

УДК 544.018.2

МИКРОРАЗМЕРНЫЕ ГЛЮКОЗООКИСЛЯЮЩИЕ И КИСЛОРОДВОССТАНАВЛИВАЮЩИЕ БИОЭЛЕКТРОДЫ НА ОСНОВЕ НАНОКОМПЗИТНЫХ МАТЕРИАЛОВ

^{1,2}Панкратов Д.В., ¹Парунова Ю.М., ^{1,2}Горбачева М.А., ¹Зейфман Ю.С.,
³Кузнецов С.В., ¹Липкин А.В., ^{1,2}Шлеев С.В.

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт»,
Москва, e-mail: pankratov.dmitriy@list.ru;

²Институт биохимии им. А.Н. Баха Российской академии наук, Москва;

³Брянский государственный университет им. акад. И.Г. Петровского, Брянск

Разработаны и изготовлены микроразмерные глюкозоокисляющие биоаноды и кислородвосстанавливающие биокатоды на основе нанобиокомпозитных материалов, содержащих графен, поли (3,4-этилендиокситиофена), многостенные углеродные нанотрубки и редокс-ферменты (глюкозооксидазу и билирубиноксидазу как анодный и катодный биоэлементы соответственно). Основные характеристики электродов, полученные в растворах с рН 7,4 (плотность тока в несколько мА/см² и емкость свыше 50 мФ/см²), наряду с возможностью варьировать как емкостные, так и биоэлектрокаталитические параметры электродов в широком диапазоне, подтверждают перспективность использования разработанных электродов для создания потенциально имплантируемых биоэлектронных устройств для одновременной генерации и накопления электрической энергии. Принципиальная возможность замены углеродных нанотрубок в составе нанобиокомпозита на наночастицы золота позволяет добиться создания различных поверхностей для специфической иммобилизации различных редокс-ферментов.

Ключевые слова: глюкозооксидаза, билирубиноксидаза, графен, электропроводящий органический полимер, углеродные нанотрубки, нанобиокомпозит

MICROSIZED GLUCOSE OXIDIZING AND OXYGEN REDUCING BIOELECTRODES BASED ON THE NANOBIOCOMPOSITE MATERIALS

^{1,2}Pankratov D.V., ¹Parunova Y.M., ^{1,2}Gorbacheva M.A., ¹Zeyfman Y.S., ³Kuznetsov S.V.,
¹Lipkin A.V., ^{1,2}Shleev S.V.

¹National Research Centre «Kurchatov Institute», Moscow, e-mail: pankratov.dmitriy@list.ru;

²A.N. Bach Institute of Biochemistry of Russian Academy of Sciences, Moscow;

³I.G. Petrovsky Bryansk State University, Bryansk

Microscale glucose oxidising bioanodes and oxygen reducing biocathodes based on nanobiocomposite materials containing graphene, poly (3,4-ethylenedioxythiophene), multi-walled carbon nanotubes, and redox enzymes (glucose oxidase and bilirubin oxidase as anodic and cathodic bioelements, respectively) were elaborated and fabricated. Basic characteristics of electrodes obtained in solutions with pH 7,4 (few mA/cm² current densities and capacitance higher than 50 mF/cm²) along with a possibility to vary both capacitive and bioelectrocatalytic parameters of the electrodes in a broad range point to the fact that fabricated bioelectrodes are promising for potentially implantable bioelectronic devices for concomitant generation and storage of electric power. A general possibility to exchange carbon nanotubes with gold nanoparticles in nanocomposite allows creation of different surfaces for proper immobilization of different redox enzymes.

Keywords: glucose oxidase, bilirubin oxidase, graphene, conducting organic polymer, carbon nanotubes, nanobiocomposite

Разработка и исследование свойств электродов на основе новых нанобиокомпозитных материалов для современных биоэлектронных устройств (биотопливных элементов, биосенсоров, самозаряжающихся биосуперконденсаторов, и т.д.) является одним из основных направлений современной биоэлектрохимии. Использование редокс-ферментов как биокатализаторов, иммобилизованных на матрицах из углеродных нанотрубок и наночастиц золота, возможность использования которых в составе потенциально имплантируемых биоэлектродов была показана ранее [1, 2, 4], позволяет добиться высокой эффективности при функционировании в растворах, близких по составу к физиологическим жидкостям че-

ловека, по сравнению с катализаторами небиологической природы.

