



## تشخیص اتانول بواسطه الکتروکال دهیدروژناز اصلاح شده با آنتراکوئینون و نانولوله های کربنی چند دیواره کربوکسیل دار

مصطفی شوریان\*

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، گیلان

**چکیده:** سنجش اتانول برپایه تولید سیگنال از نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید (NAD) که اساس فعالیت آنزیم است، تولید می‌شود. آنتراکوئینون ۲ کربوکسیلیک اسید (AQ) به‌عنوان حدواسط انتقال الکترون به NAD از آنزیم الکل دهیدروژناز (ADH) متصل می‌شود تا انتقال الکترون به سطح تسهیل شود. همچنین، نانولوله های کربنی چند دیواره کربوکسیله با هدایت الکتریکی بالا (MWCNT) پروتئین را قادر می‌سازد که بر سطح گسترده تثبیت شود. براین اساس، MWCNT ها در ابتدا بواسطه عامل اکسند نیتریک اسید ۶۵٪ و امواج تراسونیک بصورت کربوکسیله عامل دار شدند. مطالعات طیف‌سنجی فرسرخ تبدیل فوریه و میکروسکوپ الکترونی SEM عامل دار شدن MWCNT را تایید می‌کند. فعالیت الکتروکاتالیستی برای کاهش NAD با AQ و MWCNT با قابلیت اکسایش و کاهش ارتقا یافته است. اتصال کوالانس بین گروه کربوکسیلیک اسید از آنتراکوئینون یا نانولوله های کربنی با گروه آمین از NAD انجام می‌شود. الکتروکال AQ-NAD/ADH/CNT پاسخ های آمپرومتری برای تشخیص اتانول در شرایط بهینه را در گستره خطی بین ۳/۳۴ تا بالای ۲۲/۸ میکرو مولار تولید می‌کند. این الکتروکال و لتاموگرام های شبه برگشت پذیر را در ناحیه ۵۶۲- و ۴۸۸- ولت نشان می‌دهد. تهیه الکتروکال AQ-NAD/CNT دستاوردی برای زیست حسگرهای الکتروشیمیایی مبتنی بر دهیدروژناز ها است.

**واژگان کلیدی:** زیست حسگر، الکل دهیدروژناز، نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید، آنتراکوئینون ۲ کربوکسیلیک اسید، نانولوله کربنی چند دیواره.

Shourian@guilan.ac.ir

شاخص همان اتانول است، در ایجاد انواع بیماری ها از جمله انواع سرطان [۱]، فیروز و نکروز کبدی، کاتاراکت، بیماری های قلبی و عروقی، نقص های دستگاه گوارش و بیماری هایی از این قبیل نقش اساسی دارد و به‌عنوان یک فاکتور جدی شناخته می‌شود [۲]. لذا سنجش اتانول از دیدگاه های متفاوت در علوم متفاوت بسیار مهم و کاربردی است. نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئوتید (NAD<sup>+</sup>/H) یکی از مهمترین کوفاکتورهای زیستی است. این مولکول که به دو فرم اکسایش و کاهش وجود دارد، در بیش از

### ۱- مقدمه

از دیدگاه علوم زیستی الکل از جمله متابولیت هایی است که حین فرایند سوخت و ساز در بدن موجودات زنده تولید می‌شود و در برخی فعالیت های سلولی و بیماری ها نقشی اساسی دارد [۱ و ۲]. به طور کلی الکل در صنایع و علوم متفاوت از جمله صنایع دارویی و لوازم آرایشی و بهداشتی، صنایع تخمیری، غذایی، تولید نوشیدنی ها، علوم پزشکی و پایه کاربرد فراوانی دارد [۲ و ۳]. الکل



شکل ۲-۱- تصاویر میکروسکوپ الکترونی از نانولوله های کربنی عامل دار شده با بزرگنمایی ۳۰ هزار برابر.

سنجی فرابنفش انجام شد، تا مقدار فعالیت آنزیم در محلول تعیین شود [۲۰]. نانولوله های کربنی چند دیواره با قطر داخلی ۳ تا ۵، قطر خارجی ۸ تا ۱۵ نانومتر و طول تقریبی ۵۰ میکرومتر از نانو تایمز (چین) بصورت زیر کربوکسیله شده: ابتدا نانولوله های کربنی چنددیواره (۵۰ mg) در یک ویال حاوی ۱۰۰ میلی لیتر اسید نیتریک غلیظ (۶۵٪) ریخته و ویال به حمام دارای امواج اولتراسونیک به مدت ۵ ساعت (بطور تناوبی ۱۵ دقیقه استراحت) در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد منتقل می شود. بعد از فیلتراسیون نانو لوله ها به محیط دارای امواج فرسوخ تبدیل فوریه برای خشک شدن منتقل می شود [۲۱]. شکل ۲-۱ تصویر میکروسکوپ الکترونی از نانولوله های کربنی عامل دار شده در سطح الکتروود را به صورت نانولوله ها کامل سالم و خرد نشده نشان می دهد.

