

УДК 66.094.3.098.
DOI 10.26456/vtchem2021.1.5

ИССЛЕДОВАНИЯ СПОСОБОВ ОПТИМИЗАЦИИ СТРУКТУРЫ ФЕРМЕНТПОЛИМЕРНЫХ КОМПОЗИЦИЙ ЭЛЕКТРОДОВ БИОТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ

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

Тверской государственной технической университет, Тверь

Эффективным способом оптимизации работы электродов биотопливных элементов с помощью различных химических и электрохимических нанесений различных пленок оксидов и полимерных матриц, содержащих в своем составе окислительно-восстановительные ферменты, посвящено множество исследований. В данной работе представлена оптимальная методика включения окислительно-восстановительных ферментов в полимерную матрицу поливинилпирролидона путем его модификации хитозаном и глутаровым диальдегидом; а также путем нанесения аминопропилтриэтоксисилана и глутарового диальдегида на полимерную матрицу ацетилцеллюлозы. В результате иммобилизации ферментов в матрицу ПВП активность уменьшилась в 1.6 раза, причем максимальная степень иммобилизации составила 87%; в результате иммобилизации ферментов в матрицу АЦТ активность уменьшилась в 1.8 раза, а максимальная степень иммобилизации составила 78%. Полученные данные указывают, что полученные ферментполимерные композиции являются перспективными для использования в качестве электропроводящих пленок при модификации и улучшении свойств электродов биотопливных элементов.

Ключевые слова: биотопливные элементы, полимерные композиты, пероксидаза, глюкооксидаза, активность ферментов, электропроводящие пленки.

Введение

За последнее время достигнут значительный прогресс в области создания биотопливных элементов. Но еще предстоит решить ряд теоретических и практических вопросов как строения подобных систем так и их функционирования. В настоящее время ферментативные биотопливные элементы по-прежнему отличаются более низкой стабильностью и невысокими электрохимическими характеристиками. Основные усилия предпринимаются для улучшения стабильности посредством сочетания биотехнологических стратегий (например,

использование термофильных организмов и ферментов) и принципов разработки материалов для улучшения химического микроокружения ферментов на поверхностях электродов. Тем не менее, проблемы повышения производительности и стабильности взаимосвязаны, поскольку часто стабилизация ферментов приводит к снижению каталитической активности и, следовательно, к снижению электрохимических характеристик. Кроме того, возможно увеличение потенциалов открытых цепей за счет использования более коротких систем переноса электронов и разработки новых систем на основе медиаторов с потенциалами, более близкими к окислительно-восстановительным потенциалам фермента/кофактора. Плотность тока и плотность мощности могут быть увеличены за счет включения стратегий ускорения переноса электронов между ферментами и электродами, а также улучшения каталитической активности ферментов и способности загружать большое количество ферментов на поверхности электродов. Высокая загрузка может происходить за счет использования материалов с высокой площадью поверхности электрода. Наконец, эффективность и плотность энергии могут быть улучшены с помощью различных стратегий. Синтетическая биология научила нас, что минимальные ферментативные каскады могут быть спроектированы для различных путей реакции, но для этих минимальных ферментативных каскадов потребуются существенные технологические усовершенствования для улучшения близости между последовательными ферментами и обеспечения диффузии субстрата между катализаторами [1, 2].

Для изучения способов оптимизации композиций, наносимых на различного рода электроды биотопливных элементов с целью увеличения их мощности, был проведен анализ литературных источников.

В частности одним из способов модификации является нанесение неорганических пленок на поверхность электрода для ускорения переноса электронов между ферментами и электродами. Нанесение таких пленок может осуществляться несколькими рассмотренными ниже методами.

Химические вакуумные методы

Метод химического осаждения тонких пленок осуществляется при напуске в рабочую камеру смеси газов, содержащей компоненты получаемой пленки. Главными преимуществами метода химического осаждения являются широкий диапазон скоростей осаждения и возможность получения заданной кристаллической структуры пленки (вплоть до монокристаллов), а основным недостатком — использование токсичных, экологически небезопасных газовых смесей [3].

