

Министерство образования и науки Российской Федерации

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г.ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра физической химии

**Сравнительное изучение биоэлектрокаталитического окисления
различных органических субстратов с помощью микроорганизмов**

АВТОРЕФЕРАТ БАКАЛАВРСКОЙ РАБОТЫ

Студента (ки) 4 курса 413 группы

направления 04.03.01 «Химия»

Институт химии

наименование факультета

Ловягиной Юлии Алексеевны

фамилия, имя, отчество

Научный руководитель

д.х.н., профессор
должность, уч. степень, уч. звание

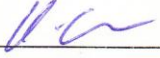

дата, подпись

20.06.18

И.А. Казаринов
инициалы, фамилия

Зав. кафедрой:

д.х.н., профессор
должность, уч. степень, уч. звание


дата, подпись

20.06.18

И.А. Казаринов
инициалы, фамилия

Саратов 2018 г.

ВВЕДЕНИЕ

Мировой расход энергии существенно возрос за последние десятилетия. В то время как нет никаких признаков того, что этот рост спроса уменьшится (особенно в развивающихся странах), пришло понимание быстрого истощения невозобновляемых ресурсов и необратимого вреда, причиняемого окружающей среде. Необходимо найти новый источник энергии, который смог бы решить эти проблемы.

Биологические топливные элементы предлагают решение всех этих проблем, они берут доступные вещества из возобновляемых источников и преобразуют их в безопасные продукты с выработкой электричества. В отличие от обычных топливных элементов, использующих водород, этанол и метанол как топливо, биотопливные элементы используют органические продукты метаболических процессов или органические доноры электронов, задействованные в процессах роста, как топливо для генерации тока.

Существует 2 типа биотопливных элементов-микробные и ферментативные. В микробных топливных элементах бактерии непосредственно не переносят электроны, которые они производят, на их характерный концевой акцептор электронов; вместо этого эти электроны отводятся к электроду (аноду). Затем электроны проводят по сопротивлению или мощности пользователя к катоду, и, таким образом, бактериальная энергия непосредственно преобразуется в электрическую энергию.

Микробные топливные элементы (МТЭ) считаются относительно дешевыми, экологически чистыми и могут использовать отходы в качестве источника углерода. Именно их я и рассмотрю подробнее в своей работе.

Объектами переработки, из которых можно получать биоэнергию и биохимикаты, могли бы послужить промышленные сточные воды, например, от отраслей пищевой промышленности и пивоваренных заводов, сельскохозяйственные сточные воды от животных ферм, поскольку они

содержат высокие уровни легко деградируемого органического материала, что приводит к экономической выгоде, даже когда требуется подогревание жидкости. Кроме того, они уже имеют высокое содержание воды, что исключает необходимость её добавления. Восстановление энергии и ценных продуктов могло бы частично скомпенсировать стоимость обработки сточных вод и несколько уменьшить нашу зависимость от ископаемого топлива.

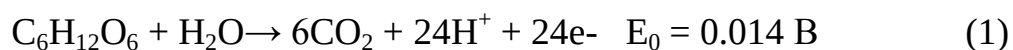
Для того, чтобы получить биотопливо или биохимикаты, нужно правильно подобрать соответствующие микробиологические системы. Поэтому целью выпускной квалификационной работы является изучение биоэлектрокаталитического окисления различных органических субстратов с помощью микроорганизмов.

Основное содержание работы

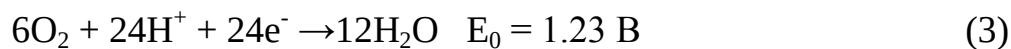
Биотопливный элемент – устройство, которое непосредственно преобразует энергию химических связей субстрата в электричество путём биокаталитического окисления органических или неорганических веществ. Отличительной особенностью биотопливных элементов является возможность объединения процессов биodeградации и получения электрического тока.

