

БИОТЕХНОЛОГИЯ / BIOTECHNOLOGY

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.86>

РЕАЛИЗАЦИЯ ПРОЦЕССА АНАЭРОБНОЙ ФЕРМЕНТАЦИИ МОЛОЧНОЙ СЫВОРОТКИ ПРИ ИЗБЫТОЧНОМ ДАВЛЕНИИ В РЕАКТОРЕ

Научная статья

Михеева Э.Р.<sup>1,\*</sup>, Катраева И.В.<sup>2</sup>, Ковалев А.А.<sup>3</sup>, Литтий Ю.В.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ORCID : 0000-0001-8659-3166;

<sup>2</sup>ORCID : 0000-0002-5951-0430;

<sup>3</sup>ORCID : 0000-0002-1983-3454;

<sup>4</sup>ORCID : 0000-0002-5457-4603;

<sup>1</sup>Национальный научно-исследовательский университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, Российская Федерация

<sup>2</sup>Нижегородский государственный архитектурно-строительный университет, Нижний Новгород, Российская Федерация

<sup>3</sup>Федеральный научный агроинженерный центр ВИМ, Москва, Российская Федерация

<sup>4</sup>Федеральный исследовательский центр "Фундаментальные основы биотехнологии", Москва, Российская Федерация

\* Корреспондирующий автор (biomikheeva[at]gmail.com)

**Аннотация**

Анаэробное сбраживание под давлением позволяет получать биогаз с высоким содержанием метана и в то же время избегать затрат энергии на обогащения биогаза и подачу его в распределительную сеть. Технология обладает потенциалом, но исследования сталкиваются с практическими ограничениями, связанными с капиталовложениями, необходимыми для создания реакторов высокого давления и датчиков, и связанными с этим ограничениями. В представленной работе спроектирована установка, позволяющая исследовать анаэробное сбраживание при избыточном автогенерируемом давлении до 0,2 бар. Было показано, что растворимость углекислого газа растёт при повышении давления в реакторе, но зависит и от нагрузки на реактор. Наибольший средний выход метана 66.9% наблюдали при избыточном давлении 0,2 бар и HRT 15 ч. Наибольшее удаление ХПК 91,11% наблюдали при HRT 24 ч и избыточном давлении 0,1 бар, при котором средняя концентрация углекислого газа также была наименьшей 32,3%, а средняя концентрация водорода – наибольшей 1,7%, при этом средняя концентрация метана в биогазе составила 66,1%, а рН 6,69.

**Ключевые слова:** молочная сыворотка, анаэробный реактор под давлением, анаэробное сбраживание, биогаз.

IMPLEMENTATION OF ANAEROBIC FERMENTATION OF LACTOSERUM AT OVERPRESSURE IN THE REACTOR

Research article

Mikheeva E.R.<sup>1,\*</sup>, Katraeva I.V.<sup>2</sup>, Kovalev A.A.<sup>3</sup>, Litt Y.V.<sup>4</sup>

<sup>1</sup>ORCID : 0000-0001-8659-3166;

<sup>2</sup>ORCID : 0000-0002-5951-0430;

<sup>3</sup>ORCID : 0000-0002-1983-3454;

<sup>4</sup>ORCID : 0000-0002-5457-4603;

<sup>1</sup>Lobachevsky State University of Nizhny Novgorod, Nizhny Novgorod, Russian Federation

<sup>2</sup>Nizhny Novgorod State University of Architecture and Civil Engineering, Nizhny Novgorod, Russian Federation

<sup>3</sup>Federal Scientific Agroengineering Center VIM, Moscow, Russian Federation

<sup>4</sup>Federal Research Centre "Fundamentals of Biotechnology", Moscow, Russian Federation

\* Corresponding author (biomikheeva[at]gmail.com)

**Abstract**

Anaerobic digestion under pressure can produce biogas with a high methane content while avoiding the energy costs of enriching the biogas and feeding it into the distribution network. The technology has potential, but research faces practical limitations due to the capital investment required for high-pressure reactors and sensors and the associated constraints. In the presented work, a plant has been designed to study anaerobic digestion at excess autogenerated pressures as low as 0.2 bar. It was shown that the solubility of carbon dioxide increases with increasing reactor pressure, but also depends on the reactor load. The highest average methane yield of 66.9% was observed at an overpressure of 0.2 bar and HRT of 15 h. The highest COD removal of 91.11% was observed at HRT 24 h and overpressure of 0.1 bar, at which the average carbon dioxide concentration was also the lowest 32.3% and the average hydrogen concentration was the highest 1.7%, with an average biogas methane concentration of 66.1%. and pH of 6.69.

**Keywords:** lactoserum, anaerobic pressure reactor, anaerobic digestion, biogas.

**Введение**

Анаэробное сбраживание представляет собой сложный четырехстадийный процесс, которому способствует взаимодействие многих групп микроорганизмов и который состоит из следующих стадий:

(i) гидролиз сложных органических полимеров до мономеров;

- (ii) ацидогенез, приводящий к образованию водорода, углекислого газа, аммония, короткоцепочечных жирных кислот и спиртов;
- (iii) ацетогенная стадия, включающая окисление негазообразных продуктов ферментации в анаэробных условиях;
- (iv) метаногенез, который протекает в условиях низкого окислительно-восстановительного потенциала ( $< 240$  мВ) [1].

