

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова
Биологический факультет

на правах рукописи



САДРАДДИНОВА
ЭЛЬМИРА РАМИЗ-КЫЗЫ

**МИКРОБНАЯ ПЕРЕРАБОТКА ЦЕЛЛЮЛОЗОСОДЕРЖАЩЕГО
ОРГАНИЧЕСКОГО СЫРЬЯ В ВОДОРОД**

03.02.03 - Микробиология

03.01.06 - Биотехнология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва – 2010

Работа выполнена на кафедре микробиологии биологического факультета Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова

Научный руководитель: доктор биологических наук, профессор
Нетрусов Александр Иванович

Официальные оппоненты: доктор биологических наук
Ножевникова Алла Николаевна

кандидат химических наук
Скляр Владимир Ильич

Ведущая организация: Институт фундаментальных проблем
биологии РАН, г. Пущино, Московская область

Защита состоится « » _____ 2010 г. в _____. на заседании диссертационного совета Д.501.001.21 при Московском государственном университете имени М.В.Ломоносова по адресу: 119992, Москва, Ленинские горы, дом 1, МГУ, корп.12, биологический факультет, ауд. М-1.

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Автореферат разослан « » _____ 2010 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета, к.б.н.



Пискунова Н.Ф.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы. На сегодняшний день одной из глобальных проблем для человечества является поиск новых альтернативных источников энергии, так как современные способы ее получения путем переработки горючих полезных ископаемых (нефть, газ, каменный уголь) приводят к серьезному загрязнению окружающей среды, а цены на топливо неизбежно растут. Следовательно, становятся актуальными исследования, связанные с поиском и разработкой новых энергетических технологий, таких, как получение энергии с помощью возобновляемых источников (солнечная, энергия ветра, воды и т.д.). Одним из перспективных направлений в этой области является получение энергии путем сжигания водорода (Das and Veziroglu, 2001).

По оценкам экспертов, водород является весьма перспективным экологически чистым топливом будущего (www.biohydrogen.nl). Выбор водорода как энергоносителя определяется не только его исключительно высокой теплотой сгорания, но и практически неисчерпаемыми запасами сырья для его производства. Однако развитие водородной энергетики связано, в первую очередь, с поиском экономичных способов получения водорода. Все более многообещающими в данной области становятся микробиологические методы получения этого вида топлива. В связи с этим появился даже специальный термин — «биоводород», которым называют водород, полученный биологическим путем (т.е. с помощью микроорганизмов, например, бактерий). Запасы водорода, связанного в органическом веществе и в воде, практически неисчерпаемы. Поэтому исследования, посвященные получению биоводорода, в первую очередь направлены на использование в качестве исходного сырья органических отходов, количество которых неизбежно возрастает (Soetaert and Vandamme, 2009).

В последние 10-15 лет биоэнергетика стала самостоятельной отраслью Большой энергетики, и во всем мире, включая Россию, ведутся активные исследования в области получения альтернативных источников энергии, в частности водорода, с помощью микроорганизмов. Исходя из вышеизложенного, исследования, посвященные поискам и разработкам систем получения топливного водорода с помощью микроорганизмов из возобновляемых растительных отходов (целлюлозы), следует считать крайне актуальными и своевременными.

Исследования проведены при финансовой поддержке федеральной целевой программы Министерства образования и науки Российской Федерации «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009 – 2013 годы в рамках реализации проекта «Проведение поисковых научно-исследовательских работ по направлению

«Производства топлив и энергии из органического сырья», ГК №П558, а так же при поддержке европейского гранта FP6 «Hyvolution» SES-6 № 019825.

Цель работы. Основной целью данной работы является разработка мембранной биореакторной системы для получения водорода из целлюлозосодержащего органического сырья.

Достижение данной цели предполагало решение следующих задач:

- скрининг микроорганизмов-продуцентов водорода, способных эффективно разлагать целлюлозосодержащее органическое сырье в анаэробных термофильных условиях;
- разработка мембранных модулей для отделения водорода из среды ферментации и оценка эффективности сепарации газов;
- интеграция мембранного модуля в ферментационную систему для переработки органического сырья в биоводород;
- разработка фототрофного биореактора для переработки продуктов первичного разложения органического сырья в водород.

Научная новизна. В работе впервые рассмотрены и предложены:

- сочетание термофильного и фототрофного анаэробных биореакторов, для непрерывного образования биоводорода при утилизации целлюлозосодержащих органических отходов;
- использование полимерных мембран для непрерывного извлечения биоводорода из культуральной жидкости в сконструированном мембранном блоке сепарации, работающем на границе раздела двух фаз (газа и жидкости);
- сочетание мембранного блока сепарации и биореакторов в одной установке, обеспечивающих эффективный процесс утилизации целлюлозосодержащих органических отходов с образованием топливного биоводорода.

Практическая значимость. Полученные в результате проведенных исследований сведения могут быть применены для разработки в дальнейшем установок для получения водорода за счет двухстадийного процесса сбраживания целлюлозы, который может быть затем очищен до степени технической чистоты с помощью мембранных газоразделяющих систем.

Подобные установки могут быть смонтированы в любой точке страны, где имеются растительные ресурсы или органические отходы для переработки, с получением водорода в качестве энергоносителя для целей локальной энергетики.

Апробация работы. Материалы диссертации были представлены на международных научных конференциях: 3-ем Московском международном конгрессе «Биотехнология - состояние и перспективы развития» (март 2006, Москва), 3-ем российско-французском семинаре «PICS» (октябрь 2006, Москва), «Permea-2007» (сентябрь 2007, Шиофок, Венгрия), "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы" (декабрь 2007, Москва), 11-я научная конференции "Экосистемы, организмы, инновации-11" (июнь 2009, Москва), «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» (декабрь 2009, Москва), «Биотехнология: экология крупных городов» (март 2010 г., Москва), EurAsiaBio-2010 (Москва, апрель 2010 г.), «Permea-2010» (сентябрь 2010, Словакия).

Публикации. По материалам диссертации опубликованы 4 статьи в рецензируемых журналах, 4 из которых – в журналах, рекомендованных ВАК, 8 тезисов докладов на международных и российских конференциях и получен 1 патент.

Объем и структура диссертации. Диссертация состоит из введения, обзора литературы, описания материалов и методов исследования, изложения результатов и их обсуждения, выводов и списка цитируемой литературы (129 литературных источников, из которых 37 отечественных и 92 иностранных). Работа изложена на 115 страницах, содержит 19 таблиц и 52 рисунка.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

ОБЪЕКТЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Объекты исследования. Для выделения сообществ целлюлозолитических микроорганизмов, способных активно образовывать водород при разложении целлюлозосодержащего органического сырья производили отбор следующих образцов из различных экологических ниш, в которых теоретически возможен данный процесс: ил закрытого пресного водоема, разложившиеся образцы камыша (прикорневая часть, корни), опад полуразложившейся листвы из лесного водоема, содержимое кишечника различных видов тараканов (американского, мадагаскарского, черного, туркестанского), содержимое кишечника термитов, дождевой червь (целиком, включая содержимое кишечника), образцы

компостированного жома красного и белого винограда (из различных резервуаров), образцы химуса толстого кишечника антилопы Гну, зебры, жирафа, черной антилопы, пони, слона, пулированные пробы навоза коров, образцы содержимого горячих гейзеров из Долины гейзеров на полуострове Камчатка и т.д. Пробы отбирали в различные температурные сезоны, в анаэробные герметичные флаконы. Всего было отобрано более 42 образцов. Культивирование вели на двух типах питательных сред.

