

Bioelektrochemische 2-Propanol-Sensoren

J. G. Schindler, K. Herna und H. Guntermann

Marburg/Lahn, ZABS Zentrum für Angewandte Bioelektrochemische Sensorik

Gesellschaft für Forschung, Entwicklung und Produktion mbH

M. M. Schindler

Marburg/Lahn, Schindler Bio- und Chemosensoren Forschungslabor

Eingegangen am 9. April bzw. 30. Mai 1997

Bioelectrochemical 2-Propanol Biosensors

Abstract. 2-Propanol biosensors for O₂-detectors based on bienzyme membranes with sequentially installed catalase and alcohol oxidase are described. Measurements were performed in undiluted media up to 20 vol.-% 2-propanol according to the principle of intermediate carrier analysis by use of a microdialysator, an oxygenating pump and a pressure adjusting chamber. For the extension of the measuring scale in the en-

zyme membrane O₂ is released out of hydrogen peroxide within the phosphate buffered carrierstream by catalase. Therefore, oxygen is available to the serially installed alcohol oxidase for the enzymatic substrate transformation beyond the physically soluted part of oxygen in the measuring medium. Molecular selectivities of bienzyme membranes are described for normally used moisturizing concentrates in printerries.

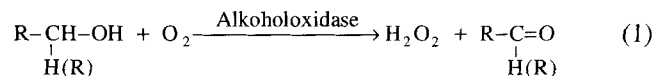
Außer als Desinfektionsmittel wird 2-Propanol u.a. in Feuchtmitteln der Offsetdruckereien, Frostschutzmitteln sowie als Lösungsmittel in Kosmetika und Einreibungsmitteln verwendet. Daher besteht ein erhebliches Interesse an einer verlässlichen elektrochemischen Meßmethode ohne aufwendige Probenvorbereitung.

In Offsetdruckereien beispielsweise machen Arbeits- und Umweltschutz sowie Kosteneinsparung eine Reduzierung des Verbrauchs an 2-Propanol erforderlich. Isopropylalkohol als Bestandteil von Feuchtmitteln werden als Funktionen schnelle Einstellung des Farbe-Wasser-Gleichgewichtes mit daraus folgender Makulatureinsparung, stabilere Wasserführung, gleichmäßiger Ausdruck, Reinigungseffekte bei bakterizider Wirkung auf die bezogenen Feuchtwalzen, Herabsetzung der Oberflächenspannung, Verdunstungskühlung des Druckwerkes und schnellere Trocknung der Druckfarbe zugeschrieben [1].

In der Drucktechnologie soll vorzugsweise ein Gehalt von 5 bis 8 Vol.-% im Feuchtmittel angestrebt werden [1]. Da aber in Offsetdruckereien nach unserem Kenntnisstand gegenwärtig durchaus zwischen 10 und 15 Vol.-% vorkommen können, sollte der Meßbereich eines 2-Propanol-Sensors zur Prozeßkontrolle bis 20 Vol.-% ausgelegt sein.

Material und Methodik

Wie andere kurzkettige Alkanole wird auch der sekundäre Alkohol 2-Propanol durch Alkohol-Oxidase (AOD) oxidiert:



Bioelektrochemische Sensoren auf der Basis von Enzymmembranen mit Alkohol-Oxidase (AOD) aus *Pichia pastoris* (EC 1.1.3.13) sprechen mit folgender Selektivitätssequenz auf einwertige Alkohole an: Methanol > Ethanol > 1-Propanol > 2-Propanol [2]. Daher sollte sich 2-Propanol in Abwesenheit der anderen genannten Alkohole elektroanalytisch bestimmen lassen.

Drei verschiedene Enzym-Membranen wurden entwickelt (Tab. 1). Da die Quervernetzung von AOD durch Glutardialdehyd zu einer erheblich nachlassenden enzymatischen Aktivität – wahrscheinlich ausgelöst durch Konformationsänderungen im Bereich des aktiven Zentrums – führt, erfolgte entweder eine Makroverkapselung zwischen zwei Dialysemembranen oder zusätzlich eine Immobilisierung an Cellulosefasern.

