

酪氨酸酶和漆酶的直接电化学研究

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, 130022, 吉林, 长春)

(2. 南京师范大学化学与环境科学学院, 210097, 江苏, 南京)

[摘要] 首次报道了吸附在活性炭表面的酪氨酸酶(Tyr)和漆酶(Lac)能进行准可逆的直接电化学反应,并保持对氧还原的电催化作用.本文所用的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,可用于研究氧化还原蛋白质和酶的直接电化学和用于制备生物燃料电池的催化剂.

[关键词] 酪氨酸酶, 漆酶, 直接电化学, 活性炭

[中图分类号] O646, **[文献标识码]** A, **[文章编号]** 1001-4616(2004)04-0052-03

漆酶^[1]和酪氨酸酶^[2]是两个代表性的、重要的含铜氧化酶,它们的氧化还原中心是铜离子.主要被用于催化氧化广泛存在于地下和地表水中的有毒有害污染物,如多酚或芳胺类化合物等.由于漆酶和酪氨酸酶在催化底物氧化的同时 O₂ 分子经一步 4 电子过程还原为 H₂O,因此它们也是制作生物燃料电池阴极的理想催化剂.

已报道过许多方法可将漆酶或酪氨酸酶固定到电极表面,如溶胶-凝胶法^[3]、共价键合^[4]及吸附法^[5]等,但都未能获得漆酶或酪氨酸酶的可逆或准可逆的直接电化学反应.仅 Yaropolov 等^[5]报道了酪氨酸酶与热解石墨电极间直接电子转移反应小的伏安峰.

本文首次成功地获得了吸附在活性炭表面并用 Nafion 膜固定的漆酶和酪氨酸酶的准可逆的直接电化学反应,表明活性炭粉和 Nafion 构筑的表面微环境有利于含铜氧化酶的直接电子转移.固定化的漆酶和酪氨酸酶没有发生变性和失活,对 O₂ 的电化学还原具有催化作用.

1 实验

1.1 电化学测试

漆酶(EC 1.10.3.2, 36 U/mg, 来源于 *Rhus vernicifera*, Sigma), 酪氨酸酶(EC 1.14.18.1, 3 400 U/mg, 来源于 mushroom, Sigma)和 Vulcan XC-72 活性炭(粒径约为 30 nm, 平均孔径约为 10 nm, 比表面积约为 254 m²/g, Cabot Co, USA)和 5%(质量分数)Nafion 溶液(EW 为 1 100, Aldrich Co, USA)都未经预处理直接使用,其他试剂均为分析纯.所有溶液均用三次蒸馏水配制.

电化学实验用 M273 Potentiostat/Galvanostat(美国 EG&G 公司)和常规的三电极体系电化学池进行.以 Vulcan XC-72 活性炭修饰的玻碳(C/GC)电极、Lac 和 Vulcan XC-72 活性炭修饰的玻碳(Lac-C/GC)电极或 Tyr 和 Vulcan XC-72 活性炭修饰的玻碳(Tyr-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.电解液为不同 pH 值的 0.1 mol/L 磷酸缓冲溶液(PBS).在进行电化学实验前,溶液中通入高纯氮气 30 min 以除去溶液中的氧.所有实验都在室温(25 ± 2 °C)下进行.

1.2 漆酶和酪氨酸酶在活性炭表面的固定

玻碳(GC, 直径为 4 mm)电极依次用 6# 砂纸、0.3 和 0.05 μm Al₂O₃ 抛光粉抛光至镜面后,分别在无水乙醇和二次蒸馏水中超声清洗各 1 min.将 4 mg 活性炭粉末超声分散于 5 mL 水中,约 30 min 后加入 4 mg Tyr,并在 4 °C 下搅拌数小时,然后离心分离,得到吸附有 Tyr 的炭粉(Tyr-C).室温真空干燥.将 2 mg Tyr-C 与 80 μL Nafion 溶液充分混合均匀,用微量进样器取 1 μL 混合液均匀地平铺在预处理过的 GC 电极表面,室温下待溶剂挥发后,即得到 Tyr-C/GC 电极.当电极不用时,可将其浸于 0.1 mol/L PBS(pH 7.0)中,保存于

收稿日期:2004-06-02.

基金项目:国家“211”工程重点学科建设和南京师范大学青年科学基金(2003XQ002)资助项目.