Реактивное катодное распыление

В отличие от физического распыления реактивное катодное распыление происходит в тлеющем разряде смеси инертного и активного газов. Частицы распыленного катода химически взаимодействуют с активным газом или образуют с ним твердые соединения, и новое вещество попадает в основу. Чтобы процесс образования вещества пленки, которая наносится, не проходил на катоде, что очень усложняет горения разряда, применяют смеси аргона с содержанием активных газов не более 10%. Для получения пленок оксидов распыления проводят в плазме аргон-кислород, нитрид - в плазме аргон-азот, карбидов в плазме аргон-угарный газ или аргон-метан. При вводе в камеру различных активных газов, получают пленки различных соединений, которые практически невозможно получить термовакuumным напылением.

Реактивное катодное распыление позволяет не только получить различные по составу пленки, но и управлять их свойствами, например удельное сопротивление резистивных пленок. Реактивное распыление широко используется для формирования высокоомных резисторов [4].

Жидкофазная эпитаксия

Жидкофазная эпитаксия в основном применяется для получения многослойных полупроводниковых соединений, таких как GaAs, CdSnP₂. Готовится шихта из вещества наращиваемого слоя, легирующей примеси (может быть подана и в виде газа) и металл-растворителя, имеющего низкую температуру плавления и хорошо растворяющий материал подложки (Ga, Sn, Pb). Процесс проводят в атмосфере азота и водорода (для восстановления оксидных плёнок на поверхности подложек и расплава) или в вакууме (предварительно восстановив оксидные плёнки). Расплав наносится на поверхность подложки, частично растворяя её, и удаляя загрязнения и дефекты. После выдержки при максимальной температуре $\approx 1000^{\circ}\text{C}$ начинается медленное охлаждение. Избытки полупроводника осаждаются на подложку, играющую роль затравки. Существуют три типа контейнеров для проведения эпитаксии из жидкой фазы: вращающийся (качающийся), пенального типа, шибберного типа.

Другим способом повышения эффективности биотопливных элементов является использование полимерных пленок и их химическая модификация различными соединениями. В настоящей работе проведено изучение влияния полимерной основы и модификаторов на активность ферментной окислительно-восстановительной системы (глюкооксидаза-пероксидаза), наиболее часто используемой в биотопливных элементах.

В данной работе выбор носителя – поливинилпирролидона (ПВП) – обусловлен прежде всего его высокой механической

прочностью и химической стабильностью, наличием высокореакционноспособных ионогенных групп (ОН), что делает возможным модификацию носителя различными функциональными группами.

Применение хитозана обусловлено тем, что, по литературным данным, хитозан широко используется в процессах, катализируемых оксидоредуктазами, причем как в качестве носителя, так и в качестве коагулянта и защитной добавки для предотвращения инактивации фермента. Наиболее важным свойством хитозана является наличие аминогрупп, которые, во-первых, позволяют использовать его при ковалентной иммобилизации ферментов, во-вторых, обуславливают высокую адсорбционную способность хитозана по отношению к хинонам, являющимся продуктами реакции окисления многих фенолов, защищая тем самым активный центр фермента от инактивации. В то же время, многими исследователями была доказана неэффективность использования чистого хитозана в качестве носителя для иммобилизации из-за его растворимости исключительно в кислой среде и высокой способности к гелеобразованию [5].

