

# 基于三维石墨烯的甘油酶生物燃料电池的构建及其性能研究

董长城<sup>1</sup>, 张力<sup>1</sup>, 陈东霞<sup>1</sup>, 朴金花<sup>1</sup>, 梁振兴<sup>2</sup>, 姜建国<sup>1</sup>

(1. 华南理工大学食品科学与工程学院, 广东广州 510641)(2. 华南理工大学化学与化工学院, 广东广州 510641)

**摘要:** 本文采用修正的 Hummers 方法制备了氧化石墨, 通过超声波剥离得到氧化石墨烯溶液, 用水热法进行还原, 制得三维石墨烯。结果表明, 制备的三维石墨烯材料具有多孔结构, 且还原后某些含氧基团消失。所构建的酶生物燃料电池以三维石墨烯(GN)为载体, 以麦尔多拉蓝(MB)为导电介体, 用 Nafion(NF)固定甘油激酶(GK)和甘油-3-磷酸氧化酶(GPO)制备阳极催化电极, 并以 Pt/C 作为阴极催化剂。结果显示, 基于 NF/GN/MB 酶修饰碳纸电极的甘油酶生物燃料电池具有良好的放电性能, 开路电位达到 0.77 V, 并在 0.42 V 取得最大功率密度 42.05  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ 。论文中对该酶生物燃料电池的组装、工作条件等进行了优化, 用极化曲线法和交流阻抗法对其性能进行了评价。该酶生物燃料电池将为生物柴油副产物甘油的处理, 提供一种清洁可靠的能源再利用方式。

**关键词:** 甘油; 酶生物燃料电池; 三维石墨烯; 麦尔多拉蓝; 极化曲线; 交流阻抗

文章编号: 1673-9078(2017)6-173-177

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2017.6.025

## Preparation and Properties of Glycerol Enzymatic Biofuel Cells Based on Three-dimensional Graphene

DONG Chang-cheng<sup>1</sup>, ZHANG Li<sup>1</sup>, CHEN Dong-xia<sup>1</sup>, PIAO Jin-hua<sup>1</sup>, LIANG Zhen-xing<sup>2</sup>, JIANG Jian-guo<sup>1</sup>

(1.College of Food Science and Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

(2.School of Chemistry and Chemical Engineering, South China University of Technology, Guangzhou 510641, China)

**Abstract:** Graphene oxide (GO) was prepared according to a modified Hummer's method, and graphene oxide aqueous solution, obtained by ultrasonic exfoliation, was then reduced by hydrothermal method to produce three-dimensional graphene (GN). The results showed that the as-prepared three-dimensional graphene material possessed a porous structure and some oxygen-containing groups disappeared after reduction. A glycerol enzymatic biofuel cell (EBFC) was prepared using three-dimensional GN as the carrier, and Meldola's blue as the mediator; Nafion (NF) was used to immobilize glycerol kinase (GK) and glycerol-3-phosphate oxidase (GPO) to prepare the anode catalyst, and platinum on carbon was used as the cathode catalyst. The results showed that the glycerol EBFC based on the NF/GN/MB enzyme-modified carbon paper electrode had good discharge performance. The open circuit potential was 0.77 V and the maximum power density was 42.05  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  at 0.42 V. The assembly of the glycerol EBFC and the working conditions were optimized. The performance was also evaluated using polarization curve and alternating current (AC) impedance methods. This EBFC will provide a clean and reliable energy reuse approach for the treatment of glycerol, a by-product of biodiesel in the future.

