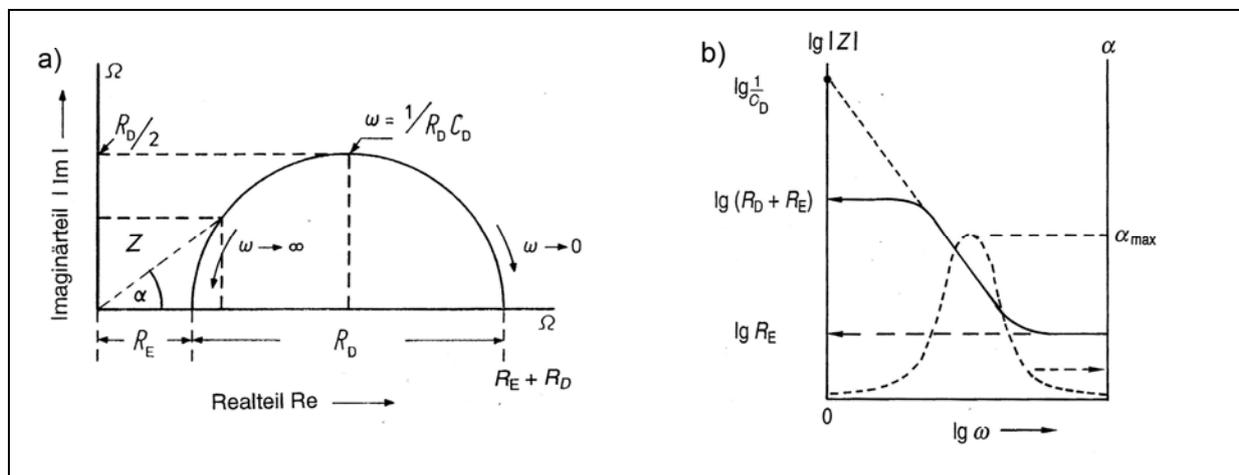


Abbildung 2-7: Darstellung des Nyquist-Plots (a) und Bode-Plots (b) [20]

Häufig treten jedoch bei der Untersuchung Diffusionsprozesse ein, die ebenfalls berücksichtigt werden müssen. Durch den aufgeprägten Wechselstrom entstehen an der Elektrodenoberfläche Konzentrationsschwingungen, die sich als gedämpfte Welle  $\Delta c(x,t)$  in das Innere des Elektrolyten fortpflanzen [20]. Diese Konzentrationsschwingungen berechnen sich, unter Berücksichtigung der linearen Diffusion in x-Richtung nach dem 2. *Fick'schen Gesetz*, zu

$$\Delta c(x,t) = \pm \frac{(1-i) \cdot j_{\max}}{n \cdot F \cdot \sqrt{2D_i \cdot \omega}} \left\{ \exp \left[ -\sqrt{\frac{\omega}{2D_i}} \cdot x \right] \cdot \exp i \left[ \omega t - \sqrt{\frac{\omega}{2D_i}} \cdot x \right] \right\}. \quad (2-11)$$

Die erste Exponentialfunktion beschreibt die Abnahme der Amplitude mit zunehmendem Abstand zur Elektrodenoberfläche und der zweite Exponentialterm den periodischen Verlauf von  $\Delta c(x,t)$  sowie die daraus resultierende ortsabhängige Phasenverschiebung  $\alpha$  zwischen Strom und Konzentrationsänderung [20].

An der Elektrodenoberfläche ( $x=0$ ) ergibt sich Gleichung 2.11 zu

$$\Delta c(t) = \pm \frac{(1-i) \cdot j_{\max}}{n \cdot F \cdot \sqrt{2D_i \cdot \omega}} \cdot e^{i\omega t} = \pm \frac{(1-i)}{n \cdot F \cdot \sqrt{2D_i \cdot \omega}} \cdot j \quad (2-12)$$

wobei Real- und Imaginärteil betragsgleich sind und somit eine Phasenverschiebung von  $45^\circ$  an der Elektrodenoberfläche erhalten wird.

Unter Berücksichtigung der Diffusion ergibt sich somit für das einfache System aus Kaliumhexacyanoferrat das folgende Ersatzschaltbild:

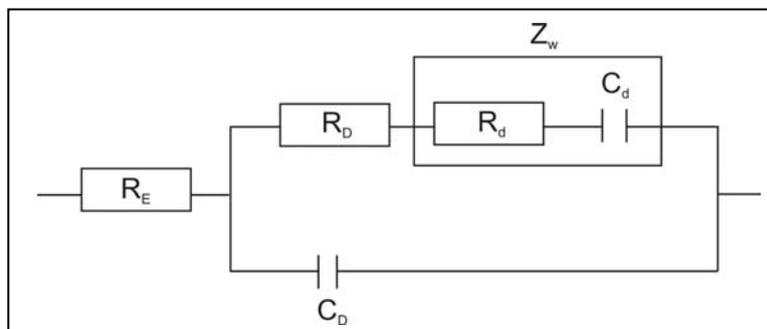


Abbildung 2-8: Ersatzschaltbild mit Stofftransport

## 2. Theorie

Die mit  $Z_W$  beschriebene Warburg-Impedanz kommt erst bei kleinen Frequenzen zum tragen, da die Diffusionshemmung mit fallendem  $\omega$  zunimmt [20, 24] und berechnet sich zu

$$Z_W = \frac{k}{\sqrt{\omega}} - i \cdot \frac{k}{\sqrt{\omega}} \quad (2-13)$$

$$\text{mit } k = \frac{RT}{n^2 F^2 \sqrt{2}} \left[ \frac{1}{c_{\text{Red}}^* \cdot \sqrt{D_{\text{Red}}}} + \frac{1}{c_{\text{Ox}}^* \cdot \sqrt{D_{\text{Ox}}}} \right] \quad (2-14)$$

Für die Grenzwertbetrachtung von  $\omega \rightarrow 0$  ergibt sich der Realteil der Impedanz zu

$$Z_{\text{Re}} = R_E + R_D - 2k^2 C_D \quad (2-15)$$

und beschreibt somit den in Abbildung 2-9 dargestellten Punkt  $R_M$ .

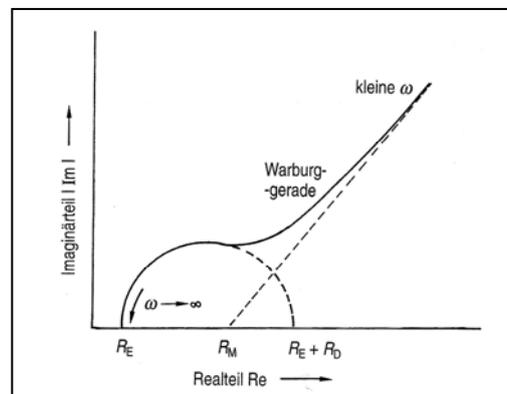


Abbildung 2-9: Nyquist-Plot mit Warburg-Impedanz [20]

Die Warburg-Gerade steigt mit fallendem  $\omega$  in einem Winkel von  $45^\circ$  an, d.h. der Strom eilt der Spannung um  $45^\circ$  voraus, da bei einem schnellen Ladungsdurchtritt Potential und Konzentration gemäß dem Nernst'schen Verhalten

$$\frac{c_{\text{Ox}}}{c_{\text{Red}}} = \exp \left[ \frac{nF}{RT} \cdot (E(t) - E_0) \right] \quad (2-16)$$

direkt miteinander gekoppelt sind [20].

### 2.2 Grundlagen der Enzyme

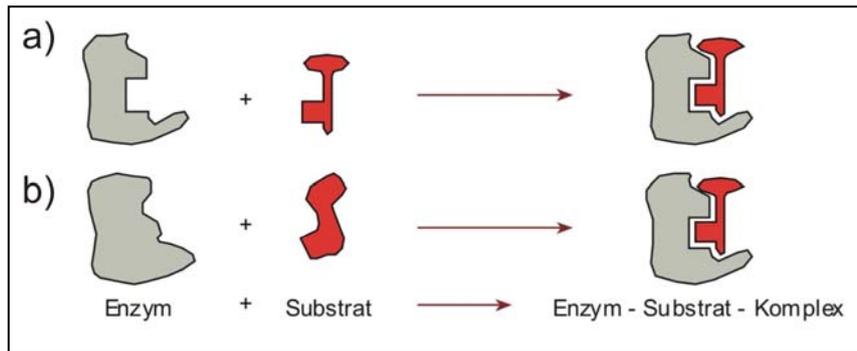
In biologischen Systemen stellen fast alle Katalysatoren von chemischen Reaktionen Proteine dar, die auch als Enzyme oder Biokatalysatoren bezeichnet werden.

Enzyme sind in der Lage die Aktivierungsenergie einer Reaktion zu senken und somit die Reaktionsgeschwindigkeit zu beschleunigen, wobei das Gleichgewicht der Reaktion unbeeinflusst bleibt. Des Weiteren gehen sie dabei wieder unverändert aus der Reaktion, die sie katalysieren, hervor. Die meisten Enzyme arbeiten sowohl chemo- als auch wirkungsspezifisch und stereoselektiv. Daher kommt es zu keiner Bildung von Nebenprodukten.

Die elementare Struktureinheit der Enzyme stellen die Aminosäuren dar. Sie bestehen aus einem Einheitssatz von 20 Aminosäuren, welche durch Ausbildung einer Peptidbindung zu Polypeptidketten verknüpft werden. Die Seitenketten unterscheiden sich dabei in Größe, Ladung, Gestalt, Wasserstoffbrückenbildungskapazität und chemischer Reaktivität.

Die Polypeptidketten bestehen aus vier Strukturebenen, die als Primär-, Sekundär-, Tertiär- und Quartärstruktur bezeichnet werden. Durch die Primärstruktur wird die reine Aminosäuresequenz beschrieben. Nach der Biosynthese einer Polypeptidkette beginnt sich diese schnell zu falten und anzuordnen. Dabei kommt es zur Ausbildung von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern, die als Sekundärstruktur bezeichnet wird. Die fertig gefaltete asymmetrische Struktur, die die Polypeptidkette einnimmt, um die katalytische Aktivität und hohe Spezifität zu erhalten, wird als Tertiärstruktur bezeichnet [28]. Besteht ein Enzym aus mehreren Untereinheiten, so wird deren räumliche Anordnung durch die Quartärstruktur bestimmt.

Die Bindung der Substrate erfolgt sehr spezifisch in einer vom Enzym gebildeten hydrophoben Tasche, die als aktives Zentrum bezeichnet wird. Dabei muss das Substrat eine geeignete Gestalt besitzen, um in das aktive Zentrum des Enzyms zu passen, gemäß dem „*Schlüssel-Schloß-Prinzip*“ von E. Fischer (1894) bzw. müssen sowohl Substrat als auch Enzym eine Konformationsänderung erfahren, gemäß dem „*induced-fit-Modell*“ von D. Koshland (1958) [29].



**Abbildung 2-10:** Schlüssel-Schloss-Prinzip nach E. Fischer (a) und induced-fit-Modell nach D. Koshland (b) [29]

Die enzymkatalysierten Reaktionen zeichnen sich dabei durch die Bildung eines Komplexes (ES) zwischen Enzym (E) und Substrat (S) aus, die der so genannten *Michaelis-Menten-Kinetik* folgen [30]:



Die Michaelis-Menten-Konstante  $K_M$  entspricht somit der Substratkonzentration, bei der die Reaktionsgeschwindigkeit den halben Maximalwert erreicht hat und wird berechnet zu

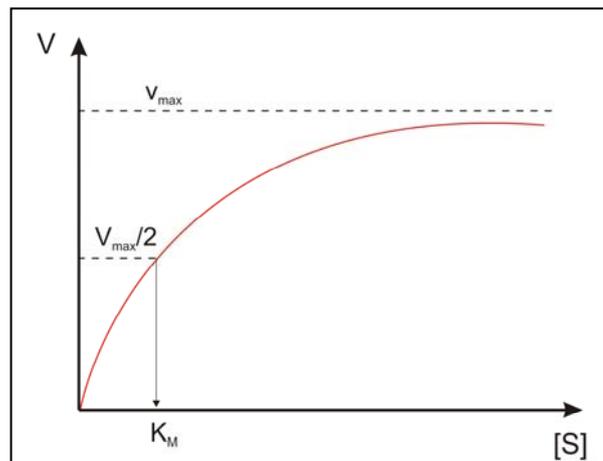
$$K_M = \frac{k_b + k_a'}{k_a} \quad (2-18)$$

wobei  $k_a$ ,  $k_a'$  und  $k_b$  die Geschwindigkeitskonstanten darstellen. Durch Umformen wird somit die Bildungsgeschwindigkeit des Produkts wie folgt

$$v = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S]} \quad (2-19)$$

erhalten. Durch Auftragung von  $v$  gegen  $[S]$  können durch Anfitzen mittels einer hyperbolischen Formel die Werte für  $v_{\max}$  bzw.  $K_M$  bestimmt werden. Die Auftragung beschreibt eine Sättigungskurve, deren Reaktionsgeschwindigkeit bei konstanter Enzymkonzentration und kleiner Substratkonzentration in annähernd linearem Verhältnis zur Substratkonzentration steht. Bei hohen Substratkonzentrationen wird

die Reaktionsgeschwindigkeit jedoch unabhängig von ihr und erreicht ihren Maximalwert  $v_{\max}$ .

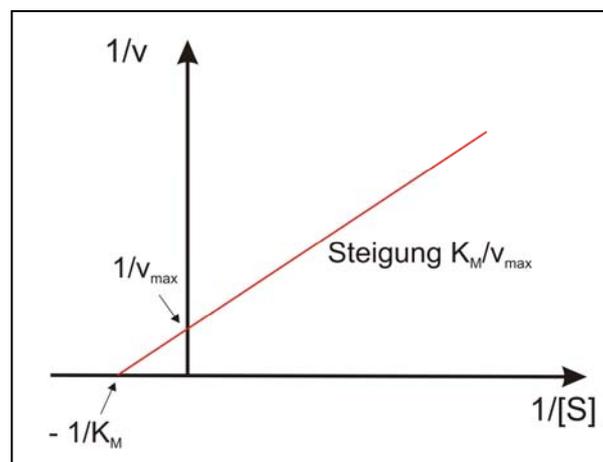


**Abbildung 2-11:** Michaelis-Menten-Kinetik

Eine einfachere und genauere Art der Auftragung liefert die doppelreziproke Auftragung nach *Lineweaver-Burk*.

$$\frac{1}{v} = \frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{\max}} \quad (2-20)$$

Hierbei wird  $1/v$  gegen  $1/[S]$  aufgetragen, wobei durch lineare Regression aus dem Achsenabschnitt bzw. der Steigung die Werte für  $v_{\max}$  bzw.  $K_M$  erhalten werden.



**Abbildung 2-12:** Lineweaver-Burk

Zur Vermeidung einer Punkthäufung bei hohen Konzentrationen, d.h. bei kleinen  $1/[S]$ -Werten, wird die Auftragung nach *Hanes* gewählt. Hierbei wird  $[S]/v$  gegen  $[S]$  aufgetragen [31, 32].

$$\frac{[S]}{v} = \frac{K_M}{v_{\max}} + \frac{[S]}{v_{\max}} \quad (2-21)$$

Die Enzyme lassen sich entsprechend der Reaktionen, die sie katalysieren, in sechs verschiedene Enzymklassen einteilen (International Union of Biochemists, IUB) [33, 34]:

1. *Oxidoreduktasen* katalysieren Redoxreaktionen durch Elektronentransfer oder durch Übertragung von Wasserstoff- bzw. Sauerstoffatomen. Zu der Gruppe der Oxidoreduktasen werden die Dehydrogenasen, Oxidasen, Oxygenasen und Hydroxylasen gezählt. Diese Enzyme benötigen zur Umsetzung eines Substrates einen Cofaktor wie  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ,  $\text{NADP}^+/\text{NADPH}$ ,  $\text{FAD}/\text{FADH}_2$  oder Liponsäure.
2. *Transferasen* übertragen funktionelle Gruppen von einem Substrat auf ein anderes. Zu ihnen werden die Phosphotransferasen (enthalten Kinasen) und die Aminotransferasen gezählt. Auch diese Enzymklasse benötigt zur Umsetzung einen Cofaktor wie z.B. Biotin.
3. *Hydrolasen* spalten Bindungen unter Einsatz von Wasser. Hierzu werden die Lipasen, Esterasen, Phosphatasen und Peptidasen gezählt, die zur Umsetzung jedoch keinen Cofaktor benötigen.
4. *Lyasen* katalysieren die Spaltung oder das Hinzufügen von Gruppen unter Bildung von Doppelbindungen. Beispiele sind Decarboxylasen, Aldolasen und Synthasen.
5. *Isomerasen* beschleunigen die Umwandlung von chemischen Isomeren. Zu ihnen zählen die Razemasen und Mutasen.

6. *Ligasen* oder *Synthetasen* katalysieren das Verknüpfen zweier Moleküle durch eine chemische Bindung, wobei Adenosintriphosphat (ATP) gespalten wird.

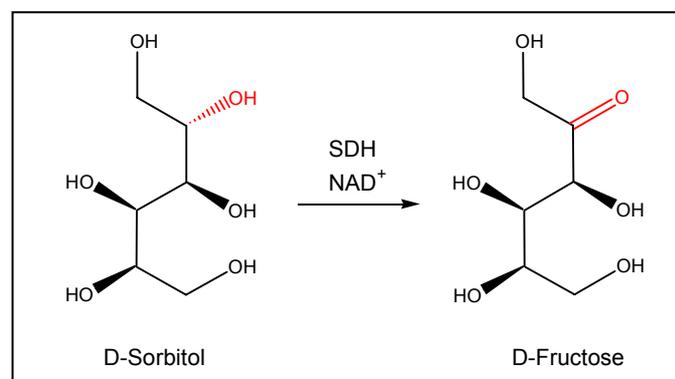
Die in dieser Arbeit verwendeten Enzyme gehören zur Klasse der Oxidoreduktasen, da es hierbei zu einem Elektronentransfer kommt, der für elektroenzymatische Anwendungen am interessantesten ist.

Im Folgenden sollen sowohl die Sorbitol- und Galaktit-Dehydrogenase als auch die Pyranose-2-Oxidase vorgestellt werden.

### 2.2.1 Sorbitol- / Galaktit-Dehydrogenase (SDH / GatDH)

SDH und GatDH gehören zur Gruppe der Oxidoreduktasen und benötigen zur Substratumsetzung den Cofaktor  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ .

Sorbitol-Dehydrogenase wird aus dem Bakterium *Rhodobacter sphaeroides* gewonnen. Es handelt sich um ein  $\text{NAD}^+$ -abhängiges Homodimer mit einem Molekulargewicht von  $\sim 29$  kDa pro Untereinheit. Das Enzym katalysiert die Umsetzung der Substrate D-Sorbitol (D-Glucitol) und D-Fructose, L-Iditol und L-Sorbose sowie von Galaktitol und D-Tagatose. Bevorzugt jedoch wird die enantioselektive Oxidation von D-Sorbitol zu D-Fruktose bzw. die Reduktion zu D-Sorbitol katalysiert [35].

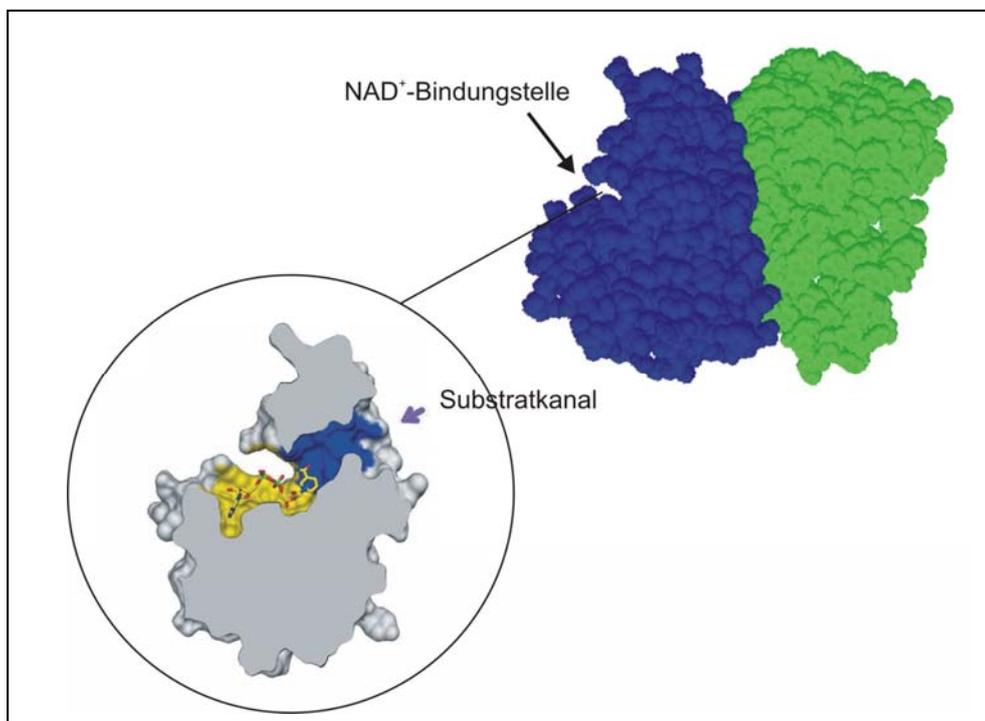


**Abbildung 2-13:** Substratoxidation mittels SDH

Die Sorbitol-Dehydrogenase zeigt in ihrer Anordnung von  $\alpha$ -Helices und  $\beta$ -Faltblättern in der  $\text{NAD}^+$ -Bindungsdomäne einige typische Eigenschaften der SDR-Familie („short-chain dehydrogenasen/reductasen“) und wird daher zu ihnen gezählt [35, 36].

In Abbildung 2-14 ist in der Vergrößerung das aktive Zentrum der SDH zu sehen. Zu erkennen sind die  $\text{NAD}^+$ -Bindungsstelle mit dem sich darin befindenden Cofaktor und der Substratkanal, der von einer Seite an den Nicotinamidring des Cofaktor grenzt.

Das im aktiven Zentrum befindliche Tyrosin nimmt das Proton der C2-Hydroxylgruppe von Sorbitol auf, während der C4-Kohlenstoff von Nicotinamid das Hydridion aufnimmt und somit die Oxidation zu D-Fruktose katalysiert.

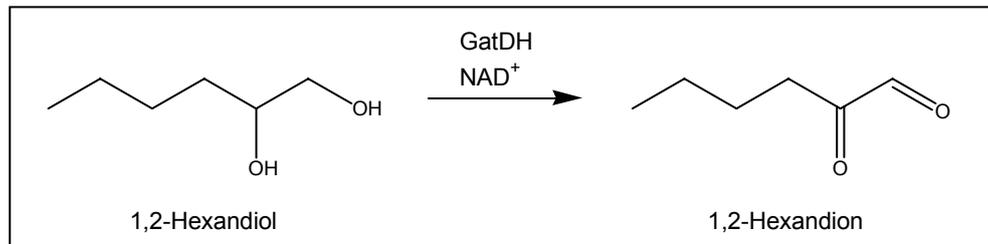


**Abbildung 2-14:**  $\text{NAD}^+$ - und Substratbindungsstelle der SDH [35]

Die Konzentrationsbestimmung von D-Sorbitol wird vor allem im Bereich der Lebensmittelchemie benötigt und kann durch enzymatische Analyse mittels SDH erreicht werden, indem D-Sorbitol in Gegenwart von  $\text{NAD}^+$  zu Fruktose oxidiert wird. In den folgenden Kapiteln soll die elektrochemische Regenerierung des Cofaktors  $\text{NAD}^+$  anhand der enantioselektiven Oxidation von D-Sorbitol zu D-Fruktose untersucht werden.

## 2. Theorie

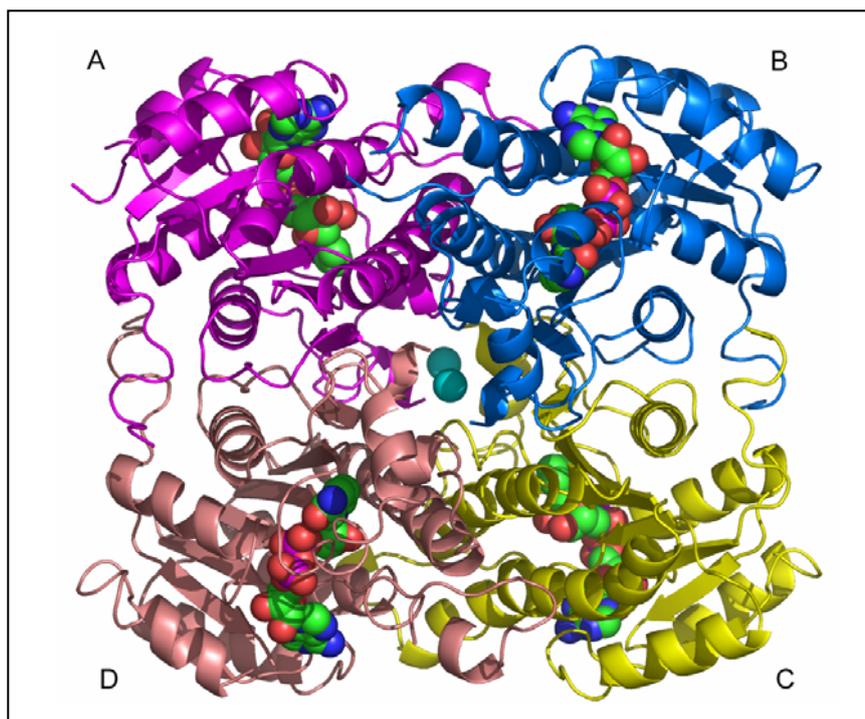
Die Galaktit-Dehydrogenase wird entweder aus *Rhodobacter sphaeroides* gewonnen oder aber in *E.coli* exprimiert, stellt ein Homotetramer dar und besitzt ein Molekulargewicht von ~ 110 kDa. Das Enzym katalysiert die Oxidation verschiedener Zuckeralkohole, Diolen und sekundärer Alkohole, wobei die Aktivität von der Gegenwart zweiwertiger Kationen abhängig ist [37, 38].



**Abbildung 2-15:** Substratoxidation mittels GatDH

Dehydrogenasen repräsentieren Enzyme, die sowohl Oxidationen als auch Reduktionen durchführen können. Daher katalysiert die GatDH auch die Reduktion von prochiralen Carbonylverbindungen zu chiralen Alkoholen.

In Abbildung 2-16 ist die Struktur der GatDH mit den vier Untereinheiten und den sich darin befindlichen Cofaktoren dargestellt. Im Zentrum des Homotetramers befinden sich die zwei zweiwertigen Magnesiumionen (türkis), die für die Aktivität der GatDH essentiell sind.



**Abbildung 2-16:** Struktur der GatDH [39]

Unnatürliche Monosaccharide sind nützliche Bausteine für die Synthese biologisch aktiver Produkte. L-Sorbose z.B. wird für die industrielle Produktion von Ascorbinsäure verwendet und kürzlich auch als Vorstufe für die Synthese des potenten Glycosidase-Inhibitor 1-Deoxygalactonojirimycin [40]. Ähnlich, aber effizienter kann auch L-Tagatose zur Synthese verwendet werden, jedoch ist die Verfügbarkeit des Substrats aufgrund der mangelhaften Produktionsmethoden gehindert. Rentabler ist dabei die enzymatische Route wie die Synthese von L-Tagatose durch regioselektive Oxidation an C-5 von Galaktitol mittels GatDH, die in Gegenwart katalytischer Mengen an  $\text{NAD}^+$  durchgeführt wird [40].

Um eine kontinuierliche in situ Regenerierung des Cofaktors zu erreichen, wird in der Biologie das Enzym Laktat-Dehydrogenase eingesetzt.

Eine Alternative stellt hierbei die elektrochemische Regenerierung dar und soll in den folgenden Kapiteln anhand der enantioselektiven Oxidation von 1,2-Hexandiol zum entsprechenden 1,2-Hexandion untersucht werden.

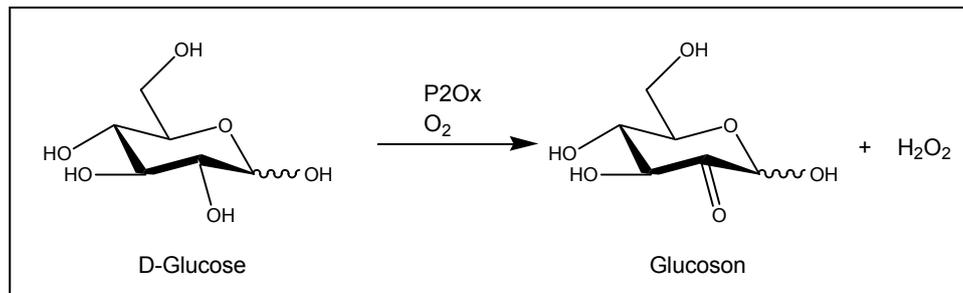
### 2.2.2 Pyranose-2-Oxidase (P2Ox)

Bei der Pyranose-2-Oxidase handelt es sich um ein homotetrameres Flavoenzym mit einem Molekulargewicht von  $\sim 270$  kDa. Im Gegensatz zu den Dehydrogenasen besitzen die Oxidasen bereits den kovalent gebundenen Cofaktor FAD/FADH<sub>2</sub>.

Die in dieser Arbeit verwendete P2Ox wird von dem Weißfäulepilz *Peniophora gigantea* produziert und in *E.coli* exprimiert [41, 42].

Die Pyranose-2-Oxidase katalysiert die regioselektive C2-Oxidation von Aldopyranosen wie D-Glucose und verschiedenen Mono- und Disacchariden zu den entsprechenden Dicarbonsäuren in Gegenwart von molekularem Sauerstoff (Abbildung 2-17). Dieser wird in Folge der Oxidation zu Wasserstoffperoxid reduziert und muss aufgrund des Oxidationspotentials entfernt werden [42].

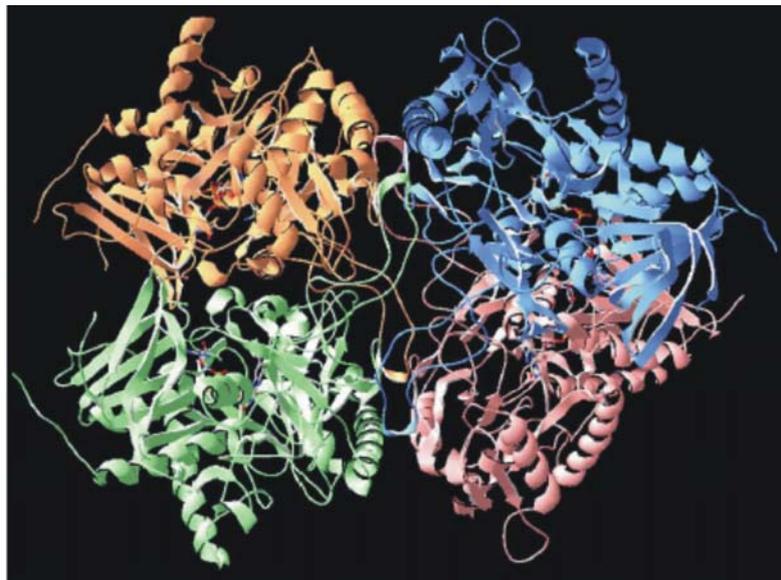
Die dabei gewonnenen Dicarbonsäuren stellen interessante Ausgangsverbindungen für die Synthese von Feinchemikalien und pharmazeutisch relevanten Produkten dar und finden somit Einsatz in Bereichen wie Medizin, Chemie oder Biotechnologie.



**Abbildung 2-17:** Substratoxidation mit P2Ox

Die Pyranose-2-Oxidase gehört zur GMC-Familie (Glucose-Methanol-Cholin) der FAD-abhängigen Oxidoreduktasen wie Glucose-, Cholesterol- oder Cellobiose-Oxidase [41].

Wie in Abbildung 2-18 zu sehen, besitzt die P2Ox aus *Peniophora sp.* pro Untereinheit ein kovalent gebundenes FAD mit einem zentralen Hohlraum in der Mitte der vier Untereinheiten, der zu den vier aktiven Zentren führt. Ebenso verhält es sich bei der P2Ox aus *Peniophora gigantea*.



**Abbildung 2-18:** rekombinante P2Ox aus *Peniophora sp.* mit FAD [41]

In den folgenden Kapiteln soll die regioselektive Oxidation von D-Glucose zu Glucoson durch elektrochemische Oxidation des während der Substratoxidation entstehenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> untersucht werden.

### 2.3 Klassische Regeneration des Cofaktors $\text{NAD}^+$ / $\text{NADH}$

Die Regenerierung des teuren Cofaktor-Systems  $\text{NAD}^+$ / $\text{NADH}$  stellt in Bereichen wie Biologie oder Biochemie ein bedeutendes Problem dar.

Bei der Wahl einer geeigneten Recyclingmethode ist, aufgrund der geringen Stabilität des Cofaktors, auf Faktoren wie die Wahl einer Reaktion mit günstiger Gleichgewichtslage, eine schnelle Cofaktoroxidation und eine Vermeidung von Nebenproduktbildung zu achten [23]. Des Weiteren darf das Regenerierungssystem natürlich keine schlechten Auswirkungen auf das Enzym haben [23].

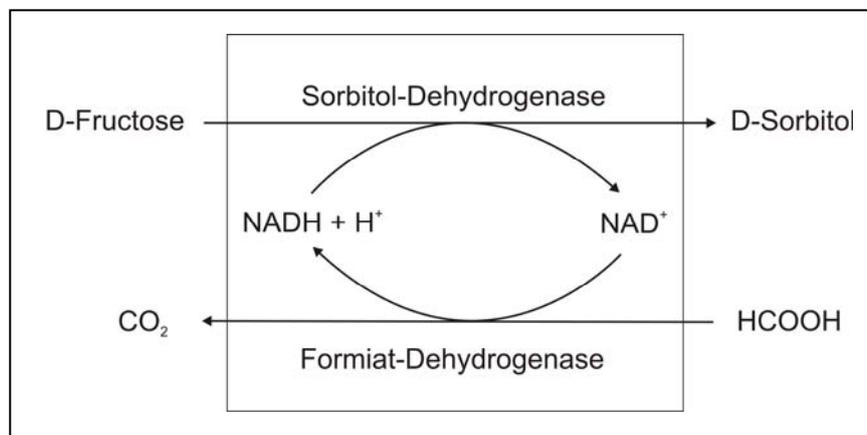
Traditionell werden zwei verschiedene Verfahren zur Regenerierung verwendet: Die chemische und enzymatische Cofaktoroxidation.

Bei der chemischen Oxidation von  $\text{NADH}$  werden Oxidationsmittel wie Hexacyanoferrate  $\text{Fe}[\text{CN}_6]^{3-}$  verwendet, deren Nachteile jedoch zum einen im stöchiometrischen Einsatz und zum anderen in der Inkompatibilität mit den meisten biologischen Systemen liegen.

Eine weitere Methode stellt die enzymatische Regenerierung dar, bei der der Einsatz eines weiteren Enzyms zum tragen kommt, wie z.B. einer Dehydrogenase.

Infolge der Reduktion oder Oxidation eines Substrates durch das zweite Enzym, wird  $\text{NADH}$  bzw.  $\text{NAD}^+$  als Cofaktor benötigt und somit die Reoxidation oder Rereduktion des Cofaktors katalysiert.

Im Fall der enzymatischen Regenerierung von  $\text{NADH}$  wird das Enzym Formiat-Dehydrogenase verwendet, welches Ameisensäure zu  $\text{CO}_2$  oxidiert und gleichzeitig den oxidierten Cofaktor reduziert (Abbildung 2-19).

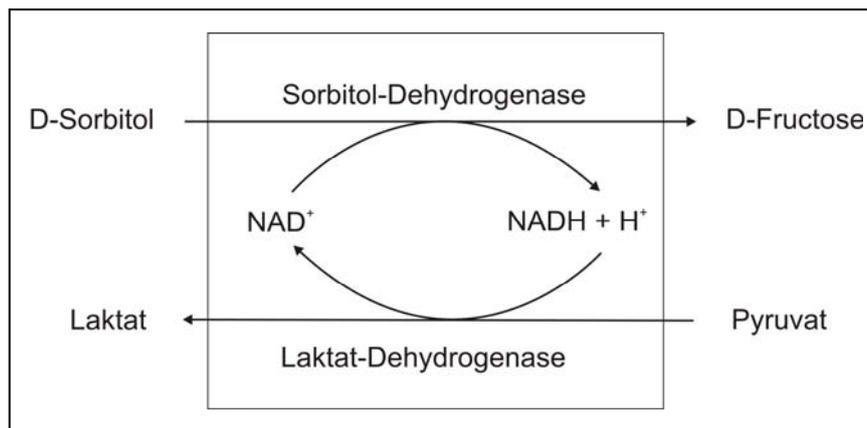


**Abbildung 2-19:**  $\text{NADH}$ -Rereduktion mittels Formiat-Dehydrogenase

Somit steht NADH wieder der Reduktion von D-Fructose zu D-Sorbitol mittels SDH zur Verfügung. Das zweite Produkt  $\text{CO}_2$  kann entweichen [43].

Abbildung 2-20 zeigt die enzymatische Regenerierung von  $\text{NAD}^+$  mittels Laktat-Dehydrogenase.

Die Verwendung dieses Verfahrens hat jedoch einige Nachteile. Zum einen entstehen höhere Kosten aufgrund des Einsatzes eines zweiten Enzyms und des Substrats Pyruvat. Zum anderen kann es durch die Verwendung von Pyruvat zu einer Inaktivierung des Cofaktors kommen, da Pyruvat nukleophil am Nicotinamidring von NADH angreifen kann und somit die Umsatzrate minimiert [23]. Des Weiteren kommt es zur Entstehung eines zweiten Produktes, Laktat, welches von dem eigentlichen Produkt Fructose zu isolieren ist und damit eine zusätzliche und evt. aufwändige Aufarbeitung einhergeht.



**Abbildung 2-20:**  $\text{NAD}^+$ -Reoxidation mittels Laktat-Dehydrogenase

Eine Alternative stellt die elektrochemische Regenerierung des Cofaktors dar. Dieses Verfahren hat den Vorteil, dass kein weiteres Enzym und Substrat zur Reoxidation des Cofaktors eingesetzt werden müssen und somit eine anschließende Aufreinigung und Isolierung von zusätzlichen Produkten vermieden werden kann.

Dabei gilt es zwischen direkter und indirekter Oxidation zu unterscheiden.

Die direkte Oxidation von NADH ist zwar prinzipiell möglich, hat aber den Nachteil, dass eine Oxidation erst bei hohen Überspannungen erreicht wird [44-46]. Dies kann jedoch sowohl zur Oxidation anderer Substrate als auch zu einer Enzymdenaturierung führen. Des Weiteren kann es durch die direkte Oxidation des

Cofaktors an der Elektrodenoberfläche zu Radikalfolgeprodukten kommen und stellt somit keine geeignete Methode dar [23].

Im Gegensatz dazu erfolgt die indirekte Oxidation mit Hilfe so genannter Redoxmediatoren, die die Überspannung der jeweiligen Reaktion herabsetzen. Hierbei wird der Mediator durch Oxidation des Cofaktors reduziert und anschließend selbst wieder an der Anode recycelt (Abbildung 2-21). Dabei kann der Mediator entweder in Lösung oder auf der Elektrodenoberfläche immobilisiert vorliegen.

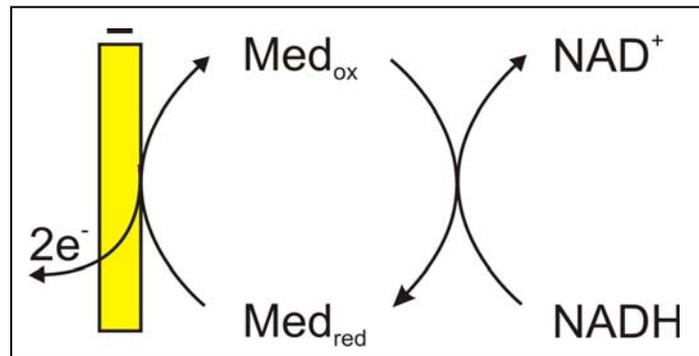
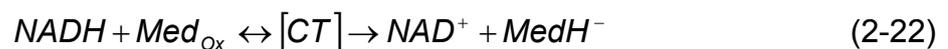


Abbildung 2-21: NAD<sup>+</sup>-Regenerierung mittels Redoxmediator

In einem ersten Reaktionsschritt bildet NADH einen Charge-Transfer-Komplex (CT) mit dem Redoxmediator, gefolgt von der Übertragung des ersten Elektrons, dem Proton, dem anschließenden schnellen Transfer des zweiten Elektrons auf den Mediator und dem Zerfall des Komplexes [47].



Als Mediatoren eignen sich die bereits in den 80er Jahren untersuchten o-Chinone sowie Dopamin und deren Derivate. Des Weiteren wurden eine Reihe von Farbstoffen wie Meldola Blau [48, 49], Methylengrün [50], Azure A [51], Nilblau [52] oder Toluidine Blau O [49, 51, 52] zur Reduktion der Überspannung eingesetzt.

1998 wurden neue effiziente Mediatoren publiziert, die aus aromatischen Molekülen mit Nitrosubstituenten bestehen. Diese Substituenten werden elektrochemisch aktiviert zur Bildung von Hydroxylaminen, welche wiederum durch einen zwei-Elektronen-zwei-Protonen Prozess zu Nitrosogruppen oxidiert werden können und

somit das reversible Redoxpaar NHOH/NO bilden [44, 47, 53, 54]. Außerdem werden als Redoxmediatoren auch z.B. Osmiumkomplexe verwendet, die in eine Polymermatrix eingebunden sind [55].

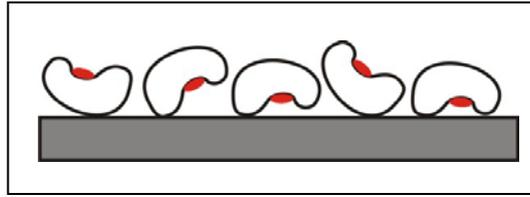
### **2.4 Modifizierung von Elektroden zur Enzymimmobilisierung**

Zur Nutzung von Biosensoren in Bereichen wie klinischer Diagnostik, Umweltanalyse, zur Herstellung von Feinchemikalien oder Herstellung wichtiger Zwischenprodukte in der Arzneimittelforschung ist es wichtig, dass alle am Prozess beteiligten Komponenten an der verwendeten Elektrode immobilisiert vorliegen. Ebenfalls zu beachten sind die universelle Einsetzbarkeit der modifizierten Elektroden und die Stabilität der immobilisierten Enzyme, um eine mögliche Denaturierung zu vermeiden. Auch ein guter Elektronentransfer zwischen Enzym und Elektrode muss gewährleistet werden, um eine gute Substratumsetzung zu ermöglichen.

Entsprechend der Art der Immobilisierung wird zwischen physikalischer und chemischer Modifizierung von Elektroden unterschieden.

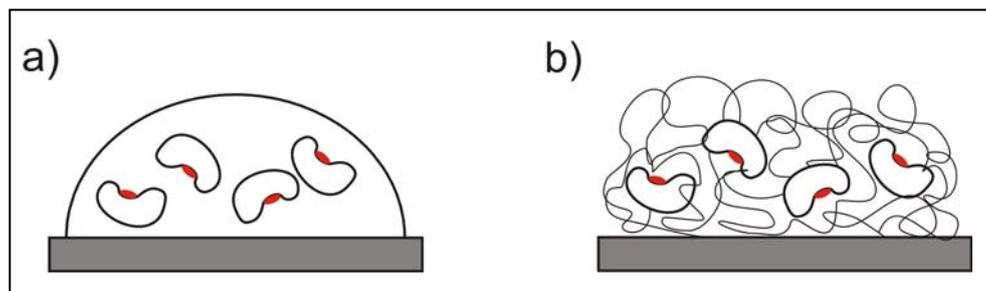
Zur physikalischen Modifizierung wird die Adsorption und der Einbau in ein Polymernetzwerk, ein Gel oder eine Membran gezählt. Die chemische Immobilisierung umfasst die kovalente Anbindung von funktionellen Gruppen des Proteins an modifizierte Elektrodenoberflächen sowie die Quervernetzung von Enzymen [9, 56, 57].

Bei der Adsorption handelt es sich um einen reversiblen Prozess, der durch schwache Wechselwirkungen wie van-der-Waals-, Dipol-Dipol- oder Wasserstoffbrückenbindungen zwischen Enzym und Elektrode hervorgerufen wird [58]. Diese Methode stellt die einfachste Art der Immobilisierung dar (Abbildung 2-22), mit einem breiten Anwendungsbereich und eignet sich für eine hohe Enzymbeladung. Geeignete Materialien stellen u.a. Glas, Plastik, poröser Kohlenstoff oder Metalloxide dar. Aufgrund der schwachen Wechselwirkungen sind diese Art von modifizierten Elektroden jedoch nicht sehr stabil und reagieren empfindlich auf Änderungen von pH oder Ionenstärke. Auch kann das Enzym hierbei auf unterschiedliche Arten mit der Oberfläche interagieren, wobei jedoch die Orientierung des aktiven Zentrums direkt zur Elektrodenoberfläche eine wichtige Rolle spielt für den direkten Elektronentransfer. Auch eine Desorption des Biomoleküls ist auf diese Art möglich, wodurch keine wünschenswerte Langzeitstabilität gegeben ist [56].



**Abbildung 2-22:** Adsorption von Enzymen an einer Oberfläche. Das aktive Zentrum ist in rot dargestellt.

Der Einschluss in ein Gel, eine Membran oder ein Polymernetzwerk stellen eine bequeme, einfache und kostengünstige Methode zur Elektrodenmodifizierung dar. Durch die Einbettung von Proteinen innerhalb einer semipermeablen Membran, werden diese geschlossen in der Nähe der Elektrodenoberfläche festgehalten. Die Membran kann dabei als reine Retentionsschicht genutzt werden, die das Enzym physikalisch abgrenzt (Abbildung 2-23 (a)). Das Substrat diffundiert durch die Membran und erreicht das Enzym, wobei das entsprechende Produkt enzymatisch gebildet wird. Das Produkt wiederum diffundiert zur Elektrodenoberfläche, wo die eigentliche analytische Reaktion stattfindet [56]. Wichtig ist die gute Haftbarkeit der Membran an der Elektrodenoberfläche. Des Weiteren muss die Membran dünn, hydrophil und porös sein. Geeignete Materialien stellen Celluloseacetat, Cellulosenitrat, Cellophan oder Nafion dar. Die Membran verhindert auch die Abscheidung unlöslicher Materialien auf der Oberfläche und andere Ablagerungsphänomene [56].

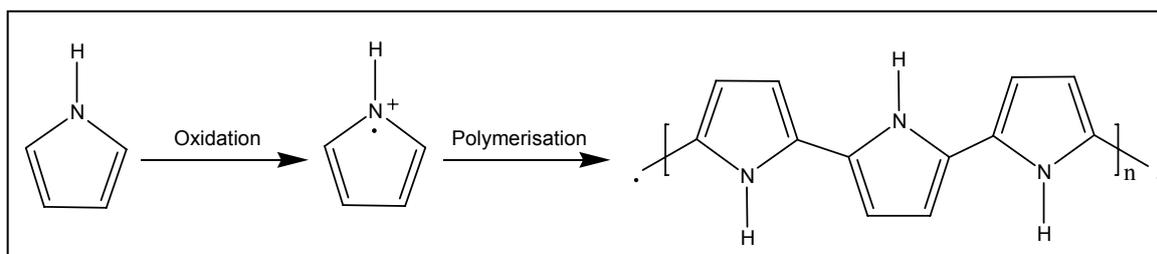


**Abbildung 2-23:** Einschluss in eine Membran (a) und in ein Polymernetzwerk (b)

Ebenso bietet die Sol-Gel-Technologie eine interessante Möglichkeit zur Einbettung von Enzymen innerhalb einer Silica-Matrix ohne die Aktivität des Enzyms zu beeinflussen [59-61].

## 2. Theorie

Eine direkte in-situ Bildung eines leitenden Polymerfilms aus einer Lösung von Monomeren kann z.B. durch elektrochemische Abscheidung erzeugt werden. Dazu werden Monomere wie Pyrrole, Phenole oder Thiophene zu einem polymerisierbaren Radikal oxidiert und somit fest auf die Elektrodenoberfläche integriert (Abbildung 2-23 (b)). Das Polymerwachstum ist gut kontrollierbar z.B. durch das Anlegen eines Potentials oder durch die Anzahl der Cyclen während einer CV-Messung. Diese Methode stellt ein weites Spektrum an Monomerkomponenten zur Verfügung, ist kostengünstig und an vielen unterschiedlichen Elektrodenmaterialien wie z.B. Gold, Platin oder Glaskohlenstoff anwendbar. Weitere Vorteile sind u. a. die Flexibilität, die einfache Durchführbarkeit, das „Stapeln“ mehrerer Enzymschichten übereinander bei leitenden Polymeren sowie die Co-Immobilisierung anderer Enzyme. Die häufigsten verwendeten Polymere sind Polyanilin [62, 63], Polypyrrol (Abbildung 2-24) [56], Polytyramin [64-67] oder Polyphenol [57].



**Abbildung 2-24:** Herstellung eines Polypyrrol-Films

Heller et al. beschäftigen sich seit Jahren sehr erfolgreich mit der Immobilisierung von Glucose-Oxidase an polymermodifizierten Elektroden im Bereich der Diabetesforschung (Abbott Diabetes Care), wobei die ersten Produkte bereits vermarktet werden (Free Style Flash<sup>®</sup>). Zur Abscheidung werden Polymere wie Polyamine [27] oder Poly-N-vinylimidazol-Derivate [6, 55] verwendet, bei denen Osmiumkomplexe als Mediatoren kovalent an das Polymer angebunden werden (Abbildung 2-25). Die so funktionalisierten Elektroden können mittels cyclischer Voltammetrie untersucht werden und zeigen das reversible Redoxpaar  $\text{Os}^{2+}$  und  $\text{Os}^{3+}$ . Im Anschluss wird Glucose-Oxidase immobilisiert und durch Zugabe definierter Mengen an Glucose die Substratoxidation zu Gluconolacton bei einem Potential von -360 mV vs. Ag/AgCl untersucht.

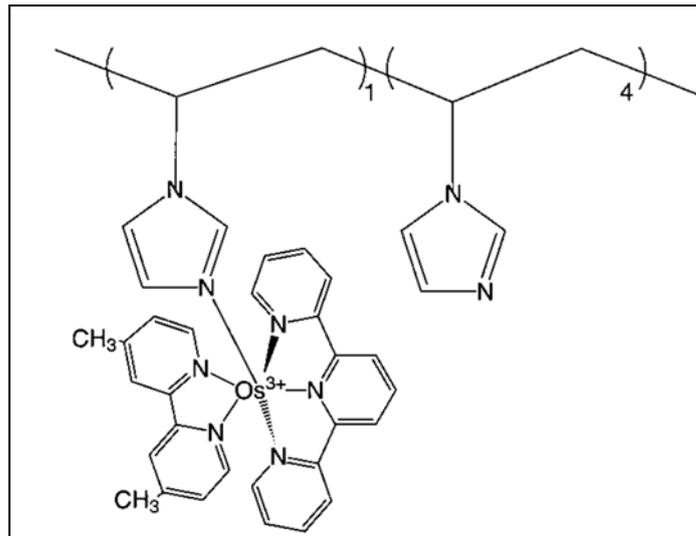


Abbildung 2-25: Beispiel eines Osmium-Komplexes nach Heller [55]

Eine weitere Methode zur Enzymimmobilisierung sind Elektrodepositionslacke wie Resydrol AY498w35WA (Fa. Cytec), welche von der Arbeitsgruppe Schuhmann verwendet werden [57, 68, 69]. Dabei werden die kathodischen bzw. anodischen Lacke aufgrund des Anlegens eines Potentials deprotoniert bzw. protoniert und somit das Polymer ausgefällt [57].

