

ШАСТИК ЕВГЕНИЙ СЕРГЕЕВИЧ

Функционирование гидрогеназного электрода в биореакторе с
водородвыделяющими микроорганизмами

03.02.03. микробиология

03.01.06 – биотехнология (в том числе бионанотехнологии)

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва-2013

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном учреждении науки
Институте фундаментальных проблем биологии Российской Академии наук

Научный руководитель

доктор биологических наук
Цыганков Анатолий Анатольевич

Официальные оппоненты:

Ивановский Руслан Николаевич
доктор биологических наук,
профессор, биологический факультет
Московского государственного
университета имени М.В.Ломоносова,
ведущий научный сотрудник

Ярополов Александр Иванович
доктор химических наук,
профессор, Институт биохимии
им. А.Н. Баха РАН,
заведующий лабораторией химической энзимологии

Ведущая организация

Федеральное государственное бюджетное
учреждение науки Институт биохимии и физиологии
микроорганизмов им. Г. К. Скрыбина

Защита состоится «11» июня 2013 г. в 15:30 на заседании диссертационного совета
Д.501.001. 21 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по
адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, корп.12, Биологический факультет, ауд. М-1.
Тел.8(495)939-54-83, эл. почта npiskunkova@rambler.ru

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке МГУ.

Автореферат разослан « » _____ 2013 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, к. б. н



Пискункова Нина Федоровна.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. К наиболее важным проблемам, стоящим перед современной цивилизацией, можно отнести дефицит энергоносителей и утилизацию техногенных отходов, загрязняющих окружающую среду. Эти проблемы являются взаимосвязанными, так как большая часть современной энергетики использует полезные ископаемые: нефть, газ, каменный уголь. При использовании ископаемого топлива выделяется углекислый газ, который загрязняет атмосферу. Очистка органических отходов, в свою очередь, требует больших затрат электроэнергии, хотя окисление этих же отходов могло бы давать энергию. Таким образом, использование отходов как вторичных ресурсов для получения энергии - перспективный путь решения проблем энергосбережения и утилизации отходов. Особенно интересен с этих позиций молекулярный водород, синтезируемый биологическим путем из сточных вод. Несмотря на интенсивные исследования в течение нескольких десятилетий, проводимые как на фундаментальном, так и на прикладном уровнях с участием молекулярных биологов, микробиологов, биотехнологов, уровень наших знаний еще недостаточен для внедрения в практику биологического преобразования органических отходов в молекулярный водород.

Преобразование биоводорода в электричество является важной практической задачей. Использование биоводорода в топливных элементах (ТЭ) в децентрализованных энергосистемах, где H_2 образуется из органических отходов на месте их получения, может снять проблемы его хранения и транспортировки без изменения инфраструктуры энергосетей. В литературе описаны работы по сопряжению топливных элементов на основе платины с биореакторами, образующими водород. Однако для использования биоводорода в ТЭ на основе платины требуется его предварительная очистка от каталитических ядов, таких как сероводород, необратимо инактивирующих металлический катализатор, что приведет к дополнительным затратам энергии. С другой стороны, совмещение в одном пространстве ТЭ и биореактора, генерирующего водород, может дать дополнительные преимущества. Снижение парциального давления водорода в биореакторе за счет его поглощения ТЭ может увеличить скорость выделения водорода, а также изменить спектр получаемых продуктов брожения. Как альтернативу катализу благородными металлами предлагается использовать биологические катализаторы — ферменты. В качестве биологического катализатора окисления водорода в ТЭ можно использовать гидрогеназу – белок, участвующий в превращениях водорода в живых организмах. Вместе с тем, уровень разработанности водородных электродов на основе гидрогеназ пока не позволяет их применять в промышленных ТЭ.

Степень разработанности проблемы. К 2008 году (начало исследований) в литературе не имелось публикаций, касающихся интеграции выделения водорода и его окисления с

помощью гидрогеназного электрода (ГЭ), хотя принципиальная возможность работы ГЭ в качестве сенсора водорода в среде, где развиваются клостридии, была показана в кратковременных экспериментах. Возможность длительной работы ГЭ в среде, где могут появляться протеазы, разрушающие фермент на электроде, не была показана. Также было неизвестно, как присутствие и функционирование ГЭ может повлиять на метаболизм водородвыделяющих микроорганизмов.

Целью работы было проверить возможность длительного использования гидрогеназного ферментного электрода для преобразования биоводорода, выделяемого микробным консорциумом, в электричество.

Для достижения поставленной цели решались следующие задачи:

- Разработка и изготовление биореактора и системы управления для одновременного выделения водорода микроорганизмами и его электрохимического окисления на ГЭ.
- Изучение операционной стабильности ГЭ как в буферных растворах, так и в биореакторе с крахмалразлагающим микробным консорциумом.
- Исследование электрохимической активности ГЭ при разных температурах.
- Исследование работы ГЭ в режиме сенсора водорода и в режиме генерации электрокаталитического тока в биореакторе с водородвыделяющим микробным консорциумом.
- Выявление особенностей периодического и непрерывного процессов сбраживания крахмала в присутствии и отсутствие ГЭ.

Научная новизна. Впервые изучена операционная стабильность ГЭ на основе гидрогеназ из *Thiocapsa roseopersicina* BBS и *Desulfomicrobium baculatum* и показано, что ГЭ с гидрогеназой из *T. roseopersicina* обладает высокой стабильностью. Впервые изучена зависимость энергии активации электрохимического окисления водорода на ГЭ от приложенного перенапряжения. Показана возможность работы ГЭ в режиме сенсора и в режиме генерации тока в биореакторе с водородвыделяющим микробным консорциумом. Обнаружено, что при длительном непрерывном культивировании микробного крахмалразлагающего консорциума в присутствии ГЭ наблюдаются изменения в составе продуктов брожения.

Практическая значимость. Сконструирован и апробирован биореактор для получения электричества из крахмалсодержащих сточных вод и разработана система управления этим процессом, что может служить прообразом для промышленных образцов. Полученные данные могут служить основой для дальнейшей оптимизации процесса преобразования органических отходов в электричество. Обнаружено, что обрастание ГЭ является одной из важных причин снижения его каталитической активности.

Апробация результатов исследования. Результаты работы были апробированы на следующих конференциях: 13th International Symposium on Phototrophic Prokaryotes (2009, Montreal, Canada); Всероссийский симпозиум с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (2009, Москва, Россия); 14 - Международная Пушинская школа – конференция молодых ученых. «Биология - наука XXI века» (2010, Пушкино, Россия.); The 9-th International Hydrogenase Conference (2010, Uppsala, Sweden); III Международный форум по нанотехнологиям Rusnanotech (2010, Москва, Россия); 16-я Международная Пушинская школа-конференция молодых ученых (2012, Пушкино, Россия); Школа-конференция молодых ученых «Биосистема: от теории к практике» (2010, Пушкино, Россия).

Объем и структура диссертации. Диссертация содержит 7 глав и состоит из введения, обзора литературы, описания методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы. Работа изложена на 112 страницах, содержит 8 таблиц, 31 рисунок. Список литературы содержит 306 литературных источников.

Работа была поддержана программой РАН «Химические аспекты энергетики».

Публикации по теме работы. В рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ, опубликованы 2 статьи по материалам диссертации, также опубликовано 7 тезисов докладов на российских и международных конференциях.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Интеграцию водородвыделяющего консорциума и ГЭ проводили в рабочей системе (рисунок 1), которая состоит из электрохимической ячейки, являющейся одновременно и биореактором (1), а также системы управления процессом брожения и электрокаталитического поглощения водорода ГЭ. Система управления процессом включает в себя рН-электрод (2) (Inpro 3030/120, Mettler Toledo), Pt электрод (3), ГЭ (4), вспомогательный электрод (5), контроллер рН и измеритель Eh (6) (QMbox, R-Technology, Россия), потенциостат (7) (PC-Compact, Volta, Россия). ГЭ подключается по трехэлектродной схеме (Ag|AgCl-электрод в качестве электрода сравнения и вспомогательный электрод). Регулирование рН осуществляется подачей щелочи (2 М NaOH) перистальтическим насосом (8) (77120-62 60 RPM, Masterflex, USA) из емкости (9). Система также снабжена шлангами (вакуумная резина и ПВХ (Tygon)) для подачи в ячейку аргона, емкостью для сбора газа из биореактора (10), а также газопроводом (11) и вентилем (12). Вся система располагалась в термостате. Все аппараты были подключены к компьютеру (13) для записи информации. Накопление газа в перевернутом градуированном цилиндре (10), записывалось при помощи фотосъемки (каждые

15 мин, камера (LifeCam VX-1000, Microsoft)). После эксперимента данные переводились в цифровую форму вручную.

