

УДК 544.47

А.А. Горенберг¹, А.Н. Костров^{2,1}, О.М. Саркисов¹, В.А. Надточенко¹,
В.В. Никандров³

¹ Институт химической физики им. Н.Н. Семёнова РАН

² Московский физико-технический институт (государственный университет)

³ Институт биохимии им. А.Н. Баха РАН

Каталитические реакции на поверхности мезопористых плёнок диоксида титана с иммобилизованной гидрогеназой

В работе электрохимическими методами исследованы каталитические реакции восстановления протонов среды до водорода и окисления молекулярного водорода на электроде TiO_2 с иммобилизованной гидрогеназой из пурпурных бактерий *Thiocapsa roseopersicina*. Показано, что происходит реакция прямого переноса электрона от твёрдого тела — полупроводника TiO_2 — к активному каталитическому центру гидрогеназы из пурпурных бактерий *Thiocapsa roseopersicina*. Установлено, что при использовании метилвиологена (MV^{2+}) в качестве переносчика электронов ток обмена составляет 78 мкА/см^2 .

Ключевые слова: каталитические реакции, ферментативный катализ, мезопористые плёнки, иммобилизованная гидрогеназа, диоксид титана, полупроводник TiO_2 , метилвиологен (MV^{2+}).

I. Введение

Сопряжение наночастиц неорганических полупроводников с ферментами и/или фотоферментами открывает новые возможности для использования фото- и электрохимически генерированных в полупроводнике зарядов в многоэлектронных ферментативных каталитических реакциях или для сенсibilизированной инъекции электрона из возбуждённого фотофермента в зону проводимости полупроводника. Этот подход позволяет создавать каталитические системы нового типа, способные селективно вести многоэлектронные каталитические реакции, разрабатывать сенсоры и преобразователи света в химическую энергию и электричество [1–3].

В настоящей работе сообщается о разработке новой системы на основе фермента гидрогеназы, иммобилизованного в мезопористую плёнку TiO_2 . Фермент гидрогеназа способен катализировать реакцию окисления молекулярного водорода, а также реакцию восстановления протонов до водорода:



Интерес к исследованию систем, основанных на ферменте гидрогеназы, связан с

тем, что молекулярный водород считается сегодня наиболее перспективным химическим топливом, в частности, для топливных ячеек. Таким образом, ферментативный катализ на основе фермента гидрогеназы является одним из перспективных способов получения молекулярного водорода.

Выбор мезопористых плёнок диоксида титана в качестве подложки для иммобилизации фермента был обусловлен тем, что за счёт пористости диоксида титана достигается высокая площадь поверхности, многократно (~ 1000) превышающая геометрическую площадь [4]. Эта большая поверхность с порами размеров, схожих с размером молекул фермента, позволяет адсорбировать большое количество фермента без потери его структурных свойств и активности.

Ключевыми вопросами в работе таких систем являются возможность иммобилизации фермента на полупроводник без потери структуры и активности фермента, а также возможность эффективного переноса заряда с полупроводника на активный центр фермента.

Целью данной работы является исследование электрохимическими методами нанобиокатализаторов на основе мезо-

пористых плёнок из нанокристаллов TiO_2 с иммобилизованными белковыми глобулами фермента гидрогеназы из бактерий *Thiocapsa roseopersicina*.

II. Экспериментальная часть

II.1. Материалы

В работе использовалась гидрогеназа из пурпурных бактерий *Thiocapsa roseopersicina*, штамм BBS (молекулярный вес 63Кда, состоит из двух субъединиц, содержит два редокс-центра: кластер Fe_4S_4 и Ni-центр).

II.2. Приготовление мезопористых плёнок TiO_2

Для получения мезопористых плёнок TiO_2 использовали промышленный порошок окиси титана: Aeroxide P25 (Degussa, Германия). Данный порошок, представляющий собой кристаллическую фазу, на 85% состоит из анатаза, на 15% из рутила. Средний размер частиц порошка 25 нм, удельная поверхность около $50 \text{ м}^2/\text{г}$.

Приготовление плёнок TiO_2 включает в себя следующие стадии.

