

ЭЛЕКТРОАКТИВНЫЕ ПОЛИМЕР-ОСНОВАННЫЕ КОМПОЗИТЫ ДЛЯ ИММОБИЛИЗАЦИИ БИОМАТЕРИАЛА В БИОТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТАХ

С.В. Алферов, В.В. Федина

ФГБОУ ВО «Тульский государственный университет», Тула, Россия

Введение

Биотопливные элементы на основе иммобилизованных микроорганизмов (БТЭ) и их ферментных систем перспективны для решения целого ряда экологических проблем благодаря своей уникальной способности одновременно вырабатывать энергию и утилизировать загрязнители [1–3].

Интенсивный прогресс в развитии биотехнологий, нанотехнологий, наноматериалов и проводящих полимерных композитов позволил выйти на новый уровень исследований в области процессов биоэлектрокатализа для создания БТЭ и их миниатюризации [4, 5].

Стоит особо отметить, что методы иммобилизации биокатализаторов на поверхности электродов играют важную роль в эффективности работы биотопливных элементов. Внеклеточный перенос электронов от ферментных систем микроорганизмов на электрод может быть организован используя редокс-активные или электропроводящие гидрогели на основе природных или синтетических полимеров и углеродных наноматериалов [6, 7]. В качестве полимеров, изначально не обладающих электрической активностью, но способных образовывать биосовместимые гидрогели, применяемые для иммобилизации микроорганизмов и их ферментных систем в том числе в биоэлектрокатализе используются хитозан [8], бычий сывороточный альбумин [9] и поливиниловый спирт (ПВС) [10, 11].

Как правило, полимерная основа в таких композитах не обладает электроактивностью, поэтому для придания ей электропроводности используют проводящие наноматериалы [12]. Волокнистые углеродные материалы, к которым относятся углеродные нанотрубки (УНТ) и нановолокна, являются одним из наиболее перспективных объектов для создания проводящих матриц [8]. Было показано, что УНТ особенно подходят для установления электронных связей с активными центрами ферментов, поскольку имеют диаметр от одного до нескольких десятков нанометров. Таким образом, биокатализаторы могут эффективно осуществлять либо прямой перенос электронов на электрод, либо опосредованный электронными челноками, которые служат промежуточными звеньями для переноса электронов [13, 14]. Гидрогели на основе полимерных композитов с наноматериалами значительно повышают энергетические характеристики БТЭ [8].

Ферменты, выделенные из уксуснокислых бактерий и целые бактериальные клетки, были ранее использованы для создания БТЭ [5, 6]. Таким образом, мембранные фракции уксуснокислых бактерий можно рассматривать как природные мультиферментные системы для эффективного окисления сахаров, полиолов и спиртов в БТЭ.

Цель работы – разработка перспективных нанокомпозитных материалов на основе проводящих полимерных гидрогелей с иммобилизованным биокатализатором – мембранно-связанными ферментными системами (мембранными фракциями) уксуснокислых бактерий *Gluconobacter oxydans* в биоэлектрохимических системах БТЭ.

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 10 мин. (10000 g) и отмывали двукратно 20 mM натрий-фосфатным буфером с pH 6,0. Осажденные клетки ресуспендировали в свежем буферном растворе и разрушали на ультразвуковом процессоре Qsonica (Q125) в течение 40 минут при амплитуде 80 %. Затем разрушенные клетки центрифугировали при 4 °С в течение 40 минут (5000 g) для осаждения крупного клеточного дебриса. Полученный лизат центрифугировали на центрифуге Beckman Coulter Avanti J-30I при 4 °С в течение 40 минут (101000 g) для осаждения мембранной фракции клеток *Gluconobacter oxydans*. Мембранные фракции хранились при температуре -18 °С.

Многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ) были получены при 630 °С из смеси пропан-бутана с использованием катализатора Co/Mo/Mg/Al [15]. MWCNT окисляли в 37 % парах пероксида водорода при 120 °С в течение 10 ч по методике, описанной в работе [16]. Многостенные углеродные нанотрубки были любезно предоставлены ООО «Нанотехцентр» (г. Тамбов, Россия).

