

## تثبیت آنزیم لاکاز با استفاده از نافیون و نانولوله‌های کربنی در بیوکاتد پیل‌های زیست سوختی و بیوسنسورها

معصومه احمدی\*

گروه زیست شناسی دانشگاه پیام نور بانه، بانه، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۰/۰۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۱۱/۲۵)

### چکیده

امروزه تقاضا برای انرژی پاک رو به افزایش است. پیل زیست سوختی می‌تواند انرژی شیمیایی را به انرژی الکتریکی تبدیل کند. انواع مختلفی از پیل‌های زیست سوختی طراحی شده‌اند که می‌توانند از بیوکاتالیست‌ها، آنزیم‌ها و حتی میکروارگانیسم‌ها، با هدف تولید انرژی الکتریکی استفاده نمایند. پیل‌های زیست سوختی آنزیمی مقرون به صرفه، فشرده و انعطاف پذیر می‌باشد. اساس کار پیل‌های زیست سوختی آنزیمی، انتقال الکترون از آنزیم به سطح الکتروود و بالعکس می‌باشد. انتقال مستقیم الکترون آنزیم لاکاز با روش ساخت الکتروود با استفاده از پلیمر نافیون و نانولوله‌های کربنی چند دیواره بررسی شد. لاکاز توسط پلیمر نافیون گیراندازی شده و از آنجائیکه پلیمر نافیون نقش انتقال یون پروتون را ایفا کرده، غیرهادی است در نتیجه نانولوله‌های کربنی چند دیواره جهت تسهیل انتقال الکترون استفاده شد. نتایج ولتاموگرام چرخه ای، یک پیک با بیشینه جریان ۱۷۰ میکروآمپر در محلولی با غلظت ۱۰ میکرومولار اودیانیزیدین بعنوان سوبسترای پلیمر نافیون و نانولوله‌های کربنی چند دیواره نشان داد. همچنین نتیجه ولتاموگرام چرخه ای بیوکاتد نشان داد که تثبیت آنزیم لاکاز با استفاده از نافیون و نانولوله‌های کربنی چند دیواره موثر می‌باشد. بنابراین این روش می‌تواند برای ساختن بیوکاتد پیل‌های زیست سوختی و بیوسنسورها بکار رود.

### کلیدواژگان

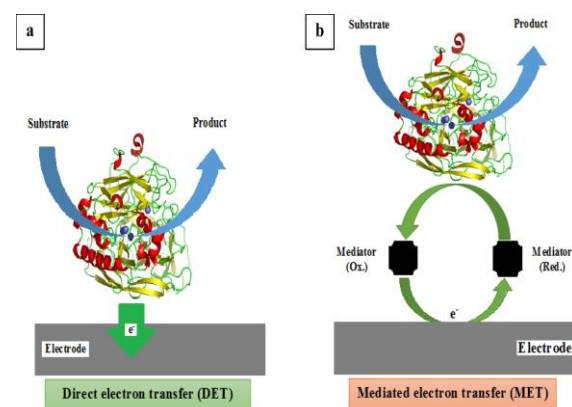
بیوکاتد، پیل زیست سوختی، تثبیت آنزیم لاکاز، نافیون، نانولوله‌های کربنی چند دیواره.



## مقدمه

پیل‌های زیست سوختی که بر اساس آنزیم‌ها طراحی می‌شوند، یک وسیله الکترونیکی زیستی هستند که قادرند با استفاده از ویژگی واکنشهای آنزیمی، انرژی شیمیایی را به انرژی الکتریکی تبدیل نمایند (۱). در این گروه از پیل‌های زیست سوختی، یک آنزیم اکسیدکننده روی الکترود آند و یک آنزیم احیاکننده، روی الکترود کاتد تثبیت می‌گردد. با اکسیدشدن سوبسترا توسط آنزیم اکسیدکننده، الکترون تولید می‌شود. سپس این الکترون بوسیله مدار الکتریکی به سمت الکترود کاتدی حرکت نموده و در آنجا آنزیم احیاکننده الکترون مذکور را دریافت و سوبسترای خود را احیا می‌نماید. بنابراین الکترون در مدار، بین الکترود آندی و کاتدی حرکت نموده و جریان الکتریکی تولید می‌گردد (۵) (شکل ۱).

در نوع دیگری از پیل‌های زیست سوختی از واسطه‌های انتقال الکترون استفاده می‌شود. این واسطه‌ها به عنوان یک هادی عمل نموده و الکترون را از تونل فعال آنزیم به سطح الکترود کاتدی منتقل می‌نمایند. بنابراین ارتباط الکتریکی مناسب بین جایگاه فعال آنزیم و سطح کاتد ایجاد می‌گردد. به کمک این واسطه‌ها جریان افزایش پیدا کرده و پایدارتر می‌شود (شکل ۱).



