

## تثبیت آنزیم لاکاز در پیل زیست‌سوختی با استفاده از سول - ژل و نانولوله‌های کربنی

معصومه احمدی<sup>۱</sup>، احمد مولایی راد<sup>۲</sup>، ژیلا جمشیدی نیا<sup>۳</sup>

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

۲. استاد گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

۳. کارشناس ارشد، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران

### چکیده

**سابقه و هدف:** امروزه تقاضا برای انرژی پاک رو به افزایش است. یکی از روش‌های آسان و پاک تولید انرژی استفاده از پیل‌های سوختی به‌ویژه پیل زیست‌سوختی می‌باشد. پیل زیست‌سوختی وسیله‌ای است که قادر به تبدیل انرژی شیمیایی به انرژی الکتریکی می‌باشد. انواع مختلفی از پیل‌های زیست‌سوختی طراحی شده‌اند که می‌توانند از بیوکاتالیست‌ها، آنزیم‌ها و حتی میکروارگانیزم‌ها، با هدف تولید انرژی الکتریکی استفاده نمایند.

**مواد و روش‌ها:** در این پژوهش، از سول - ژل در کپسوله‌کردن و تثبیت آنزیم لاکاز روی الکتروده، استفاده گردیده است. در این روش تثبیت، رله آنزیمی داخل حفره‌های کربن - سیلیکا که از ساختار هتروژن الکتروده کربن - سرامیک (CCE) ناشی می‌شود، تثبیت و ساختار ABTS-CCE تشکیل می‌گردد. از سول - ژل به دلیل دارا بودن ABTS به عنوان یک ماتریکس برای دستیابی به انتقال الکترون واسطه‌ای لاکاز استفاده گردید.

**یافته‌ها:** ولتاموگرام چرخه‌ای مقدار انتقال الکترون پایین را به دلیل ارتباط ضعیف آن بین آنزیم و سطح الکتروده را نشان داد. بیشینه پیک ردوکس در ۱۰ میکروآمپر در یک محلول حاوی ۱۵ میکرومولار او- دیانیزیدین به عنوان سوپسترا به دست آمده است.

**نتیجه‌گیری:** با استفاده از نانولوله‌های کربنی اتصال بهبود یافته و بیشینه پیک ردوکس در ۱۴ میکروآمپر در غلظت مشابه به دست آمد.

**کلمات کلیدی:** پیل زیست‌سوختی، تثبیت آنزیم لاکاز، نانولوله‌های کربنی، سول - ژل.

### مقدمه

می‌شوند، قادرند با استفاده از ویژگی واکنش‌های آنزیمی، انرژی شیمیایی را به انرژی الکتریکی تبدیل نمایند. در این گروه از پیل‌های زیست‌سوختی، یک آنزیم اکسیدکننده روی الکتروده و یک آنزیم احیا کننده، روی الکتروده کاتد تثبیت می‌گردد. با اکسیدشدن سوپسترا توسط آنزیم اکسیدکننده، الکترون تولید می‌شود. سپس این الکترون بوسیله مدار الکتریکی به سمت الکتروده کاتدی حرکت نموده و در آنجا

پیل‌های زیست‌سوختی<sup>۱</sup> که بر اساس آنزیم‌ها طراحی

نویسنده مسئول: معصومه احمدی

پست الکترونیکی: [Maasomeahmadi@yahoo.com](mailto:Maasomeahmadi@yahoo.com)

تاریخ دریافت مقاله: ۹۲/۱۰/۰۳

تاریخ پذیرش مقاله: ۹۳/۰۶/۲۱

1 - Biofuel cell.

حفظ می‌نماید. در این روش آنزیم بوسیله میکروکپسول‌ها احاطه می‌گردد و تثبیت آنزیم بوسیله یک غشای پلیمری نیمه تراوا صورت می‌گیرد (۱۴،۲۰).

