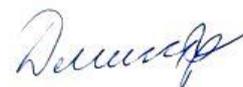


На правах рукописи



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 «Пушинский 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 по адресу 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 с^{-1}), но и высокой селективностью биокатализаторов. Идея получения электроэнергии из таких реакций, первоначально воспринимаемая как научный курьез¹, 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

¹ 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 биоэлектrokatalитического окисления глюкозы исследуемыми грубыми белковыми экстрактами. На основании полученных результатов выявлены оптимальные условия для получения грубых ферментативных экстрактов с максимальной активностью и условия проведения биоэлектrokatalитического окисления глюкозы с максимальными токовыми откликами.

Изучены особенности кинетики медиаторного биоэлектrokatalитического 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 биоэлектrokatalитического 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 биоэлектrokatalиза. Иными словами, в работе решена важная для биоэлектrokatalиза задача по установлению закономерностей осуществления медиаторной биоэлектrokatalитической реакции окисления глюкозы ферментативными экстрактами и выявлению ключевых параметров, влияющих на кинетику этой реакции.

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

Установлены основные факторы, определяющие эффективность электrokatalиза 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 биоэлектrokatalитическую 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 (AAAA-A19-119061890019-5, 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 см² (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 бицинхолиновой кислоты.

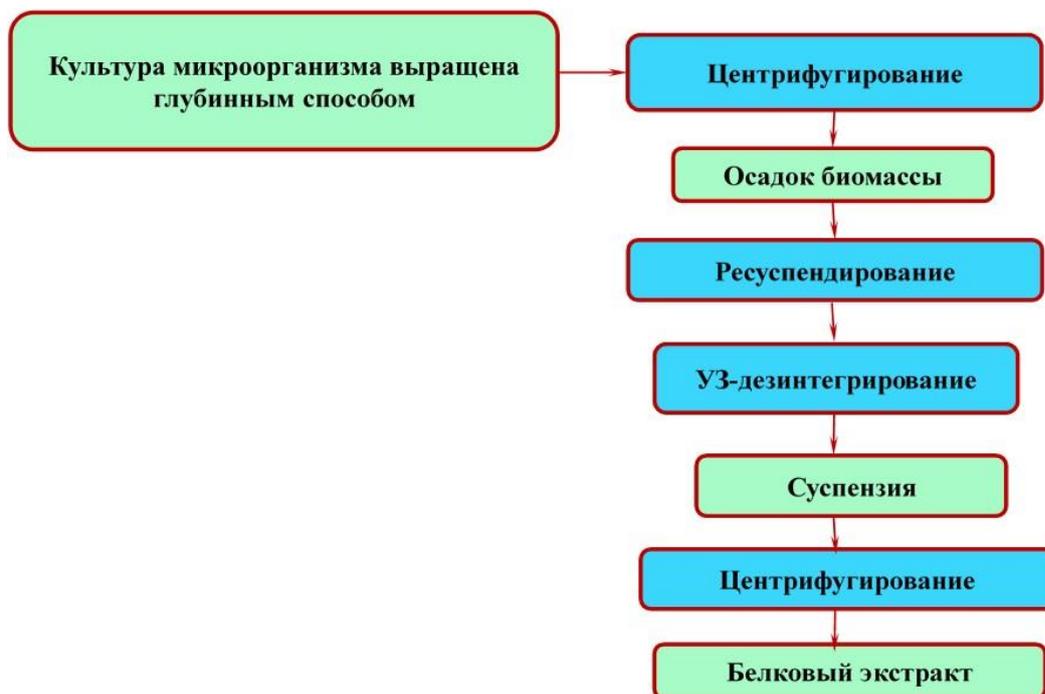


Рис. 1. Принципиальная схема получения грубых экстрактов из культур микроорганизмов.

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.

