



УДК 543.257.2 + 577.158.8

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ЦИТОХРОМ-*c*-ОКСИДАЗЫ В РЕГЕНЕРАТИВНОМ КИСЛОРОДНОМ ЭЛЕКТРОДЕ

*Березин И. В., Побочин А. С., Куприянов В. В.,
Лузиков В. Н.*

*Межфакультетская лаборатория биоорганической химии им. А. П. Белозерского
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова*

Исследованы характеристики модельного регенеративного кислородного электрода, содержащего в качестве переносчика редокс-эквивалентов пару WB — TMPD. Катализатором окисления TMPD кислородом служила цитохром-*c*-оксидаза субмитохондриальных частиц. Показано, что WB — TMPD обратимо взаимодействуют с графитовым электродом, при этом плотность предельного тока достигала 1 mA/cm^2 геометрической поверхности электрода при $2,5 \text{ mM}$ концентрации WB. Максимальная скорость окисления TMPD, катализируемого цитохром-*c*-оксидазой, составляла 10 мкмоль в 1 мин на 1 мг белка субмитохондриальных частиц. WB подвергается дальнейшим химическим превращениям: диспропорционированию и, по-видимому, окислению. Константа скорости этого побочного процесса слабо зависела от pH. Предполагается, что побочные реакции, приводящие к уменьшению концентрации WB, вызывают медленное падение стационарного тока в модельном короткозамкнутом элементе. Цитохром-*c*-оксидаза сравнительно устойчива в выбранных условиях. При pH 7,5 и 20° период полуинактивации составлял 10 сут , а в присутствии TMPD и WB — 5. Сделан вывод, что для усовершенствования электрода такого типа необходим более стабильный переносчик.

Успешное развитие конструирования топливных элементов в большой степени зависит от доступности хороших катализаторов восстановления кислорода. В обычном водородно-кислородном топливном элементе «слабым» звеном является кислородный электрод, что связано с необратимостью восстановления кислорода на электроде. Необратимость выражается в низкой плотности тока обмена кислорода (10^{-9} — 10^{-11} A/cm^2 в зависимости от материала электрода [1]), и в большом перенапряжении на электроде. Теоретически напряжение на клеммах элемента должно быть равным $1,23 \text{ В}$, а в действительности оно составляет $0,8$ — $0,9 \text{ В}$ [2]. Технологически проблема осложняется повышенными требованиями к материалу электрода. Наилучшими из применяемых катализаторов восстановления кислорода являются металлы платиновой группы. Другим потенциальным источником такого рода катализаторов могут служить окислительно-восстановительные ферменты, обладающие в отличие от неорганических катализаторов высокой специфичностью и способностью осуществлять катализ в мягких условиях. Однако конструирование ферментных электродов осложняется тем, что непосредственный обмен электронов между активным центром фермента и поверхностью электрода затруднен. Так,

Сокращения: TMPD — N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилэвдиамин; WB — голубой Вурстера; СМЧ — субмитохондриальные частицы.

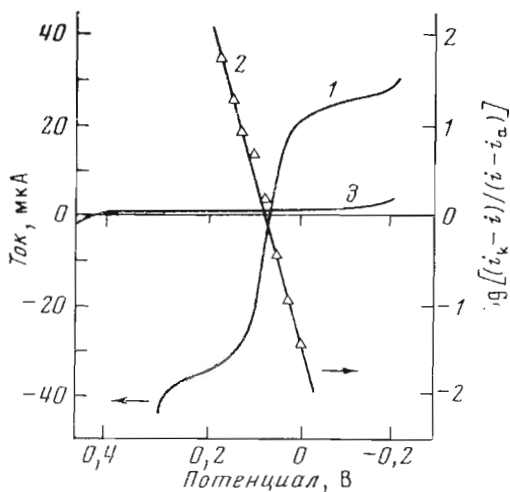


Рис. 1

Рис. 1. Полярограмма системы WB — TMPD (1) и ее линейная анаморфоза (2). Концентрация TMPD, 0,93 мМ, WB 0,67 мМ. рН 7,5; t 30°. 3 — полярограмма фона

