


На правах рукописи



Дмитриева Мария Валерьевна

**ЭЛЕКТРОКАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БЕЛКОВЫХ ЭКСТРАКТОВ,  
ПОЛУЧЕННЫХ ИЗ КУЛЬТУРЫ *E. COLI* ВВ**

1.4.6. Электрохимия

**АВТОРЕФЕРАТ**  
диссертации на соискание ученой степени  
кандидата химических наук

Черноголовка-2024

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки Федеральном исследовательском центре проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук (ФИЦ ПХФ и МХ РАН)

**Научный руководитель:** доктор химических наук  
**Золотухина Екатерина Викторовна**

**Официальные оппоненты:** **Казаринов Иван Алексеевич**  
доктор химических наук, профессор  
Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования "Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н.Г. Чернышевского", кафедра физической химии, заведующий кафедрой

**Решетиллов Анатолий Николаевич**  
доктор химических наук, профессор  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки «Федеральный исследовательский центр «Пушкинский научный центр биологических исследований Российской академии наук», обособленное структурное подразделение Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук, лаборатория биосенсоров, заведующий лабораторией

**Ведущая организация:** Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Иркутский государственный университет»

Защита состоится «24» июня 2024 г. в 12:00 на заседании диссертационного совета 24.1.108.04 по адресу: 143432, г. Черноголовка, проспект Академика Семенова, д. 1, КОИ

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке ФИЦ ПХФ и МХ и на сайте [www.icp.ac.ru](http://www.icp.ac.ru) по адресу [https://www.icp.ac.ru/media-store/EDUCATION/DIS-SOVET/Zatshita\\_disser/Dmitrieva/Diss\\_Dmitrieva.pdf](https://www.icp.ac.ru/media-store/EDUCATION/DIS-SOVET/Zatshita_disser/Dmitrieva/Diss_Dmitrieva.pdf)

Автореферат разослан «\_\_» \_\_\_\_\_ 2024 г.

Ученый секретарь диссертационного совета

к.х.н.



Шмыглева Любовь Вячеславовна

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность темы.** Биоэлектрокатализ – явление, которое лежит в основе работы современных биосенсоров для контроля физиологически важных органических веществ и активно развиваемых биотопливных элементов. Процессы, протекающие в этих устройствах, происходят при участии биологических объектов – ферментов или живых микроорганизмов. Интерес к биокатализаторам обусловлен не только большой скоростью реакций с их участием (TOF  $10^1$ - $10^6$   $\text{с}^{-1}$ ), но и высокой селективностью биокатализаторов. Идея получения электроэнергии из таких реакций, первоначально воспринимаемая как научный курьез<sup>1</sup>, получает все большее распространение.

Осуществление эффективного биоэлектрокатализа требует сопряжения ферментативной и электрохимической реакций. Наиболее перспективным для практики представляется прямой биоэлектрокатализ, заключающийся во взаимодействии фермента с электродом, однако до сих пор известно лишь небольшое количество ферментов и микроорганизмов, которые способны взаимодействовать с электродом напрямую в широком интервале концентраций субстрата. В настоящее время преимущественно используют медиаторный биоэлектрокатализ, в котором перенос электронов от фермента или живой клетки к электроду происходит через введенную в систему или образующуюся в ходе метаболизма микроорганизма обратимую редокс-пару.

Основной проблемой использования чистых ферментов для осуществления биоэлектрокатализа является продолжительная и сложная процедура их выделения и очистки и неполное окисление ими субстрата. Живые микроорганизмы являются весьма перспективными в этом смысле, однако их практическое внедрение ограничено сложностью изучения процессов, протекающих при их «сборке» в электроактивный слой на электроде, цикличностью процесса работы, связанной с естественным метаболизмом и жизненным циклом клеток, изменением производительности при изменении внешних условий. Промежуточной системой между живыми микроорганизмами и чистыми ферментами являются ферментные каскады – совокупность ферментов, способных более полно перерабатывать субстраты.

В настоящей работе рассматривается особый тип биоэлектрокатализаторов, до сих пор не описанный в литературе: грубые белковые экстракты, полученные разрушением клеток бактерий без дальнейшего разделения и очистки, что привлекательно для практического использования. Такие системы являются аналогом ферментативного каскада, и отличаются

---

<sup>1</sup> M. C. Potter. // Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character. 1911. Vol. 84, № 571. P. 260–276.

простотой получения. В качестве основного модельного объекта был выбран микроорганизм *Escherichia coli* BB (*E. coli*).

**Степень разработанности темы исследования.** Микроорганизмы и выделяемые из них ферменты, используемые в биоэлектрокатализе, весьма многочисленны и разнообразны.

Для достижения высокой эффективности работы биокатализатора в электрохимических устройствах требуется обеспечить контакт биообъекта с электродом, поскольку в противном случае реакция ферментативного окисления будет протекать преимущественно в объеме раствора, что приведет к снижению токовых характеристик. Один из наиболее распространенных способов решения проблемы переноса заряда с биообъекта на электрод заключается в использовании обратимых редокс-медиаторных систем.

Описанные в литературе редокс-медиаторы представляют собой ионные или молекулярные пары, способные к быстрому обратимому окислению/восстановлению, что позволяет им участвовать в редокс-реакции с молекулами фермента или взаимодействовать с живыми микроорганизмами в растворе, переходя в окисленное (в катодном процессе) или восстановленное (в анодном процессе) состояние и далее возвращаться в исходную форму на поляризуемом электроде. В качестве таких редокс-медиаторных систем используют как водорастворимые, так и нерастворимые в воде соединения. Известны также способы конструирования медиаторной системы с помощью полимерных пленок. Столь большое разнообразие редокс-медиаторов связано с необходимостью взаимодействия медиатора с живой клеткой или молекулой фермента (биообъекты), что является нетривиальной задачей в силу зарядовых, стерических и иных ограничений. При этом лишь небольшая часть работ посвящена изучению механизма и кинетики взаимодействия редокс-медиаторной системы с биообъектом. В итоге в литературе практически отсутствуют сведения, обосновывающие эффективность использования той или иной редокс-медиаторной системы.

Другой актуальной проблемой является определение условий, при которых исследуемые биообъекты проявляют максимальную активность. Активность как живых микроорганизмов, так и выделенных ферментов зависит от целого ряда факторов: температура, pH и состав среды, источник углерода и т.д. При этом для каждого биообъекта эти условия индивидуальны. Таким образом, установление оптимальных условий, при которых достигается максимальная активность исследуемых биообъектов, является неотъемлемой частью любой научной работы в области биоэлектрокатализа.

**Цель работы:** определение закономерностей биоэлектрокаталитического окисления субстратов (глюкоза, цитрат) белковыми экстрактами из *E. coli*.

### **Задачи работы:**

1. Изучение влияния условий получения белковых экстрактов из штамма *E. coli* ВВ на их дегидрогеназную активность.
2. Определение влияния фазы роста культуры микроорганизма и природы субстрата (глюкоза, этиловый спирт, яблочная кислота, молочная кислота, лимонная кислота) на дегидрогеназную активность белковых экстрактов из штамма *E. coli* ВВ.
3. Определение основных закономерностей кинетики медиаторного биоэлектрoхимического окисления глюкозы полученными экстрактами.
4. Установление влияния природы редокс-медиатора, рН, природы буферного раствора и его ионной силы, температуры и концентрации реагентов, природы субстрата на электрoхимическую активность полученных экстрактов.

