

**ІНСТИТУТ ЗАГАЛЬНОЇ ТА НЕОРГАНІЧНОЇ ХІМІЇ
ІМ. В.І. ВЕРНАДСЬКОГО
НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ**

Кваліфікаційна наукова
праця на правах рукопису

Ходикіна Марія Олегівна

УДК 544.3.03+54.057:678.746.52+546.57/543.632.552

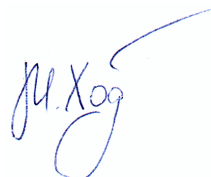
ДИСЕРТАЦІЯ

**ФОРМУВАННЯ ГЕТЕРОСТРУКТУР В СИСТЕМІ
НЕОРГАНІЧНИЙ НОСІЙ - НАТИВНИЙ ФЕРМЕНТНИЙ
ПРЕПАРАТ КЛАСУ ОКСИДОРЕДУКТАЗ**

02.00.04 – фізична хімія

10 – Природничі науки

Подається на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук
Дисертація містить результати власних досліджень. Використання ідей, ре-
зультатів і текстів інших авторів мають посилання на відповідне джерело



М.О. Ходикіна

Науковий керівник
Каздобін Костянтин Олександрович
Доктор хімічних наук,
старший науковий співробітник

Київ - 2017

АНОТАЦІЯ

Ходикіна М.О. Формування гетероструктур в системі неорганічний носій - нативний ферментний препарат класу оксидоредуктаз. - Кваліфікаційна наукова праця на правах рукопису.

Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата хімічних наук за спеціальністю 02.00.04 – фізична хімія. – Інститут загальної та неорганічної хімії ім. В.І. Вернадського НАН України, Київ, 2017.

На даний час більшість досліджень присвячено створенню нанокомпозитних систем і гетероструктур для перетворення енергії і біокатализаторів, складовими компонентами яких є електропровідні вуглецеві матеріали (графен, нанотрубки). Використання неорганічних матеріалів, переважно силікатів - досліджується в значно меншому обсязі. Гетероструктури з використанням нативного ферментного препарату - витяжки з рослин - досі не досліджувались.

Згідно з основною ідеєю роботи, зшивання неорганічного компонента з ферментним препаратом створює гетероструктури, здатні до розподілу зарядів, змінює механізм перебігу хімічних і електрохімічних реакцій і відкриває нові сфери застосування отриманих матеріалів.

Метою даної роботи є встановлення закономірностей впливу природи неорганічного носія з різною структурою та фізико-хімічними властивостями на зв'язування нативних ферментних препаратів класу оксидоредуктаз (на прикладі витяжки з коренеплоду редьки чорної); застосування одержаних гетероструктур в якості активних мас електродів для енергоперетворюючих пристроїв та біосенсорів.

Для досліджень формування гетероструктур в системі неорганічний носій - нативний ферментний препарат класу оксидоредуктаз застосовано ряд фізико - хімічних та електрохімічних методів. Фізико-хімічні властивості органіномінеральних гетероструктур встановлені завдяки прямій потенціометрії і

потенціометричному титруванню, інфрачервоній (ИК) і ультрафіолетовій (УФ) спектроскопії, атомно-абсорбційній спектрофотометрії (ААС), спектрофотометрії, скануючій електронній мікроскопії (SEM), циклічній вольтамперометрії (ЦВА), спектроскопії електрохімічного імпедансу (CEI). Одночасне застосування взаємодоповнюючих загальноприйнятих методів дослідження дають підстави стверджувати про обґрунтованість зроблених в роботі висновків.

Методом атомно-адсорбційного аналізу встановлено наявність чотирьох основних іонів металів (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}) у нативному ферментному препараті, що свідчить про формування різних каталітичних і адсорбційних центрів білкової молекули. Виявлено, що природний бентоніт селективно зв'язує іони Cu^{2+} , модифікований фосфат-іонами бентоніт – іони Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , а аеросил-300 та каолін – всі чотири іона металу (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}). Це вказує на можливість формування різних каталітичних центрів на основі суміші ферментів класу оксидоредуктаз, або суміші пероксидази з супероксиддисмутазою.

Основний вплив на функціональні властивості гетероструктур має не площа поверхні, а кількість кислих і основних центрів на поверхні носія. Підвищення кількості кислих центрів обумовлює неселективне зв'язування різних оксидоредуктаз, що і передбачає значний вплив синергізму на електрохімічні властивості досліджених систем. Збільшення кількості основних центрів на поверхні неорганічних носіїв обумовлює селективне зв'язування іонів металів.

Комплексом фізико-хімічних і електрохімічних методів встановлена відмінність в механізмах зв'язування металовмісних ділянок білкових молекул ферментів з препарату, засноване на реалізації просторового поділу ферментів по іонам металів, що входять до їх складу. Реалізація такого поділу дозволяє підвищити окислювальну активність і стабільність іммобілізованого препарату і створює умови для утворення областей, здатних до специфічної (розподіленої) адсорбції зарядів.

За результатами досліджень іммобілізації нативного ферментного препарату на неорганічних носіях і даних ІЧ- спектрів встановлено зміну механізму зв'язування ферментів з носієм, що істотно впливає на збільшення його окисної активності. Так, на бентоніті окислювальна активність в реакції збільшується в 7 разів, на модифікованому фосфат-іонами бентоніті - в 3 рази, на каоліні активність практично не змінюється, а на аеросилі-300 вона зростає в 4 рази.

Виявлено вплив кислотно-основних властивостей поверхні носія на посилення активності ферментного препарату після іммобілізації на неорганічних носіях. Встановлена макроструктура активного центру, утвореного нативним ферментним препаратом, іммобілізованим на неорганічних носіях. Підтверджено наявність у ньому системи з двох ферментів і двох коферментів. Показано, що в залежності від природи носія механізм зв'язування ферментів і активність змінюються.

Вперше показано, що редокс - активністю іммобілізованого нативного ферменту можна керувати застосуванням носіїв з переважно електронною або протонною провідністю, які впливають на окисні або відновні властивості новоствореної системи. Аналіз спектрів електрохімічного імпедансу в координатах Боде виявив наявність резонансних частотних областей зсувів фазового кута Θ у всіх досліджених системах, які обрані в якості основних зон для отримання значень активного і реактивного опору, і подальшого розрахунку сумарного опору і типу носія заряду. На цій основі запропоновано розрахунковий метод оцінки впливу матеріалу носія на редокс - активність гетероструктури та її стабільність у часі на основі значень активного і реактивного опорів системи. Наявність високих позитивних значень $\sum = R + X$ призводить до ініціації електронної провідності іммобілізованого ферменту. Зворотний вплив буде надавати носій, що володіє високим негативним значенням $\sum = R + X$, тобто високою протонною провідністю. Виявлено, що максимально ефективним носієм для іммобілізації ферментного препарату редьки чор-

ної є аеросил - 300, який підвищує в присутності води внесок електронної провідності.

Із застосуванням розрахункового методу на основі значень активного і реактивного опорів показана можливість оцінки впливу матеріалу носія на редокс - активність кінцевої гетероструктури і її стабільність у часі.

Наявність чотирьох основних іонів металів в ферментному препараті приводить до формування різних каталітичних і адсорбційних центрів білкової молекули, що визначається появою різних поверхневих структур. На основі аналізу зображень скануючої електронної мікроскопії встановлено, що на бентоніті і модифікованому бентоніті, що мають основну поверхню, активний центр ферменту формує ендо- тип структури з розривом «внутрішніх» глікозидних зв'язків на поверхні білкової молекули ферменту, уздовж якої і розташовується субстрат. На аеросилі-300 з кислою поверхнею відбувається формування активного центру екзо- типу з розривом «зовнішніх» глікозидних зв'язків, спрямований вглиб білкової молекули, структура якого не дозволяє вмістити більше визначеного числа мономерних ланок субстрату. На каоліні, для якого характерна наявність кислих і основних центрів, формуються хаотичні структури.

Аналізом спектрів імпедансу показана можливість формування структур, що відповідають за накопичення енергії в системах з іммобілізованими ферментами. Доведено, що зв'язування просторово розділених ферментів проявляє стабілізуючий вплив на формування областей, здатних накопичувати заряд і реалізовувати редокс перетворення. Встановлено дестабілізуючу роль води на редокс - перетворення у гетероструктурі каолін - ферментний препарат.

Встановлено, що кислотно-основні властивості носія є основним фактором впливу на селективність зв'язування ферментів з суміші; вони забезпечують формування систем з різними функціями: основне середовище формує сенсорну активність, а кисле - здатність до накопичення енергії.

Спектр електрохімічного імпедансу 0,5% водної суспензії нативного ферментного препарату показує, що чистий фермент поводить себе як електроліт. Еквівалентна схема є характерною для неоднорідного електроліту (модель Ершлера - Рендлса).

Моделювання еквівалентних схем досліджених систем встановили різницю в послідовності з'єднання елементів у гетероструктурах з бентонітом та його кислою формою. Існування опору індуктивності в схемі пов'язана, очевидно, з наявністю редокс – пари та протона, які володіють магнітним моментом. Така властивість пов'язана зі змінами у структурі носія після іммобілізації. Типові схеми гетероструктур для бентоніту та модифікованого бентоніту формально моделюють електроліт, це пов'язано з утворенням квазігомогенної системи між носієм та ферментом. З іншого боку, на аеросилі-300 та каоліні спостерігається утворення двофазної системи, в якій відбувається фізичний процес переносу заряду між фазами. Таким чином, типові еквівалентні моделі вказують на різні електрохімічні властивості синтезованих гетероструктур та можливість їх використання в якості суперконденсаторів або біосенсорів. Для перших необхідний лише фізичний перенос заряду, для других – участь у редокс – реакції.

На основі аналізу циклічної вольтамперометрії гетероструктур неорганічний носій - ферментний препарат показана можливість використання синтезованих гетероструктур в якості активних мас (твердого електроліту) для створення редокс- сенсорів і пристроїв для накопичення енергії.

Вперше створена система гетероструктура - графен - струмознімач, і показана можливість формування суперконденсатора в системі графен - аеросил-300 - ферментний препарат і графен - каолін - ферментний препарат. Виміряні величини ємності досягають 95 Ф/г, що знаходиться на рівні кращих розробок останніх років в області накопичення енергії з біомаси.

Доведено, що специфічність зв'язування з носієм переважно комплексів заліза дає можливість використання синтезованих гетероструктур на основі бентоніту і його модифікованої форми в якості ефективних і перспективних

платформ для іммобілізації ферментів при створенні амперометричних біосенсорів на глюкозу з високим рівнем вихідного сигналу.

Вибір матеріалу збірки, а саме використання Au - струмопідводу обумовлений високою каталітичною активністю ферментного препарату. Використання інших електродів (Pt) призводило до появи досить високих фонових струмів і подальшої втрати чутливості сенсора.

Результати дослідження можна використовувати для створення дешевих накопичувачів енергії, біосумісних джерел струму, сенсорів з високим рівнем сигналу.

Ключові слова: гетероструктура, фермент, іммобілізація, бентоніт, модифікований бентоніт, аеросил, каолін, вольтамперометрія, імпеданс, біосенсор, суперконденсатор.

SUMMARY

Khodykina M.O. Formation of heterostructures in the system of inorganic carrier - native enzyme preparation of the class of oxidoreductases – Manuscript.

Thesis for the scientific degree of the Candidate of Chemical Sciences in the specialty 02.00.04. – Physical Chemistry. – Vernadsky Institute of General and Inorganic Chemistry of the Ukrainian National Academy of Sciences, Kyiv, 2017.

Currently, most research is dedicated to the design of nanocomposite systems and heterostructures for energy conversion and biocatalysts that contain electrical components of carbon materials (graphene, nanotubes). Use of inorganic materials, preferably silicates – is explored to a much lesser extent. Heterostructures with the usage of native enzymes - extracts of plants - has not yet been investigated.

According to the basic idea of the work, stitching the enzyme preparation into the inorganic component creates heterostructure capable for the distribution of charges what changes mechanisms of chemical and electrochemical reactions and opens new areas of application of such materials.

The aim of current work is the determination of the influence of natural inorganic carrier with a different structure and physicochemical properties onto the binding of the native enzyme from the class of oxidoreductases (for example, extracts from black radish root) isolated from its root, the use of heterostructures obtained as platforms for the design of energy conversion devices and biosensors.

To study the formation of heterostructures of system inorganic carrier - native enzyme from class of oxidoreductases several physical - chemical and electrochemical methods were used. Physical and chemical properties of organomineral heterostructures established through direct potentiometry and potentiometric titration, infrared (IR) and ultraviolet (UV) spectroscopy, atomic absorption spectrophotometry (AAS) spectrophotometry, scanning electron microscopy (SEM), cyclic voltammetry (CVA), electrochemical spectroscopy impedance (EIS). Concomitant use of complementary research methods generally give reason to assert the validity of findings made in the work.

The presence of four major metal ions (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}) in the native enzyme Preparations was revealed by AAS indicating that the formation of various catalytic and adsorption centers of protein molecule is possible. The natural bentonite was found to bind selectively ions of Cu^{2+} , the modified bentonite modified by phosphate ions - ions Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , aerosil-300 and kaolin - all four metal ions – (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}). This indicates the possibility of forming different catalytic centers on a mixture of enzymes oxidoreductases class, or a mixture of peroxidase superoxide dismutase.

The main influence on the functional properties of heterostructures has not the surface area but the number of acidic and basic centers on the surface of the carrier. Increasing the number of acid centers causes the selective binding of different oxidoreductases, which provides a significant effect on the electrochemical properties of synergy in studied systems. Increasing the number of alkaline centers on the surface of the inorganic carrier causes the selective binding of metal ions.

The complex of physical-chemical and electrochemical methods has established the difference in the mechanisms of metal-binding sites of the protein mole-

cules of native enzymes based on the implementation of the spatial separation of metal ions in enzymes that make up their composition. The implementation of such a division can increase oxidative activity and stability of the immobilized preparation and creates conditions for the formation of regions capable to specific (distributed) adsorption of charges.

According to the research the native enzyme immobilization on inorganic carriers and IR spectra data set change mechanism of linking enzymes with a carrier, which significantly affects the increase of its oxidative activity. Thus, in presence of bentonite oxidation reaction activity increased in 7 times, the modified bentonite phosphate ions gives rise in 3 times, for kaolin activity remains virtually unchanged, and at the silica-300 it increases in 4 times.

The influence of acid-base properties of the surface of the carrier in the enhancement of enzyme activity after immobilization on inorganic carriers is found. The macrostructure of active center formed by native enzymes, immobilized on inorganic carriers is established. The presence of two enzymes and two nucleotides in a system is confirmed. It is shown that depending on the nature of the carrier a mechanism of enzyme linking and activity changes.

For the first time it's shown that the redox – activity of immobilized native enzyme can be controlled using carriers possessing predominantly electronic or proton conductivity that affect the oxidation or reducing properties of the newly synthesized system. Analysis of the EIS spectra in Bode coordinates in presence of in all investigated systems is revealed the Θ resonant frequency domain which shifts the phase angle systems. These shifts are selected as key areas for the values $\sum = R + X$ of active and reactive resistance, and further calculations of total resistance and type of carriers. Based on this the numerical method is proposed to assess the impact of carrier material for redox - active heterostructure and its stability over time based on the values $\sum = R + X$ of active and reactive resistance of a system. The presence of high positive values $\sum = R + X$ leads to the initiation of electronic conductivity of immobilized enzyme. The reverse effect provides a carrier

that has a high negative value $\sum = R + X$, i.e., with high proton conductivity. The most efficient carrier for immobilized enzyme black radish preparation became aerosil - 300, which increased the proportion of electronic conductivity in presence of water.

With the application of the numerical method based on the values of active and reactive resistance, the possibility of assessing the impact on the redox carrier material - the final activity heterostructures and its stability over time is shown.

The presence of four main metal ions in enzyme preparations leading to the formation of various catalytic and adsorption centers of protein molecules is determined by the appearance of different surface structures. Based on image analysis of SEM it was revealed that on the bentonite and modified bentonite with basic surface active sites the enzyme forms endo-type structures with a gap of "internal" glycoside bonds on the surface of the enzyme protein molecule along which the substrate and positioned. In aerosil-300 with acidic surface the formation of the active center of exogenous type gaps of "external" glycoside bonds directed into the depth of protein molecule forms whose structure does not allow to accommodate more than a certain number of monomer units of the substrate. On kaolin, which is characterized by the presence of acidic and basic centers, chaotic structures are forming.

It's established that the acid-base properties of the media is a major factor in the binding selectivity of enzymes with the mixture. They provide the formation of different functions: basic environment creates sensory activity, and acidic - the capacity for energy storage.

EIS spectra of 0.5% aqueous suspension of native enzyme indicate that pure enzyme behaves as the electrolyte. The equivalent circuit is a typical for non-uniform electrolyte (Randls model).

Modeling of equivalent circuits of studied systems has established differences in the sequence of combining the elements in heterostructures with bentonite and its acidic form. The existence of inductance resistance in the circuit is connected, apparently, with the presence of redox - pair and protons, which have a magnet-

ic moment. This property is associated with changes in the structure of the carrier after immobilization. Typical schemes of heterostructures for bentonite and modified bentonite formal modeling electrolyte is associated with the formation kuazi homogenous system between the carrier and the enzyme. On the other hand, in presence of silica-300 and kaolin the two-phase system formation was observed, in which the physical process of charge transfer between the phases takes place only. Thus, typical equivalent models indicate different electrochemical properties of the synthesized heterostructures and their possible use as supercapacitors or biosensors. For the first only the physical transfer of charge is required, for others – charge transfer involved in redox - reaction.

Based on analysis of cyclic voltammetry of synthesized heterostructures inorganic carrier - enzyme the possibility of the usage of heterostructures as active layers (solid electrolyte) in the design of redox sensors and devices for energy storage was proven.

For the first time a system heterostructure - graphene - current collector designed, and the possibility of forming ultracapacitor in the system - aerosil-300 - enzyme - graphene and graphene - kaolin – enzyme is shown. The measured capacity values reached 95 F/g, which coincides to best developments of recent years in the field of energy storage devices from biomass.

It is proved that the specificity of binding to a carrier mainly iron complexes enables the use of synthesized heterostructures based on bentonite and its modified form as effective and promising platforms for the immobilization of enzymes in creating biosensors for glucose with high output signal.

The choice of material distribution, namely the use of Au – current collector is due to the high catalytic activity of enzymes. Using of other electrode (Pt) leads to the emergence of relatively high background current and further loss of sensitivity of the sensor.

Results of the study can be used to create cheap energy storage, biocompatible power sources and sensors with high signal.

Keywords: heterostructure, enzyme, immobilization, bentonite, modified bentonite, aerosil, kaolin, voltammetry, impedance, biosensor, supercapacitor.

Список публікацій здобувача

1. Вяткина О.В. Каталитическая активность пероксидазы редьки чёрной относительно неорганического субстрата $S_2O_3^{2-}$ / Вяткина О.В., Лаврентьева И.В., **Ермакова М.О.** // Ученые записки ТНУ им. В. И. Вернадского. – Серия «Биология и химия», 2011. – Т.24(63), №1. – С. 190–195. (*Особистий внесок здобувача: визначення середньої молярної активності ферменту, обговорення результатів, участь у написанні та оформленні статті*).
2. Вяткіна О. Каталітична активність пероксидази редьки чорної щодо субстратів- відновників різної природи / Вяткіна О., Лаврентьєва І., **Єрмакова М.** // Вісник Львівського ун-ту. – Сер. хімічна, 2012. – № 53. – С. 357–362. (*Особистий внесок здобувача: дослідження каталітичної дії ферменту, участь в підготовці рукопису і обговоренні результатів*).
3. **Ходыкина М.О.** Электрохимические свойства иммобилизованных ферментных препаратов *Raphanus sativus l. Var. Niger* на водонерастворимых подложках / **Ходыкина М.О.** Першина Е.Д., Каздобин К.А. // Укр. Хим. Журн. – 2015. – Т. 81, № 4. – С. 116–119. (*Особистий внесок здобувача: синтез гетероструктур, розшифровка ІЧ- спектрів, участь в підготовці рукопису і обговоренні результатів*).
4. Pershina K.D. Analysis of the activity of immobilized enzyme preparations of black horseradish using electrochemical impedance spectroscopy / Pershina K.D., **Khodykina M.O.**, Kazdobin K.A. // Surface Engineering and Applied Electrochemistry – 2015. – Vol. 51, No. 6. – pp. 572–580. (*Особистий внесок здобувача: іммобілізація неорганічних носіїв, дослідження каталітичної активності ферменту, обговорення результатів, написання та оформлення статті*).
5. **Ходыкина М.О.** Стабилизация нативного ферментного препарата на неорганических носителях каолине и аэросиле / Ходыкина М.О., Першина

- Е.Д., Каздобин К.А., Трунова Е.К. // Укр. Хим. Журн. – 2016. – Т. 82, № 9. – С. 57–63. (*Особистий внесок здобувача: синтез гетероструктур, участь в підготовці рукопису і обговоренні результатів*).
6. **Khodykina M.O.** Immobilization of the *Raphanus sativus l. Var. Niger* enzyme preparation on natural bentonite and bentonite modified by phosphate ions / **Khodykina M.O.**, Pershina K.D., Kazdobin K.A., Trunova E.K. // Surface Engineering and Applied Electrochemistry – 2017. – Vol. 53, No. 2. – pp. 196–201. (*Особистий внесок здобувача: іммобілізація препарату, розшифровка SEM зображень, обговорення результатів, написання та оформлення статті*).
 7. Субстратна специфічність пероксидази редьки чорної, що іммобілізована на бентоніті / Лаврентьєва І.В., **Єрмакова М.О.**, Вяткіна О.В. // 13 наук. Конф. «Львівські хімічні читання - 2011» – Львів, Україна. – 28 травня-1 червня 2011. – С. 23.
 8. Иммобилизация как метод стабилизации и повышения активности растительных пероксидаз / Вяткина О.В., **Єрмакова М.О.** // Международная конференция «Прикладная физико - неорганическая химия» – Севастополь, Украина. – 2-7 октября 2011. – С. 243.
 9. Влияние природы подложки на каталитическую активность пероксидазы редьки черной относительно фенольных субстратов в водных системах / **Єрмакова М.О.**, Вяткина О.В. // Зб. тез IV Міжнар. Конф. студентів, аспірантів та молодих вчених НТУУ “КПІ”, ХТФ – Київ, Україна. – 4-6 квітня 2012. – С. 233.
 10. Анализ каталитической активности пероксидазы редьки чёрной методом спектроскопии импеданса / **Ходыкина М.О.**, Каздобин К.А. // Зб. тез Восьмої Всеукраїнської наукової конференції студентів, аспірантів і молодих учених «Хімічні проблеми сьогодення» – Донецьк, Україна. – 17-20 березня 2014. – С. 65.
 11. Электрохимическая оценка совместимости носителя и фермента / Каздобин К.А., Першина Е.Д., **Ходыкина М.О.**, Коханенко В.В. // Збірник тез

- XIX Української конференції з неорганічної хімії за участю закордонних учених – Одеса, Україна. – 7-11 вересня 2014. – С. 123.
12. Electrochemical activity of immobilized enzyme preparation of black horseradish on inorganic carries / **Khodykina M.O.**, Pershina K.D., Kazdobin K.A. // 7th International Conference on Chemistry and Chemical Education «Sviridov readings - 2015» – Minsk, Belarus. – April 7-11, 2015. – P. 78.
 13. Адсорбционные явления при иммобилизации оксидоредуктаз на поверхности дисперсных алюмосиликатов / **Ходыкина М.О.**, Першина Е.Д., Каздобин К.А. // 36. тез Всеукраїнської конф. з міжнародною участю «Хімія, фізика і технологія поверхні» – Київ, Україна. – 13-15 травня 2015. – С. 70.
 14. Природа иммобилизации ферментного препарата *Raphanus sativus l. Var. Niger* на водонерастворимых неорганических подложках / **Ходыкина М.О.**, Каздобин К.А., Трунова Е.К., Першина Е.Д // VIII Всеукраїнська наукова конференція студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання-2016» – Харків, Україна. – 18-20 квітня 2016. – С. 197-198.
 15. Electrochemical properties of composites based on the system of the immobilized enzyme preparation *Raphanus sativus l. Var. Niger* – graphene / **Khodykina M.O.**, Pershina K.D., Kazdobin K.A. // 36. тез Всеукраїнської конференції з міжнародною участю «Хімія, фізика і технологія поверхні» – Київ, Україна. – 17-18 травня 2016. – С. 65.
 16. Voltammetric Responses of Black Horseradish Enzyme preparation immobilized on Kaolin and Aerosil / **Khodykina M.O.**, Pershina K.D., Kazdobin K.A., Shulga S.V. // The 8th Int. Conference on Materials Science and Condensed Matter Physics – Chisinau, Moldova. – September 12-16, 2016. – P. 296.
 17. **Ходыкина М.О.** Физико-химические свойства композитных материалов на основе неорганических силикатов и ферментного препарата // Тез. Конф. Молодых ученых Института общей и неорганической химии им. В.И. Вернадского НАН Украины – Киев, Украина. - 17-18 ноября 2016. – С. 22-23.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ.....	18
ВСТУП.....	20
РОЗДІЛ 1 ФІЗИКО ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ОРГАНОМІНЕРАЛЬ- НИХ ГЕТЕРОСТРУКТУР (літературний огляд).....	26
1.1 Знаходження в природних об'єктах, структурні особливості і будова оксидоредуктаз	27
1.2 Механізми формування редокс - активності оксидоредуктаз.....	28
1.3 Електрохімічні властивості оксидоредуктаз.....	32
1.3.1 Електрохімічні методи досліджень ферментів.....	33
1.4 Імобілізація ферментів. Види імобілізації ферментів на неоргані- чних носіях.....	34
1.4.1 Адсорбційна імобілізація.....	36
1.4.2 Механізми імобілізації оксидоредуктаз на неорганічних носіях...	37
1.4.3 Способи ковалентного зв'язування ферменту з носієм.....	39
1.5 Електрохімічні системи на основі органо-мінеральних гетероструктур..	41
1.5.1 Електрохімічні сенсори.....	41
1.5.1.1 Амперометричні сенсори.....	41
1.5.1.2 Потенціометричні сенсори.....	43
1.5.1.3 Ємнісні сенсори.....	43
1.5.2 Паливні елементи.....	43
1.5.3 Суперконденсатори.....	44
1.5.3.1 Конструкційні особливості суперконденсаторів.....	44
1.6 Висновки. Постановка завдань дослідження.....	46
РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ МЕТОДИКИ ТА АПАРАТУРА.....	48
2.1 Об'єкти дослідження.....	48
2.1.1 Виділення ферментного препарату з рослинної сировини.....	48
2.1.2 Імобілізація ферментного препарату.....	49
2.1.3 Неорганічні носії.....	49

2.1.4 Вихідні реактиви.....	53
2.1.4.1 Визначення вмісту гідроген пероксиду.....	53
2.2 Методи дослідження.....	54
2.2.1 Поглинання ферментного препарату на носіях.....	54
2.2.2 Визначення середньої ферментативної активності.....	55
2.2.2.1 Фотоколориметричне визначення гідрохінону.....	56
2.2.3 Визначення кількості кислотно - основних центрів на поверхні носіїв методом потенціометричного титрування.....	57
2.2.4 Визначення ізоелектричної точки у ферментному препараті та синтезованих гетероструктурах.....	58
2.2.5 Визначення компонентного складу ферментного препарату.....	59
2.2.6 Спектральні методи дослідження.....	59
2.2.7 Циклічна вольтамперометрія.....	60
2.2.8 Спектроскопія електрохімічного імпедансу.....	61
2.2.8.1 Вимірювання імпедансу.....	61
2.2.8.2 Комплексний опір і комплексна електропровідність.....	63
2.2.9 Методики формування електродів для амперометричних сенсорів і дослідження їх характеристик.....	65
2.3 Висновки до розділу 2.....	66
РОЗДІЛ 3. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ СИСТЕМИ НЕОРГАНІЧНИЙ НОСІЙ - ФЕРМЕНТНИЙ ПРЕПАРАТ ЯК ГЕТЕРОСТРУКТУРИ.....	68
3.1 Елементний склад і властивості нативного ферментного препарату...	68
3.2 Спектральні характеристики гетероструктур.....	71
3.3 Утворення поверхневих сполук з перенесенням заряду	79
3.4 Висновки до розділу 3.....	81
РОЗДІЛ 4. ФОРМУВАННЯ РЕДОКС-АКТИВНОСТІ ГЕТЕРОСТРУКТУР НА ОСНОВІ НЕОРГАНІЧНИХ НОСІЇВ І ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТУ.....	83

4.1 Морфологічні характеристики поверхні гетероструктур фермент – носій.....	83
4.2 Редокс – властивості синтезованих гетероструктур.....	90
4.3 Закономірності перенесення заряду в системі неорганічний носій - нативний ферментний препарат – електроліт.....	95
4.4 Висновки до розділу 4.....	103
РОЗДІЛ 5. ЗАСТОСУВАННЯ ГЕТЕРОСТРУКТУР ФЕРМЕНТНИЙ ПРЕПАРАТ – НЕОРГАНІЧНИЙ НОСІЙ В ЕЛЕКТРОХІМІЧНИХ ПРИСТРОЯХ.....	105
5.1 Електрохімічні властивості синтезованих гетероструктур.....	105
5.2 Амперометричний глюкозний біосенсор на основі гетероструктури: неорганічний носій - іммобілізований ферментний препарат.....	113
5.3 Висновки до розділу 5.....	118
ВИСНОВКИ.....	120
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ.....	122

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ

ААС – атомно-абсорбційна спектроскопія;

ПЕШ – подвійний електричний шар;

ІК – інфрачервона спектроскопія;

УФ – ультрафіолетова спектроскопія;

СЕМ – скануюча електронна мікроскопія;

ЦВА – циклічна вольтамперометрія;

СЕІ – спектроскопія електрохімічного імпедансу;

СРЕ – елемент постійної фази (Constant Phase Element);

ЕСП – електронні спектри поглинання;

НФП – нативний ферментний препарат;

«ч.д.а» – чистий для аналізу;

«х.ч.» – хімічно чистий;

«ч.» – чистий;

E_M – еквівалент;

M – молярна маса, г/моль;

f – фактор еквівалентності;

$C_{об}$ – об'ємна концентрація речовини, %;

τ – час, с/хв/год;

N – ступінь зв'язування фермента з носієм, %;

$D_{поч}$ – початкова оптична густина розчину фермента;

$D_{кін}$ – кінцева оптична густина розчину фермента;

\bar{A} – активність, о.а.;

о.а. – одиниці активності, мкмоль/мл·мл;

C_M – молярна концентрація, моль/л (M);

V – об'єм, мл;

λ – довжина хвилі, нм;

α – ступінь дисоціації в даний момент титрування, %;

V_0 – амплітуда напруги, В;

- I_0 – амплітуда струму, А;
 f – частота, Гц;
 θ – фазовий зсув, град;
 χ – питома електропровідність, См/см²;
 t_+ – рухливість протона;
 R_H – константа Холла, м⁻¹·Кл⁻¹;
 $J = \sqrt{-1}$
 ω – кругова частота, рад;
 n – експонентний фактор;
 ε – діелектрична проникність, Ф/м;
 C_{ef} – ефективна ємність, Ф;
 L – індуктивність, Гн;
 X – реактивний опір, Ом;
 R – активний опір, Ом;
 S – площа, см²;
 q – заряд, Кл;
 ρ – густина заряду, Кл/м³;
 t_{\pm} – рухливість заряду, См/см.

ВСТУП

Актуальність теми. Сьогоднішні зусилля вчених спрямовані на пошуки нових матеріалів для поновлюваних «зелених» джерел енергії. Пріоритети досліджень зміщуються в область створення структур, що складаються з носія та активного шару, які мають здатність до гетеропереходів, що надає можливість їх застосування в біо- і хемосенсориці, фото- та хімічних джерелах струму. Розділення зарядів в таких матеріалах можливе тільки за умови, якщо носій та сполука формує шарувату структуру, яка здатна до гетеропереходів. Органомінеральні гетероструктури вже стали інноваційною альтернативою для сенсibiliзованих сонячних елементів, тому що вони обумовлені взаємодією обох систем. Однак, досі не існує чіткого визначення взаємозв'язку між природою поверхні носія зі сполуками, що мають супрамолекулярну будову, для розширення сфер їх подальшого застосування.

Рослинні ферменти є типовими представниками супрамолекулярних структур, які мають здатність до редокс-перетворень, з одного боку, та з другого - є поновлюваними джерелами. Активність ферменту до конкретного субстрату визначається його структурними особливостями і хімічною природою субстрату. Наявність таких властивостей дозволили сформулювати основні принципи селективної взаємодії субстрату з ферментом, що передбачають диференціацію каталітичних центрів для субстратів різної природи. Тому вони представляють інтерес як компоненти біосенсорів і енергоперетворюючих пристроїв. Регулювання структурних, хімічних і каталітичних властивостей нативних ферментів з використанням іммобілізації на неорганічних матеріалах (створення гетероструктур) не тільки стабілізують ферменти у водних середовищах, а й підвищують їх електрохімічну активність, що призводить до розширення можливостей використання ферментних систем. Це обумовлено тим, що гетероструктури за участю ферментів полегшують транспорт заряду завдяки утворенню розподілених каталітичних центрів. Носій і механізм зв'язування ферменту з ним є основними факторами формування електронно- і протонноакцепторної активності новоствореної структури.

Нині існують два підходи до створення гетероструктур для перетворення енергії. У першому основна маса робіт з іммобілізації чистих індивідуальних ферментів присвячена їх закріпленню на поверхні різних вуглецевих матеріалів (графен, нанотрубки) з метою підвищення електропровідності нового матеріалу. Другий підхід - використання неорганічних матеріалів, переважно силікатів, і органічних полімерів, для створення високочутливих біосенсорів і біокаталізаторів - використовується у поодиноких випадках. Гетероструктури із застосуванням суміші нативних ферментних препаратів (НФП) досі не досліджувались.

Тому визначення взаємозв'язків між фізико-хімічними (кислотно-основними, каталітичними, спектральними, морфологічними) та електрохімічними властивостями ферменту та носія, що впливають на властивості кінцевої гетероструктури має як фундаментальне, так і важливе практичне значення.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана відповідно до планів науково-дослідних робіт Інституту загальної та неорганічної хімії ім. В.І. Вернадського НАН України «Розробка електрохімічних систем з малою перенапругою катодних та анодних процесів та високоекономічних електролізерів для одержання водню високої чистоти», № Держреєстрації 0110U001650 (2012-2014 р.) та «Синтез і фізико-хімічні властивості неорганічних електрокаталізаторних систем на основі карбіду вольфраму, модифікованого металами Ib (Cu, Ag), IVb (Ti, Zr, Hf) та Vb (V, Nb, Ta) підгруп, для альтернативної електрохімічної енергетики», № Держреєстрації 0110U001650 (2015 – 2017 р.).

Мета і задачі дослідження. Метою даної роботи є встановлення закономірностей впливу природи неорганічного носія з різною структурою та фізико-хімічними властивостями на зв'язування нативних ферментних препаратів класу оксидоредуктаз (на прикладі витяжки з коренеплоду редьки чорної); застосування одержаних гетероструктур в якості активних мас електродів для енергоперетворюючих пристроїв та біосенсорів.

Для досягнення даної мети необхідно було вирішити наступні задачі:

- Визначити фізико-хімічні властивості неорганічних носіїв різної природи (бентоніт, модифікований фосфат-іонами бентоніт, каолін, пірогенний кремнезем), що відповідають за утворення гетероструктур з ферментним препаратом класу оксидоредуктаз;
- Дослідити вплив кислотно – основних властивостей носія на зміну редокс - активності в системах нативний ферментний препарат на основі оксидоредуктаз, іммобілізований на цих носіях;
- Визначити вплив структурних та морфологічних особливостей мінерального носія на стабільність редокс - активності іммобілізованого нативного ферментного препарату;
- Виявити взаємозв'язок особливостей зв'язування з електрохімічною активністю гетероструктур в системі неорганічний носій - нативний ферментний препарат;
- Випробувати синтезовані гетероструктури як активні маси для створення суперконденсаторів та біосенсорів.

Об'єкт досліджень: гетероструктури в системі неорганічний носій (бентоніт, модифікований фосфат-іонами бентоніт, каолін, пірогенний кремнезем) - нативний ферментний препарат класу оксидоредуктаз.

