

# 介孔碳掺杂氮材料-壳聚糖固定漆酶电极的直接电化学行为及化学传感性能

库里松·哈衣尔别克 曾 涵\*

(新疆师范大学化学化工学院 乌鲁木齐 830054)

**摘 要** 以壳聚糖和介孔碳氮材料共混所得复合物为固定漆酶的载体,将固酶复合物滴涂在裸玻碳电极表面并干燥后,得到固定漆酶基阴极。考察了此电极在不含底物的电解质溶液中的直接电化学行为,同时还研究了其对氧气还原反应的催化性能和电极的长期使用性、重现性和力学稳定性。在此基础上还考察了此电极作为氧气电化学传感器的性能。研究表明,介孔碳氮材料-壳聚糖固定漆酶修饰电极能在无任何电子中介体条件下,实现漆酶活性中心  $T_1$  与电极之间的直接电子转移,而且能在较高的电位下实现氧气的电还原。此电极催化氧还原的起始电位约为 860 mV,氧还原的半波电流密度约为  $78 \times 10^{-6} \text{ A/cm}^2$ 。这种漆酶基电极的重现性良好且具有优异的长期稳定性,但力学稳定性较差。此电极对氧的传感性能良好:检测限低达  $0.4 \mu\text{mol/L}$ ,灵敏度高达  $(67.9 \times 10^{-6} \text{ A} \cdot \text{L}/\text{mmol})$ ,具有良好的对氧亲和力 ( $K_M = 764.0 \mu\text{mol/L}$ )。

**关键词** 漆酶,直接电子迁移,氧还原反应,电化学传感器

中图分类号:O629.8

文献标识码:A

文章编号:1000-0518(2013)10-1194-08

DOI:10.3724/SP.J.1095.2013.20554

漆酶是当前公认具有较高催化氧还原活力的一种多铜氧化酶<sup>[1-4]</sup>,但漆酶的活性中心为不导电的多肽链包裹,难以实现酶与电极之间的直接电子转移,所以最常见的实现酶-电极间有效电子迁移的方法是引入电子中介体中介酶-电极间的电子转移<sup>[5-8]</sup>。但是引入外加电子中介体会降低电池能量输出,而且这种酶基电池的长期使用的稳定性也欠佳<sup>[9-10]</sup>。近年来,以具有良好导电能力且表面修饰特定官能团的纳米材料作为固定蛋白质的载体,已成为制备酶基燃料电池电极和酶基电化学传感器的首选<sup>[11-13]</sup>。所修饰的官能团中,有的扮演分子导线的角色以实现酶与导电纳米材料间的直接电子转移<sup>[11-12]</sup>,有的在酶电极中起着维持游离酶的空间结构不改变以维持酶的催化活性的作用<sup>[13]</sup>。

碳纳米管、介孔碳或介孔碳氮材料(N掺杂的介孔碳材料,孔径范围 2~50 nm)由于具有相对较高的导电能力和比表面积、规则的孔径、可调节的多孔结构以及较好的生物相容性等特点,一直是固定氧化还原酶的首选载体之一<sup>[14-18]</sup>。制备的介孔碳或碳氮材料表面上存在很多亲水基团(如羟基、羧基、氨基等官能团)以及一些突出于表面的孤立芳香环。这些化学基团有可能深入酶活性中心附近,从而实现其与酶的活性中心的电子导通,因此具有分子导线的功能并能有效固定漆酶<sup>[11-12]</sup>。另一方面,介孔碳或碳氮材料表面的亲水基团使之更易于在水溶液中分散,且分散后的介孔碳或碳氮材料不容易再团聚,因此很适合作为具有高比表面积的三维固酶载体<sup>[19]</sup>。这两方面的优点使其与碳纳米管相比,更适合作为酶电极的载体。但是介孔碳氮材料作为修饰电极的材料有一个很大的缺点,就是成膜性差进而影响电极的力学稳定性。

壳聚糖是甲壳素脱乙酰氨基的产物,具有粘度高、成膜性和延展性好、机械强度较高、且对生物分子具有良好相容性等特点。研究表明,壳聚糖作为载体担载的漆酶能很好地保持游离漆酶的活力和天然构象<sup>[14]</sup>,但是壳聚糖本身并不导电,因此需要借助其它导电材料制备复合物才可获得具有良好性能的固酶电极。如果将介孔碳材料与壳聚糖混合得到复合物,结合二者的优势,既可以实现酶-电极间的有效导通又能使固酶电极具有良好稳定性。虽然文献<sup>[11-12]</sup>对于使用碳材料或其它介孔材料(例如介孔硅

材料)作为固酶载体,制备漆酶基电极的电化学行为以及直接/间接电子中介情况下的催化氧化还原性能做了大量的研究,但是对于酶-电极间直接电子迁移的机制以及催化氧还原的反应动力学研究还不够深入,特别是碳材料以及介孔材料本身的结构、组成以及形貌、孔径的分布,尺寸与固酶电极性能之间关系尚缺乏系统和深入地研究,对这些电极的长期使用性和稳定性也缺乏系统的研究。文献研究结果<sup>[11-12]</sup>表明,多数没有经过任何修饰的碳材料与其它成膜材料复合很难实现酶-电极之间的直接电子迁移,但是前文研究结果<sup>[11-12]</sup>表明,如果碳材料含有具有“分子导线”作用的分子基团(例如芳香环或是氮、硫、氧的杂环),就有可能实现酶-电极间的直接电子迁移,使用分子中含有类似吡啶环结构的介孔碳掺杂氮材料<sup>[19]</sup>,不仅具有实现固定漆酶-电极之间直接电子迁移的可能性,而且便于深入了解酶-电极间电子迁移机制。基于上述思路,本文利用壳聚糖与介孔碳氮材料机械混合的方法,制备复合材料作为固定漆酶的载体,并采用滴涂法制备固酶基电极,考察了这种漆酶修饰电极的直接电化学行为及催化氧化还原性能,在此基础上考察了这种电极的重现性、长期稳定性、力学稳定性以及对氧的化学传感性能。

