

Technische Universität München  
Fakultät für Physik  
Lehrstuhl für Physik E19

**Untersuchung der Adsorptions- und Katalyseeigenschaften  
der Horseradish Peroxidase auf Au(111)**

Sven Bugarski

Vollständiger Abdruck der von der  
Fakultät für Physik der Technischen Universität München  
zur Erlangung des akademischen Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. Ralf Metzler

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Ulrich Stimming
2. Univ.-Prof. Dr. Motomu Tanaka,  
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

Die Dissertation wurde am 27.10.2008 bei der Technischen Universität München  
eingereicht und durch die Fakultät für Physik am 17.12.2009 angenommen.

<b>1. Einleitung</b>	1
1.1 Einführung in die Thematik	1
1.2 Ziel der Arbeit	2
1.3 Gliederung	4
<b>2. Eigenschaften und Immobilisierung von Enzymen</b>	6
2.1 Aufbau und grundlegende Eigenschaften der Horseradish Peroxidase und Glucose Oxidase	6
2.2 Immobilisierung von Enzymen an Elektrodenoberflächen	7
2.3 Katalytische Enzymaktivität und die Michaelis-Menten-Gleichung	10
2.4 Kinetik adsorbierter Enzyme	12
2.5 Katalytischer Zyklus der Horseradish Peroxidase	14
<b>3. Experimentelle Setups und Messmethoden</b>	16
3.1 Strom-/Spannungs-Messungen in der elektrochemischen Zelle (EC-Zelle)	16
3.1.1 Grundlagen der Strom-/Spannungsmessungen	16
3.1.2 Setup EC-Zelle	18
3.1.3 Kontaktierung der Arbeitselektroden	20
3.1.4 Charakterisierung der Arbeitselektroden	21
3.1.5 Messmethoden zur Bestimmung der katalytischen Aktivität der Horseradish Peroxidase	28
3.2 Elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS)	33
3.2.1 Grundlagen der Impedanzspektroskopie	33
3.2.2 Messsystem und Schaltkreis	35
3.3 Rastertunnelmikroskopie (STM)	37
3.3.1 Grundlagen der Rastertunnelmikroskopie	37
3.3.2 Grundlagen der Rastertunnelmikroskopie an Biomolekülen	39
3.3.3 Grundlagen Nanostrukturierung von Oberflächen	41
3.3.4 Grundlagen selbst-assemblierende Monoschichten (SAMs)	42
3.3.5 Aufbau EC-STM	44
3.3.6 Referenzelektrode in der STM-Zelle	47
3.3.7 Herstellung der STM-Spitzen	49
3.3.8 Charakterisierung der Proben mit dem STM	52
3.4 Chemikalien und Reinheit	54

<b>4. Ergebnisse</b>		58
4.1	<b>Nanostrukturierung von Thioloberflächen</b>	58
4.1.1	<b>Erzeugung von Palladium-Nanoclustern auf Au(111) mit einer Thiol-SAM</b>	58
4.2	<b>Rastertunnelmikroskopie von Enzymen auf Elektrodenoberflächen</b>	62
4.2.1	<b>Glucose Oxidase auf HOPG</b>	62
4.2.2	<b>Horseradish Peroxidase auf Au(111) und Au(111)/Pd</b>	66
4.3	<b>Aktivitäts- und Adsorptionsuntersuchungen der an Au(111) immobilisierten Horseradish Peroxidase</b>	70
4.3.1	<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Reaktion an der Elektrodenoberfläche</b>	70
4.3.2	<b>Vergleich der katalytischen Aktivität an verschiedenen Elektroden</b>	73
4.3.3	<b>Charakterisierung der katalytischen Aktivität an Au(111)</b>	75
4.3.4	<b>Untersuchung des Adsorptionsvorganges auf Au(111)</b>	80
<b>5. Diskussion der Ergebnisse</b>		85
5.1	<b>Nanostrukturierung von Thioloberflächen</b>	85
5.1.1	<b>Diskussion der Resultate und deren Reproduzierbarkeit</b>	85
5.1.2	<b>Bewertung der Methode und Verbesserungsmöglichkeiten</b>	89
5.2	<b>Rastertunnelmikroskopie von Enzymen auf Elektrodenoberflächen</b>	91
5.2.1	<b>Diskussion der Abbildung von Enzymen mit dem Rastertunnel-mikroskop</b>	91
5.2.2	<b>Erkenntnisse aus den Messungen der Faradayströme mit der STM-Spitze</b>	93
5.3	<b>Aktivitäts- und Adsorptionsuntersuchungen der an Au(111) immobilisierten Horseradish Peroxidase</b>	95
5.3.1	<b>Diskussion des Einflusses des Elektrolyten auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Reaktion an der Au(111)-Oberfläche</b>	95
5.3.2	<b>Motivation für die Wahl von Au(111) zur Adsorption von Horseradish Peroxidase</b>	99
5.3.3	<b>Diskussion der katalytischen Aktivität eines stabilen Au(111)/Horseradish Peroxidase-Systems</b>	100
5.3.4	<b>Herleitung einer Gleichung zur Beschreibung der zeitlichen Adsorption von Horseradish Peroxidase auf Au(111)</b>	108

5.4	Zusammenfassung der Reproduzierbarkeits- und Fehlerbetrachtung	117
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung der Resultate</b>	<b>121</b>
6.1	Überblick der wichtigsten Resultate	121
6.1.1	Erkenntnisse aus den angewandten Messmethoden	121
6.1.2	Diskussion der Resultate bezüglich der Ziele	122
6.2	Möglichkeiten für weitergehende Forschungsarbeiten	124
<b>7.</b>	<b>Verzeichnis der in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen</b>	<b>126</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>129</b>

# 1. Einleitung

Eine allgemeine Einführung in die Thematik erfolgt in Kapitel 1.1, in dem die Forschung dieser Arbeit mit anwendungsbezogenen Applikationen in Verbindung gebracht wird. Innerhalb dieses Rahmens ist das Ziel der vorliegenden Arbeit in Kapitel 1.2 beschrieben, wobei zwischen konkreten Zielen dieser Arbeit und weitergehenden Zielen unterschieden wird. Kapitel 1.3 gibt schließlich einen Überblick über die Gliederung dieser Arbeit.

## 1.1 Einführung in die Thematik

Steigende Energiepreise, abnehmende Öl- und Gasressourcen und populistische Presse zu den aufkommenden kommerziellen Brennstoffzellen haben in den 1990er Jahren eine Hysterie bezüglich der „revolutionierenden“ elektrochemischen Einheiten erzeugt, die den kompletten Energiesektor radikal ändern sollten. Einige Jahre mussten vergehen und das Zerplatzen der New-Economy-Blase sowie eine damit einhergehende Konsolidierung auf dem Energiemarkt mussten um die Jahrtausendwende geschehen, bis sich wieder Nüchternheit in diesem Gebiet verbreitet hat. Tatsächlich führen energetische Betrachtungen zu dem Schluss, dass die Brennstoffzellen mit bis zu 80% Effizienz den Verbrennungsmotoren mit ca. 35% Effizienz überlegen sind und ohne Zweifel ist das H<sub>2</sub>O als Abfallprodukt bei H<sub>2</sub>/O<sub>2</sub>-Brennstoffzellen dem CO<sub>2</sub> und anderen Oxiden der Verbrennungsmotoren vorzuziehen. Gleiches gilt für den Vergleich von Kohlekraftwerken mit Brennstoffzellenkraftwerken. Allerdings stellt die Natur reinen Wasserstoff nicht zur Verfügung, was in Verbindung mit der Lagerung des Wasserstoffs die Energiebilanz entscheidend zum Nachteil der Brennstoffzellen ändert. Es stellt sich immer mehr heraus, dass Brennstoffzellen in Verbindung mit Reformierungsprozessen als lokale Kraftwerke sowie in Nischenbereichen wettbewerbsfähig bzw. anderen Methoden der nutzbaren Energieumwandlung überlegen sind.

Eine dieser Nischenbereiche bilden die bioelektrochemischen Brennstoffzellen, die im Folgenden entsprechend der Literatur („biofuel cells“) nur noch als Biobrennstoffzellen bezeichnet werden. Bei dieser Art Brennstoffzellen werden Enzyme oder Mikroorganismen eingesetzt, um an Elektrodenoberflächen Brennstoffe (z.B. Glukose und Sauerstoff) zu oxidieren/reduzieren, wodurch nutzbarer Strom generiert wird. Einen aktuellen und umfassenden Überblick zum Forschungsstand bei Biobrennstoffzellen findet man in den Review-Publikationen von Walsh et al. [1] und Higson et al. [2]. Aus diesen und den zahlreichen darin zitierten Publikationen geht hervor, dass Biobrennstoffzellen in drei Bereichen Anwendung finden: in der Medizin, in der Abwasserbehandlung und in der

Forschung selbst, da man aus den Studien über Biobrennstoffzellen neue Erkenntnisse über die katalytischen Eigenschaften von Enzymen erhält. Im Bereich der Medizin sind die Arbeiten von Heller et al. hervorzuheben. Aufbauend auf seinen Forschungen mit Miniatur-Biobrennstoffzellen [3] hat er den subkutanen Glukosesensor Therasense (Abbott Diabetes Care, Illinois, USA) entwickelt, der Diabeteskranken das Leben erleichtert.

Die Zuordnung der vorliegenden Arbeit zu möglichen Anwendungen ist nicht eindeutig, da es sich in der vorliegenden Arbeit um fundamentale Forschung handelt, die nicht direkt anwendungsorientiert, sondern vielmehr verständnisorientiert ist. Im Fokus ist die Erforschung und das damit einhergehende Verständnis der katalytischen Eigenschaften der an Elektrodenoberflächen adsorbierten Horseradish Peroxidase. Weitergehende Arbeiten könnten möglicherweise aus den Resultaten dieser Arbeit auf dem Gebiet der Biosensoren Verwendung finden.

Die Arbeit umfasst neben der Thematik der Biobrennstoffzellen auch Gebiete der Nanotechnologie. Vergleichbar mit der Erforschung und Nutzung von elektrochemischen Vorgängen bei Enzymen hat sich auch die Erforschung und Nutzung der Nanotechnologie insbesondere in den Jahren nach der Jahrtausendwende sehr verstärkt. Einhergehend mit der fortschreitenden Miniaturisierung im Halbleitersektor, aber auch in der Elektrochemie rückt die Nanotechnologie immer weiter in den Vordergrund. Einen wichtigen Beitrag zum Verständnis der katalytischen Aktivität von Nanostrukturen in der Elektrochemie machte dabei die Gruppe von Prof. Stimming. Ehemalige Doktoranden dieser Gruppe, J. Meier [4,5,6,7,8] und S. Pandelov [9,10], trugen mit ihren Arbeiten wesentlich dazu bei, die Wasserstoffreduktion an Palladium-Nanoclustern zu verstehen; die gemessenen Stromdichten an Kleinststrukturen waren um bis zu 3 Größenordnungen höher als an strukturlosen ebenen Flächen. Das Know-how auf dem Gebiet der Nanostrukturierung in der Gruppe von Prof. Stimming wurde im Hinblick auf die geplante Kombination von enzymatisch-katalysierten Prozessen mit Nanostrukturen genutzt, um Experimente auf diesem Gebiet durchzuführen.

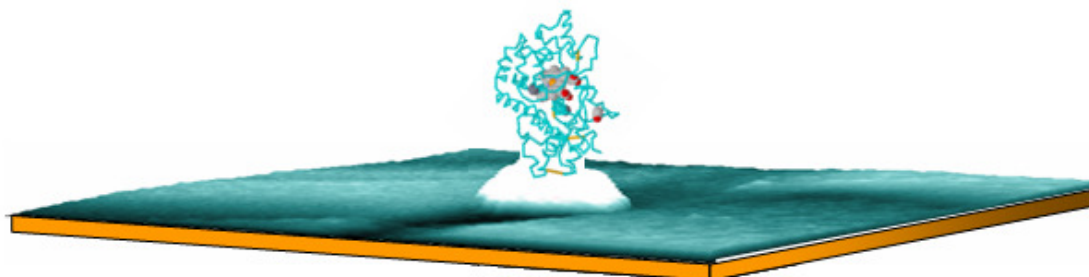
## **1.2 Ziel der Arbeit**

Langfristiges Ziel des Forschungsprojektes, in dessen Rahmen diese Arbeit erstellt wurde, ist die Untersuchung einzelner Enzyme mit lokalen Untersuchungsmethoden. Der gegenwärtige Stand der Forschung in diesem Gebiet zeigt, dass in den letzten Jahren Enzyme auf vielfältige Art und Weise immobilisiert [11,12,13] wurden und derartige Elektroden/Enzym-Systeme unter anderem auch mit lokalen Methoden wie dem Rasterkraftmikroskop und Rastertunnelmikroskop untersucht wurden [14,15,16]. Jedoch

kennzeichnen noch folgende Punkte nach bestem Wissen des Autors dieser Arbeit den Stand der Forschung in diesem Gebiet:

- Von der großen Zahl ( $\gg 10^6$ ) bekannter Enzyme sind nur einige wenige Enzyme elektrochemisch charakterisiert worden.
- Aufgrund der erst in den letzten Jahren aufkommenden Untersuchungen adsorbierter Enzyme mit lokalisierten Methoden sind die Forschungen in diesem Bereich nicht weit fortgeschritten.
- Untersuchungen der katalytischen Aktivität von Enzymen beschränken sich in der Regel auf integrale Methoden (z.B. zyklische Voltammetrie).
- AFM und STM wurden eingesetzt, um Enzyme an Oberflächen abzubilden und um deren Elektronenleitfähigkeit zu bestimmen.
- Die Enzyme wurden mit verschiedenen Methoden an der Oberfläche immobilisiert, doch erfolgte die Immobilisierung in der Regel an vorher nicht determinierten Stellen einer modifizierten Elektrodenoberfläche.

Dementsprechend wurde als Ziel des langfristigen Forschungsprojektes die Charakterisierung einzelner an Nanoclustern adsorbierter Enzyme (siehe Abb. 1.1) formuliert.



*Abb. 1.1: Lokales Nanosystem bestehend aus einem Enzym (mehrfarbige komplexe Struktur), das an einem Nanocluster (weiß) immobilisiert ist. Der Nanocluster befindet sich auf einer leitfähigen Probe (orange-gelb), die abgesehen vom Nanocluster mit einer Thiolschicht (blaue Fläche) passiviert ist.*

Durch das Erzeugen von metallischen Nanoclustern (z.B. Gold oder Palladium) auf einer passivierten Oberfläche lassen sich prinzipiell Enzyme an determinierten Stellen adsorbieren und dort mit dem Rastertunnelmikroskop untersuchen. Derartige Untersuchungen, die idealerweise die Aktivität einzelner Enzyme an Nanoclustern bestimmen, sind äußerst komplex und erfordern zahlreiche Studien im Vorfeld, um im Wesentlichen folgende wichtige Fragen zu beantworten:

- Die meisten Enzyme binden nicht direkt an metallischen Nanoclustern bzw. denaturieren sofort [17,18]. Ein Linker würde jedoch das Elektrode/Enzym - System in seiner Komplexität erhöhen. Inwiefern bleiben ausgewählte Enzyme wie die Horseradish Peroxidase adsorbiert an metallischen Oberflächen katalytisch aktiv?
- Welche Abbildungseigenschaften zeigen die adsorbierten Enzyme bei der Verwendung des Rastertunnelmikroskops?
- Wie lassen sich Nanocluster verschiedener Größen lokal auf thiolbedeckten Goldoberflächen erzeugen?

Genau diese Fragen bzw. deren Beantwortung bilden den roten Faden dieser Arbeit. Über den derzeitigen Stand der Forschung hinaus wurden die Adsorptions-, Abbildungs- und Aktivitätseigenschaften der Horseradish Peroxidase an vorwiegend Au(111) charakterisiert. Ferner wurde die in der Gruppe von Prof. Stimming entwickelte Methode der lokalen spitzeninduzierten Erzeugung von Nanoclustern auf Thioloberflächen untersucht. Folglich liefert die vorliegende Arbeit zielführende Ergebnisse im Rahmen des oben beschriebenen Forschungsprojekts. Es wurden somit die wissenschaftlichen Grundsteine gelegt, um in darauf aufbauenden Forschungsarbeiten einzelne Enzyme in bisher nicht durchgeführter Form studieren zu können.

### **1.3 Gliederung**

Acht Kapitel bilden die vorliegende Dissertationsschrift, beginnend mit dem einführenden ersten Kapitel. Der allgemeinen Einführung folgt das Kapitel 2 mit den Grundlagen zu den Eigenschaften von Enzymen mit Fokus auf der Horseradish Peroxidase und Glucose Oxidase. Zahlreiche Literaturverweise und für die Arbeit relevanten Erklärungsmodelle, vor allem zur Immobilisierung und zu den katalytischen Eigenschaften der Horseradish Peroxidase, vertiefen das Verständnis dieser für die Arbeit wesentlichen Punkte. Kapitel 3 stellt die drei Messmethoden vor, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Nach einer allgemeinen Einführung in die Messmethoden mit Literaturverweisen und grundlegenden Erläuterungen folgen jeweils der Messaufbau und die Charakterisierung des in dieser Arbeit verwendeten Systems. Abgeschlossen wird das Kapitel mit einem Überblick über die verwendeten Chemikalien und Reinheit. Den Kern dieser Arbeit bilden Kapitel 4 (Ergebnisse) und Kapitel 5 (Diskussion). Während in Kapitel 4 die Ergebnisse der Arbeit dargestellt und beschrieben werden, erfolgt in Kapitel 5 die weitergehende Interpretation der Daten. Da die Arbeit drei inhaltliche Schwerpunkte hat (1. Nanostrukturierung von Oberflächen, 2. Rastertunnelmikroskopie an Enzymen auf Elektrodenoberflächen, 3. Aktivitäts- und



Adsorptionsuntersuchungen der an Au(111) immobilisierten Horseradish Peroxidase), sind Kapitel 4 und Kapitel 5 analog dieser Schwerpunkte gegliedert. In 5.4 erfolgt eine Reproduzierbarkeits- und Fehlerbetrachtung aller durchgeführten Experimente. Eine Zusammenfassung aller wichtigsten Erkenntnisse dieser Arbeit, diskutiert im Rahmen der Zielfragestellung dieser Arbeit, ist in Kapitel 6 zu finden. Davon ausgehend werden weitergehende Forschungsarbeiten vorgeschlagen. Im Anschluss befindet sich das Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen (Kapitel 7) und das Literaturverzeichnis (Kapitel 8).

## 2. Eigenschaften und Immobilisierung von Enzymen

Dieses Kapitel stellt eine Einführung in die Eigenschaften von Enzymen dar. Es wird dabei auf die Besonderheiten der Horseradish Peroxidase (HRP) und der Glucose Oxidase (GOD) eingegangen, da diese beiden Enzyme in dieser Arbeit untersucht wurden. Im Vordergrund der grundlegenden Erläuterungen stehen die Immobilisierung und die katalytischen Eigenschaften der HRP. Weitergehende Überlegungen sind in den relevanten Abschnitten in Kapitel 3 (Rastertunnelmikroskopie an Enzymen) und Kapitel 4/Kapitel 5 (Ergebnisse/Diskussion) eingebunden.

### 2.1 Aufbau und grundlegende Eigenschaften der Horseradish Peroxidase und Glucose Oxidase

Enzyme sind mit nur ganz wenigen Ausnahmen Proteine, die im Wesentlichen aus 20 Standard-Aminosäuren aufgebaut sind. Abgesehen vom Prolin handelt es sich bei diesen

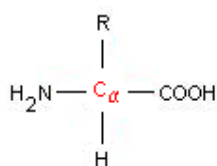


Abb. 2.1: Aminosäure-Strukturformel.

Aminosäuren um  $\alpha$ -Aminosäuren mit der allgemeinen Strukturformel, wie sie in Abb. 2.1 gezeigt ist, d.h. das  $\text{C}_\alpha$ -Kohlenstoffatom trägt eine primäre Amino- und Carboxylgruppe. Unter Bildung von Peptidbindungen polymerisieren die  $\alpha$ -Aminosäuren zu Polypeptiden; die Proteine sind Moleküle aus einer oder mehreren Polypeptid-Ketten [19].

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Experimente mit den Horseradish Peroxidase Enzymen sowie in weitaus geringerem Ausmaße mit den Glucose Oxidase Enzymen durchgeführt. Ihre wichtigsten Eigenschaften sind im Folgenden zusammengestellt.

Horseradish Peroxidase (HRP): Eine der meiststudierten Enzymspezies ist die HRP [15,20], die unter verschiedenen Bedingungen eine vergleichsweise stabile katalytische Aktivität vorweist, die in Biosensoren Verwendung gefunden hat und deren Eigenschaften von der Kristallstruktur [21] bis hin zur Kinetik [21,22,23] vielfältig untersucht worden sind. Sie katalysiert die Reduktion von Wasserstoffperoxid zu Wasser (Näheres hierzu in Kapitel 2.5). Das Molekulargewicht liegt bei 42000 g/mol [25], die



Abb. 2.2: HRP-Molekül [24].

Struktur ist in vereinfachter wasserfreier Form in Abb. 2.2 wiedergegeben. Hervorzuheben ist die prosthetische Gruppe, die für die enzymatische Aktivität verantwortlich ist und im Falle der HRP eine für ein Häm charakteristische Komplexverbindung mit einem Fe-Ion in der Mitte (gelbe Kugel), umgeben von Stickstoffatomen (hellgraue Kugeln) darstellt. Das Enzym besteht zum grössten Teil aus  $\alpha$ -Aminosäuren (türkisfarbene Striche) und aus einigen wenigen S-S Bindungen (gelbe Striche). Aus den mit Röntgenstrahlen bestimmten Kristalldaten (Abb. 2.2) konnte eine Dimension des Enzyms von ca.  $6 \times 5 \times 4 \text{ nm}^3$  bestimmt werden, allerdings können die Ausmaße des Enzyms in Lösung bzw. an Elektrodenoberflächen davon abweichen. Der isoelektrische Punkt (pI) liegt bei 8,8, d.h. bei einem pH < 8,8 ist das HRP-Molekül positiv geladen. Bei Temperaturen um die 25°C zeigt HRP ihre höchste Aktivität bei pH = 6,0 [20]; bei diesem pH-Wert liegt das Redox-Potential der HRP bei ca. 980mV vs. NHE [26].

Glucose Oxidase (GOD): Auch die GOD wurde in zahlreichen Publikationen charakterisiert und auch in Biosensoren oder Biobrennstoffzellen [11,27] eingesetzt. Sie katalysiert die Oxidation von Glucose zu Gluconolactone, wobei die katalytische Aktivität durch den in der GOD gebundenen Kofaktor Flavin Adenin Dinucleotid (FAD) geschieht. Charakteristisch für das GOD Molekül mit dem Molekulargewicht 186000 g/mol [28] ist die sogenannte „Schmetterlingsform“ [29], wie sie in Abb. 2.3 abgebildet ist. Dementsprechend ist die GOD in zwei Domänen gegliedert, die neben 17  $\alpha$ -Helices und 30  $\beta$ -Faltblätter aus insgesamt 583 Aminosäure-Residuen bestehen und eine Größe des Moleküls von  $6 \times 5,2 \times 3,7 \text{ nm}^3$  ergeben [30]. Der pI-Wert liegt bei 4,2; unter physiologischen Bedingungen (ca. 25°C und pH  $\approx$  7,0) hat die GOD ein Redoxpotential von -240mV vs. NHE [31].

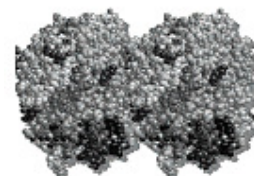


Abb. 2.3: Schmetterlingsform des GOD-Moleküls.

## 2.2 Immobilisierung von Enzymen an Elektrodenoberflächen

Prinzipiell gibt es vier verschiedene Möglichkeiten, Enzyme in elektrochemischen Zellen einzusetzen, schematisch dargestellt in Abb. 2.4. In Abb. 2.4 A handelt es sich um ein elektrochemisches System, bei dem die Enzyme in Lösung sind und der Elektrontransfer von Redox-Mediatoren durchgeführt wird. Solche Systeme sind mit Au/HRP nicht realisierbar, da HRP an Gold adsorbiert. Aber man findet eine Vielzahl charakterisierter Systeme mit anderen Elektroden und/oder Enzymen, wie z.B. mit Alkohol-Dehydrogenase, Aldehyd-Dehydrogenase, Formiat-Dehydrogenase [32] oder mit Glucose Oxidase und Bilirubin Oxidase [27] und den jeweils benötigten Mediatoren. Höhere Stromdichten unter

Verwendung von weniger Enzymen und eine bessere Anwendbarkeit (z.B. bei Biosensoren) erreicht man in der Regel mit Systemen, bei denen die Enzyme an oder in der Nähe der Elektrodenoberfläche immobilisiert sind, was in Abb. 2.4 B bis Abb. 2.4 D veranschaulicht ist. Etwas ausführlicher wird im Folgenden und in den Kapiteln 2.4 und 2.5 das System in Abb. 2.4 B diskutiert, da mit wenigen Ausnahmen alle mit HRP durchgeführten Messungen dieser Arbeit mit direkt an Gold adsorbierten HRP erfolgten.

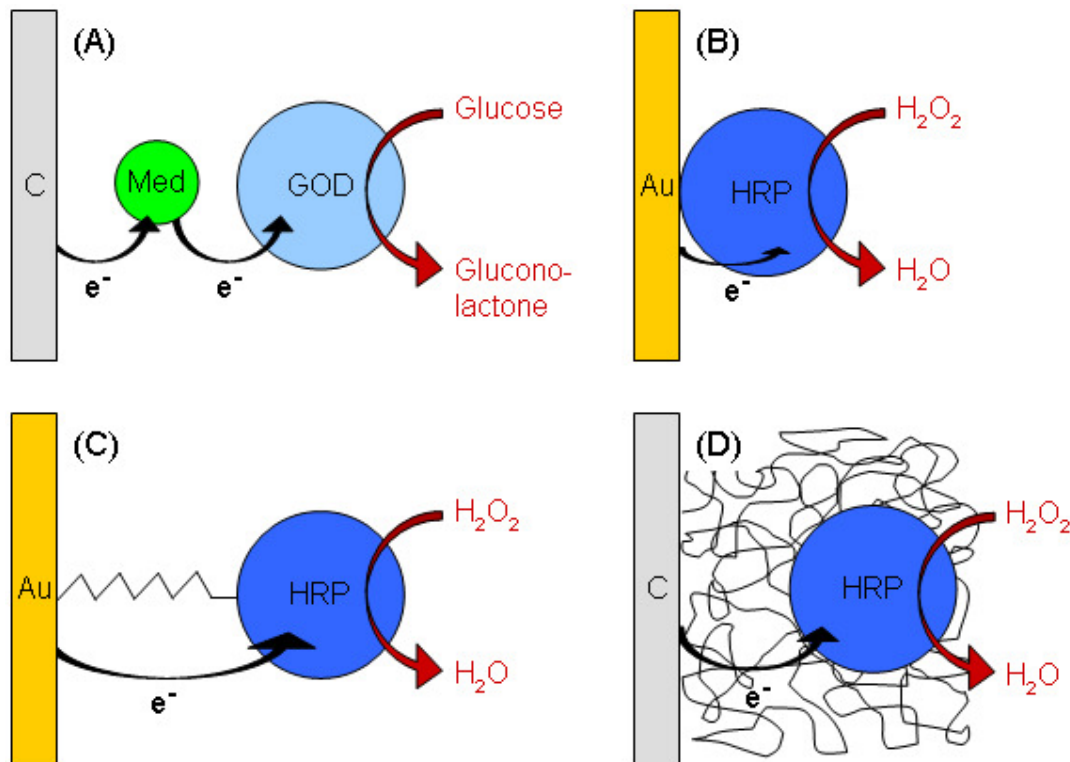


Abb. 2.4: Übersicht der Einsatzmöglichkeiten von Enzymen in einer elektrochemischen Zelle. A: GOD in Lösung, Elektronenübertrag mit Hilfe von Mediatoren (Med), B: HRP direkt an der Elektrode adsorbiert, direkter Elektronentransfer, C: Immobilisierung von HRP an der Elektrode mittels Linkermolekülen, Elektronenübertrag über die Linkermoleküle, D: Immobilisierung von HRP innerhalb eines Polymers, Elektronenübertrag über Polymerleitkanäle.

Obwohl die Adsorption in Abb. 2.4 B die einfachste Form der Immobilisierung darstellt, ist sie verglichen zu den in Abb. 2.4 C und Abb. 2.4 D dargestellten Systemen wenig untersucht worden. Grund dafür ist, dass die meisten Enzyme entweder nicht an die Elektrode direkt binden können oder vor allem an Metallelektroden denaturieren [17,18] und damit ihre katalytische Aktivität verlieren. Ferner liegt bei den meisten Enzymen das aktive Zentrum tief innerhalb der Struktur [33,34], d.h. dass der direkte Elektronentransfer zwischen Elektrode und Enzym entweder gar nicht oder nur bei bestimmten Orientierungen der adsorbierten Enzyme stattfinden kann. Unter Berücksichtigung dieser Tatsachen nimmt die HRP eine

herausragende Stellung ein, denn direkt adsorbiert auf Graphit / HOPG (Highly Ordered Pyrolytic Graphite) [17,35] und auf Gold und Silber [23,36] kann man zeitlich stabile katalytische Stromdichten im Bereich von  $10^{-6}\text{Acm}^{-2}$  bis  $10^{-4}\text{Acm}^{-2}$  beobachten. Hierbei werden keine Mediatoren eingesetzt, d.h. dass die katalytischen Ströme durch den direkten Elektrontransfer zwischen der Elektrode und der HRP zustande kommen.

Im Gegensatz dazu erfolgt der Elektrontransfer in Systemen, bei denen die Enzyme an modifizierten Elektrodenoberflächen immobilisiert sind, in der Regel über leitfähige Kanäle der Linker/Polymere, selten auch über gelöste Redox-Mediatoren. Werden Linkermoleküle entsprechend der Abbildung in Abb. 2.4 C eingesetzt, geht man von einer Monolage einer organischen Schicht auf der Elektrode aus, an die die Enzyme binden können bis hin zur vollständigen zweidimensionalen Bedeckung der organischen Schicht durch die Enzyme. Verwendet man Goldelektroden, kommen prinzipiell Thiolverbindungen als Linkermoleküle in Betracht, da sie kovalent an Gold binden und selbst-assemblierend eine Monolage bilden (mehr dazu in Kapitel 3.3.4). Die funktionelle Gruppe der Thiole wählt man derart, dass stabile Bindungen zu den aktiven Zentren der Enzyme entstehen. Unter Einfluss von 1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid (EDC) wurden HRP an Gold, modifiziert mit Mercaptopropionsäure, gebunden [37], allerdings mit Stromdichten der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Reduktion im sub- $\mu\text{Acm}^{-2}$ -Bereich. Ein offensichtlicher Grund für diese niedrigen Stromdichten im Vergleich zu den Stromdichten direkt an Au(111) adsorbierter HRP ( $\mu\text{A}/\text{cm}^{-2}$ -Bereich [20]) ist die geringe Leitfähigkeit der verwendeten Kohlenwasserstoffthiole und EDC. Demgegenüber sind die Stromdichten der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Reduktion von bis zu  $1\text{mAcm}^{-2}$  im System Nanokristalliner Diamant (NCD)/Aminolinker/Katalase [38] um über zwei Größenordnungen höher, doch wurden diese Stromdichten bei Potentialen um bis zu 800mV niedriger und bei  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen um bis zu 100fach höher als bei den bisher aufgeführten Experimenten mit Stromdichtenangaben gemessen. Trotz der großen Unterschiede in den verwendeten Elektroden, Linkern, Enzymen und Versuchsparametern haben diese Experimente gemeinsam, dass der Elektrontransfer über die Linkermoleküle erfolgt. In einer bemerkenswerten Arbeit [14] wurde Azurin an Gold, modifiziert mit Alkanthiolen verschiedener Längen, adsorbiert und die Ratenkonstante des Elektrontransfers vom Enzym über den Thiollinker zur Elektrodenoberfläche wurde in Abhängigkeit der Thiollänge (n) bestimmt. Es zeigte sich, dass die Ratenkonstante bei einer Thiollänge von 4 bis 8 Methyllängen unabhängig von der Länge ist, begründet durch den ratenlimitierenden Einfluss der Reorganisation in der Konfiguration des adsorbierten Enzyms. Bei  $n > 8$  Methyllängen beobachtete man einen exponentiellen Abfall der Ratenkonstante mit steigender Länge; ebenso war die Ratenkonstante bei Thiollängen  $< 4$  Methyllängen niedriger als bei  $n = 4$ , zurückzuführen durch die zunehmende freie Reorganisationsenergie. Dieses Beispiel zeigt,

dass prinzipiell kürzere Linker eine höhere Elektronentransferrate aufweisen, allerdings bei hinreichend kurzen Linkern andere Effekte berücksichtigt werden müssen.

Die lokalisierbare zweidimensionale Adsorption von Enzymen, wie sie in Abb. 2.4 B und Abb. 2.4 C vorliegt, erlaubt mit geeigneten Methoden (z.B. STM) eine detaillierte Charakterisierung bis hin zu einzelnen Enzymen. Schwieriger sind lokale Messungen bei Systemen gemäß Abb. 2.4 D, da die Enzyme dreidimensional innerhalb eines Polymergefüges (z.B. auf Osmium-bis-N,N-(2,2'-bipyridil)-dichlorid Basis [39]) immobilisiert sind. Vorteile dieser Form der Immobilisierung sind zum einen die viel höhere Zahl immobilisierbarer Enzyme und zum anderen die bessere Verkabelung der Enzyme mittels des leitfähigen Polymers mit der Elektrodenoberfläche. Angaben in der Literatur reichen bis zu 1000fach höheren Stromdichten bestimmter Enzyme in leitfähigen Redoxpolymeren, verglichen mit einer zweidimensionalen Immobilisierung der gleichen Enzyme willkürlicher Orientierung direkt an der Oberfläche [40]. Bei der HRP treffen diese theoretischen Überlegungen im Experiment nicht zu. Ein Vergleich der Stromdichten der katalytischen Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$  durch HRP in dieser Arbeit, bei der die HRP direkt auf Au adsorbiert wurden mit den Stromdichten der gleichen katalytischen Reaktion, bei der die HRP in verschiedenen Os-basierten Redoxpolymertypen immobilisiert wurden, zeigt bei identischer  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentration Werte, die sich im  $\mu\text{Acm}^{-2}$ -Bereich nur wenig unterscheiden.

### **2.3 Katalytische Enzymaktivität und die Michaelis-Menten-Gleichung**

Als Katalysatoren setzen Enzyme, ohne selbst beim Prozess verbraucht zu werden, bei chemischen Reaktionsvorgängen die Aktivierungsenergie herab, was zu einer deutlich höheren Reaktionsgeschwindigkeit führt. Im Gegensatz zu nicht-enzymatischen Katalysatoren liegen die Geschwindigkeiten pro Molekül von enzymatisch katalysierten Reaktionen um mehrere Größenordnungen ( $10^6$  bis  $10^{12}$ ) höher [19]. Hervorzuheben ist weiterhin bei der enzymatischen Katalyse, dass sie bei milden Reaktionsbedingungen erfolgt ( $T = 25^\circ\text{C} \pm 10^\circ\text{C}$ ,  $\text{pH} = 7 \pm 2$ ,  $p \approx 1 \text{ atm}$ ) und dass sie eine hohe Reaktionsspezifität aufweist.

Anschaulich zeigt Abb. 2.5, dass Enzyme im Gegensatz zu den meisten nicht-enzymatischen Katalysatoren nur sehr spezifische Substrate katalytisch umsetzen, während in der chemischen Struktur sehr ähnliche Verbindungen unbeeinflusst bleiben. Damit können unerwünschte Reaktionen sowie deren Nebenprodukte vermieden werden.

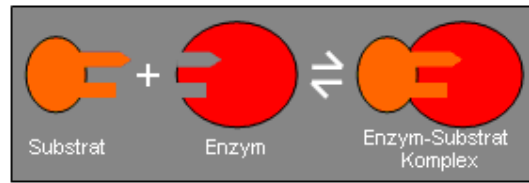
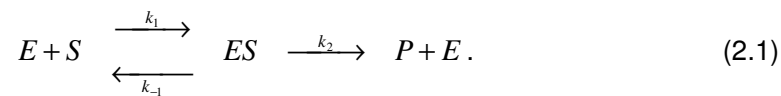


Abb. 2.5: Reaktionsspezifität der enzymatischen Katalyse.

Im Folgenden wird ein Modell vorgestellt, das die Geschwindigkeit einer enzymatisch katalysierten Reaktion beschreibt. Es wird dabei angenommen, dass sich die Reaktion von Enzym (E) + Substrat (S) zu Produkt (P) + Enzym (E) in zwei Teilschritten über das Enzym-Substrat-Komplex (ES) nach folgendem Schema vollzieht:



Die Geschwindigkeit der Reaktion ist somit:

$$v = \frac{d[P]}{dt} = k_2[ES], \quad (2.2)$$

wobei [ES] im Allgemeinen nicht bekannt ist. Es lässt sich jedoch die Geschwindigkeit der Produktion von ES angeben, sie ergibt sich aus der Differenz ihrer Bildung und Dissoziation, woraus sich bei Betrachtung von (2.1) ergibt:

$$\frac{d[ES]}{dt} = k_1[E][S] - k_{-1}[ES] - k_2[ES]. \quad (2.3)$$

In der Regel ist  $[S] \gg [E]$ , was die Annahme eines Fließgleichgewichtes rechtfertigt, in dem mit Ausnahme des Anfangsstadiums der Reaktion (erste Millisekunden nach Mischen der Enzyme und Substrate [19]) und des Endstadiums ( $[S] \gg [E]$  trifft nicht mehr zu) [ES] konstant ist, d.h.

$$\frac{d[ES]}{dt} = 0. \quad (2.4)$$

Führt man die messbare totale Enzymkonzentration

$$[E]_T = [E] + [ES] \quad (2.5)$$

ein und ersetzt gemäß (2.5) [E] in (2.3), so erhält man unter Berücksichtigung von (2.4) und Umstellen:

$$[ES] = \frac{[E]_T[S]}{K_M + [S]} \quad \text{mit} \quad K_M = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1}. \quad (2.6)$$

$K_M$  ist die sogenannte Michaelis-Konstante.

Durch Einsetzen von (2.6) in (2.2) erhält man die Anfangsgeschwindigkeit (bevor mehr als ca. 10% des Substrats zum Produkt umgewandelt worden sind [19]) der Reaktion:

$$v_0 = \frac{k_2[E]_T[S]}{K_M + [S]} \quad (2.7)$$

Bei hohen Substratkonzentrationen erhält man aus (2.7) die maximale Geschwindigkeit gemäß

$$v_{\max} = k_2[E]_T \quad (2.8)$$

und kann damit (2.7) modifizieren zur Michaelis-Menten-Gleichung, die als Grundgleichung der Enzymkinetik anzusehen ist:

$$v_0 = \frac{v_{\max}[S]}{K_M + [S]} \quad (2.9)$$

Es konnte in der vorliegenden Arbeit nicht mit hohen Substratkonzentrationen gearbeitet werden, da hohe  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen zu zeitlich sinkenden katalytischen Stromdichten an der mit HRP modifizierten Arbeitselektrode führten. Bei einer Langzeitmessung von über 20 Stunden wurden stabile katalytische Stromdichten nur bei  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen um  $10\mu\text{M}$  oder kleiner gemessen [41], eigene Messungen zeigten bei entsprechend präparierten Elektroden (siehe Kapitel 5) über mehrere Stunden stabile Stromdichten bei  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen bis zu  $50\mu\text{M}$ . Als möglicher Grund für die steigende Inaktivität der HRP bei zu hohen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen wird die Bildung einer inaktiven Form der HRP genannt, die mit Compound-III bezeichnet wird [42]. Für hinreichend niedrige Substratkonzentrationen ( $[S] \ll K_M$ ) ergibt sich aus (2.9):

$$v_0 = \frac{v_{\max}}{K_M} [S], \quad (2.10)$$

d.h. die Anfangsgeschwindigkeit ist dann proportional zur Substratkonzentration.

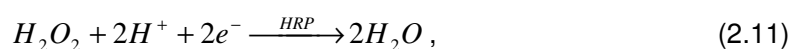
## 2.4 Kinetik adsorbierter Enzyme

In erster Linie handelt es sich bei dem Modell zur Herleitung der Michaelis-Menten-Gleichung um ein System, bei dem die Enzyme, Enzym-Substrat Komplexe und Substrate in gelöster Form im Elektrolyt verteilt sind, was sich darin ausdrückt, dass die Menge der Reaktanten in Konzentrationen mit der Einheit mol/l ausgedrückt werden. Zwar wurden im Rahmen dieser Arbeit Systeme mit HRP in Lösung untersucht, doch es stellte sich heraus, was Experimente mit voradsorbierten HRP auf Gold in enzymfreier Lösung bestätigten (siehe Kapitel 5), dass die an der Goldelektrode adsorbierten Enzyme maßgeblich für die katalytische Aktivität und den damit einhergehenden gemessenen Stromdichten verantwortlich sind. Nun könnte man ein kleines Volumenelement über der Goldoberfläche mit den adsorbierten Enzymen einführen und innerhalb dieses Volumenelementes die Anwendbarkeit der Gleichungen (2.9) und (2.10) untersuchen. Neben den schon erwähnten



Schwierigkeiten,  $v_{\max}$  zu bestimmen, können  $v_{\max}$  und  $K_M$  nicht für einzelne Enzyme direkt aus integralen Messergebnissen berechnet werden. Begründet ist die Aussage durch eine wichtige Eigenschaft, die sich sehr auf die katalytische Aktivität eines einzelnen Enzyms auswirkt: die Orientierung der adsorbierten HRP auf der Elektrodenoberfläche.

In Lösung können die HRP im oxidierten Zustand zwar folgende Reaktion katalytisch durchführen:



aber bei Abwesenheit von geeigneten Redox-Mediatoren in Lösung würden sämtliche HRP in den reduzierten Zustand übergehen und die katalytische Reduktion von  $H_2O_2$  wäre damit beendet. Um die katalytische Reaktion in einem Elektrolyt ohne Redox-Mediatoren aufrecht zu erhalten, müssen die HRP Kontakt haben zur Elektrodenoberfläche, um nach jedem Katalyse-Schritt durch Elektronenabgabe an die Elektrodenoberfläche vom reduzierten in den oxidierten Zustand überzugehen, womit der Ausgangszustand für neue katalytische Reaktionen erreicht ist. Zweifellos führen diese Überlegungen zu einem System, bei dem die HRP direkt mit der Elektrodenoberfläche „verkabelt“ sind, also die reaktiven Zentren der Enzyme derart mit der Elektrode verbunden sind, dass ein möglichst effektiver Ladungstransfer erfolgen kann. Anschaulich sind verschiedene Orientierungen der HRP adsorbiert z.B. auf Au(111) in Abb. 2.6 dargestellt.

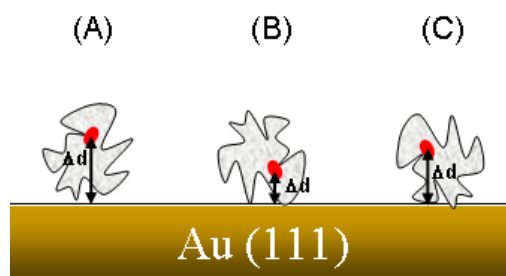


Abb. 2.6: Beispiele möglicher Orientierungen der HRP (schematisch dargestellt) auf Au(111). Der rote Punkt kennzeichnet den Ort des aktiven Zentrums des Enzyms.

Eine optimale „Verkabelung“ bei der direkten Adsorption ist dann gewährleistet, wenn die Differenz  $\Delta d$  zwischen dem aktiven Zentrum der HRP und der Elektrodenoberfläche minimal ist [43], was annäherungsweise in Abb. 2.6 B zu sehen ist. Die Marcus-Theorie liefert die Grundlage für die theoretische Behandlung des Elektrontransfers zwischen zwei Redoxzentren [44,45]; dieses Modell wurde dahingehend weiterentwickelt, dass auch der Elektrontransfer von/zu Enzymen beschrieben werden kann [46]. Demzufolge ist die Geschwindigkeit des Elektrontransfers  $k_{et}$ :

$$k_{et} = \nu_n \Gamma_0 e^{-\beta \Delta d} e^{-\frac{(\Delta G^0 + \lambda)^2}{4\lambda RT}} \quad (2.12)$$

$\nu_n$  und  $\Gamma_0$  sind zusammengefasste Konstanten,  $\beta$  ist die Tunnelkonstante, die ein Maß für die exponentielle Abnahme der elektronischen Kopplung darstellt,  $\Delta G^0$  ist die Änderung der freien Energie, im elektrochemischen Zusammenhang als Überpotential der Elektrode zu verstehen,  $\lambda$  ist die Reorganisationsenergie, die für den Übergang der Gleichgewichtsgeometrie des Reaktanten in die des Produkts ohne Elektrontransfer benötigt wird,  $R$  ist die Gaskonstante und  $T$  die Temperatur. Da bei Berechnungen mit Gleichung (2.12) nur bestimmte Pfade innerhalb der Enzyme als Leitkanäle benutzt wurden [46,47], decken sich Theorie und Experiment quantitativ bedingt. Wichtig ist jedoch die Feststellung, dass  $k_{et}$  exponentiell mit größer werdendem  $\Delta d$  abnimmt, d.h. dass die Orientierung der Enzyme auf der Elektrodenoberfläche wesentlichen Einfluss auf die Geschwindigkeit des Elektrontransfers hat.

## 2.5 Katalytischer Zyklus der Horseradish Peroxidase

Für folgende Betrachtungen wird vorausgesetzt, dass die HRP derart an einer Elektrode immobilisiert ist, dass das an der Elektrode angelegte Potential unmittelbar auch am Enzym anliegt und dass direkter Elektrontransfer zwischen dem Enzym und der Elektrodenoberfläche erfolgt. Abb. 2.7 gibt einen Überblick über die potentialabhängigen Zustände der HRP und der Übergänge zwischen den Zuständen.

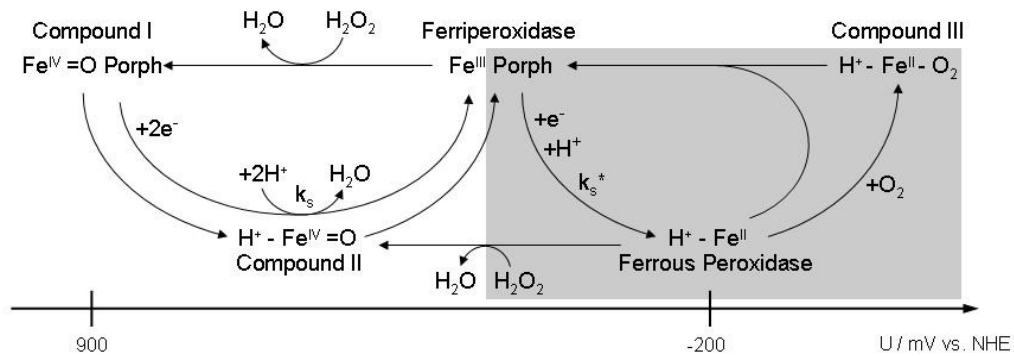
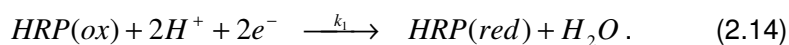
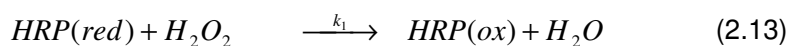


Abb. 2.7: Bioelektrokatalytischer Zyklus der HRP [23].

Betrachtet man die Ferri-Peroxidase als Ausgangszustand, so kann diese bei  $-217\text{mV vs. NHE}$  ( $\text{pH} = 6,0$ ) [48,49] unter Protonenaufnahme in die Ferrous Peroxidase reduziert werden, die molekularen Sauerstoff binden kann und dann in den Zustand Compound III übergeht. Ferner kann der enzymatisch inaktive Zustand Compound III auch bei zu hohen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Konzentrationen erreicht werden [42]. Da die in dieser Arbeit untersuchten Elektrode/HRP-

Systeme bei Potentialen deutlich kleiner als 500mV vs. NHE irreversible starke Abnahme der katalytischen Aktivität zeigten, wurden die Zustände im grauen Bereich von Abb. 2.7 nicht näher untersucht. Sämtliche in dieser Arbeit gemessenen Stromdichten aufgrund der katalytischen Reduktion von  $H_2O_2$  zu  $H_2O$  sind vereinfacht durch die Übergänge zwischen der Ferri-Peroxidase, dem Compound I und dem Compound II beschrieben (weißer Bereich von Abb. 2.7). Dabei ist der Zustand Compound II als Zwischenzustand zu betrachten; laut Ferapontova und Gorton [20,23] ist es jedoch sehr schwierig zu unterscheiden, ob bei einem gegebenen System der direkte Elektrontransfer über Compound II verläuft oder nicht. Nichtsdestotrotz lässt sich für den Übergang vom Zustand Compound I zur Ferri-Peroxidase die Ratenkonstante  $k_s$  für den direkten Elektrontransfer angeben, die ratenbestimmend ist. Bei  $pH = 6,0$  (Pufferlösung) wurde für die katalytische Aktivität von HRP immobilisiert auf Gold der Wert  $k_s = (11,6 + 3,8)s^{-1}$  angegeben [23]. Abschließend sind hier die wesentlichen Schritte aus Abb. 2.7 zusammengefasst, dabei ist  $HRP(red)$  = Ferri-Peroxidase und  $HRP(ox)$  = Compound I:



### **3. Experimentelle Setups und Messmethoden**

Im Folgenden werden die in dieser Arbeit verwendeten Messmethoden vorgestellt, mit denen die Ergebnisse in Kapitel 4 erzielt wurden. Alle durchgeführten Messungen lassen sich einer der drei Messmethoden zuordnen: Strom-/Spannungs-Messungen in der EC-Zelle (Kapitel 3.1), elektrochemische Impedanzspektroskopie (Kapitel 3.2) oder Rastertunnelmikroskopie (Kapitel 3.3). Jede Messmethode wird durch grundlegende Erläuterungen eingeleitet, dann folgen die Beschreibungen der entsprechenden experimentellen Aufbauten inklusive Diskussion möglicher spezifischer Probleme der Aufbauten und Messtechniken. Eigene Modifikationen am Messaufbau, um den Anforderungen der Experimente gerecht zu werden, auch im Hinblick der Sauberkeit beim Experimentieren, sind an den jeweiligen Stellen beschrieben. Weitergehende, vor allem selbstentwickelte und/oder auf ein spezielles Problem angepasste experimentelle Vorgehensweisen, sind in Kapitel 4 an relevanten Stellen zu finden. Eine Auflistung der verwendeten Chemikalien und Erläuterungen zur Reinheit beim Experimentieren (Kapitel 3.4) bilden den Abschluss.

#### **3.1 Strom-/Spannungs-Messungen in der elektrochemischen Zelle (EC-Zelle)**

Biokatalysatoren beschleunigen potentialabhängig spezifische chemische Reaktionen, was sich in einer Änderung des Umsatzes eines Substrates gegenüber eines nicht-katalytischen Prozesses äußert. Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Au(111)/HRP-System (HRP direkt adsorbiert an der Au(111)-Oberfläche) lässt sich das katalytische Verhalten des Systems durch Messungen der Stromdichten bei verschiedenen angelegten Potentialen studieren. Wie die Erläuterungen in den Kapiteln 4 und 5 zeigen, konnten durch elektrochemische Messungen unter gewissen Annahmen auch Rückschlüsse über das zeitliche Adsorptionsverhalten der HRP auf Au(111) gezogen werden. Dementsprechend sind elektrochemische Messungen ein sehr wichtiges Werkzeug für die Erreichung der Ziele dieser Arbeit.

Sämtliche elektrochemischen Messungen zur Charakterisierung der Katalyseaktivität und Adsorption von HRP auf Gold sowie zahlreiche CV-Messungen wurden in einer elektrochemischen Zelle (EC-Zelle) durchgeführt, die in den Kapiteln 3.1.2 bis 3.1.3 näher beschrieben ist.

##### **3.1.1 Grundlagen der Strom-/Spannungsmessungen**

Auf ausführliche Erläuterungen zu den Strom-/Spannungsmessungen wird an dieser Stelle verzichtet, da erstens die verwendeten Methoden in elektrochemischen Kreisen bekannt sind

und zweitens zahlreiche elektrochemische Nachschlagewerke zur Vertiefung der Thematik allgemein verfügbar sind. Es werden nur kurz die beiden wichtigsten Messmethoden der Strom-/Spannungsmessungen, die in dieser Arbeit verwendet wurden, vorgestellt.

### Chronoamperometrische Messungen

Bei chronoamperometrischen (oder kurz: amperometrischen) Messungen wird das an einer Elektrode angelegte Potential über die Zeit konstant gehalten (Abb. 3.1 A) und dabei der Strom an dieser Elektrode gemessen. Unter anderem wird in einer elektrochemischen Zelle dieses Verfahren verwendet, wenn sich die Elektrodenoberfläche ändert (z.B. durch Adsorptionsprozesse) und/oder sich die Konzentration reaktiver Spezies im Elektrolyten ändert (z.B. durch Zugabe in den Elektrolyten). Durch Änderungen der gemessenen Stromdichten bei konstantem Potential lassen sich Rückschlüsse über Oberflächenprozesse an der Elektrode ziehen.

### Zyklovoltammetrische Messungen

Die Aufnahme von CVs ist eine bewährte Methode in der Elektrochemie, um ein Elektroden/Elektrolyt-System zu charakterisieren. Dabei wird das an der Elektrode angelegte Potential linear mit der Zeit zwischen einem Minimal- und einem Maximalwert variiert (Abb. 3.1 B), wobei der Anfangs- und Endwert der Messung zwischen diesen beiden Schranken festgelegt werden. Mit dieser Methode lassen sich Stromdichten in Abhängigkeit des Potentials darstellen und daraus lassen sich prinzipiell Erkenntnisse über potentialabhängige Oberflächenprozesse gewinnen.

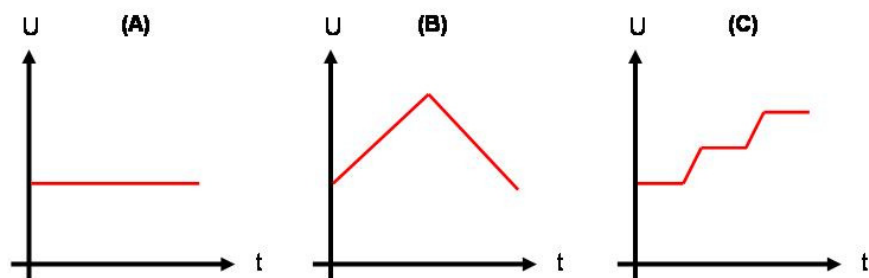


Abb. 3.1: Änderung des an einer Elektrode angelegten Potentials mit der Zeit bei amperometrischen (A) und zykvoltammetrischen (B) Messungen. Potentialabhängige Messungen unter amperometrischen Bedingungen lassen sich durch stufenartige Potentialänderungen durchführen (C).

Untersuchungen von Elektroden mit adsorbierten Enzymen, insbesondere zeitliche Stabilitäts- und Adsorptionsuntersuchungen sowie Untersuchungen, bei denen die durch Katalyse umzusetzende Substratkonzentration geändert wird, erfolgen in der Regel unter amperometrischen Bedingungen. Um den Einfluss des angelegten Potentials auf den Strom zu untersuchen, kann das Potential stufenförmig erhöht (Abb. 3.1 C) oder erniedrigt werden, so dass man in einem Experiment Strommessungen unter statischen Bedingungen bei verschiedenen Potentialen durchführen kann. Um unerwünschte Stromspitzen durch sehr schnelle Potentialänderung zu vermeiden, sollte das Potential nicht sprunghaft, sondern durch eine an das System angepasste Vorschubgeschwindigkeit geändert werden.

### 3.1.2 Setup EC-Zelle

Amperometrische, zykelvoltammetrische und impedanzspektroskopische Experimente erfolgten in einer individuell durch einen Glasbläser (Jürgen Höhn, Garching bei München) hergestellte Glaszelle mit einer klassischen Dreielektrodenanordnung, skizziert in Abb. 3.2. Zwei verschiedene kommerzielle Schott-Elektroden dienten als Referenzelektroden (RE = Reference Electrode): eine Hg/Hg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Elektrode in 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> und eine Hg/Hg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Elektrode in gesättigter K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Lösung. Beide Elektroden wurden alle 6 Monate in verdünnten Säuren und in Pufferlösungen gegeneinander und gegen andere verfügbare Referenzelektroden (z.B. Ag/AgCl in 3M KCl) gemessen; alle 12 Monate wurde der Elektrolyt der Referenzelektroden durch einen neu angemischten Elektrolyten ausgetauscht.

Es zeigte sich bei diesen Untersuchungen, dass beide Referenzelektroden über die Dauer dieser Arbeit kaum Veränderungen im Gleichgewichtspotential zeigten. Die Potentiale der verwendeten Referenzelektroden und deren Fehler betragen:

$$U_{0,Hg/Hg_2SO_4-0,1M\ H_2SO_4} = 660mV \pm 2mV \text{ vs. } NHE \quad (3.1)$$

$$U_{0,Hg/Hg_2SO_4-sat.K_2SO_4} = 650mV \pm 2mV \text{ vs. } NHE . \quad (3.2)$$

NHE steht für „Normal Hydrogen Electrode“ und kennzeichnet, dass sich die Angabe auf das als absolut definierte Potential von 0mV einer Wasserstoffelektrode unter Normalbedingungen bezieht. Sat. steht für „saturated“, d.h. dass eine gesättigte Lösung vorliegt. Wie in Abb. 3.2 angedeutet, reichte die Lugginkapillare des Referenzelektrodenraumes einige Millimeter bis an die Arbeitselektrode (WE = Working Electrode). Die Gegenelektrode (CE = Counter Electrode) wurde am Rand der Zelle derart positioniert, dass der Abstand zur Arbeitselektrode möglichst groß war. Ausschließlich Goldgegenelektroden wurden verwendet. Einzelheiten zu den Arbeitselektroden sind in Kapitel 3.1.3 und Kapitel 3.1.4 aufgeführt.

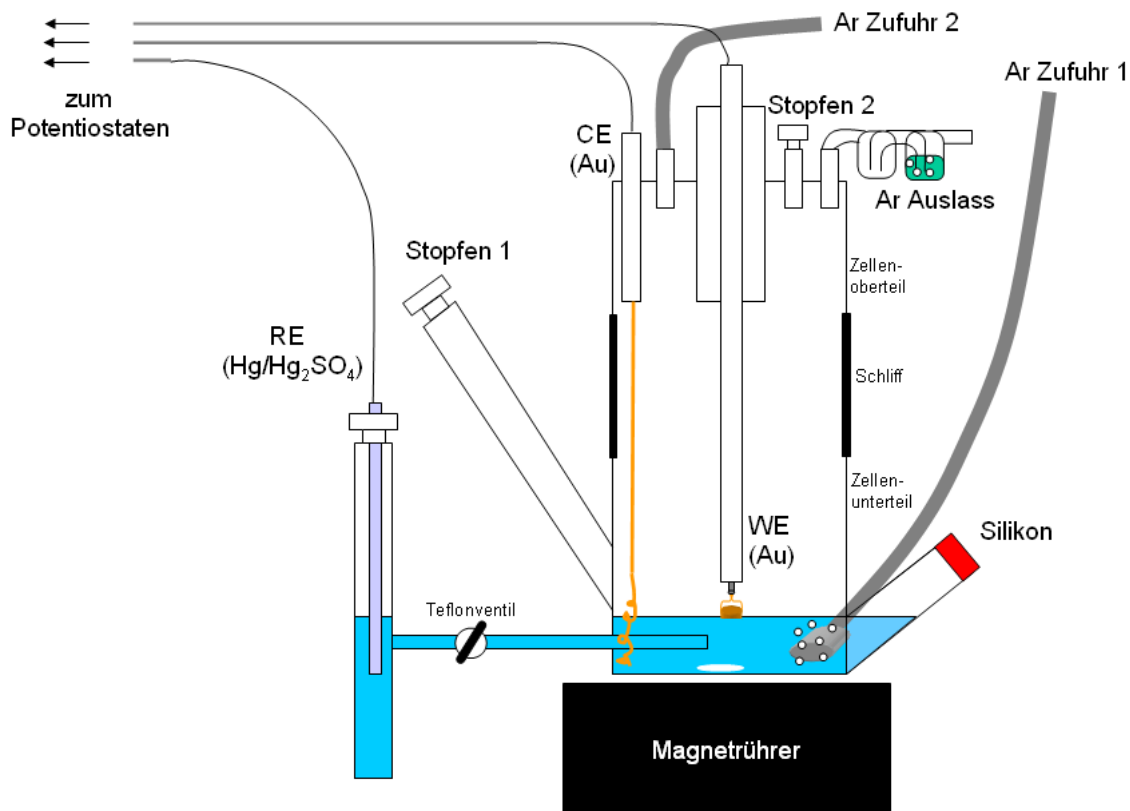


Abb. 3.2: Aufbau der Dreielektroden-EC-Messzelle, die in dieser Arbeit für zahlreiche EC-Messungen verwendet wurde.