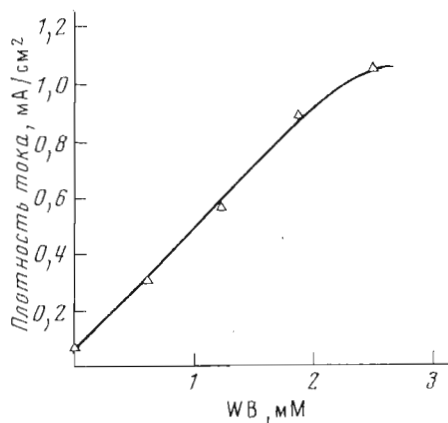


Рис. 2

Рис. 2. Зависимость плотности предельного катодного тока в расчете на 1 см² геометрической поверхности электрода от концентрации WB в среде. рН 7; t 30°

например, предельный ток восстановления цитохрома *c* на ртути равен 0,1 мкА/см² [3]. В связи с этим представляется целесообразной разработка регенеративного ферментного топливного элемента, в котором контакт активного центра с электродом осуществляется с помощью переносчика редокс-эквивалентов. В последние годы появилась информация о свойствах ферментных анодов [4—8], в то время как ферментным катодам пока должного внимания не уделяется.

В настоящей работе изучена система, в которой катализатором восстановления кислорода служила цитохром-*c*-оксидаза СМЧ, способная эффективно окислять TMPD кислородом до катион-радикала WB, который далее восстанавливался на катоде. Выбор указанной системы обусловлен тем, что, во-первых, TMPD — один из наиболее активных доноров электронов для цитохром-*c*-оксидазы [9] и его электрохимические свойства изучены достаточно подробно на платине и ртути [10—12]. Во-вторых, цитохром-*c*-оксидаза способна с высокой скоростью восстанавливать кислород до воды без образования перекиси водорода [13,14].

Из рис. 1, на котором представлена полярограмма пары WB — TMPD на графитовом электроде при рН 7,5, следует, что потенциал полуволны пары WB — TMPD относительно нормального водородного электрода при рН 7 равен 270 мВ, что близко к величине равновесного потенциала этой пары — 300 мВ [15]. На рис. 1 приведена также линейная анаморфоза указанной кривой в координатах $\lg [(i_k - i)/(i - i_a)] \div \varphi$, где i — ток, i_k — предельный катодный, i_a — предельный анодный ток, φ — потенциал относительно насыщенного хлорсеребряного электрода. Тангенс угла наклона в этих координатах близок к 59 мВ, что свидетельствует об обратимом одноэлектронном взаимодействии пары WB — TMPD с графитовым электродом. Обратимость взаимодействия подтверждается также и тем, что разность потенциалов элемента, составленного из хлорсеребряного электрода и катода в растворе, содержащем WB и TMPD, не зависела от материала электрода и была одинакова для графита и платины. Представленная на рис. 2 зависимость плотности предельного катодного тока в расчете на единицу геометрической поверхности электрода от концентрации WB в системе показывает, что ток линейно возрастает с увеличением concentra-

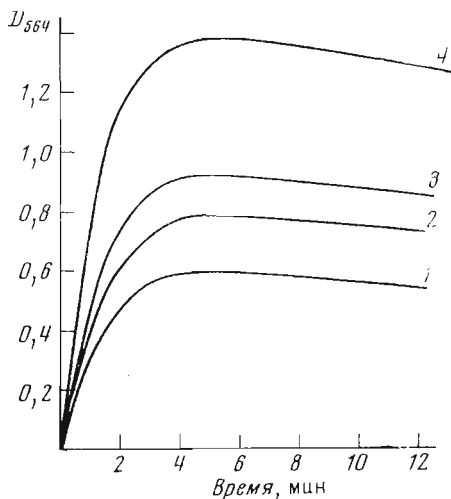


Рис. 3

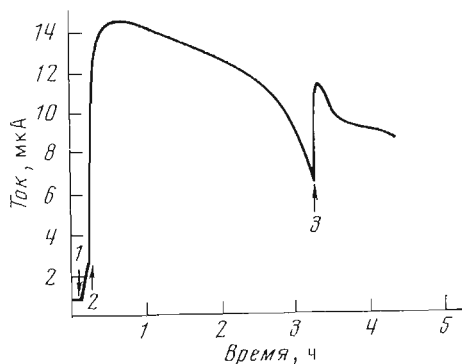


Рис. 4

Рис. 3. Кинетика накопления WB при катализируемом СМЧ окислении TMPD кислородом в зависимости от концентрации TMPD (мкМ): 1 — 50; 2 — 62; 3 — 83; 4 — 125. Кинетику накопления TMPD регистрировали при pH 7,5 и 38° по увеличению оптической плотности при 564 нм. Концентрация СМЧ — 0,11 мг/мл