آنزیم احیا کننده الکترون مذکور را دریافت و سوبسترای خود را احیا می‌نماید. بنابراین الکترون در مدار، بین الکتروند آندی و کاتدی حرکت نموده و جریان الکتریکی تولید می‌گردد (۸،۹،۱۷،۶).

## مواد و روش کار

**مواد:** نانو لوله‌های کربنی چند دیواره (نانوتایمز چین با خلوص ۹۵٪)، آنزیم لاکاز (Sigma-Aldrich)، او-دیانیزیدین (Sigma)، متیل تری متوکسی سیلان (Aldrich)(MTMOS)، الکتروند کربن سرامیک<sup>۴</sup> (Aldrich)(CCE)، تترامتوکسی سیلان (Aldrich) (TMOS) (Aldrich)، ۲،۲-آزینو-بیس(۳-ایتل بنزوتیازولین-۶-سولفونات) (Aldrich)(ABTS)، اسیدکلریدریک (Merck)، پراکسید هیدروژن ۳۰٪، پودر گرافیت (MO-300) (Sigma-Aldrich)، فیلتر با قطر ۰/۴۵ میکرومتر. آزمایشات ولتامتری چرخه‌ای<sup>۵</sup> با استفاده از دستگاه پتانسیوگالوانومتر اسپانیایی Drop Sens مدل DRP-STAT200 انجام شده است. هر آزمایش، در غلظت مربوطه، سه مرتبه و در هر مرتبه سه چرخه کامل انجام شده است.

### روش ساخت بیوکاتد با کپسوله کردن آنزیم

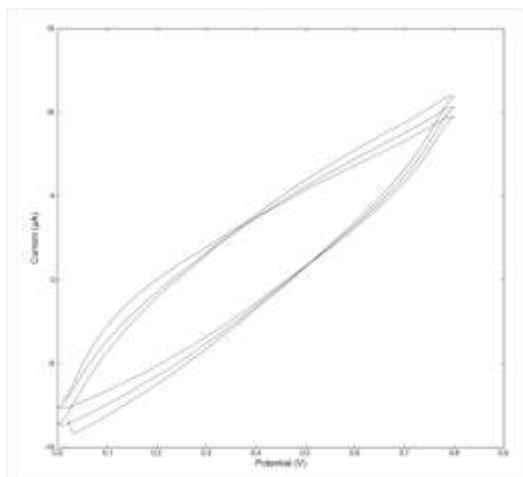
**لاکاز توسط سول-ژل:** در این روش تثبیت، رله آنزیمی داخل حفره‌های کربن-سیلیکا که از ساختار هتروژن الکتروند کربن-سرامیک (CCE) ناشی می‌شود، تثبیت و ساختار CCE-ABTS تشکیل می‌گردد. به عبارت دیگر آنزیم روی فیلم هیدروفوب سیلیکا که بر روی سطح CCE مدیفای شده با ABTS<sup>۲-</sup> قرار دارد، از طریق کپسوله شدن تثبیت می‌گردد. این روش کپسوله شدن آنزیم روی سول-ژل بستر سیلیکات تأثیر چندانی روی فعالیت آنزیم نمی‌گذارد (۷،۱۰،۱۸،۲۲). ماتریکس سول-ژل هیدروفوبیک برای کربن سرامیک الکتروند (CCE) آماده شد. سول هیدرولیز شده با مخلوط کردن ۱ میلی لیتر از متیل تری متوکسی سیلان (MTMOS) با ۱/۵ میلی لیتر متانول بدست آمده است. برای آماده سازی ABTS-CCE، ۱۲ میلی گرم ABTS به سول اضافه شد و بعد از اضافه کردن ۵۰ میکرولیتر از ۱۱ mol dm<sup>-3</sup> HCL به مدت ۲ دقیقه در دستگاه سونیکاسیون قرار داده شد. سپس ۱۲/۵ گرم پودر

