

Elektrogesponnene Polymerfasern als neuartiges Material für die Bioelektrokatalyse des Enzyms *Pyrrlochinolin-chinon-abhängige Glukosedehydrogenase*

Johannes Gladisch, David Sarauli, Daniel Schäfer, Birgit Dietzel, Burkhard Schulz, Fred Lisdat*

Zusammenfassung

Es wurde ein dreidimensionales Polymerfasernetzwerk aufgebaut, charakterisiert und anschließend daran das Enzym *Pyrrlochinolinchinon-abhängige Glukosedehydrogenase* (PQQ)GDH gebunden. Das Polymerfasernetzwerk wurde durch Elektrosponnen einer Mischung des Polymers Polyacrylnitril und verschiedener leitfähiger Polymere der Polyanilin-Familie auf Indium-Zinn-Oxid-Elektroden aufgebracht. Die so hergestellten Fasermatten erwiesen sich bei mikroskopischen Untersuchungen gleichförmig präpariert und die Faserdurchmesser bewegten sich im Bereich weniger hundert Nanometer. Das Redoxpaar Kaliumhexacyanoferrat (II/III) zeigte an diesen Polymer-Elektrodenstrukturen eine quasi-reversible Elektrochemie. Bei weitergehenden Untersuchungen an den enzymmodifizierten Fasern ((PQQ)GDH) konnten unter Substratzugabe (Glukose) bioelektrokatalytische Ströme nachgewiesen werden. Das Fasernetzwerk fungiert hier nicht nur als Immobilisierungsmatrix, sondern als auch als Teil des Signalwandlers.

Abstract

A three-dimensional polymeric electrode structure was developed, characterized and subsequently coupled with the enzyme pyrroloquinoline quinone-dependent Glucosedehydrogenase (PQQ)GDH. The polymeric fiber network is produced by means of electrospinning from mixtures of polyacrylonitrile (PAN) and three different sulfonated polyanilines on top of ITO electrodes. The mats are uniform in their overall appearance; average diameters of the fibers produced are in the range of a few hundred nanometers. These polymeric structures can be shown to allow electrochemical conversions as verified with the ferri-/ferrocyanide redox couple. In addition, application in bioelectrocatalysis can be demonstrated. For two of three selected blends of PAN with sulfonated polyanilines, a well-defined bioelectrochemical response is obtained upon covalent fixation of PQQ-GDH to the fiber network and subsequent addition of substrate glucose. The electrospun matrix does not only act here as an immobilization support, but at the same time as a transducing element.

1. Einleitung

Leitfähige Polymere wie Polyaniline, Polypyrrol oder Polythiophen stellen ein gutes Material zur Konstruktion von Elektroden dar, die mit biologischen Systemen interagieren sollen (Wallace & Kane-Maguire 2002). Daher werden sie gern als Material für Biosensoren eingesetzt, wo sie als Matrix zur Fixierung der Biomoleküle dienen können (Sassolas et al. 2012). Darüber hinaus können sie als molekulare Nanodrähte dienen, die die Enzyme mit den Elektroden verbinden (Sassolas et al. 2012). Insbesondere den Polyanilinen wurde verstärkt Aufmerksamkeit gewidmet, weil diese gegenüber anderen leit-

fähigen Polymeren einige Vorteile aufweisen. Sie sind günstig und einfach herzustellen sowie stabil bei erhöhten Temperaturen und ungünstigen Umwelteinflüssen (Jaymand 2013). Ferner können sowohl unterschiedlich dichte, als auch verschieden strukturierte Polyanilinfilmpräparate werden. Sie weisen eine definierte Ladung auf und es können Biomoleküle gebunden oder eingebettet werden (Dhand et al. 2011). Nicht zuletzt können die Eigenschaften der Polyaniline durch das Einbringen funktioneller Gruppen in die Molekularstruktur angepasst und optimiert werden. Durch Sulfonierung kann, im Vergleich zu unmodifiziertem Polyanilin, neben der Leitfähigkeit und der Löslichkeit auch

die Redoxaktivität über einen weiten pH-Bereich verbessert werden (Jaymand 2013). Sulfonierte Polyaniline sind in einer breiten Auswahl von Lösungsmitteln löslich, während für ein vergleichbares Ergebnis bei unmodifizierten Polyanilinen zusätzliche Substanzen zugegeben werden müssen (Jaymand 2013). Darüber hinaus sind die negativen Ladungen der Sulfonsäure-Gruppen sehr wahrscheinlich vorteilhaft für die Interaktion mit Proteinen und Enzymen. Mehrere Studien legen nahe, dass sulfonierte Polyaniline eine geeignete Umgebung zur Immobilisierung von Redoxproteinen wie Cytochrom c (Zhang et al. 2006) und Hämoglobin (Zhou et al. 2005) sowie auch für Redoxenzyme wie Sulfioxidase

* korrespondierender Autor

(Sarauli et al. 2012), Peroxidase (Tatsuma et al. 2001), Urease (Słoniewska & Pałysz 2014), Glukoseoxidase (Lee et al. 2010), Tyrosinase (Mangombo et al. 2010) oder Fructosedehydrogenase (Sarauli et al. 2015) darstellen können.

Da die Leistungsfähigkeit von Biosensoren von der Größe der Sensorfläche abhängt, ist es erstrebenswert, diese zu maximieren. Diese Flächenvergrößerung kann etwa durch Aufrauen der Elektroden oder durch dreidimensionale Strukturen erfolgen. Derartige Strukturen können z. B. durch chemische Gasphasenabscheidung, Elektropolymerisation oder Immobilisierung von Nanopartikeln hergestellt werden. Eine verhältnismäßig junge Methode in dieser Hinsicht ist das Elektrospinnen. Durch Elektrospinnen können Netzwerke aus Fasern mit Durchmessern von wenigen hundert Nanometern bis einigen Mikrometern hergestellt werden. Die Technik des Elektrospinnens hat bereits zahlreiche Anwendungen gefunden, beispielsweise in der medizinischen Diagnostik, der Gewebezüchtung, als Material für Superkondensatoren oder Luftfilter (Hughes et al. 2015). Auch erste sensorische Anwendungen wurden bereits gezeigt (Bourourou et al. 2015). Für die Biosensorik wurden elektrogesponnene Fasern bis jetzt überwiegend dazu genutzt, größere Molekülmengen zu fixieren. Von diesem Entwicklungsstand ausgehend ist es erstrebenswert, die Technik weiter zu entwickeln und nicht nur große Molekülmengen auf die Oberfläche zu bringen, sondern diese auch elektrochemisch mit den Fasern zu koppeln.

