

## انتقال مستقیم الکترون آنزیم گلوکز اکسیداز در بیوسلول سوختی با استفاده از قرارگیری سوزنی شکل نانولوله‌های کربنی

ژیلا جمشیدی نیا\*

گروه شیمی، واحد علوم و تحقیقات، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران

احمد مولایی راد

پژوهشکده فناوری زیستی، دانشگاه مالک اشتر، لویزان، ایران

تاریخ دریافت: ۸۸/۶/۱۱

تاریخ پذیرش: ۸۸/۱۲/۱۹

### چکیده:

**مقدمه:** امروزه با افزایش تقاضا برای انرژی، ساخت انواع بیوسلولهای سوختی، از اهمیت ویژه‌ای برخوردار می‌باشد. بیوسلول سوختی، نوعی دستگاه مبدل انرژی است که از مواد زیستی به عنوان کاتالیست استفاده می‌نماید و می‌تواند، در انواع باتریها یا وسایل کاشتنی در بدن، یا حسگرهای زیستی کاربرد داشته باشد.

**هدف:** این پژوهش، با هدف گسترش کاربردهای جدید نانولوله‌های کربنی، به عنوان ماده‌ای نوین جهت تسهیل انتقال مستقیم الکترون، بین مولکولهای زیستی و الکتروود انجام پذیرفته است.

**روش بررسی:** با توجه به ویژگیهای الکتریکی و مکانیکی منحصر بفرد نانولوله‌های کربنی، در این پژوهش از نانولوله‌های کربنی چند دیواره به منظور انتقال مستقیم الکترون آنزیم گلوکز اکسیداز و ساخت الکتروود آندی بیوسلول سوختی استفاده شده است. بدین ترتیب که نانولوله‌های کربنی چند دیواره پس از فعال شدن، به صورت سوزنی شکل و با اتصال کووالان، به الکتروود کار متصل شده و سپس آنزیم گلوکز اکسیداز به نانولوله‌های کربنی چند دیواره متصل می‌شود.

**نتایج:** ناحیه پاسخ مستقیم بیواند به غلظت گلوکز، بین ۱۰ تا ۴۰ میلی‌مولار و بیشینه پیک ردوکس، در ۱۱ میکروآمپر و در غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار گلوکز ثبت شده است.

**نتیجه گیری:** با توجه به نتایج بدست آمده، روش تثبیت معرفی شده نسبت به روشهایی که در آنها نانولوله‌های کربنی به صورت تصادفی روی سطح الکتروود قرار می‌گیرند، دارای بازده بیشتری در تشدید انتقال مستقیم الکترون می‌باشد. نتایج حاصل از ولتامتری چرخه‌ای، جفت پیک ردوکس مشخص را نشان می‌دهد که دلیلی بر انتقال مستقیم الکترون گلوکز اکسیداز تثبیت شده روی نانولوله‌های کربنی چند دیواره که به صورت سوزنی شکل قرار گرفته‌اند، می‌باشد. بنابراین، تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز با روش معرفی شده می‌تواند، در ساخت انواع بیوسلولهای سوختی و همچنین حسگرهای زیستی گلوکز مورد استفاده قرار بگیرد.

**واژه های کلیدی:** انتقال مستقیم الکترون، نانولوله‌های کربنی چند دیواره، بیوسلول سوختی، گلوکز اکسیداز.

#### مقدمه

امروزه انتقال الکترون در سیستمهای زیستی بسیار مورد توجه قرار گرفته‌است و به یکی از مباحث مهم در علم بیوفیزیک و بیوشیمی تبدیل شده‌است.<sup>(۱-۹)</sup> الکتروود اصلاح شده با آنزیمها، در انواع حسگرهای زیستی<sup>۱</sup>، وسایل پزشکی و بیوسلولهای سوختی<sup>۲</sup>، کاربرد فراوان دارد. در صورتیکه مولکول آنزیم، روی سطح الکتروود تثبیت شود، امکان مبادله مستقیم الکترون، فراهم می‌گردد. متأسفانه به دلایلی، مبادله مستقیم الکترون توسط آنزیمها بسیار دشوار می‌باشد. برای مثال ممکن است، آنزیم از طریق پیوندهای آب گریز به سطح الکتروود جذب شود. این امر باعث می‌شود که مولکول آنزیم غیرطبیعی شده و در نتیجه فعالیت الکتروشیمیایی خود را از دست بدهد. همچنین وجود ساختارهای سه بعدی پیچیده، واقع شدن مرکز ردوکس<sup>۳</sup> در عمق آنزیم و عدم دسترسی آسان جایگاه فعال آنزیمها نیز از جمله عواملی هستند که باعث مشکل تر شدن انتقال مستقیم الکترون توسط آنزیمها می‌شوند. بنابراین به منظور ثبت فعالیت الکتروشیمیایی آنزیمها، استفاده از مواد تشدید کننده و یا واسطه اجتناب ناپذیر می‌باشد. در نتیجه استفاده از مواد و روشهای تثبیت مناسب، به عنوان عوامل بسیار مهم جهت حفظ و ثبت فعالیت الکتروشیمیایی آنزیمها، همواره مورد توجه بوده‌است. آنزیم گلوکز اکسیداز استخراج شده از *Aspergillus niger*<sup>۴</sup>، یک آنزیم هومودایمر با وزن مولکولی ۱۶۰ کیلو دالتون می‌باشد. آنزیم حاوی دو مولکول فلاوین آدنین دی نوکلئوتید<sup>۵</sup> به عنوان کوفاکتور است که به طور محکم به گلوکز اکسیداز متصل شده‌است.<sup>(۱۰)</sup> آنزیم گلوکز اکسیداز، انتقال الکترون از گلوکز به اکسیژن مولکولی را کاتالیز می‌نماید که در نتیجه آن گلوکونیک اسید و پراکسید هیدروژن تشکیل می‌گردد.