Bei der kovalenten Immobilisierung werden so genannte „self-assembled monolayer“ (SAM) auf die Elektrodenoberfläche aufgebracht. Diese SAM-Schichten stellen eine sehr stabile und irreversible Oberflächenfunktionalisierung dar (Abbildung 2-26 (a)), die bis zu einem Potential von ca. +800 mV stabil sind. Dabei werden häufig Thiole verwendet, die aufgrund ihrer hohen Affinität zu Gold via Thiolatbindungen an die Oberfläche angreifen. Die van der Waals-Wechselwirkungen zwischen benachbarten Alkylketten erhöhen somit die Stabilität und die Ordnung der SAM [70].

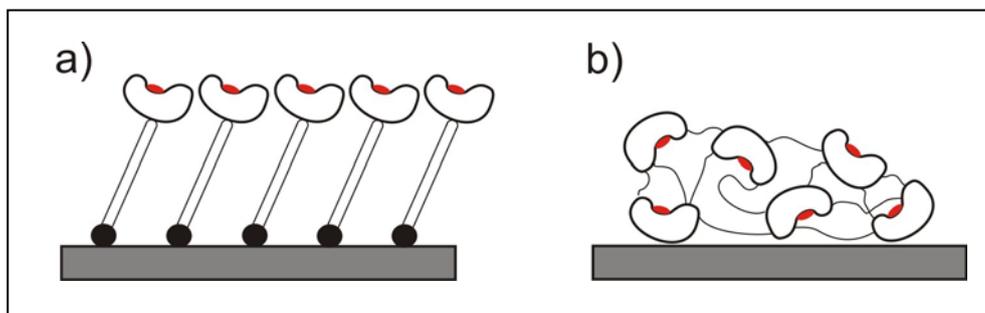
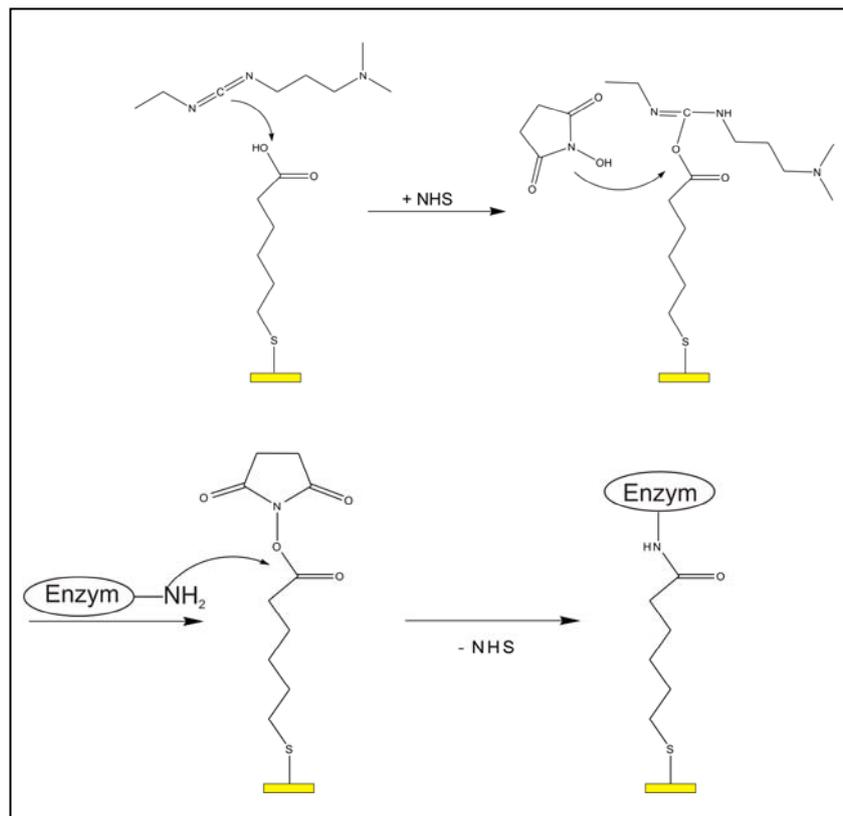


Abbildung 2-26: SAM mit kovalent gebundenem Enzym (a) und Quervernetzung mittels Gutardialdehyd (b).

## 2. Theorie

Die Adsorption von Alkanthiolen bildet hochgeordnete Monolagen, bei denen das Thiolat zwischen drei Goldatomen bindet. So entsteht eine hexagonale Symmetrie. Die Alkylketten sind um 25-39° geneigt angeordnet, wodurch die dicht gepackte und hochgeordnete Monolage entsteht [71]. Am anderen Ende besitzen diese Thiole funktionelle Gruppen, die eine kovalente Bindung zum Protein ermöglichen. Hierbei handelt es sich häufig um freie COOH-, OH- oder NH<sub>2</sub>-Gruppen, die an Aminosäuren wie Lysin, Glutamat, Aspartat oder Histidin des Biomoleküls anbinden. Zu beachten ist jedoch, dass die kovalente Anknüpfung nicht an Stellen des Enzyms erfolgt, die an der katalytischen Aktivität involviert sind, wie z.B. an essentiellen Aminosäuren direkt im aktiven Zentrum. Dies könnte u.a. eine Konformationsänderung oder gar Denaturierung zur Folge haben.

Zur Aktivierung der unreaktiven Carboxylgruppen werden meist ein Carbodiimid (N-Ethyl-N-(dimethylaminopropyl)carbodiimid, EDC) und N-Hydroxysuccinimid (NHS) als nützliche bifunktionelle Kupplungsreagenzien verwendet (Abbildung 2-27).



**Abbildung 2-27:** Aktivierung der unreaktiven Carboxylgruppen mittels eines Carbodiimids und N-Hydroxysuccinimid (NHS).

## 2. Theorie

Dabei erfolgt zunächst die Bildung eines Aktivesters, wobei NHS das stabilere reaktive Intermediat bildet, an welches anschließend das Enzym im Sinne einer Peptidknüpfung angebunden wird.

Häufig wird auch die bereits aktivierte N-Hydroxysulfosuccinimid-3-Thiopropionsäure verwendet [72, 73].

Die Modifizierung von Goldelektroden mittels Thiolen und die Adsorption oder kovalente Immobilisierung von Proteinen wurde bereits intensiv anhand von Cytochrom C, u.a. von Scheller, Song, Bowden und Co [74-83] untersucht. Auch Enzyme wie Glucose-Oxidase [70], Cellobiose-Dehydrogenase [84, 85] oder Adrenodoxin [86] konnten bereits erfolgreich auf modifizierten SAM-Oberflächen aufgebracht und untersucht werden.

Willner et al. beschäftigen sich bereits seit mehreren Jahren mit der Modifizierung von Elektrodenoberflächen mit Thiolalkanen, um Proteine oder gar ganze DNA-Stränge auf den so funktionalisierten Elektroden immobilisieren zu können. So wird z.B. durch die Aufbringung einer SAM aus Cysteamin auf Gold ein amin-terminales Thiol erhalten. Die Cysteamin-Goldelektrode wird anschließend mit 4,4'-Diisothiocyanatostilben-2,2'-Disulfonsäure (DIDS) durch Bildung eines Thioharnstoffs verknüpft [12]. DIDS ist ein symmetrisches Molekül, so dass das unreaktive Ende mit den primären Aminosäuren des Proteins im Sinne einer Peptidbindung reagieren kann (Abbildung 2-28).

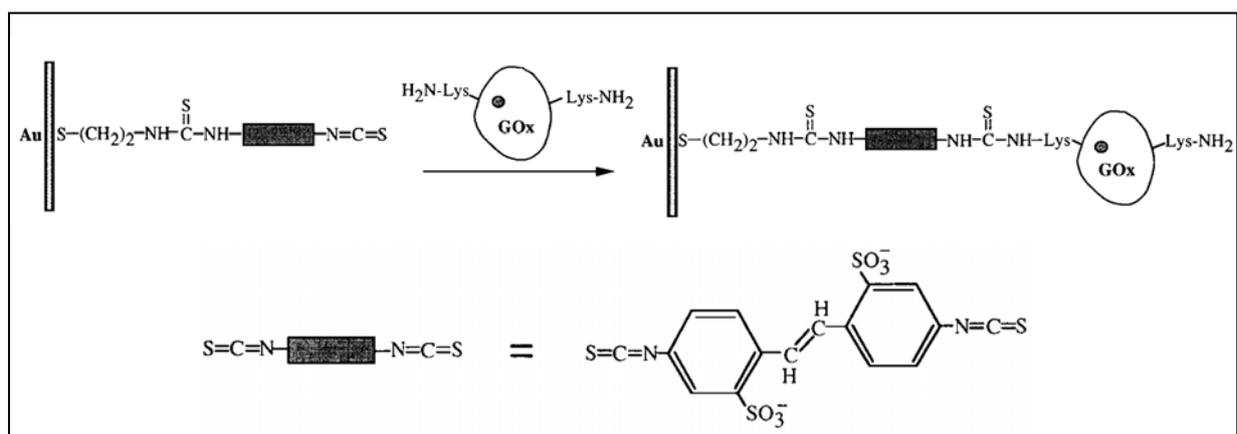


Abbildung 2-28: Gold / Cysteamin / DIDS / GOx nach Willner [12]

Ein weiterer Aspekt, den es bei den verschiedenen Immobilisierungsvarianten zu berücksichtigen gilt, ist die Beibehaltung der katalytischen Aktivität des Enzyms nach der Immobilisierung. Zur zusätzlichen Stabilisierung der adsorbierten Enzymschicht

wird häufig ein Quervernetzer („cross-linking“, Abbildung 2-26 (b)) wie z.B. Glutardialdehyd eingesetzt unter Zusatz von Rinderserum Albumin (BSA). BSA dient hierbei zur Strukturhaltung des Enzyms, um einen möglichen Aktivitätsverlust oder gar eine Denaturierung zu vermeiden. Die „Fixierung“ erfolgt durch Reaktion der freien  $\text{NH}_2$ -Gruppen am Enzym mit den Aldehydgruppen des Glutardialdehyds unter  $\text{H}_2\text{O}$ -Abspaltung. Auf diese Art kann eine Stabilisierung und Strukturhaltung des Enzyms gewährleistet werden.

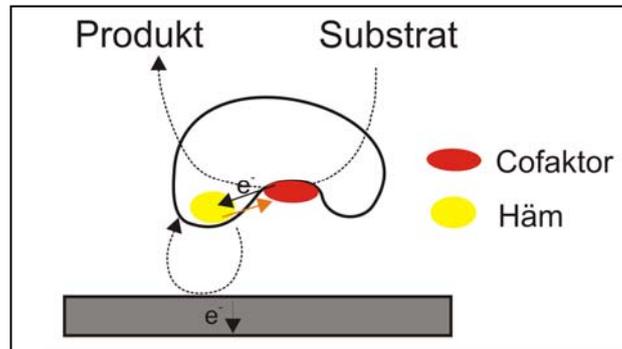
Entsprechend der unterschiedlichen Methoden zur Enzymimmobilisierung auf den unterschiedlichsten Elektrodenmaterialien wird in Bezug auf den Elektronentransfer zwischen Enzym und Elektrode zwischen Biosensoren erster, zweiter und dritter Generation unterschieden.

Bei den Biosensoren erster Generation wird in den meisten Fällen entweder die Konzentrationsänderung eines Cofaktors oder eines enzymatischen Produktes elektrochemisch gemessen. Bei Sensoren zweiter Generation dagegen wird ein künstlicher Redoxmediator eingeführt, der die Elektronen zwischen dem aktiven Zentrum im Enzym und der Elektrode hin- und herbewegt (Shuttle-Mechanismus, MET) [87]. Redoxmediatoren haben hierbei den Vorteil, dass durch ihre Hilfe das Potential einer enzymatisch katalysierten Reaktion herabgesetzt wird, wie z.B. bei der Oxidation von  $\text{NADH}$  zu  $\text{NAD}^+$  unter Einsatz des von Kuhn et al. entwickelten Redoxmediator [54]. Des Weiteren müssen die Redoxmediatoren eine gute Langzeitstabilität aufweisen, dürfen zu keinen Nebenreaktionen führen und müssen eine schnelle Elektronentransfer-Geschwindigkeit aufzeigen [57, 88]. Als Mediatoren kommen Moleküle wie z.B. Ferrocene und deren Derivate [89, 90], Chinone [18, 91] oder verschiedene Farbstoffe wie z. B. Meldola Blau [48, 49], Methylengrün oder -blau [50] und Toluidine Blau O [49, 51, 52, 92, 93] in Frage.

Der effiziente direkte Elektronentransfer (DET) zwischen aktivem Redoxenzym und Elektrode ist sowohl von der Distanz zwischen Enzym und Elektrode als auch von der komplexen Struktur des Enzyms abhängig (Biosensor dritter Generation).

Bisher ist der DET nur bei einer geringen Anzahl von Proteinen erfolgreich durchführbar gewesen. Dabei handelt es sich meist um so genannte Multicofaktorenzyme, die sowohl ein Häm als auch FAD als Cofaktor besitzen. Dabei sind z.B. das Enzym Meerrettich-Peroxidase (HRP) von Lindgren et al. bzw. Ruzgas et al. [94-96] und Cellobiose-Dehydrogenase [84, 85, 87] von Lindgren et al., Stoika

et al. bzw. Larsson et al. untersucht worden. Multicofaktorenzyme ermöglichen einen internen Elektronentransfer, indem das Substrat zunächst vom Cofaktor gebunden wird und die Elektronen anschließend über das Häm auf die Elektrodenoberfläche übertragen werden (Abbildung 2-29) [57].



**Abbildung 2-29:** Elektronentransfer beim DET in Multicofaktorenzymen

Beim DET ist allerdings darauf zu achten, dass das Enzym mit seinem aktiven Zentrum zur Elektrodenoberfläche hin orientiert ist, da sich die prosthetischen Gruppen normalerweise tief in den Enzymen befinden und andernfalls kein guter Elektronentransfer (ET) möglich wäre.

Eine gezielte Orientierung der Biomoleküle und somit eine Minimierung des ET-Abstandes kann dabei z.B. durch kovalente Immobilisierung an eine SAM erfolgen [84, 85, 97].

### **2.5 Herstellung von nanokristallinen Elektrodenoberflächen**

Die moderne Nanotechnologie hat sich heutzutage in Bereichen wie Physik, Chemie, Elektronik und Biotechnologie wie z.B. bei den industriellen Anwendungen oder in der pharmazeutischen Technologie etabliert [98-104]. Durch nanokristalline Materialien werden neue und verbesserte Funktionalitäten und mechanische Eigenschaften [105], wie z.B. Kratzfestigkeit, Härte oder Bruchzähigkeit und -festigkeit, erzielt, deren Nutzen für technische Anwendungen interessant ist.

Die Anwendungen als Katalysatoren und Pigmente waren der erste technologische Nutzen dieser Materialien. Das große Oberflächen- zu Volumenverhältnis erhöht die chemische Aktivität. Aufgrund dieser erhöhten Aktivität werden signifikante Kostenvorteile in der Fabrizierung von Katalysatoren aus Nanomaterialien erzielt.

Die kristallinen Bereiche von Nanostrukturen haben einen Durchmesser kleiner 100 nm. Die ungeordnete Korngrenzendicke beträgt 1 nm. Die im Korngrenzbereich befindlichen Atome zeigen einen höheren atomaren Abstand und verringern daher die Dichte. Dadurch bedingt verändern sich die physikalischen und chemischen Eigenschaften [106].

Bei Partikeln mit nur wenigen Nanometern Größe steigt die Anzahl der Oberflächenatome, die zu den oben erwähnten neuen oder veränderten Eigenschaften führt. Des Weiteren zeigen die kleinen Partikel Abweichungen vom Feststoffverhalten makroskopischer Partikel wie die Reduzierung der Schmelztemperatur [107] und Änderungen in den Gitterparametern. Das regelmäßige Gitter eines Kristallites wird nicht fortgesetzt [106]. Es entstehen Grenzflächen im Bereich der Korngrenzen, die im Gegensatz zum restlichen Material eine andere Struktur aufweisen.

Die Änderungen der Gitterparameter, die für metallische und halbleitende Partikel beobachtet werden, resultieren aus den Effekten der Oberflächenspannung. Die Reduzierung der Schmelztemperatur hingegen ergibt sich durch die veränderte freie Oberflächenenergie, die zu besseren katalytischen sowie Sensoreigenschaften führt [108]. Beide, die Oberflächenspannung und Oberflächenenergie, werden durch die verringerte Koordination der Oberflächenatome bedingt [109].

Die Herstellung nanokristalliner Materialien kann aus der Gasphase erfolgen, durch Verfahren wie Inertgaskondensation (IGC), Chemical Vapour Synthesis (CVS), Flammensynthese oder durch mechanische Verfahren wie das Kugelmahlen. Eine weitere Möglichkeit zur Herstellung nanokristalliner Partikel bieten Flüssigphasenreaktionen wie die kontrollierte Fällung, der Sol-Gel-Prozess, das Mikroemulsionsverfahren oder aber die elektrochemische Abscheidung.

### 2.5.1 Elektrochemische Abscheidung und Elementarschritte der Metallabscheidung

Die einzelnen Kristallite auf einer polykristallinen Elektrodenoberfläche tragen durch unterschiedliche kristallographische Orientierungen zur Oberfläche bei. Zwischen den Kristalliten befinden sich die Korngrenzen. Zusätzlich spielen Defekte im Kristallaufbau, Einschlüsse und adsorbierte Moleküle bei der elektrochemischen Abscheidung eine Rolle [20].

Im einfachsten Fall einer Metallabscheidung aus einem Elektrolyten erfolgt die Reaktion wie folgt:



Das thermodynamische Gleichgewicht für Metallabscheidung und -auflösung auf nativem und fremdem Substrat wird durch die *Nernst-Gleichung* beschrieben,

$$E_{Me/Me^{z+}} = E_{Me/Me^{z+}}^0 + \frac{RT}{nF} \cdot \ln \frac{a_{Me^{z+}}}{a_{Me}} \quad (2-25)$$

wobei  $E_{Me/Me^{z+}}$  das Nernst-Potential,  $E_{Me/Me^{z+}}^0$  das Standard-Potential, R die ideale Gaskonstante, T die Temperatur, n die Anzahl der Elektronen, F die Faradaykonstante,  $a_{Me^{z+}}$  die Aktivität der Metallionen und  $a_{Me}$  die Aktivität des Feststoffes (gleich eins) sind.

Das angelegte Elektrodenpotential beschreibt die Richtung der Reaktion. Die kathodische Abscheidung findet bei einem Potential statt, das negativ vom Nernst-

Potential liegt, im Gegensatz dazu erfolgt die anodische Auflösung bei einem Potential positiv vom Nernst-Potential. Die Überspannung wird als Differenz zwischen angelegter Spannung  $E$  und Nernst-Potential definiert:

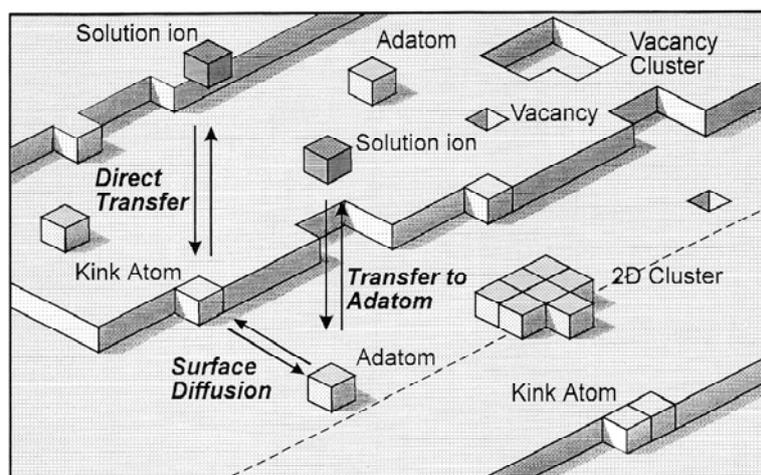
$$\eta = E - E_{Me/Me^{z+}} \quad (2-26)$$

Bei der elektrochemischen Abscheidung werden zwei verschiedene Arten der Anlagerung eines Metallions an einer Wachstumsstelle oder Stufe unterschieden.

Zum einen die Entladung eines Metallions aus der äußeren Helmholtz-Schicht zu einem ad-Atom mit anschließender Oberflächendiffusion zu den Kanten und Einschnitten und Einbau in das Gitter [20]. Zum anderen kann das Metallatom dabei auch direkt an einem festen Platz im Metallgitter entladen werden, wobei in diesem Fall keine Kristallisationshemmung auftritt (Abbildung 2-30).

Des Weiteren besteht die Möglichkeit einer Entladung und zweidimensionaler Keimbildung. Dies tritt z.B. bei glatten Oberflächen mit wenigen Wachstumskanten auf. In diesem Fall kommt es zu einer Bildung von Flächenkeimen.

An der Grenzfläche findet eine ständige Adsorption und Desorption der ad-Atome statt, da sich diese im thermodynamischen Gleichgewicht mit den Ionen im Elektrolyten befinden und somit eine größere Oberflächenmobilität und thermodynamisch stabile Strukturen bewirken [110].



**Abbildung 2-30:** Schematische Darstellung der Elementarschritte bei der Metallabscheidung [111]

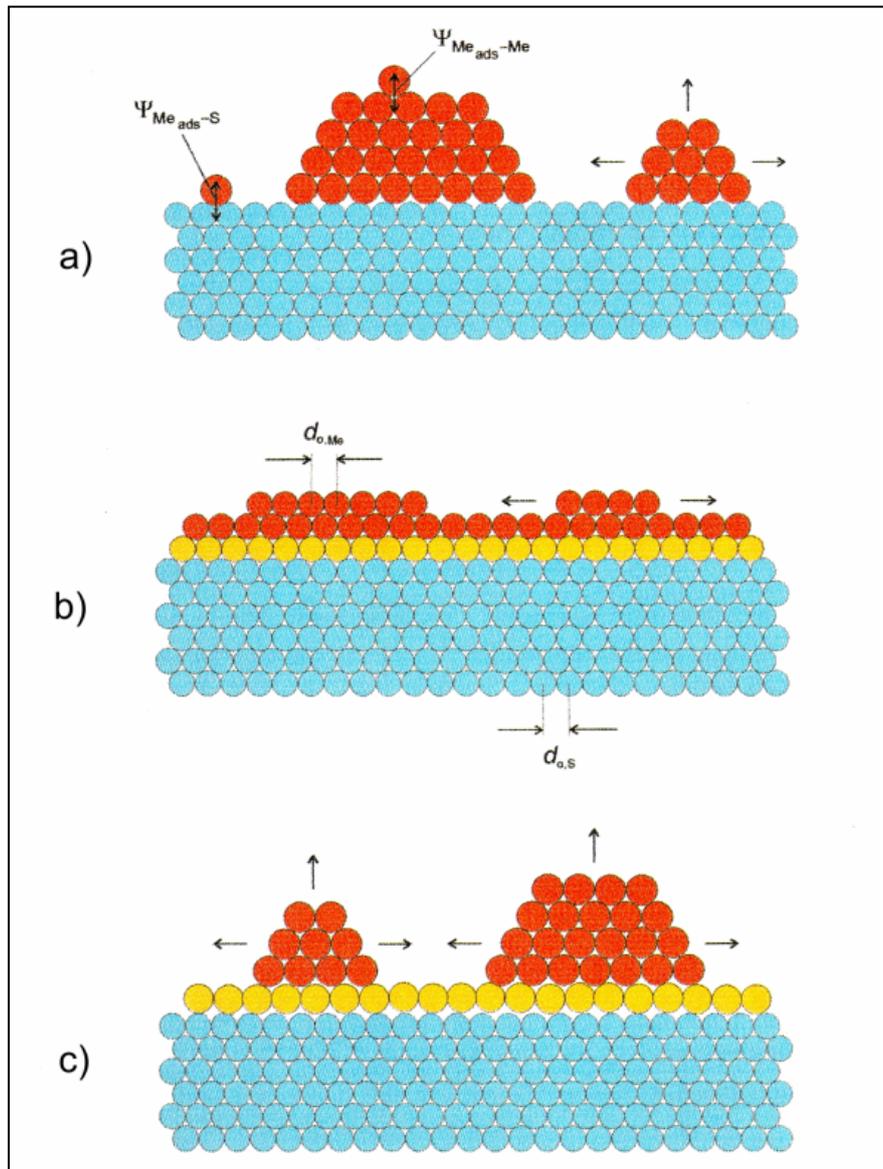
### 2.5.2 Wachstumsmodelle

Die zwei wichtigsten Parameter, die für die elektrochemische Abscheidung auf einem fremden Substrat entscheidend sind, sind die Unter- (underpotential deposition, UPD) und Oberpotentialabscheidung (overpotential deposition, OPD). Die OPD findet bei einem Potential negativ vom Nernst-Potential statt, die UPD oberhalb des Nernst-Potentials. Die Erklärung der vorzeitigen Abscheidung bei der UPD lässt sich damit begründen, dass das chemische Potential der Monolage infolge von Wechselwirkungen mit dem Substrat deutlich kleiner ist als das chemische Potential des bulk-Metalls [20].

Die wichtigsten Parameter bei der OPD und UPD von Metallen auf fremden Substraten sind die  $Me_{ads}$  - Substrat (S)-Bindungsenergie und die kristallographischen Fehler zwischen Substrat und Metall. Entsprechend der Abscheidung in Gleichgewichtsnähe, d.h. bei geringer Übersättigung, vernachlässigbarer Kinetik und Vermeidung einer Legierungsbildung, kann zwischen drei verschiedenen Wachstumsmoden unterschieden werden [111]:

1. *Volmer-Weber* Wachstum: Die Bindungsenergie der adsorbierten Metallatome auf fremdem Substrat ist kleiner als die der adsorbierten Metallatome auf nativem Substrat. Folglich ist die Oberflächenkonzentration von  $Me_{ads}$  beim Nernst-Potential  $E_{Me/Me^{z+}}$  klein, so dass es bei der OPD zu einem 3D-Inselwachstum kommt (Abbildung 2-31 (a)).
2. *Frank-van der Merwe* Wachstum: Die Bindungsenergien der adsorbierten Metallatome auf fremdem Substrat sind größer als auf nativem Substrat. Folglich kommt es zu einem 2D-Schichtwachstum, bei dem die nächste Schicht erst zu wachsen beginnt, wenn die vorherige bereits abgeschlossen ist (layer-by-layer, Abbildung 2-31 (b)).
3. *Stranski-Krastanov* Wachstum: In diesem Fall finden sowohl Schicht- als auch Inselwachstum statt. Zunächst wird eine 2D-Schicht abgeschieden, die eine andere Struktur aufweist als die Bulkphase und somit zu internen Verzerrungen führt. Dabei entstehende Fehler zwischen den Gitterabständen

von Substrat und abgeschiedenem Metall führen zu einem Inselwachstum, der bei dieser Art von Wachstum energetisch bevorzugt wird (Abbildung 2-31 (c)).



**Abbildung 2-31:** Schematische Darstellung der verschiedenen Wachstumsmodelle bei der Metallabscheidung auf fremdem Substrat (S) in Abhängigkeit von der Bindungsenergie von  $\text{Me}_{\text{ads}}$  auf S im Vergleich zu nativem Substrat. Volmer-Weber- (a), Frank-van der Merwe- (b) und Stranski-Krastanov Wachstum (c) mit den interatomaren Abständen  $d_{0,\text{Me}}$  und  $d_{0,\text{S}}$ .

## 2.6 Kristallitgrößenbestimmung mittels Röntgendiffraktometrie (XRD)

Zur Bestimmung der Teilchengröße und der Struktur einer Substanz wird in der Kristallographie das Verfahren der Röntgenbeugung (X-Ray Diffraction, XRD) angewandt. Die Kristallitgröße wird durch Auswertung der Halbwertsbreite bestimmt. Diese Methode stellt eine einfache und billige Charakterisierungsmethode dar, für die es eines geringen Aufwands bedarf. Im Gegensatz zu anderen Verfahren wird nicht nur eine Untersuchung der Oberfläche, sondern auch tieferer Schichten ( $\sim 80 \mu\text{m}$ ) ermöglicht sowie einer größeren Anzahl an Objekten.

Röntgenstrahlen werden ebenso wie sichtbares Licht an den Netzebenen gebeugt, d.h. der Einfallswinkel ist gleich dem Ausfallswinkel. Die Absorption der Röntgenstrahlung ist dabei, im Gegensatz zu sichtbarem Licht, sehr gering [112].

Trifft die Röntgenstrahlung auf ein Atom, so werden die Elektronen in der Hülle der Atome zu Oszillationen angeregt, die Röntgenstrahlen werden inkohärent emittiert und somit gestreut (*Rayleigh-Streuung*).

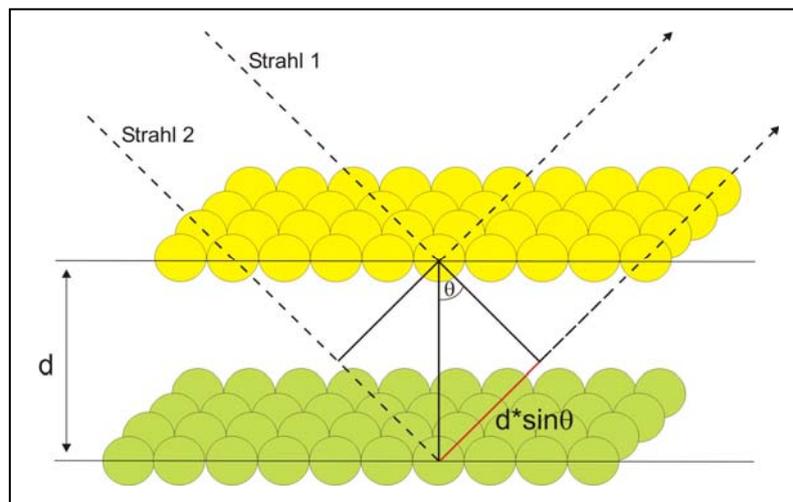


Abbildung 2-32: Schematische Darstellung der Netzebenen (Bragg)

Treffen Röntgenstrahlen einer bestimmten Wellenlänge auf eine Netzebenen­schar, so kann es zu konstruktiver Interferenz kommen, wenn die beiden Strahlen 1 und 2 in Phase schwingen und der Gangunterschied der zwei parallelen Strahlen 1 und 2 einem ganzzahligen Vielfachen der Wellenlänge  $\lambda$  entspricht (Abbildung 2-32).

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d \cdot \sin \Theta \quad (2-27)$$

Gleichung 2.26 beschreibt die so genannte *Bragg'sche Gleichung* (1913) [113], wobei  $d$  der Netzebenenabstand,  $\Theta$  der Winkel unter dem die Strahlung auf die Netzebene trifft und  $\lambda$  die Wellenlänge des monochromatischen Röntgenstrahls sind. Die Wellenlänge der in dieser Arbeit verwendeten  $\text{CuK}_\alpha$ -Strahlung beträgt 1,540 Å. Die gebeugte Strahlung wird mittels eines Detektors registriert, wobei der Ablenkungswinkel  $2\Theta$  als Messgröße verwendet wird.

### 2.6.1 Scherrer-Verfahren

Scherrer entdeckte 1918, dass Kristallite mit einem Durchmesser kleiner 100 nm eine Verbreiterung der Röntgenbeugungsreflexe bedingen [114] und begründete ein Verfahren zur Kristallitgrößenbestimmung.

Dieses Verfahren basiert auf einer monodispersen Kristallitgrößenverteilung, deren Formel einen Zusammenhang zwischen voller Peakbreite bei halber Maximalintensität (FWHM) und mittlerer Säulenlänge  $L_{\text{vol}}$  beschreibt, aus der sich die volumengemittelte Kristallitgröße  $D_{\text{vol}}$  bestimmen lässt ( $L_{\text{vol}} = \frac{3}{4} D_{\text{vol}}$ ) [106, 115]. Ausgehend von der Bragg-Gleichung wird unter Berücksichtigung, dass bei Abweichung eines gebeugten Strahls um kleine Winkel eine Phasenverschiebung eintritt, die zu einer Phasendifferenz zwischen erster und letzter Netzebene führt und Addition der Streuamplituden zur Ermittlung der Intensität [106, 115] die *Scherrer-Formel* erhalten

$$FWHM = \frac{K_{\text{Scherrer}} \cdot \lambda}{L_{\text{vol}} \cdot \cos \Theta} \quad (2-28)$$

mit  $\lambda = 0,154$  nm bei  $\text{CuK}_\alpha$ -Strahlung,  $\Theta$  dem Bragg-Winkel bzw.  $2\Theta$  dem Streuwinkel und der dimensionslosen Scherrer-Konstante  $K_{\text{Scherrer}}$ , die für kubische Gitter 0,94 beträgt und je nach Kristallitgestalt zwischen 0,89 und 1,39 variieren kann [116].

Durch Auftragung der Maximumsintensität (FWHM) gegen  $1/\cos\Theta$  lässt sich  $L_{\text{vol}}$  auch anhand der Steigung ermitteln.

Die Formel beschreibt somit die Peakverbreiterung der Bragg-Reflexe mit fallender Kristallitgröße.

Mit Hilfe der Scherrer-Formel kann die mittlere Kristallitgröße ermittelt werden, jedoch sind auch Mikroverspannungen oder Versetzungen und Stapelfehler möglich, die zu einer Peakverbreiterung führen können und von der Scherrer-Formel nicht berücksichtigt werden. Warren und Averbach [117, 118] berücksichtigen diese Verbreiterung der Beugungsreflexe, indem jede Domäne in Säulen unterschiedlicher Länge eingeteilt wird und senkrecht zur gebeugten Ebene ausgerichtet ist. Dadurch werden Einheitszellen mit einer Kantenlänge  $a_3$  erhalten, wobei sich die Intensität eines Reflexes aus den Einzelbeiträgen aller Säulen zusammensetzt. Die Gesamtintensität ergibt sich als eine Verteilung unterschiedlicher Säulenlängen [106, 119]. Das Verfahren nach Warren und Averbach bestimmt neben der volumengemittelten Säulenlänge auch die flächengemittelte, die jedoch nicht mit der Kristallitgröße übereinstimmt. Der Röntgenstrahl wird von allen Zellen gebeugt, jedoch stimmt nur die mittlere Säule mit der Kristallitgröße überein [106]. Daher muss eine Konvertierung von Säulenlänge in Kristallitgröße gemäß [119] erfolgen.

Zur Bestimmung der Halbwertsbreite müssen bei der gemessenen Linienbreite zusätzlich die instrumentellen Parameter berücksichtigt werden. Die Reflexe werden z.B. mit Hilfe einer Lorentz-Funktion angefüttet, wobei zusätzliche Phänomene wie Mikroverspannungen ebenfalls bei den Berechnungen berücksichtigt werden. Die Kristallitgrößenbestimmung erfolgte in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe einer Auswertesoftware [120].

## 2.7 Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Das Elektronenmikroskop dient zur vergrößerten Abbildung von Objekten mittels beschleunigter Elektronen. Das erste Elektronenmikroskop wurde bereits 1933 von E. Ruska vorgestellt [29].

Es wird zwischen Transmissions- (TEM) und Rasterelektronenmikroskopie (REM) unterschieden. Bei beiden Mikroskopiearten werden beschleunigte Elektronen zur Bilderzeugung verwendet.

Beim REM handelt es sich bei der Strahlungsquelle um eine aus einem Wolframdraht bestehende Kathode, die elektrisch aufgeheizt wird und somit Elektronen emittiert. Diese werden in einem elektromagnetischen Feld zur Anode hin beschleunigt (Anodenspannung  $\sim 30$  keV), wobei elektromagnetische Linsen den Elektronenstrahl verkleinern und mit Hilfe eines Ablenkspulensystems über die Oberfläche lenken. Beim Auftreffen der Elektronen auf die zu untersuchende Probe werden Sekundärelektronen frei, die über ein Szintillator-Photomultipliersystem zunächst in ein optisches und anschließend in ein elektrisches Signal umgewandelt und letztendlich verstärkt auf einer Bildröhre abgebildet werden (Abbildung 2-33). Der Ertrag an Sekundärelektronen ist dabei von der Flächenneigung abhängig. Je größer die Neigung, desto heller das Bild, da mehr Sekundärelektronen entstehen [121].

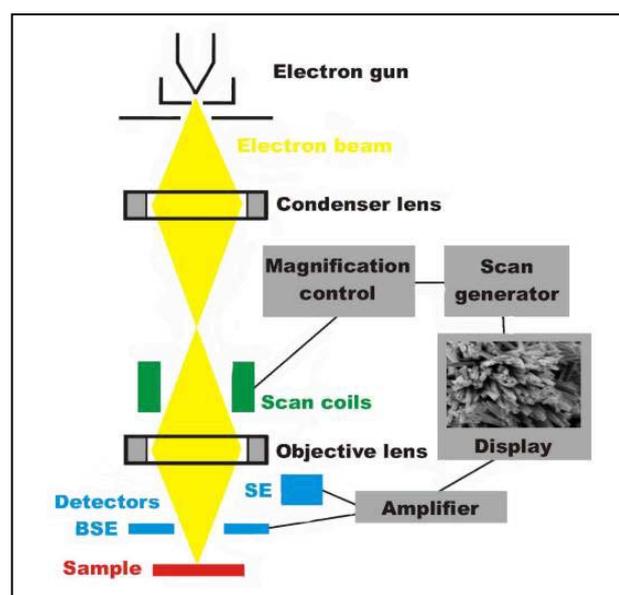


Abbildung 2-33: Aufbau des Rasterelektronenmikroskops (REM) [122]

### **2.8 Rastertunnelmikroskopie (STM)**

Mit Hilfe der Rastertunnelmikroskopie (eng. *Scanning tunnelling microscopy*, STM) ist es sowohl möglich die Topographie von Probenoberflächen abzubilden als auch einzelne Atome und Moleküle darzustellen.

Das erste Rastertunnelmikroskop wurde 1981 von G. Binnig und H. Rohrer entwickelt. Dabei wird eine feine spitz zulaufende Nadel mit Hilfe von piezoelektrischen Kristallen in x-, y- und z-Richtung über eine Probenoberfläche gerastert. Die feine Spitze wird durch elektrochemisches Ätzen hergestellt, wodurch sich am Ende der Nadel nur wenige Atome befinden, die eine hohe laterale Auflösung ermöglichen. Zur Vermeidung elektrochemisch ablaufender Prozesse an der Spitzenoberfläche wird diese mit einem isolierenden Material bedeckt. Die Nadel besteht dabei meist aus einem Pt-Ir- oder W-Draht. Der Abstand zwischen Spitze und Probe beträgt weniger als 1 nm, wobei es jedoch zu keinerlei elektrischem Kontakt kommt. Zwischen Nadel und Probe wird eine elektrische Spannung (Bias) angelegt, wobei der dabei resultierende Strom als Tunnelstrom bezeichnet und zur Bilderzeugung genutzt wird. Die Amplitude des Tunnelstroms stellt dabei ein Maß für den Abstand zwischen Nadel und Probenoberfläche dar und nimmt mit zunehmender Distanz exponentiell ab [29]. Durch Abtasten der Oberfläche lässt sich somit die Topographie bestimmen.

In der Praxis werden zwei verschiedene Methoden angewandt:

#### *1. constant height method (CHM)*

Die absolute Höhe der Nadel wird konstant gehalten und der Strom variiert. Der Strom ändert sich mit der Oberflächenstruktur und wird zur Bilderzeugung verwendet. Bei dieser Methode werden nur die x- und y-Richtungen des Piezoelementes zum Abrastern genutzt (Abbildung 2-34). Ein Nachteil dieser Messmethode ist die unterschiedliche Beschaffenheit der Oberfläche. Dadurch ist es z.B. nicht möglich bei extremen Vertiefungen einen Tunnelstrom zu erhalten bzw. kann die Spitze bei Auswölbungen die Oberfläche berühren und somit zerstört werden. Daher wird diese Methode nur zum Abtasten flacher Oberflächen genutzt.

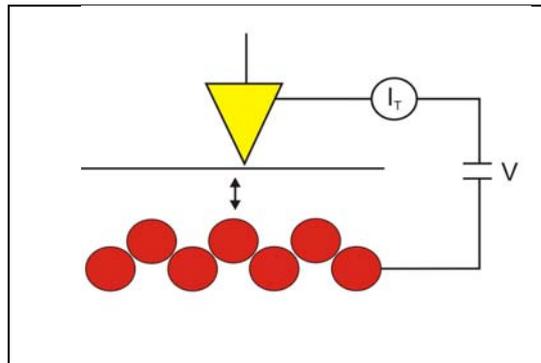


Abbildung 2-34: constant height method

### 2. constant current method (CCM) oder constant gap width mode (CGM)

Der Strom ist konstant und die Nadel folgt der Oberflächenstruktur der Probe (Abbildung 2-35). In diesem Fall wird die z-Richtung des Piezokristalls zur Regulierung der Distanz zwischen Spitze und Probe genutzt, so dass der Strom durchgehend konstant bleibt und somit die Piezospaltung als Bilderzeugungssignal genutzt wird. Die Methode zeigt eine hohe Auflösung und macht die atomare Struktur sichtbar.

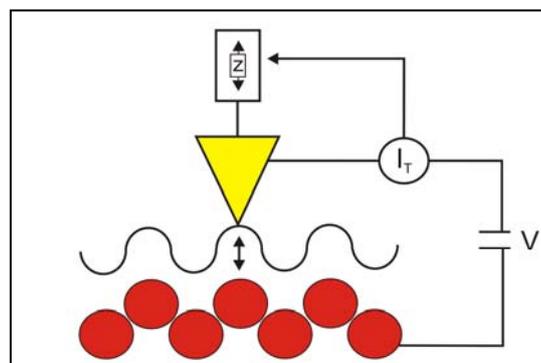


Abbildung 2-35: constant current method

Sowohl Spitze als auch Probe müssen für STM-Messungen leitend sein, ansonsten muss eine leitende Schicht z.B. Gold aufgedampft werden. Werden die beiden leitenden Metalle (Probe und Spitze) einander angenähert, so wird ab einem Punkt ( $< 1$  nm) die endlich hohe Potentialbarriere überwunden und die Elektronen mit annähernder Fermi-Energie tunneln von einem besetzten Leitungsbandniveau des einen Metalls in ein unbesetztes Niveau gleicher Energie des anderen Metalls. Dazu wird eine Spannung angelegt, die die Energieniveaus so verschiebt, dass sich besetzte und unbesetzte Niveaus gegenüberstehen [123].

Des Weiteren kann die STM-Spitze auch zur Verschiebung einzelner Atome genutzt werden [124-127].

Zusätzliche Probleme, die die empfindliche Messmethode mit sich bringt, müssen dabei bereits beim Aufbau ausgeschlossen werden. Dazu zählen z.B. Vibrationen, Schwingungen oder Temperaturschwankungen.

## 3. Instrumenteller Teil

### 3.1 *Cyclische Voltammetrie*

#### 3.1.1 CV-50 W

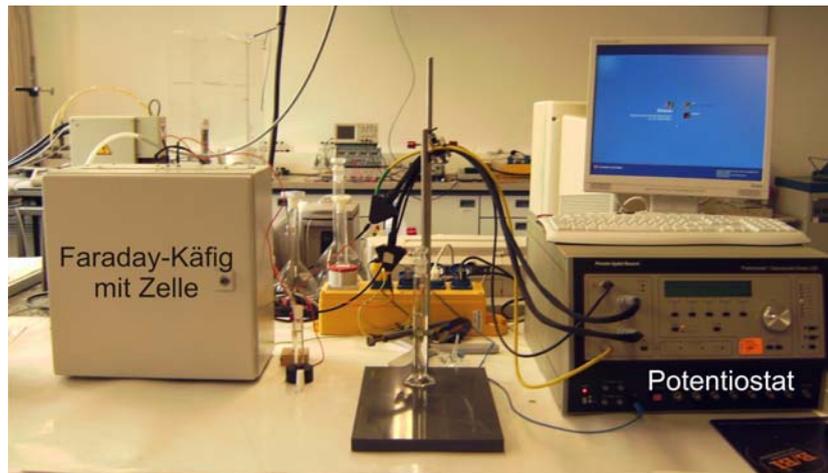
Die in den folgenden Kapiteln 4, 5 und 6 durchgeführten elektrochemischen Enzymmessungen wurden an dem Potentiostat CV-50W der Firma Bioanalytical Systems (BAS, USA) mit dem Cell Stand 3 von BAS bzw. mit einer konstruierten Teflonzelle (siehe Kapitel 3.2) mit mechanischem Rührer durchgeführt.



Abbildung 3-1: CV-50W

#### 3.1.2 PAR

Sowohl die elektrochemischen Platinabscheidungen (Kapitel 6.2.1) als auch die Herstellung und Untersuchung der in Kapitel 7 beschriebenen Platin-Inseln wurden am Galvanostat / Potentiostat Model 283 der Firma Princeton Applied Research (PAR) durchgeführt.



**Abbildung 3-2:** Model 283 der Fa. PAR mit Faraday-Käfig

Die elektrochemischen Impedanzmessungen wurden am Model 6310 der Firma PAR durchgeführt.

### **3.2 Elektrochemische Zellen**

Zur Herstellung der in Kapitel 6 verwendeten nanokristallinen Platinelektroden wurden Teflonzellen mit einem Volumen von ca. 750  $\mu\text{l}$  angefertigt. Die Skizzen sind in Kapitel 9.5 dargestellt. Als Arbeitselektrode dient ein Glaskohlenstoffblättchen mit einem Abscheidungsdurchmesser von 1  $\text{cm}^2$ , wobei eine Stahl- oder Goldschraube als Kontakt dient und die Zelle mit Hilfe von Dichtungsringen verschlossen wird.

Bei der Platinabscheidung wurden als Gegenelektrode ein Glaskohlenstoffstift und als Bezugslektrode  $\text{Hg}/\text{HgSO}_4$  verwendet.

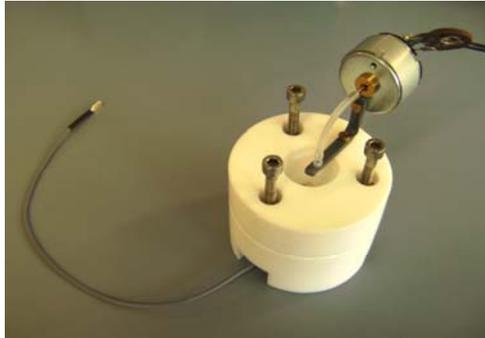


**Abbildung 3-3:** kleine Teflonzelle

### 3. Instrumenteller Teil

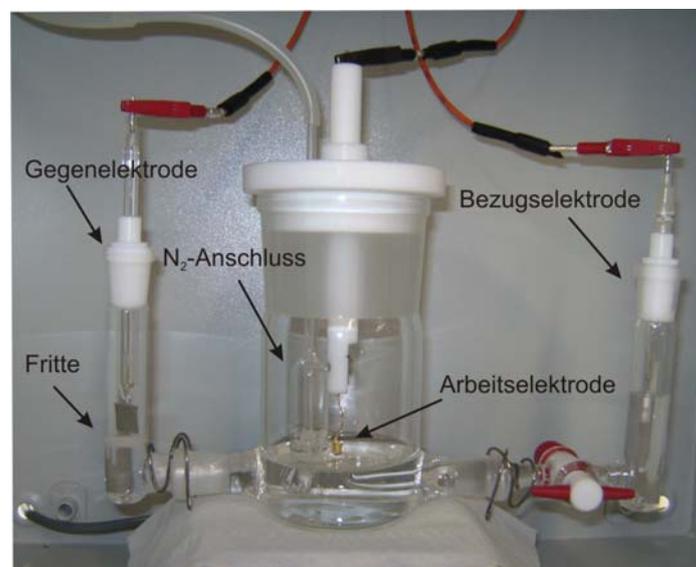
---

Für die elektroenzymatischen Messungen wurde eine Teflonzelle mit einem Volumen von ca. 8 ml angefertigt. Zusätzlich wurde ein mechanischer Rührer eingebaut. In diesem Fall wurden ein Platindraht als Gegen- und eine Ag/AgCl als Bezugs- und eine Ag/AgCl als Arbeitselektrode verwendet.



**Abbildung 3-4:** große Teflonzelle mit mechanischem Rührer

Sowohl für die Herstellung und Untersuchung der in Kapitel 7 beschriebenen Pt-Inseln als auch für die elektroenzymatischen Untersuchungen wurde folgende Glaszelle benutzt (Skizze siehe Kapitel 9.5):



**Abbildung 3-5:** Glaszelle mit Haber-Luggin-Kapillare

Als Gegenelektrode diente ein Platinblech, das durch eine Fritte von der restlichen Zelle abgetrennt wurde. Als Bezugselektrode wurde eine Kalomel-Elektrode ( $\text{Hg}_2\text{Cl}_2$ , SCE) verwendet, die über eine Haber-Luggin-Kapillare an die Arbeitselektrode

herangeführt wird. Zusätzlich wurde die Zelle während der Messungen mit Stickstoff gespült.

### **3.3 REM / STM**

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten REM-Aufnahmen wurden von Frau S. Kuhn mit dem JSM 7000 F durchgeführt. Eine Vorbehandlung der Proben ist nicht nötig.

Die in Kapitel 7 durchgeführten STM-Messungen wurden von Frau Dr. M. Manolova im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. D. Kolb, Universität Ulm, am TMX 2010 Discoverer der Fa. TopoMetrix durchgeführt. Die STM-Messungen wurden mit Hilfe einer Platin-Iridium-Spitze durchgeführt im CCM-Modus. Zur Vermeidung von Faraday'schen Strömen wurde die Spitze mit einem elektrophoretischen Tauchlack der Fa. BASF (ZQ 84 3225) überzogen.

### **3.4 XRD**

Die Charakterisierung der in Kapitel 4.4 hergestellten nanokristallinen Gold- und in Kapitel 6.2.1 hergestellten nanokristallinen Platinelektroden wurde mit einem Siemens D500- bzw. D5000-Diffraktometer in  $\Theta/2\Theta$ -Geometrie durchgeführt. Die Beschleunigungsspannung der Cu-Anode beträgt 35 kV, der Anodenstrom 26 mA und die Wellenlänge  $\lambda = 0,154$  nm.

Die Kristallitgrößenbestimmung erfolgte am D500 bei einer Schrittweite von  $0,015^\circ$ , einer Stufendauer von 30s und wurde in einem Intervall von  $35^\circ$  bis  $50^\circ$  ( $2\Theta$ ) aufgenommen. Dabei wurde das auf Glaskohlenstoff abgeschiedene nanokristalline Platin auf einem PVC-Probenhalter befestigt.

Die Aufnahme der Wachstumskinetik erfolgte am D5000 bei einer Schrittweite von  $0,04^\circ$ , einer Stufendauer von 1s und wurde in einem Intervall von  $30^\circ$  bis  $90^\circ$  ( $2\Theta$ ) gemessen. Dabei wurde das auf Glaskohlenstoff abgeschiedene nanokristalline

Platin in einer Probenhalterung aus Bornitrid (BN) aufgelegt und in die Probenkammer eingeschraubt. Als Schutzgas diente Wasserstoff, welches vor Beginn der Messung die Probenkammer für ca. 30 Minuten spülte, und anschließend wurde alle 5 Minuten ein Diffraktogramm aufgenommen.

### 3.5 Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)

Die in Kapitel 6 durchgeführten Oberflächenplasmonenresonanz-Messungen wurden zusammen mit Herrn Dr. A. Zöllner im Arbeitskreis von Frau Prof. Dr. R. Bernhardt am Biacore 3000 durchgeführt.

Die SPR dient zur quantitativen Bestimmung von Schichtdicken. Dabei wird monochromatisches Licht aus einer Lichtquelle emittiert und trifft über ein Prisma auf die Grenzfläche Metall/Analyt, wodurch Oberflächenplasmonen angeregt werden. Das Prisma befindet sich dabei auf der dem Analyten abgewandten Seite, wodurch das Licht unter einem Winkel  $\theta$  total reflektiert wird.

