

**НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
“КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО”**

Факультет біотехнології і біотехніки

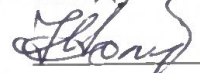
Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

«На правах рукопису»

УДК 606:628

До захисту допущено:

Завідувач кафедри

 Наталія ГОЛУБ

«20» травня 2026 р.

Магістерська дисертація

на здобуття ступеня магістра

за освітньо-науковою програмою «Біотехнології»

зі спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»

на тему: «Вплив комплексів феруму та нікелю на синтез біоводню»

Виконав:

Студент 2 курсу, групи ББ-41мн

Бондаренко Андрій Ігорович



Науковий керівник:

Ст.викладач. каф. біоенергетики, біоінформатики

та екобіотехнології, к.т.н.,

Дем'яненко Ірина Володимирівна



Консультант з розділу: економічна частина

Доц. каф. економіки і підприємства, к.е.н., доц.

Погребняк Анна Юріївна



Рецензент:

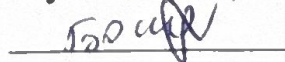
Директор ТОВ «Про-Енерджі», к.ф.-м.н.,

Делідон Руслан Миколайович



Засвідчую, що у цій магістерській дисертації
немає запозичень з праць інших авторів без
відповідних посилань.

Студент (-ка)



Київ – 2026

Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

Рівень вищої освіти – другий (магістерський)
Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»
Освітньо-наукова програма «Біотехнології»



ЗАТВЕРДЖУЮ
Директор ІОВ «Про-Енерджі»
Рустан ДЕЛІДОН
2026 р.

ЗАТВЕРДЖУЮ
Завідувачка кафедри
Наталія ГОЛУБ
« 10 » 02 2026 р.

ЗАВДАННЯ

на магістерську дисертацію студенту

Бондаренко Андрію Ігоровичу

1. Тема дисертації «Вплив комплексів феруму та нікелю на синтез біоводню», науковий керівник дисертації – Дем'яненко Ірина Володимирівна, к.т.н. затверджені наказом університету від « 02 » Вісім 2026 р. № 1378-с

2. Термін подання студентом дисертації 22 травня 2026 р

3. Об'єкт дослідження: процес темного бродіння органічного субстрату (відходи переробки яблука та курячий послід) для отримання біоводню.

4. Вихідні дані: відходи переробки яблука та курячий послід, хелатоване залізо та комплекс нікелю.

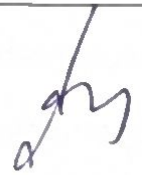
5. Перелік завдань, які потрібно розробити: провести аналіз літературних даних щодо біохімічних механізмів темного бродіння та ролі металоферментів (гідрогеназ) у метаболізмі воднепродукуючих мікроорганізмів; дослідити вплив іонів Fe^{3+} у концентраціях (0,1; 1; 10 мг/дм³) на кінетику накопичення та кумулятивний вихід біоводню та визначити її ефективне значення; дослідити вплив іонів Ni^{2+} у концентраціях (0,1; 1; 10 мг/дм³) на кінетику накопичення та кумулятивний вихід

біоводню та визначити її ефективне значення; дослідити комплексний вплив іонів Ni^{2+} та Fe^{3+} у концентраціях (1+1; 10+10 мг/дм³) на кінетику накопичення та кумулятивний вихід біоводню та визначити її ефективне значення; розробити прогностичні математичні моделі на основі теоретичних та експериментальних даних інтенсифікації синтезу біоводню для практичного застосування в біотехнологічних системах; сформулювати концепцію стартап-проєкту та визначити заходи безпеки під час виконання досліджень.

6. Орієнтовний перелік ілюстративного матеріалу: презентація за результатами досліджень: згенеровані результати розроблених програм, таблиці, діаграми, графіки для точки беззбитковості.

7. Орієнтовний перелік публікацій: 2 тези конференцій.

8. Консультанти розділів дисертації:

Розділ	Прізвище, ініціали та посада консультанта	Підпис, дата	
		Завдання видав	Завдання прийняв
Стартап-проєкт	Погребняк А. Ю. доц. каф. економіки і підприємництва		

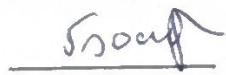
9. Дата видачі завдання 10. 02. 2026

Календарний план

№ з/п	Назва етапів виконання магістерської дисертації	Термін виконання етапу	Примітка
1	Аналіз наукової літератури за темою дослідження	02.02.26 - 11.02.26	Виконано
2	Формування алгоритму проведення експерименту	12.02.26 - 15.02.26	Виконано
3	Методологічне обґрунтування та опис обраних підходів	16.02.26 - 21.02.26	Виконано
4	Проведення практичного етапу досліджень	22.02.26 - 21.03.26	Виконано
5	Написання тез	01.03.26 - 13.04.26	Виконано
6	Написання розділу «Результати і обговорення»	22.03.26 - 14.04.26	Виконано
7	Розробка стартап-проєкту	15.04.26 - 20.04.26	Виконано
8	Охорона праці та безпека в надзвичайних ситуаціях	21.04.26 - 30.04.26	Виконано
9	Оформлення магістерської дисертації	01.05.26 - 13.05.26	Виконано
10	Підготовка до захисту дисертації. Попередній захист	13.05.26	Виконано

Студент

Науковий керівник



Андрій БОНДАРЕНКО



Ірина ДЕМ'ЯНЕНКО

РЕФЕРАТ

Магістерська робота присвячена дослідженню впливу комплексів феруму та нікелю на синтез біоводню в процесі темної ферментації органічних субстратів. Робота спрямована на вирішення актуальної науково-практичної проблеми підвищення ефективності біотехнологічного виробництва екологічно чистих енергоносіїв.

Актуальність теми. У сучасних умовах глобальної енергетичної трансформації, спрямованої на зменшення викидів парникових газів та розвиток відновлюваної енергетики, біоводень розглядається як один із найбільш перспективних альтернативних енергоносіїв. Особливу увагу привертає технологія темної ферментації органічних відходів, яка дозволяє поєднати утилізацію біомаси з отриманням енергії. Проте її промислове впровадження обмежується низьким виходом водню та нестабільністю процесу. Однією з ключових причин є недостатня активність металоферментів (гідрогеназ), функціонування яких залежить від наявності іонів перехідних металів, зокрема феруму та нікелю. Визначення оптимальних концентрацій цих металів, які стимулюють синтез біоводню без токсичного впливу на мікробний консорціум, є важливим науковим і прикладним завданням.

Мета роботи полягає у встановленні ефективних концентрацій іонів Fe^{3+} та Ni^{2+} , а також їх комплексного впливу на інтенсифікацію синтезу біоводню під час темного бродіння та побудові математичних моделей процесу.

Об'єкт дослідження — процес темної ферментації органічних відходів (яблучний жом та курячий послід).

Предмет дослідження — вплив концентрацій іонів феруму та нікелю на кінетику та ефективність синтезу біоводню.

У роботі проведено аналіз біохімічних механізмів воднеутворення за участю бактерій роду *Clostridium*, досліджено роль металоферментів ($[\text{FeFe}]$ -

та [NiFe]-гідрогеназ) та обґрунтовано значення мікроелементів як кофакторів у процесах біосинтезу водню. Експериментальна частина включає дослідження впливу різних концентрацій іонів Fe^{3+} та Ni^{2+} (0,1–10 мг/дм³), а також їх комбінованого внесення на об'єм біогазу та вміст молекулярного водню.

Отримані результати свідчать про наявність дозозалежного ефекту впливу металів та їх синергізму. Встановлено, що оптимальні концентрації металів сприяють підвищенню швидкості газоутворення та кумулятивного виходу біоводню, тоді як їх надлишок викликає інгібування мікробіологічної активності. Розроблено математичні моделі, які описують кінетику процесу та дозволяють прогнозувати ефективність синтезу біоводню залежно від концентрації металів.

Наукова новизна полягає у створенні прогностичних моделей впливу іонів феруму та нікелю на процес темної ферментації та встановленні оптимальних параметрів їх застосування для інтенсифікації біоводневого синтезу.

Практичне значення роботи полягає у можливості використання отриманих результатів для оптимізації роботи біореакторів, підвищення виходу біоводню та розробки інноваційних біотехнологічних рішень, зокрема у сфері переробки агропромислових відходів.

Ключові слова: біоводень, темнова ферментація, ферум, нікель, гідрогенази, мікробний консорціум, біогаз, математичне моделювання.

ABSTRACT

The master's thesis is devoted to investigating the influence of iron and nickel complexes on biohydrogen production during dark fermentation of organic substrates. The study addresses a relevant scientific and practical problem related to improving the efficiency of biotechnological production of environmentally friendly energy carriers.

Relevance of the study. In the context of the global energy transition aimed at reducing greenhouse gas emissions and expanding renewable energy sources, molecular hydrogen is considered one of the most promising alternative energy carriers. Dark fermentation of organic waste represents a particularly attractive technology, as it enables the integration of biomass utilization with energy generation. However, its industrial implementation is limited by low hydrogen yields and process instability. One of the key limiting factors is the insufficient activity of metalloenzymes (hydrogenases), whose functioning depends on the availability of transition metal ions, particularly iron and nickel. Therefore, determining optimal concentrations of these metals that stimulate biohydrogen production without exerting toxic effects on microbial consortia is a critical scientific and applied task .

The aim of the study is to determine the effective concentrations of Fe^{3+} and Ni^{2+} ions, as well as their combined effect on enhancing biohydrogen production during dark fermentation, and to develop mathematical models of the process.

Object of the study — the process of dark fermentation of organic substrates (apple pomace and poultry manure).

Subject of the study — the influence of iron and nickel ion concentrations on the kinetics and efficiency of biohydrogen production.

The work includes an analysis of biochemical mechanisms of hydrogen production involving *Clostridium* spp., with particular emphasis on the role of metalloenzymes ([FeFe]- and [NiFe]-hydrogenases) and the importance of trace

metals as cofactors in hydrogen biosynthesis. The experimental part investigates the effects of various concentrations of Fe^{3+} and Ni^{2+} ions (0.1–10 mg/L), as well as their combined application, on biogas volume and hydrogen content.

The results demonstrate a dose-dependent effect of metal ions and their synergistic interaction. Optimal concentrations were found to enhance gas production rates and cumulative hydrogen yield, whereas excessive concentrations inhibited microbial activity. Mathematical models describing the kinetics of the process were developed, enabling prediction of biohydrogen production efficiency depending on metal concentrations.

Scientific novelty lies in the development of predictive models describing the influence of iron and nickel ions on dark fermentation and in determining optimal parameters for intensifying biohydrogen production.

Practical significance of the study consists in the potential application of the obtained results for optimizing bioreactor performance, increasing biohydrogen yield, and developing innovative biotechnological solutions for agro-industrial waste valorization.

Keywords: biohydrogen, dark fermentation, iron, nickel, hydrogenases, microbial consortium, biogas, mathematical modeling.

ЗМІСТ

ВСТУП	8
РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ ЗА ТЕМОЮ ДОСЛІДЖЕННЯ	11
1.1 Біологічні та біохімічні особливості воднепродукуючих мікроорганізмів.....	11
1.1.1 Біологічна характеристика та екологія бактерій роду <i>Clostridium</i> у системах темної ферментації.....	11
1.1.2 Метаболічні шляхи утилізації вуглеводів: домінування бутиратного шляху	12
1.1.3. Синтрофні та конкурентні взаємодії у складі мікробних консорціумів.....	13
1.2. Характеристика сировинної бази для процесу темної ферментації.	14
1.2.1. Використання комплексних субстратів: перспективи яблучного жому	14
1.2.2. Технологічні основи темного бродіння фруктових-овочевих відходів.....	15
1.2.3. Оптимізація ферментації комплексних органічних субстратів та бінарні суміші.....	16
1.3. Фізико-хімічні фактори та роль металоферментів в інтенсифікації газовиділення	17
1.3.1. Вплив фізико-хімічних параметрів середовища на ефективність біосинтезу	17
1.3.2. Роль буферних систем та регулювання рН середовища.....	18
1.3.3 Еволюційна дивергенція, загальна класифікація та фізіологічне значення металоферментів.....	18
1.3.4 Кінетика процесу та синергізм мікроелементів: залізо та нікель	20
1.3.5 Архітектура каталітичного центру та механізм дії [FeFe]-гідрогеназ	21
1.3.6 Структурно-функціональна характеристика та спектроскопічні стани [NiFe]-гідрогеназ.....	22
1.3.7 Біогеохімічна роль заліза та нікелю як есенціальних кофакторів темного бродіння	23
1.3.8 Практичні аспекти синергетичного впливу металів на оптимізацію біосинтезу водню	24
1.3.9 Біодоступність металів та застосування хелатуючих агентів у біореакторах.....	25
1.3.10. Механізми токсичної дії надлишку важких металів на анаеробні мікробні консорціуми	26
1.4. Адаптаційні реакції та динаміка утворення органічних речовин при металевому стресі	27
РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ ТА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ	29
2.1. Попередня термічна обробка інокуляту	29
2.2 Визначення рН субстрату	29

2.3	Визначення вологості субстрату	30
2.4	Визначення загальної сухої органічної маси у бінарній суміші.....	30
2.5	Підготовка батч-систем для дослідження процесу темної ферментації при додаванні металів-кофакторів	31
2.6	Визначення об'єму продукованого біогазу	32
2.7	Визначення вмісту молекулярного водню у виробленому біогазі	33
2.8	Методика розрахунку параметрів уніфікованого контролю та відсоткового приросту ..	34
2.9	Математичне моделювання кінетики газовиділення та дозозалежного відгуку мікробного консорціуму	36
2.10	Методика побудови прогностичних моделей динаміки ферментації та створення прогностичних графіків інтенсифікації процесу.....	38
РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ		40
3.1	Результати математичного моделювання кінетики газовиділення та дозозалежного відгуку мікробного консорціуму <i>in silico</i>	40
3.2	Визначення початкової та кінцевої кислотності органічного субстрату	42
3.3	Визначення вологості та загальної сухої органічної маси	42
3.4	Визначення об'єму продукованого біогазу.....	43
3.5	Визначення вмісту молекулярного водню у виробленому біогазі	46
3.6	Визначення значень уніфікованого контролю та відсоткового приросту дослідів з додаванням іонів металів-кофакторів.....	50
3.7	Прогностичне моделювання динаміки газовиділення та побудова прогностичних графіків інтенсифікації процесу.....	53
РОЗДІЛ 4. СТАРТАП-ПРОЄКТ.....		55
4.1	Резюме проекту	55
4.2	Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу	60
4.3	Визначення ключових факторів успіху стартапу	66
4.4	Визначення потенційних споживачів	69
4.5.	Ціна інноваційної пропозиції на ринку	73
4.6.	Концепція бізнес-моделі проекту	81
4.7.	Ризики стартап-проекту та методи управління ними	83
РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА		87
5.1	Особливості роботи з біологічними матеріалами та мікроорганізмами	87
5.2	Особливості роботи з хімічними реагентами та солями важких металів.....	88

5.3 Особливості роботи з пожежо- та вибухонебезпечними газами	89
5.4 Рекомендації для покращення умов праці працівників лабораторії	89
ВИСНОВКИ.....	91
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ:	94

ВСТУП

Сучасна глобальна енергетична парадигма перебуває на етапі докорінної трансформації, зумовленої необхідністю декарбонізації промисловості та переходу до відновлюваних енергоресурсів. У цьому контексті молекулярний водень розглядається як найбільш перспективний енергоносіє майбутнього завдяки його високій питомій теплоті згоряння та відсутності парникових викидів при використанні. Одним із найбільш економічно вигідних та екологічно безпечних методів отримання біоводню є темнова ферментація органічних відходів агропромислового комплексу. Ця технологія дозволяє інтегрувати процеси енергогенерації з глибокою утилізацією біомаси, забезпечуючи замкненість виробничих циклів. Проте промислова реалізація темнкової ферментації стикається з проблемою низької ефективності виходу цільового продукту, що зумовлено конкуренцією з боку метаногенної мікрофлори та обмеженою активністю гідрогеназних комплексів у природних субстратах [1,2].

Використання бінарних субстратів, таких як яблучний жом та курячий послід, дозволяє оптимізувати співвідношення вуглецю до азоту (C/N), що є критичним для метаболізму гідрогеногенних бактерій. Проте навіть за оптимального складу середовища активність ферментів [FeFe]- та [NiFe]-гідрогеназ часто залишається лімітованою через дефіцит специфічних металевих кофакторів. Дослідження впливу мікроконцентрацій феруму та нікелю на кінетичні параметри процесу в поєднанні з методами попередньої термічної селекції мікробіому відкриває нові можливості для спрямованого регулювання біосинтезу водню. Необхідність пошуку точних доз перехідних металів, які б забезпечували стимуляцію гідрогенезу без проявів токсичності для консорціуму, обумовлює актуальність даного дослідження. [3,4,5].

Мета дослідження. Метою роботи є визначення ефективної концентрації іонів Fe^{3+} та Ni^{2+} або їх суміші для інтенсифікації виходу біоводню під час темного бродіння на відходах агропромислового комплексу та побудова математичної моделі процесу.

Завдання дослідження:

1. Провести аналіз літературних даних щодо біохімічних механізмів темного бродіння та ролі металоферментів (гідрогеназ) у метаболізмі воднепродукуючих мікроорганізмів;

2. Дослідити вплив іонів Fe^{3+} у концентраціях (0,1; 1; 10 мг/дм³) на кінетику накопичення та кумулятивний вихід біоводню та визначити її ефективне значення;

3. Дослідити вплив іонів Ni^{2+} у концентраціях (0,1; 1; 10 мг/дм³) на кінетику накопичення та кумулятивний вихід біоводню та визначити її ефективне значення;

4. Дослідити комплексний вплив іонів Ni^{2+} та Fe^{3+} у концентраціях (1+1; 10 +10 мг/дм³) на кінетику накопичення та кумулятивний вихід біоводню та визначити її ефективне значення;

5. Розробити прогностичні математичні моделі на основі теоретичних та експериментальних даних інтенсифікації синтезу біоводню для практичного застосування в біотехнологічних системах.

6. Сформулювати концепцію стартап-проєкту

7. Визначити заходи безпеки під час виконання досліджень.

Об'єкт дослідження — процес темного бродіння органічного субстрату (відходи переробки яблука та курячий послід) для отримання біоводню.

Предмет дослідження — закономірності та ефективність впливу концентрацій металів-кофакторів (Fe^{3+} та Ni^{2+}) на інтенсивність синтезу біоводню мікробіологічними системами.

Наукова новизна одержаних результатів. Вперше розроблено прогностичні математичні моделі впливу іонів Fe^{3+} на процес темної ферментації біоводню в перехідному діапазоні концентрацій від 10 до 100 мг/дм³ та визначено пік накопичення біоводню за концентрації 334 мг/дм³ згідно математичної моделі.

РОЗДІЛ 1. ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ ЗА ТЕМОЮ ДОСЛІДЖЕННЯ

1.1 Біологічні та біохімічні особливості воднепродукуючих мікроорганізмів.

1.1.1 Біологічна характеристика та екологія бактерій роду *Clostridium* у системах темної ферментації

Бактерії роду *Clostridium* відіграють фундаментальну роль у біотехнологічних процесах переробки органічної сировини завдяки своїй унікальній здатності до темного ферментативного бродіння. Згідно з сучасними мікробіологічними класифікаціями, ці мікроорганізми представляють собою грампозитивні, облигатно анаеробні бактерії, що здатні формувати ендоспори для виживання в екстремальних умовах навколишнього середовища[7].

У контексті біоенергетики та синтезу біоводню, їхня здатність гідролізувати складні полісахариди до простих мономерів з подальшим виділенням молекулярного водню робить їх ключовим об'єктом досліджень.

Широке поширення бактерій роду *Clostridium* у природних екосистемах, таких як ґрунти, донні відкладення та органічні залишки, свідчить про їхню високу адаптивність та потужний ферментативний апарат. Використання змішаних мікробних культур для виробництва біоводню вимагає попередньої обробки інокуляту, зазвичай шляхом термічного шоку або кислотного впливу, що дозволяє елімінувати вегетативні клітини неспороутворюючих бактерій, зокрема метаногенних архей, залишаючи при цьому життєздатними спори бактерій роду *Clostridium*. Цей технологічний прийом забезпечує селективне збагачення консорціуму цільовими воднепродукуючими мікроорганізмами та запобігає подальшому поглинанню синтезованого водню метаногенами під час анаеробного зброджування [8].

Ефективність функціонування цих мікроорганізмів у біореакторах прямо залежить від їхньої здатності адаптуватися до змінних умов середовища,

ефективно конкурувати з іншими членами мікробного угруповання та швидко утилізувати доступні вуглеводи з утворенням летких жирних кислот і біогазу.

1.1.2 Метаболічні шляхи утилізації вуглеводів: домінування бутиратного шляху

Процес біологічного синтезу водню під час темного бродиння є результатом метаболічної регуляції всередині клітини. Деградація гексоз бактеріями роду *Clostridium* переважно відбувається за шляхом Ембдена-Мейєргофа-Парнаса (гліколіз), в результаті якого утворюється піруват, аденозинтрифосфат (АТФ) та відновлений нікотинамідаденіндинуклеотид (NADH). Подальша доля пірувату є критичною для виходу водню. Піруват декарбоксилюється за участю ключового ферменту — піруват:фередоксин оксидоредуктази (PFOR), що призводить до відновлення фередоксину та утворення ацетил-КоА і вуглекислого газу. Відновлений фередоксин згодом окислюється гідрогеназами, що каталізують термодинамічно вигідну реакцію перенесення електронів на протони з утворенням молекулярного водню [9].

За ідеальних умов термодинамічна межа синтезу водню за ацетатним шляхом становить чотири молі водню на один моль спожитої глюкози. Проте, у реальних біотехнологічних системах, особливо при утилізації комплексних біомас, таких як яблучний жом, мікроорганізми змушені перенаправляти метаболічні потоки для підтримки внутрішньоклітинного окислювально-відновного балансу. Це призводить до активації бутиратного шляху, де частина ацетил-КоА конденсується до ацетоацетил-КоА з подальшим відновленням до масляної кислоти (бутирату). Цей перехід вимагає споживання відновлювальних еквівалентів (NADH), що знижує теоретичний вихід водню до двох молей на моль глюкози. Тим не менш, такий зсув є еволюційно необхідним компромісом, оскільки він дозволяє клітинам регенерувати NAD^+

і продовжувати гліколіз навіть за умов підвищеного парціального тиску водню в середовищі, який блокує альтернативні шляхи реокислення [10].