Рис. 4. Изменение силы тока в зависимости от времени при работе короткозамкнутого элемента в различных условиях. Стрелками указаны моменты введения в следующей последовательности: 1 — 0,5 мМ TMPD, 2 — 0,6 мг/мл СМЧ, 3 — буфера, содержащего O₂ (260 мкМ). В пулевой момент времени буфер содержал насыщающую концентрацию O₂ (260 мкМ). pH 7; 25°

ции WB в растворе до 2,5 мМ. Дальнейшее увеличение концентрации катион-радикала ограничивалось растворимостью его хлорнокислой соли в воде в этих условиях. Обращает на себя внимание тот факт, что удельная плотность тока в расчете на единицу концентрации WB, равная тангенсу угла наклона прямой зависимости тока от концентрации, составляет значительную величину (0,44 мА/см²·мМ).

TMPD спонтанно окислялся кислородом, растворенным в буфере, с образованием WB, при этом реакция подчинялась кинетике первого порядка по концентрации TMPD, с константой псевдопервого порядка $0,33 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ при pH 7,5 и 30°. СМЧ катализировали окисление TMPD кислородом, причем начальная скорость реакции зависела от концентрации TMPD по закону Михаэлиса с $K_m \approx 1 \text{ мМ}$ и $V \approx 10 \text{ мкмоль/мин} \cdot \text{мг}$, что в пересчете на содержание цитохром-с-оксидазы в препарате (0,2 нмоль/мг) при pH 7,5 и 30° дает величину $k_{\text{кат}} 8,3 \cdot 10^2 \text{ с}^{-1}$. Пересчет величины V в электрохимические единицы позволяет оценить возможность цитохром-с-оксидазы как электродного катализатора. Расчет дает значение 16 А/г, тогда как для платины оно составляет 0,1 А/г. На рис. 3 показана кинетика накопления WB в зависимости от концентрации TMPD в интервале 50—125 мкМ, т. е. в значительной мере более низкой, чем величина K_m . В этом случае начальная скорость окисления, как и следовало ожидать, линейно зависела от концентрации СМЧ и TMPD. Накопление WB сначала увеличивается и достигает максимума, а затем наблюдается медленное снижение его концентрации. Это означает, что реакция окисления TMPD не заканчивается появлением WB, а протекает дальше с образованием, например, хинондимина. В пользу этого предположения свидетельствует наличие второй волны на полярограммах пары WB — TMPD в области более положительных потенциалов (800 мВ относительно нормального водородного электрода при pH 7), что согласуется с имеющимися данными [41].

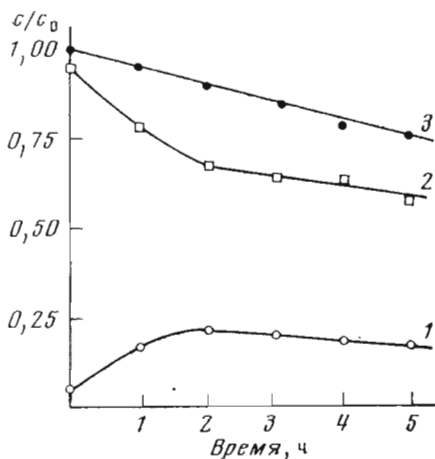


Рис. 5. Изменение относительного содержания WB и TMPD при инкубации раствора WB в анаэробных условиях. 1 — TMPD, 2 — WB, 3 — WB + TMPD. Суммарная начальная концентрация WB и TMPD (c_0) — 0,63 мМ. Инкубацию проводили при pH 6,5 и 30°