**Key words:** glycerol; enzyme biofuel cell; three-dimensional graphene; Meldola's blue; polarization curve; alternating current impedance

随着化石燃料的消耗殆尽, 人们一直在探索利用可再生能源, 这一日益增长的兴趣导致了生物燃料的

收稿日期: 2017-01-03

基金项目: 国家自然科学基金项目 (21576101、21476087、21676106); 十三五国家重点研发计划子课题 (2016YFB0101200、2016YFB0101204); 中央高校基本科研业务费

作者简介: 董长城 (1991-), 硕士研究生, 研究方向: 轻工技术与工程

通讯作者: 朴金花 (1970-), 副研究员, 硕士生导师, 研究方向: 电化学食品分析, 食品安全检测; 梁振兴 (1978-), 教授, 硕士生导师, 研究方向: 纳米材料催化相关方向

兴起<sup>[1]</sup>。生物柴油就是一种可替代化石燃料的清洁环保的生物燃料。在生物柴油的生产过程中会产生大量的不可避免的副产物甘油(图1), 所以甘油已成为一种廉价且丰富的资源, 将甘油作为燃料电池的燃料是高效利用甘油的有效方式之一<sup>[2,3]</sup>, 同时, 利用酶作为催化剂的酶生物燃料电池相比利用贵金属作为催化剂的传统燃料电池, 因其能源转化率高等因素表现出了极大的应用前景<sup>[3]</sup>。

酶生物燃料电池以酶修饰电极作为生物电极, 由于酶活性中心外有一层不导电的蛋白质外壳, 影响了

电子从酶的活性中心到电极表面的传递，从而导致酶生物燃料电池的电流密度和功率密度都较低<sup>[4-6]</sup>。目前通过引入电子介体，可以在酶的氧化还原中心和电极表面之间建立直接的联系，从而解决了这个问题<sup>[5]</sup>。但是电子介体与酶一样都存在固定化的问题。所以在

高性能酶生物燃料电池的发展中一个重要研究方向是寻求一种方法，来提高酶修饰电极的稳定性，并防止电子介体的泄漏，使电子在酶、电子介体与电极之间得以自由传递<sup>[6-8]</sup>。

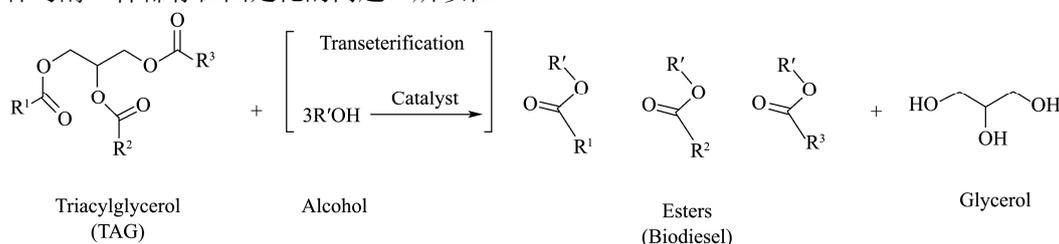


图 1 生物柴油制备过程中副产物甘油的产生

Fig.1 Generation of by-product glycerol during the production of biodiesel

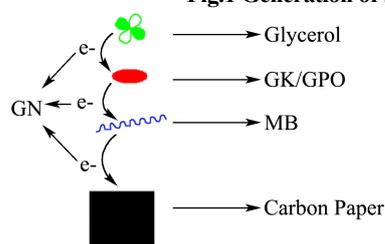


图 2 酶电极反应过程示意图

Fig.2 Schematic diagram of the reaction in the NF/GN/MB/enzyme-modified electrode

在过去的 30 年中，研究人员为了提高酶生物燃料电池的性能，研究出很多提高酶和电子介体的稳定性的方法，包括用导电的纳米材料作为酶电极的修饰材料，采用化学（如共价结合）和物理的方法（如吸附和封装）进行固定等<sup>[6,9,10]</sup>。石墨烯是蜂窝状二维晶体，其理论比表面积可以达到 2600 m<sup>2</sup>/g，在室温下，既有较高的电子迁移率和力学性能，又有较强的吸附能力<sup>[11]</sup>，已引起科研人员的极大兴趣。与二维晶体石墨烯相比，三维石墨烯具有更高的比表面积和活性，在催化、储能等领域能够体现其重要应用价值。麦尔多拉蓝（MB）是一种最广泛研究的电子介体<sup>[7]</sup>。Santo 等人报道了 MB 与多壁碳纳米管的直接连接，可以很容易地将其固定在电极表面而不发生泄漏<sup>[8]</sup>。Maroneze 等人通过共价键将 MB 固定在一个新的 SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub>/石墨复合材料上促进 MB 在电极上的吸附<sup>[9]</sup>。Hart 等人直接将酶和 MB 固定在丝网印刷碳电极上进一步提高生物传感器的性能<sup>[10]</sup>。然而，在生物燃料电池的性能，如电化学活性和稳定性方面，仍然不能令人满意。在甘油催化中，甘油激酶（GK）和甘油-3-磷酸氧化酶（GPO）可以很好地对甘油进行催化氧化，反应中，甘油首先被甘油激酶（GK）催化，然后被甘油-3-磷酸氧化酶（GPO）氧化形成磷酸二羟丙酮（图 2）<sup>[7]</sup>，使用这两种酶作为甘油生物催化剂制备甘

