

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Федеральный исследовательский центр проблем химической физики
и медицинской химии Российской академии наук

На правах рукописи

Дмитриева Мария Валерьевна

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

1.4.6 – Электрохимия

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата химических наук

Научный руководитель: доктор химических наук Золотухина Е.В.

Черноголовка – 2024

Оглавление

ВВЕДЕНИЕ.....	5
ГЛАВА 1. ЯВЛЕНИЕ БИОЭЛЕКТРОКАТАЛИЗА И ЕГО ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ (обзор литературы).....	15
1.1 Классификация биоэлектродокаталитических систем	15
1.2 Классификация биотопливных элементов	17
1.2.1 Микробный топливный элемент	19
1.2.2 Ферментативный топливный элемент	30
1.2.3 БТЭ на основе биомиметиков	40
1.3 Области применения биоэлектродокаталитических систем	41
1.4 Биоэлектродокатализ и электродокатализ: теории и механизмы	43
1.4.1 Теории и механизмы электродокатализа	44
1.4.2 Теории и механизмы биоэлектродокатализа	51
1.5 Особенности выбора редокс-медиаторных систем.....	58
1.6 Метаболизм <i>E. coli</i>	64
1.7 Выделение и очистка ферментов из микробиологических источников.....	68
1.8 Заключение к главе 1	71
ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ.....	73
2.1 Метод получения белкового экстракта из культуры <i>E. coli</i> BB....	73
2.2 Метод получения белкового экстракта из культуры <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	74
2.3 Метод определения концентрации белка в белковом экстракте ..	75
2.4 Методы определения дегидрогеназной активности белкового экстракта	76
2.4.1 Метод определения дегидрогеназной активности белкового экстракта с помощью 2,3,5 - трифенилтетразолия хлорида.....	76

2.4.2 Метод определения дегидрогеназной активности белкового экстракта с помощью феррицианида калия	76
2.5 Изучение электрокаталитической активности белкового экстракта	81
2.5.1 Электрохимическая ячейка. Подготовка электродов	81
2.5.2 Приготовление растворов	83
2.5.3 Циклическая вольтамперометрия	84
2.5.4 Хроноамперометрия	84
2.6 Определение содержания ионов в активном окислительно-восстановительном центре ферментов в экстракте	84
2.7 Фракционная очистка белковых экстрактов методом диализа.....	85
2.7.1 Проведение диализа	85
2.7.2 Характеристика белковых экстрактов после диализа.....	86
2.8 Тестирование белкового экстракта в прототипе биотопливного элемента	86
2.8 Заключение к главе 2	88
ГЛАВА 3. ДЕГИДРОГЕНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВЫХ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ШТАММА <i>E. COLI</i> BB	89
3.1 Влияние условий получения белковых экстрактов на их дегидрогеназную активность	89
3.2 Дегидрогеназная активность экстрактов из штамма <i>E. coli</i> BB в зависимости от фазы роста культуры микроорганизма и природы субстрата	94
3.3 Спектроскопический способ оценки дегидрогеназной активности белковых экстрактов, полученных из микроорганизмов, с помощью феррицианида калия	98

3.4 Применимость разработанного подхода к получению биоэлектродокатализаторов из инога класса микроорганизмов, <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	100
3.5 Заключение к главе 3	105
ГЛАВА 4 ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВЫХ ЭКСТРАКТОВ.....	107
4.1 Определение механизма биоэлектрохимической реакции.....	107
4.2 Выбор редокс-медиаторной системы	109
4.3 Сравнение электрокаталитической активности грубых экстрактов, полученных на различных стадиях роста <i>E. coli</i> ВВ	118
4.4 Влияние ионной силы, рН и типа буферной системы на электрохимическую активность белковых экстрактов	120
4.5 Определение температурного оптимума биоэлектродокаталитической реакции с участием грубых экстрактов <i>E. coli</i> ВВ	125
4.6 Влияние концентрации реагентов на электрохимическую активность белковых экстрактов. Кинетические закономерности биоэлектрохимической реакции.....	126
4.7 Электрохимическая активность белкового экстракта после различных стадий очистки	135
4.8 Снижение токовых потерь от пассивации электрода при помощи диализных мембран	146
4.9 Пробные испытания биоэлектрохимической активности живых клеток <i>E. coli</i>	149
4.10 Апробация работы модельного биотопливного элемента с белковым экстрактом в качестве анодного катализатора.....	154
4.11 Заключение к главе 4.....	161
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	164
СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	166

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. Биоэлектрокатализ – явление, которое лежит в основе работы современных биосенсоров для контроля физиологически важных органических веществ и в основе работы активно развиваемых биотопливных элементов. Процессы окисления субстрата (топлива) или восстановления окислителя, протекающие в таких устройствах, происходят при участии биологических объектов – ферментов или живых микроорганизмов. Интерес к биологическим катализаторам обусловлен, прежде всего, не только большой скоростью реакций с их участием (TOF 10^1 - 10^6 с^{-1}), но и высокой селективностью подобных катализаторов. Идея получения электроэнергии из таких реакций, первоначально воспринимаемая как научный курьез [1], теперь получает все большее распространение. Так, первые биотопливные элементы уже применялись в качестве переносных источников энергии для маломощных электрических устройств [2]. Кроме того, биокатализаторы представляют собой воспроизводимый ресурс [3].

Осуществление эффективного биоэлектрокатализа требует сопряжения ферментативной и электрохимической реакций на электроде. 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 очень продолжительная и сложная процедура их выделения и очистки. Это существенно ограничивает их практическое применение, кроме сенсорных приложений. 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 биоэлектродокатализаторов, 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 простотой получения. В качестве основного модельного объекта был выбран микроорганизм *Escherichia coli* ВВ (*E. coli*).

Степень разработанности темы исследования. Микроорганизмы и выделяемые из них ферменты, используемые в биоэлектродокатализе, весьма многочисленны и разнообразны. Так, например, из *Thiocapsa roseopersicina*, *Lamprobacter modestogalofillum*, *Desulfomicrobium baculatum* получают ферменты для окисления водорода, из *Aspergillus* sp., *Acinetobacter calcoaceticus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Moorella thermoacetica*, *Bacillus* sp. – окисления глюкозы, из *Saccharomyces cerevisiae*, *Gluconobacter* sp – окисления этилового спирта, из *M. extorquens*, *Pichia pastoris* – метилового спирта.

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 (метиленовый синий и бензохинон), так и нерастворимые в воде (ферроцен, 1,1-диметилферроцен, 2,5-дибромо-1,4-бензохинон и 2-метил-1,4-бензохинон) соединения. Известны также способы конструирования медиаторной системы с помощью полимерных пленок (полипиррол, полианилин, 1,1'-диметилферроцен-модифицированный линейный полиэтилен и полимер нейтрального красного). 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. Поскольку медиаторный биоэлектрокатализ является в настоящее время наиболее распространенным на практике (в коммерческих устройствах или прототипах), вопросы о закономерностях взаимодействия ферментных систем или живых микроорганизмов с медиаторными системами остаются актуальными.

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, состав среды, источник углерода и т.д. При этом для каждого биообъекта эти условия индивидуальны.

Так, для ферментов влияние этих факторов связано с конформационными изменениями молекулы и взаимодействием функциональных групп белка с компонентами раствора. Таким образом, установление оптимальных условий, при которых достигается максимальная активность исследуемых биообъектов, является неотъемлемой частью любой научной работы в области биоэлектrokатализа.

Цель работы: определение закономерностей биоэлектrokаталитического 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 биоэлектrokхимического 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 электrokхимическую активность полученных экстрактов.

Научная новизна основных результатов:

Впервые грубые белковые экстракты, полученные ультразвуковым разрушением клеток модельной культуры *E. coli*, использованы в качестве объекта для биоэлектrokаталитического окисления различных субстратов (глюкоза, цитрат калия). Показана применимость разработанного подхода к получению аналогичных биоэлектrokатализаторов из принципиально иного класса микроорганизмов, *Saccaromyces 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 биоэлектродокаталитического 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 электродокатализа с участием таких экстрактов: помимо природы медиаторной системы и субстрата, оптимальных температуры и pH 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» (г. Черноголовка, 2014, 2018 гг.); Российская конференция «Физико-химические проблемы возобновляемой энергетики» (г. Санкт-Петербург, 2015 г.); 28-ой симпозиум «Современная химическая физика» (г. Туапсе, 2016 г.); 13-ое, 14-ое, 15-ое и 16-ое Международное совещание "Фундаментальные проблемы ионики твердого тела", ФПИТТ (г. Черноголовка, 2016, 2018, 2020, 2022 гг.); International conference "Ion Transport in Organic and Inorganic Membranes" (Сочи, 2017 г.); XI International Conference «Mechanisms of Catalytic Reactions», MCR (г. Сочи, 2019 г.); Международная научно-техническая конференция «Современные электрохимические технологии и оборудование» (г. Минск, 2019 г.); XXVI Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых учёных «Ломоносов-2019», секция «Химия» (г. Москва, 2019 г.); 62-ая и 64-ая Всероссийская научная конференция МФТИ (г. Долгопрудный, 2019, 2021 гг.); 5-я Международная научная конференция перспективных разработок молодых ученых «Наука молодых - будущее России» (г. Курск, 2020 г.); Международная научная конференция «Scientific research of the SCO countries: synergy and integration» (г. Пекин, 2020 г.); VI Международная научно-практическая конференция "Актуальные проблемы науки и техники" (г. Уфа, 2021 г.); VII Международная научно-практическая конференция "Технологические инновации и научные открытия" (г. Уфа, 2021 г.); XIII Международная научно-практическая конференция "Инновационный потенциал развития мировой науки и техники: взгляд современных ученых" (г. 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 (номера госрегистрации АААА-А19-119061890019-5, 124013000692-4). Работа дважды поддержана стипендией Президента РФ (№ СП-2619.2018, № СП-5461.2021.1).

ГЛАВА 1. ЯВЛЕНИЕ БИОЭЛЕКТРОКАТАЛИЗА И ЕГО ПРАКТИЧЕСКОЕ ПРИМЕНЕНИЕ (обзор литературы)

В данной главе рассмотрены закономерности ферментативного электрокатализа, приведена подробная классификация биоэлектрокаталитических систем и отражены 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.

1.1 Классификация биоэлектрокаталитических систем

Биокаталитические системы могут выполнять две диаметрально противоположные функции: производить топливо или непосредственно участвовать в генерации электроэнергии. В соответствии с этим электрохимические устройства, которые используют биокатализ в основе своей работы, можно разделить на два типа [4]:

- А. С биокатализатором, производящим топливо (Product type);
- Б. С биокатализатором, непосредственно генерирующим электроэнергию (Direct energy production type).

В первом типе в непосредственной генерации электроэнергии участвуют традиционные неорганические катализаторы топливных элементов, а биокатализаторы посредством биокаталитической трансформации или метаболических процессов производят только топливо для них [5].

Второй тип включает биообъекты, непосредственно участвующие в биокаталитической реакции, приводящей к генерированию электроэнергии. На аноде биокатализаторы окисляют органический субстрат с высвобождением электронов, а на катоде биокатализаторы выступают в

качестве катализатора для восстановления окислителя и принимают электроны. Одной из основных проблем устройств такого типа является создание эффективного электронного переноса между биокатализатором и электродом [4,6].

Биокатализаторы условно можно разделить на три типа: живые микроорганизмы [7], ферменты (энзимы) [7] или их комбинации (каскады) [8] и биомиметики [9]. Микробный катализатор содержит в себе множество ферментов, что, как следствие, лишает сенсорную систему на их основе избирательной селективности. Таким образом, микробные биоэлектродкатализаторы используются для извлечения энергии из топлив на основе отходов растительного, животного и антропогенного происхождения. В то время как чистые ферменты и биомиметики находят свое применение как в сенсорах, так и в биотопливных элементах.

В основе всех биоэлектродкаталитических процессов лежит явление биоэлектродкатализа. Биоэлектродкатализ – ускорение электрохимического процесса биологическим агентом. Осуществление эффективного биоэлектродкатализа требует сопряжения ферментативного катализа и электрохимической реакции на электроде. Существуют два принципиально различных пути для достижения этой цели – прямой (безмедиаторный) биоэлектродкатализ и медиаторный биоэлектродкатализ.

Наиболее привлекательными являются устройства, работающие по механизму прямого биоэлектродкатализа через прямой электронный перенос с биообъекта на электрод (ПЭТ). Однако лишь ограниченное число редокс-ферментов и микроорганизмов способно к осуществлению прямого биоэлектродкатализа [10–13]. Поэтому часто приходится применять второй путь сопряжения ферментативной и электрохимической реакций, медиаторный биоэлектродкатализ, путем электронного переноса с биокатализатора на медиатор и с медиатора на электрод (МЭТ). В этом случае используют низкомолекулярные редокс-активные соединения (медиаторы), которые осуществляют перенос электронов между субстратом, активным

центром фермента и электродом. Следует отметить, что хоть и ПЭТ-тип более перспективен вследствие отсутствия проблем, связанных со стабильностью и необходимостью введения медиатора и массопереносом к электроду, но мощностные характеристики у систем, работающих по МЭТ-типу гораздо выше [14].

Как уже было сказано во введении, областью применения рассмотренных биокаталитических систем являются биотопливные элементы и биосенсоры. Эти устройства имеют общие черты, поскольку в биосенсорах обычно используются ферментативные биоаноды или биокатоды. Рассмотрим особенности работы и типы биотопливных элементов.

1.2 Классификация биотопливных элементов

Топливный элемент – электрохимическое устройство, которое непосредственно осуществляет прямую конверсию химической энергии топлива в электрическую. Эти устройства в простейшем варианте состоят из катода и анода, которые разделяет ионный проводник (электролит) [15]. Такие устройства имеют ряд достоинств в сравнении с традиционно используемыми аккумуляторными или иными источниками энергии. Так, топливные элементы (ТЭ) не требуют подзарядки, реагенты подаются извне, а не содержатся внутри устройства, энергия реакции топлива с окислителем преобразуется в электричество и тепло в одну стадию, что отличает топливные элементы от тепловых машин, выброс вредных веществ в окружающую среду не происходит, а электрохимические генераторы на основе ТЭ компактны и бесшумно работают. В качестве топлива в таких устройствах обычно используют водород или простые органические вещества - метанол, этанол, глюкоза, муравьиная кислота и т.п., а в качестве окислителя – кислород (обычно из воздуха).

Топливные элементы, использующие в качестве катализаторов реакции окисления топлива биообъекты (ферменты или микроорганизмы),

представляют отдельный интерес, поскольку в данном случае предполагается получение энергии из естественных процессов питания микроорганизмов, самопроизвольно протекающих в природе. Аналогом топливного элемента в природе является митохондрия живой клетки. Ферменты и коферменты митохондрии, вовлеченные в цикл Кребса и электронно-транспортную цепь, окисляют органические топлива, синтезируя АТФ – универсальный источник энергии живых организмов [16]. Соответственно, создание устройств, моделирующих естественные биологические процессы, является важным направлением современной биоэлектрохимии.

Биологические топливные элементы (БТЭ) – подкласс низкотемпературных топливных элементов, преобразующих химическую энергию окислителя в электрическую посредством биоэлектрокатализа. Поскольку БТЭ разрабатываются на основе разных подходов и критериев, их можно классифицировать по трем основным признакам (рисунок 1).



Рисунок 1 - Классификация БТЭ.

Рассмотрим далее подробно классы БТЭ по типу биокатализатора и принципы их работы.

1.2.1 Микробный топливный элемент

Микробный топливный элемент (МТЭ) использует микроорганизмы в качестве биокатализатора, а топливом выступает органическое вещество, растворенное в культуральной среде или буферном электролите [17]. Исследования в области разработки МТЭ начались еще в 1960-х годах, но продвинулись лишь после того, как в 1980-х годах Allen и Bennetto применили редокс - медиаторы для осуществления электронного переноса от микроорганизма к аноду [18]. Однако такие системы генерировали очень малые токи. Некоторые исследования в этой области были обращены на устранение биокоррозии комплектующих материалов МТЭ, индуцированной микроорганизмами [19,20]. Новое направление развития в области разработки МТЭ началось в 2000-х годах, с открытия, что некоторые микроорганизмы способны сами осуществлять электронный перенос без применения медиаторных систем – прямой биоэлектрокатализ [21].

Изначально интерес исследователей в области МТЭ был направлен лишь на анодную реакцию, а для катализа катодной реакции использовали традиционные платиновые катализаторы. Однако появилась тенденция к созданию МТЭ, работающих исключительно на микробных катализаторах [22,23].

Постепенно возник интерес к конструированию МТЭ, не только генерировавших электроэнергию, но и осуществляющих параллельные технологические процессы: очистка сточных вод [24–26] и биоэлектрохимическое производство водорода [27,28].

Конструкция МТЭ встречается двух типов: однокамерная и двухкамерная (рисунок 2). В конфигурации однокамерного МТЭ анод и катод опущены в один и тот же электролит (рисунок 2А). В МТЭ двухкамерной конфигурации анодное и катодное пространства разделены протонпроводящей мембраной или солевым мостиком, соответственно, анодное и катодное отделения могут иметь разный состав (рисунок 2Б).

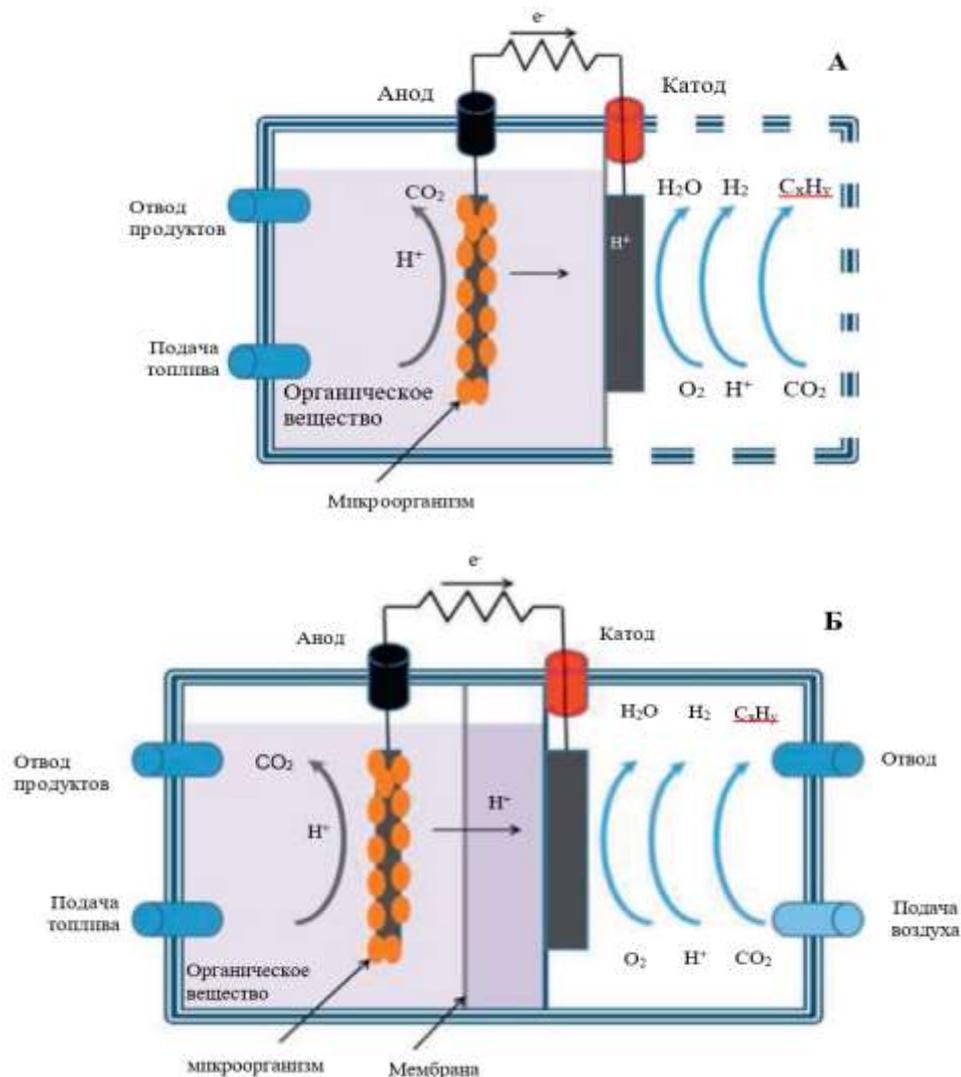
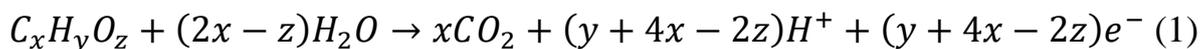


Рисунок 2 - Схема работы микробного топливного элемента в однокамерной (А) и двухкамерной (Б) конфигурации.

Принцип работы МТЭ основан на формировании микроорганизмом на аноде и/или катоде (в зависимости от конструкции) электроактивной биопленки. Растворенное в культуральной среде или буферном электролите органическое вещество выступает в качестве топлива и окисляется под воздействием микроорганизма, образуя электроны и протоны (уравнение 1), которые участвуют в реакции восстановления кислорода (РВК) в присутствии биологического или неорганического катализатора (уравнение 2).





При этом одним из центральных вопросов биоэлектродкатализа является механизм электронного переноса от микроорганизма к токоотводу, который можно разделить на 4 варианта [29]:

- 1) Прямой электронный перенос через цитохромы с-типа;
- 2) Последовательный электронный перенос через микробные нанотрубки (пили);
- 3) Электронный перенос через проводящую матрицу биопленки;
- 4) Электронный перенос посредством редокс-медиаторов.

При этом ни один из вышеперечисленных процессов может и не быть лимитирующим, а лимитировать электрохимический процесс может транспорт протонов [30]. Движущей силой для переноса электронов от анода к катоду является разность электрических потенциалов, а транспорт протонов обеспечивается диффузией и миграцией. Эффективность протонного транспорта (внутреннее сопротивление) зависит от типа используемого сепаратора, разделяющего катодное и анодное пространства, а также от типа и концентрации используемой буферной системы и от расстояния между катодом и анодом. Таким образом, наличие сепаратора и его проводящие свойства могут оказать решающее влияние на характеристики устройства. Так, Liu и Logan сравнили мощностные характеристики, генерируемые МТЭ с воздушным катодом в присутствии и в отсутствии протонообменной мембраны [31]. Оказалось, что в отсутствие протонообменной мембраны максимальная удельная мощность, генерируемая МТЭ, возросла с 262 до 494 Вт/м². К тому же, следует отметить, что применение сепараторов может привести к изменению рН в катодном и анодном отделениях [32]. Такие скачки рН приводят к частичной или даже полной потере микробиологической активности, вызванной метаболическими изменениями в микроорганизме из-за неестественных физиологических условий и рН-зависимости электродных реакций (уравнения (1) - (2)). Кроме того, при изменении рН на единицу

происходит изменение анодного и катодного потенциала (на 59 мВ), что суммарно приводит к понижению напряжения ячейки [32].

Поскольку сопротивление сепаратора и электролита вызывает основное омическое падение напряжения ТЭ, большое внимание уделяется типу используемого в МТЭ сепаратора [33]:

- 1) солевые мостики;
- 2) сепараторы, разделяющие за счет размера пор: микропористые фильтрующие мембраны и фильтрующие материалы с глубокими порами;
- 3) ионообменные мембраны.

В свою очередь, ионообменные мембраны разделяются на катионообменные и анионообменные мембраны. Наиболее распространенными являются катионообменные мембраны (протонообменные) вследствие своего низкого внутреннего сопротивления и высокой катионной проводимости, хороших механических свойств.

В качестве сепараторов и мембран используют перфторированные сульфокатионообменные мембраны, биполярные мембраны, диализные мембраны, сульфированный сополимер стирола с дивинилбензолом и нанопористые фильтры. Часто используемой является протонообменная мембрана Нафион, представляющая собой полимер, основанный на гидрофобных фторуглеродных цепях ($-\text{CF}_2-\text{CF}_2-$), в который включены гидрофильные сульфогруппы (SO_3^-). Наличие сульфогрупп в структуре мембраны Нафион обеспечивает ее протонную проводимость, однако, при контакте с растворами с нейтральным рН, используемыми в МТЭ, когда концентрация катионов (Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , NH_4^+ , Mg^{2+}) превышает концентрацию протонов в 10^5 раз, мембрана переходит в солевую форму, что повышает ее сопротивление (особенно в случае двухзарядных ионов). Благодаря этому в катодном отделении возрастает рН, что приводит к падению катодного

потенциала и снижению производительности МТЭ [34]. К тому же стоимость таких мембран составляет до 40% от стоимости всей конструкции МТЭ.

В связи с этим в ряде работ было предложено использовать анионообменные мембраны, являющиеся более экономичными [35,36]. Однако такие мембраны пока имеют несовершенные механические свойства.

Поскольку биоанод является наиболее важной частью всех МТЭ, его конструкция и используемые материалы являются наиболее активно изучаемыми. Как правило, биоанод организован как анаэробный электрод. В анодное пространство входят субстрат (топливо), микроорганизмы, медиатор (в случае медиаторного электронного переноса) и, конечно же, токоотвод, играющий роль акцептора электронов и подложки для формирования биопленки. Природа токоотвода оказывает существенное влияние на мощностные характеристики МТЭ, поэтому к нему предъявляют целый ряд требований [37]:

- 1) высокая электронная проводимость (малое сопротивление);
- 2) биосовместимость с микроорганизмом;
- 3) коррозионная стойкость;
- 4) большая площадь активной поверхности;
- 5) химическая стабильность.

Материалы, используемые для анодного токоотвода, можно разделить на 4 большие группы, представленные на рисунке 3 [38]. Аноды на основе углеродных материалов (углеродная бумага и ткань; графитовые пластины, стержни и гранулы) обладают рядом преимуществ: низкая стоимость, биосовместимость, химическая стабильность и высокая электропроводность. Главным их достоинством является большая площадь активной поверхности, которая может достигать до 1018 см^2 [39]. С целью улучшения анодных характеристик в последнее время стали обращаться к композитным анодным материалам, в которых сочетаются свойства двух и более материалов, дающих синергетический эффект.

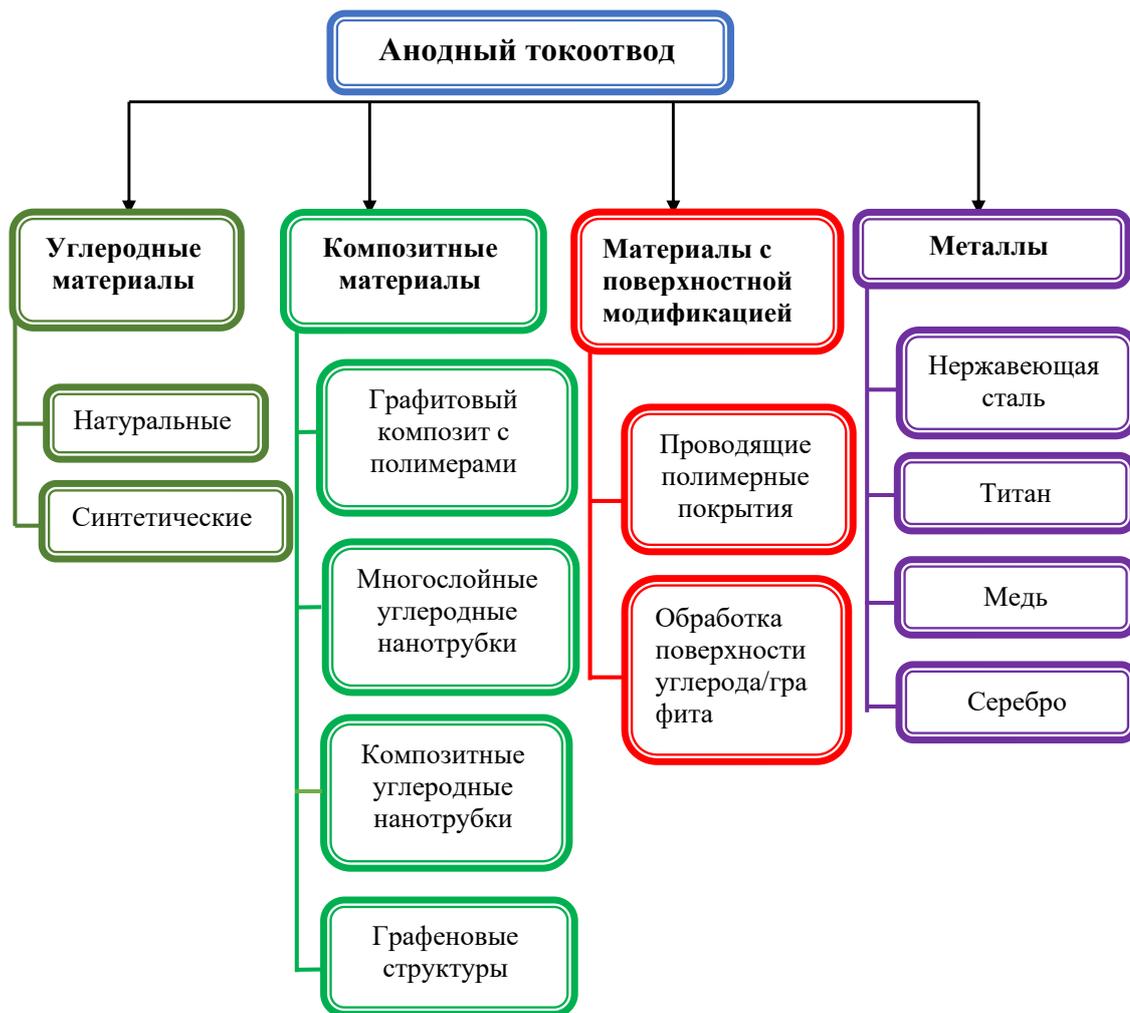


Рисунок 3 - Классификация материалов анодных токоотводов, применяемых в МТЭ.

Например, такой оригинальный композит, как модифицированный наноструктурированным емкостным слоем 3D анод (диоксид титана и углерод, полученный из протеина яичного белка), предложенный Tang и др. [40]. Получаемые мощностные характеристики при применении подобной модификации анода в два раза выше, чем при использовании графитового анода. Авторы полагают причиной повышения мощности является увеличение электрохимической емкости 3D-анодов и синергетический эффект между диоксидом титана и углеродом. Такая комбинация материалов позволяет

достичь хорошей биосовместимости, благоприятной поверхности для осуществления межфазного переноса электронов от микроорганизмов.

Shen и др. разработали композитный электрод на основе графитовых волокон, модифицированных углеродными нановолокнами, такая модификация позволила увеличить производительность до 7 раз в сравнении с немодифицированным анодом [41]. Посредством пиролиза полиакрилонитрила, полученного методом электропрядения, с последующей активацией паром Manickam и др. получили активированные нетканые углеродные нановолокна [42]. Такой анод обладает ультратонкой пористой структурой с высокой площадью биосовместимой поверхности, облегчающей перенос электронов от биообъектов. В работе Mehdinia и др. предложили нанокompозитное покрытие (многослойные углеродные нанотрубки/ SnO_2), нанесенное на стеклогуглеродный электрод, в качестве анода для МТЭ [43]. МТЭ, работающий на немодифицированном стеклогуглеродном аноде, генерировал максимальную удельную мощность 457 мВ/м^2 , а МТЭ с модифицированным анодом – 1421 мВ/м^2 .

Одним из перспективных материалов для разработки композитных анодов является графен, обладающий рядом полезных свойств: большая удельная площадь поверхности (до $2600 \text{ м}^2/\text{г}$), высокая электропроводность (7200 См/м), механическая прочность (модуль растяжения до 35 ГПа) [44]. К тому же недавние исследования показали, что графен обладает хорошей биосовместимостью [45], что делает его перспективным материалом в качестве анодного токоотвода для МТЭ. Так, модификация токоотвода из нержавеющей стали графеном позволила повысить удельную мощность МТЭ в 18 раз благодаря увеличению площади поверхности электрода, лучшей адгезии бактериальной биопленки и эффективному внеклеточному электронному переносу [46]. Осаждение наночастиц оксида олова SnO_2 на поверхность восстановленного оксида графена (R-GO- SnO_2) привела к 5-кратному увеличению мощности в сравнении с немодифицированным восстановленным оксидом графена [43]. Синергетические эффекты между

графеном и SnO_2 не только улучшают формирование бактериальной биопленки на электроде, но и повышают эффективность переноса заряда.

Поверхностную модификацию токоотводов в биоанодах МТЭ проводят и проводящими полимерными покрытиями. Полианилин наиболее часто рассматривается в качестве такого покрытия. Так, Mehdinia и др. применили стеклоуглеродный электрод, покрытый наноструктурированным полианилином, при окислении глюкозы в МТЭ, такая модификация позволила увеличить генерируемую мощность до 0.082 мВ/см^2 [47]. Электроосаждением полианилина на графеновые нановолокна, покрывающие углеродную бумагу, Zhao и др. также удалось повысить генерируемую мощность МТЭ [48]. В качестве объяснения этому эффекту авторы предполагают электростатическое взаимодействие положительно заряженного полимера с отрицательно заряженными бактериальными клетками, что облегчает перенос электрона с мембраны на электрод посредством цитохрома с [48].

Металлические токоотводы активно изучались в биоанодах [49–52], но для большинства из них решить проблему коррозии под действием микроорганизмов не удалось. В работе [52] нержавеющая сталь в качестве токоотвода, тем не менее, позволила получить 35 А/м^2 при потенциостатической поляризации в 0.1 В (отн. каломельного электрода).

В ряде работ считается, что при работе МТЭ лимитирующим фактором является производительность или дизайн катода [53,54]. Производительность можно повысить при использовании материалов с высокой площадью поверхности или гранулированных материалов. Углеродная бумага, углеродные волокна, углеродный войлок, графит различных видов, Pt, Cu, Cu-Au, карбид вольфрама – наиболее распространенные материалы, используемые на катоде. В таблице 1 представлены максимальные электрохимические характеристики МТЭ на основе различных углеродных материалов. Видно, что максимальную удельную мощность удается достигнуть при применении катода на основе войлока из активированного углеродного волокна.

Таблица 1. Электрохимические характеристики катодов, применяемых в МТЭ [17].

Катод	Максимальная удельная мощность	Максимальная плотность тока	Максимальное напряжение, мВ
Войлок из активированного углеродного волокна	315 мВт/м ²	1.67 мкА/м ²	679
Воздушный катод с графитом	283 мВт/м ²	1210 мА/м ²	440
Углеродный войлок	77 мВт/м ²	6 мкА/м ²	575
Однородный угольный электрод	67 мВт/м ²	1.5 мА/м ²	598
Углеродная бумага, покрытая Pt	0.3 Вт/м ³	4.69 мА/м ²	644
Трубчатый войлок из активированного углеродного волокна	784 мВт/м ²	3.17 А/м ²	716
Гранулированный войлок из активированного углеродного волокна	667 Вт/м ³	3.34 А/м ²	658
Биокатод	19.53 Вт/м ³	41.78 А/м ³	432
Войлок из графита	539 мВт/м ²	3145 мА/м ²	742
Воздушный катод из углеродной ткани	50 Вт/м ³	363 А/м ³	710

Как и в классических топливных элементах, в биотопливных катализатор (культура микроорганизмов) подбирается в зависимости от типа используемого топлива (субстрата). В качестве топлива для МТЭ могут использоваться различные органические субстраты: углеводы, жирные кислоты, аминокислоты, производные сахара, органические кислоты, спирты, азотные гетероциклические соединения, а также сумма органических компонентов в составе сточных вод. Экспериментальные данные, полученные на МТЭ с чистыми субстратами (таблица 2), позволяют спрогнозировать мощностные характеристики МТЭ, работающих на сложных субстратах из сточных вод.

Таблица 2. Характеристики МТЭ на различных типах субстратов [55].

Субстрат	Концентрация, мМ	Инокулят	Тип МТЭ	Анод	Катод	ЭДС, В	P, мВ/м ²
Гексозы							
D-глюкоза	6.7	Смешанная бактериальная культура	двухкамерный	Углеродная ткань	Углеродная ткань	0.39	2160
D-галактоза	6.7	Смешанная бактериальная культура	двухкамерный	Углеродная ткань	Углеродная ткань	0.35	2090
D-фруктоза	6.7	Смешанная бактериальная культура	двухкамерный	Углеродная ткань	Углеродная ткань	0.31	1810
D-моноза	6.7	Смешанная бактериальная культура	двухкамерный	Углеродная ткань	Углеродная ткань	0.29	1240
Пентозы							
D-ксилоза	8.0	Смешанная бактериальная культура	двухкамерный	Углеродная ткань	Углеродная ткань	0.38	2330
D-рибоза	8.0	Смешанная бактериальная культура	двухкамерный	Углеродная ткань	Углеродная ткань	0.27	1520
Гекситы							
Галацитол	6.7	Смешанная бактериальная культура	однокамерный	Углеродная ткань	Углеродная ткань	0.34	2650
Сорбитол	6.7	Смешанная бактериальная культура	однокамерный	Углеродная ткань	Углеродная ткань	0.26	1690
Пентиты							
Рибит	8.0	Смешанная бактериальная культура	однокамерный	Углеродная ткань	Углеродная ткань	0.32	2350
Арабит	8.0	Смешанная бактериальная культура	однокамерный	Углеродная ткань	Углеродная ткань	0.26	2030
Аминокислоты							
L-серин	2.0	Бытовые сточные воды	Однокамерный с воздушным катодом	Углеродная ткань	Углеродная ткань	0.37	768
L-лизин	1.0	Бытовые сточные воды	Однокамерный с воздушным катодом	Углеродная ткань	Углеродная ткань	0.32	592
L-гистидин	1.0	Бытовые сточные воды	Однокамерный с воздушным катодом	Углеродная ткань	Углеродная ткань	0.42	718
L-аргинин	1.0	Бытовые сточные воды	Однокамерный с воздушным катодом	Углеродная ткань	Углеродная ткань	0.36	727
Органические кислоты							
Уксусная кислота	1 г/л	Бытовые сточные воды	однокамерный	Графитовое волокно	Увлажненная углеродная ткань	0.475	835
Молочная кислота	1 г/л	Бытовые сточные воды	однокамерный	Графитовое волокно	Увлажненная углеродная ткань	0.400	739
Янтарная кислота	1 г/л	Бытовые сточные воды	однокамерный	Графитовое волокно	Увлажненная углеродная ткань	0.400	444

Спирты							
Этанол	1.5	Анаэробный ил	однокамерный	Углеродная бумага Toray	Углеродная бумага	0.750	488
Глицерин	0.5 мл/л	<i>Bacillus subtilis</i>	однокамерный	Углеродная ткань	Углеродная ткань	0.560	600
Другие							
Фенол	600 мл/л	Анаэробный ил	однокамерный	Углеродный войлок	Углеродная ткань, покрытая платиной	0.631	31.3
Фурфурол	6.68	Анаэробный и аэробный ил	однокамерный	Углеродная ткань	Углеродная ткань	0.420	361

МТЭ, использующие сточные воды, способны не только генерировать электроэнергию, но и также очищать загрязненную воду, что является привлекательным с практической точки зрения. Однако пока мощностные характеристики таких МТЭ не являются достаточно высокими (таблица 3).

Таблица 3. Удельная мощность МТЭ, работающих на сточных водах из различных источников [56].

Источник сточной воды	Тип МТЭ	Плотность тока, мА/см ²
Бытовые	двухкамерный	0.06
Ликероводочный завод	двухкамерный	0.1
Пивоваренный завод	однокамерный	0.2
Производство молочных продуктов	однокамерный	0.0025
Шоколадное производство	двухкамерный	0.302
Бумажное производство	однокамерный	0.0125
Городская сточная вода	двухкамерный	0.018
Обработка крахмала	однокамерный	0.09
Свинопроизводство	однокамерный	0.015

Таким образом, современные МТЭ пока не совершенны для применения их в качестве альтернативных источников энергии. Основные работы в области МТЭ направлены на подбор материалов, позволяющих повысить мощностные характеристики и стабильность работы таких устройств.

1.2.2 Ферментативный топливный элемент

Ферментативные топливные элементы (ФТЭ), подобно МТЭ, являются биологическими топливными элементами, в которых катализ анодной и (или) катодной реакции осуществляет непосредственно очищенный ферментный препарат. По этому принципу организованы и биосенсоры. Но в МТЭ концентрация фермента и ферментативная активность зависят от его выработки микроорганизмом. Использование же чистого ферментативного препарата более технологичный способ, позволяющий контролировать такие параметры, как концентрация и активность фермента. Ферменты, которые используют в ФТЭ, относятся к классу оксидоредуктаз, т.е. катализирующим окислительно-восстановительные реакции.

Первая работа, в которой был создан ферментативный топливный элемент с биоанодом на основе глюкозооксидазы и платиновым катодом была опубликована в 1964 году [57]. Хотя эта система и имела очень малый потенциал разомкнутой цепи (175-350 мВ), но именно она показала возможность осуществления ферментативного катализа в топливном элементе. В 70-х годах авторы работы [58] открыли возможность прямого электронного переноса с белка на электрод без участия редокс-медиаторов. Такой способ сопряжения электродной и ферментативной реакций приводит к уменьшению потерь, вызванных разностью потенциалов между активным участком фермента и медиатором. Однако до сих пор исследователи больше ориентированы на усовершенствование ФТЭ медиаторного типа. Поскольку, даже несмотря на потери потенциала и проблему стабильности медиатора, именно ФТЭ медиаторного типа позволяют достигать более высоких плотностей тока. В начале 1980-х авторы [59] впервые предложили использовать органометаллические медиаторы в ФТЭ. Это важное открытие получило далее развитие в разработке метода инкорпорации органометаллических редокс – медиаторов в редокс полимеры [60–62], что

послужило основой для современных типов биосенсоров. Наиболее распространенная конструкция ФТЭ представлена на рисунке 4.

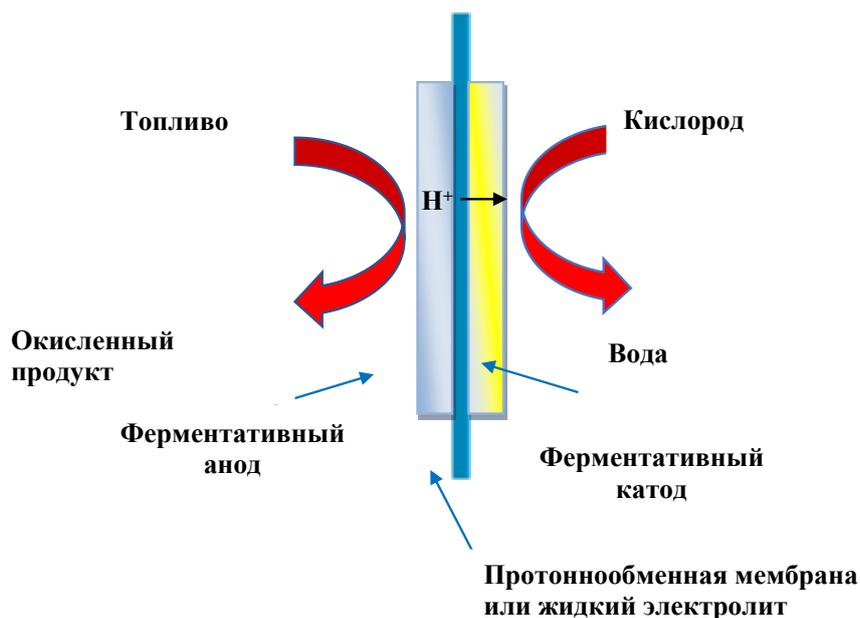


Рисунок 4 - Схема ФТЭ.

ФТЭ состоит из анода и катода с иммобилизованным ферментом на них, разделенных протонообменной мембраной или жидким электролитом. Применение протонообменной мембраны может быть необязательным, если иммобилизованные на электродах ферменты высокоселективны [61].

Разнообразие ферментов в природе, обладающих селективностью к различным органическим соединениям, позволяет использовать в качестве топлив в ФТЭ огромное количество разных органических соединений (от сахаров до низших алифатических спиртов). Основные топлива, применяемые в ФТЭ, и ферменты, необходимые для их биоэлектрокаталитического окисления, представлены в таблице 4.

Глюкоза является наиболее распространенным топливом, применяемым в ФТЭ. Это обусловлено ее изобилием в природе и тем, что она играет существенную роль в метаболизме большинства организмов. Глюкоза участвует в гликолизе, окисляясь до пирувата, который затем вступает в цикл Кребса. После ряда химических превращений, сопровождающихся поглощением и выделением энергии (образование и распад АТФ), глюкоза

распадается до углекислого газа и воды. Фруктоза, являющаяся структурным изомером глюкозы, и дисахариды (лактоза и целлобиоза) также широко применяются в качестве топлив для ФТЭ. Алифатические спирты (метанол, этанол и глицерин) являются возобновимыми топливами, которые могут быть произведены из биомассы. Пируват, являющийся важным интермедиатом метаболизма живых организмов, и водород, широко используемый в традиционных платиновых ТЭ, также используются в качестве топлив для ФТЭ.

Таблица 4. Топлива и ферменты, применяемые в ФТЭ [63].