Tab. 1 Enzymmembranen für 2-Propanol-Biosensoren

SBC-Nr.	Katalase	Immobilisierung	Alkoholoxidase	Immobilisierung
1310	–	–	16,7 U	Adsorption und/oder ionische Bindung an Cellulosefasern zwischen zwei Dialysemembranen
1309	2,6×10 ⁴ U	makroverkapselt durch Dialysemembranen	33,3 U	makroverkapselt durch Dialysemembranen
1314	2,6×10 ⁴ U	makroverkapselt durch Dialysemembranen	33,3 U	Adsorption und/oder ionische Bindung an Cellulosefasern zwischen zwei Dialysemembranen

Die Lösung des Problems des kleinen Meßbereiches von AOD-Membranelektroden und damit der Notwendigkeit starker Probenverdünnung lag darin, der AOD beim Substratumsatz Sauerstoff in hoher Konzentration anzubieten: im Trägerstrom wurde über den physikalisch gelösten Anteil hinaus in Form von 150 mg/l H₂O₂ zusätzlich chemisch gebundener Sauerstoff mitgeführt, dessen Freisetzung in den Bienzymmembranen (Abb. 1 und Tab. 1) durch die der AOD sequentiell vorgeschaltete Katalase erfolgt:

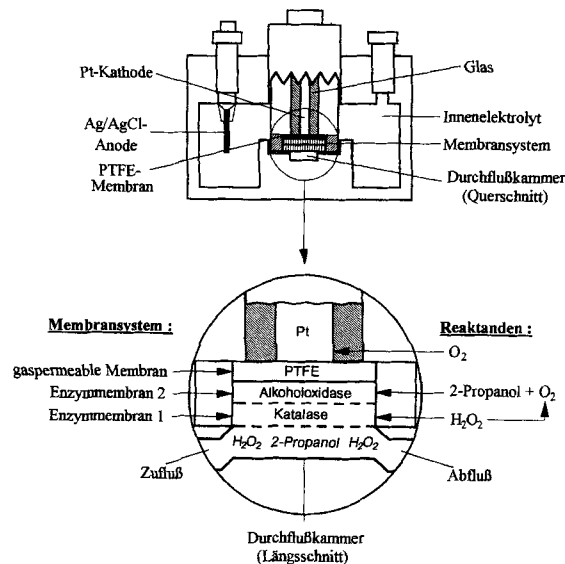
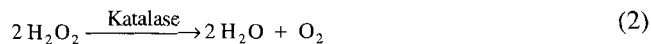


Abb. 1 O₂-sensitiv-enzymatischer 2-Propanol-Biosensor mit Bienzymmembran aus Alkoholoxidase und Katalase zur bioelektrochemischen Analyse im Durchflußverfahren



Als Detektor fungierte eine Durchflußmeßzelle mit O₂-Elektrode. Die Messungen wurden entweder unter Vorverdünnung direkt oder nach der in [2] dargestellten Zwischenträgeranalyse ausgeführt. Dabei wird der Analyt unter Verwendung eines im Gegenstrom betriebenen Mikrodialysators in den auf pH 7,04 phosphatgepufferten (PPL) und wasserstoffperoxidhaltigen Carrierstrom übernommen, der eine Oxigenatorpumpe zur Einstellung eines konstanten pO₂ im Meßmedium durchläuft. Eine dem Biosensor nachgeschaltete Rollenpumpe saugt das Meßgut aus einer hinter dem Mikrodialysator positionierten Druckausgleichskammer an, um durch die Oxigenatorpumpe ausgelöste Pulsationen auf

die Enzymmembran zu vermeiden.