لاکازها (p-diphenol:dioxygen oxidoreductases, EC 1.10.3.2) متعلق به گروه بزرگی از آنزیم‌های مس چند ظرفیتی هستند (۱،۲،۲۳،۲۶). آنها توسط گیاهان، قارچ‌ها و بعضی باکتری‌ها و حشرات تولید می‌شوند (۲۱، ۲۷،۳۰). آنزیم لاکاز<sup>۲</sup> از آنزیم‌های قابل کاربرد در پیل‌های زیست‌سوختی به ویژه به عنوان کاتد می‌باشد. لاکاز نخستین بار توسط یوشیدا توصیف شده است (۱۹،۳۳). آماده سازی الکتروند اصلاح شده لاکاز (۲۱،۲۷،۳۰)، به علت توانایی کارکردی در اکسیداسیون سوبستراهای فنولیک (۱۵) و احیاء الکتروکاتالیزی دی اکسیژن (۱۱،۱۵،۱۲،۲۸) در پیل‌های زیست‌سوختی (۴،۳، ۱۶،۱۲،۵)، کار با اهمیتی است. طراحی لاکاز برپایه سیستم الکتروکاتالیزی بستگی به روش مبادله الکترون بین آنزیم و الکتروند دارد (۳۰). در پیل‌های زیست‌سوختی که از واسطه‌های انتقال الکترون استفاده می‌شود، واسطه‌ها به عنوان یک هادی عمل نموده و الکترون را از تونل اکتیو سایت آنزیم به سطح الکتروند 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. 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 (۱۳،۲۹).

استفاده از سول-ژل<sup>۳</sup> کاربرد فراوانی در کپسوله کردن انواع بیومولکول‌ها دارد و هم‌چنین بستر بسیار مناسبی جهت تثبیت آنزیم لاکاز روی نانولوله‌های کربنی می‌باشد و در ساخت بیوسنسور کارائی فراوان دارد. مواد تشکیل دهنده سول-ژل باعث می‌شود اثر کمی روی فعالیت آنزیم داشته باشد، بنابراین پیل زیست سوختی ساخته شده با این روش پایداری قابل قبولی دارد. برای مثال آنزیم کپسوله شده در سول-ژل حاوی کلونیدهای سیلیکا فعالیت خود را تا یک ماه

4- Carbon Ceramic Electrode.  
5 - Cyclic voltammogram.  
6 - Encapsulation.

2 - Laccase.  
3 - Sol - gel.



شکل ۱- ولتاموگرام چرخه‌ای الکتروکاتدی ساخته شده، به روش سول - ژل، با قراردادن الکتروکود در ۰/۱ مولار او- دیانیزیدین و سرعت روبش  $100 \text{ mV s}^{-1}$  در بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار در  $\text{pH } 5/0$  و دمای  $25$  درجه سانتی‌گراد.

شکل ۲ ولتاموگرام چرخه‌ای بیوکاتد ساخته شده، با کپسوله کردن ۱ میلی مولار آنزیم لاکاز به روش سول - ژل، با قراردادن الکتروکود در محلول ۵ میکرو مولار او- دیانیزیدین و سرعت روبش  $100 \text{ mV s}^{-1}$  در بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار در  $\text{pH } 5/0$  و دمای  $25$  درجه سانتی‌گراد ثبت شده است. از آنجا که در روشی که از نانولوله‌های کربنی استفاده شده بود، در غلظت ۵ میکرو مولار او- دیانیزیدین بیشترین جریان به- دست آمده بود و از آنجایی که در این روش برخلاف دو روش قبلی که از مواد واسطه برای انتقال الکترون استفاده نشده بود، مواد واسطه به کار رفته‌اند، انتظار می‌رفت که در این غلظت از سوبسترا جریان قابل قبولی ثبت شود. اما همانطور که مشاهده می‌شود پیک اختصاصی آنزیم تشکیل نشده است. این امر می-تواند ناشی از تماس نامناسب بین الکتروکود سرامیکی ساخته شده و آنزیم موجود در ژل باشد که البته اجتناب ناپذیر است.