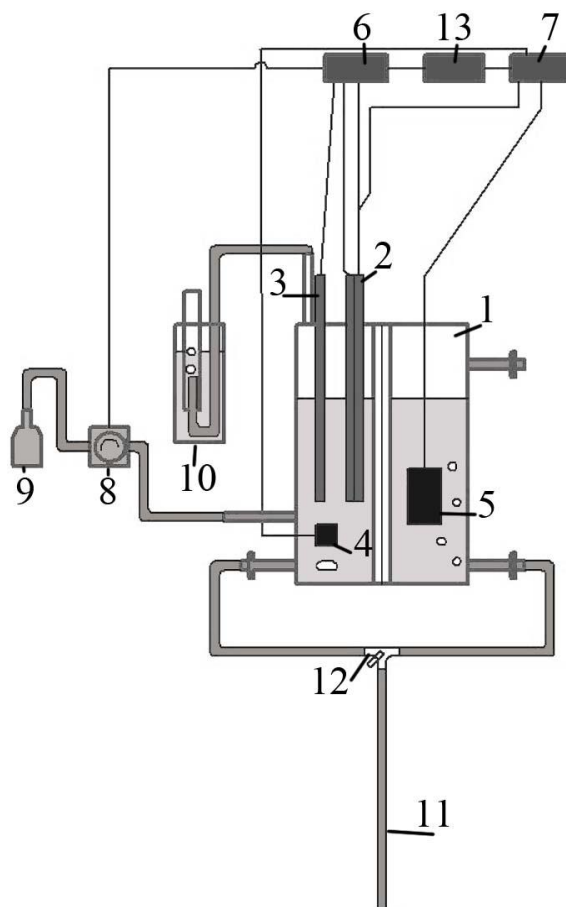


Рисунок 1. Схема рабочей системы, используемой в экспериментах.

Биореактор (рисунок 2) состоит из двух камер: рабочей (1) (65 мм x 40 мм x 32 мм) и вспомогательной (2) (52 мм x 36 мм x 32 мм), разделенных ионоселективной мембраной (3) (Nafion 125мкм) для предотвращения попадания продуктов восстановления из вспомогательной камеры в рабочую. В рабочей камере располагаются рабочий (4), pH- (5) и Eh- (6) (Pt4805-SC-DPAS-K8S/120 combination Redox, Mettler Toledo) электроды. Все три электрода подключены к одному электроду сравнения Ag|AgCl. Рабочая камера имеет штуцеры входа и выхода среды (7, 12), а также вывода газа (8). В рабочей камере размещается магнитный мешалник (9), перемешивающий культуральную жидкость (400 об/мин). Во вспомогательной камере (2) располагается вспомогательный электрод (10) и штуцеры входа-выхода (11). Во время экспериментов вспомогательная камера заполнялась раствором калий-фосфатного буфера (0,05 М) с 7,45 г/л KCl и pH =5,5.

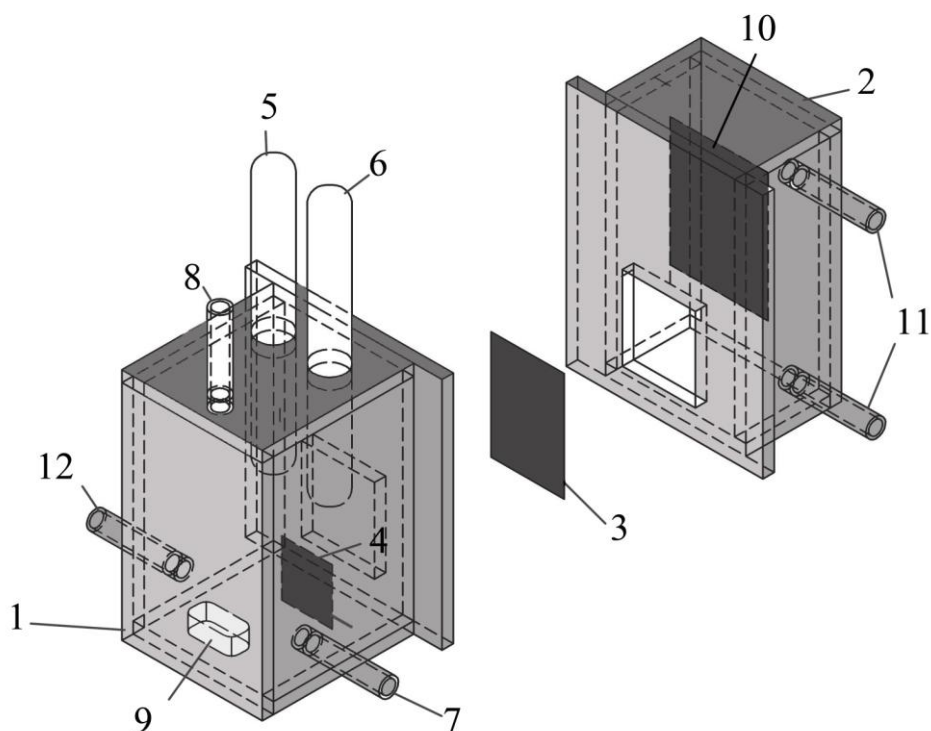


Рисунок 2. Биореактор с интегрированным ГЭ.

В экспериментах с интегрированной системой использовался микробный консорциум с преобладанием бактерий рода *Clostridium*, выделенный из силосной ямы и адаптированный для разложения крахмала Белокопытовым Б.Ф. Инокулят выращивали в пробирках Хангейта (16 мл) в атмосфере аргона после предварительного прогревания при 100⁰С в течение 10 минут (для инактивации водородпоглощающих бактерий и метаногенов).

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ

1. Изучение стабильности ГЭ во времени

Исследования стабильности ГЭ с иммобилизованной гидрогеназой из *T. roseopersicina* и *D. baculatum* проводили в потоке насыщенного водородом калий-фосфатного буферного раствора (рН=7,0) при постоянном перенапряжении (200 мВ) и температуре 30⁰С.

В первые 40 ч работы электрод с гидрогеназой из *T. roseopersicina* показывал увеличение активности на 8% относительно начального значения (рисунок 3). Затем активность падала до 90% и к концу эксперимента снизилась до 82 % (348 ч работы). Электрод с иммобилизованной гидрогеназой *D. baculatum* с первых часов работы снижал свою активность и к 163 ч сохранял лишь 20% от первоначальной активности.

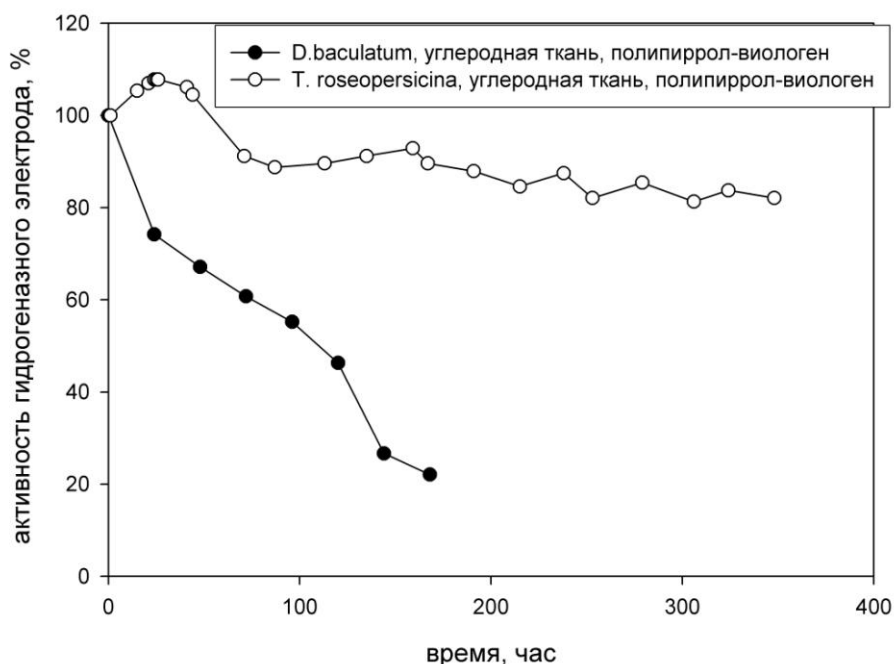


Рисунок 3. Зависимость активности ГЭ от времени.

Таким образом, ГЭ с ферментом *T. roseopersicina* более стабильны при непрерывной работе и максимальном перенапряжении, чем с гидрогеназой *D. baculatum*. Поэтому для дальнейшей работы были выбраны электроды с гидрогеназой из *T. roseopersicina* BBS.