Für die Berechnung des zu bestimmenden Analytgehaltes aus den Meßströmen im Rahmen einer Zweipunktkalibrierung gilt bei 2-Propanol-Biosensoren mit AOD-Membranen an O₂-Detektoren:

$$c_{2\text{-Propanol}} = c_1 + \frac{I_1 - I_x}{I_1 - I_2} (c_2 - c_1) \quad (3)$$

- c*_{2-Propanol} Gehalt an 2-Propanol in der Meßlösung
*c*₁ niedrigerer Substratgehalt in der Kalibrierlösung K₁
*c*₂ höherer Substratgehalt in der Kalibrierlösung K₂
*I*_{*x*} Stromstärke entsprechend *c*_{2-Propanol} in der Meßlösung [nA]
*I*₁ Stromstärke entsprechend *c*₁ in K₁ [nA]
*I*₂ Stromstärke entsprechend *c*₂ in K₂ [nA]

Alle Messungen wurden bei 25 °C durchgeführt. Dabei wurde zur Polarisation der Biosensoren – für eine Polarisationsspannung von –750 mV (Meß- gegen Referenzelektrode) – ein nA-Meßwandler (NAMW) eingesetzt, der eine Wandlerkonstante 1 mV/nA aufwies. Die mV-Signale des NAMW wurden von einem 21 Bit-AD-Wandler über eine serielle Schnittstelle (RS 232) in einen Rechner (PC) übermittelt und aus den gemessenen Stromstärken anhand einer speziell erstellten Software die errechneten Volumengehalte (vgl. Gl. 3) fortlaufend (ca. 1 Meßwert/Sekunde) registriert.

Ergebnisse

Direktmessungen von 2-Propanol wurden nach Lösung des Analyten in frisch entnommenem Marburger Leitungswasser (LW) zwischen 1,00 und 15,00 Vol.-% unter Verwendung von O₂-sensitiven Biosensoren mit AOD-Membranen (SBC-1310 in Tab. 1) bei einer Vorverdünnung von 1:101 mit PPL ausgeführt. Für präzise Elektroanalysen sollte der Meßwert innerhalb eines Kalibrierungsintervalles von 5,00 Vol.-% liegen (Abb. 2, links im Bild). Bei Lage der Kalibrierpunkte K₁ = 5,00 Vol.-% und K₂ = 10,00 Vol.-% kann auch ein Meßbereich von 1,00 bis 15,00 Vol.-% mit einer in den meisten Fällen hinreichenden Genauigkeit erreicht werden (Abb. 2).

Vorverdünnung ist eine unnötige Maßnahme, wenn Katalase/Alkoholoxidase-Membransysteme (SBC-1309

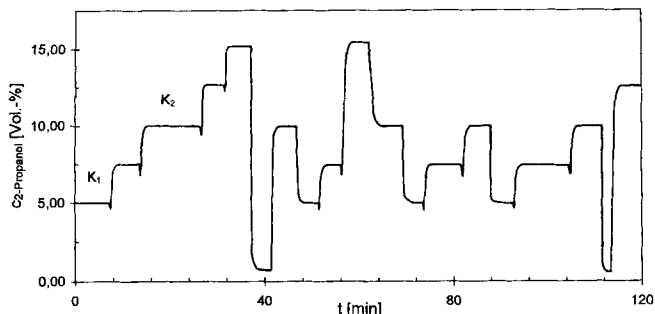


Abb. 2 Volumengehalt-Zeit-Kurve zur Darstellung der Reproduzierbarkeit von Direktmessungen mit Sensor SBC-1310 (vgl. Tab.1) nach Zweipunktkalibrierung. 1:101-Vorverdünnung mit Phosphatpuffer pH 7,04: $K_1 = 5,00$ Vol.-%, $K_2 = 10,00$ Vol.-%, Probenlösungen 1,00, 7,50, 12,50 und 15,00 Vol.-% 2-Propanol jeweils in Leitungswasser

und 1314 in Tab. 1) vor einem O_2 -Detektor eingesetzt werden und in der Zwischenträgerlösung Wasserstoffperoxid als Carrier für chemisch gebundenen Sauerstoff dient, der katalatisch innerhalb der Bienzymmembran additiv zum physikalisch gelösten Sauerstoff im Meßmedium für die Alkoholoxidase zum Analytumsatz freigesetzt wird. Es wurden Versuche durchgeführt, die belegen, daß die der AOD vorgeschaltete Katalase die Einwirkung von H_2O_2 auf die Alkoholoxidase drastisch mindert. Katalase selbst sprach unter den Bedingungen der angewandten wasserstoffperoxidführenden und phosphatgepufferten Zwischenträgeranalyse (vgl. Abb. 2 in [2]) im Gegensatz zu Ethanol [2] auf 15,00 Gew.-

