

## **Метрология, стандартизация, контроль**

УДК 53.082.9::577.151.4

Л.А. КОШКАРОВА<sup>1,\*</sup>, О.Г. ВОРОНИН<sup>2</sup>, С.М. АБРАМОВ<sup>1</sup>, А.И. НЕТРУСОВ<sup>1</sup>, А.И. ШЕСТАКОВ<sup>1</sup>

<sup>1</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234

<sup>2</sup>МГУ имени М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991

*e-mail*: liliyakoshkarova@mail.ru

### **Влияние метана и двуокиси углерода на работу ферментного электрода на основе гидрогеназы**

В работе проведена оценка влияния метана и двуокиси углерода на функционирование гидрогеназного электрода. Данный ферментный электрод предлагается использовать как чувствительный элемент биосенсора на водород, который в перспективе может применяться в различных областях науки, в том числе в микробиологии. Поскольку электрод предполагается использовать непосредственно в среде культивирования микроорганизмов, важно исследовать влияние на его работу микробных метаболитов. Было показано, что исследуемые газы не обуславливают токов окисления на электроде, т.е. не вызывают положительных откликов ферментного сенсора и снижения плотности тока при перенапряжении от 20 до 200 мВ. Иными словами, метан и двуокись углерода не оказывают ингибирующего действия на работу ферментного электрода.

*Ключевые слова*: биосенсор, водород, гидрогеназа, ферментный электрод.

Водород является крайне важным метаболитом для микробных сообществ; он выделяется в разнообразных процессах, преимущественно анаэробных, и потребляется как в аэробных, так и анаэробных условиях [1]. Благодаря множеству реакций, в которых он участвует, водород играет важную роль в регулировании деятельности сообществ микроорганизмов; во многих случаях концентрация водорода имеет критическое значение для состояния системы [2]. Так, в анаэробной зоне межвидовой перенос водорода играет решающую роль в жизнедеятельности ряда микробных сообществ, так как определяет окислительно-восстановительные условия в системе, а через них и термодинамический выход биологически важных реакций [3]. Поэтому концентрация водорода зачастую является важным показателем, характеризующим как состояние сообщества в целом, так и ряда его компонентов. Например, в метаногенном сообществе первичные анаэробы в процессе метаболизма выделяют большое количество водорода

в среду, но он сразу потребляется гидрогенотрофными метаногенами. В результате метаногены снижают концентрацию водорода до 10—100 ppm [4].

Изменение уровня водорода может служить сигналом дестабилизации сообщества. Например, при поступлении в среду большого количества легкодоступных питательных веществ происходит активное развитие первичных анаэробов и, как следствие, быстрое накопление продуктов их метаболизма, в первую очередь, органических кислот, которые останавливают развитие сообщества. В таком случае образованный первичными анаэробами водород не потребляется участниками сообщества, стоящими на более низких ступенях в трофической цепи, и его концентрация значительно возрастает. Повышение уровня водорода происходит и при значительном снижении температуры окружающей среды, поскольку в этих условиях вместо метаногенов в сообществе развиваются гидрогенотрофные гомоацетогены, порог снижения концентрации водорода для которых более высок [2].

Кошкарова Лилия Андреевна, Воронин Олег Геннадьевич, Абрамов Сергей Маркович, Нетрусов Александр Иванович, Шестаков Андрей Иннокентьевич.

*Список сокращений*: ОБЭ — обратимый водородный электрод; ppm (particle per million) — миллионная доля.

\* Автор для переписки.

В настоящее время существуют различные способы определения концентрации  $H_2$ . В микробиологических лабораториях одним из самых популярных методов является газовая хроматография. Возможно также измерение водорода при помощи приборов, созданных на основе твердых электролитов и структур металл—оксид—полупроводник, но такие датчики работают только при температурах выше  $200^\circ$  [5]. При этом вышеупомянутые методы предполагают анализ газовой фазы, что не всегда удобно в микробиологических работах, чревато ошибками на этапе отбора пробы и внесения ее в аналитическую систему. Непосредственно в жидкой среде водород можно измерять при помощи электрохимических датчиков, в которых в качестве чувствительного элемента выступает платина. Но платина дает отклик и на другие соединения, выделяемые микроорганизмами (например, метан), либо отравляется ими (сероводород или окись углерода). Так, эффективность платиновых катализаторов снижается в присутствии окиси углерода в концентрации более 0,01%, а при содержании угарного газа 0,1 % платиновый электрод необратимо теряет 99% своей активности за 10 мин [6]. Отравляющее действие на платину сероводорода в 100 раз сильнее, чем CO [7].

