



УДК 579.66:663

ВЛИЯНИЕ ЦЕЛЛЮЛОЗОРАЗРУШАЮЩИХ ФЕРМЕНТОВ НА АКТИВНОСТЬ МЕТАНООБРАЗУЮЩИХ БАКТЕРИЙ В УСЛОВИЯХ ЛАБОРАТОРНОЙ БИОГАЗОВОЙ УСТАНОВКИ АО «БЕЛГОРОДСКИЙ ИНСТИТУТ АЛЬТЕРНАТИВНОЙ ЭНЕРГЕТИКИ» НА СУБСТРАТЕ ДЕЙСТВУЮЩЕЙ БИОГАЗОВОЙ СТАНЦИИ «ЛУЧКИ» ООО «АЛЬТЭНЕРГО»

INFLUENCE OF CELLULOLYTIC ENZYMES ON THE METHANOGENIC BACTERIA IN CONDITIONS OF LABORATORY BIOGAS PLANT JSC "BELGOROD INSTITUTE OF ALTERNATIVE ENERGY" ON THE SUBSTRATE OF ACTIVE BIOGAS PLANT "LUCKY" LLC "ALTENERGO"

**И.В. Батлущая¹, В.П. Бредихин², И.К. Мейлах², П.В. Украинский³,
А.С. Кистаубаева⁴, В.В. Ключева¹, К.А. Дегтярёва¹, Е.А. Кортиюкова¹,
М.Н. Шкуропат¹**
**I.V. Batlutckaya¹, V.P. Bredikhin², I.K. Meylakh², P.V. Ukraynsky³,
A.S. Kistaubaeva⁴, V.V. Klueva¹, K.A. Degtyareva¹, E.A. Kortiukova¹,
M.N. Shkuropat¹**

¹ Белгородский государственный национальный исследовательский университет, Россия, 308015, г. Белгород, ул. Победы, 85

² Общество с ограниченной ответственностью «АльтЭнерго»

Россия, 308000, Белгородская область, г. Белгород, проспект Славы, 28

³ Акционерное общество «Белгородский институт Альтернативной энергетики»

Россия, 308000, Белгородская область, г. Белгород, проспект Славы, 28

⁴ Казахский национальный университет имени аль-Фараби, Республика Казахстан, 050040, г. Алматы, проспект Аль-Фараби, 71

¹ Belgorod State National Research University, 85 Pobedy St, Belgorod, 308015, Russia

² Limited Liability Company "AltEnergo", 28 Slavy Ave, Belgorod, 308000, Russia

³ Joint-stock company "Belgorod Institute of alternative Energy", 28 Slavy Ave, Belgorod, 308000, Russia

⁴ Al-Farabi Kazakh National University, 71 Al-Farabi Ave, Almaty, 050040, Republic of Kazakhstan

E-mail: bat@bsu.edu.ru; bvp@altenergo.su; posta@altenergo.su; aida_kaz@mail.ru

Аннотация. В статье рассматривается проблема использования альтернативных возобновляемых источников энергии. Для решения данной проблемы предлагается использовать микробиологическую переработку растительного сырья с целью получения биогаза в процессе метанового брожения. На основе проведенного лабораторного эксперимента доказано влияние различных концентраций целлюлозоразрушающих ферментов фирмы Biogas-Additive.de GmbH & Co. KG на активность метанообразующих бактерий и количество выхода биогаза в условиях лабораторной установки «Лучки» ООО «Альт Энерго». В рамках данной проблематики впервые изучено влияние целлюлозоразрушающих ферментов в первой стадии гидролиза метаногенеза на активность метанообразующих бактерий.

