

ENZYMOVÉ BIOPALIVOVÉ ČLÁNKY

JAROSLAV FILIP a JÁN TKÁČ

Slovenská akadémia vied, Chemický ústav, Oddelení glykobiotechnologie, Dúbravská cesta 9, 845 38 Bratislava
jaroslav.filip@savba.sk, jan.tkac@savba.sk

Došlo 30.5.13, přijato 22.7.13.

Klíčová slova: enzymatické biopalivové články, bioelektrokatalýza, biokatalyzátory

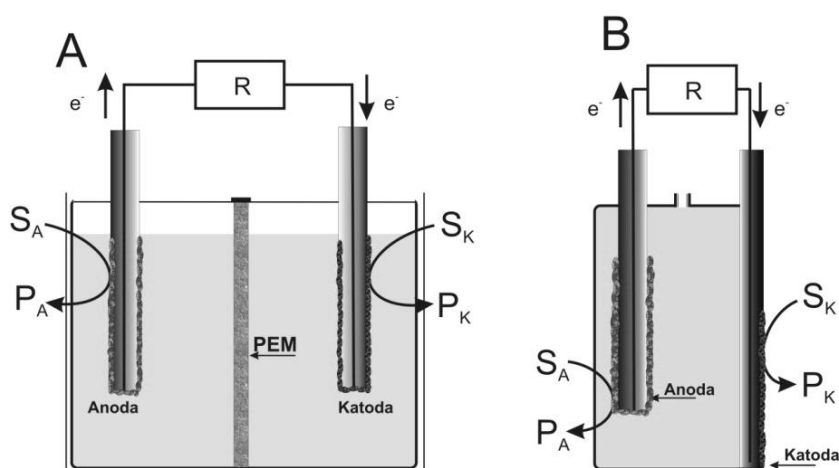
Obsah

1. Úvod
2. Konstrukční faktory BFC
3. Substráty a biokatalyzátory anodových reakcí
 - 3.1. Sacharidy
 - 3.2. Alkoholy
 - 3.3. Karboxylové kyseliny
 - 3.4. Vodík
4. Substráty a biokatalyzátory katodových reakcí
5. Aplikace biopalivových článků
6. Závěr

1. Úvod

Jednou z velmi intenzivně se rozvíjejících oblastí aplikovaných biotechnologií je využití elektrochemických vlastností biokatalyzátorů, kdy enzymově katalyzované redoxní reakce probíhající na povrchu elektrod jsou detegovány jako proudová odezva. Tohoto principu ve spojení se selektivitou enzymů se využívá při konstrukci jednak elektrochemických biosenzorů, v současnosti je ovšem předmětem čím dál intenzivnějšího výzkumu i konstrukce tzv. biopalivových článků. V těchto zařízeních jsou na povrchu dvou spojených elektrod (anody a katody) imobilizovány biokatalyzátory umožňující přeměnu části chemické energie substrátu na elektrickou stejným způsobem jako v konvenčních palivových článcích. První experimenty v této oblasti využívaly celé buňky (mikrobiální biopalivové články¹), nicméně efektivnější se ukázalo využití izolovaných oxidoreduktas (enzymové biopalivové články, EBFC), které bylo poprvé realizováno v šedesátých letech². Takto je zajištěno vyšší množství vlastních katalytických jednotek na povrchu elektrody a díky nepřítomnosti buněčných membrán nedochází k omezení transportu hmoty mezi jednotlivými složkami biokatalytického elektrodového rozhraní.

K vlastní reakci u enzymů dochází pouze v jejich katalytickém centru, což je hlavní rozdíl proti částicím anorganických katalyzátorů katalyticky aktivních na celém jejich povrchu. Proto poskytují konvenční palivové články s anorganickými katalyzátory vždy vyšší výkon, nicméně EBFC jsou biokompatibilní, tzn. lze je využít pro specifické aplikace, především pro napájení implantovaných me-



Obr. 1. **Obecné schéma biopalivových článků;** dvoukomorová (A) jednokomorová (B) konfigurace. S – substrát, P – produkt, _A – anodový, _K – katodový. PEM – proton permeabilní membrána

dicínských zařízení, případně napájení zařízení s nízkou spotřebou.

Předmětem tohoto referátu je přehled biokatalyzátorů a substrátů použitých při konstrukci enzymových biopalivových článků spolu s přehledem jejich využití na konstrukci samonapájejících biosenzorů a jako implantovaných energetických zdrojů.

2. Konstrukční faktory EBFC

Při konstrukci EBFC musíme počítat s nižší stabilitou enzymů mimo jejich přirozené prostředí, proto je nutno použít technologie zaručující vyšší životnost zařízení, např. kovalentní vázání enzymů, chemické síťování, uzavírání do polymerních matic, atd. Další nevýhoda enzymů spočívá v nekompletní oxidaci substrátu, čemuž se lze vyhnout imobilizací více enzymů – enzymové kaskády.

Z konstrukčního hlediska lze rozlišit biopalivové články dvoukomorové a jednokomorové, u nichž odpadá nutnost oddělit anodový a katodový prostor proton-permeabilní membránou (viz obr. 1). Toto uspořádání je z cenového i provozního hlediska výhodnější, je ovšem podmíněno dostatečnou aktivitou anodového i katodového biokatalyzátoru za stejných podmínek. To lze zajistit buď vhodným výběrem biokatalyzátoru nebo koimobilizací látek nutných pro efektivní katalýzu (především disociovatelných kofaktorů nebo elektronových mediátorů, viz dále) spolu s enzymem do elektrodového rozhraní.