از آنجایی که در غلظت ۵ میکرو مولار او- دیانیزیدین پیک اختصاصی آنزیم ثبت نشد، غلظت سوبسترا در آزمایش بعدی افزایش داده شد. شکل ۳ ولتاموگرام چرخه‌ای بیوکاتد ساخته شده، با کپسوله کردن ۱ میلی مولار آنزیم لاکاز به روش سول - ژل، با قراردادن الکتروکود در محلول ۱۰ میکرو مولار او- دیانیزیدین و سرعت روبش  $100 \text{ mV s}^{-1}$  در بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار در  $\text{pH } 5/0$  و دمای  $25$  درجه سانتی‌گراد ثبت شده است. همان‌طور که در این نمودار مشاهده می‌شود پیک اختصاصی آنزیم به صورت بسیار خفیف در  $0/4$  ولت و در حدود ۵ میکروآمپر تشکیل شده است. این امر تماس نامناسب بین الکتروکود سرامیکی ساخته شده و آنزیم موجود در ژل را تأیید می‌نماید. اما از آنجایی که نمودار دارای

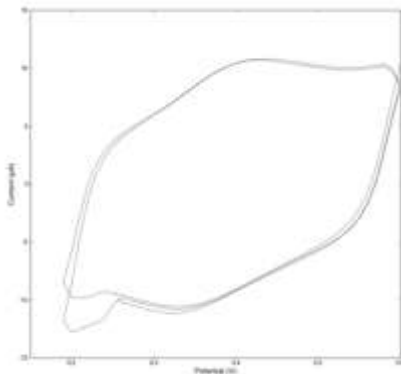
گرافیت اضافه شد و به مدت یک دقیقه دیگر در دستگاه سونیکاسیون قرار گرفت. سپس یک سیم مسی در محلول گذاشته شد و به مدت ۴۸ ساعت در دمای اتاق خشک شد. ورقه ژل هیدروفیلیک (TMOSgel) برای کپسوله کردن آنزیم فعال به روش زیر آماده می‌شود.  $\text{H}_2\text{O}$  و  $\text{TMOS}$ ،  $3 \text{ mol dm}^{-3}$  و  $0/04$  محلول آبی HCL به نسبت‌های حجمی ۱ : ۴/۵ : ۱۸ با هم مخلوط شد. این مخلوط به مدت ۲۰ دقیقه در دستگاه سونیکاسیون قرار گرفت. و سپس به نسبت حجمی ۱ : ۱ با آب رقیق شد. این ژل دوباره به مدت ۳ دقیقه در دستگاه سونیکاسیون گذاشته شد. و بعد با آب به نسبت حجمی ۱۰۰ : ۱ رقیق می‌شود و به مدت ۳ دقیقه دیگر در سونیکاسیون قرار می‌گیرد. در نهایت ۱۴۵ میکروگرم لاکاز به  $250$  میکرولیتر ژل رقیق اضافه می‌شود. ۱۰ میکرولیتر از سول رقیق شده  $100 : 1$  روی سطح ABTS-CCE قرار می‌گیرد. سپس سول - ژل به مدت ۲۰ دقیقه در دمای اتاق در رطوبت نسبی  $40 - 50\%$  گذاشته شد تا خشک شد ( $24, 31, 32$ ).

## نتیجه‌گیری و بحث

ولتاموگرام چرخه‌ای بیوکاتد ساخته شده، با کپسوله کردن آنزیم لاکاز با غلظت  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  به روش سول - ژل در غلظت‌های مختلف سوبسترا (او- دیانیزیدین) و سرعت روبش  $100 \text{ mV s}^{-1}$  در بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار در  $\text{pH } 5/0$  و دمای  $25$  درجه سانتی‌گراد در شکل‌های ۳ تا ۷ اندازه‌گیری جریان را نشان می‌دهند.