Для решения поставленных задач по второму (световому) этапу преобразования целлюлозы в водород из коллекции кафедры микробиологии МГУ была подобрана культура фототрофных микроорганизмов *Rhodobacter capsulatus* В 10, использующих продукты первой стадии разложения целлюлозы (ацетат и лактат), как самый эффективный продуцент водорода из числа исследованных культур (Зотова, 2004).

Культивирование. Выделение сообществ водородобразующих целлюлозолитиков проводили на двух средах: среде Имшенецкого для выделения анаэробных целлюлозолитиков состава (г/л): NaNH_4PO_4 - 1,5; K_2HPO_4 - 0,5; KH_2PO_4 - 0,5; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,4; NaCl - 0,1; $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - следы; $\text{Fe SO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - следы; CaCO_3 - 2,0; пептон - 5,0. pH среды - 7,0 - 7,2 до стерилизации;

и среде DSM 640 состава (г/л): NH_4Cl - 0,9; KH_2PO_4 - 0,75; K_2HPO_4 - 1,5; дрожжевой экстракт («Difco») - 1,0; цистеин (в виде 25%-го раствора) - 2 мл/л, микроэлементы - 1 мл/л. Раствор микроэлементов имел следующий состав (мг/л): $\text{FeCl}_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ - 1,5; ZnCl_2 - 70,0; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ - 100,0; H_3BO_3 - 6,0; $\text{CoCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ - 190,0; $\text{CuCl}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ - 2,0; $\text{NiCl}_2 \cdot 6 \text{H}_2\text{O}$ - 24,0; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ - 36,0; Na_2WO_4 - 15,0; $\text{Na}_2\text{SeO}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ - 15,0.

В качестве источников углерода использовали фильтровальную бумагу в количестве 15,0 г/л или целлобиозу в количестве 7,5 г/л. Растворы цистеина и микроэлементов готовили отдельно и добавляли непосредственно перед засевом. Степень анаэробности среды отслеживали по изменению окраски раствора резазурина (0,15 г/л), который добавляли в количестве 1 мл/л.

Для культивирования применяли модифицированную технику Хангейта (Митрофанова, 1995). Объем посевного материала составлял 10% от общего объема среды. Культивирование образцов вели при двух температурных режимах - 60°C и 70°C в условиях перемешивания на качалках (фирмы New Brunswick) с частотами вращения 35 и 50 об/мин.

Культивирование клеток *Rb. capsulatus* В10 проводили на модифицированной среде Ормерода не содержащей связанного источника азота следующего состава (г/л): CaCl_2 - 0,075; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,2; $\text{FeSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ - 0,012; ЭДТА - 0,02; лактат натрия (в виде 10%-го раствора) - 0,1, дрожжевой экстракт (в виде 10%-го раствора) - 0,01, микроэлементы - 1 мл/л. Раствор микроэлементов имел следующий состав (г/л): H_3BO_4 - 2,8; $\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 2,1;

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ - 0,75; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ - 0,24; $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ - 0,04. Буферный раствор добавляли в объеме 15 мл/л, состав буфера - (г/л): KH_2PO_4 - 4,0; K_2HPO_4 - 6,0.

Посевной материал вносили в объеме 10% от общего объема среды (для выращивания планктонной культуры).

В качестве источника азота в данной среде использовали газообразный азот и одновременно этим создавали анаэробные условия. Бактерии выращивали при температуре 27° – 30°C, в условиях периодического и проточного культивирования в герметичных стеклянных флаконах объемом 120 мл, содержащих 50 мл среды или в двублочном биореакторе общим объемом 5 л.

Иммобилизация клеток. Для иммобилизации клетки предварительно выращивали до достижения стационарной фазы роста. Далее клетки отделяли от питательной среды центрифугированием (5000g, +4°C, 25 мин). Полученную биомассу суспендировали в 8% растворе ПВС в массовом соотношении 1:20. Суспензию раскапывали в стерильные планшеты и замораживали при -18°C, затем медленно оттаивали при +5°C. Полученные гранулы переносили в свежую питательную среду.

Изучение морфологии клеток. Морфологию клеток изучали методами световой и электронной микроскопии. Окраску по Граму проводили согласно общепринятой методике (Нетрусов, 2005). Эффект биофоулинга мембран, а также детальное изучение морфологии клеток полученных культур проводили на сканирующем электронном микроскопе JEOL – JSM-6380LA (Япония). Препараты для электронной микроскопии фиксировали по стандартной методике. В качестве материала напыления использовали золото и платину.

Определение продуктов брожения. Состав газовой фазы определяли с помощью метода газовой хроматографии, на хроматографе Кристалл 2000 М (Россия) с катарометром, оснащённым угольной колонкой 1000 × 2,5 мм - газ-носитель - аргон, температура термостата колонок - 150°C. Данные, полученные при проведении хроматографического анализа обрабатывали на компьютере с помощью программного обеспечения Chromatec Analytic 2.5 (Россия).

Концентрацию газа измеряли при атмосферном давлении. Избыточное давление во флаконах, образовавшееся во время культивирования, измеряли манометром и учитывали при подсчете конечной концентрации продукта.

Для определения состава летучих жирных кислот (ЛЖК - ацетата, пропионата, бутирата и др.) в культуральной жидкости в качестве продуктов брожения использовали метод газожидкостной хроматографии (ГЖХ) на приборе Кристалл 2000 М (Россия), оснащённом микрокапиллярной колонкой Zebron ZB- FFAP (15м × 0,32 мм × 0,50 мкм). Газ - носитель — аргон, расход газа - 15 мл/мин, детектор – ПИД, температура детектора - 200°C.

Измерения проводили в условиях температурного градиента в термостате от 70 до 160°C. Результаты хроматографии были обработаны при помощи программного обеспечения Chromatec Analytic 2.5 (Россия).

Для определения концентрации глюкозы и молочной кислоты использовали метод высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ). Измерения проводили на приборе «Аквилон» с УФ-детектором (Россия). В качестве подвижной фазы использовали бидистиллированную воду, которую доводили до значения pH 3,5 концентрированной серной кислотой (чда). Скорость потока элюента – 0,5 мл/мин. Разделение вели на колонке C18 (250×4,6 mm) Luna, производитель - PHENOMENEX (USA).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ОБСУЖДЕНИЕ

1. Разработка процесса термофильного сбраживания целлюлозы с образованием водорода. Первым этапом исследований стало определение возможных источников выделения требуемых микроорганизмов, подбор оптимальных условий роста продуцентов и исследование продуктов темновой ферментации целлюлозы как субстрата.

Из естественных источников обитания (гниющий стог сена, лиственный опад, ил со дна пруда, термальные источники, образцы почвы, а также симбионтная микробиота животных и насекомых) получена серия накопительных культур целлюлозолитических микроорганизмов (всего было выделено 42 термофильных микробных сообщества), образующих водород и смесь продуктов метаболизма, выделяемых в среду культивирования. В процессе работы отбирали микробные ассоциации, образующие максимальное количество водорода. Культивирование отобранных образцов продолжали на протяжении 168 часов при 60 и 70°C на среде с целлюлозой (фильтровальная бумага) в качестве субстрата.

В результате стало возможным сравнение полученных сообществ по количеству образованного водорода (рис. 1).

Как видно из представленных диаграмм, наиболее продуктивными оказались сообщества № 4, 8, и 9, то есть симбионтная микробиота пищеварительного тракта животных (корова и пони) и образцы донных осадков пресного водоема. При изучении диаграмм видно, что образование водорода сообществами при 60° С превосходит в 2-3 раза продукцию при 70° С, по этой причине дальнейшее культивирование вели при 60° С. Следует отметить, что сообщество 4, являющееся симбионтной микробиотой пищеварительного тракта коровы, предпочтительнее для процесса, вследствие большего выхода водорода. Одновременно накопительная культура проявила себя более устойчивой. Она характеризуется хорошим ростом на подобранной среде и отличается более активным разложением субстрата.

