



ساخت زیست حسگر الکتروشیمیایی شناسایی اتانول با استفاده از الکتروپلاتین اصلاح شده

سمیرا خالق پناه^۱ | مصطفی رحیم نژاد^{۱*} | افشین فرح بخش^۲ | رزان زختاره^۱

۱ گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی نوشیروانی بابل، بابل، مازندران

۲ دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی قوچان، قوچان، خراسان رضوی

چکیده: در این پژوهش، آنزیم الکل اکسیداز با استفاده از کیتوسان در سطح الکتروپلاتین تثبیت شد تا یک زیست حسگر الکتروشیمیایی دقیق و حساس برای شناسایی و اندازه گیری اتانول در فاز مایع طراحی شود. مطالعات آمپرومتری در محلول بافر فسفات ۰/۱ M حاوی اتانول انجام شد. با توجه به نتایج به دست آمده، شرایط بهینه برای عملکرد زیست حسگر در دمای ۳۵ °C و pH برابر با ۸ به دست آمد. برای بهبود عملکرد زیست حسگر از نانوذرات طلا در ساخت آن استفاده شد. مقایسه نتایج حاصل از زیست حسگر پیش و پس از افزودن این نانوذرات، افزایش چهار برابری در شدت جریان تولید شده از اکسایش اتانول را نشان داد. گستره ی خطی زیست حسگر اصلاح شده با نانوذرات طلا، ثابت میکائیلیس- منتن و حساسیت آن نیز به ترتیب برابر با ۲/۶۶ mM^{-۱} و ۰/۰۱۶ mM^{-۱} cm^۲ محاسبه شدند.

واژه های کلیدی: زیست حسگر الکتروشیمیایی، اتانول، الکل اکسیداز، الکتروپلاتین، نانوذرات طلا.

rahimnejad@nit.ac.ir

۱- مقدمه

اهمیت است. همچنین، اندازه گیری سریع و دقیق اتانول در سنجش های بالینی و قانونی برای بررسی مقدار آن در خون، بزاق، ادرار و بازدم انسان بسیار مهم است [۳-۱]. به ویژه در تولید نوشیدنی های الکلی، اندازه گیری دقیق اتانول به دلیل مقررات سخت گیرانه ی اتحادیه ی اروپا برای برچسب زدن به نوشیدنی ها ضروری است [۴ و ۵]. همچنین، این مسأله در کشورهای اسلامی برای اطمینان از حلال بودن فراورده اهمیت ویژه ای دارد [۶]. افزایش غلظت اتانول تا سطوح سمی در فرایندهای تخمیر و تقطیر، موجب ایجاد التهاب، ورم ملتحمه ی چشم و سوزش پوست می شود. همچنین، مسمومیت با الکل در غلظت بالای اتانول رخ

الکل ها، گروه مهمی از ترکیبات شیمیایی پر کاربرد هستند که شناسایی و تعیین مقادیر کمی آن ها با حساسیت، گزینش گری و دقت بالا در حوزه های متفاوت امری ضروری به نظر می رسد. در میان الکل ها، اندازه گیری اتانول به دلیل اثرگذاری بر روان انسان، سمی بودن و کاربردهای متنوع آن، مورد توجه بسیاری قرار گرفته است. تعیین غلظت اتانول در فرایندهای صنعتی بی شماری از جمله صنایع غذایی، آشامیدنی (تولید انواع شراب و آبجو)، دارویی، تخمیری، پالپ و آرایشی و بهداشتی برای کنترل کیفیت فراورده ها و جلوگیری از بروز اختلال حین فرایند تولید حائز

می‌دهد. بنابراین، ارائه‌ی روشی ساده، سریع، دقیق و اقتصادی برای شناسایی و تعیین مقدار اتانول در آنالیزهای پزشکی و قانونی و کنترل فرایند تخمیر و تضمین کیفیت فرآوردهات تولیدشده در صنایع متفاوت مورد نیاز است [۲].

تاکنون از روش‌های تجزیه‌ای متفاوتی مانند کروماتوگرافی گازی^۱، کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنجی جرمی^۲، کروماتوگرافی مایع^۳، کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی جرمی^۴، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا^۵، گرماسنجی^۶، شکست‌سنجی^۷، هیدرومتری^۸، الکتروفورز موئن^۹، طیف‌سنجی رامان^{۱۰}، طیف‌سنجی مادون قرمز^{۱۱} و طیف‌سنجی فرورسرخ تبدیل فوریه^{۱۲} برای شناسایی و اندازه‌گیری اتانول استفاده شده است. اغلب این روش‌ها، دقیق و قابل اطمینان هستند؛ اما به‌کارگرفتن آن‌ها به زمان زیاد، تجهیزات پیچیده و گران‌قیمت و افراد متخصص نیازمند است [۲ و ۳ و ۱۰-۷]. بنابراین، استفاده از یک روش جدید برای غلبه بر این مشکلات ضروری است. به‌نظر می‌رسد زیست‌حسگرهای الکتروشیمیایی به‌دلیل برخورداری از مزایایی همچون کوچک و قابل حمل بودن، سادگی، دقت، گزینش‌پذیری و قیمت مناسب جایگزین مناسبی برای روش‌های مذکور به‌شمار می‌روند [۸].

آنزیم‌ها، درشت مولکول‌های پروتئینی هستند که در واکنش‌های زیستی به‌عنوان کاتالیست عمل می‌کنند و موجب افزایش سرعت واکنش‌ها می‌شوند و با توجه به بهره‌مندی از فعالیت و گزینش‌پذیری بسیار مطلوب از متداول‌ترین ترکیبات زیستی مورد استفاده در ساختمان زیست‌حسگرها هستند [۱۱]. الکل اکسیداز^{۱۳}، الکل دهیدروژناز^{۱۴} وابسته به نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید^{۱۵} و الکل دهیدروژناز وابسته به پیرولوکینونولین کیونن^{۱۶} از جمله

¹ Gas chromatography (GC)

² Gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS)

³ Liquid chromatography

⁴ Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS)

⁵ High performance liquid chromatography (HPLC)

⁶ Colorimetry

⁷ Refractometry

⁸ Hydrometry

⁹ Capillary electrophoresis

¹⁰ Raman spectrometry

¹¹ Infrared spectroscopy

¹² near-infrared (NIR) spectroscopy

¹³ Alcohol oxidase (AOX)

¹⁴ Alcohol dehydrogenase (ADH)

¹⁵ Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD)

¹⁶ Pyrroloquinoline quinone (PQQ)

آنزیم‌های مناسب به‌عنوان بخش‌گرایش‌گر زیستی در زیست-حسگرهای اتانول هستند. الکل دهیدروژنازها، اکسیداسیون برگشت‌پذیر الکل‌های آروماتیک و آلیفاتیک اولیه به استثنای متانول را کاتالیز می‌کنند و برای این منظور به حضور NAD^+ یا PQQ به‌عنوان کوفاکتور نیاز دارند. به‌طور کلی، زیست‌حسگرهای مبتنی بر الکل اکسیداز ساده‌تر هستند؛ چراکه برای تولید مجدد کوفاکتور فقط به اکسیژن مولکولی احتیاج دارند [۳-۱ و ۶ و ۸]. این آنزیم‌ها با استفاده از اکسیژن مولکولی، اتانول را اکسید کرده و هیدروژن پراکسید و استالدهید تولید می‌کنند [۱۲ و ۱۳].

