

DOI

УДК 631.147

**ОПРЕДЕЛЕНИЕ РАЦИОНАЛЬНЫХ РЕЖИМНЫХ ПАРАМЕТРОВ ФЕРМЕНТАЦИИ
БИОВОДОРОДА С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ *CLOSTRIDIUM BUTYRICUM* И
ENTEROBACTER CLOACAE НА ГИДРОЛИЗАТАХ СОЛОМЫ,
АКТИВИРОВАННОЙ ПАРОВЗРЫВНОЙ ОБРАБОТКОЙ**

Д. Б. Просвириков, Д. В. Тунцев, Л. И. Гизатуллина, И. Х. Гайфуллин

Реферат. Исследования проводили с целью определения возможности использования сельскохозяйственных отходов, в частности, соломы для производства биоводорода. В работе использовали два типа гидролизатов соломы (после кислотного и ферментативного гидролиза), предварительно активированной паровзрывной обработкой при температурах водяного пара 100, 165, 210°C. Гидролизаты разбавляли дистиллированной водой до концентраций редуцирующих веществ (РВ) в них 1,0 1,5 и 2,0% от их массы с целью определения рациональной концентрации. На 18 образцах гидролизатов испытывали две культуры анаэробных микроорганизмов – штамм бактерий рода *Clostridium butyricum* E.VI.3.2.1 (№ ВКПМ В-9619), штамм бактерий рода *Enterobacter cloacae* (№ ВКПМ В-1980). Температуру ферментации для всех проб устанавливали равной 37±0,5°C, рН – 5,5±0,1. Выделившийся газ накапливали в газгольдере, через каждые 12 ч его пробы отбирали и анализировали на объемное содержание водорода. После установления рациональной начальной концентрации субстрата, температуры паровзрывной активации соломы, вида гидролизата и наибольшего выхода биоводорода, дополнительно изменяли температуру культивации и рН для каждой культуры с целью выявления рациональных параметров: для *Clostridium butyricum* температуру культивации устанавливали на уровне 32±0,5, 37±0,5 и 42±0,5°C, для *Enterobacter cloacae* – 36±0,5, 37±0,5, 38±0,5°C; рН для всех проб устанавливали в диапазоне 5...6 с шагом 0,5±0,1). На кислотных гидролизатах соломы лучшую продуктивность демонстрировали *Clostridium butyricum* (температура паровзрывной обработки 165°C) – выход водорода составил 73 мл/г, на гидролизатах, ферментированных *Enterobacter cloacae* (температура паровзрывной обработки 210°C), выход водорода был равен 50 мл/г. Обе культуры способны продуцировать максимальное количество водорода при концентрации редуцирующих веществ 2%. Рациональная температура ферментации для *Clostridium butyricum* – 37±0,5°C, для *Enterobacter cloacae* – 36±0,5°C, для обеих культур – рН=6.

Ключевые слова: солома, паровзрывная обработка, гидролиз, ферментация, биоводород.

Введение. Современное общество сталкивается с растущей потребностью в поиске альтернативных, более экологически безопасных источников энергии. Особое место в этом контексте занимает биоводород [1, 2]. Одновременно значительным источником биомассы, которая может быть потенциальным сырьем для производства биоводорода могут быть растительные остатки, в частности, солома. Они образуются в огромных объемах, а их накопление становится существенной проблемой. Высокое содержание целлюлозы и гемицеллюлозы делает солому хорошим источником углеводов для ферментации и производства биогаза, включая биоводород [3, 4, 5]. Однако для максимальной эффективности использования соломы необходимо проводить предварительную обработку, чтобы разрушить клеточные структуры и сделать её более доступной для ферментации и производства биогаза, включая биоводород.

Один из способов предварительной обработки сельскохозяйственных отходов предусматривает использование кислот (серная, соляная и др.) для делигнификации и гидролиза биомассы. Это позволяет освободить целлюлозу для последующей ферментации, однако может потребовать обработку отходов для нейтрализации остаточных кислот и повлиять на экономическую эффективность процесса [5]. Кроме того, известен метод, при использовании которого применяют

NaOH или гидроксид кальция Ca(OH)₂, что позволяет облегчить делигнификацию и высвобождение целлюлозы [6].

Некоторые исследователи разрабатывают бескислотные методы предварительной обработки, например, паровзрывную обработку (steam explosion) и автогидролиз (autohydrolysis) [6, 7]. Оба метода основаны на использовании водяного пара, высоких температур (160...260°C) и давления (2...5 МПа), чтобы изменить структуру и химический состав сырья [8, 9].

В работе ряда авторов изучали производство биоэтанола, биоводорода и биогаза из пшеничной соломы в контексте биопереработки. Методы исследования включали гидротермическую обработку пшеничной соломы (автогидролиз) для разделения ее на целлюлозную (волокно) и жидкую, богатую гемицеллюлозой (гидролизат), фракции; ферментативный гидролиз целлюлозной фракции, который обеспечивал получение 0,41 г этанола на 1 г глюкозы; темная ферментация пентозного гидролизата, которая приводила к получению 178 мл водорода на 1 г сахара. Исследователи оценили шесть различных вариантов и пришли к выводу, что использование пшеничной соломы для производства биогаза или нескольких видов топлива энергетически более эффективно, чем такого монотоплива, как биоэтанол, путем ферментации только сахара C₆. Это открывает возможности для более

эффективного использования растительной биомассы соломы и энергии, делая процесс более экономически выгодным [10].

[11] Изучение возможностей оптимизации предварительной обработки рисовой соломы с использованием органосольвентных веществ с целью увеличения производства биоводорода при участии *Enterobacter aerogenes* показало, что изменение параметров предварительной обработки рисовой соломы (концентрация этанола, температура, продолжительность) не оказывало существенного влияния на выход водорода. Наибольший выход водорода составил 19,73 мл/г соломы и был достигнут при обработке в течение 30 минут этанолом с концентрацией 45% по объему и температуре 180°C.

Выбор метода зависит от таких условий и параметров процесса, как тип биомассы, доступность оборудования и энергетические затраты [12]. Эффективная предварительная обработка позволяет максимально использовать потенциал растительных отходов для производства биоводорода и снизить негативное воздействие на окружающую среду.

На сегодняшний день не существует оптимальной технологии предварительной обработки субстрата (гидролизата). Ее целью служит создание таких условий (состава среды), при которых происходит подавление штаммов-потребителей водорода и стимулирование штаммов его продуцентов [13]. Однако некоторые водород-потребители могут выживать в субстратах после предварительной обработки, а некоторые водород-продуценты могут быть ингибированы. Это в большей мере зависит от состава питательной среды субстрата, нахождения в ней антипитательных веществ и метаболических процессов, происходящих при ферментации.

Так, некоторые методы предварительной обработки субстратов приводят к образованию ингибирующих соединений, которые могут негативно сказаться на выходе биоводорода. Поэтому необходимо провести дополнительные исследования для поиска оптимальных технологий, учитывая энергетическую, экономическую и техническую осуществимость их применения в промышленных масштабах.