شکل ۱- مکانیزم انتقال الکترون (a) انتقال مستقیم الکترون از جایگاه فعال آنزیم به سطح الکترود (b) انتقال الکترون از جایگاه فعال آنزیم به سطح الکترود به وسیله مواد واسطه.

در سال‌های اخیر علاقه مندی به تحقیق در خصوص ابزارهای جمع آوری انرژی همچون پیل‌های زیست سوختی آنزیمی افزایش یافته است. دلایل این علاقه به پیل‌های زیست سوختی آنزیمی شرایط خاص قابلیت اجرا در شرایط معتدل ( $20-40^{\circ}\text{C}$  و pH نزدیک به شرایط فیزیولوژیکی) بدون آلودگی محیط زیستی می‌باشد (۱). به دلیل ویژگی‌های اجرایی خوب، به پیل‌های زیست سوختی آنزیمی با توجه به استفاده در کاربردهایی که نیازمند شرایط دماهای بالا و واکنش‌های شدید توجه زیادی شده است (۱۷ و ۱۹).

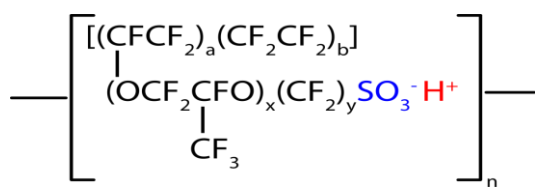
تثبیت آنزیم به فرایندهایی گفته می‌شود که منجر به نگهداری مولکول آنزیم و مستقر شدن آن بر روی یک منطقه یا ناحیه کاملاً مشخص شود، به طوری که بتواند فعالیت کاتالیکی خود را به دست آورد. آنزیم تثبیت شده در مقایسه با آنزیم طبیعی دارای چندین مزیت می‌باشد که می‌توان به مواردی مثل افزایش پایداری، تسهیل بازسازی و تخلیص آنزیم، امکان استفاده مجدد از آنزیم و کارکرد پیوسته آنزیم در فرایندهای آنزیمی اشاره نمود (۱۲ و ۱۸ و ۱۹ و ۲۴ و ۲۵).

از آنزیم‌های کاربردی در پیل‌های زیست سوختی به ویژه به عنوان کاتد آنزیم لاکاز می‌باشد (شکل ۲). لاکاز نخستین بار توسط یوشیدا توصیف شده است (۲۸). لاکاز یکی از نخستین آنزیم‌هایی است که توصیف شده است. با این حال، در طی چند سال اخیر، کار روی کاربردهای لاکاز توسعه یافته است. کاربردهای گزارش شده شامل توسعه کاتدهای اکسیژن در پیل‌های زیست سوختی (۵)، بیوسنسورها (۷)، تجزیه زیستی سبز شامل رنگبری خمیر کاغذ (۴) و نشاندار کردن در سنجش‌های ایمن شناسی (۱۳) می‌باشد. لاکاز یک گلیکوپروتئین چند مسی است و وزن مولکولی بین ۵۴ kDa تا ۳۸۳ kDa دارند که بستگی به گونه‌های قارچی دارد (۲ و ۱۴ و ۱۶ و ۱۷). آنزیم لاکاز شامل ۴ مس ( $\text{Cu}^{2+}$ ) با یک مرکز فعال



آنزیم‌ها در محلول‌ها برای چند روز پایدار هستند در حالی که وقتی تثبیت شوند برای ماه‌ها پایدار خواهند بود (۱۵). از آنجاکه یکی از موانع اصلی پیل‌های زیست سوختی بر پایه آنزیمها طول عمر آنزیم‌های مورد استفاده می باشد، با تثبیت آنزیم در یک غشاء روی سطح الکتروود که منجر به تشکیل یک لایه پایدار شیمیایی و مکانیکی می شود، می توان طول عمر آنزیم را افزایش داد و به این ترتیب بر این مشکل غلبه نمود. بیشتر از یک دهه گذشته هلر و همکاران (۸) و کاتز و ویلنر (۱۰) پیل‌های زیست سوختی آنزیمی را توسعه و طول عمر آنها را تا ۱۰ روز افزایش دادند.