کیتوسان یک بسپار زیستی غیرسمی، زیست‌سازگار و زیست-تخریب‌پذیر است که از مزایایی همچون توانایی تشکیل فیلم عالی، استحکام مکانیکی خوب، نفوذپذیری بالا و خاصیت ضد میکروبی برخوردار است و به‌دلیل حضور گروه‌های آمین و هیدروکسیل در ساختارش به‌طور گسترده برای تثبیت آنزیم‌ها و دیگر مولکول‌های زیستی در زیست‌حسگرها به‌کار گرفته شده است. با این حال، رسانایی ضعیف این ترکیب، اغلب موجب حساسیت پایین در اندازه‌گیری آنالیت می‌شود [۱۴ و ۱۵]. برای غلبه بر این مشکل، استفاده از نانوذرات طلا راهکار مناسبی است. این نانوذرات به‌دلیل برخورداری از ویژگی‌هایی نظیر زیست-سازگاری، رسانایی و نسبت سطح به حجم بالا می‌توانند انتقال الکترون بین پروتئین‌های اکسید-احیا و سطح الکتروود را تسهیل کنند. نانوذرات طلا توانایی فراهم کردن یک سطح پایا برای تثبیت مولکول‌های زیستی با حفظ فعالیت آن‌ها را دارند و انتقال مستقیم الکترون بین پروتئین‌های ردوکس و الکتروود را امکان‌پذیر می‌کنند؛ این امر سبب می‌شود که تعامل الکتروشیمیایی بدون نیاز به واسطه‌های انتقال الکترون شکل بگیرد. مزیت دیگر نانوذرات طلا، امکان کنترل اندازه و مورفولوژی سطح آن‌ها به‌صورت تجربی و با تنظیم شرایط و پارامترها حین فرایند سنتز است [۱۶-۱۸].

در این پژوهش، با استفاده از یک الکتروود پلاتین اصلاح‌شده با آنزیم الکل اکسیداز، شناسایی و اندازه‌گیری اتانول در مسیری ساده، سریع و دقیق، تحقق پذیرفت. زیست‌حسگر حاصل با استفاده از روش آمپرومتری مورد بررسی قرار گرفت و اثر عوامل مؤثر بر عملکرد آن و شرایط بهینه نیز مشخص شدند. همچنین، از نانوذرات طلا برای تسهیل انتقال الکترون‌ها و بهبود عملکرد

زیست‌حسگر بهره‌گرفته شد. عملکرد زیست‌حسگر اصلاح‌شده با نانوذرات طلا در شناسایی اتانول به طور کامل رضایت‌بخش بود.

۲- بخش تجربی

۱-۲- مواد

اتانول (C₂H₅OH) با خلوص ۹۹/۹۹٪ از شرکت مرک (آلمان) خریداری شد. کیتوسان و الکل اکسیداز حاصل از مخمر پیچیا پاستوریس^{۱۷} با فعالیت ویژه‌ی ۱۰-۴۰ units/mg protein از شرکت سیگما-آلدریج (آمریکا) خریداری شدند. محلول کلئیدی نانوذرات طلا با غلظت ۱۰۰۰ ppm و ابعاد کمتر از ۵۰ nm از شرکت پیام‌آوران نانو (ایران) و خمیر پولیش از شرکت آذرالکترو (ایران) تهیه شدند. دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات (K₂HPO₄) و پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات (KH₂PO₄) برای تهیه‌ی محلول بافر فسفات و استیک اسید نیز از شرکت مرک خریداری شدند. همه‌ی مواد دیگر از درجه‌ی تجزیه‌ای بودند و بدون تصفیه‌ی مجدد استفاده شدند. تمامی محلول‌ها با آب دیونیزه آماده شدند. برای تهیه‌ی محلول مادر اتانول، مقدار مناسبی از اتانول خالص با آب دیونیزه به حجم رسانده شد.

۲-۲- دستگاه‌ها

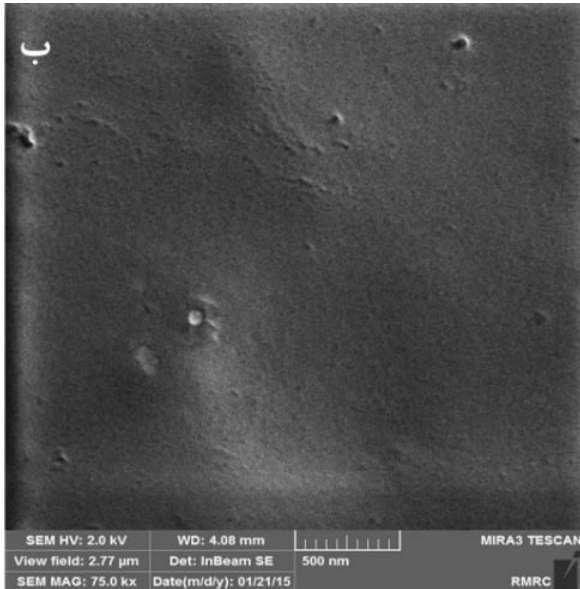
یک دستگاه پتانسیوستات/گالوانوستات (IVIUM TECHNOLOGY-VERTEX) ساخت کشور هلند و یک سل سه‌الکترودی برای انجام آزمایش‌های الکتروشیمیایی به‌کار گرفته شدند. یک الکتروود پلاتین اصلاح‌شده با آنزیم الکل اکسیداز و نانوذرات طلا به‌عنوان الکتروود کار، یک سیم پلاتین به‌عنوان الکتروود کمکی و یک الکتروود Ag/AgCl/KCl_{sat} به‌عنوان الکتروود مرجع مورد استفاده قرار گرفتند. برای بررسی مورفولوژی بسیار کیتوسان و سطح الکتروود پلاتین اصلاح‌شده با آنزیم الکل اکسیداز تثبیت‌شده با کیتوسان از یک میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی^{۱۸} (Mira 3-XMU, Tescan, Czech Republic) استفاده شد.

