

УДК 541.136; 577.15.087.8

**ПУТИ И ПЕРСПЕКТИВЫ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ
БИОКАТАЛИЗАТОРОВ В ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ***Ярополов А. И., Березин И. В.*

Рассмотрена новая область использования биологически активных веществ для ускорения электродных процессов. Сопряжение ферментативной и электрохимической реакций может быть осуществлено двумя путями: медиаторным и непосредственным обменом электронами между активным центром фермента и электродом. Дан подробный анализ механизма реакции электроокисления водорода с участием иммобилизованной гидrogenазы. Приведены материалы, указывающие на туннельный механизм транспорта электронов при ферментативном катализе электродных процессов. Указаны основные направления использования биоэлектрохимических систем: аналитические сенсоры, биоэлектрохимические преобразователи энергии, биоэлектросинтез.

Библиография — 129 ссылок.

ОГЛАВЛЕНИЕ

I. Введение	1448
II. Пути сопряжения ферментативных и электрохимических реакций в биоэлектродном катализе	1449
III. Основные направления использования биоэлектродокаталитических систем	1459

I. ВВЕДЕНИЕ

В сферу исследований биоэлектрохимии входят в основном два направления. Первое — это исследование мембранных явлений, чрезвычайно распространенных в живой природе. Главным в этом направлении является изучение свойств мембран, в том числе мембран со встроенными ферментными системами. Это представляет значительный интерес для понимания процесса превращения энергии и переноса электронов в живых организмах. Вторым направлением в биоэлектрохимии является использование биологических систем в качестве катализаторов электродных реакций.

Развитие этого направления обусловлено высокой специфичностью и эффективностью ферментативных реакций, а также возможностью их протекания в мягких условиях.

Биокатализаторы могут быть использованы для создания электрохимических аналитических устройств, при разработке электрохимических преобразователей энергии, в специфическом электросинтезе сложных органических соединений, а также для выяснения механизма ферментативных реакций с применением электрохимических методик.

В настоящее время можно говорить о биоэлектродокатализе, как явлении ускорения электродных процессов под действием биокатализаторов [1].

Исследование биоэлектродокатализа подразумевает в первую очередь изучение способов сопряжения ферментативной и электрохимической реакций, а также механизма электронного транспорта в системе фермент — электрод.

Настоящая работа имеет цель показать успехи и перспективы этого нового направления химических исследований.

II. ПУТИ СОПРЯЖЕНИЯ ФЕРМЕНТАТИВНЫХ И ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКИХ РЕАКЦИЙ В БИОЭЛЕКТРОКАТАЛИЗЕ

1. Перенос электронов с использованием медиатора

Сопряжение ферментативной и электрохимической реакций с помощью медиатора может быть осуществлено, в основном, тремя способами, которые различаются подвижностью медиатора и фермента относительно поверхности электрода (рис. 1). Фермент и медиатор находятся в объеме раствора и медиатор диффундирует к поверхности электрода (а); фермент иммобилизован на поверхности электрода, а медиатор находится в объеме раствора (б); фермент и медиатор иммобилизованы на поверхности электрода (в).

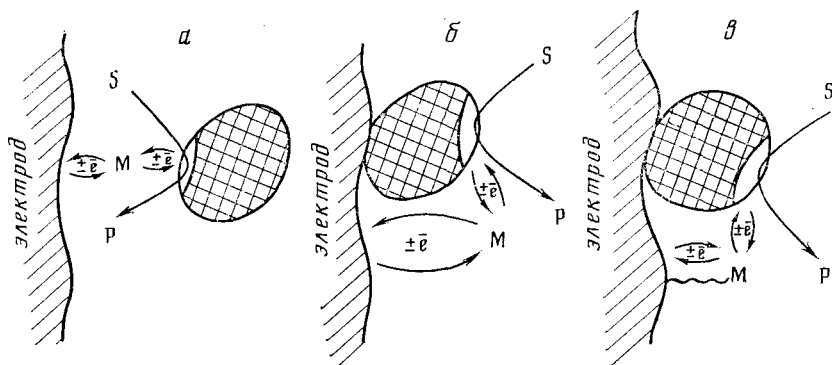


Рис. 1. Схемы возможных способов сопряжения ферментативной и электрохимической реакций с помощью медиатора; S — субстрат, P — продукт ферментативной реакции; М — переносчик электронов (описание схем в тексте)

В качестве медиатора выступает, как правило, либо электрохимически активный продукт ферментативной реакции, либо специально подобранный для данной системы переносчик. Использование химических соединений в качестве медиаторов для сопряжения конкретных ферментативной и электрохимической реакций налагает определенные требования к этим переносчикам, которые сформулированы в работах [2, 3].

1. Стадия взаимодействия медиатора с активным центром фермента должна быть быстрой, т. е. медиатор должен быть специфическим субстратом фермента.

2. Нормальный окислительно-восстановительный потенциал медиатора должен быть близок к окислительно-восстановительному потенциалу топлива или окислителя. Это условие должно быть выполнено особенно при разработке электрохимических генераторов энергии, в противном случае происходит уменьшение к.п.д. таких систем. С другой стороны переносчик с низким окислительно-восстановительным потенциалом легко окисляется кислородом, что особенно нежелательно при использовании ферментов в аналитических электрохимических устройствах.

3. Медиатор должен электрохимически окисляться — восстанавливаться на электроде из данного материала в условиях, близких к обратимым.

4. Необходима стабильность медиаторной системы.

Одни из первых работ по биоэлектрокатализу были посвящены изучению каталитических свойств фермента гидрогеназы в реакции электрохимического окисления водорода. Эти работы направлены на создание водородного анода биотопливного элемента [4—7], определение гидрогеназной активности [8, 9] или исследование возможности электроделения водорода в присутствии фермента [10].

В работе [4] рассматривали возможность создания анода топливного элемента на основе гидрогеназы из *E. coli*. В качестве диффузионно-подвижного переносчика использовали систему метиленовый голубой — лейкомаметиленовый голубой, которая имеет окислительно-восстановительный

потенциал, равный $+0,01$ В относительно водородного электрода ($\text{pH}=7,0$). В этой системе метиленовый голубой ферментативно восстанавливается водородом до лейкоформы, которая затем окисляется на платиновом электроде. Максимальная плотность тока на аноде составляла $0,16 \text{ мА/см}^2$.

В работе [10] исследовали реакцию образования водорода из протонов восстановленным метилвиологеном в присутствии гидрогеназы. Таким образом была показана обратимость данной системы по водороду.

Как показано в работах [1, 2, 3, 11], оптимальным переносчиком для системы водород — гидрогеназа — электрод является метилвиологен, окислительно-восстановительный потенциал которого близок к равновесному водородному потенциалу при pH , близких к нейтральным. Было установлено, что при использовании гидрогеназы из *Thiocapsa roseopersicina*, *Pseudomonas aestuarii* для анодного окисления водорода в системе H_2 — фермент — метилвиологен — угольный электрод, удается осуществить эту реакцию в условиях, близких к обратимым.

Рассматриваемые выше системы содержали фермент и медиатор в растворе. С практической точки зрения более удобными являются системы, в которых хотя бы один из этих компонентов находится на поверхности электрода.

Примером, когда фермент иммобилизован на поверхности электрода, а медиатор диффузионно подвижен, может служить система окисления водорода на основе гидрогеназы и медиатора — метилвиологена [12]. Авторами разработан метод адсорбционной иммобилизации гидрогеназы на поверхности электрода из сажи с удельной поверхностью $\sim 100 \text{ м}^2/\text{г}$. Гидрогеназа адсорбируется на сажу необратимо и сохраняет около 90% активности нативного фермента. В результате ферментативной реакции, протекающей в непосредственной близости от поверхности электрода в присутствии метилвиологена и водорода, образуется восстановленная форма медиатора, которая может окисляться на электроде или диффундировать в объем раствора, причем соотношение между этими процессами зависит от потенциала электрода. Исследования проводили методом полупогруженного и вращающегося дискового электродов. Результаты, полученные в этой работе, показывают, что при наличии достаточно активного фермента реакция контролируется не только кинетикой окисления водорода, но и его диффузией к поверхности электрода. При потенциале $-0,15$ В и концентрации метилвиологена $8 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ плотность тока на электродах составляла $1,1 \div 1,2 \text{ мА/см}^2$.