2. Выявление основной лимитирующей стадии в процессе электрокатализа

Электрокатализ на ГЭ – сложный физико-химический процесс, включающий диффузию водорода к электроду и отток протонов от электрода, активацию молекулы водорода ферментом, перенос электронов от фермента к электроду. Если же перенос электронов происходит не прямо на электрод, а через промотор (в нашем случае электрополимеризованный нейтральный красный (НК)), то появляются еще стадии переноса электронов от фермента к промотору и от промотора к электроду. В литературе не встречаются работы по теоретическому анализу возможных лимитирующих стадий электрокатализа окисления водорода ГЭ. Вместе с тем, зависимость тока электрода от температуры позволяет оценить энергию активации реакции и на основе ее сравнения с энергией активации гидрогеназы оценить, является ли гидрогеназная активность фактором, лимитирующим электрокатализ.

Эксперименты проводились с гидрогеназой *T. roseopersicina*, иммобилизованной на углеродной ткани ЛТ 2-22/15 с электрополимеризованным НК в качестве промотора при рН-статировании (рН=7,0) в диапазоне температур от 17,5°C до 50°C.

Показано, что активность ГЭ зависит от температуры, при которой производятся измерения (рисунок 4). При этом угол наклона графика увеличивается и кривая стремится к экспоненте при низких значениях перенапряжения (5мВ, 10мВ, 25мВ). При высоких значениях перенапряжения (50мВ, 100мВ, 150 мВ) угол значительно меньше, что может свидетельствовать о лимитировании реакции скоростью диффузии водорода к электроду. В этих условиях электрод поглощает водород с более высокой скоростью, вследствие чего концентрация водорода в околоэлектродном пространстве может быть лимитирующей.

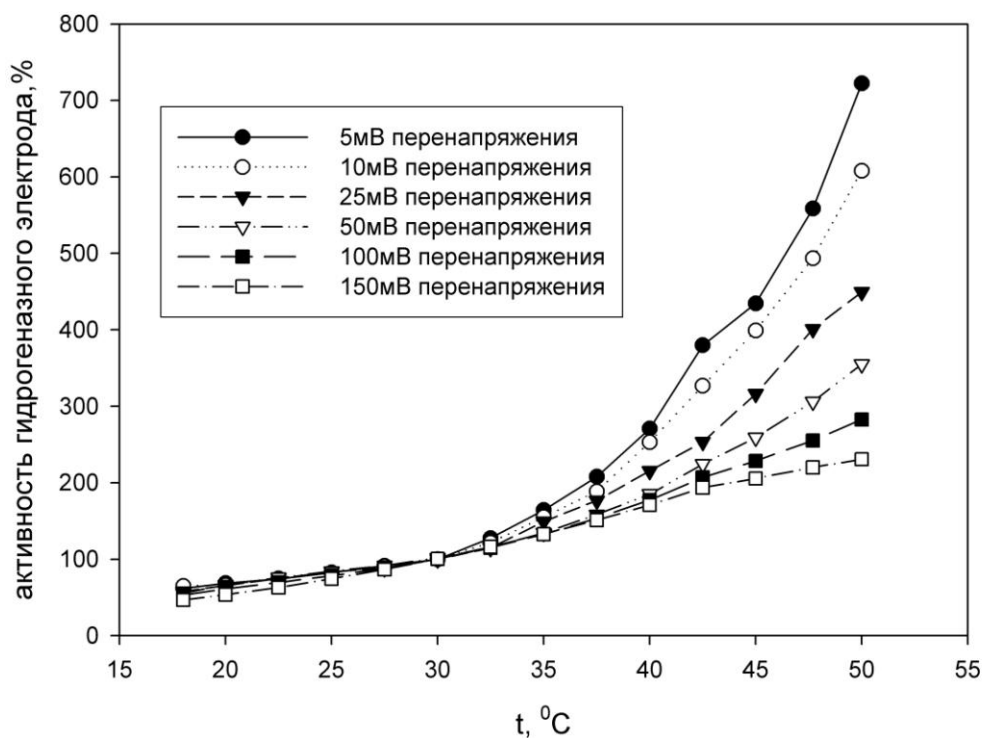


Рисунок 4. График зависимости активности ГЭ от температуры.

Была рассчитана энергия активации ГЭ для каждого перенапряжения при разных температурах:

$$d \ln K / dT = -E / (RT^2) \quad (1)$$

$$\ln K = \ln(I/I_0) = -E / (RT) \quad (2),$$

где K-константа скорости химической реакции; R-универсальная газовая постоянная; T-температура; E- энергия активации; I- сила тока на ферментном электроде; I₀- первоначальная сила тока на ферментном электроде. При этом активность ГЭ начинали измерять с потенциала, при котором каталитический ток равнялся нулю, что позволяло автоматически учитывать смещение потенциала электрода сравнения при изменении температуры.

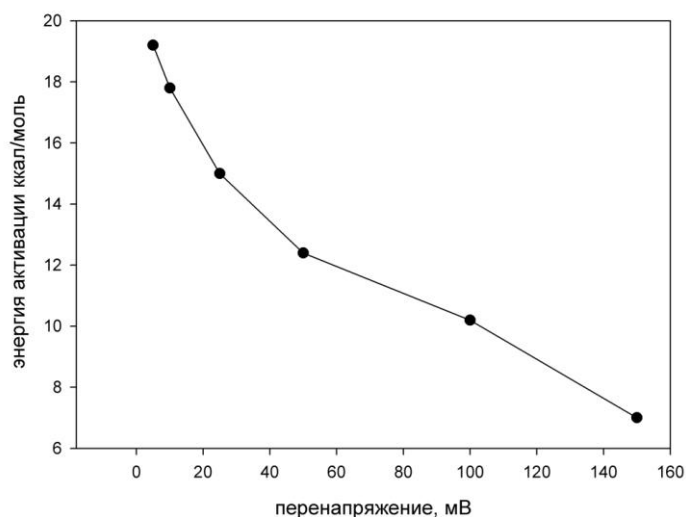


Рисунок 5. Энергия активации ГЭ в зависимости от прикладываемого перенапряжения.

На рисунке 5 изображена зависимость энергии активации от прикладываемого перенапряжения на электрод. При высоких значениях перенапряжения ($U > 100 \text{ мВ}$) энергия активации значительно меньше 13 ккал/моль (энергия активации гидрогеназы в растворе) и равна 7-10 ккал/моль, причем энергия имеет тенденцию к дальнейшему снижению при $U > 150 \text{ мВ}$. При малых перенапряжениях (менее 50 мВ) энергия активации возрастает, достигая 19,2 ккал/моль (превышая энергию активации гидрогеназы в растворе).

Энергия активации электрокатализа близка к энергии активации гидрогеназы в растворе лишь при перенапряжениях около 35 мВ. Вблизи этого перенапряжения не наблюдается относительной стабилизации энергии активации (независимость от перенапряжения), что могло бы свидетельствовать о лимитировании активности ГЭ ферментативной активностью в данных условиях. Участок вблизи перенапряжения 50 мВ не может рассматриваться и как точка перегиба графика, когда происходит смена лимитирующих стадий.

Учитывая значительное отклонение формы вольтамперных характеристик электродов от экспоненциальной при высоких перенапряжениях, можно предполагать, что в этом диапазоне лимитирующей стадией может являться перенос водорода к гидрогеназе путем диффузии. К аналогичному результату может привести и ингибирование гидрогеназы избытком протонов. Для разграничения этих возможностей необходимы дальнейшие исследования.

Вследствие сложности процессов (даже при рассмотрении системы «газ-жидкость-фермент-промотор-электрод» без углубления в каждую стадию) полученные нами результаты не позволяют сделать предположений о природе лимитирующей стадии при низких

перенапряжениях. Можно определенно утверждать лишь, что ни при каких перенапряжениях активность фермента не является лимитирующей.

3. Совмещение ГЭ и водородвыделяющих микроорганизмов

3.1. Выявление возможности работы ГЭ в биореакторе с крахмалразлагающим микробным консорциумом при периодическом культивировании

Гидрогеназа во всех изученных нами ГЭ была иммобилизована на электроде так, что белковая молекула доступна экзопротеазам, которые могут синтезироваться микроорганизмами. Поэтому возможность работы ГЭ в биореакторе с микробным анаэробным консорциумом, разлагающим крахмал с выделением водорода, требует экспериментальной проверки.

Эксперименты проводили в рабочей системе, изображенной на рисунке 1. Микробный консорциум культивировали в периодическом режиме, причем работу ГЭ проверяли в режиме сенсора (2 эксперимента) и в режиме генерации тока (3 эксперимента). Параллельно проводили культивирование микробного консорциума в таком же биореакторе без ГЭ, с использованием той же среды и того же количества инокулята.