作者简介:孙冬梅,女,1969-,南京师范大学化学与环境科学学院工程师,中国科学院长春应用化学研究所博士生,主要从事生物电化学的学习与研究, E-mail: sundongmei@njnu.edu.cn

通讯联系人:陆天虹,1943-,南京师范大学化学与环境科学学院教授,主要从事电化学研究, E-mail: tianhonglu@263.net

4℃的冰箱中,用同样的方法可制得 Lac-C/GC 和 C/GC 电极。

酶在 C/GC 电极表面的吸附量 Γ 由下式计算:

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

其中 Q 是酶直接电化学反应的氧化峰或还原峰的积分电量, n 为每个酶分子的电子转移数, F 为 Faraday 常数, A 为 C/GC 电极的面积. A 是以 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ 为探针分子,根据 $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ 在 C/GC 电极上的伏安峰电流与扫速平方根的关系求得,在计算过程中, $\text{Ru}(\text{NH}_3)_6^{3+}$ 的扩散系数 D 采用 $2.3 \times 10^{-9} \text{ cm}^2/\text{s}^{61}$.

2 结果

2.1 Tyr 和 Lac 的直接电子转移

将 C/GC 电极在 0.1 mol/L PBS (pH = 7.0) 中进行循环伏安测量时,其伏安曲线上没有出现任何可观察到的氧化还原峰(图 1, 曲线 a) 表明在 C/GC 电极上没有电化学活性物质存在.而在同样条件下, Tyr-C/GC 电极的循环伏安曲线中出现了一对很好的氧化还原峰(图 1, 曲线 b) 与空白曲线相减(图 1, 曲线 a) 后,其氧化还原峰更加明显(图 1, 曲线 c). 以上结果说明在图 1, 曲线 b 或 c 中的一对氧化还原峰可归属于 Tyr 的氧化还原峰. 如将 Tyr 直接用 Nafion 溶液固定在 GC 电极表面,则在图 1 的扫描电位范围内没有出现类似曲线 b 的氧化还原峰,说明活性炭对 Tyr 的电化学反应具有很好的促进作用.

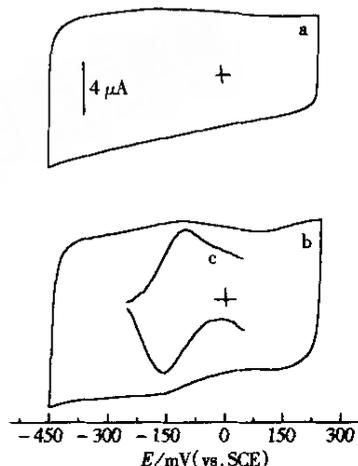
由图 1 曲线 c 可见,在扫速 (v) 为 20 mV/s 时, Tyr 的氧化还原峰电位分别为 $E_{\text{pa}} = -0.108 \text{ V}$, $E_{\text{pc}} = -0.169 \text{ V}$, 峰电位差 $\Delta E_p = 61 \text{ mV}$, 氧化还原峰电流基本相等,即 $i_{\text{pa}}/i_{\text{pc}} = 1$. 这表明吸附在活性炭上的 Tyr 能进行准可逆的电化学反应,其式电位 $E^{0'}$ = -0.138 V. 进一步的研究发现,当 v 增加时,氧化峰正移,还原峰负移,但 $E^{0'}$ 几乎不随扫速的增加而发生变化,在 10 ~ 150 mV/s 范围内, $E^{0'}$ 的平均值为 $(-0.138 \pm 0.001) \text{ V}$. 另外,峰电流 i_p 随 v 变化呈线性关系,可见该电极反应是受表面过程控制的,这进一步说明 Tyr 的确已固定到电极上. 根据循环伏安曲线上氧化峰或还原峰的电量求 Tyr 在 C/GC 电极上的表观吸附量 Γ 为 $(2.94 \pm 0.23) \times 10^{-13} \text{ mol}/\text{cm}^2$.

Lac-C/GC 电极在 0.1 mol/L PBS (pH = 7.0) 中的循环伏安测量结果表明,在循环伏安曲线中也可观察到一对很好的准可逆氧化还原峰. 在扫速为 20 mV/s 时, Lac 的 $E_{\text{pa}} = -0.135 \text{ V}$, $E_{\text{pc}} = -0.196 \text{ V}$, $\Delta E_p = 61 \text{ mV}$, 氧化还原峰电流基本相等,表明吸附在活性炭上的 Lac 也能进行准可逆的电化学反应. Lac 在 C/GC 电极表面的表观吸附量 Γ 为 $(3.16 \pm 0.27) \times 10^{-13} \text{ mol}/\text{cm}^2$. 所有上述的结果说明,活性炭粉和 Nafion 膜构筑的表面微环境有利于含铜氧化酶进行直接电化学反应.