Морфологию поверхности образцов исследовали методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ). Образцы исходных полимеров, полимеров с окисленными МУНТ, полимеров с окисленными МУНТ и мембранной фракции *G. oxydans* фиксировали при 4 °С в течение 12 ч в 0,05 М натрий какодилатном буфере (рН 6,8), содержащем 1,5 % глутарового альдегида, и затем постфиксировали при 20 °С в течение 3 ч в том же буфере с добавлением 1 % OsO₄. Образцы после обезвоживания покрывали золотом (Fine Coat Ion Sputter JFC-1100, Токио, Япония) и исследовали на сканирующем микроскопе JSM-6510LV (JEOL, Токио, Япония). Сканирующая электронная микроскопия проводилась в ЦКП Федерального исследовательского центра «Пушинский научный центр биологических исследований Российской Академии наук» (ФИЦ ПНЦБИ РАН).

Ячейка биотопливного элемента представляла собой две взаимосвязанных кюветы, объём анодного отделения был равен объёму катодного и составлял 3 мл. Electroдами 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).

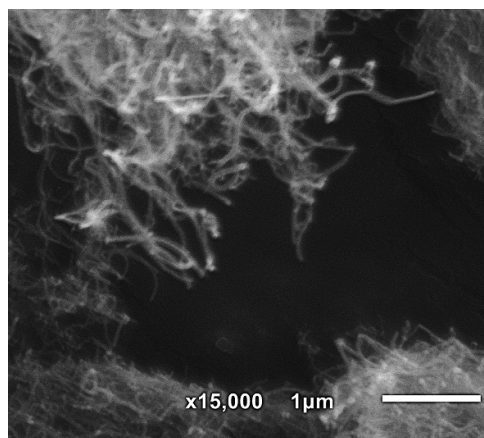
В качестве фонового раствора использовали 30 мМ натрий-фосфатный буфер рН=6,0, в качестве субстрата биоокисления использовали глюкозу с концентрацией в кювете 10 мМ. В анодном пространстве использовался медиатор 2,6 – дихлорфенолиндифенол, в катодном пространстве гексацианоферрат (III) калия.

Измерения потенциала проводили с помощью потенциостата Coretest CS120 ("Coretest", КНР). 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.

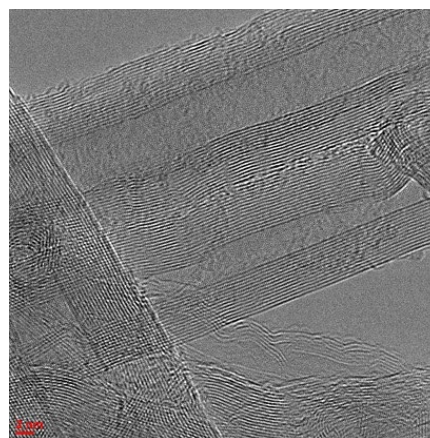
Результаты и обсуждение

В качестве наполнителя для формирования проводящих гидрогелей использовались многостенные углеродные нанотрубки, полученные синтезом из пропан-бутановой смеси в присутствии катализаторов на основе оксидов металлов (Co/Mo/Mg/Al) и окисленные в парах пероксида водорода (МУНТок). Окисление в парах перекиси водорода обеспечивает образование кислородсодержащих групп на поверхности МУНТок без увеличения степени дефектности [16].

СЭМ и ПЭМ изображения МУНТок приведены на рис. 1. Внешний диаметр нанотрубок варьируется в диапазоне 15–30 нм.



(а)



(б)

Рисунок 1. Сканирующая электронная микроскопия (а) и просвечивающая электронная микроскопия (б) многостенных углеродных нанотрубок, используемых в работе

Диаметр внутреннего канала составляет 4–8 нм, длина – более 2 мкм, количество графеновых слоев варьируется от 8 до 20. Удельная площадь поверхности (по данным БЭТ-анализа) составляет 260 м²/г.

Для определения характеристик проводящих композитов на основе полимерных гидрогелей использовался метод СЭМ. Изображения исходного гидрогеля поливинилового спирта, модифицированного *n*-винилпирролидоном (А), композита ПВС-ВП/МУНТок (Б), и ПВС-ВП/МУНТок/мембранная фракция бактерий *G. oxydans* (В) приведены на рис. 2. Синтетический полимер ПВС-ВП образует гидрогели с размером пор 3–10 мкм (рис. 2А).