در شکل ۱ ولتاموگرام چرخه‌ای الکتروکاتدی ساخته شده، به روش سول - ژل، با قراردادن الکتروکود در ۰/۱ مولار او- دیانیزیدین و سرعت روبش  $100 \text{ mV s}^{-1}$  در بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار در  $\text{pH } 5/0$  و دمای  $25$  درجه سانتی‌گراد ثبت شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود هیچ پیکی در ناحیه اختصاصی آنزیم تشکیل نشده است. در نتیجه در صورتی که پس از تثبیت آنزیم روی الکتروکود در نمودار حاصله پیک اختصاصی آنزیم مشاهده شود می‌توان آن را به فعالیت آنزیم نسبت داد.

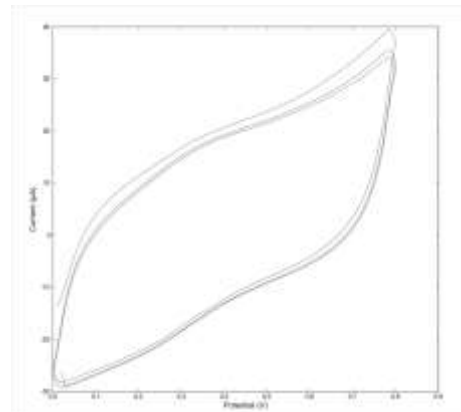
شده است. همانطور که مشاهده می‌شود در این غلظت از سوبسترا دو پیک ردوکس مشخص در ۰/۳۷ ولت و ۸ میکرو آمپر تشکیل شده است. پیک ردوکس تشکیل شده بسیار پهن می‌باشد. این امر بیانگر این مطلب است که آنزیم‌هایی که در ژل امکان دسترسی به سوبسترا و همچنین امکان انتقال الکترون را داشته‌اند اشباع شده‌اند و در نتیجه افزایش غلظت سوبسترا تأثیر بسزایی در میزان جریان تولید شده نخواهد داشت.



شکل ۴- ولتاموگرام چرخه‌ای بیوکاتد ساخته شده، با کپسوله کردن ۱ میلی مولار آنزیم لاکاز به روش سول - ژل، با قراردادن الکتروود در محلول ۱۵ میکرومولار او- دیانیزیدین و سرعت روبش  $100 \text{ mV s}^{-1}$  در بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار در pH ۵/۰ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد.

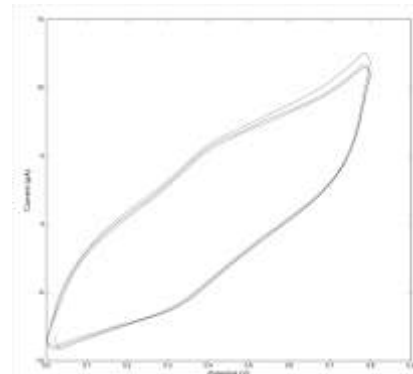
در نتیجه ولتاموگرام بیوکاتد ساخته شده در غلظت‌های بالاتر انجام نشد. به منظور بررسی این مطلب که آیا ارتباط نامناسب ژل و الکتروود سرامیکی عامل اصلی عدم کارکرد صحیح بیوکاتد است یا خیر در ژل تهیه شده ۱۰۰ میکرولیتر نانولوله کربنی با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر اضافه شد و بقیه مراحل ساخت بیوکاتد مانند روش قبل انجام پذیرفت. در صورتی که پس از اضافه شدن نانولوله‌های کربنی عدد بالاتری از جریان را نشان دهد و یا شکل پیک ردوکس اصلاح شده باشد می‌توان نتیجه‌گیری نمود که عامل اصلی عدم کارکرد صحیح بیوکاتد فقط عدم تماس مناسب آنزیم و سطح الکتروود بوده است و مراحل تثبیت آنزیم اثر قابل توجهی در ساختار و فعالیت آنزیم نداشته است. در نتیجه ولتاموگرام چرخه‌ای بیوکاتد ساخته شده، با کپسوله کردن حضور ۲۰ میکرولیتر از آنزیم لاکاز با غلظت  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  به روش سول - ژل، با قراردادن الکتروود در محلول ۱۵ میکرو مولار او- دیانیزیدین و اضافه کردن ۱۰۰ میکرولیتر نانولوله کربن با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر و سرعت روبش  $100 \text{ mV s}^{-1}$  در بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار در pH ۵/۰ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام شد.