Анаэробное сбраживание широко изучалось с использованием одно- и двухступенчатых систем [2]. Например, Fernández et al. сравнили одно- и двухэтапный процесс анаэробного сбраживания (АС) подсырной сыворотки в термофильных условиях ( $55 \pm 1$ ) °С и получили для первого максимальный выход 314,5 л  $\text{CH}_4/\text{кгХПК}$  при HRT 8,3 сут., тогда как для двухступенчатого АС наблюдали эффект ингибирования при этом же HRT 8,3 сут. [3]. Это говорит о том, что двухэтапные процессы могут быть неоптимальными для термофильного АС. Одноступенчатая биосистема позволяет производить ценное и экономически эффективное биотопливо с меньшим контролем, чем отдельные ацидогенные и метаногенные процессы [4], [5], [7], [8]. Однако к реализации технологии одностадийного процесса производства биогаза существует множество вопросов, таких как конструкции биореакторов, режимы их работы, а также механизмы образования биоводорода и биометана без разделения фаз [9].

Многие исследования анаэробного сбраживания показали значительное улучшение производства биогаза при использовании захваченных/иммобилизованных клеток [2], [10], [11]. Использование иммобилизующих материалов возможно будет способствовать физическому разграничению процессов ацидогенеза и метаногенеза, что позволит получить метановодородный биогаз в одном реакторе. Этот захват клеток может быть многообещающим подходом к снижению проблем гидрогенотрофного метаногенеза, поскольку он может помочь физически разделить гидрогенные и метаногенные бактерии в реакторе [2], [11]. Например, авторы показали, что без добавления гранулированного активированного угля образование метана практически не наблюдалось, что, по-видимому, свидетельствовало о невозможности синтрофной деградации продуктов ацидогенеза из-за высокого парциального давления водорода и отсутствия проводящего материала для активации прямого межвидового переноса электронов (DIET) [10].

Обычные установки анаэробного сбраживания (АС) используют конфигурацию однофазного реактора непрерывного перемешивания (CSTR). В однофазной системе все стадии АС, от гидролиза до метаногенеза, протекают в одном реакторе, работающем в оптимальных для метаногенов условиях, т.е. нейтральном рН и длительном времени гидравлического удержания (обычно более 20-30 сут.). Это означает, что ацидогены, физиологические и ростовые характеристики которых отличаются от метаногенов, находятся в таком реакторе в субоптимальных условиях [7], влияющих на сложные синтрофные взаимодействия между ацидогенами и метаногенами [12].

В последнее время значительное внимание уделяется анаэробному сбраживанию под давлением (PAD), которое представляет собой анаэробное сбраживание, происходящее при давлении, превышающем атмосферное. Анаэробное сбраживание под давлением может выполняться в реакторах непрерывного действия [13] или реакторах периодического действия путем добавления внешнего газа (т.е.  $\text{N}_2$  или  $\text{CO}_2$ ), или путем самонакопления/автогенерации биогаза [14], [15].

Процесс автогенерации давления за счет выработки биогаза может поддерживаться без участия внешнего источника энергии. Микроорганизмы при анаэробном сбраживании выделяют газы, такие как метан, водород, углекислый газ, сероводород и др., которые первоначально растворены в жидкой фазе анаэробного реактора. Впоследствии эти газы переходят в газовую фазу, накапливаются в верхней части реактора и вызывают повышение давления. Контролируя удаление газа из реактора с помощью напорного клапана, можно контролировать уровень давления в реакторе потенциально примерно до 10 МПа (100 бар) [16].

В отличие от изменения температуры, повышение давления напрямую не влияет на биологическую часть процесса; однако оно влияет на конечный состав биогаза, способствуя более высокой концентрации метана в биогазе, которая может достигать 90% [17] за счет повышения растворимости углекислого газа [18]. Поскольку растворимость сероводорода также относительно высока и увеличивается с ростом давления, анаэробный реактор под давлением (PAD) может напрямую генерировать биометан высокой чистоты с минимальным загрязнением сероводородом. Следовательно, давление влияет на состав образующегося биогаза при анаэробном сбраживании в условиях повышения давления [19].

Lindeboom et al. [18] показали, что при сбраживании ацетата натрия в реакторе периодического действия под высоким давлением 20 бар содержание метана в биогазе может достигать значений выше 90%. Lemmer et al. [20] изучали сбраживание кукурузного силоса и смеси травы с кукурузным силосом наблюдали стабильное образование биогаза при повышении давления от 1 до 9 бар, независимо от нагрузки на реактор. Merkle et al. также получили выход метана около 90 об%/об при рабочем давлении 50 бар при непрерывном сбраживании кукурузного силоса и травы [21]. Данные литературы показали, что давление оказывает более существенное влияние на состав биогаза, чем скорость загрузки органического вещества [22]. С помощью технологии PAD становится возможным получить биогаз с высоким содержанием метана, при этом сократить энергетические затраты на очистку и закачку газа в распределительную сеть на 45-60% [17].

Механизмы переработки биомассы в условиях PAD на сегодня мало изучены [16].

Цель работы: изучить анаэробное сбраживание молочной сыворотки в реакторе без- и с применением небольшого избыточного давления в термофильном режиме при изменении гидравлического времени пребывания и нагрузки на анаэробный аппарат.

