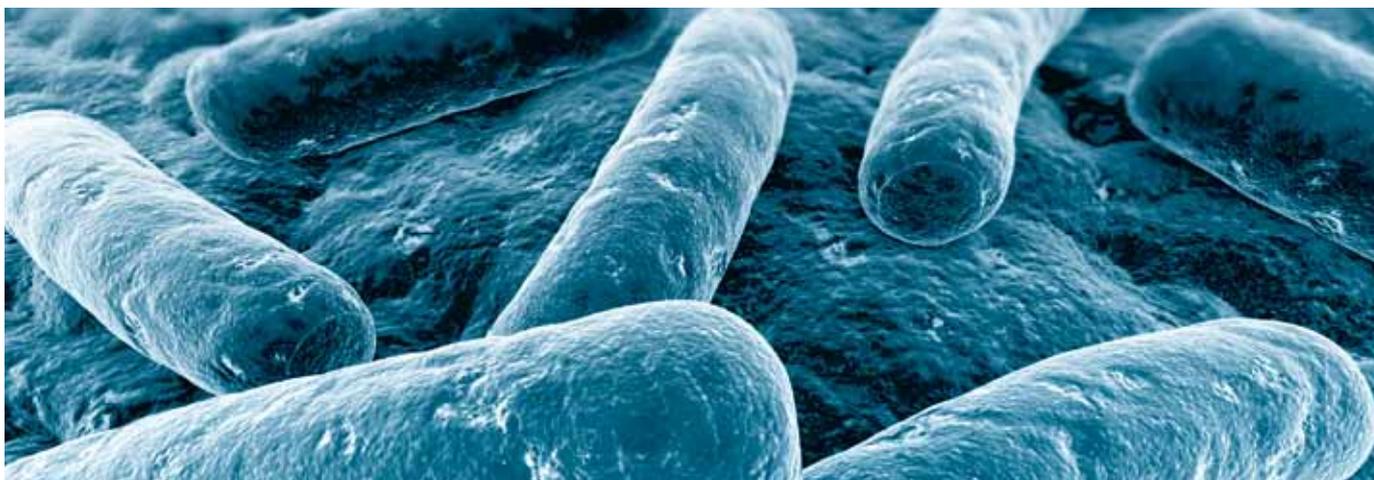


ИММОБИЛИЗАЦИЯ бактерий **GLUCONOBACTER OXYDANS** на АНОДЕ БИОТОПЛИВНОГО ЭЛЕМЕНТА

Разработан макет биотопливного элемента (БТЭ) на основе бактериальных клеток *Glucanobacter oxydans* иммобилизованных на поверхности анода в химически модифицированный поливиниловый спирт (ПВС). Проведена оценка каталитической эффективности ферментных систем бактерий на различных стадиях роста микробной популяции в условиях работы БТЭ. Долговременная стабильность разработанных биоэлектродов составила 7 суток, мощность биотопливного элемента – 200 мкВт/м². Использование отходов бродильных производств в качестве субстрата позволило увеличить генерируемый потенциал до 25% по сравнению с использованием глюкозы. Макет БТЭ может рассматриваться как основа для создания источника электроэнергии, позволяющего увеличить чистоту окружающей среды за счет окисления отходов биотехнологических производств.



Введение

Биотопливные элементы (БТЭ) являются многообещающим альтернативным источником электрической энергии. В отличие от химических топливных элементов, использующих водород или метанол как топливо, в БТЭ топливом служат органические доноры электронов – вещества, обладающие большим запасом химической энергии, но пассивные в электрохимическом отношении. Отличительная особенность БТЭ – биокатализ электродных реакций, в то время как в химических топливных элементах электродную кинети-

П.Р. Минайчева*,
аспирант кафедры химии
Естественно-научного факультета,
ФГБОУ ВПО Тульский государственный университет

ку определяют катализаторы, включающие, как правило, благородные металлы [1]. Кроме того, возрастающий интерес к БТЭ обусловлен возможностью использования в качестве субстратов веществ, являющихся отходами биотехнологических производств. Это связано с тем, что микроорганизмы или их ферменты способны к деструкции достаточно широкого круга низко- и высокомолекулярных органических соединений. Следовательно, кроме энергетических, БТЭ способны решать и экологические проблемы [2].