Альтернативой вышеупомянутым методам может стать использование биосенсора на основе фермента гидрогеназы. Гидрогеназы — группа ферментов, отвечающих в клетках за реакции поглощения и выделения водорода [8]. В составе сенсора фермент выступает в качестве селективного агента, а электрод, на котором он иммобилизован, является физическим преобразователем сигнала, трансформирующим его в электрический. Электрический сигнал может быть воспринят и усилен электронным устройством и преобразован в данные, выводимые на экран устройства [9]. Преимуществом данного метода также является возможность иммобилизации фермента на различных носителях, поэтому размеры и форма электрода могут варьировать в зависимости от задач исследователя.

Ферментный электрод на основе гидрогеназы, выделенной из *Thiocapsa roseopersicina* BBS, устойчив к действию кислорода [10], что является важным технологическим показателем, поскольку многие гидрогеназы необратимо инактивируются  $O_2$  [11]. Для данного электрода показано также, что его работа не ингибируется теми концентрациями угарного газа и сероводорода, которые могут образовываться при микробной ферментации и необратимо ингибируют платину [12]. Поскольку ферментный электрод предполагается помещать непосредственно в среду культивирования, необходимо исследовать влияние образуемых микроорганизмами

метаболитов на его работу. Одними из основных продуктов анаэробного микробного сообщества могут быть метан и углекислый газ.

Целью настоящей работы была оценка влияния данных газов на работу гидрогеназного электрода.

#### УСЛОВИЯ ЭКСПЕРИМЕНТА

**Материалы.** [Ni-Fe]-Гидрогеназу из фототрофной пурпурной бактерии *Thiocapsa roseopersicina*, штамм BBS (получен из коллекции микроорганизмов кафедры микробиологии биологического факультета МГУ, № в коллекции 317), выделяли и очищали согласно методике [13]. Препарат фермента был электрофоретически однороден и имел активность  $40\text{—}50$  мкмоль  $H_2 \cdot \text{мин}^{-1}$  на 1 мг белка. В качестве электрода использовали графитовую ткань ТВШ-300М ( $1 \times 0,5$  см, ГУП «Альтен», Россия) с толщиной 0,7—0,8 мм и удельным электросопротивлением 50—70 мОм·см. В эксперименте использовали водород, полученный электролизом воды (генератор водорода Хроматэк 6.140, «Хроматэк», Россия); аргон, метан и углекислый газ марки «х.ч.»; однозамещенный и двузамещенный фосфат калия, хлорид калия, гидроксид калия марок «х.ч.» и «о.с.ч.» и нейтральный красный (Sigma-Aldrich). Все растворы готовили на деионизованной воде (установка серии Увои «М-Ф», «Медиана Фильтр»).

**Приготовление ферментных электродов.** Графитовую ткань модифицировали нейтральным красным, после чего проводили на ней сорбцию фермента. Электрополимеризацию нейтрального красного осуществляли на поверхности графитовой ткани из фосфатного буферного раствора при pH 6. Полимеризация проходила в потенциодинамическом режиме в диапазоне потенциалов от  $-0,8$  до  $0,8$  В (относительно Ag/AgCl) с предварительной гидрофилизацией графитовой ткани в концентрированной серной кислоте в течение 10 мин и отмывкой в течение 10 мин в 50 мМ калий-фосфатном буферном растворе, pH 7,0. Сорбция гидрогеназы проходила в течение 12 ч из раствора 0,5 М KCl в 20 мМ К-фосфатном буфере, pH 7,0, содержащего 1 мг/мл фермента, при температуре  $4^\circ$ .

**Исследование электрохимической активности ферментных электродов.** Электрохимическая ячейка состояла из трех отделов, соединенных между собой. Ее конструкция предусматривала продувку газа через раствор. В качестве раствора использовали фосфатный буфер (0,05 М  $KH_2PO_4$ , 0,1 М KCl, pH 7,0). Электродом сравнения служил хлорсеребряный электрод, в качестве вспомогательного использовали стеклоуглеродный электрод. Поляризационные кривые записывали с помощью

гальваностатического и потенциодинамического методов с использованием потенциостата EmStat 2 PalmSens (Нидерланды) при постоянном потоке газа через ячейку. Результаты представлены относительно обратимого водородного электрода (ОВЭ).