### Методы и принципы исследования

*Инокулят:* при проведении исследований был использован инокулят, сформировавшийся в процессе анаэробного сбраживания молочной сыворотки в одноступенчатом анаэробном термофильном реакторе: содержание сухих веществ (СВ)  $1,1(\pm 0,2)\%$ ; содержание сухих органических веществ (оСВ)  $0,78(\pm 0,22)\%$ , рН  $6,53(\pm 0,11)$ . В качестве

иммобилизирующего материала использовали угольный войлок и пенополиуретановую губку, взятые в соотношении 50/50, общая масса загрузочного материала составила 7,2 г.

*Субстрат:* сухая творожная сыворотка ГОСТ 33958-2016 (АО «Зеленодольский молокоперерабатывающий комбинат», Россия) была разведена в 200 раз водопроводной водой (ХПК исх. = 6760 мг/л). Для соблюдения соотношения углерода к азоту 300,5 в сыворотку добавляли 0,25 мл/л 25% водного аммиака, pH подаваемого субстрата составлял  $8,85(\pm 0,11)$ .

*Описание эксперимента:* исследование одноступенчатого анаэробного сбраживания проводилось в экспериментальной автоматизированной установке, включающей два идентичных реактора, каждый из которых имел рабочий объем 900 мл. Один из реакторов работал при нормальном, а другой – при избыточном автогенерируемом давлении. Скорость восходящего потока жидкости в реакторах обеспечивалась за счет рециркуляции и составляла 1,5 м/ч. Реакторы работали в непрерывном режиме в течение 33-х суток при гидравлическом времени удерживания (ГВУ) 24 ч; 15 ч; и 6 ч с нагрузкой по органическому веществу 6 г ХПК/(л·сутки); 9,6 г ХПК/(л·сутки) и 24 г ХПК/(л·сутки). В реакторе поддерживался термофильный режим ( $55\pm 1$ )°C за счет установки их в термостатируемый шкаф MIR-154 (SANYO, Япония).

Подробное описание установки представлено в разделе Результаты.

*Аналитические методы:* для определения количества биогаза, образующегося в реакторах, были использованы газовые счетчики MilliGascounter (Ritter, Германия). Концентрацию метана ( $\text{CH}_4$ ), углекислого газа ( $\text{CO}_2$ ) и водорода ( $\text{H}_2$ ) в биогазе определяли с помощью газового хроматографа «Хромос ГХ-1000» (Россия) [23]. Определение химического потребления кислорода (ХПК) проводили с использованием бихроматного метода, для определения pH использовали pH-метр WTW pH 3110 SET.

### Основные результаты

Схема и внешний вид установки представлены на рис. 1 и 2.



Рисунок 1 - Внешний вид установки для изучения непрерывного процесса анаэробной ферментации с реакторами, работающими при нормальном и избыточном автогенерируемом давлении в термофильном режиме

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.86.1>

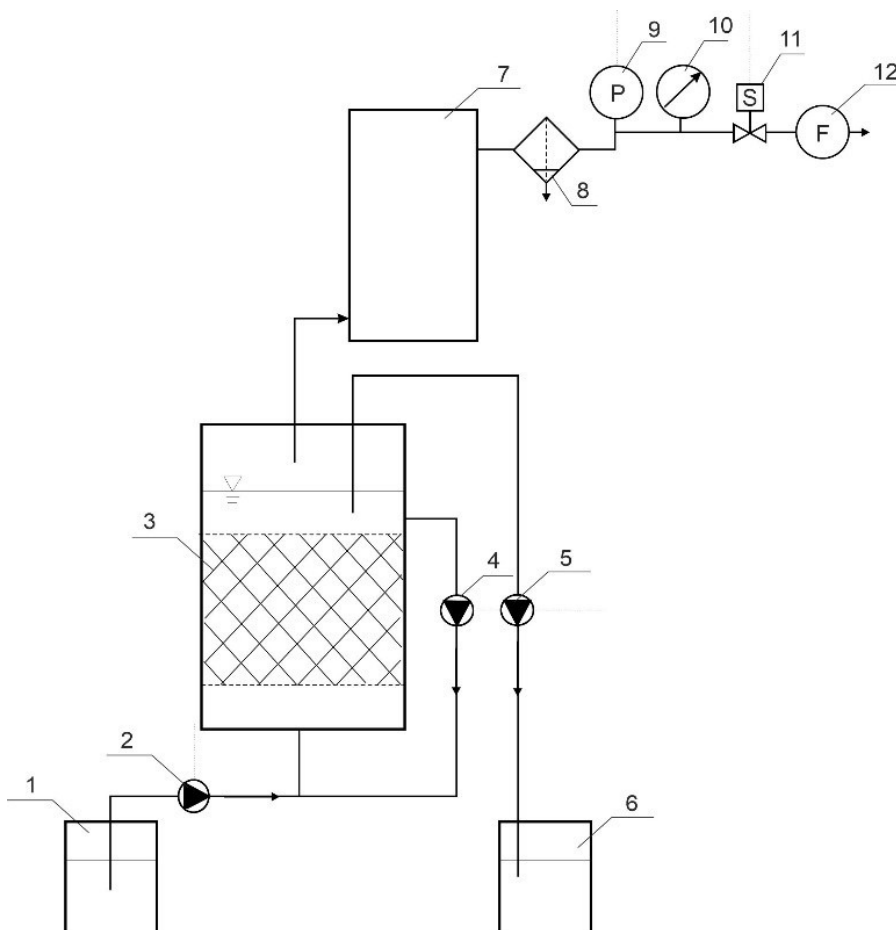


Рисунок 2 - Схема реактора, работающего под давлением

DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.86.2>

*Примечание: 1 – ёмкость субстрата; 2 – подающий насос; 3 – реактор; 4 – насос рециркуляции; 5 – насос откачки эфлюента; 6 – ёмкость эфлюента; 7 – ресивер; 8 – влагоотделитель; 9 – датчик давления; 10 – манометр; 11 – электромагнитный клапан; 12 – счетчик газа*