Основой БТЭ является биокатализатор, в качестве которого могут выступать целые клетки микроорганизмов. Их использование в качестве биокатализатора БТЭ устраняет необходимость выделения инди-

*Адрес для корреспонденции: polina.minaycheva@gmail.com

видуальных ферментов и позволяет активному биоматериалу работать в условиях, близких к их естественной среде и, следовательно, с более высокой производительностью. Выбор микроорганизмов для БТЭ определяется рядом факторов, главными из которых являются простота культивирования, спектр используемых субстратов и эффективность их окисления. Использование, например, дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* основано на их непатогенности и доступности. Однако применение эукариотических клеток дрожжей в БТЭ ограничено сложностями их внутренней организации. Так, окислительно-восстановительные процессы, связанные с деградацией субстратов, происходят, в основном, в митохондриях [4], которые в клетке окружены мембраной, создающей дополнительное препятствие для транспорта медиатора к реакционным центрам. Следует отметить, что эффективность конверсии энергии в электричество для эукариотических клеток обычно составляет ~ 40 %, для прокариотов эта величина может достигать ~50-65 %, а для некоторых микроорганизмов (таких, как *Proteus vulgaris* и *Esherichia coli*) — вплоть до 70-80 % [3]. Так, описан БТЭ на основе *Proteus vulgaris*, где в качестве медиатора электронного транспорта использовался тионин, а субстратом являлась глюкоза. Развиваемый потенциал составлял 350 мВ при токе 4 мкА/см². [4]. Микроорганизмы *Esherichia coli* применялись в сочетании с медиатором (нейтральным красным) и субстратом (уксусной кислотой), развиваемый потенциал составлял 250 мВ при токе 1 мкА/см² [5]. Однако главным недостатком описанных выше микроорганизмов является локализация ферментов в цитоплазме, что существенно затрудняет доступ субстрата и медиатора к активным центрам окислительно-восстановительных ферментов. Одними из перспективных микроорганизмов, на основе которых возможно создание БТЭ, являются бактерии *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius*. Данные микроорганизмы обладают уникальной организацией метаболической системы, характеризующейся мембранной локализацией основных ферментов клеточного метаболизма — дегидрогеназ, осуществляющих неполное окисление углеродных субстратов, что обеспечивает легкий доступ медиатора к активным центрам фермента [6]. Еще одним достоинством этих микроорганизмов является широкий спектр окисляемых субстратов, в который входят углеводы и спирты [7].

С.В. Алферов,
кандидат химических наук, доцент кафедры биотехнологии Естественно-научного факультета, ФГБОУ ВПО Тульский государственный университет

В.А. Арляпов,
кандидат химических наук, доцент кафедры химии Естественно-научного факультета, ФГБОУ ВПО Тульский государственный университет

В.А. Алферов,
кандидат химических наук, профессор кафедры химии Естественно-научного факультета, ФГБОУ ВПО Тульский государственный университет

А.Н. Решетилов,
доктор химических наук, профессор, заведующий лабораторией биосенсоров, ФГБУН Институт биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина Российской академии наук

Предложенные к настоящему времени модели БТЭ отличаются по конструкциям, используемым материалам и субстратам. Одним из перспективных направлений по увеличению долговременной работы и мощности БТЭ является иммобилизация биокатализатора на поверхности анода. В качестве матриц для иммобилизации клеток бактерий или ферментов используются агароза, полианилин [8], золь-гель матрицы и матрицы из углеродных наночастиц [9]. Однако эти способы имеют ряд недостатков. Так, при полимеризации анилина на аноде невозможна одновременная иммобилизация фермента, поскольку процесс протекает в сильноокислой среде [10], а матрицы из углеродных частиц и золь-гель матрицы дорогостоящи. Перспективным методом иммобилизации клеток микроорганизмов в БТЭ является включение в гель на основе поливинилового спирта (ПВС). ПВС химически стабилен, нетоксичен и биосовместим [11], что обуславливает эффективное использование полимера в качестве матрицы для иммобилизации клеток микроорганизмов. Однако для иммобилизации микроорганизмов на графитовых электродах БТЭ ПВС мало пригоден, так как в виде тонких пленок гель обладает низкой механической прочностью. Известны методики получения механически устойчивых гелей ПВС путем использования УФ-облучения [12], воздействия раствора борной кислоты [13] и сополимеризации с N-винилпиридином [14]. Однако описанные методы сопряжены с использованием реагентов или условий реакции, оказывающих негативное влияние на живые микроорганизмы и приводящих к снижению энергетических характеристик БТЭ. Новым подходом при иммобилизации микроорганизмов является использование N-винилпирролидона для модификации ПВС [15]. N-винилпирролидон не только практически нетоксичен, но и повышает активность ферментных систем некоторых микроорганизмов [16]. Иммобилизация бактерий *G. oxydans* в ПВС, химически модифицированный N-винилпирролидоном на поверхности анода БТЭ является важным этапом, позволяющим в перспективе создать проточную систему и увеличить долговременную стабильность БТЭ.