### **Научная новизна основных результатов:**

Впервые грубые белковые экстракты, полученные ультразвуковым разрушением клеток модельной культуры *E. coli*, использованы в качестве объекта для биоэлектрoкаталитического окисления различных субстратов (глюкоза, цитрат калия). Показана применимость разработанного подхода к получению аналогичных биоэлектрoкаталитизаторов из принципиально иного класса микроорганизмов, *Saccharomyces cerevisiae*.

Получены данные о дегидрогеназной активности грубых экстрактов клеток *E. coli* на разных стадиях роста культуры в присутствии различных субстратов с использованием хлорида трифенилтетразолия в качестве акцептора электронов (**ТТХ-активность**). Показано, что в период экспоненциального роста бактерий наибольшая ТТХ-активность наблюдается при использовании глюкозы и изоцитрата калия в качестве субстратов. Предложен способ оценки дегидрогеназной активности спектроскопическим методом по кинетике восстановления феррицианида калия в контакте с белковым экстрактом, позволяющий сократить время эксперимента.

Доказан медиаторный тип взаимодействия белковых экстрактов *E. coli* с инертным стеклоуглеродным электродом в ходе биоэлектрoкаталитического окисления глюкозы и цитрата. Среди изученного ряда известных растворимых редокс-медиаторов наибольшие токовые отклики получены с бензохиноном, метиленовым синим и гексацианоферратом (III) калия. Показано, что при выборе редокс-медиаторной системы помимо известных параметров (редокс-потенциал, совместимость с биообъектом) необходимо также учитывать наличие конкурирующих редокс-процессов между медиатором и компонентами среды.

Получена совокупность экспериментальных данных, отражающая влияние состава, ионной силы и рН буферного раствора, температуры на дегидрогеназную активность и на эффективность процесса биоэлектродокаталитического окисления глюкозы исследуемыми грубыми белковыми экстрактами. На основании полученных результатов выявлены оптимальные условия для получения грубых ферментативных экстрактов с максимальной активностью и условия проведения биоэлектродокаталитического окисления глюкозы с максимальными токовыми откликами.

Изучены особенности кинетики медиаторного биоэлектродокаталитического окисления глюкозы исследуемыми экстрактами (медиатор – феррицианид калия). Лимитирующей стадией процесса является взаимодействие ферментов экстракта с медиатором. Найдены основные кинетические параметры процесса (максимальная скорость, эффективная константа скорости реакции, эффективная энергия активации). Кинетика процесса в избытке медиатора хорошо описывается уравнением псевдопервого порядка.

**Теоретическая значимость результатов работы.** В работе установлены закономерности медиаторного биоэлектродокаталитического окисления глюкозы и цитрата грубыми белковыми экстрактами, полученными из культуры *E. coli* на различных стадиях роста. Определены основные оптимальные параметры осуществления этой реакции с максимальной скоростью. На примере исследуемой модельной системы показана принципиальная возможность использования грубых белковых экстрактов в качестве альтернативы чистым ферментам или живым микроорганизмам для проведения биоэлектродокатализа. Иными словами, в работе решена важная для биоэлектродокатализа задача по установлению закономерностей осуществления медиаторной биоэлектродокаталитической реакции окисления глюкозы ферментативными экстрактами и выявлению ключевых параметров, влияющих на кинетику этой реакции.

**Практическая значимость результатов работы.** Предложен новый объект для осуществления биоэлектродокаталитического окисления субстратов (топлив) - грубые белковые экстракты, который демонстрирует аналогичные чистым ферментам электрохимические и каталитические характеристики.

Установлены основные факторы, определяющие эффективность электрокатализа с участием таких экстрактов: помимо природы медиаторной системы и субстрата, оптимальных температуры и рН среды, в качестве таких факторов также нужно учитывать концентрацию и тип буферной системы, инертность редокс-медиатора к компонентам раствора. В работе обоснован ряд методических решений, позволяющих повысить биоэлектродокаталитическую активность исследуемых белковых экстрактов. Предложена новая конструкция

двухэлектродного биотопливного элемента с разделенными пространствами, позволяющая произвольно и независимо изменять состав биоанода.

### **Методология и методы, использованные в диссертационной работе.**

Методологической основой диссертационного исследования послужили научные работы в области ферментативного электрокатализа, а также работы, описывающие кинетические и электрохимические закономерности окисления глюкозы дегидрогеназами. Для биохимической части экспериментов использованы классические методы и протоколы, применяемые для выращивания микроорганизмов, определения общего белка, дегидрогеназной активности. Для электрохимической части экспериментов использованы классические электрохимические методы и подходы. Предложен альтернативный метод оценки дегидрогеназной активности получаемых экстрактов и новая конструкция двухэлектродного асимметричного биотопливного элемента с разделенными пространствами, позволяющая произвольно и независимо изменять состав биоанода. Обработка результатов экспериментов велась с использованием известных теоретических уравнений и статистических подходов. В работе использованы методы спектроскопии в УФ-видимом диапазоне, атомно-абсорбционного анализа, электрохимического анализа.

### **Положения, выносимые на защиту:**

1. Предложенный способ выделения грубых белковых экстрактов из *E. coli* на разных стадиях роста позволяет получать ферментативные экстракты с дегидрогеназной активностью к различным субстратам и может быть использован и для других классов микроорганизмов.

2. Дегидрогеназная и биоэлектрохимическая активности белковых экстрактов *E. coli* определяются не только стадией роста культуры, типом субстрата, рН и температурой среды, но также зависят от типа буферной системы и ее концентрации.

3. Лимитирующей стадией в процессе биоэлектрокаталитического окисления глюкозы полученными экстрактами с использованием феррицианида калия в качестве медиатора является взаимодействие ферментов экстракта с медиатором, описываемое кинетическим уравнением псевдопервого порядка.

4. Полученные экстракты способны выступать биоэлектрокатализаторами в составе медиаторного биоанода асимметричного топливного элемента с глюкозой в качестве топлива и получать сопоставимые с аналогами на чистых ферментах или живой культуре *E. coli* вольтамперные характеристики в подобранных оптимизированных условиях работы.

**Личный вклад автора.** Постановка задач и выбор методов исследования, а также интерпретация результатов и их опубликование в научных журналах выполнены автором

совместно с научным руководителем. Поиск и анализ научно-технической литературы, выполнение основных экспериментальных работ, обработка полученных данных, формулировка выводов сделаны лично соискателем. В опубликованных в соавторстве патенте и статьях по результатам работы соискателем выполнены биохимические и электрохимические измерения, обработка результатов, написание первичных версий, редактирование переработанных версий.

**Степень достоверности и апробация результатов.** Достоверность полученных в работе результатов обеспечивается использованием комплекса современных биохимических, физических и электрохимических методов исследования, получением сходимых результатов при многократных повторениях эксперимента, а также непротиворечивостью полученных в работе результатов с данными, известными из научной литературы.

По материалам диссертации опубликовано 29 печатных работ (общий объем 106 стр.), из них 7 статей в рецензируемых журналах, входящих в системы цитирования Scopus, RSCI, PubMed, ESCI, относящихся к категориям K1 и K2 на основании рекомендации ВАК от 21.12.2023 № 3-пл/1, 1 патент РФ, 21 тезис докладов на конференциях различного уровня, имеется 1 подтвержденная заявка на патент.