Другим полимером, часто используемом в изготовлении мембран, является ацетилцеллюлоза. В соответствии со способом изготовления мембран из ацетилцеллюлозы вещество превращают в жидкость (то есть расплавляют) и соединяют как с растворителем, так и с осадителем для ацетилцеллюлозы. Растворитель и осадитель должны представлять собой жидкости при температуре плавления ацетилцеллюлозы. Кроме того, в том случае, если мембраны предназначены для использования в медицинских или других целях и при их использовании предусмотрен прямой или непрямой контакт с живыми клетками, растворитель и осадитель предпочтительно должны быть нетоксичными и не вызывать коагуляцию. Образующуюся в результате расплавленную смесь перемешивают до однородного состояния и экструдуют в расплавленном состоянии через соответствующую экструзионную головку.

Предпочтительная смесь для получения "высокотекучих" (то есть с большой водопроницаемостью) пустотелых волокон из ацетилцеллюлозы, пригодных для использования при гемодиализе, состоит по существу из ацетилцеллюлозы при процентном отношении масс (w/w) от примерно 32 до примерно 40 процентов, глицерина при процентном отношении масс (w/w) от примерно 5 до примерно 10 процентов, и добавленного для баланса полиэтиленгликоля, имеющего молекулярную массу в диапазоне от примерно 150 до примерно 600 дальтон. Относительные количества этих трех химических соединений в расплаве могут быть изменены для получения пустотелых волокон из ацетилцеллюлозы, имеющих другие характеристики по проницаемости.

Главным преимуществом мембран из ацетилцеллюлозы является то, что мембраны могут быть залиты (заправлены исходным веществом) для использования без необходимости предварительного промывания и без необходимости слива раствора для заливки (первичного раствора). Можно просто заправить устройства и использовать их немедленно. Обычные мембраны из ацетилцеллюлозы (а также медицинские устройства, содержащие такие мембраны) требуют предварительного промывания [6].

Экспериментальная часть

Реактивы: поливинилпирролидон (ПВП) (чда, марка 11/2, сорт 1 ГОСТ 10779-78); хитозан (Chit) (2-амино-2-диокси-(1→4)-β-D-глюкопиранан, чда, “Реахим”); глутаровый диальдегид (GA), (чда, “Sigma”); пероксидаза корня хрена (Horseradish peroxidase (HRP), A=150 ед/мг, КФ 1.11.1.7, (“Sigma”); глюкооксидаза (Glucose Oxidase from *Asp.niger* (GOx), A=200 ед/мг, КФ 1.1.3.4 (“Sigma”); 2,2-азино-бис-(3-этилбензтиозолин-6-сульфоукислоты) диааммониевая соль (ABTS) (чда, “BioChemica”); ацетилцеллюлоза (АЦТ), (хч, “BioChemica”); глицерин (х.ч, “Aldrich”); полиэтиленгликоль (х.ч, “Реахим”); CH₃COOH (х. ч., “Реахим”); CH₃COONa (х. ч., “Реахим”).

Получение ферментполимерной композиции на основе поливинилпирролидона

К 10.0 г 40%-ного водного раствора ПВП добавили 10.0 г 2%-ного водного раствора хитозана. Смесь перемешивали в течение одной минуты до гелеобразного состояния. Гель при помещении в среду с избытком воды или соли при комнатной температуре абсорбирует дополнительную жидкость, но не растворяется и не разрушается. К 10 мл полученного геля добавили 1 мл 0.1% глутарового диальдегида (GA) и перемешивали с помощью магнитной мешалки в течение 6 часов. Затем добавляли ацетатный буферный раствор комплекса окислительно-восстановительных ферментов пероксидазы и глюкооксидазы в соотношении 2:5, перемешивали в течении 3 часов при t=4⁰C. Из полученного полимерного геля готовили пленку толщиной 1 мм, размещая полученный раствор по 50 мл в чашках Петри и, высушивая на воздухе при комнатной температуре. Исследуемый образец ферментполимерной композиции обозначили в работе ПВП/Chit/GA/HRP/GOx.

