

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ
**«БЕЛГОРОДСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ
ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ»**
(**Н И У « Б е л Г У »**)

ИНСТИТУТ ИНЖЕНЕРНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ И ЕСТЕСТВЕННЫХ НАУК

КАФЕДРА БИОТЕХНОЛОГИИ И МИКРОБИОЛОГИИ

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ФЕРМЕНТНЫХ ДОБАВОК НА
ПРОТЕКАНИЕ ПРОЦЕССА АНАЭРОБНОГО БРОЖЕНИЯ В
УСЛОВИЯХ ДЕЙСТВУЮЩЕЙ БИОГАЗОВОЙ СТАНЦИИ**

Магистерская диссертация

Обучающегося по направлению подготовки

19.04.01 Микробиология

очной формы обучения, группы 07001644

Мейлах Ильи Константиновича

Научный руководитель
доктор биологических наук,
профессор кафедры
биотехнологии и
микробиологии
Батлуцкая И.В.

Рецензент (-ы)
кандидат биологических
наук,
декан факультета
математики и
естественнонаучного
образования
педагогического института
Чернявских С.Д.

БЕЛГОРОД 2018

Содержание

	ВВЕДЕНИЕ	3
ГЛАВА 1	ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	5
1.1.	Особенности работы биогазовой станции «Лучки»	5
1.1.1.	Принципы и технический регламент работы станции	5
1.2.	Параметры, характеризующие технологический процесс метаногенеза	6
1.3.	Субстраты метаногенеза и пути оптимизации их использования	8
1.2.	Теоретические основы синтеза и применения ферментов	11
1.2.1.	Принципы биосинтеза и структурной организации молекулы фермента	11
1.2.2.	Свойства протеиногенных аминокислот как химическая основа структуры фермента	23
1.2.3.	Создание штаммов-продуцентов и промышленное производство ферментов	29
1.3.	Проблема гидролиза высокомолекулярных соединений в переработке органических отходов	30
1.4.	Потенциальный эффект применения ферментных препаратов в биогазовом производстве	32
ГЛАВА 2.	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ	35
ГЛАВА 3.	РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ	40
3.1	Определение оптимального количества энзимов.	40
3.2	Влияние энзимов различных классов на эффективность разложения субстрата	41
	ЗАКЛЮЧЕНИЕ	47
	СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМОЙ ЛИТЕРАТУРЫ	49
	ПРИЛОЖЕНИЕ	

ВВЕДЕНИЕ

Проблема переработки органических отходов агропромышленного комплекса является актуальной проблемой для нашего региона ввиду интенсивного роста сельхозпроизводства и необходимости обеспечить максимально эффективную утилизацию всех побочных продуктов для повышения окупаемости сельхозпредприятий и повышения тем самым их экономической устойчивости. Биогазовые производства продемонстрировали способность решать эту проблему, перерабатывая более 80 % органического вещества отходов в метан в составе биогаза, который может быть в дальнейшем использован для выработки электроэнергии или для отопления помещений. Технология анаэробного сбраживания, применяемая для производства метана из органических отходов, основывается на поэтапном разложении сложных органических веществ до более простых, их сбраживании до летучих жирных кислот и переработке этих кислот в метан и углекислый газ, являющиеся основными компонентами биогаза. Различными путями полученный биогаз обогащается метаном за счёт частичного удаления углекислого газа, при этом повышается его теплотворность и эффективность использования запасённой в нём химической энергии (Khan, 2017).

Технология анаэробного сбраживания продолжает развиваться, для интенсификации работы используемого микробного сообщества применяются различные подходы. Одним из таких подходов является использование ферментных препаратов, обеспечивающих ускоренное расщепление исходных органических веществ, поступающих в реактор в виде субстратов (Christy, 2014).

В целом, основным подходам к интенсификации процесса метаногенного брожения можно отнести:

- ускорение сбраживания сырья;

- увеличение степени биологического разложения сырья в ходе процесса брожения;

- увеличения содержания метана в биогазе и т.д.;

Одним из способов, позволяющих интенсифицировать процесс брожения, является введение дополнительных энзимов, направленных на деструктуризацию определенных органических составляющих, входящих в состав загружаемой биомассы.

Цель работы: Провести исследование влияния ферментных добавок на протекание процесса анаэробного брожения в условиях действующей биогазовой станции.

Задачи:

1. Определить оптимальные соотношения количества энзимов и разлагаемого субстрата в лабораторных условиях

2. Изучить влияние энзимов классов протеаз, пектиназ и целлюлаз на эффективность разложения субстрата и выход биогаза.

В рамках данной работы, в условиях лабораторной биогазовой установки было проведено испытание трех видов ферментов, производства компании Novozymes (Дания), испытанных на кукурузном силосе (как источнике целлюлозы), боенских отходах (как источнике белка) и жоме сахарной свеклы (как источнике пектина).

ГЛАВА 1. ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1. Особенности работы биогазовой станции «Лучки»

1.1.1. Принципы и технический регламент работы станции

Биогазовая станция – это комплекс инженерных сооружений, предназначенный для переработки биомассы методом анаэробного сбраживания, выработки электрической и тепловой энергии и получения анаэробно переработанного органического удобрения. Согласно ГОСТ 52808-2007 под биомассой понимаются все виды веществ растительного и животного происхождения, продукты жизнедеятельности организмов и органические отходы, образующиеся в процессах производства, потребления продукции и на этапах технологического цикла отходов. Анаэробная переработка биомассы осуществляется в соответствии с ГОСТ 52808-2007 и «Правилами проведения дезинфекции и дезинвазии объектов государственного ветеринарного надзора».

Перерабатываемая биомасса загружаются в анаэробные мезофильные реакторы биогазовой станции, где под воздействием различных групп микроорганизмов происходит ее преобразование в биогаз и анаэробно переработанные органические удобрения.

Анаэробная обработка проходит на протяжении 30-70 дней при температурах 38-41 °С в бродильных резервуарах (ферментаторах и дображивателях) биогазовой станции «Лучки». Прошедший цикл сбраживания перебродивший остаток разделяется на жидкую и твердую фракции при помощи сепараторной установки. Полученная сухая масса имеет название «отсепарированная масса» или «шлам». Полученные осветленные стоки называют «эффлюент» или «фугат».

Выработанный биогаз преобразовывается в электрическую и тепловую энергию в когенерационных установках БТЭЦ, суммарной мощностью 3600 кВт.

Прием сырья на переработку в БГС «Лучки» осуществляется через отделение приема мясных отходов, представляющее из себя подземный герметичный бетонный резервуар объемом 60 м³, с опускающейся крышкой, устройствами перемешивания и перекачки отходов, а также систему загрузки растительного сырья. Поставляемые автотранспортом отходы без промежуточного хранения выгружаются в герметичный приемный резервуар, после чего измельчаются и подаются в бродильные резервуары биогазовой станции.

В бродильных резервуарах (ферментаторах и дображивателях) под воздействием четырех групп микроорганизмов происходит расщепление подаваемых отходов, получаемый при этом биогаз используется для выработки электрической и тепловой энергии, а перебродившая масса (эффлюент) сливается в лагуны и используется в качестве удобрения. Помимо отходов I-IV классов опасности, станция перерабатывает растительное сырье (жом сахарной свеклы, кукурузный силос и т.д.) и биоотходы (кровь, кишечное и мякотное сырье и т.д.)

Эффективность процесса переработки сырья обеспечивается систематической и равномерной загрузкой через одинаковые промежутки времени и с постоянным частичным количеством, например, 24 партии в сутки.

1.1.2. Параметры, характеризующие технологический процесс метаногенеза

Для получения достаточно точной оценки среды рекомендуются следующие измерения и анализы:

Температура брожения. При мезофильной рабочей температуре отклонения могут составлять +/- 2 К

Содержание сухого вещества (СВ). Данный параметр служит для ориентации определения характера течения в ферментаторе и является

признаком подвижности. При применении пропеллерных мешалок содержание СВ в субстрате должно быть $\leq 10\%$.

Содержание органического сухого вещества (ОСВ). Данный параметр является одним из ключевых при прогнозировании объемов выработки биогаза, так как результате распада органического сухого вещества вырабатывается биогаз. Чем ниже эта доля в остатках сбраживания, тем выше степень распада.

Показатель рН. Доказатель рН пригоден в качестве параметра рабочего процесса только тогда, когда буферирующая способность бродильного субстрата не сильно выражена. В качестве ориентации действительно следующее: буферирующая способность должна быть лишь незначительно выше, чем свободные органические кислоты

Свободные органические кислоты (FOS). Кислоты являются промежуточным продуктом анаэробного разрушения. Их низкая концентрация, составляющая < 1 г/л, является при правильной эксплуатации и выходом газа в ожидаемом диапазоне признаком сбалансированного распада органических веществ.

Буферирующая способность (ТАС). Экскременты животных, а также отдельные органические отходы из пищевой промышленности, к примеру, отходы с высоким содержанием белка, придают бродильному субстрату чрезвычайные противокислотные буферные свойства. Такие отходы хорошо пригодны в смеси с легко расщепляемыми и склонными к повышенной кислотности субстратами.

Короткоцепные карбоновые кислоты (кислоты C1- до C6-). Пропионовая кислота является признаком нарушенного анаэробного разрушения.

Аммонийный азот. Аммиачный азот является потенциальным цитоксином, поэтому его содержание должно быть не более 3 г/л.

1.1.3. Субстраты метаногенеза и пути оптимизации их использования

Выработанное количество газа и состав газа (CH_4 , CO_2 , H_2S , NH_3). Ключевыми особенностями биогазовой станции «Лучки» по сравнению с аналогичными станциями, работающими в Европе (в частности, в Германии) является то, что упор в работе станции делается на получение электроэнергии из побочных продуктов и отходов, а не специально заготавливаемого кукурузного силоса.

Так, при проектировании биогазовой станции немецкими специалистами планировалось, что общая загрузка кукурузного силоса будет составлять порядка 26 000 тонн в год при выработке электрической энергии 19 600 000 кВтч/год. Однако, в 2017 году фактическая загрузка кукурузного силоса составила 11 500 тонн при получении 21 000 0000 кВтч электрической энергии, а в дальнейшем у компании есть планы и полностью отказаться от данного вида сырья.

Необходимость снижения доли специально заготавливаемых для биогазовой станции культур обуславливается их относительно высокой стоимостью и необходимостью задействовать в структуре посевных площадей специальные площади под посев данных культур.

Выбор бродильных субстратов (таблица 1) продиктован непосредственно спецификой агропромышленного комплекса Белгородской области, которая является интенсивно развивающимся сельскохозяйственным регионом. В этой связи проблема утилизации больших объёмов отходов растениеводства, животноводства и пищевой промышленности требует экономически эффективного решения.

Таблица 1.

Бродильные субстраты биогазовой станции «Лучки»

Вид отходов	Количество субстрата	Размер фракции, мм	Содержание сухого вещества, %	Органическое сухое вещество, % от сухого вещества	Удельная норма выработки газа, м ³ /т орг. сухого вещества в среднем
Кукурузная силосная масса	26000,0 Мг/год	< 25	35	95	700
Свиная навозная жижа	26000,0 м ³ /год	< 25	6	80	400
Отстойные шламы	1820,0 м ³ /год	< 25	80	70	250
Содежимое желудка и кишечника	2912,0 Мг/год	< 100	3	93	650
Остатки шкуры и щетины	475,0 Мг/год	< 100 мм	25	90	400
Мясные отходы	11180,0 Мг/год	< 100 мм	25	93	650

Производство биогаза на основе широкого спектра органических субстратов позволяет решать эту проблему, повышая окупаемость сельхозпроизводства и энергетическое обеспечение хозяйства области. Экономии растительного сырья удастся достигнуть за счет переработки на станции других видов сырья, в частности отходов убоя животных и побочной продукции птицеводства: кровь, жировые отходы, шламы очистных сооружений.

Более эффективная переработка субстратов, в том числе растительного сырья достигается также за счет работы, проводимой по поиску путей интенсификации процесса брожения.

Ввиду того, что время нахождения субстрата в бродильных резервуарах биогазовой установки ограничено размерами самих резервуаров, и составляет, как правило, не более 60 суток, часть органики, потенциально

пригодная для получения биогаза не успевает перерабатываться и переходить в биогаз. Таким образом, промышленные биогазовые станции, как правило, используют потенциал загруженного сырья на 70-80%. Опыты, проведенные на лабораторной биогазовой установке, показали, что газ из некоторых видов сырья вырабатывается и на 90 и на 100 день пребывания в ферментаторе.

Вместе с тем, увеличение объемов бродильных резервуаров для получения времени гидравлического удерживания на уровне 90 и более дней ведет к увеличению как капитальных затрат при строительстве установок, так и повышению эксплуатационных издержек, связанных с необходимостью поддерживать рабочую температуру в зимнее время в большем объеме емкостей и, как правило, экономически не целесообразно.

В виду вышеизложенного, для увеличения выработки биогаза и повышения эффективности процесса анаэробной переработки целесообразно применять не экстенсивный (увеличение бродильных емкостей), а интенсивный путь развития.

Таким путём и может стать применение ферментных препаратов, обеспечивающих ускорение переработки органических сельскохозяйственных отходов. Весьма актуальным представляется вопрос об ускоренном расщеплении целлюлозы, пектинов и белков с использованием ферментных препаратов, представленных на мировом рынке. Актуальность такого подхода диктуется экологической заострённостью большинства видов микроорганизмов на более лёгких для расщепления источниках энергии, таким образом, клетки не спешат затрачивать энергию на выработку целлюллолитических и других ферментов, если есть возможность питаться моно- и дисахаридами, другими легкоусваиваемыми веществами. В результате концентрации целлюллолитических, пектинолитических и даже протеолитических ферментов остаются в сбраживаемой смеси ниже, чем это было бы оптимальным для максимально быстрой переработки субстратов. Данная

проблема как раз и может быть решена путём искусственного внесения ферментов в сбраживаемую смесь.

1.2. Теоретические основы синтеза и применения ферментов

2.1. Принципы биосинтеза и структурной организации молекулы фермента

Каталитическая активность белков-ферментов основана на общих принципах структурной организации белковой глобулы, обеспечивающей пространственное сближение и оптимальное взаимное расположение определённых химических групп, задействованных в обратимом связывании субстратов и индукции химических эффектов, приводящих к снижению энергетического порога катализируемой реакции. Взаимодействие аминокислотных остатков внутри глобулы и их взаимодействие с субстратом обеспечивается водородными связями, ван-дер-ваальсовыми взаимодействиями и гидрофобными взаимодействиями. В конечном счёте, все они обеспечиваются химической природой аминокислотных остатков, из которых строится белковая цепь на основе генетического кодирования информации (Page, 1979).