2.2 Tyr-C/GC 和 Lac-C/GC 电极对 O_2 的电催化还原

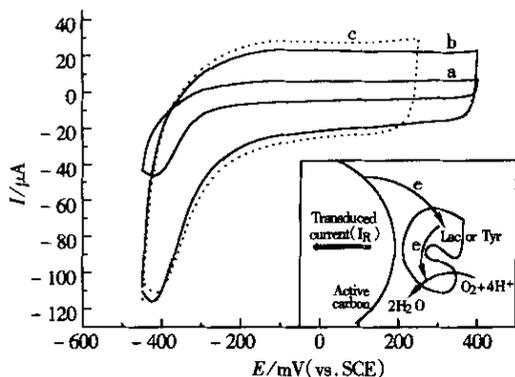
图 2 为 C/GC (曲线 a), Lac-C/GC (曲线 b) 和 Tyr-C/GC (曲线 c) 电极在 O_2 饱和的 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) 中的循环伏安曲线. 由图可知,当缓冲溶液用 O_2 饱和后,出现明显的 O_2 的还原峰,表明 Tyr 和 Lac 固定在 C/GC 电极表面后仍能保持其对 O_2 的还原电催化活性,其电催化过程可用图 3 中的示意图表示(见插图). 虽然 C/GC 电极对 O_2 的还原也有一定的催化作用(图 3 曲线 a),但与 Tyr-C/GC 和 Lac-C/GC 电极相比,其催化活性较小(约小 2.5 倍),且 O_2 在 Tyr-C/GC 和 Lac-C/GC 电极上还原的起始还原电位也有较大正移(约 100 mV).

万方数据



(a) C/GC 电极, (b) Tyr-C/GC 电极, (c) 曲线 b 减 a 后的循环伏安曲线

图 1 电极在 0.1 mol/L 的 PBS (pH = 7.0) 中的循环伏安曲线



(a) C/GC 电极 (b) Lac-C/GC 电极 (c) Tyr-C/GC 电极

图 2 电极在 O_2 饱和的 0.1 mol/L PBS (pH 7.0) 中的循环伏安曲线

3 结论

上述的实验结果表明,吸附在活性炭表面的 Tyr 和 Lac 能进行准可逆的直接电化学反应,而且能保持对 O₂ 还原的生物电催化活性.本文固定酶的方法具有简单易行、操作方便、酶用量少、酶活性保持良好等优点,是制备生物燃料电池阴极催化剂的新途径.

[参考文献]

- [1] Mayer A M, Staples R C. Laccase: new functions for an old enzyme[J]. *Phytochem* 2002, 60(2): 551—565.
- [2] van Gelder C W G, Flurkey W H, Wichers H J. Sequence and structural features of plant and fungal tyrosinases[J]. *J Phytochem*, 1997, 45(7): 1309—1323.
- [3] Liu Z J, Liu B H, Kong J L, et al. Probing trace phenols based on mediator-free alumina sol-gel-derived tyrosinase biosensor[J]. *Anal Chem* 2000, 72(19): 4707—4712.
- [4] Barton S C, Kim H H, Binyamin G, et al. Electroreduction of O₂ to water on the “Wired” laccase cathode[J]. *J Phys Chem B*, 2001, 105(47): 11917—11921.
- [5] Yaropolov A I, Kharybin A N, Ennéus J, et al. Electrochemical properties of some copper-containing oxidases[J]. *Bioelectrochem Bioenerg*, 1996, 40(1): 49—57.
- [6] Martin C R, Dollard K A. Effect of hydrophobic interaction on the rates of ionic diffusion in Nafion films at electrodes surfaces[J]. *J Electroanal Chem*, 1983, 159(1): 127—135.

Direct Electrochemistry of Tyrosinase and Laccase

Sun Dongmei^{1,2}, Cai Chenxin², Xing Wei¹, Lu Tianhong^{1,2}

(1. Changchun Institute of Applied Chemistry, Chinese Academy of Sciences, 130022, Changchun, China)

(2. College of Chemistry and Environment Science, Nanjing Normal University, 210097, Nanjing, China)

Abstract It is reported for the first time that tyrosinase or laccase, adsorbed on the surface of active carbon powder can undergo the quasi-reversible direct electrochemical reaction and have the electrocatalytic activity for the O₂ reduction. The formal redox potentials of tyrosinase and laccase are -0.138 and -0.161 V, respectively. The direct electrochemical reactions of tyrosinase and laccase can not occur at the glassy carbon electrode. These results indicated that the microenvironment constructed with active carbon and Nafion membrane is favorable for the direct electrochemical reactions of biomacromolecules. The immobilization method has several advantages, such as simplicity, easy to operation and keeping good activity of enzyme etc. Therefore, this method can be used for investigating the direct electrochemistry of redox proteins and enzymes. It may be also used to prepare the catalysts for biofuel cells.

Key words tyrosinase, laccase, direct electrochemistry, active carbon

[责任编辑 孙德泉]