

多铜氧化酶/中介体催化氧还原反应动力学分析

赵淑贤 曾 涵*

(新疆师范大学化学化工学院 乌鲁木齐 830054)

摘 要 采用分光光度法、Clark 型氧电极以及循环伏安法结合旋转圆盘电极技术,分别测定了游离多铜氧化酶在扩散型电子中介体存在时,催化氧还原循环中每一个组成步骤的速率并进行了比较,试图确定这个催化反应的决速步骤。实验结果表明,漆酶分子内部的电子迁移速率($10^3/\text{s}$)最高,酶催化氧气化学还原的速率次之($91/\text{s}$),酶催化中介体氧化产物在电极上电化学还原的速率再次之($0.19/\text{s}$ 或 $7.8 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$),底物 O_2 气以及氧化态/还原态电子中介体 2,2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS) 的传质系数分别为 1.7×10^{-3} 、 4.4×10^{-4} 和 $6.3 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$,相应地酶催化中介体氧化的化学反应速率为 $0.047/\text{s}$,酶催化中介体氧化的化学反应步骤以及中介体的传质步骤是影响催化反应速率的关键。在此基础上,通过系统改变体系中酶的种类、活力以及浓度、中介体种类及浓度、溶液温度及 pH 值等参数,研究了酶催化氧还原活力与这些参数之间的依赖关系,进一步确证了前述的结论。

关键词 多铜氧化酶,电子中介体,氧还原动力学,反应决速步骤

中图分类号:O629.8

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2013)09-1073-09

DOI:10.3724/SP.J.1095.2013.20500

漆酶是一种具有较高氧还原电位的多铜氧化酶,而且具有较高的催化效率,因此引起了生物电化学家的极大兴趣,近年来,已有不少使用漆酶作为阴极催化剂制备燃料电池和生物电化学传感器电极的相关报道^[1-5]。但是由于漆酶等多铜氧化酶的活性中心为不导电的蛋白质骨架包裹,难以实现酶活性中心与电极之间的有效电子通讯,限制了漆酶基电极的输出能量密度,所以目前最常见的实现酶-电极间有效电子迁移的方法,仍然是引入某种电子中介体中介酶-电极之间的电子迁移。尽管近期已有不少文献报道无需引入任何外加中介体就可以实现酶活性中心与电极之间的有效电子迁移^[6-11],但这些文献均未对直接电子迁移的机制进行深入地探讨,对其催化反应的动力学更是缺乏定量的分析。而对于引入中介体实现游离酶-电极间有效电子迁移的酶催化反应,目前,已有不少文献对其动力学进行了分析并建立了相关模型^[12-16],这其中,多数只是给出了测定的酶催化反应扩散极限电流与宏观总反应催化反应速率常数的关系式,对中介体中介的酶催化反应的各个组成步骤速率缺乏分析与比较,因此无从找出反应的决速步骤,提出改善电极性能的有效途径。2,2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐 (ABTS) 由于具有较高的氧化还原式电位(接近漆酶活性位 T_1 的式电位,约为 710 mV vs NHE),较快的扩散速率和较高的电子迁移速率(前文^[17]已经获得上述参数),因此很适合作为漆酶催化氧还原的电子中介体。自从 1999 年 Palmore 等^[18]首次报道使用扩散型 ABTS 作为电子中介体中介漆酶催化氧还原以来,近 13 年已有相当多文献报道这种体系的发展和催化氧还原性能的改善方法。这其中比较有代表性的报道包括:研究游离漆酶在扩散型 ABTS 共存时的稳态电流密度与酶催化反应参数(如米氏常数和宏观酶催化反应速率常数等)之间的关联^[19-20];基于 ABTS 接枝多壁碳纳米管/液晶相固定酶复合物修饰电极,以改善酶催化氧还原反应的性能^[21]以及将漆酶与 ABTS 一同吸附在多壁碳纳米管上,以提高其酶基电极的输出能量密度^[22],将漆酶与 ABTS 一同固定在硅土或有机粘合剂修饰的多孔碳纸载体上以提高酶基阴极的性能^[23]的实例。对于游离漆酶和扩散型 ABTS 共存的均相催化氧还原体系,尽管稳态催化电流与酶催化反应的总反应速率常数之间的关联已有文献^[19-20]做了系统的研究,其结果也得到了广泛承认,但对于 ABTS 中介的酶催化反应的各组成步骤的速率没有进行比较(由于量纲不统一),也没

有明确指出酶催化反应的决速步骤。虽然这类体系由于催化剂无法回收已经丧失了应用价值,但是了解了反应的决速步骤将有助于设计高性能的固定酶-中介体复合物修饰电极,具有半经验性的指导意义。

本研究小组采用分光光度法、Clark 型氧电极结合计时电流法、旋转圆盘电极技术结合循环伏安法等多种方法相结合,分别求出酶和底物氧分子的传质速率、酶-氧气反应速率(以 O_2 气的消耗速率表征)、酶催化 ABTS 氧化反应速率以及氧化态 ABTS 分子在电极表面上电化学反应的速率,并在同样的量纲下进行比较以确定反应的决速步骤,从而为改善此类电极的性能提出可行性方案。此外还对得到结论的适用性进行了验证。

1 实验部分

1.1 仪器和试剂

不同活力的云芝漆酶(Lac,分子量 68000,美国 Sigma)和胆红素氧化酶(BOD,分子量 52000,美国 Sigma-Aldrich),现买现用无需进一步纯化;2,2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(化学纯,纯度 98.5%)和二茂铁甲酸(缩写为 FcCOOH ,化学纯,纯度 98.0%),购自阿拉丁试剂公司(中国)。配制磷酸盐缓冲液所需的试剂购自国药集团化学试剂有限公司。所用试剂如无特殊说明均为分析纯。实验过程中使用的缓冲溶液为 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液(PBS, $\text{pH} = 4.0$),通过控制柠檬酸三钠和磷酸二氢钾的相对比例来调控溶液的 pH 值,所有溶液均用 Milli-Q 超纯水配制。

