

Электрохимическая энергетика. 2024. Т. 24, № 1. С. 38–49

Electrochemical Energetics, 2024, vol. 24, no. 1, pp. 38–49

<https://energetica.sgu.ru>

<https://doi.org/10.18500/1608-4039-2024-24-1-38-49>, EDN: IAJGYL

Научная статья

УДК 541.136

КИСЛОРОДНЫЙ БИОКАТОД НА ОСНОВЕ *LACCASE PLEUROTUS OSTREATUS НК-35* ДЛЯ БИОТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА

М. О. Мещерякова¹, М. В. Филиппова¹, Г. Л. Бурьгин², И. А. Казаринов¹✉

¹Саратовский национальный исследовательский государственный университет имени Н. Г. Чернышевского
Россия, 410012, г. Саратов, ул. Астраханская, д. 83

²Институт биохимии и физиологии растений и микроорганизмов
ФИЦ «Саратовский научный центр РАН»
Россия, 410049, г. Саратов, проспект Энтузиастов, д. 13

Мещерякова Мария Олеговна, ассистент кафедры физической химии Института химии, mno24@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0899-8517>

Филиппова Маргарита Викторовна, студентка Института химии, rita.zag25@mail.ru

Бурьгин Геннадий Леонидович, кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории иммунохимии, buryingl@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8031-9641>

Казаринов Иван Алексеевич, доктор химических наук, профессор, заведующий кафедрой физической химии Института химии, kazarinovia@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4858-9614>

Аннотация. Сокращение зависимости от ископаемого топлива и снижение загрязнений – это основные тенденции, заставляющие человечество искать новые источники энергии. Обработка сточных вод с помощью микробных топливных элементов – область, в которой две эти цели могут быть совмещены. Микробные топливные элементы, в которых микроорганизмы являются катализаторами процесса окисления органических веществ, представляют собой новую и перспективную альтернативу для производства электроэнергии. Важной проблемой таких систем является создание эффективного катода. Естественно, в указанных приложениях перспективным катодом является кислородный (воздушный) электрод.

В данной работе представлены исследования кислородного биокатода на основе фермента *laccase Pleurotus ostreatus НК-35* в зависимости от способа его иммобилизации на поверхности углеродистого электрода и природы электролита. Экспериментально установлено, что эффективным методом иммобилизации лакказы на поверхности углеродистого электрода является введение её с помощью золь-гель матрицы. Показано, что более эффективная работа биокатода на основе лакказы наблюдается в фосфатно-цитратном (рН 4.0) буферном растворе, т. е. в кислой среде.

Ключевые слова: микробные топливные элементы, биокатод, биоэлектрокатализатор, лакказы, иммобилизация ферментов

Для цитирования: Мещерякова М. О., Филиппова М. В., Бурьгин Г. Л., Казаринов И. А. Кислородный биокатод на основе *laccase Pleurotus ostreatus НК-35* для биотопливного элемента // Электрохимическая энергетика. 2024. Т. 24, № 1. С. 38–49. <https://doi.org/10.18500/1608-4039-2024-24-1-38-49>, EDN: IAJGYL

Статья опубликована на условиях лицензии Creative Commons Attribution 4.0 International (CC-BY 4.0)

Article

Oxygen biocathode based on *laccase Pleurotus ostreatus НК-35* for biofuel cell

М. О. Meshcheryakova¹, М. V. Filippova¹, G. L. Burygin², I. A. Kazarinov¹✉

¹Saratov State University
83 Astrakhanskaya St., 410012 Saratov, Russia

²*Institute of Biochemistry and Physiology of Plants and Microorganisms RAS*
13 Entuziastov prosp., 410049 Saratov, Russia

Mariya O. Meshcheryakova, mmo24@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0003-0899-8517>

Margarita V. Filippova, rita.zag25@mail.ru

Gennadiy L. Burygin, buryingl@gmail.com, <https://orcid.org/0000-0001-8031-9641>

Ivan A. Kazarinov, kazarinovia@mail.ru, <https://orcid.org/0000-0002-4858-9614>

Abstract. The main reasons that make mankind look for new sources of energy are decreasing dependence on fossil fuels and reducing pollution. Wastewater treatment with the help of microbial fuel cells is an area where these two goals can be combined. Microbial fuel cells, in which microorganisms catalyze the oxidation of organic substances, represent a new and promising alternative for electricity generation. The creation of an efficient cathode in such systems is the important problem. It is evident that in these applications an oxygen (air) electrode is a promising cathode. In this study, the oxygen biocathode based on the *laccase enzyme Pleurotus ostreatus HK-35* was developed and its electrochemical properties were studied depending on the immobilization method of the enzyme on the surface of a carbon-graphite electrode and the type of the electrolyte.

It was experimentally established that *laccase* injection using a sol-gel matrix was the effective method for immobilizing *laccase* on the surface of a carbon-graphite electrode. It was shown that the more efficient operation of the *laccase*-based biocathode was observed in a phosphate-citrate (pH 4.0) buffer solution, i.e., in an acidic environment.

Keywords: microbial fuel cells, biocathode, bioelectrocatalyst, *laccase*, enzyme immobilization

For citation: Meshcheryakova M. O., Filippova M. V., Burygin G. L., Kazarinov I. A. Oxygen biocathode based on *laccase Pleurotus ostreatus HK-35* for biofuel cell. *Electrochemical Energetics*, 2024, vol. 24, no. 1, pp. 38–49 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1608-4039-2024-24-1-38-49>, EDN: IAJGYL

This is an open access article distributed under the terms of Creative Commons Attribution 4.0 International License (CC-BY 4.0)

ВВЕДЕНИЕ

Сокращение зависимости от ископаемого топлива и снижение загрязнений – это основные тенденции, заставляющие человечество искать новые источники энергии. Обработка сточных вод – область, в которой две эти цели могут быть совмещены.

Промышленные сточные воды, например, от отраслей пищевой промышленности и пивоваренных заводов, сахарных производств, сельскохозяйственные сточные воды от животноводческих ферм, сточные воды целлюлозно-бумажных отраслей производства являются идеальным сырьём для биообработки, поскольку они содержат высокие уровни легко деградируемого органического материала, что приводит к экономической выгоде даже когда требуется подогревание жидкости.

Кроме того, они уже имеют высокое содержание воды, что исключает необходимость её добавления. Такие сточные воды – потенциальные объекты переработки, из ко-

торых можно получать биоэнергию и биохимикаты. Восстановление энергии и ценных продуктов могло бы частично компенсировать стоимость обработки сточных вод и несколько уменьшить нашу зависимость от ископаемого топлива.

