

УДК 577.151.36

П.П. Гладышев¹, Д.П. Гладышев², А.В. Рыбакова³

¹ *Международный университет природы, общества и человека «Дубна»;
ул. Университетская, д. 19, г. Дубна Московской области; glad@uni-dubna.ru*

² *ООО «Инновационный альянс»; ул. Жуковского, д. 5, г. Дубна
Московской области; furman@dubna.ru*

³ *ФГУП «Научно-исследовательский институт прикладной акустики»;
ул. 9 Мая, д. 7А, г. Дубна Московской области; nasty.rybakova@niipa.ru*

МОЛЕКУЛЯРНАЯ САМОСБОРКА БИОКАТАЛИТИЧЕСКИХ НАНОКОНСТРУКЦИЙ С ЭЛЕКТРОХИМИЧЕСКОЙ И ФОТОХИМИЧЕСКОЙ РЕГЕНЕРАЦИЕЙ НИКОТИНАМИДНЫХ КОФЕРМЕНТОВ

Получена 1 февраля 2010 года

Опубликована 9 июля 2010 года

03.01.06 – биотехнология

В работе рассмотрены вопросы наноконструирования иммобилизованных фермент-коферментных систем с электрохимической регенерацией коферментов. Такие наноконструкции были определены как реконструированные ферментные системы, в частности, реконструированные оксидоредуктазные системы. Основными техническими требованиями к рассматриваемым наноконструкциям являются объединение в пределах единой наноконструкции всех структурных блоков, обеспечивающих протекание и сопряжение целевого биокаталитического процесса и процесса электрохимической регенерации кофактора. Также рассмотрены различные механизмы переноса заряда из активного центра оксидоредуктаз на электродный материал и выбраны оптимальные конструкции иммобилизованных фермент-кофакторных систем.

Ключевые слова: иммобилизованные фермент-коферментные системы, оксидоредуктазы, НАД, НАДФ, электрохимическая и фотохимическая регенерация коферментов.

ВВЕДЕНИЕ

Наиболее экономически важным направлением создания наноконструкций является молекулярная самосборка. Она соответствует принципу построения нанообъектов «снизу вверх» и позволяет реализовать наноконструкции с высокоинтеллектуальными функциями. На фоне современного нанотехнологического бума может показаться, что молекулярная самосборка является новым подходом решения

технологических задач. Между тем на этом принципе функционирует живая природа и вся синтетическая, полимерная, супрамолекулярная химия и различные направления химических технологий, которые издавна базируются на этом фундаментальном принципе. За термином «нанотехнология» формально стоит только определенный размер создаваемых объектов, который находится между размерами отдельных атомов, макромолекул, кластеров и других систем с размером до 100 нм. Такие системы характеризуются высоким соотношением площади поверхности к их объему, а также проявлениями квантовых свойств, присущих отдельным атомам и молекулам. Наука обрела основные фундаментальные знания о таких системах еще до появления модного сегодня термина «нанотехнология», который означает, что наши знания о наноразмерных системах стали более широко востребованы в современных технологиях и производстве.

В [1,2] нами были рассмотрены вопросы наноконструирования иммобилизованных фермент-коферментных систем с электрохимической регенерацией коферментов. В данном обзоре проблема наноконструирования биокаталитических систем с электрохимической и фотоэлектрохимической регенерацией никотинамидных коферментов рассматривается более подробно.

Рассмотрим проблему молекулярной самосборки и самоорганизации на примере создания наноконструкций с использованием биомолекулярных компонентов, которые могут использоваться в промышленных технологиях и сенсорной технике. В семидесятые годы прошлого века в мире, в том числе и в Советском Союзе, широким фронтом велись работы по иммобилизации ферментов. Основной целью этих работ было использование преимуществ биологического катализа в реальных технологиях. Эффективность и

преимущества ферментативного катализа хорошо известны. Разработка методов иммобилизации ферментов, перевод гомогенного катализа в русло гетерогенного катализа явились важным вкладом в практическое применение биокатализаторов. Изначально при иммобилизации в качестве основных ставились задачи увеличения сроков действия ферментов и повышения их устойчивости в условиях реализации технологических процессов (температура, рН, ионная сила растворов, концентрация органических растворителей и других компонентов). При этом длительное время не ставилась цель существенного вмешательства в саму природную ферментативную систему. В случае односубстратных, в частности гидролитических ферментов, такой подход не встретил принципиальных трудностей и быстро нашел применение в промышленности.

Проблема иммобилизации простых биокаталитических систем, направленная на переход от гомогенного катализа в гетерогенный и повышение устойчивости ферментов, в целом решена и во многом себя исчерпала. Разработано большое число приемов закрепления биоматериалов на поверхности и в объеме носителей. И на этом пути использования хорошо известных решений сложно ожидать качественно новых результатов. Для этого необходимо перейти к созданию таких объектов, обеспечивающих в пределах единой наноконструкции сопряжение биологических, химических и физических процессов, таких как электрохимические и оптические процессы и т.д. Однако имеющийся опыт в этом отношении на первый взгляд может разочаровать – не так уж много достигнуто в этом направлении. Причина этого, по мнению некоторых авторов, кроется, прежде всего, в игнорировании важности пространственно-ориентационных эффектов при построении описанных систем. Самосборка наноконструкций на базе биомолекул без учета их взаимной ориентации не может привести к

эффективным решениям. Необходимо идти дальше, обеспечивая такую самоорганизацию наносистем, в которой исходные блоки занимали бы оптимальное положение с учетом их взаимной ориентации. Именно в этом случае можно говорить о молекулярных нанотехнологиях с реализацией принципиально новых функций получаемых объектов. Рассмотрим эту проблему на примере достаточно простой конструкции, включающей кофактор-зависимые ферментные системы и обеспечивающей эффективное сопряжение биокаталитических и электрохимических процессов в пределах одной наносистемы.

Иммобилизация таких двухсубстратных ферментов, в том числе класса оксидоредуктаз, представляет существенно более сложную задачу по сравнению с иммобилизацией односубстратных ферментов, так как при этом возникает необходимость связывания как самого фермента, так и его кофактора. Принципиальную трудность представляет также решение проблемы циклической регенерации дорогостоящих коферментов, участвующих в реакции в эквивалентных с субстратом количествах. Такая регенерация может осуществляться ферментативными, химическими, электрохимическими и фотоэлектрохимическими методами. При этом несомненное преимущество в технико-экономическом плане имеет электрохимическая и фотоэлектрохимическая регенерация кофермента. До восьмидесятых годов прошлого века в описанных работах имело место пространственное разобщение ферментных систем и электрохимической регенерации коферментов. Нами [1] была поставлена задача осуществления обоих процессов непосредственно на единой электропроводной матрице, выступающей одновременно матрицей иммобилизации фермента и кофермента и набором нанoeлектродов, на которых осуществляется электрохимическая регенерация кофермента. Решение этой задачи требует

создание наносистемы, включающей фермент и кофермент с благоприятной для ферментативного и электрохимического процессов пространственной структурой, на поверхности подходящего электропроводного материала. Такие наноконструкции были определены нами как реконструированные ферментные системы, в частности, реконструированные оксидоредуктазные системы [1]. Были рассмотрены различные механизмы переноса заряда из активного центра оксидоредуктаз на электродный материал и выбраны оптимальные структуры иммобилизованных фермент-кофакторных систем. В результате на примере иммобилизации оксидоредуктазных систем на углеродных материалах были разработаны электропроводные фермент-кофакторные системы с электроферментативной регенерацией кофермента. Такие системы полностью отвечают современным понятиям нанотехнологий, так как характеризуются наноразмерами и принципиально новыми, не реализованными в природе функциями электроферментативного катализа. Важным моментом этих работ является реализация данных наноконструкций на современных принципах молекулярной самосборки и самоорганизации.