Саме баланс між ацетатним та бутиратним шляхами ферментації визначає загальну ефективність роботи воднепродукуючого біореактора.

1.1.3. Синтрофні та конкурентні взаємодії у складі мікробних консорціумів

У реальних біореакторах бактерії роду *Clostridium* не функціонують ізольовано, а є частиною складних і динамічних мікробних консорціумів. Метагеномна реконструкція анаеробних дигестерів виявила наявність розгалуженої мережі взаємодій між різними філогенетичними групами, які спільно забезпечують стабільність біодеградації [11].

У таких угрупованнях бактерій роду *Clostridium* переважно виступають у ролі первинних деструкторів полісахаридів та активних кислотоутворювачів. Однак, їхня діяльність тісно пов'язана з іншими мікрорганізмами складу мікробного консорціуму. Наприклад, факультативні анаероби у складі консорціуму здатні споживати залишкові сліди кисню, підтримуючи таким чином анаеробний стан середовища, який є необхідним для функціонування кисневочутливих гідрогеназних комплексів [12].

Водночас, існують і жорсткі конкурентні умови. Найбільшу загрозу для стабільного виходу водню становить розмноження молочнокислих бактерій, які конкурують за ті ж самі прості цукри, але продукують лактат без виділення водню, а також виділяють бактеріоцини, що пригнічують ріст бактерій роду *Clostridium*. Крім того, гостро стоїть проблема міжвидового перенесення водню, де гомоацетогенні бактерії та метаногенні археї виступають як споживачі H_2 . Саме тому інженерія мікробних консорціумів фокусується на створенні селективного тиску, який максимізує активність *Clostridium* і

нівелює вплив конкурентів та мікроорганізмів-споживачів водню, забезпечуючи переважання бутиратно-ацетатного типу бродіння[9].

1.2. Характеристика сировинної бази для процесу темної ферментації.

1.2.1. Використання комплексних субстратів: перспективи яблучного жому

Економічна доцільність технологій отримання біоводню безпосередньо залежить від вартості та доступності субстрату. Сільськогосподарські залишки та відходи харчової промисловості є оптимальним вибором для масштабування процесу. Яблучний жом, який є багатотоннажним відходом виробництва соків та сидру, характеризується високим вмістом біодеградабельних вуглеводів, зокрема пектину, целюлози, геміцелюлози та вільних цукрів, що робить його перспективною сировиною для темного бродіння [13].

Полісахаридна матриця яблучного жому потребує ефективного гідролізу, який успішно здійснюється екзоферментами бактерій роду *Clostridium*. Однак, переробка моносубстратів часто стикається з проблемою незбалансованого співвідношення вуглецю до азоту (C/N) та дефіцитом мікроелементів, які є кофакторами життєвоважливих ферментів. Для вирішення цієї проблеми активно застосовується стратегія коферментації. Дослідження підтверджують, що спільне зброджування бінарних субстратів, наприклад сирого гліцерину та яблучного жому, дозволяє суттєво підвищити кінетику утворення водню за рахунок синергетичного ефекту компенсації поживних речовин [14].

Наявність оптимальної концентрації СОР (сухих органічних речовин) у такій суміші забезпечує стабільний субстратний потік до гліколітичних шляхів мікроорганізмів. Крім того, додавання специфічних лужних буферів або правильний підбір ко-субстратів дозволяє підтримувати стабільність рН без значних економічних витрат на постійне титрування системи хімічними

реагентами, що є критичним для забезпечення довготривалої та безперервної роботи промислових водневих біореакторів [15].

1.2.2. Технологічні основи темного бродіння фруктово-овочевих відходів

Ефективність промислового виробництва біоводню шляхом темного ферментативного бродіння значною мірою визначається фізико-хімічною природою субстрату та його здатністю забезпечувати мікроорганізми необхідними поживними речовинами. Фруктово-овочеві відходи розглядаються як надзвичайно перспективна сировина завдяки високому вмісту легкодоступних вуглеводів, таких як фруктоза, глюкоза, сахароза, а також пектинових речовин і геміцелюлози [16].

Біодеградація таких субстратів бактеріями родини *Clostridiaceae* відбувається з високою швидкістю, що зумовлено їхньою потужною ферментативною системою, здатною швидко гідролізувати складні полісахаридні матриці до простих мономерів [17].

Втім, використання фруктово-овочевих відходів як моносубстрату пов'язане з низкою технологічних викликів. Зокрема, інтенсивний гідроліз і подальша кислотна фаза анаеробного зброджування призводять до надзвичайно швидкого накопичення летких жирних кислот. Це, у свою чергу, спричиняє стрімке падіння водневого показника середовища, що може призвести до інгібування гідрогеназної активності та передчасного припинення виділення водню. Окрім цього, фруктово-овочеві відходи характеризуються високим відсотком доступних органічних речовин, що вимагає ретельного контролю органічного навантаження на біореактор для запобігання так званому субстратному шоку. Дослідження показують, що оптимізація початкової концентрації доступних органічних речовин та попередня обробка фруктово-овочевих відходів дозволяють значно покращити

доступність вуглеводів для ферментації, водночас мінімізуючи ризики закислення системи [18].

1.2.3. Оптимізація ферментації комплексних органічних субстратів та бінарні суміші

Незважаючи на високий потенціал індивідуальних видів біомаси, використання комплексних органічних субстратів, таких як органічна фракція твердих побутових відходів або бінарні суміші сільськогосподарських залишків, часто забезпечує значно вищу технологічну стабільність та загальну енергетичну рентабельність процесу. Сумісне зброджування різних типів відходів (коферментація) дозволяє природним чином збалансувати співвідношення вуглецю до азоту (C/N), розбавити потенційно токсичні сполуки та створити більш різноманітне середовище для розвитку мікробного консорціуму. Впровадження стратегій дозування мікроелементів при роботі з такими складними субстратами вимагає комплексного підходу, оскільки матриця змішаних відходів володіє власною, часто непередбачуваною здатністю до зв'язування металів.

Оптимізація процесу полягає у визначенні базового вмісту мікроелементів у сировині та розрахунку необхідних компенсаційних доз заліза, нікелю та, за необхідності, інших кофакторів (наприклад, молібдену чи кобальту), з урахуванням високої концентрації органічних речовин у системі. Застосування бінарних сумішей у поєднанні з оптимізованим мікроелементним живленням і використанням хелаторів, відкриває шлях до створення високопродуктивних, самобалансуючих біореакторів. Такий інтегрований підхід нівелює недоліки моносубстратної ферментації та дозволяє наблизити вихід біоводню до теоретично можливих значень, роблячи технологію темнового бродіння економічно привабливою для промислового впровадження [19].

1.3. Фізико-хімічні фактори та роль металоферментів в інтенсифікації газовиділення

1.3.1. Вплив фізико-хімічних параметрів середовища на ефективність біосинтезу

Фізіологічний стан та метаболічна спрямованість бактерій роду *Clostridium* надзвичайно чутливі до змін фізико-хімічних параметрів культивування. Водневий показник (pH) середовища є, мабуть, найбільш впливовим фактором операційного контролю у процесах темного бродіння. Дослідження [20] показують, що оптимальна активність гідрогеназ та пригнічення конкуруючих метаболічних шляхів досягаються у вузькому діапазоні pH, зазвичай від 5.5 до 6.5. Відхилення від цього оптимуму призводять до різких змін у профілі летких жирних кислот. Безперервне виробництво біоводню з вуглеводних субстратів змішаними культурами демонструє високу схильність до метаболічного зсуву у бік сольвентогенезу при зниженні pH нижче 5.0.

За таких умов клітини бактерій роду *Clostridium* починають синтезувати ацетон, бутанол та етанол (ABE-бродіння) як захисний механізм проти внутрішньоклітинного закислення недисоційованими формами органічних кислот. Цей процес супроводжується кардинальним падінням виходу біоводню, оскільки відновлювальні еквіваленти витрачаються на формування спиртів, а не на відновлення протонів. Крім того, температурний режим також відіграє визначальну роль, оскільки більшість промислово значущих штамів є мезофілами або термофілами. Ретельний контроль за концентрацією доступних органічних речовин у субстраті має вирішальне значення для запобігання субстратному інгібуванню. Перевантаження біореактора органічною масою провокує швидке накопичення кислот, що перевищує буферну ємність системи, і спричиняє незворотний зрив процесу ферментації водню на користь молочнокислого або сольвентогенного бродіння [15].

1.3.2. Роль буферних систем та регулювання рН середовища

Оскільки продукування водню під час темнового бродіння нерозривно пов'язане з утворенням органічних кислот, насамперед оцтової та масляної, підтримка оптимального значення рН стає одним із найважливіших завдань операційного контролю біореакторів. Різке зниження рН нижче позначки 5.0 не лише пригнічує активність ключових ферментів, але й провокує метаболічний зсув у бактерій роду *Clostridium* у бік сольвентогенезу, тобто синтезу розчинників замість газоподібних продуктів. Для запобігання цьому явищу в біотехнологічній практиці широко застосовуються різноманітні буферні системи. Використання карбонатних та фосфатних буферів довело свою високу ефективність у стабілізації кислотно-основного балансу середовища під час утилізації сільськогосподарських відходів.

Карбонатні системи виступають не лише як нейтралізатори надлишкової кислотності, але й можуть впливати на термодинаміку реакцій декарбоксилювання пірувату. Фосфатні буфери, у свою чергу, виконують подвійну функцію: окрім підтримки рН, вони слугують незамінним джерелом фосфору для синтезу нуклеїнових кислот та АТФ мікробними клітинами, що особливо актуально при використанні бідних на макроелементи субстратів, якими є багато видів фруктових відходів. Застосування зовнішніх буферних агентів у комбінації з точним дозуванням субстрату дозволяє створити умови, за яких швидкість утворення кислот збалансована зі швидкістю їх нейтралізації, що пролонгує експоненційну фазу росту воднепродукуючих бактерій та максимізує кінцевий вихід енергоносія[21].

1.3.3 Еволюційна дивергенція, загальна класифікація та фізіологічне значення металоферментів

Гідрогенази являють собою унікальний клас високоспеціалізованих металопротеїнів, які каталізують одну з фундаментально важливих хімічних

реакцій у біологічних системах: оборотне окислення молекулярного водню на протони та електрони. Ця ферментативна активність є критично необхідною для підтримки внутрішньоклітинного окислювально-відновного гомеостазу та енергетичного метаболізму в надзвичайно широкому спектрі мікроорганізмів, дозволяючи їм гнучко використовувати водень як екзогенне джерело енергії або інтенсивно виділяти його для скидання надлишкових відновлювальних еквівалентів під час ферментації [22].

Згідно з сучасною кристалографічною базою даних та на основі філогенетичного аналізу й атомного складу каталітичних центрів, ці ензими чітко поділяються на три основні філогенетично відмінні класи: [NiFe]-гідрогенази, [FeFe]-гідрогенази та моноядерні [Fe]-гідрогенази, що зустрічаються переважно у метаногенних архей. З точки зору промислової біотехнології виробництва біоводню шляхом темного бродіння органічної сировини, виключно перші два класи становлять ключовий науковий та практичний інтерес, оскільки саме вони репрезентовані в геномах основних мікроорганізмів-продуцентів, зокрема строгих анаеробів роду *Clostridium*. Незважаючи на те, що [NiFe]- та [FeFe]-гідрогенази каталізують абсолютно ідентичну хімічну реакцію розщеплення або формування водневого зв'язку, вони не демонструють гомології первинних амінокислотних послідовностей і вважаються у світовій науці еталонним прикладом конвергентної еволюції. Їхня складна тривимірна структура відображає тривалу еволюційну адаптацію до різних екологічних ніш та метаболічних потреб: [NiFe]-ферменти зазвичай налаштовані на споживання водню (окислення) та мають вищу толерантність до молекулярного кисню, тоді як [FeFe]-гідрогенази еволюціонували як неперевершені каталізатори виділення водню, хоча їхнім суттєвим недоліком є надзвичайна інактивація навіть слідовими кількостями кисню.

Розуміння цих еволюційних обмежень і метаболічних спеціалізацій є базою для стратегій генної інженерії та біохімічної оптимізації процесів отримання екологічно чистого палива з біомаси [23].

1.3.4 Кінетика процесу та синергізм мікроелементів: залізо та нікель

Вплив екзогенного додавання іонів металів на кінетику анаеробної ферментації є об'єктом інтенсивних досліджень, оскільки саме вони визначають активність внутрішньоклітинних каталітичних каскадів. Залізо є основним структурним елементом як [FeFe]-, так і [NiFe]-гідрогеназ, а також ключовим компонентом фередоксинів — основних переносників електронів у метаболізмі бактерій роду *Clostridium*. Нікель, у свою чергу, є специфічним кофактором ферментів, відповідальних за споживання та перерозподіл водню, а також необхідний для функціонування карбоксилаз. Дослідження кінетичних параметрів свідчать, що цілеспрямоване внесення оптимальних доз цих металів значно скорочує лаг-фазу процесу бродіння та різко збільшує максимальну швидкість виділення біогазу [24].

Більше того, встановлено потужний синергетичний ефект при сумісному використанні іонів Fe^{3+} та Ni^{2+} . Їхня комбінована дія викликає комплексну стимуляцію мікробного метаболізму, яка перевершує ефекти від їх ізольованого застосування. Це проявляється у підвищенні загальної експресії гідрогеназних генів та посиленні каталітичної активності цих ферментів [25].

Кінетичне моделювання підтверджує, що синергізм мікроелементів сприяє більш глибокій конверсії субстрату, зсуваючи термодинамічну рівновагу реакцій розщеплення вуглеводів у бік утворення водню та оцтової кислоти. У складі мікробних консорціумів додавання цих металів також відіграє роль фактора селективного тиску, стимулюючи проліферацію саме тих штамів мікроорганізмів, які володіють найвищим воднепродукуючим потенціалом [26].

1.3.5 Архітектура каталітичного центру та механізм дії [FeFe]-гідрогеназ

Видатна каталітична спроможність [FeFe]-гідрогеназ, що здатні продукувати до 10 000 молекул водню на секунду на один активний центр, зумовлена наявністю унікального залізо-сірчаного комплексу, який отримав назву Н-кластер. Згідно з даними рентгеноструктурного аналізу високої роздільної здатності, Н-кластер інтегрує в собі класичний кубановий кластер [4Fe-4S], який ковалентно з'єднаний через тіолатний залишок цистеїну поліпептидного ланцюга з біядерним залізним субкластером [2Fe]H. Біядерний центр, де безпосередньо відбувається зв'язування протонів і генерація молекулярного водню, має виняткову координаційну сферу: кожен атом заліза стабілізований сильнопольовими небілковими лігандами, такими як монооксид вуглецю (CO) та ціанід (CN⁻), які забезпечують необхідну електронну щільність для стабілізації низьких ступенів окислення заліза під час каталітичного циклу [27].

Крім того, два атоми заліза в біядерному підцентрі з'єднані специфічним азадитіолатним містком, вторинна аміногрупа якого функціонує як найважливіший каталітичний кислотно-основний каталізатор, який полегшує перенесення протонів безпосередньо до металевого центру. Формування такої безпрецедентної біоінорганічної структури не відбувається спонтанно і вимагає надзвичайно складної системи дозрівання за участю специфічних матураційних білків HydE, HydF та HydG. Біохімічні дослідження доводять, що збірка Н-кластера відбувається поетапно, де складні прекурсори, включаючи токсичні ліганди CO та CN⁻, синтезуються матураційними ферментами з ендогенних амінокислот і лише після цього обережно інтегруються в апофермент для формування повністю функціональної голоензиматичної форми [28].

Ефективність роботи цього ферменту в бактеріях роду *Clostridium* прямо залежить від безперервного потоку електронів, які доставляються до ферменту через каскад зовнішніх залізо-сірчаних кластерів від ферредоксину, що окислюється в процесі розпаду пірувату.

1.3.6 Структурно-функціональна характеристика та спектроскопічні стани [NiFe]-гідрогеназ

На відміну від своїх аналогів, [NiFe]-гідрогенази характеризуються гетеродимерною структурою, що складається з великої та малої субодиниць, і містять гетеродиметалічний активний центр, глибоко занурений у гідрофобне ядро великої субодиниці. Активний центр утворений одним атомом нікелю та одним атомом заліза, які міцно утримуються в білковій матриці завдяки чотирьом залишкам цистеїну, два з яких виконують роль місткових лігандів між металами. Подібно до Н-кластера, атом заліза у [NiFe]-гідрогеназах незвично координований двома молекулами ціаніду та однією молекулою монооксиду вуглецю, що робить його електронно-насиченим і дозволяє атому нікелю виступати основним місцем зв'язування субстрату [29].

Механізм активації та каталітичного циклу цього ферменту був детально розшифрований за допомогою методів електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) та інфрачервоної спектроскопії (Фур'є-ІЧ). Було встановлено, що фермент проходить через кілька послідовних окислювально-відновних станів, зокрема неактивні (окислені) стани Ni-A та Ni-B, які повільно активуються під дією відновників, переходячи у повністю активні стани Ni-SI (мовчазний в ЕПР), Ni-C (проміжний стан з гідридним містком між атомами Ni та Fe) та Ni-R (повністю відновлений стан, готовий до вивільнення водню). Ретельні спектроскопічні дослідження засвідчили, що перехід між цими станами супроводжується тонкими змінами в геометрії координаційної сфери

та перерозподілом спінової щільності, що є визначальним для розриву зв'язку в молекулі водню.

Мала субодиниця ферменту містить ланцюжок з трьох залізо-сірчаних кластерів, які діють як молекулярний провідник, направляючи електрони від поверхні білка до гетеродіметалічного активного центру. Така розгалужена металопротейнова архітектура пояснює абсолютну залежність багатьох мікроорганізмів від наявності іонів нікелю та заліза в живильному середовищі для забезпечення повноцінного росту в анаеробних умовах [30].

1.3.7 Біогеохімічна роль заліза та нікелю як есенціальних кофакторів темногового бродіння

Зважаючи на описану складність і металомісткість каталітичних центрів гідрогеназ, стає очевидним, що біодоступність перехідних металів, зокрема заліза (Fe^{3+}) та нікелю (Ni^{2+}), є лімітуючим фактором у мікробіологічних процесах генерації біогазу. У середовищах для темногового бродіння ці елементи виконують множинні функції: вони не лише інтегруються в активні центри ключових ферментів виділення водню, але й є структурними компонентами цитохромів, фередоксинів та ферментів шляху Вуда-Льонгдала. Відповідно, дефіцит або недостатня розчинність цих металів у субстраті, що часто спостерігається при використанні сільськогосподарських відходів, призводить до різкого пригнічення синтезу гідрогеназ на транскрипційному рівні та метаболічного зсуву в бік утворення молочної кислоти або розчинників замість біоводню [31].

Водночас, існує чітко виражена дозозалежна реакція мікробного консорціуму на концентрацію іонів металів. Додавання оптимальних доз мікроелементів до субстратів з низькою буферною ємністю, таких як харчові відходи, спричиняє значне посилення активності піруват:фередоксин оксидоредуктази та $[\text{FeFe}]$ -гідрогенази, тим самим збільшуючи молярний

вихід водню на одиницю утилізованого вуглецю. Однак, перевищення порогових концентрацій металів викликає сильний токсичний ефект, пов'язаний із зв'язуванням металів із сульфгідрильними групами нецільових білків та руйнуванням клітинних мембран мікроорганізмів, що вимагає розробки точних стратегій дозування в біореакторах.

Тому розуміння специфіки хелатування металів та їхньої взаємодії з органічною матрицею є ключем до досягнення стабільного виробництва енергії [32].

1.3.8 Практичні аспекти синергетичного впливу металів на оптимізацію біосинтезу водню

Перенесення теоретичних знань про будову металоферментів у площину біотехнологічної інженерії відкрило нові шляхи для інтенсифікації водневого бродіння. Сучасні дослідження демонструють, що одночасне екзогенне додавання комбінації іонів Fe^{3+} та Ni^{2+} здатне викликати потужний синергетичний ефект у чистих культурах, зокрема *Clostridium* sp., суттєво підвищуючи внутрішньоклітинну концентрацію гідрогеназ і прискорюючи кінетику утилізації глюкози. Показано, що оптимізоване співвідношення цих металів модифікує архітектуру мікробного угруповання в змішаних культурах, селективно сприяючи домінуванню воднепродукуючих видів над конкурентними мікроорганізмами [33].

Більше того, глибоке розуміння металоалежної природи ферментації стимулювало розвиток інноваційних гібридних технологій, таких як мікробні електролізні комірки (МЕК). У таких системах додавання оптимізованих доз мікроелементів сприяє не лише ферментативному виділенню водню, але й поліпшує формування електроактивних біоплівки на аноді. Завдяки цьому бактерії здатні більш ефективно окислювати складні субстрати, такі як целюлоза, передаючи електрони на зовнішній контур з подальшим їх катодним

відновленням до водню, що дозволяє подолати термодинамічний бар'єр темного бродіння і наблизити загальний вихід водню до теоретичного максимуму [34].

Отже, прецизійне управління пулом металів-кофакторів є фундаментальним інструментом для розкриття повного потенціалу біоводневих технологій.

1.3.9 Біодоступність металів та застосування хелатуючих агентів у біореакторах

Забезпечення мікробного консорціуму достатньою кількістю мікроелементів, зокрема металів-кофакторів гідрогеназ, є нетривіальним завданням через складну фізико-хімічну динаміку анаеробних середовищ. У процесі анаеробної ферментації іони важких металів, таких як залізо (Fe) та нікель (Ni), мають виражену тенденцію до утворення нерозчинних сполук, насамперед сульфідів, карбонатів та фосфатів. Осадження цих елементів виводить їх з розчину, роблячи абсолютно недоступними для поглинання мікробними клітинами, що призводить до прихованого мікроелементного голодування навіть за умови їх достатнього початкового внесення [35].

Ця проблема стає особливо гострою у системах з високим вмістом сірки або при змішаному (синтрофному) культивуванні з сульфатредуючими бактеріями. Для вирішення цієї проблеми розроблено стратегію застосування хелатуючих агентів. Хелатори, такі як цитрати або синтетичні комплексоны (наприклад, ЕДТА), утворюють з іонами перехідних металів стабільні розчинні комплекси, які запобігають їх преципітації.

