

УДК 620.95

**ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ПОЛИМЕРНОЙ МАТРИЦЫ НА ОСНОВЕ ХИТОЗАНА
ДЛЯ РАЗРАБОТКИ БИОАНОДОВ ТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ**

С.В. Алферов, Н.А. Клименова

Тульский государственный университет, Тула, Россия

ВВЕДЕНИЕ

Одним из актуальных направлений при поиске путей замещения ископаемых энергоносителей и снижения экологической нагрузки на окружающую среду является разработка альтернативных источников энергии – биотопливных элементов (БТЭ), в которых осуществляется преобразование химической энергии различных веществ в электрическую в процессе биологических трансформаций. Эффективность работы БТЭ напрямую зависят от способа иммобилизации биокатализатора на поверхности электрода. В большинстве разработанных к настоящему времени БТЭ биоматериал закрепляется на электроде путем адсорбции или формируется биопленка. Внедрение микроорганизмов в полимерные гели позволяет сохранить активность ферментных систем, увеличить срок службы биоанодов, а также защитить клетки от воздействий внешних факторов. Создание прочных проводящих полимерных матриц возможно на основе хитозана, модифицированного нейтральным красным [1]. Таким образом целью данной работы являлась разработка биоанода на основе бактерий *Gluconobacter oxydans*, иммобилизованных в проводящую матрицу на основе модифицированного хитозана.

Хитозан – это высокомолекулярный полимер глюкозамина, деацетилированная форма широко распространенного в природе полимера хитина. Обычно коммерчески доступный хитозан имеет степень деацетилирования около 80–90 %, то есть обладает достаточным количеством аминогрупп для растворения в водных растворах кислот, таких как уксусная, муравьиная и молочная, в которых не растворим хитин [2]. Хитозан обладает прекрасной способностью к пленкообразованию и адгезии, высокой биосовместимостью и биоразлагаемостью, нетоксичен.

Нейтральный красный является диазиновым красителем, участвует в двухэлектронном переносе. Ранее было показано, что данный медиатор способен ковалентно пришиваться к графитовому электроду при помощи амидной связи между карбоксильной группой на поверхности электрода и аминогруппой красителя. Таким образом, для нейтрального красного предпочтительнее использование его иммобилизованным на поверхности анода, а не в растворе, в том числе в составе полимерных матриц, что является перспективным при разработке биотопливных элементов и биосенсоров на основе графитового электрода [3].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В работе использовали бактерии *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrialis* (ВКМ В-1280) (Всероссийская коллекция микроорганизмов, ИБФМ РАН). Культивирование бактерий проводили на питательной среде, следующего состава: D-сорбит – 200 г./л; дрожжевой экстракт – 20 г./л; дистиллированная вода – 100 мл, pH среды – 5,2–5,5, при температуре 28°С, в течение 18–20 часов. После культивирования клетки собирали центрифугированием при 10000 об/мин 10 мин. и отмывали двукратно 20 мМ натрий-фосфатным буфером с pH 6,0. Осевшие клетки ресуспендировали в новой порции буфера и центрифугировали 10 мин при 10000 об/мин. Полученные осадки подсушивали на воздухе в течение часа, и замораживали для длительного хранения при температуре -15°С.

Ячейка биотопливного элемента представляла собой две взаимосвязанных кюветы, объём анодного отделения был равен объёму катодного и составлял 3 мл. Электродами служили графитовые стержни диаметром 8 мм, площадь рабочей поверхности электродов составляла 300 мм². Высота погружения электродов в раствор – 10 мм. Камеры разделяли протонселективной мембраной МФ-4СК («Пластполимер, Санкт-Петербург, Россия).

В качестве фоновых растворов использовали 30 мМ натрий-фосфатный буфер pH = 6,0, в качестве субстрата биоокисления использовали глюкозу с концентрацией в кювете 10 мМ.