Топливо	Фермент	Шифр фермента	Кофермент	Полуреакция в ячейке	Природный акцептор
глюкоза	глюкозооксидаза	ЕС 1.1.3.4	ФАД	глюкоза → глюконо-1,5-лактон+2H ⁺ +2e ⁻	O ₂
	глюкозодегидрогеназа	ЕС 1.1.1.47	НАД	глюкоза → глюконо-1,5-лактон+2H ⁺ +2e ⁻	НАД
	глюкозодегидрогеназа	ЕС 1.1.5.2	РQQ	глюкоза → глюконо-1,5-лактон+2H ⁺ +2e ⁻	хинон
	целлобиозодегидрогеназа	ЕС 1.1.99.18	ФАД, гем	глюкоза → глюконо-1,5-лактон+2H ⁺ +2e ⁻	акцептор
фруктоза	фруктозодегидрогеназа	ЕС 1.1.99.11	ФАД, гем	фруктоза → 5-дигидрофруктоза+2H ⁺ +2e ⁻	акцептор
целлобиоза	целлобиозодегидрогеназа	ЕС 1.1.99.18	ФАД, гем	целлобиоза → целлобионо-1,5-лактон+2H ⁺ +2e ⁻	акцептор
лактоза	целлобиозодегидрогеназа	ЕС 1.1.99.18	ФАД, гем	лактоза → 4-О-(галактопиранозил)-1,5-лактон + 2H ⁺ + 2e ⁻	акцептор
метанол	алкогольдегидрогеназа*	ЕС 1.1.1.1	НАД	спирт → альдегид+2H ⁺ +2e ⁻	НАД
	альдегиддегидрогеназа*	ЕС 1.2.1.5	НАД	альдегид+H ₂ O → кислота +2H ⁺ +2e ⁻	НАД
	формиатдегидрогеназа*	ЕС 1.2.1.2	НАД	формиат → СО ₂ +2H ⁺ +2e ⁻	НАД
	алкогольдегидрогеназа	ЕС 1.1.99.8	РQQ, гем	спирт → альдегид+2H ⁺ +2e ⁻	акцептор
этанол	алкогольдегидрогеназа*	ЕС 1.1.1.1	НАД	спирт → альдегид+2H ⁺ +2e ⁻	НАД
	альдегиддегидрогеназа*	ЕС 1.2.1.5	НАД	альдегид+H ₂ O → кислота+2H ⁺ +2e ⁻	НАД
	алкогольдегидрогеназа	ЕС 1.1.99.8	РQQ, гем	спирт → альдегид+2H ⁺ +2e ⁻	акцептор
глицерин	алкогольдегидрогеназа*	-	РQQ, гем	спирт → альдегид+2H ⁺ +2e ⁻	-
	альдегиддегидрогеназа*	-	РQQ, гем	альдегид+H ₂ O → кислота+2H ⁺ +2e ⁻	-
	оксалат оксидаза*	ЕС 1.2.3.4	ФАД, Мп	оксалат → 2СО ₂ +2H ⁺ +2e ⁻	O ₂
пируват	пируватдегидрогеназа*	ЕС 1.2.4.1	НАД	пируват +CoA → ацетил-CoA+2H ⁺ +2e ⁻	НАД
водород	мембранносвязанные гидрогеназы	-	-	H ₂ → 2H ⁺ +2e ⁻	-

*ферменты, осуществляющие полное окисление топлива

Среди ферментов, способных осуществлять биокаталитическое окисление глюкозы, наиболее широко используемой в области ФТЭ является глюкозооксидаза (ЕС 1.1.3.4, GOx). Глюкозооксидаза представляет собой димерный белок, состоящий из двух идентичных субъединиц с общим молекулярным весом в 160 кДа. GOx катализирует превращение глюкозы до глюконолактона, который самопроизвольно гидролизуется до глюконовой кислоты. Соответствующим коферментом для GOx является ФАД, а природным электронным акцептором – кислород, который в случае естественной реакции восстанавливается до перекиси водорода [64]. Однако, образование перекиси водорода около электрода должно быть исключено, поскольку она может инактивировать фермент. Глюкозодегидрогеназа (ЕС 1.1.1.47, GDH) - другой широко применяемый фермент в качестве катализатора для анодной реакции в ФТЭ. Преимуществом GDH перед GOx является то, что ее природным акцептором является не кислород, а кофермент – никотинамиддинуклеотид, НАД, что исключает образование перекиси водорода в рабочем пространстве ФТЭ.

В качестве альтернативного фермента для анодной реакции в ФТЭ Gorton и др. предложили использовать целлобиозодегидрогеназу (ЕС 1.1.99.18, CDH), выделенную из аскомицетовых грибов [65]. CDH способна окислять не только свой природный субстрат (целлобиоза), но и другие дисахариды и моносахариды. Другими ферментами из семейства дегидрогеназ, которые применяются в ФТЭ, являются PQQ-зависимая GDH (ЕС 1.1.5.2, для окисления глюкозы) [66] и фруктозодегидрогеназа (ЕС 1.1.99.11, FDH, для окисления фруктозы) [67]. Для окисления спиртов обычно применяют не один конкретный фермент, а каскад (композицию) ферментов, который позволяет осуществить полное окисление субстрата. Например, каскад из НАД – зависимых дегидрогеназ (алкогольдегидрогеназы ЕС 1.1.1.1, ADH; альдегиддегидрогеназы ЕС 1.2.1.5; формиатдегидрогеназы ЕС 1.2.1.2) позволяет окислить метанол до CO₂ [68]. Пируватдегидрогеназа (ЕС 1.2.4.1, PDH) окисляет пируват до Ацетил-КоА [69]. PQQ-зависимые дегидрогеназы

осуществляют неполное окисление этанола и глюкозы [70] и полное окисление глицерина, так же, как и оксалат оксидаза (ЕС 1.2.3.4, ООх) [71]. Окисление водорода осуществляют мембранно-связанные дегидрогеназы (МВН), которые содержат Ni-Fe каталитический центр [72].

Самым распространенным окислителем в ФТЭ, как и в случае традиционных ТЭ на платиновых катализаторах, является кислород. Пероксид водорода используется гораздо реже в качестве окислителя для ФТЭ, так как может оказать вредное воздействие на фермент. Известна работа, где пероксид кумола применяется в качестве окислителя для ФТЭ, электролит которого основан на двух несмешивающихся растворах [73].

Наиболее распространенными ферментами, которые используют в качестве катализаторов для катодной реакции в ФТЭ, являются лакказы (ЕС 1.10.3.2) и билирубин оксидаза (ЕС 1.3.3.5, ВOD). Медьсодержащие оксидазы, окисляющие ряд различных субстратов, классифицируют на три группы: Т₁, Т₂, Т₃. Группа Т₁ вступает в реакцию с органическими субстратами, а группы Т₂, Т₃ катализируют 4-электронное восстановление кислорода до воды [74,75]. Лакказы обычно проявляют активность в условиях слабокислой среды (рН =5), в то время как билирубин оксидаза – в более щелочной среде. Цитохромоксидаза (ЕС 1.9.3.1, СОх) и цитохром С, содержащие гем в качестве каталитического центра, также используют для восстановления кислорода. Для восстановления перекиси водорода используют микропероксидазу-11(МР-11) и пероксидазу хрена (ЕС 1.11.1.7, НRP). Основные окислители и ферменты, применяемые в ФТЭ, представлены в таблице 5.

Таблица 5. Окислители и ферменты, применяемые в ФТЭ [63].

Окислитель	Фермент	Шифр фермента	Металл/Кофактор	Полуреакция в ячейке
кислород	лакказа	ЕС 1.10.3.2	Cu	$O_2+4H^++4e^- \rightarrow 2H_2O$
	билирубиноксидаза	ЕС 1.3.3.5	Cu	$O_2+4H^++4e^- \rightarrow 2H_2O$
	цитохромоксидаза	ЕС 1.9.3.1	Cu, Fe, гем	$O_2+4H^++4e^- \rightarrow 2H_2O$
	цитохром С	-	Fe, гем	$O_2+4H^++4e^- \rightarrow 2H_2O$
пероксид водорода	микروпероксидаза-11	-	Fe, гем	$H_2O_2+2H^++2e^- \rightarrow 2H_2O$
	пероксидаза хрена	ЕС 1.11.1.7	Fe, гем	$H_2O_2+2H^++2e^- \rightarrow 2H_2O$
	микروпероксидаза-8	-	Fe, гем	$H_2O_2+2H^++2e^- \rightarrow 2H_2O$
пероксид кумола	микروпероксидаза-11	-	Fe, гем	$C_9H_{12}O_2+2H^++2e^- \rightarrow C_9H_{12}O+H_2O$

Производительность ФТЭ зависит не только от каталитической активности используемых ферментов, но и от характеристик биоэлектрода. Решающим фактором, определяющим эффективность биоэлектрода, является иммобилизация фермента на его поверхности. Методы иммобилизации ферментов на электроде можно разделить на физические и химические (рисунок 5).



Рисунок 5 - Классификация методов иммобилизации ферментов на электроде.

Физический метод иммобилизации фермента, заключающийся во включении энзима в структуру геля (желатин, полиакриламид, силиконовый каучук, коллаген, полиуретан, поливиниловый спирт со стирилпиридиновыми группами) применим к большинству ферментов, а также к грубым экстрактам и микроорганизмам. Этот метод иммобилизации заключается в образовании сшитой или поперечно-связанной (cross-linked) полимерной цепочки вокруг материала, который должен быть иммобилизован. Обычно такое связывание создается посредством перемешивания мономеров, связующего агента и фермента в буферном растворе с последующим добавлением катализатора, который инициирует процесс полимеризации. Достоинство этого метода заключается в том, что он не нарушает третичную структуру белка, поскольку именно изменения в третичной структуре белка приводят к инактивации ферментов [76]. Однако при таком методе иммобилизации могут уменьшиться степени свободы фермента, и как следствие, может также уменьшиться его активность. Между компонентами биоэлектрода образуются взаимозависимые связи, которые показаны в таблице 6, и для достижения высокой производительности ФТЭ необходима их оптимизация [77].

Физическая адсорбция ферментов в твердую матрицу – это самый простой и быстрый способ иммобилизовать ферменты на электроде. Основой этого метода является неспецифическое физическое взаимодействие, возникающие за счет слабых сил (силы Ван – Дер - Ваальса или дисперсионные силы) между ферментом и поверхностью матрицы. Такое адсорбционное взаимодействие создается посредством перемешивания концентрированного раствора фермента с твердым веществом. Адсорбционный метод иммобилизации не только экономически не затратен и технологически легко выполним, но и он является основным методом иммобилизации для нерастворимых ферментов. Однако, при работе ФТЭ изменения в температуре, pH и ионной силе, а также продолжительность работы в жидкой среде могут привести к десорбции (вымыванию) белка [78].

Таблица 6. Влияние характеристик компонентов биоэлектрода на генерируемые потенциал и плотность тока ФТЭ [77].

Компонент биоэлектрода	Характеристика компонента биоэлектрода, влияющая на	
	потенциал	плотность тока
Медиатор	редокс-активность медиаторной системы	концентрация
Фермент	редокс – потенциал кофермента, 3D-структура, активность	3D-структура, активность
Сшивающий агент	разделение медиатора и активного участка	диффузия через слой
Полимер		диффузия через слой

Формирование ковалентных связей между функциональными группами энзима и функциональными группами поверхности электродной подложки лежит в основе химического метода иммобилизации. Для ковалентного связывания при мягких условиях являются подходящими следующие функциональные группы белков: α – аминокислоты цепи и ϵ – аминокислоты лизина и аргинина; α – карбоксильная группа цепи; β – карбоксильные группы аспаргиновой и глутаминовой кислот; фенольное кольцо тирозина; тиоловая группа цистеина; гидроксильные группы серина и треонина; имидазольная группа гистидина; индольная группа триптофана. Следует отметить, что при формировании ковалентной связи активный центр фермента не должен быть подвергнут воздействию со стороны используемых реагентов [78].

Основными преимуществами этого метода являются высокая стабильность иммобилизованного фермента и отсутствие диффузионных барьеров. Тем не менее, иммобилизация по методу ковалентного связывания трудно воспроизводима из-за технологической сложности осуществления данного способа.

Метод иммобилизации фермента в полимерную матрицу не имеет таких ограничений. Полипиррол и полианилин - типичные проводящие редокс-полимеры, используемые в этом методе. Полипиррол достаточно

перспективный материал для иммобилизации, поскольку он позволяет предотвратить некоторые нежелательные электрохимические взаимодействия и даже способствует электронному переносу от некоторых ферментов. Ферментные электроды с полипирролом создаются посредством электрополимеризации, и ферменты включаются в полимер в качестве допанта в процессе полимеризации. Для улучшения электронного переноса полипиррольную пленку можно модифицировать посредством добавления катионных боковых групп (например, комплекс трис(бипиридил)рутения (II) [4]. Полианилин является другим широко используемым полимером для иммобилизации ферментов. Интерес к полианилину у исследователей возник благодаря его химическим и электрохимическим свойствам: высокая проводимость, электрохимическая стабильность, сильные бимолекулярные взаимодействия [79]. Для улучшения его свойств в качестве иммобилизационной подложки применяют различные модификации: полианилин - полиакрилонитрил композитные пленки [80], пирролохинолинхинон (PQQ) – модифицированный полианилин [81], альгинат/полианилин/диоксид титана/графит [82].

Влияние характеристик компонентов биоэлектрода на генерируемые потенциал и плотность тока ФТЭ представлены в таблице 6.

Таким образом, анализ работ в области ФТЭ показывает, что большинство из них сфокусировано на разработку различных технологических подходов, призванных повысить эффективность ферментативного электрода. Однако до сих пор есть проблемы в этой области, затрудняющие дальнейшее развитие ФТЭ: стабильность ферментативного электрода, эффективный электронный перенос между активным центром фермента и поверхностью электрода, недостаточно высокие генерируемые плотности тока.

1.2.3 БТЭ на основе биомиметиков

В биомиметических катализаторах имитируется активный центр фермента и структурная гибкость белковой глобулы, окружающей активный центр фермента. При конструировании биомиметических катализаторов исследователи фокусируются на нескольких характеристиках фермента, которые обеспечивают эффективный катализ:

1) Высокое сродство фермента к субстрату. При конструировании биомиметических катализаторов этот показатель достигается оптимизацией активного центра искусственного энзима. Активный центр часто содержит каталитически активные аминокислоты, которые способствуют протеканию каталитической реакции.

2) Высокое число оборотов катализатора (максимальное количество продукта, получаемого от одного фермента за 1 минуту). Этот показатель является одним из ключевых в ферментативном катализе. Роль катализатора заключается в том, чтобы способствовать образованию переходного состояния реакции. Ферменты проявляют более высокое сродство к переходному состоянию реакции, чем к субстратам или продуктам – это стабилизирует переходное состояние реакции, обладающей более низкой энергией активации. Показатель высокого числа оборота в синтетических энзимах достигается посредством имитации высокого сродства к переходному состоянию реакции [83].

Считается, что молекулярный импринтинг - самый надежный метод синтеза искусственных энзимов. В основе этого метода лежит полимеризация функциональных мономеров в присутствии специальных молекул – темплатов [84]. Так, Tomohiko и др. синтезировали искусственную дегидрогеназу методом молекулярного импринтинга в применении к сенсорной системе [85].

В настоящее время активно разрабатываются биомиметические катализаторы, которые имитируют активные участки ферментов гидрогеназ, осуществляющих как каталитическое получение, так и каталитическое

окисление водорода [86–88]. Такие искусственные биокатализаторы могут конкурировать с неорганическими в топливных элементах, но, все же основной их областью применения является органический (электро)синтез. Тем не менее, испытания комплексов никеля в качестве со-катализаторов окисления водорода в реальной топливной ячейке продемонстрировали возможность увеличения плотности тока до ~52% [89]. Органометаллический катализатор ($[\text{Ni}^{\text{II}}\text{Ru}^{\text{IV}} - \text{пероксокомплекс}]$, разработанный Matsumoto и др., в качестве катодного катализатора для топливного элемента позволил получить 26 мВт/см² [90], что является хорошим результатом для подобных систем.

1.3 Области применения биоэлектрокаталитических систем

Области применения биологических топливных элементов на данный момент ограничены генерируемой ими мощностью. Но они уже нашли свою нишу в качестве портативных источников энергии для маломощных устройств (рисунок 6).



Рисунок 6 - Области применения биоэлектрокаталитических систем

Имплантируемые медицинские устройства (кардиостимуляторы, нейростимуляторы головного мозга, стимуляторы спинного мозга, мышечные имплантаты, желудочные стимуляторы и т.д.) для своего функционирования требуют электроэнергию, тем самым открывая перспективы для разработки имплантируемых биотопливных элементов, работающих по принципу

«извлечение энергии из метаболитов организма». Так, Chia и коллеги [91] разработали миниатюрный микробный топливный элемент для имплантируемых медицинских устройств, такая система уникальна тем, что потребляет глюкозу, присутствующую в крови, в качестве топлива. В работе Minter [92] ферментативный топливный элемент интегрировали в контактную линзу. Различные типы биотопливных элементов были успешно имплантированы в живые организмы: кролики [93], крысы [94–97], омары [98], насекомые [99,100], моллюски [101,102].

Портативные электронные устройства (ноутбуки, мобильные телефоны, mp3-плееры и т.д.) представляют другую сферу применения биологических топливных элементов [4,103]. В сочетании с обычными батареями такие биосистемы смогут обеспечить перезарядку батарей и обеспечить режим ожидания для электронного оборудования [104].

В 2001 г. Katz и Willner предложили концепцию самопитаемых биосенсоров [105]. В основе этой концепции лежит идея, что в самопитаемых биосенсорах биологический топливный элемент функционирует как в качестве источника энергии, так и в качестве сенсора. Такая сенсорная система не только высоко специфична по отношению к определяемому веществу, но и не требует внешнего источника электроэнергии. После выдвижения этой концепции были предложены различные типы самопитаемых биосенсоров: ферментативный самопитаемый биосенсор [106–109], самопитаемый биосенсор на основе митохондрий [110], микробный самопитаемый биосенсор [111–113].

В ряде исследований показано, что биотопливные элементы могут генерировать электроэнергию за счет окисления соединений, содержащихся в сточных водах [114–116]. Таким образом, на основе биологических топливных элементов можно сконструировать систему очищения сточных вод, в которой будут реализованы два технологических процесса: генерация электроэнергии и очищение сточной воды от органических загрязнений. В обзоре [117] показано, что биотопливные системы, очищающие сточные воды города с

населением 150000 человек, могут генерировать до 2.3 МВт электроэнергии. Конечно, в реальности такие идеи пока являются скорее масштабными замыслами, поскольку в настоящее время известны только пилотные установки для сточных вод небольших производств.

Одним из оригинальных применений биологических топливных элементов является создание гастророботов – биоэлектрохимических машин, получающих электроэнергию за счет биотопливных элементов, окисляющих органических субстраты [118]. Уже созданы модели таких роботов – «SlugBot» [119], «EcoBot-III» [120], «Row-bot» [121], «EvoBot» [122]. Эти модели показывают принцип использования биотопливных элементов, но пока технологии далеки до коммерческого использования.

1.4 Биоэлектрокатализ и электрокатализ: теории и механизмы

Электрокатализ – вид катализа, при котором скорость электрохимических реакций изменяется в результате каталитического действия электродов, на поверхности которых эти реакции протекают. Биоэлектрокатализ – сопряжение биокаталитической реакции (чистые ферменты, микробные клетки, биомиметики) и электрохимической. Каталитическое действие всех трех видов биологических агентов основано на ферментативном катализе.

Многие биологические и важные химико-технологические процессы схожи по своим механизмам. Например, существуют аналогии между реакцией восстановления кислорода в топливных элементах и реакцией восстановления кислорода, протекающей в дыхательной цепи у живых организмов, между производством биогенного кислорода (фотосинтез) и выделением и поглощением водорода ферментами гидрогеназ [123]. Более того, существует ряд общих закономерностей между биологическими и электрохимическими реакциями, которые не могут быть воспроизведены другими химическими системами [124]. Для описания общих и различных

закономерностей рассмотрим подробнее теории и механизмы электрокатализа и биоэлектрокатализа.

1.4.1 Теории и механизмы электрокатализа

Во время электрохимической реакции происходит межфазный перенос заряда. Существует два механизма, описывающих перенос заряда, между реагирующими частицами – внешнесферный и внутрисферный.

В общем случае окислительно-восстановительного процесса, рассматривая взаимодействие между двумя частицами – ионами металлов, имеющими лигандное окружение (растворитель, ионы), внешнесферная реакция – это реакция, в ходе которой происходит перенос электрона в паре частиц, а координационное окружение обоих металлических центров реагирующих частиц не изменяется (рисунок 7). Этот механизм включает в себя обмен электронов между электродом и реагирующими частицами, причем между электродом и реагентами либо вообще нет взаимодействия, либо оно очень слабое.

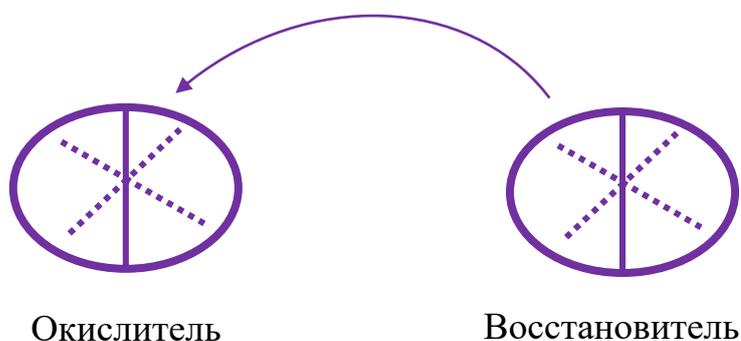


Рисунок 7 - Внешнесферный механизм [125].

В этом случае кинетика и термодинамика переноса заряда не зависят от электронной структуры электрода, и электронный перенос хорошо объясняет теория Маркуса [123]. Теория Маркуса основана на предположении, что электронный перенос происходит в адиабатических условиях и не учитывает

неадиабатические процессы. Модель Маркуса описывает внешнесферный электронный перенос с помощью следующих постулатов [126]:

1. При переносе электрона ближняя координационная сфера реагирующих частиц не меняется.

2. Между исходными веществами в растворе и комплексом, который состоит из реагирующей пары донор/акцептор, существует установившееся равновесие. Диффузионной стадией образования реакционной пары пренебрегают, а поскольку разделение продуктов реакции (т.е. их выход из клетки растворителя) считается быстрым, то только кинетический режим реакции следует рассматривать.

3. Ориентационная поляризация среды является источником возникновения энергии активации.

Однако теория электронного переноса Маркуса не смогла объяснить существование безактивационных и безбарьерных процессов [127]. И, кроме того, внутрисферный механизм электронного переноса не может быть описан в рамках теории Маркуса.

Второй механизм межфазового переноса заряда получил название внутрисферный (рисунок 8). При таком виде переноса между электродом и реагирующими частицами возникает значительное взаимодействие, которое может привести к разрыву или образованию химических связей.

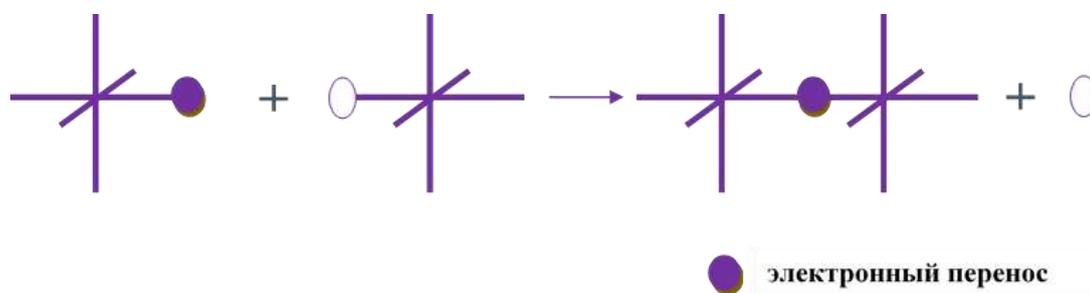


Рисунок 8 - Внутрисферный механизм [125].

В обобщенном виде элементарные стадии внутрисферного механизма переноса электрона показаны на рисунке 9. Проследить все эти этапы в ходе

эксперимента очень сложно, но при внутрисферном механизме переноса электрона реакция пройдет через все эти элементарные стадии с образованием интермедиатов, даже если они могут быть не обнаружены спектроскопическими и другими методами анализа.



Рисунок 9 - Элементарные стадии общего внутрисферного механизма переноса электронов [125].

Ключевую роль при внутрисферном механизме играет замещение лиганда, происходящее до электронного переноса. Электрон обычно переносится «мгновенно» через мостиковый лиганд, без образования долгоживущего промежуточного лигандного радикала. Необходимым условием внутрисферного переноса электрона является наличие подходящего мостикового лиганда. Но электрон часто не задерживается на мостиковом лиганде, перенос электрона от центра одной реагирующей частицы к другой обычно происходит быстрее, чем образование первичного комплекса. Перенос электрона внутри первичного комплекса проходит за одну кинетическую стадию сразу к вторичному комплексу, который затем быстро распадается на конечные продукты [125].

При внутрисферном электронном переносе скорость электрохимической реакции сильно зависит от свойств поверхности электрода. Таким образом, только реакции с внутрисферным электронным переносом относятся к электрокатализу [123].

Одна из значимых интерпретаций теории электрокатализа была предложена Поляни в 1935 году [128]. В своей работе Horiuti and Polany описали механизм гидрирования этилена и бензола, взяв за основу обмен водорода между водой и этиленом/бензолом [129]. Они выдвинули следующие основные стадии этого механизма:

1. Хемосорбция (активированная адсорбция) водорода, образующего адсорбированные атомы водорода.

2. Хемосорбция (активированная адсорбция) двойной связи соединения на поверхности, которая сопровождается раскрытием двойной связи и образованием двух новых связей с катализатором.

3. Перенос атома водорода к одному из атомов углерода адсорбированного углеводорода, в ходе которого он переходит в полугидрированное состояние. После этого процесса может последовать следующее:

а) удаление атома водорода из атома углерода в полугидрированном состоянии, что приводит к замещению;

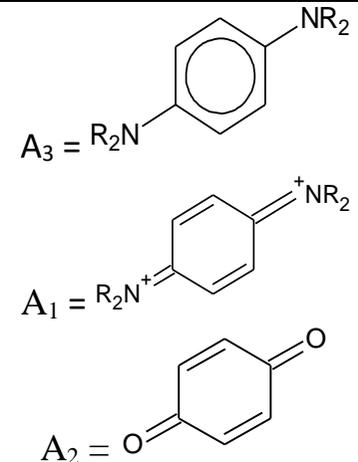
б) последующее замещение атома водорода на другой атом углерода, что впоследствии приводит к гидрированию.

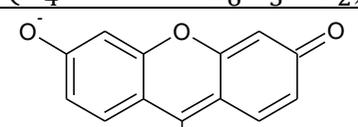
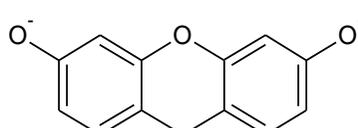
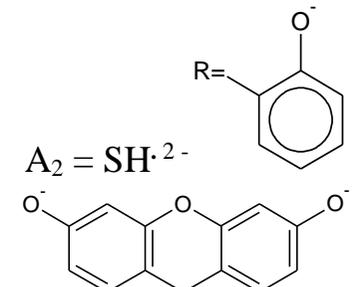
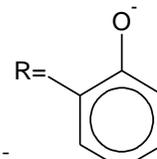
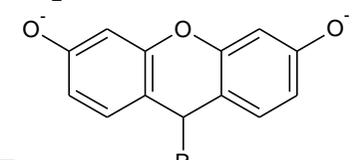
Учитывая, что на концентрацию и природу реагирующего на поверхности электрода вещества может оказывать влияние предшествующая или последующая химическая или электрохимическая стадия, рассмотрение механизма электродных процессов, связанных с гомогенными химическими реакциями в растворе, важно для развития представлений о механизме электрокаталитических реакций. Возможные варианты таких процессов представлены в таблице 7 [130]. Электродные процессы состоят из чередования стадий двух типов: химические (С) и электрохимические (Е). Химическая стадия представляет собой химическую реакцию, протекающую в приэлектродном пространстве.

При химической стадии не происходит переноса электрона с участием электрода, следовательно, эти стадии подчиняются законам химической

кинетики. При протекании же электрохимической стадии непосредственно происходит перенос электрона от электрода или к электроду. Электрохимические стадии подчиняются законам электрохимической кинетики. Процессы $DISP_1$ и $DISP_2$ представляют собой частные случаи ECE процесса.

Таблица 7. Механизмы электродных процессов со связанными гомогенными реакциями [130].

Тип механизма	Процесс на электроде	Пример
CE	$\begin{array}{l} \text{В растворе: } A_2 \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} A_1 \\ \text{На электроде: } A_1 \pm ne^- \rightarrow A_3 \end{array}$	$\begin{array}{l} A_2 = H_2C(OH)_2 \\ A_1 = H_2Co \\ A_3 = CH_3OH \end{array}$
EC ¹	$\begin{array}{l} \text{В растворе: } A_2 \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} A_1 \\ \text{На электроде: } A_1 \pm ne^- \rightarrow A_3 \end{array}$	$\begin{array}{l} A_2 = Fe(III) \\ A_1 = Fe(II) \\ \text{Гомогенный катализатор } H_2O_2 \end{array}$
EC	$\begin{array}{l} \text{На электроде: } A_3 \pm ne^- \rightarrow A_1 \\ \text{В растворе: } A_2 \xrightleftharpoons[k_{-1}]{k_1} A_1 \end{array}$	 $\begin{array}{l} A_3 = \text{R}_2\text{N}-\text{C}_6\text{H}_4-\text{NR}_2 \\ A_1 = \text{R}_2\text{N}^+=\text{C}_6\text{H}_4 \\ A_2 = \text{O}=\text{C}_6\text{H}_4=\text{O} \end{array}$
ECE	$\begin{array}{l} \text{На электроде: } A_3 \pm ne^- \rightarrow A_1 \\ \text{В растворе: } A_1 \xrightarrow{k} A_2 \end{array}$	$\begin{array}{l} A_3 = ClC_6H_4NO_2 \\ A_1 = ClC_6H_4NO_2^- \\ A_2 = \cdot C_6H_4NO_2 \end{array}$

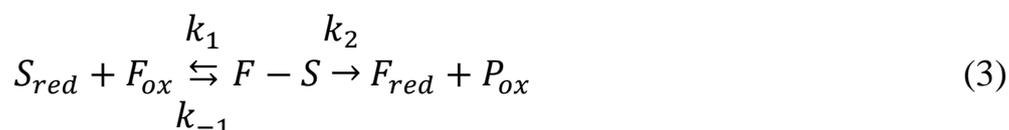
	На электроде: $A_2 \pm ne^- \rightarrow A_4$	$A_4 = \cdot\bar{C}_6H_4NO_2$ ($A_4 + H^+ \rightarrow C_6H_5NO_2$)
DISP ₁	На электроде: $A_3 \pm ne^- \rightarrow A_1$ В растворе: $A_1 \xrightarrow{k} A_2$ В растворе: $A_1 + A_2 \rightarrow A_3 + A_4$	 A ₃ =  A ₁ =  A ₂ = SH ^{·2-} (R = ) A ₄ =  (L ³⁻) pH 9-10 DISP1 pH 6 DISP 2
DISP ₂	На электроде: $A_3 \pm ne^- \rightarrow A_1$ В растворе: $A_1 \rightleftharpoons A_2$ В растворе: $A_1 + A_2 \xrightarrow{k} A_3 + A_4$	

Примечание. E – электрохимическая стадия (на электроде), С – химическая стадия (в растворе).

1.4.2 Теории и механизмы биоэлектрокатализа

Фундаментальные подходы, изложенные выше в отношении электрокатализа, работают и в отношении биоэлектрокатализа. Однако в случае биоэлектрокатализа существуют свои особенности. Так, для осуществления эффективного биоэлектрокатализа требуется сопряжение ферментативного катализа и электрохимической реакции на электроде. Существуют два принципиально различных пути для достижения этой цели, уже упомянутые выше, прямой (безмедиаторный) биоэлектрокатализ и медиаторный биоэлектрокатализ.

В первом случае реализуется прямой электронный перенос с белковых фрагментов на электрод:



Здесь S_{red} – восстановленная форма субстрата; P_{ox} – окисленная форма продукта; F_{ox} , F_{red} – окисленная и восстановленная формы фермента/кофермента.

Прямой биоэлектрокатализ протекает в две стадии, представленные схематически уравнениями (3) и (4). Первая стадия осуществляется путем переноса электронов между субстратом и активным центром фермента, на второй же стадии перенос электронов происходит непосредственно между активным центром фермента/кофермента и электродом, который становится субстратом.

Прямой биоэлектрокатализ описывается рядом кинетических уравнений, базирующимися на различных математических моделях, в основе которых лежит кинетическая схема Михаэлиса – Ментен (уравнение 3). Кинетическое уравнение (5) выведено из математической модели, ограничивающейся лишь принципами формальной кинетики, для процессов в биотопливном элементе [131]

$$v_F = \frac{k_{cat}C_F}{1 + \frac{k_S}{C_S}} \quad (5)$$

где v_F – скорость ферментативной реакции, C_F – концентрация фермента, $k_S = \frac{k_2+k_{-1}}{k_1}$, $k_{cat} = k_2$.

Уравнения (6)-(11) лежат в основе математической модели, представленной в работе [132] и учитывающей перенос частиц, гетерогенные химические реакции и кинетику ферментов с учетом геометрии микроканалов.

$$R = R_{max} \frac{C_0}{K_m + C_0} \quad (6)$$

$$R_{max} = k_{cat} C_F \quad (7)$$

$$C_F = (A_c N_a)^{-1} \quad (8)$$

$$R_{max} = \frac{k_{cat}}{A_c N_a} \quad (9)$$

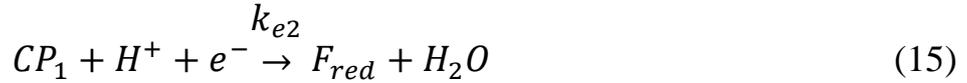
$$k_{cat} = vM \quad (10)$$

$$v = \frac{v_{max} C_0}{K_m + C_0} \quad (11)$$

где R - скорость образования продукта ферментативной реакции, K_m – константа Михаэлиса, A_c – площадь поперечного сечения молекулы фермента, N_a – число Авогадро, M – молекулярная масса фермента, v – специфическая активность, C_0 – объемная концентрация фермента, k_{cat} – число оборотов фермента.

Более сложная кинетическая модель была представлена в работе [133], рассматривающей биоэлектрохимическую реакцию через 2 ферментативные стадии по механизму Мехэлиса – Ментен (уравнения 12 – 13) и 2 электрохимические стадии (уравнения 14 – 15). В качестве модельной реакции было взято восстановление перекиси водорода пероксидазой хрена.





где S – субстрат (пероксид водорода), CP_1 – частично восстановленная форма фермента.

Кинетические уравнения в рамках данной модели учитывают образование фермент-субстратного комплекса и эффекты массопереноса с допущением, что ферменты распределены равномерно вдоль каталитического слоя и без рассмотрения влияния диффузии протонов.

Скорости ферментативных реакций с учетом принципов, изложенных выше, выражаются в соответствии с уравнениями (16) и (17):

$$v_{1(z,t)} = k_1 C_{S(z,t)} \Gamma_{F_{red}(z,t)} - k_{-1} \Gamma_{F-S(z,t)} \quad (16)$$

$$v_{2(z,t)} = k_2 \Gamma_{F-S(z,t)} \quad (17)$$

где Γ – поверхностная концентрация фермента.

Скорости для электрохимических стадий выражаются в соответствии с уравнением Тафеля (уравнения 18 - 19):

$$v_{e1(z,t)} = -k_{e1} e^{-\alpha \frac{F}{RT} \eta_1(z,t)} \Gamma_{F_{ox}(z,t)} C_{H^+(z,t)} \quad (18)$$

$$v_{e2(z,t)} = -k_{e2} e^{-\alpha \frac{F}{RT} \eta_2(z,t)} \Gamma_{CP_1(z,t)} C_{H^+(z,t)} \quad (19)$$

где α – коэффициент переноса, η – перенапряжение, F – постоянная Фарадея, R – универсальная газовая постоянная, T – температура.

$$\eta_1(z,t) = E_{(z,t)} - E_{r,1}$$

$$\eta_2(z,t) = E_{(z,t)} - E_{r,2}$$

где $E_{r,1}$ и $E_{r,2}$ – равновесные потенциалы для электрохимических стадий 14, 15 соответственно.

Существует довольно большой круг работ, рассматривающих гетерогенные реакции электронного переноса между белками и поверхностью электрода, в том числе теоретических, см., например [134,135]. Эти

исследования показали, что теория Маркуса работает в биоэлектрокаталитических процессах. Полуклассическая теория Маркуса предсказывает, что скорость переноса электронов зависит от термодинамической движущей силы реакции (ΔG^0), энергии ядерной реорганизации (λ) и электронного соединения (H_{DA}) между донором (D) и акцептором (A) в переходном состоянии (уравнение 20).

$$k_{et} = \frac{2\pi}{\hbar} \frac{H_{DA}^2}{\sqrt{4\pi\lambda RT}} e^{-\frac{(\Delta G^0 + \lambda)^2}{4\lambda RT}}, \quad (20)$$

где k_{et} – скорость электронного переноса, \hbar – редуцированная постоянная Планка, R – универсальная газовая постоянная, T – абсолютная температура

Для прогнозирования электронного перехода между донором и акцептором в переходном состоянии (H_{DA}) были разработаны различные подходы. Наиболее простой из данных подходов является квадрат-барьерная модель. В данной модели белок рассматривается, как замороженное органическое стекло, и H_{DA} экспоненциально убывает в зависимости от расстояния между донором и акцептором:

$$H_{DA}^2 = (H_{DA}^0) e^{-\beta(r_{DA} - r_0)} \quad (21),$$

где H_{DA}^0 – электронная связь на расстоянии Ван-дер-Ваальса (r_0), r_{DA} – расстояние между донором и акцептором, β – параметр туннелирования, который зависит от структуры белка [136].

Параметр туннелирования играет важную роль для возможности протекания прямого биоэлектрокатализа. Электронное туннелирование возникает, когда потенциальная энергия, действующая на электрон в пространстве между реагирующей парой выше энергии электрона в его начальном локализованном участке.

Таким образом, для того чтобы протекал прямой биоэлектрокатализ необходимо выполнение следующих условий [75,137]:

1. Расстояние между донором и акцептором электронов не должно превышать 2 нм (20 Å). На расстоянии больше данного значения наблюдается незначительная скорость электронного переноса.

2. Если фермент обладает кофактором, который имеет достаточно близкое расположение, то кофактор также должен быть ориентирован в пространстве к электроду на расстоянии не больше 2 нм. Такая ориентация зависит от первичной, вторичной и результирующей третичной структур белка, поскольку заряженные области белковой структуры при фиксированном рН могут отталкиваться или притягиваться к поверхности электрода.

Наиболее известными ферментами, которые способны к осуществлению прямого биоэлектрокатализа, являются: медьсодержащие оксидазы (лакказа E.C. 1.10.3.2, билирубиноксидаза VOx E.C. 1.3.3.5), гидрогеназы E.C. 1.12.X.X, целлобиозодегидрогеназа CDH, E.C. 1.1.99.18, пирролохинолин-хинонзависимая глюкозодегидрогеназа PQQ-GDH, E.C. 1.1.5.2 и глюкозооксидаза GOx , E.C. 1.1.3.4 [138].

Однако для большинства ферментов прямой биоэлектрокатализ неосуществим, поскольку активные центры этих энзимов очень глубоко встроены в белковую структуру и эффект электронного туннелирования невозможен на таком расстоянии [10]. Поэтому часто приходится применять второй путь сопряжения ферментативной и электрохимической реакций (медиаторный биоэлектрокатализ). Медиаторный биоэлектрокатализ можно описать в виде пинг-понг механизма [139]:

- 1) ферментативное окисление субстрата (уравнение 3)
- 2) электронный перенос между ферментом и редокс-медиатором (M) (уравнение 22)
- 3) диффузия окисленного медиатора к поверхности электрода:



Когда электронный обмен через редокс-медиатор протекает очень быстро относительно скорости ферментативной реакции или скорости электронного обмена между ферментом и медиатором, то электродная реакция

будет следовать кинетической модели псевдопервого порядка. Таким образом, для этого случая общую скорость реакции можно выразить [138]:

$$v = \frac{v_{max}}{1 + \frac{K_m}{[M_{ox}^*]} + \frac{K_s}{[S^*]}} \quad (23)$$

где

$$V_{max} = k_{cat}[E] = \frac{k_2 k_4}{k_2 + k_4} \quad (24)$$

K_m – константа Михаэлиса для медиатора, K_s – константа Михаэлиса для субстрата, $[M_{ox}^*]$ и $[S^*]$ – концентрации окисленной формы медиатора и субстрата в иммобилизованном слое.

В работе [140] рассматривается модельная система с иммобилизованным ферментом на аноде (при этом субстрат и медиатор находятся в растворе), отделенном мембраной Nafion от платинового катода. В основе модели лежит пинг-понг механизм анодной реакции с учётом конкурирующей побочной реакции (окисление фермента растворенным кислородом на аноде). Скорость биоэлектрохимической реакции на аноде выражается уравнением (25), представленным по форме уравнения Батлера-Фольмера при условии переноса двух электронов.

$$v_{anod} = k_{anod} C_{M_{red}}^{\alpha_a} C_{M_{ox}}^{\alpha_c} \left[\exp\left(\frac{2\alpha_c F \eta_a}{RT}\right) - \exp\left(\frac{-2\alpha_a F \eta_a}{RT}\right) \right] \quad (25)$$

где k_{anod} – константа скорости окисления медиатора, α_a – коэффициент переноса заряда на аноде, α_c – коэффициент переноса заряда на катоде, η_a – перенапряжение на аноде.

Скорость восстановления кислорода на катоде выражается уравнением (26), представленным по форме уравнения Батлера-Фольмера при условии равных коэффициентов переноса заряда.

$$v_{cath} = \frac{i_{O_2}}{F} \left(\frac{c_{O_2}}{c_{O_2}^0}\right) \left[\exp\left(\frac{-2F\eta_a}{RT}\right) - \exp\left(\frac{2F\eta_a}{RT}\right) \right] \quad (26)$$

где $\frac{i_{O_2}}{F}$ – плотность тока обмена.

Медиаторный биоэлектрокатализ может протекать как по гомогенному, так и по гетерогенному механизму. В гомогенной системе медиатор и фермент свободно диффундируют в растворе. В гетерогенной же системе медиатор может быть введен в рабочий раствор (энзим иммобилизован на электроде) или же быть иммобилизованным на электроде. Схематичное изображение принципа медиаторного биоэлектрокатализа на аноде представлено на рисунке 10.

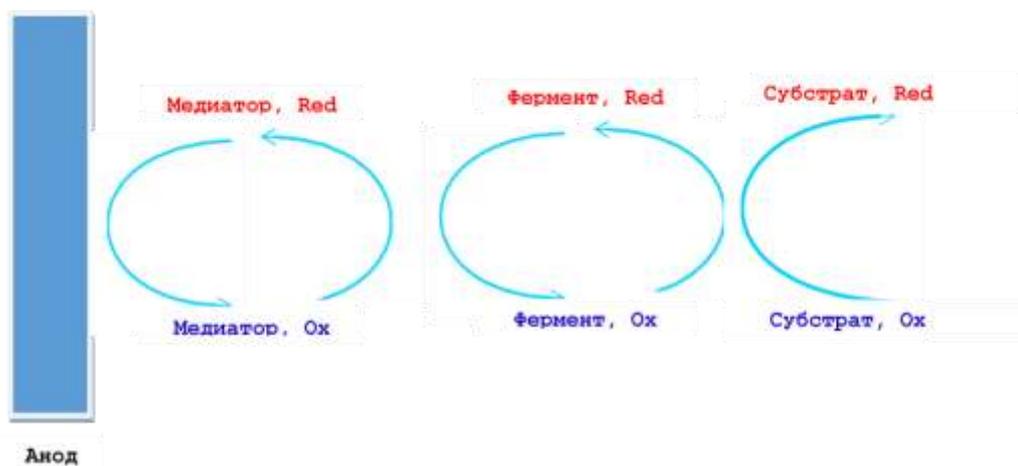


Рисунок 10 - Схематическое изображение принципа медиаторного биоэлектрокатализа на аноде.

Рассмотрев подходы к описанию механизмов электрокатализа и биоэлектрокатализа, можно заключить, что биоэлектрокатализ представляет собой частный случай электрокатализа. При этом медиаторный биоэлектрокатализ является более универсальным, но возникает вопрос о свойствах медиаторной системы, которую можно использовать для реакции с ферментом. При этом механизм электродного процесса будет выглядеть следующим образом ССЕ ((био)химическая стадия, химическая стадия, электрохимическая стадия).

1.5 Особенности выбора редокс-медиаторных систем

Эффективность редокс-медиаторной системы зависит от ряда факторов, и при выборе медиатора необходимо учитывать ряд требований, суммированных ниже:

1. Для возникновения электронного переноса между энзимом и медиатором необходима разность потенциалов, возникающая из-за их отличия между потенциалами фермента и медиатора. Так, для реакции окисления потенциал медиатора должен быть больше, чем редокс-потенциал фермента, а для реакции восстановления, соответственно, потенциал медиатора должен быть меньше, чем редокс-потенциал энзима. Слишком большая разность потенциалов нежелательна для биоэлектрохимических систем, поскольку в случае биосенсоров это приводит к искусственно завышенному сигналу, а в случае биотопливных элементов ограничивает напряжение разомкнутой цепи. Поэтому желательно минимизировать разность потенциалов [138]. По литературным данным для осуществления эффективного биоэлектрокатализа оптимальная разница потенциалов между медиатором и ферментом должна составлять 50 мВ [141].

