

Enzymbasierter Gassensor zur selektiven, direkten und kontinuierlichen Detektion von Formaldehyd

Von der Fakultät für Angewandte Naturwissenschaften

der Universität Bayreuth

zur Erlangung der Würde eines

Doktor-Ingenieurs (Dr.-Ing.)

genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Dipl.-Ing. Sabine Achmann

aus

Hof/Saale

Erstgutachter: Prof. Dr.-Ing. Ralf Moos

Zweitgutachter: Prof. Dr. rer. nat. Ruth Freitag

Tag der mündlichen Prüfung: 19.06.2009

Lehrstuhl für Funktionsmaterialien

Universität Bayreuth

2009

Bayreuther Beiträge zur Sensorik und Messtechnik

Band 4

Sabine Achmann

**Enzymbasierter Gassensor zur selektiven, direkten
und kontinuierlichen Detektion von Formaldehyd**

Shaker Verlag
Aachen 2009

Bibliografische Information der Deutschen Nationalbibliothek

Die Deutsche Nationalbibliothek verzeichnet diese Publikation in der Deutschen Nationalbibliografie; detaillierte bibliografische Daten sind im Internet über <http://dnb.d-nb.de> abrufbar.

Zugl.: Bayreuth, Univ., Diss., 2009

Copyright Shaker Verlag 2009

Alle Rechte, auch das des auszugsweisen Nachdruckes, der auszugsweisen oder vollständigen Wiedergabe, der Speicherung in Datenverarbeitungsanlagen und der Übersetzung, vorbehalten.

Printed in Germany.

ISBN 978-3-8322-8378-0

ISSN 1862-9466

Shaker Verlag GmbH • Postfach 101818 • 52018 Aachen

Telefon: 02407 / 95 96 - 0 • Telefax: 02407 / 95 96 - 9

Internet: www.shaker.de • E-Mail: info@shaker.de

Eigentlich weiß man nur, wenn man wenig weiß.
Mit dem Wissen wächst Zweifel.

Johann Wolfgang von Goethe
(Maxime und Reflexionen)

Vorwort der Herausgeber

Formaldehyd ist ein mittlerweile als karzinogen eingestufte Schadstoff. Das Bundesinstitut für Risikobewertung empfiehlt die Einhaltung eines maximalen Grenzwertes von 0,1 ppm in der Raumluft. Um die Einhaltung dieses Grenzwertes kostengünstig nachzuweisen, können an Stelle von aufwändigen Analysegeräten hochselektive miniaturisierte Gassensoren eingesetzt werden.

Hier setzt die vorliegende Arbeit an. Die erforderliche Selektivität des amperometrischen Sensors wird durch den Einsatz eines Enzyms (Formaldehyd-Dehydrogenase) erzielt. Durch die Anwendung der LTCC-Technik (Low Temperature Cofired Ceramics) wird der Sensoraufbau miniaturisiert.

In diesem Beitrag werden zunächst Grundlagen und Funktionsweise enzymbasierter Sensoren dargestellt. Danach wird die Thematik weiter fokussiert und der aktuelle Stand der Forschung bei Biosensoren für gasförmige Analyte mit Schwerpunkt Formaldehyd-Bestimmung dargelegt.

Nach einer Beschreibung des Sensoraufbaus werden einzelne Komponenten hinsichtlich Empfindlichkeit und Langzeitstabilität optimiert. So konnten Sensoren dargestellt werden, die Messzeiten bis zu 60 h erlauben und Formaldehyd-Konzentrationen von 0,1 ppm nachweisen können. Mit dem miniaturisierten LTCC-Sensoraufbau konnte eine Nachweisgrenze von 40 ppb erzielt werden. Dabei blieb über eine 8 h-Arbeitsschicht mehr als 90 % der Sensitivität erhalten, wobei die Ansprechzeit im Bereich von nur 1 - 3 Minuten lag.

Eine detaillierte mathematische Beschreibung der Vorgänge im Sensor rundet den Beitrag ab.

Mit dem Aufbau und Betrieb von Sensoren, die zur Messung von geringsten Formaldehydkonzentrationen geeignet sind, wird gezeigt, dass enzymbasierte Sensoren, die bislang vor allem zur Detektion von Analyten in Flüssigkeiten eingesetzt werden, auch bestens Spurengase detektieren können.

