

УДК 579.222:546.11

## ПЕРСПЕКТИВЫ ПРИМЕНЕНИЯ ОТХОДОВ АЛКОГОЛЬНОЙ ПРОМЫШЛЕННОСТИ В ФОТОВЫДЕЛЕНИИ ВОДОРОДА ПУРПУРНОЙ БАКТЕРИЕЙ *RHODOBACTER SPHAEROIDES*<sup>1</sup>

Л. С. ГАБРИЕЛЯН<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>Ереванский государственный университет, ул. Алека Манукяна, 1, 0025, г. Ереван, Армения

В настоящее время рассматриваются возможности использования различных промышленных отходов при производстве биотоплива, что не только обеспечит новые, эффективные и дешевые источники молекулярного водорода ( $H_2$ ), но и поможет решить проблему утилизации отходов. Исследованы перспективы применения отходов алкогольной промышленности, таких как пивная дробина и зерновая барда, для получения  $H_2$  из пурпурной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* MDC6522. Представленные данные указывают на возможность использования зерновой барды и пивной дробины в качестве источников углерода для производства  $H_2$ . Продемонстрировано, что предварительная обработка отходов, их разведение и нейтрализация необходимы для обеспечения эффективного роста и выделения  $H_2$  у *R. sphaeroides*. Скорость роста и выход  $H_2$  при выращивании бактерий на разбавленной в 2 раза зерновой барде увеличивались в 2 и 4 раза соответственно по сравнению с таковыми у культуры, выращенной на стандартной среде Ормерада. Тогда как скорость роста и фотовыделение  $H_2$  при использовании разбавленной в 10 раз пивной дробины превышали в 2 раза рост и выход  $H_2$  в контрольном образце. Таким образом, результаты проведенного исследования свидетельствуют о том, что данные отходы алкогольной промышленности могут служить перспективными субстратами для получения биоводорода.

**Ключевые слова:** *Rhodobacter sphaeroides*; фотоброжение; биоводород; отходы алкогольной промышленности.

**Благодарность.** Работа выполнена при поддержке Комитета по науке Министерства образования, науки, культуры и спорта Республики Армения (научный проект № 18T-1F045).

## THE PROSPECTS OF ALCOHOL INDUSTRY WASTES APPLICATION IN PHOTOPRODUCTION OF HYDROGEN BY THE PURPLE BACTERIA *RHODOBACTER SPHAEROIDES*

L. S. GABRIELIAN<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Yerevan State University, 1 Alex Manoukian Street, Yerevan 0025, Armenia

The possibilities of using various industrial wastes to produce biofuel are currently being considered. It will provide not only novel, efficient and cheap sources of hydrogen ( $H_2$ ), but will also help to solve the problem of waste disposal.

<sup>1</sup>Материал статьи представлен в виде доклада на Международной научной конференции «Молекулярные, мембранные и клеточные основы функционирования биосистем», проводившейся в рамках XIV съезда Белорусского общественного объединения фотобиологов и биофизиков (Минск, 17–19 июня 2020 г.).

### Образец цитирования:

Габриелян ЛС. Перспективы применения отходов алкогольной промышленности в фотовыделении водорода пурпурной бактерией *Rhodobacter sphaeroides*. Журнал Белорусского государственного университета. Биология. 2021;1: 70–77.  
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-70-77>

### For citation:

Gabrielyan LS. The prospects of alcohol industry wastes application in photoproduction of hydrogen by the purple bacteria *Rhodobacter sphaeroides*. Journal of the Belarusian State University. Biology. 2021;1:70–77. Russian.  
<https://doi.org/10.33581/2521-1722-2021-1-70-77>

### Автор:

Лилит Сергеевна Габриелян – кандидат биологических наук, доцент; доцент кафедры биохимии, микробиологии и биотехнологии биологического факультета.

### Author:

Lilit S. Gabrielyan, PhD (biology), docent; associate professor at the department of biochemistry, microbiology and biotechnology, faculty of biology.  
[lgabrielyan@ysu.am](mailto:lgabrielyan@ysu.am)

The current work presents the prospects of application of alcohol industry wastes, such as distillers grains and brewery spent grains, for production of  $H_2$  by the purple bacteria *Rhodobacter sphaeroides* MDC6522. The data obtained showed the possibility of using distillers grains and brewery spent grains as effective carbon sources for producing  $H_2$ . It was shown that pre-treatment of wastes, their dilution and neutralization are necessary to ensure the effective bacterial growth and  $H_2$  production by *R. sphaeroides*. The growth rate and  $H_2$  yield during the cultivation of bacteria on a 2-fold diluted distillers grains medium increased 2- and 4-fold, respectively, compared with a culture, grown on standard Ormerod medium. At the same time, the growth rate and photoproduction of  $H_2$  on a 10-fold diluted brewery spent grains medium were 2-fold higher, in comparison with the control. Thus, the results obtained indicate that these alcohol industry wastes can be used as promising substrates for biohydrogen production.