U-2810 型紫外可见分光光度计(日本岛津公司),比色皿厚度 1 cm;CHI-1140A 型电化学分析仪(上海辰华仪器有限公司),AFMSRCE 型旋转圆盘电极系统(美国 Pine 公司), ν 为 50 ~ 10000 r/min;作为参比电极的 Ag/AgCl (饱和氯化钾)电极和作为工作电极的玻碳电极(GCE,直径 6 mm)均购自天津艾达恒晟工贸有限公司,对电极铂丝电极自制。高纯 N_2 气和高纯 O_2 气钢瓶均购自南京特气。工作电极使用前先以 3500#砂纸,1.0 和 0.5 μm 氧化铝粉浆抛光,再用丙酮和三次重蒸水超声清洗各 2 次,每次 2 min。文中如无特殊说明,所有的电极电位均为相对于 NHE(标准氢参比电极)而言。Clark 型氧电极(英国 Hansatech 公司)。

1.2 游离漆酶活力的测定

称取一定量的漆酶加入 $\text{pH} = 4.0$ 的磷酸盐缓冲液,搅拌溶解后以 N_2 气鼓泡至少 30 min 以除尽溶液中的 O_2 气,随后与事先配制的含有一定浓度 ABTS 的无氧磷酸盐缓冲液($\text{pH} = 4.0$)混合得到一定漆酶和 ABTS 浓度的混合溶液,移取部分溶液到比色皿中,立刻测试此溶液在 420 nm 处吸光度随时间的变化率,按照文献^[18]的定义和方法求出漆酶的活力(量纲为 U)。再根据溶液中含有漆酶的物质,量,求出出游离漆酶在氧气不存在时催化 ABTS^{2-} 氧化的化学反应速率常数(量纲为 s^{-1})。BOD 催化活力的测定类似于此种方法。

1.3 游离漆酶在电子中介体 ABTS 存在时催化氧还原速率(以氧消耗速率表征)

将一定体积的 $\text{pH} = 4.0$ 的氧气饱和磷酸盐缓冲液(以 O_2 鼓泡至少 15 min)与不同体积的无氧 $\text{pH} = 4.0$ 的磷酸盐缓冲液共混后,得到不同含氧浓度的 PBS 缓冲液,使用 Clark 型氧电极绘制电解质溶液中氧的浓度与外电路检测氧还原电流之间的工作曲线。随后向与大气平衡的有恒温水浴夹套的一定体积电解池中,加入含一定浓度漆酶的空气饱和 PBS 缓冲液($\text{pH} = 4.0$),氧还原反应是通过向此溶液中加入一定体积的为空气饱和,且含一定 ABTS^{2-} 浓度的 PBS 缓冲液启动的(ABTS 浓度至少是溶液中氧气浓度的 4 倍以上以使溶液中氧完全被还原),通过检测氧气浓度随时间的变化曲线来测定游离漆酶在电子中介体 ABTS 存在时催化氧还原的速率,再根据溶液中存在的漆酶浓度就可以求出漆酶催化氧还原的速率常数(量纲以 s^{-1} 计算)。BOD 在电子中介体 ABTS 存在时催化氧还原的速率也以类似方法测定。

1.4 漆酶催化 ABTS^{2-} 氧化产物在 GC 电极上电化学还原的速率

由于 ABTS^{2-} 在空气中可以自发缓慢氧化成为 $\text{ABTS}^{\cdot+}$,可以采用分光光度计测定 420 nm 处吸光度,并根据 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 的摩尔吸光系数和比色皿厚度求出不同时刻产生的 $\text{ABTS}^{\cdot+}$ 浓度。经验表明,新购

买的 ABTS^{2-} 在氧气饱和条件下,于室温(25 ℃)静置2周之后就基本转化为深绿色的 $\text{ABTS}^{\cdot-}$,此时按照前文^[17]介绍的方法可以算出 $\text{ABTS}^{\cdot-}$ 在裸玻碳电极上电化学还原反应的速率常数(cm/s)。由于这可以视为一个均相催化反应,按照文献[23]方法可以算出反应层厚度 Δ ,将反应速率对反应层厚度归一化,可以求出归一化的电化学反应速率常数(量纲为 s^{-1})。BOD 催化 ABTS^{2-} 氧化产物在 GC 电极上电化学还原的速率方法也类似于此。

1.5 实验所得结论的验证

为了验证分析和总结实验数据后所得结论是否正确,本文选取了几个不同的实验参数,系统改变这些参数的数值以确认实验所得结论是否具有普适性。具体条件如下:

1.5.1 酶的种类和对底物 ABTS 的催化活力 选定了漆酶和胆红素氧化酶作为研究对象,漆酶和胆红素氧化酶对 ABTS 的催化比活力分别为 0.0256 和 0.0418 U/mg(漆酶);0.0284 和 0.0441 U/mg(胆红素氧化酶)。分别测试在酶种类相同、活力不同以及活力相近、种类不同情况下游离酶的催化活力(以所得的稳态催化电流密度,即电流对电极几何面积归一化而得)并进行比较。

1.5.2 中介体种类和浓度 选取 ABTS 和 FcCOOH 作为研究的电子中介体,其浓度均分别选取 4 个标准:0.26、0.43、0.60 和 2.80 mmol/L。在其余实验条件均不变的前提下,测定游离酶在扩散型中介体存在条件下催化氧还原的活力,标准如 1.5.1 节所述。

1.5.3 酶的浓度 对于 BOD 和 Lac,均选取 3 个浓度标准:37.2、110.0 以及 218.0 nmol/L,其它实验条件不变的条件下,测定所得的稳态催化电流密度,并进行比较。