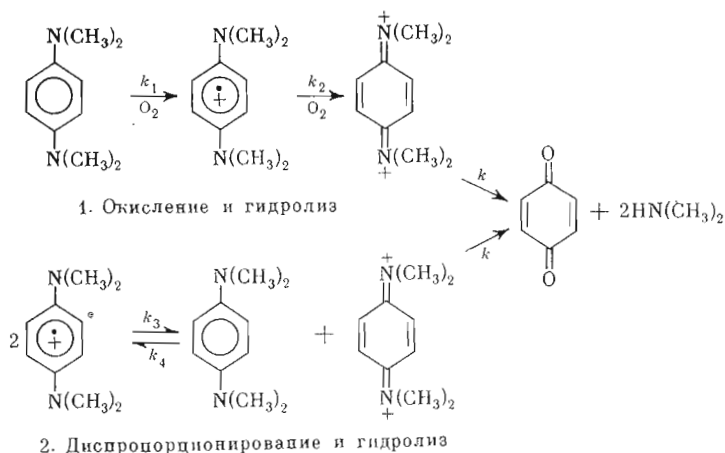
WB в системе: электролиза WB до TMPD, диспропорционирования WB до TMPD и хинондиимина. Действительно, добавление свежего буфера, насыщенного O_2 , приводило к быстрому возрастанию силы тока (рис. 4), которая, однако, не достигала максимальной величины. Это может означать, что в системе без кислорода действительно накопилось некоторое количество TMPD, который при добавлении кислорода быстро окислялся до WB, в результате чего и увеличилась сила тока. После добавления кислорода сила тока, как уже указывалось, не достигала максимума и при этом не удалось получить устойчивого стационарного тока.

Этот факт свидетельствует о том, что при работе элемента протекают процессы превращения TMPD и WB в другие химические соединения. Последний вывод хорошо согласуется с полученными нами спектрофотометрическими данными (рис. 3). Одним из этих соединений, возможно, является хинондиимин, который может образоваться в результате протекания реакций окисления и диспропорционирования WB, а также продукт его гидролиза — *n*-бензохинон [12]. Кроме того, превращения WB и TMPD в случае использования модельного элемента наблюдали непосредственно, регистрируя спектрофотометрически концентрации WB и TMPD во времени в системе, исходно содержащей только 0,63 мМ WB (рис. 5). (Концентрацию WB в смеси определяли по величине оптической плотности раствора при 564 нм, после чего в среду добавляли СМЧ, полностью окисляя имеющийся TMPD до WB и регистрируя прирост оптической плотности при 564 нм.)

Как видно из рис. 5, концентрация WB и сумма концентраций WB и TMPD снижались во времени, что свидетельствует о появлении третьего компонента, а концентрация TMPD, достигая максимума, затем снижалась до нуля. Присутствие третьего компонента регистрируется по появлению пика в УФ-области спектра при 248 нм. Этот пик может быть приписан хиноидной структуре: хинондиимину или *n*-бензохинону, образующемуся в результате гидролиза хинондиимина, поскольку в этих условиях *n*-бензохинон имеет максимум поглощения при 248 нм. Как известно, гидролиз хинондиимина при pH 9,8 протекает с высокой скоростью и значение константы скорости этой реакции псевдопервого порядка составляет 10^6 с^{-1} [12]. Таким образом, последовательность реакций, происходящих

На рис. 4 приведена зависимость силы тока от времени при использовании модельного элемента, составленного из хлорсеребряного анода и графитового катода на основе пары WB — TMPD. Когда в катодном пространстве находился буферный раствор, насыщенный кислородом, ток короткозамкнутого элемента был мал. Введение 0,5 мМ TMPD сопровождалось увеличением силы тока благодаря спонтанному окислению TMPD кислородом и появлению WB. Последующее добавление СМЧ (0,6 мг/мл) приводило к резкому возрастанию силы тока, которая быстро достигала максимального значения, медленно уменьшалась, а затем снижалась с большей скоростью. Это быстрое снижение может быть объяснено исчерпанием кислорода в катодном пространстве и протеканием в анаэробных условиях процессов, сопровождающихся уменьшением концентрации