Zum Entgasen wurde die Zelle zu Beginn 30 Minuten unter Rühren über Zufuhr 1 + 2 mit Argon gespült, danach ohne Rühren nur noch über Zufuhr 2; dieses Vorgehen verringerte den Sauerstoffgehalt des Elektrolyten soweit, dass man in CVs der Arbeitselektrode (siehe dazu Kapitel 3.1.4) nur geringste  $O_2$ -Reduktionsströme erkennen konnte. Um die Zugabe von Lösungen zum Elektrolyten in Argon-Atmosphäre zu ermöglichen, wurde die ursprüngliche Glaszelle [4] in Eigenentwicklung mit einem Schliff erweitert, in dem eine Silikondichtung luftdicht angebracht war. Mit Hilfe von Spritzen mit sterilisierten Einwegkanülen (VWR Produktnummern 612-0106 und 612-0162) konnten Lösungen wie z.B.  $H_2O_2$ - oder HRP-Lösungen dem Elektrolyten zugegeben werden, ohne dass eine messbare Erhöhung des  $O_2$ -Gehaltes des Elektrolyten beobachtet werden konnte. Nach jeweils 10 Einstichen wurde eine neue Silikondichtung eingesetzt. Die zugegebenen Lösungen waren konzentriert, um die Menge zugegebener Lösungen ( $\leq 0,5\text{ml}$ ) gering zu halten; ferner erfolgte die Zugabe unter Rühren, um die zugegebene Lösung rasch im Elektrolyten (50ml) gleichmäßig zu verteilen. Gemessen wurde hingegen ohne Rühren, da dies zu deutlich reproduzierbareren  $H_2O_2$ -Oxidationsströmen und damit einhergehend zu

reproduzierbareren HRP-Aktivitäten führte (siehe hierzu auch Kapitel 3.1.5). Bei Bedarf konnte der pH-Wert des Elektrolyten durch Einsatz einer pH-Elektrode an Stelle des Glasstopfens 1 bestimmt werden.

Angeschlossen waren die CE, RE und WE an einen HEKA PG310 Potentiostaten der Firma HEKA Elektronik Dr. Schulze GmbH, betrieben mit der Software PotPulse Version 8.77. Die regelmäßige Aufnahme von Referenz-CVs von Au(111) und deren Vergleich mit der Literatur stellte sicher, dass das System zuverlässige Messwerte lieferte.

### 3.1.3 Kontaktierung der Arbeitselektroden

Alle in der Zelle in Abb. 3.2 benutzten Arbeitselektroden wurden von oben in Kontakt mit dem Elektrolyten gebracht, wodurch es möglich war, unter Argonatmosphäre die Elektrode je nach den Erfordernissen des jeweiligen Experimentes zu bestimmten Zeitpunkten aus dem Elektrolyten rauszuziehen oder einzutauchen.

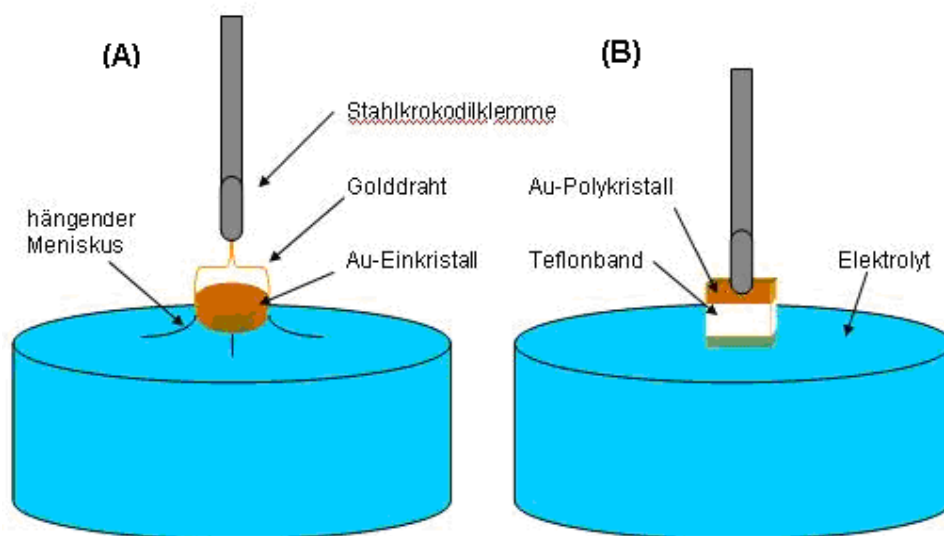


Abb. 3.3: Kontaktierung der Arbeitselektrode in der EC-Zelle mit dem Elektrolyten. Links: hängender Meniskus beim runden Goldeinkristall, rechts: Eintauchen eines Plättchens bis zum unteren Teflonbandrand.

Der Goldeinkristall hatte an zwei Seiten kleine Nuten, umspannt von einem 0,5mm dicken Golddraht, der für die Kontaktierung mit einer Krokodilklemme oberhalb der Probe erforderlich war. Um Randeffekte zu vermeiden [50], d.h. ausschließlich die untere nach (111) orientierte Fläche mit dem Elektrolyten in Kontakt zu haben, wurde ein Meniskus gezogen, in der Literatur auch als „hängender Meniskus“ (Abb. 3.3 A) bezeichnet. Bei Spülung der Zelle mit trockenem Argon blieb der Meniskus ca. 15 Stunden lang stabil. Verdunstung und ein damit einhergehendes Absinken des Elektrolytstandes in der Zelle



drohte, den Meniskus nach über 15 Stunden reißen zu lassen. Dieses Problem stellte jedoch keine Einschränkung dar, weil die Experimentzeit stets deutlich unter 15 Stunden lag.

Proben, die als quadratische Plättchen vorlagen (Goldpolykristall, HOPG – Highly Ordered Pyrolytic Graphite, NCD - Nanocrystalline Diamond), wurden nach der Vorbehandlung (siehe Kapitel 3.4) mit einem dünnen gereinigten Teflonband derart abgedeckt, dass auf der Vorder- und Rückseite nur der untere und der obere Bereich frei blieben (Abb. 3.3 B). Während der obere Teil der Probe mit einer Krokodilklemme kontaktiert war, war der untere Teil bis zum unteren Rand des Teflonbandes im Elektrolyten eingetaucht. Bei dieser selbstentwickelten Kontaktierung konnte anhand zahlreicher CVs nachgewiesen werden, dass der Elektrolyt nicht mit der durch das hydrophobe Teflon abgedeckten Fläche in Kontakt kam. Da das Teflonband nicht immer an exakt derselben Stelle angebracht werden konnte, wurde nach dem Experiment mit einer Schieblehre die genaue Position des Bandes und damit die Fläche bestimmt, die mit dem Elektrolyten in Kontakt war; der Messfehler bei der Bestimmung der Fläche lag bei ca. 3% des Flächenwertes.

### **3.1.4 Charakterisierung der Arbeitselektroden**

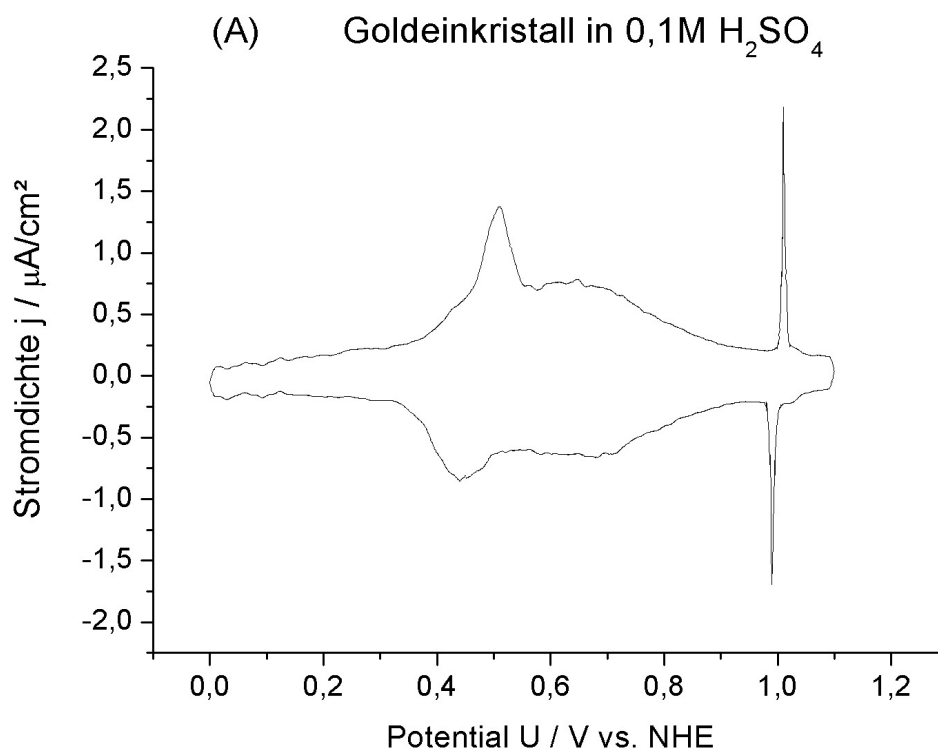
Reproduzierbarkeit in der Elektrochemie erfordert neben sauberem Arbeiten einen genau definierten Ausgangszustand, der auf der einen Seite durch strukturiertes Vorbereiten der Experimente und vor allem durch genau festgelegtes Vorbehandeln der Arbeitselektrode erreicht wird, auf der anderen Seite aber auch möglichst vor jedem Experiment überprüft werden sollte. Um am Anfang der Experimente sicherzustellen, dass das System bestehend aus Arbeitselektrode, Elektrolyt und Messgerät Daten hoher Qualität liefert, wurden CVs der Arbeitselektroden aufgenommen und mit der Literatur verglichen. Die wichtigsten CVs der benutzten Arbeitselektroden sind in diesem Kapitel aufgeführt

#### *Goldelektroden*

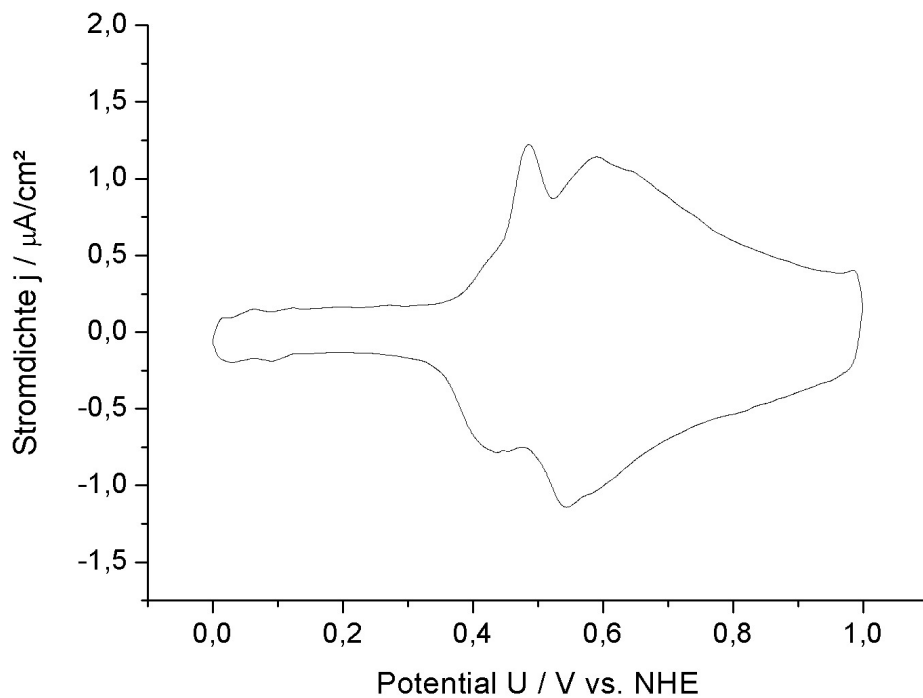
Charakteristisch für Goldeinkristalle mit (111)-Orientierung von hoher Qualität sind in 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> ausgeprägte Peaks der Aufhebung der Rekonstruktion bei 0,57V vs. NHE sowie des Phasenübergangs der adsorbierten Sulfatschicht bei 1,02V vs. NHE. Dabei wird das Potential des Peaks der Aufhebung der Rekonstruktion mit höher Defektdichte negativer [51]. Diese Peaks sind klar in Abb. 3.4 A zu erkennen und deren Potentiale weichen nur wenig von den Literaturwerten ab. Der besonders scharfe und ausgeprägte Phasenübergangspik bei 1,02V in Abb. 3.4 A ist ein Hinweis darauf, dass der Goldeinkristall eine hohe Oberflächenqualität hat und dass eine (111)-Orientierung mit breiten Terrassen vorliegt [51].

CVs mit der in dieser Arbeit benutzten PBS-Lösung sind bislang nicht veröffentlicht. Aber ein Vergleich mit Untersuchungen von Au(111) in  $\text{H}_3\text{PO}_4$  [52] und  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$  Ionen [53] zeigt, dass die Aufhebung der Rekonstruktion bei gleichzeitiger Hydrogenphosphationen-Adsorption, in Abb. 3.4 B bei 0,48V vs. NHE zu sehen, für Au(111)-Proben im erwarteten Bereich liegt. Beim Vergleich der CVs B und D in Abb. 3.4 fällt auf, dass der entsprechende Peak, der beim Einkristall deutlich zu sehen ist, beim Polykristall etwas weniger deutlich ausfällt. Dies ist im Einklang mit den Ergebnissen von Rekonstruktionsuntersuchungen von Au(111) in  $\text{H}_3\text{PO}_4$  [52], die unter anderem zu dem Ergebnis kommen, dass die Ausprägung dieses Peaks mit geringerer Breite der Terrassen abnimmt.

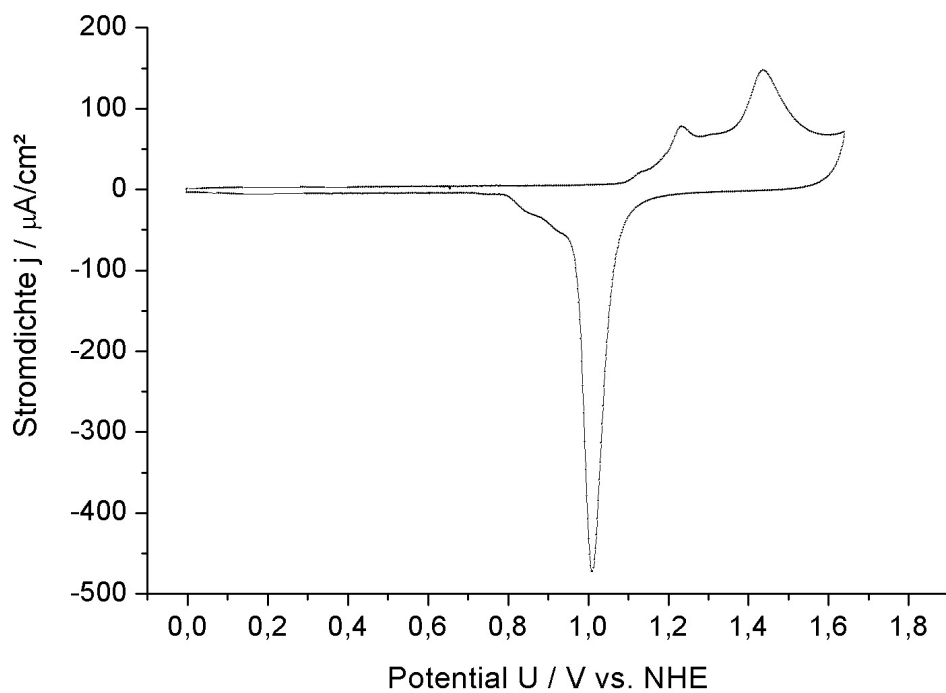
Abb. 3.4 C zeigt das CV des Goldpolykristalls in 0,1M  $\text{HClO}_4$ , welches mit den CVs der detaillierten Untersuchungen von Au(111) in 0,1M  $\text{HClO}_4$  in der Literatur [54] verglichen wurde. Zwar kennzeichnen die Peaks durch die oxidative Anlagerung von  $\text{OH}^-$  - Ionen an die Oberflächenatome (1,23V und 1,42V) und durch die nachfolgende Reduktion (1V) reproduzierbar eine saubere Au(111)-Oberfläche, aber durch die erhöhte Rauigkeit der Oberfläche sind die Oxidationspeaks nicht so scharf wie bei Einkristallen.



(B) Goldeinkristall in PBS (pH = 6,0)



(C) Goldpolykristall in 0,1M  $\text{HClO}_4$



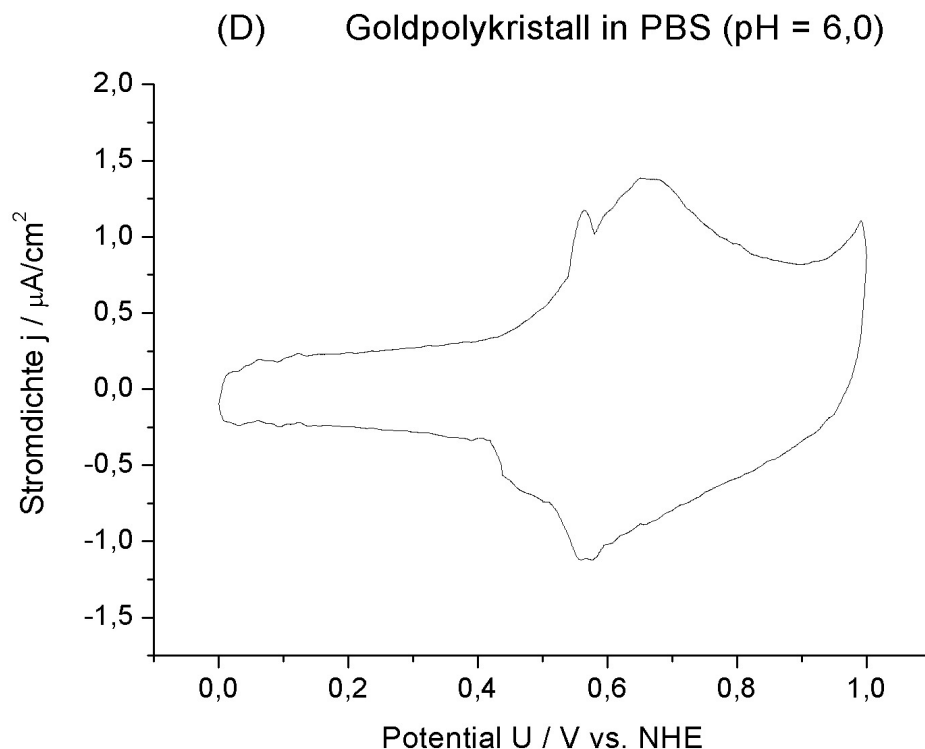


Abb. 3.4: CVs des in der Arbeit verwendeten Goldeinkristalls (A + B) und Goldpolykristalls (C + D), aufgenommen mit 5mV/s (A, B, D), bzw. 50mV/s (C) in Argonatmosphäre. Das Startpotential lag jeweils bei 0,45V vs. NHE, die Sweeprichtung war im Uhrzeigersinn. Einzelheiten zur PBS-Pufferlösung sind in Kapitel 3.4 aufgeführt.

Mit Ausnahme einiger weniger in Kapitel 5.4 erwähnten Experimente sind die Untersuchungen der katalytischen Aktivität von HRP an Goldoberflächen (Kapitel 4.3) ausschließlich am Goldeinkristall durchgeführt worden. Im Gegensatz dazu erfolgten alle STM-Experimente (Kapitel 4.1 und Kapitel 4.2) mit Goldarbeitselektrode am Goldpolykristall, da sich dieser in der STM-Zelle besser kontaktieren ließ. In Übereinstimmung mit der beobachteten Kristallorientierung und in Anlehnung an die Terminologie in der Literatur wird fortan generell „Au(111)“ als Elektrodenbezeichnung verwendet.

#### Goldelektrode + Thiol-Selbst-assemblierende Monolage (SAM)

Die Au(111)-Proben waren nach dem Reinigungsprozess über Nacht in einer 20mM-Thiollösung in Ethanol eingetaucht. 2-3 Minuten lagen die Proben nach dem Herausnehmen und Spülen mit Ethanol im Ultraschallbad, wurden dann mit Ethanol und Wasser gespült und unter Potentialkontrolle in den Pufferelektrolyten eingetaucht.

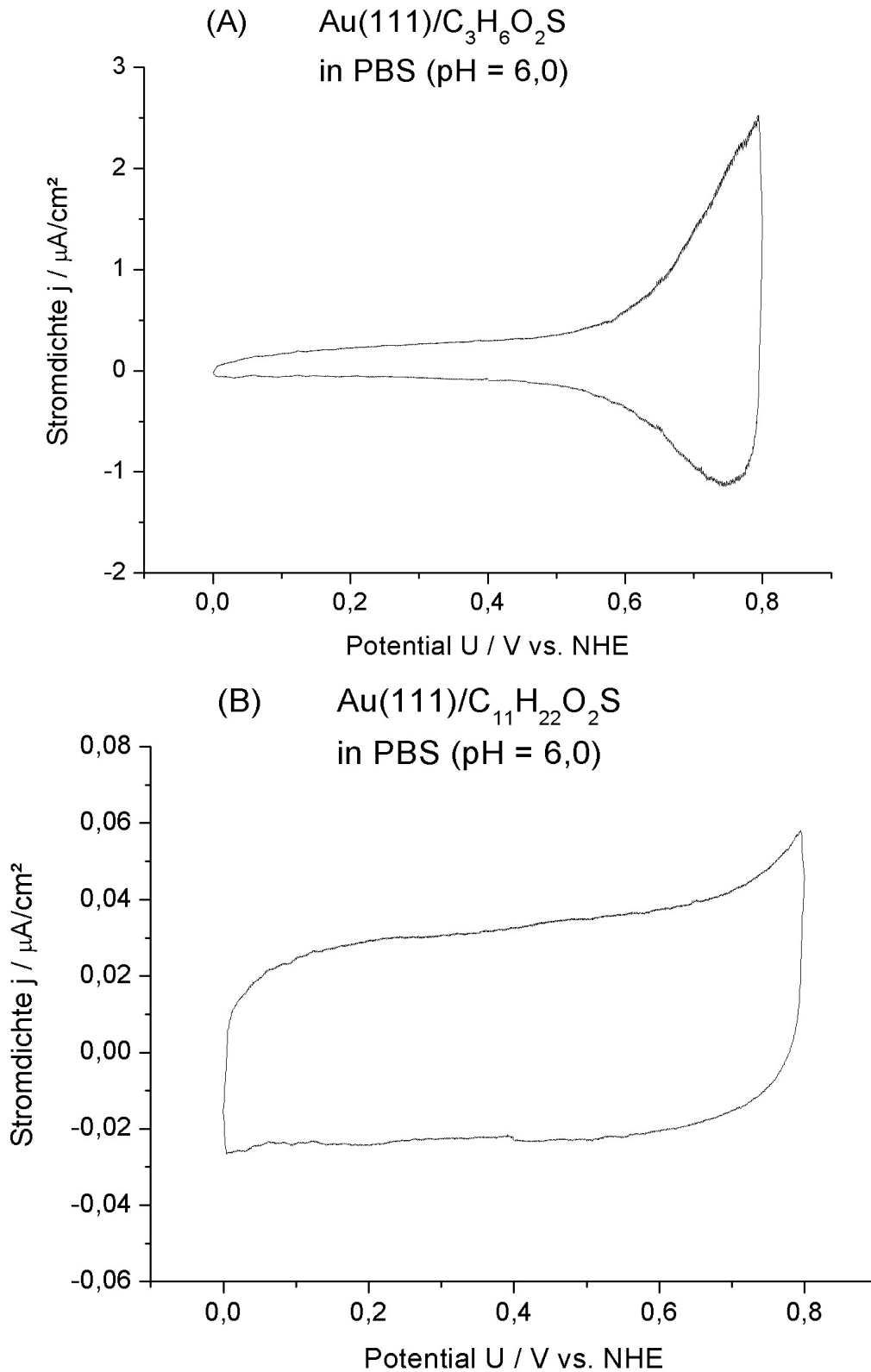
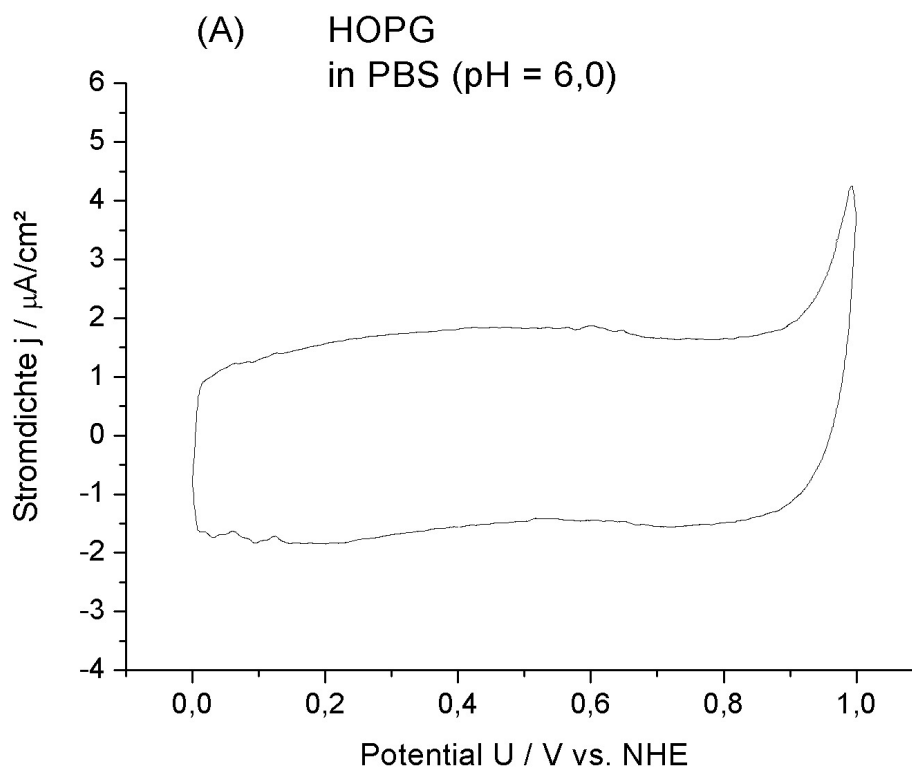


Abb. 3.5: CVs von Au(111) mit einer Monolage 3-Mercaptopropionsäure (A) bzw. 11-Mercapto-undecansäure (B), aufgenommen mit 5mV/s in Argonatmosphäre. Das Startpotential lag jeweils bei 0,4V vs. NHE, die Sweeprichtung war im Uhrzeigersinn.

Wie bei den thiofreien Au(111)-Proben erfolgte vor jedem Experiment mit passivierten Au(111)-Proben eine Charakterisierung der Proben durch Aufnahme von CVs. Diese Charakterisierung beschränkte sich auf ein Potentialfenster von 0V bis 0,8V, um irreversible reduktive oder oxidative Desorption der Thiole [55] zu vermeiden. Ein Vergleich von Abb. 3.5 A mit Abb. 3.5 B zeigt, dass eine Monolage von  $C_{11}H_{22}O_2S$  deutlich effektiver passiviert als eine Monolage von  $C_3H_6O_2S$ . Im Bereich von 0V bis 0,5V sind die Stromdichten an der Au(111)/ $C_{11}H_{22}O_2S$ -Elektrode über 10mal kleiner als die Stromdichten an der Au(111)/ $C_3H_6O_2S$ -Elektrode, im Bereich von 0,5V bis 0,8V bis zu 50mal kleiner. Vielfach wird die Eigenschaft, dass Thiol-Monolagen mit zunehmender Länge stärker reduzierte Doppelschicht-Ladungsströme haben und in einem großen Potentialbereich nahezu potentialunabhängige Stromdichten aufweisen, in der Literatur diskutiert (z.B. [56]). Vergleicht man Abb. 3.5 A mit dem entsprechenden CV von Au(111) ohne Thiol-SAM (Abb. 3.4 B), erkennt man, dass die Passivierung durch diese kurzkettinge Monolage gering ist. Im Gegensatz dazu ist ein vergleichsweise hoher Passivierungsgrad in Abb. 3.5 B erkennbar.

#### HOPG und NCD

Die Charakterisierung beider Proben fand nach der in Kapitel 3.4 beschriebenen Vorbehandlung statt. Ausgewählte CVs sind in Abb. 3.6 zu sehen.



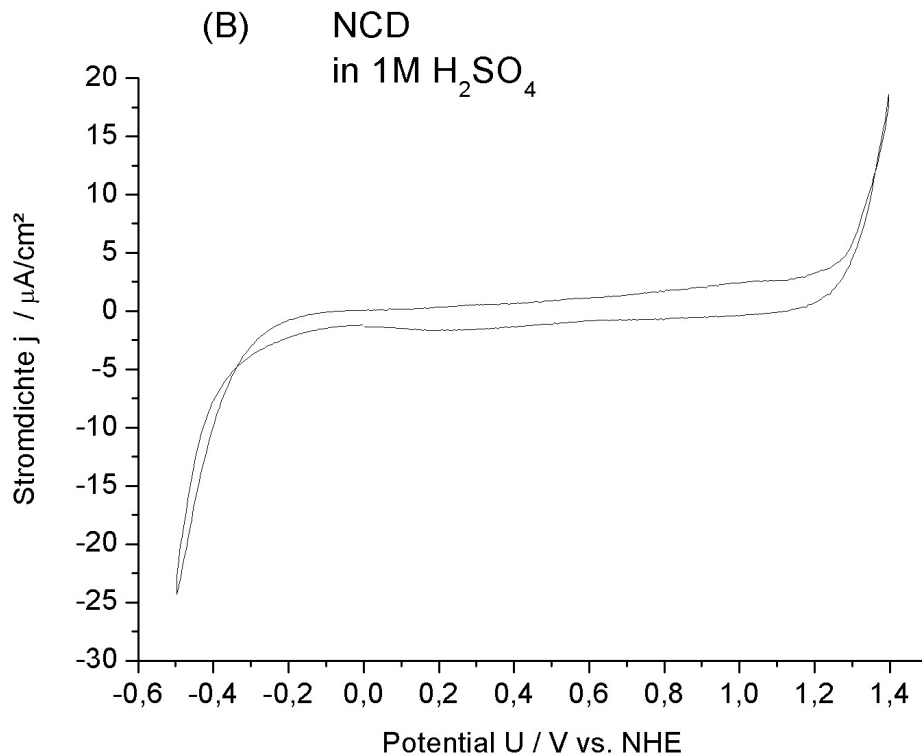


Abb. 3.6: CVs von HOPG (Highly Ordered Pyrolytic Graphite - A) bzw. NCD (Nanocrystalline Diamond - B), aufgenommen mit 5mV/s (A), 50mV/s (B) in Argonatmosphäre. Das Startpotential lag bei 0,4V vs. NHE (A) und bei 0V vs. NHE (B), die Sweeprichtung war im Uhrzeigersinn.

Im für Enzymaktivitätsuntersuchungen relevanten Potentialbereich erkennt man in Abb. 3.6 A nahezu ausschließlich Doppelschicht-Ladungsströme, aus denen man eine Kapazität der Doppelschicht von  $C = 10^{-4}\text{F}/\text{cm}^2$  bestimmen kann. Dieser Kapazitätswert variiert mit der Vorbehandlung der Elektrode, liegt jedoch in derselben Größenordnung relevanter publizierter Werte [27,57]. Für die anfängliche Charakterisierung der NCD-Probe wurde 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> als Elektrolyt gewählt, um Vergleiche mit Literatur-CVs [58] zu ermöglichen, die auf Messungen mit 1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> basieren. In Übereinstimmung mit der Literatur hatte die NCD-Probe (Abb. 3.6 B) ein breites Doppelschicht-Potentialfenster (-0,3V bis 1,2V vs. NHE), begrenzt durch die Wasserstoffentwicklung bei  $U < -0,3$  V und durch die Sauerstoffentwicklung bei  $U > 1,2$  V. Dieses Potentialfenster wird maßgeblich durch den Herstellungsprozess bestimmt, bei dem im Gegensatz zu HOPG oder Gold mehr Spielraum besteht. Unter anderem können bei NCD-Proben die Größe der Nanodiamanten, die Anzahl der Diamanten und die Dotierung der Diamanten variieren. Doppelschichtpotentialfenster für unabhängig voneinander hergestellte NCD-Proben haben Breiten von z.B. 1,6 V [38] oder 2,5V [58].

### 3.1.5 Messmethoden zur Bestimmung der katalytischen Aktivität der Horseradish Peroxidase

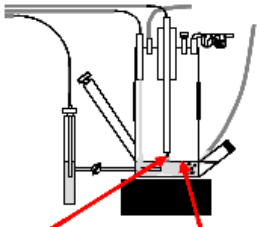
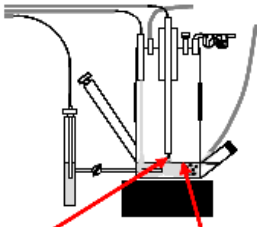
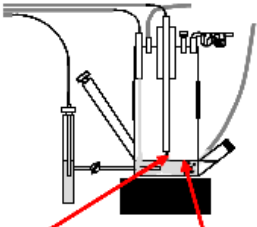
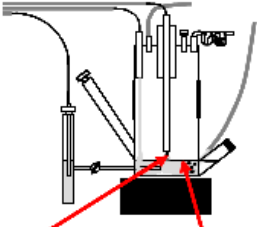
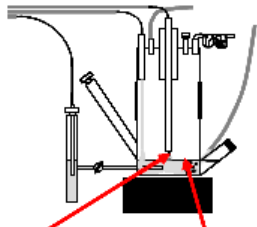
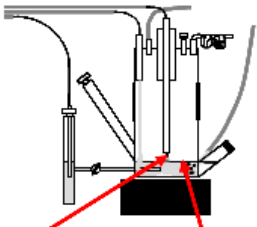
Chronoamperometrische und CV-Messungen zur Untersuchung der katalytischen Aktivität der HRP konzentrieren sich in bisherigen Veröffentlichungen [15,18,20,23,37,43] auf Experimente, bei denen die HRP im Vorfeld der Messungen auf der Elektrodenoberfläche adsorbiert waren. Diese mit den HRP präparierten Elektroden wurden in einen HRP-freien Elektrolyten getaucht, um dann durch Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  die katalytische Aktivität der HRP zu bestimmen. Zweifellos erlaubt dieses Vorgehen einen definierten Ausgangszustand und ermöglicht zielführend die Charakterisierung der HRP-modifizierten Elektroden. Der Adsorptionsprozess wird jedoch bei der Methode gar nicht oder nur indirekt untersucht. Auch gibt es dabei keinen „vor der Adsorption / nach der Adsorption“ – Vergleich der Stromdichten innerhalb eines Experimentes. Wie die weiteren Erläuterungen in Kapitel 5.3 zeigen, sind in Ergänzung zu Experimenten mit voradsorbierter HRP weitere Experimente mit in-situ adsorbierenden HRP nötig, um ein tieferes Verständnis der Prozesse zu erhalten. Tab. 3.1 gibt einen Überblick über die drei grundsätzlich angewandten experimentellen Methoden zur Untersuchung der katalytischen Aktivität von an Au(111) adsorbierter HRP. Dabei sind die Methoden A, B und C nicht mit den drei technischen Methoden (EC, EIS, STM) zu verwechseln, die in den Kapiteln 3.1 bis 3.3 vorgestellt werden. Methoden A, B und C sind als Vorgehensweisen zu verstehen, mit denen durch Strom-/Spannungsmessungen das Au(111)/HRP-System charakterisiert werden kann.

#### Method A

Prinzipiell entspricht die Methode A dem experimentellen Vorgehen der oben zitierten Veröffentlichungen. In einer PBS-Lösung mit HRP wird in einer zweiten Zelle unter definierten Bedingungen (HRP-Konzentration, Eintauchdauer) HRP auf der Au(111)-Oberfläche adsorbiert. Sofort nach dem Rausziehen der Elektrode aus der Lösung wird die Elektrode mit PBS gespült, um nicht adsorbierte HRP zu entfernen. Die Charakterisierung dieser Elektrode mit voradsorbierten HRP, bezeichnet als Au(111)/HRP, erfolgt anschließend in einem HRP-freien Elektrolyten. In der Zelle setzt bei entsprechendem Potential (siehe unten) nach Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  die katalytische Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu  $\text{H}_2\text{O}$  ein. Bei dieser Methode kann man davon ausgehen, dass nur adsorbierte HRP zum katalytischen Strom beitragen, da die vorherige Spülung nichtadsorbierte HRP entfernt hat. Unter Annahme vernachlässigbarer Desorption, wie sie experimentell nachgewiesen wurde (siehe Kapitel 4.3.3), hat man bei Methode A einen zeitlich konstanten Bedeckungsgrad an HRP auf der Oberfläche. Durch genaue Kontrolle der Voradsorption hat man eine definierte Au(111)/HRP-



Elektrode, die sich in verschiedenen Elektrolyten bei festgelegten Potentialen charakterisieren lässt. Ein Vergleich von Messungen mit Au(111)/HRP in PBS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und den gleichen Messungen mit reinem Au(111) liefert Kenntnisse über die katalytische Aktivität der adsorbierten HRP. Als Nachteil der Methode ist zu nennen, dass die Dynamik des Adsorptionsprozesses nicht untersucht wird. Zwar könnte man indirekt die katalytische Aktivität der Au(111)/HRP-Elektrode mit den vor der Messung festgelegten Adsorptionsparametern korrelieren, aber genauere Rückschlüsse sind mit Methode B möglich.

	<b>Ausgangszustand</b>	<b>1. Schritt</b>	<b>2. Schritt</b>	<b>Endzustand</b>
<b>Methode A</b>	 <p>Elektrode: Au(111)/HRP</p> <p>Elektrolyt: PBS (pH = 6,0)</p>	Zugabe von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	(entfällt)	 <p>Elektrode: Au(111)/HRP</p> <p>Elektrolyt: PBS (pH = 6,0) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></p>
<b>Methode B</b>	 <p>Elektrode: Au(111)</p> <p>Elektrolyt: PBS (pH = 6,0)</p>	Zugabe von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Zugabe von HRP	 <p>Elektrode: Au(111)/HRP*</p> <p>Elektrolyt: PBS (pH = 6,0) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + HRP</p>
<b>Methode C</b>	 <p>Elektrode: Au(111)</p> <p>Elektrolyt: PBS (pH = 6,0)</p>	Zugabe von HRP	Zugabe von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	 <p>Elektrode: Au(111)/HRP*</p> <p>Elektrolyt: PBS (pH = 6,0) + HRP + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></p>

Tab. 3.1: Veranschaulichung dreier verschiedener experimenteller Methoden zur Untersuchung der katalytischen Aktivität der HRP an Au(111). Das Vorgehen bei den jeweiligen Methoden ist chronologisch von links nach rechts dargestellt.

### Methode B

Ausgangszustand ist hier die zu Beginn des Experiments HRP-freie Au(111)-Elektrode, die in einer PBS-Lösung eingetaucht ist. Elektrochemische Messungen (Amperometrie, CVs) charakterisieren zu dem Zeitpunkt das System Au(111) in PBS. Zugabe von  $\text{H}_2\text{O}_2$  und die dann durchgeführte Charakterisierung des Systems Au(111) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  in PBS liefert Kenntnisse über das Verhalten von  $\text{H}_2\text{O}_2$  an der Elektrode. Im 2. Schritt wird HRP zugegeben und 1-2 Minuten durch Rühren im Elektrolyten ohne Elektrodenkontakt verteilt. Nach Eintauchen der Elektrode beginnt der Adsorptionsprozess unmittelbar im ungerührten Elektrolyten. Durch Aufzeichnung der Stromdichte an der Elektrode lässt sich der Übergang vom reinen  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Oxidationsstrom zum katalytisch bedingten  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Reduktionsstrom (siehe Kapitel 4.3.4) und damit einhergehend grundsätzlich der zeitliche Verlauf der Adsorption verfolgen. Folglich erlaubt Methode B prinzipiell das Studium, insbesondere die zeitliche Stabilität betreffend, des Verhaltens von HRP auf Au(111) in einem Elektrolyten mit großem HRP-Reservoir (bezeichnet als Au(111)/HRP\*). Hervorzuheben ist bei der Methode, dass man einen unmittelbaren vorher/nachher Vergleich hat, da elektrochemische Daten des Systems vor und nach Zugabe der HRP vorliegen. Nachteile ergeben sich aus der Komplexität der Experimente, bedingt durch die Adsorptionsdynamik. Der Bedeckungsgrad verändert sich zeitlich und zudem ist die ganze Dynamik sehr abhängig von den Anfangsbedingungen. Die Interpretation der Ergebnisse ist komplizierter als bei Methode A.

### Methode C

Analog zu Methode B erfolgt die Durchführung der Experimente nach Methode C, nur dass zuerst HRP (Schritt 1) dem Elektrolyten zugegeben wird und danach  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Schritt 2). Nach Schritt 1 lässt sich das Verhalten von HRP in einem  $\text{H}_2\text{O}_2$ -freien PBS-Elektrolyten beobachten. Dies ist weder mit Methode A, noch mit Methode B möglich. Weiterhin ist der Vergleich der katalytisch bedingten Stromdichten der Endzustände von Methode B und Methode C von Bedeutung. Bei Durchführung beider Methoden mit vergleichbaren Zeitvorgaben der Adsorption erhält man Erkenntnisse darüber, ob HRP in Anwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  genauso adsorbiert wie in Abwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Die Nachteile dieser Methode entsprechen denen der Methode B.

Aus den Erläuterungen zu den drei Methoden folgt, dass jede der Methoden das System Au(111)/HRP + PBS +  $\text{H}_2\text{O}_2$  bzw. Au(111)/HRP\* + PBS +  $\text{H}_2\text{O}_2$  auf unterschiedliche Art und Weise charakterisiert. Dementsprechend wurden in dieser Arbeit alle drei Methoden bei der Untersuchung von HRP auf Au(111) angewandt. Hierbei ist anzumerken, dass den

Methoden A und B eine deutlich größere Bedeutung zukommt als der Methode C. Dementsprechend waren zum besseren Verständnis der HRP-Aktivität auf Au(111) nur wenige Experimente nach Methode C erforderlich, nachdem zahlreichen Daten aus Experimentreihen nach Methode A und Methode B vorlagen.

Wenn nicht anders in Kapitel 4 angegeben, entsprachen die experimentellen Rahmenbedingungen aller drei Methoden den in Kapitel 3.1.2 beschrieben. Die Konzentration der mit der Spritze zugegebenen Lösungen betrug mindestens das 100fache der gewünschten Endkonzentration im Elektrolyten. Um z.B. die Konzentrationen  $[HRP] = 0,01\text{mg/ml}$  oder  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 50\mu\text{M}$  in 50ml PBS zu erreichen, waren die zugegebenen Lösungen 0,5ml PBS mit  $[HRP] = 1\text{mg/ml}$  bzw.  $[\text{H}_2\text{O}_2] = 5\text{mM}$ . Wie schon in Kapitel 3.1.2 erwähnt, wurde der Elektrolyt bei der Zugabe für ca. 1 Minute gerührt, um eine möglichst schnelle homogene Verteilung der zugegebenen Moleküle im Elektrolyten zu erzielen. Die Elektrode war dabei über dem Elektrolyten positioniert und kam erst nach dem Rührprozess und ca. 3-4 Minuten Warten in Kontakt mit dem Elektrolyten. Es stellte sich heraus, dass das Rühren des Elektrolyten die  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Oxidation an Au(111) wesentlich beeinflusste.

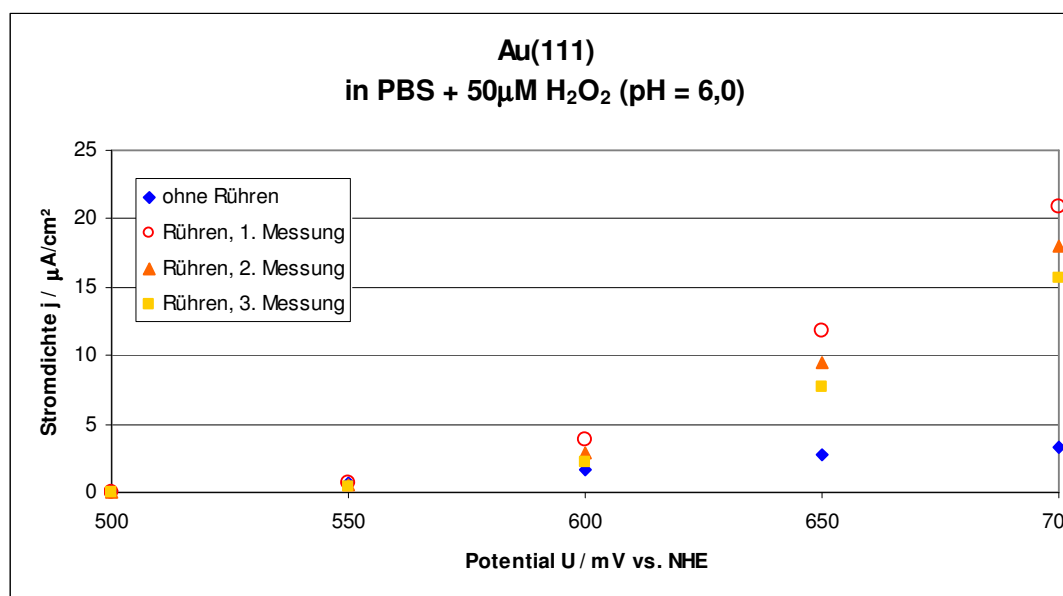


Abb. 3.7: Stromdichten an Au(111), amperometrisch bestimmt. Es wurde jeweils für 5min bei konstantem Potential gemessen, in der Reihenfolge 700mV, 650mV, 600mV, 550mV, 500mV. Elektrolyt: PBS + 50 $\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ , in Argonatmosphäre. Die Rührgeschwindigkeit des Magnetrührers betrug 150 Umdrehungen pro Minute. Gemessen nach dem 1. Schritt der Methode B.

Dieser Einfluss ist in Abb. 3.7 dargestellt. Im nichtgerührten Elektrolyten ergaben sich Stromdichten der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Oxidation an Au(111) im Potentialbereich von 500mV bis 700mV (zur

Wahl des Bereichs siehe Kapitel 4.3.3) zwischen  $0\mu\text{A}/\text{cm}^2$  und  $5\mu\text{A}/\text{cm}^2$  (blaue Karos). Mehrere Messungen hintereinander führten bei den jeweiligen Potentialen zu Stromdichtenwerten, die nur geringfügig ( $\approx 1\%$ ) voneinander abweichen. Im Gegensatz dazu sind die Stromdichten der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Oxidation an Au(111) vor allem bei Potentialen  $U > 600\text{mV}$  deutlich höher im gerührten Elektrolyten. Diese Stromdichten sind nicht nur abhängig von der Rührgeschwindigkeit, sondern auch bei konstanter Rührgeschwindigkeit von z.B. 150 Umdrehungen pro Minute zeitlich fallend. Bei drei Messungen direkt hintereinander (3 \* je 25 Minuten) zeigten die gemessenen Stromdichten (rote Kreise, orangene Dreiecke und gelbe Quadrate) signifikante Unterschiede. Ein derartiges Verhalten erhöht die Komplexität des Systems und stellt die Reproduzierbarkeit in Frage. Im Vordergrund der Experimente steht das Studium des katalytischen Verhaltens von HRP an Au(111) und dafür sind zeitlich konstante  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Oxidationsströme eine wichtige Grundlage. Aus diesen experimentellen Ergebnissen und den Erläuterungen folgt, dass die Messungen im ungerührten Elektrolyten durchgeführt werden mussten. Detaillierte Erläuterungen zur  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Oxidation an Au(111) sind in Kapitel 5.3.1 zu finden.

## 3.2 Elektrochemische Impedanzspektroskopie (EIS)

Eins der wichtigsten Ziele dieser Arbeit war, die Immobilisierung von HRP an Au(111) durch direkte Adsorption zu untersuchen. Für die Untersuchung von Prozessen an der Grenzfläche Elektrode/Elektrolyt, wo die Adsorption von HRP auf Au(111) stattfindet, ist die EIS grundsätzlich eine mögliche geeignete Methode. In dieser Arbeit wurde sie in Kombination mit Strom-/Spannungsmessungen und dem STM verwendet, um den Oberflächenprozess der HRP-Adsorption auf Au(111) zu charakterisieren. Nach einer kurzen allgemeinen Einführung in die EIS (Kapitel 3.2.1) werden die experimentellen Rahmendaten des EIS-Aufbaus vorgestellt (Kapitel 3.2.2).

### 3.2.1 Grundlagen der Impedanzspektroskopie

EIS basiert darauf, dass an der zu untersuchenden Arbeitselektrode in einer elektrochemischen Zelle eine Wechselfspannung mit geringer Amplitude (z.B. 5mV) gegenüber eingestellten Potentialen angelegt wird und aus den Strömen die resultierenden Impedanzen bestimmt werden. Ändert man das Potential  $U_t$  der Arbeitselektrode mit der Amplitude  $U_0$  und der Kreisfrequenz  $\omega$  gemäß

$$U_t = U_0 e^{i\omega t}, \quad (3.3)$$

erhält man einen Wechselstrom  $I_t$ , der gegenüber  $U_t$  eine Phasenverschiebung von  $\phi$  hat:

$$I_t = I_0 e^{i(\omega t - \phi)}. \quad (3.4)$$

Wie in der Literatur üblich, wurde für die Gleichungen (3.3) und (3.4) die komplexe Schreibweise mit  $i^2 = -1$  gewählt. Als Impedanz ergibt sich:

$$Z(\omega) = \frac{U_t}{I_t} = Z_0 e^{i\phi} = Z_0 (\cos \phi + i \sin \phi). \quad (3.5)$$

Der Phasenwinkel berechnet sich aus dem imaginären und realen Teil der Impedanz:

$$\phi = \arctan\left(\frac{Z_{\text{Im}}}{Z_{\text{Re}}}\right). \quad (3.6)$$

Hat man mit einem experimentellen Aufbau impedanzspektroskopische Messungen durchgeführt und für verschiedene Werte von  $\omega$  bzw.  $f$  (Frequenz  $f = \omega/(2\pi)$ ) Impedanzen  $Z(\omega)$  bestimmt, stellt sich die Frage, wie diese Impedanzen zu interpretieren sind. Da umfassende Ausführungen zur Auswertung impedanzspektroskopischer Daten über den Rahmen dieser Einführung hinausgehen, wird für Details und weitergehende Betrachtungen auf die Literatur verwiesen [59,60] und nur die relevanten Grundsätze der Auswertung für die in dieser Arbeit gemessenen EIS-Daten werden vorgestellt.

Prinzipiell können sich an der Elektroden/Elektrolyt-Grenzfläche eine Vielzahl von Prozessen abspielen, z.B. Ladungstransfer, Adsorption/Desorption, Ausbildung einer Doppelschicht, wobei die Konzentrationen und Diffusionsgeschwindigkeiten der Spezies im Elektrolyt einen großen Einfluss auf die Prozesse an der Oberfläche haben. Die resultierenden gemessenen Ströme dieser Prozesse lassen sich in oft guter Näherung modellhaft – zumindest bei einfachen Systemen – durch elektrische Schaltkreise erklären, die für meist ohmsche und kapazitive Prozesse in entsprechenden Serien- und/oder Parallelschaltungen stehen. D.h. man legt physikalischen Prozessen, die Einfluss auf den gemessenen Strom bei der EIS-Messung haben, einen adäquaten Schaltkreis zugrunde und fittet die erhaltenen Daten mit durch einen Schaltkreis berechneten simulierten Impedanzwerten. Beim Fit wird berücksichtigt, dass

$$Z = R_{el} \quad (3.7)$$

für reale Widerstände gilt und dass

$$Z = \frac{1}{i\omega C} \quad (3.8)$$

für auftretende Kapazitäten gilt. Neben der Darstellung als Nyquist-Plot (-Im Z über Re Z) werden EIS-Daten vorwiegend als Bode-Plots (log |Z| und  $\phi$  über Log  $\omega$ ) dargestellt. Abb. 3.8 zeigt simulierte Bode-Plots, berechnet aus simulierten Impedanzen einiger einfacher elektrischer Schaltungen.

Ein Hinweis auf die Güte der Fits gemessener Daten, die heutzutage mit Softwarepaketen durchgeführt werden, sind die angegebenen Fehler (in %) der ausgegebenen Werte für die einzelnen Schaltelemente sowie der Gesamtfehlerindikator  $\chi^2$ . Eine graphische Fit-Linie z.B. im Bodeplot veranschaulicht, bei welchen Frequenzen die gefitteten Werte von den gemessenen Werten in welchem Maße abweichen. Zu bedenken ist, dass man mit hinreichend komplizierten Schaltbildern Messdaten mit immer geringeren Fit-Fehlern fitten kann, dann fehlt jedoch für das Schaltbild jegliche physikalische Grundlage der zu modellierenden Elektrochemie. Bei guter Qualität der Messdaten und einem adäquaten Fit-Modell erhält man reproduzierbare Werte, z.B. in Ohm für den Elektrolytwiderstand und in Farad für die Oberflächenkapazität.

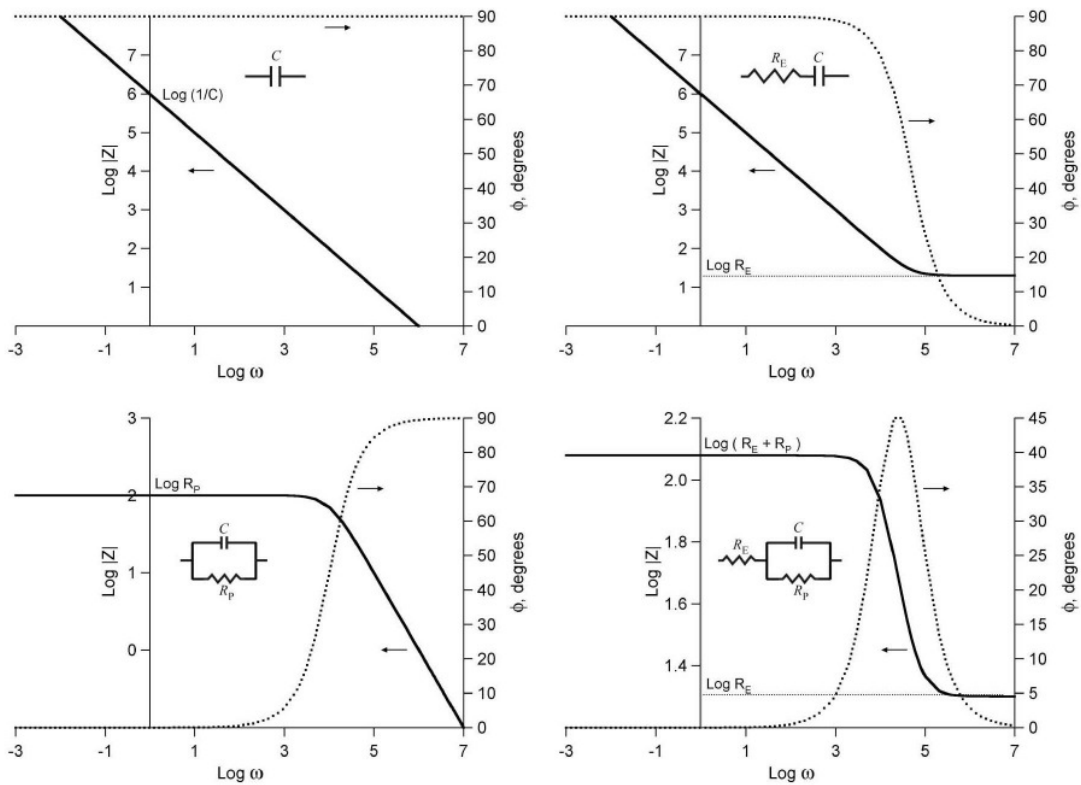


Abb. 3.8: Bode-Plots, berechnet aus dem simulierten Verhalten der dargestellten Schaltungen. Durchgezogene Linie:  $\text{Log } |Z|$  über  $\text{Log } \omega$ , gepunktete Linie:  $\phi$  über  $\text{Log } \omega$ . Für die Berechnung der simulierten Kurven wurde gesetzt: Kapazität  $C = 10^{-6}\text{F}$ , Elektrolyt-widerstand  $R_E = 20\Omega$  und Polarisationswiderstand  $R_P = 100\Omega$  [61].

### 3.2.2 Messsystem und Schaltkreis

EIS-Messungen wurden mit einem Autolab PGSTAT 30 Impedanzmessgerät von Eco Chemie B.V. in Verbindung mit der in Kapitel 3.1.2 beschriebenen Zelle und der Frequency Response Analyser (FRA) Version 4.9 Software durchgeführt. Zum Testen des Systems

wurde eine Dummyzelle benutzt, die mit den Eingängen der CE, RE und WE des Potentiostaten verbunden war. Der Schaltkreis in der Dummyzelle ist in Abb. 3.9 abgebildet, die Werte der einzelnen Schaltelemente betragen:  $R_1 = 100\Omega$ ,  $R_2 = 1\text{k}\Omega$  und  $C_1 = 1\mu\text{F}$ . Mit der angeschlossenen Dummyzelle wurde die FRA Testprozedur gestartet, die Impedanzen bei 51 logarithmisch verteilten Frequenzen zwischen 0,1 und 10000 Hz mit einer Amplitude von 10mV gegenüber einem virtuellen Referenzpotential von 0V gemessen hat. Der aus den Messwerten bestimmte Bode-Plot ist in Abb. 3.10

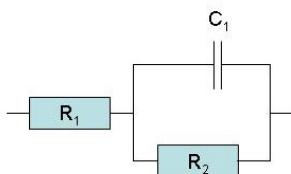


Abb. 3.9: Schaltkreis der EIS-Dummyzelle

abgebildet.

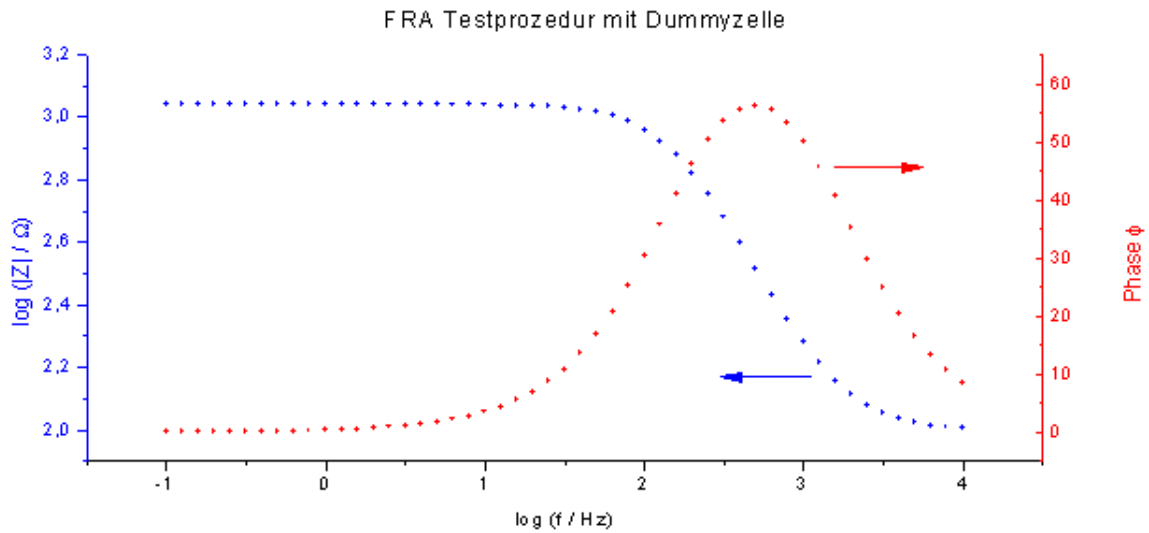


Abb. 3.10: Bode-Plot der mit der Dummyzelle zwischen 0,1 und 10000 Hz gemessenen Impedanzen.