۲-۳- روش آماده‌سازی زیست‌حسگر

ابتدا، الکتروود پلاتین با استفاده از پد مخصوص و دوغاب آلومینا (۰/۰۵ μM) به مدت ۱ دقیقه پولیش داده شد. سپس، الکتروود با آب دیونیزه شست‌وشو داده شده و دوباره با استفاده از خمیر پولیش، به‌آرامی پولیش داده شد. پس از آن، الکتروود با آب دیونیزه شست‌وشو داده شد و برای اطمینان از پاکسازی کامل به مدت ۵ دقیقه در حمام فراصوت قرار گرفت. درنهایت، الکتروود با آب دیونیزه، اتانول و دوباره آب دیونیزه کامل شسته شده و در هوای اتاق خشک شد. برای اصلاح سطح الکتروود، ۲/۵ μL از مخلوطی از محلول بافر فسفات ۰/۱ M با pH برابر با ۷/۳، محلول کیتوسان ۰/۶ درصد وزنی در استیک اسید (محلول ۱ درصد حجمی در آب) و محلول آنزیمی با نسبت ۱ : ۱ : ۰/۶ در سطح الکتروود قطره‌گذاری شد. این حجم با توجه به آزمایش‌های مکرر انجام‌شده به‌عنوان مقدار مناسب برای سطح مقطع الکتروود کار انتخاب شد. پس از قطره‌گذاری، الکتروود به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار گرفت تا کامل خشک شود. سپس، الکتروود آماده‌شده حدود ۱۵ دقیقه درون محلول بافر فسفات ۰/۱ M با pH برابر با ۷/۳ قرار گرفت تا آنزیم‌هایی که به‌خوبی در ساختمان بسپاری کیتوسان محبوس نشده‌اند، شسته شوند و تکرارپذیری آزمایش‌ها افزایش پیدا کند. برای ساخت زیست‌حسگر اصلاح‌شده با نانوذرات طلا، ۲/۵ μL از مخلوطی از محلول کلئیدی نانوذرات طلا، محلول کیتوسان ۰/۶ درصد وزنی و محلول آنزیمی با نسبت ۱ : ۱ : ۰/۶ در سطح الکتروود پلاتین قطره‌گذاری شد. سپس، الکتروود در دمای اتاق خشک شده و بعد از آن در محلول بافر فسفات قرار گرفت. حجم دقیق مواد تشکیل‌دهنده‌ی محلول‌های اصلاح‌کننده‌ی سطح الکتروودها در جدول ۱ آورده شده است. به‌منظور مشخص کردن مقدار بهینه‌ی آنزیم، زیست-حسگرهای متفاوت با افزودن نسبت‌های ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۶ از محلول آنزیمی، به مخلوطی از محلول کیتوسان ۰/۵ درصد وزنی و بافر فسفات ۰/۱ M با pH برابر با ۷/۳ با نسبت ۱:۱ ساخته شده و مورد بررسی قرار گرفتند. برای تعیین کردن غلظت بهینه‌ی کیتوسان، غلظت‌های ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶ و ۰/۷ درصد وزنی کیتوسان در استیک اسید مورد استفاده قرار گرفتند.

¹⁷ *Pichia pastoris*

¹⁸ Field emission scanning electron microscope (FESEM)



جدول ۱: حجم و نسبت مواد تشکیل دهنده‌ی محلول‌های اصلاح کننده-ی سطوح الکترودها

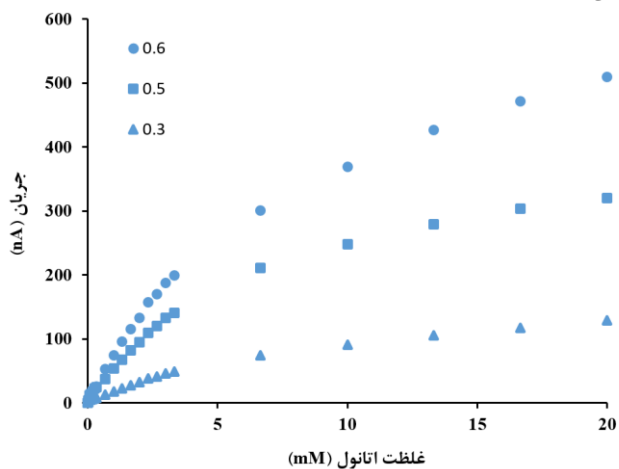
نسبت بافر فسفات/ محلول کلونیدی نانوذرات طلا: کیتوسان: آنزیم	محلول کلونیدی نانوذرات طلا (μL)	محلول آنزیمی (μL)	محلول کیتوسان (μL)	بافر فسفات با pH = ۷/۳ (μL)	
۰/۶: ۱: ۱	-	۱/۵	۰/۵	۰/۵	زیست حسگر آنزیمی
۰/۶: ۱: ۱	۰/۵	۱/۵	۰/۵	-	زیست حسگر اصلاح شده با نانوذرات طلا

شکل ۱ تصاویر FESEM (الف) بسیار کیتوسان و (ب) مخلوط آنزیم الکل اکسیداز و کیتوسان قرار گرفته در سطح الکترودها با بزرگ‌نمایی ۷۵۰۰۰ برابر

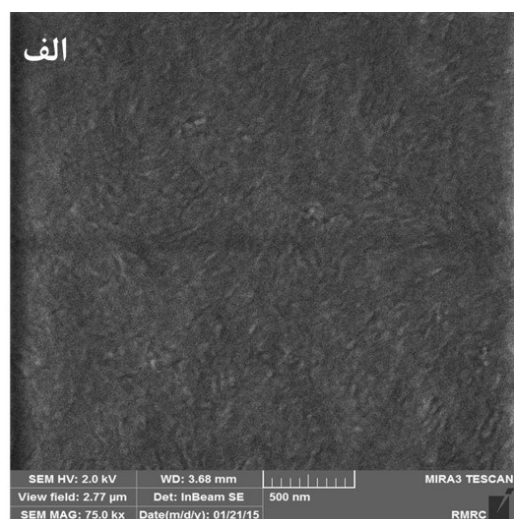
محلول‌های گفته شده با انحلال مقادیر مناسب کیتوسان در استیک اسید (۱ درصد حجمی در آب) به دست آمدند.

۳-۲- بررسی اثر غلظت آنزیم

غلظت آنزیم مورد استفاده در زیست حسگر یکی از عوامل تعیین کننده‌ی کارایی آن است. با توجه به نتایج به دست آمده که در شکل ۲ قابل مشاهده است. می‌توان چنین بیان کرد که با افزایش مقدار آنزیم، مقدار الکل بیشتری در واحد زمان اکسید شده و جریان بیشتری تولید می‌شود. با توجه به این مسأله، سه نسبت حجمی متفاوت از محلول آنزیمی برای تثبیت در سطح الکترودها مورد بررسی قرار گرفتند و همان گونه که مشخص است، افزایش حجم و در نتیجه افزایش غلظت محلول آنزیمی موجب افزایش جریان شده است.

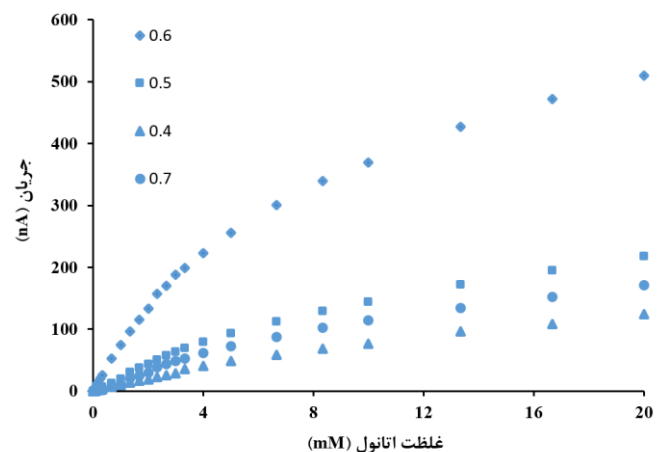


شکل ۲ مقایسه‌ی جریان به دست آمده از غلظت‌های متفاوت اتانول برای زیست حسگرهای ساخته شده با استفاده از نسبت‌های ۰/۳، ۰/۵ و ۰/۶ محلول آنزیم الکل اکسیداز و مخلوطی از محلول کیتوسان ۰/۵ درصد وزنی و بافر فسفات ۰/۱ M با pH برابر با ۷/۳ در دمای محیط



