

مروری بر عوامل مؤثر در تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی

فاطمه بسحاق^۱، خسرو رستمی^{۲*}

۱- دانشجوی دکتری مهندسی شیمی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

۲- دانشیار مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

تاریخ دریافت: ۹۵/۱۰/۲۹ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۹/۱۹

پیام‌نگار: Rostami2002@yahoo.com

چکیده

تخمیر در تاریکی یکی از روش‌های زیستی تولید هیدروژن، فرایندی چند محصوله و بسیار پیچیده است که عوامل زیادی بر آن تأثیر می‌گذارند. در این مطالعه، با مرور بر عوامل مؤثر در تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی، شامل آماده‌سازی تلقیح، دما، pH، فشار جزئی هیدروژن، زمان ماند هیدرولیکی، نوع زیست واکنش‌گاه، نوع و غلظت رشدمایه، نوع و غلظت مواد مغذی بر تولید هیدروژن بررسی شده است. قسمت عمده مطالعات در شرایط عملیاتی ناپیوسته و برای گلوکز و ساکارز به عنوان رشدمایه انجام شده است. تحقیقات آتی باید به سمت بررسی تولید هیدروژن در عملیات پیوسته و بهره‌گیری از رشدمایه‌های کم‌هزینه و پسماندهای واقعی هدایت شوند.

کلیدواژه‌ها: تخمیر در تاریکی، زمان ماند هیدرولیکی، دما، pH، فشار جزئی هیدروژن، هیدروژن زیستی.

۱. مقدمه

فیزیکی - شیمیایی و زیستی تولید می‌شود. در حال حاضر، تولید هیدروژن جهان، ۹۶٪ از روش تبدیل با بخار از منابع فسیلی تجدیدناپذیر، ۳۹٪ از الکترولیز آب و ۱٪ درصد از منابع تجدیدپذیر به دست می‌آید. تولید هیدروژن از منابع فسیلی ۴۸٪ از گاز طبیعی، ۳۰٪ درصد از مواد نفتی و ۱۸٪ از زغال سنگ صورت می‌گیرد. بازار فروش هیدروژن تقریباً بیش از ۴۰ میلیارد دلار در هر سال است که در بخش‌های تولید آمونیاک (۴۹٪)، پالایش نفت (۳۷٪)، تولید متانول (۸٪) و مصرف در حجم‌های کمتر (۶٪) است. تولید زیستی هیدروژن نسبت به سایر روش‌ها دارای مزایایی چون استفاده از منابع بازگشت پذیر برای تولید، انجام فرایند در شرایط محیط (دما و فشار محیط)، عدم آلوده‌سازی محیط زیست، استفاده از گستره وسیعی از رشدمایه‌ها شامل

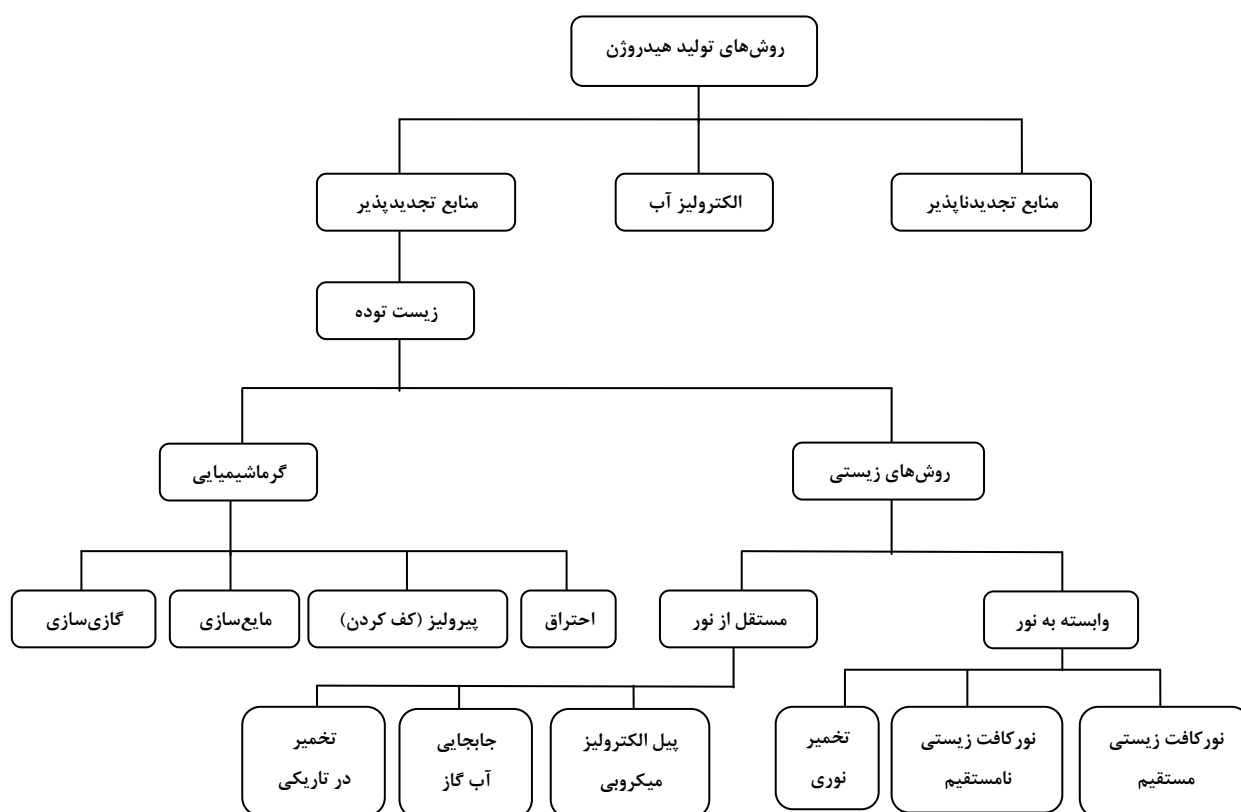
هیدروژن به عنوان حامل انرژی دارای خواصی مانند تولید انرژی پاک (عدم تولید گازهای گلخانه‌ای)، برخورداری از بالاترین میزان انرژی در هر واحد جرم (حاوی انرژی بیش از ۲/۷ تا ۳/۱ برابر سوخت‌های فسیلی)، پایین‌ترین میزان انتشار کربن دی‌اکسید، سمی نبودن، سرعت اشتعال سریع، عدد اکتان مؤثر بالا، انتقال آسان از طریق خطوط لوله، مناسب برای سوخت اتوموبیل، هواپیما و سامانه‌های گرمایش خانگی است. از احتراق هیدروژن فقط آب تولید می‌شود و با استفاده از پیل‌های سوختی از آن برق تولید می‌شود. هیدروژن از قابلیت حل دو مشکل انرژی، یعنی وابستگی به سوخت‌های فسیلی و انتشار گازهای گلخانه‌ای، برخوردار است. هیدروژن با روش‌های

* تهران، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده زیست فناوری

چند محصول (اسیدها و الکل‌ها همراه با مخلوطی از گازها شامل گاز هیدروژن) بسیار پیچیده است و با عوامل زیادی مانند آماده‌سازی تلقیح، دما، pH، فشار جزئی هیدروژن، زمان ماند هیدرولیکی، نوع و غلظت رشدمایه، نوع و غلظت مواد مغذی بر آن تأثیر می‌گذارند [۱-۳]. علاوه بر این، بازدارنده‌های گوناگونی مانند حضور ریزاندامگانهای دیگر در محیط کشت‌های مخلوط، یون‌های فلزی (سبک و سنگین)، مواد حاصل از پیش تیمار اولیه رشدمایه (ترکیبات فنولیک و مشتقات فوران)، غلظت آمونیاک، هیدروژن و غلظت متابولیت‌های محلول، بر مقدار و سرعت تولید هیدروژن مؤثرند [۲]. مطالعه آثار پارامترهای مختلف بر فرایند تولید هیدروژن تخمیری به فهم بیشتر فرایند کمک می‌کند و اطلاعات مفیدی برای طراحی و عملیات فرایند تخمیر فراهم می‌آورد [۱-۳].

در این مقاله مروری اثر پارامترهای مؤثر بر فرایند تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی شامل آماده‌سازی تلقیح، دما، pH، فشار جزئی هیدروژن، زمان ماند هیدرولیکی، نوع و غلظت رشدمایه، نوع و غلظت مواد مغذی بررسی شده است.

پسماندهای جامد شهری و فاضلاب‌ها است. روش‌های زیستی تولید هیدروژن شامل روش‌های وابسته به نور و مستقل از نورند (شکل (۱)) [۱]. تخمیر در تاریکی عبارت است از فرایندی که باکتری در نبود نور و اکسیژن، قندهای ساده را به دی ساکاریدها تبدیل و هیدروژن زیستی، کربن‌دی‌اکسید، الکل‌ها و اسیدهای آلی تولید می‌کند. در روش تخمیر در تاریکی، مخلوط گاز زیستی شامل هیدروژن و کربن‌دی‌اکسید همراه با مقدار کمی گازهای متان، هیدروژن سولفید و کربن مونواکسید است. تولید هیدروژن به روش تخمیر در تاریکی به دلیل برخورداری از مزایایی چون عدم نیاز به نور (صرف انرژی کمتر)، بازده بالاتر تولید هیدروژن، نیاز به کنترل ساده‌تر، هزینه‌های عملیاتی کمتر، امکان‌پذیری گسترده‌تر برای صنعتی شدن و استفاده از انواع رشدمایه مانند پسماندهای آلی، نسبت به سایر روش‌های زیستی تولید هیدروژن مورد توجه بیشتری قرار گرفته است. باکتری‌های شاخص در تولید هیدروژن به روش تخمیر در تاریکی عبارت‌اند از گونه‌های کلستری‌دیم و *انتروباکتر*. این فرایند به اعتبار وجود شرایط بی‌هوازی و تولید همزمان



شکل ۱. روش‌های تولید هیدروژن.

۲. عوامل مؤثر بر تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی

۲-۱ آماده‌سازی مایه تلقیح

فرایند تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی با بهره‌گیری از کشت‌های خالص یا مخلوط انجام می‌شود. استفاده از کشت مخلوط نسبت به کشت خالص از نظر مهندسی کاربرد بیشتری دارد، زیرا برای عملیات و کنترل آسان‌تر است و در انتخاب خوراک گستره بیشتری در دسترس است [۴]. گونه‌های باکتریایی مانند انتروباکتر (بی‌هوازی اختیاری) و کلستری‌دیم (بی‌هوازی اجباری) اغلب اولین انتخاب برای کشت خالص در تولید هیدروژن به روش تخمیر در تاریکی‌اند [۵]. در غیاب باکتری‌های مصرف‌کننده هیدروژن، بازده تولید هیدروژن در کشت‌های خالص بیشتر است اما کشت‌های خالص به نگهداری ثابتی نیاز دارند و به تغییرات شرایط محیط خیلی حساس‌اند [۳]. در تولید هیدروژن از طریق کشت مخلوط، هیدروژن تولید شده می‌تواند از طریق باکتری‌های مصرف‌کننده هیدروژن مهار شود. یکی از معایب کشت‌های مخلوط حضور باکتری‌های مصرف‌کننده هیدروژن است. بنابراین، بذر لجن اغلب به پیش تیمار برای توقف فعالیت باکتری‌های مصرف‌کننده هیدروژن و حفاظت از فعالیت باکتری‌های تولیدکننده هیدروژن نیاز دارد [۶]. روش‌های زیادی برای دستیابی به تلقیح از منابع مختلف بذر، مانند لجن هاضم بی‌هوازی، لجن فاضلاب، پوسال، کود و خاک وجود دارد. این روش‌ها شامل استفاده از مواد شیمیایی، ضربه گرمایی، اسید، قلیا، هوادهی، میکروموج، امواج فراصوت، پرتو UV، میدان الکتریکی، منجمدسازی، ضربه بارگذاری و پرتو گاماست. زمان تماس، دما، فشار وارد آمده، pH، غلظت مواد شیمیایی و نسبت زیست‌توده به مواد شیمیایی از پارامترهای کلی به‌شمار می‌آیند که در بازده پیش تیمار مؤثرند [۵]. از مواد شیمیایی سمی مانند ۲ برمواتان سولفونات (BES)^۱، استیلن و کلروفرم برای بازدارندگی واکنش مصرف هیدروژن، مخصوصاً کشتن متانوژن‌ها استفاده شده است [۷]. اما، امروزه به دلیل هزینه گزاف مواد شیمیایی و نامؤثر بودن آن‌ها بر باکتری‌های غیرتولیدکننده هیدروژن، مانند باکتری‌های لاکتیک و پروپیونیک اسید، به ندرت از آن‌ها بهره می‌گیرند. تیمار اسید قلیا در راه دستیابی به تلقیح در تولید هیدروژن تخمیری مؤثر است، زیرا فعالیت میکروبی در pH بالا و پایین متوقف می‌شود. غنی‌سازی اسیدی (pH=۳) و قلیایی

1. 2-Bromoethanesulfonate (BES)

(pH=۱۰) لجن فاضلاب، قابلیت تولید هیدروژن را در مقایسه با کنترل، به ترتیب، ۲۰۰ و ۳۳۳ بار افزایش داده است [۸]. از تیمار گرمایی بذر لجن نیز برای غربالگری باکتری‌های تولیدکننده هیدروژن بهره می‌گیرند. تیمار گرمایی نه تنها باکتری‌های بدون هاگ را کاهش می‌دهد، بلکه هاگ‌های کلستری‌دیم را با تغییر پذیرنده رویش برای شروع رویش فعال می‌کند [۹]. تیمار گرمایی از ۷۵ تا ۱۲۱ درجه سلسیوس و از ۱۲ دقیقه تا ۱۵ ساعت متغیر است [۵]. گاهی پیش تیمار متوالی (ضربه حرارتی در ۱۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۲ ساعت و تیمار اسیدی در pH=۳ به مدت ۲۴ ساعت) برای نابودی کامل باکتری‌های غیرتولیدکننده هیدروژن در منابع بذر به کار رفته است [۱۰]. علاوه بر روش‌های تیمار یادشده، هوادهی برای پوسال به کار می‌رود [۱۱]. از مزایای کشت مخلوط فقدان نگرانی از آلودگی خوراک ناسترون است اما در کشت‌های خالص خوراک ناسترون می‌تواند سبب کاهش بازده شود [۳]. در جدول (۱)، نمونه‌هایی از کشت‌های خالص و مخلوط در تولید هیدروژن به روش تخمیر در تاریکی، و در جدول (۲)، انواع روش‌های پیش تیمار برای کشت‌های مخلوط درج شده است.