دو پیک اکسید و احیا می‌باشد می‌توان نتیجه گرفت که انتقال الکترون از آنزیم به الکتروود با استفاده از روش فوق امکان‌پذیر است.



شکل ۲- ولتاموگرام چرخه‌ای بیوکاتد ساخته شده، با کپسوله کردن ۲۰ میکرولیتر آنزیم لاکاز با غلظت  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  به روش سول - ژل، با قراردادن الکتروود در ۵ میکرو مولار او- دیانیزیدین و سرعت روبش  $100 \text{ mV s}^{-1}$  در بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار در pH ۵/۰ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد.

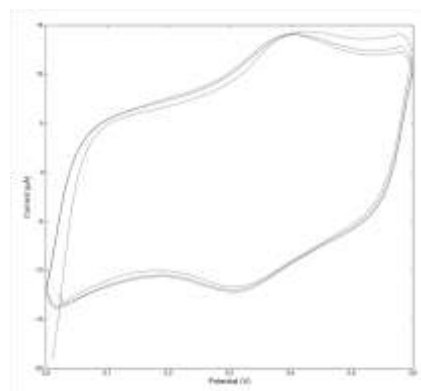
هم‌چنین از آنجایی که از  $\text{ABTS}^{2-}$  به عنوان ماده واسطه جهت انتقال الکترون استفاده شده است، با تشکیل پیک ردوکس در ۵ میکرو آمپر نقش  $\text{ABTS}^{2-}$  به عنوان یک واسطه جهت انتقال الکترون آنزیم لاکاز مورد تأیید قرار می‌گیرد. در ادامه به منظور تشکیل پیک ردوکس مشخص از آنزیم لاکاز، غلظت سوبسترا تا ۱۵ میکرو آمپر افزایش داده شد.



شکل ۳- ولتاموگرام چرخه‌ای بیوکاتد ساخته شده، با کپسوله کردن حضور ۲۰ میکرولیتر از آنزیم لاکاز با غلظت  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  به روش سول - ژل، با قراردادن الکتروود در ۱۰ میکرومولار او- دیانیزیدین و سرعت روبش  $100 \text{ mV s}^{-1}$  در بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار در pH ۵/۰ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد.

ولتاموگرام چرخه‌ای بیوکاتد ساخته شده، با کپسوله کردن ۱ میلی مولار آنزیم لاکاز به روش سول - ژل، با قراردادن الکتروود در محلول ۱۵ میکرو مولار او- دیانیزیدین و سرعت روبش  $100 \text{ mV s}^{-1}$  در بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار در pH ۵/۰ و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد در شکل ۴ نشان داده

کربنی (شکل ۵) و ولتاموگرام انجام شده بدون استفاده از نانولوله‌های کربنی (شکل ۴) هر دو در غلظت یکسانی از سوبسترا (۱۵ میکرو مولار - او- دیانیزیدین) انجام شده‌اند اما به دلیل اینکه در شکل ۴ ارتباط الکتریکی مناسبی بین آنزیم و سطح الکتروود وجود نداشت بیشترین جریان تولید شده ۸ میکرو آمپر ثبت شده بود اما با اضافه شدن نانولوله‌های کربنی و اصلاح ارتباط الکتریکی بین آنزیم و سطح الکتروود، الکترونهای بیشتری از آنزیم به سطح الکتروود منتقل شده و در نتیجه جریان حاصله در همان غلظت بیشتر از حالتی است که نانولوله‌های کربنی استفاده نشده است.



