



ВОДОРОДНАЯ ЭКОНОМИКА  
HYDROGEN ECONOMY

НОВЫЕ СПОСОБЫ ПОЛУЧЕНИЯ ВОДОРОДА

NOVEL HYDROGEN PRODUCTION METHODS

Статья поступила в редакцию 22.08.20. Ред. Рег. №11-05

The article has entered in publishing office 22.08.20 Ed. Reg. No. 11-05

УДК 631.1.004.18:636.22/28

**ХАРАКТЕРИСТИКИ ПРОЦЕССА ПОЛУЧЕНИЯ БИОВОДОРОДА  
ИЗ ПРОСТЫХ И КОМПЛЕКСНЫХ СУБСТРАТОВ  
С РАЗНЫМ БИОПОЛИМЕРНЫМ СОСТАВОМ**

**Ю.В. Литти<sup>1</sup>, А.А. Ковалев<sup>2</sup>, Д.А. Ковалев<sup>2</sup>, И.В. Катраева<sup>3</sup>,  
С.Н. Паршина<sup>1</sup>, Е.А. Журавлева<sup>1</sup>, Е.А. Бочкова<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>ФИЦ Биотехнологии РАН 119071, РФ, г. Москва, Ленинский проспект, д.33, стр. 2,

тел. +7(926)369-92-43, e-mail: [litty-yuriy@mail.ru](mailto:litty-yuriy@mail.ru)

<sup>2</sup>ФГБНУ ФНАЦ ВИМ

109428, РФ, г. Москва, 1-й Институтский проезд, дом 5

<sup>3</sup>ФГБОУ ВО ННГАСУ

603950, РФ, г. Нижний Новгород, ул. Ильинская, д.65

doi: 10.15518/isjaee.2020.09.010

Заключение совета рецензентов: 24.08.20

Заключение совета экспертов: 24.08.20

Принято к публикации: 29.08.20

В работе исследовали характеристики процесса темновой ферментации (ТФ) ряда простых (крахмал, подсолнечное масло, пептон и их смесь) и комплексных (корм для собак, комбикорм для свиней, осадок сточных вод (ОСВ)) субстратов с использованием смешанной культуры, контроля pH (5.5), при 55°C. Пептон и подсолнечное масло характеризовались минимальной продукцией H<sub>2</sub>, составившей, соответственно, 5.0 и 2.3 мл H<sub>2</sub>/г ХПК. Удельный выход водорода в расчете на разложенный крахмал составил 1.55 моль H<sub>2</sub>/моль. Добавление пептона и подсолнечного масла к крахмалу снижало удельный выход водорода из крахмала на 23%. Значительное отличие в продукции водорода наблюдалось при ТФ комплексных отходов. Удельный выход водорода из корма для собак составил 46.5 мл H<sub>2</sub>/г ХПК или 143.4 мл H<sub>2</sub>/г углеводов, из комбикорма для свиней – 32.1 мл H<sub>2</sub>/г ХПК или 91.6 мл H<sub>2</sub>/г углеводов, а из ОСВ – 9.3 мл H<sub>2</sub>/г ХПК или 98.0 мл H<sub>2</sub>/г углеводов. Возможные взаимосвязи между биополимерным составом субстратов и характеристиками процесса ТФ были проанализированы с применением коэффициентов ранговой корреляции Спирмена. Концентрация углеводов, а также соотношение углеводы/белки и углеводы/жиры были основными факторами, влияющими на высокий удельный выход H<sub>2</sub>, его содержание в биогазе, а также соотношение H<sub>2</sub>/растворимые метаболиты. Концентрация белков оказывала статистически значимое положительное влияние на накопление ацетата и сукцината, а углеводов – на накопление капроната.

**Ключевые слова:** биоводород, темновая ферментация, органические отходы, биополимерный состав, растворимые метаболиты.

**CHARACTERISTICS OF BIOHYDROGEN PRODUCTION FROM SIMPLE AND  
COMPLEX SUBSTRATES WITH DIFFERENT BIOPOLYMERIC COMPOSITION**

**Yu.V. Litti<sup>1</sup>, A.A. Kovalev<sup>2</sup>, D.A. Kovalev<sup>2</sup>, I.V. Katraeva<sup>3</sup>,  
S.N. Parshina<sup>1</sup>, E.A. Zhuravleva<sup>1</sup>, E.A. Bochkova<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Federal State Institution «Federal Research Centre «Fundamentals of Biotechnology» of the Russian Academy of Sciences»

119071, Russian Federation, Moscow, Leninsky prospect, 33, building 2,

tel. +7 (926) 369-92-43, e-mail: [litty-yuriy@mail.ru](mailto:litty-yuriy@mail.ru)



<sup>2</sup>Federal Government Budgetary Institution of Science "Federal scientific agroengineering centre VIM" 109428, Russian Federation, Moscow, 1st Institutskiy proezd, building 5

<sup>3</sup>Nizhny Novgorod State University of Architecture and Civil Engineering 603950, RF, Nizhny Novgorod, st. Ilyinskaya, 65

doi: 10.15518/isjaee.2020.09.010

Referred: 24.08.20

Received in revised form: 24.08.20

Accepted: 29.08.20

The work investigated the characteristics of the dark fermentation (DF) process of a number of simple (starch, sunflower oil, peptone and their mixture) and complex (dog food, pig feed, sewage sludge (SS)) substrates using a mixed culture, pH control (5.5), at 55°C. Peptone and sunflower oil were characterized by the lowest production of H<sub>2</sub>, namely 5.0 and 2.3 ml H<sub>2</sub>/g COD, respectively. The specific hydrogen yield per decomposed starch was 1.55 mol H<sub>2</sub>/mol. The addition of peptone and sunflower oil to starch reduced the specific yield of hydrogen from starch by 23%. A large difference in hydrogen production was observed during DF of complex substrates. The specific hydrogen yield from dog food was 46.5 ml H<sub>2</sub>/g COD or 143.4 ml H<sub>2</sub>/g carbohydrates, from pig feed – 32.1 ml H<sub>2</sub>/g COD or 91.6 ml H<sub>2</sub>/g carbohydrates, and from SS – 9.3 ml H<sub>2</sub>/g COD or 98.0 ml H<sub>2</sub>/g carbohydrates. Possible relationships between the biopolymeric composition of substrates and characteristics of the DF process were analyzed using Spearman's rank correlation coefficients. The concentration of carbohydrates, as well as the ratio of carbohydrates/proteins and carbohydrates/fats, were the main factors influencing the high specific yield of H<sub>2</sub>, its content in biogas, as well as the ratio of H<sub>2</sub>/soluble metabolites. The concentration of proteins had a statistically significant positive effect on the accumulation of acetate and succinate, and carbohydrates - on the accumulation of caproate.

**Keywords:** biohydrogen, dark fermentation, organic waste, biopolymeric composition, soluble metabolites.



Литти Юрий Владимирович  
Yuriy V. Litti

**Сведения об авторе:** ФИЦ Биотехнологии РАН, старший научный сотрудник лаборатории микробиологии антропогенных мест обитания, кандидат биологических наук.

**Образование:** Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева (РХТУ) 2008г., инженер.

**Область научных интересов:** анаэробные микроорганизмы, метаногенные сообщества микроорганизмов, метаногенез, твердые органические отходы, очистка сточных вод, нитрификация, денитрификация, процесс анаммокс, анаммокс-бактерии.

**Публикации:** 29;

**Индекс Хирша:** РИНЦ - 6;

**Scopus** - 4; **WoS** - 4

**SPIN:** 1487-7611;

**Researcher ID:** C-4945-2014

**Information about the author:** Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Senior Researcher, Laboratory of Microbiology of Anthropogenic Habitats, Candidate of Biological Sciences.

**Education:** D.Mendeleev University of Chemical Technology of Russia (MUCTR) 2008, engineer.

**Research area:** anaerobic microorganisms, methanogenic communities of microorganisms, methanogenesis, solid organic waste, wastewater treatment, nitrification, denitrification, anammox process, anammox bacteria.

**Publications:** 29.



Журавлева Елена Александровна  
Elena A. Zhuravleva

**Сведения об авторе:** ФИЦ Биотехнологии РАН, м.н.с. лаборатории микробиологии антропогенных мест обитания, аспирант.

**Образование:** Московский государственный университет имени М. В. Ломоносова 2019г., микробиолог

**Область научных интересов:** анаэробные микроорганизмы, метаногенные сообщества микроорганизмов, метаногенез, органические отходы, очистка сточных вод, прямой межвидовой перенос электронов, синтрофия.

**Публикации:** 2.

**Индекс Хирша:** РИНЦ - 0;

**Scopus** - 1; **WoS** - 1

**ORCID:** 0000-0002-5525-0459,

**Scopus Author ID:** 57216346570

**Information about the author:** Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, junior researcher Laboratory of Microbiology of Anthropogenic Habitats, postgraduate.

**Education:** Lomonosov Moscow State University, 2019, microbiologist.

**Research area:** anaerobic microorganisms, methanogenic communities of microorganisms, methanogenesis, organic waste, wastewater treatment, direct interspecies electron transfer, syntrophy.

**Publications:** 2.



Ковалев Андрей  
Александрович  
Andrey A. Kovalev

**Сведения об авторе:** ФГБНУ ФНАЦ ВИМ, старший научный сотрудник лаборатории биоэнергетических и сверхкритических технологий, кандидат технических наук.

