

УДК 621.352.6

## ПРИМЕНИМОСТЬ ПЛЕНКИ АЛЬГИНАТА С ИММОБИЛИЗОВАННЫМИ ДРОЖЖЕВЫМИ КЛЕТКАМИ ДЛЯ ИСПОЛЬЗОВАНИЯ В МИКРОБНЫХ ТОПЛИВНЫХ ЭЛЕМЕНТАХ

© 2019 г. У. Мардиана<sup>a, b, c, \*</sup>, Х. Инносент<sup>a</sup>, М. Кретин<sup>a</sup>, Бучари<sup>b</sup>, Г. Сетиянто<sup>b</sup>,  
Р. Нурпалах<sup>c</sup>, М. Кусмиати<sup>c</sup>

<sup>a</sup>Университет Монпелье 2, Монпелье, 34293 Франция

<sup>b</sup>Бандунгский Технологический Институт, Бандунг, 40132 Индонезия

<sup>c</sup>STIKES Bakti Tunas Husada Tasikmalaya, Tasikmalaya, 46115 Индонезия

\*e-mail: mardiana.ramdan@gmail.com

Поступила в редакцию 13.07.2017 г.

После доработки 01.10.2017 г.

Принята к публикации 09.12.2017 г.

Предложены новые подходы для модифицирования анода микробного топливного элемента. Описана иммобилизация дрожжевых клеток с использованием альгината в качестве электрогенного микроорганизма в микробном топливном элементе. Захват дрожжевых клеток внутри альгинатной матрицы производится путем осаждения пленки на поверхность электрода из углеткани; полученные аноды охарактеризованы методом хроноамперометрии. Дрожжевые клетки, захваченные в альгинатной пленке на углеткани, окисляют глюкозу и генерируют ток в результате как прямого, так и медиаторного переноса электронов от дрожжевых клеток к углеродному электроду. Полученный результат указывает на то, что иммобилизация дрожжевых клеток в микробном топливном элементе может быть перспективным способом производства электричества.

**Ключевые слова:** *Saccharomyces cerevisiae*, нейтральный красный, иммобилизация дрожжевых клеток, биоэнергия, микробный топливный элемент

**DOI:** 10.1134/S0424857019010079

### ВВЕДЕНИЕ

Микробный топливный элемент (МТЭ) можно рассматривать как новую биоэлектрохимическую систему, способную преобразовывать химическую энергию непосредственно в электрическую [1, 2]. Микроорганизмы в качестве биокатализаторов окисляют органические соединения и создают поток электронов (т.е., электрический ток). В настоящее время широко исследуются возможности улучшения эксплуатационных характеристик микробных топливных элементов [3–7]. Ранее *Saccharomyces cerevisiae* (род дрожжевых грибов) уже применяли в качестве биокатализатора в микробном топливном элементе [8–10]. В настоящее время исследования сталкиваются с решением следующей проблемы: энергия, производимая дрожжевыми клетками, все еще слишком мала, главным образом из-за того, что прямой переход электронов на электрод микробного топливного элемента замедлен. Ранее было показано, что присутствие искусственно введенного медиатора облегчает перенос электронов на твердый электрод. В присутствии подходящего переносчика электронов (медиатора) можно реализовать перенос электрона от дрожжевых кле-

ток к электроду [8–11]. Было показано [1], что с применением медиатора *Saccharomyces cerevisiae* и *E. coli* обеспечивают установление анодного потенциала до 100 мВ, чего не происходит в отсутствие медиатора. Искусственно введенный электронный медиатор позволяет генерировать электричество микроорганизмам, которые иначе не способны к непосредственной коммуникации либо обеспечивают низкую плотность энергии [12]. Существенно, что медиаторы – это липофильные химические переносчики электрона, способные проникать сквозь стенки клеток микроорганизмов и таким образом перемещаться между межклеточным пространством и внеклеточным окружением. Они могут способствовать метаболизму микроорганизмов, действуя в качестве терминального акцептора электрона. Желательные характеристики окислительно-восстановительного медиатора – это хорошая электрохимическая обратимость и подходящий для данного субстрата окислительно-восстановительный потенциал, например пара  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  – основной переносчик электрона в метаболизме дыхания микробов. Одна из окислительно-восстано-

вительных молекул с такими свойствами – это нейтральный красный (Neutral red, **NR**) [13, 14].

Исследование генерации электричества в безмедиаторных МТЭ с помощью некоторых микроорганизмов, таких как *Shewanella putrefaciens*, *Geobacter sulfurreducens* или *Rhodospirillum rubrum*, важно потому, что они обеспечивают непосредственный переход электрона на электрод [15–17]. Сообщалось, что при физическом контакте между электродом и цитохромами во внешней мембране или проводящими фимбриями бактерий возможно непосредственное соединение. Некоторые бактерии также содержат эндогенный электронный медиатор и способны облегчать быстрый переход электрона при псевдопрямом электронном переносе между электродом и бактерией [18].

В то же время дрожжевые грибки нуждаются в некоторых средствах для того, чтобы поддерживать электронный перенос. В качестве подготовки, в работе [19] исследовали возможность непосредственной электрической связи между дрожжевыми грибами *Hansenula anomala* в безмедиаторном МТЭ на их основе и окислительно-восстановительным белком, присутствующим в клеточной мембране и генерирующим мощность 2.9 Вт/м<sup>3</sup>. Каталитическую активность *Saccharomyces cerevisiae* исследовали в безмедиаторном МТЭ с целью установить механизм электронного переноса от клетки дрожжевого грибка на анод: либо посредством частиц, находящихся строго на поверхности, либо через раствор; производимая мощность равняется 3 мВт/м<sup>2</sup> [20]. Однако относительно низкая плотность тока и низкий КПД преобразования энергии предполагают использование электронного медиатора в МТЭ на основе дрожжевых грибков в качестве биокатализатора.

Исследования иммобилизации электродных медиаторов дали интересные результаты [12, 13]. В стандартном методе применение растворимого электронного медиатора может улучшить эксплуатационные характеристики МТЭ, но в то же время вызвать загрязнение окружающей среды, не говоря уже о непрерывном промышленном процессе. Предшествующие исследования показали, что медиатор, физически адсорбированный на электроде, менее эффективен, поскольку он легче удаляется с поверхности анода, непосредственно на поверхности которого нелегко физически иммобилизовать медиатор в большом количестве [12, 19–21].

Наряду с иммобилизацией медиатора, в настоящее время хорошо известна иммобилизация дрожжевых грибков [22–28], но лишь в нескольких работах они использованы в качестве биокатализатора в МТЭ. Клетки дрожжевых грибков могут быть иммобилизованы в альгинате (**Alg**) – полимерном гидрогеле – для повышения электроактивности [29]. В работе [30] проведена иммобилизация биокатализатора с целью улучше-

ния характеристик МТЭ. Полученные результаты показывают, что иммобилизация клеток может быть перспективным способом и мощной стратегией для увеличения продолжительности жизни и устойчивости микроорганизмов. Более того, была также исследована иммобилизация биокатализаторов [7, 23, 31].