1-Biosensore

2- Biofuel Cell

3- Redox Center

4- *Aspergillus Niger*

5- Flavin Adenine Dinucleotide (FAD)

آنزیم، گلوکز اکسیداز به کمک روشها و مواد مختلف تثبیت شده است. برای مثال گیر اندازی آنزیم در سول ژل،<sup>۱</sup> قرار گرفتن آنزیم در پلیمر،<sup>(۱۲-۱۵)</sup> اتصال کووالان آنزیم به سطح الکتروود و یا تثبیت به روش خود آرایی تک لایه<sup>۲</sup> (۱۶-۱۸) را می توان نام برد. در این میان استفاده از نانولوله های کربنی<sup>۳</sup> نیز بسیار رایج می باشد. (۱۹-۲۱) با توجه به اینکه توانایی الکتروود اصلاح شده با نانولوله های کربنی در تشدید مبادله مستقیم الکترون در مولکولهای زیستی به اثبات رسیده است و همچنین به دلیل ویژگیهای منحصر بفرد الکتریکی و مکانیکی نانولوله های کربنی، استفاده از آنها بسیار مورد توجه پژوهشگران قرار گرفته است. (۲۲-۲۹) اگرچه تحقیقات بسیاری در مورد مبادله الکترون آنزیم گلوکز اکسیداز انجام شده است، ولی نمونه های کمی از ولتاموگرام چرخه ای این آنزیم گزارش شده است. در این پژوهش مبادله مستقیم الکترون گلوکز اکسیداز متصل به نانولوله های کربنی چند دیواره<sup>۴</sup>، که به صورت سوزنی شکل قرار گرفته اند، مورد بررسی قرار گرفته است. نتایج حاصل از آزمایشات ولتامتری چرخه ای، جفت پیک ردوکس مشخص را نشان می دهد. تشکیل جفت پیک ردوکس مشخص، نشان دهنده این مطلب است که انتقال مستقیم الکترون از مرکز ردوکس آنزیم گلوکز اکسیداز به سطح الکتروود اصلاح شده با نانولوله های کربنی به روش معرفی شده در این پژوهش، صورت می پذیرد.

## مواد و روشها

### مواد

نانولوله های کربنی چند دیواره (نانوتایمز چین با خلوص ۹۵٪)، بتا-دی گلوکز (Merck)، آنزیم گلوکز اکسیداز نوع ۵ با منبع آسپریلوس نیگر (Sigma-Aldrich)، اسید نیتریک (Merck)، فیلتر با قطر ۰/۴۵ میکرومتر، اسید سولفوریک ۹۸٪ (Merck)، پراکسید هیدروژن ۳۰٪ (Merck)، آمونیوم پر سولفات (Merck)، (۳-۱)-آمینوپروپیل تری متوکسی سیلان ۵٪ (Sigma-Aldrich)، تولوئن (Merck)، ۱-۳ دی سیکلوکربادی ایمید (Merck)، دی متیل فورم آمید (DMF) (Merck)، ۱- اتیل ۳- (۳-دی متیل آمینوپروپیل) کربودی ایمید (Merck)، ان هیدروکسی سوکسین ایمید (Merck). در این پژوهش الکتروود مرجع از جنس نقره، الکتروود شمارنده از جنس کربن و الکتروود کار نیز از جنس کربن و با قطر ۴ میلی متر می باشد. آزمایشات ولتامتری چرخه ای با استفاده از دستگاه پتانسیوگالوانومتر اسپانیایی Drop Sens، مدل DRP-STAT200 انجام شده است. هر آزمایش، در غلظت مربوطه، سه مرتبه و در هر مرتبه سه چرخه کامل انجام شده است.

روش فعال سازی نانولوله های کربنی فعال سازی MWNTC<sub>s</sub> با روش معرفی شده توسط لویی و همکارانش<sup>۴</sup> انجام شد. (۳۰) طبق این روش، به منظور فعال نمودن نانولوله های کربنی، ۲ میلی گرم MWNTC<sub>s</sub> به ۱۰ میلی لیتر محلول اسید سولفوریک و اسید نیتریک اشباع با نسبت ۳:۱ اضافه می گردد. سپس محلول فوق برای مدت ۴ ساعت در حمام سونیکاسیون با قدرت ۵۵ هرتز قرار می گیرد. پس از اتمام سونیکاسیون، MWNTC<sub>s</sub> شسته شده و توسط فیلتری با قطر ۰/۴۵ میکرومتر، جمع آوری می شوند. این فرایند تا جایی ادامه می یابد که آب خارج شده در اثر شستشوی MWNTC<sub>s</sub> دارای pH خنثی باشد. در این روش، با اکسید شدن نانولوله های کربنی

توسط اسید و در نتیجه تشکیل گاز CO<sub>2</sub> و خروج آن از محلول، گروههای فعال کربوکسیل در انتهای نانولولههای کربنی تشکیل شده و به این ترتیب نانولولههای کربنی فعال می گردند.

### روش فعال سازی الکتروود کار با گروههای آمینی

فعال سازی سطح الکتروود کار با گروههای آمینی، شامل دو مرحله می باشد. مرحله اول فعال سازی الکتروود کار، به کمک تیمار الکتروشیمیایی صورت می گیرد. در این روش، محلولی از اسید سولفوریک ۹۸٪ و پراکسید هیدروژن ۳۰٪ با نسبت ۷:۳ تهیه می گردد. سپس یک قطره از محلول فوق روی الکتروود کار قرار می گیرد. در این زمان الکتروود کار را به دستگاه پتانسیوگالوانومتر متصل نموده و دستگاه را روی روش ولتامتری چرخه ای با سرعت روبش ۱۰۰ میلی ولت بر ثانیه و ولتاژ بین +۱/۰ و -۱/۰ ولت قرار داده تا ۱۰-۵ چرخه کامل انجام گیرد. در این حالت، از قطره ریخته شده روی الکتروود کار، حبابهایی خارج می شود که ناشی از اکسیداسیون کربن الکتروود کار و در نتیجه تشکیل گاز CO<sub>2</sub> می باشد. در اثر این تیمار، گروههای فعال کربوکسیل روی الکتروود کار تشکیل شده و به این ترتیب الکتروود کار فعال می گردد.