**Образование** Московский государственный университет путей сообщения (МИИТ) 2009г., инженер

**Область научных интересов:** возобновляемые источники энергии, анаэробная переработка отходов животноводства, производство биогаза из биомассы, теплоэнергетические установки, тепло-массообмен.

**Публикации:** 54

**Индекс Хирша:** РИНЦ - 5;

**Scopus - 2; WoS - 1**

**SPIN:** 4267-3026

**Researcher ID:** F-7045-2017

**ORCID iD:** 0000-0002-1983-3454

**Scopus Author ID:** 57205285134

**Information about the author:** Federal Scientific Agroengineering Center VIM, senior researcher of the laboratory of bioenergy and supercritical technologies, candidate of technical sciences.

**Education:** Moscow state University of railway engineering (MIIT) 2009, engineer.

**Research area:** renewable energy, anaerobic digestion of animal waste, biogas production from biomass heat and power plants, heat and mass transfer.

**Publications:** 54.



Ковалев Дмитрий  
Александрович  
Dmitry A. Kovalev

**Сведения об авторе:** ФГБНУ ФНАЦ ВИМ, заведующий лабораторией биоэнергетических технологий, кандидат технических наук.

**Образование** Московский государственный индустриальный университет (МГИУ) 2003 г., инженер.

**Область научных интересов:** возобновляемые источники энергии, анаэробная переработка отходов животноводства, технические инновации в сельском хозяйстве и защите окружающей среды, производство биогаза из биомассы.

**Публикации:** 62

**Индекс Хирша (РИНЦ):** 6

**SPIN:** 6513-5547

**Researcher ID:** K-4810-2015

**ORCID iD:** 0000-0002-3603-3686

**Information about the author:** Federal Scientific Agroengineering Center VIM, head of the laboratory of bioenergy and supercritical technologies, candidate of technical Sciences.

**Education:** Moscow state industrial University (MSIU) 2003, engineer.

**Research area:** renewable energy, anaerobic digestion of animal waste, technical innovations in agriculture and environmental protection, the production of biogas from biomass.

**Publications:** 62.



Катраева Инна  
Валентиновна  
Inna V. Katraeva

**Сведения об авторе:** ФГБОУ ВО «Нижегородский государственный архитектурно-строительный университет», доцент кафедры водоснабжения, водоотведения, инженерной экологии и химии, кандидат технических наук.

**Образование** Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского (ННГУ) 1989 г., химик.

**Область научных интересов:** очистка производственных и хозяйственно-бытовых сточных вод с использованием биологических, физико-химических и баромембранных методов, анаэробная переработка органических отходов с получением биогаза.

**Публикации:** 50

**Индекс Хирша (РИНЦ):** 5

**SPIN:** 3369-3091

**Researcher ID:** O-4715-2016

**Information about the author:** Nizhny Novgorod State University of Architecture and Civil Engineering, associate professor of the chair of water supply, sewage, engineering ecology and chemistry, candidate of technical sciences.

**Education:** Lobachevsky Nizhny Novgorod State University (NNGU) 1989, chemist.

**Research area:** treatment of industrial and household wastewater by biological, physical-chemical and baromembrane methods, organic waste anaerobic processing with biogas production.

**Publications:** 50.





С.Н. Паршина  
S.N. Parshina

**Сведения об авторе:** ФИЦ Биотехнологии РАН, старший научный сотрудник Лаборатории микробиологии антропогенных мест обитания, кандидат биологических наук

**Образование:** Московский Государственный Педагогический Институт (МГПИ) им. В.И. Ленина, биолого-химический факультет, 1971 г., биолог

**Область научных интересов:** анаэробные микробные сообщества, анаэробные микроорганизмы, метаногенез, биологическая очистка сточных вод, биологическая обработка органических отходов

**Публикации:** 60

**Индекс Хирша:** РИНЦ- 17 ;

**Scopus-** 17; **WoS** - 16;

**SPIN:** 1315-8275

**ResearcherID:** A-8607-2014

**Scopus ID:** 35511680900

**Information about the author:** Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Laboratory of Microbiology of Anthropogenic Habitats, PhD

**Education:** Moscow State Pedagogical Institute V.I. Lenin, 1971, speciality Biology

**Research area:** anaerobic microbial communities, anaerobic microorganisms, methanogenesis, biological wastewater treatment, biological treatment of organic waste.

**Publications:** 60



Бочкова Екатерина  
Александровна  
Ekaterina A. Botchkova

**Сведения об авторе:** ФИЦ Биотехнологии РАН, научный сотрудник лаборатории микробиологии антропогенных мест обитания, кандидат биологических наук.

**Образование:** Московский Государственный Университет им. М.В. Ломоносова, 2013г., микробиолог

**Область научных интересов:** анаэробные микроорганизмы, очистка сточных вод, нитрификация, денитрификация, процесс анаммокс, анаммокс-бактерии, биоплёнки, микробные сообщества, компостирование

**Публикации:** 23.

**Индекс Хирша:** РИНЦ - 2;

**Scopus** - 4; **WoS** - 1

**SPIN:** 5343-1389

**Researcher ID:** C-1974-2014

**ORCID:** 0000-0002-3987-902X

**Scopus Author ID:** 56674603800

**Information about the author:** Research Center of Biotechnology, Russian Academy of Sciences, Laboratory of Microbiology of Anthropogenic Habitats, Candidate of Biological Sciences, Researcher

**Education:** Lomonosov Moscow State University 2013, microbiologist.

**Current Field of Interest and Activities:** anaerobic microorganisms, wastewater treatment, nitrification, denitrification, anammox process, anammox bacteria, biofilms, microbial communities, composting

**Publications:** 23.



## Введение

Получение биоводорода при темновой ферментации (ТФ) различных органических отходов представляет собой как процесс производства возобновляемой энергии, так и решение проблемы переработки органических отходов. Следует отметить, что в процессе ТФ происходит лишь частичное биоразложение органического вещества (ОВ) отходов. В сбраживаемой массе накапливаются органические кислоты, спирты и другие соединения, которые можно использовать для получения продуктов с высокой добавленной стоимостью, в том числе биотоплива, химикатов, биополимеров и биопластика [1].

На эффективность процесса ТФ влияет много параметров, в том числе тип субстратов и их соотношение при совместном сбраживании, тип и источник инокулята, способы обработки субстратов и инокулятов, температура, pH и другие. Эти факторы оказывают значительное влияние на удельный выход водорода из органических отходов, что отражается в большом разбросе данных, представленных в науч-

ной литературе [2–6]. Так, выход водорода из простых субстратов, в частности из крахмала, различался в разы, от 0.98 до 3.8 моль  $H_2$ /моль глюкозы [5]. При использовании реальных пищевых отходов в качестве субстрата удельный выход биоводорода варьировал от 39 до 90 мл  $H_2$ /г ОВ [6], что, впрочем, может быть вызвано различиями в составе отходов. Органические отходы состоят из трех главных биоразлагаемых компонентов: жиров, белков и углеводов. Их соотношение в отходах является одной из фундаментальных характеристик, которые необходимо учитывать при правильном сравнении выходов водорода [7]. Известно, что богатые углеводами отходы имеют более высокий выход водорода, чем субстраты, богатые белками и жирами [4]. ТФ жиров продуцирует глицерин и длинноцепочечные жирные кислоты (ДЦЖК). При разложении глицерина образуется водород и спирты [8]. ДЦЖК ингибируют анаэробные бактерии из-за их адсорбции к клеточной стенке и снижения эффективности клеточного транспорта [9]. Считается, что субстраты, богатые белками, при разложении не могут образовывать

большое количество водорода [9]. В то же время присутствие белков может способствовать процессу ТФ за счет обеспечения микроорганизмов необходимыми питательными веществами. Так, при использовании простых соединений: глюкозы и крахмала в качестве источника углеводов, и пептона в качестве источника белков, наиболее высокий удельный выход водорода наблюдался при соотношении 1.5 г ХПК глюкозы/г ХПК пептона и 4.0 г ХПК крахмала/г ХПК пептона [10]. Использование в качестве ко-субстратов комплексных органических веществ дает иные оптимальные соотношения компонентов для наиболее высокого удельного выхода водорода. Так, оптимальное соотношение углеводов к белкам составляло 1.66 г ХПК/г ХПК, когда в качестве источника углеводов и белков использовали, соответственно, пищевые отходы и осадок сточных вод (ОСВ) в работе [11]. Удельный выход водорода из отхода производства биодизеля, содержащего глицерин после переэтерификации растительного масла,

также увеличивался в присутствии дрожжевого экстракта и триптона [8]. В то же время не отмечалось какого-либо положительного влияния белков и жиров на образование водорода в работе [7].

Таким образом, имеющиеся литературные данные указывают на большие различия по (1) выходу водорода из простых и комплексных органических субстратов, и (2) влиянию компонентного состава органических отходов на процесс ТФ, что вероятнее всего связано с различными условиями проведения экспериментов [2–4]. Целью настоящей работы было провести сравнительное исследование удельного выхода биоводорода в процессе ТФ из простых субстратов (моделей белков, жиров и углеводов), а также ряда комплексных субстратов в одинаковых условиях (контроль pH, термофильный режим, инокулят – активный ил очистных сооружений). Исследование также было направлено на оценку того, как природа субстрата и его компонентный состав влияют на состав растворимых метаболитов.

