

APART Stipendium geht an Roland Ludwig



DI Dr. Roland Ludwig
Foto © Reinhard Öhner

Ein Forschungsprogramm zur Aufklärung des Elektronentransfermechanismus von Enzymen in Bioelektroden überzeugte das Vergabekomitee der Österreichischen Akademie der Wissenschaften. Die Entwicklung von sensitiven Glukosesensoren und implantierbaren Biobrennstoffzellen stehen im Mittelpunkt des geförderten Projektes.



Ministerialrätin Dr. Anneliese Stoklaska (BMWF) und Univ.Prof. Dr. Peter Schuster (Mitte) überreichen das APART Stipendium an Dr. Roland Ludwig.
Foto © Reinhard Öhner

Am 23. Jänner 2009 wurden im Festsaal der Österreichischen Akademie der Wissenschaften die diesjährigen ÖAW-Stipendien durch deren Präsidenten Univ.Prof. Dr. Peter Schuster, dem Bundesminister für Wissenschaft und Forschung Dr. Johannes Hahn und Ministerialrätin Dr. Anneliese Stoklaska verliehen. **Unter den Preisträgern des Austrian Programme for Advanced Research and Technology (APART) war auch Dr. Roland Ludwig.** Somit kommt nach drei Jahren erstmals wieder dieses renommierte Stipendium an die BOKU.

In den nächsten Jahren sollen mit dem Projekt die Grundlagen für extrem kleine und implantierbare Biosensoren erforscht werden. Die Entwicklungsarbeit erfolgt in Zusammenarbeit mit Dr. Lo Gorton, Universität Lund, Dr. Christina Divne, Königlich Technische Hochschule Stockholm

und Dr. Dietmar Haltrich, Dr. Christoph Sygmond und DI Wolfgang Harreither an der Abteilung für Lebensmittelbiotechnologie des Departments für Lebensmittelwissenschaften und -technologie.

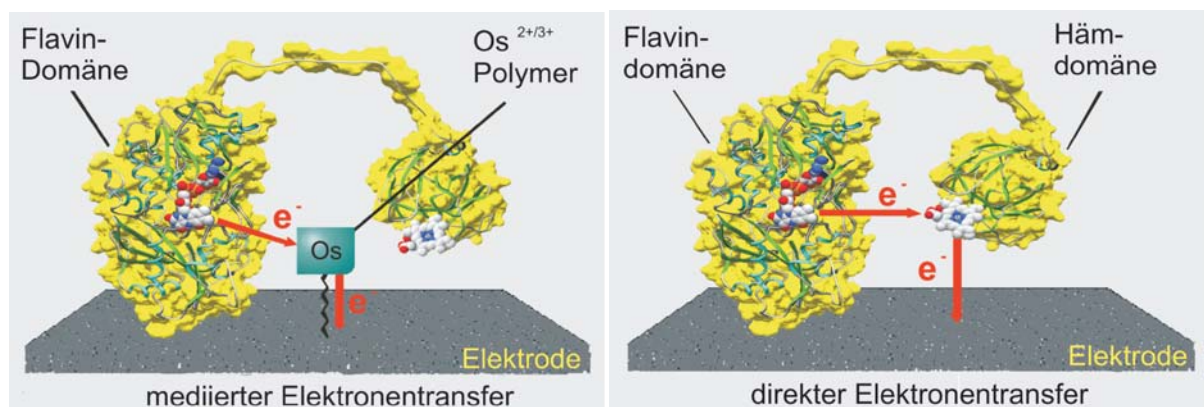
Biosensoren und Biobrennstoffzellen

Biosensoren verwenden biologische Komponenten wie Enzyme, Antikörper, oder Mikroorganismen zur Detektion von Analyten vorwiegend biogenen Ursprungs und hoher Relevanz für den Stoffwechsel höherer Lebewesen. Ihre sensitive und selektive Detektion in komplexen Probengemischen wie Blut, Nahrungsmitteln oder Abwässern hängt hauptsächlich von der eingesetzten Biokomponente ab. Oxidoreduktasen mit hoher spezifischer Aktivität ermöglichen Sensoren mit niedrigen Nachweisgrenzen um Glukose, Laktat, Pestizide und andere Substanzen in Konzentrationen bis zu 1 nM zu detektieren. Ihre Verwendung in amperometrischen Biosensoren führt zu schnellen, vor allem aber präzisen und kontinuierlichen Analyseinstrumenten für die medizinische Diagnostik, industrielle Prozesskontrolle oder Umweltanalytik. Die Miniaturisierung dieser Sensoren führt zu neuen Applikationen wie implantierbare, mit Transmitter und Energiespeicher kombinierte Biosensoren zur Funkübertragung an Datenerfassungssysteme. Der Einsatz von Biobrennstoffzellen statt herkömmlicher Batterien erlaubt unter der Voraussetzung optimierter Enzyme und Elektrodenoberflächen eine Gesamtgröße von etwa 1 mm³.

Kopplung durch Elektronentransfer

Die Kopplung des Enzyms mit der Elektrode ist das wichtigste Designmerkmal von amperometrischen Biosensoren und Biobrennstoffzellen und kann unterschiedlich gelöst werden. Die indirekte Detektion der Oxidaseaktivität über O₂ Verbrauch oder H₂O₂ Bildung ist fehleranfällig und nur für Sensoren einsetzbar. Mediatoren in Form von löslichen Redoxverbindungen oder Redoxpolymeren ermöglichen die direkte Kopplung enzymatischer Aktivität mit der Elektrode und vermindern Matrixeinflüsse. Mit Elektroden die auf mediierten Elektronentransfer beruhen wurden bereits Stromdichten von bis zu 1 mA/cm² erzielt.