۲-۲ دما

دما یکی از عوامل مؤثر در تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی است، زیرا دما می‌تواند فعالیت باکتری‌های تولیدکننده هیدروژن را با تأثیر بر فعالیت برخی آنزیم‌های ضروری چون هیدروژناز متأثر کند. دما بر تجزیه رشدمایه، تولید هیدروژن، توزیع محصول، pH و رشد باکتری‌ها مؤثر است. همچنین، جمعیت میکروبی در زیست‌واکنش‌گاه‌های تولید هیدروژن زیستی تحت تأثیر پدیده دما قرار می‌گیرد [۴۸]. ریزاندامگانها توانایی تولید هیدروژن را در دمای ۱۵ تا ۸۵ درجه سلسیوس دارند. مطالعات مقیاس آزمایشگاهی حاکی از آنند که ۷۳ درصد مطالعات با کشت‌های معتدل دوست انجام شده است [۴۹]. واکنش‌های تخمیری تولید هیدروژن می‌توانند در دماهای معتدل دوست (۲۵ تا ۴۰ درجه سلسیوس)، گرمادوست (۴۰ تا ۶۵ درجه سلسیوس)، و فرا گرمادوست (بالتر از ۸۰ درجه سلسیوس) انجام گیرند. کشت‌های معتدل دوست کم‌هزینه‌ترند، اما گزارش شده است با توجه به نوع رشدمایه، کشت‌های گرمادوست و فرا گرمادوست می‌توانند عملکرد بالاتری در تولید هیدروژن داشته باشند [۴].

جدول ۱. نمونه‌هایی از کشت‌های خالص و مخلوط در تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی.

مرجع	بیشینه بازده تولید هیدروژن	pH	دما (°C)	زیست واکنش‌گاه	رشدمایه	مایه تلقیح	نوع کشت
[۱۲]	۱/۷ mol / mol	۵/۲	۳۰	ناپیوسته متوالی	گلوکز	کلستریدیوم بوتیریوم ^۱ CWBI1009	کشت خالص
[۱۲]	۲ mol / mol	۵/۶	۳۰	ناپیوسته متوالی	نشاسته	کلستریدیوم بوتیریوم CWBI1009	
[۱۳]	۰/۶۲ mol / mol	۷/۲	۳۷	ناپیوسته	سلولوز	کلستریدیوم ترمیتیدیس ^۲ CT1112	
[۱۴]	۱/۴۵ mol / mol	۶/۷	۳۷	ناپیوسته	گلوکز	کلستریدیوم بیجرینسکی ^۳	
[۱۵]	۲ mol / mol	۶	۳۷	ناپیوسته	گلوکز	کلستریدیوم استوبوتیلیوم ^۴	
[۱۶]	۱/۰۸ mol/mol	-	۳۰	پیوسته	گلوکز	کلستریدیوم استوبوتیلیوم ATCC 824	
[۱۷]	۰/۷۳ mol / mol	-	۳۷	ناپیوسته	اکسیلوز	کلستریدیوم بوتیریوم CGS5	
[۱۸]	۰/۰۰۹۹ mol/g COD	۶/۸۶	۵۲/۴	ناپیوسته	نشاسته	کلستریدیوم بوتیریوم CGS2	
[۱۹]	۲/۲ mol/mol	۶	۴۵	ناپیوسته	پسماند استخوانی	کلستریدیوم پاراپوتریفیکم ^۵ M-21	
[۲۰]	۲/۳ mol/mol	-	۶۰	ناپیوسته	زیست توده سلولوزی	کلستریدیوم ترموسلم ^۶ 27405	
[۲۱]	۳/۱ mol / mol	۶	۳۷	ناپیوسته	گلوکز	کلستریدیوم ساکارپروتیل استونیکم ^۷ NI-4	
[۱۹]	۱/۱ mol / mol	۵/۸	۴۵	ناپیوسته	گلوکز	کلستریدیوم پاراپوتریفیکم M-21	
[۲۲]	۲/۴۲ mol / mol	۶/۵	۶۰	ناپیوسته	گلوکز	ترمواناثر ویاکتریم W16 ^۸ ترموساکارولیتیکم	
[۲۳]	۲/۲ mol / mol	۷	۶۰	ناپیوسته	علوفه ذرت	ترمواناثر ویاکتریم W16 ترموساکارولیتیکم	
[۲۴]	۳/۴ mol / mol	۷	۷۰	ناپیوسته	گلوکز	کالدیدسلولوزیراپتور ساکارولیتیکوس ^۹	
[۲۵]	۳/۳۳ mol / mol	۷-۷/۴	۶۵	ناپیوسته	گلوکز	ترموتوگا الفی ^{۱۰}	

1. *Clostridium Butyricum*
2. *Clostridium Termitidis*
3. *Clostridium Beijerinckii*
4. *Clostridium Acetobutylicum*
5. *Clostridium Paraputrificum*
6. *Clostridium Thermocellum*
7. *ClostridiumS Accharaperbutylaceticum*
8. *Thermoanaerobacterium Thermosaccharolyticum*
9. *Caldicellulosiruptor Saccharolyticus*
10. *Thermotoga Elfi*

جدول ۱. نمونه‌هایی از کشت‌های خالص و مخلوط در تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی. (ادامه)

مرجع	بیشینه بازده تولید هیدروژن	pH	دما (°C)	زیست واکشن گاه	رشدمایه	مایه تلقیح	نوع کشت
[۲۶]	گلوکز ۱ mol/mol	۶-۷	۳۸	ناپیوسته	گلوکز	انتروباکتر آنروژنز ^۱ HO-39	کشت خالص
[۲۷]	محیط کشت ۰/۰۵ mol/L	۶/۵	۳۰	ناپیوسته	گلوکز	انتروباکتر آنروژنز NBRC 13534	
[۲۸]	گلیسرول ۰/۶ mol/mol	۶/۳	۳۷	ناپیوسته	گلیسرول	انتروباکتر آنروژنز HU-101	
[۲۹]	گلوکز ۲ mol/mol	۶/۴	۳۷	پیوسته	گلوکز	اشرشیا کولی	
[۳۰]	زایلوز ۲/۰۷ mol/mol	۶	۳۷	ناپیوسته	گلوکز	کلبسیلا پنومونیا ^۲ ECU-15	
[۲۵]	زایلوز ۱ mol/mol	۶-۷	۳۸	ناپیوسته	گلوکز	انتروباکتر آنروژنز HO-39	
[۳۱]	زایلوز ۳/۱۲ mol/mol	۶	۳۷	CSTR	گلوکز	اشرشیا کولی BL-21	
[۳۲]	زایلوز ۲/۲ mol/mol	۶	۳۶	ناپیوسته	گلوکز	انتروباکتر کلوانسا IITBT08	
[۳۳]	زایلوز ۲/۷۶ mol/mol	۷	۳۷	ناپیوسته	گلوکز	رودوسودوموناس پالوستریس ^۳ P4	
[۳۴]	زایلوز ۲/۷ mol/mol	۵/۲۵	۳۷	ناپیوسته	تقاله نشاسته سیب زمینی شیرین	کلستریدیوم بوتیریکم و انتروباکتر آنروژنز HO-39	
[۳۵]	زایلوز ۰/۶۴ mol/mol	۷-۷/۵	۳۲	ناپیوسته	گندم	کلستریدیوم بیجریسکی و رودوباکتر اسفرویدس ^۴ RV	
[۱۴]	زایلوز ۱/۷۱ mol/mol	۵/۳	۳۷	ناپیوسته	گلوکز	کلستریدیوم بوتیریکم و کلستریدیوم فلسینیم ^۵	
[۱۴]	زایلوز ۱/۶۲ mol/mol	۵/۳	۳۷	ناپیوسته	گلوکز	کلستریدیوم پاستوریانیم و کلستریدیوم فلسینیم	
[۳۶]	زایلوز ۱/۸ mol/mol	۶/۸	۶۰	ناپیوسته	سلولوز میکرو کریستالی	کلستریدیوم ترموسلم و ترموانائروباکتریم و ترموساکارولیتیکم	
[۳۷]	زایلوز ۰/۳۵ mol/mol	۵	۵۵	ناپیوسته	گلوکز	کود احشام	کشت مخلوط
[۳۸]	زایلوز ۰/۷۵ mol/mol	۵/۵	۷۰	بستر لجن گرانولی گسترده	گلوکز	کشت مخلوط بی هوازی	
[۳۹]	زایلوز ۲/۳۲ mol/mol	۴/۹	۵۵	CSTR	نشاسته	لجن فعال پسماند	
[۳۹]	زایلوز ۲/۱۳ mol/mol	۵/۳	۵۵	CSTR	نشاسته	کمپوست زباله جامد شهری	
[۴۰]	زایلوز ۳/۲۱ mol/mol	۵/۵	۳۵	ناپیوسته با کنترل pH	گلوکز	لجن هاضم بی‌هوازی	معتدل دوست
[۴۱]	زایلوز ۱/۷۹ mol/mol	۵/۵	۳۷	ناپیوسته	گلوکز	لجن هاضم بی‌هوازی	
[۴۲]	زایلوز ۱/۸ mol/mol xylose	۵/۵	۳۶	CSTR	گلوکز	لجن مخزن ته‌نشینی دوم	
[۴۳]	زایلوز ۱/۵۶ mol/mol	۷	۳۵	ناپیوسته	فاضلاب نشاسته	فضولات گاو	

1. *Enterobacter Aerogenes*
2. *Klebsiella Pneumonia*
3. *Rhodopseudomonas Palustris*
4. *Rhodobacter Sphaeroides*
5. *Clostridium Felsineum*

جدول ۲. مقایسه انواع روش‌های پیش تیمار کشت‌های مخلوط.

مرجع	بیشینه بازده تولید هیدروژن	زیست واکنش گاه	رشدمایه	روش پیش تیمار بهینه	روش‌های پیش تیمار مطالعه شده	مایه تلقیح
[۴۴]	گلوکز ۱/۸ mol/mol	ناپیوسته	گلوکز	ضربه گرمایی	اسید، قلیا، ضربه گرمایی، هوادهی و کلروفرم	لجن هاضم
[۴۵]	گلوکز ۱ mol/mol	ناپیوسته	گلوکز	اسید	منجمد کردن و آب شدن یخ، اسید، ضربه گرمایی، سدیم ۲- برمواتان سولفونات	لجن کود گاو
[۴۶]	ساکاروز ۶/۱۲ mol/mol	ناپیوسته	ساکارز	باز	ضربه گرمایی، هوادهی، اسید، قلیا، ۲- برمواتان سولفونیک اسید و ایودوپروپان	لجن پسماند هضم شده
[۴۷]	۰/۰۳۱۷mmol/g COD	ناپیوسته	پسماند لبنیات	سدیم ۲- برمواتان سولفونات	سدیم ۲- برمواتان سولفونات، اسید، ضربه گرمایی، تلفیق همه	لجن بی‌هوازی

زیست‌واکنش گاه و محدوده دمایی مورد بررسی در این مقالات با هم تفاوت دارند [۴۸]. مطابق مندرجات جدول (۳)، دمای بهینه برای باکتری‌های معتدل دوست و گرمادوست همیشه یکسان نیست. دمای زیاد عملکرد تخمیر هیدروژن را با افزایش آبکافت و ساده کردن تنوع میکروبی که برای تولید هیدروژن مطلوب است بهبود می‌بخشد. از طرفی هم می‌تواند سبب تنوع میکروبی یکنواخت شود که سبب تخمیر ناکامل رشدمایه، مخصوصاً در تیمار پسماند واقعی می‌شود. عملیات در دمای بالا به دلیل استفاده از انرژی زیاد برای گرم کردن و حفظ دمای زیست‌واکنش گاه و ساختار مستحکم زیست‌واکنش گاه هزینه‌ها را افزایش می‌دهد. بنابراین، آثار دما نه تنها باید با در نظر گرفتن بهبود تخمیر هیدروژن، بلکه با توجه به عوامل اقتصادی و تجزیه رشدمایه بررسی شود [۴۸-۵۶].