Таблица обозначений	
<i>Буквы латинского алфавита</i>	
pH	Водородный показатель
H <sub>2</sub> O	Вода
CO <sub>2</sub>	Диоксид углерода
O <sub>2</sub>	Кислород
H <sub>2</sub>	Водород
KOH	Гидроксид калия
HCl	Хлористый водород
CH <sub>3</sub> COOH	Уксусная кислота
NH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> )COOH	Аланин
NH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	Глицин
NH <sub>3</sub>	Аммиак
HO <sub>2</sub> CCH(NH <sub>2</sub> )CH <sub>2</sub> CH(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	Лейцин
CH <sub>3</sub> -CH(CH <sub>3</sub> )-CH <sub>2</sub> -COOH	Изовалерат
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Анион гидрокарбоната
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup>	Катион аммония
C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	Глюкоза
CH <sub>3</sub> CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> COOH	Масляная кислота
r	Коэффициент корреляции
P	Вероятность
ΔG°	Стандартная энергия Гиббса
<i>Индексы нижние</i>	

исх.	исходный
углевод.	углеводы
<i>Аббревиатуры</i>	
РФФИ	Российский фонд фундаментальных исследований
ТФ	Темновая ферментация
ОСВ	Осадки сточных вод
ХПК	Химическое потребление кислорода
ЛЖК	Летучие жирные кислоты
ДЦЖК	Длинноцепочечные жирные кислоты
БГ	Биогаз
Г	Газ
СВ	Сухое вещество
ОВ	Органическое вещество
ГХ	Газовый хроматограф
ГОСТ	Межгосударственный стандарт
ПНДФ	Природоохранные нормативные документы федеративные
кДж	килоджоуль

## 1. Материалы и методы

### 1.1. Инокулят, субстраты, минеральная среда

В качестве источника водород-образующих микроорганизмов использовали осадок сточных вод (ОСВ) Люберецких очистных сооружений (г. Москва). Для получения водорода использовали ряд модельных субстратов, представляющих разные классы биополимеров, а также комплексные органические субстраты. Модель углеводов была представлена картофельным крахмалом (далее – крахмал) с молекулярной массой 162.1 г/моль, белков – ферментативным пептоном (далее – пептон), жиров – подсолнечным маслом (далее – масло). Для имитации

биополимерного состава комплексных органических отходов использовали смесь крахмала, масла и пептона в соотношении, близком к наблюдающемуся в реальных пищевых отходах [12]. Комплексные органические субстраты были представлены комбикормом для свиней (в основном состоящим из отходов переработки злаков, подсолнечного шрота и рапсового жмыха) и кормом для собак (в состав которого входят злаки, мясо и субпродукты, жиры животного происхождения, морковь, люцерна, растительные масла). Используемый в качестве инокулята ОСВ также был субстратом в контрольных опытах, где не было добавления иного субстрата. Комплексные органические субстраты, в т.ч. инокулят, не подвергались никакой предварительной обработке, та-

ким как измельчение, нагрев, обработке реагентами и т.п.

Для культивирования водород-образующих микроорганизмов готовили минеральную среду согласно [13], которую перед использованием автоклавировали при 1 ати в течение 30 мин.

### 1.2. Проведение эксперимента по ТФ

В стеклянные флаконы общим объемом 265 мл добавляли инокулят и субстрат, согласно табл. 1. Затем общий объем жидкой фазы доводили минеральной средой до 240 мл. Газовую фазу тщательно продували аргоном, флаконы герметично закрывали резиновыми пробками. Резиновые пробки протыкали толстой медицинской иглой сквозь ребро жесткости, к основанию иглы присоединяли 0.5 л мешок с металлизированной поверхностью (E-Switch, Китай) для сбора образующегося биогаза. Флаконы инкубировали при температуре 55°C. Перемешивание осуществляли 1-2 раза в сутки путем встряхивания вручную. Регулярно измеряли объем и состав образующегося биогаза, а также pH и содержание растворенных метаболитов в сбраживаемой массе. При анализе газового состава отбирали пробы как из газовой фазы флакона, так и из мешка, для контроля однородности состава газа в них. Регулярно, раз в 1-2 суток, доводили pH жидкой фазы до 5.5±0.1 путем добавления соответствующего количества 5н р-ра КОН или HCL.

### 1.3. Измерение количественного и качественного состава биогаза

Измерение объема образующегося биогаза осуществляли с использованием трехкомпонентного шприца объемом 50 мл. Наконечник шприца присоединяли к клапану мешка с помощью силиконовой трубки. Биогаз эвакуировали из мешка путем вытягивания плунжера из цилиндра шприца. Объем эвакуированного биогаза соответствовал положению основания плунжера на шкале, нанесенной на цилиндр шприца. Количество H<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub> было рассчитано исходя из измерения их объемных концентраций в биогазе (БГ) и общего объема произведенного биогаза в каждый интервал времени с использованием уравнения:

$$V_{G,i} = V_{G,i-1} + V_{BGgb,i} * \frac{C_{G,i}}{100} + V_{BGg,i} * \frac{(C_{G,i} - C_{G,i-1})}{100} \quad (1)$$

где:  $V_{G,i}$  и  $V_{G,i-1}$  - совокупные объемы газов (H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) в текущий ( $i$ ) и предыдущий ( $i-1$ ) интервалы времени;  
 $V_{BGgb,i}$  и  $V_{BGg,i}$  - общие объемы биогаза в газовом мешке и газовой фазе флакона в текущем интервале времени;  
 $C_{G,i}$  и  $C_{G,i-1}$  - объемные концентрации газов (H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>) в газовой фазе флакона в текущий ( $i$ ) и предыдущий ( $i-1$ ) интервалы времени.

Характеристика смесей, использованных в работе для проведения процесса ТФ.

Таблица 1

Characteristics of mixtures for carrying out the DF process.

Table 1

Субстрат	Крахмал	Масло	Пептон	Крахмал+ масло+ пеп- тон	Комби- корм для свиней	Корм для собак	ОСВ
Масса субстрата, г	3.6	3.6	3.6	3.6	10	8	-
Масса инокулята, г	55	55	55	55	55	55	55
ОВ (ХПК) смеси, г/л	17.5 (20.4)	17.5 (35.9)	17.5 (16.6)	17.5 (20.3)	37.2 (51.6)	32.0 (44.5)	2.5 (4.4)
Соотношение суб- страт:инокулят, г ОВ/г ОВ (г ХПК/г ХПК)	6.0 (3.7)	6.0 (7.2)	6.0 (2.8)	6.0 (3.6)	13.9 (10.8)	11.8 (9.2)	-
Углеводы, г	3.69	0.09	0.09	2.12	3.72	2.93	0.30
Белки, г	0.15	0.15	3.75	1.47	1.65	1.52	0.55
Жиры, г	0.02	3.62	0.02	0.27	0.20	0.34	0.05
Массовое соотношение: углеводы: белки: жиры	224: 9.0: 1	1: 1.6: 38.9	5.7: 228: 1	7.8: 5.4: 1	19.0: 8.4: 1	8.7: 4.5: 1	5.7: 9.0: 1

### 1.4. Аналитические методы

Содержание сухого вещества (СВ) определяли после высушивания образца до постоянной массы при 105°C. Зольный остаток определяли при сжигании сухого образца в муфельной печи до постоянной массы при 650°C. Содержание органического вещества

Кристалл 5000.2 (Хроматэк, Россия), как описано ранее [14]. Этанол, ацетат, пропионат, н- и изо-бутират, н- и изо-валерат, капронат определяли на ГХ

(ОВ) рассчитывали, как разницу между СВ и зольным остатком. Уровень pH определяли с помощью рН-метра FE20 (Mettler Toledo, Швейцария), оснащенного микроэлектродом InLab® (Mettler Toledo, Швейцария). Концентрацию газообразных продуктов ТФ анализировали с помощью газового хроматографа (ГХ)

Кристалл 5000.2 (Хроматэк, Россия), как описано ранее [15]. Содержание муравьиной, янтарной и молочной кислоты определяли с помощью системы высоко-



эффективного капиллярного электрофореза Капель-205 (Люмэкс, Россия) по ГОСТ Р 56373-2015. Содержание жира определяли путем его экстракции петролейным эфиром в аппарате Сокслета и последующего взвешивания, согласно ПНДФ 14.1:2.122-97 и ГОСТ 13496.15-2016. Определение белков было основано на минерализации анализируемого образца при нагревании с концентрированной серной кислотой в присутствии перекиси водорода, смешанного катализатора, с последующей отгонкой аммиака в раствор борной кислоты и титровании серной кислотой, согласно ГОСТ 26715-85. Углеводы определяли ферроцианидным методом, согласно ГОСТ 5903-89. Химическое потребление кислорода (ХПК) определяли бихроматным методом, согласно ПНДФ 14.1:2.100-97. Эквивалентны ХПК конечных продуктов ТФ (водорода, этанола и органических кислот) рассчитывали по уравнениям, основанным на средних реакциях окисления анализируемых соединений и кислорода воды в качестве акцептора электронов [16].

