

ИССЛЕДОВАНИЕ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНЫХ ФЕРМЕНТОВ ДЛЯ УЛУЧШЕНИЯ РАБОТЫ ЭЛЕКТРОДОВ БИОТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

**Н.В. Лакина, В.Ю. Долуда, М.Г. Сульман.,
М.Е. Лакина, А.М. Сивенок**

Тверской государственной технической университет, Тверь

В работе представлен обзор способов получения биоэлектродов на основе ферментных комплексов глюкооксидазы и пероксидазы в реакциях по окислению глюкозы. Показано, что пероксидаза, нанесенная на поверхность биокатода, увеличивает энергетическую эффективность биотопливных элементов за счет превращения пероксида водорода, образующегося при окислении D-глюкозы, - ингибитора электродной реакции. Экспериментальная часть работы содержит данные по измерению ферментативной активности окислительно-восстановительного комплекса глюкооксидазы и пероксидазы при хранении. Показано, что активность такого комплекса остается стабильной в течение длительного времени. Полученные данные сопоставимы с зарубежными исследованиями и даже немного превышают представленные величины активностей. Высокую ферментативную активность можно объяснить оптимальным соотношением количеств применяемых окислительно-восстановительных ферментов. В дальнейшем, полученные модифицированные комплексы ферментов могут быть рекомендованы для повышения эффективности биотопливных элементов.

Ключевые слова: окислительно-восстановительные ферменты, биокатод, биоанод, D-глюкоза, пероксид водорода, электродный потенциал.

В настоящее время ферменты широко используются в качестве катализаторов для повышения эффективности различных синтезов биологически активных веществ, а также для увеличения чувствительности биосенсоров и в конструкциях биотопливных ячеек. Окислительно-восстановительный фермент глюкооксидаза (GOx) катализирует с высокой селективностью окисление β -D-глюкозы до глюконолактона. Реакция осуществляется за счет процесса переноса $2e^-$ и $2H^+$. Регенерация фермента происходит путем восстановления

кислорода до перекиси водорода, которая может служить электрохимическим зондом для биосенсора глюкозы. GOx, из-за своей высокой специфичности, используется в биотопливных элементах различной конструкции для преобразования энергии, а также для питания электронных устройств в живом организме. GOx является одним из наиболее широко используемых ферментов для анодного окисления глюкозы, в частности в биотопливных ячейках, за счет высоких показателей активности и стабильности при различных значениях pH. GOx состоит из двух идентичных субъединиц, в которых органический редокс-кофактор фениладениндинуклеотид (ФАД) защищен гликозилированной белковой оболочкой [1].

В настоящее время существует научный подход, использующий преимущества выделения H_2O_2 в процессе реакции окисления глюкозы. Этот подход основан на разработке биокатодов с использованием ферментативной системы с пероксидазой, выделенной из корня хрена (HRP), в качестве катализатора для восстановления пероксида водорода. Этот небольшой фермент имеет легкодоступную функцию гема, позволяющую облегчить прямой перенос электронов. Преимуществом таких биокатодов является сокращение ингибирующих эффектов, а недостатком - необходимость объединения двух ферментов – Gox и HRP. За счет этого увеличивается количество используемого для иммобилизации белка. Кроме того высока вероятность критического снижения концентрации глюкозы, необходимой для работы биоанода. Более того, до сих пор не решен вопрос о чистоте выделяющегося на биоаноде в ходе реакции H_2O_2 [2].

Этот побочный продукт, из-за его токсичности и способности ускорять денатурацию белков, часто рассматривается как основной недостаток в применении биотопливных элементов. При этом электроны, используемые для восстановления кислорода, не передаются на электроды и не способствуют увеличению мощности элемента. Перспективным способом повышения эффективности электрохимических процессов и снижения выхода H_2O_2 является использование окислительно-восстановительных активных молекул с соответствующими потенциалами [3].

Биосенсоры – биоаналитические устройства, преобразующие сигнал от биоселективного элемента с помощью преобразователя в измеримый сигнал (например, ток) [1]. В качестве биологического компонента чаще всего применяются ферменты, но также могут использоваться антитела, нуклеиновые кислоты, органеллы, микроорганизмы и ткани. При этом биораспознающий элемент находится в непосредственном контакте с преобразователем первичного сигнала. Основным преимуществом биосенсоров является

их специфичность, а также низкие затраты энергии (анализ проводится при нормальных температурах, низких потенциалах) [4].