Иммобилизацию клеток можно классифицировать в соответствии с использованной для этого методикой. Существует физическая иммобилизация в пористой матрице (т.е., инкапсулирование), адсорбция и химическое прикрепление. Широко практикуется иммобилизация клеток дрожжевых грибков. Она заключается в простом внесении раствора дрожжей и альгината по каплям в ретикулярный раствор двухвалентного катиона, чтобы путем перекрестного связывания получить микросферы (**microbeads**) [25, 26, 32, 33]. В работах [24, 34] достигнут прогресс в инкапсулировании дрожжевых грибков в Alg-матрицу; изучено также использование различных агентов, образующих сетчатую структуру [35, 36]. Было доказано, что процесс желирования альгината зависит от “емкости” полисахаридов в процессе связывания двухвалентных катионов с образованием различных структур. Использование хлорида кальция в качестве агента, образующего сетчатую структуру, есть наиболее эффективный способ получить подобную матрицу с высокой емкостью к загрузке. В литературе также описаны и другие способы использования с этой целью природных и синтетических полимеров [23, 33, 37, 38], но альгинат используется чаще благодаря своей высокой стабильности.

Однако есть и другая методика иммобилизации с образованием полимера, содержащего дрожжевые грибки и медиатор, которая может быть перспективной в качестве альтернативы при модифицировании электродов. Более того, применение физико-химической иммобилизации одновременно электронного медиатора и биокатализатора может снизить стоимость активирования и очистить сточные воды, содержащие красители, [39, 40], а также стать эффективным методом улучшения биоанодного поведения МТЭ.

В настоящей работе предложены два способа приготовления анодной части МТЭ, работающего на основе *Saccharomyces cerevisiae*. Первый – это синтез микросфер для захвата клеток дрожжевых грибков. Микросферы будут работать в суспензии анолита в контакте с исходной углетканью (**CF**). Второй способ – осадить на поверхность углеткани пленку альгината, содержащую клетки дрожжевых грибков. Цель нашего исследования – разработать эффективный метод иммобилизации клеток дрожжевых грибков. В качестве основного электрохимического метода мы использовали хроноамперометрию. Для идентификации электродных поверхностей с дрожжевыми грибами применялся метод сканирующей

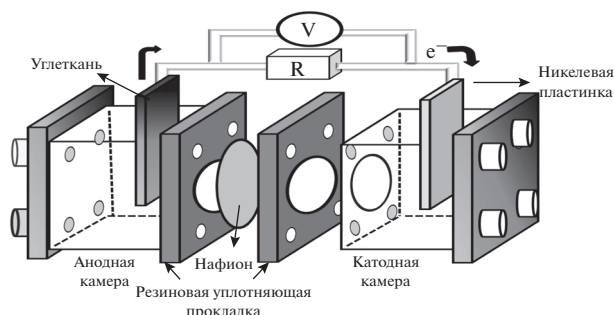


Рис. 1. Конструкция микробного топливного элемента.

электронной микроскопии. В качестве электронных медиаторов для применения в МТЭ использовали метиленовый голубой (МВ) и нейтральный красный [5]. Далее, одновременное применение иммобилизованного медиатора и биокатализатора позволило создать автономный МТЭ, способный к долговременной работе.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все реактивы имели квалификацию “ч. д. а.”.

### Приготовление электродов

Анодным и катодным материалами служили, соответственно, углеткань (Alfa Caesar, толщина 1.27 см) и никель. Их предварительно выдерживали в 1 М НСI в течение 48 ч, а затем очищали от загрязнений в сверхчистой воде.

### Методика иммобилизации клеток дрожжевых грибов

Методика иммобилизации в альгинате описана в работе [41]. В качестве желирующего агента использовали  $\text{CaCl}_2$  (Sigma). Раствор *Saccharomyces cerevisiae* (хлебопекарные дрожжи) в концентрации 2% (в весовом отношении) готовили в 0.85% (в весовом отношении) растворе NaCl (Sigma). Раствор нейтрального красного в концентрации 0.3% (в весовом отношении) в качестве медиатора готовили в фосфатном буферном растворе (pH 7). Порошок альгината Na (Sigma) (2 мас. %) растворяли в сверхчистой воде при 75–80°C в течение 30 мин. Растворы альгината Na и дрожжевых грибов смешивали в отношении 1 : 1, а затем к этому раствору добавляли нейтральный красный. Микросферы из дрожжевых грибов–нейтрального красного–альгината Ca получали, прикапывая 0.05 М раствор  $\text{CaCl}_2$  с помощью шприца. При этом образовывались сферы красного цвета диаметром  $2 (\pm 0.3)$  мм.

С другой стороны, при погружении углеткани в раствор дрожжевых грибов–альгината–нейтрального красного (CF–Alg–NR) (0.3 мас. %)

образуются пленки. Углеткань погружали в этот раствор на 1 ч, а затем на 1 ч в 0.05 М раствор  $\text{CaCl}_2$ , после чего вынимали и оставляли на 12 ч в эксикаторе для того, чтобы гель сформировался полностью. В результате получали два типа иммобилизованных дрожжевых грибов – микросферы и в форме осажденной пленки. Их промывали сверхчистой водой для того, чтобы удалить избыток ионов кальция, а затем хранили при 4°C, а перед использованием активировали при 30°C в течение 30 мин. Как было описано в предшествующей работе [8], мы продемонстрировали биологический топливный элемент с применением обычных дрожжей без необходимости стерилизовать их, чтобы работали живые культуры.

### Конструкция микробного топливного элемента и методика эксперимента

Двухкамерный МТЭ (2 по 100 мл) состоит из анодной и катодной камер, разделенных протонообменной мембраной Nafion® 117 (DuPont, США). Перед использованием мембрану Нифион кипятили в  $\text{H}_2\text{O}_2$  (30%), затем промывали сверхчистой водой,  $\text{H}_2\text{SO}_4$  и снова сверхчистой водой. Электродами – анодом и катодом – служили, соответственно, углеткань (углеродный фетр,  $5 \times 1.3 \times 0.5$  см) и никелевая пластинка ( $5 \times 1.5$  см). На рис. 1 представлена схема микробного топливного элемента. Все использованные камеры были закрыты крышкой.

