

Immobilisierung und Bioelektrokatalyse Porphyrin-basierter Katalysatoren

Bettina Neumann¹, Matthias Schwalbe², Ulla Wollenberger¹

¹Universität Potsdam, Karl-Liebknecht-Str. 24-25, 14476 Potsdam, Deutschland

²Humboldt-Universität Berlin, Brook-Taylor-Strasse 2, 12489 Berlin, Deutschland
uwollen@uni-potsdam.de

Zusammenfassung

Das hier präsentierte Projekt beschäftigt sich mit biomimetischen Katalysatoren für die Sauerstoff- und Wasserstoffperoxidreduktion und deren Elektrokatalyse. Die biomimetischen Peroxidasen besitzen einen Porphyrinkomplex als katalytisch aktives Zentrum und sind entweder von natürlichen Hämproteinen abgeleitet oder chemisch synthetisiert. Die Katalysatoren wurden auf leitfähigen Unterlagen immobilisiert und die elektrokatalytische Reduktion von Wasserstoffperoxid untersucht. Schwerpunkt der Studien war die Immobilisierung von Mikroperoxidase-11 auf mesoporösen Metalloxid-Dünnschicht-Elektroden und der Vergleich mit einem synthetischen Pendant. Die optische Transparenz der Elektroden ermöglichte die Kopplung elektrochemischer Methoden an spektroskopische Analysen und so die nähere Charakterisierung der immobilisierten Katalysatoren. Die kathodische Reduktion von Wasserstoffperoxid durch immobilisierte Mikroperoxidase-11 startet bei ca. +500 mV vs Ag/AgCl was auf die Bildung eines hochreaktiven Oxo-ferryl-Intermediats, wie für natürliche Peroxidasen beschrieben, hindeutet. Der biomimetische Katalysator wurde weiter bis auf Porphyrin IX (Häm-Kofaktor) minimiert. Thiophensubstituenten am synthetischen Katalysator werden für die Immobilisierung durch Elektropolymerisation genutzt. So modifizierte Elektroden zeigen in Gegenwart von Wasserstoffperoxid einen deutlichen Reduktionsstrom. Die Potentialabhängigkeit der Elektrokatalyse macht hier eine Reduktion sowohl über die Bildung eines Intermediats bei höheren Potentialen als auch über die Fenton-Reaktion, die bei deutlich niedrigeren Potentialen stattfindet, wahrscheinlich. Solche elektrokatalytischen Prozesse können sowohl attraktiv für chemische Synthesen sein, als auch in der Sensorik genutzt werden.

Keywords: Bioelektrokatalyse, artifizielle Peroxidasen, mimetische Enzyme, transparente Elektroden

Einleitung

Natürliche oder synthetische Strukturanaloga von Enzymen dienen der Erforschung von Reaktionsmechanismen und finden als Katalysatoren verschiedenster Reaktionen auch Anwendung in der Bioanalytik und Biosensorik. Die Minimierung einer komplexen Proteinstruktur auf ihre katalytisch relevante Einheit hat neben dem simpleren Design oft den Vorteil einer höheren Stabilität unter extremen Reaktionsbedingungen und in Lösungsmitteln sowie einer einfacheren Produktion oder kommerziellen Verfügbarkeit [1] (Abb. 1). Desweiteren können bei Immobilisierung auf Sensoren wesentlich größere Oberflächenkonzentrationen erzielt werden, was wiederum häufig auftretende

geringere Umsatzraten der biomimetischen Katalysatoren ausgleichen kann.

Ein Beispiel für ein hocheffizientes Enzym ist Peroxidase, dessen Funktion bereits mittels (semi-)synthetischer Analoga imitiert wurde. Die Meerrettich-Peroxidase (HRP) ist die am besten untersuchte Häm-Peroxidase und als Reporterenzym neben der Sensorik auch in der Molekularbiologie und Bioanalytik weit verbreitet. Peroxidasen katalysieren die Reduktion von H₂O₂ zu Wasser bei gleichzeitiger Oxidation diverser Substrate, wie z.B. Phenole. Dabei werden die zwei hochreaktive Oxo-Ferryl-Spezies Compound I und II als Intermediate gebildet. Das hohe Reduktionspotential des Compound I/II-Redoxpaares ist dabei mit ca. +700 mV vs.