Nahezu identisch zu den gemessenen Kurven in Abb. 3.10 verlaufen die entsprechenden Referenzkurven im Autolab Handbuch [62]. Im Gegensatz zur Dummyzelle ist das Fehlerpotential bei Messungen in der elektrochemischen Zelle deutlich größer, daher wurden EIS-Messungen in der Zelle stets mehrfach durchgeführt. Dieses Vorgehen, das im Übrigen auch für die anderen Messungen dieser Arbeit zutrifft, war wichtig, um die Reproduzierbarkeit und Qualität der Daten zu bewerten. Einzelheiten hierzu werden in Kapitel 5.4 diskutiert.



### 3.3 Rastertunnelmikroskopie (STM)

#### 3.3.1 Grundlagen der Rastertunnelmikroskopie

„We have now performed an experiment demonstrating the feasibility of vacuum tunnelling with modest means. The main purpose of the experiment is not to observe vacuum tunnelling *per se*, but to achieve it in a configuration which allows simultaneously spacially resolved tunnelling spectroscopy and other surface spectroscopic methods. [63]”

Dieses Zitat sagt deutlich aus, dass der Tunneleffekt Anfang der 1980er Jahre nichts Neues war. Aber sich den Tunneleffekt in einer brillant durchdachten technischen Ausführung zum Abbilden von Oberflächen mit bis zu atomaren Auflösungen im Rastertunnelmikroskop zu Nutze zu machen, das revolutionierte Teile der Oberflächen- und Nanophysik und machte Gerd Binnig und Heinrich Rohrer 1986 zu Nobelpreisträgern. Da die Literatur zum Rastertunnelmikroskop (im Folgenden als STM - Scanning Tunneling Microscope - bezeichnet) sowohl mit Büchern als auch mit Publikationen (z.B. [64,65,66]) sehr ausgiebig und detailliert das Prinzip des STMs beschreibt, wird hier nur kurz die Funktionsweise zusammengestellt.

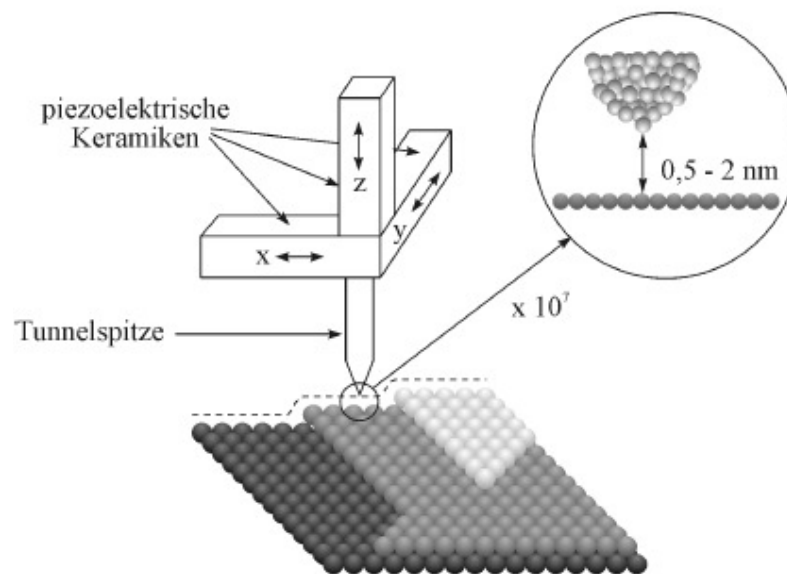


Abb. 3.11: Scannen einer Oberfläche mit einem STM [4].

Mit piezoelektrischen Keramiken wird eine elektrisch leitfähige Spitze mit möglichst geringem Endradius zeilenweise, d.h. in x- und y-Richtung (siehe Abb. 3.11), über eine elektrisch leitfähige Oberfläche gefahren. Dabei ist der Abstand zwischen Spitze und Oberfläche im Ångströmbereich, wo ein abstandsabhängiger Tunnelstrom auftritt, wenn eine Spannung

zwischen Spitze und Oberfläche anliegt. Beim Constant Current Mode, der ausschließlich in dieser Arbeit verwendet wurde, wird der Tunnelstrom zwischen Spitze und Oberfläche konstant gehalten. Nähert sich die Spitze einer Stufe der Oberfläche, verringert sich der Abstand, der Tunnelstrom steigt und die Regelung vergrößert mit Hilfe des z-Piezos den Abstand, bis der eingestellte Tunnelstrom wieder fließt. Scannt man auf die Art und Weise eine Oberfläche von z.B. 20nm x 20nm, gibt die z-Position in Abhängigkeit der x-y-Koordinaten eine pseudo-dreidimensionale Abbildung dieser Oberfläche, die bei hoher Spitzenqualität atomare Auflösung erzielen kann. Insbesondere sei hier auf die sehr hohe z-Auflösung hingewiesen, die auf die exponentielle Beziehung zwischen dem Tunnelabstand  $d$  und dem Tunnelstrom  $I_T$  zurückzuführen ist:

$$I_T \propto U_T e^{-A\sqrt{\phi_T} d}. \quad (3.9)$$

$U_T$  ist die Tunnelspannung,  $A$  eine Konstante mit dem Wert  $A = 10,25 \text{ nm}^{-1}(\text{eV})^{-1/2}$  und  $\phi_T$  ist die mittlere Barrierenhöhe, deren Bedeutung in Abb. 3.12 veranschaulicht ist.

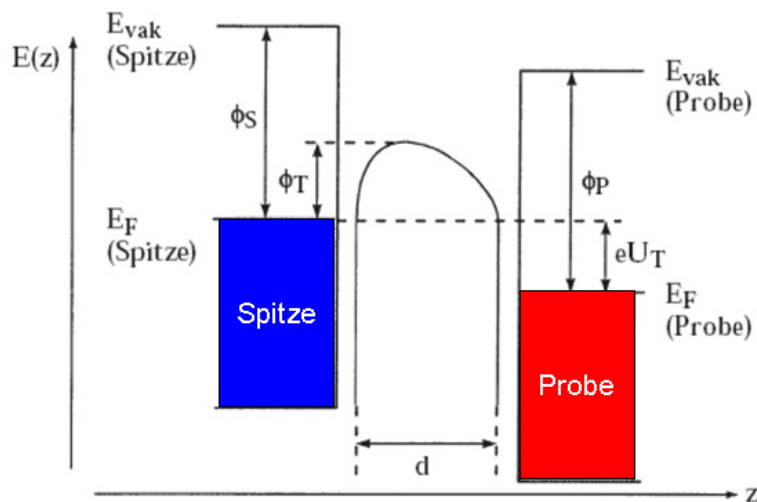


Abb. 3.12: Energetische Verhältnisse am Tunnelkontakt zwischen einer STM-Spitze und der Probe, über die gescannt wird [66].

Durch das Anlegen einer Spannung  $U_T$  verschieben sich die Fermienergien  $E_F(\text{Spitze})$  und  $E_F(\text{Probe})$  um den Betrag  $eU_T$  gegeneinander. Im Beispiel in Abb. 3.12 tunneln die Elektronen von der Spitze zur Probe und müssen dabei die Barrierenhöhe  $\phi_T$  überwinden.  $\phi_S$  und  $\phi_P$  sind die Austrittsenergien der Spitze und der Probe. Eine quantenmechanische Behandlung des Modells führt zum Ausdruck (3.9).

Es wurde schon 1986 experimentell gezeigt, dass man mit dem STM auch in wässrigen und nicht-wässrigen Lösungen arbeiten kann [67]. Insbesondere in-situ Untersuchungen von

elektrochemischen Vorgängen an der Phasengrenze fest-flüssig der zu untersuchenden Probe können durchgeführt werden, wenn die STM-Spitze in einer geeigneten elektrochemischen Zelle eingesetzt wird. Dabei muss darauf geachtet werden, dass die in Kontakt mit dem Elektrolyten stehende STM-Spitze mit Ausnahme des möglichst kleinen Spitzenendes isoliert ist, damit der an der Spitze gemessene Tunnelstrom nicht von unerwünschten Faraday-Strömen überlagert wird.

Schematisch ist das EC-STM (elektrochemisches STM) in Abb. 3.13 dargestellt. Mit dem Bipotentiostat werden die Potentiale der Spitze ( $U_{\text{Spitze}}$ ) und der Arbeitselektrode ( $U_{\text{WE}}$ ; WE = working electrode) relativ zum Potential der Referenzelektrode eingestellt und die jeweiligen Ströme der Spitzen- und Arbeitselektrode gemessen. Der Spitzenstrom  $I_{\text{Spitze}} = I_{\text{ist}}$  wird an die STM-Steuereinheit gegeben, um beim Constant Current Mode durch Steuerung des z-Piezos der Piezokeramik den Zustand  $I_{\text{soll}}$  zu erreichen.

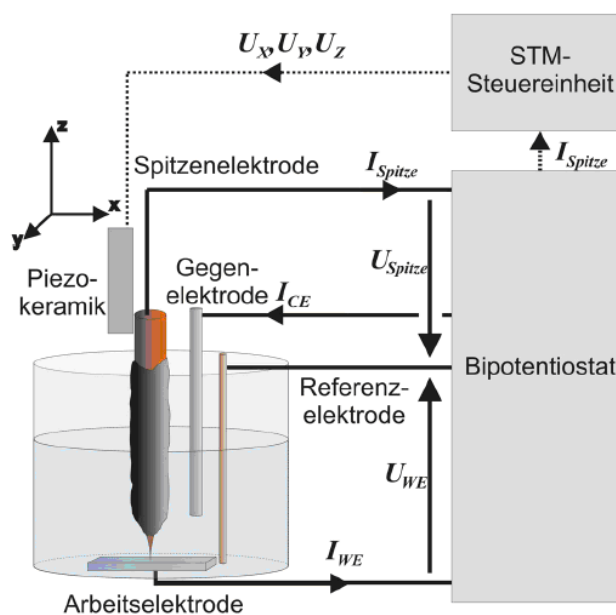


Abb. 3.13: Aufbau des EC-STMs [68].

### 3.3.2 Grundlagen der Rastertunnelmikroskopie an Biomolekülen

Voraussetzung für das Scannen einer Probe mit einem STM ist deren elektrische Leitfähigkeit; z.B. Gold oder HOPG sind unter anderem wegen ihrer hohen elektrischen Leitfähigkeit für STM-Untersuchungen geeignet und zudem sind sie wegen hoher elektrochemischer Stabilität oft die bevorzugten Proben in EC-STMs. STM-Untersuchungen an Halbleitern [69,70], an mit Thiolen modifizierten Goldoberflächen [56,71] und an Proteinen/Enzymen auf leitfähigen Proben [14,15,72,73,74,75,76] haben jedoch gezeigt, dass man bei STM-Untersuchungen mit entsprechenden Parametern (Bias,  $U_{\text{Spitze}}$ ,  $U_{\text{WE}}$ , Elektrolyt/Atmosphäre) auch Oberflächen abbilden kann, die nicht metallische Leitfähigkeit besitzen. Wegen des dreidimensionalen komplexen Aufbaus von Proteinen bieten Erklärungsmodelle für das Tunneln durch Proteine eine Herausforderung, der sich in der

Literatur bisher vergleichsweise wenige Forschungsgruppen gestellt haben. Ulstrup et al. konnten mit Hilfe des Modells in Abb. 3.14 die gemessene Veränderung des normalisierten Kontrastes von Azurinmolekülen auf Au(111)/Octanthiol in STM-Bildern mit dem angelegten Potential relativ zum Redoxpotential des Azurinmoleküls verifizieren [14]. Sie nahmen dabei an, dass das Redox-Molekül, welches sich zwischen Spitze und Probe befindet, energetische Zwischenzustände aufweist (vergleiche Abb. 3.12 und Abb. 3.14), über die Elektronen in einem zweistufigen Elektronentransfer von der Probe über das Molekül zur Spitze tunneln können, bzw. bei entgegengesetztem Bias in die andere Richtung.

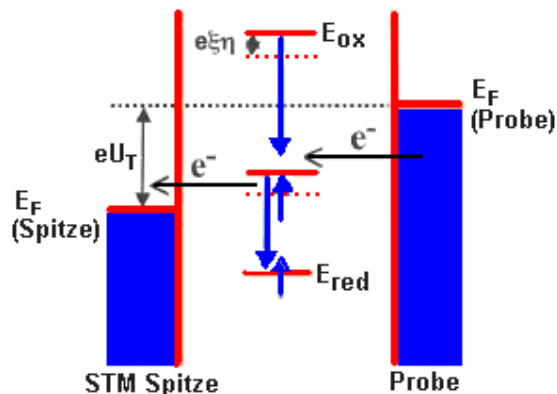


Abb. 3.14: Modell zum Tunneln durch ein Redox-Molekül [14].

$E_{ox}$  und  $E_{red}$  sind die Energiezustände des Redox-Moleküls im oxidierten bzw. reduzierten Zustand, ( $e\xi\eta$ ) ist das effektive Überpotential, berechnet aus dem Produkt der Elementarladung  $e$ , dem Probe-Lösung Potentialabfalls  $\xi$  und dem angelegten Überpotential relativ zum Redox-Potential des Moleküls  $\eta$ . Die anderen Größen sind analog den Größen in Abb. 3.12. Obwohl das Modell in Abb. 3.14 das Tunneln durch Azurinmoleküle hinreichend gut beschreibt und einen interessanten qualitativen Einblick in das Tunneln durch Proteine/Enzyme gibt, ist es nicht einfach

auf alle Enzym/Probe-Systeme übertragbar. Folgende Punkte sind zu bedenken:

- Orientierung des Moleküls und Verkabelung mit der Probe
- Zugang der STM-Spitze zu den Leitfähigkeitskanälen des Moleküls
- Scannen ohne mechanische Spitzen-Molekül Wechselwirkung.

Bei der Immobilisierung von Enzymen auf Oberflächen kann die Orientierung des Enzyms beträchtlich variieren, was entsprechend der räumlichen Orientierung leitfähiger Kanäle innerhalb des Enzyms zur Änderung des Tunnelverhaltens führen kann. Ferner gibt es große Unterschiede im Aufbau der unzähligen Enzymspezies, sowohl in der molekularen Größe, als auch in der Lage der Redox-Zentren und der räumlichen Struktur der Aminosäuren. Selbst unter der Annahme optimaler Orientierung eines Enzyms mit für die STM-Spitze relativ gut zugänglichen Leitfähigkeitskanälen bleibt das Problem der Wechselwirkung bestehen. Die STM-Spitze ist beim Tunneln über leitfähigen Oberflächen üblicherweise 0,1nm bis 2nm von der Oberfläche entfernt [4,77], was sich wegen der exponentiellen Abhängigkeit zwischen dem Abstand und dem Tunnelstrom nur unwesentlich vergrößern lässt. Intensive Studien maximaler Spitzen-Proben-Abstände und deren Auswirkungen auf

die Abbildung von Enzymen haben gezeigt, dass nur ein wechselwirkungsfreies STM-Scannen von Enzymen auch deren kristallografische Höhe annäherungsweise wiedergibt [75]. Maximal 3nm Spitzen-Abstand wurden bei diesen Experimenten in wässriger Lösung erreicht, was für viele Enzyme unterhalb der Enzymdimension liegt und damit ein wechselwirkungsfreies Scannen nahezu unmöglich macht. Je nach Stärke der Spitzen-Enzym-Wechselwirkung erhält man stabile Enzymbilder mit niedrigeren Höhen als man von kristallografischen Daten erwarten würde [15,75] bis hin zur Zerstörung und/oder Versetzung der adsorbierten Enzyme. Mögliche Spitzen-Enzym-Wechselwirkungen sind ein wichtiger Punkt bei der Diskussion von HOPG/GOD- und Au(111)/HRP-STM-Bildern in Kapitel 5.2.

### **3.3.3 Grundlagen Nanostrukturierung von Oberflächen**

Unter Nanostrukturierung versteht man das Formen/Modifizieren einer Oberfläche in Nanodimensionen. Im engeren Sinne und im Zusammenhang der Thematik dieser Arbeit geht es bei der Nanostrukturierung darum, die Elektrodenoberfläche durch Entfernen oder Hinzufügen von Nanostrukturen topografisch zu verändern und die so erhaltene Oberfläche elektrochemisch zu charakterisieren. Besondere Aufmerksamkeit verdienen die Arbeiten, bei denen die katalytische Aktivität von Palladium-Nanoclustern auf Gold studiert wurden, auf der einen Seite mit integraler elektrochemischer Abscheidung des Palladiums durch kurze Potentialpulse [9,10] und auf der anderen Seite durch lokale STM-spitzeninduzierte Abscheidung einzelner Palladium-Nanocluster [4,5,6,7,8]. Durch diese neu entwickelte Methode war es erstmals möglich zu zeigen, dass die Stromdichten bei der Reduktion von  $2\text{H}^+$  zu  $\text{H}_2$  an einzelnen Palladiumclustern mit kleiner werdendem Inselradius im Nanobereich um bis zu zwei Größenordnungen ansteigen.

Diese Arbeit hat Studien zur katalytischen Aktivität und zur Adsorption von HRP auf Elektrodenoberflächen zum Schwerpunkt, weshalb hier nicht näher auf die katalytischen Eigenschaften von Palladiuminseln eingegangen wird. Allerdings wurden Experimente zur Nanostrukturierung mit der am Lehrstuhl entwickelten STM-spitzeninduzierten Abscheidung einzelner Nanoclustern durchgeführt, die prinzipiell lokale Enzymcharakterisierung erlauben. Bei der in Abb. 3.15 dargestellten Methode bedient man sich eines EC-STMs mit entweder einer Pd-Spitze oder einer Au-Spitze, auf der Palladium in einer zweiten Zelle elektrochemisch abgeschieden wurde. Im Tunnelmodus wird die Regelung ausgeschaltet und ein Spannungspuls auf den z-Piezo gegeben.

Dies hat zur Folge, dass die Spitze mechanisch Richtung Au-Oberfläche bewegt wird; die Annäherung erfolgt dabei mindestens bis zum „jump-to-contact“ [5] und mit steigendem Puls immer tiefer in die Oberfläche (Abb. 3.15 B und Abb. 3.15 C). Nach diesem wenige ms dauerndem Puls bewegt sich die Spitze zurück in den Tunnelmodus und hinterlässt eine Insel (Abb. 3.15 D), deren Größe bis zu einer Partikelhöhe von 1,2nm linear mit dem angelegten Puls steigt [4]. Hervorzuheben ist, dass man mit dieser Methode durch Scannen zunächst die Topographie der untersuchten Oberfläche erhält, dann an gewünschter Stelle gezielt einen Nanocluster setzen kann und unmittelbar nach der Abscheidung die Insel nach einem weiteren Scan vermessen und für weitere lokale Untersuchungen benutzen kann.

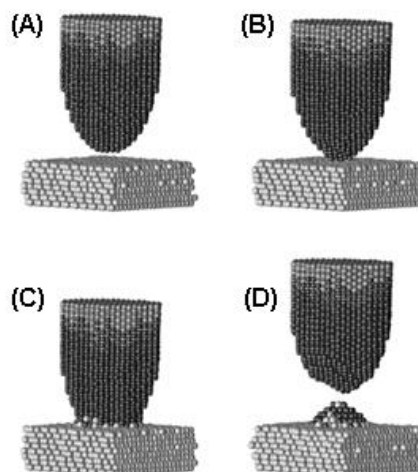


Abb. 3.15: Spitzeninduzierte Abscheidung von Palladiumclustern auf Au(111) [8].

### 3.3.4 Grundlagen selbst-assemblierende Monoschichten (SAMs)

Aus den vielfältigen organischen Molekülgruppen, die auf Metalloberflächen selbst-assemblierende Monoschichten bilden, werden hier nur die für diese Arbeit relevanten Alkanthiole vorgestellt. Abb. 3.16 zeigt den molekularen Aufbau der Alkanthiole, die die in der Struktur einfachsten Thiole sind. Sie bestehen aus einer S-H Ankergruppe, einem N-methyl-Rückgrat und einer funktionellen Terminierung, die meistens aus einer  $-CH_3$ ,  $-COH$  oder  $-COOH$  Gruppe besteht. Die hydrophilen kurzkettigen Thiole, z.B.  $C_2H_6OS$  oder  $C_3H_6O_2S$ , sind im mM-Bereich in Wasser löslich. Längerkettige Thiole und Thiole mit hydrophoben Terminierungen sind im mM-Bereich in Alkoholen löslich. Charakteristisch für die Thiole ist ihre Eigenschaft, dass sie selbsttätig dicht gepackte Monolagen auf Metalloberflächen bilden, die aufgrund ihrer kovalenten Bindung zwischen den Ankergruppen und der Oberfläche sehr stabil sind.

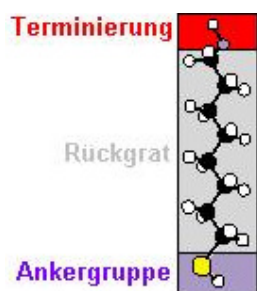


Abb. 3.16: Alkanthiol [78].

Taucht man eine Au(111)-Probe in eine verdünnte Thiollösung ( $10^{-3}M$ ), setzt unmittelbar sehr schnelle Adsorption der Thiole auf der Goldoberfläche ein, so dass schon nach wenigen Minuten 80% - 90% der Oberfläche bedeckt sind [79]. Im folgenden Schritt (Minuten bis Stunden) nimmt die Ordnung zu und die Oberfläche wird vollständig von einer Monolage bedeckt. Der Mechanismus der Bildung kann dabei –

abhängig von der Art der Thiole und den experimentellen Bedingungen – verschiedenen Pfaden folgen (siehe Abb. 3.17), am Ende des Prozesses erhält man in jedem Fall die dichtgepackte kovalent gebundene Monolage. Um die Ausbildung von Multilagern zu vermeiden, werden die Proben nach der Adsorption gründlich gespült und Ultraschall ausgesetzt.

Verglichen mit einer thiol-freien Au(111)-Oberfläche zeigt eine Au(111)/SAM-Oberfläche deutlich reduzierte Doppelschicht-Ladungsströme sowie ein nahezu potential-unabhängiges Verhalten in einem weiten Potentialbereich [56], d.h. die Au(111)/SAM-Probe ist elektrochemisch passiviert. Thiol-SAMs werden jedoch nicht nur dazu benutzt, die elektrochemischen Eigenschaften metallischer Oberflächen zu modifizieren, sie finden auch Verwendung als sogenannte Linker (siehe auch Abb. 2.4 C in Kapitel 2.2), um Enzyme mit leitenden Oberflächen zu verkabeln, d.h. sie in unmittelbarer Nähe der Elektrodenoberfläche zu immobilisieren, ohne sie der Gefahr der Denaturierung an der Oberfläche auszusetzen und mit möglichst geringen Einbußen beim Ladungstransfer. Mit Oligoether-SAMs wurde mittels Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie (IRRAS) gezeigt, dass die Proteinadsorption an der Au/SAM-

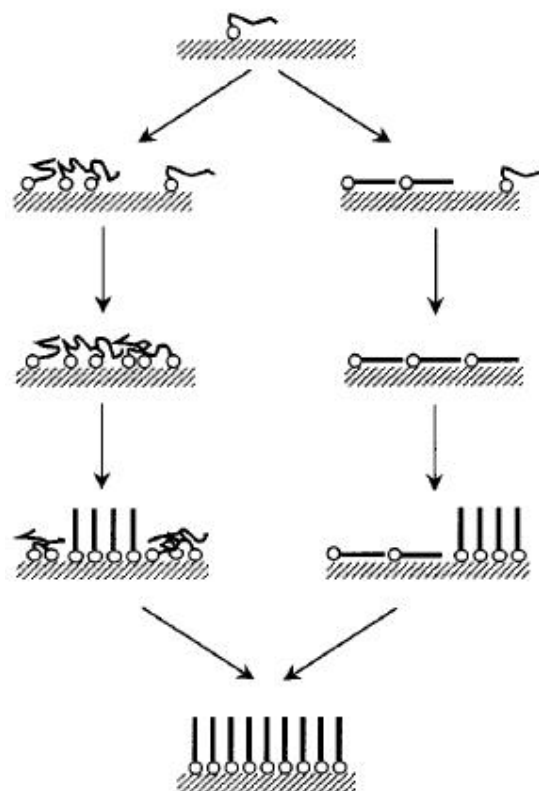


Abb. 3.17: Ausbildung einer Thiol-Monolage [80].

Oberfläche sehr stark von der funktionellen Gruppe (Terminierung) der SAM abhängt; insbesondere wurde beobachtet, dass Fibrinogenproteine an hydrophober Terminierung mit wachsender Länge der SAM-Moleküle höhere Adsorption zeigen, aber an OH-terminierten SAMs verschiedener Längen keine messbare Adsorption zu beobachten war [81]. Viele Enzyme lassen sich nur unzureichend oder gar nicht direkt an Thiole binden, bei der Bindung von HRP an Au/C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S wurde z.B. EDC als Cross-Linker benutzt [37].

Um thiol-modifizierte Oberflächen zu charakterisieren, bedient man sich vieler Methoden, von denen die Zyklische Voltammetrie (Cyclic Voltammetry – CV) und der Einsatz von STM und Rasterkraftmikroskop (Atomic Force Microscope – AFM) am häufigsten verwendet werden. CVs haben den Nachteil, dass sie integrale elektrochemische Messwerte liefern,

während STM und AFM lokale strukturelle und elektrochemische Messungen sowie Modifikationen erlauben.

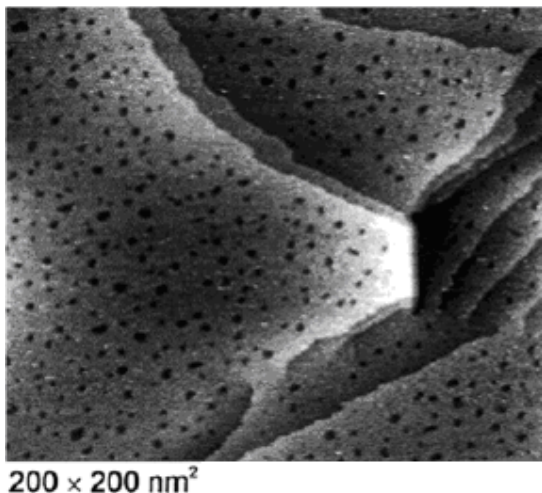


Abb. 3.18: STM-Bild von Au(111) mit einer C17-Thiol-SAM in 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>;  $I_T = 1\text{ nA}$ ,  $U_{WE} = 0,14\text{ V vs. NHE}$  [56].

Thiolschichten bei verschiedenen Potentialen inklusive deren Adsorption und Desorption konnten unter anderem auf Au(111) in hoher Auflösung mit dem STM abgebildet werden [56,71]. Charakteristisch für Thiol-SAMs auf Gold sind die „Vacancy-Islands“ (Abb. 3.18), die bei der Adsorption durch chemische Erosion der Goldoberflächenatome vorwiegend auf größeren Terrassen entstehen [56,82], sie sind ca. 2 – 6 nm im Durchmesser, eine Goldlage tief und ebenso mit Thiolmolekülen bedeckt wie der Rest der Fläche.

Aus obiger Diskussion ist festzuhalten, dass Thiole bei der Erforschung von Elektroden/Enzym-Systemen eine wichtige Rolle spielen können, z.B. als Linker, um Enzyme an gewisse Oberflächen zu binden oder als passivierende Schicht, um die Adsorption von Enzymen an bestimmten Oberflächen zu verhindern. Mit dem STM lassen sich prinzipiell passivierte Oberflächen charakterisieren und lokal modifizieren; Letzteres ist Gegenstand von Kapitel 3.3.3.

### 3.3.5 Aufbau EC-STM

EC-STM-Systeme sind in der Wissenschaft etabliert, mittlerweile kann man Komplettsysteme kommerziell beziehen. Aufgrund des hohen Bekanntheitsgrades dieser Geräte in entsprechenden wissenschaftlichen Kreisen und wegen der zahlreichen verfügbaren Literatur dazu wird neben den grundsätzlichen Erläuterungen in Kapitel 3.3.1 daher nicht detailliert auf die technischen Grundelemente des EC-STM-Systems eingegangen. Stattdessen fällt der Fokus dieses Kapitels auf die individuellen Veränderungen/Umbauten des ursprünglichen Systems (aufgebaut und charakterisiert durch J. Meier [4]), um den Anforderungen der Experimente mit Enzymen zu genügen.

Schematisch ist das EC-STM-System in Abb. 3.19 beschrieben, es entstand nach Vorarbeiten von J. Meier. Die Basiseinheit des EC-STM-Systems (im Folgenden als „STM-System bezeichnet) bildete der Molecular Imaging PicoSPM Scanner von Agilent



Technologies AFM, dessen x-y-z-Piezos die Spitze über die eingesetzte Probe führen. Der Probenhalter mit der zu untersuchenden Probe in einer STM-Zelle wurde über Magneten unterhalb der STM-Spitze eingesetzt. Ein anschließend luftdicht angebrachtes zylindrisches Glasgefäß (siehe Abb. 3.20) erlaubte in Verbindung mit Gaszufuhr- und -abfuhrschläuchen den Betrieb des STMs in Argonatmosphäre. Gesteuert wurde der Scanner mit einer Nanoscope IIIa Scanning Probe Microscopy Kontrolleinheit der Firma Veeco Metrology Digital Instruments. NanoScope IIIa Version 6.13r1 von Veeco und WSxM 4.0 Develop 9.2 von Nanotec Electronica S.L. bildeten die Software zur STM-Bildaufzeichnung und -auswertung. Um Störeffekte durch Vibrationen und elektromagnetischen Einflüssen zu minimieren, stand die Scannereinheit auf einem 300kg schweren an hängenden Stahlfedern angebrachten Granitstein mit Stahlplatte innerhalb eines mit Stahlblechplatten ausgebauten Turmes. Die Kombination der Stahlfedern mit dem schweren Granitstein hatte eine Eigenfrequenz im 1/2-Hz-Bereich, wodurch höherfrequente Erschütterungen im Versuchsraum stark gedämpft wurden. Durch die Stahlblechverkleidung war der Turm ein Faradayscher Käfig. Mit dem Bi-Potentiostat BP-600 von EC-Tec in Verbindung mit dem Bi-Scangenerator SG-600 von EC-Tec wurde die Elektrochemie der STM-Zelle inklusive der STM-Spitze gesteuert. Ausgelesen wurden die Potentiale und Ströme von Probe und Spitze mit einem Tektronix TDS5034B Digital Phosphor Oszilloskop, das die Beobachtung und Aufzeichnung von vier Signalen gleichzeitig erlaubte. Das z-Piezo-Steuerungssignal von der Kontrolleinheit zum Scanner lief über einen Spannungsaddierer, an dem der Wavetek 10MHz DDS Funktionsgenerator Modell 29 angeschlossen war.

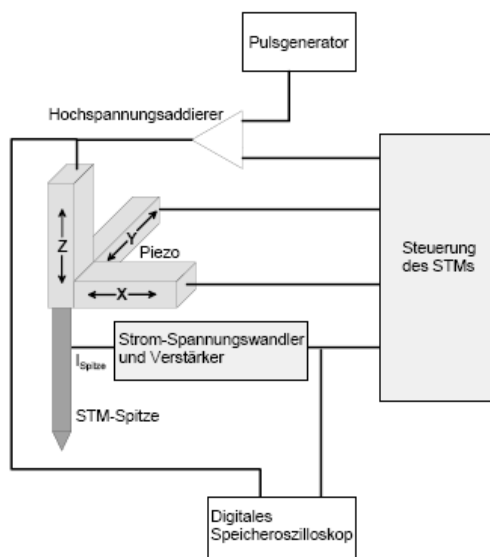


Abb. 3.19: Schematische Darstellung der wichtigsten STM-System-Einheiten [4].

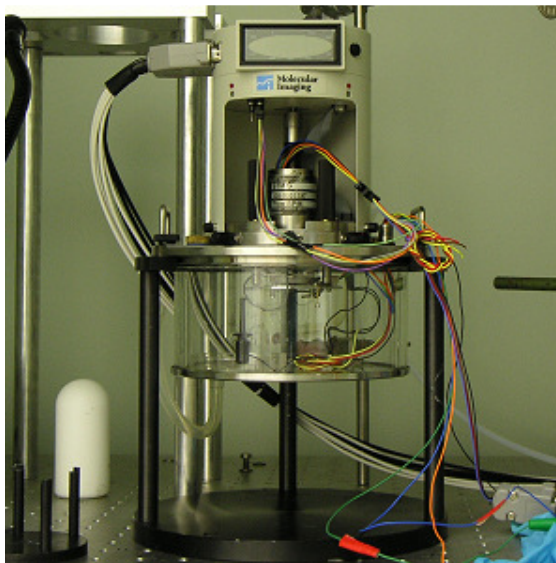


Abb. 3.20: Foto der Basis des STMs unter Betriebsbedingungen.

Damit war es möglich, definierte Spannungspulse direkt an den z-Piezo zu geben, was bei ausgeschaltetem STM-Scanfeedback dazu diente, die Spitze für wenige ms in z-Richtung um eine voreingestellte Strecke auszulenken. Untersuchungen von J. Meier ergaben eine durch Kalibration festgelegte Auslenkung des z-Piezos und damit der STM-Spitze des verwendeten Scanners von 5,4nm/V [4]. Unter Anwendung der Spannungspulse wurden entsprechend den Erläuterungen in Kapitel 3.3.3 Palladiuminseln spitzeninduziert lokal erzeugt.

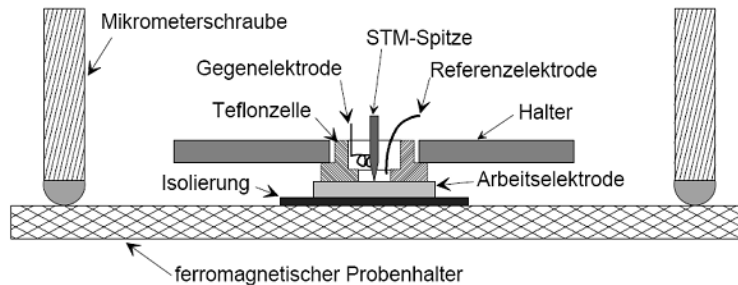


Abb. 3.21: Aufbau der EC-STM-Zelle von J. Meier [4].

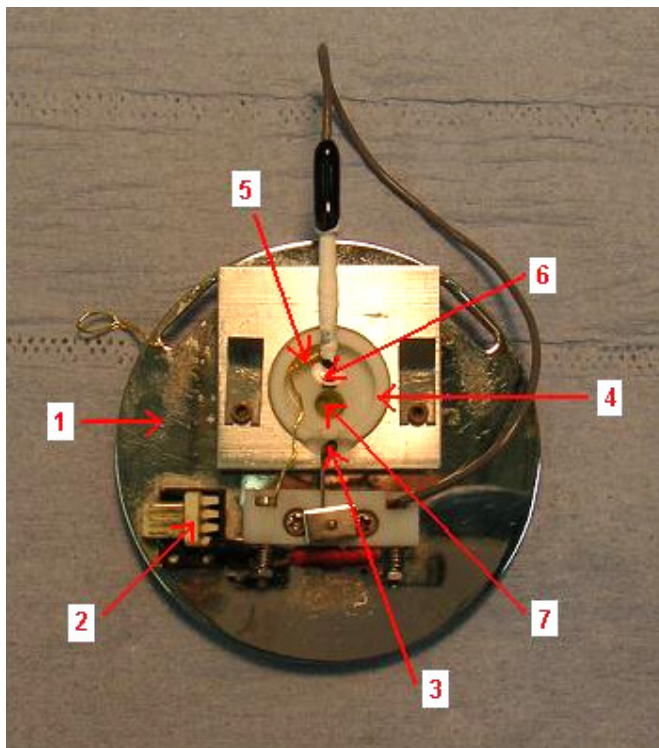


Abb. 3.22: Modifizierte EC-STM-Zelle, die für die STM-Messungen in dieser Arbeit benutzt wurde.

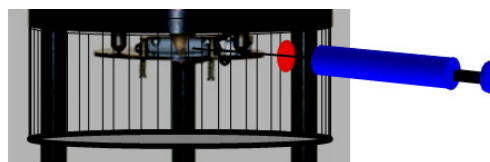
- 1: ferromagnetischer Probenhalter,
- 2: Anschluss für die CE-, RE- und WE-Kabel,
- 3: Kontaktierung der WE,
- 4: 560µl STM-Zelle aus Teflon,
- 5: CE aus Gold,
- 6: Ag/AgCl RE,
- 7: WE in Plättchenform.

Neben der besseren Abschirmung des STM-Scanners gegen Störeinflüsse sowie dem Einsatz neuer Hardware- und Softwarekomponenten (z.B. Nanoscope IIIa, EC-Tec Produkte) bestand eine wesentliche Änderung des STM-Systems von J. Meier in der Modifikation der STM-Zelle auf dem Probenhalter. J. Meier benutzte eine 140µl-Zelle aus Teflon, die auf die Arbeitselektrode (WE) gesetzt wurde und in der mit gleichem Abstand zur Spitze und mit

nahezu gleichem Abstand zur WE die Gegenelektrode (CE) und Referenzelektrode (RE) angeordnet waren (Abb. 3.21). Diese Anordnung der Elektroden ist nicht optimal. Erwünscht ist ein sehr geringer Abstand zwischen RE und WE, um den IR-Drop zu minimieren und ein großer Abstand zwischen CE und den anderen beiden Elektroden, um den Einfluss unerwünschter Reaktionen an der CE auf die RE und WE gering zu halten. Diese Forderungen an die Anordnung wurden im veränderten STM-Zellenaufbau umgesetzt (Abb. 3.22). Wie das Foto zeigt, liegt die RE (6) unmittelbar an der Öffnung zur WE (7), während die CE (5) den weitest möglichen Abstand zu den beiden anderen Elektroden hat. Auch die STM-Spitze (WE2 in der Teflonzelle), die von oben durch die Öffnung an die WE herangeführt wird, hat einen geringen Abstand zur RE und einen größeren Abstand zur CE.

Durch das größere Elektrolytvolumen in der neuen Teflonzelle (560 $\mu$ l vs. 140 $\mu$ l) und durch den größeren Durchmesser lassen sich im STM-Betrieb einfacher Lösungen in kleinen Mengen der STM-Zelle unter Betriebsbedingungen zuführen und die resultierende Konzentration der zugeführten Lösung lässt sich aufgrund der größeren Volumina genauer bestimmen. Bei einigen STM-Experimenten wurden z.B. Lösungen mit Enzymen dem Elektrolyten in der STM-Zelle zugefügt.

*Abb. 3.23: Zugabe einer Lösung in die STM-Zelle mittels einer Spritze.*



Dazu wurde ein Glasgefäß mit einer runden Silikondichtung (rot in Abb. 3.23 eingezeichnet) verwendet, durch die eine ca. 12cm lange Kanüle eingeführt wurde. Damit war es möglich, das Ende der Kanüle über der 560 $\mu$ l-STM-Zelle zu platzieren und tröpfchenweise den in der Spritze enthaltenen Elektrolyten dem in der Zelle vorhandenen Elektrolyten zuzugeben. Diese Methode erlaubte es, z.B. die Enzymkonzentration des Elektrolyten in der sauberen Argonatmosphäre der STM-Zelle von null auf einen vorbestimmten Wert zu erhöhen. Da bei diesem Einspritzvorgang geringe Erschütterungen des Scanners nicht völlig vermeidbar waren, war die STM-Spitze während des Einspritzvorganges außerhalb des Tunnelbereiches positioniert. Es konnte 1-2 Minuten nach dem Einspritzvorgang die Spitze wieder angenähert und weiter gescannt werden.

### **3.3.6 Referenzelektrode in der STM-Zelle**

Wichtig bei der Konzeption einer neuen STM-Zelle war die Möglichkeit, eine Elektrode zweiter Art als Referenzelektrode zu verwenden. Zahlreiche eigene Untersuchungen haben

gezeigt, dass der Einsatz von Drahtelektroden, die sich in sauren Lösungen (z.B. 0,1M HClO<sub>4</sub> oder 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) bewährt haben [4], nicht für die in dieser Arbeit verwendeten Elektrolyten geeignet sind.

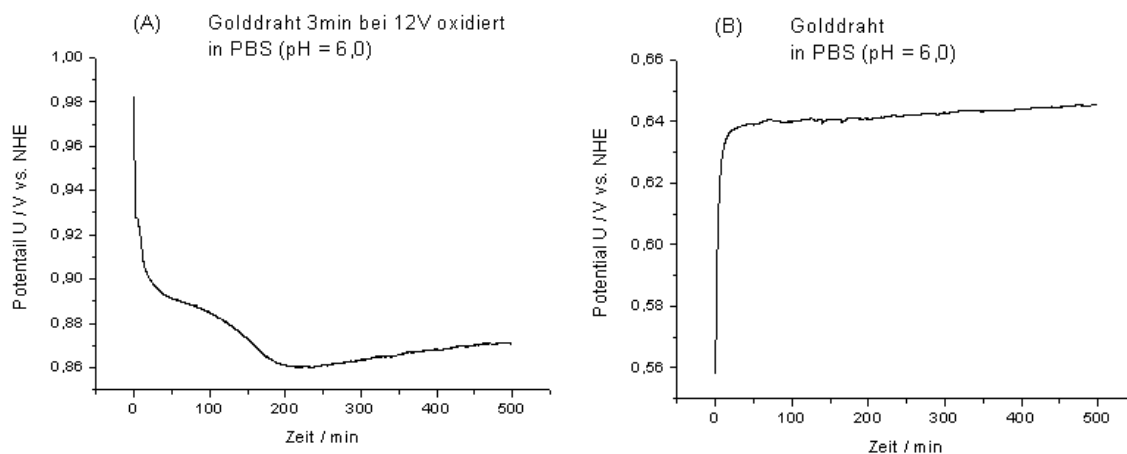


Abb. 3.24: Zeitlicher Verlauf des Potentials einer voroxidierten Golddrahtelektrode und einer nicht-voroxidierten Golddrahtelektrode in Pufferlösung mit pH = 6,0.

Voroxidierte Golddrähte zeigten je nach Länge der Oxidation und Oxidationspotential in PBS (pH = 6,0) quantitativ unterschiedliche Potentialverläufe, jedoch stellte sich in keinem Fall in dem betrachteten Zeitfenster von 500 Minuten ein stabiles Potential ein. Abb. 3.24 A zeigt einen typischen Potentialverlauf einer Au/Au<sub>2</sub>O<sub>3</sub>-Drahtelektrode in PBS. Im Gegensatz dazu stellt sich bei einem reinen Golddraht (Abb. 3.24 B) schon nach 50 Minuten ein Potential von 0,64V vs. NHE ein, das in den nachfolgenden 450 Minuten um nur 5mV auf 0,645V vs. NHE gestiegen ist. Ein mit Wasserstoff beladener Palladiumdraht zeigte in PBS ein unstabiles Verhalten. Demgegenüber hatten reine und nicht vorbehandelte Drahtelektroden aus Palladium und Platin in PBS nahezu den gleichen Potentialverlauf wie Gold, d.h. es stellte sich nach 50 Minuten ein Potential von 0,64V ein, der sich in den nachfolgenden Stunden nur unwesentlich änderte.

Folglich entwickeln reine Edelmetalldrahtelektroden nach rund einer Stunde in PBS ein stabiles Potential, das in PBS als Referenzpotential dienen könnte. Da jedoch eine Draht-Referenzelektrode gemäß des STM-Zellenaufbaus wie in Abb. 3.22 in direktem Kontakt mit dem Elektrolyten der Zelle wäre, könnten reaktive Spezies des Elektrolyten direkt an der Drahtelektrode reagieren und damit das Potential dieser Elektrode verschieben. Insbesondere würde an einer reinen Draht-Referenzelektrode in PBS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> das H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> umgesetzt werden (siehe dazu Kapitel 4.3.1). Demzufolge sind beim Arbeiten mit PBS und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Draht-Referenzelektroden völlig ungeeignet. In dieser Arbeit wurden zwar keine Untersuchungen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der STM-Zelle durchgeführt, aber es wurde darauf geachtet,

dass die verwendete STM-Zelle auch für weitergehende Untersuchungen mit HRP und H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> geeignet sein sollte.

Gelöst wurde das grundsätzliche Stabilitätsproblem einer STM-RE durch den Einsatz der DRIFREF-2SH Ag/AgCl-Elektrode von World Precision Instruments. Diese sogenannte „Mikro-Referenzelektrode“ war über zwei Jahre lang in sämtlichen in dieser Arbeit verwendeten Elektrolyten so stabil wie eine kommerzielle Schott-Hg/Hg<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-Referenzelektrode. Die kleinen Dimensionen der Mikroelektrode (2cm Länge, 2mm Durchmesser) erleichterten die Verwendung in der STM-Zelle. Teflonband wurde um die Elektrode gewickelt, um sie horizontal mit dieser „Dichtung“ in eine runde Kerbe der Teflonzelle zu stecken (Abb. 3.22). Zu bedenken ist bei dieser mit KCl gefüllten Elektrode, dass ein unerwünschter Austritt von Cl<sup>-</sup>-Ionen in den Cl<sup>-</sup>-freien PBS-Elektrolyten nicht vermeidbar ist. Allerdings ist dieser Austritt äußerst gering; vom Hersteller wird eine Leckrate des KCl-Elektrolyten mit  $5,7 \cdot 10^{-8}$  ml/h angegeben. Experimentell konnte ein Einfluss der Cl<sup>-</sup>-Ionen aus der Ag/AgCl-Elektrode auf die Elektrochemie in der STM-Zelle nicht beobachtet werden. Getestet wurde das z.B. durch Aufnahme von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-CVs in Cl<sup>-</sup>-freiem PBS in der STM-Zelle. Eine Inhibierung der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidation durch mögliche aus der Referenz ausgetretene Cl<sup>-</sup>-Ionen (siehe Kapitel 4.3.1) ließ sich mit diesem Verfahren nicht beobachten.

### 3.3.7 Herstellung der STM-Spitzen

Alle in dieser Arbeit verwendeten STM-Spitzen wurden in der Regel erst 1-2 Stunden vor dem eigentlichen Experiment hergestellt. Die Clustererzeugung auf Thiolflächen erfolgte mit Pt/Ir-Spitzen, die umfassenderen Untersuchungen an Enzymen erfolgten mit Au-Spitzen. Pt/Ir-Spitzen sind härter als Au-Spitzen und damit einfacher im STM-Kopf einzusetzen. Da aber die Au-Spitzen im Durchschnitt von höherer Qualität waren, wurde von Pt/Ir- auf Au-Spitzen übergegangen. STM-Bilder resultieren aus der Faltung der Form der äußersten Spitze und der Topographie der Probe. Daher ist für eine möglichst genaue Abbildung der Topographie der Probenoberfläche eine symmetrisch spitz zulaufende Spitze erwünscht [83]. Diese erwünschte Form kann durch elektrochemisches Ätzen erreicht werden [84]. Die Ätzvorrichtung bestand aus einem Stanford Research Systems Model DS335 3.1 MHz Funktionsgenerator, einer Dreielektrodenanordnung (Abb. 3.12) und einem Schalter, mit dem entweder eine Spannung zwischen Ätzelektrode und Reinigungselektrode oder zwischen Ätzelektrode und zu ätzendem Draht (hier: Golddraht) eingestellt wurde. Vor dem Ätzvorgang wurde der Platinring der Ätzelektrode (Durchmesser 8,5mm, Drahtdicke 0,25mm) flammgetempert, dann eingesetzt und mit -3,5V gegen die Reinigungselektrode in 30% HCl in einem 20ml Becherglas mit dem entwickelten Wasserstoff gereinigt. Der

Golddraht wurde so eingesetzt, dass er senkrecht durch die Mitte des Platinringes verlief und ca. 1,8cm unterhalb des Ringes

endete. Etwa 1-2 Sekunden waren in 30% HCl im Becherglas -1,65V an der Ätzelektrode gegenüber der Reinigungselektrode angelegt, dann wurde das Becherglas rasch entfernt, so dass nur noch eine HCl-Lamelle im Ring zurückblieb. Ein Umschalten des Schalters legte schließlich +1,65V am Golddraht gegenüber der Ätzelektrode an. Nach einer Ätzzeit von  $(160 \pm 5)$ s fiel die Spitze in einen kleinen zylindrischen Behälter, wurde zum Reinigen von HCl-Rückständen in 90°C warmen Wasser gereinigt und konnte daraufhin isoliert werden. Reproduzierbare makroskopische Spitzenformen waren nur möglich, wenn nach jedem Ätzvorgang die Ätzelektrode nach dem oben beschriebenen Verfahren gereinigt wurde und wenn jeweils frische HCl benutzt wurde. Pt/Ir-Spitzen wurden mit dem gleichen Aufbau in 3M KCN/3M NaOH mit 1kHz Wechselspannung und 5V-Amplitude geätzt, die Ätzdauer variierte zwischen 8 und 10 Minuten.

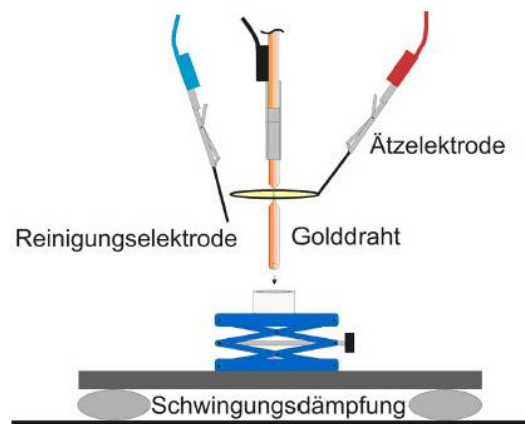


Abb. 3.25: Dreielektrodenanordnung zum Ätzen von STM-Spitzen [68].

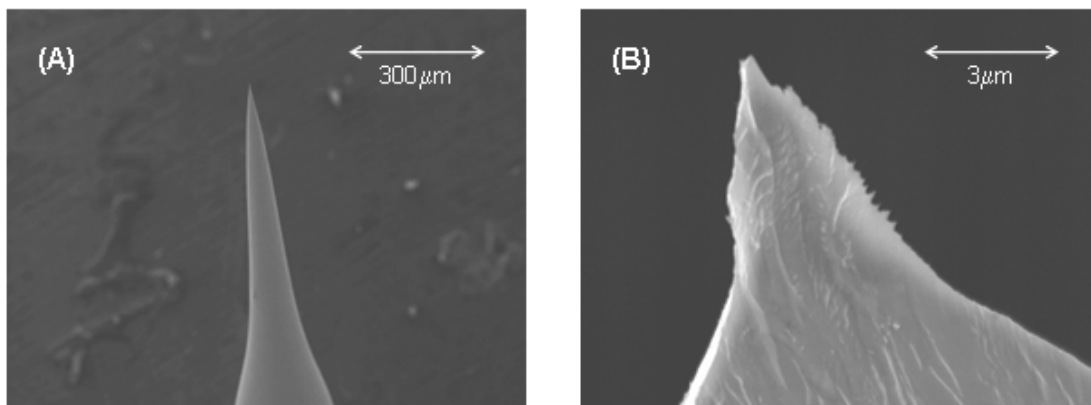


Abb. 3.26: REM-Aufnahmen einer Goldspitze, die in 30% HCl elektrochemisch geätzt wurden. A: 100fache Vergrößerung, B: 10000fache Vergrößerung.

REM (Rasterelektronenmikroskop) – Aufnahmen von elektrochemisch mit verschiedenen Spannungen geätzten Goldspitzen zeigten, dass für die oben beschriebene Methode eine Ätzspannung von +1,65V die Spitzen mit den besten Tunneleigenschaften (hohe Auflösung, wenig Drift) hervorbringt [85]. Abb. 3.26 A zeigt die typische makroskopische Form einer

unter den beschriebenen Bedingungen geätzten Goldspitze. Eine gleichmäßige Form im Mikrometerbereich bestätigt die Reproduzierbarkeit des Ätzverfahrens und verursacht weniger Drift beim Scannen als beispielsweise eine langgezogene dünne Spitze. Entscheidend für das Auflösungsvermögen einer STM-Spitze im Nanometerbereich ist jedoch nur der Radius des äußersten Endes der Spitze. Bei 10000facher Vergrößerung (siehe Abb. 3.26 B) lässt sich dieser Radius mit  $\pm 50\text{nm}$  abschätzen, doch für genauere Aussagen war das Vergrößerungsvermögen des zur Verfügung stehenden REMs nicht ausreichend. Zahlreiche Experimente mit den geätzten Spitzen zeigten, dass das Auflösungsvermögen einer STM-Spitze zwar stochastisch bestimmt war, aber dass die mittlere Ausschussrate unbrauchbarer Spitzen durch sorgfältiges Arbeiten minimiert werden konnte. Im Mittel waren 70 - 80% der Goldspitzen und 30 - 40% der Platin/Iridium-Spitzen von einer Qualität, dass beim Goldpolykristall Rekonstruktion beobachtet werden konnte.

Hohe Faradaysche Ströme verhindern den Einsatz von unisolierten Spitzen in einer EC-STM-Zelle. Folglich müssen die Spitzen bis auf das äußerste Ende isoliert werden. Die geätzten und gereinigten Spitzen wurden dazu entsprechend Abb. 3.27 in erwärmtes flüssiges Apiezon-Wachs von der Seite eingetaucht. Mit Mikrometerschrauben und unter Mithilfe eines Lichtmikroskops wurde die Spitze zum Spitzenende hin soweit eingetaucht, bis gerade das letzte sichtbare Stück mit Apiezon-Wachs bedeckt war.

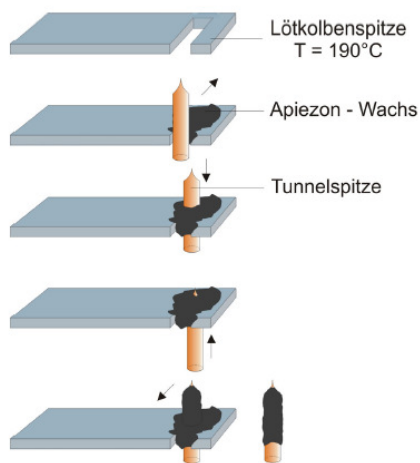


Abb. 3.27: Isolierung einer STM-Spitze mit Apiezon-Wachs [68].

Beim Abkühlen zog sich infolge des starken Krümmungsradius am äußersten Ende das Wachs etwas zurück [86], womit das Ende der Spitze unisoliert blieb. Die durch diese Methode resultierende freie Spitzenfläche wurde gemittelt auf  $1 * 10^{-7}\text{cm}^2$  geschätzt [68].

Mit der beschriebenen Isoliermethode konnten bei 95% der STM-Spitzen Dunkelströme in der EC-STM-Zelle im Bereich von  $5\text{pA}$  beobachtet werden. Dieser Wert lag im Bereich des Rauschens am Potentiostaten, d.h. die Isoliermethode lieferte sehr gute Ergebnisse.

### 3.3.8 Charakterisierung der Proben mit dem STM

Von den in Kapitel 3.1.4 vorgestellten Arbeitselektroden wurden nur der Goldpolykristall und die HOPG-Probe für Untersuchungen in der STM-Zelle benutzt. Beide Proben wurden im Vorfeld weiterer Experimente (Clusterdeposition, Enzymadsorption) vor jeder Messserie charakterisiert, um sowohl die Qualität der Proben als auch die Qualität des STM-Systems zu überprüfen.

#### Goldpolykristall

Charakteristisch für einen Goldpolykristall sind die durch Korngrenzen im STM-Bild deutlich sichtbar getrennten Einkristallkörner (Abb. 3.28 A). Durch Flammtempnern verringert sich die Zahl der Einkristallkörner, d.h. die durchschnittliche Größe der Einkristallkörner wächst [87]. Im Fall der in dieser Arbeit benutzten Arrandee-Goldpolykristalle konnten trotz der Vorbehandlung selten Einkristallkörner mit einer Fläche von über  $4\mu\text{m}^2$  gefunden werden, was aber für lokale Untersuchungen im nm-Bereich ausreichend ist. Sehr wichtig ist die Rauigkeit der Einkristalloberflächen, die durch Flammtempnern sinkt [87], aber über die gesamte Oberfläche hinweg statistisch verteilte Unterschiede aufweist. In Folge dessen wurde bei lokalen Untersuchungen oft nach einer adäquaten Terrasse gesucht; in der Regel konnten während eines Experimentes durch systematisches Suchen Terrassen mit bis zu  $0,02\mu\text{m}^2$  gefunden werden.

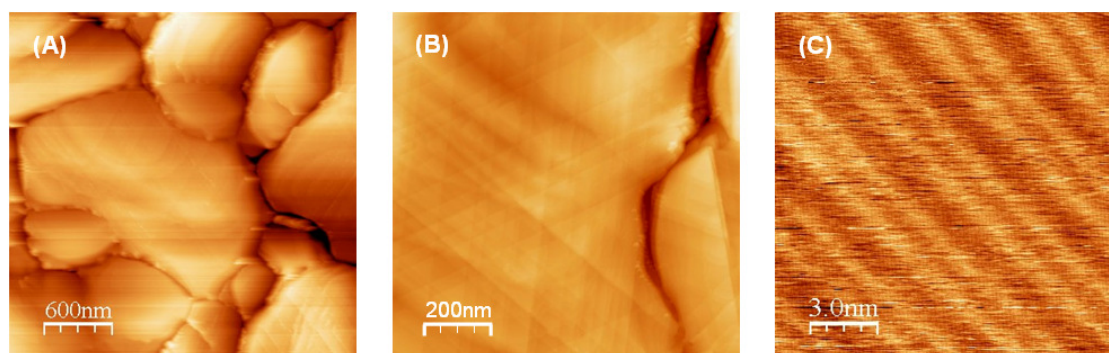


Abb. 3.28: STM-Bilder vom Goldpolykristall. A:  $3\mu\text{m} \times 3\mu\text{m}$ , z-Höhenskala: 30nm, Bias: 100mV, Setpoint: 1nA, in Argon. B:  $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ , z-Höhenskala: 14nm, Bias: 100mV, Setpoint: 1nA, in Argon. C:  $15\text{nm} \times 15\text{nm}$ , z-Höhenskala: 0,5nm,  $U_{WE}$ : 600mV,  $U_{Spitze}$ : 700mV, Setpoint: 20nA, in PBS.

Es wurde festgestellt, dass nach dem Flammtempnern eines Goldpolykristalls eine (111)-Orientierung der Einkristalle vorlag, so dass der Goldpolykristall in  $\mu\text{m}$ -Dimensionen als



Quasi-Einkristall betrachtet werden kann. An den Stufen eines (111)-Einkristalls wurde der z-Piezo des STMs kalibriert. Klar erkennbar zeigten sich in STM-Bildern die für die (111)-Orientierung charakteristischen symmetrischen Dreiecksstrukturen [88], die in Abb. 3.28 B abgebildet sind. Beim Scannen einer (111)-Terrasse unter Potentialkontrolle konnte die Rekonstruktion dargestellt werden, die eine um 4% komprimierte oberste hexagonal dicht gepackte Atomschicht aufweist [88]. In STM-Bildern erscheint die (111)-Rekonstruktion als Doppelstreifenmuster (Abb. 3.28 C), das vergleichbar ist mit Au(111)-Rekonstruktionsbildern in der Literatur [89,90].

### HOPG

Eine noch höhere STM-Bildauflösung als beim Goldpolykristall wurde mit der HOPG-Probe erreicht. Bei sehr niedrigen Gains, also im Quasi-Constant Height Mode, erreichte die STM-Auflösung atomare Dimensionen in x-,y- und z-Richtung. Abb. 3.29 C zeigt das atomare Gitter des (0001)-Graphits, in dem die A- und B-Typ-Atome der hexagonalen Struktur zu sehen sind. Der im STM-Bild bestimmte Abstand von  $1,4\text{\AA}$  zwischen den A- und B-Typ-Atomen entspricht mit nur kleinem Fehler dem Literaturwert von  $1,42\text{\AA}$  [91], was eine gute Kalibration der x- und y-Piezos des STMs bestätigt. Zur Verifizierung der z-Kalibration an der HOPG-Probe wurden Stufenkanten im STM-Bild vermessen (Abb. 3.29 A), deren Werte zwischen  $3,3\text{\AA}$  und  $3,5\text{\AA}$  lagen, beispielhaft für eine Stufe in Abb. 3.29 B gezeigt. Verglichen mit dem Literaturwert von  $3,4\text{\AA}$  zwischen zwei Lagen [92] ergibt sich eine hohe Genauigkeit für die z-Auflösung und in Verbindung mit den Messdaten atomarer Auflösung eine hohe Genauigkeit für das STM-Scannen insgesamt.