Ферментация служит ключевым этапом производства биоводорода из растительных отходов и включает в себя выбор микроорганизмов и условий ферментации. Для успешной ферментации используют разнообразные анаэробные микроорганизмы – *Clostridium spp.* [14], в том числе *Clostridium acetobutylicum* или *Clostridium butyricum* [15, 16], *Escherichia coli* [17], *Thermoanaerobacter spp.* [16], *Enterobacter spp.* [18], *Rhodobacter sphaeroides* [19, 20]. Такие виды, как *Enterobacter aerogenes* и *Enterobacter cloacae*, хорошо известны своей способностью ферментировать органические субстраты и производить биоводород в анаэробных условиях. В некоторых

случаях на его выход влияет конкуренция с другими микроорганизмами, например, *Clostridium spp.* [21, 22]. Это может быть связано с различными путями ферментации и предпочтительными условиями для роста микроорганизмов.

К важным параметрам ферментации относят температуру, давление, pH среды, а также минимальное наличие или полное отсутствие кислорода (в зависимости от выбранных микроорганизмов), состав сельскохозяйственных отходов. Их контроль играет ключевую роль в эффективной конверсии биомассы в водород.

Оптимальная температура для многих анаэробных бактерий, используемых в процессе ферментации для производства биоводорода, находится в диапазоне от 35 до 55°C [23, 24, 25]. Например, для *Clostridium acetobutylicum* она составляет около 37°C. Результаты изучения воздействия температуры и общего содержания твердых веществ на производство биоводорода при темной ферментации рисовой соломы показали, что при термофильном темном брожении (ТДФ) при 55±1°C оно было выше, чем при мезофильном темном брожении (МДФ) при 37±1°C.

Время ферментации может составлять от нескольких дней до нескольких недель в зависимости от многих факторов, включая вид микроорганизмов, состав субстрата и условия ферментации, наличие света [26, 27]. Установлено, что *Rhodobacter Sphaeroides* плохо растет в темноте, но при освещении рост и продукция H₂ восстанавливаются [28].

Давление может влиять на равновесие между биогазами, включая биоводород. Оптимальная величина этого показателя может варьировать, но она часто находится в диапазоне от 1 до 3 бар [29, 30]. Например, увеличение общего давления на 0,18 бар снизило выходы биоводорода на 19,5%, а уменьшение на 0,11 бар позволило повысить выход на 7% [31].

Оптимальный расход субстрата может быть определен в ходе экспериментов и зависит от его состава и качества [32]. Например, добавление растительного ферментного препарата, экстрагированного из семян спящей клещевины (*Ricinus communis L.*) в одностадийный процесс (одновременный гидролиз и ферментацию) привело к значительному сокращению адаптивной фазы примерно на 50%. При этом выход водорода увеличился на 14%, а производительность по водороду – на 48% [33].

Снижение негативного влияния побочных реакций на ход метаболического процесса и увеличение выхода биоводорода и других продуктов изучали многие авторы [34, 35, 36]. Основной их идеей можно считать введение в ходе ферментации дополнительных химических веществ, способствующих снижению негативного влияния побочных соединений.

Таким образом, предварительная обработка таких сельскохозяйственных отходов, как солома, служит ключевым способом

повышения выхода биоводорода при ферментативной обработке. Это позволяет эффективнее использовать сельскохозяйственные ресурсы и снижать негативное воздействие побочных продуктов на процесс ферментации. К наиболее распространенным методам предварительной обработки перед ферментативной обработкой (ферментализом) или кислотной обработкой (гидролизом) можно отнести паровзрывную обработку, обработку щелочами, а к наименее распространенным – озонирование и применение органосольвентных веществ.

Цель исследования – определение рациональных параметров ферментации биоводорода с использованием *Clostridium butyricum* и *Enterobacter cloacae* на гидролизатах соломы, активированной паровзрывной обработкой.

Условия, материалы и методы. В работе использовали гидролизаты соломы, предварительно активированные паровзрывной обработкой при температурах водяного пара 100, 165, 210°C – 3 кислотных и 3 ферментативных. Активированную паровзрывной обработкой солому подвергали кислотному (H_2SO_4 – 0,5% и 1,5%, гидромодуль 1:15, температура – 187°C, давление – 1,1...1,15 МПа, продолжительность – 5 ч) и ферментативному (ферментный препарат – Целлюлокс-А (порошок, 2000 ед. на 1 г препарата, ООО ПО «Сиббиофарм», Россия) – 6 и 12 г/кг сырья, температура – 45°C, pH субстрата 4,7 (ацетатный буфер), концентрация сырья в субстрате 33 г/л, продолжительность 72 ч, гидромодуль 1:5, скорость перемешивания – 150 об/мин) гидролизу [34]. Начальные концентрации редуцирующих веществ (РВ) в гидролизатах доводили путем разбавления дистиллированной водой до 1, 1,5 и 2% от массы гидролизата с целью выявления рациональной концентрации. Таким образом, было получено 18 образцов гидролизатов.

Штамм бактерий рода *Clostridium butyricum* E. VI.3.2.1 (№ ВКПМ В-9619) выращивали на среде для анаэробной ферментации следующего состава, г/л: дрожжевой экстракт – 1, триптона – 1, K_2HPO_4 – 0,7, KH_2PO_4 – 0,7, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,1, $MnSO_4 \cdot H_2O$ – 0,02, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,015, NaCl – 0,01, CH_3COONH_4 – 3,0, цистеин – 0,5, резазурин – 0,001.

Для штамма бактерий рода *Enterobacter cloacae* (№ ВКПМ В-1980) использовали среду для анаэробной ферментации, г/л: говяжий экстракт (полученный путем экстракции при 37...39 °C в течение 2 ч 500 г говяжьего обезжиренного фарша в 1 л дистиллированной воды, с последующей фильтрацией и кипячением экстракта в течение 30 минут) – 5, пептон – 10, NaCl – 5, KH_2PO_4 – 0,5, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ – 0,5.

Обе культуры высевали на агаре с кукурузной мукой при температуре 4...8°C. Для культивирования посевных образцов *Clostridium butyricum* и *Enterobacter cloacae* инокулировали в колбу 250 мл, содержащую 50 мл соответствующей среды, а затем инкубировали

в шейкере Kuhner Shaker ISF1-X при 37 °C и 130 об/мин в течение 12 ч.

Восемнадцать проб гидролизатов ферментировали готовыми инокулятами (всего 36 проб). Температуру ферментации во всех пробах устанавливали $37 \pm 0,5^\circ C$, pH $5,5 \pm 0,1$. В подготовленные колбы 500 мл добавляли 200 мл гидролизата (с концентрацией РВ 1,0, 1,5 или 2,0%), питательные компоненты среды для анаэробной ферментации и подготовленные инокуляты в объеме 30 мл. Для поддержания анаэробной ферментации колбы с субстратом, установленные в инкубационном шейкере, без включения света, продували азотом и герметизировали резино-алюминиевой крышкой с отбором проб газа. Ферментацию проводили при 100 об/мин в течение 72 ч. Выделившийся газ накапливали в газгольдере и через каждые 12 ч определяли объемное содержание водорода на газоанализаторе. Затем его пересчитывали в объем (мл) выделившегося водорода с 1 г субстрата (сухих веществ РВ в гидролизате) и рассчитывали совокупное производство водорода в соответствующий период ферментации.