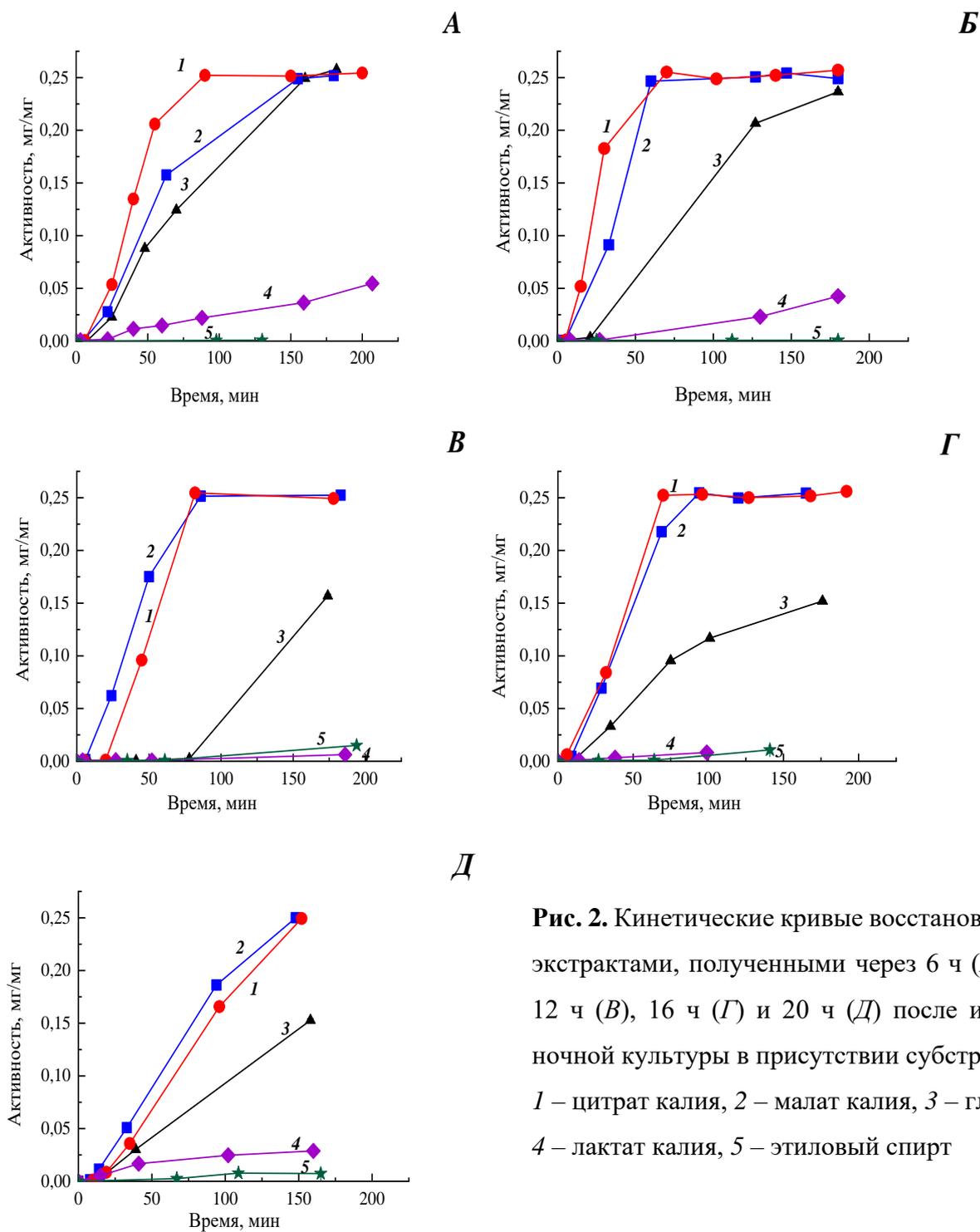


Рис. 2. Кинетические кривые восстановления ТТХ экстрактами, полученными через 6 ч (А), 8 ч (Б), 12 ч (В), 16 ч (Г) и 20 ч (Д) после инокуляции ночной культуры в присутствии субстратов: 1 – цитрат калия, 2 – малат калия, 3 – глюкоза, 4 – лактат калия, 5 – этиловый спирт

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 pH 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 ²
25 мМ			
КРВ	18±4	6.5±0.3	22±3
MOPS	15±3	4.2±0.2	38±5
HEPES	17±4	6.6±0.3	30±4
TRIS	13±3	8.0±0.4	30±4
50 мМ			
КРВ	17±4	8.0±0.4	74±9
MOPS	20±4	7.9±0.4	43±6
HEPES	14±3	8.3±0.4	58±8
TRIS	15±3	7.9±0.4	45±6
75 мМ			
КРВ	18±4	0	0.10±0.01
MOPS	20±4	0	0.10±0.01
HEPES	26±5	0	0.10±0.01
TRIS	18±4	0	0.10±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 ⁻²		j _{уд} , А·см ⁻² ·моль ⁻¹ 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