ساخت الکتروود آنزیمی الکل دهیدروژناز بدین گونه آغاز می شود که پیش از هر مرحله باید الکتروود کربن شیشه برهنه کامل صیقل داده شود تا عاری از هر گونه آلودگی باشد، برای این کار ابتدا سطح الکتروود کربن شیشه ای با دوغاب پودر آلومینا (با قطر ۱۰ و سپس، ۰/۳ میکرون) و شستشو با آب، تمیز و صیقلی می شود [۲۲]. در ضمن پیش از هر اندازه گیری محلول آزمایشی را به واسطه گاز نیتروژن با خلوص بالا (۹۹/۹۹ درصد) به مدت ۱۰ دقیقه اکسیژن زدایی شده و سپس، گاز نیتروژن در طول اندازه گیری بالای محلول نگه داشته می شود [۲۳]. سپس، نحوه اصلاح الکتروود کربن شیشه برهنه به ترتیب زیر دنبال می شود:

۱- الکتروود به طور الکتروشیمیایی به روش ولتامتری چرخه ای بین ۱- تا ۰/۵ ولت با سرعت رویشی ۰/۱ ولت بر ثانیه به مدت ۱۰ دقیقه در محلول ۰/۲ مولار سولفوریک اسید تمیز شود [۲۳].

۳۵۰ آنزیم نقش کوفاکتوری دارد. لازم به ذکر است غلظت غیر طبیعی این کوفاکتور بویژه فرم کاهش آن در ایجاد بیماری هایی مانند آلزایمر، پارکینسون و برخی بیماری های دیگر نقش اساسی دارد [۳۰]. پس، سنجش این کوفاکتور در زیستی و پزشکی بسیار مهم و ضروری است.

آنزیم الکل دهیدروژناز مخمر (ADH) یک آنزیم تترامر با زیرواحد های یکسان و وزن مولکولی ۱۵۰ کیلو دالتون از خانواده الکل دهیدروژناز های زنجیر متوسط است. این آنزیم دارای دو اتم بر در هر زیرواحد است که یکی نقش ساختاری و دیگری نقش کاتالستی دارد. در انسان و در برخی از حیوانات این آنزیم الکل را به آلدهید، کتون یا الکل های مفید دیگری تبدیل می کند [۴-۶]. ترکیب هایی همانند کیتوزان/نافیون، پلی ونیل الکل، تفلون، فنانترویلین، مایعات یونی و تیتانیا در کنار نانولوله های کربنی چنددیواره بر الکترودهای کربن شیشه ای به روش الکتروشیمیایی برای تشخیص الکل و  $NAD^+/H$  با آنزیم الکل دهیدروژناز مورد استفاده قرار می گیرد [۷-۱۵].

در الکتروشیمی و بیوالکتروشیمی از ویژگی ها نانولوله های کربنی بویژه ویژگی الکتریکی و رسانایی الکترونی بالا [۱۶] و ویژگی الکتروشیمیایی عالی [۱۷] برای اصلاح سطح الکتروود استفاده می شود. این نانولوله ها یا ترکیبات مخلوط با آن به عنوان مثال، در سنجش پراکسید هیدروژن [۱۶]، گلوکز [۱۸] و هموگلوبین [۱۹] کاربرد دارد.

در پژوهش حاضر، از دو روش ولتامتری چرخه ای و کرومئومتری استفاده شده است. توانایی نانولوله های کربنی و مولکول حدواسط آنتراکوئینون در نقل و انتقالات الکترونی، ما را مجاب کرد تا زیست حسگری برای اتانول طراحی و غلظت اتانول را در محیط محلول بافری سنجش کنیم.

## ۲- بخش تجربی

### ۲-۱- آماده سازی الکتروود اصلاح شده اتانول

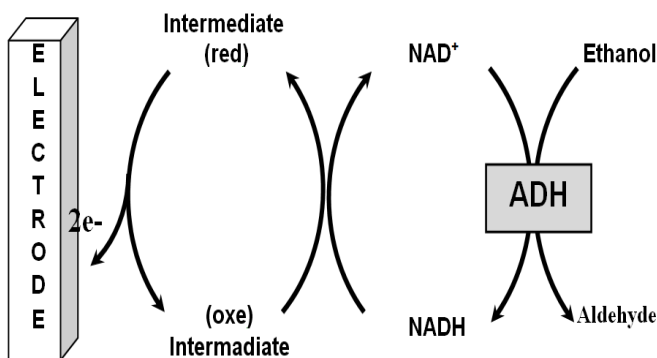
سنجش کیفیت فعالیت آنزیم الکل دهیدروژناز طبق روش سیگما و از طریق افزایش جذب در ناحیه ۳۴۰ nm با استفاده از طیف-

الکترودهای دستگاه، در ایران تولید شده‌اند. برای ثابت نگه داشتن حجم محلول فقط به مقدار ۱-۳٪ از حجم محلول افزوده می‌شود. داده‌های به‌دست آمده از دستگاه با برنامه E-Chem و برد حد فاصل (Interface) در رایانه ذخیره و پس از ویرایش‌های لازم به برنامه اکسل ارسال و گرافها رسم می‌شوند. الکترودهای شیشه‌ای که طبق روش‌ها آماده شد درون بافر قرار داده و پس از به تعادل رسیدن محلول، با روش ولتامتری چرخه ای با سرعت روبشی ۰/۱ ولت بر ثانیه و بین پتانسیل ۰ تا ۰/۷- ولت به الکترودها اصلاح شده اجازه پایداری جریان داده می‌شود پس از آن می‌توان اندازه‌گیری‌های لازم را به دو روش ولتامتری چرخه‌ای و کروئامپرومتری انجام داد. در روش ولتامتری چرخه ای سرعت روبشی ۰/۰۵ ولت بر ثانیه و در روش کروئامپرومتری از پتانسیل ۰/۵- ولت به مدت ۲۰ ثانیه استفاده می‌شود.