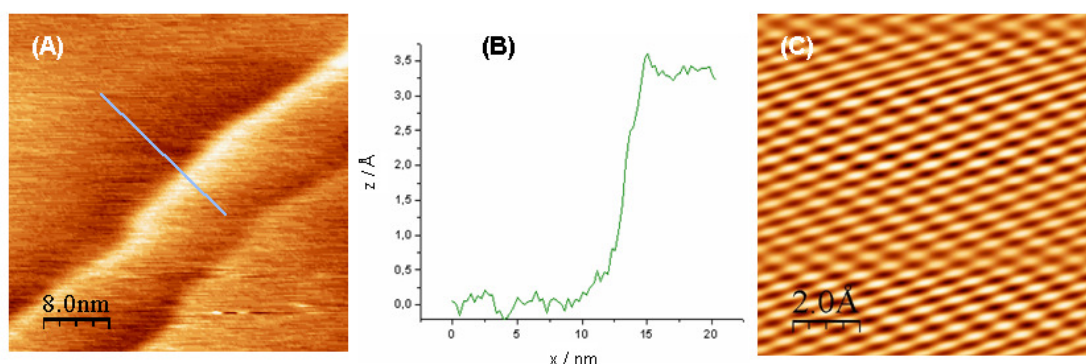


Abb. 3.29: STM-Bilder von der HOPG-Probe, aufgenommen in Argon. A:  $40\text{nm} \times 40\text{nm}$ , z-Höhenskala:  $0,4\text{nm}$ , Bias:  $100\text{mV}$ , Setpoint:  $1\text{nA}$ . B: Höhenprofil entlang der eingezeichneten Strecke in A. C:  $1\text{nm} \times 1\text{nm}$ , z-Höhenskala:  $< 1\text{\AA}$ , Bias:  $100\text{mV}$ , Setpoint:  $20\text{nA}$ .

### 3.4 Chemikalien und Reinheit

Sämtliche für die Versuche dieser Arbeit benutzten Chemikalien stammen von bekannten Herstellern und sind, wo erforderlich, vom höchsten kommerziell verfügbaren Reinheitsgrad. Die Entnahme von Feststoffen aus der Verpackung erfolgte entweder mit frisch ausgepackten Einmalspateln oder mit gereinigten Teflonspateln. Flüssigkeiten wurden mit einer Eppendorf-Pipette mit frisch aufgesetzten Einmal-Kunststoffpipettenspitzen entnommen. Gelagert wurden die Chemikalien in trockener Umgebung; Pufferlösungen und Enzymlösungen wurden bis zu 2 Wochen im Kühlschrank aufbewahrt und dann neu angemischt, Enzyme im kristallinen Zustand wurden in Glasbehältern bei  $-18^{\circ}\text{C}$  im Tiefkühlschrank gelagert. Regelmäßig erfolgte eine Überprüfung der Aktivität der Enzyme, indem die Stromdichten eines Au(111)/HRP-System mit festgelegten Parametern mit denen des eigenen Referenzsystems und mit Literaturwerten [23] verglichen wurden. Tab. 3.2 gibt einen Überblick über die wichtigsten in dieser Arbeit verwendeten Chemikalien, deren Vertrieber und Spezifikation.

<b>Name</b>	<b>Formel</b>	<b>Vertrieb</b>	<b>Produktnummer</b>	<b>Reinheit</b>
Apiezon W Wachs	-----	Plano	B7276	keine Angabe
Argon	Ar	Linde	-----	4.8
di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat	$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	Merck (VWR)	1.06579.1000	zur Analyse
Ethanol	$\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$	Merck (VWR)	1.00983.1000	zur Analyse
Ethanthiol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{S}$	Merck (VWR)	8.00796.0250	zur Synthese
Glucose Oxidase	-----	Sigma-Aldrich	G6641	keine Angabe
Golddraht $\varnothing = 0,25\text{mm}$	Au	Chempur	009163/009164	99,9%/99,995%
Golddraht $\varnothing = 0,50\text{mm}$	Au	Chempur	009165	99,9%
Goldeinkristall $\varnothing = 1,0\text{cm}$	Au(111)	Unbekannt	-----	keine Angabe
Goldpolykristall $11 \times 11 \text{mm}^2$	Au(111)	Arrandee	-----	keine Angabe
HOPG $12 \times 12 \times 2 \text{mm}^3$	C	Advanced Ceramics	10700	Grade ZYH
Horseradish Peroxidase	-----	Roche	10814407/001	EIA Grade
Kaliumcyanid	KCN	Merck (VWR)	1.04967.0100	zur Analyse
2-Mercaptoethanol	$\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$	Sigma-Aldrich	568678-100G	99%
6-Mercapto-1-hexanol	$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{OS}$	Sigma-Aldrich	451088-25ML	97%

3-Mercaptopropionsäure	C <sub>3</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub> S	Merck (VWR)	8.05967.0100	zur Synthese
11-Mercapto-1-undecanol	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> OS	Sigma-Aldrich	447528-5G	97%
11-Mercaptoundecansäure	C <sub>11</sub> H <sub>22</sub> O <sub>2</sub> S	Sigma-Aldrich	450561-25G	95%
Nanokristalliner Diamant	C	Unbekannt	-----	keine Angabe
Natriumchlorid	NaCl	Merck (VWR)	1.06404.0500	zur Analyse
Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	Merck (VWR)	1.06349.1000	reinst
Natriumhydroxid-Monohydrat	NaOH · H <sub>2</sub> O	Merck (VWR)	1.06466.0050	Suprapur
Natriumperchlorat-Monohydrat	NaClO <sub>4</sub> · H <sub>2</sub> O	Merck (VWR)	1.06564.0500	zur Analyse
1-Octadecanthiol	C <sub>18</sub> H <sub>38</sub> S	Merck (VWR)	8.14444.0050	zur Synthese
ortho-Phosphorsäure 85%	H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>	Merck (VWR)	1.00573.1000	zur Analyse
Palladium Draht Ø = 0,25mm	Pd	Chempur	009318/009319	99,9%/99,95%
Palladium(II)nitrat-Lösung Pd: 16,56%	Pd(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	MaTeck	006108	keine Angabe
Perchlorsäure 70%	HClO <sub>4</sub>	Merck (VWR)	1.00517.1000	Suprapur
Platin/Iridium 90/10 Draht Ø = 0,25mm	Pt/Ir	Chempur	902365	keine Angabe
Salzsäure 30%	HCl	Merck (VWR)	1.00318.1000	Suprapur
Schwefelsäure 96%	H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	Merck (VWR)	1.00714.1000	Suprapur
Stickstoff	N <sub>2</sub>	Linde	-----	5.0
1-Undecanthiol	C <sub>11</sub> H <sub>24</sub> S	Sigma-Aldrich	510467-5G	98%
Wasserstoff	H <sub>2</sub>	Linde	-----	5.0
Wasserstoffperoxid 30%	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Merck (VWR)	1.08597.2500	medizinisch reinst

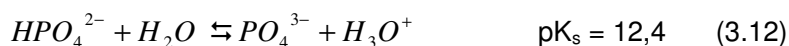
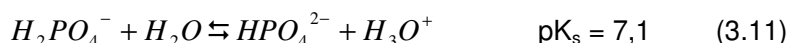
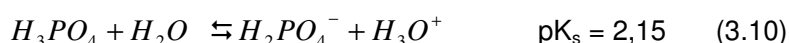
Tab. 3.2: Auflistung der in dieser Arbeit benutzten Chemikalien, deren Vertreiber und Spezifikation

Zum Reinigen als auch zum Anmischen bzw. Verdünnen von Elektrolyten diente Wasser aus einer Millipore-Anlage, bestehend aus einem Elix und Milli-Q Gradient A10 System mit einem durchschnittlichen Widerstandswert von 18MΩcm und einem TOC-Wert von 3ppb. Glas- und Teflonteile der Messapparatur, die mit dem Elektrolyten im Kontakt waren, wurden nach Lieferung, nach längerer Lagerung und bei organischer Verschmutzung für mehrere Stunden in konzentrierte Schwefelsäure oder Carosche Säure gelegt und anschließend mehrfach mit heißem und kaltem Wasser gereinigt. Nach jedem Experiment erfolgte die Spülung der

betroffenen Glas- und Teflonteile gründlich zunächst mit 90° - 100° heißem Wasser, dann mit kaltem Wasser. Langfristig wurden Elektrolyte in gereinigten Glaskolben mit Glasstopfen aufbewahrt, kurzfristig (bis zu 2 Wochen) auch in Bechergläsern, die mit Parafilm "M" – Folien abgedeckt waren.

Edelmetallteile aus Gold oder Platin (Arbeitselektrode, Gegenelektrode etc.) wurden vor dem Experiment für ca. 2 – 3 Minuten in frische Carosche Säure getaucht und danach mit Wasser gespült. Bei den Gold-Arbeitselektroden umfasste die Vorbehandlung neben der Säure-/Wasser-Reinigung ein anschließendes 2-3 Minuten dauerndes Flammtempnern bis zur Rotglut. In Argonatmosphäre erfolgte die Abkühlung der Gold-Arbeitselektroden bis auf Raumtemperatur. Die verschmutzten obersten Schichten des HOPG wurden mit Tesafilm abgezogen, die Diamantprobe wurde im Ultraschallbad (Branson B200, VWR) vorgereinigt und danach gründlich mit Wasser gespült. In das Ultraschallbad wurden auch Au(111)-Polykristall-Proben gelegt, die vorher in einer Thiollösung gelegen hatten, so dass überschüssige Thiole abgelöst werden konnten.

Vielfach wurde in dieser Arbeit eine Pufferlösung mit pH = 6,0 verwendet. Dazu wurden 10mmol di-Natriumhydrogenphosphat-Dodecahydrat und 10mmol Natriumdihydrogenphosphat-Monohydrat in ein Liter Wasser gegeben. Der pH-Wert dieser Lösung, ermittelt mit dem pH-Meter CG 804 der Firma Schott mit zugehöriger Universal-pH-Einstabmesskette von VWR (Kalibration erfolgte mittels einer pH = 4,01 Pufferlösung von Hanna Instruments und einer CertiPUR pH = 7,00 Pufferlösung von Merck), lag nach dem Auflösen der Salze zunächst bei  $7,0 \pm 0,1$ . Unter Rühren wurde mit einer Pipette 85%ige Phosphorsäure zugegeben, bis sich ein pH-Wert von  $6,0 \pm 0,02$  einstellte, was nach Zugabe von ca. 550µl  $H_3PO_4$  der Fall war. Unter Berücksichtigung der Dissoziationsmöglichkeiten der dreiwertigen Säure



und deren  $pK_s$ -Werte [93] ergibt sich mit der Gleichung für die Säurekonstante (die Säure HA dissoziiert in wässriger Lösung zu  $H_3O^+$  und  $A^-$ )

$$K_s = 10^{-pK_s} = \frac{[H_3O^+][A^-]}{[HA]}, \quad (3.13)$$

dass bei pH = 6,0 vorwiegend das  $H_2PO_4^-$  Ion vorliegt und zwar im Verhältnis

$$\frac{[H_2PO_4^-]}{[HPO_4^{2-}]} = 12,6. \quad (3.14)$$

Für die Ionenstärke dieser Pufferlösung, im folgenden PBS (phosphate buffer system) genannt, ergibt sich, wenn  $i$  für die Ionen  $H^+$ ,  $Na^+$ ,  $H_2PO_4^-$ ,  $HPO_4^{2-}$  steht,  $c_i$  deren Konzentration und  $z_i$  deren Ionenladung angibt, schließlich:

$$I_{PBS, pH=6,0} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^4 c_i z_i^2 \approx 0,032. \quad (3.15)$$

## 4. Ergebnisse

Thematisch geordnet werden die Ergebnisse in drei Kapiteln präsentiert. Hierbei stellt das Kapitel über Nanostrukturierung von Thioloberflächen (4.1) ein eigenständiges Kapitel dar, das zunächst keinen direkten Bezug zu den anderen beiden Ergebniskapiteln hat, aber einen wichtigen Beitrag zum Forschungsprojekt (siehe Kapitel 1.2) liefert und damit eine generelle Verknüpfung zwischen der Nanostrukturierung und den Enzymstudien gegeben ist. In Kapitel 4.2 werden die Abbildungseigenschaften von GOD- und HRP-Enzymen mit dem STM vorgestellt. Kapitel 4.3 behandelt die katalytischen Eigenschaften der HRP an verschiedenen Elektrodenoberflächen, unter denen der Schwerpunkt auf Au(111) liegt. Da das Verständnis der katalytischen Aktivität der an Gold adsorbierten HRP von elementarer Bedeutung für die Ziele dieser Arbeit ist, ist 4.3 das umfangreichste und wichtigste Ergebniskapitel. Eine weitergehende Diskussion der Ergebnisse erfolgt in Kapitel 5.

### 4.1 Nanostrukturierung von Thioloberflächen

#### 4.1.1 Erzeugung von Palladium-Nanoclustern auf Au(111) mit einer Thiol-SAM

Entsprechend der Vorgehensweise von J. Meier [4] wurde Palladium elektrochemisch durch Reduktion von Pd-Ionen in einer 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 0,1mM PdSO<sub>4</sub> – Lösung auf einer Pt/Ir-STM-Spitze abgeschieden. Für die Berechnung des Überpotentials zur Abscheidung kann man prinzipiell die Nernstgleichung

$$U_{0,Me/Me^{z+}} = U_{Me/Me^{z+}}^{\theta} + \frac{RT}{nF} \ln \frac{a_{Me^{z+}}}{a_{Me}} \quad (4.1)$$

sowie das Standardpotential  $U_{Pd/Pd^{2+}}^{\theta} = 0,915V$  vs. NHE [94] berücksichtigen.  $U_{0,Me/Me^{z+}}$  ist das sich ergebende Potential aus dem Standardpotential  $U_{Me/Me^{z+}}^{\theta}$  des Redoxpaares  $Me/Me^{z+}$ , der Gaskonstante R, der Temperatur T, der Zahl der übertragenen Elektronen n, der Faradaykonstante F und der Aktivitäten  $a_{Me^{z+}}$  und  $a_{Me}$  der Metallionen bzw. Metallatome. Problematisch bei der rein theoretischen Betrachtung ist, dass  $a_{Me}$  zu Beginn der Abscheidung null ist. Zustände mit beliebig kleinen Aktivitäten sowie die Unterpotential-Abscheidung (UPD, under-potential deposition) bleiben in der Nernstgleichung unberücksichtigt, bzw. die Gleichung ist für diese Zustände nicht definiert. Kolb et al. haben in der oben genannten Schwefelsäure/Palladiumionen-Lösung das Einsetzen der Palladiumabscheidung auf Au(111) bei  $U < 940mV$  vs. NHE [95] beobachtet.

Da die freie Spitzenfläche der ansonsten isolierten Pt/Ir-Spitze nur mit großem Fehler abgeschätzt werden konnte und die genaue Geometrie des Spitzenendes unbekannt war, konnte die Palladiumabscheidung bei zwei verschiedenen Spitzen nicht zur gleichen

Beladung bezüglich Menge und Geometrie erfolgen. Es zeigte sich jedoch experimentell, dass bei einer Eintauchzeit der Pt/Ir-Spitze von 20s in 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 0,1mM PdSO<sub>4</sub> bei 300mV vs. NHE, also bei U<sub>Spitze</sub> << 940mV vs. NHE, das Palladium derart abgeschieden wurde, dass die beladene Spitze in palladiumfreier Lösung vergleichbare STM-Bilder wie die unbeladene Spitze lieferte und zur spitzeninduzierten Erzeugung von bis zu 10 Palladium-Nanoclustern verwendet werden konnte.

Mit der Pd-beladenen Spitze wurde zunächst in einem palladiumfreien Elektrolyten die Au(111)/Thiol-SAM Oberfläche gescannt. An einer geeigneten Stelle, vorzugsweise in einem 100 \* 100nm<sup>2</sup> - bis 200 \* 200nm<sup>2</sup> - Fenster mit geringer Stufendichte, wurde ein 2ms langer Spannungspuls zur z-Piezo-Spannung U<sub>z</sub> dazuaddiert, was eine unmittelbare kurzzeitige Auslenkung der Spitze Richtung Probenoberfläche zur Folge hatte. Wurde dieser Spannungspuls entsprechend gewählt (U<sub>z-Piezo</sub> > 1V), konnte die Pd-beladene Spitze bis zum sogenannten jump-to-contact genähert werden, an dem die Spitze die Probenoberfläche gerade berührt und beim Zurückziehen ein Pd-Nanocluster zurücklässt. Dieser kann beim anschließenden STM-scannen abgebildet und in seiner Größe und katalytischen Eigenschaften [4,5,6,7,8] charakterisiert werden. Diese von J. Meier an reinen Au(111)-Oberflächen durchgeführte Methode der Nanostrukturierung wurde in dieser Arbeit an thiolpassivierten Au(111)-Oberflächen angewandt. Abb. 4.1 zeigt repräsentative STM-Bilder von erfolgreich erzeugten Pd-Nanoclustern auf Au(111) mit einer Thiol-SAM. Abb. 4.1 A – C zeigen Au(111)-Oberflächen, die mit 2-Mercaptoethanol passiviert wurden, Abb. 4.1 D – F zeigen Au(111)-Oberflächen, die mit 6-Mercapto-1-hexanol passiviert wurden.

Mit einem 2ms 1,0V Puls wurde gezielt der Nanocluster in die Mitte des STM-Bildes (Abb. 4.1 B) gesetzt und 5 Minuten später entstand der zweite Nanocluster (der untere Cluster in Abb. 4.1 C) durch Anlegen eines 2ms 1,2V Pulses am z-Piezo. Der erste Cluster hat einen Durchmesser von 12nm und ist 1,5nm hoch, der zweite Cluster hat einen Durchmesser von 14nm und ist ebenfalls 1,5nm hoch. Bei der Au(111)-Oberfläche mit 6-Mercapto-1-hexanol (Abb. 4.1 D – F) wurden Nanocluster auf einer stufenlosen 200nm \* 200nm Fläche erzeugt, bei der hoch aufgelöst die Vacancy-Islands deutlich zu sehen sind (Abb. 4.1 D). Es mussten jeweils 2ms 5V-Pulse am z-Piezo angelegt werden, um die drei Cluster zu erzeugen, die in Abb. 4.1 E und F abgebildet sind. Alle 3 Cluster haben einen Durchmesser von 14nm ± 1nm und eine Höhe von 0,9nm ± 0,1nm.

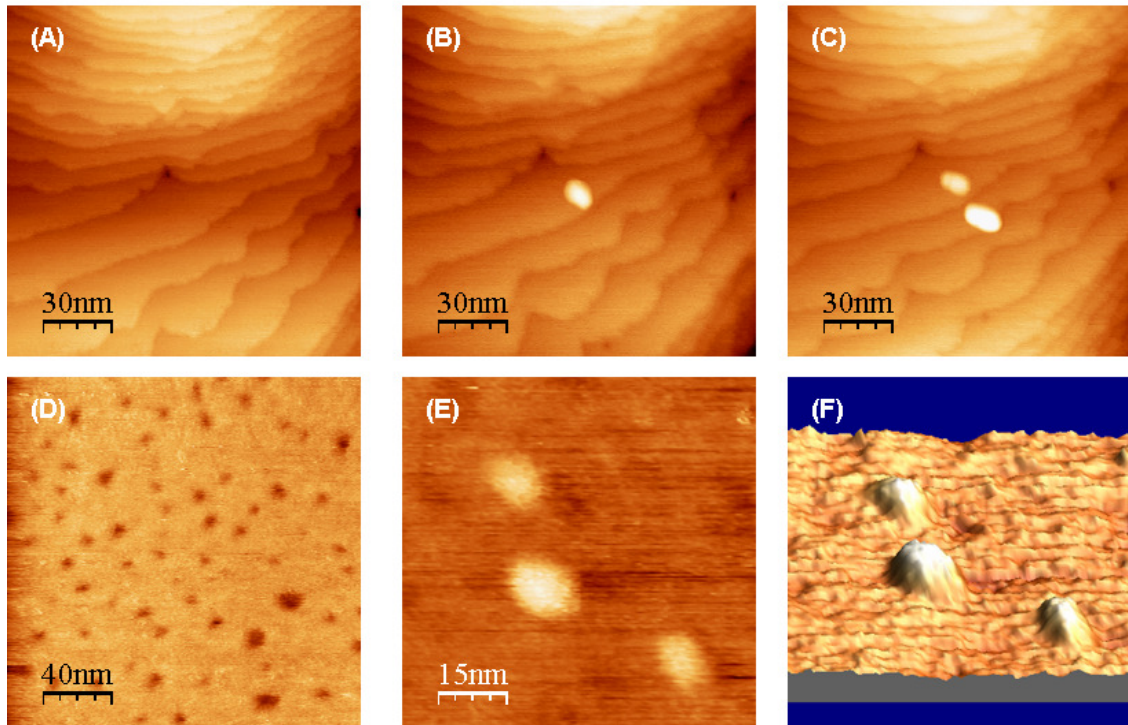


Abb. 4.1: A-C: Au(111) + C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS, 150nm \* 150nm, z-Höhenskala: 2,5nm, U<sub>WE</sub>: 250mV, U<sub>Spitze</sub>: 350mV, Setpoint: 0,5nA, in 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N<sub>2</sub> gespült. D-E: Au + C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>OS, 200nm \* 200nm (D), 75nm \* 75nm (E), z-Höhenskala: 1,3nm, U<sub>WE</sub> = 0mV, U<sub>Spitze</sub> = 100mV, Setpoint: 0,5nA, PBS, N<sub>2</sub> gespült. F: 3D-Ansicht von (E).

Experimente zur Clustererzeugung auf thiolpassivierten Au(111)-Oberflächen wurden mit allen in Tab. 3.2 aufgelisteten Thiolen durchgeführt, jedoch wurden Daten mit hinreichender Qualität und Quantität für eine Auswertung nur mit Au(111)/C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS und Au(111)/C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>OS gesammelt. Dargestellt in Abb. 4.2 sind Korrelationen zwischen der Clustergröße und dem am z-Piezo addierten Spannungspuls auf Au(111) mit einer C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS-SAM (Abb. 4.2 A und B, Rotfarben) und Au(111) mit einer C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>OS-SAM (Abb. 4.2 C und D, Blaufarben). Deutlich erkennbar ist in den dargestellten Graphen, dass sowohl die Durchmesser, als auch die Höhen der Cluster mit steigenden Spannungspulsen zunehmen und dass man einen linearen Zusammenhang annehmen kann. Zur Veranschaulichung der angenommenen linearen Korrelation ist eine gestrichelte schwarze Linie eingezeichnet. Auffällig beim Vergleich zwischen Abb. 4.2 A,B und Abb. 4.2 C,D ist der Unterschied beim addierten Spannungspuls. Bei der mit C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS -passivierten Oberfläche wurden Spannungspulse zwischen 1 und 1,6V, bei der mit C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>OS -passivierten Oberfläche hingegen Spannungspulse zwischen 5 und 7V zur z-Piezo Spannung addiert. Diese großen Unterschiede wurden generell bei der Clusterbildung auf Au(111) mit Thiol-SAMs beobachtet; bei den länger-kettigen Thiol-SAMs mussten deutlich höhere Spannungspulse angelegt werden, um überhaupt Cluster zu erzeugen (siehe unten). Beim experimentellen Vorgehen wurden prinzipiell zunächst kleine Pulse angelegt, bei denen zwar eine



Spitzenannäherung stattfand – zu Beobachten durch das kurzzeitige Ansteigen des Tunnelstromes – aber kein Cluster gebildet wurde. Diese Pulse wurden schrittweise solange erhöht, bis ein Cluster zu sehen war, d.h. die in Abb. 4.2 dargestellten kleinsten Spannungspulse sind als untere Grenzwerte zu verstehen, bei denen im jeweiligen Experiment gerade ein Cluster erzeugt wurde. Alle erzeugten Cluster waren für ca. 60 Minuten stabil, d.h. sie änderten weder ihre Größe, noch ihre Form. Dieses Verhalten wurde für Pd-Cluster mit Durchmessern > 10nm auch auf reinem Au(111) beobachtet [4]. Topographisch glichen die erzeugten Pd-Cluster der Experimente mit den dargestellten Daten (Abb. 4.1 und 4.2) spitz zulaufenden symmetrischen Hügeln (siehe Abb. 4.1 F), es wurden jedoch auch asymmetrische bzw. willkürlich geformte Cluster beobachtet.

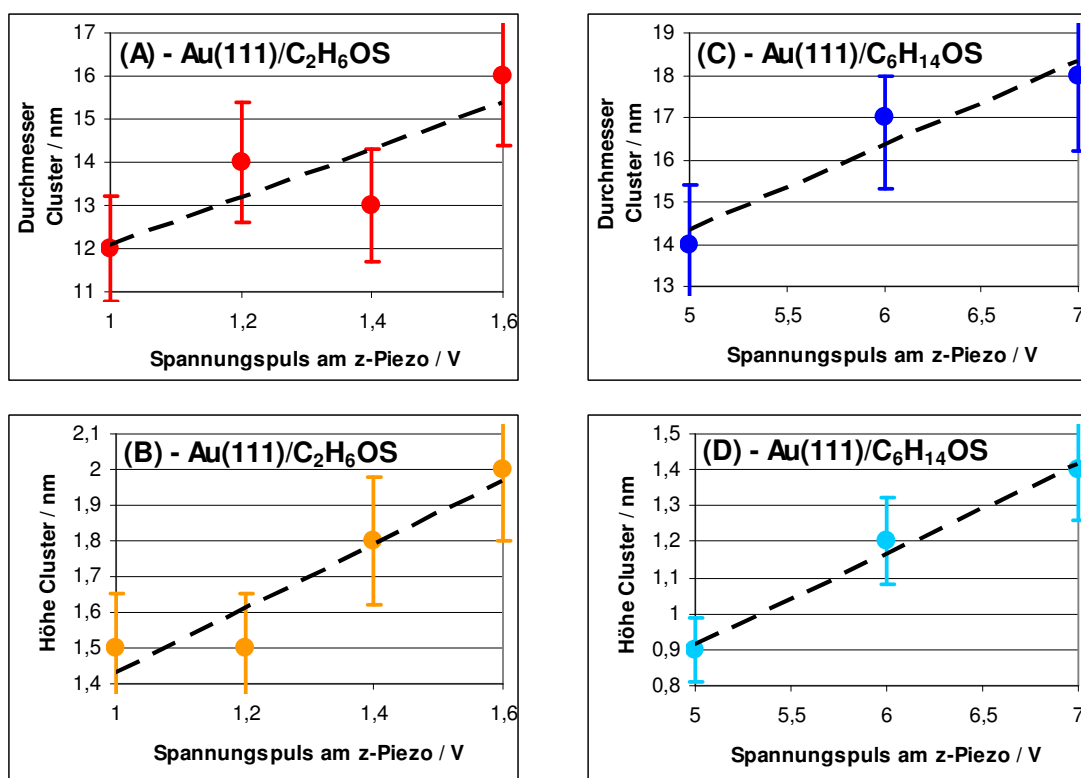


Abb. 4.2: Durchmesser und Höhe der spitzeninduziert erzeugten Pd-Nanocluster auf Au(111)/C<sub>2</sub>H<sub>6</sub>OS (A,B) und auf Au(111)/C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>OS (C,D), aufgetragen in Abhängigkeit des am z-Piezo addierten 2ms langen Spannungspulses. Die Scanparameter bei der Erzeugung waren: Bias: 100mV, Setpoint: 0,5nA, Elektrolyt: 0,1M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (A,B) und PBS (C,D). Die gestrichelte schwarze Linie wurde linear an die Daten gefittet.

## 4.2 Rastertunnelmikroskopie von Enzymen auf Elektrodenoberflächen

### 4.2.1 Glucose Oxidase auf HOPG

In Zusammenarbeit mit M. Wang, der den wesentlichen experimentellen Teil durchgeführt hat, wurde die mit dem STM durchgeführte Charakterisierung von GOD adsorbiert auf HOPG ausgewertet [96]. Bei diesen Experimenten war die Referenzelektrode eine Silber Quasi-Referenzelektrode und die PBS-Lösung hatte einen pH-Wert von 7,2. Ansonsten erfolgten die Messungen mit den in Kapitel 3 beschriebenen Geräten und Chemikalien.

HOPG eignet sich prinzipiell aufgrund seiner geringen Rauigkeit in atomaren Dimensionen und aufgrund seiner biokompatiblen Eigenschaft als Oberfläche für die Adsorption zahlreicher Enzyme. Allerdings muss die HOPG-Oberfläche für eine für STM-Untersuchungen geeignete Adsorption von Enzymen oxidiert werden, damit die Enzyme stabile Bindungen mit den hydrophilen Sauerstoffgruppen der Oberfläche bilden können [15,97,98]. Die Oxidation erfolgte durch 3 Potentialsweeps mit 200mV/s von 0,24V bis 2,04V vs. NHE in 0,1M HClO<sub>4</sub>. Anschließend wurde die HOPG-Probe mit PBS (pH = 7,2) gereinigt und in PBS (pH = 7,2) mit 0,001mg/ml GOD ohne Potentialkontrolle eingetaucht. Mit zunehmender Eintauchzeit stieg die Dichte adsorbierter Enzyme. Erwünscht war eine möglichst geringe Dichte, um die Untersuchung einzelner GOD mit dem STM zu ermöglichen. Empirisch zeigte sich, dass eine Eintauchzeit von 1-3 Stunden die erwünschte Dichte an adsorbierten GOD lieferte.

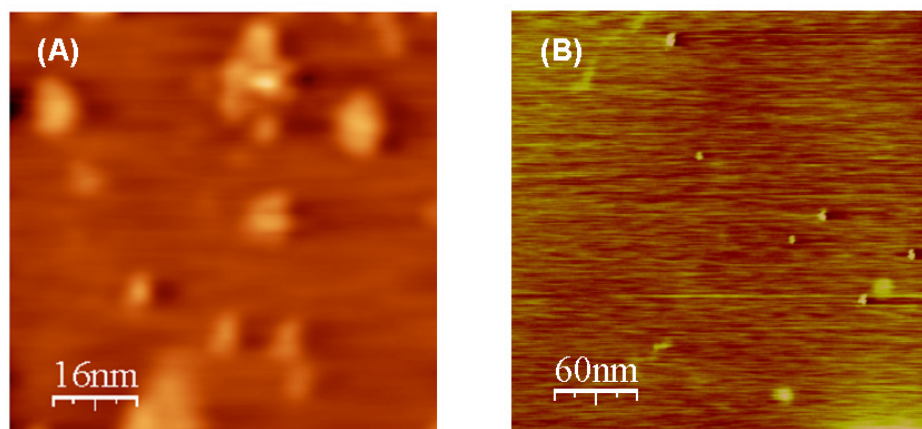


Abb. 4.3: GOD adsorbiert auf HOPG in PBS (pH = 7,2), Ar gespült. A: 80nm \* 80nm, z-Höhenskala: 1,5nm,  $U_{WE}$ : -210mV,  $U_{Spitze}$ : -160mV, Setpoint: 0,5nA. B: 500nm \* 500nm, z-Höhenskala: 1,0nm,  $U_{WE}$ : -210mV,  $U_{Spitze}$ : -160mV, Setpoint: 0,5nA [96].

Um die Zahl adsorbierter GOD auf HOPG abzuschätzen, wurden einerseits CVs von HOPG/GOD und andererseits STM-Bilder großer Terrassen (siehe z.B. Abb. 4.3 B) ausgewertet. Anhand der Ladung des kathodischen Redox-Peaks des CVs wurde die Menge adsorbierter GOD auf  $1,3 \cdot 10^{-12} \text{molcm}^{-2}$  bestimmt [96]. Dieser Wert ist in derselben Größenordnung wie die Zahl einer kompletten Monolage mit ca.  $2,25 \cdot 10^{-12} \text{molcm}^{-2}$ . Erklären kann man die Diskrepanz der beiden oben genannten Werte durch die Ausbildung statistisch verteilter GOD-Agglomerate auf der Oberfläche (Abb. 4.3 A), die durch beide Messmethoden unterschiedlich erfasst werden.

Um störende Einflüsse benachbarter Enzyme zu vermeiden, wurden nur einzeln adsorbierte GOD auf ausgedehnten Terrassen, wie man sie in Abb. 4.3 B als verstreute Punkte erkennen kann, mit dem STM charakterisiert. Diese Charakterisierung lässt sich in drei Schritten zusammenfassen:

1. Abbildung einzelner adsorbierter GOD bei verschiedenen Probenpotentialen mit dem STM im Tunnelmodus in einem Fenster von typischerweise  $20 \text{nm} \cdot 20 \text{nm}$ .
2. Positionierung der STM-Spitze über dem Enzym, Abschalten des STM-Regelkreises, Einstellen eines Abstandes zur Oberfläche von ca.  $10 \text{nm}$  und Aufnahme des Spitzenstromes während das Potential des HOPGs mit ca.  $1 \text{V/s}$  zyklisch verändert wird.
3. Annäherung der Spitze zur Oberfläche und Scannen der Oberfläche im Tunnelmodus mit eingeschaltetem Regelkreis.

Es folgen genauere Ausführungen zu den oben beschriebenen Experimenten bzw. deren Ergebnisse, gliedert nach den drei Teilen des Experimentes.

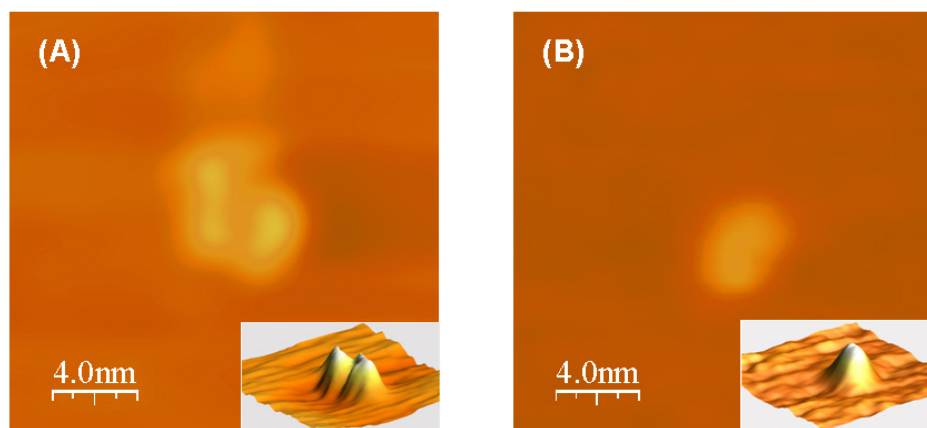


Abb. 4.4: Einzelne GOD adsorbiert auf HOPG in PBS ( $\text{pH} = 7,2$ ), Ar gespült.  $20 \text{nm} \cdot 20 \text{nm}$ , z-Höhenskala:  $1,0 \text{nm}$ ,  $U_{WE}: -210 \text{mV}$ ,  $U_{Spitze}: -160 \text{mV}$ , Setpoint:  $0,5 \text{nA}$ . A: GOD-Schmetterlingsform. B: GOD-Kugelform. [96]

### 1. Teil: Abbildung adsorbierter GOD auf HOPG bei verschiedenen Potentialen

Vergrößerungen großer Scanbereiche (Abb. 4.3 B) beim Scannen lieferten Bilder einzelner GOD, wie sie in Abb. 4.4 dargestellt sind. Zwei verschiedene Erscheinungsformen der GOD adsorbiert auf HOPG können dabei unterschieden werden. Die erste ist die Schmetterlingsform (Abb. 4.4 A) der GOD, die zu beobachten ist, wenn die GOD liegend auf dem HOPG entsprechend Abb. 2.3 adsorbiert ist. Kugelförmig erscheint die GOD hingegen in der STM-Abbildung, wenn die GOD aufrecht adsorbiert ist, d.h. wenn die lange Symmetrieachse der Schmetterlingsform einen Winkel von ca.  $90^\circ$  zur Oberfläche bildet. Abgesehen von nur wenigen Ausnahmen konnten alle einzeln auf HOPG-Terrassen adsorbierten und untersuchten GOD mit der Auflösung wie in Abb. 4.4 dargestellt mit dem STM abgebildet werden. Qualitativ erreichen die STM-Bilder in Abb. 4.4 ein Niveau, das mit den STM-Bildern der ausführlichen Studien von GOD auf passiviertem Gold [29,99,100] vergleichbar ist. Bei den wenigen Enzymen, die nicht oder in schlechter Qualität abgebildet wurden, handelt es sich um GOD, die keine stabile Bindung mit der Oberfläche bilden konnten. Gründe dafür können entweder fehlende Oxidgruppen in diesen Bereichen oder eine für eine Bindung unvorteilhafte Orientierung der GOD sein.

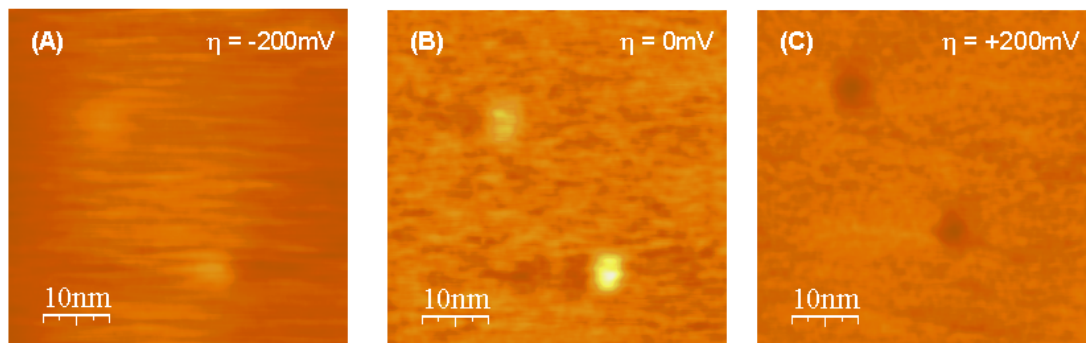


Abb. 4.5: Zwei GOD adsorbiert auf HOPG in PBS ( $\text{pH} = 7,2$ ), Ar gespült.  $50\text{nm} * 50\text{nm}$ , z-Höhenskala:  $0,8\text{nm}$ , Bias:  $100\text{mV}$ , Setpoint:  $0,5\text{nA}$ . A:  $U_{WE}: -200\text{mV}$  vs.  $U_{GOD}$ . B:  $U_{WE}: 0\text{mV}$  vs.  $U_{GOD}$ , C:  $U_{WE}: +200\text{mV}$  vs.  $U_{GOD}$  [96].

Zunächst erfolgte das STM-Scannen der GOD bei festem Potential. In Scanfenstern von etwa  $50\text{nm} * 50\text{nm}$  wurden auf einer ebenen Terrasse adsorbierte GOD Enzyme gescannt, wobei das Probenpotential variiert wurde. Während Setpoint, Bias, Scangeschwindigkeit und die Gains konstant waren und nur das Potential des HOPGs und der Spitze parallel verändert wurden, zeigte sich eine Änderung im Kontrast der Bilder. Diese ist für drei repräsentative Potentiale in Abb. 4.5 dargestellt;  $\eta$  gibt das Überpotential gegenüber dem Gleichgewichtspotential  $U_{GOD}$  der GOD an, welches experimentell bestimmt den Wert  $U_{GOD} = -0,175\text{V}$  vs. NHE hat (siehe Abb. 4.6, Kurve mit schwarzen Kreisen). Unterschiede zwischen

den verwendeten Elektrolyten inklusive dem pH-Wert erklären die Diskrepanz zum in der Literatur angegebenen Gleichgewichtspotential  $-0,24\text{V}$  vs. NHE [31] der GOD.

## 2. Teil: Messung von Faraday-Strömen

Bedingung für die Ausführung der Messungen des 2. Teils war eine vorherige Charakterisierung eines GOD wie im 1. Teil beschrieben und eine sehr niedrige Drift, die nur geringe Verschiebungen zwischen Spitze und Oberfläche verursachte ( $< 5\text{nm}$  pro Minute). Gezielt über einem GOD positioniert wurde die STM-Spitze aus dem Tunnelbereich auf eine Höhe von ca.  $10\text{nm}$  nach oben bewegt, um als elektrochemischer Sensor Faradayströme messen zu können. Da Drift nicht völlig vermeidbar war, musste die Messung in der Position  $10\text{nm}$  über der Oberfläche schnell erfolgen, damit sich die Verschiebung der relativen Position der Spitze zur GOD minimierte. Folglich wurde das CV der HOPG-Probe bei konstantem Spitzenpotential mit  $1\text{V/s}$  durchgeführt. Dabei zeichnete das Oszilloskop (siehe Abb. 4.6) gleichzeitig den Strom an der Probe (schwarze Kreise) und den Strom an der Spitze (blaue Dreiecke) auf. Als Referenz dient die rote Kurve (ohne Symbole), die  $10\text{nm}$  über einer enzymfreien HOPG-Oberfläche mit der Spitze aufgezeichnet wurde.

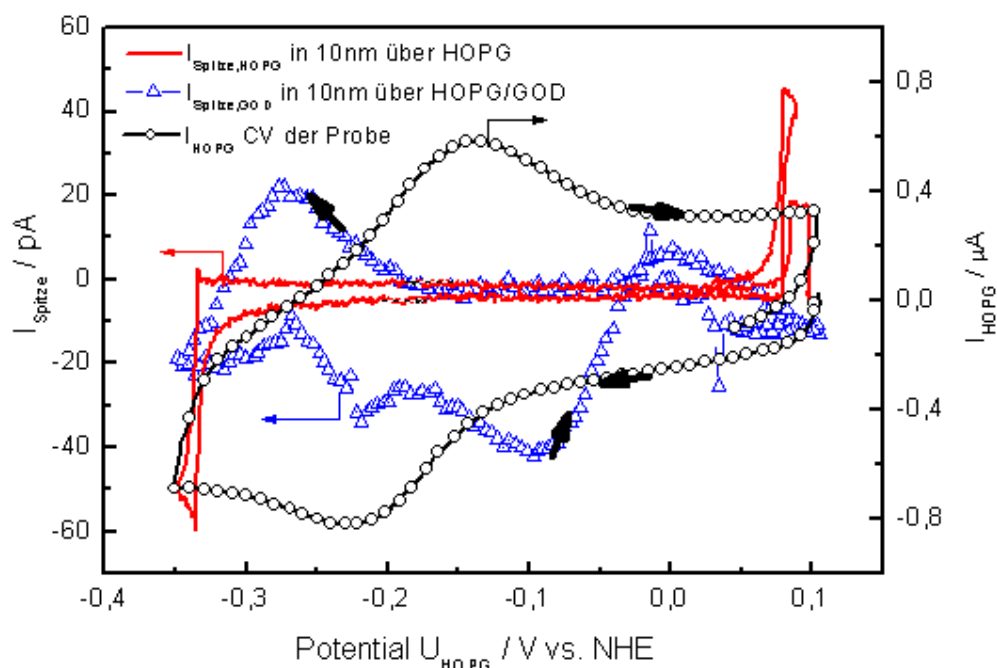


Abb. 4.6: CVs von HOPG mit adsorbierten GOD, aufgenommen mit  $1\text{V/s}$  in Argonatmosphäre. Das Startpotential lag bei  $0,1\text{V}$ , die Sweeprichtung war im Uhrzeigersinn.  $I_{\text{HOPG}}$  (schwarze Kreise) wurde direkt an der HOPG/GOD-Elektrode gemessen,  $I_{\text{Spitze,GOD}}$  (blaue Dreiecke) an der STM-Spitze  $10\text{nm}$  über einer an HOPG adsorbierten GOD,  $I_{\text{Spitze,HOPG}}$  (rote Kurve) an der STM-Spitze  $10\text{nm}$  über der enzymfreien HOPG-Oberfläche [96].

In Abb. 4.6 ist zu erkennen, dass wenn z.B. mit negativer werdenden Potentialen  $I_{\text{HOPG}}$  (schwarze Kreise) zum Peak bei ca. -0,22V hin abfällt, der Spitzenstrom über der GOD  $I_{\text{Spitze,GOD}}$  (blaue Dreiecke) zum Peak bei ca. -0,27V hin ansteigt. Entsprechendes Verhalten ist bei positiver werdenden Potentialen zu beobachten:  $I_{\text{Spitze,GOD}}$  reagiert aufgrund von Diffusion mit kurzer Zeitverzögerung, was die 50mV Differenz in den Peaks ausmachen, auf  $I_{\text{HOPG}}$ . Demnach sind  $I_{\text{HOPG}}$  und  $I_{\text{Spitze,GOD}}$  in Gegenwart von GOD miteinander korreliert. Anders verhält es sich, wenn sich die Spitze über der enzymfreien HOPG-Oberfläche befindet und das gleiche CV-Experiment durchgeführt wird.  $I_{\text{Spitze,HOPG}}$  zeigt keine Korrelation zu  $I_{\text{HOPG}}$  und die gemessenen Ströme sind im nahezu kompletten untersuchten Potentialfenster mit ca. +/- 5pA an der Messgrenze der STM-Spitze und damit vorwiegend durch Rauschen bedingt. Die hohen Ausschläge von  $I_{\text{Spitze,HOPG}}$  bei den Umkehrpotentialen sind nicht auf elektrochemische Prozesse zurückzuführen und damit technisch bedingt.

### 3. Teil: Rückkehr in den Tunnelmodus

Unmittelbar nach der Aufzeichnung der CVs (Abb. 4.6) näherte sich die Spitze der Oberfläche bis in den Tunnelmodus. Ein anschließender Scan in einem 20nm \* 20nm bis 50nm \* 50nm Fenster, entsprechend Abb. 4.4, zeigte, wie sich die GOD während der Aufnahme der CVs relativ zur Spitze verschob. Diese relative Verschiebung betrug in der Regel nur 5nm – 10nm. Nach der Rückkehr in den Tunnelmodus konnten in den meisten Experimenten andere Enzyme abgebildet und nach der Prozedur im 2. Teil charakterisiert werden.

#### **4.2.2 Horseradish Peroxidase auf Au(111) und Au(111)/Pd**

Im Gegensatz zum STM-Scannen der GOD auf HOPG stellte sich das STM-Scannen von HRP auf Au(111) als deutlich schwieriger heraus. Trotz zahlreicher Versuchsreihen mit veränderten Parametern (Probenvorbehandlung, Setpoint, Bias, HRP-Konzentration) konnten die HRP nicht hochaufgelöst abgebildet werden.

In sämtlichen Experimenten wurden die Au(111)-Proben vor dem Experiment gereinigt und flammgetempert. Eine regelmäßige Überprüfung der Proben zeigte, dass die Au(111)-Proben wie in Abb. 3.28 dargestellt, die erwünschte Orientierung, Rauigkeit und Sauberkeit hatte. Folgende Experimente zum STM-Scannen von HRP werden unterschieden:

- Au(111) ohne elektrochemische Vorbehandlung, HRP voradsorbiert, HRP-freier Elektrolyt während des Scannens

- Au(111) ohne elektrochemische Vorbehandlung, HRP im Elektrolyten während des Scannens
- Au(111) elektrochemisch voroxidiert, HRP voradsorbiert, HRP-freier Elektrolyt während des Scannens
- Au(111) elektrochemisch voroxidiert, HRP im Elektrolyten während des Scannens.

Die elektrochemische Voroxidation erfolgte durch Anlegen von 1,6V für 2min in einem Fall und 1,8V für 10min in einem anderen Fall. Bei der Voradsorption lag die gereinigte Probe für 30min – 120min in 0,01mg/ml HRP-Lösung, wurde dann mit Pufferlösung kurz und gründlich gespült und in einer STM-Zelle mit Pufferlösung ohne HRP untersucht. In den anderen Fällen (keine Voroxidation) wurde die Au(111)-Oberfläche zunächst in einem enzymfreien Elektrolyten gescannt und HRP wurden der STM-Zelle zugegeben (siehe Abb. 3.23). In keinem der Experimente konnten die Enzyme derart auf der Oberfläche adsorbiert werden, dass von ihnen STM-Bilder mit der Auflösung, wie in Abb. 4.4 gezeigt, aufgenommen werden konnten.

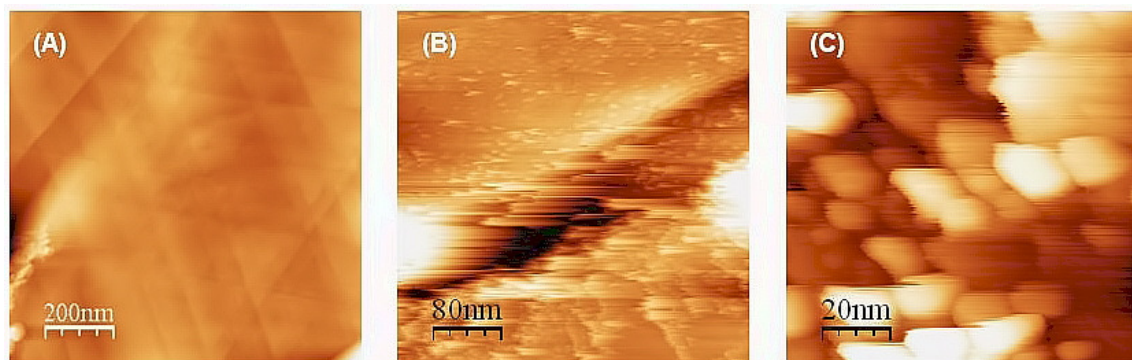


Abb. 4.7: Au(111) bei 600mV in PBS (pH = 6,0), Ar gespült. A:  $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ , z-Höhenskala 14nm, Bias: 100mV, Setpoint: 1nA, vor HRP-Zugabe. B:  $400\text{nm} \times 400\text{nm}$ , z-Höhenskala: 18nm, Bias: 100mV, Setpoint: 0,5nA, 30min nach HRP-Zugabe. C:  $100\text{nm} \times 100\text{nm}$ , z-Höhenskala: 7nm, Bias: 100mV, Setpoint: 0,5nA, 40min nach HRP-Zugabe.

Nichtsdestotrotz konnten trotz der Probleme beim Scannen, die sich in Schlieren und Verzerrungen in den Bildern äußerten (siehe z.B. Abb. 4.7 B in der Mitte), HRP zweifellos auf der Au(111)-Oberfläche nachgewiesen werden. Das Experiment begann mit dem Scannen der blanken Au(111)-Oberfläche in einem enzymfreien Pufferelektrolyten (Abb. 4.7 A). Nach Zugabe von HRP mit einer resultierenden Konzentration von 0,03mg/ml konnten 30 Minuten später signifikante Mengen an kugelförmigen Strukturen abgebildet werden (Abb. 4.7 B). Abb. 4.7 C zeigt diese kugelförmigen Strukturen vergrößert 40min nach HRP-Zugabe. Der Vergleich zur enzymfreien Fläche (Abb. 4.7 A) und die x-y-Dimensionen vieler abgebildeter

Strukturen im Bereich von 5nm – 10nm (Abb. 4.7 C) lassen kaum Zweifel aufkommen, dass die beobachteten Strukturen HRP sind. Strukturen mit x-y-Dimensionen > 10nm sind durch Agglomerate zu erklären. Betrachtet man die z-Höhenskala in Abb. 4.7 C, fällt auf, dass die auf dem STM-Bild angegebene Höhe niedriger ist als man aufgrund der Kristalldaten der adsorbierten Enzymschichten erwarten würde. Diese "Enzymhöhendiskrepanz" wurde beim Scannen der GOD auf HOPG genauso wie in zahlreichen publizierten Studien beobachtet [15,75,96,101,102]. Laut dieser Studien sind Wechselwirkungen mit den Enzymen und Änderungen der Tunnelbarriere für die scheinbare Diskrepanz in der z-Höhe des Enzyms verantwortlich. Wegen der unvermeidbaren Wechselwirkungen zwischen Spitze und HRP auf Au(111) konnten zwar das Einsetzen der Adsorption sowie die Zunahme adsorbierter HRP nicht direkt verfolgt werden. Allerdings zeigen die Bilder in Abb. 4.7 eine Tendenz zunehmender Ausbildung adsorbierter HRP-Dichte/HRP-Agglomerate auf Au(111) mit der Zeit. Abb. 4.7 C zeigt HRP-Multilagene/HRP-Agglomerate, wie sie großflächig typischerweise bei hohen Enzymkonzentrationen ( $\geq 0,1\text{mg/ml}$ ) schon nach wenigen Minuten bzw. bei niedrigerer Enzymkonzentration ( $\ll 0,1\text{mg/ml}$ ) nach Stunden mit dem STM beobachtbar ist.

Vergleichbare Experimente der HRP Adsorption auf Au(111) wurden auch auf Au(111)-Proben mit elektrochemisch abgeschiedenem Palladium durchgeführt. Bei dem Verfahren ist die frisch gereinigte Au(111) Probe zunächst mit einer  $0,5\text{mM Pd}(\text{NO}_3)_2 + 0,1\text{M HClO}_4$  – Lösung in Kontakt, wobei das Potential anfangs mit  $950\text{mV vs. NHE}$  oberhalb des Abscheidungspotentials lag. Entsprechend der ausführlich charakterisierten Methode von S. Pandelov [9,10] erfolgte die Abscheidung des Palladiums aus dem oben genannten Elektrolyten durch Herabsetzung des Au(111)-Probenpotentials unterhalb des Abscheidungspotentials. In den Experimenten zum STM-Scannen von HRP auf Au(111)/Pd wurde das Potential mit  $5\text{mV/s}$  von  $950\text{mV}$  auf  $200\text{mV}$  erniedrigt und so lange auf  $200\text{mV}$  gehalten, bis eine kathodische Ladung beobachtet wurde, die bei der Abscheidung von drei Monolagen fließen muss. Eine Monolage Palladium erfordert bei einem Sweep von  $5\text{mV/s}$  eine Ladung von  $\approx 430\mu\text{C/cm}^2$  [9]. Nach einem Ladungsfluss von  $1290\mu\text{C/cm}^2$  wurde die Kontaktierung der Au(111)/Pd-Arbeits Elektrode sofort unterbrochen, die Probe aus dem Elektrolyten gezogen und gründlich mit palladiumfreien Wasser gespült. Es bleibt noch die Frage offen, warum drei Monolagen gewählt wurden. Weniger Monolagen haben als Dünnschichtmonolagen besondere katalytische Eigenschaften [10], die bei diesen Experimenten unerwünscht waren, da das STM-Scannen der Enzyme im Vordergrund stand. Eine elektrochemisch aktive Oberfläche hat bei solchen Experimenten den Nachteil, dass das Potentialfenster zum Scannen eingeschränkt ist bzw. Faradayströme entstehen, die den Tunnelstrom überlagern. Mehr als drei Monolagen hätten durch zunehmend



dreidimensionales Wachstum [9,95] zu einer sehr rauhen Oberfläche geführt, was die Reproduzierbarkeit und das Scannen mit dem STM deutlich erschwert hätte.

Die Ergebnisse der STM-Messungen von HRP adsorbiert auf Au(111)/Pd sind mit denen von HRP auf Au(111) vergleichbar. Wie in Abb. 4.8 gezeigt, konnten auch auf Au(111)/Pd die HRP identifiziert, jedoch nicht hochaufgelöst abgebildet werden. Bei den in Abb. 4.8 abgebildeten STM-Bildern handelt es sich um eine Oberfläche mit voradsorbierten Enzymen. Sofort nach Abscheidung von drei Monolagen Palladium auf Au(111) und anschließender Reinigung wurde die Probe in eine Pufferlösung mit 0,001mg/ml HRP für 30 Minuten gelegt. Diese Konzentration ist deutlich geringer als die Konzentration der HRP im Experiment, das die STM-Bilder in Abb. 4.7 lieferte. Nach den 30 Minuten wurde die Au(111)/Pd Probe aus der Enzymlösung gezogen und mit PBS gespült, um nicht adsorbierte HRP zu entfernen. Mit dem STM erfolgte schließlich die Charakterisierung dieser Probe.

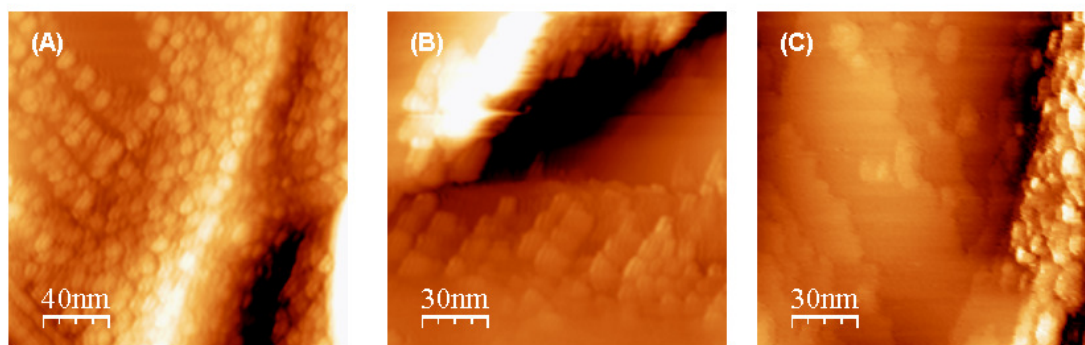


Abb. 4.8: HRP adsorbiert auf Au(111)/Pd in PBS ( $pH = 6,0$ ),  $N_2$  gespült. A:  $200nm \times 200nm$ , z-Höhenskala:  $8nm$ , Bias:  $100mV$ , Setpoint:  $0,5nA$ . B:  $150nm \times 150nm$ , z-Höhenskala:  $11nm$ , Bias:  $100mV$ , Setpoint:  $0,5nA$ .

Aufgrund der vergleichsweise geringen HRP-Konzentration bei der Adsorption sind auf den STM-Bildern (Abb. 4.8) Agglomerate vorwiegend an Kristallgrenzen und Stufenkanten zu erkennen, während Terrassen mit Monolagen, teilweise oder gar nicht mit HRP bedeckt sind.

### 4.3 Aktivitäts- und Adsorptionsuntersuchungen der an Au(111) immobilisierten Horseradish Peroxidase

#### 4.3.1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Reaktion an der Elektrodenoberfläche

HRP katalysiert die Reduktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> entsprechend (2.11). Bei der Auswertung der gemessenen Ströme durch die katalytische Aktivität von HRP an Elektrodenoberflächen muss berücksichtigt werden, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> direkt an der Elektrode chemisch umgesetzt werden kann. Dementsprechend wurde die direkte H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Reaktion an der Au(111)-Oberfläche untersucht; Abb. 4.9 zeigt ein CV von Au(111) in PBS und 50 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Vergleicht man das CV in Abb. 4.9 mit dem CV in Abb. 3.4 B, beide mit Ausnahme des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> unter identischen Bedingungen aufgenommen, sind deutliche Unterschiede festzustellen. Die experimentell festgestellte hohe Reaktivität von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS an Au(111) kann maßgeblich das Verhalten des Au(111)/HRP Systems beeinflussen, weshalb die Untersuchungen des Verhaltens von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> an Au(111) eine wichtige Rolle spielen.

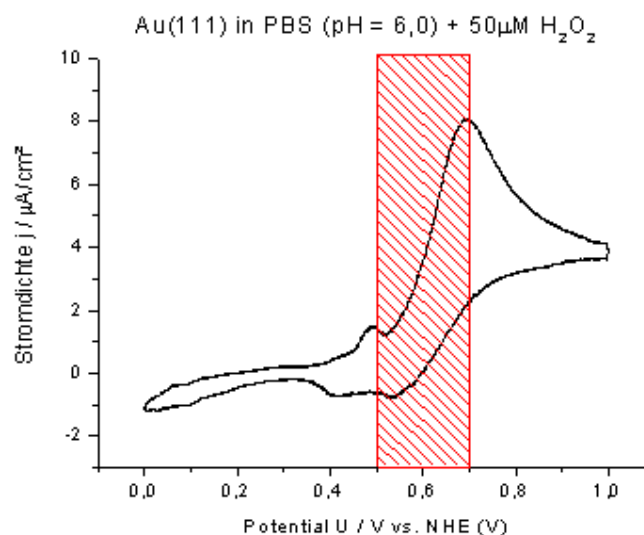


Abb. 4.9: CV von Au(111) in PBS + 50 μM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, aufgenommen mit 5 mV/s in Argonatmosphäre. Das Startpotential lag bei 0,45 V vs. NHE, die Sweeprichtung war im Uhrzeigersinn. Rot schraffiert ist der detailliert untersuchte Potentialbereich 0,5 V bis 0,7 V. Gemessen nach dem 1. Schritt der Methode B.

