

УДК 66.094.3.098.

ИЗУЧЕНИЕ ОПТИМАЛЬНЫХ МЕТОДОВ НАНЕСЕНИЯ ФЕРМЕНТ-ПОЛИМЕРНЫХ КОМПЛЕКСОВ НА ПОВЕРХНОСТЬ БИОТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА

**Н.В. Лакина, В.Ю. Долуда, Э.М. Сульман, В.А. Лыса,
Д.А. Паздерина, Д.А. Паньков, А.Д. Хамайдула**

Тверской государственный технический университет
Кафедра биотехнологии, химии и стандартизации

В данной работе представлен литературный обзор данных по способам нанесения фермент-полимерных комплексов на поверхности биоэлектродов, применяемых в конструкциях биосенсоров и биотопливных элементах. Показано, что ферментные электроды могут работать как ионселективные, вольтамперометрические и амперометрические. Для иммобилизации фермента используют два метода: химическую модификацию фермента введением групп, снижающих его растворимость, и физический захват фермента инертным носителем. В работе приведены сведения о химической иммобилизации, как наиболее эффективной для изготовления ферментных электродов.

Ключевые слова: ферментные электроды, биотопливные элементы, биоэлектроды, биосенсоры.

DOI 10.26456/vtchem2019.4.7

Важным стимулом в развитии технологии топливных элементов (ТЭ) является использование при их конструировании иммобилизованных окислительно-восстановительных ферментов. Причем, в качестве полимерных носителей применяются поливинилпирролидон, полиакрилонитрил, Nafion и т.д. Ферменты могут быть гомогенно диспергированы внутри геля посредством химической и термической полимеризации водного раствора, содержащего фермент и мономер. Ферменты, переведенные в связанное состояние с помощью химической реакции, хемосорбции или адсорбции, представляют собой полимерно-ферментные системы, функционирование которых зависит от количества доступных для субстрата активных центров. Доступность активных центров достигается наиболее благоприятным пространственным положением функциональных групп фермента и модифицирующего агента.

Отличительными особенностями катализаторов белковой природы являются высокие скорости осуществляемых реакций и высокая селективность, что позволяет успешно применять их как катализаторы электрохимических процессов катодного восстановления кислорода и анодного окисления водорода. Преимуществами ферментов являются: 1) они не содержат драгоценных металлов и редких металлов и являются возобновляемыми ресурсами; 2) увеличение стабильности в результате иммобилизации; 3) в процессе реакции электроны передаются непосредственно на электрод, поэтому не требуется добавления медиаторов в раствор [1,2].

Электрические устройства требуют много энергии для выполнения своих функций. Для снижения энергопотребления производятся биоэлектрические устройства, для стабилизации которых требуется лишь небольшой источник. Эти устройства работают путем преобразования биохимической энергии в полезную электрическую энергию с помощью биокатализатора. Биотопливная ячейка состоит из 2 комплектов электродов и подходящего стабильно проводящего энергию материала для восстановления или окисления веществ с использованием биокаталитических ферментов.

Авторы работы [3] представляют конструкцию электрода, который обеспечивается кислородом за счет генерации последнего на аноде в ферментном слое; при этом содержание определяемого вещества определяется по величине тока кислорода, необходимого для поддержания стационарного давления O_2 (рис. 1).

Развитие потенциометрических биосенсоров часто связывают с продолжением исследований способов применения ионселективных электродов (ИСЭ) [4]. Такое представление обусловлено двумя причинами. Во-первых, большинство высокоимпедансных электрохимических биосенсоров, описанных в литературе, включают ИСЭ; во-вторых, причиной разработки этих модифицированных электродов была идея расширить аналитические возможности базового датчика. Редокс-электроды менее избирательны и, следовательно, могут иметь более широкое применение. Авторы исследовательской работы выделяют общие черты биосенсоров на основе ИСЭ и редокс-электродов:

- 1) Их селективность определяется биологической активностью материала, непосредственно связанного с рабочим электродом.
- 2) Аналитический сигнал, в данном случае э.д.с., измеряется в условиях нулевого тока, что обуславливает необходимость использования высокоимпедансной измерительной аппаратуры.