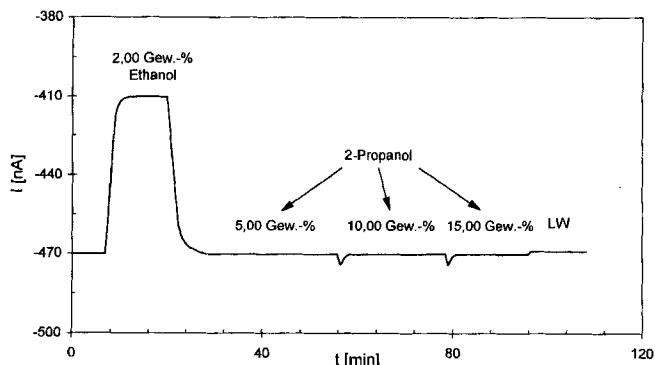


Abb. 3 Selektivitätsüberprüfung der Katalase-Membran SBC-1306 [2] gegenüber 2-Propanol. Ethanol bzw. 2-Propanol jeweils in Leitungswasser

% 2-Propanol nicht an (Abb. 3). Zweckmäßigerweise sind für kontinuierliche Messungen mit Katalase/AOD-Membranen zwischen 5,00 und 15,00 Vol.-% des Analyten die Kalibrierpunkte K_1 und K_2 bei 7,50 und 12,50 Vol.-% 2-Propanol zu plazieren (Abb. 4). Allerdings gilt auch hier für eine exakte bioelektrochemische Analytik, daß der Meßwert innerhalb eines Kalibrierungsintervalles von 5,00 Vol.-% liegen sollte (Abb. 4, links im Bild).

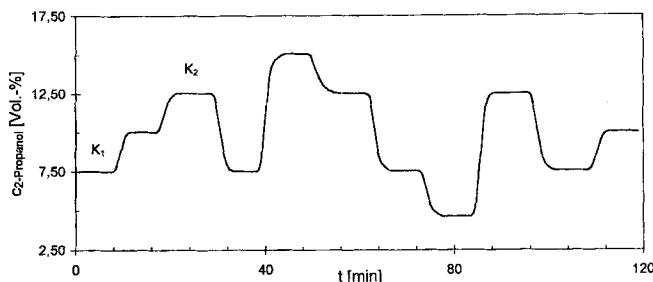


Abb. 4 Reproduzierbarkeit der Zwischenträgeranalyse mit Sensor SBC-1309 (vgl. Tab.1) nach Zweipunktkalibrierung: $K_1 = 7,50$ Vol.-%, $K_2 = 12,50$ Vol.-%, Probenlösungen 5,00, 10,00 und 15,00 Vol.-% 2-Propanol in Leitungswasser

In die Untersuchungen einbezogen wurde eine Bestimmung der molekularen Selektivität der 2-Propanol-Biosensoren gegenüber gängigen Feuchtmittelkonzentraten (FMK). Da deren Gehalte im Druckbetrieb vorzugsweise unter 4,00 Vol.-% FMK in Leitungswasser (LW) liegen, erfolgte die Kalibrierung der Biosensoren zur Ermittlung der Querempfindlichkeit gegenüber 4,00 Vol.-% FMK mit $K_1 = 0,50$ Vol.-% und $K_2 = 1,00$ Vol.-% 2-Propanol in Leitungswasser. Die erwartungsgemäß stets positive Meßwertabweichung ist dementsprechend sinnvollerweise auf Vol.-% 2-Propanol bezogen und in Tab. 2 entsprechend angegeben (zum Verfahren der Selektivitätsbestimmung vgl. auch Abb. 5).