### Приготовление анодной и катодной камер

Анодная камера содержала раствор моногидрата глюкозы (Sigma Aldrich), приготовленный из 1.98 г глюкозы, растворенной в 100 мл буферного раствора с pH 7, после чего раствор перемешивали в течение 24 ч для получения гомогенного раствора. Фосфатный буферный раствор был приготовлен из смеси  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  и  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  (Sigma Aldrich) в отношении 4.08 : 3.28 г, растворенной в 1 л сверхчистой воды. В анодной же камере находились и дрожжи *Saccharomyces cerevisiae* в качестве биокатализатора, иммобилизованные как в микросферах, так и в осажденной пленке. Все количество микросфер, произведенных по вышеописанной методике, переносили в анодную камеру. Осажденная пленка была получена из того же количества клеток дрожжей, что и микросферы; пленка альгината, осажденная на углеткань, использовалась без дополнительной обработки. Биокатализатор окисляет глюкозу и в качестве продукта он высвобождает электрон на аноде. Эксперименты проводили с нейтральным красным, захваченным в альгинатно-дрожжевом растворе в качестве молекулы, облегчающей переход электрона (т.е., медиатора). Катодная камера содержала 0.02 М раствор феррицианида калия

(Sigma Aldrich) в фосфатном буферном растворе (pH 7), как это было описано в предшествующей работе [9]. Феррицианид калия получает электрон из внешней цепи. При этом он восстанавливается до ферроцианида на электроде – никелевой пластинке. Кислород в катодной камере окисляет Fe(II) до Fe(III). Ре-окисление железа необходимо для функционирования МТЭ.

*Характеристизация*

Для определения электрохимических эксплуатационных характеристик анода была использована хроноамперометрия с применением потенциостата VERSASTAT 3 (PAR AMETEK, Великобритания). Этот полуэлемент содержал 100 мл испытуемого раствора, углеткань в качестве рабочего электрода, насыщенный каломельный электрод (нас. к. э.) в качестве электрода сравнения и платиновый вспомогательный электрод. Все потенциалы, за исключением редокс-потенциалов медиаторов, приведены относительно нас. к. э. чтобы охарактеризовать анод, на электрохимический полуэлемент накладывали потенциал 0.3 В (нас. к. э.) с целью обеспечить окисление медиатора. В контрольном опыте без клеток дрожжей фоновый ток на аноде электрохимического полуэлемента равнялся 5 мкА м<sup>-2</sup> при поляризации 0.3 В. Характеристики клеток дрожжей, иммобилизованных на углеткани, определяли с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ) Hitachi S-4800 (Япония). Методика приготовления образцов для СЭМ-измерений такова: тщательно вырезали кусок модифицированной углеткани размером 1 × 1 см и выдерживали его в 4%-ном растворе глутаральдегида не менее 4 ч, чтобы стабилизировать иммобилизованные микроорганизмы. После двукратной промывки фосфатным буферным раствором (pH 7) образцы обезживали в серии этанольных растворов 40, 60, 80, 100% в течение 30 мин. Последняя стадия – сушка образцов в эксикаторе в течение 3 ч.

При окончательной характеристике МТЭ использовали различные сопротивления (100 Ом–3 кОм) в качестве внешней нагрузки для того, чтобы определить максимальную мощность на выходе, как описано в работе [9]. МТЭ работал при температуре окружающего воздуха 25 ± 1 °С. Генерируемое напряжение (E) записывали с помощью цифрового миллиамперметра Voltcraft (модель VC 850, Германия), а ток (I) вычисляли по формуле  $I = E/R$ .

**Таблица 1.** Редокс-потенциалы молекул медиатора (отн. стандартного водородного электрода, НВЭ)

pH	Редокс-потенциалы молекул медиатора (отн. НВЭ), В		
	NR	MB	NADH
7	-0.325	+0.011	-0.320

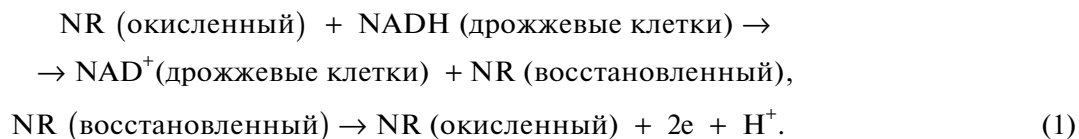
**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

*Альгинат-дрожжевая пленка на углеткани как продукт иммобилизации дрожжей и влияние растворенного медиатора*

Мы показали, что толщина альгинат-дрожжевой пленки составляет около 15 мкм; шероховатость ее велика из-за присутствия клеток дрожжей (рис. 2). Клетки дрожжей хорошо идентифицируются как сферы диаметром 4 мкм. Они утоплены в альгинатной матрице с равномерным размещением на ее поверхности, что благоприятно для электрокатализа.

Чтобы исследовать влияние природы электрохимического медиатора на каталитическое поведение, к раствору глюкозы добавляли метиленовый голубой и нейтральный красный. Анодом служила углеткань, модифицированная иммобилизованной альгинат-дрожжевой пленкой. Результаты представлены на рис. 3.

Рисунок 3 ясно показывает, что метиленовый голубой и нейтральный красный облегчают переход электрона на анод, так как плотность тока увеличивается из-за электрокаталитического окисления глюкозы клетками дрожжей. В иммобилизованной форме этих клеток их дыхание ограничено из-за ограничения содержания кислорода внутри матрицы. Дрожжевые клетки способны переключать метаболизм от дыхательного в присутствии кислорода на ферментативный в бескислородной среде [23, 41]. Добавление нейтрального красного промотирует восстановление окислительно-восстановительного центра клетки микроорганизма, т.е. восстановление никотинамидадениндинуклеотида NADH [18, 21, 42]. Исследования проводили при pH 7, где редокс-потенциалы NADH/NAD<sup>+</sup> ближе к редокс-потенциалам NR, чем MB (табл. 1). Этим можно объяснить более высокий электрокаталитический ток, наблюдающийся в присутствии нейтрального красного.