1. Приготовление пасты: порошок окиси титана смешивали с полиэтилен гликолем (молекулярная масса 20 000) и ацетилацетоном $\text{C}_5\text{H}_8\text{O}_2$ ($1 \cdot 10^{-8}$ моль/л) на основе 0,25% водного раствора ПАВ (Triton X-100). Массовая доля окиси титана в пасте составляла 40%. В качестве порообразующего агента использовали полиэтилен гликоль PEG 20 000, в количестве 10% от массы TiO_2 . Ацетилацетон брали в количестве 3% от массы TiO_2 .

2. Ультразвуковое диспергирование: приготовленную пасту подвергали ультразвуковому диспергированию в течение 1 часа.

3. Нанесение пасты: полученную пасту наносили на проводящее стекло ИТО методом наката.

4. Отжиг плёнок: для предотвращения растрескивания плёнок высушивали их на воздухе в течение 5–15 минут. Затем для удаления органических примесей плёнки отжигали в муфельной печи при 450°C в течение 1 часа.

Таким образом, были получены полупрозрачные плёнки TiO_2 толщиной около 8 мкм (рис. 1, 2).

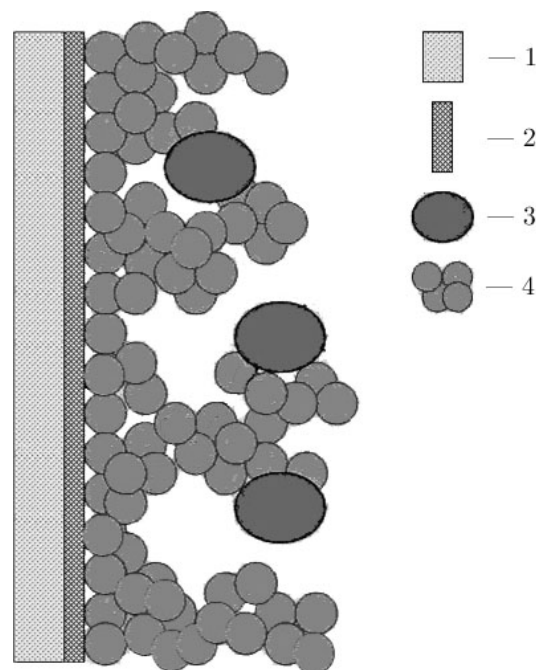


Рис. 1. Схема рабочего электрода с иммобилизованной гидрогеназой: 1 — стекло, 2 — проводящее покрытие ИТО, 3 — фермент, 4 — мезопористая плёнка диоксида титана

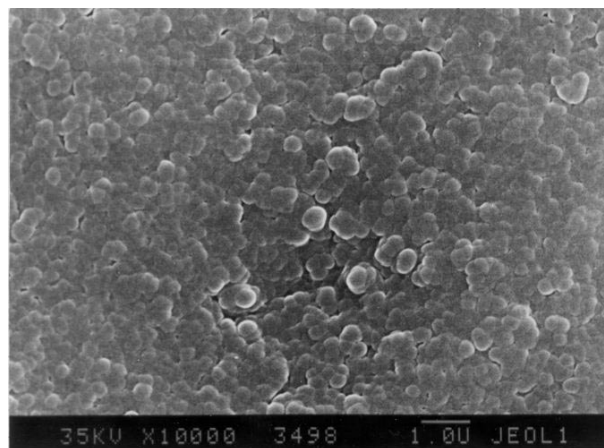


Рис. 2. Морфология мезопористых плёнок диоксида титана. Снято на сканирующем электронном микроскопе JSM35C (JEOL). Длина маркера на фотографии — 1 мкм

Далее на полученные плёнки адсорбировалась гидрогеназа. Адсорбция происходила при выдерживании плёнки в растворе гидрогеназы в течение 2–4 суток при температуре 4°C .

II.3. Электрохимическая ячейка

Используемая в работе электрохимическая ячейка представляет собой стеклянный сосуд, закрытый от падающего света металлической фольгой, герметично закрытый резиновой крышкой и заполненный электролитом. В качестве раствора

электролита во всех проведённых экспериментах использовался раствор $\text{pH} = 7,2$, содержащий $0,1 \text{ M}$ KCl и трис-буфер. Часть экспериментов была проведена с добавлением в раствор дополнительного переносчика зарядов метилвиологена MV^{2+} . Концентрация метилвиологена в растворе составляла 10^{-3} M .