Ряд исследований посвящен разработке биокатода топливного элемента. Реакция электровосстановления кислорода на углеродистых материалах в нейтральных растворах протекает с большим перенапряжением. В работах [13—16] было предложено для активации этой реакции использовать медиаторную ферментную систему. Окислительно-восстановительный потенциал переносчиков в таких системах более положителен, чем область, в которой происходит электровосстановление кислорода на углеродистых электродах. В работе [18] была использована система цитохром c — оксидаза $\text{N}, \text{N}, \text{N}', \text{N}'$ -тетраметил- p -фенилендиамин (ТМФД), который окисляется ферментом до радикала (голубой Вурстера) и последний восстанавливается на катоде. Этот медиатор способен окисляться кислородом и в отсутствие катализатора, но в присутствии цитохром c — оксидазы скорость этой реакции значительно возрастает. Показано, что на платиновом и графитовом электродах система ТМФД — голубой Вурстера является электрохимически обратимой и ее редокс-потенциал составляет $0,7$ В.

При катодном восстановлении кислорода в присутствии лакказы в работе [17] была использована также система переносчиков — $4,4'$ -диоксидифенил и его окисленная форма. Переход к данным медиаторам был связан с поисками системы переносчиков, окислительно-восстановительный потенциал которых близок к равновесному потенциалу водородного электрода. Для ускорения реакции электровосстановления кис-

лорода использовалась также *o*-дифенолоксидаза из картофеля [18]. В качестве медиаторов применялись пирокатехин, кофейная и хлорогеновая кислоты. Авторам удалось сместить потенциал электровосстановления кислорода на 300—350 мВ в положительную область.

Большую роль в процессах метаболизма играют НАД- и НАДФ-зависимые ферменты. В работах [18—20] описаны биоаноды, использующие ферменты дегидрогеназы и НАД—НАДН редокс-систему переносчиков. Недостатком таких систем является наличие необратимых процессов при многократном повторении электрохимической реакции, которые приводят, в частности, к димеризации переносчика. Кроме того, процессы электроокисления НАДН и электровосстановления НАД протекают с большим перенапряжением. Как показано в работе [20] электроокисление НАДН на гладкой и платинированной платине, а также пирографите протекает лишь при потенциале выше +1,3 В (относительно нормального водородного электрода). В присутствии феназинметасульфата потенциал окисления НАДН на пирографитовом электроде понижается до +0,4 В. Авторами [20] описан процесс электрохимического окисления формиата натрия на пирографитовом электроде в системе с НАД-зависимой формиатдегидрогеназой при использовании в качестве медиатора феназинметасульфата, а также при использовании биферментной системы с НАД-зависимой формиатдегидрогеназой и НАДН-дегидрогеназой, когда переносчиком электронов является метилвиологен. Токи окисления формиата натрия в данной системе при потенциале выше +0,2 В составляли 15 мА/см². Более совершенными, чем выше приведенные, являются системы, в которых осуществлена одновременная иммобилизация фермента и медиатора на поверхности электрода. В работах [21, 22] изучалась возможность создания модели ферментативного топливного элемента, использующего в качестве топлива спирт, а также аналитического электрохимического сенсора на спирт. Катализатором окисления спирта являлась алкогольдегидрогеназа из печени лошади, а медиатором — никотинамидадениндинуклеотид. Фермент и кофактор иммобилизовали на поверхность электрода двумя способами: адсорбционно, за счет гидрофобных и электростатических взаимодействий системы фермент—кофактор с электропроводным носителем и ковалентно, путем пришивки НАД к носителю и сорбции апофермента на кофактор. Показано, что кофактор сохраняет физиологическую активность лишь тогда, когда он отделен от носителя на расстояние ~10 Å. При введении в ячейку фермента и НАД генерировался устойчивый ток и ЭДС. Введение в электролит небольшого количества цианистого калия, который является ингибитором ферментативной активности алкогольдегидрогеназы (АДГ), приводило к уменьшению тока. Величина тока была пропорциональна концентрации субстрата и достигала максимального значения 0,6 мА при напряжении 0,2 В.

Авторы [23] также использовали в качестве катализатора электрохимического окисления этанола фермент-кофакторный комплекс АДГ—НАД, иммобилизованный на поверхности сажевого электрода. При этом потенциал полуволны ($E_{1/2}$) окисления НАДН из фермент-кофакторного комплекса на 0,22 В ниже, чем $E_{1/2}$ окисления НАДН, адсорбированного на саже. Непосредственное участие фермента в электроокислении НАДН было подтверждено добавлением к адсорбированному комплексу ингибитора АДГ—фенантролина, что привело к исчезновению каталитического эффекта. Была предложена схема окисления этанола на ферментном электроде. Предложенный метод позволяет не только определять этанол в диапазоне концентраций $3 \cdot 10^{-5}$ ÷ $5 \cdot 10^{-4}$ М, но и регенерировать кофермент НАД с применением АДГ. В работе [24] использовали для окисления этанола фермент АДГ и медиаторы: метиленовый синий, N-метилфеназин-ион, которые окисляют восстановленный вследствие протекания ферментативной реакции НАДН и сами окисляются на электроде. Анодное пространство используемой электрохимической ячейки содержало фермент метанолдегидрогеназу, который по данным работы [2] окислял метанол в присутствии медиаторов фенозинметасульфата и

фенозинтосульфата. Максимальный ток в системе достигал величины 3,7 мА.

К группе ферментов, которые играют существенную роль в окислительно-восстановительных процессах в живых организмах, принадлежат ФАД-зависимые ферменты — глюкозооксидаза и оксидазы аминокислот. Оксидаза *L*-аминокислот ковалентно присоединенная к поверхности сажевого электрода, модифицированного 2,4,6-трихлортриазином, использовалась в работе [26] для определения *L*-аминокислот. Потенциал на электроде линейно зависел от концентрации аминокислот в интервале $10^{-5} \div 10^{-2}$ М.

Исследование реакции электроокисления глюкозы в присутствии биоорганических катализаторов представляет значительный интерес ввиду того, что данная реакция протекает даже на платине со значительным перенапряжением. Сажевый электрод, модифицированный 2,4,6-трихлортриазином с ковалентно присоединенным ферментом, авторы [27] использовали для изучения восстановления глюкозооксидазы, которое происходило при потенциале $-0,51$ В (относительно Ag/AgCl), что на 100 мВ положительнее, чем восстановление апофермента. В работе [28] исследовали ферментативное окисление глюкозы на стеклоуглеродном электроде с адсорбированными медиаторами. Глюкозооксидазу наносили на модифицированный электрод и отделяли от объема раствора диализной мембраной. В качестве переносчиков использовали тетрациан-*n*-хинодиметан и калиевую соль его аниона, пиоцианин, 9,10-фенантренхинон, дихлорфенолиндифенол, декстран-дофамин. Эти соединения являются субстратами глюкозооксидазы. Максимальный ток в системе зависел от концентрации компонентов в приэлектродном слое и природы переносчика, причем достигал в анаэробных условиях значения 67 мкА/см². В работах [29, 30] исследовали электрохимическое окисление глюкозы в присутствии глюкозооксидазы, иммобилизованной на органических металлах — комплексах ионов *N*-метилфеназина (НМФ^+) и *N*-метилакридиния (НМА^+) с анион-радикалом тетрацианхинодиметана. Биокаталитический эффект имел место при потенциалах выше $-0,05$ В (Ag/AgCl). Зависимость тока от концентрации глюкозы имела вид кривой с насыщением, причем, величина предельного тока зависела от потенциала электрода. Электрод с иммобилизованным ферментом сохраняет активность в течение более чем 100 дней.

Большую роль в переносе электронов в биологических системах играют металлоферменты, которые содержат в своей молекуле ионы железа и меди. В работах [31, 32] использовали для активации реакции окисления лактата на платиновом электроде систему цитохром b_2 — ферри/ферроцианид калия. Исследования проводили в двухэлектродной ячейке, анодное и катодное пространства которой разделены электропроводным мостиком. В анодное пространство помещали раствор лактата, феррицианида калия и фермента, а в катодное — феррицианида. В результате ферментативной реакции образовывался ферроцианид, который затем электрохимически окислялся на аноде. На катоде происходит электровосстановление феррицианида. Величина тока во внешней цепи при замыкании ячейки линейно зависит от концентрации лактата в интервале от $5 \cdot 10^{-6}$ — $4 \cdot 10^{-3}$ М. В качестве переносчиков были использованы также 2,6-дихлорфенолиндифенол, феназинметасульфат, метиленовый голубой, индигокармин. Авторы [33, 34] использовали медиаторную систему для контроля за потенциалом в слое, содержащем фермент галактозооксидазу. В ходе ферментативной реакции происходит восстановление активного центра, который обратимо окисляется медиатором. Подбор переносчика является определяющим для установления в системе соответствующего потенциала. В качестве медиаторов использовали феррицианид, 2,6-дихлорфенолиндифенол, тетрацианмонофенантролин феррат, кобальт терпиридин.

