

УДК 661.721.422:602.4

**ОПИСАНИЕ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОГО ОКИСЛЕНИЯ МЕТАНА
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МОДЕЛЕЙ МНОГОСУБСТРАТНОЙ КИНЕТИКИ**

© 2008 г.

Д.А. Казаков, В.В. Вольхин, И.А. Зернина, Д.А. Кошелева

Пермский государственный технический университет

kazakovbiotech@mail.ru

Поступила в редакцию 06.05.2008

Представлены результаты исследования кинетики биокаталитического окисления метана, осуществляемого целыми клетками метанооксиляющих микроорганизмов в жидкой среде. На основе полученных данных предложена математическая модель для описания изучаемого процесса, которая может быть использована для предсказания поведения рассматриваемой кинетической системы в заданных условиях.

Ключевые слова: окисление метана, многосубстратная кинетика, биокинетическая модель, метанооксиляющие бактерии, метод нелинейных оценок.

Введение

Биокаталитическое окисление метана – биохимический процесс, протекающий под действием метанмонооксигеназы (ММО) – фермента, продуцируемого клетками метанооксиляющих бактерий [1]. Данный процесс может быть использован при решении ряда экологических проблем, связанных с предотвращением эмиссии метана с полигонов твёрдых бытовых отходов [2], скотоводческих ферм [3] и дегазационных установок угольных шахт [4].

С точки зрения эффективного использования данного процесса в экологической биотехнологии важным является знание его кинетических закономерностей. Однако публикации, посвящённые исследованию кинетики биокаталитического окисления метана, содержат сложно сопоставимые данные, не дающие однозначного представления о протекании процесса в целом [5].

Цель настоящей работы – математическое описание биокаталитического окисления метана с использованием моделей многосубстратной кинетики.

Экспериментальная часть

Объект исследования. Объектом исследования являлась смешанная культура микроорганизмов, использующая метан в качестве единственного источника углерода и энергии.

Среда культивирования. Для культивирования метанооксиляющих микроорганизмов использовали жидкую синтетическую минеральную среду следующего состава (мг/л дистиллированной воды): KNO_3 – 1000; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 200;

CaCl_2 – 20; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 1500; KH_2PO_4 – 700; Na_2EDTA – 5; $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 2; $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ – 0.03; $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.2; $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ – 0.1; $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ – 0.02; $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ – 0.03. Устанавливали pH среды в интервале 6.8–7.2 [1].

Определение зависимости удельной скорости окисления метана от концентраций метана и кислорода в культуральной жидкости. В герметичные сосуды объёмом 1550 мл вводили 45 мл свежеприготовленной жидкой среды и 5 мл засевной культуры (инокулята). Сосуды продували метановоздушной смесью с концентрацией метана 2–95 об.%, герметично закрывали и инкубировали при температуре 30°C с перемешиванием 180 об/мин на орбитальной термостатированной качалке КТ 104. Периодически проводили отбор проб культуральной жидкости для определения концентрации биомассы. Концентрацию биомассы определяли весовым методом [6].

В периодически отбираемых из реакционных сосудов пробах газовой смеси определяли концентрацию метана на газовом хроматографе ЛХМ-8МД: детектор – катарометр, насадочная колонка с молекулярными ситами NaX длиной 1 м, газ носитель – гелий, температура колонки и детектора – 40°C, температура испарителя – 50°C.

Удельную скорость окисления метана рассчитывали для начального этапа процесса (8–10 ч) по следующему уравнению [1]:

$$q = \frac{\ln(x/x_0) \cdot (S_0 - S)}{(t - t_0) \cdot (x - x_0)}, \quad (1)$$

где x_0 и x – начальное и конечное количество АСБ (абсолютно сухой биомассы) соответ-

венно, г; S_0 и S – начальное и конечное количество метана, ммоль; t_0 – начальное время, ч; t – конечное время, ч.

Концентрации метана и кислорода в культуральной жидкости для начального этапа процесса (8–10 ч) определяли исходя из предположения, что при малых количествах биомассы и высокой интенсивности перемешивания растворение газов происходит намного быстрее, чем их утилизация микроорганизмами. Таким образом, в культуральной жидкости поддерживаются концентрации метана и кислорода, близкие к равновесным для данных условий. Для расчёта равновесных концентраций метана и кислорода в среде культивирования использовали уравнение Сеченова, которое позволяет учесть снижение растворимости газов в водных растворах сильных электролитов вследствие эффекта высаливания [7]:

$$\lg \frac{\alpha_0}{\alpha} = \frac{1}{2} \sum_{i=1}^n H_i c_i z_i^2, \quad (2)$$

где α_0 , α – коэффициенты абсорбции газа для чистого растворителя и раствора соответственно; H_i – параметр, характеризующий ион, л/моль; c_i – концентрация ионов в растворе, моль/л; z_i – заряд иона.