Получение ферментполимерной композиции на основе ацетилцеллюлозы

1г АЦТ растворяли в 20 мл полиэтиленгликоля в течение 24 ч при t=60 °C, в качестве нерастворителя (осадителя) используем глицерин в объеме 30 мл. Смесь охлаждали, фильтровали, из полученного полимерного геля формировали пленку толщиной 1 мм. Схема синтеза ацетилцеллюлозной мембраны представлена на рисунке

1. Полученную ацетилцеллюлозную пленку пропитывали раствором АРТЕS, 2% в течении 6 ч, промывали дистиллированной водой, высушивали. Полученную полимерную матрицу пропитывали раствором глутарового диальдегида 0.1%, объемом 50 мл, в течение 6 часов, тщательно промывали и высушивали на воздухе. Затем добавляли 50 мл ацетатный буферный раствор комплекса окислительно-восстановительных ферментов HRP/GOx в соотношении 2:5 и выдерживали в течение 3 часов при $t=4^{\circ}\text{C}$, после чего ферментполимерный композит промывали ацетатным буфером и высушивали. Исследуемый образец ферментполимерной композиции обозначили в работе АЦТ/АРТЕS/GA/HRP/GOx. Схематично химические стадии включения ферментов в полимерный композит представлены на рисунке 2.

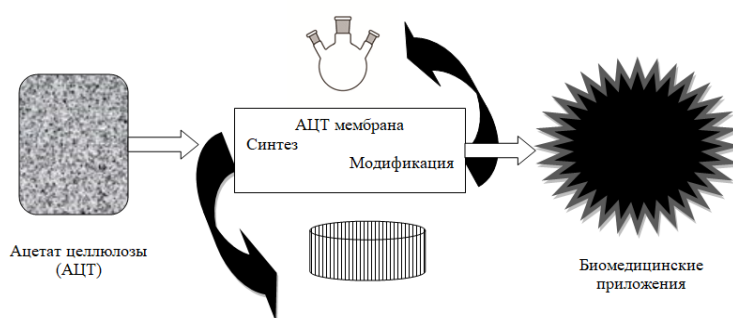


Рис. 1. Схема синтеза ацетатцеллюлозной мембраны

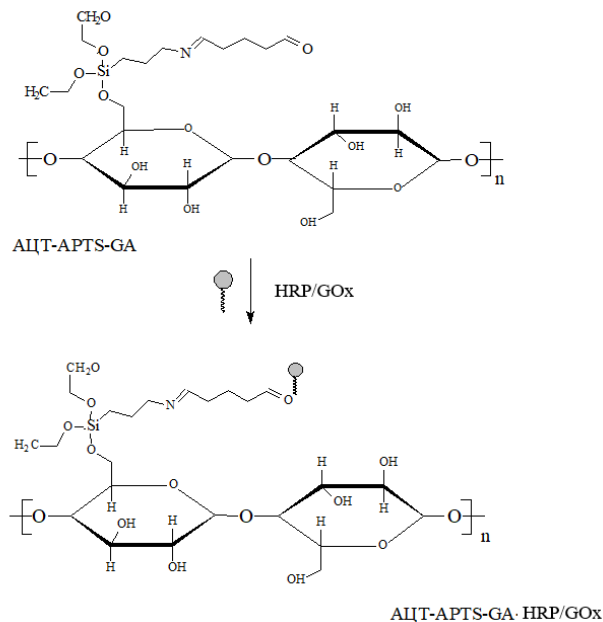


Рис. 2. Реакции функционализации ацетатцеллюлозной мембраны

окислительно-восстановительными ферментами

Измерения активности ферментной системы проводили спектрофотометрическим методом с помощью спектрофотометра UV/VIS Excellence. Реакционная смесь содержала 0.36 мМ АВТС (диаммониевая соль 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоната), 5 мМ H₂O₂, 5 мМ D-глюкозы в 0.1 М Na-ацетатном буфере (рН 4.5). Активность ферментполимерной композиции изучали при λ=405 нм, используя коэффициент экстинкции окисленного АВТС 36.8 мМ⁻¹см⁻¹. За единицу активности фермента принимали такое количество фермента, которое превращает 1.0 ммоль АВТС в минуту.