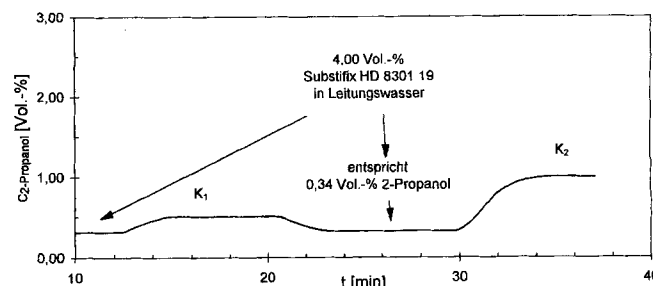


Abb.5 Beispiel zur Ermittlung der Querempfindlichkeit von Sensor SBC-1314 (s. Tab.1) gegenüber 4,00 Vol.-% Feuchtmittelkonzentrat über Zweipunktkalibrierung mit $K_1 = 0,50$ Vol.-% und $K_2 = 1,00$ Vol.-% 2-Propanol in Leitungswasser

Aufgrund der vergleichbaren Selektivitäten von Alkoholoxidase- und AOD/Katalase-Membranen darf der Schluß gezogen, daß die relativ geringen Querempfindlichkeiten vorzugsweise durch die AOD bedingt sind. Allerdings muß beispielsweise Ethanol im FMK abwesend sein, da ansonsten außer AOD auch Katalase wegen der Anwesenheit von H_2O_2 in beträchtlichem Ausmaß ansprechen würde [2]. Für eine Überprüfung auf Ionenselektivität gab es keinen Bedarf, da die gaspermeablen PTFE-Membranen der O_2 -Detektoren für Ionen undurchlässig sind.

Da die Feuchtmittelkonzentrate über die Benetzbarkeit der Dialysemembran des Mikrodialysators einen

Tab. 2 Molekulare Selektivität der 2-Propanol-Biosensoren gegenüber 4,00 Vol.-% Feuchtmittelkonzentrationen in Leitungswasser als positive Meßwertabweichung in Vol.-% 2-Propanol

Feuchtmittelkonzentrate Bezeichnung	Sensor SBC- 1309	Sensor SBC- 1310	Sensor SBC- 1314
Alcofount R 171/50	0,49	0,69	0,35
Aquarol H 4849	0,69	0,53	0,54
Combifix XL 8054 19	0,15	0,12	0,17
Dampstar 1360 DH		1,64	1,59
Hydrofix S 8093 69	0,14	0,32	0,45
Substifix HD 8301 19		0,22	0,34
Wassertop DH „Plus“		0,03	0,03
Wassertop 104-Plus (UN 1993)		0,54	0,35

Einfluß auf den Dialysevorgang ausüben können, sollte das im jeweiligen Druckverfahren angewandte FMK im drucktechnisch eingesetzten Gehalt den Kalibrierlösungen zugesetzt werden. Diese Maßnahme erhöht zudem im Hinblick auf die oben beschriebenen Selektivitätsergebnisse die Analysenrichtigkeit.

Den die Funktionsdauer begrenzenden Anteil der Bienzymmembran stellte die Alkoholoxidase dar. In Abhängigkeit von der Enzymcharge betrug ihre Aktivität 1 bis 6 Wochen; hierfür kann ein Grund gegenwärtig nicht angegeben werden. Hingegen bleibt die Katalase über einen Zeitraum von mindestens 4 bis 6 Monaten aktiv.

Diskussion

Funktionstüchtige 2-Propanol-Sensoren mit H_2O_2 -Detektoren (SBC-1313 mit 16,7 U AOD/Enzymmembran) wurden zwar erstellt und vermessen, aber gegenwärtig nicht weiter verfolgt, da die Verwendung eines H_2O_2 -Chemosensors mit AOD-Membranen das Risiko nicht vorhersehbarer Querempfindlichkeiten auf der Basis anodischer Oxidationsprozesse in sich birgt; denn in den einzelnen Druckereien werden zum Teil erheblich differierende Chemikalien beim Druckprozeß angewandt. Hingegen schützt eine Ausnutzung von O_2 als molekularer Transducer zwischen Enzymmembran und Detektor über die gaspermeable, aber ionenundurchlässige PTFE-Membran (Abb. 1) die Pt-Kathode der O_2 -Elektrode vor unerwünschten Reaktionen gegenüber nicht flüchtigen, polarographisch aktiven Substanzen.