На первом этапе исследований для обоих видов бактерий определяли рациональную начальную концентрацию субстрата, температуру паровзрывной активации соломы, влияющей на состав субстрата, и сравнивали эффективность продуцирования биоводорода обеими культурами на кислотных и ферментативных гидролизатах. Температура ферментации $37 \pm 0,5^\circ C$ и поддерживаемый уровень pH $5,5 \pm 0,1$ были фиксированными для всех проб.

На втором этапе исследований дополнительно определяли рациональную температуру культивации. Для *Clostridium butyricum* ее варьировали на уровне $32 \pm 0,5^\circ C$, $37 \pm 0,5^\circ C$ и $42 \pm 0,5^\circ C$, для *Enterobacter cloacae* – $36 \pm 0,5^\circ C$, $37 \pm 0,5^\circ C$, $38 \pm 0,5^\circ C$. Всего было проведено по 3 параллельных опыта. Выбор температур для выявления рациональных значений основывался на результатах предыдущих исследований [21, 22, 23]. pH среды для обеих культур на этом этапе фиксировали на уровне $5,5 \pm 0,1$. После определения рациональной температуры культивации для каждого штамма дополнительно уточняли рациональный уровень pH для обоих штаммов в диапазоне 5...6 с шагом $0,5 \pm 0,1$. Для его определения использовали pH-метр ИПЛ-113 Мультитест. Сравнение по максимальному выходу водорода проводили при трех параллельных измерениях.

Результаты и обсуждение. Паровзрывная активация и состав получаемых гидролизатов существенно повлияли на работу сравниваемых бактерий (рис. 1). *Clostridium butyricum* проявили большую активность на гидролизатах соломы, активированной при 165°C (максимальный выход водорода составил от 52 до 71 мл/г в зависимости от концентрации субстрата), меньше всего произведенного водорода было зафиксировано на гидролизатах

соломы, активированной при 100°C – от 40 до 49 мл/г. Повышение температуры паровзрывной обработки до 210°C привело к снижению активности *Clostridium butyricum*. Такая ситуация может быть обусловлена тем, что при повышении температуры паровзрывной обработки в кислотных гидролизатах соломы увеличивается содержание фурфурола и

гидроксиметилфурфурола [37], что снижает деятельность бактерий и их способность продуцировать водород.

Увеличение концентрации субстрата с 1 до 2% для *Clostridium butyricum* позволило повысить выход водорода на 22...37%. Продолжительность ферментации во всех экспериментах составила 72 ч.

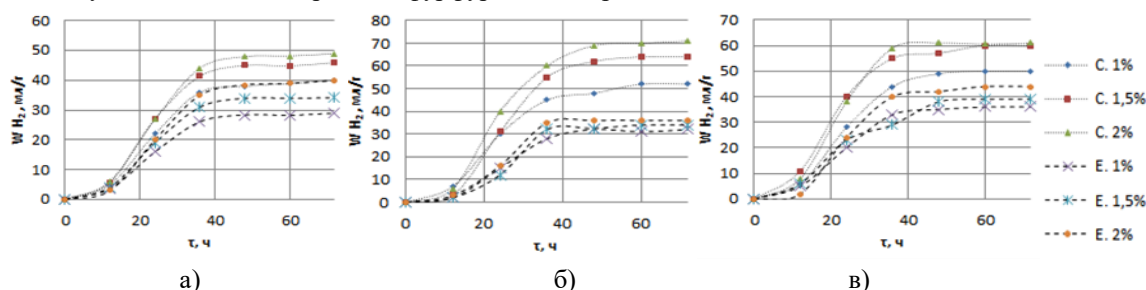


Рис. 1 – Кинетика выхода биоводорода, продуцируемого *Clostridium butyricum* и *Enterobacter cloacae* при различных концентрациях субстрата, на кислотных гидролизатах соломы, активированной при температурах паровзрывной обработки: а) 100 °С; б) 165 °С; в) 210 °С (температура ферментации 37±0,5 °С, рН 5,5±0,1) (С - *Clostridium butyricum*, Е - *Enterobacter cloacae*)

Максимальный выход биоводорода при использовании *Enterobacter cloacae* отмечали в вариантах с концентрацией субстрата 2%: при температуре предварительной паровзрывной активации перед кислотным гидролизом 100°C – 40 мл/г, 165°C – 36 мл/г, 210°C – 44 мл/г, что в целом на 38% меньше, по сравнению с *Clostridium butyricum*. Увеличение выхода водорода при повышении температуры паровзрывной активации до 210°C может быть связано с тем, что продукция водорода штаммом *Enterobacter cloacae* идет по так называемому «муравьиному пути» [37], когда в метаболизме могут использоваться органические кислоты, присутствующие в субстрате. Характер влияния концентрации субстрата на выход водорода для *Enterobacter cloacae* в целом аналогичен *Clostridium butyricum*, что свидетельствует о общности основного источника продукции водорода – D-глюкозы, содержание которой в кислотных гидролизатах активированной соломы составляет, по нашим данным [34], 2...3%. Увеличение концентрации субстрата для *Enterobacter cloacae* с 1 до 2% позволило увеличить выход водорода на 12...38%.

Как показали результаты изучения ферментации кислотных гидролизатов, наибольший выход водорода обеспечивает *Clostridium butyricum* (71 мл/г) при концентрации редуцирующих веществ 2% в гидролизате соломы, активированной паровзрывной обработкой при температуре 165°C.

Конверсия ферментативных гидролизатов соломы, активированной паровзрывной обработкой, с использованием *Clostridium butyricum* и *Enterobacter cloacae*, показала (рис. 2), что бактерии *Enterobacter cloacae* ведут себя более активно, чем *Clostridium butyricum*, в особенности на гидролизатах, полученных ферментализом соломы, активированной паровзрывной обработкой при 210°C, что позволило достичь максимального выхода водорода 35,5 мл/г при концентрации субстрата 2%. В целом наибольший выход водорода для этой культуры составил 31...35,5 мл/г в зависимости от концентрации субстрата. Изменение температуры паровзрывной активации соломы со 100 до 210°C и переход продуктов автогидролиза в гидролизаты способствовало повышению выхода водорода в 1,5...2 раза с 16 до 22 мл/г.