Амперометрическая детекция широко применяется на практике благодаря своей простоте, высокой чувствительности и широкому линейному диапазону определения. Принцип работы первых амперометрических биосенсоров был основан на детекции снижения концентрации субстратов или увеличения концентрации продуктов ферментативной реакции («биосенсоры первого поколения»). Примером для данного типа биосенсоров может служить сенсор на основе глюкозооксидазы. В этом случае субстратом является O_2 , а продуктом реакции – H_2O_2 . Детекция при этом проводится по току восстановления образующегося на электроде H_2O_2 . Существенными недостатками данного биосенсора являются низкая растворимость O_2 и связанные с этим диффузионные ограничения, а также низкая воспроизводимость и необходимость использования высокой разницы потенциалов (что приводит к протеканию различных побочных окислительно-восстановительных процессов) [5,6].

Введение в анализируемую смесь различных молекул-медиаторов, которые участвуют в переносе электронов между активным центром фермента и электродом, позволяет существенно снизить значение рабочего потенциала. Биосенсоры, в работе которых используется медиаторный перенос электронов, получили название «биосенсоров второго поколения». Соединения, выполняющие роль медиаторов, должны отвечать ряду условий: их окисление и восстановление должно быть обратимым, окисленная и восстановленная формы должны быть стабильны, окислительно-восстановительный потенциал должен быть сопоставим с потенциалом ферментативной реакции. Кроме того, медиатор не должен быть токсичным. Главным недостатком использования медиаторов является их «вымывание» из реакционной смеси при многократном использовании биосенсора или при хранении, что приводит к ухудшению его характеристик.

В последнее время всё большее внимание исследователей уделяется безреагентным биосенсорам, основанным на прямом переносе электронов между активным центром фермента и поверхностью электрода («биосенсоры третьего поколения») [6]. К ним относятся и биосенсоры, в которых перенос происходит после предварительной модификации поверхности электрода. Основным ограничением для ферментов, определяющим возможность существования прямого переноса электронов, является близкое расположение активного центра к поверхности глобулы. Наличие прямого переноса было показано для ряда пероксидаз.

Пример биотопливного элемента на основе глюкоза/ H_2O_2 с использованием GOx в качестве анодного и HRP в качестве катодного биокатализатора представлен в работе [6]. Установка состоит из двух отсеков с определенными концентрациями глюкозы и H_2O_2 . Смесь GOx, нафтохинона и многослойных углеродных нанотрубок (МСУНТ) была заключена в корпус из оргстекла с образованием биоанода. Биокатод был изготовлен таким же образом с использованием смеси HRP и МСУНТ. Биоэлектроды были интегрированы в проточную установку. Перекись водорода проводится от анода к катоду на основе HRP, снабжая этот фермент его природным субстратом, который полностью расходуется. Такая конструкция уменьшает ограничения диффузии кислорода к катоду и обеспечивает высокие показатели по стабильности и активности.

В работе [5] бианод получали измельчением смеси 100 мкл дистиллированной воды, 5 мг 1,4-нафтохинона, 15 мг GOx из *AspergillusNiger* (174 Umg-1) и 35 мг МСУНТ. Такая же процедура применялась для биокатода с использованием 15 мг HRP из хрена и 35 мг МСУНТ. Каждая из полученных однородных паст прессовалась в плексигласовом корпусе толщиной 3 мм с отверстием диаметром 1,3 см с помощью гидравлического пресса [5, 6].

Биотопливные элементы конструируются в соответствии с конкретной конфигурацией. Пример биоэлемента изображен на рисунке. Кусок оргстекла толщиной 3 мм спроектирован с отверстием в центре диаметром 13 мм. Микропористый газодиффузионный слой (далее как ГДС) помещается на задней стороне плексигласа. Этот материал служит в качестве коллектора электронов и одновременно обеспечивает диффузию кислорода в раствор глюкозы. После смесь МСУНТ-фермент вводят под давлением в отверстие плексигласа. Открытую сторону электрода покрывают слоем целлюлозы, который служит резервуаром для электролита. Лист политетрафторэтилена (ПТФЭ) толщиной 100 мкм вставляют между биоанодом и биокатодом в качестве разделителя и для предотвращения утечки электролита. Для обеспечения постоянного потока глюкозы в ячейке используют перистальтический насос или стандартный мешок для перфузии глюкозы. Поток $0,2 \text{ мл} \cdot \text{мин}^{-1}$ ориентирован от анода к катоду [6].