Résumé. The article deals with the problem of the use of alternative renewable energy sources. To solve this problem, we propose to use microbial processing of vegetable raw materials for the production of biogas in the process of the methane fermentation. The results of a the laboratory experiment proved the influence of cellulolytic enzymes on the methanogenic bacteria in conditions of laboratory biogas plant JSC "Belgorod Institute of alternative energy" on the substrate of active biogas plant "Luchky" LLC "AltEnergo". The influence of cellulolytic enzymes on the methanogenic bacteria was first studied at the first stage hydrolysis of the methanogenesis.

Ключевые слова: метаногенные бактерии, биогаз, целлюлозоразрушающие ферменты, углеводородное топливо, альтернативная энергетика, растительное сырье, микробиологический синтез.

Key words: methanogenic bacteria, biogas, cellulolytic enzymes, hydrocarbon fuels, alternative energy, plant material, microbial synthesis.



Введение

Одной из важнейших проблем развития современного общества является энергетический кризис, обусловленный, прежде всего, истощением природных ресурсов – нефти, природного газа, угля, сланцев, как основных невозобновляемых источников энергии. Актуальным становится использование альтернативных возобновляемых источников энергии, к которым относят и отходы агропромышленного комплекса. По нашему мнению, в контексте решения проблемы энергетического кризиса первостепенным является изучение условий микробиологической переработки растительного сырья с целью получения биогаза в процессе метанового брожения.

Метановое брожение или метаногенез широко распространен в природе, и одним из главных условий его протекания является отсутствие кислорода, то есть анаэробная среда. При определенном соотношении компонентов сырья, одним из основных продуктов разложения органических остатков в процессе метаногенеза является метан. В исследованиях ученых прототипами процесса, моделируемого в условиях биогазовых станций, являются процессы метанового брожения в природе с использованием богатой перегноем почвы [Min et al, 1997; Freeman et al, 1997; Lokshina, Vavilin, 1999; Desjardins et al, 2001; Conrad, 2002; Yang, Liu, 2003; Kaku, Ueki, 2010], содержащего, включая микрофлору, желудочно-кишечного тракта животных, в особенности жвачных млекопитающих, а также разлагающихся фекалий [Othman et al, 1996; Dongowski et al, 2000; Davies et al, 2000; Denmead et al, 2000; Van Laar et al, 2000; Broudiscou et al, 2000], отложений торфа [Bergman et al, 1999], нефтяных месторождений [Pallasser, 2000], бытовых и промышленных стоков [Broughton et al, 1998; Saiki et al, 1999; Kawachara et al, 1999; Francese et al, 2000; Booker, Pavlostathis, 2000; Marty et al, 2001; Filidei et al, 2003; Kim et al, 2003], заиленного дна пресных стоячих водоемов [Lokshina, Vavilin, 1999], морских донных осадков [Bonin et al, 2002; McHugh et al, 2003].

Микроорганизмами, способными осуществлять метаногенез, являются прокариоты – архебактерии, или археи, родов *Metanobacterium*, *Metanosaeta* (*Metanothrix*), *Metanococcus*, *Metanobrevibacteria* и *Metanopyrus* [Min et al, 1997; White, 1998; Shima, 2002; Ince et al, 1997; Ince et al, 2003; Hochheimer et al, 1998; Pender et al, 2004; Kletzin, Adams, 1996; Hippler, Thauer, 1999]. Для этих микроорганизмов метановое брожение является основным, а в некоторых случаях, единственным источником энергии. В процессе участвуют уникальные коферменты птеринового цикла – птерины (2-амино-4-оксоптеридины), которые представляют собой класс гетероциклических соединений, функционирующих в живых организмах в качестве коферментов. Ряд соединений (5,6,7,8-тетрагидроцианоптерин, 5,10-гидрофолат) обладают фоторецепторными свойствами. В природе птериновые ферменты выполняют роль регуляторов ферментативного катализа и фотогенераторов синтетического кислорода.

ООО «Альт Энерго» (г. Белгород) накоплен значительный опыт получения биогаза в процессе микробиологической переработки отходов агропромышленного комплекса, в том числе растительного сырья. Интерес к целлюлозоразрушающим ферментам связан с тем, что они способствуют переводу труднодоступных для микроорганизмов компонентов растительного сырья в растворимую, более доступную для их переработки форму.

