

УДК 66.094.3.098.

СТРАТЕГИЯ РАЗРАБОТКИ БИОМАТЕРИАЛОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЭЛЕКТРОДОВ

Н.В. Лакина, В.Ю. Долуда, В.Г. Матвеева, Э.М. Сульман

Тверской государственный технический университет, Тверь, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Одним из перспективных направлений в развитии биоэнергетики является создание биотопливных элементов на основе ферментных электродов. Поэтому исследование эффективности процессов иммобилизации ферментов и их стабилизации имеет практическую направленность. Иммобилизация и стабилизация ферментов на электродах является критическим этапом для разработки биотопливных элементов [1, 2]. Так во многих исследованиях с прямым переносом электронов использовалась адсорбция для иммобилизации фермента [3]. Хотя прямая адсорбция ферментов доказала концепции биоэлектродокатализа, но этот метод не является эффективным для стабилизации поверхностных пленок, поскольку фермент может легко вымываться во время использования. Одним из наиболее широко применяемых ферментов является пероксидаза (КФ 1.1.11.7) [4]. Исследование неорганических носителей в качестве адсорбентов ферментов для приготовления промышленных гетерогенных биокатализаторов является актуальным направлением, поскольку неорганические носители обладают очевидными преимуществами перед органическими, а именно, эти носители относительно дешевы и доступны; имеют высокую механическую прочность и низкое гидродинамическое сопротивление; инертны и устойчивы в водных средах; и, что особенно важно, свойства неорганических носителей, их геометрическая форма, текстурные характеристики, химические свойства и морфология поверхности варьируются в очень широком диапазоне. Тем не менее, не более ¼ всех научных и прикладных работ посвящено использованию данных носителей для иммобилизации ферментов [5].

В данной работе исследуются методы иммобилизации пероксидазы на определенные виды стекла и керамику, с целью дальнейшего создания ферментных электродов.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Для чистоты эксперимента стекла и керамику отмывают гексаном (чда) от пыли и других, загрязняющих носитель, веществ; промывают дистиллированной водой и сушат при 30 °С. Затем отбирают 4 пробы по 9 носителей. С каждой пробой проводят следующие процедуры:

1 проба: берут 3 образца стекла и высушивают в муфельной печи, в течение суток, при следующих температурах: 120, 300, 600 °С.

2 проба: 3 образца стекла помещают в тигли с NH_4Cl . Носители высушивают в муфельной печи, в течении суток, при следующих температурах: 120, 300, 600 °С.

3 проба: 3 образца стекла помещают в тигли с силианом, таким образом, чтобы стекла были покрыты этим реактивом. Носители высушивают в муфельной печи, в течении суток, при следующих температурах: 120, 300, 600 °С. После прокаливания носители промывают изопропиловым спиртом и высушивают при 30 °С

4 проба: 3 образца стекла помещают в тигли с NH_4Cl . Носители высушивают в муфельной печи, в течение суток, при следующих температурах: 120, 300, 600 °С. Затем стекла заливают силианом и прокаливают при той же температуре соответственно. После прокаливания носители промывают изопропиловым спиртом, водой и высушивают при 30 °С. После сушки пробы помещают в эксикатор.

Для нанесения пероксидазы корня хрена на неорганические носители использовали обработку различными сшивающими агентами с последующем нанесением фермента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Активность иммобилизованных ферментных образцов оценивали по константе Михаэлиса. Полученные данные представлены на рисунке 1.

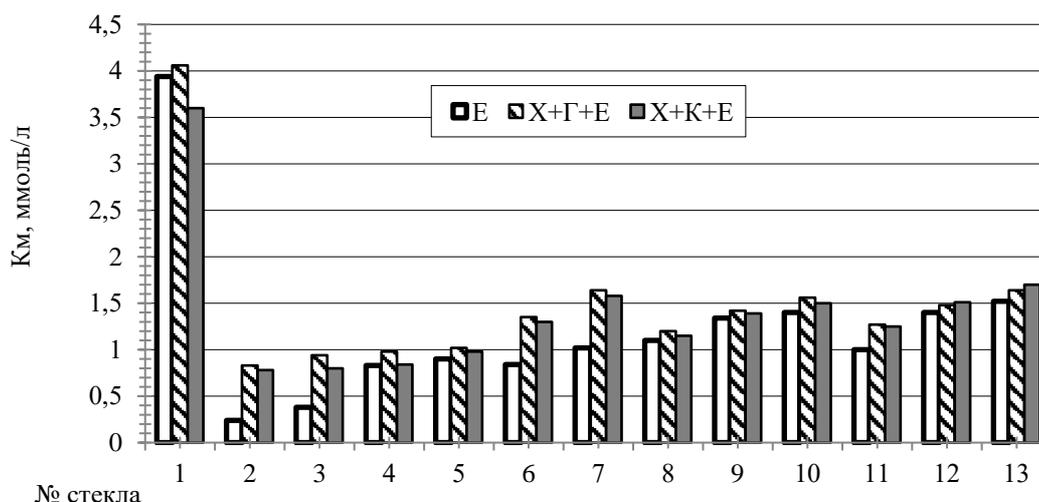


Рисунок 1 – Зависимость эффективности иммобилизации фермента от способов обработки образцов стекла и керамики

Из представленных диаграмм видно, что в серии экспериментов с непрокаленным носителем для иммобилизации фермента наименее активной является иммобилизованная ферментная система № 2, № 3, № 4. Она приготовлена путем последовательного нанесения хитозана, глутарового альдегида, пероксидазы, без предварительной обработки неорганических образцов.