Как видно из приведенных данных, медиаторный способ сопряжения ферментативной и электрохимической реакций с растворимыми медиаторами изучен достаточно подробно. Интерес представляет новое, более

совершенное осуществление медиаторного переноса, с применением переносчиков и ферментов в иммобилизованном состоянии на электродах, а также осуществление прямого обмена электронами между активными центрами ферментов и электродом.

2. Электрохимические реакции белков на электродах

В связи с возможностью применения ферментов в электрокаталитических процессах представляет интерес исследование электрохимических свойств белков. Применение электрохимических методов исследования может дать важную информацию о механизме передачи электрона в белковых молекулах и связи между скоростью переноса электронов (или скоростью изменения потенциала) с конформационными перестройками белков.

При исследовании электрохимических реакций белков большую роль играет их адсорбция на поверхности электродов.

Адсорбцию белков на ртутных электродах и механизм переноса электронов в таких системах исследовали в работах [35—37]. Показано, что адсорбция белка на поверхности ртути протекает быстро с образованием монослоя денатурированного белка толщиной 8—10 Å. Этот слой белка адсорбирован необратимо и закрывает около 80% поверхности ртути, образуя пористую структуру. Активный центр денатурированного белка не участвует в обмене электронами с молекулами белка, находящимися в растворе. Последние обмениваются электронами с электродом через поры необратимо сорбированного белка.

Авторы работы [38] считают, однако, что на ртутном электроде за счет большого поверхностного давления денатурации адсорбированных молекул в первом монослое не происходит.

Показано, что цитохром *c* из сердца лошади восстанавливается на ртути необратимо [39—42]. При анодной развертке потенциала не наблюдается окисление восстановленного белка. Восстановление цитохрома *c* происходит с перенапряжением [42] и зависит от pH, ионной силы раствора и концентрации белка.

Изучение поведения цитохрома *c* на золотом электроде, модифицированном γ,γ -дипиридилем и 1,2-бис-(4-пиридил)-этиленом показало, что в данной системе происходит обратимое окисление — восстановление простетической группы белка. Интересно, что модификация лизиновых остатков цитохрома *c* приводит к тому, что цитохром *c* перестает быть субстратом цитохром *c*-оксидазы и одновременно с этим прекращается обратимый электрохимический процесс окисления — восстановления белка на электроде [43—48].

Обратимое окисление — восстановление цитохрома *c* при равновесном потенциале наблюдается также на электроде из окиси индия, легированной оловом [49], и на золотом электроде, модифицированном 1,2-бис-(4-пиридил)-этиленом [47]. Константа скорости окисления — восстановления на электродах этого типа равна 0,014—0,019 см/с.

Авторы [50, 51] исследовали восстановление бактериородопсина на ртутном и платиновом электродах. Подробно электрохимическое поведение белков рассмотрено в обзоре [52].

Исследуемые в работах [35—51] белки не обладают ферментативной активностью, а являются только переносчиками электронов или кислотного рода. Возможность переноса электронов непосредственно на активные центры ферментов в отсутствие субстратов изучалась для ксантиноксидазы [53], лактатдегидрогеназы [54], каталазы и супероксид-дисмутаза [55], пероксидазы [56], холестеролоксидазы [57], глюкозооксидазы [58].

Гемин в молекуле пероксидазы на амальгамированном золотом электроде и на электродах из золота и пирографита электрохимически не активен. Наблюдаемый на амальгаме золота обратимый окислительно-восстановительный процесс соответствует превращению связей S—S [56].

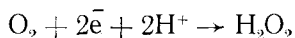
Электрохимические свойства цитохрома P-450 были изучены в работе [39]. Показано, что цитохром P-450 на ртути восстанавливается необ-

ратимо при потенциале $-1,4$ В. Флавинадениндинуклеотид (ФАД), входящий в состав активного центра ксантиноксидазы и оксидазы *D*-аминокислот, восстанавливается на ртути в области потенциалов, соответствующих свободному ФАД [36]. Простетическая группа другого ФАД-зависимого фермента — глюкозооксидазы восстанавливается при равновесном окислительно-восстановительном потенциале фермента [58]. Для холестериноксидазы, в которой ФАД ковалентно связан с апоферментом, на ртутном электроде обнаружено обратимое окисление — восстановление простетической группы, проходящее, однако, с перенапряжением [57]. Необходимо отметить, что окислительно-восстановительные процессы, связанные с простетическими группами ферментов, не могут однозначно указывать на возможность эффективного электрокатализа этими ферментами соответствующих реакций, т. е. редокс-превращения простетических групп при гомогенном ферментативном катализе отличаются от соответствующих редокс-превращений этих групп в электрохимических системах. Так, например, пероксидаза, для которой в анаэробных условиях не наблюдали восстановление гема [56], является эффективным катализатором в реакции электровосстановления перекиси водорода. Подробнее этот эффект будет обсуждаться ниже.

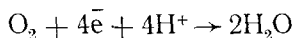
3. Прямой перенос электрона между активным центром фермента и электродом

Принципиальным вопросом биоэлектрокатализа является осуществление прямого сопряжения ферментативной и электродной реакций. Возможность прямого переноса электрона с электрода на активный центр фермента (или наоборот) обсуждалась в работе [11].

Большое практическое значение имеет получение эффективных катализаторов электровосстановления кислорода. Известно, что стационарный потенциал, устанавливающийся в атмосфере кислорода на электродах из углеродистых материалов, далек от равновесного кислородного потенциала и составляет примерно $0,6-0,7$ В. В работах [59, 60] использовали цитохром *c* в качестве катализатора этой реакции. Показано, что катализ осуществляется цитохромом *c* только в адсорбированном состоянии и во всем исследованном диапазоне потенциалов (от $-0,18$ до $+0,6$ В). Установлено, что в присутствии биокатализатора не только увеличивается скорость реакции восстановления кислорода до перекиси водорода



но появляется также параллельная реакция восстановления до воды



Вторая реакция связана с разрывом связи кислород — кислород и, по-видимому, протекает за счет адсорбции молекул кислорода на центральном атоме железа в активном центре цитохрома *c*.

Группа японских авторов [61] установила, что цитохром *c*₃ из *Desulfovibrio vulgaris* катализирует восстановление молекулярного кислорода в адсорбированном состоянии на ртутном электроде. В данном случае восстановление кислорода протекало полностью до воды, т. е. по четырехэлектронному механизму без образования перекиси водорода. Максимальное ускорение реакции наблюдали при заполнении поверхности ртутного электрода на 50% адсорбированным цитохромом *c*₃.

Детальное изучение электровосстановления кислорода и прямого переноса электронов в системе кислород — лакказа из *Polyporus versicolor* — углеродистый электрод было проведено в работах [62, 63]. Фермент находился на поверхности электродов в адсорбированном состоянии. Введение в систему лакказы вызывает смещение стационарного потенциала электродов в область положительных значений и ускоряет электровосстановление O_2 в интервале потенциалов $1,2 \div 0,6$ В, причем значения потенциала и токи при данном потенциале возрастают с уве-

личением количества адсорбированного на электроде фермента. В качестве электродов применяли золото, пирографит, стеклоуглерод и сажу. Исследования проводили в аэробных и анаэробных условиях. Максимальное значение потенциала +1,207 В устанавливается в атмосфере кислорода на электродах, которые предварительно выдерживали в растворе лакказы с концентрацией $\sim 10^{-5}$ М в течение суток. Введение в систему ингибитора лакказы (F^- или N_3^- ионов) практически прекращает ускорение реакции электровосстановления кислорода (рис. 2). Устойчивое и воспроизводимое значение потенциала +1,20 В позволило детально исследовать механизм электровосстановления кислорода вблизи равновесного потенциала. Линейная зависимость между током и перенапряжением сохраняется в интервале потенциалов 1,20 ÷ 1,15 В. В обла-

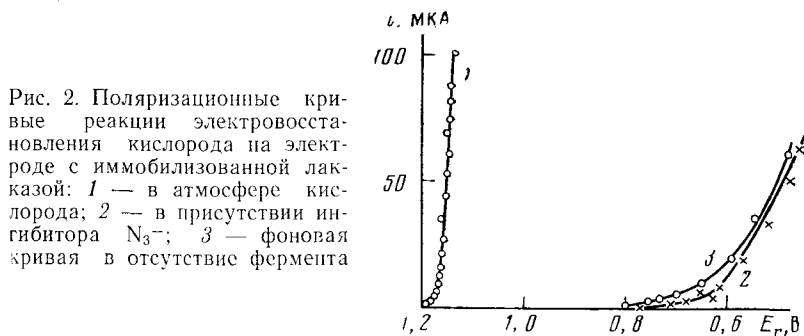
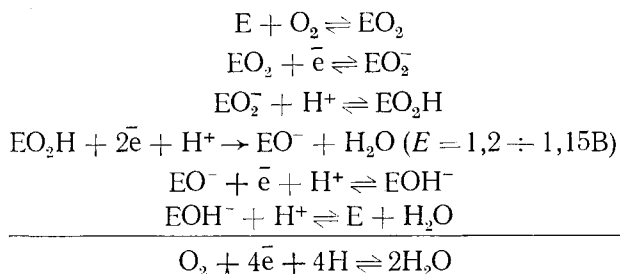