油生物燃料电池可以期望获得很好的结果。

本论文设计了一个基于三维石墨烯的甘油酶生物燃料电池。其中，以三维石墨烯（GN）为载体，麦尔多拉蓝为导电介体，用 Nafion(NF)固定甘油激酶（GK）和甘油-3-磷酸氧化酶（GPO）制备阳极催化剂。基于 NF/GN/MB 的酶修饰电极的反应过程如图 2 所示。同时以 Pt/C 催化剂为阴极催化剂，Nafion 115 膜作为离子交换膜来构建酶生物燃料电池。对该酶生物燃料电池的组装、工作条件等进行了优化，对其性能也进行了评价。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

石墨粉来自于（99.0%，天津市科密欧化学试剂公司）；甘油（99.0%，天津市福晨化学试剂厂）；甘油激酶（≥21.2 U/mg, Sigma）；甘油三磷酸氧化酶（≥250 U/mg, Sigma）；麦尔多拉蓝（99.0%，Damas-beta）；Nafion（5wt%，上海河森电气有限公司）；碳纸（HCP020N，厚度 0.2 mm，上海河森电气有限公司）；VC-72（99.0%，卡博特（中国）投资有限公司）；Nafion115 膜（分析纯，美国 Dupont）；其他常规试剂均来自广州化学试剂厂，均为分析纯，实验用水为去离子水。

### 1.2 主要仪器设备

用 X-射线衍射仪（Shimadzu XD-3A，日本岛津）、场发射扫描电子显微镜（Zeiss SUPRA40，德国）表征石墨烯的微观结构及表面形貌，用电化学工作站（Zennium，德国）进行电化学性能测试。其他常规仪器包括精密电子天平（AY120，HANGPING），磁力加热搅拌器（78-1 型，常州澳华仪器有限公司），

电热恒温鼓风干燥箱 (DHG-9076A 型, 广东环凯微生物科技有限公司), 数控超声波清洗器 (KQ5200DE, 昆山市超声仪器有限公司), 真空干燥箱 (DZF-6050, 上海秣马恒温设备厂), 低速离心机 (KDC-40, 中佳)。

### 1.3 实验过程

#### 1.3.1 三维石墨烯的制备

采用改进的 Hummers 方法<sup>[11]</sup>制备 GO, 将 100 mg 的 GO 分散在 50 mL 的去离子水中, 超声分散 30 min。取超声分散获得的黑棕色胶态分散液 33 mL, 移到高压反应釜中, 先在 100 °C 下反应 40 min, 后升温到 180 °C 再保温 24 h。反应完成后, 将反应釜取出, 自然冷却至室温, 并用 X 射线衍射 (XRD)、扫描电子显微镜 (SEM) 对三维石墨烯进行了表征。

#### 1.3.2 膜电极的制备

##### (1) 碳纸的预处理

碳纸 (Toray 90) 用 2% 聚四氟乙烯 (PTFE) 溶液多次浸渍, 在 340 °C 烘 0.5 h 后使 PTFE 含量为大于 30% (实际含量 31.5%), 待用。