1.5.4 温度和 pH 值 由于温度和 pH 值可能会影响底物,中介体的扩散速率,化学反应速率(即酶的催化活力)和 ABTS 在电极表面的电化学反应速率,考虑到多铜氧化酶结构与 pH 值之间的相互关系所以选取 3 个 pH 值:4.0、5.0 和 6.0(漆酶);6.0、7.0 和 8.0(胆红素氧化酶)以及 4 个温度:25、40、55 和 70 ℃,在其它条件均不改变的条件下,测定 Lac 和 BOD 各自反应条件下所得的稳态催化电流密度并进行比较。

2 结果与讨论

2.1 游离漆酶在 ABTS 中介体存在条件下催化氧还原反应的动力学分析

在前文^[17]研究基础上,进一步研究了漆酶在扩散型电子中介体 ABTS 存在条件下催化氧还原的动力学。我们的研究思路是期望通过设计一系列实验并结合相关文献的研究结果,获得中介体参与的酶催化氧还原过程每一个步骤的动力学数据,由此找出反应的决速步骤,在此基础上提出改善此体系催化氧还原性能的方法。图 1 给出了溶液中游离漆酶借助扩散型电子中介体 ABTS 催化氧还原的反应循环流程图示意图。游离漆酶活性中心的 4 个铜离子最初全部处于氧化态,一旦与处于还原态的中介体 ABTS^{2-} 接触后,漆酶的 T_1 活性中心迅速转化为还原态,从 ABTS^{2-} 得到的电子自 T_1 位通过分子内电子传递链(组氨酸-半胱氨酸-组氨酸)传递给处于漆酶分子内部的三核铜簇(1 个 T_2 铜离子和 2 个共轭 T_3 铜离子构成),并使在 T_2 与 T_3 位上结合的氧分子以及 H^+ 反应生成水;与此同时,漆酶活性中心恢复为初始的氧化态;而处于氧化态的 $\text{ABTS}^{\cdot-}$ 则扩散到电极表面附近发生电化学还原反应,恢复初始的还原态,进入下一个催化循环。因此整个催化反应包括 3 个部分:1)漆酶分子、 $\text{ABTS}^{2-}/\text{ABTS}^{\cdot-}$ 及氧分子在溶液中的扩散过程等传质步骤;2)漆酶催化 ABTS^{2-} 氧化以及氧气还原等化学反应步骤;3) $\text{ABTS}^{\cdot-}$ 在电极表面发生电化学还原反应步骤。

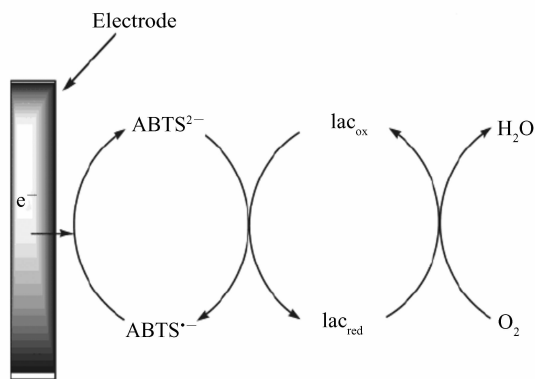


图1 游离漆酶在扩散型电子中介体 ABTS 存在时催化氧还原反应机制示意图

Fig. 1 Schematic illustration of mechanism in the catalytic oxygen reduction reaction with free laccase in the presence of diffusional electron mediator (ABTS)

只要分别求出这3个步骤的速率并在同一量纲下进行比较,就可以确定整个催化循环的决速步骤。前文^[17]分别给出了氧气分子和ABTS分子的扩散系数分别为 1.7×10^{-5} 和 4.4×10^{-6} cm²/s,考虑到溶液处于静态时扩散层厚度一般不超过 10^{-2} cm,对扩散层厚度归一化后所得的氧气和ABTS的传质系数分别为 1.7×10^{-3} 和 4.4×10^{-4} cm/s, O₂气的扩散速率大大高于ABTS,这样处理的结果有利于在同一量纲下与ABTS阴离子自由基电化学还原的速率常数进行对比。为了测定漆酶与O₂气以及漆酶与ABTS的化学反应速率,分别采用Clark型氧电极测定溶液中O₂气浓度随时间的变化率(O₂气的消耗速率)以及分光光度法测定ABTS阴离子自由基的产生速率。当溶液为空气饱和时,溶液中所含ABTS²⁻浓度为0.5 mmol/L,漆酶浓度为4.5 nmol/L时,根据测定的O₂气消耗速率12.5 μmol/(L·min)以及文献^[19]报道的氧气消耗速率与酶浓度,酶对O₂气和ABTS的米氏常数之间的关系式可以算出漆酶催化O₂气还原的速率常数为 (111 ± 8) s⁻¹,此值与文献^[19]报道的数值 (118 ± 10) s⁻¹非常接近,其中漆酶对O₂气的表观米氏常数为262 μmol/L,而漆酶对ABTS的表观米氏常数则是192 μmol/L,而由表观速率常数和底物O₂气浓度,游离漆酶对O₂气的表观米氏常数之间的关系式^[19],算出溶液为O₂气饱和且处于稳态时的催化速率常数 k_{cat} 为 (91 ± 7) s⁻¹;如前所述方法测定游离漆酶的比活力为0.0418 U/mg时,可以根据漆酶比活力的定义与漆酶的分子量求出漆酶在无氧状态下催化ABTS氧化的速率常数为 (0.047 ± 0.004) s⁻¹。由此可以看出,漆酶催化O₂气还原的速率大大高于漆酶催化ABTS氧化的速率。

