



УДК 62-622

**ПОВЫШЕНИЕ ВЫРАБОТКИ БИОВОДОРОДА С ПОМОЩЬЮ НОВОЙ
СТРАТЕГИИ АУГМЕНТАЦИИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ РАЗЛИЧНЫХ
ОРГАНИЧЕСКИХ ОСТАТКОВ****П. Синха, К. Гаурав, Ш. Рой, Г. Балахандар, Д. Дас*Кафедра биотехнологий, Индийский технологический институт
Харагпур, 721302, Индия
факс: +91 3222 255303; e-mail: ddas.iitkgp@gmail.com

doi: 10.15518/isjaee.2019.34-36.026-040

Заключение совета рецензентов: 15.05.19 Заключение совета экспертов: 24.09.19 Принято к публикации: 06.11.19

Биоводород считается углеродно-нейтральным топливом, и поэтому обладает огромным потенциалом в энергетическом секторе. В настоящем исследовании рассмотрена потенциальная возможность повышения выработки водорода за счет использования в процессе его производства факультативной анаэробной бактерии, биоаугментированной облигатным анаэробом. Подход, при котором смешиваются *Klebsellia pneumoniae* и *Clostridium acetobutylicum*, привел к увеличению выработки водорода на 37 % и 18 % соответственно по сравнению с отдельным организмом. С использованием смешанной культуры также отмечено более эффективное устранение химического потребления кислорода (ХПК). Максимальные значения выработки водорода в этой аугментированной системе составили 9,47 моль $H_2/кг^{-1}$ ХПК_{сниж.} (с использованием тростниковой мелассы), 8,72 моль $H_2/кг^{-1}$ ХПК_{восстанов.} (с использованием крахмальных сточных вод) и 7,78 моль $H_2/кг^{-1}$ ХПК_{восстанов.} (с использованием сточных вод спиртового производства). Эффективность устранения ХПК при использовании различных органических отходов колеблется в диапазоне 50–70 %. Максимальные значения выработки водорода 1 125 $мл/л^{-1} \cdot ч^{-1}$, 642 $мл/л^{-1} \cdot ч^{-1}$ и 790 $мл/л^{-1} \cdot ч^{-1}$ получены при использовании соответственно мелассы, крахмальных сточных вод и сточных вод спиртового производства в режиме CSTR. Таким образом, эта биоаугментированная система может внести полезный вклад в успешную реализацию концепции «превращения отходов в энергию».

Ключевые слова: смешанная культура; режим непрерывного перемешивания (CSTR); [FeFe]-гидрогеназа; комплекс ФГЛ; биоаугментация.

**IMPROVEMENT OF BIOHYDROGEN PRODUCTION
WITH NOVEL AUGMENTATION STRATEGY USING DIFFERENT
ORGANIC RESIDUES***Pallavi Sinha, Kartik Gaurav, Shantonu Roy, G. Balachandar, Debabrata Das*

*Синха П., Гаурав К., Рой Ш., Балахандар Г., Дас Д. Повышение выработки биоводорода с помощью новой стратегии аугментации с использованием различных органических остатков // Международный научный журнал «Альтернативная энергетика и экология» (IS-JAEE), 2019;34-36:26-40.

Ранее публиковалась: International Journal of Hydrogen Energy, 2016;41:14015-14025; <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.06.233>.
0360-3199/© 2016 Hydrogen Energy Publications LLC. Published by Elsevier Ltd. All rights reserved.



Department of Biotechnology, Indian Institute of Technology
Kharagpur 721302, India
fax: +91 3222 255303, e-mail: ddas.iitkgp@gmail.com

doi: 10.15518/isjaee.2019.34-36.026-040

Referred 15 May 2019 Received in revised form 24 September 2019 Accepted 6 November 2019

Biohydrogen has been regarded as carbon neutral fuel. Thus it possesses tremendous potential in energy sector. The present study deals with the potentiality of bio-augmented facultative anaerobic bacteria with obligate anaerobe for the improvement of H_2 production. The co-culture strategy of *Klebsellia pneumoniae* and *Clostridium acetobutylicum* improved hydrogen yield by 37% and 18% respectively as compared to individual organism. COD removal efficiency was also observed higher in case of co-culture. Maximum H_2 yield by this augmented system using cane molasses, starchy wastewater and distillery effluent were 9.47, 8.72 and 7.78 mol H_2 kg⁻¹ COD reduced respectively. The COD removal efficiency using different organic residues were in the range of 50–70%. Highest H_2 production rate of 1125, 642 and 790 mL L⁻¹ h⁻¹ were observed by using cane molasses, starchy wastewater and distillery effluent respectively in CSTR. So, bio-augmented system could be helpful in realizing the goal of “waste to energy” concept.

Keywords: co-culture; CSTR; [FeFe]-hydrogenase; FHL complex; bioaugmentation.



Дебабрата Дас
Debabrata Das

Сведения об авторе: д-р наук (биоэнергетика), профессор, старший преподаватель Индийского технологического института; член 8-ми научных организаций.

Награды: несколько национальных и международных наград.

Образование: Университет Джадавпур, Калькутта; Индийский технологический институт Дели (1977 г.); степень д-ра наук в биоэнергетике (1985 г.).

Опыт работы: Индийский технологический институт Харагпур, отдел биотехнологии, ведущий кафедрой, профессор кафедры MNRE (1988 г. – настоящее время); Центр биоэнергетики, ИТИ Харагпур, профессор-руководитель (2014–2017 гг.); главный редактор Американского журнала биомассы и биоэнергетики (AJBB).

Область научных интересов: производство биоводорода из органических отходов; процесс биометанизации; биохитановый процесс, биопереработка; секвестирование CO₂; микробный топливный элемент.

Публикации: более 150, редактор 5 книг и материалов, соавтор книг «Производство биоводорода: основы и технологические достижения» и «Биохитан: топливо для будущего».

Information about the author: Ph.D. in Bioenergy, Professor of Indian Institute of Technology Kharagpur, member of 8 scientific organizations.

Awards: several national and international awards.

Education: Jadavpur University, Kolkata; the Indian Institute of Technology Delhi with degrees in Food Technology and Biochemical Engineering, 1977; Ph.D. in Bioenergy, 1985.

Experience: Indian Institute of Technology Kharagpur, Biotechnology Department, department head, professor, MNRE Chair Professor (1988–now); P.K. Sinha Center for Bioenergy, ИТ Харагпур, Professor-in-Charge (2014–2017); Editor-in-Chief of the American Journal of Biomass and Bioenergy (AJBB).

Research interests: biohydrogen production from organic wastes; biomethanation process; biohythane process; algal biorefinery & CO₂ sequestration and microbial fuel cell.

Publications: more than 150, Editor of 5 books and proceedings, co-author of the books “Biohydrogen Production: Fundamentals and Technology Advances” and “Biohythane: Fuel for the Future”.



1. Введение

На сегодняшний день одним из наиболее обсуждаемых вопросов в области энергетики и экономики являются экологически безопасные энергоносители и источники энергии. Устойчивое развитие человеческой цивилизации и использование различных энергетических ресурсов развиваются параллельно. До промышленной революции потребность в энергии удовлетворялась преимущественно дровами, которые затем, в середине XIX в., заменили углем. В XX в. преобладали более энергоемкие виды топлива, такие как нефть, бензин и природный газ. Беспечная эксплуатация ископаемого топлива привела к его истощению, а также выбросам газов (CO_x, SO_x, NO_x), что способствует глобальному потеплению. Учитыва-

вая рост спроса на ископаемые виды топлива, мировых запасов нефти и газа хватит на ближайшие 60–70 лет, поэтому незамедлительный переход от традиционных энергоресурсов к дешевым, экологически чистым и возобновляемым источникам энергии остается на сегодня одним из важнейших вопросов.

Перспективной альтернативой традиционному ископаемому топливу является водород, способный решить большинство проблем, связанных с их использованием. Водород обладает самой высокой плотностью энергии (141,8 кДж/г⁻¹) из известных видов топлива. Побочным продуктом сжигания водорода является только вода, и его можно легко преобразовать в электричество с помощью топливных элементов, обладающих высокой эффективностью преобразования. Эти свойства делают водород эффективным энергоно-



сителем, чистым и экологически безопасным топливом, которое можно использовать в качестве моторного топлива [1]. В настоящее время около 96 % водорода получают из ископаемых видов топлива со значительным количеством выбросов CO₂ [2].

