



بررسی روش‌های طراحی آزمایش و آماری در بهینه‌سازی تولید هیدروژن زیستی با روش تخمیر در تاریکی

زهرا اصفهانی بلندبالایی، خسرو رستمی*

۱- کارشناس ارشد پژوهشی میکروبیولوژی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

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

پیام نگار: rostami2002@yahoo.com

چکیده

هیدروژن زیستی دارای بالاترین محتوای انرژی شناخته‌شده تا به امروز است که بر اثر احتراق آن بخار آب تولید می‌شود و در تبدیل به الکتریسیته در پیل سوختی بازده زیادی دارد؛ در نتیجه منبع منتخب انرژی پایدار در آینده به شمار می‌رود. تولید هیدروژن زیستی با روش تخمیر در تاریکی نسبت به روش‌های فتوسنتزی برتری‌هایی مانند بی‌نیازی از نور، قابلیت مصرف پیش‌ماده‌های متنوع از جمله قندهای ۵ و ۶ کربنه و برخی از پساب‌ها و پس‌ماندهای تبدیلی با آهنگ و بازدهی زیادتری دارد. تولید هیدروژن تخمیری فرایندی پیچیده و متأثر از چندین عامل است که با روش آماری می‌توان تأثیر اندرکنش‌ها را به روش بهتری درک کرد. یکی از روش‌های افزایش آهنگ و بازدهی فرایند، بهینه‌سازی تأثیر عوامل انتخابی مانند دما، pH، نوع و غلظت پیش‌ماده، تلقیح و عوامل دیگر است که تأثیر مؤثر بر پاسخ دارند و می‌توان با به‌کارگیری روش‌های آماری به آن دست یافت. برای غربالگری و رگرسیون از روش ANOVA استفاده شده است. در میان روش‌های آماری گوناگون، طراحی‌ها مانند تک‌عاملی، چندعاملی، تاگوچی، پلاکت-برمن، مرکب مرکزی، باکس-بن‌کن، روش تندترین صعود/نزول و شبکه عصبی مصنوعی (ANN) و الگوریتم ژنتیک و رویه پاسخ سطح (RSM) در تولید هیدروژن تخمیری استفاده می‌شود. مقاله گردآوری حاضر بعضی از برتری‌ها و کاستی‌ها و تجزیه و تحلیل روش‌های طراحی آزمایش و آماری را پوشش می‌دهد. انتخاب روش صحیح غربالگری، طراحی آزمایش و روش آماری باعث درک بیشتر اندرکنش‌ها می‌شود و این دانش عمیق در کاهش تعداد آزمایش‌ها، هزینه‌ها، افزایش بازدهی و بهینه‌سازی فرایند تولید هیدروژن زیستی تخمیر در تاریکی مفید است.

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۶/۲۶

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۹/۱۳

شماره صفحات: ۴۹ تا ۷۵

کلیدواژه‌ها: تولید هیدروژن

زیستی با تخمیر در تاریکی،

طراحی آزمایش، روش‌های آماری،

پلاکت-برمن، طراحی سطح رویه،

شبکه عصبی

۱. مقدمه

پیشرفت‌های سریع جامعهٔ امروزی را می‌توان ناشی از انرژی حاصل از سوخت‌های فسیلی دانست؛ زیرا در دسترس و ارزان قیمت است و

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

جابه‌جایی آسان و نسبتاً ایمنی دارد. اما امروزه، تقاضای بالای بشر برای تأمین انرژی از سوخت‌های فسیلی تبدیل به یک چالش شده است. استفادهٔ یک‌سره از سوخت‌های فسیلی شامل ترکیبات نفت خام مانند: گازوئیل، بنزین، نفت و نفت سفید، مازوت و زغال‌سنگ و

ترکیبات آن، مشکلات زیست محیطی فراوانی مانند سوء سلامت جسم و روان و بهداشت، گرم شدن کره زمین (تا به حال اندکی بیشتر از ۲ درجه سلسیوس)، آب شدن تدریجی کوه‌های یخی در قطب‌ها، بارش باران‌های اسیدی، جاری شدن سیلاب‌ها، بالا آمدن آب دریاها احتمال بالای وقوع آب‌گرفتگی و به زیر آب رفتن برخی از مناطق در بعضی از کشورها مانند ژاپن، هلند و بنگلادش در آینده، عمدتاً به دلیل اثر انتشار گازهای گلخانه‌ای است [۱ و ۲]. یکی از راهکارها در برطرف ساختن این مشکلات، استفاده از سوخت‌های زیستی تجدیدپذیر است؛ شاید با جای‌گزینی سوخت‌های دوستدار محیط‌زیست، تنفس زمین دوباره ممکن شود. در این راستا هیدروژن به‌عنوان نویدبخش‌ترین سوخت آینده مطرح است؛ زیرا دارای برتری‌هایی مانند بالاترین محتوای انرژی (۱۴۱/۸ کیلوژول بر گرم) است که بر اثر احتراق در کاربراتور آب حاصل می‌شود و سرعت اشتعال بالایی دارد؛ به ویژه زمانی که در پیل‌های سوختی برای تبدیل به الکتریسیته استفاده می‌شود [۳]. تخمین زده شده است که سالانه حدود پنجاه میلیون تن هیدروژن در سراسر جهان با نرخ رشد سالانه ۱۰ درصد داد و ستد شود [۴]. هیدروژن یکی از منابع پر کالری نسبت به دیگر منابع سوخت‌های تاکنون شناخته‌شده است که در جدول (۱) این ویژگی مشاهده می‌شود [۵].

جدول ۱. مقایسه انرژی هیدروژن بر مبنای وزن

با دیگر منابع انرژی [۵].

| ماده سوختی | نوع پیوند | مقدار ارزش (kJ/g) |
|------------|-----------|-------------------|
| هیدروژن | H-H | ۱۴۱/۸ |
| بنزین | C-H | ۴۸ |
| زغال سنگ | C-H, C-O | ۲۷-۱۵ |
| چوب | C-H, C-O | ۱۵ |
| اتانل | C-H, O-H | ۲۹/۷ |
| بوتانل | C-H, O-H | ۳۶ |
| بوتان | C-H | ۴۹/۵ |
| اکتان | C-H | ۴۸ |
| متان | C-H | ۵۵/۵ |
| متانل | C-H, C-OH | ۲۲/۷ |

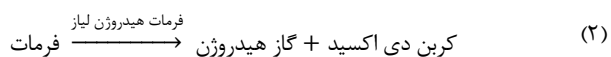
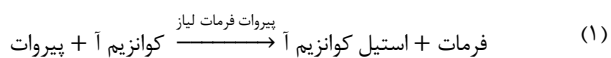
برای تولید هیدروژن با کارایی بالا از روش‌های الکتروشیمیایی

(برق کافت و فتوبرق کافت) و ترموشیمیایی (بازآرایی مولکولی با بخار، تجزیه ترموشیمیایی آب، گازسازی و آذرکافت) استفاده می‌شود که انرژی مورد نیاز هر یک از این فرایندها از انواع سوخت‌های فسیلی تهیه می‌شود. روش تولید سبز هیدروژن با به‌کارگیری ریزاندام‌ها و استفاده از منابع تجدیدپذیر بسیار مورد توجه پژوهشگران ایران و جهان بوده است. از ویژگی‌های بی‌همتای هیدروژن زیستی می‌توان تولید در شرایط متعارف دمایی و فشار، استفاده از منابع بسیار متنوع و ارزان تجدیدپذیر را - مانند پساب‌ها و پس‌ماندها که کاهش آلودگی زیست‌محیطی و بازیابی آب را نیز به همراه دارد- برشمرد [۶]. تولید اسیدهای آلی و اتانل و بوتانل از جمله محصولات جانبی هستند که طی تولید هیدروژن تشکیل می‌شوند [۷]. تولید هیدروژن زیستی شامل روش‌های وابسته به نور (نورکافت مستقیم، نورکافت غیرمستقیم و تخمیر نوری) و مستقل از نور است [۸] که در بین آن‌ها تخمیر در تاریکی دارای برتری‌هایی مانند نرخ تولید بالای هیدروژن، بی‌نیازی به نور، امکان استفاده گسترده از پیش‌ماده‌های تجدیدپذیر، طراحی با پیچیدگی کمتر، ساخت آسان‌تر واکنش‌گاه‌ها و کارکرد و سترون کردن راحت‌تر با آن‌ها است. بنابراین تولید هیدروژن زیستی تخمیری به کاربرد عملی بسیار نزدیک‌تر است. فرایند تخمیر در تاریکی با استفاده از باکتری‌های خالص [۹] یا مخلوط انجام‌پذیر است که در کشت‌های مخلوط، امکان مصرف هیدروژن تولیدشده به وسیله باکتری‌های مصرف‌کننده هیدروژن بسیار زیاد است. بنابراین مایه تلقیح حاصل از کشت‌های مخلوط یا پیش‌ماده‌هایی مانند فاضلاب و پساب نیاز به پیش‌تیمار دارد که در بیشتر موارد پیچیدگی فرایند را افزایش و نرخ و بازدهی تولید را کاهش می‌دهد.

عوامل مهم محیطی مانند دما، pH، دور همزن و زمان ماند آب کافتی و مواد غذایی اصلی مانند نوع و مقدار منابع کربن و نیتروژن و ریزمغذی‌ها مانند مقدار آهن، فسفات، سولفات، نیکل و غیره به‌طور مجزا و هم‌چنین با تأثیرگذاری بر یکدیگر بر مقدار تولید و بازدهی هیدروژن مؤثر هستند. یکی از ابزارهای کلیدی و اصلی در درک و تحلیل اندرکنش‌ها و بهبود تولید انواع محصولات در این‌گونه فرایند و گاز هیدروژن، با توجه به کاهش زمان و هزینه تولید، طراحی آزمایش‌ها با روش آماری مناسب است؛ زیرا که اطلاعات عوامل مهم و تأثیرهای آن‌ها را که به اختیار انتخاب‌شده بر یکدیگر و بر تولید محصول در دسترس قرار می‌دهد. به‌طور کلی، طراحی آزمایش به دو دسته تک‌عاملی و چندعاملی تقسیم می‌شود. این مقاله، مروری بر

در چرخه‌های مختلف که معمولاً امبدن - میرهوف - پانس^۱ (گلیکولیز نیز نامیده می‌شود) و انتنر - دودورف^۲ است به پیرووات تبدیل می‌شود. سپس پیرووات تولیدشده به استیل کوانزیم آ تبدیل می‌شود. طی این واکنش‌ها، حامل‌های انرژی سلولی از جمله ATP، نیز تولید می‌شوند. برحسب سامانه‌های آنزیمی ریزاندام، هیدروژن از فرمات یا فرودوکسین احیاشده به دست می‌آید. برحسب نوع ریزاندام، دو مسیر برای تبدیل پیرووات به استیل کوانزیم آ که طی آن هیدروژن مولکولی نیز تولید می‌شود وجود دارد:

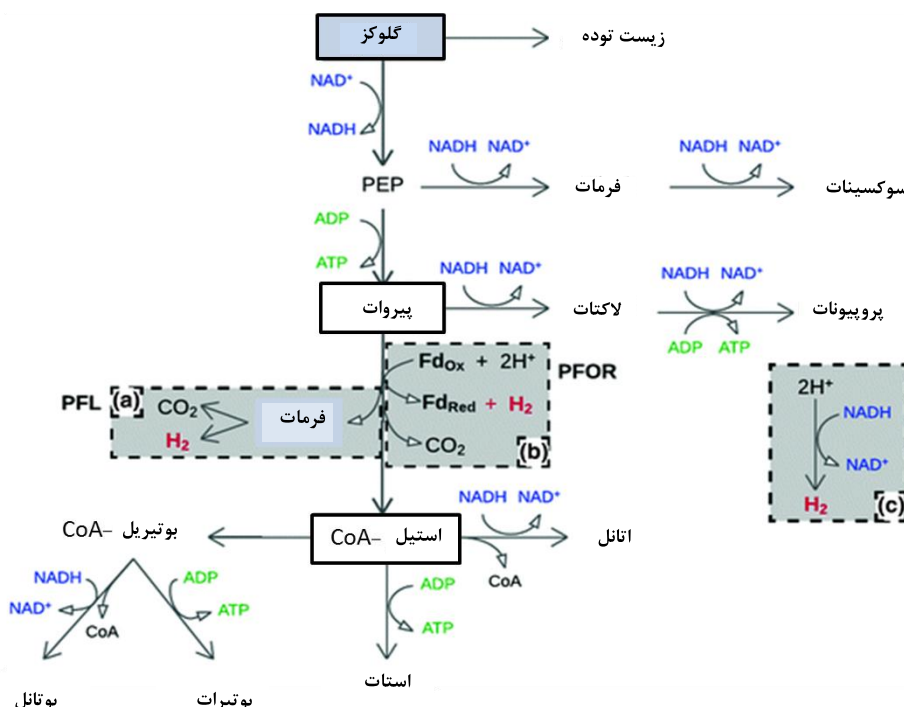
۱. مسیر پیرووات فرمات لیاز (Pfl): پیرووات با کوانزیم آ عملکرد آنزیم پیرووات فرمات لیاز به استیل کوانزیم آ و فرمات تبدیل می‌شود (فرمول (۱) [۱۱ و ۳]. در شرایط اسیدی، فرمات تولیدشده به وسیله فرمات هیدروژن لیاز فعال شده به کربن دی‌اکسید و گاز هیدروژن تبدیل می‌شود (فرمول (۲)).



بیشتر طراحی‌های آزمایش آماری است که در فرایند تولید هیدروژن زیستی استفاده می‌شود. معمولاً آزمایش‌های اثربخش و تأثیر متغیرهای ضروری و مهم در گستره آزمایش مورد هدف انتخاب و سپس طراحی‌های تکمیلی انجام می‌شود. این طراحی‌ها شامل طراحی تک‌عاملی، طراحی عملی کامل، تاگوچی، پلاکت برمن، طراحی مرکب مرکزی و طراحی باکس - بن کن است که به‌طور خلاصه توضیح داده خواهد شد. همچنین شبکه عصبی و الگوریتم ژنتیک و روش تندترین صعود برای استفاده در فرایند تولید هیدروژن زیستی معرفی شده‌اند.