Typische, beim Elektrospinnen eingesetzte Polymere sind Polyacrylnitril (PAN), Polyethylenoxid (PEO) oder Polyvinylalkohol (PVA). Die Eigenschaften der Fasern können nicht nur durch die Auswahl der Polymere verändert werden, sondern auch durch Zugabe von Nanopartikeln oder Kohlenstoffnanoröhren zu der Spinnlösung (Attout et al. 2008).

In dieser Arbeit wird die Herstellung dreidimensionaler leitfähiger Polymerfasernetzwerke durch Elektrospinnen präsentiert. Zur Herstellung der Fasern werden Gemische dreier unterschiedlich sulfonierter Polyaniline mit nicht leitfähigem Polyacrylnitril elektrogesponnen. Das PAN dient dabei als strukturgebendes Stützpolymer. Die Fasernetzwerke wurden auf ITO-Elektroden abgeschieden. Die präparierten

Fasernetzwerke wurden mittels mikroskopischer Techniken sowie elektrochemisch mit dem anorganischen Redoxpaar Kaliumhexacyanoferrat (II/III) charakterisiert. In weitergehenden Analysen wurde das Enzym *Pyrrrolochinolinchinon-abhängige Glukosedehydrogenase* (PQQ) GDH kovalent an die Fasern gebunden und anschließend voltametrisch unter Substratzugabe (Glukose) untersucht.

2. Ergebnisse und Diskussion

Es wurden sulfonierte Polyaniline eingesetzt, weil diese nicht nur leitfähig sind, sondern auch eine direkte Interaktion mit (PQQ)GDH erlauben. Es wurden drei verschiedene Polymere untersucht, PABSA [poly(3-aminobenzonsäure-co-3-aminobenzensulfonsäure)], PAPASA [poly(3-aminobenzolessigsäure-co-3-aminobenzensulfonsäure)] und PANABMSA [poly(3-aminobenzonsäure-co-2-methoxyanilin-5-sulfonsäure-co-anilin)] (Abb. 1). Abgesehen von Sulfonsäuregruppen wiesen die Polymere auch Carbonsäuregruppen als Seitenketten auf. Letztere erlauben eine kovalente Ankopplung des Enzyms (PQQ)GDH. Die Unterschiede der Polymere ergeben sich durch die verschiedenen Substitutionen am Anilinring.

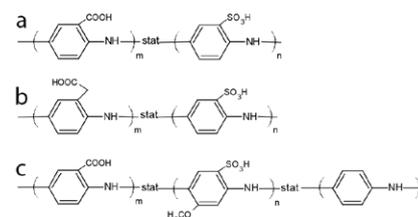


Abb. 1) Chemische Struktur der verschiedenen verwendeten Polyaniline: (a) PABSA, (b) PAPASA, (c) PANABMSA.

2.1 Herstellung und Charakterisierung der dreidimensionalen Elektrodenstrukturen

Bei ersten Versuchen mit den reinen Polyanilinen stellte sich heraus, dass diese allein nicht beim Elektrospinnen zu verarbeiten sind. Dies ist wahrscheinlich auf deren geringe Viskosität und geringe Molmasse zurückzuführen. Daher wurden die sulfonierten Polyaniline in Verbindung mit PAN als Stützpolymer verwendet. Hier wurden Fasern erhalten und auf planaren ITO-Elektroden abge-

schieden. Nach der Herstellung wurden sie zunächst mittels Lichtmikroskopie untersucht um die Qualität der Fasernetzwerke zu beurteilen. Anschließend wurden die Polymerfasernetzwerke mittels Rasterelektronenmikroskopie (REM) weitergehend charakterisiert.

Die Abb. 2 und 3 zeigen REM-Aufnahmen von PAN/PAPASA-, PAN/PANABMSA- und PAN/PAPASA-Polymerfasernetzwerken. Bevor die Polymermischungen in DMSO zum Elektrospinnen eingesetzt werden konnten, wurden sie mit Ultraschall behandelt um eine homogene Polymerlösung zu erhalten. Bei einer Pumpgeschwindigkeit von 2 $\mu\text{l}/\text{min}$ wurde nahezu keine Tropfenbildung festgestellt, aber zuverlässig Fäden abgeschieden. In Abhängigkeit des gewählten Polyanilins zeigten die Polymerfasernetzwerke unterschiedliche Farben. So waren PAN/PABSA und PAN/PAPASA bräunlich, während PAN/PANABMSA bläulich war. Die festgestellten Farben stimmen mit den anhand des Redoxzustands zu erwartenden Farben der Polymere nach der Synthese überein. Die Polymerfasernetzwerke unterschieden sich weder bei Verwendung verschiedener Polymergemische noch bei verschiedenen, mit derselben Polymermischung präparierten Elektroden deutlich in der Faserstruktur. Lediglich in einigen Fällen, insbesondere für PAN/PANABMSA, konnten agglomerierte Fasern beobachtet werden. Das kann durch die, verglichen mit den anderen Polymeren, größere Viskosität von PANABMSA-Lösungen erklärt werden.