Рассмотрим теоретические предпосылки и движущие силы молекулярной самосборки и самоорганизации таких нанообъектов на примере электропроводных фермент-кофакторных систем с электрохимической регенерацией кофермента. Основными техническими требованиями к рассматриваемым наноконструкциям являются объединение в пределах единой системы всех структурных блоков, обеспечивающих протекание и сопряжение целевого биокаталитического процесса и процесса электрохимической регенерации кофактора. Следовательно, такая конструкция должна включать фермент, кофермент и фрагмент электродного материала или специально собранный на его поверхности кластер, выступающий в роли наноэлектрода (рис. 1).



Рис. 1. Схема наноконструкции, обеспечивающей эффективное сопряжение биокаталитических и электрохимических процессов: С – субстрат; АФ – апофермент; АЦ – активный центр фермента; К – кофермент; НЭ – наноэлектрод (фрагмент электропроводной матрицы или специфический кластер, выполняющий роль наноэлектрода).

Исходными данными для конструирования наноконструкции с заданными свойствами могут выступать:

- рентгеноструктурные данные о структуре фермента в кристаллическом состоянии и данные о его свойствах в водных растворах, включая конформационную подвижность в процессе каталитических превращений субстрата и кофермента;
- данные о структуре и конформационной подвижности окисленной и восстановленной форм кофермента;
- данные об электрохимическом поведении кофермента и фермента и данные о механизмах переноса зарядов в этих молекулах;
- данные об электрохимических свойствах и поведении различных модифицированных электродных материалов.

СТРУКТУРА И СПОСОБЫ ОБЕСПЕЧЕНИЯ В ПРОЦЕССЕ САМОСБОРКИ И САМООРГАНИЗАЦИИ НАНОКОНСТРУКЦИИ ОПТИМАЛЬНОЙ ОРИЕНТАЦИИ ГЛОБУЛЫ ФЕРМЕНТА НА ПОВЕРХНОСТИ

Изофермент АА алкогольдегидрогеназы (АДГ, КФ 1.1.1.1) из печени лошади имеет молекулярную массу 84 000 дальтон, содержит 374 аминокислотных остатка, включает два каталитических центра и состоит из двух субъединиц. Каждая субъединица включает два атома цинка, один из которых образует хелатный комплекс и формирует третичную структуру субъединицы. Второй атом цинка входит в активный центр фермента и участвует в каталитическом акте. Согласно рентгеноструктурным данным Эклунда [3,4], в первом приближении фермент представляет эллипсоид размером 4,5x5,5x11,0 нм.

Кофермент оксидоредуктаз никотинамидадениндинуклеотид (НАД) существует в двух формах - окисленной и восстановленной (рис.2) - и характеризуется двумя основными конформациями: вытянутой (открытой) α -конформацией с максимальным расстоянием между нуклеотидами и сложенной (изогнутой) β -конформацией, в которой плоскости аденина и никотинамида сближены и параллельны. Выявлено, что только при сложенной конформации возможен эффективный перенос энергии между нуклеотидами [5,6].

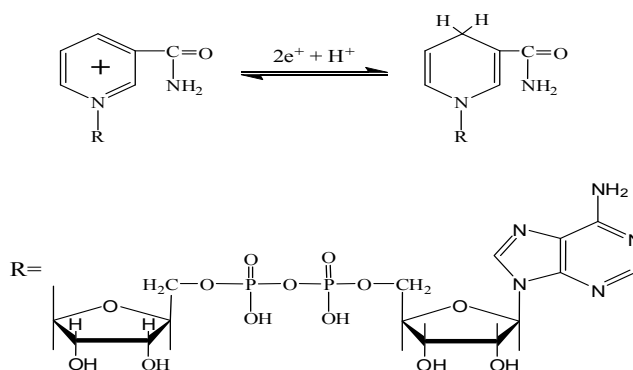
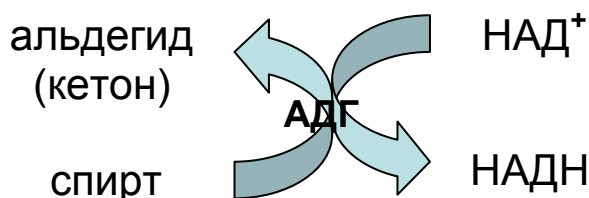


Рис. 2. Структура окисленной и восстановленной форм кофермента НАД

В клеточных метаболических процессах алкогольдегидрогеназа обратимо катализирует ряд окислительно-восстановительных процессов, в том числе спиртов в альдегиды (кетоны) по следующей схеме:



При этом в клетках реализуются различные пути регенерации необходимой формы кофермента за счет дополнительных ферментативных процессов. В технических системах желательно обеспечить регенерацию кофермента без использования мультиферментных систем. Наиболее заманчиво регенерировать кофермент электрохимическими методами, однако в этом случае имеются определенные трудности из-за возможности образования неактивного димера в результате рекомбинации радикалов, образующихся на первой одноэлектродной стадии окисления НАД [1,7].

Для создания целевой наноконструкции важное значение имеют взаимодействия кофермента с апоферментом. Методом рентгеноструктурного анализа была детально изучена структура фермент-коферментного комплекса и установлены конкретные аминокислотные остатки активного центра связанные с никотинамидным нуклеотидом [8]. Учитывая то, что кофермент непосредственно взаимодействует с индольным остатком триптофана апофермента, была рассчитана наиболее устойчивая и энергетически выгодная пространственная ориентация комплекса аденин-никотинамид-индол в составе фермент-кофакторного комплекса [9]. С учетом приведенных выше и в [1] данных можно представить возможные механизмы переноса заряда с активного центра НАД-зависимого фермента на электропроводную матрицу (рис. 3).