۲. بررسی سازوکار تولید هیدروژن زیستی با روش تخمیر در تاریکی

تولید هیدروژن زیستی با روش تخمیر در تاریکی به وسیله دو دسته از باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری و بی‌هوازی اجباری در شرایط محیطی بی‌هوازی انجام می‌شود [۱۰]. پیش‌ماده‌های آلی متفاوتی مانند کربوهیدرات‌ها، پروتئین‌ها و چربی‌ها در این فرایند استفاده می‌شوند؛ برای بررسی مسیرهای زیست‌شیمیایی و برآورد عملکرد نظری، تخمیر تبدیل گلوکز به استات به‌عنوان مسیر استاندارد در بسیاری از مطالعات پذیرفته شده است (شکل (۱)). نخست، گلوکز



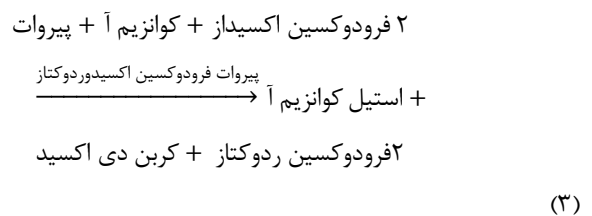
شکل ۱. تولید هیدروژن زیستی در دو مسیر پیرووات: فرمات لیاز و پیرووات: فردوکسین اکسید و ردوکتاز [۱۲].

اسیدهای آلی - که به مقدار ناچیز هستند - و دسته دوم شامل اسیدهای چرب فرار و حلال‌هایی مانند الکل و غیره می‌شوند. در زمان تولید هیدروژن تخمیری، توزیع محصولات اسیدوژن به میزان چشمگیری متفاوت است. علاوه بر این، برخی از محصولات اسیدوژن مانند استات، بوتیرات، هیدروژن، دی‌اکسید کربن ممکن است اسیدهای چرب بلند زنجیره پیچیده یا الکل‌ها را تشکیل دهند که طی آن هیدروژن مصرف می‌شود [۱۵ و ۱۶]؛ در نتیجه، پیچیدگی فرایند تولید هیدروژن زیستی وسیع است و خواص پیش‌ماده‌های اصلی، ریزمغذی‌ها و غیره فهم تداخل اندرکنش‌ها را سخت‌تر می‌کند. بنابراین برای به‌دست‌آوردن مقدار و سرعت تولید لازم هیدروژن زیستی، پژوهشگران بر آن هستند تا از طراحی آزمایش آماری و مدل‌های جنبش‌شناختی استفاده کنند. چندین مدل جنبش‌شناختی مانند گومپرز، گومپرز اصلاح‌شده، لجستیک، لجستیک تغییر یافته و ریچاردز را می‌توان در تولید هیدروژن زیستی استفاده کرد که، مدل گومپرز اصلاح شده یکی از مناسب و متداول‌ترین آن‌ها است (شکل (۲) [۱۷]). این مدل را در سال ۱۸۲۵ بنیامین گومپرز به‌عنوان قانون نظری مرگ و میر پیشنهاد کرد که برای بسیاری از موجودات مانند انسان، جانوران و حتی گیاهان کاربرد یافت. تاکنون، اصلاحات گوناگونی بر این مدل انجام و به رویه‌های مختلفی ارائه شده است. زیرینگ^۱ توانست این مدل را به‌خوبی اصلاح و برای ریزاندام‌ها کاربردی کند [۱۸].

این مدل به‌طور گسترده دارای سه ویژگی خاص است؛ مانند: ۱- دارای زمان تأخیر λ یا (lag فرایند) ۲- نرخ تولید هیدروژن و ۳- قابلیت مدل کردن تولید هیدروژن با داده‌های آزمایشگاهی با ضریب همبستگی بالا که ماهیت تجربی دارند. بعضی از انتشارات در راستای تولید هیدروژن تخمیری با روش ناپیوسته و تجزیه پیش‌ماده، رشد باکتری، تولید برخی محصولات متابولیکی مانند استات، بوتیرات هم‌پوشانی بسیار مناسبی با این مدل دارند. در این مدل، غلظت ریزاندام با X (g-VSS/L) نشان داده می‌شود و از فرمول (۵) به دست می‌آید [۱۹]:

$$X = X_0 + \int_0^t r_x dt = X_0 + \Delta X_{\max} \times \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_{\max} X}{\Delta X_{\max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (5)$$

۲. پیروات: فرودوکسین (فلادوکسین) اکسید و ردوکتاز (PFOR): در این مسیر، پیروات به‌همراه استیل کوانزیم آ و فرودوکسین اکسیداز وارد واکنش شده و به استیل کوانزیم آ، فرودوکسین ردوکتاز و کربن دی‌اکسید تبدیل می‌شود (فرمول (۳)). آنزیم پیروات فرودوکسین ردوکتاز این واکنش را تسریع می‌کند. در مرحله بعدی، فرودوکسین احیا شده، دو اتم هیدروژن را به مولکول گازی هیدروژن تبدیل می‌کند و خود اکسید می‌شود (فرمول (۴)).



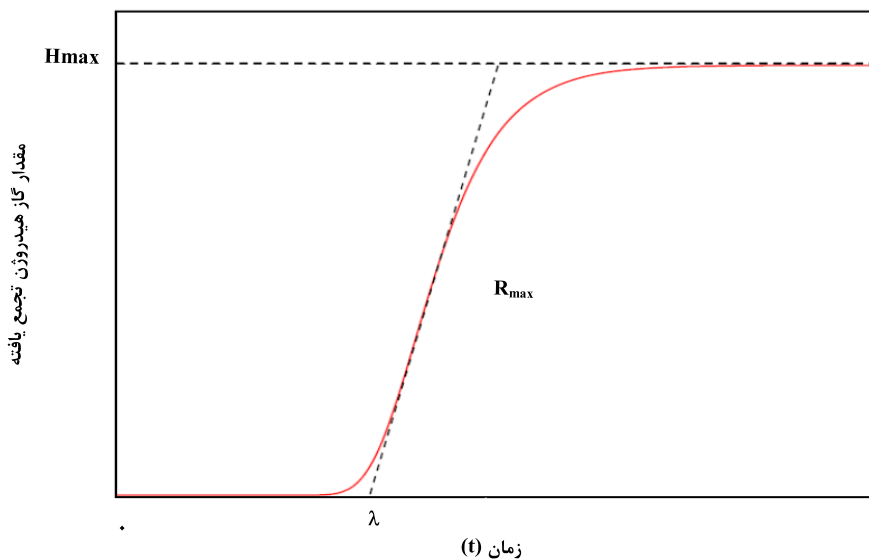
+ فرودوکسین اکسیداز \rightarrow ۲ اتم هیدروژن + فرودوکسین ردوکتاز
هیدروژن مولکولی (۴)

عملاً بازده بالای تولید هیدروژن با مخلوطی از استات و بوتیرات و بازده پائین آن با پروپیونات و محصولات احیا شده نظیر الکل و اسید لاکتیک به‌عنوان محصولات نهایی تخمیر همراه است [۵].

۲-۱ گام‌های پیشرفت فرایند تولید هیدروژن

محصولات تخمیری حاصل از فرایند تولید هیدروژن زیستی به‌وسیله باکتری‌های میانه‌دوست مانند جنس کلاستریدیوم (کلاستریدیوم ساکاروپروپونیل استونیکوم، کلاستریدیوم بیجریکی، کلاستریدیوم بوتیریکوم، کلاستریدیوم استوبوتیریکوم، کلاستریدیوم لانگیسپور)، خانواده انتروباکتریاسته (انتروباکتر آئروژنز، اشرشیا کلی، انتروباکتر کلواسه، کلبسیلا اکسی توکا، سالمونلا تیفی موریم)، باسیلوس‌ها (باسیلوس لیکینی فورمیس، باسیلوس آمیلولیکفیسینس، باسیلوس سوبتیلیس، باسیلوس کواگولانس) [۱۳] و گرمادوست (ترموتوگا ماریتیمما، ترموتوگا نیپولیتانا، کلدی سلولوسیریتور ساکارولیتیکوس) [۱۴]، به دو دسته اصلی تقسیم‌بندی می‌شوند. دسته نخست، شامل محصولات گازی است؛ مانند هیدروژن، دی‌اکسید کربن و گاهی منوکسید کربن و هیدروژن سولفور و

1. Zwietering



شکل ۲. منحنی مدل اصلاح‌شده گومپرز.

تولید هیدروژن نیز در مدل اصلاح‌شده گومپرز با فرمول (۹) بیان می‌شود [۲۰ و ۲۱]:

$$H = H_{\max} \times \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_{\max, H_2} e}{H_{\max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (9)$$

همچنین با تغییر فرمول (۹) سرعت تولید هیدروژن، r_{H_2} نیز به دست می‌آید (فرمول (۱۰)):

$$r_{H_2} = R_{\max, H_2} \times \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_{\max, H_2} e}{H_{\max}} (\lambda - t) + 1 \right] + \left[\frac{R_{\max, H_2} e}{H_{\max}} (\lambda - t) + 1 \right] + 1 \right\} \quad (10)$$

یکی از ویژگی‌های این مدل، محاسبه تشکیل محصولات محلول در مایع است که بر اساس فرمول (۱۱) حساب می‌شود:

$$P_i = \Delta P_{\max, i} \times \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_{\max, P_i} e}{\Delta P_{\max, i}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (11)$$

در این فرمول، P_i غلظت محصول محلول i (g/L)، R_{\max, P_i} سرعت بیشینه تشکیل محصول مایع i (g/L/h) و $\Delta P_{\max, i}$ غلظت بیشینه تشکیل محصول در مایع i (g/L) است. سرعت تشکیل این مواد با بازآرایی و مرتب‌کردن این فرمول به دست می‌آید (فرمول (۱۲)):

در این فرمول، X_0 غلظت اولیه ریزاندام (g-VSS/L)، ΔX_{\max} غلظت بیشینه رشد ریزاندام (g-VSS/L)، $R_{\max, X}$ بیشینه نرخ رشد ریزاندام (g-VSS/L/h)، r_x نرخ رشد ریزاندام (g-VSS/L/h)، t زمان تخمیر (h) و λ زمان تأخیر (h) است. VSS= مواد جامد معلق فرار را می‌توان با بازآرایی در فرمول (۵)، نرخ رشد باکتری به دست آورد (فرمول (۶)):

$$r_x = R_{\max, X} \times \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_{\max, X} e}{\Delta X_{\max}} (\lambda - t) + 1 \right] + \left[\frac{R_{\max, X} e}{\Delta X_{\max}} (\lambda - t) + 1 \right] + 1 \right\} \quad (6)$$

همچنین مصرف پیش‌ماده نیز با فرمول (۷) حساب می‌شود:

$$S_0 - S = S_{\max} \times \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_{\max, S} e}{S_{\max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (7)$$

که S غلظت پیش‌ماده (g/L)، S_0 غلظت اولیه پیش‌ماده (g/L) و S_{\max} بیشینه غلظت پیش‌ماده مصرف شده (g/L) است که با تغییر این معادله، سرعت مصرف پیش‌ماده به دست می‌آید (فرمول (۸)):

$$-r_s = R_{\max, S} \times \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_{\max, S} e}{S_{\max}} (\lambda - t) + 1 \right] + \left[\frac{R_{\max, S} e}{S_{\max}} (\lambda - t) + 1 \right] + 1 \right\} \quad (8)$$

عامل‌های منتخب مختلف است تا بیشینه اندرکنش‌ها بر بازدهی با کم‌ترین هزینه به دست آید. طراحی آزمایش، روشی ساختاری است که به وسیله آن عامل‌هایی در یک فرایند انتخاب و تأثیر آن‌ها بر خروجی یا پاسخ فرایند تجزیه و تحلیل می‌شود. در طراحی آزمایش، عامل‌های مهم و مؤثر و روابط بین آن‌ها پیش‌بینی می‌شود. انتخاب عوامل مؤثر، تعریف سطوح و پاسخ‌ها از جمله مراحل مهم و زیربنایی در غربالگری طراحی آزمایش است. انتخاب عوامل مؤثر بستگی به شناخت، مهارت و تجربه پژوهشگر دارد که یک یا چند پاسخ در دامنه آزمایش انتخاب کند و پاسخ جزء مشتق شده نسبت به هر عامل را به دست آورد. در شرایطی که از مدل آنوا^۲ استفاده شود اگر مقدار $P < 0.05$ باشد واریانس مؤثر است. مراحل غربالگری طراحی آزمایش را به صورت زیر می‌توان خلاصه کرد:

$$r_{P_i} = R_{\max, P_i} \times \exp \left\{ - \exp \left[\frac{R_{\max, P_i} e}{\Delta P_{\max, i}} (\lambda - t) + 1 \right] + 1 \right\} \quad (12)$$

برتری چشمگیر به‌کارگیری این مدل در تشریح رشد ریزاندام‌ها و تولید محصول، به دلیل ضریب همبستگی بالایی است که در پژوهش‌های گوناگون به دست آمده است. جدول (۲) برخی از پژوهش‌هایی را که از این روش بهره گرفته نشان می‌دهد. در بیشتر مطالعات، ضریب همبستگی بیش از ۰/۹۵ به دست آمده که گویای پوشش مناسب داده‌های آزمایشی - تجربی است.