Есть несколько биологических стратегий обработки промышленных и сельскохозяйственных сточных вод [1, 2]:

- 1) очистка сточных вод с помощью микробных топливных элементов;
- 2) метаногенное анаэробное ферментативное расщепление органических веществ в сточных водах;
- 3) ферментативное производство водорода из сточных вод;
- 4) биологическое химическое производство.

Три из этих стратегий приводят к выработке биоэнергии (электричество, метан, водород), а четвёртая – к ферментативному получению биохимикатов. Однако для внедрения каждой из этих технологий существуют научно-технические проблемы, важнейшей

из которых является подбор соответствующих микробиологических систем.

Микробные топливные элементы (МТЭ), в которых микроорганизмы вырабатывают электроэнергию, окисляя органические вещества, представляют собой новую и многообещающую альтернативу для получения энергии. Несмотря на массу достоинств МТЭ, по-прежнему, большой проблемой является создание эффективных катодов [3]. Сегодня перспективными направлениями являются использование химического или ферментного кислородного (воздушного) электрода.

Кислород является наиболее подходящим электронным акцептором для данных систем, благодаря его высокому редокс-потенциалу, низкой стоимости, доступности, устойчивости и отсутствию химических отходов (вода является единственным конечным продуктом). Однако низкая скорость восстановления кислорода на поверхности графитовых электродов является одним из лимитирующих факторов для оптимальной работы кислородного электрода. Платина является наиболее часто используемым катодным катализатором реакции восстановления кислорода; однако высокая стоимость не позволяет использовать ее в коммерческих приложениях МТЭ.

В связи с этим проводятся разработки катализаторов для катодов с малым содержанием платины, либо совсем исключаящее ее наличие [4]. Например, диоксид марганца является эффективным перспективным катализатором кислородного (воздушного) катода из-за его низкой стоимости, нетоксичности и экологичности, высокой химической стабильности и каталитической активности. Учитывая успешную замену Pt на MnO_2 во многих электрохимических приложениях, диоксид марганца может действовать как альтернативный катализатор Pt для окислительно-восстановительных реакций в МТЭ с воздушным катодом [5].

Еще одним эффективным решением проблемы является применение биокатодов. В этих случаях использование ферментов и

микроорганизмов как катализаторов процесса восстановления кислорода является перспективным и позволяет создать полностью биотопливный элемент для генерации электрической энергии.

Одним из представителей активных биоэлектрокатализаторов восстановления кислорода является лакказа. Лакказа является ферментом, который принадлежит к классу оксидоредуктаз и способствует окислению различных соединений, включая фенолы, полифенолы, аминовые соединения и другие ароматические соединения, путем переноса электронов на молекулярный кислород, с сопутствующим восстановлением молекулярного кислорода до воды без образования в качестве промежуточного продукта H_2O_2 или каких-либо других кислородных интермедиатов [6]. Лакказы широко распространены в природе – они были обнаружены в грибах, насекомых, бактериях и археях.

В биотопливных элементах лакказа может быть использована в виде наночастиц на поверхности катода, встроенной в мембрану, или использована как молекулярно иммобилизованный биоэлектрокатализатор.

Целью данной работы является разработка кислородного биокатода на основе фермента лакказы и изучение его электрохимических свойств в зависимости от способа иммобилизации фермента на поверхности углеродистого электрода и природы электролита.

1. ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

1.1. Получение и характеристика лакказы

Мицелий гриба *Pleurotus ostreatus* НК-35 был предоставлен сотрудниками ИБФРН РАН. Гриб был предварительно очищен дистиллированной водой и переведен в мелкодисперсную систему. Биомасса отмывалась центрифугированием (10000 об./мин, 20 мин) с последующей лиофилизацией.

Впервые выделенный фермент *laccase* *Pleurotus ostreatus* НК-35 имеет молекуляр-

ную массу 64000 г/моль и аморфную структуру, что подтверждено рентгенофазовым анализом с применением рентгеновского дифрактометра ДРОН-8Т («ИЦ Буревестник», Санкт-Петербург, Россия) (рис. 1).

Активность фермента определялась фотоэлектроколориметрически по следующей методике. Аликвотная порция рабочего раствора, содержащего 1 мл раствора лакказы и 1 мл 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновая кислота) (АБТС), переносили в кювету с толщиной поглощающего слоя 1 см и измеряли оптическую плотность во времени относительно дистиллированной воды, регистрируя изменения оптической плотности при длине волны 436 нм на фотоэлектроколориметре КФК-2МП че-

рез каждые 20 с, считая за нулевой отсчет момент внесения АБТС к раствору фермента. В дальнейшем кинетические кривые обрабатывали для получения зависимости скорости химической реакции от различных параметров. На рис. 2 приведена зависимость оптической плотности раствора фермента от времени.

Активность фермента рассчитывалась по формуле:

$$A = \frac{\Delta OD}{V \cdot C \cdot E \cdot l \cdot t}, \quad (1)$$

где A – активность лакказы, ммоль/мг·мин; OD – разность оптических плотностей ($OD_{нач} - OD_{контр}$), нм; V – объем анализируемой пробы, мл; C – концентрация ана-

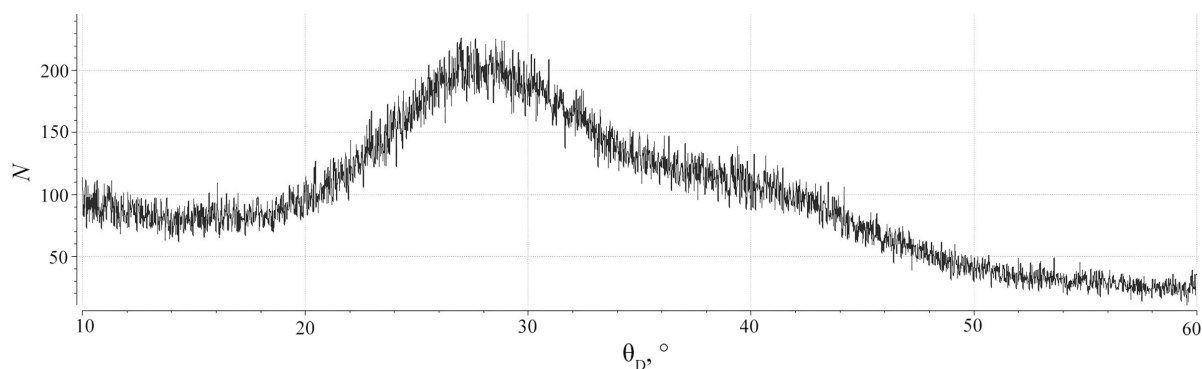


Рис. 1. Дифрактограмма суспензии лакказы с шагом сканирования 0.1°

Fig. 1. The X-ray diffraction pattern of the *laccase* suspension with a scanning step of 0.1°