В отличие от химических топливных элементов, биологические работают в умеренных условиях реакций - при температуре и давлении окружающей среды. Они также используют нейтральный электролит и недорогие катализаторы типа платины. В биотопливных элементах катализатор - это либо микроорганизмы типа дрожжей, либо фермент. Биотопливные элементы конвертируют химическую энергию углеводов типа сахара и спиртов непосредственно в электрическую. Поскольку большинство органических соединений подвергаются окислению с высвобождением энергии, биокатализируемое окисление органических соединений кислородом на поверхностях двух электродов даёт способ преобразования химической энергии в электрическую.

В нормальном микробном катаболизме субстрат типа углевода сначала окисляется без участия кислорода и его электроны идут на центр активного фермента, который функционирует как восстановленный интермедиат, что описывается реакциями:



В отсутствие кислорода электроны направляются к электроду, проходят через внешнюю цепь и в конечном счете объединяются с акцептором электронов - молекулярным кислородом:



Электрохимическое поведение медиатора метиленового синего

На рисунке 1 представлены вольтамперные кривые, снятые в рабочем электролите, содержащем субстрат и различные концентрации медиатора.

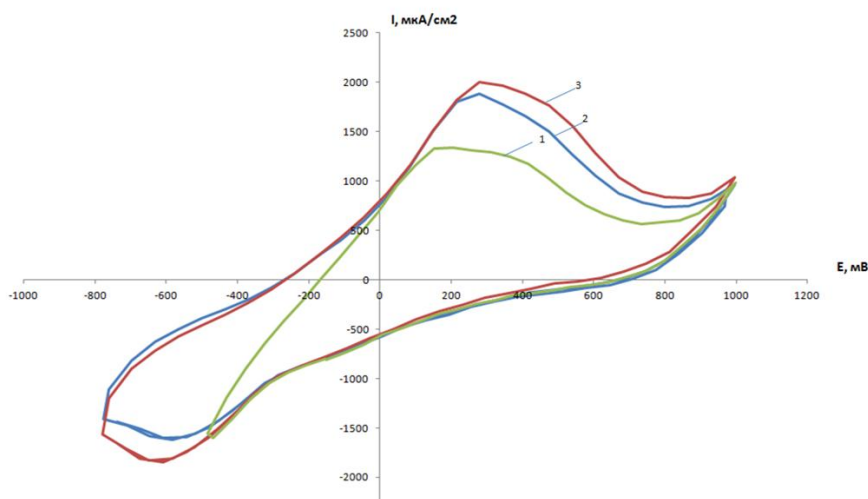
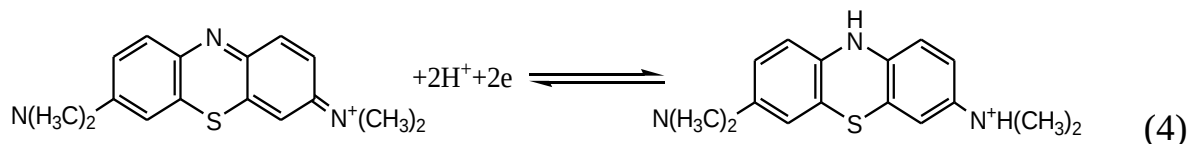


Рис.1. Циклические вольтамперные кривые углеродистого электрода, снятые в рабочем электролите (рН 7.0), содержащем $2 \cdot 10^{-3}$ моль/л глюкозы и различные концентрации метиленового синего (моль/л): 1 – $7,5 \cdot 10^{-4}$; 2 – $1 \cdot 10^{-3}$; 3 – $1,5 \cdot 10^{-3}$.

При введении в рабочий электролит метиленового синего в анодной области потенциалов появляется анодный пик тока, а в катодной области – катодный ток максимума. Появление анодного пика связано с процессом окисления метиленового синего на электроде, а появление катодного пика связано с его восстановлением по реакции:

(метиленовый синий, $E=0,01 \text{ В}$)



Кинетика биоэлектрокаталитического окисления глюкозы с помощью бактериальных клеток *Escherichia Coli* и *Enterobacter cloacae*

С целью изучения кинетики электрохимических процессов, протекающих во внешнедиффузионной цепи, были проведены амперометрические измерения биоэлектрохимического окисления глюкозы бактериальными клетками *Escherichia coli* и *Enterobacter cloacae* на вращающемся дисковом электроде.