Основные результаты работы докладывались на международных и российских конференциях: 10-я и 14-я конференция «Физико-химические проблемы возобновляемой энергетики» (Черноголовка, 2014, 2018 гг.); Российская конференция «Физико-химические проблемы возобновляемой энергетики» (Санкт-Петербург, 2015 г.); 28-ой симпозиум «Современная химическая физика» (Туапсе, 2016 г.); 13-ое, 14-ое, 15-ое и 16-ое Международное совещание ФПИТТ (Черноголовка, 2016, 2018, 2020, 2022 гг.); International conference “Ion Transport in Organic and Inorganic Membranes” (Сочи, 2017 г.); 11 International Conference «Mechanisms of Catalytic Reactions», MCR (Сочи, 2019 г.); Международная конференция «Современные электрохимические технологии и оборудование» (Минск, 2019 г.); XXVI Международная научная конференция «Ломоносов-2019» (Москва, 2019 г.); 62-ая и 64-ая Всероссийская научная конференция МФТИ (Долгопрудный, 2019, 2021 гг.); 5-я Международная научная конференция «Наука молодых - будущее России» (Курск, 2020 г.); Международная научная конференция «Scientific research of the SCO countries: synergy and integration» (Пекин, 2020 г.); 6-я Международная научно-практическая конференция «Актуальные проблемы науки и техники» (Уфа, 2021 г.); 7-я Международная научно-практическая конференция «Технологические инновации и научные открытия» (Уфа, 2021 г.); 8-я Международная научно-практическая конференция «Инновационный потенциал развития мировой науки и техники: взгляд современных ученых» (Нижний Новгород, 2023 г.).



**Структура диссертации.** Диссертация состоит из введения, четырех глав, основных выводов и заключения, списка литературы. Работа изложена на 189 страницах, содержит 57 рисунков и 32 таблицы. Список литературы включает 251 библиографическое наименование.

**Плановый характер работы.** Исследования по теме диссертации выполнены в рамках тематической карты ФИЦ ПХФ и МХ РАН (АААА-А19-119061890019-5, 124013000692-4). Работа дважды поддержана стипендией Президента РФ (№ СП-2619.2018, № СП-5461.2021.1).

## ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

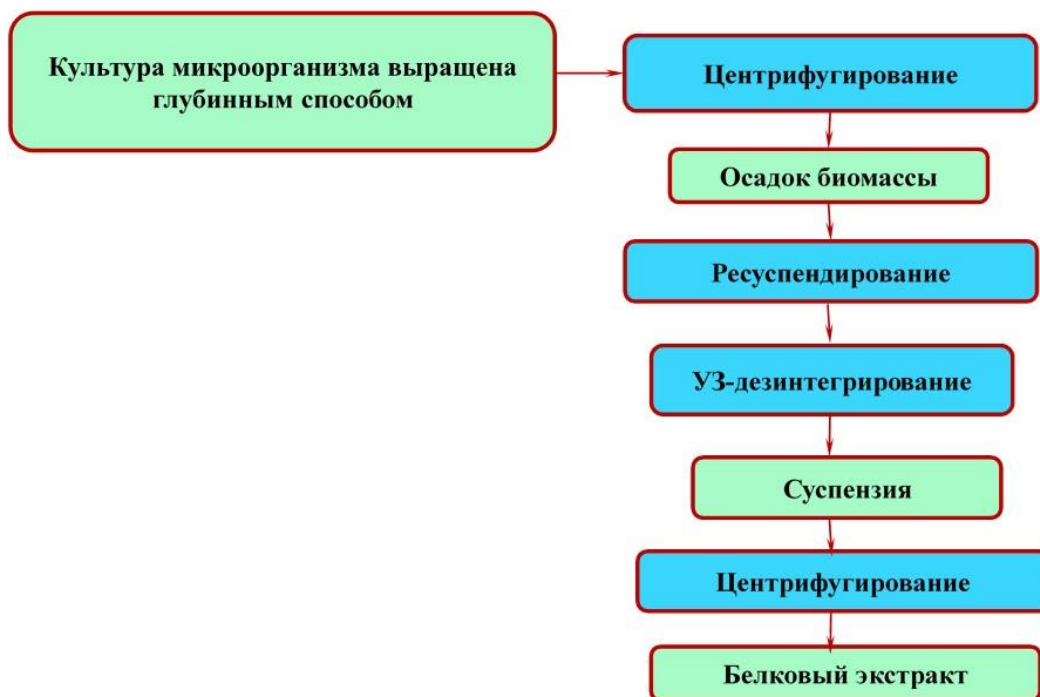
В **первой главе** проведен обзор литературы, в котором описаны закономерности ферментативного электрокатализа, приведена подробная классификация биоэлектрокаталитических систем и области их применения. Рассмотрены теории и механизмы электрокатализа, а также кинетика и механизмы прямого и медиаторного ферментативного электрокатализа. Подробно рассмотрен метаболический цикл переработки глюкозы *E. coli* с описанием ферментов, образующихся в клетке в ходе этого процесса. Описаны биологические системы, используемые для получения электрокатализаторов и основные подходы к выделению и очистке ферментов.

Во **второй главе** описаны объекты и методы исследования. Бактерии выращивали в среде Lysogeny broth (**LB**). Колонию *E. coli*, выращенную на твердой среде (LB, 2 % агар) инокулировали в 10 мл LB для получения ночной культуры. Ночную культуру (1 мл) вносили в 100 мл LB и выращивали при 37 °С при интенсивной аэрации. Через необходимый отрезок времени после начала выращивания бактерии осаждали центрифугированием при 1700 g и использовали для получения экстракта. Осажденные бактерии ресуспендировали в различных буферных системах, применяемых для работы с биологическими объектами. Принципиальная схема получения грубых экстрактов из культур микроорганизмов, обсуждаемая в 3 главе, показана на рис. 1. По данной схеме получены белковые экстракты *E. coli* и *S. cerevisiae*.

Активность дегидрогеназ определяли с использованием 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (**ТТХ**), который под действием дегидрогеназ восстанавливается до окрашенного ТТХ-формаза. Предложена альтернативная методика определения дегидрогеназной активности белковых экстрактов по скорости реакции перехода феррицианида калия из окисленного в восстановленное состояние.

Для проведения электрохимических измерений использовали стандартную стеклянную трехэлектродную ячейку с разделенными пространствами с контролем атмосферы на линии Шленка. В качестве рабочего электрода использовали стеклоуглеродный дисковый электрод (**СУЭ**) площадью 0.07 см<sup>2</sup> (если не указано иное). Электродом сравнения служил насыщенный

хлоридсеребряный электрод, а вспомогательным электродом – платиновая фольга; оба электрода были отделены от рабочего отделения стеклянной фриттой. В качестве фонового электролита использовали различные буферные растворы, применяемые для биологических систем. Предложен прототип измерительной ячейки асимметричного биотопливного элемента, позволяющий произвольно и независимо изменять состав биоанода. Все измерения проводили на потенциостате Autolab PGSTAT 101 (Metrohm). Содержание белка в экстрактах определяли с помощью бицинхониновой кислоты.

