

葡萄糖氧化酶在活性炭上的固定及直接电化学

孙冬梅^{1,2} 蔡称心² 邢巍¹ 陆天虹^{*1,2}

(¹中国科学院长春应用化学研究所, 长春 130022)

(²南京师范大学化学与环境科学学院, 南京 210097)

关键词: 直接电化学; 生物电催化; 葡萄糖氧化酶; 活性炭

中图分类号: O611.3; O646.2

文献标识码: A

文章编号: 1001-4861(2005)03-0405-04

Direct Electrochemistry of Glucose Oxidase Immobilized on Surface of Activated Carbon

SUN Dong-Mei^{1,2} CAI Chen-Xin² XING Wei¹ LU Tian-Hong^{*1,2}

(¹Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Science, Changchun 130022)

(²School of Chemistry and Environmental Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097)

Abstract: The glucose oxidase (GOD) immobilized onto the surface of activated carbon powders at the glassy carbon electrode (GOD-C/GC) could undergo the quasi-reversible, direct electrochemical reaction. Its formal redox potential, $E^{0'}$, is almost independent on the scan rates. The average value of $E^{0'}$ is (-0.467 ± 0.002) V (vs SCE) in the pH 6.8 phosphate buffer solution. Its apparent heterogeneous electron transfer rate constant (k_s) is (1.18 ± 0.59) s⁻¹, which is much higher than that reported previously. The dependence of $E^{0'}$ on the pH of the buffer solution indicated that the direct electrochemical reaction of the immobilized GOD is a two-electron transfer reaction process coupled with two-proton transfer. The further experimental results demonstrated that the immobilized GOD retained its bioelectrocatalytic activity to the oxidation of β -D(+)-glucose.

Key words: direct electrochemistry, bioelectrocatalysis, glucose oxidase, activated carbon powder

0 引 言

氧化还原蛋白质和酶的直接电化学是研发制作方法简单、重现性好和响应快的生物传感器和高效的生物燃料电池电极催化剂的基础, 已得到广泛关注^[1-8]。然而, 由于大部分氧化还原蛋白质和酶在电极表面会发生强烈的吸附而伴随变性, 同时影响其他自由扩散分子的电化学反应以及其自身的结构特点阻碍了蛋白质和酶在电极表面直接电子转移反应

的发生。为了实现蛋白质和酶能在电极表面发生可逆或准可逆的直接电子转移反应, 探索合适的电极材料和固定方法是非常重要的。

葡萄糖氧化酶(GOD)分子通常以二聚体的形式存在, 它的氧化还原活性中心是黄素腺嘌呤二核苷酸(FAD)^[9]。GOD在体内的生理功能是以O₂作为自然媒体, 催化葡萄糖氧化成葡萄糖内脂。将GOD用合适的方法固定在电极表面, 得到能直接响应其底物的生物电极是制作基于直接电子转移的生物燃料

收稿日期: 2004-07-20。收修改稿日期: 2004-12-01。

国家“211”工程重点学科建设和南京师范大学青年科学基金(No.2003XQ002)资助项目。

*通讯联系人。E-mail: tianhonglu@263.net

第一作者: 孙冬梅, 女, 35岁, 博士, 讲师; 研究方向: 生物电化学。

电池的关键,已报道过许多方法可以将 GOD 固定在电极表面,如溶胶-凝胶法^[10-12]、聚合物包裹法^[13,14]、共价键合法以及吸附法^[15]等,但有关 GOD 的直接电化学反应的报道较少。只有 Ianniello 等^[16]采用示差脉冲伏安法观察到了经氰尿酸氯共价固定到石墨电极表面的 GOD 的直接电化学反应;Wingard 等^[17]报道了将 GOD 固定在氨基苯基硼酸修饰玻碳(GC)电极上,获得了 GOD 的直接电化学反应;Cooper 等^[15]将 GOD 固定在自组装单分子层修饰电极上,观察到了 GOD 的直接电化学反应。但在这些研究中,所获得的 GOD 直接电子转移速率都很小,伏安峰形发生严重扭曲。