Предмет досліджень: закономірності утворення, фізико-хімічні та електрохімічні властивості гетероструктур в системі неорганічний носій - нативний ферментний препарат класу оксидоредуктаз.

Методи дослідження. В роботі використано: пряма потенціометрія та потенціометричне титрування – визначення кількості кислотно-основних центрів на поверхні носіїв. Фотоколориметрія – визначення концентрацій гідроксінону в досліджених системах. Інфрачервона (ІЧ) спектроскопія - вивчення особливостей будови досліджених матеріалів. Ультрафіолетова (УФ) спектроскопія - вивчення особливостей будови нативного ферментного препарату. Атомно-абсорбційна спектрофотометрія (ААС) – визначення компонентного складу ферментного препарату по іонам металів. Спектрофотомет-

рія – визначення активності нативного ферментного препарату. Скануюча електронна мікроскопія (SEM) - дослідження мікротекстури досліджених зразків. Циклічна вольтамперометрія (ЦВА) – дослідження електрохімічних властивостей отриманих гетероструктур. Спектроскопія електрохімічного імпедансу (SEI) – дослідження механізмів електропровідності отриманих систем.

Наукова новизна одержаних результатів. У роботі вперше:

- встановлено, що кислотно-основні властивості носія є основним фактором впливу на селективність зв'язування ферментів із суміші; вони забезпечують формування систем з різними функціями: основне середовище формує сенсорну активність, а кисле – здатність до накопичування енергії;
- методами спектроскопії, елементного аналізу та скануючої електронної мікроскопії доведено зміну селективності зв'язування ферментів із рослинної суміші (нативного ферментного препарату), завдяки просторовому поділу ферментів по іонам металів, що входять до їх складу;
- методом спектроскопії електрохімічного імпедансу показано, що формування гетероструктур призводить до зміни природи електропровідності в залежності від хімії поверхні неорганічного носія: з електронної на протонну та навпаки;
- аналізом даних циклічної вольтамперометрії та спектроскопії електрохімічного імпедансу показана можливість формування структур, що відповідають за накопичення енергії в неорганічних системах з іммобілізованими ферментами.

Практичне значення одержаних результатів:

- Одержано гетероструктури з редокс- активністю вищою, ніж у вихідному субстраті, здатні зберігати окислювальну активність в часі.
- Створено систему, що моделює суперконденсатор, а також показана можливість формування підвищеної ємності у гетероструктурах з неспецифічним зв'язуванням фрагментів ферменту з носієм. З'ясовано, що в залеж-

ності від природи носія можливо створення електрохімічних систем, які здатні заряджатися й мають високу питому ємність – до 95 Ф/г.

- Встановлено можливість формування сенсорних властивостей гетероструктур на визначення глюкози на основі бентоніту та його модифікованої форми за рахунок селективного зв'язування активних центрів за участю йонів Fe^{3+} та Cu^{2+} , що дозволяє розглядати їх в якості перспективної основи для створення редокс- сенсорів з високим вихідним сигналом.

Особистий внесок здобувача. Вибір та обґрунтування тематики наукових досліджень, формулювання мети роботи, постановки завдань, які необхідно було розв'язати для її реалізації, обговорення вихідних положень та інтерпретація основних експериментальних результатів, формулювання узагальнень та висновків дисертаційної роботи проводилися спільно з науковим керівником – д.х.н., ст.н.с. К.О. Каздобіним.

Дисертантка особисто виконала експериментальну роботу по виділенню ферментного препарату з рослинної сировини та його іммобілізацію на неорганічних носіях, проаналізувала дані ІЧ- та УФ- спектроскопії, провела та узагальнила обробку одержаних експериментальних даних, дослідила електрохімічну активність гетероструктур, провела апробацію макетів гібридних систем, що моделюють суперконденсатор та амперометричний сенсор, систематизувала дані літературного огляду, оформила матеріали дисертації.

Атомно-абсорбційну, ІЧ- та УФ- спектрофотометрію проведено у співробітництві з к.х.н. Шовковою Г.В., пров. інж. Бистрик О.В. Аналіз електронних спектрів ферментного препарату проведено спільно з д.х.н. Труною О.К. СЕМ природних та синтезованих гетероструктур здійснено спільно з к.х.н. Бережницькою О.С. (ІЗНХ ім. В.І. Вернадського НАН України). Електрохімічні дослідження (ЦВА, СЕІ) проведено спільно з д.х.н. Першиною К.Д. (Міжвідомче відділення електрохімічної енергетики НАН України).

Апробація результатів дисертації. Основні результати дисертації представлені та обговорені на наукових конференціях: 13 науковій конферен-

ції «Львівські хімічні читання – 2011» (28 травня-1 червня 2011 р., м. Львів), Міжнародній конференції «Прикладна фізико-неорганічна хімія» (2-7 жовтня 2011 р., м. Севастополь), IV Міжнародній конференції студентів, аспірантів та молодих вчених з хімії та хімічної технології (4-6 квітня 2012 р., м. Київ), VIII Всеукраїнській науковій конференції студентів, аспірантів і молодих учених з міжнародною участю «Хімічні проблеми сьогодення» (17-20 травня 2014 р., м. Донецьк), XIX Українській конференції з неорганічної хімії з міжнар. участю (7-11 вересня 2014 р., м. Одеса), VII Міжнародній науковій конференції з хімії та хімічної освіти «SVIRIDOV READINGS – 2015» (7-11 квітня 2015 р., м. Мінськ, Білорусь), Всеукраїнській конференції з міжнар. участю «Хімія, фізика і технологія поверхні» (13-15 травня 2015 р., 17-18 травня 2016 р., м. Київ), VIII Всеукраїнській науковій конференції студентів та аспірантів «Хімічні Каразінські читання» (18-20 квітня 2016 р., м. Харків), VIII Міжнародній конференції «Матеріалознавство і фізика конденсованих середовищ» (12-16 вересня 2016 р., м. Кишиневу, Молдова), конференції молодих вчених ІЗНХ ім. В.І. Вернадського (17-18 листопада 2016 р., м. Київ).

Публікації. За результатами дисертаційної роботи опубліковано 6 статей у фахових вітчизняних та зарубіжних виданнях, тези 11 наукових доповідей на міжнародних та всеукраїнських наукових конференціях.

Структура та обсяг дисертації. Дисертаційна робота складається зі вступу, п'яти розділів, висновків, списку цитованої літератури (151 найменування). Робота викладена на 136 сторінках друкованого тексту, містить 51 рисунок та 30 таблиць.

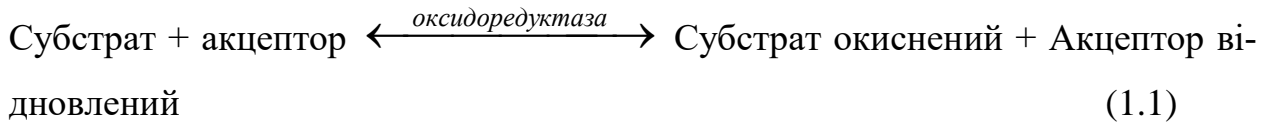
РОЗДІЛ 1 ФІЗИКО ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ ОРГАНО-МІНЕРАЛЬНИХ ГЕТЕРОСТРУКТУР (літературний огляд)

Широке застосування нанокompозитних матеріалів і гетероструктур обумовлює пошук нових компонентних складів таких матеріалів. Зокрема, це ферменти і ферментні системи, оскільки вони володіють унікальним комплексом фізико-хімічних властивостей (групова субстратна специфічність і висока каталітична активність), що робить їх перспективними в біо - і хемосенсориці, хімічних джерелах струму, мікроелектроніці, біоінженерії в порівнянні з індивідуальними речовинами . Електрохімічні системи на основі ферментів здатні полегшувати електронний транспорт завдяки власній селективності і редокс - активності, які є функцією електроно - і протонаакцепторної здатності ферменту [1]. Особливо перспективним є переведення нативного біокаталізатора в іммобілізовану форму на різних носіях неорганічної та органічної природи, які не тільки стабілізують ферменти в різних середовищах, але й підвищують їх активність.

Особливий інтерес представляє використання неорганічних носіїв для іммобілізації ферментів класу оксидоредуктаз, що мають високу редокс - активність. При використанні таких носіїв можливе утворення гетероструктур, які володіють високою селективністю, чутливістю щодо кисню, гідроген пероксиду та озону, і стабільністю в широкому температурному діапазоні. Це робить їх перспективними для розробки датчиків, біокаталізаторів, та для сучасних пристроїв перетворення енергії [3]. Таким чином, практична необхідність в таких пристроях диктує необхідність дослідження і створення нових композитних систем на їх основі.

1.1 Знаходження в природних об'єктах, структурні особливості і будова оксидоредуктаз

До класу оксидоредуктаз належать ферменти, що каталізують реакції окиснення-відновлення. Загальна схема їх може бути представлена наступним чином:



Окиснення протікає як віддача атомів Н (електронів) від субстрату, а відновлення - як приєднання атомів Н (електронів) до акцептора. Рівняння реакції окиснення-відновлення за участю оксидоредуктаз має вигляд:



де А – акцептор, а В – субстрат.

Характерною особливістю оксидоредуктаз є їх здатність утворювати системи (так звані ланцюги окисно-відновних ферментів), в яких здійснюється багатоступінчасте перенесення атомів Н (електронів) від первинного субстрату до кінцевого акцептору, яким є, як правило, кисень, в результаті чого утворюється вода.

Розрізняють такі класи оксидоредуктаз - аеробні дегідрогенази або оксидази та анаеробні дегідрогенази або редуктази. Перші переносять атоми Н або електрони безпосередньо на кисневі атоми, а інші - атоми Н і електрони від одного компонента окислювального ланцюга ферментів до іншого без передачі їх на кисневі атоми [4].

Головна особливість оксидоредуктаз полягає в тому, що вони прискорюють перебіг хімічних реакцій, пов'язаних з вивільненням енергії, яка використовується як для забезпечення синтетичних процесів в організмі, так і для інших потреб.

Оксидоредуктази - двокомпонентні ферменти з вельми обмеженим набором активних груп (коферментів), здатні прискорювати велику кількість

найрізноманітніших окисно-відновних реакцій. Це досягається за рахунок того, що один і той самий кофермент здатний з'єднуватися з багатьма апоферментами, утворюючи щораз оксидоредуктази, специфічні по відношенню до того чи іншого субстрату або акцептору.

У природних об'єктах виявлено близько п'ятисот індивідуальних оксидоредуктаз [5]. Класифікація та відмінні риси пероксидаз рослинного походження наведені у таблиці 1.1.

1.2 Механізми формування редокс - активності оксидоредуктаз

Основним ферментом класу оксидоредуктаз, що становлять інтерес для композитних редокс - матеріалів є пероксидаза. Фермент здатний каталізувати реакції оксидазного, пероксидазного та оксигеназного окиснення субстратів. Не володіючи специфічністю в реакціях індивідуального пероксидазного окиснення, фермент здатний набувати вибірковість в реакціях спільного окиснення субстратів [6]. Хоча участь ферменту в оксигеназних реакціях мало досліджена.

Наявність у ферменту двох різних функцій (оксидазної та пероксидазної) дозволяє припустити, що в каталітичній дії ферменту можуть брати участь два незалежних активних центра пероксидази, просторово розділених, хоча і близько розташованих один від одного на молекулі ферменту. Така поліфункціональність пероксидази модулюється іонами металів і станом мікросередовища поблизу молекули. При цьому ідентифікація пероксидазного і оксидазного ділянок ферменту утруднена через недостатність кількісних даних про деталі структури пероксидази та її молекулярної неоднорідності [7].

Таблиця 1.1 – Класифікація та відмінні особливості пероксидаз

Суперсемейство рослинних пероксидаз	Клас	Фермент	Іони металів	Оптимальна рН стійкість	Білкові залишки	
	I мікробіальні пероксидази	Дріжджова цитохром c пероксидаза	Cu			Білки не глікозовані, й не містять ані дисульфідних зв'язків, ані іонів Ca ²⁺
		Аскорбатпероксидаза		pH = 6,5–7,5		
		Бактеріальна каталаза-пероксидаза				
	II пероксидази грибів	Лігнінпероксидаза	Fe	pI* = 3,2–4,7	Ферменти - мономерні глікопротеїди, характерна наявність чотирьох дисульфідних зв'язків і двох консервативних кальцій-зв'язуючих доменів	
		Манган-пероксидаза	Mn	pI = 3–4		
Лакказа		Cu	pI = 3,0–5,1			
Секреторна пероксидаза рослинного типу			pH = 7			
III класичні пероксидази рослин	Пероксидаза хрону Пероксидаза арахісу Пероксидаза сої	Fe	pI = 9 pH = 6–8	Мономерні глікопротеїди, мають чотири дисульфідні зв'язки і два кальцій-зв'язуючих центра, проте розташування дисульфідних зв'язків та «укладання» поліпептидного ланцюга в пероксидазі другого і третього класів дещо різняться		

pI* - ізоелектрична точка

Таблиця 1.2 – Класифікація оксидоредуктаз щодо координованого іона металу

Клас оксидоредуктаз	Класифікація	Фермент	Іони металів	
Оксидази	Металоферменти	Глюкозо-6-фосфатаза Гексокіназа ДНК-полімераза	Mg	
		Гемованадін	V	
		Аргіназа	Mn	
		Каталаза, Пероксидаза, Гідрогеназа, Аконітаза	Fe	
		Уреаза, Гідрогеназа	Ni	
		Цитохром с-оксидаза, Лакказа	Cu	
		Алкогольдегідрогеназа Карбоксипептидаза Амінопептидаза Бета-амілоїд	Zn	
		Нітратредуктаза	Mo	
		Глутатіонпероксидаза Монодейодиназа	Se	
		Флавопротеїди (Простетична група представлена флавінаденіндинуклеотидом (ФАД) або флавінмононуклеотидом (ФМН))	Ксантин-оксидаза Альдегідоксидаза Ацил-КоА-дегідрогеназа	негемове Fe

Структура каталітичного центру пероксидази в різних станах представлена на рис. 1.1. Основний стан представлено феррі-ферментом, який при одоелектронному відновленні утворює ферро-форму; остання приєднує молекулу кисню і утворює так звану сполуку III - оксидазний цикл.

Пероксидазний каталітичний цикл починається зі швидкої взаємодії ферменту й H_2O_2 з утворенням так званої сполуки I, яка містить 2 окислювальних еквівалента: оксиферил - гем та вільний радикал. Сполука I відновлюється донором електронів з утворенням сполуки II, а потім нативного ферменту.

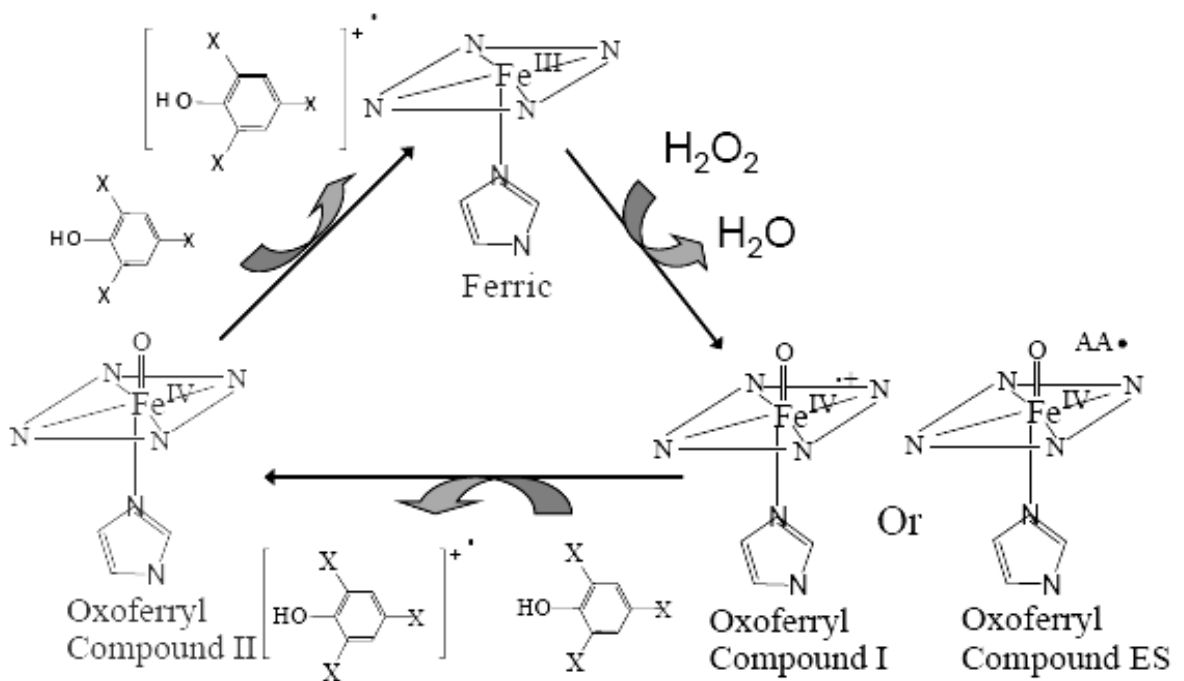


Рисунок 1.1 – Структура каталітичного центру пероксидази в різних станах

Під дією надлишку гідроген пероксиду сполука II утворює сполуку III, проте, при такому утворенні вона швидко розкладається під дією надлишку гідроген пероксиду [8-9].

Фермент може проявляти оксидазну (субстрат окисник O_2) і оксигеназну активність. Оксигенази активують молекулу кисню, а потім впроваджують один або два атоми кисню в молекулу окислюваної речовини. Участь ферменту в ок-

сигеназних реакціях мало досліджена. Оксигеназний цикл, як передбачається, діє при окисненні гормону росту рослин, індолілуксусної кислоти [10].

Вперше модель активної частини пероксидази хрому була представлена в роботі [11], і з тих пір не зазнала змін.

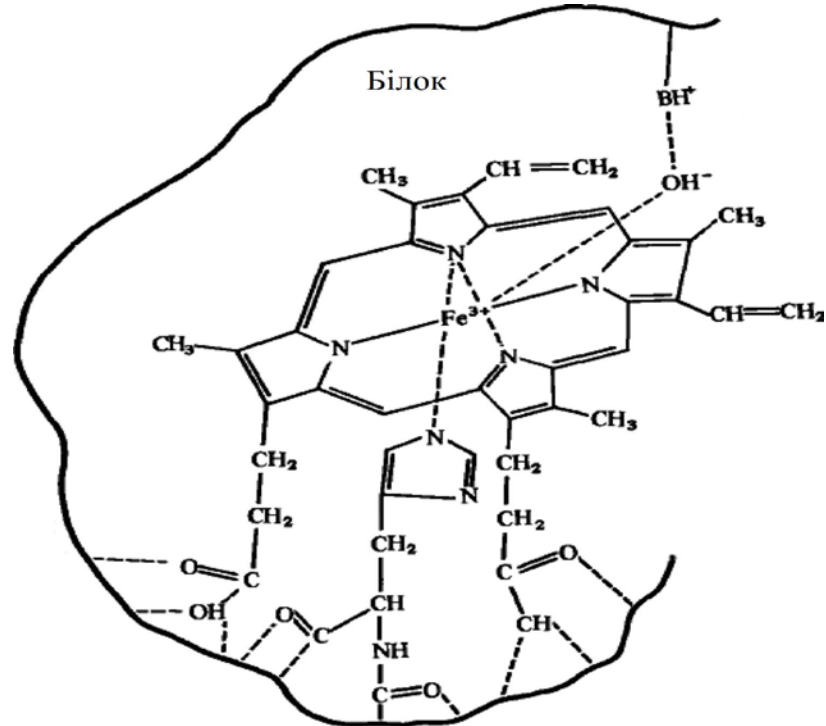


Рисунок 1.2 – Модель активної частини пероксидази хрому

На рис. 1.2 показано оголені сектора простетичної гемової частини, в яких відбувається перехід електронів від субстрату.

1.3 Електрохімічні властивості оксидоредуктаз

Оксидоредуктази - це ферменти, які каталізують перенесення відновлених еквівалентів від донора до акцептора. Спроби реалізації перенесення електрона між редокс-парою та оксидоредуктазою повинні враховувати внутрішні природні властивості цих ферментів [12]. Дослідження механізмів електронного перенесення в ферментах класу оксидоредуктаз розпочаті у 80-х роках ХХ ст. [13]. Першими каталізаторами і медіаторами були залізо-сірчані білки, тіоредоксини і флавін. Різниця потенціалів нових ферментів коливалася в діапазоні від -500 mV до +200 mV і

була доступна в якості джерела енергії для живих систем. Згодом різниця потенціалів була розширена до 1300 mV. Таким чином, енергія окисно-відновних реакцій дозволила вирішити задачу перенесення одного або декількох електронів, оминаючи утворення високореактивних і цитотоксичних радикалів. Заряд може переноситися електронами, протонами, катіонами, аніонами та нейтральними сполуками. У великих молекулах ферментів відсутній безпосередній контакт з носіями заряду, і перенесення досягається за рахунок механізмів, що залучають фрагмент органічної макромолекули [14].

Структури і можливості доступу до активних центрів залізо-сірчаних білків, флавопротеїдів, цитохромів і білків міді корелюють з можливостями електронного обміну між штучними медіаторами і модифікованими електродами. При цьому необхідно дотримуватись певної орієнтації (конформації) білкової молекули і електрода. Використання спеціально модифікованих електродів, наприклад, на основі електропровідних полімерів, пропонується в якості одного з варіантів прямого перенесення електрона в білках [15].

1.3.1 Електрохімічні методи досліджень ферментів

У ферментах класу оксидоредуктаз представлені найбільш розповсюджені типи окисно-відновних центрів, які вивчені різними електрохімічними методами. При опосередкованому (непрямому) або прямому перенесенні електронів між електродами і білком спостерігаються результати, які узгоджуються з їх структурними особливостями.

Для визначення сфери практичного застосування оксидоредуктаз в біоелектрохімії необхідно систематично комбінувати інформацію щодо структури білка і конформації активного центру молекули, спостерігаючи при цьому за її електрохімічною поведінкою. Для деяких оксидоредуктаз редокс стан надає модулюючий або регуляторний вплив на їх діяльність, наприклад співвідношення тіолу до дисульфідних груп в деяких білках, і у флавопротеїдах [16]. Аналогічним чином, закріплення субстрату може викликати конфо-

рмаційні зміни і зсуви окисно-відновних потенціалів, а також впливати на електронно-транспортний механізм і кінетику.

Систематичні дослідження поверхні електрода і його модифікацій, на електрохімічну поведінку адсорбованих білків і розроблення нових методів зв'язування, включає в себе використання електропровідних полімерів з каталітичними властивостями на основі механізмів дії оксидоредуктаз [17].

Орієнтована іммобілізація маленьких біомолекул, з доступними окисно-відновними центрами на поверхні електрода може бути способом перенесення електронів на великі оксидоредуктази з прихованими центрами, імітуючи природні механізми електронного транспорту [18-19].

1.4 Іммобілізація ферментів. Види іммобілізації ферментів на неорганічних носіях

Одним з механізмів формування гетероструктур є іммобілізація ферментного препарату на носіях різної структури (природи). При цьому вибір механізму зв'язування впливає на формування гетероструктури в цілому.

Термін «іммобілізовані ферменти» узаконений порівняно нещодавно, в 1974 р. Сандерсом і Реєм, хоча ще в 1916 р. Нельсон і Гриффі показали, що інвертаза, адсорбована на вугіллі або алюмогелі, зберігає свою каталітичну активність [20]. Однак початок цілеспрямованих досліджень, орієнтованих на створення такого роду стабілізованих ферментних каталізаторів, відноситься до середини ХХ століття.

Відповідно до одного з прийнятих визначень, під іммобілізацією ферменту розуміється його включення в яку-небудь ізольовану фазу, яка відокремлена від фази вільного розчину, але здатна обмінюватися з розташованими в останній молекулами субстрату [21]. На підставі цього визначення всі існуючі методи іммобілізації поділяються на 2 групи: фізичні та хімічні.

Методи фізичної іммобілізації (тобто іммобілізації, при якій фермент не з'єднаний з носієм ковалентними зв'язками) можна розділити на чотири

групи (рис. 1.3): 1 - адсорбція на нерозчинних носіях; 2 - включення в пори гелю; 3 - просторове відділення ферменту від решти обсягу реакційної системи за допомогою напівпроникної перегородки (мембрани); 4 - включення в двофазне середовище, де фермент розчинний, і може знаходитися тільки в одній з фаз [22].

Головною відмінністю хімічних методів іммобілізації є те, що шляхом хімічного впливу на структуру ферменту в його молекулі створюються нові ковалентні зв'язки, зокрема між білком і носієм [23]. Препарати іммобілізованих ферментів, отримані із застосуванням хімічних методів, володіють двома важливими перевагами: високою міцністю утвореного кон'югату, підвищеною субстратною специфічністю і каталітичною активністю.

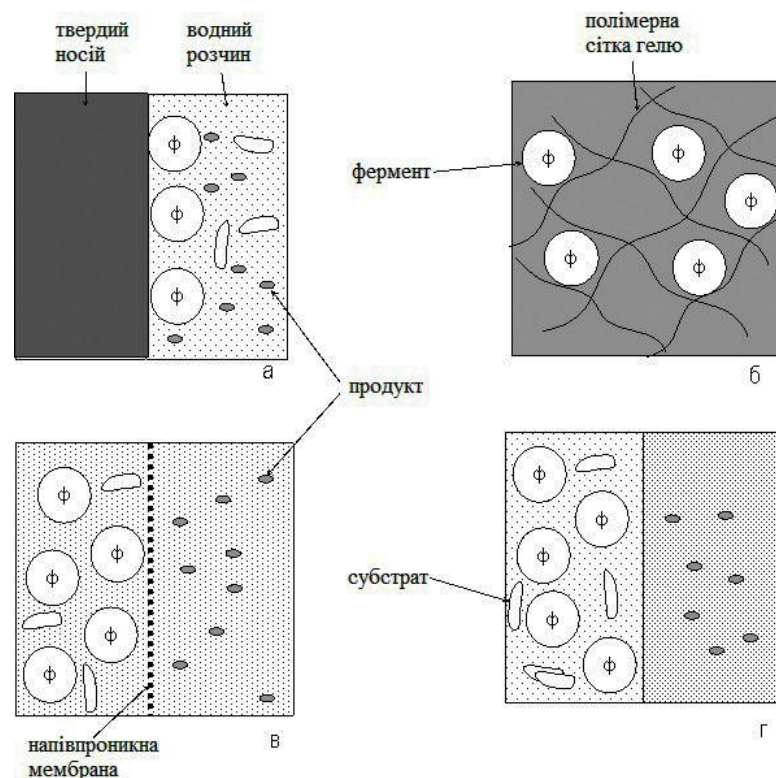


Рисунок 1.3 – Способи іммобілізації ферментів: а - адсорбція на нерозчинних носіях; б - включення в пори гелю; в - відділення ферменту за допомогою напівпроникної мембрани; г - використання двофазного реакційного середовища

Використання одного і того ж методу в якості стандартної процедури для різних ферментів призводить до кінцевих результатів, що різко відрізняються між собою по рівню залишкової активності і стабільності. Вибір методу іммобілізації роблять, виходячи з критеріїв стабільності іммобілізованого ферменту, його доступності для реакції з обумовленою речовиною, способу реєстрації аналітичного сигналу [24].

1.4.1 Адсорбційна іммобілізація

Найпростіший метод іммобілізації ферментів - це адсорбція на нерозчинному носії [25]. В даний час адсорбційна іммобілізація завдяки цілому ряду переваг, є найбільш широко поширеним способом отримання іммобілізованих ферментних препаратів промислового значення [23].

Процедура іммобілізації полягає в перемішуванні при певних умовах ферменту і носія, відокремленні нерозчинного компонента суміші від розчинного центрифугуванням або фільтруванням. Носії для адсорбційної іммобілізації можна розділити на два основні класи - неорганічні і органічні (табл.1.3).

Таблиця 1.3 – Класифікація носіїв для адсорбційної іммобілізації ферментів [22-24]

Неорганічні носії	Органічні носії
кремнезем	полісахариди
оксиди алюмінію	полімерні іонообмінні смоли
оксиди титану та інших металів	колаген
природні алюмосилікати (глини)	поліетилен
пористе скло	спінена гума
кераміка	
активоване вугілля	

Імобілізація досягається за рахунок дифузії ферменту до поверхні носія з подальшою адсорбцією. Недоліком методу є те, що для отримання препарату з високим вмістом адсорбованого ферменту необхідно тривалий час контакту ферменту і носія. У лабораторній практиці найчастіше застосовується метод з перемішуванням, при якому носій суспендується в розчині ферменту і отримана суміш безперервно перемішується за допомогою магнітної чи механічної мішалки. Цей спосіб набагато ефективніше статичного і забезпечує більш рівномірне заповнення поверхні носія адсорбованим ферментом [26-27].

До числа переваг методу адсорбційної імобілізації слід віднести доступність і дешевизну сорбентів, які виступають в ролі носіїв, яким можна надати будь-яку конфігурацію і забезпечити необхідну пористість; простота застосованих методик. Крім того, при адсорбційній імобілізації нерідко вдається одночасно вирішити і проблему очищення ферменту, оскільки зв'язування білка з носієм в багатьох випадках досить специфічне. Недоліком методу є те, що для отримання препарату з високим вмістом адсорбованого ферменту необхідний тривалий час контакту ферменту з носієм.

1.4.2 Механізми імобілізації оксидоредуктаз на неорганічних носіях

Наскільки різноманітні матеріали, що застосовуються для адсорбції ферментів, настільки різні механізми і міцність зв'язування ферменту з носієм. Характеризуючи ці зв'язки, можна говорити про широкий їх спектр, від простого «обростання» носія до утворення полярних, іонних і ковалентних зв'язків.

Вибір методу імобілізації залежить від характеристик, що пред'являються до носія [28]:

- велика внутрішня поверхня, для досягнення геометричної відповідності з поверхнею ферменту;
- висока концентрація на поверхні і стабільність активних груп, з метою досягнення мультиточечного ковалентного приєднання;

- мінімальні стеричні утруднення в реакції між реакційними групами білкової молекули ферменту і носія, так як після первинної іммобілізації ковалентне приєднання вимагає контакту між групами, пов'язаними з жорсткими конструкціями;
- легкість отримання інертної поверхні в носії після іммобілізації при блокуванні інших реакційно здатних груп у носії, які не впливають на фермент.

Серед неорганічних носіїв [29] для іммобілізації в літературі є деякі, які можуть відповідати більшій частини цих вимог як цеоліти, глинисті мінерали [30], пористі стекла [31-32], силікатні нанотрубки [33], оксиди металів [34].

Дані матеріали доступні в широкому діапазоні завдань, можливо хімічно змінити їх поверхню шляхом багатьох методів іммобілізації. Неорганічні носії мають термічну і механічну стійкість. [35]. Крім того, двома новими особливостями неорганічних носіїв є жорсткість і пористість [36-37]. На відміну від неорганічних матеріалів, органічні дуже чутливі до тиску і рН. Найбільш перспективними є мезопористі матеріали, що мають пори в діапазоні від 2 до 50 нм, і площу поверхні, починаючи від 300-500 м²·г⁻¹ й до 1500 м²·г⁻¹ [38].

Алюмосилікатні нанотрубки додають в УФ захисні покриття. Плівки, створені на основі композиту ГНТ/хітозан з іммобілізованим ферментом, демонстрували пряме перенесення електронів в електрохімічній комірі. Крім того, вони проявили активність при електрокаталітичному розкладі гідроген пероксиду. Схожі плівки з іммобілізованим гемоглобіном можуть бути застосовані в біосенсорах і біокаталізі [33].

Застосування адсорбційного зв'язування в кожному індивідуальному випадку вимагає додаткових досліджень для виявлення справжнього механізму зв'язування на конкретних носіях. Однак прийом адсорбційної іммобілізації не завжди призводить до отримання адсорбованих продуктів, так як адсорбція є оборотним процесом. Часто спостерігається хімічне зв'язування за двома механізмами: поверхнево ковалентне зв'язування і об'ємне зшивання [23].

1.4.3 Способи ковалентного зв'язування ферменту з носієм

Шляхом хімічного впливу на структуру ферменту в його молекулі утворюються нові ковалентні зв'язки, зокрема між білком і носієм. Дана взаємодія з носієм забезпечує високу міцність утвореного кон'югату і при досить широкому варіюванні умов (рН, температура), фермент не десорбується з носія і не забруднює цільових продуктів каталізуємої їм реакції [39]. Хімічна модифікація ферментів здатна приводити до істотних змін їх властивостей, таких, як субстратна специфічність, каталітична активність і стабільність. Саме хімічними методами, шляхом ковалентного закріплення білкової структури вдається досягти найбільших ефектів стабілізації ферментів [40-41].

Незалежно від числа і хімічної природи компонентів у ковалентній іммобілізації розрізняють три елементи - блоку хімічної конструкції: молекула ферменту (Ф), носій (Н) і зшиваючий бі- чи поліфункціональний реагент (З), званий також «зшивання», «спейсер» [20-21].

Ковалентна іммобілізація ферментів передбачає створення конструкцій з трьох елементів, пов'язаних хімічними зв'язками: Н-З-Ф (як максимум) і (або) двох, Н-Ф і З-Ф (як мінімум). У свою чергу, принципи конструювання відповідних кон'югатів можна наочно позначити термінами «пришиття» (для Н-Ф), «зшивання» (для Н-З-Ф) і «вшивка» (для З-Ф).

При наявності на поверхні носія функціональних груп, здатних вступати в хімічні реакції з функціональними групами фермента з утворенням ковалентних зв'язків: отримання іммобілізованого ферменту зводиться до виключно простої процедури, аналогічно використовуваній для фізичної адсорбції ферменту на носії [42]. До розчину ферменту вводиться носій і фермент на ньому адсорбується, однак адсорбція при хімічній іммобілізації необоротна - фермент пришивається до носія однією або кількома ковалентними зв'язками (рис. 1.4, а).

Тісний контакт білка з носієм іноді може виявитися небажаним. Для цієї мети застосовуються зшиваючі реагенти різної довжини. Вони можуть бу-

ти як простими біфункціональними (тобто з двома однаковими або різними за хімічною природою реакційно здатними групами), так і дуже складними поліфункціональними реагентами, в тому числі побудованими з різних за хімічною природою ланок та з різними по міцності зв'язками між ними. Тим не менш, використовується один загальний принцип ковалентної іммобілізації – зшивка ферменту з носієм допомогою зшиваючого агента (рис. 1.4, б).

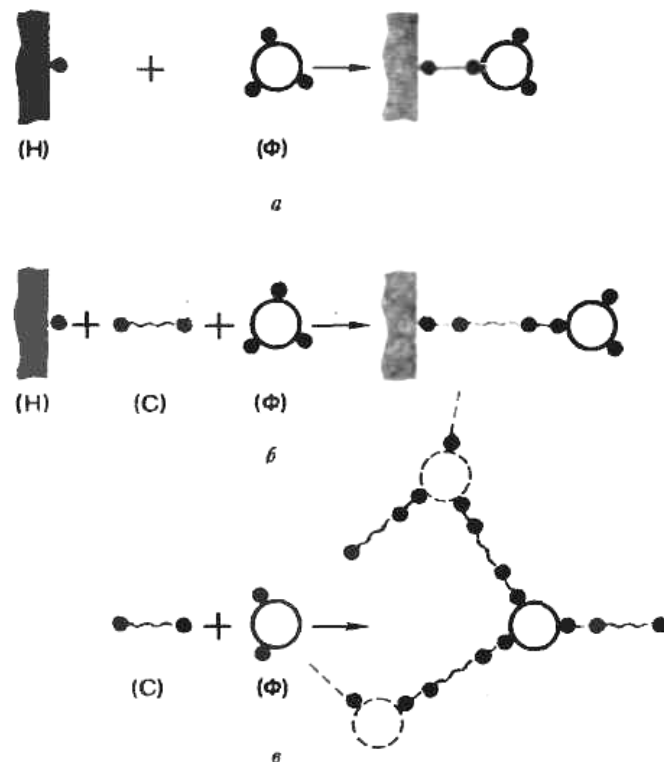


Рисунок 1.4 – Блок-схеми ковалентної іммобілізації ферментів

Цілий ряд рішень для ковалентної іммобілізації ферментів дає використання систем, які спочатку не містять носія, а тільки фермент і зшиваючі агенти, де носій (як тверде тіло) формується безпосередньо при іммобілізації або ж сам фермент служить одночасно і носієм. Мова, таким чином, йде про ковалентне вшивання молекули ферменту в різні типи сіток (рис. 1.4, в).