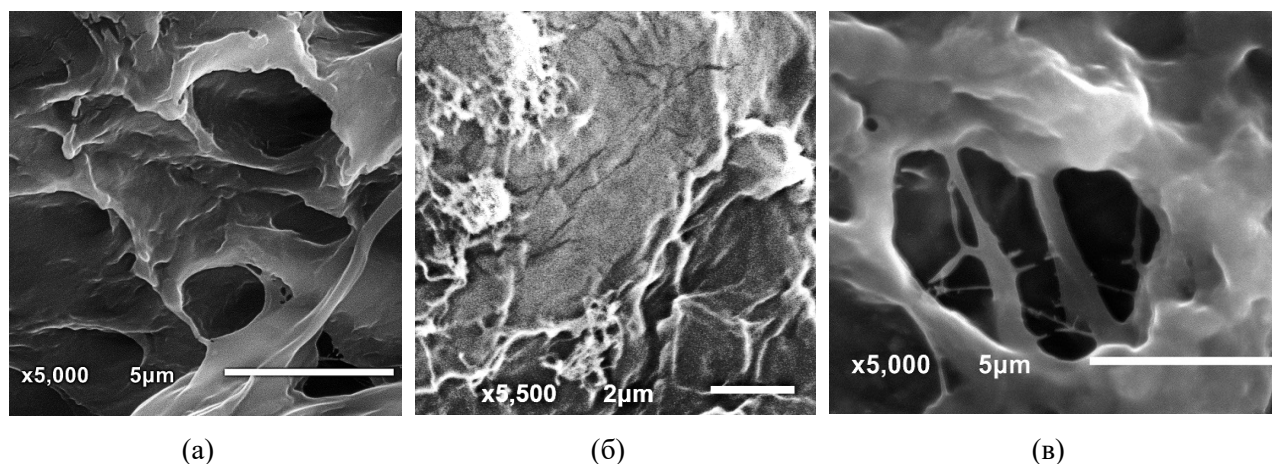


Рисунок 2. Сканирующая электронная микроскопия исходного гидрогеля поливинилового спирта, модифицированного *n*-винилпирролидоном (а), композита ПВС-ВП/МУНТок (б), и ПВС-ВП/МУНТок/мембранная фракция бактерий *G. oxydans* (в)

Распределение нанотрубок в гидрогеле ПВС-ВП неравномерно (рис. 2Б), в некоторых местах наблюдается явное образование конгломератов. Это связано с высокой гидрофильностью полимерной матрицы при отсутствии в полимере катионных групп для электростатического взаимодействия с МУНТок. Структура гидрогеля с диаметром пор 2–5 мкм сохраняется при последующем добавлении мембранных фракций бактерий *G. oxydans* (рис. 2В), кроме того, на отдельных участках структуры нанокompозита визуализируются одиночные нанотрубки.

Изображения исходного гидрогеля бычьего сывороточного альбумина (А), композита БСА/МУНТок (Б), и БСА/МУНТок/мембранная фракция бактерий *G. oxydans* (В) приведены на рис. 3.