Исследования в области производства биогаза также набирают обороты. Биологическое производство водорода включает биофотолитиз воды с использованием водорослей и цианобактерий, фоторазложение органических соединений фотоферментативными бактериями и темное брожение органических соединений анаэробными бактериями. Наиболее подходящим методом получения водорода из различных углеводородсодержащих органических отходов является темное брожение, которое решает сразу две задачи – получение чистой энергии и удаление отходов. Применение фермента гидрогеназы может облегчить процесс производства водорода путем темновой ферментации. В облигатных и факультативных анаэробах структура гидрогеназы различается. Как известно, такие облигатные анаэробы, как *Clostridium sp.*, *Thermoanaerobacterium sp.* содержат [FeFe]-гидрогеназу для производства водорода. [FeFe]-гидрогеназа служит посредником при переносе электрона от ферредоксина к протону, образуя, таким образом, водород. Электроны движутся к ферредоксину либо через пируват-ферредоксин-оксидоредуктазу (ПФОР), либо через NADH-ферредоксин-оксидоредуктазу (НФОР). Мультиферментная система, отвечающая за производство водорода в факультативных анаэробных установках, представляет собой комплекс формил гидрогенилазы (ФГЛ). Комплекс ФГЛ катализирует расщепление формилата на CO₂ и H₂. Наряду с электронными носителями в комплекс ФГЛ входят такие ферменты, как формил-дегидрогеназа H (FdhH) и гидрогеназа (Hud). Среди различных типов гидрогеназы, преобладающих в факультативных анаэробах, никель-железосодержащие гидрогеназы-3 (Hud-3) отвечают в основном за метаболизм водорода [3, 4]. Гидрогеназа Hud-3 является двунаправленной и действует как производящая, так и потребляющая водород, хотя при слабокислом уровне pH реакция синтеза преобладает [3]. Гидрогеназы [FeFe] и [NiFe] обладают общими механистическими особенностями катализировать взаимное преобразование водорода с протонами и электронами:



Несмотря на сходство, эти два типа гидрогеназы имеют различное происхождение [4]. Активность [Ni-Fe]-гидрогеназы в сторону поглощения составляет, как правило, порядка 300–400 мкмоль/мин⁻¹·мг⁻¹, а активность выделения водорода очищенным ферментом составляет 65 мкмоль/мин⁻¹·мг⁻¹, что соответствует скорости обмена 98 с⁻¹. Количество обменов [FeFe]-гидрогеназы намного больше. В *Clostridium pasteurianum* количество обменов [FeFe]-

гидрогеназы составило 6 000 с⁻¹, а в *Desulfovibrio spp.* – 9 000 с⁻¹ [5].

До недавнего времени большинство экспериментов по получению водорода проводилось с помощью чистых культур. Вместе с тем в научной литературе появился ряд исследований на тему использования смешанных культур при производстве биоводорода. Цели, стоящие за этим подходом, могут быть как экономическими, так и техническими. С экономической точки зрения, смешанные культуры могли бы помочь сохранить анаэробные условия для получения водорода и исключить использование дорогостоящих восстановителей, таких как L-цистеин-HCl. С технической точки зрения, смешанные культуры обеспечивают широкий спектр ферментов, и поэтому могут метаболизировать и гидролизировать множество субстратов, таких как сложные сахара и растительную биомассу. В силу этих причин основное внимание в настоящем исследовании уделено совершенствованию процесса ферментативного производства H₂ со смешанной культурой. Исследования производства водорода проводились как с монокультурами *Klebsiella pneumoniae* ПТ-ВТ 08 и *Clostridium acetobutylicum* МТСС 11274, так и со смешанными культурами. Сначала брали глюкозу в качестве субстрата для производства водорода, а затем заменяли ее органическими остатками, такими как тростниково-сахарная меласса, сточные воды крахмального и спиртового производства. Органические остатки, которые являются ценным источником углеводов, могут стать потенциальным субстратом для производства водорода методом темновой ферментации. В связи с этим предполагается, что наличие смешанных культур улучшит производство водорода. Настоящее исследование проведено с целью изучения преимуществ смешанной культуры над чистой культурой при производстве водорода с использованием различных органических субстратов.

Как показали исследования, смешанная культура *K. pneumoniae* ПТ-ВТ 08 и *C. acetobutylicum* МТСС 11274 делает процесс получения водорода более экономичным, поскольку исключает использование дорогостоящего восстановителя (цистеин-HCl), необходимого для *C. acetobutylicum*. В процессе производства водорода также осуществлялся мониторинг активности ФГЛ и [FeFe]-гидрогеназы. Значения потенциала производства водорода (*P*), скорости производства водорода (*Rm*) и лаговой фазы (*I*) были получены подгонкой кривых нарастания производства водорода с помощью модифицированного уравнения Гомперца [6]. Насколько нам известно, это первое исследование, посвященное изучению ферментативной активности гидрогеназ в прогрессии производства водорода с использованием смешанной культуры. Потенциал системы смешанной культуры оценивался в двух различных экспериментальных режимах (дозированном и режиме CSTR) с использованием различных органических остатков.

Список обозначений	
<u>Буквы греческого алфавита</u>	
α	Коэффициент рециркуляции
λ	Время запаздывания (ч)
μ	Скорость роста клетки
<u>Буквы латинского алфавита</u>	
H	Совокупная выработка (водорода)
k_s	Сродство субстрата
P	Потенциал (выработки) водорода (мл H_2)
R^2	Коэффициент корреляции
R_m	Максимальный темп выработки водорода (мл/ч ⁻¹)
t	Время
<u>Индексы верхние и нижние</u>	
max	Максимальное значение
восстанов.	Восстановленный
<u>Аббревиатуры</u>	
CSTR	Режим непрерывного перемешивания
DNS	Динитросалициловая кислота
MV	Метилвиологен
NAD	Никотинамидадениндинуклеотид
NADH	Восстановленный никотинамидадениндинуклеотид
PMSF	Фенилметилсульфонилфторид
T.D.S.	Общее содержание растворенных веществ
T.S.	Общее содержание сухих остатков
T.S.S.	Общее содержание взвешенных веществ
T.V.S.	Общее содержание летучих веществ
БПК	Биохимическое потребление кислорода
ВГУ	Время гидравлического удержания
ВУТВ	Время удержания твердых веществ
ВЭЖХ	Высокоэффективная жидкостная хроматография
ГХ	Газовый хроматограф
ДТ	Детектор теплопроводности
ЛЖК	Летучие жирные кислоты
НФОР	Ферредоксин-оксидоредуктаза
ПИД	Пламенно-ионизационный детектор
ПФОР	Пируват-ферредоксин-оксидоредуктаза
ФГЛ (FHL)	Формиат гидроген-лиазы
ХПК	Химическое потребление кислорода

2. Материалы и методы

2.1. Микроорганизмы

В настоящей работе применялся вырабатывающий водород факультативный штамм *K. pneumoniae* ПТВТ 08 и облигатный анаэроб *C. acetobutylicum* МТСС 11274. Штамм *K. pneumoniae* ПТ-ВТ 08 является хорошо зарекомендовавшей себя лабораторной культурой для производства H_2 [7]. Штамм был аэробно выращен в течение ночи при температуре 37 °С в бульоне Лурия-Бертани (лаборатории HiMediaLaboratories, Индия) в инкубационном шейкере (NewBrunswickScientific, Нью-Джерси, США) при 180 об/мин и постоянно поддерживался в аэробном состоянии на питательном агаре (лаборатория HiMediaLaboratories, Индия) при 37 °С путем ежемесячной пересадки. В настоящем исследовании использовался инокулят размером 10 % (объем/объем).

Штамм *C. acetobutylicum* МТСС 11274 был получен из коллекции типов микробных культур и генно-го банка (МТСС) Индии. Штамм выращивался в сре-

де, содержащей 1 % (вес/объем) глюкозы (HiMediaLaboratories, Индия), 1 % (вес/объем) триптона (HiMediaLaboratories, Индия), 0,4 % (вес/объем) дрожжевого экстракта (лаборатория SRL Laboratories, Индия) и 0,1 % (вес/объем) L-цистеина HCl (HiMediaLaboratories, Индия) при температуре 37 °С в инкубационном шейкере производства New Brunswick Scientific, Нью-Джерси, США при 180 об/мин и через каждые 2 дня регулярно пересевался. Размер инокулята составлял 10 % (объем/объем).

2.2. Характеристики отходов

На основе Стандартных методов исследования воды и сточных вод (APHA, 1998 г.) [8] определялись такие характеристики различных органических остатков, как: общее содержание сухих остатков (T.S.), общее содержание взвешенных веществ (T.S.S.), общее содержание летучих веществ (T.V.S.), общее содержание растворенных веществ (T.D.S.), биохимическое потребление кислорода (БПК) и др.

2.3. Среда для получения водорода

Среда, используемая для получения водорода, состоит из 1 % (вес/объем) глюкозы, 1 % (вес/объем) триптона и 0,4 % (вес/объем) экстракта дрожжей. В эксперименте с *C. acetobutylicum* МТСС 11274 в среду выработки водорода был добавлен L-цистеин HCl 0,1 % (вес/объем). Значение pH среды поддерживалось на уровне 6,5. В целях изучения получения водорода из органических остатков и органических отходов, глюкоза в среде заменялась патокой тростника черного цвета (40 % вес/вес сахарозы), а также сточными водами крахмального и спиртового производства. Крахмальные сточные воды брались у местных предприятий общественного питания, а спиртовые – у предприятия спиртовой промышленности «M/s. IFB AgroIndustries Ltd.», Калькутта.

2.4. Экспериментальная установка для производства водорода

2.4.1. Периодическая ферментация

Эксперименты проводились в двухкорпусном стеклянном реакторе рабочим объемом 500 мл при pH на уровне $6,5 \pm 0,2$ и при температуре 37 °C. Температура поддерживалась циркуляционной водяной баней. До начала эксперимента для поддержания анаэробных условий разбрызгивался газ N₂. В экспериментах использовалась смешанная культура *Klebsiella pneumoniae* ПТ-ВТ 08 и *Clostridium acetobutylicum* МТСС 11274 (инокулят размером 10 % (объем/объем) при соотношении обоих штаммов 1:1). Для запуска эксперимента первым добавлялся *K. pneumoniae* ПТ-ВТ 08, а с началом выработки водорода – *C. acetobutylicum* МТСС 11274. Начало выработки водорода при добавлении *K. pneumoniae* ПТ-ВТ 08 указывает на то, что среда становится полностью анаэробной и пригодной для роста облигатного анаэроба *C. acetobutylicum* МТСС 11274 без добавок кислородного поглотителя, как, например, L-цистеин-HCl. Образовавшаяся газовая смесь в свободном пространстве реактора была пропущена через 40 % раствор КОН для селективной абсорбции CO₂. Оставшийся газ, содержащий в основном H₂, собирался в газовый коллектор путем вытеснения воды вниз. Дозированный эксперимент продолжался до тех пор, пока не прекратилась выработка водорода.