Використання цитрату як комплексоутворювача має суттєву перевагу в процесах біосинтезу, оскільки він є біодеградабельним і може додатково слугувати джерелом вуглецю для деяких мікроорганізмів, не створюючи токсичного навантаження на довкілля. Формування розчинних метало-

органічних комплексів суттєво підвищує біодоступність заліза та нікелю, забезпечуючи їхній безперешкодний транспорт через клітинні мембрани і пряму інтеграцію в активні центри металопротеїнів, що є абсолютно необхідним для підтримки високої швидкості генерації молекулярного водню [36].

1.3.10. Механізми токсичної дії надлишку важких металів на анаеробні мікробні консорціуми

Незважаючи на те, що перехідні метали, такі як залізо та нікель, є есенціальними кофакторами для синтезу біоводню, перевищення їхніх порогових концентрацій у ферментаційному середовищі викликає гострий токсичний ефект, що призводить до повного інгібування метаболічної активності бактерій. Токсичність металів в анаеробних умовах має комплексну природу і реалізується через декілька молекулярних механізмів. Насамперед, надлишок незв'язаних іонів важких металів здатний конкурентно витіснити інші критично важливі метали з активних центрів ферментів, що призводить до їх незворотної інактивації та руйнування білкової структури [37].

Крім того, іони металів з високою спорідненістю зв'язуються з сульфгідрильними (-SH) групами білків клітинної мембрани, порушуючи її цілісність, проникність та функціонування іонних насосів. Це спричиняє витік внутрішньоклітинного вмісту та втрату здатності клітини підтримувати градієнт протонів, який є життєвонеобхідним для генерації АТФ. У випадку бактерій роду *Clostridium* надлишок металів також індукує окислювальний стрес навіть у суворих анаеробних умовах за рахунок генерації реактивних форм кисню через реакцію Фентона, що пошкоджує ДНК та рибосомальний апарат [38].

Визначення точних меж толерантності є складним завданням, оскільки токсичний поріг залежить не лише від абсолютної концентрації металу, але й

від його хімічної форми (спеціалізації), присутності органічних лігандів, загальної буферної ємності середовища та специфічного штаму мікроорганізмів, що вимагає проведення глибоких кінетичних досліджень для кожної конкретної системи біореактора.

1.4. Адаптаційні реакції та динаміка утворення органічних речовин при металевому стресі

У відповідь на підвищення концентрації важких металів мікробні консорціуми здатні активувати низку адаптаційних механізмів, спрямованих на виживання популяції. Однією з первинних реакцій є посилений синтез позаклітинних полімерних речовин (ЕПС) — складного матриксу з полісахаридів, білків та нуклеїнових кислот, який огортає клітини і діє як своєрідний хімічний щит. Функціональні групи ЕПС (карбоксильні, гідроксильні, амінні) ефективно зв'язують вільні іони металів, переводячи їх у неактивний стан і запобігаючи їхньому проникненню всередину клітини [39].

Однак така гіперпродукція позаклітинного матриксу є енергозатратним процесом, що неминуче призводить до зниження загального виходу біоводню, оскільки значна частина субстрату перенаправляється з енергетичного метаболізму на синтез захисних полімерів. З технологічної точки зору, ці процеси безпосередньо впливають на динаміку деградації органічної речовини. У присутності інгібуючих концентрацій металів спостерігається різке зниження швидкості утилізації органічних речовин, що свідчить про пригнічення гідролітичної та ацидогенної фаз бродіння [40].

Накопичення нерозщеплених органічних речовин у біореакторі не лише знижує енергетичну рентабельність процесу, але й змінює реологічні властивості ферментаційної маси, ускладнюючи масообмін та виділення утвореного газу. Відповідно, моніторинг динаміки доступних органічних

речовин стає ключовим індикатором для своєчасного виявлення металевого стресу та коригування операційних параметрів системи.

РОЗДІЛ 2. МЕТОДИ ТА МАТЕРІАЛИ ТА БІОЛОГІЧНІ ОБ'ЄКТИ

2.1. Попередня термічна обробка інокуляту

Метод полягає у цілеспрямованому температурному впливі на курячий послід з метою інактивації воднеспоживаючих мікроорганізмів.

Прилади та обладнання: лабораторна водяна баня, термостійкий скляний посуд (хімічні стакани або колби), лабораторні ваги, лабораторний термометр, алюмінієва фольга.

Методика виконання: Попередньо підготовлену вологу наважку масою 25 г курячого посліду, отриманого з відходів птахофабрики ПрАТ «Оріль-Лідер» Дніпропетровської області, поміщали у термостійкий скляний посуд. Для запобігання надмірному випаровуванню вологи під час нагрівання ємності щільно закривали алюмінієвою фольгою.

Посуд із інокулятом встановлювали у робочу камеру водяної бані. Термічну обробку проводили протягом 1 години при підтриманні температури на рівні 85-90 °С. Після завершення процесу прогрівання, ємності виймали з водяної бані та залишали охолоджуватися до кімнатної температури. Охолоджений оброблений курячий послід використовували в якості інокуляту для завантаження у батч-системи.

2.2 Визначення рН субстрату

Метод полягає у вимірюванні кислотності дослідних зразків за допомогою рН-метра.

Прилади та обладнання: рН-метр, буферний розчин КСІ, досліджувані зразки, скляний посуд, піпетка.

Методика виконання: в мірні стаканчики місткістю 50 см³ поміщали 10 см³ досліджуваних зразків. Вміст стакана перемішували протягом 10 хв. Налаштовували рН-метр за допомогою буферного розчину. Проводили рН-

метрів досліджуваних зразків до отримання стабільних показників рН на рівні $5,5 \pm 0,1$.

2.3 Визначення вологості субстрату

Визначення вологості субстрату проводилося термостатно – ваговим методом. Зразки субстрату зважували на аналітичних вагах з точністю до 0,001 г та пересипали в керамічні тиглі. Після зважування тиглі висушували в сушильній шафі за температури 110 °С до постійної маси, що дозволило повністю видалити вологу. На основі різниці мас зразків до і після висушування розраховували вологість (у відсотках до маси сухої наважки) за формулою:

$$w = \frac{m_1 - m_2}{m_1} \cdot 100\%, \quad (2.1)$$

де m_1 – маса зразка до висушування, m_2 – маса зразка після висушування .

Абсолютна суха маса субстрату визначалася за формулою 2.2:

$$M_{\text{абс.сух.}} = m_{\text{факт.}} \cdot K_{\text{сух.}}, \text{ г} \quad (2.2)$$

де $m_{\text{факт.}}$ – маса субстрату фактична;

$K_{\text{сух.}}$ – коефіцієнт сухості дорівнює:

$$K_{\text{сух.}} = \frac{100 - w}{100}, \quad (2.3)$$

де w – початкова вологість субстрату.

2.4 Визначення загальної сухої органічної маси у бінарній суміші

Для визначення маси реактивної органіки у біореакторі використовували розрахунковий метод визначення вмісту летких органічних речовин, який ґрунтується на перерахунку гравіметричних даних абсолютно сухої маси компонентів, отриманих в пункті 2.4, за допомогою стандартизованих літературних коефіцієнтів.

Методика виконання: загальну суху органічну масу обчислювали на основі маси абсолютно сухої речовини відходів переробки яблук та

безпідстилкового посліду м'ясних бройлерів шляхом множення на відповідні коефіцієнти вмісту загальної сухої органічної маси. Для розрахунків використовували нормативні значення 0,87 для відходів переробки яблук та 0,868 для курячого посліду [41,42]. Визначення загальної маси летких органічних речовин у реакторі здійснюють за формулою:

$$m_{VS} = (m_{TS1} \cdot K_{VS1}) + (m_{TS2} \cdot K_{VS2}), \quad (2.4)$$

де m_{VS} - загальна суха органічна маса бінарної суміші, г;

m_{TS1} та m_{TS2} – експериментально встановлені маси абсолютно сухої речовини відходів яблук та курячого посліду відповідно, г;

K_{VS1} та K_{VS2} – довідкові коефіцієнти загальної сухої органічної маси відповідних компонентів.

2.5 Підготовка батч-систем для дослідження процесу темної ферментації при додаванні металів-кофакторів

Для дослідження процесу інтенсифікації виходу біоводню використовували лабораторні батч-системи періодичної дії з робочим об'ємом 750 см³. В якості органічного субстрату для темної ферментації застосовували попередньо підготовлену суміш відходів яблук та курячого посліду.

Батч-систем наповнювали сумішшю підготовленого органічного субстрату з інокулятом вагою 75 г. Дослідження динаміки виходу біоводню під впливом різних концентрацій іонів металів проводили для таких груп:

- К – контроль;
- 0,1Fe³⁺ – система з додаванням цитрату феруму в концентрації 0,1 мг/дм³;
- 1Fe³⁺ – система з додаванням цитрату феруму в концентрації 1 мг/дм³;
- 10Fe³⁺ – система з додаванням цитрату феруму в концентрації 10 мг/дм³;
- 0,1Ni²⁺ – система з додаванням комплексу хелатів Ni в концентрації 0,1 мг/дм³;

- 1Ni^{2+} – система з додаванням комплексу хелатів Ni в концентрації 1 мг/дм^3 ;
- 10Ni^{2+} – система з додаванням комплексу хелатів Ni в концентрації 10 мг/дм^3 ;
- $1\text{Fe}^{3+}+\text{Ni}^{2+}$ – дослідні зразки із субстратом та інокулятом, до яких вносили суміш металів-кофакторів для забезпечення початкових концентрацій у середовищі на рівні $1+1\text{ мг/дм}^3$;
- $10\text{Fe}^{3+}+\text{Ni}^{2+}$ – дослідні зразки із субстратом та інокулятом, до яких вносили суміш металів-кофакторів для забезпечення початкових концентрацій у середовищі на рівні $10+10\text{ мг/дм}^3$;

Кожен дослід проводили у 2-х повторностях.

Дослідження проводилося в два етапи:

1. Дослід 1 – 5 ємностей(контрольний зразок; дослідний зразок 1Fe^{3+} ; дослідний зразок 1Ni^{2+} ; дослідний зразок 10Fe^{3+} ; дослідний зразок 10Ni^{2+} ;
2. Дослід 2 – 5 ємностей(контрольний зразок; дослідний зразок $0,1\text{Fe}^{3+}$; дослідний зразок $0,1\text{Ni}^{2+}$; дослідний зразок $1\text{Fe}^{3+}+\text{Ni}^{2+}$; дослідний зразок $10\text{Fe}^{3+}+\text{Ni}^{2+}$)

Після внесення всіх компонентів кожна ємність герметично закривалася корком з відвідною трубкою для забезпечення анаеробних умов та підключалася до системи збору газу. Протягом всього періоду дослідження температура робочого середовища дослідних зразків підтримувалась на рівні $38\text{ }^{\circ}\text{C}$. Відбір проб з кожного дослідного зразку відбувався кожні 48 годин.

2.6 Визначення об'єму продукованого біогазу

Вимірювання сумарного об'єму біогазу, що утворювався в процесі метаболічної діяльності бактеріального консорціуму, здійснювалося волюметричним методом за принципом витіснення робочої рідини. Газгольдер, попередньо заповнений дистильованою водою, виконував роль

накопичувача, де об'єм витісненої води був еквівалентним об'єму синтезованого газу. З метою підвищення точності вимірювань та спрощення процедури оперативного моніторингу кінетики процесу, геометрія пляшки-газгольдера приймалася за правильний циліндр. Внутрішній радіус r використовуваного газгольдера був сталим параметром і становив 4 см. Розрахунок накопиченого об'єму газу на кожному часовому інтервалі проводили шляхом вимірювання висоти стовпа газу (h) над рівнем рідини за формулою об'єму циліндра:

$$V_{\text{бг}} = \pi \cdot r^2 \cdot h, \quad (2.5)$$

де $V_{\text{бг}}$ - шуканий об'єм біогазу, см^3 , π -математична константа, $r = 4$ см, а h -фактична висота газового простору в газгольдері.

2.7 Визначення вмісту молекулярного водню у виробленому біогазі

Визначення якісного та кількісного складу виробленого біогазу, зокрема об'ємної частки молекулярного водню, проводили шляхом регулярного аналізу відібраних проб газової суміші з дослідних батч-систем. Вимірювання здійснювали інструментальним методом за допомогою газоаналізатора Bolean K-600. На основі отриманих аналітичних даних щодо відсоткової концентрації водню та загального об'єму накопиченого біогазу, який фіксувався волюмометричним методом, проводили розрахунок абсолютного об'єму виділеного цільового газу. Значення об'єму молекулярного водню розраховували за формулою:

$$V_{H_2} = \frac{V_{\text{бг}} \cdot C_{H_2}}{100}, \quad (2.6)$$

де:

- V_{H_2} - об'єм утвореного молекулярного водню, см^3 ;
- $V_{\text{бг}}$ - загальний об'єм виробленого біогазу, зафіксований у системі збору газу за відповідний проміжок часу, см^3 ;

- C_{H_2} - об'ємна частка молекулярного водню у досліджуваній пробі біогазу, %.

Для стандартизації експериментальних даних, забезпечення можливості їх коректного порівняння між різними дослідними зразками та подальшої побудови математичних моделей процесу, визначали питомий кумулятивний вихід молекулярного водню. Даний показник дозволяє оцінити ефективність конверсії органічної сировини і розраховується шляхом віднесення сумарного об'єму згенерованого водню до загальної сухої органічної маси завантаженого субстрату формулою:

$$P_{H_2} = \frac{\sum V_{H_2}}{m_{ЗСО}}, \quad (2.7)$$

де:

- P_{H_2} - питомий кумулятивний вихід біоводню, см³/г ЗСО(загальна суха органічна маса;
- $\sum V_{H_2}$ - загальний накопичений об'єм молекулярного водню за весь період ферментації (240 години), см³;
- $m_{ЗСО}$ – загальна суха органічна маса наважки завантаженої суміші яблучних відходів та курячого посліду, г.

2.8 Методика розрахунку параметрів уніфікованого контролю та відсоткового приросту

З метою нівелювання локальних варіацій біологічних показників, згладжування випадкових похибок паралельних дослідних серій та формування єдиної достовірної базової лінії для оцінки ефективності додавання іонів Fe³⁺ та Ni²⁺ застосували метод уніфікації контрольних зразків. Уніфікований контроль розраховували математичним шляхом для кожного фіксованого часового інтервалу ферментації (t = 0, 48, 96, 144, 192, 240 годин) як середнє арифметичне значення відповідних показників двох незалежних

контрольних батч-систем (Контроль 1 та Контроль 2), що функціонували в аналогічних умовах без внесення стимуляторів:

$$C_{uni}(t) = \frac{C_1(t) + C_2(t)}{2}, \text{ де:} \quad (3.8)$$

- $C_{uni}(t)$ - розрахункове значення показника уніфікованого контролю у момент часу t ;
- $C_1(t)$ та $C_2(t)$ - експериментальні значення відповідного досліджуваного показника у паралельних контрольних зразках (Контрольний зразок з Досліді 1 та Досліді 2 відповідно) у той самий момент часу t ;

Розрахунок проводили для загального об'єму виділеного біогазу, абсолютного вмісту молекулярного водню, а також для питомого кумулятивного виходу цільового газу у перерахунку на одиницю загальної сухої органічної маси субстрату ($\text{см}^3/\text{г}$ ЗСО). Отриманий у такий спосіб дискретний масив середніх значень використовували як універсальну точку відліку (100%) для подальшого обчислення динамічних коефіцієнтів дозозалежного приросту та відносного відсотка інтенсифікації ферментативного процесу в усіх дослідних варіантах із різними концентраціями іонів Fe^{3+} та Ni^{2+} .

Для кількісної оцінки стимулюючого ефекту від внесення іонів металів-кофакторів визначали динаміку відсоткового приросту досліджуваних параметрів відносно встановленої базової лінії. Розрахунок ступеня інтенсифікації здійснювали шляхом зіставлення експериментальних даних дослідних варіантів із розрахованим раніше уніфікованим контролем. Математичний алгоритм обчислення відсоткового приросту описується наступним рівнянням:

$$\Delta I(t) = \frac{P_{exp}(t) - C_{uni}(t)}{C_{uni}(t)} \cdot 100, \text{ де} \quad (3.9)$$

- $\Delta I(t)$ - відсотковий приріст цільового показника у дослідному зразку в момент часу t , %;
- $P_{exp}(t)$ - експериментальне значення показника (загального об'єму біогазу, об'єму водню або питомого кумулятивного виходу) у варіанті з додаванням металів у момент часу t ;
- $C_{uni}(t)$ - розрахункове значення уніфікованого контролю у той самий момент часу t .

Отримані за цією формулою додатні значення безпосередньо відображають рівень інтенсифікації метаболічних процесів та стимуляції газовиділення досліджуваним анаеробним консорціумом. Відповідно, від'ємні значення розцінювалися б як свідчення інгібуючого (токсичного) впливу застосованих концентрацій важких металів на мікрофлору.

2.9 Математичне моделювання кінетики газовиділення та дозозалежного відгуку мікробного консорціуму

Для опису часової кінетики накопичення біоводню (Модель А) застосовували модифіковане рівняння Гомпертца:

$$H(t) = P \cdot \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_m \cdot e}{P} (\lambda - t) + 1 \right] \right\}, \quad (2.10)$$

де:

- $H(t)$ - кумулятивний вихід біоводню в момент часу t (см³/г загальної сухої органіки);
- P - потенціальний максимальний (цільовий) вихід водню при повному вичерпанні субстрату (см³/г загальної сухої органіки);
- R_m - максимальна швидкість утворення водню (см³/(г загальної сухої органіки · год))

- λ - тривалість лаг-фази (період адаптації мікробного консорціуму), год;
- t - час ферментації, год;
- e - основа натурального логарифма, прийнятого за 2,718.

Для математичного опису дозозалежного ефекту від внесення іонів металів-кофакторів (Моделі Б та В) використовували параболічну функцію (модель гормезису). Цей метод дозволяє описати біологічний відгук мікроорганізмів: стимулюючу дію (інтенсифікацію) при внесенні оптимальних мікродоз та токсичне інгібування (спад інтенсивності) при перевищенні допустимих концентрацій важких металів.

Функція теоретичної інтенсифікації описується рівнянням:

$$I(C) = I_{max} - k(C - C_{opt})^2, \quad (2.11)$$

де:

- $I(C)$ - теоретична інтенсифікація процесу при концентрації металу C (% відносно контролю);
- I_{max} - максимальна цільова інтенсифікація процесу (теоретичний максимум газовиділення, %);
- C_{opt} - оптимальна концентрація іонів металу в середовищі, при якій досягається I_{max} (мг/дм³);
- C - поточна досліджувана концентрація іонів металу (мг/дм³);
- k - емпіричний коефіцієнт чутливості воднепродукуючої мікрофлори (визначає швидкість настання токсичного інгібування при відхиленні від оптимуму).

Розрахунок параметрів математичних моделей, лінійна та нелінійна інтерполяція експериментальних даних, а також візуалізація сумісного впливу часу ферментації та концентрації кофакторів здійснювалися за допомогою

мови програмування Python із використанням бібліотек наукових обчислень (NumPy, SciPy) та пакету для побудови графіків високої якості (Matplotlib).

2.10 Методика побудови прогностичних моделей динаміки ферментації та створення прогностичних графіків інтенсифікації процесу

Для комплексної оцінки динаміки ферментації та створення прогностичних графіків інтенсифікації процесу було розроблено алгоритм інтеграції експериментальних масивів даних із референтними літературними даними [43].

На першому етапі здійснювали розрахунок базової лінії кінетики газовиділення шляхом обчислення параметрів уніфікованого контролю. Уніфікований контроль визначали як середнє арифметичне значення питомого кумулятивного виходу біоводню двох паралельних контрольних батч-систем (контрольний зразок з Дослідку 1 та Дослідку 2 відповідно) для кожного фіксованого часового інтервалу ферментації впродовж усіх 240 годин дослідку. Розрахунок питомих показників здійснювали у перерахунку на одиницю загальної сухої органічної маси ($\text{cm}^3/\text{г ЗСО}$).

На основі зіставлення показників дослідних зразків із траєкторією уніфікованого контролю для кожного часового проміжку розраховували динамічні коефіцієнти дозозалежного приросту. Ці коефіцієнти відображають математичну залежність швидкості та об'єму синтезу водню від поточної концентрації доданого металу-кофактора на різних стадіях життєдіяльності консорціуму. З метою розширення прогностичного потенціалу математичної моделі, подолання обмежень локального лабораторного експерименту та забезпечення можливості математичної екстраполяції у зону вищих концентрацій, до розрахункової матриці інтегрували калібрувальні дані та

кінетичні константи макродозування, вилучені з дослідження впливу іонів Fe^{3+} та Ni^{2+} на продукування водню та метану в біогазі [43].

Об'єднання отриманих коефіцієнтів дозозалежного приросту, значень уніфікованого контролю та верифікованих літературних параметрів сформували багатовимірні масиви даних. На основі цих масивів у програмному середовищі Python за допомогою методів двовимірної нелінійної інтерполяції побудували прогностичні тривимірні графіки (3D-поверхні відгуку). Моделювання у просторі координат «час ферментації (t , год) — концентрація іонів металу (C , мг/дм^3) — питомий кумулятивний вихід біоводню (P , $\text{см}^3/\text{г ЗСО}$)» забезпечило безперервну візуалізацію топографії процесу.

РОЗДІЛ 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Результати математичного моделювання кінетики газовиділення та дозозалежного відгуку мікробного консорціуму *in silico*

Головною метою розробки комплексу теоретичних моделей було формування розрахункового еталона — базової траєкторії теоретичного виходу цільового продукту та функцій відгуку мікробного консорціуму на внесення іонів Fe^{3+} і Ni^{2+} . Згенеровані теоретичні профілі слугують фундаментальною базою для подальшого порівняльного аналізу: вони дозволяють об'єктивно зіставити потенційну ефективність стимуляції металами-кофакторами із реальними експериментальними результатами, отриманими *in vitro*.

Для розрахунку параметрів теоретичних моделей *in silico* в якості базових значень використали референтні теоретичні константи макро- та мікродозування Fe^{3+} і Ni^{2+} із кінетичними закономірностями темної ферментації [43]. На основі літературних даних розраховували теоретичні показники кінетики та інтенсифікації газовиділення. Результати просторової візуалізації розроблених теоретичних моделей представлені на рисунку 3.1.