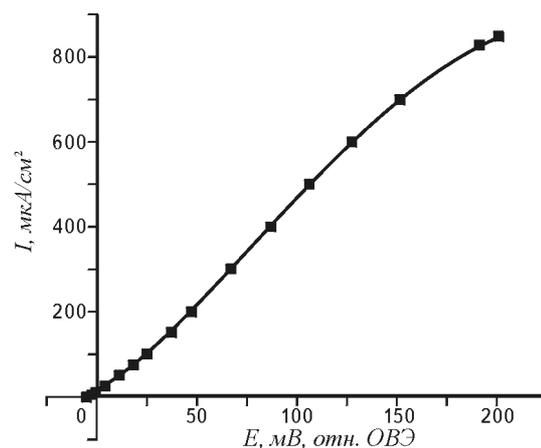
**Исследование влияния метана и двуокиси углерода на электрохимическую активность гидрогеназных электродов** проводили в потенциостатическом режиме. Осуществляли непрерывную запись тока до достижения стационарного значения при барботировании пространства рабочего электрода водородом, либо исследуемыми газами, либо их смесью. Смесь газов представляла собой в контроле — 80% водорода и 20% аргона, а в опыте — 80% водорода и 20% исследуемого газа ( $\text{CH}_4$  или  $\text{CO}_2$ ). Смесь газов готовили и подавали с помощью формирователя газовых потоков “Хроматэк-Кристалл ФГП”. При исследовании влияния  $\text{CO}_2$  на работу электрода использовали буфер следующего состава: 0,5 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 М  $\text{KCl}$ , pH 7,0.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

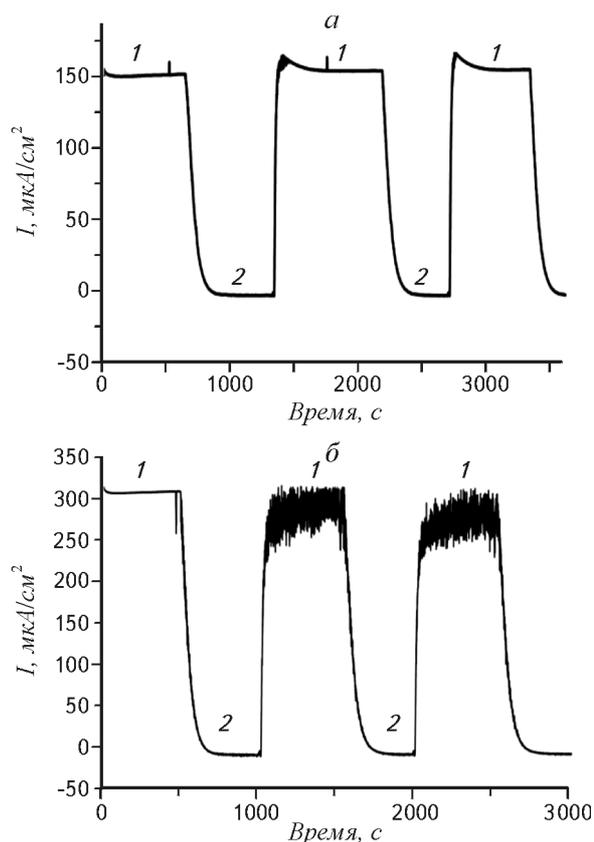
Ранее нами было показано, что при погружении гидрогеназного электрода в нейтральный буферный раствор, насыщенный водородом, на электроде устанавливается равновесный водородный потенциал [12,14]. На рис. 1 представлена стандартная зависимость плотности тока от потенциала для ферментного электрода на основе графитовой ткани, модифицированной нейтральным красным, с гидрогеназой из *Th. roseopersicina*. Максимальный ток окисления водорода составляет  $850 \text{ мкА/см}^2$  при потенциале 200 мВ. Анодный ток при положительных значениях перенапряжения должен быть обусловлен окислением водорода на гидрогеназном электроде, поскольку в предыдущих работах в отсутствие фермента ток не регистрировали, а при замене молекулярного водорода на аргон при данных значениях потенциала регистрировали только катодный ток [12]. При отрицательных значениях перенапряжения катодный ток обусловлен выделением водорода [10].

На основании полученных данных можно сделать предположение о том, что метан и двуокись углерода не влияют на работу гидрогеназного электрода. Это предположение проверяли путем анализа способности данных газов вызывать анодные токи и снижать значения токов окисления водорода.