Целью данной работы являлось определение параметров работы БТЭ на основе иммобилизованных бактерий *G. oxydans* в химически модифицированный ПВС на поверхности графитовых электродов.

Материалы и методы исследования

Культивирование клеток микроорганизмов

В работе использовали бактерии *G. oxydans* subsp. *industrius* (ВКМ В-1280) из Всероссийской коллекции микроорганизмов Института биохимии и физиологии микроорганизмов им. Г.К. Скрыбина РАН, г. Пущино. Культивирование бактерий проводили на питательной среде следующего состава: D-сорбит — 200 г/л; дрожжевой экстракт — 20 г/л; объем среды 100 мл, pH среды 5,2–5,5, при температуре 28 °С в течение 18 ч. Клетки собирали центрифугированием на центрифуге Avanti J-30I («Beckman Coulter, Inc», США) при 12000 об/мин 10 мин. и отмывали двукратно 20 мМ натрий-фосфатным буферным раствором с pH 6,0. Осевшие клетки ресуспендировали в новой порции буферного раствора и центрифугировали на центрифуге Eppendorf 5417 C/R («Eppendorf», Германия) 10 мин при 12000 об/мин. Полученные осадки в микропробирках подсушивали на воздухе, для каждой серии опытов в качестве биокатализатора в БТЭ использовали новую порцию клеток (на различных стадиях роста), разбавленных 30 мМ натрий-фосфатного буфера (pH 6,0) в соотношении 1:3 (мг сырого веса/мкл).

Получение кривой роста микроорганизмов

Культивирование бактерий *G. oxydans* проводили путем перекрытия интервалов времени, в течение которых оценивалась оптическая плотность бактериальной культуры. Кривую роста микроорганизмов регистрировали спектрофотометрическим методом, измеряя зависимость оптической плотности культуральной жидкости от времени культивирования. Регистрацию оптической плотности суспензии проводили на спектрофотометре СФ-103 («Аквилон», Россия) при длине волны 540 нм и толщине кюветы 1 см относительно кюветы с дистиллированной водой. Измерения повторяли каждые 2 ч в течение 2 сут.

Формирование ячейки БТЭ

Ячейка БТЭ представляла собой две взаимосвязанных кюветы, рабочий объем анодного отделения был равен объему катодного и составлял 3 мл. Electroдами служили спектрографические графитовые стержни диаметром 8 мм (СЭУ, ФГУП Научно-исследовательский институт электроугольных изделий), площадь рабочей поверхности электродов составляла 300 мм². Глубина погружения электродов в раствор 10 мм.

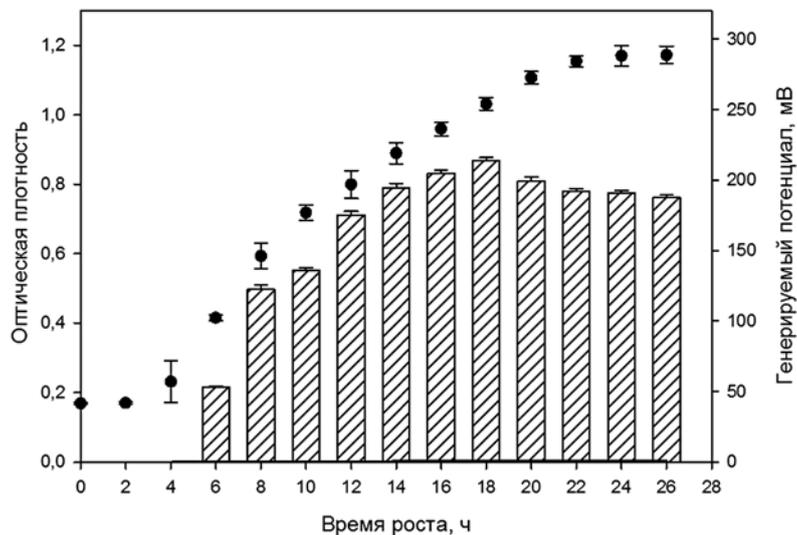


Рис. 1. Кривая роста и каталитическая эффективность бактерий *G. oxydans* на разных стадиях роста в условиях работы БТЭ.

Связь кювет осуществлялась через отверстие в стенке диаметром 6 мм. Камеры разделяли протонселективной мембраной МФ-4СК («Пластполимер», Санкт-Петербург), являющейся аналогом мембраны Nafion 117 в протонированной форме. В качестве фонового раствора использовали 30 мМ натрий-фосфатный буферный раствор pH 6,0, а в качестве медиатора — 2,6-дихлорфенолидофенол («Sigma Aldrich», Германия) с концентрацией в анолите 100 мкМ. Для оценки каталитической эффективности бактерий *G. oxydans* наряду с 2,6-дихлорфенолидофенолом в анодном отделении, в катодном использовали гексацианоферрат (III) калия (концентрация 3 мМ). Субстратом для окисления клетками *G. oxydans* служила глюкоза с концентрацией в кювете 10 мМ.