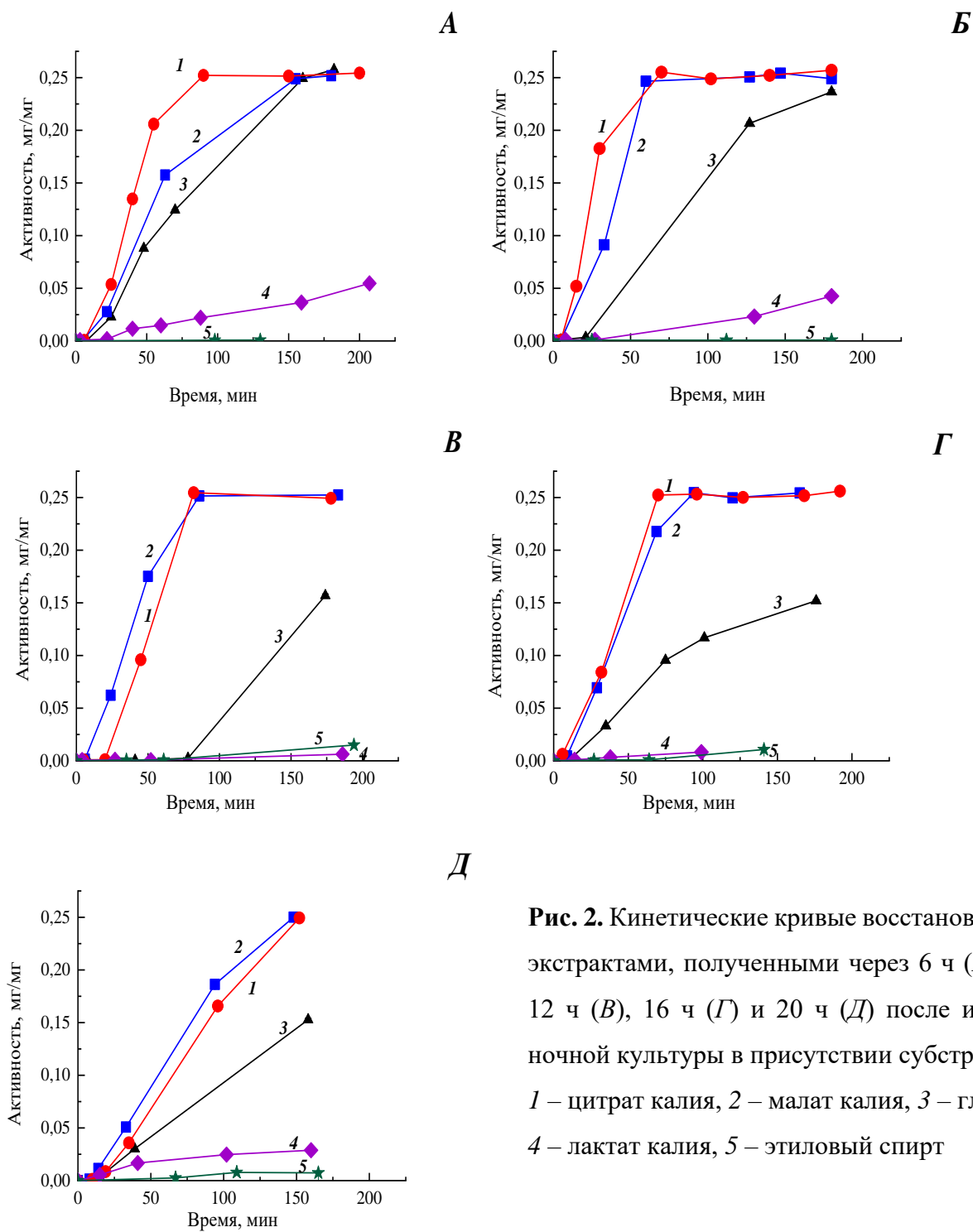


**Рис. 1.** Принципиальная схема получения грубых экстрактов из культур микроорганизмов.

**Третья и четвертая главы** содержат основные экспериментальные результаты работы. Третья глава посвящена изучению дегидрогеназной (по ТТХ) и электрохимической активностей грубых белковых экстрактов из штамма *E. coli* в зависимости от условий получения экстракта и состава раствора; показана применимость разработанного способа получения экстрактов из принципиально иного класса микроорганизмов, *Saccharomyces cerevisiae*. В четвертой главе обсуждается электрохимическая активность полученных грубых белковых экстрактов (ЭХАЭ) в составе медиаторного биоанода.

В различные периоды роста микроорганизмов вырабатываются различные ферменты, следовательно, дегидрогеназная активность экстракта, получаемого из культуры, дезинтегрированной в разные фазы роста, будет отличаться. На рис. 2 показаны кривые

накопления ТТХ-формазана при использовании разных субстратов (цитрат калия, малат калия, глюкоза, лактат калия и этиловый спирт) в контакте с экстрактами, полученными из *E. coli* в разные фазы роста. Видно, что активность ферментов изменяется в ходе роста культуры.



**Рис. 2.** Кинетические кривые восстановления ТТХ экстрактами, полученными через 6 ч (А), 8 ч (Б), 12 ч (В), 16 ч (Г) и 20 ч (Д) после инокуляции ночной культуры в присутствии субстратов: 1 – цитрат калия, 2 – малат калия, 3 – глюкоза, 4 – лактат калия, 5 – этиловый спирт

На протяжении всего периода роста бактерий наибольшую активность проявляют ферменты, использующие в качестве субстратов цитрат и малат калия.

Условия получения экстрактов могут оказывать существенное влияние на активность белков. Как видно из данных табл. 1, концентрация и природа буферного раствора, используемого на стадии ресуспендирования, оказывают влияние как на концентрацию белка в экстракте, так и на ТТХ- и электрохимическую активности. При этом высокую активность проявляли экстракты, ресуспендированные в 50 мМ калий-фосфатном буферном растворе (КРВ), который и был выбран для дальнейших исследований.

**Таблица 1.** Влияние природы и концентрации буферного раствора при рН 7.2, применяемого на стадии ресуспендирования при получении грубых экстрактов, на экстракцию белка, дегидрогеназную (ДГА) и электрохимическую активности

Буферный раствор	Концентрация белка, мг/мл	Удельная ДГА $\times 10^3$ , мг/мг (формазан/белок)	Плотность тока, $i$ , мкА/см <sup>2</sup>
<b>25 мМ</b>			
КРВ	18 $\pm$ 4	6.5 $\pm$ 0.3	22 $\pm$ 3
MOPS	15 $\pm$ 3	4.2 $\pm$ 0.2	38 $\pm$ 5
HEPES	17 $\pm$ 4	6.6 $\pm$ 0.3	30 $\pm$ 4
TRIS	13 $\pm$ 3	8.0 $\pm$ 0.4	30 $\pm$ 4
<b>50 мМ</b>			
КРВ	17 $\pm$ 4	8.0 $\pm$ 0.4	74 $\pm$ 9
MOPS	20 $\pm$ 4	7.9 $\pm$ 0.4	43 $\pm$ 6
HEPES	14 $\pm$ 3	8.3 $\pm$ 0.4	58 $\pm$ 8
TRIS	15 $\pm$ 3	7.9 $\pm$ 0.4	45 $\pm$ 6
<b>75 мМ</b>			
КРВ	18 $\pm$ 4	0	0.10 $\pm$ 0.01
MOPS	20 $\pm$ 4	0	0.10 $\pm$ 0.01
HEPES	26 $\pm$ 5	0	0.10 $\pm$ 0.01
TRIS	18 $\pm$ 4	0	0.10 $\pm$ 0.01

Поскольку на различных стадиях роста культуры образуются разные ферменты в разном количестве, то важно было оценить, как время роста культуры влияет на электрохимическую активность получаемых белковых экстрактов в отношении выбранных субстратов (глюкоза и цитрат калия). Как видно из данных табл. 2, содержание белка в экстракте возрастает при увеличении времени роста культуры, ТТХ-активность выше у экстрактов 6-ти и 8-ч культуры, а удельная плотность тока, напротив, несколько выше для экстракта из 4-ч культуры в отношении глюкозы, но воспроизводимость для 4-ч экстракта невысока. Оптимальным по отношению к обоим исследованным субстратам оказался 6-ч экстракт.