Измерения потенциала проводили с помощью гальванопотенциостата IPC Micro ("Вольта", Россия). Регистрацию ответов на добавку субстрата в измерительную ячейку начинали после установления стационарного состояния электрода. Оценку электрических характеристик производили после достижения стационарного значения генерируемого потенциала. Измеряемым параметром в процессе биокаталитического окисления субстрата в режиме генерации потенциала являлась величина разности потенциалов за время проведения эксперимента.

Для получения проводящей матрицы на основе хитозана 30 мг клеток бактерий *G. oxydans* перемешивали с раствором хитозана и нейтральным красным, полученную суспензию наносили на графитовый электрод (высота нанесения 1 см).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Производительность биотопливного элемента в первую очередь зависит от эффективности и устойчивости биокатализатора. Иммобилизация биоматериала играет важную роль в сохранении активности биологических объектов, а также дает возможность многократного использования электродов в условиях биотопливного элемента. Иммобилизация клеток, содержащих специфические ферменты, устраняет необходимость длительных и дорогостоящих процедур разделения и очистки ферментов. Для иммобилизации можно использовать различные полимерные органические матрицы. При выборе полимерной матрицы необходимо учитывать особенности распределения в ней микробных клеток. Равномерное распределение клеток позволяет увеличить их площадь контакта с электродом, следовательно, генерируемый потенциал в такой системе теоретически должен быть выше, чем при образовании конгломератов клеток в матрице. Этим качествам отвечает матрица на основе хитозана. В настоящей работе данная матрица, модифицированная медиатором нейтральным красным, была использована для иммобилизации целых клеток бактерий *G. oxydans*.

На первом этапе был произведен подбор количества хитозана, при котором генерируется максимальный потенциал и матрица наиболее стабильна. 1 % раствор хитозана в 1 % уксусной кислоте использовался в количестве 5, 10, 15, 20 и 25 мкл, все остальные параметры оставались постоянными. Оценка потенциала производилась при приложенном внешнем сопротивлении 150 кОм, полученный вид зависимости представлен на рисунке 1.

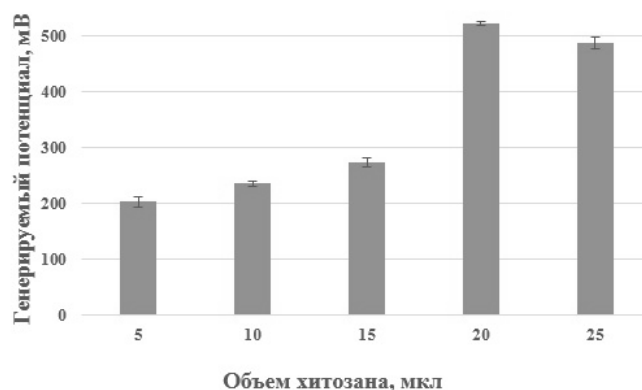


Рис. 1. Зависимость величины генерируемого потенциала от количества полимерного хитозана, модифицированного нейтральным красным в макете БТЭ на основе клеток *G. oxydans*

Таким образом оптимальное количество смеси хитозана с нейтральным красным, применяемой для иммобилизации, составляет 20 мкл. При этом генерируемый потенциал в макете БТЭ при использовании внешнего сопротивления 150 кОм составил 520 ± 10 мВ.

Важнейшими характеристиками БТЭ являются мощность и долговременная стабильность биоанода. Мощность позволяет оценить возможность применения БТЭ в качестве источника электропитания. Для достижения максимальных значений мощности необходимо учитывать сопротивление, эффективность медиатора электронного транспорта, рабочую поверхность анода и др. Определение максимальной мощности производили методом пика в макете БТЭ на основе целых клеток *G. oxydans*, иммобилизованных в хитозан совместно с нейтральным красным, при приложенном внешнем сопротивлении в интервале от 10 до 200 кОм. Полученные данные представлены на рисунке 2.

