

СОВРЕМЕННЫЕ СТРАТЕГИИ РАЗРАБОТКИ БИОЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМ

О.Н. Пономарева, В.А. Алферов

Тульский государственный университет, Тула, Россия

Биоэлектрохимическими системами (bioelectrochemical systems, BESs, БЭС) принято называть биоэлектрохимические устройства или технологии, в которых поток электронов в системе генерируется в результате биохимических реакций микроорганизмов, и используются для биотехнологических приложений, включая производство электроэнергии в микробных топливных элементах (microbial fuel cell, MFC, МТЭ) или ценных продуктов в микробных электролизных элементах (microbial electrolytic cell, MEC) [1]. Однако, в общем смысле, к биоэлектрохимическим системам можно отнести также биотопливные элементы (biofuel cell, BFC, БТЭ) на основе ферментов [2], так как принцип их функционирования основан на прямом или опосредованном переносе электронов между биологическим объектом и электродом. Электрохимические и микробные биосенсоры, в которых регистрируется генерируемый при участии биологического материала электрический ток, тоже можно отнести к БЭС. Несмотря на многочисленные исследования последних лет, которые фокусируются на разработке и характеристике биоэлектрохимических систем (согласно информации Web of Science, за последние 5 лет представлено около 2400 публикаций с термином «bioelectrochemical systems», из них 137 обзоров, что сопоставимо с числом публикаций по МТЭ и в два раза больше, чем публикаций с результатами исследований ферментных БТЭ), широкому практическому применению этих систем препятствует целый ряд нерешенных проблем фундаментального характера, связанных с эффективностью их функционирования, стабильностью, технологичностью. Кроме того, конструкция и принципы эксплуатации БЭС сложны и интересны с научной точки зрения, поэтому результаты исследований таких систем могут стать отправной точкой для новых идей будущего в области разработки природоподобных технологий. По каждому из направлений исследований в этой области существуют оригинальные инновационные решения. В этом небольшом обзоре авторы хотели бы остановиться только на некоторых из них, касающихся интересов научного коллектива и их ближайших коллег.

Ферментные биотопливные элементы и биосенсоры. Одним из критических условий успешного функционирования ферментных биосенсоров и БТЭ является эффективность переноса электронов между ферментом и поверхностью электрода. Для улучшения характеристик биоэлектрохимических устройств на основе ферментов (чувствительности биосенсоров или выходной мощности БТЭ) разрабатываются три наиболее важных стратегии: применение методов белковой инженерии для направленной модификации ферментов, получение полимеров с особыми свойствами (дизайнерских полимеров) для иммобилизации ферментов и применение наноматериалов [3]. Направленное конструирование ферментов позволяет настроить их стабильность, активность и специфичность. Если прямой перенос электронов от фермента на электрод неблагоприятен, в систему можно ввести полимеры, которые опосредуют перенос электронов на поверхность электрода или от нее. Наконец, встраивание наночастиц в материал электрода или на его поверхности обеспечивает формирование каркасов для иммобилизации биокаталитических элементов или направленной ориентации активных центров белков посредством адсорбции или химической реакции с функциональными группами. В научном коллективе авторов доклада разрабатываются некоторые методические подходы по всем трем вышеперечисленным направлениям. В дополнение к этим стратегиям следует отметить такие важные инновационные разработки, как биосенсоры с автономным питанием и самозарядные биосуперконденсаторы, на что необходимо обратить внимание в будущем.

При разработке миниатюрных БТЭ безмедиаторного типа на биоанодах предложено использовать пирролохинолинхинон (PQQ) – зависимые ферменты, прежде всего глюкозодегидрогеназу [4]. В БТЭ, работающих на метаноле, применили ферментативный каскад, включающий НАД-зависимую метанолдегидрогеназу (МДГ) [5]. Кофактор дегидрогеназ PQQ, в отличие от НАД⁺, прочно связан с активным центром фермента, поэтому PQQ-МДГ является перспективным ферментом для разработки метанольных биосенсоров и биоанодов. Продуцентами нативного фермента [6] и рекомбинантного фермента, полученного методом гомогенной экспрессии (данные не опубликованы), являются метилотрофные бактерии.

Для ориентированной адсорбции PQQ-МДГ использовали гидроксиапатит, способный к образованию координационной связи с коферментом [7]. В обоих случаях наблюдался опосредованный медиаторами эффективный перенос электронов. При получении рекомбинантного белка экспрессировали только одну субъединицу, но получили функционально активную МДГ, содержащую полигистидиновую метку (His)₆ для быстрого выделения целевого белка. Результаты этих исследований представлены на конференции (Карасевой Т.А., ТулГУ.).

