

УДК 541.136

ФИЗИЧЕСКАЯ ХИМИЯ

Член-корреспондент АН СССР И. В. БЕРЕЗИН, С. Д. ВАРФОЛОМЕЕВ,
А. И. ЯРОПОЛОВ, В. А. БОГДАНОВСКАЯ, М. Р. ТАРАСЕВИЧ

БИОХИМИЧЕСКИЕ ТОПЛИВНЫЕ ЭЛЕМЕНТЫ. ГИДРОГЕНАЗА КАК КАТАЛИЗАТОР ОКИСЛЕНИЯ ВОДОРОДА В СИСТЕМЕ МЕДИАТОР — УГОЛЬНЫЙ ЭЛЕКТРОД

Биоэнергетические процессы, протекающие в живых организмах, характеризуются высокой эффективностью преобразования химической энергии в другие формы энергии. Эти процессы включают большое число переносчиков электронов, ферменты и полиферментные системы. Успешное развитие методов получения, стабилизации и иммобилизации биополимерных катализаторов в настоящее время позволяет поставить задачу разработки эффективных преобразователей энергии на основе использования уникальных каталитических свойств ферментов. В этом плане весьма привлекательной задачей является разработка систем, преобразующих химическую энергию в электрическую. Особенности биокатализаторов позволяют наметить два основных пути применения биохимических реакций в электрохимических источниках тока.

1. Создание топливных элементов, использующих в качестве топлива продукты ферментативного расщепления сложных органических веществ (^{1, 2}). В (^{3, 4}) обсуждается возможность использования в качестве топлива глюкозы. В (⁵) ставится задача разработки электрохимических преобразователей на основе дегидрогеназ, окисляющих спирты.

2. Использование ферментов в качестве гетерогенных катализаторов, ускоряющих перенос электронов с топлива (или окислителя) на электрод, что должно обеспечить повышение мощности элементов на единицу объема или веса. Ориентировочные расчеты показывают, что при условии окисления топлива в кинетическом режиме, в котором лимитирующей стадией является каталитическая ферментативная реакция, могут быть достигнуты весьма высокие скорости реакций в единице объема элемента. Ферментативные реакции в большинстве случаев характеризуются константами скорости, лежащими в диапазоне 10^2 — 10^3 сек⁻¹. На рис. 1 приведена кривая распределения ферментов по группам с заданной константой скорости. Известные в литературе величины каталитических констант для 50 ферментов были разбиты на группы с приблизительно одинаковыми значениями констант (использовались данные обзорных работ (^{6, 7})). На рис. 1 по оси ординат отложено количество ферментов в группе, характеризующееся данной константой скорости. Наиболее часто встречаются ферменты с числом оборотов 10^2 — $5 \cdot 10^2$ сек⁻¹. Для ферментативной системы, лимитирующая стадия которой характеризуется константой скорости $5 \cdot 10^2$ сек⁻¹ при концентрации фермента $2 \cdot 10^{-3}$ мол/л, скорость реакции равна 1 мол/л·сек. Сила тока, соответ-

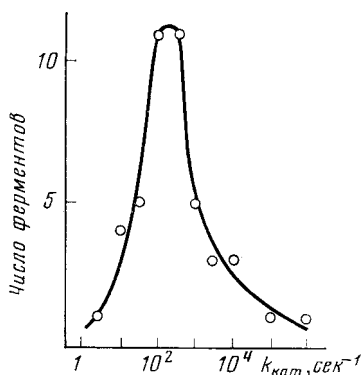


Рис. 1. Распределение ферментов по каталитической эффективности (статистический анализ данных по каталитическим константам скорости, приведенных в работах (^{6, 7}))

вующая этой скорости реакции, равна 10^5 а/л, что дает предельную мощность до 100 квт/л. Ясно, однако, что при увеличении скорости каталитической реакции на первое место выйдут проблемы, связанные с макрокинетикой процесса.

При использовании ферментов в электрокатализе основным вопросом, требующим решения, является обеспечение эффективного транспорта

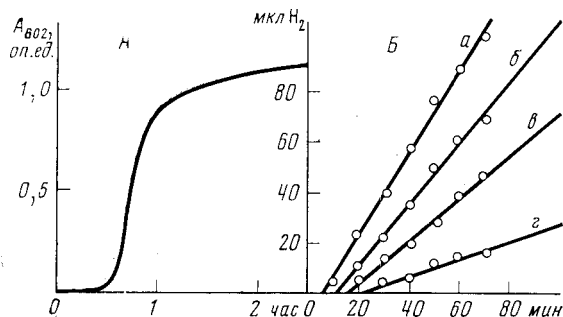


Рис. 2. Кинетика реакций метилвиологена с водородом в присутствии гидрогеназы. А — прямая реакция — восстановление MV молекулярным водородом. Измерения проводились спектрофотометрически при 602 нм, начальная концентрация MV $4,45 \cdot 10^{-4}$ M, pH 7,2; 25° С; концентрация белка 0,3 мг/мл; Б — обратная реакция — выделение молекулярного водорода из восстановленного дитионитом натрия метилвиологена. Количество выделившегося водорода определялось газохроматографически, [MV] = $4 \cdot 10^{-3}$ M, концентрация дитионита натрия $1 \cdot 10^{-2}$ M, pH 7,8; 21° С; концентрация белка (мг/мл): а — 0,625; б — 0,5; в — 0,315; г — 0,125

электронов с активного центра фермента на электрод. Решение этой проблемы может быть осуществлено двумя принципиально различными путями.