При расчётах по уравнению (2) учитывали только ионы основных компонентов среды культивирования: KNO_3 , MgSO_4 , CaCl_2 , Na_2HPO_4 , KH_2PO_4 .

Описание зависимости удельной скорости окисления метана от концентраций метана и кислорода в культуральной жидкости с использованием многосубстратных кинетических моделей. Для описания данной зависимости использовали мультипликативные многосубстратные модели и модели многосубстратной кинетики, основанные на механизмах ферментативного катализа.

Общий вид мультипликативных многосубстратных моделей можно представить уравнением [8]:

$$q = \Omega(c_1) \times \Theta(c_2), \quad (3)$$

где q – удельная скорость окисления метана, ммоль CH_4 /(г АСБ·ч); c_1 , c_2 – соответственно концентрации метана и кислорода, моль/л; $\Omega(c_1)$, $\Theta(c_2)$ – индивидуальные односубстратные модели для метана и кислорода соответственно.

В качестве мультипликативных многосубстратных моделей в соответствии с уравнением (3) рассматривали все возможные сочетания следующих индивидуальных односубстратных моделей [9]:

1) модель Моно:

$$q(c) = q_{\max} \frac{c}{K_c + c}, \quad (4)$$

где q_{\max} – максимальная удельная скорость окисления лимитирующего субстрата, ммоль/(г АСБ·ч); c – концентрация лимитирующего субстрата, моль/л; K_c – константа насыщения, моль/л;

2) модель Тисье:

$$q(c) = q_{\max} (1 - e^{-kc}), \quad (5)$$

где k – постоянный коэффициент, л/моль;

3) модель Мозера:

$$q(c) = q_{\max} \frac{c^\lambda}{K_c + c^\lambda}, \quad (6)$$

где λ – постоянный коэффициент.

Анализировали следующие модели многосубстратной кинетики, основанные на механизмах ферментативного катализа [10]:

1) модель механизма тройного комплекса:

$$q = \frac{q_{\max}}{1 + K_2/c_2 + K_1 K_2/c_1 c_2}, \quad (7)$$

где K_1 , K_2 – константы для метана и кислорода соответственно, моль/л;

2) модель «пинг-понг» механизма:

$$q = \frac{q_{\max}}{1 + K_1/c_1 + K_2/c_2}. \quad (8)$$

Параметры всех моделей определяли по экспериментальным данным, отражающим зависимость удельной скорости окисления метана от концентраций метана и кислорода в культуральной жидкости, с использованием метода нелинейных оценок. Расчёты проводили с использованием программы математической обработки данных **Statistica 6.0** (StatSoft, Inc., www.statsoft.com). Адекватность многосубстратных моделей оценивали по величине множественного коэффициента корреляции (R) [8].

Результаты и их обсуждение

Зависимость удельной скорости окисления метана от концентраций метана и кислорода в культуральной жидкости. Кинетические исследования показали, что скорость окисления метана в значительной степени зависит от концентраций метана и кислорода в культуральной жидкости. На рис. 1 представлена зависимость удельной скорости окисления метана от его концентрации в культуральной жидкости. Во всех случаях удельная скорость окисления определена для начального этапа процесса (8–10 ч), поскольку при небольших концентрациях

биомассы скорости утилизации субстратов малы по сравнению со скоростями их массопередачи в культуральную жидкость и можно принять, что концентрации метана и кислорода близки к равновесным для данных условий. Таким образом, в данном случае рассмотрены условия, когда массообмен не оказывает значительного влияния на скорость процессов роста микроорганизмов и утилизации субстратов.

На рис. 1 можно видеть, что зависимость удельной скорости окисления метана от его концентрации в культуральной жидкости имеет форму кривой с максимумом. Наличие максимума обусловлено тем, что при увеличении концентрации метана в газовой смеси снижается концентрация кислорода. Уменьшение концентрации кислорода в газовой фазе при условии установления равновесия влечёт снижение его концентрации в жидкой фазе, что в свою очередь вызывает уменьшение скорости процесса окисления метана. Так, при повышении концентрации метана с 0.03 до 0.37 ммоль/л и соответствующем снижении концентрации кислорода с 0.22 до 0.17 ммоль/л в среде культивирования наблюдается увеличение удельной скорости окисления метана, что говорит о преобладании в этой области лимитирующего действия метана. При дальнейшем повышении концентрации метана с 0.37 до 1.1 ммоль/л и снижении концентрации кислорода с 0.17 до 0.02 ммоль/л удельная скорость окисления метана уменьшается вследствие перехода процесса в режим с лимитирующим действием кислорода. Таким образом, удельная скорость окисления метана зависит одновременно от концентрации двух субстратов. Это делает справедливым использование для описания зависимости удельной скорости окисления метана от концентраций метана и кислорода моделей многосубстратной кинетики.