2.4.2. Реактор с непрерывным перемешиванием (CSTR)

После 6 ч работы реактора в дозированном режиме его перевели в режим непрерывного перемешивания. К питательному баку присоединялся подающий насос на подачу в реактор, а на другом конце сливной насос закачивал сточные воды в сливной бак. Насосы регулировались с частотой вращения в минуту в соответствии с исследуемой степенью разбавления. На выходе устанавливался насос рециркуля-

ции для забора части сточных вод и подачи их в реактор через входное отверстие.

2.4.3. Ферментный анализ

Таким образом, микроорганизмы, растущие в различных условиях окружающей среды, ферментная система и метаболический путь, ответственные за производство водорода, также отличаются друг от друга. Генерация водорода происходит из-за присутствия комплекса формиат-гидроген-лиазы (ФГЛ) в *K. pneumoniae* ПТВТ 08 и [FeFe]-гидрогеназы в *C. acetobutylicum*. Все этапы экстракции ферментов проводились строго в анаэробной атмосфере в анаэробной перчаточной камере (Coу) при температуре 4 °C. Все буферные смеси и реагенты, задействованные в экстракции и анализе ферментов, барботировались азотом для удаления следов кислорода. Экстракция ферментов проводилась центрифугированием 50 мл культуры в течение 20 мин при 8 000 об/мин и температуре 4 °C для сбора бактериальных клеток, а затем суспендированием в промывочном буфере объемом 1,0 мл (50 мМ трис-HCl, 20 мМ дитионита натрия, pH 8,0). Клетки дважды промывались, а затем ресуспендировались в 500 мл лизирующего буфера (50 мМ трис-HCl, 20 мМ дитионита натрия, 2 мМ дитиотреитола, 2 мМ фенилметилсульфонил-фторида (PMSF) и 0,2 % (объем/объем) тритон X-100, pH 8,0). Клетки лизировались с помощью ультразвука (3 цикла по 40 секунд с интервалом в 30 с каждый). Суспензия клеток центрифугировалась в течение 20 мин при 10 000 об/мин и температуре 4 °C для удаления остатков клетки. Надосадочная жидкость (супернатант), оставшаяся после центрифугирования, использовалась в дальнейшем в качестве сырого фермента.

В эксперименте с *K. pneumoniae* ПТ-ВТ 08 проанализирована активность формиат-дегидрогеназы, которая является важнейшим компонентом комплекса ФГЛ и отражает активность всего этого комплекса в сторону выделения водорода. Формиат-дегидрогеназы катализируют следующую реакцию:



Преобразование NAD в NADH в присутствии фермента отражает активность формиат-дегидрогеназы. Анализ формиат-дегидрогеназы проводился по протоколу, взятому с незначительными изменениями из работы Шираиши (Shiraishi) и др. [9], в газонепроницаемой сыворотке объемом 10 мл, содержащей реактив для анализа (0,05 М фосфатный буфер (pH 8,0), 40 мкмоль NAD, 20 мкмоль формиат-натрия). К этому реактиву добавляли 100 мл сырого фермента, а затем реакционная смесь в течение 5 мин выдерживалась в термостате при температуре 25 °C, после чего реакцию останавливали, и смесь выдерживалась в течение 20 с при 60 °C. Затем с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) количественно определялось



NADH/NAD⁺ с использованием 50 мМ ацетата аммония в качестве подвижной фазы А и ацетонитрил в качестве подвижной фазы В со скоростью градиентного потока 0,8÷1 мл/м⁻¹. Одна единица фермента определялась как количество фермента, необходимое для образования 1 мкмоль NADH в минуту на 1 мг белка.

Анализ [FeFe]-гидрогеназы проводился, как описано выше [10]. Активность гидрогеназы определялась количественно объемом H₂, образованного из Na-дитионита восстановленного метилвиологена (MV). Анализ проводился в газонепроницаемых ампулах с винтовым колпачком, содержащих 2 мл реактива (50 мМ трис-НСl; рН 8,0 мМ MV, 5 мМ MV; 10 мМ Na-дитионита). Реакция инициировалась добавлением 100 мл сырого клеточного лизата. Реакционную смесь выдерживали в течение 10 мин в шейкере при температуре 25 °С. Полученный газ анализировали на газовом хроматографе Perkin-Elmer, США, оснащенный детектором теплопроводности (ДТ) с колонкой 2м x 2мм, содержащей Рогарак Q, 80÷100 меш. Одна единица фермента определяется как количество гидрогеназы, вырабатывающей 1 мкмоль H₂ в минуту на мг белка.

2.4.4. Методы анализа

Концентрация биомассы определялась путем взвешивания высушенной клеточной массы 1,0 мл культуры. Снижение содержания сахара (глюкозы) в образце оценивалось спектрофотометрически с помощью реагента DNS (динитросалициловая кислота) [11], а общее содержание углеводов – фенолсерной кислоты. Оценка химического потребления кислорода (ХПК) проводилась стандартными методами АРНА с помощью набора измерительных приборов ХПК (портативный спектрофотометр DRB200 и DR2800, НАСН, США).

Газовый состав определялся на газовом хроматографе (ГХ) PerkinElmer LLC, США, оснащенный ДТ и колонкой из нержавеющей стали с сеткой Рогарак Q 80-100 меш. Рабочая температура впускного от-

верстия, рабочей камеры печи и детектора составляла 80 °С, 150 °С и 200 °С соответственно. В качестве газа-носителя брался азот со скоростью потока 20 мл/мин⁻¹. Летучие жирные кислоты (ЛЖК) (уксусная и масляная кислота) и этанол анализировались на газовом хроматографе PerkinElmer LLC, США, оснащенный пламенно-ионизационным детектором (ПИД) и капиллярной колонкой из нержавеющей стали с покрытием 10 % PEG-20 М и 2% H₃PO₄ (80÷100 меш). Температура входного отверстия, детектора и программируемой колонны составляла 220 °С, 240 °С, 130÷175 °С соответственно. В качестве газа-носителя брался азот со скоростью потока 20 мл/мин⁻¹. Для образования пламени использовалась смесь водорода и воздуха со скоростью потока 30 мл/мин⁻¹.

Совокупная динамика выработки водорода в периодической ферментации (брожении) была подобрана под модифицированное уравнение Гомперца [6]:

$$H(t) = P \exp \left\{ -\exp \left[\frac{R_m \times e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\},$$

где $H(t)$ – совокупная выработка водорода за время t . Значение измерялось путем накопления содержания водорода из фиксированного объема свободного пространства за время t (ч). P (мл H₂) – потенциал водорода; R_m (мл/ч⁻¹) – максимальная скорость выработки водорода; λ (ч) – время запаздывания. Совокупная динамика выработки водорода определялась при помощи приведенного уравнения. Кинетические параметры (P , R_m и λ) оценивались с помощью приложения Matlab (Curvefittingtoolbox™, версия 1.1.7).

3. Результаты и их обсуждение

3.1. Характеристика органических остатков

Характеристика углеводов, содержащих органические остатки, приведена в табл. 1.

Таблица 1
Характеристики различных органических отходов, используемых при получении биоводорода
Table 1

Characteristics of different organic residues used for biohydrogen production

Параметр	Ед. изм.	Тростниковая меласса	Крахмальные сточные воды	Сточные воды спиртового производства
рН		4,5 ± 0,3	7,2 ± 0,2	4,8 ± 0,5
T.S.	Г/л ⁻¹	978 ± 20	25 ± 2,0	30 ± 2,2
T.S.S.	Г/л ⁻¹	153 ± 15	22 ± 0,5	14 ± 1,8
T.V.S.	Г/л ⁻¹	788 ± 22	24 ± 1,2	16 ± 2,1
V.S.S.	Г/л ⁻¹	135 ± 26	19 ± 0,5	12 ± 1,4
ХПК	Г/л ⁻¹	890 ± 50	23 ± 2,1	60 ± 1,5
Всего углеводов	Г/л ⁻¹	756 ± 20	18 ± 2,5	8,2 ± 0,8

3.2. Определение кинетики роста и выработки водорода

Кинетика роста и выработка водорода из различных субстратов, таких как глюкоза, меласса тростника, сточные воды крахмального и спиртового производства, определяется с использованием *K. pneumoniae* ПТ-ВТ08 и *C. acetobutylicum* МТСС 11274 индивидуально и системы смешанной культуры как организма. Максимальные значения скорости роста клетки (μ_{max}) наблюдались у субстрата, глюкозы и далее тростниковой мелассы, сточных вод крахмального и спиртового производства как в случае чистой, так и смешанной культуры. Значения сродства субстрата (k_s) указывают на то, что глюкоза является наиболее предпочтительным, а крахмальные сточные воды – наименее предпочтительным субстратом.