2. Редокс-превращение медиатора должно быть быстрым и носить обратимый характер [142].

3. Окисленная и восстановленная формы медиатора должны быть стабильными [143].

Медиаторные системы весьма разнообразны, это связано в основном с особенностью строения белковых молекул – необходима совместимость медиатора с редокс-центром фермента.

Азиновые производные. Химическая структура азиновых медиаторов представлена на рисунке 11. (где X - S для фенотиазинов, O для феноксазинов, N для феназинов) [14].

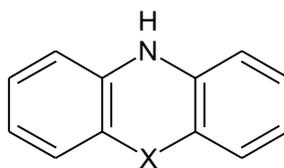


Рисунок 11 - Химическая структура азиновых медиаторов.

Привлекательность применения азиновых медиаторов в биоэлектродокаталитических системах с НАД-зависимыми дегидрогеназами вызвана тем, что формальный редокс-потенциал кофермента NADH составляет - 0.52 В (Ag/AgCl, pH 7), но для его окисления на электроде требуется перенапряжения в 1.1 В [144]. Это ограничивает применение НАД-зависимых энзимов в немедиаторных биоэлектродокаталитических системах. Однако при использовании азиновых медиаторов кофермент NADH может окисляться при гораздо более низких значениях перенапряжения.

Фенотиазиновую группу представляют медиаторы метиленовый синий [145], метиленовый зеленый [146], толуидиновый синий [147] и тионин [148]. Основными медиаторами феноксазиновой группы являются Мелдола синий [149] и крезильовый синий блестящий [150]. В феназиновую группу входят нейтральный красный [151] и рибофлавин [152]. Однако возможная чувствительность азиновых производных к кислороду не была детально изучена [14], а именно эта характеристика может оказать существенное ограничение для практического применения электродокаталитических систем с азиновыми медиаторами.

Ферроцен и его производные. Ферроцен и его производные представляют собой весьма обширный класс электронных переносчиков среди медиаторов биоэлектродокаталитических систем. Химическая структура ферроцена и его производных представлена на рисунке 12.

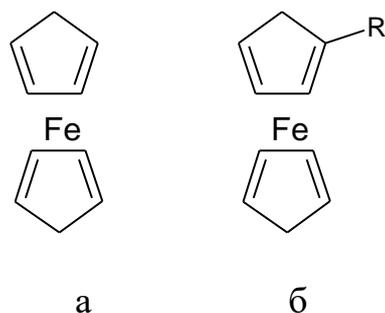


Рисунок 12 - Химическая структура ферроцена (а) и его производных (б).

Применимость ферроценовых медиаторов вызвана их химической стабильностью, рН индифферентностью и высокой обратимостью электрохимической реакции [153]. Довольно часто ферроцен и его производные используют в биоэлектрокаталитических системах с глюкозооксидазой [153,154]. Некоторые производные ферроцена применяются в качестве медиаторов в системах с пирролохинолинхинон-зависимыми дегидрогеназами [153]. Однако, ион ферроцена (окисленная форма ферроцена) подвергается медленному гидролизу в водном растворе [155].

Хиноны. Хиноновые медиаторы вызывают особый интерес, поскольку убихинон (производное 1,4-бензохинона) играет ключевую роль в

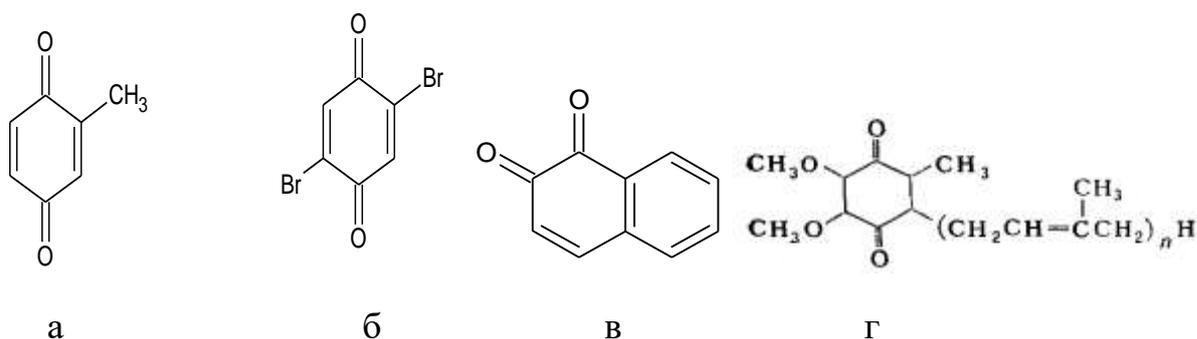


Рисунок 13 - Химическая структура хинонов. а – 2-метил - 1, 4-бензохинон, б – 2,5 – дибромо-1,4-бензохинон, в – 1,2 – нафтохинон, г – убихинон.

биологических процессах, в частности, как электронный переносчик. Химическая структура хинонов представлена на рисунке 13.

В процессах анаэробного/аэробного дыхания и фотосинтеза окисленная форма убихинона Q выступает в роли акцептора электронов, быстро переходя в восстановленную форму убихинона QH₂, которая впоследствии переносит электроны по дыхательной цепи /электротранспортной цепи фотосинтеза [156]. Соответственно, хиноновые редокс - системы могут проявлять совместимость с активным центром энзима. Семейство хинона представлено большим количеством различных соединений. Однако не все из них могут выступать в роли редокс-медиаторов. Авторы [157] исследовали 2-метил - 1, 4-бензохинон, 2,5 – дибромо-1,4-бензохинон и 1, 2 – нафтохинон в качестве редокс-медиаторов PQQ-глюкозодегидрогеназы из *G. Oxydans*, в ходе исследования выяснилось, что 1,2 – нафтохинон не проявляет медиаторных свойств в отличие от остальных двух хиноновых медиаторов. Авторы объяснили отсутствие электронного переноса в системе с 1,2 – нафтохиноном тем, что он отличен по своей химической структуре от убихинона (рисунок 13), который является основным природным акцептором PQQ-глюкозодегидрогеназы. В то время как положение карбонильных групп у 2-метил-1, 4-бензохинона, 2,5-дибромо-1,4-бензохинона аналогично со структурой убихинона. Кроме того, хиноновые медиаторы чувствительны к рН [158].

Комплексы осмия и рутения. Комплексы осмия (в особенности бипиридины, терпиридины и фенантролины) обладают высокой скоростью электронного переноса, благодаря чему они часто применяются, как редокс-медиаторы в биоэлектродокаталитических системах [159]. Химические структуры бипиридиновых комплексов осмия, координированных с кватернизованным азотом, представлены на рисунке 14.

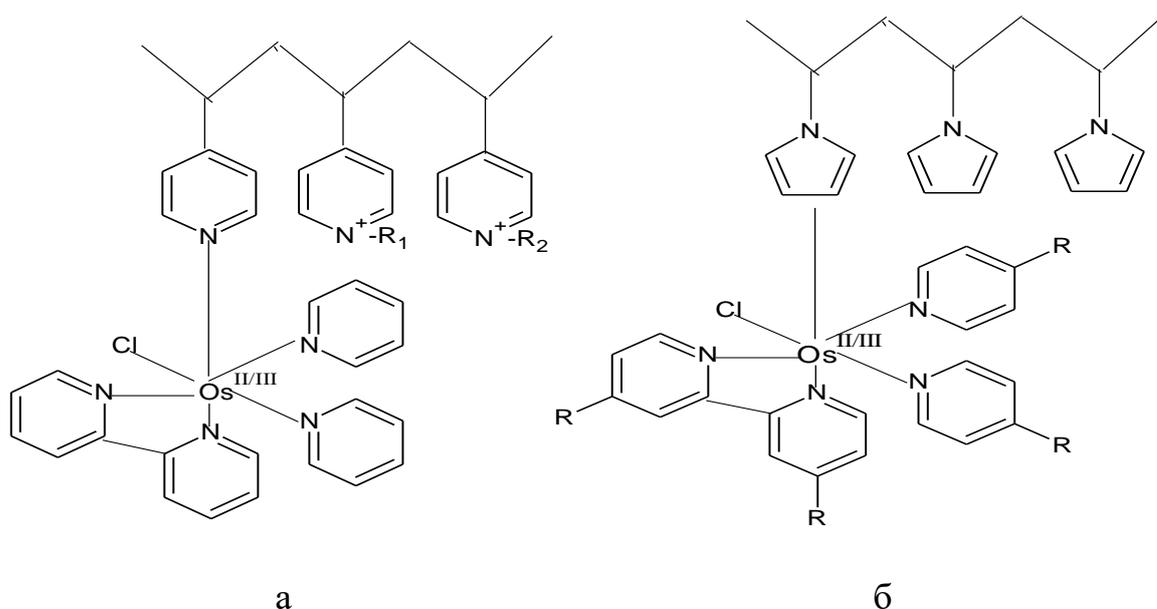
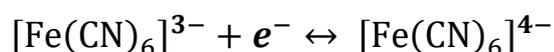


Рисунок 14 - Химические структуры бипиридиновых комплексов осмия, координированных с кватернизованным азотом (четвертичный атом азота) а) поли(4-винилпиридин) или б) поли(1-винилимидазол) [159].

Многие медиаторные системы на основе этих комплексов сконструированы с помощью полимерных пленок (редокс-полимеры) [160–162]. Известны также работы, в которых в качестве редокс-медиаторов для биоэлектрокаталитических систем тестируются аналогичные комплексы рутения [163,164]. Однако следует отметить, что некоторые комплексы рутения чувствительны к наличию кислорода в системе, что, несомненно, ограничивает их практическое применение [165].

Ферри/ферроцианид. Не только высокая скорость переноса заряда, но и редокс-совместимость со многими ферментами и белками (например, флавин-аденин-динуклеотид оксидазы, цитохром с) делают феррицианид $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ одной из наиболее используемых медиаторных систем [166]. Редокс реакция в медиаторной системе ферри/ферроцианид представлена ниже:



Ферри/ферроцианид редокс-медиаторная система применяется в различных биоэлектрокаталитических системах: микробных топливных

элементах [167], биосенсорах [168] и ферментативных топливных элементах [169].

Помимо вышерассмотренных медиаторных систем известны работы, в которых для повышения эффективности электронного переноса предлагается использовать комбинированные медиаторные системы. Так, авторы [170] при разработке биосенсора (катализатор – микробные клетки) установили, что при использовании композиции из двух медиаторов (ферроцен и метиленовый синий) электронный перенос улучшается за счет того, что один медиатор восстанавливается микробными клетками с высокой скоростью, а другой обеспечивает быструю электрохимическую реакцию и переносит заряд на электрод. Wilkinson и др. [171] подтверждают, что использование комбинированной медиаторной системы (метиленовый синий и нейтральный красный) позволяет увеличить производительность микробного топливного элемента по сравнению с микробным топливным элементом, в котором электронный перенос осуществляет лишь один медиатор. Однако, надо понимать, что в таком случае кинетика биоэлектрокаталитической реакции еще больше усложняется за счет возможных вариантов параллельных и последовательных стадий с участием разных медиаторных систем.

Помимо вопросов об организации электродов с биообъектами в качестве электрокатализаторов и вопросов о кинетике биоэлектрокатализа важным представляется рассмотрение вопроса о составе ферментов в микроорганизмах и способах их выделения в чистом виде. Наиболее изученной клеточной культурой, ставшей модельной для многих практических приложений [172,173], в том числе, биоанодов в топливных элементах, является *E. coli*. Рассмотрим особенности метаболизма этой культуры, который определяет состав ферментов, вырабатываемых в процессе жизнедеятельности.

1.6 Метаболизм *E. coli* [172–178]

Основными метаболическими путями *E. coli* являются гликолиз (путь Эмбдена - Мейергофа – Парнаса), цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса), глиоксилатный шунт и пентозофосфатный путь (рисунок 15).

Ассимиляция глюкозы в клетках *E. coli* начинается с ее транслокации через цитоплазматическую мембрану посредством фосфотрансферной системы и её фосфорилирования с образованием глюкозо-6-фосфата. Далее глюкозо-6-фосфат может вступить в метаболические превращения по трем различным направлениям: на пути Эмбдена - Мейергофа – Парнаса происходит изомеризация глюкозо-6-фосфата во фруктозо-6-фосфат посредством фермента фосфогексоизомеразы; он также может вступить в окислительную ветвь пентозофосфатного пути; или он может превратиться под влиянием фермента фосфоглюкомутазы до глюкозо-1-фосфата для синтеза нуклеотидов сахара.

Гликолиз. В гликолитическом пути 6-фосфофруктокиназа катализирует превращение фруктозо-6-фосфата во фруктозо-1,6-дифосфат, затем фермент фруктозо-1,6-дифосфатаальдозаза катализирует обратимую альдольную конденсацию фруктозо-1,6-дифосфата до триозофосфатов (глицеральдегид-3-фосфат и дигидроксиацетонфосфат).

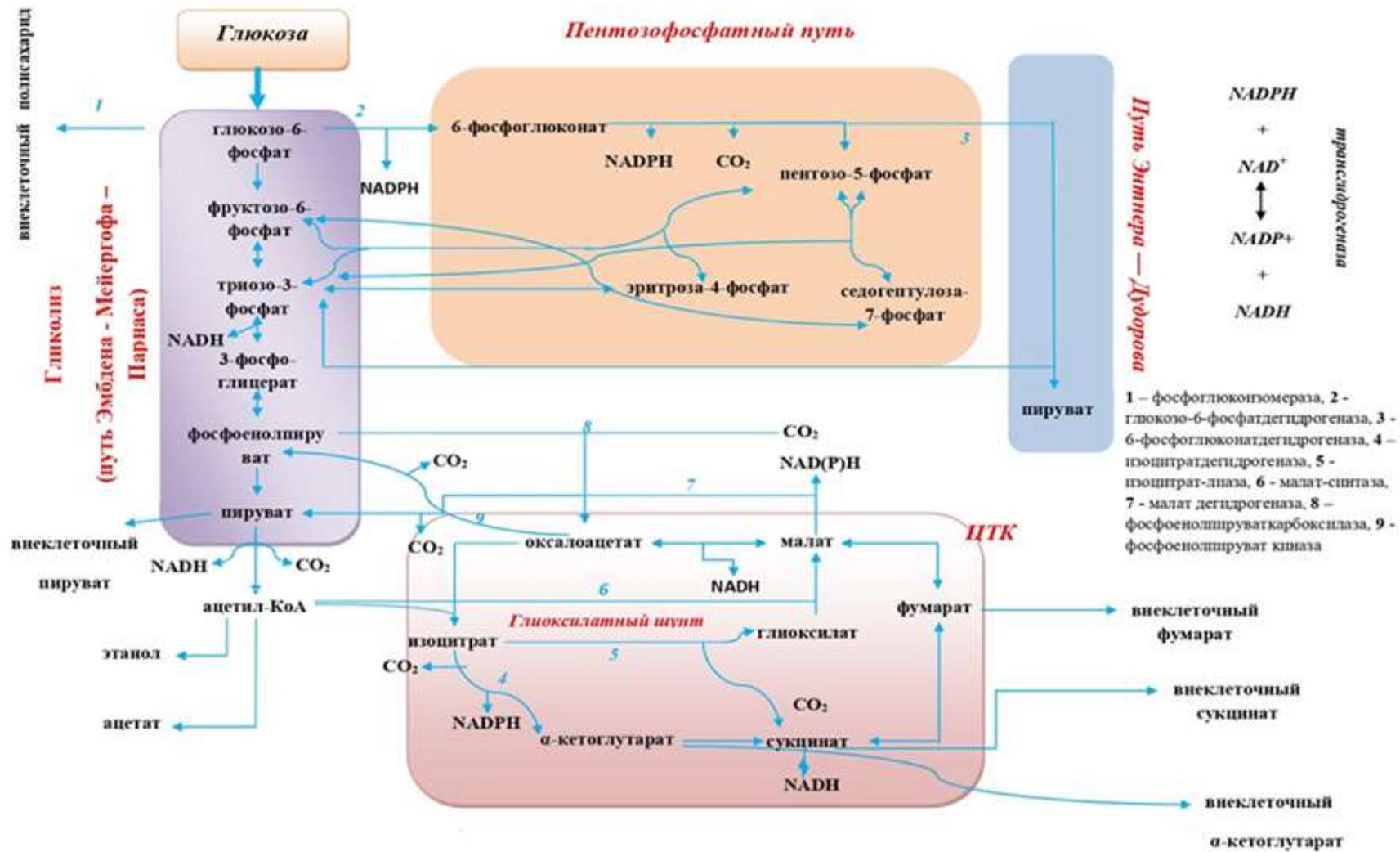


Рисунок 15 - Схема центрального углеводного метаболизма *E. coli* [178].

Однако лишь глицеральдегид-3-фосфат может принимать дальнейшее участие в превращениях гликолиза, в то время как дигидроксиацетонфосфат подвергается обратимому превращению в глицеральдегид-3-фосфат посредством триозофосфатизомеразы. Таким образом, молекула глюкозы расщепляется на две молекулы глицеральдегид-3-фосфата, которые подвергаются окислительному фосфорилированию до 1,3 – дифосфоглицерата. Далее происходит синтез АТФ посредством фермента фосфоглицераткиназы с образованием 3-фосфоглицерата. Превращение 3-фосфоглицерата в 2-фосфоглицерат происходит посредством двух фосфоглицератмутаз, катализирующих реакцию внутреннего переноса фосфатной группы с С-3 на С-2. Енолаза катализирует дегидратацию 2-фосфоглицерата до фосфоенолпирувата. Фосфоенолпируват содержит высокоэнергетическую фосфатную группу, которая используется как при синтезе АТФ, так и при переносе глюкозы фосфотрансферазной системой. В заключительной стадии гликолиза фосфоенолпируват превращается в пируват посредством двух различных пируваткиназ (рукF и рукA).

Пируватдегидрогеназный комплекс (пируватдегидрогеназа E₁, дигидролипоилтрансацилаза E₂, дигидролипоилдегидрогеназа E₃, асеEF, Ipd) окисляет конечный продукт гликолиза (пируват) до ацетил-КоА и СО₂. Ацетил-КоА, являющийся ключевым участником метаболических превращений, принимает участие в нескольких реакциях: доставляет атомы углерода с ацетил-группой в цикл трикарбоновых кислот, может использоваться для биосинтеза жирных кислот и триглицеридов и принимает непосредственное участие в образовании ацетата.

Пентозофосфатный путь. Пентозофосфатный путь (путь Варбурга — Диккенса — Хорекера) представляет собой альтернативный механизм окисления глюкозы. Пентозофосфатный путь выполняет несколько метаболических функций: катаболизм пентоз, глюкозы и глюконата; обеспечение клетки предшественниками, необходимыми для биосинтеза липосахаридов, нуклеотидов, нескольких аминокислот и витаминов. Этот

метаболический путь включает два этапа: окислительный и неокислительный. В ходе окислительного этапа глюкозо-6-фосфат окисляется глюкозо-6-фосфатдегидрогеназой и далее преобразуется рядом ферментов в рибулозо-5-фосфат и CO_2 . Две молекулы НАДФ, которые восстанавливаются в результате этого процесса, могут быть использованы для поддержания окислительно-восстановительного баланса и регенерации окислительного повреждения. Неокислительный этап пентозофосфатного пути включает обратимые реакции, в ходе которых происходит взаимопревращение пентозофосфатов (рибулозо-5-фосфата, рибозо-5-фосфата и ксилулозо-5-фосфата) и перенос гликоальдегидной (транскетолаза) или дигидроксиацетонной групп (трансальдолаза) среди фосфатов сахаров.

Цикл трикарбоновых кислот. Цикл трикарбоновых кислот (цикл Кребса, цикл лимонной кислоты) выполняет две важные функции в углеводном метаболизме: он отвечает за полное окисление ацетил-КоА и служит источником интермедиатов для биосинтеза нескольких аминокислот. В начале цикла лимонной кислоты ацетил-КоА, образованный при окислении пирувата в гликолитическом пути, вступает в реакцию конденсации с оксалоацетатом, образуя цитрат. Затем цитрат изомеризуется в изоцитрат под воздействием двух генетически различных ферментов аконитаз (*acnA* и *acnB*).

Рассмотренный на примере *E. coli* метаболический путь переработки глюкозы показывает, что даже в простейших живых микроорганизмах содержится сложный набор пищеварительных ферментов. Стоит отметить, что состав ферментативной среды может меняться и от фазы роста клеток. В то же время ясно, что извлечение одного или нескольких чистых ферментов из микроорганизмов будет представлять собой сложный в технологическом исполнении процесс, который определяет высокую стоимость чистых ферментных препаратов. Рассмотрим далее схему получения чистого фермента и методы, используемые в настоящее время для его выделения и очистки.

1.7 Выделение и очистка ферментов из микробиологических источников

Принципиальная схема получения ферментных препаратов с различной степенью очистки представлена на рисунке 16. В целом, микроорганизмы продуцируют как внеклеточные, так и внутриклеточные ферменты.

Процессы выделения внутриклеточных и внеклеточных ферментов различаются между собой начальными стадиями технологии получения ферментных препаратов. Внеклеточные ферменты выделяют из культуральной жидкости, а для выделения внутриклеточных ферментов требуется предварительное разрушение микробных клеток (ультразвук, шаровая мельница, пресс Френча, химический и ферментативный лизис). Далее выделение ферментов внеклеточной и внутриклеточной локализации происходит по одинаковой схеме [179].

Культивирование продуцентов ферментов. Существуют два метода культивирования микроорганизмов: глубинный и поверхностный методы. При глубинном способе культивирования микроорганизмы выращивают в жидкой питательной среде, а при поверхностном культивировании - на поверхности твердой увлажненной питательной среды. Глубинный метод культивирования гораздо легче поддается автоматизации, чем поверхностный метод, однако при его применении выходная концентрация фермента на единицу массы среды значительно более низкая. Поэтому перед непосредственным выделением фермента фильтрат, полученный после глубинного метода культивирования, предварительно концентрируют. При поверхностном методе культивирования для выделения энзимов необходима экстракция, но при этом в раствор вместе с белками также переходят сахара, продукты гидролиза пектиновых веществ и целлюлозы [180].

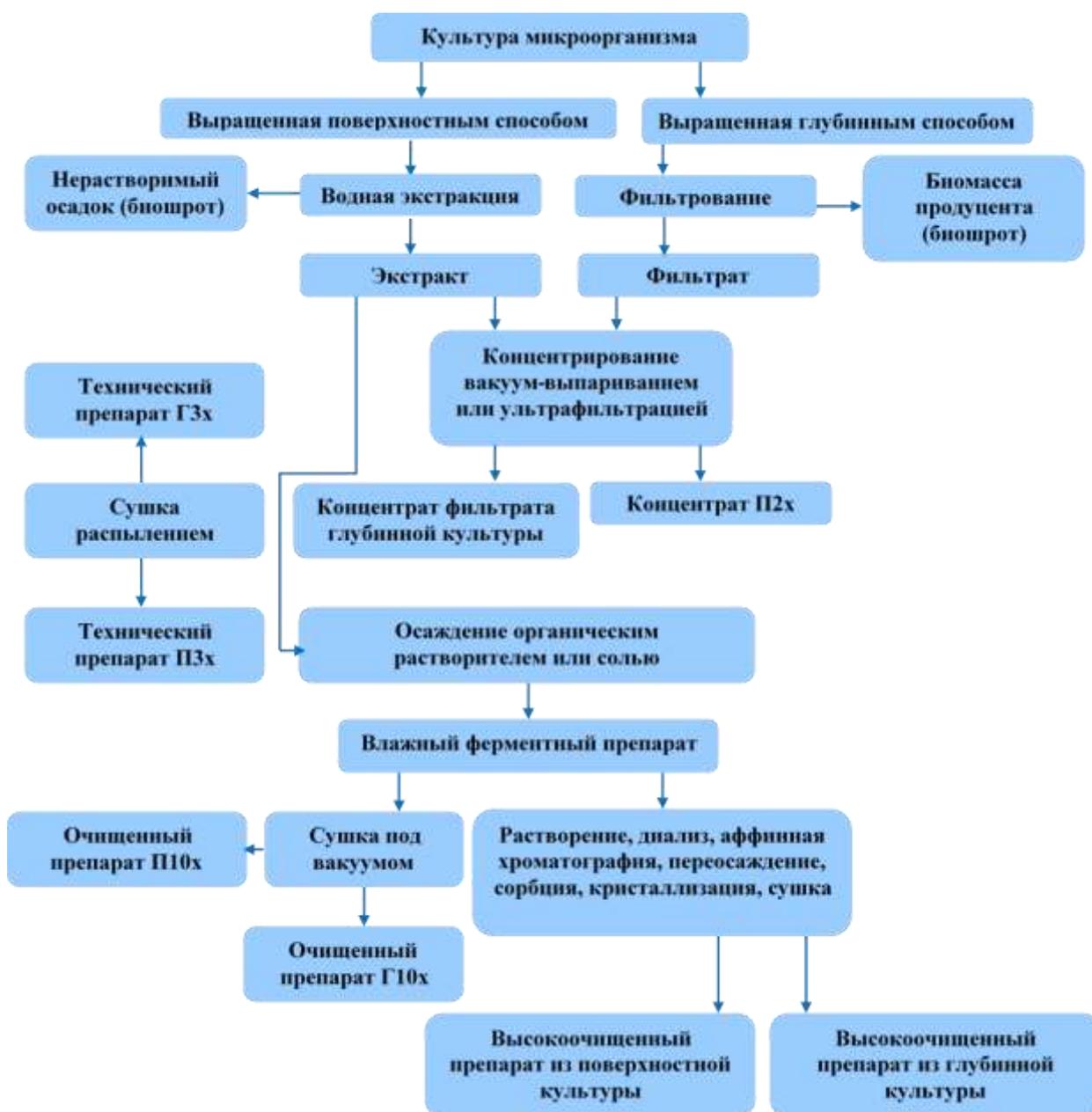


Рисунок 16 - Принципиальная схема получения очищенных ферментных препаратов из культур микроорганизмов [179].

Фракционирование ферментов осаждением. После приготовления экстракта проводят уже дальнейшую его очистку с целью извлечения целевого фермента. Универсальной технологии очистки, применимой ко всем ферментам, не существует, поэтому под каждый энзим разрабатывается своя технология очистки. Селективное осаждение белков органическими растворителями является одним из классических старейших методов

фракционирования белков, в основе которого лежит воздействие на гидрофобные и гидрофильные аминокислотные остатки белковых молекул, от количества и распределения которых зависит растворимость белка. К одному из наиболее распространенных методов очистки ферментов относится способ осаждения (высаливание) белков сульфатом аммония, основанный на различной растворимости ферментов в солевых растворах. На этот процесс в основном влияет гидрофобность белка. Анионы (SO_4^{2-}) и катионы (NH_4^+) сульфата аммония взаимодействуют с зарядами белка (группы NH_4^+ и COO^-). В результате такого взаимодействия происходит исчезновение заряда и уменьшение гидратной оболочки белковой молекулы, приводящие к её "слипанию" и осаждению. Однако при этом могут осаждаться и другие белки со схожими гидрофобными свойствами, поэтому для получения высокоочищенного ферментного препарата требуется дальнейшая очистка уже другими методами [181].

Диализ. Для удаления низкомолекулярных примесей используют метод диализа, основанный на диффузии ионов через полупроницаемую полимерную мембрану под действием градиента концентраций. Высокомолекулярные молекулы фермента не могут проходить через поры полимерной мембраны, в то время как низкомолекулярные соединения диффундируют через нее. Преимуществом такого метода является то, что он не требует сложных аппаратов. Однако процедура диализа очень медленная и поэтому его целесообразнее использовать только при очистке небольших объемов. К тому же во время проведения диализа возможна деактивация энзима, вызванная либо потерей кофактора, либо попаданием в раствор фермента ингибитора (ион металла) при использовании не очень чистой воды [182].

Аффинная хроматография. Самым эффективным методом очистки ферментов принято считать аффинную хроматографию. Её эффективность обусловлена тем, что зачастую гомогенный ферментный препарат можно получить за один этап с 100% выходом. Механизм данного метода

заключается в биоспецифическом распознавании и комплементарном связывании белковой молекулы со «своим» лигандом, закрепленном на нерастворимой матрице. Лигандами ферментов могут выступать аналоги субстрата, кофакторы и ингибиторы [181].

Гель-фильтрация. Гель-фильтрация относится к хроматографическим методам разделения белков. В основе этого метода лежит то, что вещества с различной молекулярной массой по-разному распределяются между подвижной (раствор, подвергающийся разделению на компоненты) и неподвижной фазой (гели). Гранулами пористого вещества заполняют хроматографическую колонку. Формирование гранул с «порами» происходит в структуре полисахарида вследствие образования поперечных связей, меняя условия можно влиять и на размер «пор».

Следует отметить, что ввиду высокой чувствительности энзимов к изменению различных параметров окружающей среды (рН, температура, пенообразование и т.д.) нарушение на любой из рассмотренных выше стадий получения фермента может привести к частичной или даже полной потере ферментативной активности. Поэтому использование чистых ферментных препаратов может быть оправданным только для медицинских целей (биосенсоры физиологически важных молекул), но не для биотопливных элементов, учитывая малые производимые ими мощности и стоимость материалов, используемых для их изготовления.

1.8 Заключение к главе 1

Проведенный анализ научной литературы по особенностям биоэлектрокаталитических систем показал, что, несмотря на актуальность развития данного направления и большое число работ, опубликованных в области биотопливных элементов, биосенсоров, биокатализа и биоэлектрокатализа, до сих пор существуют проблемы, которые требуют решения:

1. Условия проведения биоэлектрокаталитических реакций индивидуальны для каждого фермента или микроорганизма, при этом набор выявленных ключевых факторов, определяющих активность используемых биообъектов, является неполным даже для хорошо изученных модельных систем.

2. Механизм взаимодействия медиатора с ферментом, каскадом ферментов или живым микроорганизмом остается не выясненным.

3. Использование чистых ферментных препаратов или каскада ферментов можно считать целесообразным только в биосенсорах или иных медицинских целях, но не в биотопливных элементах, вследствие сложности технологии их выделения и очистки и нерентабельности таких устройств вследствие низких производимых мощностей.

В то же время, в литературе отсутствует информация об активности неочищенных экстрактов белков, полученных из клеточной жидкости после разрушения мембран. Такие экстракты интересны для рассмотрения, поскольку будут содержать набор ферментов для окисления топлива и технология их получения весьма проста. Получение и аттестация свойств (активности) таких ферментных экстрактов, изучение кинетики биоэлектрокаталитического процесса с их участием представляется ввиду этого весьма интересной задачей.

ГЛАВА 2. ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В главе рассмотрены основные методы, используемые при получении, определении белка и дегидрогеназной активности экстрактов из культуры *E. coli*. Описаны подходы, используемые в работе для изучения биоэлектродатитических свойств получаемых экстрактов в составе биоанода. Описана модель разработанного асимметричного биотопливного элемента с биоанодом с возможностью независимой замены состава функциональных элементов мембранно-электродного блока.

2.1 Метод получения белкового экстракта из культуры *E. coli* BB

Бактерии выращивали в среде Lysogeny broth (LB), содержащей 1 % (в/о) пептона Vacto™ («BD», США), 0.5 % (в/о) дрожжевого экстракта Vacto™ («BD», США), 1 % (в/о) NaCl и 0.1 % (в/о) глюкозу. 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 в 500-мл колбах и выращивали при 37 °C 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 четырех буферных системах (калий-фосфатный буферный раствор (КРВ), 3-[N-Морфолино]пропансульфоновая кислота (MOPS), 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоновая кислота (HEPES), трис(гидроксиметил)аминометан (TRIS)) при различных значениях pH и концентраций этих буферных систем из расчета 1 мл на осадок живых клеток, осажденных из 50 мл культуральной жидкости. Химические составы буферных систем приведены в таблице 8. В большинстве экспериментов для ресуспендирования осажденных бактерий использовали 50 мМ калий-фосфатный буферный раствор, pH 7.2. (если не указано иное).

Таблица 8. Химический состав буферных систем.

Буферная система	Химический состав
KPB	H ₂ O, K ₂ HPO ₄ , KOH
MOPS	H ₂ O, C ₇ H ₁₅ NO ₄ S, HCl
HEPES	H ₂ O, C ₈ H ₁₈ N ₂ O ₄ S, HCl
TRIS	H ₂ O, C ₄ H ₁₁ NO ₃ , HCl

Клетки разрушали на льду на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Т («НПП Укрросприбор», Украина) при частоте 22 кГц в ходе пяти серий по 10 с, охлаждая образцы между сериями (если не указано иное). Экстракты осветляли центрифугированием при 15000 g в течение 15 мин. Экстракты хранили при температуре -20 °С.

2.2 Метод получения белкового экстракта из культуры *Saccharomyces cerevisiae*

Для проверки работы разработанной электрохимической ячейки биотопливного элемента с возможностью произвольной замены состава электродной системы в работе также использовали ферментативный экстракт, выделенный из дрожжей. Культуру *Saccharomyces cerevisiae* Y-3502 выращивали в питательной среде YPD, содержащей 2% (в/о) пептона Vasto™ («BD», США), 1 % (в/о) дрожжевого экстракта Vasto™ («BD», США) и 0.1 % (в/о) глюкозу. Ночную культуру (1 мл) вносили в 100 мл YPD в 500-мл колбах и выращивали при 32 °С при интенсивной аэрации. Через 24 часа после начала выращивания дрожжи осаждали центрифугированием при 2980 g в течение 30 минут при 4 °С и использовали для получения экстракта. Осажденные дрожжи ресуспендировали в 0.1М калий-фосфатном буферном растворе со значением pH 7.0. Клетки разрушали на льду на ультразвуковом дезинтеграторе УЗГ13-0.1/22 при 99 Вт в ходе четырех серий по 10 с, охлаждая образцы между сериями (если не указано иное). Экстракты осветляли центрифугированием при 5000 g в течение 5 мин. Экстракты хранили при температуре -20 °С.

2.3 Метод определения концентрации белка в белковом экстракте

Содержание белка в экстрактах определяли с использованием бицинхониновой кислоты [183]. Метод заключается в том, что ионы меди Cu^{2+} при взаимодействии с остатками аминокислот и пептидной связью белка восстанавливаются до ионов меди Cu^+ , образуя окрашенный комплекс Cu^+ с бицинхониновой кислотой.

Для определения концентрации белка в исследуемых образцах смешивали 500 мкл *раствора С* (100 частей раствора А и 2 части раствора В) и 10 мкл раствора белка, разведенного в 10 раз. Состав *раствора А* приведен в таблице 9. рН раствора доводили до значения 11.25. *Раствор В*: 0.4 г ч.д.а. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ растворяют в 10 мл тридистиллированной воды.

Содержимое пробирок Eppendorf с раствором С и белковым раствором перемешивали на микроцентрифуге Microspin 12. Далее пробирки помещали в термостат и инкубировали 30 мин при температуре $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ до появления фиолетового окрашивания. Интенсивность окрашивания образцов определяли фотометрией при длине волны 560 нм на планшетном фотометре «Эфос-9305» («МЗ Сапфир», Россия).

Концентрацию белка в образцах определяли по калибровочной зависимости, полученной с использованием бычьего сывороточного альбумина.

Таблица 9. Состав раствора А на 250 мл.

Вещество	Навеска, г
Бицинхолиновая кислота	0.1
Na_2CO_3	1.7
Na тартрат	0.16
NaOH	0.4
NaHCO_3	0.95

2.4 Методы определения дегидрогеназной активности белкового экстракта

2.4.1 Метод определения дегидрогеназной активности белкового экстракта с помощью 2,3,5 - трифенилтетразолия хлорида

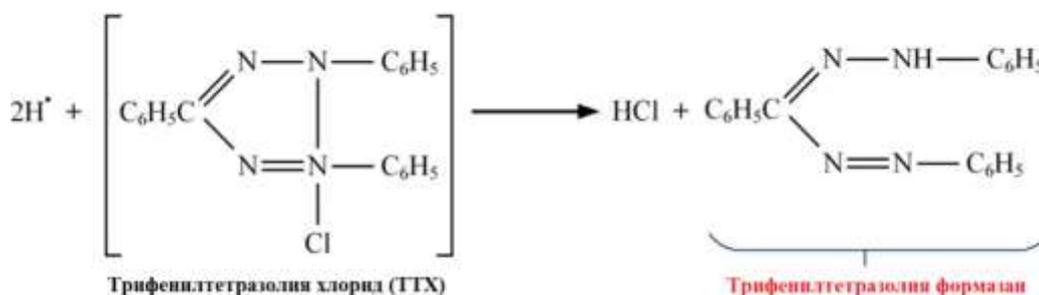
Активность дегидрогеназ определяли с использованием 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида (ТТХ), который под действием дегидрогеназ восстанавливается до окрашенного ТТХ-формаза [184,185]. В качестве субстратов-источников электронов для восстановления ТТХ (ч.д.а. Dudley Chemical) использовали глюкозу (х.ч.), этиловый спирт (х.ч.), калиевые соли лимонной (х.ч.), молочной (х.ч.) и яблочной (х.ч.) кислот. Реакционная смесь готовилась на буфере КРВ и содержала 10 мг/мл белка, 33.3 мМ субстрата, 0.17 % ТТХ. Реакцию проводили при температуре 37 °С, для остановки реакции в образцы добавляли 4.2 объема смеси этиловый спирт: уксусная кислота (19:1). Денатурированный белок осаждали центрифугированием, супернатант отбирали для измерения количества ТТХ-формаза. Интенсивность окрашивания образцов определяли фотометрией при длине волны 532 нм на планшетном фотометре «Эфос-9305» («МЗ Сапфир», Россия), неспецифичное поглощение света определяли при длине волны 620 нм. Количество формаза в образцах определяли по калибровочной кривой, полученной с использованием чистого ТТХ-формаза.

2.4.2 Метод определения дегидрогеназной активности белкового экстракта с помощью феррицианида калия

В настоящее время существует целый ряд фотоколориметрических методов для определения дегидрогеназной активности различных биологических объектов. Принцип действия таких фотоколориметрических методов основан на взаимодействии биообъекта, содержащего ферменты дегидрогеназ, с субстратом и акцептором водорода. Ферменты дегидрогеназ

окисляют субстрат и акцептор водорода восстанавливается, изменяя свой цвет. Поскольку при исследовании электрохимических свойств грубых экстрактов феррицианид калия хорошо себя показал в качестве редокс-медиаторной системы при взаимодействии с экстрактом и субстратом (см. Главу 4), а также имеет различный цвет окисленной (желтый) и восстановленной (бесцветный) формы, то стало интересно проверить как он поведет себя в качестве акцептора водорода при фотоколориметрическом определении ДГА.

Наиболее распространенным акцептором водорода в фотоколориметрических методиках определения ДГА является 2,3,5-трифенилтетразолий хлорид (ТТХ), который и использовался для определения дегидрогеназной активности при написании данной диссертационной работы (раздел 2.4.1). Бесцветный ТТХ восстанавливается до формазана, окрашенного в красный цвет:

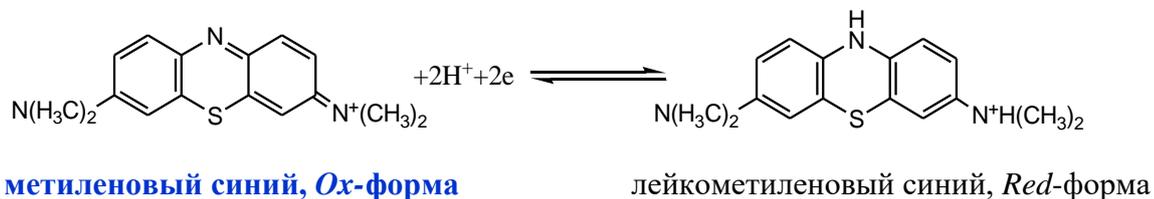


Однако у данного метода существует ряд недостатков:

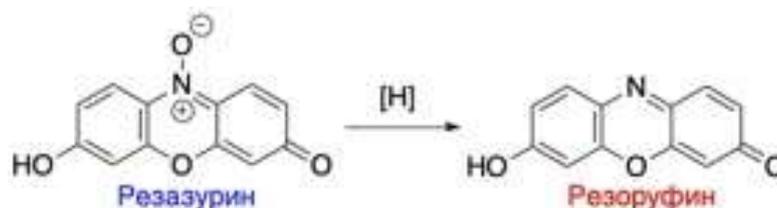
- 1) длительность процедуры анализа;
- 2) формазан нерастворим в воде, и поэтому требуется применение летучего растворителя;
- 3) несмотря на высокую распространенность данного метода в биологических и клинических исследованиях, его применение ограничено низкой растворимостью формазана – образующегося продукта реакции;
- 4) негативное воздействие меди на абсорбцию продукта восстановления акцептора водорода 2,3,5 – трифенилтетразолия хлорида, что

приводит к невозможности определения дегидрогеназной активности биологического материала, содержащего медь [186].

Также известны методы, где в качестве акцептора водорода используют метиленовый синий [187,188]:



Резазурин – вещество (7-гидрокси-3Н-феноксизан-3-один-10-оксид), основанное на тетразолии, водорастворимое нетоксичное красящее вещество, которое может быть восстановлено до высокофлуоресцентного резорурфина, которое также применяется для определения активности дегидрогеназ [189]:



Недостатком данного способа является длительное время инкубации реакции – 24 часа.

Поскольку в данной работе было показано, что феррицианид калия является медиатором для биоэлектрохимической реакции окисления глюкозы экстрактами из *E. coli*, активность дегидрогеназ определяли также по скорости изменения концентрации феррицианида калия, который, как показали исследования, проведенные в работе, под действием дегидрогеназ восстанавливается до ферроцианида калия.

Методика определения основана на восстановлении феррицианида, поглощающего на длине волны 425, который под действием ферментов дегидрогеназ может быть восстановлен до ферроцианида, не поглощающего на длине волны 425 (рисунок 17).

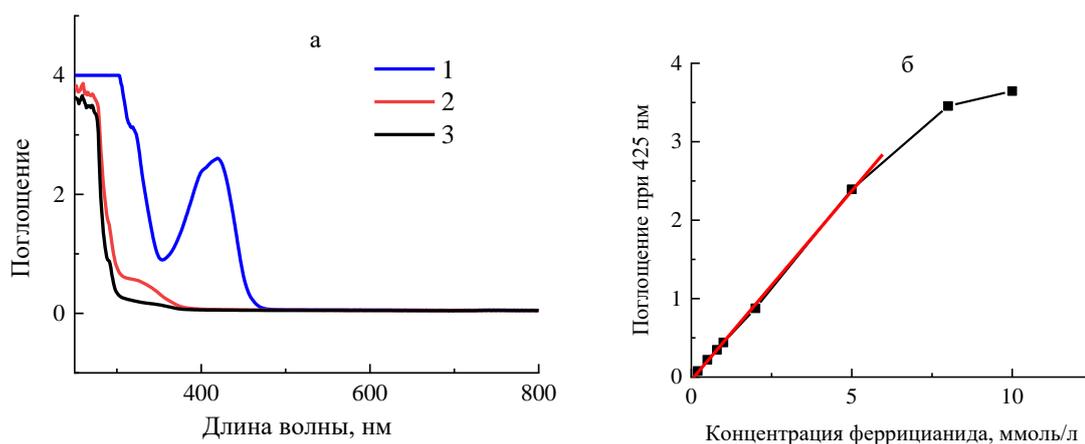


Рисунок 17 - (а) Спектры поглощения (1) 5 мМ раствора феррицианида в 50 мМ калий-фосфатном буферном растворе (рН 7.2), (2) 5 мМ раствора ферроцианида в 50 мМ калий-фосфатном буферном растворе (рН 7.2), (3) 50 мМ калий-фосфатного буферного раствора (рН 7.2). (б) калибровочная зависимость поглощения растворов феррицианида калия при 425 нм.

Для получения достоверных значений дегидрогеназной активности необходимо вычесть поглощение белка, которое может вносить весомые погрешности в полученные данные.

Оптическая плотность белка на длине волны 425 и 500 нм коррелирует как $A_{\text{белок}}(425) = A_{\text{белок}}(500 \text{ нм}) * 3.57$ (рисунок 18). Далее находится значение поглощения рабочего раствора ($A_{\text{рабочий раствор}}(425 \text{ нм})$) за вычетом поглощения белка ($A_{\text{белок}}(425 \text{ нм})$). Полученное поглощение пересчитывается в концентрацию феррицианида с учетом калибровочной зависимости (рисунок 17 б).

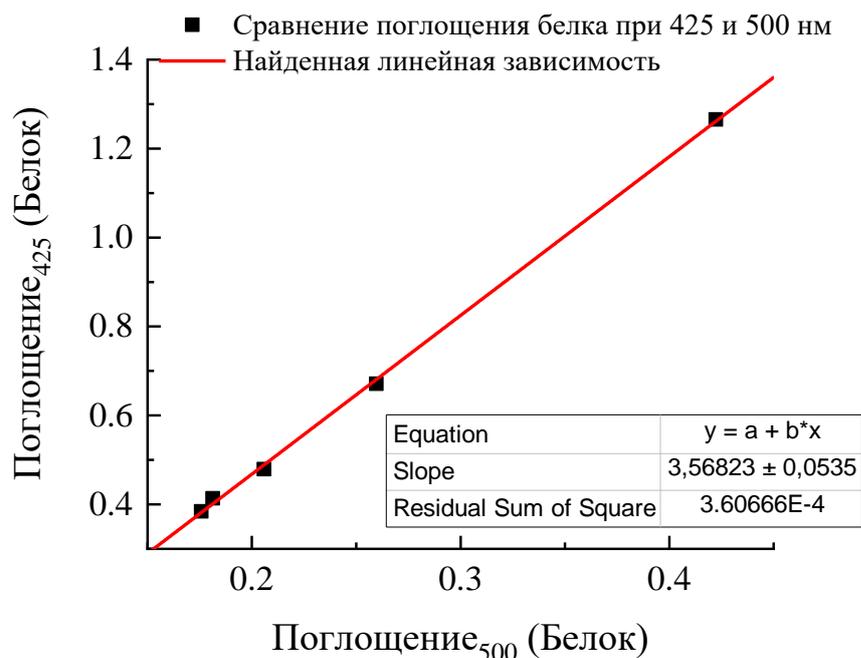


Рисунок 18 - Сравнение поглощения белка при OD₄₂₅ и OD₅₀₀.