## 1 实验部分

### 1.1 试剂和仪器

云芝漆酶(Lac, 相对分子质量 68000, 美国 Sigma), 未进一步纯化; 对 2,2'-连氮-双-(3-乙基苯并噻唑啉-6-磺酸)二铵盐(ABTS)的比活力为 0.66 U/mg; SBA-15 介孔分子筛和 ITO 玻璃片(购自南京先锋纳米材料科技有限公司); 乙二胺,  $\text{CCl}_4$ , HF, 乙醇, 壳聚糖(脱乙酰度  $\geq 90\%$ , 相对分子质量为 250000, 简称为 CTS), 氢氧化钠, 异丙醇, 氯乙酸, 冰乙酸, 硫酸铵, 甲醇, 柠檬酸三钠,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  等, 以上试剂均为分析纯, 以及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。实验中使用的缓冲溶液为 0.2 mol/L 磷酸二氢钾缓冲液(PBS), 溶液 pH 值通过改变磷酸二氢钾和柠檬酸三钠的浓度比例来调控; 所有溶液均用 Milli-Q 超纯水配制。实验中用到的  $\text{N}_2$  气和  $\text{O}_2$  气(5N)购自南京特气。

2K15 型高速离心机(德国 Sigma 公司); 扫描电子显微镜照片由 JSM-6700F 型场发射扫描电子显微镜(日本电子公司 JEO, 加速电压: 0.5 ~ 30 kV)拍摄, 样品制备系介孔碳氮材料的分散液(pH = 6.0 的 PBS 缓冲液为分散剂)滴涂在铜网基底上, 真空干燥制得; 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,  $\omega$  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。工作电极使用前先以 3500# 砂纸, 1.0 和 0.5  $\mu\text{m}$  氧化铝粉浆抛光, 再用丙酮和 3 次重蒸水超声清洗各 2 次, 每次 2 min。文中如无特殊说明, 所有的电极电位均相对于 NHE(标准氢参比电极)而言。

### 1.2 介孔碳氮材料的制备

介孔碳氮材料参考文献[19]方法制备: 将 1.35 g 乙二胺(EDA)和 3 g 四氯化碳(CTC)充分混合后, 向其中加入 1.6 g 煅烧过的 SBA-15 介孔分子筛并磁力搅拌 10 min。然后在 90  $^\circ\text{C}$  磁力搅拌回流 6 h, 发生较为复杂的缩合反应生成高分子模板碳氮化物, 经聚四氟乙烯透析膜(孔径 0.2  $\mu\text{m}$ )过滤获得的深棕色混合物置于真空干燥箱中, 于 0.08 MPa 表压、65  $^\circ\text{C}$  条件下干燥 12 h, 将干燥过的固体在研钵内碾为细粉。将其置于高温反应炉中于  $\text{N}_2$  气( $\text{N}_2$  流速: 50 mL/min)气氛中以 3  $^\circ\text{C}/\text{min}$  升温速率加热至 600  $^\circ\text{C}$ , 并在 600  $^\circ\text{C}$  下加热处理 5 h 直至模板碳化为止。以质量分数为 5% 的氢氟酸溶液溶解硅骨架之后回收得到介孔碳的氮化物, 以无水乙醇冲洗 3 次后放入干燥箱中, 于 100  $^\circ\text{C}$  干燥处理 10 h 后, 得到介孔碳氮材料的成品。

### 1.3 壳聚糖-介孔碳氮材料复合物担载漆酶修饰玻碳电极的制备

1) 称取 1.0 g 壳聚糖溶解在 100 mL 质量分数为 1.5% 醋酸溶液中, 随后移取 3 mL 此溶液向其中加入介孔碳氮粉末 10 mg, 超声共混 30 min 后得到分散均匀的黑色悬浮液; 2) 向其中加入 6.5 mg 漆酶粉末并磁力搅拌 1 h 得到固酶复合物, 随后放入冰箱中于 4  $^\circ\text{C}$  下储存过夜; 3) 将固酶复合物取出, 在 8000 r/min 转速下离心 15 min, 倒去上清液后用少量 PBS 清洗固酶复合物 2 次, 按同样条件离心沉降, 移除上清液后保留离心管底部的粘稠剩余物(即稳定固定漆酶的复合物); 4) 最后移取 20  $\mu\text{L}$  固定漆酶

的介孔碳氮-壳聚糖复合物(Lac/CTS-MPCN)滴涂到玻碳圆盘电极上,于室温下干燥,得到壳聚糖-介孔碳氮复合物固载的漆酶电极(Lac/CTS-MPCN/GC)。