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- مطالعه الکترودهای اصلاح شده اتانول

آنزیم الکل دهیدروژناز (فعالیت برابر ۳۰ کیلوواحد بر میلی گرم) توانایی اکسایش الکل به آلدئید را دارد که این الکترونها صرف کاهش  $NAD^+$  و تولید NADH هستند [۲۵]. این عمل در طی یک واکنش آندی الکترون به سطح الکتروده منتقل می‌شود (شکل ۳-۱). هر دو گونه AQ و MWCNT با توجه به نوع ساختارشان ناقل الکترون به سطح هستند [۲۲، ۲۳ و ۲۶].



شکل ۳-۱ اکسایش اتانول در حضور آنزیم الکل دهیدروژناز در سطح الکتروده اصلاح شده با نانولوله های کربنی و آنتراکوئینون به‌عنوان حواسط.

۲- الکترودهای کربن شیشه ای را درون بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار با  $pH=7$  قرار داده و سپس با اعمال پتانسیل آندی ۱/۷ ولت به مدت ۵ تا ۸ دقیقه سطح الکتروده را فعال می‌کند.

۳- با چهار روش در ترتیب قرار گیری مواد بر سطح الکتروده برهنه، الکتروده آنزیمی بصورت زیر ساخته می‌شود:

الکتروده الف- ابتدا تعلیق آنتراکوئینون را بصورت قطره، ۲ میکرولیتری بر سطح الکتروده چکانده تا خشک شود (GC/AQ).

الکتروده ب- ابتدا ۲ میکرولیتر از آنتراکوئینون غلیظ را به همراه ۲ میکرولیتر کربن نانولوله کربوکسیله شده (غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر از اتانول) بر سطح الکتروده چکانده تا خشک شود (GC(MWCNT/AQ)-).

الکتروده ج- ابتدا ۲ میکرولیتر از آنتراکوئینون غلیظ بر سطح الکتروده چکانده و پس از خشک شدن ۲ میکرولیتر از کربن نانولوله کربوکسیله (۲ غلظت میلی گرم بر میلی لیتر اتانول) چکانده تا خشک شود (GC/AQ/MWCNT-).

الکتروده د- ابتدا ۲ میکرولیتر از کربن نانولوله کربوکسیله (غلظت ۲ میلی گرم بر میلی لیتر اتانول) چکانده تا خشک شود سپس ۲ میکرولیتر از آنتراکوئینون غلیظ بر سطح الکتروده چکانده می‌شود (GC/MWCNT/AQ-).

۴- پس از خشک شدن سر الکترودها، برای فعال سازی برای تشکیل پیوند آمیدی [۲۴] از محلول ۱۰ میلی مولار اتیل دی اتیل آمینوپروپیل کربودی ایمید و هیدروکسی سوکسین آمید (EDC/NHS) موجود در بافر HEPES با قدرت یونی ۰/۱ مولار و  $pH$  برابر ۶/۲ به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه می‌شود. سپس  $NAD$  با غلظت ۰/۱ مولار در بافر فسفات به مدت ۱۸ ساعت بر روی سطح الکتروده آماده شده تا به  $NAD$  کووالانسی متصل شود. سپس آنزیم الکل دهیدروژناز (۳ mg/ml) بر روی الکترودهای اصلاح شده قرار داده و به مدت دو شبانه روز انکوباسیون درون یخچال انجام و در پایان الکتروده شستشو داده می‌شود.

برای انجام آزمایش‌های الکتروشیمیایی از دستگاه پتانسیواستات گالوانواستات EG&G مدل A-۲۶۳ با سیستم سه الکترودهی استفاده شد. الکتروده مرجع آن الکتروده نقره-نقره کلراید، الکتروده کمکی آن پلاتین و الکتروده کار، کربن شیشه‌ای است. سل و

نحوه اکسایش اتانول در حضور ۴ الکترون اصلاح شده الکل دهیدروژناز بصورت زیر است :