Все реактивы, используемые в работе, имели степень чистоты х.ч. или ч.д.а.

Иммобилизация бактерий *G. oxydans* в химически модифицированный ПВС

ПВС (молекулярная масса $1 \cdot 10^5$ – $1,1 \cdot 10^5$ а.е.м., 16/1, Россия) был модифицирован по методике, приведенной в [15]. Иммобилизацию *G. oxydans* в модифицированный ПВС на поверхность графитового электрода (анода) проводили следующим образом: в 200 мкл раствора модифицированного ПВС добавляли 40 мг клеток *G. oxydans*, тщательно перемешивали и полученную суспензию наносили на графитовый электрод (высота нанесения 1 см). Затем электрод с иммобилизованными клетками

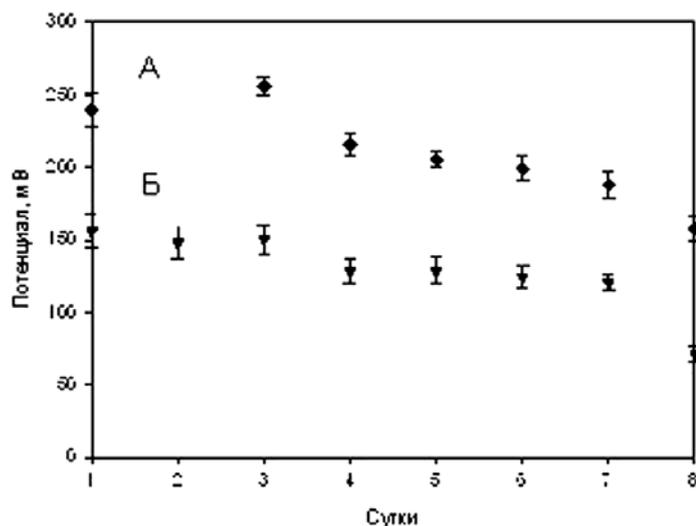


Рис. 2. Долговременная стабильность электродов с иммобилизованными клетками бактерий *G. oxydans* в химически модифицированный ПВС; А — активированные электроды, Б — неактивированные электроды.

оставляли на 24 ч в холодильнике при температуре 4 °С.

Обработка графитовых электродов концентрированной азотной кислотой

Окисление поверхности графитового электрода в азотной кислоте проводили следующим образом: в термостойкий стакан помещали графитовые электроды, 50 мл азотной кислоты ($\rho = 1,35$ г/мл) и выдерживали 15 мин при нагревании (78-80 °С). Затем электроды отмывали дистиллированной водой в течение 7 сут до достижения постоянной разности потенциалов между анодом и катодом 0-10 мВ.

Электрохимические измерения

Потенциал измеряли при помощи гальванопотенциостата IPC Micro (ЗАО «Вольта», Россия), входное сопротивление которого составляло 10^{13} Ом. Графитовые стержни погружали в электролитическую ячейку. Измерения проводили в натрий-фосфатном буферном растворе (рН 6,0) при постоянном перемешивании раствора магнитной мешалкой. Скорость перемешивания составляла 400 об/мин. Регистрацию ответов на добавление субстрата в измерительную ячейку и определение электрических характеристик проводили после достижения стационарного значения генерируемого потенциала. Измеряемым параметром в процессе биокаталитического окисления субстратов в режиме генерации потенциала являлась амплитуда генерируемой разности потенциалов.

Результаты и их обсуждение

На первом этапе работы представляло интерес выявление наибольшей каталитической эффективности клеток микроорганизмов *G. oxydans* на различных стадиях роста при их использовании в качестве биокатализатора в БТЭ. Для этих целей была получена кривая роста, определены фазы роста микроорганизмов и проведена оценка величин генерируемого потенциала при окислении глюкозы биокатализатором на различных стадиях роста. Измерения потенциала проводили в режиме замкнутой внешней цепи сопротивлением 50 кОм, субстратом биоокисления являлась глюкоза с концентрацией в кювете 10 мМ. Полученные данные приведены на рис. 1.

В диапазоне времени культивирования биомассы от 4 до 18 ч наблюдается возрастание величины генерируемого потенциала, что обусловлено увеличением активности ферментных систем бактерий в экспоненциальной и линейной фазах и фазе замедления роста.

