

2000-05-28

## Preparation and Characteristics of a Enzyme Electrode Based on Immobilization of Tyrosinase in Electropolymerized Polypyrrole Film

Liu-shui YAN

Qia WEI

Cheng-Yi WANG

Rong-rong SHI

Xiao-tong MA

---

### Recommended Citation

Liu-shui YAN, Qia WEI, Cheng-Yi WANG, Rong-rong SHI, Xiao-tong MA. Preparation and Characteristics of a Enzyme Electrode Based on Immobilization of Tyrosinase in Electropolymerized Polypyrrole Film[J]. *Journal of Electrochemistry*, 2000 , 6(2): 222-226.

DOI: 10.61558/2993-074X.1384

Available at: <https://jelectrochem.xmu.edu.cn/journal/vol6/iss2/11>

This Article is brought to you for free and open access by Journal of Electrochemistry. It has been accepted for inclusion in Journal of Electrochemistry by an authorized editor of Journal of Electrochemistry.

文章编号:1006-3471(2000)02-0222-05

# 电聚吡咯固定化酪氨酸酶电极的制备及性能

颜流水\*, 魏 洽, 王承宜, 史蓉蓉, 马晓通

(南昌航空工业学院环境与化学工程系, 江西 南昌 330034)

**摘要:** 在应用恒电位法电化学聚合吡咯的同时, 将酪氨酸酶固定在导电聚吡咯膜内, 制成一种灵敏、稳定的酪氨酸酶电极. 讨论了溶液 pH 值和聚合电位对酶固定化的影响, 对酶分子嵌入吡咯膜前后的 SEM 图和 CV 曲线进行了分析、比较. 该电极对甲苯酚响应的线性范围为  $5.0 \times 10^{-8} \sim 1.0 \times 10^{-6}$  mol/L, 最适 pH 值为 6.6, 酶反应表现上遵循 Michaelis-Menten 动力学, 表现米氏常数为  $2.2 \times 10^{-5}$  mol/L.

**关键词:** 酪氨酸酶, 聚吡咯, 电化学固定化, 酶电极, 生物电化学活性

**中图分类号:** O 646.2, O 657.1

**文献标识码:** A

工业废水中酚类化合物及神经传递质儿茶胺的检测在环境控制及临床分析中具有重要意义. 影响生物传感器性能的关键是固定化技术, 在已有的报道中, 固定酪氨酸酶的方法多为吸附法<sup>[1]</sup>、化学交联法<sup>[2]</sup>及包埋法<sup>[3]</sup>. 近年来, 用电化学聚合高分子膜固定生物敏感元件已发展成为制作生物传感器的一种新方法<sup>[4]</sup>. 它具有制作简单、重现性好和响应快等优点, 因而越来越受到人们的重视. 目前用该方法固定的酶类主要有葡萄糖氧化酶<sup>[5]</sup>、黄嘌呤氧化酶<sup>[6]</sup>和尿酸酶<sup>[7]</sup>等. 本文采用一步法在恒电位聚合吡咯的过程中, 使酪氨酸酶直接固定在导电聚吡咯膜内, 探讨了对甲苯酚响应的电极过程, 并对所制得的聚吡咯酪氨酸酶电极的生物电化学活性进行了考察.

## 1 实验部分

### 1.1 仪器与试剂

AD-3 型极谱仪(江苏金坛分析仪器厂), X-Y 函数记录仪(上海大华仪器厂), pH S-3C 型精密酸度计、EPM-810 电子探针分析仪(日本岛津). 实验用三电极体系, 工作电极、辅助电极均为铂片电极, 参比电极为饱和甘汞电极(SCE). 文中的电极电位均相对于 SCE, 实验温度为 25

酪氨酸酶(Tyrosinase, EC1.14.18.1, Sigma 公司), 2400 U/mg, 冷藏保存. 吡咯(Fluka 出品), 使用前经减压蒸馏. 不同 pH 值的 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲溶液. 其它试剂均为分析纯, 实

收稿日期:1999-12-14

\* 通讯联系人:颜流水 验用水为二次蒸馏水.

## 1.2 固定化酶电极的制备

将铂片电极用 6 号金相砂纸磨光,置于浓  $\text{HNO}_3$  中数秒种,然后超声清洗,最后用二次蒸馏水清洗后作为工作电极,待用.在 0.9 V 的恒电位下于静止溶液中进行聚合 15 min.聚合介质为含 0.01 mol/L Py 和 0.1 mol/L  $\text{NaClO}_4$  及 0.03 mg/mL 酪氨酸酶的 pH 为 6.6 磷酸盐缓冲溶液.聚合完毕获得了亮黄色致密膜电极.取出电极,用二次蒸馏水冲洗,待用.不用时将酶电极放入 pH 6.6 磷酸盐缓冲溶液中,4℃ 冰箱保存.