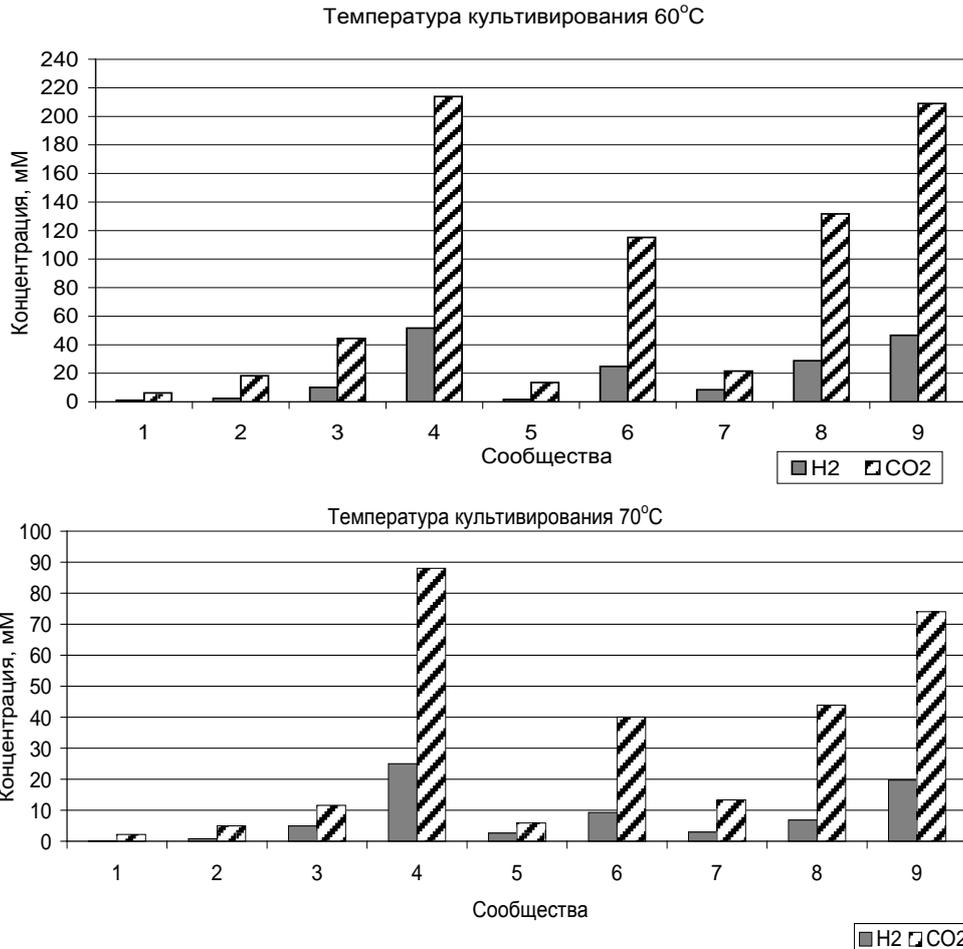


Рисунок 1. Сводные диаграммы образования газов наиболее активными выделенными сообществами на среде Имшенецкого с целлюлозой в качестве субстрата при 60°C и 70°C. Сообщества 1-3 – образцы целлюлозосодержащих органических отходов, сообщества 4-8 – симбионтная микробиота пищеварительного тракта жвачных животных и насекомых, сообщество 9 – донные осадки пресного водоема.

Параллельно были изучены продукты брожения целлюлозы в культуральной жидкости двух наиболее активных сообществ (№4 и №9) с учетом разницы мест отбора исходных образцов и двух различных сред культивирования при 60°C (Имшенецкого с целлюлозой и DSM 680 с целлобиозой, табл. 1).

Таблица 1.

Продукты разложения целлюлозы сообществами при культивировании в течение 168 ч (в мМ).

Сообщества	Субстрат	Лактат	Ацетат	Пропионат	Глюкоза	H ₂
4	Целлюлоза	30,4	8,2	0,2	0,1	51,6
9	Целлюлоза	23,1	13,6	0,0	0,6	46,7
4	Целлобиоза	29,9	21,3	0,0	26,4	65,6
9	Целлобиоза	36,8	16,9	0,0	10,3	47,2

При анализе продуктов разложения целлюлозы консорциумами анаэробных термофильных микроорганизмов было установлено, что основными продуктами гидролиза и переработки целлюлозы сообществами, помимо водорода, являются уксусная и молочная кислоты. Следует также отметить высокий уровень образованной в результате действия анаэробных целлюлаз глюкозы, накапливаемой анаэробными и термофильными консорциумами на среде 2 (таблица 1).

Подобный состав продуктов брожения (таблица 1) является предпочтительным в процессе производства водорода из органического сырья, так как уксусная и молочная кислоты являются прекрасным субстратом для H_2 -образующих аноксигенных пурпурных фототрофных бактерий.

В работе также была исследована способность использования в качестве единственного источника углерода не только чистой целлюлозы, но и различных органических целлюлозосодержащих субстратов, и образования из них водорода выделенными консорциумами (рис. 2 и 3).

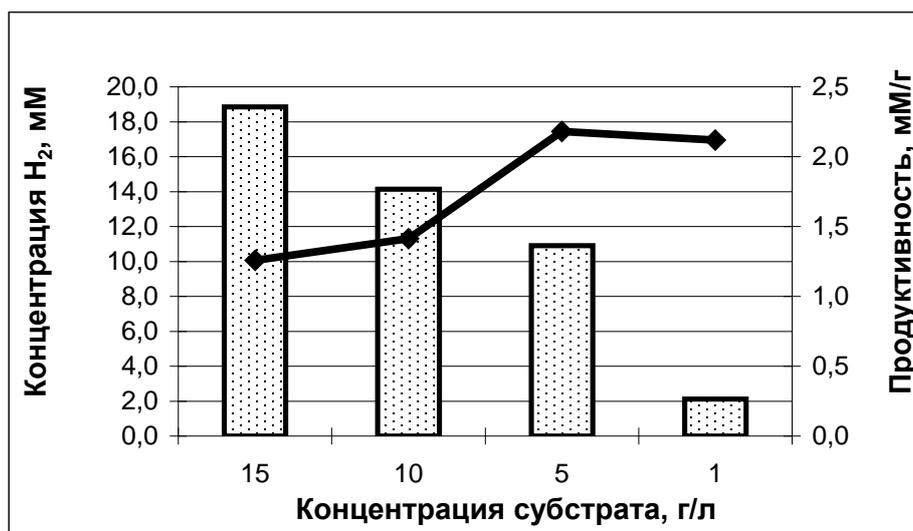


Рисунок 2. Образование водорода сообществом 4 при росте на пшеничных отрубях (при $60^\circ C$ за 24 ч). На диаграмме столбцами обозначено общее количество образованного водорода, а линейной зависимостью отображено отношение образованного водорода к концентрации субстрата в каждой точке, то есть продуктивность сообщества.

Отмечено, что наиболее эффективная конверсия происходит при росте сообщества на отрубях с концентрацией субстрата в среде 5 г/л. Также изучали сравнительную продуктивность данного сообщества при росте на фильтровальной бумаге и древесных опилках (рис. 3). Опилки перед использованием не подвергали специальной обработке для увеличения доступности субстрата микроорганизмам.