Характеристики одержуваних методами ковалентної іммобілізації ферментних препаратів істотним чином залежать від вихідного зразка ферменту (зокрема, від процедури його виділення та очищення), природи носія, чистоти використовуваних реагентів [28]. При хімічній модифікації активний

центр бажано захищати шляхом формування нових ковалентних зв'язків в молекулі з використанням функціональних груп, які істотно не впливають на прояв його каталітичної активності [22].

1.5 Електрохімічні системи на основі органо-мінеральних гетероструктур

Сьогодні існує кілька видів електрохімічних систем з використанням ферментів: амперометричні, потенціометричні та ємнісні сенсори, а також паливні елементи і суперконденсатори. Це обумовлено симетричною будовою і властивостями цих ферментів [43-44].

В кінці ХХ ст. виникла нова сфера наукових досліджень - біоелектроніка, і поступово почали з'являтися пристрої для аналізу і переробки інформації, що отримали назву біосенсорів. Нині біосенсори розглядаються як перші біоелектронні пристрої [45-47]. Біосенсори - це аналітичні пристрої, що використовують біологічні матеріали для "розпізнавання" певних молекул і видають інформацію про їх присутність і кількості у вигляді електричного сигналу [48].

1.5.1 Електрохімічні сенсори

Вперше, модель біосенсора була запропонована в 1967 році Кларком і Ліонсом [49], де в якості біологічного чутливого елемента використовувався іммобілізований фермент. Завдяки такому електрохімічному датчику створено і досліджено багато систем, деякі з яких отримали апробацію і промислову реалізацію [50-52].

1.5.1.1 Амперометричні сенсори

Засновані на використанні ферментів, які каталізують окисно-відновні реакції [53-55]. За механізмами роботи їх можна розділити на перше, друге і

третє покоління біосенсорів (рис. 1.5). Біосенсиори першого покоління, складаються тільки з ферменту і датчика, який вимірює електрохімічний сигнал в окисно-відновній реакції, що належить до природної схеми ферментативної реакції.

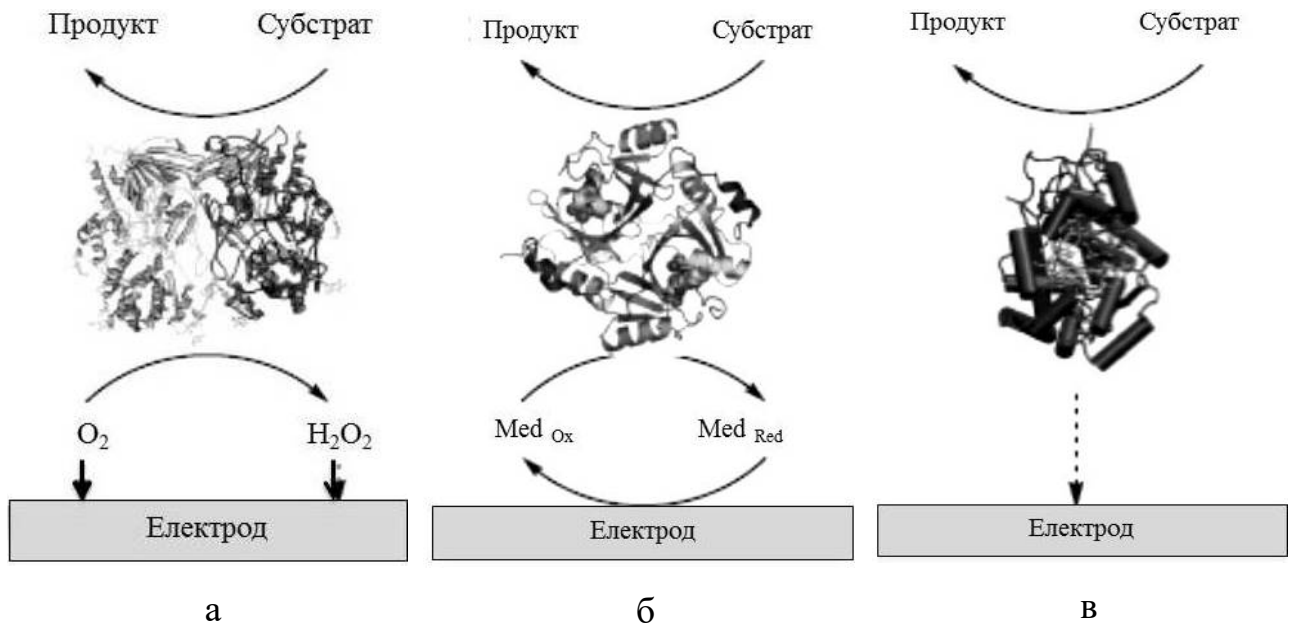


Рисунок 1.5 – Сумарна схема генерації амперометричних біосенсорів першого покоління (а), другого покоління (б), третього покоління (в)

Найбільш поширеним типом є біосенсиори на основі оксидаз (глюкозооксидаза) [56] і дегідрогеназ (алкогольдегідрогеназа) [57], де вимірювання ґрунтовані на утворенні гідроген пероксиду або окисненні спирту (етанолу).

У другому поколінні біосенсорів природний субстрат замінюється на спеціальну редокс речовину - медіатор, який має окисно-відновний потенціал достатній для регенерації активного стану окисно-відновного ферменту [58-60].

При цьому необхідно забезпечити вільну дифузію медіатора між електродом і ферментом, щоб здійснити його електрохімічну регенерацію.

Застосування третього покоління біосенсорів обмежено тільки для певних білків, наприклад, для пероксидази хрону [61], оскільки не всі ферменти здатні переносити електрони безпосередньо на поверхні електрода без денатурації білкової молекули.

1.5.1.2 Потенціометричні сенсори

Іоноселективні електроди використовують для того, щоб перетворювати біологічні реакції в електричний сигнал. У найпростішому вигляді він складається з іммобілізованої ферментної мембрани, навколишнього зонд рН-метра, де каталізатор реакції генерує або поглинає іони гідрогену [62-63]. Реакції, що відбуваються поруч з тонкою скляною мембраною зондування призводять до зміни рН, які фіксуються на дисплеї рН-метра. Електричний потенціал визначається при дуже високих опорах, що дозволяє ефективно подавати нульовий струм і не викликає перешкод в реакції [64]. Основною перевагою таких пристроїв є їх вкрай малий розмір ($\ll 0.1 \text{ мм}^2$), що дозволяє виготовляти дешеві біосенсори, використовуючи технологію виробництва інтегральних мікросхем [65].

1.5.1.3 Ємнісні сенсори

Принцип дії ємнісних біосенсорів базується на вимірюванні ємності подвійного електричного шару на межі поділу електрод / електроліт і діелектричних властивостях мембрани [66-67]. Подібні датчики з успіхом використовуються в деяких іммуносенсорах, де зв'язування антитіл з антигенами призводить до зменшення діелектричної постійної приповерхневої зони [68].

1.5.2 Паливні елементи

Біологічні паливні елементи («клітини біопалива») визначені в якості паливних елементів, які ґрунтуються на ферментативному каталізі. Це пристрої, здатні безпосередньо перетворювати хімічну енергію в електричну за допомогою електрохімічних реакцій за участю біохімічних [69]. У паливному елементі відбувається реакція окиснення на аноді, і зниження реакції на катоді

[70]. Продуктивність паливних елементів характеризується початковою потужністю, яка залежить від струму, досягнутого при різній напрузі в комірці.

У біологічних паливних елементах ферменти використовуються в якості каталізатора і, як правило, працюють в м'яких умовах (20-40 °С, рН середовища близький до нейтральної) [71]. Ці властивості роблять біопаливні елементи з участю ферментів привабливою перспективою для використання в пристроях, де генерація ускладнюється при високих температурах, або де жорсткі умови реакції не є бажаними [72]. Біокаталізатори, або білки, ферменти в порівнянні з металевими каталізаторами володіють цінними перевагами у великих виробничих масштабах [73].

1.5.3 Суперконденсатори

Електрохімічні конденсатори, так звані. суперконденсатори - енергетичні пристрої з високою потужністю і щільністю енергії. Вони є перспективними пристроями акумулювання енергії для вирішення багатьох проблем, пов'язаних з переходом від енергії викопного палива до технології використання поновлюваних джерел енергії [74-75]. Це нове покоління накопичувачів енергії між електрохімічними акумуляторами і діелектричними конденсаторами [76]. Суперконденсатори можуть зберігати у 20-200 разів більше енергії, ніж звичайні конденсатори і випускати її з найвищою потужністю, досягаючи в той же час щільності струму характерного для конденсаторів і недоступного для акумуляторів. Сьогодні багато конденсаторів можуть працювати при напрузі близько 1000 В і при рівнях потужності понад 100 кВт [77-78]. Таким чином, суперконденсатори є єдиним технічним пристроєм, що дозволяє заощадити до 25% спожитої енергії.

1.5.3.1 Конструкційні особливості суперконденсаторів

Електрохімічні конденсатори, які накопичують заряд в ПЕШ або суперконденсатори відрізняються від звичайних конденсаторів рівнем електрич-

ної ємності: максимальна ємність звичайних конденсаторів становить сотні мікрофарад, а максимальна ємність суперконденсаторів досягає тисячі фарад, тобто, на шість порядків більше. Таким чином, суперконденсатори мають наступні характеристики [79]:

- густина електричної ємності до 900 Ф/г;
- густина електричної енергії до 50 Дж/см³;
- внутрішній опір до 0,0001 Ом;
- час заряду і розряду в діапазоні 0,025÷5,0 с.;
- мала втрата струму - і можливість зберігання заряду протягом сотень годин.

Такі характеристики виділили суперконденсатори в особливу групу пристроїв зберігання енергії, що займає нішу між звичайними конденсаторами і акумуляторними батареями, що ілюструє діаграма Рагона [80] (рис. 1.6).

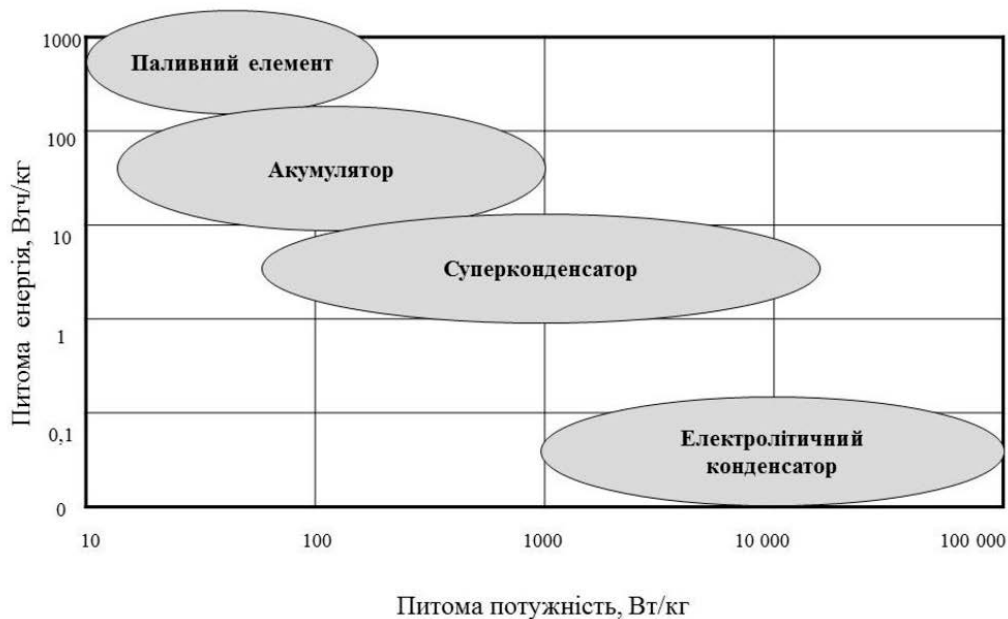


Рисунок 1.6 – Діаграма Рагона для пристроїв генерації та накопичення енергії

Матеріали для редокс-електродів, в тому числі оксиди перехідних металів і електронно-провідні полімери, здатні до фарадесівських реакцій перенесення зарядів, і грають важливу роль в більшості електрохімічних накопичувачів енергії, наприклад суперконденсатор, акумуляторна батарея та їх гібрид [81-82]. Батареї часто засновані на окисно-відновних матеріалах з низь-

кою потужністю. Суперконденсатори, зокрема, на основі редокс-неактивних матеріалів, таких як активоване вугілля, проявляють високу вихідну потужність, але мають відносно низьку енергетичну потужність. Поєднуючи переваги суперконденсаторів і акумуляторів, гібридні суперконденсатори - батареї можуть мати енергію, як акумулятор і вихідну потужність майже таку ж високу, як у суперконденсаторі [83].

Мініатюризація і інтеграція суперконденсаторів в більш складні системи, які включають комбінування енергії і функціональних пристроїв, є значним механізмом для вирішення систем автономії енергії [84].

В даний час набула розвитку розробка тонких і гнучких суперконденсаторів за допомогою адитивних технологій на основі осадження надзвукового кластерного пучка, який буде здійснюватися в ємнісних електролітах транзистора закритого типу і ємнісних мікробних паливних елементах [85-86]. Такі системи інтегрують в матеріалах конкретні функції пристрою: електричні переходи або зберігання енергії з оборотною можливістю. Таким чином, дослідження відкривають нові горизонти для розвитку та застосування нових багатофункціональних і енергетичних елементів для зберігання і накопичення енергії [87-88].

1.6 Висновки. Постановка завдань дослідження

В даний час більшість досліджень присвячено створенню наноконструктивних систем і гетероструктур для перетворення енергії і біокаталізаторів, складовими компонентами яких є електропровідні вуглецеві матеріали (графен, нанотрубки). Використання неорганічних матеріалів, переважно силікатів - досліджується в значно меншому обсязі. Гетероструктури з використанням нативного ферментного препарату - витяжки з рослин - досі не досліджувались. Згідно з основною ідеєю роботи, зшивання неорганічного компонента з ферментним препаратом створює гетероструктури, здатні до розподі-

лу зарядів, змінює механізм перебігу хімічних і електрохімічних реакцій і відкриває нові сфери застосування отриманих матеріалів.

Тому метою даної роботи є встановлення закономірностей впливу природи неорганічного носія з різною структурою та фізико-хімічними властивостями на зв'язування нативних ферментних препаратів класу оксидоредуктаз (на прикладі витяжки з коренеплоду редьки чорної); застосування одержаних гетероструктур в якості активних мас електродів для енергоперетворюючих пристроїв та біосенсорів.

Для досягнення даної мети необхідно було вирішити наступні задачі:

- Визначити фізико-хімічні властивості неорганічних носіїв різної природи (бентоніт, модифікований фосфат-іонами бентоніт, каолін, пірогенний кремнезем), що відповідають за утворення гетероструктур з ферментним препаратом класу оксидоредуктаз;
- Дослідити вплив кислотно – основних властивостей носія на зміну редокс - активності в системах нативний ферментний препарат на основі оксидоредуктаз, іммобілізований на цих носіях;
- Визначити вплив структурних та морфологічних особливостей мінерального носія на стабільність редокс - активності іммобілізованого нативного ферментного препарату;
- Виявити взаємозв'язок особливостей зв'язування з електрохімічною активністю гетероструктур в системі неорганічний носій - нативний ферментний препарат;
- Випробувати синтезовані гетероструктури як активні маси для створення суперконденсаторів та біосенсорів.

РОЗДІЛ 2. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНІ МЕТОДИКИ ТА АПАРАТУРА

2.1 Об'єкти дослідження

Пероксидаза дуже широко поширена в рослинах. Фермент був отриманий з таких різноманітних джерел, як хрін [89], дріжджі [90], солодка картопля [91], квасоля [92], ріпа [93], японська редька [94], люпин [95] та пшениця [96]. Одним з найбільш детально вивчених ферментів, виділених з рослин є корінь хрону. Тому, дослідження проведені на витяжці природного ферментного препарату, виділеного з коренеплоду редьки чорної. Особливістю експерименту стало використання саме нативної суміші ферментів, а не очищених форм оксидоредуктаз.

2.1.1 Виділення ферментного препарату з рослинної сировини

Для дослідження використовували нативну суміш ферментних препаратів складу (г / 100 г): білки - 1,9, жири - 0,2, вуглеводи - 6,7 (моно- і дисахариди- 6,4, крохмаль - 0,3), харчові волокна - 2,1, органічні кислоти - 0,1, вода - 88, зольність – 1 [97]. Препарат отримували шляхом змішування 3 г рослинної маси з 25 г скляних гранул (розмір 0,25 мм) і 7мл фосфатного буфера рН 6,86 і розтиранням протягом 5 хв. Значення рН для виділення ферментного препарату вибиралися відповідно до рН максимальної активності пероксидази хрону рН 5-8 [4, 98]. Далі суміш поділяли на 3 частини, і кожную частину окремо розтирали в порцеляновій ступці протягом 5 хв. Розтерту масу об'єднували, доливали 6 мл того ж буфера. Виділення препарату проводилося в центрифугі СМ-50 (СРСР) на швидкості 7000 об / хв протягом 10 хв. Прозору надосадову рідину використовували як джерело ферментного

препарату. Виділення ферментного препарату проводили за методикою, характерною саме для збереження ферментів класу оксидоредуктаз.

2.1.2 Іммобілізація ферментного препарату

Іммобілізацію проводили методом поглинання ферментного препарату з 20% розчину у фосфатному буфері при рН 6,86. У мірну колбу місткістю 100 см³ поміщали 20 мл досліджуваного розчину нативного ферментного препарату, доводили об'єм розчину водою до мітки і перемішували. Неорганічний носій масою 10 г заливали приготвленим розчином ферментної суміші об'ємом 100 мл при температурі 25 °С і витримували протягом 2 год на повітрі [20-21, 23].

Проведені раніше дослідження кінетики сорбції ферментного препарату на неорганічних носіях за часів контакту від 0.5 до 24 год показали значне зниження каталітичної активності ферменту в часі, починаючи з 2 год контакту ферментного препарату з носієм. Це пов'язано з утворенням нових продуктів в системі внаслідок взаємодії на світлі компонентів фосфатно-буферних розчинів між собою, з компонентами носія, киснем повітря [99].

Отриману гетероструктуру неорганічний носій-ферментний препарат відокремлювали від вихідного розчину фільтруванням з подальшою сушкою на повітрі протягом 48 год. Отримані зразки зберігали без доступу повітря в поліетиленових контейнерах протягом 6 місяців і більше.

2.1.3 Неорганічні носії

В якості носіїв для іммобілізації ферментного препарату використані неорганічні матеріали різного походження, природи і будови. Це природні силікати і алюмосилікати: бентоніт, модифікований фосфат - іонами бенто-

ніт, каолін, а також промисловий силікат - пірогенний кремнезем марки аеросил-300.

Оцінку питомої поверхні носіїв проводили методом БЕТ на приладі СОРБІ – М (РФ) шляхом порівняння обсягів газу-адсорбата, сорбуючого досліджуваним зразком і стандартним зразком матеріалу (Al_2O_3) з відомою питомою поверхнею. Вимірювання питомої поверхні проводили по 4-х точкового методу БЕТ. В якості газу-адсорбата в даній модифікації використовувався газоподібний азот ГОСТ 9293-74. Характеристики носіїв представлені в табл. 2.1.

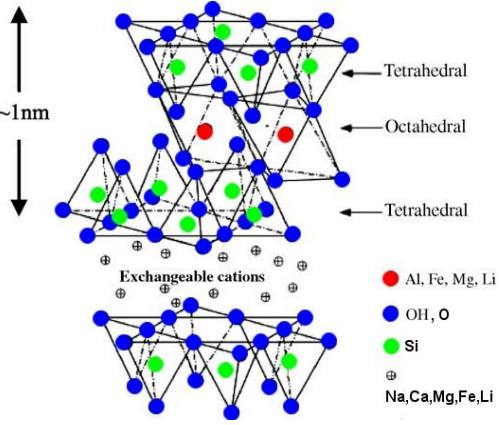
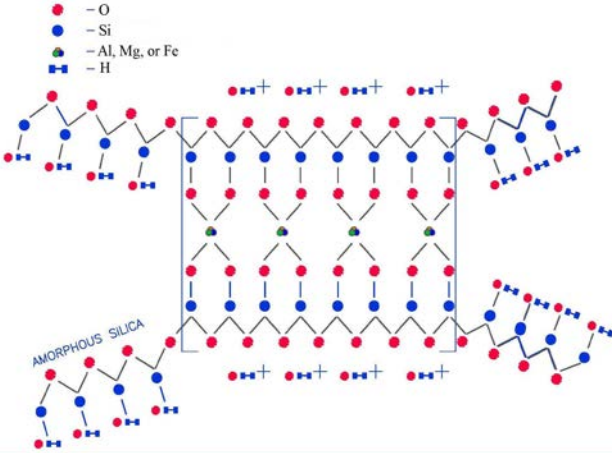
Модифікований фосфат-іонами бентоніт отримували низькотемпературною обробкою (до $40\text{ }^\circ\text{C}$) бентоніту 0,1 М розчином H_3PO_4 при постійному перемішуванні, і подальшій сушці на повітрі.

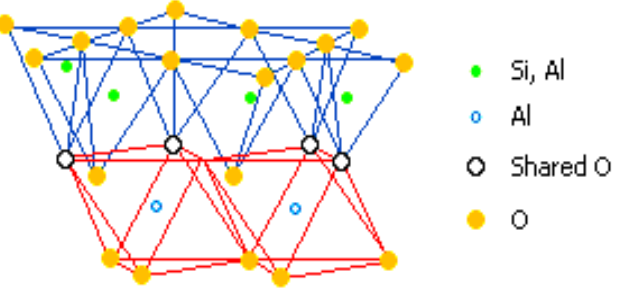
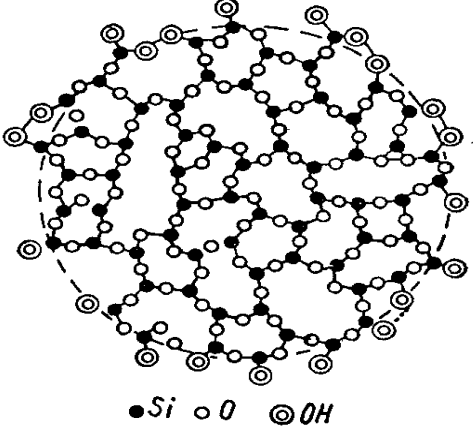
В якості електропровідного носія використовували графен. Графен отримували шляхом механічного відлущування шарів пластин пресованого терморозширеного графіту виробництва ІХП ім. А.А. Чуйка НАН України. Даний метод дозволяє отримувати найбільш якісні зразки з високою рухливістю носія, але не передбачає використання масштабного виробництва, оскільки це ручна процедура.

Листовий графен використовували у якості струмозбірника для систем гетероструктура – графен – золотий контакт (див. розділ 5).

Суспензію графена отримували з тонкошарового графена, отриманого з графіту AG-1500, "Графіт-майстер", Запоріжжя, Україна, анодним розпиленням. Отримані частинки середнього розміру 5×5 мкм, товщиною 50 нм промивали в етанолі, сушили, а потім диспергували в киплячому етанолі з ультразвукової обробкою за допомогою ультразвукового диспергатора УЗДН-2Т (РФ) при частоті 20 кГц. Отриману суспензію використовували для друку двостороннього покриття на ватманському папері.

Таблиця 2.1– Походження, хімічний і структурний склад використаних носіїв

Матеріал	Склад, %	Метод обробки	Площа поверхні, м ² /г	Структура
Бентоніт (родовище Дашуківка, Україна)	SiO ₂ – 58,3; Al ₂ O ₃ – 12,8; Fe ₂ O ₃ – 6,8; CaO – 1,45; MgO – 1,6; Na ₂ O + K ₂ O – 0,5; Вологість – 9,3 Втрати при прожарюванні – 9,75	Відмулювання дрібної фракції у воді	36±2	Шарувата, розмір зерна 50-110 нм 
Бентоніт, модифікований фосфат-іонами	SiO ₂ – 57,0; Al ₂ O ₃ – 12,1; Fe ₂ O ₃ – 6,6; CaO – 1,45; MgO – 1,3; Na ₂ O + K ₂ O – 0,3; P ₂ O ₅ – 2,45; Вологість – 9,0 Втрати при прожарюванні – 9,8	Низькотемпературна обробка H ₃ PO ₄	115±5	Шарувата, розмір зерна 50-70 нм 

<p>Каолініт (Глуховецьке родовище, Україна)</p>	<p>Al_2O_3 – 35,5; SiO_2 – 62,0; TiO_2 -0,4; Fe_2O_3 – 0,35; MgO 0,18-0,9; CaO – 0,71; $\text{Na}_2\text{O}+\text{K}_2\text{O}$ 0,18-1,6</p>	<p>Відмулювання дрібної фракції у воді</p>	<p>16 ± 2</p>	<p>Шарувата, розмір зерна 50-70 нм</p> 
<p>Аеросил – 300 (Калуш, Україна)</p>	<p>SiO_2 – 100</p>	<p>–</p>	<p>300</p>	<p>Аморфна</p> 

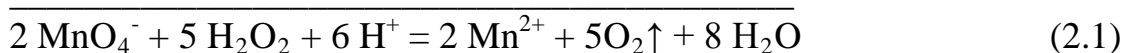
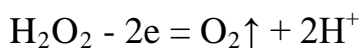
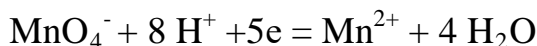
2.1.4 Вихідні реактиви

В якості вихідних реактивів для іммобілізації нативного ферментного препарату і досліджень отриманих гетероструктур використано: HCl, KMnO₄ (стандарт- тітри, Черкаський завод хімреактивів), FeCl₃·6H₂O, KCl, KBr, C₆H₁₂O₆ ("ч", РЕАХІМ), крохмаль, H₂SO₄, (концентрована), "ч.д.а" H₃PO₄, о-фенантролін, гідрохінон, NaOH ("х.ч.", РЕАХІМ), Na₂HPO₄, NaH₂PO₄ ("ч. д. а", РЕАХІМ), C₂H₅OH ГОСТ 18300-87, ацетатний буферний розчин, H₂O₂ (30%). Аналітичні розчини готували на дистильованій воді.

В якості субстратів - відновників застосовували гідрохінон (C_M= 0,0001 ÷ 0,001 M), субстрата окисника - H₂O₂ (C_M= 30%).

2.1.4.1 Визначення вмісту гідроген пероксиду

В основі визначення покладена реакція, представлена рівняннями:



$$E_M(\text{H}_2\text{O}_2) = M(\text{H}_2\text{O}_2) \cdot f$$

$$f = 1/2$$

В мірну колбу місткістю 100 см³ поміщали аліквотний об'єм досліджуваного розчину H₂O₂, доводили розчин водою до мітки і перемішували. В колбу для титрування мірною піпеткою відбирали аліквотну частину отриманого розчину (20 см³), додавали 10-15 см³ 1 M розчину H₂SO₄ й титрували 0,1 M розчином KMnO₄ до отримання слабо-рожевого забарвлення, стійкого не менше 15 секунд. Титрування повторюють до одержання відт-

ворюваних результатів. Розраховували вміст H_2O_2 , г, в об'ємі мірної колби [100-101].

2.2 Методи дослідження

2.2.1 Сорбція ферментного препарату на носіях

Для вивчення поглинання ферментного препарату на неорганічних носіях використовували його розчини, де об'ємна концентрація фосфатно-буферного екстракту варіювалася від 5% до 50%. Склад досліджуваних сорбційних систем представлений в табл. 2.2.

Динаміку сорбції ферментного препарату на носіях вивчали в розчинах з $C_{об} = 20\%$.

Таблиця 2.2 – Склад сорбційних систем

Сорбат	Сорбент	Умови
фосфатно-буферний екстракт ферментного препарату $C_{об}$, % від 5 до 50	Носій	$m_{(сорбента)} = 1 \text{ г}$ $\tau = \text{від } 10 \text{ хв до } 24 \text{ год,}$ $pH = 6,8$

Сорбційні дослідження проводили в статичних умовах при температурі 25 °С.

Залишковий вміст ферментного препарату в розчині визначали через відповідні інтервали часу фотоколориметричним методом на колориметрі КФК-2 ($\lambda=400 \text{ нм}$, $t=10 \text{ мм}$) по калібрувальному графіку (рис. 2.1).

Після цього розраховували ступінь зв'язування ферментного препарату з твердою фазою N (2.5).

$$N (\%) = \frac{D_{нач} - D_{кон}}{D_{нач}} \cdot 100\% ; \quad (2.5)$$

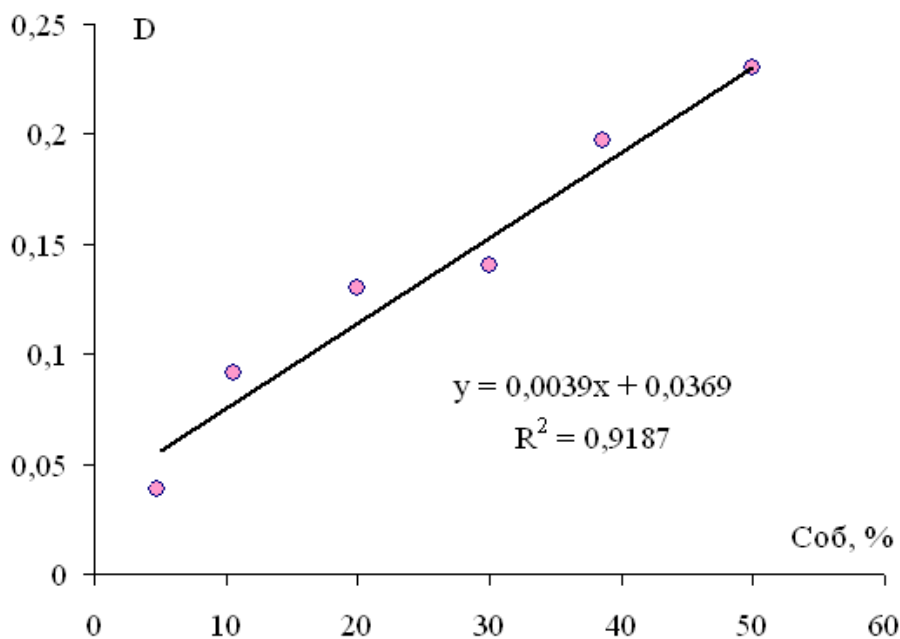


Рисунок 2.1 – Залежність оптичної густини від об'ємної концентрації ферментного препарату в розчині ($\lambda=403$ нм, $\tau=10$ см)

2.2.2 Визначення середньої ферментативної активності

Активність визначали по початковій швидкості реакції ферментного окиснення гідрохінону ($\tau=10$ хв), (табл 2.3).

Таблиця 2.3 – Склад каталітичної системи

Окисник	Відновник	Каталізатор	Умови
$C_M(\text{H}_2\text{O}_2) = 0,02$ М	$C_M(\text{C}_6\text{H}_4(\text{OH})_2) =$ 0,005 М	іммобілізований на носії фермент $m=2,5; 5; 7,5$ г	$\tau=10$ хв $t=25$ °С рН = 6,8

Зміну концентрації гідрохінону в досліджуваних системах контролювали методом фотоколориметрії по реакції з о-фенантроліном в присутності іонів Fe^{3+} [102].

За одиницю активності приймали кількість окисненого субстрата (мкМ), каталізоване 1 мл ферментного препарату протягом 1 хв.

Активність розраховували за формулою:

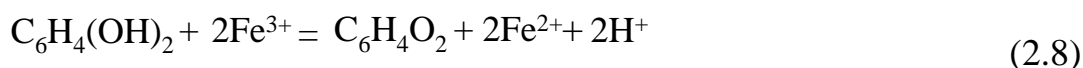
$$\bar{A} \text{ (активність)} = \frac{C_M \text{ (гідрохінона)} \cdot V \text{ (реакційної суміші, л)}}{V \text{ (фермента, мл)} \cdot t \text{ (хв)}}; \quad (2.6)$$

$$1 \cdot \frac{\text{мкмоль(субстрата)}}{\text{мл(фермента)} \cdot \text{хв}} = 1 \text{ о.а.}$$

2.2.2.1 Фотоколориметричне визначення гідрохінону

Залишкові концентрації гідрохінону в досліджуваних системах визначали фотоколориметричним методом на приладі КФК – 2МП, ($\lambda=580$ нм, $l=10$ мм).

Метод заснований на реакції окиснення гідрохінону FeCl_3 :



Утворене залізо (II) в кількості, еквівалентній початковому змісту гідрохінону, визначають з о- фенантроліном, з яким Fe^{2+} дає стійкий помаранчево-червоний комплекс $\text{Fe}(\text{C}_{12}\text{H}_8\text{N}_2)^{3/2+}$. Інтенсивність забарвлення не змінюється в межах рН=2-9. Молярний коефіцієнт світлопоглинання становить $13,6 \cdot 10^3$ [103].

Досліджуваний розчин, що містить у 5 мл від 0,01 до 0,16 мг гідрохінону, помістили у калібровану пробірку місткістю 20 мл, забезпечену притертою пробкою. До нейтральної проби (при необхідності, її попередньо нейтралізують, визначивши необхідну кількість кислоти або лугу титруванням однієї порції проби того ж об'єму) додають 1 мл ацетатного буферного розчину, 1 мл 0,004 М розчину $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,5 мл розчину о-фенантроліну і розбавляють водою до 20 мл.

Через 1 год вимірювали оптичну густину отриманого помаранчево-червоного розчину в кюветі товщиною 10 мм при довжині хвилі світла 508

ним по відношенню до розчину холостого досліду, проведеного з дистильованою водою і всіма перерахованими реагентами. Концентрацію гідрохінону визначили по калібрувальному графіку (рис. 2.2).

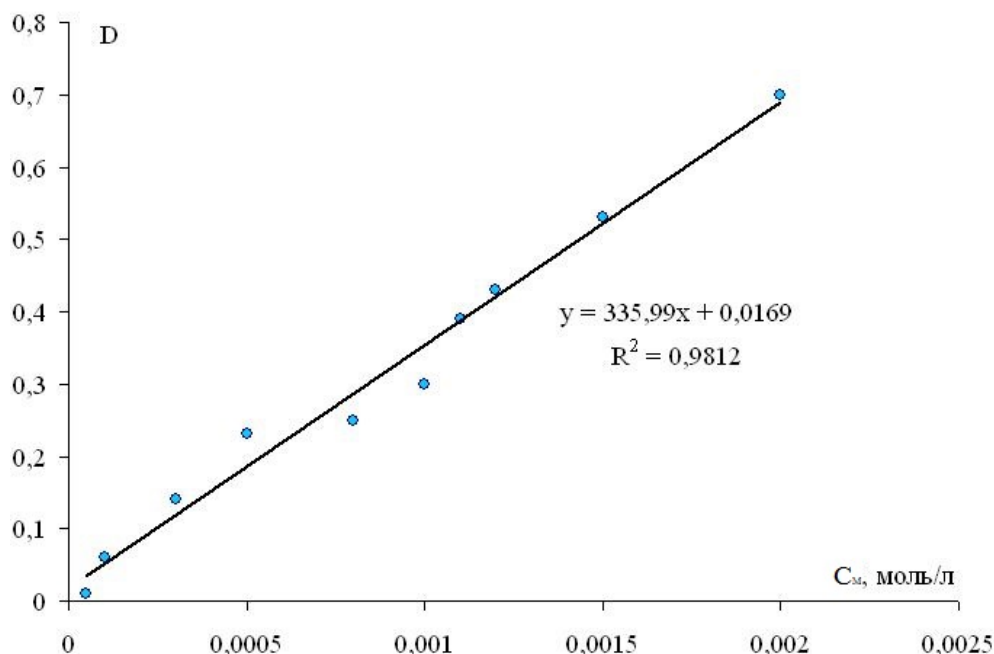


Рисунок 2.2 – Залежність оптичної густини розчинів гідрохінону від концентрації

2.2.3 Визначення кількості кислотно - основних центрів на поверхні носіїв методом потенціометричного титрування

Розрахунок співвідношення кислотних і основних центрів проводився за результатами потенціометричного титрування водних суспензій 0,1 М розчинами HCl і NaOH з використанням лабораторного іонміра I-160М, хлорид- срібного (ЕВЛ-1М3.1) і скляного (ЕС-1) електродів. Титрування проводили у водному середовищі і у середовищі індиферентного електроліту (1 М розчин KCl). Для фонового розчину використовували перекристалізований хлорид калію кваліфікації х.ч., 0,1 М розчин HCl готували з фіксанала. Наважку зразка масою 100 мг заливали водою, після чого готу-

вали суспензію з концентрацією $1 \cdot 10^{-2}$ г/л. Загальний обсяг розчину становив 20 мл. Після досягнення рівноваги в розчині вимірювали рН і будували криві титрування в координатах $E - V_T$ ($pH - V_T$), де V_T – об'єм титранта. Для точного визначення V_T в точці еквівалентності (ТЕ) будували диференціальні криві титрування в координатах $\Delta^2 E / \Delta^2 V$, що представляють залежність зміни потенціалу (ΔE) від об'єму доданого титранта (ΔV). З кривих титрування визначали повну обмінну ємність (ПОЄ). Значення силових показників активних центрів ($pK\alpha$) у воді визначали по лінеаризованим кривим титрування у координатах рівняння Гендерсона-Гассельбаха ($pH - \lg \alpha / (1 - \alpha)$) [104]:

$$pH = pK\alpha + n \lg \alpha / (1 - \alpha) \quad (2.9),$$

2.2.4 Визначення ізоелектричної точки у ферментному препараті та синтезованих гетероструктурах

У ізоелектричній точці розчин ферментного препарату як білкової молекули нестійкий. Молекули з однаковою кількістю позитивних і негативних зарядів легко випадають в осад. Значення рН, що відповідає ізоелектричній точці, є характерним для кожного ферменту.