#### 1.4 紫外可见光谱分析

将漆酶溶解于PBS中得到 $50 \times 10^{-3}$  g/mL的溶液(游离漆酶)测定游离漆酶的紫外可见吸收光谱,将漆酶溶解在壳聚糖质量分数为3%乙酸溶液(乙酸的质量分数为1.5%)中后,得到漆酶浓度为 $50 \times 10^{-3}$  g/mL混合液,移取此混合液200  $\mu$ L均匀地涂覆在ITO玻璃片上使其在空气中室温干燥,插入比色槽中测定漆酶-壳聚糖复合物的紫外可见吸收光谱。介孔碳氮材料-壳聚糖复合物固定漆酶则是按1.3节方法制备,固定漆酶的壳聚糖-介孔碳氮材料复合物,随后移取这种复合物200  $\mu$ L均匀地涂覆在ITO玻璃片上使其在空气中室温干燥,插入比色槽中测定紫外可见吸收光谱。

#### 1.5 Lac/CTS-MPCN/GC的直接电化学行为及催化氧化还原性能

所有电化学测试在常规三电极电解池中进行,以循环伏安法结合旋转圆盘电极技术研究了Lac/CTS-MPCN/GC的直接电化学行为及催化氧化还原性能。以Lac/CTS-MPCN/GC作为工作电极,CTS-MPCN/GC为对比电极,不含底物的PBS缓冲液(pH=4.4)作为电解质溶液,实验前先向溶液中鼓泡通入 $N_2$ 气除 $O_2$ 至少30 min。在氧化还原实验中,实验前先向PBS缓冲液中不断鼓泡通入高纯 $O_2$ 气至少15 min,使溶液为氧气饱和,实验中还不断向电解液上方通入 $O_2$ 使溶液上方维持 $O_2$ 气气氛,所有测定均在25.0  $^{\circ}C$ 进行。文中给出的电流密度以电极的活性表面积进行归一化处理。活性表面积按照文献<sup>[20]</sup>给出的方法标定。实验测定Lac/CTS-MPCN/GC的实际活性表面积为0.35  $cm^2$ 。

#### 1.6 壳聚糖-介孔碳氮材料复合物固定漆酶修饰电极对氧的传感性能

采用计时电流法(CA)评估Lac/CTS-MPCN/GC对氧气的传感性能。计时电流曲线系固酶电极在含有一系列不同 $O_2$ 浓度的PBS溶液中(pH=4.4)于恒定电压下记录响应还原电流-时间关系曲线而得到,这一系列不同 $O_2$ 浓度的PBS溶液是向为 $N_2$ 气饱和的PBS溶液中加入不同体积的空气饱和PBS溶液而制得(溶液中氧气浓度约为 $260 \times 10^{-6}$  mol/L),氧还原电压参考前文<sup>[21]</sup>方法,以出现极限扩散电流的电位作为工作电位,设定为425 mV。

## 2 结果与讨论

#### 2.1 介孔碳氮材料的形貌表征和紫外-可见分光光度法实验结果分析

图1给出了所制备的介孔碳氮材料的扫描电子显微镜照片。从图1可以看出,所制备的介孔碳氮材料表面比较粗糙且具有无序的多孔结构,在每一个片状介孔碳氮材料表面上有许多细小的微孔,孔径均一且均小于10 nm。形貌类似于文献<sup>[17]</sup>中提到的 $Co_3O_4$ 纳米片。根据文献<sup>[19]</sup>给出的透射电子显微镜照片可知,介孔碳氮材料的规则碳基骨架结构一方面提供了良好的电子通道,同时各有序结构之间近直径10  $\mu m$ 的孔道也给小分子底物和产物提供了良好的传质通道。图2分别给出了游离漆酶、漆酶-壳聚糖复合物以及Lac/CTS-MPCN的紫外可见吸收光谱。从图2可以看出,游离漆酶的 $T_1$ 氧化态特征吸收峰位于605 nm处,该峰对应于漆酶活性位 $T_1$ 中心铜离子(氧化态)的 $d-d$ 配位跃迁,与文献报道的结果一致<sup>[22]</sup>。在杂环配位体存在时中心离子的低能态 $d$ 电子吸收光能后可跃迁至高能态 $d$ 轨道,这种 $d-d$ 配位跃迁通常发生在可见光区<sup>[22]</sup>。漆酶-壳聚糖复合物薄膜以及Lac/CTS-MPCN在同样的位置也可观察到较强的吸收峰,表明这类复合物固定的漆酶较好地保持了游离漆酶 $T_1$ 活性位氧化态中心离子的原有配位构型及其活性中心的微环境。另外,对比实验表明与多壁碳纳米管直接接触6 h的漆酶则观察不到此吸收峰,而且不能催化ABTS或2,6-二甲氧基苯酚(DMP)的氧化,即失去了活力;而本

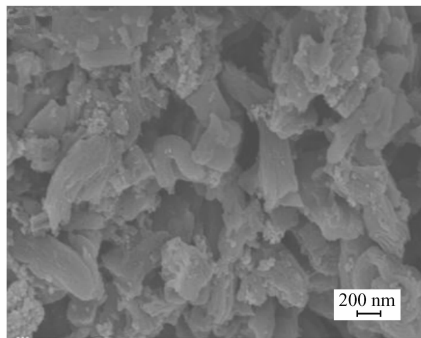


图1 介孔碳氮材料的扫描电子显微镜照片  
Fig. 1 SEM of meso-porous carbon doped with nitrogen material