۳. انواع طراحی‌ها

به طور کلی، به‌کارگیری طراحی آزمایش^۱، بررسی تأثیر هم‌زمان

جدول ۲. پژوهش‌هایی بر تولید هیدروژن زیستی با استفاده از مدل گومپرز اصلاح شده.

| منابع | ضریب همبستگی | محصول | پیش‌ماده | نوع تلقیح |
|-------|---------------|----------------|--------------------|-------------------------------------|
| [۲۲] | ۰/۹۸۵ | هیدروژن | پساب ساگو | انترویاکتر آئروژنز |
| [۲۳] | ۰/۹۵ < | هیدروژن | نشاسته | لجن بی‌هوازی |
| [۲۴] | ۰/۹۹۰ < | هیدروژن | پس‌ماند جامد آلی | کنسرسیون مخلوط بی‌هوازی |
| [۲۵] | ۰/۹۸۹ - ۰/۹۹۶ | هیدروژن | آب پنیر | کلاستریدیوم ساکاروپروتیل استونیکوم |
| [۲۶] | ۰/۹۹۶ | هیدروژن | زایلوز | کلاستریدیوم بیجریکی Fanp3 |
| [۲۶] | ۰/۹۵۳۶ | هیدروژن | کربوکسی متیل سلولز | |
| [۱۵] | ۰/۹۹۹ | هیدروژن | ساکارز | لجن بی‌هوازی |
| [۲۷] | ۰/۹۹ | هیدروژن | گلوکز | انترویاکتر آئروژنز |
| [۲۸] | ۰/۹۷۸ < | هیدروژن | پس‌ماند لاکتات | لجن بی‌هوازی |
| [۲۹] | ۰/۹۸۲ - ۰/۹۹۶ | هیدروژن | پس‌ماند آناناس | لجن فاضلاب شهری |
| [۳۰] | ۰/۹۹۹ | هیدروژن | پساب آبجوسازی | رودویاکتر M 19 و انترویاکتر آئروژنز |
| [۳۱] | ۰/۹۷ < | هیدروژن | گلوکز | انترویاکتر آئروژنز |
| [۱۹] | ۰/۹۹۴ | تجزیه پیش‌ماده | ساکارز | لجن بی‌هوازی |
| [۱۹] | ۰/۹۹۸ | رشد | ساکارز | لجن بی‌هوازی |
| [۱۵] | ۰/۹۹۷ | بوتیرات | ساکارز | لجن بی‌هوازی |
| [۱۵] | ۰/۹۹۹ | استات | ساکارز | لجن بی‌هوازی |
| [۳۲] | ۰/۹۵ < | هیدروژن | پساب آسیاب برنج | کلاستریدیوم بیجریکی |

۱. انتخاب عوامل مؤثر با روش آنوا

۲. تعریف سطح برای عامل‌ها

۳. تعیین پاسخ‌ها

۴. تهیه ماتریکسی از نوع پلاکت برمن یا باکس بن - کن

با توجه به داده‌های تجربی در دسترس

۵. بلاک کردن تصادفی و انجام آزمایش موردی

۶. بازنگری دوباره طراحی آزمایش

۷. تهیه مدلی مناسب

۸. تهیه تأثیر عوامل به صورت آماری یا تحلیل نموداری

۹. تهیه تجزیه و تحلیل و نتیجه‌گیری با اصول آماری

۱۰. پیشنهاد روش‌های توسعه‌یابی و استفاده از رزلوشین زیاد

۱۱. تدوین ابزاری برای ارزیابی

بر مبنای تعداد عامل‌های بررسی شده در یک زمان، می‌توان طراحی آزمایش را به دو دسته اصلی تقسیم‌بندی کرد: ۱- طراحی تک‌عاملی ۲- طراحی چندعاملی، طراحی چندعاملی (فاکتوریل) نیز به دو دسته طراحی عملی کامل و طراحی عملی جزئی تقسیم‌بندی می‌شود. برخی از این روش‌ها به طور مؤثر در بهینه‌سازی فرایند تولید هیدروژن زیستی به کار می‌روند که اساس، برتری‌ها و کاستی‌های آن‌ها در جدول (۳) آمده است.

۳-۱ طراحی تک‌عاملی

طراحی تک‌عاملی، با این روش سنتی تنها تأثیر یک عامل در یک زمان بررسی می‌شود، در حالی که سطوح عوامل دیگر ثابت می‌ماند. سطح عامل مورد نظر در یک محدوده تعیین و تغییر آن بر روی پاسخ بررسی می‌شود. پس از به دست آمدن نتایج، نمودار رسم می‌شود که نشان‌دهنده تأثیر عامل بر پاسخ است. این روش بسیار ساده و آسان، نیازی به تجزیه و تحلیل ندارد و در بسیاری از مطالعات تولید هیدروژن استفاده می‌شود. در جدول (۴) مطالعه تأثیر برخی از عوامل بر تولید هیدروژن زیستی با روش تک‌عاملی آمده است. برای نمونه، Dao و Argun به بررسی اثر مقدار لجن به عنوان مایه تلقیح

در دامنه صفر تا ده درصد حجمی - حجمی بر تولید هیدروژن زیستی از پس‌ماند تفاله هلو پرداختند. آن‌ها بیشترین بازده هیدروژن، ۱۲۳/۲۷ میلی‌لیتر هیدروژن بر گرم کربن آلی کل، با ۵ درصد تلقیح و بالاترین سرعت تشکیل هیدروژن، ۳۵/۶ میلی‌لیتر هیدروژن بر ساعت و حذف کربن آلی کل، ۲۵/۱۷ درصد، با اضافه کردن ۱۰ درصد لجن به دست آوردند. در این تحقیق بازده هیدروژن با افزایش لجن از صفر به ۵ درصد افزایش و درصد بالاتر کاهش می‌یابد. آرگون و دانو، دلیل افزایش بازده هیدروژن را با بالا بردن میزان تلقیح تا ۵ درصد به محدودیت آب‌کافت میکروبی در غلظت‌های کم زیست‌توده و کاهش بازده هیدروژن را با افزایش میزان تلقیح به بیش از ۵ درصد به مصرف پیش‌ماده‌ها در ابتدای فاز لگاریتمی و تغییر مسیر متابولیکی از تولید هیدروژن به سمت تولید محصولات دیگر نسبت دادند [۳۳]. گش، و همکاران با روش تک‌عاملی، اثر دما و pH را بر تولید هیدروژن به وسیله /شرشیا کلی DJT135 بررسی و بیشینه تولید را در دمای ۲۵ درجه سلسیوس و pH ۶/۵ در محیط دارای گلوکز به دست آوردند [۳۴]. گرچه استفاده از این روش بسیار راحت است؛ اما دو اشکال اساسی در آن وجود دارد: ۱- در این طراحی، تعامل بین عوامل تعیین نمی‌شود؛ بنابراین شاید نتوان شرایط بهینه را مشخص کرد. ۲- همچنین با داشتن چندین عامل، زمان نسبتاً طولانی لازم است تا تأثیر همه عوامل بررسی شود برای نمونه، چیتی بابو و همکاران اثر عامل‌های میزان تلقیح، pH اولیه، غلظت اولیه پیش‌ماده، دما و نرخ رقت را بر تولید هیدروژن به وسیله /شرشیا کلی نوترکیب BL-21 با استفاده از طراحی تک‌عاملی با بیش از ۳۰ آزمایش بررسی کردند. آن‌ها ریزاندام را در زیست‌واکنش‌گاه پرشده با الیاف نارگیل تثبیت و بالاترین نرخ تولید هیدروژن را ۶۶ میلی مول بر ساعت با نرخ رقت ۰/۵۵ بر ساعت گلوکز به دست آوردند که با استفاده از ملاس، نرخ تولید هیدروژن را به ۹۷/۴ میلی مول بر ساعت رساندند [۳۵].

جدول ۳. برخی از اساس روش‌های آماری و برتری‌ها و کاستی‌های آنها.

| نام روش آماری | اساس روش | برتری‌ها و کاستی‌ها |
|--|---|--|
| طراحی تک‌عاملی | روش سنتی است که در یک‌زمان تأثیر یک عامل را بررسی می‌کند و بقیه عوامل دیگر ثابت نگه داشته می‌شوند. | برتری‌ها: انجام آن ساده، آسان و چون تک عاملی است تحلیل آن راحت است. کاستی‌ها: ۱- اندرکنش سایر متغیرها را پوشش نمی‌دهد و کارایی آن نسبت به دیگر روش‌های طراحی آزمایش ضعیف‌تر است ۲- برای به‌دست‌آوردن شرایط بهینه، تعداد آزمایش‌های لازم زیاد، زمان انجام طولانی و هزینه بر است. |
| طراحی عملی کامل | روش آماری است که نشان‌دهنده رابطه میان پاسخ‌های تمامی عامل‌های آزمایش است که به‌صورت هم‌زمان تغییر می‌کنند. | برتری‌ها: تأثیر عامل‌ها بیش از یک عدد را در دو سطح می‌توان ارزیابی کرد. کاستی‌ها: ۱- نمی‌توان به‌طور دقیق مکان‌هایی را از فضای عامل که دارای فاصله‌ای یکسان از مرکز هستند پیش‌بینی کرد (چرخش‌پذیری ضعیف). ۲- به‌دلیل نارسایی مدل چند جمله‌ای درجه دوم در مدل‌سازی، استفاده از راه حل بهینه، همیشه تضمین‌کننده رسیدن به نتیجه مطلوب نیست. ۳- تعداد آزمایش‌ها با افزایش تعداد عامل‌ها به‌صورت نمایی افزایش می‌یابد. |
| طراحی عملی جزئی گزینه‌هایی از روش طراحی کامل است. | اثرات برخی از عوامل بر پاسخ در شرایط عملی و اقتصادی بررسی می‌شود که جزئی از آزمایش‌های طراحی عملی کامل محسوب می‌شود. طراحی تاگوچی، باکس-بن‌کن، طراحی مرکب مرکزی، از جمله طراحی‌های جزئی هستند که در مطالعه هیدروژن زیستی استفاده شده است. | جزئی از آزمایش‌ها نسبت به طراحی عملی کامل باید انجام شود. جواب بهینه به‌دست آمده به‌دلیل ضعف توانایی مدل‌سازی در تابع چندجمله‌ای مرتبه دوم، ممکن است شرایط بهینه را مناسب پوشش ندهد. |
| الف- تاگوچی | نوعی طراحی عملی جزئی با استفاده از آرایه متعامد است. این طراحی با تعداد اندکی آزمایش، اثر بسیاری از عوامل با دو یا چند سطح را بر روی پاسخ بررسی می‌کند. | برتری‌ها: طراحی تاگوچی یکی از روش‌های نسبتاً قدرتمند و کارآمد برای یافتن ترکیب بهینه سطوح عامل می‌باشد. کاستی‌ها: در طراحی تاگوچی ممکن است که سطح بهینه واقعی عامل را پوشش ندهد؛ زیرا این سطح ممکن است با سطح از پیش تعیین‌شده متفاوت باشد. |
| ب- پلاکت-برمن | نوعی طراحی عملی جزئی است که پلاکت و برمن ابداع کردند و تأثیر عوامل مهم برای عملکردهای به‌صورت اکثراً خطی و گاهی غیر خطی را غربال می‌کند. تعداد آزمایش‌های این طراحی ضربی از ۴ است. | برتری‌ها: ۱- امکان شناسایی عامل‌های اثربخش را فراهم می‌کند. ۲- برای داده‌های تجربی خطی بسیار مناسب است. کاستی‌ها: ۱- تعداد آزمایش‌ها نسبت به باکس-بن‌کن بیشتر است. نمودارهای درجه ۲ را خوب پوشش نمی‌دهد. ۲- بر اساس طراحی پلاکت-برمن، هر عامل دارای دو سطح پائینی ۱- و سطح بالایی ۱+ است. |
| پ- طراحی مرکب مرکزی | نوعی طراحی عملی جزئی پنج سطحی است. در این طراحی تعداد آزمایش‌ها به‌صورت $N = k^2 + K + c_p$ حساب می‌شود که k تعداد عامل‌ها و c_p تعداد تکرار نقطه مرکزی است. | برتری‌ها: نسبتاً تعداد سطح‌های هر عامل زیاد است و سطح‌های بسیار پایین و بسیار بالا در نظر گرفته می‌شود. کاستی‌ها: ۱- تعداد آزمایش‌های لازم نسبت به روش BBD بیشتر است. ۲- چرخش نداشتن سطوح |
| ت- طراحی‌های باکس-بن‌کن | طراحی‌های عملی ناکامل سه سطحی است. تعداد آزمایش‌ها به‌صورت $N = 2k(k-1) + c_p$ حساب می‌شود که k تعداد عامل‌ها و c_p تعداد نقاط مرکزی است. | برتری‌ها: ۱- با تعداد عامل‌های یکسان، تعداد آزمایش‌های کمتری نسبت به طراحی مرکب مرکزی لازم است. ۲- الگوریتم بهتری نسبت به طراحی مرکب مرکزی دارد. ۳- سطوح قابلیت چرخش دارد. واریانس پاسخ پیش‌بینی‌شده در هر نقطه بستگی به آن فاصله از مرکز نقطه طراحی دارد که سبب چرخش سطوح می‌شود. ۴- قابلیت پیش‌بینی مؤثر درجه ۲ دارد که پاسخ در محدوده سه‌بعدی در فضا قابل مشاهده است. |
| شبکه عصبی مصنوعی | روشی غیرخطی است که در برازش آن از توانایی‌های پردازش مغز انسان الگوبرداری شده است. | ۱- کاستی‌ها: برای ساختن یک مدل کارآمد نسبت به طراحی سطح رویه به تعداد بیشتری آزمایش نیاز است. ۲- نیاز به الگوریتم از پیش تعریف شده دارد. ۲- برتری‌ها: دقت برازش و پیش‌بینی آن از روش RSM بیشتر و بهتر است. در شرایطی که پاسخ‌های زیادی برای بهینه‌سازی فرایند وجود داشته باشد، می‌توان آن را به‌طور هم‌زمان انجام داد. با این طراحی، می‌توان هر تابع غیر خطی به‌ویژه از توابع مرتبه دوم را تقریب کرد. |
| پاسخ رویه سطح (RSM) | روشی بسیار مناسب برای تجزیه و تحلیل داده‌های تجربی است؛ زیرا دارای پایه ریاضی است. | ۱- اگر برای غربالگری از مدل باکس-بن‌کن استفاده شده باشد روش آماری RSM داده‌های تجربی را که از نوع درجه دو باشند دقیق‌تر برازش می‌کند. |

جدول ۴. نمونه‌هایی از بررسی عوامل مختلف بر تولید هیدروژن که به روش تک‌عاملی بررسی شده است.

| منابع | عامل بهینه‌شده | پیش‌ماده | تلقیح |
|-------|--|------------------------|--|
| [۳۶] | $\frac{C}{N}$ ، غلظت Fe^{+2} | پساب روغن‌کشی نخل | لجن |
| [۳۷] | غلظت فرمات | گلوکز | رامینوکوکوس آلبوس |
| [۳۸] | غلظت Fe^{+2} ، روش پیش تیمار تلقیح | گلوکز | لجن هضم شده |
| [۳۹] | غلظت پیش‌ماده، pH، دما، نسبت تلقیح | گلوکز | انتروباکتر فیسسیوم |
| [۳۳] | مقدار تلقیح | تفاله هلو | لجن |
| [۲۶] | غلظت منابع نیتروژنی عصاره گوشت، عصاره مخمر، پپتون، اوره، نترات آمونیوم، نترات سدیم، دما و pH | گلوکز | کلاستریدیوم بیجریکی Fanp3 |
| [۴۰] | غلظت منابع نیتروژنی عصاره گوشت، عصاره مخمر، پپتون، اوره، دما و pH | گلوکز | کلاستریدیوم بیجریکی RZF-1108 |
| [۴۱] | غلظت سورفکتانت‌های مختلف و غلظت سدیم کربنات | پس‌ماند هسته خرما | کلاستریدیوم ترموسلوم ATCC 27405 |
| [۴۲] | نوع تلقیح | گلوکز | کشت‌های خالص |
| [۱۵] | دما | گلوکز | لجن بی‌هوازی |
| [۴۳] | pH | گلوکز | کلاستریدیوم بوتیریکم CGS2 |
| [۴۴] | نوع پیش‌ماده | کربوهیدرات | ترموانشیروباکتریوم ترموساکارولیتیکوم PSU-2 |
| [۴۵] | غلظت گلوکز و زمان ماند هیدرولیکی | گلوکز | کلاستریدیوم تری بوتیریکوم ATCC 25755 |
| [۴۶] | غلظت پیش‌ماده | ساکارز | لجن هاضم بی‌هوازی |
| [۴۷] | غلظت نیتروژن | نشاسته | غلات شکسته‌شده |
| [۴۸] | غلظت نترات | گلوکز | لجن هاضم فاضلاب |
| [۴۹] | غلظت فسفات | گلوکز | سیتروباکتر Y19 sp. |
| [۵۰] | غلظت ال-سیستین | ساکارز | کشت مخلوط بی‌هوازی |
| [۵۱] | غلظت نشاسته و دما | نشاسته | کشت مخلوط |
| [۵۲] | میزان تلقیح | آلترنانترا فلوکسیرویدس | انتروباکتر آئروژنز ZJU1 |

۲-۳ طراحی چندعاملی

در این طراحی، اثر بیش از یک عامل در دو یا چند سطح مطالعه می‌شود. طراحی چندعاملی (فاکتوریل) را می‌توان به دو دسته طراحی عملی کامل و طراحی عملی جزئی تقسیم کرد.