در مرحله دوم فعال سازی الکتروود کار، الکتروود در محلول ۵٪ از دو ترکیب ۳- آمینوپروپیل تری متوکسی سیلان<sup>۱</sup> و آمونیوم پراسولفات<sup>۲</sup> در حلال تولوئن<sup>۳</sup> برای مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق قرار می گیرد. بدین ترتیب ترکیب سیلان فوق از طریق سیلان به گروههای کربوکسیل روی الکتروود کار متصل شده و گروه آمین آن به صورت آزاد باقی می ماند تا به گروههای کربوکسیل موجود در MWNTC<sub>s</sub> متصل گردد.

### روش اتصال نانولولههای کربنی فعال شده به الکتروود کار فعال شده

اتصال نانولولههای کربنی فعال شده به انتهای آمینی الکتروود کار، به وسیله انکوبه نمودن الکتروود در محلول MWCNT/DMF در حضور ۰/۵ میلی گرم بر میلی لیتر ترکیب ۱-۳ دی سیکلوکربادی ایمید<sup>۴</sup> برای مدت یک روز در دمای اتاق انجام می شود. در نتیجه، نانولولههای کربنی که دارای انتهای فعال ناشی از گروههای کربوکسیل هستند، به گروه آمینی ترکیب سیلان تثبیت شده روی سطح الکتروود کار متصل می گردند. محلول MWCNT/DMF با سونیکاسیون ۱ میلی گرم MWCNT در ۱ میلی لیتر از حلال DMF<sup>۵</sup> به مدت ۳-۵ دقیقه تهیه می گردد. با انجام مراحل فوق اولین مرحله در ساخت بیواند، که اصلاح نمودن الکتروود کار با نانولولههای کربنی می باشد، به اتمام می رسد.<sup>(۳۱)</sup> مرحله بعد، اتصال آنزیم گلوکز اکسیداز به الکتروود اصلاح شده می باشد. با تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز، ساخت بیوالکتروود آندی تکمیل می گردد.

<sup>1</sup> Aminopropyltrimethoxy silan

<sup>2</sup> Amonium persulfate (APS)

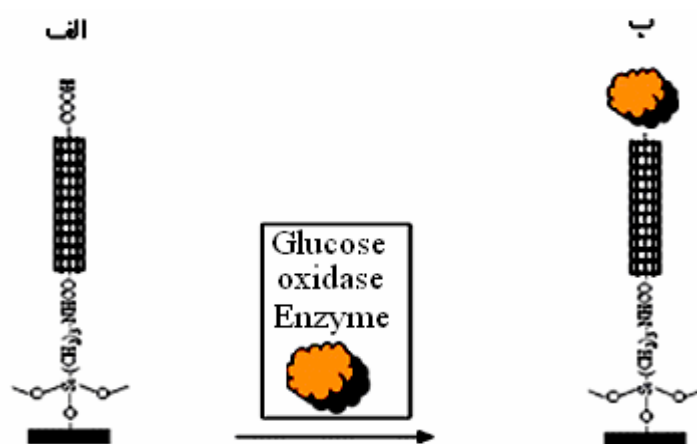
<sup>3</sup> Toluene

<sup>4</sup> 1-3 Dicyclocarbodiimide (DCC)

<sup>5</sup> Dimethylformamide (DMF)

روش اتصال آنزیم گلوکز اکسیداز به الکتروود اصلاح شده

بدین منظور الکتروود کار اصلاح شده به مدت یک ساعت در محلول ۲۰۰ میلی مولار از ترکیب ۱-اتیل-۳-دی متیل آمینو پروپیل)<sup>۱</sup> کربودی ایمید<sup>۲</sup> و محلول ۵۰ میلی مولار، از ترکیب ان-هیدروکسی سوکسین ایمید<sup>۳</sup> قرار می گیرد تا استر فعال گروه های کربوکسیلی روی الکتروود کار اصلاح شده تشکیل گردد. سپس آنزیم گلوکز اکسیداز با غلظت ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر، در بافر فسفات سدیم ۲۵ میلی مولار، حل شده و به مدت دو ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، در حضور الکتروود اصلاح شده انکوبه می شود.<sup>(۳۳)</sup> شمایی از نحوه اتصال آنزیم گلوکز اکسیداز به نانولوله های کربنی چند دیواره که به صورت سوزنی شکل تثبیت شده اند، در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱- نحوه اتصال آنزیم گلوکز اکسیداز به نانولوله های کربنی. الف: قرارگیری سوزنی شکل نانولوله های کربنی. ب: اتصال آنزیم گلوکز اکسیداز به نانولوله های کربنی چند دیواره با تثبیت سوزنی شکل.