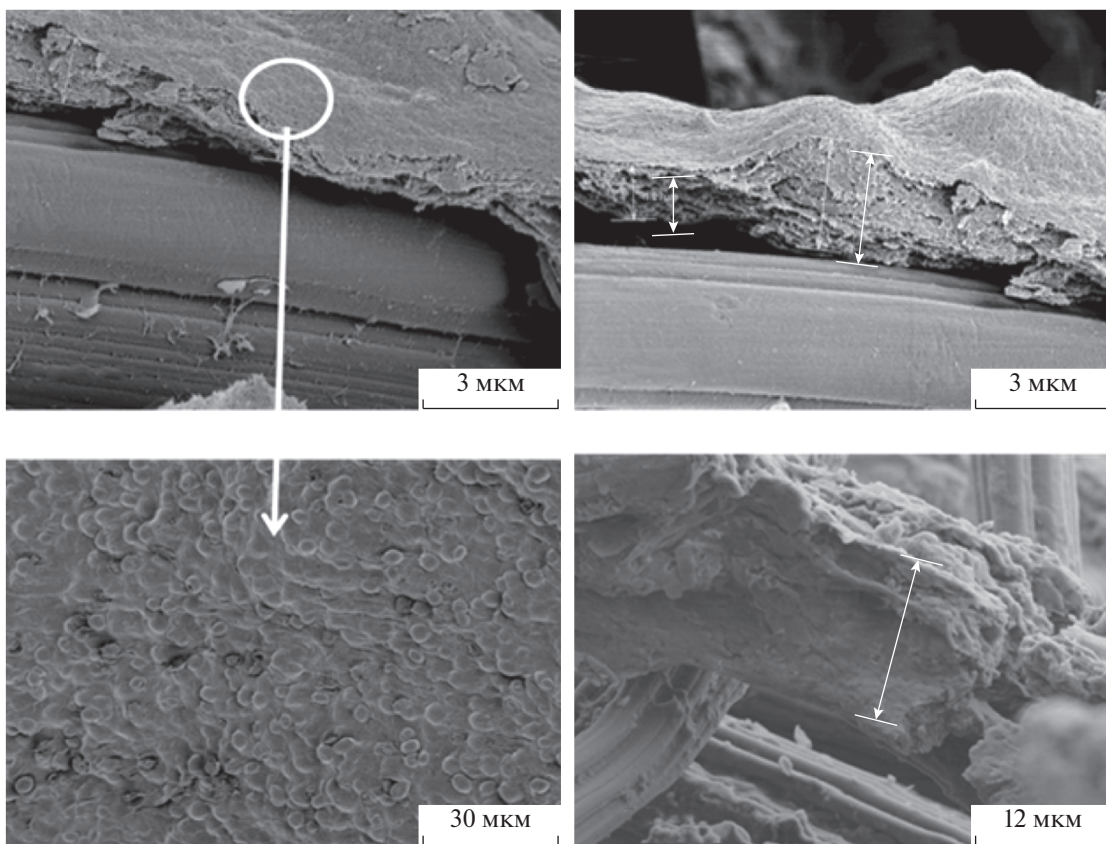


Рис. 2. СЭМ-микрофотографии иммобилизованных дрожжевых клеток в пленке альгината, осажденной на углеткань.

Экспериментально исследовали много различных медиаторов [9, 11, 12], но о немногих из них известно, почему они действуют лучше дру-

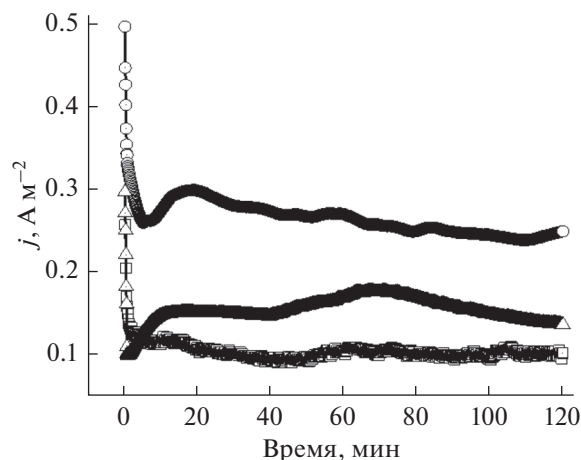


Рис. 3. Плотность тока окисления глюкозы при поляризации 0.3 В (нас. к. э.) как функция времени. В качестве рабочего электрода был использован CF/Im-тов Y-Alg и апробирован в следующих условиях: в присутствии метиленового голубого в качестве медиатора (треугольники); в присутствии нейтрального красного в качестве медиатора (кружочки); без медиатора (квадраты).

гих. В нашем предшествующем исследовании [5] сообщалось, что метиленовый голубой был выбран в качестве подходящего электронного медиатора для МТЭ на основе суспензии дрожжевых клеток. Однако в настоящей работе дрожжевые клетки используются, будучи иммобилизованными в альгинатной матрице; в этих условиях в качестве подходящего электронного медиатора выбран нейтральный красный.

В других исследованиях некоторые медиаторы показали невысокую эффективность, вероятно, из-за условий, связанных с микробной культурой [42–44]. В работе [12] наблюдали, что метиленовый голубой может сильнее адсорбироваться на поверхности анода, чем нейтральный красный, в результате простого сдвига pH. Вероятно, это объясняется тем, что при высоких pH (например, pH 12) NR легче взаимодействует с поверхностью углерода, чем  $MV^+$ , поскольку заряженный ион  $MV^+$ , полученный из хлорида метиленового голубого, хорошо растворим при pH 12. Однако различие в величине pH анодного раствора может эффективно повлиять на кинетику электронного медиатора, тип которого следует выбрать. В нашей системе нейтральный красный больше подходит как медиатор, вероятно, потому что было выбрано более низкое значение pH (а именно,



pH 7), поскольку при более высоких pH эффект не наблюдался; pH мог подействовать на работу дрожжевых клеток – биокатализатора.

*S. cerevisiae*, подобно многим другим микроорганизмам, может работать в анаэробных условиях. Это – легко доступный микроорганизм с хорошо исследованным метаболизмом. Присутствие кислорода в анодной камере не является благоприятным для работы топливного элемента в целом, так как это нарушает течение электронов через внешнюю цепь [8].

#### *Иммобилизация дрожжевых клеток с альгинатом и влияние захвата нейтрального красного*

Способность дрожжевых клеток сообщаться напрямую с поверхностью электрода продемонстрирована в работе [20]. Следующая ступень настоящего исследования – сравнить электроактивность микросфер и осажденной пленки альгинат–дрожжевые клетки–нейтральный красный. На рис. 4 представлены плотности тока окисления глюкозы на иммобилизованной системе альгинат–дрожжевые клетки с захваченным NR.

Фоновые токи, полученные с углетканью и с электродом из углеткани с микросферами альгината (CF@Alg-microbeads), измеряли в течение 2 ч после 30-минутной выдержки для стабилизации электродов. Полученный результат показывает, что электрод в форме микросфер (CF@Alg-microbeads) и осажденной пленки (CF/immob Alg) также способен генерировать электрический ток: соответственно, 0,01 и 0,06 А м<sup>-2</sup>. Отсюда ясно следует необходимость использования медиатора, потому что измеряемые плотности тока очень малы. Получаемый ток мог бы относиться к дрожжевым клеткам, прилегающим к поверхности анода, если бы имелся активный биокатализатор окисления глюкозы, и перенос электронов происходил с участием частиц, сосредоточенных на поверхности. Было предположено, что в случае иммобилизации клеток на поверхности имеется химическая утечка от этих клеток к электрохимически активным молекулам. NAD<sup>+</sup> и другие активные соединения диффундируют наружу и являются внеклеточными медиаторами, в то время как частицы в растворе анолита, включая диспергированные дрожжевые клетки, не принимают участия в переносе электронов и генерировании тока [20]. Этот результат также подтверждает, что улучшение работы элемента путем введения медиатора добавляет, соответственно, 90 и 82% в случае микросфер и осажденной пленки. Роль нейтрального красного в переносе электронов ясно доказывает необходимость использования медиатора.