Информация в ДНК закодирована в виде генов (рис. 1), являющихся последовательностями нуклеотидов, в состав которых входят последовательности, обеспечивающие связывание ДНК-зависимой РНК-полимеразы, называемые промоторами. Вблизи промотора обычно располагаются участки связывания регуляторных белков – активаторов транскрипции и её репрессоров, соответственно, способствующих транскрипции и увеличивающих вероятность её начала, и препятствующих транскрипции. Таки последовательности называют энхансерами, если с ними связываются белки-активаторы, и сайленсерами, если с ними связываются белки, частично или полностью тормозящие транскрипцию. В сумме эти участки носят название операторов, как правило, они располагаются на

некодирующих участках гена. Справа от промотора располагается стартовый кодон АУГ, кодирующий метионин, с него начинается кодирующая последовательность или как её ещё называют открытая рамка считывания. Число нуклеотидов в открытой рамке считывания всегда кратно трём, так как она представляет собой последовательность нуклеотидных триплетов – кодонов – кодирующих определённые аминокислотные остатки. Заканчивается открытая рамка считывания одним из нескольких возможных терминирующих кодонов, на которых заканчивается кодирующая последовательность. В отличие от стартового кодона, терминирующие или стоп-кодона аминокислот не кодируют, это исключительно «знаки препинания», предназначенные чтобы поставить «точку» в синтезе белковой цепи.

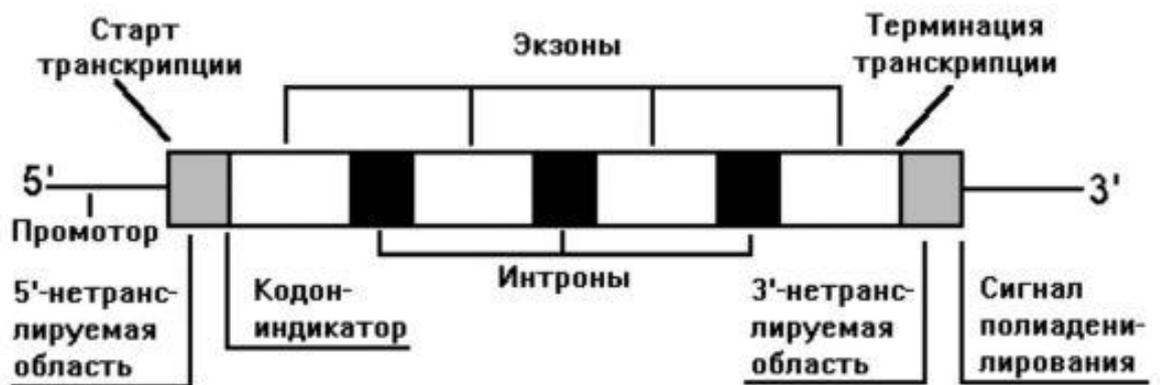


Рис. 1. Компоненты структуры гена белка.

ДНК-зависимая РНК-полимераза в ходе транскрипции (рис. 2) узнаёт последовательность промотора определённого гена и при помощи белков, входящих в состав инициаторного транскрипционного комплекса начинает синтез матричной РНК на кодирующей цепи ДНК. Синтез мРНК начинается значительно раньше инициаторного кодона АУГ, который будет необходим позже, уже в ходе трансляции на рибосоме. Элонгация цепи мРНК происходит с использованием рибонуклеотид-трифосфатов АТФ, ГТФ, УТФ и ЦТФ. Заканчивается она несколько дальше терминирующего кодона,

который также будет иметь значение уже в ходе трансляции. Транскрипция прерывается на особых последовательностях ДНК – терминаторах транскрипции (Льюин, 2018).

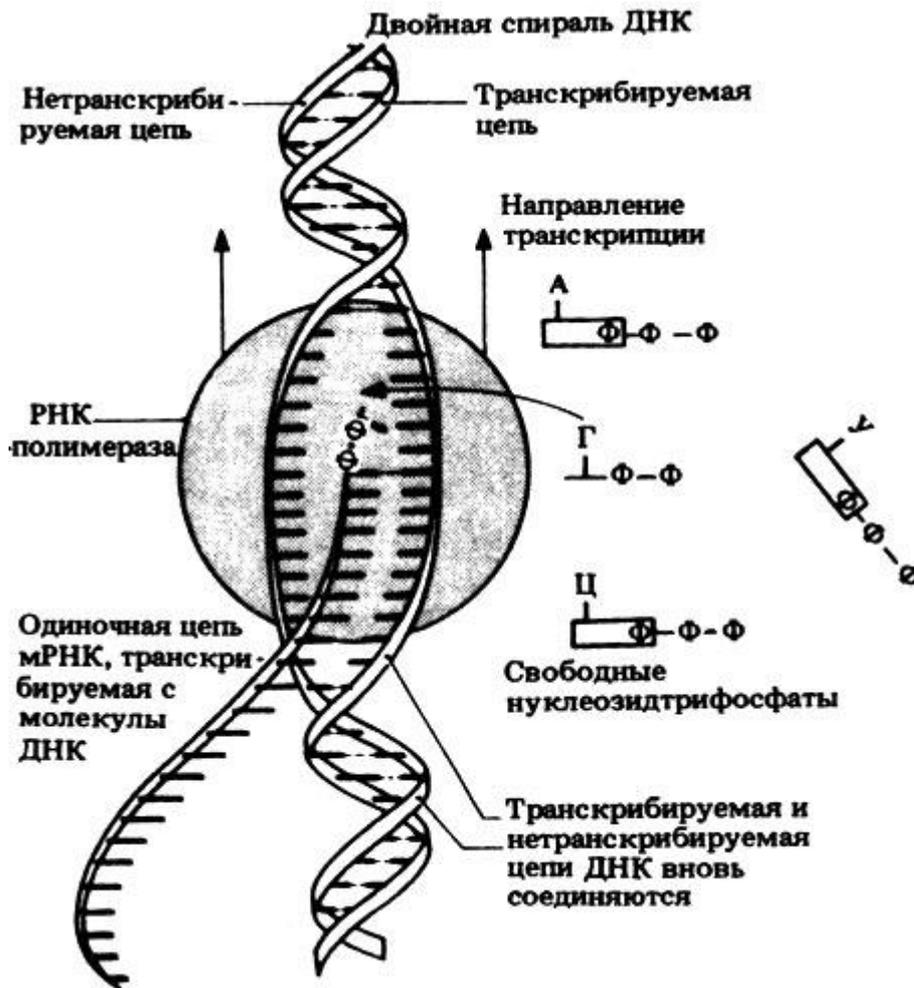


Рис. 2. Транскрипция матричной РНК.

После терминации транскрипции у эукариот вновь синтезированная мРНК подвергается полиаденилированию 3-конца, формированию структуры известной как кэп на 5-конце, а также сплайсингу, подразумевающему вырезание некодирующих последовательностей – интронов – находящихся среди кодирующей последовательности. Всё это вместе называют процессингом мРНК. Также она транспортируется из ядра в цитоплазму. Для прокариот эти процессы не характерны, так как интронов у них как правило нет, как и необходимости в кэп-структуре и полиаденилировании (Киселев, 2000).

Матричная РНК (рис. 3) у прокариот связывается с малой субъединицей рибосомы при помощи последовательности Шайно-Дельгарно, расположенной на её некодирующей части. Эта последовательность вступает в комплементарное взаимодействие с особым участком 16S рибосомальной РНК. К её инициаторному кодону при помощи факторов инициации трансляции присоединяется антикодон *p*-формилметионил-тРНК_{Мет}, инициаторной аминоацил-тРНК прокариот. Далее происходит присоединение к растущему инициаторному трансляционному комплексу большой субъединицы рибосомы, а фактор элонгации Ef-Tu доставляет аминоацил-тРНК, комплементарную следующему за инициаторным кодоном (Кольман, 2018).

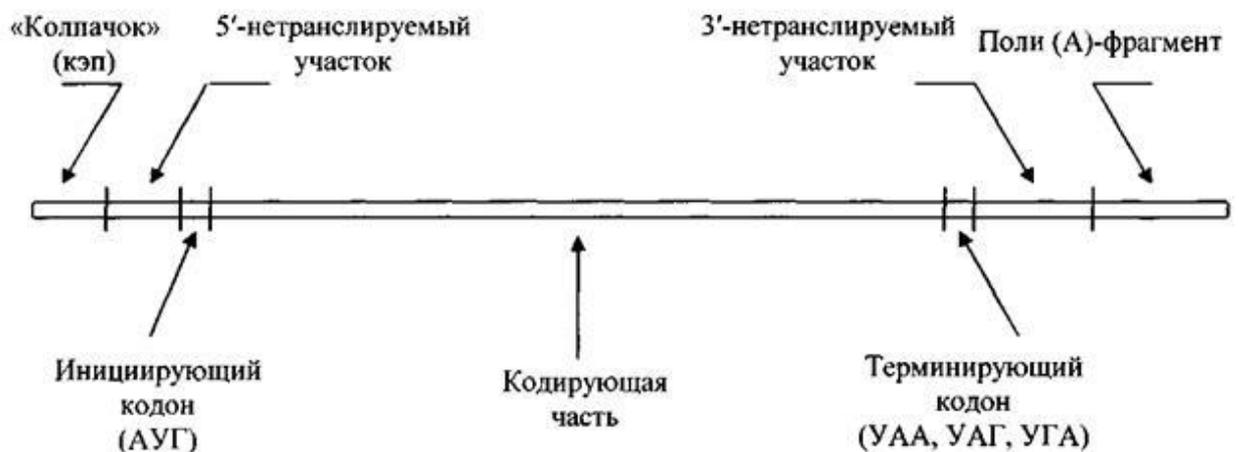


Рис. 3. Структура матричной РНК.

Доставка аминоацил-тРНК фактором элонгации происходит вероятностным путём, то есть с рибосомой взаимодействуют молекулы фактора элонгации, несущие любые аминоацил-тРНК. Однако, в рибосоме остаётся (и, соответственно, отсоединяется от молекулы фактора) только аминоацил-тРНК, антикодон которой комплементарен кодону, находящемуся в данный момент в аминоацильном сайте рибосомы. В пептидильном сайте в это же время находится инициаторная *p*-формилметионил-тРНК_{Мет}, либо, на последующих стадиях трансляции, пептидил-тРНК, с антикодоном,

комплементарным расположенному в пептидилном сайте кодону (Киселев, 1984).

Аминоацил-тРНК синтезируются аминоацил-тРНК синтетазами – особыми ферментами, способными специфически узнавать как аминокислоты, так и соответствующие им тРНК, что позволяет обеспечивать образование правильных их пар и синтез правильных аминоацил-тРНК. Все аминоацил-тРНК эволюционно происходят от всего двух ферментов, обеспечивавших синтез аминоацил-тРНК на самых первых стадиях становления генетического кода и биосинтеза белков в живой клетке. Этим ферментам, вероятно, предшествовали каталитические молекулы РНК – рибозимы – выполнявшие функции биологических катализаторов до начала становления механизма белкового синтеза. Такая каталитическая РНК, способная специфически узнавать нужную тРНК и нужную аминокислоту (фенилаланин), была получена экспериментально, что позволило проверить гипотезу «мира РНК», предшествовавшего известной нам белковой жизни (Lee, 2000).

Аминоацил-тРНК синтетазы состоят из нескольких участков – доменов – каждая. В их структуру входит каталитический (или синтетический) домен, обеспечивающий катализ реакций, ведущих к образованию ковалентной связи между аминокислотой и тРНК (рис. 4). Здесь же происходит узнавание так называемых элементов идентичности на акцепторном стебле тРНК, обозначающих, какой из аминоацил-тРНК синтетаз она должна быть узнана. Эти элементы идентичности несколько разнятся по длине и расположению, однако всегда присутствуют и образуют так называемый операционный код аминокислотирования, представляющий не меньшее значение для процессов биосинтеза белка, чем собственно генетический код (Schimmel, 1993).

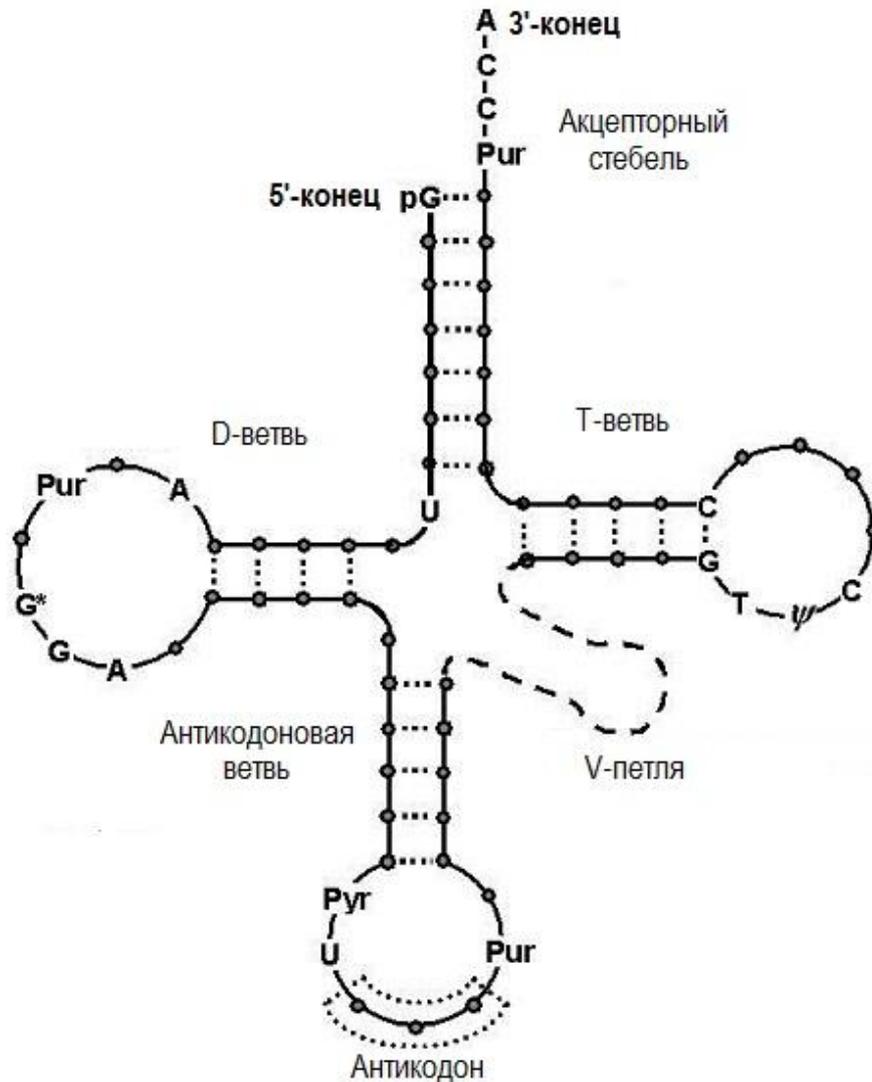


Рис. 4. Структура транспортной РНК.