III. Результаты и их обсуждение

III.1. Электрохимические измерения

Все эксперименты в работе были проведены по трёхэлектродной схеме, где в качестве рабочих электродов использовались мезопористые плёнки диоксида титана, приготовленные, как описано выше, с иммобилизованной на них гидрогеназой, а также мезопористая плёнка диоксида титана без иммобилизованной гидрогеназы. В качестве электрода сравнения нами был использован каломельный электрод ЭСр-10101, потенциал которого составлял $202 \pm 3 \text{ мВ}$ относительно нормального водородного электрода. Все окислительно-восстановительные потенциалы в работе представлены относительно каломельного электрода ЭСр-10101. В качестве противоэлектрода использовалась платиновая сетка. Внутри ячейки в течение опыта, благодаря непрерывному продуву, поддерживалась водородная или аргоновая атмосфера в зависимости от эксперимента. Все эксперименты были проведены при комнатной температуре. Электрохимические измерения проводились при помощи потенциостата PS-7.

Основной задачей электрохимических измерений в работе было получение циклических вольт-амперных характеристик при разных скоростях развёртки потенциала в аргоновой или водородной атмосферах.

III.2. Эксперименты с использованием метилвиологена в качестве дополнительного переносчика заряда

Предварительно нами была измерена активность нашего рабочего электрода. Активность измеряли по восстановлению

метилвиологена водородом в реакции, катализируемой гидрогеназой, на поверхности рабочего электрода при продуве ячейки водородом. В контрольном эксперименте нами было показано, что метилвиологен не восстанавливается водородом в отсутствие активной гидрогеназы. В реальном времени измеряли спектры поглощения раствора, и по кинетике окрашивания раствора вычислялась скорость реакции, $\lambda = 610 \text{ нм}$. Скорость реакции восстановления метилвиологена составила $7,25 \cdot 10^{-10} \text{ моль/с} \cdot \text{см}^2 \cdot \text{л}$.

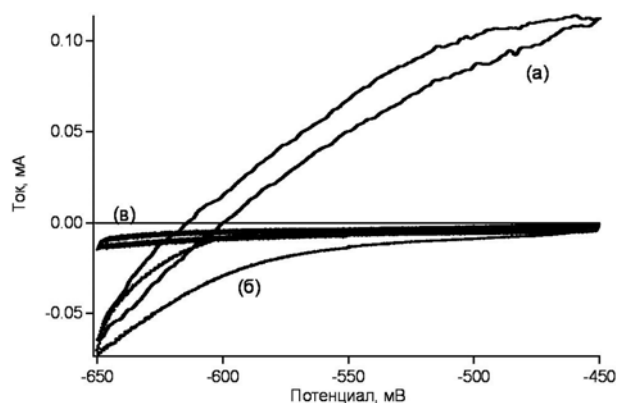


Рис. 3. Циклические вольт-амперметрические характеристики, снятые на электроде с иммобилизованной гидрогеназой в присутствии метилвиологена: (а) — в атмосфере водорода; (б) — в атмосфере аргона; (в) — циклическая вольт-амперная характеристика электрода без иммобилизованной гидрогеназы. Все потенциалы даны относительно каломельного электрода, pH раствора составлял 7,2

На рис. 3 изображены характерные циклические вольт-амперные характеристики электродов диоксида титана с иммобилизованной гидрогеназой, снятые в аргоновой (рис. 3б) и в водородной (рис. 3а) атмосферах, а также циклическая вольт-амперная характеристика плёнки диоксида титана в водородной атмосфере (рис. 3в), при скорости развёртки потенциала 2 мВ/с . Как видно из этой картинки, иммобилизация фермента приводит к существенному изменению тока в системе, что свидетельствует о каталитическом окислении/восстановлении (при соответствующем потенциале) водорода/протонов на электроде при катализе на гидрогеназе. Как видно из рис. 3, как в аргоновой, так и в водородной атмосфере наблюдается появление катодного тока, который свидетельствует о каталитической реакции восстановления протонов