Рис. 2. Поляризационные кривые реакции электровосстановления кислорода на электроде с иммобилизованной лакказой: 1 — в атмосфере кислорода; 2 — в присутствии ингибитора N_3^- ; 3 — фоновая кривая в отсутствие фермента

сти потенциалов 1,18 ÷ 1,15 В наклон поляризационной кривой возрастает до значения $\partial E / \partial \lg i \approx 0,03$ В. При потенциалах отрицательнее 1,15 В — $\partial E / \partial \lg i \approx 0,06$ В. На участке поляризационной кривой 1,20 ÷ 1,15 В $\partial E / \partial \lg i \approx \partial E / \partial \lg p_{O_2}$, т. е. реакция имеет первый порядок по кислороду, и зависимость от pH характеризуется величиной $\partial E / \partial pH \approx 0,06$ В. Рассчитано значение стехиометрического числа, которое составляло от 0,75 до 1,8; среднее значение равно 1,2. Следовательно, замедленная стадия в реакции электровосстановления кислорода повторяется один раз. На основании экспериментальных данных авторы предложили механизм реакции электровосстановления кислорода в присутствии лакказы:



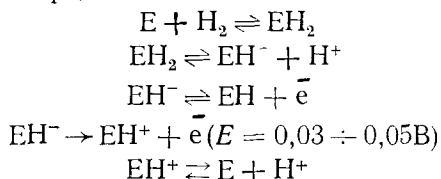
где E — фермент.

Необычным для электрохимической реакции является синхронный перенос двух электронов в замедленной стадии. Однако, как предполагают авторы, наличие в молекуле лакказы двухэлектронного акцептора позволяет осуществить эту реакцию.

В работе [16] исследовали безмедиаторный катализ реакции электровосстановления кислорода с использованием О-дифенол: O_2 -оксиредуктазы от картофеля. В присутствии фермента в адсорбированном состоянии на сажевом электроде в атмосфере кислорода устанавливается потенциал +1,13 ÷ 1,16 В. Методом дискового электрода с кольцом было показано, что в данной системе, подобно электроду с лакказой, восстановление кислорода происходит непосредственно до воды, без образования H_2O_2 .

В связи с поисками новых, неметаллических, катализаторов для водородного электрода топливного элемента, значительный интерес пред-

ставляет электроокисление водорода в присутствии гидрогеназы. В работе [64] получены результаты, указывающие на возможность прямого окисления H_2 на сажевых электродах с адсорбционно иммобилизованной гидрогеназой из *Thiocapsa roseopersicina*. На этих электродах удалось реализовать равновесный водородный потенциал. На основании анализа кинетических параметров системы был предложен механизм реакции электроокисления водорода:



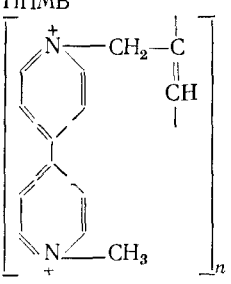
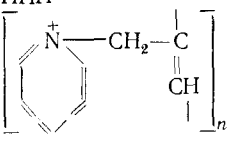
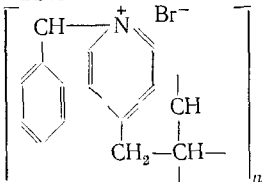
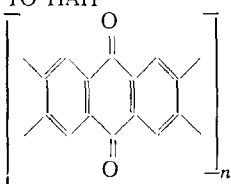
Лимитирующей стадией является перенос второго электрона, при предположении, что все остальные стадии протекают равновесно.

Исследование возможности прямого переноса электронов в электрохимических системах, содержащих фермент глюкозооксидазу и глюкозу, представляет интерес для создания безреагентного датчика на глюкозу и в биохимических топливных элементах. В работах [65—68] была исследована реакция электроокисления глюкозы на платиновом электроде с иммобилизованной глюкозооксидазой. Фермент был закреплен на поверхности предварительно заряженного электрода глутаровым альдегидом, полиакриламидным гелем или глутаровым альдегидом на незаряженном электроде. Методика получения модифицированной поверхности платины приведена в работе [69]. Положительные результаты получены только при применении первого способа иммобилизации фермента на заряженном электроде. Стационарные токи в данном случае в 2—3 раза превышают токи, получаемые при использовании платинового электрода без фермента, и достигают величины 10 мкА/см². В остальных случаях иммобилизации фермента на платине каталитические эффекты вообще не наблюдаются. Авторы объясняют эти в целом негативные результаты плохим контактом между ферментом и электродом [65]. В работе [70] исследовали влияние ионов Ag^+ и Hg^{2+} , ингибиторов глюкозооксидазы, на электрокаталитическую активность фермента, который был иммобилизован на поверхности платиновой сетки. Устанавливающийся на электроде в присутствии глюкозы и фермента потенциал линейно уменьшался с увеличением концентрации ингибиторов. Это может служить одним из доказательств того, что в данной системе имеет место прямой перенос электронов между электродом и активным центром глюкозооксидазы, хотя в работе не приведены другие данные, подтверждающие это предположение.

Во всех перечисленных выше исследованиях биоэлектрокатализаторы находились либо в растворимой форме, либо в иммобилизованном состоянии на поверхности металлических и углеродистых электродов. Однако не во всех случаях удается осуществить прямой перенос электронов в системе фермент—электрод, используя выше перечисленные способы иммобилизации фермента на электроде.

Значительный интерес в плане разработки общего подхода к созданию безмедиаторных биоэлектрокаталитических систем представляют исследования, связанные с использованием в качестве носителей для иммобилизации ферментов токопроводящих комплексов тетрацианхинодиметана с низкомолекулярными или полимерными органическими соединениями [71, 72]. В работах [73—75] разработан метод применения полимерных электропроводящих носителей для осуществления безмедиаторного транспорта электронов в системе электрод—активный центр фермента. Включение фермента в токопроводящую матрицу приводит к улучшению контакта между активным центром катализатора и носителем. Иммобилизация ферментов и образование матриц с высокой электропроводностью (вплоть до 10^{-2} Ом⁻¹·см⁻¹ [76]) достигается путем соосаждения полимерных поликатионов и ферментов под действием полу-

Состав и характеристики полимерных носителей

Полимер	Вероятный состав носителя	A, мг белка/г носителя	ρ , Ом·см	Сохранение активности %
<p>ППМВ</p> 	$[(\text{ППМВ}^{2+})(\text{ТЦХДМ})_2^-]$ $(\text{ТЦХДМ}_2^0)_n$	200 ± 20	$3,6 \cdot 10^4$	200
<p>ППП</p> 	$[(\text{ППП}^+)(\text{ТЦХДМ})_n^- (\text{ТЦХДМ}^0)_m]$ $m/n = 0,25$	200 ± 20	$1,2 \cdot 10^4$	400
<p>ПВБП</p> 	$[(\text{ПВБП}^+)(\text{ТЦХДМ})_n^- (\text{ТЦХДМ}^0)_m]$	70 ± 10	$10^8 - 10^9$	—
<p>ТО ПАН</p> 	ТО ПАН	25 ± 5	$2,0 \cdot 10^3$	30

Обозначения: A — емкость носителя по белку; ρ — удельное сопротивление носителя; ПВБП — поли-1-винил-1-бензилпиридиний хлорид.

восстановленной соли тетрацианхинодиметана (ТЦХДМ). Этот метод иммобилизации отличается также высокой емкостью носителя по белку. В работах [73—75] были использованы ион-радикальные соли ТЦХДМ и термически обработанные полиакрилонитрилы (ТОПАН) для иммобилизации гидрогеназы. Данные о составе, емкости по белку, электропроводности и проценту сохранения активности фермента для исследованных полимерных носителей гидрогеназы даны в таблице. Иммобилизация приводит к активации гидрогеназы с одновременным увеличением стабильности фермента по отношению к денатурации на воздухе. Интересно отметить, что один из используемых полимеров поли-1-пропаргил-1-метил-4,4'-дипиридиний (ППМВ) является субстратом гидрогеназы. Электрокаталитические свойства иммобилизованной на комплексах полимер-ТЦХДМ гидрогеназы изучали по реакции образования H_2 на полимерном ферментном электроде, которая происходит только при наличии в системе гидрогеназы. В работе показано, что перенос электронов на активный центр фермента при изучении процесса образования водорода после предварительного электровосстановления носителя с гидрогеназой может осуществляться с любого участка полимерной матрицы.