в системе, содержащей WB и TMPD, может быть представлена следующей упрощенной кинетической схемой:



Кинетическая обработка этой схемы без учета стадий гидролиза и диспропорционирования при начальных условиях $t = 0$, $[X] = X_0$, $[Y] = 0$, $[Z] = 0$ ($[X]$, $[Y]$, $[Z]$ — концентрации TMPD, WB и хинондиимина соответственно, а X_0 — начальная концентрация TMPD) дает хорошо известное в химической кинетике выражение для зависимости концентрации WB от времени:

$$[Y] = \frac{k_1 X_0}{k_1 - k_2} [\exp(-k_2 t) - \exp(-k_1 t)]. \quad (1)$$

Это уравнение описывает кривую накопления катион-радикала, имеющую максимум, координаты которого даются соотношениями

$$t_{\text{макс}} = \frac{\ln(k_1/k_2)}{k_1 - k_2} \quad (2)$$

и

$$Y_{\text{макс}} = \frac{k_1 X_0}{k_2 - k_1} \left[(k_1/k_2)^{-\frac{k_1}{k_1 - k_2}} - (k_1/k_2)^{-\frac{k_2}{k_1 - k_2}} \right]. \quad (3)$$

Отсюда вытекает, что положение максимумов на кривых не должно зависеть от начальной концентрации TMPD, а высота максимума должна быть пропорциональна этой концентрации. Из рис. 3 видно, что экспериментальные кривые удовлетворяют этим условиям. Из этих кривых можно определить константы k_1 и k_2 . При малых значениях t из уравнения (1) следует, что $[Y] \approx k_1 X_0 t$, т. е. k_1 определяется из начальных скоростей ($v_0 \approx k_1 X_0$). Величина k_2 может быть найдена из выражения для $t_{\text{макс}}$. Кроме того, если $k_1 \gg k_2$, то k_1 определяется с помощью линеаризации восходящего участка кривой в координатах $\lg(Y_{\text{макс}} - [Y]) \div t$ ($Y_{\text{макс}} \approx X_0$), а k_2 — из начального наклона нисходящего участка этой кривой ($v_2 \approx X_0 k_2$). При 38° и pH 7,5 $k_1 = 9 \cdot 10^{-3} \text{ с}^{-1}$ и $k_2 = 2 \cdot 10^{-4} \text{ с}^{-1}$, а $k_1/k_2 = 45$, т. е. условие $k_1 \gg k_2$ выполняется хорошо. Константа k_1 в действительности эффективная, так как линейно зависит от концентрации СМЧ. При низких, много меньших, чем величина K_m , концентрациях TMPD ($\sim 100 \text{ мкМ}$) k_1 , очевидно, дается выражением $k_1 = (k_{\text{кат}}/K_m) [\text{СМЧ}]$. Принимая содержание цитохром-с-оксидазы в препарате равным $0,2 \text{ нмоль/мг}$, можно найти, что в этих условиях $k_{\text{кат}}/K_m = 4,5 \cdot 10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$.

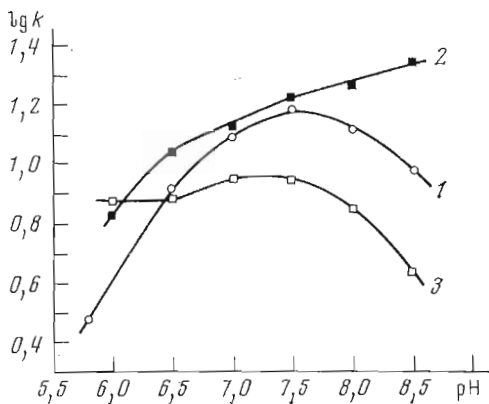


Рис. 6

Рис. 6. pH-Зависимость логарифмов констант скорости ферментативного окисления TMPD до WB (1 — $k_1 \cdot 10^3 \text{ c}^{-1}$) и последующего превращения WB (2 — $k_2 \cdot 10^5 \text{ c}^{-1}$). 3 — зависимость $\lg 10^{-1} \cdot k_1/k_2$ от pH. Температура 33°C .