Das in Abb. 4 dargestellte Polymerfasernetzwerk wurde mit einer Prozessdauer von 15 min hergestellt. Die Dicke des Polymerfasernetzwerks bewegt sich im Bereich einiger Mikrometer. Die durchschnittlichen Faserdurchmesser sind in Tab. 1 zusammengefasst. Im Fall von PAN/PANABMSA sind die Faserdurchmesser und deren Variation im Netzwerk größer als im Fall der anderen Polymere. Darüber hinaus traten bei PAN/PANABMSA deutlich größere Verdickungen auf als bei anderen Polymermischungen. Es gibt eine Vielzahl möglicher Ursachen hierfür; ein entscheidender Faktor könnte aber die verhältnismäßig hohe Prozessspannung von 25 kV sein. Hinsichtlich der Interaktion mit Wasser zeigten alle Polymerfasernetzwerke ein ähnlich hydrophiles und schwammartiges Verhalten. Kontaktwinkelmessungen ergaben bei allen Poly-

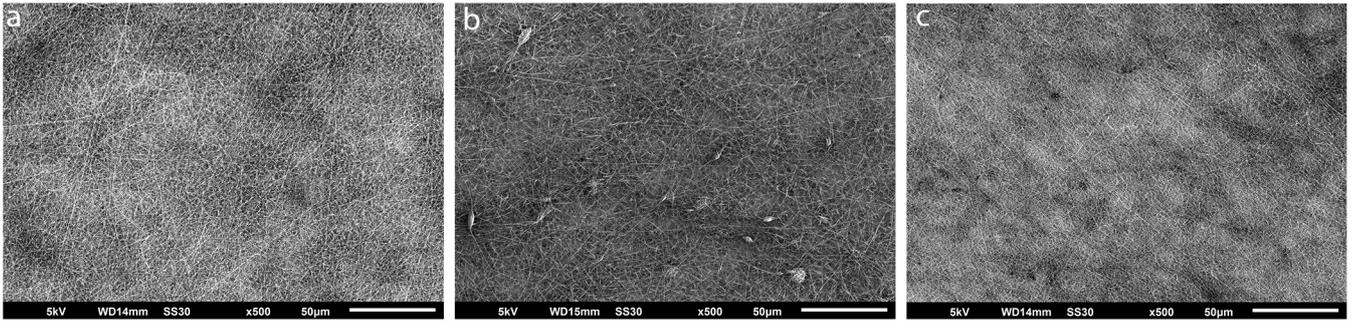


Abb. 2) REM-Aufnahmen der Fasermatten von (a) ITO-PAN/PAPASA, (b) ITO-PAN/PANABMSA, (c) ITO-PAN/PABSA (Legende = 50 µm).

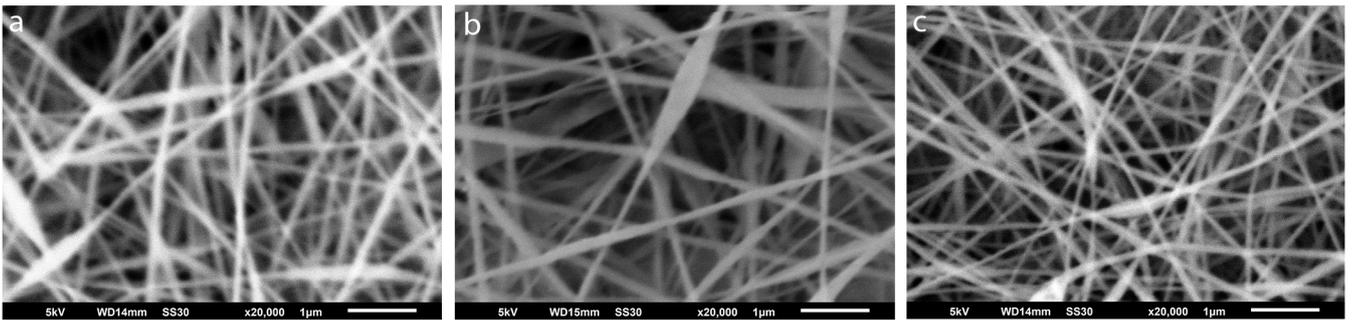


Abb. 3) REM-Aufnahmen der Fasermatten von (a) ITO-PAN/PAPASA, (b) ITO-PAN/PANABMSA, (c) ITO-PAN/PABSA (Legende = 1 µm).

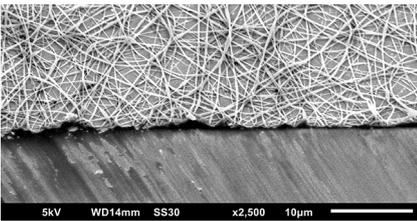


Abb. 4) REM-Aufnahme einer ITO-PAN/PABSA-Matte, hergestellt durch 15 min Elektrospinnen.

Tab. 1: Mittlere Durchmesser der Fasern und Faserverdickungen verschiedener Fasern, ermittelt mittels Elektronenmikroskopie (n=3).

	ITO-PAN/ PAPASA	ITO-PAN/ PANABMSA	ITO-PAN/ PABSA
Durchmesser [µm]	0,13±0,02	0,15±0,04	0,12±0,02
Durchmesser Verdickungen [µm]	0,31±0,08	0,51±0,15	0,30±0,05

meren Werte im Bereich von 30°.

2.2 Elektrochemische Charakterisierung der Polymerfasernetzwerke

Mit dem Ziel, die elektrochemischen Eigenschaften der hergestellten Polymerfasernetzwerke zu bestimmen, wurden zykovoltametrische Untersuchungen mit Kaliumhexacyanoferrat (II/III) durchgeführt. Die elektrochemischen Eigenschaften wurden mit denen von ITO-Elektroden verglichen, die die Basis für die Polymerfasernetzwerke darstellten. Im Vergleich zu blanken ITO-Elektroden konnte durch das Aufbringen der Polymerfasernetzwerke ein deutlich verbesserter Umsatz von Kaliumhexacyanoferrat festgestellt werden. Im Vergleich zu den anderen Polymeren zeigte PAN/PABSA die größten Strommaxima (Abb. 5, Tab. 2). PAN/PAPASA und PAN/PABSA weisen niedrigere Abstände