В работе [72] для осуществления электроокисления глюкозы были использованы полимерные проводники поли-1-пропаргилпиридиний (ППП) — ТЦХДМ с иммобилизованной глюкозооксидазой. Существен-

ное увеличение токов наблюдалось лишь при наличии фермента на электроде и глюкозы в растворе. Линейная зависимость токов при заданном потенциале от концентрации глюкозы в растворе сохранялась в диапазоне концентраций 0,15—2,0 мМ. Экспериментальные данные описывались параболической функцией и были интерпретированы в терминах уравнения Михаэлиса — Ментен. Спрямление в обратных координатах дает значение $i_{\text{макс}} = 67 \text{ мкА/см}^2$ и константы Михаэлиса $4,0 \pm 0,5 \cdot 10^{-3} \text{ М}$ при потенциале 140 мВ (Ag/AgCl).

Авторы [77] при иммобилизации цитохрома b_2 на комплексе ТЦХДМ с N-метилфеназином (НМФ) обнаружили эффект ускорения электрохимического окисления лактата с осуществлением переноса электрона с активного центра фермента на электрод без участия низкомолекулярного медиатора. На основе этой системы авторами [78] разработан безреагентный аналитический датчик на лактат.

В работе [79] описано явление восстановления перекиси водорода пероксидазой, адсорбционно иммобилизованной на электродах НМФ — ТЦХДМ и НМА — ТЦХДМ. Восстановление перекиси водорода происходило при потенциалах $\sim 0,25 \text{ В}$ относительно насыщенного хлорсеребряного электрода. В отсутствие пероксидазы данная реакция протекает только при потенциалах ниже $-0,2 \text{ В}$. Эти исследования подтвердили возможность успешного использования ион-радикальных матриц («органических металлов»), в качестве материала электрода для осуществления иммобилизованными ферментами катализа электрохимических реакций.

Из приведенных литературных данных видно, что в последнее время проявляется повышенный интерес именно к изучению прямого переноса электрона между активным центром фермента и электродом. Однако все приведенные выше исследования направлены на изучение прямого переноса в конкретной системе и не затрагивают вопросы о закономерностях переноса электрона в биоэлектрохимических системах в целом.

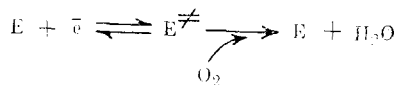
4. Механизм переноса электрона при ферментативном катализе электродных процессов

Основным вопросом в безмедиаторных системах окисления или восстановления активного центра фермента на электроде является изучение механизма переноса электрона с фермента на электрод (или обратный процесс). Кинетическая модель биоэлектрокатализа, предложенная в работах [80, 81], не может, конечно, дать исчерпывающего ответа. Вероятно, что прямой перенос электрона требует определенной ориентации активного центра фермента относительно электрода, причем чем меньше расстояние от активного центра до электрода, тем больше вероятность переноса. Однако активные центры ферментов локализованы, по-видимому, внутри белковой глобулы и при иммобилизации могут быть расположены на значительном расстоянии от поверхности носителя.

Зависимость эффективности переноса электрона от расстояния между активным центром лакказы и электродом исследовали в работе [82] по реакции электровосстановления кислорода. На поверхность сажевого электрода адсорбировали сначала холестерин из спиртовых или гептановых растворов или лецитин из раствора в бензоле, а поверх липидов сорбировали фермент. Таким образом расстояние между электродом и молекулой лакказы увеличивалось до 6 Å, 17 Å или 20 Å, соответственно (рис. 3). Токи электровосстановления кислорода при соответствующем потенциале нормировали на максимальную скорость ферментативной реакции, измеренную в независимых экспериментах.

При увеличении расстояния от 6 Å до 17 Å авторы наблюдали уменьшение скорости переноса электронов через слой холестерина примерно в 4,5 раза, а до расстояния 20 Å (через слой лецитина) приблизительно в 200 раз. Авторы считают, что для объяснения этого явления, а также эффектов биоэлектрокатализа, является достаточным представление о туннельном механизме переноса электрона между активным центром

фермента и электродом с использованием простой кинетической схемы:



где E — лакказа в исходном состоянии, а E^{\neq} — в восстановленном.

Вторая стадия является ферментативной и лимитирует скорость реакции. Первая стадия является электрохимической, причем протекает обратимо и по туннельному механизму. Эти выводы подтверждаются потенциодинамическими опытами в анаэробных условиях с адсорбированной на поверхности электрода лакказой. При потенциалах $\sim +0,75$ В наблюдаются обратимые максимумы, соответствующие окислительно-восстановительному потенциалу меди первого типа, которая является первичным акцептором электронов в активном центре лакказы. Стадию

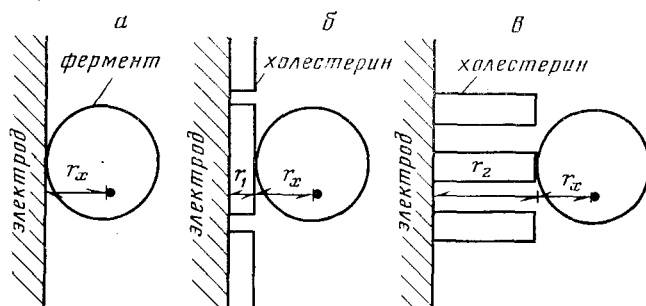


Рис. 3. Схема расположения фермента относительно поверхности электрода: а — лакказа, адсорбированная на поверхности электрода; б — фермент адсорбирован поверх липида с плоской ориентацией относительно электрода; в — фермент адсорбирован поверх липида с вертикальной ориентацией относительно электрода; r_1 — толщина липидного слоя с плоской ориентацией холестерина, r_2 — с вертикальной ориентацией. r_x — расстояние от поверхности до места в ферменте, которое принимает электрон

туннелирования можно описать уравнением [83]

$$k_1(r) = A \exp(-2r/a)$$

где A — частота столкновений электрона с потенциальным барьером, U — высота барьера, $a = \hbar[2m(U-E)]^{1/2}$, \hbar — постоянная Планка, m — масса электрона, E — энергия электрона.

Таким образом, в рассматриваемой системе вероятность туннельного переноса электрона на расстояние больше 20 Å резко уменьшается, что также наблюдалось экспериментально.

III. ОСНОВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ БИОЭЛЕКТРОКАТАЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ

Ферменты, эффективно участвующие в катализе электрохимических реакций, могут найти применение при преобразовании химической энергии в электрическую в так называемых биотопливных элементах [84—86].

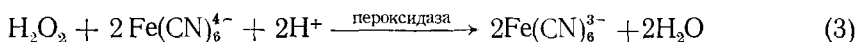
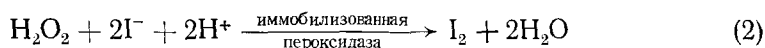
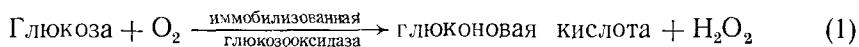
Используя высокую субстратную специфичность и эффективность каталитического действия иммобилизованных ферментов, представляется возможным осуществить специфический электросинтез ряда органических соединений.

Применение ферментов в разного рода электроаналитических датчиках, которое обсуждалось в [87, 88], позволяет расширить круг определяемых соединений и упростить технику измерений.

1. Ферментные электроды

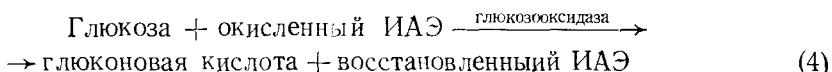
Медиаторный способ сопряжения ферментативной и электрохимической реакций наиболее часто применяется в ферментативных электроаналитических датчиках. Использование этих аналитических устройств существенно упрощает технику анализа, позволяет расширить круг определяемых соединений, а в ряде случаев увеличивает чувствительность измерений.

Определение нужного соединения, которое может быть электрохимически не активно, проводится по изменению концентрации других компонентов ферментативной реакции (субстратов или продуктов). Так, например, концентрацию глюкозы, которая является электрохимически малоактивным соединением, можно определить амперометрически, регистрируя электрохимическое окисление продукта реакции — перекиси водорода [89], либо электровосстановление субстрата — кислорода [90], в реакции (1). Также можно регистрировать изменение pH растворов в результате образования продукта — глюконовой кислоты [91].