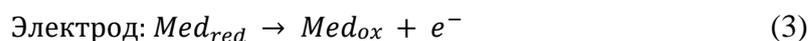
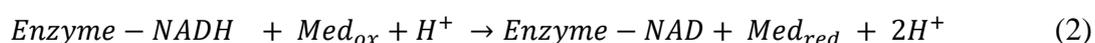
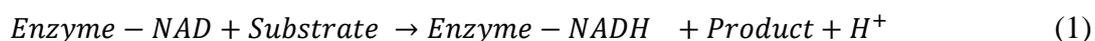
Примечание: * инкубационный период реакции – 60 мин. Состав раствора: 0.5 мМ К₃[Fe(CN)₆], 4.6 мМ глюкоза (Г)/цитрат калия (Ц), 0.5 М КРВ, рН 7.6 и 0.6 мл экстракта. Перемешивание: 150 об/мин.

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 ⁻²	1.58
2	2·10 ⁻³	1.39
3	6·10 ⁻⁴	0.78
4	3·10 ⁻⁴	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.

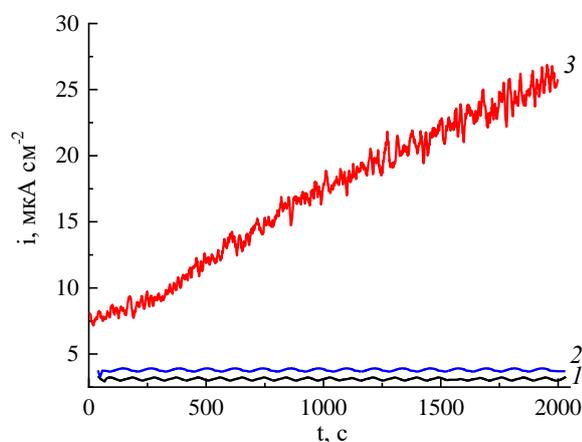


Рис. 3. Изменение токового отклика СУЭ в 0.1М КРВ (рН 7.2), содержащем 4.6 мМ глюкозы и 0.6 мл экстракта (1); 4.6 мМ глюкозы и 0.5 мМ феррицианида калия (2); в растворе (2) с добавлением 0.3 мл экстракта (3). Потенциал поляризации 0.5В. Перемешивание 150 об/мин.

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-пигов 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 ⁻²			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 ⁻²	$j_{уд}$, А·см ⁻² ·моль ⁻¹
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.

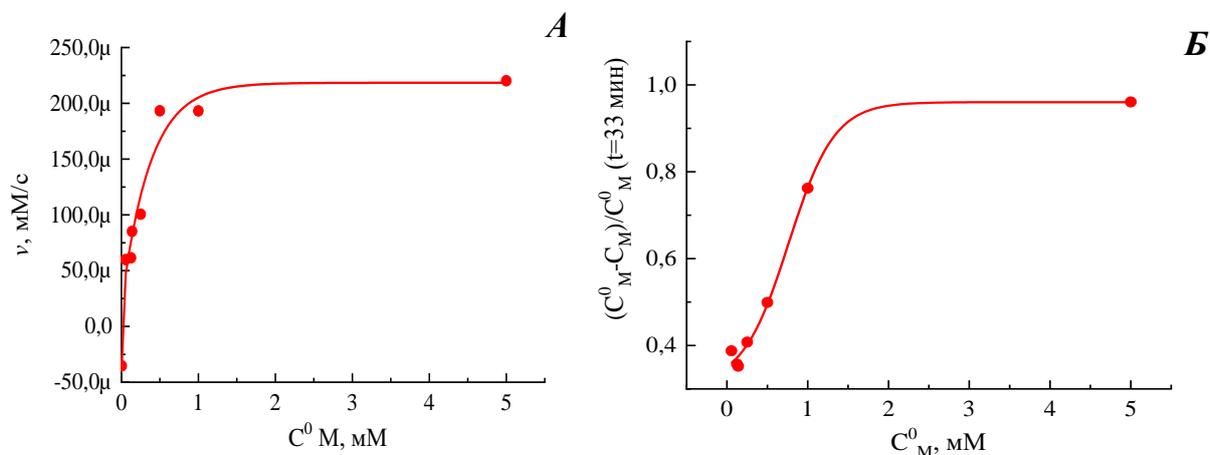


Рис. 4. (А) Зависимость скорости окисления восстановленной формы медиатора от его концентрации в растворе 0.6 мл экстракта (0.06 mM дегидрогеназ), 4.6 mM глюкозы в 0.5 М КРВ, рН 7.2 при 32 $^{\circ}\text{C}$. (Б) Конверсия медиатора в растворе 0.6 мл экстракта (0.06 mM дегидрогеназ) и 4.6 mM глюкозы в 0.5 М КРВ, рН 7.2 при 32 $^{\circ}\text{C}$.