فشار جزئی هیدروژن اثر بازدارندگی کمتری بر تولید هیدروژن توسط باکتری‌های فرا گرمادوست دارد و به علاوه در دمای بالا احتمال آلودگی کمتر است [۵۰]. از باکتری‌های تولیدکننده هیدروژن معتدل دوست انتروباکتر و کلستری‌دیم، گرمادوست گرمانانروباکتریم و فرا گرمادوست ترموتوگا را می‌توان برشمرد. کشت مخلوط به دما حساسیت زیادی دارد. تغییر دمای فرایند می‌تواند باکتری‌های شاخص در کشت مخلوط را متاثر کند. تغییر باکتری‌های شاخص از کلستری‌دیم در شرایط معتدل دوست به گرمانانروباکتریم در شرایط گرمادوست در کشت مخلوط مشاهده شده است [۵۱]. در بعضی پژوهش‌ها، دمای بهینه برای مخلوط باکتری‌ها ۴۰ درجه سلسیوس و در بررسی دیگری، این دما ۵۵ درجه سلسیوس گزارش شده است. نوع و غلظت رشدمایه، نوع

جدول ۳. تأثیر دما روی تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی.

مرجع	بیشینه بازده تولید هیدروژن	دما		نوع زیست واکنش گاه	رشدمایه	مایه تلقیح
		بهینه	مورد مطالعه			
[۴۸]	گلوکز ۲۷۵/۱ mL/g	۴۰	۲۵-۵۵	ناپیوسته	گلوکز	لجن بی‌هوازی
[۵۲]	گلوکز ۱/۶۷ mol/mol	۴۱	۳۳-۴۱	ناپیوسته	گلوکز	لجن بی‌هوازی
[۵۳]	ساکارز ۳/۷ mol/mol	۳۵/۱	۲۵-۴۵	ناپیوسته	ساکارز	لجن بی‌هوازی
[۵۴]	ساکارز ۲۵۲ mL/g	۳۵/۵	۲۵-۴۵	ناپیوسته	ساکارز	لجن بی‌هوازی
[۵۵]	ساکارز ۳/۸۸ mol/mol	۴۰	۳۰-۴۵	پیوسته	ساکارز	لجن فاضلاب شهری
[۵۶]	اکسیلوز ۱/۴ mol/mol	۵۰	۳۰-۵۵	پیوسته	اکسیلوز	لجن فاضلاب شهری

pH ۳-۲

زیست‌واکنش‌گاه‌های تولید هیدروژن معمولاً در بازه ۵ تا ۶/۵ کنترل می‌شوند. مطابق مندرجات جدول (۴)، pH بهینه در عملیات ناپیوسته و پیوسته یکسان نیست. در عملیات ناپیوسته، اگر pH کمتر از ۴/۳ یا بیشتر از ۶/۱ باشد، آهنگ تولید الکل از آهنگ تولید هیدروژن بیشتر می‌شود [۴۱]. افزایش تنوع میکروبی در pH بالا مشاهده شده است [۴۲] و ترکیب درصد پروپیونیک و اتانول در pH کمتر افزایش یافته است [۵۰]. افزودن محلول قلیایی برای کنترل pH در تولید هیدروژن زیستی لازم است، ولی سبب افزایش هزینه‌ها می‌شود. بهره‌گیری از جریان برگشتی در یک زیست‌واکنش‌گاه متان برای کاهش میزان مصرف محلول قلیایی بررسی شد ولی سبب کاهش ۸۷ درصدی تولید هیدروژن، به دلیل فعالیت متانوزن‌های مصرف‌کننده هیدروژن شد [۶۲]. بهره‌گیری از خوراک بافری بالا مانند لجن فاضلاب یا پسماند احشام، می‌تواند از نظر اقتصادی به صرفه باشد. این پسماندها از پروتئین غنی‌اند و مقدار زیادی یون‌های هیدروکسید و آمونیم در طول تخمیر تولید می‌کنند که از افت pH می‌کاهند.

۴-۲ فشار جزئی هیدروژن

غلظت هیدروژن محلول در فاز مایع (از طریق قانون هنری به فشار جزئی هیدروژن مربوط می‌شود) یکی از عوامل مهم و تأثیرگذار بر تولید هیدروژن زیستی است. فشار جزئی کم هیدروژن در فضای بالای زیست‌واکنش‌گاه سبب تسهیل انتقال جرم از فاز مایع به فاز گاز می‌شود. فشار جزئی بالای هیدروژن با کاهش فعالیت هیدروژناز و نامطلوب کردن واکنش تولید هیدروژن از نظر ترمودینامیکی بر تولید هیدروژن اثر منفی می‌گذارد. با افزایش غلظت هیدروژن، تولید آن کاهش و مسیر سوخت‌وسازی به سمت تولید بیشتر محصولات

در میان پارامترهای عملیاتی مختلف تأثیر pH بر تولید هیدروژن زیستی خیلی مهم است، زیرا pH فعالیت باکتری‌های تولیدکننده هیدروژن را با تأثیر بر حالت‌های یونی اجزای فعال سلول‌ها و رشدمایه متأثر می‌کند [۵۷]. pH به طور مستقیم فعالیت هیدروژناز، مسیر سوخت‌وسازی و گونه‌های غالب را متأثر می‌کند [۴۲]. بعضی مطالعات نشان می‌دهند که pH پایین‌تر از ۵ برای تولید هیدروژن مؤثرتر است [۵۸]. شرایط اسیدی ضعیف حدود ۵ برای نابودی متانوزن‌های مصرف‌کننده هیدروژن کافی نیست و باید برای جلوگیری از انجام واکنش‌های معطوف به مصرف هیدروژن، pH به ۴/۵ کاهش یابد. براساس تعادل نسبت $ADHN/NADH^+$ داخل سلول، پیشنهاد شد تخمیر استات- اتانول در $pH = 4/5$ مسیر سوخت‌وسازی خیلی پایدارتر و بهتر از مسیرهای سوخت‌وسازی استات- پروپیونات و استات- بوتیرات در pH بین ۵ و ۷/۵ است [۵۹]. تغییر pH به غلظت رشدمایه و ظرفیت بافری وابستگی پردامنه‌ای دارد؛ مثلاً، اگر مقدار ناکافی بافر در محیط تیمار رشدمایه با استحکام بالا وجود داشته باشد، کاهش pH شدید است. بنابراین، pH بهینه در گستره‌های بالاتری قرار دارد. اگر این رشدمایه با بافر کافی آماده شود و یا بافر رقیق باشد، یک pH اولیه خنثی می‌تواند کارایی تولید هیدروژن را افزایش دهد. بنابراین، در فرایندهای ناپیوسته لازم است نقش pH اولیه و عملیاتی به طور جداگانه‌ای مشخص و مقادیر بهینه با در نظر گرفتن غلظت رشدمایه و ظرفیت بافری تعیین شود. باکتری کلوستریدیوم که هیدروژن را به صورت بی‌هوازی اجباری تولید می‌کند چندین مسیر سوخت‌وسازی دارد. برای این سویه، واکنش‌های هیدروژنی در $pH = 5$ تا $pH = 6/5$ و واکنش‌های ناهیدروژنی خارج از این بازه غالب‌اند [۶۰]. بنابراین،

جدول ۴. تأثیر pH روی تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی.

مرجع	بیشینه بازده تولید هیدروژن	pH		نوع زیست واکنش‌گاه	رشدمایه	مایه تلقیح
		بهینه	محدوده مطالعه			
[۴۲]	گلوکز ۲/۱ mol/mol	۵/۵	۴-۷	پیوسته	گلوکز	لجن بی‌هوازی
[۶۲]	نشاسته ۳۴۶ mL/g	۴/۵	۴-۷	ناپیوسته	دوغاب برنج	لجن هاضم بی‌هوازی
[۶۴]	ساکارز ۳/۷ mol/mol	۵/۵	۴/۷-۶/۳	ناپیوسته	ساکارز	لجن بی‌هوازی
[۶۵]	ساکارز ۲۵۲ mL/g	۵/۵	۴/۵-۶/۵	ناپیوسته	ساکارز	لجن بی‌هوازی
[۶۶]	گلوکز ۱/۶۱ mol/mol	۴/۲	۲/۴-۶/۳	پیوسته	ساکارز	کشت مخلوط

تولید پیوسته هیدروژن را تحت تأثیر قرار می‌دهد. مدت زمان توقف مواد آلی در زیست واکنش‌گاه را زمان ماند هیدرولیکی گویند که بر اقتصاد فرایند اثر مستقیم می‌گذارد زیرا هر چه HRT بزرگتر باشد، حجم زیست‌واکنش‌گاه بیشتر می‌شود و هزینه‌ها افزایش می‌یابند. کنترل HRT از مصرف هیدروژن از طریق مصرف‌کننده‌های هیدروژن مانند متانوژن‌ها جلوگیری می‌کند. باکتری‌های تولیدکننده هیدروژن زمان ماند کوتاه را ترجیح می‌دهند [۵۹]. به طور کلی، زمان ماند کوتاه از رشد متانوژن‌ها جلوگیری می‌کند. آهنگ رشد متانوژن‌ها از باکتری‌های تولیدکننده هیدروژن خیلی کمتر است [۷۰]. اما ممکن است در HRT کم پدیده شسته شدن^۲ اتفاق بیفتد [۷۱]. HRT کم توأمأ دو اثر مثبت و منفی بر تولید هیدروژن می‌گذارد. در صورتی که HRT کم (شدت رقیق‌سازی زیاد) باشد، میزان زیست‌توده در زیست واکنش‌گاه محدود است و اغلب ممکن است زیست‌توده از زیست واکنش‌گاه شسته شود. بنابراین، شدت تولید هیدروژن محدود و سبب ناپایداری عملیاتی شدید می‌شود [۷۲]. بهره‌گیری از روش‌های تثبیت با افزایش آهنگ تولید هیدروژن، HRT را کاهش می‌دهد. HRT بهینه معمولاً متغیر و در بازه ۸ تا ۱۲ ساعت به دست آمده است (جدول (۶)).

کاهش‌های مانند اتانول، لاکتات و استات تغییر می‌کند. تلاش‌های زیادی برای کاهش فشار جزئی هیدروژن در شرایط تولید ناپیوسته انجام شده است. روش‌های مؤثر برای کاهش فشار جزئی هیدروژن شامل اختلاط شدید برای جلوگیری از فوق اشباع شدن، آزاد شدن پیوسته گاز، حجم زیاد فضای بالای زیست واکنش‌گاه، پخش کردن گاز بی اثر مانند نیتروژن و کربن‌دی‌اکسید، تخلیه خلا و نصب غشاء نفوذپذیر هیدروژن است. در مقایسه با روش آزاد کردن متناوب گاز، روش آزاد کردن پیوسته گاز به تولید هیدروژن بیشتری می‌انجامد. پخش کردن گاز نیتروژن و کربن‌دی‌اکسید نیز به افزایش تولید هیدروژن منجر شده است. بنابر گزارش‌های انتشاریافته، پخش کردن گاز کربن‌دی‌اکسید تولید هیدروژن را نسبت به گاز نیتروژن بیشتر افزایش داده است. نسبت حجم فضای بالای زیست واکنش‌گاه به حجم مایع ۲ به ۱ به عنوان حجم بهینه برای تولید هیدروژن زیستی در روش تخمیر در تاریکی نیز به دست آمده است [۶۹-۶۷، ۳۰۷-۱]. نمونه‌هایی از مطالعات انجام شده درباره بررسی تأثیر فشار جزئی هیدروژن روی تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی در جدول (۵) درج شده است.

۲-۵- زمان ماند هیدرولیکی (HRT)^۱

زمان ماند هیدرولیکی یکی از پارامترهای کنترل‌کننده مهم است که

جدول ۵. تأثیر فشار جزئی هیدروژن بر تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی.