Из серии экспериментов с носителем прокаленным при 120⁰ С наиболее активной иммобилизованной системой являются № 5, № 8, № 11. № 5 приготовлен путем обработки раствором хитозана, глутаровым альдегидом и пероксидазой; № 8 приготовлен путем обработки носителя NH_4Cl , хитозаном, глутаровым альдегидом, пероксидазой; № 11 приготовлен путем обработки носителя силианом, хитозаном, глутаровым альдегидом, пероксидазой; № 13 приготовлен путем обработки носителя силианом, NH_4Cl , хитозаном, глутаровым альдегидом, пероксидазой.

Из серии экспериментов с носителем прокаленным при 300⁰ С наиболее активной иммобилизованной системой являются № 10, № 11, № 12 и № 13. Образцы № 10 приготовлены путем обработки раствором хитозана, глутаровым альдегидом и пероксидазой; № 11 приготовлен обработкой NH₄ Cl, хитозаном, глутаровым альдегидом, пероксидазой; № 12 приготовлен путем обработки носителя силаном, хитозаном, глутаровым альдегидом, пероксидазой; № 13 приготовлен обработкой силаном, NH₄ Cl, хитозаном, карбодиимидом, пероксидазой.

Из серии экспериментов с носителем прокаленным при 600⁰ С наиболее активной иммобилизованной системой являются № 7, № 10, № 12 и № 13. № 7 приготовлен путем обработки раствором хитозана, глутаровым альдегидом и пероксидазой; № 10 приготовлен путем обработки носителя NH₄ Cl, пероксидазой; № 12 приготовлен путем обработки носителя силаном, хитозаном, глутаровым альдегидом, пероксидазой; № 13 приготовлен путем обработки носителя силаном, NH₄ Cl, хитозаном, карбодиимидом, пероксидазой.

Этот факт можно объяснить тем, что прокаливание при 300⁰С обеспечивает наибольшее количество гидроксильных групп на поверхности носителя, вследствие чего заряд данной поверхности наибольший и физическая иммобилизация происходит наиболее успешно, дальнейшая модификация силосаном и NH₄ Cl привело к созданию оптимальной концентрации на поверхности носителя химически связанных аминокрупп необходимых для ковалентной связи со сшивающими и активирующими агентами.

Напротив, на поверхности образца, прокаленного при температуре 600⁰С практически отсутствуют связанные гидроксильные группы, площадь поверхности минимальна и как следствие – иммобилизация практически не происходит.

Наибольшее родство к субстрату пирокатехину наблюдается у иммобилизованных систем приготовленных с применением в качестве сшивающего агента – глутарового альдегида, так как приводит к получению максимального количества свободных альдегидных групп способных к взаимодействию с аминокруппами фермента пероксидазы. Хитозан же известен как хороший активатор пероксидазы, из-за наличия большого количества свободных аминокрупп и они могут активировать карбоксильные группы активного фермента за счет их Вандер-Ваальсового взаимодействия. А применение карбодиимида, вероятно, приводит к перекрестной сшивке между карбоксильными и аминокруппами группами пероксидазы и является следствием снижения работы активных центров пероксидазы.

Полученные биоматериалы на основе иммобилизованной пероксидазы достаточно перспективны для применения биотопливных электрогенерирующих элементов.

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-08-00186).

ЛИТЕРАТУРА

- 1 Arechederra M.N., Jenkins C., Rincon R.A., Artyushkova K., Atanassov P., Minteer S.D. Chemical polymerization and electrochemical characterization of thiazines for NADH electrocatalysis applications *Electrochim. Acta*, 55 (2010), pp. 6659–6664.
- 2 Goran J.M., Favela C.A., Rust I.M., Stevenson K.J. Enhanced electrochemical oxidation of NADH at carbon nanotube electrodes using methylene green: is polymerization necessary *J. Electrochem. Soc.*, 161 (2014), pp. H3042-H3048.
- 3 Meredith M., Giroud F., Minteer S.D. Azine/hydrogel/nanotube composite-modified electrodes for NADH catalysis and enzyme immobilization *Electrochim. Acta*, 72 (2012), pp. 207–214.
- 4 Katz E., Willner I. Kotlyar A.B. Anon-compartmentalized glucose/O₂ biofuel cell by bioengineered electrode surfaces *J. Electroanal. Chem.*, 479 (1) (1999), pp. 64–68
5. Gregg B.A., A. Heller Cross-linked redox gels containing glucose oxidase for amperometric biosensor applications *Anal. Chem.*, 62 (3) (1990), pp. 258–263.