**Keywords:** *Rhodobacter sphaeroides*; photofermentation; biohydrogen; alcohol industry wastes.

**Acknowledgements.** This study was supported by research grants from the Science Committee, Ministry of Education, Science, Culture and Sport of the Republic of Armenia (scientific project No.18T-1F045).

## Введение

Пурпурные несерные бактерии имеют весьма разнообразный метаболизм, поскольку способны расти как анаэробно при освещении (фототрофия), так и аэробно в темноте (хемотрофия), используя или органические соединения (гетеротрофия), или  $CO_2$  (автотрофия) в качестве источника углерода [1–4]. Не менее сложен и многообразен водородный метаболизм пурпурных бактерий: одновременно в них протекают различные реакции с поглощением или выделением водорода ( $H_2$ ) [2; 4; 5]. Водородный метаболизм пурпурных несерных бактерий обусловлен деятельностью двух ферментов – нитрогеназы и гидрогеназы [2; 4–6].

В последнее время возрос интерес к пурпурным несерным бактериям как эффективным продуцентам  $H_2$ , являющегося перспективным видом экологически чистого биотоплива [2; 4–7]. Пурпурные бактерии выделяют  $H_2$  в результате фотоброжения (*photofermentation*) органических соединений в процессе аноксигенного фотосинтеза [5–8].

Ранее нами было показано, что пурпурные несерные бактерии *Rhodobacter sphaeroides*, выделенные из минеральных источников Армении, способны к фотовыделению  $H_2$  в анаэробных условиях [8; 9]. При этом выход  $H_2$  может стимулироваться добавлением экзогенных органических источников углерода, азота и микроэлементов [10–13].

Одним из актуальных направлений водородной биотехнологии является создание оптимальных условий для более эффективного производства биоводорода. Выбор источника углерода – ключевой фактор для данного процесса. Крайне важно подобрать такие субстраты, которые могут эффективно усваиваться бактериями и обеспечивать высокие выход и продолжительность производства  $H_2$ , являясь при этом экономически выгодными. Не менее важно определить их оптимальные концентрации и необходимость предварительной обработки.

В настоящее время рассматриваются возможности использования различных промышленных отходов для получения биотоплива, что, с одной стороны, обеспечит новые, эффективные и недорогие источники  $H_2$ , а с другой – поможет решить проблему утилизации отходов [4; 14; 15]. Главные отходы алкогольной промышленности – зерновая барда (отход производства этанола) и пивная дробина (основной отход пивоварения) – являются экономически выгодными источниками белков, углеводов, органических и жирных кислот, аминокислот, а также витаминов [16–19]. Элементный состав указанных отходов отличается высоким содержанием важных микроэлементов (фосфора, калия, магния, кальция, натрия, железа).

Отходы спиртового и пивоваренного производства в мире составляют около 30 и 40 млн т в год соответственно (в Армении – в сумме около 5 млн т в год), из которых, по разным данным, перерабатывается примерно 10–15 % [14; 15]. При этом единственным практическим направлением переработки, например, зерновой барды является производство кормовых добавок из твердой фазы, а жидкая фаза (около 80–90 %) остается невостребованной и сбрасывается в окружающую среду, загрязняя ее вследствие содержания лабильных веществ, таких как белки, аминокислоты, сахара и углеводы, которые в разбавленной водной среде могут подвергаться процессам окисления, брожения и гниения [20]. Такой подход к использованию сырья, безусловно, нельзя считать рациональным.

В данной работе исследованы перспективы применения зерновой барды и пивной дробины для получения  $H_2$  из пурпурной бактерии *R. sphaeroides* MDC6522.

## Материалы и методы исследования

**Штамм, условия культивирования и характеристика роста.** В работе использовали пурпурную бактерию *R. sphaeroides* MDC6522 (Центр депонирования микробов Национальной академии наук Республики Армения, WDCM803), выделенную из минерального источника Джермук в Армении [8; 9]. Бактерии *R. sphaeroides* выращивались в анаэробных условиях в термостате типа ТПС-3 при температуре  $(30,0 \pm 0,2)^\circ\text{C}$  и освещении 2000 лк ( $50 \text{ Вт/м}^2$ ) в течение 96 ч на жидкой питательной среде Ормера, содержащей  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (0,9 г/л),  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (0,6 г/л),  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,2 г/л),  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (0,075 г/л),  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (0,012 г/л), ЭДТА (0,02 г/л), сукцинат (30 ммоль/л) в качестве источника углерода, дрожжевой экстракт (2 г/л) в качестве источника азота и витаминов, а также микроэлементы [8–10]. Для освещения использовали галогеновые лампы (мощность 60 Вт). Интенсивность света измеряли люксметром LM37 (*Carl Roth*, Германия) [9; 10].