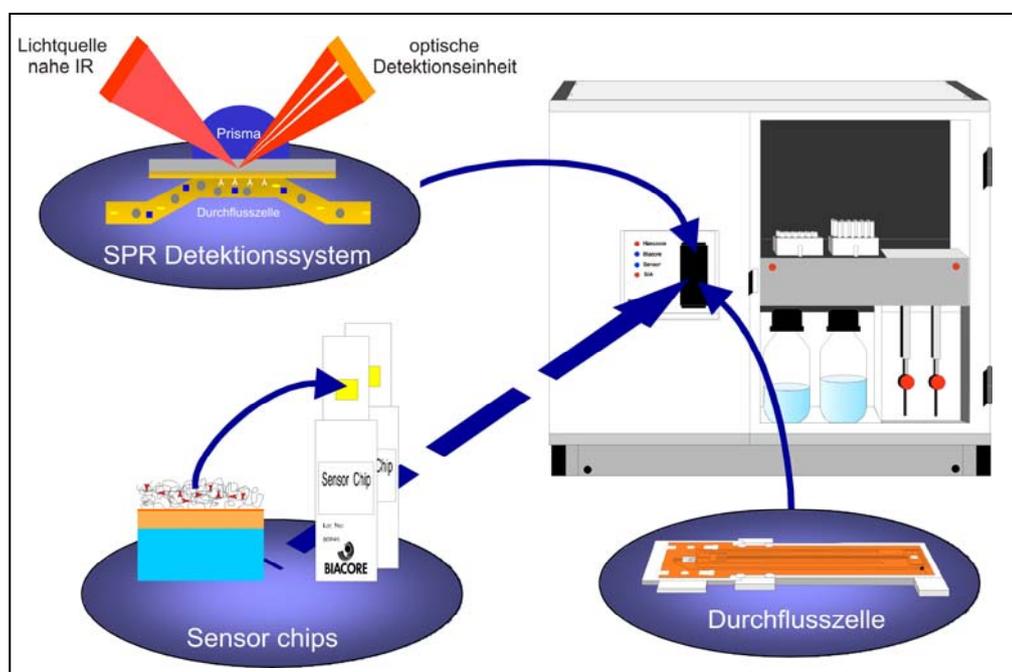


Abbildung 3-6: Biacore SPR mit Sensor-Chips und Detektionssystem [128]

### 3. Instrumenteller Teil

---

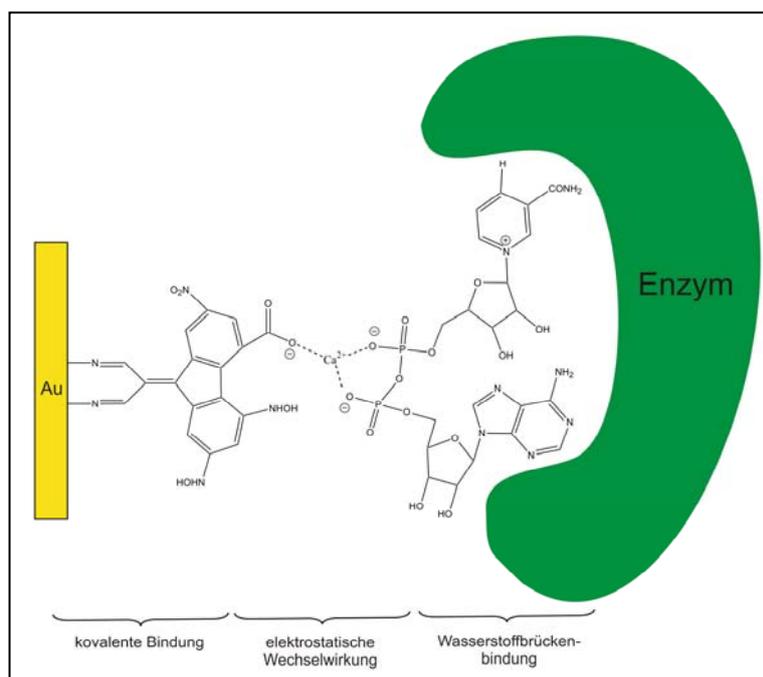
Die Immobilisierung von Proteinen erfolgte an funktionalisierten organischen Oberflächen, die von der Fa. Biacore direkt bezogen wurden. Dabei handelt es sich u.a. um Dextran-modifizierte Goldoberflächen, die funktionelle Gruppen wie z.B. COOH besitzen, an die Proteine via Aminogruppen angekoppelt werden können.

Die Proteine werden somit auf die Oberfläche dieser Miniaturflusszellen immobilisiert, indem der Interaktionspartner über die Probenoberfläche gespült wird. Die Wechselwirkung mit der funktionalisierten Oberfläche wird über die daraus resultierende Änderung des Brechungsindex detektiert.

Zudem wurden die in Kapitel 5 durchgeführten SPR-Messungen am Bio-Suplar II SPR Spektrometer der Firma Analytical  $\mu$ -Systems, Mivitec GmbH von Frau Katrin Ohliger im Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. G. Wenz durchgeführt.

## 4. Modifizierung von poly- und nanokristallinen Goldelektroden mit SDH / GatDH

Im folgenden Kapitel wurden sowohl poly- als auch nanokristalline Goldelektroden mit dem in Abbildung 4-1 dargestellten System modifiziert. Ziel dieser Immobilisierung ist die Herstellung eines geeigneten Biosensors für die stereoselektive Produktion enantiomerenreiner Substanzen.



**Abbildung 4-1:** Schematische Darstellung der Enzymimmobilisierung mit (4-Carboxy-2,5,7-Trinitrofluorenylid)malonnitril,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{NAD}^+$  und dem Enzym SDH bzw. GatDH.

Hierzu wurde ein Trinitrofluorenon-Derivat als Redoxmediator zur elektrokatalytischen Oxidation von NADH verwendet. Der Redoxmediator ist kovalent an die Goldoberfläche gebunden, während der Cofaktor über elektrostatische Wechselwirkungen und das jeweilige Enzym SDH bzw. GatDH über Wasserstoffbrückenbindungen gebunden werden. Aufgrund dieser teils schwachen Wechselwirkungen ist eine Desorption des immobilisierten Cofaktors bzw. des Enzyms möglich, so dass diese zusätzlich auf die Oberfläche fixiert werden müssen. Dies wurde in Kapitel 4.3.2 sowohl durch Quervernetzung mit Glutardialdehyd als auch durch Einschluss in eine Nafionmembran erzielt.

#### 4. Modifizierung von poly- und nanokristallinen Goldelektroden mit SDH/GatDH

---

Des Weiteren wurde zur Erhöhung der aktiven Oberfläche nanokristallines Gold mittels Pulstechnik hergestellt und ebenfalls mit dem System aus Redoxmediator, Cofaktor und Enzym modifiziert. Hierzu wurde von einem Goldhydrochlorid ausgegangen, dass durch Zusatz eines Thiols zu einer Kristallitgröße von 20-30 nm führt. Wird dem Goldbad Arsen(III)-oxid als Kornverfeinerer zugegeben, so minimiert sich die Teilchengröße auf 6-10 nm. Die Ergebnisse dieser nanokristallinen Goldelektroden wurden mit denen einer polykristallinen Goldoberfläche verglichen.

### 4.1 Redoxmediator

Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Redoxmediator handelt es sich um ein Trinitrofluorenon-Derivat, das von Kuhn et al. [54, 129, 130] entwickelt und im Besonderen auf Glaskohlenstoffoberflächen untersucht wurde. Zur Immobilisierung des Redoxmediators 2,5,7-Trinitro-9-fluorenon-4-Carbonsäure auf Goldoberflächen wurde dieser von der Firma Toroma Organics mittels Malonnitril durch die so genannte Knoevenagel-Kondensation zu (4-Carboxy-2,5,7-Trinitrofluorenyliden)-malonnitril (CTFM) umgesetzt.

Das Molekül besitzt drei Nitrogruppen, die mittels cyclischer Voltammetrie einzeln aktiviert werden können. Dies ist aufgrund des durchkonjugierten  $\pi$ -Systems möglich, da die elektroaktiven Nitrogruppen auf diese Weise mit der Goldoberfläche leitend verbunden sind. Der Mediator wird dabei durch die Cyanogruppen auf die Goldoberfläche adsorbiert, so dass die freie Carboxylgruppe zur späteren Immobilisierung von NADH zur Verfügung steht. Das Molekül ist sehr effizient für die elektrokatalytische Oxidation von NADH, aufgrund der Aufnahme von zwei Protonen und zwei Elektronen unter gleichzeitiger Reduktion der aktivierten Nitrosogruppen am Mediator zu Hydroxylamin.

Damit der Mediator seine elektrokatalytische Aktivität entfalten kann, erfolgt zunächst die elektrochemische Aktivierung (4.1), bei der die entsprechenden Nitrogruppen zu Hydroxylamin reduziert werden. Im zweiten Cyclus steht dann das reversible Redoxpaar Hydroxylamin/Nitroso (4.2) zur Verfügung [54].

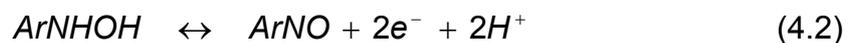
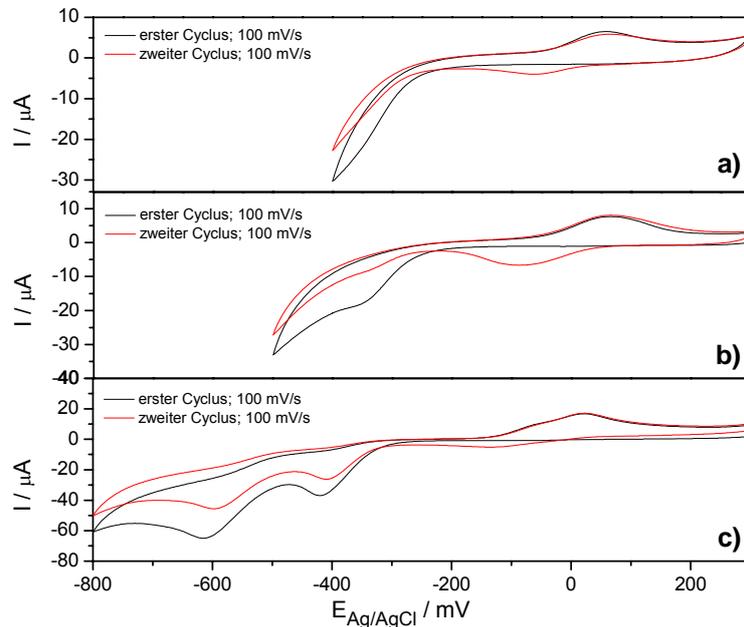


Abbildung 4-2 (a) zeigt im ersten Cyclus die irreversible Reduktion einer Nitrogruppe zu Hydroxylamin in einem Potentialfenster von +300 mV bis -400 mV vs. Ag/AgCl in 0,1 M Bis-Tris-Puffer (pH 8) mit einer Scanrate von  $v = 100$  mV/s. Durch Verschiebung des Umkehrpotentials zu -500 mV bzw. -800 mV erfolgt entsprechend die Aktivierung der zweiten (Abbildung 4-2 (b)) bzw. dritten Nitrogruppe zu Hydroxylamin (Abbildung 4-2 (c)). Die Aktivierung lässt sich dabei anhand der Anzahl an

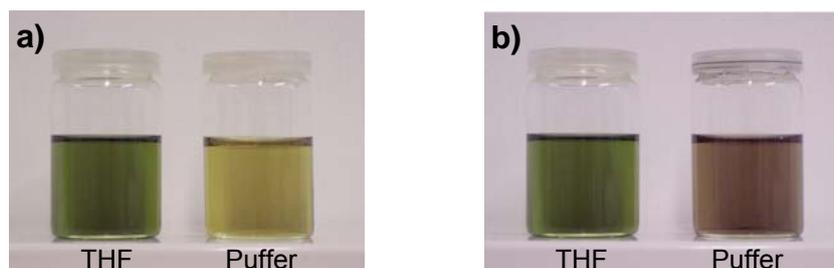
#### 4. Modifizierung von poly- und nanokristallinen Goldelektroden mit SDH/GatDH

Reduktionspeaks beobachten. Im zweiten Cyclus wird das reversible Redoxpaar mit einem Oxidationspeak von 60 mV und einem Reduktionspeak von -85 mV erhalten.



**Abbildung 4-2:** Aktivierung von einer (a), zwei (b) bzw. drei Nitrogruppen (c) zum reversiblen Redoxpaar in 0,1 M Bis-Tris-Puffer (pH 8) bei 100 mV/s (schwarz: erster Cyclus; rot: zweiter Cyclus).

Zur Modifizierung wurden die Goldelektroden, nach Reinigung durch cyclische Voltammetrie in 0,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ , über Nacht in eine 3 mM Lösung aus CTFM in 0,1 M Bis-Tris-Puffer (pH 8) getaucht, anschließend mit Puffer gespült, um den ungebundenen Mediator zu entfernen und mittels cyclischer Voltammetrie aktiviert. Es stellte sich heraus, dass der Redoxmediator in Pufferlösung schnell an Aktivität verliert. Ebenso ist die Reversibilität des Redoxpaares  $\text{NHOH}/\text{NO}$  in Puffer mit einer Potentialdifferenz von ca.  $140/n$  mV nicht zufrieden stellend. Daher wurden die Goldelektroden im Folgenden in Tetrahydrofuran (THF) immobilisiert.

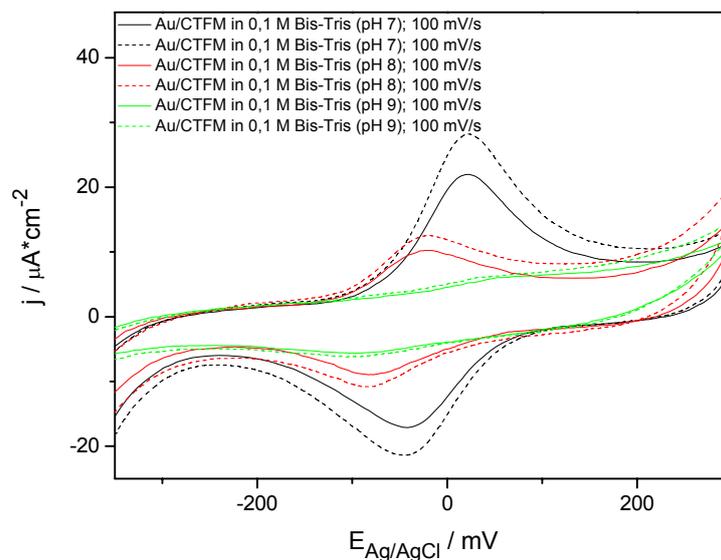


**Abbildung 4-3:** Vergleich von CTFM in THF und in Puffer direkt (a) und nach einem Tag (b)

#### 4. Modifizierung von poly- und nanokristallinen Goldelektroden mit SDH/GatDH

In Abbildung 4-3 ist zu erkennen, dass der Mediator in THF über mehrere Stunden bis hin zu Tagen stabil ist, während durch die Aufbewahrung in Puffer bereits nach drei Stunden eine Farbänderung auftritt. Der Versuch Goldelektroden - trotz Braunfärbung - mit CTFM zu modifizieren schlug fehl. Im Gegensatz dazu konnte die Lösung von CTFM in THF auch mehrmals zum Aufbringen des Mediators verwendet werden, so dass von einer Änderung des Redoxverhaltens aufgrund des pH-Wertes ausgegangen werden kann.

Dies lässt sich anhand einer pH-abhängigen Modifizierung von CTFM belegen. Dazu wurden Mediatorlösungen in 0,1 M Bis-Tris-Puffer bei pH 7, pH 8 und pH 9 angesetzt und die Elektroden über Nacht in die einzelnen Pufferlösungen getaucht. Anschließend wurden die modifizierten Elektroden gespült und in dem jeweiligen Puffer gemessen.



**Abbildung 4-4:** pH-abhängige Aktivierung der CTFM-modifizierten Goldelektroden in 0,1 M Bis-Tris-Puffer bei pH 7 (schwarz), pH 8 (rot) und pH 9 (grün) bei 100 mV/s.

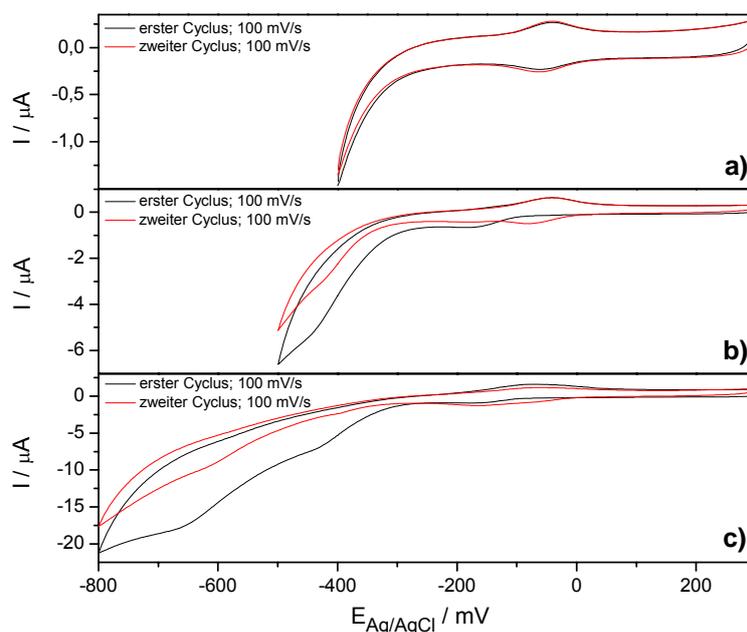
Anhand der CV-Kurven in Abbildung 4-4 wird die pH-Abhängigkeit des Redoxmediators im wässrigen Medium deutlich. Während bei pH 7 noch ein deutlich ausgeprägtes Redoxpaar vorhanden ist, lässt sich bei pH 8 bereits ein wesentlich kleinerer Oxidations- und Reduktionsstrom beobachten. Bei pH 9 ist das Redoxpaar nur noch ansatzweise zu erkennen. Dies lässt vermuten, dass es im Basischen zu einer Deprotonierung der Hydroxylaminygruppen kommt und die Substituenten somit nicht mehr zum Nitroso oxidiert werden können.

#### 4. Modifizierung von poly- und nanokristallinen Goldelektroden mit SDH/GatDH

Aufgrund der Deprotonierung könnte es auch zur Bildung intermediärer Zwischenstufen kommen, bei denen Radikale erzeugt werden, die miteinander reagieren und somit die Aktivität von CTFM zerstören.

Des Weiteren ist eine leichte Potentialverschiebung bei der Messung in pH 7 und pH 8 von ca. 50 mV in den kathodischen Bereich beobachtbar, was auf eine Umkehr des -M-Effekts der Carboxylgruppe zu einem +I-Effekt hindeutet. Während die COOH-Gruppe bei pH 7 noch vollkommen protoniert vorliegt und somit elektronenziehenden Charakter besitzt, findet bei pH 8 eine Deprotonierung statt, wodurch die Carboxylgruppe elektronendrückend wird und dadurch das Redoxverhalten des gesamten Systems zusätzlich beeinflussen kann.

Die Aktivierung der einzelnen Nitrogruppen der in THF modifizierten CTFM-Goldelektroden durch cyclische Voltammetrie zeigte hierbei eine bessere Reversibilität des Redoxpaares NHOH/NO, mit einer Potentialdifferenz von 30 bis 60/n mV (Abbildung 4-5).



**Abbildung 4-5:** Aktivierung von einer (a), zwei (b) bzw. drei Nitrogruppen (c) zum reversiblen Redoxpaar in THF bei 100 mV/s (schwarz: erster Cyclus; rot: zweiter Cyclus).

Für die in den folgenden Kapiteln durchgeführten elektroenzymatischen Messungen wurden jeweils zwei der drei Nitrogruppen aktiviert.

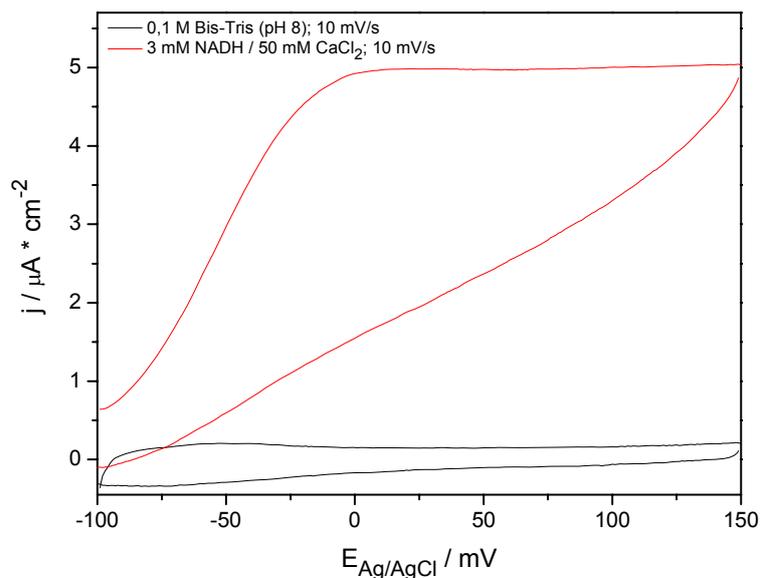
## 4.2 Cofaktor

Die direkte elektrochemische Oxidation von NADH erfolgt erst bei hohen anodischen Potentialen (ca. 0,8 - 1 V vs. Ag/AgCl) [45, 54, 131-133], so dass zur Erhöhung der Elektronentransferrate und somit zur Reduzierung der großen Überspannung, ein Elektronen-Transfer-Mediator wie CTFM nötig ist.

Die Regenerierung des Cofaktors an der mit dem Mediator modifizierten Elektrode erfolgt gemäß



Der in Abschnitt 4.1 immobilisierte und aktivierte Redoxmediator wurde für die elektrochemische Oxidation des Cofaktors NADH verwendet. Dazu wurden von den mit dem Mediator modifizierten Goldelektroden zunächst cyclische Voltammogramme in einer Lösung aus 3 mM NADH und 50 mM CaCl<sub>2</sub> in 0,1 M Bis-Tris-Puffer (pH 8) aufgenommen (Abbildung 4-6).



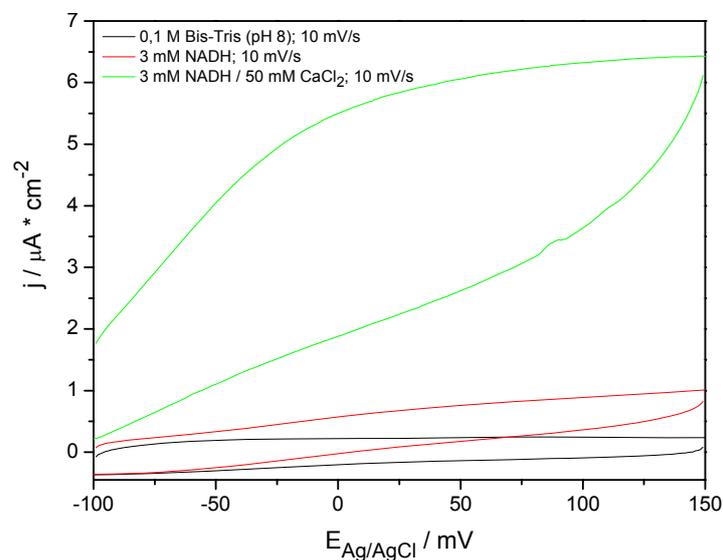
**Abbildung 4-6:** Cyclovoltammogramme einer CTFM-modifizierten Goldelektrode in 0,1 M Bis-Tris-Puffer, pH8 (schwarz) und in einer 3 mM NADH / 50 mM CaCl<sub>2</sub> -Lösung (rot) bei 10 mV/s.

#### 4. Modifizierung von poly- und nanokristallinen Goldelektroden mit SDH/GatDH

Dabei wurde die in der Literatur [44, 134, 135] verwendete Konzentration von 0,2 M  $\text{CaCl}_2$  auf 50 mM herabgesetzt, da sich die Aktivität der Enzyme bei einer höheren Calciumkonzentration drastisch verschlechtert. Bei der elektrochemischen Oxidation von NADH handelt es sich um einen langsamen, irreversiblen Prozess, so dass die Scangeschwindigkeit auf 10 mV/s festgelegt und als Bezugselektrode eine Ag/AgCl-Elektrode verwendet wurde.

Durch den Zusatz von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bilden die freien Carboxylgruppen am Mediator und die zwei Phosphatgruppen am Cofaktor einen chelatähnlichen Komplex, so dass CTFM und NADH durch elektrostatische Wechselwirkungen gebunden werden [44, 129].

Zum Vergleich wurden cyclovoltammetrische Messungen in einer Lösung aus 3 mM NADH mit und ohne Zusatz von 50 mM  $\text{CaCl}_2$  durchgeführt, womit die Bedeutung der zweiwertigen Ionen für die Komplexbildung anhand der erhöhten katalytischen Aktivität bei der NADH-Oxidation deutlich wird [129, 135]. In Abbildung 4-7 wird dieser Aktivitätsgewinn anhand des deutlich erhöhten Stromanstiegs ab -100 mV bestätigt.

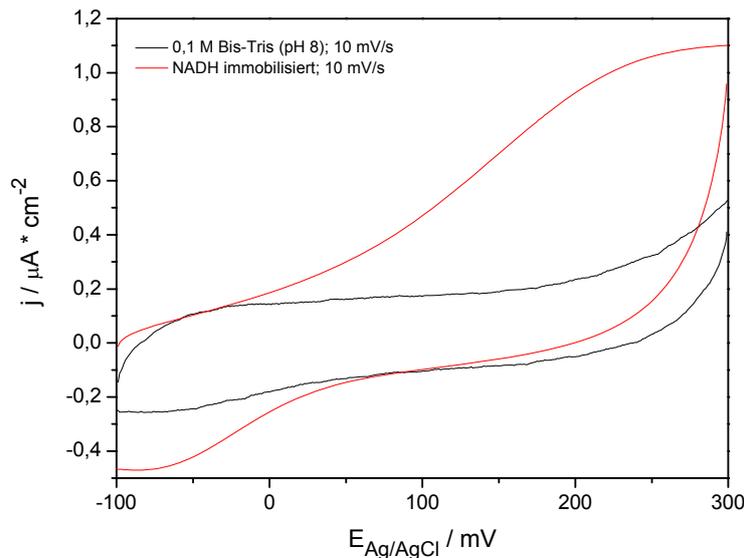


**Abbildung 4-7:** Vergleich einer CV-Messung mit CTFM-modifizierter Goldelektrode in 0,1 M Bis-Tris-Puffer, pH 8 (schwarz), in einer Lösung aus 3 mM NADH (rot) und in einer Lösung aus 3 mM NADH / 50 mM  $\text{CaCl}_2$  (grün) bei 10 mV/s.

Aufgrund der chelatähnlichen Komplexbildung durch die Calciumionen ist es möglich, den Cofaktor NADH auf den mit CTFM modifizierten Goldelektroden zu immobilisieren. Dazu wurden die mit CTFM modifizierten und aktivierten

#### 4. Modifizierung von poly- und nanokristallinen Goldelektroden mit SDH/GatDH

Goldelektroden in eine Lösung aus 3 mM NADH und 50 mM CaCl<sub>2</sub> in 0,1 M Bis-Tris-Puffer (pH 8) getaucht und für 2-3 h bei 4 °C in dieser Lösung aufbewahrt. Anschließend wurden die Elektroden mit Puffer gespült und das CV von -100 mV bis +300 mV aufgenommen. Wie im Falle der Messung einer CTFM modifizierten Goldelektrode in einer NADH-Lösung ist ein Stromanstieg ab -100 mV deutlich zu erkennen (Abbildung 4-8).



**Abbildung 4-8:** Cyclische Voltammogramme einer CTFM-modifizierten Goldelektrode in 0,1 M Bis-Tris-Puffer, pH 8 (schwarz) und nach Immobilisierung von NADH mittels CaCl<sub>2</sub> (rot) bei 10 mV/s.

Die Oxidationsstromdichte bei immobilisiertem NADH (ca. 1,1 μA) ist jedoch deutlich geringer als bei Messung in einer NADH-Lösung (ca. 6,5 μA). Dies liegt darin begründet, dass die Stoffmenge der auf der Oberfläche adsorbierten NADH-Moleküle deutlich geringer ist als in der angesetzten Konzentration der Lösung.

Bei der Oxidation von NADH handelt es sich um einen irreversiblen Prozess, d.h. es ist nur eine einmalige Oxidation von NADH zu NAD<sup>+</sup> möglich. Dann liegt nur noch die oxidierte Form des Cofaktors vor, welche einem CV-Cyclus ohne Oberflächenmodifizierung durch NADH entspricht.

Somit konnte gezeigt werden, dass die Immobilisierung des Cofaktors auf CTFM modifizierten und aktivierten Goldoberflächen möglich ist und es sich aufgrund der chelatähnlichen Komplexierung zwischen den Phosphatgruppen von NADH und der Carboxylgruppe am Mediator um eine relativ stabile Bindung handelt, an die im Folgenden die Enzyme SDH und GatDH aufgebracht werden können.

### 4.3 SDH / GatDH

Im Folgenden soll die katalytische Kette durch Immobilisierung der Enzyme SDH und GatDH vervollständigt werden. Die komplette schematische Darstellung der elektroenzymatischen Oxidation des Substrates ist in Abbildung 4-9 gezeigt.

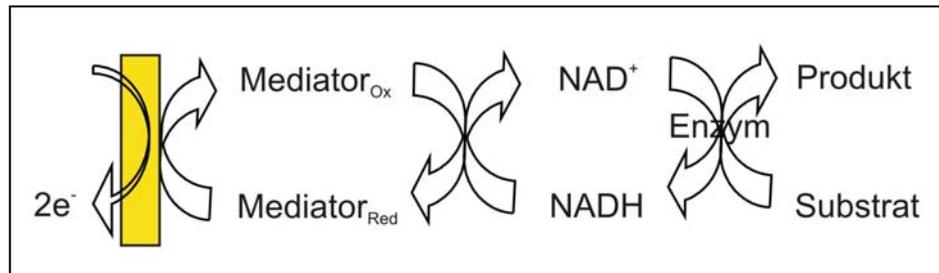


Abbildung 4-9: Schematische Darstellung der elektroenzymatischen Oxidation

Das jeweilige Substrat wird durch das entsprechende Enzym SDH bzw. GatDH unter gleichzeitiger Reduktion von  $\text{NAD}^+$  zu  $\text{NADH}$  zum Produkt oxidiert. Der reduzierte Cofaktor wird durch die Elektronenübertragung auf den oxidierten Mediator wieder recycelt und der dadurch reduzierte Redoxmediator durch Abgabe der Elektronen wieder oxidiert.

Somit steht die katalytische Kette einer erneuten elektroenzymatischen Substrat-oxidation zur Verfügung.

Des Weiteren beschrieben Schneider et al. [136] die Abhängigkeit von divalenten Kationen für die GatDH-Aktivität. Dabei wurden verschiedene divalente Kationen getestet und standardgemäß 1 mM  $\text{MgCl}_2$  dem Puffer zugesetzt. Zur Vermeidung weiterer Ionen wurde daher im Folgenden das für das Enzym GatDH benötigte zweiwertige Magnesium durch das bereits im Puffer vorhandene  $\text{CaCl}_2$  ersetzt.

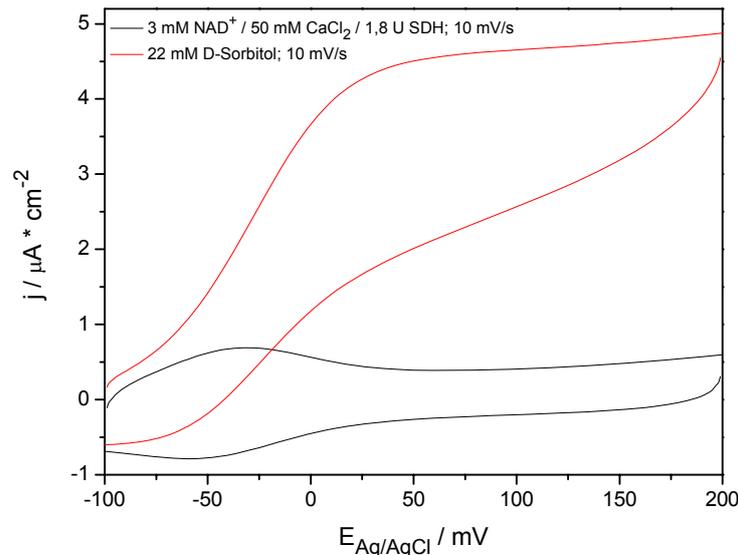
#### 4.3.1 Messung in Lösung

Zunächst wurden die mit CTFM modifizierten und aktivierten Goldelektroden in einer Lösung aus 3 mM  $\text{NAD}^+$ , 50 mM  $\text{CaCl}_2$  und 1,8 Units (U) SDH in 0,1 M Bis-Tris-Puffer (pH 8) cyclovoltammetrisch ohne Zusatz des Substrates D-Sorbitol vermessen. Nach Zugabe von 22 mM D-Sorbitol wurde die Messung wiederholt. Zu

#### 4. Modifizierung von poly- und nanokristallinen Goldelektroden mit SDH/GatDH

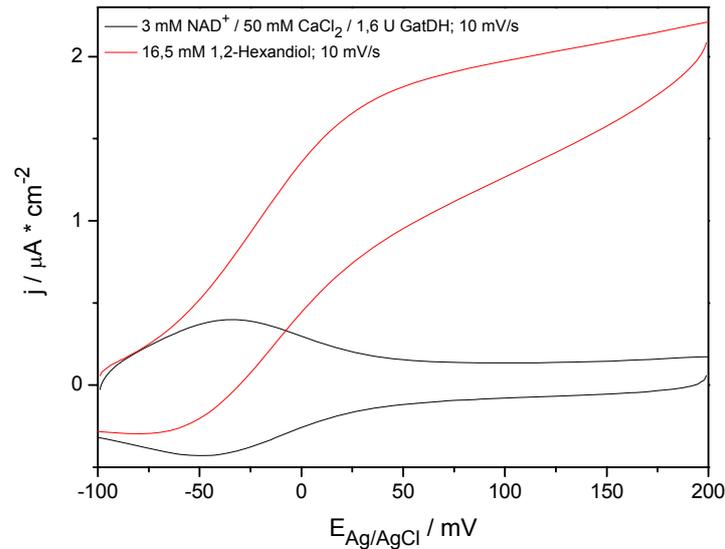
erkennen ist ein Stromanstieg ab -100 mV aufgrund des Recyclens des während der enzymatischen Substratoxidation von D-Sorbitol reduzierten Cofaktors NADH (Abbildung 4-10).

Die Substratoxidation von D-Sorbitol sowohl an unmodifizierten als auch an mit CTFM-modifizierten Goldelektroden findet dagegen erst ab einem Potential von +450 mV statt [137].



**Abbildung 4-10:** Cyclovoltammogramm einer CTFM-modifizierten Goldelektrode in einer Lösung aus 3 mM NAD<sup>+</sup>, 50 mM CaCl<sub>2</sub> und 1,8 U SDH in 0,1 M Bis-Tris-Puffer (pH 8) vor Substratzugabe (schwarz) und nach Zugabe von 22 mM D-Sorbitol (rot) bei 10 mV/s.

Analog zu den Messungen in einer Lösung mit dem Enzym SDH wurden die mit dem Mediator modifizierten und aktivierten Goldoberflächen auch in einer Lösung aus 3 mM NAD<sup>+</sup> / 50 mM CaCl<sub>2</sub> und 1,6 U GatDH in 0,1 M Bis-Tris-Puffer (pH 8) vermessen. Auch in diesem Fall ist eine Substratoxidation von 1,2-Hexandiol zu dem entsprechenden Diketon aufgrund der Reoxidation von NADH zu beobachten (Abbildung 4-11).



**Abbildung 4-11:** Elektroenzymatische Oxidation einer CTFM-modifizierten Goldelektrode in einer Lösung aus 3 mM  $\text{NAD}^+$ , 50 mM  $\text{CaCl}_2$  und 1,6 U GatDH in 0,1 M Bis-Tris-Puffer (pH 8) vor Substratzugabe (schwarz) und nach Zugabe von 16,5 mM 1,2-Hexandiol (rot) bei 10 mV/s.

Somit ist sowohl das System CTFM/ $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{NAD}^+$ /SDH als auch das System CTFM/ $\text{Ca}^{2+}$ / $\text{NAD}^+$ /GatDH zur Detektion der jeweiligen Substrate D-Sorbitol bzw. 1,2-Hexandiol geeignet.

Jedoch ist die Immobilisierung durch einfache Adsorption aufgrund der natürlichen Affinität zwischen Enzym und  $\text{NAD}^+$  so nicht möglich. Zwischen Enzym und Cofaktor herrschen schwache Wasserstoffbrückenbindungen, die es ermöglichen, dass das Enzym beim Eintauchen in die Substratlösung wegdiffundiert.

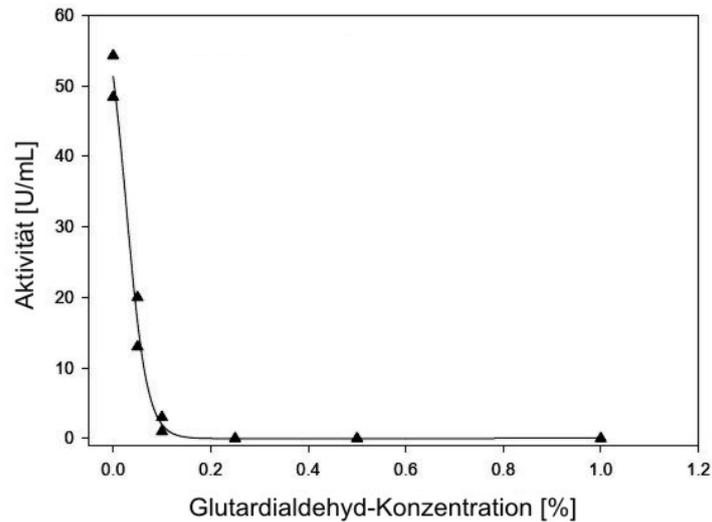
Daher sollen die Enzyme SDH bzw. GatDH im Folgenden durch Hilfe des Quervernetzers Glutardialdehyd bzw. durch Einschluss in eine Nafionmembran auf die Elektrodenoberfläche fixiert werden.

#### 4.3.2 Immobilisierung auf die Elektrode

Bevor die Enzyme SDH bzw. GatDH immobilisiert werden konnten, musste ein Aktivitätstest in der Mikrobiologie (Arbeitskreis Prof. Dr. F. Giffhorn) durchgeführt werden, um die Menge an Glutardialdehyd zu bestimmen, bei der eine Aufbringung der Enzyme ohne signifikanten Aktivitätsverlust möglich ist. Bereits oberhalb von

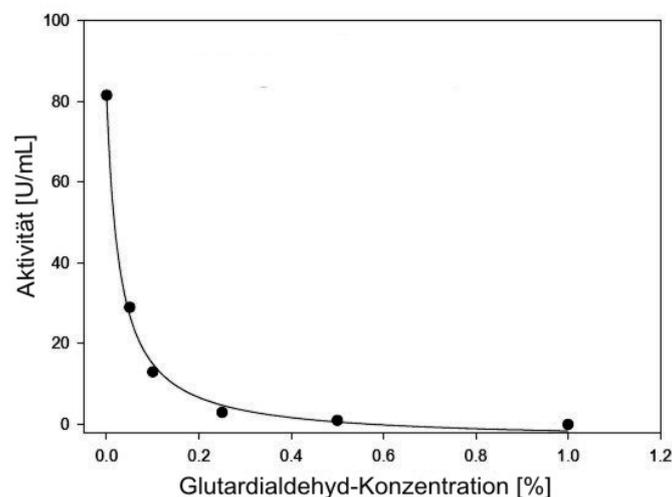
#### 4. Modifizierung von poly- und nanokristallinen Goldelektroden mit SDH/GatDH

0,05 wt% Glutardialdehyd (GA) sinkt die Aktivität der SDH von anfänglichen 55 U/mL auf weniger als 5 U/mL, so dass als Maximalkonzentration lediglich 0,05 wt% GA bei einer Restaktivität von 20 U/mL verwendet werden konnte (Abbildung 4-12).



**Abbildung 4-12:** Aktivitätstest der SDH bei steigender Glutardialdehyd-Konzentration

Ein ähnliches Verhalten war auch bei der GatDH zu beobachten, mit einer anfänglichen Aktivität von 80 U/mL. Auch in diesem Fall sinkt die Aktivität oberhalb von 0,05 wt% GA auf unter 5 U/mL (Abbildung 4-13), jedoch verläuft der Aktivitätsverlust bei der GatDH langsamer als bei der SDH. Daher wurde die Maximalkonzentration auch in diesem Fall auf 0,05 wt% GA festgelegt, mit einer Restaktivität von 30 U/mL.



**Abbildung 4-13:** Aktivitätstest der GatDH bei steigender Glutardialdehyd-Konzentration

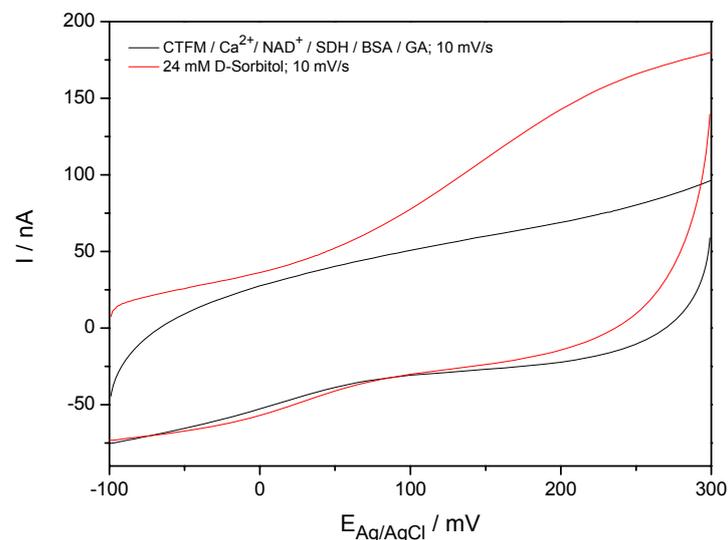
#### 4. Modifizierung von poly- und nanokristallinen Goldelektroden mit SDH/GatDH

Die beiden verwendeten Enzyme SDH und GatDH wurden auf zwei verschiedene Arten auf die mit CTFM modifizierten und aktivierten Goldelektroden aufgebracht:

##### a) Quervernetzung mittels Glutardialdehyd

Glutardialdehyd wird häufig zum Vernetzen von Enzymen verwendet, da die zwei vorhandenen Aldehydgruppen mittels Aminogruppen am Enzym durch Bildung einer Iminbindung kovalent verknüpft werden können [138-145]. Durch die kovalente Bindung ist jedoch eine Denaturierung des Enzyms möglich, da die Tertiärstruktur des Proteins verändert werden kann. Zur Unterbindung dieser Möglichkeit wird Rinderserum Albumin (BSA) im Überschuss zugegeben, welches das eigentliche aktive Enzym umschließt und die Vernetzung somit zwischen BSA und GA erfolgt.

Die Immobilisierung des Enzyms SDH erfolgte durch Auftropfen von 15  $\mu\text{l}$  einer Lösung aus 3 mM  $\text{NAD}^+$ , 50 mM  $\text{CaCl}_2$ , 23,5 U SDH, 50 mg/mL BSA und 0,05 wt% GA und Eintrocknen bei RT. Anschließend wurden die Elektroden mit 0,1 M Bis-Tris-Puffer (pH 8) gespült und durch cyclische Voltammetrie vermessen. Nach Zugabe von 24 mM D-Sorbitol ist ein deutlicher Stromanstieg ab -100 mV zu beobachten (Abbildung 4-14).

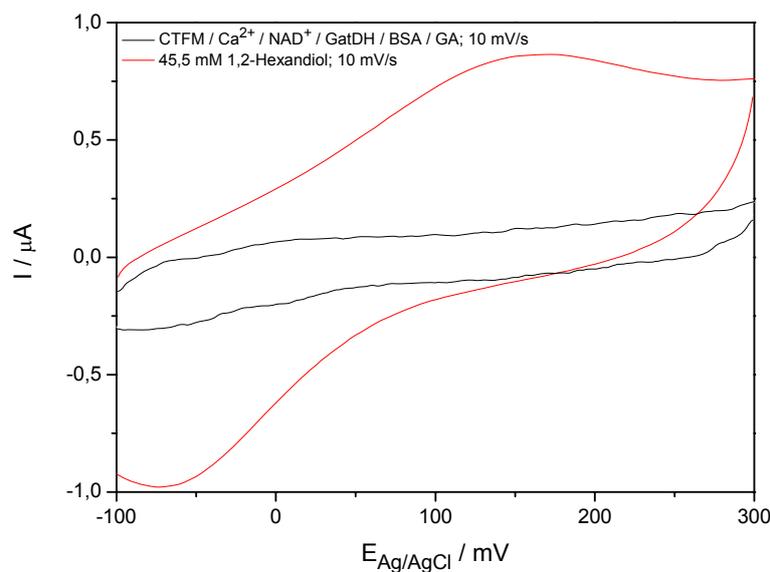


**Abbildung 4-14:** Cyclovoltammogramme einer mit CTFM /  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{NAD}^+$  / SDH / GA modifizierten Goldelektrode in 0,1 M Bis-Tris-Puffer, pH 8 (schwarz) und nach Zugabe von 24 mM D-Sorbitol (rot) bei 10 mV/s.

#### 4. Modifizierung von poly- und nanokristallinen Goldelektroden mit SDH/GatDH

Dieser Stromanstieg kann auf das Recyclen des Cofaktors, bedingt durch die enzymatische Oxidation von D-Sorbitol, zurückgeführt werden. Zur Überprüfung wurden die Messungen mehrmals durchgeführt und auch weiterhin ein Oxidationspeak beobachtet, so dass darauf geschlossen werden kann, dass die SDH nach wie vor immobilisiert vorliegt.

Analog zu den mit SDH modifizierten Elektroden wurde auch die GatDH durch Auftropfen von 15  $\mu\text{l}$  einer Lösung aus 3 mM  $\text{NAD}^+$ , 50 mM  $\text{CaCl}_2$ , 25,5 U GatDH, 50 mg/mL BSA und 0,05 wt% GA modifiziert, bei RT eingetrocknet, mit Puffer gespült und anschließend cyclovoltammetrisch vermessen. Auch in diesem Fall ist die elektrochemische Regenerierung des Cofaktors aufgrund der enzymatischen Oxidation von 1,2-Hexandiol zu beobachten (Abbildung 4-15).



**Abbildung 4-15:** Cyclovoltammogramme einer mit CTFM /  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{NAD}^+$  / GatDH / GA modifizierten Goldelektrode in 0,1 M Bis-Tris-Puffer, pH 8 (schwarz) und nach Zugabe von 45,5 mM 1,2-Hexandiol (rot) bei 10 mV/s.

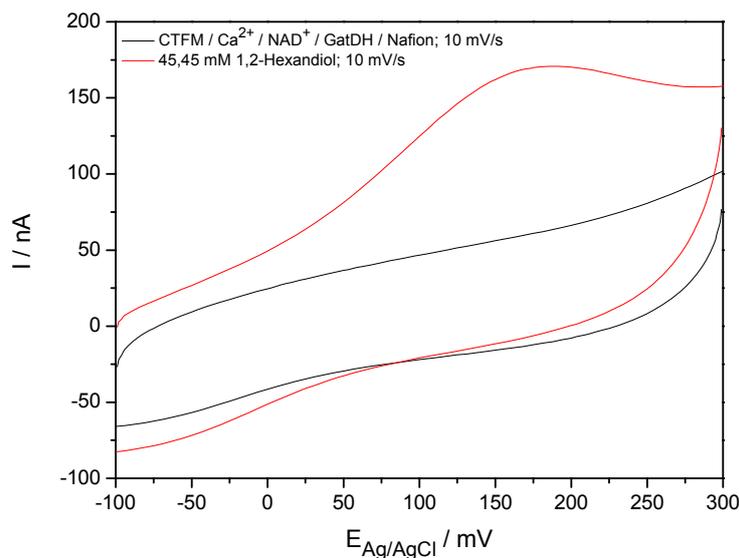
Die mit Glutardialdehyd und BSA modifizierten Elektroden zeigten jedoch keine sehr gute Reproduzierbarkeit, was auf eine Denaturierung des jeweiligen Enzyms durch die Modifizierung mit GA und BSA schließen lässt. Des Weiteren war ein deutlicher Aktivitätsverlust bereits nach sieben Tagen zu beobachten.

#### 4. Modifizierung von poly- und nanokristallinen Goldelektroden mit SDH/GatDH

##### b) Einschluss in eine Nafionschicht

Bei Nafion handelt es sich um ein Ionomer, das vor allem im Bereich der Brennstoffzellen als Membranmaterial verwendet wird. Nafion besteht aus einem sulfonierten Tetrafluorethylen-Polymer (PTFE), das Protonenleitung über die anionischen Säuregruppen zeigt. Beim Quellen entstehen in der Membran kugelförmige Erweiterungen mit einer Größe von ca. 50 Å, die durch Kanäle (ca. 10 Å) miteinander verbunden sind.

Die vorherigen adsorbierten Komponenten aus Mediator, Calcium, Cofaktor und Enzym wurden durch das Aufbringen einer Nafionschicht auf die Oberfläche fixiert. Hierzu wurde zunächst versucht die modifizierten Elektroden in eine Membran aus Nafion durch Dip-Coating bzw. durch Auftropfen einzubetten (Abbildung 4-16).



**Abbildung 4-16:** Cyclovoltammogramme einer mit CTFM / Ca<sup>2+</sup> / NAD<sup>+</sup> / GatDH / Nafion modifizierten Goldelektrode in 0,1 M Bis-Tris-Puffer, pH 8 (schwarz) und nach Zugabe von 45,5 mM 1,2-Hexandiol (rot) bei 10 mV/s.

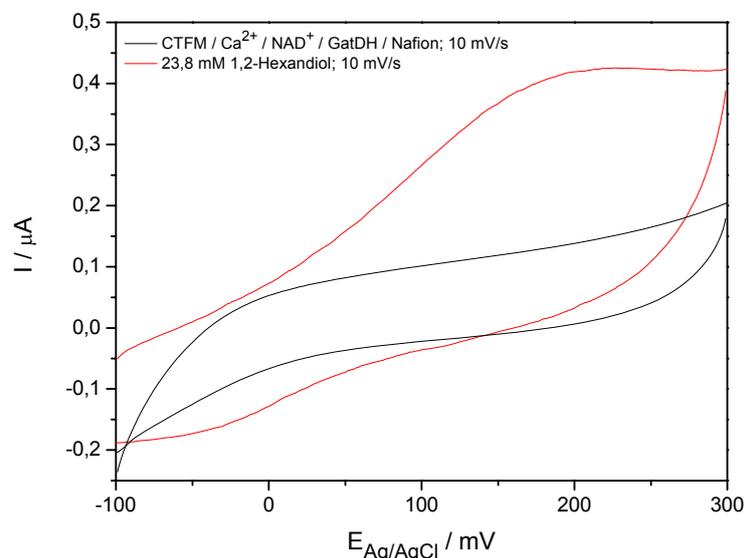
Die Modifizierung erfolgte analog zur Vernetzung mittels Glutardialdehyd, jedoch wurde in diesem Fall statt BSA und GA eine 0,05%ige Nafionlösung zum Auftropfen verwendet.

Dieses Verfahren wurde bereits in der Literatur beschrieben [134, 143], erwies sich jedoch als nicht kompatibel und nur mäßig reproduzierbar. Des Weiteren ließ die Aktivität bereits nach 7 Tagen um ca. 50% nach. Daher wurde die Nafionschicht

#### 4. Modifizierung von poly- und nanokristallinen Goldelektroden mit SDH/GatDH

durch das Air-Brush-Verfahren auf die zuvor modifizierten Elektroden bei niedrigem Sprühdruk dünn aufgetragen.