## 1.3 酶电极性能测试

以对甲苯酚为底物,在磷酸盐缓冲溶液中和搅拌情况下,由循环伏安法测定酶电极对底物响应的 CV 曲线,记录酶反应产物对甲基邻苯二醌在电极上的还原峰电流,以此进行定量.

# 2 结果与讨论

## 2.1 吡咯的电聚合

影响恒电位法聚合膜质量的主要因素有聚合电位和单体浓度.当吡咯浓度为 0.01 mol/L ( $\text{NaClO}_4$  介质),聚合电位在 0.3 ~ 1.5 V 范围内,均可获得亮黄色的导电聚吡咯膜.但将所得膜电极在 pH 6.6 磷酸盐缓冲溶液中进行 CV 扫描,发现聚合电位低于 0.7 V 或高于 1.0 V 时,制得的膜经多次循环扫描(扫描范围 0.0 ~ 1.0 V,扫速 100 mV/s)后膜易溶解.为此将聚合电位选定在 0.9 V.膜的外观随单体浓度的增大由亮黄色 棕黄色 粗糙黑色.吡咯浓度在 0.01 ~ 0.05 mol/L 范围内,膜质量较好.以下实验选定的吡咯浓度为 0.01 mol/L.

## 2.2 酪氨酸酶在 PPy 中的固定化

采用一步法使酪氨酸酶在吡咯的电聚合过程中有效地固定在聚吡咯膜中.聚合溶液的 pH 值是关键因素.比较三种不同 pH 聚合底液固定化制造的 PPy/酶电极与不含酶时电聚合 (pH = 6.6) 制造的 PPy 电极的 CV 图,发现 pH = 4.0 时,PPy/酶电极的 CV 图与 PPy 电极的 CV 图完全相同,即均存在两对氧化还原峰 (0.56/0.41 V 和 1.15/1.06 V);而 pH = 8.0 时,则因聚合速度相当慢,难于成膜;pH = 6.6 时,PPy/酶电极的 CV 图与 PPy 电极的 CV 相似(如图 1 所示),第一对峰的峰电位为 0.49/0.43 V,氧化峰负移 70 mV,第二对峰的氧化峰消失,还原峰正移 140 mV.以上结果表明,pH = 4.0 时酶分子难嵌入聚吡咯膜内,pH = 8.0 时吡咯难聚合,pH = 6.6 时,酪氨酸酶分子能通过和聚吡咯分子的相互作用有效地嵌入膜内.

根据吡咯电聚合机理<sup>[8]</sup>和阴离子对聚吡咯电化学性质影响<sup>[9]</sup>,以上结果可解释为,吡咯在水溶液中的电聚合首先是单体吡咯分子的质子化,然后质子化单体发生电化学氧化.因此,

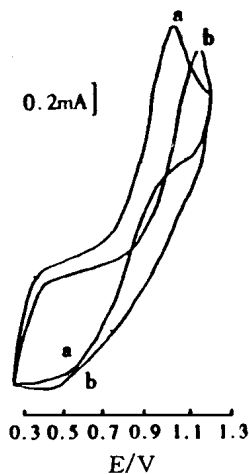


图 1 PPy 膜电极 (a) 与 PPy/酪氨酸酶电极 (b) 在 pH 6.6 磷酸盐缓冲溶液中的循环伏安图

Fig. 1 Cyclic voltammograms of the PPy film electrode (a) and the PPy/tyrosinase film electrode (b) in 0.1 mol/L phosphate buffer solution (pH 6.6) scan rate: 100 mV/s

电聚合需要在酸性或中性溶液中进行. 酪氨酸酶的等电点为 4.7<sup>[10]</sup>, 在 pH 6.6 溶液中带负电, 与电聚合过程中形成的阳离子自由基 Py<sup>+</sup> 或 PPy<sup>+</sup> 存在静电相互作用和氢键作用, 因此酶分子可嵌聚吡咯链中, 并对聚吡咯的电化学行为产生影响. 而在 pH 4.0 的溶液中, 酶分子不存在上述行为, 难于掺入聚吡咯膜内. 从获得的 PPy 膜和 PPy/ 酶膜的 SEM 图(见图 2)也可证实酶分子能有效掺入聚吡咯膜内并影响成膜机理. 可以看出 PPy 膜是松散纤维结构, 而 PPy/ 酶膜呈均匀分布的粒状结构, 且酶分子在膜内有比较自由的微环境, 有利于维持酶的较高催化活性.