**Таблица 2.** Зависимость удельной плотности тока от содержания белка в экстракте*E. coli*, полученном на различных стадиях роста культуры

Время роста <i>E. coli</i> , ч	Содержание белка, мг/мл экстракта	ТТХ-активность*, мг/мг (формазан/белок)		i, мкА·см <sup>-2</sup>		j <sub>уд</sub> , А·см <sup>-2</sup> ·моль <sup>-1</sup> формазана	
		Г	Ц	Г	Ц	Г	Ц
4	10.6	0.02	0.03	18±2	15±1	42±5	23±2
6	20.1	0.04	0.04	50±1	62±1	31±1	37±3
8	23.1	0.04	0.04	59±2	37±2	32±1	19±1

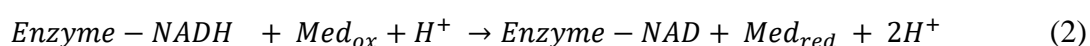
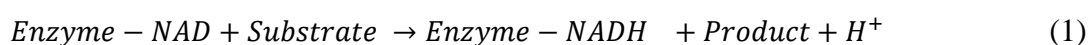
Примечание: \* инкубационный период реакции – 60 мин. Состав раствора: 0.5 мМ К<sub>3</sub>[Fe(CN)<sub>6</sub>], 4.6 мМ глюкоза (Г)/цитрат калия (Ц), 0.5 М КРВ, рН 7.6 и 0.6 мл экстракта. Перемешивание: 150 об/мин.

Использование феррицианида калия в качестве редокс-медиатора в электрохимических экспериментах позволило разработать альтернативный метод оценки дегидрогеназной активности, отличающийся быстротой и простотой исполнения в сравнении с ТТХ-методом. Оценка дегидрогеназной активности предполагается по максимальной скорости перехода феррицианида в восстановленное состояние, оцениваемой методом спектроскопии в УФ-видимом диапазоне. Как показывают результаты табл.3, предлагаемый метод позволяет адекватно сопоставлять активности получаемых образцов экстрактов.

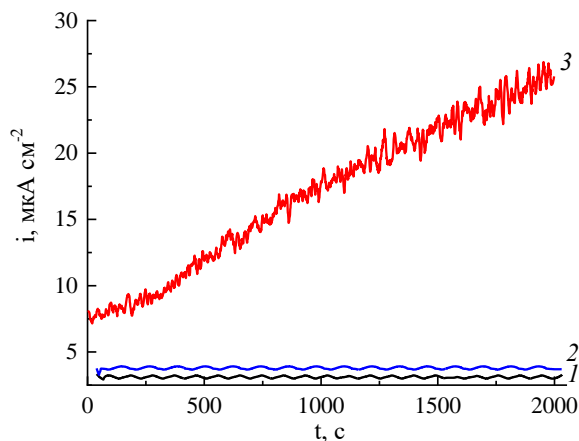
**Таблица 3.** Дегидрогеназная активность экстрактов, полученных из *E. coli*, оцененная спектроскопическим методом с использованием феррицианида и ТТХ

Образец, №	По феррицианиду, ммоль/с 15 мин	По ТТХ, мг/мл 60 мин
1	1·10 <sup>-2</sup>	1.58
2	2·10 <sup>-3</sup>	1.39
3	6·10 <sup>-4</sup>	0.78
4	3·10 <sup>-4</sup>	0.12

Необходимость использования редокс-медиатора в электрохимических экспериментах продемонстрирована на рис.3. Без добавления медиатора экстракты не проявляют электрохимической активности, а введение медиатора в состав биоанода с экстрактом приводит к появлению токовых откликов. Следовательно, в исследуемой системе возможен медиаторный биоэлектрокатализ, соответствующий схеме:



где Substrate – субстрат; Enzyme-NAD, Enzyme-NADH – окисленная и восстановленная формы фермент-коферментной системы  $Med_{ox}$ ,  $Med_{red}$  – окисленная и восстановленная формы медиатора; Product – продукт реакции.



**Рис. 3.** Изменение токового отклика СУЭ в 0.1М КРВ (рН 7.2), содержащем 4.6 мМ глюкозы и 0.6 мл экстракта (1); 4.6 мМ глюкозы и 0.5 мМ феррицианида калия (2); в растворе (2) с добавлением 0.3 мл экстракта (3). Потенциал поляризации 0.5В. Перемешивание 150 об/мин.

Из известных растворимых редокс-медиаторов в данной работе были протестированы метиленовый синий (МС), нейтральный красный (НК), рибофлавин, феррицианид калия, бензохинон, 2,4-динитрофенол, нитрат железа (III). Их редокс-отклики измеряли в буферном растворе без каких-либо дополнительных реагентов в потенциодинамическом режиме. Все медиаторы, кроме нитрата железа и 2,4-динитрофенола, продемонстрировали пару обратимых редокс-пиков в исследуемых условиях. При потенциостатической поляризации за потенциалом анодного пика редокс-перехода медиатора (для исключения влияния катодного процесса на измеряемый сигнал) получены токовые отклики, соотношение которых в системе без экстракта и с экстрактом (табл.4,  $i_c/i_b$ ) дает представление об ЭХАЭ при работе с этим медиатором.

Из сравнения плотностей фонового тока (табл. 4, А) и плотности тока в смешанном растворе медиатора и глюкозы (табл. 4, Б) можно заключить, что практически все медиаторные системы являются инертными по отношению к глюкозе, кроме бензохинона. В системах с МС и феррицианидом калия были получены самые высокие плотности тока (табл. 4, С) и достигнута максимальная ЭХАЭ, а сами медиаторы были инертны по отношению к субстрату. Однако МС способен работать в качестве медиатора только в инертной атмосфере, поскольку его восстановленная форма под действием атмосферного кислорода быстро окисляется и, кроме того, является слаборастворимой и адсорбируется на электроде и на белковых молекулах. Поэтому далее использовали феррицианид калия как медиатор, и потенциал поляризации 0.5В.

**Таблица 4.** Плотности тока,  $j$ , полученные на СУЭ в 0.1М КРВ, рН 7.2, в потенциостатическом режиме на 30 минуте измерения при потенциале  $E$  с добавлением (А) медиатора, (Б) медиатора и 4.6 мМ глюкозы, (С) медиатора, 4.6 мМ глюкозы и 0.3 мл экстракта

Медиатор	Концентрация медиатора, мМ	$E$ , В	$i$ , мкА·см <sup>-2</sup>			$i_c/i_b$
			А	Б	С	
рибофлавин	0.18*	-0.200	0.90±0.01	0.90±0.01	2.40±0.01	2.6
НК	0.56	-0.350	-0.10±0.01	-0.10±0.01	-0.07±0.01	-
2,4 – динитрофенол	0.56	0.534	0.20±0.01	0.10±0.01	0.050±0.001	-
бензохинон	0.56	0.534	12.4±0.1	19.1±0.1	62.3±0.1	3.3
МС	0.56	-0.030	0.020±0.001	0.02±0.01	8.30±0.02	415
феррицианид калия	0.56	0.534	0.10±0.01	0.10±0.01	16.50±0.03	165

Примечание. \*Концентрация медиатора выбрана, исходя из его растворимости.

Учитывая, что состав раствора (тип катионов и анионов, рН) оказывает значительное действие на активность и стабильность ферментов, было важно определить, будут ли оказывать эти факторы влияние на ЭХАЭ. С этой целью были проведены оценки ЭХАЭ в разных буферных системах с рН 7.2 при 32 °С: 0.1 М MOPS, 0.1 М HEPES, 0.1 М TRIS, 0.1 М КРВ, 0.1 М натрий-фосфатный буферный раствор (NaPB). Токовые отклики с использованием данных систем росли в ряду MOPS<NaPB<HEPES<КРВ≈TRIS. Вероятно, присутствие ОН-групп в структуре аниона органической буферной соли положительно сказывается на активности фермента. Плотности тока для КРВ выше, чем для NaPB, что соответствует порядку  $K^+$  и  $Na^+$  в ряду Хофмайстера.