Zur Modifizierung wurden die mit CTFM modifizierten Goldoberflächen aktiviert und eine Lösung aus 2,5 mM  $\text{NAD}^+$ , 40 mM  $\text{CaCl}_2$  und 25,5 U GatDH auf die Elektrode aufgetropft und eingetrocknet. Anschließend wurden die Elektroden mit einer 2,5%igen Nafionlösung besprüht, um eine dünne Membranschicht auf der Elektrodenoberfläche zu erhalten, für 30 Minuten getrocknet, mit Puffer gespült und durch cyclische Voltammetrie vermessen. Auch in diesem Fall konnte ein deutlicher Stromanstieg ab -100 mV aufgrund des Cofaktor-Recyclings beobachtet werden (Abbildung 4-17).



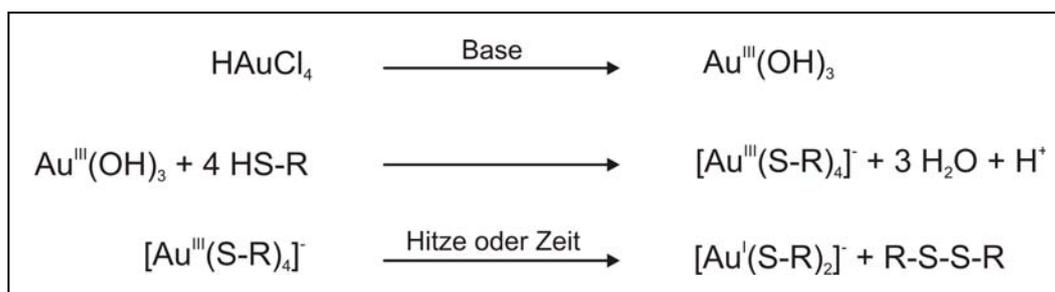
**Abbildung 4-17:** Cyclovoltammogramme einer mittels Air-Brush-Verfahren modifizierten CTFM /  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{NAD}^+$  / GatDH / Nafion Goldelektrode in 0,1 M Bis-Tris-Puffer, pH 8 (schwarz) und nach Zugabe von 23,8 mM 1,2-Hexandiol (rot) bei 10 mV/s.

Die mit Nafion beschichteten Elektroden zeigten dabei eine deutlich bessere Reproduzierbarkeit gegenüber den mit Glutardialdehyd modifizierten Goldelektroden und waren über einen Zeitraum von 30 Tagen stabil.

#### 4.4 Nanokristallines Gold zur Enzymimmobilisierung

Zur Schaffung einer größeren Oberfläche wurde das System der CTFM /  $\text{Ca}^{2+}$  /  $\text{NAD}^+$  modifizierten polykristallinen Goldelektroden auch auf nanokristallinen Goldoberflächen immobilisiert. Die Abscheidung des nanokristallinen Goldes auf Glaskohlenstoffoberflächen wurde mittels Pulstechnik nach [146] durchgeführt.

Ausgegangen wird von einem Goldhydrochlorid, welches durch Zusatz einer Base in das entsprechende Hydroxid überführt wird. Durch Zusatz von Mercaptopropansulfonsäure (MPS) wird der entsprechende dreiwertige Goldkomplex erhalten. Dieser wird durch Erhitzen in den entsprechenden  $\text{Au}^{\text{I}}$ -Komplex überführt. Die Pulsdauer beträgt 1 ms,  $t_{\text{off}}$  20 ms bei einer Stromstärke von  $50 \text{ mA/cm}^2$ . Die somit erhaltenen nanokristallinen Goldteilchen besitzen eine Kristallitgröße von 20-30 nm.

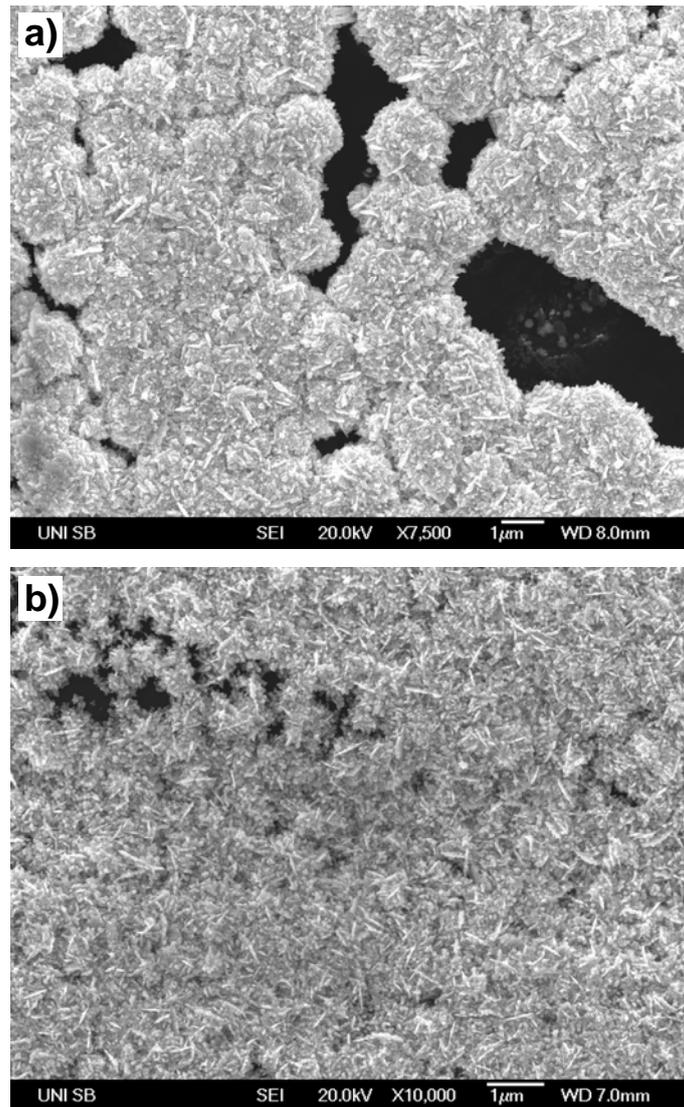


**Abbildung 4-18:** Herstellung des Goldbades nach [146];  $\text{R} = -(\text{CH}_2)_3\text{SO}_3\text{Na}$

Aufgrund der Einfügung von Thiolen in die Goldabscheidung überschreiten die Kristallite die Größe von 100 nm nicht. Die Schwefelatome adsorbieren bei diesem Prozess an die aktiven Stellen der Goldkristallite und hindern somit ihr weiteres Wachstum [146].

Des Weiteren wurden auch nanokristalline Goldelektroden mit einer Kristallitgröße von 6-10 nm durch Zusatz von Arsen(III)-oxid ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) hergestellt.  $\text{As}_2\text{O}_3$  wirkt als Kornverfeinerer und hat daher die Aufgabe das Wachstum der Goldkristallite zu hemmen und somit die Teilchengröße weiter zu minimieren.

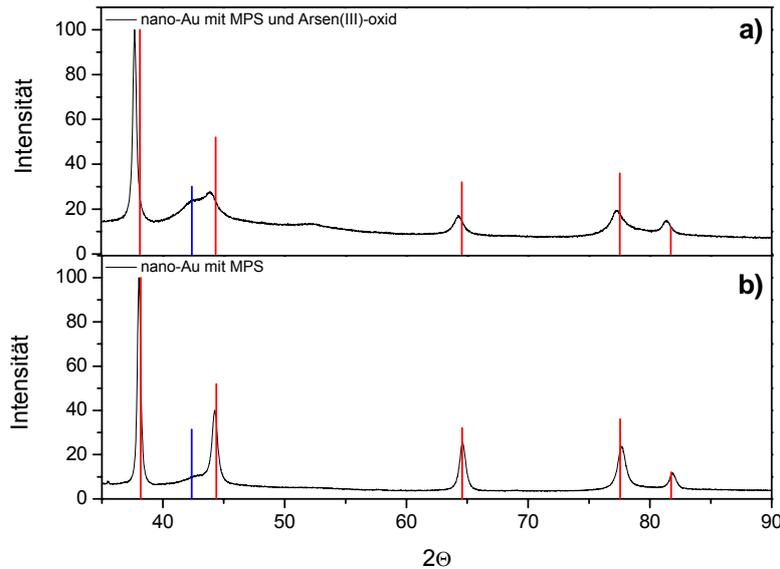
Die nach diesem Verfahren hergestellten nanokristallinen Proben wurden zunächst mittels Rasterelektronenmikroskopie untersucht und zeigten dabei sehr deutlich den Unterschied in der Oberflächenbeschaffenheit (Abbildung 4-19).



**Abbildung 4-19:** REM-Aufnahmen der Glaskohlenstoffoberflächen nach 30-minütiger Goldabscheidung ohne (a) und mit Zusatz von  $\text{As}_2\text{O}_3$  (b) mittels Pulstechnik ( $j = 50 \text{ mA/cm}^2$ ,  $t_{\text{on}} = 1 \text{ ms}$ ,  $t_{\text{off}} = 20 \text{ ms}$  bei RT).

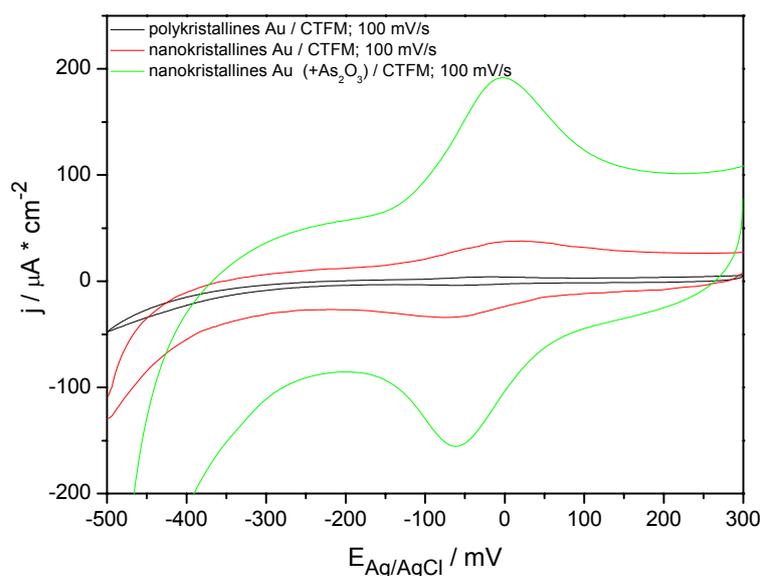
Der Vergleich der REM-Aufnahmen zeigt die Unterschiede in der Morphologie des abgeschiedenen Goldes mit und ohne Zusatz von Arsen(III)-oxid. In beiden Fällen wird eine große Oberfläche aufgrund der kleinen Kristallitgröße und des verzweigten Wachstums erhalten. Jedoch zeigt das verzweigte Wachstum des nanokristallinen Goldes ohne Zusatz von  $\text{As}_2\text{O}_3$  eine ausgeprägte „blumenkohlartige“ Oberfläche, wohingegen der Zusatz von Arsen(III)-oxid eine sehr verwachsene nadelförmige Oberfläche ergibt, die im gesamten eher eben verläuft. Auch die Kristallitgrößenbestimmung mittels XRD zeigte in diesem Fall eine geringere Teilchengröße der mit  $\text{As}_2\text{O}_3$  versetzten Proben von 6-10 nm (Abbildung 4-20).

#### 4. Modifizierung von poly- und nanokristallinen Goldelektroden mit SDH/GatDH



**Abbildung 4-20:** XRD-Messungen des abgeschiedenen Goldes mit (a) und ohne Zusatz von  $\text{As}_2\text{O}_3$  (b). Die roten Linien zeigen die für Gold charakteristischen 2-Theta-Positionen. Die blauen Linien zeigen den Untergrund Glaskohlenstoff.

Die nanokristallinen Goldelektroden wurden analog zu den polykristallinen Oberflächen mit dem Redoxmediator CTFM modifiziert und mittels cyclischer Voltammetrie bei einer Scangeschwindigkeit von 100 mV/s charakterisiert. In Abbildung 4-21 ist der Unterschied für das erhaltene reversible Redoxpaar NHOH / NO zwischen poly- und nanokristallinen Goldelektroden zu sehen.

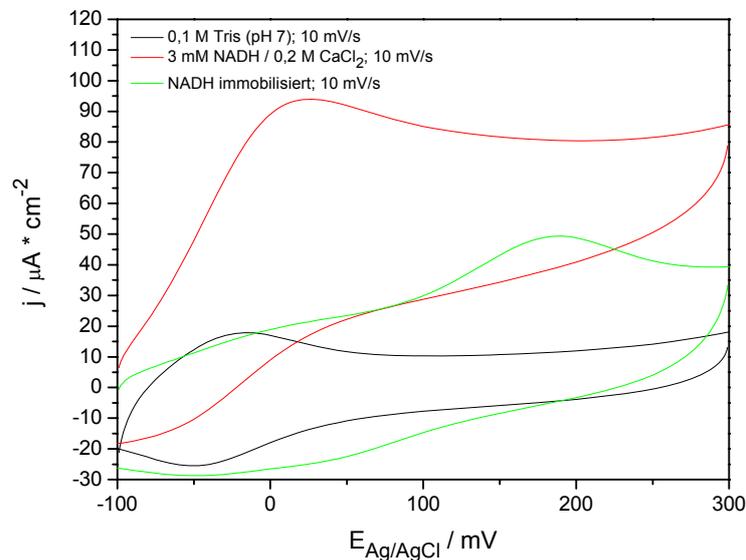


**Abbildung 4-21:** Vergleich der cyclovoltammetrischen Messungen einer polykristallinen CTFM-modifizierten Goldelektrode (schwarz) mit nanokristallinen Goldoberflächen ohne (rot) und mit Zusatz von  $\text{As}_2\text{O}_3$  (grün) in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7) bei 100 mV/s.

#### 4. Modifizierung von poly- und nanokristallinen Goldelektroden mit SDH/GatDH

Der Vergleich einer mit CTFM modifizierten polykristallinen Goldelektrode mit einer nanokristallinen Probe ohne Zusatz von  $\text{As}_2\text{O}_3$  zeigt dabei einen zehnfach größeren Oxidations- und Reduktionsstrom des reversiblen Redoxpaares Hydroxylamin/Nitroso aufgrund der größeren aktiven Oberfläche. Im Gegensatz dazu resultiert bei nanokristallinem Gold mit Zusatz von  $\text{As}_2\text{O}_3$  ein 45-fach größerer Strom im Vergleich zu polykristallinen Oberflächen und eine fünffach größere Stromdichte verglichen mit nanokristallinem Gold ohne  $\text{As}_2\text{O}_3$  (Abbildung 4-21).

Für die Untersuchung der nanokristallinen Goldelektroden mit Zusatz von  $\text{As}_2\text{O}_3$  wurden diese zunächst in einer Lösung aus NADH und  $\text{CaCl}_2$  vermessen, anschließend der Cofaktor auf die Oberfläche immobilisiert und cyclovoltammetrisch vermessen (Abbildung 4-22). Analog zu den polykristallinen Messungen war auch hier die Oxidation sowohl von NADH in Lösung als auch in immobilisiertem Zustand möglich. Verglichen mit den polykristallinen Goldoberflächen ergibt sich dabei eine bis zu 20-fach größere Stromausbeute für die Messung in einer NADH /  $\text{CaCl}_2$ -Lösung.

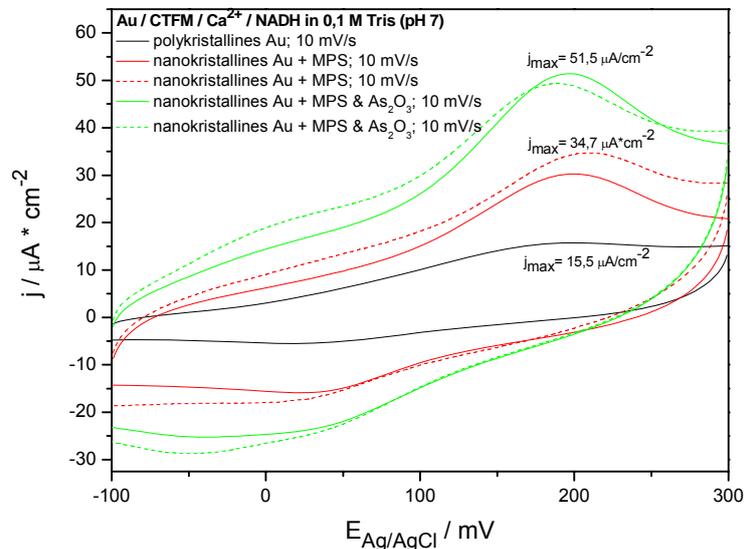


**Abbildung 4-22:** Vergleich der cyclovoltammetrischen Messungen einer nanokristallinen CTFM-modifizierten Goldoberfläche in 0,1 M Tris-Puffer, pH 7 (schwarz), in einer Lösung aus 3 mM NADH / 0,2 M  $\text{CaCl}_2$  (rot) und immobilisiert auf die Oberfläche (grün) bei 10 mV/s.

Zum Vergleich der aktiven Oberflächen wurden sowohl die nanokristallinen Goldelektroden mit und ohne Zusatz von  $\text{As}_2\text{O}_3$  als auch eine polykristalline

#### 4. Modifizierung von poly- und nanokristallinen Goldelektroden mit SDH/GatDH

Goldoberfläche mit dem Mediator modifiziert und anschließend der Cofaktor immobilisiert.



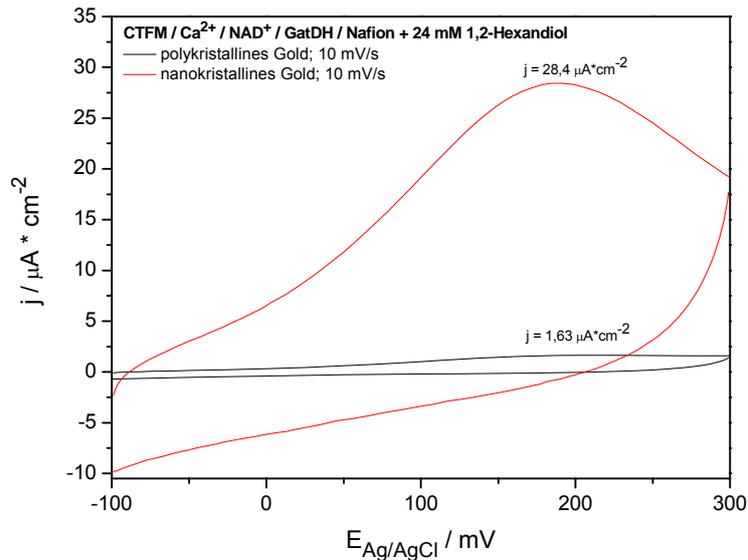
**Abbildung 4-23:** Immobilisierung von NADH auf den mit CTFM-modifizierten polykristallinen Goldoberflächen (schwarz) und den nanokristallinen Goldelektroden ohne (rot) und mit Zusatz von As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (grün) in 0,1 M Tris-Puffer (pH 7) bei 10 mV/s.

Die cyclovoltammetrischen Messungen belegen die erwartete zur Oberfläche proportional steigende Stromdichte (Abbildung 4-23). Während bei der NADH-Immobilisierung von polykristallinen Goldoberflächen eine Stromdichte von 15,5  $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  erhalten wird, ist bei nanokristallinem Gold ohne Zusatz von As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> die Stromdichte um den Faktor 2, bei Zusatz von Arsenik um den Faktor 3 größer.

Ebenso wurde das nanokristalline Gold mit dem Enzym GatDH modifiziert. Dazu wurde analog zu den polykristallinen Elektroden verfahren und eine Nafionschicht zur Fixierung aufgesprüht.

In Abbildung 4-24 lässt sich die Oberflächenabhängigkeit der auf poly- und nanokristallinen Goldträgern immobilisierten GatDH sehr deutlich erkennen. Der Oxidationsstrom von nanostrukturiertem Gold ist dabei mit 28,4  $\mu\text{A}\cdot\text{cm}^{-2}$  um den Faktor 15 größer als polykristallines Gold.

#### 4. Modifizierung von poly- und nanokristallinen Goldelektroden mit SDH/GatDH



**Abbildung 4-24:** Cyclovoltammogramme einer mittels Air-Brush-Verfahren modifizierten polykristallinen (schwarz) und einer nanokristallinen Goldelektrode (rot) mit CTFM / Ca<sup>2+</sup> / NAD<sup>+</sup> / GatDH / Nafion in 0,1 M Bis-Tris-Puffer (pH 8) nach Zugabe von 24 mM 1,2-Hexandiol bei 10 mV/s.

Für den Fall einer nanokristallinen Goldelektrode mit Zusatz von As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ist aufgrund der größeren aktiven Oberfläche eine noch größere Stromausbeute zu erwarten. Entsprechendes konnte schließlich bereits sowohl für die Modifizierung mit CTFM als auch für CTFM / Ca<sup>2+</sup> / NADH gezeigt werden.

## 5. Modifizierung von polykristallinen Goldelektroden mit GatDH-Cyst

Häufig werden Biomoleküle durch vorherige Ausbildung einer SAM auf Goldoberflächen kovalent immobilisiert (siehe Kapitel 2.4). Diese Modifizierungsarten wurden bereits von Stoica et al. [85, 97, 147], Fridman et al. [148] oder Lindgren et al. [84] im Sinne eines DET an Cellobiose-Dehydrogenase untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit sollen die Vorversuche der Immobilisierung einer neuen Variante der Galaktit-Dehydrogenase durchgeführt werden. Die GatDH wurde hierzu am His-Tag mit zwei Cysteingruppen modifiziert [149], wodurch eine direkte Immobilisierung des Enzyms auf Goldoberflächen ermöglicht wird. Insgesamt stehen zur Adsorption acht Cysteingruppen zur Verfügung, da es sich bei dem Enzym um ein Homotetramer handelt, bei der jede Untereinheit einen eigenen His-Tag besitzt.

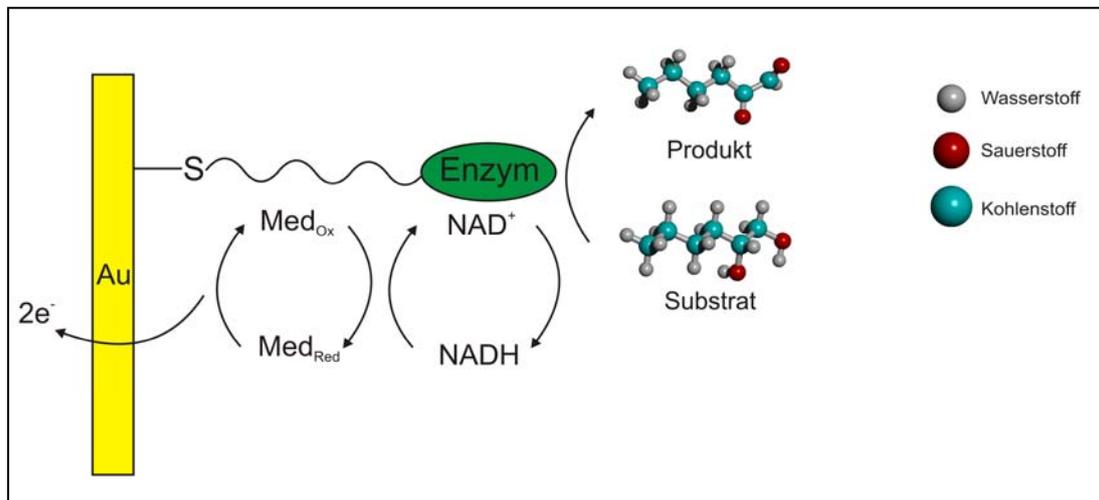
Die Enzymmodifizierung mit dem so genannten His-Tag stellt ein universelles Verfahren zur Proteinaufreinigung dar. Es gibt bereits Untersuchungen, diesen His-Tag zur Immobilisierung an festen Oberflächen zu verwenden und somit eine gewisse Kontrolle über die Immobilisierungsrichtung zu erhalten [150-155]. Dabei wird das entsprechende Enzym an einer SAM-modifizierten Goldoberfläche immobilisiert, indem zusätzlich Nitrilotriessigsäure (NTA) zur spezifischen Bindung von Enzymen eingesetzt wird. Dadurch entsteht, in Gegenwart von Nickelionen, ein Chelatkomplex zwischen NTA und His-Tag, der das Enzym an die Oberfläche bindet. Es handelt sich um eine reversible Immobilisierung, die durch Zusatz von Imidazol oder EDTA aufgehoben wird.

Jedoch bedingt auch diese Modifizierung eine vorherige Funktionalisierung der Elektrodenoberfläche mittels eines Thiols. Dies soll durch die zusätzliche Modifizierung der GatDH mittels Cysteinen vermieden werden.

Endziel ist sowohl die gerichtete Immobilisierung des Enzyms als auch die des Cofaktors  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ . Daher sollte zunächst die Adsorption und Aktivität der GatDH-Cyst näher untersucht werden, während sich Cofaktor und Redoxmediator in Lösung befinden. Hexacyanoferrat (III) konnte nicht als Redoxmediator verwendet werden, da es für das Enzym toxisch ist [136], so dass der in Kapitel 4 genutzte Redoxmediator CTFM in Lösung verwendet werden sollte. Jedoch besteht bei CTFM

## 5. Modifizierung von polykristallinen Goldelektroden mit GatDH-Cyst

eine eigene Affinität zu Gold durch die vorhandenen Cyanogruppen, so dass auch eine mögliche Co-Immobilisierung des Mediators untersucht werden sollte. Der Cofaktor kann wie bereits in Abbildung 4-1 beschrieben über Calciumbrücken an den Mediator binden und recycelt werden. Der reduzierte Mediator diffundiert zur Elektrode und wird durch Abgabe der Elektronen wieder reoxidiert (Abbildung 5-1).



**Abbildung 5-1:** Schematische Darstellung der Immobilisierung der GatDH-Cyst an Goldoberflächen und Darstellung des Prinzips der elektroenzymatischen Substratoxidation.

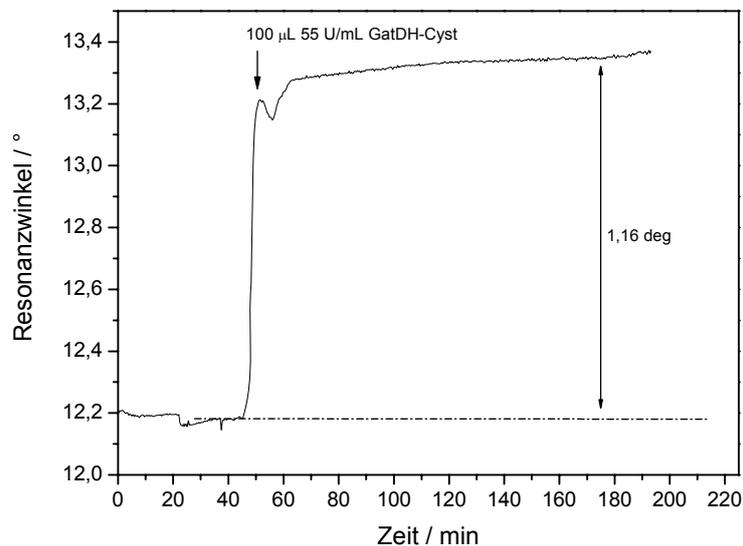
Vor der Immobilisierung der GatDH-Cyst wurde ein möglicher Aktivitätsverlust nach mehrstündigem Stehen lassen bei RT untersucht und es zeigten sich keinerlei Einbußen der Aktivität. Zur Vorbereitung wurde das Enzym auf eine Konzentration von 55 U/mL eingengt und das enthaltene NaCl entfernt [149].

Zur Überprüfung der Adsorptionsfähigkeit wurde die Immobilisierung der GatDH-Cyst mittels SPR in der Organischen Chemie (Arbeitskreis Prof. Dr. G. Wenz) näher untersucht. Die Adsorption der GatDH-Cyst auf die Goldelektrode soll dabei über die vorhandenen Schwefelatome am Cystein via Thiolatbindungen erfolgen. Hierzu wurde ein Goldblättchen mit bekanntem Brechungsindex in die Bio-Suplar 2-Anlage eingelegt und die Durchflusszelle zunächst mit 0,1 M Bis-Tris-Puffer + 1 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7,5) gespült. Anschließend wurden 100 µL einer GatDH-Cyst-Lösung (55 U/mL) zugespritzt und der Resonanzwinkel in Abhängigkeit von der Zeit gemessen. In Abbildung 5-2 ist nach Zugabe der GatDH-Cyst ein Anstieg des Resonanzwinkels nach ca. 40 Minuten zu beobachten. Dieser entsteht aufgrund der Änderung des Brechungsindex infolge der Adsorption des Enzyms an die Goldoberfläche über die Cystein-Schwefelgruppen. Im Anschluss wurde für ca. drei Stunden mit Puffer

## 5. Modifizierung von polykristallinen Goldelektroden mit GatDH-Cyst

gespült, um zu überprüfen, ob es sich hierbei um eine elektrostatische oder kovalente Bindung handelt. Nach ca. 200 Minuten ist das nach Adsorption des Enzyms erhaltene Plateau auch weiterhin zu beobachten, so dass von einer kovalenten Bindung ausgegangen werden kann. Würde es über die Zeit zu einem erheblichen Abfall des Plateaus kommen, läge eine elektrostatische Bindung vor, bei der durch Spülen mit Puffer das Enzym ausgewaschen worden wäre.

Somit kann von einer kovalenten Immobilisierung der GatDH-Cyst auf Goldoberflächen via Thiolatbindungen ausgegangen werden. Der Brechungsindex  $n$  konnte aufgrund des unbekanntes  $n$ -Wertes für die GatDH-Cyst nicht direkt berechnet werden. In Anlehnung an den bekannten Brechungsindex für HRP ( $n=1,500$ ) [156] kann eine ungefähre Schichtdicke von 6-7 nm angenommen werden.



**Abbildung 5-2:** SPR-Messung anhand einer Goldelektrode und Zugabe von 55 U/mL GatDH-Cyst. Die Detektionsstelle wird durch einen Pfeil gekennzeichnet.

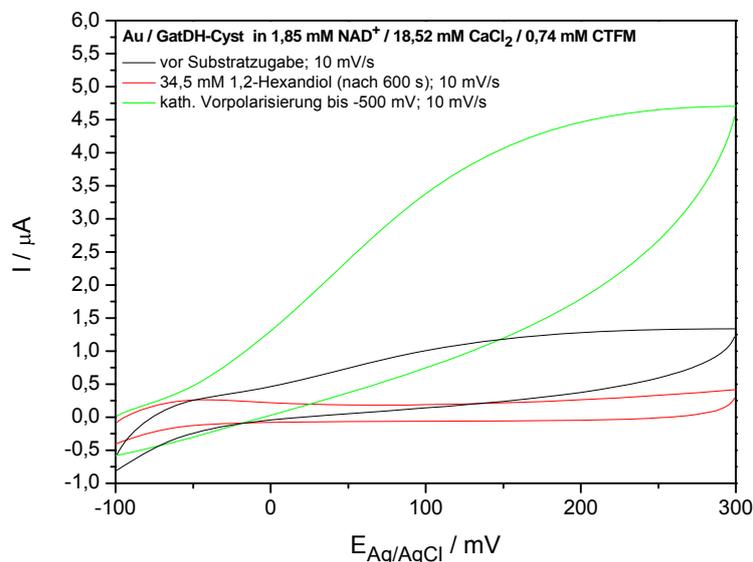
Zur Immobilisierung des Enzyms wurde eine Lösung aus 18 U GatDH-Cyst in 0,1 M Bis-Tris-Puffer + 1 mM  $MgCl_2$  (pH 7,5) angesetzt und die Goldelektrode in dieser Lösung für 1h auf Eis gestellt. Danach wurde die Elektrode mit Puffer gespült, um eventuell ungebundenes Enzym von der Elektrodenoberfläche zu entfernen.

Anschließend wurde eine Lösung aus 1,85 mM  $NAD^+$ , 18,52 mM  $CaCl_2$  und 0,74 mM CTFM in 0,1 M Bis-Tris-Puffer + 1 mM  $MgCl_2$  (pH 7,5) angesetzt und die mit Enzym modifizierte Goldelektrode in die Zelle eingetaucht. Mittels cyclischer Voltammetrie wurde im ersten Schritt der Redoxmediator CTFM durch Cyclen von +300 mV bis

## 5. Modifizierung von polykristallinen Goldelektroden mit GatDH-Cyst

-500 mV bei  $v = 100$  mV/s aktiviert. Die Nitrogruppen werden dabei zu dem reversiblen Redoxpaar NHOH/NO umgesetzt (siehe Kapitel 4.1). In einem zweiten Schritt wurde ein CV vor und nach Zugabe von 34,5 mM 1,2-Hexandiol von -100 mV bis +300 mV vs. Ag/AgCl bei einer Scangeschwindigkeit von 10 mV/s aufgenommen. Die Messung erfolgte jeweils zehn Minuten nach Substratzugabe, um ausreichend Zeit für eine Substratumsetzung zu gewährleisten.

Abbildung 5-3 zeigt das dabei erhaltene Voltammogramm. Nach zehn Minuten Wartezeit ist in diesem Fall keine irreversible Oxidation aufgrund des Recyclens des Cofaktors zu beobachten (rote Kurve). Erst nach einer kathodischen Vorpolarisierung von -500 mV bis 0 mV bei 100 mV/s und zwei Cyclen ist eine Oxidation des während der enzymatischen Reaktion reduzierten NADHs zu sehen (grün).

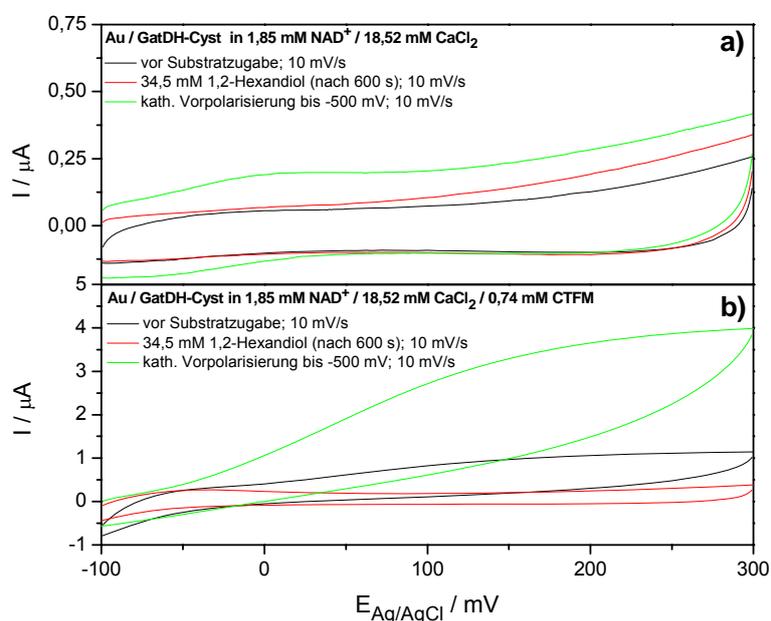


**Abbildung 5-3:** GatDH-Cyst modifizierte Goldelektrode in 1,85 mM  $NAD^+$  / 18,52 mM  $Ca^{2+}$  / 0,74 mM CTFM vor Substratzugabe (schwarz), nach Zugabe von 34,5 mM 1,2-Hexandiol und 600s Wartezeit (rot) sowie nach kathodischer Vorpolarisierung von -500 mV bis 0 mV und anschließender Messung (grün) bei 10 mV/s vs. Ag/AgCl.

Zur Kontrolle wurde obige Messung in einer mediatorfreien Lösung aus 1,85 mM  $NAD^+$ , 18,52 mM  $CaCl_2$  in 0,1 M Bis-Tris-Puffer + 1 mM  $MgCl_2$  (pH 7,5) analog durchgeführt. Die Annahme bestand darin, dass eine Co-Immobilisierung des Redoxmediators stattgefunden hat. Anschließend wurde die Elektrode wieder entnommen und erneut in mediatorhaltiger Lösung vermessen.

## 5. Modifizierung von polykristallinen Goldelektroden mit GatDH-Cyst

In Abbildung 5-4 ist der Vergleich dieser Messung in mediatorfreier (a) und mediatorhaltiger (b) Lösung dargestellt. Wird die Elektrode nach der in Abbildung 5-3 dargestellten Messung entnommen, gespült und ohne Mediator erneut vermessen, zeigt sich keine elektrochemische Cofaktorregenerierung mehr im vorliegenden Potentialbereich (Abbildung 5-4 (a)). Wird die Elektrode jedoch nach der Messung erneut gespült und in mediatorhaltiger Lösung vermessen, ist auch in diesem Fall eine erneute irreversible Oxidation ab -100 mV zu beobachten (Abbildung 5-4 (b)). Daher wurde geschlossen, dass CTFM in diesem Fall nicht auf der Oberfläche immobilisiert vorliegt.



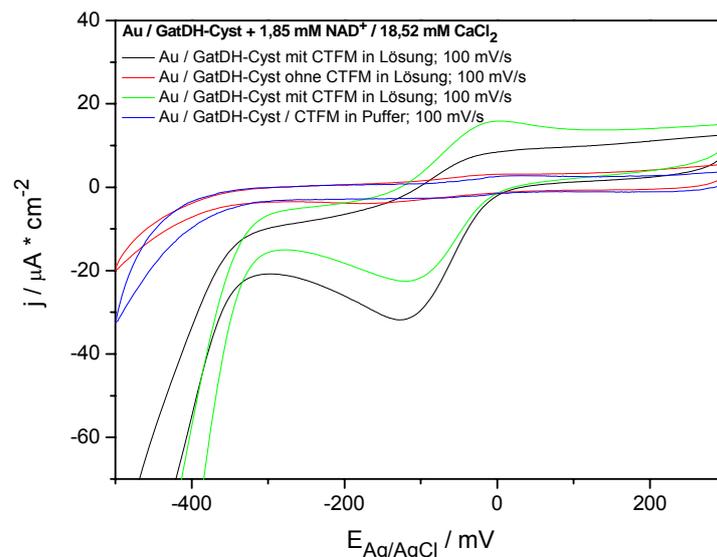
**Abbildung 5-4:** GatDH-Cyst modifizierte Goldelektrode in 1,85 mM NAD<sup>+</sup> / 18,52 mM Ca<sup>2+</sup> ohne Zusatz von CTFM (a) und mit CTFM (b) vor Substratzugabe (schwarz), nach Zugabe von 34,5 mM 1,2-Hexandiol und 600s Wartezeit (rot) sowie nach kathodischer Vorpolarisierung von -500 mV bis 0 mV und anschließender Messung (grün) bei 10 mV/s vs. Ag/AgCl.

Der Peakverlauf des Cofaktorrecyclings ist dabei vergleichbar mit den bereits in Kapitel 4.2 durchgeführten NADH-Oxidationen, wobei eine Potentialverschiebung in den anodischen Bereich erfolgte. Dies liegt vermutlich darin begründet, dass der Mediator offensichtlich nicht auf der Goldoberfläche adsorbiert vorliegt und somit der Elektronentransfer erst durch Diffusion des Mediators zur Elektrodenoberfläche erfolgen kann.

## 5. Modifizierung von polykristallinen Goldelektroden mit GatDH-Cyst

Dies wurde anhand der Aktivierung des Redoxmediators näher untersucht, da vor den jeweiligen Messungen zunächst die am Mediator vorhandenen Nitrogruppen aktiviert werden mußten. Abbildung 5-5 zeigt den dabei erhaltenen reversiblen Peakverlauf der beiden Messungen mit CTFM in Lösung (schwarz und grün) sowie der Messung ohne Mediator (rot). Des Weiteren wurde eine Goldelektrode zunächst mit GatDH-Cyst für 1h auf Eis modifiziert, gespült und anschließend zusätzlich für 30 Minuten in eine CTFM / Pufferlösung gestellt. Auch diese Elektrode wurde nach der Modifizierungszeit gespült und anschließend in CTFM-freier Lösung aktiviert (blau), jedoch ist in diesem Fall kein reversibles Verhalten zu beobachten.

Somit konnte eine Co-Immobilisierung des Mediators auf die bereits mit GatDH-Cyst funktionalisierte Goldelektrode an dieser Stelle ausgeschlossen werden. Außerdem zeigte auch die Aktivierung in mediatorfreier Lösung (Abbildung 5-5, rot) keinen reversiblen Peakverlauf, was ebenfalls eine Co-Immobilisierung ausschließt.



**Abbildung 5-5:** Aktivierung der CTFM-Moleküle einer GatDH-Cyst modifizierten Goldelektrode in 1,85 mM  $\text{NAD}^+$  / 18,52 mM  $\text{CaCl}_2$  in einer Lösung mit 0,74 mM CTFM (schwarz und grün) und in mediatorfreier Lösung (rot) sowie nach Co-Immobilisierung von CTFM für 30 Minuten (blau) bei 100 mV/s vs. Ag/AgCl.

Außerdem sollte überprüft werden, welchen Effekt die kathodische Vorpolarisierung auf die Reoxidation von NADH hat.

Dazu wurde eine Goldelektrode mit GatDH-Cyst wie oben beschrieben modifiziert und anschließend der Redoxmediator vor jeder Messung zunächst in einer Lösung

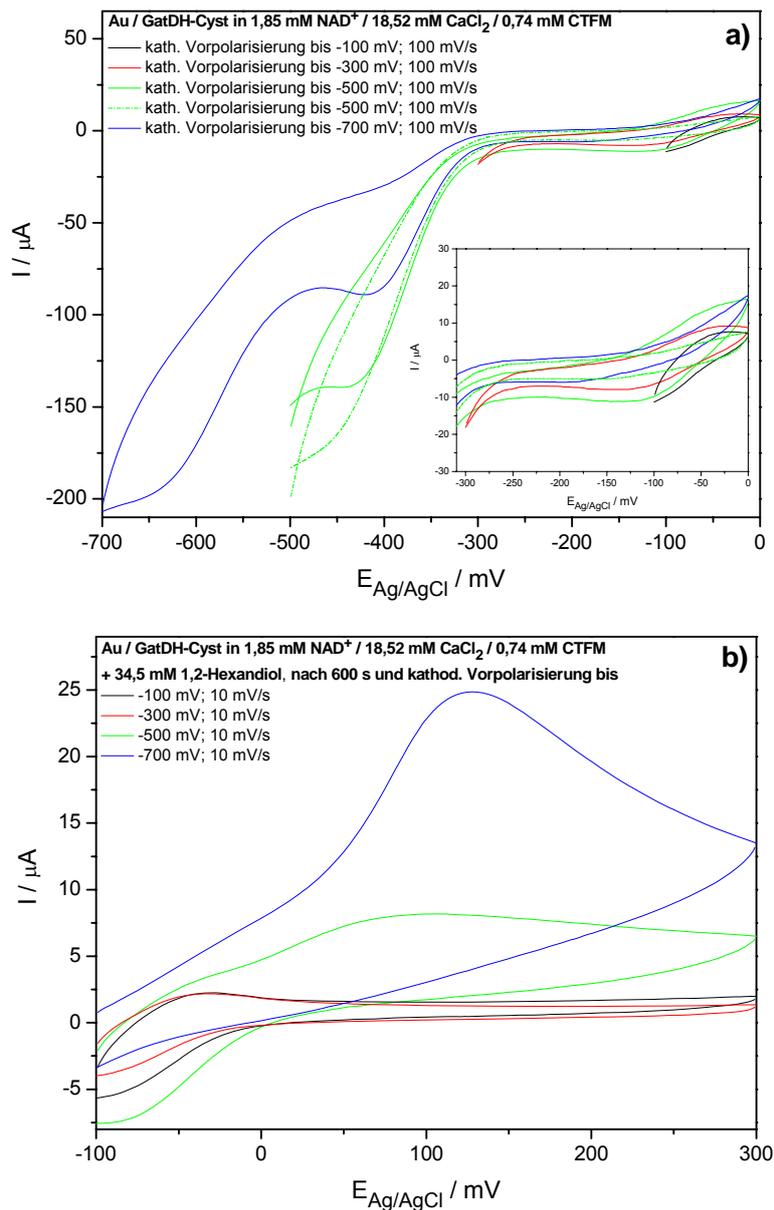
aus 1,85 mM NAD<sup>+</sup>, 18,52 mM CaCl<sub>2</sub> und 0,74 mM CTFM in 0,1 M Bis-Tris-Puffer + 1 mM MgCl<sub>2</sub> (pH 7,5) aktiviert. Dann wurden erneut 34,5 mM 1,2-Hexandiol zugegeben, zehn Minuten gewartet und anschließend das CV aufgenommen. Auch in diesem Fall ist keine NADH-Oxidation zu beobachten gewesen. Im Anschluss wurde die Vorpolarisierung in einem kathodischen Potentialbereich von -100 mV, -300 mV, -500 mV bzw. -700 mV bis 0 mV bei 100 mV/s durchgeführt und anschließend erneut die NADH-Oxidation von -100 mV bis +300 mV bei 10 mV/s untersucht.

Die Cyclovoltammogramme der kathodischen Vorpolarisierung in Abbildung 5-6 (a) zeigen beim Messen bis -100 mV bzw. -300 mV keinerlei Reaktion und somit auch keine NADH-Oxidation (Abbildung 5-6 (b), schwarz und rot).

Im Gegensatz dazu zeigen die CV-Kurven in Abbildung 5-6 (a) bei einem kathodischen Potential bis -500 mV bzw. -700 mV (grüne und blaue Kurve) die für die Aktivierung des Redoxmediators von zwei bzw. drei Nitrogruppen charakteristischen Reduktionspeaks (siehe auch Kapitel 4.1, Abbildung 4-2). Zu erkennen ist dabei auch bereits bei 0 mV der Oxidationspeak zum Erhalt des reversiblen Redoxpaares, der aufgrund der neuen Oberflächenfunktionalisierung durch GatDH-Cyst eine Potentialänderung erfahren haben könnte. Daher kann darauf geschlossen werden, dass es sich bei der kathodischen Vorpolarisierung um eine Aktivierung weiterer CTFM-Moleküle handelt.

Die Aktivierung aller drei vorhandenen Nitrogruppen und die anschließende Aufnahme der CV-Kurve der Cofaktorregenerierung zeigte sogar die besten Ergebnisse (Abbildung 5-6 (b), blau), obwohl laut Literatur der Effekt der Calciumionen am höchsten sei, wenn zwei der drei Nitrogruppen zum Hydroxylamin reduziert werden [129, 135].

## 5. Modifizierung von polykristallinen Goldelektroden mit GatDH-Cyst



**Abbildung 5-6:** CV-Kurven der kathodischen Vorpolarisierung bis -100 mV (schwarz), -300 mV (rot), -500 mV (grün) und -700 mV (blau) bei 100 mV/s (a) und anschließende Cyclovoltammogramme der Cofaktorregenerierung (b) nach Zugabe von 34,5 mM 1,2-Hexandiol bei 10 mV/s.

Die Aktivierung der Nitrogruppen vor Beginn einer Messung reduziert jeweils nur die Moleküle an CTFM, die sich in der Nähe der Elektrodenoberfläche befinden. Im Gegensatz dazu wurde der Mediator in Kapitel 4.1 zuerst immobilisiert und die anschließende Aktivierung erfolgte in mediatorfreier Pufferlösung an den adsorbierten Molekülen, so dass auch nur diese zur späteren Modifizierung zur Verfügung stehen können. Wird dagegen nach Aktivierung des in Lösung befindlichen Redoxmediators Substrat zu der NAD<sup>+</sup> / CaCl<sub>2</sub>-haltigen Lösung

zugegeben und gemessen, zeigt sich kein anodischer Oxidationspeak aufgrund der freien Beweglichkeit von CTFM in der Lösung. Die enzymatische Umsetzung findet aber offensichtlich statt und der reduzierte Cofaktor kann über Calciumbrücken an den Mediator binden. Durch die kathodische Vorpolarisierung bis zu einem Potential von -500 mV bzw. -700 mV werden weitere Mediatormoleküle aktiviert, die durch das entsprechende Potential zusammen mit NADH und  $\text{CaCl}_2$  zur Elektrode „gedrückt“ werden und somit die Elektronen übertragen. Dabei wird der reduzierte Mediator in Elektrodennähe regeneriert.

Des Weiteren spielen vermutlich sterische Effekte eine Rolle für die nicht erfolgte Co-Immobilisierung von CTFM auf zuvor modifizierten GatDH-Cyst-Elektroden. Durch das voluminöse Enzym erreicht der Mediator offensichtlich zwar die Nähe der Elektrodenoberfläche, so dass ein Elektronentransfer prinzipiell möglich ist, wird jedoch nicht zwingend adsorbiert aufgrund der sterischen Hinderung durch die GatDH-Cyst.

Zur Überprüfung eines möglichen Aktivitätsverlustes wurde die mit GatDH-Cyst modifizierte Goldelektrode nach fünftägiger Lagerung in Puffer bei 4°C erneut unter identischen Bedingungen vermessen.

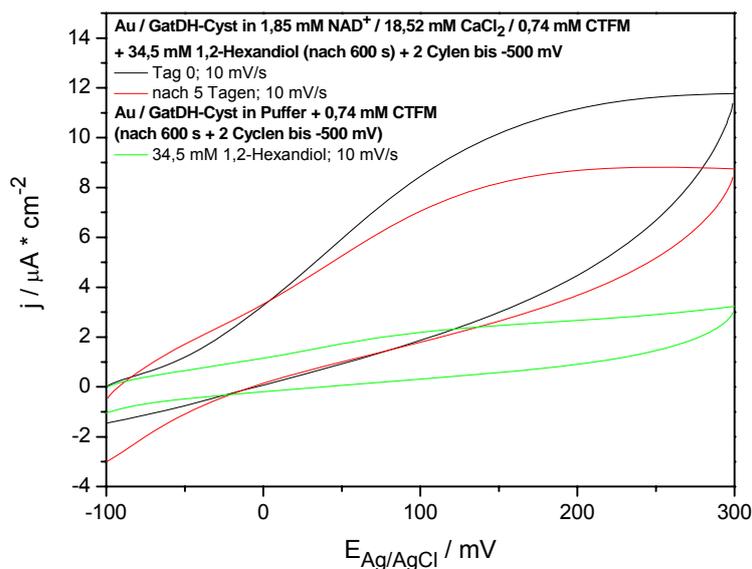
In Abbildung 5-7 ist der Vergleich einer Messung am ersten und fünften Tag (schwarze und rote Kurve) in 1,85 mM  $\text{NAD}^+$ , 18,52 mM  $\text{CaCl}_2$  und 0,74 mM CTFM in 0,1 M Bis-Tris-Puffer + 1 mM  $\text{MgCl}_2$  (pH 7,5) zu sehen. Die modifizierte GatDH-Cyst-Elektrode zeigt nach wie vor die anodische Oxidation von NADH aufgrund der Substratumsetzung. Es ist lediglich ein geringer Aktivitätsverlust von ca. 1,3% zu beobachten.

Ferner sollte die modifizierte GatDH-Cyst-Elektrode lediglich in einer Lösung aus 0,74 mM CTFM und nach Zugabe von 34,5 mM 1,2-Hexandiol gemessen werden.

Auch in diesem Fall wurde bis zu einem Potential von -500 mV gefahren, bevor die anodische Oxidation untersucht wurde, welche jedoch keine signifikanten Ergebnisse lieferte (Abbildung 5-7, grün).

Somit konnte auch eine Substratoxidation ohne benötigten Cofaktor ausgeschlossen werden.

## 5. Modifizierung von polykristallinen Goldelektroden mit GatDH-Cyst



**Abbildung 5-7:** Vergleich der CV-Kurven einer Au / GatDH-Cyst-Elektrode in  $\text{NAD}^+$  /  $\text{CaCl}_2$  / CTFM-haltiger Lösung nach Zugabe von 34,5 mM 1,2-Hexandiol und kathodischer Vorpolarisierung bis -500 mV am ersten Tag (schwarz) und nach 5 Tagen (rot). Außerdem ist das CV der GatDH-Cyst modifizierten Elektrode in 0,74 M CTFM ohne  $\text{NAD}^+$  zu sehen (grün), nach Zugabe von 34,5 mM 1,2-Hexandiol und kathodischer Vorpolarisierung bis -500 mV bei 10 mV/s.