الکترون گروه (الف) حاوی آنزیم الکل دهیدروژنازی است که انتقال الکترون به سطح الکترون را در اثر اکسایش الکل به آلدئید از طریق NAD به آنتراکوئینون هدایت می‌کند (شکل ۳-۲-الف). پیک آندی حاصل از الکترون اصلاح شده با AQ نشان می‌دهد که AQ توانایی اکسایش و کاهش NAD را دارد. در ارتباط کوالانی بین AQ با NAD، مقدمه انتقال الکترون بواسطه ساختار شیمیایی دو مولکول ناقل به سطح الکترون فراهم شده است. گزارش‌ها از الکترون اصلاح شده با آنتراکوئینون اثبات کرده اند که آنتراکوئینون یک مولکول حدواسط انتقال دهنده الکترون مناسب است [۱۹ و ۲۲] و در این پژوهش نتایج اکسایش و کاهش NAD با AQ بین آنزیم و الکترون، تایید کننده این توانایی است. حداقل مقدار الکل تشخیص داده شده توسط الکترون اصلاح شده الکل دهیدروژناز به مقدار ۱۰۰ میکرومولار است. ولتاموگرام‌های شبه برگشت پذیر تولید شده در سرعت روبشی ۰/۰۵ ولت بر ثانیه می‌باشد. مقادیر  $E_{1/2}$  و  $\Delta E_p$  به ترتیب برابر ۰/۰۶، ۰/۵۳- ولت نسبت به Ag/AgCl هستند.

در بررسی‌های الکترودهای اصلاح شده با نانولوله‌های کربنی چند دیواره و آنتراکوئینون متصل به NAD، توانایی اکسایش NADH مورد بررسی قرار گرفت. الکترون گروه (ب) انتقال الکترون به سطح را از طریق NADH به مخلوط آنتراکوئینون و نانولوله‌های کربنی کربوکسیل دار هدایت می‌کند. انتظار می‌رود در اثر اکسایش الکل به آلدئید، الکترون‌ها تا سطح الکترون از طریق NAD به هر دو حدواسط‌ها منتقل شوند و تغییرات بیشتری در پیک آندی دیده شود. در این روش از خاصیت انتقال دهندگی الکترون، آب‌گریزی ذاتی برای اتصال به سطح الکترون و اتصال کوالانس بین گروه آمین NAD و گروه‌های کربوکسیلیک اسید از مولکول‌های حدواسط استفاده شد. ولتاموگرام‌های شبه برگشت‌پذیر، مقدار الکل تشخیص داده شده با الکترون اصلاح شده را به مقدار ۶۷ میکرومولار می‌رساند که در اثر افزایش غلظت جریان پیک آندی افزایش می‌یابد. مقادیر  $\Delta E_p$  و  $E_{1/2}$  به ترتیب برابر ۰/۱۱، ۰/۵- ولت نسبت به الکترون مرجع هستند (شکل ۳-۲-ب).

در الکترون گروه (ج) روش پتانسیل اکسایش و کاهش  $E_{1/2}$  تفاوت زیادی با مقادیر پیشین ندارد. مقادیر  $\Delta E_p$  و  $E_{1/2}$  در سرعت روبشی ۰/۰۵ ولت بر ثانیه به ترتیب برابر ۰/۱۰۵، ۰/۵۱۵- ولت هستند. ولتاموگرام‌ها شبه برگشت‌پذیر هستند. مقدار الکل با الکترون اصلاح شده به مقدار ۱۷ میکرومولار تشخیص داده شده است (شکل ۳-۲-ج). در این الکترون تبدلات الکترونی برای اکسایش الکل تاکنون نسبت به الکترودهای دیگر مناسبتر انجام شده است.

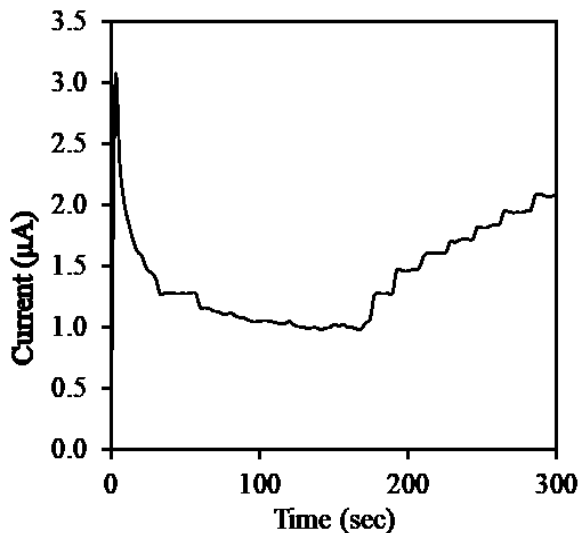
الکترون گروه (د) با انتقال الکترون از طریق NADH به آنتراکوئینونی که بر بستر حاوی نانولوله‌های کربنی کربوکسیل دار تثبیت شده، حساسیت لازم در پاسخ به اتانول مشاهده نشد. مقدار الکل تشخیص داده شده با الکترون به مقدار ۱۰۰ میکرومولار است. گراف‌های به‌دست آمده  $\Delta E_p$  و  $E_{1/2}$  در سرعت روبشی ۰/۰۵ ولت بر ثانیه را به ترتیب برابر ۰/۱۳۲، ۰/۵۲۶- ولت نشان می‌دهد (شکل ۳-۲-د). در جدول ۱ مقایسه ارقام شایستگی مربوط به الکترون گروه الف تا د نشان داده می‌شود.