Помимо этого, результат, полученный с осажденной пленкой, показывает улучшение на 71% по сравнению с микросферами. Электрод из угле-

ткани с пленкой дрожжевых клеток, альгината и нейтрального красного (CF@Y-Alg-NR) демонстрирует, что иммобилизация дрожжевых клеток и NR внутри пленки альгината, осажденной на поверхности электрода, является эффективным методом приготовления электрокаталитической пленки для МТЭ. Поскольку медиатор иммобилизован вне клетки, то окисленный нейтральный красный должен проникнуть в клетку, подвергнуться внутриклеточному восстановлению, после чего восстановленный медиатор диффундирует из клетки наружу, чтобы вновь окислиться на поверхности электрода. Альгинат удерживает клетки дрожжей и медиатор вблизи поверхности электрода, и это, по-видимому, и есть причина того, что осажденная пленка генерирует большую плотность тока по сравнению с микросферами.

Использование нейтрального красного в растворе 10 мМ в течение 2 ч работы после 30-минутной выдержки для стабилизации позволяет получить перенос электрона, который дает на электроде CF(Y-NR) плотность тока 0,185 А м<sup>-2</sup>. Более того, как показано ранее (рис. 5) хроноамперометрическими измерениями, пленка CF/Immob Y-NR-Alg film работает в качестве электрода лучше, чем микросферы или суспензия, потому что генерируется более высокий ток (соответственно, 0,326–0,095 и 0,185 А м<sup>-2</sup>).

Далее, ясно, что если клетки дрожжей захвачены внутри микросфер альгината и нейтрального красного (CF(Y-Alg-NR microbeads)), то ток ограничен из-за затруднения движения восстановленной формы нейтрального красного из слоя геля-матрицы к поверхности электрода. Результаты показывают, что электрод с осажденной пленкой CF/Immob Y-NR-Alg film может обладать улучшенными стабильностью и эксплуатационными характеристиками по сравнению с таким же электродом с микросферами CF(Y-Alg-NR microbeads), а также электродом CF(Y-NR) с суспензией: он демонстрирует наивысшую плотность тока, возможно, из-за более легкого доступа восстановленной формы нейтрального красного к поверхности электрода.

#### *Эксплуатационные характеристики МТЭ*

На основе полученных выше результатов мы применили иммобилизованные дрожжевые клетки при изготовлении анода МТЭ. Цель этого этапа работы – приготовить МТЭ и определить его базовые электрохимические свойства путем мониторинга разрядного тока (на сопротивлении 1 кОм) во времени в течение 44 дней. В нашей работе мы наблюдали наилучшие характеристики (максимальную генерируемую мощность) на нагрузке 1000 Ом (данные здесь не приводятся). Анодная камера содержала суспензию дрожже-

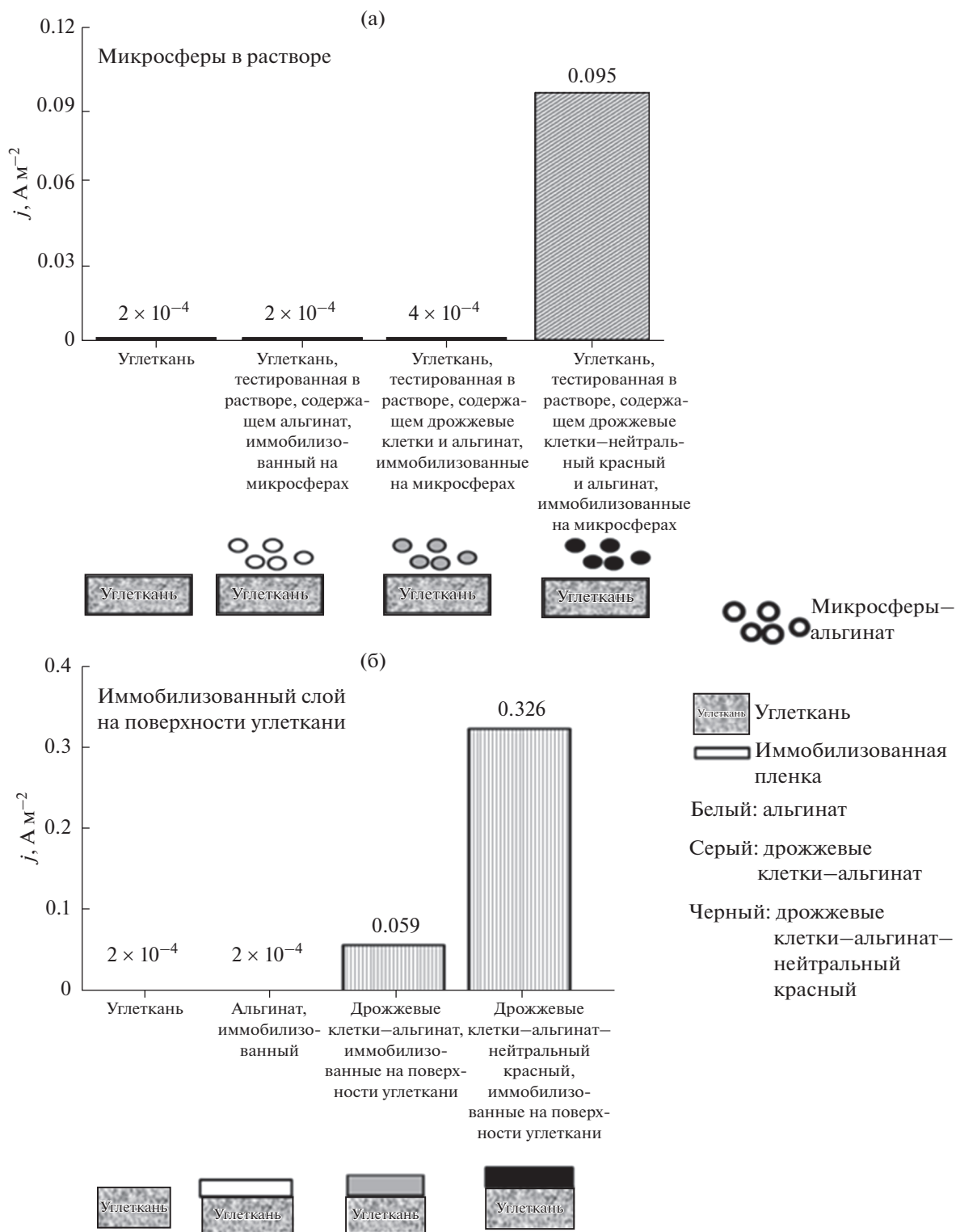


Рис. 4. Плотность тока окисления глюкозы при поляризации 0.3 В (нас. к. э.) как функция времени: а – микросферы, б – осажденная пленка на поверхности углеткани, в 0.1 М растворе глюкозы; фосфатный буферный раствор, pH 7.