Целью данной работы стало создание и изучение особенностей функционирования в нейтральных растворах глюкозоокисляющих и кислородвосстанавливающих биоэлектродов на основе новых нанобиокомпозитных материалов, содержащих графен, поли (3,4-этилендиокситиофен) и редокс-ферменты, иммобилизованные на поверхности наноматериалов различной природы.

Материалы и методы исследования

Na₂HPO₄·2H₂O, NaH₂PO₄·H₂O, NaCl, HAuCl₄·3H₂O, H₂SO₄, LiClO₄, цитрат натрия, ацетонитрил (≥ 99,9%, ACN), анилин (≥ 99,8%, ANI), толуол (≥ 99,8%), желатин (GE), D-глюкоза, 3,4-этилендиокситиофен

(EDOT), полиэтиленгликоль (PEG), 25%-ный раствор глутарового альдегида (GA), тетрагидрофуран (THF) а также грибная глюкозооксидаза (GOx) из *Aspergillus niger* были получены из Sigma–Aldrich GmbH (США) и использовались без дополнительной очистки. Препарат билирубинооксидазы из гриба *Myrothecium verrucaria* (MvBOx) был любезно предоставлен компанией Amano Enzyme Inc. (Япония). Этанол (95%) и аргон были куплены в Kemetul AB (Швеция) и AGA Gas AB (Швеция) соответственно.

Все растворы готовились на деионизированной воде (18 МОм·см), полученной с использованием системы PURELAB UNQ II из ELGA Labwater (Великобритания).

Для синтеза нанобиокомпозитов использовались наночастицы золота (AuNP) диаметром 20 нм, графен (GR, толщина – 1,6 нм, менее 3 углеродных монослоев) и два типа многостенных углеродных нанотрубок (CNT, внешний диаметр – 20–30 нм, внутренний диаметр – 1–2 нм, длина – 0,5–2 мкм). GR был куплен в компании Graphene Supermarket (США), CNT – в Sigma-Aldrich GmbH (США). AuNP были синтезированы с использованием цитрата натрия в качестве восстановителя по методике, описанной в работе [5]. 50 мл раствора HAuCl_4 с концентрацией 250 мкМ нагревали до кипения при постоянном перемешивании, затем добавляли 750 мкл водного раствора с массовой долей цитрата натрия 1%, после чего раствор выдерживался в течение 10 мин без нагревания при постоянном перемешивании. Полученная суспензия AuNP охлаждалась до комнатной температуры и центрифугировалась при $10\,000\times g$ в течение 30 мин [10]. 98% супернатанта удалялось, концентрат AuNP объединялся и ресуспендировался ультразвуковой обработкой.

Электрохимические измерения осуществлялись при помощи потенциостата/гальваностата $\mu\text{Autolab}$ Type III/FRA2 от Metrohm Autolab B.V. (Нидерланды) с использованием трехэлектродной схемы с насыщенным каломельным электродом сравнения (SCE, 242 мВ относительно нормального водородного электрода) и платиновой проволокой в качестве вспомогательного электрода. Все значения потенциалов, представленные в работе, даны относительно SCE, если об этом не упомянуто специально.

Ультразвуковая обработка проводилась с использованием ванны Ultrasonic Cleaner XB2 от VWR International Ltd. (Великобритания). Сканирующая электронная микроскопия (SEM) осуществлялась на микроскопе высокого разрешения FEI Nova NanoLab 600 (Нидерланды).