文制备的 Lac/CTS-MPCN 于 4 ℃ 下静置过夜后测定得到的 UV-Vis 谱图仍然能呈现出与游离漆酶相同的吸收峰,而且能有效催化 ABTS 或 DMP 的氧化。此结果说明含 N 杂环的介孔碳氮材料相对于碳纳米管而言更利于维持所固定的漆酶活性位中心离子的配位构型和价态。

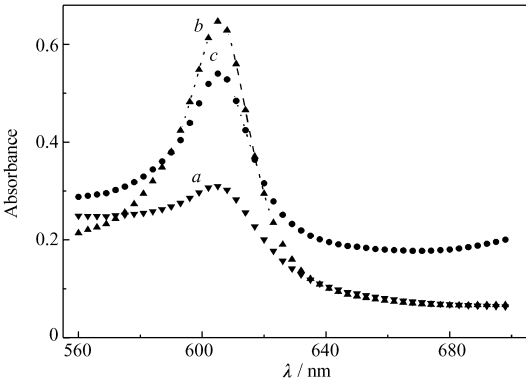


图 2 Lac-CTS 薄膜 (a)、游离漆酶在 PBS (pH = 6.0) 溶液 (b) 和 Lac/CTS-MPCN 修饰膜 (c) 的 UV-Vis 光谱  
Fig. 2 UV-Vis spectra of Lac-CTS thin film (a), solution of free laccase in pH = 6.0 PBS (b) and dried thin film of Lac/CTS-MPCN (c)

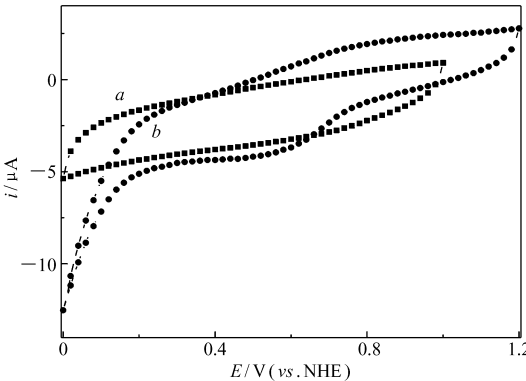


图 3 CTS-MPCN/GC (a) 和 Lac/CTS-MPCN/GC (b) 在无氧 PBS (pH = 4.4) 中的 CV 曲线  
Fig. 3 CV plots of CTS-MPCN/GC (a) and Lac/CTS-MPCN/GC (b) in deaerated PBS (pH = 4.4)  
scan rate: 100 mV/s, room temperature

2.2 Lac/CTS-MPCN/GC 电极的直接电化学行为及催化氧化还原性能

图 3 为 lac/CTS-MPCN/GC 电极和 CTS-MPCN/GC 电极分别在不含任何底物的无氧 PBS 缓冲溶液 (pH = 4.4) 中以 100 mV/s 进行扫描得到的循环伏安曲线。从图 3 可以看出, Lac/CTS-MPCN/GC 在无氧的 PBS 缓冲液中进行循环伏安测试时,其  $i$ - $E$  曲线上出现了一对峰形较钝的微弱氧化还原信号,其阳极氧化与阴极还原反应的峰电位分别出现在 0.75 和 0.5 V 左右。与之相对, CTS-MPCN/GC 在所扫描的电位区间内没有任何可以与背景电流区分的氧化还原峰,表明这种复合物在此扫描电位区间内没有发生氧化还原反应,因此是非电化学活性的,也就不会干扰担载漆酶后的修饰电极上可能出现氧化还原峰的判定和归属,因此推测位于 0.75 及 0.5 V 左右的氧化峰及还原峰很可能来自复合物修饰玻碳电极上固定的云芝漆酶的活性中心的氧化还原过程。一些研究表明,在碳基电极上发生的漆酶-电极间电荷转移过程大多以漆酶活性中心  $T_1$  作为电子给体或受体,因为相对于  $T_2$ 、 $T_3$  活性位,  $T_1$  位更接近边缘蛋白质骨架的边缘<sup>[22]</sup>。另外,与  $T_1$ 、 $T_2$  和  $T_3$  活性位的式电位<sup>[3]</sup> (分别为 780、400 和 780 mV) 相比,此氧化还原信号的式电位 (约为 625 mV) 与漆酶活性中心  $T_1$  的式电位 (约 780 mV) 较为接近,因此这一对氧化还原信号很可能源自于漆酶活性中心  $T_1$  位的氧化还原反应。此氧化还原信号的中值电位 (约为 625 mV) 与漆酶活性中心  $T_1$  的式电位 (约为 780 mV) 相差达 155 mV,这很可能是由于漆酶分子活性中心被包埋在不导电的蛋白质骨架内部,电荷由活性中心隧穿到电极需要克服较高的势垒,因此观察到的表征酶活性中心自身氧化、还原过程的峰电流相对较小,而且正、逆向电流峰位置相差很大。应该指出的是,目前所见文献报道中,很少有在不含任何底物的缓冲液中,漆酶修饰电极出现表征固定漆酶活性中心发生氧化还原反应的电信号的归属和分析。大部分研究结果均与文献<sup>[11]</sup>报道的蒽基重氮盐吸附漆酶修饰玻碳电极或多壁碳纳米管担载的漆酶修饰电极<sup>[15]</sup>测试结果类似,在不含任何底物的缓冲液中记录的循环伏安曲线要么没有明显的表征酶活性中心的电化学信号,要么仅能获得一对很难与背景电流区分的微弱氧化还原峰。图 4 为 CTS-MPCN/GC 在氧气饱和的 PBS 缓冲液中扫描所得 CV 曲线以及 Lac/CTS-MPCN/GC 分别在无氧和氧气饱和的 PBS 缓冲液中扫描得到的 CV 曲线。从图 4 可看出,固酶电极上氧还原起始电位约为 0.86 V,随着电位继续负移阴极氧还原电流迅速升高,并于 0.45 V 达到峰电流。继续负向扫描时阴极电流略微降低,到 0.2 V 左右到达最低点,随后再负扫电流又略微增加。从 0.86 ~ 0 V 的电位区间,负向扫描过程中的阴极电流总是远大于正向扫描过程中于相应电位下的阳极电流值。