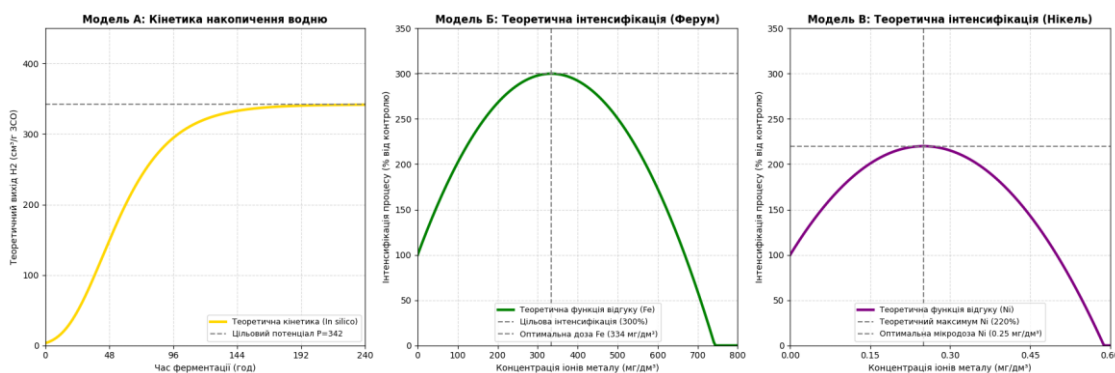


Рисунок 3.1 – Теоретичні моделі кінетики накопичення біоводню (Модель А) та дозозалежної інтенсифікації процесу за участю іонів Fe^{3+} і Ni^{2+} (Моделі Б і В відповідно)

Згідно з отриманими даними (Модель А), теоретична кінетика накопичення біоводню характеризується класичною S-подібною кривою.

Процес розпочинається з нетривалої лаг-фази (0-48 годин) під час якої відбувається адаптація воднепродукуючої мікрофлори до умов середовища, після чого система переходить у фазу інтенсивного експоненційного росту газовиділення (48-144 години). Розрахунковий цільовий потенціал системи (Р), який відповідає максимальному виходу водню при повному вичерпанні доступного органічного субстрату, становить 342 см³/г ЗСО (загальної сухої органічної маси). Цей показник використовували як орієнтир для оцінки реальної ефективності подальших лабораторних досліджень. Дослідження теоретичної дозозалежної інтенсифікації виявило принципові відмінності у впливі макро- та мікроелементів на систему. Модель Б ілюструє функцію відгуку на додавання іонів Fe³⁺. Графік демонструє широке «вікно» стимулюючої дії металу, що вказує на високу метаболічну толерантність бактерій до заліза. Розрахункова оптимальна доза Fe³⁺ (C_{opt}) становить 334 мг/дм³, при якій досягається цільова максимізація процесу на рівні 300 % відносно контролю. Пологий характер кривої свідчить про те, що навіть значні відхилення від оптимуму не викликають різкого токсичного інгібування системи. Натомість, теоретична функція відгуку для Ni²⁺ (Модель В) демонструє значно вищу чутливість мікробіологічної системи. Оптимальна стимулююча мікродоза розрахована на рівні 0,25 мг/дм³, що здатне забезпечити теоретичний максимум інтенсифікації у 220 %. Однак графік чітко показує вузький діапазон біологічного оптимуму: при концентраціях, що перевищують 0,30 мг/дм³, спостерігається стрімкий спад інтенсифікації процесу, а при досягненні позначки 0,60 мг/дм³ модель прогнозує повне пригнічення синтезу біоводню (спад до нульової позначки осі).

3.2 Визначення початкової та кінцевої кислотності органічного субстрату

Для визначення кислотності бінарної суміші субстрату приготували дослідні зразки об'ємом 10 см³. Згідно методики 2.2 кислотність визначали потенціометрично на початку експерименту та після завершення повного 240-годинного циклу культивування для всіх дослідних варіантів із різними концентраціями металів-кофакторів. Показник рН для кожного досліді наведено в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2 – рН субстрату

Дослід	рН - початок ферментації	рН субстрату - кінець ферментації	Δ рН
Контроль 1	5,58	4,54	1,23
1 Fe ³⁺	5,6	4,48	1,25
10 Fe ³⁺	5,57	4,45	1,25
1 Ni ²⁺	5,61	4,5	1,25
10 Ni ²⁺	5,59	4,49	1,24
Контроль 2	5,45	4,66	1,17
0,1 Fe ³⁺	5,47	4,7	1,16
0,1 Ni ²⁺	5,44	4,71	1,15
1 Ni ²⁺ +Fe ³⁺	5,48	4,57	1,20
10 Ni ²⁺ +Fe ³⁺	5,46	4,68	1,17

Виходячи з результатів дослідження, найнижче значення рН досягнуто в досліді з додавання іонів 10 Fe³⁺. В досліді 1 Fe³⁺, 10 Fe³⁺, 1 Ni²⁺ та 10 Ni²⁺ спостерігається схожа зміна рівню рН протягом всього періоду ферментації.

3.3 Визначення вологості та загальної сухої органічної маси

Згідно методів 2.3 та 2.4 відібрали окремі зразки вихідних компонентів субстрату (яблучних відходів та курячого посліду), що використовувалися у двох серіях експерименту.

Показник вологості та загальну суху масу (TS) визначали ваговим (гравіметричним) методом для кожного компонента окремо: 1) свіжопідготовлених яблучних відходів та курячого посліду для першої серії дослідів; 2) яблучних відходів та курячого посліду після попередньої витримки для другої серії дослідів. Наважки кожного типу сировини висушували до постійної маси у сушильній шафі при температурі 110 °С. Визначення частки ЗСО здійснювали розрахунковим шляхом на основі отриманих значень сухої маси із застосуванням довідкових літературних коефіцієнтів загальної сухої органічної речовини для кожного компонента окремо.

Таблиця 3.3. – Значення вологості та маси загальної сухої органічної маси (ЗСО) компонентів досліджуваного субстрату

№ досліду	Компонент субстрату	Середнє значення вологості, %	Середнє значення ЗСО, %	Середнє значення ЗСО, г
1	Яблучні відходи (Дослід 1)	64,15 ± 0,10	87,20 ± 0,11	25,78 ± 0,03
1	Курячий послід (Дослід 1)	81,24 ± 0,09	86,90 ± 0,10	17,04 ± 0,03
2	Яблучні відходи (Дослід 2)	59,64 ± 0,07	87,00 ± 0,14	25,78 ± 0,02
2	Курячий послід (Дослід 2)	78,52 ± 0,11	86,80 ± 0,10	17,04 ± 0,02

3.4 Визначення об'єму продукованого біогазу

Вимірювання загального об'єму утвореної газової суміші здійснювалася волюмометричним методом через кожні 48 годин протягом усього циклу культивування, тривалість якого склала 240 годин. Отримані експериментальні

дані, що відображають часову динаміку газовиділення та сумарні накопичені об'єми для обох серій дослідів, наведено на рисунках 3.2 та 3.3.

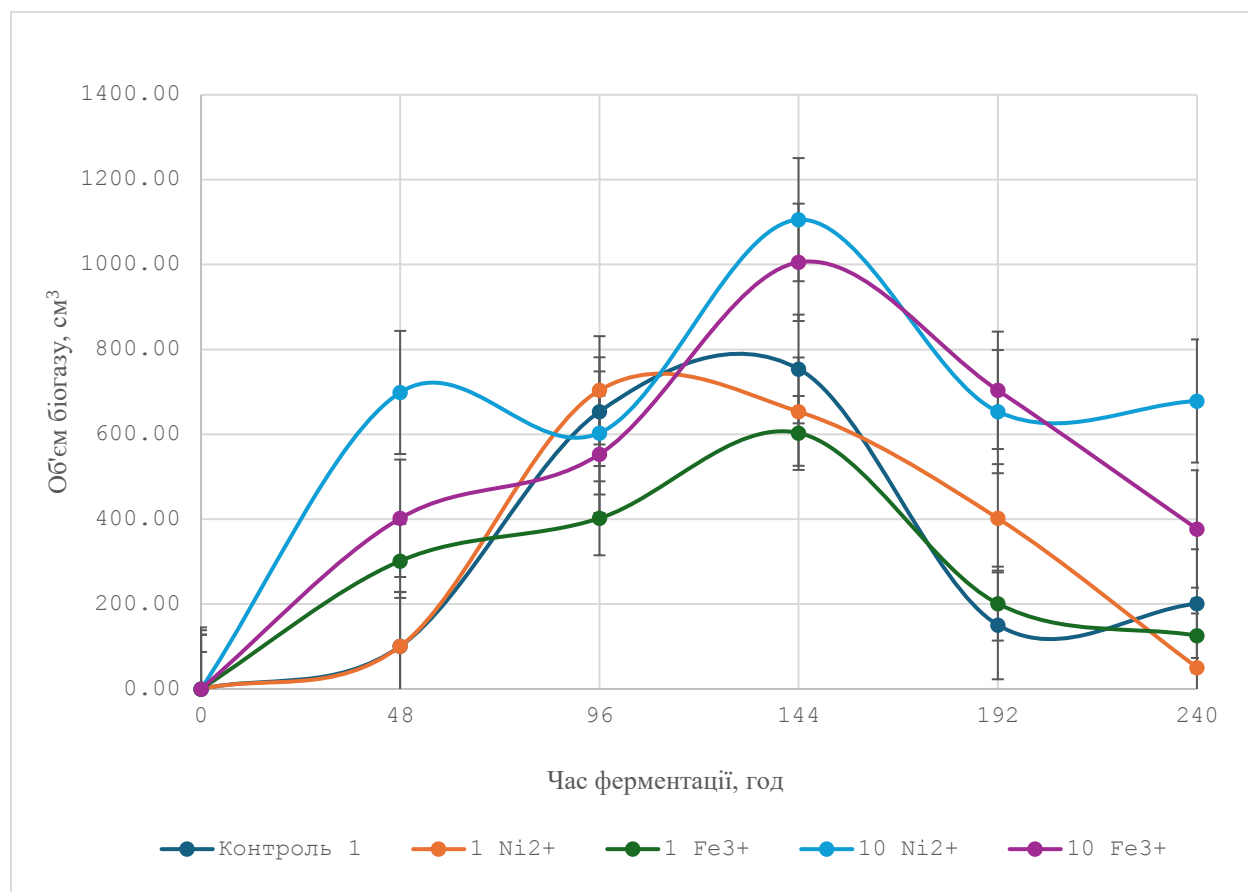


Рисунок 3.1 - Динаміка накопичення біогазу в процесі темної ферментації – Дослід 1

Згідно отриманих результатів, найбільш інтенсивне газовиділення в більшості зразків спостерігалось в період від 48 до 144 годин ферментації. Після проходження пікових значень, починаючи з 144–192 годин процесу, фіксувався закономірний спад інтенсивності газоутворення. На фінальному етапі (240 годин) погодинний приріст об'єму в більшості зразків був мінімальним, що вказує на вичерпання доступної поживної бази та перехід мікроорганізмів у стаціонарну фазу.

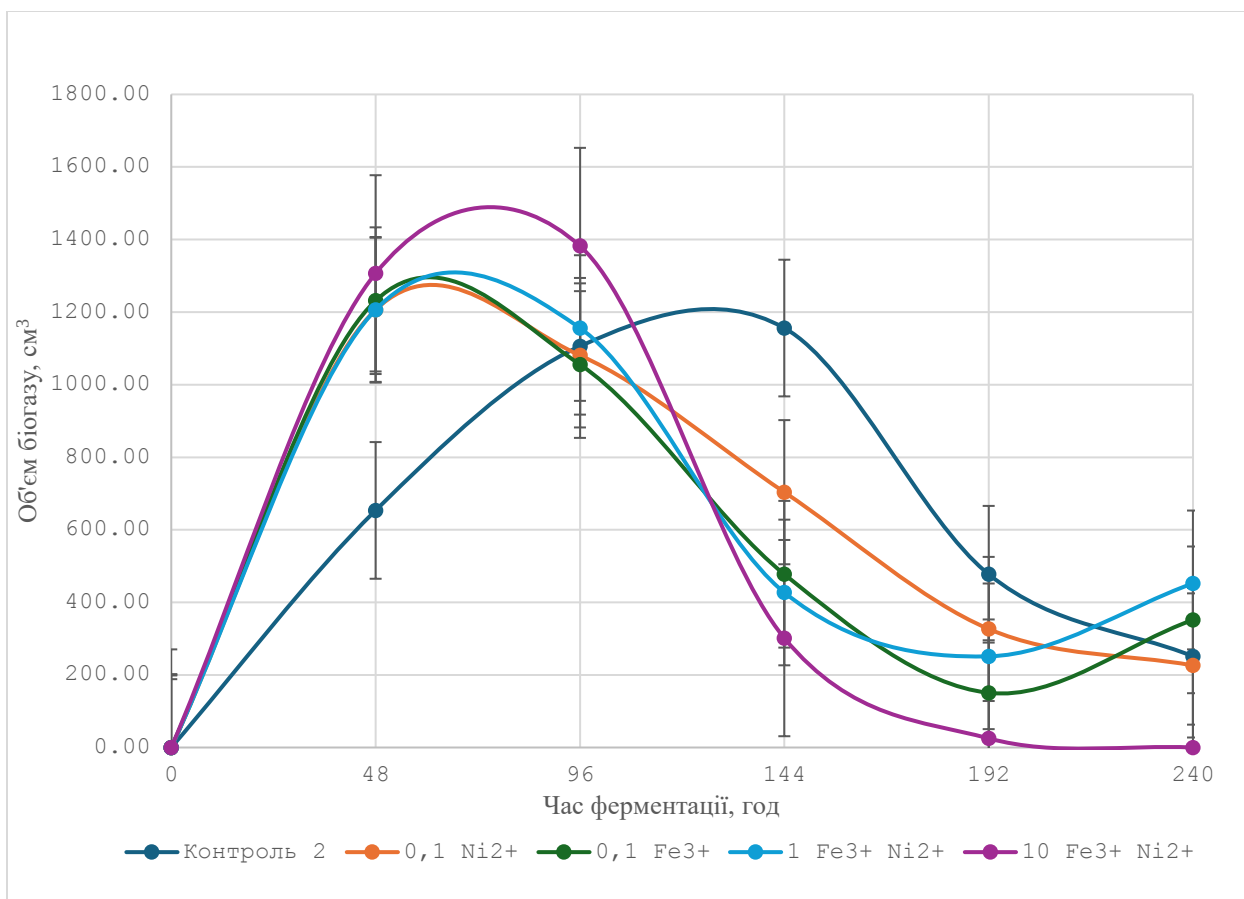


Рисунок 3.2. – Динаміка накопичення біогазу в процесі темної ферментації – Дослід 2

Порівняння показників контрольних та дослідних зразків свідчить про стимулюючий ефект від внесення металів-кофакторів. В обох серіях експериментів додавання іонів Fe^{3+} та Ni^{2+} , як у вигляді монометалевих розчинів, так і в складі біметалевих сумішей, призвело до суттєвого збільшення загального об'єму згенерованого біогазу порівняно з контролями. Так, максимальні абсолютні значення сумарного об'єму були зафіксовані у варіантах із синергійним додаванням іонів Ni^{2+} та Fe^{3+} (Дослід 2), де показники перевищили позначку у 2300–2500 см³.

3.5 Визначення вмісту молекулярного водню у виробленому біогазі

Визначення абсолютного об'єму синтезованого молекулярного водню здійснювалося розрахунковим шляхом на основі даних волюмометричного вимірювання загального об'єму біогазу та його якісного складу через кожні 48 годин протягом усього циклу культивування, тривалість якого склала 240 годин. Отримані експериментальні дані, що відображають часову динаміку накопичення цільового газу та його сумарні об'єми для обох серій дослідів, наведено на рисунках 3.3 і 3.4.

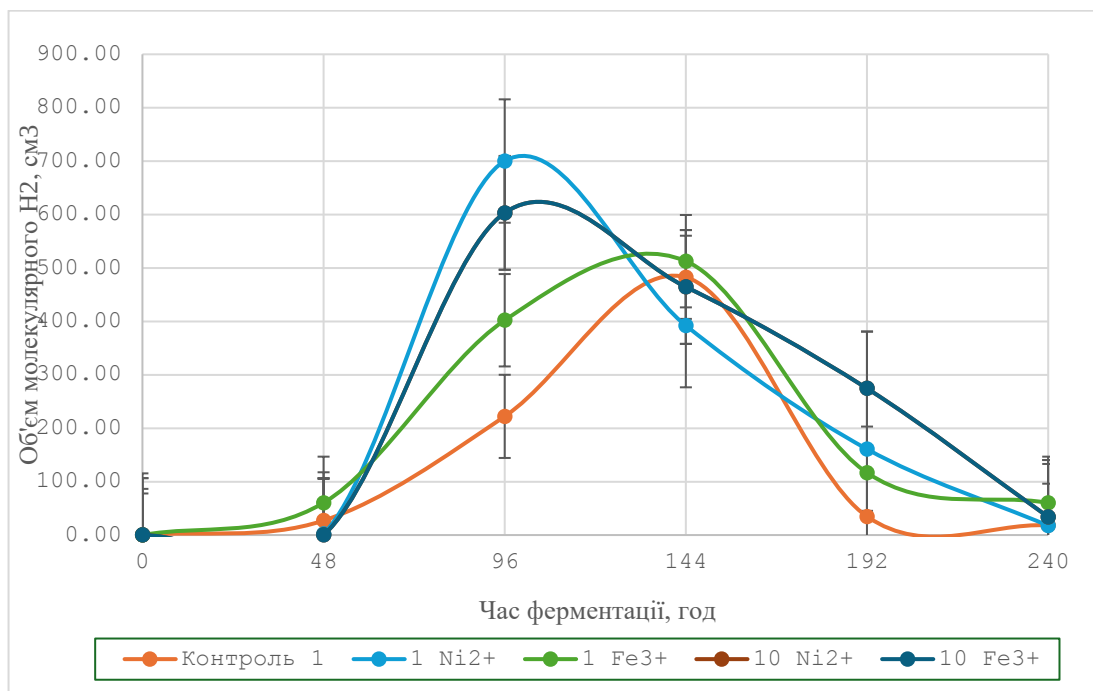


Рисунок 3.3 – Динаміка накопичення та сумарний об'єм синтезованого молекулярного водню – Дослід 1

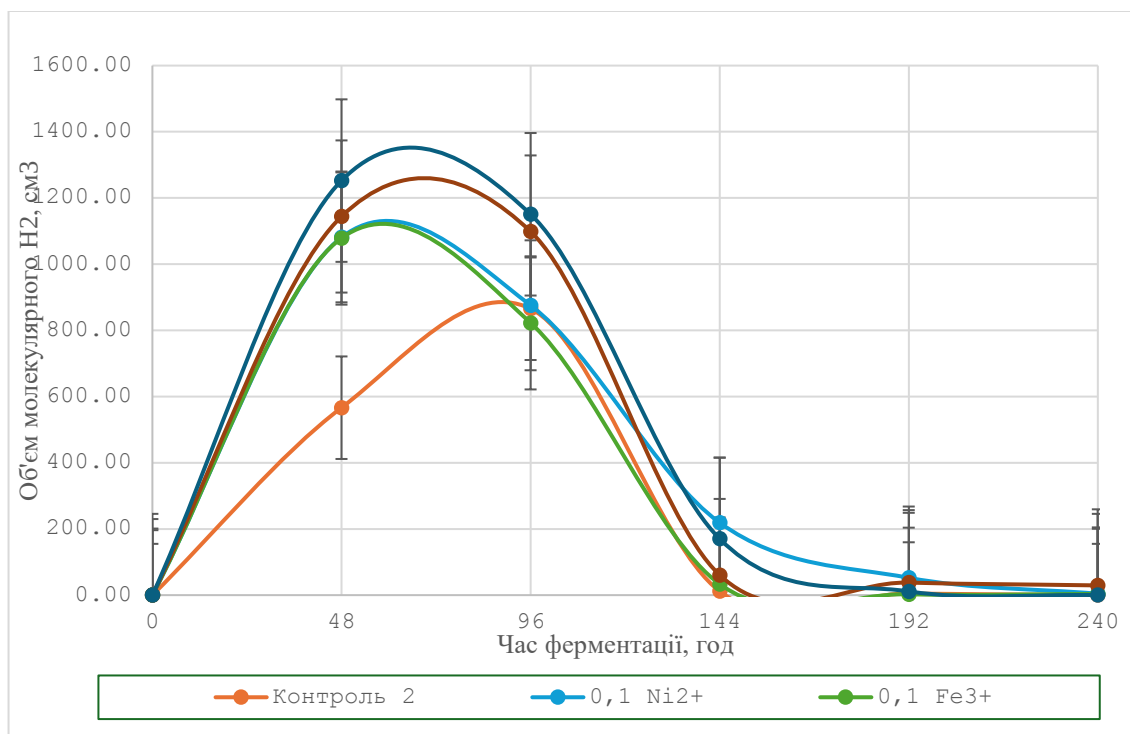


Рисунок 3.4 – Динаміка накопичення та сумарний об'єм синтезованого молекулярного водню – Дослід 2

Згідно з отриманими даними, процес біосинтезу молекулярного водню в усіх зразках характеризувався наявністю вираженої лаг-фази (перші 48 годин), протягом якої утворення цільового газу було мінімальним. Найбільш інтенсивне виділення водню спостерігалось в інтервалі від 96 до 144 годин. Після проходження пікових значень, починаючи зі 144 годин, фіксувалося поступове зниження інтенсивності газовиділення, і на момент завершення процесу (240 годин) погодинний приріст об'єму водню наближався до нуля.

Порівняння сумарних показників свідчить про стимулюючий ефект від внесення досліджуваних металів-кофакторів. У першій серії експериментів з додаванням іонів Ni²⁺ та Fe³⁺ в концентраціях 10 мг/дм³ призвело до збільшення сумарного об'єму водню до 1376,02 та 1379,71 см³ відповідно, порівняно з 784,84 см³ у контролі. У другій серії експериментів найвищі

абсолютні об'єми водню були зафіксовані у варіантах із синергійним застосуванням біметалевих сумішей. Максимальний вихід забезпечило додавання Ni^{2+} та Fe^{3+} в концентрації 10+10 мг/дм³ (2584,81 см³), що майже вдвічі перевищило показник контрольного зразка (1448,12 см³).

Визначення питомого кумулятивного виходу молекулярного водню здійснювалося розрахунковим шляхом через віднесення абсолютних об'ємів синтезованого цільового газу до маси загальної сухої органічної маси (ЗСО) завантаженого субстрату. Обчислення показників проводилося наростаючим підсумком на основі даних газовиділення через кожні 48 годин протягом усього 240-годинного циклу культивування. Отримані розрахункові дані, що відображають часову динаміку питомого кумулятивного виходу біоводню для обох серій дослідів, наведено на рисунках 3.5 і 3.6.