Изготовление электродов на основе нанокompозита PEDOT/графен

Золотая проволока диаметром 0,1 мм (Au) от компании Goodfellow (Великобритания) механически очищались полировкой на бумаге Microcloth (Buehler, Великобритания) в суспензии оксида алюминия с размером частиц 1 мкм, купленной в Struers (Дания). Далее поверхность промывалась деионизированной водой, подвергалась ультразвуковой обработке в этаноле в течение 5 минут, а затем электрохимически очищалась циклированием в 0,5 М H_2SO_4 в диапазоне потенциалов от – 0,2 до + 1,7 В в течение 20 циклов со скоростью развертки потенциала 100 мВ/с, затем электроды промывались водой и высушивались в потоке воздуха.

Далее на Au поверхности проводился электрохимический синтез нанокompозита поли(3,4-этилендиокситиофен)/графен (PEDOT/GR) потенциодинамическим циклированием в диапазоне от 200 мВ до 1300 мВ (3 цикла при скорости развертки потенциала 100 мВ/с) в 0,1 М фосфатном буферном растворе (PB, pH 7,4), содержащем 20 мМ EDOT, 1 мМ PEG, 0,1 М LiClO_4 и GR (2 мг графена на 5 мл раствора) [11]. Перед электрополимеризацией реакционная смесь подвергалась ультразвуковой обработке в течение 1 часа для получения устойчивой суспензии, после чего в течение 20 минут продувалась аргоном для удаления кислорода.

Изготовление биоанодов на основе GOx

Для обеспечения электронного переноса между электродом и иммобилизованной GOx на поверхности PEDOT/GR синтезировался комплекс с переносом заряда (CTC) TCNQ/TTF. Для этого электрод Au|PEDOT/GR погружался в раствор TCNQ в THF (1,2 мг/мл) и выдерживался до полного испарения растворителя. Затем электрод переносился в раствор TTF в ACN (1,2 мг/мл). После испарения растворителя электрод промывался в небольшом количестве ACN для удаления остатков непрореагировавшего TTF.

Биомодификация электродов осуществлялась нанесением 2 мл суспензии CNT, модифицированных GOx. Для получения суспензии CNT смешивались с PB (4 мг/мл), полученная смесь подвергалась ультразвуковой обработке в течение 20 минут, после чего к ней добавлялась GOx (1 мг/мл). После нанесения суспензии электрод высушивался при комнатной температуре, после чего покрывался GE (2 мкл 2,5%-ного раствора GE в воде), высушивался, погружался в 5%-ый водный раствор GA на 60 секунд и затем промывался водой.

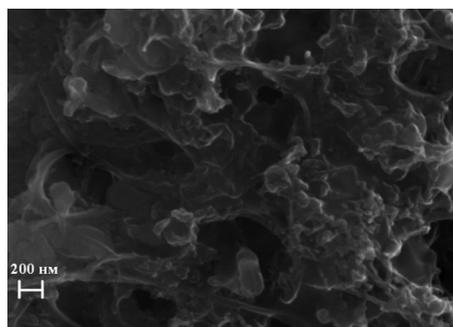
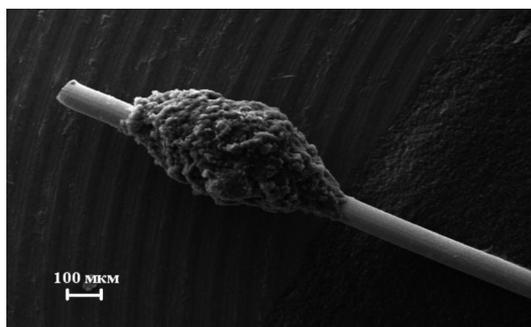


Рис. 1. SEM изображение биоанода Au|PEDOT/GR|TCNQ/TTF|CNT/GOx|GE. Слева: общий вид электрода, справа: поверхность электрода

SEM изображение биоанода Au|PEDOT/GR|TCNQ/TTF|CNT/GOx|GE представлено на рис. 1. Как видно из рисунка, поверхность электрода имеет зернистую структуру, длина активной области электрода составляет около 700 микрон, однако основная масса композита сосредоточена на участке в 300–400 микрон, что связано с особенностями распределения наноматериала в капле суспензии. Поверхность нанобиокомпозита равномерно покрыта слоем GE, обеспечивающим стабильность многокомпонентной структуры без ограничения транспорта субстрата через GE [3].