此外从图4中还可看出,在未固定漆酶的CTS-MPCN/GC电极上氧还原电位起始于0.21 V。与之相比,固酶电极的氧还原起始电位正移了约0.65 V,说明漆酶有效地催化了氧气的还原过程。与前述文献<sup>[11-16]</sup>相比,制备的漆酶修饰电极催化氧还原的起始电势(约0.86 V),与目前文献<sup>[11]</sup>报道的具有较高催化氧还原性能的碳基漆酶电极相当,而比其它大部分固定漆酶电极的催化氧还原起始电位高100~200 mV。说明壳聚糖-介孔碳氮材料能很好地实现漆酶与电极之间的有效电子接触。根据氧还原起始电位非常接近漆酶活性中心 $T_1$ 式电位(780 mV vs NHE)这一事实,可进一步确认固定在壳聚糖-介孔碳复合物修饰玻碳电极上的漆酶是以 $T_1$ 活性位作为电子的受体,直接从与电极基底连通的介孔碳氮材料导体获得电子,并通过分子内的电子传递桥链将电子传递给结合在漆酶内部三核铜簇上的氧气分子,实现转化为水分子的反应,因此其催化氧还原的超电势相对较低。另外,与漆酶修饰电极在无氧条件下记录的CV对比,可发现在氧饱和的溶液中正向扫描时几乎看不到位于0.75 V的来自漆酶活性中心阳极氧化的电流信号,这主要是因为该阳极

氧化电流叠加在一个更大的阴极氧还原电流上,因此,净电流显示为氧的阴极还原。从图4还可以看出,负向扫描时阴极氧还原的半波电流密度为 $78 \times 10^{-6} \text{ A/cm}^2$ ,这个数值与文献<sup>[11-16]</sup>对比处于中等水平,但是比文献<sup>[23]</sup>报道的最好结果即吸附漆酶的碳气凝胶电极上的数据小20倍。

### 2.3 Lac/CTS-MPCN/GC电极的重现性、长期稳定性以及力学稳定性

对于酶燃料电池的固定氧化还原酶修饰电极或基于酶电极的电化学传感器而言,电极的重现性和稳定性也是很重要的性能参数。图5为3个在不同时间按照同样工序制备的Lac/CTS-MPCN/GC在氧气饱和PBS溶液中以100 mV/s扫描得到的CV曲线。从图5可以看出,3个不同时间制备得到的固酶修饰电极在氧气饱和PBS中进行催化氧还原实验得到的CV基本重合,这表明Lac/CTS-MPCN/GC具有良好的重现性。图6为新制备的Lac/CTS-MPCN/GC以及在4℃冰箱中低温保存2、5、7以及14 d之后的这种固酶修饰电极分别在氧气饱和PBS中以100 mV/s扫速得到的CV曲线,电极低温条件下储存不同时间后测得的CV曲线基本重合,催化氧还原的起始电位不变,且催化电流密度也基本不变,即在4℃条件下储存了14 d后电极的氧还原电流仅下降了约5.4%。上述结果说明,Lac/CTS-MPCN/GC催化氧还原性能的重现性和长期稳定性较好。

此外,为研究固酶电极的力学稳定性,还进一步采用旋转圆盘电极以循环伏安法考察了固定漆酶电极在氧气饱和缓冲液中的电化学行为。图7为新制备的Lac/CTS-MPCN/GC,在氧气饱和PBS中于不同电极转速下得到的CV曲线。由图7可看出,当电极转速提高时氧还原电流明显降低。将电极从电解池取出后可观察到电极表面修饰膜的破损;向与破损电极接触的电解液中滴入100 mL  $0.5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  ABTS的PBS缓冲液并静置1 min后,溶液显现浅绿色,这个事实表明部分电极表面固载的漆酶分子已从电极表面壳聚糖-介孔碳氮材料复合物修饰膜泄露到溶液中,表明电极表面的复合物修饰膜对液流造成的剪切力的耐受性较差,这与文献<sup>[5]</sup>报道的氧化还原聚合物水凝胶在高转速下的催化氧还原行为相类似。壳聚糖和介孔碳氮材料复合物固定漆酶修饰膜的机械强度差的原因可能有:i)壳聚糖和介孔碳氮材料复合物是通过简单的机械混合制备的,2种组分之间没有化学键连接也没有形成致密的网络结构;ii)壳聚糖侧链上氨基和羟基等基团仅依靠氢键等弱相互作用不足以稳定地固定漆酶分子,在较高