Geht es einfacher? Der Verzicht auf Redoxmediatoren könnte Elektroden für Biosensoren und Biobrennstoffzellen billiger, kleiner und leichter herstellbar machen. Beim sogenannten direkten Elektronentransfer (DET) ist zwischen Enzym und Elektrode der Elektronenaustausch ohne Mediatoren möglich. Dieser Fall tritt jedoch nur bei wenigen Enzymen auf, z.B. wenn das Redoxzentrum nahe der Proteinoberfläche und damit der Elektrode liegt (<1,5 nm). Die erzielten Leistungsdichten sind bis jetzt aufgrund der monomolekularen Belegung und der teilweise schlechten Kopplung geringer als die mit MET erzielten. Abhilfe verspricht die Entwicklung hoch strukturierter Elektrodenoberflächen mit hierarchischen Strukturen z.B. aus carbon nanotubes zur Steigerung der spezifischen Fläche, sowie die Modifizierung von Enzymen.

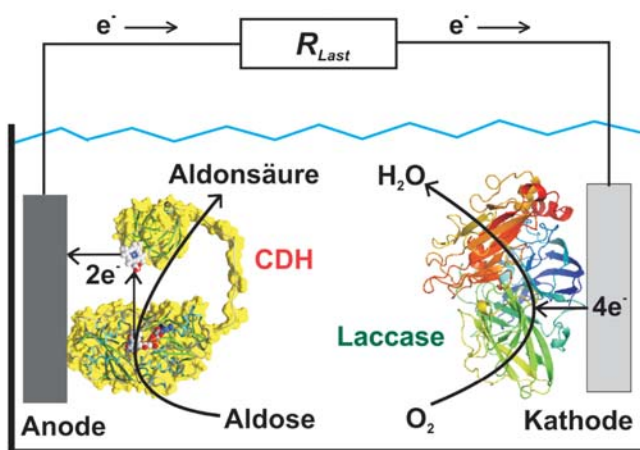


Cellobiosedehydrogenase (CDH) besteht aus einer katalytisch aktiven Flavindomäne, die durch Mediatoren (z.B. Osmiumpolymer) mit der Elektrode kommunizieren kann (MET, linke Seite). Die im nativen Enzym vorkommende, durch einen flexiblen Linker verbundene Häm-domäne, ermöglicht jedoch auch den direkten Elektronentransfer (DET, rechtes Bild).

Neue Aufgaben – neue Enzyme

Gibt es Enzyme für DET basierte Elektroden und können ihre Eigenschaften verbessert werden? Glukoseoxidase, Paradeenzym und Wegbereiter im Biosensorbereich ist leider ungeeignet. Eine Alternative, die Cellobiosedehydrogenase (CDH), wurde an der Universität für Bodenkultur, Wien in Zusammenarbeit und dem Kompetenzzentrum Angewandte Biokatalyse in Graz gefunden. Hier übernimmt eine mit der katalytisch aktiven Flavindomäne verbundene Häm-domäne den Elektronentransfer.

Dieses Enzym, das aus verschiedenen Pilzen mit unterschiedlichen katalytischen Eigenschaften erhalten wird, ist vielfältig einsetzbar. Als Biokomponente eines Laktosesensors wurde mit CDH aus *Trametes villosa* die bisher niedrigste Nachweisgrenze ($1 \mu\text{M}$) von Biosensoren in der Laktoseanalytik erreicht [Anal. Chem. 2006, 78:393]. Ebenfalls gut bestimmbar ist Glukose mit CDH aus *Myriococcum thermophilum* [Electroanal. 2007, 19:172]. Dieses Enzym ist wegen seines breiten Substratspektrums auch hervorragend für Bioanoden in Brennstoffzellen geeignet, die Glukose oder andere Zucker als Substrat verwenden [J. Phys. Chem. C, 2008, 112:13668]. Zusammen mit Laccase, die an der Kathode Sauerstoff reduziert, wurde CDH in einer vollständigen Biobrennstoffzelle bei saurem pH erfolgreich eingesetzt [Phys. Chem. Chem. Phys. 2008, 10:6093]. Um Biobrennstoffzellen auch bei höheren pH-Werten einsetzen zu können, wird derzeit am Kompetenzzentrum Angewandte Biokatalyse intensiv nach neutralen Laccasen gescreent.



Biobrennstoffzelle: Zucker werden an der Anode von CDH oxidiert, an der Kathode reduziert Laccase Sauerstoff. Die Elektronen werden durch DET ohne Redoxmediatoren übertragen.

Ausblick

Das Engineering von Enzymen für den Einsatz an Elektroden ist eine kaum in Angriff genommene Aufgabe, die jedoch große Fortschritte bei der Erhöhung der erzielten Stromdichte und Spannung verspricht. Der Einsatz von rational design und directed evolution zur Enzymoptimierung ist in der Biokatalyse Stand der Technik und wird in Zukunft zur Steigerung der Elektronentransferrate und der verbesserten räumlichen Orientierung und Immobilisierung von Enzymen an Elektrodenoberflächen beitragen, um die Sensitivität DET basierter Sensoren und die Leistungsdichte von Biobrennstoffzellen zu verbessern.

Kontakt:

DI Dr. Roland Ludwig, Department für Lebensmittelwissenschaften und -technologie, Abteilung Lebensmittelbiotechnologie, Muthgasse 18, 1190 Wien, Tel.: +43 1 36006-6280, roland.ludwig@boku.ac.at