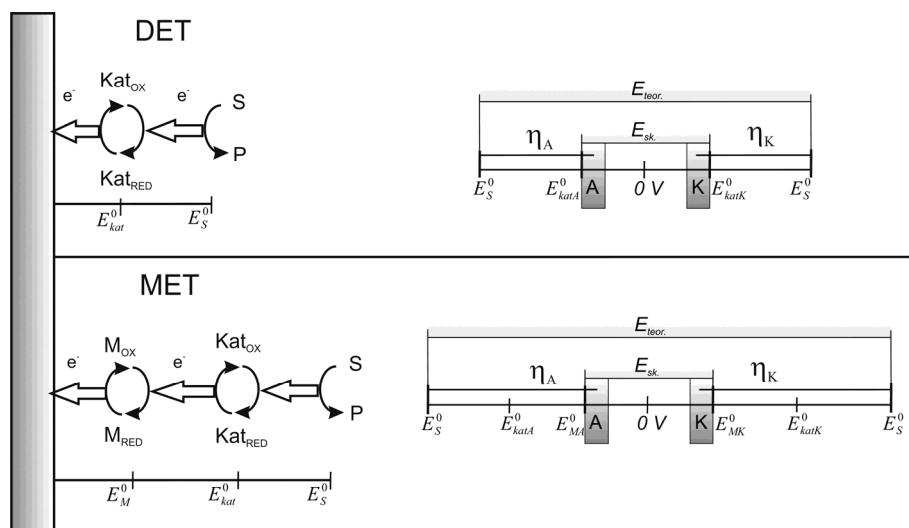
U biopalivových článků jsou možné dva základní módy přenosu náboje mezi aktivními centry enzymu a povrchem elektrody: zprostředkovaný (mediated electron transfer, MET) a přímý (direct electron transfer, DET)

elektronový transfer (viz obr. 2). První je podmíněn přítomností elektronového mediátoru, tedy látky figurující jako vlastní transportér elektronů. Na anodě dochází k její redukci biokatalyzátorem a k následné reoxidaci na povrchu elektrody a na katodě slouží po redukci jako zdroj elektronů pro biokatalytickou redukci depolarizátoru.

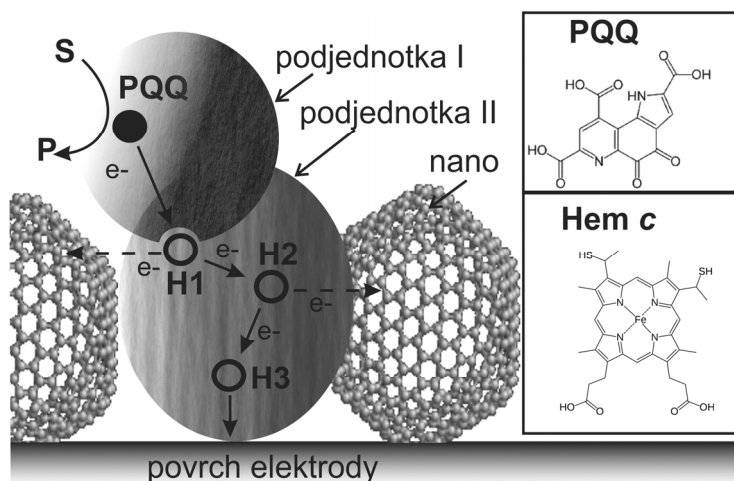
Schopnost DET závisí především na dostupnosti aktivních a redoxních center daného enzymu, tedy míst, kde dochází k přeměně substrátu, resp. která slouží k intramolekulárnímu transferu elektronů k jejich finálnímu akceptoru (viz obr. 3). Na základě toho může být rozlišen nemediovaný elektronový transfer kofaktorem, který může difundovat z apoenzymu a přímý elektronový transfer, kdy aktivní centra nejsou disociovatelná, ale jsou dostatečně blízko povrchu enzymu, takže může dojít k tzv. „tunelování“, tedy transportu elektronu i přes proteinové prostředí. Třetí možností je MET, kdy kofaktor není disociovatelný ani nemůže dojít k „tunelování“³.

Příklady kofaktorů v aktivních centrech jsou NAD (H), FAD a pyrrolo-chinolin chinon (PQQ), ostatní redoxní centra pak obsahují atomy kovů: hemy jako $\text{Fe}^{2+}/\text{Fe}^{3+}$ ligandy, Cu aktivní a redoxní centra u lakas a bilirubin oxidas nebo víceatomární Fe-S a Mo centra u hydrogenas.

Na efektivitu elektronové výměny má kromě uvedených sterických podmínek vliv mimo jiné i povrchová glykosylace; její odstranění vede ke snížení vzdálenosti mezi redoxními centry enzymu a povrchem elektrody⁴. Další možností zefektivnění DET je využití vodivých nanomateriálů; strukturovanost zajišťuje lepší kontakt povrchu enzymu s rozhraním a vyšší pravděpodobnost přenosu elektronu z redoxních center na elektrodu (viz obr. 3). Zároveň dojde k výraznému zvětšení aktivního povrchu, tedy k imobilizaci většího množství biokatalyzátoru,



Obr. 2. Schéma přímého (DET) a zprostředkovaného (MET) elektronového transferu. S – substrát, P – produkt, Kat – biokatalyzátor, M – mediátor, index ox – oxidovaný, index red – redukováný. E^0 – redoxní potenciál mediátoru (M), biokatalyzátoru (kat) a substrátu (S). η – přepětí anodické (A) a katodické (K). Pro DET i MET je schematicky zobrazen vztah mezi přepětím, teoretickým a skutečným napětím biopalivového článku



Obr. 3. Intramolekulární elektronový transfer (šipky plnou čarou) oxidoreduktasy s PQQ aktivním centrem a třemi hemy c jako redoxními centry (H1–H3) spolu s chemickou strukturou příslušných center. Šipky přerušovanou čarou – zefektivněný přenos náboje pomocí nanostruktur

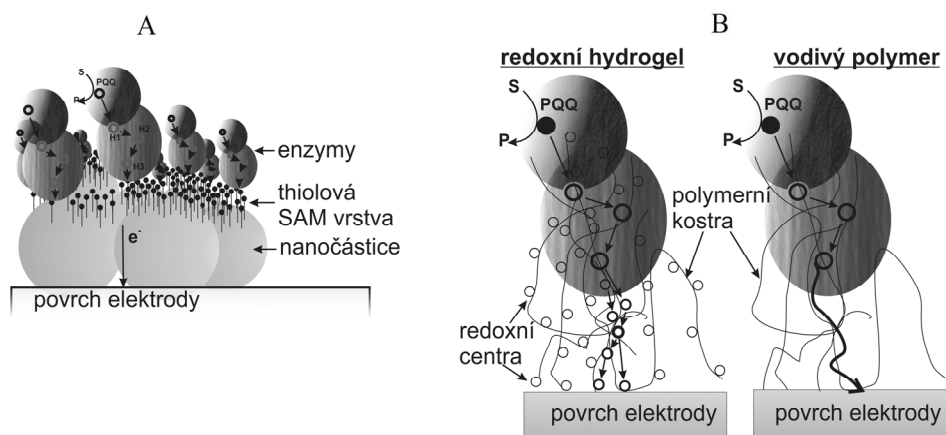
a tento efekt je ještě zesílen aplikací nanomateriálů na povrch již bohatě strukturovaných substrátů, např. porézního křemíku⁵ nebo uhlíkového papíru⁶. Velmi efektivní je rovněž orientovaná imobilizace, kdy jsou na povrch elektrody vnášeny chemické skupiny umožňující selektivní navázání (kovalentní, elektrostatické, hydrofobní) a tedy orientaci enzymu takovým způsobem, kdy bude nejlépe probíhat elektronový transfer na elektrodu. Typicky jsou takto připravovány např. thiolové samoskladebné monovrstvy (SAM) využívající silné vazby síry na zlato (viz obr. 4A) nebo pyrenové SAM na uhlíkových površích využívající π - π interakcí. Další možností zajištění elektronového transferu představují matrice z tzv. redoxních polymerů, které mají na nevodivé kostře navázána redoxní