در مطالعه الکتروشیمیایی اکسایش الکتروکاتالیستی اتانول در سطح الکترون اصلاح شده نتایج اثبات می‌کند که آنتراکوئینون توانایی اتصال کوالانس به NAD را دارد و می‌تواند انتقال الکترون را تسهیل کند و البته نانولوله‌های کربنی در امر انتقال الکترون سهیم هستند [۲]. الکترون اصلاح شده الکل دهیدروژناز با روش ولتامتری چرخه‌ای توانست با افزایش غلظت اتانول، افزایش جریان پیک آندی به مقدار بیشتری افزایش دهد و این بیان‌کننده کارایی مناسب الکل دهیدروژناز تثبیت شده در سطح الکترون برای اکسایش الکتروکاتالیستی اتانول است. به طوری که کمترین غلظت اتانول شناسایی شده در این روش حدود ۱۷ میکرو مولار با الکترون گروه (ج) است. در همه الکترودهای تهیه شده  $E_{1/2}$  تقریباً در گستره منفی ۰/۵ ولت به‌دست آمده است.

جدول ۱- مقایسه ی اکسایش NADH در سطح الکترون های گروه الف-د

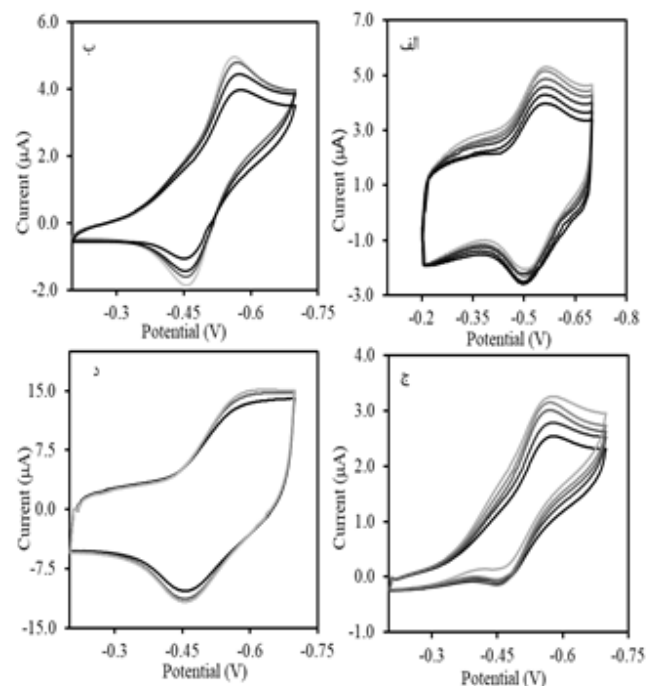
نوع الکترون	$E_{1/2}$	$\Delta E$	حداقل غلظت
الف	-۰/۵۳	۰/۰۶	۱۰۰
ب	-۰/۵	۰/۱۱	۶۷
ج	-۰/۵۱۵	۰/۱۰۵	۱۷
د	-۰/۵۲۶	۰/۱۳۲	۱۰۰

براساس جدول ۲، کمترین غلظت اتانول شناسایی شده در این روش ۰/۱۷ میکرومولار بوده است. این غلظت در مقایسه با سایر روش های الکتروشیمیایی مورد بررسی قرار گرفته است. لازم بذکر است در میان پاسخ های آمپرومتری به دست آمده شده از چهار گروه الکترودی، گروه (ج) بهترین پاسخ ها را تولید کرد.



شکل ۳- نمودار آمپرومتری اکسایش اتانول در سطح الکتروده گروه (ج). محلول بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار، pH=۷/۴.

براساس بهترین گزارش های آمپرومتری از ترکیب های متفاوت در کنار نانولوله های کربنی چند دیواره جهت سنجش اتانول با آنزیم الکل دهیدروژناز، پتانسیل های بالاتر از صفر ولت را نشان می دهند. در پژوهش حاضر، پتانسیل الکترودهای تهیه شده در گستره منفی ۰/۵۵ ولت، به عنوان یک مزیت جهت رقابت با مداخله گرهای مانند اسکوربیک اسید، اوره و ... است و عوامل مداخله گر در این پتانسیل نتوانستند اثر بگذارند. الکتروده آنزیمی اصلاح شده با آنتراکوئینون توانایی تشخیص مقادیر اتانول تا حدود ۲۳ میکرومولار را داشته و منحنی استاندارد این الکتروده با ضریب همبستگی ۰/۹۹ این یافته ها را به اثبات می رساند. از دیگر برتری های روش مذکور، اتصال کوالان مقادیر بسیار کم از NAD به بستر برای فعالیت زیست حسگری الکتروده اتانول است.