## 2. Результаты и обсуждение

В качестве инокулята в работе использовали смешанную культуру водород-образующих микроорганизмов, которая содержалась в ОСВ. Смешанная культура обладает рядом преимуществ по сравнению с чистой культурой, в частности, не требует наличия асептической среды [17], а также показывает лучшие результаты по выходу водорода, вероятно за счет улучшенной ферментной системы, способной использовать более широкий спектр комплексных субстратов в более широком диапазоне pH [18]. Подобранные для проведения процесса ТФ условия позволили практически полностью подавить активность метаногенов. Ниже представлена характеристика процесса ТФ использованных в работе простых и комплексных органических субстратов.

### 2.1. ТФ простых субстратов

#### 2.1.1. Крахмал

Микробное сообщество инокулята (ОСВ) в анаэробных условиях при пониженном pH (5.5) превращает крахмал в растворимые метаболиты (спирты, кислоты), CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>, согласно следующей общему уравнению:

Крахмал → глюкоза + мальтоза → растворимые метаболиты + CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub> (2)

Первая реакция – гидролиз крахмала с образованием глюкозы и мальтозы, и вторая реакция — это ферментация



Удельный выход водорода из крахмала после вычета эндогенного водорода (из инокулята), согласно

тация сахара с образованием растворимых метаболитов, CO<sub>2</sub> и H<sub>2</sub>. Обычно первая реакция является лимитирующей, и глюкоза разлагается намного быстрее, чем гидролиз крахмала, без значительного накопления глюкозы (измеряемой как общее количество сахаров) в сбраживаемой среде [19]. pH среды в результате биоразложения крахмала в первые сутки резко снижался до 4.5, поэтому для восстановления pH до 5.5 регулярно вносили 5н р-р NaOH. Очевидно, снижение pH было вызвано тем, что накопление ЛЖК значительно превышало накопление агентов щелочности (таких как аммоний, растворенный карбонат и бикарбонат), повышающих pH. Количество щелочи, затраченной для поддержания pH на уровне 5.5 за время эксперимента, составило 0.17 г NaOH/г крахмала. Следует учесть, что титрование сбраживаемой массы химическими реагентами для поддержания оптимального pH может составлять существенную статью расходов при промышленном получении водорода из богатых углеводами отходов. Поэтому, для контроля pH при переработке богатых углеводами отходов рационально использовать двухстадийный процесс с рециркуляцией части эффлюента метантенка, характеризующегося высоким pH, в реактор ТФ [20].

Глюкоза, получаемая в ур. 2, разлагается далее с образованием H<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub> и других продуктов в цепочке биохимических реакций, подробно описанных в ряде обзорных [21] и экспериментальных [20] работ. Теоретически, из 1 моля глюкозы может быть образовано максимум 4 моля H<sub>2</sub>, если конечным продуктом является уксусная кислота (ур. 3). В то же время при образовании масляной (ур. 4) или муравьиной (ур. 5) кислоты, а также этанола (ур. 6), теоретически может образоваться лишь 2 моля H<sub>2</sub> [21–22]. На практике же образуется смесь этих и других конечных продуктов, поэтому выход водорода обычно составляет менее 4 моль/моль глюкозы. Кроме того, образующийся водород может потребляться гомоацетогенами, метаногенами и пропионат-образующими бактериями, что также снижает «водородный потенциал» глюкозы. Помимо деятельности водород-потребляющих микроорганизмов, снижение водородного потенциала может быть вызвано также активностью бактерий, образующих из глюкозы лактат, ацетат, этанол и сукцинат без сопутствующего образования водорода [20, 23–24]. Поэтому по преимущественному накоплению в среде ацетата в качестве конечного продукта нельзя однозначно говорить как о протекании наиболее эффективного пути образования водорода.

[25], составил 138 мл H<sub>2</sub>/г ОВ или 129 мл H<sub>2</sub>/г ХПК (рис. 1). Это соответствует 6.16 ммоль H<sub>2</sub> на 1 г



крахмала, или 0.998 моль  $H_2$ /моль крахмала. С учетом неполного разложения крахмала, составившего 64.5% (Рис. 4), выход водорода в расчете на разложенный крахмал составил 1.55 моль  $H_2$ /моль крахмала. Основным метаболитом при разложении крахмала являлся ацетат, который составил 48% в расчете на ХПК (рис. 3) или 43% в расчете на моли от всех метаболитов, ассоциированных с продукцией водорода, согласно ур. 3-6. Основным метаболитом, не ассоциированным с продукцией водорода, являлся капронат (1.3% и 4.1% в расчете на моли и ХПК, соответственно), который может образовываться за счет удлинения ацетатной углеродной цепи с использованием этанола в качестве донора электронов [26] или из лактата за счет деятельности бактерий семейства Ruminococcaceae [27]. Исходя из того, что бактерии рода Ruminococcus преобладали в разлагающем крахмал микробном сообществе (90%, данные не показаны), часть крахмала могла превращаться в капронат через образование лактата, не ассоциированного с продукцией водорода [24]. Потребление части глюкозы на производство капроната могло быть одной из причин того, что исходя из углеродного баланса (ур. 3-6), выход водорода в расчете на потребленную глюкозу должен был составить 1.83 моль  $H_2$ /моль крахмала, что выше наблюдаемого выхода водорода (1.55 моль  $H_2$ /моль крахмала). Содержание водорода в суммарном биогазе составило 60.4% (рис. 2), что является достаточно высокой величиной, по сравнению с данными других авторов [5].

### 2.1.2. Подсолнечное масло

В результате анаэробного гидролиза жиров образуются глицерин и длинноцепочечные жирные кислоты (ДЦЖК). При разложении глицерина сахаролитическими клостридиями образуется водород и спирты [28]. Выход водорода достигает 23 мл  $H_2$ /г ХПК глицерина, побочными продуктами являются бутират, лактат, этанол и 1.3 пропандиол [29]. Разложение ДЦЖК (LCFA) происходит по пути бета-окисления (ур. 7) и является термодинамически невыгодной реакцией ( $\Delta G^\circ = +48$  мДж/моль), протекающей только при очень низких парциальных давлениях водорода ( $<10^{-3}$  атм), при котором величиной  $\Delta G^\circ$  становится отрицательной.



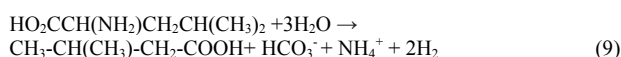
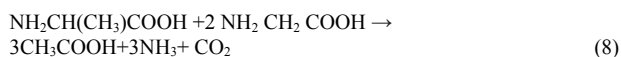
Такое низкое парциальное давление может поддерживаться при удалении водорода метаногенами, присутствие которых, как известно, нежелательно в процессе ТФ. Кроме того, ДЦЖК ингибируют микроорганизмы, прикрепляясь к клеточной стенке и нарушая механизмы клеточного транспорта. Следовательно, получение водорода из ДЦЖК является затруднительным. Таким образом, несмотря на относительно неплохой выход водорода из глицерина, получение водорода из жиров может быть не таким большим.

могут образовывать большое количество водорода [9]. В то же время есть сообщения о том, что с по-

Из рис. 1 видно, что подсолнечное масло обладает крайне низким водородным потенциалом, составившим 2.3 мл  $H_2$ /г ХПК субстрата после вычета эндогенного водорода. Учитывая, что из 1 г подсолнечного масла может образоваться примерно 0.1 г глицерина [30], а 1 г глицерина эквивалентен 1.23 г ХПК, то теоретический выход водорода мог составлять 2.83 мл  $H_2$ /г подсолнечного масла или 1.34 мл  $H_2$ /г ХПК подсолнечного масла. Интересно, что сумма ХПК метаболитов, включая водород, этанол и органические кислоты, составляла всего лишь 3% от исходного ХПК субстрата (Рис. 4), что может говорить о неполном разложении масла, а также о накоплении ДЦЖК, которые в настоящей работе не анализировались. Также вероятно, что какая-то часть водорода могла образоваться за счет возникновения синергии и более полного разложения ОВ инокулята и подсолнечного масла при ко-ферментации, что является частым явлением при метаногенном сбраживании ко-субстратов [25]. В целом, выделение водорода из подсолнечного масла происходило в первые 8 суток, концентрация водорода в биогазе при этом достигала 45% (Рис. 2). Ацетат и бутират были основными продуктами, соотношение которых в расчете на ХПК составляло практически 1:1 (Рис. 3).

### 2.1.3. Пептон

Продуктом гидролиза белков являются различные аминокислоты. Существует три типа реакций разложения аминокислот в анаэробных условиях: Реакция Стиклэнда (ур. 8), окислительное дезаминирование аминокислоты (ур. 9) и восстановительное дезаминирование аминокислоты (Ур. 10).



Все три типа разложения аминокислот включают образование ЛЖК и аммиака в качестве продуктов. Считается, что аминокислоты примерно на 90% разлагаются по реакции Стиклэнда (ур. 8) [31]. Во-вторых, реакция окислительного дезаминирования аминокислоты (ур. 9) является термодинамически невыгодной реакцией ( $\Delta G^\circ = +4.2$  кДж/моль), если парциальное давление водорода не поддерживается на чрезвычайно низком уровне. В-третьих, аминокислоты, такие как глицин, который разлагается при восстановительном дезаминировании, могут потреблять водород в качестве донора электронов [31]. Следовательно, водород, образуемый по ур. 9, может потребляться в термодинамически выгодной ( $\Delta G^\circ = -77.8$  кДж/моль) реакции восстановительного дезаминирования (ур. 10). Исходя из вышеизложенного, субстраты, богатые протеинами, при разложении не мощью щелочного гидролиза белков за счет изменения структуры белка и аминокислот выход водорода



из белков можно повысить в разы, до 205 мл  $H_2$ /г белка [32].