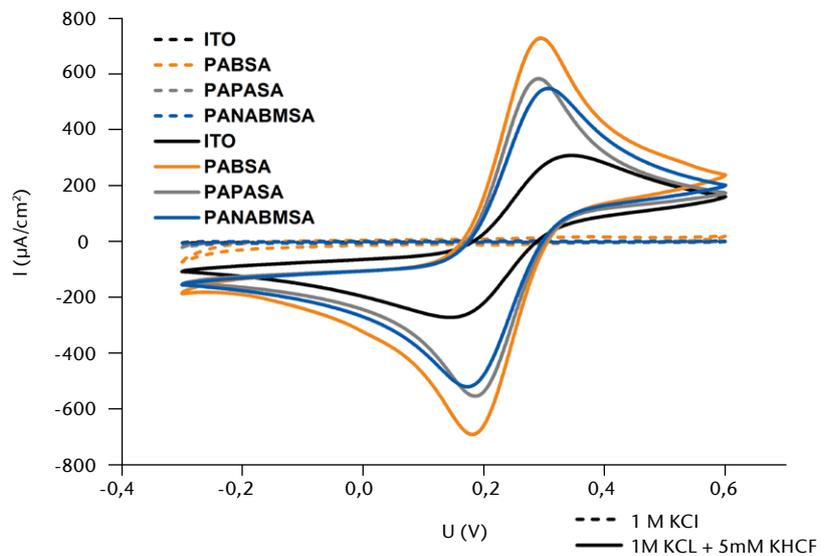


Abb. 5) Zykovoltammogramme der unterschiedlich modifizierten Elektroden, aufgenommen bei einer Scanrate von 100 mV/s, in 1 M KCl und 5 mM $K_3/4[Fe(CN)_6]$. Die Polymerfasern wurden auf den ITO-Elektroden durch 15 min Elektrospinnen abgeschieden.

Tab. 2: Ergebnisse der elektrochemischen Untersuchungen (Peakseparation, formale Potenziale, heterogene Elektronentransfergeschwindigkeitskonstante) der 15 min elektrogenesponnenen Fasermatten an den ITO-Elektroden, durchgeführt bei einer Scanrate von 100 mV/s in 1 M KCl mit 5 mM $K_{3/4}[Fe(CN)_6]$.

Elektroden	ΔE_p [V]	E_f [V]	$k_s \times 10^3$ [cm/s]
PAN/PAPASA	$0,104 \pm 0,007$	$0,239 \pm 0,002$	$9,5 \pm 3,6$
PAN/PANABMSA	$0,139 \pm 0,043$	$0,244 \pm 0,004$	$8,9 \pm 3,6$
PAN/PABSA	$0,113 \pm 0,006$	$0,239 \pm 0,002$	$6,4 \pm 1,1$
ITO	$0,186 \pm 0,052$	$0,244 \pm 0,002$	$5,6 \pm 2,5$

zwischen den Strommaxima auf als PAN/PANABMSA (bei gleicher Spindauer von 15 min). Darüber hinaus ist die Peakseparation auch geringer als für blanke ITO-Elektroden. Das deutet auf eine verbesserte Elektronentransferkinetik hin.

Bei verschiedenen Spindauern von PAN/PABSA, und damit einhergehenden Unterschieden in der Fasermattendicke, waren die Peakseparationen sowohl für die mit 5 min als auch die mit 30 min Spindauer präparierten Elektroden größer als bei Elektroden, die 15 min beschichtet wurden. Hinsichtlich des Redoxpotenzials zeigte sich zwischen den unterschiedlich präparierten Elektroden kein Unterschied. Darüber hinaus wurden die heterogenen Elektronentransfergeschwindigkeitskonstanten nach dem Ansatz von Nicholson & Shain (1964) bestimmt (Tab. 2). Die niedrigsten k_s -Werte wurden für die blanken ITO-Elektroden ermittelt. Dies deutet darauf hin, dass sich die Oberflächenmodifikationen mit den Polymerfasernetzwerken positiv auf den heterogenen Elektronentransfer des Redoxpaares auswirken. Beim Vergleich der unterschiedlichen

Polymere zeigte PAN/PABSA die geringsten Standardabweichungen, während die k_s -Werte für PAN/PAPASA und PAN/PANABMSA zwar geringfügig größer sind, aber auch deutlich größeren Schwankungen unterliegen. Aufgrund der erreichten Stromwerte und der Kinetik kann geschlossen werden, dass alle Polymerfasernetzwerke eine geeignete Oberfläche für elektrochemische Sensoren darstellen.

2.3 Bioelektrokatalyse von (PQQ)GDH an dem Polymerfasernetzwerk

Um die Eignung der aufgetragenen Polymerfasernetzwerke als Matrix für die Kopplung von Enzymen zu überprüfen, wurde das Enzym (PQQ)GDH an die modifizierten Elektroden gebunden. Dies geschah kovalent über die Carboxylseitengruppen der Polyaniline (Abb. 1), wodurch eine gute Stabilität der Enzymelektroden gewährleistet wird. Der besondere Vorteil der verwendeten sulfonierten Polyaniline besteht darin, dass sie bei neutralen pH-Werten leitfähig sind. Darüber hinaus wurde von der Arbeitsgruppe bereits in der Vergangenheit gezeigt, dass die verwendeten

sulfonierten Polyaniline in der Lage sind, mit (PQQ)GDH Elektronen auszutauschen (Sarauli et al. 2013).

Abb. 6 zeigt die Zyklovoltammogramme der elektrogenesponnenen PAN/PABSA-, PAN/PAPASA- und PAN/PANABMSA-Elektroden ohne das Substrat Glukose. Liegt keine Glukose vor, können für PABSA und PAPASA keine aus Redoxreaktionen resultierenden Ströme beobachtet werden. Für PANABMSA dagegen können eindeutige Redoxreaktionen mit einem formalen Potenzial von $E = +0,14$ V vs Ag/AgCl festgestellt werden. Ursache für das unterschiedliche elektrochemische Verhalten sind Konformationsunterschiede der verschiedenen Copolymere nach der Synthese. Diese fanden sich auch in vorhergehenden Studien (Sarauli et al. 2013). Nach der Zugabe von Glukose als Substrat konnten jedoch für alle Polymere katalytische Ströme festgestellt werden, welche wiederum ohne Polymerbeschichtung ausbleiben. Dies unterstreicht die Rolle der elektrogenesponnenen Polymerfasermatten für die Enzymreaktion.