۳-۳- بررسی اثر غلظت کیتوسان

نتایج حاصل از آزمایش‌های آمپرومتری برای سنجش اثر غلظت کیتوسان بر عملکرد زیست‌حسگر و دستیابی به مقدار بهینه‌ی آن در شکل ۳ به تصویر کشیده شده است. همان‌طور که در شکل مشخص است، کمترین مقدار جریان از زیست‌حسگر ساخته شده با استفاده از کیتوسان ۰/۴ درصد حاصل شده است. دلیل این مسأله، هدررفت زیاد آنزیم است؛ یعنی همه‌ی مولکول‌های آنزیم نمی‌توانند به مولکول‌های کیتوسان متصل شوند و مقدار آنزیم محبوس شده در ساختار بسپاری کیتوسان در سطح الکتروود کاهش پیدا می‌کند. به عبارت دیگر، از آنجایی که مقدار کیتوسان کافی برای حفظ آنزیم در سطح الکتروود وجود ندارد، درصد آنزیم آزاد افزایش می‌یابد. با افزایش غلظت کیتوسان تا ۰/۶٪، مقدار جریان حاصل نیز افزایش پیدا کرده و پس از آن افت می‌کند. به احتمال دلیل این امر، افزایش آنزیم‌های محبوس شده در زیرلایه‌های کیتوسان در اثر افزایش غلظت کیتوسان و دشوار شدن دسترسی آنزیم به سوبسترا است. این پدیده، انتقال الکترون‌ها را دشوار می‌کند و موجب کاهش جریان می‌شود. بنابراین، غلظت ۰/۶ درصد وزنی، به‌عنوان غلظت بهینه‌ی کیتوسان برای تثبیت آنزیم در نظر گرفته شد.

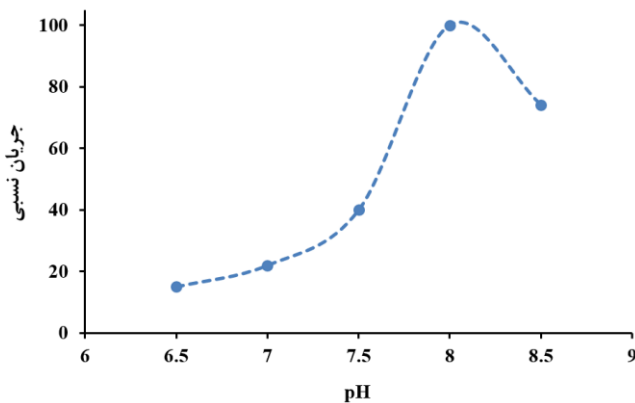


شکل ۳ نمودار جریان بر حسب تغییرات غلظت اتانول برای زیست‌حسگرهای ساخته شده با غلظت کیتوسان ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶ و ۰/۷ درصد وزنی و محلول بافر فسفات ۰/۱ M با pH برابر با ۸ در دمای محیط

۳-۴- بررسی اثر pH

از آنجایی که pH عاملی تعیین‌کننده در یک واکنش آنزیمی است، باید برای بهبود عملکرد زیست‌حسگر مقدار بهینه‌ی آن مشخص شود [۱۹]. به همین منظور، آزمایش‌های آمپرومتری در

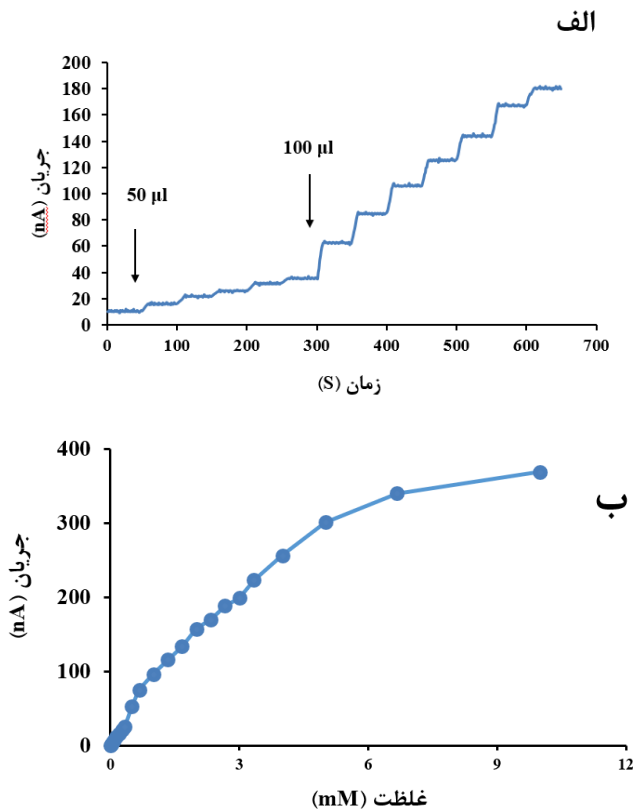
محلول‌های بافر فسفات ۰/۱ M با pH ۶/۵ تا ۸/۵ انجام شدند. این گستره با توجه به گستره‌ی مناسب گزارش شده توسط شرکت سیگما برای عملکرد مطلوب آنزیم (۶/۵-۸/۳) انتخاب شد. نتایج برای اتانول با غلظت ۳ mM در شکل ۴ نشان داده شده است. با توجه به نمودار به دست آمده، pH برابر با ۸ به‌عنوان pH بهینه برای این زیست‌حسگر انتخاب شد.



شکل ۴ بررسی اثر pH بر عملکرد زیست‌حسگر در محلول بافر فسفات ۰/۱ M حاوی اتانول ۳ mM در دمای محیط

۳-۵- بررسی اثر دما

دمای محیط، از دیگر عوامل اثرگذار بر واکنش‌های آنزیمی است. این واکنش‌ها در گستره‌ی دمایی ویژه‌ای به‌نحو مطلوب انجام می‌شوند و در دماهای خارج از این گستره، ماهیت و خواص آنزیم تغییر کرده یا فعالیتش کاهش پیدا می‌کند [۱۹]. برای بررسی این عامل، آزمایش‌های آمپرومتری در گستره‌ی دمایی ۱۵-۴۰ °C انجام شدند. شکل ۵ پاسخ نسبی زیست‌حسگر را با افزودن اتانول ۳ mM به محلول بافر فسفات ۰/۱ M با pH برابر با ۸ در گستره‌ی دمایی ذکر شده نشان می‌دهد. همان‌گونه که مشخص است، با افزایش دما فعالیت آنزیم و در نتیجه جریان حاصل از اکسایش اتانول افزایش پیدا می‌کند. این روند تا دمای ۳۵ °C ادامه می‌یابد و پس از آن نمودار روند کاهشی پیدا می‌کند. به نظر می‌رسد که مقاومت آنزیم پس از عبور از این دما کاهش می‌یابد و آنزیم بخشی از فعالیت خود را از دست می‌دهد. بنابراین، دمای بهینه برای عملکرد مطلوب این زیست‌حسگر، ۳۵ °C در نظر گرفته شد.