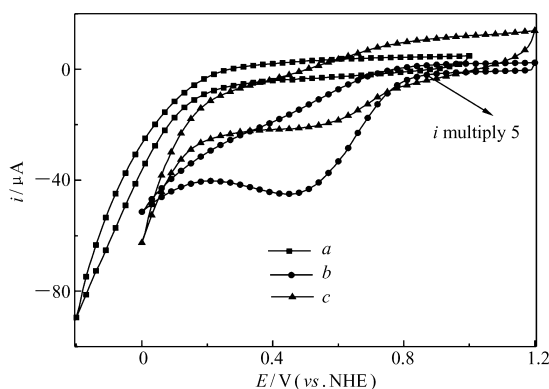


图4 CTS-MPCN/GC(a)和Lac/CTS-MPCN/GC(b)电极在氧气饱和的PBS(pH=4.4)中和Lac/CTS-MPCN/GC电极在无氧的PBS(pH=4.4)中的循环伏安曲线

Fig. 4 Cyclic voltammograms of oxygen saturated PBS (pH=4.4) solution at CTS-MPCN/GC(a) and Lac/CTS-MPCN/GC(b) electrodes as well as PBS (pH=4.4) solution without oxygen at Lac/CTS-MPCN/GC electrode(c)

Scan rate: 100 mV/s, electrode is in static state, room temperature

的剪切力作用下漆酶就会从电极表面的修饰薄膜中脱落。

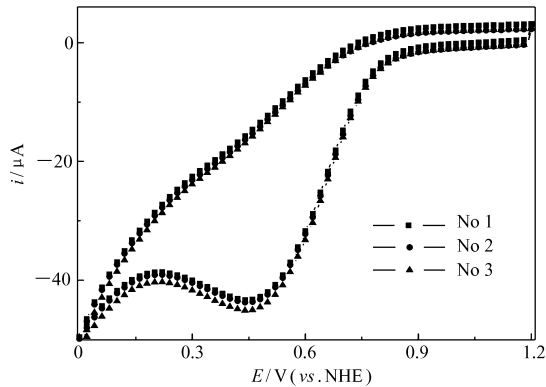


图 5 循环伏安法表征 Lac/CTS-MPCN/GC 电极催化氧还原性能的重现性

Fig. 5 Cyclic voltammograms of the reproducibility in catalytic function on ORR of Lac/CTS-MPCN/GC  
Electrode was stationary, scan rate: 100 mV/s, room temperature, oxygen saturated PBS (pH = 4.4)

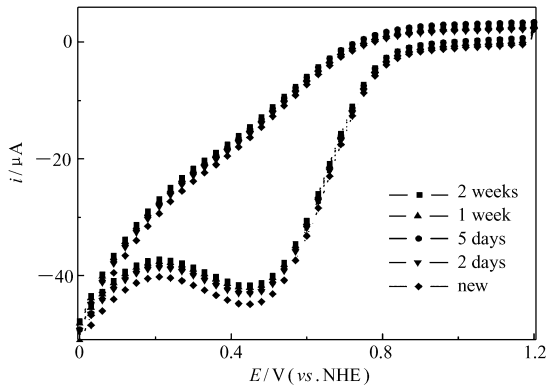


图 6 循环伏安法表征 Lac/CTS-MPCN/GC 电极催化氧还原性能的长期稳定性

Fig. 6 Cyclic voltammograms of long term stability in catalytic function on ORR of Lac/CTS-MPCN/GC  
Electrode was stationary, scan rate: 100 mV/s, room temperature, oxygen saturated PBS (pH = 4.4)

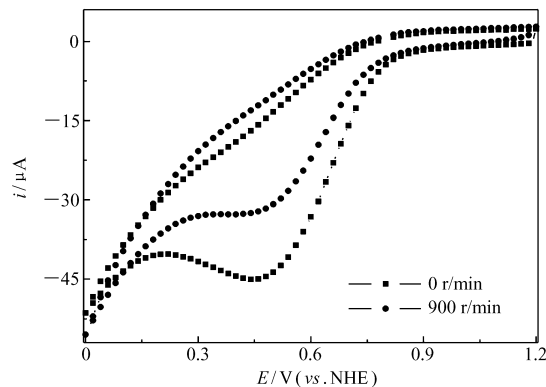


图 7 Lac/CTS-MPCN/GC 电极催化氧还原性能的力学稳定性

Fig. 7 Cyclic voltammograms of mechanic stability in catalytic function on ORR of Lac/CTS-MPCN/GC  
Electrolyte: oxygen saturated PBS (pH = 4.4), scan rate: 100 mV/s, room temperature

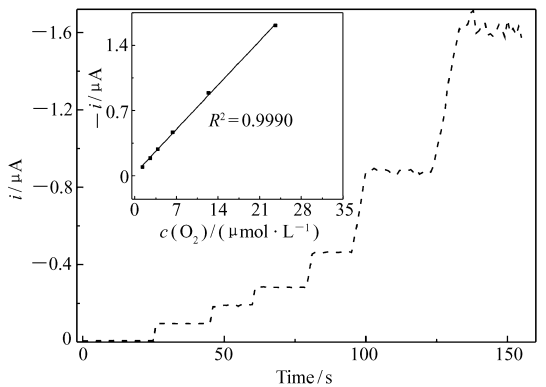


图 8 计时电流法表征 Lac/CTS-MPCN/GC 电极对氧的传感性能,插图为对应的催化电流-氧气浓度关系曲线

Fig. 8 Performance of Lac/CTS-MPCN/GC as electrochemical sensor for oxygen molecule  
Electrode is stationary, applied potential: 425 mV, room temperature, inset is calibration curve of the electrocatalytic current on the concentration of  $O_2$