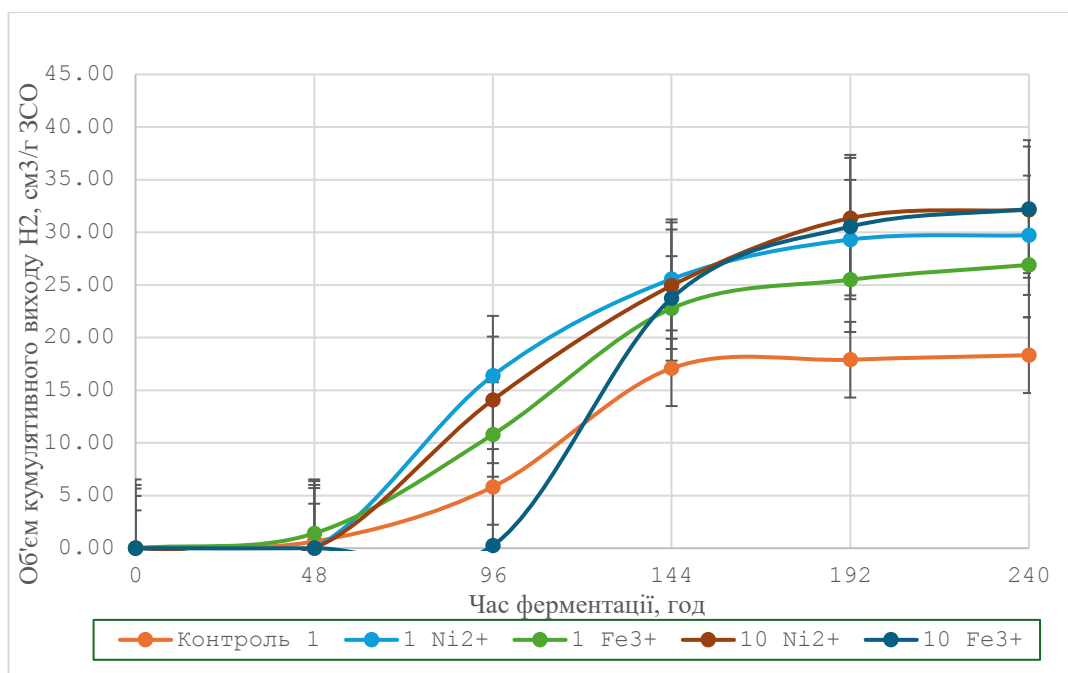


Рисунок 3.5 – Динаміка питомого кумулятивного виходу біоводню – Дослід 1

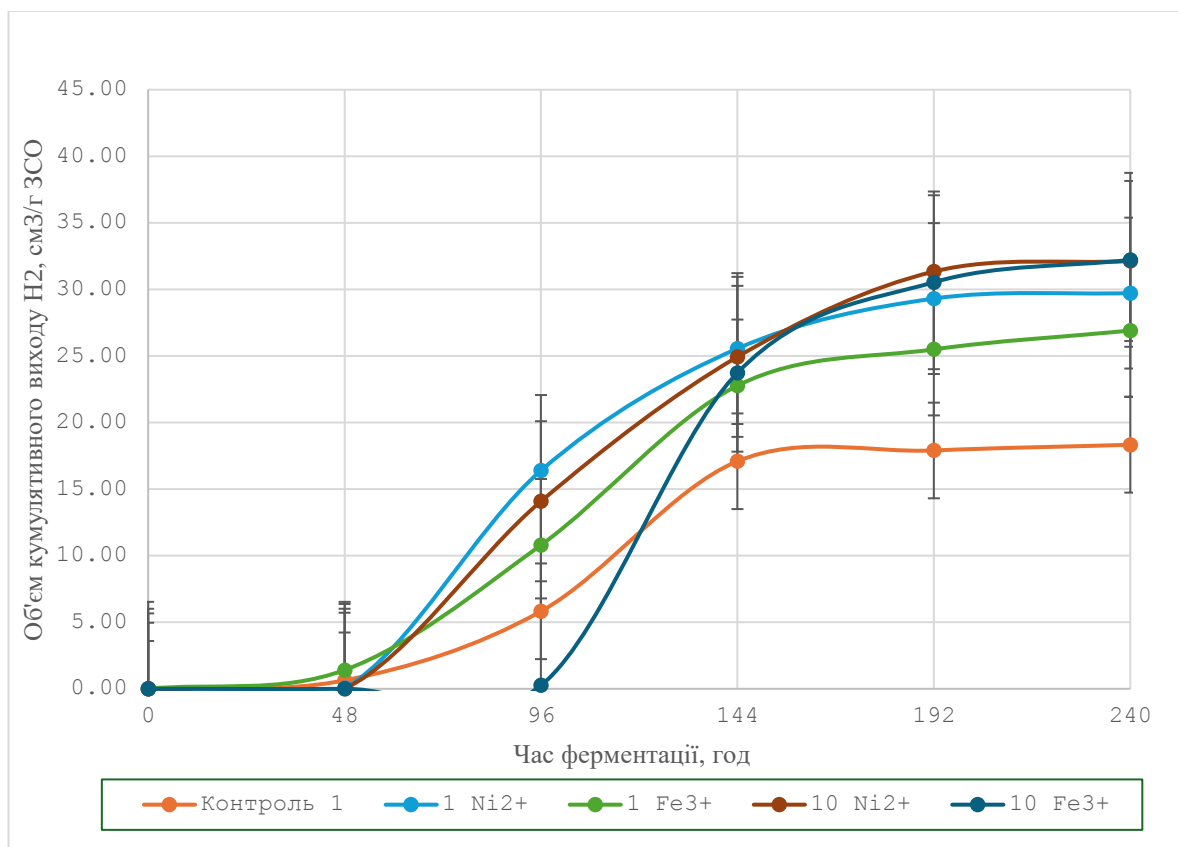


Рисунок 3.6 – Динаміка питомого кумулятивного виходу біоводню – Дослід 2

Згідно з розрахунковими даними, динаміка кумулятивного виходу біоводню на грам ЗСО в усіх батч-системах повторює встановлені кінетичні закономірності метаболічної активності консорціуму. Після початкової фази адаптації (0–48 годин) з мінімальним питомим приростом фіксувалося стрімке зростання показників, найвищі темпи якого припадали на період 96–144 годин. На фінальних етапах процесу (192–240 годин) крива кумулятивного виходу стабілізувалася та виходила на плато, фіксуючи кінцевий результат біоконверсії органічної речовини.

Порівняльний аналіз кінцевих значень підтверджує ефективність застосованих доз металів-кофакторів. Найвищі показники питомого

кумулятивного виходу біоводню були зафіксовані у дослідних зразках із синергійним застосуванням біметалевих сумішей Ni^{2+} та Fe^{3+} , що повністю корелює з результатами вимірювання абсолютних об'ємів газовиділення.

3.6 Визначення значень уніфікованого контролю та відсоткового приросту дослідів з додаванням іонів металів-кофакторів

Для побудови прогностичної моделі динаміки газовиділення та інтенсифікації процесу розраховували значення кумулятивного виходу водню на 1 г ЗСО для уніфікованого контролю. Отримані розрахункові дані наведено в таблиці 3.4.

Таблиця 3.4 – Розрахункові значення кумулятивного виходу водню на 1 г ЗСО

Час ферментації, год	Уніфікований контроль, $\text{cm}^3/\text{г ЗСО}$
0	0,00
48	6,93
96	19,63
144	25,40
192	25,86
240	26,07

Розрахункові значення уніфікованого контролю необхідні для стандартизації всіх отриманих розрахункових значень кумулятивного виходу водню на 1 грам ЗСО. Розраховані відсотки приросту кожного дослідів з додаванням іонів металів-кофакторів відносно контролю дослідів, в якому проводилося дослідження відповідної доданої концентрації іонів металів, наведені в таблиці 3.5.

Таблиця 3.5 – Розрахункові значення відсотку приросту кумулятивного виходу водню на 1 грам ЗСО дослідів з додаванням іонів металів

Дослід	1 Ni ²⁺	1 Fe ³⁺	10 Ni ²⁺	10 Fe ³⁺	0,1 Ni ²⁺	0,1 Fe ³⁺	1 Ni ²⁺ +Fe ³⁺	10 Ni ²⁺ +Fe ³⁺
Приріст виходу, %	62,16	46,79	75,32	75,79	54,15	34,05	63,71	78,49

З отриманих значень відсоткового приросту кумулятивного виходу водню на 1 грам ЗСО побудовано графік залежності доданої концентрації іонів металів до приросту синтезу біоводню. Графік залежності наведений на рисунку 3.7.

Згідно з розрахунковими даними, динаміка зростання кумулятивного виходу біоводню на грам ЗСО в усіх батч-системах повторює встановлені кінетичні закономірності метаболічної активності консорціуму відносно додавання більшої концентрації металів-кофакторів Fe³⁺ та Ni²⁺ в процес темної ферментації. Найбільше відсоткове значення приросту кумулятивного виходу біоводню спостерігається в досліді 10 Ni²⁺+Fe³⁺ на рівні 78,49%, що підтверджує позитивний вплив додавання суміші металів-кофакторів в концентрації 10 мг/дм³.

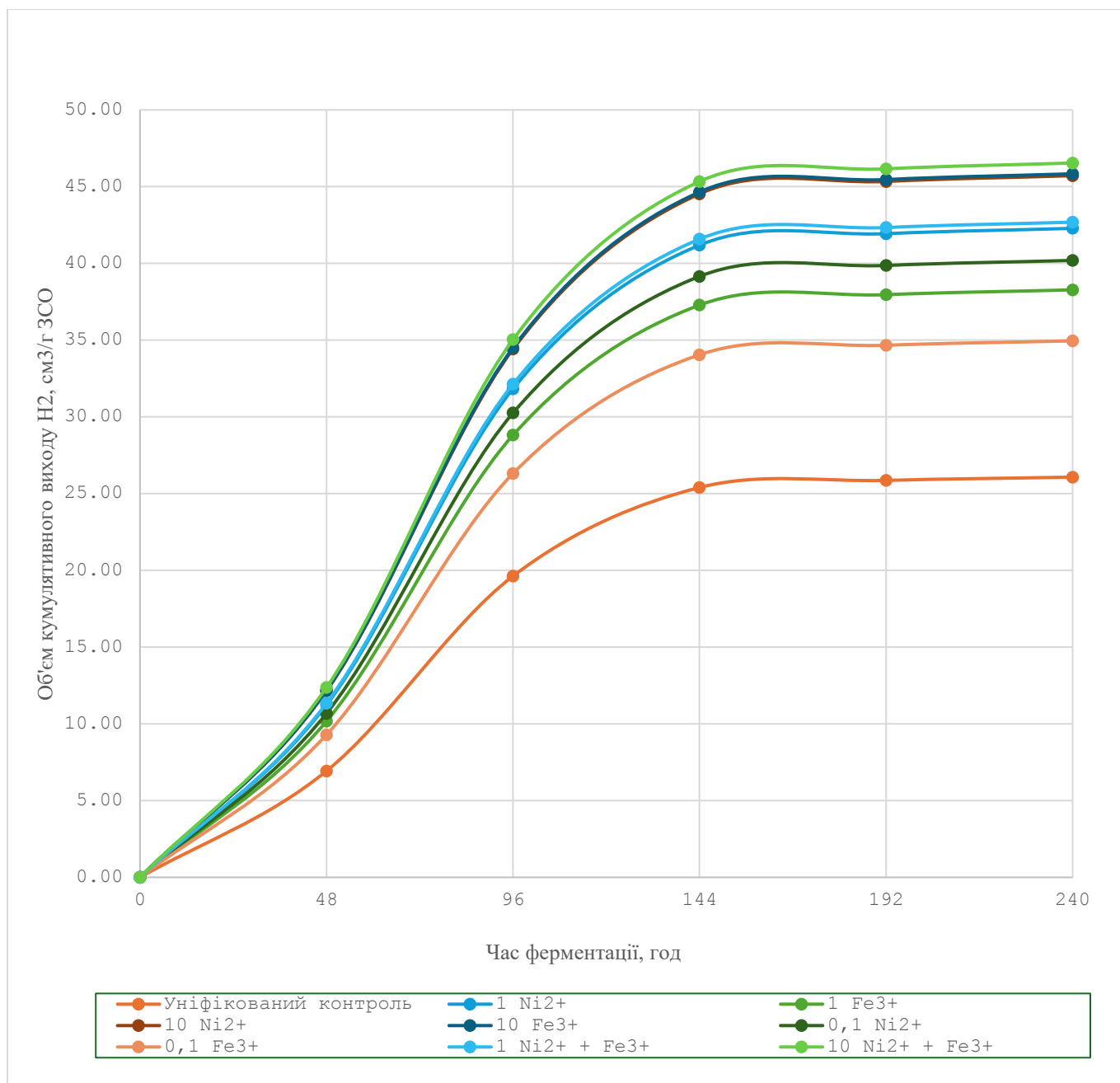


Рисунок 3.7 – Графік залежності доданої концентрації іонів металів до приросту кумулятивного виходу біоводню на 1 грам ЗСО

3.7 Прогностичне моделювання динаміки газовиділення та побудова прогностичних графіків інтенсифікації процесу.

На основі розрахункових даних пункту 3.6, доповнили вміст математичної моделі пункту 3.1 отриманими показниками *in vitro*. Розроблену візуалізацію наведено на рисунку 3.8.

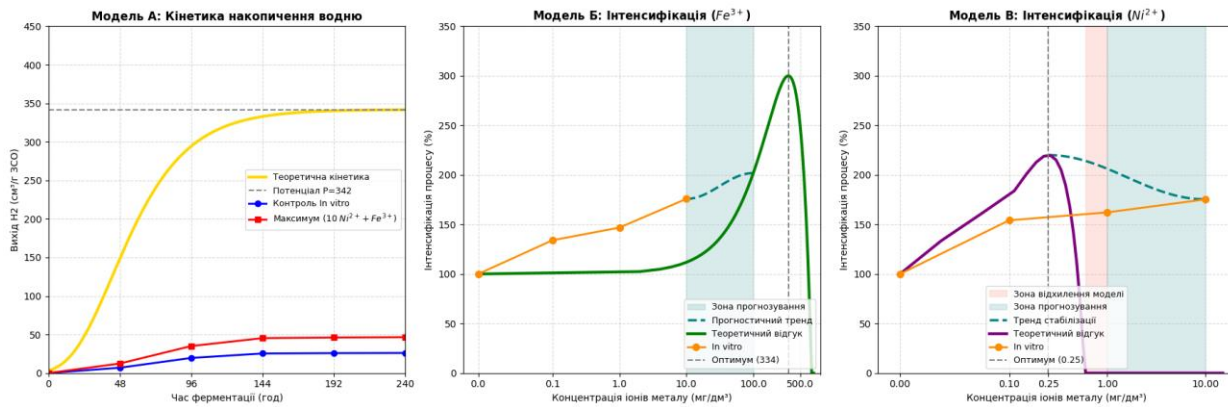


Рисунок 3.8 – Математичні моделі кінетики накопичення біоводню, *in silico* та *in vitro* (Модель А) та дозозалежної інтенсифікації процесу за участю іонів Fe³⁺ і Ni²⁺ р прогностичним трендом, зоною прогнозування та зоною відхилення моделі з зоною прогнозування (Моделі Б і В відповідно)

Аналіз кінетики накопичення біоводню (Модель А) демонструє співвідношення між максимально можливим теоретичним виходом (342 см³/г ЗСО) та реальними показниками експериментальних батч-систем. Спостерігається крива уніфікованого контролю, що знаходиться на значно нижчому рівні порівняно з розрахунковою S-подібною лінією (теоретична кінетика), що пояснюється складністю та гетерогенністю використаного бінарного субстрату порівняно з ідеальними модельними середовищами. Внесенням суміші іонів металів 10 Ni²⁺+Fe³⁺ до дослідного зразку забезпечили приріст газовиділення відносно контролю, проте загальна траєкторія все ще

залишається в межах реалістичних значень для даного типу відходів. Порівняння кривої дослідного зразку $10 \text{ Ni}^{2+} + \text{Fe}^{3+}$ свідчить про позитивний вплив на інтенсивність газовиділення порівняно з контролем. Згідно аналізу моделі А, збільшення доданої концентрації металів-кофакторів є прийнятним способом збільшення газовиділення.

Дослідження дозозалежного відгуку на внесення іонів Феруму (Модель Б), візуалізоване у напівлогарифмічному масштабі, ілюструє високу кореляцію між отриманими практичними результатами та теоретичною кривою гормезису на початкових етапах. Фактичні експериментальні точки інтенсифікації плавно зростають, формуючи висхідний тренд, який повністю відповідає логіці теоретичної моделі до досягнення концентрації 10 мг/дм^3 . Для екстраполяції подальшої поведінки системи сформували прогностичну зону (виділена бірюзовим кольором), у межах якої побудували математичний тренд. Цей тренд з'єднує останню експериментальну точку з очікуваним теоретичним оптимумом (334 мг/дм^3). Пологий характер прогностичної кривої підтверджує високу метаболічну толерантність досліджуваного мікробного консорціуму до іонів Fe^{3+} та вказує на перспективність подальшого нарощування макродоз для досягнення пікових значень газовиділення.

Під час дослідження дозозалежного відгуку на внесення іонів Ni^{2+} (Модель В) спостерігали розходження між теоретичними розрахунками *in silico* та реальними результатами *in vitro*. Згідно з теоретичною моделлю, після досягнення вузького оптимуму ($0,25 \text{ мг/дм}^3$) токсичність Ni^{2+} стрімко зростає, що має призводити до повного пригнічення синтезу біоводню вже при концентрації $0,6 \text{ мг/дм}^3$. Однак дані, отримані з результатів *in vitro* демонструють стабільну прогресію приросту: крива приросту перетинає межу розрахункової токсичності та продовжує зростати. Ця крива зростання зафіксована у червоній «зоні відхилення моделі» ($0,6\text{--}1,0 \text{ мг/дм}^3$).

РОЗДІЛ 4. СТАРТАП-ПРОЄКТ

4.1 Резюме проєкту

Основний матеріал по стартап-проєкту систематизовано в таблиці 4.1

Таблиця 4.1 – Резюме стартап-проєкту

Показник	Характеристика
Показник	Характеристика
1. Авторська сутність ідеї	Виробництво водню за допомогою біотехнологій для використання в енергетиці.
2. Наявність аналогів або прототипів ідеї	У світі існують подібні проєкти (наприклад, в ЄС), але в Україні аналогів немає.
3. Основна потреба, яку задовольнить реалізований стартап	Задоволення попиту на екологічно чисте паливо, відповідність сучасним екологічним стандартам.
4. Ступінь розробленості технології реалізації	Прототип технології перевірений у лабораторних умовах, потрібна масштабна апробація.
5. Класифікація продукту стартапу за міжнародною класифікацією товарів	Клас 1: Хімічні продукти, Клас 4: Промислові гази
6. КВЕД, до якого може належати дане виробництво	20.11 Виробництво промислових газів, 72.19 Дослідження та розробки у сфері біотехнологій
7. Очікувана потужність стартапу	Середнє підприємство
8. За масштабом виробництва	Серійне виробництво
9. За рівнем спеціалізації	Вузькопрофільне підприємство
10. За ресурсами, що споживатимуться	Капіталомістке, матеріаломістке, інформаційномістке
11. За чисельністю персоналу	Середнє підприємство (близько 50 осіб на старті виробництва)

Продовження табл. 4.1	
12. Органи управління при реалізації стартапу	Національні, з можливим залученням міжнародних партнерів для досліджень і фінансування
13. Бажане географічне розташування - потужностей стартапу, - офісу стартапу, - збутової мережі - постачальників комплектуючих	- Центральні та східні регіони України, - м. Київ, - Україна з потенційним розширенням на міжнародний ринок, - Україна та іноземні постачальники.
14. Місце ідеї у ланцюжку цінностей інноваційного процесу	На стадії виробництва та логістики
15. Гранична корисність ідеї стартапу	Ідея стартапу має високу граничну корисність, оскільки сприяє зниженню викидів CO ₂ , забезпечує енергетичну незалежність за рахунок використання місцевих біоресурсів, створює нові робочі місця та підтримує розвиток регіонів через залучення інвестицій у сучасні технології. Біотехнологічний метод виробництва водню є економічно вигідним і екологічно чистим, що робить його важливим елементом переходу до стійкої енергетики. Технологія легко масштабується залежно від попиту, відповідає міжнародним стандартам декарбонізації, а також сприяє досягненню цілей сталого розвитку, встановлених ООН.

Продовження табл. 4.1	
16. Бізнес-модель стартапу	Бізнес-модель стартапу базується на концепції B2B (business-to-business) із поступовим переходом до B2G (business-to-government). Основними споживачами продукту є великі транспортні компанії, промислові підприємства та державні організації, зацікавлені у переході на екологічно чисті джерела енергії. Стартап пропонує не лише постачання водню, але й створення комплексної інфраструктури для його транспортування, зберігання та використання. Завдяки інтеграції з екологічними та інноваційними програмами, модель передбачає залучення державних і приватних інвестицій, участь у міжнародних проектах, а також використання грантів і субсидій на розвиток "зеленої" енергетики. Стратегія включає довгострокові контракти із замовниками, розширення ринку через партнерства з логістичними та дистриб'юторськими компаніями, а також інтеграцію до європейської мережі виробництва і споживання водню. Орієнтація на інноваційність, стабільність постачання та відповідність екологічним стандартам дозволяє створити конкурентну перевагу на локальному та міжнародному ринках.
17. Конкуренти вітчизняні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні конкурентні переваги, фактори успіху)	70 грн/м ³ , пілотні проекти, локальне виробництво, стабільний попит
18. Конкуренти іноземні (ціна, на якому етапі реалізації знаходяться, основні конкурентні переваги, фактори успіху)	100–150 грн/м ³ , масове виробництво, висока потужність.