Материал и методы исследования

Материалом для данного исследования явились: кукурузный силос, используемый в качестве основного растительного сырья для получения биогаза, инокулюм – субстрат из дображивателя действующей биогазовой станции «Лучки» (Белгородская обл., Прохоровский р-н), целлюлозоразрушающие ферменты, предоставленные фирмой Biogas-Additive.de GmbH & Co. KG (Германия, г. Рудольштадт).



На первом этапе проведения лабораторного эксперимента проанализировано сырье на содержание сухого вещества (СВ) и органического сухого вещества (оСВ). Для анализа исходного сырья были использованы методики государственных стандартов [ГОСТ 31640-2012; ГОСТ 32045-2012] и методы оценки биогазового потенциала сырья [Лиллепярк, 2004]. Содержание СВ и оСВ определяется путем высушивания навесок силоса и инокулюма до постоянной массы – сначала при температуре 105°C для определения СВ (%), затем происходит высушивание навесок при 550°C для определения оСВ (% от сухого вещества). В результате анализа были получены следующие данные: инокулюм – СВ 4.42%, оСВ 78.05%; кукурузный силос – СВ 38.10%, оСВ 95.12%.

Исходя из полученных данных и нормы содержания оСВ в сырье, было рассчитано соотношение количества кукурузного силоса и инокулюма, необходимого для проведения лабораторного эксперимента. Общая масса субстрата в каждой повторности лабораторного эксперимента составила 1569 г (инокулюм – 1500 г, кукурузный силос – 69 г).

В лабораторные ферментеры с подготовленным инокулюмом было загружено определенное количество субстрата (кукурузного силоса с различной концентрацией внесенных в него целлюлозоразрушающих ферментов). Культивирование инокулюма в субстрате осуществлялось в анаэробных условиях при отсутствии освещения и постоянной температуре 38°C.

Лабораторный эксперимент включал контроль и четыре эксперимента в трехкратной повторности с использованием компонентов сырья в различном соотношении:

- контроль – без внесения целлюлозоразрушающих ферментов при загрузке основного субстрата (кукурузного силоса);
- эксперимент 1 – с внесением однократной нормы целлюлозоразрушающих ферментов при загрузке основного субстрата (кукурузного силоса);
- эксперимент 2 – с внесением двукратной нормы целлюлозоразрушающих ферментов при загрузке основного субстрата (кукурузного силоса);
- эксперимент 3 – с внесением однократной нормы целлюлозоразрушающих ферментов частями на протяжении всего эксперимента (1 раз в неделю) при загрузке основного субстрата (кукурузного силоса);
- эксперимент 4 – с внесением двукратной нормы целлюлозоразрушающих ферментов частями на протяжении всего эксперимента (1 раз в неделю) при загрузке основного субстрата (кукурузного силоса).

Длительность лабораторного эксперимента составила 57 дней.

Измерение вырабатываемого количества биогаза проводилось через определенные промежутки времени с помощью барабанного счетчика Ritter TG3/3. Энергетическая ценность полученного продукта определялась с помощью газоанализатора Dräger X-am 7000.

Далее осуществлялся пересчет полученного количества биогаза на единицу исследуемого растительного сырья и оСВ по следующей формуле:

$$\text{Количество биогаза на ед. сырой массы} = (\text{Количество биогаза на ед. оСВ} \times \text{СВ} \times \text{оСВ}) / 1000$$

Статистическая обработка полученных данных проводилась по *t*-критерию Стьюдента. Выход биогаза по результатам проведенных опытов на момент окончания лабораторного эксперимента представлен в таблице 1.

Результаты исследований

В результате лабораторного эксперимента выявлена зависимость объема получаемого биогаза в лабораторных ферментерах от количества внесенных в растительное сырье целлюлозоразрушающих ферментов.