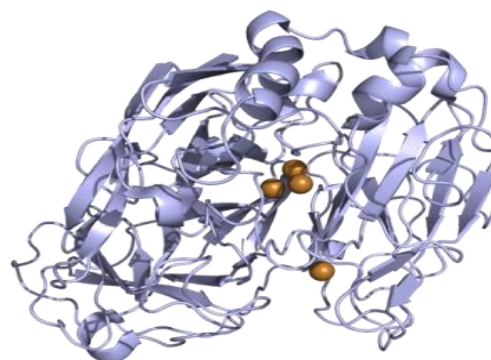
با این حال طول عمر بیشتر از ۱۰ روز برای اغلب وسایل مورد نیاز است. در بیشتر پیل‌های زیست سوختی  $H_2O_2$  پیوند دهنده‌ای که کاتالیت را در سطح الکتروود نگه می‌دارد، نافیون است. نافیون یک پلیمر مبادله کننده یون پروتون است که خصوصیات عالی به عنوان یک هدایت کننده یون دارد (۲۷). بنابراین از تترابوتیل آمونیوم بروماید برای اصلاح کردن نافیون استفاده می‌شود. نافیون محیط ایده آلی برای تثبیت آنزیم فراهم می‌کند (۹ و ۱۱).



شکل ۳- فرمول شیمیایی نافیون.

مهمترین توجه به تثبیت ماتریکس بر اساس نافیون توسط مینتر و همکارانش (۱۵) آغاز شده است، که در آن اصلاح پلیمر با نمک‌های چهارگانه آمونیوم محیط مناسبی برای بیوکاتالیست‌ها فراهم می‌کند، در حالی که خصوصیات الکتریکی‌اش را حفظ می‌کند (شکل ۵). نافیون خنثی شده اغلب همراه با متیلن‌گرین استفاده شده است، که روی ورقه کربنی برای اکسیداسیون اتانول (۲) و ۲۰ و ۲۳) و پیرووات (۲۱)

نزدیک (مس نوع ۱ (T1)) و یک خوشه دارای سه مس با یک مس نوع ۲ (T2) و ۲ مس نوع ۳ (T3) می‌باشد. مس T1 الکترون را از سوبسترای احیا شده می‌گیرد و آنرا به خوشه مس T2/T3 انتقال می‌دهد که اکسیژن مولکولی در مس T2 به آب احیا می‌شود و مس T3 به عنوان مخزن الکترون عمل می‌کند (۴ و ۵ و ۷).



شکل ۲- ساختار لاکاز.

تثبیت آنزیم هم به روش شیمیایی و هم به روش فیزیکی امکان پذیر است. نافیون به علت فاصله کم و مناسب بین هادی الکترونیکی و جایگاه فعال آنزیم در موارد مختلفی از روش‌های تثبیت به منظور انتقال مستقیم الکترون گزارش شده است (۲۲). نافیون یک تترافلورواتیلن سولفوناته بر پایه فلوروپلیمر- کوپلیمر است که در اواخر دهه ۱۹۶۰ توسط والتر گروت<sup>۱</sup> کشف شده است. نافیون اولین دسته از پلیمرهای سنتزی با خصوصیات یونی است که یونومرها نامیده شده‌اند (شکل ۳). خصوصیات خاص یونی نافیون از ترکیب گروه‌های پرفلورووینیل اثر منتهی شده با گروه‌های سولفونات روی یک ساختار تترافلورواتیلن (تفلون) ناشی شده است (شکل ۴). نافیون توجه زیادی برای کاربرد در غشاهای انتقال دهنده پروتون (PEM) برای پیل‌های سوختی به دلیل پایداری مکانیکی و حرارتی عالی به خود جلب کرده است (۱۵).

1. Walther Grot.



پتانسیوگالوانومتر اسپانیایی Drop Sens مدل DRP-STAT200 انجام شد. هر آزمایش، در غلظت مربوطه، سه مرتبه و در هر مرتبه سه چرخه کامل انجام گرفت. ساخت بیوکاتد با استفاده از پلیمر نافیون و استفاده از نانولوله‌های کربنی چند دیواره به عنوان هادی الکترون روی الکتروود.

در این پژوهش ساخت الکتروود کاتدی با استفاده از آنزیم لاکاز و با به کارگیری نانولوله‌های کربن مد نظر بوده که اولین مرحله در ساخت این الکتروود کاتدی، فعال نمودن سطح الکتروود کار می‌باشد. برای انجام این کار مراحل ذیل انجام گرفت:

۱. فعال نمودن نانولوله‌های کربنی
۲. اتصال نانولوله‌های کربنی فعال شده به الکتروود کار فعال شده.