Антикодон-связывающий домен обеспечивает узнавание антикодона тРНК, что доводит специфичность её узнавания практически до абсолюта. Столь пристальное внимание эволюции к специфичности аминоацилирования связано с высокой ценой ошибки в этом процессе, которая, выливаясь во включение неправильной аминокислоты в белковую цепь, с высокой вероятностью приводит к нарушению функции белка, его неправильному сворачиванию, катализу нежелательных реакций или агрегации белков в клетке. Столь высокая цена даже низкого процента ошибок связана прежде всего с тем, что в каждую белковую цепь входят многие десятки и даже сотни аминокислотных остатков, и большинство из

них играют определённую роль в функции данного конкретного белка. Таким образом, ошибка в одной из, скажем, трёхсот позиций с высокой вероятностью будет вести к нежелательным для клетки физиологическим последствиям (Yadavalli, 2012).

Помимо антикодон-связывающего домена за точность синтеза аминоксил-тРНК отвечают встречающиеся у многих аминоксил-тРНК синтетаз редактирующие домены. После ковалентного связывания аминокислоты с 3-концом тРНК, 3-концевая одноцепочечная часть её колеблется и попадает в активный центр редактирующего домена. Если с ним связана правильная аминокислота, реакции в нём не происходит, и вновь синтезированная аминоксил-тРНК после такой проверки высвобождается, диссоциируя с ферментом. Если же к тРНК присоединён ошибочный аминокислотный остаток, в активном центре редактирующего домена он отщепляется. Существование такого тонкого механизма редактирования аминоксил-тРНК аминоксил-тРНК синтетазами также свидетельствует о высочайшей важности точности её синтеза для физиологии клетки (Sankaranarayanan, 2001).

Предполагается, что точность белкового синтеза не всегда была настолько жизненно необходимой, однако, всегда давала существенные преимущества. Поэтому, несмотря на то, что первые аминоксил-тРНК синтетазы были низкоспецифичны и узнавали каждая множество химически сходных аминокислот, эволюция точности белкового синтеза продвигалась стремительно. Этот процесс был неразрывно связан с развитием генетического кодирования, при котором в определённый момент каждый кодон стал обозначать только одну определённую аминокислоту, а не множество сходных одновременно. Однозначность генетического кодирования позволила клеткам отказаться от использования большинства рибозимов и перейти практически полностью на белковый катализ метаболических реакций (Schimmel, 2000).

Реакция аминоацилирования тРНК проходит в две стадии. На первой аминокислота активируется, взаимодействуя с молекулой АТФ и превращается в аминоацил-аденилат с высвобождением пирофосфата. Аминоацил-аденилат – это ковалентно связанные аминокислотный остаток и АМФ. На второй стадии аминокислотный остаток переносится на 3-концевой аденозин тРНК, ковалентно связываясь с 2- либо 3-кислородом его остатка рибозы. АМФ при этом высвобождается и удаляется, как и ранее пирофосфат. Таким образом, на присоединение одного аминокислотного остатка к одной тРНК расходуется одна молекула АТФ (Pang, 2014).

На стадии активации аминокислоты может происходить ещё один процесс, обеспечивающий точность и безошибочность синтезе аминоацил-тРНК – так называемое претрансферное или допереносное редактирование. Он состоит в избирательном гидролизе или высвобождении ошибочно синтезированных аминоацил-аденилатов (Yadavalli, 2008). Избирательный гидролиз обычно связан с особым расположением молекул воды в активном центре аминоацил-тРНК синтетазы в случае присутствия в нём неправильного аминокислотного остатка. Одна из этих молекул оказывается вблизи ангидридной связи аминоацил-аденилата и вступает в реакцию гидролиза. В ряде случаев вместо воды используется химизм боковой цепи аминокислотного остатка, как в случае S-H группы непротеиногенной аминокислоты гомоцистеина, эта группа обеспечивает разрыв ангидридной связи а остаток гомоцистеина превращается в его тиолактон. Избирательное высвобождение неправильных аминоацил-аденилатов также зачастую имеет место, и связано с относительно слабым связыванием таких промежуточных продуктов в активных центрах аминоацил-тРНК синтетаз. Утративший связь с ферментом аминоацил-аденилат обычно быстро гидролизуется в водной среде, так как такие молекулы в целом химически нестабильны. В эксперименте также можно наблюдать вторичное улавливание ферментом высвобожденного неправильного аминоацил-аденилата, сопровождающееся его гидролизом (Бояршин, 2013).

На случай, если неправильная аминоксил-тРНК всё же будет синтезирована и избежит гидролиза редактирующим доменом аминоксил-тРНК синтетазы, существует ряд особых белков, гомологичных редактирующим доменам и выполняющих их функции отдельно от аминоксил-тРНК синтетаз. К таким белкам, в частности, относятся ProX, AlaX, PrdX и YbaK, специфичные к наиболее часто встречающимся ошибочным аминоксил-тРНК. Они способны вступать во взаимодействие с аминоксил-тРНК синтетазами, улавливая их ошибочно синтезированные продукты, но также и действовать независимо от них.

В общем и целом, механизмы обеспечения точности белкового синтеза на уровне синтеза аминоксил-тРНК играют ключевую роль в обеспечении генетического кодирования. Это разнородные механизмы, основанные на различных принципах, однако направленные на достижение одной и той же цели – обеспечение однозначного чтения кодонов генетического кода. Многообразие этих механизмов и их эволюционная древность свидетельствуют о непростых путях развития генетического кодирования в ходе становления белкового синтеза и о функциональной важности функциональной дивергенции кодонов и формирования однозначности генетического кода. Помимо фундаментального интереса к этой проблеме, она может представлять и прикладной интерес, так как манипуляции с механизмами редактирования способны позволить вводить в белки аминокислотные остатки, не встречающиеся в обычных природных белках, и сообщать им тем самым уникальные свойства, расширяющие возможности их технологического использования (Javahishvili, 2014).

Синтез аминоксил-тРНК называют нередко первой стадией трансляции, при этом под второй стадией имеется в виду синтез белковой цепи на рибосоме. Мы рассмотрели инициацию трансляции на рибосоме, а также её элонгацию, требующую непрерывной доставки при помощи фактора инициации Ef-Tu аминоксил-тРНК в аминоксильный центр рибосомы (рис. 5).

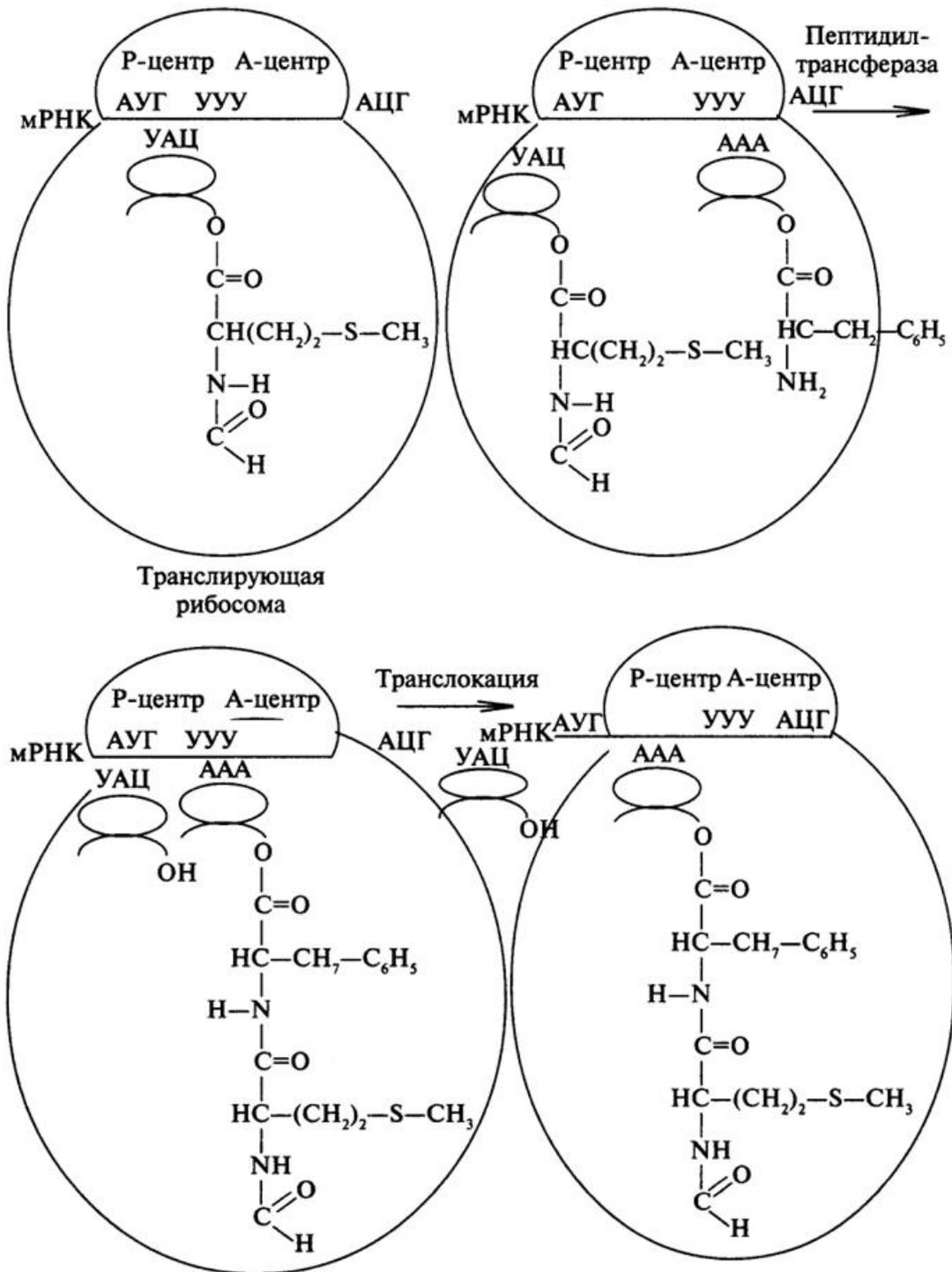


Рис. 5. Биосинтез белка на рибосоме.

Цикл элонгации трансляции, в ходе которого растущая (несцентная) белковая цепь удлиняется на один аминокислотный остаток, включает связывание новой аминоацил-тРНК в аминоацильном центре рибосомы, транспептидазную реакцию, в ходе которой карбонильный кислород С-

концевого аминокислотного остатка растущей белковой цепи переносится с 3-кислорода аденозина тРНК в пептидильном центре на аминогруппу аминоацил-тРНК в аминоацильном центре, и транслокацию мРНК со связанными с ней комплементарными взаимодействиями тРНК на один кодон, при чём освободившаяся от несцентного белка тРНК из пептидильного центра переходит в экзит-центр рибосомы (центр выхода), а тРНК из аминоацильного сайта, несущая теперь белок – в пептидильный центр. Транспептидазная реакция непосредственно катализируется 23S рибосомальной РНК большой субъединицы рибосомы, важную роль при этом играет свободная 2-гидроксильная группа пептидил-тРНК в пептидильном центре (Спирин, 1984). Таким образом, катализ формирования пептидной связи рибосомой является примером РНК-катализа, а сама рибосома действует, по существу, как рибозим, что также подтверждает представления о существовании «РНК-мира», предшествовавшего современной белковой жизни.

Цикл элонгации трансляции демонстрирует работу рибосомы как молекулярной машины, выполняющей повторяющиеся, «конвейерные» действия при ассистировании со стороны определённых факторов, обеспечивающих поступление субстратов. В случае прокариот, единственным таким фактором является фактор элонгации Ef-Tu. Для циклического изменения конформации рибосомы в ходе элонгации необходимо присоединение к ней и гидролиз молекул ГТФ, по одной на цикл трансляции. ГТФ здесь является молекулой-переносчиком энергии, как АТФ во многих других процессах. Безусловно необходимыми для элонгации являются аминоацил-тРНК, синтезируемые двадцатью аминоацил-тРНК синтетазами, в ряде случаев при участии дополнительных белков, служащих для дополнительного обеспечения точности аминоацилирования. В сумме все эти компоненты образуют механизм трансляции, обеспечивающий перенос генетической информации с мРНК на молекулу формирующегося белка. Эта информация в дальнейшем определяет структуру белковой

молекулы (рис. 6), её биологическую активность, её физические свойства, определяющие устойчивость к температуре и другим факторам среды.

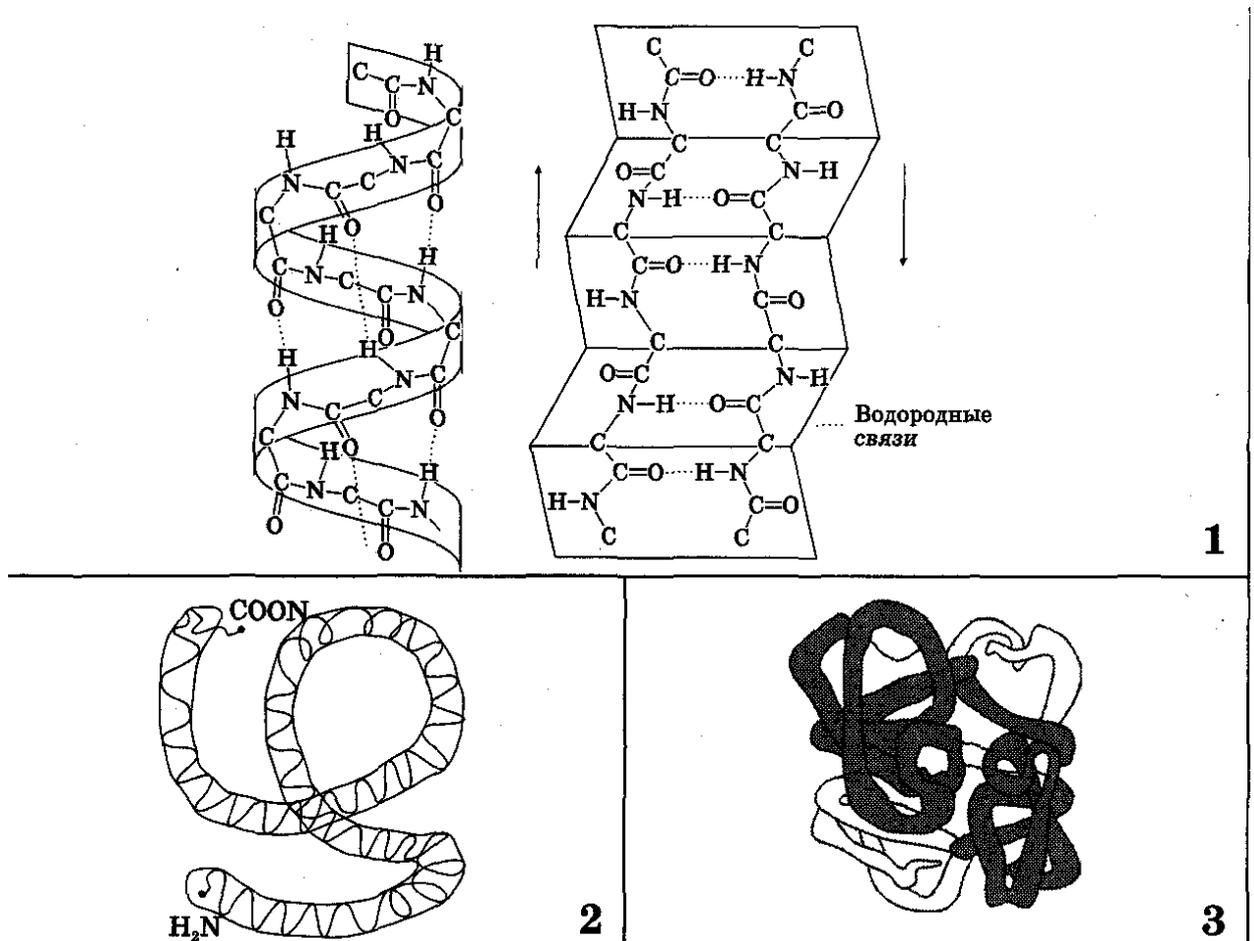


Рис. 6. Различные уровни структурной организации белка (по Д.Тейлор, Н.Грин, У. Стаут). 1 – вторичная, 2 – третичная, 3 - четвертичная.