В системе чистой культуры *K. pneumoniae* ПТ-ВТ 08 подходящим субстратом признана тростниковая

меласса, так как она обеспечила высокую выработку водорода ($6,47 \text{ моль H}_2/\text{кг}^{-1} \text{ХПК}_{\text{восстанов.}}$), в то время как крахмальные сточные воды дали очень низкую выработку ($5,73 \text{ моль H}_2/\text{кг}^{-1} \text{ХПК}_{\text{восстанов.}}$). При использовании *C. acetobutylicum* МТСС 11274 наибольшую выработку обеспечила тростниковая меласса ($7,65 \text{ моль H}_2/\text{кг}^{-1} \text{ХПК}_{\text{восстанов.}}$), а наименьшую – сточные воды спиртового производства ($6,26 \text{ моль H}_2/\text{кг}^{-1} \text{ХПК}_{\text{восстанов.}}$).

Как показывают значения выработки водорода, в условиях смешанной культуры тростниковая меласса и крахмальные сточные воды оказались лучшей альтернативой глюкозе. В табл. 2 приведен сравнительный анализ кинетики роста чистых и смешанных культур. Очевидно, что смешанная культура является более эффективной для производства биоводорода, чем монокультура.

Таблица 2
Сравнительный анализ повышения кинетики и выработки водорода при применении чистой и смешанной культур с использованием различных субстратов

Table 2
Comparative analysis of growth kinetics and hydrogen yield of pure cultures and co-culture with different substrates

Организм	Источник углерода	$\mu_{max}(\text{ч}^{-1})$	$k_s(\text{г/л})$	Выработка (моль H_2 кг^{-1} $\text{ХПК}_{\text{восстанов.}}$)	ХПК (устранение, %)
<i>K. pneumoniae</i> ПТВТ-08	Глюкоза	$0,39 \pm 0,05$	$1,92 \pm 0,2$	$4,89 \pm 0,61$	33%
<i>K. pneumoniae</i> ПТВТ-08	Тростниковая меласса	$0,32 \pm 0,12$	$3,24 \pm 0,36$	$6,47 \pm 1,09$	42%
<i>K. pneumoniae</i> ПТВТ-08	Крахмальные сточные воды	$0,24 \pm 0,03$	$16,6 \pm 0,7$	$5,73 \pm 0,27$	38%
<i>K. pneumoniae</i> ПТВТ-08	Спиртовые сточные воды	$0,22 \pm 0,12$	$24,32 \pm 0,62$	$5,9 \pm 0,04$	41%
<i>C. acetobutylicum</i> МТСС11274	Глюкоза	$0,23 \pm 0,06$	$4,06 \pm 0,18$	$6,42 \pm 0,61$	37%
<i>C. acetobutylicum</i> МТСС11274	Тростниковая меласса	$0,20 \pm 0,08$	$5,21 \pm 0,24$	$7,65 \pm 0,09$	48%
<i>C. acetobutylicum</i> МТСС11274	Крахмальные сточные воды	$0,177 \pm 0,05$	$9,64 \pm 0,98$	$7,08 \pm 0,6$	44%
<i>C. acetobutylicum</i> МТСС11274	Спиртовые сточные воды	$0,158 \pm 0,04$	$22,6 \pm 0,18$	$6,26 \pm 0,22$	48%
Смешанная культура <i>K. pneumoniae</i> ПТВТ-08 и <i>C. acetobutylicum</i> МТСС11274	Глюкоза	$0,35 \pm 0,02$	$2,58 \pm 0,19$	$7,89 \pm 0,37$	56%
Смешанная культура <i>K. pneumoniae</i> ПТВТ-08 и <i>C. acetobutylicum</i> МТСС11274	Тростниковая меласса	$0,28 \pm 0,016$	$4,92 \pm 0,18$	$9,47 \pm 0,4$	68%
Смешанная культура <i>K. pneumoniae</i> ПТВТ-08 и <i>C. acetobutylicum</i> МТСС11274	Крахмальные сточные воды	$0,22 \pm 0,05$	$11,42 \pm 0,15$	$8,72 \pm 0,11$	64%
Смешанная культура <i>K. pneumoniae</i> ПТВТ-08 и <i>C. acetobutylicum</i> МТСС11274	Спиртовые сточные воды	$0,20 \pm 0,18$	$22,16 \pm 0,28$	$7,78 \pm 0,5$	66%

В пользу смешанной культуры говорится во многих исследованиях, поскольку она обладает рядом преимуществ по сравнению с чистой культурой. В одном исследовании Эльшамуби (Elshamouby) и др. пришли к выводу, что по сравнению с монокультурами применение смешанной культуры всегда дает лучшие результаты по выработке водорода [12]. Вероятной причиной повышения выработки водорода является то, что смешанная культура обладает улучшенной ферментной системой, способной использовать широкий спектр сложных субстратов и обеспе-

чить более широкий диапазон pH для бактериальной ферментации. Система смешанной культуры особенно подходит для производства водорода, когда в качестве субстрата применяются органические отходы и растительная биомасса [12]. В настоящем исследовании использовалась смешанная культура, состоящая из факультативных анаэробов *K. pneumoniae* ПТВТ-08 и облигатного анаэроба *C. acetobutylicum* МТСС 11274. Такой подход повысил выработку водорода, обеспечив окружающие условия для роста облигатных анаэробов, поскольку факультативный анаэроб-партнер

смешанной культуры потребляет даже след кислорода. Полученные результаты свидетельствуют о том, что до четвертого часа выработка водорода осуществлялась с помощью комплекса ФГЛ *K. pneumoniae* ПТВТ-08, а затем – с помощью *C. acetobutylicum* МТСС11274, содержащего [FeFe]-гидрогеназу. Как показали различные исследования, [FeFe]-гидрогеназа обладает большей текучестью, чем ФГЛ-комплекс, обеспечивая более эффективную выработку водорода в идеальных анаэробных условиях [5]. При использовании смешанной культуры значение восстановления ХПК было также выше, чем у монокультуры, что демонстрирует более высокую эффективность преобразования субстрата смешанной культуры по сравнению с монокультурой.

3.3. Анализ выработки водорода с помощью уравнения Гомперца

Очевидно, что дозированная система смешанной культуры хорошо подходит для производства биоводорода в отличие от монокультуры, использующей различные органические остатки. В настоящем исследовании данные о совокупной выработке водорода, полученного из глюкозы, тростниковой мелассы, сточных вод крахмального и спиртового производства с использованием смешанной культуры в дозированной системе, оценивались при помощи модифицированной модели Гомперца в приложении MATLAB.

Таблица 3

Оценка кинетических параметров при помощи модифицированного уравнения Гомперца при использовании смешанной культуры (*K. pneumoniae* ПТВТ-08 и *C. acetobutylicum* МТСС 11274)

Table 3

Kinetic parameters estimation using modified Gompertz equation using co-culture (*K. pneumoniae* ПТВТ 08 and *C. acetobutylicum* МТСС 11274).

Субстрат	P (мл/л ⁻¹)	R_m (мл/л ⁻¹ ·ч ⁻¹)	λ (ч)	R^2
Глюкоза	3 968,07	474,19	1,22	0,98
Меласса	3 969,53	570,30	1,27	0,97
Крахмальные сточные воды	3 374,13	578,35	1,37	0,99
Сточные воды спиртового пр-ва	3 124,47	442,59	1,24	0,97

В табл. 3 приведены рассчитанные кинетические параметры (время запаздывания (λ), максимальная скорость выработки водорода (R_m), потенциал выработки газа (P)). Коэффициент корреляции (R^2) для всех вышеперечисленных субстратов составил более

0,99, что указывает на сильную корреляцию между экспериментальными данными и модифицированным уравнением Гомперца относительно совокупной выработки водорода (рис. 1).

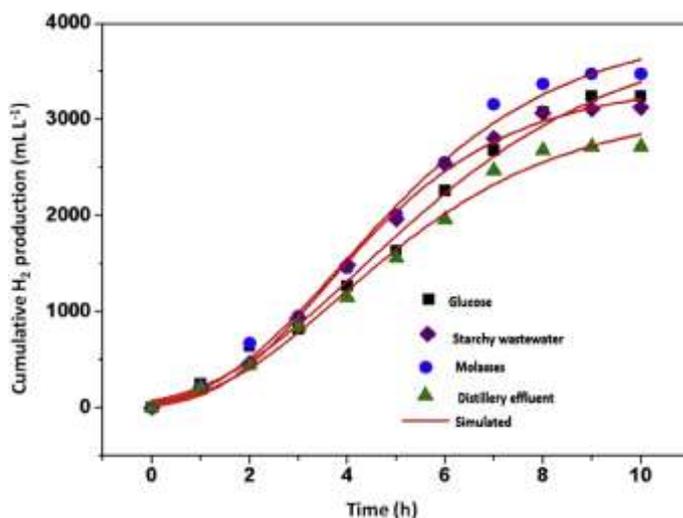


Рис. 1 – Модель динамики совокупной выработки водорода при помощи смешанной культуры с использованием различных органических отходов (кол-во экспериментальных повторений = 2)

Fig. 1 – Simulated cumulative hydrogen production profile of co-culture using different organic residues (Number of experimental repeats = 2)

3.4. Пригодность различных субстратов для производства биоводорода в дозированном режиме

3.4.1. Производство биоводорода с использованием глюкозы в качестве субстрата

Глюкоза использовалась в качестве предпочтительного субстрата для производства водорода путем

темновой ферментации. Микроорганизмы эффективно метаболизируют глюкозу для удовлетворения своих энергетических потребностей. Глюкоза бралась в качестве чистого субстрата при получении водорода с использованием монокультуры *K. pneumoniae* ПТВТ 08, *C. acetobutylicum* МТСС

11274, а также смешанной культуры *K. pneumoniae* ПТ-ВТ 08 и *C. acetobutylicum* МТСС 11274. На рис. 2а показаны совокупное производство водорода и темпы производства водорода монокультурами и смешанной культурой. В случае с *K. pneumoniae* ПТ-ВТ 08 совокупная выработка водорода составила 1 376 мл/л⁻¹ за 10 часов. Максимальный уровень выработки водорода достиг 128 мл/л⁻¹·ч⁻¹ за 4 ч. При использовании монокультуры *C. acetobutylicum* МТСС 11274 в производстве водорода с применением глюкозы в качестве субстрата совокупная выработ-

ка водорода составила 2 658 мл/л⁻¹ культуры за 10 ч с максимальной скоростью выработки водорода 213,8 мл/л⁻¹·ч⁻¹ на 6-м часе. Когда в производстве водорода использовалась смешанная культура *K. pneumoniae* ПТ-ВТ 08 и *C. acetobutylicum* МТСС 11274, общий объем полученного водорода составил 3 274 мл/л⁻¹ культуры за 10 ч, а максимальный объем выработки – 261 мл/л⁻¹·ч⁻¹ за 6 ч. Активность ключевых ферментов, ответственных за производство водорода, показана на рис. 2б.