Таблица 1
Table 1

Зависимость объема биогаза от использования кукурузного силоса и ферментов в различном соотношении
The dependence of the volume of biogas from the use of corn silage and enzymes in different ratios

№ опыта	Загружаемые вещества	Выход биогаза из натуральной массы, м ³ /т силоса	Отношение выработки биогаза к данным, полученным из натурального силоса (без ферментов), %	Выработка биогаза из органического сухого вещества, м ³ /тонна	Отношение выработки биогаза к данным, полученным из оСВ натурального силоса (без ферментов), %
Контроль	кукурузный силос	267	100	737	100
Эксперимент 1	кукурузный силос + ферменты (1-кратная норма, в начале опыта)	284	106.1	784	106.3
Эксперимент 2	кукурузный силос + ферменты (2-кратная норма, в начале опыта)	244	91.2	674	91.4
Эксперимент 3	кукурузный силос + ферменты (1-кратная норма, частями)	274	102.4	756	102.6
Эксперимент 4	кукурузный силос + ферменты (2-кратная норма, частями)	250	93.5	692	93.8

Достоверное увеличение количества биогаза по сравнению с контрольным опытом наблюдалось в экспериментах 1 ($t=2.44$, при $p \geq 0.05$) и 3 ($t=15.24$, при $p \geq 0.05$) при добавлении к основному субстрату целлюлозоразрушающих ферментов в однократной концентрации. При добавлении исследуемых энзимов в начале экспериментов достоверный показатель роста выработки биогаза по сравнению с контролем наблюдался после 14 дня культивирования ($t=3.4$, при $p \geq 0.05$), а при добавлении той же нормы частями было отмечено увеличение выхода продукта на 6 сутки при первом измерении.

Максимальный выход биогаза отмечен в эксперименте 1 при добавлении целлюлозоразрушающих ферментов в однократной норме в начале эксперимента. В экспериментах 2 и 4 добавление двукратной нормы энзимов независимо от способа подачи привело к снижению общего выхода биогаза и при каждом измерении количество выработанного биогаза было ниже, чем в контроле (рис.).