Изготовление биокатодов на основе ВОх

Биомодификация катодов осуществлялась нанесением либо 2 мл суспензии CNT, модифицированных ВОх (методика получения суспензии и модификации GE и GA аналогична таковой для GOx), либо 3 мкл суспензии AuNP с последующим высушиванием и погружением в раствор ВОх (1 мг/мл) на 15 минут.

Результаты исследования и их обсуждение

Исследование биокаталитических свойств разработанных электродов прово-

дилось в 0,1 М РВ в интервале потенциалов от – 0,1 до 0,2 В при скорости развертки потенциала 10 мВ/с и от 0,7 до 0 В при скорости развертки потенциала 20 мВ/с для биоанодов и биокатодов, соответственно. Циклические вольтамперограммы (CV) биоанодов в РВ, содержащем различные концентрации глюкозы, представлены на рис. 2.

Как видно из данных рис. 2, выраженный биоэлектрокаталитический отклик с начальным потенциалом электроокисления глюкозы около – 50 мВ, был зафиксирован для разработанных биоэлектродов в РВ, содержащем глюкозу, что находится в согласовании с литературными данными для системы СТС/GOx [6]. Плотность анодного биокаталитического тока возрастала с повышением концентрации глюкозы до 50 мМ и составляла 0,7 мА/см² и 4,1 мА/см² при потенциале 200 мВ в РВ, содержащем 5 и 50 мМ глюкозы соответственно.

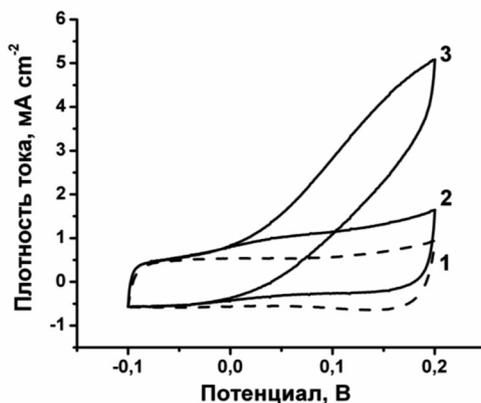


Рис. 2. CV биоанодов Au|PEDOT/GR|TCNQ/TTF|CNT/GOx|GE в РВ (пунктирная кривая 1) и в РВ, содержащем глюкозу различной концентрации (кривые 2, 3), моль л⁻¹: 5 (2) и 50 (3). Скорость развертки потенциала – 10 мВ/с

CV биокатодов Au|PEDOT/GR|CNT/ВОх|GE в насыщенном воздухе и аргоне РВ представлены на рис. 3, А. Электровосстановление кислорода начиналось при потенциале около 500 мВ, что находится в хорошем согласовании с полученными ранее результатами для ВОх, иммобилизованной на AuNP [8] и бумаге из CNT [9]. Плотность биоэлектрокаталитического тока составляла 0,3 мА/см² при 200 мВ в насыщенном воздухе РВ.

Емкость полученных электродов составляла порядка 55 мФ/см² для нанобиокомпозитов на основе CNT. При замене CNT на AuNP в составе нанокомпозита емкость возрастала до 120 мФ/см², и биоэлектрокаталитический ток практически полностью нивелировался емкостным током. Однако иммобилизация ВОх на

модифицированной AuNP поверхности электродов, не содержащих нанокомпозита PEDOT/GR, приводит к созданию электродов с ярко выраженным биоэлектрокаталитическим откликом (рис. 3, Б). Возможность замены наноматериала в составе нанобиокомпозита позволяет добиться создания оптимальных поверхностей для специфической иммобилизации различных редокс ферментов.

Следует отметить легкость вариации емкости разработанных электродов как на этапе синтеза PEDOT/GR, так и на этапе создания нанобиокомпозита. Указанное свойство является важным для разработки электродов с двойной функцией генерации и накопления электрической мощности для создания гибридных биоэлектронных устройств [7].