Sulfonierte Polyaniline sind redoxaktiv, auch wenn die Ströme wie im Fall von PABSA und PAPASA teilweise sehr schwach sind (Abb. 6). Wenn nach der Zugabe von Substrat ein bioelektrokatalytisches Signal am Redoxpotenzial des Polymers beobachtet wird, dann kann auf einen Mediatorprozess geschlossen werden. Im Fall der ITO-PAN/PANABMSA-Elektroden ist ein derartiger Prozess naheliegend, denn die bioelektrokatalytischen Ströme treten bei $E = +0,1$ V vs Ag/AgCl auf (Tab. 3). Im Fall von PAN/PABSA und PAN/PAPASA konnte die Bioelektrokatalyse jedoch bereits bei deutlich geringeren Potenzialen festgestellt werden, was darauf hindeutet, dass ein direkter Elektronen-

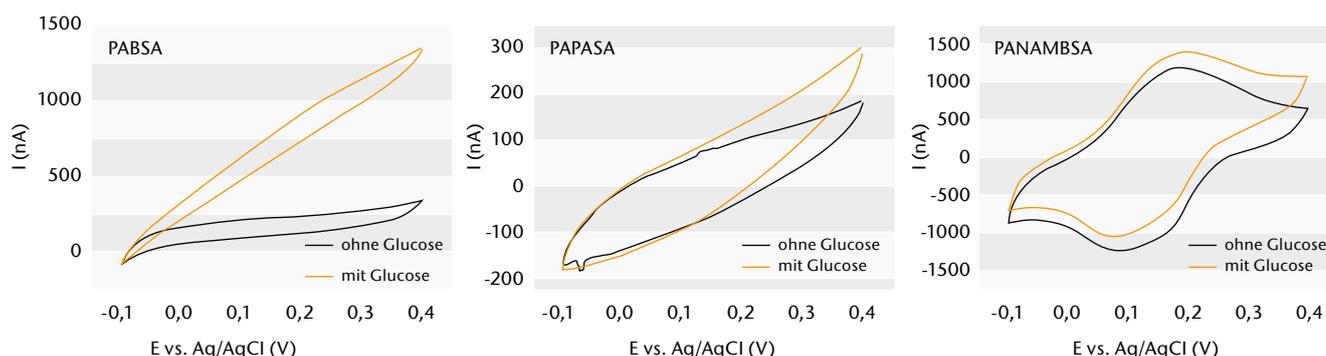


Abb. 6) Zyklovoltammogramme von ITO-PAN/PABSA, ITO-PAN/PAPASA und ITO-PAN/PANABMSA mit kovalent fixierter (PQQ)GDH in Abwesenheit (schwarze Linien) und Anwesenheit von 5 mM Glukose (orange Linien). Die Messungen wurden bei einer Scanrate von 5 mV/s in 30 mM MES Puffer pH 6 bei 25 °C durchgeführt.

transfer zwischen dem Enzym und den Polymeren vorliegt. Diese Beobachtung deckt sich mit zuvor berichteten Startpotenzialen der (PQQ)GDH-Katalyse an polymermodifizierten Elektroden (Sarauli et al. 2013).

Die in Tab. 3 dargestellten Ergebnisse zeigen, dass in Abhängigkeit der verwendeten Polymere signifikante Unterschiede hinsichtlich der Größe der katalytischen Ströme auftreten. ITO-PAN/PAPASA-Elektroden weisen die geringste bioelektrokatalytische Aktivität auf ($I_{cat} = 98 \text{ nA}$). Im Vergleich dazu sind die Glukose-induzierten Ströme bei PAN/PABSA 10fach so hoch wie bei PAN/PAPASA ($I_{cat} = 980 \text{ nA}$). Somit ist ITO-PAN/PABSA im Hinblick biosensorischer Anwendungen der aussichtsreichste Kandidat für eine effiziente Verbindung von Enzym und Elektrode. Mit dem Ziel, die Leistung der (PQQ)GDH-modifizierten Polymerfasermatten zu optimieren, wurde die Spindauer zwischen 15, 30 und 60 min variiert. Die bioelektrochemischen Ergebnisse der Elektroden nach der Enzymkopplung sind in Tab. 4 zusammengefasst. Durch verlängerte Spinnzeiten und daraus resultierende Fasermattendicken nehmen die bioelektrokatalytischen Ströme ab. Demnach sind nicht zu dicke Polymerfasermatten für die Herstellung elektroaktiver Elektroden vorteilhaft. Auch wenn dickere Polymerfasermatten eine größere Oberfläche zur Bindung von Enzymen bereitstellen, scheinen hier Transportprobleme den Stromfluss zu limitieren (Glukose durch das Netzwerk, Elektronen im Netzwerk). Dabei ist insbesondere auch zu berücksichtigen, dass ein großer Anteil der Fasern aus nicht leitfähigem PAN besteht. Vor diesem Hintergrund, kann die mit den hergestellten Polymerfasermatten ermittelte effektive Bioelektrokatalyse als voller Erfolg gewertet werden.

Abb. 7 zeigt eine an ITO-PAN/PABSA-Elektroden ermittelte Kalibrationsgerade ($n = 3$) für die Oxidationsströme bei verschiedenen Glukosekonzentrationen. Entsprechend der Michaelis-Menten-Kinetik kann ein K_m -Wert von 0,45 mM Glukose ermittelt werden. Die Konzentrationsabhängigkeit des Systems erlaubt im dargestellten Bereich einen eindeutigen Nachweis von Glukose. Es zeigt sich aber auch, dass diese Abhängigkeit bei einer

Tab. 3: Startpotenziale der Bioelektrokatalyse und Ströme an ITO-PAN/PAPASA, ITO-PAN/PANABMSA und ITO-PAN/PABSA, jeweils elektrogesponnen für 15 min, nach Zugabe von 5 mM Glukose bei 0,35 V vs Ag/AgCl.