۱-۲-۳ طراحی عملی کامل

در این طرح، هر ترکیبی از هر سطح عامل آزمایش می‌شود. برای نمونه، تعداد آزمایش‌ها برای سه عامل در این طراحی برابر با $a \times b \times c$ است که a ، b و c عامل‌ها هستند. تعداد آزمایش‌ها از فرمول $N = L^m$ به دست می‌آید که N تعداد آزمایش‌ها، L تعداد سطوح و m تعداد عوامل مؤثر هستند؛ معمولاً تعداد سطوح برابر با ۲ در نظر گرفته می‌شود. از آنجایی که با طراحی عملی کامل می‌توان تمام ترکیبات ممکن از سطوح عامل‌ها را بررسی کرد، از آن درک تأثیر چندین عامل به‌طور هم‌زمان در فرایندهای تولید هیدروژن تخمیری استفاده می‌شود. در جدول (۵) تعدادی از پژوهش‌ها که تأثیر عوامل مختلف را بر تولید هیدروژن با روش تخمیر در تاریکی با استفاده از طراحی عملی کامل بررسی کرده‌اند، خلاصه شده است. در این روش، حتی اگر تعداد سطوح عوامل ثابت باشد و تعداد عوامل افزایش یابد، تعداد آزمایش‌ها به‌طور چشمگیری افزایش می‌یابد. به‌عنوان مثال افزایش تعداد عامل‌ها از ۴ به ۵، تعداد آزمایش‌ها را ۱۶ عدد افزایش می‌دهد (فرمول (۱۳)).

$$2^5 - 2^4 = 16 \quad (13)$$

حال اگر تنها یک عامل دیگر اضافه شود، تعداد آزمایش‌ها به ۶۴ می‌رسد. بنابراین، این روش گرچه رویه‌ای است که تمامی عوامل و سطوح آن‌ها را می‌سنجد؛ اما در مواردی که تعداد عامل‌ها و سطوح آن‌ها زیاد است، در عمل نمی‌توان از آن به آسانی استفاده کرد و نیاز به صرف هزینه از جمله زمان طولانی و مواد برای انجام تعداد زیاد آزمایش دارد. نصیریان و همکاران از پیش‌ماده لیگنوسولولزی کاه گندم در تولید هیدروژن زیستی بهره جستند [۵۳]. در پیش‌تیمار کاه گندم، سه عامل غلظت اسیدسولفوریک در سه سطح ۰/۵، ۱ و ۲ درصد، دما در دو سطح ۹۰ و ۱۲۰ درجه سلسیوس و زمان را در سه سطح ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه با طراحی عملی کامل

(۳ × ۲ × ۳) در سه تکرار و با انجام ۵۴ آزمایش بررسی کردند. به کارگیری مایع رویی حاصل از آبکافت اسیدی کاه گندم در محیط تولیدی هیدروژن بذر لجن، توانست بازدهی ۱/۱۹ مول هیدروژن بر مول گلوکز حاصل سازد.

۲-۲-۳ طراحی عملی جزئی

اگر تعداد عوامل مؤثر بر آزمایش و سطوح آن‌ها زیاد باشد، استفاده از طراحی عملی کامل بسیار پرهزینه است. در این صورت می‌توان از طراحی عملی جزئی در بررسی عوامل و سطوح آن‌ها استفاده کرد. به عبارت دیگر، طراحی عملی جزئی زمانی استفاده می‌شود که تعداد آزمایش‌ها در طراحی عملی کامل بسیار زیاد باشد؛ در این صورت، استفاده از یک روش آماری، کاربردی است و هزینه‌ها کاهش می‌یابد [۷۳].

۱-۲-۳ طراحی تاگوچی

روش آماری تاگوچی با استفاده از آرایه‌های متعامد، تعداد آزمایش‌ها را بسیار کاهش می‌دهد؛ آرایه‌های متعامد را به صورت $L_n(N^k)$ نشان می‌دهد که L حرف اول عبارت Latin squares (آرایه‌ای که در طراحی آزمایش‌ها به کار می‌رود و خصوصیات ویژه‌ای دارد)، n تعداد آزمایش‌ها، N تعداد سطوح عامل‌ها و K حداکثر تعداد عامل‌هایی است که با آرایه مورد نظر می‌توان بررسی کرد.

این آرایه‌ها با خصوصیات ویژه از بین تمامی آزمایش‌ها در روش طراحی عملی کامل انتخاب می‌شوند. به‌عنوان مثال، ۴ عامل در ۴ سطح، با ۲۵۶ آزمایش با روش طراحی عملی کامل انجام می‌شود که طراحی تاگوچی تعداد آن‌ها را به ۱۶ آزمایش کاهش می‌دهد [۷۴]. ممکن است جواب بهینه در آزمایش‌های انتخابی وجود نداشته باشد و می‌توان با استفاده از محاسبات مرتبط با آزمایش‌های آرایه، شرایط بهینه و پاسخ را تعیین کرد. از برتری‌های این روش تعداد آزمایش‌های کمتر و هزینه‌های پایین‌تر، بررسی عوامل گسسته، و میزان تأثیرگذاری آن‌ها، برآورد نتایج در شرایط بهینه، برآورد نتایج در سطوح انتخابی، مشخص کردن سهم خطا و اثرات متقابل در نظر گرفته‌شده و امکان تحلیل سیگنال به نویز را می‌توان نام برد. لین و لای اثر غلظت‌های ۱۳ عنصر معدنی را بر تولید هیدروژن تخمیری با طراحی تاگوچی در سه سطح بررسی کردند و با تحلیل نتایج آزمایش‌ها نشان دادند که منیزیم،

جدول ۵. نمونه‌هایی از بررسی عوامل مختلف بر تولید هیدروژن به روش عملی کامل.

| منابع | عامل بهینه‌شده | پیش‌ماده | تلقیح |
|-------|--|------------------------------|-----------------------------|
| [۵۴] | دما و بارگذاری آنزیم | پس‌ماند صنایع کاغذ | لجن بی‌هوازی |
| [۵۵] | مایه تلقیح و pH | ساکارز | لجن بی‌هوازی |
| [۵۶] | pH و سرعت هم‌زدن | پوسال چمن | دورریز غلات |
| [۵۷] | دما و pH اولیه | ساکارز | لجن فاضلاب شهری |
| [۵۸] | دما، pH، زمان ماند آب‌کافتی، سرعت بارگذاری مواد آلی | پس‌ماند لبنی | لجن بی‌هوازی |
| [۵۹] | نوع تلقیح، روش پیش‌تیمار تلقیح و دمای کشت | پس‌ماند جامد آلی | کشت‌های مخلوط |
| [۶۰] | نوع پیش‌ماده و نوع تلقیح | کربوهیدرات | کشت مخلوط |
| [۵۳] | غلظت اسید، دما و زمان در پیش‌تیمار پیش‌ماده | کاه گندم | بذر لجن |
| [۶۰] | نوع پیش‌ماده و نوع تلقیح | کربوهیدرات | کشت مخلوط |
| [۶۱] | عصاره مخمر، عصاره مالت، سولفات منیزیم، سولفات آهن و کلرید مس دو ظرفیتی | پساب تقطیر حاصل از دانه برنج | انترویاکتر کلواسه IIT-BT 08 |
| [۶۲] | نوع پیش‌ماده و غلظت | زیست‌توده سلولزی | کلاستریدیوم ترموسلوم 27405 |
| [۶۳] | غلظت سلولز و چگالی لجن | سلولز | لجن هاضم بی‌هوازی |
| [۶۴] | زمان ماند آب‌کافتی و غلظت کلسیم | ساکارز | لجن هاضم فاضلاب |
| [۶۵] | زمان ماند آب‌کافتی و pH | شیرابه زباله | پوسال لجن |
| [۶۶] | گلوکز، غلظت‌های عصاره مخمر و تریپتون | گلوکز | ترموتوگا آلفی |
| [۶۷] | غلظت آهن و pH اولیه | نشاسته | لجن بی‌هوازی |
| [۶۸] | غلظت پیش‌ماده و نوع تلقیح | نشاسته باقیمانده | کشت‌های خالص و مخلوط |
| [۶۹] | نوع تلقیح و زمان شوک حرارتی | گلوکز | کشت مخلوط |
| [۷۰] | دما و غلظت آهن | ساکارز | غلات شکسته‌شده |
| [۷۱] | غلظت آمونیوم و pH | گلوکز | لجن هاضم فاضلاب |
| [۷۲] | زمان ماند آب‌کافتی و نوع پیش‌ماده | کربوهیدرات | لجن فاضلاب شهری |

۳-۲-۲-۲ طراحی پلاکت - برمن

عامل‌های بسیاری با میزان اثر متفاوت ممکن است بر یک فرایند مؤثر باشند؛ در اغلب موارد، عامل‌های اثربخش بیشتر مطالعه می‌شوند؛ زیرا برای دستیابی به فرایندی با محصول‌دهی بالا و شناخت تأثیر پیچیدگی‌های آن ضروری است. بنابراین، نخستین گام در بهینه‌سازی این نوع فرایند، شناسایی عوامل مؤثر است. طراحی پلاکت - برمن امکان شناسایی عامل‌های اثربخش را فراهم می‌کند [۷۷]. تعداد آزمایش‌هایی که در این طراحی در نظر گرفته می‌شود، ضریبی از ۴ است. این طراحی می‌تواند تا $n = N - 1$ عامل را بررسی کند که N تعداد آزمایش‌ها تا ۱۰۰ به جزء ۹۲ است. یک تابع چندجمله‌ای مرتبه اول، معادله (۱۴)، معمولاً برای توصیف تأثیر عوامل مختلف بر نتایج آزمایش‌های طراحی از نوع درجه یک از مدل پلاکت - برمن استفاده می‌شود.

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \varepsilon \quad (14)$$

که در آن k تعداد متغیرها، β_0 عبارت ثابت، β_i ضرایب عامل‌های خطی، x_i متغیرها و ε باقیمانده مرتبط با آزمایش است.

از این روش در تعدادی از مطالعات تولید هیدروژن زیستی استفاده شده است (جدول (۶)). به‌عنوان نمونه، باکنی و همکاران از طرح پلاکت - برمن برای مطالعه اثر ۶ عامل فرمات، عصاره مخمر، تربیتون، کلرید سدیم، سرعت همزن و غلظت سلولی در محیط /شرشیا کلی برای تولید هیدروژن زیستی استفاده کردند. نتایج آزمایش‌های آن‌ها نشان می‌دهد فرمات نقش کلیدی در تولید هیدروژن زیستی دارد [۷۸].

روش طراحی پلاکت برمن در دو سطح جزئی و کلی برای هر عامل مؤثر و اقتصادی است، در شرایطی که تعداد عامل‌ها اندک باشد روش طراحی عملی کامل برای غربالگری عامل‌های اصلی مطلوب‌تر است.

سدیم، روی و آهن تأثیر زیادی در تولید هیدروژن زیستی دارند [۷۵]. لجن فاضلاب غنی‌شده با ترکیب‌بندی جدید در آزمایش‌های آن‌ها با محصول‌دهی ۳/۴۳ مول هیدروژن بر مول ساکارز، حدوداً ۳۰ درصد افزایش نسبت به شاهد نشان می‌دهد. طراحی تاگوچی سطوح عوامل بهینه‌شده را در مجموع خوب برآزش نمی‌کند؛ به‌عبارتی، امکان سطوح عوامل بهینه‌شده واقعی با سطوح عوامل از پیش تعیین‌شده مربوطه وجود دارد. در مطالعه دیگری، کوماری و داس تولید هیدروژن را در کشت کنسرسیوم مخلوط اسیدوزئیک (حاوی ۴ گونه باکتریایی عمده کلاستریدیوم گونی سویه NCIMB 10636، یوباکتریوم تارانتلا UM 87، کلاستریدیوم پروتئولیتیکوم سویه CG و کلاستریدیوم/استوبوتیلیکوم سویه ATCC 824) با بررسی چهار عامل نسبت $\frac{C}{N}$ در سه سطح ۲۳، ۲۶ و ۲۹، pH در سه سطح ۶، ۶/۵ و ۷، دما در سه سطح ۳۳، ۳۷ و ۴۰ درجه سلسیوس و غلظت عصاره مخمر در سه سطح ۱، ۲ و ۳ گرم بر لیتر با استفاده از آرایه $L_9(3^4)$ روش طراحی تاگوچی بهینه‌سازی کردند. با انجام آزمایش‌های طراحی‌شده تاگوچی، آن‌ها بیشترین مقدار تولید هیدروژن را در نسبت $\frac{C}{N}$ برابر ۲۶، pH برابر ۶/۵، دمای ۳۷ درجه سلسیوس و ۱ گرم عصاره مخمر به دست آوردند و متوجه شدند که نسبت $\frac{C}{N}$ و pH، بیشترین تأثیرگذاری و عصاره مخمر کمترین اثر بر میزان تولید هیدروژن دارد. کوماری و داس از نتایج آزمایش‌ها چنین استنباط کردند که با افزایش مقدار منبع کربن و در نتیجه افزایش نسبت $\frac{C}{N}$ ، مقدار تولید گاز دی‌اکسید کربن افزایش یافته و مقداری از آن در محیط مایع حل شده است و در نتیجه pH آن را کاهش می‌دهد که دلیلی بر کاهش فعالیت آنزیم‌های مسیر تولید هیدروژن است. همچنین، در شرایطی که مقدار نیتروژن بالا باشد، با تولید آمونیاک و در نتیجه افزایش pH نیز میزان بازده تولید هیدروژن کاهش می‌یابد. آن‌ها با استفاده از طراحی تاگوچی و کاهش غلظت عصاره مخمر، آهنگ تولید هیدروژن را به ۳۲۲۰ میلی‌لیتر بر لیتر افزایش دادند [۷۶].