В катодном отделении БТЭ кислород – наиболее распространенный и легко доступный акцептор электронов. Однако высокое перенапряжение реакции электрохимического восстановления кислорода затрудняет использование таких катодов в БТЭ. При разработке миниатюрных БТЭ безмедиаторного типа на биокатодах предложено использовать лакказы. Лакказа – фермент, способный восстанавливать кислород до воды с использованием как органических восстановителей, так и за счет прямого переноса электронов от электрода. Различные типы лакказ могут быть использованы в БТЭ, однако нам не удалось найти прямых рекомендаций о применении какого-то определенного типа лакказ в биокатодах, хотя при выборе некоторые характеристики этих ферментов следует учитывать, например потенциал Т1-центра [8]. В сотрудничестве с коллегами Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина проводятся исследования по применению различных лакказ в биокатализе и биоэлектрохимических системах: грибных лакказ [9], которые традиционно используются в БТЭ, и термостабильных бактериальных лакказ с направленной мутацией по активному центру фермента [10]; разрабатываются биосенсоры и биокатоды на их основе. Некоторые недавно полученные результаты представлены на конференции (Алферов С.В., ТулГУ).

Прогресс в создании нано/био интерфейсов с переносом заряда достигнут путем применения углеродных наноматериалов, в том числе углеродных нанотрубок (одностенных и многостенных, немодифицированных и карбоксилированных), для сопряжения с электродом ферментов (глюкозооксидазы [11–12], алкогольоксидазы и лактатооксидазы [13]) и ферментных систем (мембранных фракций уксуснокислых бактерий [14]), как и 2D углеродных материалов (например, терморасширенного графита и графена [15]) и полиароматических углеводородов (например, коронена (рис. 1), последние могут взаимодействовать с активными центрами лакказ как аналоги субстратов.

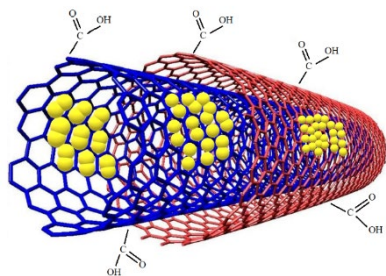


Рисунок 1. Схематическое взаимодействие карбоксилированных многостенных нанотрубок и коронена

Хотя прямой перенос электронов при участии наноматериалов осуществим для многих ферментов, в некоторых случаях он неэффективен. Если расстояние между каталитическим центром и электродом слишком велико, становится трудно установить быстрый прямой перенос электронов. Один из способов преодолеть такое большое расстояние туннелирования электронов – использовать окислительно-восстановительные медиаторы, которые перемещают электроны от окислительно-восстановительного центра фермента к поверхности электрода (медиаторный электронный транспорт, МЭТ). После иммобилизации фермента на поверхности электрода в раствор электролита можно добавлять свободно диффундирующие окислительно-восстановительные медиаторы. Однако этот подход непрактичен, поскольку он загрязняет систему медиатором. Более эффективная стратегия – интегрировать окислительно-восстановительный медиатор в макромолекулу, обычно в

полимер. Редокс-соединения связаны с полимерной структурой как часть ее основной цепи или встроены в нее как дополнительные компоненты. Кроме того, в конструкции биоэлектродов можно использовать несколько классов полимеров, включая окислительно-восстановительные полимеры, собственно проводящие полимеры, непроводящие полимеры с добавлением медиаторов и наноматериалов. При разработке биоанодов и биосенсоров на основе ферментов, целых клеток микроорганизмов и субклеточных структур для одновременной иммобилизации биоматериала и организации пути переноса электронов использовали гидрогели различной природы и состава. Иммобилизация в высокопроводящий полимер поли (3,4 – этилендиокситиофен (ПЭДОТ, PEDOT) мембранных фракций уксуснокислых бактерий, для которых характерна мембранная локализация многих дегидрогеназ, позволила осуществить прямое биоэлектрокаталитическое окисление глюкозы в исследуемой системе [16].