После поступления при очередной транслокации мРНК её стоп-кодона в аминоацильный центр рибосомы, с ним вместо очередной аминоацил-тРНК связывается белок, называемый релизинг-фактором, и служащий для запуска диссоциации компонентов трансляционного комплекса, в том числе большой и малой субъединиц рибосомы, а также для высвобождения вновь синтезированного белка.

Ещё в ходе элонгации растущий несцентный белок, N-концевая часть которого, удлиняясь, оказывается вне рибосомы, претерпевает

котрансляционный фолдинг, то есть укладку аминокислотной последовательности в строго определённую трёхмерную пространственную структуру (Kramer, 2009). Пространственная организация этой структуры определяется последовательностью аминокислот, а значит, последовательностью кодонов в мРНК и далее – в гене.

Уровни организации белков носят название первичной, вторичной, третичной и четвертичной структур. Первичная структура – это последовательность аминокислотных остатков, запрограммированная в последовательности кодирующей части гена. Вторичная структура – это альфа-спирали и бета-складки, формирующиеся благодаря образованию водородных связей между химическими группами основных цепей аминокислотных остатков. Формирование вторичной структуры в том или ином виде зависит от не принимающих прямого участия в этих взаимодействиях боковых цепей аминокислотных остатков, которыми они, собственно и отличаются друг от друга.

С формированием вторичной структуры интерферирует формирование третичной, пространственной трёхмерной структуры при участии как химических групп основных цепей (одинаковых для всех аминокислотных остатков), так и боковых цепей. При этом формируется характерная для белков-ферментов и большинства других белков глобула – достаточно строго единообразный и упорядоченный «клубок», в состав которого входят участки, имеющие вторичную структуру, и участки, её не имеющие.

Четвертичная структура белка – это слипание нескольких глобул в единую структуру, в ряде случаев с образованием ковалентных дисульфидных связей между её компонентами. Многие белки четвертичной структуры не имеют и функционируют как отдельные глобулы, состоящие из одной полипептидной цепи.

1.2.2. Свойства протеиногенных аминокислот как химическая основа структуры фермента

Приобретение белком вторичной, третичной и четвертичной структур, а конкретно их характер, зависит от последовательности аминокислотных остатков (рис. 7), несущих различные боковые цепи.

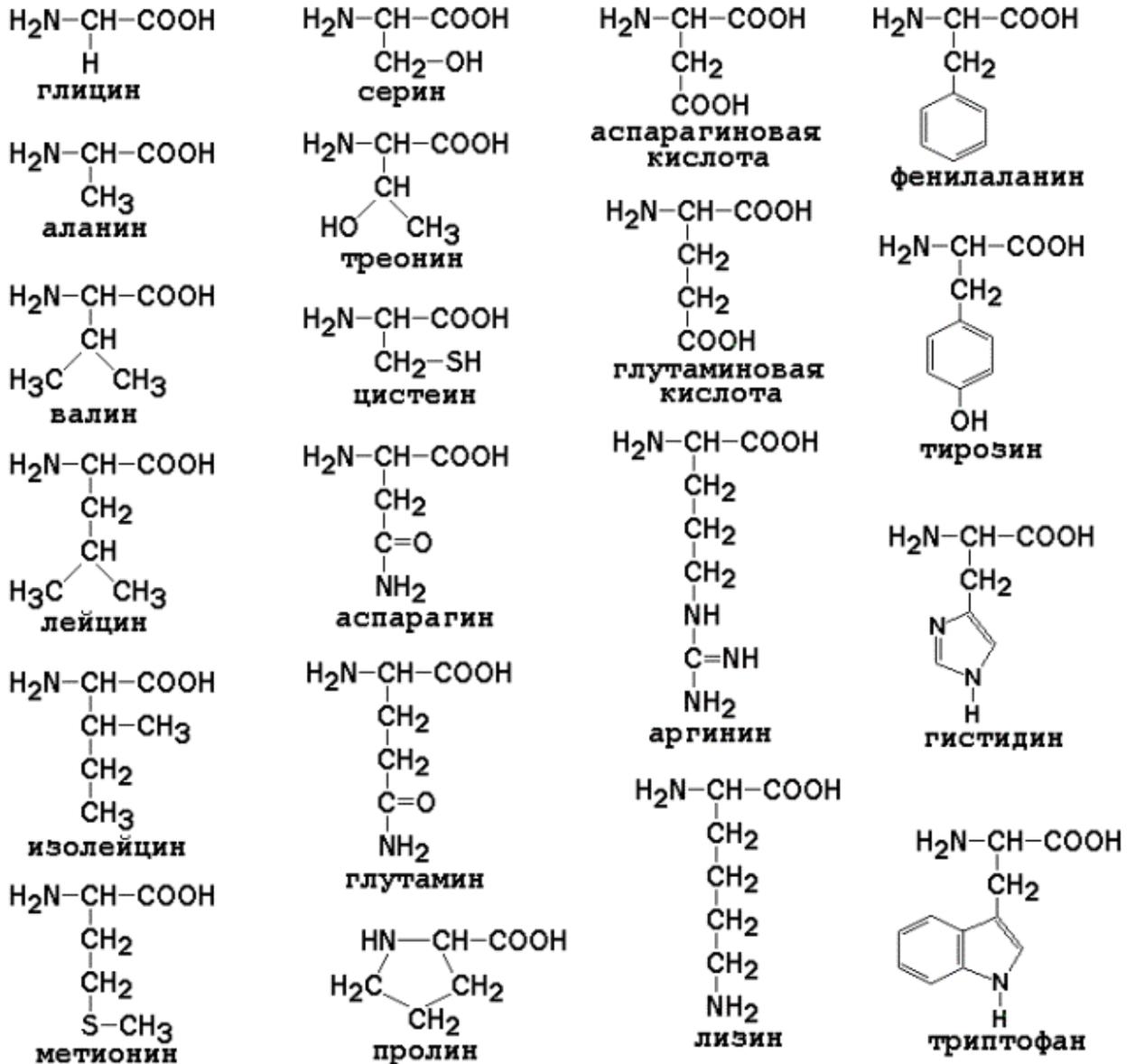


Рис. 7. Структурные формулы протеиногенных аминокислот

На характере боковых цепей строится классификация аминокислот, отражающая их функциональные свойства, вытекающие из их химических свойств. В эту классификацию входят неполярные, полярные и заряженные аминокислоты. Таким образом, она отражает химические свойства боковых

радикалов протеиногенных аминокислот, которыми они и отличаются друг от друга.

Минимальным боковым радикалом обладает аминокислота глицин, несущая в его качестве атом водорода. Это позволяет глицину принимать в составе белковой глобулы конформации, невозможные для других аминокислотных остатков, так как боковой радикал при этом не становится пространственным препятствием. Благодаря этому глицин зачастую делает возможным наличие в третичной структуре крутых изгибов полипептидной цепи.

Аланин несёт боковой радикал в виде метильной группы. Она также весьма компактна, однако уже накладывает некоторые пространственные ограничения на приобретение аминокислотным остатком определённой конформации в полипептидной цепи. Аланин является самой маленькой из неполярных аминокислот – глицин благодаря частичному положительному заряду на атоме водорода относят к полярным. Как и глицин, аланин в ряде случаев может создавать риск ошибок для аминоацил-тРНК синтетаз, так как помещается в любой активный центр по причине своих малых размеров. При этом помогает сохранению точности его слабое связывание с активными центрами по той же причине.

К неполярным аминокислотам относят также валин и изолейцин, несущие разветвлённые алифатические боковые радикалы – у валина радикал включает три углеродных атома, у изолейцина четыре. Валил-тРНК синтетаза, как и лейцил-тРНК синтетаза обладают способностью к редактированию ошибок. Необходимость в ней диктуется сходством боковых радикалов узнаваемых ими аминокислот. При этом изолейцин и валин не полностью взаимозаменяемы функционально, так как их боковые радикалы имеют различные размеры, и, соответственно, создают по-разному выраженные пространственные препятствия другим химическим группам в белковой глобуле. Также они проявляют по-разному выраженные

гидрофобные свойства, опять таки из-за разницы в размерах на одну группу CH_2 .

К неполярным гидрофобным аминокислотам относится также лейцин, с разветвлённой алифатической боковой цепью из четырёх углеродов. От изолейцина он отличается местом ветвления боковой цепи. При этом основной проблемой в плане ошибок для лейцил-тРНК синтетазы становится гомоцистеин, продукты ошибочного узнавания которого она эффективно редактирует, пользуясь особым редактирующим доменом. Гомоцистеин при этом непротеиногенная аминокислота, несущая группу S-H. Основное её сходство с лейцином заключается в достаточной степени гидрофобности и сходстве по молекулярному объёму, что позволяет ей связываться с активным центром лейцил-тРНК синтетазы.

В целом, гидрофобность таких аминокислот, как валин, изолейцин и лейцин позволяет им вступать друг с другом, а также с субстратами, в гидрофобные взаимодействия, при которых локальное уменьшение свободной энергии достигается избеганием соседства с полярными молекулами воды. Впрочем, здесь лучше сказать, что это молекулы воды избегают соседства с алифатическими углеводородными группами, так как для них энергетически естественным является образование водородных связей друг с другом и с полярными группами других молекул.

Одной из наиболее гидрофобных аминокислот является фенилаланин, обладающий бензойным кольцом в составе бокового радикала. Он также способен участвовать в формировании гидрофобных кластеров, способствующем стабилизации конформации белковой глобулы в водной среде. Благодаря гидрофобным взаимодействиям фенилаланин способен участвовать в стекинг-взаимодействиях с азотистыми основаниями нуклеиновых кислот, что зачастую играет важную роль в их связывании в активных центрах ферментов.

Также способен участвовать в стекинг-взаимодействиях другой гидрофобный аминокислотный остаток – приптофан. Это самая большая из

протеиногенных аминокислот. Триптофан обладает способностью к флуоресценции, что широко используется в исследовании белков методом спектрофлуориметрии. Находясь в глубине глобулы, триптофан частично экранируется от возбуждения светом и спектр флуоресценции белка по показаниям спектрофлуориметра смещается. Пользуясь этим, можно понять, находится ли белковая глобула в нативной конформации, или же она расплетена, то есть денатурирована.

Также флуоресцентными свойствами, хотя и в меньшей степени, обладает тирозин. Эта аминокислота отличается от фенилаланина наличием гидроксильной группы на бензойном кольце. Он проявляет гидрофобные свойства, но в то же время обладает полярной гидроксильной группой на боковом радикале, способен участвовать в водородном связывании и относится к полярным аминокислотам. Тирозил-тРНК синтетаза способна ошибочно узнавать D-изомер тирозина, в то время как в биосинтезе белка используются в норме только L-изомеры аминокислот. Эта проблема решается при помощи особого белка – D-тирозил деацилазы, которая способна узнавать D-тирозил-тРНК_{Тир} и деацилировать её, отщепляя ошибочно присоединённый D-изомер тирозина.

Возвращаясь к неполярным аминокислотам, необходимо упомянуть метионин, содержащий атом серы в своём боковом радикале наряду с тремя атомами углерода и водородами. С метионина на N-конце начинаются последовательности большинства белков, так как инициаторной тРНК является метиониновая. Впрочем, иногда в этой позиции может оказываться и валин.

Последняя из неполярных аминокислот – пролин, отличается от всех других тем, что боковая группа в ней ковалентно связана с основной цепью в двух местах. В строгом смысле она является не аминокислотой, а иминокислотой, так как на месте аминогруппы в ней расположена иминогруппа, связанная с боковым радикалом. Тем не менее, она образует пептидную связь с прилежащим аминокислотным остатком посредством этой

группы. На остатке пролина полипептидная цепь всегда изогнута и конформационно закреплена, как раз благодаря дополнительному ковалентному взаимодействию боковой и основной цепей. Проллил-тРНК синтетаза, несмотря на уникальность свойств своего субстрата, способна ошибочно узнавать аланин и цистеин. Продукты ошибочного узнавания аланина редактируются богатейшим спектром механизмов, в числе которых претрансферное редактирование путём гидролиза и путём высвобождения аланил-аденилата, гидролиз аланил-тРНК_{Про} в редактирующем домене и в активных центрах белков-деацилаз. Цистеинил-тРНК_{Про} также гидролизуется особой деацилазой YbaK.

Полярная аминокислота цистеин несёт группу S-H и способна благодаря ей образовывать дисульфидные мостики между петлями белковой глобулы или разных глобул при формировании третичной и четвертичной структур. Образованная двойная аминокислота получила также название цистин. Цистины, содержащие дисульфидные мостики, играют важнейшую роль, например, в четвертичной структуре иммуноглобулинов, обеспечивая неразрывную связь их тяжёлых и лёгких цепей. Такие структуры могут разрушаться восстанавливающими агентами, в частности, бетамеркаптоэтанолом, с восстановлением цистина до двух цистеинов, и, соответственно, с разрывом дисульфидного мостика.

Серин и треонин – полярные аминокислоты, несущие на коротких боковых радикалах гидроксильную группу. Способность участвовать в образовании водородных связей делает их важными для приобретения нужной третичной структуры белковой глобулой. Треонин отличается от серина наличием дополнительной метильной группы, меняющей стерические свойства радикала и сообщающей ей некоторые гидрофобные свойства. Существует проблема различения их аминоацил-тРНК синтетазами, а также различения их с аланином и валином.