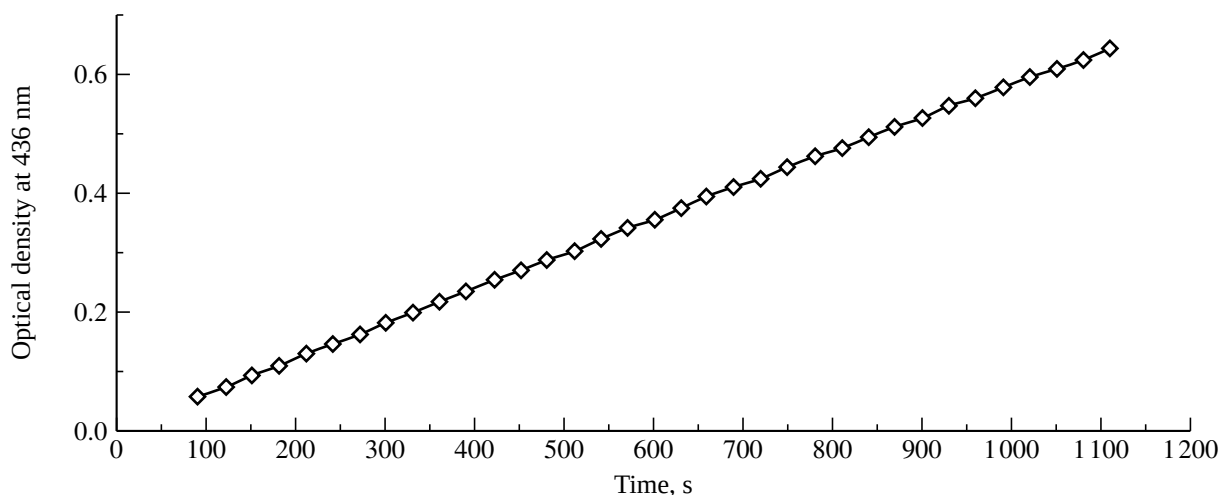


Рис. 2. Зависимость оптической плотности раствора фермента от времени

Fig. 2. The dependence of the optical density of the enzyme solution on the time

лизируемого белка, мг/мл; E – коэффициент пересчета для АВТС при 436 нм, $E = 29300$ (моль·см) $^{-1}$; l – длина кюветы, см; t – время, мин.

При измерении оптической плотности раствора фермента в растворе АВТС цвет жидкости менялся от прозрачного к изумрудному, что свидетельствует о том, что в исследуемом растворе содержится фермент лакказы. Активность фермента составила $A = 10.6$ ммоль/мг·мин.

Лакказы принадлежат к семейству медь-содержащих оксидаз, и их особенностью является наличие четырех ионов меди на каждую молекулу, что придает им особый интерес в качестве модельных белков для исследований. Активный центр лакказ состоит из четырех ионов меди, которые формируют два основных центра: моноядерный Т1 центр и трехядерный Т2/Т3 кластер.

На рис. 3 представлены 3D модели фермента лакказы с тремя активными центрами,

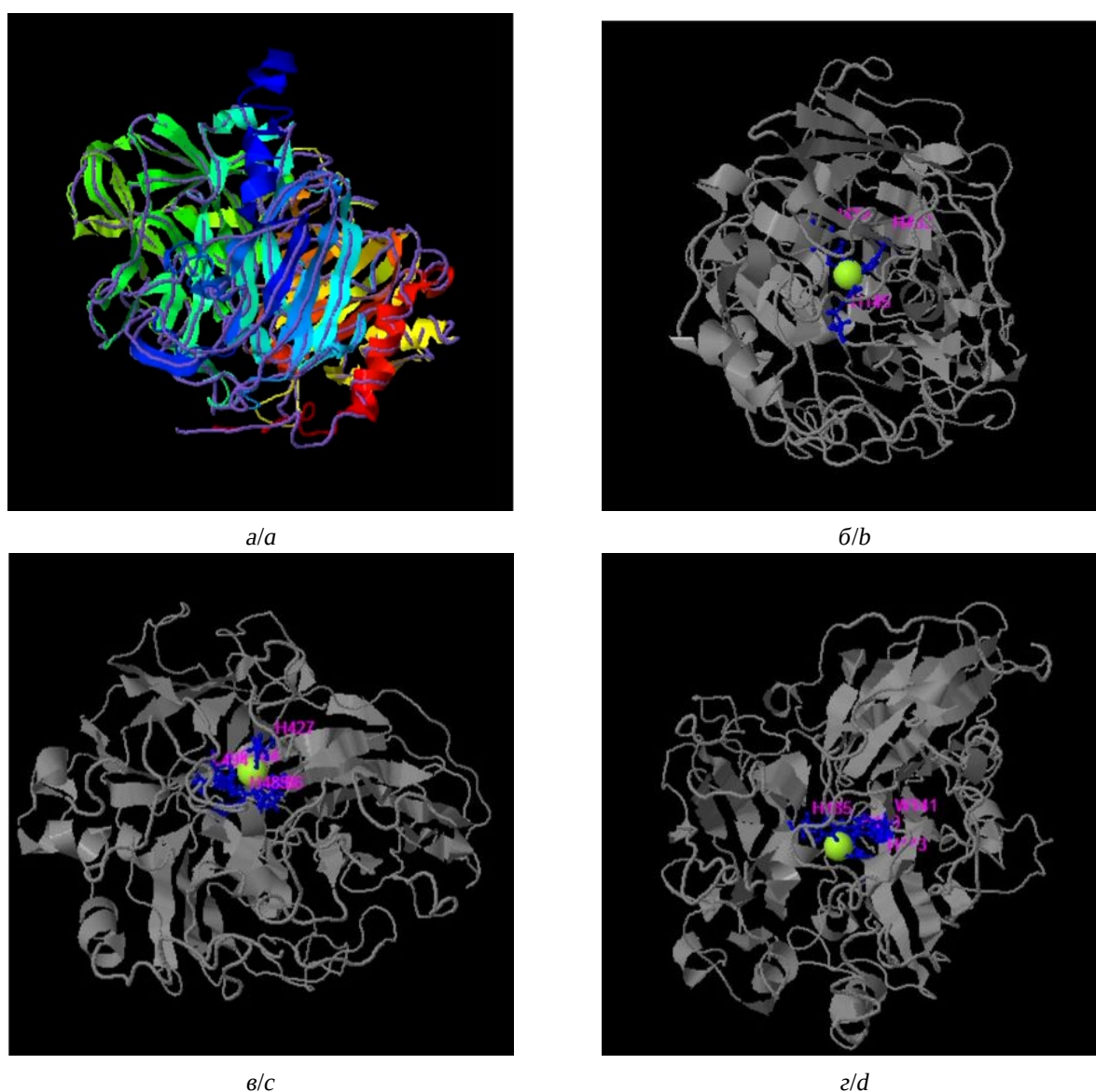


Рис. 3. 3D-модель *laccase Pleurotus ostreatus* HK-35 (a); 3D-модель активного центра (Cu)-Т1 (б); 3D-модель активного центра (Cu)-Т2 (в); 3D-модель активного центра (Cu)-Т3 (г) (цвет онлайн)