За ростом бактерий следили по изменению оптической плотности (ОП) суспензии с помощью спектрофотометра Spectro UV-Vis Auto (*Labomed*, США) при длине волны 660 нм ( $\text{ОП}_{660}$ ) [8–10]. Удельную скорость роста ( $\mu$ ) определяли как частное от деления  $0,693 (\ln 2)$  на время удвоения ОП ( $\tau$ ) в интервале, когда изменение ОП во времени носило линейный характер, и выражали в часах в минус первой степени:

$$\mu = \frac{0,693}{\tau} \quad [8; 10].$$
 Для получения спектров поглощения бактериальной суспензии в диапазоне длин волн 400–1000 нм использовали тот же спектрофотометр [9]. Величину pH определяли с помощью pH-метра селективным электродом типа HJ1131B (*Hanna Instruments*, Португалия). Начальное значение pH ростовой среды поддерживали на уровне  $7,5 \pm 0,1$  [8–10].

**Определение окислительно-восстановительного потенциала (ОВП) среды и выделения  $\text{H}_2$ .** Величину ОВП определяли с помощью цифровых иономеров И-160МП (ОАО «Гомельский завод измерительных приборов», Беларусь) с использованием платинового электрода ЭПВ-01, как описано ранее [10; 14; 15]. Потенциал данного электрода (относительно электрода сравнения) в контрольном растворе, содержащем смесь ферро- и феррицианидов калия, составлял  $(254 \pm 5) \text{ мВ}$  при температуре  $25^\circ\text{C}$ . После стабилизации показаний платинового электрода рассчитывали выход  $\text{H}_2$  на основе изменения величины ОВП и выражали в миллимолях на литр, как описано ранее [8; 9].

**Характеристики зерновой барды и пивной дробины, предварительная обработка отходов.** Барда из обыкновенной (хлебной) пшеницы *Triticum aestivum* L. была предоставлена ликеро-водочным заводом «Алекс Григ» (Армения). Зерновая барда – полидисперсная система желто-коричневого цвета с дрожжевым ароматом, в которой компоненты растворены и суспендированы. Она получается при производстве этанола с использованием дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*. Необработанную барду фильтровали через вату и бумажный фильтр. Поскольку pH барды составлял  $\sim 3,5$ , до автоклавирования его уровень доводили до  $7,5 \pm 0,1$  с помощью NaOH. Затем фильтрат стерилизовали автоклавированием при  $121^\circ\text{C}$  в течение 20 мин и использовали во время экспериментов [15].

Пивная дробина была предоставлена ЗАО «Ереванское пиво» (Армения). Первый этап обработки пивной дробины включал кислотный гидролиз содержащейся в ней лигноцеллюлозы с использованием 0,7 % раствора серной кислоты и автоклавирование при  $121^\circ\text{C}$ , после чего гидролизат фильтровали, доводили уровень pH до  $7,5 \pm 0,1$  и снова стерилизовали [14]. В работе использовались отходы, разбавленные в 2, 5, 10 и 20 раз.

**Использованные реактивы и статистический анализ.** При проведении исследования применяли реактивы аналитической чистоты производства компаний *Carl Roth* (Германия) и *Sigma-Aldrich* (США). Статистическую обработку опытных данных выполняли с помощью компьютерной программы *Excel*. В статье приводятся средние арифметические значения из не менее 4 независимых экспериментов со среднеквадратическим отклонением результатов измерений и критерием достоверности Стьюдента для разницы результатов различных серий экспериментов [8; 10]. Данные считаются достоверными при  $p < 0,05$ .

## Результаты и их обсуждение

Использование отходов спиртового и пивоваренного производства в биотехнологии микроорганизмов экономически более выгодно, чем применение дорогостоящих источников углерода и азота. Зерновая барда и пивная дробина содержат необходимые для роста бактерий органические кислоты, углеводы, аминокислоты и витамины [16–19]. Возможность использования данных отходов для получения  $\text{H}_2$  из пурпурных бактерий обеспечит дешевые источники  $\text{H}_2$  и поможет решить проблему утилизации промышленных отходов.