مرجع	بیشینه بازده تولید هیدروژن	فشار جزئی هیدروژن	زیست‌واکنش‌گاه	رشدمایه	مایه تلقیح
[۶۷]	گلوکز ۱/۹ mol/mol	۷۶۰ mmHg	ناپیوسته	گلوکز	انتروباکتر کلواسا DM11
[۶۷]	گلوکز ۳/۲ mol/mol	۷۱۰ mmHg	ناپیوسته	گلوکز	انتروباکتر کلواسا DM11
[۶۷]	گلوکز ۳/۶ mol/mol	۶۶۰ mmHg	ناپیوسته	گلوکز	انتروباکتر کلواسا DM11
[۶۷]	گلوکز ۳/۷ mol/mol	۵۵۰ mmHg	ناپیوسته	گلوکز	انتروباکتر کلواسا DM11
[۶۷]	گلوکز ۳/۹ mol/mol	۳۸۰ mmHg	ناپیوسته	گلوکز	انتروباکتر کلواسا DM11
[۶۷]	گلوکز ۲/۹ mol/mol	۳۳۰ mmHg	ناپیوسته	گلوکز	انتروباکتر کلواسا DM11
[۶۸]	گلوکز ۲/۱۸ mol/mol	۱/۱۸ bar	زیست‌قرص بی‌هوایی	گلوکز	کلستریدیوم
[۶۸]	گلوکز ۲/۳۸ mol/mol	۱ bar	زیست‌قرص بی‌هوایی	گلوکز	کلستریدیوم
[۶۸]	گلوکز ۲/۶۷ mol/mol	۰/۸۹ bar	زیست‌قرص بی‌هوایی	گلوکز	کلستریدیوم
[۶۹]	۲۶/۶۶ mmol/L	۳۳/۹۰ kPa	ناپیوسته	گلوکز	کلستریدیوم بوتیریکم TM-9A
[۶۹]	۴۴/۲۷ mmol/L	۲۶/۷۸ kPa	ناپیوسته	گلوکز	کلستریدیوم بوتیریکم TM-9A
[۶۹]	۴۹/۸۳ mmol/L	۱۵/۶۷ kPa	ناپیوسته	گلوکز	کلستریدیوم بوتیریکم TM-9A
[۶۹]	۵۹/۲۳ mmol/L	۱۲/۴۱ kPa	ناپیوسته	گلوکز	کلستریدیوم بوتیریکم TM-9A
[۶۹]	۶۹/۶۵ mmol/L	۱۰/۱۲ kPa	ناپیوسته	گلوکز	کلستریدیوم بوتیریکم TM-9A

1. Hydraulic Retention Time (HRT)

2. Wash Out

جدول ۶. تأثیر زمان ماند هیدرولیکی بر تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی.

مرجع	بیشینه بازده تولید هیدروژن	زمان ماند هیدرولیکی		نوع زیست واکنش گاه	رشدمایه	مایه تلقیح
		بهینه	محدوده مطالعه			
[۴۹]	ساکارز ۱/۵ mmol/mol	۱۲	۴-۱۸	CSTR	نشاسته	لجن هضم شده بی‌هوازی
[۷۳]	هگزوز ۱/۵ mol/mol	۱۲	۲-۱۲	CSTR	نشاسته	لجن بی‌هوازی
[۷۴]	گلوکز ۱/۸۱ mol/mol	۰/۵	۰/۵-۲	CSTR	گلوکز	لجن فاضلاب شهری
[۷۵]	ساکارز ۴/۵۲ mol/mol	۸	۲-۱۳/۳	CSTR	ساکارز	لجن فاضلاب شهری
[۷۶]	ساکارز ۴/۷۰ mol/mol	۴	۲-۱۲	CSTR	ساکارز	لجن فاضلاب شهری
[۷۷]	قند ۲/۲۵ mol/mol	۲	۱/۵-۳	UASB	گالاکتوز	کشت مخلوط
[۷۸]	هگزوز ۱/۶۸ mol/mol	۸	۲-۸	CSTR	فرکتوز	لجن فاضلاب بی‌هوازی
[۷۹]	گلوکز ۱/۹۵ mol/mol	۱۰	۶-۱۲	CSTR	گلوکز	لجن هضم شده بی‌هوازی
[۸۰]	گلوکز ۱/۶۳ mol/mol	۱۰	۴-۱۲	CSTR	گلوکز	لجن بی‌هوازی
[۸۱]	اکسیلوز ۱/۶۳ mol/mol	۱۲	۴-۱۲	CSTR	اکسیلوز	لجن فاضلاب شهری
[۸۲]	گلوکز ۰/۹۲ mol/mol	۱۲	۴-۱۲	CSTR	اکسیلوز	لجن فاضلاب شهری
[۸۳]	ساکارز ۳/۶ mol/mol	۸	۴-۲۴	UASB	ساکارز	لجن فاضلاب شهری
[۸۴]	گلوکز ۱/۷ mol/mol	۰/۲۵	۰/۱۲۵-۳	AFBR	گلوکز	لجن هضم شده بی‌هوازی
[۸۴]	گلوکز ۱/۶ mol/mol	۰/۲۵	۰/۱۲۵-۳	AFBR	گلوکز	لجن هضم شده بی‌هوازی
[۸۵]	گلوکز ۱/۴۷ mol/mol	۸	۴-۲۴	UASB	گلوکز	لجن بی‌هوازی
[۸۵]	گلوکز ۰/۸۹ mol/mol	۲	۲-۲۴	PBR	گلوکز	لجن بی‌هوازی

۲-۶ نوع و غلظت رشدمایه

در فرایند تولید هیدروژن زیستی، معمولاً رشدمایه کربوهیدرات است که می‌تواند کربن و انرژی را برای ریزاندامگان فراهم آورد. بنابراین، نوع و غلظت رشدمایه برای رشد باکتری‌های تولیدکننده هیدروژن اهمیت دارد. رشدمایه‌های اصلی برای تولید هیدروژن تخمیری فاضلاب‌های سنتزی شامل کربوهیدرات‌ها، مطالعات زیادی بر مونوساکاریدها (گلوکز، اکسیلوز، مانوز، گالاکتوز، ریبوز، آرابینوس)، دی‌ساکاریدها (ساکارز، مالتوز، لاکتوز، سلوبیوز) و پلی‌ساکاریدها (نشاسته، سلولز) انجام شده است. در ۵۹ درصد تحقیقات از مونوساکاریدها، ۱۰ درصد از دی‌ساکاریدها، ۱۱ درصد از پلی‌ساکاریدها و ۲۰ درصد از خوراک پایدار برای بررسی تولید هیدروژن بهره گرفته شده است. بنابراین، در بیشتر تحقیقات از قندهای خالص به عنوان خوراک استفاده شده است. منابع کربوهیدراتی خالص برای تولید هیدروژن در مقیاس عملی پرهزینه‌اند و به همین دلیل بهره‌گیری از منابع کم هزینه و برگشت پذیر مورد توجه قرار گرفته است. سودجستن از پسماندهای واقعی

به عنوان رشدمایه دارای دو مزیت تجزیه پسماندها و تولید انرژی است. از پسماندهای صنعتی، کشاورزی و شهری می‌توان به عنوان رشدمایه برای تولید هیدروژن زیستی بهره گرفت. فاضلاب‌های واقعی غنی از کربوهیدرات، مانند فاضلاب فرایندهای غذایی، پسماند کارخانه آبجوسازی، ملاس، پسماند میوه، لجن فاضلاب، آبکافت باگاس نیشکر و فاضلاب آب پنیر برای تولید هیدروژن استفاده شده است. این رشدمایه‌ها حاوی بسپارهای پیچیده سلولز، همی سلولز و لیگنین‌اند و بنابراین به پیش تیمار نیاز دارند که هزینه‌های تولید را افزایش می‌دهد. استفاده از جلبک (لامیناریا ژاپونیکا) و ریزجلبک (سندسمس، کلرلا، دونالیلا ترنیولکتا، کلایمیدوموناس رینهاردتی) برای یافتن خوراک جدید در تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی نیز بررسی شده است. این رشدمایه‌ها حاوی کربوهیدرات، لامینارین و آلژینات‌اند [۱۰۹-۱۰۴]. نمونه‌هایی از رشدمایه‌های به‌کار رفته در فرایند تولید هیدروژن زیستی را در شکل (۲) مشاهده می‌کنید و در جدول (۷) هم درج شده است.

- انواع رشدمایه
- ۱- فاضلاب‌های سنتزی شامل کربوهیدرات
 - مونوساکاریدها (گلوکز، اسیلوز، مانوز، گالاکتوز، ریبوز و غیره)
 - دی ساکاریدها (ساکارز، مالتوز، لاکتوز، سلوبیوز و غیره)
 - پلی ساکاریدها (نشاسته، سلولز و غیره)
 - ۲- محصولات غذایی (نیشکر، چغندر قند، گندم، سیب زمینی، ذرت و غیره)
 - ۳- محصولات دارای انرژی (کاساوا)
 - ۴- پسماندهای واقعی صنعتی، کشاورزی و شهری
 - ۵- جلبک و ریزجلبک

شکل ۲. انواع رشدمایه در تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی [۴].

جدول ۷. برخی از رشدمایه‌های به کار رفته در تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی.

مرجع	بیشینه بازده تولید هیدروژن	مایه تلقیح	رشدمایه
[۸۶]	هگزوز ۲/۶۹ mol/mol	لجن هاضم بی‌هوازی	گلوکز
[۸۷]	گلوکز ۲/۸ mol/mol	لجن هاضم بی‌هوازی	گلوکز
[۸۸]	قند ۲/۴۶ mol/mol	KKU-ED1 ترموساکارولیتیکم	اکسیلوز / آرایبنوس
[۸۹]	هگزوز ۲/۲ mol/mol	انترویاکتر آنروژنز IAM 1183	اکسیلوز
[۹۰]	هگزوز ۱/۹۸ mol/mol	کشت مخلوط	آرایبنوس
[۹۱]	هگزوز ۱/۰۲ mol/mol	اشرشیا کولی DJT135	آرایبنوس
[۹۱]	گلوکز ۰/۶۹ mol/mol	اشرشیا کولی DJT135	گالاکتوز
[۲۵]	گالاکتوز ۰/۹۵ mol/mol	انترویاکتر آنروژنز HO-38	گالاکتوز
[۹۲]	مانوز ۱/۹۳ mol/mol	سیتروباکتر CMC-1	مانوز
[۹۳]	هگزوز ۱/۹ mol/mol	لجن هاضم بی‌هوازی	ساکارز
[۹۴]	ساکارز ۲/۷۳ mol/mol	کشت مخلوط	ساکارز
[۲۵]	مالتوز ۲/۱۶ mol/mol	انترویاکتر آنروژنز HO-38	مالتوز
[۹۵]	مالتوز ۳/۱۳ mol/mol	کلستریدیوم RI	مالتوز
[۹۵]	سلوبیوز ۳/۵ mol/mol	کلستریدیوم RI	سلوبیوز
[۹۶]	نشاسته ۰/۵۹ mol/mol	کلستریدیوم	نشاسته
[۹۷]	هگزوز ۱/۱ mol/mol	کلستریدیوم سلولولیتیکوم ^۱	سلولوز
[۹۸]	۰/۰۰۴ mol/g COD	خاک	پسماند سیب زمینی
[۹۹]	۲۶/۱۳ mol/Kg COD	کشت مخلوط	ملاس
[۱۰۰]	لاکتوز ۱/۱۲ mol/g	کشت مخلوط	آب پنیر
[۹۳]	هگزوز ۱/۷ mol/mol	لجن هاضم بی‌هوازی	شیره چغندر قند
[۱۰۱]	۰/۰۰۵ mol/g carbohydrate-COD	لجن هاضم بی‌هوازی	پسماند میوه و لجن فاضلاب
[۱۰۲]	هگزوز ۱/۳ mol/mol	لجن هاضم بی‌هوازی	نشاسته گندم
[۱۰۳]	قند ۱/۷۳ mol/mol	کلستریدیوم بوتیریکم	باگاس نیشکر
[۱۰۴]	قند ۰/۸۴ mol/mol	فضولات فیل	آبکافت باگاس نیشکر
[۱۰۵]	۱۰۹/۶ mL/g COD	لجن هاضم بی‌هوازی	لامیناریا ژاپونیکا ^۲
[۱۰۶]	۱/۹ mL/g VS	لجن فاضلاب	سندسمس ^۳
[۱۰۷]	mL/g TS۴۰	کلستریدیوم بوتیریکم	کلامیدوموناس رینهاردتی
[۱۰۸]	ریزجلبک ۱۳ mL/g	باکتری‌های طبیعی موجود در دوغاب زیست توده ریزجلبک	دونالیا تریولکتا
[۱۰۹]	۲/۳۱ mL/g TS	لجن هاضم بی‌هوازی	کلرلا ولگاریس

1. *Clostridium Cellulolyticum*
 2. *Laminaria Japonica*
 3. *Scenedesmus*

در فرایند تولید هیدروژن تخمیری افزایش غلظت زیست توده می تواند سبب افزایش توانایی باکتری ها در تولید هیدروژن شود، ولی در غلظت های زیاد رشدمایه، با افزایش غلظت رشدمایه میزان تولید کاهش می یابد. در فرایند ناپیوسته غلظت بهینه رشدمایه ها کاملاً مختلف به دست آمده است و دیگر پارامترهای عملیاتی مانند pH آن را متأثر می کنند. وقتی pH کنترل شده نباشد، با افزایش غلظت رشدمایه، کارایی تولید هیدروژن به دلیل کاهش pH کاهش می یابد. دستیابی به غلظت بهینه رشدمایه در عملیات پیوسته مخصوصاً در تیمار فاضلاب خیلی معنی دار و کاربردی است [۱۱۵-۱۱۰]. نمونه هایی از مطالعات انجام شده درباره تأثیر غلظت رشدمایه در تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی در جدول (۸) درج شده است.