centra (viz obr. 4B). Obdobou tohoto principu jsou matrice z vodivých polymerů (polypyrrol, polyanilin), kde je vodivost zprostředkována konjugovanými π -elektrony uhlíkové kostry (viz obr. 4B).

Různorodost struktur a vlastností dehydrogenas imobilizovaných na elektrody odráží nutnost nastavit co nejpřesněji vlastnosti rozhraní, což je možné díky výše popsaným principům a především díky jejich kombinacím.

3. Substráty a biokatalyzátory anodových reakcí

Při výběru enzymu pro anodické reakce je nutné přihlídnout ke druhu použitého paliva, resp. substrátu. Důraz



Obr. 4. A – schématické znázornění orientované imobilizace enzymů na povrch se samoskladebnou monovrstvou, B – schéma elektronového transferu pomocí redoxního hydrogelu a vodivého polymeru

je kladen jednak na co nejlevnější a nejdostupnější substráty a dále na biologicky relevantní sloučeniny. Nejčastěji jsou proto využívány enzymy schopné katalyzovat oxidaci alkoholů a mono-, popř. di-sacharidů, z nich absolutně nejčastěji glukosy.

3.1. Sacharidy

Gluksoxidasa (GOx) jako jeden z prvních biokatalyzátorů glukosa-kyslíkových BFC (cit.²) má FAD kofaktor umístěn uvnitř apoenzymu. K elektronovému transferu jsou tedy nutné mediátory. Byly použity jak rozpustné, volně v anolytu (benzochinonem mediovaná bioelektrokatalýza GOx uzavřené v polymerní matici – BFC o výkonu $1620 \mu\text{W cm}^{-2}$, cit.⁷), tak koimobilizované v matici rozhraní⁸, včetně imobilizace GOx do redoxních polymerů. Přirozený finální elektronový akceptor FAD koenzymu je O_2 , tento je tedy nutné vyloučit z anodového prostoru, aby nedocházelo k nežádoucímu přenosu elektronů mimo elektrodu. Tohoto bylo dosaženo právě díky redox-polymerní matici, čímž byla umožněna i bezmembránová konfigurace glukosa-kyslíkového BFC (cit.⁹). DET mezi enzymovým kofaktorem a povrchem elektrody byl dosažen až integrací s nanomateriály, např. uhlíkovými nanotrubičkami (CNT)¹⁰, uhlíkovým nano-aerogelem¹¹ či modifikovaným grafitovým oxidem v chitosanové polymerní matici¹². U GOx byla dosažena amperometrická odezva i elektrochemickou transformací H_2O_2 vznikajícího jako produkt redukce přítomného O_2 . Takto indukovaná odezva byla detegována bez přítomnosti elektronových mediátorů a bývá označována jako DET (cit.¹³), nejedná se nicméně o přímou elektrochemickou transformaci aktivního centra na elektrodě. Překvapivě podobné výkonové hustoty BFC (ca $1000 \mu\text{W cm}^{-2}$) byly dosaženy v případě anody s kompresně integrovanými CNT a GOx (cit.¹⁴), anody s GOx-CNT v redoxní polymerní matici¹⁵ i GOx integrovanou s polypyrrolem modifikovanými CNT (cit.¹⁶). Popsán byl i systém¹⁷, kdy byl FAD kovalentně imobilizovaný na povrch zlatých nanočástic, jejichž následnou inkubací s apoGOx vznikla monovrstva rekonstituované aktivní GOx.

Glukosadehydrogenasa (GDH; E.C. 1.1.1.47) je rezistentní vůči snižování efektivity elektronového transferu kyslíkem díky NADH kofaktoru. Nevýhodou je ovšem vysoké přepětí nutné pro reoxidaci NADH na elektrodě; to se dá snížit využitím rozpustných mediátorů, případně koimobilizací GDH s NADH-regenerujícím systémem (diaforasa je redukována vznikajícím NADH, čímž tento kofaktor oxiduje. Následně je diaforasa reoxidována pomocí mediátoru a může oxidovat další molekulu kofaktoru)¹⁸. Výrazného snížení přepětí bylo dosaženo i aplikací nanomateriálů, např. kombinací grafenového derivátu a CNT (cit.¹⁹), případně kombinací nanomateriálů a azobarviv (BFC o výkonu $56 \mu\text{W cm}^{-2}$ při 400 mV, cit.²⁰) nebo naftylu ($131 \pm 4 \mu\text{W cm}^{-2}$ při 300 mV, cit.²¹). Výše uvedené konfigurace vyžadovaly ovšem přítomnost kofaktoru v roztoku, čemuž se lze vyhnout např. jeho kovalentní imobilizací na povrch elektrody²².

Další možností eliminace problémů s kofaktorem je využití PQQ dependentní glukosadehydrogenasy (E.C. 1.1.5.2), membránového enzymu nesenzitivního na kyslík, u něž byla prokázána schopnost přímého elektronového transferu např. na CNT (cit.²³). Hydrofilnější periplasmatická PQQ-GDH (E.C. 1.1.99.17) neobsahující redoxní hem má kofaktor ještě hůře dostupný, nicméně i zde byl popsán DET u kovalentní imobilizace na CNT (cit.²⁴), případně u fúzního proteinu PQQ-GDH/Cyt c (cit.²⁵) a při rekonstituci apoenzymu na elektrodě modifikované PQQ/CNT (cit.²⁶). Maximální anodová proudová hustota $1800 \mu\text{A cm}^{-2}$ pak byla pozorována při imobilizaci do polymeru s osmičovými redoxními centry²⁷. Popsáno bylo i využití FADH-dependentní glukosadehydrogenasy imobilizované do redoxního polymeru; anoda poskytovala proudovou hustotu $215 \mu\text{A cm}^{-2}$ při 200 mV proti Ag/AgCl elektrodě²⁸.