После 18 ч культивирования величина генерируемого потенциала снижается. Это связано с переходом бактериальной культуры в стадию стационарного роста и началом фазы отмирания бактерий. Максимальный потенциал (210 ± 10 мВ) в БТЭ развивается при использовании в качестве биокатализатора клеток бактерий *G. oxydans* в поздней стадии замедления роста после 18 ч культивирования.

Необходимо отметить, что по литературным данным в медиаторных микробных биосенсорах в качестве биокатализатора применяют клетки бактерий *G. oxydans* в поздней экспоненциальной фазе роста (12 ч культивирования) [17]. Такое отличие в полученных результатах может быть связано с различиями в окислительной активности штаммов ВКМ В-1280 и ССМ 1783 (ВКМ В-885), а также использованием в качестве субстрата смеси глюкозы и этанола при проведении биосенсорных измерений. Таким образом, для получения максимальных значений генерируемого потенциала целесообразно использовать биомассу бактерий *G. oxydans* в поздней стадии замедления роста при культивировании микроорганизмов не менее 18 ч.

Одним из способов создания проточной системы в БТЭ, а также увеличения его долговременной работы является иммобилизация биоматериала на поверхности анода

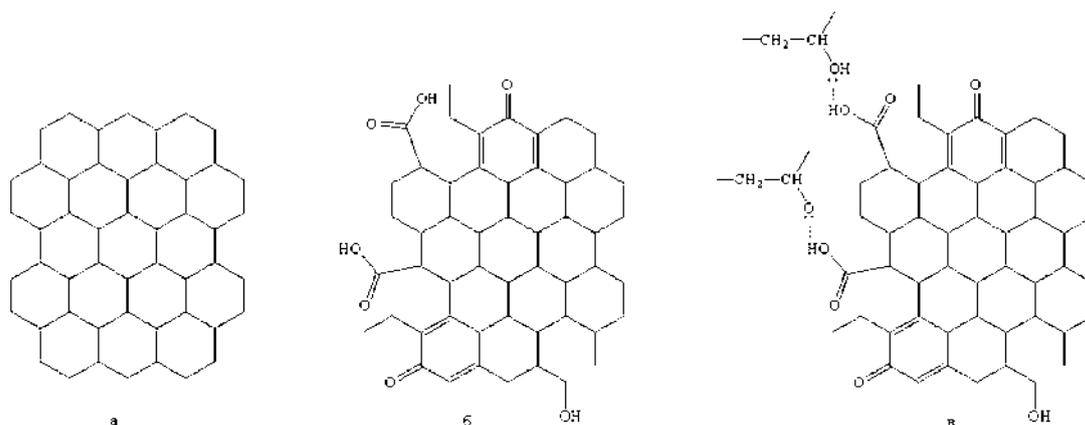


Рис. 3. Схема окисления поверхности графита в азотной кислоте при нагревании:

а – поверхность графита до активации;
 б – активированная поверхность графита;
 в – образование водородных связей между –ОН группами ПВС и –СООН группами на активированной поверхности графита.

с помощью различных матриц. Основным направлением по увеличению долговременной работы и мощности БТЭ является иммобилизация целых клеток биокатализатора на поверхности анода. Для иммобилизации *G. oxydans* на анод был использован химически модифицированный ПВС. Установлено, что в этом случае существенно увеличивается количество измерений с одной порцией клеток микроорганизмов, а величина генерируемого потенциала в БТЭ возрастает в 2 раза.

Для определения долговременной стабильности биоанода в течение 8 сут проводилась оценка величины генерируемого потенциала при добавлении в анодное отделение медиатора 2,6-дихлорфенолиндофенола и одинаковых порций глюкозы в режиме разомкнутой внешней цепи (рис. 2). Установлено, что падение генерируемого потенциала на 8-е сут составило 40 %, что позволяет многократно использовать разработанный биоанод в отличие от использования суспензии клеток *G. oxydans*, где для каждого измерения требуется добавление новых порций биокатализатора.

Для улучшения адсорбции модифицированного ПВС на поверхности графитового электрода была проведена активация поверхности электрода (выдерживание в концентрированной азотной кислоте при нагревании) с целью получения карбоксильных групп на поверхности графита [18] (рис. 3 а, б).