جدول ۶. نمونه‌هایی از بررسی عوامل مختلف بر تولید هیدروژن به روش عملی جزئی.

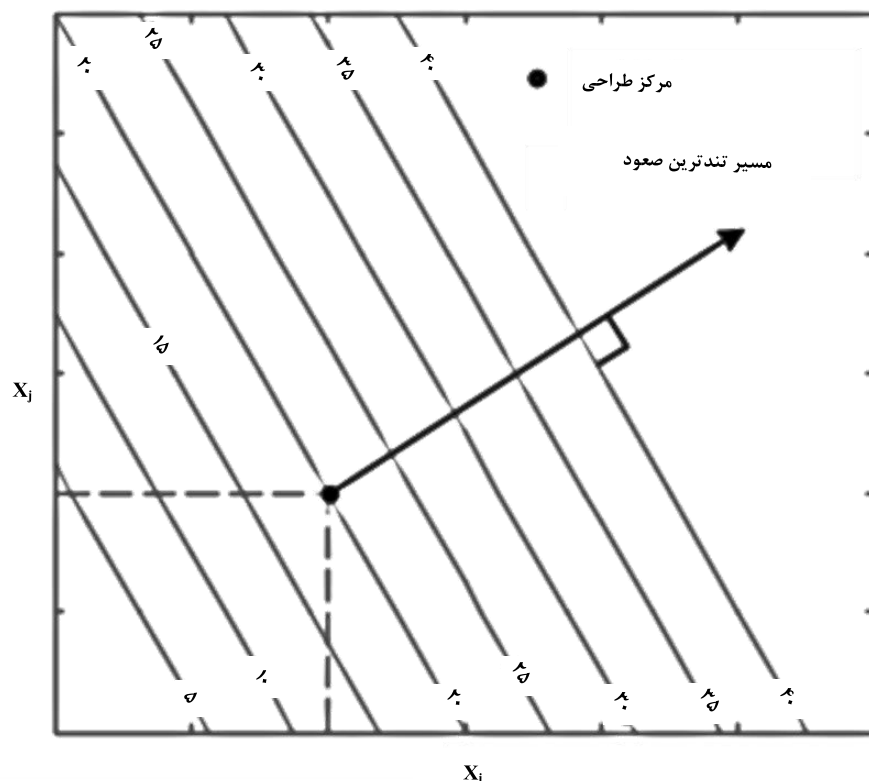
| منابع | عوامل‌های مورد مطالعه | نوع طراحی | پیش‌ماده | تلقیح |
|-------|---|--------------|-----------------------------------|--|
| [۷۹] | فرمول‌بندی مواد غذایی، ۳ منبع کربنات، ۳ منبع فسفات | تاگوچی | ساکارز | پس ماند لجن فعال |
| [۷۵] | غلظت ۱۳ ماده غذایی | تاگوچی | ساکارز | پس ماند لجن فعال |
| [۸۰] | غلظت ۷ ماده غذایی و pH اولیه | پلاکت - برمن | گلوکز | کلاستریدیوم بیجرینکی Fanp2 sp. |
| [۷۸] | غلظت ۴ ماده غذایی، سرعت همزن و غلظت سلولی | پلاکت - برمن | فرمات | اشرشیا کلی |
| [۸۱] | غلظت ۱۱ عنصر کمیاب | پلاکت - برمن | پس ماند میوه و سبزی | مایع تلقیح از سامانه مخزن صافی دار بی‌هواری تخمیری تهیه شد. |
| [۸۲] | pH اولیه و غلظت پیش‌ماده | مرکب مرکزی | ساکارز | کشت‌های مخلوط |
| [۸۳] | غلظت اسید سولفوریک، غلظت هیدروکسید سدیم و زمان در پ یش تیمار پیش‌ماده | باکس - بن کن | پس ماند پودر پوست موز | باسیلوس لیکینی فورمیس API |
| [۸۴] | نسبت C/p و C/N | مرکب مرکزی | پودر گندم | لجن بی‌هواری |
| [۸۵] | زمان ماند آب کافتی، دما و سرعت جریان گاز نیتروژن | مرکب مرکزی | باقی‌مانده غذایی و کود کشاورزی | کشت‌های مخلوط |
| [۸۶] | pH و غلظت پیش‌ماده | مرکب مرکزی | کارخانه تولید روغن نخل | لجن |
| [۸۷] | غلظت مواد جامد در غذا، باقی‌مانده خون و زمان ماند آب کافتی | مرکب مرکزی | پس ماند غذا و باقی‌مانده خون | لجن هاضم بی‌هواری |
| [۸۸] | غلظت NH_4^+ و Fe^{2+} ، PO_3^{4-} | مرکب مرکزی | پس ماند غذا | پوسال |
| [۲۱] | مقادیر باکتری‌های تولیدکننده هیدروژن، لجن هاضم بی‌هواری پیش‌تیمار شده و زباله جامد آلی شهری | مرکب مرکزی | پس ماند جامد فاضلاب آلی | کشت‌های مخلوط |
| [۸۹] | زمان ماند آب کافتی و pH | مرکب مرکزی | نشاسته | لجن هضم‌شده در شرایط بی‌هواری |
| [۹۰] | غلظت پیش‌ماده و زمان ماند آب کافتی | مرکب مرکزی | ساکارز | لجن بی‌هواری |
| [۹۱] | غلظت پیش‌ماده و pH اولیه | مرکب مرکزی | ساکارز | پوسال کود گاوی |
| [۴۴] | غلظت Fe^{2+} ، نسبت C/p و C/N | مرکب مرکزی | پساب کارخانه روغن نخل | لجن بی‌هواری |
| [۹۲] | pH، دما و غلظت پیش‌ماده | مرکب مرکزی | ساکارز | لجن بی‌هواری |
| [۹۳] | pH، دما و غلظت پیش‌ماده | مرکب مرکزی | ساکارز | لجن بی‌هواری |
| [۸۰] | گلوکز، بافر فسفات و غلظت ویتامین‌ها | باکس - بن کن | گلوکز | کلاستریدیوم Fanp2 sp. |
| [۹۴] | pH، دما و غلظت پیش‌ماده | باکس - بن کن | گلوکز | انتروباکتر آئروژنز |
| [۹۵] | pH، گلوکز و سولفات آهن | مرکب مرکزی | گلوکز | کلاستریدیوم بوتیریکوم EB6 |
| [۹۶] | دما، pH، نسبت C/N و درصد تلقیح | باکس - بن کن | پس ماند فراوری کاساوا | لجن هضم‌شده بی‌هواری |

۳-۲-۳ روش تندترین صعود یا نزول

در بسیاری از موارد مشاهده شده که شرایط بهینه اولیه برآورد شده با شرایط واقعی فرایند زیستی متفاوت است؛ در نتیجه به دست آوردن سطح منطقه عواملی که باعث ایجاد شرایط بهینه می‌شود بسیار مهم و انجام آن ضروری است. جابه‌جایی سطح منطقه آزمایشی یک پاسخ به سمت حداکثر تغییر با هدف بهینه‌سازی آزمایش روشی ساده و اقتصادی است که تندترین صعود نامیده شده است. چنانچه در این روش حداقل سازی پاسخ مورد نظر باشد به آن تندترین نزول گفته می‌شود. عوامل غربال شده با مدل پلاکت-برمن را می‌توان با استفاده از این روش بررسی و ارزیابی کرد. به منظور به دست آوردن مسیر تندترین صعود برای عوامل گوناگون، معمولاً از مدل چندجمله‌ای مرتبه اول طرح پلاکت-برمن (فرمول (۱۴)) برای متناسب کردن داده‌های آزمایشگاهی استفاده می‌شود. مسیر تندترین

صعود عمود بر نمودار کانتور است (شکل (۳)). اساس کارکرد تندترین صعود بر مبنای تخمین درجه یک پلاکت برمن و فرمول (۱۴) در نظر گرفته شده است، که هر یک از واحدهای B_i و B_j در جهت X_i و X_j به ترتیب قرار دارند. مسیر دارای حرکت یکسان شده B_j / B_i است که با مشخص بودن جهت حرکت هر واحد حرکت از X_j در هر یک از واحد حرکت X_i برابر است.

سارافیروم و ریونگ سانگ [۹۷]، پان و همکاران [۸۰]، لانگ و همکاران [۹۸]، خام تیب و ریونگ سانگ [۹۹] پس از غربالگری عامل‌ها به روش پلاکت-برمن، برای مشخص کردن منطقه بهینه از روش تندترین صعود استفاده کردند. برای مثال، پان و همکاران منطقه بهینه غلظت گلوکز، بافر فسفات و محلول ویتامین را با این روش مشخص کردند.



شکل ۳. نمودار کانتور پاسخ و مسیر تندترین صعود.

۳-۲-۴ طراحی رویه پاسخ

روش طراحی رویه پاسخ^۱ را باکس و همکارانش در دهه ۱۹۵۰ گسترش دادند که با استفاده از فنون ریاضی و آمار می توان داده های به دست آمده از آزمایش های عملی را با مدل های تجربی برازش و به صورت گرافی ارائه داد [۱۰۰]. این روش برای مدل سازی و تحلیل مسائلی است که پاسخ تحت تأثیر چندمتغیر و به صورت یکپارچه ارائه می شود. در این راستا، از توابع چندجمله ای خطی یا مربعی به منظور توصیف سامانه مورد مطالعه استفاده می شود تا بتوان شرایط آزمایش را بهینه سازی کرد. معمولاً پس از غربالگری عامل ها، مراحل طراحی رویه پاسخ طی چند مرحله زیر انجام می شود: ۱- انتخاب طراحی آزمایش و انجام آزمایش ها مطابق با ماتریس آزمایشی انتخاب شده ۲- برازش کردن نتایج آزمایش ها با تابع چندجمله ای ۳- ارزیابی تناسب مدل ۴- تأیید ضرورت و امکان انجام جابجایی در جهت منطقه بهینه ۵- به دست آوردن مقادیر بهینه بر مطالعه متغیر. ساده ترین مدل در طراحی رویه پاسخ، مبتنی بر عملکرد خطی است که برای به کارگیری آن لازم است پاسخ ها با فرمول (۱۴) به خوبی برازش شود.

برای ارزیابی خمیدگی، باید از مدل مرتبه دوم استفاده شود. طراحی های جزئی دو سطحی برای تخمین اثرات اولیه استفاده می شود که در صورت وجود اثرات دیگر مانند اثرات ثانویه مؤثر، نمی توان از آن بهره جست؛ بنابراین، نقطه مرکزی در طراحی های جزئی دو سطحی، برای ارزیابی انحنا هستند. سطح بعدی مدل چندجمله ای باید عبارات اضافی داشته باشد تا میان کنش بین متغیرهای آزمایشی مختلف را توصیف کند که از فرمول (۱۵) استفاده می شود:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (15)$$

که β_{ij} ضریب عوامل میان کنش است؛ برای تخمین نقطه بحرانی (بیشینه، کمینه یا انحنا) نیاز به تابع چند جمله ای شامل عبارات درجه دوم مطابق با فرمول (۱۶) است:

$$y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i x_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} x_i^2 + \sum_{1 \leq i < j \leq k} \beta_{ij} x_i x_j + \varepsilon \quad (16)$$

که β_{ii} ضریب عوامل درجه دوم را نشان می دهد. برای برآورده عوامل فرمول (۱۶) در طراحی آزمایش، تمام متغیرها حداقل باید دارای سه سطح باشند؛ بنابراین، دو مدل سازی با طراحی سطح پاسخ متقارن در دسترس هستند. از میان طرح های متقارن درجه دوم می توان به طراحی های عملی کامل سه سطحی^۲، طراحی های باکس-بن کن^۳، طراحی مرکب مرکزی^۴ و طراحی ذهلرت^۵ اشاره کرد. این طراحی ها با توجه به انتخاب نقاط آزمایش، تعداد سطوح متغیرها و تعداد آزمایش های تصادفی و بلوک بندی با یکدیگر متفاوت هستند. پس از انجام آزمایش و به دست آمدن نتایج، مقادیر واقعی در نرم افزار به مقادیر گذشته طبق فرمول (۱۷) تبدیل می شوند:

$$x_i = \left(\frac{z_i - z_i^0}{\Delta z_i} \right) \beta_d \quad (17)$$

که Δz_i اختلاف بین مقدار واقعی در نقطه مرکزی و مقدار واقعی در سطح بالا یا پایین متغیر، β_d مقدار حدی گذشته بالا در ماتریکس برای هر متغیر و z_i^0 مقدار واقعی نقطه مرکزی است. با به دست آمدن داده های مربوط به هر نقطه آزمایشی از یک طرح، برای توصیف نوع عملکرد پاسخ با توجه به سطح مقادیر مورد مطالعه، لازم است با یک معادله ریاضی برازش شود. به عبارت دیگر، عامل های b از فرمول های (۱۷-۱۵) برآورد می شود. بنابراین، نمادگذاری ماتریسی معادله های (۱۷-۱۵) در فرمول (۱۸) ارائه شده است:

$$y_m x_i = X_m x_n b_n x_1 + e_m x_1 \quad (18)$$

که y بردار پاسخ، X ماتریس طرح آزمایش انتخاب شده، b برداری شامل عامل های مدل، e مقدار باقی مانده و m و n به ترتیب تعداد سطرها و ستون های ماتریس هستند. معادله (۱۸) با استفاده از روش آماری حداقل مربعات حل می شود. روش آماری حداقل مربعات، روش رگرسیون چندجمله ای است که برای برازش یک مدل ریاضی بر مجموعه ای از داده های آزمایشی که کمترین مقدار باقی مانده را به وجود می آورند، به کار می رود. پس از تبدیلات ریاضی فرمول (۱۸)، یک بردار b شامل عامل ها به صورت زیر به دست می آید:

2. Full Three-Level Factorial Designs
3. Box- Behnken Designs
4. Central Composite Design
5. Doehlert Design

1. Response Surface Methodology

مجموع کل مربع نامیده می‌شود (SS_{tot}) که می‌توان آن را به صورت جمع دو عبارت به دست آمده از مدل ریاضی (SS_{reg}) و مجموع مربع باقی مانده‌های (SS_{res}) به وجود آمده مدل مطابق با فرمول (۲۲) نوشت:

$$SS_{tot} = SS_{reg} + SS_{res} \quad (22)$$

با تکرار نقاط مرکزی می‌توان خطای خالص مرتبط با تکرارها را برآورد کرد. بنابراین، می‌توان مجموع مربع باقیمانده‌ها را به دو بخش مطابق با فرمول (۲۳) تقسیم‌بندی کرد: مجموع مربع خطای خاص (SS_{pe}) و مجموع مربع به دلیل انجام نشدن برازش (SS_{lof}).

$$SS_{res} = SS_{pe} + SS_{lof} \quad (23)$$

اگر مجموع مربع برای هر نوع واریانس (کل، رگرسیون، باقی مانده بدون برازش و خطای کامل) از تعداد نسبی درجه آزادی تشکیل شده باشد، مربع آزمایش به دست می‌آید. تعداد درجه آزادی در این منابع واریانس‌های مختلف با روابط داده شده در ستون سوم جدول (۷) حساب می‌شود که در آن p تعداد ضرایب مدل ریاضی، n تعداد کل آزمایش‌ها و m تعداد سطوح استفاده شده در تحقیق را نشان می‌دهد. در جدول (۷) تجزیه و تحلیل واریانس مدل ریاضی با مجموعه پاسخ‌های آزمایشگاهی با استفاده از رگرسیون چندگانه متناسب است.