K oxidaci glukosy byla rovněž využita FADH-dependentní celobiosadehydrogenasa (CDH), která není senzitivní na kyslík, je schopna DET a vykazuje optimum aktivity v oblasti fyziologického pH. I přes zjištěnou schopnost DET se efektivnější ukázal být transfer zprostředkovaný maticí z redoxního polymeru v kombinaci s CNT ($157 \mu\text{W cm}^{-2}$ při 200 mV)²⁹, pozitivní vliv má i deglykosylace enzymu⁴. Nižší substrátové specifity CDH pak bylo využito i na konstrukci laktosa-kyslíkového BFC (cit.³⁰). Dalšími enzymy využitými na anodickou oxidaci glukosy je FAD dependentní pyranosadehydrogenasa³¹, pyranosa-2-oxidasa (přírodní a rekombinantní)³² a aldosa-dehydrogenasa³³.

Kromě glukosy je jako palivo BFC často využívána i fruktosa. Její oxidace typicky probíhá pomocí PQQ dependentní fruktosadehydrogenasy (FDH), membránového enzymu s hemy zajišťujícími intramolekulární přenos elektronů z redoxního centra na elektrodu³⁴. DET této dehydrogenasy byl pozorován a využit pro konstrukci jednokomorového bezmediátorového BFC např. na CNT modifikovaných iontovými kapalinami³⁵. Velmi efektivní se ukázala i jednoduchá adsorbce FDH na uhlíkové nanočástice KetjenBlack v hydrofobní polymerní matici⁶ (BFC o výkonu $800 \mu\text{W cm}^{-2}$), případně na nanočástice tzv. uhlíkového kryogelu, rovněž dispergovaného v hydrofobní polymerní matici³⁶, orientovaná imobilizace na merkaptethanolem modifikované zlaté nanočástice³⁷ (BFC o výkonu $660 \mu\text{W cm}^{-2}$) a adsorbce na oxidované CNT (cit.³⁸). Nejvyšší výkonová hustota $1800 \mu\text{W cm}^{-2}$ pak byla dosažena integrací FDH s vysoce uspořádanými CNT, jež aplikací iontových kapalin velmi těsně „obalily“ enzymy a tím zajistily maximální možnou hustotu katalytických center CNT/FDH kompozitu, který byl navíc flexibilní³⁹. Tyto flexibilní bioanody a biokatody oddělené vrstvou hydrogelu (elektrolyt + fruktosa) pak byly použity na konstrukci sériově zapojených fruktosa kyslíkových BFC s celkovým výkonem $640 \mu\text{W}$ při potenciálu 1210 mV, což je zatím nejslibnější krok směrem k praktickému využití enzymových BFC (cit.⁴⁰).

Kromě monosacharidů byl testován např. i maltodextrin, jehož zpracování bylo zajištěno v prvním kroku maltodextrinofosforylasou a fosfoglukomutasou (volně v roztoku) a v druhém imobilizovanou glukos-6-fosfátdehydrogenasou a diaforasa-vitamin K3 mediátorovým systémem⁴¹.

3.2. Alkoholy

Akers a spol.⁴² testoval efektivitu NADH dependentní alkoholdehydrogenasy (ADH) pro konstrukci BFC. Imobilizace ADH do matrice z hydrofobizovaného sulfonovaného fluoropolymeru (Nafion®) spolu s methylenovou zelení zajišťující reoxidaci NADH umožnila výkon zařízení vyšší než 1000 $\mu\text{W cm}^{-2}$, přičemž methanol jako palivo byl ještě o cca 30 % efektivnější než ethanol z hlediska výkonu BFC. Použitá matrice zajistila vysokou stabilitu zařízení a koimobilizace ADH s aldehyddehydrogenasou navíc umožnila efektivnější využití paliva a téměř dvojnásobné zvýšení výkonu ethanol-kyslíkového BFC. Stejný princip – koimobilizace ADH, aldehyddehydrogenasy a navíc formátdehydrogenasy pak zajistil kompletní oxidaci methanolu na CO_2 na anodě BFC (cit.⁴³). Kromě koimobilizace enzymu a mediátoru do hydrofobní matrice byla ADH i volně sorbovaná na uhlíkové nanočástice KetjenBlack spolu s NADH, kde byl využit jako mediátor ferocen⁴⁴. Elektrostatická interakce byla využita při přípravě komplexu ADH/oxidované diamantové nanočástice. Ten byl součástí anolytu BFC (cit.⁴⁵). Velmi efektivní se ukázala být kombinovaná trimethoxysilan-chitosanová matrice umožňující elektrostatickou retenci mediátoru, imobilizaci ADH i zlatých nanočástic pro zvýšení vodivosti rozhraní, nicméně s kofaktorem rozpuštěným v anolytu⁴⁶. Využity byly i polyamidoaminové dendrimery vytvářející vhodné imobilizační prostředí, bez vlivu na kinetiku bioelektrooxidace ethanolu⁴⁷. Efektivního snížení přepětí reoxidace NADH bylo dosaženo i modifikací elektrody elektropolymerizovaným ruthenium-aminofenantrolinovým komplexem⁴⁸.

Další volbu představuje PQQ dependentní membránová alkoholdehydrogenasa, v níž je intramolekulární elektronový transfer z PQQ centra na elektrodu zabezpečen pomocí hemů *c*. Přímý elektronový transfer byl pozorován na kovových⁴⁹ i uhlíkových elektrodách a nanočásticích, čehož bylo m.j. využito pro konstrukci BFC s ethanolem sloužícím jako anodický substrát i katodický depolarizátor (H_2O_2 produkující alkoholoxidasa v kombinaci s H_2O_2 redukující mikroperoxidasou)⁵⁰. Efektivita DET byla dále zvýšena integrací CNT do matrice s hydrofobizovaným Nafionem⁵¹ a pro vyšší výkon BFC bylo využito schopnosti ADH oxidovat i glycerol. Takto byl zkonstruován vysoce účinný (1200 $\mu\text{W cm}^{-2}$) glycerol-kyslíkový BFC s PQQ dependentními ADH a aldehyddehydrogenasou, přičemž glycerol díky většímu počtu reakčních míst představuje o 60 % efektivnější palivo než ethanol při stejné konfiguraci. Glycerolový BFC navíc fungoval i při velmi vysoké koncentraci paliva (98 %)⁵². Další zvýšení efektivnosti tohoto konceptu představovalo obohacení enzymové kas-

kády o FAD dependentní oxalátoxidasu⁵³.