Elektroden	Startpotenzial, E vs. Ag/AgCl, V	Strom, I, nA
ITO-PAN/PABSA	-0.1	984 ± 50
ITO-PAN/PAPASA	-0.05	98 ± 30
ITO-PAN/PANAMBSA	+0.1	360 ± 40

Tab. 4: Für verschiedene Spinnzeiten gemessene katalytische Ströme der ITO-PAN/PABSA-, ITO-PAN/PAPASA- und ITO-PAN/PANABMSA-Elektroden bestimmt bei +0,35 V vs Ag/AgCl in Gegenwart von 5 mM Glukose ($n = 3$).

Elektroden	Elektrospinnzeit [min]	Stromstärke [nA]
ITO-PAN/PABSA	30	807 ± 30
	60	630 ± 40
ITO-PAN/PAPASA	30	74 ± 20
	60	51 ± 10
ITO-PAN/PANAMBSA	30	293 ± 50
	60	226 ± 30

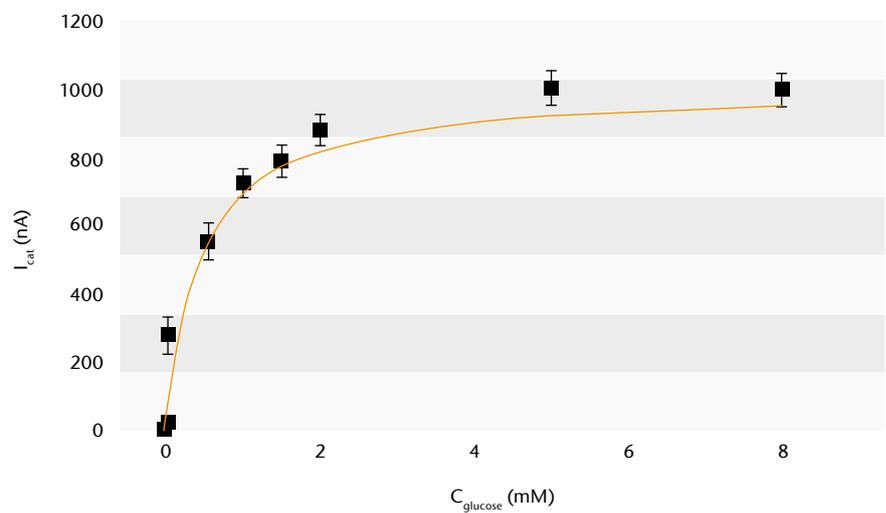


Abb. 7) Katalytische Ströme mit ITO-PAN/PABSA-Elektroden (15 min Spindauer) bei verschiedenen Glukosekonzentrationen. Die bioelektrokatalytischen Ströme wurden mit Hilfe von Zyklovoltammetrie bei 0,35 V vs Ag/AgCl ermittelt. Die Messungen wurden in 20 mM MES Puffer pH 6 bei einer Scanrate von 5 mV/s durchgeführt.

Glukosekonzentration > 8 mM nicht mehr besteht. Hier wird zunehmend der Elektronenabtransport vom reduzierten Enzym zum reaktionsbestimmenden Faktor. Nichtsdestotrotz ist der ermittelte Messbereich vergleichbar mit anderen Ergebnissen von (PQQ)GDH an modifizierten Elektroden. Besonders

hervorzuheben ist, dass die Glukosemessung bei sehr niedrigen Potenzialen stattfinden kann, weil die Bioelektrokatalyse bereits bei Potenzialen von -0,1 V vs Ag/AgCl beginnt. Dies ist insbesondere in komplexen Medien von Vorteil, bei denen andere redoxaktive Stoffe vorliegen.

3. Fazit

Die Herstellung leitfähiger dreidimensionaler Polymerfasernetzwerke durch Elektrospinnen von drei unterschiedlichen sulfonierten Polyanilinen in Verbindung mit nicht leitendem Polyacrylnitril wurde gezeigt. Bei mikroskopischen Untersuchungen zeigen die PAN/PABSA-, PAN/PAPASA- und PAN/PANABMSA-Polymerfasernetzwerke eine gleichmäßige Faserverteilung auf der ITO-Oberfläche. Die Charakterisierung der Elektroden in Gegenwart des Redoxsystems Kaliumhexacyanoferrat (II/III) deutet darauf hin, dass die Polymerfasernetzwerke einen elektrochemischen Umsatz erlauben. Verglichen mit unmodifizierten ITO-Elektroden weisen die mit dem Polymerfasernetzwerk modifizierten Elektroden größere Faradaysche Ströme und einen verbesserten Elektronentransfer auf. Nach Optimierung der Prozessparameter erfolgt die Herstellung reproduzierbar. Darüber hinaus eignen sich die Polymerfasernetzwerke als Oberfläche für die Kopplung von Enzymen, wie am Beispiel (PQQ)GDH gezeigt. Nach Zugabe des Substrates Glukose können eindeutige katalytische Ströme nachgewiesen werden. In Abhängigkeit von der ausgewählten Polymermischung erfolgt der Ladungstransfer bei der Bioelektrokatalyse ohne zusätzliche Shuttlemoleküle bei niedrigen Potenzialen. Eine eindeutige konzentrationsabhängige Signalantwort wurde mit PAN/PABSA-Elektroden gefunden. Darüber hinaus spielt der Polymerfilm eine aktive Rolle beim Elektronentransport vom Enzym (PQQ)GDH zur Elektrode. Daher stellen die präparierten elektrogewonnenen Polymerfasernetzwerke mit sulfonierten Polyanilinen in Verbindung mit (PQQ)GDH ein aussichtsreiches System für biosensorische Anwendungen dar.