Также, как и подсолнечное масло, пептон обладал крайне низким водородным потенциалом, составившим не более 5.0 мл  $H_2$ /г ХПКисх. (рис. 1). Образование водорода из пептона наблюдалось в первые 3-4 суток, при этом концентрация водорода в биогазе не превышала 15% (рис. 2). В отличие от разложения крахмала и масла, основным метаболитом при анаэробном разложении пептона был ацетат (66% ХПК метаболитов, рис. 3). Довольно низкое содержание изо-валерата (5.3 % ХПК) говорило о минорном вкладе пути окислительного дезаминирования аминокислоты (ур. 9). Также было отмечено довольно высокое содержание сукцината (11.3% ХПК) среди конечных продуктов ТФ пептона (рис. 3).

#### 2.1.4. Смесь крахмала, масла и пептона

При разложении смеси крахмала, масла и пептона удельный выход водорода составил 56.1 мл  $H_2$ /г ХПКисх. или 99 мл  $H_2$ /г ХПКуглевод. исх. (Рис. 1). Содержание водорода в образующемся биогазе составило 51% (Рис. 2). Пренебрегая минимальным производством водорода из белков и жиров, как показано выше, добавление к крахмалу пептона и подсолнечного масла снижало удельный выход водорода примерно на 23%. Вероятно, это было вызвано ингибирующим воздействием ДЦЖК – продуктов разложения жиров. Доля ацетата (в расчете на ХПК) была наибольшей среди растворимых метаболитов и составила 45.9%. Можно отметить также значительное увеличение продукции капроната (до 6% ХПК метаболитов), по сравнению с ТФ крахмала (рис.3). Бактерии рода *Ruminosoccus*, также как и при ТФ крахмала, доминировали в микробном сообществе, ферментирующем смесь крахмала, масла и пептона (78%, данные не показаны), и полностью отсутствовали при ТФ пептона и подсолнечного масла. Из этого можно сделать вывод, что накопление капроната было вызвано неблагоприятными для *Ruminosoccus* условиями среды вследствие добавления пептона и подсолнечного масла.

### 3.ТФ комплексных органических субстратов

#### 3.1.Комбикорм для свиней

Удельный выход водорода из комбикорма для свиней составил 59.5 мл  $H_2$ /г ОВисх., или 32.1 мл  $H_2$ /г ХПКисх. или 91.6 мл  $H_2$ /г ХПКуглевод. исх. (рис. 1). Содержание водорода в образующемся биогазе составило 52.9% (рис. 2). Удельный выход водорода из углеводов и содержание водорода в биогазе из комбикорма для свиней было практически одинаковым с таковыми из смеси крахмала, масла и пептона. В то же время баланс ХПК конечных продуктов (рис. 4) показал, что при разложении комплексного органического отхода на долю водорода и растворимых метаболитов приходилось в 2 раза меньше

ХПК, чем при разложении смеси простых субстратов (20% в комбикорме для свиней против 40% в смеси крахмала, масла и пептона). Известно, что основным препятствием для получения высоких выходов водорода при ТФ органических отходов является недостаточная степень разложения сложных субстратов [33]. Вероятно, крупный размер частиц вследствие отсутствия тщательного измельчения является одной из причин неполного разложения комплексных субстратов, в частности комбикорма для свиней. Процесс ТФ стеблей пшеницы в периодическом режиме с использованием смешанной культуры микроорганизмов показал, что чем меньше был размер частиц субстрата, тем лучше была характеристика производства биоводорода в работе [34]. Из рис. 2 видно, что в отличие от ТФ простых субстратов, при ТФ комбикорма для свиней основным растворимым метаболитом был бутират (56.4% ХПК), что говорило о не самом эффективном пути образования водорода.

#### 3.2.Корм для собак

Удельный выход водорода из корма для собак составил 63.3 мл  $H_2$ /г ОВисх., или 46.5 мл  $H_2$ /г ХПКисх. или 143.4 мл  $H_2$ /г ХПКуглевод. исх. (рис. 1). Полученные значения были немного выше 57.7 мл  $H_2$ /г ОВисх., полученных в работе [35], что, впрочем, могло объясняться различием в составе. Содержание водорода в образующемся биогазе составило 31.9% (рис. 2). Более высокий удельный выход водорода из корма для собак, по сравнению с комбикормом для свиней, вероятно объяснялся тем, что комбикорм для свиней был приготовлен из более грубых и крупных неизмельченных компонентов, и по нашим наблюдениям, хуже набухал и распадался в воде. Возможно, за счет более полной деградации углеводов, содержащихся в корме для собак, удельный выход водорода в расчете на исходные углеводы был даже выше (на 10%), чем при ТФ крахмала (Рис. 1). Растворимые метаболиты при ТФ корма для собак в основном были представлены бутиратом (44.6% ХПК) и этанолом (35% ХПК), продукция которых сопровождается образованием лишь 2 молей  $H_2$ /моль глюкозы, согласно ур. 4 и ур. 6, соответственно.

#### 3.3.ОСВ

При использовании ОСВ в качестве субстрата для ТФ образовалось 16.2 мл  $H_2$ /г ОВисх., или 9.3 мл  $H_2$ /г ХПКисх. или 98 мл  $H_2$ /г ХПКуглевод. исх. (рис.1). Содержание водорода в биогазе было довольно низким и составляло 13.8% (рис. 2), что, видимо, объяснялось высокой долей белков в органическом веществе ОСВ (табл. 1). Полученные данные по удельному выходу водорода значительно превышают данные, представленные в работе [11], где в мезофильных условиях выход водорода составил 32.6 мл  $H_2$  на г ХПК углеводов, содержащихся в ОСВ. Вероятно, это объясняется более полной де-



градацией углеводов за счет использования термофильного режима (55°C) и довольно длительного инкубирования (13 суток). На это указывает очень высокая доля водорода и растворимых метаболитов (в сумме 67%) в балансе ХПК (рис. 4). Значимая часть водорода могла быть также образована из белков, на что указывают результаты ряда исследований. Так, после предварительной обработки щелочью выход водорода из ОСВ увеличивался почти в 2 раза, с 9.1 до 16.6 мл H<sub>2</sub>/г СВ в работе [36]. При этом белки, а не углеводы, были главными компонентами ОСВ, при разложении которых выделялся водород. Главным продуцентом водорода в обработанном щелочью ОСВ были *Eubacterium multiforme* и *Paenibacillus polymyxa*, метаболизирующих протеи-

ны. Похожие результаты при получении водорода из обработанного щелочью (pH 12, выдерживание в течение суток) ОСВ наблюдались в работе [13]. Максимальное производство водорода составило 10.32 мл/г ХПК ОСВ, за счет деятельности протеин-разлагающих бактерий. В то же время после термической обработки ОСВ (100°C, 15 мин) максимальное образование водорода составляло лишь 8.94 мл H<sub>2</sub>/г ХПК, в основном за счет активности бактерий, метаболизирующих глюкозу. При разложении сырого ОСВ выход водорода при нейтральном pH составил всего лишь 0.35 мл H<sub>2</sub>/г ОСВ, однако после обработки щелочью выход водорода увеличился до 16.26 мл H<sub>2</sub>/г ОСВ в работе [37], что согласуется с полученными нами данными (рис. 1).

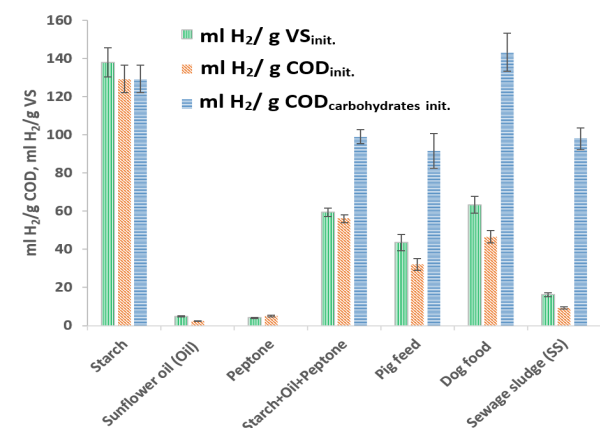


Рис. 1. Удельный выход H<sub>2</sub> в зависимости от использованного субстрата.  
Fig. 1. Specific yield of H<sub>2</sub>.

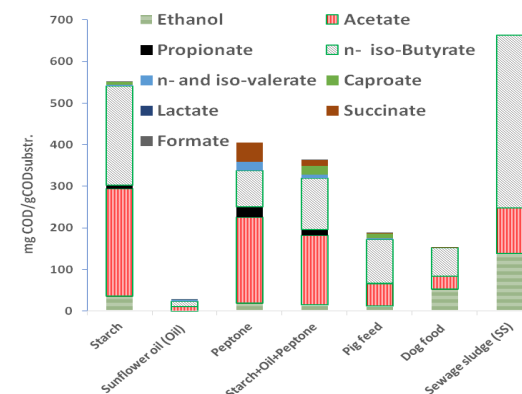


Рис. 3. Удельный выход растворимых метаболитов (анализируемых в работе) в зависимости от использованного субстрата на момент полного прекращения образования H<sub>2</sub>.  
Fig. 3. Specific yield of soluble metabolites after complete cessation of H<sub>2</sub> production.