1. Перенос электрона с активного центра фермента на электрод осуществляется с помощью низкомолекулярных переносчиков (медиаторов).

2. Можно думать, что существуют возможности непосредственного электродного электрохимического окисления или восстановления активных центров ферментов. Вопрос о принципиальной осуществимости процессов такого рода обсуждается в литературе и до настоящего времени остается открытым⁽⁸⁾.

В настоящей работе описана система, в которой происходит окисление водорода и генерирование электрохимического потенциала на пирографитовом электроде с участием фермента гидрогеназного действия. Передача электронов с активного центра фермента на электрод осуществляется с помощью медиатора.

Катализ гидрогеназной обратимой реакции медиатора метилвиологена (MV) с водородом. Ферменты гидрогеназного действия катализируют реакции переноса электрона на протоны с образованием молекулярного водорода и обратные реакции восстановления органических соединений водородом. В нашей работе использовались препараты гидрогеназы из фотосинтезирующих бактерий *T. roseopersicina*, любезно предоставленные в наше распоряжение И. Н. Гоговым (Институт фотосинтеза АН СССР, Пущино-на-Оке).

Катализ реакций с участием гидрогеназы происходит с образованием гидридных промежуточных соединений активного центра фермента с водородом⁽⁹⁾. В качестве низкомолекулярного медиатора, осуществляющего перенос электронов с восстановленного водородом активного центра фермента на электрод, использовали метилвиологен, дающий при восстановлении устойчивый катион — радикал.

Кинетику и равновесие реакции исследовали спектрофотометрическим методом с использованием спектрофотометра Хитачи-124 по образованию

окрашенной восстановленной формы метилвиологена ($\epsilon_{600}=1,1 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, $\epsilon_{396}=4 \cdot 10^4 M^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$, pH 8,0) и хроматографически, по образованию молекулярного водорода из восстановленного дитиопитом натрия метилвиологена.

Типичные кривые, отражающие кинетику прямой и обратной реакций метилвиологена с водородом в присутствии гидрогеназы, приведены на

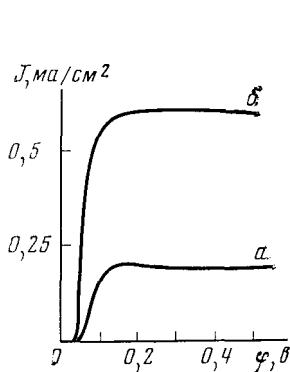


Рис. 3

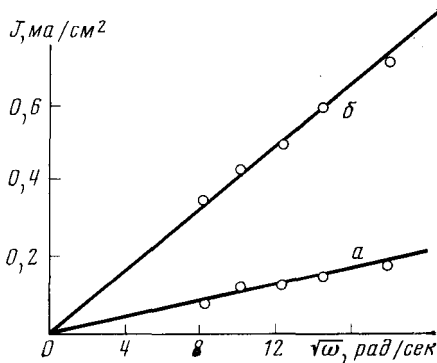


Рис. 4

Рис. 3. Поляризационные кривые электроокисления MV, восстановленного водородом в присутствии гидрогеназы. Количество препарата гидрогеназы на 25 мл раствора: а — 5 мл (уд. активн. 4,5 мкл $\text{H}_2/\text{мл} \cdot \text{мин}$), б — 10 мл (уд. активн. 5,1 мкл $\text{H}_2/\text{мл} \cdot \text{мин}$). Условия опыта: pH 7,2, 25° С, 0,1 М KCl; 0,06 М ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 + \text{Na}_2\text{HPO}_4$)

Рис. 4. Зависимость предельных анодных токов электроокисления восстановленного водородом MV в присутствии гидрогеназы от скорости вращения электрода. Количество препарата гидрогеназы на 25 мл раствора: а — 3 мл (уд. активн. 4,5 мкл $\text{H}_2/\text{мл} \cdot \text{мин}$), б — 10 мл (уд. активн. 5,1 мкл $\text{H}_2/\text{мл} \cdot \text{мин}$)

рис. 2. При нейтральных значениях pH устанавливается равновесие между окисленной и восстановленной формами:



Результаты опытов, проведенных при различных значениях pH, позволили оценить константу равновесия этой реакции.

$$K_{(P_{\text{H}}=1 \text{ атм})} = \frac{[\text{MV}_{\text{восст}}][\text{H}^+]}{[\text{MV}_{\text{окисл}}]} = (8 \pm 2) \cdot 10^{-9} \text{ мол/л.} \quad (2)$$

Окисление водорода в системе гидрогеназа — метилвиологен — угольный электрод. Нами была исследована возможность электрохимического восстановления и окисления метилвиологена на пирографитовом электроде. Электрохимическую реакцию изучали на установке с вращающимся дисковым электродом с использованием трехэлектродной схемы. Методика электрохимических измерений описана в работе (10). Метилвиологен обратимо окисляется и восстанавливается электрохимически на пирографитовом электроде. Окислительно-восстановительный потенциал пары $\text{MV}_{\text{восст}}/\text{MV}_{\text{окисл}}$, найденный из данных по полярографии метилвиологена на пирографитовом электроде, равен $-0,44$ в (pH 7,0) и паходится вблизи равновесного потенциала водородного электрода при этом значении pH. Это позволяет провести реакцию окисления водорода на угольном электроде с использованием гидрогеназы в качестве катализатора.

Раствор окисленной формы метилвиологена насыщали водородом в присутствии гидрогеназы. В результате ферментативного восстановления метилвиологена после определенного промежутка времени в системе устано-

вилось равновесие между восстановленной и окисленной формой медиатора. При концентрации ионов водорода вблизи нейтральных значений pH, согласно найденной константе равновесия, соотношение равновесных концентраций окисленной и восстановленной формы метилвиологена близко к единице. Соответственно, относительно водородного электрода при данном значении pH потенциал исследуемого электрода близок к нулю (рис. 3). Таким образом, в системе устанавливается окислительно-восстановительный потенциал равновесного водородного электрода на пирографите, и окисление водорода в этих условиях протекает без перенапряжения.

Величина тока, которую можно снимать в диффузионном режиме с электрода данной площади, определяется скоростью ферментативного восстановления медиатора. Это иллюстрируют рис. 3 и рис. 4. На рис. 3 приведены поляризационные кривые системы водород — гидрогеназа — медиатор — пирографитовый электрод при двух различных концентрациях фермента. В условиях эксперимента предельный ток зависит от концентрации фермента. Это связано, по-видимому, с тем, что в системе устанавливается стационарное состояние, в котором скорость ферментативного восстановления метилвиологена равна суммарной скорости всех окислительных процессов. При этом стационарная концентрация восстановленной формы метилвиологена, определяющая величину предельного тока, зависит от концентрации фермента. На рис. 4 приведены зависимости предельного тока от скорости вращения электрода при различных концентрациях гидрогеназы. Из этого рисунка видно, что электрохимическое окисление восстановленного водорода метилвиологена протекает в диффузионном режиме.

Наиболее важным параметром, характеризующим активность исследуемой системы, является величина плотности тока, которую можно снимать с электрода. Проведенное изучение окисления водорода с помощью гидрогеназы и медиатора на пирографитовом электроде показывает, что на пирографите устанавливается потенциал, близкий к равновесному потенциалу водородного электрода, и окисление водорода протекает в условиях, близких к обратимым. Плотность тока, снимаемая с электрода, определяется, в данных условиях, скоростью ферментативной реакции. Это открывает возможность дальнейшего изучения такой системы для использования ее в электрохимических источниках тока.

Московский государственный университет
им. М. В. Ломоносова

Институт электрохимии
Академии наук СССР
Москва

Поступило
20 VI 1975

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ L. Sisler, New Scientist, v. 256, 110 (1964). ² M. Cenek, Chem. Listy, v. 62, 927 (1967). ³ L. B. Wingard jr., C. C. Liu, Proc. VIII Intern. Conf. Med. Biol. Eng. Chicago, 1969, p. 96. ⁴ L. B. Wingard jr., C. C. Liu, N. L. Nagda, Biotechnol. Bioeng., v. 13, 629 (1971). ⁵ C. L. Cooney, IFEAS Biochemical Fuel Cell Projects, June, 1974. ⁶ И. В. Березин, С. Д. Варфоломеев, К. Мартинек, Усп. хим., т. 43, 835 (1974). ⁷ О. М. Полторацк, Б. С. Чухрай, Радиохимические основы ферментативного катализа, М., «Высшая школа», 1971. ⁸ Б. А. Кузнецов, Г. П. Шумакович, Н. М. Бешенковская, V Всесоюз. совещ. по электрохимии, М., 1975. ⁹ A. I. Krasna, D. Rittenberg, J. Am. Chem. Soc., v. 76, 3015 (1954). ¹⁰ М. Р. Тарасевич, Ф. З. Сабиров и др., Электрохимия, т. 4, 432 (1968).