На первом этапе были подготовлены и испытаны на герметичность три реактора из полипропилена, один из которых был использован в качестве ресивера. Каждый из двух анаэробных реакторов был укомплектован тремя перистальтическими насосами ETATRON (Италия) (рециркуляция, подача субстрата и откачка эфлюента). Для исследования процесса анаэробной ферментации при избыточном давлении был смонтирован дополнительный блок для газовой линии аппарата, включающий влагоотделитель, датчик давления ELHART PTE5000C-006-M20-C и электромагнитный клапан Burkert 6013. Каждый из насосов мог работать в трех режимах: в непрерывном режиме (рециркуляция), по уровню, по заданному временному режиму.

Были внесены изменения в программу управления установкой, написанной в среде WinProLadder. На панель управления Weintek были добавлены текущие показания датчика давления, окно установки критического давления, при превышении которого происходит срабатывание электромагнитного клапана, а также окно выбора гистерезиса давления, при котором клапан автоматически закрывается (рис. 3).

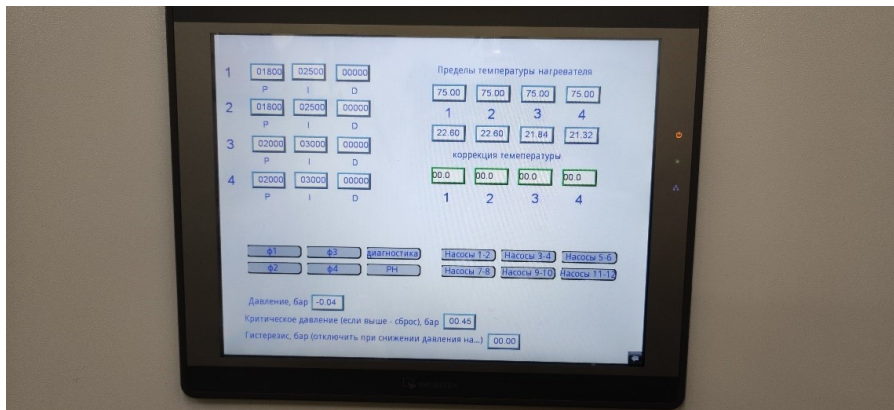


Рисунок 3 - Панель управления Weintek с вкладкой «настройки»  
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.86.3>

#### Одноступенчатое анаэробное сбраживание молочной сыворотки при нормальном и избыточном давлении

Известно, что коэффициент растворимости углекислого газа в воде при давлении 1 бар и 20 °С равен 0,879 и он намного выше, чем у метана 0,033 и водорода 0,018 и ниже, чем у сероводорода 2,59 и аммиака 685. Повышение давления способствует повышению растворимости углекислого газа, а повышение температуры, наоборот снижает растворимость газов. Известно, что биогаз в реакторе с избыточным давлением (PAD) характеризуется высоким содержанием  $\text{CH}_4$  [24], достигая равновесных значений от 90 до 95% при давлениях 3-90 бар. Кроме того,  $\text{H}_2\text{S}$  и  $\text{NH}_3$  теоретически более растворимы в жидкости, чем  $\text{CO}_2$  [25].

При нормальных условиях работы реактора наблюдали увеличение концентрации водорода в биогазе с увеличением нагрузки на реактор. При избыточном давлении 0,1 бар и ГВУ 24 ч концентрация водорода в биогазе резко увеличилась (в 8,5 раз), но при дальнейшем увеличении давления до 0,2 бар концентрация водорода в биогазе была практически равна 0. При ступенчатом снижении ГВУ до 15 ч и 6 ч концентрация водорода аналогично сначала увеличилась в 1,7 раз и 1,8 раз соответственно, а затем снизилась до 0,1% и 0,5% (рис. 4).

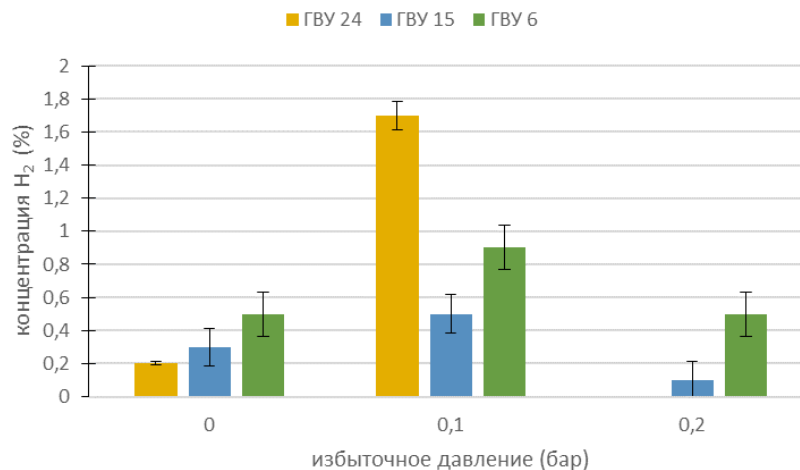


Рисунок 4 - Средняя концентрация водорода в биогазе в зависимости от избыточного давления при разных ГВУ  
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.86.4>