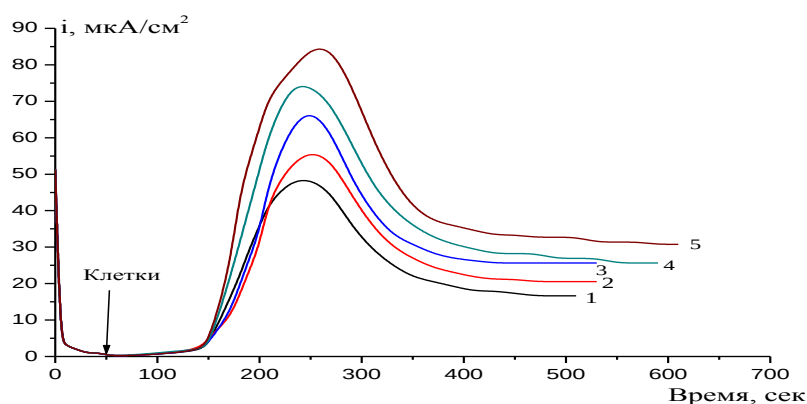


Рис.2. Потенциостатические кривые анодного окисления метиленового синего на вращающемся дисковом электроде в рабочем электролите, содержащем $7.5 \cdot 10^{-4}$ моль/л медиатора, $4.6 \cdot 10^{-3}$ моль/л глюкозы и 2 мг вл. веса/мл клеток *Escherichia coli* при различных скоростях вращения (рад/с): 1- 36.6; 2-54.5; 3- 80.64; 4- 104.6; 5- 151.8 при потенциале +0.250 В.

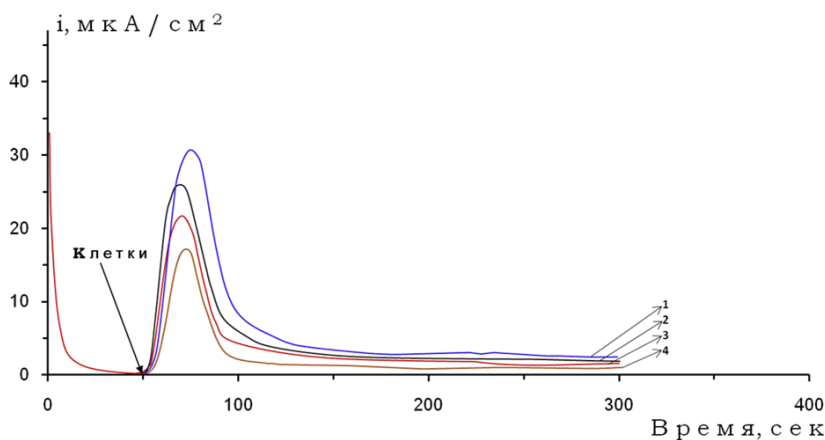


Рис.3. Потенциостатические кривые анодного окисления метиленового синего на вращающемся дисковом электроде в рабочем электролите, содержащем $7.5 \cdot 10^{-4}$ моль/л медиатора, $4.6 \cdot 10^{-3}$ моль/л глюкозы и $1.5 \cdot 10^9$

клеток/мл *Enterobacter cloacae* при различных скоростях вращения (рад/с):
1- 104.6; 2-177.9; 3- 251.2; 4- 324.5 при потенциале +0.080 В.

Из рисунков 2 и 3 видно, что при добавлении бактериальных клеток в рабочий электролит начинается резкое возрастание плотности анодного тока, поскольку происходит увеличение концентрации восстановленной формы метиленового синего в объёме раствора, о чем свидетельствует постепенное обесцвечивание электролита. Кривые проходят через максимум, после чего наблюдается постепенное снижение плотности тока во времени с выходом на постоянное значение, что, по всей видимости, связано со снижением концентрации восстановленной формы медиатора в объёме раствора. Величина плотности тока максимума возрастает при увеличении скорости вращения дискового электрода.