Zahlreiche Messungen am Au(111)/HRP-System haben gezeigt, dass der Potentialbereich  $0,5\text{V} \leq U_{WE} \leq 0,7\text{V}$  die höchste Stabilität bei gleichzeitig hohen katalytischen Stromdichten liefert (siehe dazu Kapitel 4.3.3 und 5.3.3). Deshalb lag auch der Fokus der Untersuchung der direkten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Reaktion an der Au(111)-Oberfläche in diesem Potentialbereich. Zunächst wurden amperometrisch die Stromdichten von verschiedenen Konzentrationen von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> an Au(111) gemessen (Abb. 4.9). An dieser Stelle sei darauf hingewiesen, dass mit Ausnahme einiger Messungen zur Charakterisierung des enzymfreien Au(111) - Systems, Werte zur quantitativen Auswertung stets amperometrisch durchgeführt wurden. Dies war analog zu

den Messungen des Au(111)/HRP – Systems, die zur quantitativen Auswertung amperometrisch erfolgten.

Wie in Abb. 4.9 gezeigt, sind die Stromdichten von Au(111) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verschiedener Konzentrationen in dem verwendeten PBS an Au(111) mit steigendem Potential bei U > 0,5V zu signifikanten Stromdichten, die bei 0.7V ihr Maximum erreichen.

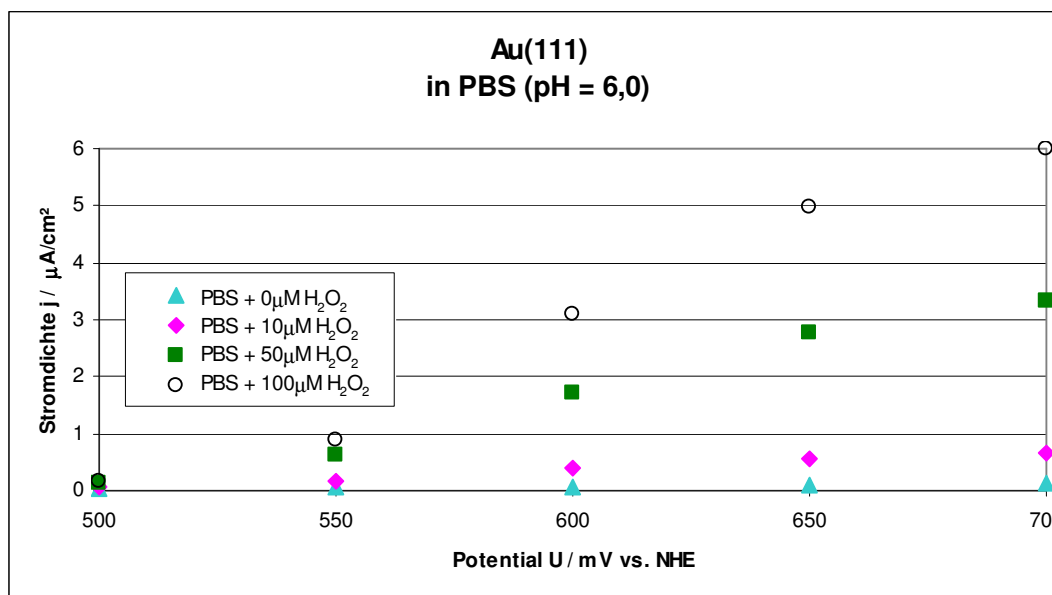


Abb. 4.10: Stromdichten an Au(111), amperometrisch bestimmt. Ausgehend vom PBS ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> wurden die Stromdichten je 5 Minuten lang bei konstantem Potential gemessen, in der Reihenfolge 700mV, 650mV, 600mV, 550mV, 500mV (türkisfarbene Dreiecke); in Argonatmosphäre. Die Messung erfolgte vor dem 1. Schritt der Methode B, die nachfolgenden Messungen erfolgten in der gleichen Potentialstufenreihenfolge jeweils nach Zugabe der entsprechenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Lösungen.

In diesem Potentialbereich ist die Stromdichte für Konzentrationen bis 100μM mit nur geringen Abweichungen, die im Rahmen der Fehlerbalken liegen, proportional zur H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration (Abb. 4.10). Da die Experimente mit HRP (Kapitel 4.3.3) mit [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 50μM durchgeführt wurden, konzentrierten sich auch die weiteren enzymfreien Experimente auf den Wert [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 50μM. Im Folgenden wurden verschiedene Elektrolyte mit [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 50μM untersucht, zunächst mit 5mV/s Sweeps im Potentialbereich 0,2V bis 1,0V (Abb. 4.11).

### Au(111) in verschiedenen Elektrolyten mit pH = 6,0

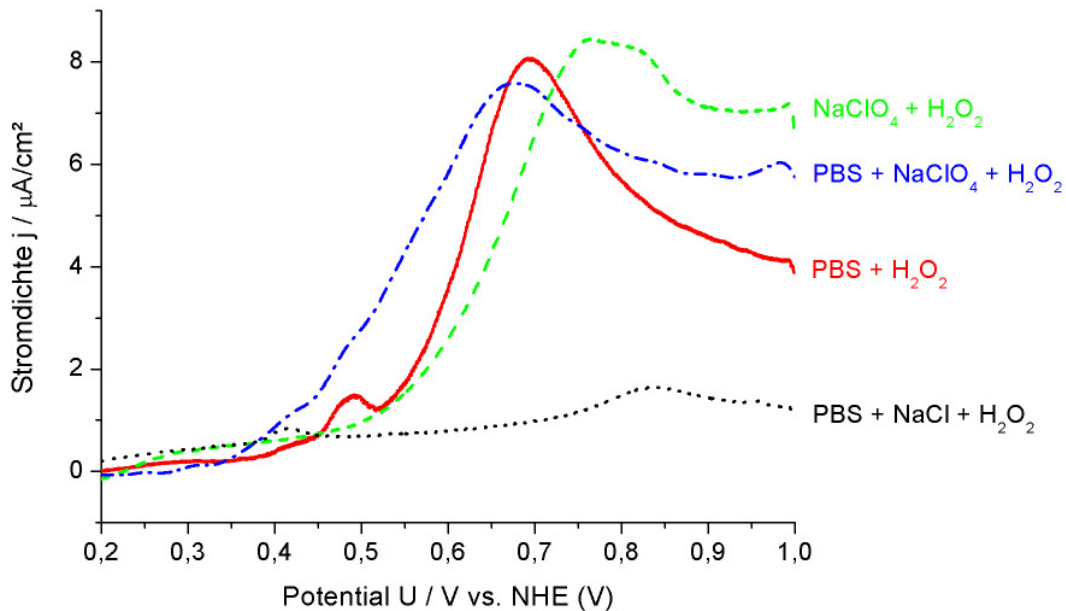


Abb. 4.11: Anodische Stromdichten bei steigenden Potentialen der CVs von Au(111) mit 5mV/s in verschiedenen Elektrolyten. Es wurde jeweils in vier verschiedenen Experimenten in NaClO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (grüne Striche), PBS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (rote Linie), PBS + NaClO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (blaue Punkt-Striche) und PBS + NaCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (schwarze Punkte) gemessen. [NaCl] = 10mM, [NaClO<sub>4</sub>] = 200mM, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 50μM; in Argonatmosphäre. Gemessen nach dem 1. Schritt der Methode B.

Bei allen vier untersuchten Elektrolyten steigt die Stromdichte mit steigenden Potentialen zu einem Maximum, der je nach Elektrolyt zwischen 0,65V und 0,83V liegt, um bei noch höheren Potentialen bis 1,0V wieder etwas abzufallen. Das Maximum liegt dabei bei den Elektrolyten NaClO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PBS + NaClO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PBS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zwischen 7,5μA/cm<sup>2</sup> und 8,2μA/cm<sup>2</sup>. Der Elektrolyt PBS + NaCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> hingegen weist einen Maximumwert von etwa 1,5μA/cm<sup>2</sup> auf, der deutlich unter den Werten der anderen untersuchten Elektrolyten liegt.

Quantitativ differenzierter sind die Unterschiede im Potentialbereich 0,5V ≤ U<sub>WE</sub> ≤ 0,7V in Abb. 4.12 dargestellt, wo die Stromdichten amperometrisch gemessen wurden. Man erkennt, dass die Stromdichten unter Verwendung der Elektrolyte PBS + NaClO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PBS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und NaClO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im untersuchten Potentialbereich mit steigenden Potentialen steigende positive Stromdichtenwerte bis ca. 2,3μA/cm<sup>2</sup> bis 4,25μA/cm<sup>2</sup> erreichen. Anders verhält es sich unter Verwendung der Elektrolyte PBS ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PBS + NaCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, wo die Stromdichten im gesamten untersuchten Potentialbereich nur vernachlässigbar kleine Werte über 0μA/cm<sup>2</sup> erreichen.

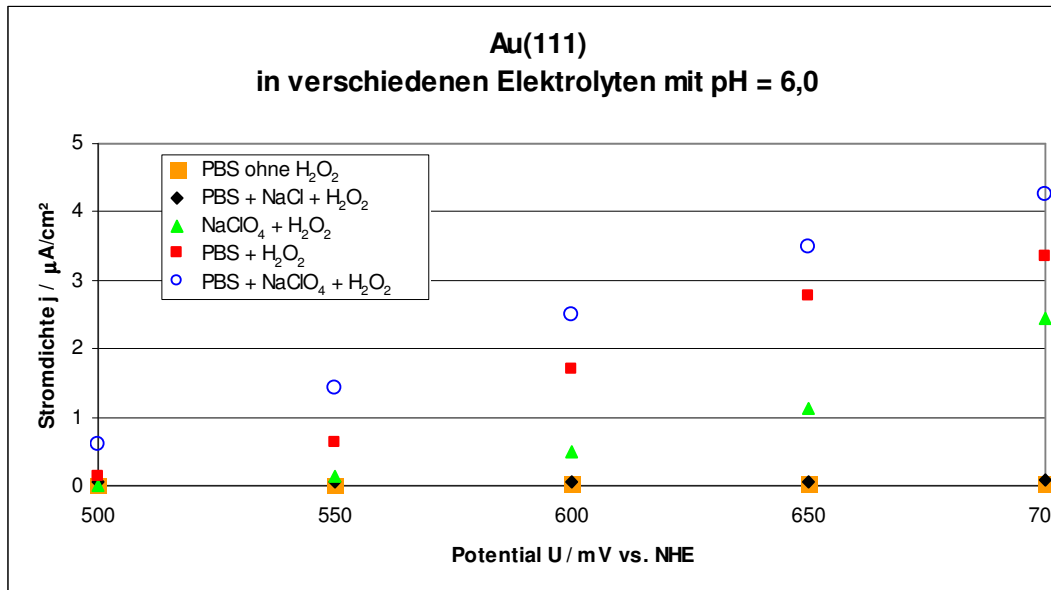


Abb. 4.12: Stromdichten an Au(111), amperometrisch bestimmt. Es wurde jeweils in fünf verschiedenen Experimenten in PBS ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, in PBS + NaCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NaClO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, PBS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> und PBS + NaClO<sub>4</sub> + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für jeweils 10min bei konstantem Potential gemessen, in der Reihenfolge 700mV, 650mV, 600mV, 550mV, 500mV. [NaCl] = 10mM, [NaClO<sub>4</sub>] = 200mM, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 50μM; in Argonatmosphäre. Große orangene Quadrate: gemessen vor dem 1. Schritt der Methode B, ansonsten nach dem 1. Schritt der Methode B.

Studien der Reaktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in PBS mit der Elektrodenoberfläche wurden nicht nur an Au(111) durchgeführt, sondern auch mit einer Reihe weiterer Elektroden. Da jedoch die Wahl für den Fokus der Experimente mit HRP auf Au(111) fiel, wurden entsprechend auch die Studien mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> auf Au(111) konzentriert. Das folgende Kapitel vertieft diesen Punkt.

#### 4.3.2 Vergleich der katalytischen Aktivität an verschiedenen Elektroden

Bevor die Ergebnisse zur katalytischen Aktivität der HRP an Au(111) im Detail präsentiert werden (Kapitel 4.3.3 und 4.3.4), soll dieses Kapitel einleitend zum Übergang zu den Messungen mit HRP darlegen, dass die Elektrode Au(111) von den untersuchten Elektroden für ein Elektrode/HRP-System die geeignetste Wahl war. Die wichtigste Auswahl in Betracht gezogener Elektroden zur Immobilisierung von HRP ist in Abb. 4.13 dargestellt.

**Stromdichten verschiedener Elektroden in PBS (pH = 6,0)  
+ 50 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> bei 600mV vs. NHE**

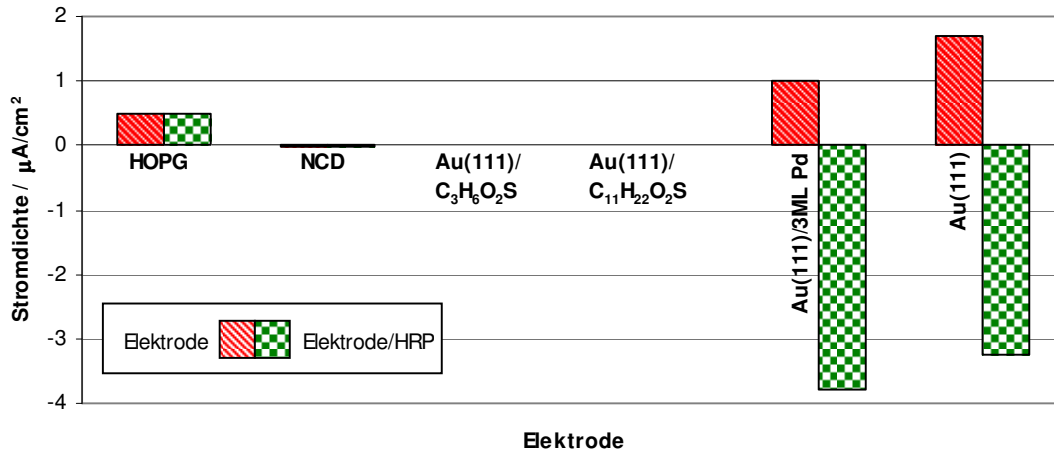


Abb. 4.13: Vergleich der Stromdichten von verschiedenen Elektroden ohne (rote Streifen) und mit (grünes Schachbrettmuster) voradsorbierten HRP. Die Messung erfolgte jeweils amperometrisch bei 600mV in PBS (pH = 6,0) + 50 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Voradsorbiert wurden die HRP, indem die Elektrode für 10 Minuten in einer 0,01mg/ml HRP-Lösung eingetaucht war. Bei der Au(111)/3ML Pd-Elektrode handelt es sich um eine Au(111)-Elektrode, auf der entsprechend dem in Kapitel 4.2.2 geschilderten Verfahren 3 ML (Monolagen) Palladium abgeschieden wurden. Rote gestreifte Balken: gemessen nach dem 1. Schritt der Methode B mit entsprechender Elektrode, grüne Schachbrettmuster-Balken: gemessen nach Methode A mit entsprechender Elektrode.

In Abb. 4.13 sind jeweils links als rote gestreifte Balken die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidations-Stromdichten an der HRP-freien Oberflächen dargestellt. Rechts sind diesen Balken die Stromdichten, gemessen bei 600mV an verschiedenen Elektrodenoberflächen mit adsorbierten HRP (grüne Schachbrettmuster-Balken), gegenüber gestellt.

Zweifelloos ist die Auswahl der in Frage kommenden Elektroden in Abb. 4.13 nicht erschöpfend. Mit Ausnahme der Palladiumelektrode konzentrieren sich die Untersuchungen auf Elektrodenoberflächen, die häufig von anderen Gruppen (siehe z.B. [23,37,103,104]) für Experimente mit adsorbierten Enzymen gewählt wurden. In deren Experimenten wurden zum größten Teil modifizierte Elektrodenoberflächen verwendet. Die Adsorption von HRP auf NCD [104] oder auf Au(111) mit Thiol-SAMs [37,103] erfolgte in den zitierten Arbeiten in Gegenwart des Linkermoleküls EDC. HOPG und Au(111) ohne passivierende SAM wurden vor der HRP-Adsorption voroxidiert [23,36,43]. Eine derartige Vorbehandlung der Elektrode ist mit einer besseren Bindung der HRP an die Oberfläche begründet. Doch ist schon in Kapitel 2.2 angedeutet, dass die Stromdichten mit verlinkten Enzymen unter den

Stromdichten von direkt an der Oberfläche gebundenen Enzymen liegen können. Aus den Ausführung in Kapitel 1.2 und 2.2 ist ersichtlich, dass bei den Experimenten dieser Arbeit auf jegliche weitere Vorbehandlung (z.B. Verwendung von EDC, Voroxidation) der Elektroden Au(111), Au(111)/C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>2</sub>S, Au(111)/C<sub>11</sub>H<sub>22</sub>O<sub>2</sub>S, Au(111)/3ML Pd, HOPG und NCD verzichtet wurde, um ein Modellsystem zu charakterisieren, das eine niedrigere Komplexität aufweist. Dies erleichterte die reproduzierbare Durchführung der Experimente, die in den beiden Kapiteln 4.3.3 und 4.3.4 vorgestellt werden.

### 4.3.3 Charakterisierung der katalytischen Aktivität an Au(111)

#### Einführung

Analog zu Abb. 4.13 sind in Abb. 4.14 die Stromdichten von Au(111) mit und ohne voradsorbiertes HRP in PBS + 50µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gegenübergestellt und zwar für fünf verschiedene Potentiale zwischen 500mV und 700mV.

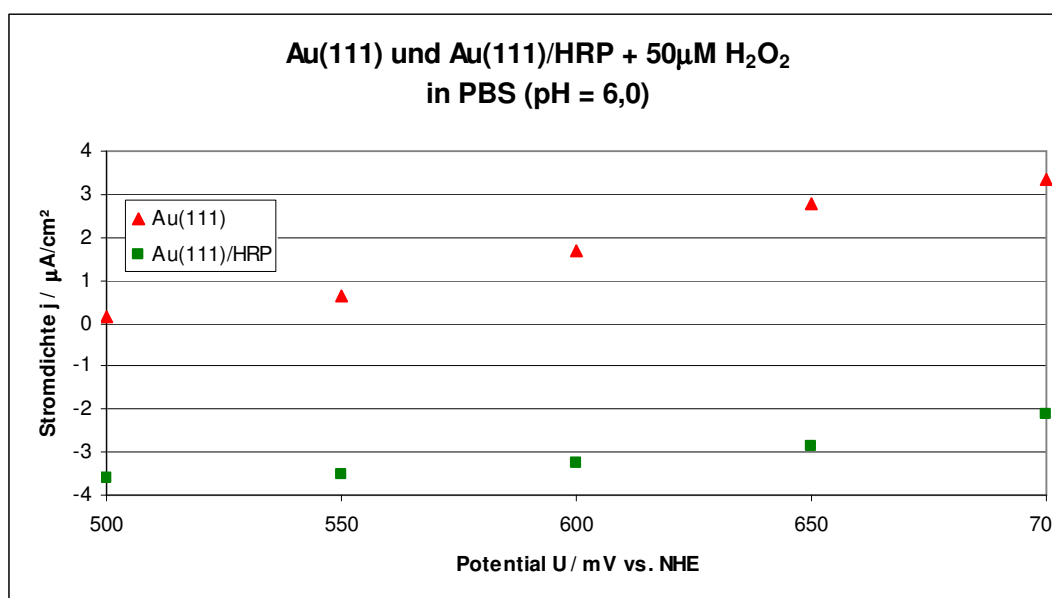


Abb. 4.14: Vergleich der Stromdichten von Au(111) ohne (rote Dreiecke) und Au(111) mit (grüne Quadrate) voradsorbierten HRP (10 Minuten in 0,01mg/ml HRP-Lösung). Die Messung erfolgte in PBS (pH = 6,0) + 50µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; es wurde 5 Minuten lang amperometrisch bei den entsprechenden Potentialen, beginnend bei 700mV und endend bei 500mV, gemessen. Rote Dreiecke: gemessen nach dem 1. Schritt der Methode B, grüne Quadrate: gemessen nach Methode A.

Unverkennbar zeigt Au(111)/HRP deutlich negativere Stromdichten gegenüber Au(111) im gesamten dargestellten Potentialbereich. Die Werte für Au(111)/HRP (grüne Quadrate) sind

durchweg kathodisch mit Werten zwischen  $-3,6\mu\text{A}/\text{cm}^2$  und  $-2,1\mu\text{A}/\text{cm}^2$ , die Werte für Au(111) (rote Dreiecke) sind durchweg anodisch mit Werten zwischen  $0,14\mu\text{A}/\text{cm}^2$  und  $3,34\mu\text{A}/\text{cm}^2$ . Folglich erzeugen die an der Oberfläche voradsorbierten HRP kathodische Stromdichten im Potentialbereich  $0,5\text{V} \leq U_{\text{WE}} \leq 0,7\text{V}$ . Die Wahl dieses Potentialbereiches ergibt sich aus Untersuchungen, die im nächsten Abschnitt dargestellt sind.

### Wahl des Potentialfensters

Aufgrund des generell großen Fehlerpotentials beim Durchführen von Experimenten mit Au(111)/HRP-Systemen (siehe dazu Kapitel 5.4) ist es wichtig, Versuchsbedingungen zu finden, die reproduzierbare Messwerte liefern. Die Messungen, deren Werte in Abb. 4.15 dargestellt sind, wurden durchgeführt, um zu ermitteln, welche Potentiale zeitlich stabile bzw. reproduzierbare Ergebnisse liefern und welches Potentialfenster damit für weitergehende Untersuchungen gewählt werden kann.

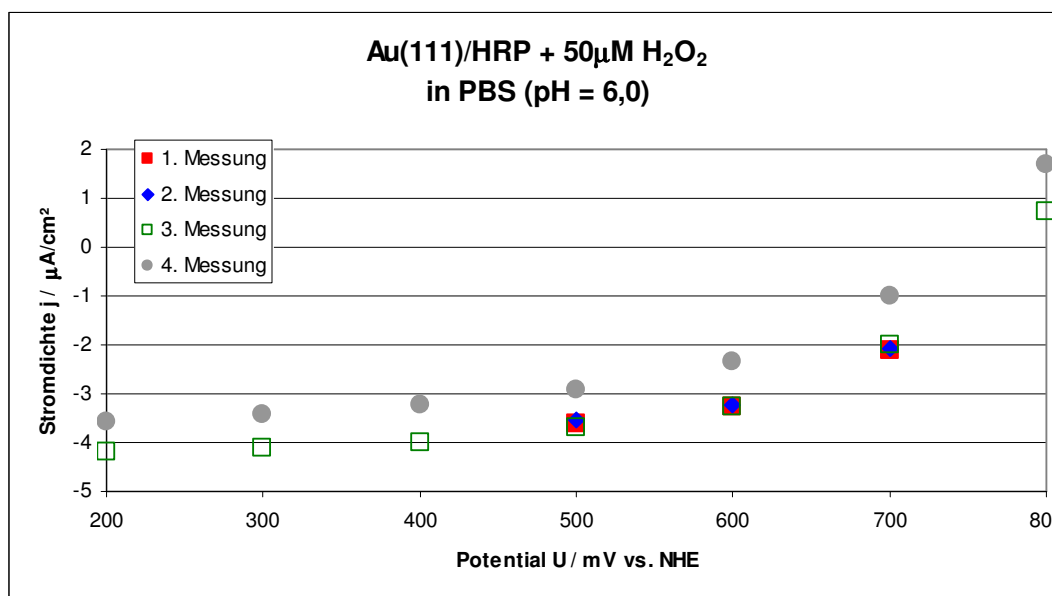


Abb. 4.15: Darstellung der Stromdichten von vier direkt hintereinander durchgeführten Messungen von Au(111) mit voradsorbierten HRP (10 Minuten in  $0,01\text{mg}/\text{ml}$  HRP-Lösung) in PBS ( $\text{pH} = 6,0$ ) +  $50\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ . Die Messung nach Methode A erfolgte jeweils 5 Minuten lang amperometrisch bei festen Potentialen, beginnend beim höchsten (700mV bzw. 800mV) und endend beim niedrigsten (500mV bzw. 200mV).

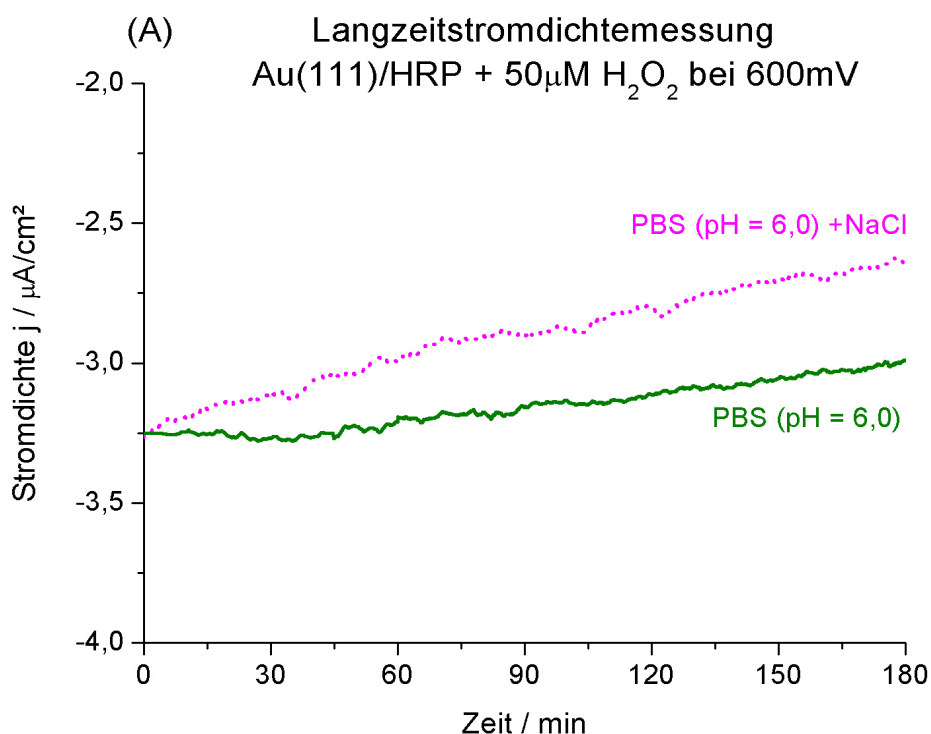
Bei der ersten Messung in Abb. 4.15 (rote ausgefüllte Quadrate) wurde zuerst die Stromdichte 5 Minuten lang bei 700mV, dann bei 600mV und schliesslich bei 500mV gemessen. Dabei stellte sich nach Potentialänderung ein fester Wert meist nach 1-2 Minuten ein. Die zweite Messung erfolgte direkt nach der ersten mit gleichem Vorgehen; die



Messwerte der zweiten Messung (blaue Karos) liegen nur sehr geringfügig über den Werten der 1. Messung. Gleiches Vorgehen, aber ein Startpotential von 800mV kennzeichnen die 3. Messung (grüne nicht-ausgefüllte Quadrate). Abb. 4.15 zeigt, dass die Stromdichten-Werte der 3. Messung im Bereich von 500mV bis 700mV nur wenig von den Werten der ersten beiden Messungen abweichen. Zwischen 200mV und 400mV der 3. Messung muss jedoch ein irreversibler Vorgang erfolgt sein, da die vierte Messung (graue Kreise) signifikant nach oben abweichende Werte zeigt. Das Studium dieser irreversiblen Vorgänge liegt außerhalb des Rahmens dieser Arbeit; die Potentiale weiterer unten vorgestellter Messungen wurden im Bereich  $0,5V \leq U_{WE} \leq 0,7V$  festgelegt, in der Regel auf 600mV.

### Zeitliche Entwicklung der katalytischen Aktivität

Bei Elektroden/Enzym-Systemen stellt die zeitliche Stabilität der katalytischen Aktivität einen wichtigen Punkt dar. Mit Hilfe von Abb. 4.16 soll die zeitliche Stabilität des Au(111)/HRP-Systems näher betrachtet und quantifiziert werden.



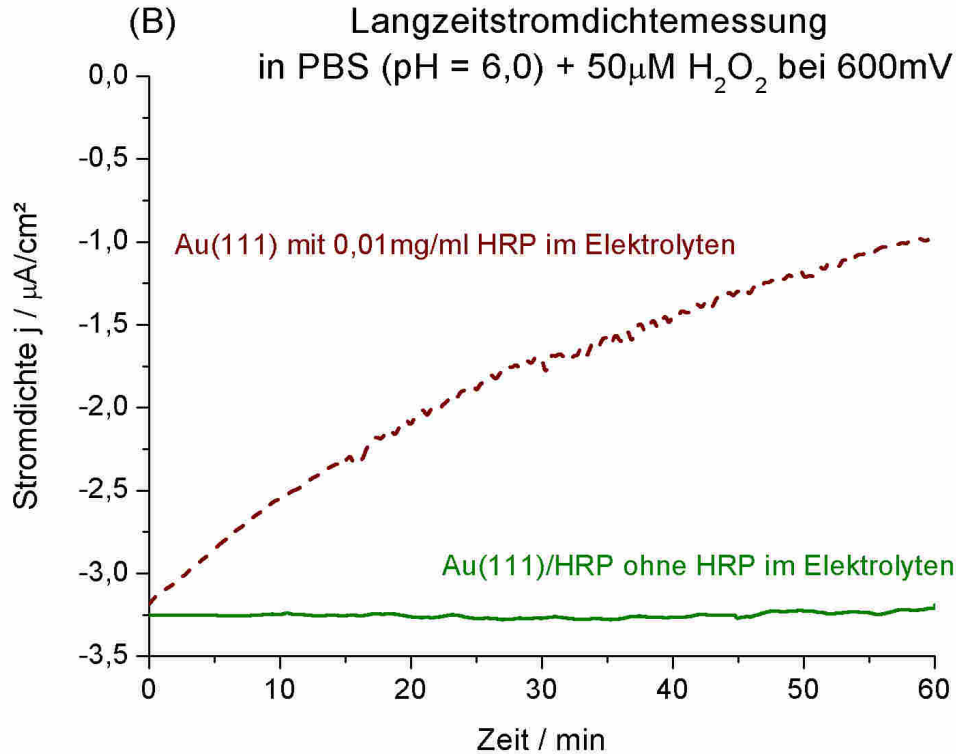


Abb. 4.16: Langzeitstromdichten, gemessen amperometrisch bei 600mV. A: Au(111) mit voradsorbierten HRP (10 Minuten in 0,01mg/ml HRP-Lösung) in PBS (pH = 6,0) + 50 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (grüne Linie) bzw. in PBS (pH = 6,0) + 10mM NaCl + 50 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (magentafarbene Punkte). B: Au(111) in PBS (pH = 6,0) + 50 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 0,01mg/ml HRP, Messbeginn 10 Minuten nach Kontakt mit dem Elektrolyten (braune Striche); die grüne Linie entspricht derjenigen aus (A). Die Werte der braunen gestrichelten Kurve wurde nach Methode B gemessen, die anderen Kurven nach Methode A.

In Abb. 4.16 A ist festzustellen, dass die Stromdichten von Au(111)/HRP in PBS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> um ca. 3%, in PBS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + NaCl um ca. 7% pro Stunde fallen. Beide Messungen wurden zwei Minuten nach Eintauchen der Elektrode in den Elektrolyten gestartet. Verschiedene Messserien zeigten, dass einzelne Messungen Abweichungen von ca.  $\pm 10\%$  zeigten, im Mittel aber den gleichen Anfangs-Stromdichtewert von ca. -3,25 $\mu$ A/cm<sup>2</sup> hatten.

Misst man die katalytische Aktivität von HRP in PBS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + 0,01mg/ml HRP (braune gestrichelte Kurve, Abb. 4.16 B), lässt sich ein Abfall der kathodischen Stromdichte von ca. 45% in der ersten Stunde beobachten. Dieser Abfall wurde gemessen, nachdem die Elektrode 10 Minuten in Kontakt mit dem Elektrolyten gewesen war (analog zur Voradsorptionszeit, siehe dazu auch Kapitel 4.3.4 und 5.3.4). Experimente nach Methode B und Methode C lieferten nahezu gleiche abfallende Stromdichten, d.h. dass demnach das Verhalten der Au(111) mit adsorbierenden HRP nicht oder unwesentlich davon abhängig ist, ob H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> während der Adsorption der HRP an der Au(111)-Oberfläche vorhanden ist.

Neben dem  $\text{H}_2\text{O}_2$  könnte auch  $\text{NaCl}$  die Adsorption der HRP an  $\text{Au}(111)$  beeinflussen. Ergänzend zu den Messungen, bei denen HRP im Beisein von  $\text{NaCl}$  im Elektrolyten voradsorbierten (Abb. 4.16 A, magentafarbene Punkte), wurden Messungen durchgeführt, bei denen  $\text{NaCl}$  erst später zugegeben wurde (Abb. 4.17).

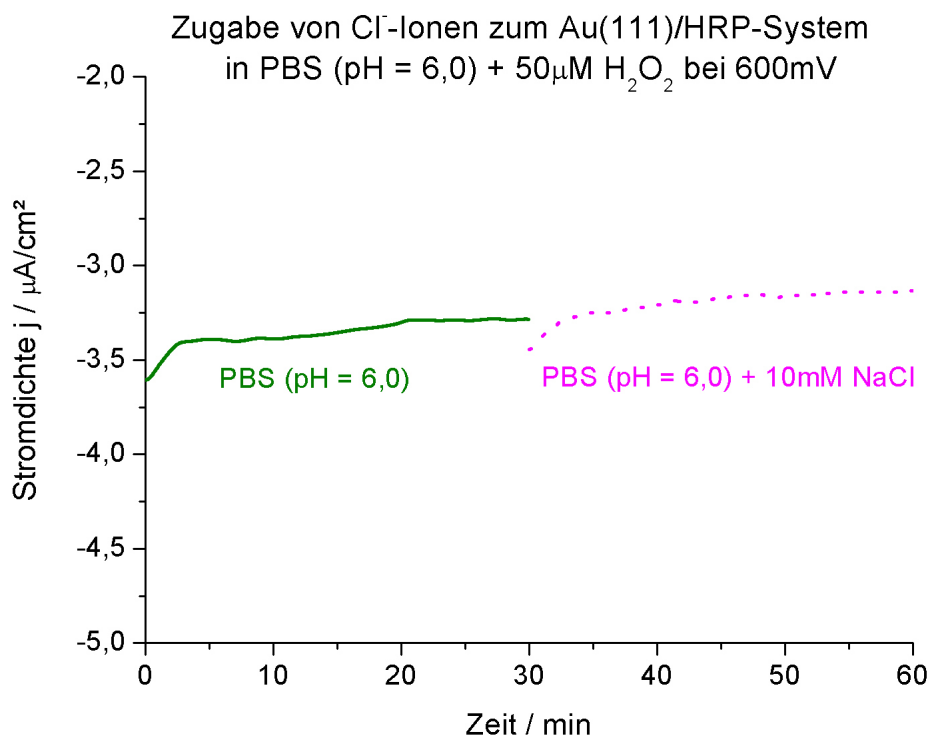


Abb. 4.17: Amperometrisch bei 600mV gemessene Stromdichten an  $\text{Au}(111)$  mit voradsorbierten HRP (10 Minuten in  $0,01\text{mg}/\text{ml}$  HRP-Lösung) in PBS (pH = 6,0) +  $50\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  (grüne Linie). Nach 30 Minuten wurde  $\text{NaCl}$  zugegeben, d.h. die magentafarbene gepunktete Kurve zeigt die Stromdichte bei 600mV von  $\text{Au}(111)$ /HRP in PBS (pH = 6,0) + 10mM  $\text{NaCl}$  +  $50\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Analog zum Experiment in Abb. 4.16 wurde eine  $\text{Au}(111)$ /HRP-Elektrode in PBS +  $50\mu\text{M}$   $\text{H}_2\text{O}_2$  getaucht und bei 600mV die Stromdichte an der  $\text{Au}(111)$ /HRP-Elektrode gemessen. Da die Messung im Gegensatz zu Abb. 4.16 in Abb. 4.17 sofort nach Kontakt mit dem Elektrolyten dargestellt ist (in Abb. 4.16 begann die Messung erst 2 Minuten nach Kontakt), ist zu Beginn ein kleiner Stromdichtenausschlag zu sehen, der sich nach weniger als 5 Minuten auf ein relativ gleichmäßiges Niveau einstellt und nach etwa 20 Minuten ein stabiles Gleichgewicht erreicht. Nach 30 Minuten wurde die elektrochemische Zelle auf OCP gestellt und der Rührer eingeschaltet. Zugegeben wurde das  $\text{NaCl}$  in konzentrierter Form mit einer Spritze. Nach einer Minute Rühren und einer Minute Warten ohne Rühren wurde wieder 600mV an der  $\text{Au}(111)$ /HRP-Elektrode angelegt und die Messung fortgesetzt (magentafarbene gepunktete Kurve). Eine mehrfache Durchführung dieses Experimentes

bestätigte, dass das Zugabe von NaCl zu dem Au(111)/HRP-PBS-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-System bei 600mV nur zu einem kleinen Abfall der kathodischen Stromdichte führt.

Für ein tieferes Verständnis dieser Vorgänge sind gezielte Studien der Adsorption von HRP auf Au(111) in verschiedenen Elektrolyten notwendig. In dieser Arbeit konzentrierten sich die Studien auf die Adsorption von HRP im NaCl-freien PBS-Elektrolyten.

#### **4.3.4 Untersuchung des Adsorptionsvorganges auf Au(111)**

Forschungsgruppen, die Studien von der katalytischen HRP auf Elektrodenoberflächen veröffentlicht haben [15,20,23,37,103], gehen in der Regel von Elektroden mit voradsorbierten Enzymen aus. Untersuchungen des Adsorptionsvorganges bleiben in diesen Fällen aus. Aufgrund der zunächst unbekanntem Dynamik bei der Adsorption von HRP auf Au(111) sind die Experimente dieser Arbeit zur Voradsorption erst durchgeführt worden, nach dem ein definiertes Au(111)/HRP-System vorlag. Wie sich herausstellte, waren die in Kapitel 4.3.3 vorgestellten Ergebnisse und die in Kapitel 5.3.3 diskutierten Erkenntnisse von wesentlicher Bedeutung für die Wahl der Parameter der Experimente dieses Kapitels.

In Kapitel 4.3.3 ist vorwiegend das Au(111)/HRP-System charakterisiert, bei dem die HRP 10 Minuten lang in einer 0,01mg/ml HRP-Lösung voradsorbiert wurden. Empirisch zeigte sich, dass eine Voradsorptionszeit von 5 – 10 Minuten in 0,01mg/ml die höchsten Stromdichten lieferte. Zur Untersuchung des Adsorptionsverhaltens eignete sich die Konzentration von 0,01mg/ml jedoch nicht, da schon nach wenigen Minuten der Adsorption maximale kathodische Stromdichten erzielt wurden. Diese schnelle Dynamik hat ein höheres Fehlerpotential bei der Analyse der zeitabhängigen Daten und macht zeitaufwendige Messungen wie die Impedanzspektroskopie (siehe unten) unmöglich. Folglich konzentriert sich die Untersuchung des Adsorptionsvorganges von HRP auf Au(111) auf die Konzentrationen 0,00001mg/ml, 0,0001mg/ml und 0,001mg/ml HRP in Lösung.

##### *HRP-Adsorptionsuntersuchung durch zeitliche Messung von Stromdichten*

Abb. 4.18 stellt die zeitliche Entwicklung an der Au(111)-Elektrode dar, nachdem HRP mit den angezeigten resultierenden Konzentrationen dem PBS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Elektrolyten zugefügt wurde. Es handelt sich dabei um vier unabhängige Experimente, deren Stromdichtenentwicklungen im gleichen Diagramm angezeigt sind. Jedes der vier Experimente hatte den gleichen Ausgangszustand (gereinigte Zelle, enzymfreier PBS Elektrolyt mit 50µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, gereinigte Au(111)-Elektrode) und wurde zur Sicherherstellung der Reproduzierbarkeit mehrmals durchgeführt.

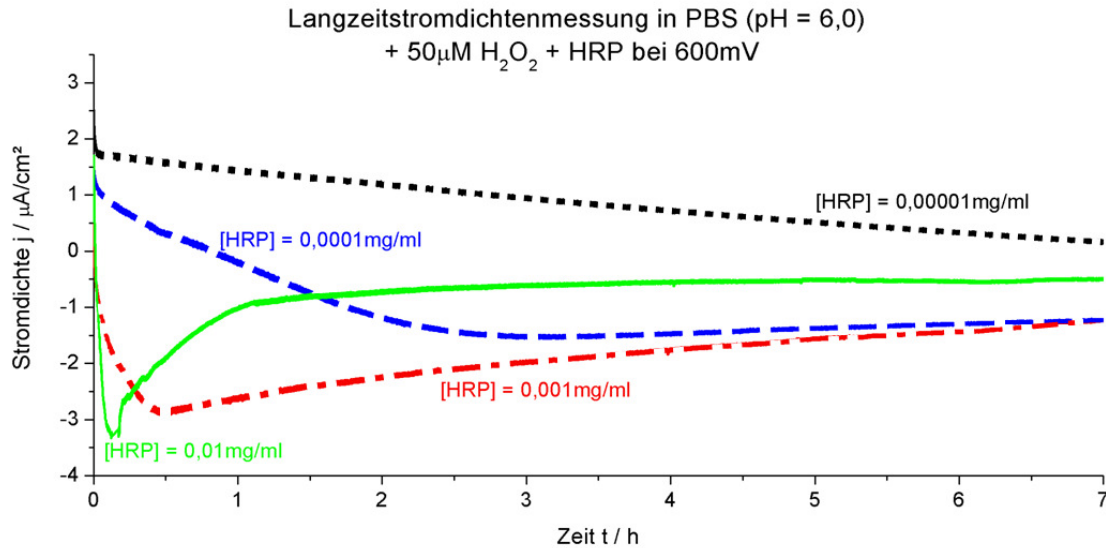


Abb. 4.18: Verlauf der Stromdichten  $j_{mess}$  an Au(111) in PBS (pH = 6,0) + 50 $\mu$ M H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> + HRP verschiedener Konzentrationen. Die Messung erfolgte bei 600mV prinzipiell nach Methode B, direkt nachdem die Elektrode mit dem Elektrolyten kontaktiert wurde.

Alle vier Kurven in Abb. 4.18 haben eine Anfangsstromdichte von 1,7 $\mu$ A/cm<sup>2</sup>, die jeweils zum Zeitpunkt  $t = 0$  gemessen wurden, also unmittelbar vor Zugabe von HRP in die Zelle. Nach Zugabe von HRP mit den jeweils unterschiedlichen resultierenden [HRP] wird in allen vier Fällen die Stromdichte zunächst kathodischer. Mit Ausnahme des Experimentes mit [HRP] = 0,00001mg/ml, wo im betrachteten Zeitraum von sieben Stunden dieser Trend anhielt, zeigten alle anderen Experimente eine Zunahme der kathodischen Stromdichte bis zu einem klar definierten Maximum. Dieses Maximum liegt HRP-konzentrationsabhängig bei verschiedenen Zeitpunkten  $t^* = t^*([HRP])$ . Über  $t^*$  hinaus entwickelten sich die Stromdichten zu anodischeren Werten. Es sei an dieser Stelle darauf hingewiesen, dass eine maximale kathodische Stromdichte mit einer maximal negativen Stromdichte gleichzusetzen ist; entsprechend sind kathodische Maxima in der Austragung in Abb. 4.18 als Minima gekennzeichnet.

Zwar liefert Abb. 4.18 schon wichtige Hinweise auf den konzentrationsabhängigen Adsorptionsvorgang der HRP auf Au(111), was im Diskussionsteil ausgeführt wird, dennoch war es für eine Vertiefung des Verständnisses der Adsorption notwendig, den Vorgang mit einer weiteren Messmethode zu untersuchen. Dazu wurde die elektrochemische Impedanzspektroskopie als Messmethode ausgewählt (siehe dazu auch Kapitel 3.2).

### HRP-Adsorptionsuntersuchung durch zeitliche Messung von Oberflächenkapazitäten

Um die von  $t = 0$  bis  $t = t^*$  steigenden kathodischen Stromdichten und bei  $t > t^*$  fallenden kathodischen Stromdichten näher zu untersuchen, wurde eine zweite, von der ersten Stromdichten-Messmethode unabhängige, Messreihe durchgeführt. Die Messungen erfolgten mit den in Kapitel 3.1.2 und Kapitel 3.2.2 beschriebenen Messgeräten, wobei die Zelle, Au(111)-Elektrode und Elektrolyte die gleichen waren wie bei den Messungen, aus denen Abb. 4.18 resultierte. Gemessen wurden zunächst bei festem Potential im Frequenzbereich 0,1Hz bis 10000Hz  $Z_{Re}$  und  $Z_{Im}$ , aus denen Bode-Plots und damit Widerstände sowie Kapazitäten bestimmt wurden. Repräsentativ für den Potentialbereich  $600\text{mV} \pm 100\text{mV}$ , auf dem analog zu den schon vorgestellten Resultaten der Schwerpunkt liegt, ist der Bode-Plot des Au(111) + PBS – Systems in Abb. 4.19 dargestellt. Ziel der EIS-Messungen ist es, das Adsorptionsverhalten von HRP an Au(111) zu studieren. Ein Vergleich von nahezu gleichen Stromdichten aus Experimenten nach Methode B und Methode C (siehe Erläuterungen zu Abb. 4.16 B) ist ein deutlicher Hinweis dafür, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$  nur unwesentlich das Adsorptionsverhalten beeinflusst. Wegen der hohen Reaktivität von  $\text{H}_2\text{O}_2$  an Au(111) und der damit verbundenen Schwierigkeiten bei der Auswertung der EIS-Daten, erfolgten alle EIS-Messungen in Abwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$ , ohne dadurch den Bezug zu den Messergebnissen aus Abb. 4.18 zu verlieren.

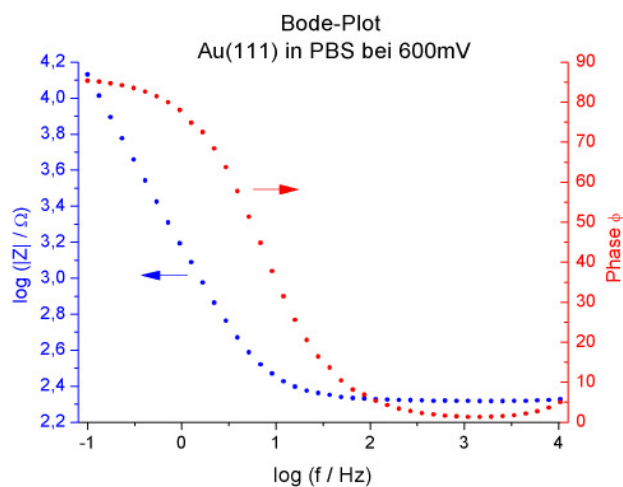


Abb. 4.19: Bode-Plot einer EIS-Messung von Au(111) in PBS bei 600mV. Gemessen wurde bei den Frequenzen 0,1Hz bis 10000Hz mit einer Amplitude von 5mV.

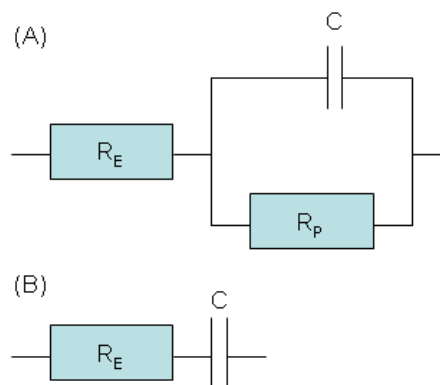


Abb. 4.20: Elektrische Schaltkreise für den Fit an die EIS-Daten.

Gefittet werden EIS-Daten einfacher Elektroden-/Oberflächen-Systeme häufig mit dem Schaltkreis in Abb. 4.20 A. Entsprechend den simulierten Verläufen in Abb. 3.8 zeigte sich

aber im untersuchten Frequenzbereich (siehe Abb. 4.19), dass keine sinnvollen Daten für  $R_p$  berechnet werden konnten. Erwartungsgemäß für die Oberflächenprozesse ohne Ladungstransfer bei 600mV simuliert ein einfacher  $R_E - C$  Schaltkreis (Abb. 4.20 B) die Oberflächenprozesse des vorliegenden Au(111) + PBS - Systems zutreffend. Da bei der Adsorption von HRP ebenfalls kein Ladungstransfer erfolgt, konnten alle in diesem Kapitel vorgestellten EIS-Daten mit dem Schaltkreis in Abb. 4.20 B gefittet werden. Als Fehler hat die Fitprozedur für den Fit an die Datenpunkte in Abb. 4.19 den Wert  $\chi^2 = 0,18$  angegeben. Fits von Daten reproduzierter Messungen haben einen vergleichbaren  $\chi^2$ , d.h. die Fitergebnisse

<b>Elektrode</b>	<b>Elektrolyt</b>	<b>Potential</b>	<b><math>R_E</math></b>	<b>C</b>
Au(111)	PBS (pH = 6,0)	600mV	220 $\Omega$	155 $\mu$ F/cm <sup>2</sup>

Tab. 4.1: Elektrolytwiderstand und Oberflächenkapazität von Au(111) + PBS, Mittelwert mehrerer Fitresultate von EIS-Messungen.

sind mit einem geringen Fehler behaftet. Durch die Adsorption der Dihydrogenphosphationen des PBS-Puffers ist die hohe Kapazität von 155 $\mu$ F/cm<sup>2</sup> bei 600mV zu erklären. Für Potentiale  $U \leq 400$ mV sind Kapazitäten von 25 $\mu$ F/cm<sup>2</sup> gemessen worden; diese Kapazitäten entsprechen denen von Au(111) mit einem NaClO<sub>4</sub>-Elektrolyt ohne PBS, bei dem keine Adsorption stattfindet. In Tab. 4.1 ist der gemessene nicht-normierte Widerstandswert  $R_E$  des Elektrolyten angegeben, da die geometrische Anordnung der Elektroden (siehe Abb. 3.2 und Abb. 3.3) eine eindeutige Normierung des Widerstandswertes erschwert. Auf eine Abschätzung wurde verzichtet, weil der Widerstandswert für die weiteren Betrachtungen unwesentlich ist.

Basierend auf den Erkenntnissen aus Abb. 4.19 wurden die Messungen mit HRP bei 10Hz durchgeführt. Diese Frequenz ist charakterisiert durch kapazitives Verhalten und erlaubt gleichzeitig schnelle Messungen, was für zeitsensible Messungen wichtig ist. Abb. 4.21 ergibt sich aus einer Messreihe, bei dem zunächst bei 10Hz die Kapazitäten des HRP-freien Au(111) + PBS – Systems bestimmt wurden. Dazu wurde zunächst 700mV eingestellt, dann in 50mV Schritten 650mV, 600mV, 550mV und 500mV. Der Kapazitätswert bei 600mV (oberstes rotes Quadrat in Abb. 4.21) liegt nah an dem entsprechenden Wert in Tab. 4.1. Damit ist die Annahme, bei 10Hz reproduzierbare Kapazitätswerte zu erhalten, bekräftigt. Das Einspritzen der HRP in den Elektrolyten erfolgte bei ausgeschalteter Zelle und aus dem Elektrolyten rausgezogener Au(111)-Elektrode. Eine Minute lang wurden die Enzyme im Elektrolyt verrührt, um eine gleichmäßige Konzentration von  $[HRP] = 0,001$ mg/ml zu erreichen. Nach Abschalten des Rührers und 4 Minuten Warten wurde die Au(111)-Elektrode

bei eingeschalteter Zelle in den Elektrolyten getaucht und sofort die EIS-Messung gestartet. In Abständen von 4 Minuten zeichnete der Messstand die Widerstandswerte bei 700mV, 650mV, 600mV, 550mV und 500mV auf, aus denen sich die Kapazitätswerte errechneten. Für den in Abb. 4.21 abgebildeten Graphen eignet sich die Konzentration [HRP] = 0,001mg/ml besonders, da die Adsorptionsdynamik (siehe dazu Abb. 4.18) weder zu schnell (für [HRP] = 0,01mg/ml zutreffend) noch zu langsam (für [HRP] << 0,001mg/ml zutreffend) für eine reproduzierbare EIS-Zeitmessung ist.

Abb. 4.21 zeigt, dass im Potentialbereich 500mV bis 700mV die Oberflächenkapazität für jedes dargestellte Potential stetig mit fortschreitender Zeit sinkt. Offenbar ist dieser nicht-lineare Prozess bei allen abgebildeten Potentialen beobachtbar, obgleich die Kapazitäten sich potentialabhängig in den absoluten Werten unterscheiden.

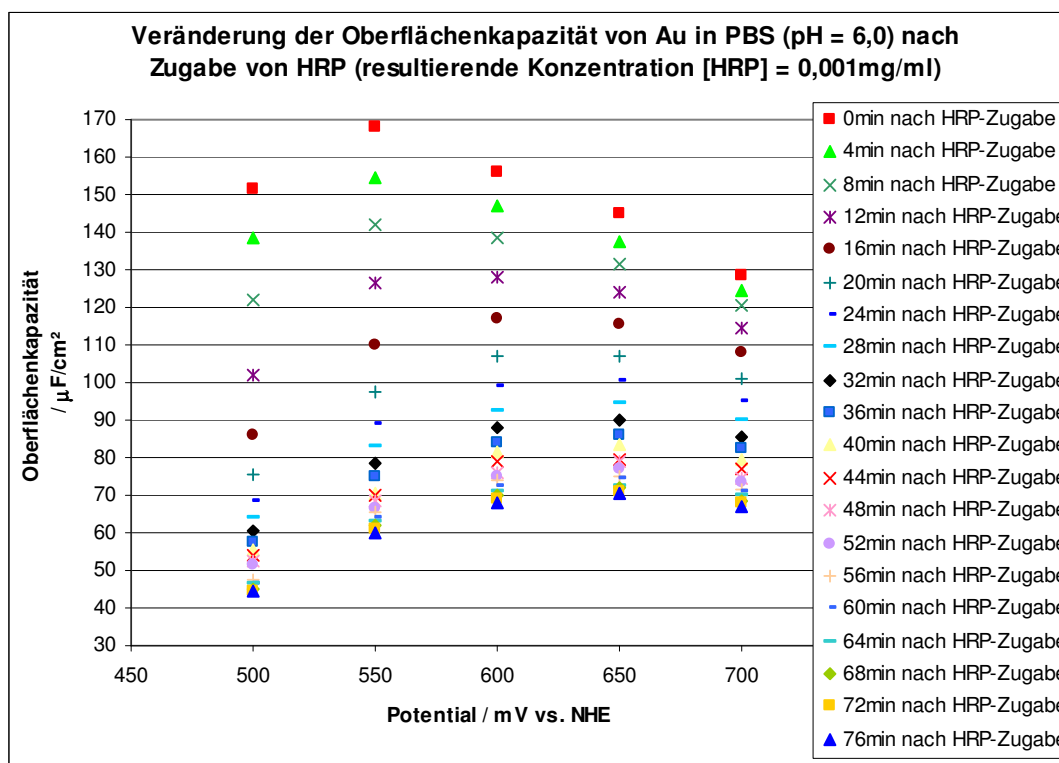


Abb. 4.21: Oberflächenkapazitäten des Au(111) + PBS – Systems (rote Quadrate) und nachdem HRP mit einer resultierenden Konzentration von 0,001mg/ml der Zelle zugegeben wurden (andere Symbole). Eine Messung erfolgte jeweils in 50mV Schritten von 700mV aus abwärts und dauerte ca. 100 Sekunden. Alle 4 Minuten wurden neue Messwerte bestimmt, insgesamt 80 Minuten dauerte die komplette Messreihe. Die Frequenz betrug 10Hz, die Amplitude 5mV.

Wie im Diskussionsteil deutlich wird, tragen die Ergebnisse aus Abb. 4.21 wesentlich zum Verständnis des Adsorptionsvorganges von HRP an Au(111) bei. Abb. 4.21 bildet den Abschluss des Ergebnisteils; es folgt in analoger Gliederung zum Ergebniskapitel das Diskussionskapitel, in dem die gemessenen Daten inhaltlich ausgewertet werden.



## 5. Diskussion der Ergebnisse

### 5.1 Nanostrukturierung von Thioloberflächen

#### 5.1.1 Diskussion der Resultate und deren Reproduzierbarkeit

Einige Experimente zur spitzeninduzierten Clustererzeugung auf thiolbedeckten Oberflächen lieferten nicht zufriedenstellende Ergebnisse. Bei den Unzulänglichkeiten handelte es sich vorwiegend um unerwünschte Clusterformen, unerwünschte Clustergrößen oder ein nicht-stetiger Zusammenhang zwischen dem angelegten Spannungspuls am z-Piezo und der Clustergröße. Dargestellt sind beispielhaft derartige unerwünschte, nicht-reproduzierbare, Ergebnisse in Abb. 5.1.

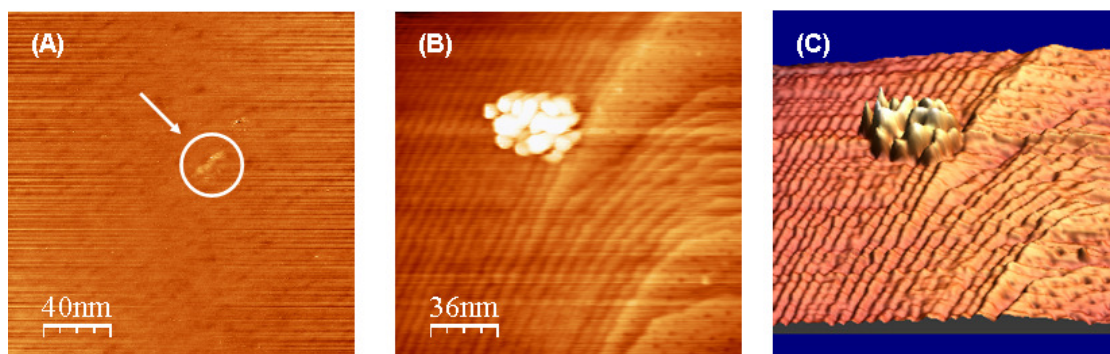


Abb. 5.1: Spitzeninduzierte Pd-Cluster, erzeugt durch 2ms Spannungspulse auf passiviertem Au(111). A: Au(111)/C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>OS, 200nm \* 200nm, z-Höhenskala: 0,8nm, U<sub>WE</sub>: 400mV, U<sub>Spitze</sub>: 450mV, Setpoint: 1nA, in 0,1M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N<sub>2</sub> gespült, 4V Puls, Cluster: Ø = 10 – 20nm, Höhe = 0,5nm. B: Au(111)/C<sub>11</sub>H<sub>24</sub>OS, 180nm \* 180nm, z-Höhenskala: 5,7nm, U<sub>WE</sub>: 400mV, U<sub>Spitze</sub>: 450mV, Setpoint: 1nA, in 0,1M K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, N<sub>2</sub> gespült, 6V Puls, Cluster: Ø = 35 – 45nm, Höhe = 4 – 5nm. C: 3D-Darstellung von B.

Nachfolgend werden die aus den Experimenten erhaltenen Erkenntnisse sowie aus theoretischen Überlegungen gefolgerte Einflüsse auf die Reproduzierbarkeit diskutiert.

#### Beladung der STM-Spitze mit Palladium

Wie schon in Kapitel 4.1.1 erwähnt, können zwar Konzentration der Palladiumlösung, Abscheidopotential und -zeit genau festgelegt werden. Jedoch ist man bei der Geometrie und bei der Größe der freien Fläche der STM-Spitze einer statistischen Schwankung ausgesetzt. In ungünstigen Fällen kann es zu einer Fehlbeladung kommen, wenn z.B. zu wenig Palladium an der äußersten Spitze abgeschieden wird oder wenn Mehrfachspitzen entstehen. Diese Fehlbeladung äußert sich bei der Clustererzeugung in nicht-definierten

Clustern, wie sie z.B. in Abb. 5.1 dargestellt sind. Andererseits hat eine gelungene (reproduzierbare) Palladiumbeladung zu definierter Clusterbildung geführt, bei der wie in Abb. 4.1 gezeigt mit verschiedenen Pulsen mehrere Cluster gezielt an determinierten Orten erzeugt werden konnten.