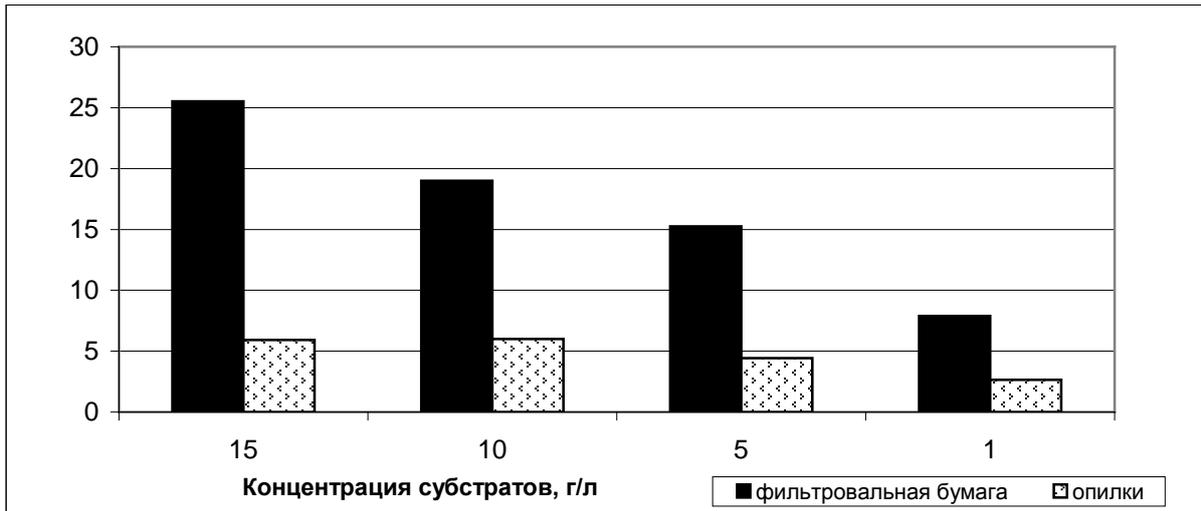


Рисунок 3. Сравнение образования водорода сообществом 4 при росте на разных субстратах (при 60°C за 168 ч). Опилки вишневого дерева (размер частиц опилок 0,1-3 мм).

Установлено, что при повышении концентрации фильтровальной бумаги образование водорода также увеличивается, однако на древесных опилках при увеличении концентрации субстрата выше 10 г/л выход водорода не растет. В результате сравнения продуктивности водорода сообществами на фильтровальной бумаге и опилках показано, что образование водорода на бумаге в 5 раз превосходит образование водорода на опилках. Однако показательно, что при всей сложности естественного субстрата, полученное активное сообщество способно его разлагать и при этом образовывать водород.

При росте сообщества 4 на целлюлозосодержащей печатной продукции (рис. 4) было показано, что наибольшее выделение водорода наблюдается при росте на журнальной мелованной бумаге.

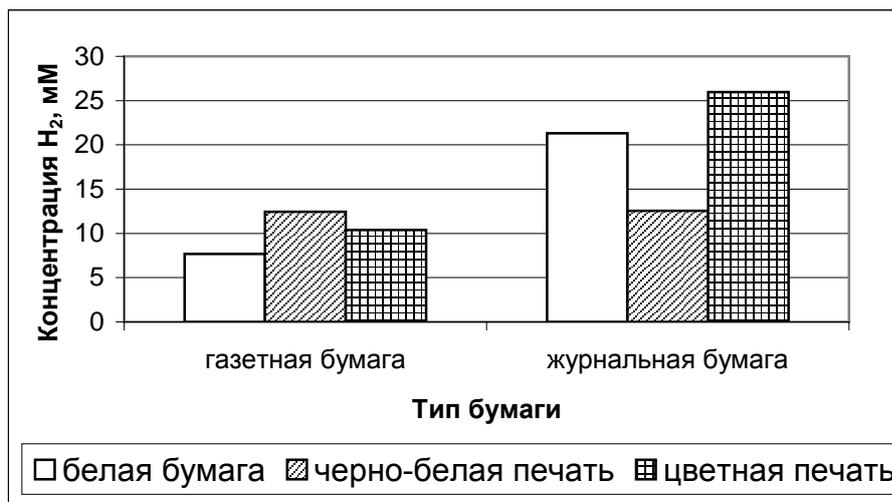


Рисунок 4. Образование водорода сообществом 4 при росте на разных типах бумаги (при 60°C за 336 ч)

Для наиболее активных сообществ также показано стабильное образование водорода при длительном культивировании консорциумов (рис 5).

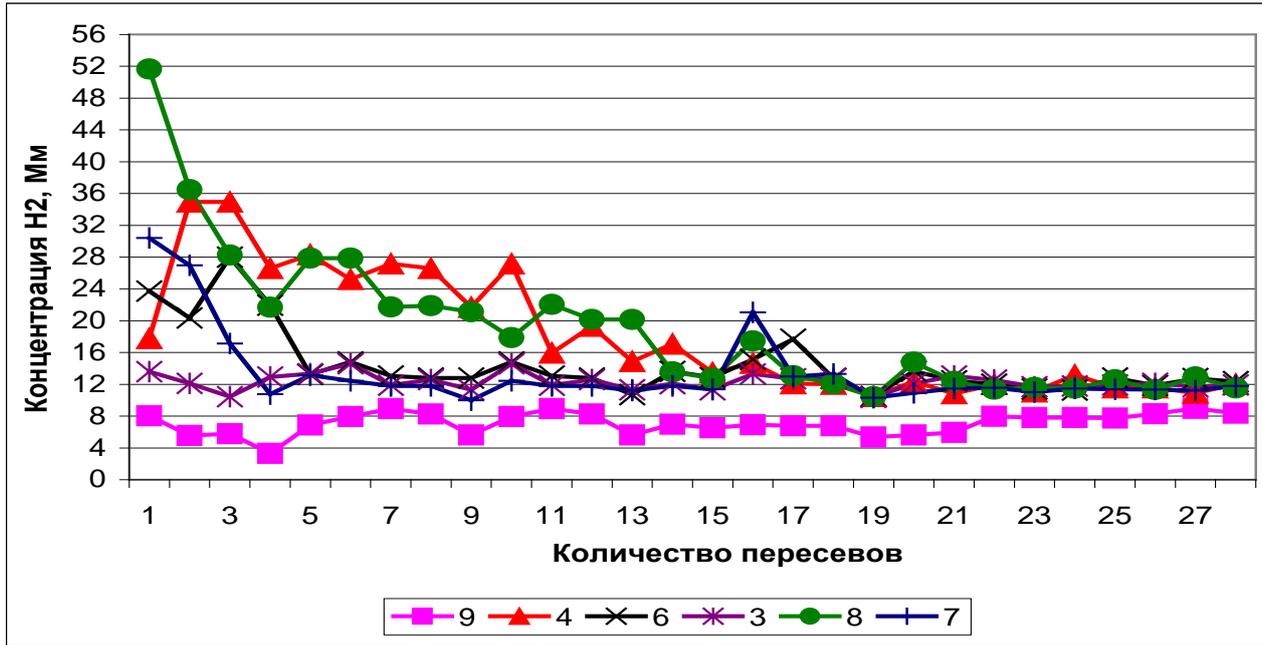


Рисунок 5. Динамики образования водорода наиболее активными накопительными культурами на целлюлозе в течении длительного времени (более 4000 часов) при периодическом режиме культивирования. Сообщество 3 – образец слоновьего навоза, сообщество 4 – образец коровьего навоза, сообщество 6 – образец коровьего навоза (другой экземпляр), сообщество 7 – образец навоза черной антилопы, сообщество 8 – образец навоза пони, сообщество 9 – образец донных осадков пресного водоема.