4. Material-/Methodenteil

Chemikalien: Alle Reagenzien sowie Lösungsmittel wurden ohne weitere Aufreinigung eingesetzt. Dimethylsulfoxid (DMSO), CaCl_2 , 2-(N-morpholino)ethansulfonsäure (MES), Polyacrylnitril und Kaliumhexacyanoferrat II wurden von Sigma Aldrich bezogen. Aceton, Ethanol und Kaliumhexacyanoferrat III wurden von Roth (CARL

ROTH GmbH und CO. KG, Germany) erhalten. 3-Aminobenzoesäure (3-AB) (Sigma-Aldrich Chemicals Co., Germany) and 3-Aminobenzolsulfonsäure (3-ABS) (Sigma-Aldrich Chemicals Co., Fluka, Germany) wurden aus wässrigem Medium rekristallisiert (3-AB: m.p. 176-177 °C; 3-ABS: m.p. 288 °C). 3-Aminobenzoesäure (3-ABA), 3-Amino-4-Methoxybenzolsulfonsäure (MAS), Ammoniumpersulfat (APS), HCl, DMF und Natriumhydroxid wurden ebenfalls von Sigma-Aldrich Chemicals Co., Fluka, Germany bezogen.

Copolymerisations: PAPASA wurde durch chemisch-oxidative Polymerisation synthetisiert: 1 g (0,006 mol) 3-Aminobenzoesäure und 1,14 g (0,006 mol) 3-Aminobenzolsulfonsäure wurden zunächst in 27 ml 0,5 M NaOH gelöst. 2,97 g (0,013 mol) Ammoniumpersulfat (gelöst im Wasser) wurde kontinuierlich unter ständiger Rührung für mehr als 30 Minuten bei Raumtemperatur zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde für weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, um die Reaktion ablaufen zu lassen. Das ausgefallene Produkt wurde abfiltriert, mit der Mischung von 1.2 M HCl und Wasser gewaschen und unter Vakuum bei 80 °C für 24 Stunden getrocknet. PANABMSA wurde auf folgende Weise synthetisiert: Die 1:1-Mischung von 80 ml 0,5 M NaOH mit 8,1 g (0,04 mol) 3-Amino-4-Methoxybenzolsulfonsäure, 10 ml 0,5 M NaOH mit 0,55 g (0,004 mol) 3-Aminobenzoesäure und 3,72 g (0,04 mol) Anilin wurde bei Raumtemperatur gerührt, anschließend 12,3 g (0,054 mol) Ammoniumpersulfat (gelöst in 30 ml Wasser) langsam für mehr als 30 Minuten zugegeben. Die Reaktionsmischung wurde dann weitere 24 Stunden bei Raumtemperatur gerührt, um die Reaktion ablaufen zu lassen. Das ausgefallene Produkt wurde abfiltriert, mit 1,2 M HCl und Wasser gewaschen und unter Vakuum bei 80 °C für 24 Stunden getrocknet. PABSA wurde nach einer bereits publizierten Prozedur synthetisiert (Sarauli et al. 2013).

Charakterisierung der Polymere: Die Molekulargewichte wurden mit GPC mit bestimmt. Die Messungen erfolgten in DMF. IR-Spektren wurden mit Bio-Rad FTX 3000MX Spektrometer aufgenommen. $^1\text{H-NMR}$ Messungen erfolgten

mittels Bruker Instrument.

Polymerlösung: Vor Benutzung wurden 50 mg/ml Polyacrylonitril und 10 mg/ml Polyanilin in DMSO aufgelöst, gemischt und für 11 Stunden ins Ultraschallbad gegeben.

Elektrospinning: Zunächst wurden die ITO-Elektroden gesäubert. Dafür wurden sie abwechselnd mit DMSO, Aceton und Ethanol gewaschen und anschließend für 15 Minuten ins Ultraschallbad platziert. Die Polymerlösung wurde mit der Geschwindigkeit von 2 $\mu\text{l}/\text{min}$, mit einem Elektrodenabstand von 35 cm bei der Spannung von 25 kV in der Elektrospinnkabine (IME Technologies, Niederlande) gesponnen. Die Temperatur wurde auf 25 °C eingestellt und die Luftfeuchtigkeit auf 40 % gesetzt. Beide Parameter wurden während des Spinnprozesses kontrolliert. Dabei wurden die Spinnzeiten von 5 bis 60 Minuten variiert.

Charakterisierung von Polymerfilmen: Die beschichteten Elektroden wurden mikroskopisch (Olympus DSX500, Olympus Deutschland GmbH, Germany und JEOL JSM-6510 SEM, JEOL Germany GmbH, Germany) untersucht. Kontaktwinkelmessungen erfolgten mittels DataPhysics OCA15EC Gerät (DataPhysics GmbH, Germany).

Enzymlösung: Die Glukosedehydrogenase (apoGDH, Roche GmbH) wurde in 5 mM MES Puffer+1 mM CaCl_2 aufgelöst und der pH-Wert auf 5 eingestellt. Danach wurde apoGDH mit PQQ rekonstituiert. Dafür wurden apoGDH und PQQ gemischt und 1 Stunde im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Rekonstitution wurden die Enzymlösungen bei -20 °C gelagert. Vor jeder Messung wurde die spezifische Aktivität des Enzyms bestimmt. Der Wert der spezifischen Aktivität betrug dabei $2200 \pm 30 \text{ U mg}^{-1}$. 2,6-Dichlorophenolindophenol wurde als Elektronenakzeptor verwendet.

Enzymbindung: Die mit Polymerfilmen beschichteten viereckigen Indium-Zinn-Oxid (ITO)-Elektroden (bezogen von Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Germany) wurden als Material für die kovalente Bindung des Enzyms verwendet. Dafür wurden die Elektroden in eine Lösung

von EDC/NHS (100 mM/25 mM) in 5 mM MES + 1 mM CaCl₂ Puffer (pH 6.5) für 15 Minuten platziert, danach dreimal mit dem gleichen Puffer gewaschen. Anschließend wurden die Elektroden in der Enzymlösung 1 Stunde lang inkubiert, danach mit Puffer gewaschen.