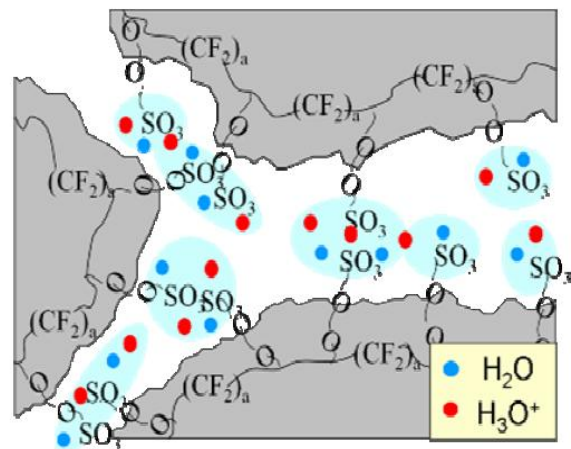
#### الف) فعال نمودن نانولوله‌های کربنی

فعال سازی نانولوله‌های کربنی چند دیواره به وسیله روش معرفی شده توسط لویی و همکارانش<sup>۱</sup> انجام گرفت (۲۶). طبق این روش به منظور فعال نمودن نانولوله‌های کربنی، ۲ میلی گرم نانولوله‌های کربنی چند دیواره به ۱۰ میلی لیتر محلول سولفوریک اسید ( $H_2SO_4$ ) و نیتروس اسید ( $HNO_2$ ) اشباع با نسبت ۳:۱ اضافه گردید. سپس محلول فوق برای مدت ۴ ساعت در حمام سونیکاسیون با قدرت ۵۵ هرتز قرار گرفت. سپس نانولوله‌های کربنی چند دیواره شسته شده و توسط فیلتری با قطر ۰/۴۵ میکرومولار جمع آوری شد. این فرایند تا جایی ادامه یافت که آب خارج شده در اثر شسته شوی نانولوله‌های کربنی چند دیواره دارای pH خنثی شد.

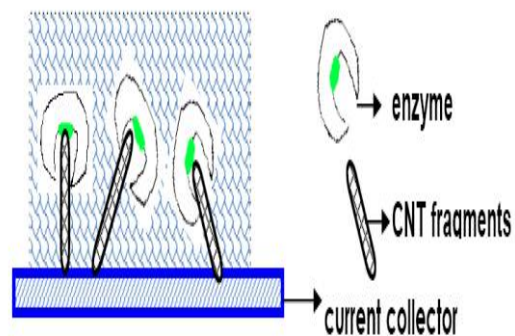
#### ب) فعال نمودن الکتروود کار با گروه‌های آمینی

فعال سازی سطح الکتروود کار با گروه‌های آمینی شامل دو مرحله است. در مرحله اول می‌بایست سطح

الکتروپلیمریزه شده است. نافیون محیط مناسبی را برای تثبیت لاکاز فراهم می‌کند (۲۲).



شکل ۴- ساختار نافیون.



شکل ۵- ساختار MWCNT/laccase/Nafion

#### مواد و روش‌ها

نانولوله‌های کربنی چند دیواره (نانوتایمز چین با خلوص ۹۵٪)، آنزیم لاکاز (Sigma-Aldrich)، او-دیانیزیدین (Sigma)، متیل تری متوکسی سیلان (Aldrich) (MTMOS)، کربن سرامیک الکتروود (Aldrich) (CCE)، تترامتوکسی سیلان (TMOS) (Aldrich) ۲ و ۲-آزینو- بیس-۳-ایتل بنزوتیازولین-۶-سولفونات (ABTS)، اسید کلریدریک (Merck)، پراکسید هیدروژن ۳۰٪، پودر گرافیت (MO-300) (Sigma-Aldrich)، فیلتر با قطر ۰/۴۵ میکرومتر. آزمایشات ولتامتری چرخه‌ای با استفاده از دستگاه

1. Liu et al.



### ج) اتصال نانولوله‌های کربنی فعال شده به الکترودار فعال شده

هدف اصلی از اصلاح نمودن الکترودار و نانولوله‌های کربنی این است که با ایجاد سرهای آزاد، این دو جز مهم به یکدیگر متصل شوند. اتصال نانولوله‌های کربنی فعال شده به انتهای آمینی الکترودار کار به وسیله انکوبه نمودن الکترودار در محلول MWCNT/DMF در حضور ۰/۵ میلی گرم ترکیب ۳-۱ دی سیکلوکربادی ایمید<sup>۴</sup> برای مدت یک روز در دمای اتاق انجام شد. در نتیجه نانولوله‌های کربنی که دارای انتهای فعال ناشی از گروه‌های کربوکسیل هستند به گروه آمینی ترکیب سیلانه تثبیت شده روی سطح الکترودار متصل شدند. محلول MWCNT/DMF با سونیکاسیون ۱ میلی گرم MWCNT در ۱ میلی لیتر از حلال DMF به مدت ۳-۵ دقیقه تهیه شد. در این صورت با انجام مراحل فوق اولین مرحله در ساخت این بیوکاتد که اصلاح نمودن الکترودار کار با نانولوله‌های کربنی بود به اتمام رسید (۲۵). مرحله دوم اتصال آنزیم لاکاز به الکترودار اصلاح شده، با تثبیت آنزیم کاندی که در این پژوهش آنزیم لاکاز است، ساخت بیوالکترودار کاتدی تکمیل شد.