К полярным аминокислотам также относятся аспарагин и глутамин, несущие карбоксамидную группу, способную выступать как донором, так и

акцептором водородных связей. Боковая цепь глутамина на одну СН₂-группу длиннее.

Аналогичные им, но несущие легко ионизируемую в водной среде карбоксильную группу аспарагин и глутамин относятся уже к группе заряженных аминокислот. Заряженные аминокислоты формируют заряд белковой глобулы, как правило, это положительный заряд. Но аспарагин и глутамин при этом несут заряд отрицательный. Кулоновское притяжение положительных и отрицательных зарядов играет важную роль в формировании третичной и четвертичной структуры белков, в межбелковых и белково-нуклеиновых взаимодействиях. Заряженные аминокислотные остатки активно участвуют в образовании водородных связей.

Лизин и аргинин – крупные положительно заряженные аминокислоты. Наибольший заряд способен приобретать остаток аргинина, содержащий одновременно три ионизируемые группы. Крупной гетероциклической аминокислотой с положительным зарядом также является гистидин (Horovits, 2017, Майстренко, 2010).

Структурное разнообразие протеиногенных аминокислот обеспечивает формирование структуры белковой глобулы, взаимодействие белков друг с другом, с другими макромолекулами и низкомолекулярными лигандами, а также каталитическую активность белков-ферментов.

1.2.3. Создание штаммов-продуцентов и промышленное производство ферментов

Синтез ферментов в промышленных масштабах как правило осуществляется с использованием особых рекомбинантных штаммов микроорганизмов, часто кишечной палочки и дрожжей. Для получения таких рекомбинантных штаммов в клетки вносится плазмидная ДНК, содержащая ген нужного фермента. Для обеспечения стабильного нахождения плазмиды в клетках из поколения в поколение её последовательность содержит один

или несколько сайтов начала репликации, узнаваемых ДНК-зависимой ДНК-полимеразой данного микроорганизма, а так же ген устойчивости к определённому антибиотику или фунгициду, обеспечивающий содержащим плазмиду клеткам мощное селективное преимущество в присутствии этого вещества.

Ген изначально может быть амплифицирован при помощи полимеразной цепной реакции на матрице геномной ДНК организма-источника фермента, в присутствии праймеров, комплементарных началу и концу этого гена. ПЦР-продукт далее лигируется в линеаризованную плазмиду, для этого существуют технологии на основе ферментов системы рестрикции и лигазы, а также на основе топоизомеразы. Полученная генетическая конструкция вносится в клетки организма, выбранного в качестве продуцента, чаще всего путём электропорации, то есть высоковольтного разряда в среде с высоким электрическим сопротивлением.

Полученный штамм-продуцент выращивается в биореакторах в присутствии питательной среды и селективного антибиотика (одного или нескольких). Синтезированный белок в ряде случаев секретируется в питательную среду, и выделяется из неё, чаще всего, путём хроматографии. Также белок может извлекаться из клеток путём их лизиса, с дальнейшим осаждением клеточного дебриса на центрифугах и хроматографической очисткой продукта.

1.3. Проблема гидролиза высокомолекулярных соединений в переработке органических отходов

На первом этапе микробной переработки органического сырья, используемого для производства биогаза, происходит расщепление высокомолекулярных соединений до их мономеров, пригодных для извлечения энергии в ходе процессов брожения, а также для анаболических процессов (Майстренко, 2010). Этот этап требует от микробных клеток

синтеза широкого спектра ферментов, задействованных в катализе гидролиза макромолекул. При этом процессы гидролиза могут идти достаточно медленно, как по причине избытка тех или иных макромолекул, так и по причине высоких энергетических порогов реакций их расщепления.

В сырье, в основе которого лежат ткани животных, преобладают белковые молекулы, при массированном применении такого сырья создаётся их высокая концентрация. С расщеплением белков в частицах животных тканей специализирующиеся на этом аммонифицирующие микроорганизмы могут справляться далеко не сразу, в частности, по причине достаточно постепенного расширения доступа к нижележащим слоям ткани при разрушении вышележащих слоёв. Может оказывать влияние и концентрация токсичных соединений азота, образующихся при интенсивном дезаминировании аминокислот. Локальное снижение скорости пролиферации микроорганизмов и белкового синтеза в их клетках при этом будет сказываться и на скорости расщепления субстратов, и, в итоге, на последующих стадиях их переработки.

По этой причине представляется логичным, что ускорение процессов разложения белковых субстратов может быть достигнуто внесением в субстратную смесь препаратов протеолитических ферментов. Суть идеи применения ферментных препаратов в данном случае состоит в том, чтобы разнести во времени и пространстве синтез ферментов и сбраживание продуктов их расщепления, что может существенно упростить задачу микробного сообщества по максимально быстрому освоению белковых субстратов. Таким образом, необходимые в больших количествах ферменты синтезируются на этапе производства ферментных препаратов, микроорганизмами, предназначенными специально для решения этой задачи и находящимися в оптимальных для этого условиях в промышленных биореакторах. А последующие стадии переработки белковых субстратах за счёт присутствия искусственно внесённых ферментов в более сложных для микроорганизмов условиях проходят быстрее и эффективнее.

Тот же принцип положен и в основу применения в производстве биогаза ферментов, предназначенных для гидролиза полисахаридов, в частности целлюлозы и пектинов. Полисахаридами богаты растительные субстраты, такие как силос, сахаросвекольный жом и скошенная газонная трава. В отличие от лигнинов, имеющих иррегулярную химическую структуру, целлюлоза и пектины относительно хорошо поддаются ферментативному расщеплению, так как существуют ферменты, высокоспецифичные к ним. Целлюлазы и пектиназы, как и протеазы, представлены на мировом рынке рядом препаратов, эффективность которых подтверждена многолетним применением в различных отраслях промышленности.

При этом, каждый ферментный препарат характеризуется определёнными диапазонами применимости в зависимости от значений температуры, кислотности, окислительно-восстановительного потенциала среды, концентраций в среде тех или иных химических агентов. Информация об этих диапазонах не всегда в полном объёме предоставляется производителем, и не всегда у него имеется в нужном объёме. Даже для хорошо охарактеризованных химически препаратов необходимо экспериментальное опробование их действия в конкретных условиях конкретного производственного процесса, для того, чтобы сделать вывод о практической целесообразности их применения.

1.4. Потенциальный эффект применения ферментных препаратов в биогазовом производстве

Специфика биогазового производства заключается в непрерывном поиске максимально дешёвых источников сырья, связанных с развитием тех или иных отраслей хозяйства в конкретном регионе, зачастую сезонным характером проводимых в них процессов и, с необходимостью, с поддержанием приемлемых условий функционирования микробных

сообществ, вырабатывающих биометан. Транспортировка сырья на далёкие расстояния при этом снижает рентабельность производства биогаза, цены на различные виды сырья могут варьировать не только в зависимости от времени года, но и от погодных условий, от меняющихся тенденций на рынке сельхозпродукции и масштабов производства тех или иных её видов. Так, рост производства сахара в регионе будет вести к предпочтению сахаросекольному жому, а, скажем, рост производства зерновых, поддерживаемых открывающимися экспортными возможностями, актуализирует вопрос об использовании соломы и отрубей. Всё это ведёт к непрерывному изменению технологических условий функционирования метаногенных микробных сообществ и к риску создания условий, далёких от оптимума. Снижение продукции биометана, количества и качества вырабатываемого биогаза грозит сказаться на прибыльности, окупаемости и, следовательно, экономической устойчивости предприятия, специализирующегося на выработке биогаза.

Применение ферментных препаратов, способных содействовать повышению усвояемости различных видов сырья микроорганизмами, способно в значительной мере сгладить влияние субоптимальных параметров состава сбраживаемой смеси, возникающих при избытке тех или иных видов сырья, возникающем в определённый период, когда закупка этих видов сырья представляется наиболее экономически целесообразной.

Повышение гибкости биогазовых производств с точки зрения эффективного использования различных видов сырья и общая интенсификация выработки биометана, а следовательно, их рентабельности, ведёт к расширению биогазовой отрасли и к повышению её роли в утилизации органических отходов. В настоящее время биогазовые производства в нашей стране занимают далеко не всю ту нишу, которую они способны занять, перерабатывая всё ещё лишь небольшую часть отходов сельскохозяйственной и пищевой индустрии. Дальнейшее увеличение числа и суммарной мощности биогазовых станций является естественным

следствием совершенствования технологии анаэробного сбраживания органических субстратов, и является выгодным не только для самих биогазовых предприятий, но и для отраслей, поставляющих сырьё для них. Меры, направленные на стимулирование этого процесса путём повышения рентабельности биогазовых производств и их инвестиционной привлекательности, будут служить своего рода катализатором этого процесса, и нести положительный вклад в ускорение экономического роста в целом, за счёт взаимодействия с другими отраслями промышленности.

В данной работе использованы ферментные препараты производства известной зарубежной компании, качество которых подтверждено многолетним присутствием на мировом рынке. Для экспериментальных исследований мы выбрали поставщика, основываясь на его деловой репутации и максимальной надёжности предлагаемой продукции. При этом, внедрение ферментных препаратов в биогазовую отрасль с необходимостью поставит вопрос о поиске более дешёвых и доступных ферментных препаратов, создавая нишу для продукции отечественных биотехнологических компаний. Таким образом, существует перспектива сопряжения процессов инновационного развития различных наукоёмких отраслей, в интересах которых и проведена данная работа.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперимент проводился на лабораторной биогазовой установке АО «Белгородский институт альтернативной энергетики» с использованием субстрата действующей биогазовой станции «Лучки» и перерабатываемого ей сырья, полученных с хозяйств Белгородской области.

В качестве источника микроорганизмов и запуска процессов брожения был использован инокулум, полученный из дображивателя биогазовой станции «Лучки» и предварительно отстаиванный для удаления остаточного количества растворенного биогаза. В качестве бродильных субстратов в эксперименте использовали свекольный жом, кукурузный силос и отходы бойни (мясные отходы и содержимое кишечника животных).

На предварительном этапе проведения лабораторного эксперимента было проанализировано содержание сухого вещества (СВ) и органического сухого вещества (ОСВ) в исследуемом сырье. Анализ сырья проводили по методикам государственных стандартов ГОСТ 31640-2012 и ГОСТ 32045-2012, также использовали и методы оценки биогазового потенциала сырья. (Лиллепярг, 2004). Содержание сухого вещества и органического сухого вещества определяется путем высушивания навесок сырья до постоянной массы. СВ(%) определяли после высушивания при температуре 105°C. Для определения ОСВ(% от сухого вещества) температуру повышали до 550°C и также выдерживали до постоянной массы (Батлуцкая, 2016). Исходя из полученных данных и нормы содержания органического сухого вещества в инокулуме и бродильных субстратах, было рассчитано соотношение инокулума и каждого из используемых субстратов, необходимое для постановки лабораторного эксперимента. Полученные результаты по определению физико-химических характеристик и расчеты массы загружаемого в лабораторные биореакторы сырья представлены в таблице 2.

Таблица 2

Исходные данные для эксперимента по выявлению влияния энзимов на выход биогаза

Повторность	Тип субстрата	Вес инокулума			Общий вес субстрата		СВ, %	ОСВ, %
		Расчетный, г	Фактический, г.	Фактический, кг.	Расчетный, г	Фактический, г.		
I	инокулум	1 500,0	1 543,0	1,5	0,0	0,0	5,48	4,13
II		1 500,0	1 512,0	1,5	0,0	0,0	5,48	4,13
III		1 500,0	1 487,0	1,5	0,0	0,0	5,48	4,13
I	реф-целлюлоза	1 500,0	1 500,0	1,5	31,0	31,0	100,00	100,00
II		1 500,0	1 503,0	1,5	31,0	31,0	100,00	100,00
III		1 500,0	1 550,0	1,6	31,0	31,0	100,00	100,00
I	Жом	1 500,0	1 508,0	1,5	172,1	172,0	19,48	18,00
II		1 500,0	1 532,0	1,5	172,1	172,0	19,48	18,00
III		1 500,0	1 532,0	1,5	172,1	172,0	19,48	18,00
I	Отходы бойни	1 500,0	1 554,0	1,6	145,1	145,0	22,62	21,35
II		1 500,0	1 526,0	1,5	145,1	145,0	22,62	21,35
III		1 500,0	1 520,0	1,5	145,1	145,0	22,62	21,35
I	Силос 2016 года	1 500,0	1 489,0	1,5	119,1	119,0	27,25	26,00
II		1 500,0	1 528,0	1,5	119,1	119,0	27,25	26,00
III		1 500,0	1 508,0	1,5	119,1	119,0	27,25	26,00
I	Жом + энзим SB2	1 500,0	1 523,0	1,5	132,0	132,0	27,74	23,46
II		1 500,0	1 514,0	1,5	132,0	132,0	27,74	23,46
III		1 500,0	1 504,0	1,5	132,0	132,0	27,74	23,46
I	Отходы бойни + энзим SH3	1 500,0	1 480,0	1,5	145,1	145,0	22,62	21,35
II		1 500,0	1 538,0	1,5	145,1	145,0	22,62	21,35
III		1 500,0	1 499,0	1,5	145,1	145,0	22,62	21,35
I	Силос 2016 года + энзим C1	1 500,0	1 502,0	1,5	119,1	119,0	27,25	26,00
II		1 500,0	1 555,0	1,6	119,1	119,0	27,25	26,00
III		1 500,0	1 480,0	1,5	119,1	119,0	27,25	26,00

Эксперимент проводился параллельно. Для проверки и контроля качества инокулума использовали добавление в качестве бродильного субстрата очищенной целлюлозы.

В таблице 3 представлены результаты измерений выхода биогаза и его компонентный состав для инокулума без добавления дополнительных бродильных субстратов.

Таблица 3.

Средние значения выхода биогаза при использовании инокулума

дата	Параметры		Выход газа						
	температура	давление	объем (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)
07.03.2018	27,8	977,2	3,605	64,92	35,08	0	2,342	1,263	0
12.03.2018	28,0	985,3	0,271	64,29	35,71	0	0,174	0,097	0
16.03.2018	29,0	989,5	0,454	64,17	35,83	0	0,296	0,158	0
21.03.2018	29,0	987,4	0,315	64,29	35,71	0	0,203	0,113	0
27.03.2018	27,2	979,5	0,920	63,46	36,54	0	0,582	0,337	0
02.04.2018	25,7	995,9	0,255	24,89	75,11	0	0,062	0,192	0
06.04.2018	26,0	1002	0,221	42,06	57,94	0	0,098	0,123	0
10.04.2018	27,9	991,1	0,219	42,06	57,94	0	0,092	0,128	0
13.04.2018	27,0	998	0,210	50,00	50,00	0	0,105	0,105	0
26.04.2018	23,4	984,4	0,179	50,00	50,00	0	0,090	0,090	0
Суммарный выход			6,651				4,044	2,607	0

В таблице 4 представлены результаты эксперимента по стандартной проверке качества инокулума и его сбраживающей способности путем внесения 100% целлюлозы в качестве бродильного субстрата. Из полученных данных видно, что при добавлении целлюлозы повышается выход биогаза, следовательно инокулум содержит достаточное количество живых микроорганизмов, обеспечивающих разложение субстрата.