Влияние рН раствора оценивали сопоставлением полученных на СУЭ плотностей тока и удельных токов в 0.1 М TRIS и 0.5 М КРВ с добавкой 0.3 мл б-ч экстракта. Для буферной системы TRIS в диапазоне рН 6.6-7.8 был найден только один экстремум при рН 7.2. В то время как для КРВ в интервале рН 7.2-8.0 было найдено 2 экстремума: 7.2 и 7.6. Таким образом, для экстракта, полученного из *E. coli*, максимальная плотность тока может быть достигнута при рН 7.2 или 7.6 в КРВ и при рН 7.2 в TRIS.

Следует отметить, что эти буферные системы отличаются не только химическим составом, но и ионной силой. Зависимость плотности тока от ионной силы также имеет экстремальный характер, как видно из сравнения результатов, представленных в табл. 5 для буферных систем TRIS (рН 7.2, 32 °С) и КРВ (рН 7.6, 32 °С). Кроме того, оптимальная ионная сила варьирует в зависимости от типа буферной системы.

**Таблица 5.** Влияние ионной силы буферной системы на биоэлектродокаталитическую активность экстрактов в различных буферных растворах

Концентрация буферной системы, М	Ионная сила, М	$i$ , мкА·см <sup>-2</sup>	$j_{уд}$ , А·см <sup>-2</sup> ·моль <sup>-1</sup>
TRIS, pH 7.2			
1.0	0.81	14±1	35±2
0.5	0.40	39±1	97±3
0.1	0.08	60±1	146±3
0.05	0.04	42±6	103±15
КРВ, pH 7.6			
1.0	2.46	30±6	75±16
0.5	1.38	51±6	124±14
0.1	0.26	30±4	74±10
0.05	0.13	35±2	87±5

Полученные данные позволили выбрать оптимальные условия для достижения максимальной ЭХАЭ биоанода, но не позволяют судить о природе лимитирующей стадии исследуемого процесса. На биоаноде протекают одновременно два типа реакций: биохимические – взаимодействие энзима с субстратом и медиатором (1), (2) и электрохимическая – превращение медиатора (3). Измеряемая плотность тока при медиаторном биоэлектродокатализе пропорциональна концентрации восстановленной формы медиатора в растворе, образующейся вследствие окисления кофермента, связанного с активным центром фермента, по реакции (2). Для определения влияния на скорость процесса концентрации медиатора ее варьировали в пределах 0.005...5 мМ при избытке глюкозы и постоянной концентрации фермента (оцененной по формазану) 0.06 мМ дегидрогеназ.

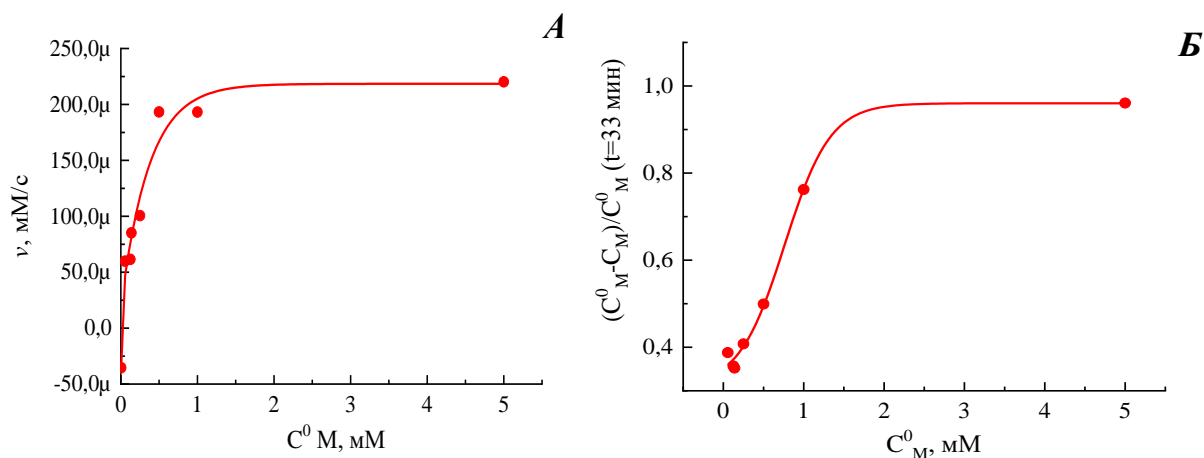
При концентрации медиатора свыше 1 мМ начальная скорость реакции превращения медиатора (3) выходит на стационарный уровень (рис. 4А), а степень превращения медиатора за 2000 с реакции (время анализа) составляет всего 5-20% (рис.4Б). Пересчет измеряемого тока в концентрацию восстановленной формы медиатора проводили по градуировочной кривой «ток-концентрация ферроцианида».

В квазистационарных условиях кинетика ферментативного катализа (1) описывается уравнением Михаэлиса-Ментен. В условиях, когда концентрация глюкозы сильно превышает константу Михаэлиса, скорость биокаталитической реакции максимальна и зависит только от концентрации фермента:

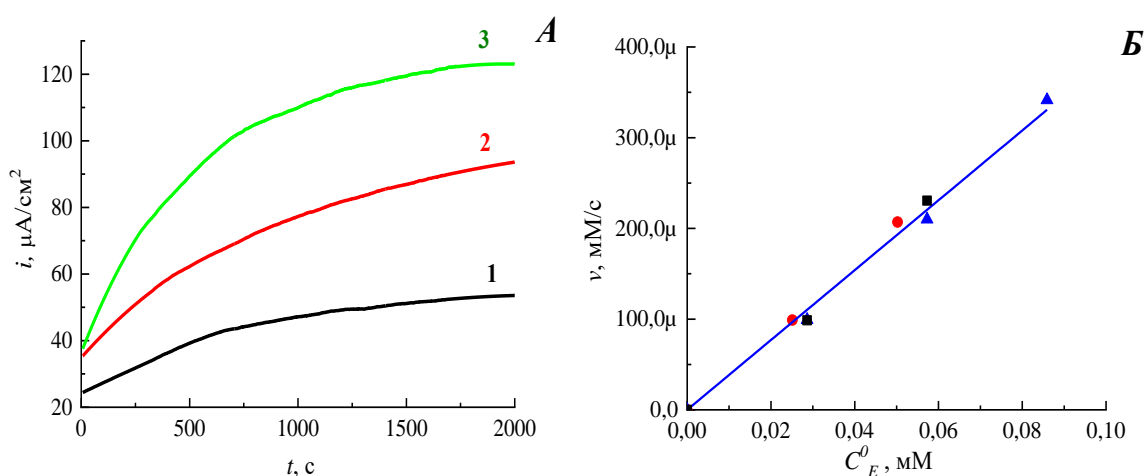
$$v_{\max} = k_3 C_E^0, \quad (4)$$



где  $C_E^0$  - начальная концентрация фермента,  $k_3$  – константа скорости распада фермент-субстратного комплекса на продукты реакции.