按照与前文^[17]类似的方法,结合分光光度法测定体系达到稳态时溶液本体中ABTS阴离子自由基的浓度所得结果,可以算出ABTS阴离子自由基的扩散速率及其稳态时电化学还原的标准平衡速率常数。再由文献[23]方法,按照式(1)算出酶-中介体均相催化反应的电化学反应层厚度 Δ 为0.041 cm。

$$\Delta = \left(D_M \frac{K_M^e}{k_{\text{cat}}^e [\text{Enz}]} \right)^{1/2} \quad (1)$$

式中, D_M 为中介体ABTS的扩散系数, $[\text{Enz}]$ 系溶液中酶的浓度,而 K_M^e 则如前述为溶液为氧气饱和且处于稳态时的漆酶对ABTS的米氏常数,其它物理量的意义如前所示。

对于漆酶催化产生的ABTS阴离子自由基在电极表面上还原的速率,可以由2种方法计算得出:第1种是以被氧气充分氧化的ABTS²⁻溶液,pH=4.0(分光光度法测定结果表明,初始的ABTS²⁻几乎全部被氧化)作为研究体系,按照前文^[17]方法,以旋转圆盘电极技术结合线性扫描伏安法,测定不同电极旋转速度下的伏安曲线,根据不同转速下的极限扩散电流求出ABTS阴离子自由基的扩散系数,同时将不同过电位的 $i^{-1} \sim \omega^{-1/2}$ 曲线外推至转速无穷大,可以根据所得的截距求出动力学电流,再凭借动力学电流与过电位的线性关系可以求出稳态电位下的标准速率常数(图略),按此方法计算所得的ABTS^{·-}的扩散系数为 5.8×10^{-6} cm²/s,ABTS^{·-}电化学还原的标准速率常数为 8.0×10^{-3} cm/s;第2种方法则是在含有游离漆酶和扩散型电子中,介体ABTS而且为氧气饱和的磷酸盐缓冲液中(pH=4.0),使用前述的旋转圆盘电极结合循环伏安法按照前文^[17]类似的方法,研究体系达到稳态时的电动力学。图2为裸玻碳电极在同时含有37.2 nmol/L漆酶和ABTS²⁻(初始浓度为2.80 mmol/L)且为氧气饱和的PBS(pH=4.0)溶液中,以20 mV/s扫描于不同电极旋转速度下获得的

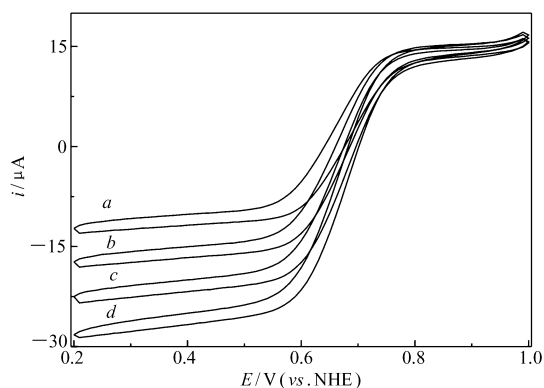


图2 裸玻碳电极在含漆酶和电子中介体ABTS的氧气饱和PBS中于不同电极旋转速度下扫描所得的循环伏安曲线,起始扫描为正向

Fig. 2 Cyclic voltammograms recorded with variable electrode rotating rates of bare GCE in oxygen-saturated PBS (pH = 4.0) with laccase (37.2 nmol/L) and electron relay

ABTS (2.80 mmol/L) at scan rate: 20 mV/s, room temperature, WE: bare GCE, CE: Pt coil, RE: AgCl|Ag (sat KCl)

a. 400 r/min; b. 900 r/min; c. 1600 r/min; d. 2500 r/min

循环伏安曲线。从图2可以看出,阴极还原的起始电位约为0.75 V,非常接近于漆酶T₁活性位的式电位(780 mV),这表明ABTS²⁻首先将电子传递给T₁活性位,再将电子通过分子内电子传递链传给在T₃活性位上结合的氧分子,并使O₂气在接近T₃式电位(780 mV)的电位条件下还原;而催化氧化还原半波电位(710 mV)也表明实际上在电极上反应的电活性物种是ABTS(半波电位非常接近于ABTS的式电位),这与文献^[18,20]报道的结果一致。另外值得指出的是,图2显示的O₂饱和溶液中ABTS^{·-}还原的极限扩散电流,仅为没有O₂时ABTS²⁻氧化的极限电流的1/3^[17]。这说明在极限扩散电流区,电极表面附近仍存在较多还原态ABTS²⁻。导致上述现象可能的原因有:1)漆酶的活力不够高,不足以催化氧化所有的ABTS²⁻的氧化;2)相对于ABTS²⁻的用量,溶液中O₂气的浓度太低或者其扩散系数不够高,导致O₂到漆酶的活性中心的传质太慢等原因导致漆酶无法催化ABTS完全氧化。而根据图2显示的极限扩散电流与电极旋转角速度平方根 $\omega^{1/2}$ 的关系式(2)结合分光光度法的相关测试结果(分光光度法测定溶液处于稳态时420 nm的吸光度,再根据ABTS^{·-}在此波长处的摩尔吸光系数36000 L/(mol·cm)可算出处于稳态时,溶液本体中ABTS^{·-}的浓度为0.159 mmol/L)求出ABTS^{·-}的扩散系数为 $6.3 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ 。

$$i_{L,c} = 0.62nFA \cdot D_{\text{ABTS}^{2-}}^{2/3} \cdot \nu^{-1/6} \cdot c_{\text{ABTS}^{2-}}^b \cdot \omega^{1/2}$$

(2)