При выращивании микробного консорциума с использованием ГЭ в режиме сенсора после сборки рабочей системы и записи вольтамперной характеристики включали регуляцию рН (5,45). Это значение рН оптимально для максимального выделения биогаза используемым нами микробным консорциумом. Ранее было показано, что ГЭ на основе гидрогеназы *T. roseopersicina* имеет оптимум в диапазоне значений рН=5,5-6,8, поэтому поддерживаемый рН=5,45 является оптимальным и для микробного консорциума, и для ГЭ. Потенциал на рабочем (гидрогеназном) электроде измеряли потенциостатом (рисунок 1, 7) в режиме гальваностата с током $I=0$ мкА. Остальные параметры измеряли и регулировали с помощью Qmbox (рисунок 1, 6).

Через 2 ч после инокуляции на Eh- и гидрогеназном электродах начиналось падение потенциала (рисунок 6), что говорит о появлении водорода в культуральной жидкости. Только через 13 ч H_2 начинал выделяться в газовую фазу и накапливаться в измерительном цилиндре. На 15 ч культивирования рН снизился до 5,45 (вероятно, за счет синтеза углекислоты и органических кислот) и при помощи автоматической системы поддерживался на этом уровне в течение всего эксперимента. Спустя 28 ч выделилось 75% от всего синтезированного H_2 . За следующие 30 ч общий объем синтезированного H_2 составил 2,4 л/л реактора. После стабилизации рН (15 ч) и до конца эксперимента значения потенциала на гидрогеназном и Eh-электродах были стабильны (-544 мВ относительно Ag|AgCl) и примерно равны с различием не более чем 5 мВ.

Полученные результаты подтверждают возможность генерации ГЭ потенциала близкого к стандартному H_2/H^+ и способность ГЭ работать в качестве сенсора водорода в культуральной жидкости при наличии микроорганизмов. В наших экспериментах показано, что и в активно растущем микробном консорциуме фермент на электроде не разлагается экзопротеазами.

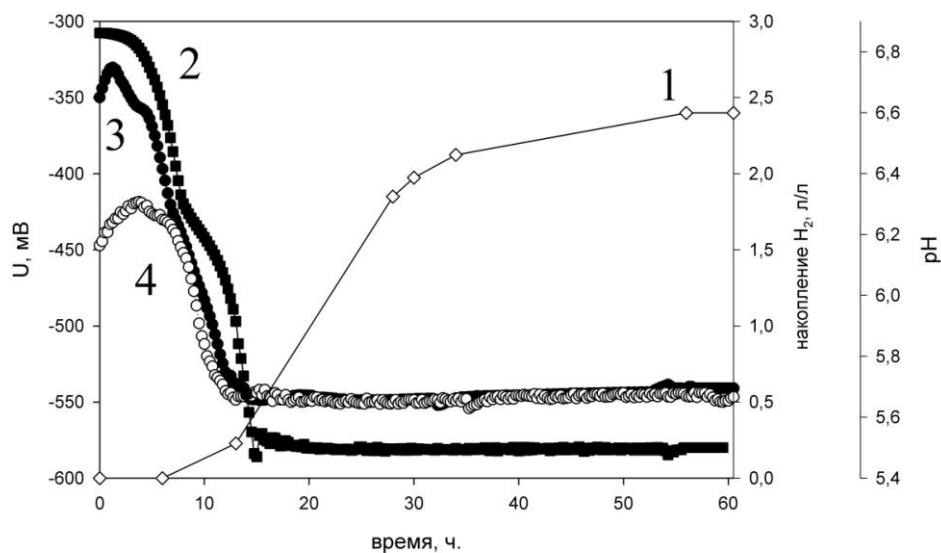


Рисунок 6. Работа биореактора в режиме сенсора. 1- накопление водорода, 2- pH, 3- Eh, 4- потенциал на ГЭ. Приведены данные типичного эксперимента.

Возможность работы ГЭ в режиме генерации тока при поглощении выделяющегося микроорганизмами водорода проверяли в той же системе. При этом культуральную жидкость заменяли средой, а инокулятом служили оставшиеся в биореакторе микроорганизмы. При работе в режиме генерации тока на 7 ч культивирования pH среды начинал падать и стабилизировался на значении 5,45 после 12 ч. Параллельно происходило снижение потенциала гидрогеназного и Eh-электродов (рисунок 7). Потенциал на ГЭ в начале эксперимента был ниже, чем Eh среды, как и в случае измерений в режиме сенсора водорода (рисунок 6). Если в первом эксперименте это могло быть связано с остатками водорода в ячейке после измерения вольтамперной характеристики, то в данном случае, это, возможно, связано с тем, что микроорганизмы, уже иммобилизованные на поверхности рабочего электрода, начинали выделять водород сразу после подачи среды с крахмалом, тогда как в среде растворенный H_2 , который и измеряется платиновым Eh-электродом, появлялся позже.

После стабилизации потенциала обоих электродов на ГЭ в режиме гальваностата подавали ток $I = 200 \mu A$, что приводило к смещению потенциала в положительную область на

35 мВ. В течение остальных 36 ч значение потенциала на ГЭ изменялось в диапазоне от -517 мВ до -486 мВ.

Через 23 ч после смены среды H_2 выделилось 2,23 л /л реактора. Синтез H_2 прекратился на 43 ч культивирования и общее количество выделившегося H_2 составило 3,43 л/л реактора. На последнем часе эксперимента началось поглощение водорода, и общий выход водорода составил 3,09 л/л реактора. Также стоит учитывать H_2 , поглощенный в электрокаталитической реакции на ГЭ. Если принять, что электрокатализ идет со 100% кулоновской эффективностью, то за 33 ч работы в режиме генерации тока было поглощено 0,13 мМ H_2 или 56,7 мл. Таким образом, объем выделившегося водорода составил 3,15 л/л реактора.

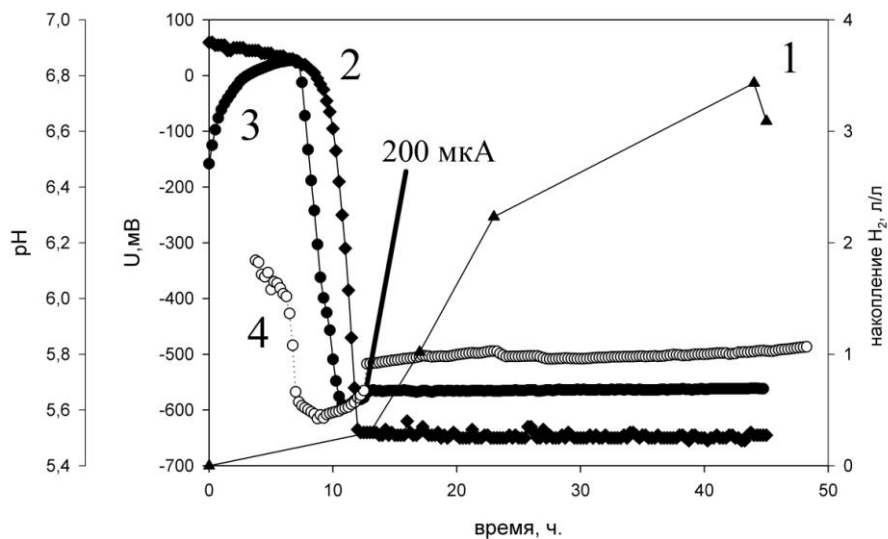


Рисунок 7. Биореактор в режиме генерации тока (200 мкА). 1- накопление водорода, 2- pH, 3- Eh, 4- потенциал на ГЭ. Приведены данные типичного эксперимента.

Перед каждым культивированием происходила запись вольтамперной характеристики ГЭ. Затем биореактор продували Ag и начинали эксперимент. На рисунке 8 изображены начальная и конечная (после 2 культивирований в режиме сенсора и 3 в режиме генерации водорода или 220 часов работы) поляризационные кривые, из которых можно судить об операционной стабильности ГЭ в среде с микроорганизмами. При перенапряжении выше 70 мВ активность ГЭ перед началом экспериментов значительно ниже, чем в конце серии экспериментов. Такое увеличение можно было бы отнести к активации фермента на электроде. Однако более вероятно, что происходит снижение вязкости среды вследствие сбраживания крахмала, что облегчает диффузию водорода. По-видимому, активность ГЭ при перенапряжении выше 70 мВ определяется не электрокаталитической реакцией, а скоростью диффузии H_2 к поверхности электрода. В свою очередь ток, генерируемый ГЭ при перенапряжении ниже 70 мВ, показывает каталитическую активность ГЭ (отсутствие влияния

диффузии) и может учитываться в операционной стабильности. На основании этих данных можно сделать вывод, что ГЭ после эксплуатации в биореакторе с микробным консорциумом может сохранять не менее 81% от начальной активности.

Таким образом, ГЭ способен к электрохимической генерации тока при поглощении H_2 , выделяемого микробным консорциумом. При этом после 220 ч работы в среде с микроорганизмами ГЭ терял не более 20% своей активности, что сопоставимо с его стабильностью в буферном растворе (рисунок 3).