Редокс-активные полимеры на основе хитозана и бычьего сывороточного альбумина (БСА) были синтезированы путем ковалентной модификации медиаторами ферроценом, метиленовым синим или тионином. При последующем встраивании глюкозооксидазы и углеродных нанотрубок в сетку зацепления полимерного гидрогеля регистрировали биоэлектрохимическое окисление глюкозы [11]. Эти редокс-гидрогели показали свою эффективность в сочетании с целыми клетками бактерий [17–19], что в будущем предполагает возможность разработки искусственных биопленок с переносом заряда для микробных топливных элементов. В процессе золь-гель синтеза силикагеля, который является диэлектрическим материалом, в присутствии углеродных нанотрубок и глюкозооксидазы удалось получить электропроводящий гибридный материал для создания биоэлектродов [20]. В отличие от окислительно-восстановительных полимеров, проводящие полимеры позволяют электронам проходить через основную цепь полимера. Полипиррол, полианилин (ПАНИ) и политиофен используются в биоэлектрохимии, их синтезируют путем электрополимеризации. Регулируя заряд, подаваемый в процессе полимеризации, можно регулировать толщину полимерной пленки. Кроме того, проводящие полимеры не только поддерживают перенос заряда, но также могут составлять иммобилизационную матрицу для захвата биоматериала на поверхности электрода. Проводящие полимеры объединяют с наночастицами и медиаторами с образованием проводящих нанокомпозитов. Результаты по этому направлению представлены на конференции (Арляпов В.А., ТулГУ). Описанные гибридные редокс-гидрогели и матрицы с электропроводящими свойствами являются перспективными материалами для разработки биоэлектрохимических систем как на основе оксидоредуктаз, так и на основе целых клеток.

Микробные электрохимические системы. В отличие от ферментных электрохимических систем, восстановительные эквиваленты микроорганизмов генерируются в результате внутриклеточного энергетического метаболизма. Поскольку клеточная мембрана изолирована, необходимым предварительным условием для протекания электрохимических реакций является то, что электроны могут беспрепятственно перемещаться через мембрану. Существует три основных механизма внеклеточного транспорта в БЭС на основе микроорганизмов [21]: электроны перемещаются по нанопроводам (проводящим пиллям), посредством особого белкового мембранного комплекса и / или опосредуются эндогенными или экзогенными электронными медиаторами (рис. 2).

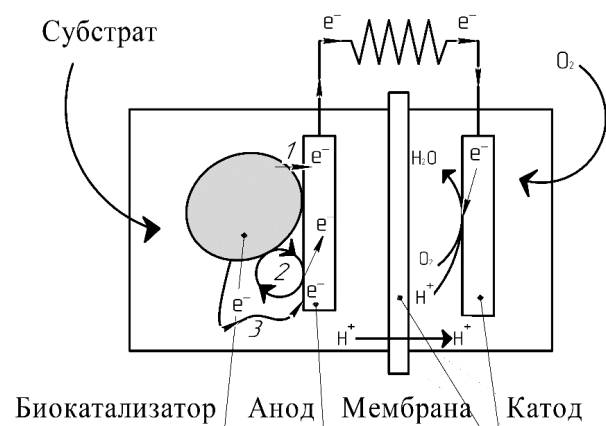


Рисунок 2. Схема работы двухкамерного микробного топливного элемента. Пути переноса электронов: 1 – прямой перенос электронов, 2 – через медиатор, 3 – по нанопроводам

Для электрохимически активных штаммов бактерий характерны разные механизмы проводимости. Так, *Shewanella* имеет полный набор внеклеточных цепей переноса электронов: белковые каналы, образованные цитохромами внешней мембраны; синтез и высвобождение рибофлавина способствует трансмембранному переносу электронов. Другие модельные бактерии, *Geobacter*, способны синтезировать проводящие пилы (нанопроволоки) и имеют цитохромы во внешней мембране. Типичный МТЭ состоит из анаэробной анодной и аэробной катодной камер, соединенных протон-проводящей мембраной. На аноде микроорганизмы окисляют органические субстраты, генерируемые восстановительные эквиваленты по одному из описанных выше механизмов окисляются на электроде, поток электронов направляется по внешней цепи на катод.

Кислород восстанавливается на катоде и связывается с протонами, которые поступают в катодное пространство через мембрану. Наличие биопленки обеспечивает прямой перенос электронов на большие расстояния, высокую каталитическую скорость и высокую выходную мощность [2].

Электрохимически неактивные бактерии не имеют полностью функциональной внеклеточной системы переноса электронов, и почти ни один из штаммов не способен секретировать природные медиаторы.

Для таких микроорганизмов необходимо присутствие искусственных акцепторов электронов. В этом направлении в нашем научном коллективе получены значительные результаты, опубликованные в высокорейтинговых изданиях и составивших основу нескольких диссертаций. Некоторые аспекты продолжающихся исследований по этому направлению изложены выше и формируют основу для дальнейшей разработки биоанодов с искусственной биопленкой микроорганизмов.

Хотя бактерии разделяют на электроактивные и неактивные, до конца граница так и не ясна. Например, после инкубации микроорганизмов в электрохимических системах потребовался пусковой период в виде постоянного напряжения на электроде, чтобы активировать процесс образования биопленки и выработки электроэнергии. В коллективе получены первые результаты таких исследований, однако для эффективного функционирования сформированной на электроде биопленки пока еще необходимо добавление медиатора.

