



Doctoral Thesis

Membranlose Immobilisierung von Enzymen auf Tetrathiafulvalen-p-tetracyanochinodimethan-Elektroden

Author(s):

Korell, Ulrich

Publication Date:

1994

Permanent Link:

<https://doi.org/10.3929/ethz-a-000940363> →

Rights / License:

[In Copyright - Non-Commercial Use Permitted](#) →

This page was generated automatically upon download from the [ETH Zurich Research Collection](#). For more information please consult the [Terms of use](#).

Diss. ETH Nr. 10474

**Membranlose Immobilisierung von Enzymen
auf
Tetrathiafulvalen-p-tetracyanochinodimethan-Elektroden**

ABHANDLUNG
zur Erlangung des Titels

DOKTOR DER NATURWISSENSCHAFTEN
der
EIDGENÖSSISCHEN TECHNISCHEN HOCHSCHULE ZÜRICH

vorgelegt von

Ulrich Korell
M. Sc. (McGill University, Montreal, Kanada)

geboren am 19. Juni 1965
deutscher Staatsangehöriger

Angenommen auf Antrag von
Prof. Dr. E. Pretsch, Referent
Dr. U. E. Spichiger-Keller, Korreferentin
Prof. Dr. P. L. Luisi, Korreferent

Zürich 1994

1 Zusammenfassung

Die zwei Enzyme Xanthin-Oxidase (XOD, E.C. 1.2.3.2) und Peroxidase (POD, E.C. 1.11.1.7) wurden auf Elektroden immobilisiert, die das leitfähige organische Salz TTF-TCNQ (Tetrathiafulvalen-p-tetracyanochinodimethan) und Silikonöl enthielten. Die so erhaltenen amperometrischen Biosensoren verwendete man für die Messung von Hypoxanthin bzw. Wasserstoffperoxid. Zum Betrieb dieser Sensoren sind lediglich Pufferlösungen ohne Hilfsreagenzien erforderlich.

Die Immobilisierung von XOD geschah mittels verschiedener Techniken. Die besten Resultate erhielt man durch Ausnützen der lipophilen Wechselwirkungen zwischen Enzym und Elektrodenpaste. Die Kalibrationsfunktion für Hypoxanthin als Substrat kann mit dem enzymkinetischen Michaelis-Menten-Formalismus beschrieben werden. Dabei erhält man eine gute Korrelation über einen weiten Potential- und pH-Bereich (-100 bis +300 mV vs. Ag / AgCl; pH 6,10 bis 8,80). Die Sättigungsstrom- und K_{ME} -Werte variieren stark mit der Herstellungstechnik des Sensors, ebenso dessen Lebensdauer, welche bei Raumtemperatur maximal einige Wochen beträgt. Mit den beschriebenen Immobilisierungstechniken können Diffusionsprobleme vermieden werden, die bei konventionellen Verfahren (z. B. bei Enzyemeinschluß in Gelen oder zwischen Dialysemembranen) auftreten.

Messungen mit rotierenden Scheibenelektroden, deren elektroaktive Paste aus XOD, TTF-TCNQ und Silikonöl bestand, ergaben, daß XOD von mindestens zwei Mediatorspezies in homogener Reaktion oxidiert werden kann. Der Elektronentransfer zu molekularem Sauerstoff ist offensichtlich langsamer als der zu den Mediatoren. Daher kann der Sensor in luftgesättigten Lösungen betrieben werden. Da seine Kalibrationsfunktion aber durch Unterbrechungen des Meßstromkreises verändert wird, ist der Betrieb in einem Durchflußsystem empfehlenswert. Die analytischen Kenndaten wie Ansprechzeit ($t_{95} \approx 10$ s), Erfassungsgrenze (≈ 10 nM Hypoxanthin), Selektivität (z. B. gegenüber Ascorbat) sowie die Einfachheit der Herstellung und die Betriebs- und Lagerungsstabilität sind im Vergleich zu bisher in der Literatur be-

beschriebenen XOD-Biosensoren sehr vorteilhaft.