۷-۲ نوع و غلظت مواد مغذی

در کنار رشدمایه های اصلی (کربوهیدرات ها) تولید هیدروژن به روش تخمیر در تاریکی مانند همه فرایندهای تیمار زیستی به مواد مغذی برای فعالیت باکتری ها نیاز دارد. مواد مغذی شامل نیتروژن، فسفات، آهن و بعضی فلزات اند [۱۲۷-۱۱۶]. تأثیر نوع و غلظت یون فلزات روی تولید هیدروژن به روش تخمیر در تاریکی در جدول (۹) درج شده است. در میان همه مواد مغذی، نیتروژن برای رشد باکتری ها بسیار ضروری است و به شکل های مختلف مانند یون آمونیم، عصاره مخمر، پپتون و غیره به محیط کشت اضافه می شود.

جدول ۸. تأثیر غلظت رشدمایه بر تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی.

مرجع	بیشینه بازده تولید هیدروژن	غلظت رشدمایه		زیست واکنش گاه	رشدمایه	مایه تلقیح
		بهینه	محدوده مطالعه			
[۵۰]	هگزوز ۱/Amol/mol	۶/۴	۳/۲-۱۰/۷	ناپیوسته	پسماند غذایی	لجن بی هوازی
[۱۱۰]	هگزوز ۲/۰۷ mol/mol	۴۰	۵-۴۰	ناپیوسته	ساکارز	کلستریدیم پاستوریانیم
[۱۱۱]	گلوکز ۱/۹۳ mol/mol	۱۰/۷	۵/۳-۲۱/۳	ناپیوسته	گلوکز	اتانولیجنز هاربیننس ^۱ YUAN-3
[۱۱۲]	گلوکز ۳/۱ mol/mol	۲/۱	۱/۱-۳۲۰	ناپیوسته	گلوکز	لجن هضم شده
[۱۱۳]	هگزوز ۱/۲۲ mol/mol	۳۰	۱۰-۶۰	پیوسته	ساکارز	لجن هاضم بی هوازی
[۱۱۴]	نشاسته ۶۷ mL/g	۹/۸	۹/۸-۳۹	ناپیوسته	نشاسته	لجن بی هوازی
[۱۱۵]	۱۱۹mL/g COD	۴	۰-۹۶	ناپیوسته	شیر خشک بدون چربی	لجن هاضم بی هوازی

جدول ۹. تأثیر غلظت یون فلزات روی تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی.

مرجع	بیشینه بازده تولید هیدروژن	غلظت یون فلزات		یون فلزی	نوع زیست واکنش گاه	رشدمایه	مایه تلقیح
		بهینه	محدوده مطالعه				
[۱۲۲]	محیط کشت ۲۳۶۰/۵ mL/L	۲۳/۶	۱/۲-۲۳/۶	⁺ Mg ²	ناپیوسته	گلوکز	باکتری B49
[۱۲۳]	ساکارز ۳/۶ mol/mol	۱۵۰	۰-۳۰۰	⁺ Ca ²	پیوسته	ساکارز	لجن هاضم بی‌هوازی
[۱۲۴]	ساکارز ۲/۱۹ mol/mol	۲۷/۲	۰-۲۷/۲	⁺ Ca ²	پیوسته	ساکارز	لجن فاضلاب شهری
[۱۲۵]	گلوکز ۲۹۶/۱ mL/g	۰/۱	۰-۵۰	⁺ Ni ²	ناپیوسته	گلوکز	لجن هضم شده
[۱۲۶]	گلوکز ۱/۷۳ mol/mol	۲۵۰	۰-۵۰۰	⁺ Zn ²	ناپیوسته	گلوکز	لجن بی‌هوازی
[۱۲۶]	گلوکز ۱/۷۴ mol/mol	۴۰۰	۰-۴۰۰	⁺ Cu ²	ناپیوسته	گلوکز	لجن بی‌هوازی
[۱۲۷]	ساکارز ۱۳۱/۹ mL/g	۳۵۲/۸	۰-۱۷۶۳/۸	⁺ Fe ²	ناپیوسته	ساکارز	لجن بی‌هوازی

است. مثلاً، غلظت‌های بهینه SeFO₄ در دماهای ۲۵، ۳۵ و ۴۰ درجه سلسیوس به ترتیب ۸۰۰، ۲۰۰ و ۲۵ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمده است [۱۱۹]. علاوه بر فلز آهن و نیکل، سمی بودن دیگر فلزات سنگین مانند یون‌های مس، منگنز، روی، کرم، کادمیم و سرب نیز بر تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی در سطح گسترده‌ای بررسی شده است. مثلاً، سمیت نسبی شش فلز مس، نیکل، روی، کادمیم، کریپتون و پالادیم بر تولید هیدروژن تخمیری به صورت Cu>Ni>Zn>Cr>Cd >Pb به دست آمده است [۱۲۰]. در حالی که سمیت نسبی سه فلز سنگین روی، مس و کریپتون بر تولید هیدروژن تخمیری به صورت Zn>Cu >Cr گزارش شده است [۱۲۱].

الکترون‌ها از پیروات اکسید شده به استیل کوآنزیم A کمک می‌کند [۱۱۷]. یون آهن در رشد ریزاندامگان، ساخته شدن آنزیم‌ها و تشکیل هیدروژنازهایی که در تولید هیدروژن از طریق احیای پروتون در فرایند تخمیر در تاریکی مشارکت دارد و در مهار احیایی از طریق سولفید مورد نیاز است. آهن تولید هیدروژن را به ویژه زمانی که آنزیم هیدروژناز بیان می‌شود، افزایش می‌دهد [۱۱۸]. غلظت کمینه‌ای از آهن برای تولید مؤثر هیدروژن زیستی ضروری است و افزایش آن تولید هیدروژن را بهبود می‌بخشد. با این وجود، اگر غلظت این یون بالاتر از غلظت آستانه در محیط باشد بازدارنده فرایند است. غلظت بسیار بالای آهن، بر سوخت‌وساز باکتری تأثیر منفی می‌گذارد که نتیجه آن کاهش فعالیت باکتری و تولید هیدروژن است [۲]. غلظت بهینه آهن در دماهای مختلف متفاوت

جدول ۱۰. تأثیر C/N و C/P بر تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی.

مرجع	بیشینه بازده تولید هیدروژن	C/N		C/P		زیست واکنش گاه	رشدمایه	مایه تلقیح
		بهینه	محدوده مطالعه	بهینه	محدوده مطالعه			
[۱۲۸]	ساکارز ۴/۸ mol/mol	۴۷	۴۰-۱۳۰	-	-	ناپیوسته	ساکارز	لجن فعال پسماند
[۱۲۹]	نشاسته ۲۸۱ mL/g	۲۰۰	۲۰-۲۰۰	۱۰۰۰	۵۰-۱۰۰۰	ناپیوسته	پودر گندم	لجن بی‌هوازی
[۱۳۰]	رشدمایه ۶/۳۳ L/L	۷۴	۴۵-۹۵	۵۵۹	۴۵۰-۶۵۰	ناپیوسته	پساب کارخانه روغن نخل آسیاب شده	لجن بی‌هوازی

۲-۸ نوع زیست واکنش گاه

زیست واکنش گاه محفظه‌ای است که در آن واکنش زیستی از طریق آنزیم‌ها یا سلول‌های زنده تحت شرایط سترون و کنترل شده انجام می‌شود. زیست واکنش گاه‌ها بر مبنای نوع عملیات به سه دسته ناپیوسته، نیمه پیوسته و پیوسته، بر مبنای ساختار (شکل هندسی) به چهار دسته زیست واکنش گاه کاملاً همزده، لوله‌ای، ثابت بستر و سیال بستر، و بر مبنای نحوه به کارگیری ریزاندامگانها، به دو دسته سلول تثبیت شده و آزاد دسته‌بندی می‌شوند [۱۳۱-۱۳۲]. زیست واکنش گاه‌های تولید هیدروژن تخمیری بر مبنای نحوه به کارگیری ریزاندامگانها به دو دسته زیست واکنش گاه سلول آزاد و تثبیت شده تقسیم می‌شوند. زیست واکنش گاه‌های سلول آزاد به سه دسته مخزن همزن دار پیوسته (CSTR)^۱، زیست واکنش گاه بی‌هوای ناپیوسته متوالی (ASBR)^۲ و غشایی بی‌هوای (AnMBR)^۳ و زیست واکنش گاه‌های سلول تثبیت شده، به چهار دسته زیست واکنش گاه لجن بی‌هوای جریان بالارونده (UASBR)^۴، بستر لجن گرانول گسترده (EGSBr)^۵، بستر پر شده بی‌هوای (AnMBR)^۶ و بستر سیال بی‌هوای (AFBR)^۷ تقسیم می‌شوند. در تولید هیدروژن زیستی زیست واکنش گاه‌های

ناپیوسته به دلیل انعطاف پذیری، عملیات ساده و کنترل مؤثر بیشتر بکار رفته است، اما تولید هیدروژن در مقیاس صنعتی به زیست واکنش گاه جریان پیوسته نیاز دارد. تولید پیوسته هیدروژن از نظر اقتصادی و کاربردی لازم است. دو شاخص مهم ارزیابی عملکرد فرایند تولید هیدروژن زیستی عبارت‌اند از بازده هیدروژن (HY)^۸ و آهنگ تولید هیدروژن (HPR)^۹. بازده هیدروژن به صورت مول هیدروژن تولید شده به ازای مول رشدمایه مصرف شده تعریف می‌شود (معادله (۱)) که نوع رشدمایه، ویژگی‌های میکروبی و شرایط محیطی بیشتر از نوع زیست واکنش گاه بر آن تأثیر می‌گذارند. در فرایند تخمیر در تاریکی، اساساً نوع زیست واکنش گاه تأثیری بر HY ندارد و مقایسه بین انواع زیست واکنش گاه باید بر مبنای HPR انجام شود [۱۳۳]. آهنگ تولید هیدروژن به صورت حجم هیدروژن تولید شده به ازای زمان کل تولید در حجم محیط کشت تعریف می‌شود (معادله (۲)). نمونه‌هایی از تحقیقات انجام شده در تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی با انواع زیست واکنش گاه‌های زیست توده آزاد و تثبیت شده و انواع فرایندهای پیوسته و ناپیوسته در جدول (۱۱) درج شده است.

جدول ۱۱. انواع زیست واکنش گاه در تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی.

مرجع	HY (mol H ₂ /mol هگزوز)	HPR (L H ₂ /L.h)	HRT (h)	pH	دما (°C)	نوع عملیات	رشدمایه	نوع زیست واکنش گاه
[۱۳۴]	۰/۸۳	۰/۱۲	۲۴	۵/۲	۳۵	پیوسته	فاضلاب آب پنیر	CSTR
[۱۳۵]	۱/۹۳	۳/۲	۰/۵-۱۲	۵/۵	۳۷	پیوسته	گلوکز	CSTR
[۱۳۶]	۰/۳۲	۰/۳۴	۶-۱۲	۵/۵	۳۵	پیوسته	فاضلاب کارخانه قهوه	CSTR
[۱۳۷]	۱/۴۶	-	۴-۱۲	۶/۷	۳۵	ناپیوسته	ساکارز	ASBR
[۱۳۸]	۰/۵	-	۱۸	۵/۳	۳۵	ناپیوسته	نشاسته	ASBR
[۱۳۹]	۹/۸۰	۰/۱۱	۲۴-۴۲	بیش از ۵/۳	-	ناپیوسته	فاضلاب میوه	ASBR
[۱۴۰]	۱/۳۹, ۱/۲۷	۱/۴۸, ۲/۰۷	۱-۴	۶/۲-۶/۸	۳۵	ناپیوسته	گلوکز	AnMBR
[۱۴۱]	۱/۰۳	۰/۱۷	۸	۵/۵	۲۳	ناپیوسته	گلوکز	AnMBR
[۱۴۲]	۱/۷۱	-	۹	۵/۵	۳۵	ناپیوسته	گلوکز	AnMBR
[۱۴۳]	۰/۷۵	۰/۲۵	۴-۲۴	۶/۷	۳۵	پیوسته	ساکارز	UASBr
[۱۴۴]	۱/۶۸	۰/۱۴۵	۱۳	۳/۴-۶/۳	۳۹	پیوسته	ساکارز	UASBr
[۱۴۵]	۱/۳۳	۰/۱	۱۷	۳/۱-۶	۳۵	پیوسته	ساکارز	UASBr
[۱۴۶]	۱/۹۵	۰/۷۱	۱-۶	۴/۲-۴/۴	۳۵	پیوسته	فاضلاب ملاس	EGSBr
[۱۴۷]	-	۰/۰۷	۴-۲۴	۳/۹۵	۳۰	پیوسته	فاضلاب نشاسته	EGSBr
[۱۴۸]	۱/۷	۷/۶	۰/۲۵-۰/۷۵	۵/۵	۳۷	پیوسته	گلوکز	AFBR
[۱۴۹]	۱/۳۱	۰/۲۵	۱۰	-	۷۰	پیوسته	گلوکز	AFBR
[۱۴۹]	۲/۹۹	۰/۲	۱۰	-	۷۰	پیوسته	گلوکز	TBR

1. Continuously Stirred Tank Reactor (CSTR)
3. Anaerobic Membrane Bioreactor (AnMBR)
5. Expanded Granular Sludge Bed Reactor (EGSBr)
7. Anaerobic Fluidized Bed Reactor (AFBR)

2. Anaerobic Sequencing Batch Reactor (ASBR)
4. Up-flow Anaerobic Sludge Blanket Reactor (UASBr)
6. Anaerobic Packed Bed Reactors (APBR)
8. Hydrogen Yield (HY)
9. Hydrogen Production Rate (HPR)

degradation using a mixed anaerobic culture in the presence of natural and synthetic inhibitors", Ms Thesis 2011, Windsor, Ontario, Canada.