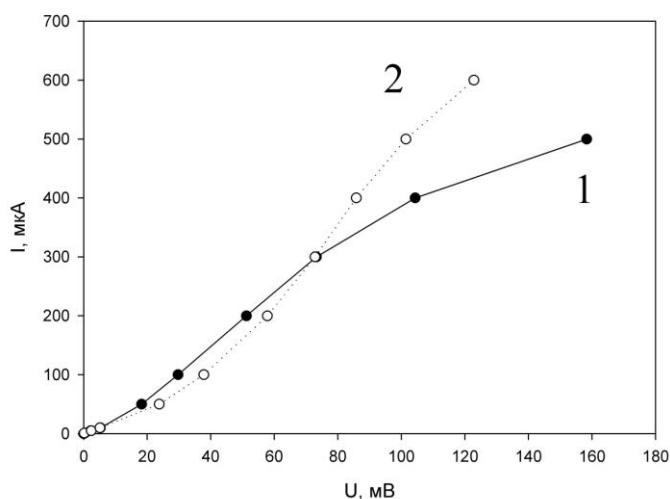


Рисунок 8. Операционная стабильность ГЭ. 1- начальная поляризационная кривая. 2- конечная поляризационная кривая.

3. 2. Изучение влияния поглощения водорода ГЭ на метаболизм микробного консорциума

Для изучения влияния ГЭ на метаболизм микробного консорциума проводили серию экспериментов в режиме потенциостата. На ГЭ прикладывали перенапряжение 50 мВ или 100 мВ. Выделение водорода (рисунок 9) проходило те же стадии, что и в режиме гальваностата (200 мкА): 1-2 ч начало выделения, через 19 ч синтезировалось около 70% от всего выделившегося водорода. Скорость выделения водорода к 3 ч культивирования при перенапряжении 50 мВ была максимальной и составляла 0,38 л/л реактора, а к концу эксперимента снизилась до нуля. При перенапряжении 100 мВ на 8 ч скорость выделения H_2 достигла максимума 0,29 л/л реактора. Изменение тока, генерируемого ГЭ, коррелировало со скоростью выделения водорода: в первые часы ферментации ток возрастал, затем достигал пика, и к концу эксперимента имел наименьшие значения.

Хотя в конце ферментации скорость выделения водорода (детектируемая в цилиндре по изменению уровня жидкости) равнялась нулю, на ГЭ генерировался ток. Это может быть связано с использованием водорода, растворенного в околоэлектродном пространстве, за счет

продолжающегося выделения H_2 иммобилизованным на поверхности ГЭ микробным консорциумом. При этом в эксперименте с прикладываемым перенапряжением в 50 мВ

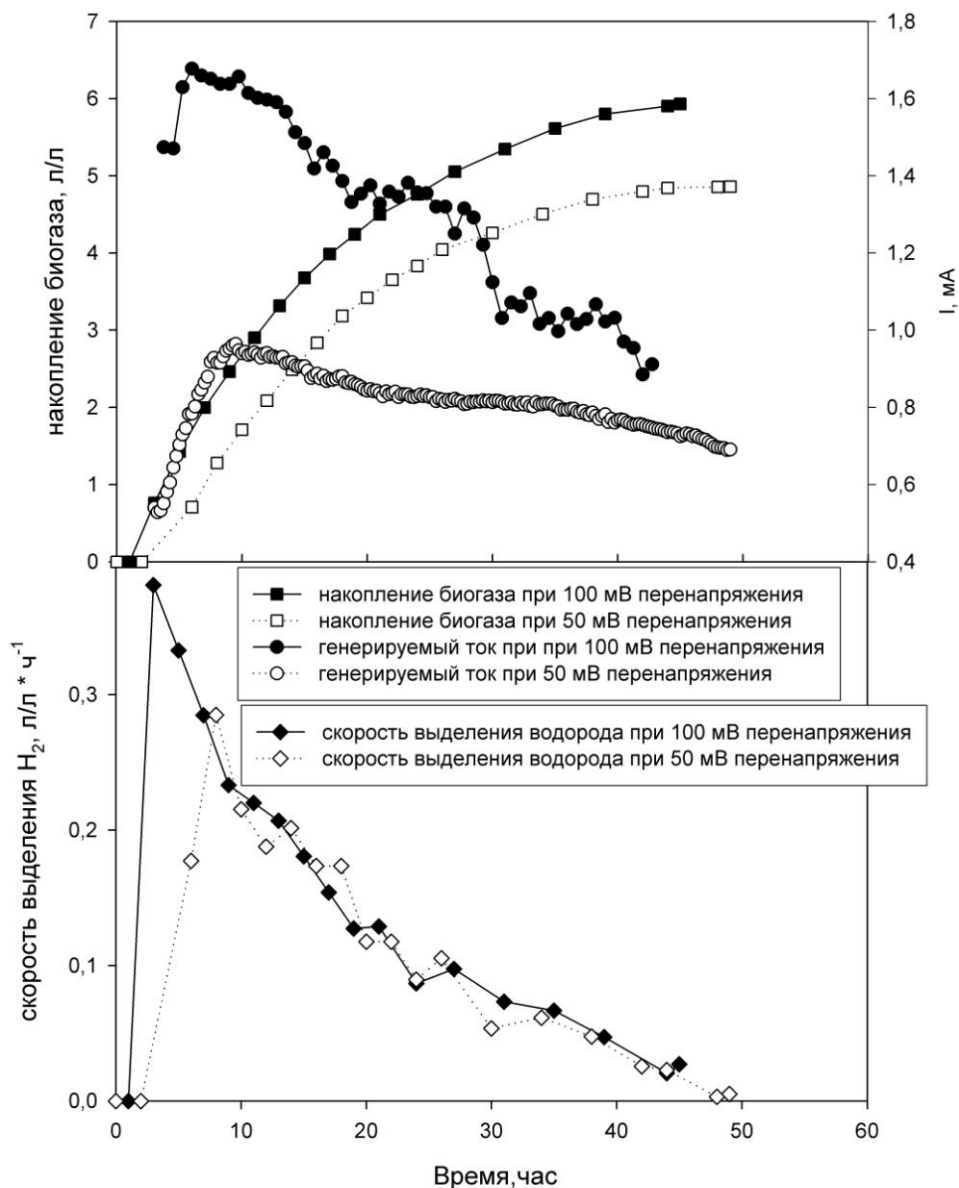


Рисунок 9. Зависимость тока, генерируемого ГЭ, скорости выделения водорода и накопления H_2 от времени.

генерируемый ток колебался в диапазоне 0,53 - 0,96 мА, в то время как в случае с перенапряжением в 100 мВ - от 0,89 до 1,3 мА.

Для оценки влияния ГЭ на метаболизм микробного консорциума производили анализ продуктов брожения при работе ГЭ в режиме гальваностата (200 мкА) и потенциостата (50 мВ и 100 мВ перенапряжения) и в биореакторе без ГЭ (контроль). Данные представлены в таблице 1. Основными продуктами брожения были ацетат (33-47 мМ) и бутират (56-63 мМ). В следовых количествах присутствовали: лактат, пропионат, изобутират (данные не приведены).

Таблица 1. Основные продукты ферментации микробного консорциума, культивируемого в биореакторе без ГЭ и с ГЭ в режимах гальваностата (200 мкА) и потенциостата (50 мВ и 100 мВ перенапряжения).

Продукты ферментации	Условия ферментации					
	I		II		III	
	-ГЭ	+ГЭ1	-ГЭ	+ГЭ2	-ГЭ	+ГЭ3
Начальная глюкоза (н. г.), М	0,1	0,1	0,1	0,1	0,09	0,09
Остаточная глюкоза; М/М н. г.	0,1	0,12	0,19	0,22	0,07	0,17
Ацетат, М/М н. г.	0,5	0,4	0,42	0,45	0,37	0,36
Бутират, М/М н. г.	0,61	0,56	0,56	0,62	0,67	0,68
Водород, л/л; М/М н. г.	3,26 1,42	3,1 1,22	3,2 1,31	3,51 1,31	2,47 1,1	2,64 1,16
Потребленный водород, л/л; % от общего	0 0	0,08 2,7	0 0	0,2 5,7	0 0	0,41 18,5
Количество углерода в продуктах, % от н. г.	90,4	96,1	88,4	103,1	87,5	102,8

Примечания:

+ГЭ1 - режим гальваностата (200 мкА);

+ГЭ2 - режим потенциостата (50 мВ перенапряжения);

+ГЭ3 - режим потенциостата (100 мВ перенапряжения).

Количество выделенного водорода варьировало в диапазоне 2,47-3,26 л/л реактора, причем потребление ГЭ водорода составило 0,08 л/л реактора (режим гальваностата), 0,2 л/л реактора (режим потенциостата при перенапряжении 50 мВ) и 0,41 л/л реактора (режим потенциостата при перенапряжении 100 мВ), что составляло 2,7%, 5,7% и 18,7% от всего выделившегося водорода, соответственно. Доля углерода в продуктах брожения по отношению к углероду питательной среде составляла от 87,5% до 102,8% .