Bayreuth im Juli 2009

Prof. Dr.-Ing. Ralf Moos, Prof. Dr.-Ing. Gerhard Fischerauer

Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Dissertation war die Entwicklung, Optimierung und Miniaturisierung eines enzymbasierten, amperometrischen Biosensors zur direkten Detektion von Formaldehyd aus der Gasphase. Bekanntermaßen sind Enzyme durch eine hohe Substratspezifität gekennzeichnet, sie entfalten ihre hohe Aktivität jedoch zumeist nur in wässrigem Umgebungsmilieu. Die sich daraus ergebende Schnittstelle zwischen Gas- und Flüssigphase stellt daher eine besondere Herausforderung bei der Entwicklung eines enzymbasierten Gassensors dar.

Die vorliegende Arbeit gliedert sich in vier Hauptabschnitte: Entwicklung und Charakterisierung eines enzymbasierten Biosensors, Optimierung des Sensors hinsichtlich Langzeitstabilität und Sensitivität, Miniaturisierung des Designs und abschließend die Modellierung des Sensormechanismus.

Der Sensormechanismus beruht in diesem Fall auf der enzymatischen Umsetzung des Analyten Formaldehyd zu Ameisensäure. Die dabei freiwerdenden Elektronen werden in einer Reaktionskaskade von dem eingesetzten NAD^+ -abhängigen Enzym Formaldehyd-Dehydrogenase über sein Coenzym NAD^+ zunächst auf einen Mediator übertragen. Dieser übergibt die Elektronen nachfolgend in einem amperometrischen Messaufbau an die Arbeitselektrode. Gemessen wird schließlich ein von der Formaldehydkonzentration der Umgebungsluft abhängiger Strom.

Zunächst wurde der Biosensor in einem PMMA-Gehäuse aufgebaut und der Übergang des Analyten aus der Gasphase in den wässrigen Reaktionsraum des Sensors über eine Gasdiffusionsmembran aus Teflon sichergestellt. Bereits bei der Charakterisierung dieses ersten Sensors hinsichtlich Sensitivität, Langzeitstabilität, Reproduzierbarkeit des Signals, Querempfindlichkeit und Signalveränderungen aufgrund von Umwelteinflüssen wie Feuchte und Temperatur konnte die Detektion von Formaldehyd erfolgreich nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich eine nur geringe Langzeitstabilität des Sensors von ca. 4 h, die im Zuge der Untersuchung der Einzelkomponenten auf eine geringe

Stabilität des verwendeten Mediators und Nebenreaktionen zwischen Enzym und Mediator zurückgeführt werden konnte.

Der zweite Teil der Arbeit, die Optimierung des Sensors, widmete sich daher hauptsächlich der Verbesserung der Langzeitstabilität, die durch den Einsatz neuer Mediatoren um das 15-fache auf über 60 h gesteigert werden konnte. Einen Fortschritt hinsichtlich Ansprechverhalten der Sensoren brachte die Integration einer Membranelektrode in den Sensor. Anstelle der bisher getrennt vorliegenden Diffusionsmembran und Arbeitselektrode wird letztere bei einer Membranelektrode direkt auf der teflonbasierten Gasdiffusionsmembran aufgebracht. In diesem Fall handelt es sich bei dem Elektrodenmaterial um eine 300 nm dünne Au-Schicht, die über Elektronenstrahlverdampfen auf der Membran abgeschieden wird. Die Ansprechzeiten t_{90} der mit Membranelektroden ausgestatteten Sensoren liegen zwischen 1 min und 3 min.

Um den Verbrauch an Material und an Reaktionskomponenten zu senken und die Fertigung und Handhabung des Sensors zu vereinfachen, wurde anschließend eine Miniaturisierung des Sensordesigns angestrebt. Der Sensor wurde dazu planar in LTCC-Mehrlagentechnologie (LTCC: low temperature cofired ceramics) aufgebaut und mit siebgedruckten Elektroden ausgestattet. Der dritte Abschnitt dieser Arbeit dokumentiert diese erfolgreiche Entwicklung des Sensordesigns, die Einbindung und Charakterisierung einer internen Referenzelektrode und die Auswahl und Modifizierung keramischer Diffusionsmembranen. Durch die Miniaturisierung konnte die eingesetzte Enzymmenge bei gleicher Konzentration (und damit die anfallenden Kosten) auf die Hälfte reduziert werden. Trotz dieser Einsparungen weist der miniaturisierte Sensor sehr ähnliche Charakteristiken, wie der PMMA-Sensor auf und ermöglicht ebenfalls die Detektion des Analyten im ppb-Bereich.