Fig. 3. 3D model of *laccase Pleurotus ostreatus* HK-35 (a); 3D model of the active center (Cu)-T1 (b); 3D model of the active center (Cu)-T2 (c); 3D model of the active center (Cu)-T3 (d) (color online)

полученные при помощи программного сервера ITASSER.

Молекулярные реакции окисления первого субстрата происходят вблизи моноядерного центра T1, в то время как окисление молекулы кислорода до воды происходит в трехядерном кластере T2/T3. Важной характеристикой лакказы является редокс-потенциал центра T1, который определяет спектр субстратов, способных быть окисленными. Различные лакказы имеют разные значения редокс-потенциала, таким образом их классифицируют на высоко- (> 720 мВ), средне- (450–720 мВ) и низкопотенциальные (< 450 мВ) в зависимости от энергетических требований для окисления конкретных субстратов.

Данные 3D-модели наглядно подтверждают, что в полученном нами ферменте лакказы содержатся три активных центра меди.

1.2. Методика электрохимического эксперимента

Для проведения электрохимического эксперимента использовалась стеклянная герметичная трехэлектродная ячейка. Эксперименты проводились при температуре 20°C.

В качестве рабочих электродов использовались углеродистые стержни, закрепленные на вертикальных осях, которые одновременно служили токоподводами. Непосредственно перед экспериментом проводилась обработка поверхностей электродов, которая заключалась в зачистке их наждачной бумагой разной зернистости и промывании горячей концентрированной серной кислотой (1 : 1) и дистиллированной водой. Целью такой обработки являлось удаление с поверхности загрязнений (в том числе и биомассы), оставшихся там после предыдущего эксперимента.

Электродом сравнения служил насыщенный хлоридсеребряный электрод сравнения (ЭВЛ-1М1), потенциал которого составлял +0.201 В относительно нормального водородного электрода. Электрод сравнения

соединялся с рабочим отсеком ячейки через капилляр Луггина. Отсек вспомогательного электрода отделялся от рабочего отсека стеклянной мембраной (фильтром Шотта). Вспомогательный электрод представляет собой платиновую проволоку в виде спирали.

Рабочими электролитами служили фосфатный (рН 7.1) и фосфатно-цитратный (рН 4.0) буферные растворы. Растворы приготавливались растворением навесок кристаллических солей в бидистиллированной воде.

В работе использовались два способа иммобилизации лакказы на углеродистые электроды: в виде композитной смеси и в виде золь-гель матрицы.

Композитная смесь состояла из сухого фермента (1 мг), наноструктурированного углерода (2 мг), фторопласт-2М (1 мг), растворенных в фосфатно-цитратном буфере (лакказа : HCY : Ф2М в соотношении 1 : 2 : 1) [7, 8].

Золь-гель матрица состояла из 20 мкл 5%-ного поливинилового спирта (ПВС), 50 мкл фермента, 50 мкл тетраэтоксисилан (TEOS), 50 мкл диэтоксидиметилсилан (DEDMS), 5 мкл 0.2 М NaF. Матрица приготавливалась следующим образом: к 20 мкл 5%-ного раствора ПВС добавляли суспензию фермента 10.6 ммоль и перемешивали в течение 5 мин, затем добавляли смесь TEOS и DEDMS объемом 100 мкл и снова перемешивали в течении 5 мин. После этого добавляли 5 мкл раствора катализатора, 0.2М NaF и перемешивали в течение 15 мин, затем наносили на поверхность электрода [9].

2. РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

2.1. Кислородный биокатод на основе лакказы, иммобилизированной на углеродистый электрод в виде композитной смеси

На рис. 4 представлены поляризационные кривые процесса катодного восстановления кислорода на биокатоде на основе лакказы, иммобилизированной на угле-