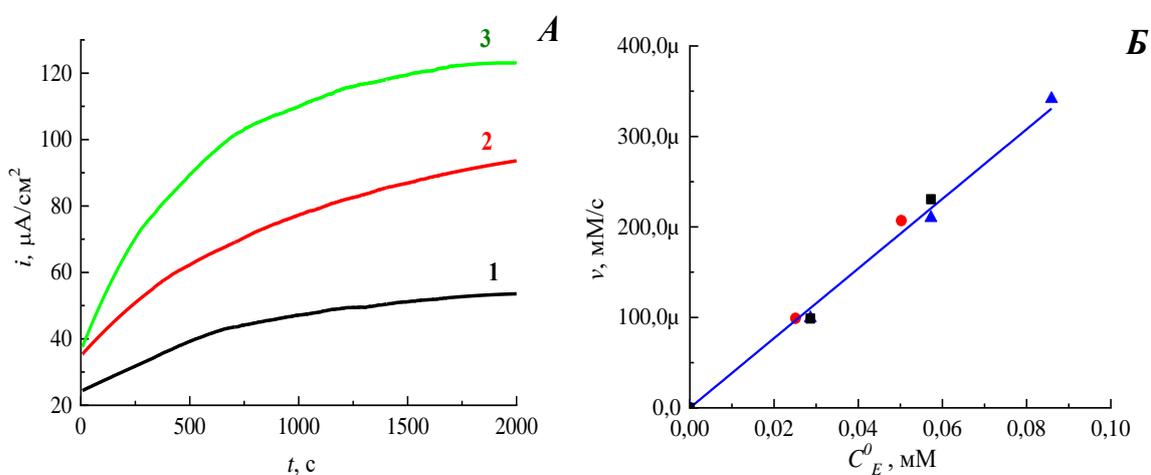


Рис. 5. (А) Кинетические кривые при разных количествах экстракта и (Б) зависимость максимальной скорости реакции от концентрации фермента. Состав раствора: 5 mM $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, 4.6 mM глюкоза, 0.5 М КРВ, рН 7.2 при 32 $^{\circ}\text{C}$. Содержание экстракта: 1 - 0.3 мл (0.025 mM),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

Аналогичный вид будет иметь кинетическое уравнение псевдопервого порядка для реакции (2) в условиях избытка медиатора (5 mM). 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 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 кДж/моль (рис.6), что согласуется как с энергией активации работы дегидрогеназ, так и с энергией активации диффузионно-контролируемых процессов редокс-сорбции.

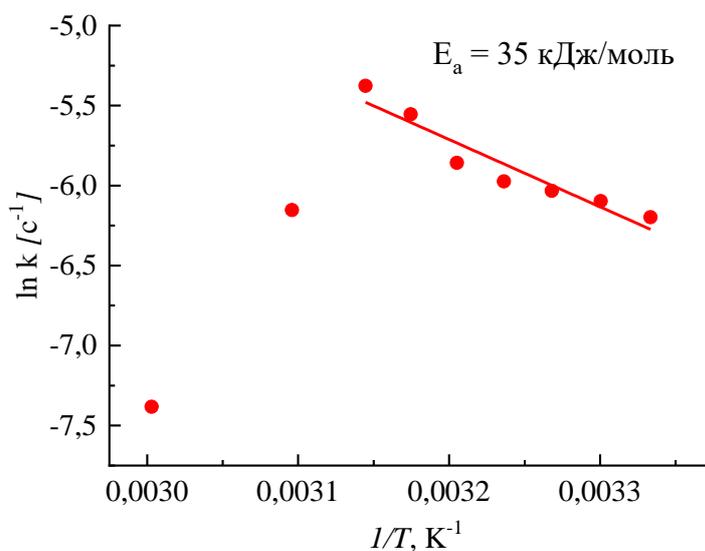


Рис. 6. Зависимость эффективной константы скорости исследуемой реакции от температуры в координатах уравнения Аррениуса. Состав раствора: 0.6 мл 6-ч белкового экстракта и 5 мМ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ в 0.5 М КРВ, pH 7.2.

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.