Для определения дегидрогеназной активности готовили рабочий раствор путем смешивания 100 мкл определяемого белкового экстракта и 200 мкл субстратной смеси, которая готовится путем смешивания раствора 1 и раствора 2 в соотношении 1:1. Составы растворов 1 и 2 приведены в таблице 10.

Таблица 10. Составы растворов 1 и 2.

Раствор 1	15 мМ раствор феррицианида в 50 мМ калий-фосфатном буферном растворе (pH 7.2)
Раствор 2	1 М раствор глюкозы в 50 мМ калий-фосфатном буферном растворе (pH 7.2)

Рабочий раствор перемешивали на микроцентрифуге Microspin 12 и помещали в 96-луночный измерительный планшет спектрофотометра «Multiskan sky» («Thermoscientific», Германия), предварительно разогретый до 37 °С. Для фиксации уменьшения концентрации феррицианида калия в ходе ферментативной реакции измеряли оптическую плотность рабочего раствора при длинах волн 425 нм и 500 нм каждые 2 секунды. Полное время измерения 15-20 минут. Полученные значения оптической плотности переводили в

концентрации феррицианида по формуле, полученной с помощью калибровочного графика. По рассчитанным значениям строили график зависимости изменения концентрации феррицианида от времени. У полученного графика к начальному линейному участку строили касательную и находили тангенс угла наклона. Таким образом определяли скорость реакции v , характеризующую дегидрогеназную активность в качестве кинетического параметра.

2.5 Изучение электрокаталитической активности белкового экстракта

2.5.1 Электрохимическая ячейка. Подготовка электродов

Для проведения электрохимических измерений использовали стандартную термостатируемую стеклянную трехэлектродную ячейку с разделенными пространствами (рисунок 19). В качестве рабочего электрода использовался стеклоуглеродный дисковый электрод площадью 0.07 см^2 . Потенциометрические измерения проводились относительно насыщенного хлоридсеребряного электрода сравнения, отделенного от рабочего отделения ячейки двойной стеклянной фриттой. В отделение, контактирующее с ячейкой, заливали буферный раствор, используемый в рабочем отделении. Далее в работе все потенциалы указаны относительно этого электрода сравнения. Вспомогательным электродом (противоэлектрод) служила платиновая фольга, отделенная от рабочего отделения ячейки стеклянной фриттой (для исключения влияния процессов на противоэлектроде). В качестве фонового электролита использовали буферные растворы. Активные вещества (глюкоза, цитрат калия, экстракт биомассы, редокс-медиатор) вводились непосредственно в ячейку, находящуюся под давлением 20 мбар аргона (5.0, 99.999%, Линде Газ Рус). Заполнение инертной атмосферой и дегазацию растворов осуществляли на линии Шленка. В ряде экспериментов использовали воздушную атмосферу.

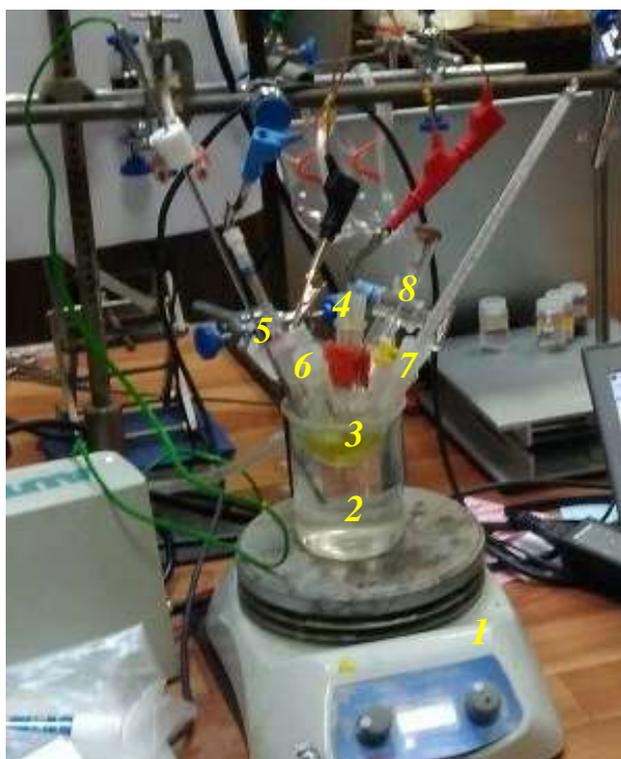


Рисунок 19 - Организация работы трехэлектродной жидкостной электрохимической ячейки, 1 – магнитная мешалка с термоплиткой, 2 – водяная баня, 3 - ячейка, 4 – рабочий электрод, 5 – электрод сравнения, 6 – вспомогательный электрод, 7 – термометр, 8 - кран для вакуумирования и замещения атмосферы рабочего раствора на линии Шленка.

Дегазацию раствора проводили при перемешивании, чередуя вакуумирование (10 секунд) с насыщением аргоном (30 секунд). Процедуру повторяли 7-10 раз. Как показали холостые эксперименты, этого достаточно для полного удаления электрохимически активного кислорода из ячейки.

Стеклоуглеродные электроды шлифовали на наждачной бумаге с размером зерен P400 (35.0 ± 1.5 мкм) – P800 (21.8 ± 1.0 мкм) – P1200 (15.3 ± 1.0 мкм) (WSFLEX 18C, Hermes) – P2500 (8.4 ± 0.5 мкм) (WSFLEX 16, Hermes) – P4000 (5 мкм) (карбид кремния, маркировка по ISO-6344, Bramet N Disks (Waterproof silicon carbide paper), Kemet1200, 4000), последовательно от крупнозернистой к мелкозернистой, а затем полировали на фетре (шероховатость 1 мкм)(FD 1, Escil;NFC, Kemet) с алмазной суспензией (1 мкм, Ака-Poly 1 мкм, Akasel; 1 мкм, 1PS, Escil), промывали тридистиллированной

водой и этанолом, после чего в течение 10 минут подвергали ультразвуковой обработке в тридистиллированной воде для удаления алмазов с поверхности.

Поддержание температуры в ячейке осуществляли при помощи водяной бани и магнитной мешалки с контролируемым термопарой подогревом Intelli-Stirrer MSH – 300i.

2.5.2 Приготовление растворов

В качестве фонового электролита использовали 0.05 М, 0.1 М, 0.5 М, 1 М буферные растворы, которые применяются для биологических систем: 4-(2-гидроксиэтил)-1-пиперазинэтансульфоная кислота (HEPES, $\geq 99.5\%$, Sigma-Aldrich), 3-[N-Морфолино]пропансульфоная кислота (MOPS, $>99.5\%$, JustPURE(TM)), трис(гидроксиметил)аминометан (TRIS, $>99.5\%$, ООО НПП «ПанЭко»), калий фосфатный (х.ч. KH_2PO_4) и натрий фосфатный (х.ч. Na_2HPO_4 /х.ч. NaH_2PO_4) буферные растворы. Для приготовления всех растворов использовали тридистиллированную воду.

Для исследования влияния pH на электрокаталитическую активность белковых экстрактов была произведена серия электрохимических измерений с различным значением pH (6.8, 7.0, 7.2, 7.4, 7.6, 7.8, 8.0) буферных растворов. Буферный раствор готовили растворением соли в тридистиллированной воде и доводили до требуемого значения pH с помощью HCl, или H_3PO_4 (х.ч.), или KOH (ч.д.а.) на pH-метре EUTECH INSTRUMENTS PC 6000 при температуре, эквивалентной рабочей температуре в ячейке.

Все измерения проводились на потенциостате Autolab PGSTAT 101 («Metrohm», Нидерланды) в двух режимах поляризации: 1) потенциодинамический (циклическая вольтамперометрия); 2) потенциостатический (хроноамперометрия).

2.5.3 Циклическая вольтамперометрия

Для исследования электрохимического окна стабильности электролита и для определения области редокс-перехода медиаторных систем использовался метод циклической вольтамперометрии (ЦВА) со скоростью развертки потенциала 20 мВ/с и 100 мВ/с.

2.5.4 Хроноамперометрия

Для определения электрокаталитической активности грубых-экстрактов применялся метод хроноамперометрии. При наложении анодной поляризации измеряли ток окисления восстановленной формы редокс-медиатора или кофермента (в случае его электроактивности), образующейся при окислении органических субстратов грубыми белковыми экстрактами. Потенциал, при котором проводили поляризацию электрода, выбирали в анодной области после потенциала анодного пика, чтобы катодный процесс не оказывал влияния на измеряемые токи.

Для предотвращения пассивации электрода белковыми молекулами измерения длительной (более 4000 с) хроноамперометрической кривой проводились следующим образом: рабочий электрод не находился постоянно в электрохимической ячейке, а погружался в неё через заданные промежутки времени, в течение одной минуты снимались электрохимические отклики, затем электрод вытаскивали из ячейки и зачищали, как описано в разделе 2.5.1.

2.6 Определение содержания ионов в активном окислительно-восстановительном центре ферментов в экстракте

Определение содержания ионов в активных центрах ферментов в экстракте проводили методом атомно-адсорбционной спектроскопии в пламени ацетилен/воздух с использованием дейтериевого корректора фона на

следующих длинах волн: для Ni – 232.0 нм; для Fe – 248.3 нм; для Co – 240.7 нм; для Mg – 285.0 нм.

2.7 Фракционная очистка белковых экстрактов методом диализа

2.7.1 Проведение диализа

В ходе исследования использовали диализные мембраны со следующими размерами пор: 3.5 кДа, 12-14 кДа, 25 кДа, 50 кДа. Перед началом проведения диализа проводили предобработку диализных мембран посредством их кипячения в 1 мМ растворе ЭДТА (объем раствора 1 л) в течение 10 минут и с последующей промывкой в 1 л воды 1 типа.

Затем диализную мембрану заполняли белковым экстрактом и погружали её в 50 мМ калий-фосфатный буферный раствор с фиксированным значением рН 7.2, при этом погружение диализной мембраны осуществляли таким образом, чтобы пограничный уровень жидкости образца совпадал с пограничным уровнем буферного раствора. Диализ проводили при перемешивании в течение 48 часов с заменой каждые 12 часов буферного раствора на свежий и при температуре 4 °С. Схема организации процесса диализа показана на рисунке 20. Характеристики диализных мембран представлены в таблице 11.

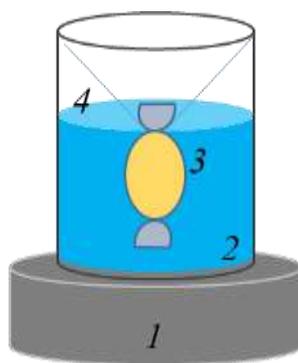


Рисунок 20 - Организация процесса диализа, 1 – магнитная мешалка, 2 – 2 л емкость с 50 мМ калий-фосфатным буферным раствором, рН 7.2, 3 – диализная мембрана с образцом внутри, 4 – конструкция крепления диализной мембраны к емкости с буферным раствором.

Таблица 11. Характеристика используемых диализных мембран

Диализный мешок	Ширина, мм
3.5 кДа	55
12-14 кДа	25
25 кДа	44
50 кДа	34

2.7.2 Характеристика белковых экстрактов после диализа

Белковые экстракты после диализа характеризовали по 3 параметрам: концентрация белка (методика описана в 2.3), дегидрогеназная активность (методика описана в 2.4.1), электрохимическая активность (методика описана в 2.5). Также все эти три показателя изучались в экстрактах после диализа с добавлением различных концентраций коферментов НАД, НАДФ и ФАД.

2.8 Тестирование белкового экстракта в прототипе биотопливного элемента

Был разработан прототип биотопливного элемента, представленный на рисунке 21 [190].



Рисунок 21 - Схема прототипа биотопливного элемента.

Такая модель представляет собой ассиметричную двухкамерную ячейку с воздушным катодом (20 мас.% Pt/C, HiSPEC) и ионообменной мембраной Nafion 212. Катод (рисунок 22) представляет собой два газодиффузионных слоя (ГДС) из углеродной бумаги Freudenberg H23C5 с напыленным слоем платиноуглеродного катализатора 20 мас.% Pt/C (HiSPEC), прижатые вплотную к протоннообменной мембране Nafion 212.

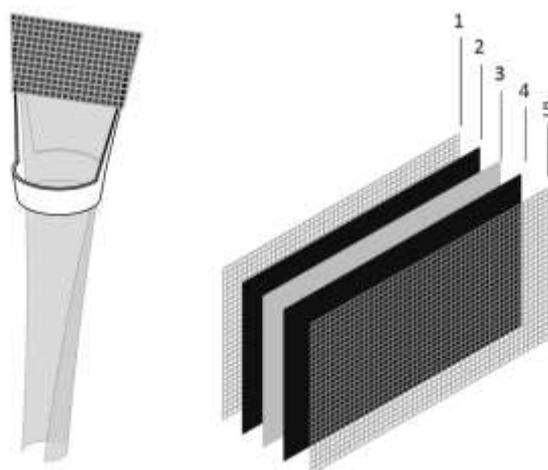


Рисунок 22 - Катод. 1,5 – серебряная сетка, 2,4 – ГДС, 3 – мембрана.

Поджим газодиффузионных слоев и токосъема осуществляли при помощи серебряной или медной сетки; жесткость конструкции придается рамкой, которая образована двумя пластиковыми цилиндрами с прорезями и кольцом, в которое пропускается мембрана для придания ей жесткости. Мембрана ориентирована вертикально, ионная проводимость осуществляется вдоль мембраны [191], поскольку ее нижняя часть опускается в емкость с рабочим раствором, содержащим компоненты биоанода. Это, с одной стороны, дает возможность погружать в рабочий раствор только часть ТЭ по аналогии с работой Miyake et al. [93], а с другой – защищает материал воздушного катода от нежелательного воздействия компонентов рабочего раствора биоанода и солей, в отличие от ячейки, рассматриваемой в работе [93].

Анодная полуячейка представлена рабочим раствором, содержащим белково-ферментный комплекс и медиатор, в который погружен токоотвод (в

данной работе использовались платиновая проволока, константановая проволока и углеродная ткань (материал угольный адсорбционно-активный марки ЖУЛ), на котором окисляется медиатор после его восстановления за счет образовавшихся электронов при ферментативном окислении субстрата в объеме раствора. Анод был зафиксирован с токоотводом при помощи зажима «крокодил».

2.8 Заключение к главе 2

В качестве методов исследования использованы стандартные, принятые в биохимических и биоэлектрохимических системах, но предложены и новые решения, не описанных ранее в литературе:

1. Разработана методика получения белкового экстракта из культуры *E. coli* ВВ, позволяющая использовать его в качестве биоэлектродкатализатора.
2. Разработана методика определения дегидрогеназной активности белковых экстрактов по феррицианиду калия, позволяющая оценить дегидрогеназную активность, как кинетическую характеристику – скорость реакции перехода феррицианида калия из окисленного в восстановленное состояние.
3. Разработан прототип измерительной ячейки асимметричного биотопливного элемента, работающий на белковом экстракте из культуры *E. coli* ВВ, позволяющий произвольно менять состав электродной системы.

ГЛАВА 3. ДЕГИДРОГЕНАЗНАЯ АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВЫХ ЭКСТРАКТОВ ИЗ ШТАММА *E. COLI* ВВ

В главе изложены результаты исследования дегидрогеназной (по ТТХ) и электрохимической активностей, получаемых грубых белковых экстрактов из штамма *E. coli* ВВ в зависимости от условий получения экстракта и используемой буферной системы, также показано изменение дегидрогеназной активности экстрактов на разных стадиях роста культуры в присутствии различных субстратов. Продемонстрированы результаты разработанного нового способа измерения дегидрогеназной активности с помощью феррицианида калия.

3.1 Влияние условий получения белковых экстрактов на их дегидрогеназную активность [192]

Метод получения нового биоэлектрокатализатора состоит из следующих простых стандартных технологических операций (рисунок 23): культивирование микроорганизма и выращивание биомассы бактериальных клеток – центрифугирование полученной биомассы с целью отделения культуральной жидкости от бактериальных клеток – ресуспендирование осадка бактериальных клеток буферным раствором – ультразвуковое дезинтегрирование бактериальных клеток – центрифугирование с целью отделения осадка разрушенных клеток от супернатанта (грубый бактериальный экстракт).

Новизна предлагаемого подхода к получению биокатализатора состоит в отсутствии дальнейшей очистки получаемого экстракта с целью извлечения конкретных ферментов. Получаемый белковый экстракт в таком случае содержит каскад ферментов и связанных с ними коферментных систем, которые необходимы для осуществления окислительного или восстановительного превращения, что делает его привлекательным для практического использования объектом.



Рисунок 23 - Принципиальная схема получения грубых экстрактов из культур микроорганизмов.

Важной стадией в этой синтетической схеме является разрушение бактериальных клеток ультразвуком. Поскольку в процессе ультразвуковой дезинтеграции может происходить не только нагревание образца, но и пенообразование, вызывающие денатурацию белка, то образцы подвергались не одной продолжительной, а нескольким кратковременным ультразвуковым обработкам по 10 секунд с перерывами по 20 секунд и при постоянном охлаждении при температуре 0 °С. Как оказалось, (таблица 12), судя по содержанию выделившегося белка, оптимальная длительность ультразвуковой обработки грубых белковых экстрактов составляет 50 секунд. Продолжительность ультразвуковой обработки в 30 секунд еще не достаточна для полного разрушения бактериальных клеток, а при ультразвуковой обработке длительностью в 70 секунд уже наблюдаются потери белка.

Таблица 12. Влияние времени разрушения клеток *E. coli* ВВ ультразвуком на концентрацию белка и дегидрогеназную активность белковых экстрактов. Экстракты были получены с использованием 50 мМ калий-фосфатного буферного раствора, рН 7.2.

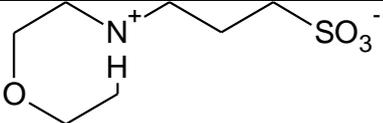
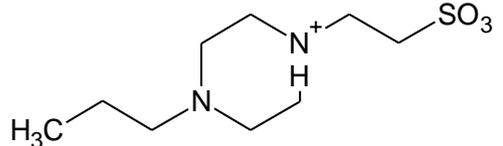
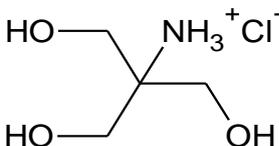
Длительность обработки образца ультразвуком, с	Концентрация белка, мг/мл	Дегидрогеназная активность, мг/мл
30	3.7	0.09
50	5.2	0.12
70	4.1	0.09

Буферный раствор является необходимым компонентом любой биохимической реакции, поскольку позволяет поддерживать определенное значение рН. Буферные растворы играют большую роль в обеспечении жизнедеятельности живых клеток и организмов в целом, т.к. они поддерживают постоянство рН физиологических жидкостей. Также изменение значения рН раствора влияет на форму существования и реакционные свойства белков [193]. Именно поэтому важно поддерживать постоянную кислотность среды.

Таким образом, было важно оценить влияние природы и концентрации буферного раствора, используемого при ресуспендировании экстракта, на экстракцию белка, дегидрогеназную и электрохимическую активности. В качестве буферных систем были выбраны стандартные буферные растворы, используемые при работе с биологическими объектами: калий-фосфатный буферный раствор (КРВ), MOPS, HEPES, TRIS. Характеристика используемых буферных систем представлена в таблице 13.

Первоначально оценивалось влияние природы и ионной силы буферного раствора, используемого на стадии ресуспендирования, при фиксированном значении рН 7.2 на изучаемые показатели грубого экстракта. Как видно из таблицы 14, для экстрактов, ресуспендированных в 75 мМ буферных системах, дегидрогеназная и электрохимическая активности полностью отсутствуют.

Таблица 13. Характеристика используемых буферных систем.

Буферный раствор	Аббревиатура	Структура	pK _a , 25°C
3-Морфолинопропан-1-сульфоная кислота	MOPS		7.31
2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]этансульфоная кислота	HEPES		7.66
2-Амино-2-(гидроксиметил)пропан-1,3-диол	TRIS		8.02
калий-фосфатный буферный раствор	KPB		7.21

Экстракты, ресуспендированные в 50 мМ буферных системах, обладали большими дегидрогеназной и электрохимической активностями по сравнению с системами, полученными с использованием 25 мМ буферных растворов. Отличие в дегидрогеназной активности между экстрактами, ресуспендированными в 50 мМ буферных системах, было небольшое, однако наибольшая плотность тока соответствовала экстракту, полученному в калий-фосфатном буферном растворе. Это может быть связано с наиболее благоприятной конформацией белковых молекул в буферной системе данного типа. Поэтому для дальнейших исследований был выбран 50 мМ калий-фосфатный буферный раствор.

Таблица 14. Влияние природы и ионной силы буферного раствора, применяемого на стадии ресуспендирования в процессе получения грубых экстрактов, на экстракцию белка, их дегидрогеназную и электрохимическую активности. Фиксированное значение рН 7.2.

Состав рабочего раствора при электрохимических измерениях: 0.5 мМ $K_3[Fe(CN)_6]$, 4.6 мМ глюкозы и 0.6 мл экстракта из 6-часовой культуры в 0.5 М калий-фосфатном буферном растворе (рН 7.6). Температура 32 °С. Перемешивание: 150 об/мин.

Буферный раствор	Концентрация белка; мг/мл	Удельная ДГ активность $\times 10^3$; мг/мг формазан/белок	Плотность тока, мкА/см ²
25 мМ			
КРВ	18±4	6.5±0.3	22±3
МОПС	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
МОПС	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
МОПС	20±4	0	0.10±0.01
HEPES	26±5	0	0.10±0.01
TRIS	18±4	0	0.10±0.01

Не менее важно было и оценить влияние рН выбранной буферной системы на изучаемые характеристики грубого экстракта. Наибольшая дегидрогеназная активность и лучшие значения по току были получены для экстрактов, ресуспендированных в буферном растворе с рН 7.0-7.2 (таблица 15). Экстракты, полученные в буферных растворах с рН 7.4; 7.6; 7.8 продемонстрировали более низкую дегидрогеназную или электрохимическую активности. Полученные значения дегидрогеназной и электрохимической активностей для систем с рН 7.0 и 7.2 можно оценить равноценными в рамках

погрешности. Для проведения дальнейших исследований было выбрано значение рН: 7.2.

Таблица 15. Влияние рН 50 мМ калий-фосфатного буферного раствора, применяемого на стадии ресуспендирования в процессе получения грубых экстрактов, на экстракцию белка, их дегидрогеназную и электрохимическую активности.

Состав рабочего раствора при электрохимических измерениях: 0.5 мМ $K_3[Fe(CN)_6]$, 4.6 мМ глюкозы и 0.6 мл экстракта из 6-часовой культуры в 0.5 М калий-фосфатном буферном растворе (рН 7.6). Температура 32 °С. Перемешивание: 150 об/мин.

Буферный раствор	рН	Концентрация белка, мг/мл	Удельная ДГ активность $\times 10^3$, мг/мг формазан/белок	Плотность тока, мкА/см ²
КРВ	7.0	25±5	7.8±0.4	60±8
	7.2	26±5	7.2±0.4	57±7
	7.4	30±6	7.0±0.4	30±4
	7.6	30±6	6.9±0.3	50±7
	7.8	29±6	6.8±0.3	59±8

3.2 Дегидрогеназная активность экстрактов из штамма *E. coli* ВВ в зависимости от фазы роста культуры микроорганизма и природы субстрата [192]

На рисунке 24 показана динамика роста бактериальной культуры *E. coli* ВВ, отчетливо видно, что с увеличением времени роста культуры оптическая плотность растёт и проходит через максимум. Фаза замедления роста (отмирания) наступает после 16 часов от начала посева.

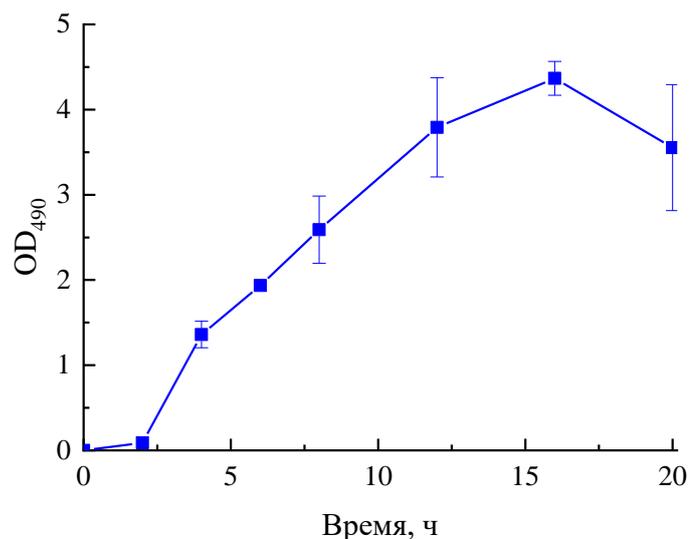


Рисунок 24 - Кривая роста *E. coli* ВВ [192]

При этом в различные периоды роста бактерий вырабатываются различные ферменты, таким образом, дегидрогеназная активность для культуры, дезинтегрированной в определенные фазы роста будет отличаться.

На рисунке 25 показаны кривые накопления ТТХ-формаза при использовании разных субстратов (цитрат калия, малат калия, глюкоза, лактат калия и этиловый спирт) для восстановления ТТХ. Из рисунка видно, что активность ферментов изменяется в ходе роста культуры, наиболее заметные изменения наблюдаются для глюкозодегидрогеназной активности [192].

На ранних стадиях роста культуры *E. coli* ВВ наибольшую активность проявляют глюкозодегидрогеназы, что свидетельствует о стадии гликолиза в этот этап роста *E. coli* ВВ, при этом наблюдается начало прироста биомассы.

На протяжении всего периода роста бактерий наибольшую активность проявляют ферменты, использующие в качестве субстратов цитрат и малат калия. Это отражает активность ферментов цикла трикарбоновых кислот, аконитазы и изоцитратдегидрогеназы в случае цитрата калия и малатдегидрогеназы в случае малата калия.

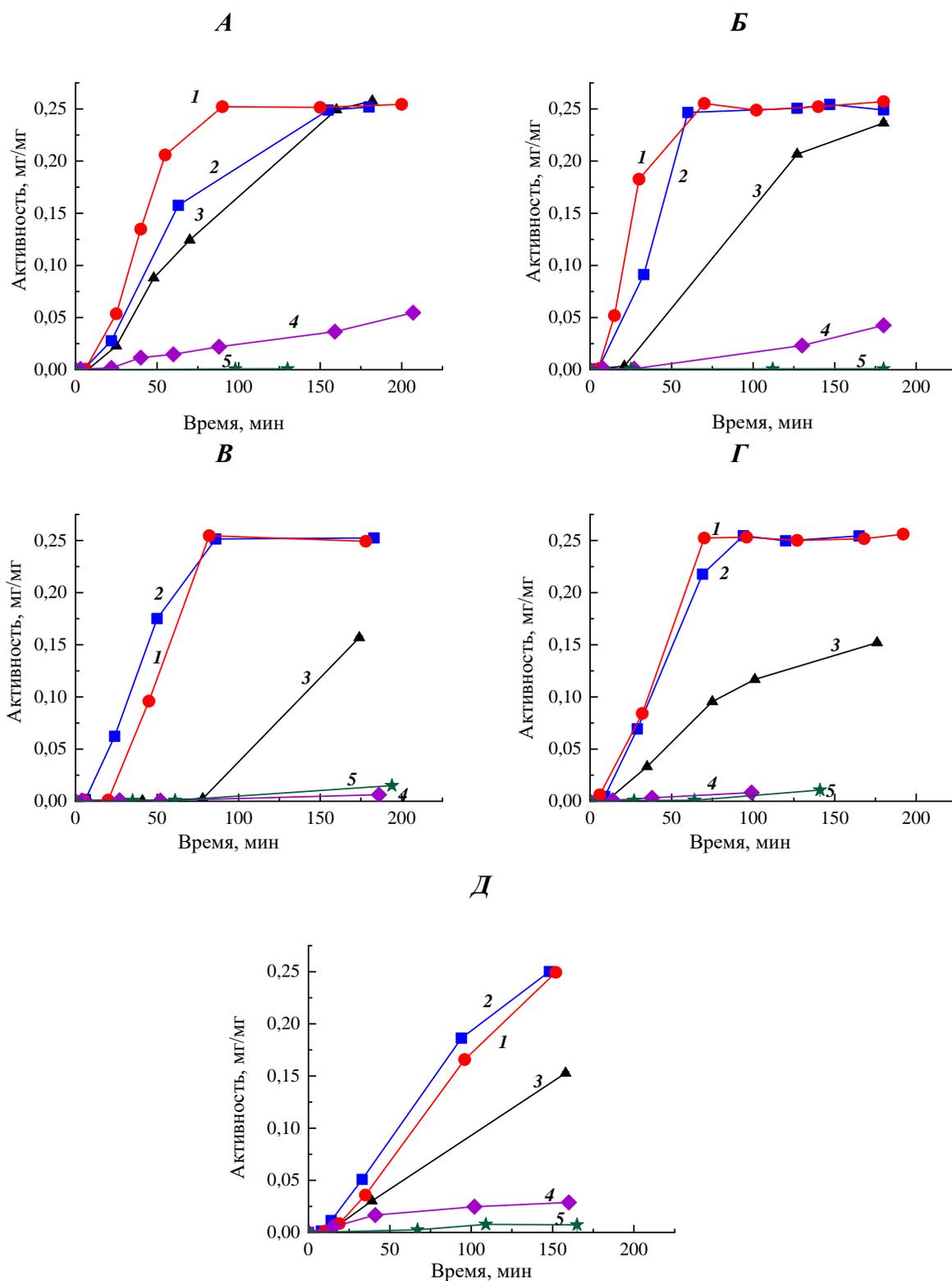


Рисунок 25 - Кинетические кривые восстановления ТТХ экстрактами бактерий, полученных через 6 ч (А), 8 ч (Б), 12 ч (В), 16 ч (Г) и 20 ч (Д) после инокуляции ночной культуры в присутствии субстратов: 1 – цитрат калия, 2 – малат калия, 3 – глюкоза, 4 – лактат калия, 5 – этиловый спирт [192]

Снижение активности у 12-часовой культуры по отношению к цитрату калия может быть обусловлено тем, что на разных фазах роста синтезируются различные изоферменты изоцитратдегидрогеназ, отличающиеся по своей каталитической активности.

С другой стороны, снижение активности у 12-часовой культуры, возможно, происходит из-за того, что у *E. coli* ВВ цикл трикарбонных кислот связан с механизмом глиоксилатного шунта. В этом метаболическом пути происходит расщепление изоцитрата изоцитратлиазой на сукцинат и глиоксилат.

Причем изоцитратлиаза с изоцитратдегидрогеназой, участвующей в цикле трикарбонных кислот, конкурируют за изоцитрат, что может и вызвать снижение активности у 12-часовой культуры.

Малатдегидрогеназа, обладающая максимальной активностью в 12 ч роста, принимает участие в последней стадии цикла трикарбонных кислот, когда фумарат обратимо гидратируется до малата посредством трех различных фумараз (*fumA*, *fumB*, *fumC*), а НАД – зависимая малатдегидрогеназа катализирует окисление малата.

К концу стационарной фазы роста активность этих ферментов заметно падает. Лактатдегидрогеназная и алкогольдегидрогеназная активности находятся на низком уровне в течение всего времени наблюдений. Разницу в активностях у лактатдегидрогеназ, полученных на различных стадиях роста культуры *E. coli* ВВ, можно объяснить тем, что существует 5 различных изоформ этого фермента, отличающихся по степеням аллостерического ингибирования продуктом реакции - пируватом. Можно предположить, что на разных стадиях роста культуры синтезируются различные изоформы лактатдегидрогеназы. У 16-часовой культуры *E. coli* ВВ наблюдается максимальная дегидрогеназная активность с субстратом этиловый спирт. Это связано с тем, что 16-ый час выращивания культуры соответствует уже фазе замедления роста, когда образуются спирты, индуцирующие синтез алкогольдегидрогеназы. Разницу в активностях у алкогольдегидрогеназ,

полученных из культур при остальных фазах роста, так же, как и в случае с лактатдегидрогеназой, можно объяснить секрецией различных изоформ фермента, отличающихся по активностям, на разных стадиях роста.

В таблице 16 приведены данные по максимальным скоростям и конверсиям окисления ТТХ при использовании разных субстратов для восстановления ТТХ. Из таблицы видно, что активность ферментов изменяется в ходе роста культуры, наиболее заметные изменения наблюдаются для глюкозодегидрогеназной и изоцитратдегидрогеназной активностей.

Таблица 16. Максимальные скорости дегидрогеназной реакции, V_{\max} , с различными субстратами у экстрактов, полученных при разных фазах роста культуры *E. coli* ВВ.

Параметр	Субстрат	Время роста культуры, ч					
		4	6	8	12	16	20
Максимальная скорость, V_{\max} 10^{-5} , мг/мг/мин	Глюкоза	15.1	12.3	12.0	11.6	11.6	11.0
	Цитрат калия	-	15.1	18.7	13.8	13.8	12.0
	Малат калия	-	13.2	15.8	14.3	13.7	12.0
	Этанол	-	0.1	0.5	0.4	2.5	5.4
	Лактат калия	-	2.1	3.4	3.1	1.1	2.0
Восстановительная конверсия ТТХ, %	Глюкоза	100	100	100	84	100	100
	Цитрат калия	-	100	100	100	100	100
	Малат калия	-	100	100	100	100	100
	Этанол	-	8	66	50	100	39
	Лактат калия	-	35	40	53	19	28

3.3 Спектроскопический способ оценки дегидрогеназной активности белковых экстрактов, полученных из микроорганизмов, с помощью феррицианида калия

Используя разработанную методику оценки дегидрогеназной активности (глава 2, раздел 2.3.2), по данным изменения концентрации феррицианида калия (высчитанным по поглощению раствора феррицианида и белкового экстракта) во времени строили кинетическую кривую, показанную на рисунке 26. К начальному участку полученной кинетической кривой,

соответствующей линейной фазе ферментативной реакции, строили касательную, наклон которой давал скорость изменения концентрации феррицианида, которую использовали для оценки дегидрогеназной активности белка.

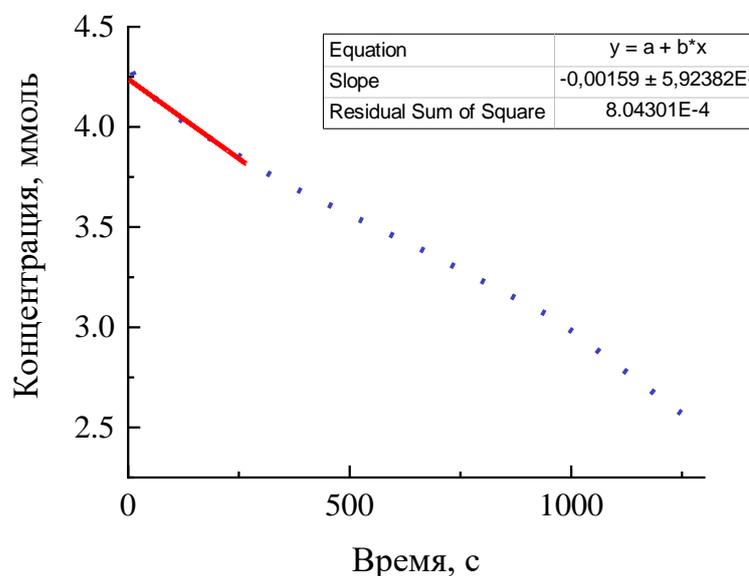


Рисунок 26 - Уменьшение концентрации феррицианида калия в ходе ферментативной реакции.

Сравнение результатов по дегидрогеназной активности, полученной с помощью ТТХ, с результатами, полученными с применением феррицианида калия приведено в таблице 17. Как видно, использование феррицианидного метода позволяет адекватно оценить дегидрогеназную активность в пробах, и этот метод может применяться на практике для более экспрессного определения активности белковых экстрактов.

Таблица 17. Сравнение дегидрогеназной активности экстрактов, полученных из *E. coli*, оцененной спектроскопическим методом с использованием феррицианида и ТТХ

Образец, №	С использованием феррицианида, ммоль/с	С использованием ТТХ, мг/мл
1	$1 \cdot 10^{-2}$	1.58
2	$2 \cdot 10^{-3}$	1.39
3	$6 \cdot 10^{-4}$	0.78
4	$3 \cdot 10^{-4}$	0.12

3.4 Применимость разработанного подхода к получению биоэлектродокатализаторов из иного класса микроорганизмов, *Saccharomyces cerevisiae* [194]

Применимость разработанного подхода для получения белковых экстрактов, обладающих дегидрогеназной активностью, из клеток прокариот *E.coli* к другим классам микроорганизмов проверяли на клетках более сложным образом организованных дрожжей, а именно, *Saccharomyces cerevisiae*. Использование дрожжей, таких как *Saccharomyces cerevisiae*, основано на их доступности и непатогенности, а также на предположении, что из данной культуры на выходе экстракта можно получить больше ферментных систем, способных к переработке глюкозы. Так, известно [195], что в культурах *Saccharomyces cerevisiae* в большом количестве содержится глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа (G6PD, EC 1.1.1.49), входящая в пентозофосфатный путь.

Экстракты из дрожжей получали таким же методом, что и экстракты из *E. coli* (рисунок 23). Специфика биологических объектов обуславливает их индивидуальность, вследствие чего важно было подобрать собственные оптимальные условия получения такого экстракта белков, который бы обладал наибольшей дегидрогеназной активностью.

Выращивание культуры – первая стадия в процессе получения грубых белковых экстрактов. На данном этапе было важно подобрать процентное соотношение добавляемой глюкозы, которая требуется не только для питания клеток, но может и служить индуктором выработки глюкозодегидрогеназных ферментных систем [196]. Как видно из таблицы 18, минимальные значения удельной дегидрогеназной активности (то есть соотношенной на мг общего белка в экстракте) наблюдаются у экстрактов, полученных из культур, выращенных без введения глюкозы. Это можно объяснить тем, что без глюкозы не происходит должной выработки глюкозодегидрогеназных ферментных систем.

Таблица 18. Влияние содержания глюкозы при выращивании *Saccharomyces cerevisiae* на дегидрогеназную активность и содержание белка у экстрактов*, полученных из данной культуры.

Содержание глюкозы в культуральной среде, %	ДГА·10 ³ , мг/мл	Концентрация белка, мг/мл	Удельная ДГА·10 ³ , мг (ТФФ)/мг (белка)
0	30±3	28.9±1.4	1.0±0.2
0.02	40±4	27.4±2.7	2.0±0.3
0.1	230±20	29.5±3.0	8.0±1.2
0.2	60±6	23.8±2.4	2.0±0.3
2	20±2	23.9±2.4	1.0±0.2

Примечание: * - экстракты получали из клеток в стационарную фазу роста, ТФФ - трифенилформазан

Наибольшее значение удельной ДГА было получено у образца, выделенного из культуры, выращенной при 0.1% содержании глюкозы (0.008 мг/мг). При 0.2% уже наблюдается снижение активности до 0.002 мг/мг, а при 2% содержании глюкозы ДГА составляет всего 0.001 мг/мг. Можно предположить, что такое уменьшение ДГА вызвано явлением субстратного ингибирования и концентрация глюкозы выше 0.1% является уже перенасыщенной для данной культуры. Соответственно, дальнейшие

исследования проводили на экстрактах, полученных при выращивании культуры в питательной среде с 0.1% содержанием глюкозы.

Далее оценивали влияние природы, ионной силы и рН буферной системы, используемой для стадии ресуспендирования клеток.

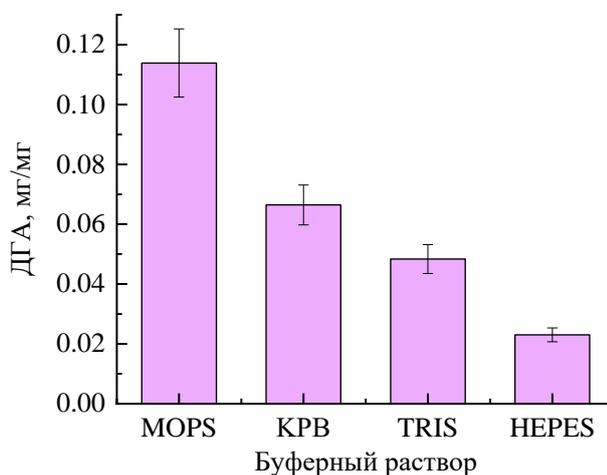


Рисунок 27 - Влияние природы 50 мМ буферного раствора, рН 7.2, на удельную ДГА грубого экстракта *S. cerevisiae*.

Как видно из данных рисунка 27, активность возрастает в ряду HEPES < TRIS < KPB < MOPS. Причем, удельная ДГА у экстракта, полученного в буферном растворе MOPS, практически в 2.5 раза больше, чем у экстракта в буферном растворе HEPES.

Для оценки влияния ионной силы и рН буферной системы использовали калий-фосфатный буфер, который, несмотря на почти в 2 раза более низкую активность в сравнении с MOPS, является все же более привлекательным для практического использования с экономической точки зрения. Как показали результаты оценки ДГА в растворах KPB разных концентраций и рН (рисунок 28), оптимальной буферной системой для стадии ресуспендирования можно считать 0.1М KPB со значением рН 7.0.

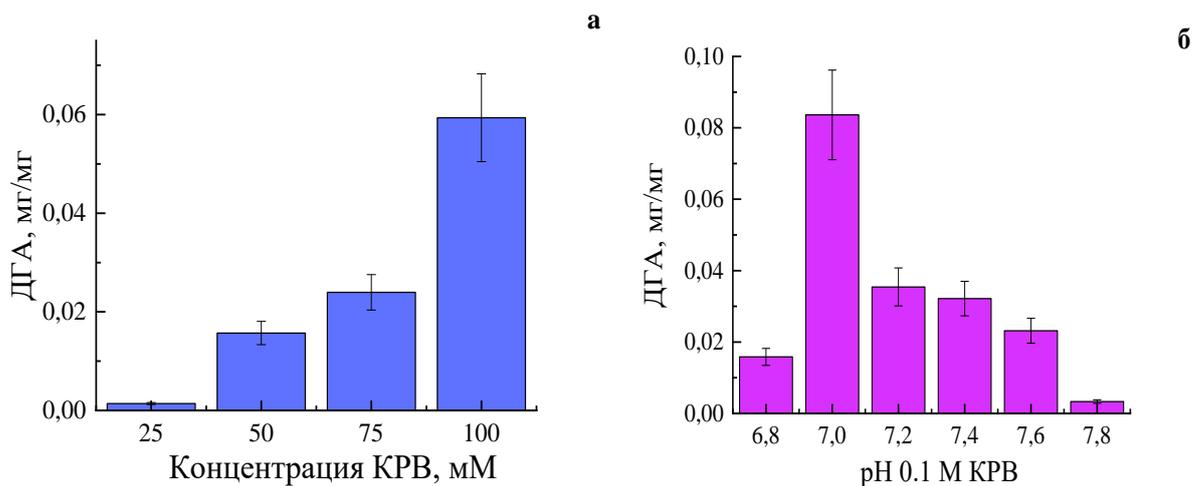


Рисунок 28 - Влияние концентрации (а) и рН (б) КРВ на удельную дегидрогеназную активность экстрактов, полученных из *Saccharomyces cerevisiae*.

На стадии УЗ-дезинтегрирования оптимизируемыми параметрами стало количество серий воздействие-релаксация (продолжительность УЗ-обработки). С этой целью образцы подвергали нескольким сериям кратковременной ультразвуковой обработки по 10 секунд с перерывами по 20 секунд, используя постоянное охлаждение при температуре 0 °С и мощность 99 Вт.

Как видно из рисунка 29, при 40 и 70 секундах УЗ - воздействия, видимо, еще не все клетки разрушены, тогда как 100 секунд достаточно для получения максимального выхода белка и высокой ДГА. Дальнейшее увеличение времени УЗ - воздействия приводит к снижению ДГА и белка на выходе, что свидетельствует о начале разрушения белковых молекул.

Экстраты *Saccharomyces cerevisiae*, показавшие максимальную дегидрогеназную активность, испытывали в составе биоанода, проверяя наличие токовых откликов. С этой целью использовался тот же состав медиаторного биоанода, что и для экстрактов из *E.coli*. (рисунок 30). Как видно, полученные белковые экстракты работают в составе биоанода – токовые отклики на 30 мин измерений составили 80 мкА/см², что доказывает

возможность использования полученного экстракта из дрожжей в качестве биоэлектродкатализатора.