### د) روش اتصال آنزیم لاکاز به الکترودار اصلاح شده

بدین منظور محلول ۲۰۰ میلی مولار از ترکیب ۱- اتیل-۳- (۳- دی متیل آمینو پروپیل) کربودی ایمید<sup>۵</sup> به مدت ۱ ساعت در محلول ۵۰ میلی مولار از ترکیب ان- هیدروکسی سوکسین ایمید<sup>۶</sup> مولار قرار گرفت تا استر فعال گروه‌های کربوکسیلی روی الکترودار کار مدیفای شده تشکیل گردد. سپس آنزیم لاکاز با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر در بافر فسفات سدیم ۰/۱ میلی مولار حل شده و به محلول فوق اضافه

الکترودار کار با گروه‌های کربوکسیل فعال گردد. در مرحله دوم ترکیب سیلانه آمین‌دار به الکترودار کار حاوی گروه‌های کربوکسیل اضافه شود. تا این ترکیب از طریق سیلان به گروه‌های کربوکسیل موجود روی الکترودار کار متصل شده و گروه آمین آن به صورت آزاد باقی بماند، تا به گروه‌های کربوکسیل موجود در نانولوله‌های کربنی چند دیواره متصل گردد.

مرحله اول فعال نمودن الکترودار کار از طریق تیمار الکتروشیمیایی صورت گرفت. در این روش محلولی از اسید سولفوریک ۹۸٪ و پراکسید هیدروژن ۳۰٪ با نسبت ۷:۳ تهیه می‌گردد. سپس روی الکترودار کار یک قطره از محلول فوق قرار گرفت. در این زمان الکترودار کار را به دستگاه پتانسیوگالوانومتر متصل و دستگاه را روی روش ولتامتری چرخه‌ای با سرعت روبش ۰/۱ V/s و ولتاژ بین ۰/۱+ و ۰/۵- قرار داده و ۱۰-۵ چرخه کامل انجام شد. در این حالت، از قطره ریخته شده روی الکترودار کار حباب‌هایی خارج شد، که ناشی از اکسیداسیون کربن الکترودار کار و در نتیجه تشکیل گاز CO<sub>2</sub> است. در اثر این تیمار گروه‌های فعال کربوکسیل روی الکترودار کار تشکیل شده و به این ترتیب الکترودار کار فعال گردید.

در مرحله دوم فعال نمودن الکترودار کار، الکترودار 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 گرفت. تا ترکیب سیلانه فوق از طریق سیلان به گروه‌های کربوکسیل روی الکترودار کار متصل شده و گروه آمین آن به صورت آزاد باقی بماند، تا به گروه‌های کربوکسیل موجود در نانولوله‌های کربنی چند دیواره متصل گردد.

4. Dicyclocarbodiimide (DCC).

5. Ethyl-3-(3-Dimethylaminopropyl)Carbodiimide (EDC).

6. N- HydroxySuccinimide (NHS).

1. Aminopropyltrimethoxysilan

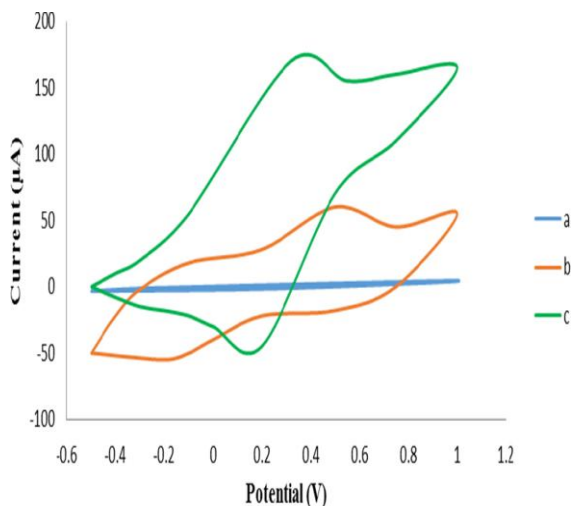
2. Amonium persulfate(APS)

3. Toluene



هنگامی که لاکاز روی سطح الکتروود تثبیت شد، بدست آمده است. در شکل (b-6) ولتاموگرام چرخه ای بیوکاتد ساخته شده بوسیله نافیون و نانولوله های کربنی چنددیواره و بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار pH=5 در ۲۵°C و سرعت روبشی ۰/۱۷/s و اختلاف پتانسیل بین ۰/۶- و ۱/۲ V و غلظت ۵ میکرومولار اودیانیزیدین ثبت شده است. این نشان می دهد که فاصله بین قله و دره ۰/۵ ولت یک جریان بهبود یافته نسبت به Ag/AgCl و بیشترین جریان ۶۰ میکروآمپر به دست آمده است. پیک کاهشی در ۰/۲- ولت در Ag/AgCl با کمترین جریان ۵۵- میکروآمپر بدست آمده است.