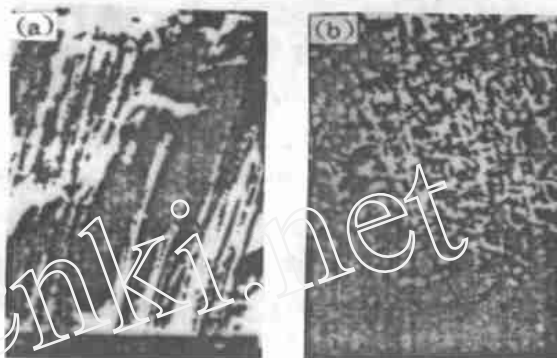


图 2 PPy 膜(a)与 PPy/ 酪氨酸酶膜(b)的 SEM 图

Fig. 2 SEM photographs of the PPy film(a) and the PPy/tyrosinase film (b)

### 2.3 PPy/ 酶电极的响应特性

PPy/ 酶电极在含  $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$  对甲苯酚磷酸盐缓冲溶液 (pH 6.6) 中的 CV 曲线如图 3 所示. 图上显示一对氧化还原峰 (0.30/ - 0.07V). 而在相同条件下 PPy 电极则未出现该氧化还原峰 (图略). 因此, 可认为该峰 (对) 是由酶反应生成的产物在电极上发生氧化还原反应的结果. 根据酪氨酸酶催化反应机理, 其反应式可表示为:

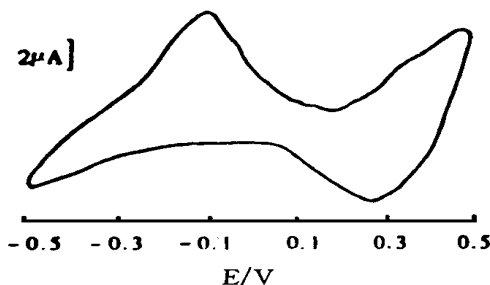


图 3 聚吡咯/ 酪氨酸酶电极在  $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  对甲苯酚磷酸盐缓冲溶液 (pH 6.6) 中的循环伏安图

Fig. 3 Cyclic voltammogram of PPy/tyrosinase film electrode in 0.1 mol/L phosphate buffer (pH 6.6) containing  $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol L}^{-1}$  p-cresol scan rate: 100 mV/s

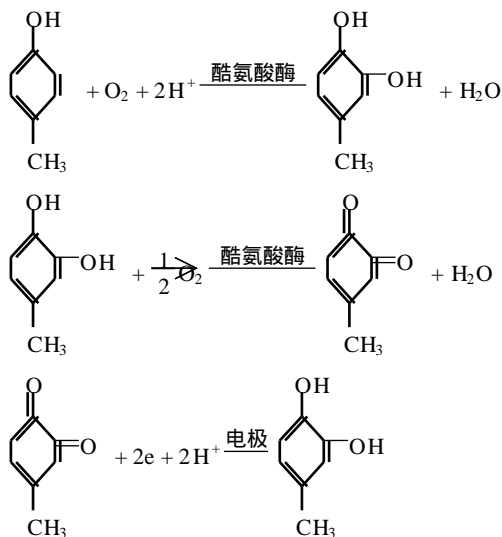


图 4 示出 PPy/ 酶电极响应对甲苯酚的还原峰电流在  $5.0 \times 10^{-8} \sim 10 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$  浓度范围内与底物浓度成正比. 可见该电极具有很高的灵敏度和很低的检测限, 远优于应用普通的包埋、化学交联或共价键合固定化制造的传感器. 尽管膜内含膜量很低, 但表现出的活性很高, PPy 基体对底物或产物在膜内的扩散阻力小. 由图 4 实验结果, 依据 Michaelis-Mehten 方程的 Eadie-Hofstee 表达式  $I = I_{\max} - K_M^{\text{app}} (I/C)$ , 作  $I \sim I/C$  图, 得一直线, 求得该固定化酶的表观米氏常数  $K_M^{\text{app}}$  为  $2.2 \times 10^{-5} \text{ mol/L}$ .

实验还表明对甲苯酚浓度为  $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$  时, 在  $\text{pH} = 6 \sim 8$  范围内 PPy/ 酶电极均有很好的响应, 最适的  $\text{pH}$  为 6.6. 使用制得的 PPy/ 酶电极, 每周测定一次它对  $1.0 \times 10^{-6} \text{ mol/L}$  底物的响应电流, 其第 1 周后及第 7 周后的活性分别为初期活性的 82% 和 69%, 亦即存放初期活性下降较快, 后期变化较小. 可见该固定化酶电极具有良好的贮存稳定性.