شکل ۵- ولتاموگرام چرخه‌ای بیوکاتد ساخته شده، با کپسوله کردن حضور ۲۰ میکرولیتر از آنزیم لاکاز با غلظت  $1 \text{ mg ml}^{-1}$  به روش سول-ژل و استفاده از نانولوله‌های کربنی، با قراردادن الکتروود در ۱۵ میکرو مولار او-دیانیزیدین و سرعت روبش  $10 \text{ mV s}^{-1}$  در بافر فسفات پتاسیم ۰/۲ مولار در pH ۵/۰ و دمای ۲۵ درجه سانتیگراد.

هم‌چنین از تشکیل پیک ردوکس در در ۱۴ میکروآمپر می-توان نتیجه گرفت که تثبیت آنزیم با استفاده از سول-ژل آسیبی به ساختار و فعالیت آنزیم نمی‌رساند بلکه عدم تماس مناسب بین آنزیم و سطح الکتروود عامل اصلی عدم کارکرد صحیح بیوکاتد ساخته شده به روش فوق می‌باشد و استفاده از هر روش مکملی که بتواند ارتباط الکتریکی معیوب بین الکتروود و آنزیم در این روش را بهبود بخشد منجر به بهبود جریان حاصله می‌شود.

شکل ۵ نمودار ولتاموگرام بیوکاتد فوق را نشان می‌دهد. در این حالت پیک ردوکس در ۰/۳۸ ولت تشکیل شده و عدد ۱۴ میکروآمپر را نشان می‌دهد. به علاوه همانطور که انتظار می‌رفت اولاً دو پیک ردوکس کاملاً مشخص تشکیل شده است. دوماً پیک ردوکس تشکیل شده دارای شیب تندتری نسبت به روش تثبیتی است که در آن نانولوله‌های کربنی استفاده نشده بودند چرا که نانولوله‌های کربنی استفاده شده در ژل به صورت نانوسیم عمل نموده و منجر به بهبود ارتباط الکتریکی آنزیم و سطح الکتروود می‌شود در نتیجه سرعت انتقال الکترون افزایش یافته و به دنبال آن شیب پیک ردوکس بیشتر می‌شود. سوم اینکه اگرچه ولتاموگرام انجام شده با استفاده از نانولوله‌های

## سپاسگزاری

از کلیه همکاران در آزمایشگاه زیست‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات، تهران نهایت سپاسگزاری را داریم.

## منابع

- [1] Baldrian P. Fungal Laccases - Occurrence and Properties. *FEMS Microbiol Rev.* 2006;30(2):215–42.
- [2] 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.
- [3] Barriere F, Kavanagh P, Leech D. A laccase–glucose oxidase biofuel cell prototype operating in a physiological buffer, *Electrochim. Acta.* 2006; 51 :5187–5192.
- [4] Barton S C, Kim H H, Binyamin G, Zhang Y, Heller A. Electroreduction of O<sub>2</sub> to water on the “wired” laccase cathode, *J. Phys. Chem. B.* 2001; 105: 11917–11921.
- [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. *Biosens Bioelectron.* 2006; 21:2015- 2045.
- [7] Cho N S, Cho HY, Shin S J, Choi Y J, Leonowicz A, Ohga S. Production of Fungal Laccase and Its Immobilization and Stability. *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.* 2008; 53 (1): 13-18.
- [8] Deng L, Wang F, Chen H, Shang L, Wang L, Wang T, Dong S. A biofuel Cell with Enhanced Performance by Multilayer Biocatalyst Immobilized on Highly Ordered Macroporous Electrode Biosensors & Bioelectronics. 2008; 24: 329-333.
- [9] Durán N, Rosa MA, D'Annibale A, Gianfreda L. Applications of Laccases & Tyrosinases (Phenoloxidases) Immobilized on Different Supports: a Review, *Enzyme Microb. Technol.* 2002; 31 :907–931.
- [10] Fei J, Basu A, Xue F, Palmore GTR, *Org. Lett.* 2006; 8: 3.