Количество адсорбированного комплекса ферментов оценивали по относительной активности по формуле (1):

$$A_{\text{адс}} = (A_{\text{имм}}/A_{\text{нат}}) * 100\% \quad (1)$$

где A_{имм} – активность биополимерного комплекса;

A_{нат} – активность нативного комплекса HRP/GOx.

Результаты и их обсуждение

В таблице представлены полученные данные по активностям ферментполимерных композиций на основе поливинилпирролидона и ацетилцеллюлозы.

Таблица

Зависимость активности биферментной полимерной матрицы от количества иммобилизованного ферментного комплекса

№ образца	Вид матрицы	Chit:GA, APTS:GA	A _{адс} , %	A, ед/мг
1	ПВП 2 г	1:2	68	92
2		1:3	50	90
3		1:4	87	50
4		1:5	80	37
5	АЦТ 2 г	1:2	40	84
6		1:3	60	68
7		1:4	78	45
8		1:5	70	28

Данные, полученные с помощью Уф-спектрофотометрии по оценке активности и степени иммобилизации ферментного комплекса HRP:GOX, показывают, что процесс иммобилизации прошел эффективно, так как активность ферментного комплекса уменьшилась незначительно. Активность комплекса ферментов в нативном растворенном состоянии составляет 150 ед/мг. В результате иммобилизации на модифицированную матрицу ПВП активность уменьшилась в 1.6 раза, причем максимальная степень иммобилизации составила 87%. В результате иммобилизации на модифицированную матрицу АЦТ активность уменьшилась в 1.8 раза, причем максимальная степень иммобилизации составила 78%.

Результаты исследований по применению комплекса ферментов для увеличения активности биополимерной матрицы можно объяснить получением достаточно эффективных размеров пор синтезированных полимерных матриц, для преодоления ферментами стерических затруднений при иммобилизации. Данный факт указывает на перспективность применения полученных ферментполимерных композиций для нанесения на электроды биотопливных элементов с целью эффективного преобразования биохимической энергии в электрическую.

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

Список литературы

1. Veitch N.C. Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme // *Phytochemistry* 2004 V. 65, P. 249–259.
2. Tahir A., Ali S. 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 Москва «Агропромиздат», 1987, с 276-278.
4. Turner A., Karube I., Wilson G., *Biosensors, fundamentals and applications* Oxford: Oxford University Press, 1987, 240 p.
5. Abreu C., Nedellec Y., Ondelc O., Buretc F., Cosnier S., [et al.]. 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 – кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии, химии и стандартизации, Тверской государственный технический университет, химико-технологический факультет, , e-mail: doludav@yandex.ru.

СУЛЬМАН Михаил Геннадьевич – доктор химических наук, профессор кафедры 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

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

Tver State Technical University, Tver

Many studies have been devoted to effective ways to optimize the operation of biofuel cell electrodes by using various chemical and electrochemical applications of various oxide films and polymer matrices containing redox enzymes. This paper presents an optimal method for the inclusion of redox enzymes in the polymer matrix of polyvinylpyrrolidone by modification with chitosan and glutaric dialdehyde; aminopropyltriethoxysilane and glutaric dialdehyde in the polymer matrix of acetylcellulose. As a result of the immobilization of enzymes into the PVP matrix, the activity decreased by 1.6 times, with the maximum degree of immobilization being 87%; as a result of the immobilization into the ADT matrix, the activity decreased by 1.8 times, with the maximum degree of immobilization being 78%. The obtained data indicate that the obtained enzyme-polymer compositions are promising for use as electron-conducting films for modifying and improving the properties of the electrodes of biofuel elements.

Keywords: biofuel elements, polymer composites, peroxidase, glucooxidase, enzyme activity, electron-conducting films.