معادلات مربوط به منبع واریانس‌های استفاده شده برای محاسبه SS و MS نیز در جدول (۷) داده شده است. اعتبار رگرسیون را می‌توان با نسبت محیط مربع رگرسیون MS_{reg} بر محیط مربع باقی مانده MS_{res} و مقایسه این منابع رگرسیون با توزیع فیشر (آزمون F)، در نظر گرفتن درجه آزادی نسبی مربوط به رگرسیون v_{reg} و واریانس باقی مانده v_{res} ، ارزیابی کرد (فرمول (۲۴)):

$$\frac{MS_{reg}}{MS_{res}} \approx F_{v_{reg}, v_{res}} \quad (24)$$

$$b_{n.1} = (X_{n,m}^T X_{m,n})^{-1} (X_{n,m}^T y_{m,i}) \quad (19)$$

فرمول (۱۹) در ساختار سطح پاسخ که نشان دهنده رفتار پاسخ در دامنه آزمایش است، استفاده می‌شود. برتری بالای معادله (۱۹)، هزینه پایین محاسبات رایانه‌ای مورد نیاز برای ضرایب b است. در روش آماری حداقل مربعات فرض می‌شود که خطاها از یک توزیع تصادفی با میانگین صفر و واریانس مشترک غیر معلوم ارائه می‌شوند و این خطاها مستقل از یکدیگر هستند. به این ترتیب، تخمین واریانس برای هر مؤلفه بردار b معمولاً با تکرارهای معتبر از نقطه مرکزی با توجه به فرمول (۲۰) به دست می‌آید:

$$\hat{V}(b)_{n,n} = (X_{n,m}^T X_{m,n})^{-1} s^2 \quad (20)$$

بنابراین، با به دست آوردن ریشه مربع برای هر مؤلفه $\hat{V}(b)$ می‌توان خطاهای استاندارد را برای ضرایب b که معادله سطح پاسخ را تشکیل می‌دهند، به دست آورد و امکان اعتبار آن را سنجید.

گاهی مدل ریاضی به دست آمده بعد از برازش تابع بر روی داده‌ها ممکن است توصیف رضایت بخشی از دامنه مطالعه شده ارائه ندهد. بهترین روش برای برآورد کیفیت مدل برازش شده، کمک گرفتن از برنامه تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) است. ایده اصلی ANOVA، مقایسه تغییرات به وجود آمده به وسیله تیمار (تغییر در ترکیب سطوح متغیر) با تغییرات ایجاد شده به دلیل خطاهای تصادفی ذاتی در اندازه گیری پاسخ‌های به دست آمده است. از این مقایسه، می‌توان اعتبار رگرسیون استفاده شده برای پیش بینی پاسخ‌ها را با توجه به منابع واریانس تجربی ارزیابی کرد. در ANOVA، ارزیابی تغییرات مجموعه پاسخ‌های به دست آمده با مطالعه پراکندگی آن انجام می‌شود. برآورد انحراف d_i برابر با میزان پراکندگی داده‌ها (y_i) یا تکرار آن‌ها (y_{ij}) از نقطه میانگین (\bar{y}) است که به طور دقیق تر به صورت مربع در فرمول (۲۱) آمده است:

$$d_i^2 = (y_{ij} - \bar{y})^2 \quad (21)$$

مجموع مربع برای کلیه انحرافات مشاهده در رابطه با مسیر آزمایش،

جدول ۷. تجزیه و تحلیل واریانس مدل ریاضی متناسب با مجموعه داده‌های تجربی با استفاده از رگرسیون چندگانه.

| منشأ واریانس | مجموع مربعات | درجه آزادی | واسطه مربعات |
|--------------|--|------------|-------------------------------------|
| رگرسیون | $SS_{reg} = \sum_i^m \sum_j^{n_1} (\hat{y}_i - \bar{y})^2$ | p - 1 | $MS_{reg} = \frac{SS_{reg}}{p - 1}$ |
| باقیمانده‌ها | $SS_{res} = \sum_i^m \sum_j^{n_1} (y_{ij} - \hat{y}_i)^2$ | n - p | $MS_{res} = \frac{SS_{res}}{n - p}$ |
| بدون برازش | $SS_{lof} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (\hat{y}_i - \bar{y}_i)^2$ | m - p | $MS_{lof} = \frac{SQ_{lof}}{m - p}$ |
| خطای خالص | $SS_{pe} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y}_i)^2$ | n - m | $MS_{pe} = \frac{SS_{pe}}{n - m}$ |
| مجموع | $SS_{tot} = \sum_i^m \sum_j^{n_i} (y_{ij} - \bar{y})^2$ | n - 1 | |

بخش بزرگی از رگرسیون در معادله رگرسیون توصیف می‌شود و باقی‌مانده واریانس مسلماً ناشی از باقی‌مانده‌ها خواهد بود؛ بیشتر واریانس مربوط به باقی‌مانده‌ها به دلیل خطای خالص (تصادفی اندازه‌گیری‌ها) و نبود برازش است که ارتباط مستقیمی با کیفیت مدل دارد [۹۹].

برای مدل کردن تابع پاسخ با داده‌های آزمایشی غیرخطی از طراحی درجه دوم مانند طراحی‌های عملی کامل سه سطحی، باکس-بن کن، طراحی مرکب مرکزی و دهلرت استفاده می‌شود، که خلاصه اطلاعات مروری در زیر آمده است. طراحی‌های عملی کامل سه سطحی، ماتریکسی تجربی است که کاربرد محدودی دارند. این روش معمولاً برای آزمایش‌هایی با دو عامل استفاده می‌شود. تعداد آزمایش‌های طراحی به صورت $N = 3^k$ حساب می‌شود که در آن N تعداد آزمایش‌ها و k تعداد عامل‌ها است. این طراحی معمولاً برای آزمایش‌هایی با دو عامل در نظر گرفته می‌شود؛ زیرا تنها با افزایش یک عامل دیگر، تعداد آزمایش‌ها از ۹ به ۲۷ افزایش می‌یابد. این طراحی تاکنون در بررسی‌های تولید هیدروژن کاربردی نشده است.

طراحی‌های باکس-بن کن، طراحی‌های عملی ناکامل سه سطحی است که از ضرایب مرتبه اول و دوم مدل ریاضی در پیش‌بینی شرایط بهینه استفاده می‌شود که روشی کارآمد و اقتصادی برای شرایطی است که تعداد متغیر زیاد باشد. این طراحی مدل مکعبی است که آزمایش‌ها در میان لبه‌ها و تعداد تکرارها در مرکز آن

بنابراین، یک مقدار آماری معنی‌دار برای این نسبت باید بالاتر از مقدار موجود در جدول برای F باشد، که این حالت نشان‌دهنده آن است که مدل ریاضی به خوبی بر داده‌های آزمایش برازش شده است. روش دیگر برای ارزیابی مدل، آزمایش نبود برازش است. اگر مدل ریاضی به خوبی بر داده‌های آزمایش برازش شود، MS_{lof} فقط باید خطاهای تصادفی ذاتی سامانه را نشان دهد. علاوه بر این، MS_{pe} برآوردی برای این خطاهای تصادفی نیز است و فرض بر این است که این دو مقدار از نظر آماری با یکدیگر تفاوت ندارند. ایده اصلی این آزمایش نبود برازش است. اگر بین این دو محیط اختلاف آماری وجود داشته باشد، به همان روشی که اهمیت رگرسیون تأیید شد، در مجموع از توزیع F برای ارزیابی استفاده شود (فرمول (۲۵)):

$$\frac{MS_{reg}}{MS_{res}} \approx F_{V_{lof}, V_{pe}} \quad (25)$$

که V_{pe} و V_{lof} به ترتیب درجه آزادی با نبود برازش و واریانس خطای خالص است. اگر این نسبت بالاتر از مقدار F داخل جدول باشد، نشان‌دهنده نبود برازش مناسب است و مدل باید تصحیح شود. اگر این مقدار کمتر از مقدار F جدول باشد، برازش مدل مناسب است. برای استفاده از آزمایش نبود برازش، طراحی آزمایش باید با تکرارهای معتبر در نقطه مرکزی آن انجام شود؛ به طور خلاصه، یک مدل در صورتی که با داده‌های آزمایشی دارای رگرسیون معنی‌دار باشد؛ یعنی تطابق دارد و بدون برازش بی‌اعتبار است. به عبارت دیگر

مایع ۱ به ۱۵ و در دمای ۱۲۱ درجه سلسیوس و فشار ۰/۱۵ مگاپاسکال به مدت ۶۰ دقیقه انجام دادند. هم‌چنین بهینه‌سازی عوامل مؤثر بر هیدروژن تولیدی از هیدرولیزات SCB را با سه عامل غلظت پیش‌ماده (X_1)، نسبت پیش‌ماده به بافر (X_2) و نسبت تلقیح به پیش‌ماده (X_3) با طراحی آزمایش مرکب مرکزی (CCD) و سطح پاسخ رویه (RSM) ارزیابی کردند. برای محاسبه تولید هیدروژن نیز از مدل آماری با استفاده از تجزیه و تحلیل رگرسیون چندگانه^۱ بر روی داده‌های تجربی و معادله چندجمله‌ای مرتبه دوم استفاده کردند و نشان دادند که نتایج مدل آماری در آزمون F و تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) مرتبه دوم در سطح پاسخ ($P < 0/0001$) از لحاظ آماری کاملاً معنی‌دار است. R^2 برابر با ۰/۹۹۵ نیز به این معنی است که مدل می‌تواند ۰/۹۹۵ از تغییرات کل سامانه را پردازش کند. نتایج آنها نشان می‌دهد که مدل درجه دوم از نظر غلظت پیش‌ماده، نسبت پیش‌ماده به بافر و نسبت تلقیح به پیش‌ماده به نحو مؤثری قابلیت تولید هیدروژن را برازش می‌کند ($P\text{-value} < 0/05$) (X_1X_2). هم‌چنین میان‌کنش معنی‌داری بین غلظت پیش‌ماده و نسبت پیش‌ماده به بافر وجود دارد (X_1X_2) ($P\text{-value} < 0/0019$)، در حالی که میان‌کنش بین غلظت پیش‌ماده و نسبت تلقیح به پیش‌ماده (X_1X_3) ($P\text{-value} < 0/2381$) و نسبت پیش‌ماده به بافر و نسبت تلقیح به پیش‌ماده (X_2X_3) ($P\text{-value} < 0/7063$) معنادار نیست.

نتایج سطح پاسخ سه‌بعدی و خطوط کانتر دو بعدی غلظت پیش‌ماده نشان می‌دهد که افزایش غلظت پیش‌ماده از ۱۰ به ۲۲/۷۷ گرم قند کل بر لیتر تولید هیدروژن را افزایش می‌دهد و افزایش بیش از این مقدار باعث کاهش آن می‌شود. غلظت پیش‌ماده اولیه نقش مهمی در آهنگ تولید و بازده هیدروژن دارد. غلظت پایین پیش‌ماده اولیه، سرعت تخمیر را کاهش می‌دهد و افزایش غلظت پیش‌ماده بر زمان تخمیر می‌افزاید. افزایش غلظت پیش‌ماده می‌تواند بر تولید هیدروژن تا سطح مشخصی بیفزاید و غلظت بالاتر آن از تولید هیدروژن می‌کاهد؛ زیرا متابولیسم به سمت افزایش غلظت سلولی و اسیدهای چرب فرار^۲ می‌رود. تولید اسیدهای چرب فرار، pH محیط زیست واکنشگاه را کاهش می‌دهد و می‌تواند تولید هیدروژن را متوقف کند؛ علاوه بر این، افزایش غلظت

قرار می‌گیرند. تعداد آزمایش‌ها به صورت $N = 2k(k-1) + c_p$ حساب می‌شود که k تعداد عامل‌ها و c_p تعداد نقاط مرکزی است. تمام سطوح عامل‌ها تنها در سه سطح -۱، ۰، ۱ با فواصل مساوی بین این سطوح تنظیم می‌شوند. ری و همکاران با بهره‌جستن از این روش در پیش‌تیمار پس‌ماند پودر پوست موز، آزادسازی قند را بهینه‌سازی و از آن در محیط تولیدی هیدروژن باسیلوس لیکنی فورمیس API استفاده کردند [۸۳]. آن‌ها سه عامل غلظت اسیدسولفوریک (در سه سطح ۰/۰۵، ۰/۱۰ و ۰/۱۵ درصد حجمی/حجمی)، زمان تیمار در حمام بخار آب ۹۵ درجه سلسیوس (در سه سطح ۱، ۲، ۳ ساعت) و غلظت هیدروکسید سدیم (در سه سطح ۰/۰۵، ۰/۱۰ و ۰/۱۵ درصد حجمی/حجمی) را در پیش‌تیمار مطالعه کردند و نشان دادند که حداکثر قند کل آزاد شده ۵۲۴۳/۶۲ میکروگرم بر میلی‌گرم، به مقدار پیش‌بینی شده، ۵۰۱۰/۰۷ میکروگرم بر میلی‌گرم، بسیار نزدیک است. به‌طور کلی، طراحی‌های باکس-بن کن نسبت به طراحی مرکب مرکزی اقتصادی‌تر است.

طراحی مرکب مرکزی را باکس و ویلسون ارائه کردند. این طراحی دارای چند قسمت است: ۱- یک طراحی عملی جزئی یا طراحی عملی کامل ۲- یک طراحی اضافی، که اغلب یک طراحی ستاره‌ای است که در آن نقاط آزمایشی در فاصله‌ای از α مرکز قرار داد. ۳- یک نقطه مرکزی. در این طراحی تعداد آزمایش‌ها به صورت $N = k^2 + K + c_p$ حساب می‌شود که k تعداد عامل‌ها و c_p تعداد تکرار نقطه مرکزی است. مقدار α وابسته به تعداد متغیرهاست که به صورت $\alpha = 2^{(k-p)/4}$ حساب می‌شود. برای ۲، ۳ و ۴ متغیر، α به ترتیب ۱/۴۱، ۱/۶۸ و ۲ است. تمام عوامل در ۵ سطح -۱، ۰، +۱، +۲ بررسی می‌شود. از این روش نسبت به طراحی‌های باکس-بن کن برای مطالعه تولید هیدروژن زیستی بیشتر استفاده شده است.