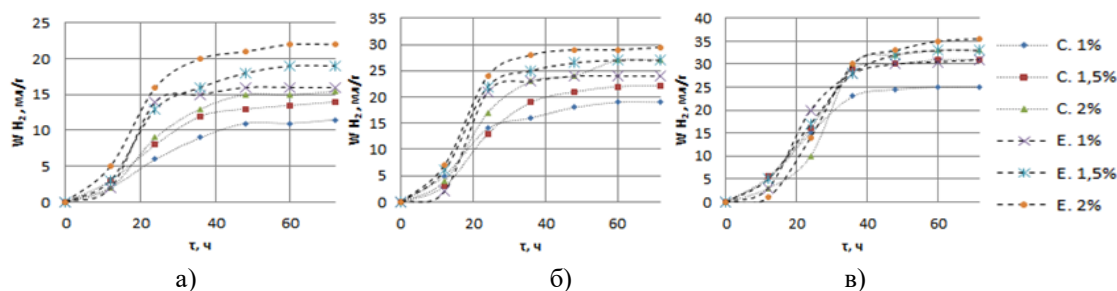


Рис. 2 – Кинетика выхода биоводорода, продуцируемого *Clostridium butyricum* и *Enterobacter cloacae* при различных концентрациях субстрата, на ферментативных гидролизатах соломы, активированной при температурах паровзрывной обработки: а) 100 °С; б) 165 °С; в) 210 °С (температура ферментации 37±0,5 °С, рН 5,5±0,1) (С - *Clostridium butyricum*, Е - *Enterobacter cloacae*)

Хотя общий уровень выхода водорода при использовании ферментативных гидролизатов в присутствии *Enterobacter cloacae* в среднем был в 1,42 раза ниже, по сравнению с кислотными гидролизатами, повышение температуры паровзрывной обработки (а, следовательно, изменение состава гидролизата) существенно увеличивает выход водорода. То есть *Enterobacter cloacae* охотнее метаболизируют более кислые гидролизаты в присутствии большего количества глюкозы, хотя этот путь до конца не ясен. В ферментативных гидролизатах соломы, активированных при 210°C, содержание глюкозы на 20...25% больше, по сравнению с активированными при 165°C. Как и в случае с кислотными гидролизатами, повышение концентрации субстрата способствовало увеличению выхода водорода, продуцируемого бактериями *Enterobacter cloacae*, в среднем на 24,9 %.

Clostridium butyricum на ферментативных гидролизатах активированной соломы вели себя менее активно, особенно в варианте с активацией при 100°C (минимальный выход водорода отмечен при концентрации субстрата 1% – 11,5 мл/г). Наибольший выход наблюдали на гидролизатах соломы, активированной при 210°C (33 мл/г при концентрации

субстрата 2%). Он был сопоставим с величиной этого показателя при использовании *Enterobacter cloacae* в тех же условиях. Увеличение температуры паровзрывной обработки перед ферментативным гидролизом также способствовало повышению выхода водорода. По-видимому, это связано с увеличением концентрации D-глюкозы.

Наибольшее продуцирование водорода на ферментативных гидролизатах соломы обеспечил *Enterobacter cloacae* (35,5 мл/г) при концентрации редуцирующих веществ 2% в гидролизате и температуре паровзрывной активации соломы перед гидролизом 210°C.

Выход водорода при использовании *Clostridium butyricum* был выше при температурах более 37°C (рис. 3а). При температуре 42°C он был сопоставим с результатами при 37°C, особенно после 48 ч ферментации, но явно отличались в первые 36 ч ферментации. Очевидно повышенные температуры в начале снизили активность *Clostridium butyricum*, однако, выравнивание значений по завершении концентрации свидетельствует о термостабильности бактерий. При температуре 32°C выход водорода в среднем был на 35...40% ниже с максимально возможной величиной этого показателя 61 мл/г.

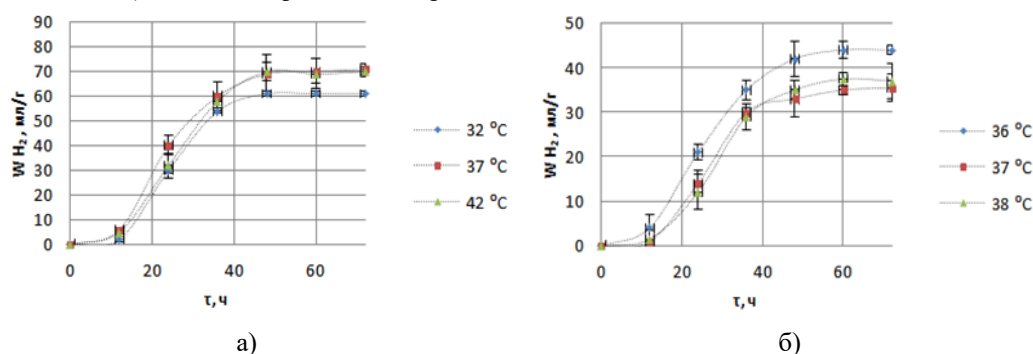


Рис. 3 – Выход водорода на кислотном гидролизате соломы, активированной паровзрывной обработкой при 165°C (а) и ферментативном гидролизате соломы, активированной паровзрывной обработкой при 210°C (б), при различных температурах ферментации

Для *Enterobacter cloacae* изменение температуры ферментации можно считать существенным фактором. Ее повышение с 36 до 38°C снижало выход водорода в среднем в 1,2...2,7 раза, особенно в первые 36 ч ферментации. Последующие значения для температур 37 и 38°C сопоставимы. Однако они ниже результатов, полученных при 36°C, на 18...20%. Стабильно высокий выход (42...44 мл/г) водорода наблюдали при температуре 36±0,5°C, которая для этой культуры определена как рациональная (рис. 3б).

На рис. 4 а, б представлены результаты выхода водорода для *Clostridium butyricum* (кислотный гидролизат) и *Enterobacter cloacae* (ферментативный гидролизат) соответственно при выявлении рациональных значений pH среды.

Для обеих культур повышение pH с 5 до 6 вело к увеличению выхода водорода, однако

для *Enterobacter cloacae* такое изменение было заметнее (рис. 4, б). Например, при 72 ч ферментации выход водорода при pH 6 повышался в 1,56 раз. Такое влияние изменения pH может быть связано со снижением ингибирования летучих жирных кислот, присутствующих в гидролизате, при продолжительной ферментации. Максимальный в опыте выход при pH 6 для *Clostridium butyricum* составил 73 мл/г, для *Enterobacter cloacae* – 50 мл/г.

По результатам исследований для достижения максимального выхода биоводорода из соломы, предварительно активированной паровзрывной обработкой, можно рекомендовать следующие рациональные режимные параметры:

при использовании в качестве продуцента водорода бактерий рода *Clostridium butyricum* температура паровзрывной активации соломы 165°C, кислотный гидролиз активированной

соломы, концентрация редуцирующих веществ в субстрате 2%, температура ферментации 37°C, pH 6, продолжительность ферментации до 72 ч;

при использовании в качестве продуцента водорода бактерий рода *Enterobacter cloacae* –

температура паровзрывной активации соломы 210°C, ферментативный гидролиз активированной соломы, концентрация редуцирующих веществ в субстрате 2%, температура ферментации 36°C, pH 6, продолжительность ферментации до 72 ч.