### 3 结 论

在恒定电位  $0.7 \sim 1.0 \text{ V}$  和中性或弱酸性的磷酸盐缓冲溶液中, 酪氨酸酶能在吡咯的电化学聚合成膜过程中有效地固定在聚吡咯膜内. 制得的聚吡咯/ 酪氨酸酶电极稳定性好, 对甲苯酚响应的灵敏度高. 该电极对其它酚类化合物响应的动力学模型及其于在线监测中的应用有待进一步研究.

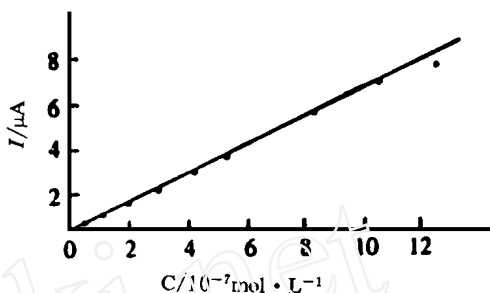


图 4 酶电极响应电流对甲苯酚浓度关系曲线  
Fig. 4 The response curve of p-cresol at the PPy/ tyrosinase electrode

## Preparation and Characteristics of a Enzyme Electrode Based on Immobilization of Tyrosinase in Electropolymerized Polypyrrole Film

YAN Liu-shui<sup>\*</sup>, WEI Qia, WANG Cheng-Yi, SHI Rong-rong, MA Xiao-tong  
(Dept. of Environmental and Chem. Eng., Nanchang Institute of Aeronautical Technology, Nanchang 330034, China)

**Abstract:** A sensitive and stable amperometric enzyme electrode was constructed, based on the immobilization of tyrosinase in potentiostatically electropolymerized polypyrrole film at a platinum electrode. The influence of pH and potential on immobilization was discussed. SEM micrographs and CV curves of films obtained before and after incorporation of tyrosinase molecular were analyzed and compared each other. The enzyme electrode responds linearly to p-cresol over a

concentration range of  $5 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-6}$  mol/L with an optimum pH of 6.6, It exhibited kinetic characteristics of the typical enzyme - catalyzed reaction with an apparent Michaelis constant of  $2.2 \times 10^{-5}$  mol/L.

**Key words:** Tyrosinase, Polypyrrole, Electrochemical immobilization, Enzyme electrode  
Bioelectrochemical activity

## References:

- [1] Hu Xiaoya, Leng Zongzhou. Response characteristics of phenol on a tyrosinase biosensor[J]. Environmental Science, 1995, 16(3):1 (in Chinese).
- [2] Vieira I C, Filho O F. Amperometric biosensor for the determination of phenols using a crude extract of sweet potato[J]. Anal. Lett, 1997, 3(5):895.
- [3] Lindgren A, Rnzgas T, Emneus J, et al. Flow injection analysis of phenolic compounds with carbon paste electrodes modified with tyrosinase purchased from different companies[J]. Anal. Lett., 1996, 29(7): 1 055.
- [4] Deng Jiaqi, Zhang Zhanen. Immobilized enzyme biosensor by electropolymerization polymer films and its proceedings[J]. J. Anal Sci., 1995, 11(4):71 (in Chinese).
- [5] Zheng Zhimin, Wu Huihuang, Zhou Shaomin. Study on electrochemical immobilization of glucose oxidase [J]. Acta physico - Chimica Sinica, 1991, 7(2):163 (in Chinese).
- [6] Mu Shaolin, Xue huaiguo. Bioelectrochemical activities of the polyaniline xanthine oxidase electrode[J]. Acta Chimica Sinica, 1995, 53:521.
- [7] Kan Jinqing, Mu Shaolin. The study of properties for the polyaniline uricase electrode[J]. Acta Physico-Chimica Sinica, 1993, 9(3):345 (in Chinese).
- [8] Fang Huiqun, Wang Meiquan, Chen Hongyuan. Polymerization of pyrrole and file - growth on microelectrode [J]. Acta Chimica Sinica, 1995. 53:789 (in Chinese).
- [9] Osaka T, Naoi K, Ogano S. Effect of polymerization anion on electrochemical properties of polypyrrole and on Li/LiClO<sub>4</sub>/ Polypyrrole battery performance[J]. J. Electrochem Soc., 1988, 135(5):1 071.
- [10] Cosnier S, Innocent C. A new strategy for the construction of a tyrosinase - based amperometric phenol and O - diphenol sensors. Bioelectrochem[J]. Bioenerg., 1993, 31:147.