نتایج ارتباط الکتریکی بین جایگاه فعال لاکاز و سطح الکتروود را نشان می دهد. بعلاوه اختلاف پتانسیل بین قله و دره در ۰/۷ ولت افزایش می یابد و تغییر غیرعادی دره در ناحیه منفی اتفاق می افتد. این مسئله به دلیل چرخش غیر ایده آل واکنش آنزیم ها که قادر به کاتالیز واکنش های برگشت پذیر آنزیمی در پتانسیل مشخص می باشد.



شکل ۶- ولتاموگرام چرخه ای لاکاز تثبیت شده با استفاده از نافیون و نانولوله های کربنی چنددیواره در سرعت روبشی ۰/۱۷/s، بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار و pH=5 در ۲۵ °C و در a: غلظت ۰/۱ مولار اودیانیزیدین (بدون آنزیم)، b: غلظت ۵ میکرومولار اودیانیزیدین و c: غلظت ۱۰ میکرو مولار اودیانیزیدین.

می‌گردد. و به مدت دو ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد، در حضور الکتروود مدیفای شده انکوبه گردید (۲۵).

انتقال الکترون آنزیم با قرار گرفتن بیوکاتد ساخته شده در غلظت‌های مختلف او - دیانیزیدین در بافر فسفات (pH=5) ۰/۲ مولار تهیه و الکتروود کار با استفاده از دستگاه پتانسیوگالوانومتر Drop Sens اندازه گیری شد. پس از فعال سازی الکتروود، سطح الکتروود به وسیله آب مقطر شستشو و پس از خشک شدن الکتروود، ۱ میلی لیتر متیل تری متوکسی سیلان (MTMOS<sup>1</sup>) و سپس ۱۰ میکرولیتر نافیون ۵ درصد به صورت قطره‌ای روی الکتروود قرار گرفت و پس از خشک شدن، نانولوله‌های کربنی چند دیواره با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر روی سطح الکتروود ریخته شد. پس از خشک شدن کامل سطح الکتروود، آنزیم لاکاز با غلظت ۱ میلی گرم بر میلی لیتر تهیه و ۲۰ میکرولیتر از آن به صورت قطره‌ای روی الکتروود کار قرار گرفت. پس از خشک شدن کامل الکتروود، بیوکاتد آماده شد.

## نتایج و بحث

از آنجایی که روش های تثبیت شیمیایی ممکن است روی فعالیت آنزیم اثر بگذارد یک روش فیزیکی (کپسوله کردن آنزیم) مطالعه شد. برای این هدف لاکاز بوسیله پلیمر نافیون کپسوله شد. نافیون پلیمر تبادل پروتون می باشد اما انتقال دهنده ی پروتون نمی باشد. نانولوله های کربنی انتقال الکترون را تسهیل می کند. ولتاموگرام چرخه ای بیوکاتد ساخته شده با استفاده از نافیون و نانولوله های کربنی چند دیواره در سرعت روبش ۰/۱۷/s با پتانسیل بین ۰/۶- و ۱/۲ در محلول اودیانیزیدین ۰/۱ مولار هیچ پیک ردوکسی را نشان نداد (شکل a-6). در نتیجه پیک های ردوکس

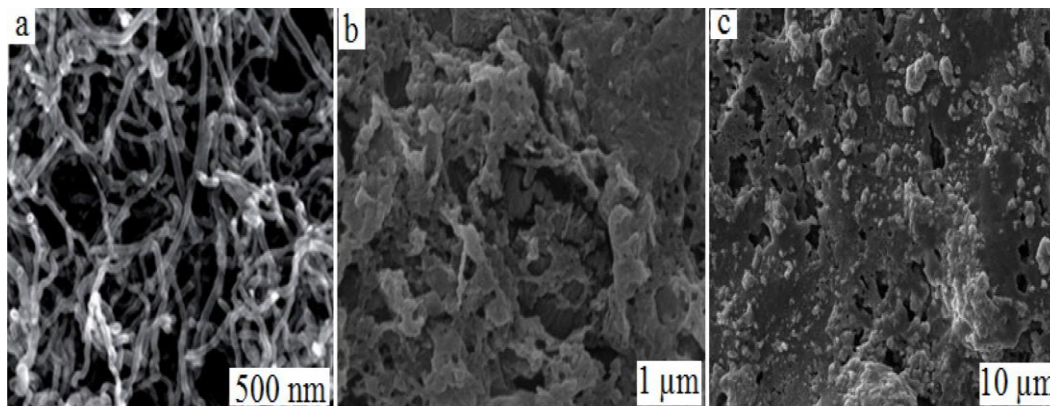
1. Methyltrimethoxysilane (MTMOS).