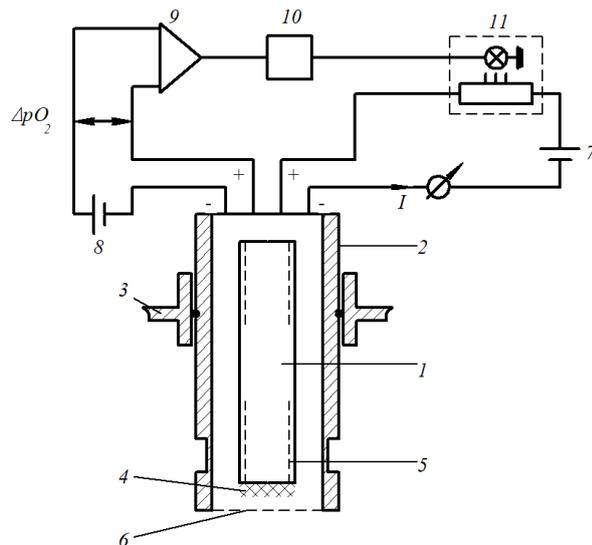


Рис. 1. Электрод на основе оксидазы, снабжаемый электролитическим кислородом. 1 – кислородный электрод; 2 – корпус электрода; 3 – крышка ферментера; 4 – Pt сетка с иммобилизованным ферментом; 5 – Pt спираль (катод); 6 – полупроницаемая мембрана; 7 – источник напряжения, прилагаемого к электродам; 8 – источник задаваемого напряжения; 9 – дифференциальный усилитель; 10 – контроллер; 11 – регулятор тока электролиза

Авторы исследовательских работ [5,6] изучали два подхода к созданию потенциометрических биосенсоров на основе редокс-электродов с биокаталитической поверхностью. В качестве примеров биокатализа на поверхностях редокс-электродов можно привести работы с глюкозооксидазой, глицериндегидрогеназой и уреазой. В системе с блокированной границей раздела можно использовать комплекс антитело - антиген, который служит промежуточным звеном для передачи потенциометрического сигнала, обуславливаемого изменениями концентрации определяемого компонента. Упомянутые системы были изучены экспериментально. Наиболее хорошо изучена глюкозо-оксидазная редокс-электродная система. Глюкозооксидаза катализирует реакцию между D-глюкозой и O_2 с образованием глюконолактона и пероксида водорода. Отмечается, что в биокаталитических ферментных редокс-электродных системах оксидоредуктазный фермент иммобилизован на поверхности электрода, а определяемое вещество находится в растворе.

Изученные в работе [7] редокс-системы включали: 1) иммобилизацию кофактора фермента, например порфирина или

флавина, на поверхности электрода, так как содержащиеся в пробе апоферменты катализируют окисление или восстановление иммобилизованных редокс-центров; 2) иммобилизацию фермента и медиатора на поверхности электрода. В частности, фермент был иммобилизован на электроде из благородного металла или углерода. Предполагалось, что потенциал этих электродов зависит от концентрации глюкозы, кислорода и пероксида водорода в растворе, а также наличия функциональных групп на поверхности платины или углерода. Глюкозооксидазу (в чистом виде или в смеси с каталазой) иммобилизовали на платине, пористом графите или золоте. Такая система давала непосредственный потенциометрический сигнал в растворах глюкозы при $pH=7.4$. Для приготовления ферментной системы в буферном растворе фосфата натрия ($pH=7.4$) смешивали каталазу, лиофилизованную глюкозооксидазу из *A. niger*, бычий сывороточный альбумин и глутаровый альдегид. Смесь выливали в формочку, в которой находится диск из платиновой фольги толщиной 0.05 мм. Толщину поперечно-сшитой фермент-альбуминовой матрицы варьировали с помощью прокладок на дне формы, от 0.05 до 0.32 см. При комнатной температуре сшивка белков глутаровым альдегидом длилась 2 ч. Перед проверкой ферментативной активности или потенциометрическими измерениями сшитый глутаровым альдегидом слой отмывали буферным раствором в течение 1-2 дней, чтобы удалить слабосвязанный фермент. Сшитый фермент-альбуминовый слой толщиной 0.32 см содержал около 8 мкг глюкозооксидазы (приблизительно 0,8 ед. активности). Кажущуюся активность иммобилизованного фермента определяли фотометрически с одианизидином и пероксидазой, используя глюкозу и кислород в качестве субстратов. Активность глюкозооксидазы составляла обратно пропорциональную величину толщине сшитого фермент-альбуминового слоя.