Повышение нагрузки способствовало снижению концентрации метана в составе биогаза в реакторе, работающем при нормальном давлении и избыточном давлении 0,1 бар. Тогда как в реакторе с избыточным давлением 0,2 бар средняя концентрация метана при ГВУ 15 ч была выше, чем при ГВУ 24 ч и 6 ч. Значительное увеличение средней концентрации метана (66,9%) наблюдали в реакторе при ГВУ 15 ч и избыточном давлении 0,2 бар, которая была на 14,8% выше чем в реакторе с избыточным давлением 0,1 бар (рис. 5). Наибольшая средняя концентрация метана (66,1% и 59%) при избыточном давлении 0,1 бар и для реактора, работающего при нормальных условиях, наблюдали при HRT 24 ч соответственно. Следовательно, увеличение нагрузки на реактор и снижение HRT способствовало снижению средней концентрации метана при нормальном и избыточном 0,1 бар давлениях, тогда как для реактора с избыточным давлением 0,2 бар наблюдалась иная тенденция.

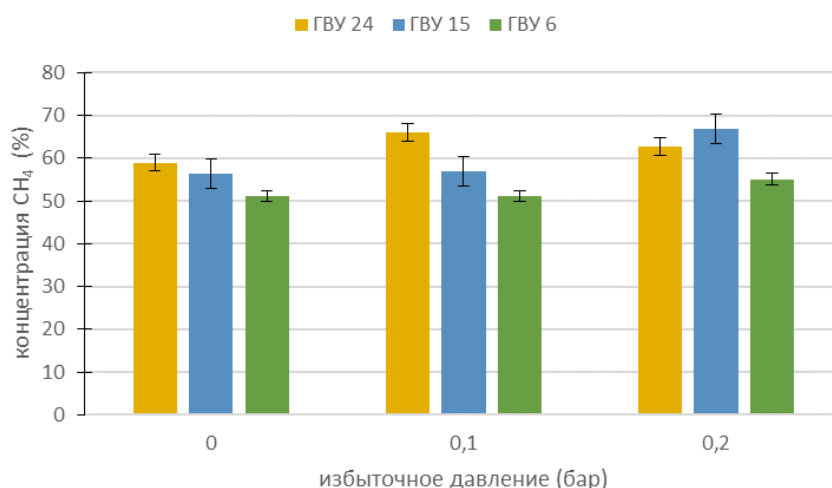


Рисунок 5 - Средняя концентрация метана в биогазе в зависимости от избыточного давления при разных ГБУ  
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.86.5>

Известно, что при повышении давления растворимость углекислого газа увеличивается, следовательно, концентрация его в составе биогаза должна снижаться. В реакторе без давления при увеличении нагрузки концентрация углекислого газа росла (рис. 6).

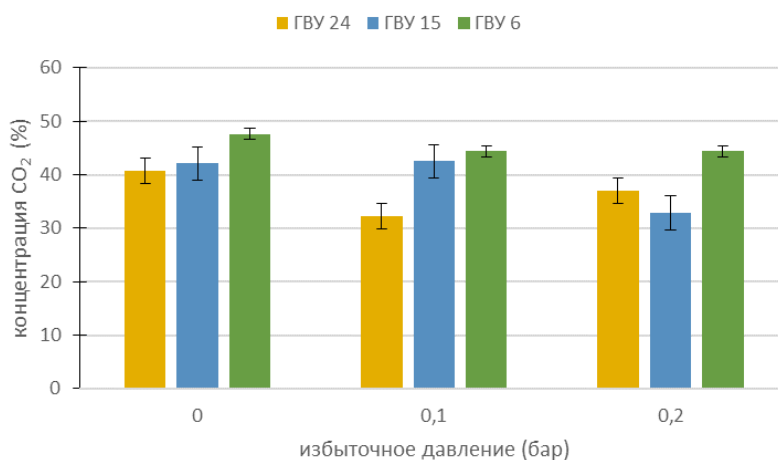


Рисунок 6 - Средняя концентрация углекислого газа в биогазе в зависимости от избыточного давления при разных ГБУ  
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.86.6>

В реакторе с избыточным давлением (ИД) 0,1 бар наблюдали аналогичную картину, тогда как в реакторе с ИД 0,2 бар концентрация углекислого газа была ниже при ГБУ 15 ч по сравнению с ГБУ 24 ч. Тенденция повышения растворимости углекислого газа при избыточном давлении наблюдалась только при ГБУ 6 ч, тогда как при ГБУ 24 ч концентрация углекислого газа при меньшем ИД 0,1 бар была ниже, чем при ИД 0,2 бар. Для ГБУ 15 ч при 0,2 бар наблюдали снижение концентрации углекислого газа на 23% по сравнению с давлением 0,1 бар.

При повышении ИД до 0.1 бар наблюдали рост pH в одноступенчатом реакторе, сбрасывающем молочную сыворотку при ГБУ 24 ч и 15 ч (рис. 7).