Рост *R. sphaeroides* MDC6522 контролировали в средах, содержащих зерновую барду, разбавленную в 2 и 5 раз, и пивную дробину, разбавленную в 5 и 10 раз. В качестве контроля использовали культуру бактерий, выращенных на стандартной среде Ормерода с сукцинатом (30 ммоль/л) в качестве источника углерода. Сукцинат является одним из самых перспективных источников углерода для пурпурных бактерий [10; 12; 13]. Он присутствует в различных органических отходах, и анализ их утилизации может объяснить применение отходов при производстве  $H_2$  [16–18].

Как видно из рис. 1, удельная скорость роста *R. sphaeroides*, выращенной на зерновой барде и пивной дробине, примерно в 1,5 раза превышала скорость роста контрольных клеток бактерии, выращенной на стандартной среде Ормерода. Максимальный рост бактерий был зафиксирован в среде, содержащей барду, разбавленную в 2 раза, и дробину, разбавленную в 10 раз. На неразбавленных отходах роста бактерий не наблюдалось, что может быть связано с высокой концентрацией органических кислот и сахаров [16; 17; 19]. Как известно, высокое содержание сахаров может подавлять рост бактерий и образование  $H_2$  [21]. Таким образом, разбавление отходов необходимо для оптимизации концентрации органических соединений и обеспечения роста бактерий.

Известно, что в процессе фототрофного роста пурпурных бактерий происходит синтез фотосинтетического аппарата, который представлен двумя светособирающими комплексами – B800–850 и B875 [9]. В состав этих комплексов входят фотосинтетические пигменты (бактериохлорофилл *a* (Бхл *a*) и каротиноиды). В работе были получены спектры поглощения клеточных суспензий *R. sphaeroides* MDC6522, выращенных на средах, содержащих отходы алкогольной промышленности (рис. 2). Как видно из рис. 2, во всех спектрах поглощения в диапазоне длин волн 400–1000 нм наблюдаются несколько максимумов, типичных для пурпурных бактерий [9]. Эти максимумы указывают на наличие Бхл *a* (590; 800; 850 и 875 нм) и каротиноидов (450; 478 и 510 нм) соответственно. При культивировании бактерии на разбавленной в 2 раза барде и разбавленной в 10 раз дробине отмечается рост максимумов поглощения, типичных для каротиноидов, и уровня комплекса B800–850 (см. рис. 2). Данный комплекс участвует в аккумуляции и передаче световой энергии реакционному центру, тем самым и способствуя синтезу водорода [9].

Как известно, ОВП является важным параметром, определяющим рост бактерий. В работе была исследована кинетика ОВП при анаэробном росте *R. sphaeroides* MDC6522 на различных средах. Рост контрольных клеток *R. sphaeroides* на среде Ормерода сопровождался падением величины ОВП от положительных значений  $(+(130 \pm 10) \text{ мВ})$  в начале лаг-фазы до низких отрицательных значений  $(-(550 \pm 10) \text{ мВ})$  по истечении 72 ч (рис. 3). При росте бактерии на отходах наблюдалось более резкое

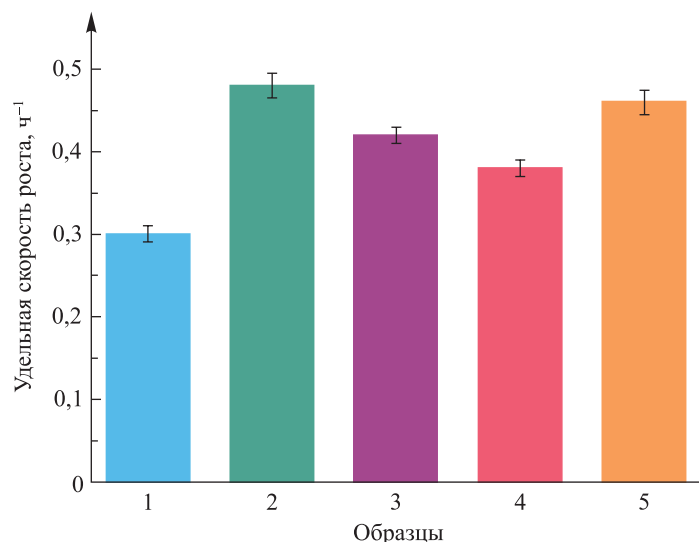


Рис. 1. Удельная скорость роста *R. sphaeroides* MDC6522 при культивировании на средах, содержащих отходы алкогольной промышленности.