Таким образом, показана способность ГЭ потребить до 18,7% выделившегося H_2 , причем скорость и доля потребления водорода лимитировалась не скоростью его выделения и не электрокаталитической активностью ГЭ, а доступностью водорода. При этом даже при максимальном количестве потребленного водорода нами не было замечено значительного изменения продуктов брожения, т.е. поглощение повышенного количества водорода не приводило к смещению метаболизма.

3.3. Работа ГЭ в биореакторе при проточном культивировании

Исследования проводили одновременно в двух одинаковых биореакторах: с ГЭ и без ГЭ (рисунок 2). Первые 75 ч работы биореакторы культивировали в периодическом режиме (рисунок 10). На ГЭ (в момент появления водорода в газоотводном цилиндре и стабилизации pH= 5,5) прикладывали перенапряжение в 150 мВ. На рисунке 10 мы наблюдаем сходное поведение значения силы тока с описанным ранее: в первые часы ток возрастал, затем достигал максимума (1,53 мА) и к концу культивирования был минимальным (0,3 мА).

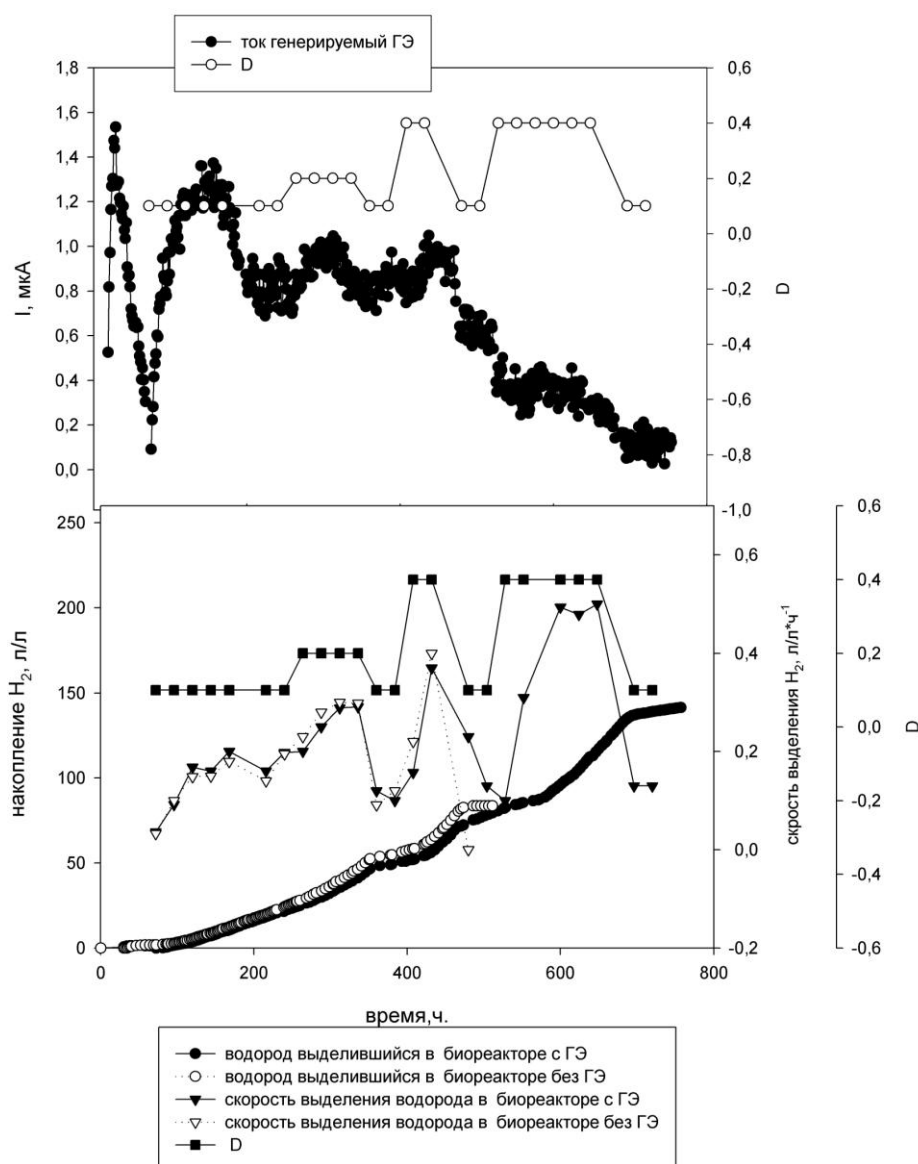


Рисунок 10. Зависимость тока, генерируемого ГЭ, скорости выделения водорода и накопления H_2 от времени при проточном культивировании.

После периодического культивирования (75 ч, рисунок 10) включили режим проточного культивирования при $D= 0,1 \text{ ч}^{-1}$, и на ГЭ прикладывали перенапряжение в 150 мВ. Мы наблюдали повышение значения тока на ГЭ с 0,091 мА до 1,37 мА, что коррелирует с соответствующим увеличением выделения водорода, обусловленного появлением крахмала. Однако значение тока на ГЭ после 160 ч начало падать и стабилизировалось только на 198 ч. Вероятнее всего, это связано с появлением биопленки на электроде за счет автоиммобилизации микроорганизмов, что создавало дополнительный барьер для диффузии водорода из среды к ГЭ.

Стабильный ток генерировался с 198 до примерно 450 ч работы, после чего началось его снижение. Можно предположить, что это также связано с продолжением увеличения толщины биопленки на ГЭ, что приводило к снижению скорости диффузии водорода к ГЭ. В пользу этого предположения свидетельствуют фотографии ГЭ до и после эксперимента (рисунок 11), из которых видно наличие 1-2 мм биопленки, образовавшейся на ГЭ после проведения длительного эксперимента.

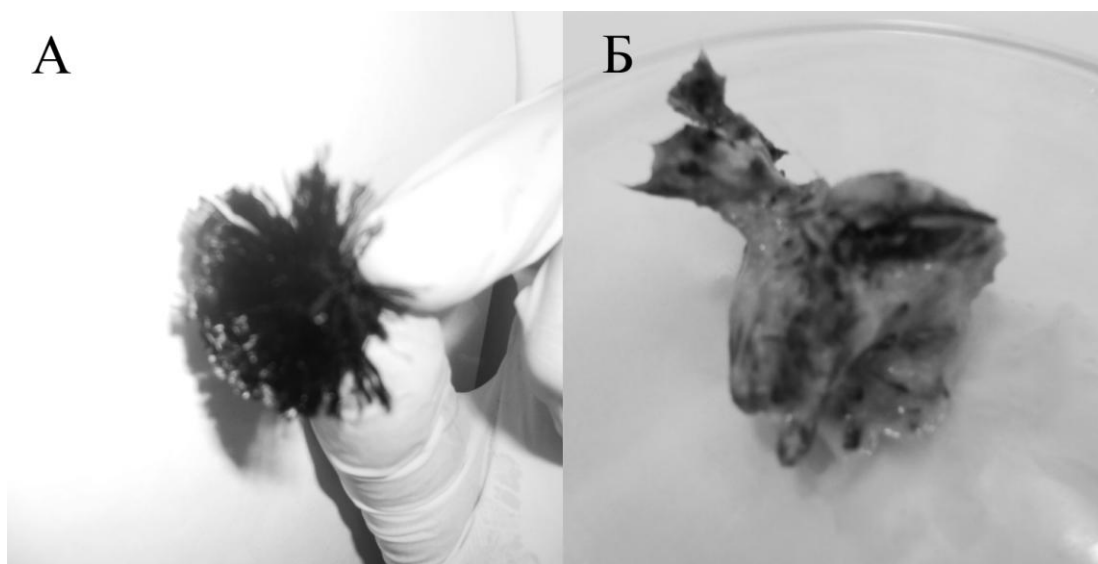


Рисунок 11. ГЭ до эксперимента (А) и после его окончания (Б).

Нами также были измерены вольтамперные характеристики ГЭ до и после его применения в биореакторе (рисунок 12). Как до, так и после эксперимента при перенапряжении больше 20 мВ генерируемый ток определялся в большей степени диффузионными ограничениями, что следует из вида кривых. Однако генерируемый ток ГЭ после эксперимента был значительно ниже и составлял 31% при 20 мВ и еще меньше при дальнейшем увеличении перенапряжения. Очевидно, наличие 1-2 мм биопленки на ГЭ после ферментации играет важную роль в ограничении скорости диффузии водорода к электроду.