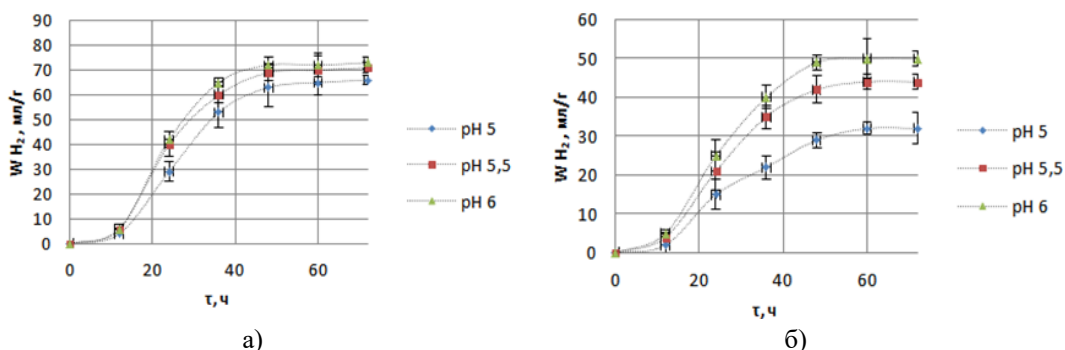


Рис. 4 – Выход водорода на гидролизатах соломы, активированной паровзрывной обработкой, при различных pH: а) *Clostridium butyricum* (кислотный гидролизат); б) *Enterobacter cloacae* (ферментативный гидролизат)

Выводы. Сравнение эффективности ферментации гидролизатов соломы, активированной паровзрывной обработкой, бактериями *Clostridium butyricum* и *Enterobacter cloacae* показало, что на кислотных гидролизатах соломы, лучшую продуктивность демонстрирует *Clostridium butyricum* (температура паровзрывной обработки 165°C), использование которой позволяет достичь выхода водорода 73 мл/г, на гидролизатах, ферментированных *Enterobacter cloacae* (температура паровзрывной обработки 210°C), выход водорода составил 50 мл/г. Обе культуры продуцируют максимальное количество водорода при концентрации редуцирующих веществ 2%. Рациональная температура ферментации для *Clostridium butyricum* – 37±0,5°C. Для *Enterobacter cloacae* повышение температуры ферментации с 36 до 38°C снижает выход водорода в среднем

в 1,2...2,7 раза, особенно в первые 36 ч ферментации. Стабильно наиболее высокий выход водорода наблюдали при температуре 36±0,5°C, которая для этой культуры определена как рациональная. Для обеих культур повышение pH с 5 до 6 ведет к увеличению выхода водорода, однако для *Enterobacter cloacae* такое повышение более значительно. Полученные рациональные параметры ферментации позволяют достичь эффективной конверсии биомассы соломы в водород. Дальнейшие исследования в области биоэнергетики могут способствовать разработке более эффективных и экологически безопасных методов производства водорода.

Сведения об источнике финансирования. Работа выполнена при поддержке Стипендии Президента Российской Федерации СП-332.2021.1.

Литература

1. Chen H., Wu J., Huang R. Effects of temperature and total solid content on biohydrogen production from dark fermentation of rice straw: Performance and microbial community characteristics // *Chemosphere*. 2022. Vol. 286. P. 131655. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653521021275> (дата обращения: 30.01.2024).
2. Kisielewska M., Dębowski M., Zieliński M. Improvement of biohydrogen production using a reduced pressure fermentation // *Bioprocess and biosystems engineering*. 2015. Vol. 38. P. 1925. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00449-015-1434-3> (дата обращения: 30.01.2024).
3. Влияние препарата Мефосфон на эффективность процесса получения биогаза и утилизации углеродсодержащих отходов / И. Х. Гайфуллин, З. М. Халиуллина, Б. Г. Зиганшин и др. // *Вестник Казанского государственного аграрного университета*. 2021. Т. 16. № 3(63). С. 19–26. doi: 10.12737/2073-0462-2021-19-26.
4. Influence of alkaline and oxidative pre-treatment of waste corn cobs on biohydrogen generation efficiency via dark fermentation / K. Kucharska, P. Rybarczyk, I. Hołowacz, et al. // *Biomass and Bioenergy*. 2020. Vol. 141. P. 105691. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0961953420302257> (дата обращения: 30.01.2024).
5. Optimization of steam explosion parameters for improved biotechnological use of wheat straw / D. Sulzenbacher, D. Atzmüller, F. Hawe, et al. // *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2021. P. 1. URL: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s13399-020-01266-z.pdf> (дата обращения: 30.01.2024).
6. Influence of steam explosion pre-treatment conditions on binder-less boards from hemp shives and wheat straw / R. Tupciauskas, J. Rizhikovs, P. Brazdausks, et al. // *Industrial Crops and Products*. 2021. Vol. 170. P. 113717. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669021004817> (дата обращения: 30.01.2024).
7. Biohydrogen production from pineapple waste: effect of substrate concentration and acid pretreatment / K. Cahyari, A. Putri, E. Oktaviani, et al. // *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. IOP Publishing. 2018. Vol. 358. No. 1. P. 012001. URL: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/358/1/012001/>

pdf (дата обращения: 30.01.2024).