Другим подходом, к определению концентрации глюкозы, является использование биферментных систем, в которых один из продуктов первой ферментативной реакции является субстратом во второй реакции. В данном случае концентрация глюкозы определяется потенциометрически с применением электрода, чувствительного к иодид-ионам [92], (реакция (2)), или амперометрически, регистрируя токи восстановления феррицианида (реакция (3)) на угольном или платиновом электродах [93]. Известна также биферментная система с применением глюкозооксидазы и цитохрома Р-450, катализирующего превращение анилина под действием перекиси водорода, образующейся при окислении глюкозы, в *n*-аминофенол, который затем анодно окисляется в хинон. Предельные токи при этом пропорциональны концентрации глюкозы [94].

Вместо кислорода для ферментативного окисления глюкозы можно использовать искусственные акцепторы электронов (ИАЭ) [95].



Искусственные акцепторы электронов являются электрохимически активными соединениями и их восстановленную форму можно легко регистрировать амперометрически. В работе [96] описана возможность определения глюкозы с использованием в качестве ИАЭ поливиологенов в присутствии кислорода. Измерения проводились при pH=8,0, когда отсутствует окисление глюкозы кислородом в присутствии глюкозооксидазы. От объема раствора ИАЭ были отделены диализной мембраной.

В настоящее время в литературе описано большое число способов определения различных органических и неорганических соединений с применением ферментных электродов. Эти методы, а также устройство ферментных сенсоров, обсуждаются подробно в обзорах [97—99].

Ферментные электроды кроме применения в сенсорах в последнее время широко используются в медицинских целях. Так называемые имплантированные электроды могут служить источником энергии и передавать информацию об изменениях в организме. Применение и принцип работы имплантированных электродов обсуждаются в обзоре [100].

В последнее десятилетие появился новый тип биосенсоров, в которых тот или иной эффект ферментативной реакции переводится в электрический ответ с помощью термисторов, транзисторов или пьезоэлектрических кристаллов [101—103]. Такие аналитические устройства отлича-

ются от известных ранее быстрым ответом, высокой чувствительностью и универсальностью. Так, например, принцип работы биотермистора заключается в следующем. При выделении теплоты в результате ферментативной реакции происходит изменение температуры окружающей среды, на которое реагирует термистор. В определенном интервале изменение температуры и, следовательно, электрический ответ будут пропорциональны концентрации определяемого компонента.

Новый тип биосенсоров нашел широкое применение для клинических анализов разнообразных метаболитов, таких как аскорбиновая кислота, мочевины, глюкоза, креатин, холестерин, АТФ, лактат и др., а также при контроле ферментативных процессов. Комбинация твердофазного иммуноферментного анализа с калориметрическим контролем позволили определять концентрации некоторых соединений ниже 10^{-13} М.

2. Создание высокоэффективных преобразователей энергии на основе биокатализаторов

Особенности ферментных катализаторов позволяют использовать биохимические реакции в электрохимических генераторах энергии. Существуют возможности создания топливных элементов, которые используют в качестве топлива соединения органического характера — спирты, углеводы. С другой стороны, высокая каталитическая активность биокатализаторов позволяет создать топливные элементы повышенной мощности, например, в системах биофотолиза воды [104].

Уже в начале 60-х гг. обсуждалась возможность создания биохимических топливных элементов [84]. К настоящему времени существуют системы, которые можно разделить на два класса.

Первый класс, это системы, использующие биокатализаторы (в виде микроорганизмов, клеток или ферментов) для превращения определенного материала в электроактивное соединение [105—107]. Например, в работах [106, 107] эфиры фосфорной кислоты, пирокатехина, *n*-аминофенола сначала гидролизуются под действием ферментов гидролаз, а продукты этой реакции уже электрохимически окисляются на электроде в виде топлива. Показано, что при участии щелочной фосфатазы процесс окисления продуктов ферментативной реакции протекает при потенциалах, на 0,3—0,4 В более отрицательных, чем электроокисление исходных субстратов.

Описаны способы превращения сложных органических веществ в простейшее топливо под действием микроорганизмов [108—111]. В качестве первичных веществ использовались сахараиды, мочевины, лактат, муравьиная кислота, гексадекан. Под действием биокатализаторов образовывалось топливо — аммиак, водород, метан, окисляющееся на электроде. Особенностью данных топливных элементов является наличие одной или нескольких стадий, которые не являются окислительно-восстановительными реакциями и служат для превращения вторичного топлива в электрохимически активное первичное топливо.

Ко второму классу принадлежат системы, основанные на непосредственном использовании ферментных катализаторов в биоэлектрохимических реакциях [17]. Очевидно, что такую функцию могут выполнять только окислительно-восстановительные ферменты. В этой связи перспективным является исследование электрокаталитических свойств гидрогеназ, глюкозооксидазы, дегидрогеназ кислот, оксидаз метанола, метана, а также ферментов, активирующих электровосстановление кислорода. Топливные элементы, использующие фермент глюкозооксидазу, описаны в работах [66, 112]. Биотопливный элемент на основе иммобилизованной на сефарозе — CNBr гиалуронидазы достигал мощности 2,8 мВт/см² [113].

В литературе описаны электроды для биотопливных элементов, работающие по механизму прямого переноса электрона и использующие ферменты лакказы [62] и гидрогеназу [114].

В топливных элементах могут найти применение также так называемые «кофактор-модифицированные электроды». Возможность использования кофакторов в электрохимических процессах обсуждается в работах [115, 116].

В последние годы опубликован ряд работ, целью которых является создание анода топливного элемента, использующего в качестве топлива метанол [117, 118]. Катализатором в этой системе служила не НАД-зависимая метанолдегидрогеназа, а акцептором электронов — феназинэтносульфат или феназинметосульфат. Восстановленный медиатор окислялся на платиновом электроде. В качестве катодной использовали реакцию восстановления кислорода на платине. Максимальная мощность элемента составляла 20 мВт/мг.

3. Специфический электросинтез под действием иммобилизованных ферментов

При использовании биокатализаторов представляется возможным эффективно получать соединения, синтез которых другими методами затруднен [119, 120]. Основываясь на данных работы [121], можно предложить метод синтеза, использующий реакцию окисления кетостероидов, катализирующуюся ферментом стероид- Δ^1 -дегидрогеназой. Авторы [122] обсуждают возможность электросинтеза АТФ в присутствии АТФ-фосфатазы из АДФ и ортофосфата. В работе [123] предложен способ деметилирования бензфетамина, *n*-нитроанизола и аминопиридина при катодном восстановлении кислорода до перекиси водорода в присутствии цитохрома Р-450.

В литературе в последнее время довольно часто обсуждаются методы, позволяющие регенерировать кофакторы ферментов [124—126]. Авторы [127] предложили метод регенерирования никотинамидадениндинуклеотида (НАД), находящегося в комплексе с алкогольдегидрогеназой, иммобилизованной на поверхности стеклоуглеродного электрода. Для получения комплекса использовали аналог $\text{НАД}-\text{NH}_2-(\text{CH}_2)_6-\text{NHCOCH}_3-\text{НАД}^+$. Поверхность электрода модифицировали 2,4,6-трихлортриазинном. В присутствии этанола происходила ферментативная реакция с образованием НАДН-аналога, который затем электрохимически окислялся в НАД-аналог. Недостатком данного способа является протекание побочных электрохимических процессов, приводящих к разрушению НАД-аналога и образованию ферментативно неактивных димерных соединений.

В работах [128, 129] была предложена система, регенерирующая НАД, с использованием (НМФ⁺) в качестве медиатора. Аналог кофактора НАД-декстран в присутствии субстратов ферментов алкогольдегидрогеназы и лактатдегидрогеназы восстанавливается до НАДН-декстрана. Последний окисляется химически в присутствии НМФ⁺ до НАД-декстрана. Возникающий МФН обратимо окисляется до НМФ⁺ на электроде. Предложенный метод позволяет также регенерировать НАДФ в присутствии фермента глутаматдегидрогеназы. Эффективность регенерирования кофактора в таких системах достигает 99,85 %.

Описаны реакции электросинтеза ряда производных углеводов с использованием метанмонооксигеназы [48, 119].

Следует ожидать, что интерес к получению разного рода органических веществ с применением метода биоэлектросинтеза будет постоянно расти. Это связано с необходимостью крупномасштабного производства некоторых веществ, например, для фармацевтической промышленности, синтез которых затруднен известными методами органического синтеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Березин И. В., Варфоломеев С. Д., Ярополов А. И., Богдановская В. А., Тарасевич М. Р. Докл. АН СССР, 1975, т. 225, с. 103.
2. Varfolomeev S. D., Jaroplov A. I., Berezin I. V., Tarasevich M. R., Bogdanovskaya V. A. Bioelectrochem. Bioenerg., 1977, v. 4, p. 314.