Помимо продуктивности, крайне интересным является вопрос о составе полученных сообществ и определении групп микроорганизмов, образующих данные консорциумы. Проведенный DGGE-анализ сообщества 4 позволил определить видовой состав последнего (рис. 6)

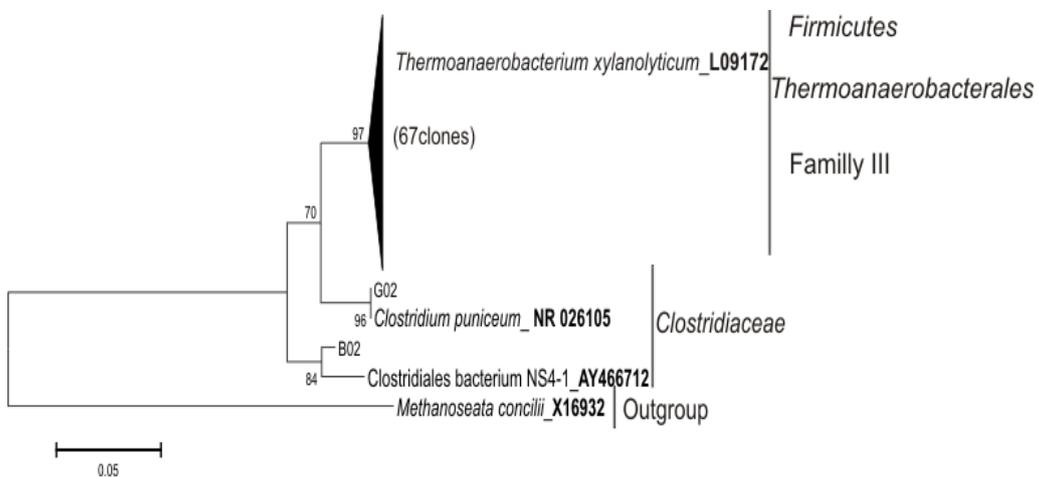


Рисунок 6. Результат секвенирования наиболее доминирующих групп микроорганизмов в сообществе 4. Масштаб – 5 нуклеотидных замен на 100 оснований.

Как видно на рис. 6, большинство различных фрагментов ДНК были идентифицированы с одним родом микроорганизмов, который очевидно является сильно преобладающим в сообществах. Этим родом является *Thermoanaerobacterium*. Микроорганизмы преобладающего рода, идентифицированные по участкам ДНК, очевидно несколько различаются на уровне штаммов или видов. Точнее анализ может быть сделан с помощью клонирования, хотя его применение позволит лишь детализировать картину и получить некоторые уточнения. Очевидно, что преобладающие формы уже выявлены.

Помимо указанного рода, в сообществах значительное место занимали представители рода *Clostridium*.

2. Фототрофная мезофильная стадия ферментации продуктов анаэробного разложения целлюлозы. На втором этапе работы были проведены исследования по способности фототрофных микроорганизмов использовать продукты темновой стадии разложения целлюлозы для образования водорода. Для этого была выбрана культура *Rb. capsulatus* B10, как самый эффективный продуцент водорода. В качестве субстрата в работе использовали лактат. Выбранная культура по производительности, количеству накопленного водорода на единицу объема среды и по удельной продуктивности процесса заметно опережала другие культуры из числа исследованных пурпурных фототрофных бактерий (Зотова, 2004). Для стабилизации клеток в стационарной фазе развития, а также с целью упрощения процедуры замены питательной среды в реакторе, была проведена иммобилизация клеток в криогель ПВС.

Культивирование иммобилизованных клеток продолжали на протяжении более чем 360 суток (рис. 7).

Установлено, что биокатализатор не теряет своих свойств на протяжении длительного периода культивирования (рис. 7). Клетки сохраняют способность к быстрому образованию водорода, что важно с биотехнологической точки зрения по дальнейшему применению метода. Более того, процесс характеризуется стабильностью и увеличением производственных параметров на протяжении времени. Была получена максимальная скорость образования водорода иммобилизованными клетками при периодическом культивировании в 247 мМ/ч*л матрицы иммобилизующего носителя (что соответствует 5528мл/ч*л*матрицы, патент РФ на изобретение № 2323975).

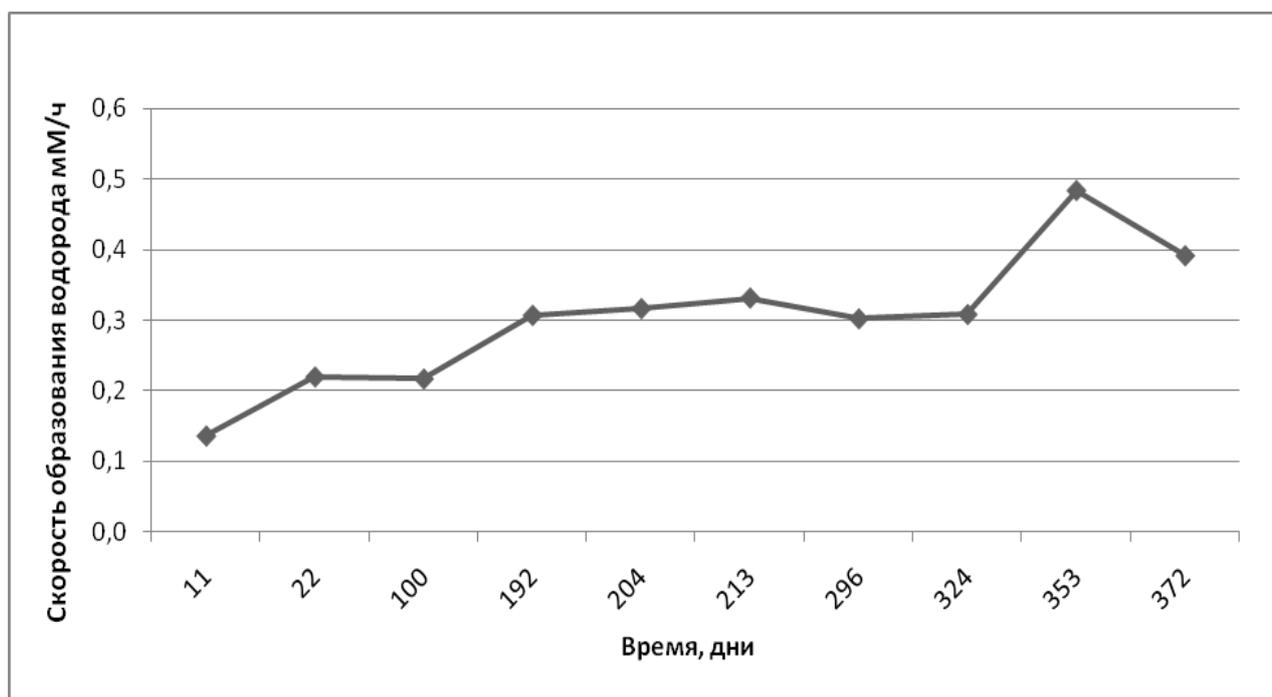
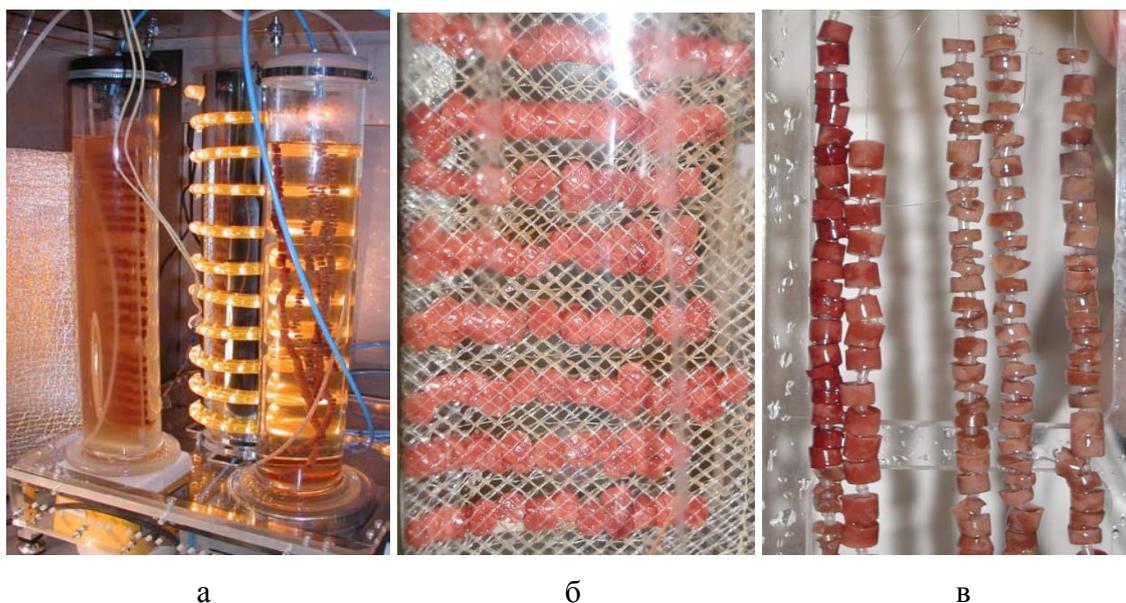