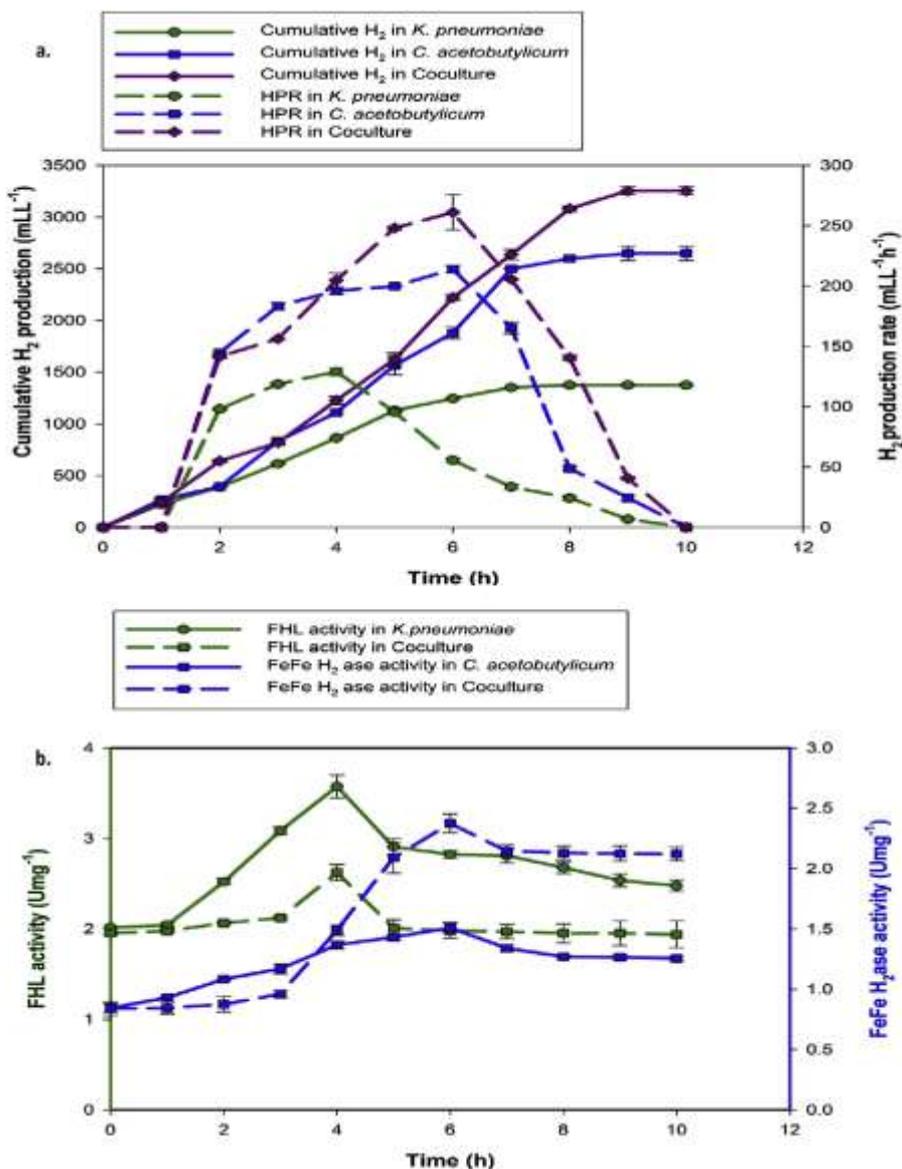


Рис. 2 – а – Динамика выработки водорода из различных культур в серии экспериментов с использованием глюкозы в качестве субстрата; б – динамика активности ФГЛ и [FeFe]-гидрогеназы (кол-во повторений эксперимента = 2)

Fig. 2 – а – Hydrogen production profiles in batch experiments using glucose as substrate by different cultures; б – FHL and FeFe hydrogenase activities profiles (Number of experimental repeats = 2)

В течение 4 ч активность ФГЛ в *K. pneumoniae* ПТ-ВТ 08 была наивысшей. На 4-ый час активность ферментов повышалась с базального уровня 2,02 U/мг⁻¹ до 3,57 U/мг⁻¹ белка, после чего снизилась.

Ключевым ферментом, отвечающим за производство водорода в *C. acetobutylicum* МТСС 11274, является [FeFe]-гидрогеназа, которая была сильно выражена на 6-ом часе ферментации. Фер-

ментативная активность составила $1,54 \text{ U/mg}^{-1}$ белка. Исследования показали, что первичная выработка водорода в *K. pneumoniae* ПТ-ВТ 08 поддерживается преимущественно комплексом ФГЛ. На 4-ом часу ферментации активность комплекса ФГЛ повысилась до $2,65 \text{ U/mg}^{-1}$ белка, после чего стала постепенно снижаться. Следующая выработка водорода поддерживалась преимущественно [FeFe]-гидрогеназой, так как на 6-ом часу активность гидрогеназы повысилась и достигла максимума. Полученные результаты позволяют предположить, что высокие темпы выработки водорода в монокультурах *K. pneumoniae* ПТВТ-08 и *C. acetobutylicum* МТСС11274 достигаются в середине логарифмической фазы роста в сочетании с высокой ферментативной активностью, необходимой для метаболизма водорода. Ранее было документально подтверждено, что выделяемый микро-

организмами водород является продуктом, связанным с ростом, и более высокая выработка достигается в условиях, когда посевной материал находится в быстро разделяющемся состоянии (середина логарифмической фазы) [13].

3.4.2. Получение водорода с использованием тростниковой мелассы в качестве субстрата

Тростниковая меласса является побочным продуктом сахарной промышленности, а ее основные компоненты – это глюкоза, фруктоза и сахароза. Меласса – ценный источник углеводов, поэтому используется в качестве субстрата для производства водорода [14]. В табл. 4 приведены значения совокупной выработки водорода, скорости его производства и активности ферментов как для чистой, так и для смешанной культуры.

Таблица 4

Выработка водорода и активность ферментов у чистых и смешанных культур при использовании различных субстратов

Table 4

H₂ production and enzyme activity studies with pure cultures & co-cultures with different substrates

Субстрат	Культура	Совокупная выработка H ₂ (мл/л ¹)	Макс. темп выработки H ₂ (мл/л ¹ ·ч ⁻¹)	Активность ферментов (U/mg ⁻¹)	
				Комплекс ФГЛ	[FeFe]-гидрогеназа
Глюкоза	<i>K. pneumoniae</i> ПТ-ВТ 08	1 376 ± 8,48	128 ± 3,35	3,57 ± 0,126	–
	<i>C. acetobutylicum</i> МТСС 11274	2 658 ± 69,29	213,8 ± 3,00	–	1,54 ± 0,024
	Смешанная культура (<i>K. pneumoniae</i> ПТ-ВТ 08 и <i>C. acetobutylicum</i> МТСС 11274)	3 274 ± 36,76	261 ± 14,4	2,65 ± 0,08	2,43 ± 0,077
Тростниковая меласса	<i>K. pneumoniae</i> ПТ-ВТ 08	1 825 ± 9,89	156,12 ± 2,65	4,16 ± 0,11	–
	<i>C. acetobutylicum</i> МТСС 11274	2 837 ± 16,26	248,5 ± 4,77	–	1,76 ± 0,06
	Смешанная культура (<i>K. pneumoniae</i> ПТ-ВТ 08 и <i>C. acetobutylicum</i> МТСС 11274)	3 484 ± 19,79	298,8 ± 0,70	3,2 ± 0,049	3,45 ± 0,0735
Крахмальные сточные воды	<i>K. pneumoniae</i> ПТ-ВТ 08	1 062 ± 28,99	95,4 ± 1,94	2,88 ± 0,07	–
	<i>C. acetobutylicum</i> МТСС 11274	2 349 ± 60,10	177,47 ± 3,00	–	1,42 ± 0,05
	Смешанная культура (<i>K. pneumoniae</i> ПТ-ВТ 08 и <i>C. acetobutylicum</i> МТСС 11274)	3 120 ± 56,57	276,3 ± 5,26	2,82 ± 0,028	2,2 ± 0,056
Сточные воды спиртового пр-ва	<i>K. pneumoniae</i> ПТ-ВТ 08	1 123 ± 16,97	125,88 ± 6,01	3,32 ± 0,127	–
	<i>C. acetobutylicum</i> МТСС 11274	2 230 ± 20,4	188,62 ± 4,77	–	1,53 ± 0,047
	Смешанная культура (<i>K. pneumoniae</i> ПТ-ВТ 08 и <i>C. acetobutylicum</i> МТСС 11274)	2 721 ± 12,72	227,25 ± 9,89	2,72 ± 9,89	2,23 ± 0,07