8. Thermophilic hydrogen production from sugarcane bagasse pretreated by steam explosion and alkaline delignification / R. P. Ratti, T. P. Delforno, I. K. Sakamoto, et al. // *International Journal of Hydrogen Energy*. 2015. Vol. 40. No. 19. P. 6296–6306. doi: 10.1016/j.ijhydene.2015.03.067.
9. Hydrogen production from acidic, alkaline, and steam-exploded *Bambusa stenostachya* hydrolysates in dark fermentation process / N. H. Dai, T. T. Vo, L. P. Le, et al. // *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2021. P. 1. URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13399-020-01128-8> (дата обращения: 30.01.2024).
10. Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery concept / P. Kaparaju, M. Serrano, A. Thomsen, et al. // *Bioresource technology*. 2009. Vol. 100. No. 9. P. 2562. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S096085240800967X> (дата обращения: 30.01.2024).
11. Asadi N., Zilouei H. Optimization of organosolv pretreatment of rice straw for enhanced biohydrogen production using *Enterobacter aerogenes* // *Bioresource technology*. 2017. Vol. 227. P. 335. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852416317515> (дата обращения: 30.01.2024).
12. Bundhoo M., Mohee R., Hassan M. Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review // *Journal of environmental management*. – 2015. Vol. 157. P. 20. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0301479715300098> (дата обращения: 30.01.2024).
13. Математический аппарат расчета конструкционных решений газификационной установки / Б. Г. Зиганшин, Н. Н. Фахреев, Е. И. Байгильдеева и др. // *Вестник Казанского государственного аграрного университета*. 2023. Т. 18. № 1(69). С. 60–67.
14. The production of biohydrogen by a novel strain *Clostridium* sp. YM1 in dark fermentation process / P. Abdeshahian, N. Al-Shorgani, N. Salih, et al. // *International journal of hydrogen energy*. 2014. Vol. 39. No. 24. P. 12524–12531. doi: 10.1016/j.ijhydene.2014.05.081.
15. Dissecting the roles of *Escherichia coli* hydrogenases in biohydrogen production / M. Redwood, I. Mikheenko, F. Sargent, et al. // *FEMS microbiology letters*. 2008. Vol. 278. No. 1. P. 48–55. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00966.x.
16. Brynjarsdottir H., Scully S., Orlygsson J. Production of biohydrogen from sugars and lignocellulosic biomass using *Thermoanaerobacter* GH15 // *International journal of hydrogen energy*. 2013. Vol. 38. No. 34. P. 14467–14475. doi: 10.1016/j.ijhydene.2013.09.005.
17. Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19. / Y. K. Oh, E. H. Seol, J. R. Kim, et al. // *International Journal of Hydrogen Energy*. 2003. Vol. 28. No. 12. P. 1353–1359. doi:10.1016/S0360-3199(03)00024-7.
18. Statistical optimization of process parameters on biohydrogen production from glucose by *Clostridium* sp. Fanp2 / C. Pan, Y. Fan, Y. Xing, et al. // *Bioresource technology*. 2008. Vol. 99. No. 8. P. 3146–3154. doi: 10.1016/j.biortech.2007.05.055.
19. Enhancement of biohydrogen production from sustainable orange peel wastes using *Enterobacter* species isolated from domestic wastewater / M. H. Abd-Alla, F. A. Gabra, A. W. Danial, et al. // *International Journal of Energy Research*. 2019. Vol. 43. No. 1. P. 391–404. doi: 10.1002/er.4273.
20. Hung C. H., Chang Y. T., Chang Y. J. Roles of microorganisms other than *Clostridium* and *Enterobacter* in anaerobic fermentative biohydrogen production systems—a review // *Bioresource technology*. 2011. Vol. 102. No. 18. P. 8437–8444. doi: 10.1016/j.biortech.2011.02.084.
21. Rosales-Colunga L., De León Rodríguez A. *Escherichia coli* and its application to biohydrogen production // *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. 2015. Vol. 14. P. 123–135. doi: 10.1007/s11157-014-9354-2.
22. Woo J. H., Song Y. C. Influence of temperature and duration of heat treatment used for anaerobic seed sludge on biohydrogen fermentation // *KSCE Journal of Civil Engineering*. 2010. Vol. 14. P. 141–147. doi: 10.1007/s12205-010-0141-5.
23. Wu J., Upreti S., Ein-Mozaffari F. Ozone pretreatment of wheat straw for enhanced biohydrogen production // *International journal of hydrogen energy*. 2013. Vol. 38. No. 25. P. 10270–10276. Doi: 10.1016/j.ijhydene.2013.06.063.
24. Wang J., Yin Y. *Clostridium* species for fermentative hydrogen production: An overview // *International Journal of Hydrogen Energy*. 2021. Vol. 46. No. 70. P. 34599–34625. doi: 10.1016/j.ijhydene.2021.08.052.
25. Uncharacterized *Escherichia coli* proteins YdjA and YhjY are related to biohydrogen production / M. Yusoff, T. Maeda, V. Sanchez-Torres, et al. // *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012. Vol. 37. No. 23. P. 17778–17787. doi: 10.1016/j.ijhydene.2012.08.115.
26. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation / E. Elbeshbishy, B. Dhar, G. Nakhla, et al. // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2017. Vol. 79. P. 656–668. doi: 10.1016/j.rser.2017.05.075.
27. Biohydrogen production from cattle wastewater by enriched anaerobic mixed consortia: influence of fermentation temperature and pH / G. Tang, J. Huang, Z. Sun, et al. // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2008. Vol. 106. No. 1. P. 80–87. doi: 10.1263/jbb.106.80.
28. Light–dark duration alternation effects on *Rhodobacter sphaeroides* growth, membrane properties and biohydrogen production in batch culture / H. Sargsyan, L. Gabrielyan, L. Hakobyan, et al. // *International journal of hydrogen energy*. 2015. Vol. 40. No. 11. P. 4084–4091. doi: 10.1016/j.ijhydene.2015.01.163.
29. Mandal B., Nath K., Das D. Improvement of biohydrogen production under decreased partial pressure of H₂ by *Enterobacter cloacae* // *Biotechnology letters*. 2006. Vol. 28. P. 831–835. doi: 10.1007/s10529-006-9008-8.
30. Effects of hydrogen partial pressure on fermentative biohydrogen production by a chemotropic *Clostridium* bacterium in a new horizontal rotating cylinder reactor / B. Laurent, H. Serge, M. Julien, et al. // *Energy Procedia*. 2012. Vol. 29. P. 34–41. doi: 10.1016/j.egypro.2012.09.006.
31. Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production / Y. Kawagoshi, N. Hino, A. Fujimoto, et al. // *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 2005. Vol. 100. No. 5. P. 524–530. doi: 10.1263/jbb.100.524.
32. Lee H. S., Rittmann B. E. Evaluation of metabolism using stoichiometry in fermentative biohydrogen // *Biotechnology and bioengineering*. 2009. Vol. 102. No. 3. P. 749–758. doi: 10.1002/bit.22107.

33. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum* / S. Pattra, S. Sangyoka, M. Boonmee, et al. // *International journal of hydrogen energy*. 2008. Vol. 33. No. 19. P. 5256–5265. doi: 10.1016/j.ijhydene.2008.05.008.

34. Просвирников Д. Б., Тунцев Д. В., Зиганшин Б. Г. Технология и оборудование переработки активированных сельскохозяйственных растительных отходов в биоэтанол // *Вестник Казанского ГАУ* №. 2021. Т. 4. С. 64. doi: 10.12737/2073-0462-2022-59-67.

35. Hydrogen production from biodiesel industry waste by using a co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum* / V. L. Pachapur, S. J. Sarma, S. K. Brar, et al. // *Biofuels*. 2017. Vol. 8. No. 6. P. 651–662.

36. Efficient biohydrogen production via dark fermentation from hydrolyzed palm oil mill effluent by non-commercial enzyme preparation / V. L. Pachapur, S. J. Sarma, S. K. Brar, et al. // *International journal of hydrogen energy*. 2017. Vol. 42. No. 49. P. 29166–29174. doi: 10.1080/17597269.2015.1122471.

37. Biohydrogen production by deep eutectic solvent delignification-driven enzymatic hydrolysis and photo-fermentation: Effect of liquid–solid ratio / Y. Jing, F. Li, Y. Li, et al. // *Bioresource Technology*. 2022. Vol. 349. P. 126867. URL: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852422001961> (дата обращения: 30.01.2024).