**Рис. 4.** (А) Зависимость скорости окисления восстановленной формы медиатора от его концентрации в растворе 0.6 мл экстракта (0.06 мМ дегидрогеназ), 4.6 мМ глюкозы в 0.5 М КРВ, рН 7.2 при 32 °С. (Б) Конверсия медиатора в растворе 0.6 мл экстракта (0.06 мМ дегидрогеназ) и 4.6 мМ глюкозы в 0.5 М КРВ, рН 7.2 при 32 °С.

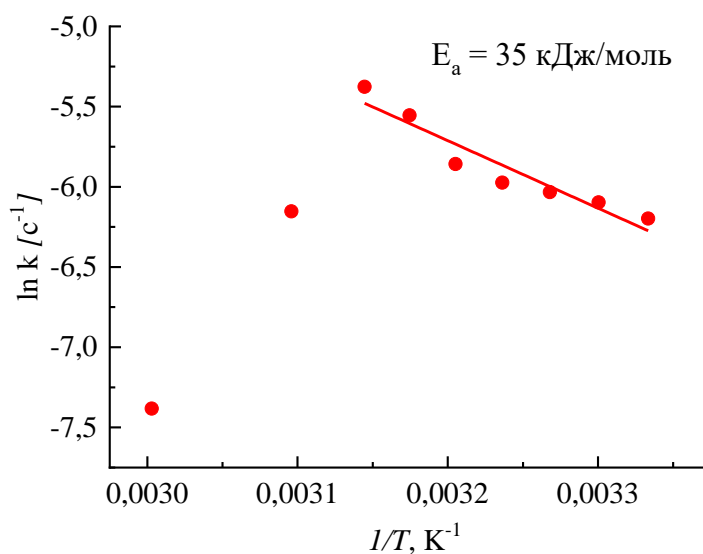


**Рис. 5.** (А) Кинетические кривые при разных количествах экстракта и (Б) зависимость максимальной скорости реакции от концентрации фермента. Состав раствора: 5 мМ  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ , 4.6 мМ глюкоза, 0.5 М КРВ, рН 7.2 при 32 °С. Содержание экстракта: 1 - 0.3 мл (0.025 мМ), 2 - 0.6 мл (0.050 мМ), 3 - 0.9 мл (0.075 мМ).

Аналогичный вид будет иметь кинетическое уравнение псевдопервого порядка для реакции (2) в условиях избытка медиатора (5мМ). Увеличение концентрации фермента путем увеличения количества вводимого экстракта приводит к пропорциональному увеличению

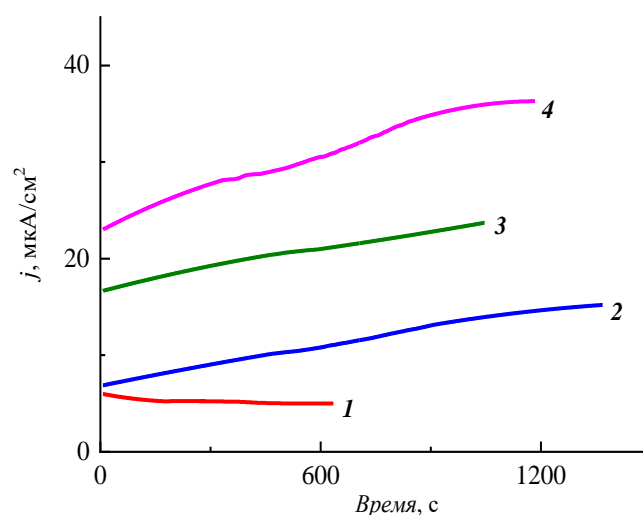
токовых откликов и максимальной скорости реакции, оцениваемой по касательной к начальному участку кинетической кривой (рис.5). Эффективная константа скорости реакции составила  $0.004 \text{ с}^{-1}$ , что на порядки меньше константы скорости для ферментативной реакции и более характерно для реакций химической природы.

Анализ влияния температуры показал, что существует диапазон активации до  $42 \text{ }^{\circ}\text{C}$  и диапазон инактивации, связанный с началом денатурации белков. Рассчитанное значение энергии активации в интервале температур  $27\text{-}42 \text{ }^{\circ}\text{C}$  составляет  $35 \text{ кДж/моль}$  (рис.6), что согласуется как с энергией активации работы дегидрогеназ, так и с энергией активации диффузионно-контролируемых процессов редокс-сорбции.



**Рис. 6.** Зависимость эффективной константы скорости исследуемой реакции от температуры в координатах уравнения Аррениуса. Состав раствора: 0.6 мл 6-ч белкового экстракта и 5 мМ  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$  в 0.5 М КРВ, pH 7.2.

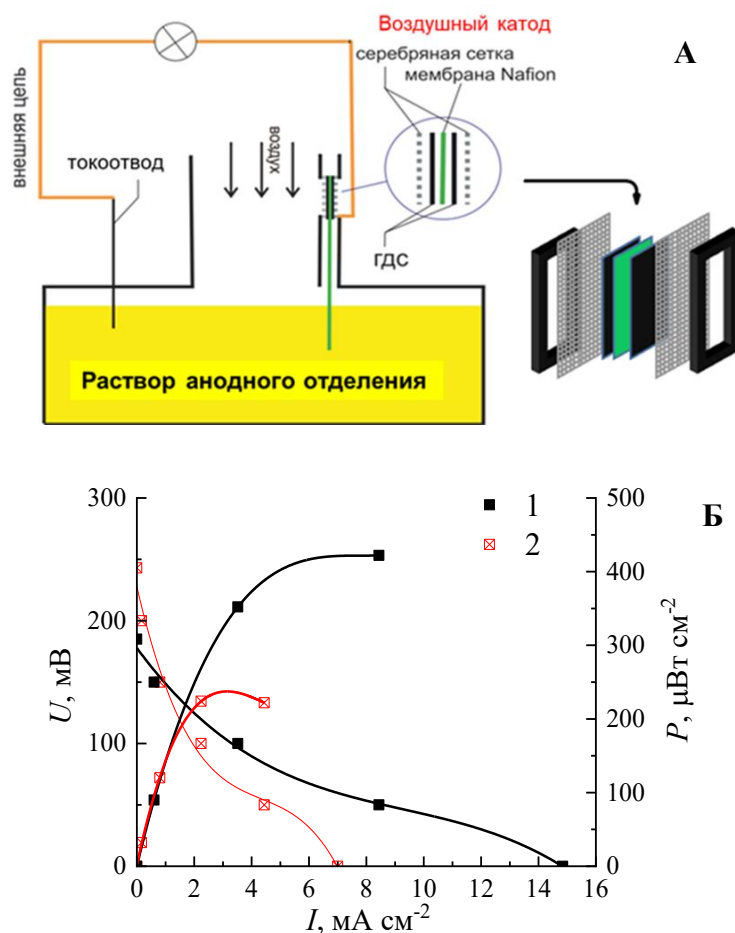
Переведение ферментов в экстракте в апо-форму диализной очисткой (3.5, 12-14, 25 и 50 кДа) приводит к полной инактивации системы даже в присутствии редокс-медиатора (рис. 7). Введение коферментов (НАД, НАДФ) восстанавливает биоэлектрохимическую и ТТХ-активность экстрактов. При этом концентрация кофермента влияет на величину регистрируемого тока и скорость реакции.



**Рис. 7.** Токовые отклики биоанода с экстрактами после диализа на мембране 50 кДа. Система: 0.5 М КРВ, рН 7.6, 0.3 мл экстракта, 4.6 мМ глюкоза, 5 мМ  $K_3Fe(CN)_6$ . 1 – без введения коферментов, 2 – система 1 с 10 мкМ НАД, 3 – система 2 с добавкой 20 мкМ НАД, 4 – система 3 с добавкой 10 мкМ НАДФ.