##### (2) 扩散层的制备

先定量称取碳粉, 加入相应量的 PTFE, 然后加入适当量的乙醇 (10 mg 样品 1 mL 乙醇), 超声波振荡 1 h, 并每隔 15 min 用玻璃棒搅拌一次, 喷涂膜电极 (预处理的碳纸)。待均匀喷涂后, 在马弗炉中 350 °C 热处理 90 min。

##### (3) 催化层的制备

1、配浆液: 取 2% nafion 溶液 500  $\mu$ L、3 mM MB 500  $\mu$ L、20 mg/mL GK 1000  $\mu$ L、20 mg/mL GPO 500  $\mu$ L、1 mg/L 3D-GN 500  $\mu$ L 混合均匀。

2、喷涂电极, 35 °C 真空干燥过夜, 阴极的制备方法方法与阳极相同, 只是将催化剂换为 Pt/C (HiSPEC 4000), 催化剂载量为 3.0 mg/cm<sup>2</sup>。

#### 1.3.3 电化学测试

单电池测试的极化曲线使用 Zennium (Zahner) 电化学工作站在两电极模式下采集, 以 1 mV/s 从电池开路电压 (OCV) 扫到 50 mV, 电池的阻抗在开路电压下使用电化学交流阻抗法进行测量。电解质膜为 Nafion 115 膜。

## 2 结果与讨论

### 2.1 三维石墨烯的制备及表征

#### 2.1.1 X-射线衍射分析(XRD)

图 3 为石墨、氧化石墨和三维石墨烯的 X-射线衍射分析图。从图中可以看出, 对于氧化石墨, 一个宽

的衍射峰出现在  $2\theta=10^\circ$  (根据布拉格方程计算层间距  $d$  约 0.88 nm) 处, 这不同于石墨的尖锐的衍射峰 ( $d=0.34$  nm,  $2\theta=26.5^\circ$ )。这种情况可能是加入强氧化剂后, 氧原子与碳原子之间形成共价键, 在其表面引入了 C-OH、-COOH 和 C=O 等大量含氧官能团, 使得氧化石墨的层间距比石墨大。从图中还可以看出, 经还原的 GO 获得的三维石墨烯峰值几乎消失说明经高温高压处理后, 多层的氧化石墨烯得到还原和剥离, 氧化石墨烯中的很多含氧基团消失了, 石墨的空间完整性被破坏, 无序度大大增加, 石墨在尺寸上发生了变化, 而且破坏了原有的结晶性能。