式中, $i_{L,c}$ 即为阴极极限扩散电流, n 为ABTS阴离子自由基电化学还原得失电子数,为1, A 为电极几何表面积, D 为电活性物种的扩散系数, ν 为溶液的动力学黏度, $c_{\text{ABTS}^{2-}}^b$ 为ABTS²⁻在溶液本体中的浓度。根据图2给出的扣除背景电流的某一过电位下的电流倒数 $i^{-1} \sim \omega^{-1/2}$ 曲线,按照前文^[17]给出的式(3)可以算出这一过电位下的动力学电流 $i_k(\eta)$ 。表1为不同过电位下(ABTS²⁻/ABTS^{·-}电对的式电位为705 mV vs NHE)的动力学电流以及按照式(3)算出的电还原反应速率常数 k ,进而根据式(4)可以算出式电位下的

$$i_k(\eta) = nFAkc_{\text{ABTS}^{2-}}^b$$

(3)

$$\ln k - \ln k^0 + (\beta nF/RT)\eta$$

(4)

式中,电化学反应的标准速率常数 k^0 为 $7.8 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ 。而 β 为反应的对称因子(或电荷传递系数),按照前文^[17]方法求算。

从这些数据中可以判断出:无论漆酶以及偶联的氧化还原反应是否存在,2种方法算出的扩散系数以及ABTS阴离子自由基,在电极上还原的反应标准速率常数没有显著性差异。这表明漆酶催化ABTS²⁻的氧化以及共存的氧化还原化学反应不会影响电极上的电化学反应。将求得的标准速率常数对前述的电化学反应层厚度归一化可得归一化的速率常数为0.19/s。表1为根据图2数据推算得到的ABTS^{·-}电化学还原反应的动力学参数。

表1 从图2所得数据求算的ABTS^{·-}电化学还原反应动力学参数

Table 1 Kinetic parameters of ABTS^{·-} electrochemical reduction reaction derived from the secured data in Fig. 2

η/mV	$i_k/\mu\text{A}$	$10^3 k/(\text{cm} \cdot \text{s}^{-1})$	η/mV	$i_k/\mu\text{A}$	$10^3 k/(\text{cm} \cdot \text{s}^{-1})$
7	34.8	8.0	37	45.31	10.4
17	38.7	8.9	47	48.0	11.1
27	42.2	9.7	57	50.4	11.6

综上所述,根据文献^[3]给出的数据,多铜氧化酶分子内部电子传递的速率常数约为 $10^3/\text{s}$,此数值远高于ABTS阴离子自由基电化学还原反应的归一化速率常数0.19/s和漆酶催化氧化还原以及ABTS²⁻氧化的反应速率(91和0.047/s),而后三者中,ABTS阴离子自由基电化学还原的速率常数 $7.8 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$ 又高于底物O₂气以及中介体ABTS氧化态/还原态的传质系数(分别为 1.7×10^{-3} 、 4.4×10^{-4} 和 $6.3 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$),因此综合考量,对此催化循环反应速率起决定性影响的步骤是ABTS(氧化态以及还原态)的传质过程以及漆酶催化ABTS²⁻氧化的化学过程。这个结果暗示漆酶的比活力或是溶剂的性质(如黏度等)会制约游离多铜氧化酶在电子中介体存在时催化氧化还原反应速率,因此使用纯度高,活力经过优化的基因突变型多铜氧化酶以及使用黏度低,溶剂效应较弱的溶剂,或是将中介体固定在化学修饰的天然高分子水凝胶上,借助高分子侧链的所谓“摆动”来增强电活性基团捕获和释放电

子的能力,将是提高此类体系催化活力的有效方法,虽然这类体系由于生物电催化剂无法回收,中介体与酶长期接触会使中介体过度氧化,从而失去电子中介能力等缺陷没有实用价值,但本文所获得的结论将利于深入研究现有文献报道的酶/中介体复合体系催化氧还原的动力学以及其催化机制,特别是酶-中介体共同固定在电极表面的体系(因为扩散层和电化学反应层重合)。应该说明的是:胆红素氧化酶在中介体 ABTS 存在条件下催化氧气还原反应动力学研究结果也表明,BOD 催化 ABTS 氧化和 ABTS 的传质过程是整个催化循环的决速步骤。

2.2 研究结论的验证

2.2.1 酶活力、种类以及酶浓度对酶催化活力的影响 当体系的其它参数(温度保持为室温,中介体 ABTS 的浓度保持为 2.80 mmol/L,多铜氧化酶为漆酶或胆红素氧化酶,溶液 pH 值恒定为 4.0(Lac)或 7.0(BOD),电极旋转速率恒定为 2500 r/min,酶浓度恒定为 37.2 nmol/L)保持不变时,通过改变酶的活力比较获得的稳态催化电流密度(图 2 显示的稳态催化电流对电极几何表面积归一化就可得到稳态催化电流密度)可知,对于漆酶,当其活力由 0.0256 U/mg 提高至 0.0418 U/mg 时,稳态催化电流密度由 134.1×10^{-6} A/cm² 提高至 141.3×10^{-6} A/cm²;对于 BOD,当其比活力由 0.0284 U/mg 提高至 0.0441 U/mg 时,对应的稳态催化电流密度由 210.4×10^{-6} A/cm² 提高至 218.5×10^{-6} A/cm²。综上所述可以看出,当酶浓度相同,对 ABTS 的比活力接近时,使用胆红素氧化酶相对于漆酶会取得更高的催化氧还原活力,这也许可以解释为 BOD 的结构相对而言更简单,其活性中心更易于结合氧分子和催化 ABTS 氧化所致^[14];而在酶浓度相近的条件下,无论使用哪种多铜氧化酶,其电催化氧还原活力均随着酶催化 ABTS 化学氧化的能力增强而提高,这与 2.1 节获得的结论相一致。