При использовании *K. pneumoniae* ПТ-ВТ 08 совокупная выработка водорода составила $1 825 \text{ мл/л}^{-1}$ культуры за 10 ч, при этом на 4-ый час максимальная скорость его производства составила $156,12 \text{ мл/л}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$. Активность ФГЛ на 4-ом часу также достигла максимального значения на уровне $4,166 \text{ U/mg}^{-1}$. При использовании *C. acetobutylicum* МТСС 11274 с тростниковой мелассой общий объем выработки водорода составил $2 837 \text{ мл/л}^{-1}$ культуры за 10 ч. Максимальная скорость производства на уровне $248,5 \text{ мл/л}^{-1} \cdot \text{ч}$ куль-

туры была достигнута за 6 часов. Активность [FeFe]-гидрогеназы также достигла своего пика за 6 ч. При использовании смешанной культуры *K. pneumoniae* ПТВТ-08 и *C. acetobutylicum* МТСС 11274 общий объем выделяемого водорода составил $3 484 \text{ мл/л}^{-1}$, при этом на 6-й час реакции максимальная скорость выработки достигла $289,87 \text{ мл/л}^{-1} \cdot \text{ч}^{-1}$, а [FeFe]-гидрогеназа проявила наибольшую активность на уровне $3,45 \text{ U/mg}^{-1}$ белка. Максимальная активность ФГЛ отмечена на 4-ом часу реакции. Кроме того,

установлено, что смешанная культура больше способствует снятию ХПК, чем чистая культура. Таким образом, можно заключить, что смешанная культура *K. pneumoniae* ПТ-ВТ 08 и *C. acetobutylicum* МТСС 11274 является более эффективной в производстве водорода, чем монокультура. Проведенные исследования показали, что наиболее подходящим субстратом для получения водорода является тростниковая меласса.

Поскольку тростниковая меласса богата сахарами, поддающимися ферментации (>50 %), преимущественно фруктозой, глюкозой и сахарозой, она считается потенциальным субстратом для получения биоводорода. Как показали результаты одного из проведенных исследований, наряду с сахарами, поддающимися ферментации, меласса содержит достаточное количество азота и фосфора, необходимое для выращивания микроорганизмов [15,16] (табл. 5).

Сравнительный анализ различных смешанных культур, использованных при получении водорода
 Таблица 5
 Table 5
 Comparative studies on the different co-cultures used for hydrogen production

Культура	Тип реактора	T (°C)	Субстрат	Выработка водорода	Темп H ₂	Лит-ра
<i>Enterobacter aerogenes</i> W23 и <i>Candidamaltose</i> НУ-35	Дозиров.	35	Глюкоза	77,45 ммоль H ₂ /л ⁻¹	6,27 л/л ⁻¹ ·д ⁻¹	[19]
<i>Enterobacter aerogenes</i> и <i>C.butyricum</i>	CSTR	36	Крахмал	2 моль H ₂ /моль ⁻¹ гексозы	–	[20]
<i>Enterobacter aerogenes</i> и <i>C.butyricum</i>	Дозиров.	37	Яблочное пюре, ферментированное сырым глицерином	26,07 ммоль H ₂ /л ⁻¹	–	[21]
<i>Clostridium thermocellum</i> и <i>Thermoanaerobacteriumaotearoense</i>	Дозиров.	55	Багасса	50,05 ммоль л ⁻¹	–	[22]
<i>Clostridium butyricum</i> и <i>Escherichia coli</i>	Дозиров.	37		1,65 моль H ₂ /моль ⁻¹ глюкозы	–	[23]
<i>K. pneumoniae</i> ПТ-ВТ 08 и <i>C. acetobutylicum</i> МТСС 11274	Дозиров.	37	Глюкоза	146,16 ммоль/л ⁻¹	261мл/л ⁻¹ ·ч ⁻¹	н.р.*
<i>K. pneumoniae</i> ПТ-ВТ 08 и <i>C. acetobutylicum</i> МТСС 11274	Дозиров.	37	Тростниковая меласса	155 ммоль/л ⁻¹	289,87мл/л ⁻¹ ·ч ⁻¹	н.р.
<i>K. pneumoniae</i> ПТ-ВТ 08 и <i>C. acetobutylicum</i> МТСС 11274	Дозиров.	37	Крахмальные сточные воды	139,28 ммоль/л ⁻¹	276,3 мл/л ⁻¹ ·ч ⁻¹	н.р.
<i>K. pneumoniae</i> ПТ-ВТ 08 и <i>C. acetobutylicum</i> МТСС 11274	Дозиров.	37	Сточные воды спиртового пр-ва	121,47 ммоль/л ⁻¹	227,25мл/л ⁻¹ ·ч ⁻¹	н.р.
<i>K. pneumoniae</i> ПТ-ВТ 08 и <i>C. acetobutylicum</i> МТСС 11274	CSTR	37	Глюкоза	–	630 мл/л ⁻¹ ·ч ⁻¹	н.р.
<i>K. pneumoniae</i> ПТ-ВТ 08 и <i>C. acetobutylicum</i> МТСС 11274	CSTR	37	Тростниковая меласса	–	834 мл/л ⁻¹ ·ч ⁻¹	н.р.
<i>K. pneumoniae</i> ПТ-ВТ 08 и <i>C. acetobutylicum</i> МТСС 11274	CSTR	37	Крахмальные сточные воды	–	532,8 мл/л ⁻¹ ·ч ⁻¹	н.р.
<i>K. pneumoniae</i> ПТ-ВТ 08 и <i>C. acetobutylicum</i> МТСС 11274	CSTR	37	Сточные воды спиртового пр-ва	–	480,26мл/л ⁻¹ ·ч ⁻¹	н.р.

*Настоящая работа

3.4.3. Получение водорода с использованием крахмальных сточных вод в качестве субстрата

Крахмальные сточные воды являются богатым источником углеводов и витаминов и могут быть использованы в качестве субстрата для производства биоводорода. ХПК этих вод составляет 24 г/л⁻¹. В табл. 4 приведены данные о выработке водорода и ферментативной активности при использовании крахмальных сточных вод в качестве субстрата для производства водорода. Общий ход процесса получения водорода из крахмальных сточных вод с использованием монокультуры *K. pneumoniae* ПТВТ-08 и *C. acetobutylicum* МТСС 11274 происходил аналогично тому, как при использовании в качестве суб-

страта глюкозы и мелассы тростника. С использованием при получении биоводорода *K. pneumoniae* ПТ-ВТ 08 общий объем выработки составил 1 062 мл/л⁻¹ за 10 ч. Максимальные значения скорости производства водорода и активности ФГЛ получены на 4-й час процесса. Когда при получении водорода применялся *C. acetobutylicum* МТСС 11274, общий объем выработки составил 2 349 мл/л⁻¹. Максимальная производительность на уровне 117,47 мл/л⁻¹·ч⁻¹ водорода, а также наивысшая активность [FeFe]-гидрогеназы на уровне 1,42 U/мг⁻¹ белка получены на 6-й час процесса. При этом общий ход процесса генерации водорода с использованием смешанной

культуры *K. pneumoniae* ПТ-ВТ 08 и *C. acetobutylicum* МТСС 11274 развивался по-другому. Совокупная выработка водорода составила 3 120 мл/л⁻¹, при том что максимальная активность ФГЛ зафиксирована на 4-м часу процесса, максимальные значения производительности на уровне 276,3 мл/л⁻¹·ч⁻¹ водорода и активности [FeFe]-гидрогеназы на уровне 1,02 У/мг⁻¹ белка отмечены на 5-м часу.

3.4.4. Получение водорода с использованием сточных вод спиртового производства в качестве субстрата

Сточные воды спиртового производства обладают высокой нагрузкой по органическим веществам, и если они не подвергаются обработке, то способны навредить водным организмам и окружающей среде. В их состав входят различные виды углеводов, поэтому применение смешанной культуры в получении биоводорода из сточных вод спиртового производства становится все более актуальным. Поскольку смешанная культура содержит два различных микроорганизма, сложные ферментные системы способны метаболизировать большое количество простых и сложных углеводов. Динамика выработки водорода и соответствующая ферментативная активность чистых и смешанных культур приведены в табл. 4. Совокупная выработка водорода с использованием *K. pneumoniae* ПТ-ВТ 08 составила 1 122,78 мл/л⁻¹ при максимальной скорости 125,88 мл/л⁻¹·ч⁻¹ на 4-м часу процесса. Тогда же проявил максимальную активность комплекс ФГЛ. При использовании *C. acetobutylicum* совокупная выработка составила 2 230 мл/л⁻¹. Максимальные значения скорости производства водорода на уровне 188,62 мл/л⁻¹·ч⁻¹ и активности [FeFe]-гидрогеназы на уровне белка 1,53 У/мг⁻¹ получены на 6-й час процесса. При использовании смешанной культуры *K. pneumoniae* ПТ-ВТ 08 и *C. acetobutylicum* при производстве водорода со сточными водами спиртовых предприятий в качестве субстрата совокупная выработка составила 2 721 мл/л⁻¹. Максимальная выработка (227,25 мл/л⁻¹·ч⁻¹) и активность [FeFe]-гидрогеназы отмечены на 6-м часу, а активность ФГЛ достигла своего максимума на 4-м часу реакции.