- [11] Farneth W E, Diner B A, Gierke T D, D'Amore M B. Current densities from electrocatalytic oxygen reduction in laccase/ABTS solutions. *J. Electroanal. Chem.* 2005; 581: 190–196.
- [12] Farneth W E, D'Amore M B. Encapsulated laccase electrodes for fuel cell cathodes, *J. Electroanal. Chem.* 2005; 581: 197–205.
- [13] 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.
- [14] Gill I, Ballesterose A. Bioencapsulation Within Synthetics Polymers(Part 1): Sol-Gel Encapsulated Biologicals. *Trends Biotechnol.* 2000; 18: 282-296.
- [15] Gomes S A S S, Nogueira J M F, Rebelo M J F. An amperometric biosensor for polyphenolic compounds in red wine. *Biosens. Bioelectron.* 20 (2004) 1211–1216.
- [16] Heller A. Miniature biofuel cells. *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2004; 6: 209–216.
- [17] Jungbae K, Hongfei J, Wang P. *Biotechnol Adv.* 2006; 24:296.
- [18] Katz E, Shipway A N, Willner I, Schmid G. *Nanoparticles From Theory to Applications*, Wiley-VCH, Weinheim, Germany. 2004; p. 368 (Chapter 6).
- [19] Kuznetsov BA, Shumakovich G P, Koroleva O V, Yaropolov A I. On Applicability of Laccase as Label in the Mediated and Mediatorless Selectroimmunoassay: Effect of Distance on the Direct Elecelectron Transfer Between Laccase and Electrode. *Biosens. Bioelectron.* 2001; 16: 73–84.
- [20] Livage J, Cordin T, Roux C. Encapsulations of Biomolecules in Silica Gels. *J. Phys.:Condent matter.* 2001; 13: R673-R691.
- [21] Mayer A M, Staples R C. Laccase: New Functions for an Old Enzyme. *Phytochemistry.* 2002; 60:551–565.
- [22] Nogala W, Rozniecka E, Zawisza I, Rogalski J, Opallo M. Immobilization of ABTS – Laccase System in Silicate Based Electrode for Bioelectrocatalytic Reduction of Dioxygen. *Electrochemistry Communications.* 2006; 8: 1850-1854.
- [23] Piontek K. Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes Versicolor* at 1.90Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers. *J. Biol. Chem.* 2002; 277:37663–37669.
- [24] Quan D, Shin W. Modification of Electrode Surface for Covalent Immobilization of Laccase. *Materials Science and Engineering.* 2004; 24: 113-115.
- [25] Quan D, Kim Y, Shin W. Characterization of an amperometric laccase electrode covalently immobilized on platinum surface. *J. Electroanal.Chem.* 2004; 561 : 181–189.
- [26] Riva S. Laccases: Blue Enzymes for Green Chemistry. *TRENDS in Biotechnology* 2006; Vol.24 No.5.
- [27] Rogalski J, Leonowicz A. in: A. Pandey (Ed.), *Concise Encyclopedia of Bioresource Technology*. The Haworth Press, Inc., Binghamton, USA, 2004, pp. 533–542.
- [28] Rowinski P, Bilewicz R, Stebe M J. E. Rogalska. *Anal. Chem.* 75 (2004) 283.
- [29] 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.
- [30] Solomon E I , Sundaram U M, Machonkin T.E. Multicopper oxidases and oxygenases. *Chem. Rev.* 1996; 96: 2563–2605.
- [31] Tsujimura S, Tatsumi H, Ogawa J, Shimizu S, Kano K, Ikeda T. *J. Electroanal. Chem.* 2001; 496 :69.
- [32] Yinghui D, Qiuling W, Shiyu F. Laccase Stabilization by Covalent Binding Immobilization on Activated Polyvinyl Alcohol Carrier. *Letters in Applied Microbiology.* 2002; 35:451-456.
- [33] Yoshida H. Chemistry of Lacquer Urushi. *J. Chem. Soc.* 1883; 43: 472–486.
- [34] Zawisza I, Rogalski J, Opallo M. Electrocatalytic reduction of dioxygen by redox mediator and laccase immobilized in silicate thin film. *J. Electroanal. Chem.* (2006) ;588: 244–252.