Für die Bestimmung von H_2O_2 wurden amperometrische Biosensoren durch Adsorption von POD (nach Lipophilisierung mit Caprylaldehyd) an TTF-TCNQ / Silikonöl-Pastenelektroden hergestellt. In dieser Arbeit wird damit die erste erfolgreiche Kopplung einer Reduktase mit dem leitfähigen organischen Salz einer Elektrode beschrieben. Deren Kalibrationsfunktion bei -50 mV vs. Ag/AgCl und pH 6,0 kann mit der enzymkinetischen Michaelis-Menten-Gleichung beschrieben werden. Bereits weniger als 10 s nach H_2O_2 -Zugabe werden stabile Signale gemessen. Die Erfassungsgrenze für H_2O_2 ist typischerweise ≈ 10 nM. Die Enzymstabilität unter verschiedenen Betriebsbedingungen sowie während der Lagerung wurde ebenfalls untersucht.

Die erfolgreiche Inkorporierung zweier grundverschiedener Enzyme wie XOD und POD in TTF-TCNQ-Pastenelektroden läßt die Annahme zu, daß die beschriebenen Immobilisierungstechniken, die keine Membranen erfordern, auf weitere Redox-Enzyme angewandt werden können. Dies würde neue Einsatzgebiete für amperometrische Biosensoren erschließen.

2 Summary

Two enzymes, xanthine oxidase (XOD, E.C. 1.2.3.2) and peroxidase (POD, E.C. 1.11.1.7), have been immobilized on paste electrodes containing the organic conducting salt TTF-TCNQ (tetrathiafulvalene-p-tetracyanoquinodimethane) and silicone oil, yielding amperometric biosensors for the detection of hypoxanthine and hydrogen peroxide, respectively. For operating the sensors, only buffer solutions and no coreactants are required.

Different techniques were used for immobilizing XOD. Optimum analytical performance was obtained by taking advantage of the hydrophobic interaction between XOD and the lipophilic paste. The sensor response to hypoxanthine can be described by the enzyme-kinetic Michaelis-Menten formalism yielding a good correlation over a wide range of potential and pH values (-100 to +300 mV vs. Ag / AgCl; pH 6,10 to 8,80). The apparent K_{ME} and saturation current values strongly depended on the preparation procedure chosen as did the useful lifetime of the XOD sensors, which was up to several weeks at room temperature. The described immobilization methods avoid diffusion problems associated with well-established biosensor preparation techniques (e. g. physical entrapment in gel or between dialysis membranes).

Measurements with rotating disk electrodes containing XOD / TTF-TCNQ / silicone oil paste reveal that XOD is oxidized by at least two mediator species in a homogeneous mechanism. Apparently, the electron transfer to oxygen is slower than that to the mediators so that the sensor can be operated in air-saturated solutions. Since its kinetic parameters are altered by open circuit conditions, operation in flow-through systems is recommended. Analytical characteristics, such as response time ($t_{95} \approx 10$ s), detection limit (≈ 10 nM hypoxanthine), selectivity over interferents (e.g., ascorbate), and ease of preparation as well as stability during operation and storage compare very favourably with other XOD biosensors described in the literature.

Amperometric biosensors for the detection of hydrogen peroxide were prepared by adsorbing POD (lipophilized with caprylic aldehyde) to TTF-TCNQ / silicone oil paste electrodes. This is the first time that a reductase is coupled to

an organic conducting salt electrode. At -50 mV vs. Ag / AgCl and pH 6.0, the current vs. H₂O₂ concentration function can be described by the enzyme-kinetic Michaelis-Menten equation. Stable signals were obtained within 10 s after adding H₂O₂. The detection limit is typically in the low nanomolar range. The enzyme stability under storage, standby, and various operation conditions was also investigated.

Given the successful incorporation of so widely different enzymes as XOD and POD, it can be expected that the membraneless immobilization techniques described in this study may be used with a great number of other redox-enzymes and allow their application for a variety of analytical purposes.