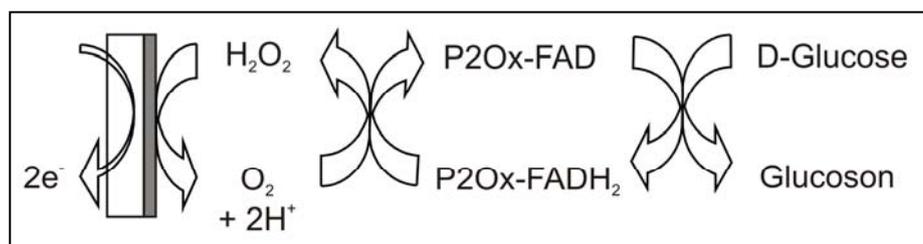
Folglich konnten bereits einige aufschlussreiche Ergebnisse bezüglich der immobilisierten GatDH-Cyst erhalten werden, deren intensivere Untersuchung noch aussteht. Zu überlegen wäre an dieser Stelle auch der Versuch einer gleichzeitigen Co-Immobilisierung von Enzym und Mediator an die Goldoberflächen, indem unterschiedliche Verhältnisse an Enzym zu Mediator getestet werden. Damit könnte der größeren Affinität von Schwefel zu Gold im Gegensatz zu Stickstoff z.B. durch einen Überschuss an CTFM entgegengewirkt werden.

Auch sollten weitere mögliche Redoxmediatoren getestet werden, wie z.B. 4-Nitrophenol oder 2-Nitrobenzoesäure. Diese Moleküle können aufgrund der vorhandenen Nitrogruppen ebenfalls zu einem reversiblen Redoxpaar aus  $\text{NHOH}/\text{NO}$  aktiviert werden, führten aber in diesem Fall noch zu keinen hinreichenden Ergebnissen bezüglich der Cofaktorregenerierung.

## 6. Modifizierung von Gold- und Platinelektroden mit P2OxB1H

Im folgenden Kapitel wurden sowohl polykristalline Gold- als auch poly- und nanokristalline Platinoberflächen mit dem Enzym Pyranose-2-Oxidase (P2Ox) modifiziert.

Ziel dieser Immobilisierung ist die Herstellung eines Sensors sowohl zur Produktion pharmazeutischer Zwischenprodukte als auch zur Synthese von Feinchemikalien.



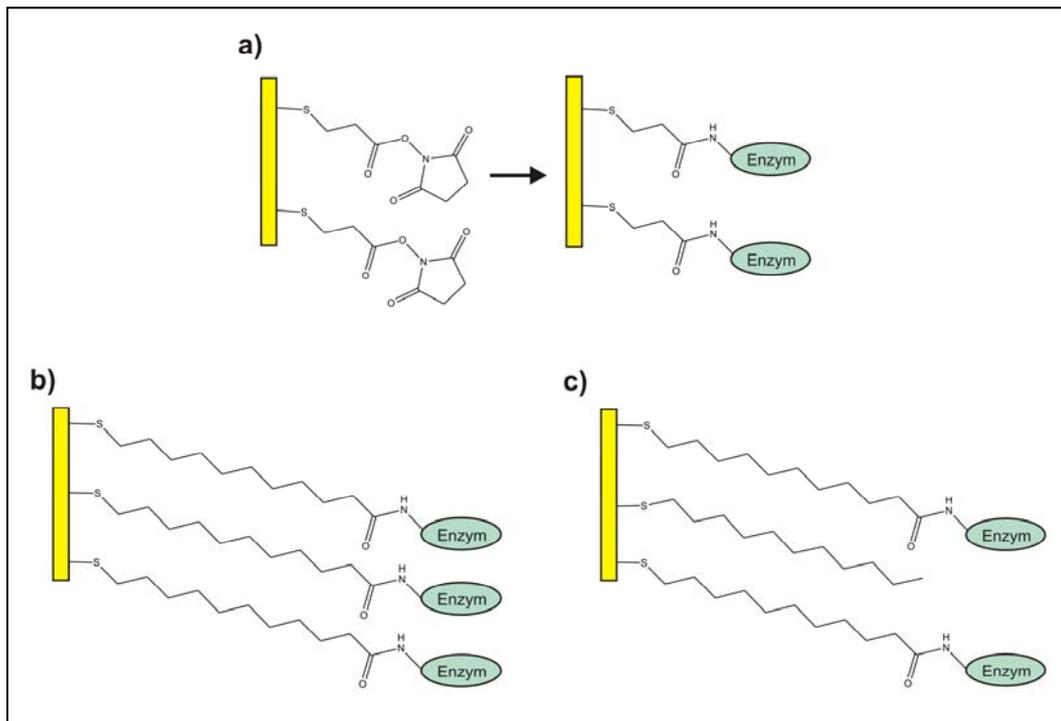
**Abbildung 6-1:** Schematische Darstellung der katalytischen Kette bei der elektroenzymatischen Oxidation von D-Glucose durch P2Ox.

So wird z.B. bei der Oxidation von D-Glucose zu 2-Keto-D-Glucose (Glucoson) das an der P2Ox kovalent gebundene FAD zu FADH<sub>2</sub> reduziert. Die Regenerierung des reduzierten Cofaktors erfolgt durch Reduktion von gelöstem Sauerstoff zu Wasserstoffperoxid, welches durch elektrochemische Oxidation an der Elektrodenoberfläche detektiert wird (Abbildung 6-1). Das Reaktionsprodukt H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> beeinflusst die Aktivität der P2Ox und kann auf diese Art direkt detektiert werden, wodurch die katalytische Kette weiterhin erhalten bleibt.

Zur Immobilisierung wurden drei verschiedene Verfahren durchgeführt:

### 1. Self-Assembled Monolayer (SAM) aus Thiolen

Aufgrund der hohen Affinität zwischen Gold und Schwefel kommt es zu einer spontanen Adsorption der Alkanthiole an die Substratoberfläche via Thiolatbindungen. Dabei entsteht eine sehr stabile und gut geordnete SAM, an die das Enzym P2OxB1H immobilisiert werden kann. Dieses Verfahren ist in der Literatur weit verbreitet und wurde vor allem an Cytochrom C [77, 82, 148], Glucose-Oxidase (GOx) [157-159] und Horseradish-Peroxidase (HRP) [72, 73, 159] untersucht.

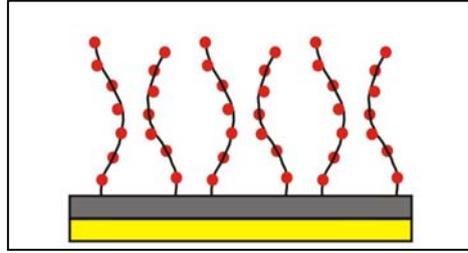


**Abbildung 6-2:** Enzymimmobilisierung durch SAM auf Gold. Kopplung mittels 3,3'-Dithiodipropionsäure di(N-Hydroxysuccinimidylester) (DTSP) (a), durch 11-Mercaptoundecansäure (11-MUA) (b) und mit einer Mischung aus 11-MUA und Undecanthiol (UDT) (c).

Dabei werden Alkanthiole mit unterschiedlichen funktionellen Gruppen zur kovalenten Immobilisierung des Enzyms verwendet, wobei meist Kupplungsreagenzien zur Aktivierung der funktionellen Gruppen eingesetzt werden müssen. Abbildung 6-2 zeigt die in diesem Fall verwendeten Alkanthiole zur P2OxB1H-Immobilisierung.

### 2. Oberflächenplasmonenresonanz auf funktionalisierten Trägern

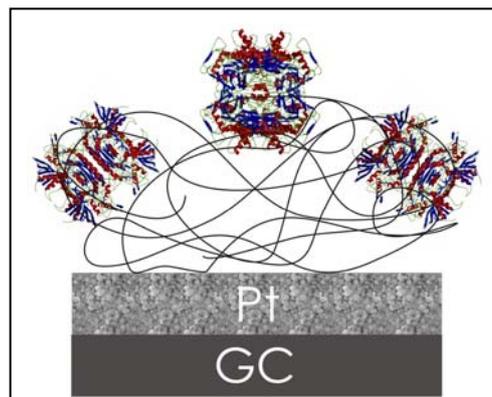
Bei diesem Verfahren wurden zur Immobilisierung der P2OxB1H vorgefertigte Sensor-Chips der Firma Biacore verwendet. Dabei handelt es sich um carboxymethylierte Dextranschichten, die kovalent an Gold gebunden sind (Abbildung 6-3). Die Kopplung des Enzyms erfolgt dabei über freie  $\text{NH}_2$ -Gruppen, nach vorheriger Aktivierung der Carboxylgruppen. Anschließend wird zur Deaktivierung aller ungekoppelten Carboxylgruppen eine Ethanolaminlösung durch die Zelle gespült.



**Abbildung 6-3:** Sensor-Chip CM5 (Biacore). Goldoberfläche (gelb) mit Dextranschicht (grau) und gebundenen Carboxylgruppen (rot).

### 3. *Elektropolymerisation*

Ein weiteres Verfahren, das zur Enzymimmobilisierung verwendet wurde, ist die Elektropolymerisation von Tyramin auf Platinoberflächen (Abbildung 6-4). Die freien  $\text{NH}_2$ -Gruppen am Tyramin werden dabei zur kovalenten Bindung der P2OxB1H verwendet, nach Aktivierung der freien Carboxylgruppen am Enzym.



**Abbildung 6-4:** nanokristallines Platin auf Glaskohlenstoff mit Polymer und P2OxB1H

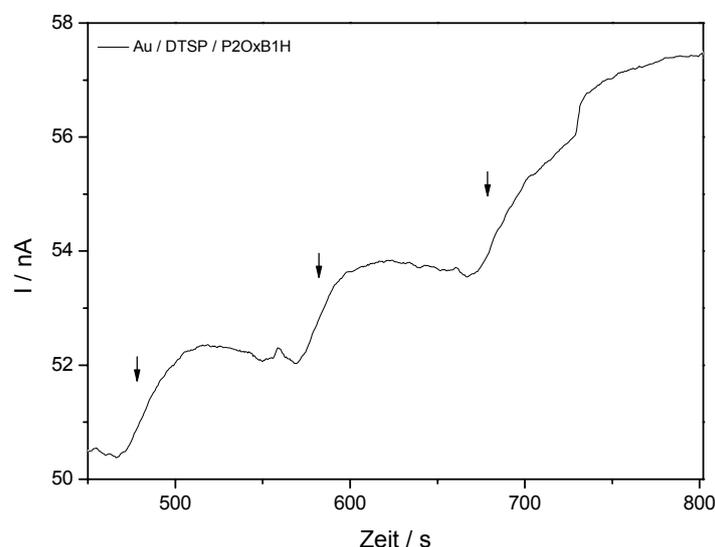
Zur Erhöhung der aktiven Oberfläche wurden nanokristalline Platinoberflächen durch galvanostatische Abscheidung hergestellt. Des Weiteren wurde das Kristallwachstum des nanokristallinen Platins untersucht und die so hergestellten Elektroden verschiedener Kristallitgrößen mit dem Enzym P2OxB1H modifiziert. Die dabei erhaltenen Ergebnisse wurden mit einem polykristallinen Platinblech verglichen, um den Einfluss der nanostrukturierten Oberfläche auf die katalytische Aktivität zu verdeutlichen.

## 6.1 Modifizierung von Goldelektroden mittels Thiolen zur Enzymimmobilisierung

a) 3,3'-Dithiodipropionsäure di(N-Hydroxysuccinimidylester) (DTSP)

Aufgrund der Adsorption von DTSP auf Gold unterliegen die Disulfide einer dissoziativen Chemisorption zu den korrespondierenden adsorbierten Thiolaten. Die Immobilisierung der P2OxB1H erfolgt dabei durch den nukleophilen Angriff der primären Aminogruppen des Enzyms an die terminalen N-Hydroxysuccinimidylester der SAM [72, 73, 159].

Zur Modifizierung wurden in einem ersten Schritt die Goldelektroden über Nacht in eine 10 mM Lösung aus DTSP in Aceton eingetaucht und anschließend mit Aceton und dest. Wasser gespült. Im zweiten Schritt wurden die DTSP-modifizierten Goldoberflächen in 9 U/mL P2OxB1H für 1h bei 4 °C inkubiert und die nicht gekoppelten DTSP-Gruppen mittels einer Lösung aus 10 mM Ethanolamin für 1h bei RT deaktiviert. Im Anschluss wurden die modifizierten Elektroden mit dest. Wasser gespült und chronoamperometrisch untersucht.



**Abbildung 6-5:** Strom-Zeit-Kurve einer Goldelektrode funktionalisiert mit DTSP und P2OxB1H bei einem Potential von +600 mV vs. Ag/AgCl und Zugabe definierter Mengen einer 0,5 M Glucosestammlösung (Pfeile).

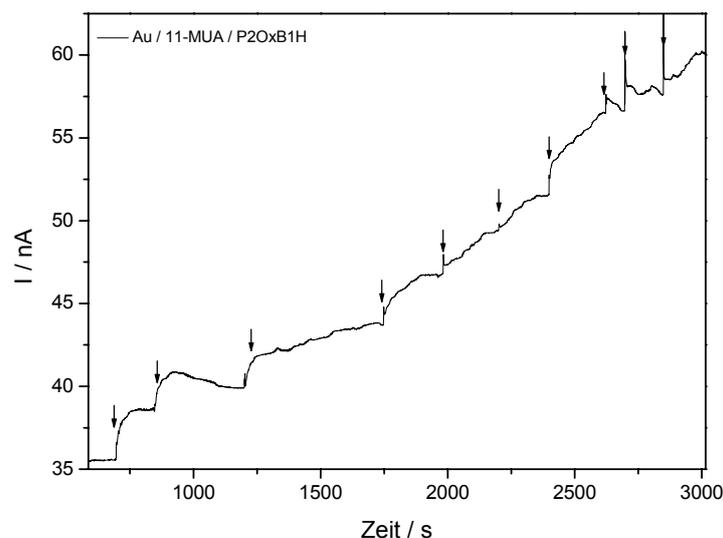
## 6. Modifizierung von Gold- und Platinelektroden mit P2OxB1H

Die modifizierten Elektroden wurden in 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7) getaucht und unter Rühren bei einem Potential von +600 mV vs. Ag/AgCl gemessen. Durch Zugabe definierter Konzentrationen einer 0,5 M Glucosestammlösung wurde jeweils der Strom nach Einstellung des Gleichgewichts gemessen. Anhand der Strom-Zeit-Kurve in Abbildung 6-5 sind Ansätze eines „stufenförmigen“ Verlaufs zu erkennen, jedoch ist aufgrund der geringen Anzahl an messbaren Glucosekonzentrationen keine Auftragung in einem Michaelis-Menten-Plot möglich.

Bei DTSP handelt es sich um ein Thiol mit einer Kettenlänge von lediglich drei Kohlenstoffatomen, so dass eine Enzymdenaturierung aufgrund dieser kurzen Kette nicht ausgeschlossen werden kann. Des Weiteren bilden langkettige Alkanthiole geordnetere Strukturen auf Gold als Kurz-kettige [78, 160, 161]. Daher wurde im Folgenden eine längere Kohlenstoffkette zur Immobilisierung der P2OxB1H verwendet.

b) 11-Mercaptoundecansäure (11-MUA) mit und ohne Zusatz von Undecanthiol (UDT) [70, 77, 81, 148, 162-164]

Analog zur Modifizierung mittels DTSP wurde eine SAM aus 11-MUA auf die Goldoberflächen adsorbiert. Dazu wurden die Elektroden über Nacht in einer Lösung aus 10 mM 11-MUA in Ethanol inkubiert, mit Puffer gespült und anschließend für 1 ½ Stunden in eine Lösung aus 15 mM EDC und 50 mM NHS getaucht.



**Abbildung 6-6:** Strom-Zeit-Kurve einer mit 11-MUA-modifizierten Goldelektrode mit P2OxB1H bei +600 mV vs. Ag/AgCl. Die Pfeile kennzeichnen die jeweilige Substratzugabe.

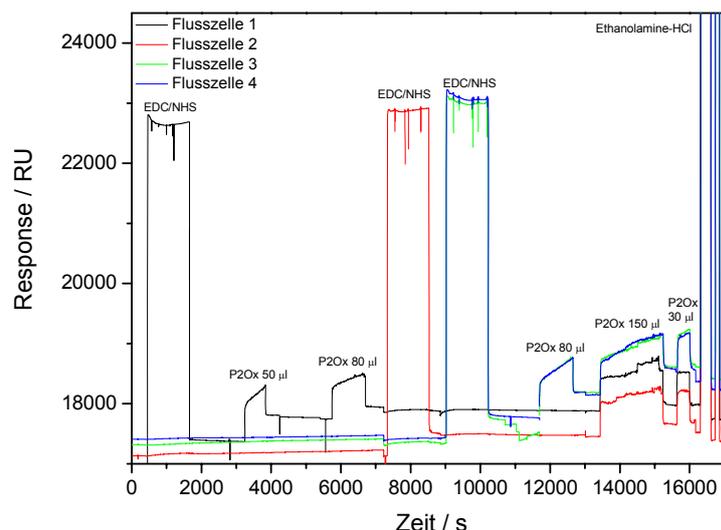
## 6. Modifizierung von Gold- und Platinelektroden mit P2OxB1H

Die durch die Kupplungsreagenzien aktivierten 11-MUA-modifizierten Goldelektroden wurden mit Puffer gespült, für 1 ½ Stunden bei RT in eine Lösung aus 9 U/mL P2OxB1H getaucht und erneut gespült.

Auch in diesem Fall wurde in 0,1 M Kaliumphosphat-Puffer (pH 7) bei einem Potential von +600 mV vs. Ag/AgCl der Strom aufgrund der Zugabe definierter Mengen an Glucose chronoamperometrisch gemessen. Dieser zeigte jedoch keine gute Gleichgewichtseinstellung nach Substratzugabe, was durch den stetigen Anstieg belegt wird (Abbildung 6-6). Die Immobilisierung mittels 11-MUA und UDT (1:3) erfolgte analog und zeigte, dass eine Immobilisierung prinzipiell möglich ist, jedoch führte auch diese Modifizierung zu wenig reproduzierbaren Ergebnissen.

### c) Oberflächenplasmonenresonanz (SPR)

Zur besseren Kontrolle der einzelnen Immobilisierungsschritte wurde das Verfahren der Oberflächenplasmonenresonanz angewandt. Dabei wurde der vorgefertigte Sensor-Chip in die SPR-Anlage eingelegt und zunächst eine Lösung aus EDC/NHS zur Aktivierung der COOH-Gruppen durch die Zelle gespült. Im Anschluss wurde die P2OxB1H durch die Flusszelle gespült und die unbesetzten Carboxylgruppen mittels Ethanolamin deaktiviert (Abbildung 6-7).

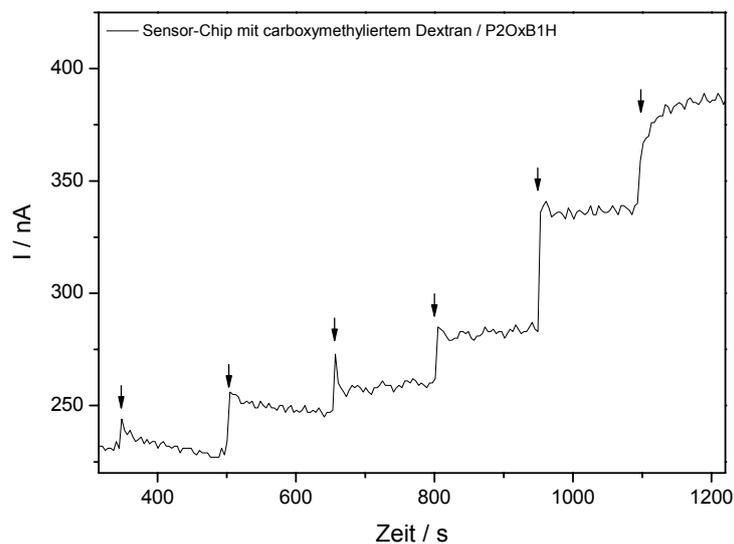


**Abbildung 6-7:** SPR-Messung einer Goldelektrode mit carboxymethylierter Dextranschicht. Aktivierung aller vier Flusszellen und Immobilisierung von P2OxB1H (1RU ~ 1 pg Protein/mm<sup>2</sup>).

## 6. Modifizierung von Gold- und Platinelektroden mit P2OxB1H

Nach der Modifizierung müssen die so funktionalisierten Elektroden zunächst aus der Plastikummantelung gelöst und kontaktiert werden. Im Anschluss wurden die modifizierten Goldelektroden mittels Chronoamperometrie bei einem Potential von +600 mV vs. Ag/agCl und durch Zugabe definierter Mengen einer 0,5 M GlucosestammLösung unter Rühren vermessen.

Das in Abbildung 6-8 erhaltende Strom-Zeit-Diagramm zeigt dabei bereits eine wesentlich bessere Einstellung des Gleichgewichts nach jeder Zugabe von Glucose, womit die Immobilisierung der P2OxB1H in diesem Fall verbessert werden konnte. Auch waren diese Elektroden über mehrere Tage stabil.



**Abbildung 6-8:** Strom-Zeit-Kurve des mittels SPR modifizierten Sensor-Chips bei +600 mV vs. Ag/AgCl und sukzessiver Substratzugabe (Pfeile).

Das SPR-Verfahren bietet dabei die Möglichkeit der genauen Kontrolle der einzelnen Modifizierungsschritte. Dadurch kann direkt geschlussfolgert werden, ob die Immobilisierung der P2OxB1H erfolgreich war oder nicht.

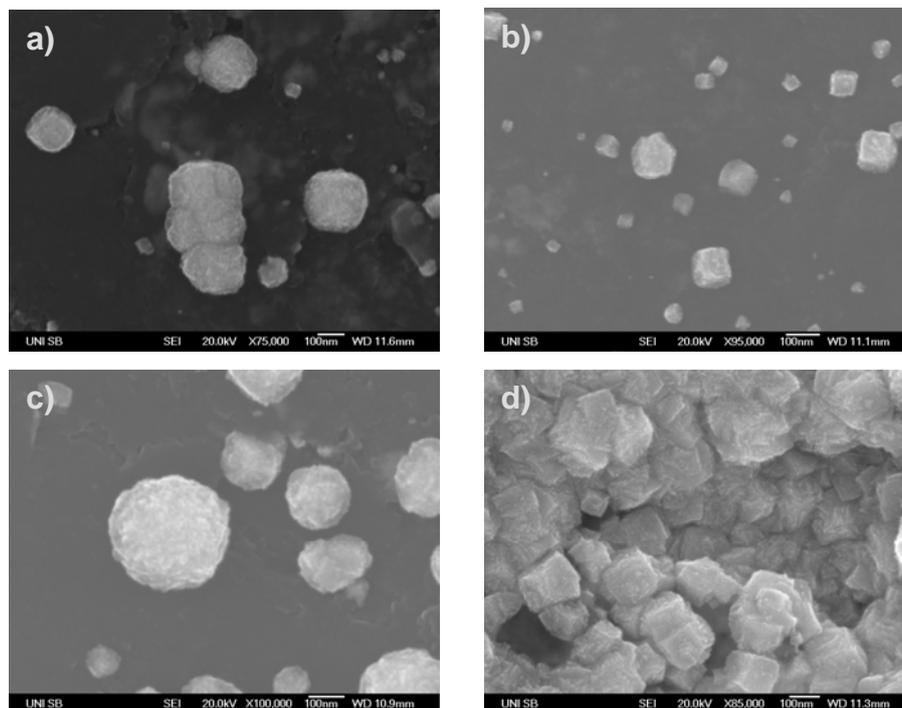
Jedoch ist dieses Verfahren in seiner Herstellung teuer, da nur vorgefertigte Chips verwendet werden können. Auch muss die Elektrode zunächst aus der Ummantelung gelöst und kontaktiert werden. Dies kann leicht zu einem Zerschneiden der dünnen Oberfläche führen. Während dieser Prozedur ist auch eine Denaturierung des Enzyms denkbar. Aus den geschilderten Gründen wurde dieses Verfahren somit nicht weiter untersucht.

## 6.2 Modifizierung von nanokristallinem Platin mit P2OxB1H mittels Elektropolymerisation von Tyramin

### 6.2.1 Herstellung der nanokristallinen Platinelektroden

Zur Erzeugung einer großen aktiven Oberfläche wurden im Folgenden zunächst nanokristalline Platinoberflächen für die spätere Enzymimmobilisierung hergestellt. Diese nanokristallinen Platinelektroden wurden mittels galvanostatischer Abscheidung bei einer Stromdichte von  $-1 \text{ mA/cm}^2$  auf Glaskohlenstoff (GC) hergestellt. Als Bezugselektrode wurde  $\text{Hg/HgSO}_4$  und als Gegenelektrode GC verwendet.

In Abbildung 6-9 sind die Platinabscheidungen aus 2 wt%  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  in 0,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  auf Glaskohlenstoffoberflächen bei 30 s (a), 45 s (b), 60 s (c) und 300 s (d) gezeigt. Deutlich zu erkennen ist dabei das unterschiedliche Wachstum der einzelnen Platindomänen, was auf eine progressive Keimbildung schließen lässt [165-167]. Die Nukleation erfolgt während der gesamten Abscheidung, wie durch Abbildung 6-9 (b) anhand der unterschiedlich großen Kristallite deutlich wird.



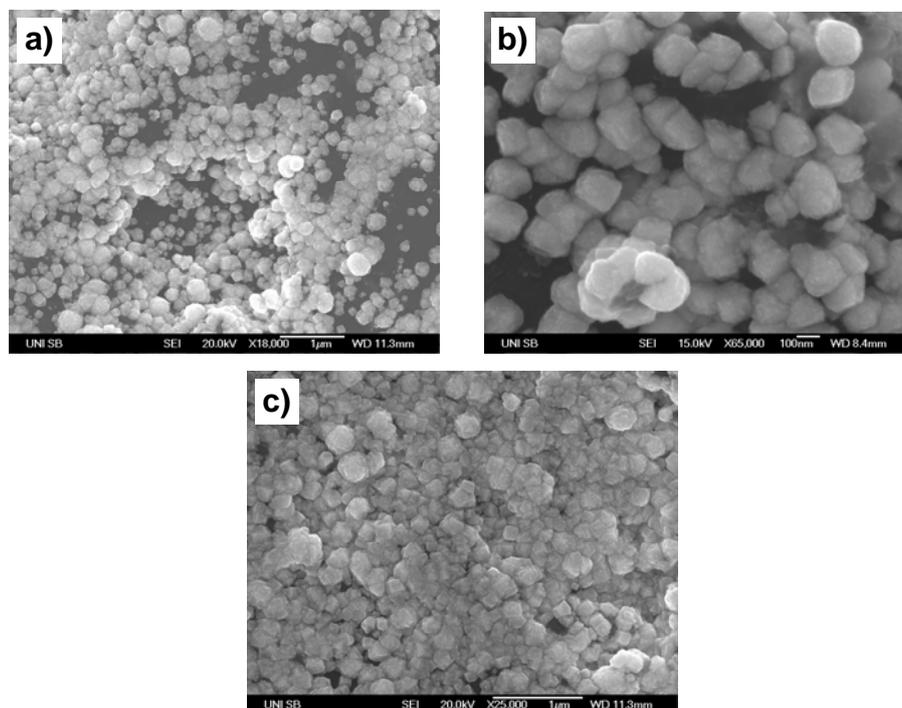
**Abbildung 6-9:** REM-Aufnahmen der Glaskohlenstoffoberflächen nach 30 s (a), 45 s (b), 60 s (c) und 300 s (d) Abscheidung von Platin aus 2 wt%  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  in 0,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bei  $-1 \text{ mA/cm}^2$ .

## 6. Modifizierung von Gold- und Platinelektroden mit P2OxB1H

Des Weiteren können die unterschiedlichen Formen der Platinkristallite von kubisch zu kugelförmig in Abbildung 6-9 (b) und (c) beobachtet werden.

Die Kristallitform und Art des Wachstums sind dabei sowohl von den Abscheidungsbedingungen und den zugesetzten Additiven als auch von den Eigenschaften des verwendeten Substrats abhängig.

Während auf nativem Substrat entweder ein 2D-Schichtwachstum oder das komplexere Schicht-Insel-Wachstum nach Stranski-Krastanov favorisiert werden, handelt es sich bei der Abscheidung auf fremdem Substrat wie Glaskohlenstoff um ein 3D-Inselwachstum nach Volmer-Weber (siehe Kapitel 2.5.2). Bei Glaskohlenstoff handelt es sich um ein inertes Material, so dass es sich aufgrund der später folgenden Modifizierungen als am besten geeigneter Untergrund herausstellte. Die REM-Aufnahmen in Abbildung 6-10 (a) zeigen das bevorzugte Inselwachstum auf Glaskohlenstoffoberflächen. Das Partikelwachstum findet dabei bevorzugt an Defekten wie Stufenkanten oder Terrassen statt. Auch einzelne Defekte an Terrassen wie z.B. Lücken sind dabei zur Keimbildung geeignet [168]. In Abbildung 6-10 (b) ist das bevorzugte Inselwachstum an diesen Defektstellen zu erkennen. Der dunkelgraue Glaskohlenstoffuntergrund zeigt Abplatzungen, in dessen Mulden die Abscheidung der Platindomänen begünstigt wird.

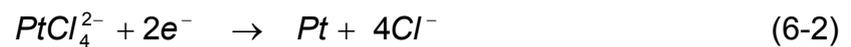
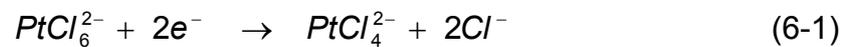


**Abbildung 6-10:** REM-Aufnahmen der Platinabscheidung aus 2 wt%  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  auf Glaskohlenstoff mit Inselwachstum (a), bevorzugte Adsorption an Defekten (b) und Bedeckung der gesamten Oberfläche bei Platinabscheidungen von mehr als 5 Minuten (c).

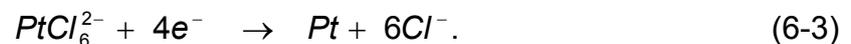
Aus dem anfänglichen 3D-Inselwachstum bildet sich bei Abscheidungen über einen längeren Zeitraum (> 5 Minuten) eine einheitliche, dichte Oberfläche (Abbildung 6-10 (c)).

Zur Bestimmung der Kristallitgröße wurden die oben hergestellten nanokristallinen Platinoberflächen mittels XRD charakterisiert. Die Teilchengröße beträgt unter den obigen Bedingungen bei der Abscheidung aus Platin (IV) 10 nm und wurde wie in Kapitel 2.6.1 beschrieben, berechnet.

Die elektrochemische Abscheidung von Platin erfolgt entweder in zwei Schritten oder in einem 4-Elektronen-Prozess [169, 170]:



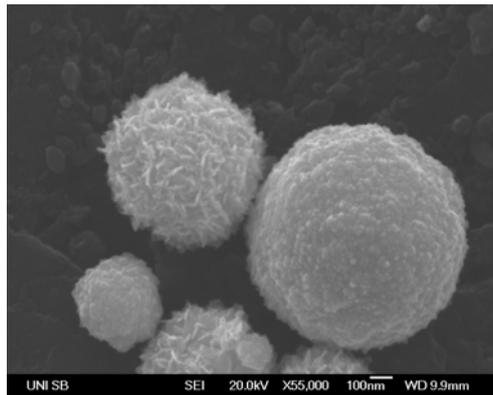
und / oder



Die Bildung von  $\text{PtCl}_4^{2-}$  während der Platinreduktion lässt sich dabei laut Feltham und Spiro [170] auf die im Strom-Spannungsdiagramm mehr als eine vorhandene „Welle“ begründen. Des Weiteren wurden die Elektrodenprodukte nach verschiedenen Zeiten untersucht und eine Farbänderung von gelb nach dunkelrot beobachtet, die charakteristisch für Pt (II) ist. Eine Hydrolyse von Pt (IV) konnte in diesem Fall aufgrund der Verwendung von Schwefelsäure ausgeschlossen werden.

Auch die Zugabe von Chloridionen kann einen nachteiligen Effekt ausüben: Bei kleinen Chloridkonzentrationen unterzieht sich Pt (II) einer schnellen Reduktion oder Disproportionierung, vor allem wenn  $\text{H}_2\text{SO}_4$  als Elektrolyt verwendet wird. Im Gegensatz dazu ist die Reduktion von Pt (II) zu Pt (0) bei hohen Chloridkonzentrationen kathodisch polarisiert, wodurch sich eine Hemmung des Reduktionsprozesses bemerkbar macht [169, 170].

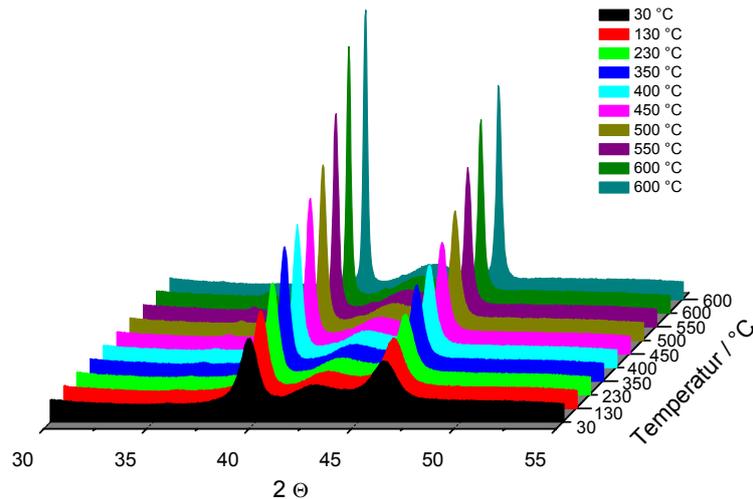
Aufgrund der schnelleren Reduktion von Pt (II)-Salzen wurde die Abscheidung aus  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  mit der Abscheidung aus  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$  verglichen. Im Fall von Platin (II) ist dabei ein wesentlich schnelleres Wachstum der Platindomänen nach bereits 60 s zu beobachten (Abbildung 6-11). Nach der kurzen Abscheidungszeit sind im Gegensatz zu Platin (IV) die gemischten Kristallitformen an Platin von kubisch zu kugelförmig in diesem Fall nicht mehr zu beobachten. Lediglich die kugelförmigen Platindomänen sind zu erkennen.



**Abbildung 6-11:** REM-Aufnahme einer Platinabscheidung auf Glaskohlenstoff aus 2 wt%  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$  in 0,5 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  nach 60 s.

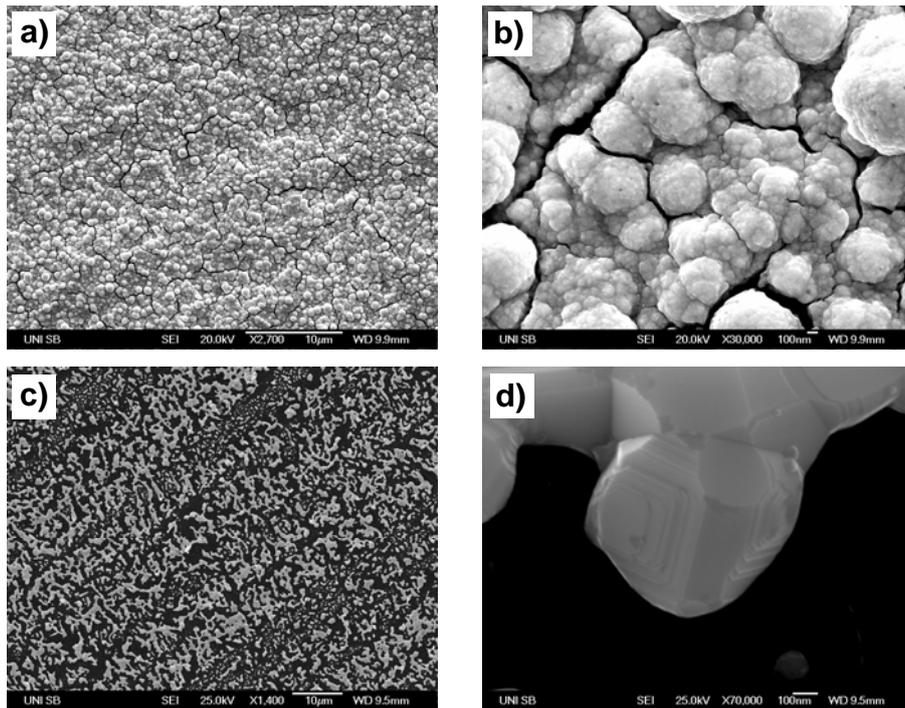
Durch die Ausbildung von feinen nadelförmigen Substrukturen auf den Oberflächen wurde von einer größeren aktiven Oberfläche ausgegangen. Jedoch ist der Unterschied laut XRD-Messungen äußerst gering. Die Kristallitgröße nach Abscheidung aus Platin (II) beträgt 7,8 nm.

Des Weiteren wurde die Wachstumskinetik der aus  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$  hergestellten nanostrukturierten Platinelektroden mittels XRD unter Wasserstoff-Atmosphäre beobachtet und charakterisiert. Abbildung 6-12 zeigt das Diffraktogramm von Platin mit den einzelnen Bragg-Reflexen. Nach jedem Temperaturanstieg wurde ein neues Diffraktogramm aufgenommen und im Anschluss die Temperatur weiter erhöht. Deutlich ist die Abnahme der mittleren Halbwertsbreite mit zunehmender Temperatur zu erkennen. Dadurch lässt sich ein Wachstum von 7,8 nm zu Beginn bis zu 90 nm bei 600 °C, unter Berücksichtigung der instrumentellen Parameter sowie der Mikrospannungen (siehe Kapitel 2.6.1), beobachten.



**Abbildung 6-12:** Diffraktogramme von Platin (111) und (200) Bragg-Reflexen in Abhängigkeit von der Temperatur (GC-Peak bei  $42,87^\circ$  ( $2\theta$ )).

Die REM-Aufnahmen in Abbildung 6-13 zeigen die bis  $600^\circ\text{C}$  bzw.  $800^\circ\text{C}$  getemperten Platinoberflächen. Ab einer Temperatur von  $600^\circ\text{C}$  sind sowohl größere Platindomänen zu erkennen als auch leichte Risse in der Oberflächenstruktur. Dies ist durch die entstehende größere Oberflächenspannung während des Hochheizens bedingt. Ab einer Temperatur von  $800^\circ\text{C}$  beginnen die Platininseln schließlich miteinander zu verwachsen. Dies kann dadurch erklärt werden, dass bei einer Abscheidung bei Raumtemperatur viele Defekte innerhalb der nanostrukturierten Proben zu finden sind. Diese Defekte und Lücken zwischen den einzelnen Domänen verschwinden durch Erhöhung der Temperatur zunehmend und bewirken somit ein Zusammenwachsen der einzelnen Domänen zu größeren Kristalliten [171-173]. Dabei sind auf der Oberfläche deutlich pyramidenartige Stapelungen von Schichten zu erkennen (Abbildung 6-13 (d)). Diese entstehen aufgrund der Inhomogenität der einzelnen Platindomänen. Es handelt sich hierbei um Platindomänen auf deren Oberfläche sich Unebenheiten befinden, welche durch die stetige Temperaturerhöhung schließlich in sich zusammenwachsen. Dadurch geht die inhomogene Oberfläche in einen schichtähnlichen Aufbau über.

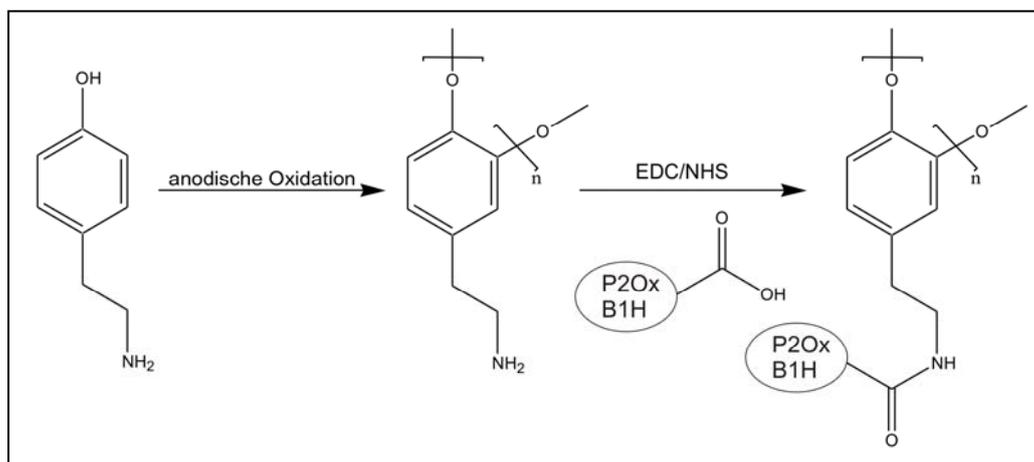


**Abbildung 6-13:** REM-Aufnahmen der Platinabscheidungen nach Hochheizen bis 600 °C (a) und (b) bzw. nach Hochheizen bis 800 °C (c) und (d).

Für die späteren elektroenzymatischen Untersuchungen wurden sowohl die nanokristallinen Platinoberflächen von 7,8 nm bzw. 10 nm Größe als auch die 90 nm großen nanostrukturierten Platinteilchen verwendet. Die Abscheidungen wurden bei einer Stromdichte von  $-1 \text{ mA/cm}^2$  für 20 Minuten durchgeführt. Somit ist gewährleistet, dass es sich nach der Abscheidung von nanokristallinem Platin um eine geschlossene Schicht handelt, bei der das darunter liegende Substrat Glaskohlenstoff nicht an der Reaktion teilnehmen kann.

### 6.2.2 Elektropolymerisation und Modifizierung mit P2OxB1H

Elektrochemische Methoden wie die Elektropolymerisation bieten sowohl eine gute Möglichkeit zur Kontrolle des Polymerwachstums als auch der Schichtdicke des Polymerfilms [64, 65, 174]. Des Weiteren ist die Elektropolymerisation unter milden Bedingungen wie z.B. im wässrigen Medium und bei Raumtemperatur durchführbar. Die Elektropolymerisation von Tyramin stellt dabei eine interessante Methode in der Biosensorentwicklung dar. Sie zeichnet sich durch Sensitivität, Selektivität, Stabilität und Reproduzierbarkeit aus. Die Polymerisation findet dabei in ortho-Position zur Hydroxylgruppe am phenolischen Ring statt (Abbildung 6-14).

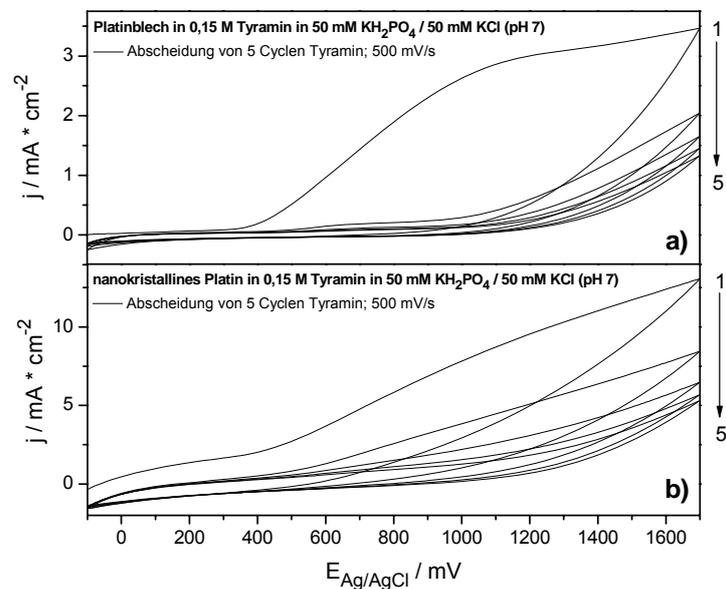


**Abbildung 6-14:** Elektropolymerisation von Tyramin und kovalente Bindung zur P2OxB1H

Die  $\text{NH}_2$ -Gruppen sind durch zwei Methylgruppen vom Phenolring getrennt, so dass nur das Phenol zur Durchführung der Polymerisation oxidiert wird [175]. Nach der oxidativen Polymerisation besitzt das schwach leitende Polytyramin somit freie  $\text{NH}_2$ -Gruppen, die zur kovalenten Immobilisierung von Enzymen wie P2OxB1H geeignet sind (Abbildung 6-14). Zur Förderung der Polymerisation werden bevorzugt hochleitende Materialien wie Gold [176], Platin [175] aber auch Glaskohlenstoff [66] verwendet und der Prozess mittels cyclischer Voltammetrie beobachtet. Zur Elektropolymerisation wurden im Folgenden sowohl ein Platinblech als auch die in Kapitel 6.2.1 hergestellten nanokristallinen Platinoberflächen verwendet.

### a) Elektropolymerisation und Charakterisierung von Tyramin

Für die anodische Oxidation von Tyramin wurde das Monomer in einer 2:1-Mischung aus 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  / 50 mM KCl-Puffer (pH 7) und Ethanol gelöst. Die Endkonzentration betrug dabei 0,15 M Tyramin. Mittels cyclischer Voltammetrie in einem Potentialbereich von -100 mV bis + 1,7 V wurde anschließend die irreversible Oxidation von Tyramin untersucht. Die Vorschubgeschwindigkeit betrug 500 mV/s und als Gegenelektrode wurde ein Platindraht verwendet.

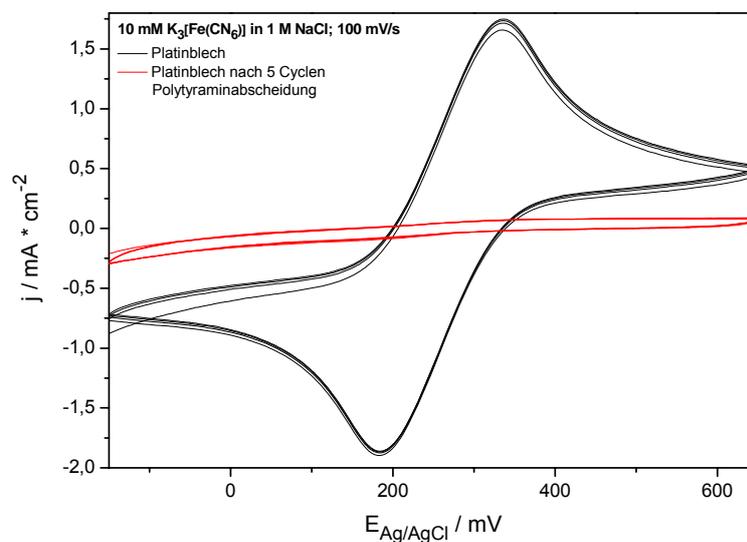


**Abbildung 6-15:** Cyclische Voltammogramme der Elektropolymerisation von Tyramin auf einem Platinblech (a) und auf einer nanokristallinen Platinoberfläche (b) bei 500 mV/s vs. Ag/AgCl in 0,15 M Tyramin in einer 2:1-Mischung aus 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  / 50 mM KCl (pH 7) und Ethanol.

In Abbildung 6-15 ist die oxidative Polymerisation von Tyramin auf einem Platinblech (a) und auf nanokristallinem Platin (b) zu sehen. Im ersten Cyclus ist der irreversible Oxidationspeak noch detektierbar. Mit zunehmender Anzahl an Cyclen nimmt der anodische Strom jedoch aufgrund der sich bildenden Polymerschicht immer weiter ab. Somit kann es zu einer Passivierung auf der Elektrodenoberfläche mit steigender Anzahl an Cyclen kommen [64, 65]. Sowohl Tran et al. als auch Tenreiro et al. [175] hingegen widerlegen diese Art von Passivierung. Der Strom nimmt zunächst zwar für etwa die ersten zehn bis fünfzehn Cyclen aufgrund der Polymerisation ab, beginnt dann aber wieder leicht zu steigen [177]. Situmorang et al. konnten zeigen, dass bei

einer Abscheidung von fünf Cyclen Tyramin das Antwortsignal von Apfelsäure ca. acht Minuten benötigt und die Scangeschwindigkeit während der Elektropolymerisation einen Einfluss auf die Schichtdicke des Filmes und somit auch auf die zur Elektrode gelangende Menge an  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei der Glucoseoxidation durch GOx hat [178, 179].

Zur Untersuchung der Oberflächenmodifizierung wurden zum einen cyclovoltammetrische Messungen durchgeführt. Zum anderen wurde die mit Polytyramin modifizierte Platinoberfläche mittels Impedanzspektroskopie untersucht.

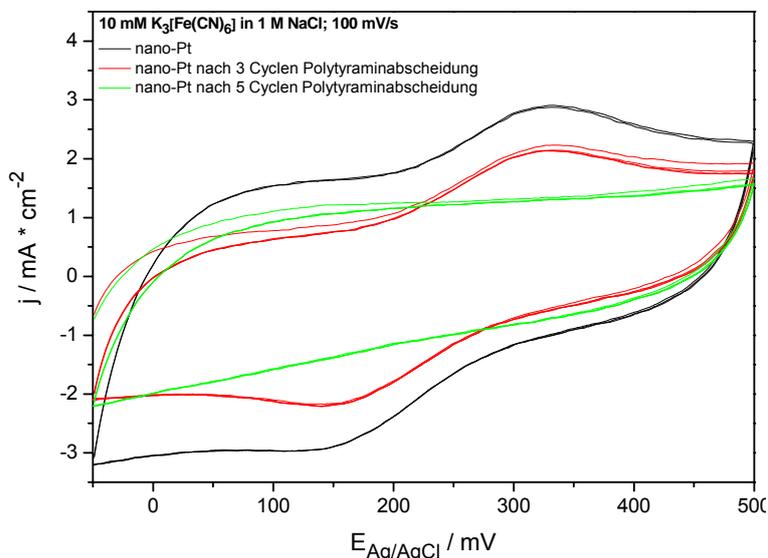


**Abbildung 6-16:** Cyclovoltammogramme eines unmodifizierten Platinblechs (schwarz) in 10 mM  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  in 1 M NaCl vs. Ag/AgCl und eines mit Tyramin modifizierten Platinblechs (rot) mit GC als Gegenelektrode und  $v = 100 \text{ mV/s}$ .

Anhand von Abbildung 6-16 ist die einheitliche Membranschicht durch die Elektropolymerisation von Tyramin zu erkennen. Die cyclovoltammetrische Messung eines unmodifizierten Platinblechs in 10 mM  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  in 1 M NaCl vs. Ag/AgCl mit  $v = 100 \text{ mV/s}$  und GC als Gegenelektrode zeigt das reversible Redoxpaar  $\text{Fe}^{\text{II}} / \text{Fe}^{\text{III}}$  mit einem Oxidationspeak bei +330 mV und einem Reduktionspeak bei +180 mV. Im Gegensatz dazu zeigt dieselbe Messung nach der Elektropolymerisation von Tyramin bei 500 mV/s und 5 Cyclen kein reversibles Verhalten mehr. Somit kann darauf geschlossen werden, dass bereits eine anodische Oxidation mit nur 5 Cyclen zu einem sehr dichten Polymerfilm auf der polykristallinen Platinoberfläche führt.

Entsprechend wurde auch nanokristallines Platin mit Tyramin modifiziert und der reversible Peakverlauf des Redoxsystems  $\text{Fe}^{\text{II}} / \text{Fe}^{\text{III}}$  untersucht (Abbildung 6-17). In

diesem Fall wurde Polytyramin zunächst in 3 Cyclen abgeschieden und zeigte dabei nach wie vor einen reversiblen Peakverlauf. Der Oxidations- und Reduktionsstrom liegen bei +300 mV bzw. +150 mV, zeigen jedoch bereits eine geringere Stromdichte als das unmodifizierte nanokristalline Platin.



**Abbildung 6-17:** CV-Kurven einer unmodifizierten nanokristallinen Platinelektrode (schwarz) in 10 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] in 1 M NaCl vs. Ag/AgCl, nach Abscheidung von 3 Cyclen Tyramin (rot) und nach 5 Cyclen Tyraminabscheidung (grün) mit GC als Gegenelektrode und  $v = 100 \text{ mV/s}$ .

Bereits bei einer Abscheidung von 5 Cyclen Tyramin ist auch in diesem Fall kein reversibler Peakverlauf mehr zu erkennen. Somit konnte gezeigt werden, dass bereits 5 Cyclen bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 500 mV/s zur Bildung eines einheitlichen und sehr dichten Polymerfilms ausreichen.