рН – стабільність нативного та іммобілізованого на неорганічних носіях ферментного препарату досліджували у 0,5% суспензіях при 25 °С протягом 10 хв, і при витримці даних суспензій протягом 1 тижня (Waterproof pH Tester 30 OAKTON EUTECH Instruments, USA, похибка виміру 0,01 рН).

Для випадання осаду у ферментному препараті та гетероструктурі додавали водовіднімаючу речовину - 96% розчин етилового спирту. Через 5-10 хв. переглядали всі проби та оцінювали ступінь каламутності отриманих сумішей. рН найбільш каламутної суміші відповідала ізоелектричній точці ферментного препарату та гетероструктури.

2.2.5 Визначення компонентного складу ферментного препарату

Компонентний склад дослідженого нативного і іммобілізованого на неорганічних носіях ферментного препарату визначали на атомно-абсорбційному спектрофотометрі Analyst 200 Perkin Elmer (США). Дослідження проводили з наважок масою 9 г, загальний об'єм системи становив 10 мл і 15 мл для нативного і іммобілізованого ферментного препарату відповідно.

2.2.6 Спектральні методи дослідження

Електронна спектроскопія. Електронні спектри поглинання розчинів досліджуваних систем записані на спектрометрі Specord M40 Karl Zeiss Jena ($5000 - 11000 \text{ см}^{-1}$) у кварцових кюветах, $l=1 \text{ см}$. Аналіз зафіксованих смуг поглинання проводили після розкладання їх на гаусові компоненти [105].

ІЧ - спектроскопія. Для запису спектрів нативного ферментного препарату, носіїв і гетероструктур використана методика пресування зразків в таблетках з KBr у співвідношенні ($m_{\text{зразка}}:m_{\text{KBr}}=1:50$). ІЧ - спектри зняті на спектрофотометрі Specord M80 Karl Zeiss Jena, BRD у діапазоні довжин хвиль $4000-280 \text{ см}^{-1}$.

Скануюча електронна мікроскопія. Мікротекстури зразків досліджували на скануючому електронному мікроскопі з високою роздільною здатністю Mira 3 FESEM Tescan USA Inc. з катодом з польовою емісією при SEM HV – 10 KeV і автоматичним виміром на зображенні в вакуумі $9 \times 10^{-3} \text{ Па}$.

Спектрофотометрія. Дослідження ферментних препаратів проведені на приладі КФК – 2МП, ($\lambda=580 \text{ нм}$, $l=10 \text{ мм}$).

2.2.7 Циклічна вольтамперометрія

Вимірювання проведені з використанням 3х-електродної комірки на електрохімічному модулі Autolab-30, Ekochemie BV, the Netherlands.

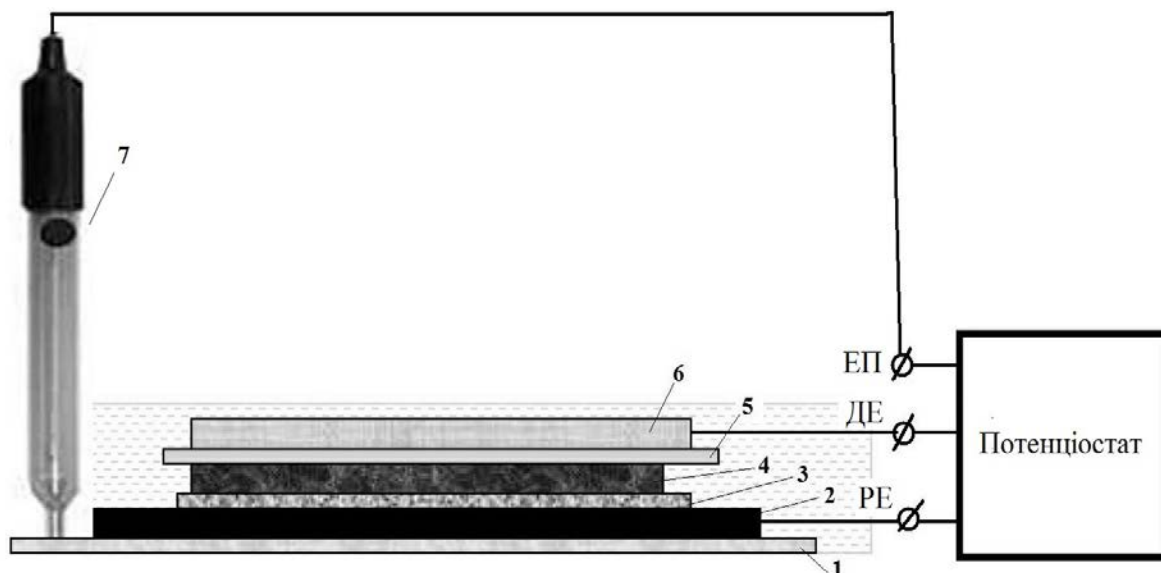


Рисунок 2.3 – Вимірювальна схема досліджуваних гетероструктур для ЦВА: 1 – фільтрувальний папір, змочений у КСl; 2 – струмозбірник, 3 – графен (робочий електрод); 4 – гетероструктура; 5 – мембрана (ацетилцелюлоза); 6 – платинований титан (допоміжний електрод); 7 – хлоридсрібний електрод порівняння

Стандартизація областей потенціалів вольтамперних кривих проведена за розчином H_2O_2 в діапазоні концентрацій $1 - 10^{-6}$ М. Заданою програмою на комірку подавався потенціал, значення якого варіювалося в області потенціалів $-1.0 \div +1.5$ В.

Запис вольтамперограмм проведений із швидкістю розгортки потенціалу в інтервалі $5 \div 100$ мВ/с. Електродом порівняння служив хлоридсрібний електрод. Схема вимірів по screen-printed technology представлена на рис. 2.3.

2.2.8 Спектроскопія електрохімічного імпедансу

Дослідження механізмів електропровідності нативного ферментного препарату і синтезованих гетероструктур проводили на підставі аналізу спектрів електрохімічного імпедансу 0,5% водних суспензій при 22 ± 2 °С.

Спектри електрохімічного імпедансу знімали у двохелектродній комірці з платиновими електродами площею по 1 см^2 на відстані 1 см на електрохімічному модулі Autolab-30 моделі PGSTAT302N Metrohm Autolab, оснащеному модулем FRA (Frequency Response Analyzer) в інтервалі 10^{-2} – 10^6 Гц. Управління модулем здійснювали за допомогою програми Autolab 4.9 за стандартною процедурою з подальшою обробкою в пакеті Zview 2.0. Моделювання електрохімічних реакцій здійснювали за методом еквівалентних схем [106].

2.2.8.1 Вимірювання імпедансу

У основі методу спектроскопії електрохімічного імпедансу лежить вивчення реакції відгуку електрохімічної системи, що знаходиться в стаціонарному стані, на вплив коливань (струму або напруги) малої амплітуди. Основним завданням цього методу є побудова найбільш ймовірних електричних ланцюгів, що моделюють електрохімічні явища в зразках, з використанням сучасних фізико-хімічних уявлень про будову міжфазних кордонів і розчинів електролітів.

Суть методу спектроскопії імпедансу (CEI) полягає в подачі синусоїдального сигналу малої амплітуди, що впливає на приелектродний шар досліджуваної системи, внаслідок чого змінюється і сигнал відгуку на виході [107]. Якщо в якості вхідного імпульсу використовувати напругу $V(t) = V_0 \sin(\omega t)$, а сигнал на виході фіксувати як струм $I(t) = I_0 \sin(\omega t + \theta)$, що протікає через цю систему, де V_0 та I_0 – амплітуди, відповідно, напруги і стру-

му, $\omega = 2\pi f$ – кутова частота, θ – фазовий зсув, то імпеданс $Z^*(\omega)$ визначається співвідношенням (2.10) [108-110].

$$Z(\omega) = \frac{V(t)}{I(t)} \quad (2.10)$$

Для подальшого розрахунку використали метод комплексних амплітуд.

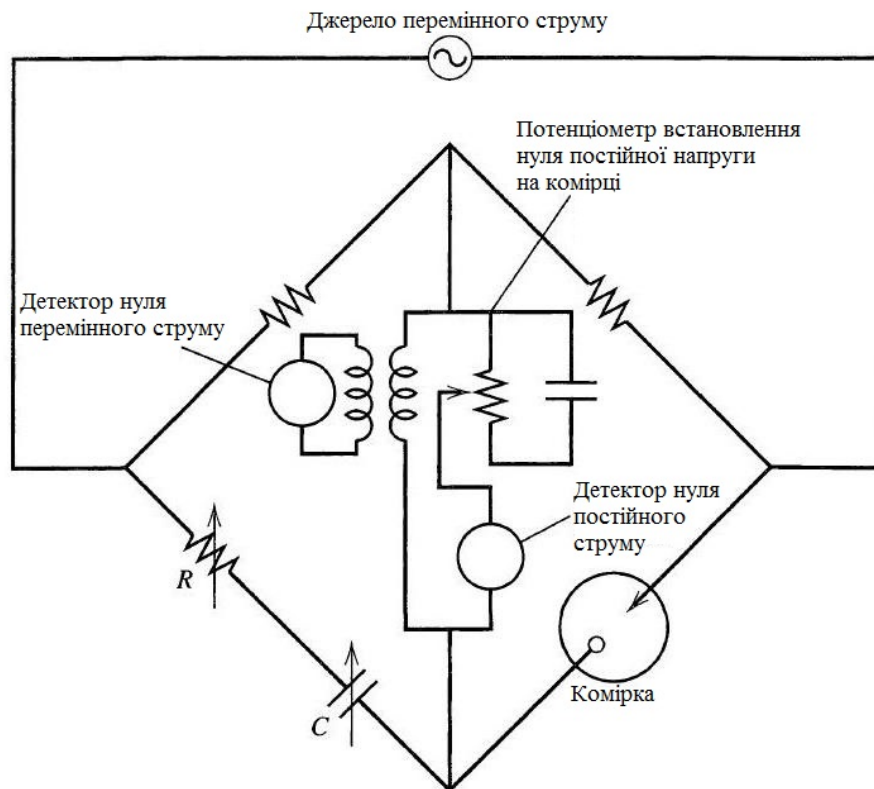


Рисунок 2.4 – Схема вимірювання імпедансу - RCL- метр

При розрахунку цим методом кожній синусоїдальній функції часу ставиться у відповідність комплексне число виду (2.11)

$$\dot{A}_m = A_m e^{j\psi} \quad (2.11)$$

яке називається комплексною амплітудою величини. Як видно, комплексна амплітуда - це комплексне число, модуль якого дорівнює амплітуді синусоїдальної величини, а аргумент - початковій фазі.

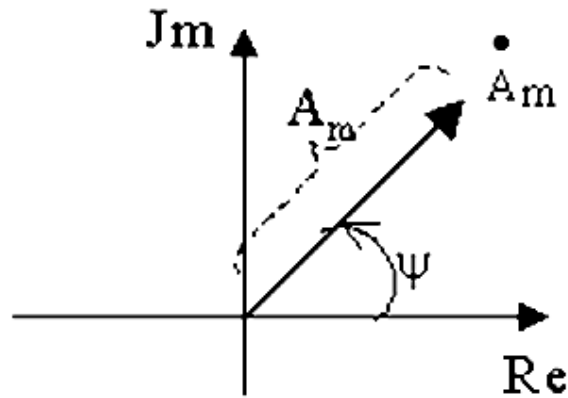


Рисунок 2.5 – Поняття комплексної амплітуди

Як і будь-яке комплексне число - комплексна амплітуда може бути представлена на комплексній площині вектором з довжиною A_m і кутом повороту щодо дійсної осі (рис. 2.5).

Існує взаємно однозначна відповідність між комплексною амплітудою і синусоїдальною функцією часу.

2.2.8.2 Комплексний опір і комплексна електропровідність

Відношення комплексної амплітуди напруги на контактах двополюсника до комплексної амплітуди струму, що протікає через ці затискачі, називається комплексним опором пасивного двополюсника.

$$Z = \frac{\dot{U}_m}{\dot{I}_m} = \frac{U_m e^{j\psi_u}}{I_m e^{j\psi_i}} = z e^{j\omega}, \hat{I} \hat{i} \quad (2.12)$$

Модуль комплексного опору дорівнює відношенню амплітуди напруги до амплітуди струму й називається повним опором двополюсника, тобто

$$z = |Z| = U_m / I_m, \hat{I} \hat{i} \quad (2.13)$$

Аргументом комплексного опору є фазовий зсув між напругою і струмом на затискачах двополюсника, тобто

$$\phi = \psi_u - \psi_i \quad (2.14)$$

Представляючи комплексний опір, як комплексне число в алгебраїчній формі, отримаємо

$$Z = z \cos \phi + jz \sin \phi = \tilde{R} + j\tilde{X}, \hat{I} \hat{i} \quad (2.15)$$

Дійсна і уявна частини комплексного опору двополюсника називаються відповідно активною і реактивною складовими комплексного опору. Величина зворотна комплексному опору, називається комплексною електропровідністю.

$$Y = \frac{\dot{I}_m}{\dot{U}_m} = \frac{I_m e^{j\psi_i}}{U_m e^{j\psi_u}} = z e^{-j\omega} \tilde{N} \hat{i} \quad (2.16)$$

Модуль комплексної електропровідності, яка дорівнює відношенню амплітуди струму до амплітуди напруги, називається повною електропровідністю двополюсника, тобто

$$y = |Y| = I_m / U_m, \tilde{N} \hat{i} \quad (2.17)$$



Аргумент комплексної електропровідності є фазовий зсув між напругою і струмом на контактах двополюсника, взятому зі знаком (-).

Представляючи комплексну електропровідність, як комплексне число в алгебраїчній формі, отримаємо

$$Y = y(\cos \phi - j \sin \phi) = \tilde{g} - j\tilde{b}, \tilde{N} \hat{i} \quad (2.18)$$

Вимірювані параметри:

Вид	Назва	Значення	Функція
	R - Resistor	Опір	Опір
	C - Capacitor	Ємність	Реактивний опір (заряджання ПЕШ)
	L - Inductor	Індуктивність	Індуктивність

 <p>CPE</p>	CPE - Constant Phase Element	Елемент постійної фази	Характеристика нерівноважності
 <p>Ws</p>	Warburg Short Circuit Terminus	Елемент Варбурга	Массоперенос, дифузія

На особливу увагу заслуговує елемент постійної фази (Constant Phase Element, CPE), який є узагальненим і універсальним засобом для моделювання імпедансу великого класу електрохімічних систем. У найзагальнішому сенсі поведінку елемента CPE можна розглядати як прояв властивостей фрактальності у просторі частот.

Цей елемент може відображати як експоненційний розподіл параметрів даної електрохімічної реакції, пов'язаної з подоланням енергетичного бар'єру при перенесенні заряду і маси, так і імпеданс системи, що має фрактальні структури на поверхні досліджуваного електрода або гетерогенні утворення поблизу нього. Часто елемент CPE є формальним описом складної системи, що дає лише зовнішню, якісну подобу, не відображаючи фізичної суті явища. В цьому випадку CPE є найпростішою моделлю, яка лише формально апроксимує більш складний розподіл параметрів об'єкта. Тому пошуки фізичного сенсу в цих випадках повністю неспроможні [107].

Застосовувати його можливо лише на базі комплексного фізико - хімічного опису досліджуваної системи.

Сума наведених параметрів застосована для опису комплексної електропровідності досліджуваних матеріалів.

2.2.9 Методики формування електродів для амперометричних сенсорів і дослідження їх характеристик

В якості токоподвода до ферментного електрода використовували Au-електрод модифікований гетероструктурою, нанесеною на підкладку з гра-

фена. В якості гетероструктур використовували іммобілізовані неорганічні носії $m=0,03$ г, змочені розчином KCl, які наносили на графен (1×1 см).

Виміри проводили за допомогою цифрового мультиметра UNI-T UT30 C (USA) з вхідним опором не менше 20 мОм.

Схема вимірів представлена на рис. 2.6.

Аналітичний сигнал фіксували у вигляді значень густини струму на комірці у часі, який встановлювався в системі після послідовного додавання до системи гетероструктура - графен аліквот $3 \cdot 10^{-6} \div 0,15$ г/мл розчину глюкози об'ємом 0,05 мл.

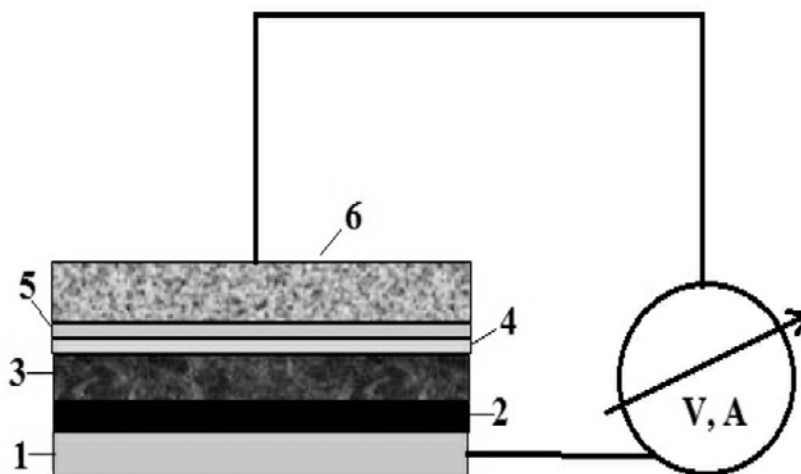


Рисунок 2.6 – Вимірювальна схема досліджуваного глюкозного біосенсора: 1 – Au - електрод; 2 – шар графену; 3 – гетероструктура; 4 – мембрана (ацетилцелюлоза); 5 – фільтрувальний папір, змочений у KCl; 6 – платинований титан

2.3 Висновки до розділу 2

Для дослідження формування гетероструктур в системі неорганічний носій - нативний ферментний препарат класу оксидоредуктаз крім фізико - хімічних були також використані електрохімічні методи. Фізико-хімічні

властивості органомінеральних гетероструктур встановлені завдяки прямій потенціометрії і потенціометричному титруванню, інфрачервоній (ІК) і ультрафіолетовій (УФ) спектроскопії, атомно-абсорбційній спектрофотометрії (ААС), спектрофотометрії, скануючій електронній мікроскопії (СЕМ), циклічній вольтамперометрії (ЦВА), спектроскопії електрохімічного імпедансу (СЕІ).

Вибір матеріалу збірки, а саме використання Au - струмопідводу обумовлений високою каталітичної активністю ферментного препарату. Використання інших електродів (Pt) призводило до появи досить високих фонових струмів і подальшої втрати чутливості сенсора.

Однчасне застосування взаємодоповнюючих загальноприйнятих методів дослідження дають підстави стверджувати про обґрунтованість зроблених в роботі висновків.

РОЗДІЛ 3. ФІЗИКО-ХІМІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ СИСТЕМИ НЕОРГАНІЧНИЙ НОСІЙ - ФЕРМЕНТНИЙ ПРЕПАРАТ ЯК ГЕТЕРОСТРУКТУРИ

Всі відомі дослідження систем фермент - носій виконані з використанням індивідуальних ферментів високої чистоти. Склад нативного ферментного препарату значно складніший. Тому, в припущенні можливих додаткових вкладів компонентів препарату, досліджені його хімічний склад і властивості утворених гетероструктур.

3.1 Елементний склад і властивості нативного ферментного препарату

Атомно-абсорбційний аналіз нативного та іммобілізованого на неорганічних носіях ферментного препарату (табл. 3.1) виявив чотири основних іонів металів (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}), що входять до його складу.

Таблиця 3.1 – Зміст іонів металів в нативному та іммобілізованому на неорганічних носіях ферментному препараті

Система	Зміст іонів металів, %			
	$\text{Fe}^{3+} \cdot 10^{-3}$	$\text{Cu}^{2+} \cdot 10^{-4}$	$\text{Ni}^{2+} \cdot 10^{-5}$	$\text{Zn}^{2+} \cdot 10^{-4}$
НФП	1,85±0,09	1,20±0,06	6,72±0,34	5,38±0,27
Бентоніт + НФП	2,55±0,13	0,32±0,02	6,50±0,33	4,62±0,23
Мод.бентоніт+НФП	1,40±0,07	0,17±0,01	6,70±0,34	4,30±0,22
Каолін + НФП	0,77±0,04	0,12±0,01	5,01±0,251	2,90±0,15
Аеросил-300 + НФП	0,30±0,02	0,012±0,001	2,40±0,120	1,50±0,08

Концентрацію металів в іммобілізованих гетероструктурах визначали за різницею між концентраціями металів у нативному ферментному препараті та у носіях.

Аналіз необоротного зв'язування за іонами металів, що входять до складу нативного ферментного препарату встановив таку залежність для іонів Fe^{3+} і Ni^{2+} – аеросил-300 > каолін >> модифікований фосфат-іонами бентоніт = бентоніт, для Cu^{2+} і Zn^{2+} – аеросил-300 > каолін > модифікований фосфат-іонами бентоніт > бентоніт.

Це свідчить про селективне виділення з рослинного матеріалу суміші ферментів класу оксидоредуктаз, або суміші пероксидази з супероксиддисмутазою [111-112].

Встановлено, що природний бентоніт селективно зв'язує іони Cu^{2+} , модифікований фосфат-іонами бентоніт – іони Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , а аеросил-300 й каолін – всі чотири іона металу (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}), (табл. 3.2-3.3).

Таблиця 3.2 – Ступінь необоротного зв'язування іонів металів, що входять до складу ферментного препарату на носіях різної природи

Носій	Необоротне зв'язування іонів металів							
	$\text{Fe}^{3+} \cdot 10^{-3}$	%	$\text{Cu}^{2+} \cdot 10^{-4}$	%	$\text{Ni}^{2+} \cdot 10^{-5}$	%	$\text{Zn}^{2+} \cdot 10^{-4}$	%
Бентоніт	-	-	$0,84 \pm 0,04$	70,0	-	-	-	-
Мод. бентоніт	0,19	10,2	$1,00 \pm 0,05$	83,3	-	-	$0,19 \pm 0,01$	3,5
Каолін	0,84	45,3	$1,04 \pm 0,05$	86,7	$0,98 \pm 0,05$	14,6	$2,06 \pm 0,10$	38,3
Аеросил-300	1,26	68,0	$1,14 \pm 0,06$	98,4	$3,29 \pm 0,16$	48,9	$3,50 \pm 0,18$	65,0

Наявність чотирьох основних іонів металів в нативному ферментному препараті свідчить про присутність кількох типів ферментів, що мають відмінності у складі і будові каталітичних і адсорбційних центрів білкової молекули.

Таблиця 3.3 – Еквівалентні співвідношення іммобілізованих іонів металів на поверхні неорганічних носіїв

Носій	Співвідношення
Бентоніт	Cu ₁
Мод. бентоніт	Fe _{11,7} : Cu _{5,5} : Zn ₁
Каолін	Fe _{89,8} : Cu _{9,8} : Ni ₁ : Zn ₁₉
Аеросил	Fe _{40,1} : Cu _{3,1} : Ni ₁ : Zn _{9,6}

Різниця в адсорбційній ємності щодо ферменту і пористості вихідних носіїв (останні коливаються в межах від 16 до 300 м²/г) носить антибатний характер, що вказує на вплив кількості кислих і основних центрів поверхні на вибірковість зв'язування.

Аналіз кислотно-основної активності носіїв встановив, що вибірковість зв'язування оксидоредуктаз різної будови (супероксиддисмутаза і пероксидаза) є функцією концентрації основних груп на поверхні носія (табл. 3.4).

Таблиця 3.4 – Кількість кислих і основних центрів на поверхні неорганічних носіїв до і після іммобілізації ферментного препарату, (ммоль-екв/г)

Система	[H ⁺]	Δ [H ⁺]	[OH ⁻]	Δ [OH ⁻]
Бентоніт	0,09±0,005		0,08±0,004	
Бентоніт + НФП	0,072±0,004	-0,02	0,08±0,004	0
Мод. бентоніт	0,14±0,007		0,08±0,006	
Мод. бентоніт + НФП	0,14±0,007	0	0,1±0,006	+ 0,02
Каолін	0,220±0,011		-	
Каолін + НФП	0,320±0,016	+ 0,10	0,200±0,010	+ 0,20
Аеросил-300	0,072±0,004		0,200±0,010	
Аеросил-300 + НФП	0,045±0,002	+ 0,06	0,110±0,006	-

З підвищенням кількості протонів на поверхні неорганічного матеріалу втрачається вибірковість зв'язування ферментів. В результаті абсолютна кількість зв'язаного ферменту зменшується за рахунок конкурентного зв'язування оксидоредуктаз інших класів.

З табл. 3.4 видно, що надмірна концентрація іонів H^+ впливає на вихідну структуру оксидоредуктаз. Поява додаткових гідроксид - іонів (OH^-) в разі модифікованого фосфат - іонами бентоніту може бути викликана виділенням вільної полуацетальної гідроксидної групи в результаті гідролізу ферменту. Це зберігає здатність фрагменту адсорбованої молекули до розкриття циклу, посилює можливість здійснення цикло-оксо-таутомерії і обумовлює відновні властивості отриманої системи.

3.2 Спектральні характеристики гетероструктур

Для визначення впливу структурних особливостей мінерального носія на стабільність редокс - активності іммобілізованого ферментного препарату паралельно знято ІЧ – спектри всіх досліджених носіїв та гетероструктур на їх основі.

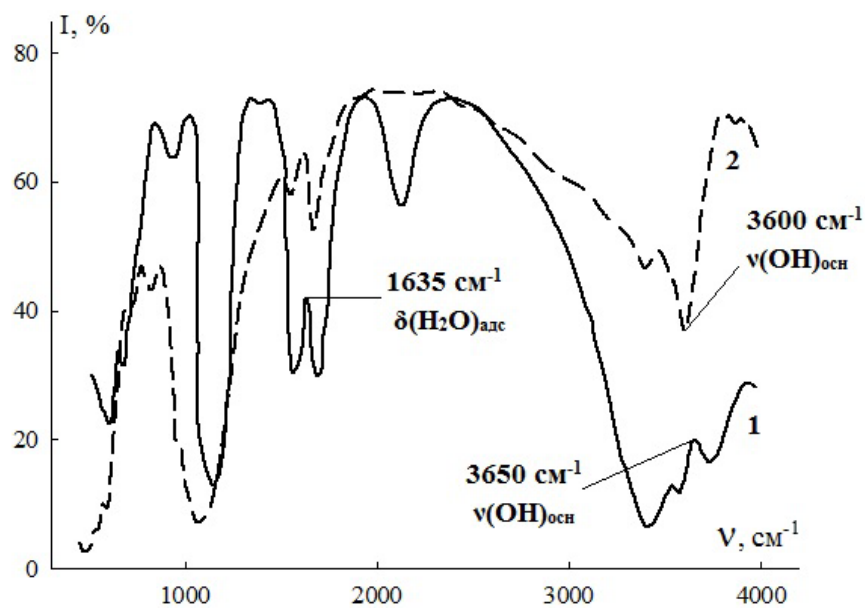


Рисунок 3.1 – ІЧ - спектри бентоніту (1) і гетероструктури на його основі (2)

В спектрі досліджуваного бентоніту (рис. 3.1, табл. 4.3) ідентифіковані всі найбільш характерні для мінералів дашуківського родовища смуги поглинання, а саме: смуги з максимумами 470, 1040 cm^{-1} – обумовлені коливаннями Si–O зв’язків; 525 cm^{-1} – Si–O–Al, коливання OH- груп проявляються у вигляді смуг поглинання в областях 1600-3200 и 3200-4000 cm^{-1} .

Таблиця 3.5 – Характеристичні довжини хвиль ІЧ- спектрів бентоніту і гетероструктури на його основі

	Частота коливань (cm^{-1})		Тип коливань	Атомна група [113-115]
	Бентоніт	Бентоніт + НФП		
3700	3710, 3640	3600	v	-ОН (структурн.)
3400	3400	3400	v	H ₂ O (адсорбц.)
2320	2320	—	v	H ₂ O
	1640	—	δ	H ₂ O
1627-1683	—	1630	δ	C=O (амід I)
1498-1587	—	1500	v	N-H в площині (амід II)
	1450	—	δ	-ОН
1040	1040	1030	δ	Si-O- Si
613-700	—	680	v	O=C-N в площині (амід IV)
525	525	520	δ	змішані Si–O–Al і Mg-O
	470	470	δ	Si-O
470	430	430	δ	Fe(III)-O в окт. позиціях

Максимальну стабільність в часі показав носій - модифікований фосфат - іонами бентоніт (рис. 3.2, табл. 3.6). Однак в спектрі щодо вихідного природного мінералу спостерігається зміщення піку адсорбованої води в більш довгохвильову область, а прояв структурних ОН- груп в більш короткохвильову область, що в сумі знижує хвильовий діапазон в 1.5 рази. Отже, можливе зниження енергетичного бар'єру при утворенні водневих зв'язків між ОН- групами і водою, або ОН- групами і полярними групами ферменту, що повинно призводити до більш стабільної редокс - активності гетероструктури.

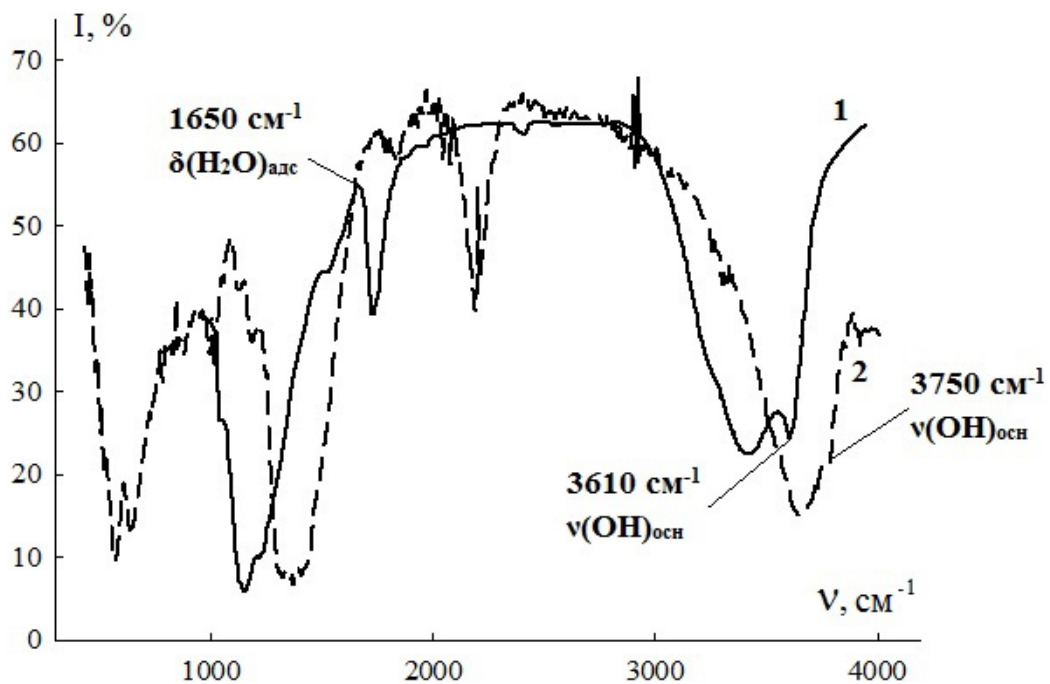


Рисунок 3.2 – ІЧ-спектри модифікованого бентоніту (1) і гетероструктури на його основі (2)

Присутність в ІЧ- спектрі модифікованого бентоніту, що контактував з розчином ферментного препарату смуг, характерних для коливань амідних груп білків (1654, 1648, 1642 см⁻¹ - (ν) C=O (амід I); 1562, 1556, 1500 см⁻¹ - (δ) N-H в площині (амід II); 694, 668 см⁻¹ – (δ) O=C-N в площині (амід IV)), підтверджує сорбційне зв'язування ферменту з носієм. Зсув і зменшення інтенсивності смуг поглинання амід-I з 1650 до 1640 см⁻¹ та амід-II з 1520 до 1500 см⁻¹ обумовлений змінами CN- конформації білкової молекули [4]. У зв'язку з відсутністю смуг поглинання, характерних для валентних коливань груп C-N

(амід – А, В) – 3300-3100 cm^{-1} і значними змінами спектра в області валентних коливань вільних ОН- груп поверхні модифікованого бентоніту і адсорбованої води: зсув смуги 3437 до 3428 cm^{-1} , а також деформаційних коливань адсорбційної води 1650 cm^{-1} і 1375 cm^{-1} (δ – тетраedr Si-OH), свідчать про утворення міцних хімічних зв'язків молекул ферменту з бентонітом і підтверджують наявність необоротного зв'язування, що і визначає стабільність редокс - активності отриманої гетероструктури.

Таблиця 3.6 – Характеристичні довжини хвиль ІЧ- спектрів модифікованого фосфат- іонами бентоніту і гетероструктури на його основі

Частота коливань (cm^{-1})			Тип коливань	Атомна група [113-115]
	Мод. бентоніт	Мод. бентоніт + НФП		
3700	3625, 3575	3840, 3792	v	-ОН (структурн.)
3400	3437	3428	v	H ₂ O (адсорбц.)
2320	—	2368, 2364, 2336, 2304	v	H ₂ O
	1650	—	δ	H ₂ O (адс)
	1575	—	δ	-ОН
1627-1683	—	1654, 1648, 1642	v	C=O (амід I)
1498-1587	—	1562, 1556, 1500	δ	N-H в площині (амід II)
	1375	—	δ	-ОН
1040	1037	1064	v	Si-O- Si
613-700	—	694, 668	δ	O=C-N в площині (амід IV)
525	525	520	δ	змішані Si-O-Al і Mg-O
470	—	470	δ	Fe(III) в окт. позиціях

На ІЧ - спектрах каоліну (рис. 3.3, табл. 3.7) спостерігаються смуги в діапазонах, характерних для валентних коливань гідроксид - аніону, (3620 - 3700 cm^{-1}).