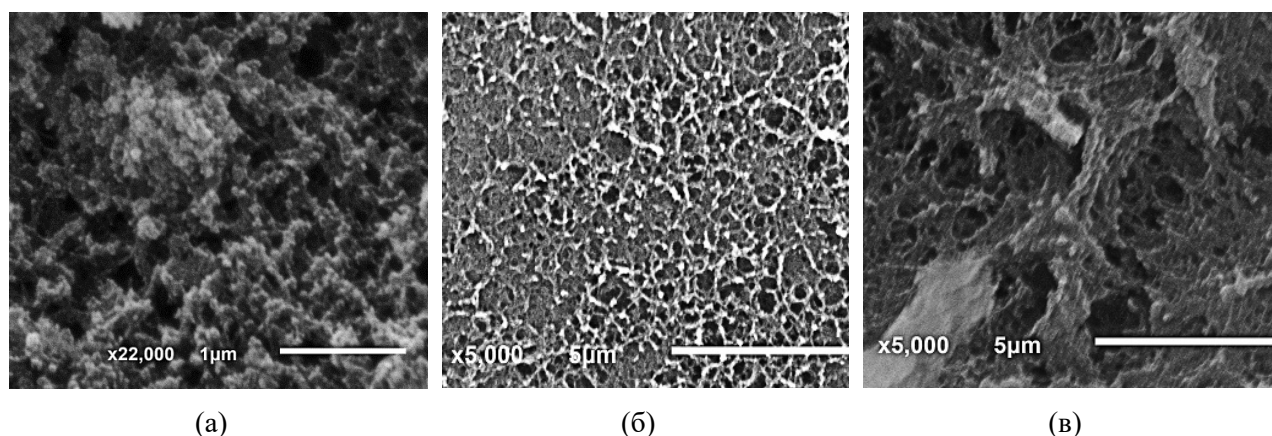


Рисунок 3. Сканирующая электронная микроскопия исходного гидрогеля бычьего сывороточного альбумина (а), композита БСА/МУНТок (б), и БСА/МУНТок/мембранная фракция бактерий *G. oxydans* (в)

БСА формирует пленку с диаметром пор 1–5 мкм (рис. 3А). Добавление МУНТок к БСА приводит к образованию упорядоченной сетчатой структуры с диаметром пор менее 1 мкм (рис. 3Б). При этом углеродные нанотрубки не визуализируются в свободном виде. Предполагается, что БСА формирует

белковую пленку на поверхности МУНТ, ключевую роль в формировании таких структур играют гидрофобные взаимодействия между графеновой поверхностью углеродных нанотрубок и участками белка, обладающими высокой плотностью гидрофобных остатков. Подобное поведение было продемонстрировано ранее для карбоксилированных МУНТ и БСА [17]. При добавлении мембранных структур бактерий в композит БСА/МУНТок происходит значительная дестабилизация упорядоченной структуры и образование пор размером от 2 до 6 мкм (рис. 3В). Присутствие дифильных мембранных липидов бактериальных структур приводит к нарушению гидрофобных взаимодействий между белком и МУНТок. Тем не менее можно ожидать, что белковая оболочка БСА на поверхности МУНТок в нанокompозитах будет препятствовать эффективному переносу электронов с активных центров ферментов на электрод БТЭ при участии МУНТок.

Изображения исходного гидрогеля хитозана (А), композита Хитозан/МУНТок (Б), и Хитозан/МУНТок/мембранная фракция бактерий *G. oxydans* (В) приведены на рис. 4.

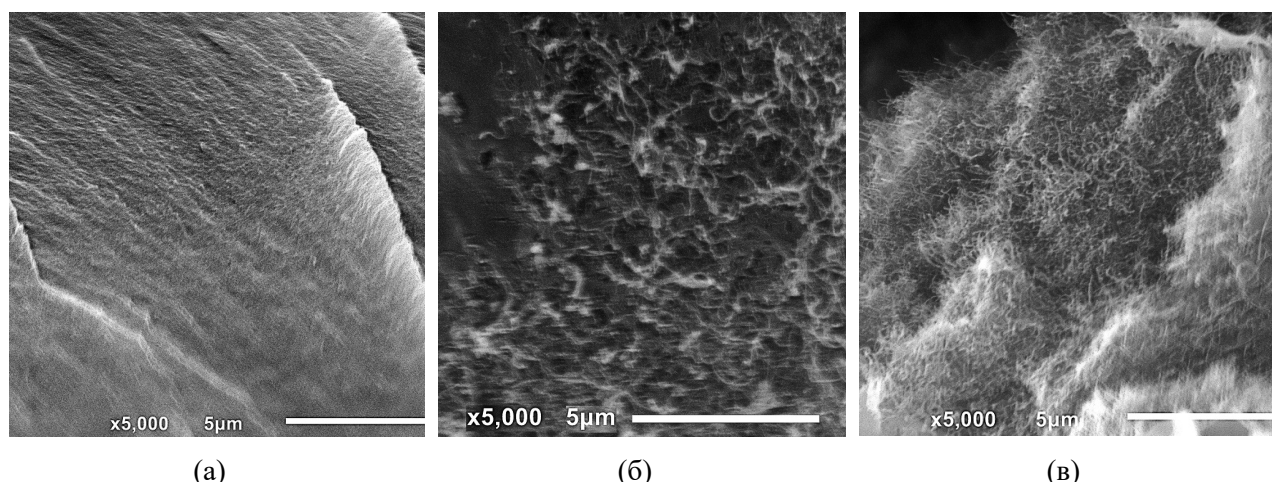


Рисунок 4. Сканирующая электронная микроскопия исходного гидрогеля хитозана (а), композита Хитозан/МУНТок (б), и Хитозан/МУНТок/мембранная фракция бактерий *G. oxydans* (в)