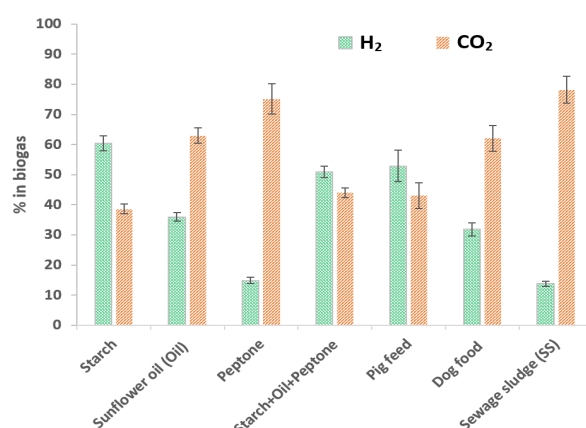


Рис. 2. Содержание H<sub>2</sub> и CO<sub>2</sub> в биогазе (в суммарном биогазе после полного прекращения образования H<sub>2</sub>) в зависимости от использованного субстрата.  
Fig. 2. Content of H<sub>2</sub> and CO<sub>2</sub> in biogas (in total biogas after complete cessation of H<sub>2</sub> production).

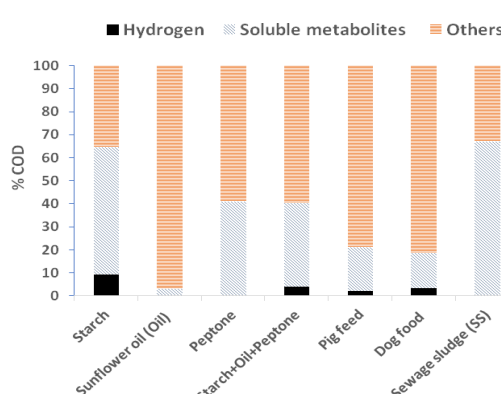


Рис. 4. Баланс ХПК конечных продуктов на момент полного прекращения образования H<sub>2</sub>.  
Fig. 4. The balance of the COD of end products after the complete cessation of biohydrogen production.

#### 4. Связь биополимерного состава субстратов с характеристиками процесса ТФ



Возможные взаимосвязи между биополимерным составом использованных в работе субстратов и характеристиками процесса ТФ были проанализированы с применением коэффициентов ранговой корреляции Спирмена. В табл. 2 представлены некоторые характеристики процесса ТФ, которые имели наиболее статистически значимую корреляцию с содержанием белков, жиров и углеводов. Показано, что концентрация углеводов, а также соотношение углеводов/белки и углеводы/жиры в субстрате были основными факторами, влияющими на удельный выход  $H_2$ , его содержание в биогазе, а также соотношение  $H_2$ /растворимые метаболиты (по ХПК). Удельный выход  $H_2$  значительно повышался с увеличением соотношения углеводов/белки ( $r = 0.88$ ,  $P < 0.01$ ) и

углеводы/жиры ( $r = 0.83$ ,  $P < 0.05$ ). Содержание  $H_2$  в биогазе также положительно коррелировало с концентрацией углеводов ( $r = 0.78$ ,  $P < 0.05$ ) и соотношением углеводов/белки ( $r = 0.81$ ,  $P < 0.05$ ). Доля  $H_2$  в балансе ХПК конечных продуктов ТФ увеличивалась с повышением содержания углеводов ( $r = 0.82$ ,  $P < 0.05$ ), соотношения углеводов/белки ( $r = 0.88$ ,  $P < 0.01$ ) и углеводов/жиры ( $r = 0.78$ ,  $P < 0.05$ ). Концентрация белков в субстрате оказывало статистически значимое положительное влияние на накопление ацетата ( $r = 0.93$ ,  $P < 0.01$ ) и сукцината ( $r = 0.85$ ,  $P < 0.05$ ), а углеводов – на накопление капроната ( $r = 0.78$ ,  $P < 0.05$ ).

Таблица 2.

Коэффициенты корреляции Спирмена между биополимерным составом субстратов и некоторыми характеристиками процесса ТФ. Статистически значимые значения обозначены символами: \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ .

Table 2.

Spearman's correlation coefficients between the biopolymer composition of substrates and some characteristics of the DF process. Statistically significant values are indicated by symbols: \*\*  $P < 0.01$ ; \*  $P < 0.05$ .

Параметр	Углеводы, г/л	Белки, г/л	Жиры, г/л	Углеводы/белки, г/г	Углеводы/жиры, г/г	Белки/жиры, г/г
Ацетат, мМ	0.30	0.93**	-0.30	-0.02	0.31	0.45
Капронат, мМ	0.78*	0.16	-0.06	0.66	0.66	0.01
Сукцинат, мМ	0.04	0.85*	0.11	-0.25	-0.04	0.09
$H_2$ в биогазе, %	0.78*	-0.11	0.11	0.81*	0.70	-0.18
$H_2$ , мл/г ОВисх.	0.74	-0.26	0.04	0.88**	0.83*	-0.18
$H_2$ /растворимые метаболиты, г ХПК/г ХПК	0.82*	-0.07	0.33	0.88**	0.78*	-0.43

### Заключение

Среди использованных в работе простых субстратов крахмал отличался наиболее высоким удельным выходом водорода ( $\approx 200$  мл  $H_2$ /г ХПК разложенного крахмала) и его содержанием в биогазе (60.4%). Пептон и подсолнечное масло практически не продуцировали водород; продукты их распада, очевидно, действовали угнетающе на метаболизирующих углеводы микроорганизмов, что выразилось в 23% снижении удельного выхода водорода из крахмала. Значительные отличия в характеристиках ТФ комплексных субстратов (9.3–46.5 мл  $H_2$ /г ХПК, 91.6–143.4 мл  $H_2$ /г углеводов, 13.8–52.9%  $H_2$  в биогазе) были вызваны не только разным соотношением биополимеров, но и видимо, разной природой и биодоступностью этих субстратов для микроорганизмов. Довольно низкая доля водорода в балансе ХПК была следствием неполной степени разложения использованных субстратов. В то же время доля водорода среди конечных продуктов ТФ богатых углеводами субстратов составляла от 10 до 18%.

В целом, исключительно углеводы отвечали за высокий водородный потенциал использованных в работе субстратов, т.к. содержание белков и жиров не имело статистически достоверной корреляции с

водородным потенциалом, что согласуется с результатами [7]. Что касается растворимых метаболитов, то белки оказывали статистически значимое положительное влияние на накопление ацетата и сукцината, а углеводы – на накопление капроната.

### Выводы

1. Крахмал отличался наиболее высоким удельным выходом биоводорода ( $\approx 200$  мл  $H_2$ /г ХПК разложенного крахмала) и его содержанием в биогазе (60.4%).
2. Добавление пептона и подсолнечного масла снижало удельный выход водорода из крахмала.
3. Доля водорода среди конечных продуктов темновой ферментации богатых углеводами субстратов составляла от 10 до 18% по ХПК.
4. Белки оказывали статистически значимое положительное влияние на накопление ацетата и сукцината, а углеводы – на накопление капроната.

### Благодарности

Работа выполнена при поддержке Минобрнауки России в рамках соглашения № 075-15-2020-907 от 16.11.2020 о предоставлении гранта в форме субси-



дий из федерального бюджета на осуществление государственной поддержки создания и развития научного центра мирового уровня «Агротехнологии будущего».