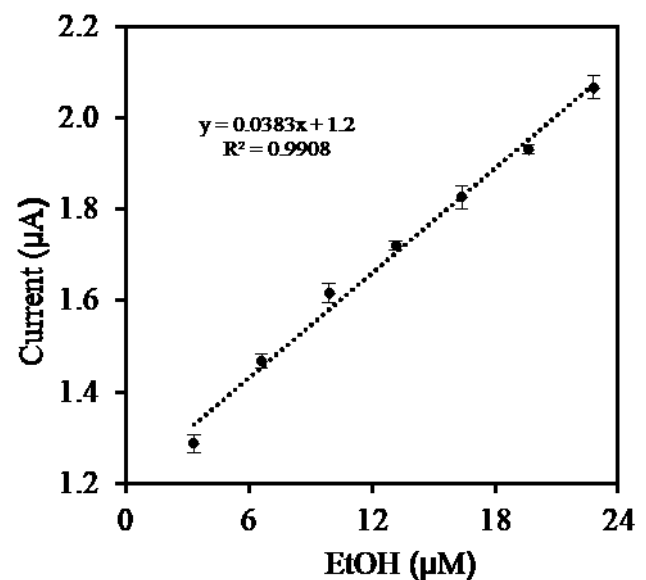
شکل ۴- ولتاموگرام های چرخه ای اکسایش الکتروکاتالیستی اتانول. (الف) الکتروده GC/AQ-NAD/ADH در غیاب و حضور اتانول به ترتیب ۰/۱۷، ۰/۱، ۰/۰۳۳، ۰/۰۶۷ و ۱/۴ میلی مولار اتانول. (ب) الکتروده GC(MWCNT/AQ)-NAD/ADH در غیاب و حضور اتانول به ترتیب ۰/۰۶۷، ۰/۰۱، ۰/۰۲ میلی مولار اتانول. (ج) الکتروده GC/AQ/MWCNT-NAD/ADH در غیاب و حضور اتانول به ترتیب ۰/۰۱۷، ۰/۰۳۳، ۰/۰۶۷ میلی مولار اتانول (د) الکتروده GC/MWCNT/AQ-NAD/ADH در غیاب و حضور اتانول به ترتیب ۰/۰۱ و ۰/۰۲ میلی مولار اتانول. همه آزمایش ها در سل ۳ میلی لیتر بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار با pH=۷/۴ در سرعت روبشی ۰/۰۵ ولت بر ثانیه انجام شده است (با افزایش غلظت اتانول جریان پیک آندی افزایش می یابد).

مطالعه الکتروشیمی اکسایش الکتروکاتالیستی اتانول در سطح الکتروده اصلاح شده با روش آمپرومتری از غلظت های متفاوتی از اتانول در سل الکتروشیمیایی حاوی بافر فسفات با pH=۷/۴ استفاده شد. با افزایش غلظت و افزایش مجاورت اتانول با آنزیم تثبیت شده بر سطح الکتروده اصلاح شده، الکتروده گروه ج بهتر از مرحله پیش، اکسایش را در روش آمپرومتری انجام داد. همان گونه که در شکل ۳-۳ نمایان است، با افزایش غلظت، افزایش جریان آندی را به مقدار بیشتری دارا است. با رسم نمودار استاندارد معادله خطی مابین غلظت ۳/۳۴ تا ۲۲/۸ میکرومولار اتانول و حساسیت تقریبی برابر ۰/۰۴ میکرو آمپر بر میکرومولار حاصل شد و این نشان دهنده کارایی مناسب الکتروده اصلاح شده گروه (ج) برای اکسایش الکتروکاتالیستی است (شکل ۳-۴).

جدول ۲- جدول مقایسه ی اکسایش اتانول در سطح الکتروکد کربن شیشه اصلاح شده با نانولوله های کربنی چنددیواره با سایر سیستم های الکتروشیمیایی

Composite	Voltage (V)	DOL ( $\mu\text{M}$ )	NAD (mM)	Linear range
CHIT-NAD/MWCNT/Nafion[7]	+0.4	8	bond	8 $\mu\text{M}$ -20mM
PLL/CA-MWCNT[8]	+0.7	1700	10	16.6-66.2 mM
MWCNT-Nafion[9]	+0.5	3	40	Up to 0.1 mM
Au <sub>coil</sub> -MWCNT-Teflon[10]	+0.3	4.7	3	0.3-7 mM
MWCNT-CHIT[11]	+0.7	0.52	10	4 $\mu\text{M}$ -2.5 mM
PD/MWCNT[12]	0.0	300	0.2	Up to 7 mM
MWCNT/IL/NAD <sup>+</sup> [13]	+0.05	0.5	0.08	0.06-0.9 mM
MWCNT-titania-Nafion[14]	+0.5	5	1	10 $\mu\text{M}$ -50 mM
PVA/MWCNT[15]	+0.6	13	15	Up to 1.5 mM
AQ-MWCNT-NAD[this work]	-0.55	0.17	bond	Up to 22.8 $\mu\text{M}$

(PVA): poly vinyl alcohol. (MWCNT): multiwalled carbon nanotube. (CHIT): chitosan. (PLL): poly-L-lysine. (CA): carminic acid. (PD): 1, 10 phenanthroline 5, 6 dione. (IL): ionic liquid.