Продовження табл. 4.1	
19. Ключові фактори успіху стартапу	Ключовими факторами успіху стартапу є інноваційність та екологічність запропонованого рішення, які дозволяють відповідати сучасним глобальним викликам у сфері енергетики та охорони довкілля. Біотехнологічні методи виробництва водню забезпечують економічну ефективність та екологічну безпечність, що є вагомим конкурентним перевагою. Висока гнучкість технології дає масштабувати виробництво залежно від попиту, а інтеграція з державними програмами декарбонізації та підтримкою зеленої енергетики дозволяє залучати додаткові інвестиції та користуватися пільговими умовами. Налагодження партнерських відносин із великими промисловими підприємствами, транспортними компаніями та міжнародними корпораціями сприяє розширенню ринків збуту та забезпечує стабільний попит. Важливим фактором є відповідність продукту міжнародним екологічним стандартам, що відкриває доступ до ринків ЄС і стимулює залучення стратегічних партнерів. Крім того, професійна команда, включно з інженерами, маркетологами та менеджерами, дозволяє ефективно впроваджувати нові технології, реалізовувати маркетингові стратегії та забезпечувати стабільний розвиток стартапу.

Продовження табл. 4.1	
20. Споживачі (основні на етапі впровадження, групи, орієнтовна чисельність)	Транспортні компанії, промислові підприємства.
21. Планова кількість продукту розробки для першого етапу реалізації	10000 м ³
22. Мінімальна кількість виробництва за методом точки беззбитковості	4000 м ³ за рік
23. Споживачі на етапі розвитку	Приватний сектор, електростанції
24. Споживачі на етапі зрілості	Масові споживачі – державні програми, міжнародні корпорації
25. Конкурентна ціна на продукт стартапу	70–80 грн/м ³
26. Плановий рівень рентабельності при реалізації продукту	15–20%
27. Капіталовкладення в проект	10 000 000 грн
28. Період повернення капіталовкладень у проект	5 років
29. Джерела фінансування	Зовнішні (державні програми, інвестиції ЄС), внутрішні (приватні інвестори, гранти)
30. Основні компоненти продукції стартапу (їх доля у готовому товарі, ступінь готовності компонентів у наявному виробництві)	Біомаса (60%), ферменти (20%), енергетичне забезпечення (20%)
31. Потенційні постачальники складових компонентів розробки (виділити вітчизняних і закордонних, плановий обсяг замовлень, наявна потужність постачальника)	RGC Production (Україна), NEL Hydrogen (Норвегія)

Продовження табл. 4.1	
32. Планове місце реалізації результату розробки (місце, планова доля реалізації продукту через це місце)	Україна, ЄС
33. Наявність посередників при реалізації (так, ні, орієнтовні посередники, форми оплати їх діяльності)	Наявні посередники: торгові представники, дистриб'ютори. Форми оплати їх діяльності: відсоток від продажу, фіксована плата за контрактом, комісія за залучення нових клієнтів.

4.2 Аналіз зовнішнього та внутрішнього середовища стартапу

Зовнішнє макросередовище визначає «правила гри» на ринку альтернативної енергетики та екологічно чистих палив, створюючи як бар'єри у вигляді жорстких технічних регламентів і стандартів безпеки для промислового газового обладнання, так і вікна можливостей через глобальний тренд на декарбонізацію промисловості та стрімкий перехід до відновлюваних джерел енергії. У таблиці 4.2 систематизовано ключові фактори впливу, що дозволяють адаптувати стратегію стартапу до динамічних умов світового біоенергетичного простору.

Таблиця 4.2 – Аналіз можливостей та загроз зовнішнього середовища

Фактор	Загрози	Можливості
Економіка		
1. Макроекономічна кон'юнктура та умови державного фінансування	Висока волатильність національної валюти та інфляційні процеси, що критично ускладнюють довгострокове фінансове планування діяльності стартапу.	Запровадження комплексних державних програм цільового субсидування екологічних ініціатив, що відкриває доступ до спеціалізованого пільгового кредитування.
2. Динаміка ринку енергоресурсів та ціноутворення на сировину	Постійна тенденція до зростання вартості біомаси та інших органічних ресурсів, що здатне суттєво підвищити собівартість кінцевого енергопродукту.	Стійке зростання глобального попиту на енергоносії з низьким вуглецевим слідом, яке гарантує стабільне та прогнозоване розширення ринку збуту.

Продовження табл. 4.1		
3. Стан інвестиційного клімату у секторі відновлюваної енергетики	Гострий дефіцит приватного венчурного капіталу для фінансування високоризикових R&D проектів на ранніх стадіях їхньої практичної реалізації.	Посилення інтересу міжнародних інституційних інвесторів до проектів у сфері біоенергетики, що створює сприятливе підґрунтя для залучення капіталу.
Політика		
1. Трансформація національного законодавства у сфері клімату	Непередбачуваність регуляторних змін, зокрема висока ймовірність раптового запровадження додаткових фіскальних навантажень або жорстких технічних обмежень.	Активізація державних ініціатив у межах національної політики декарбонізації, що забезпечує довгострокову нормативну підтримку інноваційних рішень.
2. Вплив геополітичного середовища на міжнародне партнерство	Глобальна геополітична нестабільність, яка виступає демотивуючим фактором для іноземних партнерів щодо участі у програмах технологічного співробітництва.	Широка можливість інтеграції у глобальні енергетичні альянси під егідою міжнародних організацій для безперешкодного трансферу передових технологій.
3. Гармонізація технічних регламентів та стандартів якості	Ризики виникнення непередбачуваних адміністративних бар'єрів під час ліцензування через наявні розбіжності між внутрішніми та міжнародними нормами.	Планомірна адаптація вітчизняної нормативно-правової бази до директив Європейського Союзу, що сприяє полегшенню виходу на європейський ринок.
Науково-технічний прогрес		
1. Інтенсивність інноваційної конкуренції у профільній галузі	Високий рівень конкурентного тиску з боку великих енергетичних корпорацій, що володіють незрівнянно більшим ресурсним потенціалом для проведення досліджень.	Стрімкий паралельний розвиток суміжних технологічних галузей, що дозволяє стартапу системно оптимізувати та здешевлювати процеси розробки й тестування.
2. Темпи життєвого циклу профільних інноваційних технологій	Перманентний ризик прискореного морального старіння обраних наукових підходів у зв'язку з появою більш ефективних методів синтезу енергоносіїв.	Висока організаційна адаптивність стартап-моделі, що дозволяє вкрай оперативно інтегрувати найновіші фундаментальні відкриття у власну архітектуру.

Продовження табл. 4.2		
3. Умови доступу до передової науково-дослідної інфраструктури	Суттєво обмежений доступ до високотехнологічного лабораторного обладнання та непропорційно великі витрати на юридичний захист інтелектуальної власності.	Формування стратегічних колаборацій із профільними дослідницькими університетами та науковими парками для спільного використання матеріально-технічної бази.
Демографія		
1. Динаміка міграційних процесів та зміна структури трудових ресурсів	Відтік висококваліфікованих інженерно-технічних та наукових кадрів за кордон, що формує гострий дефіцит спеціалістів для забезпечення R&D діяльності стартапу.	Залучення перспективних випускників профільних закладів вищої освіти шляхом створення цільових програм стажування та співпраці з університетами.
Культура		
1. Еволюція екологічної свідомості та сприйняття інновацій суспільством	Імовірність прояву локального соціального спротиву щодо розміщення новітніх енергетичних об'єктів через побутові упередження щодо їхньої безпеки.	Формування високої лояльності з боку споживачів та інвесторів завдяки позиціонуванню підприємства як соціально відповідального еко-бренду.
Географія		
1. Агрокліматичний потенціал та територіальний розподіл сировинної бази	Залежність стабільності виробничого циклу від сезонних погодних коливань та природної циклічності накопичення органічної сировини.	Стратегічно вигідне розміщення потужностей у безпосередній близькості до агропромислових комплексів, що критично мінімізує логістичні витрати.

У таблиці 4.3 систематизовано фактори, що формують позицію стартапу як реального проєкту конкурентного екологічного енергоносія.

Таблиця 4.3 – Аналіз оперативного середовища

Фактор	Переваги	Недоліки
Конкуренти		
Ринкова позиція та масштаб гравців	Вітчизняні конкуренти перебувають на ранніх стадіях розвитку, що створює сприятливі умови для швидкого захоплення локальної частки ринку.	Іноземні компанії вже володіють масштабним виробництвом та доступом до великих ринків, що ускладнює конкуренцію на глобальному рівні.
Технологічний підхід та ціноутворення	Використання унікального біотехнологічного методу виробництва водню забезпечує суттєву диференціацію від традиційних технологій конкурентів	Загальна висока конкуренція в енергетичному секторі створює постійний тиск на ціноутворення та вимагає боротьби за збереження частки ринку.
Постачальники		
Забезпечення сировинною базою (біомасою)	Можливість залучення локальних постачальників органічної сировини суттєво оптимізує логістичні витрати та підтримує місцеву економіку.	Критична залежність виробництва від стабільності поставок сировини, яка може порушуватися внаслідок економічних чи політичних криз.
Матеріально-технічне апаратне забезпечення та	Доступ до високоякісного технологічного обладнання від провідних міжнародних виробників із підтвердженою індустріальною репутацією.	Значні фінансові витрати на імпорт спеціалізованого обладнання та матеріалів, що супроводжується митними та валютними ризиками.
Споживачі		
Динаміка попиту та обізнаність ринку	Стійке зростання попиту на водневе паливо у промисловому та транспортному секторах, стимульоване державними програмами декарбонізації	Низький рівень обізнаності клієнтів щодо специфічних переваг саме біоводню, що може суттєво гальмувати швидкість прийняття інноваційного продукту..
Формування B2B відносин та стандарти якості	Наявність перспективи укладання стабільних довгострокових контрактів із великими промисловими споживачами енергоресурсів.	Надзвичайно високі вимоги корпоративних клієнтів до сертифікації, стабільності обсягів постачання та відповідності жорстким стандартам якості

Продовження табл. 4.3		
Посередники		
Інфраструктура дистрибуції "зеленої" енергії	Наявність на ринку сформованих логістичних компаній та дистриб'юторів, які вже мають досвід та адаптовані до роботи з альтернативними джерелами енергії.	Високий ступінь залежності безперебійності поставок від операційної ефективності та надійності обраних логістичних партнерів.
Економічна взаємодія та доступ до ринку	Спостерігається зростаючий інтерес логістичного бізнесу до формування партнерств із перспективними екологічними стартапами.	Залучення посередників неминуче підвищує собівартість продукту через комісійні збори та обмежує прямий доступ розробника до кінцевого споживача.

У таблиці 4.4 проведено ранжування зацікавлених сторін, де пріоритет зміщено на суб'єктів, здатних прискорити впровадження рішень реальних проєктів відновлювальної енергетики світовий ринок енергоносіїв.

Таблиця 4.4 – Аналіз зацікавлених сторін

Зацікавлена сторона	Вплив на реалізацію	Цікавість її до проєкту	Загальний коефіцієнт впливу
Суб'єкти зовнішнього оперативного середовища			
Виробник:			
Команда розробників (технологи, інженери стартапу)	5	5	5
Постачальники:			
Агropідприємства (постачальники біомаси / субстрату)	4	3	3.5
Постачальники лабораторного та промислового обладнання	3	3	3
Споживачі:			
Промислові підприємства	4	4	4
Енергогенеруючі компанії	3	4	3.5
Посередники:			
Логістичні компанії	3	3	3
Енергетичні трейдери та дистриб'ютори	3	4	3.5
Конкуренти:			
Традиційні виробники водню	4	2	3

Продовження табл. 4.4			
Інші стартапи у сфері біоенергетики	3	4	3.5
Зовнішнє середовище			
Політичні структури:			
Міністерство енергетики України	4	3	3.5
Державні регулятори (НКРЕКП тощо)	4	3	3.5
Місцеві органи влади	3	4	3.5
Державна екологічна інспекція	4	3	3.5
Суб'єкти економічного середовища:			
Інвестори (Venture Capital / грантові фонди)	5	4	4.5
Банки (кредитори)	3	3	3
Власники географічних об'єктів:			
Власники промислових зон	2	2	2
Суб'єкти демографії:			
Екосвідоме населення	2	3	2.5
Суб'єкти культурного середовища:			
Екологічні активісти	3	3	3
ЗМІ	2	3	2.5
Суб'єкти НТП:			
Наукові й конструкторські організації (дослідні інститути)	4	4	4
Експериментальні (дослідні) підприємства	3	4	3.5

Внутрішнє середовище проєкту відображає його здатність трансформувати науковий капітал у технологічну перевагу, попри обмеженість початкових ресурсів. У таблиці 4.5 систематизовано ключові компетенції та зони росту команди.

Таблиця 4.5 – Аналіз внутрішнього середовища

	Переваги	Недоліки
Організаційна структура	1. Гнучкість управління завдяки невеликому розміру стартапу 2. Чіткий розподіл функцій і обов'язків між членами команди	1. Недостатній досвід команди у масштабуванні виробництва 2. Обмеженість ресурсів для створення багаторівневої організаційної структури
Технологічне забезпечення	1. Унікальна технологія біотехнологічного виробництва водню, що забезпечує конкурентну перевагу 2. Можливість модернізації обладнання для масштабування виробництва	1. Висока вартість закупівлі та обслуговування обладнання 2. Технологія потребує подальшої оптимізації для зниження собівартості
Персонал	1. Висока кваліфікація інженерів і технологів у сфері біотехнологій 2. Мотивація команди до інновацій та розвитку	1. Невелика кількість досвідчених працівників для забезпечення всіх напрямків діяльності 2. Необхідність додаткового навчання персоналу для роботи з новітніми технологіями.
Забезпечення ресурсами	1. Наявність доступу до місцевих джерел біомаси, що знижує логістичні витрати 2. Можливість залучення іноземних ресурсів через партнерські програми	1. Залежність від стабільності постачання сировини 2. Високі витрати на імпорتنі матеріали та обладнання.

4.3 Визначення ключових факторів успіху стартапу

Конкурентний аналіз за методом Шонфільда дозволяє об'єктивно оцінити ринкову позицію стартапу, перевівши якісні переваги наукової розробки у кількісні показники конкурентоспроможності. У таблиці 4.6 наведено порівняльну характеристику проєкту відносно світових лідерів індустрії CADD, що базується на зважених оцінках ключових параметрів успіху.

Таблиця 4.6 – Конкурентний аналіз за методом Шонфільда

Фактор	Коефіцієнт	Наша продукція	Конкурент А (EnviTec Biogas)	Конкурент Б (Nel Hydrogen)
Екологічність виробництва	0,1	$4,67 \times 0,1 = 0,47$	$3,33 \times 0,1 = 0,33$	$3,67 \times 0,1 = 0,37$
Собівартість продукції	0,2	$4,35 \times 0,2 = 0,87$	$4,00 \times 0,2 = 0,80$	$4,30 \times 0,2 = 0,87$
Енергоефективність використання	0,1	$3,67 \times 0,1 = 0,37$	$3,67 \times 0,1 = 0,37$	$3,67 \times 0,1 = 0,37$
Безпека транспортування	0,1	$4,33 \times 0,1 = 0,43$	$4,67 \times 0,1 = 0,47$	$4,33 \times 0,1 = 0,43$
Доступність постачання	0,1	$4,67 \times 0,1 = 0,47$	$4,33 \times 0,1 = 0,43$	$3,33 \times 0,1 = 0,33$
Технологічна інноваційність	0,1	$4,33 \times 0,1 = 0,43$	$3,67 \times 0,1 = 0,37$	$4,33 \times 0,1 = 0,43$
Відповідність стандартам	0,2	$5 \times 0,2 = 1,00$	$4,67 \times 0,2 = 0,93$	$4,67 \times 0,2 = 0,93$
Підтримка та обслуговування	0,1	$4,33 \times 0,1 = 0,43$	$4,33 \times 0,1 = 0,43$	$4,67 \times 0,1 = 0,47$

На рисунку 4.1 відображено діаграму Шонфільда, яка демонструє амплітуду переваг нашого продукту за кожним із пріоритетних критеріїв оцінки.

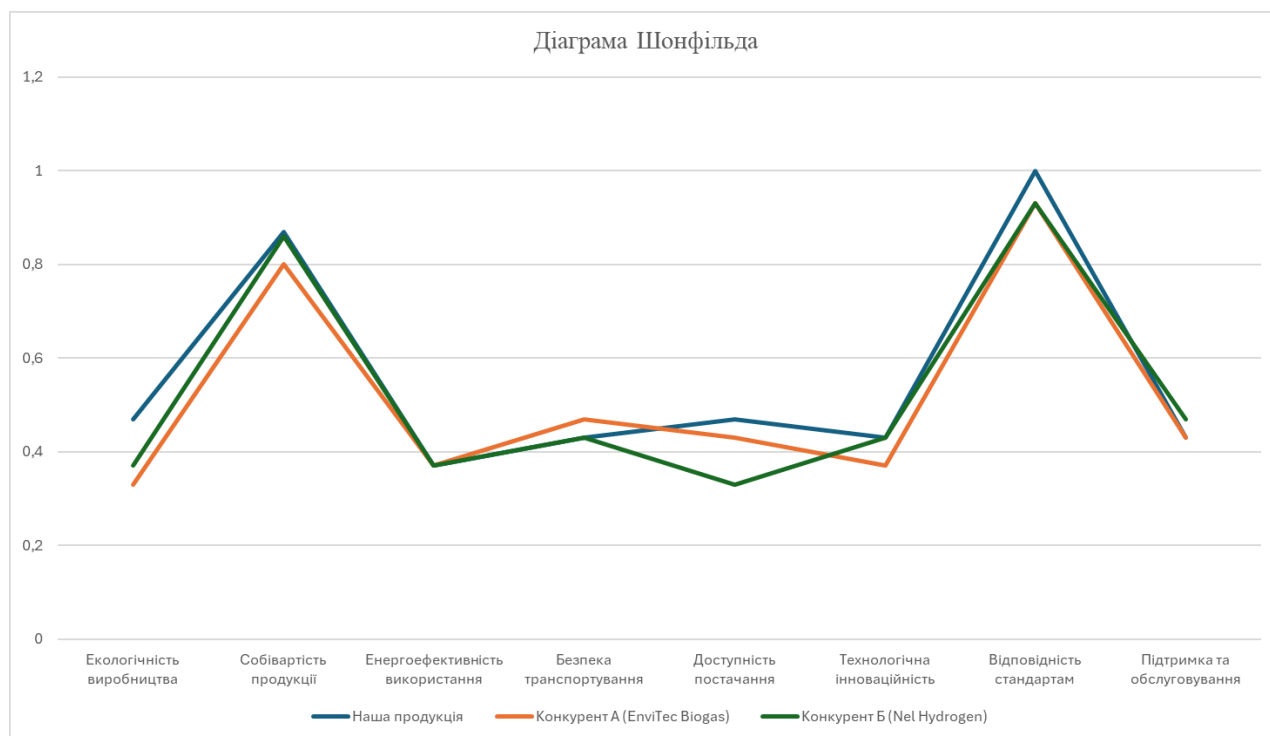


Рисунок 4.1 – Порівняння конкурентних переваг підприємства з конкурентами

Розробка перевершує конкурентів у точності моделювання поринів, прозорості обчислень та безпеці даних. Завдяки ціновій політиці та спеціалізації на наукових викликах, проєкт демонструє високу інтегральну ефективність. Сценарії його подальшої еволюції описано в таблиці 4.7.

Таблиця 4.7 – Варіанти розвитку стартап-проєкту

Варіант розвитку	Стислий опис можливого розвитку
1. Локальне виробництво та збут у межах України	Стартап зосереджується на виробництві водню для внутрішнього ринку України. Основними споживачами стануть промислові підприємства, транспортні компанії та енергетичний сектор. Проєкт використовує українську інфраструктуру для мінімізації логістичних витрат і залучає державну підтримку для декарбонізації економіки.
2. Розширення на ринок ЄС через партнерство	Реалізація партнерства з європейськими інвесторами для розвитку виробництва та виходу на ринок ЄС. Проєкт інтегрується у європейську водневу екосистему, залучає фінансування через програми підтримки ЄС та дотримується міжнародних стандартів якості.
3. Масштабування та диверсифікація продуктів	Розширення виробництва з фокусом на створення побічних продуктів (біогаз, добрива) та комбінованих виробничих комплексів. Це дозволяє збільшити прибутковість, зменшити кількість відходів та забезпечити стійкість бізнесу через диверсифікацію продуктів.

4.4 Визначення потенційних споживачів

Таблиця 4.8 – Потенційні споживачі

Критерій	Значення
1. Юридична особа	
1. Форма власності	- Державна, приватна, змішана.
2. КВЕД	- 35.21: Виробництво газу;
	- 35.30: Постачання газу;
	- 35.11: Виробництво електроенергії;
	- 72.11: Дослідження і експериментальні розробки у сфері біотехнологій;
	- 49.41: Вантажний автомобільний транспорт;
	- 71.12: Діяльність у сфері інжинірингу, геології та геодезії, надання послуг технічного консультування в цих сферах
3. За потужністю	малі, середні, великі підприємства.
4. За масштабом виробництва	серійне, масове виробництво.
5. За рівнем спеціалізації	вузькопрофільні підприємства, багатoproфільні компанії.
6. За ресурсами, що споживаються	енергоємкі, матеріаломісткі, капіталомісткі, інформаціємісткі.

Продовження табл. 4.8	
7. За чисельністю персоналу	малі (до 50 працівників), середні (51–250 працівників), великі (понад 250).
8. За сферою діяльності	- транспорт;
	- енергетика;
	- наукові дослідження;
9. За приналежністю капіталу	національні, іноземні, транснаціональні (ТНК).
10. За географічним розташуванням	Україна, країни ЄС, США.
11. За віддаленістю органів управління	міжнародні, транснаціональні.
12. За характером господ. діяльності	виробничі, наукові, торгові, інфраструктурні.
13. За рівнем технол. цілісності	інтегровані підприємства, автономні..
14. За долею іноземного капіталу	зі 100% іноземним капіталом, із частковою іноземною участю, без іноземного капіталу.
15. За формуванням статутного капіталу	державний, приватний, змішаний.
16. За організацією виробн. процесів	безперервні
17. За роботою протягом року	позасезонні.
18. За розташуванням в Україні	Великі міста, малі міста
19. За наявністю вільних коштів	наявні вільні оборотні засоби або грантове фінансування.
20. За динамікою розвитку регіону	Регіон ЄС та Україна, США
2. Фізична особа (науковці, експерти)	
1. Вік	30–60 років (власники агробізнесу, інвестори, власники домогосподарств).
2. За платоспроможністю	середній та високий рівень.
3. За соціальним рівнем	середній, високий клас.
4. За способом життя	Фізичні проживання у передмісті або сільській місцевості.
	Соціальні: екологічна свідомість.
5. Тип особистості	реаліст (економічна вигода), ідеаліст (пошук екологічних рішень).
6. За ставленням до товару	Мотивація: енергонезалежність.
	Пошук вигоди: стабільне енергопостачання.
	Інформованість: висока.