Результаты проведённых расчётов показывают (рис. 2), что процесс биокаталитического окисления метана можно достаточно точно описывать с использованием различных моделей многосубстратной кинетики, поскольку множественный коэффициент корреляции (R) для всех рассмотренных моделей близок к единице. Для наиболее точного предсказания скорости исследуемого процесса следует использовать модель Мозера – Мозера, которая характеризуется большей адекватностью ($R = 0.970$) по сравнению с другими проанализированными моделями. В ходе обработки данных по методу нелинейных оценок получены следующие значения параметров данной модели: $q_{\max} = 12.9$ ммоль $\text{CH}_4/(\text{г АСБ}\cdot\text{ч})$;

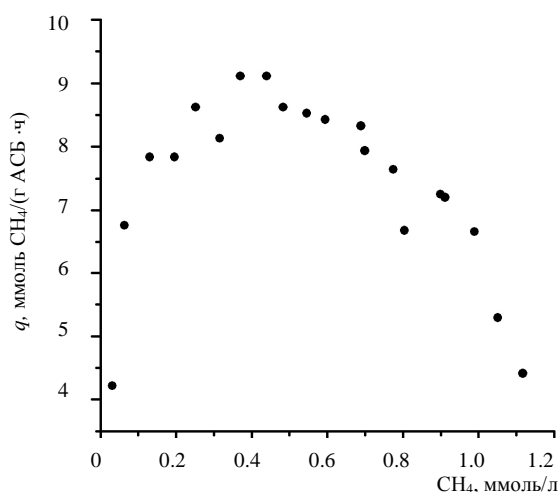


Рис. 1. Зависимость удельной скорости окисления метана от его концентрации в культуральной жидкости

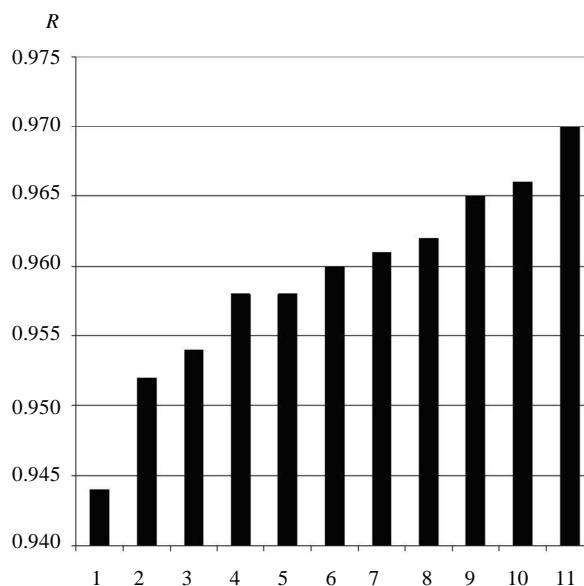


Рис. 2. Результаты оценки адекватности многосубстратных кинетических моделей: 1 – модель Моно – Тисье; 2 – модель Тисье – Тисье; 3 – модель Мозера – Тисье; 4 – модель Тисье – Моно; 5 – модель Тисье – Мозера; 6 – модель тройного комплекса; 7 – модель Моно – Моно; 8 – модель «пинг-понг» механизма; 9 – модель Мозера – Моно; 10 – модель Моно – Мозера; 11 – модель Мозера – Мозера

$$K_{\text{CH}_4} = 6.2 \cdot 10^{-6} \text{ моль/л}; K_{\text{O}_2} = 5.35 \cdot 10^{-4} \text{ моль/л};$$

$$\lambda_{\text{CH}_4} = 1.178; \lambda_{\text{O}_2} = 0.756.$$

На рис. 3 показано соотношение экспериментальных и рассчитанных по модели Мозера – Мозера значений удельной скорости окисления метана.