Elektrochemie: Die Elektroden wurden zykovoltametrisch mit Hilfe des CH-Instruments 1230b in einer 1 ml Messzelle mit einer Ag/AgCl/1 M KCl Referenzelektrode (Biotetra, Germany) und einer Pt-Draht-Gegenelektrode charakterisiert. Die ersten Untersuchungen wurden mit einer Mischung von K₄[Fe(CN)₆]/K₃[Fe(CN)₆] (5 mM) in 1 M KCl durchgeführt. Die bioelektrochemischen Studien erfolgten in derselben Messzelle in 20 mM MES Puffer bei pH 6. Das katalytische Verhalten des Systems wurde bei unterschiedlichen Glukosekonzentrationen untersucht. Zykovoltametrische Messungen wurden mit Hilfe des µAutolab Type-II-Gerätes (Metrohm) bei einer Scanrate von 5 mV s⁻¹ durchgeführt. Das Potenzialfenster wurde zwischen -0,4 und +0,4 V vs. Ag/AgCl ausgewählt. Die Datenanalyse erfolgte mit der GPES-Software (General Purpose for Electrochemical System, Eco Chemie, Niederlande).

LITERATUR

- Attout A, Yunus S, Bertrand P (2008) Electrospinning and alignment of polyaniline-based nanowires and nanotubes. *Polym Eng Sci* 48(9):1661–1666. doi: 10.1002/polb.20969
- Bourourou M, Holzinger M, Bossard F, Hugenell F, Maaref A, Cosnier S (2015) Chemically reduced electrospun polyacrylonitrile–carbon nanotube nanofibers hydrogels as electrode material for bioelectrochemical applications. *Carbon* 87:233–238. doi: 10.1016/j.carbon.2015.02.026
- Dhand C, Das M, Datta M, Malhotra BD (2011) Recent advances in polyaniline based biosensors. *Biosens Bioelectron* 26(6):2811–2821. doi: 10.1016/j.bios.2010.10.017
- Hughes LA, Gaston J, McAlindon K, Woodhouse KA, Thibeault SL (2015) Electrospun fiber constructs for vocal fold tissue engineering: Effects of alignment and elastomeric polypeptide coating. *Acta Biomater* 13:111–120. doi: 10.1016/j.actbio.2014.10.039
- Jaymand M (2013) Recent progress in chemical modification of polyaniline. *Prog Polym Sci* 38(9):1287–1306. doi: 10.1016/j.progpolymsci.2013.05.015
- Lee KP, Komathi S, Nam NJ, Gopalan AI (2010) Sulfonated polyaniline network grafted multi-wall carbon nanotubes for enzyme immobilization, direct electrochemistry and biosensing of glucose. *Microchem J* 95(1):74–79. doi: 10.1016/j.microc.2009.10.008
- Mangombo ZA, Baker P, Iwuoha E, Key D (2010) Tyrosinase biosensor based on a boron-doped diamond electrode modified with a polyaniline-poly(vinyl sulfonate) composite film. *Microchim Acta* 170(3–4):267–273. doi: 10.1007/s00604-010-0378-1
- Nicholson RS, Shain I (1964) Theory of Stationary Electrode Polarography. Single Scan and Cyclic Methods Applied to Reversible, Irreversible, and Kinetic Systems. *Anal Chem* 36(4):706–723. doi: 10.1021/ac60210a007
- Sarauli D, Wettstein C, Peters K, Schulz B, Fattakhova-Rohlfing D, Lisdat F (2015) Interaction of Fructose Dehydrogenase with a Sulfonated Polyaniline. Application for Enhanced Bioelectrocatalysis. *ACS Catal* 5(4):2081–2087. doi: 10.1021/acscatal.5b00136
- Sarauli D, Xu C, Dietzel B, Schulz B, Lisdat F (2013) Differently substituted sulfonated polyanilines: The role of polymer compositions in electron transfer with pyrroloquinoline quinone-dependent glucose dehydrogenase. *Acta Biomater* 9(9):8290–8298. doi: 10.1016/j.actbio.2013.06.008
- Sarauli D, Xu C, Dietzel B, Stiba K, Leimkühler S, Schulz B, Lisdat F (2012) Thin films of substituted polyanilines: interactions with biomolecular systems. *Soft Matter* 8(14):3848–3855. doi: 10.1039/c2sm07261k
- Sassolas A, Blum LJ, Leca-Bouvier BD (2012) Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors. *Biotechnol Adv* 30(3):489–511. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.09.003
- Słoniewska A, Patys B (2014) Supramolecular polyaniline hydrogel as a support for urease. *Electrochim Acta* 126:90–97. doi: 10.1016/j.electacta.2013.10.164
- Tatsuma T, Ogawa T, Sato R, Oyama N (2001) Peroxidase-incorporated sulfonated polyaniline–polycation complexes for electrochemical sensing of H₂O₂. *J Electroanal Chem* 501(1–2):180–185. doi: 10.1016/S0022-0728(00)00525-8
- Wallace GG, Kane-Maguire L (2002) Manipulating and Monitoring Biomolecular Interactions with Conducting Electroactive Polymers. *Adv Mater* 14(13–14):953–960. doi: 10.1002/1521-4095(20020705)14:13/14<953:AID-ADMA953>3.0.CO;2-T
- Zhang L, Jiang X, Niu L, Dong S (2006) Syntheses of fully sulfonated polyaniline nano-networks and its application to the direct electrochemistry of cytochrome c. *Biosens Bioelectron* 21(7):1107–1115. doi: 10.1016/j.bios.2005.04.004
- Zhou B, Sun R, Hu X, Wang L, Wu H, Song S, Fan C (2005) Facile Interfacial Electron Transfer of Hemoglobin. *Int J Mol Sci* 6(12):303–310. doi: 10.3390/i6120303

AUTOREN

Johannes Gladisch
David Sarauli
Daniel Schäfer
Fred Lisdat
 Technische Hochschule Wildau
 Institut für Angewandte Biowissenschaften
 Forschungsgruppe Biosystemtechnik

Birgit Dietzel
 Technische Hochschule Wildau
 Forschungsgruppe Photonik,
 Laser- und Plasmatechnologien

Burkhard Schulz
 Institut für Dünnschichttechnologie
 und Mikrosensorik Teltow

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