3. Тарасевич Н. Р., Богдановская В. А., Багоцкий В. С., Варфоломеев С. Д., Ярополов А. И., Березин И. В. Электрохимия, 1977, т. 13, с. 892.
4. Mizuguchi J., Suzuki S., Takahashi F. Bull. Tokyo Institute Technology, 1967, v. 78, p. 27.
5. Mizuguchi P., Suzuki S., Kashiwaya K., Tokura M. Kogyo Kagaku Zasshi, 1964, v. 67, p. 410.
6. Suzuki S. Chem. Letters, 1964, v. 17, p. 1359.
7. Mizuguchi J., Suzuki S. J. Chem. Soc. Japan, 1964, v. 67, p. 410.
8. Yagi T., Goto M., Nakano K., Kimura K., Inokuchi H. J. Biochem. (Tokyo), 1975, v. 78, p. 443.
9. Kimura K., Inokuchi H., Yagi T. Chem. Letters, 1972, v. 8, p. 693.
10. Yagi T. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1976, v. 73, p. 2947.
11. Варфоломеев С. Д. Ж. физ. химии, 1981, т. 55, с. 545.
12. Богдановская В. А., Варфоломеев С. Д., Тарасевич М. Р., Ярополов А. И. Электрохимия, 1980, т. 26, с. 763.
13. Березин И. В., Побочин А. С., Куприянов В. В., Лузиков В. И. Биоорг. химия, 1977, т. 3, с. 989.
14. Minaguchi J., Suzuki S. J. Chem. Soc. Japan, 1962, v. 65, p. 1606.
15. Yaropolov A. I., Varfolomeev S. D., Berezin I. V., Bogdanovskaya V. A., Tarasevich M. R. FEBS Letters, 1976, v. 71, p. 306.
16. Богдановская В. А., Газрилова Е. Ф., Тарасевич И. Р., Стоп Д. И. Электрохимия, 1980, т. 16, с. 1596.
17. Ярополов А. И. Дис. на соискание уч. степени канд. хим. наук. Москва: МГУ, 1978.
18. Takahashi F., Aizawa M., Mizuguchi J., Suzuki S. Kogyo Kagaku Zasshi, 1970, v. 73, p. 908.
19. Takahashi F., Aizawa M., Mizuguchi J., Suzuki S. J. Chem. Soc. Japan, 1970, v. 73, p. 908.
20. Петухова Р. П., Сухно А. А., Родионов Ю. В., Егоров А. М., Подловченко Б. И., Березин И. В. Тез. докл. II Всесоюз. совещания по электрокатализу. Москва, 1978, с. 54.
21. Гладышев П. П., Горяев Н. И., Шаповалов Ю. А., Гладышев В. П. Сборник работ по химии, вып. 4, Алма-Ата: Каз. ГУ, 1975, с. 206.
22. Гладышев П. П., Горяев Н. И., Шаповалов Д. А. Авт. свид. СССР 615087 (1978): Бюл. изобр. 1978, № 26, с. 15.
23. Ястребова Е. А., Осипов И. В., Варфоломеев С. Д., Агасян П. К. Ж. аналит. химии, 1982, т. 37, с. 1278.
24. Кулис Ю. Ю., Малинаускас А. А. Там же, 1979, т. 34, с. 778.
25. Plotkin E. V., Higgins I. J., Hill H. A. O. Biotechnology Letters, 1981, v. 3, p. 187.
26. Lanniello R. M., Yacynych A. M. Anal. Chim. Acta, 1981, v. 131, p. 123.
27. Lanniello R. M., Yacynych A. M., Lindson T. J. Anal. Chem., 1982, v. 54, p. 1098.
28. Кулис Ю. Ю., Ченас Н. К. Биохимия, 1981, т. 46, с. 1780.
29. Cenas N. K., Kulis J. J. Bioelectrochem. Bioenerg., 1981, v. 8, p. 123.
30. Kulis J. J., Samalius A. S., Svirmickas G.-J. S. FEBS Letters, 1980, v. 114, p. 7.
31. Kulis J. J., Svirmickas G.-J. S. Anal. Chim. Acta, 1979, v. 109, p. 55.
32. Кулис Ю. Ю., Швирмицкас Г.-Ю. С. Тр. АН Литов. ССР, 1980, № 2(117), с. 9.
33. Johnson J. M., Halsall H. B., Heineman W. R. Anal. Chem., 1982, v. 54, p. 1377.
34. Johnson J. M., Halsall H. B., Heineman W. R. Ibid., v. 54, p. 1394.
35. Шумакович Г. П., Кузнецов Б. А. ВИНТИ, № 804-79. Лен. М., 1979.
36. Kuznetsov B. A., Mestechkina N. M., Shumakovich G. P. Bioelectrochem. Bioenerg., 1977, v. 4, p. 1.
37. Kuznetsov B. A., Shumakovich G. P., Mestechkina N. M. Ibid., 1977, v. 4, p. 512.
38. Scheller F. Ibid., 1977, v. 4, p. 490.
39. Кузнецов Б. А., Местечкина И. М., Изотов Н. В., Карузина Н. И., Карякин А. В., Аргаков А. И. Биохимия, 1979, т. 44, с. 1569.
40. Betso S. R., Klapper M. M., Anderson L. B. J. Amer. Chem. Soc., 1972, v. 94, p. 8197.
41. Haladjian J., Bianco P. Bioelectrochem. Bioenerg., 1979, v. 6, p. 551.
42. Serre P. A., Haladjian J., Bianco P. J. Electroanal. Chem., 1981, v. 122, p. 327.
43. Eddowes M. J., Hill H. A. O., Uosaki K. Bioelectrochem. Bioenerg., 1980, v. 7, p. 527.
44. Eddowes M. J., Elzanowska H., Hill H. A. O. Biochem. Soc. Trans., 1979, v. 7, p. 735.
45. Eddowes M. J., Hill H. A. O., Uosaki K. J. Amer. Chem. Soc., v. 101, p. 7113.
46. Eddowes M. J., Hill H. A. O. Ibid., 1979, v. 101, p. 4461.
47. Hill H. A. O., Walton N. J., Higgins I. J. FEBS Letters, 1981, v. 126, p. 282.
48. Hill H. A. O., Higgins I. Y. Phil. Trans. Roy Soc., 1981, v. A 302, p. 267.
49. Yeh R., Kuwana T. Chem. Letters, 1977, v. 10, p. 1145.
50. Saponeva E. P., Kiselev B. A., Chechilaeva L. N. Bioelectrochem. Bioenerg., 1981, v. 8, p. 251.
51. Czochralska B., Szweykowskay M., Deuncher N. A., Shugar D. Ibid., 1978, v. 5, p. 713.
52. Senda M., Ikeda T., Kakutani T., Kano K., Kinochita H. 1981, v. 8, p. 151.
53. Spence J. T., Barber M. J., Siegel L. M. Biochemistry, 1982, v. 21, p. 1656.
54. Durlat M., Comtat M. J. Electroanal. Chem., 1978, v. 89, p. 221.
55. Rigo A., Rottilio G. Anal. Biochem., 1977, v. 81, p. 157.
56. Yaropolov A. I., Tarasevich M. R., Varfolomeev S. D. Bioelectrochem. Bioenerg., 1978, v. 5, p. 18.