Таблица 4.

Средние значения выхода биогаза при использовании инокулума с добавлением целлюлозы

дата	Параметры		Выход газа						
	темпе- ратура	давле- ние	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)
07.03.2018	27,8	977,2	8,237	38,81	61,19	0	3,264	4,973	0
12.03.2018	28,0	985,3	4,197	46,56	53,44	0	1,952	2,246	0
16.03.2018	29,0	989,5	3,325	69,75	30,25	0	2,314	1,012	0
21.03.2018	29,0	987,4	2,682	72,29	27,71	0	1,948	0,734	0
27.03.2018	27,2	979,5	2,257	76,36	23,64	0	1,724	0,534	0
02.04.2018	25,7	995,9	1,291	61,71	38,29	0	0,807	0,483	0
06.04.2018	26,0	1002	0,503	58,28	41,72	0	0,293	0,211	0
10.04.2018	27,9	991,1	0,737	59,40	40,60	0	0,448	0,289	0
13.04.2018	27,0	998	0,366	58,04	41,96	0	0,215	0,151	0
26.04.2018	23,4	984,4	0,813	63,92	36,08	0	0,519	0,294	0
Суммарный выход			24,409				14,34	9,925	0

В качестве контрольных образцов использовались чистый инокулум без добавления других бродильных субстратов и инокулум с добавлением бродильных субстратов без энзимов.

В опытные образцы вносили соответствующие энзимы производства компании Novozymes (Дания), Для кукурузного силоса энзим С1 из класса целлюлаз, для боенских отходов энзим SH3 из класса протеаз и для жома сахарной свеклы энзим SB2 класса пектиназ.

Первый эксперимент по выявлению оптимальной концентрации энзимов включал контроль и четыре опыта в, проведенных в трехкратной повторности с использованием кукурузного силоса в качестве 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) (Батлукская, 2016, Hochheimer, 1998.).

Далее количества вносимых энзимов были рассчитаны на основании данных, полученных в первом эксперименте.

В лабораторные ферментеры с подготовленным инокулумом было загружено определенное количество субстрата. Культивирование инокулума в субстрате осуществлялось в анаэробных условиях при отсутствии освещения и постоянной температуре 38°C.

Продолжительность лабораторного эксперимента составила 55 дней. Вырабатываемый газ собирался в мешки. Измерение вырабатываемого объема биогаза проводилось через определенные промежутки времени с помощью барабанного счетчика Ritter TG3/3. Компонентный состав полученного биогаза поределяли с помощью газоанализатора Drager X-am 7000.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

3.1. Определение оптимального количества энзимов.

По результатам первого эксперимента было отмечено достоверное увеличение количества биогаза по сравнению с контрольным опытом наблюдалось в первом и третьем экспериментах, с внесением однократной нормы энзимов единоразово и с частями в течение всего эксперимента. При добавлении исследуемых энзимов в начале экспериментов достоверный показатель роста выработки биогаза по сравнению с контролем наблюдался на второй неделе культивирования, а при внесении того же количества частями было отмечено увеличение выхода продукта уже на 6 сутки эксперимента. Наибольший достоверный выход биогаза отмечен в опыте 1 при добавлении целлюлозоразрушающих ферментов в однократной концентрации при загрузке биореактора. В экспериментах с добавлением двукратной дозы фермента, как и единоразово, так и порциями, выявлено снижение общего выхода биогаза (таблица 5).

Таблица 5.

Выход биогаза в зависимости от концентрации энзима и способа подачи.

Номер опыта	Субстрат	Выход биогаза в пересчете на 1 тонну сырья, м ³	Выход биогаза, % от контроля	Выход биогаза в пересчете на 1 тонну ОСВ, м ³	Выход биогаза, % от контроля по ОСВ
0	силос	267	100	737	100
1	силос +энзим 1 раз 1 х	284	106,1	784	106,3
2	силос +энзим 1 раз 2 х	244	91,2	674	91,4
3	силос + энзим х раз 1/2 х	220	82,3	608	82,5
4	силос + энзим х раз 1 х	274	102,4	756	102,6
5	силос +энзим х раз 2 х	250	93,5	692	93,8

Таким образом выявлено, что высокие дозы энзимов вызывали угнетение метанообразующей микрофлоры и увеличение количества летучих жирных кислот, приводя к снижению выработки биогаза (рис.7).

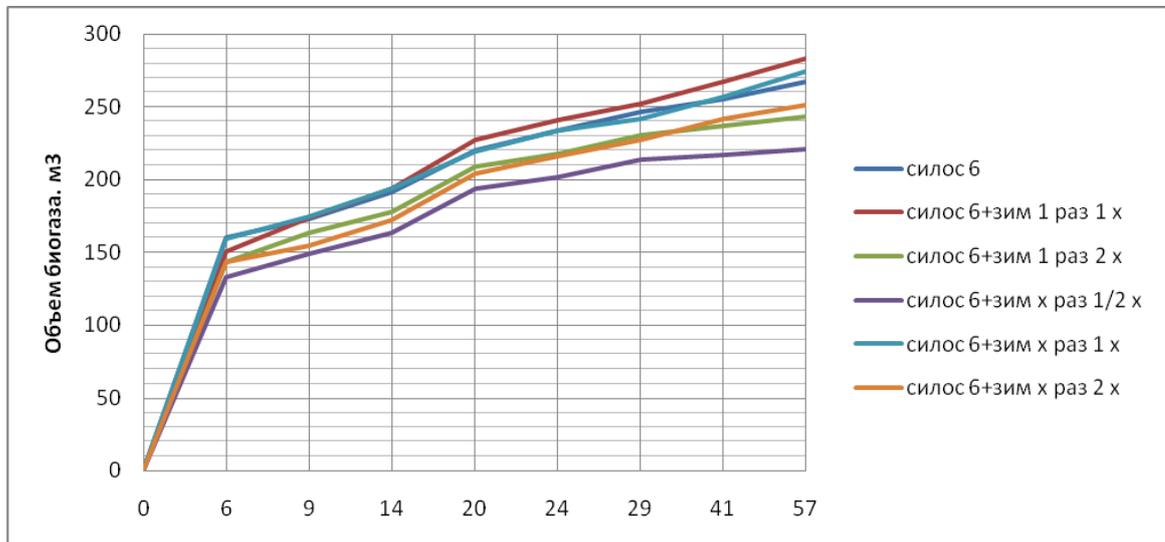


Рис. 7. Зависимость объема образования биогаза от времени удерживания и способа внесения энзимов.

3.2. Влияние энзимов различных классов на эффективность разложения субстрата

В контрольных экспериментах в бродильные емкости с инокулумом вносили расчетные количества бродильных субстратов, применяемых в работе биогазовой станции «Лучки». Данные представлены в таблицах 6,7 и 8. Параллельно проводились аналогичные измерения в опытных биореакторах. Результаты анализа выхода газа и его компонентного состава в опытных образцах с добавлением энзимов представлены в таблицах 9,10 и 11. Были рассчитаны количества биогаза и его качественный состав по результатам каждого измерения, а также суммарные количества по итогам всего эксперимента. Выявлено, что максимальное количество биогаза выделялось в первые недели, но содержание метана увеличивлось постепенно и достигало

максимальных значений в середине эксперимента без добавления энзимов и к третьей неделе с добавлением энзимов.

Таблица 6.

Средние значения выхода биогаза при использовании инокулума с добавлением жома

дата	Параметры		Выход газа						
	температура	давление	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)
07.03.2018	27,8	977,2	8,237	38,81	61,19	0	3,264	4,973	0
12.03.2018	28,0	985,3	4,197	46,56	53,44	0	1,952	2,246	0
16.03.2018	29,0	989,5	3,325	69,75	30,25	0	2,314	1,012	0
21.03.2018	29,0	987,4	2,682	72,29	27,71	0	1,948	0,734	0
27.03.2018	27,2	979,5	2,257	76,36	23,64	0	1,724	0,534	0
02.04.2018	25,7	995,9	1,291	61,71	38,29	0	0,807	0,483	0
06.04.2018	26,0	1002	0,503	58,28	41,72	0	0,293	0,211	0
10.04.2018	27,9	991,1	0,737	59,40	40,60	0	0,448	0,289	0
13.04.2018	27,0	998	0,366	58,04	41,96	0	0,215	0,151	0
26.04.2018	23,4	984,4	0,813	63,92	36,08	0	0,519	0,294	0
Суммарный выход			20,328				11,21	9,258	0

Таблица 7.

Средние значения выхода биогаза при использовании инокулума с добавлением отходов бойни

дата	Параметры		Выход газа						
	температура	давление	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)
07.03.2018	27,8	977,2	11,27	66,37	33,63	0	7,483	3,790	0
12.03.2018	28,0	985,3	8,00	67,36	32,64	0	5,399	2,600	0
16.03.2018	29,0	989,5	1,86	74,12	25,88	0	1,379	0,484	0
21.03.2018	29,0	987,4	1,81	55,77	44,23	0	0,986	0,828	0
27.03.2018	27,2	979,5	1,86	60,52	39,48	0	1,128	0,735	0
02.04.2018	26,2	993,4	1,47	64,21	35,79	0	0,946	0,528	0
06.04.2018	26,0	1002	0,34	54,77	45,23	0	0,191	0,152	0
10.04.2018	27,9	991,1	0,47	61,99	38,01	0	0,293	0,179	0
13.04.2018	27,0	998	0,42	57,39	42,61	0	0,240	0,177	0

26.04.2018	23,4	984,4	0,58	61,29	38,71	0	0,354	0,225	0
Суммарный выход			28,10				18,39 9	9,699	0

Таблица 8.

Средние значения выхода биогаза при использовании инокулума с добавлением силоса

дата	Параметры		Выход газа						
	температура	давление	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)
07.03.2018	27,8	977,2	8,882	51,17	48,83	0	4,351	4,351	0
12.03.2018	28,0	985,3	4,870	65,77	34,23	0	1,664	1,664	0
16.03.2018	29,0	989,5	1,395	69,90	30,10	0	0,416	0,416	0
21.03.2018	29,0	986,8	1,652	61,21	38,79	0	0,645	0,645	0
27.03.2018	28,2	986	1,834	60,84	39,16	0	0,718	0,718	0
02.04.2018	26,2	993,4	1,293	56,41	43,59	0	0,557	0,557	0
06.04.2018	26,0	1002	0,704	56,23	43,77	0	0,306	0,306	0
10.04.2018	27,9	991,1	0,703	55,74	44,26	0	0,310	0,310	0
13.04.2018	27,0	998	0,340	59,50	40,50	0	0,139	0,139	0
26.04.2018	23,4	984,4	0,596	54,75	45,25	0	0,280	0,280	0
Суммарный выход			22,269				9,387	9,387	0

Таблица 9.

Средние значения выхода биогаза при использовании инокулума с добавлением жома+энзим SB2

дата	Параметры		Выход газа						
	температура	давление	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)
07.03.2018	27,8	977,2	8,627	47,54	52,46	0	4,102	4,525	0
12.03.2018	24,3	980,9	4,191	66,21	33,79	0	2,775	1,416	0
16.03.2018	29,0	989,5	0,565	63,78	36,22	0	0,373	0,191	0
21.03.2018	29,0	986,8	0,932	75,76	24,24	0	0,713	0,219	0
27.03.2018	28,2	986	1,602	61,93	38,07	0	0,993	0,609	0
02.04.2018	25,7	995,9	1,456	66,05	33,95	0	0,960	0,495	0
06.04.2018	26,0	1002	1,018	55,02	44,98	0	0,560	0,458	0
10.04.2018	27,9	991,1	0,532	61,29	38,71	0	0,326	0,206	0

13.04.2018	27,0	998	0,305	51,03	48,97	0	0,155	0,151	0
26.04.2018	23,4	984,4	0,313	54,24	45,76	0	0,165	0,148	0
Суммарный выход			19,541				11,12 2	8,419	0

Таблица 10.

Средние значения выхода биогаза при использовании инокулума с добавлением отходов бойни + энзим SH3

дата	Параметры		Выход газа						
	темпе- ратура	давле- ние	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)
07.03.2018	23,0	980,7	9,446	68,86	31,14	0	6,467	2,980	0
12.03.2018	28,0	985,3	10,246	64,53	35,47	0	6,622	3,624	0
16.03.2018	29,0	989,5	1,905	60,47	39,53	0	1,146	0,759	0
21.03.2018	29,0	986,8	1,255	67,81	32,19	0	0,877	0,379	0
27.03.2018	28,2	986	1,404	64,42	35,58	0	0,899	0,506	0
02.04.2018	25,7	995,9	0,975	62,63	37,37	0	0,612	0,363	0
06.04.2018	26,0	1002	0,396	61,97	38,03	0	0,245	0,151	0
10.04.2018	27,9	991,1	0,421	58,00	42,00	0	0,245	0,176	0
13.04.2018	27,0	998	0,268	58,20	41,80	0	0,156	0,111	0
26.04.2018	23,4	984,4	0,622	57,48	42,52	0	0,362	0,261	0
Суммарный выход			26,940				17,63 1	9,309	

Таблица 11.

Средние значения выхода биогаза при использовании инокулума с добавлением силоса + энзим С1

дата	Параметры		Выход газа						
	темпе- ратура	давле- ние	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)
07.03.2018	27,8	977,2	7,769	52,29	47,71	0	4,065	3,704	0
12.03.2018	28,0	985,3	5,591	69,41	30,59	0	3,883	1,708	0
16.03.2018	29,0	989,5	1,047	66,52	33,48	0	0,696	0,351	0
21.03.2018	29,0	986,8	0,664	58,22	41,78	0	0,387	0,277	0
27.03.2018	28,2	986	1,161	59,57	40,43	0	0,695	0,466	0
02.04.2018	25,7	995,9	1,670	57,21	42,79	0	0,956	0,714	0

06.04.2018	26,0	1002	0,486	56,95	43,05	0	0,275	0,211	0
10.04.2018	27,9	991,1	0,299	54,12	45,88	0	0,166	0,133	0
13.04.2018	27,0	998	0,418	54,85	45,15	0	0,240	0,178	0
26.04.2018	23,4	984,4	0,379	52,76	47,24	0	0,202	0,177	0
Суммарный выход			19,484				11,56 4	7,919	0

Таблица 12.

**Суммарный выход биогаза в опытных и экспериментальных
биореакторах**

Субстрат	Объём (мл)		СН ₄ (мл)		СО ₂ (мл)	
	Без энзима	С энзимом	Без энзима	С энзимом	Без энзима	С энзимом
Жом	20,328	19,541	11,21	11,122	9,258	8,419
Силос	22,269	19,484	9,387	11,564	9,387	7,919
Отходы бойни	28,10	26,940	18,399	17,631	9,699	9,309

Далее был проведен расчет подневных выходов биогаза в пересчете на 1 тонну сырой массы бродильного субстрата, а также суммарного выхода по итогам эксперимента.