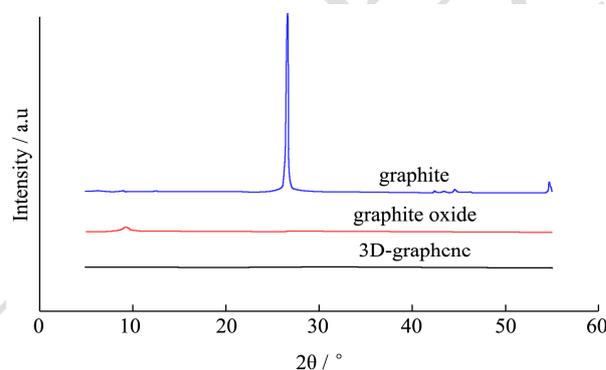


图 3 石墨、氧化石墨和三维石墨烯的 XRD 图

Fig.3 XRD patterns of graphite, graphite oxide, and 3D-graphene

#### 2.1.2 扫描电子显微镜分析(SEM)

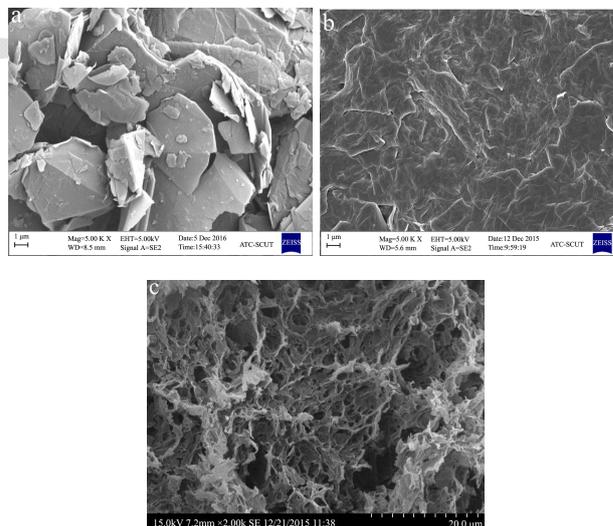


图 4 SEM 照片

Fig.4 SEM images

注: a, 石墨粉; b, 氧化石墨烯; c, 三维石墨烯。

图 4 为石墨粉、氧化石墨烯、三维石墨烯的扫描电镜照片。从图中可以看出, 原料石墨呈现鳞片状结构。在通常情况下, 石墨烯在 SEM 下很难成像, 但是由于石墨烯质软, 在基底上沉积会形成大量的褶皱, 而氧化石墨烯及还原的石墨烯均在片层边缘存在褶

皱, 呈现薄纱状, 而氧化石墨烯上的含氧官能团破坏了 C=C 双键是造成褶皱的主要原因。同时, 从该图中可清楚地看到三维石墨烯水凝胶的空间多孔网状结构, 孔洞的平均尺寸约为 1~2  $\mu\text{m}$ , 形成的孔洞内壁较薄, 说明制备的石墨烯的片层厚度不是很厚。可见, 三维石墨烯是由石墨烯相互搭接而构成的多孔材料。在水热反应时, 由系统能量推动, 水分子做链接, 使石墨烯相互靠近并连接在一起。在三维石墨烯中存在大量孔洞且均为通孔, 孔径由几纳米到几十微米不等。随机取向的石墨烯片之间相互重叠、缠绕、相互包裹而构成了三维结构。片层之间靠范德瓦尔斯力相互连接。石墨烯随机堆积而成的三维结构使其可以在宏观上呈现稳定性。

## 2.2 电化学测试

甘油激酶 (GK) 和甘油-3-磷酸氧化酶 (GPO) 对甘油有很好的催化活性, 本文利用 GK 和 GPO 制备甘油催化酶修饰电极。为了改善酶修饰电极的电子传导性能和提高酶电极的稳定性, 采用石墨烯纳米材料作为酶催化剂的载体, 麦尔多拉蓝 (MB) 作为电子介体, 构建酶修饰电极, 并对其进行了优化, 分别考察了酶修饰电极的面积、MB 的干燥时间和酶修饰电极的交流阻抗三个因素对酶修饰电极性能的影响。

### 2.2.1 电极面积的影响

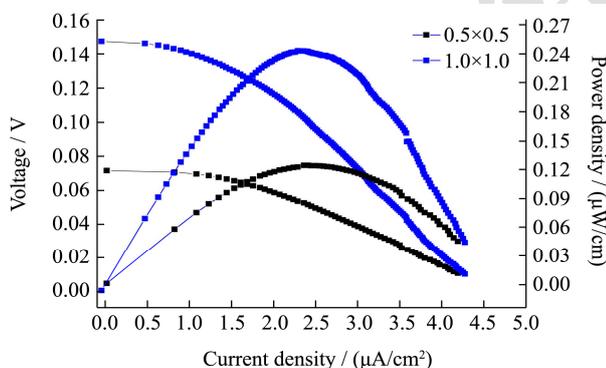


图5 电极面积对甘油酶生物燃料电池的功率密度的影响

Fig.5 Effect of electrode area on the power density of the glycerol enzymatic biofuel cell

在组装燃料电池时, 当电极面积增大时, 由于各种不确定因素的影响, 电池的性能会降低。在本论文中考察了电极面积对甘油燃料电池性能的影响, 实验中制备了 0.5 cm $\times$ 0.5 cm 和 1.0 cm $\times$ 1.0 cm 大小的两个面积的甘油催化酶修饰电极。图 5 是两个不同面积的电极组装的电池的功率密度曲线, 从图中可以看出, 电极面积为 1.0 cm $\times$ 1.0 cm 的电池的性能要优于面积为 0.5 cm $\times$ 0.5 cm 的电池。从图 5 中可以看出, 面积为 1.0 cm $\times$ 1.0 cm 的电池的开路电压为 0.15 V, 极限电流