Здесь и далее: образец 1 – контроль (стандартная среда Ормерода);  
образец 2 – разбавленная в 2 раза зерновая барда; образец 3 – разбавленная в 5 раз зерновая барда;  
образец 4 – разбавленная в 5 раз пивная дробина; образец 5 – разбавленная в 10 раз пивная дробина

Fig. 1. The specific growth rate of *R. sphaeroides* MDC6522 cultivated on alcohol industry wastes containing media.

Here and after: sample 1 – control (standard Ormerod medium);  
sample 2 – 2-fold diluted distillers grains medium; sample 3 – 5-fold diluted distillers grains medium;  
sample 4 – 5-fold diluted brewery spent grains medium; sample 5 – 10-fold diluted brewery spent grains medium

снижение ОВП. Максимальное падение ОВП (до  $-(715 \pm 20)$  мВ) было зарегистрировано при выращивании бактерий на разбавленной в 2 раза барде (см. рис. 3). Такое падение ОВП свидетельствует об усилении восстановительных процессов, что характерно для бактериального метаболизма в анаэробных условиях, а также о выделении  $H_2$  [8; 10; 14].

В нашей лаборатории установлена связь между падением ОВП и выделением  $H_2$  у *R. sphaeroides* [8–10]. Как известно, пурпурные бактерии выделяют  $H_2$  при участии нитрогеназы, тогда как гидрогеназа ответственна за поглощение (окисление)  $H_2$  [2]. Согласно полученным результатам, несмотря на то что сукцинат является наиболее эффективным источником углерода при производстве биоводорода, выход  $H_2$  на разбавленной в 2 раза барде превышал в 4 раза выход  $H_2$  в *R. sphaeroides* MDC6522, выращенной на среде Ормерода (рис. 4). Выделение  $H_2$  при использовании разбавленной в 10 раз пивной дробины возрастало в 2,5 раза по сравнению с контрольным образцом. При остальных разбавлениях отходов выход  $H_2$  был значительно ниже, чем у бактерии, выращенной на среде Ормерода (не показано).

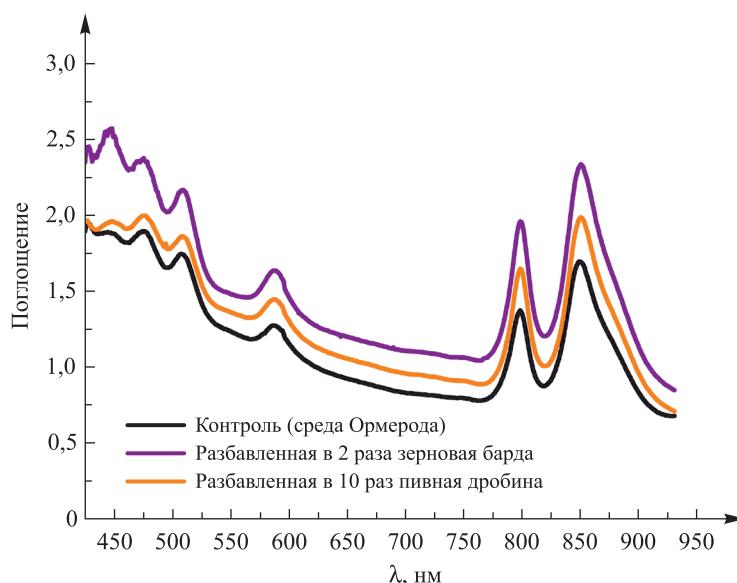


Рис. 2. Спектры поглощения *R. sphaeroides* MDC6522, выращенной на средах, содержащих отходы алкогольной промышленности.

Контроль – культура бактерий, выращенных на стандартной среде Ормерода

Fig. 2. Absorption spectra of *R. sphaeroides* MDC6522 grown on alcohol industry wastes containing media. Control was bacteria grown on standard Ormerod medium