При использовании активированных графитовых электродов генерируемый потенциал в макете БТЭ в присутствии медиатора 2,6-ДХФИФ при добавлении глюкозы в анолит в режиме разомкнутой внешней цепи составлял 250 ± 10 мВ. При использовании неактивированных графитовых электродов в тех же условиях значение генерируемого потенциала составляло 150 ± 10 мВ. Увеличение значений генерируемого потенциала при использовании активированных графитовых электродов может быть обусловлено улучшением адсорбции химически модифицированного ПВС на поверхности графита за счет образования водородных связей между гидроксильными группами спирта и карбоксильными группами (рис. 3 в) на поверхности окисленного

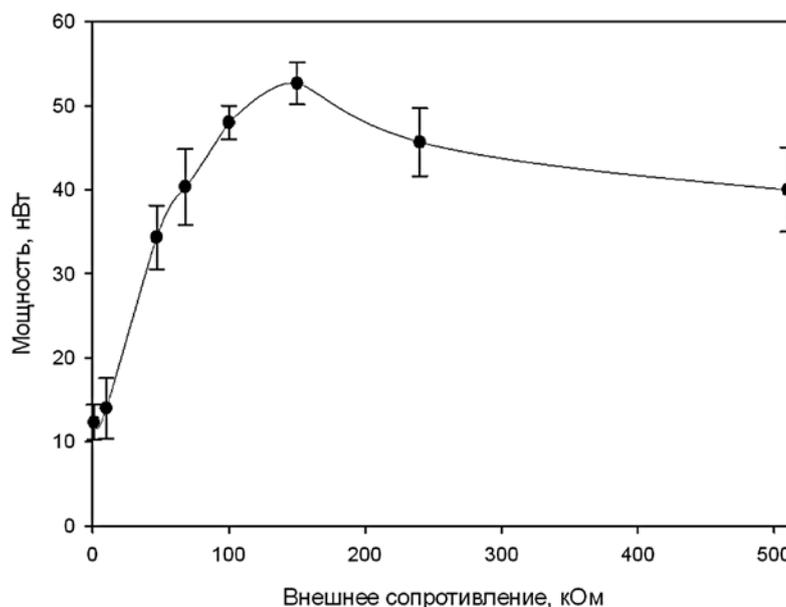


Рис. 4. Зависимость мощности БТЭ от внешнего сопротивления при иммобилизации клеток *G. oxydans* в химически модифицированный ПВС.

Следует отметить, что увеличения долговременной стабильности электродов не произошло (рис. 2), т.к. в обоих случаях падение генерируемого потенциала на 8-е сут в среднем составило около 40 %. Уменьшение значений генерируемого потенциала в макете БТЭ на 7-8-е сут может быть связано с вымыванием клеток бактерий из пленки модифицированного ПВС.

Мощность БТЭ является важной характеристикой, позволяющей судить о возможности его применения в качестве источников электропитания. Для достижения максимальных значений мощности в макете БТЭ требуется достичь равенства внешнего и внутреннего сопротивления. Из этого следует, что мощность при равенстве величин сопротивлений будет равна

$$P_{\max} = \frac{E_{\text{эдс}}^2}{4R_{\text{внутр}}}. \quad (1)$$

Поэтому основная цель при конструировании макетов БТЭ — это минимизировать внутреннее сопротивление системы [19].

Представлялось важным провести оценку мощностных характеристик полученного макета БТЭ на основе бактерий *G. oxydans*, иммобилизованных в химически модифицированный ПВС на поверхности графитового электрода. Оценка максимальной мощности представлена на рис. 4. Для этой цели исследовали зависимость мощности БТЭ от приложенного внешнего сопротивления, которое изменяли в интервале от 1 до 510 кОм.

Пик мощности, генерируемой БТЭ, наблюдался при приложенном внешнем сопротивлении 150 кОм; внутреннее сопротивление ячейки при этом составляло 180 ± 10 кОм, а максимальная мощность $P_{\max} = 52 \pm 3$ нВт.

Необходимо отметить, что при использовании иммобилизованных бактерий по сравнению с суспензией микроорганизмов в анолите БТЭ внутреннее сопротивление элемента снижается в 1,6 раз, а максимальная мощность БТЭ (нормированная к единице рабочей поверхности электрода) возрастает в 30 раз (табл. 1).

Для описания и корректного сравнения разработанных моделей БТЭ между собой рекомендуется использовать понятие мощности, нормированной к единице поверхности рабочего электрода [19]. Расчетное значение мощности, отнесенной к геометрической поверхности анода, составляет $0,20 \pm 0,02$ мкВт/м². По литературным данным в подобных моделях БТЭ внутреннее

сопротивление составляет от 10 до 100 кОм, а удельная мощность, отнесенная к рабочей поверхности электрода, варьирует от 10 до 80 мВт/м² [20]. Таким образом, макет БТЭ на основе иммобилизованных бактерий *G. oxydans* имеет сопоставимое с литературными данными значение внутреннего сопротивления, однако значительно уступает им по удельной мощности, что свидетельствует о необходимости улучшения его параметров.