密度为 4.27  $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ , 其最大功率密度为 0.24  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$ , 性能要比电极面积为 0.5 cm $\times$ 0.5 cm 的电池好, 结果说明电极面积增大, 没有影响到酶修饰电极的性能。

### 2.2.2 电极干燥时间的影响

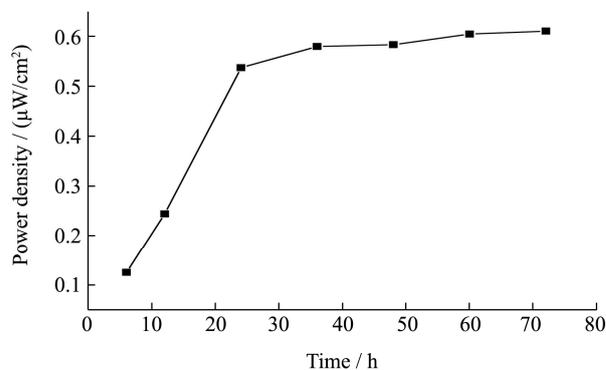


图6 干燥时间对甘油酶生物燃料电池的功率密度的影响

Fig.6 Effect of drying time on the power density of the glycerol enzymatic biofuel cell

本论文是采用喷涂的方法制备酶修饰电极, 如果酶修饰电极没有足够的时间干燥, 酶催化剂和麦尔多拉蓝介体就不能很好的固定在基底电极上, 从而在电池工作过程中产生脱落的现象, 影响酶修饰电极的催化性能和酶电极的寿命。因此, 电极的干燥时间对酶电极的性能有重大影响。图 6 是制备酶修饰电极时在不同干燥时间下制备的甘油燃料电池的功率密度, 从图中可以看出, 电池的功率密度随着酶修饰电极的干燥时间增加而增加, 当干燥时间达到 40 h 时, 电池的功率密度基本稳定, 说明在干燥时间低于 40 h 的时候, 甘油激酶和甘油-3-磷酸氧化酶不能很好地固定在电极基体上, 在电池工作过程中会脱落, 从而影响电池的性能及寿命, 同时, 如果没有足够的干燥的时间, 电子介体麦尔多拉蓝也会溶于电解质溶液中, 从而影响电池的性能。从图 6 中可以看出, 酶修饰电极的干燥时间可以选择 40 h。

### 2.2.3 阻抗的影响

对于燃料电池, 电池的性能和电池的内阻有着密切的联系, 如果内阻很高会严重影响到电池的性能, 本文讨论了电池的电化学阻抗和电池性能之间的关系。图 7 是电化学阻抗与电池开路电压 (a)、极限电流密度 (b)、最大功率密度 (c) 间的的关系曲线, 从图中可以看出, 随着阻抗的增加, 甘油酶生物燃料电池性能逐渐降低, 开路电压、极限电流密度、最大功率密度均明显减小。可见, 内阻对酶生物燃料电池性能有着重要的影响, 这与文献<sup>[12]</sup>中报道的一致, 在电极的制备过程中, 尽量减小电池的电化学阻抗, 从而提高酶生物燃料电池的性能。