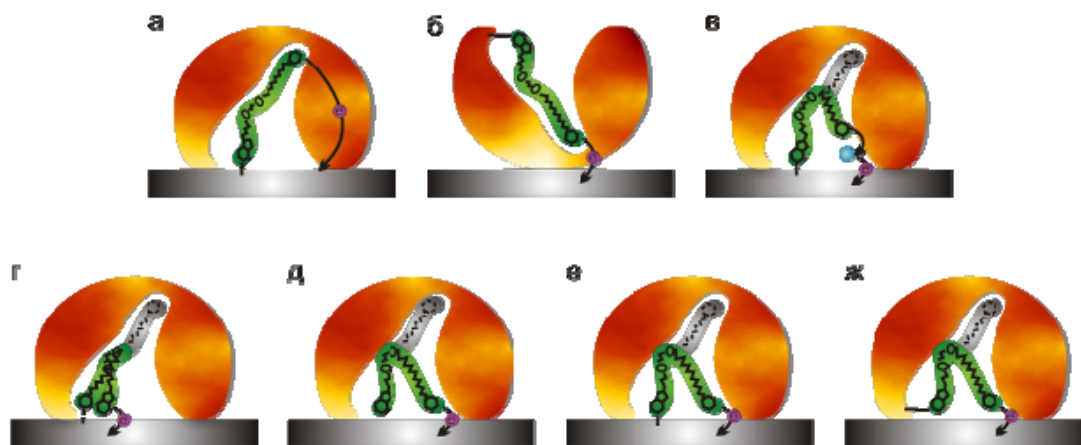


Рис. 3. Возможные механизмы переноса заряда с активного центра НАД-зависимого фермента на электропроводную матрицу: а,б – через белковую матрицу; в – посредством медиатора; г – между носителем и коферментом, ковалентно иммобилизованным через систему электропроводных связей; д – в сорбционно иммобилизованной фермент-коферментной системе; е – между электропроводным носителем и коферментом, ковалентно иммобилизованным через систему гибких связей; ж – между электропроводным носителем и коферментом, ковалентно связанным с белковой матрицей апофермента.

Некоторые авторы [10-17] считают возможным транспорт электронов в активный центр через белковую матрицу фермента (рис. 3а,б). Квантово-механические основы такого переноса и пути сопряжения ферментативных и электрохимических реакций рассмотрены в [1,15,18,19]. Считается, что перенос электронов в белковых молекулах может происходить путем туннелирования от донорной группы к акцепторной группе вдоль специфических путей (по «электронным тропам») [15,20].

Реализация эффективного переноса электронов согласно схеме, представленной на рис. 3а, может вызвать трудности из-за отсутствия гарантий выхода «электронных троп» на поверхность электродного материала. При ковалентной пришивке кофермента к электродной поверхности может также существовать противоречие в требованиях к ориентации коферментной каталитической щели и мест выхода «электронных троп» на поверхность электродного материала. Это

противоречие может быть разрешено путем пришивки кофермента, находящегося в его каталитической щели, к белковой матрице фермента, находящегося на поверхности электродного материала в необходимом для эффективного переноса электрона через белковую матрицу направлении (рис. 3б). Впервые каталитически активный ковалентно сшитый фермент-коферментный комплекс на примере АДГ-НАД был получен в [21].

Возможен перенос электронов посредством медиатора, совершающего челночные движения в активном центре фермента к электропроводному носителю и обратно (рис. 3в). Этот механизм при совместной ковалентной иммобилизации фермента и кофермента вряд ли представляет интерес из-за стерических препятствий, возникающих при связывании с медиатором. Однако в случае пространственной разобщенности кофермента и электропроводной поверхности использование медиаторов существенно повышает эффективность электроферментативных систем [22].

Возможны варианты электронного транспорта за счет конформационной подвижности НАД путем образования комплекса с переносом заряда между никотинамидным и адениновым нуклеотидами НАД, пришитого к электропроводному материалу через систему электропроводных связей (рис. 3г), или непосредственного контакта никотинамидного нуклеотида с электропроводным материалом при различных способах иммобилизации кофактора (рис. 3д, 3е, 3ж). Эти механизмы предусматривают строгую ориентацию фермента относительно поверхности электродного материала и точное соблюдение стерических условий для конформационных переходов кофермента в каталитической щели фермента, иммобилизованного на поверхности электропроводного носителя. Возможность переноса энергии (электрохимического эквивалента) в результате «маятникового» движения никотинамидного нуклеотида от

активного центра к адениновому нуклеотиду или непосредственно к матрице иммобилизации не вызывает сомнения вследствие конформационной подвижности НАД [23].

Трудновыполнимые стерические требования предъявляет механизм, представленный на рис. 3г, ввиду жесткости и малой подвижности электропроводных ковалентных связей. Наиболее перспективным является механизм, реализовать который можно путем стерического заключения кофермента в области его каталитической щели, в пространстве между белковой матрицей апофермента и поверхностью электропроводного материала (рис. 3д), путем ковалентной пришивки кофермента через гибкую «ножку» к поверхности электропроводного материала (рис. 3е) или к белковой матрице самого фермента (рис. 3ж).

На рисунке 4 даны возможные варианты иммобилизации фермент-кофакторных систем (ФКС) на электропроводных матрицах [24]. Во всех случаях для оптимального переноса заряда требуется строгая ориентация ферментной глобулы на поверхности электропроводного материала, при которой коферментные каталитические щели направлены к поверхности.

Независимо от того, как происходит окончательное закрепление фермента на поверхности – сорбционно или ковалентно, чаще всего в процессе иммобилизации ориентация белковой глобулы навязывается не валентными или другими близкодействующими взаимодействиями с поверхностью носителя, а более дальнедействующими взаимодействиями. Именно эти взаимодействия ответственны за связывание ферментов и их самоорганизацию в микроструктурах клеток [25,26].

При отсутствии внешних полей при иммобилизации белковая глобула приближается к матрице иммобилизации за счет диффузии. Движущая сила

этого процесса определяется только градиентом концентрации белка в приповерхностном пространстве.

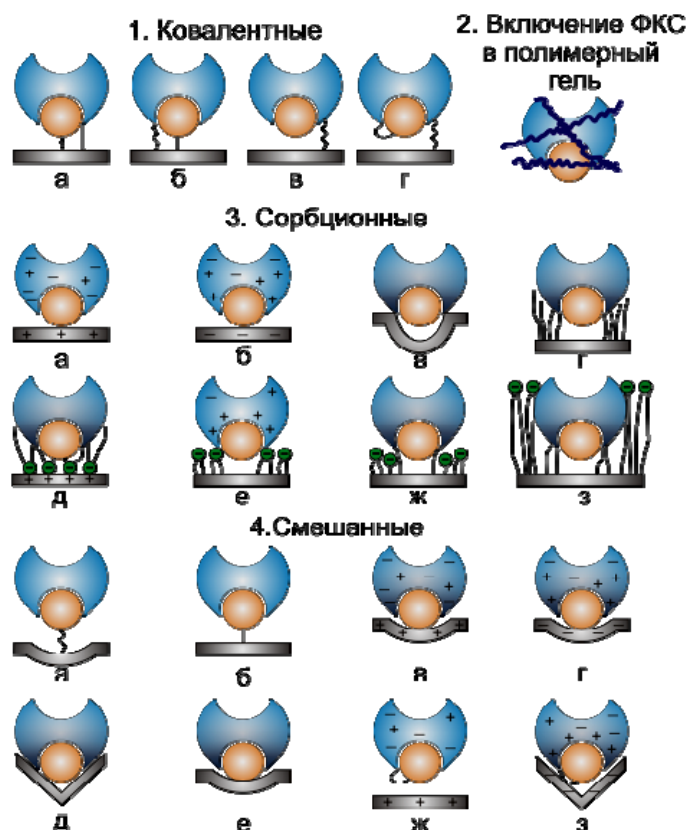


Рис. 4. Способы иммобилизации фермент-кофакторной системы на электропроводных носителях.