本文利用纳米活性炭具有比表面积大、表面活性中心多等特性,将 GOD 吸附固定到纳米活性炭颗粒表面,用全氟磺酸树脂(商品名为 Nafion)作固定剂将吸附有 GOD 的活性炭涂敷到电极表面,成功地获得了 GOD 准可逆的直接电化学反应的循环伏安峰;进一步的实验结果还表明固定在活性炭表面的 GOD 没有发生变性和失活,对 β -D(+)-葡萄糖的电化学氧化具有催化作用。

1 实验部分

1.1 主要仪器和试剂

电化学实验用 M273 Potentiostat/Galvanostat(美国 EG&G 公司)和常规的三电极体系的电化学池进行。以 GC、C/GC 或 GOD-C/GC 电极作为工作电极,铂丝为辅助电极,饱和甘汞电极(SCE)为参比电极。在进行电化学实验前,溶液中通入高纯氮气除氧至少 30 min,所有的实验都在室温(22±2 °C)下进行。

GOD(EC 1.1.3.4, 111 U·mg⁻¹,来源于 *Aspergillus niger*,南京生兴生物技术有限公司)、 β -D(+)-葡萄糖(Sigma)和三氯化六氨基钌(III)(Ru(NH₃)₆Cl₃, 99%, Strem Chemicals)都未经纯化直接使用。Vulcan XC-72 活性炭(Cabot, USA)的粒径 30 nm,平均孔径 10 nm,比表面积约为 254 m²·g⁻¹。5% Nafion 溶液为 Aldrich 公司产品。其他试剂均为分析纯试剂。所有溶液均用二次蒸馏水配制, β -D(+)-葡萄糖溶液在使用前至少放置 24 h,使其不同异构体之间达到平衡。

1.2 GOD 在活性炭表面的固定

GC 电极(直径为 4 mm)分别用 6 号砂纸、0.3 μ m 和 0.05 μ m Al₂O₃ 抛光至镜面,然后分别在无水乙醇和二次蒸馏水中超声清洗各 1 min。用超声波

分散的方法将 4 mg 活性炭粉末分散在 5 mL 水中,约 30 min 后加入 10 mg GOD,于 4 °C 搅拌数小时,使 GOD 吸附在活性炭表面。然后离心分离,得到吸附有 GOD 的炭粉(GOD-C),并在室温下真空干燥。将 2 mg GOD-C 与 80 μ L Nafion 溶液充分混合均匀,用微量进样器取混合液 1 μ L 均匀地覆盖在 GC 电极表面,室温下待溶剂挥发后,即得到 GOD-C/GC 电极。当电极不用时,可将其浸在 pH 值 6.80 的 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲溶液(PBS)中保存于 4 °C 的冰箱中。用同样的方法可制得 C/GC 电极,只是活性炭粉表面没有吸附 GOD。

GOD 在 C/GC 电极表面的吸附量 Γ 由下式计算:

$$\Gamma = Q/nFA \quad (1)$$

其中 Q 是 GOD 直接电化学反应的氧化峰或还原峰的积分电量, n 为每个 GOD 分子的电子转移数, F 为 Faraday 常数, A 为 C/GC 电极的表观面积。 A 是以 Ru(NH₃)₆Cl₃ 为探针分子,根据 Ru(NH₃)₆Cl₃ 在 C/GC 电极上的伏安峰电流与扫速平方根的关系曲线的斜率求得,在计算过程中 Ru(NH₃)₆³⁺ 的扩散系数 D 的值采用 2.3×10⁻⁹ cm²·s⁻¹^[18]。

2 结果与讨论

2.1 GOD 的直接电子转移

图 1 曲线 a 和 b 分别是 C/GC 和 GOD-C/GC 电极在 0.1 mol·L⁻¹ PBS (pH=6.8) 中的循环伏安曲线。由图可知,在实验的电位扫描范围内,在 C/GC 电极的循环伏安曲线上(曲线 a),没有观察到任何氧化还原峰,表明在 C/GC 电极上没有能发生电化学反应