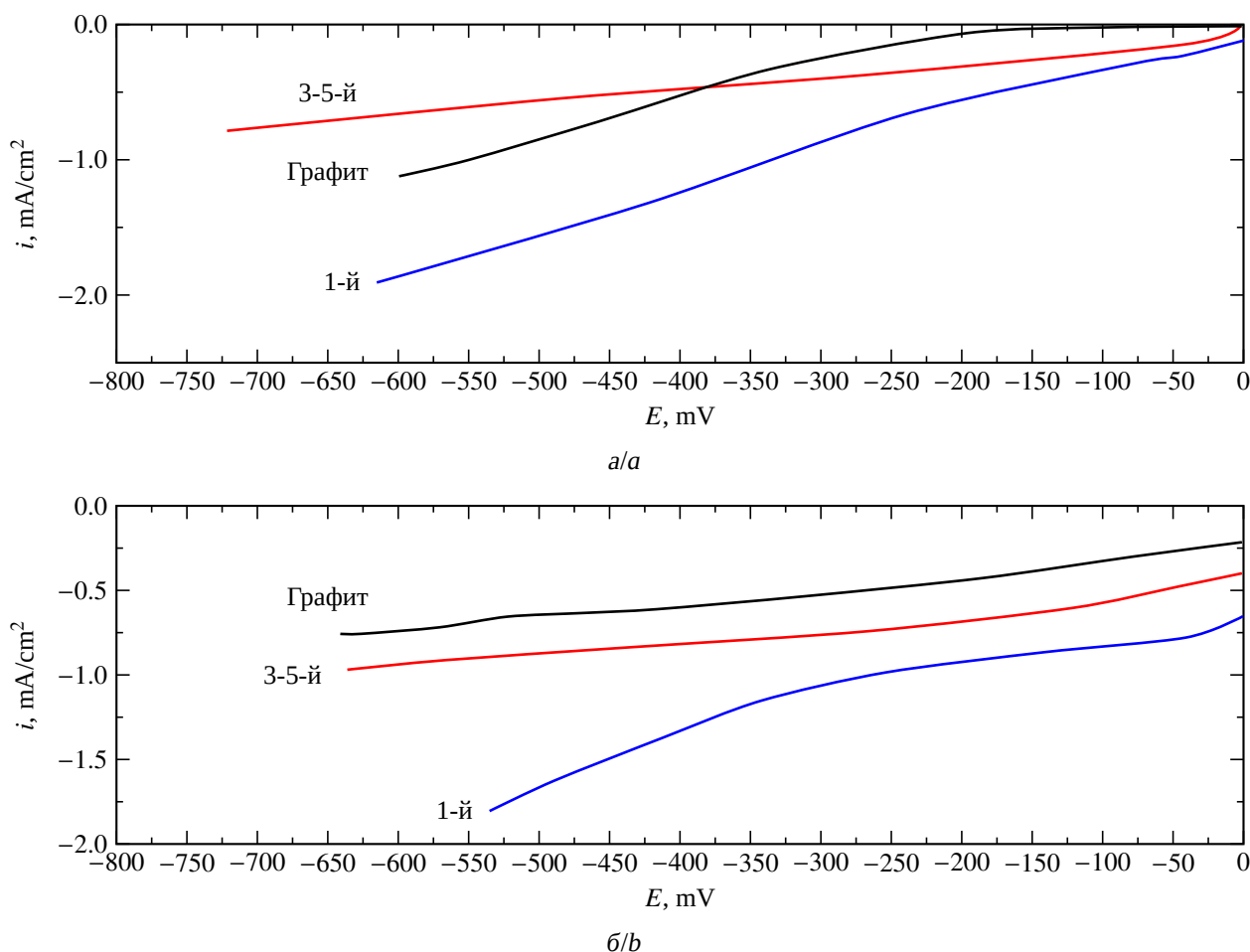


Рис. 4. Поляризационные кривые процесса катодного восстановления кислорода на биокатоде на основе лакказы, иммобилизованной на углеграфитовом электроде в виде композитной смеси, в фосфатном (рН 7.1) (а) и фосфатно-цитратном (рН 4.0) (б) буферных растворах, снятые при скорости развертки потенциала $v = 1$ мВ/с на 1-м–5-м циклах

Fig. 4. Polarization curves of the cathodic reduction of oxygen on a biocathode based on *laccase*, the latter being immobilized on a carbon-graphite electrode in the form of a composite mixture, in phosphate (pH 7.1) (a) and phosphate-citrate (pH 4.0) (b) buffer solutions, taken at the potential scan rate $v = 1$ mV/s on 1st–5th cycles

графитовом электроде в виде композитной смеси (лакказы : НСУ : Ф2М в соотношении 1 : 2 : 1), в фосфатном (рН 7.1) и фосфатно-цитратном (рН 4.0) буферных растворах, снятые при скорости развертки потенциала $v = 1$ мВ/с.

Анализ полученных поляризационных кривых показал, что более высокие электрохимические свойства кислородный биокатод на основе лакказы проявляет в кислой среде, в цитратно-фосфатном буферном растворе при рН 4.0. В табл. 1 приведено сравнение показателей плотности тока кислородно-

го биокатода в двух буферных средах при потенциале -0.400 В.

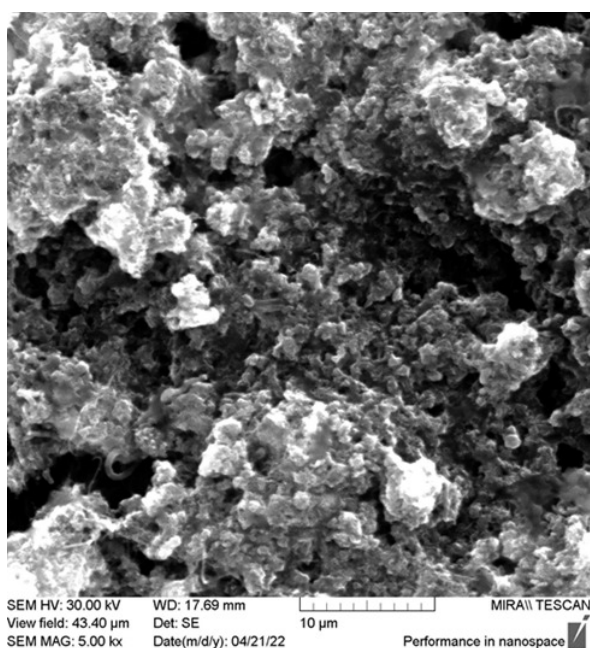
Из полученных данных также следует, что наибольшую активность ферментный биокатод при восстановлении кислорода проявляет на 1-м цикле. На последующих циклах скорость восстановления кислорода снижается, что связано с вымыванием лакказы электролитом. Последнее подтверждено результатами сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) (рис. 5).

Сравнение микрофотографий СЭВ, представленных на рис. 5, б и рис. 5, в, пока-

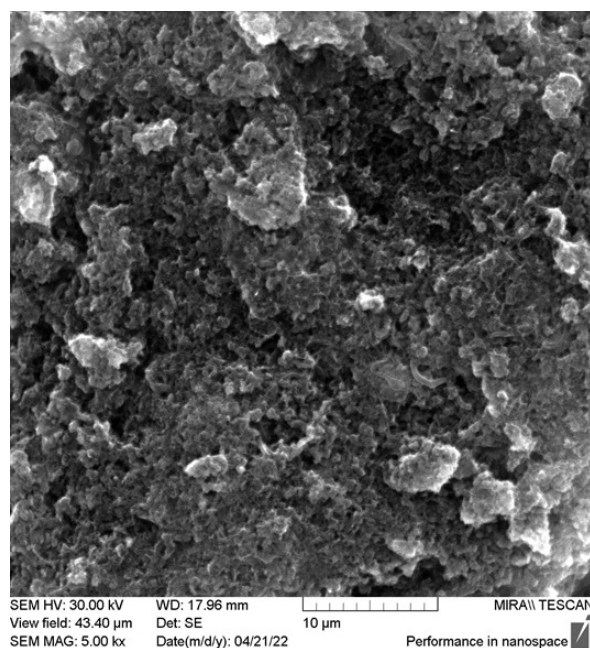
Таблица 1 / Table 1

Значения плотности тока ($-i_k$), мА/см², кислородного биокаатода при потенциале –400 мВ
The values of current density ($-i_k$), mA/cm² of the oxygen biocathode at the potential of –400 mV