При этом при подходе к поверхности наблюдается статистическое распределение ориентаций глобул относительно поверхности. Возможность влияния различных сил на ориентацию макромолекулы при подходе к поверхности матрицы иммобилизации определяется различной природой и дальностью действия различных сил и полей поверхности. Наибольшим дальностью действия обладают электростатические силы заряженной поверхности [25]. Что касается гидрофобных и других Ван-дер-ваальсовых взаимодействий, они короткодействующие и не могут существенно повлиять на изменение ориентации «атакующих поверхность» глобул. Состояние ориентации при посадке глобулы на поверхность может быть определяющим

в окончательной ориентации фермента на поверхности, несмотря на принципиальную возможность движения белковой глобулы в поле поверхности, включая ее «катание» вплоть до достижения истинного термодинамического равновесия. Следовательно, управлять ориентацией глобулы необходимо в процессе ее «посадки» на поверхность. Окончательно достигнутая ориентация может быть зафиксирована образованием ковалентных связей белковой глобулы с поверхностью.

Оптимальную ориентацию ферментных глобул на поверхности наиболее просто реализовать для макромолекул, обладающих значительным постоянным или наведенным дипольным моментом. Если «посадка» асимметричной макромолекулы в процессе сорбционной или ковалентной иммобилизации осуществляется на заряженную поверхность или в приложенном перпендикулярно к поверхности электрическом поле, то уже при диффузионном подходе такой глобулы к поверхности может быть достигнута высокая степень ориентации глобулы. Отдельные примеры иммобилизации ферментов и клеток в электрическом поле были описаны [27,28].

Самосборка и самоорганизация кластеров и надмолекулярных систем предполагают, что наноконструкция образуется в результате наличия химических и иных движущих сил используемых процессов, и полученная система устойчива во времени и поддерживается за счет ее термодинамических факторов или кинетической «замороженности» термодинамически возможных для нее процессов. Рассмотрим, как можно целенаправленно управлять самосборкой и самоорганизацией фермент-коферментной конструкции на поверхности носителя. Используя рентгеноструктурные данные [3,4], мы провели математическое моделирование электростатического и гидрофобного взаимодействий

алкогольдегидрогеназы с полем поверхности с учетом реального пространственного расположения ионизирующихся и гидрофобных групп в глобуле этого фермента [25,26,29]. В результате было выявлено, что точный учет положения конкретных ионизирующихся групп белка приводит к существенно различной энергии взаимодействия фермента с носителем по сравнению с энергией взаимодействия предсказываемой теорией сорбции белков, в которой в качестве основного параметра сорбата выбирается суммарный заряд белка [30].

На рисунке 5 показана зависимость энергии электростатического взаимодействия алкогольдегидрогеназы с положительно заряженной поверхностью от угла поворота глобулы вокруг ее оси Y , проходящей через центр массы вдоль максимального размера глобулы, и pH раствора, определяющего суммарный заряд глобулы. Расчет показал, что при $pH \sim 8$ энергия переориентации из состояния $\gamma = 0$ в состояние $\gamma = \pi$ равна $\sim 1,5$ эВ, или ~ 35 ккал/моль, и значительно превышает энергию теплового движения молекул. Это свидетельствует в пользу ориентированной сорбции фермента.

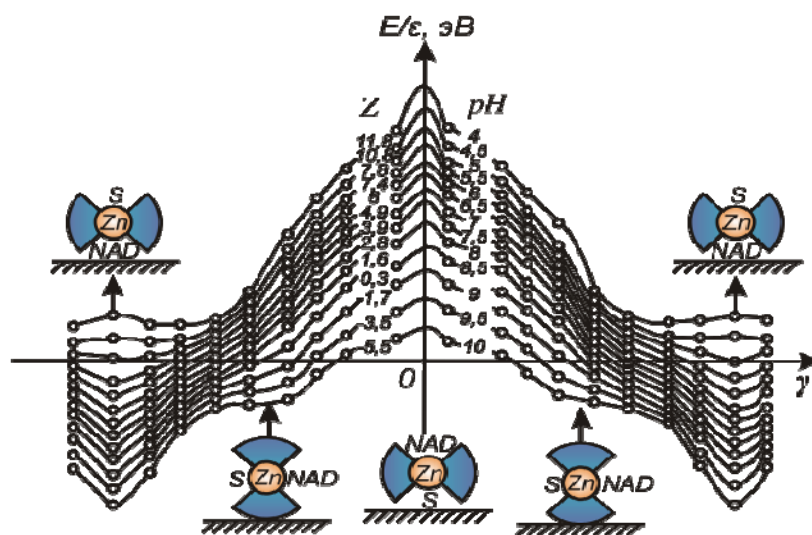


Рис. 5. Зависимость энергии электростатического взаимодействия алкогольдегидрогеназы с положительно заряженной поверхностью от угла поворота глобулы вокруг ее оси, проходящей через центр массы вдоль максимального размера глобулы, и pH раствора (Z – суммарный заряд глобулы).

Одним из перспективных методов управления ориентацией ферментов на поверхности носителя может быть целенаправленная модификация этой поверхности с целью придания ей оптимальной гидрофобности для необходимой ориентации глобулы белка. Нами была предложена полуэмпирическая модель взаимодействия «белковая глобула – электронейтральная гидрофобная поверхность» [26]. Энергия взаимодействия рассчитывалась по аддитивной схеме, исходя из экспериментальных данных по гидрофобным взаимодействиям аминокислот и пептидов с обратнoфазовыми сорбентами. Полученные данные представлены на рисунке 6 в виде перспективной азимутальной ортографической проекции уровней энергии взаимодействия белковой глобулы при различных направлениях касания с гидрофобной плоскостью.

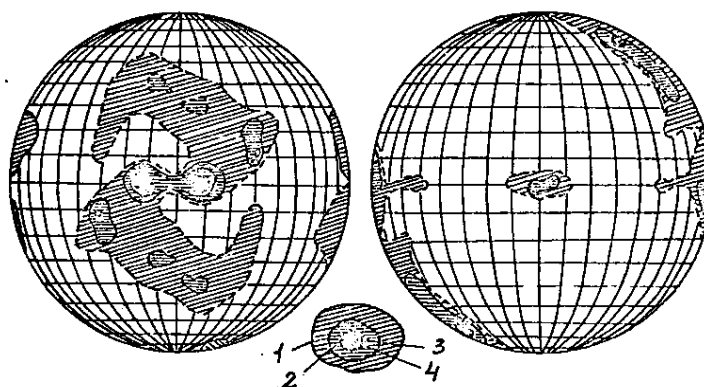


Рис. 6. Перспективная азимутальная ортографическая проекция уровней гидрофобности алкогольдегидрогеназы: 1. $5 < F/RT < 10$; 2. $10 < F/RT < 20$; 3. $10 < F/RT < 30$; 4. $F/RT > 30$; «меридианы» и «параллели» проведены через 9° .