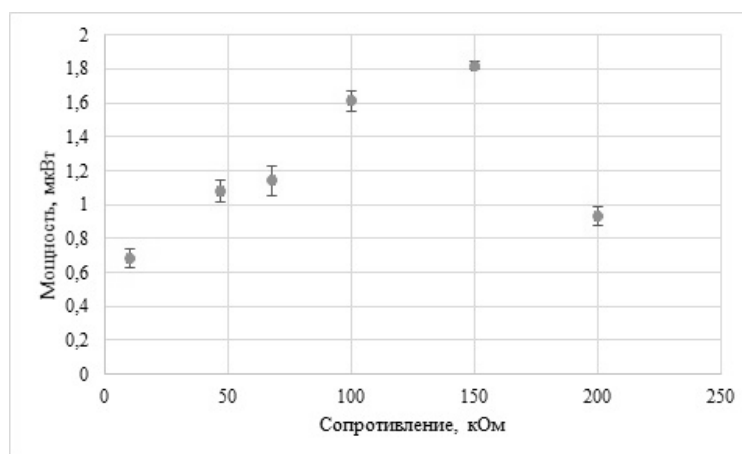


Рис. 2. Зависимость мощности БТЭ от внешнего сопротивления при иммобилизации клеток *G. oxydans* в хитозан, модифицированный нейтральным красным

Пик мощности, генерируемой в данной системе БТЭ наблюдается при приложенном внешнем сопротивлении 150 кОм: $P_{\max} = 1,8 \pm 0,1$ мкВт. Значение мощности БТЭ недостаточно полно отражает эффективность изучаемого элемента. Для сравнения и описания разработанных моделей БТЭ рекомендуется использовать понятие удельной мощности, т. е. нормированной к единице поверхности [4]. Значение удельной мощности в исследуемом макете БТЭ составило $6,1 \pm 0,2$ мВт/м².

Долговременная стабильность характеризует устойчивость работы электрода в течение длительного периода времени. За время стабильной работы иммобилизованного электрода принимается время, в течение которого величина генерируемого потенциала составляла не менее 50 % от первоначальной активности. Долговременную стабильность определяли путём ежедневного измерения величины генерируемого потенциала при добавлении 30 мкл раствора глюкозы (концентрация в анодном отделении 10 ммоль/л). Между измерениями электроды хранились в буферном растворе в холодильнике. Для электрода на основе полимерной матрицы хитозана падение потенциала на 50 % от первоначального значения происходит на четвертые сутки. Несмотря на не высокие значение долговременной стабильности, электроды на основе модифицированного хитозана показывают значительно увеличение величин генерируемого потенциала и мощности БТЭ относительно разработанных ранее макетов на основе бактерий *G. oxydans* [5].

*Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания Минобрнауки
№ 0824_2019–0007.*

ЛИТЕРАТУРА

- Скрябин К.Г. Хитин и хитозан, получение, свойства, применение // М.: Наука, 2002 – С. 368.
- Новочадов В.В., Семенов П.С., Лябин М.П., Гайфуллин Н.М. Бесклеточная матрица на основе хитозана с повышенными хондроиндуктивными свойствами // Вестник новых медицинских технологий 2012 В. 10 С. 54–57.
- Kaipeng Wang, Yuwen Liu, Shengli Chen Improved microbial electrocatalysis with neutral red immobilized electrode // Journal of Power Sources – 2011 – V. 196 – P. 164–168.
- Logan E. Microbial fuel cells // John Willey & Sons – 2008.
- С.В. Алферов П.Р. Минайчева, В.А. Арляпов, Л.Д. Асулян, В.А. Алфёров, О.Н. Понаморёва, А.Н. Решетилов. Биоанод для микробного топливного элемента на основе бактерий *Gluconobacter oxydans*, иммобилизованных в полимерную матрицу // Прикладная биохимия и микробиология. Т. 50. № 6. 2014 – С. 570–577.