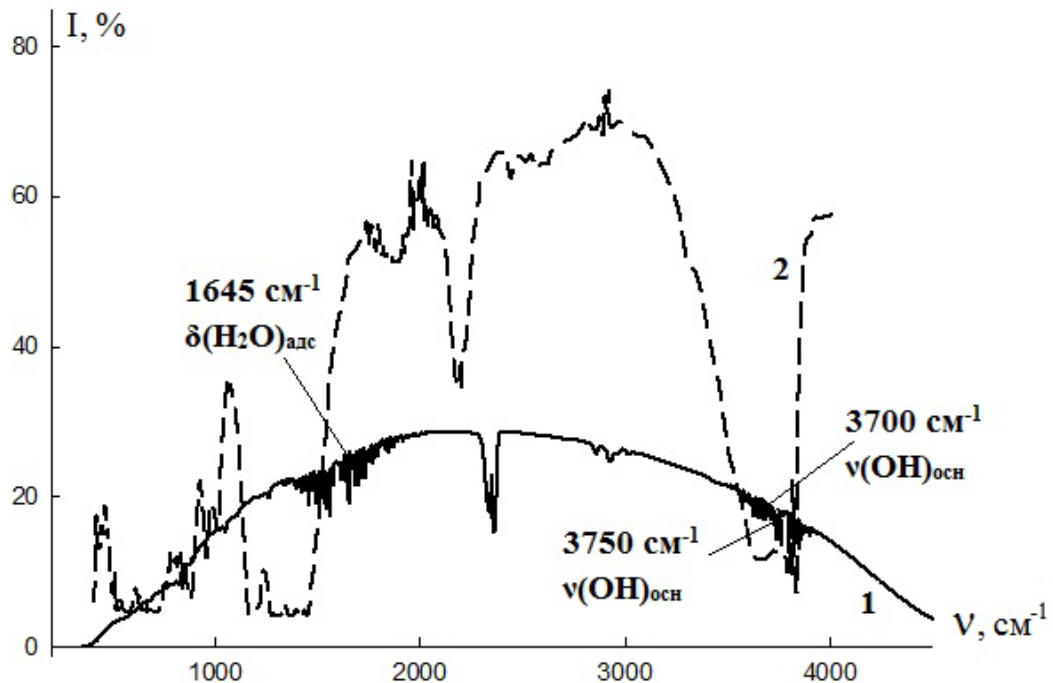


Рисунок 3.3 – ІЧ-спектри каоліну (1) і гетероструктури на його основі (2)

При детальній розшифровці спектра виявлено невеликий пік з максимумом 1682 cm^{-1} , який характерний для коливань поверхневої води в комплексі типу M-OH_2 , що вказує на слабку фіксацію води поверхнею мінералу, а також на конкуруючу адсорбцію ферменту цими групами при іммобілізації ферменту на каоліні.

Виявлені характерні для коливань амідних груп білків смуги: (ν) зв'язки C=O (амід I), (δ) N-H в площині (амід II), (δ) O=C-N в площині (амід IV)) підтверджують слабе сорбційне зв'язування ферменту з каоліном. Таким чином, наявність конкурентної оборотної адсорбції призводить до нестабільності редокс - активності гетероструктури.

Таблиця 3.7 – Характеристичні довжини хвиль ІЧ- спектрів каоліну і гетероструктури на його основі

Частота коливань (см ⁻¹)		Тип коливань	Атомна група [113-115]	
	Каолін			Каолін + НФП
3700	3780	3696, 3676, 3668, 3652	v	-ОН серпентиту (структурн.)
3620	3640	3624	v	-ОН
3400	3465	3440	v	H ₂ O (адс)
2320	2420	2368, 2324, 2320	v	H ₂ O
1640	1682	—	δ	H ₂ O (адс)
1627-1683	—	1644	v	C=O (амід I)
1498-1587	—	1536, 1500, 1492	δ	N-H в площині (амід II)
	1472	—	δ	-ОН
1100	1125	1104	v _{as}	Si-O- Si
850-1100	937, 1060	916, 964	v	молекули тетрадрів, складених з атомів O ₂ з атомами Si всередині
730-760	748, 717	754, 730	v	групи SiO ₂
613-700	—	696	δ	O=C-N в площині (амід IV)
≤ 500	544, 465, 433	568	δ	групи SiO ₂ Si-O-Al ^{VI} – зв'язки
	—	384	δ	Fe(III) в окт.позиціях

На ІЧ- спектрі вихідного аеросилу -300 (рис. 3.4, табл. 3.8) ідентифіковані смуги, що відповідають наступним видам коливань поверхневих гідроксилів: 3752, 3744 см⁻¹ – ν- коливання ОН- основна (Н- пов'язана).

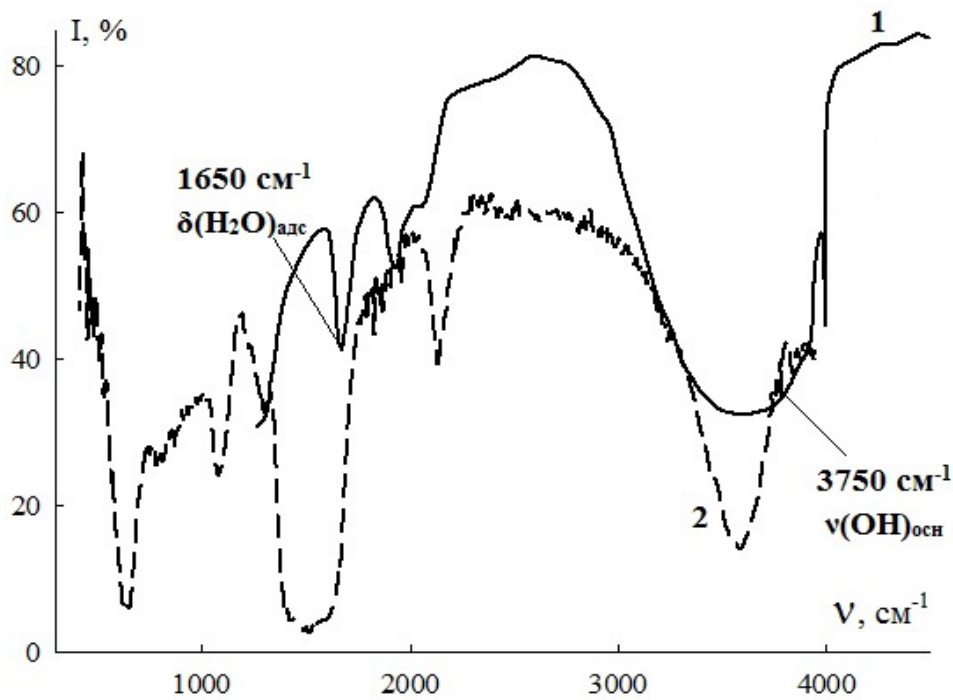


Рисунок 3.4 – ІЧ-спектри аеросилу-300 (1) і гетероструктури на його основі (2)

Після адсорбції ферменту виявляються характерні для білків смуги амід I і амід II ($1500\text{—}1700\text{ см}^{-1}$). Присутність в спектрі характерних смуг амід I і амід II дозволяє зробити висновок, що при адсорбції не відбувається істотних змін вторинної структури білкової молекули. Однак при іммобілізації ферменту на аеросилі-300, в ІЧ-спектрі з'являються зміни в області валентних коливань пов'язаних водневим зв'язком основних гідроксилів поверхні аеросилу-300 (водневі зв'язки ($3400\text{--}3750\text{ см}^{-1}$)) і адсорбційної води ($1670\text{--}1640\text{ см}^{-1}$). Так, значно зменшується інтенсивність смуги 3750 см^{-1} і зовсім зникає смуга $1670\text{--}1640\text{ см}^{-1}$ ($\delta\text{ H}_2\text{O}$ (адс)), що, очевидно, пов'язано з утворенням водневих зв'язків білкової частини ферменту з поверхнею носія, що частково утримує фермент від десорбції.

Аналіз ІЧ-спектрів дозволив припустити консервуючу дію носія на іммобілізований ферментний препарат з подальшою його активацією у водному середовищі.

Таблиця 3.8 – Характеристичні довжини хвиль ІЧ- спектрів аеросилу-300 і гетероструктури на його основі

Частота коливань (см ⁻¹)			Тип коливань	Атомна група [113-115]
	Аеросил-300	Аеросил-300 + НФП		
3750	3750	3752, 3744	v	-ОН-основна (Н- пов'язана)
3400	3250-3500	3464	v	H ₂ O (адс)
	1900-1875	—	δ	-ОН
1627-1683	—	1636	v	C=O (амід I)
	1670-1640	—	δ	H ₂ O (адс)
1498-1587	—	1524	δ	N-H в площині (амід II)
1100	1260	1116	v _{as}	Si-O-Si
	—	480	δ	Fe(III) в окт.позиціях

Таблиця 3.9 – Окислювальна активність іммобілізованих ферментних препаратів щодо субстрату - відновника C₆H₄(OH)₂

Система	\bar{A} , о.а.
НФП	0,1±0,01
Бентоніт + НФП	0,7±0,01
Мод. бентоніт + НФП	0,3±0,001
Каолін + НФП	0,12±0,001
Аеросил-300 + НФП	0,42±0,001

За результатами досліджень іммобілізації нативного ферментного препарату на неорганічних носіях і даних ІЧ-спектрів встановлено зміну механізму зв'язування ферментів з носієм, що істотно впливає на збільшення його

окисної активності (табл. 3.9) [116]. Так, на бентоніті окислювальна активність в реакції (2.8) збільшується в 7 разів, на модифікованому фосфатіонами бентоніті в 3 рази, на каоліні активність практично не змінюється, а на аеросилі-300 зростає в 4 рази.

3.3 Утворення поверхневих сполук з перенесенням заряду

В електронних спектрах поглинання 20% розчину нативного ферментного препарату (рис. 3.5) зафіксована смуга поглинання з максимумом при 29920 см^{-1} , яка відповідає $d-d$ переходу ${}^4T_{2g} \rightarrow {}^2A_{2g}, {}^2T_{1g}$ іона Fe^{3+} в октаедричному оточенні. Особливістю поглинання в заданому діапазоні є прояв переважно перенесення заряду, проте невелике розщеплення дублетних і квартетних станів при $28736 ({}^4T_{2g})$ і $30960 ({}^2A_{2g}, {}^2T_{1g}) \text{ см}^{-1}$ може свідчити про формування низкоспінового комплексу Fe^{3+} групи симетрії O_h [105, 117-122]. Такий комплекс дозволяє здійснювати переходи типу: $\pi L \rightarrow \pi^* e$, $\pi L \rightarrow \pi^* z^2 (a_1)$ і $\pi L \rightarrow \pi^* x^2 - y^2 (b_1)$.

Використовуючи модель кутового перекривання, і вводячи поправку на зміну енергії спіну - спарювання (параметр D), обумовлене переходами з перенесенням заряду ліганд - метал, відносні енергії d -орбіталей можна записати в наступному вигляді:

$$\begin{aligned} E(x^2 - y^2) &= 3e_{\sigma}(As) - (4/3)D \\ E(z^2) &= 2e_a(X) + e_{\sigma}(As) - (4/3)D \\ E(xz, yz) &= 2e_{\pi}(X) + 2e_{\pi}(As) + (2/3)D \\ E(xy) &= 4e_{\pi}(As) + (2/3)D \end{aligned}$$

Таким чином, для залізовмісних частин ферменту характерні два типи взаємодії з поверхнею носія, обумовлені ковалентним зв'язуванням, а також наявністю слабких електростатичних взаємодій на іоногенних групах поверхні при відсутності стеричних труднощів, обумовлених типом симетрії комплексу заліза.

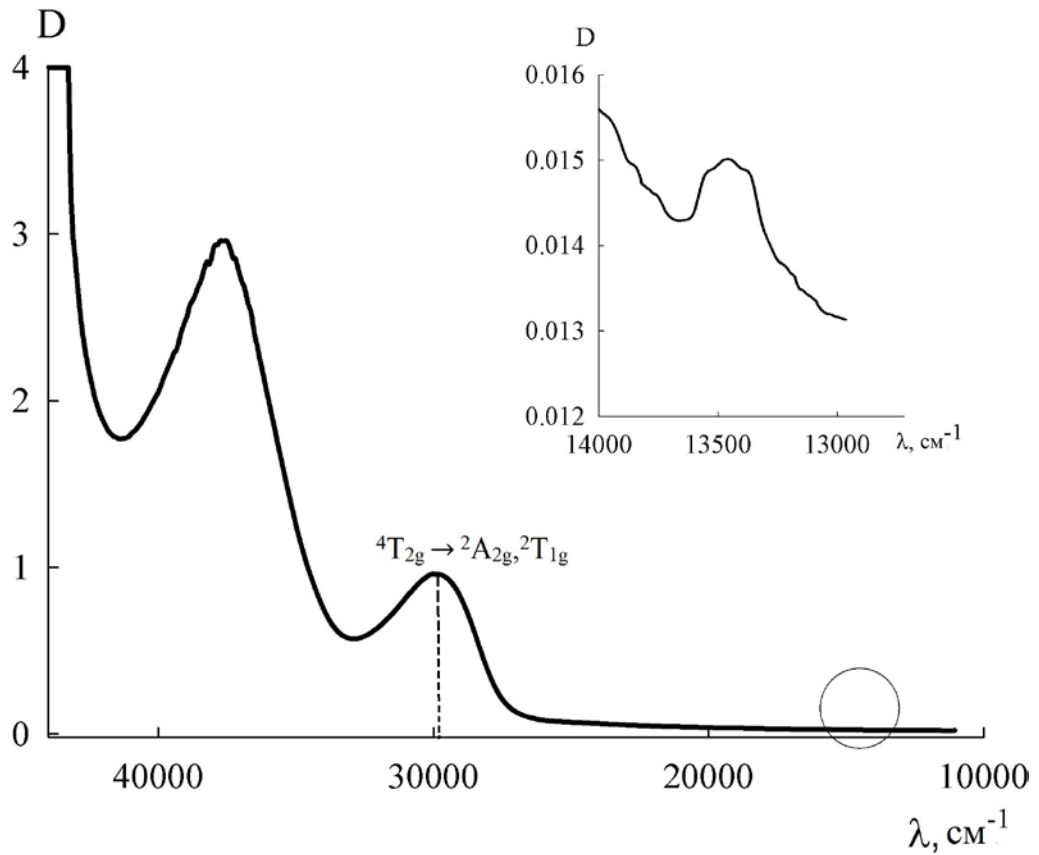


Рисунок 3.5. – Електронні спектри поглинання нативного ферментного препарату ($C_{\text{ф.п.}}=20\%$, $\lambda=5000 - 11000 \text{ cm}^{-1}$, $l=1 \text{ cm}$): а - $d-d$ переходи іона Fe^{3+} ; б - $d-d$ переходи іона Cu^{2+}

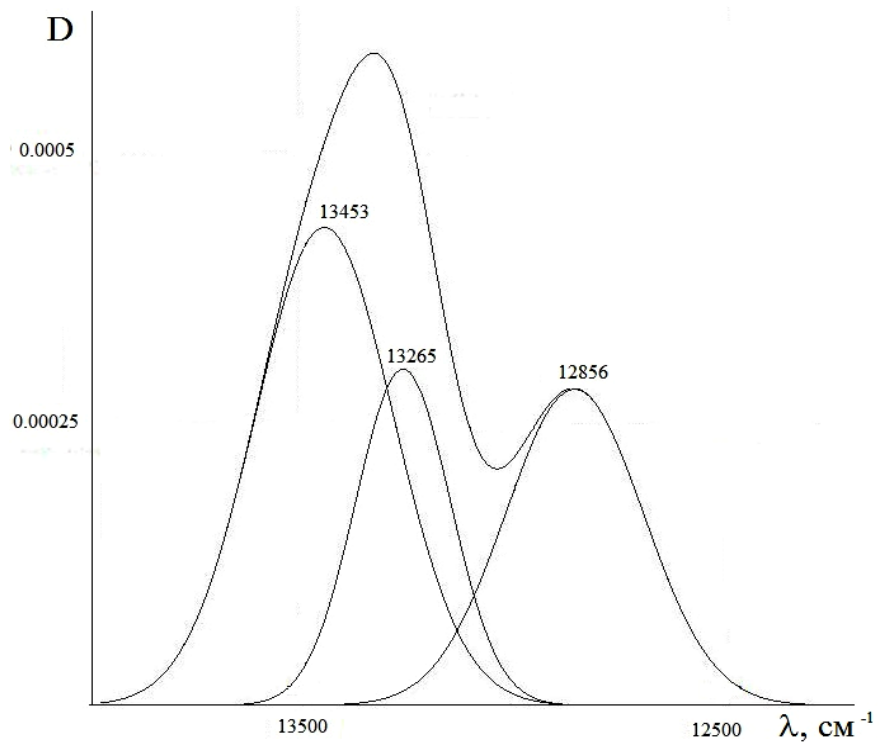


Рисунок 3.6. – Нормальний (гаусівський) розподіл - триплет для Cu^{2+}

В ЕСП нативного ферментного препарату зафіксована широка розщеплена смуга поглинання з максимумом при 13453 см^{-1} , яка відноситься до $d-d$ переходу $A_{1g} \rightarrow T_{1g}$ іона Cu^{2+} (рис. 3.6) [105,117]. Подібна спектральна картина свідчить про наявність в структурному фрагменті ферменту 5 координованого мідь – вмісного хромофора. На зниження координаційного числа міді (II) з 6 до 5 вказує і батохромний зсув основного максимуму поглинання ($\sim 12000 \rightarrow 13500 \text{ см}^{-1}$). Ймовірно, координаційний поліедр Cu^{2+} відповідає викривленій тригональній біпіраміді (симетрія D_{3h}) [123-124].

Даний висновок підтверджується наявністю в $d-d$ -спектрах триразового розщеплення $\nu_{\text{макс}}$, що може свідчити про дозвіл трьох електродипольних станів іона міді. Розкладання зазначеної смуги на гаусові складові (рис. 4.2) дозволило виявити, що вона складається з трьох компонентів, що мають сильну енергетичну смугу (13453 см^{-1}), яка супроводжується слабшими смугами в області низьких частот (13265 і 12856 см^{-1}). Лінійна симетрія комплексу та наявність електродипольних станів збільшує можливість реалізації фізичної адсорбції, викликаной електростатичною взаємодією, а також підвищує ймовірність захоплення і зшивання ферменту неорганічним носієм.

На ЕСП нативного ферментного препарату в даному частотному діапазоні не вдалося виявити переходи іона Ni^{2+} через його низьку концентрацію ($\sim 10^{-5}\%$). Однак доказом присутності даного іона, так само як і іона Zn^{2+} в нативному ферментному препараті, є дані високочутливого атомно-адсорбційного аналізу [124-125].

3.4 Висновки до розділу 3

В даному розділі встановлено наявність чотирьох основних іонів металів (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}) у нативному ферментному препараті, що свідчить про формування різних каталітичних і адсорбційних центрів білкової молекули. Виявлено, що природний бентоніт селективно зв'язує іони Cu^{2+} , модифікова-

ний фосфат-іонами бентоніт – іони Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , а аеросил-300 та каолін – всі чотири іона металу (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}).

Основний вплив на функціональні властивості гетероструктур має не площа поверхні, а кількість кислих і основних центрів на поверхні носія. Підвищення кількості кислих центрів обумовлює неселективне зв'язування різних оксидоректуктаз, що і передбачає значний вплив синергізму на електрохімічні властивості досліджених систем. Збільшення кількості основних центрів на поверхні неорганічних носіїв обумовлює селективне зв'язування іонів металів.

Комплексом фізико-хімічних і електрохімічних методів встановлена відмінність в механізмах зв'язування металовмісних ділянок білкових молекул ферментів з препарату, засноване на реалізації просторового поділу ферментів по іонам металів, що входять до їх складу. Реалізація такого поділу дозволяє підвищити (в 4 рази) окислювальну активність і стабільність іммобілізованого препарату і створює умови для утворення областей, здатних до специфічної (розподіленої) адсорбції зарядів.

РОЗДІЛ 4. ФОРМУВАННЯ РЕДОКС-АКТИВНОСТІ ГЕТЕРОСТРУКТУР НА ОСНОВІ НЕОРГАНІЧНИХ НОСІЇВ І ФЕРМЕНТНОГО ПРЕПАРАТУ

Відмінності у поведінці гетероструктур на різних носіях обумовлені проявом відмінностей в механізмах зв'язування нативного ферментного препарату з неорганічним носієм. При цьому важливим фактором є природа і кислотно-основні властивості поверхні носія і їх вплив на властивості утвореної гетероструктури. Необхідні подальші дослідження зміни морфології поверхні носія під впливом ферменту.

4.1 Морфологічні характеристики поверхні гетероструктур фермент-носій

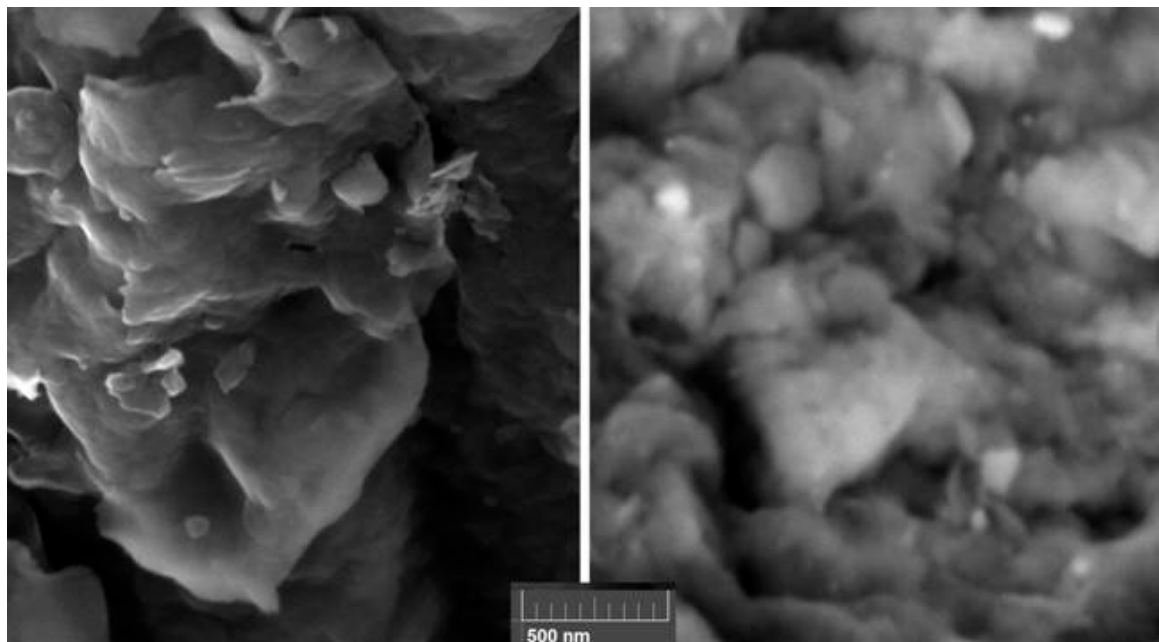
Інформація про розмір і розподілу часток в досліджених гетероструктурах отримана на основі аналізу СЕМ зображень. Наявність чотирьох основних іонів металів у нативному ферментному препараті призводить до зміни розподілу каталітичних і адсорбційних центрів початкової конфігурації ферментного препарату, що визначається появою різних поверхневих структур.

Ферментам, що входять до складу різних систем, властива певна спеціалізація: одні з них ефективно гідролізують «внутрішні» глікозидні зв'язки між моносахаридними залишками, віддаленими від кінців полісахариду (їх називають ендоферменти); інші переважно розщеплюють «зовнішні» глікозидні зв'язки, що знаходяться на кінцях полісахаридної молекули (екзоферменти) [125-126].

На основі сучасних уявлень про структуру активного центру ферменту екзо-типу можна виділити структуру з розривом «зовнішніх» глікозидних зв'язків, спрямований вглиб білкової молекули, структура якого не дозволяє вмістити більше визначеного числа мономерних ланок субстрату, а для

ферментів ендо-типу – структуру з розривом «внутрішніх» глікозидних зв'язків на поверхні білкової молекули ферменту, уздовж якої і розташовується субстрат.

У природного бентоніту на поверхні існує приблизно рівна кількість кислих і основних центрів (табл. 3.4). В цьому випадку зберігається можливість зв'язування ферменту як за кислими, так і за основними центрами мінералу. Можливий розрив не тільки «внутрішніх», але і крайових глікозидних зв'язків, що знаходяться на кінцях молекули. У зв'язку з цим на поверхні носія будуть формуватися два типи гетероструктур. Однак після іммобілізації ферменту на поверхні зменшується кількість тільки кислих центрів. Це вказує на те, що зв'язування йде тільки по одному з механізмів, тому в гетероструктурі формується ендо-тип структура, що підтверджується даними електронної мікроскопії (рис. 4.1).



а

б

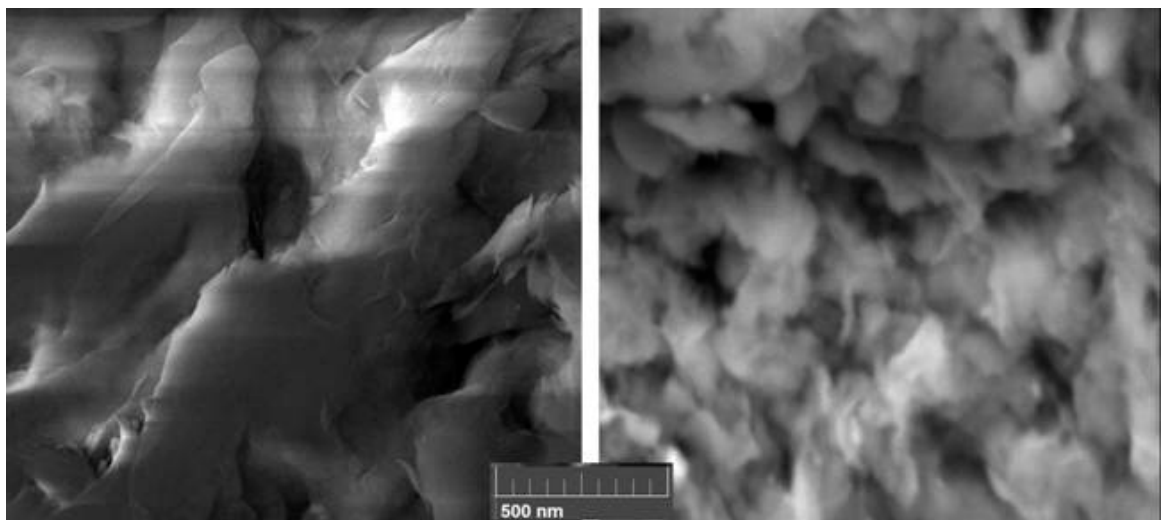
Рисунок 4.1 – СЕМ гетероструктури (а) і вихідної поверхні (б) природного бентоніту

Так, згідно з даними таблиці 4.1, розміри пор в утвореній гетероструктурі бентоніт-фермент вказують на переважне формування структур ендо-типу.

Таблиця 4.1 – Розмір пор бентоніту і гетероструктури на його основі

Носій	Екзо- тип, нм	Ендо- тип, нм	Розмір пор, нм
Бентоніт	100-300	150-200	150-200
Бентоніт + НФП	150-300	250-500	100-200

У разі модифікованого фосфат-іонами бентоніту (рис. 4.2), фермент іммобілізують за рахунок розриву внутрішніх глікозидних зв'язків, і активний центр залишається доступним для субстратів будь-яких розмірів.



а

б

Рисунок 4.2 – СЕМ гетероструктури (а) і вихідної поверхні (б) модифікованого фосфат-іонами бентоніту

Додатковим доказом розриву цих зв'язків служить необоротне зв'язування іонів металів, які формують активні центри ферментів: заліза (активний центр оксидоредуктаз), міді (активний центр редуктази і кофактор оксидоредуктаз) і цинку (кофактор оксидоредуктаз) (табл. 3.2). Наявність

певного кількісного співвідношення іонів металів, пов'язаних модифікованим бентонітом дозволяє припустити вибірковість незворотного зв'язування, викликаного не тільки наявністю кислих центрів на мінеральній поверхні, але і структурними особливостями мінералу - носія, що має ламеллярну структуру. Тому, як і в випадку з бентонітом, на модифікованому бентоніті теж відбувається формування структур ендо-типу [127].

Аналіз даних таблиці 4.2 показав утворення близьких за розміром пір з гетероструктурою бентоніт-фермент, але при цьому - відсутність структур екзо- типу.

Таблиця 4.2 – Розмір пор модифікованого бентоніту і гетероструктури на його основі

Носій	Екзо- тип, нм	Ендо- тип, нм	Розмір пор, нм
Мод. бентоніт	50-250	100-200	100-200
Мод. бентоніт + НФП	-	300-400	-

На поверхні каоліну є тільки кислі центри (табл. 3.4), які формують його високу протонну провідність у водних середовищах. Ці особливості носія і визначають специфіку зв'язування ферментів, знижуючи загальну кількість необоротно зв'язаних ділянок, що містять іони металів. На поверхні формується чотири активних центра ферментів: заліза (активний центр оксидоредуктаз і супероксиддисмутаза), міді (активний центр супероксиддисмутаза і кофактор оксидоредуктаза), цинку (активний центр супероксиддисмутаза, кофактор оксидоредуктаза) і нікелю (активний центр оксидоредуктаза і супероксиддисмутаза) [111, 128-129]. При цьому специфіка зв'язування впливає на підвищення еквівалентних співвідношень в залізо - нікель (в 1,4 рази) і мідь-цинк (в 1,9 рази) вмісних ділянках ферменту (табл. 3.3). Отримані результати дозволяють припустити переважний вплив кислих центрів поверхні носія на іммобілізацію ферменту.

Після іммобілізації на каоліні є обидва типи центрів (кислі та основні), тому селективність даного носія істотно знижується в порівнянні з іншими матеріалами. Тому на каоліні замість структур екзо- або ендо- типу формується хаотична структура (рис. 4.3).

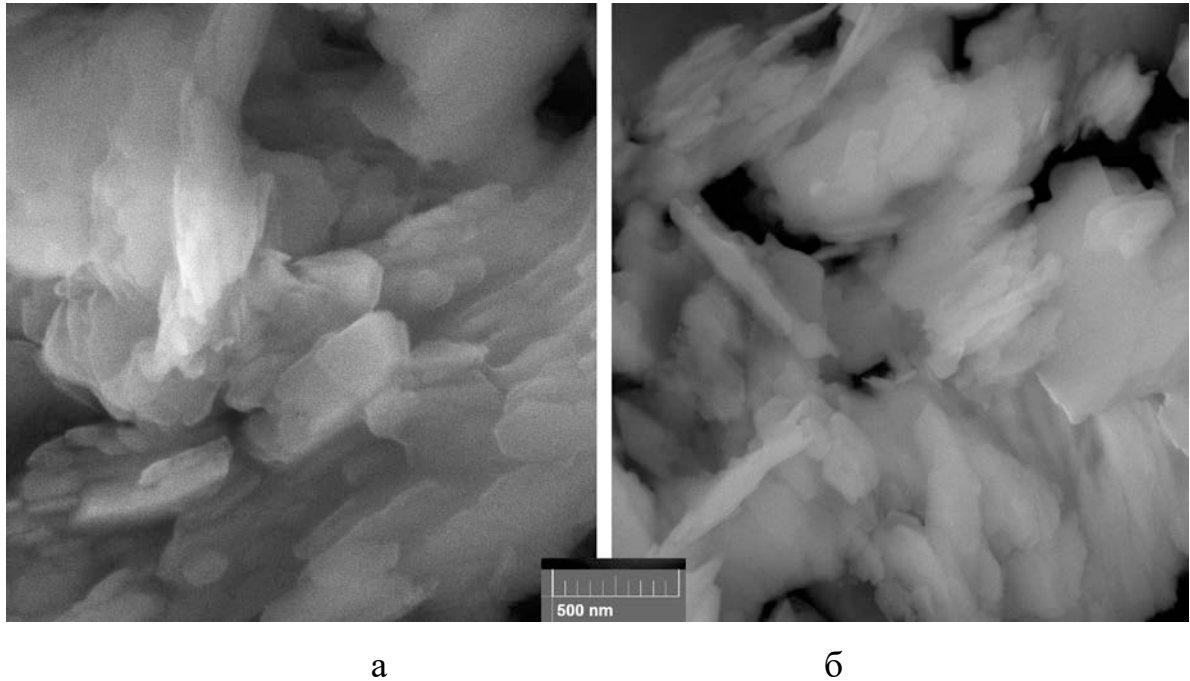


Рисунок 4.3 – СЕМ гетероструктури (б) і вихідної поверхні (а) каоліну

Так, за даними таблиці 4.3 розміри пір для структур екзо- і ендо-типу практично однакові, це свідчить про одночасне формування цих структур.

Табл. 4.3 – Розмір пор каоліну і гетероструктури на його основі

Носій	Екзо- тип, нм	Ендо- тип, нм	Розмір пор, нм
Каолін	200-300	200-450	150-450
Каолін + НФП	200-450	250-500	300-500

Аналіз кислотно-основних характеристик аеросилу-300 до та після іммобілізації встановив, що кількість основних центрів перевищує більш ніж у 2,5 рази кількість кислих центрів на поверхні носія (табл. 3.4). Однак після іммобілізації спостерігається сімбатне зниження кількості кислих і основних

центрів, що вказує на їх спільну участь у зв'язуванні ферментів. При цьому значне збільшення частки необоротного зв'язування з іонами Fe^{3+} і Ni^{2+} корелює зі зменшенням як частки основних, так і кислих центрів, а по іонам Cu^{2+} і Zn^{2+} - зі зменшенням частки кислих центрів (рис.4.4).

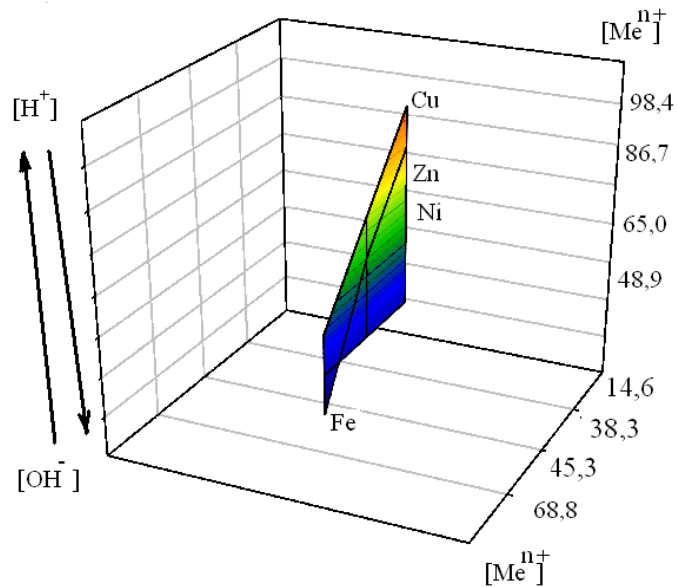


Рисунок 4.4 – Зміна зв'язування іонів металів в залежності від кількості кислих і основних центрів на поверхні носія

Таким чином, проявляється дуальний характер зв'язування з іонами Fe^{3+} і Ni^{2+} , тоді як для іонів Cu^{2+} і Zn^{2+} підтверджується переважно зв'язування з кислими центрами. Отже, за формування структур екзо-типу в іммобілізованих ферментах можуть відповідати ферменти, що містять мідь і цинк (рис. 4.5).

Присутність основних груп на поверхні аеросилу-300 створює певні стеричні труднощі, що відбивається на кількісному співвідношенні зв'язаних металів. Виявлена відмінність в механізмах зв'язування металовмісних ділянок білкових молекул дозволяє припустити наявність просторового поділу ферментів, що мають іони Fe^{3+} і Ni^{2+} з мідь і цинк- вмісними ферментами.

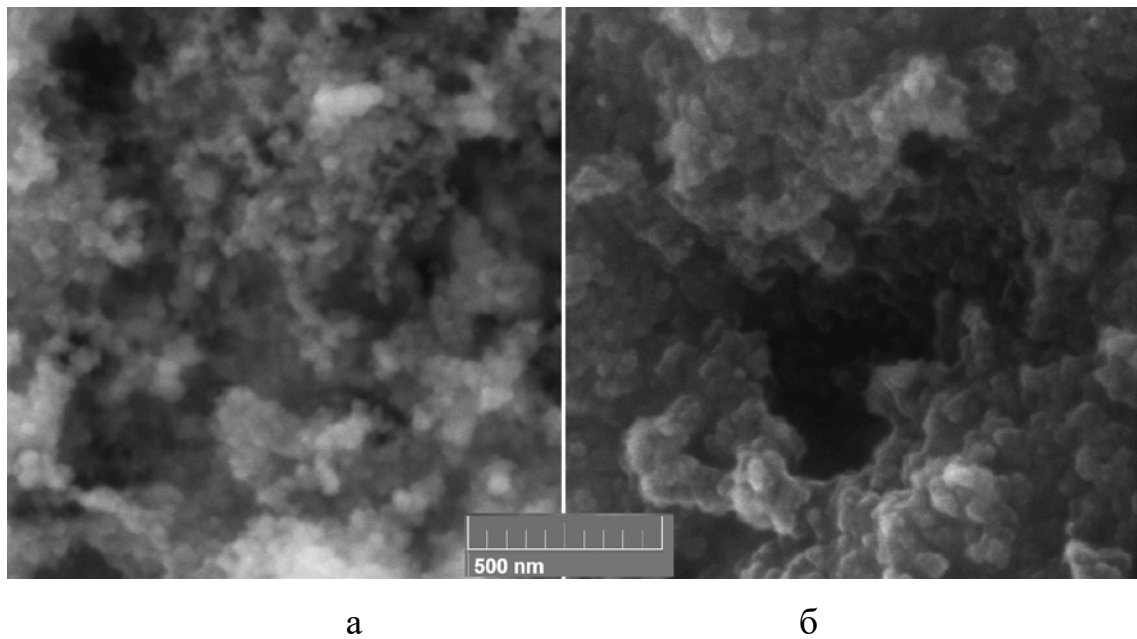


Рисунок 4.5 – СЕМ гетероструктури (б) і вихідної поверхні (а) аеросилу - 300

У гетероструктурі аеросил-300–фермент (табл. 4.4) розміри пір вказують на формування структур тільки екзо-типу.