- [4] Elsharnouby, O., Hafez, H., Nakhla, G., El Naggar, M. H., "A critical literature review on biohydrogen production by pure culturesInt", *Int. J. Hydrogen Eng.* 38, 4945–4966 (2013).
- [5] Yin, Y., Wang, J., "Optimization of hydrogen production by response surface methodology using gamma irradiated sludge as inoculum". *Energy & fuels*, 30, 4096-4103, (2016).
- [6] Wang, J., Wan, W., "Experimental design methods for fermentative hydrogen production: A review", *Int. J. Hydrogen Eng.* 34, 235-244, (2009).
- [7] Liang, T. M., Cheng, S. S., Wu, K. L., "Behavioral study on hydrogen fermentation reactor installed with silicone rubber membrane", *Int. J. Hydrogen Eng.* 27, 1157–1165, (2002).
- [8] Chen, C. C., Lin, C. Y., Lin, M. C., "Acid-base enrichment enhances anaerobic hydrogen production process". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 58, 224–228, (2002).
- [9] Hawkes, F. R., Hussy, I., Kyazze, G., Dinsdale, R., Hawkes, D. L., "Continuous dark fermentative hydrogen production by mesophilic microflora: principles and progress". *Int. J. Hydrogen. Eng.* 32, 172–184, (2007).
- [10] Mohan, S. V., Bhaskar, Y. V., Krishna, P. M., Rao, N. C., Babu, V. L., Sama, P. L., "Biohydrogen production from chemical wastewater as substrate by selectively enriched anaerobic mixed consortia: Influence of fermentation pH and substrate composition", *Int. J. Hydrogen Eng.* 32, 2286–2295, (2007).
- [11] Ueno, Y., Otsuka, S., Morimoto, M., "Hydrogen production from industrial wastewater by anaerobic microflora in chemostat culture". *J. Ferment. Bioeng.* 82, 194–197, (1996).
- [12] Masset, J., Hiligsmann, S., Hamilton, C., Beckers, L., Franck, F., Thonart, P., "Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequencedbatch mode with a recently isolated strain of hydrogen-producing *Clostridium butyricum* CWBI1009", *Int. J. Hydrogen Eng.* 35, 3371-3378, (2010).
- [13] Ramachandran, U., Wrana, N., Cicek, N., Sparling, R., Levin, D. B., "Hydrogen production and end-product synthesis patterns by *Clostridium termitidis* strain CT1112 in batch fermentation cultures with cellobiose or α -cellulose", *Int. J. Hydrogen Eng.* 33, 7006-7012, (2008).
- [14] Masset, J., Calusinska, M., Hamilton, C., Hiligsmann, S., Joris, B., Wilmotte, A., Thonart, P., "Fermentative hydrogen production from glucose and starch using pure strains and artificial co-cultures of *Clostridium* spp", *Biotechnol. Biofuel.* 5, 1-15, (2012).

$$(1) \quad \text{بازده تولید هیدروژن} = \left(\frac{\text{مول هیدروژن تولید شده}}{\text{مول رشدمایه مصرف شده}} \right)$$

$$(2) \quad \text{آهنگ تولید هیدروژن} = \left(\frac{\text{حجم هیدروژن تولید شده}}{\text{زمان تولید هیدروژن. حجم محیط کشت}} \right)$$

۳. نتیجه گیری کلی

در این مقاله مروری اثر عوامل مختلف بر تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی بررسی شده است. پارامترهای عملیاتی زیادی مانند آماده سازی تلقیح، دما، pH، فشار جزئی هیدروژن، زمان ماند هیدرولیکی، نوع زیست واکنش گاه، نوع و غلظت رشدمایه، نوع و غلظت مواد مغذی، تولید هیدروژن به روش تخمیر در تاریکی را متأثر می کنند. ارزیابی مقالات علمی حاکی از عدم هماهنگی در شرایط بهینه پارامترهای مؤثر در تولید هیدروژن به روش تخمیر در تاریکی است. بیشتر مطالعات در شرایط عملیاتی ناپیوسته و برای گلوکز و ساکارز به عنوان رشدمایه انجام شده است. تحقیقات آینده باید به سمت بررسی تولید هیدروژن در عملیات پیوسته و بهره گیری از پسماندهای آلی و رشدمایه های ارزان قیمت هدایت شود. برای فهم بهتر اثر هر پارامتر بر تولید هیدروژن و برهم کنش آن ها با یکدیگر، استفاده از روش های آماری و مدل های سینتیکی توصیه می شود تا با استفاده از آن ها بتوان اطلاعات مفیدی برای انجام تجزیه و تحلیل داده ها، طراحی دستگاه ها و عملیات فرایند تخمیر به دست آورد. قبل از آن که تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی به مرحله کاملاً تجاری برسد، تاثیر عوامل مختلف بر این فرایند در مقیاس آزمایشگاه و در مقیاس زیاد باید مطالعه و بررسی های اقتصادی و فنی کامل در این زمینه انجام شود. امید می رود با تحولات فناوری در دست اقدام در تولید هیدروژن زیستی در آینده نزدیک اقتصاد هیدروژنی جایگزین اقتصاد کربنی شود.

مراجع

- [1] Das, D., Khanna, N., Nag Dasgupta, C., "Biohydrogen Production: Fundamentals and Technology Advances", CRC Press, (2014).
- [2] Bundhoo, M. A. Z., Mohee, R., "Inhibition of dark fermentative bio-hydrogen production: A review", *Int. J. Hydrogen Eng.* 41, 6713-6733, (2016).
- [3] Philpott, J. P., "Bio-hydrogen production from glucose

- culture as biocatalyst for enhancing hydrogen production", *Biotechnol. Prog.* 19, 383–388, (2003).
- [16] Zhang, H., Bruns, M. A., Logan, B. E., "Biological hydrogen production by *Clostridium acetobutylicum* in an unsaturated flow reactor", *Water Res.* 40, 728–734, (2006).
- [17] Lo, Y. C., Chen, W. M., Hung, C. H., Chen, S. D., Chang, J. S., "Dark H₂ fermentation from sucrose and xylose using H₂-producing indigenous bacteria: feasibility and kinetic studies", *Water Res.* 42, 827–842, (2008).
- [18] Chen, S. D., Sheu, D. S., Chen, W. M., Lo, Y. C., Huang, T. I., Lin, C. Y., "Dark hydrogen fermentation from hydrolyzed starch treated with recombinant amylase originating from *Caldimonas taiwanensis* On1", *Biotechnol. Prog.* 23, 1312–1320, (2007).
- [19] Evvyernie, D., Morimoto, K., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K., Ohmiya, K., "Conversion of Chitinous waste to hydrogen gas by *Clostridium paraputrificum* M-21", *J. Biosci. Bioeng.* 91, 339-343, (2001).
- [20] Levin, D. B., Islam, R., Cicek, N., Sparling, R., "Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates". *Process Biochem.* 31, 1496–1503, (2006).
- [21] Alalayah, W. M., Kalil, M. S., Kadhum, A. A. H., Jahim, J. M., Alauj, N. M., "Hydrogen production using *Clostridium saccharoperbutylacetonicum* N1-4 (ATCC 13564)", *Int. J. Hydrogen Eng.* 33, 7392-7396, (2008).
- [22] Ren, N., Cao, G., Wang, A., Lee, D. J., Guo, W., Zhu, Y., "Dark fermentation of xylose and glucose mix using isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16", *Int. J. Hydrogen Eng.* 33, 6124-6132, (2008 a).
- [23] Ren, N., Cao, G., Guo, W., Wang, A., Zhu, Y., Liu, B., Xu, J., "Biological hydrogen production from corn stover by moderately thermophile *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* W16", *Int. J. Hydrogen Eng.* 35, 2708-2712, (2010).
- [24] Mars, A. E., Veuskens, T., Budde, M. A. W., van Doeveren, F. N. M., Lips, S. J., Bakker, R. R., de Vrije, T., Claassen, A. M., "Biohydrogen production from untreated and hydrolyzed steam peels by extreme thermophilic *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga neopolitana*", *Int. J. Hydrogen Eng.* 35, 7730-7737, (2010).
- [25] Van Niel, E. W. J., Budde, M. A. W., de Haas, G. G., Van der Wal, F. J., Claassen, P. A. M., Stams, A. J. M., "Distinctive properties of high hydrogen producing extreme thermophiles, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga elfii*", *Int. J. Hydrogen Eng.* 27, 1391–1398, (2002).
- [26] Yokoi, H., Ohkawara, T., Hirose, J., Hayashi, S., Takasaki Y., "Characteristics of hydrogen production by aciduric *Enterobacter aerogenes* Strain HO-39", *J. Ferment. Bioeng.* 80, 571-574, (1995).
- [27] Ogino, H., Miura, T., Ishimi, K., Seki, M., Yoshida, H., [15] Chin, H. L., Chen, Z. S., Chou, C. P., "Fedbatch operation using *Clostridium acetobutylicum* suspension "Hydrogen production from glucose by anaerobes", *Biotechnol. Prog.* 21, 1786–1788, (2005).
- [28] Nakashimada, Y., Rachman M. A., Kakizono, T., Nishio, N., "Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states", *Int. J. Hydrogen Eng.* 27, 1399–1405, (2002).
- [29] Turcot, J., Bisailon, A., Hallenbeck, P. C., "Hydrogen production by continuous cultures of *Escherichia coli* under different nutrient regimes", *Int. J. Hydrogen Eng.* 33, 1465–1470, (2008).
- [30] Niu, K., Zhang, X., Tan, W. S., Zhu, M. L., "Characteristics of fermentative hydrogen production with *Klebsiella pneumonia* ECU-15 from anaerobic sewage sludge", *Int. J. Hydrogen Eng.* 35, 71-80, (2010).
- [31] Chittibabu, G., Nath, K., Dad, D., "Feasibility studies on the fermentative hydrogen production by recombinant *Escherichia coli* BL-21", *Process Biochem.* 41, 682-688, (2006).
- [32] Kumar, N., Das, D., "Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BL 08", *Process Biochem.* 35, 589-593, (2000).
- [33] Oh, Y. K., Seol, E. H., Lee, E. Y., Park, S., "Fermentative hydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Rhodospseudomonas palustris* P4". *Int. J. Hydrogen Eng.* 27, 1373-1379, (2002).
- [34] Yokoi, H., Maki, R., Hirose, J., Hayashi, S., "Microbial production of hydrogen from starch-manufacturing wastes", *Biomass Bioenerg.* 22, 389-395, (2002).
- [35] Argun, H., Kargi, F., "Bio-hydrogen production from ground wheat starch by continuous combined fermentation using annular-hybrid bioreactor", *Int. J. Hydrogen Eng.* 35, 6170-6178, (2010).
- [36] Liu, Y., Yu, P., Song, X., Qu, Y., "Hydrogen production from cellulose by co-culture of *Clostridium thermocellum* JN4 and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17", *Int. J. Hydrogen Eng.* 33, 2927-2933, (2008).
- [37] Cheong, D. Y., Hansen, C. L., "Feasibility of hydrogen production in thermophilic fermentation by natural anaerobes", *Bioresour. Technol.* 98, 2229- 2239, (2007).
- [38] Abreau, A. A., Karakashev, D., Souza, D. Z., Alves, M. M., "Biohydrogen production from arabinose and glucose using extreme thermophilic anaerobic mixed cultures", *Biotechnol. Biofuel.* 5, 1-12, (2012).
- [39] Akutsu, Y., Li, Y. Y., Tandukar, M., Kubota, K., Harada, H., "Effects of seed sludge on fermentative characteristics and microbial community structures in thermophilic hydrogen fermentation of starch", *Int. J. Hydrogen Eng.* 33, 6541-6548, (2008).
- [40] Datar, R., Huang, J., Maness, P. C., Mohagheghi, A.,