Полимерная матрица на основе хитозана образует гомогенный гидрогель (рис. 4А), В присутствии МУНТок в гидрогеле хитозана формируется структура с упорядоченным равномерным распределением нанотрубок по всему объему нанокompозита (рис. 4Б). Присутствие бактериальных мембранных структур не оказывает существенного влияния на структуру нанокompозита (рис. 4В).

Все 3 проводящих биокompозита на основе полимерных гидрогелей были использованы для формирования биоанодов в модели БТЭ. Полученные значения энергетических характеристик моделей БТЭ приведены в таблице 1.

Таблица 1. Значения энергетических параметров микробного БТЭ при использовании различных электроактивных композитов

| Параметр | ПВС-ВП/МУНТок/МФ | БСА/МУНТок/МФ | Хитозан/МУНТок/МФ |
|-------------------------------|----------------------|----------------------|----------------------|
| Генерируемый потенциал, мВ | 114 ± 3 | 164 ± 3 | 176 ± 9 |
| Удельная мощность, Вт | $0,74 \cdot 10^{-3}$ | $0,63 \cdot 10^{-7}$ | $1,39 \cdot 10^{-7}$ |
| Внутреннее сопротивление, кОм | 5,1 | 10 | 9 |

Наиболее высокие значения энергетических характеристик были достигнуты в БТЭ где при формировании биоанода использовался электроактивный нанокompозит на основе гидрогеля хитозана. Удельная мощность такого БТЭ в 2 раза превышает значения, зафиксированные для БТЭ с использованием других нанокompозитов. Не смотря на достаточно высокий генерируемый потенциал при использовании БСА, пленка нанокompозита склонна к быстрому разрушению, что делает невозможным повторное использования такого биоанода. Таким образом нанокompозит на основе гидрогеля хитозана в композиции с окисленными МУНТ является наиболее перспективным материалом для иммобилизации биокатализаторов при создании биоэлектрохимических систем.

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ в рамках государственного задания № FEWG-2021–0013 (Биокаталитические платформы на основе клеток микроорганизмов, субклеточных структур и ферментов в сочетании с наноматериалами).