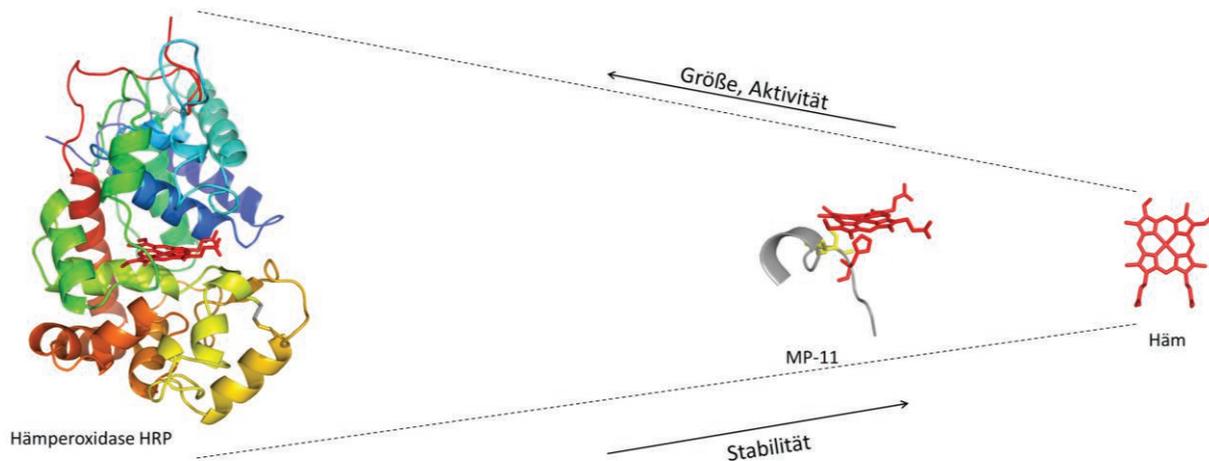


Abb. 1: Schematische Darstellung der Miniaturisierung der Peroxidase aus Meerrettich bis zum Häm als kleinste katalytische Einheit. Die Strukturen wurden mit PyMol erstellt (MP-11: modifiziert von Cytochrom c, PDB-Code 1HCH; HRP: PDB 1ATJ)

Ag/AgCl essentiell für die große Oxidationskraft der HRP [2,3].

Charakterisierung von Mikroperoxidase-11 immobilisiert in mpATO

Ein bekanntes Beispiel für Hämpeptide mit peroxidatischer Aktivität sind die durch proteolytischen Abbau von Cytochrom c gewonnenen Mikroperoxidasen. Diese „Mini-Enzyme“ sind 8-20 Aminosäuren lang und beinhalten einen Häm c-Kofaktor, der kovalent über zwei Cystein-Reste an die Peptidkette gebunden ist. Wie bei HRP dient ein Histidin-Aminosäurerest als proximaler Ligand am zentralen Eisenatom, während die sechste Koordinationsstelle frei und zugänglich für Substrate ist [4].

Die bei pH 7 negativ geladene Mikroperoxidase-11 (MP-11) wurde mithilfe des positiv geladenen Polydiallyldimethylammoniumchlorid (PDADMAC) auf transparenten mpATO-Elektroden immobilisiert [5]. Durch die Porosität des Materials konnte das Enzym in hohen Konzentrationen von ca. $1.5 \pm 0.4 \text{ nmol cm}^{-2}$ adsorbiert werden, was einer ca. 60fachen Monolage entspricht. Die spektroskopischen Eigenschaften der adsorbierten MP-11 stimmten mit denen des Minienzyms in Lösung in Anwesenheit von PDADMAC überein.

Der direkte Elektronentransfer wurde in zykovoltametrischen Experimenten untersucht, konnte aber auch durch Änderung der spektroskopischen Eigenschaften des Häms bei Reduktion verfolgt werden. Das Redoxpotential des $\text{Fe}^{2+/3+}$ -Übergangs ist mit $-374 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ vergleichbar mit dem von MP-11 in Lösung bei pH 7 [4]. Ein linearer

Anstieg der Peakströme mit Erhöhung der Scanrate demonstriert die feste Adsorption der MP-11 an der Oberfläche (Abb. 2).