3.4.5. Пригодность различных субстратов для производства биоводорода в режиме CSTR

В отдельной серии экспериментов был исследован непрерывный режим производства водорода с применением смешанных культур *K. pneumoniae* ПТ-ВТ 08 и *C. acetobutylicum* МТСС 11274 с использованием глюкозы, тростниковой мелассы, сточных вод крахмального и спиртового производства при разной скорости разбавления. Во всех проведенных экспериментах по мере повышения скорости разбавления до максимального значения 0,2 ч⁻¹ выработка водорода (рис. 3а) постепенно увеличивалась. В экспериментах с глюкозой максимальная скорость производства водорода при скорости разбавления 0,2 ч⁻¹ со-

ставила 630 мл/л⁻¹·ч⁻¹. В результате проведенных экспериментов установлено, что наиболее подходящим субстратом для производства водорода является тростниковая меласса, с применением которой максимальная скорость производства водорода при скорости разбавления 0,2 ч⁻¹ составила 834 мл/л⁻¹·ч⁻¹. С повышением скорости разбавления выработка водорода уменьшалась, а при скорости разбавления 0,35 ч⁻¹ полностью прекратилась, что, вероятно, вызвано вымыванием клеток. При скорости разбавления 0,2 ч⁻¹ зафиксированы низкие значения концентрации субстрата и рН сточных вод (рис. 3б), которые с увеличением скорости разбавления приближаются к своим исходным значениям.

Конечными метаболитами, накопленными в процессе ферментации, оказались преимущественно ацетат, бутират и этанол (рис. 3с), максимальная концентрация которых отмечена при скорости разбавления 0,2 ч⁻¹, где в качестве основного конечного метаболита доминирует бутират, а ацетат и этанол образуются в процессе ферментации. Как показано на рис. 3с, во всех случаях концентрация бутирата менялась от 46 % до 65 %, ацетата – в диапазоне 22÷36 %, этанола – от 6 % до 18 %. Эта тенденция наблюдалась во всех проведенных экспериментах. В ходе углеводного обмена происходит декарбоксилирование пирувата ферредоксином, в результате которого выделяется 1 моль водорода с образованием ЛЖК, таких как масляная кислота, уксусная кислота, пропионовая кислота и этанол. Образование ЛЖК является механизмом поддержания пула NAD⁺ и (NADH + H⁺) внутри бактериальной клетки для удержания заданного соотношения NAD⁺/NADH. Образование этанола и пропионовой кислоты вызвано окислением NADH + H⁺, при котором окисление 2 молей NADH + H⁺ ведет к образованию 1 моля этанола или пропионовой кислоты. Таким образом, при уксуснокислой ферментации, протекающей в сопровождении этанол/пропионовокислой ферментации, достигается динамическое равновесие между окислением и восстановлением NAD⁺ и NADH + H⁺ с требуемым молярным соотношением этанола и уксусной кислоты 1:1. Каждый раз, когда соотношение этанола и уксусной кислоты отклоняется выше или ниже 1, динамическое равновесие между NAD⁺ и NADH + H⁺ нарушается, препятствуя большинству метаболических путей. Такое отклонение соотношения этанола к уксусной кислоте также указывает на неустойчивость процесса ферментации внутри микроорганизмов. В проведенном исследовании соотношение этанола к уксусной кислоте оказалось ниже равновесного значения, что свидетельствует о неустойчивости процесса ферментации [17]. Кроме того, при скорости разбавления 0,2 ч⁻¹ ХПК тростниковой мелассы, сточных вод крахмального и спиртового производства значительно снизилось на 68,75 %, 60,0 % и 64,4 % соответственно.



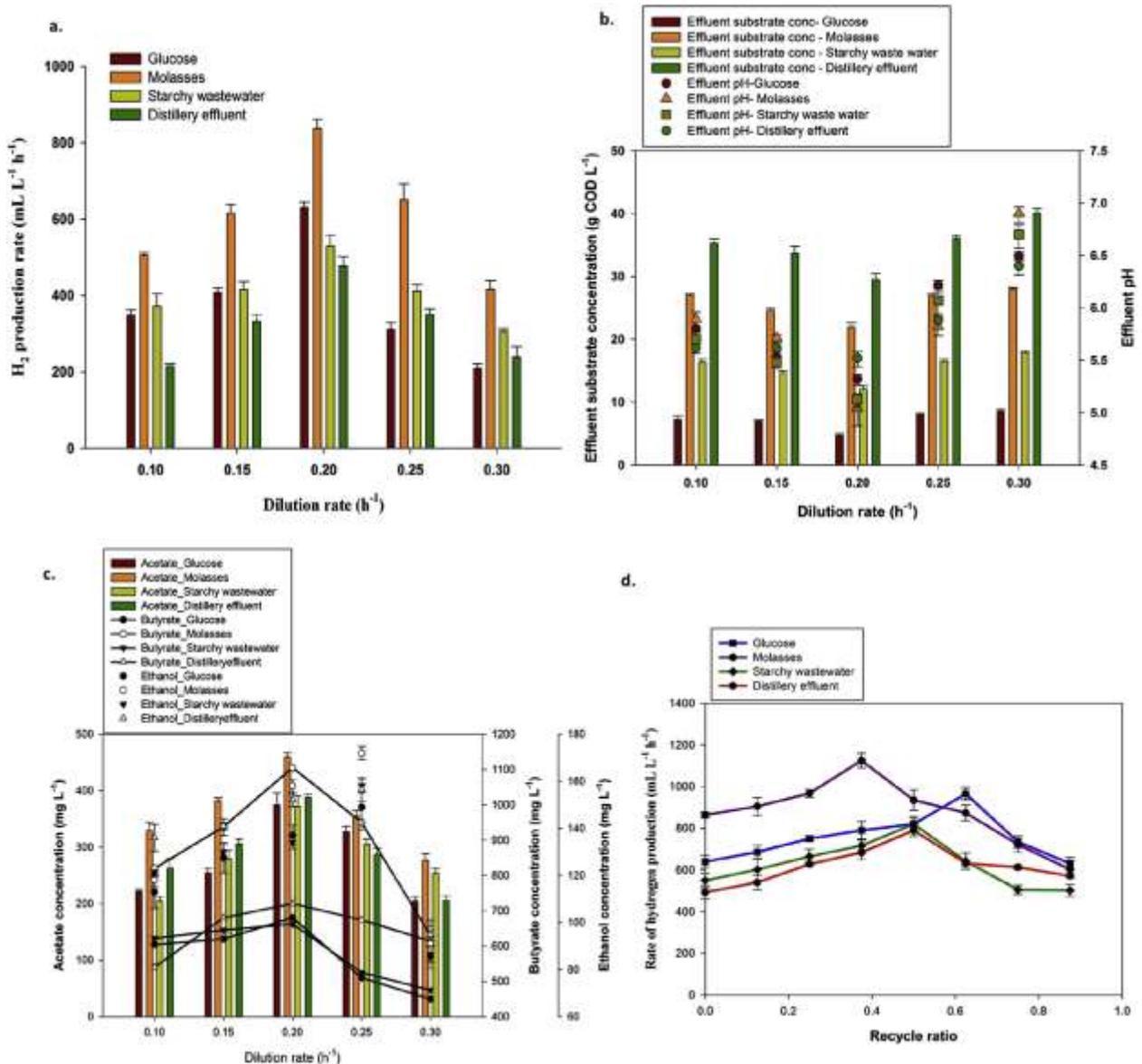


Рис. 3 – а – Влияние скорости разбавления на темп выработки водорода с использованием различных субстратов; б – влияние скорости разбавления сточных вод на концентрацию субстратов и pH сточных вод для смешанных культур при использовании различных субстратов; с – влияние скорости разбавления на концентрацию конечных метаболитов для смешанных культур при использовании различных субстратов; д – влияние коэффициента рециркуляции на выработку биоводорода при использовании различных субстратов (кол-во повторений экспериментов = 2)

Fig. 3 – a – Effect of dilution rate on rate of hydrogen production by co-culture using different substrates; б – effluent dilution rate on the substrate concentrations and effluent pH by co-culture using different substrates; с – effect of dilution rate on the concentration of end metabolites by co-culture using different substrates; д – effect of recycle ratio on biohydrogen production using different substrates (number of experimental repeats = 2)

Кроме того, изучено влияние рециркуляции сточных вод на скорость выработки H₂. Влияние коэффициента рециркуляции (а), меняющегося в диапазоне от 0 до 0,8, показано на рис. 3d. Сначала с увеличением коэффициента рециркуляции выработка H₂ повысилась до значений коэффициента рециркуляции на уровне 0,625 у глюкозы, 0,375 – у тростниковой мелассы, 0,625 – у крахмальных сточных вод и 0,5 – у сточных вод спиртового производства. Возможно, это связано с более продолжительным временем удержания твердых веществ (ВУТВ) по сравнению с временем гидравлического удержания

(ВГУ), что способствовало более эффективной утилизации субстрата [18]. При дальнейшем увеличении коэффициента рециркуляции наблюдалось снижение скорости производства H₂, что, вероятно, обусловлено повышением концентрации субстрата в реакторе, способным привести к ингибированию субстрата в системе. Кроме того, увеличение значений коэффициента рециркуляции может вызвать резкое снижение pH по причине усиления притока ЛЖК в систему. Максимальный объем выработки H₂ на уровне 960 мл/л·ч⁻¹ зафиксирован при α = 0,625 (глюкоза), 1 125 мл/л·ч⁻¹ при α = 0,375 (тростниковая меласса),

642 мл/л⁻¹·ч⁻¹ при $\alpha = 0,625$ (крахмальные сточные воды) и 790 мл/л⁻¹·ч⁻¹ при $\alpha = 0,5$ (сточные воды спиртового производства). Очевидно, при наиболее подходящем коэффициенте рециркуляции темп выработки водорода с применением глюкозы увеличился на 65,6 %, тростниковой мелассы – на 74,13 %, крахмальных сточных вод – на 82,8 % и сточных вод спиртового производства – на 60,25 %.