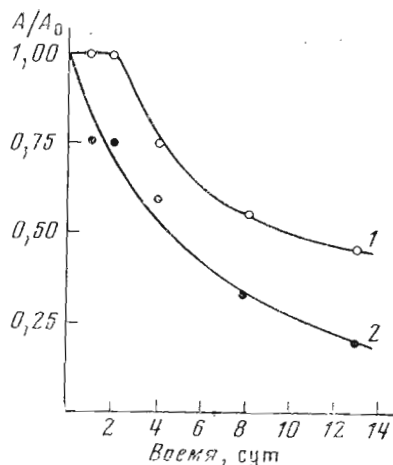


Рис. 7

Рис. 7. Инактивация цитохром-с-оксидазной системы в отсутствие и в присутствии TMPD и WB. 1 — без TMPD и WB, 2 — $0,76 \text{ мМ}$ TMPD + WB. Концентрация СМЧ 2 мг/мл , pH $7,5$; 20° , аэробные условия. A/A_0 — относительная активность

Протекание реакции превращения катион-радикала в хинондиимин нежелательно, так как хинондиимин, по-видимому, неустойчив и гидролизуется до бензохинона [12]. По этой причине представляется целесообразным выяснение условий, в которых реакция окисления и/или диспропорционирования катион-радикала осуществляется с минимальной скоростью.

Из pH-зависимости констант k_1 и k_2 окисления TMPD и WB в присутствии СМЧ при 33° (рис. 6) следует, что величина k_2 уменьшается при снижении pH от 8,5 до 6 всего лишь примерно втрое и минимальная величина k_2 при pH 6 составляет $6,3 \cdot 10^{-5} \text{ c}^{-1}$ ($\tau_{1/2} = 4,4 \text{ ч}$). pH-Зависимость константы скорости ферментативного окисления TMPD (k_1) имеет максимум при pH 7,5. Величина константы снижается приблизительно в 4 раза в сравнении с оптимумом при уменьшении pH до 6. Отсюда следует, что изменение pH в том диапазоне, в котором сохраняется заметная цитохром-с-оксидазная активность, не приводит к существенному замедлению реакций, сопровождающихся превращением катион-радикала в хинондиимин и другие продукты. Последние могут появляться в результате протекания реакций димеризации WB, а также процессов более глубокого окислительного разрушения [16]. Все эксперименты по кинетике окисления TMPD и WB проводили в условиях насыщения среды кислородом ($\sim 200 \text{ мкМ}$). По-видимому, побочные процессы окисления WB можно замедлить, существенно снижая концентрацию кислорода в среде до величины, превосходящей значение K_m цитохром-с-оксидазы по кислороду. Эта величина равна $\sim 0,05 \text{ мкМ}$ [17], что практически позволяет снижать концентрацию кислорода до 1 мкМ без уменьшения скорости ферментативной реакции, а значит, и величины стационарного тока элемента.

Важным фактором, определяющим пригодность цитохром-с-оксидазы к использованию в качестве электродного катализатора, является стабильность ферментного комплекса. На рис. 7 показано уменьшение максимальной скорости окисления TMPD (см. «Экспериментальную часть»), катализируемого цитохром-с-оксидазой СМЧ в присутствии и в отсутствие

TMPD и WB в среде инкубации (WB появлялся в среде инкубации в результате окисления TMPD, катализируемого СМЧ).

Без TMPD и WB время полуминерализации оксидазы составляло 10 сут, добавление 0,76 мМ TMPD приводило к сокращению времени полуминерализации вдвое. В обоих случаях в начальный момент инкубации частиц среда содержала насыщающую концентрацию O_2 . Это означает, что в действительности инкубация осуществлялась не с TMPD, а со смесью TMPD и WB, так как первый быстро окислялся в присутствии СМЧ до WB.