پتانسیل بین قله و دره در  $0/12$  ولت کاهش می‌یابد. در شکل (۷) میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) نانولوله‌های کربنی چنددیواره (a)، نافیون- نانولوله‌های کربنی چنددیواره (b) و نافیون- آنزیم- نانولوله‌های کربنی چنددیواره روی الکتروود (c) نشان داده شده است.

نتایج نشان می‌دهد که انتقال مستقیم الکترون بین آنزیم و الکتروود هنگامی که آنزیم بوسیله ی نافیون و نانولوله‌های کربنی تثبیت شده امکان پذیر می‌باشد. اما اتصال‌های کوالانسی آنزیم روی الکتروود باعث کارایی بیشتر انتقال مستقیم الکترون می‌شود.

در شکل (c- ۶) ولتاموگرام چرخه ای بیوکاتد ساخته شده بوسیله نافیون و نانولوله‌های کربنی چنددیواره در بافر فسفات پتاسیم  $0/2$  مولار  $pH=5$  در  $25^{\circ}C$  و سرعت روبشی  $0/1V/s$  و اختلاف پتانسیل بین  $-0/6$  و  $1/27$  و غلظت  $10$  میکرومولار اودیانیزیدین ثبت شده است. یک جفت قله تیز و به خوبی مشخص پیک جریان با پیک اکسیداسیون در  $0/32$  ولت نسبت به  $Ag/AgCl$  و بیشترین جریان  $170$  میکروآمپر را نشان می‌دهد. دره در  $0/2$  ولت یا کمترین جریان  $-45$  آمپر می‌باشد. با افزایش غلظت سوبسترا از  $5$  میکرومولار به  $10$  میکرومولار تغییر



شکل ۷- میکروسکوپ الکترونی نگاره (SEM) نانولوله‌های کربنی چنددیواره (a)، نافیون- نانولوله‌های کربنی چنددیواره (b) و نافیون- آنزیم- نانولوله‌های کربنی چنددیواره روی الکتروود (c).