Как видно из рис. 2, а, в атмосфере водорода при заданном потенциале 100 мВ относительно потенциала разомкнутой цепи плотность тока составила  $150 \text{ мкА/см}^2$ . При замене водорода на метан при том же значении потенциала анодных то-



**Рис. 1.** Зависимость стационарных токов окисления водорода ( $I$ ) от перенапряжения ( $E$ ) в атмосфере водорода для гидрогеназного электрода на основе графитовой ткани, модифицированной нейтральным красным, с иммобилизованной гидрогеназой из *Th. roseopersicina* (0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 М  $\text{KCl}$ , 25°, pH 7)



**Рис. 2.** а — зависимость плотности тока ( $I$ ) от времени нахождения в атмосфере водорода (1) и метана (2) для ферментного электрода при потенциале 100 мВ относительно потенциала разомкнутой цепи (0,05 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 М  $\text{KCl}$ , 25°, pH 7); б — зависимость плотности тока от времени в атмосфере водорода (1) и двуокиси углерода (2) для ферментного электрода при потенциале 150 мВ относительно потенциала разомкнутой цепи (0,5 М  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 0,1 М  $\text{KCl}$ , 25°, pH 7)

ков не наблюдали (см. рис. 2, а). Зависимость плотности тока от времени в атмосфере водорода и двуокиси углерода имеет аналогичный вид. При подаче в ячейку молекулярного водорода и заданном потенциале 150 мВ относительно потенциала разомкнутой цепи регистрировали плотность тока, равную 310 мкА/см<sup>2</sup>; при смене барботируемого газа с водорода на СО<sub>2</sub> анодные токи отсутствовали (см. рис. 2, б). Исходя из полученных данных можно сделать вывод о том, что исследуемые газы не вызывали положительных откликов ферментного сенсора и ток при заданном потенциале обусловлен исключительно окислением водорода.

На следующем этапе работы через ячейку пропускали смесь газов (20% аргона и 80% водорода) и в амперметрическом режиме задавали различные значения потенциала, фиксируя показания тока окисления водорода. После этого в подаваемой газовой смеси аргон заменяли на метан и проводили те же измерения. Как видно из рис. 3, а, при замене аргона на метан токи окисления водорода практически не изменялись. Таким же образом проверяли влияние двуокиси углерода на работу ферментного электрода. Углекислый газ, как видно из рис. 3, б, так же, как и метан, не оказывал ингибирующего действия на работу электрода при всех значениях перенапряжения.

В работе Куайна с соавт. [15] изучали влияние метана на работу гидрогеназного электрода. Фермент был иммобилизован между двумя слоями монтмориллонитовой глины с включенным поли(бутилвиологеном), которые были закреплены на стеклоуглеродном электроде. Такой модифицированный стеклоуглеродный электрод не показал активности в атмосфере метана. В то же время, непродолжительное воздействие метана на электрод не вызвало снижение токов окисления водорода, т.е. метан не оказывал ингибирующего действия на фермент. Результаты работы [15] согласуются с нашими данными о том, что метан не оказывает влияние на работу гидрогеназного электрода. Углекислый газ, как было показано в работе, также не оказывает непосредственного эффекта на работу электрода. Однако, как было установлено, при выделении микроорганизмами СО<sub>2</sub> в больших количествах он может влиять на кислотность среды, что необходимо учитывать при разработке ферментного сенсора [16].

Проблемой при биотехнологическом применении большинства гидрогеназ является тот факт, что они необратимо инактивируются кислородом [8, 11]. Так, в растворе гидрогеназы из *Th. roseopersicina* необратимо теряет 100% активности в присутствии 1 % кислорода из-за окисления ее активного центра [17]. Однако при иммобилизации