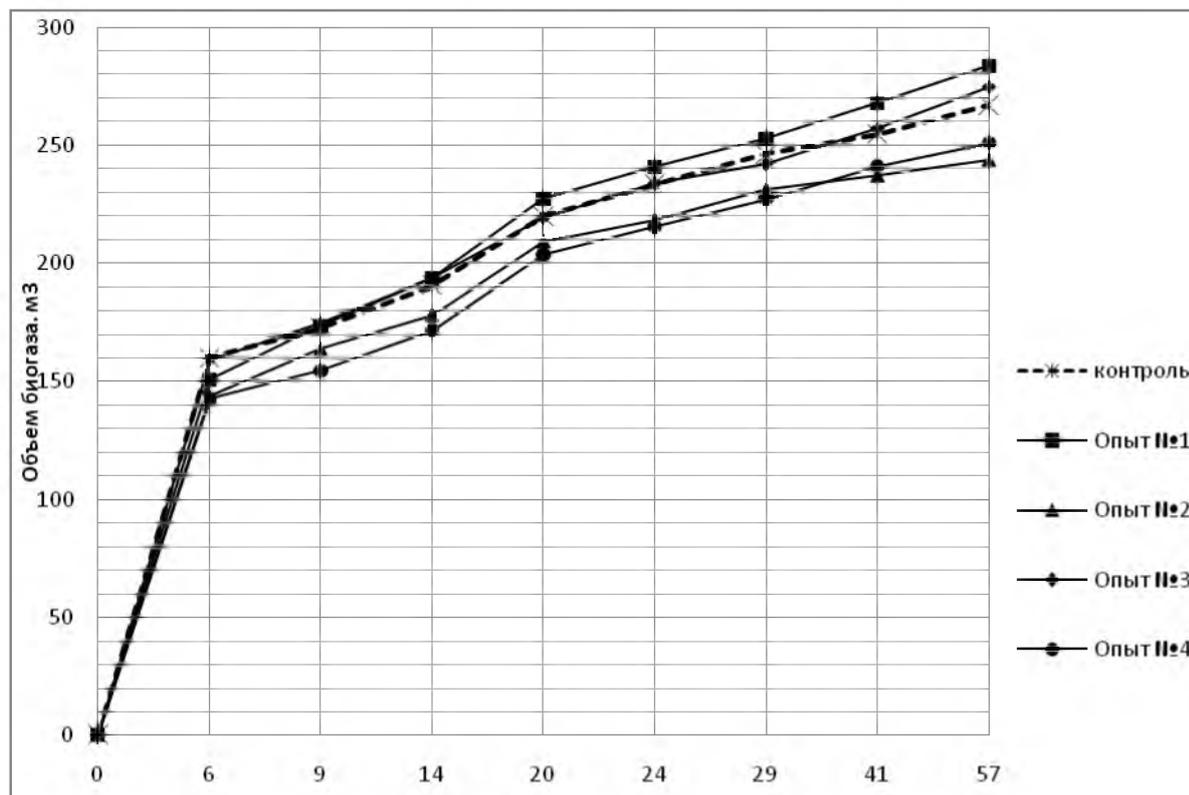


Рис. Объем биогаза на разных этапах лабораторного эксперимента
Fig. The volume of biogas at different stages of laboratory experiment

Заклучение

Исходя из результатов лабораторного эксперимента, можно предположить, что повышенная концентрация целлюлозоразрушающих ферментов приводит к угнетению активности метанообразующих микроорганизмов. Это может быть связано с предполагаемым увеличением концентрации промежуточных продуктов метанового брожения, таких как летучие жирные кислоты, образующихся на первых этапах брожения (гидролиз, кислотообразование). В связи с внесением в ферментер больших концентраций целлюлозоразрушающих ферментов при загрузке основного субстрата (кукурузного силоса) скорость разрушения целлюлозы с образованием промежуточных продуктов могла быть больше скорости, с которой метаногенные микроорганизмы могли утилизировать данные промежуточные продукты, образуя метан. В результате, повышенные концентрации промежуточных продуктов, таких как летучие жирные кислоты, и могли ингибировать метаногенные микроорганизмы. Наиболее заметное снижение их активности наблюдалось при внесении двукратной концентрации целлюлозоразрушающих ферментов (эксперименты 2 и 4). При внесении частями однократной нормы целлюлозоразрушающих ферментов незначительное угнетение метаногенеза наблюдалось в первую неделю эксперимента, при расходе энзимов после 6 дня эксперимента отмечен рост выработки биогаза, что указывало на оптимальное развитие метанообразующей микрофлоры. Следует отметить, что однократное внесение определенного количества целлюлозоразрушающих ферментов не вызывало угнетения микрофлоры и положительно влияло на увеличение объема выработки биогаза в первую неделю эксперимента (эксперимент 1).

Таким образом, на основании проведенных лабораторных экспериментов установлено, что наибольшее возрастание активности метанообразующих бактерий наблюдается при разовом внесении однократной нормы целлюлозоразрушающих ферментов.