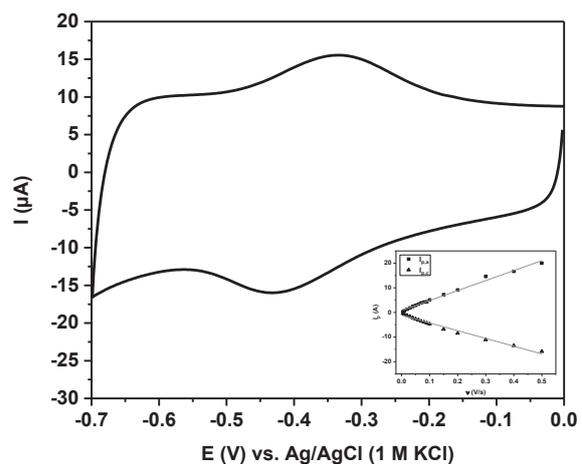


Abb. 2: Zykovoltammogramm von MP-11 immobilisiert in PDADMAC auf mpATO und Abhängigkeit der Peakströme von der Scanrate. Die Messung wurde bei 100 mV/s in O_2 -freiem 100 mM HEPES Puffer, pH 7, 10 mM NaCl durchgeführt.

Die immobilisierte MP-11 kann mit Wasserstoffperoxid reagieren, was schon bei einem Potential um $+500 \text{ mV vs. Ag/AgCl}$ zur Entstehung eines Reduktionsstromes führt. Das deutet darauf hin, dass hier analog zu HRP ein hochreaktives Intermediat gebildet wird, dessen Reduktionspotential ähnlich dem der Compound I ist.

Elektropolymerisation eines Hämin-Derivats

Der Häm-Kofaktor selbst stellt die kleinste katalytische Einheit der HRP dar (Abb. 1). Die inhärente peroxidatische Aktivität ist zwar aufgrund fehlender Liganden ca. 1000fach niedriger im Vergleich zum Enzym [6], jedoch ist er stabil in organischen Lösungsmitteln. Eine Möglichkeit der stabilen Immobilisierung von Hämen auf verschiedenen Oberflächen ist die Elektropolymerisation von Hämin bzw. seinen Derivaten. Als funktionelle Gruppen für die Polymerisation wurden dabei die Vinylgruppen von Hämin [7] bzw. einem Dimethylester-Derivat [8,9], sowie Pyrrole [7] oder Thiophene [10,11] verwendet. Die resultierenden Filme reagierten mit Superoxid [10], Nitrit und Stickstoffmonoxid [7,9,11] und wurden für die Konstruktion verschiedener Sensoren verwendet.

Wir haben die elektrokatalytische Aktivität eines elektropolymerisierten Thiophen-Derivats (Tetra(thiophenyl-3-yl)-porphyrinato-Eisen(III)-chlorid, FeT3ThP) gegenüber O₂ sowie H₂O₂ untersucht. Die Polymerabscheidung konnte durch Ethylendioxythiophen (EDOT) verstärkt werden, was zu einer Steigerung der Aktivität führt. Die Filme katalysierten die Reduktion von Sauerstoff bereits ab einem Potential um +140 mV vs. Ag/AgCl, bei pH 7.

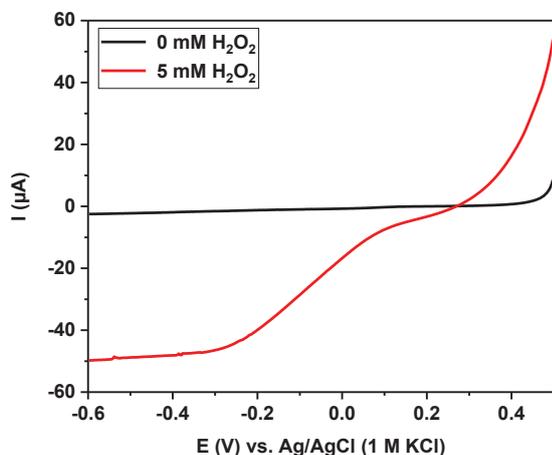


Abb. 3: Reduktionsstrom vor und nach Zugabe von H₂O₂ aufgenommen mit einer Elektrode, auf die ein FeT3ThP/EDOT-Film abgeschieden wurde. Die LSV-Messungen wurden in O₂-freiem 100 mM NPP, pH 7 unter Rühren (300 rpm) bei 2 mV/s durchgeführt.