Рисунок 7. Динамика изменения скорости образования водорода иммобилизованными клетками *Rb. capsulatus* B10 в течение 360 суток периодического культивирования.

Помимо свойств непосредственно иммобилизованного биокатализатора, важную роль в реализации технологических и экономических преимуществ играет выбор условий культивирования иммобилизованных клеток, осуществляющих биокаталитические процессы. В связи с этим в работе проведено сравнение процесса образования водорода иммобилизованными клетками пурпурных бактерий *Rb. capsulatus* B10 в условиях периодического и проточного культивирования. Для этого был сконструирован двублочный фотобиореактор с различными способами закрепления биокатализатора внутри его блоков и проведена новая иммобилизация клеток в криогель поливинилового спирта.

Биореактор представляет собой 2 цилиндра, объемом по 2,5 л, содержащих по 2 л среды (рис. 8, а). Гранулы иммобилизованных клеток в первом цилиндре в количестве 330 штук находятся в карманах полипропиленовой сети, зафиксированной на рамке из органического стекла (рис.8, б). Второй цилиндр представляет собой систему, в которой на такой же рамке закреплены нити с нанизанными на них гранулами иммобилизованных клеток в том же количестве (рис.8, в). Концентрация клеток в каждом блоке реактора составила 1,34 г/л.

При исследовании динамики накопления водорода иммобилизованными клетками после каждого количественного выхода водорода на постоянные значения производили смену питательной среды на свежую.



а

б

в

Рисунок 8. Двублочный водородный фототрофный биореактор: а) общий вид; б) иммобилизованные клетки в первом цилиндре; в) иммобилизованные клетки во втором цилиндре.

Были рассчитаны величины максимальной продуктивности процесса накопления водорода иммобилизованными клетками в обоих блоках реактора для сравнения продуктивностей по водороду в зависимости от расположения гранул в реакторе. В качестве органического субстрата была использована молочная кислота. Результаты эксперимента отражены в таблице 2.

Таблица 2

Показатели, характеризующие динамику накопления водорода иммобилизованными клетками *Rb. capsulatus* В10 в условиях периодического культивирования в реакторе (на объем одного блока реактора – 2 л).

Блоки реактора	Максимальная продуктивность процесса накопления водорода, мМ/ч	Максимальная продуктивность клеток, мМ Н ₂ /г(белка)	Максимальная удельная продуктивность клеток, мМ Н ₂ /ч* г(белка)
1	0,19	281	11,70
2	0,05	74	3,06

Можно заключить, что продуктивнее оказались иммобилизованные клетки, зафиксированные в карманах полипропиленовой сети, по сравнению с таковой у клеток, нанизанных на полиэтиленовые нити.

3. Разработка мембранных систем сепарации газов. Третьим этапом работы являлось создание системы двухстадийной переработки целлюлозы в водород с непрерывным удалением водорода из ферментационной среды при помощи уникальной мембранной технологии (рис 9).

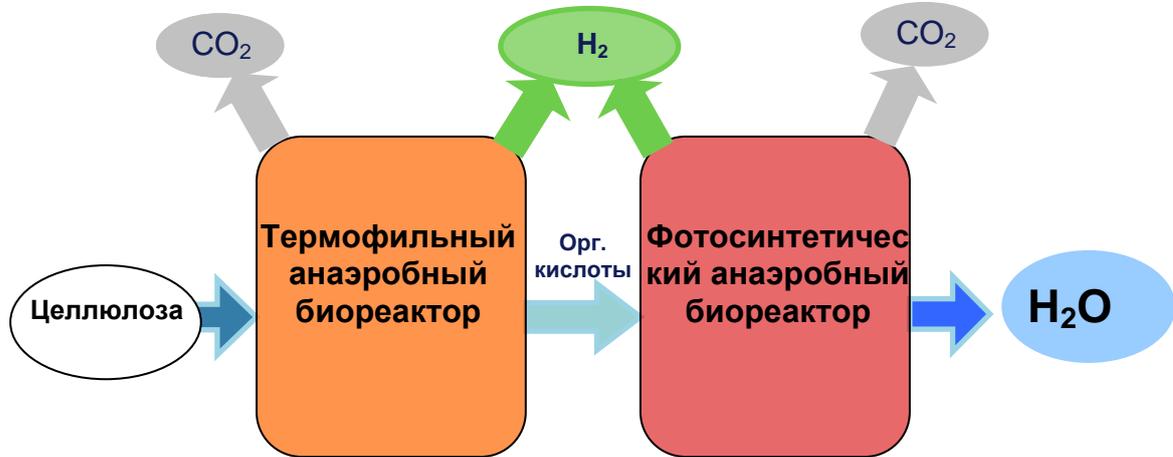


Рисунок 9. Схема работы системы двухстадийной переработки целлюлозосодержащего органического сырья в водород.

Помимо подбора субстратов и условий культивирования для термофильной стадии переработки целлюлозосодержащего органического сырья, существует также проблема ингибирования процесса накопленным водородом. Для решения данной проблемы провели разработку системы непрерывного удаления водорода из культуральной жидкости на основе полимерных мембран и мембранных контакторов. Принцип работы системы может быть описан при помощи следующей схемы (рис. 10):

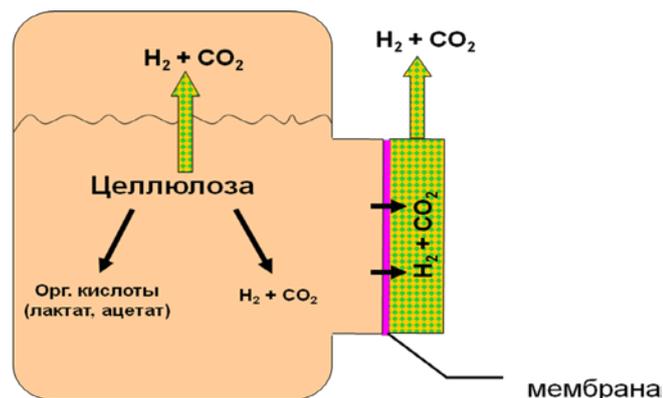


Рисунок 10. Принципиальная схема работы системы непрерывного удаления водорода из среды культивирования.