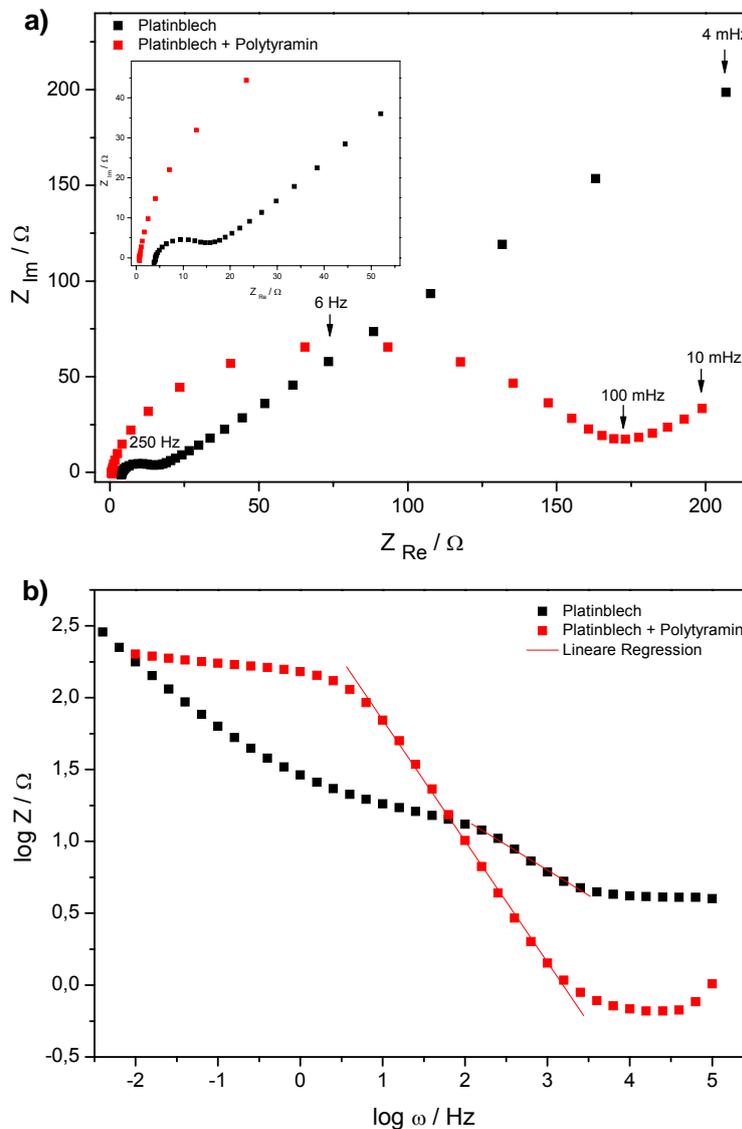
Die impedanzspektroskopischen Untersuchungen wurden an einem unmodifizierten und mit Polymer modifizierten Platinblech durchgeführt. Zu erwarten ist ein deutlich höherer Durchtrittswiderstand aufgrund der abgeschiedenen Polymerschicht auf der Elektrodenoberfläche.

Als Redoxpaar wurde eine 1:1-Mischung aus 10 mM K<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>] und 10 mM K<sub>4</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>]\*3H<sub>2</sub>O verwendet, in einem Messbereich von 100 kHz bis 10 mHz und einer Amplitude von 20 mV. Als Bezugslektrode wurde Hg/HgSO<sub>4</sub> und als Gegenelektrode ein Platinblech verwendet.

In Abbildung 6-18 sind die Auftragungen nach Nyquist und Bode dargestellt. Zu erkennen ist eine deutliche Zunahme des Durchtrittswiderstandes  $R_D$  von 14,10  $\Omega$  für

## 6. Modifizierung von Gold- und Platinelektroden mit P2OxB1H

ein unmodifiziertes Platinblech zu  $163,72 \Omega$  für ein mit Polytyramin modifiziertes Platinblech. Der Elektrolytwiderstand  $R_E$  beträgt  $4,08 \Omega$  für ein unmodifiziertes bzw.  $0,69 \Omega$  für ein modifiziertes Platinblech. Die Widerstände wurden gemäß Kapitel 2.1.3 (Abbildung 2-7) aus den jeweiligen Auftragungen bestimmt [180-182].



**Abbildung 6-18:** Elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS) mit der Auftragung nach Nyquist (a) und Bode (b) eines unmodifizierten (schwarz) und mit Polytyramin modifizierten Platinbleches (rot) von 100 kHz bis 10 mHz und einer Amplitude von 20 mV.

Die Variation des  $R_E$ -Wertes lässt sich durch Konzentrationsunterschiede des Redoxpaares sowie durch Abweichungen in der Position von Bezugs- und Gegenelektrode begründen. Jedoch zeigt der um ca.  $150 \Omega$  größere Durchtrittswiderstand, dass sich das Polytyramin auf der Elektrodenoberfläche

befindet. Somit konnte die Anwesenheit des Polymerfilms sowohl durch cyclische Voltammetrie als auch durch Impedanzspektroskopie nachgewiesen werden.

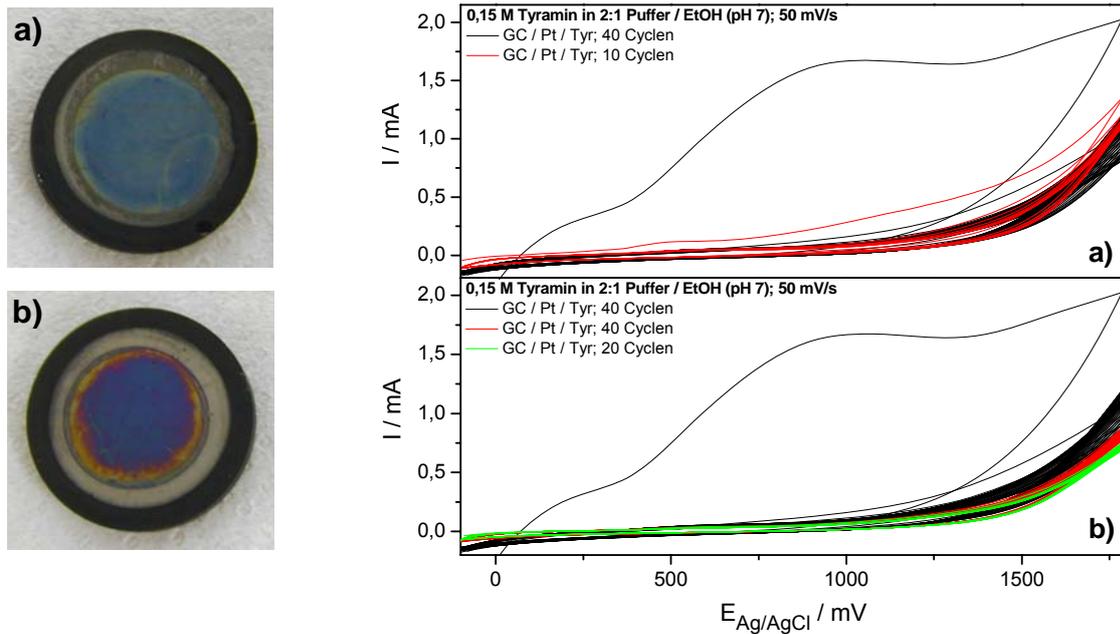
Nach Losic et al. lässt sich die Dicke des abgeschiedenen Polymerfilms anhand der Anzahl an Cyclen und der Scanrate bestimmen [64]. Je höher die Scanrate desto geringer ist die Dicke des Polymerfilms. Laut Losic et al. ergibt sich bei einer Vorschubgeschwindigkeit von 500 mV/s und 10 Cyclen eine 5-6 nm dicke Polymerschicht auf der Elektrodenoberfläche. Zudem führt die Erhöhung der Scanrate zu einem linearen Anstieg des Oxidationspotentials, so dass ein diffusionskontrollierter Prozess vorliegt [64].

Tran et al. dagegen beschreiben die Elektropolymerisation bei 50 mV/s und erhalten dabei Schichtdicken von bis zu 1,2  $\mu\text{m}$  bei einer Abscheidung von 250 Cyclen [177]. Jedoch ergibt sich durch Änderung der Cyclenanzahl auch eine Änderung der Morphologie. Während die Abscheidung von dünnen Schichten zu einer ebenen Oberflächenstruktur führt, zeigt die Abscheidung dickerer Schichten eine wesentlich rauere Morphologie [175].

Zur Charakterisierung der nanokristallinen Platin / Polytyramin-Oberflächen wurden nach einer Abscheidung von 50 bzw. 100 Cyclen Tyramin sowohl REM-Aufnahmen als auch Photos der polymerisierten Platinelektroden gemacht. Die Vorschubgeschwindigkeit betrug in diesem Fall 50 mV/s in einem Potentialbereich von -100 mV bis +1,8 V, um möglichst dicke Schichten zur Charakterisierung herstellen zu können (Abbildung 6-19).

Bereits optisch ist bei einer Polymerisation über 50 Cyclen (Abbildung 6-19 (a)) eine farbliche Änderung der Oberfläche deutlich zu erkennen. Die silbergraue Platinoberfläche schimmert nach der Polymerisation blau-grün. Bei einer Polymerisation von 100 Cyclen ist eine Farbänderung von blau-grün nach blau-rot zu beobachten (Abbildung 6-19 (b)). Die dazugehörigen Cyclovoltammogramme zeigen, ebenso wie in Abbildung 6-15, die irreversible anodische Oxidation im ersten Cylus. Im weiteren Verlauf nimmt der Oxidationspeak aufgrund der sich abscheidenden Polymerschicht immer weiter ab.

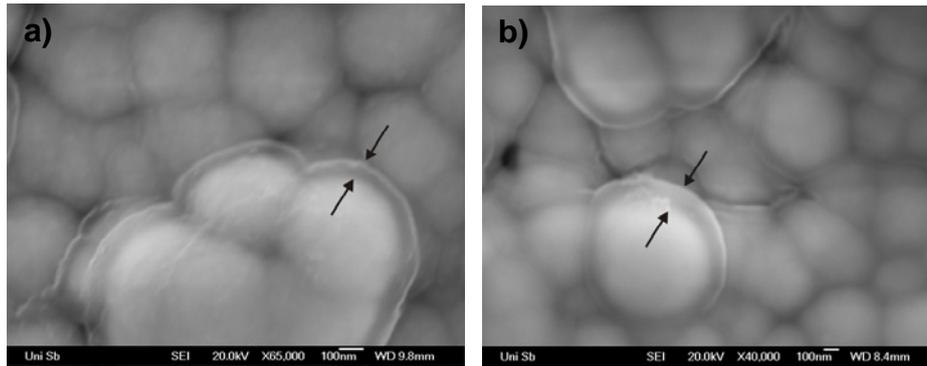
## 6. Modifizierung von Gold- und Platinelektroden mit P2OxB1H



**Abbildung 6-19:** CV-Kurven nach der Abscheidung von 50 Cyclen Polytyramin und die daraus resultierende Farbänderung der nanokristallinen Platinoberfläche (a) in 0,15 M Tyramin in Puffer / Ethanol (2:1) bzw. CV und Farbänderung nach 100 Cyclen Polytyraminabscheidung (b) bei 50 mV/s.

Die dazugehörigen REM-Aufnahmen belegen ebenfalls eine Abscheidung des Polytyraminfilms (Abbildung 6-20). Während bei einer Abscheidung von lediglich 3-5 Cyclen mittels der Rasterelektronenmikroskopie keine Oberflächenänderung aufgrund des viel zu dünnen Polymerfilms zu beobachten war, lieferte die Elektropolymerisation nach 50 bzw. 100 Cyclen sichtbare Veränderungen.

Die REM-Aufnahmen in Abbildung 6-20 zeigen einen kokonartigen, dünnen, transparenten Membranfilm auf den nanokristallinen Platindomänen. Die Abscheidung von 50 Cyclen liefert eine Schichtdicke von ca. 65 nm, während die Elektropolymerisation von 100 Cyclen eine Dicke von ca. 125 nm ergibt. Situmorang et al. beschrieben ebenfalls einen transparenten Film auf der Elektrodenoberfläche [66]. Diese kokonartige Umhüllung bestätigt ebenso wie die CV-Kurven und die impedanzspektroskopischen Untersuchungen eine erfolgreiche Elektropolymerisation von Tyramin.



**Abbildung 6-20:** REM-Aufnahmen der mit Tyramin modifizierten nanokristallinen Platinoberflächen nach 50 Cyclen (a) bzw. 100 Cyclen (b) Elektropolymerisation bei 50 mV/s. Zu erkennen sind ein ca. 65 nm dicker (a) bzw. ein ca. 125 nm (b) dicker Polymerfilm.

Zu berücksichtigen gilt hierbei, dass die elektrochemische Polymerisation abhängig ist von Parametern wie den Elektrodeneigenschaften (z.B. Leitfähigkeit oder Rauheit), der Monomerkonzentration, dem verwendeten Elektrolyten, der Temperatur und den elektrochemischen Methoden und Bedingungen.

### b) Modifizierung mit P2OxB1H und Untersuchung der Enzymkinetik

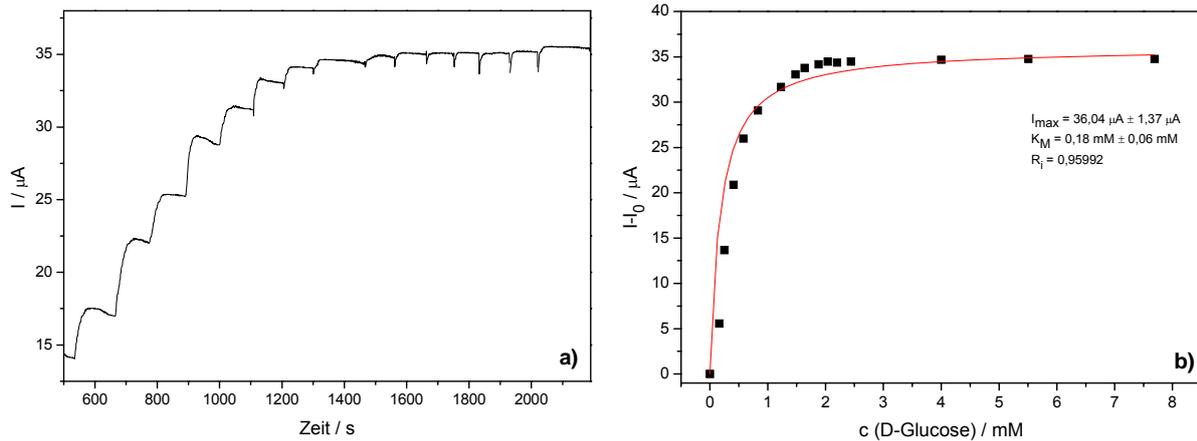
Nach der Elektropolymerisation von Tyramin auf die in Kapitel 6.2.1 hergestellten nanokristallinen Platinelektroden, soll im Folgenden das Enzym P2OxB1H kovalent an die freien  $\text{NH}_2$ -Gruppen des Polytyramins mittels Kupplungsreagenzien wie N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-Ethyl-Carbodiimid Hydrochlorid (EDC) / N-Hydroxysuccinimid (NHS) gebunden werden. Des Weiteren sollen die Ergebnisse der nanokristallinen Platinelektroden mit denen eines polykristallinen Platinbleches sowie den getemperten Platinoberflächen verglichen werden.

Dazu wurden die mit Tyramin modifizierten nanokristallinen Platinelektroden für 1h bei RT in eine Lösung aus 15 mM EDC / 30 mM NHS und 8 U/mL P2OxB1H im Verhältnis 1:1 getaucht und anschließend mit Puffer gespült. Die chronoamperometrischen Messungen wurden bei einem Potential von +600 mV vs. Ag/AgCl in 50 mM Kaliumphosphat / 50 mM KCl-Puffer (pH 7) unter Rühren durchgeführt. Die Substratzugabe erfolgte durch sukzessives Zutropfen einer 0,1 M Glucosestammlösung.

## 6. Modifizierung von Gold- und Platinelektroden mit P2OxB1H

Aus den in Abbildung 6-21 erhaltenen stufenförmigen Strom-Zeit-Kurven konnte anhand der entsprechenden „Plateaus“ für die verschiedenen Substratkonzentrationen das Stromsignal abgelesen und in einem Michaelis-Menten-Plot aufgetragen werden.

Dazu wurde die Kalibrierkurve nach der Hyperbel-Gleichung 2.19 gefittet, wobei  $v_{\max}$  in diesem Fall dem Maximalstrom  $I_{\max}$  entspricht.



**Abbildung 6-21:** Strom-Zeit-Kurve einer nanokristallinen Platinelektrode mit Polytyramin und P2OxB1H bei Zugabe von D-Glucose bei +600 mV vs. Ag/AgCl (a) und entsprechende Auftragung nach Michaelis-Menten (b).

Zur einfacheren und genaueren Auswertung des Maximalstroms ist eine lineare Auftragung nach *Lineweaver-Burk* oder *Hanes* effektiver (siehe Kapitel 2.2). Um eine Punkthäufung, wie sie bei der Auftragung nach Lineweaver-Burk auftritt, zu vermeiden, wurde hier die Auftragung nach *Hanes* gewählt (Abbildung 6-22).

Auf diese Art lassen sich durch lineare Regression der Sättigungsstrom auf 36,08  $\mu\text{A}$  und ein  $K_M$  von 0,19 mM feststellen. Diese Werte stimmen sehr gut mit den nach Michaelis-Menten berechneten Werten für  $I_{\max}$  und  $K_M$  überein. Lediglich eine Abweichung von 1% ist feststellbar.

## 6. Modifizierung von Gold- und Platinelektroden mit P2OxB1H

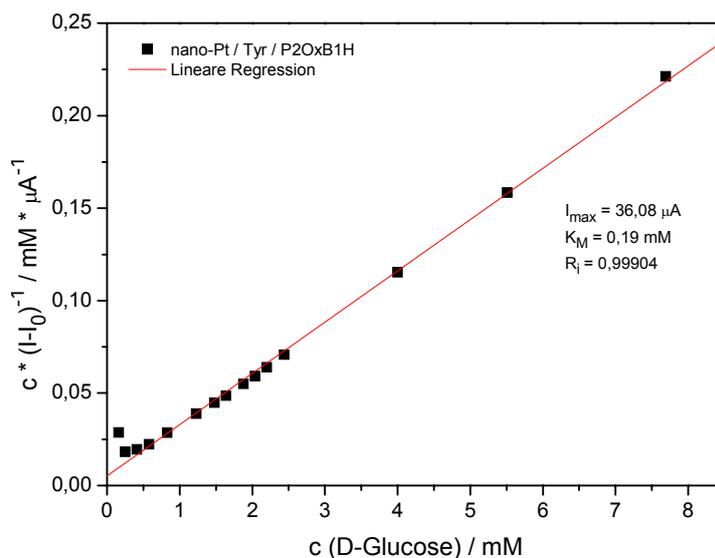


Abbildung 6-22: Hanes-Plot der nanokristallinen Platin / Polytyramin / P2OxB1H-Elektrode

Die in Kapitel 6.2.1 abgedruckten nanokristallinen Platinoberflächen aus  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$  und  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  wurden ebenfalls mit dem Enzym P2OxB1H nach der Elektropolymerisation von Tyramin modifiziert.

Aufgrund der im Fall von Platin (II) bedingten minimal größeren aktiven Oberfläche ist auch hier eine geringfügig höhere Maximalstromdichte zu erwarten. In Abbildung 6-23 ist der Vergleich dieser beiden enzymmodifizierten nanokristallinen Platinelektroden dargestellt.

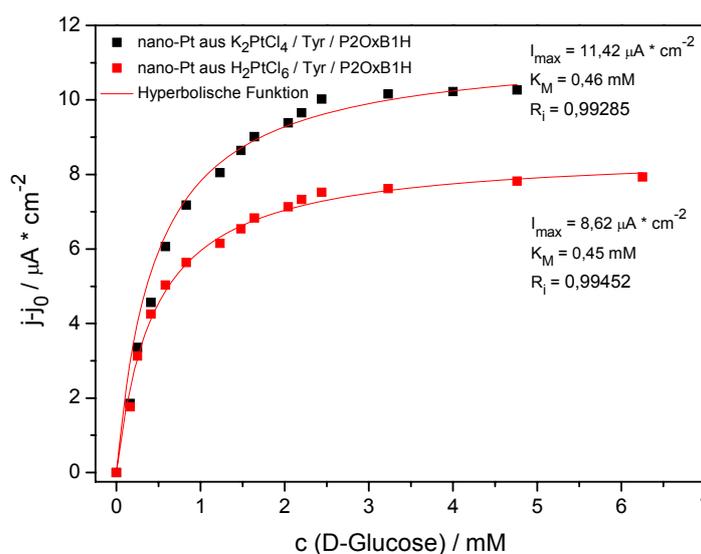


Abbildung 6-23: Michaelis-Menten-Plot der modifizierten P2OxB1H-Elektroden nach Abscheidung von nanokristallinem Platin aus  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$  (schwarz) bzw.  $\text{H}_2\text{PtCl}_6$  (rot).

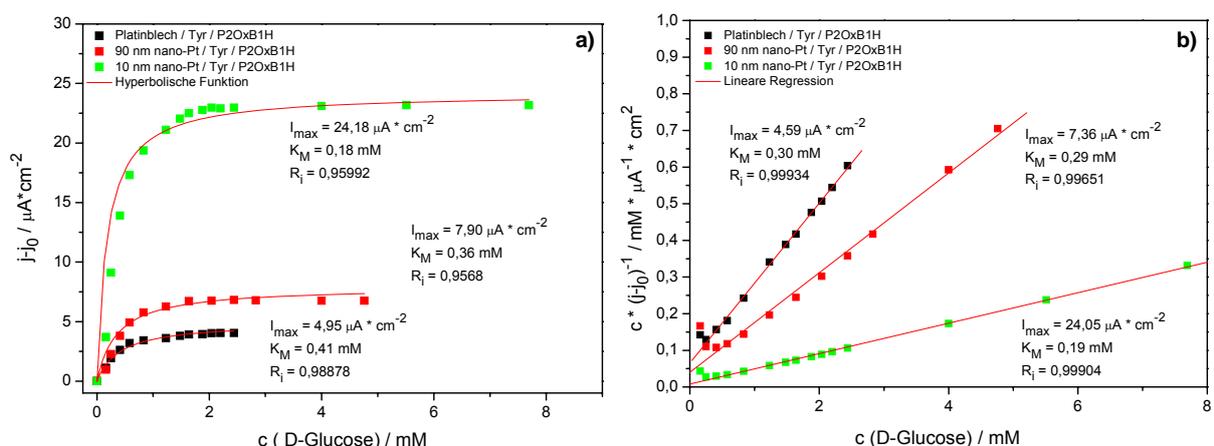
## 6. Modifizierung von Gold- und Platinelektroden mit P2OxB1H

Zu erkennen ist ein etwas höherer Maximalstrom im Fall des nanokristallinen Platins ( $11,42 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$ ), dass aus  $\text{K}_2\text{PtCl}_4$  abgeschieden wurde. Jedoch ist der Unterschied in der Maximalstromdichte der mit P2OxB1H modifizierten Platinoberflächen unwesentlich geringer.

Bereits anhand der XRD-Analyse der nanostrukturierten Platinoberflächen ließ sich erkennen, dass die Größenunterschiede der Kristalliteilchen lediglich 1,3 % betragen. Dementsprechend verhält sich auch die Maximalstromdichte in Abbildung 6-23.

Der Vergleich zwischen einer mit P2OxB1H modifizierten nano- und polykristallinen Platinelektrode sollte durch Aufnahme der Strom-Zeit-Kurven und die anschließende Auftragung nach Michaelis-Menten belegen, dass durch die erhöhte aktive Oberfläche ein deutlich besseres Ergebnis für den  $I_{\text{max}}$  erzielt werden kann. Die in Abbildung 6-24 (a) erhaltenen Sättigungskurven nach Michaelis-Menten zeigen die Ergebnisse eines mit Enzym modifizierten polykristallinen Platinblechs und einer nanokristallinen Platinoberfläche mit 10 bzw. 90 nm großen Platinteilchen.

Die in Abbildung 6-24 (a) dargestellte Sättigungskurve für ein Platinblech zeigt dabei mit einer Maximalstromdichte von  $4,95 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  den schlechtesten Wert. Auch die Platinelektrode mit 90 nm großen Kristalliteilchen zeigt ein deutlich schlechteres Ergebnis als die nanokristallinen Platinoberflächen mit einer Kristallitgröße von ca. 10 nm. In diesem Fall wird eine Maximalstromdichte von  $24,18 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  erhalten.



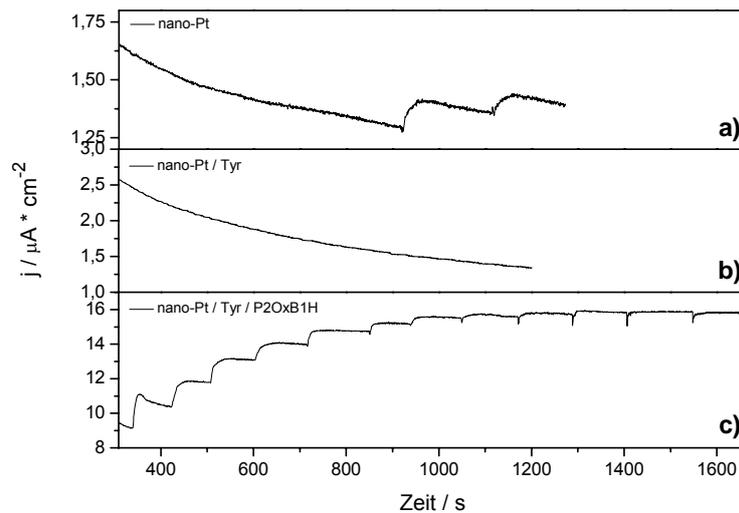
**Abbildung 6-24:** Michaelis-Menten-Auftragung (a) des mit P2OxB1H modifizierten nano-Platins (grün), der getemperten Platinoberfläche (rot) und des Platinblechs (schwarz) sowie die Auftragung nach Hanes (b).

## 6. Modifizierung von Gold- und Platinelektroden mit P2OxB1H

Zu erkennen ist somit, dass mit abnehmender Kristallitgröße der Platinteilchen der Sättigungsstrom zunimmt. Aufgrund der größeren aktiven Oberfläche kann somit mehr Enzym gebunden und eine höhere Maximalstromdichte erhalten werden.

Auch die Auftragung nach Hanes liefert hierbei analoge Ergebnisse für den jeweiligen Sättigungsstrom (Abbildung 6-24 (b)). Die Abweichung von den entsprechenden gefundenen Werten nach Michaelis-Menten beträgt 1% und ist somit vernachlässigbar gering.

Um zu belegen, dass die Substratoxidation von D-Glucose zu Glucoson nicht bereits auf unmodifizierten Platinelektroden erfolgt, wurde zunächst eine nanokristalline Platinelektrode mittels Chronoamperometrie (CA) untersucht. Anschließend wurde Tyramin cyclovoltammetrisch abgeschieden und erneut die Glucoseoxidation beobachtet. Abbildung 6-25 verdeutlicht die Ergebnisse der einzelnen Modifizierungsschritte.



**Abbildung 6-25:** Vergleich der CA-Messung einer nanokristallinen Platinelektrode (a), einer mit Tyramin modifizierten nanokristallinen Platinoberfläche (b) und einer mit Polytyramin und P2OxB1H modifizierten nanokristallinen Platinelektrode (c) nach Zugabe definierter Glucosekonzentrationen bei +600 mV vs. Ag/AgCl.

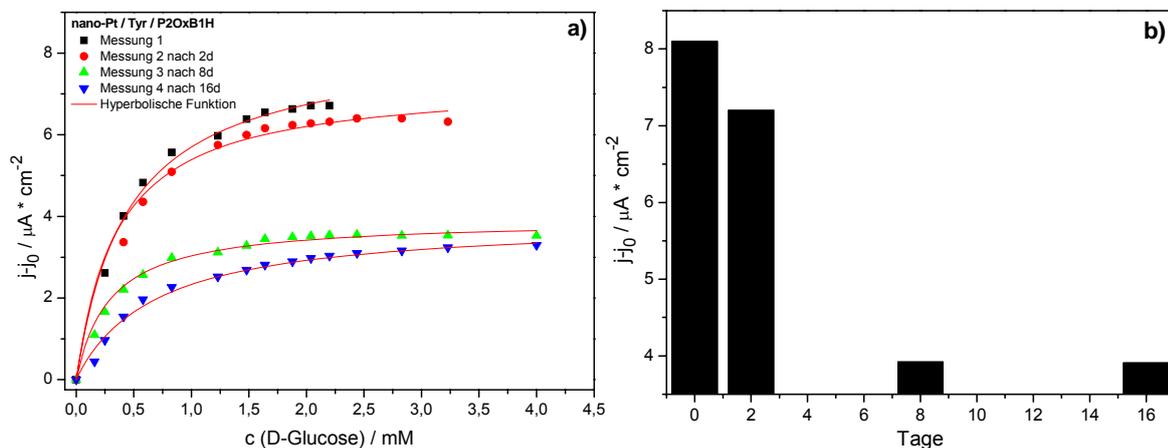
Die chronoamperometrische Messung des unmodifizierten nanostrukturierten Platins bei einem Potential von +600 mV zeigt im Grunde einen minimalen Stromanstieg von 50 nA, der sich jedoch im weiteren Verlauf nicht wesentlich bemerkbarer macht (Abbildung 6-25 (a)). In Abbildung 6-25 (b) wurde die nanostrukturierte Platin-

oberfläche zunächst mittels Tyramin polymerisiert und anschließend D-Glucose zugegeben.

Bei keiner der Zugaben an Substrat konnte eine Änderung des Oxidationsstroms aufgrund einer Substratoxidation beobachtet werden. Somit wird Polytyramin nicht nur zu Immobilisierung von Enzymen benötigt, sondern es unterdrückt auch die direkte Substratoxidation an der Elektrode.

Erst nach Peptidknüpfung von P2OxB1H mittels EDC / NHS konnte ein deutlicher Stromanstieg durch die Zugabe definierter D-Glucosekonzentrationen erzielt werden (Abbildung 6-25 (c)). Dieser Stromanstieg erfolgt aufgrund der enzymatischen Oxidation zu Glucoson, wobei das entstehende Wasserstoffperoxid detektiert wird. Somit ist die Immobilisierung der Pyranose-2-Oxidase der ausschlaggebende Punkt bei der Aufnahme der Strom-Zeit-Diagramme.

Ebenfalls wurde ein Aktivitätsverlust durch eine 16-tägige Messreihe festgestellt. In Abbildung 6-26 (a) sind die Sättigungskurven nach Michaelis-Menten einer mit P2OxB1H modifizierten nanokristallinen Platinelektrode zu sehen. Die Maximalstromdichte nimmt von anfänglichen  $8,24 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  innerhalb einer Zeitspanne von 16 Tagen auf  $3,91 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  ab (Abbildung 6-26 (b)).



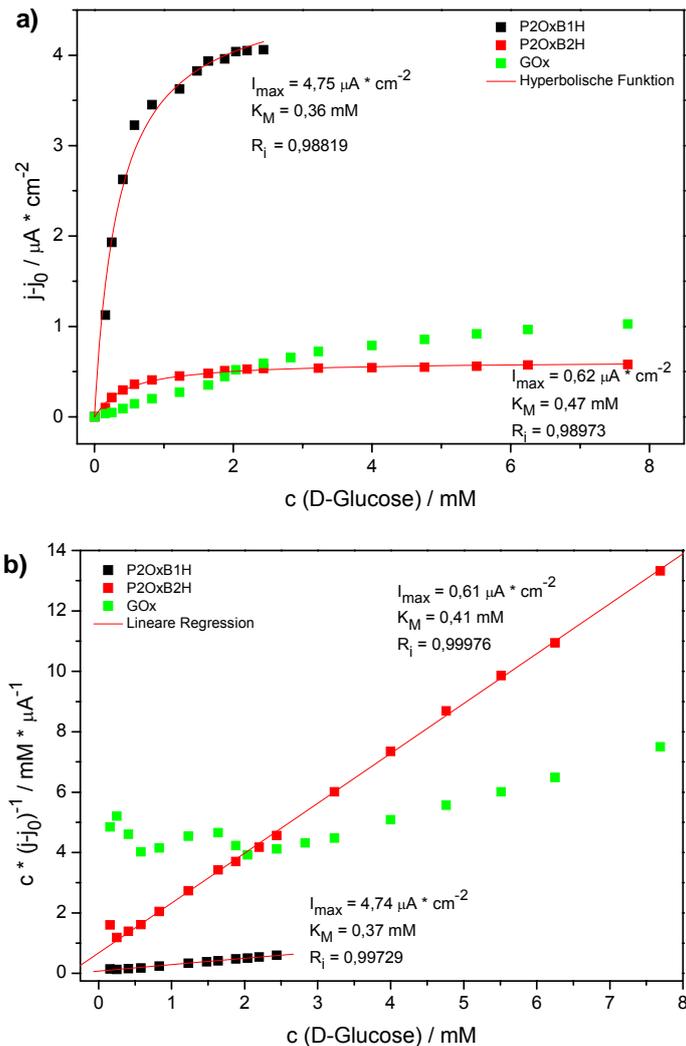
**Abbildung 6-26:** Michaelis-Menten-Plot einer nanokristallinen Pt / Tyr / P2OxB1H modifizierten Elektrode über einen Zeitraum von 16 Tagen (a) und die dazugehörige Strom-Zeit-Abhängigkeit (b).

Ferner wurde ein polykristallines Platinblech mit einer weiteren Variante der Pyranose-2-Oxidase (P2OxB2H) und Glucose-Oxidase (GOx) modifiziert. Die

## 6. Modifizierung von Gold- und Platinelektroden mit P2OxB1H

entsprechenden Auftragungen nach Michaelis-Menten bzw. Hanes sind in Abbildung 6-27 zu sehen.

Die Maximalstromdichte für die GOx konnte nicht näher bestimmt werden, da sich das Enzym in dem vorliegenden Konzentrationsbereich noch annähernd im linearen Verhältnis zur Glucosekonzentration befindet und somit weder eine Auftragung nach Michaelis-Menten noch nach Hanes durchgeführt werden konnte.



**Abbildung 6-27:** Sättigungskurven eines polykristallinen Platinbleches mit modifizierter P2OxB1H (schwarz), der Variante P2OxB2H (rot) und GOx (grün) nach Michaelis-Menten (a) und Hanes (b).

Während für die P2OxB1H eine maximale Stromdichte von  $4,75 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  erhalten wurde, wurde für die mit P2OxB2H modifizierte Platinoberfläche eine deutlich geringere Stromdichte von  $0,62 \mu\text{A} \cdot \text{cm}^{-2}$  erhalten.

Die Untersuchungen an der P2OxB1H bzw. P2OxB2H im Bereich der Mikrobiologie lieferten einen  $K_M$ -Wert für die Glucoseumsetzung von 0,6 mM bzw. 0,4 mM. Die spezifische Aktivität beträgt bei der P2OxB2H 22,5 U/mg, während die P2OxB1H lediglich 13,4 U/mg Aktivität besitzt [41]. Somit müsste die Variante P2OxB2H aufgrund ihrer deutlich besseren Aktivität auch eine bessere Umsatzrate und somit einen höheren  $I_{max}$  erreichen. Jedoch ist die Maximalstromdichte für die zweite Variante der P2Ox um mehr als 7 % geringer, was für die Immobilisierung ein bedeutender Faktor ist. Nach Bastian [41] wurde das pH-Optimum der P2OxB2H bei pH 5,5 im Phosphatpuffer bestimmt und zeigt im Bereich von pH 5 - 7 keine signifikanten Änderungen zur Variante der P2OxB1H. Jedoch nimmt die Restaktivität der P2OxB2H laut Bastian [41] oberhalb von pH 7 schneller ab als die der P2OxB1H. Der benutzte Puffer mit einem pH-Wert von 7 liegt damit gerade im Grenzbereich und hat somit evt. Einfluss auf die Aktivität. Die Auftragung nach Hanes in Abbildung 6-27 (b) liefert ähnliche Werte für  $I_{max}$  und  $K_M$ , so dass die P2OxB2H nicht näher untersucht wurde.

## 7. Herstellung von Pt-Inseln auf Au(111) und Modifizierung mit P2OxB1H

Für die im folgenden Kapitel hergestellten Platin-Inseln ist es besonders wichtig auf saubere Glasgeräte, Zellen, Elektroden und Lösungen zu achten. Aus diesem Grund wurden sämtliche Utensilien vor Gebrauch mindestens 12 Stunden in einer Lösung aus  $\text{H}_2\text{SO}_4$  konz. + 30%  $\text{H}_2\text{O}_2$  im Verhältnis 3:1 („Piranha-Wasser“) gereinigt. Anschließend wurden die Glasgeräte mittels Ionenaustauscherwasser zwei Stunden ausgekocht, wobei alle 30 Minuten ein Wasserwechsel erfolgte. Die elektrochemischen Zellen wurden vor jeder Messung und nach den Messungen gründlich mit  $\text{H}_2\text{O}$  gespült. Für jeden verwendeten Elektrolyten wurde eine separate Zelle verwendet.

Die Modifizierung fand auf Au(111)-Kristallflächen statt. Zum einen handelte es sich um einseitig polierte Einkristalle der Firma MaTeck, die vom Arbeitskreis von Herrn Prof. Dr. D. Kolb zur Verfügung gestellt wurden. Zum anderen wurden Au(111)-Schichten auf Glasblättchen verwendet.

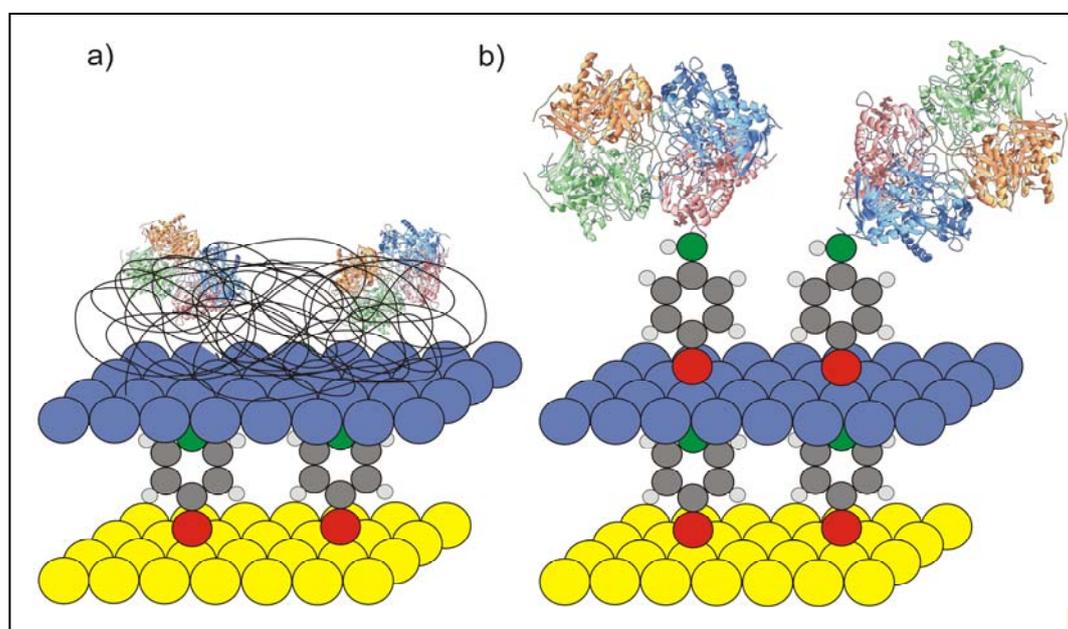
Vor jeder Messung wurden der Einkristall bzw. die Goldblättchen für fünf bzw. zweieinhalb Minuten in einer leuchtenden Bunsenbrennerflamme bis zur Rotglut getempert. Nach dem Abkühlen über der Wasseroberfläche wurden die goldbeschichteten Glasblättchen und die polierte Seite des Kristalls, zur Vermeidung von Verunreinigungen, mit einem Wassertropfen bedeckt. Die Messungen fanden mit der in Kapitel 3.2 (Abbildung 3-5) beschriebenen Apparatur statt, als Schutzgas wurde Stickstoff verwendet.

Nach den Messungen wurde der Einkristall elektropoliert, um die Modifizierungen wieder zu entfernen. Hierzu wurde der Kristall in eine 0,1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$ -Lösung eingetaucht und für 20 s eine Spannung von 10 V angelegt, wobei Glaskohlenstoff als Kathode verwendet wurde. Das dadurch entstandene Goldoxid, wurde durch das mehrminütige Eintauchen in 1 M HCl wieder aufgelöst. Anschließend wurde der Kristall mit Wasser gespült.

## 7. Herstellung von Pt-Inseln auf Au(111) und Modifizierung mit P2OxB1H

Durch das wiederholte Elektropolieren entstehen Defekte auf dem Kristall, so dass er gegebenenfalls für mehrere Stunden im Muffelofen bei 970 °C getempert werden sollte. Dies hat eine Vergrößerung der Terrassenbreite zur Folge [110].

Zunächst wurden die Goldoberflächen mittels cyclischer Voltammetrie charakterisiert. Im Anschluss wurden die Platin-Inseln durch vorherige Modifizierung der Au(111)-Oberflächen mit einer SAM (4,4'-Dithiodipyrudin) stromlos abgeschieden. Nach elektrochemischer Reduktion des abgeschiedenen Platins wurde an die so hergestellten Oberflächen eine Polymerschicht (Abbildung 7-1 (a)) adsorbiert oder ein weiteres Thiolalkan aufgebracht (Abbildung 7-1 (b)). Sowohl Polymer als auch Thiolalkan besitzen freie NH<sub>2</sub>-Gruppen, die zur kovalenten Immobilisierung der P2OxB1H verwendet wurden.



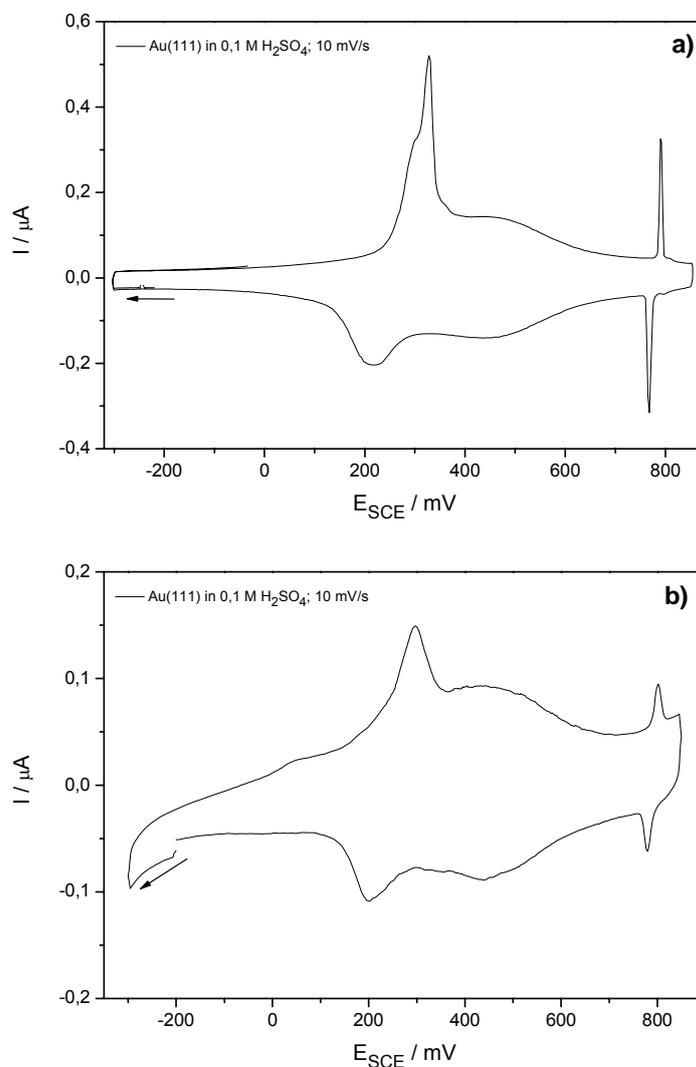
**Abbildung 7-1:** Schematische Darstellung der Au(111) / PySSPy / Pt-Oberflächen mit Polymer und P2OxB1H (a) sowie mit 4-ATP und P2OxB1H (b).

Die elektroenzymatische Substratumsetzung der mit P2OxB1H modifizierten Elektrodenoberflächen wurde mittels Chronoamperometrie untersucht.

Durch die Platin-Inseln soll eine gezielte, geordnete und strukturierte Immobilisierung des Enzyms gewährleistet werden. Der Abstand der Platin-Inseln zueinander kann dabei anhand der Abscheidungsdauer von Platin variiert werden, so dass durch den definierten Abstand das Enzym lediglich an den entsprechend funktionalisierten Oberflächenbereichen kovalent anbindet.

### 7.1 Cyclische Voltammetrie von Au (111)

In Abbildung 7-2 ist das Cyclovoltammogramm eines Au(111)-Einkristalls (a) und eines Au(111)-Blättchens (b) in 0,1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (suprapur) mit einer Scangeschwindigkeit von 10 mV/s zu sehen. Die entsprechende getemperte Elektrode wurde unter Potentialkontrolle (-200 mV) in die mit Stickstoff gespülte Zelle eingetaucht. Nach Einstellung eines konstanten Stroms von ca.  $-0,2 \mu\text{A}$  wurde ein CV von -200 mV bis zu den Umkehrpunkten von -300 mV und +850 mV vs. SCE aufgenommen. Die Potentialkontrolle ist dabei zur Vermeidung der spezifischen Adsorption von Sulfatanionen nötig [110].



**Abbildung 7-2:** Cyclovoltammogramm eines Au(111)-Einkristalls (a) und eines Au(111)-Blättchens (b) in 0,1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bei 10 mV/s vs. SCE. Der Pfeil zeigt die Scanrichtung der CV-Kurve an.

Die genaue Charakterisierung der Au(111)-Oberfläche in den einzelnen Potentialbereichen wurde bereits eingehend von Manolova [110] untersucht. Dabei lässt sich bei einem Potential unterhalb von -100 mV die typische Fischgrätenstruktur beobachten, deren Rekonstruktion bei einem Potential von +320 mV aufgehoben wird. Bei einem Potential oberhalb von +800 mV lässt sich der Phasenübergang von ungeordneter zu geordneter Sulfatadsorptionsschicht durch so genannte Spikes beobachten.

Im Fall des Au(111)-Einkristalls handelt es sich um scharf ausgebildete Spikes (Abbildung 7-2 (a)), während bei dem Au(111)-Blättchen lediglich leicht ausgeprägte Peaks zu beobachten sind. Eine der Ursachen besteht darin, dass der Einkristall lediglich aus (111)-Reflexen besteht, wohingegen es sich bei den Goldblättchen um eine polymorphe Oberfläche handelt, die auch aus weiteren Reflexen besteht. Des Weiteren sind die Terrassen auf der Oberfläche der Goldblättchen im Vergleich zum Einkristall nicht sehr ausgeprägt.

Die typische Form des Au(111)-Cyclovoltammograms bleibt jedoch bestehen und lässt somit den Schluß zu, dass auch die goldbeschichteten Blättchen für die folgenden Modifizierungen mit SAM und Platin sowie die Immobilisierung der P2OxB1H geeignet sind.

## 7.2 Modifizierung mit Thiolalkanen und Platin

Zur Modifizierung der Au(111)-Oberflächen mit einer SAM wurde 4,4'-Dithiodipyridin (Aldrithiol-4, Abbildung 7-3) gewählt, da aufgrund des delokalisierten  $\pi$ -Systems ein guter Elektronentransport durch das Molekül zur Elektrode ermöglicht wird. Die Adsorption von Aldrithiol-4 auf Goldoberflächen wurde bereits vor mehr als 25 Jahren erfolgreich zum Elektronentransfer von Cytochrom C mit der Elektrodenoberfläche verwendet [3, 76, 78]. Durch Adsorption an die Goldoberfläche wird die Disulfidbrücke gespalten und pro Molekül 4,4'-Dithiodipyridin (PySSPy) entstehen zwei chemisorbierte Moleküle.

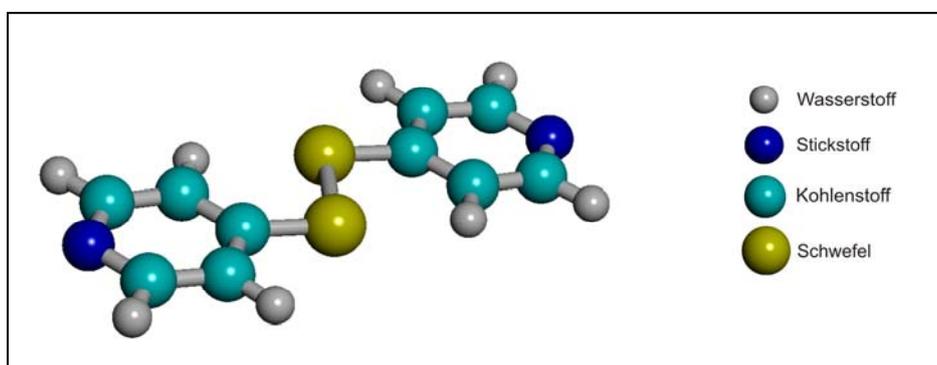


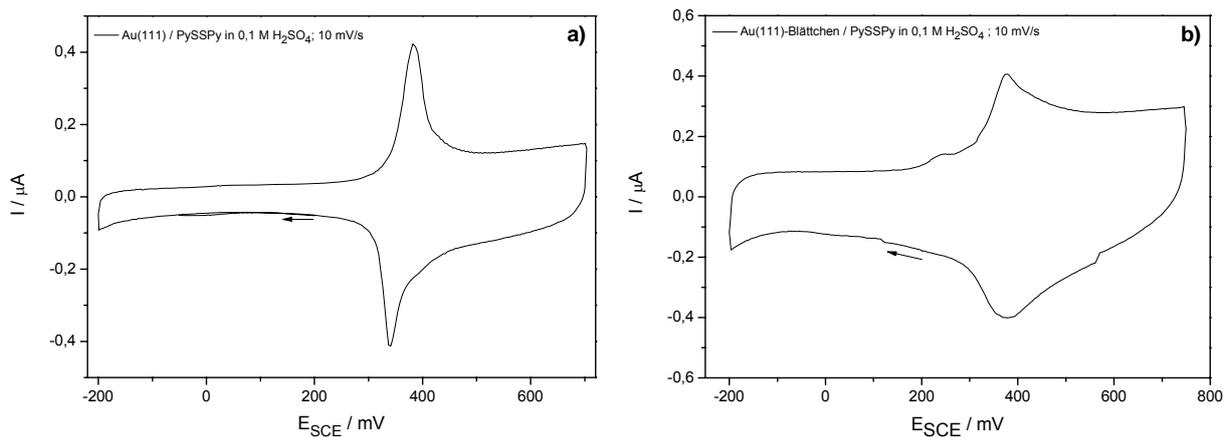
Abbildung 7-3: Struktur von 4,4'-Dithiodipyridin (Aldrithiol-4)

Zur Modifizierung der Au(111)-Oberflächen wurde eine 20  $\mu\text{M}$  PySSPy-Lösung in  $\text{H}_2\text{O}$  angesetzt. Zur Vermeidung einer Oxidation des Moleküls wurde das verwendete Wasser zuvor für mindestens 1h mit Argon gespült.

Der getemperte Kristall bzw. die Au(111)-Blättchen wurden zum Modifizieren 5 Minuten in die PySSPy-Lösung getaucht. Anschließend wurde mit einem kräftigen Wasserstrahl ca. 30 s gespült, um eventuell ungebundene Thiole zu entfernen. Die Elektrode wurde mit einem Wassertropfen bedeckt, schnellstmöglich in die elektrochemische Zelle gebracht und unter Potentialkontrolle (-200 mV) eingetaucht. Nachdem sich ein konstanter Strom von mindestens -0,2  $\mu\text{A}$  eingestellt hat, wurde das CV bei einer Scangeschwindigkeit von 10 mV/s in 0,1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  (suprapur) aufgenommen. Die Messung begann bei einem Potential von +200 mV bis zu den Umkehrpunkten bei -200 mV und +750 mV vs. SCE.