Сведения об авторах:

Просвирников Дмитрий Богданович – доктор технических наук, профессор кафедры переработки древесных материалов, e-mail: prosvirnikov_dmi@mail.ru

Тунцев Денис Владимирович – доктор технических наук, заведующий кафедрой химической кибернетики, e-mail: tunsev_d@mail.ru

Гизатуллина Лилия Ирековна – аспирант кафедры переработки древесных материалов, e-mail: prosvirnikov_dmi@mail.ru

Казанский национальный исследовательский технологический университет, г. Казань, Россия

Гайфуллин Ильнур Хамзович – кандидат технических наук, старший преподаватель кафедры машин и оборудования в агробизнесе, e-mail: ilnur-gai@yandex.ru

Казанский государственный аграрный университет, г. Казань, Россия

DETERMINATION OF RATIONAL REGIME PARAMETERS FOR BIOHYDROGEN FERMENTATION USING CLOSTRIDIUM BUTYRICUM AND ENTEROBACTER CLOCAE ON HYDROLYZATES OF STRAW ACTIVATED BY STEAM EXPLOSIVE TREATMENT D. B. Prosvirnikov, D. V. Tuntsev, L. I. Gizatullina, I. Kh. Gayfullin

Abstract. Research was carried out to determine the possibility of using agricultural waste, in particular straw, for the production of biohydrogen. In the work, we used two types of straw hydrolysates (after acid and enzymatic hydrolysis), pre-activated by steam explosion treatment at steam temperatures of 100, 165, 210°C. Hydrolysates were diluted with distilled water to concentrations of reducing substances (RS) in them of 1.0, 1.5 and 2.0% of their mass in order to determine the rational concentration. Two cultures of anaerobic microorganisms were tested on 18 samples of hydrolysates: a strain of bacteria of the genus *Clostridium butyricum* E.VI.3.2.1 (No. VKPM B-9619), a strain of bacteria of the genus *Enterobacter cloacae* (No. VKPM B-1980). The fermentation temperature for all samples was set to 37±0.5°C, pH – 5.5±0.1. The released gas was accumulated in a gas tank; every 12 hours, its samples were taken and analyzed for volumetric hydrogen content. After establishing the rational initial concentration of the substrate, the temperature of steam explosion activation of the straw, the type of hydrolyzate and the highest yield of biohydrogen, the cultivation temperature and pH for each crop were additionally changed in order to identify rational parameters: for *Clostridium butyricum* the cultivation temperature was set at 32±0.5, 37±0.5 and 42±0.5°C, for *Enterobacter cloacae* – 36±0.5, 37±0.5, 38±0.5°C; The pH for all samples was set in the range 5...6 with steps of 0.5±0.1. On acid hydrolysates of straw, the best productivity was demonstrated by *Clostridium butyricum* (steam explosion temperature 165°C) - the hydrogen yield was 73 ml/g, on hydrolysates fermented by *Enterobacter cloacae* (steam explosion temperature 210°C), the hydrogen yield was 50 ml/g. Both crops are capable of producing the maximum amount of hydrogen at a concentration of reducing substances of 2%. The rational fermentation temperature for *Clostridium butyricum* is 37±0.5°C, for *Enterobacter cloacae* – 36±0.5°C, for both cultures – pH=6.

Key words: straw, steam explosion treatment, hydrolysis, fermentation, biohydrogen.

References

1. Chen H, Wu J, Huang R. Effects of temperature and total solid content on biohydrogen production from dark fermentation of rice straw: Performance and microbial community characteristics. [Internet]. *Chemosphere*. 2022; Vol.286. 131655 p. [cited 2024, January 30]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0045653521021275>.

2. Kisielewska M, Debowski M., Zielinski M. Improvement of biohydrogen production using a reduced pressure fermentation. [Internet]. *Bioprocess and biosystems engineering*. 2015; Vol.38. 1925 p. [cited 2024, January 30]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00449-015-1434-3>.

3. Gayfullin IKh, Khaliullina ZM, Ziganshin BG. [The influence of Mephosphon drug on the efficiency of the process of producing biogas and recycling carbon-containing waste]. *Vestnik Kazanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta*. 2021; Vol.16. 3(63). 19-26 p. doi: 10.12737/2073-0462-2021-19-26.

4. Kucharska K., Rybarczyk P., Holowacz I. Influence of alkaline and oxidative pre-treatment of waste corn cobs on biohydrogen generation efficiency via dark fermentation. [Internet]. *Biomass and Bioenergy*. 2020; Vol.141. 105691 p. [cited 2024, January 30]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0961953420302257>.

5. Sulzenbacher D, Atzmuller D, Hawe F. Optimization of steam explosion parameters for improved biotechnological use of wheat straw. [Internet]. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2021; 1 p. [cited 2024, January 30]. Available from: <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007/s13399-020-01266-z.pdf>.

6. Tupciauskas R, Rizhikovs J, Brazdauskas P. Influence of steam explosion pre-treatment conditions on binder-less boards from hemp shives and wheat straw [Internet]. *Industrial Crops and Products*. 2021; Vol.170. 113717 p. [cited 2024, January 30]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669021004817>.

7. Cahyari K, Putri A, Oktaviani E. Biohydrogen production from pineapple waste: effect of substrate concentration and acid pretreatment. [Internet]. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*. IOP Publishing. 2018; Vol.358. 1. 012001 p. [cited 2024, January 30]. Available from: <https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1757-899X/358/1/012001/pdf>.

8. Ratti RP, Delforno TP, Sakamoto IK. Thermophilic hydrogen production from sugarcane bagasse pretreated by steam explosion and alkaline delignification. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2015; Vol.40. 19. 6296-6306 p. doi: 10.1016/j.ijhydene.2015.03.067.

9. Dai NH, Vo TT, Le LP. Hydrogen production from acidic, alkaline, and steam-exploded *Bambusa stenostachya* hydrolysates in dark fermentation process. [Internet]. *Biomass Conversion and Biorefinery*. 2021; 1 p. [cited 2024, January 30]. Available from: <https://link.springer.com/article/10.1007/s13399-020-01128-8>.

10. Kaparaju P, Serrano M, Thomsen A. Bioethanol, biohydrogen and biogas production from wheat straw in a biorefinery

concept. [Internet]. Bioresource technology. 2009; Vol.100. 9. 2562 p. [cited 2024, January 30]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S096085240800967X>.

11. Asadi N, Zilouei H. Optimization of organosolv pretreatment of rice straw for enhanced biohydrogen production using *Enterobacter aerogenes*. [Internet]. Bioresource technology. 2017; Vol. 227. P. 335. [cited 2024, January 30]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852416317515>.

12. Bundhoo M, Mohee R, Hassan M. Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: a review. [Internet]. Journal of environmental management. – 2015. Vol. 157. P. 20. [cited 2024, January 30]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0301479715300098>.

13. Ziganshin BG, Fakhreev NN, Baigildeeva EI. [Mathematical apparatus for calculating the design solutions of a gasification device]. Vestnik Kazanskogo gosudarstvennogo agrarnogo universiteta. 2023; Vol.18. 1(69). 60-67 p.

14. Abdeshahian P, Al-Shorgani N, Salih N. The production of biohydrogen by a novel strain *Clostridium* sp. YM1 in dark fermentation process. International journal of hydrogen energy. 2014; Vol.39. 24. 12524-12531 p. doi: 10.1016/j.ijhydene.2014.05.081.