По данным графикам построили зависимость плотности тока максимума катодного восстановления метиленового синего клетками *Escherichia coli* и *Enterobacter cloacae* от корня квадратного из скорости вращения дискового электрода.

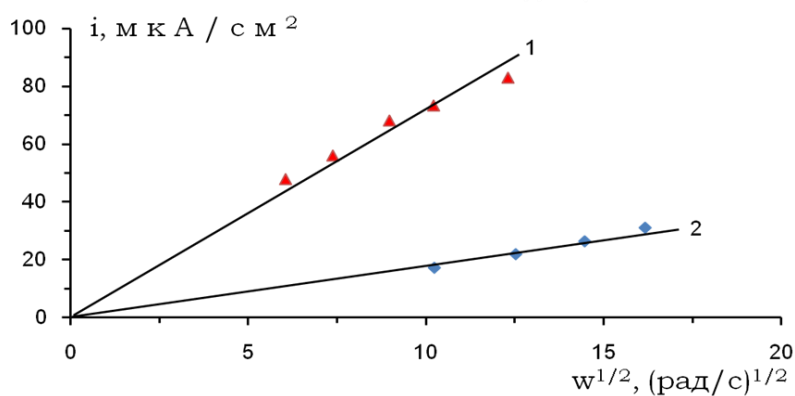


Рис.4. Зависимость плотности тока максимума катодного восстановления метиленового синего клетками *Escherichia coli* (1) и *Enterobacter cloacae* (2) от корня квадратного из скорости вращения дискового электрода.

Как видно из рисунка 4, наблюдается прямая пропорциональная зависимость между плотностью предельного диффузионного тока исследуемого медиатора и корнем квадратным из угловой скорости вращения вращающегося дискового электрода. В этом случае i_d , $\omega^{1/2}$ –кривые легко

аппроксимируются прямыми линиями, проходящими через начало координат, что свидетельствует о диффузионной природе процессов восстановления исследуемого медиатора.

Доказанный нами факт, что электрохимическая реакция восстановления метиленового синего из клеток *Escherichia coli* и *Enterobacter cloacae* протекает в режиме диффузионной кинетики дает возможность применить уравнение Левича для определения физико-химической характеристики вещества – коэффициента диффузии исследуемого медиатора в растворе электролита, содержащего бактериальную суспензию:

$$i_d = 0.62nFD^{2/3}\nu^{-1/6}\omega^{1/2}c^\circ \quad (5),$$

где D - коэффициент диффузии, $\text{см}^2/\text{с}$,

i_d – плотность предельного диффузионного тока, $\text{мкА}/\text{см}^2$,

ω – угловая скорость вращения электрода, $\text{рад}/\text{с}$,

ν – кинематическая вязкость, $\text{см}^2/\text{с}$,

c° - концентрация реагирующего вещества в объеме раствора, $\text{моль}/\text{см}^3$.

Таблица 1- Значения коэффициентов диффузии метиленового синего в растворе электролита, содержащего бактериальную суспензию:

Клетки	$D_{\text{ср}} \cdot 10^7, \text{см}^2/\text{с}$
<i>Escherichia coli</i>	4.5 ± 0.2
<i>Enterobacter cloacae</i>	1.3 ± 0.3

Из полученных данных видно, что значения коэффициентов диффузии метиленового синего в представленных экспериментах зависят от природы бактериальной суспензии, используемой в качестве катализатора процесса окисления глюкозы. Это свидетельствует о том, что мы наблюдаем не внешедиффузионный (диффузия в объеме электролита), а внутридиффузионный контроль, то есть лимитирующей стадией является перенос медиатора через наружную мембрану бактериальной клетки.