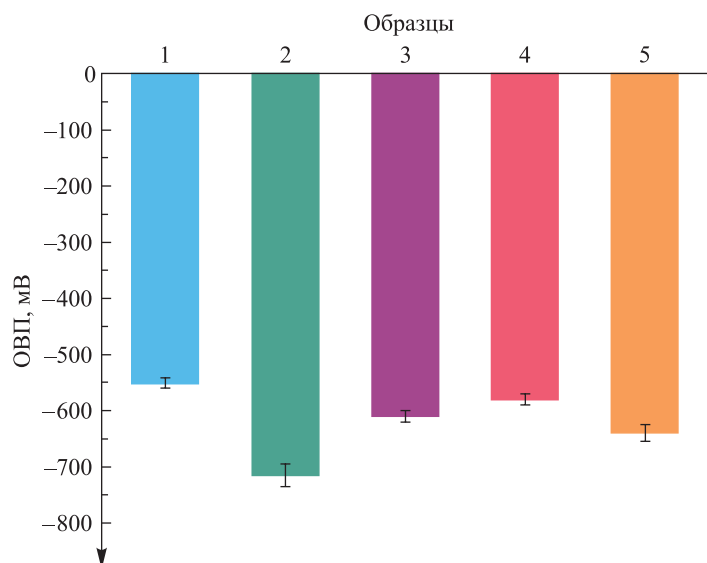


Рис. 3. Изменение ОВП среды при росте *R. sphaeroides* MDC6522

Fig. 3. Changes of medium redox potential during growth of *R. sphaeroides* MDC6522



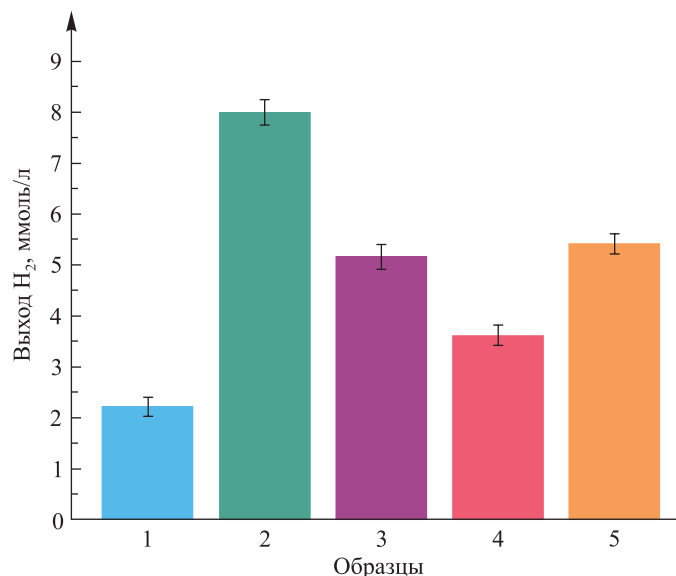


Рис. 4. Выход  $H_2$  в *R. sphaeroides* MDC6522 при росте на средах, содержащих отходы алкогольной промышленности

Fig. 4.  $H_2$  yield in *R. sphaeroides* MDC6522 grown on alcohol industry wastes containing media

Увеличение выхода  $H_2$  может быть связано с активацией различных метаболических путей, что приводит к усиленному росту бактерий и выделению  $H_2$ . Отходы алкогольной промышленности, кроме сахаров и органических кислот, содержат значительное количество аминокислот, которые являются источниками азота, необходимого в производстве  $H_2$ , и могут влиять на активность нитрогеназы – ключевого фермента, катализирующего выделение  $H_2$  пурпурными бактериями [2; 5; 8].

### Закключение

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что отходы алкогольной промышленности могут служить перспективными субстратами для получения биоводорода. Это не только обеспечит эффективные и дешевые источники  $H_2$ , но и поможет решить проблему утилизации отходов. Проблема производства  $H_2$  является комплексной, но при разработке новых подходов и использовании промышленных отходов она может получить принципиально новые решения, важные как с фундаментальной, так и с практической точки зрения.

### Библиографические ссылки

1. Петушкова ЕП, Цыганков АА. Метаболизм ацетата у пурпурной несерной бактерии *Rhodobacter capsulatus*. *Биохимия*. 2017;82(5):786–807.
2. Цыганков АА, Хуснутдинова АН. Участие  $H_2$  в метаболизме пурпурных бактерий и перспективы практического использования. *Микробиология*. 2015;84(1):3–26. DOI: 10.7868/S0026365615010152.
3. Willison JC. Biochemical genetics revisited: the use of mutants to study carbon and nitrogen metabolism in the photosynthetic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 1993;10(1–2):1–38. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1993.tb05862.x.
4. Dinesh GH, Nguyen DD, Ravindran B, Chang SW, Vo DVN, Bach Q-V, et al. Simultaneous biohydrogen ( $H_2$ ) and bioplastic (poly- $\beta$ -hydroxybutyrate-PHB) productions under dark, photo, and subsequent dark and photo fermentation utilizing various wastes. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2020;45(10):5840–5853. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.09.036.
5. Androga DD, Özgür E, Eroglu I, Gündüz U, Yücel M. Photofermentative hydrogen production in outdoor conditions. In: Minić D, editor. *Hydrogen energy – challenges and perspectives*. London: IntechOpen; 2012. p. 77–120. DOI: 10.5772/50390.
6. Morsy FM, Elbahloul Y, Elbadry M. Photoheterotrophic growth of purple non-sulfur bacteria on tris acetate phosphate yeast extract (TAPY) medium and its hydrogen productivity in light under nitrogen deprivation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2019;44(18):9282–9290. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.02.086.
7. Hu C, Choy S-Y, Giannis A. Evaluation of lighting systems, carbon sources, and bacteria cultures on photofermentative hydrogen production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2018;185(1):257–269. DOI: 10.1007/s12010-017-2655-5.
8. Gabrielyan L, Sargsyan H, Trchounian A. Novel properties of photofermentative biohydrogen production by purple bacteria *Rhodobacter sphaeroides*: effects of protonophores and inhibitors of responsible enzymes. *Microbial Cell Factories*. 2015;14(1):131. DOI: 10.1186/s12934-015-0324-3.