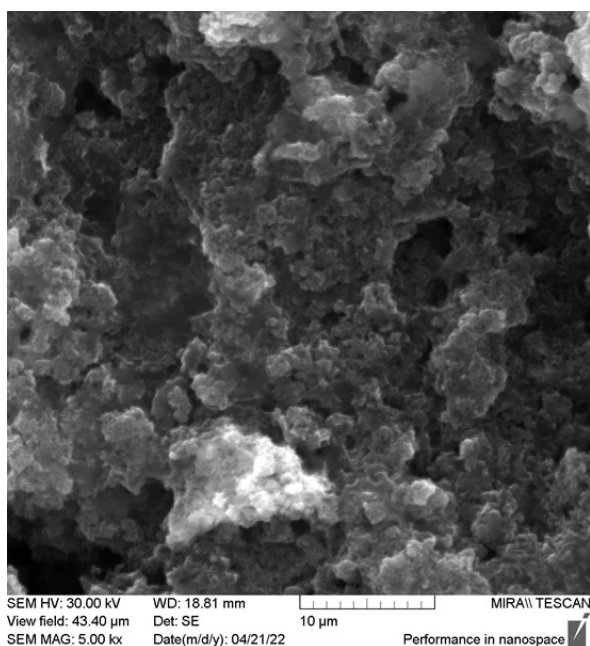
Цикл	Буферный раствор	
	Фосфатный (pH 7.1)	Фосфатно-цитратный (pH 4.0)
	Плотность катодного тока ($-i_k$), мА/см ²	
Фон	0.4	0.5
1	1.0	1.4
3–5	0.35	0.85



a/a



b/b



c/c

Рис. 5. Микрофотографии поверхности рабочих углеродистых электродов, полученные методом сканирующей электронной микроскопии (СЭВ): а – без нанесения композита, содержащего лакказы; б – с нанесенным композитом до проведения эксперимента; в – с нанесенным композитом после проведения эксперимента

Fig. 5. Microphotographs of the surface of working carbon-graphite electrodes obtained by scanning electron microscopy (SEM): a – without applying the *laccase* containing composite; b – with the applied composite before the experiment; c – with the applied composite after the experiment

зывает, что проведение электрохимического эксперимента привело к существенному разрыхлению поверхностного слоя электрода, обусловленного вымыванием растворимых форм композита, в том числе и лакказы.

2.2. Иммунизация лакказы на графитовый электрод при помощи золь-гель матриц

Формирование золь-гель матриц проводили в условиях основного катализа фторидом натрия при использовании силановых прекурсоров TEOS и DEDMS. В качестве порообразователя использовали полиэтиленгликоль, который позволяет избежать чрезмерного уменьшения пор при старении геля; порообразователь создает бимодальную структуру матрицы с микро- и нанопорами. В работе были протестированы матрицы со следующим процентным содержанием тетраэтоксисилана (TEOS) и диэтоксидиметилсилана (DEDMS):

- 1) 0 % DEDMS + 100% TEOS,
- 2) 15% DEDMS + 85% TEOS,

- 3) 50% DEDMS + 50% TEOS,
- 4) 85% DEDMS + 15% TEOS,
- 5) 100 % DEDMS + 0% TEOS.

Изучение циклических вольтамперограмм показало, что наилучший отклик показала система с матрицей 50% DEDMS + 50% TEOS (рис. 6), которую мы использовали в дальнейших исследованиях. Инкапсулирование биоматериала в кремнийорганические золь-гель матрицы обеспечивают сохранение биологической активности, эффективную защиту от механического, теплового и биологического воздействия. К достоинствам данного метода можно отнести простоту и экспрессность получения нетоксичной матрицы на основе модифицированных силикагелей для иммобилизации микроорганизмов.

Данные, приведенные на рис. 6, показывают, что кислородный ферментный катод, состоящий из лакказы и золь-гель матрицы, работает эффективно, что внедрение молекул лакказы достаточно плотное и вымывание фермента поверхностного слоя элек-

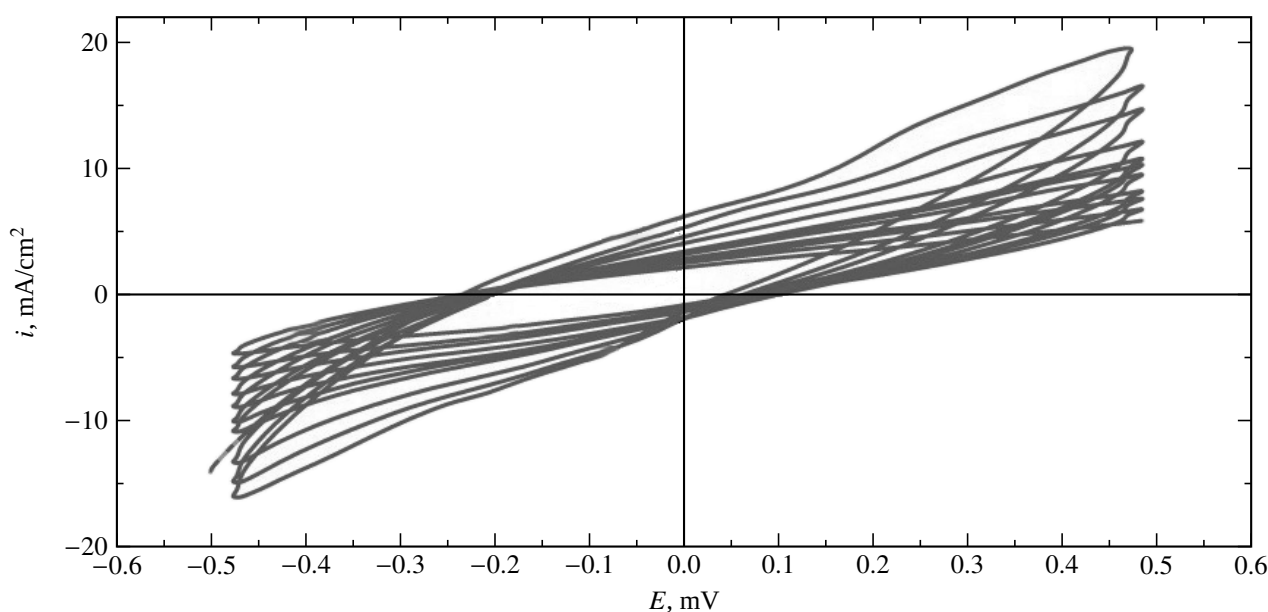


Рис. 6. Циклические вольтамперные кривые процесса катодного восстановления кислорода на углеграфитовом электроде с лакказой, инкапсулированной в золь-гель матрицу, при скорости развертки потенциала $v = 5$ мВ/с в фосфатно-цитратно буферном растворе

Fig. 6. Cyclic current-voltage characteristics of the process of cathodic reduction of oxygen on the carbon-graphite electrode with *laccase* encapsulated in the sol-gel matrix, at the potential sweep rate $v = 5$ мВ/с in a phosphate-citrate buffer solution

трода незначительное, поскольку численные значения на каждом цикле не сильно меняются.