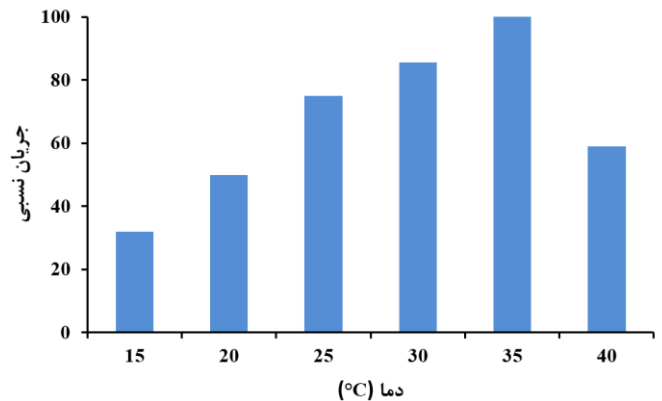


شکل ۶ الف) نمودار پلکانی جریان-زمان و ب) نمودار جریان-غلظت اتانول در محلول بافر فسفات ۰/۱ M با pH برابر با ۸ در دمای محیط

حساسیت زیست‌حسگر ساخته‌شده با الکتروپلاتین، با تقسیم شیب خط نمودار کالیبره شدن بر سطح مقطع الکتروپلاتین (الکتروپلاتین قطر ۲ mm) برابر با $0.57 \mu A / mM \text{ cm}^2$ به دست آمد. ثوابت سینتیکی زیست‌حسگر نیز از طریق رسم نمودار معکوس جریان بر حسب معکوس غلظت (شکل ۷) و با استفاده از معادله لاینیور برک^{۱۹} محاسبه شدند.

$$\frac{1}{I_{ss}} = \frac{1}{I_{max}} + \frac{K_M}{I_{max}} \frac{1}{C} \quad (1)$$

در این معادله I_{ss} پاسخ جریان حالت پایدار بعد از هر مرحله افزودن آنالیت، I_{max} بیشینه پاسخ جریان تحت شرایط اشباع‌شده با آنالیت، C غلظت آنالیت در محلول توده و K_M ثابت میکائیلیس-منتن^{۲۰} ظاهری است [۲۰]. با استفاده از شیب خط و عرض از مبدأ حاصل از نمودار رسم‌شده در شکل ۷، مقادیر K_M و I_{max} به ترتیب برابر با ۱ mM و ۱۰۰ nA برای گستره‌ی خطی نخست محاسبه شدند.



شکل ۵ پاسخ نسبی زیست‌حسگر بر حسب دما در محلول بافر فسفات ۰/۱ M با pH برابر با ۸ حاوی اتانول ۳ mM

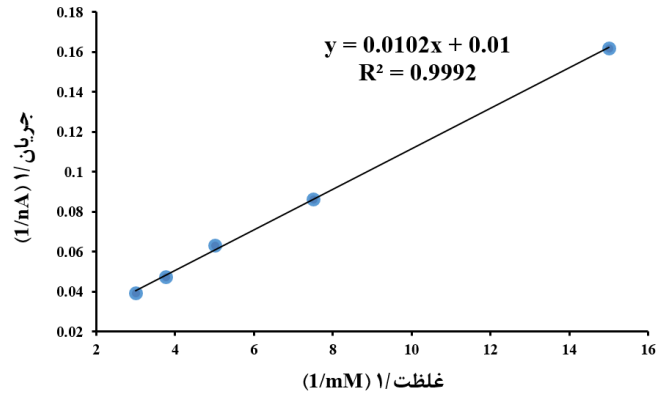
۳-۶- ویژگی‌های زیست‌حسگر

آزمایش‌های آمپرومتری برای بررسی عملکرد زیست‌حسگر مبتنی بر پلاتین در محلول بافر فسفات ۰/۱ M با pH برابر با ۸ انجام شدند. برای حصول نتایج دقیق، تکنیک آمپرومتری باید در محیط همگن انجام شود؛ یعنی غلظت اتانول تزریق‌شده در بازه‌ی زمانی کوتاهی در تمام محلول تقریبی یکسان شود. به همین دلیل، محلول در طول آزمایش با همزن با سرعت ۲۰۰ rpm هم‌زده می‌شود. دمای محیط و پتانسیل کاری ۰/۷ V به عنوان شرایط عملیاتی در نظر گرفته شدند. در ابتدا، محلول بافر عاری از اتانول است و پس از دستیابی به جریان پایا برای محلول بدون الکل، تزریق حجم‌های متفاوت از محلول ذخیره‌ی اتانول آغاز می‌شود. ابتدا، ۵ تزریق با حجم ۲۰ µL از محلول اتانول ۱۰۰ mM و در ادامه ۹ تزریق با حجم ۱۰۰ µL از همان محلول انجام شد. شکل ۶- الف، روند پلکانی پاسخ زیست‌حسگر را نشان می‌دهد. اگر نتایج این آزمایش در قالب نمودار جریان-غلظت نشان داده شود (شکل ۶- ب)، مشخص می‌شود که افزایش مقدار اتانول باعث افزایش مقدار جریان تولیدی می‌شود. افزایش جریان ابتدا با شیب تندتری پیش می‌رود و پس از عبور از گستره‌ی خطی، شیب نمودار کاهش پیدا می‌کند و زیست‌حسگر به حالت اشباع از سوبسترا نزدیک می‌شود. با توجه به نمودار می‌توان بیان کرد که گستره‌ی خطی زیست‌حسگر طراحی‌شده ۵-۲۶ mM و زمان پاسخ آن ۱۲ S ثانیه است.

¹⁹ Line weaver Burk (LB)

²⁰ Michaelis-Menten constant

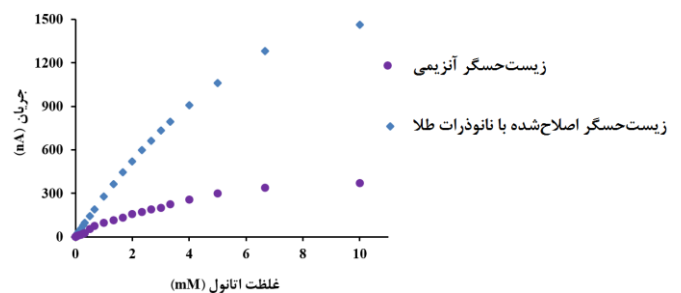
جریان‌های بیشتر، گستره‌ی خطی وسیع‌تر و زمان پاسخ کوتاه‌تری را نیز ارائه می‌کند. بازه‌ای که زیست‌حسگر حاضر آن را به صورت خطی پوشش می‌دهد، از $16 \mu\text{M}$ شروع شده و تا حدود mM $2/66$ ادامه پیدا می‌کند که در مقایسه با زیست‌حسگر طراحی شده بدون حضور نانوذرات طلا، گسترده‌تر بوده و گویای بهبود عملکرد زیست‌حسگر است. همچنین، زمان پاسخ نیز برابر با 10 S محاسبه شد که زمان مطلوبی برای پاسخ‌دهی سامانه تلقی می‌شود. با استفاده از معادله‌ی (۱) و شکل ۹-ب، $I_{\text{max}} = 500 \text{ nA}$ و $K_M = 1 \text{ mM}$ و حساسیت زیست‌حسگر نیز برابر با $\mu\text{A}/\text{mM}$ 2 mM cm^2 محاسبه شدند. مقدار K_M مقدار تمایل سوبسترا به آنزیم را مشخص می‌کند. در واقع می‌توان چنین بیان کرد که مقدار K_M پایین نشان‌دهنده‌ی این است که بسپار کیتوسان در فراهم کردن یک محیط زیست‌سازگار برای تثبیت آنزیم الکل اکسیداز عملکرد موفقیت‌آمیزی داشته و موجب افزایش فعالیت الکل اکسیداز و در نتیجه افزایش تمایل سوبسترا به آنزیم شده است [۲۰]. با توجه به ثابت ماندن مقدار K_M پس از افزودن نانوذرات طلا به ساختمان زیست‌حسگر، به نظر می‌رسد که این نانوذرات اثری در فرایند تثبیت آنزیم نداشته‌اند و تنها موجب افزایش رسانایی و فعالیت کاتالیستی زیست‌حسگر شده‌اند.