вых клеток CF(Y-NR) (без иммобилизации) либо пленку дрожжевые клетки-альгинат в нейтральном красном (CF/ImmobY-NR-Alg). Результаты приведены на рис. 6.

МТЭ, модифицированный иммобилизованными дрожжевыми клетками и медиатором, дает значительный электрический отклик в пакетном режиме, в котором МТЭ проработал 44 дня. По-



Рис. 5. Плотность тока, генерированного на электродах из углеткани в 0.1 М растворе глюкозы; фосфатный буферный раствор, рН 7. Приложенный потенциал: 0.3 В (нас. к. э.); Pt-противоэлектрод. Концентрации дрожжевых клеток и нейтрального красного, соответственно, 2 г/100 и 10 мМ.

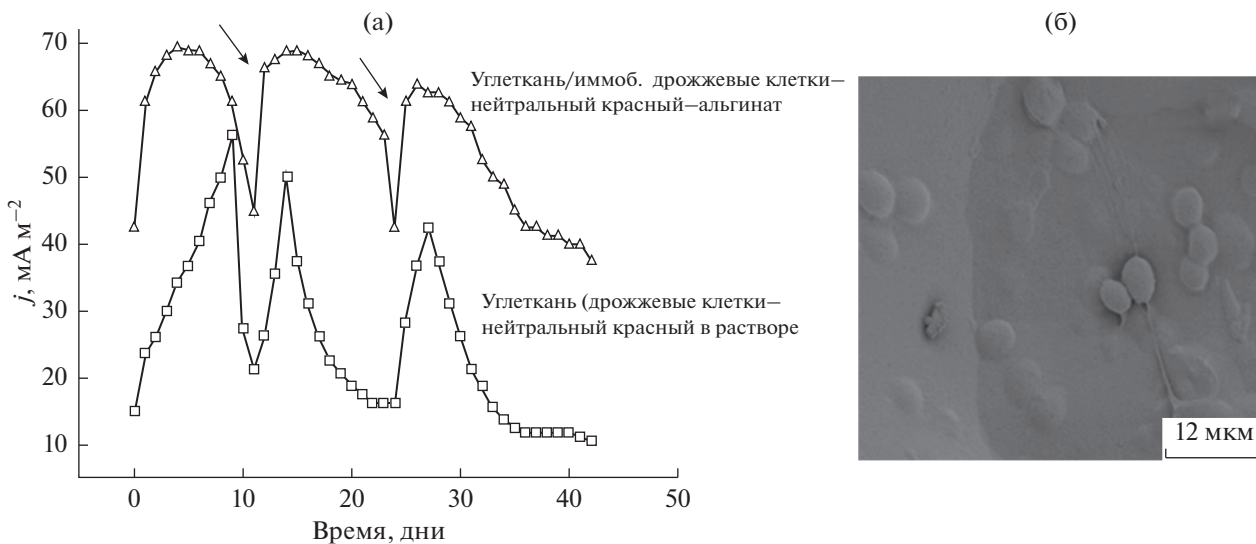


Рис. 6. Изменение тока МТЭ (а) с суспензией дрожжевых клеток в анодной камере (квадраты) и с пленкой CF/иммоб Y-Alg-NR (треугольники) в 0.1 М растворе глюкозы. Стрелками показаны добавки глюкозы и замена  $K_3Fe(CN)_6$  в католите; СЭМ-микрофотографии анода модели С после использования в МТЭ (б).

скольку иммобилизация обычно влечет за собой частичную потерю жизнеспособности или активности микроорганизмов [45], наблюдаемое небольшое снижение плотности тока можно считать объяснимым.

После пополнения запаса глюкозы (на 12-й день), разрядная емкость модельного МТЭ возросла на

~105% (с 1.9 до 3.9 Вт  $m^{-2}$ ), а ток стабилизировался на значении, показанном в первом рабочем цикле. Наблюдается большое отличие от тока МТЭ, работающего без суспензии дрожжевых клеток. Этот результат показывает, что у МТЭ с иммобилизованными дрожжевыми клетками и медиатором более стабильная электрическая отдача. Да-



лее, после повторной добавки глюкозы в то же электродное отделение МТЭ, в котором была проведена иммобилизация дрожжевых клеток, была подтверждена хорошая стабильность пленки дрожжевые клетки—альгинат, в особенности с захваченным нейтральным красным. При поддержании тех же условий в заключительных циклах мощность элемента с суспензией быстро снизилась до  $0.2 \text{ Вт м}^{-2}$  и оставалась стабильной до самого конца наблюдений. Тем не менее, при добавлении глюкозы на 36-й день не наблюдалось увеличения тока.

Явно имеются два различных типа изменений при использовании дрожжевых клеток и нейтрального красного в растворе (CF(Y–NR)) или в модельной системе CF/Immоб Y–NR–Alg (иммобилизация дрожжевых клеток и нейтрального красного в пленке альгината). МТЭ, работающий с иммобилизованными дрожжевыми клетками, демонстрирует быструю стабилизацию тока. Плотность тока в особенности стабильна при использовании в качестве медиатора нейтрального красного, иммобилизованного в пленке. Такие результаты подтверждают найденные ранее электрохимические характеристики по вышеследующей причине. Напротив, ток на выходе МТЭ на основе суспензии дрожжевых клеток растет во времени после добавления глюкозы и затем снижается, начиная с более высокого значения.

В системе CF/Immоб Y–NR принимается, что перенос электрона происходит внутри полимера-альгината с участием молекулы нейтрального красного и что поток электронов отличается высокой устойчивостью, потому что нейтральный красный и дрожжевые клетки заключены вблизи поверхности электрода в пленке альгината. Очень низкий ток, который измеряется в самом начале эксперимента для конфигурации на основе суспензии дрожжевых клеток, можно объяснить тем фактом, что контакт дрожжевых клеток с анодом вначале плохой, но со временем увеличивается из-за того, что дрожжевые клетки растут. Рециклинг NADH в  $\text{NAD}^+$  важен для поддержания непрерывного процесса гликолиза [46]. Поскольку реакция гликолиза протекает скорее в цитозоле клетки (цитоплазме, лишенной элементов эндоплазматической сети), а не в митохондриях, NADH легко связывается с молекулой медиатора, прикрепленной к мембране клетки. МТЭ на основе *S. cerevisiae* извлекает энергию с помощью окислительно-восстановительного цикла в паре  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ . Организм может поддерживать жизнь так долго, пока не нарушен путь гликолиза. Когда медиатор восстанавливается, процесс извлечения энергии в топливном элементе не мешает гликолизу при окислении NADH обратно до  $\text{NAD}^+$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дрожжевые клетки *Saccharomyces cerevisiae* были успешно иммобилизованы в качестве электрогенного микроорганизма в качестве анода микробного топливного элемента. Измерение электрохимических характеристик свежеприготовленного анода и МТЭ в целом показало, что осажденная пленка альгината, иммобилизованная дрожжевыми клетками, открывает эффективный путь к интенсификации окисления глюкозы и электронного переноса. Развита методика позволяет осадить пленку на основе альгината толщиной 15 мкм на электроде из углеткани и использовать его как анод. Дрожжевые клетки представляют собой сферические частицы диаметром 4 мкм, иммобилизованные внутри альгинатной матрицы, в которой они равномерно распределены. Ток окисления глюкозы, измеряемый на аноде, зависит от присутствия молекул нейтрального красного (медиатор), переносящих электроны от топлива к аноду.