На рис. 7 представлены поляризационные кривые процесса катодного восстановления кислорода на углеграфитовом биокатоде на основе лакказы с золь-гель матрицей при скорости развертки $v = 5$ мВ/с в фосфатно-цитратном буфере (рН 4.0) на 1-м–5-м циклах.

По отношению к чистому углеграфиту электрод на основе лакказы с золь-гель матрицей показывает скорость катодного восстановления кислорода выше в 3.3 раза.

При сравнении двух методов иммобилизации фермента на поверхность углеграфитового электрода можно сделать вывод, что композитная смесь, состоящая из лакказы и золь-гель матрицы, показывает более высокую скорость восстановления кислорода, равную 10.4 мА/см^2 , что превышает значение скорости катодной реакции на биокатоде с композитной смесью лакказа : НСУ : Ф2М в 7.4 раза (табл. 2).

Таблица 2 / Table 2

Значений плотностей катодного тока ($-i_k$), мА/см^2 , кислородного биокатода на основе лакказы при различных способах иммобилизации фермента в фосфатно-цитратном буферном растворе при потенциале -400 мВ

The values of cathodic current densities ($-i_k$), mA/cm^2 , of the oxygen biocathode based on *laccase* for various methods of enzyme immobilization in the phosphate-citrate buffer solution at the potential of -400 mV

Состав композитной смеси электрода	$(-i_k)$, мА/см^2	E , мВ
Лакказа: НСУ: Ф2М, 1-й цикл	1.4	-400
Лакказа: золь-гель матрица, 1-й цикл	10.4	-400
Лакказа: золь-гель матрица, 3-й–5-й циклы	9.7	-400

ВЫВОДЫ

1. Изучены физико-химические свойства фермента *laccasa*, выделенного из мицелия гриба *Pleurotus ostreatus НК-35*. Фермент *laccase Pleurotus ostreatus НК-35* имеет молекулярную массу 64000 г/моль и аморф-

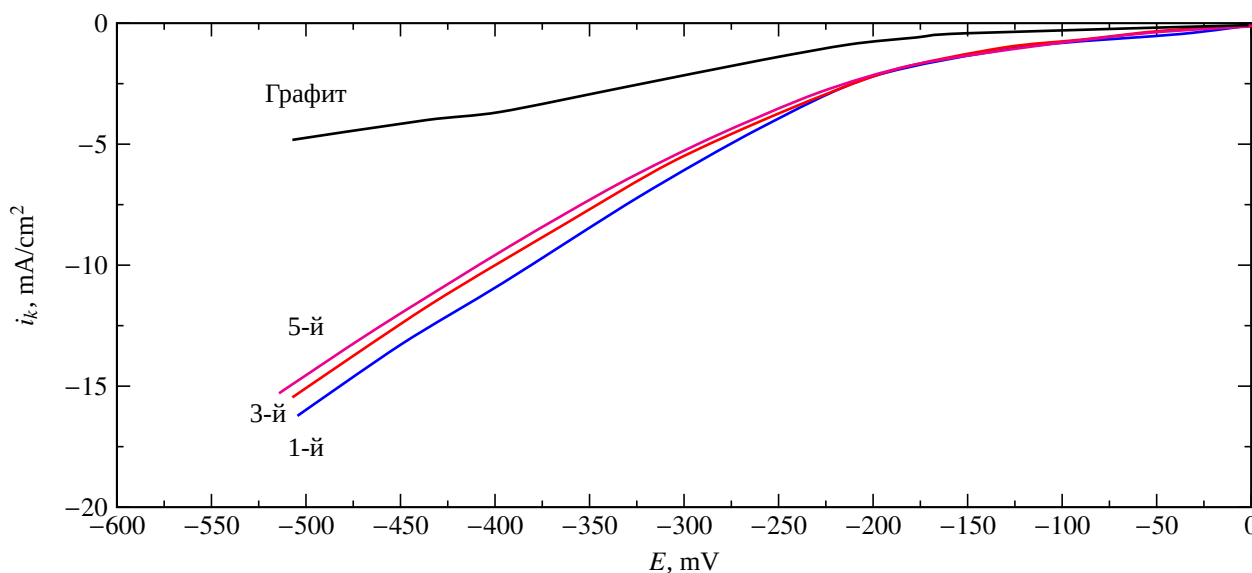


Рис. 7. Поляризационные кривые процесса катодного восстановления кислорода на углеграфитовом биокатоде на основе лакказы с золь-гель матрицей на 1-м–5-м циклах при скорости развертки $v = 5$ мВ/с в фосфатно-цитратном буферном растворе (рН 4.0)

Fig. 7. Polarization curves of the process of cathodic oxygen reduction on the carbon-graphite biocathode based on *laccase* with the sol-gel matrix in 1st–5th cycles at the scan rate $v = 5$ mV/s in the phosphate-citrate buffer solution (pH 4.0)

ную структуру, что подтверждено рентгено-структурным анализом. Активность фермента составила $A = 10.6$ ммоль/мг·мин.

2. С помощью программного сервера ITASSER определены 3D модели фермента лакказы. Активный центр лакказы состоит из четырех ионов меди, которые формируют два основных центра: мооядерный T1 центр и трехядерный T2/T3 кластер.

3. Разработан кислородный углеграфитовый биокатод на основе фермента *laccase Pleurotus ostreatus НК-35* для биотопливного элемента.

4. Протестирована работа биокатода в различных буферных средах – фосфатной (pH 7.1) и фосфатно-цитратной (pH 4.0), и с помощью различных методов иммобилизации лакказы на поверхности углеграфитового электрода – в виде композитной смеси (лакказа : HCU : Ф2М в соотношении 1 : 2 : 1) и с помощью золь-гель матрицы.

5. Показано, что более эффективная работа биокатода на основе лакказы наблюда-

ется в фосфатно-цитратном (pH 4.0) буферном растворе, т. е. в кислой среде.

6. Установлено, что при тестировании биокатода на углеграфитовых электродах, иммобилизация лакказы на которых проводилась с композитной смесью (лакказа : HCU : Ф2М в соотношении 1 : 2 : 1), наилучшие результаты ферментный биокатод показывает на 1-м цикле; на последующих циклах скорость катодного восстановления кислорода резко снижается, что связано с уходом лакказы в раствор. Это подтверждено результатами сканирующей электронной микроскопии.