شکل ۷ نمودار معکوس جریان بر حسب معکوس غلظت اتانول

۳-۷- استفاده از نانوذرات طلا برای اصلاح سطح زیست‌حسگر شناسایی اتانول

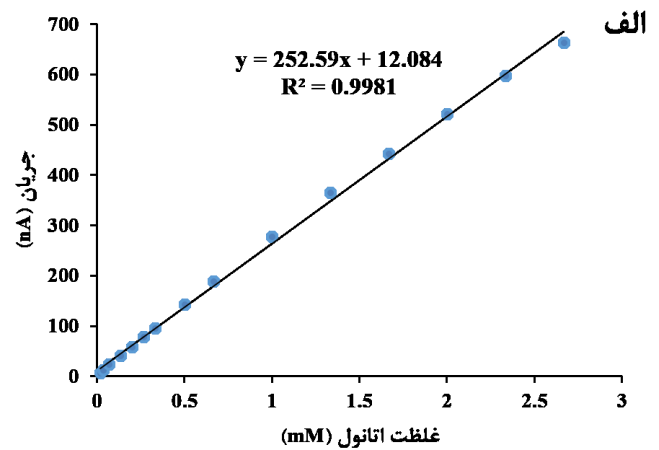
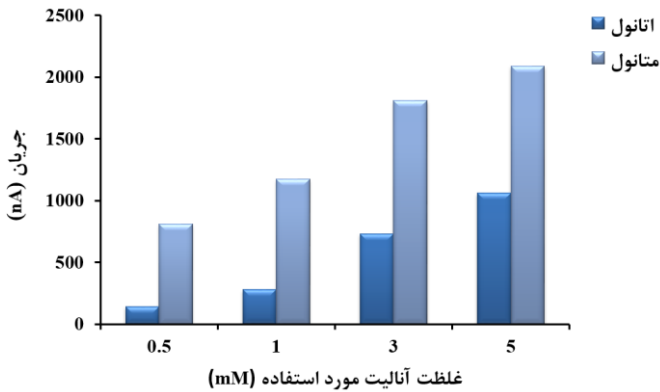
برای بهبود کارایی زیست‌حسگر و افزایش جریان حاصل از شناسایی اتانول، از نانوذرات طلا در ساختار آن استفاده شد. پس از انجام آزمایش‌های آمپرومتری، نمودارهای جریان-غلظت مطابق شکل ۸ رسم شدند. برای مقایسه‌ی بهتر، نمودار مربوط به زیست‌حسگر آنزیمی نیز تحت همان شرایط در شکل به تصویر کشیده شده است. با توجه به نمودارها کامل مشخص است که افزودن نانوذرات طلا به سامانه باعث افزایش جریان تولیدی تا حدود چهار برابر شده است. دلیل این امر، ماهیت کاتالیستی و هدایت فوق‌العاده‌ی این نانوذرات است.



شکل ۸ پاسخ جریان بر حسب افزودن مقادیر متفاوت اتانول در محلول بافر فسفات $0/1 \text{ M}$ با pH برابر با ۸ در دمای محیط

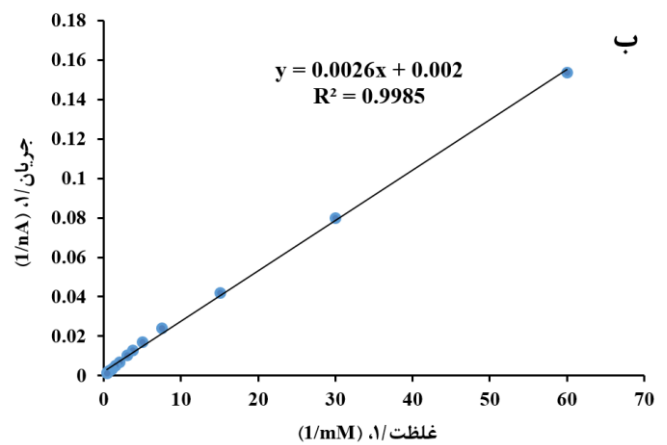
۳-۸- ویژگی‌های زیست‌حسگر اصلاح‌شده با نانوذرات طلا

با ترسیم نمودارهای جریان-غلظت و معکوس جریان بر حسب معکوس غلظت برای زیست‌حسگر اصلاح‌شده با نانوذرات طلا (شکل ۹) می‌توان دریافت که این زیست‌حسگر افزون بر ایجاد



شکل ۱۰ مقایسه‌ی عملکرد زیست‌حسگر اصلاح‌شده با نانوذرات طلا نسبت به متانول و اتانول در محلول بافر فسفات ۰/۱ M با pH برابر با ۸ در دمای محیط

در جدول ۲ نتایج حاصل از مقایسه‌ی زیست‌حسگر طراحی‌شده در این پژوهش و سایر زیست‌حسگرهای شناسایی اتانول به تصویر کشیده شده است. همان‌گونه که مشخص است، گستره‌ی خطی، ثابت میکائیلیس-منتن و زمان پاسخ زیست‌حسگر ارائه شده مناسب است و در مقایسه با دیگر پژوهش‌های انجام‌شده طراحی بسیار ساده‌تری دارد. از آنجایی که سادگی و قیمت مناسب از مهم‌ترین مشخصه‌های یک حسگر الکتروشیمیایی هستند، به نظر می‌رسد زیست‌حسگر طراحی‌شده در این پژوهش از قابلیت تجاری شدن برخوردار است و می‌تواند برای شناسایی اتانول در انواع نوشیدنی‌ها و دیگر فراورده‌ها مورد استفاده واقع شود.



شکل ۹ الف) نمودار جریان-غلظت و ب) نمودار معکوس جریان بر حسب معکوس غلظت در بازه‌ی ۰/۱۶-۲/۶۶ mM اتانول در محلول بافر فسفات ۰/۱ M با pH برابر با ۸ در دمای محیط

۳-۹- عملکرد زیست‌حسگر اصلاح‌شده با نانوذرات طلا در مقابل دیگر آنالیت‌ها

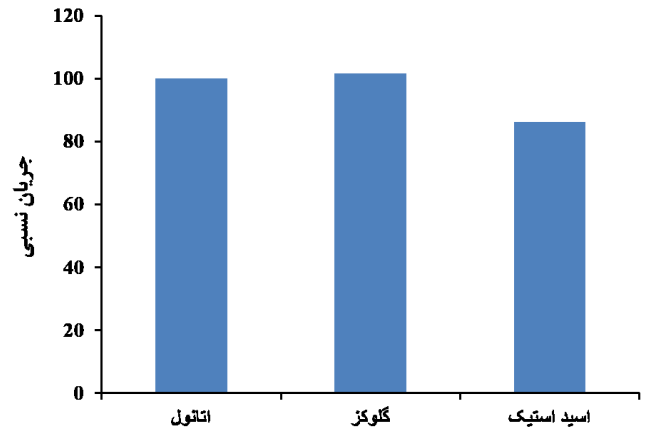
از آنجایی که آنزیم الکل اکسیداز می‌تواند الکل‌های با زنجیره‌ی کوتاه را اکسید کند و متانول ساده‌ترین عضو این خانواده است، الکل اکسیداز باید از توانایی اکسید کردن این آنالیت نیز برخوردار باشد. برای بررسی عملکرد زیست‌حسگر اصلاح‌شده با نانوذرات طلا نسبت به متانول، آزمایشی مشابه در شرایط کامل یکسان با اتانول انجام شد و نتایج حاصل در شکل ۱۰ به تصویر کشیده شده است. همان‌گونه که انتظار می‌رفت، الکل اکسیداز متانول را با سرعت بیشتری اکسید می‌کند؛ زیرا متانول در مقایسه با اتانول ساختار ساده‌تر و زنجیره‌ی کوتاه‌تری دارد. همچنین، ممکن است فرمالدهید که فراورده واکنش متانول و الکل اکسیداز است، به‌عنوان سوبسترا برای الکل اکسیداز استفاده شود.