Анализ совокупности полученных кинетических данных позволяет однозначно заключить, что лимитирующей стадией исследуемого биоэлектродокаталитического процесса на биоаноде является стадия (2).

Получаемые грубые экстракты были испытаны в составе биоанода асимметричного биотопливного элемента (БТЭ). С этой целью была разработана модельная ячейка с воздушным катодом (Pt/C катализатор), биоанодом, разделенными мембраной Нафлон, с возможностью независимого варьирования компонентов (рис.8а). Максимальная плотность мощности испытанного БТЭ с Pt-токоотводом составила  $0.4 \text{ мВт/см}^2$  ( $4 \text{ Вт/м}^2$ ) (рис. 8б), что сопоставимо с данными для микробного топливного элемента на основе *E. coli* –  $1.6 \text{ Вт/м}^2$  ( $0.16 \text{ мВт/см}^2$ ), и превышает известные значения от  $0.175$  до  $95 \text{ мкВт/см}^2$  для различных ферментативных топливных элементов. Аналогичные испытания проводили с разными токоотводами и экстрактом ферментов, полученным из *Saccharomyces cerevisiae*. Полученные данные показали, что разработанная ячейка позволяет оценить влияние разных компонентов биоанода на регистрируемые характеристики, оставляя неизменными свойства и состав катода.



**Рис. 8.** (А) Схема установки биотопливного элемента и (Б) вольт- и ваттамперные характеристики БТЭ с биоанодом состава: 1 - 5 мМ  $K_3Fe(CN)_6$  + 2.5 мМ глюкозы+ 1 мл экстракта; 2 - 5 мМ  $K_3Fe(CN)_6$  + 2.5 мМ глюкозы. Температура 38 °С. Фоновый раствор: 0.5 М КРВ, рН 7.6.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Работа посвящена анализу биоэлектrocatalитических свойств нового типа биокатализаторов – ферментативных экстрактов *E. coli* ВВ в процессах окисления различных субстратов. Полученные результаты могут быть далее использованы для создания и проверки работоспособности биотопливных элементов, работающих на топливах сложного состава.

По результатам работы можно сделать следующие **основные выводы**:

1. Установлено, что грубые белковые экстракты, полученные ультразвуковым дезинтегрированием клеток *E. coli* ВВ, можно использовать в качестве биоэлектrocatalизаторов в составе биоанода при окислении различных органических субстратов (глюкоза, цитрат), а эффективность их работы зависит от времени роста культуры, природы буферного раствора и его ионной силы. Найдены оптимальные состав, температура и рН рабочего раствора для работы биоанода на основе получаемых белковых экстрактов.

Показано, что предлагаемый способ получения биокатализаторов применим и к другому классу микроорганизмов, *S. cerevisiae*.

2. Доказано, что природа редокс-медиатора, используемого для сопряжения биохимической и электродной реакций, оказывает существенное влияние на биоэлектродокаталитическую активность белковых экстрактов. При этом наиболее эффективной из изученных медиаторных систем для исследованных экстрактов является феррицианид калия, позволяющий осуществлять процесс в условиях естественной аэрации и получать высокие токовые отклики.

3. Установлено, что кинетика процесса биоэлектродокаталитического окисления глюкозы лимитируется стадией взаимодействия медиатора с ферментами в растворе. Эффективная энергия активации процесса составляет 35 кДж/моль, что хорошо согласуется с известными из литературы значениями энергии активации работы дегидрогеназ и энергиями активации диффузионно-контролируемых процессов редокс-сорбции. Добавки кофермента в реакционную смесь позволяют ускорить реакцию за счет увеличения концентрации реагентов лимитирующей стадии.

4. Предложена новая конструкция асимметричного биотопливного элемента с биоанодом и разделенными пространствами, позволяющая произвольно и независимо изменять состав биоанода. В ходе испытаний исследуемых белковых экстрактов в такой ячейке с платиновым анодным токоотводом и воздушным катодом была получена максимальная плотность мощности 400 мкВт/см<sup>2</sup> (4 Вт/м<sup>2</sup>), что сопоставимо и даже превосходит получаемые значения этой же характеристики для микробных топливных элементов на основе *Escherichia coli* и различных имплантируемых ферментативных топливных элементов.

#### **Основное содержание диссертации изложено в следующих публикациях:**

1. **Dmitrieva, M.V.** Dehydrogenase and electrochemical activity of *Escherichia coli* extracts / M.V. Dmitrieva, E. V. Zolotukhina, E. V. Gerasimova, A. A. Terent'ev, Yu. A. Dobrovol'skii. – DOI 10.1134/S0003683817040032 // Applied Biochemistry and Microbiology. – 2017. – V. 53, № 4. – 458-463.

2. **Dmitrieva, M.V.** Electrochemical Peculiarities of Mediator-Assisted Bioelectrocatalytic Oxidation of Glucose by a New Type of Bioelectrocatalyst / M. V. Dmitrieva, E. V. Gerasimova, A. A. Terent'ev, Yu. A. Dobrovol'skii, E. V. Zolotukhina. – DOI 10.1134/S1023193519090064 // Russian Journal of Electrochemistry. - 2019. V. 55, № 9. – 1111-1123.

3. **Dmitrieva, M.V.** Data describing the cofactor additives effect on bioelectrocatalytic activity of «crude» extracts / M.V. Dmitrieva, E. V. Zolotukhina. – DOI 10.1016/j.dib.2020.105513 // Data Brief. 2020. - V. 30. – 105513.

4. **Dmitrieva, M.V.** Kinetics of Mediated Bioelectrocatalytic Oxidation of Glucose by Protein Extracts of *Escherichia coli* / M.V. Dmitrieva, I. N. Shishov, S. V. Shmalii, V. D. Myazin, A. Yu. Bazhenov, E. V. Gerasimova, E. V. Zolotukhina. – DOI 10.1134/S1023193520110038 // Russian Journal of Electrochemistry. 2020. - V. 56, № 11. – 1034-1041.

5. **Dmitrieva, M. V.** Peculiarities of Using Potassium Ferricyanide as the Mediator for Bioanodes Based on *Escherichia coli* / M.V. Dmitrieva, A. S. Freiman, V. V. Sorokin, A. A. Terent'ev, E. V. Zolotukhina. DOI 10.1134/S1023193522100044 // Russian Journal of Electrochemistry. 2022. - V. 58, № 10. - 885–890.

6. **Дмитриева, М.В.** Влияние рН и состава питательной среды на дегидрогеназную активность экстрактов, полученных из *Escherichia coli* / М.В. Дмитриева, В.Д. Мязин, Е.В. Золотухина. DOI 10.18522/1026-2237-2023-3-140-146 // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. 2023. - № 3. – 140-146. – 2с.

7. **Дмитриева, М.В.** Разработка технологии получения нового биоэлектрокатализатора – «грубого» экстракта *Saccharomyces cerevisiae* / М.В. Дмитриева, В. А. Павлов, П. С. Афанасьева, Е. В. Золотухина. DOI 10.18522/1026-2237-2024-1-133-140 // Известия высших учебных заведений. Северо-Кавказский регион. Естественные науки. 2024. - № 1. – 133-140.

8. **Патент № 2762009С1 Российская Федерация, МПК С12N 1/00 (2006.01).** Способ оценки дегидрогеназной активности белковых экстрактов, полученных из микроорганизмов: заявл. 19.11.2020 : опубл. 14.12.2021 / Дмитриева М.В., Золотухина Е.В., Фрейман А.С., Сорокин В.В.; заявитель ФГБУН ИППХФ РАН.