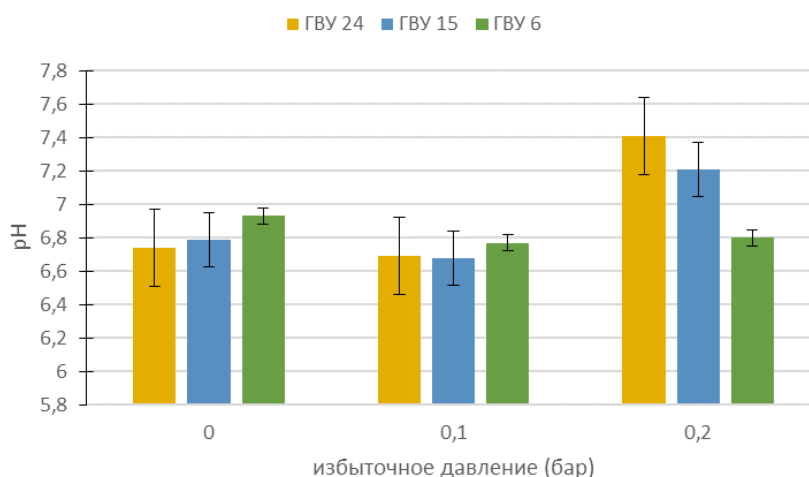


Рисунок 7 - Среднее значение рН в зависимости от давления при разных ГБУ  
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.86.7>

Повышение рН возможно связано с увеличением нагрузки и внесением в реактор большего количества сыворотки с рН 8,85, а также с более короткой ГБУ, что влекло снижение производительности реактора за счет повышения ХПК (рис. 8).

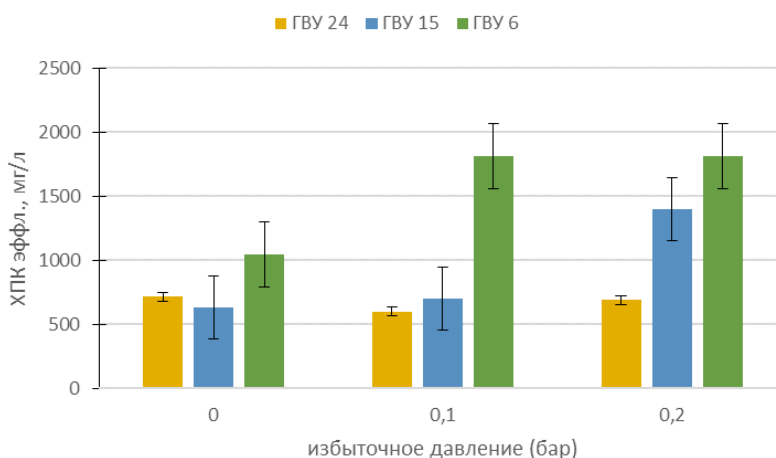


Рисунок 8 - Среднее значение ХПК эфлюента в зависимости от избыточного давления при разных ГБУ  
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.86.8>

Однако для реактора, работающего при ИД 0,2 бар увеличение нагрузки способствовало снижению рН от 7,41 до 6,8.

При увеличении нагрузки наблюдали увеличение ХПК эфлюента при ИД 0,1 бар и 0,2 бар (рис. 8). При этом стоит отметить, что при ГБУ 6 ч в реакторе при повышении давления с нормального до ИД 0,1 бар наблюдали увеличение ХПК эфлюента на 42%, при ГБУ 15 ч увеличение составило 10%, тогда как при ГБУ 24 ч ХПК эфлюента снизилось на 19%.

При увеличении ИД с 0,1 бар до 0,2 бар увеличение ХПК эфлюента наблюдали уже при ГБУ 15 ч на 50%, тогда как при ГБУ 24 ч ХПК эфлюента увеличилось на 13%, а при 6 ч практически не изменилось. Следовательно, увеличение давления на реактор приводит к росту ХПК эфлюента при ГБУ 15 ч и 6 ч, тогда как при НРТ 24 ч увеличение давления снижает ХПК эфлюента на 19% и на 4% соответственно. Это может говорить о том, что при слишком низком ГБУ увеличение давления в реакторе может негативно сказаться на биоразложении органического вещества, поэтому технологию PAD следует использовать при достаточно высоком ГБУ.

**Обсуждение**

Z. Liang et al. показали, что концентрация метана в биогазе увеличивается по меньшей мере до 70% при давлении в свободном пространстве более 4 бар по сравнению с 57,5% или менее при давлении менее 1,6 бар при сбраживании пресноводных водорослей. Еще один интересный вывод сделали авторы, что растворимость биогаза в реакторе оценивается всего в 3,7% (наилучшее значение) от его растворимости в чистой воде, что намного ниже значений, представленных ранее в литературе [26]. Нами было получено значительное увеличение средней концентрации метана (66,9%) при избыточном давлении 0,2 бар, которая была на 14,8% выше, чем в реакторе с избыточным давлением 0,1 бар и на 15,7% выше, чем в реакторе, работающем без давления.

С увеличением давления содержание  $\text{CH}_4$  в биогазе постепенно увеличивалось с 52,4% при 1 бар до 77,4% при 7 бар. Однако падение выхода  $\text{CH}_4$  (МРУ) наблюдалось при давлении 7 бар из-за падения рН до 6,7 в результате растворения избыточного  $\text{CO}_2$  [27]. Полученные нами результаты показали, что при снижении рН до 6,69 средняя концентрация метана в биогазе снизилась до 66,1%, тогда как средняя концентрация водорода была наибольшей – 1,7%, а средняя концентрация углекислого газа была наименьшей 32,3%.