而当酶的活力取最高值,无论是哪种多铜氧化酶,酶电催化氧还原活力随酶浓度的关系类似于文献^[19]的研究结果,在 2.0 ~ 30.0 nmol/L 范围内,稳态催化电流密度或氧消耗速率与酶浓度保持线性关系,当超过此浓度范围上限,继续增大酶浓度时,催化氧还原活力的上升速率急剧降低,酶浓度接近 37.2 nmol/L 时催化氧还原活力趋于恒定。图 3 表明,体系中其它参数不变,当中介体浓度很高(2.80 mmol/L)时,酶浓度达到 37.2 nmol/L 后再提高酶浓度,所获得的循环伏安曲线基本重合,即酶电催化氧还原活力大体不变,而中介体浓度不高(0.43 mmol/L)时,酶电催化氧还原活力随酶浓度提高有

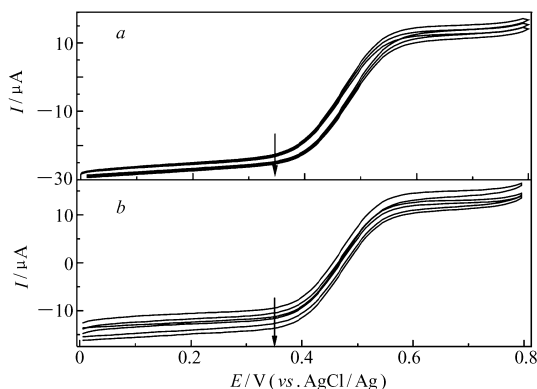


图3 不同浓度下漆酶通过 ABTS 催化氧还原的循环伏安曲线

Fig. 3 Cyclic voltammograms of oxygen reduction catalyzed by different laccase in the presence of ABTS, curves from outer layer to inner one correspond to 37.2, 110.0 and 218.0 nmol/L laccase in solution. Electrode rotating rate: 2500 r/min, r. t., scan rate: 20 mV/s, pH = 4.0 PBS saturated with oxygen

$c(\text{ABTS}^{2-})/(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})$: a. 2.80; b. 0.43

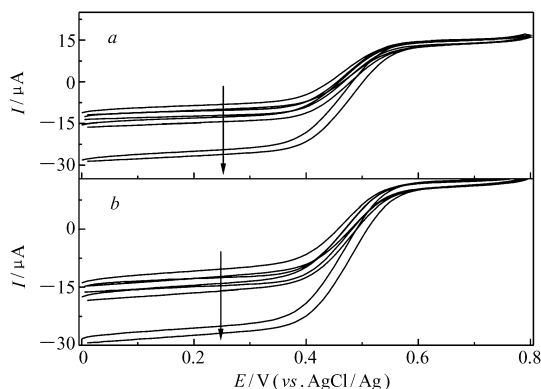


图4 不同中介体 ABTS 浓度下漆酶催化氧还原的循环伏安曲线

Fig. 4 Cyclic voltammograms of oxygen reduction catalyzed by laccase with different concentration of mediator (ABTS), curves from top to bottom correspond to 0.26, 0.43, 0.60 and 2.80 mmol/L ABTS in solution. Electrode rotating rate: 2500 r/min, r. t., scan rate: 20 mV/s, pH = 4.0 PBS saturated with oxygen

$c(\text{lac})/(\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1})$: a. 37.2; b. 218.0

较弱的改善,这也与 2.1 节所得结论相一致。

2.2.2 电子中介体种类及浓度对酶催化活力的影响 当体系的其它参数(温度保持为室温,Lac 或者 BOD 的活力均取最高值,酶的浓度取 37.2 和 218.0 nmol/L,溶液 pH 值恒定为 4.0(Lac)或 7.0(BOD)以及电极旋转速率恒定为 2500 r/min)不变时,系统改变电子中介体 ABTS 的浓度,采用循环伏安法表征此体系电催化氧还原的性能结果见图 4。从图 4 可以看出,无论漆酶的浓度高或低,当 ABTS 浓度由低增高时,同一电位下稳态催化电流密度增加得较为明显,而且增加幅度明显高于漆酶浓度改变时催化电流密度的增幅,这表明 ABTS 的传质过程可能对整个催化反应速率的影响要更大。采用 BOD 作电催化剂,ABTS 作为电子中介体测试氧还原能力的结果与图 4 类似。

当体系的其它参数不变时,中介体浓度恒定(2.8 mmol/L),而改用 FcCOOH 作为电子中介体(其式电位约为 550 mV(vs NHE),氧化态和还原态物种的扩散系数分别为 2.7×10^{-6} 和 3.2×10^{-6} cm²/s)时,在 300 mV(vs NHE)电位处获得的稳态催化电流密度仅为 68.8×10^{-6} A/cm²(Lac)和 105.4×10^{-6} A/cm²(BOD),明显低于 ABTS 中介体相同浓度时获得的稳态催化电流密度,这再次表明中介体的传质速率对酶电催化氧还原活力有非常重要的影响。这暗示如果采用扩散系数更高的电子中介体(例如所谓的氧化还原聚合物水凝胶或是 ABTS/FcCOOH 接枝纳米材料或化学修饰的天然高分子化合物),可以大大改善此类体系的催化活力。此外需要说明的是:采用 FcCOOH 作为电子中介体,改变其浓度测试酶电催化氧还原活力得到的结果与 ABTS 测试结果类似,得到了同样的结论。同时前述的所有结论也同样适用于以 FcCOOH 作为电子中介体的酶(Lac,BOD)电催化氧化还原反应。