## 7. Herstellung von Pt-Inseln auf Au(111) und Modifizierung mit P2OxB1H

In Abbildung 7-4 sind die erhaltenen CV-Kurven für den Einkristall (a) bzw. das Goldblättchen (b) gezeigt. Zu beobachten ist ein reversibler Peakverlauf mit einem Oxidations- und einem Reduktionspeak bei +380 mV bzw. +340 mV. Dies charakterisiert den Phasenübergang zwischen geordneter und ungeordneter Struktur der SAM. Bei einem Potential unterhalb von +380 mV findet sich die geordnete Struktur, bei einem Potential oberhalb von +380 mV wird diese wieder zerstört [110].



**Abbildung 7-4:** CV-Kurven des mit SAM modifizierten Au(111)-Einkristalls (a) und des Au(111)-Blättchens (b) in 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> bei 10 mV/s vs. SCE. Der Pfeil zeigt die Scanrichtung der CV-Kurve an.

Deutliche Unterschiede sind zwischen den Messergebnissen des Au(111)-Einkristalls und des Blättchens zu beobachten. Einerseits ist ein minimal größerer kapazitiver Strom in Abbildung 7-4 (b) zu beobachten, andererseits sind die Oxidations- und Reduktionspeaks nicht so ausgeprägt wie bei dem Einkristall (Abbildung 7-4 (a)). Auch dies lässt sich mit den weniger ausgeprägten Terrassen und der polymorphen Oberfläche im Fall des Blättchens erklären.

Aliphatische und aromatische Thiole mit enthaltenen funktionellen Stickstoffgruppen sind dafür bekannt mit Metallionen wie Pt<sup>2+</sup> oder Pd<sup>2+</sup> zu interagieren.

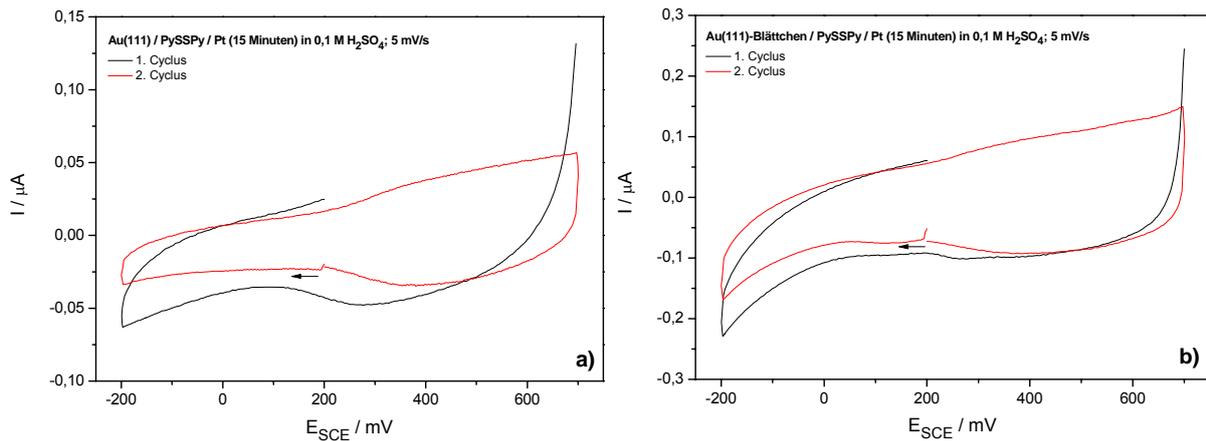
Die Elektroabscheidung von Metallen auf SAM-Oberflächen hat dabei aber häufig den Nachteil, dass sich das abzuscheidende Metall während der Reduktion unter die SAM schiebt und sich somit eine Art „Sandwich“ aus Au / Metal / SAM ergibt [183-185]. Die stromlose Abscheidung dagegen hat den Nachteil, dass weder das Wachstum noch der Ablauf des Abscheidungsprozesses präzise kontrolliert werden können [186]. Daher wurde ein neues Verfahren in der Abteilung für Elektrochemie

von Prof. Dr. D. Kolb entwickelt. Diese Technik verwendet eine Kombination aus stromloser Abscheidung und Elektroabscheidung von Metallen wie Platin oder Palladium. Diesem Verfahren folgend konnten bereits ca. 4 - 6 nm große monoatomare Inseln von Platin bei einer Abscheidungszeit von 15 Minuten erhalten werden [185].

Boyen et al. [187] beschreiben für die Abscheidung von Palladium eine dreifache Koordination des Schwefels zu den Goldatomen. Palladium selbst bildet dabei zweidimensionale Metallinseln monoatomarer Höhe aus. Sowohl die hexagonal dichteste Packung von Gold gemäß der (111)-Kristallorientierung als auch die hexagonal dichteste Packung von Palladium begünstigen die zweidimensionale Anordnung gemäß der in diesem Fall erhaltenen höchsten Atomdichte.

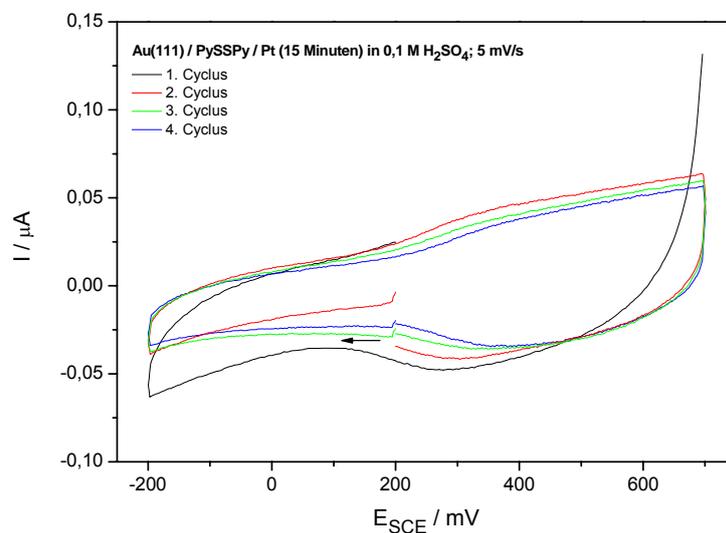
Zur Abscheidung der Platin-Inseln wurde die getemperte Elektrode zunächst für 5 Minuten in die 20  $\mu\text{M}$  PySSPy-Lösung getaucht und danach kräftig gespült. Anschließend wurde der Kristall zur stromlosen Abscheidung für 15 Minuten in eine 0,1 mM Platinlösung ( $\text{K}_2\text{PtCl}_4$ ) in 0,1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  getaucht. Dabei kommt es zu einer Komplexierung zwischen den Stickstoffatomen an der SAM und den Platinionen. Die Elektrode wurde aus der Modifizierungslösung entnommen, gut gespült und unter Potentialkontrolle in die elektrochemische Zelle mit 0,1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  eingetaucht. Während der Aufnahme der Stromspannungskurve erfolgte die Reduktion von Pt (II) zu Pt (0). Dabei wurde im ersten Cyclus der Scan bei einem Potential positiv vom Nernst-Potential begonnen (+700 mV) und in kathodische Richtung gefahren bis zum Umkehrpotential von -200 mV und anschließend bei +200 mV gestoppt. Die Scangeschwindigkeit betrug 5 mV/s. Abbildung 7-5 zeigt den ersten Cyclus (schwarz) der Platinreduktion sowohl für den Au(111)-Einkristall (a) als auch für das Goldblättchen (b). Zu erkennen ist ein schwach ausgeprägter Reduktionspeak bei +260 mV der für die Reduktion von Platin spricht. Zu beachten ist, dass nicht immer ein ausgeprägter Reduktionspeak im CV zu beobachten war. Jedoch konnte durch STM-Aufnahmen belegt werden, dass sich nach jeder Modifizierung Platin-Inseln auf der Oberfläche befunden haben.

## 7. Herstellung von Pt-Inseln auf Au(111) und Modifizierung mit P2OxB1H



**Abbildung 7-5:** Cyclovoltammogramme der elektrochemischen Platinreduktion an einem Au(111) / PySSPy-Einkristall (a) und einem Au(111) / PySSPy-Blättchen (b) in 0,1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bei 5 mV/s vs. SCE. Zu sehen ist jeweils der erste Cyclus mit einem Startpotential von +700 mV (schwarz) und der zweite Cyclus mit Beginn bei +200 mV (rot).

Im zweiten Scan von +200 mV bis zu den Umkehrpotentialen von -200 mV und +700 mV ist dieser Reduktionspeak nicht mehr zu beobachten. Ebenso in den folgenden Cyclen, so dass in diesem Fall von einer irreversiblen Reduktion zu Pt (0) ausgegangen werden kann (Abbildung 7-6).



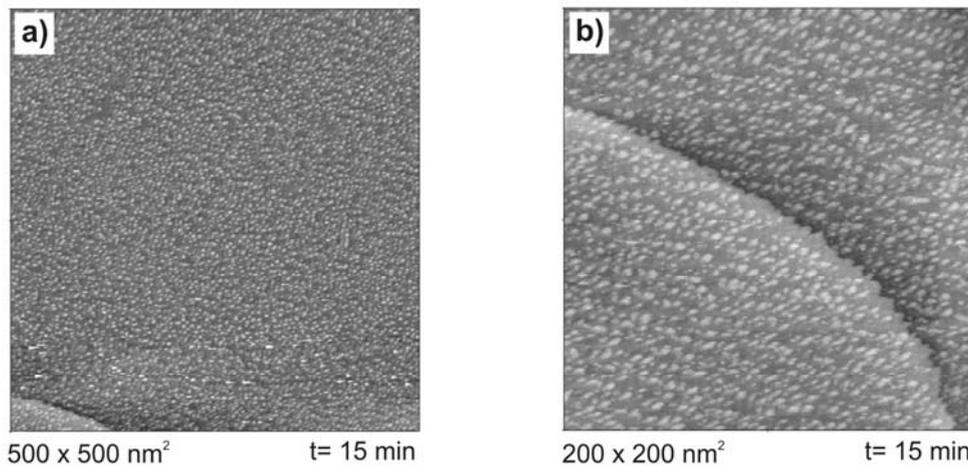
**Abbildung 7-6:** Cyclovoltammogramm der elektrochemischen Platinreduktion an einem Au(111) / PySSPy-Einkristall in 0,1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bei 5 mV/s vs. SCE. Dargestellt ist der erste Cyclus (schwarz) der Pt (II)-Reduktion und die anschließenden Cyclen 2 - 4 (rot, grün und blau).

## 7. Herstellung von Pt-Inseln auf Au(111) und Modifizierung mit P2OxB1H

---

Nach einer Abscheidungszeit von 15 Minuten aus 0,1 mM Platinlösung ist der Belegungsgrad nach Manolova [110] typischerweise 18 %.

Wie bereits oben beschrieben, ist der Platin-Reduktionspeak nicht immer mittels cyclischer Voltammetrie zu beobachten, was jedoch nicht zwangsläufig heißt, dass sich kein Platin auf der SAM befindet. Dies konnte mittels STM-Aufnahmen belegt werden. In Abbildung 7-7 sind die STM-Bilder nach einer Abscheidungszeit von 15 Minuten in platinhaltiger Lösung und anschließender elektrochemischer Reduktion in 0,1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  zu sehen. Die monoatomaren Platin-Inseln mit unterschiedlichen Durchmessern sind deutlich zu erkennen. Nach einer Abscheidung von 15 Minuten sind bereits viele Platin-Inseln auf der Oberfläche zu beobachten, im Gegensatz zu einer Abscheidungsdauer von z.B. 2 Minuten [110].



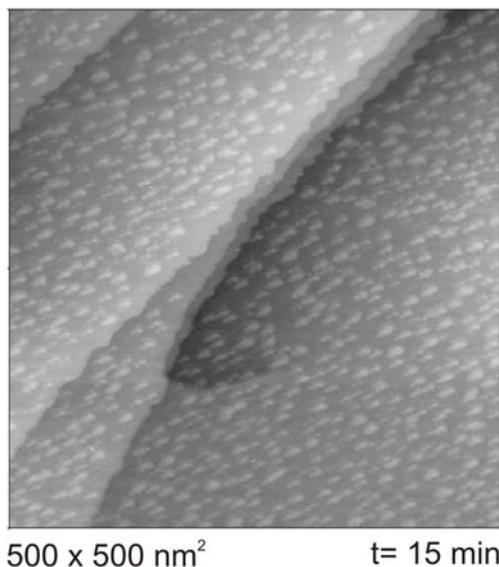
**Abbildung 7-7:** STM-Bilder der Platin-Inseln auf der Au(111) / PySSPy-Elektrode nach einer Abscheidung von 15 Minuten in 0,1 M  $\text{H}_2\text{SO}_4$  bei +100 mV vs. SCE.

Somit können die hergestellten Platin-Inseln im Folgenden mit den entsprechenden Molekülen modifiziert und an deren funktionelle Gruppen das Enzym P2OxB1H kovalent immobilisiert werden.

### 7.3 Immobilisierung von P2OxB1H

Bevor eine Modifizierung der Platin-Inseln mit Enzym erfolgte, wurde mittels STM untersucht, welchen Einfluss der verwendete Puffer 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  / 50 mM KCl auf die hergestellten Platin-Inseln hat. Die Platin-Inseln wurden entsprechend Kapitel 7.2 hergestellt und anschließend für die STM-Untersuchung in 50 mM Kaliumphosphatpuffer mit 50 mM KCl (pH 5) überführt. In diesem Fall musste der pH auf 5 eingestellt werden, da der Tauchlack, der zur Bedeckung der Pt-Ir-Spitze benötigt wird, bei pH 7 nicht stabil ist.

In Abbildung 7-8 ist die STM-Aufnahme der erhaltenen Platin-Inseln im Puffer zu sehen. Trotz des Puffers und der dadurch bedingten Ionenstärke sind nach wie vor die durch elektrochemische Reduktion erhaltenen Platin-Inseln zu erkennen.



**Abbildung 7-8:** STM-Aufnahme von Au(111) / PySSPy / Pt (15 Minuten) in 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  / 50 mM KCl (pH 5) bei +100 mV vs. SCE.

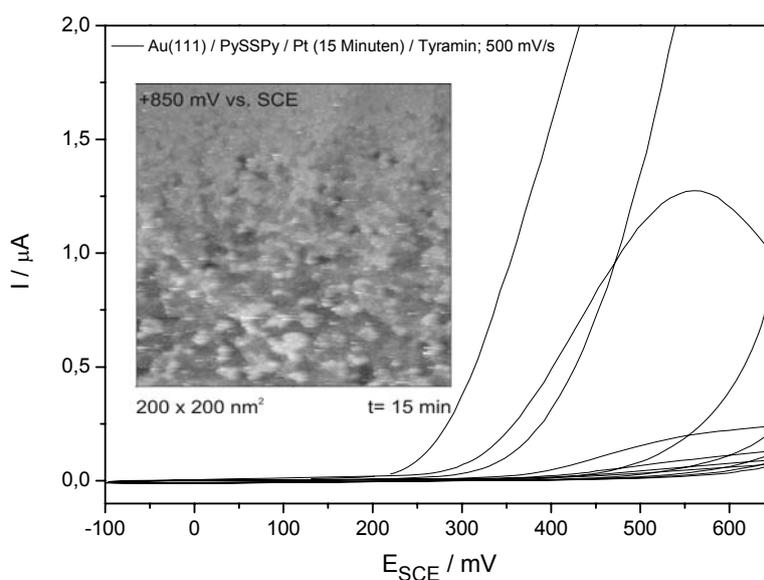
Die mit SAM und Platin modifizierten Au(111)-Oberflächen bleiben bei der Verwendung von Kaliumphosphatpuffer bestehen, so dass die anschließende Immobilisierung des Enzyms P2OxB1H durchgeführt werden kann.

### 7.3.1 Elektrochemische und chemische Polymerabscheidung zur P2OxB1H-Immobilisierung

In Kapitel 6.2.2 wurden nanokristalline Platinoberflächen mittels Elektropolymerisation von Tyramin zur Enzymimmobilisierung verwendet.

Auch die in Kapitel 7.2 hergestellten Platin-Inseln sollten im Folgenden mit Polytyramin modifiziert werden. Allerdings ergaben sich bei dem Prinzip der Elektropolymerisation einige Probleme.

Die Elektropolymerisation durch das Anlegen eines Potentials von +1700 mV war in diesem Fall nicht möglich, da die SAM-Schicht bei Potentialen größer als +700 mV zerstört wird (Abbildung 7-9, Inlay). Daher sollte das Tyramin durch ein Abscheidungspotential von maximal +700 mV polymerisiert werden (Abbildung 7-9).



**Abbildung 7-9:** Elektropolymerisation mit 0,15 M Tyramin an Au(111) / PySSPy / Pt (15 Minuten) in Puffer / Ethanol (2:1) bei 500 mV/s. Im Inlay ist die STM-Aufnahme einer Au(111) / PySSPy / Pt-Oberfläche bei +850 mV vs. SCE zu sehen.

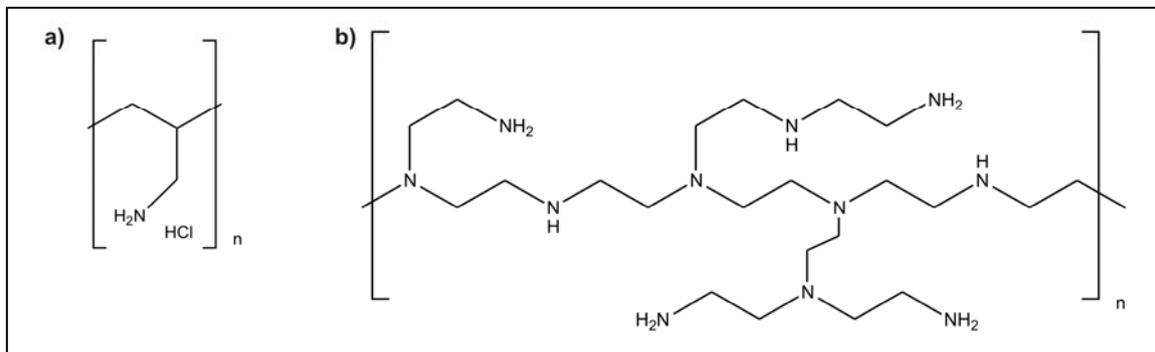
Abbildung 7-9 zeigt die irreversible Oxidation mit einem Oxidationspeak bei +560 mV von Tyramin an der Oberfläche. Jedoch waren anhand von STM-Aufnahmen nach der Elektropolymerisation weder Platin-Inseln noch die SAM zu erkennen.

Daher muss davon ausgegangen werden, dass bei der Elektropolymerisation bis +650 mV eine Polymerisation auf Gold favorisiert wird. Losic et al. [188] beschrieben

## 7. Herstellung von Pt-Inseln auf Au(111) und Modifizierung mit P2OxB1H

eine Polymerisation von Tyramin auf Goldoberflächen bei einem Potential von +800 mV vs. Ag/AgCl. Während der Abscheidung schiebt sich das Polymer vermutlich zwischen die SAM / Pt-Schicht, so dass diese von der Oberfläche abgelöst wird.

Aus diesem Grund mußte das Prinzip der Elektropolymerisierung für die Platin-Inseln verworfen werden. Alternativ sollte die Modifizierung der Platin-Inseln durch Eintauchen in eine Polymerlösung aus 500 µM Polyallylamin (PAA) bzw. 5 wt% Polyethylenimin (PEI) erfolgen (Abbildung 7-10). Beide Polymere enthalten - ebenso wie Tyramin - freie NH<sub>2</sub>-Gruppen, die sich zur kovalenten Anbindung der P2OxB1H eignen. PEI stellt dabei im Gegensatz zu PAA ein wesentlich verzweigteres Polymer dar mit vier primären NH<sub>2</sub>-Gruppen pro Monomereinheit. Die beiden Polymere sollen daher in ihrer Fähigkeit zur kovalenten Bindung zum Enzym verglichen werden.



**Abbildung 7-10:** Struktur der Polymerlösungen Polyallylamin (a) und Polyethylenimin (b)

Diese Art von Modifizierung basiert auf elektrostatischen Kräften zwischen einer geladenen Oberfläche und geladenem Polyelektrolyten und wird als „Layer-by-Layer Technologie“ [189] bzw. durch vorherige Funktionalisierung mittels Thiolen als „self-assembled Polymer“ [190] beschrieben. Taira et al. [190, 191] verwendeten Polyallylamin zur kovalenten Anbindung von Liponsäure an die Polymerseitenketten und anschließender Ausbildung einer SAM auf Gold. Andere Gruppen hingegen nutzen die elektrostatischen Kräfte zur Adsorption von PAA oder PEI, indem die Elektrode für eine gewisse Zeit in die entsprechende Polymerlösung gedippt wird [192-194]. Polyelektrolyte haben den Vorteil, dass sie stabil, billig, chemisch und physikalisch stabil sind und eine große Affinität besitzen, um an Metalle anzubinden [193]. Ein Schichtaufbau mit entgegengesetzt geladenen Polymeren und die Einbettung von Enzymen innerhalb dieser Schichten ist ebenfalls möglich [189]. Calvo et al. [195] funktionalisierten PAA mit Redoxmediatoren wie Ferrocen- und

## 7. Herstellung von Pt-Inseln auf Au(111) und Modifizierung mit P2OxB1H

Pyridincarboxylaldehyd. Letzteres wurde mit Ruthenium- oder Eisenpentakomplexen modifiziert und anschließend das Enzym GOx mittels eines Kupplungsreagenzes in das Polymernetzwerk eingebunden.

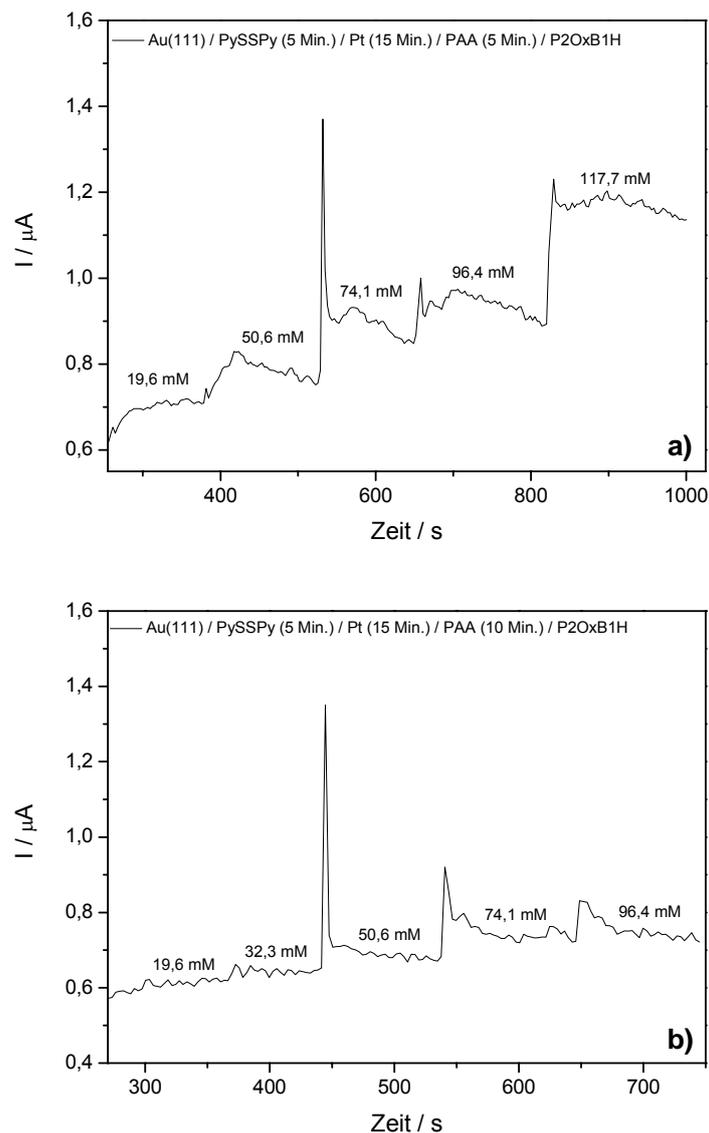
Zur Modifizierung wurden zunächst wie zuvor beschrieben die Au(111) / PySSPy / Pt-Oberflächen abgeschieden und das Platin mittels cyclischer Voltammetrie reduziert. Anschließend wurde die Elektrode entnommen, gespült und entweder in eine 500  $\mu$ M PAA-Lösung oder in 5 wt% PEI, jeweils in Puffer, für 5 bzw. 10 Minuten eingetaucht. Nach Ablauf der Modifizierungszeit wurde die Elektrode entnommen, gespült und für 1h bei RT in eine Lösung aus 15 mM EDC / 30 mM NHS und P2OxB1H (8 U/mL) im Verhältnis 1:1 eingetaucht. Danach wurde die Elektrode entnommen und mit Puffer gespült, um überschüssiges, ungebundenes Enzym zu entfernen.

Das modifizierte Goldblättchen wurde in die elektrochemische Zelle mit 50 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  / 50 mM KCl-Puffer (pH 7) eingetaucht. In diesem Fall wurde die Zelle nicht mit Stickstoff gespült, da Sauerstoff gemäß Abbildung 6-1 für die Reaktion benötigt wird. Die chronoamperometrischen Messungen wurden bei einem Potential von +560 mV vs. SCE unter Rühren durchgeführt. Die sukzessive Substratzugabe erfolgte aus einer 1,5 M Glucosestammlösung.

Die Modifizierung der Platin-Inseln mit einer 5 wt% PEI-Lösung und anschließender Immobilisierung der P2OxB1H mittels EDC / NHS zeigte weder nach 5 noch nach 10 Minuten Modifizierungszeit eine elektroenzymatische Umsetzung. Die chronoamperometrischen Messungen zeigten keinen „stufenförmigen“ Verlauf der Strom-Zeit-Kurve aufgrund einer Detektion des durch Substratumsetzung entstehenden  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Bei PEI handelt es sich zwar um ein sehr verzweigtes Netz mit vier primären  $\text{NH}_2$ -Gruppen pro Monomer, jedoch ist das Polymer mit einem gewichteten Mittelwert von  $M_w \sim 1300$  wesentlich kleiner als PAA mit  $M_w \sim 15000$ . Aufgrund dieser Resultate wurde PEI für die Enzymimmobilisierung von P2OxB1H verworfen.

Die chronoamperometrischen Messungen nach Modifizierung mit 500  $\mu$ M PAA für 5 bzw. 10 Minuten und die anschließende Immobilisierung der P2OxB1H zeigten dagegen bessere Ergebnisse (Abbildung 7-11). Nach 5-minütigem Eintauchen in PAA und Immobilisierung des Enzyms zeigt die Strom-Zeit-Kurve bereits einen deutlichen Stromanstieg. Nach jeder Zugabe von D-Glucose ist eine relativ gute Gleichgewichtseinstellung zu beobachten (Abbildung 7-11 (a)).

## 7. Herstellung von Pt-Inseln auf Au(111) und Modifizierung mit P2OxB1H



**Abbildung 7-11:** Strom-Zeit-Kurven einer Au(111)-Elektrode nach Modifizierung mit PySSPy / Pt und anschließender Modifizierung mit 500  $\mu\text{M}$  PAA für 5 Minuten (a) und 10 Minuten (b) sowie Immobilisierung der P2OxB1H. Die Substratzugabe erfolgte bei +560 mV vs. SCE.

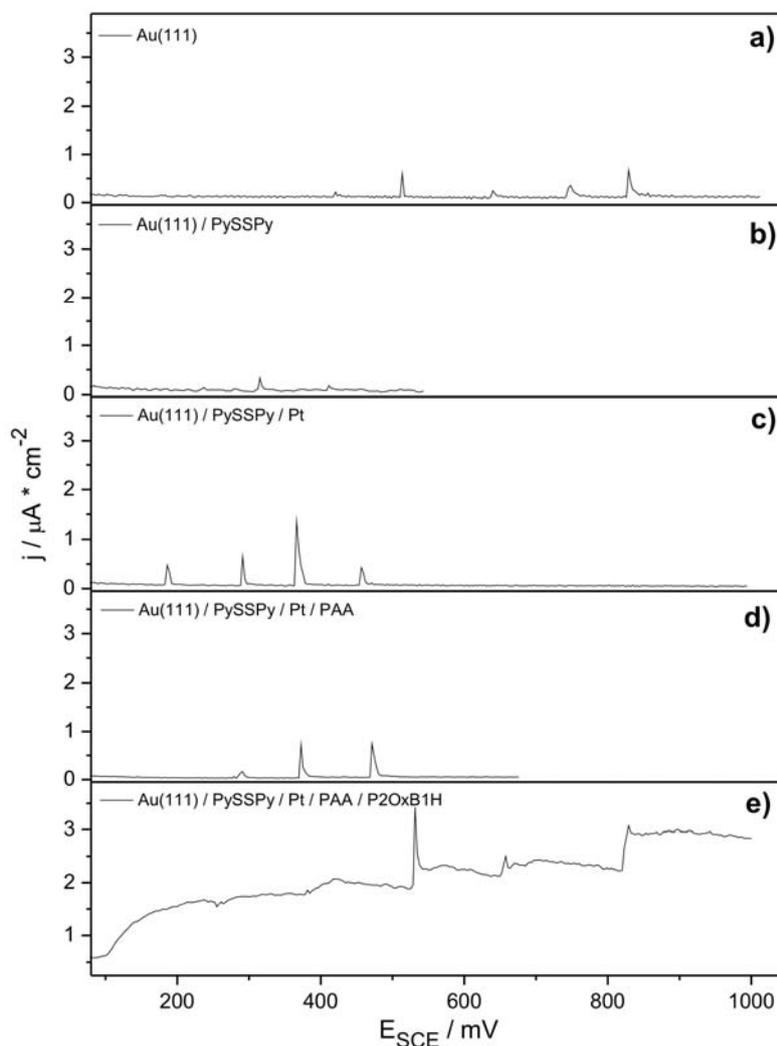
Nach einer Modifizierungszeit von 10 Minuten PAA wird die Strom-Zeit-Kurve wesentlich schlechter (Abbildung 7-11 (b)). Aufgrund der doppelten Modifizierungsdauer kann es zur Ausbildung eines dickeren und dichteren Polymernetzwerkes kommen, wodurch die Detektion des entstehenden Wasserstoffperoxids erschwert wird. Im Gegensatz zu PEI, welches einen pH von ca. 10 - 11 im Puffer aufweist, hat PAA einen pH-Wert von 5 - 6 und liegt somit protoniert vor. Damit ergibt sich in diesem Fall eine bessere Adsorptionsmöglichkeit des Polymers auf die Elektrodenoberfläche. Des Weiteren besitzt PAA pro Monomereinheit zwar lediglich eine  $\text{NH}_2$ -Gruppe, ist aber tendenziell größer aufgrund eines gewichteten Mittelwerts

## 7. Herstellung von Pt-Inseln auf Au(111) und Modifizierung mit P2OxB1H

von  $M_w \sim 15000$ . Aus diesen Gründen wurde die Modifizierungszeit auf 5 Minuten festgelegt.

Im Folgenden sollte der Schichtaufbau untersucht werden, um eine Oxidation von D-Glucose zu Glucoson an einer bereits unmodifizierten Au(111)-Elektrode sowie ohne Immobilisierung des Enzyms auszuschließen.

Die chronoamperometrischen Messungen der einzelnen Modifizierungsschritte sind in Abbildung 7-12 zu sehen. Das getemperte Au(111)-Blättchen zeigt nach Zugabe definierter Konzentrationen an D-Glucose keinerlei Reaktion (Abbildung 7-12 (a)). Auch die anschließenden Modifizierungen mittels PySSPy und Platin in Abbildung 7-12 (b) und (c) belegen, dass es zu keinerlei Substratumsetzung kommt.



**Abbildung 7-12:** Vergleich der chronoamperometrischen Messung einer unmodifizierten Au(111)-Elektrode (a), einer mit PySSPy modifizierten Elektrode (b), einer mit Platin-Inseln modifizierten Au(111)-Elektrode (c) sowie nach 5-minütiger Modifizierung mit PAA (d) und Immobilisierung von P2OxB1H (e) nach sukzessiver Substratzugabe bei +560 mV vs. SCE.

## 7. Herstellung von Pt-Inseln auf Au(111) und Modifizierung mit P2OxB1H

---

Nach 5-minütiger Modifizierung mit PAA ist ebenfalls keine Glucoseoxidation zu beobachten (Abbildung 7-12 (d)). Wird dagegen nach Aufbringung des Polymernetzwerkes aus PAA, das Enzym P2OxB1H zusammen mit den Kupplungsreagenzien EDC / NHS für 1h bei RT immobilisiert, zeichnet sich ein deutlicher Stromanstieg aufgrund des bei der Substratoxidation entstehenden  $H_2O_2$  ab (Abbildung 7-12 (e)).

Aufgrund der geringen Anzahl von Substratzugaben konnte an dieser Stelle weder eine Auftragung nach Michaelis-Menten noch nach Hanes durchgeführt werden. Durch das relativ große Volumen der Zelle war eine Detektion nach Zugabe kleiner Glucosekonzentrationen schwer möglich. Des Weiteren sind nach der Gleichgewichtseinstellung Fluktuationen im Stromsignal zu beobachten, die durch das Rühren während der chronoamperometrischen Messungen hervorgerufen werden. Aus diesem Grund kommt es während der Gleichgewichtseinstellung zu einem Rauschen. Ebenso wird im Moment der Substratzugabe ein größerer Strompeak, bedingt durch das Zupipetieren des Substrates, beobachtet bevor es zur Gleichgewichtseinstellung kommt.

Jedoch konnte gezeigt werden, dass eine Immobilisierung des Enzyms P2OxB1H durch sogenanntes Dip-Coating auf diese Art und Weise möglich ist.

### 7.3.2 Modifizierung der Pt-Inseln mit 4-Aminothiophenol zur Immobilisierung der P2OxB1H

Als Alternative zur Oberflächenfunktionalisierung über Polymere, wurde ein weiteres Thiol zur Immobilisierung verwendet. Dabei handelt es sich um 4-Aminothiophenol (4-ATP, Abbildung 7-13). Das Molekül besitzt sowohl eine freie  $\text{NH}_2$ -Gruppe, die sich zur Bindung an P2OxB1H mittels EDC / NHS eignet, als auch ein Schwefelatom zur Adsorption an Platin.

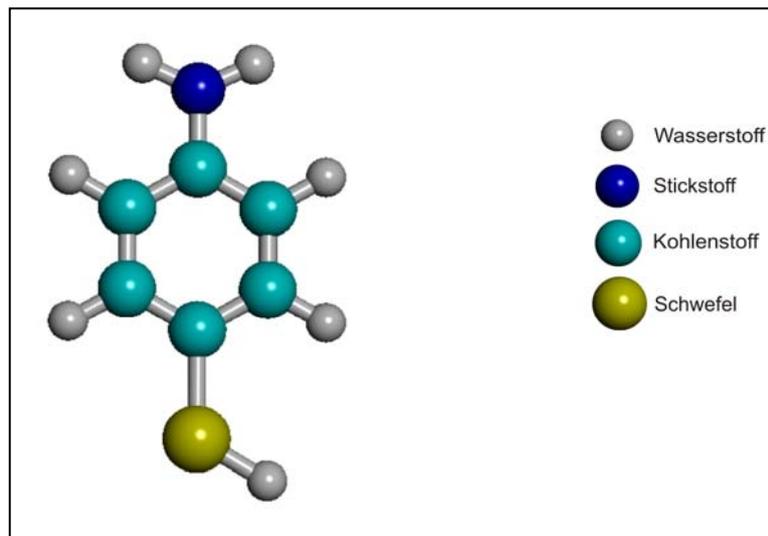


Abbildung 7-13: Struktur von 4-Aminothiophenol (4-ATP)

Die Oberflächenmodifizierung erfolgt durch Ausbildung einer SAM aufgrund der starken Adsorption von Schwefel auf Platin [196, 197]. Das Molekül kann durch elektrochemische Oxidation in ein Anilindimer überführt werden und zur Anbindung negativ geladener Moleküle wie z.B. von Enzymen genutzt werden [198]. Die Oxidation von 4-ATP wird hierbei vom verwendeten pH-Wert beeinflusst und findet meist im sauren Medium statt [198-200], so dass eine positiv geladene Oberfläche aufgrund der Protonierung der Aminogruppe entsteht. Raj et al. [201] zeigten jedoch, dass auch eine Oxidation bei neutralem pH möglich ist. Diese Art von Modifizierung stellt eine interessante Alternative dar, um Biomoleküle wie DNA, NADH, Antikörper oder Proteine an Elektrodenoberflächen durch Zusatz von Kupplungsreagenzien wie Glutardialdehyd oder EDC / NHS anzubinden [199, 202-205].

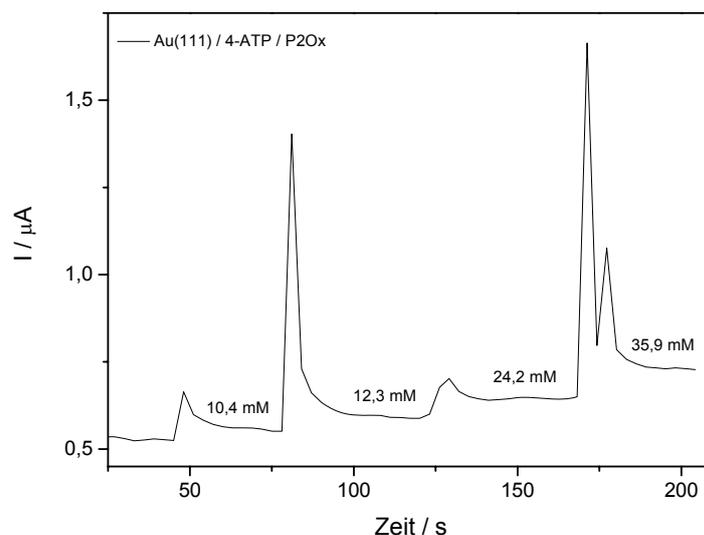
## 7. Herstellung von Pt-Inseln auf Au(111) und Modifizierung mit P2OxB1H

Aus diesem Grund soll das Enzym P2OxB1H zunächst mittels EDC / NHS auf eine Au(111) / 4-ATP-Oberfläche immobilisiert werden. Jedoch wird in diesem Fall keine elektrochemische Oxidation zum Dimer durchgeführt, sondern lediglich die Adsorption in saurem Medium.

Zur Modifizierung wurde die getemperte Elektrode für 5 Minuten in eine 0,1 mM 4-ATP-Lösung in 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> getaucht. Nach Ablauf der Modifizierungszeit wurde die Elektrode entnommen, gespült und zur Aufnahme eines CVs in die elektrochemische Zelle mit 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> überführt. Das CV wurde bei einem Potential von +200 mV begonnen und bis zu den Umkehrpunkten von -200 mV und +400 mV bei einer Scangeschwindigkeit von 10 mV/s gefahren. Durch die Adsorption von 4-ATP entstehen Multischichten [110], welche mittels der cyclischen Voltammetrie entfernt werden, so dass lediglich eine Monolage 4-Aminothiophenol bestehen bleibt.

Im Anschluss wurde das modifizierte Goldblättchen gespült und für 1h bei RT in eine 1:1-Lösung aus P2OxB1H : EDC / NHS eingetaucht. Nach der Modifizierung wurde die Elektrode entnommen, mit Puffer gespült und in die elektrochemische Zelle mit 50 mM Kaliumphosphatpuffer / 50 mM KCl (pH 7) überführt.

Die chronoamperometrische Messung einer Au(111) / 4-ATP / P2OxB1H modifizierten Elektrode bei einem Potential von +560 mV ist in Abbildung 7-14 zu sehen. Bei sukzessiver Zugabe einer 1M GlucosestammLösung ist ein Stromanstieg aufgrund des während der enzymatischen Oxidation entstehenden Wasserstoffperoxids zu beobachten.



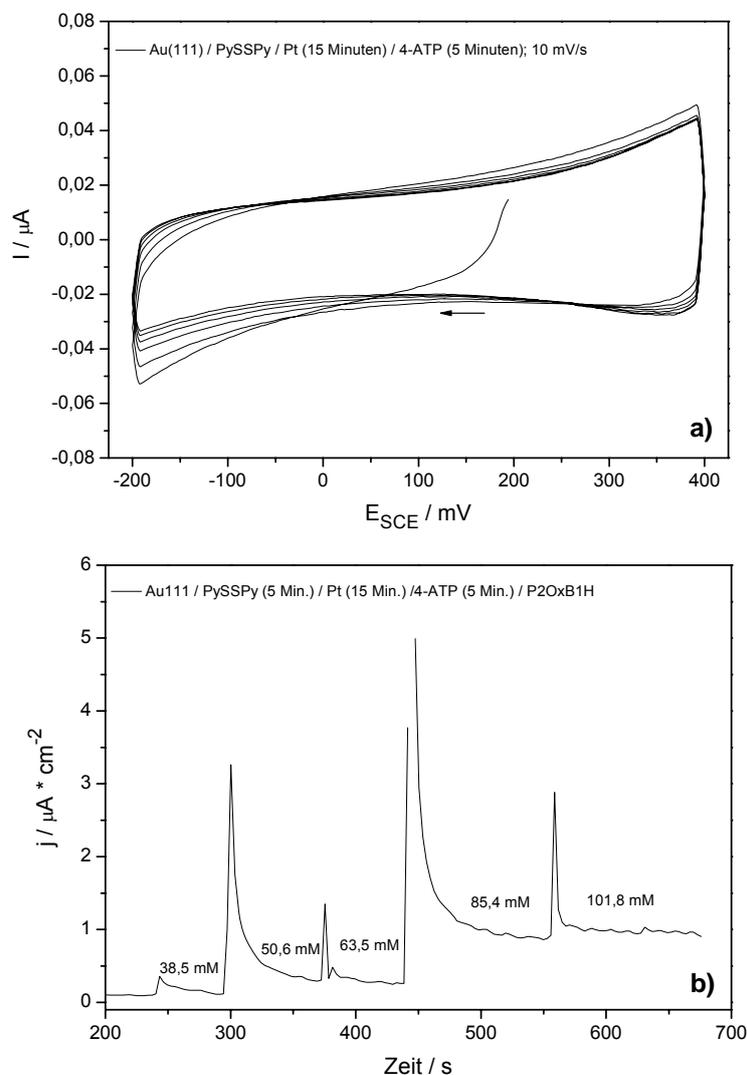
**Abbildung 7-14:** Chronoamperometrische Messung einer Au(111) / 4-ATP / P2OxB1H modifizierten Elektrode bei +560 mV vs. SCE und sukzessiver Zugabe einer 1M Glucoselösung.

## 7. Herstellung von Pt-Inseln auf Au(111) und Modifizierung mit P2OxB1H

Unmittelbar nach der Substratzugabe wird ein größerer Strompeak aufgrund des Zupipettierens beobachtet. Im Anschluss stellt sich das neue Gleichgewicht ein.

Daher sollten im Folgenden die in Kapitel 7.2 hergestellten Au(111) / PySSPy / Pt-Oberflächen mit 4-ATP modifiziert werden, um somit eine Immobilisierung des Enzyms P2OxB1H auf den funktionalisierten Platin-Inseln zu ermöglichen.

Zur Modifizierung wurde wie zuvor beschrieben, Platin auf der Au(111) / PySSPy-Oberfläche abgeschieden und elektrochemisch reduziert. Die so erhaltenen Platin-Inseln wurden 5 bzw. 15 Minuten in eine Lösung aus 0,1 mM 4-ATP in 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> eingetaucht, gespült und mittels CV in einem Potentialbereich von +200 mV bis zu den Umkehrpunkten von -200 mV und +400 mV mit einer Scangeschwindigkeit von 10 mV/s gecycelt (Abbildung 7-15 (a)).



**Abbildung 7-15:** CV der Au(111) / PySSPy / Pt / 4-ATP modifizierten Elektrode bei 10 mV/s in 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (a) und Strom-Zeit-Kurve bei +560 mV mit sukzessiver Zugabe von 1 M D-Glucoselösung nach Immobilisierung der P2OxB1H (b).

## 7. Herstellung von Pt-Inseln auf Au(111) und Modifizierung mit P2OxB1H

Im Anschluss wurde die Elektrode zur Enzymimmobilisierung 1h bei RT in eine Lösung aus P2OxB1H (8U/mL) und 15 mM EDC / 30 mM NHS im Verhältnis 1:1 eingetaucht. Nach Ablauf der Modifizierungszeit wurde die Elektrode zur Entfernung von überschüssigem, ungebundenem Enzym entnommen, mit Puffer gespült und in eine mit Puffer gefüllte Zelle gebracht. Unter Rühren bei einem Potential von +560 mV wurde die Strom-Zeit-Kurve nach jeder Substratzugabe aufgenommen.

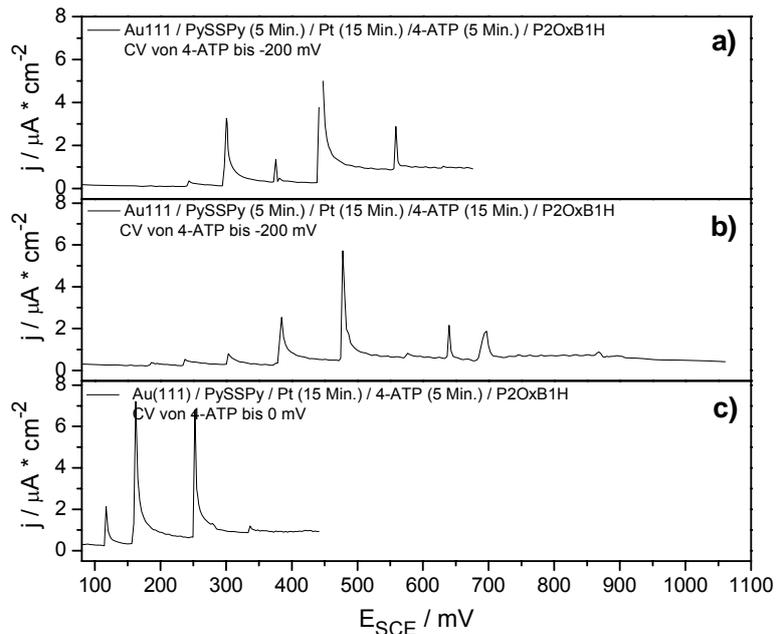
In Abbildung 7-15 (b) ist ein Stromanstieg aufgrund der Substratzugabe zu beobachten. Verglichen mit Abbildung 7-12 (e) ist die erreichte Stromdichte jedoch geringer. Nach Modifizierung mittels PAA wird eine Stromdichte von bis zu  $3 \mu\text{A}/\text{cm}^{-2}$  bei Zugabe von 117 mM D-Glucose erhalten, wohingegen die Modifizierung mit 4-ATP lediglich eine Maximalstromdichte von ca.  $1 \mu\text{A}/\text{cm}^{-2}$  bei 101 mM D-Glucose aufweist.

Wird die Modifizierungsdauer für 4-ATP von 5 auf 15 Minuten erhöht und anschließend das Enzym immobilisiert, zeichnet sich ein wesentlich schlechterer Verlauf der chronoamperometrischen Messungen aus.

Des Weiteren wurde die Au(111)-Elektrode mit PySSPy und Platin modifiziert und anschließend in einer 0,1 mM 4-ATP-Lösung für 5 Minuten inkubiert und gespült. In diesem Fall wurde die Elektrode jedoch von +200 mV lediglich bis zu einem kathodischen Potential von 0 mV und dem zweiten Umkehrpunkt von +400 mV bei einer Scangeschwindigkeit von 10 mV/s gecycelt. Auf die so modifizierte Elektrode wurde ebenfalls das Enzym P2OxB1H mittels der Kupplungsreagenzien EDC / NHS immobilisiert, in die Pufferzelle gebracht und die Substratoxidation analog zu den vorher beschriebenen Messungen untersucht.

Abbildung 7-16 zeigt den Vergleich der chronoamperometrischen Messung nach unterschiedlicher Modifizierungsdauer von 4-ATP und den im CV verwendeten kathodischen Umkehrpotentialen von -200 mV (Abbildung 7-16 (a) und (b)) bzw. 0 mV (Abbildung 7-16 (c)).

## 7. Herstellung von Pt-Inseln auf Au(111) und Modifizierung mit P2OxB1H



**Abbildung 7-16:** Vergleich der chronoamperometrischen Messung einer Au(111) / PySSPy / Pt / 4-ATP / P2OxB1H-Elektrode bei +560 mV nach 5-minütiger (a) bzw. nach 15-minütiger Modifizierung in 0,1 mM 4-ATP (b) und anschließendem CV bis zu einem kathodischen Potential von -200 mV, sowie nach 5-minütiger Modifizierung und CV bis 0 mV (c).

Anhand der Strom-Zeit-Kurven lässt sich erkennen, dass der Unterschied in der erhaltenen Maximalstromdichte minimal ist, so dass weder die Modifizierungszeit noch das im CV verwendete kathodische Umkehrpotential eine große Rolle für die anschließende Enzymimmobilisierung zu spielen scheint. Jedoch findet die Desorption eines Teils der Multischicht von 4-ATP offensichtlich bei einem Potential von -100 mV statt [110], so dass in Abbildung 7-16 (c) noch ATP-Multschichten vorhanden sein könnten.

Auch in diesem Fall wurde der Schichtaufbau untersucht und zeigte keine signifikanten Reaktionen an noch unmodifiziertem Gold bzw. ohne vorherige Enzymimmobilisierung.

Die Modifizierung mittels 4-ATP erwies sich jedoch im Gegensatz zur Polymerisierung mittels PAA als schwierig. Auch die Maximalstromdichte war in diesem Fall geringer, so dass an dieser Stelle weitere Untersuchungen nötig sind.

## 8. Zusammenfassung und Ausblick

In dieser Arbeit wurden die Redoxenzyme Sorbitol- und Galaktit-Dehydrogenase (SDH / GatDH) sowie die Pyranose-2-Oxidase (P2Ox) auf entsprechend funktionalisierten Oberflächen immobilisiert. Dabei sollten reproduzierbare und stabile Systeme gefunden werden, deren Maximalstromdichte zusätzlich durch Herstellung nanokristalliner Oberflächen erhöht wurde.

Verschiedene Systeme zur Modifizierung der Elektrodenoberflächen wurden untersucht. Das Ziel, die Enzyme SDH und GatDH auf poly- und nanokristallinen Goldoberflächen aufzubringen, wurde erfolgreich mittels eines Redoxmediators im Sinne eines MET erreicht. Zur Fixierung wurden zwei unterschiedliche Varianten gewählt: Die Quervernetzung mittels Glutaraldehyd und das Aufsprühen einer Nafionschicht. Letzteres Verfahren zeigte eine bessere Reproduzierbarkeit und war auch über längere Zeit stabil. Die Sensitivität konnte durch Herstellung von nanokristallinen Goldoberflächen mittels elektrochemischer Abscheidung erhöht werden. Die Kristallitgröße und Oberflächenbeschaffenheit wurden mittels XRD und REM bestimmt. Durch die elektrochemische Abscheidung konnten sowohl nanostrukturierte Goldteilchen mit einer Größe von 30 nm als auch mit 10 nm hergestellt werden, je nach Zusatz entsprechender Additive zum Goldelektrolyten. Somit konnte die Maximalstromdichte, der mit Nafion modifizierten Enzymelektroden, um ein fünfzehnfaches erhöht werden.

Die P2OxB1H durch Thiole mit entsprechenden funktionellen Gruppen auf Goldoberflächen kovalent zu binden wurde ebenfalls intensiv verfolgt. Dieses Verfahren führte jedoch zu nur wenig reproduzierbaren Ergebnissen im Bereich der elektrochemischen Umsetzung. Weitere Messungen bzw. Modifizierungen der Elektrodenoberflächen sind an dieser Stelle präparativ erforderlich. Die Immobilisierung an vorfunktionalisierten Miniaturflusszellen unter gleichzeitiger Kontrolle des Immobilisierungsvorganges mittels SPR zeigte dagegen bessere Ergebnisse. Jedoch ist dieses Verfahren für eine spätere Anwendung in größerem

Maßstab eher ungeeignet aufgrund der Beschränkung in der Oberflächengröße. Zusätzlich würden Flusszellen höhere Anschaffungskosten verursachen.