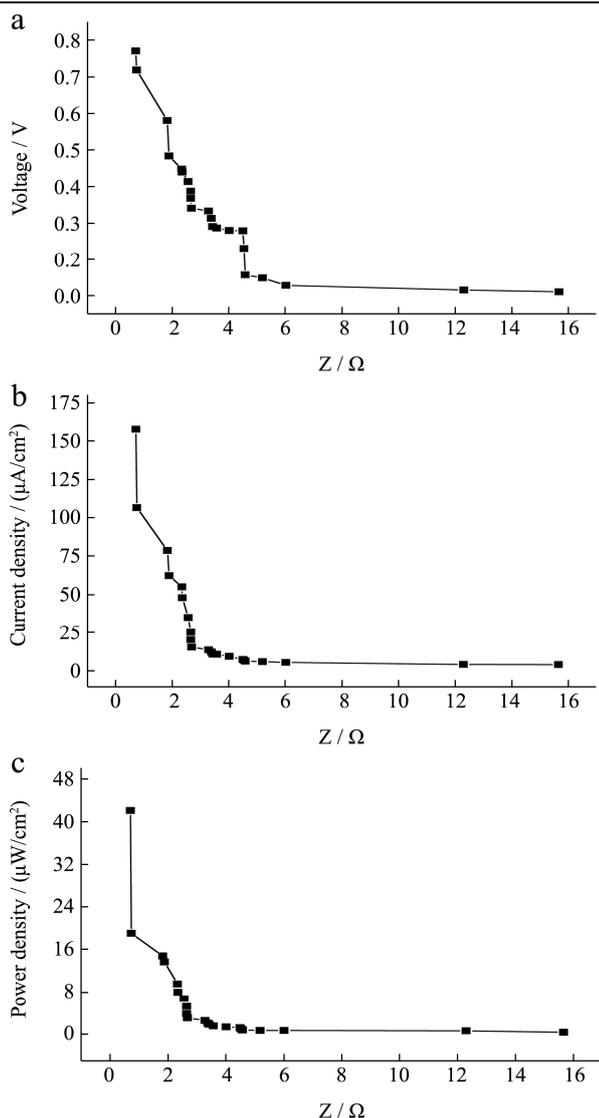


图7 阻抗对甘油酶生物燃料电池的性能的影响

Fig.7 Effect of impedance on the performance of the glycerol enzymatic biofuel cell

### 2.2.4 优化结果

图8为经过优化的甘油酶生物燃料电池的功率密度曲线(a)和电池的电化学阻抗谱曲线(b),从图中可以看出电池的开路电压为0.77V,极限电流密度为157.78 μA/cm<sup>2</sup>,相比优化前有了明显的提高,其最大功率密度可达到42.05 μW/cm<sup>2</sup>,与文献报道的酶生物燃料电池功率密度<sup>[13]</sup>相当。从电化学阻抗谱曲线(图8b)可以看出,在高频段时阻抗约为0.76 Ω,电池性能的提高与其阻抗降低到1 Ω以下密切相关。下一步工作将进一步进行电极的优化工作,使以甘油为燃料的酶生物燃料电池的性能进一步提高。

## 3 结论

本论文以三维石墨烯(3D-GN)为载体,以麦尔多拉蓝为导电介质,用Nafion固定甘油激酶(GK)和甘

油-3-磷酸氧化酶(GPO)制备甘油燃料电池阳极催化剂,用Pt/C催化剂为阴极,成功研制并构建了以甘油为燃料的酶生物燃料电池,并从电极面积、电极干燥时间、电池的阻抗大小三个方面进行优化,得到了较好结果。制得的酶生物燃料电池的最大功率为42.05 μW/cm<sup>2</sup>,该酶生物燃料电池为生物柴油副产物甘油的再利用提供了一个新方向,又提供了清洁可靠的能源。