Na konstrukci stabilního methanol-kyslíkového biopalivového článku byla využita i PQQ dependentní methanoldehydrogenasa⁵⁴.

3.3. Karboxylové kyseliny

Z dalších biopaliv pro BFC byly testovány např. pyruvát (anodická oxidace pomocí pyruvátdehydrogenasy⁵⁵ a jeho kompletní oxidace pomocí imobilizovaných enzymů Krebsova cyklu⁵⁶), dále kyselina jablečná (anodická oxidace pomocí malátdehydrogenasy⁵⁷) a laktát (anodická oxidace laktátdehydrogenasou⁵⁸), který byl využit i jako palivo oxidované až na CO_2 kaskádou šesti dehydrogenas⁵⁹.

3.4. Vodík

Velmi často používaným substrátem konvenčních palivových článků je vodík, neselektivně oxidovaný nejčastěji platinovými katalyzátory. Spousta mikroorganismů nicméně disponuje hydrogenasami umožňujícími obousměrnou přeměnu protonu na H_2 , přičemž u některých z nich byl zjištěn i přímý elektronový transfer spolu s dostatečně nízkým potenciálem oxidace vodíku⁶⁰. Pro konstrukci BFC bylo důležité najít enzymy vykazující co nejnižší inhibici kyslíkem a CO , což splňují např. membránové hydrogenasy z *Ralstonia eutropha*⁶¹, *E. coli*⁶², *Desulfovibrio vulgaris*⁶³ a *Aquifex aeolicus*⁶⁴.

Pro imobilizaci dehydrogenas na povrch elektrod byly využity vesměs techniky již zmíněné u ostatních oxidoreduktas, např. fyziosorpce na pyrolytický grafit⁶¹, kovalentní imobilizace⁶⁵ či orientovaná imobilizace na zlaté elektrody pokryté SAM⁶³. Nejeefektivnější se ukázala být kovalentní imobilizace využívající karboxylované CNT a aminové skupiny enzymu⁶⁴ (vodík-kyslíkový BFC s výkonem 300 $\mu\text{W cm}^{-2}$ při 600 mV).

4. Substráty a biokatalyzátory katodových reakcí

Jako depolarizátor na katodě je nejčastěji používán kyslík. Nejeefektivnější biokatalyzátory jeho katodické redukce se ukázaly být z hub izolované lakasy (např. z *Cerrena unicolor*, *Rhus vernificera* a *Trametes versicolor* a *hirsuta*)⁶⁶ a bilirubinoxidasy (BOD) izolovány např. z *Myrothecium verrucaria*⁶⁶, *Bacillus pumilus*⁶⁷ a *Magnaporthe oryzae*⁶⁸, u nichž byl prokázán přímý elektronový transfer. Aktivní centra těchto enzymů („multi-copper“ oxidasy, MCO) obsahují atomy mědi, přičemž pomocí tzv. T1 centra (1 atom Cu) probíhá transfer elektronů z povrchu katody. Redukované T1 centrum je pravděpodobně reoxidováno T3 centrem obsahujícím dva atomy mědi, které následně redukuje T2 centrum (1 atom Cu). Zde je navázána a následně redukována molekula kyslíku. Uvedený systém doposud nebyl i přes značné množství studií (viz reference např. v cit.⁶⁹) jednoznačně potvrzen,

nicméně z dosavadních zkoumání vyplývá, že se jedná o tzv. „uphill“ přenos, tedy transfer elektronů proti hnačmu potenciálu, z Cu s vyšším redoxním potenciálem na centrum s nižším redoxním potenciálem⁷⁰.

Lakasy izolované z různých zdrojů se vyznačují rozdílnými redoxními potenciály T1 centra; pro vyšší celkové napětí EBFC je pak výhodné použít enzym s co nejvyšším T1 redoxním potenciálem (maximální hodnota uváděna 780 mV proti standardní vodíkové elektrodě), které poskytují výše jmenované zdroje⁶⁶. Bilirubinoxidasa má podobné uspořádání aktivních center a rovněž dostatečně vysoký redoxní potenciál T1 centra, optimum katalýzy je ovšem v oblasti fyziologického pH, což je výhoda oproti lakasám (opt. pH cca 4–5).

BOD i lakasy byly podobně jako anodické biokatalyzátory úspěšně imobilizovány na různá rozhraní s nanomateriály podstatně zvyšujícími výsledné katodické proudové hustoty. Velmi efektivní DET byl např. pozorován jak u lakasy⁷¹, tak u bilirubinoxidasy³⁷ při jednoduché adsorpci na rozhraní tvořené zlatými nanočásticemi bez jakékoliv povrchové modifikace. Ještě výhodnější z hlediska použitých materiálů a stejně efektivní z hlediska výkonu je adsorpce na uhlíkové nanomateriály; v polyvinyliden fluoridu či Teflonu dispergované saze⁷², příp. nanočástice uhlíkového kryogelu umožňující efektivní nastavení porozity⁶, představují efektivní a na obnovitelných zdrojích založenou alternativu ke zlatým nanočásticím. Vysoce výkonná katoda (více než 1000 $\mu\text{A cm}^{-2}$) byla připravena i inkubací přečištěné lakasy na antracemem modifikované CNT (cit.⁷³). Podobné efektivity bylo dosaženo i při uzavření BOD do osmiových redoxních polymerů⁷⁴, jejich syntéza však není z technologického hlediska tak jednoduchá a levná jako výše uvedené materiály.

Redukce kyslíku bývá značně limitována jeho nízkou rozpustností ve vodě. Exponováním biokatalytické části katody volnému vzduchu lze tak zvýšit katodické proudové hustoty a tedy výkon celého zařízení^{40, 72}. Tyto elektrody jsou typicky tvořeny vnější difuzní vrstvou, která je hydrofobní (teflonované uhlíkové nanočástice), a hydrofilní katalytickou částí obsahující enzym. U těchto systémů byla publikována proudová hustota až 20 mA cm^{-2} (cit.⁷⁵).