## منابع و مأخذ

1. A. Karimi, A. Othman, A. Uzunoglu, L. Stanciu, S. Andreescu, *Nanoscale* 7 (2015) 6909.
2. Akers N.L.; Moore C.M.; Minteer S.D. . Development of alcohol/O<sub>2</sub> biofuel cells using salt-extracted tetrabutylammonium bromide/Nafion membranes to immobilize dehydrogenase enzymes. *Electrochim.Acta*. 2005. 50, 2521–2525.
3. Baldrian P. Fungal Laccases - Occurrence and Properties. *FEMS Microbiol Rev*. 2006.30(2):215–42.
4. Balakshin M, Chen C L, Gratzl JS, Kirkman AG, Jakob H. Biobleaching of Pulp with Dioxygen in Laccase-Mediator System-Effect of Variables on the Reaction Kinetics. *J. Mol. Catal. B: Enzyme*. 2001.16: 205–215.
5. Barton SC, Kim H H, Binyamin G, Zhang Y, Heller A. The “Wired” Laccase Cathode: High Current Density Electroreduction of O<sub>2</sub> to Water at +0.7 V (NHE) at pH 5. *J. Am. Chem. Soc*. 2001. 123:5802–5803.
6. Bullen RA, Arnot TC, Lakeman JB, Walsh FC. Biofuel Cells & Their Development. *BiosensBioelectron*. 2006. 21:2015- 2045.
7. Freire RS, Duran N, Kubota LT. Effects of Fungal Laccase Immobilization Procedures for the Development of a Biosensor for Phenol Compounds. *Talanta*. 2001. 54:681–686.
8. Heller A., Mao F., Mano N. Characteristics of a miniature compartmentless glucose-O<sub>2</sub> biofuel cell and its operation in a living plant *J. Am. Chem. Soc*. 2003. 125: 6588.
9. Kannan A. M., Renugopalakrishnan V., Filipek S., Li P., Audette G. F., and Munukutla L.. Bio-Batteries and Bio-Fuel Cells: Leveraging on Electronic Charge Transfer Proteins. *J. of Nanoscience and Nanotechnology*. 2008. Vol.8, 1–13.
10. Katz E. and Willner I. . A biofuel cell with electrochemically switchable and tunable power output, *J. Am. Chem. Soc*. 2003. 125, 6803–6813.
11. Klotzbach T., Watt M., Ansari Y., Minteer S. D. Effects of hydrophobic modification of chitosan and Nafion on transport properties, ion-exchange capacities, and enzyme immobilization. *Journal of Membrane Science*. 2006. 282: 276–283.
12. Klotzbach T. L., Watt M., Ansari Y., Minteer S. D., Improving the microenvironment for enzyme immobilization at electrodes by hydrophobically modifying chitosan and Nafion® polymers. *Journal of Membrane Science* .2008.311: 81–88.
13. Kuznetsov BA, Shumakovich G P, Koroleva O V, Yaropolov A I. On Applicability of Laccase as Label in the Mediated and Mediatorless Electroimmunoassay: Effect of Distance on the Direct Electron Transfer Between Laccase and Electrode. *Biosens.Bioelectron*. 2001. 16: 73–84.
14. Mayera A M, Staples R C. Laccase: New Functions for an Old Enzyme. *Phytochemistry*. 2002. 60:551–565.
15. Minteer S.D, Akers N.L., Hill A.D, Johnson Z.C , Moore C.M. Improving the Environment for Immobilized Dehydrogenase Enzymes by Modifying Nafion with Tetraalkylammonium Bromides Biomacromolecules. 2004. 5: 1241.
16. Piontek K. Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes Versicolor* at 1.90 Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers. *J. Biol. Chem*. 2002.277:37663–37669.
17. R.A. Luz, A.R. Pereira, J.C. de Souza, F.C. Sales, F.N. Crespilho, *Chem. Electro. Chem*. 1 (2014) 1751.
18. Riva S. Laccases: Blue Enzymes for Green Chemistry. *TRENDS in Biotechnology*. 2006. Vol.24 No.5.
19. S.A. Neto, R.D. Milton, L.B. Crepaldi, D.P. Hickey, A.R. de Andrade, S.D. Minteer, *J. Power Sources* 285.(2015) 493.





20. Shim J, Kim GY, Moon S H. Covalent Co-Immobilization of Glucose Oxidase & Ferrocenedicarboxylic Acid for an Enzymatic Biofuel Cell. *J. of Electroanalytical Chem.* 2010.
21. Silva C., Silva C. J., Zille A., Guebitz G. M., Cavaco-Paulo A. Laccase immobilization on enzymatically functionalized polyamide 6,6fibres. *Enzyme and Microbial Technology.* 2007. 41: 867–875.
22. Sokic-Lazic D.; Minteer, S.D..Citric acid cycle biomimic on a carbon electrode.*Biosens.Bioelectron.* 2008.24, 939–944.
23. Stolarczyk K., Nazaruk E., Rogalski J., Bilewicz R. Nanostructured Carbon Electrodes for Laccase Catalyzed Oxygen Reduction without Added Mediators. *ElectrochimicaActa.* 2007.
24. Topcagic S. and Minteer S.D. Development of a Membraneless Ethanol/Oxygen Biofuel Cell. *ElectrochimicaActa.* 2006. 51, 2168-2172.
25. Topcagic, S.; Minteer, S.D. Development of a membraneless ethanol/oxygen biofuel cell. In *Proceedings of the International Conference on Electrode Processes, Szczyrk, Poland, September. 2004.* pp. 2168–2172.
26. Tortolini C., Fusco M. D., Frascioni M., Favero G., Mazzei F. Laccase polyazetidineprepolymer–MWCNT integrated system: biochemical properties and application to analytical determinations in real samples, *Microchem.* 2010. J. 96: 301–307.
27. Wang J., Musameh M., Lin Y.H. Solubilization of carbon nanotubes by Nafion toward the preparation of amperometric biosensors, *J. Am. Chem. Soc.* 2003. 125: 2408–2409.
28. Withey G.D, Lazareck A.D, Tzolov M.B, Yin A, Aich P, Yeh J.I, Xu J.M,. Ultra-high redox enzyme signal transduction using highly ordered carbon nanotube array electrodes, *Biosensore and Bioelectronics.* 2006. 21 1560-1565.
29. Yinghui D., Qiuling W., and Shiyu F. Laccase stabilization by covalent binding immobilization on activated polyvinyl alcohol carrier. *Letters in Applied Microbiology.* 2002. 35, 451–456.
30. Yoshida H. Chemistry of Lacquer Urushi. *J. Chem. Soc.* 1883. 43: 472–486.