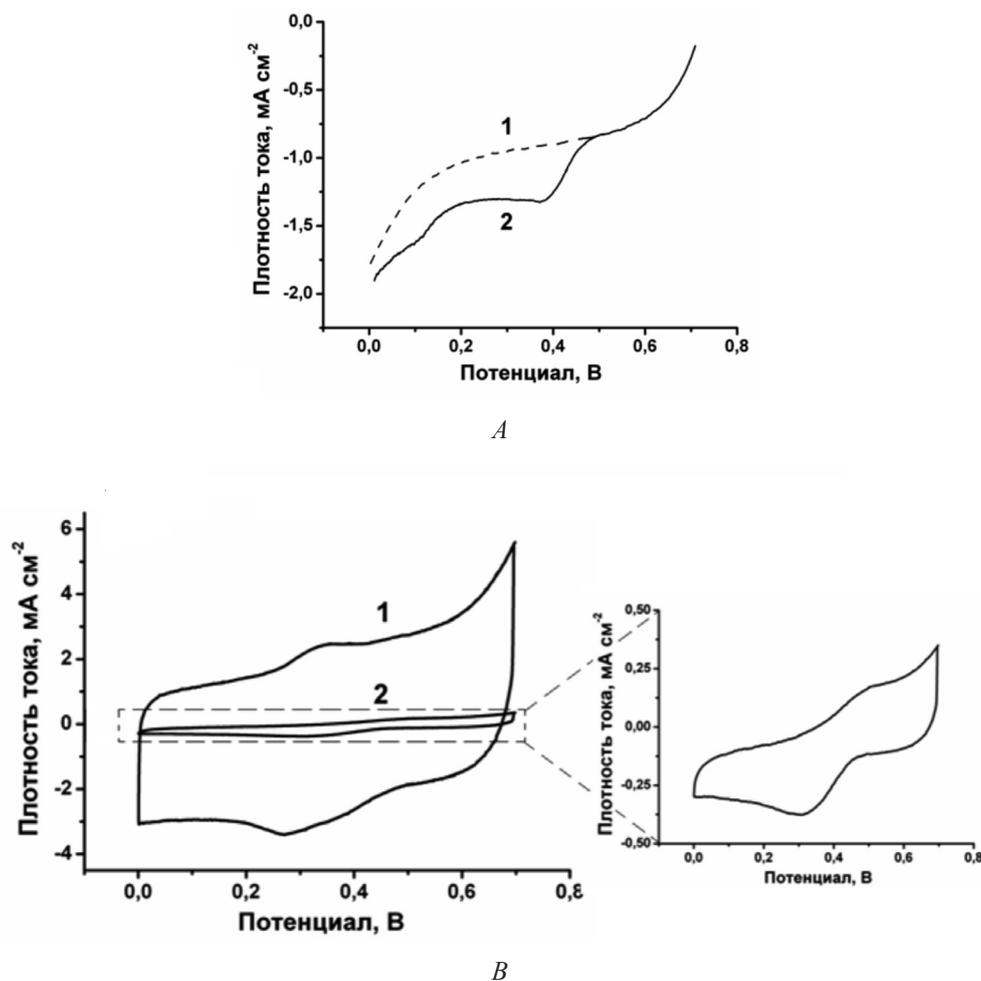


Рис. 3. А) Катодные части CV биокатодов $Au|PEDOT/GR|CNT/BOx|GE$ в РВ, насыщенном воздухе (пунктирная кривая 1) и аргоном (кривая 2).
 Б) CV биокатодов $Au|PEDOT/GR|AuNP/BOx|GE$ (кривая 1) и $Au|AuNP/BOx|GE$ (кривая 2) в РВ, насыщенном воздухе. Скорость развертки потенциала – 20 мВ/с

Выводы

В результате проведенных исследований были созданы микроразмерные глюкозоокисляющие и кислородвосстанавливающие биоэлектроды на основе новых нанокompозитных материалов с возможностью регуляции емкостных и биоэлектрокаталитических параметров. Полученные микроэлектроды могут быть использованы для создания современных биоэлектронных устройств, функционирующих в условиях, близких к физиологическим.