### Setpoint und Bias

Da der Spannungspuls direkt zur z-Piezospannung dazuaddiert wird, ist die Auslenkung der Spitze Richtung Oberfläche zunächst unabhängig von Setpoint und Bias. Durch Setpoint und Bias wird im Constant Current Mode die Entfernung der Spitze zur Oberfläche geändert und damit haben die beiden Größen einen Einfluß darauf, bei welcher Auslenkung der Spitze von der Tunnelhöhe ausgehend diese mit der Oberfläche in Kontakt kommt. Nach (3.9) ist der Tunnelstrom  $I_T$  direkt proportional zum Bias  $U_T$ , der Tunnelabstand  $d$  ist hingegen im Exponenten. Dementsprechend führen große Änderungen des Biaswertes nur zu kleinen Änderungen in  $d$ . Eine quantitativ genaue Korrelation zwischen dem Tunnelstrom  $I_T$  und der Spitzenhöhe  $z_{\text{Spitze}}$  ( $z_{\text{Spitze}} = 0$  ist die Oberfläche) wurde von M. Hugelmann für einen analog kalibrierten STM-Scanner experimentell bestimmt [77]. Folgende Beziehung leitet sich für  $z_{\text{Spitze}} > 0$  aus seinen Ergebnissen ab:

$$\log I_T = -6 \cdot z_{\text{Spitze}} + 3, \quad (5.1)$$

wobei  $U_T = 100\text{mV}$  für kleine Ströme ( $I_T$  im pA/nA-Bereich) eingestellt war.  $I_T$  wird in (5.1) in nA und  $z_{\text{Spitze}}$  in nm angegeben. Ausgehend von beispielsweise 1nA führt eine Halbierung/Verdoppelung des Tunnelstromes nach (5.1) zu einer Änderung der Spitzenauslenkung  $\Delta z_{\text{Spitze}} = 0,05\text{nm}$ , was sich nach den Studien von J. Meier [4] nicht messbar bei der Clustererzeugung auf die Clustergröße auswirkt. Aus den Betrachtungen zu den Gleichungen (3.9) und (5.1) folgt, dass eine Änderung des Biaswertes und/oder des Setpointes um mindestens eine Größenordnung erfolgen muss, um mit der damit einhergehenden Änderung der Spitzenhöhe die Größe spitzeninduzierter Cluster bei konstanten Spannungspulsen wesentlich zu ändern. Bei der Untersuchung der Clustergröße in Abhängigkeit des Spannungspulses wurden in einem Experiment Bias und Setpoint immer konstant gehalten und um die Vergleichbarkeit verschiedener Experimente zu gewährleisten, lagen die Biaswerte stets zwischen 50mV und 100mV und die Setpointwerte zwischen 0,5nA und 1,0nA.

### Dauer und Höhe des Spannungspulses

Spannungspulsdauern unterhalb 2ms führten zu nicht-reproduzierbaren Clusterbildungen, oberhalb von 2ms wurde kein Einfluss auf die Clustergröße festgestellt [4], daher wurde für

die Länge des zum z-Piezo addierten Spannungspulses 2ms gewählt. Die Höhe des Spannungspulses, sofern die Spitze geometrisch spitz-zulaufend mit Palladium beladen war, hing in diesem Fall linear von der Höhe des Spannungspulses ab (siehe Abb. 4.2). Dieses Verhalten wurde ab einer Mindestspannung  $U_{\text{Puls,min}}$  beobachtet, unterhalb dieser bei festem Bias und Setpoint von der Thiollänge abhängigen Mindestspannung wurde kein Cluster erzeugt.

Wichtig bei der Betrachtung der Höhe des Spannungspulses ist der Integral Gain (I-Gain), der die Empfindlichkeit der Regelung der z-Position der STM-Spitze regelt. Ein nennenswerter Einfluss auf die Regelung durch den Proportional Gain (P-Gain) konnte nicht beobachtet werden. Beim STM-Scannen im Constant Current Mode muss ein I-Gain  $> 0$  eingestellt werden, der von der Rauigkeit der Oberfläche, von der Tunnelgeschwindigkeit und vom Tunnelabstand abhängt. Wegen der Regelung wurde der z-Piezo und damit auch die STM-Spitze durch den angelegten Puls nicht entsprechend des kalibrierten Wertes von 5,1nm/V ausgelenkt, sondern um eine Länge  $\Delta z_{\text{Spitze}}$ , die abhängig vom I-Gain-Wert deutlich unterhalb dieses Wertes lag. Eine Überlagerung der Auslenkung durch den Spannungspuls in Richtung der Oberfläche und die durch die Regelung erzwungene Auslenkung in entgegengesetzter Richtung lässt vor allem bei hohen Spannungspulsunterschieden ( $> 2\text{V}$ ) auf eine nicht-lineare Abhängigkeit schließen. Im Rahmen kleiner Spannungspulsunterschiede (1 – 2V), wie sie in Abb. 4.2 zu sehen sind, ist annäherungsweise eine lineare Korrelation zwischen dem Spannungspuls und der Clustergröße zu erkennen. Der annäherungsweise lineare Zusammenhang zwischen der Spitzenauslenkung und der Clustergröße auf thiolfreiem Au(111) ist bestätigt worden [4].

Bei den durchgeführten Experimenten zur Pd-Clustererzeugung konnte der I-Gain-Wert in NanoScope IIIa Version 6.13r1 stets auf 0,8 eingestellt werden. Beim Vergleich verschiedener STM-Systeme (Hardware + Software) zeigte sich, dass die Gains unterschiedlich normiert sein können, so dass die angegebenen Werte für die I-Gains nur auf ein definiertes System zu beziehen sind. Daher sind die absoluten Spannungspulswerte in Abb. 4.2 mit dem I-Gain 0,8 nur auf das in dieser Arbeit verwendete STM-System zu beziehen. Demgegenüber sind die qualitativen und relativen Ergebnisse aus Abb. 4.1 und Abb. 4.2 sowie die Erläuterungen zu diesen Resultaten unabhängig vom verwendeten spezifischen System und damit prinzipiell reproduzierbar.

### Thiollänge

Untersuchungen von Au(111)-Oberflächen mit Thiol-SAMs unterschiedlicher Längen mit dem STM sind in zahlreichen Publikationen dokumentiert [56,105]. Es wurden dabei atomar aufgelöste Bilder der passivierten Oberflächen aufgenommen, woraus sich schließen lässt,

dass sich die STM-Spitze bei den untersuchten Thiolen ( $N \leq 18$ , -H, -OH und -OOH Terminierungen) im Constant Current Mode oberhalb der SAM befindet und die Elektronen durch die Thiolmoleküle durchtunneln.

Folglich steigt mit länger werdenden Alkanthiol-SAMs der Abstand  $d$  der STM-Spitze zur Probenoberfläche. Veranschaulicht ist dieser Sachverhalt in Abb. 5.2, wo  $d(C) > d(B) > d(A)$ . Die Höhe  $H_{SAM}$  (in Å) einer Alkanthiol-SAM auf polykristallinem Gold wurde experimentell bestimmt [106]. Sie hängt von der Zahl der Methylmoleküle  $N$  in folgender Weise ab:

$$H_{SAM} = 5 + 1,08 \cdot (N - 2). \quad (5.2)$$

Betrachtet man die Höhe der STM-Spitze über einer Au(111)-Oberfläche, so ergibt sich nach (5.1) für einen üblichen Tunnelstrom  $I_T = 1\text{ nA}$  der Wert  $z_{\text{Spitze}} = 0,5\text{ nm}$ . Unter der Annahme, dass die STM-Spitze oberhalb einer Thiol-SAM tunnelt, ergeben sich nach (5.2) schon bei kurzen Thiol SAMs ( $N \leq 6$ )  $z_{\text{Spitze}}$ -Werte, die deutlich über  $0,5\text{ nm}$  liegen. Man kann jedoch nicht in Gegenwart einer Thiol-SAM den Wert  $z_{\text{Spitze}}$  zu  $H_{SAM}$  dazuaddieren, um den Abstand zur Au(111)-Oberfläche  $d$  zu bestimmen. Die Tunneleigenschaften einer Thiol-SAM gleichen nicht denen einer Au(111)-Oberfläche, insbesondere ist die mittlere Barrierenhöhe  $\phi_T(\text{Au}(111)+\text{Thiol-SAM}) \neq \phi_T(\text{Au}(111))$ . Eine quantitative Korrelation der Thiollänge, der Thiolart (aliphatisch, aromatisch, disulfid etc.) und der funktionellen Terminierung mit der Höhe der STM-Spitze beim Tunneln durch die entsprechende SAM auf Au(111) ist nach bestem Wissen bisher nicht publiziert worden. In den in dieser Arbeit durchgeführten Experimenten wurde jedenfalls festgestellt, dass bei längeren Thiol-SAMs (z.B.  $N = 6$ , siehe dazu auch Abb. 4.2) im Vergleich zu kürzeren (z.B.  $N = 2$ ) deutlich höhere Spannungspulse bei sonst gleichen Parametern erforderlich waren, um Pd-Cluster vergleichbarer Größe zu erzeugen. Diese Beobachtungen sind konsistent mit den oben diskutierten theoretischen Überlegungen basierend auf Abb. 5.2.

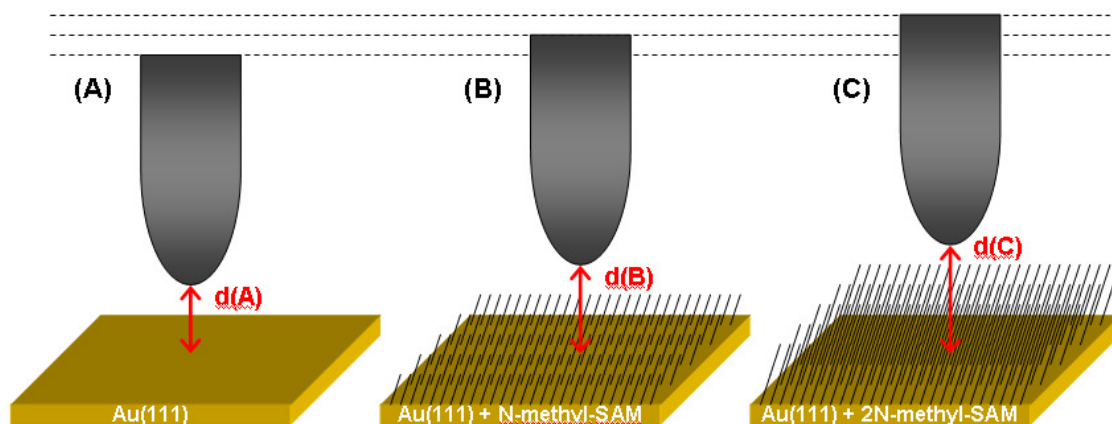


Abb. 5.2: Einfluss von Thiol-SAMs auf die Entfernung der STM-Spitze zur Au(111)-Elektrodenoberfläche. A: unpassiviertes Au(111). B: Au(111) mit einer N-methyl-Thiol SAM. C: Au(111) mit einer Thiol SAM doppelter Länge der N-methyl-Thiol SAM. In A-C werden Bias und Setpoint als konstant angenommen. Scanmodus: Constant Current Mode.

## 5.1.2 Bewertung der Methode und Verbesserungsmöglichkeiten

Hervorzuheben bei der spitzeninduzierten mechanischen Nanoclustererzeugung auf passivierten Au(111)-Oberflächen ist, dass bei hinreichend großen Pulsen die STM-Spitze durch die SAM mit der darunterliegenden Au(111)-Oberfläche in Kontakt kommt und der Cluster dadurch direkt auf der Goldoberfläche liegt und von der Thiol-SAM um den Cluster herum umgeben ist. Andere Methoden der Erzeugung von Pd-Nanoclustern auf passivierten Au(111)-Oberflächen, meist durch Reduktion adsorbierter Pd-Ionen, führten zu Nanoclustern auf der SAM liegend [107,108,109] und/oder zu sogenannten Mushroom-Gebilden, bei denen die Nanocluster wie Pilze durch die Thiol-SAM hindurch Kontakt zur Oberfläche haben [110]. Letzteres war jedoch ein statistischer Prozess, d.h. die Ausbildung der Mushroom-Strukturen konnte nicht determiniert erfolgen. All diesen Methoden ist die vorgestellte Methode durch folgende Punkte überlegen:

- Es können lokal an determinierten Stellen ein oder mehrere Cluster erzeugt werden.
- Der Cluster ist in direktem Kontakt mit der Au(111)-Oberfläche und ist von der Thiol-SAM umgeben.
- Unmittelbar nach der Erzeugung kann der Cluster mit der STM-Spitze elektrochemisch untersucht werden bzw. für weitere Versuche (z.B. Adsorption von Enzymen) genutzt werden.

Bedenkt man zusätzlich, dass die Clustergröße prinzipiell im Nanometerbereich variiert werden kann und schon Clusterhöhen mit nur wenigen Pd-Atomlagen erzeugt werden können (Abb. 4.2, Gitterabstand  $d_{Pd(111)} = 0,225\text{nm}$  [111]), ist die hier vorgestellte Methode der Nanostrukturierung von Thioloberflächen zweifellos sehr interessant für weitergehende Forschungen im Nanobereich und zudem zielführend für die in Kapitel 1.2 diskutierten langfristigen Forschungsziele mit Enzymen.

Eine Empfehlung für die in 4.1 untersuchte Methode kann jedoch nur bei hoher Reproduzierbarkeit erfolgen. Die spitzeninduzierte Erzeugung von Pd-Clustern auf thiolfreiem Gold war mit großen Fehlerbalken behaftet [4] und die zusätzliche Benutzung von Thiol-SAMs erhöht die Zahl der Freiheitsgrade und damit auch mögliche Fehlerquellen. Aus der Zusammenarbeit mit J. Meier und den Erkenntnissen der in Kapitel 4.1.1 und 5.1.1 vorgestellten und diskutierten Experimente konnten Punkte identifiziert werden, die die Reproduzierbarkeit deutlich erhöhen können. Im Einzelnen sind dies:

- Das Ätzen und Isolieren von STM-Spitzen sollte dahingehend weiterentwickelt werden, dass die freie Spitzenfläche und die geometrische Form weniger statistischen Schwankungen unterliegen.
- Unmittelbar vor der Clustererzeugung sollten die Gains auf null, allerdings sofort nach der Clustererzeugung auf die ursprünglichen Werte gesetzt werden. Für die genaue Bestimmung der Auslenkung bei abgeschalteten Gains sollte die absolute z-Position über der Oberfläche bekannt sein.
- Durch den Einsatz eines umschaltbaren STM-Vorverstärkers, um Ströme vom pA bis  $\mu$ A Bereich zu messen, könnte die Annäherung der STM-Spitze durch die Thiol-SAM bis zum jump-to-contact genauer erfolgen.
- Eine detaillierte Untersuchung der Korrelation zwischen Thiol-SAM und STM-Spitzenhöhe würde das theoretische Verständnis vertiefen.

Weiterhin ist von wissenschaftlichem Interesse, ob und inwieweit die in der Thiol-SAM erzeugten Cluster durch Oberflächendiffusion von den Thiolmolekülen selbst passiviert werden. Dies würde zu einem tieferen Verständnis von Enzym-Nanocluster-Bindungen beitragen.

## 5.2 Rastertunnelmikroskopie von Enzymen auf Elektrodenoberflächen

### 5.2.1 Diskussion der Abbildung von Enzymen mit dem Rastertunnelmikroskop

Aus den durchgeführten Experimenten ist hervorgegangen, dass die Art der Bindung der Enzyme an die Elektrodenoberfläche wesentlich die Qualität der mit dem STM erhaltenen Bilder beeinflusst. Das in Abb. 5.3 gezeigte Modell der Immobilisierung der GOD an einer oxidierten HOPG-Oberfläche entstand nach STM-Charakterisierungen verschiedener Enzyme auf oxidiertem HOPG [15,98].

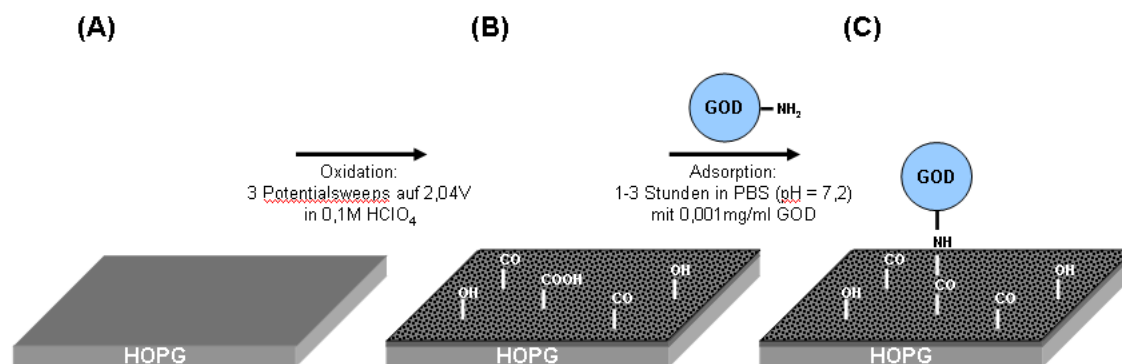


Abb. 5.3: Mechanismus der Adsorption von GOD an die oxidierte HOPG-Oberfläche [15].

An die Oxidgruppen der Oberfläche (Abb. 5.3 B und C) können die Aminogruppen der GOD gut binden, so dass die GOD kovalent an der Oberfläche immobilisiert sind. Wie die in Kapitel 4.2.1 beschriebenen Messungen bestätigen, handelt es sich um eine Bindung, die ein Scannen der Enzyme mit der in Abb. 4.4 gezeigten Auflösung ermöglicht. Gleichzeitig ist die kaum zu vermeidende Wechselwirkung bei Enzymen mit entsprechender Bindung zur Oberfläche zwischen Spitze und Enzym weder destruktiv, noch führt sie zu Verschiebungen der Enzyme; andernfalls wäre die mehrfache Abbildung einzelner Enzyme nicht möglich gewesen. Demgegenüber ist beim Scannen von HRP auf Au(111) eine deutlich niedrigere Reproduzierbarkeit gegeben. Bei den zahlreichen in Kapitel 4.2.2 beschriebenen Experimenten traten oft Schlieren, Verzerrungen und undefinierbare Strukturen auf, die statistisch verteilt auftraten und mit höherer HRP-Konzentration im Mittel zunahm. Abb. 4.7 zeigt dabei die Resultate eines Experiments mit den typischen Störeffekten. Die STM-Abbildungsexperimente mit Au(111)/HRP sind ein Hinweis darauf, dass die HRP schwach an der Au(111)-Oberfläche gebunden sind. In Folge der schwachen Bindung der HRP an Au(111), gekennzeichnet mit Pfeilen in Abb. 5.4, kommt es zu stärkeren Wechselwirkungen zwischen der Spitze und dem HRP. Die beobachteten „Störeffekte“ in den STM-Bildern sind

vermutlich auf Verschiebungen der HRP's und/oder Adsorption von HRP an der Spitze selbst zurückzuführen.

Untersuchungen zur Bindung zwischen HRP oder vergleichbaren Enzymen auf unpassivierter Au(111)-Oberfläche sind bislang nicht publiziert worden; detaillierte Studien diesbezüglich stehen noch aus. Aus den vorliegenden Experimenten kann jedenfalls gefolgert werden, dass eine Adsorption vorliegt, da sonst Bilder wie in Abb. 4.7 nicht

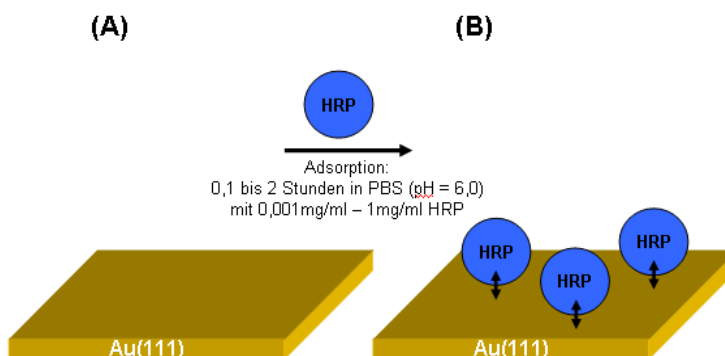


Abb. 5.4: Modell der Adsorption der HRP auf Au(111).

aufgenommen werden könnten. Adsorbierten die HRP nicht an der Oberfläche, würden sie nach der Voradsorption und anschließender Spülung nicht mehr auf der Oberfläche identifiziert werden könnten.

Aus den Experimenten der GOD auf HOPG und HRP auf Au(111) ging hervor, dass weder der eingestellte Setpoint, noch der Bias maßgeblichen Einfluss auf die Qualität der abgebildeten Enzyme hatte. Wie schon in Kapitel 3.3.2 und 4.2.2 diskutiert, ändert sich der Spitzen-Proben-Abstand relativ zu den Enzymdimensionen nur unwesentlich, so dass ein wechselwirkungsfreies Scannen großer Enzyme zum derzeitigen Stand der Technik unmöglich ist. Entscheidend für die Qualität der Bilder ist die Art der Bindung des Enzyms an die Oberfläche sowie die Zahl der adsorbierten Lagen. Generell konnten einzelne Enzyme oder Monolagen besser abgebildet werden als Agglomerate bzw. Multilagen. Dieses ist damit zu begründen, dass Enzyme nicht-metallische Leiteigenschaften haben, die das Tunneln nur über bestimmte Zwischenzustände ermöglichen (siehe Kapitel 3.3.2). Folglich ist zu erwarten, dass das Tunneln durch Multilagen, die in z-Richtung  $\gg 10\text{nm}$  hoch sein können, erschwert bis unmöglich ist. Die Zahl der adsorbierten Enzyme stieg bei den GODs und HRP's mit steigender Enzymkonzentration und Zeit. Eine genaue Quantifizierung wurde für die STM-Experimente nicht vorgenommen, da das für die Untersuchungen der GOD auf HOPG nicht Ziel der Studien war. Bei den Versuchen der HRP auf Au(111) wäre aufgrund der großen Fehlerbalken der Mengenbestimmung eine unverhältnismäßig große Zahl an Messungen durchgeführt werden müssen, um aussagekräftige Daten zu bekommen. Festzuhalten ist beim Au(111), dass bei Konzentrationen im Bereich von  $0,001\text{mg/ml}$  erst nach Stunden großflächig Agglomerate mit dem STM zu beobachten waren, bei  $0,1\text{mg/ml}$



schon nach wenigen Minuten. Au(111)/Pd zeigte ähnliche Eigenschaften als Adsorptionsoberfläche wie Au(111), aber auch hier wurde keine genaue Quantifizierung vorgenommen.

Ein ganz wichtiger Parameter beim Scannen von Enzymen ist das Potential der Probenoberfläche. Abb. 4.5 zeigt, dass die scheinbare Höhe der auf HOPG adsorbierten GOD vom Probenpotential abhängt. Quantifiziert und zusammengefasst ist diese

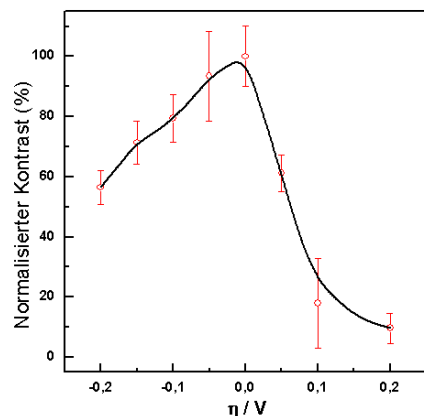


Abb. 5.5: Normalisierter Kontrast zwischen GOD und HOPG abhängig vom Überpotential relativ zu  $U_{GOD}$  [96].

Abhängigkeit in Abb. 5.5 dargestellt. Ulstrup et al. haben bei der Charakterisierung von Azurin auf Au(111)/Octanthiol-SAM mit dem STM eine vergleichbare Kurve des normalisierten Kontrastes gemessen [14]. Sie haben das Verhalten mit ihrem Tunnelmodell (Abb. 3.14) erfolgreich simuliert. Der Hauptunterschied zwischen Abb. 5.5 und dem Graphen der Messung an Azurin ist, dass die Asymmetrie spiegelverkehrt zueinander sind, d.h. beim Graph von Ulstrup et al. sind höhere normalisierte Kontraste bei  $\eta > 0$  zu beobachten. Entsprechend des theoretischen Modells ist dieser Unterschied darauf zurückzuführen, dass die Messung am Azurin bei negativem Bias erfolgte, die Messung am GOD mit positivem Bias. Derartige

Kontrastmessungen, wie in Abb. 4.5 und Abb. 5.5 dargestellt, sind am System HOPG/GOD erstmals publiziert worden [96]. Durch die hohe Übereinstimmung des Verlaufes bei vergleichbaren Versuchsdurchführungen wurde die am Azurin aufgestellte Theorie auch beim auf HOPG adsorbierten GOD im Wesentlichen bestätigt.

## 5.2.2 Erkenntnisse aus den Messungen der Faradayströme mit der STM-Spitze

Auch wenn die von Ulstrup et al. formulierte Theorie die Tunneleigenschaften an Enzymen richtig beschreibt, lässt sie doch elektrochemische Beiträge zum Tunnelstrom außer Acht. Über enzymfreien Oberflächen sind in Pufferelektrolyten die Faradayströme an der Spitze im Doppelschichtpotentialbereich mit  $\pm 5\text{pA}$  (siehe Abb. 4.6, rote Linie) im Vergleich zum Setpoint (in der Regel ist  $I_{\text{soil}} \gg 5\text{pA}$ ) vernachlässigbar. Dies war bei Messungen außerhalb des Tunnelbereiches über GOD auf HOPG nicht der Fall: die blaue Kurve (Dreiecke) in Abb. 4.6 zeigt ausgeprägte Peaks mit einer Amplitude von  $30\text{pA}$ , die auf Faradayströme zurückzuführen sind. Möglicherweise ist die Ursache dieses Stromes die Produktion von

Wasserstoffperoxid durch den Kofaktor FAD aus Restsauerstoff, der in der STM-Zelle trotz Spülung mit Argon vorhanden war. Weitere Versuche müssen mit GOD auf HOPG und eventuell auch mit anderen Enzymen durchgeführt werden, um den Einfluss und die Ursache der Faradayströme weiter aufzuklären.

Basierend auf den vorhandenen Messergebnissen und theoretischen Überlegungen kann folgende Erweiterung des Ulstrup-Modells vorgeschlagen werden. Der gemessene Strom an der Spitze  $I_{mess}$  setzt sich zusammen aus dem Tunnelstrom  $I_T$  und dem Faradaystrom  $I_F$ :

$$I_{mess} = I_T + I_F \quad (5.3)$$

Beim Scannen im Constant Current Mode wird ein eingestellter Setpoint ( $I_{soll}$ ) mit  $I_{mess}$  verglichen. Bei Änderung des Abstandes der Spitze zur Probe oder der Barrierenhöhe  $\phi_T$  weicht  $I_{mess}$  von  $I_{soll}$  ab und die Spitze wird entsprechend in der z-Position verschoben. Diese z-Positionen als Farben aufgetragen über die x-y-Positionen des Scanfensters ergeben das STM-Bild der gescannten Fläche. Aus diesen Überlegungen folgt zwangsläufig, dass ein lokales  $I_F > 0$  zu einer veränderten Topographie im STM-Bild führt. Unter Annahme vernachlässigbarer Faraday-Dunkelströme an der Spitze (ca. 5pA) und einem Tunnelstrom  $I_T$  mit positivem Vorzeichen lässt sich der Einfluss von  $I_F$  auf die scheinbare Höhe H eines leitfähigen Objektes wie folgt zusammenfassen:

$$I_F = 0 \rightarrow I_{mess} = I_T \rightarrow H = H_0 \quad (5.4)$$

$$I_F > 0 \rightarrow I_{mess} > I_T \rightarrow H > H_0 \quad (5.5)$$

$$I_F < 0 \rightarrow I_{mess} < I_T \rightarrow H < H_0 \quad (5.6)$$

$H_0$  ist als Referenzhöhe dieses Objektes zu betrachten, wenn der Faradaystrom null ist. Ist  $I_F \ll I_T$ , gilt in guter Näherung (5.4) und Abb. 4.5 bzw. Abb. 5.5 werden durch das Ulstrup-Modell hinreichend gut erklärt. In den hier vorgestellten Messungen war  $I_F < 20\text{pA}$  und  $I_T = 500\text{pA}$ , wodurch der Einfluss von  $I_F$  auf H gering ausfiel. Andere Rahmenbedingungen (Adsorptionsoberfläche, Scangeschwindigkeit, Gains etc.) können jedoch einen deutlich kleineren Setpoint (z.B.  $I_{soll} = 30\text{pA}$ ) beim Scannen von Enzymen erfordern und in diesem Fall können lokale Faradayströme, sofern sie in dem jeweiligen Experiment auftreten,  $I_{mess}$  erheblich gegenüber  $I_T$  modifizieren. Die Messergebnisse vom STM-Scannen der GOD auf HOPG sowie die weitergehenden theoretischen Überlegungen führen prinzipiell zu dem Schluss, dass beim STM-Scannen von Enzymen mit kleinem Setpoint  $I_F$  an den Enzymen bestimmt werden muss, um in die Auswertung potentialabhängiger Höhen einbezogen zu werden.

## 5.3 Aktivitäts- und Adsorptionsuntersuchungen der an Au(111) immobilisierten Horseradish Peroxidase

### 5.3.1 Diskussion des Einflusses des Elektrolyten auf die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Reaktion an der Au(111)-Oberfläche

Aus dem Vergleich der CVs von PBS ohne H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Abb. 3.4 B) und PBS mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Abb. 4.9) geht unmittelbar hervor, dass H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> mit der Elektrode reagiert. Drei Arten der chemischen Umsetzung von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> an Au(111) sind möglich:

#### 1. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zerfall

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Moleküle haben die Eigenschaft, katalysiert durch zahlreiche Metallionen und an vor allem metallischen Oberflächen nach



zu disproportionieren [93,112]. Bei der Reaktion (5.7) findet netto kein Elektrontransfer mit anderen Atomen oder Molekülen der Umgebung statt, so dass z.B. beim Zerfall des H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> an einer Elektrodenoberfläche kein Strom gemessen werden kann. Der Zerfall würde also nicht direkt gemessen werden, jedoch führt eine lokale Abnahme der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentration durch Zerfall zu einem nicht-definierten System und ist daher bei Experimenten mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in der Regel unerwünscht. In verdünnt schwefelsauerer Lösungen sind Pt, Ir und Pd katalytisch aktiv [112], Au ist dagegen katalytisch inaktiv. In salzsauren Lösungen ist keins der vier Metalle katalytisch aktiv. Untersuchungen des Zerfalls von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> an Metalloberflächen in PBS mit pH = 6,0 sind nicht veröffentlicht. Doch ein Vergleich der Eigenschaften von SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> und Hydrogenphosphationen führt zu der begründeten Annahme, dass Au in PBS mit pH = 6,0 nicht den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zerfall katalysiert. Analoge Überlegungen beim Pd lassen den Schluss zu, dass Pd in PBS mit pH = 6,0 den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zerfall katalysiert.

#### 2. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Reduktion

Als starkes Oxidationsmittel hat H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in seiner Reduktionsreaktion (5.8) ein entsprechend hohes Standardpotential (5.9) [94].



$$U_{H_2O/H_2O_2}^\theta = 1,763V \text{ vs. } NHE. \quad (5.9)$$

Setzt man die in den Experimenten dieser Arbeit üblichen Konzentrationen ( $[H_2O_2] = 5 \cdot 10^{-5}M$ ,  $[H^+] = 10^{-6}M$ ) in die Nernstgleichung für die Reaktion (5.8) ein, ergibt sich ein Potential von

$$U_{0,H_2O/H_2O_2}^* = 1,25V \text{ vs. } NHE. \quad (5.10)$$

An Goldoberflächen hat die Reduktionsreaktion von  $H_2O_2$  ein sehr hohes Überpotential [20,113,114]. Unter den in Abb. 4.9 beschriebenen Bedingungen beträgt es knapp 1V, die Reduktion setzt bei niedriger werdenden Potentialen erst unter 0,3V ein. Dabei liegen die Beträge der Stromdichten im Bereich 0V bis 0,3V deutlich unter den Stromdichten der  $H_2O_2$ -Oxidation im Bereich von 0,6V bis 1,0V. Wichtig ist festzuhalten, dass die  $H_2O_2$ -Reduktion an der Au(111)-Oberfläche im rot schraffierten Potentialbereich (0,5V bis 0,7V) nicht auftritt. Da die Experimente zur Untersuchung der HRP nahezu ausschliesslich in diesem Potentialbereich durchgeführt wurden, muss die direkte Reduktion von  $H_2O_2$  an der Au(111)-Oberfläche nicht weiter betrachtet werden.

### 3. $H_2O_2$ -Oxidation

Oxidiert wird  $H_2O_2$  in wässriger Lösung wie in (5.11) angegeben. Das Standardpotential ist in (5.12) angegeben [94].



$$U_{H_2O_2/O_2}^\theta = 0,695V \text{ vs. } NHE \quad (5.12)$$

Mit den in den Experimenten benutzten Werten ( $[H_2O_2] = 5 \cdot 10^{-5}M$ ,  $[H^+] = 10^{-6}M$ ,  $pO_2 \approx 10^{-4}bar$ ) ergibt sich ein Potential von

$$U_{0,H_2O_2/O_2}^* = 0,35V \text{ vs. } NHE. \quad (5.13)$$

Das Überpotential der  $H_2O_2$ -Oxidation ( $\eta_{H_2O_2-Ox}$ ) liegt nach Abb. 4.9 und Abb. 4.12 bezogen auf 0,35V bei ca. 0,15V in PBS (pH = 6,0). In Übereinstimmung mit publizierten Untersuchungen [113,114,115] wurde festgestellt, dass  $\eta_{H_2O_2-Ox}$  bei konstant gehaltenen  $[H_2O_2]$ ,  $pO_2$ ,  $[H^+]$  – Werten unter anderem stark vom Zustand der Metalloberfläche (z.B. Kristallorientierung, Verschmutzung) abhängt. Manche Gruppen stellen die Reproduzierbarkeit des  $H_2O_2$ -Reduktions- und Oxidationsverhaltens generell als schwierig dar [115,116]. Eigene Experimente bestätigen das. Um zuverlässige Ergebnisse zu erhalten, wurde einerseits nach einem exakt festgelegten Plan experimentiert. D.h. das Reinigen der Goldelektrode, das Flammpatern, das Abkühlen usw. erfolgte in jedem Experiment sehr genauen Vorgaben. Andererseits wurden Experimente zur Messung von  $H_2O_2$ -Strömen

mehrmals durchgeführt und Mittelwerte von Daten mit Abweichungen von höchstens 20% des Mittelwertes wurden gebildet.

Zusammenfassend aus den obigen Erläuterungen kann festgehalten werden, dass von den aufgeführten möglichen direkten Reaktionen des  $H_2O_2$  an Au(111) lediglich die  $H_2O_2$ -Oxidation für den Potentialbereich  $0,5V \leq U_{WE} \leq 0,7V$  relevant ist. Demnach wird in den folgenden Ausführungen sowie in den folgenden Kapiteln im Zusammenhang einer  $H_2O_2$ -Reaktion an der Oberfläche von einer möglichen Oxidationsreaktion nach (5.11) ausgegangen.

Ein wichtiger Punkt der Einflüsse auf das Oxidationsverhalten von  $H_2O_2$  auf Au(111) ist der Elektrolyt. In PBS, PBS + 0,2M  $NaClO_4$  und  $NaClO_4$  zeigt die  $H_2O_2$ -Oxidation an Au(111) (Abb. 4.11) qualitativ einen ähnlichen Verlauf, aber mit deutlichen Unterschieden in  $\eta_{H_2O_2-Ox}$ . Auch die Lage der Peaks der Aufhebung der Rekonstruktion bei gleichzeitiger Adsorption von Hydrogenphosphationen (zwischen 0,4V und 0,5V in Abb. 4.11) hängt von der Wahl des Elektrolyten ab (siehe dazu Erläuterungen zu Abb. 3.4 B). Die Verschiebung des Rekonstruktions-/Adsorptionspeaks wurde nicht weiter untersucht und wird im Folgenden nicht weiter betrachtet. Aus Abb. 4.11 und vor allem aus Abb. 4.12 ist als wichtige Erkenntnis festzuhalten, dass  $NaCl$  im Potentialbereich  $0,5V \leq U_{WE} \leq 0,7V$  in PBS die  $H_2O_2$ -Oxidation nahezu vollständig inhibiert. In jedem Fall sind die Oxidationsströme bzw.  $\eta_{H_2O_2-Ox}$  abhängig vom eingesetzten Elektrolyten.

Gründe für den Einfluss der Elektrolyte auf die  $H_2O_2$ -Oxidation sind in den Eigenschaften der Anionen und in der Ionenstärke zu suchen. Um den Einfluss der Anionen zu untersuchen, muss der Mechanismus der  $H_2O_2$ -Oxidation an Metalloberflächen betrachtet werden. Unterschiedliche publizierte Ansätze [117,118,119] lassen vermuten, dass der genaue Mechanismus noch nicht vollständig aufgeklärt ist. Jedoch basieren alle Ansätze auf Reaktionen mit Sauerstoffgruppen auf der Oberfläche, z.B. über adsorbierte  $OH^-$ -Gruppen [116] oder über die Reaktion von  $H_2O_2$  mit Au-O-Verbindungen [119]. Wenn  $Cl^-$ -Ionen Komplexe mit den Oberflächenatomen bilden [112], ist die Bildung von Sauerstoffgruppen an der Oberfläche inhibiert und das kann ein hohes  $\eta_{H_2O_2-Ox}$  (siehe schwarze Karos in Abb. 4.12) im PBS +  $NaCl$ -Elektrolyten erklären. Im  $NaClO_4$ -Elektrolyten befindet sich kein Puffer. Das bedeutet, dass nach (5.11) Protonen an der Oberfläche erzeugt werden und der pH-Wert mit der Zeit lokal und langfristig im gesamten Elektrolyten unter 6,0 sinkt. Betrachtet man die Nernstgleichung zu (5.11)

$$U_{0,H_2O_2/O_2} = U_{H_2O_2/O_2}^\theta + \frac{0,059}{n} \lg \frac{[H^+]^2 pO_2}{[H_2O_2]}, \quad (5.14)$$

dann ist erkennbar, dass mit höherer Protonenkonzentration  $[H^+]$  bei konstantem  $pO_2$  und annähernd konstanter  $[H_2O_2]$  das Gleichgewichtspotential  $U_{H_2O_2/O_2}$  größer wird und damit die  $H_2O_2$ -Oxidation bei höheren Potentialen einsetzt. Daraus folgt in Übereinstimmung mit den Messdaten, dass die Stromdichten der  $H_2O_2$ -Oxidation im  $NaClO_4$ -Elektrolyten (grüne Dreiecke in Abb. 4.12) unter den Stromdichten der  $H_2O_2$ -Oxidation im PBS-Elektrolyten (kleine rote Quadrate in Abb. 4.12) liegen.

Schwieriger zu verstehen ist der experimentelle Befund, dass die Stromdichten der  $H_2O_2$ -Oxidation an Au(111) in PBS +  $NaClO_4$  (blaue Kreise in Abb. 4.12) zwischen 500mV und 700mV höher sind als die entsprechenden Stromdichten in PBS (kleine rote Quadrate in Abb. 4.12). Beide Lösungen haben die gleiche Pufferkonzentration und den gleichen pH-Wert, unterscheiden sich jedoch deutlich in ihren Ionenstärken. Nach (3.15) hat der PBS-Elektrolyt die Ionenstärke  $I_{PBS,pH=6,0} = 0,032$  und der PBS +  $NaClO_4$ -Elektrolyt die Ionenstärke  $I_{PBS,NaClO_4,pH=6,0} = 0,232$ . Damit lässt sich mit (5.15) [120]

$$\beta_{diff} = \sqrt{\frac{\epsilon_r \epsilon_0 kT}{2N_A e^2 I_{Elektrolyt}}} \quad (5.15)$$

die Dicke  $\beta_{diff}$  der diffusen Doppelschicht berechnen.  $\epsilon_r$  ist die materialabhängige Dielektrizitätskonstante ( $\epsilon_r = 80$  für Wasser),  $\epsilon_0$  ist die Dielektrizitätskonstante des Vakuums ( $\epsilon_0 = 8,854 \cdot 10^{-12} C^2/(N^2m^2)$ ),  $k$  ist die Boltzmann-Konstante ( $k = 1,38 \cdot 10^{-23} J/K$ ),  $N_A$  ist die Avogadro-Konstante,  $e$  die Elementarladung ( $e = 1,602 \cdot 10^{-19} C$ ),  $I_{Elektrolyt}$  ist die Ionenladung des Elektrolyten (siehe (3.15)). Aus (5.15) erhält man:

$$\beta_{diff} (PBS) = 54nm \quad (5.16)$$

$$\beta_{diff} (PBS + 0,2M NaClO_4) = 20nm. \quad (5.17)$$

Dementsprechend fällt das angelegte Potential an der Elektrodenoberfläche im PBS +  $NaClO_4$ -Elektrolyten mit steigender Entfernung von der Oberfläche viel stärker ab als im PBS-Elektrolyten. Aufgrund der berechneten signifikanten Unterschiede in den diffusen Doppelschichten der beiden Elektrolyte bei ansonsten gleichen Versuchsbedingungen ist von einer Korrelation zu den genannten Unterschieden im  $H_2O_2$ -Oxidationsverhalten an der Au(111)-Oberfläche auszugehen. Eine detaillierte Erklärung dieser Korrelation würde weitere Experimente erfordern, die nicht Schwerpunkt dieser Arbeit sind.

Abschließend wird betont, dass die Vorgehensweise mit Experimenten in verschiedenen Elektrolyten (siehe Abb. 4.12 und Diskussion in Kapitel 5.3.3) einen neuen Zugang zum Verständnis der Einflüsse auf die katalytische Aktivität von HRP an Au(111) bildet. Bisherige Veröffentlichungen zu HRP-Untersuchungen an Au(111), vor allem von Gorton und Ferapontova [20,23,42,121], basieren auf Experimenten mit ausschließlich PBS + NaCl. Eine Diskussion des Einflusses des Elektrolyten auf die gemessenen Stromdichten von HRP auf Au(111) blieb bisher weitgehend aus.

### 5.3.2 Motivation für die Wahl von Au(111) zur Adsorption von Horseradish Peroxidase

Au(111) war nicht unter Beachtung der Ziele dieser Arbeit von Beginn an die einzige zu berücksichtigende Elektrode für die Immobilisierung der Horseradish Peroxidase. Eine der Leitfragen (Kapitel 1.2) ist: „Inwiefern bleiben ausgewählte Enzyme wie die Horseradish Peroxidase adsorbiert an metallischen Oberflächen katalytisch aktiv?“

Stromdichtemessungen einiger Elektroden (zur Auswahl siehe Kapitel 4.3.2) mit  $\text{H}_2\text{O}_2$  mit und ohne immobilisierten HRP in PBS wurden durchgeführt, um unter Berücksichtigung dieser Frage und den damit verbundenen Anforderungen für eine nachhaltige Charakterisierung des Systems die geeignetste Elektrode auszuwählen (Abb. 4.13).

Auffällig ist zunächst, dass NCD, Au(111)/ $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2\text{S}$  und Au(111)/ $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{S}$  sowohl bezüglich der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Oxidation als auch bezüglich der katalytischen Aktivität adsorbierter HRP bei 600mV fast vollständig inert sind. Dies wurde generell für  $500\text{mV} \leq U_{\text{WE}} \leq 700\text{mV}$  bestätigt. Daraus kann man ableiten, dass entweder keine Adsorption stattgefunden hat oder die Enzyme derart adsorbiert sind, dass kein Elektrontransfer stattfinden kann. HOPG weist bei 600mV eine signifikante  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Oxidationsstromdichte von  $0,5\mu\text{A}/\text{cm}^2$  auf, sowohl in Abwesenheit von HRP als auch nach 10minütigem Eintauchen in einer 0,01mg/ml HRP-Lösung. Es ist davon auszugehen, dass aktive oder inaktive adsorbierte HRP durch Blockierung der Oberfläche den  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Oxidationsstrom herabsetzen müssten. Da kein Unterschied in den Stromdichten (linke/rechte Balken) besteht, hat offenbar keine Adsorption stattgefunden. In der Literatur ist betont, dass die HRP mit ihren hydrophilen Außengruppen kaum an die hydrophobe HOPG-Oberfläche binden kann [15]. Daher hat die Gruppe um E. Wang vor der Adsorption der HRP die HOPG-Oberfläche voroxidiert. Bei Verwendung von NCD oder Thiolsäuren verwendeten die Gruppen von Stutzmann, Li und Gorton zusätzlich EDC [37,38,103], um eine kovalente Bindung zwischen der Oberfläche und den HRP zu ermöglichen. Im Fall der vier Elektrodenoberflächen HOPG, NCD, Au(111)/ $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}_2\text{S}$  und Au(111)/ $\text{C}_{11}\text{H}_{22}\text{O}_2\text{S}$  wurde in Übereinstimmung mit Abb. 4.13 der Zusammenhang

$$\begin{array}{ccc} \text{HRP an HOPG, NCD, Au(111) – Thiolsäuren (schwache / keine Bindung)} & & \\ \downarrow & & (5.18) \\ \text{keine nennenswerte HRP – Aktivität} & & \end{array}$$

bei in Abb. 4.13 aufgeführten Versuchsbedingungen experimentell verifiziert.

Nach den Resultaten in Kapitel 4.2.2 sowie den Erläuterungen dazu in Kapitel 5.2.1 haben die HRP eine nicht-kovalente, vergleichsweise schwache Bindung zur Au(111)- und Au(111)/Pd-Oberfläche. Im Zusammenhang mit Abb. 4.13 ist oben schon aufgeführt, dass man aber daraus keinesfalls eine Schlussfolgerung wie in (5.18) ableiten kann. Aus den experimentellen Daten in Abb. 4.13 und den Daten in Kapitel 4.3.4 lässt sich analog zu (5.18) bezüglich der in Abb. 4.13 aufgeführten Versuchsbedingungen aufstellen:

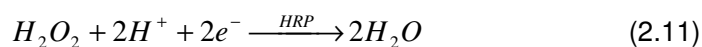
$$\begin{array}{c} \text{HRP an Au(111), Au(111)/3 ML Pd (schwache Bindung)} \\ \downarrow \\ \text{signifikante HRP – Aktivität} \end{array} \quad (5.19)$$

Palladium hat ähnliche chemische Eigenschaften wie Gold. Hat man wenige Monolagen von Palladium auf Gold, hat man zudem eine Gitterkonstante dieser Palladiumlagen, die sehr nah an der des Goldgitters liegt [9]. Damit sind die vergleichbaren gemessenen Stromdichten der HRP an beiden Oberflächen (Abb. 4.13) verständlich. Von weiteren Untersuchungen der HRP an Au(111)/Pd wurde abgesehen, da das System Au(111)/Pd/HRP wesentlich komplexer ist als das Au(111)/HRP-System. Bei der Abscheidung von Palladium auf Au(111) hat man einen zusätzlichen wichtigen Parameter und zudem ist generell an Palladiumoberflächen mit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Zerfall (Kapitel 5.3.1) zu rechnen. Nichtsdestotrotz stellen mit Palladiummonolagen bedeckte Au(111)-Oberflächen mit HRP einen interessanten Untersuchungsschwerpunkt dar, der aufbauend auf den Erkenntnissen des Au(111)/HRP-Systems dieser Arbeit vertieft werden kann. Die vorliegende Arbeit hat sich wegen der genauer definierten Au(111)-Oberfläche als Grundlage für die HRP-Adsorption auf die Untersuchungen mit Au(111)-Elektroden konzentriert. In den folgenden beiden Kapiteln (5.3.3 und 5.3.4) werden die Eigenschaften des Verhaltens von HRP auf Au(111) dargestellt und eingehend diskutiert.

### 5.3.3 Diskussion der katalytischen Aktivität eines stabilen Au(111)/Horseradish Peroxidase-Systems

#### Einführung

HRP hat bei pH = 6,0 ein Redox-Potential von 980mV vs. NHE [26]. Entsprechend Abb. 2.7 kommen prinzipiell für die Untersuchung der katalytischen Aktivität von HRP Potentiale  $U < 980\text{mV}$  in Betracht. Theoretisch direkt unterhalb des Redoxpotentials setzt die katalytische Reduktion von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nach



ein. Im Experiment treten je nach Kontaktierung zur Elektrode (siehe dazu (2.12)) Überpotentiale beim Ladungstransfer auf, so dass signifikante katalytische Ströme in der



Regel deutlich unter 980mV gemessen werden. Man erhält bei der Reaktion (2.11) kathodische Ströme, die sich vor allem zwischen 500mV und 700mV deutlich von den anodischen Strömen der  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Oxidation (Abb. 4.10 und Abb. 4.12) unterscheiden. Aufgrund der exakt gleichen Parameter bei den in Abb. 4.14 dargestellten beiden Messdatenreihen, nur in einem Fall mit Au(111) ohne HRP (rote Dreiecke) und im anderen Fall mit Au(111) mit voradsorbierten HRP (grüne Quadrate), steht außer Frage, dass die Verschiebung der Stromdichten von positiven Werten im Bereich  $0,5\mu\text{A}/\text{cm}^2$  bis  $3,5\mu\text{A}/\text{cm}^2$  zu negativen Werten im Bereich von  $-3,5\mu\text{A}/\text{cm}^2$  bis  $-2\mu\text{A}/\text{cm}^2$  eindeutig auf die katalytische Aktivität der HRP zurückzuführen ist.

Fraglich beim Betrachten von Abb. 4.14 ist, ob die Stromdichten aufgrund der katalytischen Aktivität der HRP die Differenzen zwischen den Werten der roten Dreiecke und grünen Quadrate sind. Dieser Punkt, der wesentlich zum Verständnis der Messwerte beiträgt, wird weiter unten diskutiert. Im Folgenden bezieht sich der Ausdruck „Stromdichten der katalytischen Aktivität der HRP“ auf die gemessenen Stromdichten an der Au(111)/HRP-Elektrode.

#### Wahl des Potentialfensters

Experimente zeigten, dass reproduzierbare Stromdichten aus der katalytischen Aktivität der HRP an Au(111) nur in einem Potentialfenster zwischen 500mV und 700mV möglich waren (Abb. 4.15). Setzt man die Beschreibung der Versuchsdurchführung in Zusammenhang mit den dargestellten Werten von Abb. 4.15, wird ersichtlich, dass bei der dritten Messung zwischen 200mV und 400mV eine irreversible Wechselwirkung mit den Enzymen erfolgt sein muss. Die vierte Messung (graue Kreise) zeigt in Folge dessen signifikant nach oben abweichende Werte und damit eine niedrigere katalytische Aktivität der HRP. Zahlreiche weitere Messungen von Au(111)/HRP in PBS +  $\text{H}_2\text{O}_2$  bei  $U < 500\text{mV}$  bestätigten die Annahme, dass die katalytische Aktivität von an Au(111) adsorbierten HRP nicht zeitlich stabil bleibt. Es gab Hinweise, dass die katalytische Aktivität der HRP schneller irreversibel abfällt, je niedriger das Potential unter 500mV eingestellt, doch dies müsste durch weitere systematische Messungen verifiziert werden.

Demnach konzentrierten sich die Messungen am Au(111)/HRP-System auf die Potentiale  $500\text{mV} \leq U_{\text{WE}} \leq 700\text{mV}$ . Messungen mit durchweg konstantem Potential (z.B. Langzeitmessungen) erfolgten bei 600mV, da bei diesem Potential eine besonders hohe zeitliche Stabilität der katalytischen Aktivität bei vergleichsweise hohen kathodischen Stromdichten ( $-3,25\mu\text{A}/\text{cm}^2$ ) festgestellt wurde. Kurzfristig konnten unter den in Abb. 4.15 beschriebenen Versuchsbedingungen maximal mögliche kathodische Stromdichten von ca.

-4,2 $\mu$ A/cm<sup>2</sup> erreicht werden. Zu hohe H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen können die HRP in einen inaktiven Zustand versetzen [42]; beim vorliegenden Au(111)/HRP-System zeigte sich experimentell, dass die höchsten kathodischen Stromdichten bei hoher zeitlicher Stabilität mit [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 50 $\mu$ M möglich waren. Zur Wahl des Elektrolyten, pH-Wertes und HRP-Konzentration bei der Voradsorption wird auf die Kapitel 2.1.5 und 4.3.4 verwiesen. Unter diesen Vorgaben diskutiert der nächste Abschnitt die zeitliche Stabilität des Systems.

### Zeitliche Stabilität

Unter Berücksichtigung des Elektrolytvolumens von 50ml und einer Anfangskonzentration [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 50 $\mu$ M, ergibt sich bei einem mittleren Strom von ca. (-3 $\mu$ A) – (-4 $\mu$ A) ein Verbrauch, der anfangs im Bereich von 2% - 3% pro Stunde liegt. Da die kathodische Stromdichte von Au(111)/HRP in PBS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Abb. 4.16 A, grüne durchgezogene Linie) ebenfalls ein Absinken in diesem Prozentbereich zeigt, ist davon auszugehen, dass das Absinken der kathodischen Stromdichte vorwiegend auf den Verbrauch von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> zurückzuführen ist. Das bedeutet, dass bei konstanter H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Menge eine annähernd konstante Stromdichte über viele Stunden zu erwarten ist. Aufgrund der experimentellen Schwierigkeiten in einer gerührten Durchflusszelle (siehe dazu Abb. 3.7), in der [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] konstant gehalten werden könnte, wurde aber dennoch in einem geschlossenen System gearbeitet.

Ist NaCl im Elektrolyten (Abb. 4.16 A, magentafarbene gepunktete Kurve), lässt sich der Abfall der kathodischen Stromdichten (ca. 7% pro Stunde) nicht mehr ausschließlich durch den H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Verbrauch begründen. Da die Voradsorption der HRP beim PBS + NaCl – Experiment ebenfalls im PBS + NaCl – Elektrolyten erfolgte, haben bei der Voradsorption die HRP eine Cl<sup>-</sup>-bedeckte Oberfläche vorgefunden. Eine mögliche Schlussfolgerung aus Abb. 4.16 A könnte demnach sein, dass die auf der Au(111)-Oberfläche adsorbierten Cl<sup>-</sup>-Ionen die HRP-Voradsorption beeinflusst, was dann zu einem weniger zeitlich stabilen katalytischem Verhalten führt als die Voradsorption von HRP auf Au(111) in Abwesenheit von Cl<sup>-</sup>-Ionen. Weiterhin wäre eine mögliche Schlussfolgerung, dass die Cl<sup>-</sup>-Ionen in Lösung das katalytische Vermögen des Au(111)/HRP-Systems mit der Zeit herabsetzen, allerdings gibt es experimentelle Hinweise darauf (siehe Abb. 4.17), dass letztere mögliche Schlussfolgerung unwahrscheinlich ist.

Der in Abb. 4.16 B dargestellte Unterschied im katalytischen Verhalten der HRP ohne/mit HRP im Elektrolyten ist ein Hinweis darauf, dass eine fortschreitende Adsorption der HRP mit der Zeit stattfindet, die zu einem schnellen Abfall der katalytischen Aktivität führt. Eine ausführliche Diskussion hierzu ist in Kapitel 5.3.4 zu finden.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass sich von den untersuchten Elektroden-/Elektrolytsystemen das Au(111)/HRP-System in PBS als das System mit der höchsten zeitlichen Stabilität bei vergleichsweise hohen kathodischen Stromdichten herausgestellt hat. Ferapontova und Gorton [20] haben ein, nach eigenen Angaben, stabiles System von Au(111)/HRP in PBS (pH = 6,0) + 0,15M NaCl mit verschiedenen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen bis zu 100µM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> charakterisiert. Allerdings sind Langzeitstudien nicht vorgestellt. Ferner haben Ferapontova und Gorton mit voroxidierten Au(111)-Oberflächen gearbeitet, so dass deren Ergebnisse nur bedingt auf das hier untersuchte System übertragbar sind.

Mit den obigen Abschnitten ist vor allem das Au(111)/HRP-System in PBS bezüglich Parameterwahl und Stabilität charakterisiert. Ausführliche Erläuterungen zur katalytischen Aktivität der Enzyme in diesem System werden im folgenden Abschnitt vorgestellt.

### Diskussion der katalytischen Aktivität

Auf der Grundlage der in Abb. 4.14 bis Abb. 4.16 vorgestellten Daten eines zeitlich stabilen Au(111)/HRP-Systems werden die erhaltenen Stromdichten im Folgenden in Bezug zur Theorie der biokatalytischen Aktivität gesetzt. Kapitel 2.3 stellt die allgemeine Michaelis-Menten-Theorie vor; für das vorliegende System ist zu setzen  $[S] = [H_2O_2]$  und  $[E]_T = [HRP_{ads}]$ , da in Experimenten mit voradsorbierten HRP ( $\rightarrow$  Au(111)/HRP) keine HRP in Lösung waren und nur die adsorbierten HRP katalytische Aktivität zeigten. Demnach bezieht sich  $[HRP_{ads}]$  auf die auf Au(111) adsorbierten HRP in einem Elektrolytvolumen über der Oberfläche. Wegen der zeitlich stark fallenden kathodischen Stromdichten bei hohen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen ( $[H_2O_2] \gg 50\mu M$ ), konnten (2.8) und (2.9) nicht verifiziert werden. Abb. 5.6 zeigt, dass (2.10) mit  $[S] = [H_2O_2]$ ,

$$v_0 = \frac{v_{max}}{K_M} [H_2O_2], \quad (5.20)$$

in guter Näherung qualitativ im betrachteten H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationsbereich zutrifft. Ein näherungsweise linearer Zusammenhang zwischen  $v_0$  und  $[H_2O_2]$  ist auch in PBS (pH = 6,0) + 0,15M NaCl bei den entsprechenden H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Konzentrationen festgestellt worden [20].

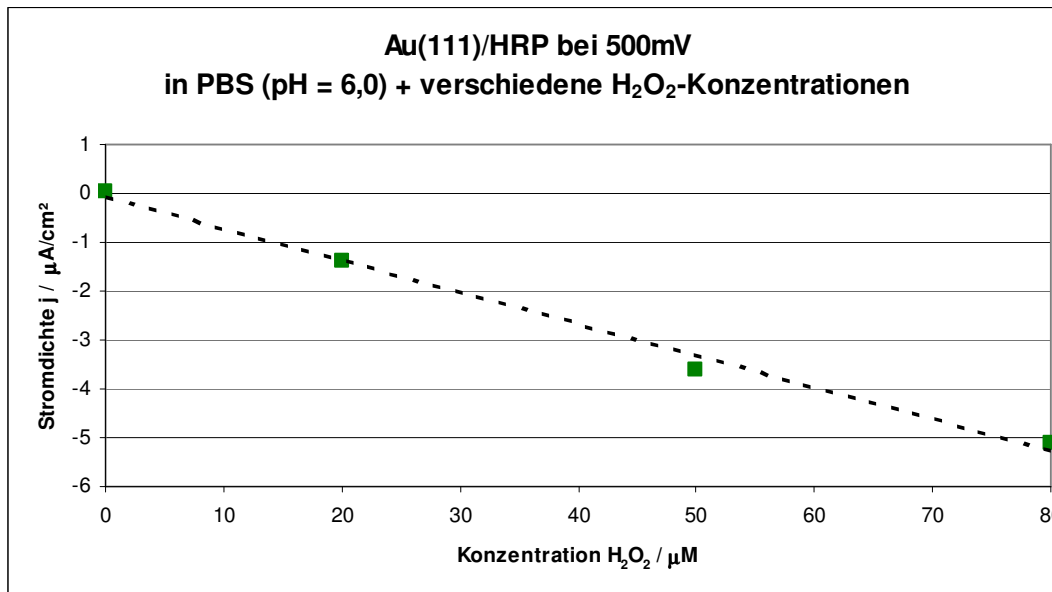


Abb. 5.6: Abhängigkeit der Stromdichte von Au(111)/HRP (10 Minuten in 0,01mg/ml HRP-Lösung voradsorbiert) in PBS (pH = 6,0) von der  $H_2O_2$ -Konzentration im Bereich von  $0\mu M$  bis  $80\mu M$ . Es wurde 5 Minuten lang nach Methode A amperometrisch bei 500mV gemessen, wo der Einfluss der direkten  $H_2O_2$ -Oxidation am Au(111) gering ist. Die gestrichelte schwarze Linie wurde linear an die Messpunkte gefittet.