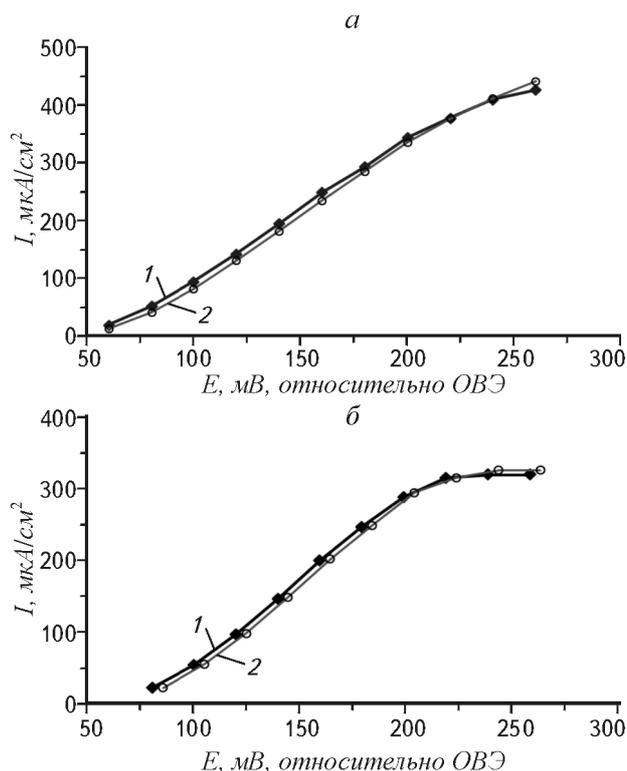


Рис 3. а — влияние метана на токи окисления водорода на ферментном электроде: 1 — 20% аргона и 80% водорода; 2 — 20% метана и 80% водорода (0,05 М КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 0,1 М КСl, 25°, рН 7); б — влияние двуокиси углерода на токи окисления водорода на ферментном электроде: 1 — 20% аргона и 80% водорода; 2 — 20% двуокиси углерода и 80% водорода (0,5 М КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub>, 0,1 М КСl, 25°, рН 7)

на поверхности электрода ее стабильность значительно увеличивается. Было, в частности, показано, что при концентрации кислорода 5% такие электроды сохраняют более 75% своей активности и после удаления кислорода из газовой смеси они восстанавливают 100% активности, т.е. наблюдается обратимое ингибирование [10]. Для ферментного электрода на основе гидрогеназы из *Th. roseopersicina*, штамм ВВS, показано, что он устойчив к действию угарного газа и сульфида [7, 12]. Эти газы в небольших количествах зачастую образуются при микробной ферментации, из-за чего, например, невозможно использовать платину непосредственно в среде культивирования, поскольку она отравляется следами этих газов [6, 18]. Для гидрогеназного электрода показано отсутствие ингибирования при содержании СО до 0,1 % [12]. Только при 1%-ной концентрации СО активность электродов снижается на 10%. Более того, ингибирование ферментных электродов угарным газом является обратимым. Токи окисления водорода в присутствии 5 мМ сульфида натрия практически также не изменяются [7].

Таким образом, гидрогеназный электрод устойчив к действию таких продуктов микробной ферментации, как метан, сульфид, угарный и углекислый газ. Он толерантен к воздействию кислорода. Такой электрод может использоваться как чувствительный элемент биосенсора водорода непосредственно в среде культивирования. Использование данного ферментного электрода имеет большие перспективы и в дальнейшем может найти широкое применение в различных областях научных исследований.

Работа поддержана грантом РФФ № 14-50-00029.