Данные из таблицы (см. табл. 1) показывают, что коэффициент диффузии восстановленной формы метиленового синего из клеток *Escherichia coli* в 3.5 раза выше, чем из клеток *Enterobacter cloacae*. В тоже время эти значение много меньше соответствующей величины в свободном объеме раствора $(1.3 \pm 0.1) \cdot 10^{-6} \text{ см}^2/\text{с}$. Это указывает на то, что при подборе микроорганизмов в качестве катализаторов биоэлектрохимического окисления субстратов необходимо учитывать механизм переноса медиатора через клеточную мембрану. По этой причине клетки *Enterobacter cloacae* являются менее эффективным катализатором по сравнению с клетками *Escherichia coli* для биоэлектрохимического окисления глюкозы.

Сравнение биоэлектрохимического окисления различных органических субстратов с помощью бактериальной клетки *Escherichia coli*.

На рисунках 5-7 приведены циклические вольтамперные кривые углеродистого электрода, снятые при одинаковой скорости вращения в рабочем электролите (pH 7.0), содержащем $4,6 \cdot 10^{-3}$ моль/л органического субстрата, $7,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л раствора метиленового синего и разное количество клеток *Escherichia coli*.

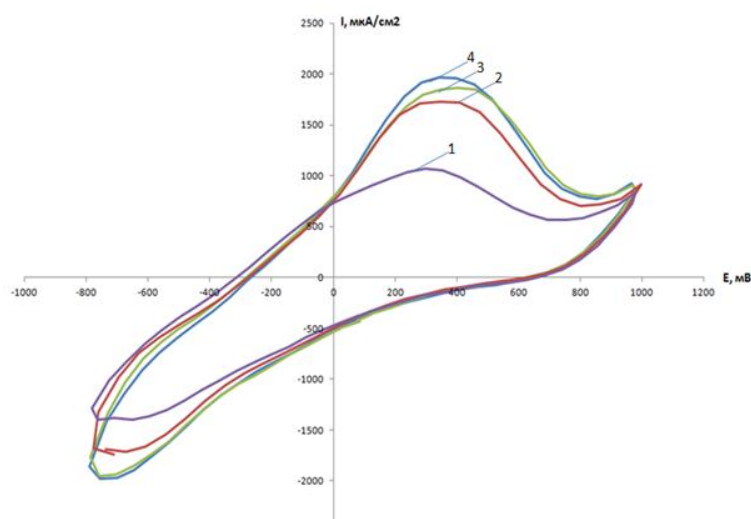


Рис.5. Циклические вольтамперные кривые углеродистого электрода в рабочем электролите (pH 7.0), содержащем $4,6 \cdot 10^{-3}$ моль/л глюкозы, $7,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л раствора метиленового синего и разное количество клеток *Escherichia coli* ($1 \cdot 10^9$ клеток/мл): 1 – без добавления; 2 – 1 мл; 3 – 2 мл; 4 – 3 мл.