В публикациях результатов электрохимических измерений с помощью ферментосодержащих ионселективных и редокс- электродов уделяется пристальное внимание состоянию индикаторного электрода. Изучение состояния включает в себя сведения о методике очистки поверхности электрода, чистоте раствора и молекулярном строении поверхности (т.е. является ли материал поли- или монокристаллическим). Авторы работы [8] изучали влияние способа обработки поверхности платины на потенциометрический сигнал ряда редокс-электродов на основе глюкозооксидазы. Показано, что влияние предварительной обработки обусловлено тем, что на поверхности благородного металла или другого электродного материала (например, стеклоглерода) имеются электрохимически активные функциональные

группы. Присутствие этих частиц может сказываться на правильности и воспроизводимости результатов соответствующих редокс-измерений. В работе показано, что применимость редокс-электродов зависит также от выбора электрода сравнения. Это, однако, относится не только к редокс-датчикам, но и к датчикам на основе ионселективных электродов.

В данном обзоре зарубежных источников по способам нанесения фермент-полимерных комплексов на поверхность биотопливного элемента (электрода), показано, что преимущества современных ферментных электродов позволяют использовать их в качестве электродов топливных элементов.

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

Список литературы

1. Zepeng K., Kailong J., Xinping Xu, Ruiyun P., et al. // *Biosensors and Bioelectronics* 2017. V. 96, P. 367–372.
2. Zepeng K., Kailong J., Jin Ch., Ruiyun P., et al. // *Biosensors and Bioelectronics* 2018. V. 101, P. 60–65.
3. Bhat Shweta V., Swathi B.R., Rosy M., and Govindappa M. // *Int.J.Curr.Microbiol.App.Sci* 2013 V. 2(6), P. 153–161.
4. Abreu C., Nedellec Y., Ondel O., FrancoisBuretF. et al // *Journal of Power Sources* 2018. V. 392, P. 176–180.
5. Bilal M., Iqbal Hafiz M.N. // *International Journal of Biological Macromolecules* 2019. V. 130, P. 462–482.
6. Rasmussen M., Abdellaoui S., Minter S.D. // *Biosens. Bioelectron.* 2016 V. 76. P. 91–102.
7. Milton R.D., Hickey D.P., Abdellaoui S., Lim K., et al. // *Chem. Sci.* 2015. V. 6 (8), P. 4867–4875.
8. Grattieri M., Tucci M., Bestetti M., Trasatti S., Cristiani P // *Chem.Electro.Chem.* 2016. V. 3 (11), P. 1884–1889.

STUDY OF OPTIMAL METHODS OF APPLICATION OF ENZYME-POLYMER COMPLEXES TO THE SURFACE OF A BIOFUEL ELEMENT

**N. V. Lakina, V. Y. Doluda, E. M. Sulman, V. A. Lisa, D. A. Pazderina,
D. A. Pankov, A. D. Hamaydula**

Tver State Technical University, Tver

This paper presents a literature review of data on the methods of application of enzyme-polymer complexes on the surface of bioelectrodes used in the construction of biosensors and biofuel elements. It is shown that the enzyme

electrodes can work as ion-selective, amperometric and voltammetric. To immobilize the enzyme, two methods are used: chemical modification of the enzyme by introducing groups that reduce its solubility, and physical capture of the enzyme by an inert carrier. The paper provides information about the immobilization process as the most effective for the manufacture of enzyme electrodes.

Keywords: *enzyme electrodes, biofuel elements, electrodes, biosensors.*

Об авторах:

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

ДОЛУДА Валентин Юрьевич – кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, Тверской государственный технический университет, химико-технологический факультет, doludav@yandex.ru.

СУЛЬМАН Эсфирь Михайловна – доктор химических наук, профессор кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, Тверской государственный технический университет, химико-технологический факультет, e-mail: sulman@online.tver.ru.

ЛЫСА Виктория Александровна – студентка 4 курса Тверского государственного технического университета, l-a-victoria@mail.ru.

ПАЗДЕРИНА Дарья Андреевна, студентка 4 курса Тверского государственного технического университета, darya.pazderina@yandex.ru.

ПАНЬКОВ Дмитрий Александрович – студент 4 курса Тверского государственного технического университета, dima_pankov_98@mail.ru.

ХАМАЙДУЛА Анастасия Дмитриевна, студентка 4 курса Тверского государственного технического университета, nastyahamaydyla@mail.ru.

Поступила в редакцию 28 октября 2019 г.