7. При тестировании биокатода на углеграфитовых пластинах с золь-гель матрицей, в которую вклинивались молекулы фермента, показатели плотности тока относительно композитной смеси лакказа : HCU : Ф2М выросли в 7.4 раза; фермент работал на протяжении десяти циклов и вымывание фермента было незначительное.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Logan E., Rabaey K. Conversion of Wastes into Bioelectricity and Chemicals by Using Microbial Electrochemical Technologies // *Science*. 2012. Vol. 337. P. 686–690. <https://doi.org/10.1126/science.1217412>
2. Largus T. Angenent, Khursheed Karim, Muthanna H. Al-Dahhan, Brian A. Wrenn, Rosa Domiguez-Espinoso. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater // *TRENDS in Biotechnology*. 2004. Vol. 22, № 9. P. 478–485. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.07.001>
3. Казаринов И. А., Мещерякова М. О., Сверчкова Л. В., Олискевич В. В., Севостьянов В. П. Моделирование процесса очистки сточных вод, содержащих органические вещества, с помощью микробных биоэлектрохимических технологий // *Электрохимическая энергетика*. 2018. Т. 18, № 4. С. 199–210. <https://doi.org/10.18500/1608-4039-2018-18-4-199-210>
4. Мещерякова М. О., Дронникова К. С., Казаринов И. А. Разработка эффективного электрокатализатора для катода микробного топливного элемента // *Современные проблемы теоретической и экспериментальной химии : межвуз. сб. науч. тр. XV Всерос. конф. молодых ученых с международ. участием. Саратов : Изд-во «Саратовский источник», 2021. С. 250–252.*
5. Zhang L., Liu C., Zhuang L., Li W., Zhou S., Zhang J. Manganese dioxide as an alternative cathodic catalyst to platinum in microbial fuel cells // *Biosensors and Bioelectronics*. 2009. Vol. 24, № 9. P. 2825–2829. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.02.010>
6. Богдановская В. А., Канустин А. В., Тарасевич М. Р., Кузнецова Л. Н. Структура и свойства полимерных биокompозитных материалов // *Электрохимия*. 2004. Т. 40. С. 352–358. <https://doi.org/10.1023/B:RUEL.0000019670.07470.af>
7. Генералова К. Н., Минькова А. Н., Олонцев В. Ф. Адсорбция клеток бактерий на углеродных сорбентах // *Вестник ПНИПГ. Химическая технология и биотехнология*. 2014. № 2. С. 53–62.
8. Аркадьева И. Н., Фокина Е. А., Василенко В. А., Кольцова Э. М. Математическая модель адсорбции лакказы на углеродном носителе при конструировании катода биотопливного элемента // *Успехи в химии и химической технологии*. 2017. Т. 31, № 8. С. 87–89. <https://doi.org/10.3303/CET1870269>
9. Kamanina O. A., Saverina E. A., Rybochkin P. V., Arlyapov V. A., Vereshchagin A. N., Ananikov V. P. Preparation of hybrid sol-gel materials based on living cells of microorganisms and their application in nanotechnology // *Nanomaterials*. 2022. Vol. 12, № 7. P. 1086–1119. <https://doi.org/10.3390/nano12071086>

REFERENCES

1. Logan E., Rabaey K. Conversion of Wastes into Bioelectricity and Chemicals by Using Microbial Electrochemical Technologies. *Science*, 2012, vol. 337, pp. 686–690. <https://doi.org/10.1126/science.1217412>
2. Largus T., Angenent, Khursheed Karim, Muthanna H. Al-Dahhan, Brian A. Wrenn, Rosa Domiguez-Espinosa. Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *TRENDS in Biotechnology*, 2004, vol. 22, no. 9, pp. 478–485. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.07.001>
3. Kazarinov I. A., Meshcheryakova M. O., Sverchkova L. V., Olishevich V. V., Sevostyanov V. P. Modelling of the Wastewater Treatment Process Using Microbial Bioelectrochemical Technologies. *Electrochemical Energetics*, 2018, vol. 18, no. 4, pp. 199–210 (in Russian). <https://doi.org/10.18500/1608-4039-2018-18-4-199-210>
4. Meshcheryakova M. O., Dronnikova K. S., Kazarinov I. A. Development of an efficient electrocatalyst for a microbial fuel cell cathode. *Sovremennyye problemy theoreticheskoy i eksperimentalnoy khimii: mezhdvuz. sb. nauch. tr. XV Vseros. konf. molodykh uchenykh s mezhdunarod. uchastiem* [Modern Problems of Theoretical and Experimental Chemistry: Interuniversity collection of scientific papers of the XV All-Russian Conference of young scientists with international participation]. Saratov, Izd-vo “Saratovskiy istochnik”, 2021, pp. 250–252 (in Russian).
5. Zhang L., Liu C., Zhuang L., Li W., Zhou S., Zhang J. Manganese dioxide as an alternative cathodic catalyst to platinum in microbial fuel cells. *Biosensors and Bioelectronics*, 2009, vol. 24, no. 9, pp. 2825–2829. <https://doi.org/10.1016/j.bios.2009.02.010>
6. Bogdanovskaya V. A., Kapustin A. V., Tarasovich M. R., Kuznetsova L. N. Structure and Properties of Polymer Biocomposite Materials. *Russian Journal of Electrochemistry*, 2004, vol. 40, no. 3, pp. 311–317. <https://doi.org/10.1023/B:RUEL.0000019670.07470.af>
7. Generalova K. N., Minkova A. A., Olontsev V. F. Adsorption of bacterial cells on carbon sorbents. *Vestnik PSTU. Chemical Technology and Biotechnology*, 2014, no. 2, pp. 53–62 (in Russian).
8. Arkadeva I. N., Fokina E. A., Vasilenko V. A., Koltsova E. M. Mathematical model of the *laccase* adsorption on the carbon support at construction of the enzymatic fuel cell cathode. *Advances in Chemistry and Chemical Technology*, 2017, vol. 31, no. 8, pp. 87–89 (in Russian). <https://doi.org/10.3303/CET1870269>
9. Kamanina O. A., Saverina E. A., Rybochkin P. V., Arlyapov V. A., Vereshchagin A. N., Ananikov V. P. Preparation of hybrid sol-gel materials based on living cells of microorganisms and their application in nanotechnology. *Nanomaterials*, 2022, vol. 12, no. 7, pp. 1086–1119. <https://doi.org/10.3390/nano12071086>

Поступила в редакцию 10.01.2024; одобрена после рецензирования 24.01.2024; принята к публикации 12.03.2024
The article was submitted 10.01.2024; approved after reviewing 24.01.2024; accepted for publication 12.03.2024