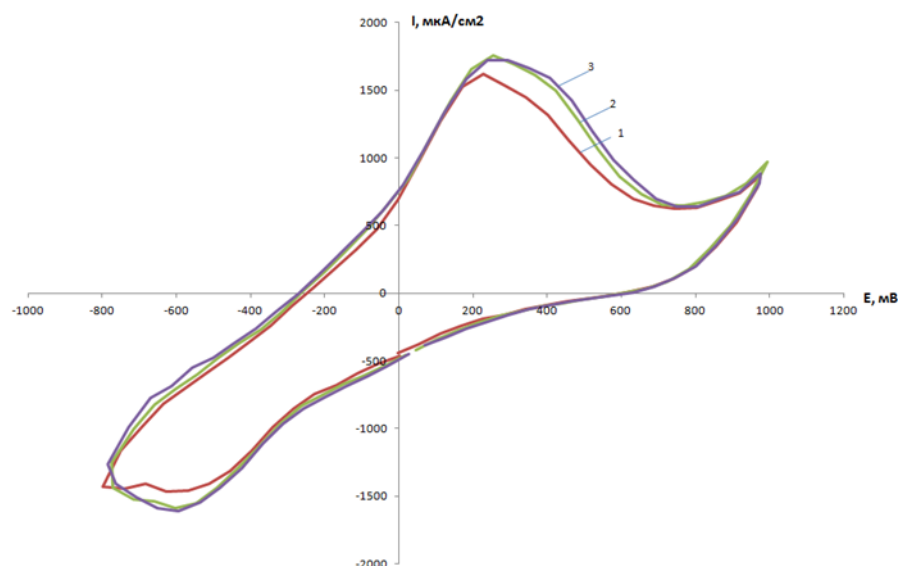


Рис.6. Циклические вольтамперные кривые углеродистого электрода в рабочем электролите (рН 7.0), содержащем $4,6 \cdot 10^{-3}$ моль/л лимонной кислоты, $7,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л раствора метиленового синего и разное количество клеток *Escherichia coli* ($1 \cdot 10^9$ клеток/мл): 1– без добавления; 2 – 1 мл; 3 – 2 мл

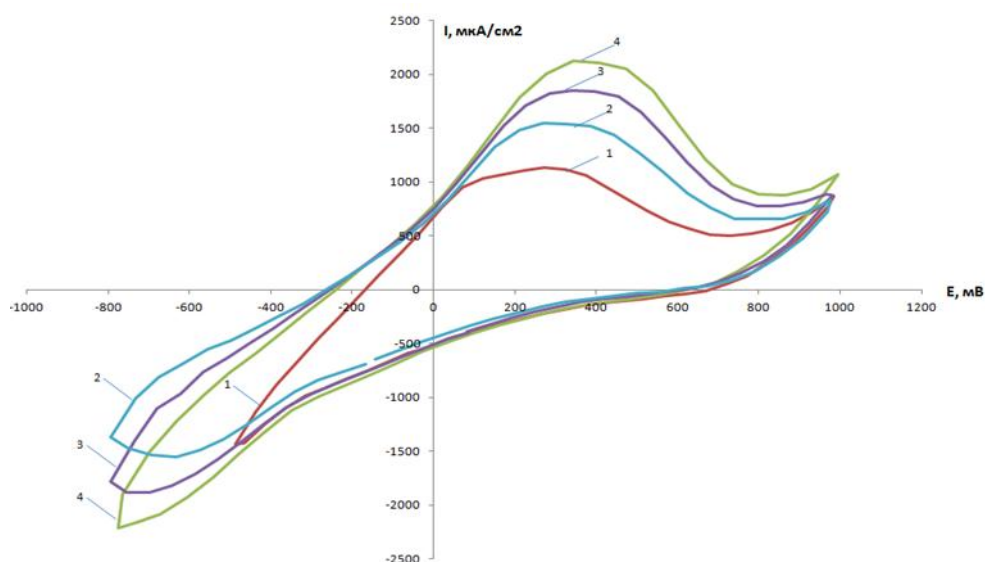


Рис.7. Циклическая вольтамперные кривые углеродистого электрода в рабочем электролите (рН 7.0), содержащем $4,6 \cdot 10^{-3}$ моль/л сахарозы, $7,5 \cdot 10^{-4}$ моль/л раствора метиленового синего и разное количество клеток *Escherichia coli* ($1 \cdot 10^9$ клеток/мл): 1- без добавления; 2 – 1 мл; 3 – 2 мл; 4 – 3мл.

Таким образом, проведенные исследования показали, что скорость биоэлектрохимического окисления исследуемых органических субстратов зависит от концентрации бактериальных клеток *Escherichia coli*. Самое большое увеличение скорости электрохимического окисления при

увеличении концентрации клеток наблюдалось в экспериментах, в которых в качестве субстрата использовалась сахароза.

При потенциостатических измерениях изучают зависимость тока от времени при постоянном потенциале электрода, поддерживаемом при помощи потенциостата. Были сняты кривые анодного окисления метиленового синего в растворе, содержащем постоянное количество медиатора и бактериальной суспензии, варьируя концентрации субстратов.