2.2.3 溶液温度及 pH 值对酶催化活力的影响 当体系的其它条件不改变,只改变溶液的温度或 pH 值,由于实际改变的是酶的比活力和传质速率(对于改变溶液温度而言)或者是仅仅影响酶的催化活力(对于改变溶液 pH 值而言),所以必定会影响酶电催化氧还原的活力。实验结果表明,当采用 ABTS 作电子中介体浓度为 2.8 mmol/L,酶浓度为 37.2 nmol/L,酶的活力取最高值且电极旋转速度为 2500 r/min,溶液 pH 值为 4.0(Lac)或 7.0(BOD)时,温度由低逐渐升高,稳态催化电流密度由 25 ℃时测得的 141.3×10^{-6} A/cm²急剧升高至 40 ℃的 214.3×10^{-6} A/cm²,当温度继续升至 55 ℃,催化电流密度缓慢增加至 228.2×10^{-6} A/cm²,但当温度继续升至 70 ℃,催化电流密度急剧降至 110.2×10^{-6} A/cm²(对于 Lac);而对于 BOD,也存在类似的温度-催化活力依赖关系,温度在 25、40、55 和 70 ℃时体系测到的稳态催化电流密度依次为: 210.4×10^{-6} 、 298.6×10^{-6} 、 313.3×10^{-6} 和 102.7×10^{-6} A/cm²。此结果与文献[19]报道的结果相一致,温度升高会提高物种的扩散速率,但同时过高的温度会降低酶的活力(漆酶的最佳活力对应的温度是 35 ℃,BOD 的最佳活力对应的温度是 41 ℃),并使酶过度氧化 ABTS 从而丧失中介能力,这可以解释这种温度-催化活力间的依赖关系。

实验的结果还进一步表明,当体系的其它条件不变(温度恒定于 55 ℃,其它条件如前段所述),只改变溶液的 pH 值,稳态催化电流的密度随 pH 值的变化关系类似于文献^[14,19]报道的游离漆酶催化活力/催化氧消耗速率与溶液 pH 值的关系,即对于漆酶而言,随着溶液 pH 值从 4.0、5.0 升至 6.0,稳态催化电流密度逐渐降低,从 228.2×10^{-6} 和 210.6×10^{-6} A/cm²逐渐降至 168.9×10^{-6} A/cm²;而对于 BOD 这种 pH-催化氧还原活力依赖关系有所不同,随着 pH 值接近中性,稳态催化活力出现极大值,溶液 pH 值为 6.0、7.0 和 8.0 时,获得稳态催化电流密度分别为 284.9×10^{-6} 、 313.3×10^{-6} 和 301.6×10^{-6} A/cm²。这表明通过改变溶液 pH 值,只改变了酶催化中介体氧化的比活力,即中介体化学反应的速率,相对于传质步骤此步骤的速率较快,因此在酶稳定存在的 pH 值范围内改变溶液 pH 值,对酶电催化氧还原活力的影响没有改变温度的影响显著。

3 结 论

通过将游离多铜氧化酶在扩散型电子中介体存在条件下,催化氧气还原为水的反应分割为 3 个部分:底物以及中介体分子的传质步骤、游离酶催化中介体氧化及氧气还原(氧气消耗)的化学反应步骤以及酶催化氧化产生的氧化态中介体分子在电极上还原的电化学反应步骤。在查出或测定出每一个步

骤速率并在同一量纲下比较的基础上,发现中介体的传质步骤以及对应的中介体被酶催化氧化化学反应步骤的速率较慢,是整个反应的决速步骤。在此基础上通过改变酶的种类、比活力以及酶的浓度、中介体种类以及浓度、溶液温度及 pH 值等参数,研究了这些参数与对应的酶电催化氧还原活力之间的依赖关系,进一步确证了中介体的传质步骤和相应的酶催化中介体氧化的化学反应步骤是影响催化反应的关键所在。这个结果暗示欲改善此类体系催化性能,需要选择结构得到改造、具有更高催化比活力的酶,同时更需要高式电位,高扩散系数的电子中介体(前提是此电子中介体具有良好的氧化还原反应可逆性)。