Список литературы References

1. ГОСТ 31640-2012. Корма. Методы определения содержания сухого вещества. Дата введения 01.07.2013.
GOST 31640-2012. Feeds. Methods for determination of dry matter content. Date of introduction 01.07.2013. (in Russian)
2. ГОСТ 32045-2012. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения содержания золы, не растворимой в соляной кислоте. Дата введения 01.07.2014.
GOST 32045-2012. Feeds, compound feeds, material for compound feeds. Methods for determination of ash content, insoluble in hydrochloric acid. Date of introduction 01.07.2014. (in Russian)
3. Лиллепярг Е.Р. 2004. Методика определения энергетического потенциала полигонов твердых бытовых отходов. Санкт-Петербург, 116.
Lillepyarg E.R. 2004. Methods of determining the energy potential of municipal solid waste landfills. Saint-Petersburg, 116. (in Russian)
4. Bergman I., Lundberg P., Nilsson M. 1999. Microbial carbon mineralization in an acid surface peat: effects of environmental factors in laboratory incubations. *Soil Biology & Biochemistry*, 31 (13): 1867–1877.
5. Bonin P., Tamburini C., Michotey V. 2002. Determination of the bacterial processes which are sources of nitrous oxide production in marine samples. *Water Research*, 36 (3): 722–732.
6. Booker R.S., Pavlostathis S.G. 2000. Microbial reductive dechlorination of hexachloro-1,3-butadiene in methanogenic enrichment culture. *Water Research*, 34 (18): 4437–4445.
7. Broudiscou L.P., Papon G., Broudiscou A.F. 2000. Effects of dry plant extracts on fermentation and methanogenesis in continuous culture of rumen microbes. *Animal Feed Science and Technology*, 87 (3): 263–277.
8. Broughton M.J., Ghiele J.H., Birch E.J., Cohen A. 1998. Anaerobic batch digestion of sheep tallow. *Water Research*, 32 (5): 1423–1428.
9. Conrad R. 2002. Control of microbial methane production in wetland rice fields. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 64 (1): 59–69.
10. Davies Z.S., Mason D., Brooks A.E., Griffuh G.W., Merry R.J., Theodorou M.K. 2000. An automated for measuring gas production from forages inoculated with rumen fluid and its use in determining the effect of enzymes on grass silage. *Animal Feed Science and Technology*, 83 (4): 205–221.
11. Denmead O.T., Leuning R., Griffirh D.W.T., Jamie I.M., Ester M.B., Harper L.A., Freney J.R. 2000. Verifying inventory predictions of animal methane emissions with meteorological measurements. *Boundary-Layer Meteorology*, 96 (3): 187–209.
12. Desjardins R.L., Kulshreshtha S.N., Junkins B., Smith W., Grant B., Boehm M. 2001. Canadian greenhouse gas mitigation options in agriculture. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 60 (2): 317–326.
13. Dongowski G., Lorenz A. 1998. Unsaturated oligogalacturonic acids are generated by in vitro treatment of pectin with human faecal flora. *Carbohydrate Research*, 314 (4): 237–244.
14. Filidei S., Masciandaro G., Ceccanti B. 2003. Anaerobic digestion of olive oil mill effluents: evaluation of wastewater organic load and phytotoxicity reduction. *Water, Air & Soil Pollution*, 145 (1): 79–94.
15. Francese A.P., Aboagye-Mathiesen G., Olesen T., Cordoba P.R., Sineriz F. 2000. Feeding approaches for biogas production from animal wastes and industrial effluents. *The World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 83 (3): 205–221.
16. Freeman C., Liska G., Ostle N.J., Lock M.A., Hyghes S., Reynolds B., Hudson J. 1997. Enzymes and biogeochemical cycling in wetlands during a simulated drought. *Biogeochemistry*, 39 (2): 177–187.
17. Hippler D., Thauer R.K. 1999. The energy conserving methyltetrahydromethanopterin: coenzyme M methyltransferase complex from methanogenic archaea: function of the subunit Mtr H. *FEBS Letters*, 449 (2): 165–168.
18. Hochheimer A., Hedderich R., Thauer R.K. 1998. The formylmethanofuran dehydrogenase isoenzymes in *Methanobacterium wolfei* and *Methanobacterium thermoautotrophicum*: induction of the molybdenum isoenzyme by molybdate and constitutive synthesis of the tungsten isoenzyme. *Archives of Microbiology*, 170 (5): 389–393.
19. Ince O., Anderson G.K., Kasapgil B. 1997. Composition of the microbial population in a membrane anaerobic reactor system during startup. *Water Research*, 31 (1): 1–10.