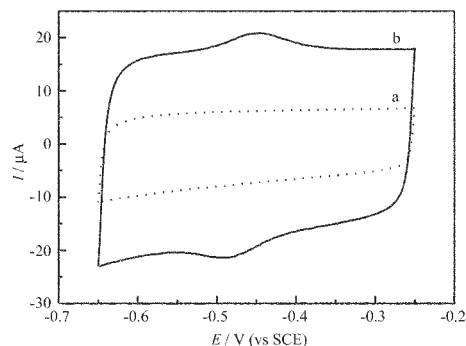


图 1 C/GC 电极(a)和 GOD-C/GC 电极(b)在 0.1 mol·L⁻¹ 的 PBS(pH=6.8) 中的循环伏安图

Fig.1 Cyclic voltammograms of the C/GC (a) and the GOD-C/GC (b) electrodes in the 0.1 mol·L⁻¹ PBS (pH=6.8)
Scan rate: 50 mV·s⁻¹

的活性物质。而在 GOD-C/GC 电极的循环伏安曲线上(曲线 b),可观察到一对很好的氧化还原峰。氧化还原峰电位分别为 $E_{pa}=-0.449\text{ V}$, $E_{pc}=-0.483\text{ V}$, 峰电位差 $\Delta E_p=34\text{ mV}$, 氧化还原峰电流基本相同,这表明固定在活性炭上的 GOD 能进行准可逆的直接电化学反应,其式电位为 $E^{\circ}=-0.466\text{ V}$ 。

图 2 是 GOD-C/GC 电极在 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS(pH=6.8)中的不同扫描速率下的循环伏安图。从图中可看出,随着扫速增加,氧化峰正移,还原峰负移,因而 ΔE_p 增加,但 E° 几乎不随扫速的增加而发生变化,其平均值为 $E^{\circ}=(-0.467\pm 0.002)\text{ V}$ 。根据扫速与 ΔE_p 的关系,利用 Laviron^[19]关于电极表面异相反应动力学常数的计算方法,可以得到 GOD 直接电子转移反应的表观速率常数 k_s 为 $(1.18\pm 0.59)\text{ s}^{-1}$,该值与 Jiang 等^[15]在 DTSSP (3,3'-dithiobis-sulfocinnimidypropionate)自组装单分子层修饰电极上得到的 GOD 直接电子转移反应速率常数 $k_s(0.026\text{ s}^{-1})$ 相比大了 2 个数量级,说明炭粉表面的微环境更有利于 GOD 的直接电子转移。另外,用氧化还原峰电流对扫速 v 作图,发现氧化还原峰电流与 v 在 v 小于 $200\text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$ 时成线性关系,表明反应过程不是扩散控制的^[20],这进一步说明 GOD 的确已固定到电极表面上。根据循环伏安曲线上氧化峰或还原峰的电量求得 GOD 在 C/GC 电极上的表观吸附量 Γ 为 $(5.01\pm 0.16)\times 10^{-13}\text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$,与在 DTSSP 自组装单分子层修饰电极上得到的数值 ($\Gamma=1.3\times 10^{-11}\text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$) 相比要小。假设每个 GOD 与电极的接触面积为 16 nm^2 ^[9,15],可以得出 GOD 在电极表面的表观吸附量 Γ 比单分子层吸附

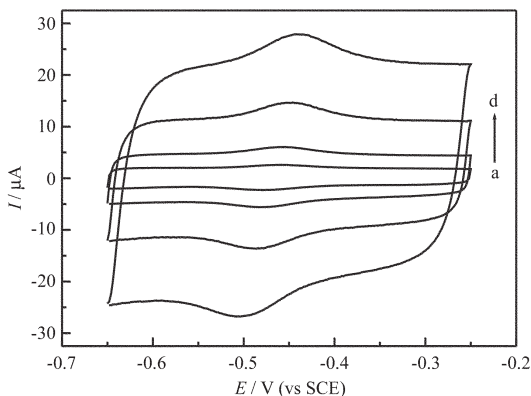


图 2 GOD-C/GC 电极在 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBS (pH=6.8) 中不同扫速时的循环伏安图

Fig.2 Cyclic voltammograms of the GOD-C/GC electrode in $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (pH=6.8) at various scan rates Scan rate / ($\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$): (a) 10, (b) 20, (c) 50, (d) 100.