водной среды. Из рис. 3 видно, что присутствие в эксперименте водорода существенно изменяет вид характеристики для электрода с ферментом. Наблюдается появление анодного тока в области от -600 мВ до -450 мВ относительно каломельного электрода. В этом диапазоне потенциалов в эксперименте, проведённом в аргоновой атмосфере, анодный ток не наблюдается. Анодный ток, зафиксированный в эксперименте в атмосфере водорода, хорошо согласуется с полученными для различных подложек каталитическими токами окисления водорода гидрогеназой [5]. Таким образом, можно сделать вывод, что регистрируемый анодный ток характеризует реакцию окисления водорода ферментом гидрогеназой на поверхности нашего электрода в присутствии метилвиологена в растворе. То есть, в этом эксперименте зафиксирован каталитический ток окисления водорода на поверхности мезопористой плёнки диоксида титана с иммобилизованной гидрогеназой в присутствии метилвиологена, который выступает в качестве переносчика электрона между электродом и ферментом. По плотности тока, зарегистрированного в эксперименте, нами была оценена скорость реакции окисления водорода. Она составила $6,25 \cdot 10^{-10}$ моль/с \cdot см² \cdot л. Этот результат хорошо согласуется с результатом, полученным для реакции восстановления метилвиологена.

Одним из основных параметров, характеризующих кинетические возможности электрода, является ток обмена. Этот параметр характеризует равенство скоростей реакции в прямом и обратном направлениях и отображается силой тока, отнесённой к единице поверхности (плотностью тока). Анализ был проведён в рамках исследования таффелевской зависимости. Была построена зависимость $\ln I_{\text{кат}}$ от сдвига потенциала по отношению к равновесному согласно уравнению

$$I_{\text{кат}} = I_0 \exp(\alpha n F \eta / RT),$$

$$\ln I_{\text{кат}} = \ln I_0 + \alpha n F \eta / RT,$$

где $\eta = E_p - E$ — сдвиг потенциала электрода по отношению к его равновесному значению, α — эмпирическая постоянная, называемая коэффициентом переноса ($0 \leq \alpha \leq 1$), T — абсолютная температура, F — постоянная Фарадея, R — газовая постоянная.

Ток обмена был рассчитан по экстраполяции таффелевского сегмента этой зависимости и составил $I_0 = 78$ мкА/см². Известные из литературы токи обмена для электродов на основе угольных электродов с иммобилизованной гидрогеназой из пурпурных бактерий *Thiocapsa roseopersicina* составляют порядка 40 мкА/см² электрода [5].

III.3. Эксперименты без использования дополнительного переносчика заряда

На рис. 4 представлена циклическая вольт-амперная характеристика электрода с ферментом в водородной атмосфере, однако этот эксперимент был проведён без метилвиологена. На этом рисунке видно, что нам также удалось зафиксировать как ток окисления водорода, так и ток восстановления протонов среды. Отличие от предыдущего эксперимента состоит лишь в значениях полученных сил токов. По сравнению с предыдущим экспериментом значения сил токов упали в 2–3 раза. Этот результат имеет принципиальное значение, так как в этом опыте зафиксирован прямой перенос электрона от твёрдого тела — полупроводника TiO_2 — к активному каталитическому центру гидрогеназы.

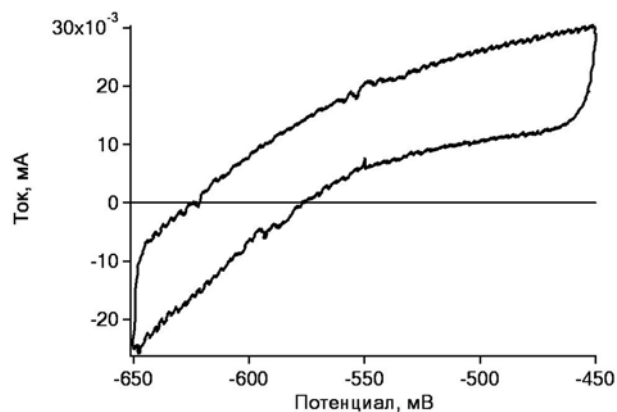


Рис. 4. Циклические вольт-амперметрические характеристики, снятые на электроде с иммобилизованной гидрогеназой в атмосфере водорода в отсутствие метилвиологена

III.4. Повторная активация электрода

Как известно, фермент может терять свою активность при окислении активного центра кислородом воздуха [6]. Этот вопрос имеет важное значение для исполь-

зования гидрогеназы в технических приложениях. Поэтому интересным представлялся также вопрос о возможной повторной его активации при воспроизводимости активности фермента. Нами был проведён эксперимент, когда после снятия циклических вольт-амперных характеристик электрод оставлялся на воздухе на сутки, происходила его дезактивация, затем электрод помещался в водородную атмосферу на три часа, после чего вновь проводился эксперимент. Как видно на рис. 5, в течение трёх дней нам удавалось реактивировать электрод без потери его активности.