ساخت بیواند با قرارگیری تصادفی نانولوله های کربنی چند دیواره روی الکتروود

در این روش ابتدا سطح الکتروود به وسیله آب مقطر و سونیکاسیون شستشو داده می شود و طبق روش شرح داده شده در بخش ۲-۳ فعال می گردد. سپس ۱۰ میکرو لیتر از MWNTs فعال شده که در دی متیل فورم آمید با غلظت ۰/۱ میلی گرم بر میلی لیتر حل شده است (به روش توضیح داده شده قبل)، روی سطح الکتروود ریخته می شود. بعد از تبخیر حلال، الکتروود شسته می شود و پس از خشک شدن کامل سطح الکتروود، آنزیم گلوکز اکسیداز با غلظت ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه شده و ۱۰ میکرو لیتر از آن به صورت قطره روی الکتروود کار قرار می گیرد. پس از خشک شدن کامل الکتروود، بیواند آماده می باشد.<sup>(۳۳)</sup>

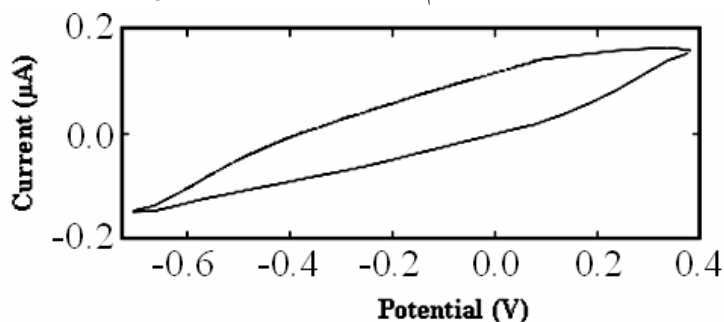
<sup>1</sup>Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)

<sup>2</sup>Carbodiimide (EDC)2-

<sup>3</sup>2-N- Hydroxy Succinimide (NHS)

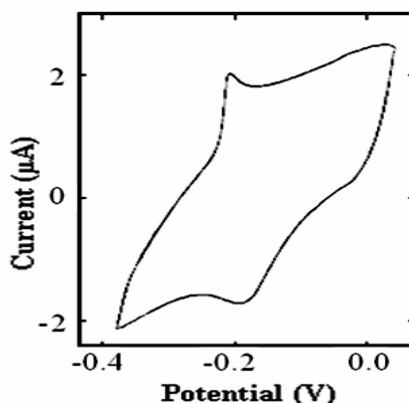
## نتایج و بحث

بررسی نتایج حاصل از آزمایشات ولتامتری چرخه‌ای بیواند ساخته شده با قرارگیری سوزنی شکل نانولوله‌های کربنی در شکل ۲ نمودار ولتاموگرام چرخه‌ای نانولوله‌های کربنی چند دیواره که به صورت سوزنی شکل به الکتروود کار متصل شده اند، در حضور غلظت ۱۰۰ میلی مولار از گلوکز و با سرعت روبش ۰/۱ ولت بر ثانیه ثبت شده است. همانطور که مشاهده می‌شود، پیک ردوکس<sup>۱</sup> تشکیل نشده است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت، در صورت مشاهده پیک ردوکس در نمودار ولتاموگرام چرخه‌ای بیواند، پس از تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز، پیک ردوکس ایجاد شده به فعالیت آنزیم گلوکز اکسیداز مربوط می‌باشد.



شکل ۲- ولتاموگرام چرخه‌ای MWCNT تثبیت شده روی الکتروود کار در حضور ۱۰۰ میلی مولار گلوکز در بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار، pH ۷/۰، دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و سرعت روبش ۱۰۰ میلی ولت بر ثانیه.

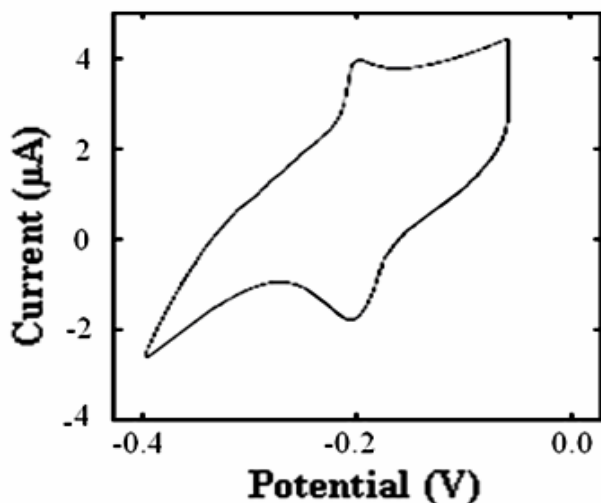
در شکل ۳ نمودار ولتاموگرام چرخه‌ای بیواند ساخته شده با استفاده از تثبیت سوزنی شکل نانولوله‌های کربنی چند دیواره روی الکتروود کار در حضور غلظت ۱۰ میلی مولار گلوکز نشان داده شده است. طبق نمودار، در این حالت، پیک ردوکس در ۲ میکرو آمپر و در ولتاژ ۰/۲ v(Ag) تشکیل شده است. تشکیل پیک ردوکس در ۲ میکرو آمپر نشان می‌دهد که نانولوله‌های کربنی چند دیواره می‌توانند انتقال مستقیم الکترون از آنزیم گلوکز اکسیداز به سطح الکتروود آندی را تسهیل نمایند.



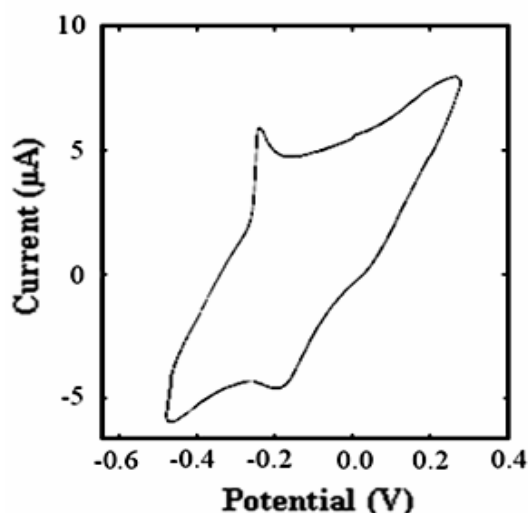
شکل ۳- ولتاموگرام چرخه‌ای بیواند ساخته شده با قرار گرفتن سوزنی شکل و اتصال کووالان MWNT<sub>s</sub> به الکتروود کار در حضور ۱۰ میلی مولار گلوکز در بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار، pH ۷/۰، دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و سرعت روبش ۱۰۰ میلی ولت بر ثانیه.