20. Ince B.K., Ince O., Oz N.A. 2003. Changes in acetoclastic methanogenic activity and microbial composition in an upflow anaerobic filter. *Water, Air & Soil Pollution*, 144 (1): 301–315.
21. Kaku N., Ueki A., Fujii H., Ueki K. 2000. Methanogenic activities on rice roots and plant residues and their contributions to methanogenesis in wetland rice field soil. *Soil Biology & Biochemistry*, 32 (14): 2001–2010.
22. Kawachara K., Yakabe Y., Ohide T., Kida K. 1999. Evaluation of laboratory – made sludge for an anaerobic biodegradability test and its use for assessment of 13 chemicals. *Chemosphere*, 39 (12): 2007–2018.
23. Kim J., Park C., Kim T.H., Lee M., Kim S., Kim S.W., Lee J. 2003. Effects of various Pretreatments for Enhanced Anaerobic Digestion with Waste Activated Sludge. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 95 (3): 271–275.
24. Kletzin A., Adams M.W.W. 1996. Tungsten in biological systems. *FEMS Microbiology Reviews*, 18 (1): 5–63.
25. Lokshina L.J., Vavilin V.A. 1999. Kinetic analysis of the key stages of low temperature methanogenesis. *Ecological Modelling*, 177 (2): 285–303.
26. Marty D., Bonin P., Michotey V., Bianchi M. 2001. Bacterial biogas production in coastal systems affected by freshwater inputs. *Continental Shelf Research*, 21 (19): 2105–2115.
27. McHugh S., Carton M., O'Flaherty V., Mahony T. 2003. Methanogenic population structure in a variety of anaerobic bioreactors. *FEMS Microbiology Letters*, 219 (2): 297–304.
28. Min H., Zhao Y.H., Chen M.C., Zhao Y. 1997. Methanogens in paddy soil. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 49 (2): 163–169.
29. Othman M.Y.H., Yatin B., Salleh M.M. 1996. Chicken dung biogas power generating system in Malaysia. *Renewable Energy*, 9 (4): 930–933.
30. Pallasser R.J. 2000. Recognising biodegradation in gasoil accumulations through the δ ^{13}C compositions of gas components. *Organic Geochemistry*, 31 (12): 1363–1373.
31. Pender S., Toomey M., Carton M., Eardly D., Patching J. W., Colleran O'Flaherty V. 2004. Long-term effects of operating temperature and sulphate addition on the methanogenic community structure of anaerobic hybrid reactors. *Water Research*, 38 (3): 619–630.
32. Saiki Y., Imahavashi S., Hvabiichi C., Kitadawa Y., Okumura Y., Kawamura H. 1999. Solubilization of excess activated sludge by self-digestion. *Water Research*, 33 (8): 1864–1870.
33. Shima S., Warkentin E., Thaner R.K., Ermler U. 2002. Structure and Function of Enzymes Involved in the Methanogenic Pathway Utilizing Carbon Dioxide and Molecular Hydrogen. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 93 (6): 519–530.
34. Van Laar H., Tamminga S., Williams B.A., Verstegen M.W.A. 2000. Fermentation of the endosperm cell walls of monocotyledon and dicotyledon plant species by faecal microbes from pigs. The relationship between cell wall characteristics and fermentability. *Animal Feed Science and Technology*, 88 (2): 13–30.
35. White R.H. 1998. Methanopterin biosynthesis: methylation of the biosynthetic intermediates. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1380 (2): 257–267.
36. Yang S.S., Liu Y.L. 2003. Estimation of methane and nitrous oxide emission from animal production sector in Taiwan during 1990–2000. *Chemosphere*, 52 (8): 1381–1388.