2.4 Lac/CTS-MPCN/GC 电极的氧传感性能

本文以计时电流法评估了诱陷漆酶的 Lac/CTS-MPCN/GC 作为氧传感器的性能。图 8 为 Lac/CTS-MPCN/GC 电极分别在无氧 PBS 缓冲液中,连续注入不同体积空气饱和溶液时产生响应电流的计时电流曲线,插图则是根据固酶修饰电极对氧气响应的时间-电流曲线推得的底物氧气浓度与对应的催化电流之间存在的线性关系曲线。从图 8 可看出,对于 Lac/CTS-MPCN/GC 电极,在氧气浓度  $1.3 \times 10^{-6} \sim 23.6 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$  的范围内,催化电流与氧气浓度均能保持良好的线性关系。氧气浓度检测限为  $(S/N=3)0.4 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ ,其检测下限比文献<sup>[14]</sup>报道的多壁碳纳米管-壳聚糖固定漆酶氧传感器的氧气浓度检测限  $7.8 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$  低得多,而且无需加入中介体。由 Lineweaver-Burk 曲线(浓度倒数-催化电流倒数)拟合所得的截距和斜率,根据前文<sup>[21]</sup>所给公式可以推算固定漆酶修饰玻碳电极对底物氧气

的亲合力(以米氏常数  $K_M$  表征)为:  $K_M = 764.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ , 比文献<sup>[14]</sup>报道的纳米管-壳聚糖固定漆酶氧传感器对氧分子的  $K_M = 3.22 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$  低得多, 这种固酶电极对氧分子的灵敏度分别可达  $67.9 \times 10^{-6} \text{ A} \cdot \text{L}/\text{mmol}$ , 较文献<sup>[14]</sup>报道的纳米管-壳聚糖固定漆酶氧传感器的灵敏度  $27.3 \times 10^{-6} \text{ A} \cdot \text{L}/\text{mmol}$  要高得多, 饱和稳态催化电流密度可达  $150.9 \times 10^{-6} \text{ A}/\text{cm}^2$ 。

### 3 结 论

以壳聚糖和介孔碳氮材料机械共混所得的复合物作为固定漆酶的载体, 利用物理吸附作用将游离漆酶诱陷在复合物中, 在此基础上采用滴涂法制备了固定漆酶复合物修饰的玻碳电极。这种复合物固定漆酶修饰玻碳电极可以在无电子中介情况下, 实现漆酶活性中心  $T_1$  与电极之间的直接电子迁移, 而且对氧还原具有良好的催化性能: 氧还原起始电位可达  $860 \text{ mV vs (NHE)}$ , 催化半波电流密度可达  $78 \times 10^{-6} \text{ A}/\text{cm}^2$ ; 这种电极具有良好的催化性能重现性和长期稳定性, 但力学稳定性欠佳, 有待改进。计时电流法实验结果表明, 这种固酶电极对氧的检测限为  $0.4 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ , 对氧的亲合力以  $K_M$  表征为  $764.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$ , 对底物的灵敏度为  $67.9 \times 10^{-6} \text{ A} \cdot \text{L}/\text{mmol}$ 。如果能够改善电极的力学稳定性和传质性能, 此种电极的实用价值将会进一步提升。

### 参 考 文 献

- [1] Ivanov I, Vidakovic-Koch T, Sundmacher K. Recent Advances in Enzymatic Fuel Cells: Experiments and Modelling[J]. *Energies*, 2010, **3**: 803-846.
- [2] Cracknell J A, Vincent K A, Armstrong F A. Enzymes as Working or Inspirational Electrocatalysts for Fuel Cells and Electrolysis[J]. *Chem Rev*, 2008, **108**: 2439-2461.
- [3] Shleev S, Christenson A, Serezhenkov V, et al. Electrochemical Redox Transformations of  $T_1$  and  $T_2$  Copper Sites in Native *Trametes Hirsuta* Laccase at Gold Electrode[J]. *Biochem J*, 2005, **385**: 745-754.
- [4] Willner I, Yan Y M, Willner B, et al. Integrated Enzyme-Based Biofuel Cells[J]. *Fuel Cells*, 2009, (1): 7-24.
- [5] 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.
- [6] Mano N, Mao F, Heller A. A Miniature Biofuel Cell Operating in a Physiological Buffer[J]. *J Am Chem Soc*, 2002, **124**: 12962-12963.
- [7] Osman M H, Shah A A, Walsh F C. Recent Progress and Continuing Challenges in Bio-fuel Cells: Part I. Enzymatic Cells[J]. *Biosens Bioelectron*, 2011, **26**: 3087-3102.
- [8] Gallaway J W, Barton S A C. Kinetics of Redox Polymer-Mediated Enzyme Electrodes[J]. *J Am Chem Soc*, 2008, **130**: 8527-8536.
- [9] 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.
- [10] 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.
- [11] Blanford C F, Heath R S, Armstrong F A. A Stable Electrode for High-potential, Electrocatalytic  $O_2$  Reduction Based on Rational Attachment of a Blue Copper Oxidase to a Graphite Surface[J]. *Chem Commun*, 2007: 1710-1712.
- [12] Wen D, Xu X L, Dong S J. A Single-Walled Carbon Nanohorn-Based Miniature Glucose/Air Biofuel Cell for Harvesting Energy from Soft Drinks[J]. *Energy Environ Sci*, 2011, **4**: 1358-1363.
- [13] 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.
- [14] Liu Y, Qu X H, Guo H W, et al. Facile Preparation of Amperometric Laccase Biosensor with Multifunction Based on the Matrix of Carbon Nanotubes-Chitosan Composite[J]. *Biosens Bioelectron*, 2006, **21**: 2195-2201.
- [15] Zheng W, Zhao H Y, Zhou H M, et al. Electrochemistry of Bilirubin Oxidase at Carbon Nanotubes[J]. *J Solid State Electrochem*, 2010, **14**: 249-254.
- [16] Pang L, Liu J, Hu D, et al. Immobilization of Laccase onto 1-Aminopyrene Functionalized Carbon Nanotubes and Their Electrocatalytic Activity for Oxygen Reduction[J]. *Electrochim Acta*, 2010, **55**: 6611-6616.
- [17] Lu X B, Zou G F, Li J H. Hemoglobin Entrapped within a Layered Spongy  $Co_3O_4$  Based Nanocomposite Featuring Direct Electron Transfer and Peroxidase Activity[J]. *J Mater Chem*, 2007, **17**(14): 1427-1432.