Velmi efektivní bezmediátorové katodické redukce kyslíku bylo dosaženo i při použití bakteriální oxidoreduktasy „Copper efflux Oxidase“ (CueO), která má strukturu velmi podobnou výše zmíněným MCO, neslouží nicméně k oxidaci organických látek, ale Cu iontů. Tento enzym byl exprimován v rekombinantní *E. coli* a následně použit jako biokatalyzátor na katodě, přičemž dosavadní výsledky naznačují, že CueO by zde mohla být ještě účinnější než BOD nebo lakasa⁷⁵.

Přímý elektronový transfer pro redukci kyslíku vykazují i další MCO, např. ceruloplasmin, jehož intenzivnějšímu využití v této oblasti brání jeho komplikovaná struktura a poměrně bohatá glykosylace, askorbát oxidasa s nepoměrně jednodušší strukturou a tyrozinasa⁶⁶.

Kromě MCO bylo k redukci kyslíku využito i systému cytochrom *c*/cytochrom oxidasa, nicméně s velmi nízkým potenciálem redukce kyslíku⁷⁶.

Jako depolarizátor byl použit i H_2O_2 redukováný mikroperoxidasami vykazujícími DET (např. MP-8, cit.⁷⁷) a peroxidasami⁷⁸. H_2O_2 byl buď přímo dodáván do systému nebo byl produkován koimobilizovanou GOx (cit.⁷⁷). Oproti kyslíku je tento depolarizátor reaktivnější, což znamená omezení jeho využití pouze na systémy, které jsou vůči jeho oxidačním schopnostem rezistentní.

5. Aplikace biopalivových článků

Jedním z předpokládaných využití EBFC je napájení implantovaných zařízení, tedy využívání kyslíku a glukosy obsažených především v krvi organismů jako depolarizátoru a paliva. Nezbytnými podmínkami jsou zde především eliminace uvolňování použitých materiálů do krevního oběhu, rezistence vůči interferencím a imunitním reakcím. Jedním z prvních experimentů v této oblasti byl glukosakyslíkový BFC (glukosaoxidasa + ubiquinon na anodě a polyfenoloxidasa + hydrochinon na katodě) implantovaný do retroperitoneálního prostoru krysy a produkující jednotky μW během deseti dnů⁷⁹. Následovaly rovněž glukosové BFC implantované do šneků⁸⁰ a do ústřic, kde bylo testováno i spojení tří „elektrifikovaných“ jedinců do baterie poskytující maximum 800 mV a 37 μW při sériovém, resp. paralelním spojení⁸¹. Podobný výkon byl dosažen u BFC na bázi glukosaoxidasy, lakasy a CNT umístěného do břišní dutiny krysy. Stabilitní experimenty pak prokázaly, že ani po 110 dnech nebyla indukována žádná zápalová reakce⁸². Southcott a spol.⁸³ pak popsali glukosadehydrogenasa/lakasový BFC s výkonem dostatečným na provoz kardiostimulátoru testovaný v simulaci lidského krevního oběhu.

Pokud jsou operační charakteristiky BFC známým způsobem závislé na podmínkách prostředí, lze tato zařízení využít i jako samonapájecí biosenzory. Publikovány byly např. samonapájecí biosenzory na glukosu (závislost napětí BFC na koncentraci glukosy)⁸⁴, CN^- ionty (inhibice intramolekulárního elektronového transportu lakasy)⁸⁵, nitroaromatické výbušniny (způsobující vyvážení oligomycinu inhibujícího anodové reakce pyruvát-kyslíkového mitochondriálního BFC)⁸⁶ a kyslík. V posledním případě bylo využito negativního vlivu kyslíku na efektivitu anodového MET, čímž mohl BFC fungovat jako logické hradlo se vstupy reprezentovanými probubláváním elektrolytu kyslíkem (inhibice anodového proudu) a dusíkem (žádná reakce na katodě). Detegovatelný signál (proud poskytovaný BFC) existuje tedy jen při takovém množství kyslíku v systému, kdy ještě nedojde k zastavení transportu elektronů na anodu a zároveň je dostatek katodického substrátu⁸⁷. Podobně bylo využito i aptamerů na konstrukci samonapájecího biosenzoru, logického hradla, který byl schopen rozlišovat různé kombinace koncentrace ATP a thrombinu⁸⁸.

Při využití BFC jako integrální součásti biosenzorů odpadá potřeba maximalizace výkonu a díky biokompatibilitě a rozmanitosti konfigurací BFC jsou tyto inteligentní samonapájecí (případně implantované) biosenzory oblast

s pravděpodobně nejvyšším potenciálem pro praktické využití BFC.

6. Závěr

Enzymové biopalivové články představují v současnosti stále intenzivněji zkoumanou specifickou alternativu alkalických baterií a zdrojů implantovaných zařízení. Pokrok především v oblasti nanomateriálů spolu s výběrem nejvhodnějších oxidoreduktas umožnil konstrukci zařízení s operačními vlastnostmi opravňujícími k předpokladu, že tento koncept bude možné využít i v praktických aplikacích. Hlavním cílem nicméně i nadále zůstává zvýšení dlouhodobé stability a další zvýšení výkonu, přičemž jednou ze slibných cest může být využití rekombinantních oxidoreduktas se speciálními vlastnostmi.

Tato publikace byla vytvořena v rámci projektů APVV 0282-11 a VEGA 1/0229/12.