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-14-00530).

Список литературы

1. Andoralov V. Biofuel cell based on microscale nanostructured electrodes with inductive coupling to rat brain neurons / V. Andoralov, M. Falk, D.B. Suyatin, M. Granmo, J. Sotres, R. Ludwig, V.O. Popov, J. Schouenborg, Z. Blum, S. Shleev // Scientific reports. – 2013. – Vol. 3, № 3270. – P. 1–11.
2. Bellucci S. Multiwalled carbon nanotube buckypaper: toxicology and biological effects in vitro and in vivo / S. Bellucci, M. Chiaretti, A. Cucina, G.A. Carru, A.I. Chiaretti // Nanomedicine–UK. – 2009. – Vol. 4, № 5. – P. 531–540.
3. Gayot A. Studies of diffusion across microcapsules / A. Gayot, C. Merle, M. Traisnel, J.C. Guyot // Labo-Pharma – Problemes et Techniques. – 1978. – Vol. 26, № 281. – P. 925–927.
4. Hussein L. Functionalized-carbon nanotube supported electrocatalysts and buckypaper-based biocathodes for glucose fuel cell applications / L. Hussein, Y.J. Feng, N. Aonso-Vante, G. Urban, M. Kruger // Electrochimica Acta. – 2011. – Vol. 56, № 22. – P. 7659–7665.
5. Haiss W. (2007) Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra / W. Haiss, N.T.K. Thanh, J. Aveyard, D.G. Fernig // Analytical Chemistry. – 2007. – Vol. 79, № 11. – P. 4215–4221.
6. Khan G.F. Design of a stable charge transfer complex electrode for a third-generation amperometric glucose sensor / G.F. Khan, M. Ohwa, W. Wernet // Analytical Chemistry. – 1996. – Vol. 68, № 17. – P. 2939–2945.
7. Pankratov D. Self-charging electrochemical biocapacitor / D. Pankratov, Z. Blum, D.B. Suyatin, V.O. Popov, S. Shleev // ChemElectroChem. – 2014. – Vol. 1, № 2. – P. 343–346.
8. Pankratov D.V. Impact of surface modification with gold nanoparticles on the bioelectrocatalytic parameters of

immobilized bilirubin oxidase / D.V. Pankratov, Y.S. Zeifman, A.V. Dudareva, G.K. Pankratova, M.E. Khlupova, Y.M. Parunova, D.N. Zajtsev, N.F. Bashirova, V.O. Popov, S.V. Shleev // *Acta Naturae*. – 2014. – Vol. 6, № 1. – P. 102–106.

9. Pankratov D.V. A comparative study of biocathodes based on multiwall carbon nanotube buckypapers modified with three different multicopper oxidases / D.V. Pankratov, Y.S. Zeifman, O.V. Morozova, G.P. Shumakovich, I.S. Vasil'eva, S. Shleev, V.O. Popov, A.I. Yaropolov // *Electroanalysis*. – 2013. – Vol. 25, № 5. – P. 1143–1149.

10. Wang X.J. Mediatorless sugar/oxygen enzymatic fuel cells based on gold nanoparticle-modified electrodes / X.J. Wang, M. Falk, R. Ortiz, H. Matsumura, J. Bobacka, R. Ludwig, M. Bergelin, L. Gorton, S. Shleev // *Biosensors and Bioelectronics*. – 2012. – Vol. 31, № 1. – P. 219–225.

11. Xiao X.X. One-step fabrication of bio-functionalized nanoporous gold/poly(3,4-ethylenedioxythiophene) hybrid electrodes for amperometric glucose sensing / X.X. Xiao, M.E. Wang, H. Li, P.C. Si // *Talanta*. – 2013. – Vol. 116. – P. 1054–1059.