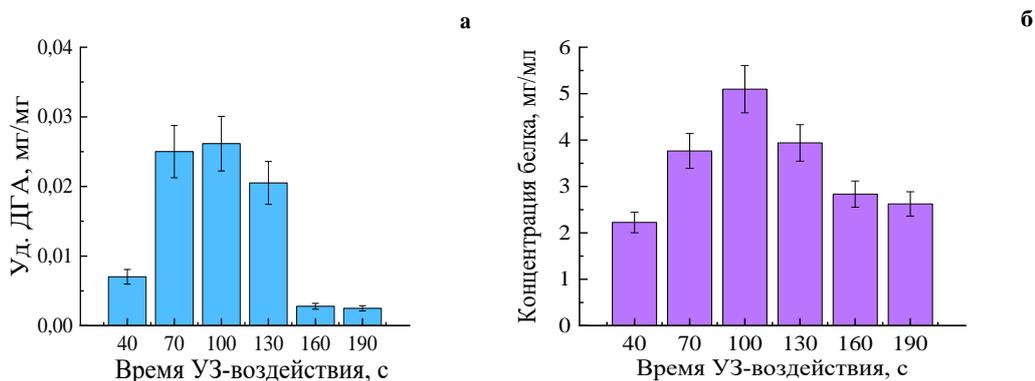


Рисунок 29 - Влияние количества серий ультразвуковой дезинтеграции (мощность 99 Вт) на удельную ДГА (а) и выход белка (б) «грубого» экстракта.

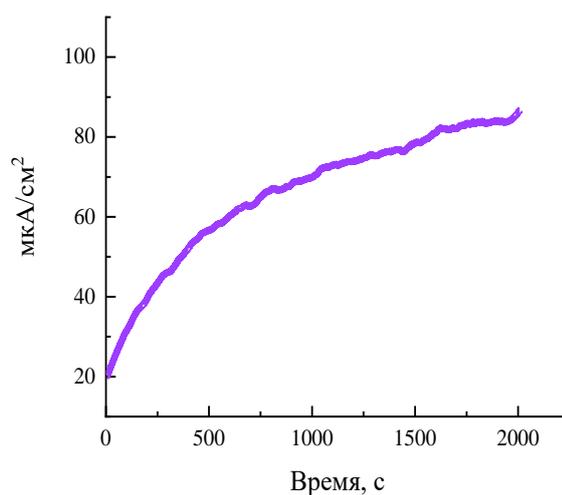


Рисунок 30 – Токвые отклики, полученные в потенциостатическом режиме поляризации при 0.5 В, в системе 0.5 М калий-фосфатного буферного раствора, рН 7.6, содержащем 5 мМ феррицианида калия, 2 мМ глюкозы и 0.6 мл экстракта *Saccharomyces cerevisiae*. Перемешивание: 150 об/мин. Температура: 37 °С.

Таким образом, предлагаемая схема процесса получения активных белковых экстрактов может быть использована для разных типов микроорганизмов, однако, оптимальные параметры для каждой стадии получения необходимо подбирать индивидуально под тип культуры.

3.5 Заключение к главе 3

Использование метода ультразвуковой дезинтеграции для получения неочищенных (грубых) белковых экстрактов, предлагаемого в данной работе, и изучение влияния параметров этой процедуры на свойства получаемой биомассы показало, что время ультразвуковой дезинтеграции влияет на экстракцию белка и дегидрогеназную активность грубых белковых экстрактов. Наиболее оптимальное время ультразвуковой обработки для используемого в работе прибора УЗДН-2Т с мощностью 400 Вт составило 50 секунд (5 раз по 10 секунд воздействие ультразвука, 20 секунд перерыв).

Получены данные, показывающие, что природа, ионная сила и рН буферного раствора, применяемого на стадии ресуспендирования при получении грубых экстрактов, оказывают непосредственное влияние на экстракцию белка, дегидрогеназную и электрохимическую активности. Для получения максимальной дегидрогеназной и электрохимической активности целесообразно использовать 50 мМ калий-фосфатный буферный раствор с фиксированным значением рН 7.2.

Установлен факт изменения дегидрогеназной активности грубых экстрактов клеток *E. coli* на разных стадиях роста культуры в присутствии различных субстратов и хлорида трифенилтетразолия в качестве акцептора электронов. Показано, что в период экспоненциального роста бактерий наибольшая ТТХ-активность восстановления хлорида трифенилтетразолия наблюдается при использовании глюкозы и изоцитрата калия в качестве субстратов.

Показано, что разработанный способ определения дегидрогеназной активности с помощью феррицианида калия позволяет адекватно оценить ДГА в пробах и обладает большей экспрессностью в сравнении с ТТХ-методом.

Показано, что разработанный подход применим к получению аналогичных биоэлектродкатализаторов из принципиально иного класса микроорганизмов, *Saccaromyces cerevisiae*.

ГЛАВА 4 ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ БЕЛКОВЫХ ЭКСТРАКТОВ

В главе изложены результаты оценки электрохимической активности полученных грубых белковых экстрактов в составе медиаторного биоанода. Обоснован выбор медиаторной системы, определено влияние состава рабочего раствора и типа субстрата на получаемые токовые характеристики, найдены основные кинетические параметры процесса медиаторного биоэлектрокаталитического окисления глюкозы. Показана электрохимическая активность белкового экстракта после различных стадий очистки методом диализа. Проведено сравнение электрокаталитической активности экстракта с живыми клетками *E. coli*. Продемонстрированы тестовые испытания разработанного прототипа асимметричного биотопливного элемента с различными анодными материалами и экстрактами из разных культур.

4.1 Определение механизма биоэлектрохимической реакции

Для осуществления успешного биоэлектрокатализа необходимо осуществить сопряжение ферментативной и электродной реакций. Как было показано в Главе 1, такое сопряжение может быть прямым и медиаторным, но лишь ограниченное число ферментов способно к прямому электронному переносу. Кроме того, концентрации субстратов, которые окисляют такие ферменты, весьма невелики [197–200]. Поэтому первоначальной задачей являлось определить тип электрокаталитического механизма в системе с грубыми белковыми экстрактами. Если бы грубые белковые экстракты были способны к осуществлению прямого электронного переноса с белка на электрод, то в системе «экстракт» + «субстрат» наблюдались бы токовые отклики (рисунок 31а, кривая 1). Но, поскольку этого не происходит, то можно сказать, что прямой биоэлектрокатализ в данной системе не реализуется.

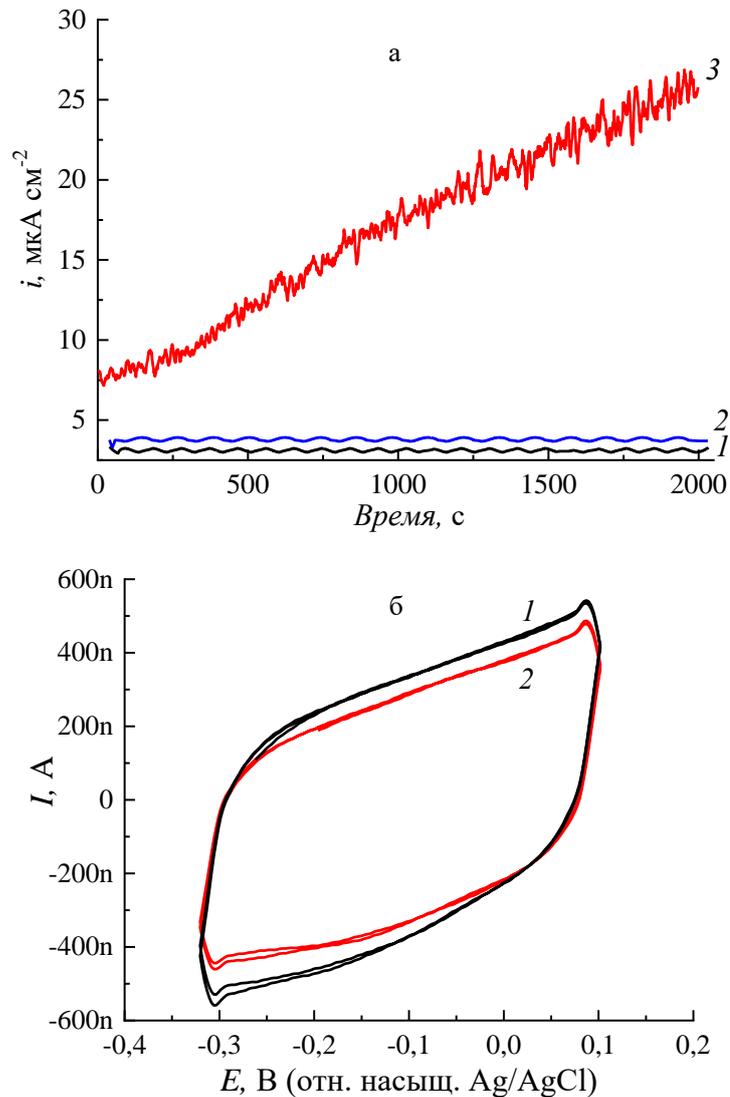


Рисунок 31 - (а) Изменение токового отклика на стеклоуглеродном электроде в 0.1М калий-фосфатном буферном растворе (рН 7.2), содержащем 4.6 мМ глюкозы и 0.6 мл экстракта, полученного из 6-часовой культуры *E. coli* ВВ (1); содержащем 4.6 мМ глюкозы и 0.5 мМ феррицианида калия (2); в том же растворе (2) с добавлением 0.3 мл экстракта, полученного из 6-часовой культуры *E. coli* ВВ (3). Перемешивание: 150 об/мин. Поляризация – 0.5В [201] (б) Циклические вольтамперные кривые стеклоуглеродного электрода в 0.1 М калий-фосфатном буферном растворе (рН 7.2) с 4.6 мМ глюкозы (1) и (2) в растворе (1) с добавкой 0.3 мл экстракта из 8-часовой культуры. Скорость развертки потенциала 100 мВ/с. [201]

То, что прямой биоэлектrokatalиз не реализуется для системы грубых экстрактов подтверждает и отсутствие роста токовых откликов при введении в раствор экстрактов белка на циклических вольтамперограммах (рисунок 31б).

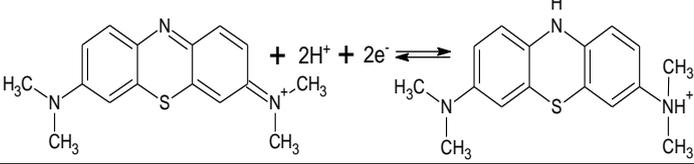
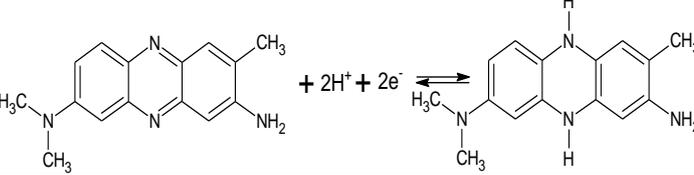
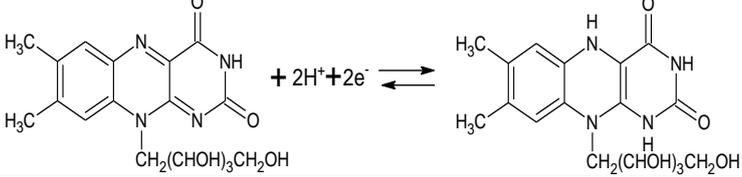
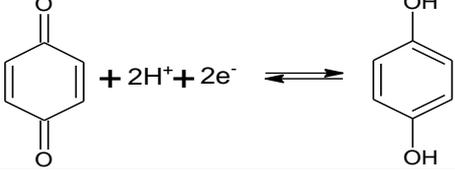
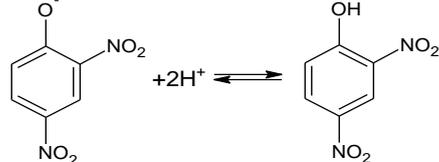
Таким образом, для осуществления сопряжения биохимической и электрохимической реакций возникла задача подобрать эффективную редокс-медиаторную систему.

4.2 Выбор редокс-медиаторной системы [201]

Для выбора редокс-медиаторной системы, которая позволила бы получить токовые отклики на электроде, был протестирован целый ряд водорастворимых медиаторов, применяемых для биологических ферментативных систем: метиленовый синий, нейтральный красный, рибофлавин, 2,4-динитрофенол, феррицианид калия, бензохинон и нитрат железа (III). Характеристики исследуемых редокс-медиаторов представлены в таблице 19. Их редокс-отклики измеряли в 0.1 М калий-фосфатном буферном растворе (рН 7.2) без каких-либо дополнительных реагентов в потенциодинамическом режиме. Как и ожидалось, из всех редокс-медиаторов нитрат железа оказался не активным из-за гидролиза соли при исследуемом рН. 2,4-динитрофенол также оказался неактивным в качестве редокс-системы. На ЦВА-зависимостях, полученных в растворах остальных медиаторов, наблюдаются пары редокс-пигов, соответствующих их превращению из окисленной в восстановленную форму (рисунок 32).

Измерения электрохимической активности экстракта, полученного из 6-часовой культуры *E. coli* ВВ, в присутствии субстрата (глюкоза) и изучаемых медиаторных систем проводили в потенциостатическом режиме поляризации.

Таблица 19. Редокс-переходы исследуемых медиаторных систем [202–204].

Тип медиатора	Реакция редокс - перехода	Потенциал редокс-перехода по н.в.э. при pH 7, В
Метиленовый синий		0.01
Нейтральный красный		-0.33
Рибофлавин		-0.29
Феррицианид калия	$[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-} + 2\text{e}^- + 2\text{H}^+ \rightleftharpoons [\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$	0.43
Бензохинон		0.078
Динитрофенол		-0.5

Потенциал выбирали в анодной области за потенциалом анодного пика так, чтобы катодный процесс не оказывал влияния на измеряемые токовые отклики. Медиатор в исходном растворе глюкозы (без добавления грубого экстракта) находится в окисленном состоянии. Введение же в раствор грубого экстракта приводит к окислению глюкозы и восстановлению медиатора в соответствии с уравнением (22) в том случае, когда медиатор может взаимодействовать с ферментом. При высоком анодном потенциале окисление

медиатора на поверхности электрода происходит мгновенно (в тот самый момент, когда медиатор в восстановленном виде достиг поверхности электрода). В перемешиваемом растворе концентрация медиатора вблизи поверхности электрода быстро обновляется.

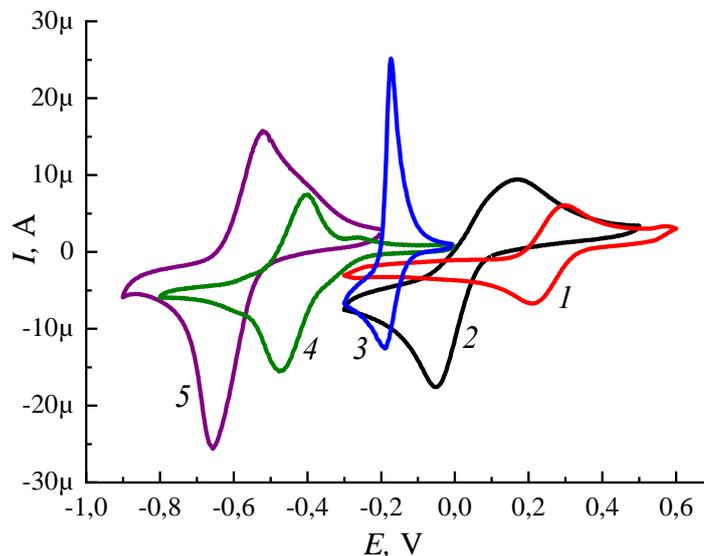


Рисунок 32 – Редокс-отклики медиаторных систем, полученные в 0.1 М калий-фосфатном буферном растворе (рН 7.2) на стеклоуглеродном электроде. 1 - феррицианид калия, 2 - бензохинон, 3 – метиленовый синий, 4 – рибофлавин, 5 – нейтральный красный. Скорость развертки – 100 мВ/с. Потенциалы здесь и далее приведены относительно насыщенного хлоридсеребряного электрода.

Таким образом, измеряемый ток пропорционален концентрации образующегося в реакции (22) продукта. В таблице 20 представлены плотности тока, полученные в холостых экспериментах (в буферном растворе медиатора (А), в этом же растворе с добавлением глюкозы (Б)) и также эксперименты с введением белкового экстракта в раствор с глюкозой и медиатором (С).

При сравнении фоновых плотностей тока (табл. 20, А) и плотностей тока в растворе медиатора и глюкозы (табл. 20, Б) можно сделать вывод, что почти все медиаторные системы инертны к глюкозе, кроме бензохинона. Достаточно

высокий фоновый ток в системе с бензохиноном является результатом наличия восстановленной формы медиатора в образце бензохинона. Кроме того, добавление глюкозы в раствор бензохинона приводит к увеличению плотности тока. Этот результат хорошо воспроизводим (Таблица 21, **I** и **II**).

Таблица 20. Плотности тока, i , полученные на стеклоуглеродном электроде в 0.1 М калий-фосфатном буферном растворе, рН 7.2, при потенциостатическом режиме на 30 минуте измерения при потенциале E с добавлением медиатора (**A**), медиатора и 4.6 мМ глюкозы (**B**), медиатора, 4.6 мМ глюкозы и 0.3 мл белкового экстракта, полученного из 8-часовой культуры *E. coli* ВВ (**C**). Перемешивание: 150 об/мин.

Медиатор	Концентрация медиатора, мМ	E , В	Плотность тока, j , мкА·см ⁻²			j_c/j_b
			A	B	C	
рибофлавин	0.18*	-0.200	0.90±0.01	0.90±0.01	2.40±0.01	2.6
нейтральный красный	0.56	-0.350	-0.10±0.01	0.10±0.01	-0.07±0.01	не активен
2,4-динитрофенол	0.56	0.534	0.20±0.01	0.10±0.01	0.050±0.001	не активен
бензохинон	0.56	0.534	12.4±0.1	19.1±0.1	62.3±0.1	3.3
метиленовый синий	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 (0.11 мг/мл при 27 °С).

Увеличение в два раза содержания бензохинона и глюкозы в растворе приводит к соответствующему увеличению плотности тока (табл. 21, **III**). Этот эффект можно объяснить прямым окислением глюкозы бензохиноном в растворе [205,206]. После добавления грубого экстракта в раствор плотность тока заметно увеличилась (табл. 21, **IV**). Таким образом, происходят два параллельных процесса в системе «бензохинон-глюкоза-экстракт»: прямое

окисление глюкозы бензохиноном и окисления глюкозы белковым экстрактом с последующей передачей электронов на электрод через бензохинон. Бензохинон не является инертным медиатором по отношению к субстрату (глюкоза). Следовательно, бензохинон не может рассматриваться как редокс-медиатор в биоэлектродокаталитических системах, работающих на глюкозе, несмотря на результаты, приведенные в [157,207], так как сам реагирует с глюкозой.

Таблица 21. Плотности тока, полученные при 0.5 В на стеклоуглеродном электроде в потенциостатическом режиме на 30 мин измерения в системе «бензохинон-глюкоза-экстракт» при различных содержаниях компонентов. Экстракт был получен из 8-часовой культуры *E. coli* ВВ. Фоновый раствор: 0.1 М калий-фосфатный буферный раствор, рН 7.2. Перемешивание: 150 об/мин.

№	Система	i мкА см ⁻²
I	мМ бензохинон	±1
II	I	±1
III	I	±1
IV	III + 0.6 мл экстракта из 8 часовой культуры <i>E. coli</i> ВВ	±1

Низкие плотности тока в присутствии 2,4-динитрофенола, рибофлавина и нейтрального красного связаны с их неудовлетворительной работой в качестве медиаторов. По-видимому, эти медиаторы не могут обратимо взаимодействовать с редокс-центром белковой молекулы фермента в экстракте из-за стерических или зарядовых ограничений.

Наиболее высокие значения в отношении измеряемый ток биоэлектродокаталитической активности экстракта к фоновому току системы «медиатор+субстрат» (jC/jБ) наблюдались у метиленового синего и феррицианида калия (таблица 20). Для практического применения в биотопливных элементах метиленовый синий кажется более

привлекательным, поскольку он обладает низким окислительным потенциалом. Однако восстановленная форма метиленового синего (лейкометиленовый синий) имеет низкую растворимость в воде и необратимо взаимодействует с экстрактом с образованием неэлектроактивных коллоидных продуктов, в результате чего происходит угнетение токовых откликов на электроде (таблица 22), несмотря на визуально наблюдаемый полный переход окраски раствора от синей (метиленовый синий) к белой (лейкометиленовый синий) (рисунок 33 б). Так увеличение количества экстракта в системе с медиатором метиленовый синий приводит к угнетению токовых откликов, не смотря на переход окраски раствора от синего к белому, тогда как при таком же повышении добавляемого объема экстракта в систему с участием феррицианида калия в качестве медиатора наблюдается рост токовых откликов (таблица 22). Это говорит о том, что, несмотря на угнетение токов на электроде (по-видимому, за счет частичной пассивации поверхности), в растворе продолжается реакция восстановления. Такая же картина наблюдается и на ЦВА при введении экстракта в рабочий раствор, содержащий метиленовый синий и субстрат. В этом случае токи пиков уменьшаются, что может говорить о пассивации рабочей поверхности электрода (рисунок 33 а).

Более того, при замещении в ячейке аргоновой атмосферы на воздушную весь лейкометиленовый синий, формирующийся в результате взаимодействия грубого экстракта с субстратом, быстро переходит в окисленную форму (рисунок 33 б) под действием атмосферного кислорода [192,208]. В результате измеряемый токовый отклик резко снижается (рисунок 34), а возвращение аргоновой атмосферы вновь приводит к постепенному росту токов, что подтверждает чувствительность электрода к наличию восстановленной формы метиленового синего.

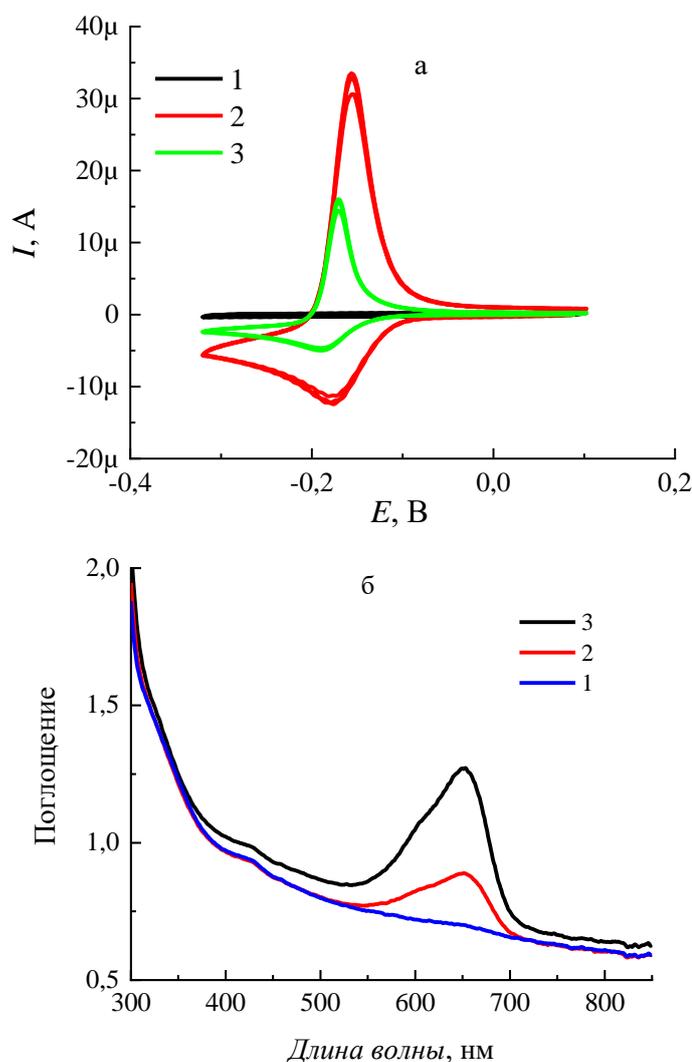


Рисунок 33 - а) ЦВА стеклоуглеродного электрода в рабочем растворе. Состав раствора: 1 - 5 мМ цитрат калия на фоне 0.1 М калий-фосфатного буферного раствора (рН 7.2), 2 - раствор 1 с 0.5 мМ метиленовым синим, 3 - раствор 2 с 0.3 мл экстракта 8-ми ч культуры *E. coli* ВВ. Скорость развертки потенциала 100 мВ/с. *Примечание.* При добавлении экстракта происходит пассивация электрода адсорбированными инактивными частицами. б) Спектры поглощения в видимой области раствора (3) через 15 мин. потенциостатических измерений в открытой кювете. Время измерения: 1 - сразу, 2 - через 15 с, 3 - через 30 с.

Таким образом, эта медиаторная система, которая обычно используется в биоэлектрокаталитических реакциях [209,210], не может быть широко использована на практике, так как способна работать только в инертной

атмосфере. Кроме того, метиленовый синий, а следовательно, и его малорастворимая восстановленная форма, адсорбируется клеточными стенками живых микроорганизмов [211,212].

Таблица 22. Стационарные токовые отклики стеклоуглеродного электрода в растворе 5 мМ цитрата калия в 0.1 М калий-фосфатном буферном растворе, рН 7.2 в присутствии 0.5 мМ редокс-медиатора (j_0) и в том же растворе при добавлении экстракта (j), полученного из 8-часовой культуры *E. coli*. Перемешивание: 150 об/мин.

Редокс-медиатор	Экстракт <i>E. coli</i> , Объем, мл (белок, мг)	j_0 , мкА·см ⁻²	Время измерения, мин	j , мкА·см ⁻²	j , мкА·см ⁻² ·мг ⁻¹ белка
Метиленовый синий	0.3 (4.89)	0.13	30	5	1
			60	2.9	0.6
	0.6 (9.78)		30	2.4	0.2
K ₃ [Fe(CN) ₆]	0.3 (4.89)	0.11	30	7.8	1.6
			60	11	2.2
	0.6 (9.78)		30	22.6	2.3

Напротив, феррицианид калия обладает гораздо более высоким окислительным потенциалом, тем не менее, этот медиатор не чувствителен к присутствию кислорода в системе (рисунок 34). Поэтому самым эффективным медиатором оказался феррицианид калия, удовлетворяющий требованиям к редокс-медиаторной системе (инертность по отношению к субстрату, возможность работы в воздушной атмосфере, высокий генерируемый токовый отклик по сравнению с другими медиаторами).

Высокие токовые отклики в системе с феррицианидом можно бы было объяснить тем, что грубый экстракт содержит Fe-глюкозодегидрогеназу. Для проверки данного предположения определили содержание ионов в активном окислительно-восстановительном центре ферментов в экстракте при помощи атомно-абсорбционной спектроскопии. Было выявлено, что даже после диализа (мембрана 3.5 кДа) в белковом экстракте представлены только ионы Fe (0.01 мкмоль/мг) и Mg (0.01 мкмоль/мг). Можно высказать предположение,

что феррицианид образует комплекс с дегидрогеназой, способствующий эффективному переносу электронов. Взаимодействие феррицианида с НАДФН-дегидрогеназой было установлено и в работе [213].

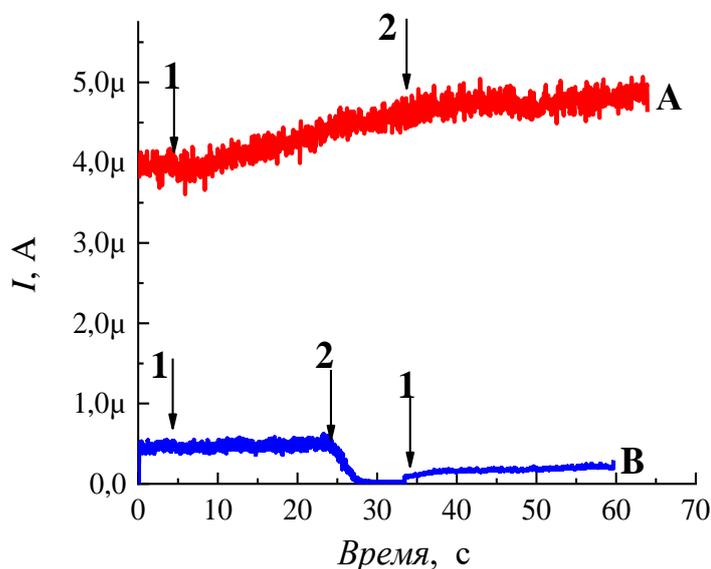


Рисунок 34 - Изменение токовых откликов в потенциостатическом режиме поляризации при замене атмосферы в ячейке с аргоновой (1) на воздушную (2) в системе: 0.1 М калий-фосфатный буферный раствор (рН 7.2), содержащий 5 мМ феррицианида калия (А) или 0.5 мМ метиленового синего (В), 5мМ цитрата калия и 0.9 мл экстракта, полученного из 8-ми часовой культуры *E. coli* ВВ. Потенциал поляризации 0.5 В (А) и -0.03 В (В). Перемешивание: 150 об/мин.

Таким образом, с помощью феррицианидной системы можно исследовать влияние различных факторов на биокаталитическую активность полученного белкового экстракта (стадии роста культуры, тип буферного раствора, рН, ионная сила, температура).

Поскольку феррицианид имеет обратимую волну на ЦВА, необходимо было подобрать потенциал поляризации, при котором катодный процесс не сказывался бы на токовых откликах при хроноамперометрических измерениях, и в то же время позволял бы быстро окислить восстановленную

форму медиатора – ферроцианид – на электроде. С этой целью рабочий электрод поляризовали разными потенциалами. Результаты представлены в таблице 23. На основании полученных данных выбрали потенциал поляризации (534 мВ), который, с одной стороны, находится в анодной области за потенциалом анодного пика, а с другой – измеряемый при этом потенциале ток не является компромиссным между катодным и анодным процессами.

Таблица 23. Токовые отклики, получаемые на стеклоуглеродном электроде в 0.5 М калий-фосфатном буферном растворе (рН 7.6), содержащем 5 мМ феррицианида калия и 0.6 мл экстракта, полученного из 8 - часовой культуры *E. coli* ВВ, при разных потенциалах поляризации. Перемешивание: 150 об/мин. Температура: 35 °С.

Потенциал поляризации, мВ	300	350	400	450	500	550	600
j , мкА·см ⁻² , на 33 мин измерения	-17	15	43	44	30	34	25

4.3 Сравнение электрокаталитической активности грубых экстрактов, полученных на различных стадиях роста *E. coli* ВВ

Как было показано в главе 3, на различных стадиях роста культуры образуются разные ферменты (глюкозодегидрогеназы, лактатдегидрогеназы, изоцитратдегидрогеназы, малатдегидрогеназы, алкогольдегидрогеназы и др.), количество которых зависит от продолжительности жизни культуры. Поэтому важно было оценить при каком времени роста культуры *E. coli* ВВ наиболее целесообразно получать грубый экстракт, обладающий высокой электрокаталитической активностью в отношении выбранных субстратов (глюкоза и цитрат калия). Для исследования были выбраны белковые экстракты *E. coli*, синтезированные на 4, 6 и 8 часах жизни культуры.

Поскольку грубый экстракт, полученный в различных синтезах и на разных стадиях роста, может различаться по содержанию белка, то необходимо использовать какую-либо удельную характеристику для сравнения. Однако расчет удельных плотностей тока в случае использования белковых экстрактов не является тривиальной задачей, поскольку содержание белка в экстракте включает не только ферменты группы глюкозодегидрогеназ (которые активны в реакции окисления глюкозы), но и все другие белки, образующиеся во время распада клеток. Это означает, что для расчета удельных плотностей тока нужна информация о присутствии глюкозодегидрогеназы в экстракте. В предположении, что ТТХ и фермент реагируют в эквивалентных количествах, можно оценить удельную плотность тока на моль формазана ($A \cdot cm^{-2}$ на моль формазана). Такого приближения достаточно для сравнения разных экспериментов с белковыми экстрактами, полученными из культуры различного времени жизни и для различных синтезов, поскольку в разных синтезах развитие культуры может несколько различаться. Результаты удельных плотностей тока как на мг всего содержания белка, так и на моль формазана (рассчитанные, как описано выше) представлены в таблице 24.

Согласно данным таблицы 24 можно заключить, что содержание белка в экстракте возрастает при увеличении продолжительности жизни культуры. Удельная плотность тока практически одинакова для экстрактов, полученных из 6 и 8 – часовых культур (в отношении субстрата глюкоза); для экстрактов из 4-часовой культуры этот параметр немного выше, однако воспроизводимость активности для 4-х часовой культуры не так достаточна, как для 6-ти и 8-ми часовых культур. Таким образом, 6-ти часовой экстракт можно использовать для электрохимических экспериментов (в отношении субстрата глюкоза) практически с той же эффективностью, что и 8-ми часовой.

Таблица 24. 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	Дегидрогеназная активность*, (мг формазана/мг белка,)		j , мкА·см ⁻²		j , мкА/см ² ·мг ⁻¹ белка		Удельная плотность тока, А·см ⁻² ·моль ⁻¹ формазана	
		Г	Ц	Г	Ц	Г	Ц	Г	Ц
4	10.6	0.02	0.03	18±2	15±1	2.9	2.3	42±5	23±2
6	20.1	0.04	0.04	50±1	62±1	4.2	5.1	31±1	37±3
8	23.1	0.04	0.04	59±2	37±2	4.3	2.6	32±1	19±1

Примечание: * инкубационный период реакции – 60 мин. Состав раствора: 0.5 мМ $K_3[Fe(CN)_6]$, 4.6 мМ глюкозы (Г)/цитрата калия (Ц), 0.5 М калий- фосфатный буферный раствор (рН 7.6) и 0.6 мл экстракта. Перемешивание: 150 об/мин.

Токовые отклики, полученные на экстрактах из 4-часовых культур, в отношении цитрата калия ниже, чем токовые отклики, полученные на этих же экстрактах, но в отношении глюкозы. Эти данные коррелируют с результатами, представленными в разделе 3.2. Несколько отличаются данные по токовым откликам и дегидрогеназной активности (раздел 3.2) для 8-ми часовой культуры по цитрату калия. Это обусловлено разнящимся количеством клеток, получаемых в разных синтезах к одному и тому же времени роста (судя по величинам оптической плотности раствора выращивания). В связи с этим в проведенном электрохимическом эксперименте для экстракта, полученного из 8-часовой культуры, в отношении цитрата калия наблюдаются более низкие токовые отклики по сравнению с глюкозой. Поскольку для глюкозы 6-ти часовая культура всегда дает воспроизводимо высокие значения и биохимической, и электрохимической активностей, для дальнейших экспериментов был выбран субстрат – глюкоза и экстракт, полученный из 6-часовой культуры *E. coli* ВВ.

4.4 Влияние ионной силы, рН и типа буферной системы на электрохимическую активность белковых экстрактов [201]

Состав раствора (тип катионов и анионов) играет важную роль для ферментативной активности, стабильности белка [214–219] и, как было

показано в работе [220], природа буферного раствора важна для оптимального интервала рН, для обеспечения стабильности ферментов. Для ферментов используется набор стандартных буферных систем, однако до сих пор не было проведено исследование по сравнению влияния буферных систем, в которых ферменты обладают заметной биологической активностью, на их электрокаталитическую активность.

Было выполнено сравнение нескольких буферных систем с фиксированным значением рН 7.2 при 32 °С: 0.1 М MOPS, 0.1 М HEPES, 0.1 М TRIS, 0.1 М калий-фосфатный буферный раствор, 0.1 М натрий-фосфатный буферный раствор (таблица 25). Среди органических буферных растворов плотность тока, генерируемого в результате биэлектрокаталитической реакции, возрастает согласно ряду MOPS < HEPES < TRIS. Возможно, что присутствие ОН-групп в их структуре положительно влияет на ферментативную активность. Значения плотности тока, полученные в калий-фосфатном буферном растворе, близки к значениям, полученным при использовании буферной системы TRIS. Однако реакция, запущенная в натрий-фосфатном буферном растворе, демонстрирует уже более низкие значения плотности тока. Данный результат соответствует порядку ионов K^+ и Na^+ в рядах Гофмейстера [221]. Таким образом, полученные результаты позволяют предположить, что выбор буферной системы может иметь важное значение для получения высоких токовых откликов в таких системах. Для дальнейших экспериментов по подбору электролита для биоэлектрокаталитической системы, работающей на грубых белковых экстрактах, было решено использовать буферную систему TRIS и калий-фосфатный буферный раствор.

Другим немалозначимым фактором, оказывающим влияние на активность ферментов, является значение рН буферного раствора. Определение рН оптимума проводили в 0.1 М буферной системе TRIS и 0.5 М калий-фосфатном буферном растворе (концентрация 0.5 М была выбрана после исследования влияния ионной силы, см. ниже).

Для буферной системы TRIS в диапазоне рН 7.2-7.8 был найден только один экстремум при рН 7.2. В то время как для калий-фосфатного буферного раствора при этих значениях было найдено 2 экстремума: 7.2 и 7.6.

Таблица 25. Влияние природы буферного раствора на биоэлектродокаталитическую активность белковых экстрактов, полученных из культуры *E. coli* ВВ.

Состав раствора: 0.5 мМ $K_3[Fe(CN)_6]$, 4.6 мМ глюкозы и 0.6 мл экстракта из 6-часовой культуры в 0.1 М исследуемых буферных растворах (рН 7.2). Температура 32 °С. Перемешивание: 150 об/мин.

Буферный раствор	Аббревиатура	рК _а , 25°С	Ионная сила	Плотность тока, мкА·см ⁻²
3-Морфолинопропан-1-сульфоновая кислота	MOPS	7.31	0.07	27±4
2-[4-(2-гидроксиэтил)пиперазин-1-ил]этансульфоновая кислота	HEPES	7.66	0.05	32±7
2-Амино-2-(гидроксиметил)пропан-1,3-диол	TRIS	8.02	0.07	50±9
$H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}	КРВ (K ⁺)	7.21*	0.26	41±5
$H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} , PO_4^{3-}	NaPB (Na ⁺)	7.21*	0.26	35±4

Примечание. *Значение рК_а приведено для второй ступени диссоциации

Было выдвинуто предположение, что второй экстремум для буферной системы TRIS будет найден при более низком значении рН (однако буферные свойства TRIS (рК_а = 8.02) при рН ниже 7.2 не проявляются). Тем не менее, были приготовлены два раствора TRIS с рН 6.6 и 7.0. Как видно из таблицы 26, действительно, при рН 6.6 плотность тока возрастает. Таким образом, для белкового экстракта, полученного из *E. coli*, максимальная плотность тока может быть достигнута при рН 7.6 в калий-фосфатном буферном растворе и при рН 7.2 в буферном растворе TRIS.

Таблица 26. Влияние рН буферной системы на биоэлектрокаталитическую активность белковых экстрактов в различных буферных растворах.

Состав раствора: 0.5 мМ $K_3[Fe(CN)_6]$, 4.6 мМ глюкозы и 0.6 мл экстракта из 6-часовой культуры в 0.1 М буферном растворе TRIS и 0.5 М калий-фосфатном буферном растворе при различных значениях рН. Температура 32 °С. Перемешивание: 150 об/мин.

рН	0.1 М TRIS			0.5 М калий-фосфатный буферный раствор		
	i , мкА·см ⁻²	j , А·см ⁻² ·моль ⁻¹	Ионная сила, М	i , мкА·см ⁻²	j , А·см ⁻² ·моль ⁻¹	Ионная сила, М
6.6	45±4	98±10		-		-
7.0	40±4	87±9		-		-
7.2	60±6	130±13	0.09	41±4	89±9	1.25
7.4	39±4	85±9	0.08	31±3	67±7	1.32
7.6	36±4	78±8	0.07	55±5	120±12	1.38
7.8	36±4	78±8	0.06	44±4	96±10	1.42
8.0	-		-	38±4	83±8	1.44

В литературе для ферментов, стабильных в диапазоне рН 7.0-8.0, известно много буферных систем [222–224]. Следует отметить, что эти буферные системы отличаются не только химическим составом, но и ионной силой. Таким образом, оптимальное значение ионной силы для активности ферментов может быть очень важным [225–228].

Для электрокаталитической активности ферментов в системе экстракт *E. coli*/Fe(CN)₆³⁻ зависимость плотности тока от ионной силы имеет также экстремальный характер, что видно из сравнения результатов, представленных в таблице 27, для буферной системы TRIS (рН 7.2, 32 °С) и калий-фосфатного буферного раствора (рН 7.6, 32 °С) с различной ионной силой. Более того, для каждой буферной системы существует свое оптимальное значение ионной силы.

Таблица 27. Оптимальное значение ионной силы для белкового экстракта *E. coli* ВВ, полученного из 6-часовой культуры.

Состав раствора: 0.5 мМ $K_3[Fe(CN)_6]$, 4.6 мМ глюкозы и 0.6 мл экстракта из 6-часовой культуры в буферном растворе TRIS (рН 7.2) и калий-фосфатном буферном растворе (рН 7.6) при различных значениях ионной силы. Температура 32 °С. Перемешивание: 150 об/мин.

Концентрация буферной системы, М	Ионная сила, М	Плотность тока, i , мкА·см ⁻²	Удельная плотность тока, j , А·см ⁻² ·моль ⁻¹
буферный раствор TRIS, рН 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
калий-фосфатный буферный раствор, рН 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

Для буферной системы TRIS наибольшая плотность тока соответствует 0.1 М буферному раствору, для калий-фосфатного буферного раствора – 0.5 М буферному раствору. Это объясняется тем, что адсорбция ионов на молекуле белка зависит от размера, заряда ионов и их специфического взаимодействия с функциональными группами белков. Таким образом, наибольшая электрохимическая активность ферментов будет зависеть не только от природы буферного раствора или его рН, но и от концентрации буферного раствора. Обычно для таких экспериментов используется 50 мМ буферный раствор, однако для электрохимических измерений такой раствор имеет недостаточную проводимость и, как можно заключить из полученных данных, его концентрация может быть недостаточна для высокой эффективности. Для дальнейших электрохимических экспериментов с целью получения высоких

токовых откликов было выбрано использовать в качестве электролита 0.5 М калий-фосфатный буферный раствор с фиксированным значением pH 7.6.

4.5 Определение температурного оптимума биоэлектрокаталитической реакции с участием грубых экстрактов *E. coli* ВВ

Роль температуры раствора очень важна для активности энзимов [229–234]. На рисунке 35 представлены результаты, демонстрирующие влияние температуры на удельные плотности тока в системе с белковым экстрактом, полученным из 6-ти часовой культуры *E. coli*. Видно, что существует диапазон активации ферментативной активности до 42 °С и диапазон инактивации, связанный с началом процесса денатурации.

Диапазон активации и оптимальная температура хорошо соответствуют известным данным для чистых дегидрогеназных систем [235]. Таким образом, для электрохимических измерений прототипа биотопливного элемента была в дальнейшем выбрана рабочая температура, близкая к оптимальной, 37–38 °С.

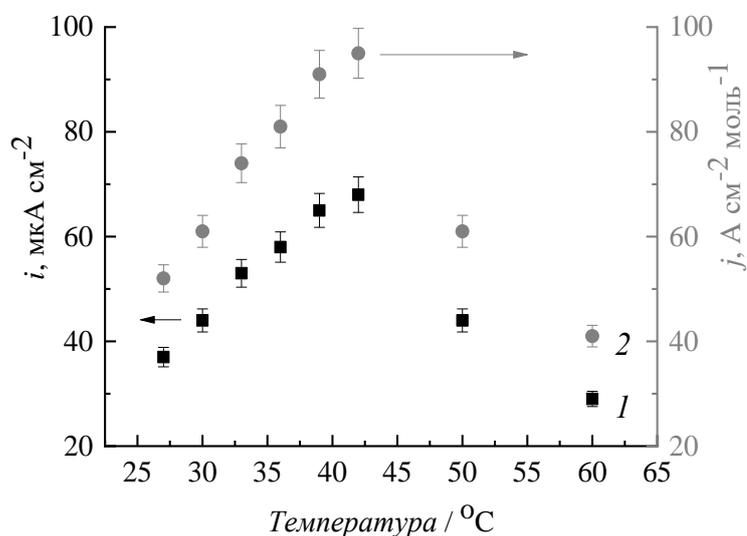
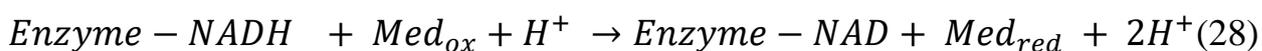
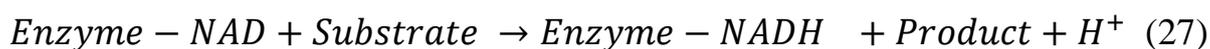


Рисунок 35. Влияние температуры на электрокаталитическую активность белковых экстрактов. 1 – плотность тока на 30 мин измерения i , 2 – удельная плотность тока j . Рабочий раствор: 1 мМ $K_3[Fe(CN)_6]$ + 4.6 мМ глюкозы + 0.6 мл экстракта, полученного из 6-ти часовой культуры *E. coli*, в 0.5 М калий-фосфатном буферном растворе, pH 7.6.

4.6 Влияние концентрации реагентов на электрохимическую активность белковых экстрактов. Кинетические закономерности биоэлектрохимической реакции [190]

На биоаноде в электрохимической ячейке протекают одновременно два типа реакций: биоэлектрокаталитические – взаимодействие фермента с субстратом и медиатором (уравнения 27 - 28) и электрохимическая (уравнение 29).