<sup>1</sup>Redox Pick

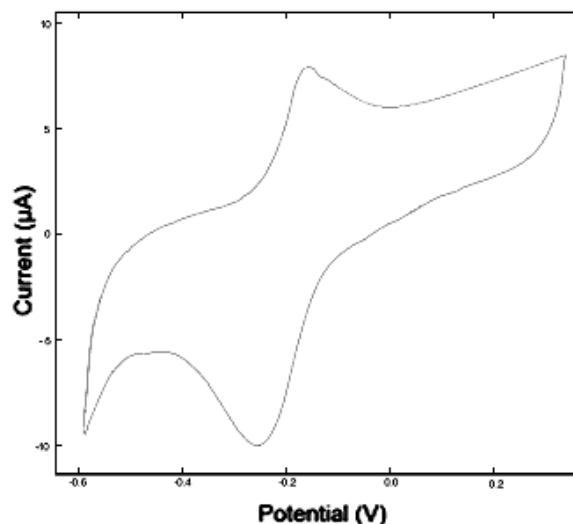
به منظور بررسی چگونگی پاسخ بیواند ساخته شده به غلظت‌های مختلف گلوکز، آزمایشات ولتامتری چرخه‌ای بیواند ساخته شده، در بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار، pH ۷/۰، دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، ولتاژ -۰/۴ تا ۰/۱ ولت و سرعت روبش ۰/۱ ولت بر ثانیه با حضور غلظت‌های مختلف گلوکز انجام شد. در شکل ۴، ۵ و ۶ ولتاموگرام چرخه‌ای بیواند ساخته شده، به ترتیب در حضور غلظت‌های ۲۰، ۳۰ و ۴۰ میلی مولار گلوکز نشان داده شده‌است. طبق نمودار، پیک ردوکس به ترتیب در ۴، ۶ و ۸ میکرو آمپر و در ولتاژ  $v(Ag) -0.2$  تشکیل شده‌است. همچنین هر سه نمودار ولتاموگرام چرخه‌ای، دارای قله و دره مشخص احیا و اکسید می‌باشند که نشان دهنده برقراری ارتباط الکتریکی مناسب بین جایگاه فعال آنزیم گلوکز اکسیداز و سطح الکتروود کار می‌باشد.



شکل ۴- ولتاموگرام چرخه‌ای بیواند ساخته شده با قرار گرفتن سوزنی شکل و اتصال کووالان MWNTCs به الکتروود کار، در حضور ۲۰ میلی مولار گلوکز در بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار، pH ۷/۰، دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و سرعت روبش ۱۰۰ میلی ولت بر ثانیه.



شکل ۵- ولتاموگرام چرخه‌ای بیواند ساخته شده با قرار گرفتن سوزنی شکل و اتصال کووالان MWNTCs به الکتروود کار، در حضور ۳۰ میلی مولار گلوکز در بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار، pH ۷/۰، دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و سرعت روبش ۱۰۰ میلی ولت بر ثانیه.

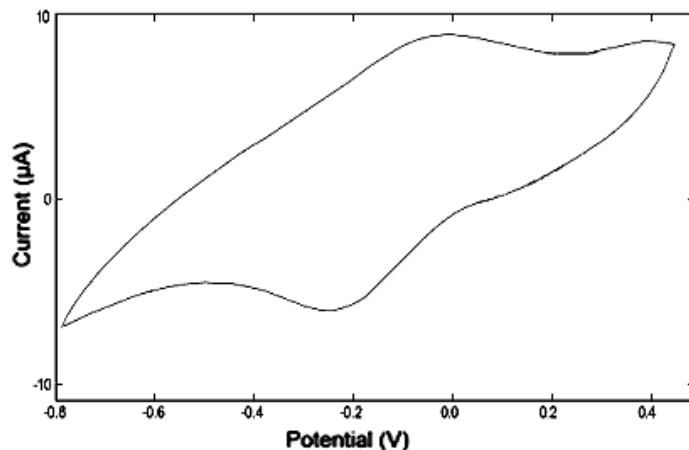


شکل ۶ - ولتاموگرام چرخه‌ای بیواند ساخته شده با قرار گرفتن سوزنی شکل و اتصال کووالان MWNTC<sub>s</sub> به الکتروود کار در حضور ۴۰ میلی‌مولار گلوکز در بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار، ۷/۰ pH دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و سرعت روبش ۱۰۰ میلی‌ولت بر ثانیه.