References

1. Andoralov V. Biofuel cell based on microscale nanostructured electrodes with inductive coupling to rat brain neurons / V. Andoralov, M. Falk, D.B. Suyatin, M. Granmo, J. Sotres, R. Ludwig, V.O. Popov, J. Schouenborg, Z. Blum, S. Shleev // *Scientific reports*. 2013. Vol. 3, no 3270. pp. 1–11.

2. Bellucci S. Multiwalled carbon nanotube buckypaper: toxicology and biological effects in vitro and in vivo / S. Bellucci, M. Chiaretti, A. Cucina, G.A. Carru, A.I. Chiaretti // *Nanomedicine-UK*. 2009. Vol. 4, no 5. pp. 531–540.

3. Gayot A. Studies of diffusion across microcapsules / A. Gayot, C. Merle, M. Traisnel, J.C. Guyot // *Labo-Pharma – Problemes et Techniques*. 1978. Vol. 26, no 281. pp. 925–927.

4. Hussein L. Functionalized-carbon nanotube supported electrocatalysts and buckypaper-based biocathodes for glucose fuel cell applications / L. Hussein, Y.J. Feng, N. Ansoo-Vante, G. Urban, M. Kruger // *Electrochimica Acta*. 2011. Vol. 56, no 22. pp. 7659–7665.

5. Haiss W. (2007) Determination of size and concentration of gold nanoparticles from UV-Vis spectra / W. Haiss, N.T.K. Thanh, J. Aveyard, D.G. Fernig // *Analytical Chemistry*. 2007. Vol. 79, no 11. pp. 4215–4221.

6. Khan G.F. Design of a stable charge transfer complex electrode for a third-generation amperometric glucose sensor / G.F. Khan, M. Ohwa, W. Wernet // *Analytical Chemistry*. 1996. Vol. 68, no 17. pp. 2939–2945.

7. Pankratov D. Self-charging electrochemical biocapacitor / D. Pankratov, Z. Blum, D.B. Suyatin, V.O. Popov, S. Shleev // *ChemElectroChem*. 2014. Vol. 1, no 2. pp. 343–346.

8. Pankratov D.V. Impact of surface modification with gold nanoparticles on the bioelectrocatalytic parameters of immobilized bilirubin oxidase / D.V. Pankratov, Y.S. Zeifman, A.V. Dudareva, G.K. Pankratova, M.E. Khlupova, Y.M. Parunova, D.N. Zajtsev, N.F. Bashirova, V.O. Popov, S.V. Shleev // *Acta Naturae*. 2014. Vol. 6, no 1. pp. 102–106.

9. Pankratov D.V. A comparative study of biocathodes based on multiwall carbon nanotube buckypapers modified with three different multicopper oxidases / D.V. Pankratov, Y.S. Zeifman, O.V. Morozova, G.P. Shumakovich, I.S. Vasil'eva, S. Shleev, V.O. Popov, A.I. Yaropolov // *Electroanalysis*. 2013. Vol. 25, no 5. pp. 1143–1149.

10. Wang X.J. Mediatorless sugar/oxygen enzymatic fuel cells based on gold nanoparticle-modified electrodes / X.J. Wang, M. Falk, R. Ortiz, H. Matsumura, J. Bobacka, R. Ludwig, M. Bergelin, L. Gorton, S. Shleev // *Biosensors and Bioelectronics*. 2012. Vol. 31, no 1. pp. 219–225.

11. Xiao X.X. One-step fabrication of bio-functionalized nanoporous gold/poly(3,4-ethylenedioxythiophene) hybrid electrodes for amperometric glucose sensing / X.X. Xiao, M.E. Wang, H. Li, P.C. Si // *Talanta*. 2013. Vol. 116. pp. 1054–1059.

Рецензенты:

Авдеев Я.Г., д.х.н., ведущий научный сотрудник Лаборатории физико-химических основ ингибирования коррозии металлов Института физической химии и электрохимии им. А.Н. Фрумкина РАН (ИФХЭ РАН), г. Москва;

Нам И.Я., д.б.н., профессор кафедры биологии естественно-географического факультета Брянского государственного университета им. академика И.Г. Петровского, г. Брянск.

Работа поступила в редакцию 05.12.2014.