Im letzten Abschnitt wurde der komplexe Sensormechanismus mit Hilfe zweier gekoppelter Differentialgleichungen in Matlab modelliert. Um die in der Praxis entwickelten Sensoren abzudecken, wurden vier Sensorkonfigurationen untersucht. Einer traditionellen Geometrie, die der Detektion aus einer Flüssigphase entspricht, stehen drei Gassensorkonfigurationen, die sich jeweils in der Anordnung der Arbeitselektrode im Sensor unterscheiden, gegenüber. Mit Hilfe der Modellierung war es möglich die Sensorkonfigurationen zu vergleichen

und daraus Empfehlungen für ein optimiertes Sensordesign zu verfassen. Im Vergleich mit den experimentellen Daten lieferte das Modell qualitativ eine gute Übereinstimmung. Für eine quantitative Validierung des Modells wurden in dieser Arbeit Strategien entwickelt, um die in der Literatur anerkannten Modelle zur Beschreibung enzymatischer Sensoren auch auf enzymatische Gassensoren übertragen zu können.

Zusammenfassend gelang in dieser Arbeit durch den Einsatz des hoch selektiven enzymatischen Erkennungselements in Kombination mit der amperometrischen Messtechnik der *direkte* und *kontinuierliche* Nachweis des gasförmigen Analyten Formaldehyd im ppb-Bereich.

Summary

The present thesis focused on the development, optimization and miniaturization of an enzyme-based, amperometric biosensor for the direct detection of formaldehyde from the gas phase. The unique advantage of sensor systems provided with biologic recognition elements, e.g. enzymes, is their high substrate specificity. However, most of the applicable enzymes need aqueous media to reach maximum activity. Thus, a specific challenge for the development of an enzyme-based gas sensor arises from the required combination of a liquid working phase and the gaseous analyte.

This thesis consists of four main parts: The development and characterization of an enzyme-based gas sensor; the optimization of the existing sensor with respect to long-term stability, response time, and sensitivity; miniaturization of the sensor design, and modelling of the sensor mechanism.

The present sensor mechanism is based on the enzymatic conversion of formaldehyde by an NAD^+ -dependent formaldehyde-dehydrogenase and the subsequent detection of released electrons in an amperometric measurement. Initially, those electrons are transferred to a redox-mediator via the coenzyme NAD^+ , where they are consecutively transferred to and detected at a working electrode.

The initial sensor set-up was based on a PMMA housing with either platinum or graphite working electrodes. Via a Teflon gas diffusion membrane, the gas was led into an aqueous reaction media including enzyme, NAD^+ and mediator. This initial set-up already enabled the successful detection of formaldehyde. However, the sensor showed only poor long-term stability in the range of 4 h. As the stability of the different sensor components was investigated, this insufficient long-term stability was attributed to poor stability of the mediator in use and side reactions between the mediator and the enzyme.

As a consequence, the second part of this work mainly dealt with the optimization of the long-term stability of the device. By investigating various mediators, this stability was greatly improved to more than 60 h. The integration of a so-called membrane-electrode in the sensor led to enhanced response

characteristics of the sensor. Instead of separating diffusion membrane and working electrode, a 300 nm thin Au-layer was electrodeposited directly on top of a diffusion membrane to form the membrane electrode. So, enzymatic conversion of the analyte and amperometric detection of released electrons proceed close-by, thus leading to a reduced diffusion path for all components. Response times t_{90} for those sensors range from 1 min to 3 min, which corresponds to a reduction by a factor of approximately 2.

To reduce consumption of material and biological components and to simplify the fabrication and handling of the sensor, the next aim of this work was the miniaturization of the whole sensor design. For this purpose, the sensor was built up in LTCC-multilayer technique (LTCC: low temperature cofired ceramics) and equipped with screen-printed electrodes. The third part therefore deals with the successful development of this new sensor design, the development and characterization of an integrated reference electrode, and the choice and modification of an appropriate ceramic diffusion membrane. The amount of enzyme needed for the PMMA-sensor was reduced to one half at constant concentration in the course of the miniaturization, yielding an enormous cost reduction. In addition to these savings, the sensor shows nearly the same characteristics as the macro PMMA-sensor and enables the direct detection of formaldehyde in the ppb and low ppm range.

The concluding fourth part of this work presents the results of the numeric modelling of the sensor mechanism. To include the developed sensor set-ups, four different sensor configurations were investigated: the traditional sensor concept representing the detection of an analyte from the liquid phase was transferred to three gas sensor configurations, which differ in the configuration of their working electrode. Based on the mechanistic model, recommendations for an optimized sensor design are given and methods to gain highest sensitivity depending on the sensor design in use are suggested. A comparison of the model with the experimental results yields good qualitative analogy. With input parameters purely taken from the literature, quantitative validation could not be achieved. However, a refined determination of these parameters, i.e. reaction and diffusion constants, was beyond the scope of this work. Nevertheless, strategies

have been developed within this work to transfer literature models describing enzyme-based liquid-phase sensors to enzyme-based gas sensors.