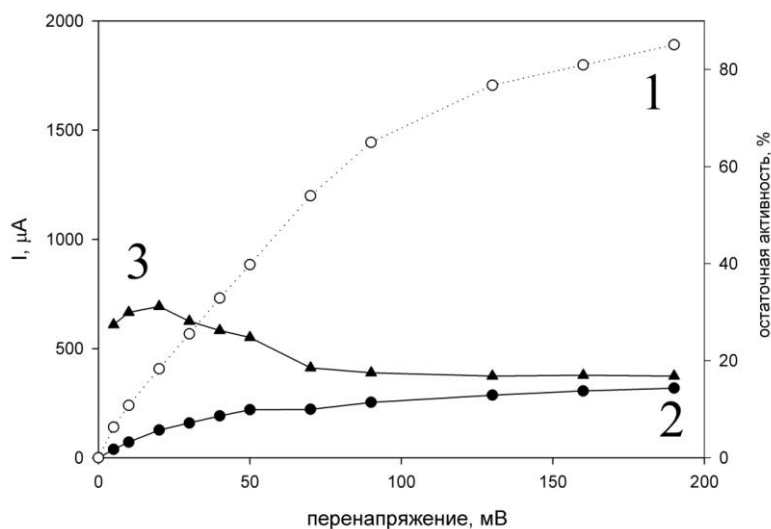


Рисунок 12. Операционная стабильность ГЭ при проточном культивировании. 1- начальная поляризационная кривая, 2- конечная поляризационная кривая, 3- остаточная активность.

Для изучения влияния проточного культивирования на работу биореактора использовали три скорости потока – 0,1, 0,2 и 0,4 ч⁻¹, причем скорость 0,1 ч⁻¹ принимали за контрольную. После относительной стабилизации скорости выделения водорода на изучаемой скорости потока (0,2 ч⁻¹ и 0,4 ч⁻¹) снова устанавливали скорость потока 0,1 ч⁻¹. За 100% в каждом случае принимали усредненные значения скорости выделения водорода и электрокаталитического тока для скорости потока 0,1 ч⁻¹ до и после изучаемой скорости потока (рисунок 10).

В таблице 2 приведены относительные значения тока ГЭ и скорости выделения водорода. При увеличении скорости потока до 0,2 ч⁻¹ скорость выделения водорода увеличилась в биореакторе с ГЭ примерно на 60%, а в биореакторе без ГЭ на 86%. При этом увеличение скорости потока приводило к незначительному увеличению электрокаталитического тока (19%). При скорости потока 0,4 ч⁻¹ скорость выделения водорода увеличивалась как в реакторе с ГЭ (в 2,7 раза), так и в реакторе без ГЭ (в 3,1 раза), тогда как увеличение тока составляло лишь 14%.

Увеличение скорости выделения водорода при увеличении скорости потока в наших экспериментах возможно связано с субстратным лимитированием, хотя при всех скоростях потока на выходе и обнаруживалось до 30% исходной глюкозы (таблица 2). Можно предположить, что основным компонентом, выделяющим Н₂ в наших экспериментах, была биопленка, а не суспензия, вследствие высокой скорости потока. В этом случае можно

полагать, что увеличение скорости протока приводило к повышению концентрации крахмала вблизи биопленки, что и увеличивало скорость выделения водорода. Однако для проверки такого предположения нужны дополнительные эксперименты.

Таблица 2. Влияние скорости протока среды на значение тока ГЭ и на скорость выделения водорода микробным консорциумом.

Скорость протока, ч ⁻¹	Наличие ГЭ	I, %	Скорость выделения H ₂ , %	Содержание глюкозы на выходе, %
0,1	+	100	100	100
	-	-	100	100
0,2	+	119±3	162±20	95±19
	-	-	186±24	92±18
0,4	+	114±7	273±26	94±19
	-	-	310±20	67±14

Величина электрокаталитического тока ГЭ практически не зависела от скорости протока. Это, очевидно, связано с тем, что при любой скорости протока концентрация водорода в жидкости была насыщающей (и вследствие этого водород выделялся в газовую фазу). Каталитический же ток зависит от концентрации H₂, а не от нагрузки по глюкозе.

Основными продуктами брожения в обоих биореакторах при проточном культивировании были: водород, лактат, ацетат, бутират, и изобутират (таблица 3). В следовых количествах присутствовал пропионат (данные не приведены). Следует отметить, что микробный консорциум без ГЭ выделял водород нестабильно, и к 432 ч выделение водорода прекратилось (таблица 3). При этом изменялись соотношения других продуктов брожения: содержание лактата увеличивалось, а ацетата и бутирата – снижалось. Это свидетельствует об изменении доминантных видов в консорциуме на виды, осуществляющие молочнокислое брожение. Возможно, при других скоростях протока можно добиться стабильного выделения водорода, однако это предположение требует отдельных исследований. В отличие от этого в биореакторе с ГЭ скорость выделения водорода колебалась, но даже после 720 ч работы она составляла 0,13 л/л культуры в час, что незначительно отличается от начального значения. Однако состав других продуктов брожения не был постоянен: концентрация лактата уменьшалась с 30 мМ до 6 мМ, а бутирата увеличивалась с 22 мМ до 35,1 мМ, а ацетата - до 67 мМ (в 4 раза). Можно предположить, что увеличение образования ацетата является результатом развития синтрофных микроорганизмов в приэлектродной области. Однако в этом случае должно

происходить увеличение скорости выделения водорода с одновременным увеличением каталитического тока электрода. В наших экспериментах этого не наблюдалось. Для выявления изменения состава микробного консорциума требуются дополнительные эксперименты.

Таблица 3. Продукты ферментации микробного консорциума, длительно культивируемого в биореакторе с ГЭ и без ГЭ при скорости протока 0,1 ч⁻¹.

Продукты брожения	Наличие ГЭ	72-240 ч	336-384 ч	432-504 ч	496-720 ч
Н ₂ , л/л в ч	+	0,18	0,11	0,18	0,13
	-	0,16	0,1	0	-
Лактат, мМ	+	30	33	37	6
	-	22	59	74	-
Ацетат, мМ	+	17	31	33	67
	-	15	18	4	-
Бутират, мМ	+	22	24	26,5	35,1
	-	24	25	3,5	-
Изо-бутират, мМ	+	2	8	10	25
	-	0,2	0,35	0,6	-
Остаточная глюкоза, мМ	+	57	56	36	20
	-	66	59	57	-

Следует отметить, что в обоих биореакторах наблюдалось снижение содержания остаточной глюкозы в выходящей жидкости, причем наиболее заметно такое снижение наблюдалось в биореакторе с ГЭ. Это косвенно свидетельствует об увеличении биомассы микроорганизмов внутри биореактора за счет биопленки на электроде и стенках рабочей камеры, что обсуждалось выше (рисунок 11).

Таким образом, при длительном проточном культивировании наличие ГЭ оказывает влияние на стабильность выделения водорода и состав продуктов брожения. При этом микробный консорциум образует биопленку на поверхности электрода, значительно снижая его активность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработанный нами биореактор для одновременного проведения ферментации и электрокатализа оказался достаточно простым в изготовлении и удобным в эксплуатации. Кроме того, за счет трехэлектродной схемы подключения ГЭ нам удалось изучать процессы, происходящие в микробном консорциуме в присутствии работающего ГЭ, за счет исключения второго электрода топливного элемента. Диффузионные ограничения, неизбежно возникающие на мембране между двумя электродами, в используемой нами схеме подключения электродов также были исключены. При этом разработанная конструкция биореактора сходна с двухкамерными МТЭ, что позволяет в дальнейшем использовать опыт, накопленный по работе МТЭ. Так как биореактор с ГЭ вместо катодной камеры имел вспомогательную (с углеродным вспомогательным электродом), нам удалось устранить контакт рабочей камеры (микробного консорциума и ГЭ) с O_2 , токсичным как для выделения H_2 , так и для ГЭ. Это позволило проводить анализ продуктов брожения, причем, как следует из наших данных, баланс углерода потребленного крахмала и углерода, находящегося в продуктах брожения, практически всегда совпадал.

Изучение операционной стабильности ГЭ, изготовленных с использованием разных углеродных матриц и промоторов, показало, что более стабильная к токсическому действию кислорода гидрогеназа *T. roseopersicina* оказалась более практична в ГЭ, чем гидрогеназа из *D. baculatum*. Работоспособность ГЭ проверена в течение более 750 ч в режиме генерации тока.

При изучении активности ГЭ в диапазоне температур нами показано, что энергия активации электрокатализа существенно зависела от перенапряжения на электроде, снижаясь при повышении перенапряжения. При этом энергия активации электрокатализа численно совпадала с энергией активации гидрогеназы лишь при 50 мВ, становясь больше при пониженных и значительно меньше при повышенных перенапряжениях. Этот факт свидетельствует в пользу того, что лимитирующая стадия биоэлектрокатализа неодинакова при разных перенапряжениях, причем ферментативная активность гидрогеназы и ее количество не являлись лимитирующими факторами. Более подробный анализ с целью выявления лимитирующих факторов при повышенных и пониженных перенапряжениях выходит за рамки данной работы.