- Czernik, S., Chornet, E., "Hydrogen production from the fermentation of corn stover biomass pretreated with a steam-explosion process", *Int. J. Hydrogen Eng.* 32, 932-939, (2007).
- [41] Quemeneur, M., Hamelin, J., Benomar, S., Guidici-Ortoni, M. T., Latrille, E., Steyer, J. P., Trably, E., "Changes in hydrogenase genetic diversity and proteomic patterns in mixed-culture dark fermentation of mono-di-and trisaccharides", *Int. J. Hydrogen Eng.* 36, 11654-11665, (2011).
- [42] Fang, H. H. P., Liu, H., "Effect of pH on hydrogen production from glucose by a mixed culture". *Bioresour. Technol.* 82, 87-93, (2002).
- [43] Lay, C. H., Kuo, S. Y., Sen, B., Chen, C. C., Chang, J. S., Lin, C. Y., "Fermentative biohydrogen production from starch-containing textile wastewater", *Int. J. Hydrogen Eng.* 37, 2050-2057, (2012).
- [44] Wang, J. L., Wan, W., "Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing cultures from digested sludge", *Int. J. Hydrogen Eng.* 33, 2934-2941, (2008).
- [45] Cheong, D. Y., Hansen, C. L., "Bacterial stress enrichment enhances anaerobic hydrogen production in cattle manure sludge". *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 72, 635-643, (2006).
- [46] Zhu, H. G., Beland, M., "Evaluation of alternative methods of preparing hydrogen producing seeds from digested wastewater sludge", *Int. J. Hydrogen Eng.* 31, 1980-1988, (2006).
- [47] Mohan, S. V., Babu, V. L., Sarma, P. N., "Effect of various pretreatment methods on anaerobic mixed microflora to enhance biohydrogen production utilizing dairy wastewater as substrate", *Bioresour. Technol.* 99, 59-67, (2008).
- [48] Wang, J. L., Wan, W., "Effect of temperature on fermentative hydrogen production by mixed cultures", *Int. J. Hydrogen Eng.* 33, 5392-5397, (2008).
- [49] Chang, F. Y., Lin, C. Y., "Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor", *Int. J. Hydrogen Eng.* 29, 33-39, (2004).
- [50] Shin, H. S., Youn, J. H., Kim, S. H., "Hydrogen production from food waste in anaerobic mesophilic and thermophilic acidogenesis", *Int. J. Hydrogen Eng.* 29, 1355-1363, (2004).
- [51] Karadag, D., Puhakka, J. A., "Effect of changing temperature on anaerobic hydrogen production and microbial community composition in an open-mixed culture bioreactor", *Int. J. Hydrogen Energy*, 35, 10954-10959, (2010).
- [52] Mu, Y., Zheng, X. J., Yu, H. Q., Zhu, R. F., "Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures", *Int. J. Hydrogen Eng.* 31, 780-785, (2006).
- [53] Wang, G., Mu, Y., Yu, H. Q., "Response surface analysis to evaluate the influence of pH, temperature and substrate concentration on the acidogenesis of sucrose-rich wastewater", *Biochem. Eng. J.* 23, 175-184, (2005).
- [54] Mu, Y., Wang, G., Yu, H. Q., "Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures", *Enzyme. Microb. Technol.* 38, 905-913, (2006).
- [55] Lee, K. S., Lin, P. J., Chang, J. S., "Temperature effects on biohydrogen production in a granular sludge bed induced by activated carbon carriers", *Int. J. Hydrogen Eng.* 31, 465-472, (2006).
- [56] Lin, C. Y., Wu, C. C., Hung, C. H., "Temperature effects on fermentative hydrogen production from xylose using mixed anaerobic cultures", *Int. J. Hydrogen Eng.* , 33, 43-50, (2008).
- [57] Mu, Y., Yu, H. Q., Wang, G. A., "kinetic approach to anaerobic hydrogen-producing process", *Water Res.* 41, 1152-1160, (2007).
- [58] Kim, I. S., Hwang, M. H., Jang, N. J., Hyun, S. H., Lee, S. T., "Effect of low pH on the activity of hydrogen utilizing methanogen in bio-hydrogen process", *Int. J. Hydrogen Eng.* 29, 1133-1140, (2004).
- [59] Ren, N., Wang, B., Huang, J. C., "Ethanol-type fermentation from carbohydrate in high rate acidogenic reactor", *Biotechnol. Bioeng.* 54, 428-433, (1997).
- [60] Jones, D., Woods, D., "Acetone-butanol fermentation revisited", *Microbiol. Rev.* 50, 484-524, (1986).
- [61] Lay, J. J., "Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen", *Biotechnol. Bioeng.* 68, 269-278, (2000).
- [62] Kraemer, J. T., Bagley, D. M., "Continuous fermentative hydrogen production using a two-phase reactor system with recycle", *Environ. Sci. Technol.* 39, 3819-3825, (2005).
- [63] Fang, H. H. P., Li, C. L., Zhang, T., "Acidophilic biohydrogen production from rice slurry", *Int. J. Hydrogen Eng.* 31, 683-692, (2006).
- [64] Wang, G., Mu, Y., Yu, H. Q., "Response surface analysis to evaluate the influence of pH, temperature and substrate concentration on the acidogenesis of sucrose-rich wastewater", *Biochem. Eng. J.* 23, 175-184, (2005).
- [65] Mu, Y., Wang, G. Yu, H. Q., "Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures", *Enzyme Microb. Technol.* 38, 905-913, (2006).
- [66] Mu, Y., Yu, H. Q., Wang, Y., "The role of pH in the fermentative H₂ production from an acidogenic granule-based reactor. *Chemosphere* 64, 350-358, (2006).
- [67] Mandal, B., Nath, K., Das, D., "Improvement of biohydrogen production under decreased partial pressure of H₂ by *Enterobacter cloacae*", *Biotechnol. Lett.* 28, 831-835, (2006).

- [68] Laurenta, B., Sergea, H., Julienna, M., Christophera, H., Philippea, T., "Effects of hydrogen partial pressure on fermentative biohydrogen production by a chemotropic *Clostridium* bacterium in a new horizontal rotating cylinder reactor", *Energy Procedia*. 29, 34–41, (2012).
- [69] Junghare, M., Subudhi, S., Lal, B., "Improvement of hydrogen production under decreased partial pressure by newly isolated alkaline tolerant anaerobe, *Clostridium butyricum* TM-9A: Optimization of process Parameters", *Int. J. Hydrogen Eng.* 37, 3160-3168, (2012).
- [70] Zhang, Z. P., Show, K.Y., Tay, J. H., Liang, D. T., Lee, D. J., Jiang, W. J., "Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community", *Process Biochem.* 41, 2118–2123, (2006).
- [71] Show, K. Y., Lee, D. J., Chang, J. S., "Bioreactor and process design biohydrogen production", *Bioresour. Technol.* 102, 8524-8533, (2011).
- [72] Waligorska, M., "Fermentative hydrogen production-process design and bioreactors", *Chem. Proc. Eng.* 33, 585-594, (2012).
- [73] Lin, C. Y., Chang, C. C., Hung, C. H., "Fermentative hydrogen production from starch using natural mixed cultures", *Int. J. Hydrogen Eng.* 33, 2445–2453, (2008).
- [74] Zhang, Z. P., Show, K. Y., Tay, J. H., Liang, D. T., Lee, D. J., Jiang, W. J., "Rapid formation of hydrogen-producing granules in an anaerobic continuous stirred tank reactor induced by acid incubation", *Biotechnol. Bioeng.* 96, 1040–1050, (2007b).
- [75] Chen, C. C., Lin, C. Y., "Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor", *Adv. Environ. Res.* 7, 695–599, (2003).
- [76] Chen, C. C., Chen, H. P., Wu, J. H., Lin, C. Y., "Fermentative hydrogen production at high sulfate concentration", *Int. J. Hydrogen Eng.* 33, 1573–1578, (2008).
- [77] Sivagurunathan, P., Anburajan, P., Kumar, G., Kim, S. H., "Effect of hydraulic retention time (HRT) on biohydrogen production from galactose in an up-flow anaerobic sludge blanket reactor", *Int. J. Hydrogen Eng.* 41, 21670-21677, (2016).
- [78] Lee, K. S., Lin, P. J., Fangchiang, K., Chang, J. S., "Continuous hydrogen production by anaerobic mixed microflora using a hollow-fiber microfiltration membrane bioreactor", *Int. J. Hydrogen Eng.* 32, 950–957, (2007).
- [79] Zhang, Z. P., Show, K. Y., Tay, J. H., Liang, D. T., Lee, D. J., Jiang, W. J., "Effect of hydraulic retention time on biohydrogen production and anaerobic microbial community", *Process Biochem.* 41, 2118–2123, (2006).
- [80] Wu, S. Y., Hung, C. H., Lin, C. Y., Lin, P. J., Lee, K. S., Lin, C. N., "HRT-dependent hydrogen production and bacterial community structure of mixed anaerobic microflora in suspended, granular and immobilized sludge systems using glucose as the carbon substrate", *Int. J. Hydrogen Eng.* 33, 1542–1549, (2008).
- [81] Wu, S. Y., Lin, C. Y., Lee, K. S., Hung, C. H., Chang, J. S., Lin, P. J., "Dark fermentative hydrogen production from xylose in different bioreactors using sewage sludge microflora", *Energy Fuel.* 22, 113–119, (2008b).
- [82] Arooj, M. F., Han, S. K., Kim, S. H., Kim, D. H., Shin, H. S., "Continuous biohydrogen production in a CSTR using starch as a substrate", *Int. J. Hydrogen Eng.* 33, 3289–3294, (2008).
- [83] Chang, F. Y., Lin, C. Y., "Calcium effect on fermentative hydrogen production in an anaerobic up-flow sludge blanket system", *Water Sci. Technol.* 54, 105–112, (2006).
- [84] Zhang, Z. P., Show, K. Y., Tay, J. H., Liang, D. T., Lee, D. J., "Biohydrogen production with anaerobic fluidized bed reactors-A comparison of biofilm-based and granule-based ", *Int. J. Hydrogen Eng.* 33, 1559–1564, (2008).
- [85] Si, B., Li, J., Li, B., Zhu, Z., Shen, R., Zhang, Y., Liu, Z., "The role of hydraulic retention time on systems controlling methanogenesis and homoacetogenesis in biohydrogen production using upflow anaerobic sludge blanket (UASB) reactor and packed bed reactor (PBR)", *Int. J. Hydrogen Eng.* 40, 11414-11421, (2015).
- [86] Kim, D. H., Kim, M. S., "Thermophilic fermentative hydrogen production from various carbon sources by anaerobic mixed cultures", *Int. J. Hydrogen Eng.* 37, 2021-2027, (2012).
- [87] Hafez, H., Nakhla, G., E., Naggar, M. H., Elbeshbishy, E., Baghchehsaraee, B., "Effect of organic loading rate on a novel hydrogen bioreactor", *Int. J. Hydrogen Eng.* 35, 81-92, (2010).
- [88] Saripan, A. F., Reungsang, A., "Biohydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KKU-ED1: Culture conditions optimization using mixed xylose/arabinose as substrate", *Electronic. J. Biotechnol.* 16, 1-17, (2013).
- [89] Ren, Y., Wang, J., Liu, Z., Ren, Y., Li, G., "Hydrogen production from the monomeric sugars hydrolyzed form hemicellulose by *Enterobacter aerogenes*", *Renew. Eng.* 34, 2774-2779, (2009).
- [90] Danko, A. S., Abreu, A. A., Alves, M. M., "Effect of arabinose concentration on dark fermentation hydrogen production using different mixed cultures", *Int. J. Hydrogen Eng.* 33, 4527-4532, (2008).
- [91] Ghosh, D., Hallenbeck, P. C., "Fermentative hydrogen yields from different sugars by batch cultures of metabolically engineered *Escherichia coli* DJT135", *Int. J. Hydrogen Eng.* 34, 7979-7982, (2009).
- [92] Mangayil, R., Santala, V., Karp, M., "Fermentative hydrogen production from different sugars by *Citrobacter* sp. CMC-1 in batch culture", *Int. J. Hydrogen Eng.* 36, 15187-15194, (2011).
- [93] Hussy, I., Hawkes, F. R., Dinsdale, R., Hawkes, D. L.,