Литература

1. Rossi, R.; Logan, B.E. Impact of Reactor Configuration on Pilot-Scale Microbial Fuel Cell Performance. *Water Res.* **2022**, *225*, 119179. DOI:10.1016/j.watres.2022.119179.
2. Varjani, S. Prospective Review on Bioelectrochemical Systems for Wastewater Treatment: Achievements, Hindrances and Role in Sustainable Environment. *Sci. Total Environ.* **2022**, *841*, 156691. DOI:10.1016/j.scitotenv.2022.156691.
3. Wang, J.; Ren, K.; Zhu, Y.; Huang, J.; Liu, S. A Review of Recent Advances in Microbial Fuel Cells: Preparation, Operation, and Application. *BioTech.* **2022**, *11*, 44. DOI:10.3390/biotech11040044.
4. Tang, J.; Yan, X.; Engelbrekt, C.; Ulstrup, J.; Magnier, E.; Xiao, X.; Zhang, J. Development of Graphene-Based Enzymatic Biofuel Cells: A Minireview. *Bioelectrochemistry* **2020**, *134*, 107537. DOI:10.1016/j.bioelechem.2020.107537.
5. Buaki-Sogó, M.; García-Carmona, L.; Gil-Agustí, M.; Zubizarreta, L.; García-Pellicer, M.; Quijano-López, A. Enzymatic Glucose-Based Bio-Batteries: Bioenergy to Fuel Next-Generation Devices. *Top. Curr. Chem.* **2020**, *378*, 49. DOI:10.1007/s41061–020–00312–8.
6. Pankratova, G.; Gorton, L. Electrochemical Communication between Living Cells and Conductive Surfaces. *Curr. Opin. Electrochem.* **2017**, *5*, 193–202. DOI:10.1016/j.coelec.2017.09.013.
7. Taghizadeh, A.; Taghizadeh, M.; Jouyandeh, M.; Yazdi, M.K.; Zarrintaj, P.; Saeb, M.R.; Lima, E.C.; Gupta, V.K. Conductive Polymers in Water Treatment: A Review. *J. Mol. Liq.* **2020**, *312*, 113447. DOI:10.1016/j.molliq.2020.113447.
8. Plekhanova, Y.; Tarasov, S.; Kolesov, V.; Kuznetsova, I.; Signore, M.; Quaranta, F.; Reshetilov, A. Effects of Polymer Matrices and Carbon Nanotubes on the Generation of Electric Energy in a Microbial Fuel Cell. *Membranes* **2018**, *8*, 99. DOI:10.3390/membranes8040099.
9. Jahanban-Esfahlan, A.; Roufegarinejad, L.; Jahanban-Esfahlan, R.; Tabibiazar, M.; Amarowicz, R. Latest Developments in the Detection and Separation of Bovine Serum Albumin Using Molecularly Imprinted Polymers. *Talanta* **2020**, *207*, 120317. DOI:10.1016/j.talanta.2019.120317.
10. Arlyapov, V.A.; Yudina, N. Yu.; Asulyan, L.D.; Alferov, S.V.; Alferov, V.A.; Reshetilov, A.N. BOD Biosensor Based on the Yeast *Debaryomyces Hansenii* Immobilized in Poly(Vinyl Alcohol) Modified by N-Vinylpyrrolidone. *Enzym. Microb. Technol.* **2013**, *53*, 257–262. DOI:10.1016/j.enzmictec.2013.05.004.
11. Alferov, S.V.; Arlyapov, V.A.; Alferov, V.A.; Reshetilov, A.N. Biofuel Cell Based on Bacteria of the Genus *Gluconobacter* as a Sensor for Express Analysis of Biochemical Oxygen Demand. *Appl. Biochem. Microbiol.* **2018**, *54*, 689–694. DOI:10.1134/S0003683818060029.
12. Eivazzadeh-Keihan, R.; Bahojb Noruzi, E.; Chidar, E.; Jafari, M.; Davoodi, F.; Kashtiaray, A.; Ghafari Gorab, M.; Masoud Hashemi, S.; Javanshir, S.; Ahangari Cohan, R.; et al. Applications of Carbon-Based Conductive Nanomaterials in Biosensors. *Chem. Eng. J.* **2022**, *442*, 136183. DOI:10.1016/j.cej.2022.136183.
13. Holzinger, M.; Le Goff, A.; Cosnier, S. Carbon Nanotube/Enzyme Biofuel Cells. *Electrochim. Acta.* **2012**, *82*, 179–190. DOI:10.1016/j.electacta.2011.12.135.
14. Kharkova, A.; Arlyapov, V.; Medvedeva, A.; Lepikash, R.; Melnikov, P.; Reshetilov, A. Mediator Microbial Biosensor Analyzers for Rapid Determination of Surface Water Toxicity. *Sensors.* **2022**, *22*, 8522. DOI:10.3390/s22218522.
15. Peters, B.; Mientus, M.; Kostner, D.; Junker, A.; Liebl, W.; Ehrenreich, A. Characterization of Membrane-Bound Dehydrogenases from *Gluconobacter Oxydans* 621H via Whole-Cell Activity Assays Using Multideletion Strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **2013**, *97*, 6397–6412. DOI:10.1007/s00253–013–4824-y.
16. Dyachkova, T.P.; Khan, Y.A.; Orlova, N.V.; Kondrashov, S.V. Oxidation of Multiwalled Carbon Nanotubes by Hydrogene Peroxide Vapor: Laws and Effects. *Vestnik* **2016**, *22*, 323–333. DOI:10.17277/vestnik.2016.02.pp.323–333.
17. Lou, K.; Zhu, Z.; Zhang, H.; Wang, Y.; Wang, X.; Cao, J. Comprehensive Studies on the Nature of Interaction between Carboxylated Multi-Walled Carbon Nanotubes and Bovine Serum Albumin. *Chem. Biol. Interact.* **2016**, *243*, 54–61. DOI:10.1016/j.cbi.2015.11.020.