Система представляет собой ферментер, в который интегрирована полимерная мембрана, контактирующая непосредственно со средой культивирования. Через мембрану происходит отделение газов из жидкой фазы ферментера. Технология использования

мембран в подобных целях на границе раздела газ/жидкость является уникальной и не встречается в мировой практике (Netrusov et al., 2010).

В работе использовали поливинилтриметилсилановые (ПВТМС) мембраны, обладающие следующими характеристиками (табл. 3):

Таблица 3.

Характеристики высокопроницаемых мембран ПВТМС-типа

Полимер	Толщина селективного слоя, мкм	Проницаемость Q, л/м ² ч бар				
		H ₂	CO ₂	H ₂ S	NH ₃	H ₂ O
ПВТМС	0,2	2700	2600	400	6400	1,5·10 ⁵

Полимерная асимметричная мембрана ПВТМС не только имеет высокую газопроницаемость по исследуемым газам (H₂ и CO₂), но так же обладает физико-химической стабильностью. Непористая структура мембран позволяет успешно использовать их в биологических системах, так как они не подвержены механическому засорению сторонними агентами. Была показана устойчивость мембран к обрастанию микроорганизмами, а также неизменность свойств при высоких (60-70 °С) температурах (рис 11).

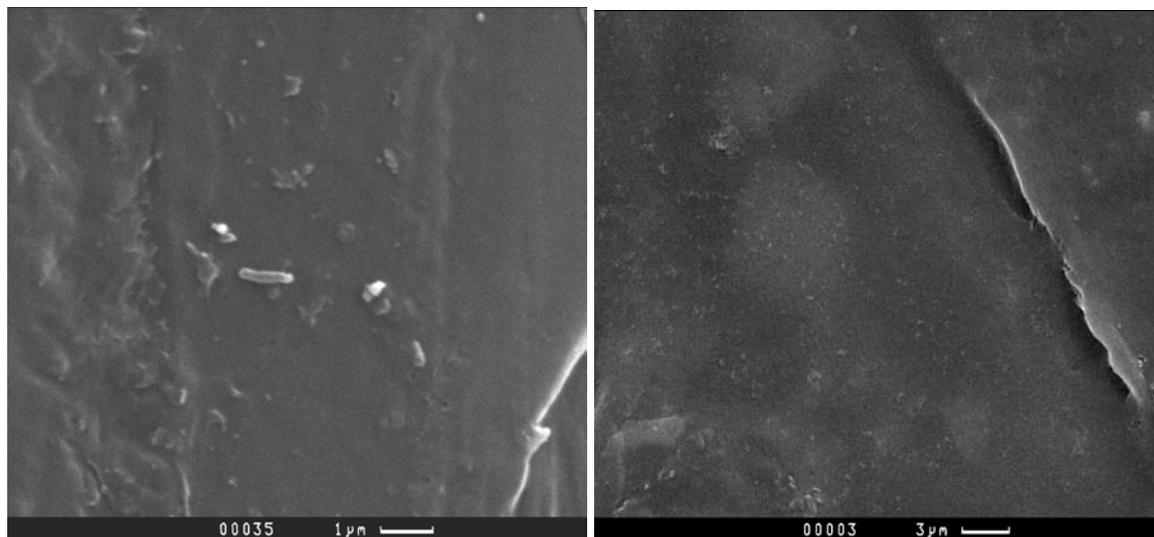


Рисунок 11. Микрофотографии СЭМ поверхности полимерных мембран ПВТМС после выдерживания их в ферментационной среде в течении 30 дней при 60 °С.

По истечении 30 дней пребывания мембран в среде культивирования в термофильных условиях на их поверхности не наблюдали каких-либо скоплений клеток или образования биопленок. Кроме того мембраны не изменили своих газоразделительных свойств.

На основе исследованных мембран были созданы несколько разновидностей мембранных модулей, подключаемых к установке переработки целлюлозы для получения водорода (рис. 12).

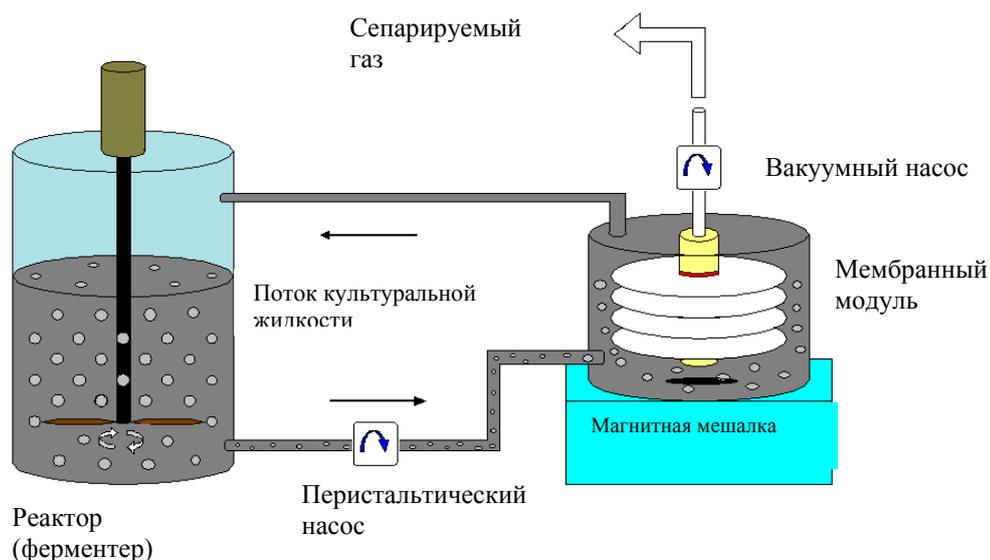


Рисунок 12. Принципиальная схема работы установки разделения. Мембранный модуль, подключен к ферментеру.

В результате работы сконструированного мембранного модуля подключенного к ферментеру (рис. 12), в котором вели культивирование полученного ранее сообщества микроорганизмов №4 на среде с целлюлозой была достигнута скорость образования водорода 68 мМ/ч (что соответствует 1,52 л/ч) при температуре культивирования 60°C в сравнении с максимальной скоростью в 20 мМ/ч, полученной при периодическом культивировании в стандартных условиях без барботирования (рис 13).

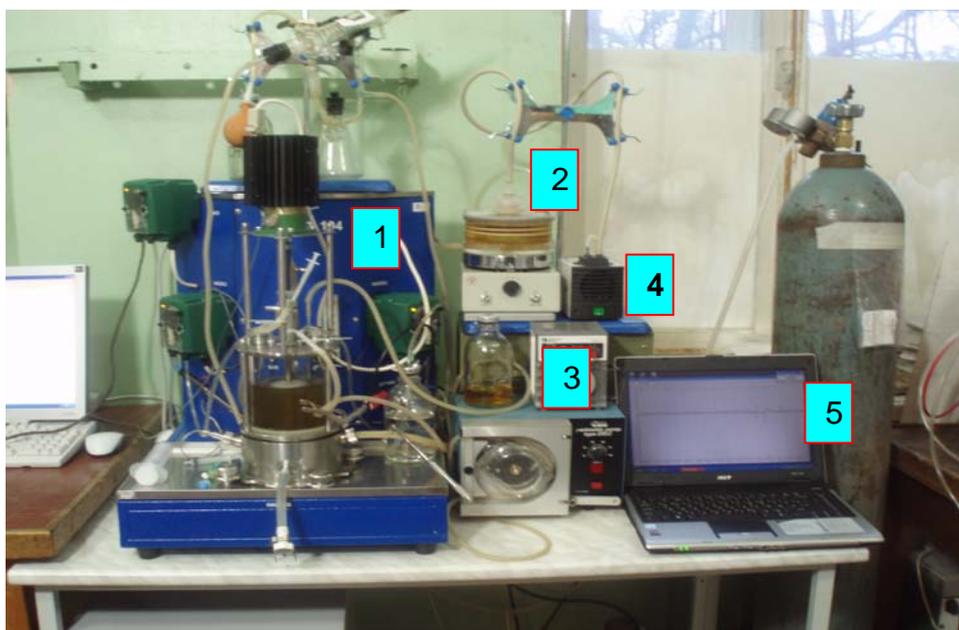


Рисунок 13. Общий вид мембранной биореакторной системы: 1 – анаэробный водородный биореактор, 2 - мембранный блок сепарации, 3 – перистальтический насос, 4 – вакуумный насос, 5 – программный контроль процесса ферментации.