Таким образом, полученные результаты позволяют заключить, что «слабым» звеном регенеративного электрода на основе пары WB — TMPD является переносчик ($\tau_{1/2} \approx 5$ ч), тогда как ферментативная система относительно устойчива ($\tau_{1/2} = 5-10$ сут). К числу недостатков переносчика следует отнести также его сравнительно низкий редокс-потенциал (300 мВ относительно нормального водородного электрода при pH 7). Это означает, что энергия в 0,52 В будет рассеиваться в виде тепла (равновесный окислительно-восстановительный потенциал кислорода равен 0,82 В относительно нормального водородного электрода при pH 7). Правда, потери энергии можно уменьшить, если элемент будет работать в условиях, когда отношение концентраций WB и TMPD велико. Например, при $[WB]/[TMPD] = 100$ выигрыш в величине потенциала составит 120 мВ.

Из сказанного следует, что путь усовершенствования рассматриваемого электрода состоит в том, чтобы подобрать условия, в которых пара WB — TMPD стабильна, или в том, чтобы найти более подходящий переносчик. Требования, предъявляемые к переносчику, могут быть сформулированы следующим образом: 1) химическая устойчивость окисленной и восстановленной форм; 2) высокий потенциал при нейтральных значениях pH среды (6—9), близкий к кислородному; 3) обратимость взаимодействия с электродом; 4) высокая скорость окисления ферментом; 5) минимальное инактивирующее действие по отношению к ферментной системе; 6) сравнительно высокая растворимость в воде окисленной формы. Последнее требование вытекает из того, что при диффузионном режиме работы электрода плотность тока пропорциональна концентрации окисленного переносчика. Кроме того, необходимо стремиться к увеличению стабильности ферментной системы, которая пока не слишком велика.

Экспериментальная часть

СМЧ выделяли из митохондрий сердца быка по методу Бейера [18] или Крейна и др. [19]. Стабильность цитохром-с-оксидазной системы СМЧ изучали, инкубируя частицы (2 мг/мл) в 80 мМ фосфатном буфере, pH 7,5, при 20°. TMPD-оксидазную активность СМЧ определяли, отбирая из среды инкубации аликвоту и перенося ее в спектрофотометрическую кювету, содержащую 9—10 мМ TMPD и 80 мМ фосфат калия, pH 7,5, насыщенный кислородом при 30° (концентрация $O_2 = 0,26$ мМ). Концентрация СМЧ (по белку) в кювете 40 мкг/мл. Активность вычисляли по скорости образования WB, используя его коэффициент экстинкции при 564 нм, равный $12,5 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [20]. При высокой скорости окисления TMPD или большой мутности среды скорость образования WB определяли амперометрически, используя графитовый электрод, в области потенциалов предельного тока восстановления WB. При этом фиксировали полную кинетическую кривую окисления TMPD. Активность вычисляли, относя начальную скорость увеличения предельного тока к стационарному току, устанавливающемуся при исчерпании кислорода в системе. Концентрацию WB, соответствующую стационарному току, определяли из градуировочного графика зависимости предельного тока от концентрации WB. С помощью спектрофотометрического и амперометрического методов были получены одинаковые результаты. Для амперометрических и полярографических измерений использовали стационарный пирографитовый элект-

род в форме цилиндра с рабочей поверхностью 5 мм² в перемешиваемом растворе в закрытой ячейке. Электродом сравнения служил хлорсеребряный электрод с поверхностью ~ 100 см² в насыщенном растворе KCl, отделенном от среды измерения агаровым мостиком (агар-агар — KCl — вода, 1:10:100 по весу). Потенциал электрода сравнения контролировали по насыщенному каломельному электроду K4112 (Radiometer, Дания). Спектрофотометрические измерения проводили в двухлучевом спектрофотометре Hitachi-124 (Япония), амперометрические и полярографические измерения — в полярографе ОН-102 (Radelkis, Венгрия).

TMPD-дигидрохлорид — препарат фирмы Sigma Chemical Co (США). WB (хлорнокислая соль) синтезировали по методу Михаэлиса и Графика [21]. Буферные растворы готовили на тридистиллированной воде. Пирографит был любезно предоставлен Л. Н. Некрасовым, кафедра электрохимии химического факультета Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова.