سانجیوکو و همکارانش در سال ۲۰۱۶ تولید هیدروژن زیستی را از باگاس نیشکر (SCB) که تقریباً ۲۵ درصد از وزن زیست‌توده است که پس از شربت‌گیری باقی می‌ماند، با روش‌های آماری بررسی کردند [۱۰۲]. ترکیبات عمده SCB شامل ۳۸/۱ درصد سلولز، ۲۱/۲ درصد همی‌سلولز و ۸/۳ درصد لیگنین است. این محققان آب‌کافت اسیدی SCB را برای شکسته‌شدن ساختمان همی‌سلولز، با استفاده از اسید سولفوریک ۰/۵ درصد حجمی/حجمی با نسبت جامد به

1. Multiple Regression Analysis
2. Volatile fatty acids

۳-۲-۲-۴-۲ بررسی نمایش گرافیکی کانطور

نمودار کانطور یک فن گرافیکی برای نشان دادن یک سطح ۳ بعدی با ترسیم برش‌های ثابت z به نام کانطورها در قالب ۲ بعدی است. در نظر گرفتن مقداری برای z، خطوط (x و y) را در جایی قطع می‌کنند که مقدار z با رسم آن دو به دست می‌آید. در ادامه کانطور جایگزین یک طرح سطح ۳ بعدی است که می‌تواند منطقه بین منحنی‌ها را رنگی نشان دهد.

منحنی میزان یا خط کانطور^۱ در یک نقشه توپوگرافی منحنی است که تمامی نقاط هم‌ارتفاع روی صفحه را به یکدیگر متصل می‌کند؛ این منحنی‌ها نقاط اشتراک با یکدیگر ندارند و کوچک‌ترین منحنی بسته در این نقشه‌ها، بالاترین و یا پایین‌ترین نقطه را نشان می‌دهد. فواصل عمودی بین خطوط منحنی‌های میزان یکسان هستند.

قوانین مربوط به منحنی‌های میزان

۱. هر خط کانطور نمایشگر نقاطی است که کاملاً هم ارتفاع هستند.
۲. خطوط حد فاصل هیچ نقطه مشترکی با یکدیگر ندارند.
۳. روی صفحه حرکت از یک خط حد فاصل به خط حد فاصل بالاتر، افزایش ارتفاع را نشان می‌دهد.
۴. خطوط حد فاصل نزدیک، شیب تندتر و خطوط حد فاصل دور نشان‌دهنده شیب ملایم‌تر است.
۵. تعدادی خطوط حد فاصل بسته، نقطه بهینه را مشخص می‌سازند و به صورت هاشورزده نمایشگر مجموعه بهینه بر روی سطح صفحه هستند.

منحنی‌های میزان بسته‌اند و هیچ خطی به صورت شاخه فرعی بر آن‌ها ترسیم نمی‌شود و یکدیگر را قطع نمی‌کنند، بدین ترتیب هیچ نقطه‌ای روی نقشه نمی‌تواند دو ارتفاع داشته باشد. با تحلیلی دیگر کلیه نقاطی که روی یک منحنی میزان است همگی از ارتفاع یکسانی برخوردارند. وقتی از یک منحنی به دیگری روی نقشه می‌رسیم، یعنی ارتفاع افزایش یا کاهش یافته است که به راحتی از روی اعداد درج شده روی منحنی‌ها قابل درک است. از این مدل کانطور برای تحلیل روش‌های آماری نیز بهره‌برداری می‌شود.

در شرایطی که نمودار داده‌های آزمایشگاهی غیرخطی باشد و برای غربالگری از مدل‌های CCD یا BBD و از روش آماری RSM برای به دست آوردن شرایط بهینه عامل‌ها روی پاسخ (ها) استفاده شده باشد و نمایش گرافیکی سطوح و کانطور رسم شده باشد، درک تأثیر

پیش‌ماده فشار جزئی سامانه تخمیر را افزایش دهد. افزایش فشار جزئی هیدروژن در فضای بالای زیست‌واکنشگاه تولید هیدروژن را به سمت تولید اسیدهای چرب فرار سوق می‌دهد. سانگ یوکو و همکاران بیشترین قابلیت تولید هیدروژن (۶۹۸۰ میلی لیتر بر لیتر) را با نسبت تلقیح به پیش‌ماده ۰/۳۱ به دست آوردند. در نسبت‌های بالای تلقیح به پیش‌ماده، مقدار بیشتری از منبع کربن برای تولید زیست‌توده نسبت به تولید هیدروژن مصرف می‌شود. هم‌چنین بیشترین تولید هیدروژن با نسبت پیش‌ماده به بافر ۴/۳۱ به دست آوردند که نشان‌دهنده تأثیر بافر بر تولید است. تشکیل هیدروژن با تولید اسیدهای چرب فرار یا حلال‌های دیگر در طی فرایند هضم بی‌هوازی همراه است که باعث افت pH می‌شود. یکی از عوامل مهم در فرایندهای بی‌هوازی زیستی است؛ زیرا بر فعالیت آنزیم هیدروژناز دارای آهن، مسیرهای متابولیکی و زمان فاز تأخیری تأثیر دارد. تولید هیدروژن در pH‌های پایین‌تر از ۵ متوقف می‌شود. از طرفی دیگر، در pH‌های اولیه بالا مانند ۹، کاهش زمان تأخیر مشاهده می‌شود، که آهنگ تولید هیدروژن نیز کاهش می‌یابد، بنابراین محیط تولید هیدروژن نیاز به بافر دارد.

طراحی دهلرت جایگزینی علمی و اقتصادی مرتبط با سایر ماتریکس‌های تجربی مرتبه دوم است. این طراحی برای دو متغیر یک دامنه دایره‌ای، برای سه متغیر یک دامنه کروی و برای بیش از سه متغیر یک سطح کروی توصیف می‌کند. از برتری‌های این روش می‌توان به تعداد آزمایش‌های کم با کارایی بالا اشاره کرد. در این طراحی تعداد آزمایش‌ها به صورت $N = k^2 + K + c_p$ حساب می‌شود که k تعداد عامل‌ها و c_p تعداد تکرار نقطه مرکزی است. هر متغیر را می‌توان در تعداد متفاوتی از سطوح بررسی کرد که فواصل بین سطوح به صورت یکنواخت است. یکی از برتری‌های طراحی دهلرت، امکان گسترش دامنه با اضافه کردن عامل دیگر یا جابه‌جایی طراحی به سمت یک دامنه آزمایشی جدید است. این طراحی نیز تاکنون در تولید هیدروژن زیستی با روش تاریکی کاربردی نشده است.

۳-۲-۲-۴-۱ بررسی نمایش گرافیکی سطح

با استفاده از مدل‌هایی مانند BBD که معمولاً سطوح دقیق‌تر و چرخشی به دست می‌آید تأثیر سطوح عوامل مؤثر در فضایی بر پاسخ حاصل می‌شود و حساسیت پاسخ نسبت به تغییرات هر سطح از عوامل و اندرکنش‌ها را نشان می‌دهد.

1. Contour Line

۳-۲-۵ روش شبکه عصبی و الگوریتم ژنتیک

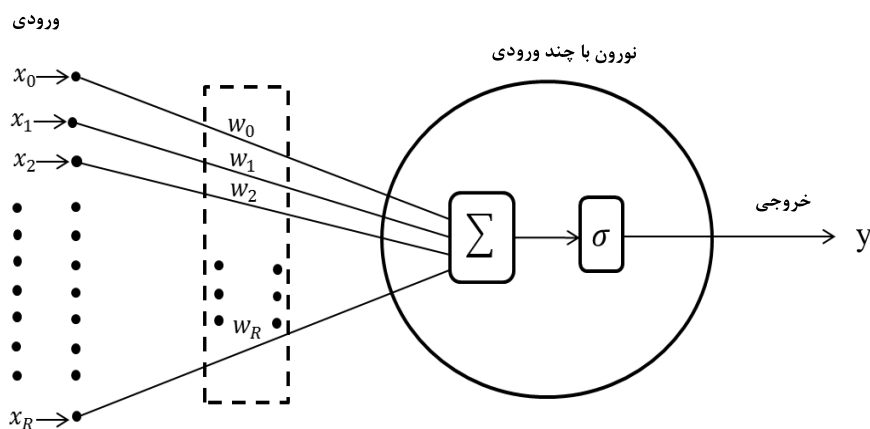
در دو دهه گذشته، شبکه عصبی مصنوعی با موفقیت در فرایندهای زیستی غیرخطی دارای چند متغیر به‌عنوان ابزاری مفید برای ساخت مدل‌ها استفاده شده است. شبکه عصبی روشی غیرخطی است که در آن از توانایی‌های پردازشی مغز انسان الگوبرداری شده است. ورودی‌های یک نورون مصنوعی که متغیرهای پیوسته‌اند، تحت تأثیر یک وزن قرار می‌گیرند که این تابع وزن، شبیه اتصال سیناپسی سلول‌های مغزی عمل می‌کند و سپس وارد ناحیه پردازشگر می‌شوند. ناحیه پردازشگر از ۲ قسمت تشکیل شده است. ورودی‌های وزن‌دار به‌وسیله قسمت اول باهم جمع می‌شوند و کمیتی به نام t به دست می‌آید. فیلتری غیرخطی که تابع فعال‌سازی نامیده می‌شود، قسمت دوم را تشکیل می‌دهد و جریان‌های علائم ورودی را ترکیب می‌کند (شکل (۴)). این مدل را می‌توان به‌صورت فرمول (۲۶) نشان داد:

$$y = \sigma \left(\sum_{i=0}^N x_i w_i \right) \quad (26)$$

که در آن y مقدار خروجی اطلاعات نورون، N تعداد ورودی‌ها، x_i متغیرهای ورودی، w_i وزن سیناپس و σ تابع فعال‌سازی است. از σ برای تغییر خروجی و معمولاً از توابع آستانه‌ای، علامت و سیگموئید استفاده می‌شود.

نمایش گرافیکی سطوح معمولاً پیچیده و دارای مشکلات تشخیص و تجزیه و تحلیل است. در صورتی که اگر از نمودار گرافیکی کانتور استفاده شود، درک و فهمیدن تأثیر عوامل روی پاسخ آسان‌تر است؛ چون که پس از تعیین مقداری برای z در دو بعد x, y ترسیم می‌شود و چون در دو بعد تأثیر عامل‌ها را نشان می‌دهد خیلی آسان‌تر و دقیق‌تر می‌توان اثر آن‌ها را روی پاسخ درک کرد. در صورتی که درک تأثیر نمایشگر گرافیکی سطحی^۱ روی پاسخ پیچیده است؛ زیرا که اشکال سطوح ممکن است دارای انحنای پیچیده و یا این که شبیه زین اسبی^۲ و دیگر اشکال باشند و نتوان به راحتی یا وضوح تأثیر عوامل روی پاسخ را متوجه شد. چنانچه سطح به‌صورت زین اسبی باشد دارای دو کانتور در فاصله‌ای است که راحت‌تر می‌توان اثر عوامل روی پاسخ را نسبت به گرافیک سطحی فهمید.

استفاده از مدل CCD برای غربالگری داده‌های تجربی درجه دو برای تولید هیدروژن زیستی با روش تاریکی زیاد مشاهده شده است، به هر حال سطح به‌دست‌آمده فاقد چرخش است و پیچیدگی‌های درک تأثیر عوامل روی پاسخ زیاد است. در شرایطی که از مدل BBD برای غربالگری داده‌های آزمایشگاهی غیرخطی بهره گرفته شود، سطح قابلیت چرخش دارد و تأثیر آن در چندنگاه روی پاسخ (ها) را می‌توان مشاهده کرد. در این مقاله مروری به‌صورت تخصصی بر موضوع کاربرد RSM در تولید هیدروژن زیستی در تاریکی نسبت به مقاله بسحاق و رستمی [۱۰۳] پرداخته شده است.



شکل ۴. نمایش نورون مصنوعی با چند ورودی [۱۰۴].

1. Surface Plot

2. Saddle

شبکه عصبی مصنوعی توانایی تقریبی کلی دارد؛ به عبارتی تقریباً می‌تواند انواع عملکردهای غیرخطی از جمله توابع درجه دوم را پردازش کند. همچنین نیازی به تابع قبلی ندارد. این دو ویژگی برتری این روش را نسبت به طراحی رویه پاسخ نشان می‌دهد؛ در این طراحی بهینه‌سازی با مشتق‌گیری انجام می‌شود. اصول برنامه‌نویسی الگوریتم ژنتیک برگرفته از تکامل ژنتیکی موجودات است. در سال‌های اخیر، الگوریتم ژنتیک بر اساس مدل شبکه عصبی به‌طور موفقیت‌آمیزی برای بهینه‌سازی فرایندهای پیچیده زیستی استفاده شده است [۱۰۵]. پراکاشام و همکاران با بهره‌جستن از شبکه عصبی، چهار عامل pH محیط کشت، نسبت گلوکز به زایلوز، سن و غلظت مایه تلقیح را بر بازده هیدروژن بررسی کردند [۱۰۶]. در مطالعه آن‌ها با استفاده از الگوریتم ژنتیک پس از ارزیابی داده‌ها برای ۳۰۰ نسل، شرایط بهینه تعیین و چهار شرایط برتر ممکن انتخاب و اعتبار سنجی یکسان شد. با به کارگیری شرایط بهینه، پراکاشام و همکاران، عملکرد هیدروژن زیستی را از ۳۲۵ به ۳۷۹ میلی‌لیتر بر ۱ گرم پیش ماده افزایش دادند. ضریب همبستگی به دست آمده ۰/۹۹۹۹ نشانگر دقت شبکه‌های عصبی در پردازش داده‌هاست. Wan و Wang در کشت ناپیوسته مخلوط باکتری‌ها، اثر دما، pH اولیه و غلظت گلوکز را با دو روش پاسخ سطح رویه و شبکه عصبی مصنوعی بررسی و شبکه عصبی را با تعداد آزمایش‌های محدودتر، دقیق‌تر و تعمیم‌دارتر نسبت به سطح پاسخ رویه یافتند. در این مطالعه، خطای میانگین مربعات ریشه مدل شبکه عصبی و طراحی پاسخ رویه به ترتیب ۱۷/۸ و ۳۸/۴ درصد و خطای استاندارد مدل شبکه عصبی و طراحی پاسخ رویه به ترتیب ۷/۷ و ۱۶/۶ درصد به دست آمد. آن‌ها با مقایسه خطای میانگین مربعات ریشه و خطای پیش‌بینی استاندارد به همراه بیشینه بازده هیدروژن ۳۶۰/۵ میلی‌لیتر هیدروژن بر گرم گلوکز در مدل شبکه عصبی نسبت به ۲۸۹/۸ میلی‌لیتر هیدروژن بر گرم گلوکز در طراحی سطح رویه نشان دادند که توانایی بهینه‌سازی مدل شبکه عصبی نسبت به پاسخ سطح رویه بسیار بالاتر است [۱۰۷].