Нами обнаружено, что ГЭ способен функционировать в одном пространстве с микробным консорциумом как в режиме сенсора, так и в режиме генерации каталитического тока. Этот факт позволяет рассматривать и в дальнейшем разрабатывать системы биоконверсии энергии органических соединений, содержащихся в отходах, в электричество. По литературным данным мощность ГЭ в условиях ТЭ в биореакторе с водородвыделяющим целлюлозолитическим консорциумом примерно в 5 раз больше чем МТЭ. Так как конверсия

отходов в электричество при помощи ГЭ делает только первые шаги и не разработаны еще биореакторы с эффективным и полным преобразованием выделяемого H_2 , можно предположить, что мощность ГЭ такого типа в будущем существенно возрастет.

Нам не удалось добиться полного поглощения выделившегося водорода на ГЭ. Однако это связано с особенностями конструкции нашего биореактора. В нашу задачу входило учесть весь выделившийся водород, и для этого его отбирали в мерную емкость, где он становился недоступным для ГЭ. Для полного преобразования выделяющегося водорода в каталитический ток следует оставлять водород в биореакторе. Однако в этих условиях важно будет уравнивать скорость выделения водорода и его поглощения ГЭ для того, чтобы парциальное давление водорода в биореакторе было невысоким и не ингибировало синтез H_2 . Нами показано, что для увеличения доли поглощенного водорода в биореакторе эффективность перемешивания не менее важна, чем площадь ГЭ. Более того, увеличение площади ГЭ в 4 раза не приводило к четырехкратному увеличению каталитического тока именно вследствие диффузионных ограничений, что коррелирует с литературными данными об отсутствии пропорционального возрастания мощности при увеличении площади поверхности анода в МГЭ. По-видимому, при технологическом совершенствовании предложенной нами системы удастся добиться больших плотностей тока за счет большей доступности водорода ГЭ.

В условиях периодического культивирования наличие ГЭ не влияло на тип брожения, осуществляемый микробным консорциумом независимо от количества потребленного H_2 при электрокатализе. Возможно, это связано с тем, что для изменения спектра продуктов брожения необходимо изменение состава микробного консорциума, что маловероятно при периодическом культивировании. При этом операционная стабильность ГЭ в биореакторе практически не отличалась от таковой в модельном буфере: после примерно 200 ч работы сохранялось больше 80% активности ГЭ. Это свидетельствует о высокой стабильности фермента.

В отличие от периодического культивирования, при длительном непрерывном культивировании обнаружено изменение выхода продуктов брожения. В биореакторе без ГЭ наблюдалось прекращение выделения водорода, увеличение образования лактата, и снижение концентрации ацетата и бутирата. Это свидетельствует об изменении состава консорциума и преобладании молочнокислого брожения. Более стабильными, очевидно, являются иммобилизованные культуры. Во всяком случае, в литературе, встречаются примеры длительного (3 года) стабильного выделения водорода из глюкозы при использовании гранул.

В биореакторе, оснащенном ГЭ, также наблюдалось изменение спектра продуктов. Однако смещение происходило в сторону образования ацетата, бутирата и изобутирата, без

существенного изменения выделения H_2 . Имеющиеся данные не позволяют сделать однозначный вывод о причинах такого смещения. Возможно, это связано с пониженным содержанием водорода вследствие его поглощения ГЭ. Не исключено, что в приэлектродном пространстве развивались синтрофные бактерии, способные к образованию ацетата и водорода из органических кислот с содержанием углерода больше 2. Хотя концентрация ацетата к концу эксперимента возрастала, не было обнаружено увеличения выделяемого H_2 , поэтому необходимы дальнейшие исследования для выяснения причин этого явления.

Подводя итог, следует отметить, что совмещение ГЭ и микробного консорциума оказалось возможным. Дальнейшее развитие таких исследований может привести к созданию технологий биологического получения водорода и электричества с одновременной очисткой органических жидких отходов.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны и апробированы биореактор и система контроля процесса для одновременного выделения водорода микроорганизмами и электрохимического окисления H_2 на ГЭ.
2. Показано, что ГЭ на основе гидрогеназы *T. roseopersicina* обладали более высокой операционной стабильностью по сравнению с ГЭ на основе гидрогеназы *D. baculatum*.
3. Впервые установлено, что энергия активации электрокатализа ГЭ на основе гидрогеназы из *T. roseopersicina* в диапазоне температур 17,5-50°C зависит от прикладываемого перенапряжения, значительно снижаясь при его увеличении.
4. Показано, что ГЭ на основе гидрогеназы из *T. roseopersicina* способен работать как в режиме сенсора водорода, так и в режиме генерации тока в биореакторе с консорциумом водородвыделяющих микроорганизмов, разлагающих крахмал.
5. В условиях периодического культивирования присутствие ГЭ не влияло на метаболизм консорциума независимо от количества потребленного водорода на ГЭ, причем ГЭ сохранял свою активность.
6. Обнаружено, что при проточном культивировании изменялся спектр продуктов брожения, образуемых микробным консорциумом из крахмала: в отсутствие ГЭ, происходит увеличение концентрации лактата, а в его присутствии преобладали ацетат, бутират и изобутират.

Публикации по теме работы. В рецензируемых изданиях, рекомендованных ВАК РФ, опубликованы 2 статьи по материалам диссертации:

1. Shastik E. S., Vokhmyanina D. V., Zorin N.A., Voronin O. G., Karyakin A. A., Tsyganko A. A. Demonstration of hydrogenase electrode operation in a bioreactor // Enzyme and Microbial Technology. -2011. –V. -49. –P. 453–458.

2. Шастик Е. С., Зорин Н. А., Цыганков А. А. Интегральная система для получения электрического тока гидрогеназным электродом расположенным в биореакторе с микробным консорциумом // Известия Тульского государственного университета. -2012. -Вып. 2. -С. 292-302.

Опубликовано 7 тезисов докладов на российских и международных конференциях:

1.Shastik E. S., Laurinavichene T. V., Minakov E. N., Voronin O. G., Zorin N. A., Karyakin A. A., Tsygankov A. A. Towards to integration of bacterial light- dependent hydrogen production and electricity generation // 13th International Symposium on Phototrophic Procaroyotes. Montreal. Canada. -2009. -P. 116-117.

2. Шастик Е. С., Вохмянина Д. Н., Воронин О. Г., Карякин А. А., Цыганков А. А. Совмещение микробного выделения водорода и его поглощения гидрогеназным ферментным электродом // Материалы Всероссийского симпозиума с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов». МГУ. Москва. Россия. -2009. -С. 204.

3. Шастик Е. С., Вохмянина Д. Н., Воронин О. Г., Зорин Н. А., Карякин А. А., Цыганков А. А. Совмещение микробного выделения водорода и его поглощения гидрогеназным ферментным электродом // 14 - Международная Пущинская школа – конференция молодых ученых. Биология наука XXI века. Пущино. Россия. -2010. –С. 344.

4. Shastik E. S., Vokhmyanyna D. V., Zorin N. A., Voronin O. G., Karyakin A. A., Tsygankov A. A. Combination of microbial H₂ production with its consumption by hydrogen electrode // Book of Abstracts The 9-th International Hydrogenase Conference. Uppsala. Sweden. -2010. -P. 129.

5.Шастик Е. С., Вохмянина Д. Н., Воронин О. Г., Зорин Н. А., Карякин А. А., Цыганков А. А. Генерация электроэнергии из крахмалсодержащих отходов при помощи электрода на основе гидрогеназы // III Международный форум по нанотехнологиям Rusnanotech. Москва. Россия. -2010.

6. Шастик Е. С., Зорин Н. А., Цыганков А. А. Генерация электроэнергии гидрогеназным электродом в биореакторе с водородвыделяющим микробным консорциумом // Биология наука XXI века: 16-я Международная Пущинская школа-конференция молодых ученых. Пущино. Россия. -2012. -С 290.

7. Шастик Е. С., Зорин Н. А., Цыганков А. А. Преобразование в электричество химической энергии полисахаридов в системе микробный консорциум - гидрогеназный электрод // Школа конференция молодых ученых биосистема: от теории к практике. Пущино. Россия. -2012.

Список сокращений.

МТЭ - микробный топливный элемент;

ТЭ - топливный элемент;

ГЭ – гидрогеназный электрод;

НК – нейтральный красный;

н. г. – начальная глюкоза.

Благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю д. б. н. А. А. Цыганкову. Глубокую благодарность и признательность за участие в написании диссертационной работы к. б. н. Т. В. Лауринавичене, а также всем сотрудникам лаборатории БФФО ИФПБ РАН за помощь и личную поддержку в работе над диссертацией.