Leider erfordert eine Direktmessung mit AOD-Membranen von 2-Propanol zwischen 1,00 und 15,00 Vol.-% eine Probenvorverdünnung von 1:101 mit einem Phosphatpuffer (pH = 7). Dabei hat unterschiedliche Schüttelintensität naturgemäß einen Einfluß auf den Sauerstoffpartialdruck des Meßmediums und ist Ursache von Fehlmessungen.

In das Gebiet der Angewandten Bioelektrochemie fällt auch die Entwicklung von Enzymelektroden als Biosensoren [3]. Um zeitraubende mühevoll Irrwege bei der Entwicklung neuer bioelektrochemischer Mem-

branelektroden zu vermeiden, ist es oftmals hilfreich, Prinzipien der Bionik anzuwenden; denn biologische Vorbilder vermögen wertvolle Informationen zur Lösung technischer Probleme zu liefern. Schließlich hatte die Natur im Laufe der Evolution Millionen Jahre Zeit, ihre biologischen Konstruktionen zweckangepaßt zu optimieren.

Bei der Entwicklung der hier beschriebenen 2-Propanol-Sensoren lieferten biologische Konzepte Ideen zur Lösung des Problems einer Erweiterung des Meßbereiches ohne Probenvorverdünnung. Den Anstoß bildeten der Sauerstoff-Transport im Blut der Säugetiere aus physikalisch gelöstem und chemisch gebundenem Anteil am Hämoglobin in den Erythrocyten sowie sequentiell arbeitende Enzymsysteme in den Zellen der Gewebe von Organen. Daher wurde bioanalog der physikalisch gelöste Sauerstoff im Trägerstrom ebenfalls um einen chemisch gebundenen Anteil – aber unter Verwendung von Wasserstoffperoxid – erhöht, um ihn in den Bienzymmembranen durch Katalase freizusetzen und der seriell nachgeordneten Alkoholoxidase für den sauerstoffabhängigen enzymatischen Umsatz des Analyten zusätzlich zur Verfügung zu stellen. Eine weitere Ausdehnung des Meßbereiches sollte sich gegebenenfalls durch höhere Wasserstoffperoxid-Konzentrationen im Trägerstrom bei substratangepaßter Alkoholoxidaseaktivität in der Bienzymmembran realisieren lassen.

Funktionell unterliegt die AOD in den Bienzymmembranen einem katalatischen Schutz vor einem Überangebot von H_2O_2 aus dem Trägerstrom. Eine Produkt hemmung der AOD konnte verfahrensbezogen nicht nachgewiesen werden. Darüber hinaus schützt die desinfizierende Wirkung von H_2O_2 gegenüber einer mikrobiellen Anreicherung des Meßsystems im Sinne eines „Biofouling“ [4]. Peroxidatische Querempfindlichkeiten sind prinzipiell möglich [2], aber bisher auf die im Druckprozeß angewandten Chemikalien nicht bekannt geworden und lassen sich durch deren Auswahl vermeiden.

Literatur

- [1] C. Leustenring, Reduzierung des Alkoholgehaltes im Feuchtmittel. Bundesverband Druck E.V., Abt. Technik + Forschung, 1/1993, Art.-Nr. 86438
- [2] J. G. Schindler, K. Herna, M. M. Schindler, J. Prakt. Chem. **338** (1996) 532
- [3] J. Koryta, Electrochim. Acta **29** (1984) 1291
- [4] H. C. Flemming, BIOforum 3/(1994) 61

Korrespondenzanschrift:
Prof. Dr. Dr. J. G. Schindler
ZABS GmbH
Hannah-Arendt-Straße 4
D-35037 Marburg/Lahn