- [18] Zhu Y F, Kaskel S, Shi J L, *et al.* Immobilization of *Trametes versicolor* Laccase on Magnetically Separable Mesoporous Silica Spheres[J]. *Chem Mater*, 2007, **19**:6408-6413.
- [19] Vinu A. Two-Dimensional Hexagonally-Ordered Mesoporous Carbon Nitrides with Tunable Pore Diameter, Surface Area and Nitrogen Content[J]. *Adv Funct Mater*, 2008, **18**:816-827.
- [20] Zhao H Y, Zhou H M, Zhang J X, *et al.* Carbon Nanotube-Hydroxyapatite Nanocomposite: A Novel Platform for Glucose/O<sub>2</sub> Biofuel cell[J]. *Biosens Bioelectron*, 2009, **25**:463-468.
- [21] ZENG Han, GONG Lanxin. Function of Chemical Sensor Based on the Immobilization of Laccase on the Composite of Chitosan-*g*-*N*-carboxymethyl-2-sulfo-4,5-2*H* Imidazolinone and Multiwall Carbon Nanotubes[J]. *Chinese J Appl Chem*, 2012, **29**(4):462-469 (in Chinese).  
曾涵, 龚兰新. 壳聚糖-*g*-*N*-羧甲基-2-磺代-4,5-2*H* 咪唑啉酮-多壁碳纳米管复合物固定漆酶基化学传感器的性能[J]. *应用化学*, 2012, **29**(4):462-469.
- [22] Palmer A E, Randall D W, Xu F, *et al.* Spectroscopic Studies and Electronic Structure Description of the High Potential Type 1 Copper Site in Fungal Laccase: Insight into the Effect of the Axial Ligand[J]. *J Am Chem Soc*, 1999, **121**:7138-7149.
- [23] Tsujimura S, Kamitaka S, Kano K. Diffusion-Controlled Oxygen Reduction on Multi-Copper Oxidase-Adsorbed Carbon Aerogel Electrodes without Mediator[J]. *Fuel Cells*, 2007, **6**:463-469.

# Direct Electrochemical Behavior and Sensing Performance of Nitrogen-Doped Meso-Porous Carbon and Chitosan Composite Immobilized with Laccase Modified Electrode

KULISONG Hayierbiek, ZENG Han\*

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

**Abstract** This article adopted the composite made up of chitosan and meso-porous carbon doped with nitrogen material which was secured by mechanical mixing as carrier for laccase immobilization. Entrapped laccase based biocathode was prepared by complex with enzyme dripping and coating on the surface of bare glassy carbon electrode and drying process in air consecutively. The direct electrochemical behavior of this as-prepared electrode in the electrolyte without any substrate was investigated, furthermore its catalytic function for oxygen reduction reaction (ORR), its long-term usability, reproducibility and mechanical stability were systematically estimated. On the basis of previous results, performance of this laccase based electrode as oxygen electrochemical sensor was examined. Results from research indicate that the composite composed of meso-porous carbon doped with nitrogen and chitosan with entrapped enzyme modified electrode displays the direct electron transfer between T<sub>1</sub> active centre in laccase and the electrode in the absence of any extra electron relay and can catalyze oxygen electrochemical reduction (ORR) under higher potentials. The onset potential for ORR is ~860 mV and the mid-wave current density for ORR is  $78 \times 10^{-12}$  A/cm<sup>2</sup>. This laccase based electrode shows excellent reproducibility and desirable long-term stability, but its mechanical stability is inferior. This laccase base electrode was proved to be a suitable sensor for oxygen molecules with the detection limit low to 0.4 μmol/L, the high sensitivity of  $67.9 \times 10^{-6}$  A·L/mmol and the preferable affinity  $K_M = 764.0$  μmol/L for oxygen.

**Keywords** Laccase, direct electron transfer, oxygen reduction reaction, electrochemical sensor