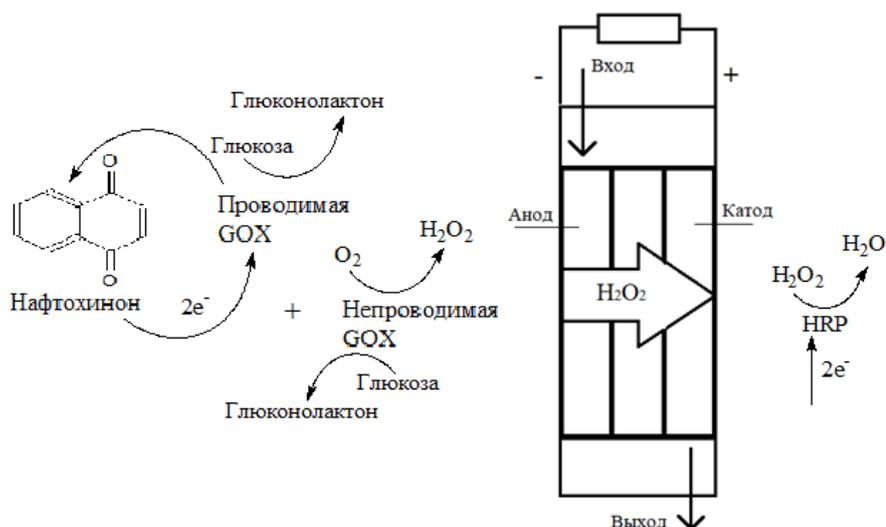


Рисунок. Схематическое изображение потока реагентов через биотопливную камеру

На аноде проводящая GOx потребляет глюкозу, а вовлеченные в реакцию электроны переносятся на электрод медиатором – нафтохиноном, при этом кислород восстанавливается непроводящей GOx до перекиси водорода. Затем H₂O₂ направляется на катод и восстанавливается до воды с помощью HRP с использованием электронов, переносимых МСУНТ.

В настоящей работе изучена активность и стабильность ферментного комплекса на основе глюкооксидазы и пероксидазы корня хрена. Изучена стабильность ферментов комплекса GOx:HRP при длительном хранении в стандартных условиях эксперимента.

Активность фермента пероксидазы по 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфонокислоте (АБТС) рассчитывается по следующей формуле (1).

$$A_n = \frac{n \Delta A 60 V_1 F 10^5}{V_2 \epsilon l 10^3} \quad (1)$$

где A – активность ферментного комплекса, мкмоль/(мин·мл); n – стехиометрический коэффициент для субстрата в реакции пероксидазного окисления (n = 1 для АБТС); Δ A – изменение экстинкции в единицу времени, с⁻¹; 60 – количество секунд в 1 мин; V₁ –

объем реакционной смеси, мл; V_2 – объем фермента в реакционной смеси, мл; F – фактор разведения; ε – коэффициент молярной экстинкции субстрата реакции, равный $36800 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$ при длине волны равной 405 нм.

Все измерения проводили спектрофотометрически с помощью спектрофотометра UV/VISExcellence.

Реакция взаимодействия пероксидазы и глюкооксидазы проходит в два этапа. Первый – окисление глюкооксидазой β -D-глюкозы до β -D-глюконолактона и H_2O_2 в присутствии кислорода. На второй стадии реакции хромогенный субстрат окисляется с помощью H_2O_2 в присутствии пероксидазы хрена с последующим изменением цвета, наблюдаемым с помощью спектрофотометра. АБТС является хромогенным субстратом, необходимым для реакции. Концентрацию образовавшегося от АБТС голубовато-зеленого окисленного продукта измеряют спектрофотометрически при 405 нм. Реакция глюкооксидазы с хромогенным красителем АБТС представлена формулами (2), (3).



Изменение активности ферментативного комплекса GOX:HRP рассчитывается в течении месяца при стандартных условиях эксперимента по изменению скорости реакции. Полученные расчеты приведены в таблице 1.