Табл. 4.4 – Розмір пор аеросилу-300 та гетероструктури на його основі

Носій	Екзо- тип, нм	Ендо- тип, нм	Розмір пор, нм
Аеросил-300	100-250	150-400	50
Аеросил-300 + НФП	100-450	150-350	70-100

Таке просторове розділення значно підвищує (у 4 рази) окислювальну активність іммобілізованого препарату (табл. 3.9) і створює умови для утворення областей, здатних до специфічної адсорбції зарядів. Наявність таких зон підвищує ймовірність утворення стійких подвійних електричних шарів, здатних до накопичення енергії у водних середовищах.

4.2 Редокс – властивості синтезованих гетероструктур

Дослідження кінетики зміни рН і областей появи точок ізоелектричного зсуву в нативному ферментному препараті показали наявність ефектів, які призводять до пригнічення електронодонорних властивостей ферменту і появи надлишку протонів у перші 2 години контакту ферменту з водним середовищем (рис. 4.6). Подібна поведінка відповідає будові ферментів типу оксидоредуктаз, що мають NH^+ і OH^- групи [4], які обумовлюють сумарну редокс - активністю. Тому кислотно-основні властивості системи можуть служити тестом для оцінки загальної редокс - активності будь-яких гетероструктур на основі ферментів класу оксидоредуктаз.

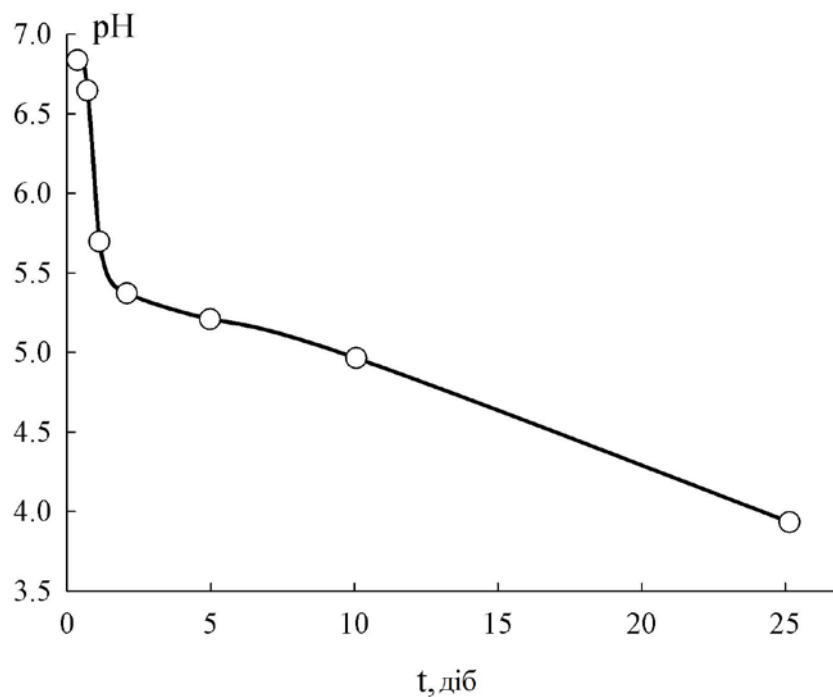


Рисунок 4.6 – Кінетика зміни рН в фосфатно-буферному екстракті нативного ферментного препарату

З урахуванням отриманих результатів, проведено математичний аналіз імпедансу ферментних систем на підставі припущення про участь вільних протонів у формуванні основних носіїв заряду [130].

Слідуючи цьому припущенню, висловимо питому електропровідність дистильованої води:

$$\sigma = e[H^+]t_+, \quad (4.1)$$

де e – елементарний заряд; $[H^+]$ – концентрація протонів в одиниці об'єму; t_+ – рухливість протонів.

Беручи до уваги наявність власного магнітного моменту у вільного протона, отримуємо вирази для константи Холла:

$$R_H = 1/[H^+]e \quad (4.2)$$

Таким чином, з підвищенням концентрації протонів слід очікувати зменшення значення постійної Холла, тому відношення поперечної різниці потенціалів до поздовжнього струму буде зменшуватися:

$$R_H = \frac{U_{\text{поперечное}}}{I_{\text{продольное}}} \quad (4.3)$$

Це відповідає практичній відсутності опору уздовж поздовжньої лінії струму. Наявність таких ефектів має відповідати появі на спектрах імпедансу областей з нульовими значеннями реактивного опору.

При наявності індуктивної складової загальний опір системи представляється як:

$$Z = R + j(\omega L - \frac{1}{\omega C}) = R + jX, \quad (4.4)$$

тобто, закон Ома запишемо у формі:

$$I = \frac{\dot{A}}{R + jX} \quad (4.5)$$

При $R > jX$ $\Sigma R + jX$ завжди буде > 0 , тому використовуючи вираз для густини струму:

$$i = \frac{I}{S} = \frac{q}{tS} = e\delta t_{\pm} \quad (4.6)$$

отримали залежність для густини заряду, яка входить в рівняння постійної Холла, що визначає знак носія заряду:

$$R_i = \frac{1}{\delta e} \quad (4.7)$$

$$R_f = \frac{\sigma^2_{\delta} R_{\delta} + \sigma^2_{\dot{a}} R_{\dot{a}}}{(\sigma_{\delta} + \sigma_{\dot{a}})^2} \quad (4.8)$$

Отже, знак алгебраїчної суми активного і реактивного опору в спектрах імпедансу

$$\Sigma = R + X \quad (4.9)$$

дозволяє оцінити знак основного носія струму.

Аналіз спектрів імпедансу в координатах Боде (рис. 4.7) виявив наявність резонансних частотних областей зсувів фазового кута Θ у всіх досліджених гетероструктурах, які, відповідно до рівняння 4.4, обрані в якості основних зон для отримання значень активного і реактивного опору, і подальшого розрахунку сумарного опору і типу носія заряду (табл. 4.1).

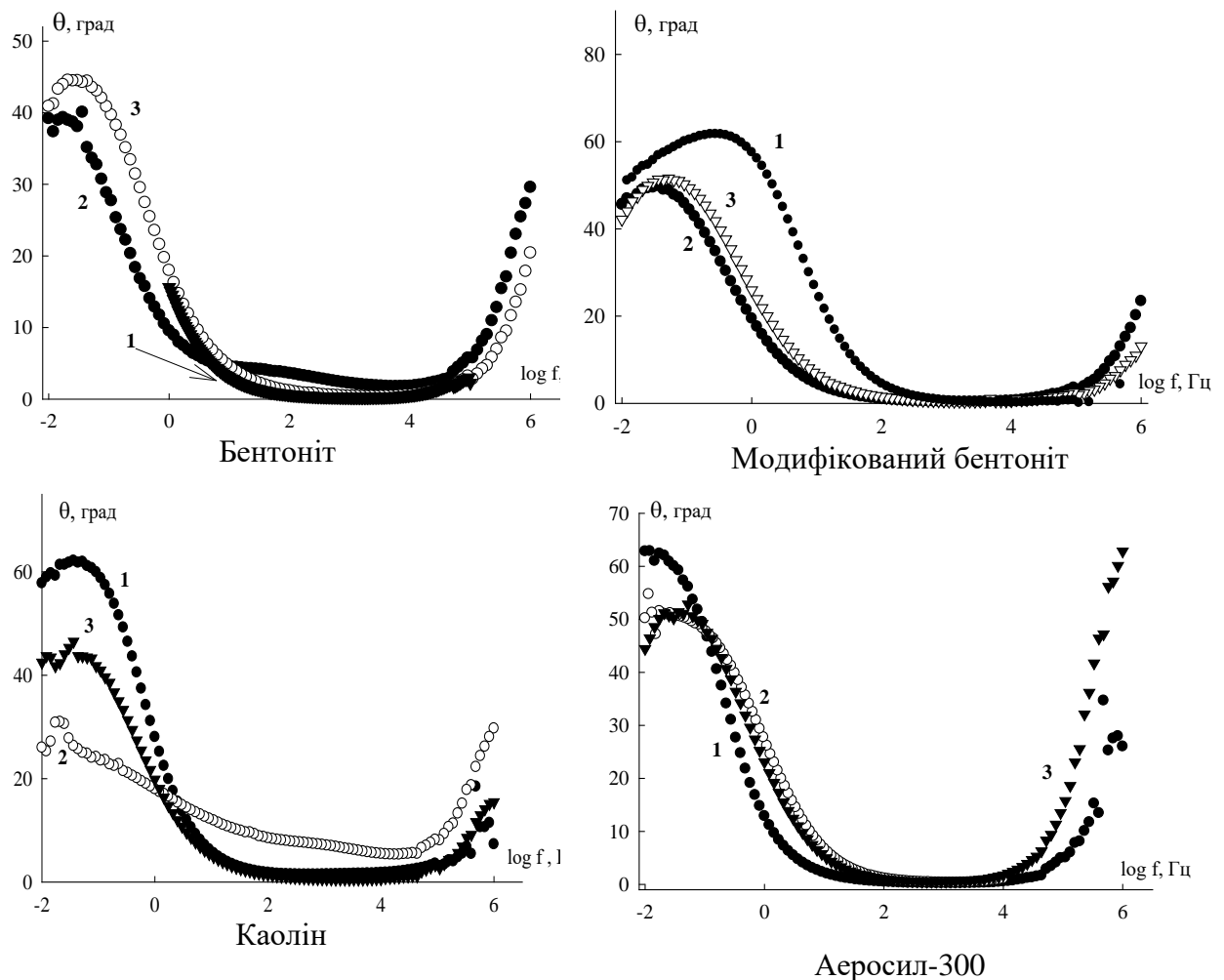


Рисунок 4.7 – Спектри імпедансу в координатах Боде: носія (1), гетероструктур з іммобілізованим ферментом в початковий момент часу (2) і після 3 діб витримки у дистильованій воді (3)

Використання запропонованої методики оцінки типу носія заряду і визначення значень сумарного імпедансу за формулою (4.9) виявило залежність знаку і значення алгебраїчної суми реактивного й активного опору від типу носія. Це вказує на здатність носія впливати не тільки на редокс - властивості ферменту шляхом зміни знаку носія заряду (протонна та електронна складова), але також на сумарну кількість носіїв заряду в досліджуваних гетероструктурах (табл. 4.5).

Таблиця 4.5 – Основні характеристики резонансних областей спектрів імпедансу водних суспензій, що містять фермент

Система	R_s Ом	Зсув фазового кута, θ	Резонанс. частота, Гц	Поч. значення Z'' , Ом	Поч. значення Z' , Ом	$\Sigma = R + X$
Бентоніт	559	-14.602	1.123	-1477.3	5671	+4193.7
Бентоніт + НФП	7435	-40.07	0.036	-18234	21677	+3443
Те ж, 3 дні	3893	-44.545	0.021	-20567	20896	+329
Мод. бентоніт	560.5	-61.773	0.275	-5280.8	2834.8	-2446
Мод.бентоніт + НФП	3733	-49.86	0.036	-20665	17426	-3239
Те ж, 3 дні	2492	-51.591	0.052	-15232	12077	-3175
Каолін	2861	-61.78	0.044	-23272	12489	-10783
Каолін + НФП	9976	-30.984	0.021	-51518	85795	+34277
Те ж, 3 дні	5100	-46.524	0.036	-22562	21393	-1169
Аеросил-300	-	-42.004	0.076	-79541	88326	+8785
Аеросил-300 + НФП	-	-45.528	0.044	-118730	116560	-2170
Те ж, 3 дні	-	-51.097	0.044	-143580	115870	-27710

У всіх експериментах, за винятком систем з каоліном, спостерігається підвищення протонної активності гетероструктури, яка досягає максимуму на носії аеросил - 300. Це свідчить про різке підвищення окислювальної активності системи в цілому.

В гетероструктурах з каоліном спостерігається зворотна тенденція [131-132].

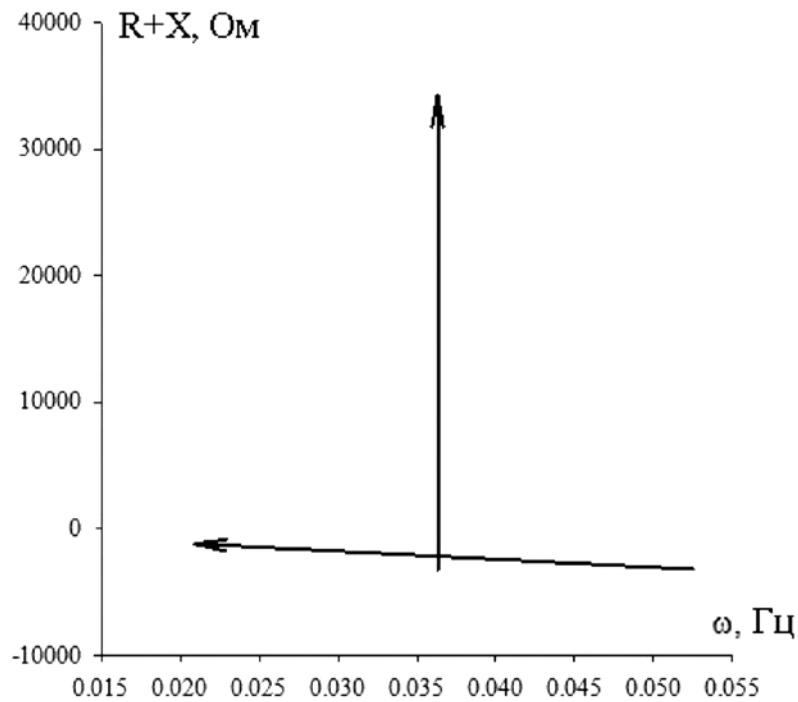


Рисунок 4.8 – Векторна залежність негативної (1) і позитивної (2) струмової компоненти від частоти

Співставлення векторів спрямованості областей електронної та протонної провідності показало наявність поздовжньої і поперечної компоненти в русі зарядів різного знаку (рис. 4.8). При цьому негативна компонента (електронна провідність) залежно від матеріалу носія охоплює більш широкий частотний діапазон, ніж позитивна (протонна провідність).

4.3 Закономірності перенесення заряду в системі неорганічний носій - нативний ферментний препарат – електроліт

Спектр електрохімічного імпедансу 0,5% водної суспензії нативного ферментного препарату (рис. 4.9) в координатах Найквіста показує, що чистий фермент поводить себе як електроліт.

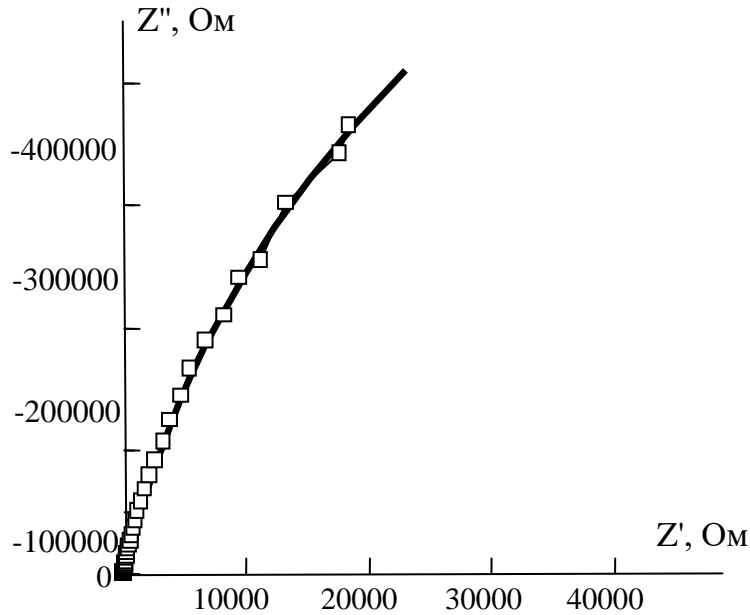


Рисунок 4.9 – Спектр імпедансу 0.5% суспензії нативного ферментного препарату в координатах Найквіста

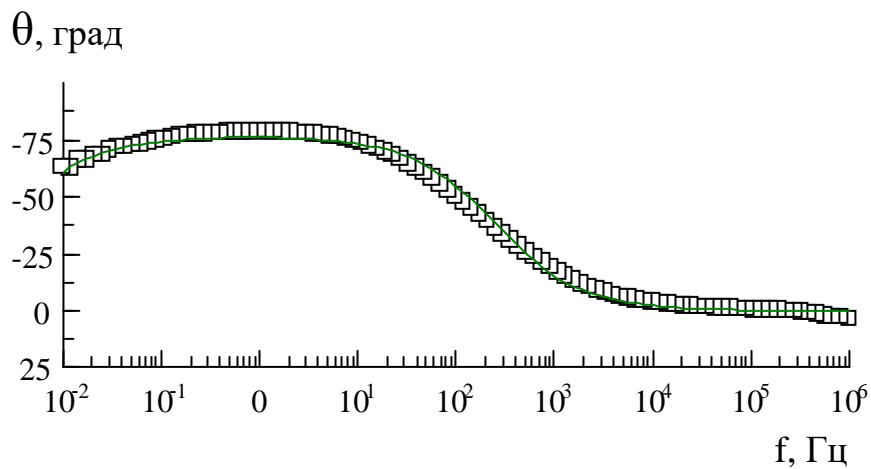


Рисунок 4.10 – Спектр імпедансу 0.5% суспензії нативного ферментного препарату в координатах Боде

Моделювання еквівалентної схеми для нативного ферментного препарату встановило наявність елемента постійної фази (CPE) і двох опорів (рис. 4.11).

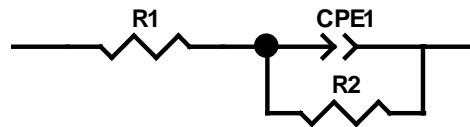


Рисунок 4.11 – Еквівалентна схема нативного ферментного препарату

Еквівалентна схема є характерною для неоднорідного електроліту (модель Ершлера - Рендлса) [106].

Аналіз чисельного значення елемента CPE-P показав, що ферментний препарат має переважно електронну провідність (табл. 4.6).

Таблиця 4.6 – Чисельні значення елементів еквівалентної схеми, що моделюють електрохімічну систему нативного ферментного препарату

Елемент	Значення, Ом	Похибка, %
R_1	91,37	0,66
CPE-T	$2,0 \cdot 10^{-5}$	0,74
CPE-P	0,85	0,22
R_2	$1,6 \cdot 10^6$	8,05

Спектри електрохімічного імпедансу 0,5% водних суспензій отриманих гетероструктур в координатах Найквіста демонструють вплив ферментів на зміну електрохімічної поведінки системи.

Так в спектрі бентоніту та гетероструктури на його основі (рис. 4.12) спостерігається поява областей перегину з нульовими значеннями реактивного опору.

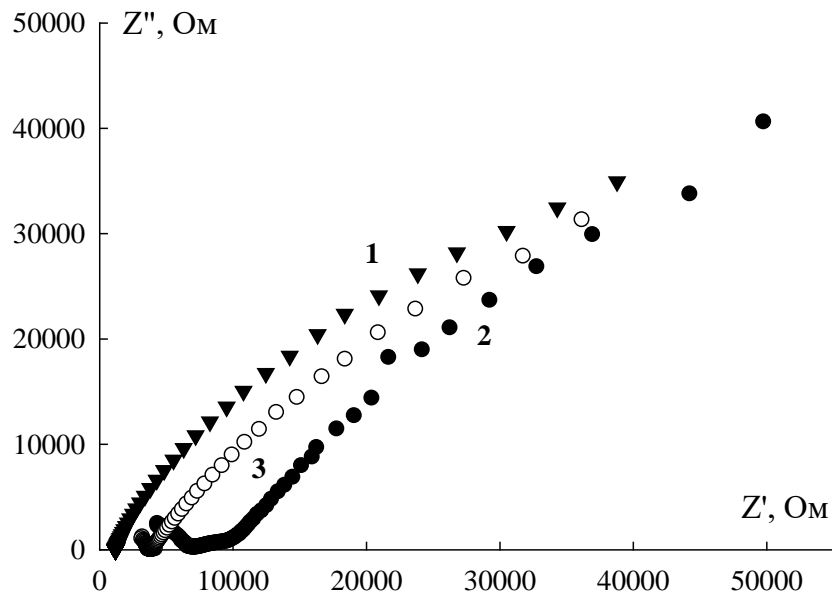


Рисунок. 4.12 – СЕІ 0,5% суспензій ферментного препарату, іммобілізованого на бентоніті у координатах Найквіста: 1 – вихідний матеріал носія, 2 – те ж зі свіжонанесеним на носій препаратом, 3 – через 3 дні витримки в дистильованій воді

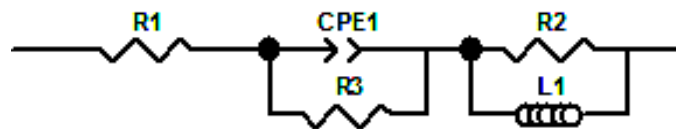


Рисунок 4.13 – Еквівалентна схема гетероструктури бентоніт - ферментний препарат

Елемент СРЕ-Р і його значення експоненційного фактору для $n = 0.5 \pm \varepsilon$ (область W) вказують, що СРЕ моделює імпеданс ідеальної або деформованою дифузії у квазігомогенній системі (рис. 4.13, табл. 4.7). Поява в еквівалентній схемі опору індуктивності пов'язано з проявом ефекту Холла на високих частотах. Це, за нашим припущенням, є відгуком частинок з власним магнітним моментом, а саме іонів заліза, які присутні як у носії, так і у препараті, і протона.

Таблиця 4.7 – Чисельні значення елементів еквівалентної схеми, що моделює електрохімічну систему бентоніт - ферментний препарат

Елемент	Значення, Ом	Похибка, %
R_1	3824	0,67
CPE-T	$1,4 \cdot 10^{-4}$	1,55
CPE-P	0,69	1,56
R_2	-1764	14,50
R_3	$1,2 \cdot 10^5$	14,45
L_1	$-3,0 \cdot 10^{-4}$	9,07

За даними СЕІ спектр гетероструктури модифікований бентоніт-фермент подібний спектру даної системи після витримки у воді, що вказує на консервуючу дію носія з наступною активацією в водній фазі (рис. 4.14).

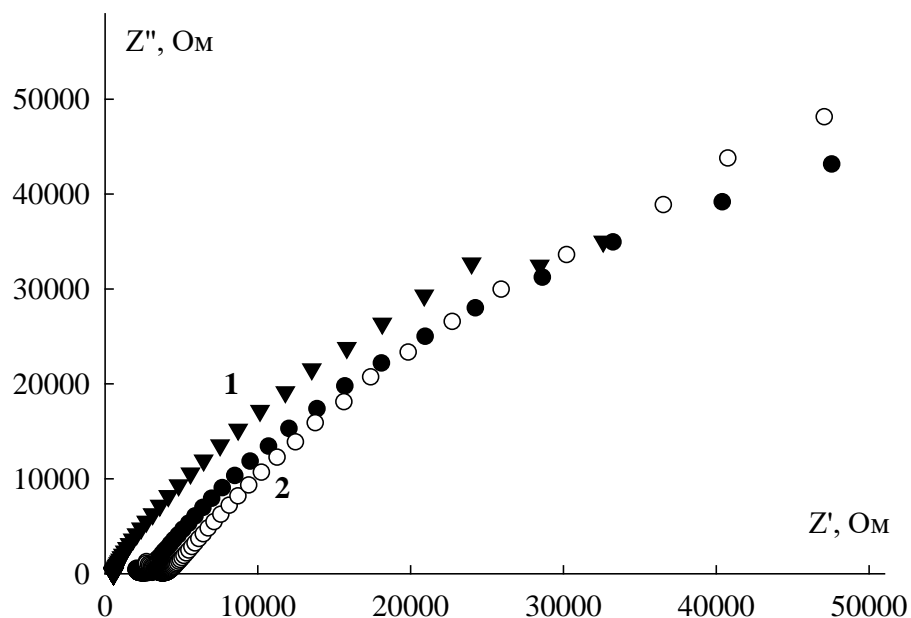


Рисунок 4.14 – СЕІ 0,5% суспензій ферментного препарату, іммобілізованого на модифікованому бентоніті у координатах Найквіста: 1 – вихідний матеріал носія, 2 – те ж зі свіжонанесеним на носій препаратом, 3 – через 3 дні витримки в дистильованій воді

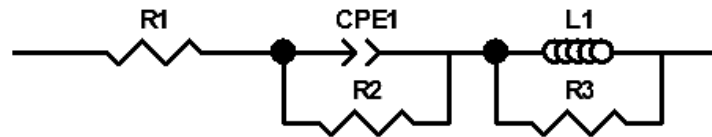


Рисунок 4.15 – Еквівалентна схема гетероструктури модифікований бентоніт - ферментний препарат

Елемент CPE-P, його значення $n \rightarrow 1 - \varepsilon$, де $0 \ll \varepsilon < (0.1-0.2)$ (область C), у цьому випадку CPE дає імпеданс чистого або розподіленого ємнісного елемента, тобто описує появу структур, що відповідають за накопичення енергії в даній системі. Поява в еквівалентній схемі опору індуктивності також пов'язана з проявом ефекту Холла на високих частотах. Це обумовлено подібністю поведінки носіїв однієї природи (рис 4.15, табл. 4.8).

Таблиця 4.8 – Чисельні значення елементів еквівалентної схеми, що моделює електрохімічну систему модифікований бентоніт - ферментний препарат

Елемент	Значення, Ом	Похибка, %
R_1	3839	1,13
CPE-T	$1,1 \cdot 10^{-4}$	2,34
CPE-P	0,71	2,20
R_2	-1498	12,18
R_3	$2,1 \cdot 10^5$	28,9
L_1	$-5,0 \cdot 10^{-4}$	13,66

Зовнішній вигляд спектра після іммобілізації подібний спектрами суперконденсаторів [133], але відрізняється високими значеннями як активної, так і реактивної складових імпедансу, що обумовлено відсутністю електролітної складової.

Моделювання спектрів і подальше дослідження механізму перенесення заряду в системі неорганічний носій - нативний ферментний препарат встановило наявність ємнісного елемента на чистому каоліні, який при нанесенні ферментного препарату бере участь в редокс - реакції і перенесенні заряду. Наявність редокс реакції з перенесенням заряду схематично описується шунтованим елементом постійної фази (СРЕ) і відповідає куту нахилу прямолінійної ділянки спектра 45° (рис. 4.16 - 4.17).

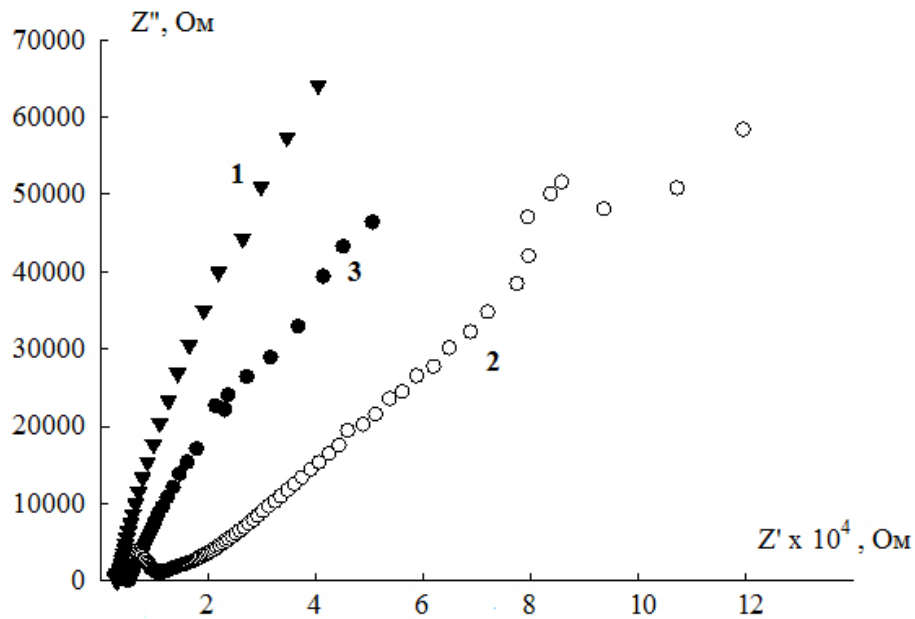


Рисунок 4.16 – СЕІ 0,5% суспензій ферментного препарату, іммобілізованого на каоліні у координатах Найквіста: 1 – вихідний матеріал носія, 2 – те ж зі свіжонанесеним на носій препаратом, 3 – через 3 дні витримки в дистильованій воді

Зникаюче малі значення ємнісного елемента (табл. 4.2) дозволяють не враховувати його в описі загального процесу перенесення заряду. Отже, в системі каолін - ферментний препарат основну функцію генератора енергії виконує власне редокс реакція за участю ферменту. Це узгоджується з даними по значенням елемента СРЕ і описує експоненціальний розподіл параметрів даної електрохімічної реакції, пов'язаної з подоланням енергетичного бар'єру при перенесенні заряду і маси. Отримані значення

$CPE-T = 1,1 \cdot 10^{-4}$ формально описує імпеданс чистого або розподіленого (спотвореного) резистивного елемента, його значення $n \rightarrow 0$, що відображає частотну залежність. Елемент $CPE-P$, його значення $n \rightarrow 1 - \varepsilon$, де $0 \ll \varepsilon < (0.1-0.2)$ (область C), в цьому випадку CPE дає імпеданс чистого або розподіленого ємнісного елемента, тобто описує появу структур, що відповідають за накопичення енергії в даній системі. Подальше підвищення кута нахилу низькочастотної області спектра більш 45^0 після витримки в дистильованій воді підтверджує низьку активність і нестабільність іммобілізованих на каоліні ферментів, що узгоджується з раніше отриманими результатами.

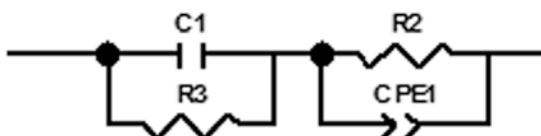


Рисунок 4.17 – Еквівалентна схема гетероструктури каолін - ферментний препарат

Таблиця 4.9 – Чисельні значення елементів еквівалентної схеми, що моделює електрохімічну систему каолін - ферментний препарат

Елемент	Значення, Ом	Похибка, %
C_1	$1,7 \cdot 10^{-11}$	11,7
$CPE-T$	$1,1 \cdot 10^{-4}$	1,22
$CPE-P$	0,79	0,98
R_2	$3,6 \cdot 10^5$	20,3
R_3	2866	0,62

На аеросилі-300 іммобілізація ферментів, призвела до протилежних результатів. Іммобілізований препарат істотно не змінив вихідних електрохімічних властивостей носія, а при тривалому перебуванні у водному

середовищі, навпаки, його стабілізував. Таким чином, нанесення просторово розділених ферментів проявляє стабілізуючий вплив на формування областей, здатних накопичувати заряд і реалізовувати редокс перетворення. Виходячи з моделі (схема Войта) таких областей повинно бути дві (рис. 4.18), що корелює з даними по іммобілізації залізо - нікель і мідь-цинк вмісних ферментів.

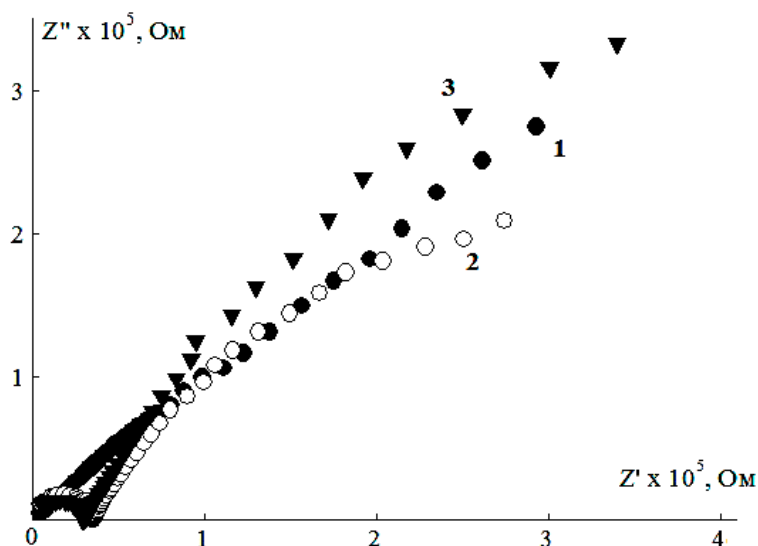


Рисунок 4.18 – СЕІ 0,5% суспензій ферментного препарату, іммобілізованого на аеросилі-300 у координатах Найквіста: 1 – вихідний матеріал носія, 2 – те ж зі свіжонанесеним на носій препаратом, 3 – через 3 дні витримки в дистильованій воді

Наявність двох шунтованих елементів СРЕ, розташованих симетричного один від одного, у яких значення $CPE-T \rightarrow 0$, а $CPE-P \rightarrow 1 - \epsilon$, (рис. 4.19, табл. 4.10), свідчать про формування системи суперконденсатора [133].

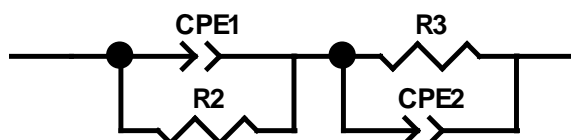


Рисунок 4.19 – Еквівалентна схема гетероструктури аеросил-300 - ферментний препарат

Таблиця 4.10 – Чисельні значення елементів еквівалентної схеми, що моделює електрохімічну систему аеросил-300 - ферментний препарат

Елемент	Значення, Ом	Похибка, %
R_2	32792	0,23
CPE_1-T	$3,1 \cdot 10^{-11}$	6,11
CPE_1-P	0,95	0,43
R_3	$3,6 \cdot 10^5$	1,52
CPE_2-T	$1,56 \cdot 10^{-5}$	0,58
CPE_2-P	0,78	0,49

Відмінності в чисельних значеннях CPE_1-P від CPE_2-P на 0,25 Ом повинно призводити до появи асиметричності в цих системах і підвищенню енергоємності [134].

4.4 Висновки до розділу 4

Виявлено вплив кислотно-основних властивостей поверхні носія на посилення активності ферментного препарату після іммобілізації на неорганічних носіях. Встановлена макроструктура активного центру, утвореного нативним ферментним препаратом, іммобілізованим на неорганічних носіях. Підтверджено наявність у ньому системи з двох ферментів і двох коферментів. Показано, що в залежності від природи носія механізм зв'язування ферментів і активність змінюються.

Вперше показано, що редокс - активністю іммобілізованого нативного ферменту можна керувати застосуванням носіїв з переважно електронною або протонною провідністю, які впливають на окисні або відновні властивості новоствореної системи. Запропоновано розрахунковий метод оцінки впливу матеріалу носія на редокс - активність гетероструктури та її стабільність у часі на основі значень активного і реактивного опорів системи.

Таким чином, можна зробити висновок, що наявність високих позитивних значень $\Sigma = R + X$ буде призводити до ініціації електронної провідності іммобілізованого ферменту. Зворотний вплив буде надавати носій, що володіє високим негативним значенням $\Sigma = R + X$, тобто високою протонною провідністю. Виявлено, що максимально ефективним носієм для іммобілізації ферментного препарату редьки чорної є аеросил - 300, який підвищує в присутності води частку електронної провідності.

Із застосуванням розрахункового методу на основі значень активного і реактивного опорів, можлива оцінка впливу матеріалу носія на редокс - активність кінцевої гетероструктури і її стабільність у часі.