Для изучения кинетики биоэлектрохимического процесса в исследуемой системе необходимо определить лимитирующую стадию процесса и описывающее ее кинетическое уравнение. Поскольку точное количество глюкозодегидрогеназы в экстракте не известно, можно применить оценочный метод, в предположении, что ТТХ и фермент реагируют в эквивалентных количествах, рассчитав удельную плотность тока на моль формазана (мкА см^{-2} моль⁻¹ формазана), зная дегидрогеназную активность добавленного количества белкового экстракта. Такое приближение описано в разделе 4.3.

Измеряемая плотность тока при медиаторном биоэлектрокатализе пропорциональна концентрации восстановленной формы медиатора в растворе, образующейся вследствие окисления кофермента, связанного с активным центром фермента по реакции (28). Фактически, скорость реакции образования восстановленной формы кофермента, связанная с количеством превращенного субстрата в единицу времени по реакции (27), будет лимитировать скорость образования восстановленной формы медиатора в реакции (28). Концентрация восстановленной формы медиатора в растворе определяется по измеряемой плотности анодного тока, поскольку для пары ферри/ферроцианид стадия электронного переноса быстрая, и окисление восстановленной формы медиатора на поверхности электрода в

потенциостатических условиях при потенциале 0.5 В отн. Ag|AgCl|Cl⁻ ограничивается только диффузией электроактивных частиц к поверхности электрода.

Для вычисления концентрации восстановленной формы медиатора строили калибровочную кривую (плотность тока – концентрация [Fe(CN)₆]⁴⁻), измеренную в том же фоновом растворе и гидродинамическом режиме, что и в биоэлектрокаталитических экспериментах. Полученный калибровочный коэффициент составил 144 мкА см⁻²мМ⁻¹. Таким образом, концентрация восстановленной формы медиатора в растворе - ферроцианида, [Fe(CN)₆]⁴⁻, может быть непосредственно рассчитана по измеренной плотности тока с помощью параметров калибровочной кривой.

Для определения порядка реакции по какому-то компоненту можно пользоваться методом избытков, переводя порядок реакции по всем остальным компонентам в нулевой. Для подбора концентрации медиатора, при котором скорость реакции по нему становится нулевого порядка, варьировали его концентрацию в исследуемом растворе. Как можно видеть из рисунка 36, когда концентрация медиатора в 10 раз ниже концентрации фермента, то концентрация восстановленной формы медиатора не может быть обнаружена на электроде (кривая 1). Увеличение концентрации феррицианида в растворе приводит к увеличению концентрации его восстановленной формы, ферроцианида, однако для диапазона 0.055-0.25 мМ это увеличение происходит только в начальный момент времени, а через несколько минут после начала реакции концентрация [Fe(CN)₆]⁴⁻ практически не изменяется, что свидетельствует о лимитировании скорости электрохимической стадии на электроде концентрацией феррицианида. Начальная скорость биоэлектрохимического процесса, оцененная по начальным участкам кинетических кривых на рисунке 36, зависит от концентрации медиатора в растворе до концентрации в 1 мМ. Увеличение же концентрации медиатора свыше 1 мМ приводит к кинетике нулевого порядка по медиатору (рисунок 37), когда скорость реакции перестает зависеть от концентрации медиатора.

Конверсия медиатора в растворе через 30 минут от начала реакции составила 20 процентов для 1 мМ раствора медиатора и 5% для 5 мМ (рисунок 38), что говорит о недостатке медиатора в его разбавленных растворах и приводит к лимитированию скорости биоэлектрохимической реакции концентрацией медиатора.

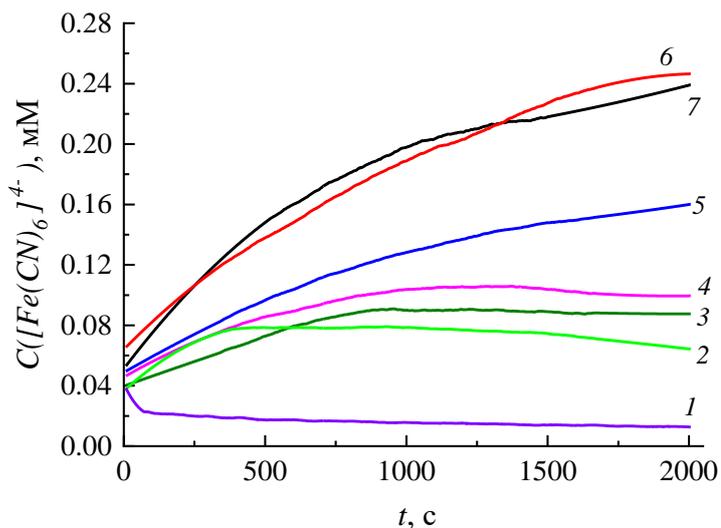


Рисунок 36 - Изменение концентрации $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ во времени в растворе с 0.6 мл белкового экстракта, полученного из 6-часовой культуры *E. coli* ВВ (0.06 мМ дегидрогеназ) и 4.6 мМ глюкозы в 0.5 М калий-фосфатном буферном растворе, рН 7.2 при 32 °С при различных начальных концентрациях $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$, мМ: 1 - 0.005; 2 - 0.055; 3 - 0.125, 4 - 0.139, 5 - 0.25; 6 - 0.5; 7 - 1.0. Перемешивание: 150 об/мин.

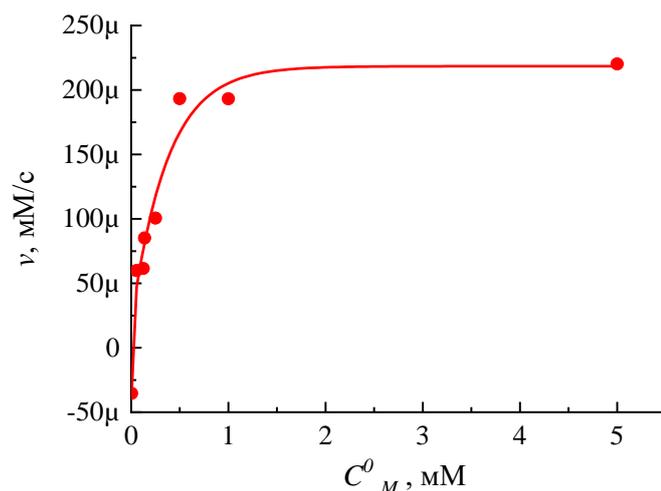


Рисунок 37 - Зависимость скорости окисления медиатора в растворе 0.6 мл белкового экстракта, полученного из 6-часовой культуры *E. coli* ВВ (0.06 мМ дегидрогеназ) и 4.6 мМ глюкозы в 0.5 М калий-фосфатном буферном растворе, рН 7.2 при 32 °С, от концентрации $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$. Перемешивание: 150 об/мин.

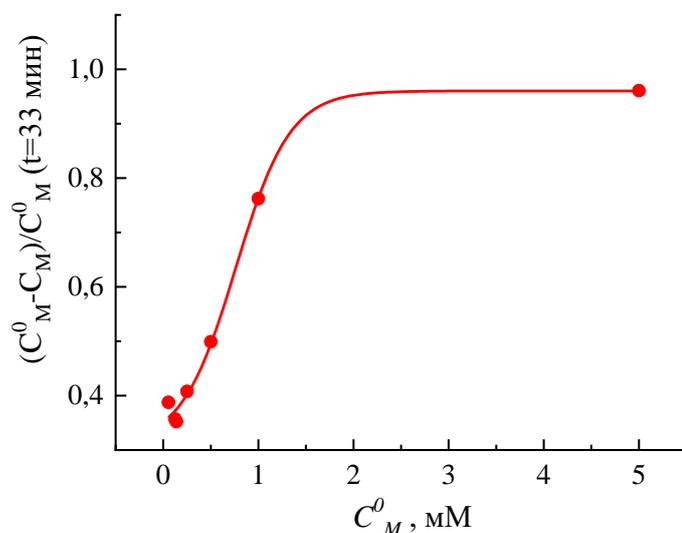
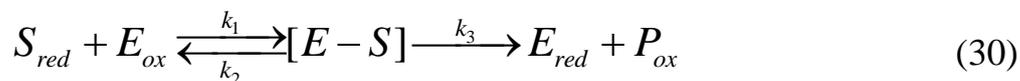
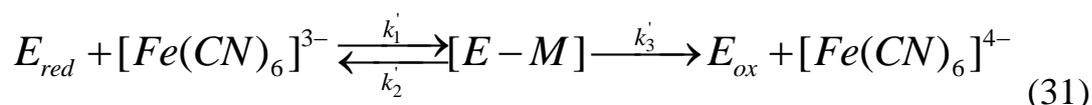


Рисунок 38 - Конверсия медиатора в растворе 0.6 мл белкового экстракта, полученного из 6-часовой культуры *E. coli* ВВ (0.06 мМ дегидрогеназ) и 4.6 мМ глюкозы в 0.5 М калий-фосфатном буферном растворе, рН 7.2 при 32 °С. Продолжительность эксперимента 2000 секунд. Перемешивание: 150 об/мин.

Таким образом, когда скорость реакции не зависит от концентрации медиатора, можно считать, что она лимитирована только параметрами биохимической реакции. Однако таких реакций в системе две. Одна связана с превращением глюкозы на ферментативном центре:



Вторая связана со взаимодействием иона феррицианида с ферментативным центром:



В квазистационарных условиях кинетика реакции ферментативного катализа (30) описывается уравнением Михаэлиса-Ментен:

$$v = \frac{dC_{M_{red}}}{dt} = \frac{dC_P}{dt} = \frac{k_3 C_E^0}{C_{Glucose} + K_M} C_{Glucose}, \quad (32)$$

где $C_{M_{red}}$ - концентрация восстановленной формы медиатора, C_P - текущая концентрация глюконолактона, который является основным продуктом реакции (27) [236], t - время реакции, C_E^0 - начальная концентрация фермента, K_M - константа Михаэлиса.

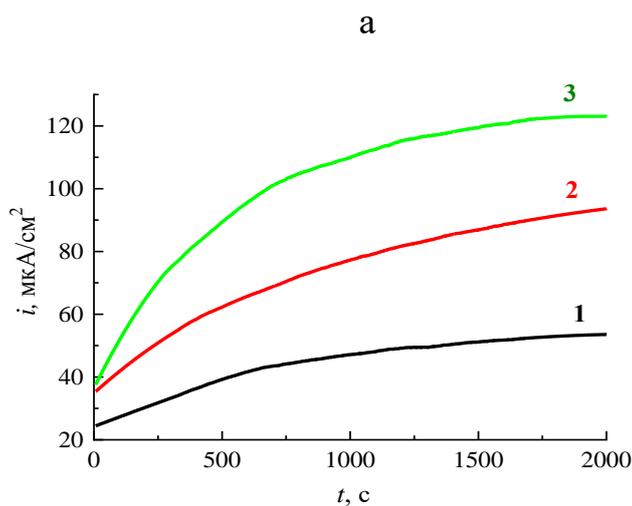
В условиях, когда концентрация глюкозы значительно превышает константу Михаэлиса, скорость биокаталитической реакции максимальна и зависит только от концентрации фермента:

$$v_{max} = \left(\frac{dC_P}{dt} \right)_{max} = k_3 C_E^0 \quad (33)$$

Аналогичный вид будет иметь кинетическое уравнение псевдопервого порядка для реакции (28) в условиях избытка медиатора. Для оценки максимальной скорости и константы скорости k_3 были проведены эксперименты с варьированием содержания экстракта в реакционной смеси. Как видно из рисунка 39 а, увеличение содержания фермента в растворе приводит к соответствующим изменениям плотности тока. Начальная

скорость процесса окисления глюкозы пропорциональна содержанию фермента в растворе (рисунок 39 б). Константа скорости, k_3 , рассчитанная как наклон этой зависимости, составила 0.004 с^{-1} . Величина константы скорости k_3 , отражающей число оборотов энзиматической реакции, для биохимических реакций должна находиться на уровне 10^6 с^{-1} . Полученная величина константы гораздо ниже, что свидетельствует о лимитировании скорости биокаталитического процесса в растворе стадией взаимодействия фермента с медиатором (уравнение 31), что согласуется с представлениями работы [138].

Следует отметить, что оценка скорости реакции и сопоставление влияния различных факторов на измеряемые токовые отклики проводилась только для короткого времени – не более 30 минут. Очевидно, что такой интервал времени не дает представления о развитии изучаемой биоэлектрохимической системы во времени. С другой стороны, во время продолжительного измерения эффект пассивации электрода, описанный в разделе 4.2, может вносить существенные погрешности в измеряемые токовые отклики. Поэтому для предотвращения пассивации электрода белковыми молекулами в длительных экспериментах измерения проводились по методике, описанной в разделе 2.5.4.



б

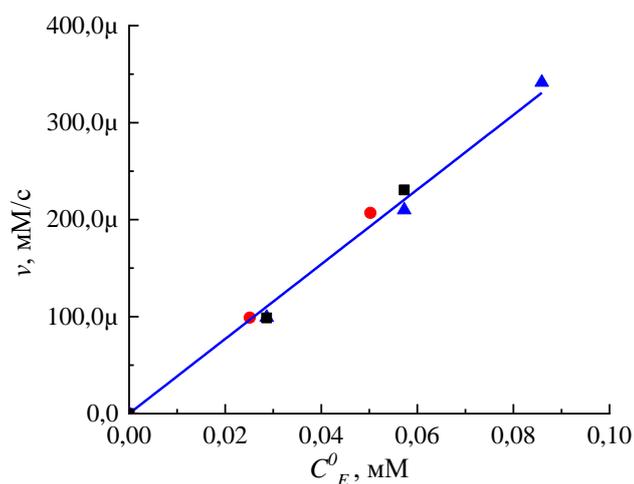


Рисунок 39 - Изменение плотности тока во времени при различных концентрациях экстракта (а) и зависимость максимальной скорости биокаталитической реакции от концентрации глюкозодегидрогеназы в растворе (б). Состав раствора: 5 мМ $K_3[Fe(CN)_6]$ и 4.6 мМ глюкозы в 0.5 М калий-фосфатном буферном растворе, рН 7.2 при 32 °С, 1- 0.3 мл экстракта (0.025 мМ), 2- 0.6 мл экстракта (0.050 мМ), 3- 0.9 мл экстракта (0.075 мМ). Экстракт получен из 6-часовой культуры *E. coli* ВВ. Перемешивание: 150 об/мин.

Как видно из рисунка 40 а, после 4 ч от начала запуска биоэлектрохимической реакции наблюдается резкий рост токовых откликов, замедляющийся к 8 часам. Такая форма длительной токовой кривой напоминает S-образную кривую развития системы, которая хорошо описывает динамику природных процессов, т.е. наличие индукционного периода [237].

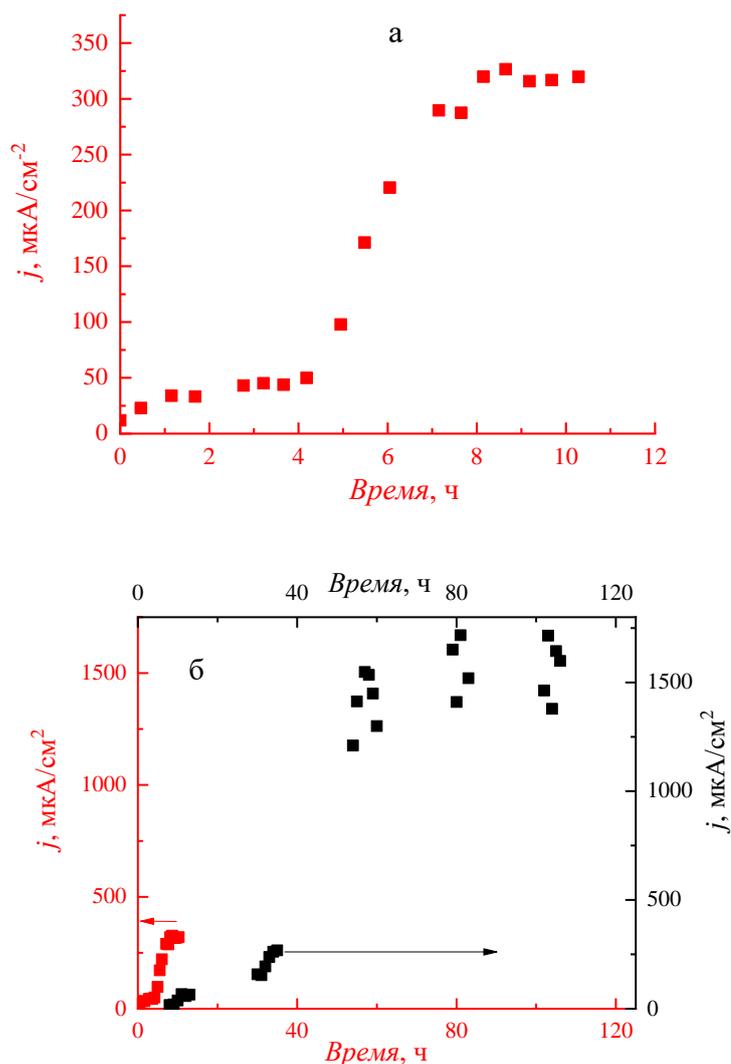


Рисунок 40 - Токовые отклики, полученные на стеклоуглеродном электроде в 0.5 М калий-фосфатном буферном растворе (рН 7.6), содержащем 5 мМ феррицианида калия, 2 мМ глюкозы, 0.6 мл экстракта, полученного из 6-часовой культуры *E. coli* ВВ. а – время измерения 12 ч, б – время измерения 110 ч (для новой партии экстракта), кривая (а) представлена для сравнения. Перемешивание: 150 об/мин. Температура: 37 °С.

Индукционный период может быть связан, например, с приобретением белковыми молекулами наиболее выгодной конформации в растворе, используемом в электрохимической ячейке. Для проверки этой гипотезы провели другой модельный эксперимент, в ходе которого рабочий раствор с

экстрактом был предварительно выдержан в течение 8 часов без поляризации, а затем поляризация при потенциале 0.5 В была продолжена в течение нескольких дней до установления стационарных токов. Как видно из рисунка 40 б, токовые отклики за 60 ч эксперимента выросли на порядок и стали стационарными. Следовательно, наблюдаемый рост токовых откликов не связан с приобретением ферментом выгодной конформации. Другим вариантом объяснения, которое наиболее подходит для интерпретации полученных данных, является работа каскада ферментов, которые начинают через некоторое время перерабатывать продукты, образовавшиеся в ходе работы дегидрогеназ.

Кинетические данные, найденные посредством электрохимических измерений, также могут быть использованы для вычисления энергии активации исследуемого процесса. Зависимость константы скорости реакции от температуры описывается уравнением Аррениуса. Эта зависимость была изучена в температурном диапазоне от 27 до 60 °С при найденных ранее оптимальных значениях рН и концентрации буферного раствора. Как видно из рисунка 41, эта зависимость хорошо согласуется с данными, полученными для чистых ферментов в реакции окисления глюкозы [235]. Энергия активации, вычисленная в температурном диапазоне 27...42 °С, составляет 35 кДж/моль. С одной стороны, это значение хорошо согласуется с известным диапазоном энергии активации 40...80 кДж моль⁻¹ для глюкозодегидрогеназных реакций [238]. С другой стороны, реакции десорбции и редокс-сорбции имеют аналогичный порядок значений энергии активации [239], и, таким образом, рассчитанное значение может соответствовать реакции взаимодействия фермента с медиатором по уравнению (31).

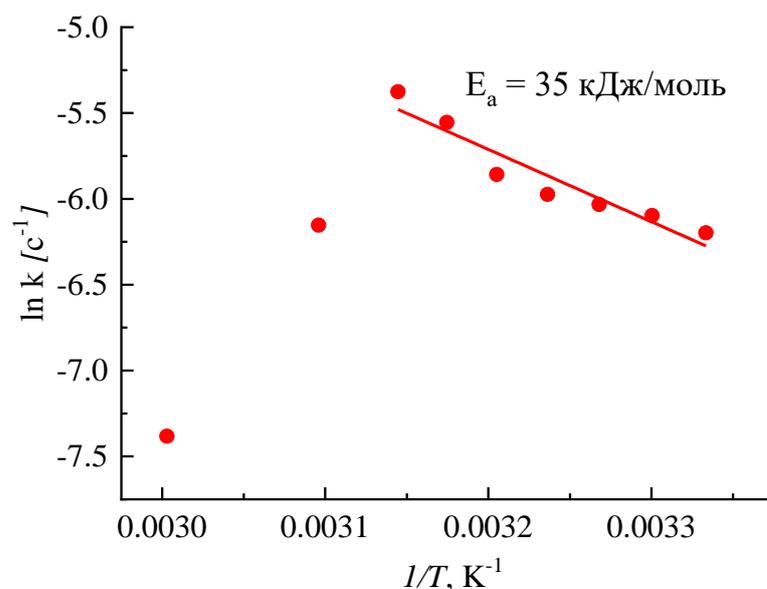


Рисунок 41 - Зависимость в координатах уравнения Аррениуса для константы скорости медиаторного биоэлектрохимического окисления глюкозы. Состав раствора: 0.6 мл белкового экстракта, полученного из 6-часовой культуры *E. coli* ВВ (0.06 мМ дегидрогеназ) и 5 мМ $K_3[Fe(CN)_6]$ в 0.5 М калий-фосфатном буферном растворе, рН 7.2.

4.7 Электрохимическая активность белкового экстракта после различных стадий очистки [240]

Поскольку установленные кинетические закономерности биоэлектрохимического процесса показали, что основной стадией, определяющей скорость процесса в целом, является стадия взаимодействия восстановленного активного центра фермента с медиатором, описываемая уравнением (31), то есть, окисления медиатором восстановленного кофермента, было важным провести проверку влияния концентрации кофермента на биоэлектродокаталитическую активность исследуемого биоанода. С этой целью первоначально проводили очистку белковых экстрактов методом диализа посредством мембран с различным размером пор (3.5; 12, 25, 50 кДа).

Проведение диализной очистки на мембранах, начиная с 3.5 кДа, приводит к полной потере дегидрогеназной активности (таблица 28). Это связано с вымыванием кофермента из активного центра белка в ходе диализа. При введении в экстракт кофермента НАД (никотинамидадениндинуклеотид) дегидрогеназная активность вновь проявляется во всех 4 изученных образцах (таблица 28).

Таблица 28. Результаты исследования влияния проведения диализа на дегидрогеназную активность грубых белковых экстрактов, полученных из 6-часовой культуры *E. coli* ВВ.

Условия эксперимента	Дегидрогеназная активность, мг формазана/мл
без диализа	0.20
после диализа 3.5 кДа	отсутствует
после диализа 12-14 кДа	отсутствует
после диализа 25 кДа	отсутствует
после диализа 50 кДа	отсутствует
после диализа 3.5 кДа с добавлением кофермента НАД	0.15
после диализа 12-14 кДа с добавлением кофермента НАД	0.13
после диализа 25 кДа с добавлением кофермента НАД	0.20
после диализа 50 кДа с добавлением кофермента НАД	0.14

Для определения изменения электрохимической активности подвергнутых диализу экстрактов белка с и без добавок кофермента первоначально важно было убедиться в отсутствии прямого электрохимического взаимодействия кофермента и медиатора с глюкозой и с электродом при заданном потенциале поляризации. С этой целью первоначально регистрировали фоновые кривые с коферментом НАД и другими реагентами (медиатор и глюкоза) изучаемого процесса без биоэлектродокатализатора. Как следует из рисунка 42, токовые отклики

электрода в растворах, содержащих кофермент, субстрат и медиатор находятся на уровне фоновых, то есть, эти компоненты раствора электрохимически инертны.

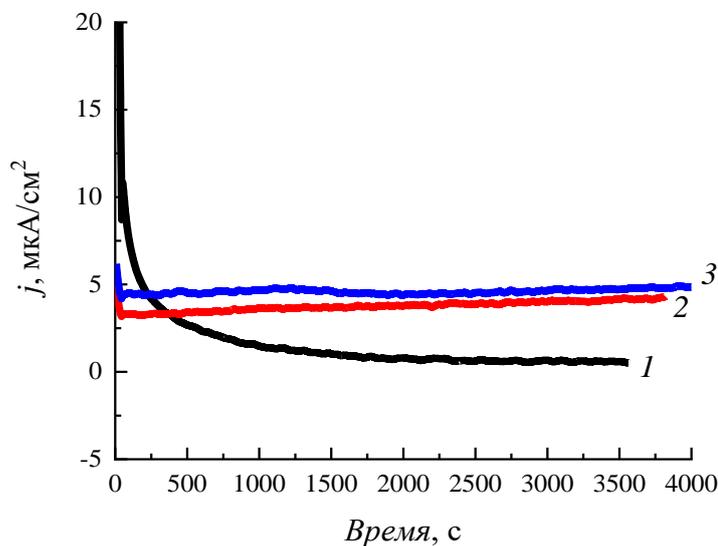


Рисунок 42 - Изменение токового отклика на стеклоуглеродном электроде в 0.5 М калий-фосфатном буферном растворе (рН 7.6), содержащем $1 \cdot 10^{-3}$ НАД (1), $1 \cdot 10^{-3}$ НАД и 5 мМ феррицианида калия (2), $1 \cdot 10^{-3}$ НАД, 5 мМ феррицианида калия и 2 мМ глюкозы (3). Перемешивание: 150 об/мин. Температура: 35 °С.

После оценки электроактивности отдельных компонентов раствора биоанода изучали электрокаталитическую активность белковых экстрактов после диализа. Оказалось, что электрохимическая активность подвергнутых диализу экстрактов, как и дегидрогеназная активность (таблица 28), отсутствует (рисунок 43, кривая 1). При добавлении в рабочий раствор кофермента НАД токовые отклики начали возрастать, причем, с увеличением концентрации НАД возрастала и плотность генерируемого тока (рисунок 43).

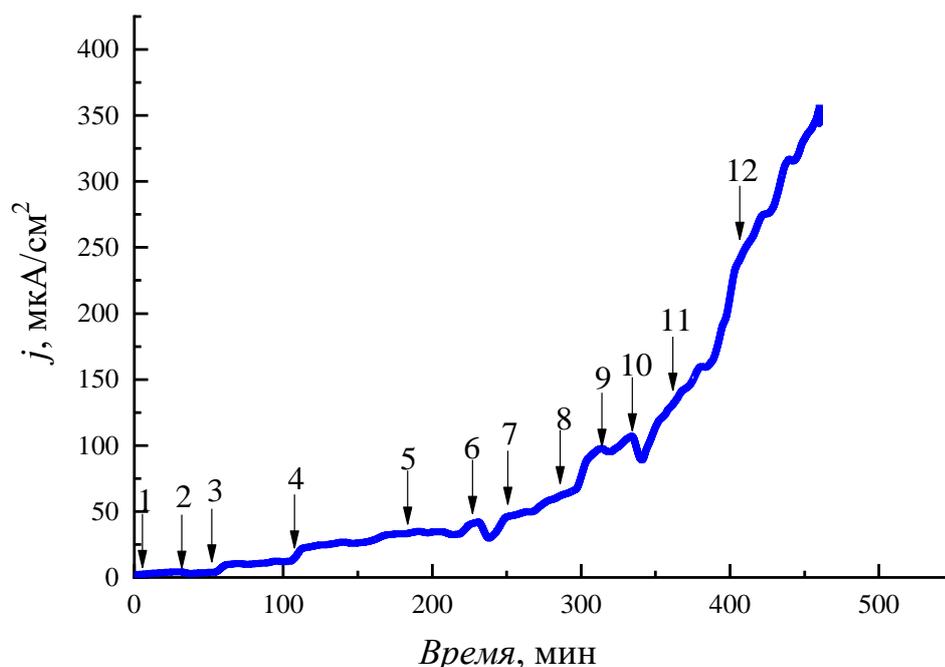


Рисунок 43 - Электрокаталитическая активность грубых экстрактов после диализа на мембране 3.5 кДа с введением различных концентраций кофермента НАД. Система: 0.5 М калий-фосфатный буферный раствор, pH 7.6, 0.6 мл экстракта + 4.6 мМ глюкозы + 5 мМ $K_3Fe(CN)_6$ + X М кофермента. **1** – без введения кофермента, **2** – 0.36 мкМ НАД, **3** - 2.1 мкМ НАД, **4** - 3.1 мкМ НАД, **5** - 3.5 мкМ НАД, **6** – 6 мкМ НАД, **7** – 10 мкМ НАД, **8** – 20 мкМ НАД, **9** – 30 мкМ НАД, **10** – 40 мкМ НАД, **11** – 60 мкМ НАД, **12** – 100 мкМ НАД. Перемешивание: 150 об/мин. Температура: 35 °С.

Важно отметить, что добавка НАД влияет именно на возникновение биохимической активности белка, что подтверждают и дополнительно проведенные эксперименты по определению дегидрогеназной ТТХ-активности экстрактов с добавкой кофермента (таблица 29). В работе [241] обсуждалась электроактивность глюкозооксидазы при переходе из апо- в холо-форму и была показана аналогичная закономерность.

Таблица 29. Влияние добавок кофермента НАД на экстракты, не подвергавшиеся процессу диализа. Образец 1: экстракт, полученный из 24-часовой культуры *E. coli* ВВ, разведенный в 3 раза 50 мМ калий-фосфатным буферным раствором, рН 7.2.

Образец	Концентрация формазана, мг/мл
Образец 1 + 0 мМ НАД	0.67
Образец 1 + 5 мМ НАД	3.09
Образец 1 + 8 мМ НАД	2.55
Образец 1 + 10 мМ НАД	2.18
Образец 1 + 25 мМ НАД	0.77

Таким образом, действительно, стадия (31) биоэлектрокаталитического процесса, протекающего в исследуемом биоаноде, является определяющей для скорости всего исследуемого процесса.

Без добавления в раствор глюкозы добавки НАД или НАДФ не приводят к возникновению токов в исследуемой биоанодной системе (рисунок 44). При этом, следует отметить, что исходный экстракт, не подвергавшийся диализу, содержит небольшое количество глюкозы, что приводит к возникновению токовых откликов в системе без добавок глюкозы в растворе биоанода (рисунок 44, кривая 5). Отсутствие токовых откликов в системе с экстрактом, прошедшим диализную очистку на мембранах 3.5 кДа, без добавления глюкозы в раствор свидетельствует о полном удалении низкомолекулярных веществ из системы.

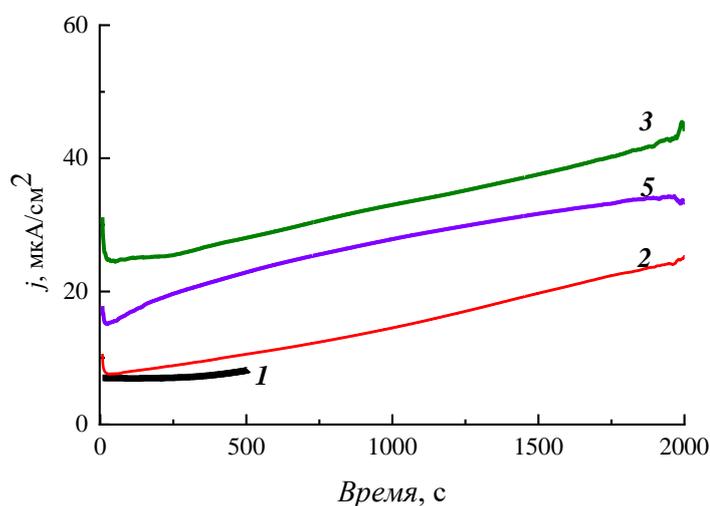
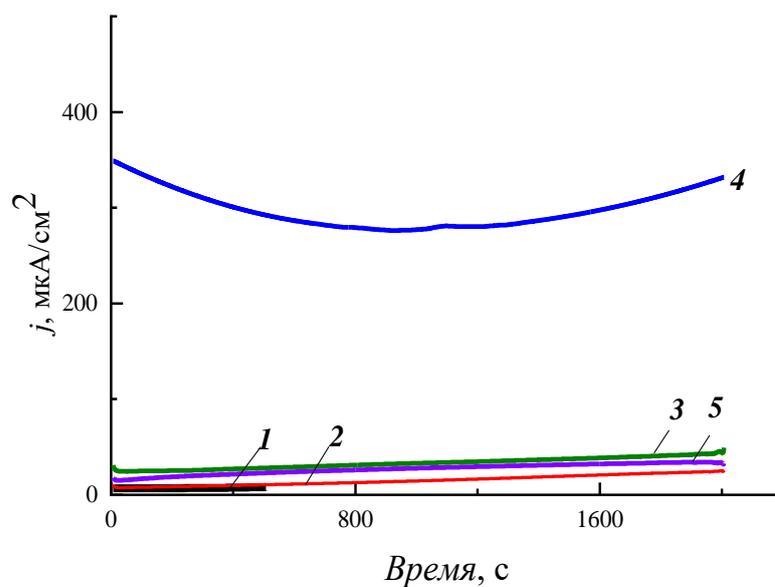


Рисунок 44 - Изменение токового отклика на стеклоуглеродном электроде в 0.5 М калий-фосфатном буферном растворе (рН 7.6), содержащем 0.6 мл экстракта после диализа на мембране 3.5 кДа, 5 мМ $K_3Fe(CN)_6$ и X М кофермента. 1 – экстракты после диализа без введения в систему кофермента (система I), 2 – система I + 10 мкМ НАД (система II), 3 – система II + 10 мкМ НАД+10 мкМ НАДФ (система III), 4 – через 15 часов после инкубации реакции, 5 - 0.6 мл экстракта до диализа + 5 мМ феррицианида калия. Перемешивание: 150 об/мин. Температура: 35 °С.

Для экстрактов после диализа на мембранах 3.5, 12-14, 25 и 50 кДа были измерены токовые отклики при добавках различных концентраций коферментов (НАД и НАДФ), величины которых, установившиеся к 30 минуте измерений, представлены в таблицах 30 и 31.

Таблица 30. Токовые отклики для экстрактов после диализа на мембранах 12-14 кДа и 25 кДа. Система: 5 мМ феррицианида + 4.6 мМ глюкозы + X М кофермента + 0.6 мл экстракта в 0.5 М калий-фосфатном буферном растворе, рН 7.6. Перемешивание: 150 об/мин. Температура: 35 °С.

Концентрация и тип кофермента	j , мкА·см ⁻²
<i>экстракт после диализа 12-14 кДа</i>	
0 М	8.4
1.9 мкМ НАДФ	17.6
<i>экстракт после диализа 25 кДа</i>	
0 М	2.1
0.3 мкМ НАДФ	7.0
2.1 мкМ НАДФ	17.5
2.6 мкМ НАДФ	15.0
2.6 мкМ НАДФ + 1.8 мкМ НАД	23.9

Для экстрактов после диализа в 12-14 и 25 кДа был испытан кофермент НАДФ. В этом случае в системе «экстракт+медиатор» плотность тока составляет 3.9 мкА/см², находясь на уровне значения фоновых откликов. При введении в систему «медиатор+экстракт+субстрат» 5 мкМ кофермента НАДФ плотность тока выросла до 17.6 мкА/см². Для экстракта после диализа на мембране 25 кДа введение кофермента НАДФ в концентрации 0.3 мкМ не приводит к резким изменениям токовых откликов (кривая продолжает расти с той же динамикой, что и для системы без кофермента). При концентрации 2.1 мкМ НАДФ плотность тока возрастает до 17.5 мкА/см². Можно заметить при сопоставлении данных таблиц 29 и 30, что кофермент НАДФ не дает сильного прироста в токовых откликах в отличие от кофермента НАД. Так, при введении в рабочий раствор близких по значению концентраций НАД в системе с экстрактом после диализа 3.5 кДа наблюдаются более высокие

значения токовых откликов (3.5 мкМ НАД – 33 мкА/см², 6 мкМ НАД – 45 мкА/см²), а добавление НАД в систему с НАДФ для экстрактов после диализа на мембране 25 кДа происходит возрастание плотности токовых откликов до 24 мкА/см². Соответственно, глюкозодегидрогеназные системы данного экстракта являются НАД-зависимыми.

Таблица 31. Сводная таблица токовых откликов, полученных в биоэлектрохимической системе с экстрактами после диализа.

Система: 0.5 М калий-фосфатный буферный раствор, рН 7.6, 0.6 мл экстракта + 4.6 мМ глюкозы + 5 мМ K₃Fe(CN)₆ + X М кофермента. Перемешивание: 150 об/мин. Температура: 35 °С.

Концентрация кофермента НАД, мкМ	j, мкА·см ⁻²	j _{уд} , мкА см ⁻² мг ⁻¹
<i>Экстракт после диализа на мембране 3.5 кДа</i>		
4	35.8	208
10	50	287
20	68	390
30	97	559
40	112	648
60	160	924
<i>Экстракт после диализа на мембране 50 кДа</i>		
10	14	230
20	26	435
<i>Исходный экстракт</i>		
5	77.3	274
10	98.8	350

Примечание: *Экстракт после диализа на мембране 50 кДа был взят объемом 0.3 мл.

Для экстракта после диализа на мембране 50 кДа без введения кофермента также наблюдаются токовые отклики на уровне фоновых (рисунок 45). Вводимый объем экстракта после диализа на мембране 50 кДа в рабочий раствор электрохимической ячейки составил всего 0.3 мл. Тем не менее, при добавлении кофермента НАД в концентрации 10 мкМ удельная плотность тока выросла до 230 мкА см⁻² мг⁻¹, что сопоставимо с удельной

плотностью тока ($287 \text{ мкА см}^{-2} \text{ мг}^{-1}$) для экстракта после диализа 3.5 кДа при той же концентрации кофермента (таблица 31). А при добавлении кофермента НАД в концентрации 20 мкМ удельная плотность тока выросла до $435 \text{ мкА см}^{-2} \text{ мг}^{-1}$, что сопоставимо с удельной плотностью тока ($390 \text{ мкА см}^{-2} \text{ мг}^{-1}$) для экстракта после диализа 3.5 кДа при той же концентрации кофермента (таблица 31). Это подтверждает тот факт, что концентрация кофермента играет решающую роль для кинетики изучаемого процесса.

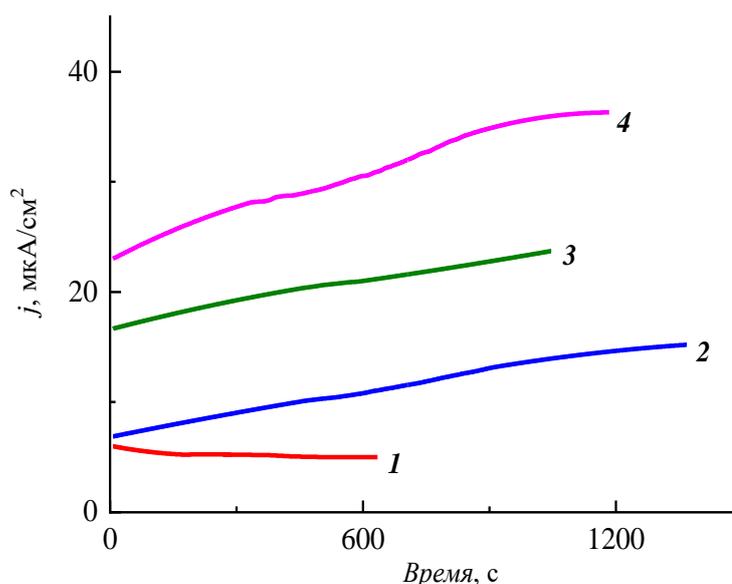


Рисунок 45 - Электрокаталитическая активность экстрактов после диализа на мембране 50 кДа. Система: 0.5 М калий-фосфатный буферный раствор, pH 7.6, 0.3 мл экстракта + 4.6 мМ глюкозы + 5 мМ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ + X М НАД + X М НАДФ. 1 – без введения коферментов, 2 – система 1 с добавкой 10 мкМ НАД, 3 – система 2 с добавкой НАД до 30 мкМ, 4 – система 3 с добавкой 10 мкМ НАДФ. Перемешивание: 150 об/мин. Температура: 35 °С.

Для исходного экстракта без диализа добавка разных концентраций кофермента также приводит к возрастанию токовых откликов (рисунок 46). При введении 4.8 мкМ НАД в ячейку с неочищенным экстрактом удельная плотность тока достигла $274 \text{ мкА см}^{-2} \text{ мг}^{-1}$. При схожей концентрации (3.8 мкМ НАД) введенного кофермента для экстракта после диализа на мембране 3.5 кДа удельная плотность тока составила $208 \text{ мкА см}^{-2} \text{ мг}^{-1}$. При увеличении

концентрации НАД до 10 мкМ в ячейке с неочищенным экстрактом удельная плотность тока достигла $350 \text{ мкА см}^{-2} \text{ мг}^{-1}$. При той же концентрации введенного кофермента для экстракта после диализа на мембране 3.5 кДа удельная плотность тока составила $287 \text{ мкА см}^{-2} \text{ мг}^{-1}$, а для экстракта после диализа на мембране 50 кДа – $230 \text{ мкА см}^{-2} \text{ мг}^{-1}$ (таблица 31). Таким образом, плотность тока при добавлении кофермента у неочищенного экстракта выше, чем плотность тока у экстрактов после диализа при введении той же концентрации кофермента, что является типичной картиной для активности кофермент-зависимых ферментативных систем при недостатке кофермента.

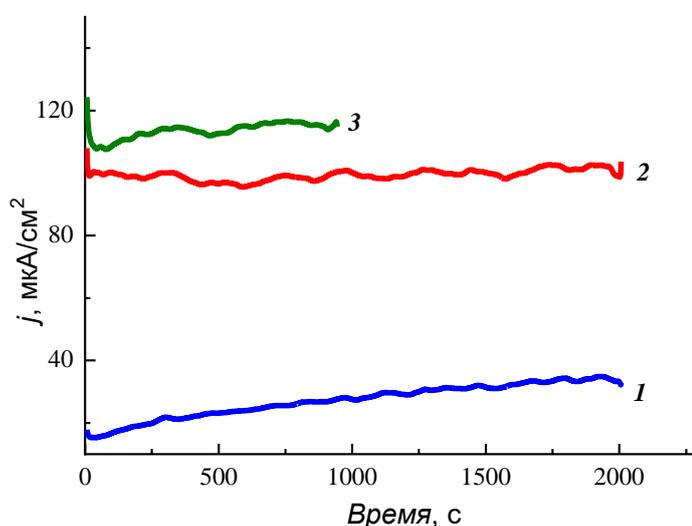


Рисунок 46 - Электрокаталитическая активность экстрактов без диализа при добавлении коферментов. Система: 0.5 М калий-фосфатный буферный раствор, pH 7.6, содержащий 0.6 мл экстракта, 4.6 мМ глюкозы, 5 мМ феррицианида калия (1), 2 - система (1) с добавкой 10 мкМ НАД, 3 – система (2) с добавкой 10 мкМ НАДФ. Перемешивание: 150 об/мин. Температура: 35 °С.

Возрастание токовых откликов в системе с биоанодом, содержащим неочищенный диализом экстракт, при введении добавок кофермента указывает на некоторый дефицит НАД в исходном экстракте. Поскольку биоэлектрокаталитический процесс чувствителен к скорости стадии (уравнение 31) – взаимодействия восстановленного активного центра

фермента с медиатором, увеличение концентрации НАД и, соответственно, его восстановленной формы после окисления глюкозы ферментом по реакции (уравнение 30), приводит к возрастанию концентрации восстановленной формы медиатора и, как следствие, измеряемых токовых откликов.

Коферментам НАД и НАДФ соответствуют глюкоза 1-дегидрогеназа ЕС 1.1.1.47, глюкоза 1-дегидрогеназа ЕС 1.1.1.118. Такие ферменты называют НАД-зависимыми дегидрогеназами. Однако, помимо дегидрогеназ за окисление глюкозы может отвечать глюкозооксидаза – ФАД-зависимый фермент. Для того, чтобы убедиться в отсутствии ФАД-зависимого фермента в исследуемой системе был проведен ряд экспериментов с добавлением кофермента ФАД (флавинадениндинуклеотид) к экстрактам после диализа. В системе «медиатор+экстракт+глюкоза» не наблюдалось существенных токовых откликов (рисунок 47, 1). Введение кофермента ФАД в рабочий раствор не привело к каким-либо изменениям в токовых откликах (рисунок 47, 2). Таким образом, ФАД-зависимых ферментов, способных к окислению глюкозы, в исследуемом экстракте не содержится.

Тем не менее, поскольку получаемый экстракт должен содержать набор ферментов, в том числе, участвующих в цикле Кребса, то интересным было бы оценить, сохраняется ли активность этих ферментов в экстракте. Среди ферментов цикла Кребса у *E. coli* есть сукцинатдегидрогеназа, которая является ФАД зависимой и окисляет кислотный остаток янтарной кислоты. Действительно, при добавлении к исследуемому рабочему раствору, содержащему очищенный диализом белковый экстракт, янтарной кислоты вместо глюкозы в качестве субстрата, которая при участии кофермента ФАД сукцинатдегидрогеназой трансформируется в фумаровую кислоту, наблюдалось мгновенное возрастание токовых откликов (рисунок 47, 3). Таким образом, в композицию ферментных систем белкового экстракта входит сукцинатдегидрогеназа, которая сохраняет свою активность и катализирует окисление сукцината в фумарат, что позволяет получать

электрохимические отклики при использовании в качестве топлива янтарной кислоты.