در شکل ۷، ولتاموگرام چرخه‌ای بیواند ساخته شده در حضور غلظت ۵۰ میلی‌مولار گلوکز نشان داده شده است. در این نمودار ولتاموگرام، پیک احیا و اکسید دارای پهنای بیشتری نسبت به ولتاموگرام چرخه‌ای بیواند ساخته شده در حضور غلظتهای قبلی گلوکز می‌باشد. در این غلظت از گلوکز پیک ردوکس در ۹ میکرو آمپر و بر خلاف حالت‌های قبل در محدوده ولتاژ (Ag) ۰/۱- تشکیل شده است. در شکل ۸، ولتاموگرام چرخه‌ای بیواند ساخته شده در حضور غلظت ۱۰۰ میلی‌مولار گلوکز نشان داده شده است. نمودار ولتاموگرام در این غلظت، مانند نمودار ولتاموگرام ثبت شده در حضور غلظت ۵۰ میلی‌مولار گلوکز، دارای پیک احیا و اکسید پهن تری نسبت به ولتاموگرام چرخه‌ای بیواند ساخته شده در حضور غلظتهای کمتر گلوکز (۴۰-۱۰ میلی‌مولار) می‌باشد. همچنین مانند نمودار ولتاموگرام ثبت شده در حضور غلظت ۵۰ میلی‌مولار گلوکز و بر خلاف حالت‌های قبل، پیک ردوکس در ولتاژ (Ag) ۰/۱۷- ایجاد شده است. این نتایج نشان می‌دهد که بیواند ساخته شده به وسیله نانولوله‌های کربنی چند دیواره که به صورت سوزنی شکل به الکتروود کار متصل شده‌اند، از غلظت ۱۰ تا ۴۰ میلی‌مولار گلوکز به صورت مستقیم به سوپسترا (گلوکز) پاسخ می‌دهد. به طوریکه با افزایش هر ۱۰ میلی‌مولار غلظت گلوکز، پیک ردوکس ایجاد شده ۲ میکرو آمپر افزایش می‌یابد. در غلظتهای بین ۱۰۰-۴۰ میلی‌مولار گلوکز، پیک ردوکس ایجاد شده توسط بیواند، دارای رابطه مستقیم با غلظت نبوده و در غلظتهای بالای ۱۰۰ میلی‌مولار از غلظت گلوکز مستقل می‌باشد. به طوریکه با افزایش غلظت گلوکز از ۴۰ میلی‌مولار به ۵۰ میلی‌مولار، پیک ردوکس ایجاد شده توسط بیواند فقط ۱ میکروآمپر و با افزایش غلظت گلوکز از ۵۰ میلی‌مولار به ۱۰۰ میلی‌مولار، پیک ردوکس ایجاد شده توسط بیواند فقط ۲ میکروآمپر افزایش می‌یابد و بعد از آن ثابت می‌گردد. به عبارت دیگر، در غلظتهای بین ۴۰-۱۰ میلی‌مولار گلوکز، آنزیمهایی که دارای جهت گیری ایده آل برای دریافت سوپسترا بوده‌اند، اشباع نشده‌اند. در نتیجه پیک احیا

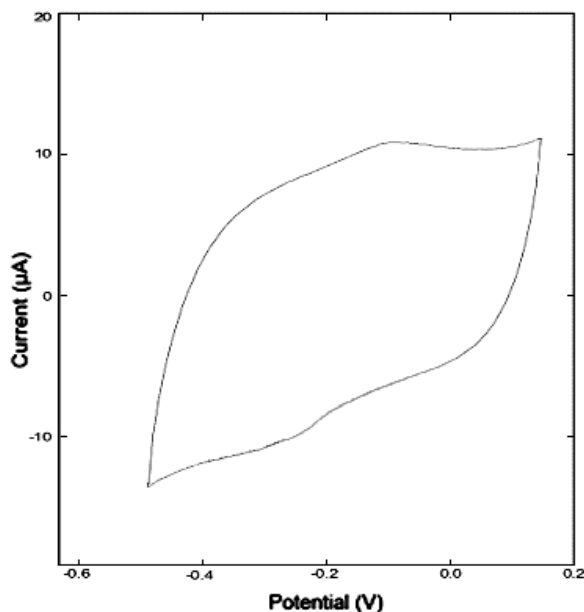


و اکسید بسیار باریک<sup>۱</sup> بوده و در ولتاژ  $v(\text{Ag}) - 0.2$  تشکیل می‌شود. اما در غلظت‌های بالاتر از ۵۰ میلی مولار گلوکز، بیواند اشباع می‌شود. بنابراین، پیک احیا و اکسید پهن‌تر شده و پیک ردوکس در ولتاژ  $v(\text{Ag}) - 0.1$  تشکیل می‌شود. دلیل پهن‌تر شدن پیک احیا و اکسید و همچنین مشاهده پیک ردوکس در ولتاژ  $v(\text{Ag}) - 0.1$  می‌تواند نشان دهنده فعالیت آنزیم‌هایی باشد که دارای جهت گیری ایده‌آل برای دریافت سوبسترا (گلوکز) نبوده‌اند. در نتیجه در غلظت‌های زیر ۴۰ میلی مولار گلوکز، به سوبسترا (گلوکز) دسترسی نداشته‌اند. اما اشباع شدن آنزیم‌هایی که دارای جهت گیری ایده‌آل برای دریافت سوبسترا (گلوکز) بوده‌اند و علاوه بر آن افزایش غلظت گلوکز باعث می‌شود که امکان دسترسی به سوبسترا، برای این گروه از آنزیم‌ها فراهم شود. در نتیجه آنزیم‌هایی که قبلاً غیر فعال بوده‌اند، فعال می‌شوند و انتقال الکترون انجام می‌گیرد. بنابر آنچه گفته شد، می‌توان افزایش ۲ میکرو آمپر پیک ردوکس (از ۹ میکرو آمپر به ۱۱ میکرو آمپر) را به فعالیت آنزیم‌هایی نسبت داد که دارای جهت گیری ایده‌آل برای دریافت سوبسترا (گلوکز) نبوده‌اند. بنابراین غلظت بهینه گلوکز مورد نیاز برای بیواند ساخته شده، ۱۰۰ میلی مولار بوده و پیک ردوکس بیواند، در ۱۱ میکروآمپر تشکیل می‌شود. کارایی بیواند ساخته شده به روش مذکور، در یک بیوسلول سوختی، با بیوکاتد آنزیم لاکاز، بررسی شد. در این آزمایش جریان به میزان ۰/۱۲ میکرو آمپر ثبت شد.



شکل ۷- ولتاموگرام چرخه‌ای بیواند ساخته شده با قرار گرفتن سوزنی شکل و اتصال کووالان MWNTC<sub>s</sub> به الکتروود کار در حضور ۵۰ میلی مولار گلوکز در بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار، ۷/۰ pH، دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و سرعت روبش ۱۰۰ میلی ولت بر ثانیه.