Аналізом спектрів імпедансу показана можливість формування структур, що відповідають за накопичення енергії в системах з іммобілізованими ферментами. Доведено, що зв'язування просторово розділених ферментів проявляє стабілізуючий вплив на формування областей, здатних накопичувати заряд і реалізовувати редокс перетворення. Встановлено дестабілізуючу роль води на редокс перетворення в гетероструктурі каолін - ферментний препарат.

РОЗДІЛ 5. ЗАСТОСУВАННЯ ГЕТЕРОСТРУКТУР ФЕРМЕНТНИЙ ПРЕПАРАТ – НЕОРГАНІЧНИЙ НОСІЙ В ЕЛЕКТРОХІМІЧНИХ ПРИСТРОЯХ

Одним з перспективних напрямків електрохімії є вивчення властивостей систем перетворення енергії з використанням біологічних препаратів, зокрема, ферментів [70]. Висока окислювально - відновна активність і селективність ферментів, а також їх здатність до іммобілізації на носіях різної природи з тривалим збереженням вихідної активності [134-135] роблять привабливими такі гетероструктури для використання в електрохімічних джерелах енергії і сенсорах [136]. Прояв електрохімічної активності пов'язується зі здатністю іммобілізованих ферментів до специфічного поділу зарядів на межі гетероструктура / електроліт, що формують ПЕШ [23,137-138].

Тому гетероструктури в системі неорганічний носій - нативний ферментний препарат класу оксидоредуктаз апробовані в якості електродів систем накопичення енергії і чуттєвих шарів амперометричних біосенсорів, наприклад, для визначення глюкози.

5.1 Електрохімічні властивості синтезованих гетероструктур

Специфіка зв'язування позначилася на електрохімічних властивостях отриманих гетероструктур. Їх дослідження методом ЦВА, проведені на електродній збірці, яка складалась зі струмозбірника, шару графену, покритого шаром одержаних матеріалів (рис. 2.3), в насиченому розчині КСІ.

Дослідження встановили значне зростання струмів в присутності матеріалів по відношенню до електрода з графена (рис. 5.1). Так, отримані значення струмів перевищують результати, отримані за подібною технологією [139].

По суті, контакт гетероструктура-графен є активним шаром, у якому проявляється електропровідність і фіксується заряд.

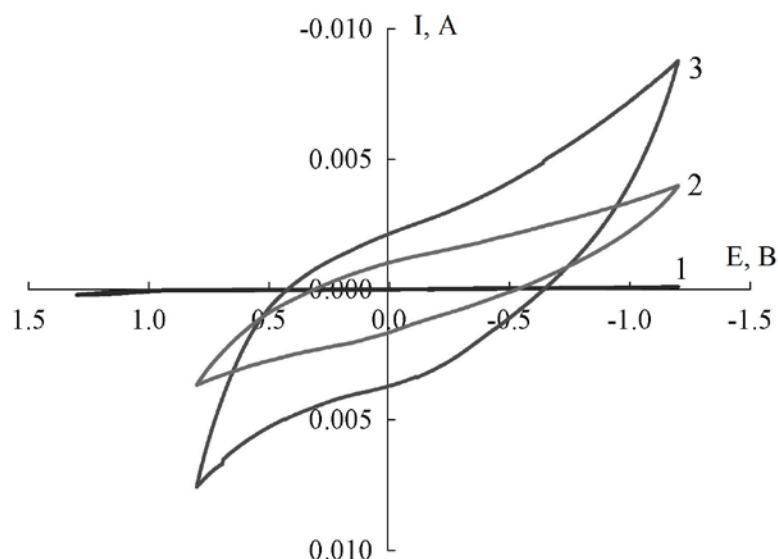


Рисунок 5.1 – ЦВА гетероструктури: 1- графен, 2- графен – каолін – НФП, 3- графен – аеросил-300 – НФП. Швидкість розгортки потенціалу 5 мВ/с. Наважка гетероструктури – 3 мг/см²

На ЦВА фіксується відсутність електродних реакцій, що характерно для конденсаторів. Однак уявлення залежностей зі змазаними кутами переходу і значним нахилом говорить про помітний внесок омичних втрат. Цей висновок підтверджується даними SEI (розділ 4), де показана низька електропровідність синтезованих гетероструктур.

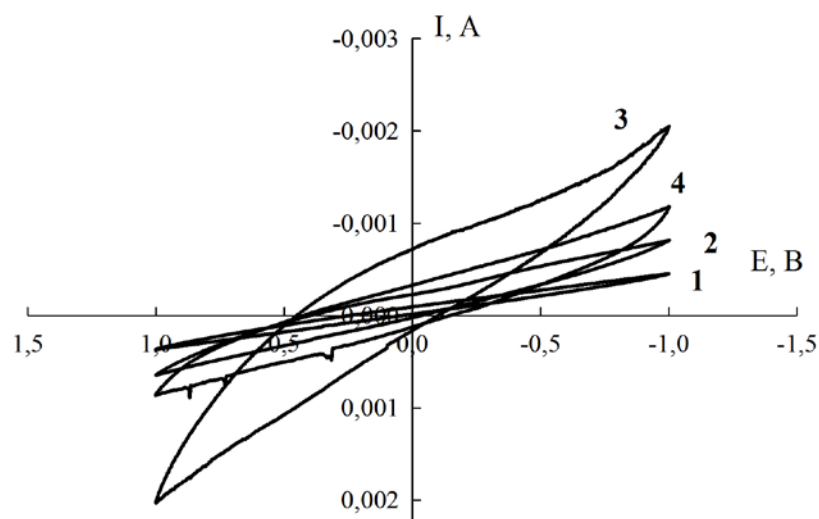


Рисунок 5.2 – ЦВА неорганічних носіїв 1- каолін, 2- аеросил-300, 3- бентоніт, 4- модифікований бентоніт. Електроліт - насичений розчин КСІ, $S_{\text{ел}} = 1.5 \text{ см}^2$. Швидкість розгортки потенціалу 5 мВ/с

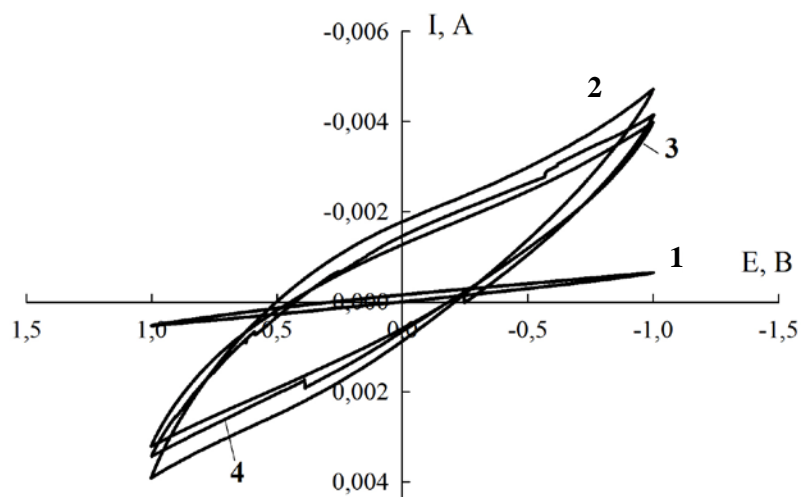


Рисунок 5.3 – ЦВА гетероструктури носій – ферментний препарат: 1- каолін, 2- аеросил-300, 3- бентоніт, 4- модифікований бентоніт. Швидкість розгортки потенціалу 5 мВ/с. Електроліт - насичений розчин КСl, $S_{\text{ел}} = 1.5 \text{ см}^2$, наважка гетероструктури – 3 мг/см^2

Так, струми для вихідних носіїв, нанесених на графен (рис. 5.2) удвічі нижче, ніж для гетероструктур носій – ферментний препарат (рис. 5.3).

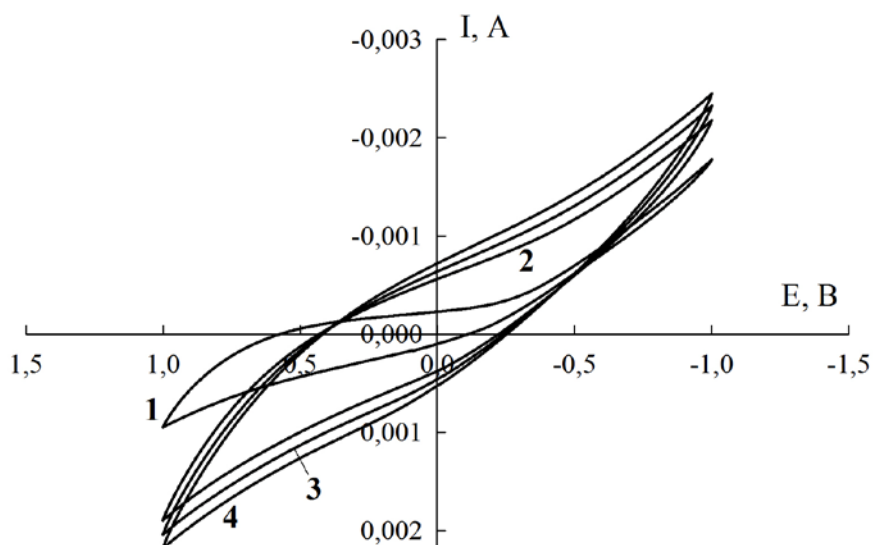


Рисунок 5.4 – ЦВА гетероструктури бентоніт–ферментний препарат в залежності від швидкості розгортки потенціалу (мВ/с): 1 – 5; 2 – 50; 3 – 75; 4 – 100. Електроліт - насичений розчин КСl, $S_{\text{ел}} = 1.5 \text{ см}^2$, наважка гетероструктури – 3 мг/см^2

Аналіз даних ЦВА в гетероструктурах на основі бентоніту і його кислої форми показав досить низькі значення струмів, тому ці носії виявилися неперспективними для використання в якості суперконденсаторів (рис. 5.4-5.5).

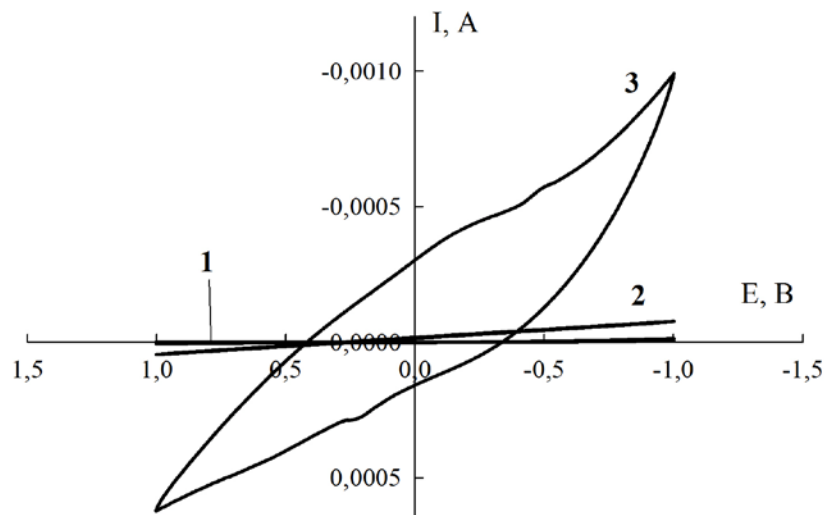


Рисунок 5.5 – ЦВА гетероструктури модифікований бентоніт – ферментний препарат в залежності від швидкості розгортки потенціалу (мВ/с): 1 – 5; 2 – 75; 3 – 100. Електроліт - насичений розчин KCl, $S_{\text{ел}} = 1.5 \text{ см}^2$, наважка гетероструктури – 3 мг/см^2

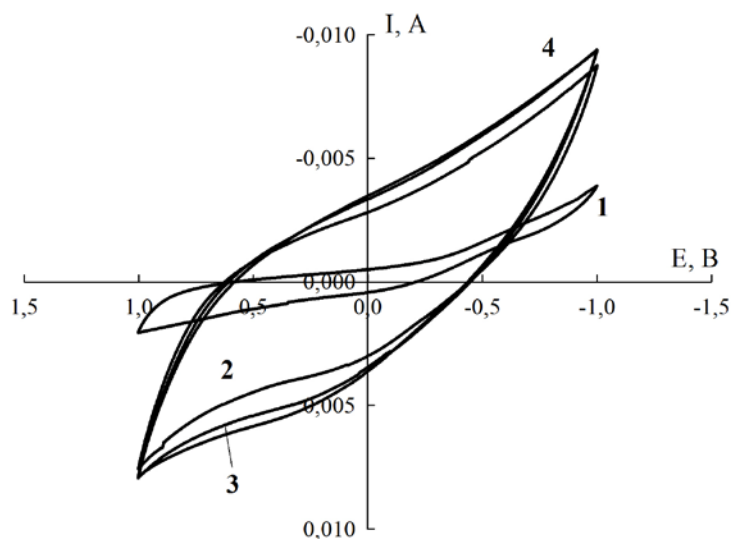


Рисунок 5.6 – ЦВА гетероструктури аеросил-300 – ферментний препарат в залежності від швидкості розгортки потенціалу (мВ/с): 1 – 5; 2 – 50; 3 – 75; 4 – 100. Електроліт - насичений розчин KCl, $S_{\text{ел}} = 1.5 \text{ см}^2$, наважка гетероструктури – 3 мг/см^2

Максимальні струми досягнуті на носії аеросил-300 - ферментний препарат, що має максимальну концентрацію по всім іонам металів (рис. 5.6).

Так струми вище, ніж на носії каолін - ферментний препарат (рис. 5.7) і значно, в 10 - 50 разів, перевищують відомі результати, отримані на електродах з використанням чистого ферментного препарату пероксидази [126, 140-141].

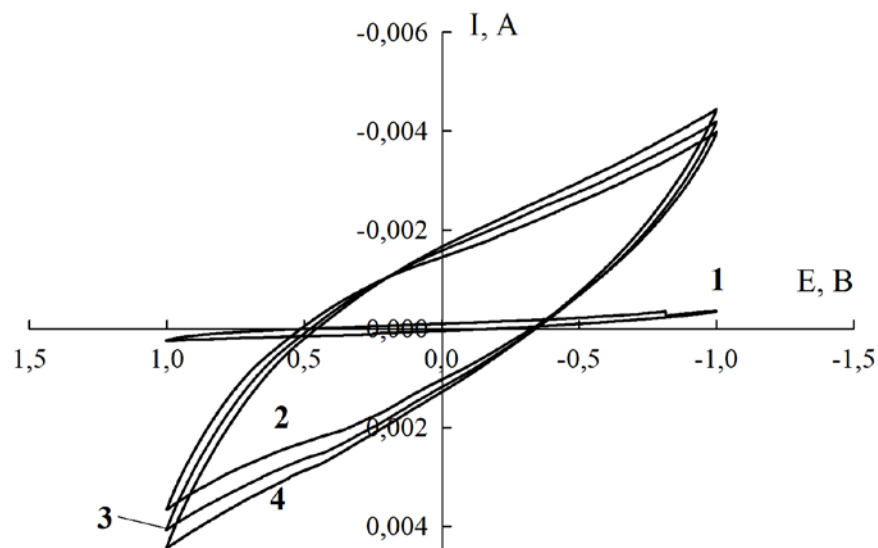


Рисунок 5.7 – ЦВА гетероструктури каолін – ферментний препарат в залежності від швидкості розгортки потенціалу (мВ/с): 1 – 5; 2 – 50; 3 – 75; 4 – 100. Електроліт - насичений розчин КСl, $S_{\text{еп}} = 1.5 \text{ см}^2$, наважка гетероструктури – 3 мг/см^2

Спектр імпедансу суперконденсатора на основі аеросил-300 - ферментний препарат (рис. 5.8), зібраного у корпусі типорозміру 2016, представляє собою класичне півколо [106], він характерний для систем, в яких відсутні електрохімічні реакції, а протікають лише фізичні процеси.

Лінійний вигляд спектра імпедансу в координатах Боде вказує на наявність тільки одного типу електропровідності (рис. 5.9).

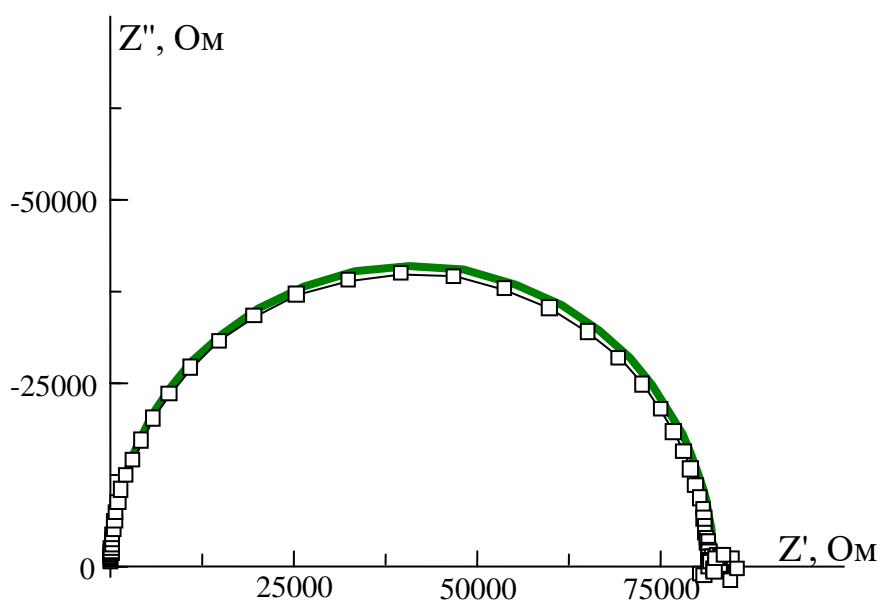


Рисунок 5.8 – СЕІ суперконденсатора на основі аеросил-300 - ферментний препарат

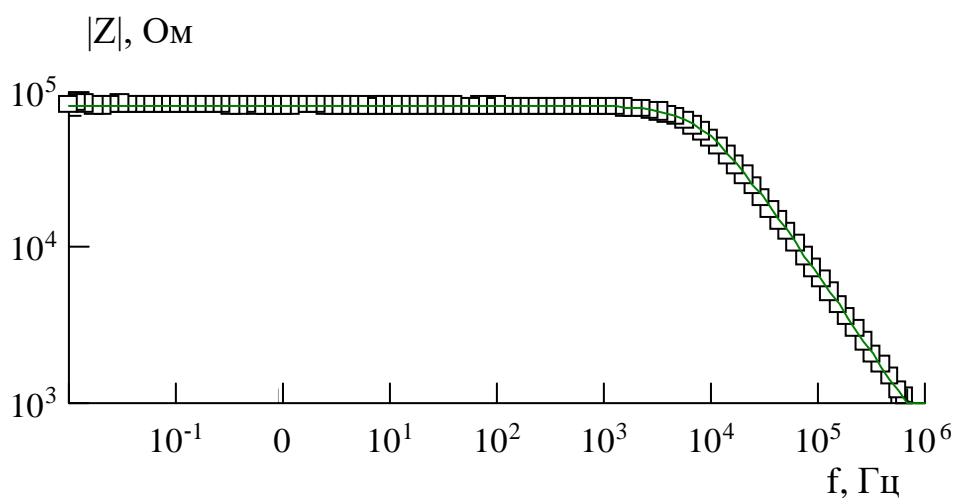


Рисунок 5.9 – СЕІ суперконденсатора на основі аеросил-300 - ферментний препарат в координатах Боде

Моделювання спектру СЕІ дало еквівалентну схему (рис. 5.10), яка включає паралельно з'єднані опір (R_3) і ємність (C_1), що характеризує відсутність електродної реакції на міжфазній межі.

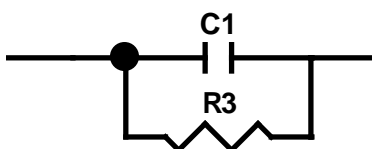


Рисунок 5.10 – Еквівалентна схема суперконденсатора на основі аеросил-300 - ферментний препарат

Таблиця 5.1 – Чисельні значення елементів еквівалентної схеми, що моделює електрохімічну систему суперконденсатора на основі аеросил-300 - ферментний препарат

Елемент	Значення, Ом	Похибка, %
C_1	$2,38 \cdot 10^{-10}$	1,02
R_3	$1,06 \cdot 10^5$	0,59

На основі досліджень ЦВА гетероструктур при різній швидкості розгортки потенціалу і даних СЕІ по початковій ємності розраховані питомі ємності досліджених матеріалів (табл. 5.2).

Суперконденсатори мають настільки великі значення ємності, що вимірювання на стандартному обладнанні не може бути використано для вимірювання їх ємності. Тому розрахунок ємностей отриманих гетероструктур проводили за даними спектрів СЕІ і ЦВА.

Ємність зразка вимірювалася згідно з наступною методикою [142, 143]:

1. З даних СЕІ за розрахунком пакета Zview 2.0 визначили початкову ємність гетероструктури.
2. Проводили зйомку ЦВА при різних швидкостях розгортки потенціалу.
3. Зі значень різниці (ΔV) початкового і кінцевого потенціалів розгортки V_1 до V_2 , різниці швидкостей розгортки ($U_2 - U_1$) і модуля певного струму (I) розраховували ємність (C) по формулі:

$$C = \frac{\Delta Q}{\Delta V} = \frac{I \cdot (U_2 - U_1)}{V_1 - V_2} \quad (5.1)$$

Таблиця 5.2 – Характеристики зарядної ємності гетероструктур

Система	$C_{\text{поч}}, \text{Ф/Г}$	$C_{\text{эф}}, \text{Ф/Г}$
Бентоніт + НФП	0,00062	1,6
Мод. бентоніт + НФП	0,00114	0,068
Каолін + НФП	0,00174	51,3
Аеросил-300 + НФП	0,00038	95,7

Встановлено, що гетероструктура на основі аеросилу-300 відрізняється здатністю заряджатися, і при високих швидкостях розгортки потенціалу її ємність в 1,5 рази вище ємності гетероструктур на основі каоліну. Матеріали на основі бентонітів виявили значно нижчі показники. Ємності гетероструктур залежать від концентрації кислих та основних центрів поверхні матеріалу.

Таблиця 5.3 – Кількість нативного ферментного препарату, зв'язаного з різними носіями

Носій	$C_{\text{M}}(\text{Fe}), \text{мг/л}$	V (носій + НФП), л	$A, \text{мг/г}$
Бентоніт	15,31	0,015	22,96
Мод. бентоніт	8,13	0,015	12,19
Каолін	6,29	0,011	6,92
Аеросил-300	2,42	0,011	2,60

Дослідження показали, що площа поверхні носія має незначний вплив на іммобілізацію ферменту в разі реалізації механізму зшивання [4] (табл. 5.3), оскільки в цьому випадку основний вплив має не площа поверхні, а кількість кислих і основних центрів на одиницю площі поверхні носія (табл. 3.3-3.4).

Таким чином, підвищення кількості кислих центрів збільшує неспецифічне зв'язування різних оксидоректуктаз, що призводить до різкого збільшення струмів заряджання і дає можливість припускати значний вплив синергізму на електрохімічні властивості досліджених гетероструктур.

5.2 Амперометричний глюкозний біосенсор на основі гетероструктури: неорганічний носій - іммобілізований ферментний препарат

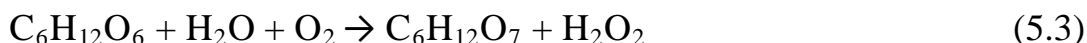
Для виявлення ефективності отриманих гетероструктур в якості матеріалу для платформи в біосенсорах і дослідження їх особливостей, сконструйовані і протестовані біосенсори на глюкозу на основі неорганічний носій - іммобілізований ферментний препарат. Детально виготовлення і методика дослідження властивостей сконструйованих біосенсорів описана в розділі 2.2.9.

Глюкоза - стандартний маркер для сенсорів амперометричного типу. Біосенсори на глюкозу користуються широким попитом вже десятки років, і з тих пір зазнали різноманітних змін в конструкції. Однак результати повторюються і відтворюються до тепер – струми відгуку мають значення порядку десятків – сотень $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ [144].

Продуктами окиснення глюкози є глюконолактон і гідроген пероксид [46, 145]:



У водних розчинах, глюконолактон ($\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_6$) спонтанно реагує з водою з утворенням глюконової кислоти ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_7$), тому загальна реакція:



Глюкозу можна визначити за кількістю спожитого кисню, або утвореного H_2O_2 [146-147]. Обидві ці речовини є електроактивними, проте кількість кисню, витраченого на окиснення глюкози зафіксувати складніше.

Тому в більшості випадків визначають кількість утвореного по реакції (5.4) кисню, фіксуючи величину струму його окиснення:



Дані дослідження представлені на рис. 5.11 – 5.14.

Найбільш стабільними виявилися дані, отримані з використанням бентоніту і його кислої форми. Результати дослідження біосенсора з використанням в якості неорганічного носія каоліну і аеросилу-300 показали нестабільність у часі, а аналітичний сигнал у вигляді значень густини струму і напруги виявився невідтворюваним.

На платформі модифікований бентоніт- фермент був сконструйований біосенсор і досліджений його відгук при додаванні кількості глюкози.

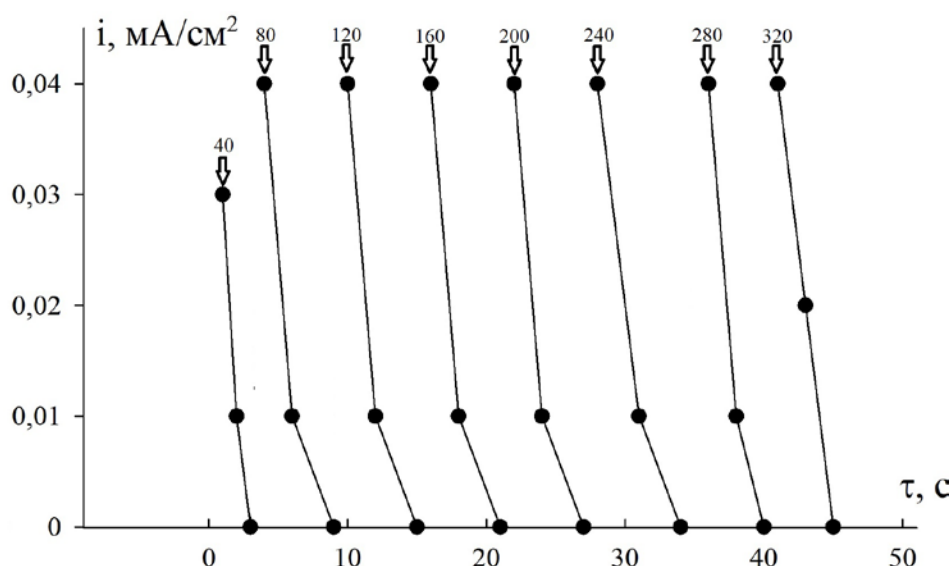


Рисунок 5.11 – Амперометричні відгуки глюкозного біосенсора на платформі модифікований бентоніт- фермент при додаванні (у мкл) відповідних аліквот субстрату ($C_M(\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6)=0,03$ г/мл)*

*Примітка. Тут і надалі позначки над стрілками вказують об'єм аликвот субстрату (в мкл), доданих до досліджуваного розчину у відповідний проміжок часу.

В таблиці 5.4 показані зміни часу відгуку і релаксації від густини струму при додаванні відповідних аліквот субстрату глюкози ($C_M(C_6H_{12}O_6)=0,03$ г/мл). При цьому інтенсивність аналітичного сигналу досягнувши свого максимального значення $0,04$ мА/см² не змінювалася в часі. Встановлено, що час відгуку біосенсора складає 1 с, а час релаксації 5 с, що свідчить про високу чутливість сконструйованого біосенсора.

Чим товстіший шар контакту в гетероструктурі, тим більше час релаксації сенсора, тому збільшення навішування не призводило до позитивних результатів.

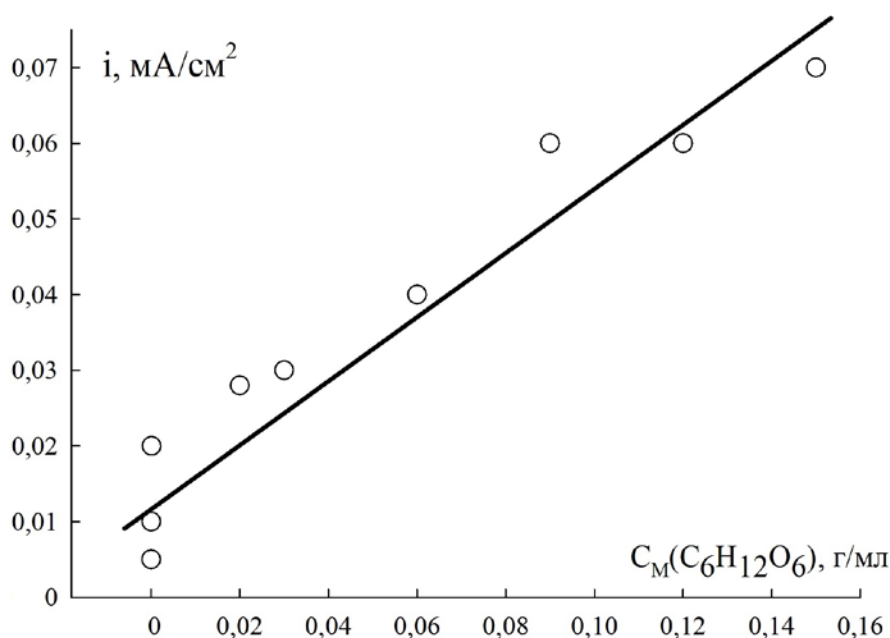


Рисунок 5.12 – Залежність відгуку струму глюкозного біосенсора на платформі модифікований бентоніт- фермент від концентрації при додаванні субстрату ($C_M(C_6H_{12}O_6)= 3 \cdot 10^{-6} - 0,15$ г/мл)

Для цього біосенсора спостерігається досить чітка лінійна залежність аналітичного сигналу від кількості субстрату (рис. 5.12) в області концентрацій $C_M(C_6H_{12}O_6)= 3 \cdot 10^{-6} - 3 \cdot 10^{-2}$ г/мл. При подальшому збільшенні концентрацій від $3 \cdot 10^{-2}$ до 0,15 г/мл під час наступних додавань аліквот глюкози значення густини струму дискретно зростали.

Таблиця 5.4 – Час відгуку і час релаксації глюкозного біосенсора на платформі модифікований бентоніт- фермент

i , мА/см ²	0,03	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04	0,04
τ_1 , с	1	1	1	1	1	1	2	1
τ_2 , с	2	5	5	5	5	5	4	5

З рис. 5.11 та 5.12 видно, що додавання аліквот аналіту призводить до зростання відгуку густини струму в часі, а значить сконструйований біосенсор можна використовувати для визначення глюкози.

Результати дослідження глюкозного біосенсора на платформі бентоніт-фермент представлені на рис. 5.13 і 5.14. Значення густини струму виявилися значно нижче, ніж в попередньому біосенсорі з використанням модифікованого бентоніту.

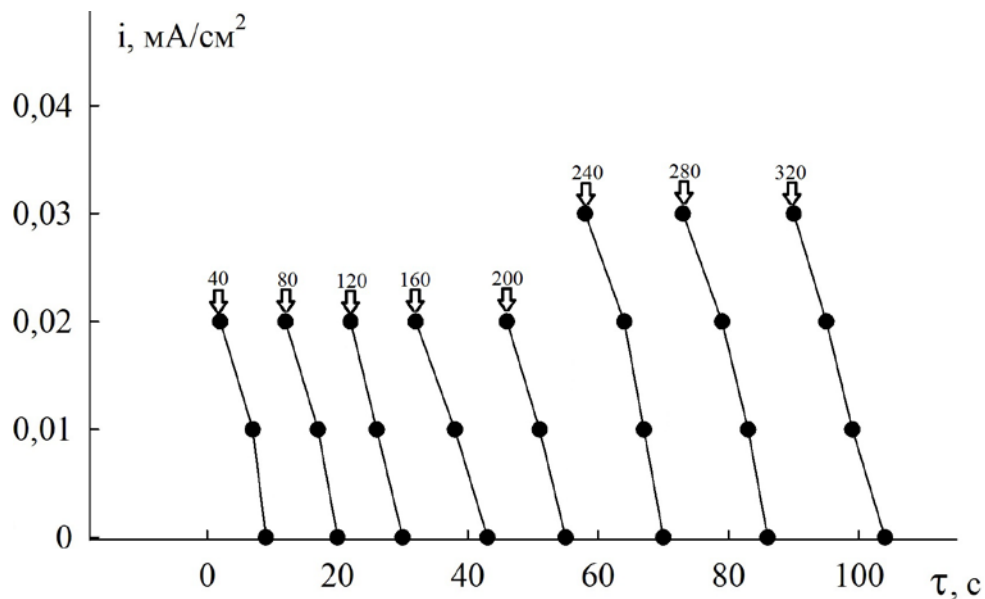


Рисунок 5.13 – Амперометричні відгуки глюкозного біосенсора на платформі бентоніт- фермент при додаванні (у мкл) відповідних аліквот субстрату ($C_M(C_6H_{12}O_6)=0,03$ г/мл)

У таблиці 5.5 показані зміни часу відгуку і релаксації при додаванні відповідних аліквот субстрату глюкози. Максимальне значення аналітичного

сигналу при концентрації глюкози $C_M(C_6H_{12}O_6)=0,03$ г/мл склало $0,03$ мА/см². Час відгуку був в межах 2-3 с, а час релаксації істотно відрізнявся і коливався в діапазоні від 8 до 12 с.

Однак, отримана залежність при збільшенні кількості глюкози, мала більш лінійний вид (рис. 5.14). Відгук біосенсора простежувався при всіх використаних концентраціях аналіту. Дані аналітичного сигналу (густини струму) в порівнянні з попереднім змінюють свій знак від негативного в позитивну область, але в 2,5 рази нижче.

Таблиця 5.5 – Час відгуку і час релаксації глюкозного біосенсора на платформі бентоніт - фермент

i , мА/см ²	0,02	0,02	0,02	0,02	0,02	0,03	0,03	0,03
τ_1 , с	2	3	2	2	3	3	3	3
τ_2 , с	8	8	8	11	11	12	12	12

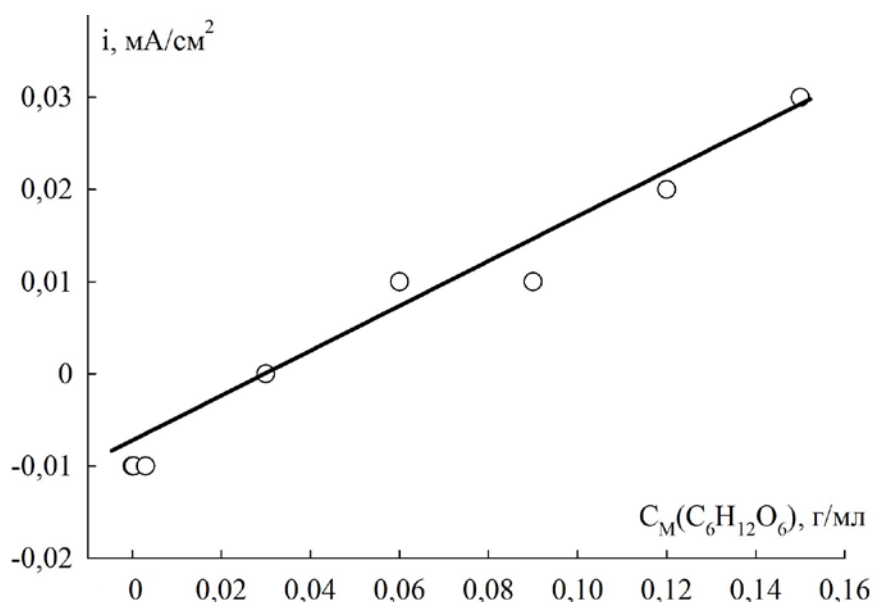


Рисунок 5.14 – Залежність відгуку струму глюкозного біосенсора на платформі бентоніт- фермент від концентрації при додаванні субстрату ($C_M(C_6H_{12}O_6)= 3 \cdot 10^{-6} - 0,15$ г/мл)

Відмінності в поведінці гетероструктур обумовлені проявом відмінностей в механізмах зв'язування ферментного препарату з неорганічним носієм. При цьому важливим фактором є природа і кислотно-основні властивості поверхні утвореної гетероструктури. Виявлено, що одні можуть вести себе як системи перетворення енергії - суперконденсаторів (каолін, аеросил-300), або як електрохімічні системи - біосенсори (бентоніт, модифікований бентоніт). Таким чином, змінюючи умови зв'язування ферменту з носієм можна впливати на формування електронної та протонакцепторної здатності системи.