9. Sargsyan H, Gabrielyan L, Hakobyan L, Trchounian A. Light-dark duration alternation effects on *Rhodobacter sphaeroides* growth, membrane properties and bio-hydrogen production in batch culture. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2015;40(11):4084–4091. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2015.01.163.
10. Hakobyan L, Gabrielyan L, Trchounian A. Biohydrogen by *Rhodobacter sphaeroides* during photo-fermentation: mixed vs sole carbon sources enhance bacterial growth and H<sub>2</sub> production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2019;44(2):674–679. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2018.11.082.
11. Hakobyan L, Gabrielyan L, Trchounian A. Biohydrogen production and the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase activity of *Rhodobacter sphaeroides*: effects of various heavy metal ions. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012;37(23):17794–17800. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.09.091.
12. Feng J, Yang H, Guo L. The photosynthetic hydrogen production performance of a newly isolated *Rhodobacter capsulatus* JL1 with various carbon sources. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2018;43(30):13860–13868. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2018.03.144.
13. Han H, Liu B, Yang H, Shen J. Effect of carbon sources on the photobiological production of hydrogen using *Rhodobacter sphaeroides* RV. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012;37(17):12167–12174. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.03.134.
14. Poladyan A, Trchounian K, Vassilian A, Trchounian A. Hydrogen production by *Escherichia coli* using brewery waste: optimal pretreatment of waste and role of different hydrogenases. *Renewable Energy*. 2018;115:931–936. DOI: 10.1016/j.renene.2017.09.022.
15. Sargsyan H, Gabrielyan L, Trchounian A. The distillers grains with solubles as a perspective substrate for obtaining biomass and producing biohydrogen by *Rhodobacter sphaeroides*. *Biomass and Bioenergy*. 2016;90:90–94. DOI: 10.1016/j.biombioe.2016.03.042.
16. Кайшев АШ, Кайшева НШ. Биологически активные вещества отходов спиртового производства. *Фармация и фармакология*. 2014;2(4):3–22. DOI: 10.19163/2307-9266-2014-2-4(5).
17. Liu K. Chemical composition of distillers grains, a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(5):1508–1526. DOI: 10.1021/jf103512z.
18. Mussatto SI. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014;94(7):1264–1275. DOI: 10.1002/jsfa.6486.
19. Muthusamy N. Chemical composition of brewers spent grain – a review. *International Journal of Science, Environment and Technology*. 2014;3(6):2109–2112.
20. Кайшева НШ, Кайшев АШ, Микелов ВА, Саморядова АБ. Обеспечение безопасности послеспиртовой зерновой барды для окружающей среды. *Известия Самарского научного центра Российской академии наук*. 2017;19(5, часть 2):260–263.
21. Trchounian K, Trchounian A. Hydrogen production from glycerol by *Escherichia coli* and other bacteria: an overview and perspectives. *Applied Energy*. 2015;156:174–184. DOI: 10.1016/j.apenergy.2015.07.009.