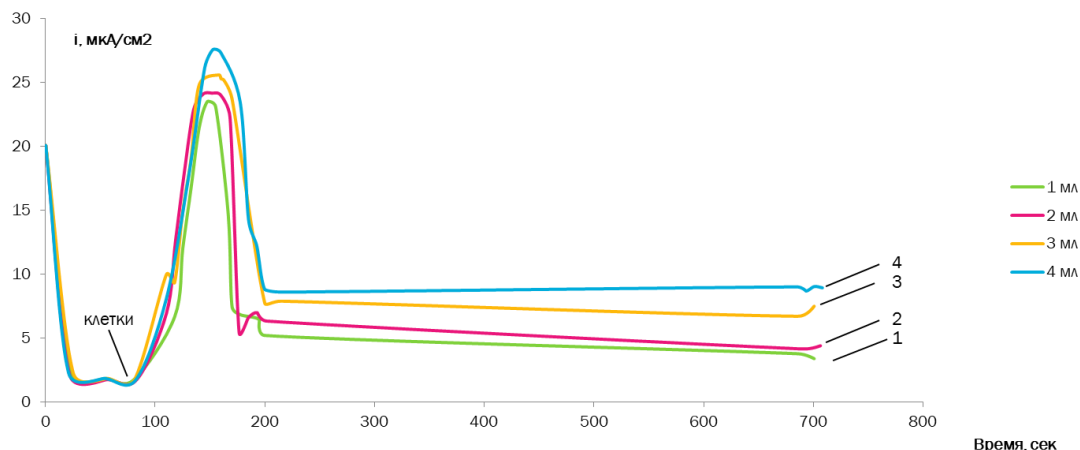


Рис.8. Потенциостатические кривые анодного окисления метиленового синего на вращающемся дисковом электроде в рабочем электролите, содержащем $7.5 \cdot 10^{-4}$ моль/л медиатора, разный объем глюкозы и 2 мг вл. веса/мл клеток *Escherichia coli* при скорости вращения 1000 об/сек при потенциале +0.40 В: 1–1 мл, 2–2 мл, 3–3 мл, 4–4 мл.

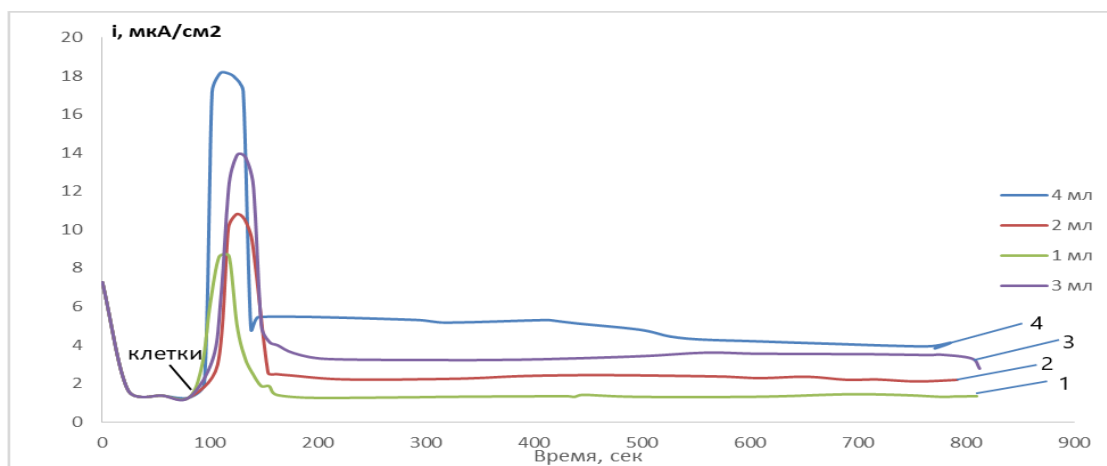


Рис.9. Потенциостатические кривые анодного окисления метиленового синего на вращающемся дисковом электроде в рабочем электролите, содержащем $7.5 \cdot 10^{-4}$ моль/л медиатора, разный объем лимонной кислоты и 2 мг вл. веса/мл клеток *Escherichia coli* при скорости вращения 1000 об/сек при потенциале +0.40 В: 1–1 мл, 2–2 мл, 3–3 мл, 4–4 мл.