In conclusion, this work succeeded in the online detection of gaseous formaldehyde from ppb to ppm range by combining a highly selective biocomponent and an amperometric detection principle.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
Zusammenfassung	i
Summary	iv
Inhaltsverzeichnis	vii
1 Einleitung und Zielsetzung	1
2 Elektrochemische Biosensoren - Eine Einführung	6
2.1 Definition und Klassifizierung	6
2.2 Entwicklung enzymbasierter amperometrischer Biosensoren	9
2.3 Theoretische Grundlagen amperometrischer Biosensoren	13
2.3.1 Amperometrie	13
2.3.2 Enzymkatalyse	16
2.3.3 Mediator vermittelter Elektronentransfer	20
2.3.4 Immobilisierung	24
3 Stand der Forschung	27
3.1 Biosensoren zur Detektion gasförmiger Analyte	27
3.2 Biosensoren zur Detektion von Formaldehyd	29
4 Sensormechanismus und Design	34
5 Experimentelles	36
5.1 Materialien	36
5.2 Sensorcharakterisierung	37

5.2.1 Bereitstellung der Testgase	37
(a) Dosierung aus wässrigen Lösungen	37
(b) Dosierung über Gassensortestanlagen	40
5.2.2 Amperometrische Messung	42
5.3 Charakterisierung der Sensorkomponenten	43
5.3.1 Zyklovoltametrie	43
5.3.2 UV-Vis Spektroskopie	45
5.4 Immobilisierungsstrategien: Chemisch modifizierte Elektroden	47
5.4.1 Physikalische Adsorption	47
5.4.2 Kovalente Kopplung an funktionalisierte Träger	48
5.4.3 Vernetzung mit bifunktionellen Agenzien	50
5.5 Charakterisierung chemisch modifizierter Elektroden	51
5.6 Miniaturisierung des Sensors	55
5.6.1 Sensorherstellung in LTCC-Mehrlagentechologie	55
5.6.2 Herstellung und Charakterisierung einer internen Ag/AgCl-Referenz	56
5.6.3 Herstellung einer keramischen Membranelektrode	57
6 Charakterisierung der Sensorfunktionalität	62
6.1 Sensitivität	62
6.2 Reproduzierbarkeit und Stabilität	64
6.3 Querempfindlichkeit	68
6.4 Einfluss von Feuchte und Temperatur	74
6.5 Zusammenfassung der Sensorcharakteristik	75
7 Optimierung des Sensorverhaltens	78
7.1 Variation der Pufferzusammensetzung	78
7.2 Variation des Elektronenüberträgers	84

7.3 Coenzym-unabhängige Formaldehyd-Dehydrogenase	94
7.4 Variation der Elektrodenkonfiguration	97
7.5 Ergebnisse der Optimierung des Makro-Sensors	101
8 Chemisch modifizierte Elektroden	103
8.1 Charakterisierung funktionalisierter Träger	103
8.2 Integration in den Biosensor	110
8.3 Zusammenfassung der Ergebnisse der Immobilisierung	114
9 Miniaturisierung des Sensors	115
9.1 Motivation und Anforderungen	115
9.2 Sensoraufbau und -design	117
9.3 Charakteristik der internen Ag/AgCl-Referenz	119
9.4 Hydrophobisierte Keramiken als Diffusionsmembran	123
9.5 Funktionalität des miniaturisierten Sensors	129
9.6 Ausblick: Erhöhung der aktiven Elektrodenfläche	132
9.7 Zusammenfassung: Miniaturisierung des Biosensors	136
10 Ansätze zur Modellierung des Sensormechanismus	138
10.1 Modellbildung und Annahmen	138
10.2 Ergebnisse der Modellbildung	154
10.2.1 Vergleich unterschiedlicher Sensorkonfigurationen	154
10.2.2 Einfluss der Enzymschichtdicke	160
10.2.3 Einfluss von Enzym- und Mediatorkonzentration	161
10.3 Validierung des Modells	167
10.4 Diskussion des Modellansatzes	172

11 Zusammenfassung und Ausblick	182
A. Anhang	187
A.1 Materialien	187
A.2 Modellimplementierung in Matlab	191
A.3 Verzeichnis der Abkürzungen	194
A.4 Verzeichnis der Symbole	197
Literaturverzeichnis	200
Danksagung	216
Lebenslauf	219
Veröffentlichungen	220