На заключительном этапе работы проведена оценка возможности использования отходов спиртового производства в качестве топлива в макете БТЭ на основе иммобилизованных бактерий *G. oxydans*. Для этого использовали 3 образца барды спиртового производства. Измерения проводили при внешней нагрузке 150 кОм (табл. 2).

При добавлении в качестве субстрата в макет БТЭ образцов № 2 и № 3 генерируемый потенциал был на 43 и 48 %, соответственно, выше, чем при добавлении образца № 1. Это обусловлено тем, что образцы № 2 и № 3 кроме декстринов и олигосахаридов содержали этанол, в отличие от образца № 1, который соответствовал начальному эта-

Таблица 1

Мощностные характеристики макетов БТЭ на основе бактерий *G. oxydans*

Биокатализатор	Внешнее сопротивление БТЭ, кОм	Мощность, нВт	Удельная мощность, мкВт/м ²
Суспензия клеток <i>G. oxydans</i>	240	2±1	7±1
Клетки <i>G. oxydans</i> , иммобилизованные в химически модифицированный ПВС	150	52±3	200±20

Таблица 2

Использование бродильной массы в качестве субстрата в макете БТЭ на основе бактерий *G. oxydans*

№ образца	Время брожения, час	БПК*, мг/л (в пересчете на объем анолита)	Генерируемый потенциал, мВ
1	0	17,7	170±10
2	24	24,8	300±20
3	48	29,0	330±20
Глюкоза	-	25,7	250±10

* БПК определяли стандартным методом по ПНДФ 14.1:2:3:4.123-97.

пу брожения, т.е. содержал только продукты распада крахмала.

Таким образом, отходы спиртовых производств могут служить дешевым и эффективным субстратом для БТЭ подобного типа, так как наряду с решением задач экологического характера, а именно утилизации барды, обеспечивают повышение генерируемого потенциала в БТЭ на 20-25 % по сравнению с использованием глюкозы.

Заключение

Разработан макет БТЭ на основе иммобилизованных клеток бактерий *G. oxydans* в химически модифицированный ПВС на поверхности анода. Проведена оценка каталитической эффективности ферментных систем бактерий на различных стадиях роста микробной популяции в условиях работы БТЭ. Максимальный потенциал (210 ± 10 мВ) в БТЭ развивается при использовании в качестве биокатализатора клеток бактерий *G. oxydans* в поздней стадии замедления роста после 18 ч культивирования. Долговременная стабильность разработанных биоанодов составила 7 сут. Мощностные характеристики полученного макета БТЭ значительно выше аналогичных значений БТЭ на основе суспензии бактерий *G. oxydans* в анолите. Показана принципиальная возможность использования отходов спиртовых производств в качестве эффективного субстрата в разработанном макете БТЭ, что позволяет увеличить генерируемый потенциал до 25 % по сравнению с вариантом использования глюкозы в качестве топлива.

Ключевые слова:

биотопливный элемент, иммобилизация, бактерии *Gluconobacter oxydans*

Работа выполнена в рамках гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых — кандидатов наук, договор № 16.120.11.4341 — МК и государственного задания Минобрнауки 4.3337.2011.

Литература

1. Казаринов И.А. Микробные топливные элементы — новое направление в развитии альтернативной энергетики / И.А. Казаринов, Е.В. Кузьмичева // Автономная энергетика. 2009. № 26. С. 37-47.
2. Федорович В.В. Биотопливные элементы — новые возможности для энергетики / В.В. Федорович, Т.О. Мажитов, С.В. Калужный // Катализ в промышленности. 2004. № 1. С. 29-34.
3. Benneto H.P. In frontiers of Science. Review // Chem. Oxford: Blackwell. 1990. V. 6. P. 66.
4. Katz E. Biochemical fuel cells. Handbook of Fuel Cells—Fundamentals, Technology and Applications, Fundamentals and Survey of Systems / Katz E., Shipway A.N., Willner I. John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, 2003. P. 355–381.
5. Park D.H. Electricity generation in microbial fuel cells using neutral red as an electronophore / Park D.H., Zeikus J.G. // Appl. Environ. Microbiol. 2000. V. 66. № 4. P. 1292–1297.
6. Lusta K.A. Physiological and biochemical features of *Gluconobacter oxydans* and prospects of their use in biotechnology and biosensor systems. Review / Lusta K.A., Reshetilov A.N. // Appl. Biochem. Microbiol. 1998. № 34. P. 307-320.
7. Алферов С.В. Уксуснокислые бактерии *Gluconobacter oxydans* как биокатализаторы в медиаторном биотопливном элементе / С.В. Алферов, О.А. Воеводская, В.Т. Нгуен, В.А.