- "Continuous fermentative hydrogen production from sucrose and sugarbeet", *Int. J. Hydrogen Eng.* 30, 471-483, (2005).
- [94] Zhang, Y., Liu, G., Shen, J., "Hydrogen production in batch culture of mixed bacteria with sucrose under different iron concentrations", *Int. J. Hydrogen Eng.* 30, 855-860, (2005).
- [95] Ho, K. L., Chen, Y. Y., Lee, D. J., "Biohydrogen production from cellobiose in phenol and cresol-containing medium using *Clostridium* sp. R1", *Int. J. Hydrogen Eng.* 35, 10239-10244, (2010).
- [96] Logan, B. E., Oh, S. E., Kim, I. S., Ginkel, S. V., "Biological hydrogen production measured in batch anaerobic respirometers", *Environ. Sci. Technol.* 36, 2530-2535, (2002).
- [97] Ren, Z., Ward, T. E., Logan, B. E., Regan, J. M., "Characterization of the cellulolytic and hydrogen-producing activities of six mesophilic *Clostridium* species", *J. Appl. Microbiol.* 6, 2258-2266, (2007).
- [98] Van Ginkel, S. W., Oh, S. E., Logan, B. E., "Biohydrogen gas production from food processing and domestic wastewaters", *Int. J. Hydrogen Eng.* 30, 1535-1542, (2005).
- [99] Ren, N., Li, J., Li, B., Wang, Y., Liu, S., "Biohydrogen production from molasses by anaerobic fermentation with a pilot-scale bioreactor system", *Int. J. Hydrogen Eng.* 31, 2147-2157, (2006).
- [100] Lima, D. M. F., Lazaro, C. Z., Rodrigues, J. A. D., Ratusznei, S. M., Zaiat, M., "Optimization performance of an AnSBBR applied to biohydrogen production treating whey", *J. Environ. Manag.* 169, 191-201, (2016).
- [101] Kim, S. H., Han, S. K., Shim, H. S., "Feasibility of biohydrogen production by anaerobic co-digestion of food waste and sewage sludge", *Int. J. Hydrogen Eng.* 29, 1607-1616, (2004).
- [102] Hussy, I., Hawkes, F. R., Dinsdale, R., Hawkes, D. L., "Continuous fermentative hydrogen production from a wheat starch co-product by mixed microflora", *Biotechnol. Bioeng.* 84, 619-626, (2003).
- [103] Patra, S., Sangyoka, S., Boonmee, M., Teungsang, A., "Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrosylate by *Clostridium butyricum*", *Int. J. Hydrogen Eng.* 33, 5256-5265, (2008).
- [104] Fangkum, A., Reungsang, A., "Biohydrogen production from sugarcane bagasse hydrolysate by elephant dung: Effect of initial pH and substrate concentration", *Int. J. Hydrogen Eng.* 36, 8687-8696, (2011a).
- [105] Jung, K. W., Kim, D. H., Shin, H. S., "Fermentative hydrogen production from *Laminaria japonica* and optimization of thermal pretreatment conditions", *Bioresour. Technol.* 102, 2745-2750, (2011b).
- [106] Abdelhalim, B. E. A., Brunstermann, R., Ibrahim, M. H. A., Widmann, R., "Biohydrogen Production from *Scenedesmus* sp. using Dark Fermentation", conference paper (2012).
- [107] Kim, M. S., Baek, J. S., Yun, Y. S., Sim, S. J., Park, S., Kim, S. C., "Hydrogen production from *Chlamydomonas reinhardtii* biomass using a two-step conversion process: anaerobic conversion and photosynthetic fermentation", *Int. J. Hydrogen Energy.* 31, 812-816, (2006).
- [108] Lakaniemi, A. M., Hulatt, C. J., Thomas, D. N., Tuovinen, O. H., Puhakka, J. A., "Biogenic hydrogen and methane production from *Chlorella vulgaris* and *Dunaliella tertiolecta* biomass", *Biotechnol. Biofuels.* 4, 34, (2011).
- [109] Yun, Y. M., Jung, K. W., Kim, D. H., Oh, Y. K., Shin, H. S., "Microalgal biomass as a feedstock for biohydrogen production", *Int. J. Hydrogen Energy.* 37, 15533-15539, (2012).
- [110] Lo, Y. C., Chen, W. M., Hung, C. H., Chen, S. D., Chang, J. S., "Dark H₂ fermentation from sucrose and xylose using H₂-producing indigenous bacteria: feasibility and kinetic studies", *Water Res.* 42, 827-842, (2008).
- [111] Xing, D. F., Ren, N. Q., Wang, A. J., Li, Q. B., Feng, Y. J., Ma, F., "Continuous hydrogen production of auto-aggregative *Ethanoligenens harbinense* YUAN-3 under non-sterile condition". *Int. J. Hydrogen Eng.* 33, 1489-1495, (2008).
- [112] Wang, J. L., Wan, W., "The effect of substrate concentration on biohydrogen production by using kinetic models", *Sci. China Ser B-Chem.* 51, 1110-1117, (2008).
- [113] Kim, S. H., Han, S. K., Shin, H. S. "Effect of substrate concentration on hydrogen production and 16S rDNA-based analysis of the microbial community in a continuous fermenter", *Process Biochem.* 41, 199-207, (2006).
- [114] Zhang, T., Liu, H., Fang, H. H. P., "Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition", *J. Environ. Manage.* 69, 149-156, (2003).
- [115] Chen, W. H., Chen, S. Y., Khanal, S. K., Sung, S., "Kinetic study of biological hydrogen production by anaerobic fermentation", *Int. J. Hydrogen Eng.* 31, 2170-2178, (2006).
- [116] Lin, C. Y., Lay, C. H., "Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora", *Int. J. Hydrogen Eng.* 29, 275-281, (2004b).
- [117] Bao, M. D., Su, H. J., Tan, T. W., "Dark fermentative bio-hydrogen production: Effects of substrate pretreatment and addition of metal ions or L-cysteine". *Fuel*, 112, 38-44, (2013).
- [118] Wang, J. L., Wan, W. "Effect of Fe²⁺ concentrations

- on fermentative hydrogen production by mixed cultures", *Int. J. Hydrogen Eng.* 33, 1215–1220, (2008).
- [119] Zhang, Y., Shen, J., "Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed microflora", *Int. J. Hydrogen Eng.* 31, 441–446, (2006).
- [120] Li, C. L., Fang, H. H. P., "Inhibition of heavy metals on fermentative hydrogen production by granular sludge", *Chemosphere*, 67, 668–673, (2007).
- [121] Lin, C. Y., Shei, S. H., "Heavy metal effects on fermentative hydrogen production using natural mixed microflora", *Int. J. Hydrogen Eng.* 33, 587–593, (2008).
- [122] Wang, X. J., Ren, N. Q., Xiang, W. S., Guo, W. Q., "Influence of gaseous end-products inhibition and nutrient limitations on the growth and hydrogen production by hydrogen-producing fermentative bacterial B49", *Int. J. Hydrogen Eng.* 32, 748–754, (2007).
- [123] Chang, F. Y., Lin, C. Y., "Calcium effect on fermentative hydrogen production in an anaerobic up-flow sludge blanket system", *Water Sci. Technol.* 54, 105–112, (2006).
- [124] Lee, K. S., Lo, Y. S., Lo, Y. C., Lin, P. J., Chang J. S., "Operation strategies for biohydrogen production with a high-rate anaerobic granular sludge bed bioreactor", *Enzyme. Microb. Technol.* 35, 605–612, (2004).
- [125] Wang, J. L., Wan, W., "Influence of Ni²⁺ concentration on biohydrogen production", *Bioresour. Technol.* 99, 8864–8868, (2008).
- [126] Zheng, X. J., Yu, H. Q., "Biological hydrogen production by enriched anaerobic cultures in the presence of copper and zinc", *J. Environ. Sci. Health A*, 39, 89–101, (2004).
- [127] Lee, Y. J., Miyahara, T., Noike, T., "Effect of iron concentration on hydrogen fermentation", *Bioresour. Technol.* 80, 227–231, (2001).
- [128] Lin, C. Y., Lay, C. H., "Carbon/nitrogen-ratio effect on fermentative hydrogen production by mixed microflora", *Int. J. Hydrogen Eng.* 29, 41–45, (2004a).
- [129] Argun, H., Kargi, F., Kapdan, I. K., Oztekin, R., "Biohydrogen production by dark fermentation of wheat powder solution: effects of C/N and C/P ratio on hydrogen yield and formation rate", *Int. J. Hydrogen Eng.* 33, 1813–1819, (2008).
- [130] O-Thong, S., Prasertsan, P., Intrasungkha, N., Dhamwichukorn, S., Birkeland, N. K., "Optimization of simultaneous thermophilic fermentative hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent by Thermoanaerobacterium-rich sludge", *Int. J. Hydrogen Eng.* 33, 1221–1231, (2008).
- [131] Bailey, J. E., Bailey, J., Ollis, D. F., "Biochemical Engineering Fundamentals", Publishing by McGraw-Hill Science/Engineering/Math, 2 Sub edition, February 1, (1986).
- [132] Aiba, S., Humphrey, A. E., Millis, N. F. "Biochemical engineering", Academic Press, New York, (1965).
- [133] Li, W. W., Yu, H. Q., "Biohydrogen Production with high-rate bioreactors." Pandey, A., Larroche, C., Ricke, S., Dussap, C.-G., Gnansounou, E., *Biofuels: Alternative Feedstocks and Conversion Processes.* Elsevier 537-567, (2011).
- [134] Waligorska, M., "Fermentative hydrogen production-process design and bioreactors", *Chem. Proc. Eng.* 33, 585-594, (2012).
- [135] Venetsaneas, N., Antonopoulou, G., Stamatelatou, K., Kornaros, M., Lyberatos, G., "Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches", *Bioresour. Technol.* 100, 3713–3717, (2009).
- [136] Zhang, Z. P., Show, K. Y., Tay, J. H., Liang, D. T., Lee, D. J., Jiang, W. J., "Rapid formation of hydrogen-producing granules in an anaerobic continuous stirred tank reactor induced by acid incubation", *Biotechnol. Bioeng.* 96, 1040–1050, (2007).
- [137] Jung, K. W., Kim, D. H., Shin, H. S., "Continuous fermentative hydrogen production from coffee drink manufacturing wastewater by applying UASB reactor", *Int. J. Hydrogen Eng.* 35, 13370–13378, (2010).
- [138] Lin, C. Y., Jo, C. H., "Hydrogen production from sucrose using an anaerobic sequencing batch reactor process", *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 78, 678–684, (2003).
- [139] Arooj, M. F., Han, S. K., Kim, S. H., Kim, D. H., Shin, H. S., "Sludge characteristics in anaerobic SBR system producing hydrogen gas", *Water Res.* 41, 1177–1184, (2007).
- [140] Kim, D. H., Kim, S. H., Ko, I. B., Lee, C. Y., Shin, H. S., "Start-up strategy for continuous fermentative hydrogen production: early switchover from batch to continuous operation", *Int. J. Hydrogen Eng.* 33, 1532–1541, (2008).
- [141] Lee, K. S., Lin, P. J., Fangchiang, K., Chang, J. S., "Continuous hydrogen production by anaerobic mixed microflora using a hollow-fiber microfiltration membrane bioreactor", *Int. J. Hydrogen Eng.* 32, 950–957, (2007).
- [142] Shen, L., Bagleya, D. M., Liss, S. N., "Effect of organic loading rate on fermentative hydrogen production from continuous stirred tank and membrane bioreactors", *Int. J. Hydrogen Eng.* 34, 3689–3696, (2009).
- [143] Lee, D. Y., Li, Y. Y., Noike, T., "Continuous H₂ production by anaerobic mixed microflora in membrane bioreactor", *Bioresour. Technol.* 100, 690–695, (2009).

- [144] Chang, F. Y., Lin, C. Y., "Biohydrogen production using an up-flow anaerobic sludge blanket reactor", *Int. J. Hydrogen Eng.* 29, 33–39, (2004).
- [145] Mu, Y., Yu, H. Q., Wang, Y., "The role of pH in the fermentative H₂ production from an acidogenic granule-based reactor", *Chemosphere* 64, 350–358, (2006a).
- [146] Wang, Y., Mu, Y., Yu, H. Q., "Comparative performance of two upflow anaerobic biohydrogen-producing reactors seeded with different sludges", *Int. J. Hydrogen Eng.* 32, 1086–1094, (2007).
- [147] Guo, W. Q., Ren, N. Q., Chen, Z. B., Liu, B. F., Wang, X. J., Xiang, W. S., Ding, J., "Simultaneous biohydrogen production and starch wastewater treatment in an acidogenic expanded granular sludge bed reactor by mixed culture for longterm operation", *Int. J. Hydrogen Eng.* 33, 7397–7404, (2008a).
- [148] Guo, W. Q., Ren, N. Q., Wang, X. J., Xiang, W. S., Meng, Z. H., Ding, J., Qu, Y. Y., Zhang, L. S., "Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor", *Int. J. Hydrogen Eng.* 33, 4981–4988, (2008b).
- [149] Zhang, Z. P., Show, K.Y., Tay, J. H., David, T. L., Lee, D. J., "Biohydrogen production with anaerobic fluidized bed reactors – a comparison of biofilm-based and granule-based systems", *Int. J. Hydrogen Eng.* 33, 1559–1564, (2008).