### Список литературы

1. Tuck CO, Pérez E, Horváth IT, Sheldon RA, Poliakoff M. Valorization of biomass: deriving more value from waste. *Science* 2012;337:695–9. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1218930>.
2. Ni M, Leung DY, Sumathy MKH. An overview of hydrogen production from biomass. *Fuel Process. Technol* 2006;87:461–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2005.11.003>.
3. Wang J, Wan W. Factors influencing fermentative hydrogen production: a review. *Int. J. Hydrogen Energy* 2009;34:799–811. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.015>.
4. De Gianninis G, Muntoni A, Poletti A, Pomi R. A review of dark fermentation hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. *Waste Manage* 2013;33:1345–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2013.02.019>.
5. Vendruscolo F. Starch: a potential substrate for bi-hydrogen production. *Int. J. Energy Res.* 2014;39(3):293–302. <http://dx.doi.org/10.1002/er.3224>.
6. Cappai G, Gianninis GD, Muntoni A, Spiga D, Boni MR, Poletti A, Pomi R, Rossi A. Biohydrogen Production from Food Waste: Influence of the Inoculum-To-Substrate Ratio. *Sustainability* 2018;10(12):4506. <http://dx.doi.org/10.3390/su10124506>.
7. Alibardi L, Cossu R. Effects of carbohydrate, protein and lipid content of organic waste on hydrogen production and fermentation products. *Waste Manage* 2016;47:69–77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2015.07.049>.
8. Ito T, Nakashimada Y, Senba K, Matsui T, Nishio N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *J Biosci Bioeng* 2005;100(3):260–5. <http://dx.doi.org/10.1263/jbb.100.260>.
9. Dong L, Zhenhong Y, Yongming S, Xiaoying K, Yu Z. Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *Int J Hydrogen Energy* 2009;34(2):812–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.031>.
10. Bai M, Cheng S, Chao Y. Effects of substrate components on hydrogen fermentation of multiple substrates. *Water Sci Technol* 2004;50:209–16. <http://dx.doi.org/10.2166/wst.2004.0517>.
11. Kim S.-H, Han S.-K, Shin H.-S. Feasibility of bi-hydrogen production by anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge. *Int J Hydrogen Energy* 2004;29:1607–1616. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.02.018>.
12. Campuzano R, González-Martínez S. Characteristics of the organic fraction of municipal solid waste and methane production: A review. *Waste Manage* 2016;54:3–12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2016.05.016>.
13. Wei S, Xiao B, Liu J. Impact of alkali and heat pretreatment on the pathway of hydrogen production from sewage sludge. *Chinese Sci Bull* 2010;55(8):777–86. <http://dx.doi.org/10.1007/s11434-009-0591-7>.
14. Lokshina L, Vavilin V, Litt Y, Glagolev M, Sabrekov A, Kotsyurbenko O, Kozlova M. Methane Production in a West Siberian Eutrophic Fen Is Much Higher than Carbon Dioxide Production: Incubation of Peat Samples, Stoichiometry, Stable Isotope Dynamics, Modeling. *Water Resour* 2019;46(S1):110–25. <http://dx.doi.org/10.1134/S0097807819070133>.
15. Litt Y, Nikitina A, Kovalev D, Ermoshin A, Mahajan R, Gunjan G, Nozhevnikova A. Influence of cationic polyacrylamide flocculant on high-solids' anaerobic digestion of sewage sludge under thermophilic conditions. *Environ Technol* 2017;14:1–26. <http://dx.doi.org/10.1080/09593330.2017.1417492>.
16. Carrillo-Reyes J, Buitrón G, Moreno-Andrade I, Tapia-Rodríguez AC, Palomo-Briones R, Razo-Flores E, Juárez OA, Arreola-Vargas J, Bernet N, Braga AFM, Braga L, Castelló E, Chatellard L, Etchebehere C, Fuentes L, León-Becerril E, Méndez-Acosta HO, Ruiz-Filippi G, Venegas ET, Trabaly E, Wenzel J, Zaiat M. Standardized protocol for determination of biohydrogen potential. *MethodsX* 2020;7:100754. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mex.2019.11.027>.
17. Li C, Fang HHP. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Crit Rev Environ Sci Technol* 2007;37:1–39. <http://dx.doi.org/10.1080/10643380600729071>.
18. Elashmouby O, Hafez H, Nakhla G, Naggat MHE. A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. *Int J Hydrogen Energy* 2013;38:4945–66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.02.032>.
19. Kargi F, Pamukoglu MY. Dark fermentation of ground wheat starch for bio-hydrogen production by fed-batch operation. *Int J Hydrogen Energy* 2009;34(7):2940–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.12.101>.
20. Ковалев АА, Ковалев ДА, Литти ЮВ, Катраева ИВ. Производство биоводорода в двухстадийном процессе анаэробной биоконверсии органического вещества жидких органических отходов с рециркуляцией эффлюента метантенка. *Альтернативная энергетика и экология (ISJAEE)* 2020;7-18(330-341):87-100. <http://dx.doi.org/10.15518/isjaee.2020.07-18.087-100>.
21. Bundhoo MAZ, Mohee R. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. *Int J Hydrogen Energy* 2016;41(16):6713–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.057>.
22. Karadag D, Puhakka JA. Direction of glucose fermentation towards hydrogen or ethanol production through on-line pH control. *Int J Hydrogen Energy* 2010;35(19):10245–51. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.07.139>.
23. Hawkes F, Hussy I, Kyazze G, Dinsdale R, Hawkes D. Continuous dark fermentative hydrogen pro-



duction by mesophilic microflora: Principles and progress. *Int J Hydrogen Energy* 2007;32:172–84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.08.014>.

24.Kothari R, Kumar V, Pathak VV, Ahmad S, Aoyi O, Tyagi VV. A critical review on factors influencing fermentative hydrogen production. *Front Biosci-Landmark* 2017;22:1195-220. <http://dx.doi.org/10.2741/4542>.

25.Angelidaki I, Sanders W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Rev Environ Sci Biotechnol* 2004;3:117–29. <http://dx.doi.org/10.1007/s11157-004-2502-3>.

26.Gavazza S, Amorim NCS, Kato MT, Florencio L, Amorim ELC. Caproic Acid Formation by Carbon Chain Elongation During Fermentative Hydrogen Production of Cassava Wastewater. *Waste Biomass Valorization* 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s12649-020-01174-3>.

27.Zhu X, Zhou Y, Wang Y, Wu T, Li X, Li D, Tao Y. Production of high-concentration n-caproic acid from lactate through fermentation using a newly isolated Ruminococcaceae bacterium CPB6. *Biotechnol Biofuels* 2017;10:102. <http://dx.doi.org/10.1186/s13068-017-0788-y>.

28.Heyndrickx M, Vos PD, Vancanneyt M, Ley JD. The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212t2 and 1213t1 and *C. pasteurianum* LMG 3285. *Appl Microbiol Biot* 1991;34(5):637–47. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00167914>.

29.Vlasis T, Stamatelatu K, Antonopoulou G, Lyberatos G. Anaerobic treatment of glycerol for methane and hydrogen production. *Global NEST J* 2012;14(2):149-56. <http://dx.doi.org/10.30955/gnj.000864>.

30.Sales A. Production of biodiesel from sunflower oil and ethanol by base catalyzed transesterification [Internet] [Dissertation]. 2011. Available from: <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:kth:diva-41158>

31.Nagase M, Matuo T. Interactions between amino-acid degrading bacteria and methanogenic bacteria in anaerobic digestion. *Biotechnol Bioeng*. 1982;24(10):2227–39. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260241009>.

32.Xiao N, Chen Y, Chen A, Feng L. Enhanced Biohydrogen Production from Protein Wastewater by Altering Protein Structure and Amino Acids Acidification Type. *Sci Rep* 2014;4(1):3992. <http://dx.doi.org/10.1038/srep03992>.

33.Lukajtis R, Holowacz I, Kucharska K, Glinka M, Rybarczyk P, Przyjazny A, Kamiński M. Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Renew Sust Energ Rev* 2018;91: 665–94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.043>.

34.Yuan X, Shi X, Zhang P., Wei Y, Guo R, Wang L. Anaerobic biohydrogen production from wheat stalk by mixed microflora: Kinetic model and particle size influence. *Bioresour Technol* 2011;102(19):9007–12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.045>.

35.Hiroshi Y, Takahiro Y, Akifumi O, Mitsuyoshi I, Yasuo T. Hydrogen Fermentation of Cow Manure Mixed with Food Waste. *Jpn Agric Res Q* 2010;44:399–404. <http://dx.doi.org/10.6090/jarq.44.399>.

36.Cai M, Liu J, Wei Y. Enhanced Biohydrogen Production from Sewage Sludge with Alkaline Pretreatment. *Environ Sci Technol* 2004;38(11):3195–202. <http://dx.doi.org/10.1021/es0349204>.

37.Xiao B, Liu J. Biological hydrogen production from sterilized sewage sludge by anaerobic self-fermentation. *J Hazard Mater* 2009;168(1):163–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.02.008>.

## References

1.Tuck CO, Pérez E, Horváth IT, Sheldon RA, Poliakoff M. Valorization of biomass: deriving more value from waste. *Science* 2012;337:695–9. <http://dx.doi.org/10.1126/science.1218930>.

2.Ni M, Leung DYC, Sumathy MKH. An overview of hydrogen production from biomass. *Fuel Process. Technol* 2006;87:461–72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fuproc.2005.11.003>.

3.Wang J, Wan W. Factors influencing fermentative hydrogen production: a review. *Int. J. Hydrogen Energy* 2009;34:799–811. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.015>.

4.De Gioannis G, Muntoni A, Poletti A, Pomi R. A review of dark fermentation hydrogen production from biodegradable municipal waste fractions. *Waste Manage* 2013;33:1345–61. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2013.02.019>

5.Vendruscolo F. Starch: a potential substrate for biohydrogen production. *Int. J. Energy Res.* 2014;39(3):293–302. <http://dx.doi.org/10.1002/er.3224>.

6.Cappai G, Gioannis GD, Muntoni A, Spiga D, Boni MR, Poletti A, Pomi R, Rossi A. Biohydrogen Production from Food Waste: Influence of the Inoculum-To-Substrate Ratio. *Sustainability* 2018;10(12):4506. <http://dx.doi.org/10.3390/su10124506>.

7.Alibardi L, Cossu R. Effects of carbohydrate, protein and lipid content of organic waste on hydrogen production and fermentation products. *Waste Manage* 2016;47:69–77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2015.07.049>.

8.Ito T, Nakashimada Y, Senba K, Matsui T, Nishio N. Hydrogen and ethanol production from glycerol-containing wastes discharged after biodiesel manufacturing process. *J Biosci Bioeng* 2005;100(3):260–5. <http://dx.doi.org/10.1263/jbb.100.260>.

9.Dong L, Zhenhong Y, Yongming S, Xiaoying K, Yu Z. Hydrogen production characteristics of the organic fraction of municipal solid wastes by anaerobic mixed culture fermentation. *Int J Hydrogen Energ* 2009;34(2):812–20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.031>.

10.Bai M, Cheng S, Chao Y. Effects of substrate components on hydrogen fermentation of multiple substrates. *Water Sci Technol* 2004;50:209–16. <http://dx.doi.org/10.2166/wst.2004.0517>.