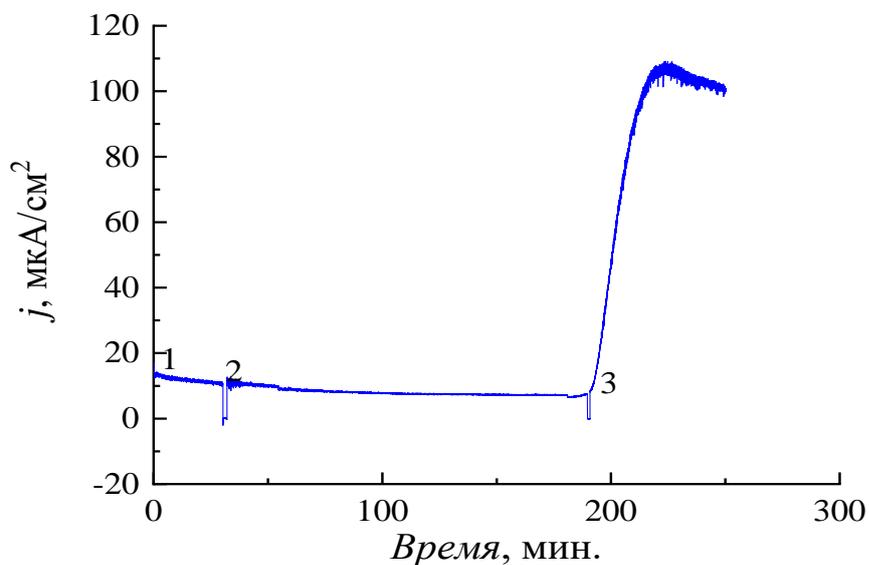


Рисунок 47 - Биоэлектрокаталитическая активность белковых экстрактов после диализа на мембране 3.5 кДа с введением кофермента ФАД. Системы: 1 – 5 мМ $K_3Fe(CN)_6$ + 4.6 мМ глюкозы + 0.6 мл экстракта после диализа в 0.5 М калий-фосфатном буферном растворе, рН 7.6. 2 – система 1 + 0.1 мМ ФАД. 3 – система 2 + 4.6 мМ янтарной кислоты. Перемешивание: 150 об/мин. Температура: 35 °С.

4.8 Снижение токовых потерь от пассивации электрода при помощи диализных мембран

Электрохимическая реакция (29) превращения восстановленной формы медиатора, сформировавшейся в ходе биохимической стадии (28), протекает в диффузионно-контролируемом режиме. В связи с этим наличие перемешивания (создание конвективного потока) в растворе биоанода оказывает заметное влияние на величины измеряемых токовых откликов, как видно из сопоставления характера кривых 1-3 рисунка 48, которые получены для одного и того же биоанода при включении перемешивания (кривая 1), затем при остановке перемешивания (кривая 2) и при повторном включении

перемешивания (кривая 3). Измерение при каждом последовательно сменяющемся режиме длилось 30 минут. С другой стороны, создание конвекции облегчает подвод к поверхности электрода не только электроактивных частиц медиатора, но и белковых молекул, содержащихся в экстракте, которые являются электрохимически неактивными. Адсорбция белковых молекул на поверхности электрода может приводить к угнетению токовых откликов за счет уменьшения электроактивной поверхности. Действительно, после зачистки рабочей поверхности электрода токовые отклики возрастают (рисунок 48, кривая 4), то есть, пассивация поверхности электрода белковыми молекулами приводит к двукратному и более снижению токовых откликов. Следует отметить, что зачистка электрода не является решением проблемы, поскольку на обновленную электродную поверхность происходит повторная адсорбция молекул белков, что приводит к постепенному снижению электрохимически активной площади поверхности и, соответственно, падению токовых откликов.

Для предотвращения пассивации электрода прибегают к разным техникам. Так, в биосенсорах используют нерастворимые формы медиаторов, наносимые на электрод и пленки из ферментов с полимерным связующим, наносимые поверх медиатора (метод нанесения слой-за-слоем) [242–244]. В биотопливных элементах на живых микроорганизмах используют технологию выращивания биопленок на поверхности электрода или используют мембранные сепараторы, отделяющие клеточные массы от рабочего раствора, в котором находится медиатор и электрод [245–248]. Следуя идеологии этих работ, для защиты электрода от адсорбции биомолекул его помещали в диализные мембраны 3.5 и 25 кДа, сохраняя таким образом возможность диффузии ферроцианида к электроду. Как видно из рисунка 48, применение диализного мешка в качестве фильтра для белковых глобул привело к уменьшению токовых откликов на 26% (кривая 5) по сравнению со снятыми после зачистки электрода (кривая 4). Кроме того, хроноамперограмма приобрела пилообразный вид. Можно полагать, что есть значительные

проблемы для транспорта восстановленной формы медиатора из объема раствора к электроду через диализный мешок. Тем не менее, пассивации электрода, судя по отсутствию тенденции к снижению токовых откликов у кривой 5, в такой системе не происходит. Вероятно, при некоторой конструкционной доработке такой метод защиты электрода можно использовать и на практике.

Электрохимическая активность, проявляемая экстрактом, полученным из клеток *E. coli*, требует сопоставления с электрохимическим поведением живых клеток, где все ферменты находятся внутри клетки. Поскольку феррицианид калия взаимодействует с коферментами белковых молекул и по сведениям [213] способен переносить электроны и с живых клеток, возможна проверка электрохимической активности *E. coli* при подобранных оптимальных параметрах для грубых белковых экстрактов *E. coli*.

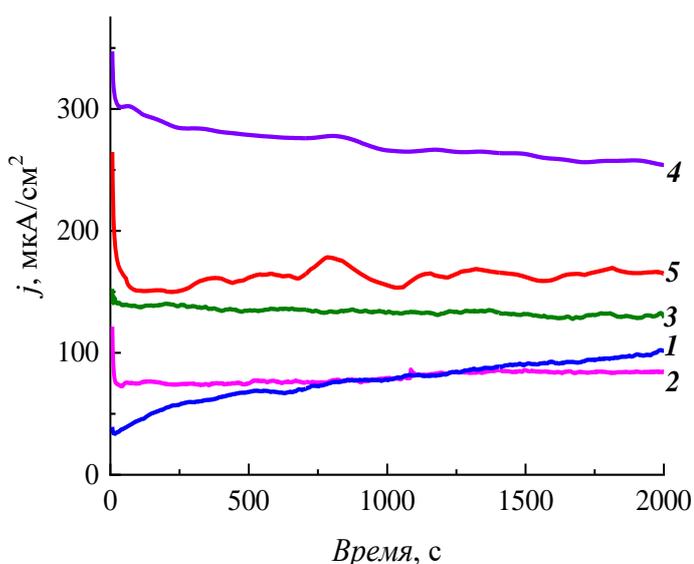


Рисунок 48 - Электрохимические отклики, полученные на стеклоуглеродном электроде в 0.5 М калий-фосфатном буферном растворе, pH 7.6, содержащем 2 мл экстракта и 5 мМ феррицианида калия при разных режимах перемешивания и с/без применения диализного мешка. Потенциал поляризации 0.5 В. Режим конвекции: 1 – перемешивание раствора, 150 об/мин; 2 – без перемешивания; 3 – включение перемешивания раствора, 150 об/мин; 4 - режим с перемешиванием, 150 об/мин, после зачистки электрода;

5 - режим с перемешиванием, 150 об/мин, электрод отделен от рабочего раствора диализной мембраной 3.5 кДа. Температура: 35 °С.

4.9 Пробные испытания биоэлектрохимической активности живых клеток *E. coli* [249]

Электрохимические измерения живых клеток *E. coli* в трехэлектродной электрохимической ячейке проводили в калий-фосфатном буферном растворе в качестве электролита. Введение живых клеток в рабочий раствор, содержащий 2 мМ глюкозу в отсутствие медиатора, не приводило к изменению токовых откликов электрода в сравнении с фоновыми. Введение медиатора феррицианида калия, как и в случае с экстрактом, привело к резкому росту токовых откликов исследуемой системы.

Концентрация медиатора была выбрана первоначально 5 мМ, поскольку для белковых экстрактов было показано, что при этой концентрации наблюдается нулевой порядок реакции по концентрации медиатора [190]. Однако в системе с живыми клетками за 10 минут измерений наблюдалось обесцвечивание рабочего раствора, характерное для полного перехода медиатора из окисленной формы феррицианида (желтый) в восстановленную ферроцианида (прозрачный). Поскольку площадь электрода мала, то за счет электродной реакции концентрация окисленной формы медиатора в растворе не успевает восстановиться, и ток быстро становится предельно диффузионным по концентрации восстановленной формы медиатора, которая уже не зависит от скорости или полноты осуществления биохимической реакции в растворе (рисунок 49, кривая 2).

Добавка окисленной формы медиатора в рабочий раствор до общей концентрации 10 мМ (рисунок 49, кривая 3) привела к резкому возрастанию токовых откликов за счет быстрого перехода добавленного медиатора в восстановленное состояние в результате гомогенной реакции с ферментной системой микроорганизмов в растворе. Далее раствор стал вновь

обесцвечиваться. Удвоение концентрации глюкозы не привело к существенным изменениям в токовых откликах (рисунок 49, кривая 4). Повторное увеличение концентрации медиатора в рабочем растворе вдвое (рисунок 49, кривая 5) вновь вызвало скачкообразный рост токового отклика системы, а последующее снижение плотности тока замедлилось.

Увеличение концентрации медиатора на порядок, до 0.2 М, увеличило токовые отклики незначительно, до 1 мА/см², но раствор перестал обесцвечиваться с течением времени, и ток стал стационарным.

Удвоение концентрации клеток *E. coli* в рабочем растворе привело к резкому росту токовых откликов до 4.5 мА/см² (рисунок 50, кривая 1), но затем токовые отклики стали снижаться. Вероятными причинами снижения токовых откликов могли быть пассивация поверхности стеклоуглеродного рабочего электрода за счет адсорбции инактивных молекул или самих клеток микроорганизмов, а также расходование глюкозы и замедление биохимической реакции. Как видно из рисунка 50, после зачистки электрода (кривая 2) токовые отклики возрастают, и плотность тока выходит на стационарный уровень в 6.7 мА/см². Через некоторое время, однако, вновь начинается снижение, связанное, видимо, с повторной пассивацией электрода. Увеличение концентрации глюкозы, напротив, не привело к значительным увеличениям плотности тока. Дополнительные эксперименты с концентрацией феррицианида показали, что концентрация в 0.1 М является достаточной для 0.79 мг клеток (в пересчете на абс. сухие клетки).

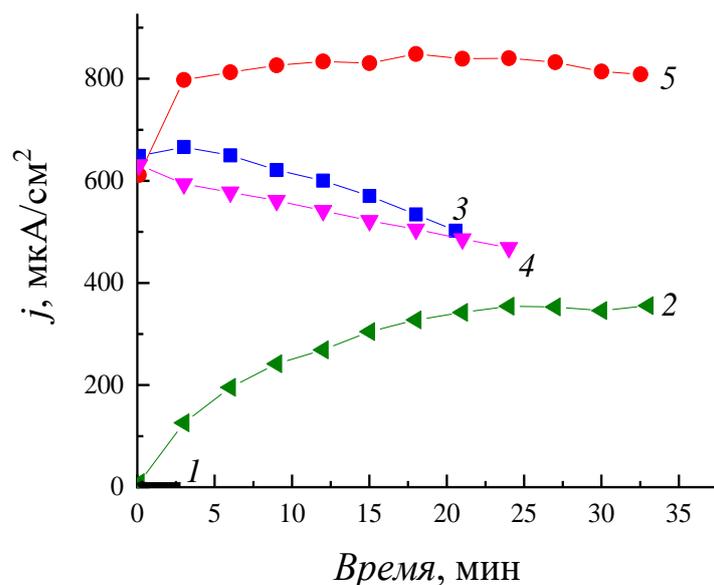


Рисунок 49 - Токвые отклики, полученные при поляризации 0.5 В на стеклоуглеродном электроде в 0.5 М калий-фосфатном буферном растворе, рН 7.6. Состав растворов: (1) 5 мМ феррицианид калия и 2 мМ раствор глюкозы; (2) система (1) с добавлением 0.79 мг клеток *E. coli*; (3) система (2) с добавлением 5 мМ феррицианида калия; (4) система (3) с добавлением 2 мМ глюкозы; (5) система (4) с добавлением 10 мМ феррицианида калия. Температура 37 °С.

Поскольку для экстракта биомассы было обнаружено влияние состава буферной системы на биоэлектрохимическую активность [201], была сделана попытка оценить также аналогичное влияние для живых клеток.

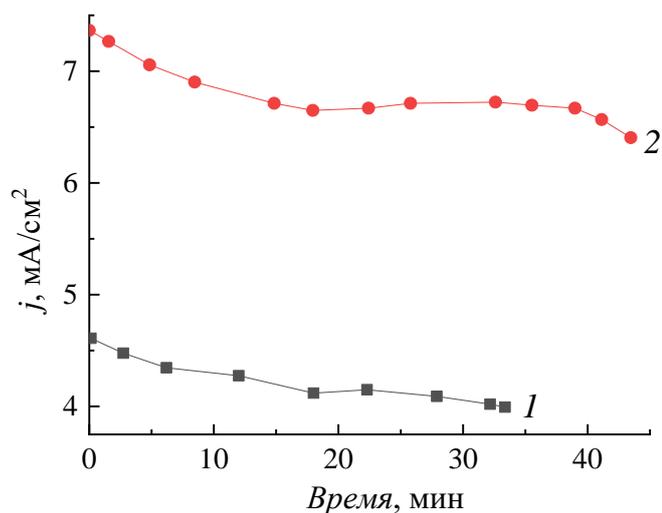


Рисунок 50 - Зависимость плотности тока от времени на стеклоуглеродном электроде при потенциале 0.5 В в системе (1) 1.58 мг *E. coli*, 0.2 М $K_3[Fe(CN)_6]$, 2 мМ $C_6H_{12}O_6$, (2) в той же системе после зачистки рабочего электрода. Фоновый электролит 0.5 М калий-фосфатный буферный раствор (рН 7.6). Температура 37 °С.

Концентрация медиатора заранее была взята в избытке, 0.1 М. Токовые отклики, генерируемые в буферной системе TRIS в качестве фонового электролита, изначально были выше (рисунок 51, кривая 1), чем при использовании в аналогичных условиях калий-фосфатного буферного раствора (рисунок 51, кривая 2). Однако со временем наблюдалось угнетение токовых откликов, в то время как для системы с калий-фосфатным буферным раствором отмечалось постепенное возрастание и стабилизация тока. Так, через 4 часа для системы на основе TRIS плотность тока упала до 1.5 mA/cm^2 , а для системы на основе калий-фосфатного буферного раствора плотность тока возросла до 1.8 mA/cm^2 . При этом в системе с буферным раствором TRIS раствор приобретал зеленый цвет и ядовитый запах, что, очевидно, негативно сказывалось как на электрохимическом поведении системы, так и на стабильности работы живых клеток в биохимической реакции.

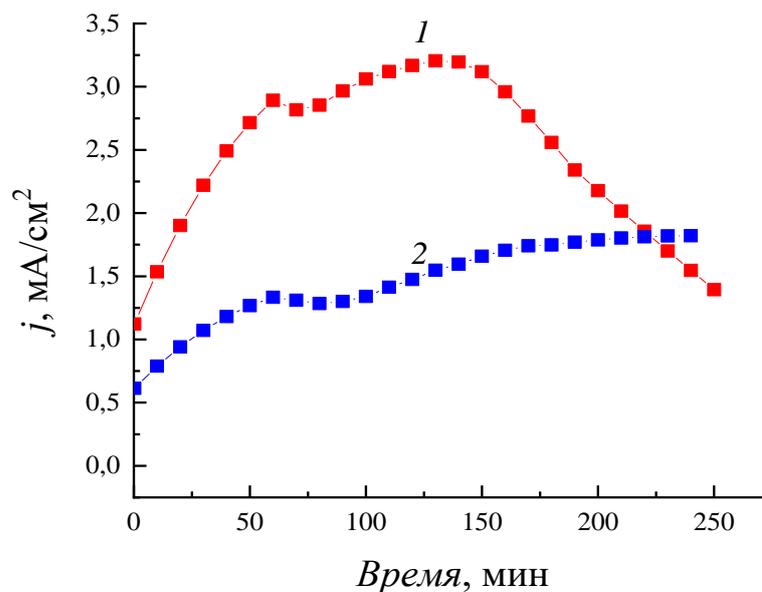


Рисунок 51 - Токвые отклики, полученные при поляризации 0.5 В на стеклоуглеродном электроде в 0.1 М буферном растворе TRIS pH 7.2 (1), в 0.5 М калий-фосфатном буферном растворе pH 7.6 (2). Состав рабочего раствора: 0.79 мг клеток *E. coli*, 2 мМ глюкозы и 0.1 М феррицианида калия. Температура 37 °С.

Таким образом, в результате тестовых экспериментов было обнаружено, что биоанод, организованный на основе биохимической реакции окисления глюкозы живыми клетками *E. coli*, работает по принципу медиаторного электрокатализа. Было подтверждено, что феррицианид-ион проявляет в реакции с живыми клетками такую же активность, как обнаруженную ранее для белкового экстракта на основе *E. coli*. При этом, как и для белкового экстракта, проявляется влияние концентрации медиатора на кинетику биоэлектрохимической реакции с живыми клетками. Также было показано, что установленная необходимая концентрация медиатора для белковых экстрактов является недостаточной для живых клеток. Учитывая дегидрогеназную активность экстракта и живых клеток (0.02 мг/мл и 1.01 мг/мл соответственно), получается, что для нулевого порядка реакции по концентрации медиатора для экстракта нужно создать 6-ти кратный избыток медиатора (в ммольях медиатора на единицу ДГА), а для живых клеток

достаточно лишь 1.5-кратного. Следовательно, экстракт является более активным с точки зрения взаимодействия с медиатором, но его количество, которое потребуется внести для обеспечения сопоставимых величин ДГА, нужно увеличить в 50 раз, что приведет к увеличению и неэлектроактивных компонентов в рабочем растворе, способных пассивировать поверхность электрода. Негативный фактор, сказывающийся на продолжительности работы биоанода, как и в случае белковых экстрактов, – постепенная пассивация поверхности электрода неактивными компонентами системы, что приводит к падению токовых откликов в системе.

4.10 Апробация работы модельного биотопливного элемента с белковым экстрактом в качестве анодного катализатора [190]

Поскольку конструкция модельной асимметричной биотопливной ячейки с воздушным катодом (20 мас.% Pt/C, HiSPEC) и ионообменной мембраной Nafion 212, подробное описание конструкции которой приведено в главе 2, позволяет независимо изменять состав функциональных элементов мембранно-электродного блока, то интересно было оценить эффективность работы различных материалов анодных токоотводов. Для выбора материала токоотвода первоначально проводили измерения в 3-х электродной электрохимической ячейке электродов из платины, золота, константана, алюминия, графита и углеродной бумаги марки Toray и Sigraset 39AA, сопоставляя полученные значения токов с токами на стеклоуглеродном электроде, СУЭ (таблица 32).

Таблица 32. Токовые отклики, полученные в 3-х электродной жидкостной ячейке, на различных анодных материалах. Система: 0.5 М калий-фосфатный буферный раствор, рН 7.6, содержащий 0.6 мл экстракта *E. coli*, 2 мМ глюкозы, 5 мМ феррицианида калия.

Рабочий электрод	Потенциал поляризации, мВ	j , мкА·см ⁻²	j , мкА·см ⁻² , полученные в этой же системе на СУЭ при 0.4В
Pt	400	31.7	45.4±10.2
Au	400	59.6	45.4±10.2
Константан	350	57.9	45.4±10.2
Алюмель	450	4.5	45.4±10.2
Графит (стержень)	400	10.8	45.4±10.2
Toray	350	0.23	45.4±10.2
Sigraset 39AA	350	28.9	45.4±10.2

На всех исследованных материалах были обнаружены редокс-отклики, соответствующие редокс-переходу феррицианида (рисунок 52).

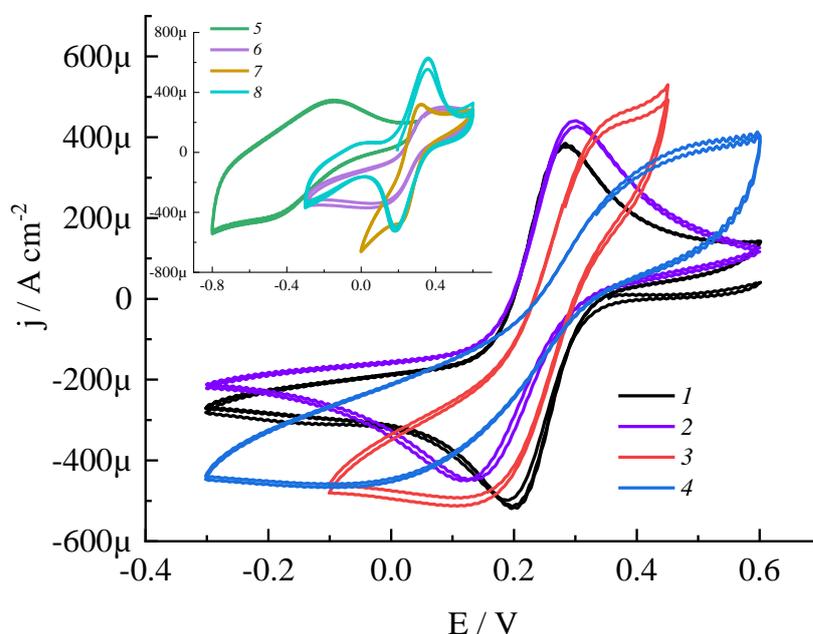


Рисунок 52 – ЦВА различных материалов токоотвода в контакте с раствором 5 мМ феррицианида калия в 0.5 М калий-фосфатном буферном растворе, рН 7.6: 1 – платина, 2 – золото, 3 – константан, 4 – алюминий, 5 – фехраль, 6 – графит, 7 – Toray, 8 – Sigraset.

На основании полученных результатов в качестве материалов токоотводов в биоаноде наиболее перспективными кажутся платина, золото, константан и углеродная бумага Sigraset 39AA.

Первоначально в модельном асимметричном топливном элементе тестировали платиновый токоотвод площадью 0.07 см^2 . В рабочей анодной камере использовали раствор при температуре $38 \text{ }^\circ\text{C}$ с концентрациями растворов глюкозы и медиатора, указанными в подписи к рисунку 53. Как видно из рисунка 53, максимальная плотность мощности такого модельного биоэлемента составила 0.4 мВт/см^2 (4 Вт/м^2). Полученная величина сопоставима с данными для микробного топливного элемента на основе *E. coli* – 1.6 Вт/м^2 (0.16 мВт/см^2) [250], и превышает известные значения плотности мощности, от 0.175 до 95 мкВт/см^2 , известные для различных имплантируемых ферментативных топливных элементов [251].

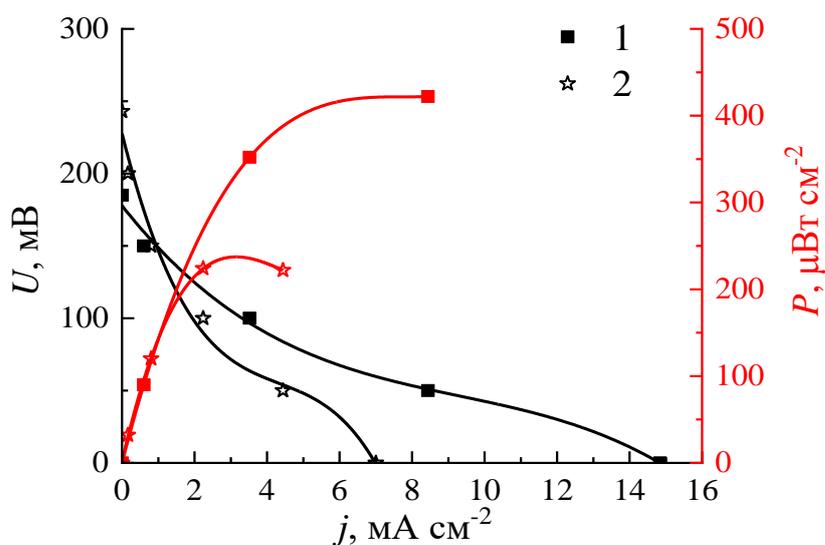


Рисунок 53 - Сравнение вольтамперных характеристик биотопливной ячейки с экстрактом *E. coli* и без экстракта. 1 - $5 \text{ мМ K}_3\text{Fe(CN)}_6 + 2.5 \text{ мМ}$ глюкозы + 1 мл экстракта; 2 - $5 \text{ мМ K}_3\text{Fe(CN)}_6 + 2.5 \text{ мМ}$ глюкозы. Температура $38 \text{ }^\circ\text{C}$. Фоновый раствор: 0.5 М калий-фосфатный буферный раствор, $\text{pH } 7.6$.

Использование константановой проволоки (площадь 1.73 см^2) в качестве анодного токоотвода выглядит более целесообразным с практической точки

зрения, тем не менее, биоанод на его основе в составе модельного биотопливного элемента позволил достичь максимальной плотности мощности лишь в 0.37 мкВт/см^2 (рисунок 54 а). Поверхность константана при этом со временем покрывалась пленкой нерастворимой медной лазури красно-коричневого цвета, которая, по всей видимости, работала как дополнительный нерастворимый редокс-медиатор и лимитировала токовые отклики системы. Об этом свидетельствует и изменение ЦВА такого электрода после работы в биотопливной ячейке (рисунок 54 б). На вольтамперограмме отчетливо видно, что появляется новая пара редокс-пиков в области более высоких потенциалов, а пики феррицианида исчезают, поскольку его редокс-переход приходится на область неэлектроактивности пленки образовавшейся лазури.

Использование углеродной бумаги Sigraset оказалось невозможным из-за ее гидрофильности, поскольку происходило заполнение ее пор раствором биоанода, достигавшим через какое-то время контактов.

Для оценки возможности произвольной замены состава биоанода независимо от состава катода и марки используемой мембраны был проведен еще ряд экспериментов с белковым экстрактом, полученным из другого типа микроорганизмов – дрожжей. Исследуемой культурой стала *Saccharomyces cerevisiae*, позволяющая на выходе экстракта получать больше глюкозодегидрогеназных и глюкозооксидазных систем. В дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* в большом количестве содержится глюкозо-6-фосфат дегидрогеназа (G6PD, EC 1.1.1.49), входящая в пентозофосфатный путь [195].

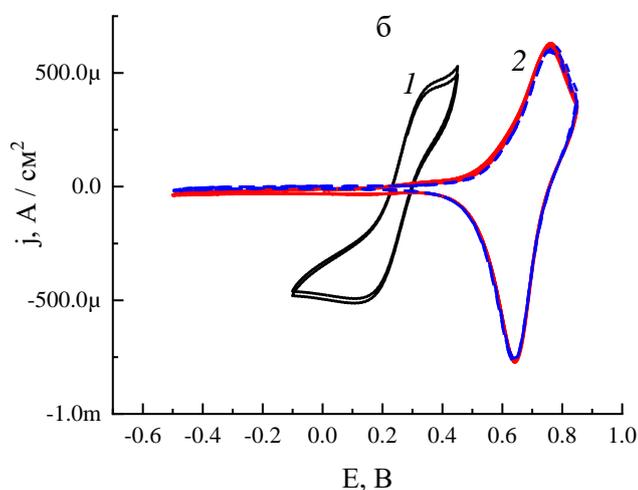
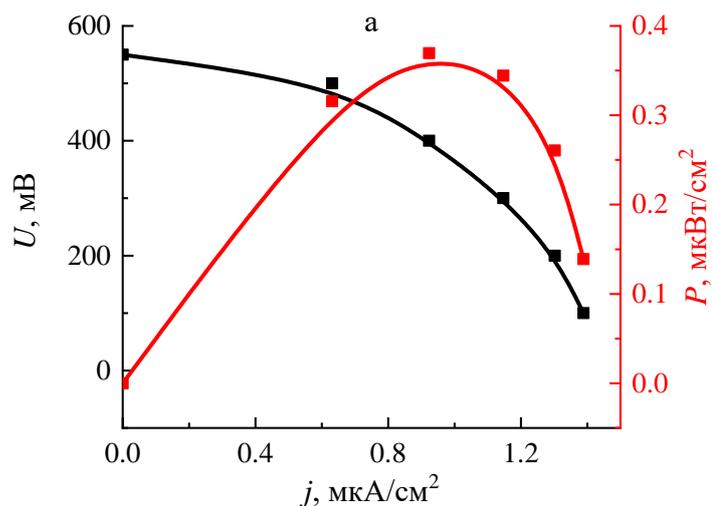


Рисунок 54 – (а) Вольт- и ваттамперные характеристики биотопливной ячейки с биоанодом на основе константана. Система: 0.5 М калий-фосфатный буферный раствор, рН 7.6, содержащий 0.6 мл экстракта *E. coli*, 2 мМ глюкозы, 5 мМ феррицианида калия. (б) ЦВА константана в контакте с раствором 5 мМ феррицианида калия в 0.5 М калий-фосфатном буферном растворе, рН 7.6 до (1) и после (2) работы в биотопливном элементе. Пунктиром отмечена кривая в фоне без феррицианида.

Сравнение вольтамперных характеристик биотопливной ячейки с экстрактом *S. cerevisiae* и без экстракта с константаном в качестве анодного токоотвода представлены на рисунке 55. Максимальная плотность мощности

такой ячейки составила 11.1 мкВт/см², что в 30 раз превосходит значения для этой же ячейки, работающей на экстракте *E. coli*.

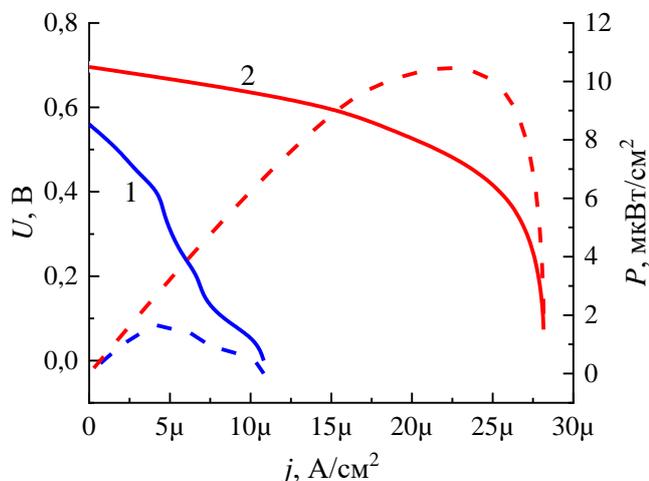


Рисунок 55 - Вольт- и ваттамперные характеристики асимметричной биотопливной ячейки с константановым анодным токоотводом без экстракта (1) и с экстрактом *S. cerevisiae* (2). 1 - 7 мМ К₃Fe(CN)₆ + 2 мМ глюкозы; 2 - 5 мМ К₃Fe(CN)₆ + 2.5 мМ глюкозы + 1 мл экстракта. Фоновый раствор: 0.5 М калий-фосфатный буферный раствор, pH 7.6.

На 2 день измерений биотопливной ячейки, работающей на экстракте *S. cerevisiae* наблюдалось обесцвечивание рабочего раствора, характерное для полного перехода медиатора из окисленной формы, феррицианид (желтый раствор) в восстановленную – ферроцианид (прозрачный раствор). Однако напряжение разомкнутой цепи, НРЦ, ячейки уменьшилось почти в 1.5 раза, и максимальная плотность мощности снизилась до 2.8 мкВт/см². Добавка медиатора до общей концентрации 50 мМ в анодный раствор не привела к увеличению плотности тока или мощности (рисунок 56), а визуальный осмотр константанового токоотвода показал, что и в этом случае образуется медная лазурь на его поверхности, выступающая твердой редокс-медиаторной системой, что, по-видимому, и вызывает деградацию вольт-амперных характеристик.

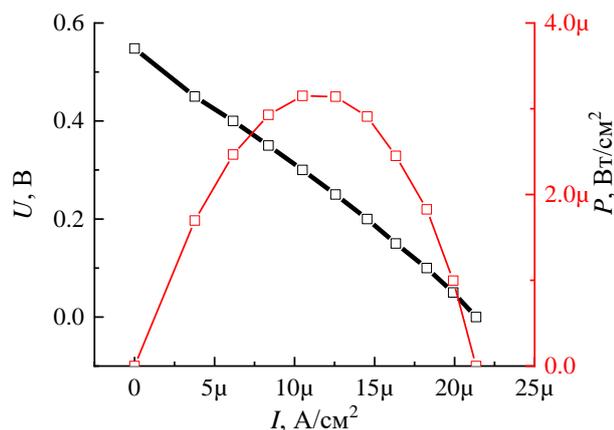


Рисунок 56 - Вольт- и ваттамперные характеристики асимметричной биотопливной ячейки с константановым анодным токоотводом с экстрактом *S. cerevisiae* на 2 день измерений. Состав раствора биоанода: 50 мМ $K_3Fe(CN)_6$ + 2.5 мМ глюкозы + 1 мл экстракта в 0.5 М калий-фосфатном буферном растворе, рН 7.6.

Проведенные эксперименты подтвердили, что константан не является подходящим материалом токоотвода при использовании феррицианида в качестве редокс-медиаторной системы. В главе 1 было показано, что углеродные пористые и волокнистые материалы часто используются в качестве токоотводов. Поскольку углеродная бумага пропитывалась раствором, а заизолировать ее контактную часть не удалось, то в качестве углеродного токоотвода использовали углеродную ткань (материал угольный адсорбционно-активный марки ЖУЛ), скрученную в цилиндр, верхний конец которого был совмещен с медным контактом и заизолирован от контакта с раствором в пластиковой полиэтиленовой оболочке эпоксидным клеем. Геометрическая площадь такого токоотвода составляла 1.2 см^2 . Испытания такого электрода показали максимальную плотность мощности $2 \text{ мкВт}/\text{см}^2$ даже при увеличенных концентрациях медиатора и экстракта (рисунок 57).

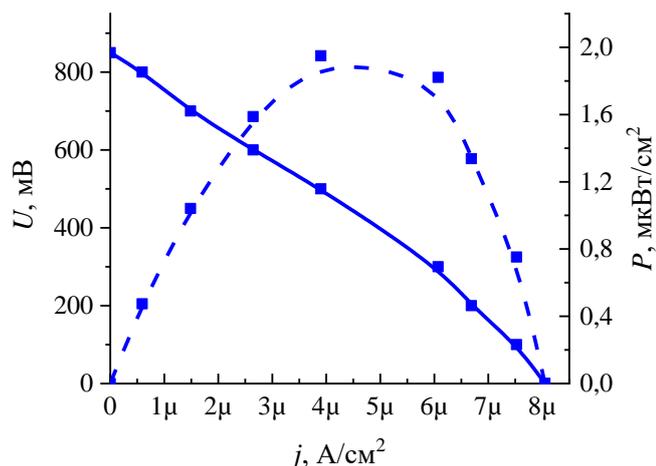


Рисунок 57 - Вольт- и ваттамперные характеристики асимметричной биотопливной ячейки с анодным токоотводом из углеродной ткани с экстрактом *S. cerevisiae* на 2 день измерений. Состав раствора: 0.5 М калий-фосфатный буферный раствор, pH 7.6, 2 мл экстракта *S. cerevisiae*, 2 мМ глюкозы, 50 мМ феррицианида калия.

Полученные результаты позволяют заключить, что разработанная конструкция биотопливного элемента позволяет произвольно изменять состав биоанода в асимметричном топливном элементе, оставляя остальные компоненты ячейки неизменными, что дает возможность изучить влияние материалов токоотвода и закономерности работы биоанода в зависимости от его состава.

4.11 Заключение к главе 4

В главе получены данные, показывающие принципиальную возможность использования грубых белковых экстрактов *E. coli* в качестве перспективных биоэлектродокатализаторов анодных реакций в биоэлектродокаталитических приложениях. Обоснован медиаторный характер сопряжения биохимической и электрохимической реакций в исследуемой системе и изучены особенности макрокинетики.

Впервые систематизированы данные о влиянии типа буферного раствора, его концентрации и pH на каталитическую активность исследуемого биоэлектродкатализатора. Показано, что изменение хотя бы одного из перечисленных параметров требует оптимизации остальных.

В ходе испытаний грубых белковых экстрактов в модельной асимметричной топливной ячейке с воздушным катодом была получена максимальная плотность мощности 0.4 мВт/см^2 (4 Вт/м^2), что сопоставимо и даже превосходит получаемые значения этой же характеристики у микробных топливных элементов на основе *E. coli* и различных имплантируемых ферментативных топливных элементов. Представленные результаты позволяют сделать ряд важных выводов:

1. Из изученных растворимых редокс-медиаторных систем наиболее эффективными по плотности измеренного тока являются бензохинон, метиленовый синий и гексацианоферрат (III) калия. При этом бензохинон и метиленовый синий оказываются реакционноспособными реагентами по отношению к компонентам ячейки (соответственно, глюкоза и кислород), а феррицианид инертен по отношению к субстрату и кислороду. Этот же медиатор оказался эффективным и в экспериментах с живыми клетками *E. coli* в составе биоанода.

2. Наиболее эффективными фоновыми растворами для получения высоких значений плотностей токов биоанодов на основе белковых экстрактов являются 0.5 М калий-фосфатный буфер, pH 7.6, и буферная система 0.1 М TRIS, pH 7.2. Использование буферной системы TRIS в случае живых клеток *E. coli* оказывается нецелесообразным из-за взаимодействий клеток с данным раствором и их отравления.

3. На основании экспериментальных данных о влиянии концентрации экстракта и медиатора на скорость биоэлектродкаталитической реакции найдена константа скорости реакции, значение которой составило 0.004 с^{-1} . Энергия активации в интервале температур 27-42 °C составляет 35 кДж/моль, а при температурах более 42 °C наступает деактивация фермента.

Переведение ферментов в экстракте в апо-форму (без кофермента) приводит к полной инактивации системы, даже в присутствии редокс-медиатора. При этом концентрация добавляемого кофермента непосредственно влияет на скорость биоэлектрокаталитической реакции. Полученные данные позволяют заключить, что лимитирующей стадией является взаимодействие восстановленного активного центра фермента с медиатором, то есть, стадия окисления медиатором восстановленного кофермента.

4. Эксперименты с добавками коферментов разных типов к белковому экстракту с ферментами в апо-форме и проверкой электрохимической активности таких экстрактов показали, что, помимо НАД-зависимой глюкозодегидрогеназы в экстракте присутствует и ФАД-зависимая сукцинатдегидрогеназа в активной форме.

5. И для белковых экстрактов, и для живых клеток *E. coli* в составе биоанодов обнаружен эффект пассивации электродов неэлектроактивными компонентами при длительной работе. Предложенный способ снижения такого негативного воздействия на электрод, заключающийся в применении диализного мешка в качестве фильтра для биообъектов, оказался не совсем удачным. При таком методе защиты электрода, вероятно, возникают значительные проблемы для транспорта восстановленной формы медиатора из объема раствора к электроду через диализный мешок.

6. Разработанный вариант асимметричного биотопливного элемента с возможностью произвольной и независимой замены состава электродов показал возможность замены токоотвода, изменения состава и концентрации компонентов биоанода без необходимости изменения состава и геометрии мембраны или катода. Таким образом, данную ячейку можно использовать для оптимизации состава биоанода и установления влияния различных факторов на его работу в составе биотопливного элемента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Работа посвящена анализу биоэлектродокаталитических свойств нового типа биокатализаторов – ферментативных экстрактов *E. coli* ВВ в процессах окисления различных субстратов. Показано, что такие экстракты являются аналогами ферментного каскада (способны к окислению набора субстратов), но получают по более простой и экономичной методике. Определена ТТХ - и биоэлектрохимическая активность получаемых экстрактов в отношении различных субстратов в зависимости от фазы роста исходной бактериальной культуры, условия, определяющие активность полученных экстрактов, в том числе, подобраны оптимальные рН, тип буферного раствора, температура, ионная сила.

Изучена кинетика биоэлектродокаталитической реакции с участием подобных экстрактов и определены наиболее активные фракции белка. Разработана ячейка биотопливного элемента с биоанодом на основе полученных экстрактов, позволяющая независимо менять состав функциональных элементов МЭБ. 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 биоэлектродокатализаторов 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/см² (4 Вт/м²), что сопоставимо и даже превосходит получаемые значения этой же характеристики у микробных топливных элементов на основе *E. coli* и различных имплантируемых ферментативных топливных элементов.

СПИСОК ЦИТИРУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ

1. M. C. Potter. Electrical effects accompanying the decomposition of organic compounds // Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character. 1911. Vol. 84, № 571. P. 260–276.
2. Cosnier S. et al. Recent advances on enzymatic glucose/oxygen and hydrogen/oxygen biofuel cells: Achievements and limitations // J Power Sources. 2016. Vol. 325. P. 252–263.
3. Willner I. et al. Integrated Enzyme-Based Biofuel Cells—A Review // Fuel Cells. 2009. Vol. 9, № 1. P. 7–24.
4. Hao Yu E., Scott K. Enzymatic Biofuel Cells—Fabrication of Enzyme Electrodes // Energies (Basel). 2010. Vol. 3, № 1. P. 23–42.
5. Mertens R., Liese A. Biotechnological applications of hydrogenases // Curr Opin Biotechnol. 2004. Vol. 15, № 4. P. 343–348.
6. Borja-Maldonado F., López Zavala M.Á. Contribution of configurations, electrode and membrane materials, electron transfer mechanisms, and cost of components on the current and future development of microbial fuel cells // Heliyon. 2022. Vol. 8, № 7. Article number e09849.
7. Minteer S.D., Liaw B.Y., Cooney M.J. Enzyme-based biofuel cells // Curr Opin Biotechnol. 2007. Vol. 18, № 3. P. 228–234.
8. Dey T. et al. Multi-enzyme cascade in carbon dioxide electroreduction fuel cell // Materials Today Sustainability. 2023. Vol. 21. Article number 100333.
9. Martins M.V.A. et al. Iron (III) nanocomposites for enzyme-less biomimetic cathode: A promising material for use in biofuel cells // Electrochem commun. 2010. Vol. 12, № 11. P. 1509–1512.
10. Stoica L. et al. Direct Electron Transfer A Favorite Electron Route for Cellobiose Dehydrogenase (CDH) from *Trametes villosa*. Comparison with CDH from *Phanerochaete c hrysosporium* // Langmuir. 2006. Vol. 22, № 25. P. 10801–10806.

11. Okamoto A., Nakamura R., Hashimoto K. In-vivo identification of direct electron transfer from *Shewanella oneidensis* MR-1 to electrodes via outer-membrane OmcA–MtrCAB protein complexes // *Electrochim Acta*. 2011. Vol. 56, № 16. P. 5526–5531.
12. Toczyłowska-Mamińska R. et al. Cellulolytic and electrogenic activity of *Enterobacter cloacae* in mediatorless microbial fuel cell // *Appl Energy*. 2015. Vol. 160. P. 88–93.
13. Prasad D. et al. Direct electron transfer with yeast cells and construction of a mediatorless microbial fuel cell // *Biosens Bioelectron*. 2007. Vol. 22, № 11. P. 2604–2610.
14. Cooney M.J. et al. Enzyme catalysed biofuel cells // *Energy Environ Sci*. 2008. Vol. 1, № 3. P. 320.
15. Коровин Н.В. Топливные элементы и электрохимические энергоустановки: состояние развития и проблемы // *Альтернативная энергетика и экология*, 2004. № 10. С. 8–14.
16. Arechederra R., Minteer S.D. Organelle-based biofuel cells: Immobilized mitochondria on carbon paper electrodes // *Electrochim Acta*. 2008. Vol. 53, № 23. P. 6698–6703.
17. Rahimnejad M. et al. Microbial fuel cell as new technology for bioelectricity generation: A review // *Alexandria Engineering Journal*. 2015. Vol. 54, № 3. P. 745–756.
18. Allen R.M., Bennetto H.P. Microbial fuel-cells // *Appl Biochem Biotechnol*. 1993. Vol. 39–40, № 1. P. 27–40.
19. Roberge P.R. *Handbook of Corrosion Engineering*. 3rd edition. New York: McGraw-Hill Education, 2019.
20. Videla H.A. *Manual of Biocorrosion*. Routledge, 2018.
21. Chaudhuri S.K., Lovley D.R. Electricity generation by direct oxidation of glucose in mediatorless microbial fuel cells // *Nat Biotechnol*. 2003. Vol. 21, № 10. P. 1229–1232.