Im Gegensatz dazu war die Elektropolymerisation von Tyramin auf Platinoberflächen und die anschließende kovalente Immobilisierung des Enzyms P2OxB1H mittels der Kupplungsreagenzien EDC / NHS reproduzierbar und über längere Zeit stabil. Die Elektropolymerisation stellt dabei ein interessantes, einfaches und kostengünstiges Verfahren zur Enzymimmobilisierung dar und wäre somit auch für eine Anwendung in größerem Maßstab interessant. Auch weitere Polymere sollten an dieser Stelle zur Immobilisierung von Enzymen getestet werden. Eine Möglichkeit bestünde in der Funktionalisierung eines verwendeten Polymernetzwerkes durch zusätzliches Vernetzen mit Redoxsystemen wie Osmium- oder Rutheniumkomplexen oder aber Ferrocenderivaten. Auch bei diesem System wurde eine Nanostrukturierung der Oberfläche angestrebt, um eine höhere Enzymbeladung und somit eine größere Maximalstromdichte zu erhalten. Zu überlegen wären an dieser Stelle weitere Möglichkeiten einer Nanostrukturierung mittels elektrochemischer Verfahren, um eine noch größere spezifische Oberfläche zu erhalten. Faktoren, die das Kristallitwachstum beeinflussen und variiert werden könnten, sind z.B. Parameter wie Temperatur, Konzentration oder Stromdichte. Auch eine gepulste Abscheidung von Platin wäre denkbar.

Zur Untersuchung der mit Cystein modifizierten Galaktit-Dehydrogenase (GatDH-Cyst) konnten im Rahmen dieser Arbeit wichtige Vorversuche geleistet werden. Der Vorteil des mit Cystein funktionalisierten Enzyms liegt hierbei einerseits in der Möglichkeit der gerichteten Adsorption auf festen Oberflächen. Andererseits ist eine Immobilisierung des Enzyms in nur einem Schritt auf Gold- aber auch Platinelektroden möglich. Die „Standardimmobilisierung“ von Biomolekülen auf Goldträgern erfolgt normalerweise in zwei Schritten: Zunächst werden die Thiole aufgrund der Affinität zwischen Gold und Schwefel durch Ausbildung einer SAM aufgebracht. In einem zweiten Schritt wird das Enzym mittels Kupplungsreagenzien an die funktionellen Gruppen der SAM kovalent immobilisiert. Durch die modifizierte Variante der GatDH kann diese Modifizierung in nur einem Schritt erfolgen und somit Faktoren wie Aktivitätsverlust oder Denaturierung vermieden werden.

Durch Oberflächenplasmonenresonanz-Messungen konnte eine erfolgreiche Immobilisierung der GatDH-Cyst nachgewiesen werden mit einer Schichtdicke von

ca. 6 - 7 nm. Die elektroenzymatischen Untersuchungen zeigten eine elektrochemische Reoxidation des Cofaktors NADH mittels des verwendeten Redoxmediators CTFM. Es konnte gezeigt werden, dass in diesem Fall eine Co-Immobilisierung des Redoxmediators auf den zuvor funktionalisierten Au / GatDH-Cyst-Elektroden nicht möglich ist. Daher sind an dieser Stelle nähere Untersuchungen zur Co-Immobilisierung nötig. Die Affinität zu Schwefel ist in diesem Fall größer als zu Stickstoff, so dass z.B. durch Variation der Verhältnisse zwischen GatDH-Cyst und Redoxmediator ein Optimum gesucht werden sollte, um beide Reaktionspartner auf die Elektrodenoberfläche zu adsorbieren. Des Weiteren ist es nötig ein System zu finden, das neben der gerichteten Immobilisierung des Enzyms auch eine Anbindung des weiteren Reaktionspartners NADH ermöglicht.

Durch die Modifizierung von Au(111)-Einkristallen mittels 4,4'-Dithiodipyridin (PySSPy) und einer anschließenden Kombination aus stromloser Abscheidung und Elektroabscheidung zur Bildung von Platin-Inseln auf der Elektrode, konnte eine geordnete strukturierte Oberfläche erhalten werden. Damit ist eine gezielte Immobilisierung von Enzymen - wie der P2OxB1H - möglich. Die Immobilisierung sollte zunächst durch Elektropolymerisation von Tyramin erfolgen, jedoch zeigte sich, dass aufgrund des benötigten hohen anodischen Oxidationspotentials, die zuvor hergestellten Au(111) / PySSPy / Pt-Inseln zerstört werden. Aus diesem Grund sollte die P2OxB1H auf zwei weiteren Wegen immobilisiert werden: Mittels Dip-Coating in eine Polymerlösung, die freie NH<sub>2</sub>-Gruppen enthält, und durch Adsorption von 4-Aminothiophenol auf die Platin-Inseln. In beiden Fällen sollte die kovalente Bindung zur P2OxB1H mittels EDC / NHS an den freien NH<sub>2</sub>-Gruppen erfolgen. Eine Immobilisierung des Enzyms an Polyallylamin-funktionalisierten Oberflächen ist so möglich. Ein Stromanstieg in der Strom-Zeit-Kurve aufgrund des während der Substratoxidation entstehenden Wasserstoffperoxids ist nach erfolgter Enzymimmobilisierung beobachtbar. Des Weiteren hat sich gezeigt, dass das leichtere und stärker verzweigte Polyethylenimin bei den gegebenen Modifizierungsbedingungen, vor allem aufgrund des basischen pH-Wertes, nicht zur Immobilisierung geeignet ist. Die Immobilisierung mittels 4-ATP zeigte bereits gute Ansätze, müsste jedoch im weiteren Verlauf noch genauer untersucht werden.

## 9. Anhang

### 9.1 Literatur

- [1] L. C. Clark, Jnr. **(1962)** *Ann. NY Acad. Sci.*, 102, 29 - 45
- [2] Cranfield University **(1996)** *Biosensors: Past, Present and Future*
- [3] W. Jin, U. Wollenberger, E. Kärger, W.-H. Schunck and F. W. Scheller **(1997)** *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 433, 135 - 139
- [4] N. Mano, F. Mao and A. Heller **(2004)** *Chem. Bio. Chem.*, 5, 1703 - 1705
- [5] A. Aoki and A. Heller **(1993)** *J. Phys. Chem.*, 97, 11014 - 11019
- [6] F. Mao, N. Mano and A. Heller **(2003)** *J. Am. Chem. Soc.*, 125, 4951 - 4957
- [7] J. G. Wagner, D. W. Schmidtke, C. P. Quinn, T. F. Fleming, B. Bernacky and A. Heller **(1998)** *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 95, 6379 - 6382
- [8] YSI Incorporated **(2007)** *Environmental Monitoring Systems Manual*
- [9] W. M. Albers **(1999)** *Immobilisation of Biomolecules onto organised molecular assemblies*, Dissertation, Cranfield University Cranfield
- [10] A. L. Pometto and S. Moizuddin **(2007)** *Electronic Nose for Rapid Detection of Food Borne Pathogens in Meats.*, Iowa State University, Department of Food Science and Human Nutrition
- [11] E. Katz, A. N. Shipway and I. Willner **(2003)** *Handbook of Fuel Cells, Fundamentals, Technology and Applications, Volume 1*, John Wiley & Sons, Ltd
- [12] I. Willner and E. Katz **(2000)** *Angewandte Chemie*, 112, 1230 -1269
- [13] A. Heller **(2006)** *Anal. Bioanal. Chem.*, 385, 469 - 473
- [14] F. Barrière, Y. Ferry, D. Rochefort and D. Leech **(2004)** *Electrochem. Commun.*, 6, 237 - 241
- [15] R. Szamocki **(2006)** *Kontrollierte Synthese makroporöser Elektroden für elektrokatalytische Anwendungen*, Dissertation, Universität Saarbrücken
- [16] M.-R. Kula and M. Pohl **(2002)** *Sanfte Chemie mit biologischen Katalysatoren*, Degussa
- [17] J. J. V. Benschoten, J. Y. Lewis, W. R. Heineman, D. A. Roston and P. T. Kissinger **(1983)** *Journal of Chemical Education*, 60, 772 - 776
- [18] D. H. Evans **(1977)** *Accounts of Chemical Research*, 10, 313 - 319

- [19] P. T. Kissinger and W. R. Heinemann (1984) *Journal of Chemical Education*, 60, 702 - 706
- [20] C. H. Haman and W. Vielstich (1998) *Elektrochemie*, 3. Auflage, Wiley-VCH
- [21] A. W. Bott and B. P. Jackson (1996) *Current Separations*, 15, 25 - 30
- [22] R. S. Nicholson and I. Shain (1964) *Analytical Chemistry*, 36, 706 - 723
- [23] I. Schröder (2003) *Elektrochemische Oxidation von Nukleotidkofaktoren*, Dissertation, Universität Bonn
- [24] A. J. Bard and L. R. Faulkner (2001) *Electrochemical Methods, Fundamentals and Applications*, Volume 2, J. Wiley & Sons, inc.
- [25] R. S. Nicholson (1965) *Analytical Chemistry*, 37, 1351 - 1355
- [26] E. Csöregi, C. P. Quinn, D. W. Schmidtke, S.-E. Lindquist, M. V. Pishko, L. Ye, I. Katakis, J. A. Hubbell and A. Heller (1994) *Anal. Chem.*, 66, 3131 - 3138
- [27] A. Heller (1992) *J. Phys. Chem.*, 96, 3579 - 3587
- [28] L. Stryer (2003) *Biochemie*, 4. Auflage, Spektrum Akad. Verlag
- [29] Römpp (1995) *Römpp Chemie Lexikon*, Volume 1.0, Thieme Verlag
- [30] P. W. Atkins (2001) *Physikalische Chemie*, 3. korrigierte Auflage, VCH
- [31] *Skript zum biochemischen Grundpraktikum*, Universität des Saarlandes, Saarbrücken
- [32] C. S. Hanes (1932) *Biochem. J.*, 26, 1406 - 1421
- [33] D. E. Metzler (2001) *Biochemistry*, Volume 1.2, Harcourt Academic Press
- [34] G. L. Zubay (1998) *Biochemistry*, Volume 4, WCB
- [35] A. Philippsen, T. Schirmer, M. A. Stein, F. Giffhorn and J. Stetefeld (2005) *Acta Crystallographica*, D61, 374 - 379
- [36] S. Schauder, K. H. Schneider and F. Giffhorn (1995) *Microbiol.*, 141, 1857 - 1863
- [37] M. W. J. Jeworski (1997) *Untersuchungen zur Reduktion von  $\alpha$ -Dicarbonylverbindungen mit der Galaktit-Dehydrogenase aus *Rhodobacter spaeroides* D*, Diplomarbeit, Universität Saarbrücken / Stuttgart
- [38] K. H. Schneider, G. Jäkel, R. Hoffmann and F. Giffhorn (1995) *Microbiol.*, 141, 1865 - 1873
- [39] C. Zimmer (2006) *Identifizierung von zwei biotechnologisch interessanten Enzymen und ihrer Gene zur stereo- und regioselektiven Modifikation von Kohlenhydraten: Benzoyl-esterase und Galaktitol-Dehydrogenase*,

- Dissertation, Universität Saarbrücken; bzw. <http://scidok.sulb.uni-saarland.de/volltexte/2006/913/index.html>
- [40] A. Huwig, S. Emmel, G. Jäkel and F. Giffhorn (1998) *Carbohydrate Research*, 305, 337 - 339
- [41] S. Bastian (2005) *Herstellung von Pyranose-2-Oxidase Enzymvarianten mit erhöhter Stabilität und Reaktivität*, Dissertation, Universität Saarbrücken
- [42] S. Bastian, M. J. Rekowski, K. Witte, D. M. Heckmann-Pohl and F. Giffhorn (2005) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 67, 654 - 663
- [43] R. Wichmann, C. Wandrey, A. F. Buckmann and M. R. Kula (2000) *Biotechnology and Bioengineering*, 67, 791 - 804
- [44] N. Mano, A. Kuhn, S. Menu and E. J. Dufourc (2003) *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 5, 2082 - 2088
- [45] M. Musameh, J. Wang, A. Merkoci and Y. Lin (2002) *Electrochem. Commun.*, 4, 743 - 746
- [46] D. C.-S. Tse and T. Kuwana (1978) *Analytical Chemistry*, 50, 1315 - 1318
- [47] A. J. Bard and M. Stratmann (2002) *Encyclopedia of Electrochemistry, Bioelectrochemistry*, Volume 9, Wiley-VCH
- [48] G. Nagy, I. Kapui and L. Gorton (1995) *Analytica Chimica Acta*, 305, 65 - 73
- [49] B. Persson and L. Gorton (1990) *J. Electroanal. Chem.*, 292, 115 - 138
- [50] L. T. Kubota and L. Gorton (1999) *Electroanalysis*, 11, 719 - 728
- [51] D. D. Schlereth, E. Katz and H. L. Schmidt (1995) *Electroanalysis*, 7, 46 - 54
- [52] B. Persson (1990) *J. Electroanal. Chem.*, 287, 61 - 80
- [53] E. Casero, M. Darder, K. Takada, H. D. Abruna, F. Pariente and E. Lorenzo (1999) *Langmuir*, 15, 127 - 134
- [54] N. Mano and A. Kuhn (1999) *J Electroanal Chem*, 477, 79 - 88
- [55] S. C. Barton, H.-H. Kim, G. Binyamin, Y. Zhang and A. Heller (2001) *J. Am. Chem. Soc.*, 123, 5802 - 5803
- [56] L. Gorton, E. Csöregi, E. Domínguez, J. Emnéus, G. Jönsson-Pettersson, G. Marko-Varga and B. Persson (1991) *Analytica Chimica Acta*, 250, 203 - 248
- [57] B. Ngounou (2005) *Optimierung von Elektrodepositionslacken als Basis für die nicht-manuelle Herstellung amperometrischer Biosensoren*, Dissertation, Universität Bochum
- [58] H. Jaegfeldt, T. Kuwana and G. Johansson (1983) *J. Am. Chem. Soc.*, 105, 1805 - 1814

- [59] A. Walcarius (1999) *Electroanalysis*, 10, 1217 - 1235
- [60] A. Walcarius, D. Mandler, J. A. Cox, M. Collinson and O. Lev (2005) *Journal of Materials Chemistry*, 15, 3663-3689
- [61] A. Walcarius, E. Sibottier, M. Etienne and J. Ghanbaja (2007) *Nature Materials*, 6, 602 - 608
- [62] C. M. Halliwell, E. Simon, C.-S. Toh, P. N. Bartlett and A. E. G. Cass (2002) *Analytica Chimica Acta*, 453, 191 - 200
- [63] C.-S. Toh, P. N. Bartlett, N. Mano, F. Aussenac, A. Kuhn and E. J. Dufourc (2003) *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 5, 588 - 593
- [64] D. Losic, M. Cole, H. Thissen and N. H. Voelcker (2005) *Surface Science*, 584, 245 - 257
- [65] Y. Miao, J. Chen and Y. Hu (2005) *Analytical Biochemistry*, 339, 41 - 45
- [66] M. Situmorang, D. B. Hibbert, J. J. Gooding and D. Barnett (1999) *Analyst*, 124, 1775 - 1779
- [67] I. Tsuji, H. Eguchi, K. Yasukouchi, M. Unoki and I. Taniguchi (1990) *Biosensors and Bioelectronics*, 5, 87 - 101
- [68] C. Lau, S. Reiter, W. Schuhmann and P. Gründler (2004) *Anal. Bioanal. Chem.*, 379, 255 - 260
- [69] S. Reiter (2005) *Elektrochemische Kombinatorik als Grundlage für die Entwicklung biologischer Assays*, Dissertation, Universität Bochum
- [70] J. J. Gooding and D. B. Hibbert (1999) *Trends in Analytical Chemistry*, 18, 525 - 533
- [71] M. Höpfner (2005) *Untersuchungen zur Anwendbarkeit der Quarzmikrowaage für pharmazeutisch analytische Fragestellungen*, Dissertation, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
- [72] M. Darder, K. Takada, F. Pariente, E. Lorenzo and H. D. Abruna (1999) *Anal. Chem.*, 71, 5530 - 5537
- [73] H. Zimmermann, A. Lindgren, W. Schuhmann and L. Gorton (2000) *Chem. Eur. J.*, 6, 592 - 599
- [74] F. A. Armstrong, H. A. O. Hill and N. J. Walton (1988) *Acc. Chem. Res.*, 21, 407 - 413
- [75] A. Avila, B. W. Gregory, K. Niki and T. M. Cotton (2000) *J. Phys. Chem. B*, 104, 2759 - 2766

- [76] A. M. Bond, H. A. O. Hill, S. Komorsky-Lovric, M. E. M. M. Lovric, I. S. M. Psalti and N. J. Walton **(1992)** *J. Phys. Chem.*, 96, 8100 - 8105
- [77] M. Collinson, E. F. Bowden and M. J. Tarlov **(1992)** *Langmuir*, 8, 1247 - 1250
- [78] W. Jin **(1998)** *Redox reactions of proteins at functionalized electrode*, Dissertation, Universität Berlin
- [79] M. C. Leopold and E. F. Bowden **(2002)** *Langmuir*, 18, 2239 - 2245
- [80] Y. Sato and F. Mizutani **(2000)** *Electrochimica Acta*, 45, 2869 - 2875
- [81] W. Scheller, W. Jin, E. Ehrentreich-Förster, B. Ge, F. Lisdat, R. Büttemeier, U. Wollenberger and F. W. Scheller **(1999)** *Electroanalysis*, 11, 703 - 706
- [82] S. Song, R. A. Clark, E. F. Bowden and M. J. Tarlov **(1993)** *J. Phys. Chem.*, 97, 6564 - 6572
- [83] Q. Wang and N. Li **(2001)** *Electroanalysis*, 13, 1375 - 1377
- [84] A. Lindgren, T. Larsson, T. Ruzgas and L. Gorton **(2000)** *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 494, 105 - 113
- [85] L. Stoica, N. Dimcheva, D. Haltrich, T. Ruzgas and L. Gorton **(2005)** *Biosensors and Bioelectronics*, 20, 2010 - 2018
- [86] W. Jin, U. Wollenberger, R. Bernhardt, W. F. M. Stöcklein and F. W. Scheller **(1998)** *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*, 47, 75 - 79
- [87] T. Larsson, M. Elmgren, S.-E. Lindquist, M. Tessema, L. Gorton and G. Henriksson **(1996)** *Analytica Chimica Acta*, 331, 207 - 215
- [88] L. Gorton **(1986)** *J. Chem. Soc., Faraday Trans.*, 1, 1245 - 1258
- [89] P. C. Pandey, S. Upadhyay, I. Tiwari and V. S. Tripathi **(2001)** *Electroanalysis*, 13, 820 - 825
- [90] P. C. Pandey, S. Upadhyay, B. C. Upadhyay and H. C. Pathak **(1998)** *Analyt Biochem*, 260, 195 - 203
- [91] R. C. Engstrom and V. A. Strasser **(1984)** *Anal. Chem.*, 56, 136 - 141
- [92] Y. Chen, J. Yuan, C. Tian and X. Wang **(2004)** *Analytical Sciences*, 20, 507 - 511
- [93] Y. Okamoto, T. Kaku and R. Shundo **(1996)** *Pure & Appl Chem*, 68, 1417 - 1421
- [94] A. Lindgren, T. Ruzgas, L. Gorton, E. Csöregi, G. B. Ardila, I. Y. Sakharov and I. G. Gazaryan **(2000)** *Biosensors and Bioelectronics*, 15, 491 - 497
- [95] A. Lindgren, M. Tanaka, T. Ruzgas, L. Gorton, I. Gazaryan, K. Ishimori and I. Morishima **(1999)** *Electrochem. Commun.*, 1, 171 - 175

- [96] T. Ruzgas, L. Gorton, J. Emnéus and G. Marko-Varga **(1995)** *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 391, 41 - 49
- [97] L. Stoica, R. Ludwig, D. Haltrich and L. Gorton **(2006)** *Anal. Chem.*, 78, 393 - 398
- [98] A. N. Shipway, E. Katz and I. Willner **(2000)** *Chem. Phys. Chem.*, 1, 18 - 52
- [99] A. Härtl, E. Schmich, J. A. Garrido, J. Hernando, S. C. R. Catharino, S. Walter, P. Feulner, A. Kromka, D. Steinmüller and M. Stutzmann **(2004)** *Nature Materials*, 3, 736 - 742
- [100] Y. Guo **(2002)** *Nanocrystalline sol-gel Nb<sub>2</sub>O<sub>5</sub> coatings: Preparation, characterisation and application to photovoltaic cell, lithium battery and electrochromic device*, Dissertation, Universität Saarbrücken
- [101] M. S. Löffler, B. Gross, H. Natter, R. Hempelmann, T. Krajewski and J. Divisek **(2001)** *Physical Chemistry Chemical Physics*, 3, 333-336
- [102] A. K. Gupta and M. Gupta **(2005)** *Biomaterials*, 26, 3995-4021
- [103] M. A. Willard, L. K. Kurihara, E. E. Carpenter, S. Calvin and V. G. Harris **(2004)** *International Materials Reviews*, 49, 125-170
- [104] Y. Shi **(2006)** *Superparamagnetic Nanoparticles for Magnetic Resonance Imaging (MRI) Diagnosis*, Dissertation, Universität Adelaide
- [105] K. A. Padmanabhan **(2001)** *Materials Science & Engineering, A: Structural Materials: Properties, Microstructure and Processing*, A304-306, 200-205
- [106] M. Bukowski **(2005)** *Elektrochemische Abscheidung nanostrukturierter Metalle aus ionischen Flüssigkeiten*, Dissertation, Universität Saarbrücken
- [107] V. V. Srdic, M. Winterer and H. Hahn **(2000)** *J. Am. Ceram. Soc.*, 83, 729 - 736
- [108] J. Seydel **(2003)** *Nanokristallines Zirkondioxid für Hochtemperatur-Brennstoffzellen*, Dissertation, Universität Darmstadt
- [109] A. S. Edelstein and R. C. Cammarata **(1996)** *Nanomaterials: Synthesis, Properties and Applications*, 1. Auflage, IOP
- [110] M. G. Manolova **(2006)** *Struktur von und Metallabscheidung auf mit aromatischen Thiofilmen bedeckten Au(111) Oberflächen*, Dissertation, Universität Ulm
- [111] E. Budevski, G. Staikov and W. J. Lorenz **(1996)** *Electrochemical Phase Formation and Growth*, VCH
- [112] R. Allmann **(2003)** *Röntgenpulverdiffraktometrie*, Volume 2, Springer Verlag

- [113] W. H. Bragg and W. L. Bragg (1913) *Proc. R. Soc. London, A* 88, 428 - 438
- [114] P. Scherrer (1918) *Nachr. Gött.*, 2, 98 - 100
- [115] M. Birkholz (2006) *Thin Film Analysis by X-Ray Scattering*, Auflage 1, Wiley-VCH
- [116] L. V. Azároff (1968) *Elements of X-Ray Crystallography*, International Student Edition, McGraw-Hill Book Company
- [117] B. L. Averbach and B. E. Warren (1951) *Physical Review*, 82, 769-769
- [118] B. E. Warren and B. L. Averbach (1950) *J. Appl. Phys.*, 21, 595 - 599
- [119] H. Natter (1996) *Nanostrukturierte metalle und Legierungen mittels gepulster Elektrolyse: Präparation, Charakterisierung und Eigenschaften*, Dissertation, Universität Saarbrücken
- [120] V. Piskarov (2007) *Characterisation of nanomaterials by X-ray diffraction profile analysis using the regularisation technique*, Dissertation, Universität Saarbrücken
- [121] [www.uni-ulm.de/elektronenmikroskopie](http://www.uni-ulm.de/elektronenmikroskopie)
- [122] [www.microscopy.ethz.ch/images/sem.jpg](http://www.microscopy.ethz.ch/images/sem.jpg)
- [123] [www.uni-bayreuth.de/departments/ddchemie/](http://www.uni-bayreuth.de/departments/ddchemie/)
- [124] M. F. Crommie, C. P. Lutz and D. M. Eigler (1993) *Science*, 262, 218 - 220
- [125] M. F. Crommie, C. P. Lutz, D. M. Eigler and E. J. Heller (1995) *Surface Review and Letters* 2, 127 - 137
- [126] D. M. Eigler and E. K. Schweizer (1990) *Nature*, 344, 524 - 526
- [127] P. A. Tipler (1994) *Physik*, 2. Auflage, Spektrum Akad. Verlag
- [128] [www.biacore.com](http://www.biacore.com)
- [129] N. Mano, P. Peyrou and A. Kuhn (2001) *Electroanalysis*, 13, 770 - 774
- [130] N. Mano and A. Kuhn (2005) *Talanta*, 66, 21 - 27
- [131] W. J. Blaedel and R. A. Jenkins (1975) *Analytical Chemistry*, 47, 1337 - 1343
- [132] J. Moiroux and P. J. Elving (1979) *Analytical Chemistry*, 51, 346 - 350
- [133] J. Moiroux and P. J. Elving (1980) *J. Am. Chem. Soc.*, 102, 6533 - 6538
- [134] S. Ben-Ali, D. A. Cook, P. N. Bartlett and A. Kuhn (2005) *J. Electroanal. Chem.*, 579, 181 - 187
- [135] N. Mano and A. Kuhn (1999) *Electrochemistry Communications*, 1, 497-501
- [136] K.-H. Schneider, G. Jäkel, R. Hoffmann and F. Giffhorn (1995) *Microbiol.*, 141, 1865 - 1873

- [137] J. Gajdzik, R. Szamocki, H. Natter, G. W. Kohring, F. Giffhorn and R. Hempelmann **(2007)** *Journal of Solid State Electrochemistry*, 11, 144 - 149
- [138] C. Lei and J. Deng **(1996)** *Anal. Chem.*, 68, 3344 - 3349
- [139] P. S. Divya, D. Savitri and C. K. Mitra **(1998)** *Biosci.*, 23, 131 - 136
- [140] J.-J. Xu, D.-M. Zhou and H.-Y. Chen **(1998)** *Electroanalysis*, 10, 713 - 716
- [141] Y. Miao, L. S. Chia, N. K. Goh and S. N. Tan **(2001)** *Electroanalysis*, 13, 347 - 349
- [142] A. S. Santos, R. S. Freire and L. T. Kubota **(2003)** *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 547, 135 - 142
- [143] M. J. Schöning, M. Arzdorf, P. Mulchandani, W. Chen and A. Mulchandani **(2003)** *Sensors & Actuators*, 91 B, 92 - 97
- [144] L. R. Júnior, G. d. O. Neto, J. R. Fernandes and L. T. Kubota **(2000)** *Talanta*, 51, 547 - 557
- [145] H. S. Nakatani, L. V. d. Santos, C. P. Pelegrine, S. Terezinha, M. Gomes, M. Matsushita, N. E. d. Souza and J. V. Visentainer **(2005)** *American Journal of Biochemistry and Biotechnology*, 1, 85 - 89
- [146] O. Yevtushenko **(2007)** *Electrocrystallization and characterization of nanostructured gold and gold alloys*, Dissertation, Universität Saarbrücken
- [147] L. Stoica, A. Lindgren-Sjölander, T. Ruzgas and L. Gorton **(2004)** *Anal. Chem.*, 76, 4690 - 4696
- [148] V. Fridman, U. Wollenberger, V. Bogdanovskaya, F. Lisdat, T. Ruzgas, A. Lindgren, L. Gorton and F. W. Scheller **(2000)** *Biochemical Society Transactions*, 28, 63 - 70
- [149] P. Kornberger *unveröffentlichte Ergebnisse*, Dissertation, Universität Saarbrücken
- [150] K. Ataka, F. Giess, W. Knoll, R. Naumann, S. Haber-Pohlmeier, B. Richter and J. Heberle **(2004)** *J. Am. Chem. Soc.*, 126, 16199 - 16206
- [151] K. Ataka and J. Heberle **(2006)** *Biopolymers*, 82, 415 - 419
- [152] K. Ataka, B. Richter and J. Heberle **(2006)** *J. Phys. Chem. B.*, 110, 9339 - 9347
- [153] G. B. Sigal, C. Bamdad, A. Barberis, J. Strominger and G. M. Whitesides **(1996)** *Anal. Chem.*, 68, 490 - 497
- [154] A. Tinazli and R. Tampé **(2004)** *Forschung intensiv, Frankfurt*, 3-4, 10 - 14

- [155] A. Tinazli, J. Tang, R. Valiokas, S. Picuric, S. Lata, J. Piehler, B. Liedberg and R. Tampé (2005) *Chem. Eur. J.*, 11, 5249 - 5259
- [156] C.-N. Bordeanu (2005) *Monoschichten funktioneller Cellulosederivate als Schnittstellen zu biologischen Systemen*, Dissertation, Universität Saarbrücken
- [157] S. E. Creager and K. G. Olsen (1995) *Analytica Chimica Acta*, 307, 277 - 289
- [158] A. J. Guiomar, J. T. Guthrie and S. D. Evans (1999) *Langmuir*, 15, 1198 - 1207
- [159] I. Willner, E. Katz, A. Riklin and R. Kasher (1992) *J. Am. Chem. Soc.*, 114, 10965 - 10966
- [160] M. D. Porter, T. B. Bright, D. L. Allara and C. E. D. Chidsey (1987) *J. Am. Chem. Soc.*, 109, 3559 - 3568
- [161] T. Wink, S. J. vanZuilen, A. Bult and W. P. vanBennekom (1997) *Analyst*, 122, R43-R50
- [162] M. K. Beissenhirtz (2005) *Proteinmultischichten und Proteinmutanten für neuartige empfindliche Superoxidbiosensoren*, Dissertation, Universität Potsdam
- [163] R. D. Vaughan, C. K. O'Sullivan and G. G. Guilbault (1999) *Fresenius J. Anal. Chem.*, 364, 54 - 57
- [164] A. J. Guiomar, J. T. Guthrie and S. D. Evans (1999) *Langmuir* 15, 1198 - 1207
- [165] J. A. Bennett, Y. Show, S. H. Wang and G. M. Swain (2005) *Journal of the Electrochemical Society*, 152, E184-E192
- [166] P. He, H. T. Liu, Z. Y. Li and J. H. Li (2005) *Journal of the Electrochemical Society*, 152, E146-E153
- [167] J. Wang and G. M. Swain (2003) *Journal of the Electrochemical Society*, 150, E24-E32
- [168] G. J. Lu and G. Zangari (2006) *Electrochimica Acta*, 51, 2531-2538
- [169] G. J. Lu and G. Zangari (2005) *Journal of Physical Chemistry B*, 109, 7998-8007
- [170] A. M. Feltham and M. Spiro (1971) *Chemical Reviews*, 71, 177-&
- [171] C. E. Krill, L. Helfen, D. Michels, H. Natter, A. Fitch, O. Masson and R. Birringer (2001) *Physical Review Letters*, 86, 842-845

- [172] H. Natter, M. S. Loffler, C. E. Krill and R. Hempelmann **(2001)** *Scripta Materialia*, 44, 2321-2325
- [173] H. Natter, M. Schmelzer, M. S. Loffler, C. E. Krill, A. Fitch and R. Hempelmann **(2000)** *J. Phys. Chem. B*, 104, 2467-2476
- [174] M. A. Cole, H. Thissen, D. Losic and N. H. Voelcker **(2007)** *Surface Science*, 601, 1716-1725
- [175] A. M. Tenreiro, C. Nabais, J. P. Correia, F. M. S. S. Fernandes, J. R. Romero and L. M. Abrantes **(2007)** *Journal of Solid State Electrochemistry*, 11, 1059-1069
- [176] D. Losic, J. G. Shapter and J. J. Gooding **(2002)** *Electrochem Commun*, 4, 953 - 958
- [177] L. D. Tran, B. Piro, M. C. Pham, T. Ledoan, C. Angiari, L. H. Dao and F. Teston **(2003)** *Synthetic Metals*, 139, 251-262
- [178] M. Situmorang, J. J. Gooding, D. B. Hibbert and D. Barnett **(2001)** *Electroanalysis*, 13, 1469 - 1474
- [179] M. Situmorang, J. J. Gooding, D. B. Hibbert and D. Barnett **(1998)** *Biosensors & Bioelectronics*, 13, 953-962
- [180] J. P. Diard, N. Glandut, B. Le Gorrec and C. Montella **(2004)** *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 566, 269-280
- [181] A. M. S. Lucho, J. L. J. Hallal and R. S. Goncalves **(2003)** *Journal of Macromolecular Science-Pure and Applied Chemistry*, A40, 933-946
- [182] J. P. Diard, N. Glandut, C. Montella and J. Y. Sanchez **(2005)** *Journal of Electroanalytical Chemistry*, 578, 247-257
- [183] T. Baunach, V. Ivanova, D. A. Scherson and D. M. Kolb **(2004)** *Langmuir*, 20, 2797 - 2802
- [184] V. Ivanova, T. Baunach and D. M. Kolb **(2005)** *Electrochimica Acta*, 50, 4283 - 4288
- [185] M. Manolova, V. Ivanova, D. M. Kolb, H.-G. Boyen, P. Ziemann, M. Büttner, A. Romanyuk and P. Oelhafen **(2005)** *Surface Science*, 590, 146 - 153
- [186] T. Baunach, V. Ivanova, D. M. Kolb, H.-G. Boyen, P. Ziemann, M. Büttner and P. Oelhafen **(2004)** *Advanced Materials*, 16, 2024 - 2028
- [187] H.-G. Boyen, P. Ziemann, U. Wiedwald, V. Ivanova, D. M. Kolb, S. Sakong, A. Gross, A. Romanyuk, M. Büttner and P. Oelhafen **(2006)** *Nature Materials*, 5, 394 - 399

- [188] D. Losic, J. G. Shapter and J. J. Gooding **(2005)** *Journal of Solid State Electrochemistry*, 9, 512-519
- [189] D. Trau and R. Renneberg **(2003)** *Biosensors & Bioelectronics*, 18, 1491-1499
- [190] S. Taira and K. Yokoyama **(2005)** *Biotechnology and Bioengineering*, 89, 835-838
- [191] S. Taira, E. Tamiya and K. Yokoyama **(2001)** *Electrochemistry*, 69, 940-941
- [192] A. Shavel, N. Gaponik and A. Eychmuller **(2005)** *European Journal of Inorganic Chemistry*, 3613-3623
- [193] I. M. Weidinger, D. H. Murgida, W. F. Dong, H. Mohwald and P. Hildebrandt **(2006)** *Journal of Physical Chemistry B*, 110, 522-529
- [194] S. P. Zheng, T. Cheng, H. Qiang, H. F. Zhu and J. B. Li **(2004)** *Chemistry of Materials*, 16, 3677-3681
- [195] E. J. Calvo and R. Etchenique **(1996)** *Anal. Chem.*, 68, 4186 - 4193
- [196] M. A. Bryant, S. L. Joa and J. E. Pemberton **(1992)** *Langmuir*, 8, 753-756
- [197] B. I. Rosario-Castro, E. R. Fachini, J. Hernandez, M. E. Perez-Davis and C. R. Cabrera **(2006)** *Langmuir*, 22, 6102-6108
- [198] J. Lukkari, K. Kleemola, M. Meretoja, T. Ollonqvist and J. Kankare **(1998)** *Langmuir*, 14, 1705-1715
- [199] C. R. Raj, F. Kitamura and T. Ohsaka **(2001)** *Langmuir*, 17, 7378-7386
- [200] L. Sun, B. Johnson, T. Wade and R. M. Crooks **(1990)** *Journal of Physical Chemistry*, 94, 8869-8871
- [201] C. R. Raj, T. Okajima and T. Ohsaka **(2002)** *Electrochemistry Communications*, 4, 330-335
- [202] G. Gupta, V. Rajendran and P. Atanassov **(2003)** *Electroanalysis*, 15, 1577-1583
- [203] C. R. Raj and T. Ohsaka **(2001)** *Electrochem. Commun.*, 3, 633 - 638
- [204] S. Shleev, M. Pita, A. I. Yaropolov, T. Ruzgas and L. Gorton **(2006)** *Electroanalysis*, 18, 1901-1908
- [205] P. Yanez-Sedeno and J. M. Pingarron **(2005)** *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 382, 884-886

## **9.2 Publikationen und Konferenzbeiträge**

### **9.2.1 Publikationen**

J. Gajdzik, R. Szamocki, H. Natter, G. W. Kohring, F. Giffhorn, R. Hempelmann **(2007)** „Electroenzymatic reactions with sorbitol dehydrogenase on gold electrodes”, *Journal of Solid State Electrochemistry*, 11, 144 – 149

J. Gajdzik, H. Natter, R. Hempelmann, F. Giffhorn, M. Manolova and D. Kolb **(2008)** ”Pyranose-2-Oxidase immobilized on platinum-islands prepared by electrochemical reduction of a Pt-II loaded SAM”, in Vorbereitung

### **9.2.2 Konferenzbeiträge**

R. Szamocki, J. Gajdzik, S. Réculusa, S. Ravaine, D. Cook, P. N. Bartlett, S. Ben-Ali, A. Kuhn, R. Hempelmann, „*Mediator-Enzyme-modified electrodes for catalytic applications*” Poster, XVIIIth International Symposium on Bioelectrochemistry and Bioenergetics, Coimbra, Portugal, 2005.

J. Gajdzik, R. Szamocki, R. Hempelmann, S. Ben-Ali, S. Réculusa, S. Ravaine, A. Kuhn, “*Elektroenzymatische Reaktionen an mesoporösen Goldelektroden*” Vortrag, GDCh-Jahrestagung, Düsseldorf, 2005.

J. Gajdzik, O. Yevtushenko, H. Natter, G. W. Kohring, F. Giffhorn, R. Hempelmann, „*Biomodification of gold electrodes for electroenzymatic applications*” Poster, Hauptversammlung der Deutschen Bunsengesellschaft, Erlangen, 2006.

J. Gajdzik, O. Yevtushenko, H. Natter, G. W. Kohring, F. Giffhorn, R. Hempelmann, „*Biofunctionalisation of smooth and nanocrystalline gold electrodes with SDH*” Poster, 11<sup>th</sup> International Conference on Electroanalysis, Bordeaux, Frankreich, 2006.

### 9.3 *Abkürzungsverzeichnis*

11-MUA	11-Mercaptoundecansäure
4-ATP	4-Aminothiophenol
AE	Arbeitselektrode
BE	Bezugselektrode
Bis-Tris	Bis-(2-Hydroxyethyl)-Imino-tris-(Hydroxymethyl)-methan
BSA	Rinderserum Albumin (bovine serum albumine)
CTFM	(4-Carboxy-2,5,7-Trinitrofluorenyliden)-malonnitril
CV	Cyclische Voltammetrie
DET	Direkter Elektronentransfer
DTSP	Dithiobis(succinimidylpropionat)
EDC	N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid Hydrochlorid
FAD/FADH <sub>2</sub>	Flavin-Adenin-Dinukleotid
GA	Glutardialdehyd
GatDH	Galaktit-Dehydrogenase
GatDH-Cyst	Galaktit-Dehydrogenase mit Cystein
GC	Glaskohlenstoff (glassy carbon)
GE	Gegenelektrode
GOx	Glucose-Oxidase
HRP	Meerrettich-Peroxidase (horseradish peroxidase)
K <sub>M</sub>	Michaelis-Menten-Konstante
MPS	Mercaptopropansulfonsäure
NAD <sup>+</sup> /NADH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NHS	N-Hydroxysuccinimid
PAA	Polyallylamin
PEI	Polyethylenimin
PySSPy	4,4'-Dithiodipyridin
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RT	Raumtemperatur
SAM	Self-assembled Monolayer
SCE	gesättigte Kalomelektrode (saturated calomel electrode)

SDH	Sorbitol-Dehydrogenase
SPR	Oberflächenplasmonenresonanz
STM	Rastertunnelmikroskopie
THF	Tetrahydrofuran
Tris	Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan
U	Unit ( $\triangleq$ der Menge an Enzym, die pro Minute 1 $\mu\text{mol}$ Substrat umsetzt)
UDT	Undecanthiol
XRD	Röntgendiffraktometrie (X-Ray diffractometry)

### 9.4 Verwendete Chemikalien und Enzyme

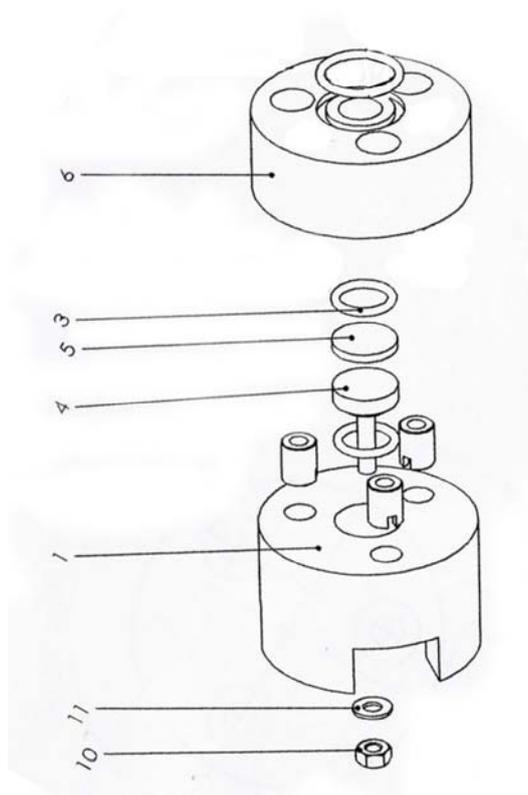
Chemikalien	Hersteller	Reinheit
(4-Carboxy-2,5,7-Trinitrofluorenylidene)-malonnitril (CTFM)	Toroma Organics	> 98 %
1,2-Hexandiol	Aldrich Fluka	98 % purum (≥ 97%)
11-Mercaptoundecansäure (11-MUA)	Aldrich	95 %
4,4'-Dithiodipyridin (Aldrithiol-4)	Aldrich	98 %
4-Aminothiophenol (4-ATP)	Alfa Aesar	97 %
Aceton	ZChL	pract.
Bis-(2-Hydroxyethyl)-Imino-tris-(Hydroxymethyl)-methan (Bis-Tris)	Roth	Pufferan ≥ 98 %
Calciumchlorid Dihydrat	ZChL	p.a.
D-Glucose Monohydrat	ZChL	≥ 99,5 %
Dithiobis(succinimidylpropionat) (DTSP)	Fluka	≥ 97 %
D-Sorbitol	AppliChem Acros Organics	Molecular Biology grade p.a.
Ethanol	ZChL	99 % vergällt mit 1% MEK
Ethanolamin	Biacore	1 molar (pH 8,5)
Galaktit-Dehydrogenase (GatDH) und GatDH-Cyst	Mikrobiologie Prof. Dr. Giffhorn	~ 50 U/mL bzw. 55 U/mL
Glucose-Dehydrogenase (GDH)	Fluka	228 U/mg
Glutardialdehyd (GA)	Aldrich	50 Gew% in H <sub>2</sub> O
H <sub>2</sub> PtCl <sub>6</sub> *xH <sub>2</sub> O	Chempur	40 % Pt
HCl	Riedel-de-Haen	1 mol
K <sub>2</sub> [Fe(CN) <sub>6</sub> ]	ZChL	p.a.
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	ZChL	p.a.

## 9. Anhang

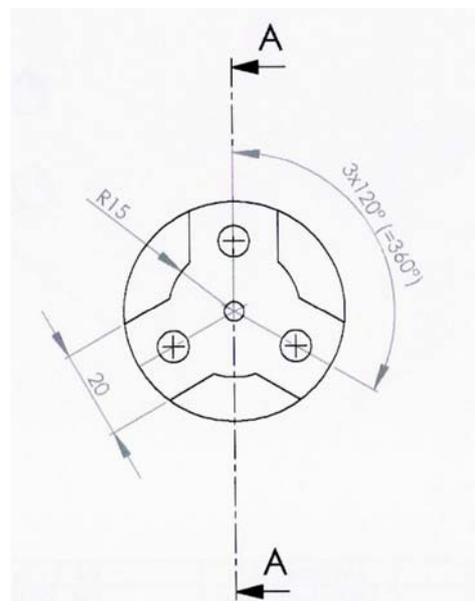
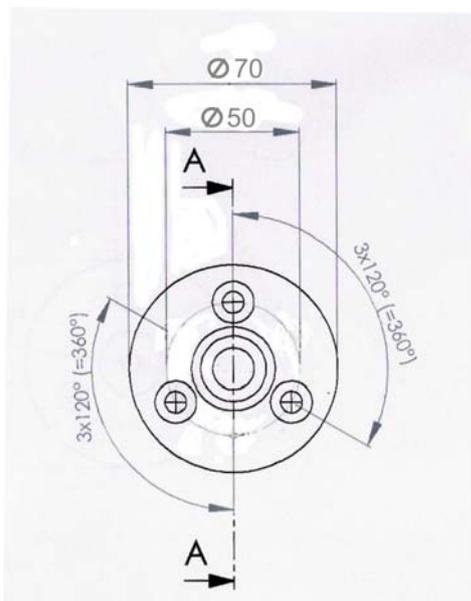
$K_3[Fe(CN)_6]$	ZChL	p.a.
Kaliumtetrachloroplatinat (II) $K_2PtCl_4$	Acros Organics	46,5-47 % Pt
KCl	ZChL	99,5 %
$KH_2PO_4$	ZChL	p.a.
Magnesiumchlorid	ZChL	Pharmakopöe
N-(3-Dimethylaminopropyl)-N'-ethyl-carbodiimid Hydrochlorid (EDC)	Fluka Merck	purum ( $\geq 98$ %)
Nafion	DuPont	10%ige Suspension
Natriumchlorid	ZChL	p.a.
N-Hydroxysuccinimid (NHS)	Aldrich	98 %
Polyallylamin Hydrochlorid (PAA)	Aldrich	$M_W \sim 15.000$
Polyethylenimin (PEI)	Aldich	50 wt%; $M_n$ 1200, $M_W$ 1300
Pyranose-2-Oxidase (P2OxB1H und P2OxB2H)	Mirobiologie Prof. Dr. Giffhorn	$\sim 8$ U/mL
Rinderserumalbumin (BSA)	Fluka	$\geq 98$ %
Schwefelsäure $H_2SO_4$	Merck	96 % suprapur
Sorbitol-Dehydrogenase (SDH)	Mirobiologie Prof. Dr. Giffhorn	$\sim 60$ U/mL
Tetrahydrofuran (THF)	ZChL	reinst
Tris(Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	ZChL	p.a.
Tyramine (Tyr)	Acros Organics	97 %
Undecanthiol (UDT)	Aldrich	98 %
Wasserstoffperoxid	ZChL	30 %
$\beta$ -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid ( $NAD^+$ )	Fluka	$\geq 95$ %
$\beta$ -Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid ( $NADH$ )	Roth	$\geq 98$ %

## 9.5 Zellaufbau und Skizzen

a) Teflonzellen für elektroenzymatische Untersuchungen



- 6 Reaktionsteil
- 3 Dichtungsring
- 5 Arbeitselektrode
- 4 Schraube / Kontakt
- 1 Kontaktträger
- 11 U-Scheibe
- 10 Sechskantmutter





## 9.6 Danksagungen

Zuletzt möchte ich all jenen danken, die mich während der Anfertigung dieser Arbeit unterstützt haben:

- Herrn Prof. Dr. R. Hempelmann für die Bereitstellung des interessanten und aktuellen Themas und die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis. Zur Fertigstellung dieser Arbeit stellte er mir ein hervorragend ausgestattetes Labor zur Verfügung, sowie eine breite Auswahl physikalischer Messgeräte. Außerdem hat er mir die Möglichkeit gegeben an nationalen und internationalen Konferenzen teilzunehmen, so dass ich einige Ergebnisse dieser Arbeit öffentlich vorstellen konnte.
- Herrn Prof. Dr. F. Giffhorn für die freundliche Zusammenarbeit und das Bereitstellen, der in dieser Arbeit verwendeten Enzyme.
- Herrn Dr. H. Natter für die Unterstützung und zahlreichen Gespräche und Anregungen während meiner Doktorarbeit.
- Herrn Dieter Münch und Herrn Josef „Joschi“ Wilhelm für die Hilfe bei technischen Problemen sowie das Beschaffen von unzähligen Glasgeräten und anderen Utensilien.
- Frau Sylvia Kuhn für die Anfertigung der REM-Aufnahmen und die vielen aufbauenden Gespräche während der gemeinsamen Mittags- und „kompetenten“ Kaffeepausen.
- Frau Petra Theobald, der guten Seele des AKs, für die ständige Versorgung mit Papier und Büromaterial.
- Herrn Dr. G. Kohring, Frau Dr. D. Heckmann-Pohl sowie Frau Petra Kornberger, Frau Susanne Dorscheid und Frau Dr. Sabine Bastian für die freundliche Zusammenarbeit und die Herstellung der benötigten Enzyme.
- Herrn Prof. Dr. D. Kolb für die freundliche Zusammenarbeit und die Einladung nach Ulm zum Erlernen der in seinem Arbeitskreis entwickelten Technik der Platinabscheidung.
- Frau Dr. Mila Manolova für die nette Zusammenarbeit, die STM-Messungen, den sehr angenehmen Aufenthalt in Ulm und die damit verbundenen wissenschaftlichen und außerfachlichen Diskussionen.

- Herrn Dr. Andy Zöllner und Frau Katrin Ohliger für die SPR-Messungen.
- Herrn Dr. Rafael Szamocki für die angenehme Zeit während der drei gemeinsam besuchten Konferenzen sowie den unzähligen fachlichen und außerfachlichen Gesprächen.
- Frau Dr. Oleksandra Yevtushenko für einen schönen Aufenthalt in Düsseldorf, den gemeinsamen Shoppingtours und ihrer Hilfsbereitschaft und Beratung in sämtlichen Lebenslagen...
- Frau Babette Hinkeldey für die vielen außerfachlichen Diskussionen, amüsanten Erlebnisse („Parken in der kleinsten Fußgängerzone der Welt“) und das Gewähren von Asyl, vor allem am alljährlichen Nauwieser Fest...
- Herrn Michael Schmitt für die lustigen und unterhaltsamen Fahrten zur und von der Uni, den fachlichen Diskussionen, dem Korrekturlesen dieser Arbeit sowie für den gemeinsam besuchten „nie enden wollenden“ BWL-Kurs, wie sich das für einen „Arbeits-Ehemann“ gehört.
- Herrn Christian Märkert für die vielen Gespräche, das Korrekturlesen und das gemeinsame Faible für Gummibärchen, die *hierbei* in rauen Mengen verzerrt wurden...
- Herrn Vinh Trieu für die unterhaltsamen sowie fachlichen Gespräche und die anfänglichen gemeinsamen „Spalter“-Mittagspausen zu denen sich mit der Zeit mehr und mehr gesellten...
- Frau Anja Berwanger, Herrn Michael Bauer und Herrn Thomas Jung für die vielen Gespräche, Aufmunterungen und gemeinsamen Canossa-Stammtischrunden, die ich sicherlich sehr vermissen werde.
- Ein Dankeschön gebührt auch meinem „fleißigen Bienchen“ Caroline Bylda sowie Jens Burkhart, die mit viel Engagement alle von mir erteilten Aufgaben erledigt haben.
- Dem gesamten Werkstatt-Team möchte ich ein großes Lob aussprechen für die Anfertigungen, Reparaturen und Umbauten von unzähligen diversen Utensilien.
- Allen weiteren Mitgliedern des Arbeitskreises, die ich an dieser Stelle vergessen habe und die für ein nettes und freundliches Arbeitsklima sorgten.
- Ganz besonderer Dank gilt meinen Eltern, meinem Bruder (besonders für die computerspezifischen Dinge), meinem Freund sowie dem Rest meiner Familie für die jahrelange Unterstützung und Förderung.