Таблица 12

**Выход биогаза по дням эксперимента в пересчете на 1 тонну
бродильного субстрата**

Субстрат	День эксперимента										
	0	5	10	14	19	25	31	36	40	43	55
	Выход биогаза (м ³ /т.сырья)										
Жом	0	51	65,4	70,7	80,6	89,7	100,5	104,6	109,5	111	118
Жом с энзимом	0	65,4	97,1	103,4	111,4	120,6	131,6	139,3	143,4	145,7	148
Силос без энзимов	0	74,6	115,6	127,3	141,2	156,6	167,4	173,4	179,3	182,1	187,1
Силос с энзимом	0	65,3	112,3	123,1	129,6	139,4	150,4	154,5	157	160,5	163,7
Отходы бойни без энзимов	0	77,7	132,9	145,8	158,3	171,1	181,3	183,6	186,9	189,2	193,8
Отходы бойни с энзимом	0	65,1	135,8	149	157,6	167,3	174	176,7	179,7	181,5	185,8

Были выявлено достоверное повышение суммарного выхода газа при использовании энзима SB2 с жомом в качестве бродильного субстрата. При добавлении энзимов к силосу и боевским отходам выявлено незначительное снижение выхода биогаза по сравнению с контрольными образцами (рис.8, 9).

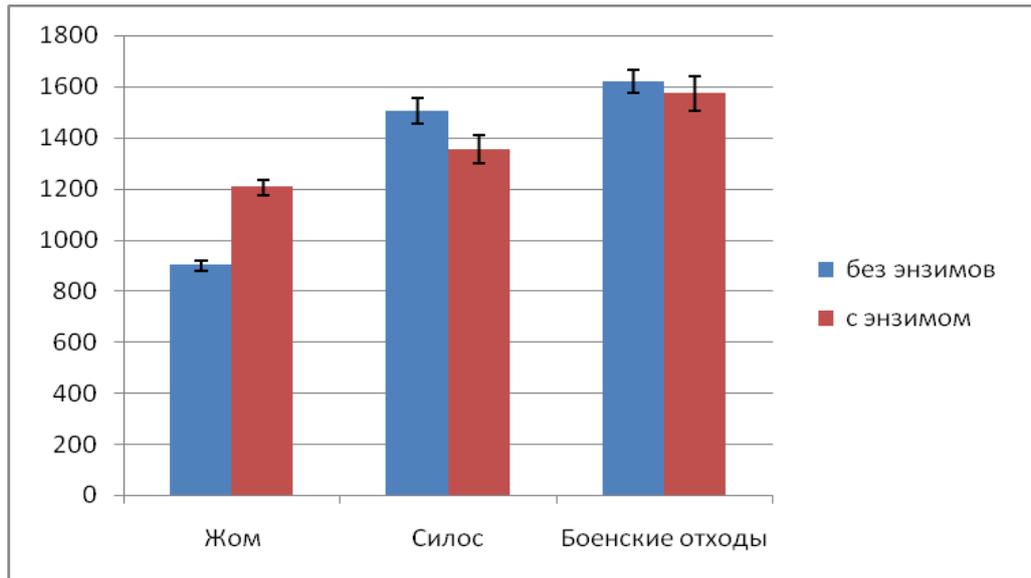


Рис. 8. Суммарный выход биогаза (м³/т)

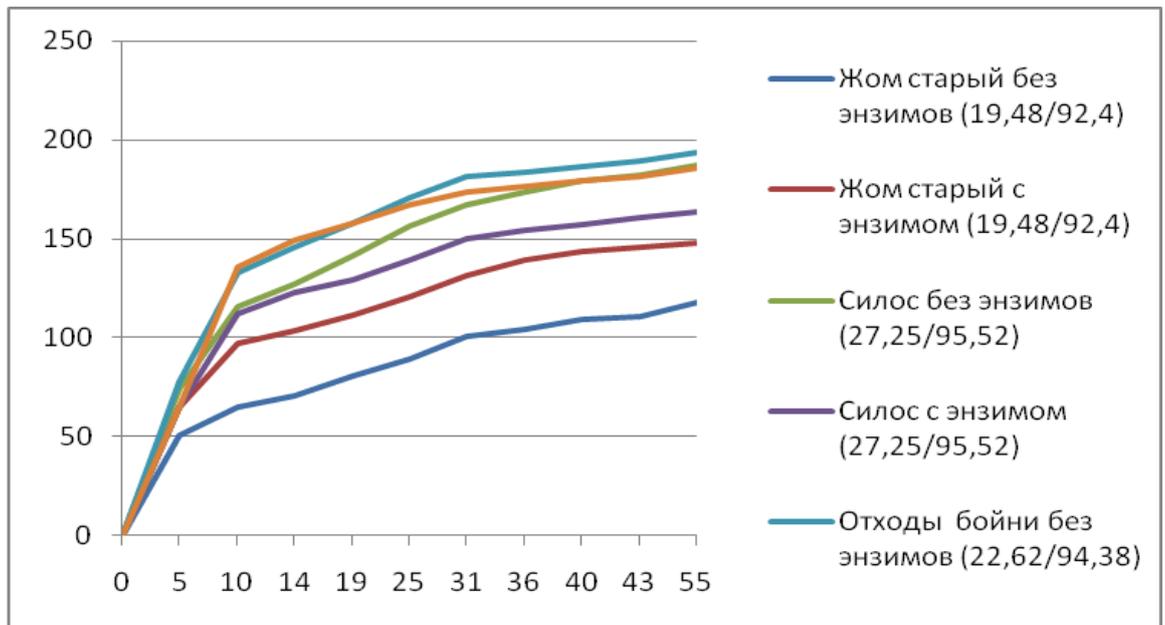


Рис.9. Влияние энзимов на выход биогаза по дням эксперимента.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами было проведено два эксперимента по выявлению влияния энзимов на процесс получения биогаза.

Первый эксперимент проводился с целью определения оптимального количества вносимых в бродильный субстрат энзимов, в ходе второго экспериментом проведен анализ влияния энзимов классов протеаз, пектиназ и целлюлаз на эффективность разложения субстрата, посуточный и суммарный выход биогаза.

Нами было выявлено, 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. 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.

Использование энзимов различных классов на таких субстратах как жом сахарной свеклы, кукурузный силос и боенские отходы показало наибольшую эффективность в эксперименте со свекловичным жомом и

добавлением энзима SB2 уже на 5 сутки эксперимента. Протеолитический фермент SH3 не оказал положительного влияния на выход биогаза с применением боенских отходов в качестве субстрата, напротив, наблюдалось незначительное снижение выхода биогаза по сравнению с контролем, также не обнаружено достоверного влияния фермента C1 при добавлении его к кукурузному силосу.

Исходя из результатов проведенных экспериментов, можно сформулировать следующие выводы:

1. Наибольшее возрастание активности метанообразующих бактерий в субстрате наблюдается при единоразовом внесении однократной нормы комплекса целлюлозоразрушающих ферментов.

2. При добавлении фермента SB2 при использовании жома в качестве бродильного субстрата наблюдается значительное увеличение выработки биогаза по сравнению с контролем с начала процесса ферментации.

Литература

1. ГОСТ 31640-2012. Корма. Методы определения содержания сухого вещества. Дата введения 01.07.2013.
2. ГОСТ 32045-2012. Корма, комбикорма, комбикормовое сырье. Методы определения содержания золы, не растворимой в соляной кислоте. Дата введения 01.07.2014.
3. Бояршин К.С., Присс А.Е., Крикливый И.А., Коваленко О.П., Яремчук А.Д., Тукало М.А. Роль тРНК^{Pro} в претрансферном редактировании аланина пролил-тРНК синтетазой // *Biopolymers and Cell*. - 2013. - V. 29. - N 5. - P. 382–388. doi: 10.7124/bc.00082D
4. Киселев Л.Л., Фаворова О.О., Лаврик О.И., Биосинтез белков от аминокислот до аминоацил-тРНК, Москва, 1984.
5. Кольман Я., Рем К.-Г., Вирт Ю. Наглядная биохимия // Москва, 2018 г., Лаборатория знаний, 509 с.
6. Лиллепярг Е.Р. 2004. Методика определения энергетического потенциала полигонов твердых бытовых отходов. Санкт-Петербург, 116.
7. Льюин Б. Гены // Москва, 2011, Бином. Лаборатория знаний, 896 с.
8. Майстренко А.Ю., Курис Ю.В., Власенко В.Н. Эффективность способов повышения получения биоэнергетического топлива // *Энергосбережение. Энергетика. Энергоаудит*. – 2010. - Т.74, №4. – С.48-55.
9. Спирин А. С., Структура рибосом и биосинтез белка, Пущино, 1984.
10. Christy P.M., Gopinath L.R., Divya D. A review on anaerobic decomposition and enhancement of biogas production through enzymes and microorganisms // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. – 2014. – V.34, P.167-173. doi.org/10.1016/j.rser.2014.03.010
11. 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.

12. Horovits O., Paska R.-D. Classification of Amino Acids by Multivariate Data Analysis, Based on Thermodynamic and Structural Characteristics // *Studia Universitatis Babes-Bolyai Chemia.* – 2017. – V.62. - N2, - P.19-31.
13. 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.
14. Javahishvili T, Manibusan A, Srinagesh S, Lee D, Ensari S, Shimazu M, Schultz PG Role of tRNA Orthogonality in an Expanded Genetic Code // *ACS Chem Biol.* – 2014. – V.9. – N.4. – P.874–879. doi:10.1021/cb4005172
15. Khan I.U., Dzarfan M.H., Hashim^aO.H., Matsuura T., Ismail A.F., Arzhandi M.R-D., Azelee I.W. Biogas as a renewable energy fuel – A review of biogas upgrading, utilisation and storage // *Energy Conversion and Management.* – 2017. – V.150. – N.15. – P.277-294. doi.org/10.1016/j.enconman.2017.08.035
16. Kramer G, Boehringer D, Ban N, Bukau B The ribosome as a platform for co-translational processing, folding and targeting of newly synthesized proteins // *Nature Structural & Molecular Biology.* – 2009. – V.16, P.589–597.
17. Lee N, Bessho Y, Wei K, Szostak JW, Suga H. Ribozyme-catalyzed tRNA aminoacylation // *Nat Struct Biol.* – 2000. – V.7, N.1, P.28-33. DOI:10.1038/71225
18. 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.
19. 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.
20. Min H., Zhao Y.H., Chen M.C., Zhao Y. 1997. Methanogens in paddy soil. *Nutrient Cycling in Agroecosystems*, 49 (2): 163–169.
21. Page M.I. The principles of enzymatic catalysis // *International Journal of Biochemistry.* – 1979. – V.10, N.6. – P.471-476. doi.org/10.1016/0020-711X(79)90001-6

22. Pang YLJ, Poruri K, Martinis SA tRNA synthetase: tRNA Aminoacylation and beyond // *Wiley Interdiscip Rev RNA*. – 2014. – V.5. – N.4. – P.461–480. doi: 10.1002/wrna.1224
23. Sankaranarayanan R, Moras D. The fidelity of the translation of the genetic code // *Acta Biochim Pol*. – 2001, - V.48, N.2, P.323-35.
24. Sarkar N. Polyadenylation of mRNA in prokaryotes // *Annu Rev Biochem*. – 1997. – V.66. – P.173-97. DOI:10.1146/annurev.biochem.66.1.173
25. Schimmel P, Kelley SO. Exiting an RNA world // *Nat Struct Biol*. – 2000, - V.7, N.1. – P.5-7. DOI:10.1038/71194
26. Schimmel P, Giegé R, Moras D, Yokoyama S. An operational RNA code for amino acids and possible relationship to genetic code // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 1993. – V.90, N.19, P.8763-8.
27. Yadavalli SS, Ibba M. Quality control in aminoacyl-tRNA synthesis its role in translational fidelity // *Adv Protein Chem Struct Biol*. – 2012, - V.86, N.1-43. doi: 10.1016/B978-0-12-386497-0.00001-3.
28. Yadavalli SS, Musier-Forsyth K, Ibba M The return of pretransfer editing in protein synthesis // *Proc Natl Acad Sci U S A*. – 2008. – V.105. – N.49. – P.19031–19032. doi:10.1073/pnas.0810781106

ПРИЛОЖЕНИЕ

Выход биогаза в контрольных образцах при использовании инокулума

дата	Параметры		Выход газа (Повторность 1)							Выход газа (Повторность 2)							Выход газа (Повторность 3)						
	температура	давление	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)
07.03.2018	27,8	977,2	4,048	78,13	21,88	0	3,163	0,886	0	2,862	66,23	33,77	0	1,895	0,967	0,00	3,905	50,40	49,60	0	1,968	1,937	0
12.03.2018	28,0	985,3	0,356	64,29	35,71	0	0,229	0,127	0	0,297	64,29	35,71	0	0,191	0,106	0,00	0,161	64,29	35,71	0	0,104	0,058	0
16.03.2018	29,0	989,5	0,195	68,38	31,62	0	0,133	0,062	0	0,144	58,62	41,38	0	0,084	0,060	0,00	1,025	65,52	34,48	0	0,671	0,353	0
21.03.2018	29,0	987,4	0,380	64,29	35,71	0	0,244	0,136	0	0,304	64,29	35,71	0	0,196	0,109	0,00	0,262	64,29	35,71	0	0,168	0,094	0
27.03.2018	27,2	979,5	1,414	60,71	39,29	0	0,858	0,555	0	0,229	62,99	37,01	0	0,144	0,085	0,00	1,117	66,67	33,33	0	0,745	0,372	0
02.04.2018	25,7	995,9	0,391	19,35	80,65	0	0,076	0,315	0	0,226	38,10	61,90	0	0,086	0,140	0,00	0,148	17,22	82,78	0	0,025	0,122	0
06.04.2018	26,0	1002	0,314	44,30	55,70	0	0,139	0,175	0	0,105	33,33	66,67	0	0,035	0,070	0,00	0,244	48,54	51,46	0	0,119	0,126	0
10.04.2018	27,9	991,1	0,222	44,30	55,70	0	0,098	0,124	0	0,230	33,33	66,67	0	0,077	0,154	0,00	0,205	48,54	51,46	0	0,099	0,105	0
13.04.2018	27,0	998	0,285	50,00	50,00	0	0,143	0,143	0	0,130	50,00	50,00	0	0,065	0,065	0,00	0,216	50,00	50,00	0	0,108	0,108	0
26.04.2018	23,4	984,4	0,174	50,00	50,00	0	0,087	0,087	0	0,174	50,00	50,00	0	0,087	0,087	0,00	0,191	50,00	50,00	0	0,096	0,096	0

Выход биогаза в образцах при использовании инокулюма с добавлением целлюлозы.