Таким образом, результаты проведенного исследования показали, что с применением смешанной культуры выработка водорода повышается. Штаммы, использованные в исследовании, относятся к двум отдельным группам семейства бактерий. Факультативный анаэроб *K. pneumonia* ИТ-ВТ-08 входит в семейство энтеробактерий (Enterobacteriaceae), а облигатный анаэроб *C. acetobutylicum* МТСС 11274 относится к фирмикутам (Firmicutes). Оба штамма содержат разнообразные механизмы получения водорода и ферментную систему. При использовании смешанной культуры этих штаммов выработка водорода повышается по сравнению с чистыми культурами. В табл. 4 представлены результаты различных исследований, посвященных смешанной культуре.

Очевидно, что объем и темп выработки полученного в настоящем исследовании водорода выше остальных. Так, в одном исследовании в производстве водорода применялся штамм грибов рода *Candida* совместно с *Enterobacter aerogenes* W23. Использование этой смешанной культуры также привело к повышению выработки водорода, по сравнению с чистыми культурами. В работе Сеппалы (Seppala) и др. (2011) авторы пришли к выводу, что в дозированном режиме смешанная культура более эффективно утилизирует глюкозу, чем чистая культура. Вместе с тем они установили, что с применением смешанной культуры совокупная выработка водорода увеличивается [23]. Таким образом, поскольку смешанная культура содержит широкий спектр ферментных систем, способных эффективно разлагать различные субстраты, ее можно рассматривать в качестве эффективной системы для получения водорода.

4. Заключение

В настоящей работе исследовалась возможность применения стратегии биоаугментации при использовании одной факультативной анаэробной бактерии и других облигатных анаэробов в системе смешанной культуры для повышения выработки водорода, а также снижения зависимости от дорогостоящих восстановителей типа L-цистеин-HCl. Установлено, что в обоих режимах (дозированном и CSTR) смешанная культура устраняет ХПК более эффективно, чем отдельные культуры. Наиболее подходящими источникам углерода оказались тростниковая меласса и сточные воды спиртового производства. Однако в будущем предстоит выяснить характер синтрофной связи между микробами.

Благодарности

Настоящее исследование проведено при финансовой поддержке Департамента биотехнологии (DBT) Министерства науки и технологий Индии, Совета научных и промышленных исследований, Организации оборонных исследований и разработок министерства обороны Индии, а также Министерства новой и возобновляемой энергетики (MNRE) Индии.

Acknowledgements

The authors are highly thankful to Dept. of Biotechnology (DBT), Council for Scientific and Industrial Research, Defence Research and Development Organisation and Ministry of New and Renewable Energy (MNRE) for providing financial assistance.

Список литературы

- [1] Forsberg C.W. Future hydrogen markets for large-scale hydrogen production systems. *Int J Hydrogen Energy*, 2007;32:431–9.
- [2] Abánades A. The challenge of hydrogen production for the transition to a CO₂-free economy, 2012:11–16.
- [3] Maeda T., Sanchez-Torres V., Wood T.K. *Escherichia coli* hydrogenase 3 is a reversible enzyme possessing hydrogen uptake and synthesis activities. *Appl Microbiol Biotechnol* 2007;76:1035–42.
- [4] Peters J.W., Schut G.J., Boyd E.S., Mulder D.W., Shepard E.M., Broderick J.B., et al. [FeFe]- and [NiFe]-hydrogenase diversity, mechanism, and maturation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.*, 2015;1853:1350–69.
- [5] Vignais P.M., Colbeau A. Molecular biology of microbial hydrogenases. *Curr Issues Mol Biol.*, 2004;6:159–88.
- [6] Roy S., Ghosh S., Das D. Improvement of hydrogen production with thermophilic mixed culture from rice spent wash of distillery industry. *Int J Hydrogen Energy*, 2012;37:15867–74.
- [7] Kumar N., Das D. Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* ИТ-ВТ 08. *Process Biochem.*, 2000;35:589–93.
- [8] Standard methods for the examination of water and wastewater. Washington D.C.: APHA-AWWA-WEF, 1998.
- [9] Shiraiishi T., Fukusaki E., Kajiyama S. Kobayashi a. Short communication A simple assay for formate dehydrogenase activity by gas chromatography e mass spectrometry q. *J Chromatogr A*, 1999;855:337–40.
- [10] Dutta T., Das A.K., Das D. Purification and characterization of [Fe]-hydrogenase from high yielding hydrogen-producing strain, *Enterobacter cloacae* ИТ-ВТ08 (MTCC 5373). *Int J Hydrogen Energy*, 2009;34:7530–7.
- [11] Miller GL. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem.*, 1959;31:426–8.
- [12] Elasharnouby O., Hafez H., Nakhla G., Naggar M.H.E. A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. *Int J Hydrogen Energy*, 2013;38:4945–66.

[13] Das D., Khanna N., Dasgupta C.N. Biohydrogen production. 1sted. New York: CRC press Taylor & Francis; 2014.

[14] Pandey A., Sinha P. An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *Int J Hydrogen Energy*, 2011;36:7460–78.

[15] Park M.J., Jo J.H., Park D., Lee D.S., Park J.M. Comprehensive study on a two-stage anaerobic digestion process for the sequential production of hydrogen and methane from cost-effective molasses. *Renew Energy*, 2010;35:6194–202.

[16] Arimi M.M., Knodel J., Kiprop A., Namango S.S., Zhang Y., Geiß S.-U. Strategies for improvement of biohydrogen production from organic-rich wastewater: a review. *Biomass Bioenergy*, 2015;75:101–18.

[17] Roy S., Vishnuvardhan M., Das D. Continuous thermophilic biohydrogen production in packed bed reactor. *Appl Energy*, 2014;136:51–8.

[18] Ngoma L., Masilela P., Obazu F., Gray V.M. The effect of temperature and effluent recycle rate on

hydrogen production by undefined bacterial granules. *Bioresour Technol*, 2011;102:8986–91.

[19] Lu W., Wen J., Chen Y., Sun B., Jia X., Liu M., et al. Synergistic effect of *Candida maltosa* HY-35 and *Enterobacter aerogenes* W-23 on hydrogen production. *Int J Hydrogen Energy*, 2007;32:1059–66.

[20] Yokoi H., Tokushige T., Hirose J., Hayashi S., Takasaki Y. H₂ production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnol Lett.*, n.d.;20:143–147.

[21] Pachapur V.L., Sarma S.J., Brar S.K., Le Bihan Y., Buelna G., Verma M. Biohydrogen production by co-fermentation of crude glycerol and apple pomace hydrolysate using coculture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. *Bioresour Technol*, 2015;193:297–306.

[22] Cheng J., Zhu M. A novel anaerobic co-culture system for biohydrogen production from sugarcane bagasse. *Bioresour Technol*, 2013;144:623–31.

[23] Seppälä J.J., Puhakka J.A., Yli-Harja O., Karp M.T., Santala V. Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* and *Escherichia coli* in pure and cocultures. *Int J Hydrogen Energy*, 2011;36:10701–8.



ACI's Ballast Water Management Conference will be taking place in Rotterdam, The Netherlands on 7th and 8th of April 2020. For its twenty-fourth edition, the conference will provide an in-depth look at the latest developments in the Ballast Water Industry, focusing on technological and regulatory advances.

Over two days, the event will give you essential insight into potential ship-owner and port solutions, and analysis of retrofitting and maintenance experience, through case studies, interactive sessions and panel discussions led by industry experts.

Once again, the conference will bring together senior executives from ship-owner and ship-management companies, regulatory institutes, equipment providers and fitters, commissioning testers, researchers, as well as other influential stakeholders involved in the Ballast Water Management supply chain.

Join us in Rotterdam to exchange your opinions and technical knowledge with your peers, and engage in excellent networking opportunities.

Key topics:

- Ballast Water Management System Technical Evaluation
- Overcoming Vessel-Specific Ballast Water Management Challenges
- Team, Tools & On Board Training
- Age of Vessels vs Revenue over Remaining Lifetime
- Vessels Owners Experience & Best Practises
- Moving Towards Prosperous Retrofitting for 2020 and 2022
- Port State Control Inspections
- Going Beyond the Current Ballast Water Management Systems and Legislation
- Power Requirement Compliance: Energy Usage of Ballast Water Treatment Systems

<https://www.wplgroup.com/aci/event/Ballast-Water-Management-Conference-Europe/>