## References

1. Petushkova EP, Tsygankov AA. Acetate metabolism in the purple non-sulfur bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *Biokhimiya*. 2017;82(5):786–807. Russian.
2. Tsygankov AA, Khusnutdinova AN. Hydrogen in metabolism of purple bacteria and prospects of practical application. *Mikrobiologiya*. 2015;84(1):3–26. Russian. DOI: 10.7868/S0026365615010152.
3. Willison JC. Biochemical genetics revisited: the use of mutants to study carbon and nitrogen metabolism in the photosynthetic bacteria. *FEMS Microbiology Reviews*. 1993;10(1–2):1–38. DOI: 10.1111/j.1574-6968.1993.tb05862.x.
4. Dinesh GH, Nguyen DD, Ravindran B, Chang SW, Vo DVN, Bach Q-V, et al. Simultaneous biohydrogen (H<sub>2</sub>) and bioplastic (poly-β-hydroxybutyrate-PHB) productions under dark, photo, and subsequent dark and photo fermentation utilizing various wastes. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2020;45(10):5840–5853. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.09.036.
5. Androga DD, Özgür E, Eroglu I, Gündüz U, Yücel M. Photofermentative hydrogen production in outdoor conditions. In: Minić D, editor. *Hydrogen energy – challenges and perspectives*. London: IntechOpen; 2012. p. 77–120. DOI: 10.5772/50390.
6. Morsy FM, Elbahloul Y, Elbadry M. Photoheterotrophic growth of purple non-sulfur bacteria on tris acetate phosphate yeast extract (TAPY) medium and its hydrogen productivity in light under nitrogen deprivation. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2019;44(18):9282–9290. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2019.02.086.
7. Hu C, Choy S-Y, Giannis A. Evaluation of lighting systems, carbon sources, and bacteria cultures on photofermentative hydrogen production. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. 2018;185(1):257–269. DOI: 10.1007/s12010-017-2655-5.
8. Gabrielyan L, Sargsyan H, Trchounian A. Novel properties of photofermentative biohydrogen production by purple bacteria *Rhodobacter sphaeroides*: effects of protonophores and inhibitors of responsible enzymes. *Microbial Cell Factories*. 2015;14(1):131. DOI: 10.1186/s12934-015-0324-3.
9. Sargsyan H, Gabrielyan L, Hakobyan L, Trchounian A. Light-dark duration alternation effects on *Rhodobacter sphaeroides* growth, membrane properties and bio-hydrogen production in batch culture. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2015;40(11):4084–4091. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2015.01.163.
10. Hakobyan L, Gabrielyan L, Trchounian A. Biohydrogen by *Rhodobacter sphaeroides* during photo-fermentation: mixed vs sole carbon sources enhance bacterial growth and H<sub>2</sub> production. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2019;44(2):674–679. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2018.11.082.
11. Hakobyan L, Gabrielyan L, Trchounian A. Biohydrogen production and the F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-ATPase activity of *Rhodobacter sphaeroides*: effects of various heavy metal ions. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012;37(23):17794–17800. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.09.091.
12. Feng J, Yang H, Guo L. The photosynthetic hydrogen production performance of a newly isolated *Rhodobacter capsulatus* JL1 with various carbon sources. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2018;43(30):13860–13868. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2018.03.144.
13. Han H, Liu B, Yang H, Shen J. Effect of carbon sources on the photobiological production of hydrogen using *Rhodobacter sphaeroides* RV. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012;37(17):12167–12174. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.03.134.
14. Poladyan A, Trchounian K, Vassilian A, Trchounian A. Hydrogen production by *Escherichia coli* using brewery waste: optimal pretreatment of waste and role of different hydrogenases. *Renewable Energy*. 2018;115:931–936. DOI: 10.1016/j.renene.2017.09.022.
15. Sargsyan H, Gabrielyan L, Trchounian A. The distillers grains with solubles as a perspective substrate for obtaining biomass and producing biohydrogen by *Rhodobacter sphaeroides*. *Biomass and Bioenergy*. 2016;90:90–94. DOI: 10.1016/j.biombioe.2016.03.042.

16. Kayshev AS, Kaysheva NS. Biologically active substances of spirit production waste. *Farmatsiya i farmakologiya*. 2014;2(4): 3–22. Russian. DOI: 10.19163/2307-9266-2014-2-4(5).
17. Liu K. Chemical composition of distillers grains, a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(5):1508–1526. DOI: 10.1021/jf103512z.
18. Mussatto SI. Brewer's spent grain: a valuable feedstock for industrial applications. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2014;94(7):1264–1275. DOI: 10.1002/jsfa.6486.
19. Muthusamy N. Chemical composition of brewers spent grain – a review. *International Journal of Science, Environment and Technology*. 2014;3(6):2109–2112.
20. Kaisheva NSh, Kaishev AS, Mikelov VA, Samoryadova AB. Ensuring the safety of the after-surge grain bard for the environment. *Izvestiya Samarskogo nauchnogo tsentra Rossiiskoi akademii nauk*. 2017;19(5, part 2):260–263. Russian.
21. Trchounian K, Trchounian A. Hydrogen production from glycerol by *Escherichia coli* and other bacteria: an overview and perspectives. *Applied Energy*. 2015;156:174–184. DOI: 10.1016/j.apenergy.2015.07.009.

Статья поступила в редколлегию 30.06.2020.  
Received by editorial board 30.06.2020.