Согласно наблюдениям, на глобуле алкогольдегидрогеназы имеется четыре области наиболее вероятной гидрофобной атаки сорбционной поверхностью. При этом две из них находятся близко друг к другу на экваторе глобулы и лежат между двумя коферментными щелями фермента. Если гидрофобная поверхность представляет собой не плоскость, а

цилиндрическую или сферическую пору с $R = 28,0$ нм, то осуществляется одновременная гидрофобная атака по этим двум основным направлениям и их равнодействующая совпадает с осью Y (рис.7). При такой «посадке» фермента стерическая доступность субстратных щелей фермента максимальна, и коферментные щели фермента направлены к поверхности, что является оптимальным для электрохимической регенерации кофермента.

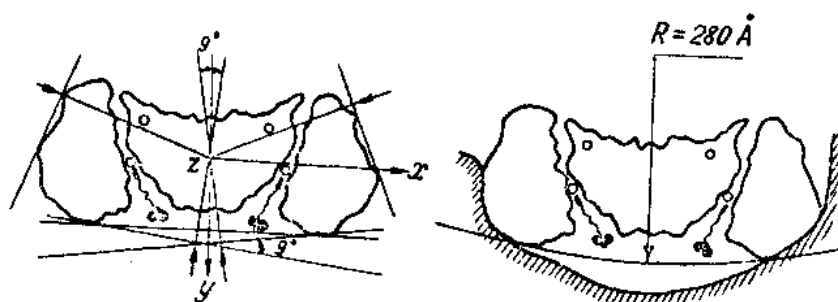


Рис. 7. Схема комплекса алкогольдегидрогеназа – НАД. Стрелки – направления максимального взаимодействия с гидрофобной поверхностью.

Необходимо отметить, что при иммобилизации ферментов чаще всего связь фермента с носителем осуществляется за счет различных сил. Наши исследования свидетельствуют о возможности одновременного связывания ферментов за счет гидрофобных и электростатических взаимодействий.

ЭЛЕКТРОПРОВОДНЫЕ МАТРИЦЫ ИММОБИЛИЗАЦИИ И НАНОЭЛЕКТРОДЫ

Предполагается, что в обсуждаемых электроферментативных системах наблюдается эффективный перенос электрохимических эквивалентов из фермент-кофакторного комплекса на матрицу иммобилизации. Такой перенос возможен только при использовании электропроводных матриц иммобилизации, способных выступать в качестве электрода в процессах электрохимической регенерации кофермента. Особенности электрохимии кофермента НАД и используемые для их электрохимической регенерации электродные материалы рассмотрены в [1]. Из всего разнообразия

материалов особое внимание уделялось иммобилизации оксидоредуктаз на различных модифицированных углеродных матрицах (в том числе на сажах, пирографите, стеклоуглероде, алмазной пленке), электропроводных и полупроводниковых полимерах (органических металлах). Данная тема широко исследовалась в 70 – 80 годы прошлого столетия и сохраняет свою актуальность в настоящее время. Остановимся на некоторых выполненных нами работах. Впервые идея иммобилизации фермент-коферментных систем на электропроводных носителях с электрохимической регенерацией кофермента была реализована на различных углеродных материалах в 1974-75 годах [31-34]. В этих работах на базе совместной иммобилизации кофермента НАД и фермента алкогольдегидрогеназы были разработаны электродные системы для амперометрического анализа спиртов и создана модель биологического топливного элемента. В последующих работах совершенствовались сорбционные и ковалентные методы иммобилизации фермент-коферментных систем на электропроводных носителях [35-39], создавались пастовые электроды [40,41], исследовались механизмы электроферментативных процессов [42], решались теоретические [43-46] и практические [47-51] вопросы использования электроферментативного катализа в аналитической химии.

Важно отметить некоторые более поздние работы и новые перспективы повышения эффективности электроферментативного катализа на базе реконструированных ферментных систем в связи с созданием новых наноматериалов и наноконструкций: углеродных нанотрубок, наночастиц золота и других металлов, квантовых точек, nanoшетонок из электропроводных материалов, получаемых путем нанолитографии или других масочных технологий, и других электропроводных наноконструкций.

Из работ, связанных с применением углеродных материалов в качестве электропроводной матрицы иммобилизации и электродов, можно отметить [52,53], где был разработан модифицированный НАД⁺ пастовый угольный электрод, обеспечивающий электроокисление НАД⁺ с хорошим выходом редокс-активных продуктов, которые прочно сорбируются на поверхности электрода. Этот модифицированный электрод может использоваться в качестве амперометрического трансдюсора при разработке биосенсоров с использованием связанных дегидрогеназ. Было показано, что путем модифицирования графита можно получать активные фермент-коферментные амперометрические системы [53]. Частицы графита функционировали толуидиновым синим. Получаемые ковалентно модифицированные частицы графита формируются в объемно-модифицированный электрод с обновляемой поверхностью.

Удобные для электроанализа свойства проявляют электроды на основе активированных бором алмазных пленок, выращенных из газовой фазы. Было выявлено, что они могут использоваться для эффективного электрохимического окисления НАДН [54].

Для повышения эффективности электрохимической регенерации НАДН была использована электропроводящая золь-гелевая матрица [55]. В присутствии ванадиевого кремнеземного ксерогеля имело место эффективное прямое восстановление НАД⁺ на платиновом электроде. Эта электропроводная матрица была использована для иммобилизации фермента глутаматдегидрогеназы. При этом наблюдался эффективный ферментативный процесс с полной регенерацией кофермента, в то время как в отсутствие электропроводной матрицы конверсия кофермента не превышала 30 %.

Для электрохимической регенерации НАД может использоваться инертный золотой электрод. Была исследована адсорбция НАД⁺ на поверхности золотого электрода и конформационное поведение этого кофермента в широких диапазонах температуры и потенциала электрода [7]. Показано, что сорбция описывается изотермой Лэнгмюра. Были получены значения энергии Гиббса для положительно и отрицательно заряженной поверхности, что подтверждает самопроизвольный процесс сорбции. Большой выигрыш энтропии обеспечивает движущую силу процесса сорбции. Показано, что энергия процесса определяется зарядом поверхности, в то время как кинетика контролируется как массопереносом, так и зарядом поверхности. В результате была предложена модель, описывающая конформацию адсорбированного кофермента в зависимости от условий сорбции.