Die Geschwindigkeit ( $\rightarrow v_0$  in einem geschlossenen System) einer mehrstufigen katalytischen Reaktion (siehe dazu Kapitel 2.5) ist durch die jeweiligen Ratenkonstanten definiert, vor allem durch die ratenbestimmende Konstante  $k_s$ . Unter zahlreichen Annahmen (Bedeckung der Oberfläche mit HRP, Prozentsatz der aktiven Enzyme, Art der Bindung für den direkten Elektrontransfer) haben Ferapontova und Gorton [20,23] für ihr System  $k_s = (11,6 + 3,8)s^{-1}$  angegeben. Nach den eigenen experimentellen Erfahrungen und unter Berücksichtigung der vielen getroffenen Annahmen ist die Genauigkeit dieses Wertes anzuzweifeln. Sie kann jedoch als Richtwert dienen und mit der unteren Grenze von  $k'_s$  der Resultate dieser Arbeit verglichen werden. Folgende Annahmen sind für die Bestimmung der unteren Grenze  $k'_s$  nötig:

- Die komplette Au(111)-Oberfläche ist mit einer HRP-Monolage bedeckt.
- Ohne Zwischenräume liegen die im Elektrolyten gelösten HRP auf der Oberfläche mit einer Fläche von ca.  $40nm^2$  pro Enzym.
- Jedes der adsorbierten HRP ist katalytisch aktiv (Gesamtstromdichte  $-3,5\mu A/cm^2$ ) und es kann ein mittleres  $k_{et}$  (2.12) für die Gesamtheit aller HRP angenommen werden.

Aus diesen Annahmen ergibt sich für die katalytische Reaktion (2.11) die untere Grenze für den ratenbestimmenden Schritt:

$$\underline{k}'_s \approx 5s^{-1}. \quad (5.21)$$

Offensichtlich hat eine geringere als die vollständige Bedeckung der Oberfläche mit HRP und/oder die Möglichkeit, dass < 100% der adsorbierten HRP katalytisch aktiv sind, die Folgerung, dass für die adsorbierten katalytisch aktiven HRP gilt:

$$k'_s > \underline{k}'_s. \quad (5.22)$$

Ein genauer Bedeckungsgrad der HRP auf der Au(111)-Oberfläche, wenn diese 10 Minuten lang in einer 0,01mg/ml HRP-Lösung adsorbiert wurden, konnte nicht ermittelt werden. Doch STM-Studien des Au(111)/HRP-Systems (Kapitel 4.2.2) haben ergeben, dass nicht von einer vollständige Bedeckung der Au(111)-Oberfläche nach 10 Minuten in 0,01mg/ml HRP-Lösung ausgegangen werden kann. Damit dürfte  $k'_s$  mit dem  $k_s$  von Ferapontova und Gorton vergleichbar sein.

Als Grundlage für die Berechnung von  $k'_s$  diene der Stromdichtenwert von ca.  $-3,5\mu\text{A}/\text{cm}^2$  bei 500mV (Abb. 4.14), da bei diesem Potential die direkte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Oxidation schon in Abwesenheit von HRP gering ausfällt. Nun stellt sich die Frage, ob bei Potentialen  $U > 500\text{mV}$ , bei denen die direkte  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Oxidation an der Au(111)-Oberfläche eine wichtige Rolle spielt, folgende Gleichung gilt:

$$j_{\text{mess}} = j_{\text{H}_2\text{O}_2} + j_{\text{kat}}. \quad (5.23)$$

$j_{\text{mess}}$  ist die gemessene Stromdichte an der Au(111) bzw. Au(111)/HRP-Elektrode,  $j_{\text{H}_2\text{O}_2}$  ist die anodische Stromdichte, die sich aus der Oxidation von  $\text{H}_2\text{O}_2$  an Au(111) ergibt,  $j_{\text{kat}}$  ist die kathodische Stromdichte, die sich aus der katalytischen Reduktion von  $\text{H}_2\text{O}_2$  durch HRP ergibt. Unberücksichtigt bleibt in (5.23) der Bedeckungsgrad  $\theta$ , der angibt, wie viel der gesamten Elektrodenoberfläche durch adsorbierte HRP belegt ist. Zu bedenken ist dabei, dass  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Moleküle an Stellen mit adsorbierten HRP nicht denselben Zugang zur Au(111)-Oberfläche haben wie an HRP-freien Au(111)-Flächen. Wichtige Erkenntnisse über den Einfluss der Oberflächenbedeckung auf die Stromdichten ergeben sich aus Abb. 5.7. Die grünen Quadrate in Abb. 5.7 stellen dieselben Stromdichtenwerte wie die grünen Quadrate in Abb. 4.14 dar. Sie entsprechen den gemessenen Stromdichten  $j_{\text{mess}}$  von Au(111)/HRP im PBS +  $\text{H}_2\text{O}_2$ -Elektrolyten. Symbolisiert durch die violetten Dreiecke in Abb. 5.7 sind die Differenzwerte  $j_{\text{mess}}$  (grüne Quadrate in Abb. 4.14 und Abb. 5.7) minus  $j_{\text{H}_2\text{O}_2}$  (rote Dreiecke in Abb. 4.14). Wenn (5.23) ohne Berücksichtigung des Bedeckungsgrades gelten würde, d.h. wenn die Bedeckung von Au(111) durch die HRP keinen Einfluss auf  $j_{\text{H}_2\text{O}_2}$  hätte, müssten die Stromdichten der violetten Dreiecke in Abb. 5.7 die tatsächliche katalytische Aktivität  $j_{\text{kat}}$  darstellen.

Allerdings widerspricht das Verhalten der potentialabhängigen Stromdichten der violetten Dreiecke dem zu erwartenden Verhalten.

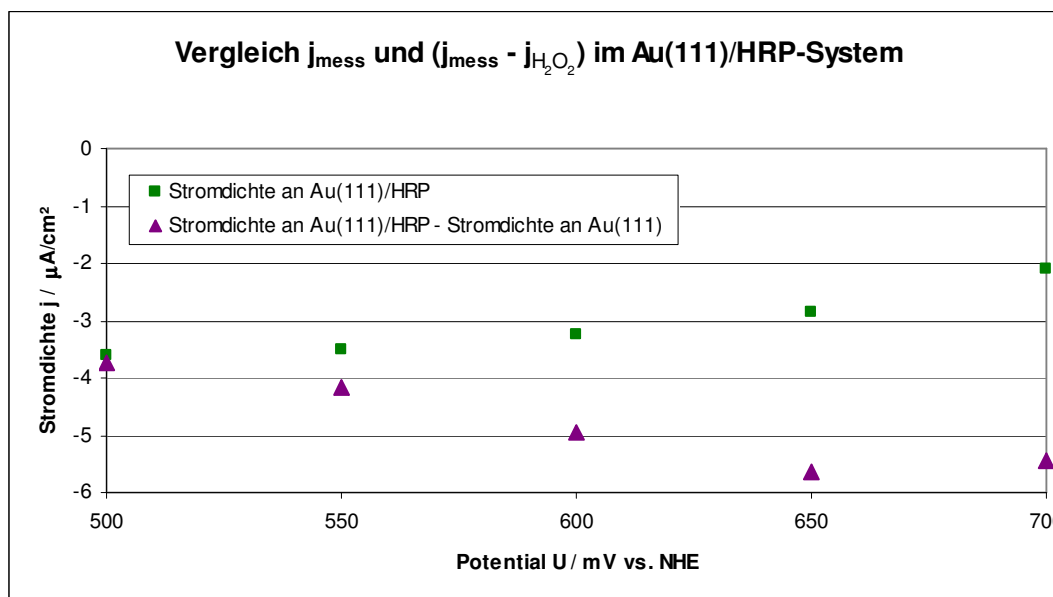


Abb. 5.7: Darstellung der Stromdichten an Au(111)/HRP in PBS (pH = 6,0) + 50 $\mu\text{M}$  H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> als grüne Quadrate (aus Abb. 4.14). Die violetten Dreiecke stellen die Differenzwerte der Stromdichten der Werte der grünen Quadrate und roten Dreiecke aus Abb. 4.14 dar. Nur zur Herleitung eines Widerspruchs (siehe Diskussion) sind die violetten Dreiecke aufgetragen worden.

In Abb. 5.7 haben die Stromdichten der violetten Dreiecke bei 650mV und 700mV die höchsten kathodischen Stromdichten, um dann mit abfallendem Potential zu sinken. Das Redoxpotential der HRP liegt bei 980mV, so dass mit auftretenden Überpotentialen bei  $U < 980\text{mV}$  die kathodische Stromdichte mit fallendem Potential steigen müsste, um schließlich ein Sättigungsniveau bzw. eine maximale kathodische Stromdichte zu erreichen. Experimente von Au(111)/HRP in PBS + NaCl + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> von Ferapontova und Gorton [20] bestätigen letzteres Verhalten. In ihrem Fall erreichten die Stromdichten mit fallendem Potential von 0 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  bei 900mV vs. NHE ausgehend ein Sättigungsniveau bei ca. 450mV vs. NHE. Von 450mV bis 140mV wurde die maximale kathodische Stromdichte gemessen; Messungen bei  $U < 140\text{mV}$  wurden nicht durchgeführt. Abb. 4.15 gibt einen Hinweis darauf, dass im vorliegenden System näherungsweise bei  $U < 500\text{mV}$  maximale katalytische Aktivität herrscht. In diesem Potentialbereich ist die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidation irrelevant und die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Reduktionsströme sind sehr niedrig. Aus der obigen Ausführung folgt, dass die violetten Dreiecke in Abb. 5.7 nicht  $j_{\text{kat}}$  darstellen, d.h.  $j_{\text{kat}} = j_{\text{mess}} - j_{\text{H}_2\text{O}_2}$  trifft in dieser Form nicht zu! Die Werte der violetten Dreiecke dienten also lediglich zur Herausarbeitung des oben

dargestellten Widerspruchs, haben aber ansonsten keine weitere Bedeutung. Um die Ergebnisse in Abb. 4.14 genauer zu erklären, muss (5.23) erweitert werden zu:

$$j_{mess} = (1 - \alpha) j_{H_2O_2}^* + \theta' j_{kat}^* \quad (5.24)$$

$j_{H_2O_2}^*$  ist  $j_{H_2O_2}$  bei  $\theta = 0$ ,  $j_{kat}^* = j_{kat}$  bei  $\theta' = 1$ .  $\theta'$  ist ein modifizierter Bedeckungsgrad;  $\theta' = 1$  bedeutet, dass alle für die HRP-Aktivität möglichen Bindungsstellen der Au(111)-Oberfläche durch HRP besetzt sind.  $\alpha$  ist eine Funktion vom Bedeckungsgrad ( $\theta = 1$ : komplett mit HRP bedeckte Fläche), also  $\alpha = \alpha(\theta)$ . Es wird angenommen, dass die HRP im Mittel eine vergleichbare katalytische Aktivität an allen für den direkten Elektrontransfer geeigneten besetzbaren Bindungsstellen der Au(111)-Oberfläche haben. Dann muss die gemessene katalytische Aktivität aller adsorbierten HRP im Bereich von  $\theta' = 0$  bis  $\theta' = 1$  proportional zu  $j_{kat}^*$  sein, d.h.  $j_{kat} = \theta' j_{kat}^*$ . Aus der Diskussion von Abb. 5.7 geht hervor, dass  $j_{H_2O_2}$  an Au(111)/HRP-Oberflächen im Gegensatz zur enzymfreien Au(111)-Oberfläche niedriger ausfällt.  $\theta' \neq \theta$  wurde in (5.24) verwendet, weil wie oben erwähnt laut der Ergebnisse in Kapitel 4.2.2 im Fall einer optimalen Bedeckung (maximale Stromdichte der katalytischen Aktivität von HRP an Au(111)) nicht von einer vollständigen Bedeckung der Au(111)-Oberfläche auszugehen ist. Das bedeutet, dass  $\theta' = 1$  für eine Bedeckung aller für HRP möglichen Bindungsstellen steht, aber dass für  $\theta' \neq \theta$  gleichzeitig HRP-freie Flächen vorhanden sind.

Die Einführung des Parameters  $\alpha$  ist nicht unmittelbar selbsterklärend. Für ein besseres Verständnis wird zunächst angenommen, dass  $j_{H_2O_2}$  unabhängig ist vom Bedeckungsgrad der Oberfläche mit HRP, d.h. es wird für die folgende Diskussion ein vernachlässigbar kleines  $\alpha$  angenommen, womit sich (5.24) schreiben lässt als:

$$j_{mess} = j_{H_2O_2}^* + \theta' j_{kat}^* \quad (5.25)$$

Man erkennt sofort, dass – wenn (5.25) gültig wäre – eine Minderung von  $j_{H_2O_2}^*$  unmittelbar  $j_{mess}$  um den gleichen Betrag mindern bzw. die kathodische Stromdichte um diesen Betrag erhöhen würde. Um (5.25) mit Messdaten zu validieren, sind relevante Daten aus Abb. 4.12, Abb. 4.16 und Abb. 4.17 in Tab. 5.1 zusammengefasst. Tab. 5.1 zeigt, dass bei 600mV die  $H_2O_2$ -Oxidationsstromdichte im NaCl-Elektrolyten (2. Zeile) um  $1,65\mu A/cm^2$  niedriger liegt als im NaCl-freien Elektrolyten (1. Zeile). Diese deutliche Herabsetzung der  $H_2O_2$ -Oxidationsstromdichten wurde auch in Experimenten bestätigt, bei denen NaCl erst nach 30 Minuten dem enzymfreien System zugegeben wurde. Folglich müsste sich nach Zugabe von NaCl laut (5.25)  $j_{H_2O_2}^*$  um  $1,65\mu A/cm^2$  reduzieren und  $j_{mess}$  um diesen Wert nach unten verschoben werden. Genau das ist aber experimentell nicht gemessen worden. Im Gegenteil: Tab. 5.1 Zeilen 3 und 4 zeigen, dass  $j_{mess}$  nach Zugabe von NaCl um  $0,1\mu A/cm^2$  nach oben verschoben wurde. Weiterhin liegt nach Abb. 4.16 A die experimentelle

Erkenntnis vor, dass NaCl nicht zu einer unmittelbaren deutlichen Herabsetzung der katalytischen Aktivität der HRP führt.

<b>Elektrode</b>	<b>Voradsorption</b>	<b>Elektrolyt</b>	<b>Potential U / mV vs. NHE</b>	<b>Stromdichte / <math>\mu\text{A}/\text{cm}^2</math></b>
Au(111)	-----	PBS + 50 $\mu\text{M}$ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	600mV	1,7
Au(111)	-----	PBS + 50 $\mu\text{M}$ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 10mM NaCl	600mV	0,05
Au(111)/HRP	10min in 0,01mg/ml HRP-PBS-Lösung	PBS + 50 $\mu\text{M}$ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	600mV	-3,25
Au(111)/HRP	10min in 0,01mg/ml HRP-PBS-Lösung	PBS + 50 $\mu\text{M}$ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> + 10mM NaCl <sup>#</sup>	600mV	-3,15

Tab. 5.1: Gegenüberstellung der Stromdichten an Au(111) und Au(111)/HRP in NaCl-haltigem und NaCl-freiem Elektrolyten. #: Der Elektrolyt war bei der Voradsorption NaCl-frei. Die Zugabe erfolgte gemäß der Beschreibung zu Abb. 4.17.

Damit ergibt sich ein Widerspruch für (5.25), d.h.  $j_{\text{H}_2\text{O}_2}$  ist vom Bedeckungsgrad der Au(111)-Oberfläche mit HRP abhängig. Es muss ein Parameter  $\alpha = \alpha(\theta)$  in (5.24) enthalten sein und zwar als  $(1 - \alpha)$ , da beim Bedeckungsgrad null definitionsgemäß  $j_{\text{H}_2\text{O}_2} = j^*_{\text{H}_2\text{O}_2}$ . Für die vorliegenden Ergebnisse mit 10min Voradsorptionszeit in 0,01mg/ml HRP ist anzunehmen, dass  $\alpha$  nicht wesentlich kleiner als 1 ist. Ungeklärt bleibt, wie  $\alpha$  und  $\theta$  zusammenhängen. Eine lineare Beziehung erklärt die experimentellen Ergebnisse nicht vollständig. Möglicherweise sind noch Einflüsse zu berücksichtigen, die mit den hier vorgestellten Experimenten nicht erfasst werden konnten. Nichtsdestotrotz ist (5.24) eine wichtige Gleichung, die dem Verständnis der Vorgänge dient und in der Form noch nicht für ein Au(111)/HRP-System aufgestellt wurde. Ausgehend von der in (5.24) postulierten Gleichung wird in Kapitel 5.3.4 der Adsorptionsvorgang der HRP auf Au(111) näher betrachtet.

### 5.3.4 Herleitung einer Gleichung zur Beschreibung der zeitlichen Adsorption von Horseradish Peroxidase auf Au(111)

Vorausgesetzt, dass die auf Au(111) adsorbierten HRP im Mittel alle die gleiche katalytische Aktivität haben, ist ein Maß für die Menge adsorbierter HRP die gemessene kathodische Stromdichte bei festem Potential. Aus z.B. Abb. 4.14 oder Tab. 5.1 ist bekannt, dass bei 600mV die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidationsstromdichte einer HRP-freien Au(111)-Oberfläche 1,7 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$  beträgt und die Stromdichte von Au(111)/HRP eine maximale kathodische Stromdichte von -



3,25 $\mu$ A/cm<sup>2</sup> liefert. Ein entsprechender Verlauf ist bei der grünen durchgezogenen Kurve ([HRP] = 0,01mg/ml) in Abb. 4.18 festzustellen. Innerhalb weniger Minuten wird die Stromdichte von der reinen H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidationsstromdichte immer negativer bis hin zu einer maximalen kathodischen Stromdichte. Alle vier Kurven haben zu Beginn der Messung anfangs erwartungsgemäß die gleiche Oxidationsstromdichte im Bereich von 1,7 $\mu$ A/cm<sup>2</sup> und zeigen im Zeitverlauf bis zu einem Minimum stetig negativer werdende Stromdichten.

Für den Verlauf der dargestellten Stromdichten aus Abb. 4.18 von  $t = 0$  bis  $t = t^*$  (Zeitpunkt der höchsten kathodischen Stromdichte) besteht unter Berücksichtigung der Ergebnisse in Kapitel 4.3.4 kein Zweifel, dass die Veränderung der Stromdichten von positiven zu negativen Werten eindeutig mit der Adsorption der HRP an der Au(111)-Oberfläche korreliert ist. Haben die adsorbierten HRP zwischen  $t = 0$  und  $t = t^*$  im Mittel die gleiche katalytische Aktivität und erniedrigen gleichermaßen die H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidationsstromdichte, kann näherungsweise von einer linearen Beziehung zwischen der Menge adsorbierter HRP und der Stromdichte ausgegangen werden.

Nicht-linear ist hingegen die Adsorption mit der Zeit. Aus den Adsorptionsisothermen für Gase an Oberflächen [122] erhält man durch Ersetzen des Druckes durch die Konzentration die Gleichung

$$\frac{d\theta}{dt} = k_{ads} [HRP] (1 - \theta), \quad (5.26)$$

die für eine wässrige Lösung mit gelösten HRP gilt. Sie beschreibt das Verhalten der Änderung des Bedeckungsgrades  $\theta$  mit der Zeit, im vorliegenden Fall die Adsorption der HRP an der Au(111)-Oberfläche mit der Zeit. Die Geschwindigkeitskonstante  $k_{ads}$  ist proportional zur Gesamtmenge der freien Bindungsstellen, zur Diffusionskonstante und zum Haftkoeffizienten der HRP-Moleküle. Analog zu (5.26) lässt sich eine Gleichung für die Desorption aufstellen und aus dieser und (5.26) folgen die Langmuir-Isotherme im Gleichgewicht. In den vorliegenden Experimenten wird jedoch wegen der zeitlich stabilen Bindung voradsorbierter HRP an Au(111) (Abb. 4.16 A) und wegen den Verläufen in Abb. 4.18 die Annahme getroffen, dass die Geschwindigkeitskonstante der Desorption  $k_{des}$  gegenüber  $k_{ads}$  vernachlässigbar klein ist. Somit liegt näherungsweise ein irreversibler Adsorptionsprozess zwischen  $t = 0$  und  $t = t^*$  vor, der näherungsweise durch (5.26) beschrieben wird. Die Anwendung von (5.26) auf die experimentellen Daten in Abb. 4.18 wird im Folgenden geprüft.

(5.26) ist eine Differentialgleichung, in der unter den vorherrschenden experimentellen Bedingungen weder  $k_{ads}$  noch [HRP] zeitabhängig sind. Die integrierte Form von (5.26) ist dann:

$$\theta = 1 - e^{-k_{ads} [HRP] t} \quad (5.27)$$

An dieser Stelle muss eine Verbindung zwischen  $\theta$  und  $j_{mess}$  hergestellt werden. Diese wurde schon in Kapitel 4.3.4 aufgestellt:

$$j_{mess} = (1 - \alpha) j_{H_2O_2}^* + \theta' j_{kat}^* \quad (5.24)$$

Zwischen  $t = 0$  und  $t = t^*$  wird der Strom stetig negativer, d.h. dass offenbar vorrangig Stellen besetzt werden, an denen die HRP gut binden und katalytisch aktiv sein können. Das heißt, dass zwischen  $t = 0$  und  $t = t^*$  näherungsweise  $\theta = \theta'$  gesetzt werden kann. Weiterhin wird vereinfachend für den Ansatz, in Anlehnung an die Erläuterungen in Kapitel 4.3.4, für den Zeitraum  $t = 0$  bis  $t = t^*$  angenommen:  $\alpha = \theta$ . Aus diesen Näherungen für (5.24) erhält man nach Einsetzen in (5.27):

$$j_{mess} = j_{H_2O_2}^* + (j_{kat}^* - j_{H_2O_2}^*) (1 - e^{-k_{ads} [HRP] t}) \quad (5.28)$$

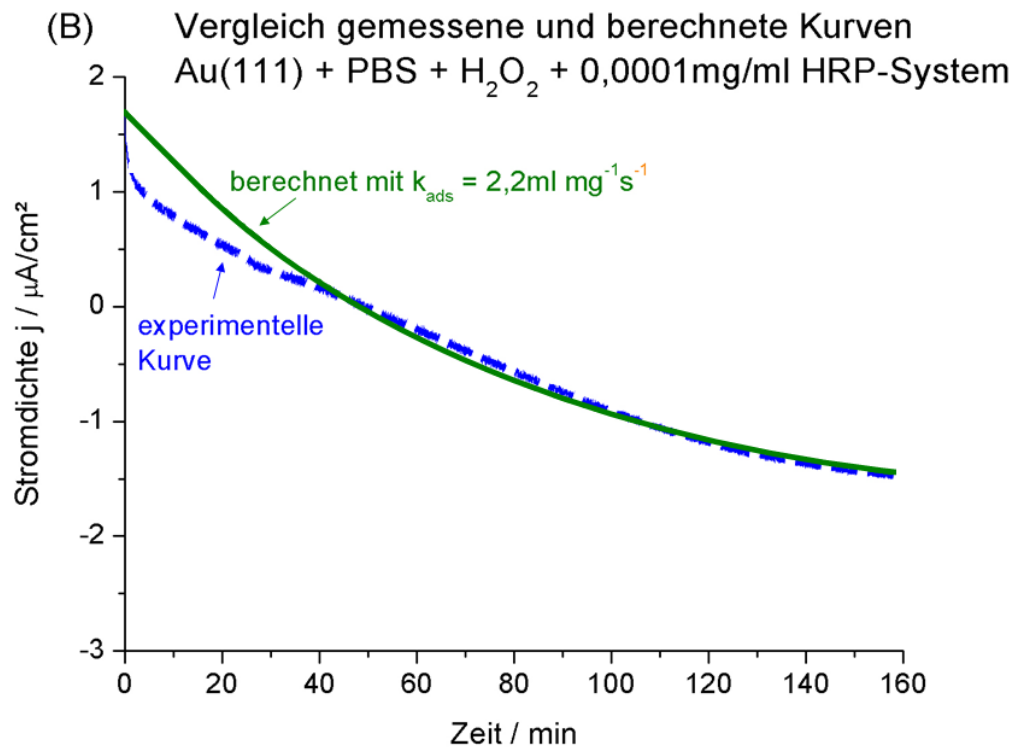
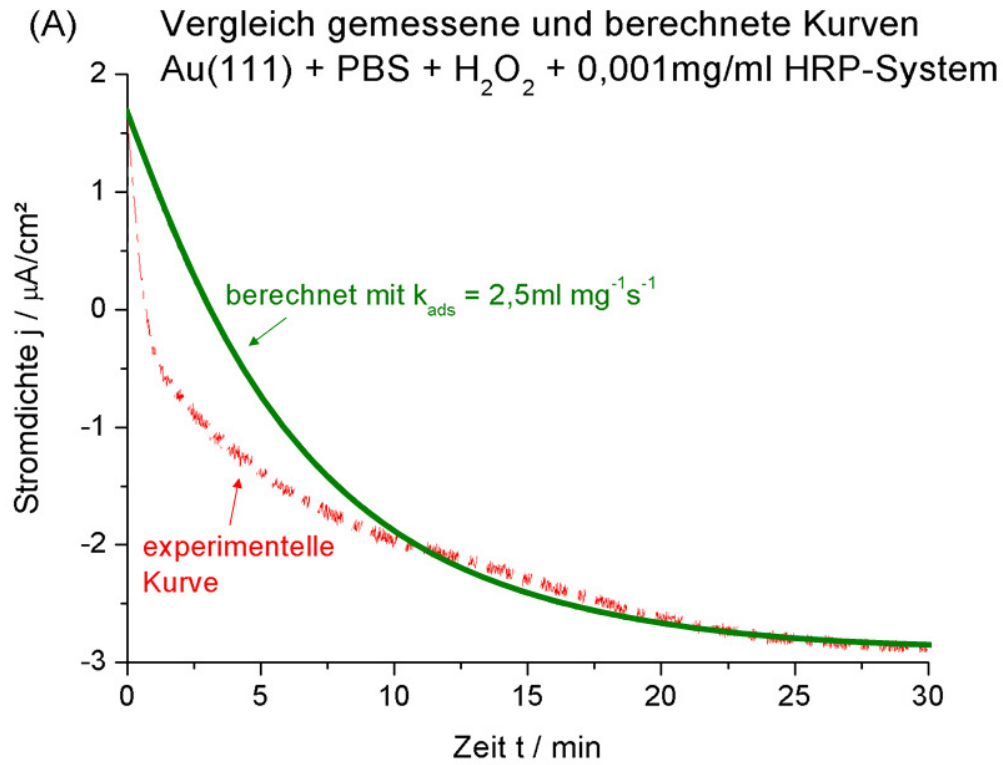
Man erkennt durch Extremwertbetrachtung der Gleichung in (5.28):

<b>Zeitpunkt der Adsorption</b>	<b><math>j_{mess}</math> nach (5.28)</b>	<b><math>j_{mess}</math> aus Abb. 4.14 und Abb. 4.18</b>
$t = 0$	$j_{mess} = j_{H_2O_2}^*$	$j_{mess} \approx 1,7 \mu A/cm^2$
$t \rightarrow \infty$ entspricht ( $t \rightarrow t^*$ )	$j_{mess} = j_{kat}^*$	$j_{mess} \approx -3,3 \mu A/cm^2$

Tab. 5.2: Vergleich der Extremwerte von (5.28) mit den Messdaten.

Die Richtigkeit von  $j_{H_2O_2}^* = 1,7 \mu A/cm^2$  für  $t = 0$  ist bei Betrachtung von Abb. 4.14 offensichtlich. Für eine detaillierte Bewertung von  $j_{kat}^* = -3,3 \mu A/cm^2$  für  $t \rightarrow t^*$  müsste der genaue Bedeckungsgrad der Oberfläche bekannt sein. Die experimentellen Daten geben jedenfalls Hinweise, dass  $j_{kat}^* = -3,3 \mu A/cm^2$  für  $t \rightarrow t^*$  näherungsweise zutrifft. Anknüpfend an die Diskussion der in Tab. 5.1 dargestellten Ergebnisse sowie die Stromdichten bei  $U \leq 500 mV$  berücksichtigend (nach Abb. 4.14 und Abb. 4.15 ist bei diesen Potentialen  $j_{H_2O_2}^* \approx 0$ ), kann damit auch  $j_{kat}^* \approx -3,3 \mu A/cm^2$  gesetzt werden. Folglich liefert die Extremwertbetrachtung von (5.28) Stromdichten, die mit den experimentellen Werten übereinstimmen.

Für eine weitergehende Analyse der Daten von Abb. 4.18 sind mit Hilfe von Origin 7.5G (OriginLab Corporation, Northampton, USA) aus (5.28) berechnete Kurven über die Kurven aus Abb. 4.18 von  $t = 0$  bis  $t \leq t^*$  gelegt worden.



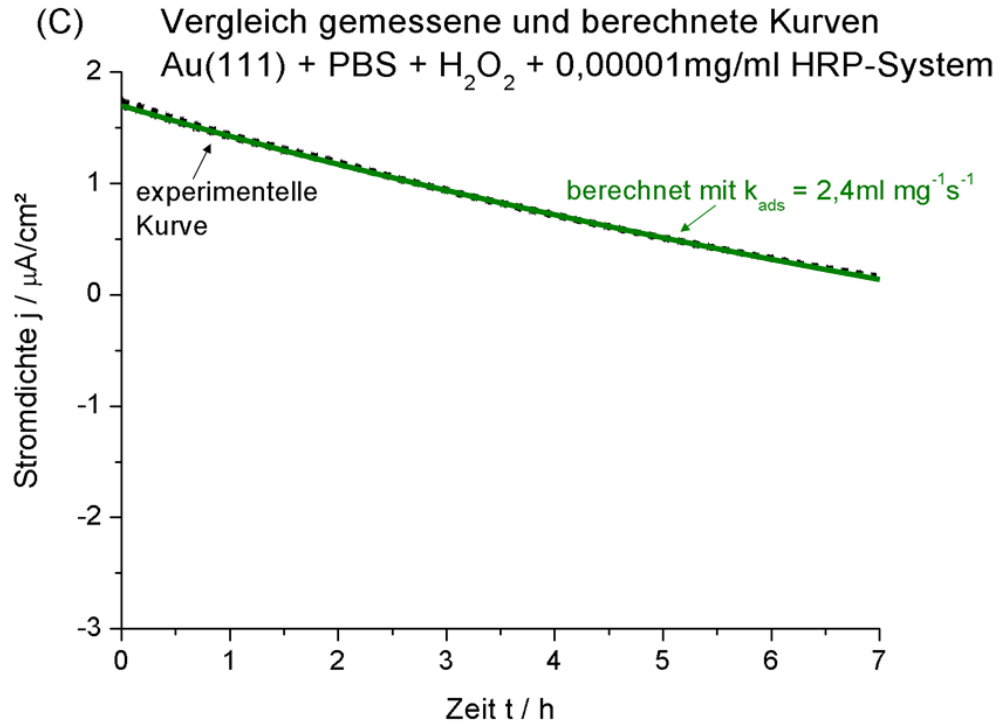


Abb. 5.8: Vergleich der Stromdichten der roten punkt-gestrichelten, blauen gestrichelten und schwarzen gepunkteten Kurve aus Abb. 4.18 mit jeweils einer mathematisch nach (5.28) berechneten Kurve (grüne Linien). A und B: Stromdichten von  $t = 0$  bis  $t = t^*$  (maximale kathodische Stromdichte). C: Stromdichten von  $t = 0$  bis  $t = 7$  Stunden.

Dargestellt sind diese Kurven in Abb. 5.8. Als Grundlage für die berechneten Kurven diente (5.28), wobei  $j^*_{\text{H}_2\text{O}_2}$  für alle drei Kurven mit  $1,7 \mu\text{A}/\text{cm}^2$  gesetzt wurde,  $(j^*_{\text{kat}} - j^*_{\text{H}_2\text{O}_2})$  jedoch mit dem Wert für die jeweilige Konzentration.  $(j^*_{\text{kat}} - j^*_{\text{H}_2\text{O}_2})$  für die schwarze gepunktete Kurve wurde durch Extrapolation geschätzt. Bei höheren HRP-Konzentrationen ist in der Anfangszeit der Adsorption eine Abweichung der berechneten Kurve von der experimentellen Kurve festzustellen. Dies könnte darauf zurückgeführt werden, dass die Annahmen  $\theta \approx \theta'$  und  $\alpha \approx \theta$  zur Herleitung von (5.28) in diesem Zeitbereich nicht hinreichend genau sind. Abgesehen von diesen Diskrepanzen ist eine relativ gute Übereinstimmung zwischen (5.28) und den experimentellen Daten gegeben. Insbesondere die angenommenen  $k_{\text{ads}}$ -Werte, die um ca. 6% um den Mittelwert variieren, sind ein Hinweis auf die Anwendbarkeit von (5.28). Man erhält als Mittelwert:

$$k_{\text{ads}} = 2,37 \frac{\text{ml}}{\text{mg} * \text{s}} \approx 10^5 \frac{\text{l}}{\text{mol} * \text{s}}. \quad (5.29)$$

Dabei wurde die Beziehung  $[\text{HRP}] = 1 \text{ mg/ml} \rightarrow [\text{HRP}] = 2,4 * 10^{-5} \text{ mol/l}$  benutzt.

Auf zwei Beobachtungen in Abb. 4.18 ist noch nicht eingegangen worden. Eine der beiden Beobachtungen ist, dass scheinbar mit fallender HRP-Konzentration niedrigere maximale kathodische Stromdichten gemessen werden. Mit den vorliegenden Daten können eindeutige Erklärungen dazu nicht gegeben werden. Möglich ist die frühzeitige ( $t < t^*$ ) Bildung von lokalen kleinen HRP-Agglomeraten, wodurch die katalytische Aktivität herabgesetzt wird. Dies wäre auch prinzipiell mit (5.28) vereinbar.

Steigende Stromdichten bzw. fallende kathodische Stromdichten bei  $t > t^*$  sind die zweite Beobachtung in Abb. 4.18. Sie ist Teil der Diskussion des gesamten Adsorptionsprozesses im folgenden Absatz.

#### HRP-Adsorptionsuntersuchung durch zeitliche Messung von Oberflächenkapazitäten

Als Grundlage für die Diskussion dient Abb. 4.21 und die Messwerte der Oberflächenkapazität von Au(111) im enzymfreien PBS – Elektrolyten. Representativ für alle untersuchten Potentiale werden zunächst nur die Werte für 600mV betrachtet. Durch mehrfache Messungen wurde der Oberflächenkapazitätswert von  $(155 \pm 3)\mu\text{F}/\text{cm}^2$  für das enzymfreie System Au(111) in PBS bei 600mV bestätigt. Bei diesem Potential sind Hydrogenphosphationen an der Oberfläche adsorbiert, was den deutlich höheren Wert gegenüber den  $25\mu\text{F}/\text{cm}^2$  Oberflächenkapazität von Au(111) in  $\text{NaClO}_4$  bei 600mV erklärt, wo keine Adsorption der Anionen an der Au(111)-Oberfläche vorliegt.

Da die einzige Änderung gegenüber dem Au(111) + PBS – System (rote Quadrate in Abb. 4.21) die Zugabe von HRP war und diese weder den Elektrolytwiderstand merklich beeinträchtigen noch in Abwesenheit von  $\text{H}_2\text{O}_2$  einen Ladungstransfer bewirken, muss die Änderung der Oberflächenkapazität auf die Adsorption von HRP auf die Au(111)-Oberfläche zurückgeführt werden. Eine deutliche Änderung der Kapazität aufgrund von Proteinadsorption auf Metalloberflächen ist schon gemessen worden [123], wenn auch mit Systemen, die keinen quantitativen Vergleich mit den vorliegenden Daten zulassen. Ivarsson, Hegg, Lundström und Jönsson konnten zwar aus den absoluten Kapazitätswerten die Enzymsbedeckung nicht berechnen. Aber Sie erhielten wichtige Erkenntnisse aus der relativen Kapazitätsänderung. Dies trifft auch für die Daten aus Abb. 4.21 zu. Üblicherweise wird die Oberflächenkapazität bei einfachen Systemen, z.B. bei einer Doppelschichtkapazität mit einem Plattenkondensator modelliert. Die Kapazität berechnet sich dann aus der Elektrodenoberfläche  $A_{\text{Kon}}$  und den Abstand  $d_{\text{Kon}}$  zwischen der Elektrodenoberfläche und der mittleren „Fläche“ mit den nächsten Ionenladungen in der Helmholtzschicht gemäß

$$C = \frac{\epsilon_0 \epsilon_r A_{\text{Kon}}}{d_{\text{Kon}}} \quad (5.30)$$

Problematisch bei der Anwendung von (5.30) ist, dass  $\epsilon_r$  für die HRP unbekannt ist. Zwar liegen  $\epsilon_r$ -Werte für organische Moleküle und einige Enzyme vor, aber die meisten dieser Messungen sind an reinen kristallinen Enzymen durchgeführt worden. Daten zu HRP im Elektrolyten, d.h. „wässrigen“ HRP, sind nicht dokumentiert. Unterstellt man aber ein im Mittel konstantes  $\epsilon_r$  für alle HRP und nimmt man weiterhin an, dass durch fortwährende Adsorption die im Mittel adsorbierte Schicht an HRP zunimmt, erlaubt die relative Änderung von C Rückschlüsse auf die Adsorptionsdynamik.

Um die Adsorptionsdynamik genauer für das betrachtete System zu untersuchen, sind repräsentativ für den Potentialbereich 500mV bis 700mV die Kapazitätswerte bei 600mV aus Abb. 4.21, die das gleiche relative Verhalten haben wie bei anderen Potentialen, logarithmisch über die Zeit aufgetragen (Abb. 5.9). Zunächst ist bei Betrachtung der Kapazitätswerte in Abb. 5.9 festzustellen:

- (I) Besondere Bedeutung ist dem Zeitpunkt  $t \approx 30\text{min}$  beizumessen.
- (II) Bei  $t < 30\text{min}$  sinkt die Oberflächenkapazität mit der Zeit exponentiell.
- (III) Bei  $t > 30\text{min}$  ist ebenfalls ein exponentielles Sinken der Oberflächenkapazität feststellbar, das jedoch langsamer ist als bei  $t < 30\text{min}$ .

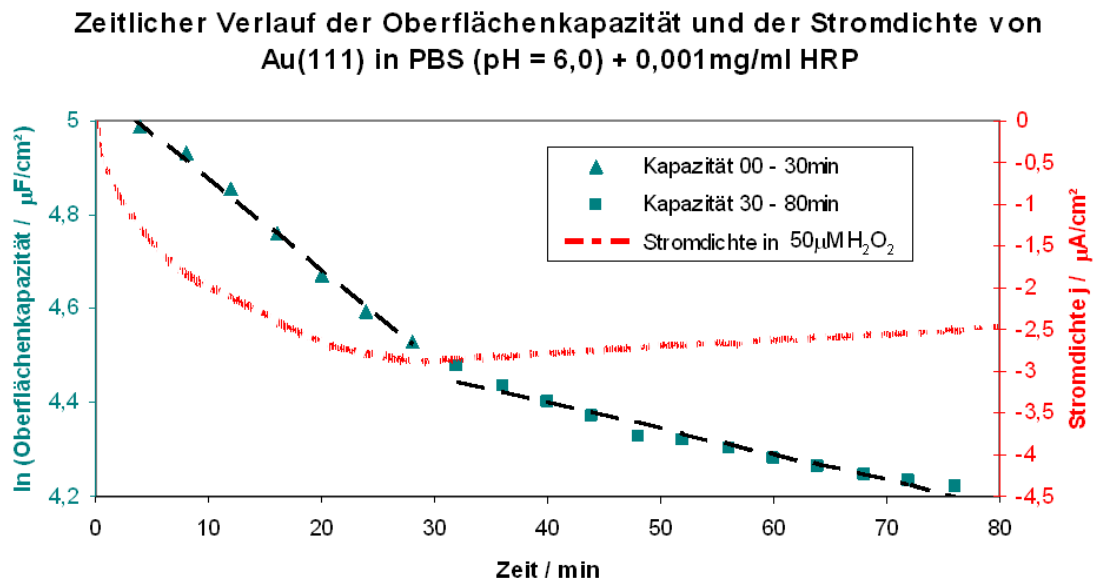


Abb. 5.9: Linke Achse: Kapazitätswerte bei 600mV aus Abb. 4.21, dargestellt logarithmisch über der Zeit. An die Messpunkte vor 30min und unabhängig davon an die Messpunkte nach 30min sind Geraden gefittet worden, die schwarz gestrichelt eingezeichnet sind. Rechte Achse: Stromdichte bei 600mV aus Abb. 4.18.

Diese Punkte führen zu der Annahme, dass die Adsorption von HRP ein exponentielles Verhalten bis ca. 30 Minuten zeigt, dass sich das Adsorptionsverhalten bei  $t \approx 30\text{min}$  ändert und fortan die Adsorptionsdynamik einem anderen exponentiellen Verlauf folgt.

Durch die in Abb. 5.9 eingezeichnete rote punkt-gestrichelte Kurve, die schon im Zusammenhang mit Abb. 4.18 von  $t = 0$  bis  $t = t^* = 30\text{min}$  diskutiert wurde, wird eine Verbindung zwischen den EIS-Messwerten und den Messungen der katalytischen Aktivität der HRP hergestellt. Der oben erwähnte „Knick“ in der logarithmischen Darstellung der Oberflächenkapazitäten bei  $t \approx 30\text{min}$  korreliert zeitlich mit der maximalen kathodischen Stromdichte. Zu beachten ist hierbei, dass die Stromdichtenmessungen und die EIS-Messungen völlig unabhängig voneinander waren. Folgende Schlussfolgerungen können aus den bisher herausgearbeiteten Erkenntnissen und Abb. 5.9 gezogen werden:

- (S1) Aufgrund der bis mindestens  $t = 80\text{min}$  stetig fallenden Oberflächenkapazität ist von einer fortschreitenden Adsorption im gesamten Zeitraum auszugehen.
- (S2) Da das System bei  $t = t^* = 30\text{min}$  die höchste kathodische Stromdichte liefert, dürfte es sich um einen Zustand handeln, bei dem alle für einen direkten Elektrontransfer geeigneten Stellen der Elektrodenoberfläche besetzt sind ( $\theta' = 1$ ). Vor  $t = 30\text{min}$  ist demzufolge  $\theta' < 1$ .
- (S3) Von  $t = 0$  bis  $t = t^* = 30\text{min}$  ist eine Adsorption der HRP auf der Elektrodenoberfläche zu beobachten, die exponentieller Natur ist und annähernd (5.28) folgt.
- (S4) Ab  $t = t^* = 30\text{min}$  muss eine weitergehende Adsorption angenommen werden, da sich die Oberflächenkapazität weiter mit der Zeit verringert. Weil jedoch gleichzeitig die gemessene katalytische Aktivität sinkt, muss es sich um eine Adsorption an Stellen handeln, an denen kein direkter Elektrontransfer möglich ist. STM-Bilder legen den Schluss nahe, dass dabei Agglomerate ausgebildet werden und dabei der Zugang von  $\text{H}_2\text{O}_2$  zu den katalytisch aktiven HRP zunehmend erschwert wird.
- (S5) Es liegen Hinweise vor, dass die Adsorption ab  $t = t^* = 30\text{min}$  exponentiell und langsamer verläuft als vor  $t = t^* = 30\text{min}$ .

(S1) bis (S5) beziehen sich auf das  $\text{Au}(111) + \text{PBS} + 0,001\text{mg/ml HRP}$  – System bei  $600\text{mV}$ ; die Stromdichten sind in Gegenwart von  $50\mu\text{M H}_2\text{O}_2$  gemessen worden. Da das prinzipielle Verhalten der Stromdichten bei der Adsorption (siehe Abb. 4.18) von  $[\text{HRP}] = 0,0001\text{mg/ml}$  bis  $[\text{HRP}] = 0,01\text{mg/ml}$  analog ist und genauso im Potentialfenster  $500\text{mV}$  bis  $700\text{mV}$  analoge Ergebnisse für die Oberflächenkapazitäten bestimmt wurden (Abb. 4.21), lassen sich (S1) bis (S5) auf  $\text{Au}(111) + \text{PBS}$  – Systeme auf mindestens die erwähnten Potentialbereiche und HRP-Konzentrationen verallgemeinern. In der Zelle mit  $50\text{ml}$   $0,001\text{mg/ml HRP}$  – Elektrolyt waren  $1,2 \cdot 10^{-9}\text{mol HRP}$  bzw.  $7,23 \cdot 10^{14}$  Enzyme in Lösung.

Eine komplette Monolage von  $40\text{nm}^2$  HRP auf einer  $0,785\text{cm}^2$  Oberfläche würde  $1,57 \cdot 10^{12}$  Enzyme erfordern, d.h. ca. 0,2% der Gesamtmenge. Demnach ist ein durch das endliche HRP-Reservoir abweichende Adsorptionsverhalten von (S1) bis (S5) bei Langzeitmessungen erst bei  $[\text{HRP}] \ll 0,0001\text{mg/ml}$  zu erwarten. Allerdings kommt es bei derart geringen Konzentrationen (siehe Abb. 4.18 schwarze gepunktete Kurve) in der Größenordnung von Stunden nicht zur Ausbildung einer Monolage.



## 5.4 Zusammenfassung der Reproduzierbarkeits- und Fehlerbetrachtung

Vorherige Kapitel haben zum Teil Hinweise auf Fehlerquellen und die Qualität von Messwerten an entsprechenden Stellen gegeben. Aus Übersichtlichkeitsgründen wird auf die Fehler in diesem Kapitel zusammenfassend eingegangen.

### Clustererzeugung auf Thiolflächen

Sind geometrisch gleichmäßig geformte Cluster (Abb. 4.1) erzeugt worden, kann deren Durchmesser und Höhe mit Werten angegeben werden, die je nach Größe und Form Fehler unter  $\pm 10\%$  der Größenangaben haben.

Schwierigkeiten bei der Methode bereitet die Vorbereitung der Experimente und die Wahl der Parameter, die zur Erzeugung definierter Cluster zu wählen sind. Die Ausführungen in Kapitel 3.3.7 und 4.1.1 machen deutlich, dass schon die Herstellung für die Clustererzeugung geeigneter STM-Spitzen fehlerbehaftet ist. Empirisch betrachtet erlaubten weniger als 20% sorgfältig hergestellter palladiumbeladener STM-Spitzen die Erzeugung geometrisch gleichförmiger Cluster. In Kapitel 5.1.1 angegebene Parameter zur Clustererzeugung (Bias, Setpoint, Länge und Höhe des Spannungspulses) sind im Experiment akkurat eingestellt worden. Aber insbesondere die absolute Höhe des Spannungspulses, wie in Kapitel 4.1.1 dokumentiert, kann nicht direkt auf andere STM-Systeme übertragen werden. Man kann jedoch die lineare Beziehung zwischen dem Spannungspuls und der Clusterhöhe bzw. dem –durchmesser (siehe Abb. 4.2) übertragen. Der Fehler der Steigungsgeraden, dargestellt durch die gestrichelten Linien in Abb. 4.2 wird mit ca.  $\pm 30\%$  angegeben.

### STM-Scannen von Enzymen

Analog zu den Clusterexperimenten erfordert auch das STM-Scannen von Enzymen geeignete STM-Spitzen. Für das Abbilden von wenigen adsorbierten Enzymen (z.B. GOD auf HOPG) konnten 60% - 70% der STM-Spitzen verwendet werden. Ein sauberes Abbilden höherer Oberflächendichten an Enzymen (z.B. HRP-Agglomerate auf Au(111)) gelang in nur ca. 20% - 30% der Experimente. Ursache dafür sind vermutlich Wechselwirkungen zwischen STM-Spitze und Enzymen, die teilweise statistisch bedingt sind und vermutlich auch durch die geometrische Form der STM-Spitze beeinflusst werden.

Experimente, aus denen Abb. 4.5, Abb. 4.6 und Abb. 5.5 hervorgegangen sind, waren anspruchsvoll in der Durchführung. Eine hochauflösende STM-Spitze, sehr geringe Drift, Terrassen mit geeigneten adsorbierten Enzymen und eine nicht-destruktive Wechselwirkung

zwischen STM-Spitze und Enzymen waren Voraussetzung für ein mögliches erfolgreiches Experiment. In ca. 2% der vorbereiteten Experimente gelangen Messungen, wie sie in Abb. 4.5 dargestellt sind. Weniger als 10% der Messungen mit dem Ziel der Faradaystrommessung (Abb. 4.6) waren erfolgreich. Lagen jedoch gute Messbedingungen vor, sind vor allem die in Abb. 5.5 dargestellten Daten mit Fehlern von  $\pm 15\%$  als qualitativ relativ gut zu beurteilen. Die aufgezeichneten CVs in Abb. 4.6 sind relativ zum Zustand des HOPG/GOD/STM-Spitzen-Systems wegen der schnell durchgeführten rauscharmen Messung als kaum fehlerbehaftet zu betrachten. Fehlerpotential könnte eher bei der Definition des genauen Zustandes vorhanden sein. Wichtigster Punkt ist dabei die STM-Spitzen-Höhe von 10nm, die mit bis zu  $\pm 50\%$  Fehler behaftet sein könnte. Da die Bestimmung des genauen Abstandes zwischen Elektrodenoberfläche und STM-Spitze generell Schwierigkeiten bereitet, müssten aufwendige Messreihen, z.B. aufbauend auf denen von M. Hugelmann [77], durchgeführt werden, um diesen Fehler genau zu bestimmen bzw. ihn zu minimieren.

#### Kinetische Untersuchungen der HRP auf Au(111)

Während Probleme durch statistisch-bedingte Einflüsse bei STM-Experimenten oft schon vor der Durchführung des Zielexperimentes auftraten oder sich in den Bildern deutlich zeigten, traten Probleme bei den kinetischen Untersuchungen in der Regel nicht offensichtlich auf. Abgesehen von eindeutigen Indikatoren wie CVs (siehe z.B. Abb. 3.4) äußerten sich statistisch-bedingte sowie systematische Fehler insbesondere bei Stromdichtenmessungen in Werten, die nur als fehlerbehaftet identifiziert werden konnten, wenn Referenzwerte oder ausreichend viele Experimentergebnisse vorlagen.

Da jedoch in der Literatur relativ wenige für das hier untersuchte Au(111)/HRP + PBS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – System relevante Referenz- bzw. Richtwerte zu finden sind, war für die Qualität der Untersuchungen in Kapitel 4.3 entscheidend, sich eigene Referenzwerte für das System zu verschaffen. Voraussetzung dafür sind das Experimentieren nach genauen Vorgaben und das mehrfache Wiederholen wichtiger Messungen. Die folgende Tabelle gibt einen Überblick über die Fehlerquellen und, wo möglich, geschätzten Fehler:

<b>Fehlerquelle</b>	<b>Experimentelles Vorgehen und geschätzter Fehler</b>
Elektrode	Präparation der Elektrode (Reinigung, Flammtempern, Abkühlen etc.) mit genauen Parametern. Schwankungen in der Rauigkeit der Au(111)-Oberfläche und dem Zustand nach dem Flammtempern werden auf maximal $\pm 15\%$ geschätzt. Unterschiede zwischen Au(111)-Ein- und Polykristall wirkten sich auch auf höchstens $\pm 10\%$ gemessener Stromdichten aus.
Elektrolyt	Fehler der Konzentrationen von PBS, $H_2O_2$ und anderer Salze können vernachlässigt werden. Beim Einstellen der HRP-Konzentrationen mit sehr geringen Mengen sind bis zu $\pm 5\%$ Fehler möglich. Ein sehr geringer Restsauerstoffgehalt hat zwischen 500mV und 700mV einen vernachlässigbaren Einfluss.
Elektronik	Die Messwerte lagen stets um Größenordnungen über den Messgrenzen. Bekannte Referenz-CVs (Abb. 3.4) waren in sehr guter Übereinstimmung mit der Literatur. Vernachlässigbarer Fehlereinfluss.
HRP-Zustand	Obwohl die HRP sachgemäß bei $-18^\circ C$ nicht über das Haltbarkeitsdatum hinaus gelagert wurden, ist eine geringe Veränderung der Enzyme mit der Zeit nicht auszuschließen. Auch können kleine Unterschiede in den gelieferten Chargen bestehen, da das Herstellungsverfahren sehr komplex ist. Man kann dadurch Auswirkungen von bis zu $\pm 5\%$ in der Reproduzierbarkeit annehmen.

Tab. 5.3: Auflistung der wichtigsten Fehlerquellen und die geschätzten Fehler bei der Experimentdurchführung von Au(111)/HRP + PBS +  $H_2O_2$  – Experimenten.

Um den Gesamtfehler zu erhalten, ist die Betrachtung empirischer Fehler sinnvoll, d.h. die Abweichung der Messwerte unabhängig durchgeführter Experimente von den Mittelwerten mehrerer Experimente, die in der Regel in Abb. 4.9 bis Abb. 4.29 und Abb. 5.6 bis Abb. 5.9 dargestellt sind.

Die  $H_2O_2$ -Stromdichten (Abb. 4.9 bis Abb. 4.12) waren stark vom Au(111)-Oberflächenzustand abhängig. Selbst mit stringenter Experimentdurchführung und viel Erfahrung mit dem Au(111) + PBS +  $H_2O_2$  – System lassen sich die Fehler der Stromdichten nicht wesentlich unter  $\pm 10\%$  verringern. Mit ca.  $\pm 20\%$  sind die Stromdichtenwerte von Au(111)/HRP + PBS +  $H_2O_2$  (Abb. 4.13 bis Abb. 4.18 und Abb. 5.6 bis Abb. 5.9) sowie die Kapazitätswerte der entsprechenden EIS-Experimente (Abb. 4.21 und Abb. 5.9) fehlerbehaftet. Betont sei, dass sich die Fehlerangaben betreffend Abb. 4.9 bis Abb. 4.21 und Abb. 5.6 bis Abb. 5.9 auf die absoluten Messwerte beziehen. Beim Vergleich von

Kurven innerhalb einer Abbildung ist die relative Lage der Werte zueinander je nach Messmethode mit einem deutlich niedrigeren Fehler behaftet.

Zusammenfassend für Kapitel 5.4. lässt sich festhalten, dass die Reproduzierbarkeit bei einem großen Teil der Experimente dieser Arbeit, bedingt durch anspruchsvolle Versuchsmethodik und/oder Systeme mit statistisch verteilten Einflussgrößen eine Herausforderung dargestellt hat. Dieser wurde durch systematisches und sorgfältiges Vorgehen, sowie durch die mehrfache Wiederholung zahlreicher Experimente begegnet. Bei Experimenten mit schwer zu reproduzierbaren absoluten Messwerten bzw. mit nicht maßgeblichen absoluten Messwerten verlagerte sich der Schwerpunkt der Messmethoden und der Auswertung der Daten auf relative Werteänderungen und das Gewinnen von Erkenntnissen aus qualitativen Verhaltensweisen eines Systems.

## 6. Zusammenfassung der Resultate

### 6.1 Überblick der wichtigsten Resultate

#### 6.1.1 Erkenntnisse aus den angewandten Messmethoden

	<b>Beschreibung</b>	<b>Wichtigste Erkenntnisse</b>
<b>j/U</b> <b>Methode</b> <b>A</b>	Zugabe von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> zu Au(111)/HRP in enzymfreien PBS, amperometrische j/U-Messungen bei verschiedenen Potentialen, Zugabe NaCl	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>j_{mess} = (1 - \alpha)j_{H_2O_2}^* + \theta' j_{kat}^*</math></li> <li>• Au(111)/HRP zeigt stabile kathodische Ströme, <math>k'_s \approx 5s^{-1}</math></li> <li>• PBS pH = 6, U<sub>WE</sub> = 600mV, [H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>] = 50μM als Parameter für maximale stabile katalytische Aktivität über Stunden</li> </ul>
<b>j/U</b> <b>Methode</b> <b>B</b>	Zugabe H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> zu Au(111) in enzymfreien PBS, dann Zugabe von HRP, amperometrische j/U-Messungen bei 600mV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <math>j_{mess} = j_{H_2O_2}^* + (j_{kat}^* - j_{H_2O_2}^*) (1 - e^{-k_{ads}^{[HRP]}t})</math>, <math>t \leq t^*</math></li> <li>• H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oxidiert in PBS für U<sub>WE</sub> &gt; 500mV direkt an Au(111), Cl<sup>-</sup>-Ionen inhibieren Oxidation zwischen 500mV und 700mV</li> <li>• Deutlicher Hinweis auf Ausbildung von Agglomeraten</li> </ul>
<b>j/U</b> <b>Methode</b> <b>C</b>	Zugabe HRP zu Au(111) in enzymfreien PBS, dann Zugabe von H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , amperometrische j/U-Messungen bei 600mV	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adsorption von HRP auf Au(111) ist weitgehend unabhängig davon, ob H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> im PBS-Elektrolyten ist</li> </ul>
<b>EIS</b>	Messung potentialabhängige zeitliche Entwicklung der Oberflächenkapazität bei 10Hz von Au(111) in PBS nach Zugabe von HRP	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bestätigung Gleichung j<sub>mess</sub> exponentieller Verlauf der Adsorption von HRP auf Au(111) bis <math>\theta' = 1</math> (j/U Methode B)</li> <li>• Für <math>t &gt; t^*</math> langsamere exponentielle Adsorption von HRP, deutlicher Hinweis auf Ausbildung von Agglomeraten</li> </ul>
<b>STM</b> <b>GOD/HRP</b>	Scannen von GOD auf HOPG und HRP auf Au(111), Messung potentialabhängiger Kontrast und Faradayströme am HOPG/GOD-System	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Kontrast/Überpotential U<sub>GOD</sub> Zusammenhang</li> <li>• Faradaystromberücksichtigung beim GOD-Scan auf HOPG</li> <li>• Zunahme HRP-Adsorption auf Au(111) mit der Zeit bis zur Ausbildung von Agglomeraten</li> </ul>
<b>STM</b> <b>Cluster</b>	Beladung von Au-Spitzen mit Pd, lokale Erzeugung von Pd-Cluster auf thiol-passivierter Au(111)-Oberfläche, Abbildung der Cluster mit der Spitze	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Größe kugelsegmentähnlicher Nanocluster ist näherungsweise proportional zum Spannungspuls am z-Piezo</li> <li>• Höhere Spannungspulse für Cluster-Bildung über Au(111) + Thiol-SAM als über Au(111) ohne Thiol-SAM</li> </ul>

Tab. 6.1 Auflistung der angewandten Messmethoden, die bei den Experimenten dieser Arbeit angewandt wurden, mit ihren jeweiligen Beiträgen zu den Resultaten. Weitere Details sind in Kapitel 4 und 5 an den entsprechenden Stellen zu finden.

Jede der aufgelisteten Methoden hat zu den Erkenntnissen dieser Arbeit beigetragen, wobei die j/U Methode C eine untergeordnete Rolle spielt. Die Beschreibung und Erkenntnisse der jeweiligen Methoden sind auf die Experimente und Erfahrungen aus dieser Arbeit bezogen und konzentrieren sich daher auf die Au(111)/HRP- und HOPG/GOD-Systeme mit den beschriebenen Parametern. Eine Übertragbarkeit ist unter Berücksichtigung der Literatur auf andere Elektroden-/Enzym-Systeme möglich, muss aber für das jeweilige System verifiziert werden.

### **6.1.2 Diskussion der Resultate bezüglich der Ziele**

Den Zielen der Arbeit (Kapitel 1.2) folgend sind die Adsorptionseigenschaften von HRP an Au(111) sowie die katalytische Aktivität der direkt an Au(111) adsorbierten Enzyme untersucht worden. Ferner sind die Abbildungseigenschaften von GOD auf HOPG und HRP auf Au(111) mit dem STM studiert worden. Den dritten Schwerpunkt der Arbeit bildet die Erzeugung und Charakterisierung von Palladiumclustern auf mit Thiol-SAMs passivierten Au(111)-Oberflächen. Drei Fragestellungen in Kapitel 1.2 bilden den Leitfaden dieser Arbeit. Da die Ergebnisse wichtige Teilantworten zu diesen Fragen liefern, werden sie im Folgenden als Antworten auf die kursiv-gedruckten Fragen formuliert.