Таблица

Изменение скорости ферментативной реакции
в зависимости от концентрации раствора

Время хранения в стандартных условиях эксперимента	$[\text{S}_0] \times 10^{-4}$, моль/л	$-(d[\text{S}]/dt) \times 10^{-7}$, моль/(л с)	Активность ферментного комплекса, %
GOx:HRP	0.37	9.82	100.00
120 ч.	0.36	9.42	95.93
240 ч.	0.36	8.06	82.06
480 ч.	0.24	5.23	53.26
1440 ч.	0.23	5.17	51.03

В таблице приведены данные, подтверждающие, что скорость реакции окисления D-глюкозы кислородом воздуха в присутствии

комплекса окислительно-восстановительных ферментов GOx и HRP падает незначительно при хранении биферментного комплекса.

Активность ферментного комплекса в течение двух месяцев понизилась на 49%. Этот факт можно объяснить высокой степенью активности нативных ферментов. Такого рода комплекс ферментов можно успешно применять для создания фермент-полимерных матриц для нанесения на электроды и увеличения производительности работы биотопливных ячеек.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 19-08-00186).

Список литературы

1. Veitch Nigel C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme // *Phytochemistry* 2004 V. 65, P. 249–259.
2. Aneeqa Tahir, Sikander Ali Isolation and purification of Glucose Oxidase from different Fungal sources // *Advance Pharmaceutical Journal*. 2016. V. 1(3), p. 71–79.
3. Грачева И. М., Технология ферментных препаратов // М.: «Агропромиздат», 1987, С 276-278.
4. Turner A., Karube I., Wilson G. Biosensors, fundamentals and applications // Oxford: Oxford University Press, 1987, P. 240.
5. Abreu C., Nedellec Y., Ondelc O., Buretc F., Cosnier S., Le Go A. Glucose oxidase bioanodes for glucose conversion and H₂O₂ production for horseradish peroxidase biocathodes in a flow through glucose biofuel cell design // *Journal of Power Sources*. 2018 V. 392. P. 176–180.
6. Kavanagh P., Leech D.. Mediated electron transfer in glucose oxidising enzyme electrodes for application to biofuel cells: recent progress and perspectives // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2013 V. 15 (14) P. 4859–4869.

Об авторах:

Лакина Наталия Валерьевна – кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, Тверской государственный технический университет, химико-технологический факультет, e-mail: lakina@yandex.ru.

Долуда Валентин Юрьевич – доктор химических наук, доцент, профессор кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, Тверской государственный технический университет, химико-технологический факультет, e-mail: doludav@yandex.ru.

Сульман Михаил Геннадьевич – доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой биотехнологии, химии и стандартизации, Тверской государственный технический университет, химико-технологический

факультет, e-mail: sulmanmichail@online.tver.ru.

Лакина Маргарита Евгеньевна – студентка 4 курса Тверского государственного технического университета, e-mail: marusalew15@yandex.ru.

Сивенок Артем Михайлович – студент 4 курса Тверского государственного технического университета, e-mail: webbot1997@gmail.com.

STUDY OF THE ACTIVITY OF A COMPLEX OF REDOX ENZYMES TO IMPROVE THE PERFORMANCE OF BIOFUEL CELL ELECTRODES

N.V. Lakina, V. Y. Doluda, M.G. Sulman, M.E. Lakina, A.M. Sivenok

Tver State Technical University, Tver

This paper presents an overview of methods for producing bioelectrodes based on the enzyme complexes of glucose oxidase and peroxidase for glucose oxidation reactions used in biofuel cells. It is shown that while using peroxidase in biocathode construction the working potential of the reaction increases due to the conversion of main reaction inhibitor - hydrogen peroxide formed during the D-glucose oxidation. The experimental part of the work contains data on changes in the enzymatic activity of the redox complex of glucose oxidase and peroxidase in long-time period. It is shown that the activity of such complex remains stable for a long time. The data obtained are comparable with foreign studies and even slightly exceed the presented values of activities. High enzymatic activity can be explained by the optimal ratio of the amounts of oxidant-reducing enzymes used. In the future, the resulting modified enzyme complexes can be recommended for increasing the efficiency of biofuel cells.

Keywords: *redox enzymes, biocathode, bioanode, D-glucose, hydrogen peroxide, electrode potential.*