<sup>۱</sup>Sharp

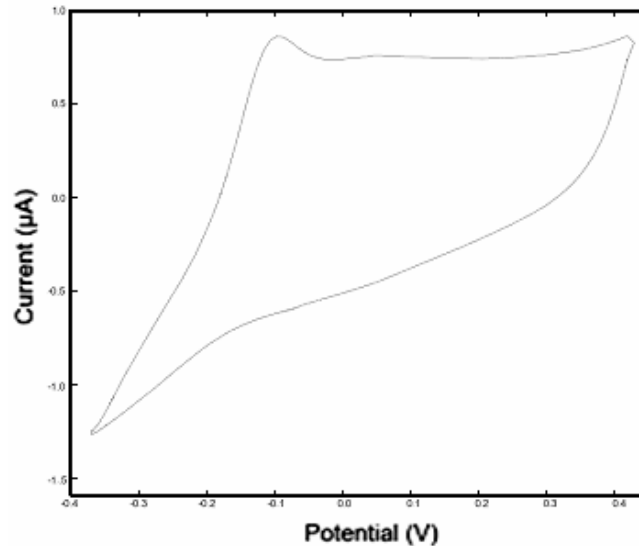


شکل ۸- ولتاموگرام چرخه‌ای بیواند ساخته شده، با قرار گرفتن سوزنی شکل و اتصال کووالان MWNTC<sub>s</sub> به الکتروود کار، در حضور ۱۰۰ میلی مولار گلوکز در بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار، ۷/۰ pH، دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و سرعت روبش ۱۰۰ میلی ولت بر ثانیه.

#### بررسی اهمیت و نقش قرارگیری سوزنی شکل نانولوله‌های کربنی چند دیواره

به منظور بررسی اهمیت و نقش قرارگیری سوزنی شکل نانولوله‌های کربنی چند دیواره، آنزیم گلوکز اکسیداز با روش شرح داده شده در مواد و روشها تثبیت شد. در این روش تثبیت، نانولوله‌های کربنی چند دیواره، کاملاً به صورت تصادفی روی الکتروود کار قرار می‌گیرند. در شکل ۹، نمودار ولتاموگرام چرخه‌ای بیواند ساخته شده به روش فوق در حضور غلظت ۱۰۰ میلی مولار گلوکز نشان داده شده است. طبق نمودار پیک ردوکس بیواند در غلظت ۱۰۰ میلی مولار گلوکز، در ۰/۸۵ میکرو آمپر و در ولتاژ ۰/۱ v(Ag) - تشکیل شده است که در مقایسه با پیک ردوکس تشکیل شده بوسیله بیواند ساخته شده با قرارگیری سوزنی شکل نانولوله‌های کربنی چند دیواره، بسیار ناچیز می‌باشد. علاوه بر این، نمودار ولتاموگرام چرخه‌ای بیواند ساخته شده فاقد پیک اکسید می‌باشد. مقایسه نمودار ولتاموگرام در شکل ۹، با نمودار ولتاموگرام در شکل ۸، نشان می‌دهد که قرارگیری سوزنی شکل نانولوله‌های کربنی چند دیواره به الکتروود کار، باعث تشدید مبادله الکترون می‌گردد. چرا که در این شرایط هم نانولوله‌های کربنی چند دیواره و هم آنزیم گلوکز اکسیداز به صورت تک لایه تثبیت می‌گردند. تثبیت تک لایه گلوکز اکسیداز دارای مزایای بسیاری می‌باشد و امکان دیالیز سریع و آسان سوبسترا و محصول به راحتی فراهم می‌گردد. بنابراین بازده آنزیم افزایش یافته و انتقال الکترون سرعت می‌یابد. از طرفی با توجه به اینکه نانولوله‌های کربنی چند دیواره به صورت کووالان به سطح الکتروود کار متصل هستند، ارتباط الکتریکی مناسب بین نانولوله‌های کربنی چند دیواره و الکتروود کار تشکیل می‌شود که باعث تشدید پیک ردوکس ایجاد شده می‌گردد. همچنین قرارگیری تصادفی نانولوله‌های کربنی چند دیواره روی سطح الکتروود کار می‌تواند در نواحی وسیعی از سطح الکتروود، بین نانولوله‌های کربنی چند

دیواره و الکتروود کار فاصله ایجاد نماید. بنابراین انتقال الکترون در چنین قسمتهایی امکانپذیر نبوده و یا به سختی صورت می پذیرد.



شکل ۹- ولتاموگرام چرخه‌ای بیواند ساخته شده با قرار گرفتن تصادفی و اتصال غیرکوالان MWNTC<sub>s</sub> به الکتروود کار در حضور ۱۰۰ میلی مولار گلوکز در بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار، ۷/۰ pH، دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و سرعت روبش ۱۰۰ میلی ولت بر ثانیه.