*Die meisten Enzyme binden nicht direkt an metallischen Nanoclustern bzw. denaturieren sofort. Ein Linker würde jedoch das System in seiner Komplexität erhöhen. Inwiefern bleiben ausgewählte Enzyme wie die Horseradish Peroxidase adsorbiert an metallischen Oberflächen katalytisch aktiv?*

Unter Beachtung der für die Beobachtung zeitlich stabiler katalytischer Aktivität wichtigen Parameter (Potentialbereich 500mV – 700mV,  $[H_2O_2] = 50\mu M$ , PBS pH = 6,0) lieferte die Au(111)/HRP-Elektrode kathodische Stromdichten von bis zu  $-3,5\mu A/cm^2$ , die ausschließlich auf die katalytische Aktivität und damit auf den direkten Elektrontransfer zwischen den HRP und der Au(111)-Oberfläche zurückzuführen sind. Trotz nicht-kovalenter und vergleichsweise schwacher Bindung zwischen den HRP und der Au(111)-Oberfläche konnte eine Elektrode mit voradsorbierten HRP reproduzierbar in einer enzymfreien Zelle ihre katalytische Aktivität über Stunden weitgehend konstant halten. Die Adsorption von HRP auf der Au(111) erfolgt exponentiell fallend, bis sämtliche für den direkten Elektrontransfer geeigneten Stellen der Oberfläche besetzt sind. Bei einer Konzentration von 0,01mg/ml HRP in PBS ist dies nach ca. 5-10 Minuten, bei einer Konzentration von 0,001mg/ml HRP in PBS ist dies nach 25-30 Minuten der Fall. Für die Adsorption bis zu dem Zeitpunkt  $t^*$ , bei dem die höchste

katalytische Aktivität auf Au(111) adsorbierten HRP gemessen wurde, konnte die Gleichung  $j_{mess} = j_{H_2O_2}^* + (j_{kat}^* - j_{H_2O_2}^*) (1 - e^{-k_{ads}[HRP]t})$  aufgestellt und mit den experimentellen Daten als näherungsweise anwendbar verifiziert werden. Über den Zeitpunkt  $t^*$  hinaus ist von einer weiteren Adsorption auszugehen, die zu HRP-Agglomeraten auf der Oberfläche führt und damit zu einer insgesamt niedrigeren katalytischen Aktivität des Gesamtsystems. Das Arbeiten mit Au(111)/HRP + PBS + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Systemen erfordert ein genaues Studium der H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-Oxidationsströme bei  $U_{WE} \geq 500\text{mV}$ . Durch entsprechende Elektrolytwahl, z.B. PBS + NaCl, können diese Oxidationsströme, allerdings mit möglichen Auswirkungen auf die Stabilität der Aktivität, im Bereich  $500\text{mV} \geq U_{WE} \geq 700\text{mV}$  inhibiert werden.

Einige Experimente gaben Hinweise darauf, dass Palladiumoberflächen mit direkt adsorbierten HRP ähnliche Verhaltensweisen zeigen. Somit bilden also Au(111) bzw. Au(111)/Pd, die weder voroxidiert noch mit organischen Verbindungen vorbehandelt werden, mit direkt adsorbierten HRP ein in ihrer „Einfachheit“ für weitere Studien interessantes System.

*Welche Abbildungseigenschaften zeigen die adsorbierten Enzyme bei der Verwendung des Rastertunnelmikroskops?*

Neben einigen Scanparametern hängt die Qualität der Abbildung von adsorbierten Enzymen wesentlich von der Bindung zwischen der Oberfläche und den Enzymen ab. Zahlreiche Experimente unter verschiedenen Bedingungen zeigten, dass GOD kovalent adsorbiert auf voroxidiertem HOPG eindeutig in STM-Bildern identifiziert und mit der Spitze lokal charakterisiert werden kann. Das an der HOPG/GOD-Oberfläche angelegte Potential relativ zum Redoxpotential der GOD determiniert die scheinbare Höhe der GOD in STM-Bildern fest. Experimentelle Hinweise liegen vor, dass Faradayströme für das Verständnis der Korrelation zwischen angelegtem Potential und den scheinbaren Enzymhöhen berücksichtigt werden müssen. HRP hat eine nicht-kovalente, vergleichsweise schwache Bindung zur Au(111)-Oberfläche und dies erschwert die Abbildung der an der Oberfläche adsorbierten Enzyme mit dem STM. Zwar lassen sich HRP grundsätzlich an geeigneten Stellen auf einer Au(111)-Oberfläche abbilden, aber diese Messungen unterliegen Störeinflüssen durch Wechselwirkungen zwischen STM-Spitze und Enzymen, die die Qualität der STM-Bilder beträchtlich senken können. Bei Messreihen mit Au(111) in Elektrolyten verschiedener HRP-Konzentrationen wurde beobachtet, dass sich mit zunehmender HRP-Konzentration Agglomerate vor allem an bevorzugten Bindungsstellen (Stufen, Kristallgrenzen) ausbilden. Ähnliche Beobachtungen der Adsorption und Scaneigenschaften von HRP auf Au(111) wurden auch beim HRP auf Au(111)/Pd gemacht.

Aufgrund von eigenen Untersuchungen und Studien anderer Gruppen kann beim STM-Scannen von adsorbierten Enzymen eine nicht-destruktive Wechselwirkung zwischen STM-Spitze und Enzym angenommen werden. Dies erlaubt die lokale Detektion von an Au(111) und Au(111)/Pd adsorbierten HRP und ermöglicht damit weitergehende lokale Untersuchungen der adsorbierten Enzyme mit der STM-Spitze.

*Wie lassen sich Nanocluster verschiedener Größen lokal auf thiolbedeckten Goldoberflächen erzeugen?*

Trotz der dokumentierten experimentellen Schwierigkeiten belegten erfolgreich lokal erzeugte Palladiumcluster auf thiolbedeckten Au(111)-Oberflächen, dass die Methode zielführend ist. Aus Experimenten geht hervor, dass bei der spitzeninduzierten Clustererzeugung die Clustergröße näherungsweise proportional zum angelegten Spannungspuls am z-Piezo ist. Es können Cluster im Nanometermaßstab erzeugt werden, die geometrisch kugelsegmentähnliche Formen haben. Diese zeitlich stabilen Cluster können direkt nach der Erzeugung mit der STM-Spitze abgebildet und charakterisiert werden. In Kapitel 5.1.2 sind aus den Erfahrungen mit der Methode entwickelte Vorschläge vorgestellt, die die Reproduzierbarkeit und Möglichkeiten dieser Methode verbessern können.

## **6.2 Möglichkeiten für weitergehende Forschungsarbeiten**

Nachdem mit dieser Arbeit wichtige Erkenntnisse über HRP an Au(111) vorliegen, können darauf aufbauende Forschungsstudien einerseits dem Erreichen der in Kapitel 1.2 formulierten langfristigen Zielen dienen und andererseits durch die Ergebnisse dieser Arbeit angeregte neue Wege gehen. Im Folgenden werden die Möglichkeiten für weitergehende Forschungsarbeiten kurz skizziert:

- Unter Benutzung anderer Methoden, z.B. EQCM (elektrochemische Quarzkristall Mikrowaage), FTIR (Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie), könnte die genaue Zahl der adsorbierten HRP abgeschätzt werden, wodurch man die mittlere Aktivität einzelner Enzyme genauer bestimmen könnte. Führt man diese Methode nach festgelegten Adsorptionszeiten durch, können die Erläuterungen zu den Adsorptionskurven dieser Arbeit erweitert werden.
- Experimente mit adsorbierten HRP auf reinen Palladium-, sonstigen Metalloberflächen sowie modifizierten Metalloberflächen (z.B. voroxidiert, Thiol-SAM + EDC, sonstige



Linkermoleküle) können mit den vorliegenden Au(111)/HRP-Ergebnissen verglichen und das Verhalten mit Bezug zu den Au(111)/HRP-Referenzergebnissen beurteilt werden.

- Verbesserungen bei der spitzeninduzierten Erzeugung von Clustern auf Au(111) mit Thiol-SAMs erhöhen die Reproduzierbarkeit der Methode. Sie könnte sich damit zu einem wichtigen Instrument zur Erforschung einzelner Enzyme entwickeln.
- Ein sehr herausfordernder und wissenschaftlich großer Schritt sind Experimente, bei denen in Thiolfächen, wo keine HRP adsorbieren, einzelne Metallcluster erzeugt werden und an diesen HRP adsorbiert werden. So könnten gezielt an vordeterminierten Stellen ein oder wenige HRP in Abwesenheit anderer HRP adsorbiert werden und diese mit der STM-Spitze charakterisiert werden.

## 7. Verzeichnis der in dieser Arbeit verwendeten Abkürzungen

### *Symbole mit lateinischen Buchstaben*

A	Konstante in der Tunnelrelation mit dem Wert $10,25 \text{ nm}^{-1}(\text{eV})^{-1/2}$
$A_{\text{Kon}}$	Fläche einer Platte eines Plattenkondensators
AFM	Rasterkraftmikroskop, engl. atomic force microscope
$a_{\text{Me}}$	Aktivität von Metallatomen mit der Ladung null
$a_{\text{Me}^{z+}}$	Aktivität von Metallionen mit der positiven Ladung z+
Au(111)/HRP	Au(111)-Elektrode mit voradsorbierten HRP in HRP-freier Lösung
Au(111)/HRP*	Au(111)-Elektrode in Lösung mit HRP, Adsorptionsprozess dauert an
C	Kapazität
$C_1$	Kapazität, Element im Schaltkreis der EIS-Dummyzelle
CE	Gegenelektrode, engl. counter electrode
$c_i$	Konzentration der Ionen i
CV	zyklische(s) Voltammogramm/Voltammetrie, engl. cyclic voltammogram/voltammetry
d	Abstand zwischen STM-Spitze und Probenoberfläche
$d_{\text{Kon}}$	Abstand zwischen den beiden Platten eines Plattenkondensators
$d_{\text{Pd}(111)}$	Abstand zwischen zwei Palladiumatomen im Pd(111)-Gitter
e	wenn nicht als Eulersche Zahl verwendet: e = Elementarladung
E	Enzym
EC-STM	elektrochemisches Rastertunnelmikroskop
EDC	1-Ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimid
$E_{\text{F}}(\text{Probe})$	Ferminiveau der Probe
$E_{\text{F}}(\text{Spitze})$	Ferminiveau der Spitze
EIS	elektrochemische Impedanzspektroskopie
$E_{\text{ox}}$	Energiezustand eines Redox-Moleküls im oxidierten Zustand
EQCM	elektrochemische Quarzkristall Mikrowaage, engl. electrochemical quartz crystal microbalance
$E_{\text{red}}$	Energiezustand eines Redox-Moleküls im reduzierten Zustand
ES	Enzym-Substrat-Komplex
$[E]_{\text{T}}$	totale Enzymkonzentration
$E_{\text{vak}}(\text{Probe})$	Vakuumsenergie, um Elektronen von der Probe ins kräftefreie Vakuum zu bringen
$E_{\text{vak}}(\text{Spitze})$	Vakuumsenergie, um Elektronen von der Spitze ins kräftefreie Vakuum zu bringen
$E(z)$	Energie in Abhängigkeit von der z-Position (senkrecht zur Oberfläche des Körpers)
f	Frequenz
F	Faradaykonstante, $F = 96485 \text{ As/mol}$
FAD	Flavin-Adenin-Dinukleotid
FRA	Frequency Response Analyzer, EIS-Software
FTIR	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
GOD	Glucose-Oxidase
h	Stunde, engl. Hour
H	scheinbare Höhe eines Objektes, berechnet nach einem Scan mit dem STM
$H_0$	scheinbare Höhe eines Objektes bei $I_{\text{F}} = 0$ , berechnet nach einem Scan mit dem STM
HOPG	hochorientiertes pyrolytisches Graphit, engl. highly ordered pyrolytic graphite
HRP	Meerrettichperoxidase, engl. horseradish peroxidase
HRP <sub>ads</sub>	an einer Oberfläche adsorbierte Meerrettichperoxidase
$H_{\text{SAM}}$	Höhe einer SAM
i	Imaginärzahl, $i^2 = -1$ (siehe Impedanzspektroskopie)
$I_0$	Amplitude der periodischen Stromänderung an einer Elektrode
$I_{\text{CE}}$	Strom an der Gegenelektrode
$I_{\text{F}}$	Faradaystrom
I-Gain	Integral Gain
$I_{\text{HOPG}}$	Strom, gemessen an der mit GOD-modifizierten HOPG-Arbeits Elektrode
$I_{\text{ist}}$	„Ist“-Strom, gemessener Stromwert
$I_{\text{Elektrolyt}}$	Ionenstärke eines Elektrolyten
$I_{\text{PBS, pH=6,0}}$	Ionenstärke des Puffers PBS mit dem pH-Wert 6,0
$I_{\text{PBS, NaClO}_4, \text{pH=6,0}}$	Ionenstärke des Puffers PBS + 0,2M NaClO <sub>4</sub> mit dem pH-Wert 6,0
IRRAS	Infrarot-Reflexions-Absorptions-Spektroskopie
$I_{\text{soll}}$	„Soll“-Strom, eingestellter Stromwert
$I_{\text{Spitze}}$	STM-Spitzenstrom
$I_{\text{Spitze, GOD}}$	STM-Spitzenstrom, gemessen 10nm über einer auf HOPG adsorbierten GOD
$I_{\text{Spitze, HOPG}}$	STM-Spitzenstrom, gemessen 10nm über einer enzymfreien HOPG-Oberfläche
$I_t$	sich zeitlich ändernder Strom einer Elektrode
$I_{\text{T}}$	Tunnelstrom
$I_{\text{WE}}$	Strom an der Arbeitselektrode
j	Stromdichte, in dieser Arbeit in der Regel auf 1cm <sup>2</sup> bezogen

$j_{\text{H}_2\text{O}_2}$	anodische Stromdichte, die sich aus der Oxidation von $\text{H}_2\text{O}_2$ an Au(111) ergibt
$j_{\text{H}_2\text{O}_2}^*$	$j_{\text{H}_2\text{O}_2} / (1 - \alpha)$ bzw. $j_{\text{H}_2\text{O}_2}^* = j_{\text{H}_2\text{O}_2}$ bei $\theta = 0$
$j_{\text{kat}}$	kathodische Stromdichte, die sich aus der katalytischen Reduktion von $\text{H}_2\text{O}_2$ durch HRP ergibt
$j_{\text{kat}}^*$	$j_{\text{kat}} / \theta$ bzw. $j_{\text{kat}}^* = j_{\text{kat}}$ bei $\theta = 1$
$j_{\text{mess}}$	an der Au(111) bzw. Au(111)/HRP gemessene Stromdichte
$k$	Boltzmann-Konstante
$k_1, k_2$	Ratenkonstanten für festgelegte Reaktionen „1“ und „2“
$k_{-1}$	Ratenkonstante für die Rückreaktion der Reaktion „1“
$k_{\text{ads}}$	Geschwindigkeitskonstante für die Adsorption von Molekülen an Oberflächen
$k_{\text{des}}$	Geschwindigkeitskonstante für die Desorption von Molekülen an Oberflächen
$k_s$	ratenbestimmende Geschwindigkeitskonstante beim katalytischen Zyklus der HRP
$k_s'$	$k_s$ , bestimmt aus den Experimenten mit Au(111)/HRP + PBS (pH = 6,0) + 50 $\mu\text{M}$ $\text{H}_2\text{O}_2$
$\underline{k}_s'$	niedrigster experimentell bestimmter Wert der Konstante $k_s'$
$K_s$	Säurekonstante
$k_{\text{et}}$	Geschwindigkeit des Elektrontransfers
$K_M$	Michaelis-Konstante
Me	Metallatom mit der Ladung null
$\text{Me}^{z+}$	Metallion mit der positiven Ladung $z+$
Med	Mediator / Mediatormolekül
min	Minute
ML	Monolage
$n$	Anzahl der Elektronen, die bei einem Redoxvorgang übertragen werden
$N$	Zahl der C-Atome in einem nichtaromatischen Thiolmolekül
$N_A$	Avogadro-Konstante
NCD	Nanokristalliner Diamant, nano-crystalline diamond
NHE	Normal-Wasserstoff-Elektrode, engl. normal hydrogen electrode
OCP	offenes Zellpotential, engl. open-cell potential
ox	oxidiert
P	Produkt
PBS	Phosphatpuffersystem, engl. phosphate buffer system
P-Gain	Proportional Gain
pH	pondus Hydrogenii, Maß für die Konzentration an $\text{H}^+$ -Ionen in einer Lösung
pl	isoelektrischer Punkt
$\text{pK}_s$	negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante
$\text{pO}_2$	Partialdruck von Sauerstoff
$R$	Gaskonstante
$R_1$	erstes Widerstandselement im Schaltkreis der EIS-Dummyszelle
$R_2$	zweites Widerstandselement im Schaltkreis der EIS-Dummyszelle
RE	Referenzelektrode
$R_E$	Elektrolytwiderstand
red	reduziert
$R_{\text{el}}$	elektrischer Widerstand
REM	Rasterelektronenmikroskop
$R_P$	Polarisationswiderstand
S	Substrat, das bei einer katalytischen Reaktion umgesetzt wird
SAM	selbst-assemblierende Monoschicht, engl. self-assembled monolayer
sat.	gesättigt, engl. saturated
STM	Rastertunnelmikroskop, engl. scanning tunneling microscope
$t$	Zeit
$t^*$	Zeitpunkt, an dem Au(111)/HRP* die höchste kathodische Stromdichte liefert
$T$	Temperatur
$U$	Potential, in dieser Arbeit gegen die Normal-Wasserstoff-Elektrode angegeben
$U_0$	Amplitude der periodischen Potentialänderung an einer Elektrode
$U_{\text{Me/Me}^{z+}}^0$	Gleichgewichtspotential des Redoxpaares $\text{Me/Me}^{z+}$ unter Standardbedingungen
$U_{\text{GOD}}$	Gleichgewichtspotential der Glucose Oxidase (-0,23V vs. NHE experimentell bestimmt)
$U_{\text{H}_2\text{O}_2/\text{H}_2\text{O}}^*$	Nernstpotential der Reduktion von $\text{H}_2\text{O}_2$ zu $\text{H}_2\text{O}$ mit $[\text{H}_2\text{O}_2] = 5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ und $[\text{H}^+] = 10^{-6} \text{M}$
$U_{\text{H}_2\text{O}_2/\text{O}_2}^*$	Nernstpotential der Reduktion von $\text{H}_2\text{O}_2$ zu $\text{H}_2\text{O}$ mit $[\text{H}_2\text{O}_2] = 5 \cdot 10^{-5} \text{M}$ und $[\text{H}^+] = 10^{-6} \text{M}$
$U_{\text{Me/Me}^{z+}}$	Gleichgewichtspotential des Redoxpaares $\text{Me/Me}^{z+}$ entsprechend der Nernstgleichung
UPD	Unterpotentialabscheidung, engl. under-potential deposition
$U_{\text{Puls,min}}$	Mindestspannung, die zur z-Piezospaltung addiert wird, um ein Pd-Cluster zu erzeugen
$U_{\text{Spitze}}$	Potential der Spitze
$U_t$	sich zeitlich änderndes Potential einer Elektrode
$U_T$	Tunnelspannung (Bias)
$U_{\text{WE}}$	Potential an der Arbeitselektrode
$U_x$	Spannung am x-Piezo der STM-Spitze
$U_y$	Spannung am y-Piezo der STM-Spitze
$U_z$	Spannung am z-Piezo der STM-Spitze
$U_{z\text{-Piezo}}$	Spannungspuls, der für kurze Zeit zu $U_z$ dazuaddiert wird

WE	Arbeitselektrode, engl. working electrode
x	Entfernung zwischen zwei Punkten auf einem STM-Bild
z	Höhe in einem STM-Bild
Z	Impedanz
Z	Betrag des Impedanzvektors, entspricht $Z_0$
$Z_0$	Amplitude der periodischen Impedanzänderung
$Z_i$	Ionenladung der Ionen i
$Z_{im}$	Imaginärteil der Impedanz
$Z_{Re}$	Realteil der Impedanz
$Z_{Spitze}$	Höhe der STM-Spitze relativ zur Elektrodenoberfläche

### *Symbole mit griechischen Buchstaben*

$\alpha$	Parameter, der eine Funktion des Bedeckungsgrades $\theta$ ist
$\beta$	Tunnelkonstante, Maß für die exponentielle Abnahme der elektronischen Kopplung
$\Gamma_0$	zusammengefasste Konstanten in der Marcus-Theorie
$\Delta d$	Differenz zwischen dem aktiven Zentrum eines Enzyms und der Elektrodenoberfläche
$\Delta G^0$	Änderung der freien Energie, Überpotential der Elektrode (Marcus-Theorie)
$\Delta Z_{Spitze}$	Änderung der Höhe der STM-Spitze relativ zur Elektrodenoberfläche
$\epsilon_0$	Dielektrizitätskonstante des Vakuums
$\epsilon_r$	materialabhängige Dielektrizitätskonstante
$\eta$	Überpotential relativ zum Redox-Potential einer Reaktion
$\theta$	Bedeckungsgrad der Oberfläche mit HRP; $\theta = 0$ : keine Bedeckung, $\theta = 1$ : komplette Bedeckung
$\theta'$	modifiziertes $\theta$ ; $\theta' = 1$ , wenn alle für die HRP-Aktivität möglichen Bindungsstellen belegt sind
$\lambda$	Reorganisationsenergie
$v$	Geschwindigkeit einer elektrochemischen Reaktion
$v_0$	Anfangsgeschwindigkeit einer elektrochemischen Reaktion
$v_{max}$	Maximalgeschwindigkeit einer elektrochemischen Reaktion
$v_n$	zusammengefasste Konstanten in der Marcus-Theorie
$\xi$	Probe-Lösung Potentialabfall
$\phi$	Phasenverschiebung zwischen $I_t$ und $U_t$
$\phi_P$	Austrittsenergie für Elektronen aus der Probe
$\phi_S$	Austrittsenergie für Elektronen aus der Spitze
$\phi_T$	mittlere Barrierenhöhe beim Tunneln
$\chi^2$	Fehlerindikator
$\omega$	Kreisfrequenz

## 8. Literaturverzeichnis

- [1] R.A. Bullen, T.C. Arnot, J.B. Lakeman, F.C. Walsh. Biofuel cells and their development. *Biosensors and Bioelectronics* 2006, 21, 2015 – 2045.
- [2] F. Davis, S.P.J. Higson. Biofuel cells – Recent advances and applications. *Biosensors and Bioelectronics* 2007, 22, 1224 – 1235.
- [3] A. Heller. Miniature biofuel cells. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2004, 6, 209 – 216.
- [4] J. Meier. Herstellung, Charakterisierung und Reaktivität von Oberflächeninhomogenitäten an der Grenzfläche fest-flüssig. *Dissertation an der TU-München*, Garching bei München, 2003.
- [5] J. Meier, K.A. Friedrich, U. Stimming. Novel method for the investigation of single nanoparticle reactivity. *Faraday Discussions* 2002, 121, 365 – 372.
- [6] M. Eikerling, J. Meier, U. Stimming. Hydrogen Evolution at a Single Supported Nanoparticle: A Kinetic Model. *Zeitschrift für Physikalische Chemie* 2003, 217, 395 – 414.
- [7] J. Meier, J. Schiøtz, P. Liu, J.K. Nørskov, U. Stimming. Nano-scale effects in electrochemistry. *Chemical Physics Letters* 2004, 390, 440 – 444.
- [8] M.G. Del Pópolo, E.P.M. Leiva, H. Kleine, J. Meier, U. Stimming, M. Mariscal, W. Schmickler. A combined experimental and theoretical study of the generation of palladium clusters on Au(111) with a scanning tunnelling microscope. *Electrochimica Acta* 2003, 48, 1287 – 1294.
- [9] S. Pandelov. Investigation of the structure and reactivity of nanostructured surfaces. *Dissertation an der TU-München*, Garching bei München, 2007.
- [10] S. Pandelov, U. Stimming. Reactivity of monolayers and nano-islands of palladium on Au(111) with respect to proton reduction. *Electrochimica Acta* 2007, 52, 5548 – 5555.
- [11] E. Katz, A.N. Shipway, I. Willner. *Handbook of Fuel Cells Volume 1* – Chapter 21 – Biochemical Fuel Cells (editors: W. Vielstich, A. Lamm, H.A. Gasteiger). John Wiley & Sons, Chichester, 2003.
- [12] S. Cosnier. Biomolecule immobilization on electrode surfaces by entrapment or attachment to electrochemically polymerized films. A review. *Biosensors and Bioelectronics* 1999, 14, 443 – 456.
- [13] L. Gorton, A. Lindgren, T. Larsson, F.D. Munteanu, T. Ruzgas, I. Gazaryan. Direct electron transfer between heme-containing enzymes and electrodes as basis for third generation biosensors. *Analytica Chimica Acta* 1999, 400, 91 – 108.
- [14] Q. Chi, O. Farver, J. Ulstrup. Long-range protein electron transfer observed at the single-molecule level: In situ mapping of redox-gated tunnelling resonance. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2005, 102, 16203 – 16208.
- [15] J. Zhang, Q. Chi, S. Dong, E. Wang. In situ electrochemical scanning tunnelling microscopy investigation of structure for horseradish peroxidase and its electrocatalytic property. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 1996, 39, 267 – 274.
- [16] C.M. Hurth. Scanning Probe Microscopy Studies of Active Enzymes at Solid Surfaces. *Dissertation an der University of Texas at Austin*, Austin, 2005.

- [17] D. Sun, C. Cai, X. Li, W. Xing, T. Lu. Direct electrochemistry and bioelectrocatalysis of horseradish peroxidase immobilized on active carbon. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2004, 566, 415 – 421.
- [18] E. Ferapontova, E. Domínguez. Adsorption of differently charged forms of horseradish peroxidase on metal electrodes of different nature: effect of surface charges. *Bioelectrochemistry* 2002, 55, 127 – 130.
- [19] D. Voet, J.G. Voet. *Biochemie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1992.
- [20] E.E. Ferapontova, L. Gorton. Effect of proton donors on direct electron transfer in the system gold electrode-horseradish peroxidase. *Electrochemistry Communications* 2001, 3, 767 – 774.
- [21] H.B. Dunford. *Peroxidases in Chemistry and Biology Volume 2* – Chapter 1 – Horseradish Peroxidase: Structure and Kinetic Properties (editors: I. Everse, K.E. Everse, M.B. Grisham). CRC Press, Boca Raton, 1991.
- [22] T. Ruzgas, L. Gorton, J. Emnéus, G. Marko-Varga. Kinetic models of horseradish peroxidase action on graphite electrode. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1995, 391, 41 – 49.
- [23] E.E. Ferapontova. Direct Peroxidase Bioelectrocatalysis on a Variety of Electrode Materials. *Electroanalysis* 2004, 16, 1101 – 1111.
- [24] G.I. Berglund, G.H. Carlsson, A.T. Smith, H. Szoke, A. Henriksen, J. Hajdu. The catalytic pathway of horseradish peroxidase at high resolution. *Nature* 2002, 417, 463 – 468.
- [25] H. B. Dunford. *Heme Peroxidases*. Wiley-VCH, New York, 1999.
- [26] Y. Hayashi, I. Yamazaki. The oxidation-reduction potentials of Compound I/Compound II and Compound II/Ferric Couples of Horseradish Peroxidases  $A_2$  and  $C^*$ . *The Journal of Biological Chemistry* 1979, 254, 9101 – 9106.
- [27] M. Dankerl. Entwicklung und Charakterisierung einer bio-elektrochemischen Brennstoffzelle. *Diplomarbeit an der TU-München*, Garching bei München, 2006.
- [28] B.E.P. Swoboda, V. Massey. Purification and Properties of the Glucose Oxidase from *Aspergillus Niger*. *The Journal of Biological Chemistry* 1965, 240, 2209 – 2215.
- [29] D. Losic, J.G. Shapter, J.J. Gooding. Scanning tunnelling microscopy studies of glucose oxidase on gold surfaces. *Langmuir* 2002, 18, 5422 – 5428.
- [30] D. Zhong, A.H. Zewail. Femtosecond dynamics of flavoproteins: charge separation and recombination in riboflavine (vitamin B2)-binding protein and in glucose oxidase enzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 2001, 98, 11867 – 11872.
- [31] M.T. Stankovich, L.M. Schopfer, V. Massey. Determination of glucose oxidase oxidation-reduction potentials and the oxygen reactivity of fully reduced and semiquinoid forms. *The Journal of Biological Chemistry* 1978, 253, 4971 – 4979.
- [32] G.T.R. Palmore, H. Bertschy, S.H. Bergens, G.M. Whitesides. A methanol / dioxygen biofuel cell that uses  $NAD^+$ -dependent dehydrogenases as catalysts: application of an electro-enzymatic method to regenerate nicotinamide adenine dinucleotide at low overpotentials. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1998, 443, 155 – 161.
- [33] P.D. Barker, K. Di Gleria, H.A.O. Hill, V.J. Lowe. Electron transfer reactions of metalloproteins at peptide-modified gold electrodes. *European Journal of Biochemistry* 1990, 190, 171 – 175.

- [34] T. Ferri, A. Poscia, R. Santucci. Direct electrochemistry of membrane-entrapped horseradish peroxidase. Part I. A voltammetric and spectroscopic study. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 1998, 44, 177 – 181.
- [35] E. Csöregi, G. Jönsson-Petterson, L. Gorton. Mediatorless electrocatalytic reduction of hydrogen peroxide at graphite electrodes chemically modified with peroxidases. *Journal of Biotechnology* 1993, 30, 315 – 317.
- [36] E. Ferapontova, L. Gorton. Bioelectrocatalytical detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with different forms of horseradish peroxidase directly adsorbed at polycrystalline silver and gold. *Electroanalysis* 2003, 15, 484 – 490.
- [37] S. Dong, J. Li. Self-assembled monolayers of thiols on gold electrodes for bioelectrochemistry and biosensors. *Bioelectrochemistry and Bioenergetics* 1997, 42, 7 – 13.
- [38] A. Härtl, E. Schmich, J.A. Garrido, J. Hernando, S.C.R. Catharino, S. Walter, P. Feulner, A. Kromka, D. Steinmüller, M. Stutzmann. Protein-modified nanocrystalline diamond thin films for biosensor applications. *Nature Materials* 2004, 3, 736 – 742.
- [39] D.A. Guschin, Y.M.Sultanov, N.F. Sharif-Zade, E.H. Aliyev, A.A. Efendiev, W. Schuhmann. Redox polymer-based reagentless horseradish peroxidase biosensors influence of the molecular structure of the polymer. *Electrochimica Acta* 2006, 51, 5137 – 5142.
- [40] S.C. Barton, H.-H. Kim, G. Binyamin, Y. Zhang, A. Heller. The “wired“ laccase cathode: high current density electroreduction of O<sub>2</sub> to water at +0.7V (NHE) at pH 5. *Journal of American Chemical Society* 2001, 123, 5802 – 5803.
- [41] E.E. Ferapontova, V.G. Grigorenko, A.M. Egorov, T. Borchers, T. Ruzgas, L. Gorton. Direct electron transfer in the system gold-electrode – recombinant horseradish peroxidase. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2001, 509, 19 – 26.
- [42] T. Ruzgas, E. Csörgi, J. Emnéus, L. Gorton, G. Marko-Varga. Peroxidase-modified electrodes: fundamentals and application. *Analytica Chimica Acta* 1996, 330, 123 – 138.
- [43] H. Zimmermann. Untersuchungen zum direkten Elektrontransfer zwischen Elektrodenoberflächen und immobilisierten Redoxproteinen. *Dissertation an der Ruhr-Universität Bochum*, Bochum, 2000.
- [44] R.A. Marcus, N. Sutin. Electron transfers in chemistry and biology. *Biochimica et Biophysica Acta* 1985, 811, 265 – 322.
- [45] R.A. Marcus. Elektrontransferreaktionen in der Chemie – Theorie und Experiment (Nobel-Vortrag). *Angewandte Chemie* 1993, 8, 1161 – 1280.
- [46] M. Alvarez-Icaza, H.M. Kalisz, H.J. Hecht, K.-D. Aumann, D. Schomburg, R.D. Schmid. The design of enzyme sensors based on the enzyme structure. *Biosensors & Bioelectronics* 1995, 10, 735 – 742.
- [47] H.B. Gray, J.R. Winkler. Electron transfer in proteins. *Annual Reviews Biochemistry* 1996, 65, 537 – 561.
- [48] H.A. Harbury. Oxidation-reduction potentials of horseradish peroxidase. *The Journal of Biological Chemistry* 1957, 225, 1009-1024.
- [49] R. Makino, R. Chiang, L.P. Hager. Oxidation-reduction potential measurements on chloroperoxidase and its complexes. *Biochemistry* 1976, 15, 4748 - 4754.

- [50] D. Dickertmann, F.D. Koppitz, J.W. Schultze. Eine Methode zum Ausschluss von Randeffekten bei Elektrochemischen Messungen an Einkristallen, Test anhand der Adsorptionssysteme Ag/Pb<sup>2+</sup> und Au/Cu<sup>2+</sup>. *Electrochimica Acta* 1976, 21, 967 – 971.
- [51] L.A. Kibler. Preparation and Characterization of Noble Metal Single Crystal Electrode Surfaces. *Booklet for the International Society of Electrochemistry* 2003.
- [52] F. Silva, A. Martins. Surface reconstruction of gold single crystals: electrochemical evidence of the effect of adsorbed anions and influence of steps and terraces. *Electrochimica Acta* 1998, 44, 919 – 929.
- [53] F. Silva, A. Martins. Surface structural effects on specific adsorption of oxoanions on gold single crystal electrodes. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1999, 467, 335 – 341.
- [54] A. Hamelin. Cyclic voltammetry at gold single-crystal surfaces. Part 1. Behaviour at low-index faces. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1996, 407, 1 – 11.
- [55] A.K. Sheridan, P. Ngamukot, P.N. Bartlett, J.S. Wilkinson. Waveguide surface plasmon resonance sensing: Electrochemical desorption of alkane thiol monolayers. *Sensors and Actuators B* 2006, 117, 253 – 260.
- [56] M.J. Esplandiú, H. Hagenström, D.M. Kolb. Functionalized Self-Assembled Alkanethiol Monolayers on Au(111) Electrodes: 1. Surface Structure and Electrochemistry. *Langmuir* 2001, 17, 828 – 838.
- [57] P.T. Kissinger, W.R. Heineman. *Laboratory Techniques in Electroanalytical Chemistry*. Marcel Dekker Ltd, New York, 1996.
- [58] L.C. Hian, K.J. Grehan, R.G. Compton, J.S. Foord, F. Marken. Influence of thin film properties on the electrochemical performance of diamond electrodes. *Diamond and Related Materials* 2003, 12, 590 – 595.
- [59] A.J. Bard, L.R. Faulkner. *Electrochemical Methods*. Wiley and Sons, New York, 2001.
- [60] *Electrochemical Impedance Spectroscopy Primer*. Gamry Instruments, 2005.
- [61] F.H. Ramírez. Characterization of Electrodeposited Pd Adlayers on Stepped Gold Single Crystals. *Dissertation an der Rheinischen-Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn*, Bonn, 2006.
- [62] Installation and Diagnostics Guide for Autolab PGSTAT30. Eco Chemie B.V. 2001.
- [63] G. Binnig, H. Rohrer, C. Gerber, E. Weibel. Tunneling through a controllable vacuum gap. *Applied Physics Letters* 1982, 40, 178 – 180.
- [64] C. Hamann, M. Hietschold. *Raster-Tunnel-Mikroskopie*. Akademie Verlag GmbH, Berlin, 1991.
- [65] C. Bai. *Scanning Tunneling Microscopy and its Applications*. Springer Verlag, Berlin, 1998.
- [66] M.A. Schneeweiss, D.M. Kolb. Das Rastertunnelmikroskop in der Elektrochemie. *Chemie in unserer Zeit* 2000, 2, 72 – 83.
- [67] P.K. Hansma, J. Tersoff. Scanning tunneling microscopy. *Journal of Applied Physics* 1987, 61, R1 – 23.
- [68] P. Hugelmann. Elektrochemische Herstellung und Charakterisierung von Nanostrukturen – Entwicklung ultrascharfer STM-Spitzen als Nanoelektroden. *Dissertation an der Universität Karlsruhe*, Karlsruhe, 2004.



- [69] H. Xu, Y.G. Li, A.T.S. Wee, C.H.A. Huan, E.S. Tok. On STM imaging of GaAs(001)-(n x 6) surface reconstructions: Does the (6 x 6) structure exist? *Surface Science* 2002, 513, 249 – 255.
- [70] W. Zimmermann-Edling, H.-G. Busmann, H. Sprang, I.V. Hertel. Imaging polycrystalline CVD diamond films on the micrometer and nanometer scale by STM and AFM. *Ultramicroscopy* 1992, 42 – 44, 1366 – 1371.
- [71] H. Hagenström, M.A. Schneeweiss, D.M. Kolb. Modification of a Au(111) Electrode with Ethanethiol. 1. Adlayer Structure and Electrochemistry. *Langmuir* 1999, 15, 2435 – 2443.
- [72] J. Zhang, Q. Chi, A.M. Kuznetsov, A.G. Hansen, H. Wackerbarth, H.E.M. Christensen, J.E.T. Andersen, J. Ulstrup. Electronic Properties of Functional Biomolecules at Metal/Aqueous Solution Interfaces. *The Journal of Physical Chemistry B* 2002, 106, 1131 – 1152.
- [73] J. Zhang, A.M. Kuznetsov, J. Ulstrup. In situ scanning tunnelling microscopy of redox molecules. Coherent electron transfer at large bias voltages. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 2003, 541, 133 – 146.
- [74] C.M. Halliwell, J.A. Davies, J.C. Gallop, P.W. Joseph-Franks. Real-time scanning tunnelling microscopy imaging of protein motion at electrode surfaces. *Bioelectrochemistry* 2004, 63, 225 – 228.
- [75] D. Alliata, L. Andolfi, S. Cannistraro. Tip to substrate distances in STM imaging of biomolecules. *Ultramicroscopy* 2004, 101, 231 – 240.
- [76] J. Zhang, Q. Chi, T. Albrecht, A.M. Kuznetsov, M. Grubb, A.G. Hansen, H. Wackerbarth, A.C. Welinder, J. Ulstrup. Electrochemistry and bioelectrochemistry towards the single-molecule level: Theoretical notions and systems. *Electrochimica Acta* 2005, 50, 3134 – 3159.
- [77] M. Hugelmann. Erzeugung und Charakterisierung metallischer Nanostrukturen auf n-Si(111):H Einkristalloberflächen. *Dissertation an der Universität Karlsruhe*, Karlsruhe, 2004.
- [78] C. Wöll. Selbstorganisiert, und doch durchschaut. *Rubin* 1999, 2, 41 – 47.
- [79] A. Ulman. Formation and Structure of Self-Assembled Monolayers. *Chemical Reviews* 1996, 96, 1533 – 1554.
- [80] D.K. Schwartz. Mechanisms and Kinetics of Self-Assembled Monolayer Formation. *Annual Review of Physical Chemistry* 2001, 52, 107 – 137.
- [81] S. Herrwerth, W. Eck, S. Reihnhardt, M. Grunze. Factors that Determine the Protein Resistance of Oligoether Self-Assembled Monolayers – Internal Hydrophilicity, Terminal Hydrophilicity, and Lateral Packing Density. *Journal of American Chemical Society* 2003, 125, 9359 – 9366.
- [82] O. Cavalleri, A. Hirstein, J.-P. Bucher, K. Kern. Ordering processes at the decanethiol/Au(111) interface. *Thin Solid Films* 1996, 284 – 285, 392 – 395.
- [83] I.H. Musselman, P.A. Peterson, P.E. Russell. Fabrication of tips with controlled geometry for scanning tunneling microscopy. *Precision Engineering* 1990, 12, 3 – 6.
- [84] A.J. Melmed. The art and science and other aspects of making sharp tips. *The Journal of Vacuum Science and Technology B* 1991, 9, 601 – 608.
- [85] P. Hugelmann. Persönliche Mitteilung.

- [86] L.A. Nagahara, T. Thundat, S.M. Lindsay. Preparation and characterization of STM tips for electrochemical studies. *Review of Scientific Instruments* 1989, 60, 3128 – 3130.
- [87] M.J. Rost, D.A. Quist, J.W.M. Frenken. Grains, Growth and Grooving. *Physical Review Letters* 2003, 91, 26101-1 – 26101-4.
- [88] D.M. Kolb. Reconstruction phenomena at metal-electrolyte interfaces. *Progress in Science* 1996, 51, 109 – 173.
- [89] W. Haiss, D. Lackey, J.K. Sass, K.H. Besocke. Atomic resolution scanning microscopy images of Au(111) surfaces in air and polar organic solvents. *Journal of Chemical Physics* 1991, 95, 2193 – 2196.
- [90] M. Hugelmann, W. Schindler. In Situ Distance Tunneling Spectroscopy at Au(111)/0.02M HClO<sub>4</sub>, from Faradaic Regime to Quantized Conductance Channels. *Journal of The Electrochemical Society* 2004, 151, E97 – E101.
- [91] H. Hölscher, W. Allers, U.D. Schwarz, A. Schwarz, R. Wiesendanger. Interpretation of “true atomic resolution“ images of graphite (0001) in noncontact atomic force microscopy. *Physical Review B* 2000, 62, 6967 – 6970.
- [92] L. Jeloica, V. Sidis. DFT investigation of the adsorption of atomic hydrogen on a cluster-model graphite surface. *Chemical Physics Letters* 1999, 30, 157 – 162.
- [93] F.A. Cotton, G. Wilkinson. *Anorganische Chemie*. Verlag Chemie GmbH, Weinheim, 1970.
- [94] A.J. Bard, R. Parsons, J. Jordan. *Standard Potentials in Aqueous Solution*. Marcel Dekker, New York, 1985.
- [95] J. Tang, M. Petri, L.A. Kibler, D.M. Kolb. Pd deposition onto Au(111) electrodes from sulphuric acid solution. *Electrochimica Acta* 2005, 51, 125 – 132.
- [96] M. Wang, S. Bugarski, U. Stimming. Topological and Electron Transfer Properties of Glucose Oxidase Adsorbed on Highly Oriented Pyrolytic Graphite Electrodes. *The Journal of Physical Chemistry C* 2008, 112, 5165 – 5173.
- [97] A. Tracz, G. Wegner, J.P. Rabe. Scanning Tunneling Microscopy Study of Graphite Oxidation in Ozone – Air Mixtures. *Langmuir* 2003, 19, 6807 – 6812.
- [98] E. Wang, H. Wang, Z. Li. Protein Structural Characterization by Scanning Tunneling Microscopy with Electrochemistry. *Analytical Sciences* 2000, 16, 205 – 209.
- [99] D. Losic, J.G. Shapter, J.J. Gooding. Atomically Flat Gold for Biomolecule Immobilization and Imaging. *Australian Journal of Chemistry* 2001, 54, 643 – 648.
- [100] D. Losic, K. Short, J.J. Gooding, J.G. Shapter. Scanning probe microscopy characterisation of immobilised enzyme molecules on a biosensor surface: visualisation of individual molecules. *Journal of the Serbian Chemical Society* 2004, 69, 93 – 106.
- [101] E.P. Friis, J.E.T. Andersen, L.L. Madsen, P. Møller, R.J. Nichols, K.G. Olesen, J. Ulstrup. Metalloprotein adsorption on Au(111) and polycrystalline platinum investigated by in situ scanning tunnelling microscopy with molecular and submolecular resolution. *Electrochimica Acta* 1998, 43, 2889 – 2897.
- [102] P. Facci, D. Alliata, S. Cannistraro. Potential-induced resonant tunnelling through a redox metalloprotein investigated by electrochemical scanning probe microscopy. *Ultramicroscopy* 2001, 89, 291 – 298.

- [103] H. Zimmermann, A. Lindgren, W. Schuhmann, L. Gorton. Anisotropic Orientation of Horseradish Peroxidase by Reconstitution on a Thiol-Modified Gold Electrode. *Chemistry – A European Journal* 2000, 6, 592 – 599.
- [104] T. Tatsuma, H. Mori, A. Fujishima. Electron Transfer from Diamond Electrodes to Heme Peptide and Peroxidase. *Analytical Chemistry* 2000, 72, 2919 – 2924.
- [105] M. Petri, D.M. Kolb, U. Memmert, H. Meyer. Adsorption of mercaptopropionic acid onto Au(111) Part I. Adlayer formation, structure and electrochemistry. *Electrochimica Acta* 2003, 49, 175 – 182.
- [106] H.A. Biebuyck, C.D. Bain, G.M. Whitesides. Comparison of Organic Monolayers on Polycrystalline Gold Spontaneously Assembled from Solutions Containing Dialkyl Disulfides or Alkanethiols. *Langmuir* 1994, 10, 1825 – 1831.
- [107] H. Kind, A.M. Bittner, O. Cavalleri, K. Kern, T. Greber. Electroless Deposition of Metal Nanoislands on Aminothiolate-Functionalized Au(111) Electrodes. *The Journal of Physical Chemistry B* 1998, 102, 7582 – 7589.
- [108] O. Shekhah, C. Busse, A. Bashir, F. Turcu, X. Yin, P. Cyganik, A. Birkner, W. Schuhmann, C. Wöll. Electrochemically deposited Pd islands on an organic surface: the presence of Coulomb blockade in STM I(V) curves at room temperature. *Physical Chemistry Chemical Physics* 2006, 8, 3375 – 3378.
- [109] V. Ivanova, T. Baunach, D.M. Kolb. Metal deposition onto a thiol-covered gold surface: A new approach. *Electrochimica Acta* 2005, 50, 4283 – 4288.
- [110] G.C. Herdt, D.R. Jung, A.W. Czanderna. Penetration of Deposited Ag and Cu Overlayers Through Alkanethiol Self-Assembled Monolayers on Gold. *The Journal of Adhesion* 1997, 60, 197 – 222.
- [111] M. Henzler, W. Göpel. *Oberflächenphysik des Festkörpers*. Teubner Verlag, Stuttgart, 1994.
- [112] G. Bianchi, F. Mazza, T. Mussini. Catalytic decomposition of acid hydrogen peroxide solutions on platinum, iridium, palladium and gold surfaces. *Electrochimica Acta* 1962, 7, 457 – 473.
- [113] M. Gerlache, S. Girousi, G. Quarin, J.-M. Kauffmann. Pulsed electrochemical detection of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on gold. *Electrochimica Acta* 1998, 43, 3467 – 3473.
- [114] M. Gerlache, Z. Senturk, G. Quarin, J.-M. Kauffmann. Electrochemical Behavior of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on Gold. *Electroanalysis* 1997, 9, 1088 – 1092.
- [115] Y. Zhang, G.S. Wilson. Electrochemical oxidation of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on Pt and Pt + Ir electrodes in physiological buffer and its applicability to H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-based biosensors. *Journal of Electroanalytical Chemistry* 1992, 345, 253 – 271.
- [116] L. Gorton. A carbon electrode sputtered with palladium and gold for the amperometric detection of hydrogen peroxide. *Analytica Chimica Acta* 1985, 178, 247 – 253.
- [117] K. Gossner, H. Bischof. Reaktionsmechanismus des Wasserstoffperoxidzerfalls an Gold. *Zeitschrift für Physikalische Chemie Neue Folge* 1972, 79, 78 – 82.
- [118] D.A. Johnston, M.F. Cardosi, D.H. Vaughan. The Electrochemistry of Hydrogen Peroxide on Evaporated Gold/Palladium Composite Electrodes. Manufacture and Electrochemical Characterization. *Electroanalysis* 1995, 7, 520 – 526.

- [119] G. Bianchi, F. Mazza, T. Mussini. Oxygen and hydrogen-peroxide processes on gold electrodes in acid solutions. *Electrochimica Acta* 1966, 11, 1509 – 1523.
- [120] G. Wedler. *Lehrbuch der Physikalischen Chemie*. Wiley-VCH Verlag GmbH, Weinheim, 1997.
- [121] E. Ferapontova, L. Gorton. Effect of pH on direct electron transfer in the system gold electrode-recombinant horseradish peroxidase. *Bioelectrochemistry* 2002, 55, 83 – 87.
- [122] P.W. Atkins. *Physikalische Chemie*. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Weinheim, 1996
- [123] B.A. Ivarsson, P.-O. Hegg, K.I. Lundström, U. Jönsson. Adsorption of proteins on metal surfaces studied by ellipsometric and capacitance measurements. *Colloids and Surfaces* 1985, 13, 169 – 192.

## Lebenslauf

Name: Sven Bugarski  
Anschrift: Am Krögel 3  
10179 Berlin  
Geburtsdatum und –ort: 23.10.1976, Frankfurt am Main  
Familienstand: ledig



### The Boston Consulting Group:

01/08 – 03/08 Telekommunikation/Medien:  
- Aufstellung einer Service Strategie  
- Prozessoptimierung

04/08 – Financial Services:  
- Betreuung einer IT-Umstellung im Accounting-Bereich  
- Optimierung von Finanzprodukten vor der Markteinführung

### Doktorarbeit:

10/03 – 11/07 Promotionsthema:  
Untersuchung der Adsorptions- und Katalyseeigenschaften der Horseradish Peroxidase auf Au(111) am Lehrstuhl E19 im Physikdepartment der TU-München.

Schwerpunkte:  
Nanotechnologie, Elektrochemie, Katalyse

Wissenschaftliche Aktivitäten und Lehrtätigkeiten:  
Vortrags- und Posterbeiträge auf mehreren Konferenzen, Organisation von Seminaren, Leitung des Tutoriums "Fuel Cells in Energy Technology", der Rechenübung "Physik für Maschinenbauer", Betreuung des Physikpraktikums für Physiker

### Studium:

10/97 – 08/03 Studienabschluss:  
Dipl.-Phys. an der TU-Darmstadt, Gesamturteil: "sehr gut"

Diplomarbeit:  
BrO und OCIO Säulendichten über Kiruna (Schweden), ausgeführt in Zusammenarbeit mit dem Institut für Umweltphysik in Heidelberg und dem Institut für Weltraumphysik in Kiruna

Auslandsaufenthalte:

10/02 – 04/03 - Leitung der spektroskopischen Messungen am Institutet för Rymdfysik (IRF) in Kiruna (Schweden) mit einem DAAD-Stipendium für Abschlussarbeiten

01/01 – 10/01 - Austauschstudent an der Nanyang Technological University in Singapur mit einem DAAD Stipendium; Scheine in zahlreichen Kursen der Physik, BWL, Informatik

07/00 – 08/00 - Sommerstudent am CERN in Genf (Schweiz); Mitarbeit bei ISOLDE, Testen von Halbleiterdetektoren und Auswertung von Neutronen-spektr

Zusätzliche akademische Leistungen:

- Vordiplom "Wirtschaftswissenschaft" der FernUni Hagen im Dez. 2005
- 2 wissenschaftliche Publikationen, eine weitere in Bearbeitung
- Scheine ausserhalb des Physikstudiums in der BWL, Informatik und in mehreren Sprachen der Universitäten TU-Darmstadt, Nanyang Technological University, FernUni Hagen und der Luleå Tekniska Universitet
- Forschungsarbeit: "The Binomial Model for Option Pricing" an der Mathematik der Nanyang Technological University im Apr. 2001

**Berufserfahrung:**

- 07/96 – 04/97 Epsilon Data, Frankfurt am Main:  
Telefonberater von Kunden verschiedener Tageszeitungen
- 05/97 – 07/97 Infratel, Frankfurt am Main:  
Telefoninterviewer zufällig ausgewählter Personen zu aktuellen Themen im Rahmen von Marktforschungsprojekten
- 02/98 – 03/98 Lurgi Öl-Gas-Chemie, Frankfurt am Main:  
Praktikant; Durchführung von graphischen Finanzanalysen mit Excel
- 02/99 – 06/00 Hessischer Rundfunk/ARD an der Frankfurter Börse, Frankfurt am Main:  
Redaktionsassistent; Recherchen in Pressedatenbanken, Darstellung des Börsengeschehens, Gespräche mit Börsenteilnehmern
- 07/98 – 12/00 ZDF an der Frankfurter Börse, Frankfurt am Main:  
11/01 – 10/02 Recherchen von finanz- und wirtschaftlich orientierten Themen, Marktanalyse, Mitarbeit bei der Vorbereitung der Livesendungen
- 09/98 – 12/00 Verschiedene Haushalte, Frankfurt am Main:  
11/01 – 10/02 Nachhilfelehrer für Gymnasialschüler der Klassen 10 bis 13 in den Fächern Chemie, Mathematik und Physik
- 12/98 – 12/00 Institut für Kernphysik der TU-Darmstadt, Darmstadt:  
11/01 – 10/02 Operator mit Mess- und Kontrolltätigkeiten am supraleitenden Elektronenbeschleuniger S-DALINAC

**Zivildienst:**

- 09/96 – 09/97 Betreuung von Kindern im Alter von 10 Monaten bis 3 Jahren in einer integrativen Krabbelstube der "Mainkrokodile" in Frankfurt am Main

**Schulbildung:**

- 08/87 – 06/96 Abitur:  
Goethe-Gymnasium in Frankfurt am Main im Juni 1996, Note: 1,6
- Auslandsaufenthalte:
- Austauschschüler an der Tamagawa Gakuen in Tokio (Japan) 27.9. 1992 – 26.10.1992 und 8.10.1993 – 6.11.1993
  - Austauschschüler an der Ingatestone Anglo European School in Ingatestone (Grossbritannien) 28.09.1991 – 23.11.1991
- Sonstige Qualifikationen:
- Teilnahme am bilingualen Zug, Internationales Abitur (zusätzlich zum deutschen) in den Fächern Chemie, Englisch, Mathematik, Physik

**Weitere Tätigkeiten:**

- 11/01 – 11/03 DAAD-Freundeskreis, Bonn:  
ehrenamtlicher Betreuer von Studenten mit geplanten Auslandsstudienaufenthalten in Frankfurt am Main und Darmstadt
- 04/05 – 07/05 Academy Consult München e.V., München:  
unentgeltliche Mitarbeit als Anwarter im Ressort Unternehmenskontakte, Teilnahme an Schulungen wie z.B. Präsentationstechniken

### **Sprachen:**

- Deutsch: Muttersprache
- Englisch: fließend in Schrift und Sprache (TOEFL im Mai 1997, 607 Punkte)
- Schwedisch: fließend in Schrift und Sprache
- Kroatisch: fließend in der Sprache
- Spanisch: fortgeschrittene Kenntnisse in Schrift und Sprache
- Französisch: Grundkenntnisse
- Japanisch: Grundkenntnisse

### **IT-Kenntnisse:**

- Windows, Word, Excel, Powerpoint, Access
- Webdesign, Dreamweaver, Frontpage, Internet
- Grundlagen des Programmierens (C++, Turbo Pascal)
- Spezialsoftware: Origin, Corel Draw, PicoScan, WinDOAS und andere

### **Hobbies:**

- Reisen: Kultur-, Studien-, Sprach- und Abenteuerreisen in 87 Ländern in Afrika, Asien, Australien, Europa, Nordamerika und Südamerika
- Bergsteigen: zahlreiche erfolgreiche Besteigungen im hochalpinen Bereich, z.B. Aconcagua (Argentinien, 6962m), Kilimanjaro (Tansania, 5895m), Mont Blanc (Frankreich, 4807m)
- Philosophie, Literatur, Kultur, Ausstellungen
- Joggen, Wandern, Skifahren

## Eigene Veröffentlichungen

- 1.) A.C. Vandaele, C. Fayt, F. Hendrick, C. Hermans, F. Humbled, M. Van Roozendaal, M. Gil, M. Navarro, O. Puentedura, M. Yela, G. Braathen, K. Stebel, K. Tørnkvist, P. Johnston, K. Kreher, F. Goutail, A. Mieville, J.-P. Pommereau, S. Khaikine, A. Richter, H. Oetjen, F. Wittrock, S. Bugarski, U. Frieß, K. Pfeilsticker, R. Sinreich, T. Wagner, G. Corlett, R. Leigh. An intercomparison campaign of ground-based UV-visible measurements of NO<sub>2</sub>, BrO and OClO slant columns: Methods of analysis and results for NO<sub>2</sub>. *Journal of Geophysical Research* 2005, 110, 1 – 24.

Veröffentlichungen mit Inhalten dieser Dissertation:

- 2.) M. Wang, S. Bugarski, U. Stimming. Topological and Electron-Transfer Properties of Glucose Oxidase Adsorbed on Highly Oriented Pyrolytic Graphite Electrodes. *The Journal of Physical Chemistry C* 2008, 112, 5165 – 5173.
- 3.) S. Bugarski, C. Baier, R. Bussar, M. Tanaka, U. Stimming. Horseradish Peroxidase on Au(111): Investigation of adsorption and catalytic properties in a chloride ion free electrolyte. In Bearbeitung.



## Danksagung

Herrn Prof. Dr. Ulrich Stimming möchte ich zunächst dafür danken, dass er mir die Promotion an seinem Lehrstuhl ermöglicht hat. Ferner bin ich sehr dankbar für die spannende Themenwahl und für die Unterstützung bei der Vorbereitung und Diskussion der zahlreichen Experimente, aus denen diese Dissertationsschrift hervorgegangen ist.

Für die sehr fruchtbaren wissenschaftlichen Gespräche über Thiole und Enzyme bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Motomu Tanaka (bis 2006 TU-München, dann Uni Heidelberg). Auch bei seinen Mitarbeitern Dr. Florian Rehfeldt, Dr. Klaus Adlkofer und Dr. Daniel Gassull möchte ich mich für deren experimentelle Unterstützung bedanken.

Sehr dankbar bin ich PD Dr. Werner Schindler, Dr. Jürgen Meier und Dr. Stanislav Pandelov, die mich mit viel Engagement in die Elektrochemie und in den Umgang mit dem Rastertunnelmikroskop eingearbeitet haben. Sie waren stets bei Fragen als Ansprechpartner verfügbar.

Ferner gilt mein Dank auch dem ganzen „ISL“-Team, insbesondere Dr. Philipp Hugelmann, Dr. Rainer Bußar, Dr. Mingkui Wang, Dipl.-Phys. Claudia Baier, Holger Wolfschmidt, Dipl.-Phys. Markus Dankerl und Dipl.-Phys. Christian Camus. Wir waren nicht nur im Labor ein Team, sondern auch bei mehreren Gelegenheiten im Münchener Nachtleben. Die lockere und vertrauensvolle Atmosphäre im ISL-Labor wird mir in sehr guter Erinnerung bleiben.

Obwohl Dipl.-Chem. Alexander Racz, Dipl.-Chem. Felix Eckstorff, Dipl.-Ing. (FH) Siegfried Schreier und Petra Bele thematisch und experimentell nicht in meine Arbeit involviert waren, konnte ich jederzeit mit Fragen zur Elektrochemie, Brennstoffzellen und mit jeglichen Problemen zu ihnen kommen. Darüber hinaus möchte ich Petra Bele für die organisatorische Tätigkeit am Lehrstuhl danken. Dipl.-Ing. (FH) Siegfried Schreier gilt mein Dank für die vielen interessanten Gespräche während der Mittagspausen. Für die freundschaftliche Atmosphäre, das Vertrauen und zahlreiche private Unternehmungen möchte ich mich bei Dipl.-Chem. Felix Eckstorff, Dr. Philipp Hugelmann und Dipl.-Phys. Markus Dankerl bedanken.

Danken möchte ich weiterhin Dr. José Garrido (Walter-Schottky-Institut) und Dr. Hendrik Heering (TU Delft) für die Hilfe beim Verständnis der Enzymadsorption und –kinetik.

Meinen Dank möchte ich ausdrücklich auch den nicht-wissenschaftlichen E19ern aussprechen. Eduard Putzer und Markus Haß von der Werkstatt haben sehr zum Aufbau einiger Versuchsssetups beigetragen, Kamila Wilson und Joana Figueiredo waren als Sekretärinnen von Herrn Prof. Dr. Ulrich Stimming für meine Anliegen immer da und Gerd Müller, Karin Mayet und Johannes Schwärzler haben mir als Computeradministratoren bei IT-Problemen stets geholfen.

Meine Freundin Andrea Martin musste erleben, wie ich in manchen Wochen nahezu täglich erst sehr spät nach Hause kam. Sie hat immer Verständnis dafür gezeigt und hat keinen einzigen Tag daran gezweifelt, dass diese Dissertation erfolgreich beendet wird. Sie hat mir das Gefühl gegeben, stolz auf das zu sein, was ich geleistet habe.

Vom Beginn der Doktorarbeit an waren mir meine Eltern eine Stütze. Sie waren immer wie ein Auffangnetz für mich. Glücklicherweise bin ich nie tief gefallen, aber die Gewissheit, dass dieses Netz im Notfall da ist, hat mir Sicherheit und Kraft gegeben.

Bei Herrn Prof. Dr. Ulrich Stimming, Dr. Philipp Hugelmann, Dipl.-Phys. Claudia Baier, Holger Wolfschmidt, Dipl.-Phys. Markus Dankerl und Dipl.-Ing. (FH) Siegfried Schreier möchte ich mich ausdrücklich für das Korrekturlesen meiner Dissertationsschrift bedanken.

## **Erklärung**

Diese Arbeit wurde in der Zeit von Oktober 2003 bis November 2007 am Physik-Department der Technischen Universität München im Lehrstuhl für Physik E19 von Prof. Dr. Ulrich Stimming angefertigt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Ulrich Stimming betreut worden.

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbstständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit, die anderen Werken im Wortlaut oder Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von oben angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen dieser Promotionsordnung sind mir bekannt.

Garching, 30.11.2007