- Арляпов, О.Н. Понаморева, А.Н. Решетиллов // Сенсорные системы. 2011. Т. 25. № 4. С. 346–351.
8. Osman M.H. Recent progress and continuing challenges in bio-fuel cells Part II: Microbial / Osman M.H., Shah A.A., Walsh F.C. // Biosens. Bioelectron. 2010. V. 26. P. 953–963.
9. Yong Yuan. Microorganism-immobilized carbon nanoparticle anode for microbial fuel cells based on direct electron transfer / Yong Yuan, Shungui Zhou, Nan Xu, Li Zhuang // Appl. Microbiol. Biotechnol. 2010. № 15. P. 3456-3461.
10. Трашин С.А. Безреагентные биосенсоры на основе электрохимических реакций в гетерогенных системах. Дисс. на соискание ученой степени к-та хим. наук. М., 2008. С. 99.
11. Handbook of Biosensors and Biochips. / Ed. by Marks R. S., Cullen D. C., Karube I., Lowe C. R., Weetall H. 2007. P.356.
12. Арляпов В.А. Иммунизация клеток *Gluconobacter oxydans* для создания стабильных рецепторных элементов биосенсоров / В.А. Арляпов, Л.Д. Асулян, Ю.А. Власова, М.А. Ануфриев, И.В. Блохин, Т.Д. Карташова // Известия ТулГУ. Сер. Химия. Тула: Изд-во ТулГУ, 2006. Вып. 6. С. 137–144.
13. J. Wang. An innovative reactor-type biosensor for BOD rapid measurement / J. Wang, Y. Zhang, Y. Wang, R. Xu, Z. Sun, Z. Jie // Biosens. Bioelectron. 2010. V. 25 № 7. P. 1705-1709.
14. B. Li. Synthesis of a self-gelatinizable grafting copolymer of poly(vinyl alcohol) for construction of an amperometric peroxidase electrode / B. Li, L. Niu, W. Kou, Q. Deng, G. Cheng, S. Dong // Anal. Biochem. 1998. № 256. P. 130–132.
15. Алферов В.А. Получение стабильного рецепторного элемента биосенсора, иммобилизацией бактериальных клеток *Gluconobacter oxydans* в пленку из поливинилового спирта, модифицированного N-винилпирролидоном / В.А. Алферов, Н.М. Филатова, Л.Д. Асулян, И.В. Блохин, А.А. Горячева // Изв. ТулГУ. Естественные науки. Тула: Изд-во ТулГУ. 2011. Вып. 1. С. 210-219.
16. Демаков В.А. Иммунизация клеток микроорганизмов / В.А. Демаков, Ю.Г. Максимова, А.Ю. Максимов // Прикл. биохим. микробиол. 2008. № 2. С. 30-31.
17. Tkac Jan. Improved selectivity of microbial biosensor using membrane coating. Application to the analysis of ethanol during fermentation / Tkac Jan, Vostiar Igor, Lo Gorton, Gemeiner Peter, Sturdik Ernest // Biosens. Bioelectron. 2003. № 18. P. 1125–1134.
18. Kaipeng Wang. Improved microbial electrocatalysis with neutral red immobilized electrode / Kaipeng Wang, Yuwen Liu, Shengli Chen // J. Power Sources. 2011. № 196. P. 164–168.
19. Logan B.E. Microbial fuel cells. John Wiley & Sons, New York, 2008. P. 44-60.
20. Frank Davis. Biofuel cells – recent advances and applications / Frank Davis, Seamus P.J. Higson // Biosens. Bioelectron. 2007. № 5. P. 1224–1235.

P.R. Minaicheva, S.V. Alferov, V.A. Arlyapov, V.A. Alferov, A.N. Reshetilov

IMMOBILIZATION OF BACTERIUM

Gluconobacter oxydans ON ANODE OF BIOFUEL CELL

Biofuel cell model based on *Gluconobacter oxydans* subsp. *industrius* cells immobilized on surface of graphite electrodes in chemical-modified polyvinyl alcohol was developed. Catalytic efficiency of bacterial cells during different growth stages was estimated for the biofuel cell. Long-time stability of developed bioelectrodes reached 7 days and capacity of the biofuel cell was 200 $\mu\text{W}/\text{m}^2$. Use of fermentation industry waste as substrate increased generated potential by 25% in comparison with glucose. Model under discussion is viewed as basis for development of electric energy source which improving ecological state by oxidation of biotechnological production wastes.

Key words: biofuel cell, immobilization, bacterium *Gluconobacter oxydans*.