۳-۱۰- بررسی عوامل مداخله‌گر بر عملکرد زیست‌حسگر

اصلاح‌شده با نانوذرات طلا

مداخله‌کننده‌های مرسوم مانند استیک اسید، آسکوربیک اسید، اوریک اسید، لاکتیک اسید، اوره، متانول و گلوکز ممکن است باعث ایجاد اختلال در سنجش اتانول شوند [۱ و ۱۳]. به‌همین دلیل، به‌طور معمول اثر این عوامل مزاحم بر پاسخ زیست‌حسگرهای اتانول بررسی می‌شود. در این پژوهش، دو مداخله‌کننده‌ی گلوکز و اسید استیک که به ترتیب در سنجش‌های بالینی و غذایی حضور پررنگی دارند، انتخاب شده و اثر آن‌ها بر عملکرد زیست‌حسگر اصلاح‌شده با نانوذرات طلا مورد بررسی قرار گرفت. در این آزمایش، از اتانول و مداخله‌گرها به نسبت ۱:۱ استفاده شد. جریان حاصل از اکسایش اتانول ۳ mM بدون حضور

و در حضور این دو عامل مداخله‌کننده در شکل ۱۱ نشان داده شده است. باتوجه به نمودار مشخص است که این غلظت از گلوکز تأثیر محسوسی بر عملکرد زیست‌حسگر ساخته‌شده ندارد و می‌توان با اطمینان از آن در سنجش‌های بالینی استفاده کرد. در رابطه با استیک اسید نیز باتوجه به نتایج، زیست‌حسگر عملکرد منطقی و قابل اطمینانی از خود نشان نمی‌دهد و استیک اسید با چنین غلظتی می‌تواند در سنجش اتانول اختلال ایجاد کند.



شکل ۱۱ اثر عوامل مداخله‌گر بر عملکرد زیست‌حسگر اصلاح‌شده با نانوذرات طلا

۴- نتیجه‌گیری

در این مطالعه، برای نخستین بار با استفاده از الکتروکود پلاتین اصلاح‌شده با آنزیم الکل اکسیداز، یک زیست‌حسگر الکتروشیمیایی ساده، جدید و معتبر برای تشخیص و تعیین مقدار اتانول در فاز مایع ساخته شد. برای ارزیابی عملکرد زیست‌حسگر از روش آمپرومتری استفاده شد و اثر عوامل تعیین‌کننده مانند دما و pH بر کارایی آن مورد بررسی قرار گرفت و شرایط بهینه مشخص شد. سپس، ویژگی‌هایی مانند گستره‌ی خطی، زمان پاسخ، ثوابت سینتیکی و حساسیت محاسبه شدند. پس از آن، برای بهبود کارایی زیست‌حسگر از نانوذرات طلا در ساختار آن استفاده شد و جریان حاصل از اکسایش اتانول در زیست‌حسگر اصلاح‌شده با این نانوذرات چهار برابر افزایش پیدا کرد. درنهایت، اثر نوع آنالیت و عوامل مداخله‌گر بر عملکرد زیست-حسگر اصلاح‌شده با نانوذرات طلا مورد بررسی قرار گرفت. پاسخ زیست‌حسگر ساخته‌شده در گستره‌ی $0.16-2.66 \text{ mM}$ خطی بود و ثابت میکائیلیس-منتن آن برابر با 1 mM و حساسیت زیست‌حسگر نیز برابر با $2 \mu\text{A}/\text{mM cm}^2$ پیش‌بینی شد.

جدول ۲: مقایسه‌ی عملکرد زیست‌حسگرهای شناسایی اتانول

مرجع	زمان پاسخ (s)	ثابت میکائیلیس-منتن (mM)	حساسیت ($\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$)	حد تشخیص (mM)	محدوده‌ی خطی (mM)	الکتروکود
[۱۳]	-	-	۱۶/۲	۰/۵۲	بیشتر از ۱۰	الکتروکود صفحه چاپی کاغذی اصلاح‌شده با الکل اکسیداز- گلوکار آلدهید- سرم البومین گاوی / نفیون / کرین سیاه / نانوذرات پراش بلو
[۲۱]	-	-	۵/۶۹	۰/۰۱۱	۰/۰۲-۰/۰۴۲	الکتروکود کرین شیشه‌ای اصلاح‌شده با پلی استایرن سولفونات- الکل دهیدروژناز
[۲۱]	-	-	۶/۸۶	۰/۰۴۹	۰/۰۷-۰/۰۴۲	الکتروکود کرین شیشه‌ای اصلاح‌شده با پلی استایرن سولفونات- الکل دهیدروژناز / نفیون
[۲۱]	-	-	۷/۸۷	۰/۰۰۵	۰/۰۱-۰/۰۴۵	الکتروکود کرین شیشه‌ای اصلاح‌شده با پلی استایرن سولفونات- الکل دهیدروژناز / نانولوله‌های کرینی چند دیواره
[۲۱]	-	-	۱۵/۶۵	۰/۰۱۹	۰/۰۷-۰/۰۴۲	الکتروکود کرین شیشه‌ای اصلاح‌شده با پلی استایرن سولفونات- الکل دهیدروژناز / نانولوله‌های کرینی چند دیواره / نفیون
[۲۲]	-	-	۰/۴۹	۰/۰۹۶	۰/۳۲-۱	الکتروکود صفحه چاپی کرینی اصلاح‌شده با الکل دهیدروژناز- گلوکار آلدهید / نانولوله‌های کرینی چند دیواره / نانوذرات طلا / پلی نوترال قرمز
[۲۳]	-	-	-	۰/۰۰۵	۰/۰۱۷-۱/۸۴۵	الکتروکود کرین شیشه‌ای اصلاح‌شده با الکل دهیدروژناز- گلوکار آلدهید- سرم البومین گاوی / نفیون / پلی (ال-سیستین) / گرافن اکساید کاهش یافته / نانوذرات طلا و نقره
[۲۴]	۱۰	-	۱۰۲	۰/۰۰۱۵	۰/۰۰۵-۰/۳۷۷	الکتروکود کرین شیشه‌ای اصلاح‌شده با الکل دهیدروژناز / نانومیله‌های طلا- گرافن
[۲۵]	۲۰	-	۲/۸	۰/۰۰۰۳	۰/۰۵-۱	الکتروکود کرین شیشه‌ای اصلاح‌شده با الکل دهیدروژناز- گلوکار آلدهید- سرم البومین گاوی / گرافن اکساید کاهش یافته به- صورت الکتروشیمیایی / پلی تیونین
پژوهش حاضر	۱۰	۱	۲	-	۰/۰۱۶-۲/۶۶	الکتروکود پلاتین اصلاح‌شده با الکل اکسیداز- کیتوسان / نانوذرات طلا