Рис. 3 демонстрирует, что расчётные значения удельной скорости окисления метана близки к экспериментальным. Таким образом, модель Мозера – Мозера довольно точно воспроиз-

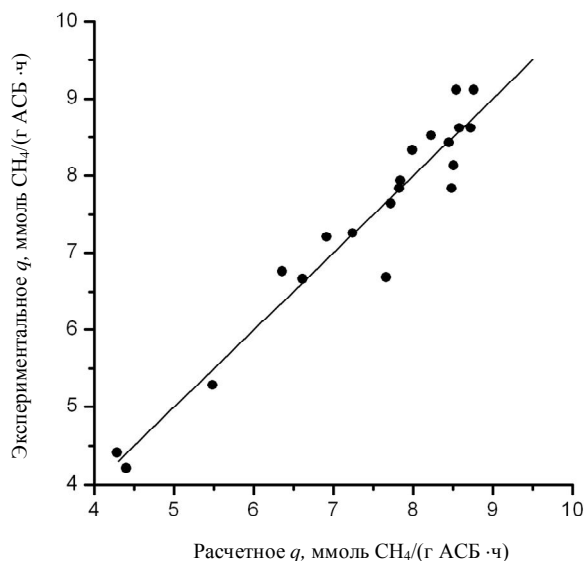


Рис. 3. Сравнение экспериментальных и рассчитанных по модели Мозера – Мозера значений удельной скорости окисления метана

изводит наблюдаемые в эксперименте тенденции и может быть использована для предсказания поведения рассматриваемой биокаталитической системы в заданных условиях.

Заключение

Проведённые кинетические исследования показали, что удельная скорость биокаталитического окисления метана зависит от концентраций метана и кислорода в среде культивирования. Для описания данной зависимости предложено использовать многосубстратные кинетические модели. В работе проведён анализ различных многосубстратных кинетических моделей. Показано, что наиболее адекватно зависимость удельной скорости окисления метана от концентраций метана и кислорода описывается кинетическим уравнением модели Мозера – Мозера в мультипликативной форме. Модель Мозера – Мозера с параметрами, определёнными в результате проведения расчётов, довольно точно аппроксимирует экспериментальные данные и, таким образом, может быть использована для описания кинетики биокатали-

тического окисления метана в ходе проведения научных исследований и при проектировании биофильтрационного оборудования, предназначенного для снижения выбросов метана в атмосферу.

Работа выполнена при финансовой поддержке внутривузовского гранта в рамках реализации инновационной образовательной программы «Создание инновационной системы формирования профессиональных компетенций кадров и центра инновационного развития региона на базе многопрофильного технологического университета» в соответствии с направлением научно-образовательного комплекса «Научкоёмкие технологии переработки нефти и газа».

Список литературы

1. Гальченко В.Ф. Метанотрофные бактерии. М.: ГЕОС, 2001. 500 с.
2. Gebert J., Groengroeft A., Miehlich G. Kinetics of microbial landfill methane oxidation in biofilters // Waste Manag. 2003. V. 23. № 7. P. 609–619.
3. Roland W.M., Arjan W.V. Biofiltration for mitigation of methane emission from animal husbandry // Environ. Sci. Technol. 2005. V. 39. № 7. P. 5460–5468.
4. Иванов М.В. Микробиологический метод борьбы с метаном в угольных шахтах // Труды Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. Вып. XII. М.: Наука, 2004. С. 7–29.
5. Глаголев М.В. Математическое моделирование метаноокисления в почве // Труды Института микробиологии им. С.Н. Виноградского РАН. Вып. XIII. М.: Наука, 2006. С. 315–339.
6. Малашенко Ю.Р., Романовская В.А., Троценко Ю.А. Метаноокисляющие микроорганизмы. М.: Наука, 1978. 198 с.
7. Blanch H.W., Clark D.S. Biochemical engineering. N.Y.: Marcel Dekker, Inc., 1997. 702 p.
8. Seker S, Beyenal H., Salih B., Tanyolac A. Multi-substrate growth kinetics of *Pseudomonas putida* for phenol removal // Appl. Microbiol. Biotechnol. 1997. V. 47. № 5. P. 610–614.
9. Минкевич И.Г. Материально-энергетический баланс и кинетика роста микроорганизмов. Москва-Ижевск: НИЦ «Регулярная и хаотическая динамика», 2005. 352 с.
10. Варфоломеев С.Д., Гуревич К.Г. Биокинетика: Практический курс. М.: ФИАР-ПРЕСС, 1999. 720 с.

DESCRIPTION OF BIOCATALYTIC METHANE OXIDATION USING MULTI-SUBSTRATE KINETIC MODELS

D.A. Kazakov, V.V. Volhin, I.A. Zernina, D.A. Kosheleva

The investigation results of kinetics of biocatalytic methane oxidation realized by whole cells of methane-oxidizing microorganisms in liquid medium are presented. Based on the data obtained, a mathematical model to describe the oxidation process has been proposed. The model can be used to predict the biocatalytic system behavior under predetermined conditions.