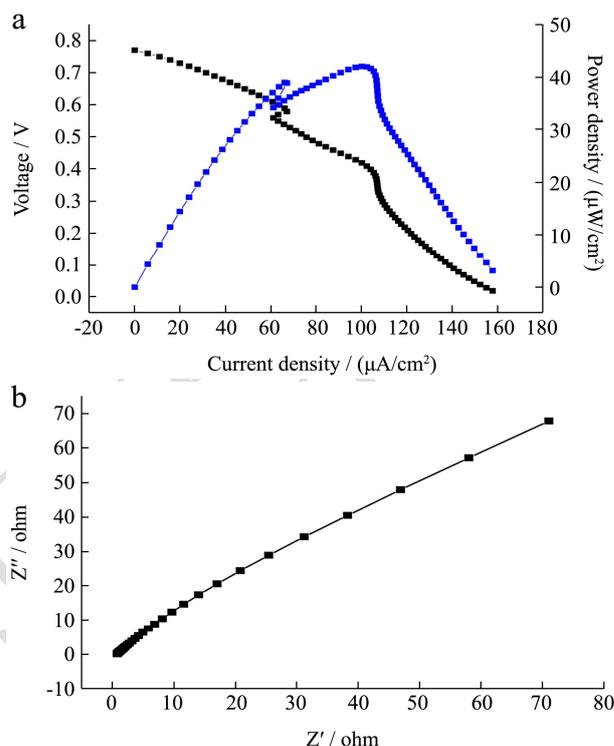


图8 甘油酶生物燃料电池测试的功率密度曲线和电化学阻抗谱曲线

Fig.8 Power density and impedance curves of glycerol enzymatic biofuel cells after optimization

## 参考文献

- [1] Shrier A, Giroud F, Rasmussen M, et al. Operational stability assays for bioelectrodes for biofuel cells: effect of immobilization matrix on laccase biocathode stability [J]. Journal of the Electrochemical Society, 2014, 161(4): H244-H248
- [2] Arechederra R L, Minteer S D. Complete oxidation of glycerol in an enzymatic biofuel cell [J]. Fuel Cells, 2009, 9(1): 63-69
- [3] Arechederra R L, Treu B L, Minteer S D. Development of glycerol/O<sub>2</sub> biofuel cell [J]. Journal of Power Sources, 2007, 173(1): 156-161
- [4] Liu J, Zhang X, Pang H, et al. High-performance bioanode based on the composite of CNTs-immobilized mediator and silk film-immobilized glucose oxidase for glucose/O<sub>2</sub> biofuel

- cells [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2012, 31(1): 170-175
- [5] Schuhmann W, Ohara T J, Schmidt H L, et al. Electron transfer between glucose oxidase and electrodes via redox mediators bound with flexible chains to the enzyme surface [J]. *Journal of the American Chemical Society*, 1991, 113(4): 1394-1397
- [6] Rasmussen M, Abdellaoui S, Minteer S D. Enzymatic biofuel cells: 30 years of critical advancements [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2016, 76: 91-102
- [7] Sokic-Lazic D, Arechederra R L, Treu B L, et al. Oxidation of biofuels: fuel diversity and effectiveness of fuel oxidation through multiple enzyme cascades [J]. *Electroanalysis*, 2010, 22(7-8): 757-764
- [8] Santos A S, Pereira A C, Durán N, et al. Amperometric biosensor for ethanol based on co-immobilization of alcohol dehydrogenase and Meldola's blue on multi-wall carbon nanotube [J]. *Electrochimica Acta*, 2006, 52(1): 215-220
- [9] Maroneze C M, Arenas L T, Luz R C S, et al. Meldola blue immobilized on a new SiO<sub>2</sub>/TiO<sub>2</sub>/graphite composite for electrocatalytic oxidation of NADH [J]. *Electrochimica Acta*, 2008, 53(12): 4167-4175
- [10] Hughes G, Pemberton R M, Fielden P R, et al. Development of a novel reagentless, screen-printed amperometric biosensor based on glutamate dehydrogenase and NAD<sup>+</sup>, integrated with multi-walled carbon nanotubes for the determination of glutamate in food and clinical applications [J]. *Sensors and Actuators B: Chemical*, 2015, 216: 614-621
- [11] Xu Y X, Sheng K X, Li C, et al. Self-assembled graphene hydrogel via a one-step hydrothermal process [J]. *ACS Nano*, 2010, 4(7): 4324-4330
- [12] Kashyap D, Dwivedi P K, Pandey J K, et al. Application of electrochemical impedance spectroscopy in bio-fuel cell characterization: A review [J]. *International Journal of Hydrogen Energy*, 2014, 39(35): 20159-20170
- [13] Das M, Barbora L, Das P, et al. Biofuel cell for generating power from methanol substrate using alcohol oxidase bioanode and air-breathed laccase biocathode [J]. *Biosens. Bioelectron.*, 2014, 59(13): 184-191