Die Reduktion von H₂O₂ startete dagegen bereits bei Potentialen von ca. +270 mV vs. Ag/AgCl, pH 7, was darauf hindeutet, dass auch hier ein Intermediat mit einem hohen Redoxpotential gebildet wird (Abb. 3). Eine

weitere Verstärkung des Reduktionsstroms ab ca. +100 mV deutet auf die zusätzliche Reduktion von Wasserstoffperoxid über die Fenton-Reaktion, welche durch Reduktion von Fe³⁺ zu Fe²⁺ gestartet wird.

Zusammenfassend konnten Porphyrinderivate auf Elektroden immobilisiert und die elektrokatalytische Umsetzung von Sauerstoff und Wasserstoffperoxid gezeigt werden. Die Reduktionspotentiale der chemischen Elektrokatalysatoren erreichen jedoch noch nicht die Werte von Hämpeptiden und natürlichen Peroxidasen. Durch weitere Funktionalisierungen und Liganden am Eisen-Porphyrin, die die natürliche Umgebung des Häm-kofaktors simulieren, wird eine Steigerung der Katalyseeffizienz erwartet. Die damit verbundene erhöhte Sensitivität ist von Bedeutung für die Sensorik, für Brennstoffzellen und attraktiv in der chemischen Synthese.

Danksagung

Diese Arbeiten wurden durch die DFG im Exzellenzcluster UniCat großzügig unterstützt.

Literaturnachweis

- [1] F. Nastri, M. Chino, O. Maglio, A. Bhagi Damodaran, Y. Lu, A. Lombardi, *Chemical Society Reviews* 45, 5020–5054 (2016); doi: 10.1039/C5CS00923E
- [2] T. Ruzgas, E. Csöregi, J. Ernés, L. Gorton, G. Marko-Varga, *Analytica Chimica Acta* 330, 123–138 (1996); doi: 10.1016/0003-2670(96)00169-9
- [3] G. Battistuzzi, M. Bellei, C. A. Bortolotti, M. Sola, *Archives of Biochemistry and Biophysics* 500, 21–36 (2010); doi: 10.1016/j.abb.2010.03.002
- [4] H. M. Marques, *Dalton Transactions* 9226, 4371–85 (2007); doi: 10.1039/b710940g
- [5] B. Neumann, P. Kielb, L. Rustam, A. Fischer, I. M. Weidinger, U. Wollenberger, *ChemElectroChem* 4, 913–919 (2017); doi: 10.1002/celec.201600776
- [6] T. Lötzbeyer, W. Schuhmann, H.-L. Schmidt, *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 42, 1–6 (1997); doi: 10.1016/S0302-4598(96)05187-2
- [7] F. Bedioui, S. Trevin, V. Albin, M. Guadalupe, G. Villegas, *Analytica Chimica Acta* 341, 177–185 (1997); doi: 10.1016/S0003-2670(96)00621-6
- [8] K. A. Macor, T. G. Spiro, *Journal of Electroanalytical Chemistry* 163, 223–236 (1984); doi: 10.1016/S0022-0728(84)80054-6
- [9] J. N. Younathan, K. S. Wood, T. J. Meyer, *Inorganic Chemistry* 31, 3280–3285 (1992); doi: 10.1021/ic00041a022
- [10] M. Yuasa, K. Oyaizu, A. Yamaguchi, M. Ishikawa, K. Eguchi, T. Kobayashi, Y. Toyoda, S. Tsutsui, *Polymers for Advanced Technologies* 16, 616–621 (2005); doi: 10.1002/pat.633
- [11] R. Matsuoka, C. Kobayashi, A. Nakagawa, S. Aoyagi, T. Aikawa, T. Kondo, S. Kasai, M. Yuasa, *Analytical Sciences* 33, 911–915 (2017); doi: 10.2116/analsci.33.911