дата	Параметры		Выход газа (Повторность 1)							Выход газа (Повторность 2)							Выход газа (Повторность 3)						
	температура	давление	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)
07.03.2018	27,8	977,2	8,812	54,55	45,45	0	4,807	4,006	0	6,961	27,59	72,41	0	1,920	5,040	0	8,938	34,29	65,71	0	3,065	5,874	0
12.03.2018	28,0	985,3	4,291	43,64	56,36	0	1,872	2,418	0	3,968	48,98	51,02	0	1,944	2,025	0	4,333	47,06	52,94	0	2,039	2,294	0
16.03.2018	29,0	989,5	2,812	71,43	28,57	0	2,008	0,803	0	3,379	69,81	30,19	0	2,359	1,020	0	3,786	68,00	32,00	0	2,574	1,211	0
21.03.2018	29,0	987,4	2,265	67,93	32,07	0	1,538	0,726	0	3,329	74,51	25,49	0	2,481	0,849	0	2,451	74,42	25,58	0	1,824	0,627	0
27.03.2018	27,2	979,5	2,218	76,79	23,21	0	1,703	0,515	0	2,311	76,00	24,00	0	1,756	0,555	0	2,243	76,31	23,69	0	1,712	0,532	0
02.04.2018	25,7	995,9	1,381	65,17	34,83	0	0,900	0,481	0	1,346	73,91	26,09	0	0,995	0,351	0	1,146	46,05	53,95	0	0,528	0,618	0
06.04.2018	26,0	1002	0,462	59,30	40,70	0	0,274	0,188	0	0,419	58,24	41,76	0	0,244	0,175	0	0,628	57,28	42,72	0	0,360	0,268	0
10.04.2018	27,9	991,1	1,093	60,00	40,00	0	0,656	0,437	0	0,837	64,29	35,71	0	0,538	0,299	0	0,282	53,92	46,08	0	0,152	0,130	0
13.04.2018	27,0	998	0,251	54,93	45,07	0	0,138	0,113	0	0,449	62,62	37,38	0	0,281	0,168	0	0,397	56,57	43,43	0	0,225	0,173	0
26.04.2018	23,4	984,4	0,677	64,86	35,14	0	0,439	0,238	0	0,895	63,27	36,73	0	0,566	0,329	0	0,868	63,64	36,36	0	0,553	0,316	0

Выход биогаза при использовании инокулума с добавлением жома

дата	Параметры		Выход газа (Повторность 1)							Выход газа (Повторность 2)							Выход газа (Повторность 3)						
	температура	давление	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)
07.03.2018	27,8	977,2	8,703	41,03	58,97	0	3,570	5,132	0	8,720	51,22	48,78	0	4,466	4,253	0	9,056	42,13	57,87	0	3,815	5,241	0
12.03.2018	28,0	985,3	2,323	55,77	44,23	0	1,296	1,028	0	2,417	50,52	49,48	0	1,221	1,196	0	2,510	56,60	43,40	0	1,421	1,089	0
16.03.2018	29,0	989,5	1,084	65,66	34,34	0	0,712	0,372	0	1,406	64,97	35,03	0	0,913	0,492	0	0,263	66,18	33,82	0	0,174	0,089	0
21.03.2018	29,0	987,4	1,834	76,60	23,40	0	1,405	0,429	0	1,462	75,00	25,00	0	1,096	0,365	0	1,808	75,00	25,00	0	1,356	0,452	0
27.03.2018	27,2	979,5	1,634	70,00	30,00	0	1,144	0,490	0	1,473	66,97	33,03	0	0,986	0,487	0	1,575	70,22	29,78	0	1,106	0,469	0
02.04.2018	25,7	995,9	2,371	66,67	33,33	0	1,580	0,790	0	1,867	56,10	43,90	0	1,047	0,820	0	1,355	56,47	43,53	0	0,765	0,590	0
06.04.2018	26,0	1002	0,524	53,64	46,36	0	0,281	0,243	0	0,977	54,69	45,31	0	0,534	0,443	0	0,611	59,02	40,98	0	0,360	0,250	0
10.04.2018	27,9	991,1	0,683	60,53	39,47	0	0,413	0,270	0	0,956	55,56	44,44	0	0,531	0,425	0	0,913	60,42	39,58	0	0,552	0,362	0
13.04.2018	27,0	998	0,233	66,67	33,33	0	0,156	0,078	0	0,285	94,94	5,06	0	0,271	0,014	0	0,233	92,31	7,69	0	0,215	0,018	0
26.04.2018	23,4	984,4	1,086	60,71	39,29	0	0,659	0,426	0	1,520	60,00	40,00	0	0,912	0,608	0	1,103	63,01	36,99	0	0,695	0,408	0

Выход биогаза при использовании инокулума с добавлением отходов бойни

дата	Параметры		Выход газа (Повторность 1)							Выход газа (Повторность 2)							Выход газа (Повторность 3)						
	температура	давление	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)
07.03.2018	27,8	977,2	8,703	41,03	58,97	0	3,570	5,132	0	8,720	51,22	48,78	0	4,466	4,253	0	9,056	42,13	57,87	0	3,815	5,241	0
12.03.2018	28,0	985,3	2,323	55,77	44,23	0	1,296	1,028	0	2,417	50,52	49,48	0	1,221	1,196	0	2,510	56,60	43,40	0	1,421	1,089	0
16.03.2018	29,0	989,5	1,084	65,66	34,34	0	0,712	0,372	0	1,406	64,97	35,03	0	0,913	0,492	0	0,263	66,18	33,82	0	0,174	0,089	0
21.03.2018	29,0	987,4	1,834	76,60	23,40	0	1,405	0,429	0	1,462	75,00	25,00	0	1,096	0,365	0	1,808	75,00	25,00	0	1,356	0,452	0
27.03.2018	27,2	979,5	1,634	70,00	30,00	0	1,144	0,490	0	1,473	66,97	33,03	0	0,986	0,487	0	1,575	70,22	29,78	0	1,106	0,469	0
02.04.2018	25,7	995,9	2,371	66,67	33,33	0	1,580	0,790	0	1,867	56,10	43,90	0	1,047	0,820	0	1,355	56,47	43,53	0	0,765	0,590	0
06.04.2018	26,0	1002	0,524	53,64	46,36	0	0,281	0,243	0	0,977	54,69	45,31	0	0,534	0,443	0	0,611	59,02	40,98	0	0,360	0,250	0
10.04.2018	27,9	991,1	0,683	60,53	39,47	0	0,413	0,270	0	0,956	55,56	44,44	0	0,531	0,425	0	0,913	60,42	39,58	0	0,552	0,362	0
13.04.2018	27,0	998	0,233	66,67	33,33	0	0,156	0,078	0	0,285	94,94	5,06	0	0,271	0,014	0	0,233	92,31	7,69	0	0,215	0,018	0
26.04.2018	23,4	984,4	1,086	60,71	39,29	0	0,659	0,426	0	1,520	60,00	40,00	0	0,912	0,608	0	1,103	63,01	36,99	0	0,695	0,408	0

Выход биогаза при использовании инокулума с добавлением жома+энзим SB2

дата	Параметры		Выход газа (Повторность 1)							Выход газа (Повторность 2)							Выход газа (Повторность 3)						
	температура	давление	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)
07.03.2018	27,8	977,2	8,459	46,43	53,57	0	3,927	4,531	0	8,518	48,84	51,16	0	4,160	4,358	0	8,905	47,37	52,63	0	4,218	4,687	0
12.03.2018	24,3	980,9	4,056	59,62	40,38	0	2,418	1,638	0	4,556	67,26	32,74	0	3,064	1,492	0	3,962	71,77	28,23	0	2,843	1,118	0
16.03.2018	29,0	989,5	0,669	61,76	38,24	0	0,413	0,256	0	0,830	71,43	28,57	0	0,593	0,237	0	0,195	58,14	41,86	0	0,113	0,082	0
21.03.2018	29,0	986,8	0,836	68,75	31,25	0	0,575	0,261	0	0,887	73,17	26,83	0	0,649	0,238	0	1,072	85,37	14,63	0	0,916	0,157	0
27.03.2018	28,2	986	1,602	60,00	40,00	0	0,961	0,641	0	1,246	62,50	37,50	0	0,779	0,467	0	1,958	63,29	36,71	0	1,239	0,719	0
02.04.2018	25,7	995,9	1,702	62,92	37,08	0	1,071	0,631	0	1,276	60,47	39,53	0	0,772	0,505	0	1,389	74,76	25,24	0	1,039	0,351	0
06.04.2018	26,0	1002	1,108	55,56	44,44	0	0,616	0,493	0	0,794	54,88	45,12	0	0,436	0,358	0	1,152	54,62	45,38	0	0,629	0,523	0
10.04.2018	27,9	991,1	0,546	58,54	41,46	0	0,320	0,227	0	0,529	62,16	37,84	0	0,329	0,200	0	0,521	63,16	36,84	0	0,329	0,192	0
13.04.2018	27,0	998	0,302	45,95	54,05	0	0,139	0,163	0	0,251	57,14	42,86	0	0,143	0,107	0	0,363	50,00	50,00	0	0,181	0,181	0
26.04.2018	23,4	984,4	0,113	59,38	40,63	0	0,067	0,046	0	0,417	57,58	42,42	0	0,240	0,177	0	0,408	45,76	54,24	0	0,187	0,221	0

Выход биогаза при использовании инокулума с добавлением отходов бойни + энзим SH3

дата	Параметры		Выход газа (Повторность 1)							Выход газа (Повторность 2)							Выход газа (Повторность 3)						
						0			0,00 000				0,0 0		2,61 3	0,00 000	9,46 7	87,3 9	12,6 1	### ##			0,00 000
07.03. 2018	23,0	980,7	9,987	48,62	51,38	0	4,855	5,132	0,00 000	8,886	70,59	29,41	0,0 0	6,272	2,61 3	0,00 000	9,46 7	87,3 9	12,6 1	### ##	8,273	1,194	0,00 000
12.03. 2018	28,0	985,3	10,438	66,76	33,24	0	6,969	3,470	0	10,447	67,59	32,41	0	7,061	3,38 6	0	9,85 3	59,2 4	40,7 6	0	5,837	4,017	0
16.03. 2018	29,0	989,5	1,719	66,67	33,33	0	1,146	0,573	0	2,024	57,60	42,40	0	1,166	0,85 8	0	1,97 3	57,1 4	42,8 6	0	1,128	0,846	0
21.03. 2018	29,0	986,8	1,165	70,00	30,00	0	0,816	0,350	0	1,689	76,92	23,08	0	1,299	0,39 0	0	0,91 2	56,5 2	43,4 8	0	0,515	0,397	0
27.03. 2018	28,2	986	1,551	61,90	38,10	0	0,960	0,591	0	1,432	59,46	40,54	0	0,852	0,58 1	0	1,22 9	71,9 1	28,0 9	0	0,884	0,345	0
02.04. 2018	25,7	995,9	1,033	65,79	34,21	0	0,680	0,354	0	0,990	63,41	36,59	0	0,628	0,36 2	0	0,90 3	58,6 8	41,3 2	0	0,530	0,373	0
06.04. 2018	26,0	1002	0,489	63,89	36,11	0	0,312	0,176	0	0,489	59,38	40,63	0	0,290	0,19 9	0	0,20 9	62,6 4	37,3 6	0	0,131	0,078	0
10.04. 2018	27,9	991,1	0,401	64,10	35,90	0	0,257	0,144	0	0,487	58,82	41,18	0	0,286	0,20 0	0	0,37 6	51,0 9	48,9 1	0	0,192	0,184	0
13.04. 2018	27,0	998	0,320	56,92	43,08	0	0,182	0,138	0	0,320	60,53	39,47	0	0,194	0,12 6	0	0,16 4	57,1 4	42,8 6	0	0,094	0,070	0
26.04. 2018	23,4	984,4	0,738	58,33	41,67	0	0,431	0,308	0	0,712	60,61	39,39	0	0,432	0,28 1	0	0,41 7	53,4 9	46,5 1	0	0,223	0,194	0
26.04. 2018	23,0	980,7	9,987	48,62	51,38	0	4,855	5,132	0	8,886	70,59	29,41	0	6,272	2,61 3	0	9,46 7	87,3 9	12,6 1	0	8,273	1,194	0

Выход биогаза при использовании инокулума с добавлением силоса + энзим С1

дата	Параметры		Выход газа (Повторность 1)							Выход газа (Повторность 2)							Выход газа (Повторность 3)						
	температура	давление	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)	объём (мл)	CH ₄ (%)	CO ₂ (%)	H ₂ S (%)	CH ₄ (мл)	CO ₂ (мл)	H ₂ S (мл)
07.03.2018	27,8	977,2	7,474	51,16	48,84	0	3,824	3,650	0	7,743	51,85	48,15	0	4,015	3,728	0	8,088	53,85	46,15	0	4,355	3,733	0
12.03.2018	28,0	985,3	5,571	66,67	33,33	0	3,714	1,857	0	5,368	69,31	30,69	0	3,720	1,647	0	5,834	72,25	27,75	0	4,215	1,619	0
16.03.2018	29,0	989,5	0,999	69,70	30,30	0	0,696	0,303	0	1,084	68,75	31,25	0	0,745	0,339	0	1,059	61,11	38,89	0	0,647	0,412	0
21.03.2018	29,0	986,8	0,557	59,52	40,48	0	0,332	0,226	0	0,667	55,36	44,64	0	0,369	0,298	0	0,768	59,79	40,21	0	0,459	0,309	0
27.03.2018	28,2	986	0,983	55,81	44,19	0	0,549	0,434	0	1,390	61,54	38,46	0	0,855	0,535	0	1,110	61,36	38,64	0	0,681	0,429	0
02.04.2018	25,7	995,9	1,832	57,78	42,22	0	1,059	0,774	0	1,572	56,34	43,66	0	0,885	0,686	0	1,606	57,50	42,50	0	0,924	0,683	0
06.04.2018	26,0	1002	0,689	55,37	44,63	0	0,382	0,308	0	0,410	57,14	42,86	0	0,234	0,176	0	0,358	58,33	41,67	0	0,209	0,149	0
10.04.2018	27,9	991,1	0,461	60,61	39,39	0	0,279	0,182	0	0,307	48,98	51,02	0	0,151	0,157	0	0,128	52,78	47,22	0	0,068	0,060	0
13.04.2018	27,0	998	0,458	52,38	47,62	0	0,240	0,218	0	0,579	65,33	34,67	0	0,378	0,201	0	0,216	46,84	53,16	0	0,101	0,115	0
26.04.2018	23,4	984,4	0,391	54,55	45,45	0	0,213	0,178	0	0,686	52,63	47,37	0	0,361	0,325	0	0,061	51,11	48,89	0	0,031	0,030	0