LITERATURA

- Filip J., Gemeiner P., Tomčík P., Tkáč J.: *Chem. Listy* 106, 158 (2012).
- Yahiro A. T., Lee S. M., Kimble D. O.: *Biochim. Biophys. Acta, Spec. Sect. Biophys. Subj.* 88, 375 (1964).
- Bullen R. A., Arnot T. C., Lakeman J. B., Walsh F. C.: *Biosens. Bioelectron.* 21, 2015 (2006).
- Ortiz R., Matsumura H., Tasca F., Zahma K., Samejima M., Igarashi K., Ludwig R., Gorton L.: *Anal. Chem.* 84, 10315 (2012).
- Wang S. C., Yang F., Silva M., Zarow A., Wang Y., Iqbal Z.: *Electrochem. Commun.* 11, 34 (2009).
- Kamitaka Y., Tsujimura S., Setoyama N., Kajino T., Kano K.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 9, 1793 (2007).
- Chen C., Wang L., Tan Y., Qin C., Xie F., Fu Y., Xie Q., Chen J., Yao S.: *Biosens. Bioelectron.* 26, 2311 (2011).
- Zebda A., Gondran C., Cinquin P., Cosnier S.: *Sens. Actuators, B* 173, 760 (2012).
- Rengaraj S., Mani V., Kavanagh P., Rusling J., Leech D.: *Chem. Commun.* 47, 11861 (2011).
- Cai C., Chen J.: *Anal. Biochem.* 332, 75 (2004).
- Yu Z. H., Su T. T., Ren C. H., Li F., Xia D. G., Cheng S. Y.: *Wuli Huaxue Xuebao/ Acta Phys., Chim. Sin.* 28, 2867 (2012).
- Lee H. U., Yoo H. Y., Lkhagvasuren T., Song Y. S., Park C., Kim J., Kim S. W.: *Biosens. Bioelectron.* 42, 342 (2013).
- Mecheri B., D'Epifanio A., Geracitano A., Campana P. T., Licoccia S.: *J. Appl. Electrochem.* 43, 181 (2013).
- Zebda A., Gondran C., Le Goff A., Holzinger M., Cinquin P., Cosnier S.: *Nat. Commun.* 2, 370 (2011).
- MacAodha D., Luisa Ferrer M., Conghaile P. O., Kavanagh P., Leech D.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 14, 14667 (2012).
- Kim J., Yoo K.-H.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15, 3510 (2013).
- Xiao Y., Patolsky F., Katz E., Hainfeld J. F., Willner I.: *Science* 299, 1877 (2003).
- Inamuddin, Shin K. M., Kim S. I., So I., Kim S. J.: *Electrochim. Acta* 54, 3979 (2009).
- Wang X., Wang J. F., Cheng H. J., Yu P., Ye J. S., Mao L. Q.: *Langmuir* 27, 11180 (2011).
- Li X., Zhou H., Yu P., Su L., Ohsaka T., Mao L.: *Electrochem. Commun.* 10, 851 (2008).
- Karaškiewicz M., Nazaruk E., Zelechowska K., Biernat J. F., Rogalski J., Bilewicz R.: *Electrochem. Commun.* 20, 124 (2012).
- Miyake T., Oike M., Yoshino S., Yatagawa Y., Haneda K., Kaji H., Nishizawa M.: *Chem. Phys. Lett.* 480, 123 (2009).
- Ivnitski D., Atanasov P., Apblett C.: *Electroanalysis* 19, 1562 (2007).
- Göbel G., Schubart I. W., Scherbahn V., Lisdat F.: *Electrochem. Commun.* 13, 1240 (2011).
- Okuda J., Sode K.: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 314, 793 (2004).
- Tanne C., Göbel G., Lisdat F.: *Biosens. Bioelectron.* 26, 530 (2010).
- Ye L., Haemmerle M., Olsthoorn A. J. J., Schuhmann W., Schmidt H. L., Duine J. A., Heller A.: *Anal. Chem.* 65, 238 (1993).
- Ó Conghaile P., Pöller S., MacAodha D., Schuhmann W., Leech D.: *Biosens. Bioelectron.* 43, 30 (2013).
- Tasca F., Gorton L., Harreither W., Haltrich D., Ludwig R., Nöll G.: *Anal. Chem.* 81, 2791 (2009).
- Wang X., Falk M., Ortiz R., Matsumura H., Bobacka J., Ludwig R., Bergelin M., Gorton L., Shleev S.: *Biosens. Bioelectron.* 31, 219 (2012).
- Zafar M. N., Tasca F., Boland S., Kujawa M., Patel I., Peterbauer C. K., Leech D., Gorton L.: *Bioelectrochemistry* 80, 38 (2010).
- Spadiut O., Brugger D., Coman V., Haltrich D., Gorton L.: *Electroanalysis* 22, 813 (2010).
- Tuurala S., Lau C., Atanasov P., Smolander M., Minter S. D.: *Electroanalysis* 24, 229 (2012).
- Tominaga M., Shirakihara C., Taniguchi I.: *J. Electroanal. Chem.* 610, 1 (2007).
- Wu X., Zhao F., Varcoe J. R., Thumser A. E., Avignone-Rossa C., Slade R. C. T.: *Biosens. Bioelectron.* 25, 326 (2009).
- Tsujimura S., Nishina A., Hamano Y., Kano K., Shirashi S.: *Electrochem. Commun.* 12, 446 (2010).
- Murata K., Kajiya K., Nakamura N., Ohno H.: *Energy Environ. Sci.* 2, 1280 (2009).
- Haneda K., Yoshino S., Ofuji T., Miyake T., Nishizawa M.: *Electrochim. Acta* 82, 175 (2012).
- Miyake T., Yoshino S., Yamada T., Hata K., Nishizawa M.: *J. Am. Chem. Soc.* 133, 5129 (2011).
- Miyake T., Haneda K., Yoshino S., Nishizawa M.: *Biosens. Bioelectron.* 40, 45 (2013).
- Zhu Z., Wang Y., Minter S. D., Zhang Y. H. P.: *J. Power Sources* 196, 7505 (2011).
- Akers N. L., Moore C. M., Minter S. D.: *Electro-*