Модификация поверхности золотого электрода также позволяет получать эффективные электроферментативные системы на основе дегидрогеназ [56]. На поверхности золота путем самосборки формировался монослой цистиамин, к которому ковалентно прививался пирролохинолинхинон. Полученный таким образом электрод катализировал электроокисление НАДН и НАДФН. К этому электроду ковалентно пришивалась НАД-зависимая дегидрогеназа. Полученная при этом электродная система позволяла определять субстрат в присутствии кофермента и наоборот.

Новые перспективы открывает использование в качестве нанoelectродов наночастиц металлов и других материалов. Разработан электрохимический сенсор с высокочувствительной наноструктурой, основанный на интеграции дегидрогеназ и наночастиц золота [57]. Наночастицы золота (Au-НЧ) внедрялись путем самосборки в трехмерную

кремнеземную сетку с концевыми тиольными группами и укрупнялись при добавлении гидросиламина и HAuCl_4 . Гидросиламин катализирует восстановление Au^{3+} на поверхности золота. Это приводит к объединению и укрупнению наночастиц. Au-НЧ самоорганизованные в нанoeлектроды до и после обработки гидросиламином характеризовались соответственно как nAu и nAuS . nAuS в кремнеземной сетке действовали как нанoeлектродный ансамбль и эффективно катализировали окисление НАДН в отсутствие какого-либо медиатора.

Также для электрохимической регенерации НАДН используют наночастицы платины (nPt) [58] для усиления гетерогенной передачи электронов между НАД^+ и электродом в присутствии металлоорганического медиатора (пентаметилциклопентадиен-2,2'-дипиридинхлорид родия(III)). Металлоорганический медиатор ($\text{M}=[\text{Cp}^*\text{Rh}(\text{bpy})\text{Cl}]^+$, где $\text{Cp}^*=\text{C}_5\text{Me}_5$, $\text{bpy}=2,2'$ -дипиридин) используется как первичный переносчик электронов между НАД^+ и электродом, а nPt как гомогенный катализатор, а также как вторичный медиатор.

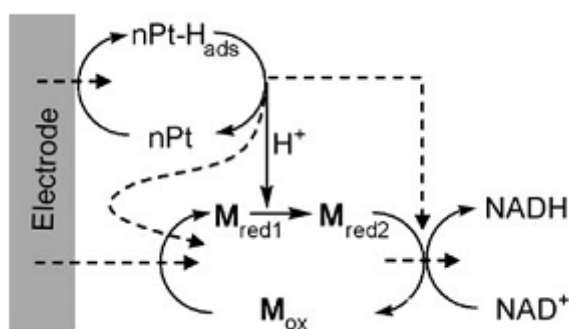


Рис 8. Косвенная электрохимическая регенерация НАДН с использованием медиатора M и наночастиц Pt nPt .

M_{ox} восстанавливается до M_{red1} , принимая два электрона от электрода (1 стадия). Затем M_{red1} химически преобразуется в M_{red2} без изменений в общем количестве электронов, присоединяя один протон из раствора (2

стадия). НАД^+ принимает один протон и два электрона от $\text{M}_{\text{red}2}$ и переходит в НАДН, а $\text{M}_{\text{red}2}$ возвращается к начальному состоянию M_{ox} .

Известно, что свободный и иммобилизованный на электродах флавинадениндинуклеотид (ФАД) может использоваться в качестве медиатора при регенерации НАДН из НАД^+ [1]. Это не удивительно, так как ФАД является простетической группой оксиредуктаз, ответственной за регенерацию кофермента НАД^+ в клетках. Направление реакции $\text{НАДН} \rightarrow \text{НАД}^+$ является термодинамически более предпочтительным, чем обратный процесс. Было показано, что в проточном электроореакторе в определенных условиях можно обеспечить обратное направление процесса $\text{НАД}^+ \rightarrow \text{НАДН}$ [59]. Продемонстрирована эффективность использования данного процесса для электрохимической регенерации НАД^+ в биокаталитических системах.

С целью повышения электрокаталитической активности была осуществлена электрополимеризация ФАД [60]. Было показано, что поли-ФАД на поверхности платинового электрода успешно имитирует функцию фермента по окислению НАДН. В связи с этим разработанная электрохимическая система является хорошим НАДН-трансдьюсором для аналитических систем.

Новые возможности открывает использование фотохимического способа регенерации НАДН. Разработан метод, в котором в качестве источника энергии для регенерации НАДН используется видимый свет [61]. В качестве катализатора в этом случае используется углеродсодержащий TiO_2 и $[\text{Cr}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$. Углеродсодержащий TiO_2 имеет сильное поглощение в видимой области света. $[\text{Cr}^*\text{Rh}(\text{bpy})(\text{H}_2\text{O})]^{2+}$ проявляет высокую активность и селективность по отношению НАДН. В присутствии водорода в качестве донора электронов была достигнута 92% конверсия кофермента. Результаты, полученные в этой работе, позволяют считать

перспективным сочетание фотохимического способа с электрохимическими методами, в которых в качестве эффективного донора электронов может выступать электродный материал.

Также в качестве катализатора используют наночастицы TiO_2 допированные фосфором [62] или бором [63]. Допирование фосфором повышает поглощение частицами TiO_2 света видимой части спектра и уменьшает рекомбинацию образующихся электрон-дырочных пар. TiO_2 допированный бором показывает увеличенную фотокаталитическую активность по сравнению с чистым TiO_2 в фотокаталитической реакции восстановления НАДН под действием УФ-излучения. При 5% добавке бора регенерация НАДН достигла 94%.

В последнее время особое внимание привлекают органические красители ксантенового ряда, такие как флоксин В, эритрозин В, эозин Y [64,65] для эффективной и легкоуправляемой фотохимической регенерации кофакторов. Фото- и электрохимические свойства таких красителей обусловлены заменой атома галогена, что является ключевым фактором в переносе электрона, образующегося под действием света, между молекулой донора и медиатора.

Чрезвычайно перспективно в качестве фотокатализатора использовать квантовые точки, которые могут использовать энергию света или энергию электрохимических процессов и безизлучательно передавать ее на кофермент, что может приводить к его регенерации.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На примере НАД-зависимого фермента алкогольдегидрогеназы рассмотрена молекулярная нанотехнология создания биокатализаторов с электро- и фотохимической регенерацией кофактора. Данная технология соответствует принципу самосборки и самоорганизации «снизу вверх» и