- [8] M. Hnaien, F. Lagarde, N. Jaffrezic-Renault, "A rapid and sensitive alcohol oxidase/catalase conductometric biosensor for alcohol determination," *Talanta*, 81, 222-227, 2010.
- [9] J. Shi, P. Ci, F. Wang, H. Peng, P. Yang, L. Wang, Q. Wang, P.K. Chu, "Pd/Ni/Si-microchannel-plate-based amperometric sensor for ethanol detection," *Electrochimica Acta*, 56, 4197-4202, 2011.
- [10] G. Wen, Z. Li, M.M. Choi, "Detection of ethanol in food: A new biosensor based on bacteria," *Journal of food engineering*, 118, 56-61, 2013.
- [11] A. Sassolas, L.J. Blum, B.D. Leca-Bouvier, "Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors," *Biotechnology advances*, 30, 489-511, 2012.
- [12] J. Schlatter, F. Chiadmi, V. Gandon, P. Chariot, "Simultaneous determination of methanol, acetaldehyde, acetone, and ethanol in human blood by gas chromatography with flame ionization detection," *Human & experimental toxicology*, 33, 74-80, 2014.
- [13] S. Cinti, M. Basso, D. Moscone, F. Arduini, "A paper-based nanomodified electrochemical biosensor for ethanol detection in beers," *Analytica chimica acta*, 960, 123-130, 2017.
- [14] H. Susanto, A. Samsudin, N. Rokhati, I. Widiassa, "Immobilization of glucose oxidase on chitosan-based porous composite membranes and their potential use in biosensors," *Enzyme and microbial technology*, 52, 386-392, 2013.
- [15] I. Leceta, P. Guerrero, K. De la Caba, "Functional properties of chitosan-based films," *Carbohydrate polymers*, 93, 339-346, 2013.
- [1] M. Das, P. Goswami, "Direct electrochemistry of alcohol oxidase using multiwalled carbon nanotube as electroactive matrix for biosensor application," *Bioelectrochemistry*, 89, 19-25, 2013.
- [2] Ş. Alpat, A. Telefoncu, "Development of an alcohol dehydrogenase biosensor for ethanol determination with toluidine blue O covalently attached to a cellulose acetate modified electrode," *Sensors*, 10, 748-764, 2010.
- [3] L. Zhao, Q. Liu, S. Yan, Z. Chen, J. Chen, X. Li, "Multimeric immobilization of alcohol oxidase on electrospun fibers for valid tests of alcoholic saliva," *Journal of biotechnology*, 168, 46-54, 2013.
- [4] D.W. Lachenmeier, R. Godelmann, M. Steiner, B. Ansay, J. Weigel, G. Krieg, "Rapid and mobile determination of alcoholic strength in wine, beer and spirits using a flow-through infrared sensor," *Chemistry Central Journal*, 4, 2010.
- [5] J. Erfkamp, M. Guenther, G. Gerlach, "Hydrogel-based sensors for ethanol detection in alcoholic beverages," *Sensors*, 19, 1199-1212, 2010.
- [6] B. Kuswandi, T. Irmawati, M. Hidayat, M. Ahmad, "A simple visual ethanol biosensor based on alcohol oxidase immobilized onto polyaniline film for halal verification of fermented beverage samples," *Sensors*, 14, 2135-2149, 2014.
- [7] A. Aziz, H. Lim, S. Girei, M. Yaacob, M. Mahdi, N. Huang, A. Pandikumar, "Silver/graphene nanocomposite-modified optical fiber sensor platform for ethanol detection in water medium," *Sensors and Actuators B: Chemical*, 206, 119-125, 2015.

- [24] L. Li, H. Lu, L. Deng, "A sensitive NADH and ethanol biosensor based on graphene–Au nanorods nanocomposites," *Talanta*, 113, 1-6, 2013.
- [25] Z. Li, Y. Huang, L. Chen, X. Qin, Z. Huang, Y. Zhou, Y. Meng, J. Li, S. Huang, Y. Liu, "Amperometric biosensor for NADH and ethanol based on electroreduced graphene oxide–polythionine nanocomposite film," *Sensors and Actuators B: Chemical*, 181, 280-287, 2013.
- [16] Y.C. Yeh, B. Creran, V.M. Rotello, "Gold nanoparticles: preparation, properties, and applications in bionanotechnology," *Nanoscale*, 4, 1871-1880, 2012.
- [17] P. Alexandridis, "Gold nanoparticle synthesis, morphology control, and stabilization facilitated by functional polymers," *Chemical Engineering & Technology*, 34, 15-28, 2011.
- [18] S. Zeng, K.T. Yong, I. Roy, X.Q. Dinh, X. Yu, F. Luan, "A review on functionalized gold nanoparticles for biosensing applications," *Plasmonics*, 6, 491-506, 2011.
- [19] H. Bisswanger, "Enzyme assays," *Perspectives in Science*, 1, 41-55, 2014.
- [20] H. Zare, G.D. Najafpour, M. Jahanshahi, M. Rahimnejad, M. Rezvani, "Highly stable biosensor based on glucose oxidase immobilized in chitosan film for diagnosis of diabetes," *Romanian Biotechnological Letters*, 22, 12611-12619, 2017.
- [21] L. Barhoumi, O.M. Istrate, L. Rotariu, M.B. Ali, C. Bala, "Amperometric determination of ethanol using a novel nanobiocomposite," *Analytical Letters*, 51, 323-335, 2018.
- [22] M. Bilgi, E. Ayranci, "Biosensor application of screen-printed carbon electrodes modified with nanomaterials and a conducting polymer: Ethanol biosensors based on alcohol dehydrogenase," *Sensors and Actuators B: Chemical*, 237, 849-855, 2016.
- [23] G.A. Tiğ, "Highly sensitive amperometric biosensor for determination of NADH and ethanol based on Au-Ag nanoparticles/poly (L-cysteine)/reduced graphene oxide nanocomposite," *Talanta*, 175, 382-389, 2017.



Fabrication of Ethanol Detection Electrochemical Biosensor Using Modified Platinum Electrode

S. Khaleghpanah¹, M. Rahimnejad^{1*}, A. Farahbakhsh², R. Zokhtareh¹

1 Department of Biotechnology, Faculty of Chemical Engineering, Babol Noshirvani University of Technology, Babol

2 Faculty of Chemical Engineering, Islamic Azad university, Quchan

Abstract: In this research, alcohol oxidase was immobilized at platinum electrode surface using chitosan to design an accurate and sensitive electrochemical biosensor for detection and measurement of ethanol in liquid phase. Amperometric studies were carried out in 0.1 M phosphate buffer solution containing ethanol. According to the obtained results, the optimal conditions for biosensor operation were acquired at the temperature of 35 °C and pH 8. In order to improve the biosensor performance, gold nanoparticles were used in its construction and the comparison of obtained results from designed biosensor before and after adding these nanoparticles showed four-fold enhancement in current intensity produced by ethanol oxidation. The linear range of the gold nanoparticles modified biosensor, its Michaelis-Menten constant value, and its sensitivity were calculated to be 0.016-2.66 mM, 1 mM, and 2 $\mu\text{A}/\text{mM cm}^2$, respectively.

Keywords: Electrochemical biosensor, Ethanol, Alcohol oxidase, Platinum electrode, Gold nanoparticles