Еще одним направлением исследований биоэлектрохимических систем является выяснение возможностей использования ацидофильных хемолитотрофных микроорганизмов, применяемых в биогидрометаллургии при добыче металлов из сульфидных руд, в технологии биотопливных элементов [22, 23]. Некоторые виды микроорганизмов этой группы способны при определенных условиях генерировать электроэнергию. Использование экстремофилов в микробных топливных элементах представляет особый интерес, поскольку эти микроорганизмы могут служить биоэлектрокатализаторами при экстремальных значениях pH, солености и температуры, в то время как подавляющее большинство микроорганизмов в подобных условиях работать не способно.

Для всех типов биоэлектрохимических систем эффективность преобразования энергии является ключевым фактором, определяющим производительность биоэлектрохимических систем, особенно этап преобразования энергии, перенос электронов играет важную роль на этом этапе. Понимание механизма переноса электронов в биоэлектрохимических расширит будущее применение биоэлектрохимических систем и позволит создавать эффективные природоподобные технологии.

Благодарим за интересное и плодотворное сотрудничество коллег: Решетилова А.Н. и сотрудников лаборатории биосенсоров; Трубицыну Л.И. и Трубицына И.В.; Коломыцеву М.П. и сотрудников лаборатории энзиматической деградации органических соединений (Институт биохимии и физиологии им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино); Абдулатипова А.В. (Институт фундаментальных проблем биологии РАН, г. Пущино); Стома Д.Э. и коллег из Иркутского государственного университета.

Исследования выполнены в рамках выполнения государственного задания Минобрнауки РФ (No. FEWG-2020-0008).

Литература

- Sleutels TH, Ter Heijne A, Buisman CJ, Hamelers HV. Bioelectrochemical systems: an outlook for practical applications. // ChemSusChem. 2012. V 5(6). P.1012–1020.
- Zheng, T., Li, J., Ji, Y., Zhang, W., Fang, Y., Xin, F., Dong, W., Wei, P., Ma, J. and Jiang, M. Progress and prospects of bioelectrochemical systems: Electron transfer and its applications in the microbial metabolism. // Front Bioeng Biotechnol. 2020. V. 8(10). P. 1–10.
- Pinyou, P., Blay, V., Muresan, L.M. and Noguera, T. (2019) Enzyme-modified electrodes for biosensors and biofuel cells. // Materials Horizons. 2019. V. 6(7). P. 1336–1358.
- Bollella, P., Lee, I., Blaauw, D. and Katz, E. (2020) A microelectronic sensor device powered by a small implantable biofuel cell. // Chemphyschem. 2020. V. 21(1). P.120–128.
- Wu, G., Gao, Y., Zhao, D., Ling, P. and Gao, F. Methanol/Oxygen Enzymatic Biofuel Cell Using Laccase and NAD[±]-Dependent Dehydrogenase Cascades as Biocatalysts on Carbon Nanodots Electrodes. // ACS Appl Mater Interfaces. 2017. V. 9(46). P. 40978–40986.
- Кузнецова Т.А., Бесчастный А.П., Понаморева О.Н., and Троценко Ю.А. Очистка и характеристика метанолдегидрогеназы ризосферного фитосимбионта *Methylobacterium nodulans*. // Прикладная биохимия и микробиология. 2012. Т. 48(6). С. 606–611.
- Кузнецова Т.А., Бесчастный А.П., Алфёров С.В., Троценко Ю.А. Свойства модифицированных амперометрических биосенсоров на основе метанолдегидрогеназы и клеток *Methylobacterium nodulans*. // Прикладная биохимия и микробиология. 2013. Т. 4(6). С. 613–618.
- Голикова В.И., Гордеева Т.А., Алфёров С.В. Биокатоды на основе лакказ в биотопливных элементах. Мини-обзор. // Известия Тульского государственного университета. Естественные науки. 2020. № 2. С. 3–11.

Shebanova, A.D., Chernykh, A.M., Baskunov, B.P., Gaidina, A.S., Myasoedova, N.M., Renfeld, Z.V., Ponamoreva, O.N. and Kolomytseva, M.P. (2021) Novel biocatalyst from *Microthielavia ovispora* VKM F-1735 for industrial dye decolorization in the absence of mediators. // *Process Biochemistry*. 2021. V. 109. P. 186–197.