22. Kumar S.S., Basu S., Bishnoi N.R. Effect of cathode environment on bioelectricity generation using a novel consortium in anode side of a microbial fuel cell // *Biochem Eng J.* 2017. Vol. 121. P. 17–24.
23. Bergel A., Feron D., Flemming H.-C. Special Issue: From fundamentals to microbial power plants: electrochemically active biofilms // *Bioelectrochemistry.* 2010. Vol. 78, № 1. P. 1.
24. Ali A.E.-H. et al. Optimization of double chamber microbial fuel cell for domestic wastewater treatment and electricity production // *Journal of Fuel Chemistry and Technology.* 2015. Vol. 43, № 9. P. 1092–1099.
25. Butti S.K. et al. Microbial electrochemical technologies with the perspective of harnessing bioenergy: Maneuvering towards upscaling // *Renewable and Sustainable Energy Reviews.* 2016. Vol. 53. P. 462–476.
26. Ismail Z.Z., Habeeb A.A. Experimental and modeling study of simultaneous power generation and pharmaceutical wastewater treatment in microbial fuel cell based on mobilized biofilm bearers // *Renew Energy.* 2017. Vol. 101. P. 1256–1265.
27. Oh S., Logan B.E. Hydrogen and electricity production from a food processing wastewater using fermentation and microbial fuel cell technologies // *Water Res.* 2005. Vol. 39, № 19. P. 4673–4682.
28. Tartakovsky B. et al. Biocatalyzed hydrogen production in a continuous flow microbial fuel cell with a gas phase cathode // *J Power Sources.* 2008. Vol. 182, № 1. P. 291–297.
29. Lovley D.R. The microbe electric: conversion of organic matter to electricity // *Curr Opin Biotechnol.* 2008. Vol. 19, № 6. P. 564–571.
30. Torres C.I., Kato Marcus A., Rittmann B.E. Proton transport inside the biofilm limits electrical current generation by anode-respiring bacteria // *Biotechnol Bioeng.* 2008. Vol. 100, № 5. P. 872–881.
31. Liu H., Logan B.E. Electricity Generation Using an Air-Cathode Single Chamber Microbial Fuel Cell in the Presence and Absence of a Proton

- Exchange Membrane // *Environ Sci Technol.* 2004. Vol. 38, № 14. P. 4040–4046.
32. Harnisch F., Schröder U. Selectivity versus Mobility: Separation of Anode and Cathode in Microbial Bioelectrochemical Systems // *ChemSusChem.* 2009. Vol. 2, № 10. P. 921–926.
 33. Li W.-W. et al. Recent advances in the separators for microbial fuel cells // *Bioresour Technol.* 2011. Vol. 102, № 1. P. 244–252.
 34. Rozendal R.A., Hamelers H.V.M., Buisman C.J.N. Effects of Membrane Cation Transport on pH and Microbial Fuel Cell Performance // *Environ Sci Technol.* 2006. Vol. 40, № 17. P. 5206–5211.
 35. Elangovan M., Dharmalingam S. Preparation and performance evaluation of poly (ether-imide) based anion exchange polymer membrane electrolyte for microbial fuel cell // *Int J Hydrogen Energy.* 2016. Vol. 41, № 20. P. 8595–8605.
 36. Hernández-Flores G., Poggi-Varaldo H.M., Solorza-Feria O. Comparison of alternative membranes to replace high cost Nafion ones in microbial fuel cells // *Int J Hydrogen Energy.* 2016. Vol. 41, № 48. P. 23354–23362.
 37. Logan B.E. et al. Microbial Fuel Cells: Methodology and Technology // *Environ Sci Technol.* 2006. Vol. 40, № 17. P. 5181–5192.
 38. Sonawane J.M. et al. Recent advances in the development and utilization of modern anode materials for high performance microbial fuel cells // *Biosens Bioelectron.* 2017. Vol. 90. P. 558–576.
 39. Sonawane J.M., Marsili E., Chandra Ghosh P. Treatment of domestic and distillery wastewater in high surface microbial fuel cells // *Int J Hydrogen Energy.* 2014. Vol. 39, № 36. P. 21819–21827.
 40. Tang J. et al. High-capacity carbon-coated titanium dioxide core–shell nanoparticles modified three dimensional anodes for improved energy output in microbial fuel cells // *J Power Sources.* 2015. Vol. 274. P. 170–176.

41. Shen Y. et al. Carbon Nanofibers Modified Graphite Felt for High Performance Anode in High Substrate Concentration Microbial Fuel Cells // The Scientific World Journal. 2014. Vol. 2014. P. 1–5.
42. Manickam S.S. et al. Activated carbon nanofiber anodes for microbial fuel cells // Carbon N Y. 2013. Vol. 53. P. 19–28.
43. Mehdinia A., Ziaei E., Jabbari A. Multi-walled carbon nanotube/SnO₂ nanocomposite: a novel anode material for microbial fuel cells // Electrochim Acta. 2014. Vol. 130. P. 512–518.
44. Li D. et al. Processable aqueous dispersions of graphene nanosheets // Nat Nanotechnol. 2008. Vol. 3, № 2. P. 101–105.
45. Liu J. et al. Graphene/carbon cloth anode for high-performance mediatorless microbial fuel cells // Bioresour Technol. 2012. Vol. 114. P. 275–280.
46. Zhang Y. et al. A graphene modified anode to improve the performance of microbial fuel cells // J Power Sources. 2011. Vol. 196, № 13. P. 5402–5407.
47. Mehdinia A., Dejaloud M., Jabbari A. Nanostructured polyaniline-coated anode for improving microbial fuel cell power output // Chemical Papers. 2013. Vol. 67, № 8. P. 1096–1102.
48. Zhao C. et al. Polyaniline networks grown on graphene nanoribbons-coated carbon paper with a synergistic effect for high-performance microbial fuel cells // J Mater Chem A Mater. 2013. Vol. 1, № 40. P. 12587.
49. Zhu X., Logan B.E. Copper anode corrosion affects power generation in microbial fuel cells // Journal of Chemical Technology & Biotechnology. 2014. Vol. 89, № 3. P. 471–474.
50. Crittenden S.R., Sund C.J., Sumner J.J. Mediating Electron Transfer from Bacteria to a Gold Electrode via a Self-Assembled Monolayer // Langmuir. 2006. Vol. 22, № 23. P. 9473–9476.
51. Heijne A. et al. Performance of non-porous graphite and titanium-based anodes in microbial fuel cells // Electrochim Acta. 2008. Vol. 53, № 18. P. 5697–5703.

52. Pocaznoi D. et al. Stainless steel is a promising electrode material for anodes of microbial fuel cells // *Energy Environ Sci.* 2012. Vol. 5, № 11. P. 9645–9652.
53. Logan B.E. *Microbial Fuel Cells*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2007.
54. Chen G.-W. et al. Application of biocathode in microbial fuel cells: cell performance and microbial community // *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008. Vol. 79, № 3. P. 379–388.
55. Pandey P. et al. Recent advances in the use of different substrates in microbial fuel cells toward wastewater treatment and simultaneous energy recovery // *Appl Energy.* 2016. Vol. 168. P. 706–723.
56. Gude V.G. Wastewater treatment in microbial fuel cells – an overview // *J Clean Prod.* 2016. Vol. 122. P. 287–307.
57. Yahiro A.T., Lee S.M., Kimble D.O. Bioelectrochemistry // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Specialized Section on Biophysical Subjects.* 1964. Vol. 88, № 2. P. 375–383.
58. Berezin I.V. et al. Bioelectrocatalysis. Equilibrium oxygen potential under the laccase action // *Dokl. Akad. Nauk. USSR.* 1978. Vol. 240. P. 615–618.
59. Cass A.E.G. et al. Ferrocene-mediated enzyme electrode for amperometric determination of glucose // *Anal Chem.* 1984. Vol. 56, № 4. P. 667–671.
60. Gao F., Courjean O., Mano N. An improved glucose/O₂ membrane-less biofuel cell through glucose oxidase purification // *Biosens Bioelectron.* 2009. Vol. 25, № 2. P. 356–361.
61. Stoica L. et al. Membrane-Less Biofuel Cell Based on Cellobiose Dehydrogenase (Anode)/Laccase (Cathode) Wired *via* Specific Os-Redox Polymers // *Fuel Cells.* 2009. Vol. 9, № 1. P. 53–62.
62. Gallaway J. et al. Oxygen-reducing enzyme cathodes produced from SLAC, a small laccase from *Streptomyces coelicolor* // *Biosens Bioelectron.* 2008. Vol. 23, № 8. P. 1229–1235.

63. Ivanov I., Vidaković-Koch T., Sundmacher K. Recent Advances in Enzymatic Fuel Cells: Experiments and Modeling // *Energies* (Basel). 2010. Vol. 3, № 4. P. 803–846.
64. Wilson R., Turner A.P.F. Glucose oxidase: an ideal enzyme // *Biosens Bioelectron.* 1992. Vol. 7, № 3. P. 165–185.
65. Tasca F. et al. Highly Efficient and Versatile Anodes for Biofuel Cells Based on Cellobiose Dehydrogenase from *Myriococcum thermophilum* // *The Journal of Physical Chemistry C.* 2008. Vol. 112, № 35. P. 13668–13673.
66. Fusco G. et al. Polymer-supported electron transfer of PQQ-dependent glucose dehydrogenase at carbon nanotubes modified by electropolymerized polythiophene copolymers // *Electrochim Acta.* 2017. Vol. 248. P. 64–74.
67. Kuwahara T. et al. Bioelectrocatalytic fructose oxidation with fructose dehydrogenase-bearing conducting polymer films for biofuel cell application // *React Funct Polym.* 2017. Vol. 116. P. 87–91.
68. Palmore G.T.R. et al. A methanol/dioxygen biofuel cell that uses NAD⁺-dependent dehydrogenases as catalysts: application of an electro-enzymatic method to regenerate nicotinamide adenine dinucleotide at low overpotentials // *Journal of Electroanalytical Chemistry.* 1998. Vol. 443, № 1. P. 155–161.
69. Sokic-Lazic D., Minteer S.D. Pyruvate/Air Enzymatic Biofuel Cell Capable of Complete Oxidation // *Electrochemical and Solid-State Letters.* 2009. Vol. 12, № 9. P. F26–F28.
70. Rabaey K. et al. *Bioelectrochemical Systems. Integrated Environmental Technology Series.* IWA Publishing, 2009. 524 p.
71. Arechederra R.L., Minteer S.D. Complete Oxidation of Glycerol in an Enzymatic Biofuel Cell // *Fuel Cells.* 2009. Vol. 9, № 1. P. 63–69.
72. Flanagan L.A., Parkin A. Electrochemical insights into the mechanism of NiFe membrane-bound hydrogenases // *Biochem Soc Trans.* 2016. Vol. 44, № 1. P. 315–328.
73. Katz E., Filanovsky B., Willner I. A biofuel cell based on two immiscible solvents and glucose oxidase and microperoxidase-11 monolayer-

- functionalized electrodes // *New Journal of Chemistry*. 1999. Vol. 23, № 5. P. 481–487.
74. Ramírez P. et al. Direct electron transfer from graphite and functionalized gold electrodes to T1 and T2/T3 copper centers of bilirubin oxidase // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. 2008. Vol. 1777, № 10. P. 1364–1369.
75. Shleev S. et al. Direct electron transfer reactions of laccases from different origins on carbon electrodes // *Bioelectrochemistry*. 2005. Vol. 67, № 1. P. 115–124.
76. Koch-Schmidt A.-C. *Gel-Entrapment of Enzymes // Biomedical Applications of Immobilized Enzymes and Proteins*. Boston, MA: Springer US, 1977. P. 47–67.
77. Rasmussen M., Abdellaoui S., Minteer S.D. Enzymatic biofuel cells: 30 years of critical advancements // *Biosens Bioelectron*. 2016. Vol. 76. P. 91–102.
78. Silva Nunes G., Marty J.-L. *Immobilization of Enzymes on Electrodes*. 2006. P. 239–250.
79. Lai J. et al. Polyaniline-based glucose biosensor: A review // *Journal of Electroanalytical Chemistry*. 2016. Vol. 782. P. 138–153.
80. Xue H., Shen Z., Li C. Improved selectivity and stability of glucose biosensor based on in situ electropolymerized polyaniline–polyacrylonitrile composite film // *Biosens Bioelectron*. 2005. Vol. 20, № 11. P. 2330–2334.
81. Raitman O.A. et al. Electrical contacting of glucose dehydrogenase by the reconstitution of a pyrroloquinoline quinone-functionalized polyaniline film associated with an Au-electrode: an in situ electrochemical SPR study // *Chemical Communications*. 2002. № 17. P. 1936–1937.
82. Szöllősi A. et al. Formation of novel hydrogel bio-anode by immobilization of biocatalyst in alginate/polyaniline/titanium-dioxide/graphite composites and its electrical performance // *Chemosphere*. 2017. Vol. 174. P. 58–65.
83. Marchetti L., Levine M. *Biomimetic Catalysis // ACS Catal*. 2011. Vol. 1, № 9. P. 1090–1118.

84. Mujahid A., Dickert F.L. *Molecularly Imprinted Polymers // Molecularly Imprinted Catalysts*. Elsevier, 2016. P. 79–101.
85. Sode K. et al. A new concept for the construction of an artificial dehydrogenase for fructosylamine compounds and its application for an amperometric fructosylamine sensor // *Anal Chim Acta*. 2001. Vol. 435, № 1. P. 151–156.
86. Khrizanforova V. v. et al. Nickel complexes with cyclic ligands containing P and N atoms as coordination sites: novel biomimetic catalysts for hydrogen oxidation // *Russian Chemical Bulletin*. 2013. Vol. 62, № 4. P. 1003–1009.
87. Tard C., Pickett C.J. Structural and Functional Analogues of the Active Sites of the [Fe]-, [NiFe]-, and [FeFe]-Hydrogenases // *Chem Rev*. 2009. Vol. 109, № 6. P. 2245–2274.
88. Simmons T.R. et al. Mimicking hydrogenases: From biomimetics to artificial enzymes // *Coord Chem Rev*. 2014. Vol. 270–271. P. 127–150.
89. Будникова Ю.Г., Карасик А.А., Синяшин О.Г. Биомиметические катализаторы для развития альтернативной водородной топливной энергетики в условиях Арктики. 2015. 89 с.
90. Matsumoto T. et al. Organometallic Catalysts for Use in a Fuel Cell // *ChemCatChem*. 2013. Vol. 5, № 6. P. 1368–1373.
91. Lam K.B. et al. A Miniaturized Microbial Fuel Cell // *2002 Solid-State, Actuators, and Microsystems Workshop Technical Digest*. San Diego, CA USA: Transducer Research Foundation, Inc., 2002. P. 59–60.
92. Reid R.C., Minter S.D., Gale B.K. Contact lens biofuel cell tested in a synthetic tear solution // *Biosens Bioelectron*. 2015. Vol. 68. P. 142–148.
93. Miyake T. et al. Enzymatic biofuel cells designed for direct power generation from biofluids in living organisms // *Energy Environ Sci*. 2011. Vol. 4, № 12. P. 5008–5012.
94. Castorena-Gonzalez J.A. et al. Biofuel Cell Operating in Vivo in Rat // *Electroanalysis*. 2013. Vol. 25, № 7. P. 1579–1584.
95. Cinquin P. et al. A Glucose BioFuel Cell Implanted in Rats // *PLoS One*. 2010. Vol. 5, № 5. Article number e10476.

96. Yu B. et al. A long-term flexible minimally-invasive implantable glucose biosensor based on an epoxy-enhanced polyurethane membrane // *Biosens Bioelectron.* 2006. Vol. 21, № 12. P. 2275–2282.
97. Zebda A. et al. Single Glucose Biofuel Cells Implanted in Rats Power Electronic Devices // *Sci Rep.* 2013. Vol. 3, № 1. Article number 1516.
98. MacVittie K. et al. From “cyborg” lobsters to a pacemaker powered by implantable biofuel cells // *Energy Environ. Sci.* 2013. Vol. 6, № 1. P. 81–86.
99. Rasmussen M. et al. An Implantable Biofuel Cell for a Live Insect // *J Am Chem Soc.* 2012. Vol. 134, № 3. P. 1458–1460.
100. Shoji K. et al. Diffusion refueling biofuel cell mountable on insect // 2014 IEEE 27th International Conference on Micro Electro Mechanical Systems (MEMS). IEEE, 2014. P. 163–166.
101. Szczupak A. et al. Living battery – biofuel cells operating in vivo in clams // *Energy Environ Sci.* 2012. Vol. 5, № 10. P. 8891–8895.
102. Halámková L. et al. Implanted Biofuel Cell Operating in a Living Snail // *J Am Chem Soc.* 2012. Vol. 134, № 11. P. 5040–5043.
103. Gellett W. et al. Biofuel Cells for Portable Power // *Electroanalysis.* 2010. Vol. 22, № 7–8. P. 727–731.
104. Cosnier S., Holzinger M., le Goff A. Recent Advances in Carbon Nanotube-Based Enzymatic Fuel Cells // *Front Bioeng Biotechnol.* 2014. Vol. 2. Article number 45.
105. Katz E., Bückmann A.F., Willner I. Self-Powered Enzyme-Based Biosensors // *J Am Chem Soc.* 2001. Vol. 123, № 43. P. 10752–10753.
106. Fischer C., Fraiwan A., Choi S. A 3D paper-based enzymatic fuel cell for self-powered, low-cost glucose monitoring // *Biosens Bioelectron.* 2016. Vol. 79. P. 193–197.
107. Liu Z. et al. Miniature Amperometric Self-Powered Continuous Glucose Sensor with Linear Response // *Anal Chem.* 2012. Vol. 84, № 7. P. 3403–3409.

108. Cheng H. et al. Biofuel cell-based self-powered biogenerators for online continuous monitoring of neurochemicals in rat brain // *Analyst*. 2013. Vol. 138, № 1. P. 179–185.
109. Hickey D.P. et al. A self-powered amperometric lactate biosensor based on lactate oxidase immobilized in dimethylferrocene-modified LPEI // *Biosens Bioelectron*. 2016. Vol. 77. P. 26–31.
110. Wang T., Reid R.C., Minter S.D. A Paper-based Mitochondrial Electrochemical Biosensor for Pesticide Detection // *Electroanalysis*. 2016. Vol. 28, № 4. P. 854–859.
111. Kim B.H. et al. Novel BOD (biological oxygen demand) sensor using mediator-less microbial fuel cell // *Biotechnol Lett*. 2003. Vol. 25, № 7. P. 541–545.
112. di Lorenzo M. et al. A single-chamber microbial fuel cell as a biosensor for wastewaters // *Water Res*. 2009. Vol. 43, № 13. P. 3145–3154.
113. Zeng L. et al. FePO₄ based single chamber air-cathode microbial fuel cell for online monitoring levofloxacin // *Biosens Bioelectron*. 2017. Vol. 91. P. 367–373.
114. Samsudeen N., Radhakrishnan T.K., Matheswaran M. Bioelectricity production from microbial fuel cell using mixed bacterial culture isolated from distillery wastewater // *Bioresour Technol*. 2015. Vol. 195. P. 242–247.
115. Fangzhou D. et al. Electricity generation directly using human feces wastewater for life support system // *Acta Astronaut*. 2011. Vol. 68, № 9–10. P. 1537–1547.
116. Dai J. et al. Electrical energy production from forest detritus in a forested wetland using microbial fuel cells // *GCB Bioenergy*. 2015. Vol. 7, № 2. P. 244–252.
117. Logan B.E. Simultaneous wastewater treatment and biological electricity generation // *Water Science and Technology*. 2005. Vol. 52, № 1–2. P. 31–37.

118. Farooq M.U., Eizad A., Bae H.-K. Power solutions for autonomous mobile robots: A survey // *Rob Auton Syst.* 2023. Vol. 159. Article number 104285.
119. Kelly I. The design of a robotic predator: The SlugBot // *Robotica.* 2003. Vol. 21, № 4. P. 399–406.
120. Ieropoulos I.A. et al. Microbial Fuel Cells for Robotics: Energy Autonomy through Artificial Symbiosis // *ChemSusChem.* 2012. Vol. 5, № 6. P. 1020–1026.
121. Philamore H. et al. Row-bot: An energetically autonomous artificial water boatman // *2015 IEEE/RSJ International Conference on Intelligent Robots and Systems (IROS).* IEEE, 2015. P. 3888–3893.
122. Faiña A., Nejati B., Stoy K. EvoBot: An Open-Source, Modular, Liquid Handling Robot for Scientific Experiments // *Applied Sciences.* 2020. Vol. 10, № 3. Article number 814.
123. Masa J., Schuhmann W. Electrocatalysis and bioelectrocatalysis – Distinction without a difference // *Nano Energy.* 2016. Vol. 29. P. 466–475.
124. Dryhurst G. *Electrochemistry of biological molecules.* New-York: Elsevier, 2012. Vol. 1. 614 p.
125. Тоуб М., Берджесс Дж. *Механизмы неорганических реакций.* Москва: БИНОМ. Лаборатория знаний, 2012. 687 с.
126. Marcus R.A. On the Theory of Electron-Transfer Reactions. VI. Unified Treatment for Homogeneous and Electrode Reactions // *J Chem Phys.* 1965. Vol. 43, № 2. P. 679–701.
127. Фрумкин А.Н. и др. *Двойной слой и электродная кинетика.* . Москва: Наука, 1981. 376 с.
128. Horányi G. In Horiuti's footsteps: links between catalysis and electrocatalysis // *J Mol Catal A Chem.* 2003. Vol. 199, № 1–2. P. 7–17.
129. Horiuti J., Polanyi M. Outlines of a theory of proton transfer // *J Mol Catal A Chem.* 2003. Vol. 199, № 1–2. P. 185–197.
130. Plambeck J.A. *Electroanalytical chemistry: basic principles and applications.* . New York; Toronto: Wiley, 1982.

131. Tamaki T., Ito T., Yamaguchi T. Modelling of Reaction and Diffusion Processes in a High-surface-area Biofuel Cell Electrode Made of Redox Polymer-grafted Carbon // *Fuel Cells*. 2009. Vol. 9, № 1. P. 37–43.
132. Kjeang E., Sinton D., Harrington D.A. Strategic enzyme patterning for microfluidic biofuel cells // *J Power Sources*. 2006. Vol. 158, № 1. P. 1–12.
133. Do T.Q.N. et al. Mathematical Modeling of a Porous Enzymatic Electrode with Direct Electron Transfer Mechanism // *Electrochim Acta*. 2014. Vol. 137. P. 616–626.
134. Shleev S. et al. Direct heterogeneous electron transfer reactions of bilirubin oxidase at a spectrographic graphite electrode // *Electrochem commun.* 2004. Vol. 6, № 9. P. 934–939.
135. Armstrong F.A., Hill H.A.O., Walton N.J. Reactions of electron-transfer proteins at electrodes // *Q Rev Biophys.* 1985. Vol. 18, № 3. P. 261–322.
136. Moser C.C. et al. Nature of biological electron transfer // *Nature*. 1992. Vol. 355, № 6363. P. 796–802.
137. Shleev S. et al. Direct electron transfer between copper-containing proteins and electrodes // *Biosens Bioelectron.* 2005. Vol. 20, № 12. P. 2517–2554.
138. Hickey D.P. et al. Fundamentals and applications of bioelectrocatalysis. 2015. P. 97–132.
139. Weibel M.K., Bright H.J. The Glucose Oxidase Mechanism // *Journal of Biological Chemistry*. 1971. Vol. 246, № 9. P. 2734–2744.
140. Osman M.H. et al. Mathematical modelling of an enzymatic fuel cell with an air-breathing cathode // *Electrochim Acta*. 2013. Vol. 112. P. 386–393.
141. Heller A. Miniature biofuel cells // *Physical Chemistry Chemical Physics*. 2004. Vol. 6, № 2. P. 209–216.
142. *Electrochemical sensors, biosensors and their biomedical applications* / ed. Zhang X., Ju H., Wang J. Academic Press., 2011. 616 p.
143. Bandodkar A.J. Review—Wearable Biofuel Cells: Past, Present and Future // *J Electrochem Soc*. 2017. Vol. 164, № 3. P. H3007–H3014.

144. Moiroux Jacques., Elving P.J. Effects of adsorption, electrode material, and operational variables on the oxidation of dihydronicotinamide adenine dinucleotide at carbon electrodes // *Anal Chem.* 1978. Vol. 50, № 8. P. 1056–1062.
145. Rossi R., Cavina M., Setti L. Characterization of Electron Transfer Mechanism in Mediated Microbial Fuel Cell by Entrapped Electron Mediator in *Saccharomyces Cerevisiae* // *Chem Eng Trans.* 2016. Vol. 49. P. 559–564.
146. Upadhyay A.K., Ting T.-W., Chen S.-M. Amperometric biosensor for hydrogen peroxide based on coimmobilized horseradish peroxidase and methylene green in ormosils matrix with multiwalled carbon nanotubes // *Talanta.* 2009. Vol. 79, № 1. P. 38–45.
147. Thenmozhi K., Narayanan S.S. Horseradish peroxidase and toluidine blue covalently immobilized leak-free sol-gel composite biosensor for hydrogen peroxide // *Materials Science and Engineering: C.* 2017. Vol. 70. P. 223–230.
148. Chen C. et al. Hydrogen peroxide biosensor based on the immobilization of horseradish peroxidase onto a poly(aniline-co-N-methylthionine) film // *Synth Met.* 2016. Vol. 212. P. 123–130.
149. Canevari T.C. et al. $\text{SiO}_2/\text{SnO}_2/\text{Sb}_2\text{O}_5$ microporous ceramic material for immobilization of Meldola's blue: Application as an electrochemical sensor for NADH // *Biosens Bioelectron.* 2011. Vol. 26, № 5. P. 2402–2406.
150. Liu H.-J., Yang D.-W., Liu H.-H. A hydrogen peroxide sensor based on the nanocomposites of poly(brilliant cresyl blue) and single walled-carbon nanotubes // *Analytical Methods.* 2012. Vol. 4, № 5. P. 1421–1426.
151. Fathey R. et al. Neutral red as a mediator for the enhancement of electricity production using a domestic wastewater double chamber microbial fuel cell // *Ann Microbiol.* 2016. Vol. 66, № 2. P. 695–702.
152. Sun J. et al. Redox mediator enhanced simultaneous decolorization of azo dye and bioelectricity generation in air-cathode microbial fuel cell // *Bioresour Technol.* 2013. Vol. 142. P. 407–414.

153. Campbell A.S., Islam M.F., Russell A.J. Intramolecular Electron Transfer through Poly-Ferrocenyl Glucose Oxidase Conjugates to Carbon Electrodes: 2. Mechanistic Understanding of Long-Term Stability // *Electrochim Acta*. 2017. Vol. 246. P. 294–302.
154. Şenel M. Construction of reagentless glucose biosensor based on ferrocene conjugated polypyrrole // *Synth Met*. 2011. Vol. 161, № 17–18. P. 1861–1868.
155. Zhang C. et al. Evaluation of substituted-1,10-phenanthroline complexes of osmium as mediator for glucose oxidase of *Aspergillus Niger* // *Anal Chim Acta*. 2000. Vol. 408, № 1–2. P. 225–232.
156. Longatte G. et al. Evaluation of photosynthetic electrons derivation by exogenous redox mediators // *Biophys Chem*. 2015. Vol. 205. P. 1–8.
157. Babkina E. et al. Bioelectrocatalytic Oxidation of Glucose by Immobilized *BacteriaGluconobacter oxydans*. Evaluation of Water-Insoluble Mediator Efficiency // *Electroanalysis*. 2006. Vol. 18, № 19–20. P. 2023–2029.
158. Wu Y. et al. pH dependence of quinone-mediated extracellular electron transfer in a bioelectrochemical system // *Electrochim Acta*. 2016. Vol. 213. P. 408–415.
159. Ohara T.J. Osmium Bipyridyl Redox Polymers Used in Enzyme Electrodes. Johnson Matthey // *Platinum Metals Review*. 1995. Vol. 39, № 2. P. 54–62.
160. Ó Conghaile P. et al. Coupling osmium complexes to epoxy-functionalised polymers to provide mediated enzyme electrodes for glucose oxidation // *Biosens Bioelectron*. 2013. Vol. 43. P. 30–37.
161. Sosna M. et al. Direct electrochemistry and Os-polymer-mediated bioelectrocatalysis of NADH oxidation by *Escherichia coli* flavohemoglobin at graphiteelectrodes // *Biosens Bioelectron*. 2013. Vol. 42. P. 219–224.
162. Jenkins P.A. et al. Evaluation of performance and stability of biocatalytic redox films constructed with different copper oxygenases and osmium-based redox polymers // *Bioelectrochemistry*. 2009. Vol. 76, № 1–2. P. 162–168.

163. Rivera N., Colón Y., Guadalupe A.R. Ruthenium complexes as redox mediators for malate and lactate dehydrogenases // *Bioelectrochemistry and Bioenergetics*. 1994. Vol. 34, № 2. P. 169–175.
164. Sakuta R. et al. Multi-enzyme anode composed of FAD-dependent and NAD-dependent enzymes with a single ruthenium polymer mediator for biofuel cells // *Electrochem commun.* 2015. Vol. 56. P. 75–78.
165. Tsujimura S. et al. Novel FAD-Dependent Glucose Dehydrogenase for a Dioxygen-Insensitive Glucose Biosensor // *Biosci Biotechnol Biochem.* 2006. Vol. 70, № 3. P. 654–659.
166. Xiang L. et al. In Situ Cationic Ring-Opening Polymerization and Quaternization Reactions To Confine Ferricyanide onto Carbon Nanotubes: A General Approach to Development of Integrative Nanostructured Electrochemical Biosensors // *Anal Chem.* 2008. Vol. 80, № 17. P. 6587–6593.
167. Penteado E.D. et al. On the Effects of Ferricyanide as Cathodic Mediator on the Performance of Microbial Fuel Cells // *Electrocatalysis*. 2017. Vol. 8, № 1. P. 59–66.
168. Ge F. et al. Potassium Ferricyanide Mediated Disposable Biosensor for Determination of Maltose and Glucose // *Anal Lett.* 1998. Vol. 31, № 3. P. 383–394.
169. Mecheri B. et al. A Glucose Biofuel Cell to Generate Electricity // *ECS Trans.* 2011. Vol. 35, № 26. P. 1–8.
170. Zaitseva A.S. et al. Use of one- and two-mediator systems for developing a BOD biosensor based on the yeast *Debaryomyces hansenii* // *Enzyme Microb Technol.* 2017. Vol. 98. P. 43–51.
171. Wilkinson S., Klar J., Applegarth S. Optimizing Biofuel Cell Performance Using a Targeted Mixed Mediator Combination // *Electroanalysis*. 2006. Vol. 18, № 19–20. P. 2001–2007.
172. Güell O., Sagués F., Serrano M.Á. Detecting the Significant Flux Backbone of *Escherichia coli* metabolism // *FEBS Lett.* 2017. Vol. 591, № 10. P. 1437–1451.

173. Systems Biology and Biotechnology of *Escherichia coli* / ed. Lee S.Y. Dordrecht: Springer Netherlands, 2009. 462 p.
174. Sprenger G.A. Genetics of pentose-phosphate pathway enzymes of *Escherichia coli* K-12 // Arch Microbiol. 1995. Vol. 164, № 5. P. 324–330.
175. Ranjbar S. et al. Effect of plasma-induced oxidative stress on the glycolysis pathway of *Escherichia coli* // Comput Biol Med. 2020. Vol. 127. Article number 104064.
176. Kornberg H. The role and control of the glyoxylate cycle in *Escherichia coli* // Biochemical Journal. 1966. Vol. 99, № 1. P. 1–11.
177. Guest J.R., Russell G.C. Complexes and Complexities of the Citric Acid Cycle in *Escherichia coli*. 1992. Vol. 33. P. 231–247.
178. Hua Q. et al. Responses of the Central Metabolism in *Escherichia coli* to Phosphoglucose Isomerase and Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase Knockouts // J Bacteriol. 2003. Vol. 185, № 24. P. 7053–7067.
179. Апостолов С.А., Бабаш С.Е. Новый справочник химика и технолога. Сырье и продукты промышленности органических и неорганических веществ. СПб: АНО НПО «Профессионал», 2007. Т. 2. 1142 с.
180. Макаревич Е.В. Промышленная микробиология и основы биотехнологии: Учебное пособие для студентов вузов. Мурманск: МГТУ, 2009. 303 с.
181. Барковский Е.В. и др. Современные проблемы биохимии. Методы исследований: учеб. пособие Выш. шк. / под ред. Чиркин А.А. Минск: Выш. шк., 2013. 491 с.
182. Диксон М., Уэбб Э. Ферменты. Москва: Мир, 1982. Т. 1. 382 с.
183. Brown R.E., Jarvis K.L., Nyland K.J. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances // Anal Biochem. 1989. Vol. 180, № 1. P. 136–139.
184. Цыперович А.С. Ферменты. Казань: Техника, 1971. 357 с.
185. Плешков Б.П. Практикум по биохимии растений. Москва: Колос, 1976. 256 с.

186. Obbard J.P. Measurement of dehydrogenase activity using 2- p -iodophenyl-3- p -nitrophenyl-5-phenyltetrazolium chloride (INT) in the presence of copper // *Biol Fertil Soils*. 2001. Vol. 33, № 4. P. 328–330.
187. Варакин Е.А. и др. Определение дегидрогеназной активности микроорганизмов активного ила в процессе биологической очистки сточных вод // *Биотехнологии в химико-лесном комплексе*. 2014. С. 99–104.
188. Чекалов В.П. Определение с помощью метиленового синего сорбционной способности и дегидрогеназной активности донных отложений // *Экология моря*. 2006. Т. 72. С. 103–109.
189. Blažić M. et al. Directed Evolution of Cellobiose Dehydrogenase on the Surface of Yeast Cells Using Resazurin-Based Fluorescent Assay // *Applied Sciences*. 2019. Vol. 9, № 7. Article number 1413.
190. Dmitrieva M.V. et al. Kinetics of Mediated Bioelectrocatalytic Oxidation of Glucose by Protein Extracts of *Escherichia coli* // *Russian Journal of Electrochemistry*. 2020. Vol. 56, № 11. P. 938-945.
191. Золотухина Е.В. и др. Электронная проводимость и потенциал модифицированной дисперсной медью сульфокатионообменной мембраны МК-40 // *Сорбционные и хроматографические процессы*. 2008. Т. 4, № 8. С. 636–645.
192. Dmitrieva M.V. et al. Dehydrogenase and electrochemical activity of *Escherichia coli* extracts // *Appl Biochem Microbiol*. 2017. Vol. 53, № 4. P. 458-463.
193. Курченко В.П. и др. Механизм взаимодействия хитозана с белками молочной сыворотки // *Труды БГУ*. 2013. Vol. 8, № 1. P. 45–51.
194. Дмитриева М.В., Павлов В.А., Афанасьева П.С., Золотухина Е.В. Разработка технологии получения нового биоэлектродокатализатора – «грубого» экстракта *Saccharomyces cerevisiae* // *Изв. вузов. Сев.-Кавк. регион. Естеств. науки*. 2024. № 1. С. 100–108.

195. Lojudice F.H. et al. Overexpression of Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase in Genetically Modified *Saccharomyces cerevisiae* // Twenty-Second Symposium on Biotechnology for Fuels and Chemicals. Totowa, NJ: Humana Press, 2001. P. 161–169.
196. D'Amato D. et al. Effects of temperature, ammonium and glucose concentrations on yeast growth in a model wine system // Int J Food Sci Technol. 2006. Vol. 41, № 10. P. 1152–1157.
197. Kamanina O.A. et al. Glucose biosensor based on screen-printed electrode modified with silicone sol–gel conducting matrix containing carbon nanotubes // 3 Biotech. 2019. Vol. 9, № 7. Article number 290.
198. Arlyapov V.A. et al. A Hybrid Redox-Active Polymer Based on Bovine Serum Albumin, Ferrocene, Carboxylated Carbon Nanotubes, and Glucose Oxidase // Journal of Analytical Chemistry. 2020. Vol. 75, № 9. P. 1189–1200.
199. Arlyapov V.A. et al. Use of biocompatible redox-active polymers based on carbon nanotubes and modified organic matrices for development of a highly sensitive BOD biosensor // Enzyme Microb Technol. 2021. Vol. 143. Article number 109706.
200. Kharkova A.S. et al. A mediator microbial biosensor for assaying general toxicity // Enzyme Microb Technol. 2020. Vol. 132. Article number 109435.
201. Dmitrieva M.V. et al. Electrochemical Peculiarities of Mediator-Assisted Bioelectrocatalytic Oxidation of Glucose by a New Type of Bioelectrocatalyst // Russian Journal of Electrochemistry. 2019. Vol. 55, № 9. P. 889–899.
202. Наянова Е.В. и др. Редокс-свойства метиленового голубого как перспективного фотометрического реагента для определения галогенных окислителей // Аналитика и контроль. 2015. Т. 19, № 2. С. 154–160.
203. Сухотин А.М. Справочник по электрохимии. Л.: Химия, 1981. 488 с.
204. Alagarsamy V. Textbook of Medicinal Chemistry E-Book. Elsevier Health Sciences, 2013. Vol. 1. 620 p.
205. Patnaik P. A Comprehensive Guide to the Hazardous Properties of Chemical Substances. New York: J. Wiley & Sons Ltd, 2007. 1059 p.

206. Hibbert D.B., James A.M. Macmillan Dictionary of Chemistry. Luxembourg: Springer, 1987. 532 p.
207. Nien P.-C. et al. Encapsulating benzoquinone and glucose oxidase with a PEDOT film: Application to oxygen-independent glucose sensors and glucose/O₂ biofuel cells // *Bioresour Technol.* 2010. Vol. 101, № 14. P. 5480–5486.
208. Impert O. et al. Kinetics and mechanism of a fast leuco-Methylene Blue oxidation by copper(II)–halide species in acidic aqueous media // *Dalton Transactions.* 2003. № 3. P. 348–353.
209. Sun Y. et al. Combination of plasma oxidation process with microbial fuel cell for mineralizing methylene blue with high energy efficiency // *J Hazard Mater.* 2020. Vol. 384. Article number 121307.
210. Zuhri F. et al. Effect of Methylene Blue Addition as a Redox Mediator on Performance of Microbial Desalination Cell by Utilizing Tempe Wastewater // *International Journal of Technology.* 2016. Vol. 7, № 6. P. 952–961.
211. Bilal A. et al. Use of *Aspergillus wentii* for biosorption of methylene blue from aqueous solution // *Afr J Biotechnol.* 2010. Vol. 9, № 6. P. 874–881.
212. Vijayaraghavan K., Mao J., Yun Y.-S. Biosorption of methylene blue from aqueous solution using free and polysulfone-immobilized *Corynebacterium glutamicum*: Batch and column studies // *Bioresour Technol.* 2008. Vol. 99, № 8. P. 2864–2871.
213. Илюхина А.С. и др. Исследование кинетики процессов переноса заряда с участием медиаторов электронного транспорта в системах на основе бактерий *Gluconobacter oxydans* и их мембранных фракций // *Известия Тульского государственного университета. Естественные науки.* 2020. № 2. С. 26–34.
214. Zhang Y., Cremer P. Interactions between macromolecules and ions: the Hofmeister series // *Curr Opin Chem Biol.* 2006. Vol. 10, № 6. P. 658–663.

215. Cacace M.G., Landau E.M., Ramsden J.J. The Hofmeister series: salt and solvent effects on interfacial phenomena // *Q Rev Biophys.* 1997. Vol. 30, № 3. P. 241–277.
216. Naushad Mu. et al. Effect of ionic liquid on activity, stability, and structure of enzymes: A review // *Int J Biol Macromol.* 2012. Vol. 51, № 4. P. 555–560.
217. Keefe A.J., Jiang S. Poly(zwitterionic)protein conjugates offer increased stability without sacrificing binding affinity or bioactivity // *Nat Chem.* 2012. Vol. 4, № 1. P. 59–63.
218. Garajová K. et al. Correlation of lysozyme activity and stability in the presence of Hofmeister series anions // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics.* 2017. Vol. 1865, № 3. P. 281–288.
219. Okur H.I. et al. Beyond the Hofmeister Series: Ion-Specific Effects on Proteins and Their Biological Functions // *J Phys Chem B.* 2017. Vol. 121, № 9. P. 1997–2014.
220. Glock G.E., McLean P. Further studies on the properties and assay of glucose 6-phosphate dehydrogenase and 6-phosphogluconate dehydrogenase of rat liver // *Biochemical Journal.* 1953. Vol. 55, № 3. P. 400–408.
221. Zhao H. et al. Effect of kosmotropicity of ionic liquids on the enzyme stability in aqueous solutions // *Bioorg Chem.* 2006. Vol. 34, № 1. P. 15–25.
222. Shaw C.R., Prasad R. Starch gel electrophoresis of enzymes? A compilation of recipes // *Biochem Genet.* 1970. Vol. 4, № 2. P. 297–320.
223. Orr M.D., Blakley R.L., Panagou D. Discontinuous buffer systems for analytical and preparative electrophoresis of enzymes on polyacrylamide gel // *Anal Biochem.* 1972. Vol. 45, № 1. P. 68–85.
224. Selander R.K. et al. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics // *Appl Environ Microbiol.* 1986. Vol. 51, № 5. P. 873–884.
225. Cohen P., Rosemeyer M.A. Human Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase: Purification of the Erythrocyte Enzyme and the Influence of Ions on its Activity // *Eur J Biochem.* 1969. Vol. 8, № 1. P. 1–7.

226. Kalnitsky G., Hummel J.P., Dierks C. Some Factors Which Affect the Enzymatic Digestion of Ribonucleic Acid // Journal of Biological Chemistry. 1959. Vol. 234, № 6. P. 1512–1516.
227. Leprince F., Quiquampoix H. Extracellular enzyme activity in soil: effect of pH and ionic strength on the interaction with montmorillonite of two acid phosphatases secreted by the ectomycorrhizal fungus *Hebeloma cylindrosporium* // Eur J Soil Sci. 1996. Vol. 47, № 4. P. 511–522.
228. Guilbault G.G. Enzymatic Methods of Analysis: International Series of Monographs in Analytical Chemistry . Amsterdam: Elsevier, 2013. 368 p.
229. Vroman H.E., Brown J.R.C. Effect of temperature on the activity of succinic dehydrogenase from the livers of rats and frogs // J Cell Comp Physiol. 1963. Vol. 61, № 2. P. 129–131.
230. Trevors J.T. Effect of substrate concentration, inorganic nitrogen, O₂ concentration, temperature and pH on dehydrogenase activity in soil // Plant Soil. 1984. Vol. 77, № 2–3. P. 285–293.
231. Wolberg A.S. et al. A Systematic Evaluation of the Effect of Temperature on Coagulation Enzyme Activity and Platelet Function // The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care. 2004. Vol. 56, № 6. P. 1221–1228.
232. Immanuel G. et al. Effect of different growth parameters on endoglucanase enzyme activity by bacteria isolated from coir retting effluents of estuarine environment // International Journal of Environmental Science & Technology. 2006. Vol. 3, № 1. P. 25–34.
233. Taylor S. Enzymes in food processing. Amsterdam: Elsevier, 2013. 480 p.
234. del Prete S. et al. Biochemical properties of a new α -carbonic anhydrase from the human pathogenic bacterium, *Vibrio cholerae* // J Enzyme Inhib Med Chem. 2014. Vol. 29, № 1. P. 23–27.
235. Ghaly A.E., Mahmoud N.S. Optimum conditions for measuring dehydrogenase activity of *Aspergillus niger* using TTC // Am J Biochem Biotechnol. 2006. Vol. 2, № 4. P. 186–194.

236. Интернет-ресурс. Information on EC 1.1.1.49 - glucose-6-phosphate dehydrogenase (NADP+) [Electronic resource].
237. Мартино Дж. Технологическое прогнозирование. Москва: Прогресс, 1977. 591 с.
238. Doran P.M. Bioprocess Engineering Principles. London: Acad. Press Limited, 1995. 439 p.
239. Кравченко Т.А. и др. Нанокompозиты металл-ионообменник. Москва: Наука, 2009. 392 с.
240. Dmitrieva M.V., Zolotukhina E.V. Data describing the cofactor additives effect on bioelectrocatalytic activity of «crude» extracts // Data Brief. 2020. Vol. 30. Article number 105513.
241. Apushkinskaya N. et al. In situ modulation of enzyme activity via heterogeneous catalysis utilizing solid electroplated cofactors // Comput Struct Biotechnol J. 2022. Vol. 20. P. 3824–3832.
242. Brett C.M.A. Perspectives and challenges for self-assembled layer-by-layer biosensor and biomaterial architectures // Curr Opin Electrochem. 2018. Vol. 12. P. 21–26.
243. David M. et al. Acidic and Basic Functionalized Carbon Nanomaterials as Electrical Bridges in Enzyme Loaded Chitosan/Poly(styrene sulfonate) Self-Assembled Layer-by-Layer Glucose Biosensors // Electroanalysis. 2015. Vol. 27, № 9. P. 2139–2149.
244. Zhao W., Xu J.-J., Chen H.-Y. Electrochemical Biosensors Based on Layer-by-Layer Assemblies // Electroanalysis. 2006. Vol. 18, № 18. P. 1737–1748.
245. Li X. et al. Power generation in dual chamber microbial fuel cells using dynamic membranes as separators // Energy Convers Manag. 2018. Vol. 165. P. 488–494.
246. Das B. et al. Crosslinked poly(vinyl alcohol) membrane as separator for domestic wastewater fed dual chambered microbial fuel cells // Int J Hydrogen Energy. 2021. Vol. 46, № 10. P. 7073–7086.

247. González T. et al. Effect of Zeolite-Fe on graphite anode in electroactive biofilm development for application in microbial fuel cells // *Appl Surf Sci.* 2019. Vol. 467–468. P. 851–859.
248. Mahmoud R.H. et al. Assisting the biofilm formation of exoelectrogens using nanostructured microbial fuel cells // *Journal of Electroanalytical Chemistry.* 2018. Vol. 824. P. 128–135.
249. Dmitrieva M. V. et al. Peculiarities of Using Potassium Ferricyanide as the Mediator for Bioanodes Based on *Escherichia coli* // *Russian Journal of Electrochemistry.* 2022. Vol. 58, № 10. P. 885–890.
250. Mehdinia A., Ziaei E., Jabbari A. Facile microwave-assisted synthesized reduced graphene oxide/tin oxide nanocomposite and using as anode material of microbial fuel cell to improve power generation // *Int J Hydrogen Energy.* 2014. Vol. 39, № 20. P. 10724–10730.
251. Gonzalez-Solino C., Lorenzo M. Enzymatic Fuel Cells: Towards Self-Powered Implantable and Wearable Diagnostics // *Biosensors (Basel).* 2018. Vol. 8, № 1. Article number 11.