Эксплуатационные характеристики МТЭ оценивались как максимальная мощность, генерируемая на нагрузке 1 кОм. Показано, что можно создать эффективную электрохимическую систему, осаждающая альгинатно-дрожжевую пленку, содержащую молекулы нейтрального красного в качестве медиатора, на анод из углеткани. Свежеприготовленный осадок имеет толщину несколько микрон; дрожжевые клетки диаметром 4 мкм равномерно распределены в нем. Легкий и надежный метод иммобилизации дрожжевых клеток, представленный в настоящей работе, открывает перспективный путь к созданию новой системы — поддерживаемого источника энергии. Следующая ступень — создание кислородного электрода в качестве катода на основе фермента, подобного лакказы, иммобилизованного на электроде [47]. Сочетание восстановления кислорода на катоде и окисления топлива дрожжевыми клетками на аноде даст самодостаточный микробный топливный элемент, пригодный для долговременной эксплуатации, например для обессоливания воды, как предлагалось ранее.

## БЛАГОДАРНОСТИ

Настоящая работа поддержана грантом Объединенного исследовательского института (PEKERTI) и грантом Международного семинара Министерства высшего образования Индонезии (DIKTI), а также частично Европейским мембранным институтом (Монпелье, Франция).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Potter, A.M.C., Character, B., and Sep, N., Electrical Effects Accompanying the Decomposition of Organic Compounds, *Royal Soc. Publ.*, 2010, vol. 84, p. 260.

2. Loganm, B.E., Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cell, *Nat. Revs. Microbiol.*, 2009, vol. 7, p. 375.
3. Zou, Y., Xiang C, Yang L, Sun L, Xu F, and Cao Z., A mediatorless microbial fuel cell using polypyrrole coated carbon nanotubes composite as anode material, *Hydrogen Energy*, 2008, vol. 33, p. 4856.
4. Liu, J., Qiao, Y., Xian, C., Lim, Sample, Song, H., and Ming, C., Bioresource Technology Graphene / carbon cloth anode for high-performance mediatorless microbial fuel cells, *Bioresource Tech.*, 2012, vol. 114, p. 275.
5. Mardiana, U., Innocent, C., Cretin, M., Buchari, B., and Gandasmita, S., Yeast fuel cell: Application for desalination, *IOP Conference Series: Materials Sci. Eng.*, 2016, vol. 107, p. 012049.
6. Zhang, Y.M., Mo, G.Q., Li, X.W., Zhang, W.D., Zhang, J.Q., Ye, J.S., Huang, X.D., and Yu, C.Z., A graphene modified anode to improve the performance of microbial fuel cell, *J. Power sources*, 2011, vol. 196, p. 5402.
7. Khrisnaraj, N.R., Karthikeyan, R., Berchmans, S., Chandran, S., and Pal, P., Functionalization of electrochemically deposited chitosan films with alginate and Prussian blue for enhanced performance of microbial fuel cells, *Electrochim. Acta*, 2013, vol. 112, p.465.
8. Walker, A.L. and Walker, C.W., Biological fuel cell and an application as a reserve power source, *J. Power Sources*, 2006, vol. 160, p. 123.
9. Mardiana, U., Innocent, C., Jarrar, H., Cretin, M., Buchari, B., and Gandasmita, S., Electropolymerized neutral red as redox mediator for yeast fuel cell, *Int. J. Electrochem. Sci.*, 2015, vol. 10, p. 8886.
10. Raghavulu, S.V., Goud, R.K., Sarma, P.N., and Mohan, S.V., Bioresource Technology Saccharomyces cerevisiae as anodic biocatalyst for power generation in biofuel cell: Influence of redox condition and substrate load, *Bioresource Tech.*, 2011, vol. 102, p. 2751.
11. Babanova, S., Hubenova, Y., and Mitov, M., Influence of artificial mediators on yeast-based fuel cell performance, *J. Bioscience Bioeng.*, 2011, vol. 112, p. 379.
12. Popov, A.L., Kim, J.R., Dinsdale, R.M., Esteves, S.R., Guwy, A.J., and Premier, G.C., The effect of physico-chemically immobilized methylene blue and neutral red on the anode of microbial fuel cell, *Biotechn. Bio-process Eng.*, 2012, vol. 17, p. 361.
13. Wang, K., Liu, Y., and Chen, S., Improved microbial electrocatalysis with neutral red immobilized electrode, *J. Power Sources*, 2011, vol. 196, p. 164.
14. Park, D.H., Laivenieks, M., Guettler, M.V., Jain, M.K., and Zeikus, J.G., Microbial utilization of electrically reduced neutral red as the sole electron donor for growth and metabolite production, *Appl. Environ. Microbiol.*, 1999, vol. 65, p. 2912.
15. Watson, V.J. and Logan, B.E., Power production in MFCs inoculated with *Shewanella oneidensis* MR-1 or mixed cultures, *Biotechnol. Bioeng.*, 2010, vol. 105, p. 489.
16. Ishii, S., Watanabe, K., Yabuki, S., Logan, B.E., and Sekiguchi, Y., Comparison of electrode reduction activities of *Geobacter sulfurreducens* and enriched consortium in air-cathode microbial fuel cell, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2008, vol. 74, p. 7348.
17. Liu, Z.D, Du, Z.W., Lian, J., Zhu, X.Y., Li, S.H., and Li, H.R., Improving energy accumulation using *Rhodoferrax ferrireducens* as biocatalyst, *Lett. Appl. Microbiol.*, 2007, vol. 44, p. 393.
18. Logan, B.E., Exoelectrogenic bacteria that power microbial fuel cell, *Nat. Rev, Microbiol.*, 2009, vol. 7, p. 375.
19. Prasad, D., Arun, S., Murugesan, M., Padmanaban, S., Satyanarayanan, R.S, Berchmans, S., and Yegnaraman, V., Direct electron transfer with yeast cells and construction of a mediatorless microbial fuel cell, *Biosens. Bioelectron.*, 2007, vol. 22, p. 2604.
20. Sayed, E.T., Tsujiguchi, T., and Nakagawa, N., Catalytic activity of baker's yeast in a mediatorless microbial fuel cell, *Bioelectrochem. (Amsterdam, Netherlands)*, 2012, vol. 86, p. 97.
21. Park, D.H. and Zeikus, J.G., Electricity generation in microbial fuel cell using neutral red as an electronophore, *Appl. Environ. Microbiol.*, 2000, vol. 66, p. 1292.
22. Stolarzewicz, I., Bialecka-Florjanczyk, E., Majewska, E., and Krzyczkowska, J., Immobilization of yeast on polymeric supports, *Chem. Biochem. Eng.*, 2011, vol. 25, p. 135.
23. Zhou, Z.D., Li, G.Y., and Li, Y.J., Immobilization of *Saccharomyces cereviceae* alcohol dehydrogenase on hybrid alginate chitosan beads, *Int. J. Biological Macromol.*, 2010, vol. 47, p. 21.
24. Panesar, R., Panesar, P.S., Singh, R.S., and Bera, M.B., Applicability of alginate entrapped yeast cells for the production of lactose hydrolyzed milk, *Food Process Eng.*, 2007, vol. 30, p. 472.
25. Liu, R., Li J., and Shen, F., Refining bioethanol from stalk juice of sweet sorghum by immobilized yeast fermentation, *Renew Energ*, 2008, vol. 33, p. 1130.
26. Cha, C., Kim, S.R., Jin, Y.-S., and Kong, H., Tuning structural durability of yeast-encapsulating alginate gel beads with interpenetrating networks for sustained bioethanol production, *Biotechnol. Bioeng.*, 2012, vol. 109, p. 63.
27. Qun, J., Shanjing, Y., and Lehe, M., Tolerance of immobilized baker's yeast in organic solvents, *Enzyme Microb. Technol.*, 2002, vol. 30, p. 721.
28. Cordona, C.A. and Sanchez, O.J., Fuel ethanol production: process design trends and integration opportunities, *Bioresour. Technol.*, 2007, vol. 98, p. 2415.
29. Kregiel, D., Berlowska, J., and Ambroziak, W., Growth and metabolic activity of conventional and non-conventional yeasts immobilized in foamed alginate, *Enzyme Microbial Technol.*, 2013, vol. 53, p. 229.
30. Yong, Y.-C., Liao, Z.-H., Sun, J.-Z., Zheng, T., Jiang, R.-R., and Song, H., Enhancement of coulombic efficiency and salt tolerance in microbial fuel cells by graphite/alginate granules immobilization of *Shewanella oneidensis* MR-1., *Process Biochem.*, 2013, vol. 48, p. 1947.
31. Tuncagil, S., Odaci, D., Varis, S., Timur, S., and Toppare, L., *Electrochemical polymerization of 1-(4-nitrophenyl)-2,5-di(2-thienyl)-1 H-pyrrole as a novel immobilization platform for microbial sensing, Bioelectrochem.*, (Amsterdam, Netherlands), 2009, vol. 76, p. 169.
32. Kuhn, S.P. and Pfister, R.M., Adsorption of mixed metals and cadmium by calcium-alginate immobilized