شکل ۳-۴- نمودار استاندارد اکسایش اتانول بوسیله الکتروکد گروه (ج) با روش آمپرومتری

که سبب شده در انجام آزمایش‌ها از هدررفت این مولکول با ارزش جلوگیری کند. عملکرد الکتروکد آنزیمی اصلاح شده با آنتراکوئینون در برابر اتانول به صورت ولتاموگرام‌های شبه برگشت‌پذیر و همچنین، وجود جریان بالای به دست آمده توانایی ارتقاء و کیفیت سنجش اتانول را در برخواهد داشت.

## ۴- نتیجه‌گیری

در این پژوهش، روش جدیدی برای تثبیت آنزیم بر سطح الکتروکد کربن شیشه معرفی می‌شود. همچنین، آنتراکوئینون به عنوان یک هادی انتقال الکترونی با اتصال کوالانی به NAD براساس پیوند آمیدی، شرایط را برای تثبیت بر بستر مهیا می‌سازد و تسهیل انتقال الکترونی را به سطح الکتروکد فراهم می‌کند. آنتراکوئینون اکسید کننده مناسبی برای NADH است و از طرفی، NAD به-

عنوان یک کوفاکتور گران قیمت، بازیابی آن در این سیستم به خوبی انجام شده، که از لحاظ اقتصادی نیز مقرون به صرفه است. الکتروکد آنزیمی الکل دهیدروژناز اصلاح شده با آنتراکوئینون و نانولوله‌های کربنی عامل‌دار شده نیز کارایی بالایی برای سنجش اتانول نشان داده است. براساس پاسخ‌های الکتروشیمیایی در گستره منفی منجر شده که مداخله‌گرها توانایی تاثیر نتوانند داشته باشند.

## تقدیر و تشکر

این پژوهش حاصل طرح انجام شده در دانشگاه گیلان است، که با حمایت مالی این دانشگاه انجام شد. بنابراین، از اساتید محترم بیوشیمی و معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان برای فراهم آوردن امکانات لازم برای انجام این مطالعات تشکر می‌کند.

## مراجع

- [1] P. Boffetta, M. Hashibe, "Alcohol and cancer," The lancet oncology, 7, 149-156, 2006.
- [2] E. Akyilmaz, E. Dinçkaya, "An amperometric microbial biosensor development based on Candida tropicalis yeast cells for sensitive determination of ethanol," Biosensors and Bioelectronics, 20, 1263-1269, 2005.
- [3] Y. Kourkoutas, M. Kanellaki, A. Koutinas, "Apple pieces as immobilization support of various microorganisms," LWT-Food Science and Technology, 39, 980-986, 2006.
- [4] H. JÖRNVALL, "The primary structure of yeast alcohol dehydrogenase," European journal of Biochemistry, 72, 425-442, 1977.
- [5] H. Eklund, J.-P. Samama, L. Wallén, C.-I. Brändén, Å. Åkeson, T. A. Jones, "Structure of a triclinic ternary complex of horse liver alcohol dehydrogenase at 2.9 Å resolution," Journal of molecular biology, 146, 561-587, 1981.

- [13] H. Teymouriana, A. Salimia, R. Hallaj, "Electrocatalytic oxidation of NADH at electrogenerated NAD<sup>+</sup> oxidation product immobilized onto multiwalled carbon nanotubes/ionic liquid nanocomposite: Application to ethanol biosensing," *Talanta*, 90, 91- 98, 2012.
- [14] H.N. Choi, Y.K. Lyu, J.H. Han, W.Y. Lee, "Amperometric ethanol biosensor based on carbon nanotubes dispersed in sol-gel-derived Titania-Nafion composite film," *Electroanalysis*, 19, 1524-1530, 2007.
- [15] Y.C. Tsai, J.D. Huang, C.C. Chiu, "Amperometric ethanol biosensor based on poly (vinyl alcohol)-multiwalled carbon nanotube-alcohol dehydrogenase biocomposite," *Biosensors and Bioelectronics*, 22, 3051-3056, 2007.
- [16] M. Wang, F. Zhao, Y. Liu, S. Dong, "Direct electrochemistry of microperoxidase at Pt microelectrodes modified with carbon nanotubes," *Biosensors and Bioelectronics*, 21, 159-166, 2005.
- [17] S. Ding, S. R. Das, B. J. Brownlee, K. Parate, T. M. Davis, L. R. Stromberg, E. K. Chan, J. Katz, B. D. Iverson, J. C. Claussen, "CIP2A immunosensor comprised of vertically-aligned carbon nanotube interdigitated electrodes towards point-of-care oral cancer screening," *Biosensors and Bioelectronics*, 117, 68-74, 2018.
- [18] J. Chen, W.-D. Zhang, J.-S. Ye, "Nonenzymatic electrochemical glucose sensor based on MnO<sub>2</sub>/MWNTs nanocomposite," *Electrochemistry Communications*, 10, 1268-1271, 2008.
- [19] A. Banaei, M. Shourian, F. Dashtestani, K. Eskandari, "Sensitive Detection of Human Hemoglobin by MWCNTs-ionic Liquid:
- [6] J. An, Y. Nie, Y. Xu, "Structural insights into alcohol dehydrogenases catalyzing asymmetric reductions," *Critical reviews in biotechnology*, 39, 366-379, 2019.
- [7] M. Zhang, W. Gorski, "Amperometric Ethanol Biosensors Based on Chitosan-NAD<sup>+</sup>-Alcohol Dehydrogenase Films," *Electroanalysis*, 23, 1856-1862, 2011.
- [8] Y.H. Ho, A. P. Periasamy, S.M. Chen, "Amperometric Ethanol Biosensor Based on Alcohol Dehydrogenase Immobilized at Poly-L-Lysine Coated Carminic Acid Functionalized Multiwalled Carbon Nanotube Film," *International Journal of electrochemical science*, 6, 3922-3937, 2011.
- [9] H.W. Liaw, J.M. Chen, Y.C. Tsai, "Development of an Amperometric Ethanol Biosensor Based on a Multiwalled Carbon Nanotube-Nafion-Alcohol Dehydrogenase Nanobiocomposite," *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 6, 2396-2402, 2006.
- [10] J. Manso, M.L. Mena, P. Yanez-Sedeno, J. M. Pingarron, "Alcohol dehydrogenase amperometric biosensor based on a colloidal gold-carbon nanotubes composite electrode," *Electrochimica Acta*, 53, 4007-4012, 2008.
- [11] C.A. Lee, Y.C. Tsai, "Preparation of multiwalled carbon nanotube-chitosan-alcohol dehydrogenase nanobiocomposite for amperometric detection of ethanol," *Sensors and Actuators B*, 138, 518-523, 2009.
- [12] X. Mao, Y. Wu, L. Xu, X. Cao, X. Cui, L. Zhu, "Electrochemical biosensors based on redox carbon nanotubes prepared by noncovalent functionalization with 1,10-phenanthroline-5,6-dione," *Analyst*, 136, 293-298, 2011.