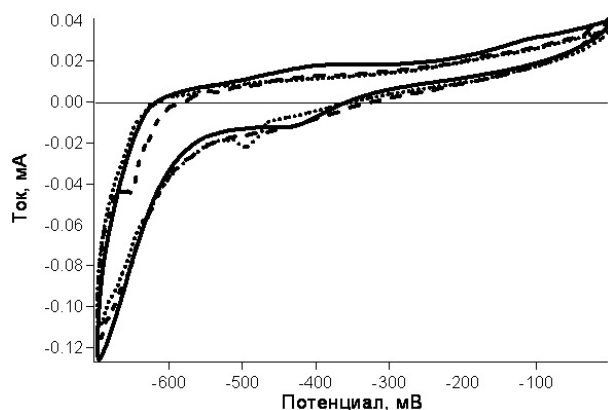


Рис. 5. Циклические вольт-амперметрические характеристики, снятые на электроде с иммобилизованной гидрогеназой в атмосфере водорода, 1-й день — сплошная линия, 2-й день — точки, 3-й день — пунктир

IV. Выводы

В настоящей работе впервые электрохимическими методами показано, что гидрогеназа из пурпурных бактерий *Thiocapsa roseopersicina*, иммобилизованная на мезопористую плёнку диоксида титана, проявляет каталитическую активность. Продемонстрирована каталитическая реакция восстановления протонов среды до водорода, которая протекает как в атмосфере аргона, так и в атмосфере водорода, то есть водород как продукт реакции не подавляет активность гидрогеназы из пурпурных бактерий *Thiocapsa roseopersicina* по отношению к реакции восстановления. Показана реакция окисления молекулярного водорода при потенциалах более положительных по сравнению с равновесным потенциалом H^+/H_2 .

Установлено, что при использовании метилвиологена в качестве переносчика электронов, ток обмена составляет 78 мкА/см^2 .

Показано, что происходит реакция прямого переноса электрона от твёрдого тела — полупроводника TiO_2 — к активному каталитическому центру гидрогеназы из пурпурных бактерий *Thiocapsa roseopersicina*.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Никандров В.В.* Неорганические полупроводники в биологических и биохимических системах: биосинтез, свойства и фотохимическая активность // Успехи биологической химии. — 2000. — Т. 40. — С. 357–396.
2. *Nikandrov V.V., Shlyk M.A., Zorin N.A., Gogotov I.N., Krasnovsky A.A.* Efficient photoinduced electron transfer from inorganic semiconductor TiO_2 to bacterial hydrogenase // FEBS Letters. — 1988. — V. 234. — P. 111–114.
3. *Pardo-Yissar V., Katz E., Wasserman J., Willner I.* Acetylcholine Esterase-Labeled CdS Nanoparticles on Electrodes: Photoelectrochemical Sensing of the Enzyme Inhibitors // J. Am. Chem. Soc. — 2003. — V. 125. — P. 622–623.
4. *Topoglidis E., Campbell C.J., Cas A.E.G., Durrant J.R.* Factors that Affect Protein Adsorption on Nanostructured Titania Films. A Novel Spectroelectrochemical Application to Sensing // Langmuir. — 2001. — V. 17. — P. 7899–7906.
5. *Воронин О.Г., Морозов С.В., Карякин А.А.* Водородные топливные электроды на основе различных гидрогеназ // Биотехнология будущего. — 2006. — № 10–12.
6. *Van der Zwaan J.W., Albracht S.P.J., Fontijn R.D., Slater E.C.* Monovalent nickel in hydrogenase from *Chromatium vinosum* Light sensitivity and evidence for direct interaction with hydrogen // FEBS Letters. — 1984. — V. 179. — P. 271–277.

Поступила в редакцию 28.12.2007.