ЛИТЕРАТУРА

1. Дамаскин Б. Б., Петрий О. А. (1975) Введение в электрохимическую кинетику, «Высшая школа», М.
2. Фильштих В. (1968) Топливные элементы, «Мир», М.
3. Scheier F., Janchen M., Lampe J., Prümke H.-J., Blanck J., Palecek E. (1975) *Biochim. et biophys. acta*, **412**, 157—167.
4. Weibel M. K., Dodge C. (1975) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **169**, 1846—1851.
5. Wingard L. B., Jr., Liu C. C., Nagda N. L. (1971) *Biotechnol. and Bioeng.*, **13**, 629—639.
6. Lahoda E. J., Liu C. C., Wingard L. B., Jr. (1975) *Biotechnol. and Bioeng.*, **17**, 413—422.
7. Nakano K., Kimura K., Inokuchi H., Yagi T. (1975) *J. Biochem. (Tokyo)*, **78**, 1347—1352.
8. Yagi T. (1975) *J. Biochem. (Tokyo)*, **78**, 443—454.
9. Crane F. L. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **63**, 355—361.
10. Hand R., Melicharek M., Scoggin D. I., Stotz R., Carpenter A. K., Nelson R. F. (1971) *Collect. Czech. Chem. Commun.*, **36**, 842—854.
11. Friend J. A., Roberts N. K. (1958) *Austr. J. Chem.*, **11**, 104—119.
12. Philp R. H., Jr. (1970) *J. Electroanal. Chem.*, **27**, 369—373.
13. Chance B., Saronio C., Leigh J. S. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 9226—9237.
14. Markossian K. A., Nalbandyan R. M. (1975) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **67**, 870—876.
15. Clark W. M. (1960) *Oxidation-Reduction Potentials of Organic Compounds*, The Williams and Wilkins, Co., Baltimore.
16. Michaelis L., Hill E. S. (1933) *J. Amer. Chem. Soc.*, **55**, 1481—1494.
17. Degn H., Wahlrab H. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, **245**, 347.
18. Beyer R. E. (1967) in *Methods in Enzymology* (Estabrook R. W. and Pullman M., eds.), vol. 10, p. 186, Acad. Press, N. Y.
19. Crane F. L., Glenn J. L., Green D. E. (1956) *Biochim. et biophys. acta*, **22**, 475.
20. Albrecht A. C., Simpson W. I. (1955) *J. Amer. Chem. Soc.*, **77**, 4454—4461.
21. Michaelis L., Granick S. (1943) *J. Amer. Chem. Soc.*, **65**, 1752.

Поступила в редакцию

14.X.1976

После доработки

31.I.1977

CYTOCHROME *c* UTILIZATION IN A REGENERATIVE OXYGEN ELECTRODE

BEREZIN I. V., POBOCHIN A. S., KUPRIYANOV V. V.,
LUZIKOV V. N.

*A. N. Belozersky Laboratory of Bioorganic Chemistry,
M. V. Lomonosov State University, Moscow*

Characteristics of a regenerative oxygen electrode were estimated. The electrode utilized a TMPD-WB couple as a carrier of redox equivalents, TMPD oxidation by oxygen being catalyzed by cytochrome *c* oxidase of submitochondrial particles (SMP). TMPD-WB are shown to reversibly interact with the graphite electro-

de, yielding a limiting current density up to 1 mA/cm² electrode geometric surface at 2.5 mM WB. The maximal rate of TMPD oxidation with cytochrome oxidase as catalyst was 10 μmoles/min mg SMP protein. WB underwent further chemical conversions: disproportionation and, probably, oxidation. The rate of this side reaction was not a sensitive function of pH. WB exhaustion due to side reactions is supposed to entail a slow drop in the steady-state current in the model short-circuited element. Cytochrome *c* oxidase of SMP was relatively stable under these experimental conditions with a half-inactivation time of 10 days (pH 7.5; 20°), which shortened to 5 days in the presence of TMPD and WB. It is concluded that further improvement of the electrode requires a more stable mediator.

Технический редактор *Е. С. Кузьмишкина*

Сдано в набор 20/IV-1977 г.	Т-07790	Подписано к печати 2/VI-1977 г.	Тираж 850 экз.
Зак. 2127	Формат бумаги 70×108 ^{1/16}	Усл. печ. л. 12,6 Бум. л. 4,5	Уч.-изд. л. 13,0

2-я типография издательства «Наука». Москва, Шубинский пер., 10