Исследования Chen et al., посвященные непрерывному двухэтапному анаэробному сбраживанию под давлением, показали значительное снижение значения рН с 7,2 до 6,5 при повышении давления с 1 до 9 бар без какой-либо дополнительной корректировки рН [28].

**Заключение**

Таким образом, была продемонстрирована возможность производства биогаза с увеличенным содержанием метана при одноступенчатом анаэробном сбраживании молочной сыворотки при автотенеруемом избыточном давлении с использованием в качестве иммобилизующих материалов угольного войлока и пенополиуретановой пены при трех нагрузках по органическому веществу 6 г ХПК/(л сутки), 9,6 г ХПК/(л сутки) и 24 г ХПК/(л сутки) и ГВУ соответственно 24 ч, 15 ч и 6 ч. Было показано, что растворимость углекислого газа растёт при повышении давления в реакторе, но зависит и от нагрузки на реактор. Наибольший средний выход метана 66,9% наблюдали при избыточном давлении 0,2 бар и ГВУ 15 ч. Наибольшее удаление ХПК 91,11 % наблюдали при ГВУ 24 ч и избыточном давлении 0,1 бар, при котором средняя концентрация углекислого газа также была наименьшей 32,3%, а средняя концентрация водорода – наибольшей 1,7%, при этом средняя концентрация метана в биогазе составила 66,1%, а рН 6,69.

**Финансирование**

Проект № 21-79-10153.

**Конфликт интересов**

Не указан.

**Рецензия**

Куркина Ю.Н., Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», Белгород, Российская Федерация  
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.86.9>

**Funding**

Project No 21-79-10153.

**Conflict of Interest**

None declared.

**Review**

Kurkina Y.N., Federal State Autonomous Educational Institution of Higher Education «Belgorod State National Research University», Belgorod, Russian Federation  
DOI: <https://doi.org/10.60797/IRJ.2024.143.86.9>

**Список литературы на английском языке / References in English**

1. Detman A. Methane-yielding microbial communities processing lactate-rich substrates: a piece of the anaerobic digestion puzzle / A. Detman, D. Mielecki, Ł. Pleśniak [et al.] // *Biotechnology for Biofuels*. — 2018. — 11(1). — DOI:10.1186/s13068-018-1106-z
2. Demirel B. The roles of acetotrophic and hydrogenotrophic methanogens during anaerobic conversion of biomass to methane: a review / B. Demirel, P. Scherer // *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*. — 2008. — 7(2). — 173–190. — DOI:10.1007/s11157-008-9131-1
3. Fernandez C. Thermophilic anaerobic digestion of cheese whey: coupling  $\text{H}_2$  and  $\text{CH}_4$  production / C. Fernandez, M.J. Cuertos, E.J. Martínez [et al.] // *Biomass Bioenergy*. — 2015. — 81. — 55–62. — DOI: 10.1016/j.biombioe.2015.05.024.
4. Pasupuleti S.B. Single-stage fermentation process for high-value biohythane production with the treatment of distillery spent-wash / S.B. Pasupuleti, S. Venkata Mohan // *Bioresource Technology*. — 2015. — 189. — 177–185. — DOI: 10.1016/j.biortech.2015.0
5. Pasupuleti S.B. Single-stage fermentation process for high-value biohythane production with the treatment of distillery spent-wash / S.B. Pasupuleti, S.V. Mohan // *Bioresour. Technol.* — 2015. — 189. — P. 177–185
6. Vo T.P. Effects of hydraulic retention time on biohythane production via single-stage anaerobic fermentation in a two-compartment bioreactor / T.P. Vo, C.H. Lay, C.Y. Lin // *Bioresource technology*. — 2019. — DOI: 10.1016/j.biortech.2019.121869
7. Ta D.T. Biohythane production via single-stage anaerobic fermentation using entrapped hydrogenic and methanogenic bacteria / D.T. Ta, C.-Y. Lin, T. Ta [et al.] // *Bioresource Technology*. — 2019. — 122702. — DOI: 10.1016/j.biortech.2019.122702.
8. Laikova A.A. The feasibility of single-stage biohythane production in a semi-continuous thermophilic bioreactor: Influence of operating parameters on the process kinetics and microbial community dynamics / A.A. Laikova, A.A. Kovalev,



D.A. Kovalev [et al.] // *International Journal of Hydrogen Energy*. — 2024. — Volume 55. — P. 1486-1494. — DOI: 10.1016/j.ijhydene.2023.12.140

9. Ta D.-T. Biohythane production via single-stage fermentation using gel-entrapped anaerobic microorganisms: effect of hydraulic retention time / D.-T. Ta, C.-Y. Lin, T.-M.-N. Ta [et al.] // *Bioresource Technology*. — 123986. — 2020. — DOI:10.1016/j.biortech.2020

10. Laikova A.A. Feasibility of successive hydrogen and methane production in a single-reactor configuration of batch anaerobic digestion through bioaugmentation and stimulation of hydrogenase activity and direct interspecies electron transfer / A.A. Laikova, A.A. Kovalev, D.A. Kovalev [et al.] // *International Journal of Hydrogen Energy*. — 2023. — Volume 48. — Issue 34. — P. 12646-12660. — DOI: 10.1016/j.ijhydene.2022.12.231