57. Ikeda I., Ando S., Senda M. Bull. Chem. Soc. Japan, 1981, v. 54, p. 117.
58. Scheller F., Strnad G., Neuman B., Kuchn H., Ostrowski W. Bioelectrochem. Bioenerg., 1979, v. 6, p. 117.
59. Богдановская В. А., Тарасевич М. Р. Электрохимия, 1975, т. 11, с. 914.
60. Tarasevich M. R., Bogdanovskaya V. A. Bioelectrochem. Bioenerg., 1975, v. 2, p. 69.
61. Niki K., Takizawa Y., Kumagai H., Fujiwara R., Yagi T., Inokuchi H. Biochim. Biophys. Acta, 1981, v. 636, p. 136.
62. Березин И. В., Богдановская В. А., Варфоломеев С. Д., Тарасевич М. Р., Ярополов А. И. Докл. АН СССР, 1978, т. 240, с. 616.
63. Tarasevich M. R., Yaropolov A. I., Bogdanovskaya V. A., Varfolomeev S. D. Bioelectrochem. Bioenerg., 1979, v. 6, p. 393.
64. Ярополов А. И., Карякин А. А., Варфоломеев С. Д. Вестник МГУ. Химия, 1983, т. 24, с. 523.
65. Lahoda E.-J. J., Liu C. C., Wingard L. B. Biotechnol. Bioeng., 1975, v. 17, p. 413.
66. Wingard L. B., Liu C. C., Nagda N. L. Ibid., 1971, v. 13, p. 629.
67. Wingard L. B. Hind. Antibiot. Bull., 1978, v. 20, p. 109.
68. Liu C. C., Wingard L. B., Wolfson S. K., Yao S. Y., Drash A. L., Schiller J. G. Biotechnol. Bioeng., 1979, v. 6, p. 19.
69. Quocho F. A., Richards F. M. Proc. Nat. Acad. Sci USA, v. 52, p. 833.
70. Liu C. C., Fryburg F. M., Chen A. K. Biotechnol. Bioeng., 1981, v. 8, p. 703.
71. В кн.: Имобилизованные ферменты. Современное состояние и перспективы, т. 2. М.: Изд-во МГУ, 1976, с. 358.
72. Бачурин С. О. Дис. на соискание уч. степени канд. хим. наук, М.: МГУ, 1980.
73. Варфоломеев С. Д., Бачурин С. О., Осипов И. В., Алиев К. В., Березин И. В., Кабанов В. А. Докл. АН СССР, 1978, т. 239, с. 348.
74. Бачурин С. О., Варфоломеев С. Д., Тысячная И. В., Давыдов Б. Э., Мавренкова Г. В., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1980, т. 253, с. 370.
75. Varfolomeev S. D., Bacheurin S. O., Naqui A. J. Mol. Cat., 1980, v. 9, p. 223.
76. Kabanov V. A., Aliiev K. V., Richmond J. J. Appl. Polym. Sci., 1975, v. 19, p. 1275.
77. Кулис Ю. Ю., Швирицкая Г.-Ю. С. Докл. АН СССР, 1979, т. 245, с. 137.
78. Kulis J. J., Svirmickas G.-J. S. Anal. Chim. Acta, 1980, v. 117, p. 115.
79. Kulis J. J., Samalius A. S., Svirmickas G.-J. S. FEBS Letters, 1980, v. 114, p. 7.
80. Varfolomeev S. D., Berezin I. V. J. Mol. Cat., 1978, v. 4, p. 387.
81. Варфоломеев С. Д. Ж. физ. химии, 1981, т. 55, с. 1118.
82. Ярополов А. И., Сухомлин Т. К., Карякин А. А., Варфоломеев С. Д., Березин И. В. Докл. АН СССР, 1981, т. 260, с. 1192.
83. Замараев К. И., Хайрутдинов Р. Ф. Успехи химии, 1978, т. 17, с. 992.
84. Cenek H. Chem. Listy, 1968, v. 62, p. 927.
85. Wingard L. New Scientist, 1974, v. 64, p. 565.
86. Rao J. R., Richter G. Naturwissenschaften, 1974, B. 61, S. 200.
87. Bauman E. K., Goods L. H., Guilbault G. G., Kramer D. N. Anal. Chem., 1965, v. 37, p. 1378.
88. Updike S. J., Hicks G. P. Nature, 1967, v. 214, p. 986.
89. Scheller F., Pfeiffer D., Hundertmarx J., Quade A., Janchen M., Lange G., Holesch M., Dittmer H. Acta biol. med. germ., 1979, B. 3, S. 671.
90. Tran-Minh C., Broun G. Anal. Chem., 1975, v. 47, p. 1359.
91. Nilsson H., Areklund A. Ch., Mosbach K. Biochim. Biophys. Acta, 1973, v. 320, p. 524.
92. Nagy G., von Strop L. M., Guilbault G. G. Anal. Chim. Acta, 1973, v. 66, p. 443.
93. Kulys J. J., Pesliakienė M. V., Samalius A. S. Bioelectrochem. Bioenerg. 1981, v. 8, p. 81.
94. Schubert F., Kirslein D., Scheller F., Mohr P. Anal. Letters, 1980, v. 13, p. 1167.
95. Кулис Ю. Ю., Ченас Н. К., Круповницкене А. Л., Швирицкая Г.-Ю. С. Тр. АН Литов. ССР, 1982, сер. В, т. 4 (80), с. 114.
96. Александровский Я. А., Сухно А. А., Родионов Ю. В. Биохимия, 1979, т. 44, с. 2130.
97. В кн.: Имобилизованные ферменты. Современное состояние и перспективы, т. 2. М.: Изд-во МГУ, 1976, с. 468.
98. Scheller F., Pfeiffer D. Z. Chem., 1978, B. 18, S. 50.
99. Kulys J. J. Enzyme Microbiol. Technol., 1981, v. 3, p. 344.
100. Von Sturm F. Bioelectrochem. Bioenerg., 1980, v. 3, p. 191.
101. Danielsson B., Mattiasson B., Mosbach K. In: Applied Biochemistry and Bioengineering, v. 3. New York: Academic Press, p. 97.
102. Danielsson B., Mosbach K. FEBS Letters, v. 101, p. 47.
103. Winquist F., Danielsson B., Lundstrom I., Mosbach K. Appl. Biochem. Biotechnol., v. 7, p. 135.
104. Березин И. В., Варфоломеев С. Д., Зайцев С. В. Докл. АН СССР, 1976, т. 229, с. 94.
105. Van Hees W. J. Electrochem. Sci., 1965, v. 112, p. 258.
106. Кулис Ю. Ю., Разумас В. Н., Маликаускас А. А. Докл. АН СССР, 1979, т. 245, с. 394.
107. Kulys J. Y., Razumas V. I., Malinauskas A. A. J. Electroanal. Chem., 1980, v. 116, p. 11.
108. Videla H. A., Arvia A. J. Biotechnol. Bioeng., 1975, v. 17, p. 1529.
109. Karable I., Matsugana T., Tsuru S., Suzuki S. Ibid., 1977, v. 19, p. 1727.
110. Disalvo E. A., Videla H. A. Ibid., 1981, v. 23, p. 1158.

111. Suzuki S., Karube I., Matsunaga T., Kuriyama S., Suzuki N., Schirogami T., Takamura Y. *Biochemie*, 1980, v. 62, p. 353.
112. Weibel M. K., Dodge Ch. *Arch. Biochem. Biophys.*, 1975, v. 169, p. 146.
113. Ahn B. K., Wolfson S. K., Yao S. J., Liu C. C., Todd R. C., Weiner S. B. *J. Biomed. Mater. Res.*, 1976, v. 10, p. 283.
114. Ярополов А. И., Карякин А. А., Варфоломеев С. Д. *Вестник МГУ, химия*, 1983, т. 24, с. 523.
115. Braun R. D. *J. Electrochem. Soc.*, 1977, v. 124, p. 1342.
116. Gorton L., Johansson G. *Ibid.*, 1980, v. 113, p. 151.
117. Davis G., Hill H. A. O., Aston W. Y., Higgins I. Y., Turner A. P. F. *Enzyme Microb. Technol.*, 1983, v. 5, p. 383.
118. Turner A. P., F., Aston W. J., Higgins I. J., Davis G., Hill H. A. O. *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, 1982, p. 401.
119. Higgins I. J., Hammond R. C., Plotkin E., Hill H. A. O., Uosaki K., Eddiwes M. J., Cass A. E. G. In: *Hydrocarbons Biotechnol. Proc. Meet.*, Canterbury, 1979, London, 1980, p. 181.
120. Webb S. *Spectrum*, 1981, № 173, p. 11.
121. Wollenberger H., Scheller F., Atrat P. *Anal. Letters*, 1980, v. 13, p. 1201.
122. Wingard L. B., Yao S. J., Liu C. C. *J. Mol. Cat.*, 1980, v. 8, p. 475.
123. Scheller F., Renneberg R., Mohr P., Janig G. R., Ruckpaul K. *FEBS Letters*, 1976, v. 71, p. 309.
124. Jangfeldt H., Torstensson A., Johansson G. *Anal. Chim. Acta*, 1978, v. 97, p. 221.
125. Aizawa M., Coughlin R. W., Charles M. *Biochim. Biophys. Acta*, 1976, v. 440, p. 233.
126. Thomas L. C., Chrustian G. D. *Anal. Chim. Acta*, 1975, v. 78, p. 271.
127. Torstensson A., Johansson G. *Anal. Letters*, 1980, v. 13, p. 837.
128. Malinauskas A. A., Kulys J. J. *Anal. Chem. Acta*, 1978, v. 98, p. 31.
129. Malinauskas A. A., Kulys J. J. *Biotechnol. Bioeng.*, 1978, v. 20, p. 769.

Ин-т биохимии им. А. Н. Баха
АН СССР, Москва