参 考 文 献

- [1] Barriere F, Ferry Y, Rochefort D, *et al.* Targetting Redox Polymers as Mediators for Laccase Oxygen Reduction in a Membrane-less Biofuel Cell[J]. *Electrochem Commun*, 2004, **6**: 237-241.
- [2] Soukharev V, Mano N, Heller A. A Four-Electron O₂-Electroreduction Biocatalyst Superior to Platinum and a Biofuel Cell Operating at 0.88 V[J]. *J Am Chem Soc*, 2004, **126**: 8368-8369.
- [3] Mano N, Kim H H, Zhang Y C, *et al.* An Oxygen Cathode Operating in a Physiological Solution[J]. *J Am Chem Soc*, 2002, **124**(22): 6480-6486.
- [4] Mano N, Mao F, Heller A. A Miniature Biofuel Cell Operating in A Physiological Buffer[J]. *J Am Chem Soc*, 2002, **124**: 12962-12963.
- [5] Gupta G, Rajendran V, Atanassov P. Bioelectrocatalysis of Oxygen Reduction Reaction by Laccase on Gold Electrodes[J]. *Electroanalysis*, 2008, **16**(13/14): 1182-1185.
- [6] Ivnitski D M, Khripin C, Luckarift H R, *et al.* Surface Characterization and Direct Bioelectrocatalysis of Multi-copper Oxidases[J]. *Electrochim Acta*, 2010, **55**: 7385-7393.
- [7] Blanford C F, Foster C E, Heath R E, *et al.* Efficient Electrocatalytic Oxygen Reduction by the 'Blue' Copper Oxidase, Laccase, Directly Attached to Chemically Modified Carbons[J]. *Faraday Discuss*, 2008, **140**: 319-335.
- [8] Wang X J, Latonen R M, Sjoberg-Eerola P, *et al.* Direct Electron Transfer of Trametes Hirsuta Laccase in a Dual-Layer Architecture of Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) Films[J]. *J Phys Chem C*, 2011, **115**: 5919-5929.
- [9] Ramasamy R P, Luckarift H R, Ivnitski D M, *et al.* High Electrocatalytic Activity of Tethered Multicopper Oxidase-carbon Nanotube Conjugates[J]. *Chem Commun*, 2010, **46**: 6045-6047.
- [10] Sosna M, Chretien J M, Kilburn J D, *et al.* Monolayer Anthracene and Anthraquinone Modified Electrodes as Platforms for Trametes Hirsuta Laccase Immobilisation[J]. *Phys Chem Chem Phys*, 2010, **12**: 10018-10026.
- [11] Martinez-Ortiz J, Flores R, Vazquez-Duhalt R, *et al.* Molecular Design of Laccase Cathode for Direct Electron Transfer in a Biofuel Cell[J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, **26**: 2626-2631.
- [12] Kano K, Ohgaru T, Nakase H, *et al.* Electrochemical Evaluation of Redox Enzyme Reaction Kinetics Based on Mediated Bioelectrocatalysis in Solution[J]. *Chem Lett*, 1996: 439-440.
- [13] Gallaway J W, Barton S A C. Kinetics of Redox Polymer-Mediated Enzyme Electrodes[J]. *Chem Lett*, 2008, **130**: 8527-8536.
- [14] Trudeau F, Daigle F, Leech D. Reagentless Mediated Laccase Electrode for the Detection of Enzyme Modulators[J]. *Anal Chem*, 1997, **69**: 882-886.
- [15] Ogino Y, Takagi K, Kano K, *et al.* Reactions Between Diaphorase and Quinone Compounds in Bioelectrocatalytic Redox Reactions of NADH and NAD⁺[J]. *J Electroanal Chem*, 1995, **396**: 517-524.
- [16] Kano K, Ikeda T. Fundamentals and Practices of Mediated Bioelectrocatalysis[J]. *Anal Sci*, 2000, **16**(10): 1013-1021.
- [17] Zeng H, Tang Z Q, Liao L W, *et al.* Electrochemistry of ABTS at Glassy Carbon Electrodes[J]. *Chinese J Chem Phys*, 2011, **12**(36): 10888-10895.
- [18] Palmore G T R, Kim H H. Electro-enzymatic Reduction of Dioxygen to Water in the Cathode Compartment of a Biofuel Cell[J]. *J Electroanal Chem*, 1999, **464**: 110-117.
- [19] Farneth W E, Diner B A, Gierke T D, *et al.* Current Densities from Electrocatalytic Oxygen Reduction in Laccase/ABTS Solutions[J]. *J Electroanal Chem*, 2005, **581**: 190-196.
- [20] Tsujimura S, Tatsumi H, Ogawa J, *et al.* Bioelectrocatalytic Reduction of Dioxygen to Water at Neutral pH Using Bilirubin Oxidase as an Enzyme and 2,2'-Azinobis(3-ethylbenzothiazolin-6-sulfonate) as an Electron Transfer Mediator[J]. *J Electroanal Chem*, 2001, **496**: 69-75.
- [21] Nazaruk E, Sadowska K, Madrak K, *et al.* Composite Bioelectrodes Based on Lipidic Cubic Phase with Carbon Nanotube Network[J]. *Electroanalysis*, 2009, **21**(3/5): 507-511.
- [22] Karnicka K, Miecznikowski K, Kowalewska B, *et al.* ABTS-Modified Multi-walled Carbon Nanotubes as an Effective

Mediating System for Bioelectro-catalytic Reduction of Oxygen[J]. *Anal Chem*, 2008, **80**(19):7643-7648.

[23] Farneth W E, D'Amore M B. Encapsulated Laccase Electrodes for Fuel Cell Cathodes[J]. *J Electroanal Chem*, 2005, **581**: 197-205.

Kinetic Analysis of Oxygen Reduction Reaction Catalyzed by Multi-copper Oxidase in Presence of Electron Relay

ZHAO Shuxian, ZENG Han *

(*Chemistry and Chemical Engineering Academy, Xinjiang Normal University, Urumuqi 830054, China*)

Abstract Rates of each procedure composed of catalytic oxygen reduction reaction cycle with free multi-copper oxidase as electro-catalyst in the presence of diffusional electron relay were determined by the spectroscopy, Clark-type oxygen electrode and cyclic voltammetry combined with rotating disc electrode technique, respectively. These rates were then compared to verify the rate-determining step in the catalytic reaction. Results from experiments indicate that the fastest step is the internal electron transfer in enzyme molecule ($10^3/\text{s}$) followed by the enzymatic catalysis of oxygen transformation into water ($91/\text{s}$). The third procedure as for the rate was attributed to the electrochemical reduction reaction of the oxidation product of enzymatic catalytic reaction for electron mediator ($0.19/\text{s}$ or $7.8 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$) at the surface of base electrode. Mass transfer coefficients of the substrate, oxygen molecule, and oxidized/reduced electron mediator, 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) diammonium (ABTS), were evaluated to be $1.7 \times 10^{-3} \text{ cm/s}$, $4.4 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$ and $6.3 \times 10^{-4} \text{ cm/s}$, respectively. Accordingly, chemical reaction rate in the enzyme catalytic electron mediator oxidation was determined to be $0.047/\text{s}$. So it is apparent that the key procedure of the whole enzymatic catalysis cycle should be ascribed to the enzyme catalytic oxidation of electron mediator and the mass transfer of electron relay. The influence of parameters (including sorts of enzyme, specific activity of enzyme, enzyme concentration, types of mediators and their contents, temperature and pH value of electrolyte, etc.) on the enzyme electro-catalyzed oxygen reduction performance was investigated according to systematic modulation of those parameters. The results confirmed the above conclusions from the kinetic analysis.

Keywords multi-copper oxidase, electron relay, kinetics of oxygen reduction reaction, rate determining step