11. Jiang H. Bio-hythane production from cassava residue by two-stage fermentative process with recirculation / H. Jiang, Y. Qin, S.I. Gadow [et al.] // *Bioresource Technology*. — 2018. — 247. — 769–775. — DOI: 10.1016/j.biortech.2017.09.102

12. Cooney M. Two-phase anaerobic digestion for production of hydrogen–methane mixtures / M. Cooney, N. Maynard, C. Cannizzaro [et al.] // *Bioresource Technology*. — 2007. — 98(14). — 2641–2651. — DOI: 10.1016/j.biortech.2006.09.054

13. Gómez Camacho C.E. Continuous two-step anaerobic digestion (TSAD) of organic market waste: rationalising process parameters / C.E. Gómez Camacho, B. Ruggeri, L. Mangialardi [et al.] // *Int J Energy Environ Eng*. — 2019. — 10:413–27.

14. Lindeboom R.E.F. Effect of substrate and cation requirement on anaerobic volatile fatty acid conversion rates at elevated biogas pressure / R.E.F. Lindeboom, I. Ferrer, J. Weijma [et al.] // *Bioresour Technol*. — 2013. — 150:60–6.

15. Postawa K. Innovations in anaerobic digestion: a model-based study / K. Postawa, J. Szczygieł, M. Kułazyński [et al.] // *Biotechnol Biofuels*. — 2021. — DOI: 10.1186/s13068-020-01864-z.

16. Budzianowski W. M. Renewable energy from biogas with reduced carbon dioxide footprint: Implications of applying different plant configurations and operating pressures / W. M. Budzianowski, K. Postawa // *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. — 2017. — 68. — 852–868. — DOI: 10.1016/j.rser.2016.05.076

17. Bär K. Development of an innovative two-stage fermentation process for high-calorific biogas at elevated pressure / K. Bär, W. Merkle, M. Tuczinski [et al.] // *Biomass Bioenerg*. — 2018. — 115. — P. 186–94.

18. Lindeboom R.E.F. Autogenerative high pressure digestion: anaerobic digestion and biogas upgrading in a single step reactor system / R.E.F. Lindeboom, F.G. Feroso, J. Weijma [et al.] // *Water Sci Technol*. — 2011. — 64:647–53.

19. Lindeboom R.E. High-caloric biogas production by keeping CO<sub>2</sub> in solution at autogenerated biogas pressures up to 20 bar / R.E. Lindeboom, J. Weijma, B. Van Jules Lier // *Environ Sci Technol*. — 2012. — DOI: 10.1021/es202633u.

20. Lemmer A. Influence of different substrates on the performance of a two-stage high pressure anaerobic digestion system / A. Lemmer, Y. Chen, J. Lindner [et al.] // *Bioresour Technol*. — 2015. — 178:313–8.

21. Merkle W. Influence of pressures up to 50 bar on two-stage anaerobic digestion / W. Merkle, K. Baer, J. Lindner [et al.] // *Bioresour Technol*. — 2017. — 232:72–8.

22. Lemmer A. Effects of organic loading rate on the performance of a pressurized anaerobic filter in two-phase anaerobic digestion / A. Lemmer // *Energies*. — 2014. — DOI: 10.3390/en7020736.

23. Mikheeva E.R. The Start-Up of Continuous Biohydrogen Production from Cheese Whey: Comparison of Inoculum Pretreatment Methods and Reactors with Moving and Fixed Polyurethane Carriers / E.R. Mikheeva, I.V. Katraeva, A.A. Kovalev [et al.] // *Appl. Sci*. — 2021. — 11. — 510. — DOI: 10.3390/app11020510

24. Lemmer A. Effects of high-pressure anaerobic digestion up to 30 bar on pH-value, production kinetics and specific methane yield / A. Lemmer, W. Merkle, K. Baer [et al.] // *Energy*. — 2017. — 138. — 659–667. — DOI: 10.1016/j.energy.2017.07.095

25. Lindeboom R.E.F. Autogenerative high pressure digestion: anaerobic digestion and biogas upgrading in a single step reactor system / R.E.F. Lindeboom, F.G. Feroso, J. Weijma [et al.] // *Water Sci Technol*. — 2011. — 64(3):647-53. — DOI: 10.2166/wst.2011.664.

26. Liang Z. Pressurised Anaerobic Digestion for Reducing the Costs of Biogas Upgrading / Z. Liang, D. Wilkinson, C. Wang [et al.] // *2023 BioEnergy Research*. — 16(4):1-10. — DOI: 10.1007/s12155-023-10602-w

27. Kim S. Production of high-calorific biogas from food waste by integrating two approaches: Autogenerative high-pressure and hydrogen injection / S. Kim, A. Mostafa, S. Im // *Water Res*. — 2021. — Apr 15:194:116920. — DOI: 10.1016/j.watres.2021.116920. — Epub 2021 Feb 10.

28. Chen Y. The pressure effects on two-phase anaerobic digestion / Y. Chen, B. Rößler, S. Zielonka [et al.] // *Applied Energy*. — 2014. — 116. — P. 409–415. — DOI: 10.1016/j.apenergy.2013.11.012