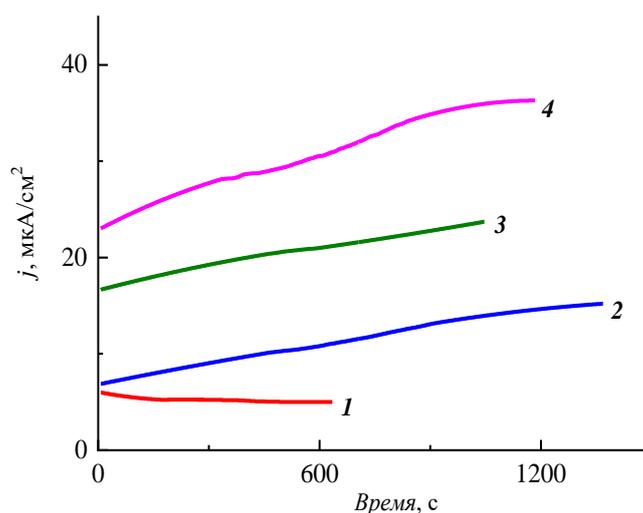


Рис. 7. Токовые отклики биоанода с экстрактами после диализа на мембране 50 кДа. Система: 0.5 М КРВ, рН 7.6, 0.3 мл экстракта, 4.6 мМ глюкоза, 5 мМ $K_3Fe(CN)_6$. 1 – без введения коферментов, 2 – система 1 с 10 мкМ НАД, 3 – система 2 с добавкой 20 мкМ НАД, 4 – система 3 с добавкой 10 мкМ НАДФ.

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 мВт/см^2 (4 Вт/м^2) (рис. 8б), что сопоставимо с данными для микробного топливного элемента на основе *E. coli* – 1.6 Вт/м^2 (0.16 мВт/см^2), и превышает известные значения от 0.175 до 95 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.

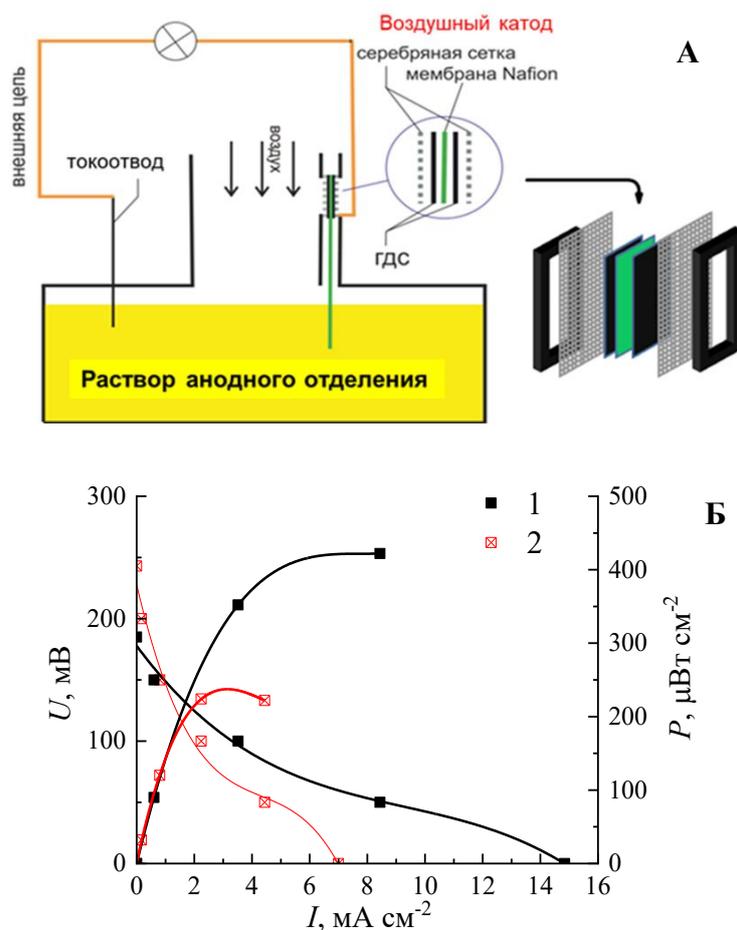


Рис. 8. (А) Схема установки биотопливного элемента и (Б) вольт- и ваттамперные характеристики БТЭ с биоанодом состава: 1 - 5 мМ $K_3Fe(CN)_6$ + 2.5 мМ глюкозы+ 1 мл экстракта; 2 - 5 мМ $K_3Fe(CN)_6$ + 2.5 мМ глюкозы. Температура 38 °С. Фоновый раствор: 0.5 М КРВ, рН 7.6.

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 биоэлектрокаталитическую 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 биоэлектрокаталитического 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/см² (4 Вт/м²), 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 pH 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.