### نتیجه گیری

انتقال مستقیم الکترون در آنزیم گلوکز اکسیداز تثبیت شده روی نانولوله‌های کربنی چند دیواره که به صورت سوزنی شکل قرار گرفته‌اند، مشاهده می‌گردد. نتایج حاصل از ولتاموگرام چرخه‌ای، جفت پیک ردوکس مشخص را نشان می‌دهد که دلیلی بر مبادله مستقیم الکترون، در آنزیم گلوکز اکسیداز می‌باشد. ناحیه پاسخ مستقیم بیواند به غلظت گلوکز بین ۱۰ تا ۴۰ میلی مولار از غلظت گلوکز ثبت شده است. نتایج حاصل نشان می‌دهد که پس از انجام فرایند تثبیت، آنزیم گلوکز اکسیداز همچنان فعالیت الکتروشیمیایی خود را حفظ می‌نماید. بنابراین تثبیت آنزیم گلوکز اکسیداز با روش ارائه شده در این پژوهش، می‌تواند در ساخت حسگرهای زیستی گلوکز و بیوسلول سوختی مورد استفاده قرار بگیرد. همچنین روش ارائه شده می‌تواند در تثبیت آنزیمهای دیگر به منظور مبادله مستقیم الکترون به کار گرفته شود. با توجه به اینکه ایجاد ارتباط الکتریکی مناسب بین نانولوله‌های کربنی چند دیواره و الکتروود کار، عامل مهمی جهت مبادله الکترون می‌باشد، مبادله مستقیم الکترون آنزیم گلوکز اکسیداز با استفاده از نانولوله‌های کربنی چند دیواره زمانیکه به صورت تصادفی روی سطح الکتروود قرار گرفته‌اند، بسیار دشوار است و در ساخت حسگرهای زیستی گلوکز و همچنین بیوسلول سوختی توصیه نمی‌شود.

## References:

1. Frew, J.E., and Hill, H.A.O., *Eur. J. Biochem.*, **172**, 261 (1988).
2. Santucci R., Picciau A., Campanella, L., and Brunori, M., *Curr. Top. Electrochem.*, **3**, 313 (1994).
3. Hess, C.R., Juda, G.A., Dooley, D.M., Amii R.N., Hill M.G., Winkler J.R., and Gray, H.B., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 7156 (2003).
4. Elliott S.J., McElhaney, A.E., Feng, C., Enemark, J.H., and Armstrong, F.A., *J. A. Chem. Soc.*, **124**, 11612 (2002).
5. Armstrong, F.A., and Wilson, G.S., *Electrochim. Acta*, **45**, 2623 (2000).
6. Aguey-Zinsou, K.F., Bernhardt, P.V., De Voss, J.J., and Slessor, K.E., *Chem. Commun*, **125**, 418 (2003).
7. Aguey-Zinsou, K. F., Bernhardt, P.V., Kappler, U., and McEwan, A.G., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 530 (2003).
8. Jhaveri, S.D., Mauro, J.M., Goldston, H.M., Schauer, C.L., Tender, L.M., and Trammell, S.A., *Chem. Commun.*, **418**, 338 (2003).
9. Xiao, Y., Patolsky, F., Katz, E., Hainfeld, J.F., and Willner, I., *Science*, **299**, 1877 (2003).
10. Hecht, H.J., Kalisz, H.M., Hendle, J., Schmid, R.D., and Schomburg, D., *J. Mol. Biol.*, **229**, 153 (1993).
11. Chen, X., Hu, V., and Wilson, G.S., *Biosens Bioelectron*, **17**, 1005 (2002).
12. Zhu, L., Li, Y., Tian, F., Xu B, and Zhu, G., *Sens. Actuat. Chem. B*, **84**, 265 (2002).
13. Reiter, S., and Habermüller, K., *Sens. Actuat. B: Chem.*, **79**, 150 (2001).
14. Piro, B., Dang, L.A., Pham, M.C., Fabiano, S., and Tran-Minh, C., *J. Electroanal. Chem.*, **512**, 101 (2001).
15. Garjonyte, R., and Malinauskas, A., *Biosens. Bioelectron.*, **15**, 445 (2000).
16. Ban, K., Ueki, T., Tamada, Y., Saito, T., Imabayashi, S., and Watanabe, M., *Anal. Chem.*, **75**, 910 (2003).
17. Savitri, D., and Mitra, C.K., *Biosens Bioelectron*, **47**, 67 (1998).
18. Jiang, L., McNeil, C.J., and Cooper, J.M., *J. Chem. Soc.*, **116**, 1293 (1995).
19. Guiseppi-Elie, A., Lei, C.H., and Baughman, R.H., *Nano Tech.*, **13**, 559 (2002).
20. Azamian, B.R., Davis, J.J., Coleman, K.S., Bagshaw, C.B., and Green, M.L.H., *J. Am. Chem. Soc.*, **124**, 12664 (2002)
21. Wang, J., and Musameh, M., *Anal. Chem.*, **75**, 2075 (2003).
22. Musameh, M., Wang, J., and Merkoci, A., *Electro chem. Com.*, **4**, 743 (2002).
23. Wang, J., Li, M., Shi, Z., Li, N., and Gu, Z., *Anal. Chem.*, **74**, 1993 (2002).
24. Yin, X., Chattopadhyay, D., Galeska, I., Papadimitrakopoulos, F., and Rusling, J.F., *Electro chem. Com.*, **5**, 408 (2003).
25. Liu, J., Yang, W., Losic, D., Orbons, S., Mearns, F.J., Shapter, J.G., and Hibbert, D.B., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 9006 (2003).
26. Wang, J., Deo, R.P., Poulin, P., and Mangey, M., *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 14706 (2003).
27. Chen, J., Bao, J.C., Cai, C.X., and Lu, T.H., *Chin. Chem. Lett.*, **14**, 1171 (2003).
28. Cai, C.X., and Chen, J., *Anal. Biochem.*, **325**, 285 (2004).
29. Chen, J., and Cai, C.X., *Chin. J. Chem.*, **22**, 167 (2004).
30. Liu, J., Chou, A., Wibowo, R., and Paddon, M., *Electroanalysis*, **17**, 38 (2005).
31. Huang, X.J., Ryu, S.W., Im, H.S. and Choi, Y.K., *Langmuir*, **23**, 991 (2007).
32. Withey, G.D., Lazareck, A.D., Tzolov, M.B., Yin, A., Aich, P., Yeh, J.I., and Xu, J.M., *Biosens Bioelectron*, **21**, 1560 (2006).
33. Lyons, M., and Keeley, G.P., *Int. J. Electrochem. Sci.*, **3**, 819 (2008).