11.Kim S.-H, Han S.-K, Shin H.-S, Feasibility of biohydrogen production by anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge. *Int J Hydrogen Energy*



2004;29:1607–1616.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.02.018>.

12. Campuzano R, González-Martínez S. Characteristics of the organic fraction of municipal solid waste and methane production: A review. *Waste Manage* 2016;54:3–12.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.wasman.2016.05.016>.

13. Wei S, Xiao B, Liu J. Impact of alkali and heat pretreatment on the pathway of hydrogen production from sewage sludge. *Chinese Sci Bull* 2010;55(8):777–86. <http://dx.doi.org/10.1007/s11434-009-0591-7>.

14. Lokshina L, Vavilin V, Littl Y, Glagolev M, Sabrekov A, Kotsyurbenko O, Kozlova M. Methane Production in a West Siberian Eutrophic Fen Is Much Higher than Carbon Dioxide Production: Incubation of Peat Samples, Stoichiometry, Stable Isotope Dynamics, Modeling. *Water Resour* 2019;46(S1):110–25. <http://dx.doi.org/10.1134/S0097807819070133>.

15. Littl Y, Nikitina A, Kovalev D, Ermoshin A, Mahajan R, Gunjan G, Nozhevnikova A. Influence of cationic polyacrylamide flocculant on high-solids' anaerobic digestion of sewage sludge under thermophilic conditions. *Environ Technol* 2017;14:1–26. <http://dx.doi.org/10.1080/09593330.2017.1417492>.

16. Carrillo-Reyes J, Buitrón G, Moreno-Andrade I, Tapia-Rodríguez AC, Palomo-Briones R, Razo-Flores E, Juárez OA, Arreola-Vargas J, Bernet N, Braga AFM, Braga L, Castelló E, Chatellard L, Etcheberhere C, Fuentes L, León-Becerril E, Méndez-Acosta HO, Ruiz-Filippi G, Venegas ET, Trably E, Wenzel J, Zaiat M. Standardized protocol for determination of biohydrogen potential. *MethodsX* 2020;7:100754. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mex.2019.11.027>.

17. Li C, Fang HHP. Fermentative hydrogen production from wastewater and solid wastes by mixed cultures. *Crit Rev Environ Sci Technol* 2007;37:1–39. <http://dx.doi.org/10.1080/10643380600729071>.

18. Elashmouby O, Hafez H, Nakhla G, Naggar MHE. A critical literature review on biohydrogen production by pure cultures. *Int J Hydrogen Energy* 2013;38:4945–66. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.02.032>.

19. Kargi F, Pamukoglu MY. Dark fermentation of ground wheat starch for bio-hydrogen production by fed-batch operation. *Int J Hydrogen Energy* 2009;34(7):2940–6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.12.101>.

20. Kovalev AA, Kovalev DA, Littl YUV, Katraeva IV. Proizvodstvo biovodoroda v dvukhstadiinom protsesse anaerobnoi biokonversii organicheskogo veshchestva zhidkikh organicheskikh otkhodov s retsirkulyatsiei ehfflyuenta metantenka. *Alternativnaya ehnergetika i ehkologiya (ISJAE)* 2020;7-18(330-341):87-100. <http://dx.doi.org/10.15518/isjaee.2020.07-18.087-100>.

21. Bundhoo MAZ, Mohee R. Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review. *Int J Hydrogen Energy* 2016;41(16):6713–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2016.03.057>.

22. Karadag D, Puhakka JA. Direction of glucose fermentation towards hydrogen or ethanol production

through on-line pH control. *Int J Hydrogen Energy* 2010;35(19):10245–51.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.07.139>.

23. Hawkes F, Hussy I, Kyazze G, Dinsdale R, Hawkes D. Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: Principles and progress. *Int J Hydrogen Energy* 2007;32:172–84. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.08.014>.

24. Kothari R, Kumar V, Pathak VV, Ahmad S, Aoyi O, Tyagi VV. A critical review on factors influencing fermentative hydrogen production. *Front Biosci-Landmark* 2017;22:1195–220. <http://dx.doi.org/10.2741/4542>.

25. Angelidaki I, Sanders W. Assessment of the anaerobic biodegradability of macropollutants. *Rev Environ Sci Biotechnol* 2004;3:117–29. <http://dx.doi.org/10.1007/s11157-004-2502-3>.

26. Gavazza S, Amorim NCS, Kato MT, Florencio L, Amorim ELC. Caproic Acid Formation by Carbon Chain Elongation During Fermentative Hydrogen Production of Cassava Wastewater. *Waste Biomass Valorization* 2020. <http://dx.doi.org/10.1007/s12649-020-01174-3>.

27. Zhu X, Zhou Y, Wang Y, Wu T, Li X, Li D, Tao Y. Production of high-concentration n-caproic acid from lactate through fermentation using a newly isolated *Ruminococcaceae* bacterium CPB6. *Biotechnol Biofuels* 2017;10:102. <http://dx.doi.org/10.1186/s13068-017-0788-y>.

28. Heyndrickx M, Vos PD, Vancanneyt M, Ley JD. The fermentation of glycerol by *Clostridium butyricum* LMG 1212t2 and 1213t1 and *C. pasteurianum* LMG 3285. *Appl Microbiol Biot* 1991;34(5):637–47. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00167914>.

29. Vlassis T, Stamatelatos K, Antonopoulou G, Lyberatos G. Anaerobic treatment of glycerol for methane and hydrogen production. *Global NEST J* 2012;14(2):149–56. <http://dx.doi.org/10.30955/gnj.000864>.

30. Sales A. Production of biodiesel from sunflower oil and ethanol by base catalyzed transesterification [Internet] [Dissertation]. 2011. Available from: <http://urn.kb.se/resolve?urn=urn:nbn:se:kth:diva-41158>

31. Nagase M, Matuo T. Interactions between amino-acid degrading bacteria and methanogenic bacteria in anaerobic digestion. *Biotechnol Bioeng* 1982;24(10):2227–39. <http://dx.doi.org/10.1002/bit.260241009>.

32. Xiao N, Chen Y, Chen A, Feng L. Enhanced Biohydrogen Production from Protein Wastewater by Altering Protein Structure and Amino Acids Acidification Type. *Sci Rep* 2014;4(1):3992. <http://dx.doi.org/10.1038/srep03992>.

33. Łukajtis R, Hołowacz I, Kucharska K, Glinka M, Rybarczyk P, Przyjazny A, Kamiński M. Hydrogen production from biomass using dark fermentation. *Re-new Sust Energ Rev* 2018;91: 665–94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.rser.2018.04.043>.

34. Yuan X, Shi X, Zhang P., Wei Y, Guo R, Wang L. Anaerobic biohydrogen production from wheat stalk by mixed microflora: Kinetic model and particle size



influence. *Bioresour Technol* 2011;102(19):9007–12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biortech.2011.06.045> .

35. Hiroshi Y, Takahiro Y, Akifumi O, Mitsuyoshi I, Yasuo T. Hydrogen Fermentation of Cow Manure Mixed with Food Waste. *Jpn Agric Res Q* 2010;44:399–404. <http://dx.doi.org/10.6090/jarq.44.399> .

36. Cai M, Liu J, Wei Y. Enhanced Biohydrogen Production from Sewage Sludge with Alkaline Pretreatment.

*Environ Sci Technol* 2004;38(11):3195–202. <http://dx.doi.org/10.1021/es0349204> .

37. Xiao B, Liu J. Biological hydrogen production from sterilized sewage sludge by anaerobic self-fermentation. *J Hazard Mater* 2009;168(1):163–7. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jhazmat.2009.02.008> .

Транслитерация по BSI



## Рае Квон Чунг: Россия играет важную роль в глобальном энергетическом переходе

*Председатель Международного комитета по присуждению премии «Глобальная энергия», лауреат Нобелевской премии мира, профессор Рае Квон Чунг выступил с докладом на Третьей экспертной онлайн-встрече «Энергетический переход и постковидный мир».*

Встреча прошла в рамках проекта «Россия и мир: профессиональный разговор», совместно организованного ИМЭМО РАН и «Интерфаксом».

Рае Квон Чунг известен как мировой эксперт в сфере низкоуглеродного «зеленого роста» экономики. Он популяризирует концепцию экологически чистого развития, согласно которой развивающиеся страны могут самостоятельно инициировать проекты по уменьшению выбросов парниковых газов, а процесс их экономического развития во многом зависит от успешной борьбы с климатическими изменениями.

По мнению профессора Чунга, Россия играет важную роль в глобальном энергетическом переходе – постепенной диверсификации мирового энергобаланса, предполагающей сокращение использования ископаемого углеводородного топлива. *«России надо подумать над тем, как реструктурировать и трансформировать энергетический ландшафт в предстоящие годы. Ключевую роль здесь могут сыграть технологии улавливания углерода с одновременным ростом производства водорода»,* — отметил Рае Квон Чунг. В качестве примера он сослался на научные исследования, представленные в докладе Ассоциации «Глобальная энергия» **«10 прорывных идей в энергетике на следующие 10 лет».**

Эксперт уверен, что с развитием подобных технологий (и, соответственно, с появлением новых мировых рынков) у России появится возможность экспортировать не только ископаемые виды топлива, но и «зеленый водород» как новый энергоноситель

[globalenergyprize.org](http://globalenergyprize.org)