Anthraquinone Modified Electrode,” *Nanoscience and Nanotechnology-Asia*, 9, 479-485, 2019.

[20] C.C. Worthington, *Worthington enzyme manual: enzymes and related biochemicals*: Worthington Biochemical Corporation, 1988.

[21] K. Balasubramanian, M. Burghard, “Chemically functionalized carbon nanotubes,” *Small*, 1, 180-92, 2005.

[22] M. Shourian, H. Ghourchian, “Biosensing improvement of horseradish peroxidase towards hydrogen peroxide upon modifying the accessible lysines,” *Sensors and Actuators B: Chemical*, 145, 607-612, 2010.

[23] N. Mogharrab, H. Ghourchian, “Anthraquinone 2-carboxylic acid as an electron shuttling mediator and attached electron relay for horseradish peroxidase,” *Electrochemistry Communications*, 7, 466-471, 2005.

[24] G. T. Hermanson, *Bioconjugate techniques*: Academic press, 2013.

[25] L. Wu, X. Zhang, H. Ju, “Detection of NADH and ethanol based on catalytic activity of soluble carbon nanofiber with low overpotential,” *Analytical chemistry*, 79, 453-458, 2007.

[26] J. Zhang, H. Zou, Q. Qing, Y. Yang, Q. Li, Z. Liu, X. Guo, Z. Du, “Effect of Oxidation on carbon nanotube structure,” *The Journal of Physical Chemistry B*, 107, 3713-3718, 2003.





# Detection of Ethanol by Alcohol Dehydrogenase Modified Electrode with Anthraquinone and Carboxylated Multiwalled Carbon Nanotubes

Mostafa Shourian\*

Department of Biology, Faculty of Sciences, University of Guilan, Rasht

**Abstract:** The detection of ethanol is based on the signal produced by nicotinamide adenine dinucleotide (NAD), the product of the enzymatic reaction. Anthraquinone 2-carboxylic acid (AQ) as electron shuttling mediator was attached to NAD of alcohol dehydrogenase (ADH) to facilitate the electron transferring. Also, multiwalled carbon nanotubes (MWCNTs) for the high electrical conductivity, MWCNTs capability for functionalization and large surface were used as carriers for protein immobilization. Based on, MWCNTs at first were functionalized with carboxyl groups by oxidation with nitric acid (65%) and ultrasonic dispersion. FTIR and SEM studies confirm the formation of carboxylic acid functionalized MWCNTs. The electrocatalytic activities of AQ and MWCNT improve towards the reduction of NAD. Covalent attachment of carboxylic acid of anthraquinone molecules and carboxylic acid functionalized MWCNTs to the amine group of NAD established. The CNT/AQ-NAD/ADH electrode was applied for amperometric sensing of ethanol in the linear concentration range from 3.34 up to 22.8  $\mu\text{M}$  at optimum conditions and specifically, the attached ADH on NAD-AQ/CNT/GC electrode showed quasi-reversible cyclic voltammogram with the formal potential of -0.562 and -0.488V. The CNT/AQ-NAD electrode represents a general approach to the development of dehydrogenases-based electrochemical biosensors.

**Keywords:** Biosensor; Alcohol dehydrogenase; Nicotinamide adenine dinucleotide; Anthraquinone 2-carboxylic acid; Multiwalled carbon nanotubes