- Zoogloearamigera*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 1989, vol. 31, p. 612.
33. Huguet, M.L., Calcium-Alginate Beads Coated with Polycationic Polymers: Comparison of Chitosan and DEAE Dextran, *Process Biochem.*, 1996, vol. 31, p. 347.
  34. Pajic-Lijakovic, I., Playsic, M., Bugarski, B., and Nedovic, V., Ca-alginate hydrogel mechanical transformations- the influence on yeast cell growth dynamics, *J. Biotechnol.*, 2007, vol. 129, p. 446.
  35. Meena, K. and Raja, T.K., Immobilization of *Saccharomyces Cerevisiae* Cells by Gel Entrapment Using Various Metal Alginates, *World J. Microbiol. Biotechnol.*, 2006, vol. 22, p. 651.
  36. Gombotz, W.R. and Wee S.F., Protein release from alginate matrices, *Adv. Drug Delivery Rev.*, 1998, vol. 31, p. 267.
  37. Călinescu, I., Chipurici, P., Trifan, A., and Bădoiu, C., Immobilization of *Saccharomyces cereviceae* for the production of bioethanol, *U.P.B. Sci. Bull. Ser. B*, 2012, vol. 74, p. 34.
  38. Balci, Z., Akbulut, U., Toppare, L., Alkan, S., Bakir, U., and Yagci, Y., Immobilization of yeast cells in several conducting polymer matrices, *Macromol. Sci.-Pure Appl. Chem.*, 2002, vol. 39, p. 183.
  39. Abdelkader, E., Nadjia, L., and Ahmed, B., Degradation study of phenazin Neutral red from aqueous suspension by paper sludge, *Chem. Eng. Process Technol.*, 2011, vol. 2, p. 1.
  40. Iram, M., Guo, C., Guan, Y., Ishfaq, A., and Liu, H., Adsorption and magnetic removal of neutral red dye from aqueous solution using Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> hollow nanospheres, *Hazard Materials*, 2010, vol. 181, p. 1039.
  41. Liu, R., Li, J., and Shen, F., Refining bioethanol from stalk juice of sweet sorghum by immobilized yeast fermentation, *Renew Energ.*, 2008, vol. 33, p. 1130.
  42. Stuart, W., Jason, K., and Shawn, A., Optimizing biofuel cell performance using a targeted mixed mediator combination, *Electroanal.*, 2006, vol. 18, p. 2001.
  43. Park, D.H., Kim, S.K., Shin, I.H., and Jeong, Y.J., Electricity production in biofuel cell using modified graphite electrode with Neutral Red, *Biotechnol. Lett.*, 2000, vol. 22, p. 1301.
  44. Park, D.H. and Zeikus, J.G., utilization of electrically reduced neutral red by *Actinobacillus succinogens*: Physiological function of neutral red in membrane driven fumarate reduction and energy concervation, *Bacteriol.*, 1999, vol. 181, p. 2403.
  45. Rehn, G., Grey, C., Branneby, C., Lindberg, L., and Adlercreutz, P., Activity and stability of different immobilized preparations of recombinant *E. coli* cells containing omega-transaminase, *Process Biochem.*, 2012, vol. 47, p. 1129.
  46. Feldmann, H., *Yeast Molecular Biology—A Short Compendium on Basic Features and Novel Aspects*; Adolf-Butenandt-Inst., Munich: Univ. Munich, 2005.
  47. Zebda, A., Gondranm, C., Cinguin, P., and Cosnier, S., Glucose biofuel cell construction based on enzyme, graphite particle and redox mediator compression, *Sensor and Actuators*, 2012, vol. 173, p. 760.