Данные результаты подтверждают целесообразность применения мембранных технологий сепарации газов непосредственно из культуральной жидкости. Предложенная технология позволяет увеличить продукцию водорода, а также облегчает дальнейшую очистку газовой смеси, поступающей из реактора (отсутствует разбавление газовой смеси дополнительными компонентами, как при использовании стандартной технологии сдувки водорода инертными газами аргоном или азотом).

На основании полученных выше данных и с учетом особенностей сочетания термофильного и мезофильного анаэробных биореакторов была смоделирована лабораторная система, состоящая из двух последовательно соединенных биореакторов с узлом мембранной сепарации водорода из культуральной жидкости.

Расчетное масштабирование полученной модели до уровня энерговыделения требуемого для потребления средней семьей из трех человек, показало, что для получения энергии в 195 кВт/месяц, требуется общий объем реакторов $1,14 \text{ м}^3$, что по площади может занимать около 3 м^2 . Такое количество энергоносителя затрачивается средней семьей в месяц, а анаэробный фототрофный биореактор можно использовать в качестве элемента ландшафтного дизайна.

Проведенная работа показала, что технологически возможно создание термофильной анаэробной установки разложения целлюлозы с образованием и непрерывным извлечением водорода из культуральной жидкости. Образованные в темновом процессе брожения кислоты могут быть с высокой эффективностью преобразованы в водород и углекислоту фототрофными аноксигенными пурпурными бактериями, иммобилизованными в матрице ПВС. Полученная в результате энергия в виде водорода может быть использована для целей локальной энергетики.

ВЫВОДЫ

1. Выделены активные микробные консорциумы микроорганизмов, разлагающие целлюлозу в термофильных условиях (60-70° С) с образованием водорода и жирных кислот, в основном лактата и ацетата.
2. Показана возможность использования иммобилизованных клеток несерных пурпурных фототрофных бактерий для активной переработки продуктов разложения целлюлозы (смеси лактата и ацетата), образованных в темновой стадии, в водород и диоксид углерода.
3. Впервые показана возможность использования полимерных мембран на границе раздела фаз (газ/жидкость) для непрерывного извлечения водорода из термофильной среды ферментации.
4. Показана принципиальная возможность объединения процесса термофильного разложения целлюлозы водородобразующими сообществами с узлом мембранной сепарации водорода из культуральной жидкости.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ:**Патент**

1. Садрадинова Э.Р., Зотова Н.А., Ефременко Е.Н., Нетрусов А.И. "Биокатализатор на основе иммобилизованных клеток фототрофных бактерий для получения водорода" Патент РФ на изобретение № 2323975 (10.05.2008), Бюл. № 13, приоритет от 28.08.2006.

Статьи в рецензируемых журналах

1. Гасанова Л.Г., Садрадинова Э.Р., Нетрусов А.И., Тепляков В.В., Зенькевич В.Б., Модигель М. Мембранные биореакторы для получения горючих газов. Мембраны, 2007, № 1 (33), с. 32-42.
2. Netrusov A., Sadraddinova E., Abramov S., Shestakov A., Shalygin M., Teplyakov V. Membrane-assisted separation of microbial gaseous fuels from renewable sources. Desalination and Water Treatment, Volume 14, 2010, p. 252 – 257.
3. Абрамов С.М., Садрадинова Э.Р., Шестаков А.И., Нетрусов А.И., Шалыгин М.Г., Тепляков В.В. Превращение органических отходов сельского хозяйства в топливо для альтернативной энергетики. Хранение и переработка сельхозсырья, 2010, (1) с. 8-12.
4. Нетрусов А.И., Карякин А.А., Тепляков В.В., Шалыгин М.Г., Воронин О.Г., Абрамов С.М., Садрадинова Э.Р., Митрофанова Т.И., Шестаков А.И. Основы технологии микробиологической конверсии органических целлюлозосодержащих отходов в электроэнергию через промежуточное образование биоводорода. Катализ в промышленности, 2010, 77-83.

Тезисы докладов

1. Садрадинова Э.Р., Кочеткова Н.А., Ефременко Е.Н., Нетрусов А.И. Биокаталитическая система на основе иммобилизованных клеток *Rhodobacter capsulatus* для получения молекулярного водорода. 3-й Московский международный конгресс «Биотехнология - состояние и перспективы развития», Москва, 2006, с. 209.
2. Sadraddinova E.R., Gasanova L.G., Teplyakov V.V., Netrusov A.I. The study of the process of hydrogen formation by free and immobilized cells of phototrophic and chemotrophic bacteria in batch and continuous mode of fermentation. Proceedings of 3rd French-Russian seminar PICS, Moscow, 2006, TIPS RAS, p. 102.

3. Sadraddinova E.R., Gasanova L.G., Teplyakov V.V., Netrusov A.I. The process of hydrogen formation by free and immobilized cells of phototrophic and chemotrophic bacteria in batch and continuous mode of fermentation suitable for gas phase membrane separation Proceedings of «Membrane science and technology conference of Visegrad countries PERMEA 2007» Hungary, 2007, p. 138.
4. Садрадинова Э.Р., Митрофанова Т.И., Нетрусов А.И. Изучение проблемы разложения целлюлозы и получения водорода с помощью микробных технологий. Тезисы конференции "Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2007-2012 годы" Россия, Москва, 2007, с. 58.
5. Садрадинова Э.Р., Абрамов С.М., Шестаков А.И., Митрофанова Т.И., Глазунова Е.В., Шалыгин М.Г., Нетрусов А.И., Тепляков В.В. Термофильная микробная конверсия целлюлозосодержащего органического сырья и отходов в водород с использованием мембранных технологий газоразделения. Сборник материалов Всероссийского симпозиума с международным участием «Современные проблемы физиологии, экологии и биотехнологии микроорганизмов» Москва, МГУ, Макс-Пресс, 2009 с. 159.
6. Netrusov A., Shestakov A., Voronin O., Sadraddinova E., Abramov S., Shalygin M., Teplyakov V, Karyakin A. Green energy from organic raw materials and wastes. Материалы международной научно-практической конференции «Биотехнология: экология крупных городов» (14-17 марта 2010 г., Москва), с. 293-294.
7. Нетрусов А.И., Шестаков А.И., Воронин О.Г., Садрадинова Э.Р., Абрамов С.М., Шалыгин М.Г., Тепляков В.В., Карякин А.А. Устойчивая система получения водорода и электротока при термофильной переработке целлюлозы и отходов. Сборник тезисов докладов межд. конфер. EurAsiaBio-2010 (Москва, 13-15 апреля 2010 г.), с. 136-137.
8. Netrusov A., Abramov S., Sadraddinova E., Shestakov A., Mitrofanova T., Glazunova E., Shalygin M., Teplyakov V. Thermophilic microbial conversion of cellulose-containing organic waste to hydrogen using membrane-assisted gas separation technology. Abstract book of PERMEA-2010 conference: Membrane science and technology conference of Visegrád Countries, Tatranské Matliare, Slovakia September 4-8, 2010, с.97.