предусматривает разработку эффективных методов управления этими процессами. Показано, что разработка оптимальных наноконструкций электробиокатализаторов требует использования в полном объеме детальной информации о структуре ферментов, коферментов, электропроводной матрицы иммобилизации. Без сомнения, любые не противоречащие известным законам наноконструкции, какими бы предельно сложными они не казались, сейчас могут быть реализованы. Вопрос заключается только в цене и в экономической целесообразности тиражирования, т.е. производства различных наноконструкций. Так как тиражирование может быть рентабельным, прежде всего, на путях самосборки и самоорганизации, то необходимо обратить особое внимание на развитие способов управления этими процессами. Именно в ходе решения задач самосборки и самоорганизации исходных компонентов следует ожидать увеличения производительных сил общества при использовании современных молекулярных нанотехнологий.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гладышев П.П., Шаповалов Ю.А., Квасова В.П. Реконструированные оксидоредуктазные системы. Алма-Ата : «Наука» КазССР, 1987. 190 с.
2. Гладышев П.П., Гладышев Д.П., Вакштейн М.С. и др. Ферментативные наноконструкции с электрохимической регенерацией коферментов : сб. ст. Ядерная физика и нанотехнологии: Ядерно-физические аспекты формирования, изучения и применения наноструктур, Дубна: ОИЯИ, 2008. – с. 356 – 367.
3. Eklund H. et al. // J. Mol. Biol. 1976. V. 102. № 1. P. 27–60.
4. Eklund H., Branden C.-I. // J. Mol. Biol. 1976. V. 102., № 1. P. 61–73.
5. Velick S.F. Light and life. J.Hopkins Press: Baltimore, 1961, P.108.

6. Freed S., Neyfakh E.A., Tumerman L.A. // *Biochem. Biophys. Acta.* 1967. V. 143. № 2. P. 432–434.
7. Alexis Damian and Sasha Omanovic. Interactive Adsorption Behavior of NAD at a Gold Electrode Surface. // *Langmuir.* 2007. 23. P. 3162–3171
8. Jon K. Rubach and Bryce V. Plapp Amino Acid Residues in the Nicotinamide Binding Site Contribute to Catalysis by Horse Liver Alcohol Dehydrogenase. *Biochemistry.* // 2003. 42. P. 2907–2915.
9. Umeyama H. et al. // *J. Theoret. Biol.* 1974, V. 46. № 1. P. 1–19.
10. Gupta R.K. // *Biochem et biophys acta.* 1973. V. 292. № 1. P. 291–295.
11. Cope Freeman W. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1973. V. 204. P. 416–431.
12. Kharkyanen V.N. et al. // *J. Theor. Biol.* 1978. V. 73. № 1. P. 29–50.
13. Миронов С.Л. // Конф. по теории атомов и молекул : тез. докладов. Вильнюс, 1979. С. 32.
14. Украинский И.И., Миронов С.Л. // *Теор. и эксперим. химия.* 1979. Т. 15. № 2. С. 144–151.
15. Петров Э.Г. *Физика переноса зарядов в биосистемах.* Киев, 1984. 368 с.
16. Nisida Yu // *Kagatu to Koguo, Chem. and Chem. Ind. Japane,* 1985. V. 38. № 9. P. 723.
17. Varfolomeev S.D., Kurochkin I.N., Jaropolov A.I. // *Direct electron transfer effect biosensors. Biosensors and bioelectronics.* 1996. 11. P. 863–871.
18. Tarasevich M.R. // *Comprehensive Treatise Electrochem.* New York; London, 1985. V. 10. P. 231–295.
19. Кулис Ю.Ю., Разумас В.Й. *Биоамперометрия.* Вильнюс. 1986. 215 с.
20. Dickerson R.E., Timkowitch R. // *Enzymes.* 1975. V. 11. № 3. P. 397–399.
21. Mansson M.-O. et al. // *Eur. J. Biochem.* 1978. V. 86. P. 455–463.

22. Тарасевич М.Р., Багдановская В.А., Багоцкий В.С. и др. // Электрохимия. 1977. Т. 13. № 16. С. 892–896.
23. Malcolm A.D. // Anal. Biochem. 1973. V. 55. № 1. P. 278–281.
24. Шаповалов Ю.А., Гладышев П.П. // Изв. АН КазССР. Сер. хим. 1984. № 4. С. 69–74.
25. Гладышев П.П., Горяев М.И., Шпильберг И.Г., Шаповалов Ю.А. Сорбционная иммобилизация НАД зависимых ферментных систем.// Молекул. биол. 1982. Т. 16. № 5. С. 938–942.
26. Гладышев П.П., Горяев М.И., Шпильберг И.Г. Сорбционная иммобилизация НАД зависимых ферментных систем. Сообщ. II. Влияние гидрофобных взаимодействий на ориентацию алкогольдегидрогеназы на поверхности носителя // Молекул. биол. 1982. Т. 16. № 5. С. 943–947.
27. Гвоздяк П.И., Могилевич Н.Ф., Никоненко В.У.// Докл. АН УССР. 1977. Б. № 5. С. 437–440.
28. Гвоздяк П.И. Иммобилизованные клетки микроорганизмов. Теория и практика.: сб. ст. конф., Пущено, 1978. С. 80–84.
29. Гладышев П.П., Шаповалов Ю.А. Изучение сорбционной иммобилизации кофермент–зависимых оксидоредуктаз и их функционирования в электроферментативных процессах и биологических мембранах // Молекулярная биология. 1985. Т. 19. № 3. С. 662–670.
30. Гладышев П.П., Горяев М.И., Бектенова А.В. Сорбция и иммобилизация биоорганических соединений на органических сорбентах с гидрофильной матрицей. // Химия природных биологических активных веществ : труды ИХН АН КазССР. Алма–Ата : изд. «Наука» КазССР, 1977. Т. 46. С. 15–29.

31. Иммобилизация коферментов и ферментов на электропроводных материалах // Гладышев П.П. [и др.] Сб. работ по химии. Алма-Ата : КазГУ, 1974. Вып. 5. С.17–29.

32. Модель биологического топливного элемента // Гладышев П.П. [и др.] Сб. работ по химии. Алма-Ата: КазГУ, 1975. Вып. 4. С. 206–212.

33. Гладышев П.П., Горяев М.И., Шаповалов Ю.А. Способ получения электропроводных фермент-кофакторных систем : А.С. 593439 (СССР); заявл. 4.08.1975 № 1770075.

34. Способ получения иммобилизованных никотинамидадениндинуклеотид зависисмых ферментов : пат. 615087 СССР. № 2304911; заявл. 22.12.1975; опубл. 15.07.1978, Бюл. изобр. № 26. 17с.

35. Иммобилизованные фермент-кофакторные системы // Гладышев П.П. [и др.] Химия природных биологических активных веществ : Труды ИХН АН КазССР. Алма-Ата : изд. «Наука» КазССР, 1980. Т. 52. С. 85–104.

36. Ориентированная сорбция ферментов на поверхности адсорбентов и электродов // Гладышев П.П. [и др.] V Всесоюзный симпозиум по межмолекулярному взаимодействию и конформации молекул (9–11 октября 1980 г., Алма-Ата). Тез. докладов. Алма-Ата : Наука. 1980. С. 75.

37. Способ получения электропроводных фермент-кофакторных систем // Гладышев П.П. [и др.] : А.С. 864781 (СССР) ; заявл. 23.05.80 № 2930941/13.

38. Гладышев П.П., Шаповалов Ю.А. Электропроводные реконструированные ферментные системы // Известия АН КазССР, сер.хим. 1984. № 4. С. 69–74.