Trubitsina, L.I., Abdullatypov, A.V., Larionova, A.P., Trubitsin, I.V., Alferov, S.V., Ponamoreva, O.N. and Leontievsky, A.A. Expression of thermophilic two-domain laccase from *Catenuloplanes japonicus* in *Escherichia coli* and its activity against triarylmethane and azo dyes. // *Peerj*. 2021. V. 9. P. e11646.

Арляпов В.А., Харьковская А.С., Абрамова Т.Н., Кузнецова Л.С., Илюхина А.С., Зайцев М.Г., Мачулин А.В., Решетилов А.Н. Гибридный редокс-активный полимер на основе бычьего сывороточного альбумина, ферроцена, карбоксилированных углеродных нанотрубок и глюкозооксидазы. // *Журнал аналитической химии*. 2020. Т. 75(9). С. 820–833

Илюхина А.С., Харьковская А.С., Арляпов В.А. Использование углеродных нанотрубок как основы ферментного биосенсора для определения глюкозы. // *Известия Тульского государственного университета. Естественные науки*. 2018. № 3. С. 19–25.

Арляпов В.А., Каманина О.А., Каманин С.С., Решетилов А.Н., Швец В.И. Контроль биотехнологических процессов ферментными электродами, модифицированными нанотрубками. // *Прикладная биохимия и микробиология*. 2019. Т. 55(3). С. 303–312

Паславская В.О., Алферов С.В. Эффективность биоанодов на основе иммобилизованного биокатализатора в макете биотопливного элемента. // *Актуальная биотехнология*. 2018. № 3 (26). С. 254–256.

Решетилов А.Н., Плеханова Ю.В., Тарасов С.Е., Быков А.Г., Гуроров М.А., Алферов С.В., Тенчуринов Т.Х., Чвалун С.Н., Орехов А.С., Шепелев А.Д., Готовцев П.М., Васильев Р.Г. Оценка свойств биоэлектродов на основе углеродных высокодисперсных материалов, содержащих микроорганизмы *Gluconobacter*. // *Российские нанотехнологии*. 2017. Т. 12(1–2). С. 83–89.

Kitova A., Tarasov S., Plekhanova Y., Bykov A., Reshetilov A. Direct bioelectrocatalytic oxidation of glucose by *Gluconobacter oxydans* membrane fractions in PEDOT:PSS/TEG-modified biosensors. // *Biosensors*. 2021. V. 11 (5).

Arlyapov, V.A., Kharkova, A.S., Kurbanaliyeva, S.K., Kuznetsova, L.S., Machulin, A.V., Tarasov, S.E., Melnikov, P.V., Ponamoreva, O.N., Alferov, V.A. and Reshetilov, A.N. 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. V. 143.

Арляпов В.А., Харьковская А.С., Курбаналиева С.К., Кузнецова Л.С. Использование биосовместимых редокс-активных полимеров на основе унт и модифицированных органических матриц для создания высокочувствительного БПК-биосенсора. // *Актуальная биотехнология*. 2020. № 3 (34). С. 478–481.

Курбаналиева С.К., Харьковская А.С., Арляпов В.А. Разработка биосенсора на основе бактерий *Parasoccus ucei*, иммобилизованных в электропроводящий гель БСА с нейтральным красным. // *Известия Тульского государственного университета. Естественные науки*. 2019. № 1. С. 11–21.

Kamanina O.A., Kharkova A.S., Arlyapov V.A., Kamanin S.S. Glucose biosensor based on screen-printed electrode modified with silicone sol–gel conducting matrix containing carbon nanotubes. // *3 Biotech*. 2019. V. 9(7). P. 290.

Nawaz A, Hafeez A, Abbas SZ, Ul Haq I, Mukhtar H, Rafatullah M. A state of the art review on electron transfer mechanisms, characteristics, applications and recent advancements in microbial fuel cells technology. // *Green Chemistry Letters and Reviews*. 2020. V.13(4). P.101–117.

Stom DI, Zhdanova GO, Kalashnikova OB, Bulaev AG, Kashevskii AV, Kupchinsky AB, et al. Acidophilic Microorganisms *Leptospirillum* sp., *Acidithiobacillus* sp., *Ferroplasma* sp. as a cathodic bioagents in a MFC. // *Geomicrobiology Journal*. 2021. V.38(4). P.340–346.

Калашникова О.Б., Кашевский А.В., Вардьян Н.С., Эрдэнэчимэг Д., Жданова Г.О., Топчий И.А., Понаморева О.Н., Вятчина О.Ф., Д.И. Стом. Ацидофильные хемолитотрофные микроорганизмы: перспективы применения в биогидрометаллургии и микробных топливных элементах. // *Известия вузов. Прикладная химия и биотехнология*. 2021. Т. 11(1). С. 34–52.