- chim. Acta 50, 2521 (2005).
43. Kim Y. H., Campbell E., Yu J., Minteer S. D., Banta S.: *Angew. Chem., Int. Ed.* 52, 1437 (2013).
 44. Addo P. K., Arechederra R. L., Minteer S. D.: *J. Power Sources* 196, 3448 (2011).
 45. Nicolau E., Mendez J., Fonseca J. J., Griebenow K., Cabrera C. R.: *Bioelectrochemistry* 85, 1 (2012).
 46. Deng L., Shang L., Wen D., Zhai J., Dong S.: *Biosens. Bioelectron.* 26, 70 (2010).
 47. Neto S. A., Forti J. C., Zucolotto V., Ciancaglini P., de Andrade A. R.: *Biosens. Bioelectron.* 26, 2922 (2011).
 48. Masuda M., Motoyama Y., Murata K., Nakamura N., Ohno H.: *Electroanalysis* 23, 2297 (2011).
 49. Ikeda T., Miyaoka S., Matsushita F., Kobayashi D., Senda M.: *Chem. Lett.* 847 (1992).
 50. Ramanavicius A., Kausaite A., Ramanaviciene A.: *Biosens. Bioelectron.* 24, 761 (2008).
 51. Neto S. A., Suda E. L., Xu S., Meredith M. T., De Andrade A. R., Minteer S. D.: *Electrochim. Acta* 87, 323 (2013).
 52. Arechederra R. L., Treu B. L., Minteer S. D.: *J. Power Sources* 173, 156 (2007).
 53. Arechederra R. L., Minteer S. D.: *Fuel Cells* 9, 63 (2009).
 54. Zhang X. C., Ranta A., Halme A.: *Biosens. Bioelectron.* 21, 2052 (2006).
 55. Treu B. L., Sokic-Lazic D., Minteer S. D.: *ECS Trans.* 25, 1 (2010).
 56. Sokic-Lazic D., Minteer S. D.: *Electrochem. Solid-State Lett.* 12, F26 (2009).
 57. Rincon R. A., Lau C., Luckarift H. R., Garcia K. E., Adkins E., Johnson G. R., Atanassov P.: *Biosens. Bioelectron.* 27, 132 (2011).
 58. Lee J. Y., Shin H. Y., Lee J. H., Song Y. S., Kang S. W., Park C., Kim J. B., Kim S. W.: *J. Mol. Catal. B: Enzym* 59, 274 (2009).
 59. Sokic-Lazic D., de Andrade A. R., Minteer S. D.: *Electrochim. Acta* 56, 10772 (2011).
 60. Yaropolov A. I., Karyakin A. A., Varfolomeev S. D., Berezin I. V.: *Bioelectrochem. Bioenerg.* 12, 267 (1984).
 61. Vincent K. A., Cracknell J. A., Lenz O., Zebger I., Friedrich B., Armstrong F. A.: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 16951 (2005).
 62. Wait A. F., Parkin A., Morley G. M., dos Santos L., Armstrong F. A.: *J. Phys. Chem. C* 114, 12003 (2010).
 63. Gutiérrez-Sánchez C., Olea D., Marques M., Fernández V. M., Pereira I. A. C., Vélez M., Lacey A. L. D.: *Langmuir* 27, 6449 (2011).
 64. Ciaccafava A., De Poulpiquet A., Techer V., Giudici-Orticoni M. T., Tingry S., Innocent C., Lojou E.: *Electrochem. Commun.* 23, 25 (2012).
 65. Baffert C., Sybirna K., Ezanno P., Lautier T., Hajj V., Meynial-Salles I., Soucaille P., Bottin H., Leger C.: *Anal. Chem.* 84, 7999 (2012).
 66. Shleev S., Jarosz-Wilkolazka A., Khalunina A., Morozova O., Yaropolov A., Ruzgas T., Gorton L.: *Bioelectrochemistry* 67, 115 (2005).
 67. Durand F., Kjaergaard C. H., Suraniti E., Gounel S., Hadt R. G., Solomon E. I., Mano N.: *Biosens. Bioelectron.* 35, 140 (2012).
 68. Durand F., Gounel S., Kjaergaard C. H., Solomon E. I., Mano N.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 1489 (2012).
 69. Filip J., Šefčovičová J., Gemeiner P., Tkac J.: *Electrochim. Acta* 87, 366 (2013).
 70. Shleev S., Andoralov V., Falk M., Reimann C. T., Ruzgas T., Srnc M., Ryde U., Rulišek L.: *Electroanalysis* 24, 1524 (2012).
 71. Dagys M., Haberska K., Shleev S., Arnebrant T., Kulys J., Ruzgas T.: *Electrochem. Commun.* 12, 933 (2010).
 72. Gupta G., Lau C., Rajendran V., Colon F., Branch B., Ivniński D., Atanassov P.: *Electrochem. Commun.* 13, 247 (2011).
 73. Minson M., Meredith M. T., Shrier A., Giroud F., Hickey D., Glatzhofer D. T., Minteer S. D.: *J. Electrochem. Soc.* 159, G166 (2012).
 74. Shen W., Deng H. M., Teo A. K. L., Gao Z. Q.: *J. Power Sources* 226, 27 (2013).
 75. Kontani R., Tsujimura S., Kano K.: *Bioelectrochemistry* 76, 10 (2009).
 76. Katz E., Willner I., Kotlyar A. B.: *J. Electroanal. Chem.* 479, 64 (1999).
 77. Ramanavicius A., Kausaite A., Ramanaviciene A.: *Biosens. Bioelectron.* 20, 1962 (2005).
 78. Gomez C., Shipovskov S., Ferapontova E. E.: *J. Renewable Sustainable Energy* 2, (2010).
 79. Cinquin P., Gondran C., Giroud F., Mazabrard S., Pellissier A., Boucher F., Alcaraz J. P., Gorgy K., Lenouvel F., Mathe S., Porcu P., Cosnier S.: *PloS One* 5, e10476 (2010).
 80. Halamkova L., Halamek J., Bocharova V., Szczupak A., Alfonta L., Katz E.: *J. Am. Chem. Soc.* 134, 5040 (2012).
 81. Szczupak A., Halamek J., Halamkova L., Bocharova V., Alfonta L., Katz E.: *Energy Environ. Sci.* 5, 8891 (2012).
 82. Zebda A., Cosnier S., Alcaraz J. P., Holzinger M., Le Goff A., Gondran C., Boucher F., Giroud F., Gorgy K., Lamraoui H., Cinquin P.: *Sci. Rep.* 3, (2013).
 83. Southcott M., MacVittie K., Halamek J., Halamkova L., Jemison W. D., Lobel R., Katz E.: *Phys. Chem. Chem. Phys.* 15, 6278 (2013).
 84. Katz E., Buckmann A. F., Willner I.: *J. Am. Chem. Soc.* 123, 10752 (2001).
 85. Deng L., Chen C. G., Zhou M., Guo S. J., Wang E. K., Dong S. J.: *Anal. Chem.* 82, 4283 (2010).
 86. Arechederra M. N., Fischer C. N., Wetzel D. J., Minteer S. D.: *Electrochim. Acta* 56, 938 (2010).
 87. Zhou M., Wang F., Dong S.: *Electrochim. Acta* 56, 4112 (2011).
 88. Zhou J., Battig M. R., Wang Y.: *Anal. Bioanal. Chem.* 398, 2471 (2010).

J. Filip and J. Tkáč (*Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava*): **Enzymatic Biofuel Cells**

Enzymatic biofuel cells are environmentally clean, renewable and biocompatible sources for low-power electronic devices. They are based on immobilization of electroactive enzymes on electrode surfaces modified preferentially with nanomaterials. Enzymatic catalysts used in biofuel cell construction are reviewed together with their immobilization techniques. An overview of fabricated biofuel cells close to practical applications is also given with the focus on the recent progress in construction of implantable biofuel cells and self-powered biosensors. These are two main fields where biofuel cells can offer advantages over conventional power sources.