Получено 14.10.15

## ЛИТЕРАТУРА

1. Кондратьева Е.Н. Гоготов И.Н. Молекулярный водород в метаболизме микроорганизмов. — М.: Наука, 1981. — 344 с.
2. Заварзин Г.А. Колотилова Н.Н. Введение в природоведческую микробиологию. — М.: Книжный дом Университет, 2001. — 256 с.
3. Stams, A.J.M. Electron transfer in syntrophic communities of anaerobic bacteria and archaea / A.J.M. Stams, C.M. Plugge // *Nat. Rev. Microbiol.* — 2009. — V. 7. — N 8. — P. 568—577.
4. Заварзин Г.А. Лекции по природоведческой микробиологии. — М.: Наука, 2003. — 348 с.
5. Lutz, B.J. Hydrogen Sensing by Enzyme-Catalyzed Electrochemical Detection / B.J.Lutz, Z.H. Fan // *Anal. Chem.* — 2005. — V. 77. — P. 4969—4975.
6. Igarashi, H. Hydrogen electrooxidation on platinum catalysts in the presence of trace carbon monoxide / H. Igarashi, T. Fujino, M. Watanabe // *J. Electroanal. Chem.* — 1995. — V. 391. — P. 119—123.
7. Karyakin, A.A. Hydrogenase electrodes for fuel cells / A.A. Karyakin, S.V. Morozov, E.E. Karyakina, N.A. Zorin, V.V. Perelygin, S. Cosnier // *Biochem. Soc. Trans.* — 2005. — V. 33. — N 1. — P. 73—75.
8. Vignais, P.M. Occurrence, Classification, and Biological Function of Hydrogenases: An Overview / P.M. Vignais, B. Billoud // *Chem. Rev.* — 2007. — V. 107. — N 10. — P. 4206—4272.
9. Evtugyn, G.A. *Biosensors: Essentials.* — Berlin: Springer, 2014. — 265 p.
10. Morozov, S.V. Tolerance to oxygen of hydrogen enzyme electrodes / S.V. Morozov, O.G. Voronin, E.E. Karyakina, N.A. Zorin, S. Cosnier, A.A. Karyakin // *Electrochem. Commun.* — 2006. — V. 8. — N 5. — P. 851—854.
11. Stiebritz, M.T. Hydrogenases and oxygen / M.T. Stiebritz, M. Reiher // *Chem. Sci.* — 2012. — V. 3. — P. 1739—1751.
12. Karyakin, A.A. Hydrogen fuel electrode based on bioelectrocatalysis by the enzyme hydrogenase / A.A. Karyakin, S.V. Morozov, E.E. Karyakina, S.D. Varfolomeyev, N.A. Zorin, S. Cosnier // *Electrochem. Commun.* — 2002. — V. 4. — N 5. — P. 417—420.
13. Задворный О.А. Свойства стабильной гидрогеназы пурпурной серной бактерии *Lamprobacter modestohalophilus* / О.А. Задворный, Н.А. Зорин, И.Н. Гоготов, В.М. Горленко // *Биохимия.* — 2004. — Т.69 — № 2. — С. 204—210.
14. Morozov, S.V. Bioelectrocatalytic hydrogen production by hydrogenase electrodes / S.V. Morozov, P.M. Vignais, L. Cornac, N.A. Zorin, E.E. Karyakina, A.A. Karyakin, S. Cosnier // *Int. J. Hydrogen Energy.* — 2002. — V. 27. — N 11—12. — P. 1501—1505.
15. Qian, D. A hydrogen biosensor made of clay, poly(butylviologen), and hydrogenase sandwiched on a glass carbon electrode / D. Qian, C. Nakamura, S. Wenk, H.I. Ishikawa, N. Zorin, J. Miyake // *Biosens. Bioelectron.* — 2002. — V. 17. — P. 789—796.
16. Tsygankov, A.A. Measuring the pH dependence of hydrogenase activities / A.A. Tsygankov, E.A. Minakov, N.A. Zorin, K.S. Gosteva, O.G. Voronin, A.A. Karyakin // *Biochemistry (Moscow).* — 2007. — V. 72 — N. 9. — P. 968—973.
17. Gogotov, I.N. The properties of hydrogenase from *Thiocapsa roseopersicina* / I.N. Gogotov, N.A. Zorin, L.T. Serebriakova, E.N. Kondratieva // *Biochim. Biophys. Acta.* — 1978. — V. 523. — N. 2. — P. 335—343.
18. Mohtadi, R. Effects of Hydrogen Sulfide on the Performance of a PEMFC / R. Mohtadi, W. Lee, S. Cowan, J.W. Van Zee, M. Murthy // *Electrochem. Solid-State Lett.* — 2003. — V. 6. — N 12. — P. A272—A274.

L.A. KOSHKAROVA<sup>1,\*</sup>, O.G. VORONIN<sup>2</sup>, S.M. ABRAMOV<sup>1</sup>, A.I. NETRUSOV<sup>1</sup>, and A.I. SHESTAKOV<sup>1</sup>

<sup>1</sup>The Lomonosov Moscow State University, Faculty of Biology, 119234, Moscow Russia

<sup>2</sup>The Lomonosov Moscow State University, Faculty of Chemistry, 119991, Moscow Russia

e-mail: liliyakoshkarova@mail.ru

## The Effect of Methane and Carbon Dioxide on Hydrogenase-Based Enzymatic Electrode Functioning

The assessment of the influence of methane and carbon dioxide on the functioning of a hydrogenase electrode has been performed. It is suggested that this enzyme electrode will be used as a sensitive element of a hydrogen biosensor that can in the future be applied to various research fields including microbiology. The electrode is supposed to work directly in a microorganism-containing culture broth; therefore, it is important to assess the effect of microbial metabolites on its functioning. It was shown that the studied gases fail to induce the currents of oxidation on the electrode, namely, they initiate neither positive response from the enzymatic sensor nor the decrease in the current density at the voltage enhancement from 20 mV to 200 mV. In other words, methane and carbon dioxide have no inhibiting effect on the enzymatic electrode functioning.

*Key words:* biosensor, enzymatic electrode, hydrogen, hydrogenase.

\* Author for correspondence.