15. Redwood M, Mikheenko I, Sargent F. Dissecting the roles of *Escherichia coli* hydrogenases in biohydrogen production. FEMS microbiology letters. 2008; Vol.278. 1. 48-55 p. doi: 10.1111/j.1574-6968.2007.00966.x.

16. Brynjarsdottir H, Scully S, Orlygsson J. Production of biohydrogen from sugars and lignocellulosic biomass using *Thermoanaerobacter* GHL15. International journal of hydrogen energy. 2013; Vol.38. 34. 14467-14475 p. doi: 10.1016/j.ijhydene.2013.09.005.

17. Oh YK, Seol EH, Kim JR. Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19. International Journal of Hydrogen Energy. 2003; Vol.28. 12. 1353-1359 p. doi:10.1016/S0360-3199(03)00024-7.

18. Pan C, Fan Y, Xing Y. Statistical optimization of process parameters on biohydrogen production from glucose by *Clostridium* sp. Fnp2. Bioresource technology. 2008; Vol.99. 8. 3146-3154 p. doi: 10.1016/j.biortech.2007.05.055.

19. Abd-Alla MH, Gabra FA, Danial AW. Enhancement of biohydrogen production from sustainable orange peel wastes using *Enterobacter* species isolated from domestic wastewater. International Journal of Energy Research. 2019; Vol.43. 1. 391-404 p. doi: 10.1002/er.4273.

20. Hung CH, Chang YT, Chang YJ. Roles of microorganisms other than *Clostridium* and *Enterobacter* in anaerobic fermentative biohydrogen production systems: a review. Bioresource technology. 2011; Vol.102. 18. 8437-8444 p. doi: j.biortech.2011.02.084.

21. Rosales-Colunga L, De Leon Rodriguez A. *Escherichia coli* and its application to biohydrogen production. Reviews in Environmental Science and Bio/Technology. 2015; Vol.14. 123-135 p. doi: 10.1007/s11157-014-9354-2.

22. Woo JH, Song YC. Influence of temperature and duration of heat treatment used for anaerobic seed sludge on biohydrogen fermentation. KSCE Journal of Civil Engineering. 2010; Vol.14. 141-147 p. doi: 10.1007/s12205-010-0141-5.

23. Wu J, Upreti S, Ein-Mozaffari F. Ozone pretreatment of wheat straw for enhanced biohydrogen production. International journal of hydrogen energy. 2013; Vol.38. 25. 10270-10276 p. Doi: 10.1016/j.ijhydene.2013.06.063.

24. Wang J, Yin Y. *Clostridium* species for fermentative hydrogen production: an overview. International Journal of Hydrogen Energy. 2021; Vol.46. 70. 34599-34625 p. doi: 10.1016/j.ijhydene.2021.08.052.

25. Yusoff M, Maeda T, Sanchez-Torres V. Uncharacterized *Escherichia coli* proteins YdjA and YhjY are related to biohydrogen production. International Journal of Hydrogen Energy. 2012; Vol.37. 23. 17778-17787 p. doi: 10.1016/j.ijhydene.2012.08.115.

26. Elbeshbishy E, Dhar B, Nakhla G. A critical review on inhibition of dark biohydrogen fermentation. Renewable and Sustainable Energy Reviews. 2017; Vol.79. 656-668 p. doi: 10.1016/j.rser.2017.05.075.

27. Tang G, Huang J, Sun Z. Biohydrogen production from cattle wastewater by enriched anaerobic mixed consortia: influence of fermentation temperature and pH. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2008; Vol.106. 1. 80-87 p. doi: 10.1263/jbb.106.80.

28. Sargsyan H, Gabrielyan L, Hakobyan L. Light-dark duration alternation effects on *Rhodobacter sphaeroides* growth, membrane properties and bio-hydrogen production in batch culture. International journal of hydrogen energy. 2015; Vol.40. 11. 4084-4091 p. doi: 10.1016/j.ijhydene.2015.01.163.

29. Mandal B, Nath K, Das D. Improvement of biohydrogen production under decreased partial pressure of H₂ by *Enterobacter* cloacae. Biotechnology letters. 2006; Vol.28. 831-835 p. doi: 10.1007/s10529-006-9008-8.

30. Laurent B, Serge H, Julien M. Effects of hydrogen partial pressure on fermentative biohydrogen production by a chemotrophic *Clostridium* bacterium in a new horizontal rotating cylinder reactor. Energy Procedia. 2012; Vol.29. 34-41 p. doi: 10.1016/j.egypro.2012.09.006.

31. Kawagoshi Y, Hino N, Fujimoto A. Effect of inoculum conditioning on hydrogen fermentation and pH effect on bacterial community relevant to hydrogen production. Journal of Bioscience and Bioengineering. 2005; Vol.100. 5. 524-530 p. doi: 10.1263/jbb.100.524.

32. Lee HS, Rittmann BE. Evaluation of metabolism using stoichiometry in fermentative biohydrogen. Biotechnology and bioengineering. 2009; Vol.102. 3. 749-758 p. doi: 10.1002/bit.22107.

33. Patra S, Sangyoka S, Boonmee M. Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. International journal of hydrogen energy. 2008; Vol.33. 19. 5256-5265 p. doi: 10.1016/j.ijhydene.2008.05.008.

34. Prosvirnikov DB, Tuntsev DV, Ziganshin BG. [Technology and equipment for processing activated agricultural plant waste into bioethanol]. Vestnik Kazanskogo GAU. 2021; Vol.4. 64 p. doi: 10.12737/2073-0462-2022-59-67.

35. Pachapur VL, Sarma SJ, Brar SK. Hydrogen production from biodiesel industry waste by using a co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. Biofuels. 2017; Vol.8. 6. 651-662 p.

36. Pachapur VL, Sarma SJ, Brar SK. Efficient biohydrogen production via dark fermentation from hydrolyzed palm oil mill effluent by non-commercial enzyme preparation. International journal of hydrogen energy. 2017; Vol.42. 49. 29166-29174 p. doi: 10.1080/17597269.2015.1122471.

37. Jing Y, Li F, Li Y. Biohydrogen production by deep eutectic solvent delignification-driven enzymatic hydrolysis and photo-fermentation: Effect of liquid-solid ratio. [Internet]. Bioresource Technology. 2022; Vol.349. 126867 p. [cited 2024, January 30]. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0960852422001961>.

Authors:

Prosvirnikov Dmitriy Bogdanovich – Doctor of Technical Sciences, Professor of Wood Materials Processing Department, e-mail: prosvirnikov_dmi@mail.ru

Tuntsev Denis Vladimirovich – Doctor of Technical Sciences, Head of Chemical Cybernetics Department, e-mail: tuncev_d@mail.ru

Gizatullina Liliya Irekovna – post-graduate student of Wood Materials Processing Department, e-mail: prosvirnikov_dmi@mail.ru

Kazan National Research Technological University, Kazan, Russia

Gayfullin Ilnur Khamzovich – Ph.D. of Technical Sciences, senior lecturer of Machinery and Equipment in Agribusiness Department, e-mail: ilnur-gai@yandex.ru

Kazan State Agrarian University, Kazan, Russia.