39. Гладышев П.П., Шаповалов Ю.А. Реконструированные ферментные системы // Современные проблемы биоорганической химии и химии природных соединений : материалы конференции, посвященной памяти

М.И.Горяева, Алма-Ата, 2–6 октября 1984 г. (деп. в КазНИИТИ 24.10.1984 № 768, Ка-84). С. 260–287.

40. Угольный пастовый электрод на основе ферментной системы АДГ–НАД // Гладышев П.П. [и др.] Сб. работ по химии. Алма-Ата : КазГУ, 1985. С. 60–66.

41. Гладышев П.П., Шарипова Н.С., Новиков Б.Е. Вольтамперометрическое поведение фермент–кофакторной системы АДГ–НАД на угольнопастовом электроде // IX Всесоюзное совещание по полярографии. Усть–Каменногоorsk, 1987. С. 435.

42. Гладышев П.П., Шаповалов Ю.А. Механизмы электроферментативных процессов в биологических мембранах // Известия АН КазССР, сер. хим. 1987. № 2. С. 42–47.

43. Форма аналитического сигнала в проточных электроферментативных датчиках при импульсном вводе пробы // Гладышев П.П. [и др.] III Всесоюзный симпозиум «Получение и применение иммобилизованных ферментов в научных исследованиях, промышленности и медицине» (1–2 октября 1980 г.) : тезисы докладов. Л., 1980. С. 228.

44. Use of Electroenzyme Catalysis in Organic and Biochemical Analysis // Gladyshev P.P. et al. Microchem.Acta. 1981. II. P.289–299.

45. Гладышев П.П., Мамлеев В.М. Функционирование проточного электроферментативного датчика при импульсном амперометрическом анализе субстратов. I. Исследование системы АДГ–НАД при анализе спирта // Известия АН КазССР сер.хим. 1982. №3. С. 49 – 54.

46. Гладышев П.П., Шаповалов Ю.А., Новиков Б.Е. Электроферментативные аналитические системы // Вестник АН КазССР. 1988. № 3. С. 21.

47. Использование иммобилизованных фермент–кофакторных систем в электрохимическом анализе биоорганических соединений // Гладышев П.П. [и др.]: Третья всесоюзная конференция по аналитической химии Тез. докладов. Минск, 1979 г., ч. 1, с.53-55.

48. Перспективы использования электроферментативных систем в клиническом анализе // Гладышев П.П. [и др.] IV Всесоюзная конференция по аналитической химии органических соединений (Москва, 7–9 января 1980 г.) : тез. докладов. М.: Наука, 1980. С. 257–258.

49. Гладышев П.П. Электроферментативные методы анализа органических соединений // Электрохимические методы анализа : тезисы Всесоюзной конференции по электрохимическим методам анализа. (2–4 июня 1981 г., Томск). Томск, 1981. Ч.1. С. 41–42.

50. Использование электроферментативных датчиков для избирательного анализа органических соединений // Гладышев П.П. [и др.] Электрохимические методы анализа: тезисы Всесоюзной конференции по электрохимическим методам анализа (2–4 июня 1981 г., Томск). Томск, 1981. Ч. 1. С. 181–182.

51. Гладышев П.П. Электропроводные иммобилизованные фермент–кофакторные системы в анализе и синтезе // 16 симпозиум ФЕБО (Москва, 1984) : тезисы докладов. М., 1984. С. 387.

52. M. Isabel Alvarez–Gonza'lez, Silvana B. Saidman, M. Jesu's Lobo–Castano'n, A Arturo J. Miranda–Ordieres, and Paulino Tuno'n–B lanco. Electrocatalytic Detection of NADH and Glycerol by NAD⁺ – Modified Carbon Electrodes // Anal. Chem. 2000. 72. P. 520–527.

53. P. Ramesh and S. Sampath A Binderless. Bulk–Modified, Renewable Surface Amperometric Sensor for NADH and Ethanol // Anal. Chem. 2000. 72. P. 3369–3373.

54. Electrochemical Oxidation of NADH at Highly Boron–Doped Diamond Electrodes // Tata N. Rao [et al.] *Anal. Chem.* 1999. 71. P. 2506–2511.

55. Eulalia Siu, Keehoon Won, and Chan Beum Park. Electrochemical Regeneration of NADH Using Conductive Vanadia–Silica Xerogels // *Biotechnol. Prog.* 2007. 23. P. 293–296.

56. Itamar Willner and Azalla Riklin. Electrical Communication between Electrodes and NAD(P)⁺–Dependent Enzymes Using Pyrroloquinolinequinone–Enzyme Electrodes in a Self–Assembled Monolayer Configuration: Design of a New Class of Amperometric Biosensors // *Anal. Chem.* 1994. 66. P. 1535–1539.

57. Bikash Kumar Jena and C. Retna Raj. Electrochemical Biosensor Based on Integrated Assembly of Dehydrogenase Enzymes and Gold Nanoparticles // *Anal. Chem.* 2006. 78. P. 6332–6339.

58. Electrochemical Regeneration of NADH Enhanced by Platinum Nanoparticles // Hyun–Kon Song [et al.] *Angew. Chem.* 2008. 120. P. 1773 –1776.

59. Laminar Flow–Based Electrochemical Microreactor for Efficient Regeneration of Nicotinamide Cofactors for Biocatalysis // Seong Kee Yoon [et al.] *J. AM. CHEM. SOC.* 2005. 127. P. 10466–10467.

60. Electropolymerized Flavin Adenine Dinucleotide as an Advanced NADH Transducer // Arkady A. Karyakin [et al.] *Anal. Chem.* 2004. 76. P. 2004–2009.

61. Zhongyi Jiang, Chenqiu Lu, and Hong Wu¹. Photoregeneration of NADH Using Carbon–Containing TiO₂ // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2005. 44. P. 4165–4170.

62. Qing Shi, Dong Yang, Zhongyi Jiang, Jian Li. Visible–light photocatalytic regeneration of NADH using P–doped TiO₂ nanoparticles // *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 2006. 43. P. 44–48.

63. Daimei Chen, Dong Yang, Qun Wang, and Zhongyi Jiang. Effects of Boron Doping on Photocatalytic Activity and Microstructure of Titanium Dioxide Nanoparticles // *Ind. Eng. Chem. Res.* 2006. 45. P. 4110–4116.

64. Sahng Ha Lee, Dong Heon Nam, Chan Beum Park. Screening Xanthene Dyes for Visible Light–Driven Nicotinamide Adenine Dinucleotide Regeneration and Photoenzymatic Synthesis // *Adv. Synth. Catal.* 2009. 351. P. 2589 – 2594.

65. Eosin Y–Sensitized Artificial Photosynthesis by Highly Efficient Visible–Light–Driven Regeneration of Nicotinamide Cofactor // Sahng Ha Lee [et al.] *ChemBioChem* 2009. V. 10. P. 1621 – 1624.