的量小一个数量级($\Gamma_{\text{单层}}\approx 2.77\times 10^{-12}\text{ mol}\cdot\text{cm}^{-2}$)。

2.2 溶液 pH 值的影响

图 3 为 GOD-C/GC 电极在不同 pH 值的 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 中的循环伏安曲线。由图可见,随着溶液 pH 值增加,GOD 的氧化还原峰电位向负方向移动。图 4 表明, E_{pa} , E_{pc} 和 E° 与溶液 pH 值之间呈线性关系,斜率分别为 -57.7 、 -57.1 和 $-57.3\text{ mV}\cdot\text{pH}^{-1}$ 。GOD 的直接电化学反应可表示为:

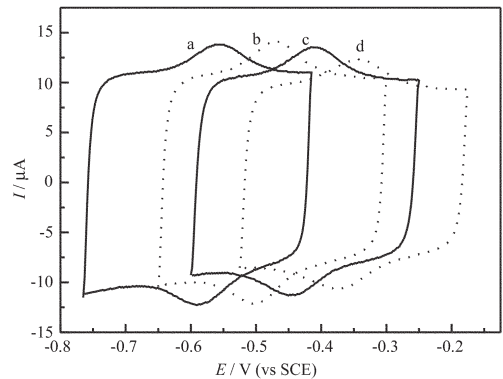


图 3 GOD-C/GC 电极在不同 pH 值的 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS 中的循环伏安图

Fig.3 Cyclic voltammograms of the GOD-C/GC electrode in $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS at various pH values pH: (a) 9.1, (b) 7.0, (c) 6.0, (d) 4.4

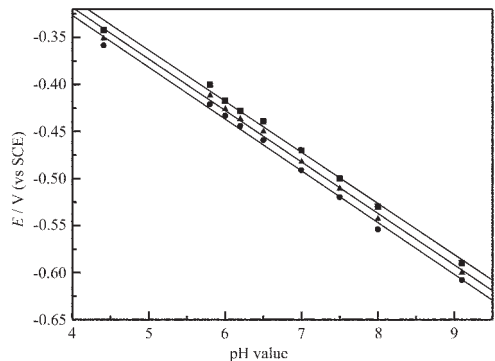


图 4 E_{pa} (■), E_{pc} (●) 和 E° (▲) 与溶液 pH 值的关系
Fig.4 Dependence of E_{pa} (■), E_{pc} (●) and E° (▲) on the pH of the solution

对于可逆($2\text{e}+2\text{H}^+$)的电化学反应的斜率应为 $-58.5\text{ mV}\cdot\text{pH}^{-1}$ ($22\text{ }^{\circ}\text{C}$),而上述的斜率与之相近,说明吸附在 C/GC 电极表面的 GOD 的直接电化学反应的可逆性较好。进一步的实验表明,固定在活性炭上的 GOD 直接电子转移氧化还原峰电位随溶液 pH 值的变化也是可逆的,即当电极从一种 pH 值的溶液移入另一种 pH 值的溶液进行完实验后,再移回

原 pH 值的溶液,可得到与前重合的循环伏安曲线。

2.3 GOD-C/GC 电极对 β -D(+)-葡萄糖的电催化氧化

图 5 为 GOD-C/GC 电极在不含和含 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -D(+)-葡萄糖的 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS(pH=6.8)中的循环伏安曲线。当溶液中不含 β -D(+)-葡萄糖时,可观察到一对葡萄糖氧化酶的氧化还原峰(曲线 a)。当溶液中含 β -D(+)-葡萄糖时,GOD 的氧化还原峰发生明显的变化,即氧化峰电流增加,还原峰电流几乎消失(曲线 b),表明固定在活性炭上的 GOD 仍能保持其生物活性,对 β -D(+)-葡萄糖的氧化有催化作用。对比实验表明,无论裸 GC 电极还是 C/GC 电极对 β -D(+)-葡萄糖的氧化均没有催化作用。GOD 对 β -D(+)-葡萄糖氧化的催化作用可表示为:

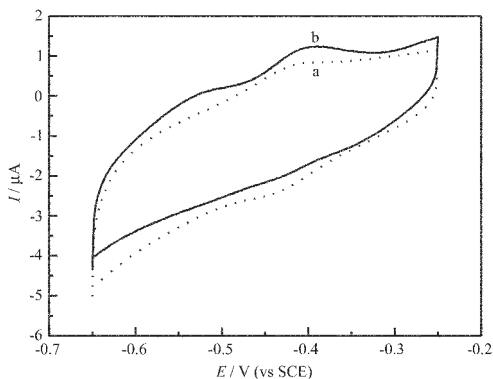


图 5 GOD-C/GC 电极在(a)不含和(b)含 $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -D(+)-葡萄糖的 $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS(pH=6.8)中的循环伏安曲线

Fig.5 Cyclic voltammograms of the GOD-C/GC electrode in $0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PBS (pH=6.8) in the absence (a) and presence (b) of $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -D(+) glucose Scan rate: $10 \text{ mV}\cdot\text{s}^{-1}$.

GOD-C/GC 电极在进行电化学测量后,在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下放置 3 周后,发现其电化学和电催化性能基本上没有变化。另外,把制备好的 GOD-C 和 Nafion 溶液的混合物在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下放置 3 个月,再制得的 GOD-C/GC 电极的电化学和电催化性能也基本上没有变化,这说明用这种方法制备的 GOD-C/GC 电极的性能有很好的稳定性,这可能是由于 GOD 在活性炭上的吸附很强,而且还有 Nafion 膜包裹在外面,因此稳定性很好。

3 结 论

用吸附的方法固定在活性炭上的葡萄糖氧化酶能进行准可逆的直接电化学反应,并能保持对 β -D(+)-葡萄糖氧化的电催化作用。本文固定酶的方法具有简单、易于操作和酶活性保持良好等优点,因此有可能用来制作葡萄糖传感器或作为生物燃料电池的阳极催化剂。

参考文献:

- [1] Ghindilis A L, Atanasov P, Wilkins E. *Electroanalysis*, **1997**, **9**:661~674
- [2] Mano N, Mao F, Heller A. *J. Am. Chem. Soc.*, **2002**, **124**: 12962~12963
- [3] Frew J E, Hill H A O. *Eur. J. Biochem.*, **1988**, **172**:261~269
- [4] Santucci R, Picciau A, Campanella L, et al. *Curr. Top Electrochem*, **1994**, **3**:313~328
- [5] Armstrong F A. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.*, **2002**:661~671
- [6] Aguey-Zinsou K F, Bernhardt P V, Kappler U, et al. *J. Am. Chem. Soc.*, **2003**, **125**:530~535
- [7] CAI Chen-Xin(蔡称心), CHEN Jing(陈 静). *Huaxue Xuebao (Acta Chim. Sin.)*, **2004**, **62**:335~340.
- [8] Xu J Z, Zhu J J, Wu Q, et al. *Chin. J. Chem.*, **2003**, **21**:1088~1091
- [9] Hecht H J, Kalisz H M, Hendle J, et al. *J. Mol. Biol.*, **1993**, **229**:153~172
- [10] Chen X, Hu Y, Wilson G S. *Biosens. Bioelectron.*, **2002**, **17**: 1005~1013
- [11] Niu J, Lee J Y. *Sens. Actuators B*, **2002**, **82**:250~258
- [12] Chen X, Dong S. *Biosens. Bioelectron.*, **2003**, **18**:999~1004
- [13] Xu J J, Yu Z H, Chen H Y. *Anal. Chim. Acta*, **2002**, **463**:239~247
- [14] Reiter S, Habermüller K, Schuhmann W. *Sens. Actuators B*, **2001**, **79**:150~156.
- [15] Jiang L, McNeil C J, Cooper J M. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.*, **1995**:1293~1295
- [16] Ianniello R M, Lindsay T J, Yacynych A M. *Anal. Chem.*, **1982**, **54**:1098~1101
- [17] Narasimhan K, Wingard L B. *Jr. Anal. Chem.*, **1986**, **58**:2984~2987
- [18] Wightman R M, Wipf D O. *In Electroanalytical Chemistry*, Bard A J ed. New York: Marcel Dekker, **1989**, **15**:267
- [19] Laviron E. *J. Electroanal. Chem.*, **1979**, **101**:19~28
- [20] Bard A J, Faulkner L R. *Electrochemical Methods, Fundamental and Applications*. 2nd ed. New York: John Wiley & Sons Inc, **2001**.594