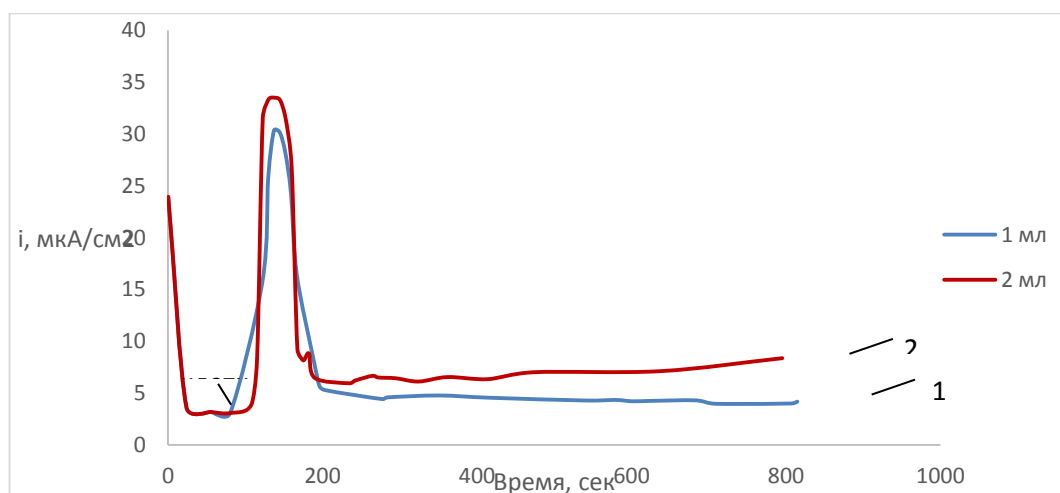


Рис.10. Потенциостатические кривые анодного окисления метиленового синего на вращающемся дисковом электроде в рабочем электролите, содержащем $7.5 \cdot 10^{-4}$ моль/л медиатора, различный объем сахарозы и 2 мг вл. веса/мл клеток *Escherichia coli* при скорости вращения 1000 об/сек при потенциале +0.40 В: 1-1 мл, 2-2 мл.

С помощью метода интегрирования рассчитали количество электричества, полученного при каждой концентрации субстрата.

Таблица 2.

Значения количества электричества разных субстратов

лимонная кислота		глюкоза		сахароза	
С, моль/л	Q, мкКл	С, моль/л	Q, мкКл	С, моль/л	Q, мкКл
$8 \cdot 10^{-3}$	32,4	$3 \cdot 10^{-3}$	162,4	$2 \cdot 10^{-3}$	201,6
$1,7 \cdot 10^{-2}$	76,6	$6 \cdot 10^{-3}$	232,15	$4 \cdot 10^{-3}$	294,9
$2,6 \cdot 10^{-2}$	144,8	$9 \cdot 10^{-3}$	315,4		
$3,5 \cdot 10^{-2}$	196,8	$1,2 \cdot 10^{-2}$	395,56		

Из полученных данных видно, что наилучшие показатели у субстрата глюкозы, существует пропорциональность между концентрациями субстрата и полученными значениями количества электричества. Тем самым подтверждая, что глюкоза является наилучшим субстратом для наших исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

1. Установлено, что лимитирующей стадией процесса биоэлектрохимического окисления исследуемых субстратов в нейтральных средах в системе «глюкоза – клетки - медиатор – электрод» является диффузия восстановленной формы медиатора (метиленового синего) через клеточную мембрану микроорганизма.
2. Показано, что скорость биоэлектрохимического окисления исследуемых органических субстратов (глюкозы, лимонной кислоты и сахарозы) зависит от концентрации введенного в систему медиатора. При увеличении концентрации бактериальных клеток *Escherichia coli* также наблюдается увеличение плотности тока максимума на вольтамперных кривых. Самое большое увеличение скорости электрохимического окисления при увеличении концентрации клеток наблюдалось в экспериментах, в которых в качестве субстрата использовалась сахароза.
3. Установлено, что микроорганизмы *Escherichia coli* являются эффективным катализатором для биоэлектрохимической конверсии сточных вод, содержащих пищевые отходы.