Продовження табл. 4.8	
7. За ціною межею	Готовність до вищої ціни (орієнтир на окупність інвестицій за 5–7 років)
8. За інтенсивністю споживання	Систематичне, регулярне.
9. За інформованістю	спеціальні джерела (профільні виставки, галузеві ресурси, еко-спільноти).

Таблиця 4.9 – Потреби споживачів

1. Агропромислові комплекси (фермерські господарства)	1. Економічно вигідна та екологічно безпечна утилізація накопичених органічних відходів тваринництва і рослинництва.
	2. Здобуття енергетичної автономності господарства та отримання високоякісних супутніх біодобрих..
2. Енергогенеруючі та логістичні компанії	1. Диверсифікація джерел енергії шляхом інтеграції відновлюваних видів палива у загальний енергобаланс.
	2. Забезпечення комерційного транспорту екологічно чистим водневим паливом для виконання програм декарбонізації.

Таблиця 4.10 – Паспорт клієнта

Характеристика	Значення	Примітки
Організаційно-правова форма:	ТОВ, ПрАТ, Фермерське господарство (ФГ)	Орієнтація на середній та великий комерційний бізнес
Класифікація:		
- за потужністю	середнє, велике	Промислові споживачі енергії або великі агрохолдинги з власною сировиною.
- за чисельністю персоналу	50 – 1000+ співробітників	Компанії зі стабільною організаційною структурою та бюджетами на модернізацію.
- за обсягом виробництва	масове, безперервне	Потребують стабільного та безперебійного енергозабезпечення 24/7.
- за сезонністю виробництва	позасезонне	Споживання енергії та процеси генерації відходів (для агро) тривають цілий рік
Розташування:		
- тип населеного пункту	- місто	Цільова локація для підприємств хімічної, металургійної та транспортної галузей
	- снт / село	Критично для агропромислових комплексів (близькість до сировинної бази біомаси)

	Продовження табл. 4.10	
	- інше (інфраструктура)	Наявність газотранспортної або автомобільної інфраструктури
Вид продукції	"Зелений" водень (газ), супутні біодобрива або біоенергетична установка "під ключ"	Формат залежить від моделі співпраці (постачання палива чи інтеграція технології).
Призначення розробки	Забезпечення виробничих процесів енергією, утилізація відходів	Одночасне вирішення енергетичних та екологічних завдань підприємства.
Кваліфікація персоналу:		
- робочі	базова або середня технічна	Здатність обслуговувати базові вузли інфраструктури після інструктажу.
- службовці	вища технічна	Наявність фахівців для безпечної інтеграції нових енергоносіїв у систему підприємства.
- керівники	топ-менеджмент, вища управлінська	Необхідне стратегічне розуміння довгострокової економічної вигоди від еко-інновацій.
Обсяг споживання:		
- одиниці	1–5 установок/комплексів	Актуально, якщо клієнт купує саму технологію генерації для власних потреб.
- періодичність	довгострокові контракти на обсяги (щомісячно)	Систематичні закупівлі кубометрів газу для підтримки безперервного виробництва.
Хто приймає рішення	Власник бізнесу, CEO, Головний інженер, Директор зі сталого розвитку (CSO)	Орієнтуються на термін окупності інвестицій, надійність постачання та безпеку

Таблиця 4.11 – Обсяг реалізації

Місяць	Травень, 2026	Червень, 2026	Липень, 2026	Серпень, 2026	Вересень, 2026	Жовтень, 2026	Листопад, 2026	Грудень, 2026	Січень, 2027	Лютий, 2027	Березень, 2027	Квітень, 2027
Реалізація біоводню (тис. м ³)	5	8	12	15	20	25	30	35	20	25	45	60

4.5. Ціна інноваційної пропозиції на ринку

Формування ціни базується на аналізі вартості екологічно чистих енергоносіїв у сегменті альтернативної енергетики, зокрема на ринку виробництва "зеленого" водню. У таблиці 4.12 наведено порівняння нашої розробки з найближчим ринковим аналогом промислового рівня, середня вартість якого становить 32 000 грн за 1 тисячу кубічних метрів.

Таблиця 4.12 – Проектні ціни

Найменування товару	Планові обсяги продажу		Аналоги, прототипи	
	Кількість, од	Ціна, грн/од	Кількість, од	Ціна, грн/од
Очищений біоводень (тис. м ³)	300	32 550	1500	32 000

Для формування обґрунтованої вартості розробленої технології виробництва та очищення біоводню застосовано комплексний підхід, що базується на комбінації витратного, параметричного та конкурентного методів, з верифікацією через аналіз точки беззбитковості.

1. Витратний метод Даний метод дозволяє визначити мінімальний поріг ціни, виходячи з повної собівартості розробки та нормативного рівня прибутку.
 $C = C + \Pi$ [грн/од],

де C – прогнозована ціна товару, грн/од;

C – очікувана собівартість одиниці товару, грн/од;

Π – фіксований прибуток від собівартості.

Розрахунок ціни одиниці продукції:

$$C = 31\,000 + 5\% = 31\,000 + 1550 = 32\,550 \text{ грн.}$$

2. Параметричний метод враховує вагомість ключових якісних характеристик платформи та їх експертну оцінку порівняно з існуючим ринковим аналогом (таблиця 4.13).

Таблиця 4.13 – Розрахунок технічно обґрунтованої ціни параметричним методом

Продукт	Екологічність виробництва		Точність очищення газу		Точність очищення газу		Ціна
	бали	коеф. вагомості	бали	коеф. вагомості	бали	коеф. вагомості	
Аналог	80	0,3	90	0,4	75	0,3	32000
Новий	100	0,3	95	0,4	90	0,3	36848*

3. Конкурентний метод. Оскільки середня ринкова ціна на традиційний «зелений» водень від компаній-аналогів становить близько 32 000 грн за 1 тис. куб. м, ціну стартап-проєкту було прийнято на рівні 32 550 грн. Такий підхід дозволяє підвищити зацікавленість з боку промислових споживачів завдяки пропозиції схожої ринкової вартості при забезпеченні суттєво вищої якості очищення газу та вищої ефективності процесу гідрогеногенезу.

4. Метод на основі аналізу точки беззбитковості. Графік точки беззбитковості (рис. 4.2) ілюструє динаміку взаємозв'язку між витратами та виручкою стартап-проєкту з виробництва біоводню залежно від обсягу реалізації цільового продукту.

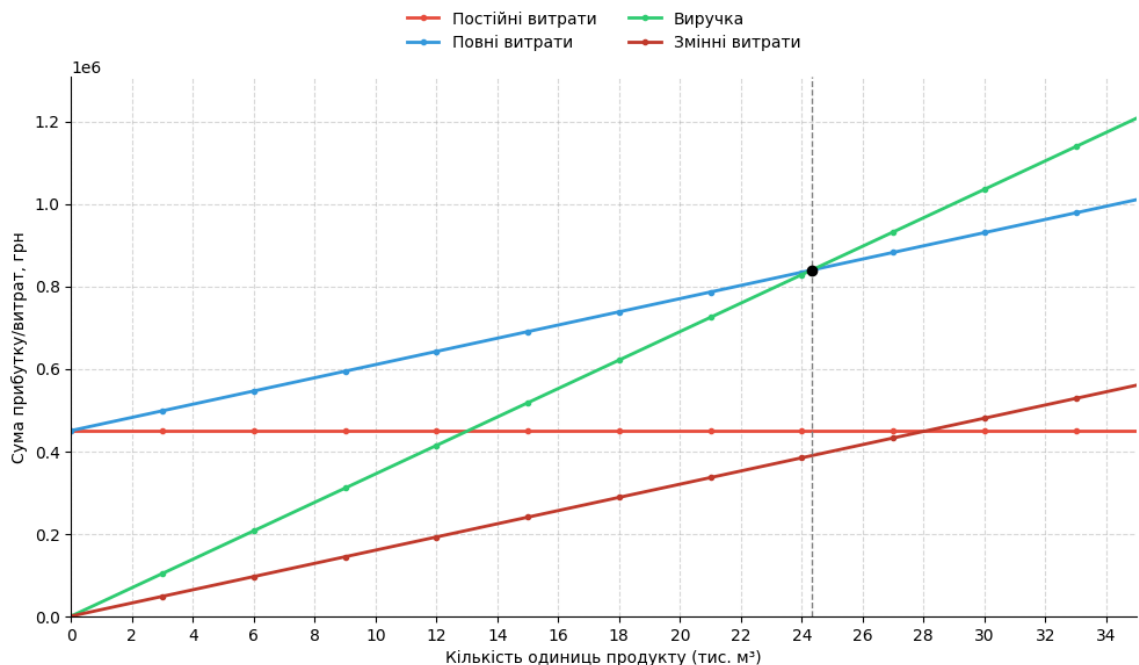


Рисунок 4.2 – Графік беззбитковості

Графічний аналіз підтвердив, що точка беззбитковості стартапу досягається при реалізації 24,32 одиниць продукції (тис. куб. м біоводню), після чого проєкт переходить у зону прибутку. За умови виконання плану продажів (30 од.) чистий фінансовий результат становить 105 000 грн, що свідчить про достатню рентабельність розробленої технології на початковому етапі комерціалізації.

Для розрахунку повної собівартості розробки було визначено основні етапи реалізації стартап-проєкту та проведено розподіл сумарних витрат між ними. У таблиці 4.14 представлено підсумкові результати розрахунків, що відображають фінансові витрати на створення платформи, починаючи від розробки алгоритмів і закінчуючи виходом на планову потужність.

Таблиця 4.14 – Калькуляція собівартості стартап-продукту

№ п/п	Етап розробки / елемент собівартості	Кількісний показник	Вартісний показник
-------	--------------------------------------	---------------------	--------------------

1	Етап розробки та інжинірингу (проектування установки)	40%	372 000
	- ліцензії на спеціалізоване ПЗ для 3D-моделювання та розрахунків	10%	37 200
	- амортизація комп'ютерного та офісного обладнання	10%	37 200
	- заробітна плата інженерів-проектувальників і нарахування (ЄСВ))	60%	223 200
	- інше (адміністративні витрати на етапі R&D)	20%	74 400
2	Етап впровадження (монтаж та пусконаладження біореактора)	45%	418 500
	- закупівля матеріалів, субстрату та комплектуючих (змінна частина)	50%	209 250
	- амортизація виробничого обладнання (реактори, компресори)	15%	62 775
	- заробітна плата технічного персоналу та ЄСВ	30%	125 550
	- інше (логістичні витрати на доставку обладнання)	5%	20 925
3	Етап виходу на планову потужність (сертифікація та маркетинг)	15%	139 500
	- сертифікація якості біоводню та технічна стандартизація	40%	55 800
	- заробітна плата персоналу відділу збуту та ЄСВ	40%	55 800
	- маркетингові заходи, промо-матеріали та участь у виставках	20%	27 900
	РАЗОМ	100%	930 000

Перехід від теоретичного інжинірингу до матеріального виробництва передбачає інвестування в довгострокові активи, які безпосередньо задіяні в технологічному процесі переробки біомаси. Оцінка капіталомісткості апаратної частини проекту базується на аналізі ринку промислового обладнання для альтернативної енергетики, що дозволяє визначити початкову вартість кожної одиниці основних засобів, терміни їх корисного використання та оптимальні джерела залучення капіталу.

У таблиці 4.15 проведено систематизацію матеріально-технічної бази стартапу із зазначенням функціонального призначення та джерел постачання необхідних активів.

Таблиця 4.15 – Забезпеченість проєкту основними засобами

Місце ОЗ у техпроцесі	Назва ОЗ	Повна початкова вартість, грн	Плановий період експл., років	Очікуваний постачальник	Джерело фінансування
Підготовка та ферментація	Промисловий біореактор (метантенк)	350 000	10	Eisele / місцеві підрядники	Грантові кошти
Очищення та сепарація газу	Система мембранного очищення	280 000	7	Evonik / Pentair	Інвестиційні кошти
Зберігання та транспортування	Газовий компресор високого тиску	150 000	5	Atlas Copco	Власні / Інвестиційні
Контроль якості продукції	Аналітичний газовий хроматограф	180 000	7	Agilent / Shimadzu	Грантові кошти
Адміністрування та облік	Офісне та комп'ютерне оснащення	60 000	5	Dell / Місцеві ритейлери	Власні кошти

Функціонування сформованого комплексу основних засобів та безперебійне проходження технологічних фаз неможливі без належного забезпечення операційними ресурсами. Виробниче обладнання потребує регулярного постачання сировини та енергоносіїв, що формує оборотні фонди підприємства. Розрахунок щорічної потреби в оборотних коштах здійснюється з огляду на плановий річний обсяг генерації газу, забезпечуючи матеріальну основу для покриття змінних витрат на хімічні реагенти, органічні субстрати, енергію та сервісне обслуговування компресорних установок.

У таблиці 4.16 систематизовано матеріальні та енергетичні ресурси відповідно до раніше розрахованої собівартості продукту.

Таблиця 4.16 – Забезпеченість проекту оборотними фондами

Група ОбФ	Назва	Норма витрат на рік	Ціна, грн/од	Очікуваний постачальник	Джерело фінансування
Сировина	Органічний субстрат (біомаса) та хімічні реагенти	1000 тонн	200	Місцеві агропідприємства	Власні кошти
Матеріали	Змінні мембрани та фільтри для очищення газу	12 міс.	5 000	Evonik / M-Кемікал	Виручка
Електроенергія	Електроенергія для промислового обладнання	20 000 кВт*год	8,50	Yasno / ДТЕК	Виручка
Запасні частини	Комплектуючі для насосів та газових компресорів	2 компл.	15 000	Atlas Copco / Prom-Tech	Власні кошти
Інші фонди	Хмарний моніторинг SCADA та управління даними	12 міс.	1 666	AWS / Siemens	Власні кошти

Матеріально-технічні елементи та сировинні потоки потребують кваліфікованого операційного управління, контролю біологічних режимів ферментації та організаційного супроводу збуту. Це зумовлює необхідність формування оптимального штатного розкладу команди стартапу. Визначення потреби в трудових ресурсах базується на принципах мінімізації адміністративних витрат при одночасному забезпеченні високої безпеки

виробництва, що вимагає залучення фахівців із відповідним рівнем кваліфікації.

Таблиця 4.17 – Трудові ресурси

Категорія кадрів	Назва посади	Чисельність	Плановий рівень заробітної плати, грн	Кваліфікаційні вимоги	Джерело фінансування
Керівники	Керівник проєкту (CEO)	1	55 000	Магістр/PhD, досвід управління проєктами в енергетичному або промисловому секторі	Власні кошти / Інвестиції
Спеціалісти	Інженер-біотехнолог (Головний технолог)	1	45 000	Вища освіта (Біотехнологія/Хімія), практичний досвід роботи з біореакторами та метантенками	Грантові кошти
	Інженер-механік (Оператор установки)	1	35 000	Вища технічна освіта, наявність допусків для роботи з газовим обладнанням високого тиску	Власні кошти / Гранти
Допоміжний персонал	Менеджер з B2B продажів	1	25 000	Вища освіта, досвід укладання контрактів у корпоративному сегменті (промисловість, агро)	Виручка

Розрахунок даних щодо капітальних інвестицій в основні засоби, щорічних витрат на оборотні фонди та фінансування трудових ресурсів дозволяє сформувати єдину систему техніко-економічних показників стартап-проєкту. Комплексне зіставлення планової виручки від реалізації біоводню із сумарними операційними витратами дає можливість математично обґрунтувати фінансову стійкість підприємства, визначити його операційну рентабельність та розрахувати точний період повного повернення інвестованого капіталу.

В таблиці 4.18 наведено повністю узгоджену фінальну таблицю техніко-економічних показників, яка об'єднує дані щодо основних засобів, оборотного капіталу та калькуляції собівартості.

Таблиця 4.18 – Техніко-економічні показники проєкту

Показники	Од. вим.	Умове позначення, формула та розрахунок	Значення
1. Річний обсяг реалізації	од.	В	300
2. Середньорічна чисельність персоналу	осіб	Чсп=4	4
3. у тому числі:			
- основних (ІТ/науковці)	осіб		2
- допоміжних / керівників	осіб		2
4. Середньорічний виробіток робітника	од./осіб	ППс.р.=В/Чсп= 30/4	7,5
5. Капіталовкладення у проєкт (К):			
- всього	грн.	$K = OF + OBK = 1\,020\,000 + 480\,000$	1 500 000
- на одиницю продукції	грн./од.	$Код = K/V = 1\,500\,000/300$	5 000
6. Повна собівартість (С):			
- всього	грн.	$C = 31\,000 \times 300$	9 300 000
- на одиницю продукції	грн./од.	$Сод = C/V = 9\,300\,000 / 300$	31 000
7. Відносний прибуток	грн./од.	$\Pi = \Pi - Сод = 34\,500 - 31\,000$	3 500
8. Рентабельність	%	$P = (\Pi / Сод) \times 100 = (3\,500 / 31\,000) \times 100$	11,29%
9. Період повернення капіталовкладень	років	$T_{пов} = K / (\Pi \times V) = 1\,500\,000 / 1\,050\,000$	1,42

Продовження табл. 4.18			
10. Фондовіддача виробничих фондів	грн./грн.	$ФВ=(Ц \times V)/ОФ=10\,350\,000 / 1\,020\,000$	10,15
11. Фондоємність	грн./грн.	$ФЄ=1/ФВ=1 / 10,15$	0,098
12. Продуктивність праці	грн./осіб	$ПП=(Ц \times V)/Ч_{сп}=10\,350\,000 / 4$	2 587 500
13. Коефіцієнт економ. ефективності	—	$Е=(П \times V)/К=1\,050\,000 / 1\,500\,000$	0,7

4.6. Концепція бізнес-моделі проекту

Концепція бізнес-моделі проекту базується на створенні високотехнологічного енергетичного продукту з чітким розмежуванням етапів наукового обґрунтування біологічних процесів, апаратної реалізації та подальшого комерційного впровадження технології. У таблиці 4.19 деталізовано карту бізнес-процесів, яка забезпечує логічну послідовність дій для трансформації інноваційної ідеї у ринково спроможний програмний комплекс.

Таблиця 4.19 – Карта бізнес процесів виконання стартап проекту

Стадія проекту	Ключові бізнес-процеси	Відповідальні (ресурси)	Тривалість	Фінансові витрати
1. Розробка ідеї	Наукове обґрунтування режимів темної ферментації та інженерне проектування біореактора	Інженер-біотехнолог, Керівник проекту	2 міс.	150 000 грн
2. Реалізація ідеї	Закупівля комплектуючих, монтаж установки гідрогеногенезу та систем мембранного очищення	Інженер-механік, Керівник проекту	4 міс.	850 000 грн
3. Випробування	Пусконаладжувальні роботи, тестова генерація та газохроматографічний аналіз чистоти водню	Інженер-біотехнолог, Інженер-механік	2 міс.	250 000 грн
4. Впровадження	Технічна сертифікація енергоносія, отримання екологічних дозволів та технічних умов (ТУ)	Керівник проекту, юрист (аутсорс)	3 міс.	150 000 грн

Продовження табл. 4.19				
5. Реалізація	В2В-продажі, безперебійне постачання біоводню промисловим клієнтам, технічне обслуговування	Менеджер з продажів, вся команда	Постійно	480 000 грн/рік
6. Екзит-стратегія	Масштабування бізнесу (будівництво нових станцій) або продаж активів стратегічному інвестору	Керівник проєкту, консультанти	6-12 міс.	100 000 грн

У таблиці 4.20 відображено зони відповідальності, де кожен етап забезпечується мультидисциплінарною взаємодією команди.

Таблиця 4.20 – Системний аналіз бізнес-процесів

Бізнес-процеси (етапи)	Керівник проєкту	Інженер-біотехнолог	Інженер-механік	Менеджер з продажів
1. Наукове обґрунтування режимів темної ферментації	+	+	–	–
2. Інженерне проєктування біореактора та систем очищення	+	+	+	–
3. Закупівля комплектуючих та монтаж установки	+	–	+	–
4. Пусконаладжувальні роботи та тестова генерація	–	+	+	–
5. Маркетингові дослідження енергетичного ринку	+	–	–	+
6. Пошук В2В-клієнтів (промисловість, агросектор)	–	–	–	+
7. Отримання екологічних дозволів та сертифікація газу	+	+	–	–

Продовження табл. 4.20				
8. Технічне обслуговування компресорів та клієнтський супровід	–	–	+	+
9. Укладання договорів на постачання біоводню	+	–	–	+
10. Фінансове планування та залучення інвестицій	+	–	–	+

4.7. Ризики стартап-проекту та методи управління ними

У таблиці 4.21 систематизовано потенційні загрози на кожному етапі життєвого циклу стартапу, що дозволяє команді заздалегідь підготувати заходи реагування на наукові, технічні та ринкові виклики.

Таблиця 4.21 – Ризики проекту

Назва процесу / стадії реалізації стартап проекту	Бізнес-процеси	Зовнішні ризики	Внутрішні ризики
Розробка ідеї стартапу	Наукове обґрунтування режимів темної ферментації та інженерне проектування біореактора.	Зміни законодавства у сфері сертифікації об'єктів альтернативної енергетики.	Помилки в розрахунках масштабування реактора; недостатня ефективність підбраного консорціуму бактерій.
Реалізація ідеї	Закупівля комплектуючих, монтаж установки гідрогенезу та систем мембранного очищення.	Затримки поставок імпортного обладнання (компресорів, мембран) через логістичні форс-мажори.	Порушення техніки безпеки при монтажі; перевищення запланованого бюджету на інсталяцію.
Впровадження у виробництво	Пусконаладжувальні роботи, технічна сертифікація газу та отримання екологічних дозволів.	Бюрократичні затримки при сертифікації "зеленого" водню та технічних умов (ТУ).	Невідповідність чистоти отриманого газу плановим показникам; технічні збої в роботі сепараторів.

Продовження табл. 4.21			
Масова реалізація	Прямі B2B-продажі біоводню, постачання промисловим клієнтам та технічний супровід.	Зниження ринкових цін на традиційні енергоносії (природний газ); агресивна конкуренція.	Нестача сировини (біомаси) для безперебійного виробництва; логістичні проблеми з доставкою палива клієнтам.