Таким чином, синтезовані гетероструктури мають ряд переваг по відношенню до вже відомих систем [148–151]. Гетероструктури типу неорганічний носій - нативний ферментний препарат відрізняються своєю простотою виготовлення, дешевизною, доступністю щодо поновлюваного джерела рослинної сировини, а також отримані без термічної обробки. Крім того, отримані високі значення ефективної ємності до 95,7 Ф/г в електрохімічній системі на зразку з аеросилом-300 сумірні з даними в кращих американських патентах останніх років. Ефективність і перспективність використання синтезованих гетероструктур як платформ для іммобілізації ферментів при створенні глюкозних біосенсорів амперометричного типу підтверджується значеннями струмів, які у 100 разів перевищують вже відомі датчики аналогічної будови. Відкриття перспектив у створенні суперконденсаторів і біосенсорів нового покоління обумовлені повною екологічною безпекою і простотою утилізації відпрацьованих відходів синтезованих гетероструктур.

5.3 Висновки до розділу 5

Встановлено, що кислотно-основні властивості носія є основним фактором впливу на селективність зв'язування ферментів з суміші; вони забезпечують формування систем з різними функціями: основне середовище формує сенсорну активність, а кисле - здатність до накопичення енергії.

На основі аналізу вольтамперометрії гетероструктур неорганічний носій - ферментний препарат показана можливість використання синтезованих гетероструктур в якості активних мас (твердого електроліту) для створення редокс- сенсорів і пристроїв для накопичення енергії.

Вперше створена гібридна система гетероструктура - графен - струмознімач, і показана можливість формування суперконденсатора в системі графен - аеросил-300 - ферментний препарат і графен - каолін - ферментний препарат. Виміряні величини ємності досягають 95 Ф/г, що знаходиться на рівні кращих розробок останніх років в області накопичення енергії з біомаси.

Доведено, що специфічність зв'язування з носієм переважно комплексів заліза дає можливість використання синтезованих гетероструктур на основі бентоніту і його модифікованої форми в якості ефективних і перспективних платформ для іммобілізації ферментів при створенні амперометричних біосенсорів на глюкозу з високим рівнем вихідного сигналу.

Результати дослідження можна використовувати для створення дешевих накопичувачів енергії, біосумісних джерел струму, сенсорів з високим рівнем сигналу.

ВИСНОВКИ

У роботі вирішено важливе наукове завдання: синтезовано і вперше систематично досліджено гетероструктури типу неорганічний носій - нативний ферментний препарат класу оксидоредуктаз на прикладі витяжки коренеплоду редьки чорної. вивчено вплив природи та структури неорганічного носія на фізико-хімічні властивості отриманих гетероструктур та показано можливість застосування синтезованих матеріалів в якості активних мас для створення енергоперетворюючих пристроїв та біосенсорів.

1. На основі комплексу фізико-хімічних методів доведено зміну механізму і селективності зв'язування суміші ферментів з ферментного препарату на неорганічних носіях (бентоніт та його кисла форма, каолін, пірогенний кремнезем), виявлено вплив кислотно-основних властивостей поверхні носія на посилення активності ферментного препарату в результаті іммобілізації та здатність зберігати її в часі. Так, на бентоніті окислювальна активність збільшується в 7 разів, на модифікованому фосфат-йонами бентоніті - в 3 рази, на каоліні активність практично не змінюється, а на аеросилі-300 зростає в 4 рази.

2. Встановлено, що наявність чотирьох основних іонів металів (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}) у ферментному препараті формує різні за складом гетероструктури з різними властивостями. Виявлено, що природний бентоніт селективно зв'язує іони Cu^{2+} , модифікований фосфат-йонами бентоніт – іони Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , а аеросил-300 та каолін – всі чотири іона металу (Fe^{3+} , Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+}). Це вказує на можливість формування структур на основі суміші ферментів класу оксидоредуктаз, або суміші пероксидази з супероксиддисмутазою.

3. Вперше показано, що редокс - активністю іммобілізованого нативного ферменту можна керувати застосуванням носіїв з переважно електронною або протонною електропровідністю, які впливають на окисні або відновні властивості новоствореної системи. Застосовано метод оцінки впливу матеріалу носія на редокс - активність гетероструктури та її стабільність у часі на основі алгебраїчної суми значень активного і реактивного опорів системи.

4. Аналізом СЕІ в неорганічних системах на базі каоліну та пірогенного кремнезему з іммобілізованими ферментами показана можливість формування гетероструктур, що відповідають за накопичення енергії. Доведено, що зв'язування просторово розділених ферментів проявляє стабілізуючий вплив на формування областей, здатних накопичувати заряд і реалізовувати редокс-перетворення. такі електрохімічні системи графен – НФП здатні заряджатися і мають високу питому ємність - до 95 Ф/г, на рівні кращих зразків суперконденсаторів на біологічній основі.

5. Встановлено, що специфічність зв'язування переважно іонів заліза надає можливість використання синтезованих гетероструктур на основі бентоніту та його модифікованої форми як ефективних і перспективних активних мас графенових електродів для іммобілізації ферментів при створенні амперометричних біосенсорів на глюкозу з високим вихідним сигналом. Виявлено, що час відгуку біосенсора становить 1 с, а час релаксації - 5 с.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Shumyantseva, V. V., et al. "Electrochemical properties of cytochroms P450 using nanostructured electrodes: Direct electron transfer and electro catalysis." *Journal of inorganic biochemistry* 101.5 (2007): 859-865.
2. Zhao, Hua. "Methods for stabilizing and activating enzymes in ionic liquids—a review." *Journal of chemical technology and biotechnology* 85.7 (2010): 891-907.
3. Alpeeva, Inna S., et al. "Palm tree peroxidase-based biosensor with unique characteristics for hydrogen peroxide monitoring." *Biosensors and Bioelectronics* 21.5 (2005): 742-748.
4. Андреева В.А. Фермент пероксидаза / В.А. Андреева. – М.: Наука, 1988. – 128 с.
5. Филиппович Ю.Б. Основы биохимии / Ю.Б. Филиппович – М.: Агар, 1999. – 512 с.
6. Рогожин В.В. Пероксидаза как компонент антиоксидантной системы живых организмов / В.В. Рогожин. – М.: ГИАРД, 2004. – 240 с.
7. Banci, Lucia. "Structural properties of peroxidases." *Journal of biotechnology* 53.2 (1997): 253-263.
8. Ator, Mark A., Shantha K. David, and PR Ortiz de Montellano. "Structure and catalytic mechanism of horseradish peroxidase. Regiospecific meso alkylation of the prosthetic heme group by alkylhydrazines." *Journal of Biological Chemistry* 262.31 (1987): 14954-14960.
9. Veitch, Nigel C. "Horseradish peroxidase: a modern view of a classic enzyme." *Phytochemistry* 65.3 (2004): 249-259.
10. Александрова, Е. Ю., М. А. Орлова, and П. Л. Нейман. "Изучение пероксидазной активности в экстрактах из корневища и корней хрена и ее стабильности к различным воздействиям." *Вестник Московского университета. Сер. Химия* 47.5 (2006): 350-352.

11. Ator, Mark A., and PR Ortiz De Montellano. "Protein control of prosthetic heme reactivity. Reaction of substrates with the heme edge of horseradish peroxidase." *Journal of Biological Chemistry* 262.4 (1987): 1542-1551.
12. Chance, Britton, Don Charles Devault, and Hans Frauenfelder, eds. *Tunneling in Biological Systems: A Colloquium of the Johnson Research Foundation*. Academic Press, 2013.
13. Schmidt, H-L., and H. Gunther. "Structure and electrochemistry of oxidoreductases." *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 316.1176 (1987): 73-84.
14. Marcus, Rudolph A., and Norman Sutin. "Electron transfers in chemistry and biology." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Bioenergetics* 811.3 (1985): 265-322.
15. Gutmann, Felix. "Some aspects of charge transfer in biological systems." *Modern Bioelectrochemistry*. Springer US, 1986. 177-197.
16. Marino, Stefano M., and Vadim N. Gladyshev. "A structure-based approach for detection of thiol oxidoreductases and their catalytic redox-active cysteine residues." *PLoS Comput Biol* 5.5 (2009): e1000383.
17. Li, Jinghong, and Shaojun Dong. "The electrochemical study of oxidation-reduction properties of horseradish peroxidase." *Journal of Electroanalytical Chemistry* 431.1 (1997): 19-22.
18. Juarez-Moreno, Karla, Marcela Ayala, and Rafael Vazquez-Duhalt. "Antioxidant capacity of poly (Ethylene glycol)(PEG) as protection mechanism against hydrogen peroxide inactivation of peroxidases." *Applied biochemistry and biotechnology* 177.6 (2015): 1364-1373.
19. Kaposi, Andras D., et al. "Horseradish peroxidase monitored by infrared spectroscopy: effect of temperature, substrate and calcium." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology* 1435.1 (1999): 41-50.
20. Березин И.В. Имобилизованные ферменты / И.В. Березин, Н.Л. Клячко, А.В. Левашов. – М.: Высш. шк., 1987. – 159 с.

21. Иммуобилизированные клетки и ферменты. Методы / Под ред. Дж. Вудворда. – М.: Мир, 1988. – 215 с.
22. Guisan, Jose M. "New opportunities for immobilization of enzymes." *Immobilization of Enzymes and Cells: Third Edition* (2013): 1-13.
23. Singh, Raushan Kumar, et al. "From protein engineering to immobilization: promising strategies for the upgrade of industrial enzymes." *International journal of molecular sciences* 14.1 (2013): 1232-1277.
24. Guzik, Urszula, Katarzyna Hupert-Kocurek, and Danuta Wojcieszńska. "Immobilization as a strategy for improving enzyme properties-application to oxidoreductases." *Molecules* 19.7 (2014): 8995-9018.
25. Jesionowski, Teofil, Jakub Zdarta, and Barbara Krajewska. "Enzyme immobilization by adsorption: a review." *Adsorption* 20.5-6 (2014): 801-821.
26. Kharrat, Nadia, et al. "Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: comparison with the free enzyme." *Process Biochemistry* 46.5 (2011): 1083-1089.
27. Rimola, Albert, et al. "Silica surface features and their role in the adsorption of biomolecules: computational modeling and experiments." *Chemical reviews* 113.6 (2013): 4216-4313.
28. Mateo, Cesar, et al. "Improvement of enzyme activity, stability and selectivity via immobilization techniques." *Enzyme and microbial technology* 40.6 (2007): 1451-1463.
29. Zucca, Paolo, and Enrico Sanjust. "Inorganic materials as supports for covalent enzyme immobilization: methods and mechanisms." *Molecules* 19.9 (2014): 14139-14194.
30. Ghiaci, M., et al. "Enzyme immobilization: Part 1. Modified bentonite as a new and efficient support for immobilization of *Candida rugosa* lipase." *Applied Clay Science* 43.3 (2009): 289-295.
31. Fornera, Sara, et al. "Immobilization of Peroxidase on SiO₂ Surfaces with the Help of a Dendronized Polymer and the Avidin-Biotin System." *Macromolecular bioscience* 11.8 (2011): 1052-1067.

32. Buthe, Andreas, Songtao Wu, and Ping Wang. "Nanoporous silica glass for the immobilization of interactive enzyme systems." *Enzyme Stabilization and Immobilization: Methods and Protocols* (2011): 37-48.
33. Lee, Yoon-Mee, et al. "Immobilization of horseradish peroxidase on multi-wall carbon nanotubes and its electrochemical properties." *Biotechnology letters* 28.1 (2006): 39-43.
34. Qiu, Huajun, et al. "Immobilization of horseradish peroxidase on nanoporous copper and its potential applications." *Bioresource technology* 101.24 (2010): 9415-9420.
35. Hartmann, Martin, and Xenia Kostrov. "Immobilization of enzymes on porous silicas – benefits and challenges." *Chemical Society Reviews* 42.15 (2013): 6277-6289.
36. Gustafsson, Hanna, et al. "Immobilization of lipase from *Mucor miehei* and *Rhizopus oryzae* into mesoporous silica – The effect of varied particle size and morphology." *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 100 (2012): 22-30.
37. Zhang, Feng, et al. "Horseradish peroxidase immobilized on graphene oxide: physical properties and applications in phenolic compound removal." *The Journal of Physical Chemistry C* 114.18 (2010): 8469-8473.
38. Mag Magner, Edmond. "Immobilisation of enzymes on mesoporous silicate materials." *Chemical Society Reviews* 42.15 (2013): 6213-6222.
39. Fernandez-Lorente, Gloria, et al. "Immobilization of proteins on highly activated glyoxyl supports: Dramatic increase of the enzyme stability via multipoint immobilization on pre-existing carriers." *Current Organic Chemistry* 19.17 (2015): 1719-1731.
40. Sheldon, Roger A., and Sander van Pelt. "Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how." *Chemical Society Reviews* 42.15 (2013): 6223-6235.
41. Aissaoui, Nesrine, et al. "Catalytic activity and thermostability of enzymes immobilized on silanized surface: influence of the crosslinking agent." *Enzyme and microbial technology* 52.6 (2013): 336-343.

42. Bolivar, Juan M., et al. "Heterofunctional supports for the one-step purification, immobilization and stabilization of large multimeric enzymes: Amino-glyoxyl versus amino-epoxy supports." *Process Biochemistry* 45.10 (2010): 1692-1698.
43. Wang, Joseph. "Electrochemical glucose biosensors." *Chemical reviews* 108.2 (2008): 814-825.
44. Leyden, Matthew R., et al. "Increasing the detection speed of an all-electronic real-time biosensor." *Lab on a Chip* 12.5 (2012): 954-959.
45. Enzyme free glucose sensor based on micro-nano dual-porous gold modified screen printed carbon electrode / X.V. Nguyen, M. Chikae, Y. Ukita, Y. Takamura // 17th Int. Conference on Miniaturized Systems for Chemistry and Life Sciences. – 27–31 10. 2013. – Freiburg, Germany, 2013. – P. 242–244.
46. Rahman, Md Mahbubur, et al. "A comprehensive review of glucose biosensors based on nanostructured metal-oxides." *Sensors* 10.5 (2010): 4855-4886.
47. Toghiani, Kathryn E., and Richard G. Compton. "Electrochemical non-enzymatic glucose sensors: a perspective and an evaluation." *Int. J. Electrochem. Sci* 5.9 (2010): 1246-1301.
48. Saleh Ahammad, A. J. "Hydrogen peroxide biosensors based on horseradish peroxidase and hemoglobin." *J Biosens Bioelectron* 9 (2013): 2.
49. Clark, Leland C., and Champ Lyons. "Electrode systems for continuous monitoring in cardiovascular surgery." *Annals of the New York Academy of sciences* 102.1 (1962): 29-45.
50. Sassolas, Audrey, Loïc J. Blum, and Béatrice D. Leca-Bouvier. "Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors." *Biotechnology advances* 30.3 (2012): 489-511.
51. Raghu, P., et al. "A novel electrochemical biosensor based on horseradish peroxidase immobilized on Ag-nanoparticles/poly (l-arginine) modified carbon paste electrode toward the determination of

- pyrogallol/hydroquinone." *Enzyme and microbial technology* 52.6 (2013): 377-385.
52. El Ichi, Sarra, Mohamed Nejib Marzouki, and Hafsa Korri-Youssoufi. "Direct monitoring of pollutants based on an electrochemical biosensor with novel peroxidase (POX 1B)." *Biosensors and Bioelectronics* 24.10 (2009): 3084-3090.
 53. Pizzariello, Andrea, et al. "Urea biosensor based on amperometric pH-sensing with hematein as a pH-sensitive redox mediator." *Talanta* 54.4 (2001): 763-772.
 54. Palanisamy, Selvakumar, Binesh Unnikrishnan, and Shen-Ming Chen. "An amperometric biosensor based on direct immobilization of horseradish peroxidase on electrochemically reduced graphene oxide modified screen printed carbon electrode." *Int. J. Electrochem. Sci* 7 (2012): 7935-7947.
 55. Korkut, Seyda, Bulent Keskinler, and Elif Erhan. "An amperometric biosensor based on multiwalled carbon nanotube-poly (pyrrole)-horseradish peroxidase nanobiocomposite film for determination of phenol derivatives." *Talanta* 76.5 (2008): 1147-1152.
 56. Pérez, JP Hervás, E. Lopez-Cabarcos, and B. Lopez-Ruiz. "Amperometric glucose biosensor based on biocompatible poly (dimethylaminoethyl) methacrylate microparticles." *Talanta* 81.4 (2010): 1197-1202.
 57. Jiang, Xiaoyan, et al. "Amperometric Ethanol Biosensor Based on Integration of Alcohol Dehydrogenase with Meldola's Blue/Ordered Mesoporous Carbon Electrode." *Electroanalysis* 21.14 (2009): 1617-1623.
 58. Guascito, Maria Rachele, et al. "Mediator-free amperometric glucose biosensor based on glucose oxidase entrapped in poly (vinyl alcohol) matrix." *Analyst* 136.1 (2011): 164-173.
 59. Islam, Ashraf B., et al. "A mediator free amperometric bienzymatic glucose biosensor using vertically aligned carbon nanofibers (vacnfs)." *IEEE Sensors Journal* 11.11 (2011): 2798-2804.
 60. Şenel, Mehmet, Emre Çevik, and M. Fatih Abasıyanık. "Amperometric hydrogen peroxide biosensor based on covalent immobilization of horseradish

- peroxidase on ferrocene containing polymeric mediator." *Sensors and Actuators B: Chemical* 145.1 (2010): 444-450.
61. Wang, Bin, et al. "A novel hydrogen peroxide sensor based on the direct electron transfer of horseradish peroxidase immobilized on silica-hydroxyapatite hybrid film." *Biosensors and Bioelectronics* 24.5 (2009): 1141-1145.
 62. Lakard, Boris, et al. "Urea potentiometric biosensor based on modified electrodes with urease immobilized on polyethylenimine films." *Biosensors and Bioelectronics* 19.12 (2004): 1641-1647.
 63. Kuralay, Filiz, Haluk Özyörük, and Attila Yıldız. "Potentiometric enzyme electrode for urea determination using immobilized urease in poly (vinylferrocenium) film." *Sensors and Actuators B: Chemical* 109.2 (2005): 194-199.
 64. Ling, Yew Pei, and Lee Yook Heng. "A potentiometric formaldehyde biosensor based on immobilization of alcohol oxidase on acryloxysuccinimide-modified acrylic microspheres." *Sensors* 10.11 (2010): 9963-9981.
 65. Wang, Yantian, et al. "Potentiometric sensors based on surface molecular imprinting: detection of cancer biomarkers and viruses." *Sensors and Actuators B: Chemical* 146.1 (2010): 381-387.
 66. Gründler, Peter. "Conductivity sensors and capacitive sensors." *Chemical sensors: An introduction for scientists and engineers* (2007): 123-132.
 67. Schöning, Michael J., et al. "Towards a capacitive enzyme sensor for direct determination of organophosphorus pesticides: fundamental studies and aspects of development." *Sensors* 3.6 (2003): 119-127.
 68. Schöning, Michael J., et al. "Capacitive microsensors for biochemical sensing based on porous silicon technology." *Sensors and Actuators B: Chemical* 64.1 (2000): 59-64.
 69. Xu, Shuai, and Shelley D. Minteer. "Enzymatic biofuel cell for oxidation of glucose to CO₂." *ACS Catalysis* 2.1 (2011): 91-94.

70. Cracknell, James A., Kylie A. Vincent, and Fraser A. Armstrong. "Enzymes as working or inspirational electrocatalysts for fuel cells and electrolysis." *Chemical Reviews* 108.7 (2008): 2439-2461.
71. Liu, Yulong, and Xiufu Hua. "Production of biodiesel using a nanoscaled immobilized lipase as the catalyst." *Catalysis letters* 144.2 (2014): 248-251.
72. Zhu, Zhiguang, et al. "Deep oxidation of glucose in enzymatic fuel cells through a synthetic enzymatic pathway containing a cascade of two thermostable dehydrogenases." *Biosensors and Bioelectronics* 36.1 (2012): 110-115.
73. Bullen, Richard Andrew, et al. "Biofuel cells and their development." *Biosensors and Bioelectronics* 21.11 (2006): 2015-2045.
74. Dupont, Madeleine F., and Scott W. Donne. "Charge storage mechanisms in electrochemical capacitors: Effects of electrode properties on performance." *Journal of Power Sources* 326 (2016): 613-623.
75. Miller, John R., and Patrice Simon. "Electrochemical capacitors for energy management." *Science Magazine* 321.5889 (2008): 651-652.
76. Fletcher, Stephen, Victoria Jane Black, and Iain Kirkpatrick. "A universal equivalent circuit for carbon-based supercapacitors." *Journal of Solid State Electrochemistry* 18.5 (2014): 1377-1387.
77. Gogotsi, Yury, and Patrice Simon. "True performance metrics in electrochemical energy storage." *Science* 334.6058 (2011): 917-918.
78. Miller, John R. "Engineering electrochemical capacitor applications." *Journal of Power Sources* 326 (2016): 726-735.
79. Lewandowski, Andrzej, and Maciej Galinski. "Practical and theoretical limits for electrochemical double-layer capacitors." *Journal of Power Sources* 173.2 (2007): 822-828.
80. Kötz, R., and M. Carlen. "Principles and applications of electrochemical capacitors." *Electrochimica acta* 45.15 (2000): 2483-2498.

81. Stevenson, Anthony J., et al. "Supercapatteries with hybrids of redox active polymers and nanostructured carbons." *Nanocarbons for Advanced Energy Storage*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2015. 179-210.
82. Klumpner, Christian, Greg Asher, and George Z. Chen. "Selecting the power electronic interface for a supercapattery based energy storage system." *PowerTech, 2009 IEEE Bucharest*. IEEE, 2009.
83. Yu, Linpo, and George Z. Chen. "Redox electrode materials for supercapatteries." *Journal of Power Sources* 326 (2016): 604-612.
84. Huang, Peihua, et al. "On-chip micro-supercapacitors for operation in a wide temperature range." *Electrochemistry Communications* 36 (2013): 53-56.
85. Sayago, J., et al. "TransCap: a monolithically integrated supercapacitor and electrolyte-gated transistor." *Journal of Materials Chemistry C* 2.48 (2014): 10273-10276.
86. Soavi, Francesca, et al. "Miniaturized supercapacitors: key materials and structures towards autonomous and sustainable devices and systems." *Journal of Power Sources* 326 (2016): 717-725.
87. Pang, Changhyun, Chanseok Lee, and Kahp-Yang Suh. "Recent advances in flexible sensors for wearable and implantable devices." *Journal of Applied Polymer Science* 130.3 (2013): 1429-1441.
88. Beidaghi, Majid, and Yury Gogotsi. "Capacitive energy storage in micro-scale devices: recent advances in design and fabrication of micro-supercapacitors." *Energy & Environmental Science* 7.3 (2014): 867-884.
89. Şişecioğlu, Melda, et al. "Purification and characterization of peroxidase from Turkish black radish (*Raphanus sativus* L.)." *Journal of Medicinal Plants Research* 4.12 (2010): 1187-1196.
90. Finzel, Barry Craig, Th L. Poulos, and J. Kraut. "Crystal structure of yeast cytochrome c peroxidase refined at 1.7-Å resolution." *Journal of Biological Chemistry* 259.21 (1984): 13027-13036.
91. Leon, J. Castillo, et al. "Purification and substrate specificity of peroxidase from sweet potato tubers." *Plant Science* 163.5 (2002): 1011-1019.

92. Bahçeci, K. Savaş, et al. "Study of lipoxygenase and peroxidase as indicator enzymes in green beans: change of enzyme activity, ascorbic acid and chlorophylls during frozen storage." *Journal of Food Engineering* 66.2 (2005): 187-192.
93. Duarte-Vázquez, Miguel A., et al. "Purification and Partial Characterization of Three Turnip (*Brassica napus* L. var. *esculenta* DC) Peroxidases." *Journal of agricultural and food chemistry* 48.5 (2000): 1574-1579.
94. Morita, Yuhei, Chiaki Yoshida, and Yutaka Maeda. "Properties and structures of peroxidase isoenzymes of Japanese-radish." *Agricultural and Biological Chemistry* 35.7 (1971): 1074-1083.
95. Morkunas, Iwona, and Joanna Gmerek. "The possible involvement of peroxidase in defense of yellow lupine embryo axes against *Fusarium oxysporum*." *Journal of plant physiology* 164.2 (2007): 185-194.
96. Zhang, Jingxian, and M. B. Kirkham. "Drought-stress-induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase, and peroxidase in wheat species." *Plant and Cell Physiology* 35.5 (1994): 785-791.
97. Klapper, Michael H., and David P. Hackett. "Investigations on the multiple components of commercial horseradish peroxidase." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Enzymology and Biological Oxidation* 96.2 (1965): 272-282.
98. Glick D. *Methods of Biochemical Analysis* / D. Glick. – Interscience Publishers, Inc., N-Y, London, 1954. – P. 357–425.
99. Першина Е.Д. Природа влияния протона на окислительную активность оксиферментов в водных средах / Першина Е.Д., Вяткина О.В. // Тез. докл. Междунар. конф. «Прикладная физическая химия и нанохимия». – 10-14 10 2009. Судак. – С. 182–183.
100. Аналитическая химия: Учебное пособие для студентов фармацевтических вузов и ф-тов III-IV уровня аккредитации / Под об. Ред. В. В. Болотова; пер. с укр. / В. В. Болотов, О. М. Гайдукевич, О. М. Свечникова и др. – Харьков: Изд-во НФАУ; Золотые страницы, 2001. – 456 с.

101. Основы аналитической химии. Практическое руководство / В.И. Фадеева, Т.Н. Шеховцова, В.М. Иванов и др.; под ред. Ю.А.Золотова. – 2 изд., испр.– М.: Высшая школа, 2003. – С. 294–297.
102. Лурье Ю. Ю. Химический анализ производственных сточных вод / Ю.Ю. Лурье, А.И. Рыбников. – М.: Химия, 1974. – 395 с.
103. Вяткина О.В. Природа кислотно-основной и каталитической активности монтмориллонита в водной среде / Вяткина О.В., Першина Е.Д., Каздобин К.А. // Укр. Хим. Журн. – 2006. – Т.72, №7. – С. 19–24.
104. Ливер Э. Электронная спектроскопия неорганических соединений / Э. Ливер; [пер. с. англ.]; в 2-х частях. – М.: Мир, 1987. – 493 с.
105. Barsoukov, Evgenij, and J. Ross Macdonald, eds. *Impedance spectroscopy: theory, experiment, and applications*. John Wiley & Sons, 2005.
106. Першина К.Д. Спектроскопія імпедансу електролітичних матеріалів / К.Д. Першина, К.О. Каздобін. – К.: Освіта України, 2012. – 223 с.
107. Yang, Hui, Guorong V. Zhuang, and Philip N. Ross. "Thermal stability of LiPF_6 salt and Li-ion battery electrolytes containing LiPF_6 ." *Journal of Power Sources* 161.1 (2006): 573-579.
108. van Schalkwijk, Walter, and Bruno Scrosati. "Advances in Lithium Ion Batteries Introduction." *Advances in Lithium-Ion Batteries*. Springer US, 2002. 1-5.
109. Dominey, Larry A., Victor R. Koch, and Tom J. Blakley. "Thermally stable lithium salts for polymer electrolytes." *Electrochimica Acta* 37.9 (1992): 1551-1554.
110. Miller, Anne-Frances. "Superoxide dismutases: active sites that save, but a protein that kills." *Current opinion in chemical biology* 8.2 (2004): 162-168.
111. Miller, Anne-Frances. "Superoxide dismutases: ancient enzymes and new insights." *FEBS letters* 586.5 (2012): 585-595.
112. Болдырев А.И. Инфракрасные спектры минералов / А.И. Болдырев. – М.: Недра, 1976. – 199 с.

113. Тарасевич Ю.И. Определение ИК спектров глинистых минералов и адсорбированных на них веществ / Ю.И. Тарасевич // Укр. Хим. Журн. – 1968. – Т. 34, №5. – С. 439–446.
114. Накамото К. ИК- спектры и спектры КР неорганических и координационных соединений / К. Накамото. – М.: Мир, 1991. – 536 с.
115. Ermakova M.O., Vyatkina O.V. Immobilization as a stabilization and regulation method of peroxidase black horseradish substrate specificity /Peer-reviewed articles 8th Int. Bata Conference for Ph.D. Students and Young Researchers. – Zlin (Czech Republic). – 19. 04. 2012. – V. 8, № 116. – P. 1–8.
116. Коттон Ф. Современная неорганическая химия / Ф. Коттон, Дж. Уилкинсон – М.: Мир, ч.3, 1969. – 386 с.
117. Springer, V., M. Kotouček, and J. Majer. "New complexanes. XXXEX. Preparation and study of the solid complexes of the racemic ethylenediamine-N,N -disuccinic acid with iron (III), cobalt (III), and bismuth (III) ions." *Chem. zvesti* 34.2 (1980): 184-189.
118. Whitburn, Joanne S., Stephen D. Wilkinson, and David R. Williams. "Chemical speciation of ethylenediamine-N, N'-disuccinic acid (EDDS) and its metal complexes in solution." *Chemical Speciation & Bioavailability* 11.3 (1999): 85-93.
119. Begum, Mohammed S. Ameerunisha, et al. "Iron (III) Schiff base complexes of arginine and lysine as netropsin mimics showing AT-selective DNA binding and photonuclease activity." *Journal of inorganic biochemistry* 104.4 (2010): 477-484.
120. Hong, Seungwoo, et al. "Crystallographic and spectroscopic characterization and reactivities of a mononuclear non-haem iron (III)-superoxo complex." *Nature communications* 5 (2014).
121. Амиров, Рустэм Рафаэлевич, et al. "Образование разнолигандных комплексов железа (III) с тироном и аминокарбоксилатами в водной среде." *Ученые записки Казанского университета. Серия Естественные науки* 154.1 (2012).

122. Speight, James G. *Lange's handbook of chemistry*. Vol. 1. New York: McGraw-Hill, 2005.
123. Wilkinson G. *Comprehensive coordination chemistry. The Synthesis, Reactions, Properties & Applications of Coordination Compounds, V. 5 Late Transition Elements* / G. Wilkinson // Oxford UK.: Pergamon Press Pergamon, 1987. – P. 831.
124. Ходыкина М.О. Стабилизация нативного ферментного препарата на неорганических носителях каолине и аэросиле / Ходыкина М.О., Першина Е.Д., Каздобин К.А., Трунова Е.К. // Укр. Хим. журнал – 2016. – Т. 81, № 9, С. 15–21.
125. Davies, Gideon, and Bernard Henrissat. "Structures and mechanisms of glycosyl hydrolases." *Structure* 3.9 (1995): 853-859.
126. Khodykina M.O. Immobilization of the *Raphanus sativus l. Var. Niger* enzyme preparation on natural bentonite and bentonite modified by phosphate ions/ Khodykina M.O., Pershina K.D., Kazdobin K.A., Trunova E.K. // *Surface Engineering and Applied Electrochemistry* – 2017. – V. 53, Is. 2, P. 196–201.
127. Tainer, John A., et al. "Structure and mechanism of copper, zinc superoxide dismutase." *Nature* 306.5940 (1983): 284-287.
128. Azevedo, Ana M., et al. "Horseradish peroxidase: a valuable tool in biotechnology." *Biotechnology annual review* 9 (2003): 199-247.
129. Timp, G., et al. "Suppression of the Aharonov-Bohm effect in the quantized Hall regime." *Physical Review B* 39.9 (1989): 6227-6230.
130. Ходыкина М.О. Электрохимические свойства иммобилизованных ферментных препаратов *Raphanus sativus l. Var. Niger* на водонерастворимых подложках / Ходыкина М.О. Першина Е.Д., Каздобин К.А. // Укр. Хим. журнал – 2015. – Т. 81, № 4, С. 116–119.
131. Pershina K.D. Analysis of the activity of immobilized enzyme preparations of black horseradish using electrochemical impedance spectroscopy / Pershina

- K.D., Khodykina M.O., Kazdobin K.A. // Surface Engineering and Applied Electrochemistry – 2015. – V. 51, Is. 6, P. 572–580.
132. Carbon nanotube based supercapacitors / Y.H. Lee, K.H. An, J.Y. Lee, S.C. Lim // Encyclopedia of Nanosci. Nanotechnol. – 2004. – V. 1. – P. 625–634.
133. Basnayaka, Punya A., et al. "Graphene/polypyrrole nanocomposite as electrochemical supercapacitor electrode: electrochemical impedance studies." (2013): 81-87.
134. Leech, Dónal, Paul Kavanagh, and Wolfgang Schuhmann. "Enzymatic fuel cells: Recent progress." *Electrochimica Acta* 84 (2012): 223-234.
135. Sassolas, Audrey, Loic J. Blum, and Béatrice D. Leca-Bouvier. "Immobilization strategies to develop enzymatic biosensors." *Biotechnology advances* 30.3 (2012): 489-511.
136. Maduraiveeran, Govindhan, and Wei Jin. "Nanomaterials based electrochemical sensor and biosensor platforms for environmental applications." *Trends in Environmental Analytical Chemistry* (2017).
137. Bayer P. Mechanism of Enzyme Action / P. Bayer // Annu. Rev. Biochem. – 1960. – V. 29. – P. 15–44.
138. Putzbach, William, and Niina J. Ronkainen. "Immobilization techniques in the fabrication of nanomaterial-based electrochemical biosensors: A review." *Sensors* 13.4 (2013): 4811-4840.
139. Chekin, Fereshteh, Lo Gorton, and Issa Tapsobea. "Direct and mediated electrochemistry of peroxidase and its electrocatalysis on a variety of screen-printed carbon electrodes: amperometric hydrogen peroxide and phenols biosensor." *Analytical and bioanalytical chemistry* 407.2 (2015): 439-446.
140. Wang, Rutao, and Xingbin Yan. "Superior asymmetric supercapacitor based on Ni-Co oxide nanosheets and carbon nanorods." *Scientific reports* 4 (2014): 3712.
141. Simon, Patrice, and Yury Gogotsi. "Materials for electrochemical capacitors." *Nature materials* 7.11 (2008): 845-854.
142. Supercapacitors / Illinois Capacitor. – Available from: <http://www.illinoiscapacitor.com/pdf/Papers/supercapacitors.pdf>.

143. *Ac Impedance Spectroscopy – A Powerful Tool For The Characterization Of Materials And Electrochemical Power Sources* / P. Kurzweil // The 14th International Seminar On Double Layer Capacitors. 6–8.12.2004. – Florida, U.S.A., 2004. – P. 11 – 15.
144. German, Natalija, et al. "The use of different glucose oxidases for the development of an amperometric reagentless glucose biosensor based on gold nanoparticles covered by polypyrrole." *Electrochimica Acta* 169 (2015): 326-333.
145. Chang, Qing, and Heqing Tang. "Optical determination of glucose and hydrogen peroxide using a nanocomposite prepared from glucose oxidase and magnetite nanoparticles immobilized on graphene oxide." *Microchimica Acta* 181.5-6 (2014): 527-534.
146. Oliver, N. S., et al. "Glucose sensors: a review of current and emerging technology." *Diabetic Medicine* 26.3 (2009): 197-210.
147. Scandurra, Graziella, et al. "Electrical characterization and hydrogen peroxide sensing properties of gold/nafion: polypyrrole/MWCNTs electrochemical devices." *Sensors* 13.3 (2013): 3878-3888.
148. Dai, Hongjie, Hailiang Wang, and Ming Gong. "Strongly coupled inorganic-graphene hybrid materials, apparatuses, systems and methods." U.S. Patent No. 9,237,658. 12 Jan. 2016.
149. Claussen, Jonathan Clay, et al. "Modified graphitic electrodes for electrochemical energy storage enhancement." U.S. Patent Application No. 14/181,106.
150. Cosnier, Serge, et al. "Biocompatible electrochemical supercapacitor." U.S. Patent Application No. 14/772,744.
151. Curchoe, Carol Lynn, and Shelley Minter. "Biological supercapacitor structure and method for manufacturing and use of the same." U.S. Patent Application No. 14/941,221.