В таблиці 4.22 ідентифіковані ризики за ймовірністю їх виникнення та ступенем критичності для кінцевого результату, виокремлюючи найбільш вагомі фактори впливу на стабільність проєкту.

Таблиця 4.22 – Ризики інноваційної розробки та ймовірність їх настання

Види ризиків	Назва ризику	Ймовірність настання	Вплив на очікуваний результат
Зовнішні ризики			
Ринковий	Коливання цін на традиційні енергоносії та конкуренція з боку виробників "сірого" водню	Середня	Високий
Регуляторний	Затримки через жорсткі вимоги до сертифікації вибухонебезпечних газових об'єктів	Низька	Високий
Економічний	Зниження обсягів європейського грантового фінансування інфраструктурних "зелених" проєктів	Середня	Середній
Внутрішні ризики			
Технічний	Падіння інтенсивності гідрогеногенезу через температурну нестабільність мікробіологічного консорціуму	Низька	Високий
Операційний	Логістичні перебої з постачанням органічного субстрату або фізичний знос компресорів	Середня	Середній

Продовження табл. 4.22			
Кадровий	Дефіцит вузькопрофільних інженерів-біотехнологів з досвідом роботи на промислових метантенках	Низька	Середній

Матриця ризиків у таблиці 4.23 математично поєднує частоту настання загроз із силою їхнього впливу, створюючи чітку ієрархію пріоритетів для стратегічного управління безпекою стартапу.

Таблиця 4.23 – Матриця ризиків

За впливом ризиків на очікуваний результат		За ймовірністю настання ризиків		
		Низька ймовірність (1)	Середня ймовірність (2)	Висока ймовірність (3)
Критерій ризику	Числове значення			
Високий рівень впливу	3	$3 * (1 \times 3) + 1$	$6 * (2 \times 3) + 1$	$6 * (3 \times 3) + 1$
Середній рівень впливу	2	$2 * (1 \times 2) + 1$	$4 * (2 \times 2) + 1$	$5 * (3 \times 2) + 1$
Низький рівень впливу	1	$1 * (1 \times 1) + 1$	$2 * (2 \times 1) + 1$	$3 * (3 \times 1) + 1$

У таблиці 4.24 представлено план заходів, спрямованих на забезпечення стабільності розробки та захист комерційних інтересів компанії.

Таблиця 4.24 – План заходів з нейтралізації ризиків

Назва ризику	Назва методу управління ризиком	Відповідальні виконавці	Період виконання / застосування методу	Очікувані результати від впровадження методів управління
Падіння інтенсивності гідрогеногенезу	Мінімізація (постійний апаратний моніторинг рН, температури та складу субстрату)	Інженер-біотехнолог, Керівник проєкту	Протягом усього циклу експлуатації біореактора	Стабільно високий вихід біоводню та збереження життєздатності бактеріального консорціуму.
Коливання цін на енергоносії та жорстка конкуренція	Диференціація (фокус на 100% "зеленому" статусі палива та супутньому продажі біодобрив)	Менеджер з продажів, Керівник проєкту	Етап виходу на ринок та активної B2B-реалізації	Створення унікальної нішевої пропозиції для екосвідомих підприємств та фіксація частки ринку.
Технічні збої та знос газового обладнання	Попередження (регулярне планово-попереджувальне обслуговування, резервні мембрани)	Інженер-механік	Етап пусконаладження та постійної експлуатації	Безперебійна та безпечна робота промислової установки, відсутність простоїв у постачанні.
Затримки у сертифікації об'єкта підвищеної небезпеки	Уникнення (залучення акредитованих аудиторів на ранніх етапах проєктування станції)	Керівник проєкту, юрист (аутсорс)	Протягом періоду інжинірингу та інсталяції обладнання	Гарантована юридична та екологічна відповідність нормам ЄС, своєчасне введення в експлуатацію.
Дефіцит оборотних коштів на масштабування	Диверсифікація джерел фінансування	Керівник проєкту, Менеджер з продажів	Етапи виходу на планову потужність та масштабування	Забезпечення фінансової стійкості через поєднання операційної виручки, європейських еко-грантів та інвестицій.

РОЗДІЛ 5. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА НАВКОЛИШНЬОГО СЕРЕДОВИЩА

У роботі досліджується процес темної ферментації оптимізованої суміші відходів яблук та курячого посліду з метою отримання молекулярного водню, а також вплив солей важких металів на інтенсифікацію цього процесу. Важливо враховувати фактори безпеки при роботі з біологічно активними субстратами, токсичними реагентами та вибухонебезпечними газами. Дотримання правил охорони праці є критично важливим для забезпечення безпеки працівників та ефективного проведення досліджень. Приміщення лабораторії мікробіологічного та хімічного профілю повинно відповідати вимогам державних будівельних і санітарних норм.

5.1 Особливості роботи з біологічними матеріалами та мікроорганізмами

Робота зі змішаними органічними субстратами та анаеробною мікрофлорою вимагає дотримання ряду важливих правил та заходів безпеки:

Працівникам слід працювати в чистих білих халатах, носити шапочки, гумові рукавички та медичні маски, оскільки контакт із сирым курячим послідом несе ризик зараження супутньою патогенною мікрофлорою.

Мірні стаканчики, батч-системи та колби з культуральними середовищами чітко підписуються маркером по склу або етикетуються для уникнення плутанини під час проведення експерименту.

Термічна обробка інокуляту у водяній бані при температурах 85–90 °C, а також висушування наважок у сушильній шафі вимагають обережності для запобігання термічним опікам. Завантаження та вивантаження гарячого посуду здійснюється виключно з використанням термостійких рукавиць або спеціальних щипців.

Після завершення ферментації робочі поверхні підлягають обов'язковій дезінфекції. Для ліквідації відпрацьованих біологічних середовищ скляний посуд ретельно очищується, миється та стерилізується з використанням гумових рукавиць.

5.2 Особливості роботи з хімічними реагентами та солями важких металів

При роботі з хімічними стимуляторами та розчинами важливо уникати потрапляння їх на шкіру, обличчя та одяг, оскільки вони можуть спричиняти подразнення або хімічні опіки.

Дослідження передбачає використання солей важких металів, зокрема комплексів Нікелю. Оскільки сполуки нікелю є токсичними речовинами, роботу з приготування їх концентрованих розчинів необхідно проводити виключно у витяжній шафі для запобігання вдиханню небезпечних аерозолів.

При роботі зі стандартними буферними розчинами для калібрування рН-метра та реагентами для коригування кислотності середовища слід обов'язково використовувати захисні окуляри.

Якщо хімічні розчини потрапляють на шкіру або одяг, їх слід негайно змити великою кількістю проточної води, після чого обробити уражене місце відповідними нейтралізуючими розчинами з лабораторної аптечки.

Відпрацьований дигестат, що містить залишкові іони важких металів, категорично заборонено зливати в загальну каналізацію або викидати у побутове сміття. Такі відходи збираються в окремі спеціальні ємності та передаються на утилізацію для захисту навколишнього природного середовища.

5.3 Особливості роботи з пожежо- та вибухонебезпечними газами

Оскільки цільовим продуктом процесу є молекулярний водень, який накопичується під час газовиділення, виникає специфічна небезпека, пов'язана з його високою горючістю.

Водень утворює вибухонебезпечні суміші з атмосферним киснем, тому всі батч-системи та волюметричні газгольдери повинні бути абсолютно герметичними для попередження витоку газу в робоче приміщення.

У лабораторії суворо забороняється використання відкритого вогню та будь-якого іскроутворюючого обладнання. Вимірювання складу біогазу за допомогою газоаналізатора має проводитися безпечно, подалі від прямих джерел нагрівання.

Залишкові газові суміші після проведення аналізів повинні акуратно стравлюватися через ефективну витяжну вентиляцію.

5.4 Рекомендації для покращення умов праці працівників лабораторії

Для запобігання забрудненню повітря в робочій зоні, захисту працівників та безпечного функціонування обладнання необхідно впровадження таких заходів:

Система вентиляції та очищення повітря: Забезпечити нормальну роботу системи припливно-витяжної вентиляції та витяжних шаф при роботі з токсичними солями металів та стравлюванні синтезованого газу.

Електробезпека: Для боротьби зі статичною напругою та зниження ризику ураження електричним струмом усе лабораторне обладнання (аналітичні ваги, рН-метр, термостати, газоаналізатор) має бути підключене до мережі через розетки з надійним захисним заземленням. Перед роботою проводиться візуальний огляд цілісності ізоляції кабелів.

Індивідуальний захист: Забезпечити працівників повним комплектом засобів індивідуального захисту відповідно до характеру виконуваних робіт.

Медичні огляди: Проводити регулярні медичні огляди працівників лабораторії, які безпосередньо контактують із біологічними об'єктами та важкими металами.

ВИСНОВКИ

1. У результаті аналізу наукової літератури встановлено, що інтенсифікація процесу темної ферментації органічних відходів тісно пов'язана з активністю ключових ферментних комплексів воднепродукуючих мікроорганізмів – гідрогеназ. Доведено, що іони важких металів, зокрема Ферум та Нікель, виступають незамінними структурними кофакторами цих ензимів. Їх цілеспрямоване внесення у культуральне середовище в оптимальних концентраціях є ефективним біотехнологічним інструментом для стимуляції метаболізму анаеробного консорціуму та максимізації виходу екологічно чистого енергоносія – молекулярного біоводню.

2. В ході дослідження визначено, що при внесенні в середовище іонів Fe^{3+} в концентрації $0,1 \text{ мг/дм}^3$ призводить до виходу кумулятивного молекулярного водню на рівні $45,33 \text{ см}^3/\text{г ЗСО}$. Найбільший показник відсоткового приросту процесу темної ферментації досягнуто при концентрації Fe^{3+} 10 мг/дм^3 , що відповідає $75,8 \%$ інтенсифікації процесу відносно контрольного дослід.

Встановлено, що внесення іонів Fe^{3+} стимулює метаболічну активність бактерій, забезпечуючи стабільне зростання кумулятивного виходу молекулярного водню;

3. Додавання іонів Ni^{2+} в систему мало подібний ефект до систем з Fe^{3+} . Найбільший показник виходу кумулятивного молекулярного водню спостерігався в досліді з додавання Нікелю в концентрації $0,1 \text{ мг/дм}^3$ та становив $52,13 \text{ см}^3/\text{г ЗСО}$. Найбільший показник інтенсифікації процесу темної ферментації було досягнуто при додаванні іонів Ni^{2+} концентрації 10 мг/дм^3 , що відповідає $75,3 \%$ інтенсифікації процесу відносно контрольного дослід. Встановлено, що внесення іонів Ni^{2+} стимулює метаболічну активність бактерій, забезпечуючи стабільне зростання кумулятивного виходу молекулярного водню;

4. Під час проведення досліджень встановлено зростання кумулятивного виходу молекулярного водню та відсоткового приросту процесу темної ферментації при використанні сумішей металів-кофакторів $\text{Fe}^{3+}+\text{Ni}^{2+}$ порівняно з контрольним зразком та варіантами з окремим додаванням іонів металів відповідної концентрації. Зокрема, кумулятивний вихід водню при використанні суміші 1 мг/дм^3 становив $55.36 \text{ см}^3/\text{г ЗСО}$, з відсотком приросту відносно контрольного дослідження – 63.7%, відносно дослідження з додаванням іонів Ni^{2+} концентрацією 1 мг/дм^3 - 2.5 %, відносно дослідження з додаванням іонів Fe^{3+} концентрацією 1 мг/дм^3 - 36.15 %. Кумулятивний вихід водню при використанні суміші $\text{Fe}^{3+}+\text{Ni}^{2+}$ концентрацією 10 мг/дм^3 становив $60.36 \text{ см}^3/\text{г ЗСО}$, з відсотком приросту відносно контрольного дослідження – 78.5%, відносно дослідження з додаванням іонів Ni^{2+} концентрацією 10 мг/дм^3 – 4.2 %, відносно дослідження з додаванням іонів Fe^{3+} концентрацією 10 мг/дм^3 – 3.6 %.

5. Створено комплекс прогностичних математичних моделей інтенсифікації синтезу біоводню, що включає кінетичну модель Гомпертца, параболічні функції гормезису для дозозалежного відгуку та просторові 3D-поверхні. Інтеграція теоретичних референтних констант із результатами досліджень *in vitro* дозволила об'єктивно оцінити ефективність стимуляції та математично візуалізувати розширення меж толерантності бактерій у реальних середовищах. Розроблені моделі, разом із визначеними зонами прогнозування, є надійною інструментальною базою для розрахунку оптимальних дозувань у промислових масштабах.

6. За результатами економічного обґрунтування доведено, що стартап-проект із промислового виробництва біоводню є фінансово доцільним та інвестиційно привабливим. При виході на планову річну потужність у 300 тисяч кубічних метрів газу та встановленій обґрунтованій ціні 32 550 грн за одиницю, проект забезпечує стабільну операційну рентабельність на рівні

11,29%. Загальні капіталовкладення в обладнання та оборотні фонди становлять 1 500 000 грн, проте завдяки високій продуктивності розрахунковий період їх повної окупності складає лише 1,42 року. Наявність розробленої системи нейтралізації технічних ризиків та оптимізований штат із чотирьох вузькопрофільних фахівців гарантують стійкість бізнес-моделі, що робить розробку повністю готовою до практичного впровадження та залучення інвестиційного капіталу.

7. У результаті аналізу встановлено, що процес отримання біоводню методом темної ферментації супроводжується впливом біологічних, хімічних і фізичних небезпечних факторів, зокрема роботою з мікроорганізмами, солями важких металів та вибухонебезпечними газами, що потребує суворого дотримання вимог охорони праці, використання засобів індивідуального захисту, забезпечення вентиляції та герметичності обладнання; водночас технологія має екологічні переваги завдяки утилізації органічних відходів, однак вимагає контролю за поведінкою із відпрацьованими субстратами та металами, що в цілому дозволяє мінімізувати ризики для персоналу та довкілля за умови впровадження відповідних організаційно-технічних заходів.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ:

1. Balat, H., & Kırtay, E. (2010). Hydrogen from biomass – Present scenario and future prospects. International Journal of Hydrogen Energy. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.04.137>
2. Щурська, К. О., & Кузьмінський, Є. В. (2011). Способи продукування біоводню. Проблеми біології та біотехнології
3. Korres, N. E., et al. (2017). Biohydrogen Production from Agricultural Biomass and Organic Wastes. https://doi.org/10.1007/978-81-322-3577-4_3
4. Sołowski, G., et al. (2020). Production of hydrogen and methane from lignocellulose waste by fermentation. Journal of Cleaner Production. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.121721>
5. Róziwicz, A., et al. (2024). Influence of Inoculum Thermal Pretreatment Time on Hydrogen Production in Dark Fermentation. Energies. <https://doi.org/10.3390/en17040974>
6. Zhang, Y., et al. (2021). Enhancement on biohydrogen production by the driving forces from extracellular iron oxide/nickel supplementation. Fuel. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2020.118880>
7. Wiegel J. The Genus Clostridium — Nonmedical. The Prokaryotes. 2006. P. 654–682. DOI: 10.1007/0-387-30744-3_21
8. Ntaikou, Ioanna & Antonopoulou, G. & Lyberatos, Gerasimos. (2010). Biohydrogen Production from Biomass and Wastes via Dark Fermentation: A Review. Waste and Biomass Valorization. 1. 21-39. 10.1007/s12649-009-9001-2.
9. Gadow S. I., Li Y. Y. Dark fermentation for biohydrogen production: focusing on the microbial community and metabolism. Water Science and Technology. 2019. Vol. 79, No. 3. P. 403–415. DOI: 10.2166/wst.2019.014

10. Patel S. K. S., Das D. Biohydrogen Production from Agricultural Residues: Role of Clostridia. *Renewable Energy*. 2021. Vol. 175. P. 556–570. DOI: 10.1016/j.renene.2021.05.025
11. Cai M., Wilkins D., Chen J. et al. Metagenomic reconstruction of key anaerobic digesters reveals functions of microbial communities in biohydrogen production. *Biotechnology for Biofuels*. 2016. Vol. 9, No. 1. P. 1–15. DOI: 10.1186/s13068-016-0511-0
12. Venkata Mohan S. et al. Biohydrogen production from chemical wastewater as a substrate by a specialized bacterial consortium. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2007. Vol. 32. P. 2286–2293. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2006.09.043
13. Duan Y, Mehariya S, Kumar A, Singh E, Yang J, Kumar S, Li H, Kumar Awasthi M. Apple orchard waste recycling and valorization of valuable product-A review. *Bioengineered*. 2021 Dec;12(1):476-495. doi: 10.1080/21655979.2021.1872905.
14. Sarma S. J., Brar S. K., Le Bihan Y., Buelna G. Bio-hydrogen production by co-fermentation of crude glycerol and apple pomace. *Bioresource Technology*. 2013. Vol. 138. P. 213–218. DOI: 10.1016/j.biortech.2013.03.181
15. Jung K. W., Kim D. H., Shin H. S. Continuous biohydrogen production from coffee waste by *Clostridium butyricum*. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2010. Vol. 35, No. 24. P. 13351–13359. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2010.08.147
16. Kumar G. et al. A review on biohydrogen production from fruit and vegetable wastes. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2015. Vol. 52. P. 756–766. DOI: 10.1016/j.rser.2015.07.133
17. Rainey F. A. The Family Clostridiaceae. *The Prokaryotes*. 2014. P. 153–193. DOI: 10.1007/978-3-642-30120-9_211

18. Yang G. et al. Enhancing biohydrogen production from apple pomace by a newly isolated *Clostridium* sp. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2018. Vol. 43, No. 28. P. 12624–12632. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2018.05.056
19. Salazar-Batres P. N. et al. Trace metal supplementation strategy for enhancing biohydrogen production from the organic fraction of municipal solid waste. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2023. Vol. 48, No. 34. P. 12614–12626. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2023.03.220
20. Masset J., Hiligsmann S., Hamilton C. et al. Effect of pH on continuous biohydrogen production from glucose by a mixed culture. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2010. Vol. 35, No. 19. P. 10571–10578. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2010.07.089
21. Lin C. Y., Lay C. H. Effects of carbonate and phosphate buffers on biohydrogen production using agricultural waste. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2005. Vol. 30. P. 1543–1549. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2004.12.011
22. Vignais P. M., Billoud B. Occurrence, Classification, and Biological Function of Hydrogenases: An Overview. *Chemical Reviews*. 2007. Vol. 107, No. 10. P. 4206–4306. DOI: 10.1021/cr050196r
23. Lubitz W., Ogata H., Ludwig O., Volbeda A. Hydrogenases. *Chemical Reviews*. 2014. Vol. 114, No. 8. P. 4081–4148. DOI: 10.1021/cr4005814
24. Jayalakshmi S. et al. Effect of metals on the kinetics of anaerobic digestion of fruit and vegetable wastes. *Bioresource Technology*. 2009. Vol. 100, No. 7. P. 2151–2156. DOI: 10.1016/j.biortech.2008.10.046
25. Guo M. et al. Effect of Fe²⁺ and Ni²⁺ supplementation on dark fermentation: Focusing on hydrogenase activity and microbial community. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2017. Vol. 42, No. 36. P. 22753–22761. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2017.07.135

26. Gonzalez-Cortes J. J. et al. Effect of iron and nickel on the production of hydrogen by a microbial consortium. *Fuel*. 2021. Vol. 285. P. 119106. DOI: 10.1016/j.fuel.2020.119106
27. Peters J. W. et al. [FeFe]- and [NiFe]-hydrogenase diversity and versatility. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2015. Vol. 25. P. 50–58. DOI: 10.1016/j.cbpa.2014.12.016
28. Mulder D. W. et al. Stepwise assembly of the [FeFe]-hydrogenase catalytic center. *Nature*. 2013. Vol. 499, No. 7456. P. 66–69. DOI: 10.1038/nature12304
29. Fritsch J., Lenz O., Friedrich B. Structure, function and biosynthesis of [NiFe]-hydrogenases. *Nature Reviews Microbiology*. 2013. Vol. 11, No. 2. P. 106–114. DOI: 10.1038/nrmicro2940
30. Shafaat H. S. et al. Spectroscopic insights into the activation of [NiFe] hydrogenase. *Journal of the American Chemical Society*. 2013. Vol. 135, No. 24. P. 9049–9062. DOI: 10.1021/ja403565t
31. Benson B. C. et al. Role of Trace Metals in the Dark Fermentation of Organic Wastes. *Bioresource Technology*. 2018. Vol. 250. P. 123–132. DOI: 10.1016/j.biortech.2017.11.052
32. Kim D. H., Kim M. S. Enhancement of biohydrogen production by adding trace metals to food waste. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2012. Vol. 37, No. 20. P. 15531–15536. DOI: 10.1016/j.ijhydene.2012.07.114
33. Cao Y. et al. Impact of Nickel and Iron on the enzymatic activity of *Clostridium* sp. *Enzyme and Microbial Technology*. 2020. Vol. 132. P. 109395. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2019.109395
34. Zhang Y., Angelidaki I. Microbial electrolysis cells (MECs) for enhancing biohydrogen production from cellulose. *Bioresource Technology*. 2014. Vol. 167. P. 490–496. DOI: 10.1016/j.biortech.2014.05.031

- 35.Zhen G. et al. A review of the acceleration of anaerobic digestion by trace metals. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2019. Vol. 102. P. 45–60. DOI: 10.1016/j.rser.2018.11.043
- 36.Abdullah N. et al. Effect of Trace Metals on the Fermentative Hydrogen Production: A Review. *Applied Sciences*. 2020. Vol. 10, No. 24. P. 8831. DOI: 10.3390/app10248831
- 37.Chen Y., Cheng J. J., Creamer K. S. Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource Technology*. 2008. Vol. 99, No. 10. P. 4044–4064. DOI: 10.1016/j.biortech.2007.01.057
- 38.Mudhoo A., Kumar S. Effects of heavy metals as stress factors on anaerobic digestion processes and biogas production from biomass. *International Journal of Environmental Science and Technology*. 2013. Vol. 10, No. 6. P. 1383–1398. DOI: 10.1007/s13762-013-0200-0
- 39.Hashemi M. et al. The role of extracellular polymeric substances (EPS) in metal toxicity. *Journal of Environmental Management*. 2021. Vol. 290. P. 112574. DOI: 10.1016/j.jenvman.2021.112574
- 40.Romero-Güiza M. S. et al. The role of additives on anaerobic digestion: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*. 2016. Vol. 58. P. 1486–1499. DOI: 10.1016/j.rser.2015.12.246