۴. نتیجه‌گیری و جمع‌بندی

برای تولید هیدروژن زیستی در تاریکی معمولاً از تأثیر سطوح سه عامل مؤثر (pH، دما و غلظت پیش‌ماده) و گاهی بیشتر و متفاوت استفاده شده است. در مطالعات اخیر مشخص شده که

عواملی چون شرایط بافری محیط و میزان تلقیح روی فرایندهای مذکور تأثیر مؤثر دارند. به هر حال اگر از سطوح بالاتر از سه عامل مؤثر بر پاسخ استفاده شود، باعث کاهش بازدهی فرایند می‌شود که در این حالت بهینه‌سازی شرایط و درک اندرکنش‌ها لازم و ضروری است. تاکنون بسیاری از پژوهش‌ها در بهینه‌سازی فرایند تولید هیدروژن با روش تخمیر در تاریکی از طراحی سنتی تک‌عاملی استفاده کرده‌اند که با مطالعه یک عامل در یک زمان به درستی نمی‌توان تأثیر اندرکنش‌های عامل‌ها را بررسی کرد؛ چون که نقطه بهینه در خارج از منطقه بهینه قرار دارد. این روش با وجود این که انجام آن پیاده و تجزیه و تحلیل آن راحت است، نسبت به بقیه روش‌های طراحی آزمایش به دلیل تعداد آزمایش‌های زیاد مورد نیاز، دربرگرفتن زمان طولانی و هزینه نسبتاً بالا از جمله روند بهینه‌سازی غیراقتصادی محسوب می‌شود. روش طراحی عملی کامل، تمام ترکیبات ممکن از سطوح عوامل را هم‌زمان بررسی و پردازش می‌کند و برای بهینه‌سازی تولید هیدروژن زیستی زیاد استفاده شده است. استفاده از این نوع طراحی اغلب با عامل‌های بسیار محدود در دو سطح انجام می‌شود و با افزایش عامل‌ها یا سطوح تعداد آزمایش‌ها برای به دست آوردن شرایط بهینه روی پاسخ را به‌طور چشمگیر افزایش می‌دهد که باعث افزایش هزینه در چارچوب مصرف مواد، تجهیزات و زمان می‌شود. استفاده از روش‌های آماری جزئی را می‌توان بخشی از آزمایش‌های روش طراحی عملی کامل که لازم است انجام شود دانست. روش‌های طراحی‌های باکس-بن کن و طراحی مرکب مرکزی و تاگوچی از روش‌های آماری جزئی به شمار می‌روند. عوامل مؤثر در تولید هیدروژن زیستی تخمیری با روش پلاکت-برمن مرتبه یک غربالگری شده و از روش تندترین صعود می‌توان برای تقریب‌سازی در حدود ناحیه بهینه استفاده کرد و با یکی از روش‌های آماری مانند پاسخ سطح رویه (RSM) و یا روش شبکه عصبی (ANN) بهینه‌سازی نهایی انجام داد. پیش‌بینی رابطه بین پاسخ و عوامل مؤثر غیرخطی تعیین شده با طراحی باکس-بن کن یا مرکب مرکزی در تقریب‌سازی به حدود شرایط بهینه و سپس در آن منطقه بر اساس تابع چندجمله‌ای مرتبه دوم بررسی و بهینه‌سازی با پاسخ سطح رویه (RSM) و روش شبکه عصبی مبتنی بر طراحی (ANN) انجام شود؛ زیرا با استفاده از طراحی ANN، می‌توان هر تابع غیرخطی به‌ویژه از نوع درجه دوم را

- International PVT. LTD., New Delhi, pp. 153-167, (2018).
- [2] Saravanan, A. P., Mathimani, T., Deviram, G., Rajendran, K., Pugazhendhi, A., "Biofuel policy in India: A review of policy barriers in sustainable marketing of biofuel", *Journal of Cleaner Production*, 193, pp. 734-747, (2018).
- [3] Das, D., Veziro-lu, T. N., "Hydrogen production by biological processes: A survey of literature", *International Journal of Hydrogen Energy*, 26(1), pp. 13-28, (2001).
- [4] Tepari, E. A., Nakhla, G., Haroun, B. M., Hafez, H., "Co-fermentation of carbohydrates and proteins for biohydrogen production: Statistical optimization using Response Surface Methodology", *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(4), pp. 2640-2654, (2020).
- [5] در پیچجو، ک. ام، نهوان، ن.، واکر، ت. اچ، "مهندسی سوخت‌های زیستی فناوری فرایند"، مترجم: رستمی، خ.، (۱۳۹۸).
- [6] بسحاق، ف. و رستمی، خ.، "جایگاه و ظرفیت‌های ایران در تولید سوخت زیستی"، هفتمین همایش ملی و اولین کنفرانس بین‌المللی انرژی تجدیدپذیر و تولید پراکنده ایران، (۱۳۹۸).
- [7] بسحاق، ف.، رستمی، خ. و اصفهانی، ز.، "مروری بر تأثیر عوامل شیمیایی و فیزیکی جهش‌زا در افزایش تولید هیدروژن زیستی به روش تخمیر در تاریکی توسط سویه انتروباکتر"، نشریه مهندسی شیمی ایران، ۱۷، ۱۷-۶، (۱۳۹۷).
- [8] Lee, D. H. "Biohydrogen yield efficiency and the benefits of dark, photo and dark-photo fermentative production technology in circular Asian economies", *International Journal of Hydrogen Energy*. (Available online 5 October 2020). In Press.
- [9] اصفهانی بلندبالایی، ز.، رستمی، خ.، "بررسی روش‌های جداسازی انتروباکترهای تولیدکننده هیدروژن به روش تخمیر در تاریکی"، ششمین کنفرانس بین‌المللی مهندسی محیط زیست و منابع طبیعی، تهران، ایران، (چهارم ژوئای ۲۰۲۰).
- [10] Nandi, R., Sengupta, S., "Microbial production of hydrogen: an overview", *Critical Reviews in Microbiology*, 24(1), pp. 61-84, (1998).
- [11] Hallenbeck, P. C., Benemann, J. R., "Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes", *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12), pp. 1185-1193, (2002).
- تقریب کرد. از روش طراحی مرکب مرکزی برای مطالعه تولید هیدروژن زیستی نسبت به طراحی‌های باکس-بن کن با شاخص‌های غیرخطی بیشتر استفاده شده است. در صورتی که روش طراحی BDD توجه بالاتر اقتصادی دارد؛ زیرا به تعداد کمتری از آزمایش برای بهینه‌سازی تأثیر عوامل مؤثر روی پاسخ نیاز دارد و دارای قابلیت چرخش سطوح است و روشی مؤثر برای برآورد تأثیر عوامل مؤثر درجه ۲ روی پاسخ در سه بعد است. گاهی اوقات با شبکه عصبی نمودار را تقریب می‌کنند و با روش آماری RSM بهینه‌سازی فرایند را انجام می‌دهند، که با اجرای این چندمجموعه درک اندرکنش‌ها را روی پاسخ دقیق‌تر و راحت‌تر می‌کنند.
- از الگوریتم ژنتیک بر اساس مدل شبکه عصبی در سال‌های اخیر به‌طور موفقیت‌آمیزی برای بهینه‌سازی فرایندهای پیچیده زیستی استفاده شده است؛ با توجه به نیاز به تهیه اطلاعات اولیه بسیار زیاد، کمتر از آن استفاده شده است. از الگوریتم ژنتیک بر اساس مدل شبکه عصبی در بهینه‌سازی تأثیر عوامل مؤثر بر فرایند تولید زیستی هیدروژن در تاریکی یا پاسخ استفاده شده است؛ زیرا دقت برازش و پیش‌بینی شبکه عصبی مبتنی بر ANN در شرایط غیرخطی نسبت به روش آماری RSM گویا دارای دقت بیشتری است؛ زیرا ماهیتاً از جنس غیرخطی است. هم‌چنین با این سامانه در شرایطی که پاسخ‌های زیادی برای بهینه‌سازی فرایند وجود داشته باشد، می‌توان آن را به‌طور هم‌زمان انجام داد که یکی از ویژگی‌های این روش است. گاهی اوقات از روش‌های شبکه عصبی مبتنی بر طراحی (ANN) برای مدل‌سازی و نهایتاً از روش آماری RSM برای بهینه‌سازی فرایند استفاده شده است. ارائه نمایشگر سطحی کانتور تجزیه و تحلیل تأثیر عوامل مؤثر بر یک فرایند در دو بعد را امکان‌پذیر می‌کند که درک اندرکنش‌ها از سطوح سه‌بعدی راحت‌تر است. بنابراین برای شناخت پیچیدگی اندرکنش‌ها، برازش کردن توابع ریاضی غیرخطی و به‌دست‌آوردن بازدهی مفید، انتخاب عوامل مؤثر و سطوح آزمایش دقیق در تعیین نوع طراحی اثربخش روی پاسخ که در قالب بهینه‌سازی فرایند منعکس می‌شود ضروری است.

مراجع

- [1] Rostami, K., Esfahani Bolandbalaei, Z., Ozgoli, H., "Sustainable biohydrogen a candidate to replace carbon based energy", *Energy models in emerging economies*, Editor Sasi K. Kottayil, Astral

- در روش های طراحی آزمایش و آماری در بهینه سازی تولید
- [12] Toledo-Alarcón, J., Capson-Tojo, G., Marone, A., Paillet, F., Júnior, A. D. N. F., Chatellard, L., Bernet, N., Trably, E., "Basics of bio-hydrogen production by dark fermentation. In Bioreactors for microbial biomass and energy conversion (pp. 199-220)", Springer, Singapore, (2018).
- [13] Wang, J., Yin, Y. Biohydrogen production from organic wastes. Springer. (2017).
- [14] Shao, W., Wang, Q., Rupani, P. F., Krishnan, S., Ahmad, F., Rezanía, S., Rashid, M.A., Sha, C., Din, M. F. M., "Biohydrogen production via thermophilic fermentation: A prospective application of *Thermotoga* species", Energy, 197, Article 117199, (2020).
- [15] Mu, Y., Wang, G., Yu, H. Q., "Kinetic modeling of batch hydrogen production process by mixed anaerobic cultures", Bioresource Technology, 97(11), pp. 1302–1307, (2006).
- [16] Mu, Y., Zheng, X. J., Yu, H. Q., Zhu, R. F., "Biological hydrogen production by anaerobic sludge at various temperatures", International Journal of Hydrogen Energy, 31, pp. 780–785, (2006).
- [17] Wang, J., Wan, W., "Application of desirability function based on neural network for optimizing biohydrogen production process", International Journal of Hydrogen Energy, 34, pp. 1253-1259, (2009).
- [18] Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., Van't Riet, K. J. A. E. M., "Modeling of the bacterial growth curve", Applied and Environmental Microbiology, 56(6), pp. 1875-1881, (1990).
- [19] Mu, Y., Yu, H. Q., Wang, G., "A kinetic approach to anaerobic hydrogen-producing process", Water Research, 41(5), pp. 1152–1160, (2007).
- [20] Lay, J. J., Li, Y. Y., Noike, T., "Developments of bacterial population and methanogenic activity in a laboratory-scale landfill bioreactor", Water Research, 32(12), pp. 3673-3679, (1998).
- [21] Lay, J. J., Lee, Y. J., Noike, T., "Feasibility of biological hydrogen production from organic fraction of municipal solid waste", Water Research, 33(11), pp. 2579-2586, (1999).
- [22] Ulhiza, T. A., Puad, N. I. M., Azmi, A. S., "Optimization of culture conditions for biohydrogen production from sago wastewater by *Enterobacter aerogenes* using Response Surface Methodology", International Journal of Hydrogen Energy, 43(49), pp. 22148-22158, (2018).
- [23] Zhang, T., Liu, H., Fang, H. H., "Biohydrogen production from starch in wastewater under thermophilic condition." Journal of Environmental Management, 69(2), pp.149-156, (2003).
- [24] Keskin, T., Abubackar, H. N., Yazgin, O., Gunay, B., Azbar, N., "Effect of percolation frequency on biohydrogen production from fruit and vegetable wastes by dry fermentation", International Journal of Hydrogen Energy, 44(34), pp.18767-18775, (2019).
- [25] Ferchichi, M., Crabbe, E., Gil, G. H., Hintz, W., Almadidy, A., "Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey", Journal of Biotechnology, 120(4), pp. 402-409, (2005).
- [26] Pan, C. M., Fan, Y. T., Zhao, P., Hou, H. W., "Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii* Famp3", International Journal of Hydrogen Energy, 33(20), pp. 5383-5391, (2008).
- [27] Boshagh, F., Rostami, Kh., Moazami, N., "Biohydrogen production by immobilized *Enterobacter aerogenes* on functionalized multi-walled carbon nanotube", International Journal of Hydrogen Energy, 44(28), pp. 14395-14405, (2019).
- [28] Ziara, R. M., Miller, D. N., Subbiah, J., Dvorak, B. I., "Lactate wastewater dark fermentation: The effect of temperature and initial pH on biohydrogen production and microbial community", International Journal of Hydrogen Energy, 44(2), pp. 661-673, (2019).
- [29] Wang, C. H., Lin, P. J., Chang, J. S., "Fermentative conversion of sucrose and pineapple waste into hydrogen gas in phosphate-buffered culture seeded with municipal sewage sludge. Process Biochemistry", 41(6), pp. 1353-1358, (2006).
- [30] Veeramalini, J. B., Selvakumari, I. A. E., Park, S., Jayamuthunagai, J., Bharathiraja, B., "Continuous production of biohydrogen from brewery effluent using co-culture of mutated *Rhodobacter* M 19 and *Enterobacter aerogenes*", Bioresource Technology, 286, Article 121402, (2019).
- [31] Boshagh, F., Rostami, Kh., Moazami, N., "Immobilization of *Enterobacter aerogenes* on carbon fiber and activated carbon to study hydrogen production enhancement", Biochemical Engineering Journal, 144, pp. 64-72, (2019).
- [32] Rambabu, K., Bharath, G., Thanigaivelan, A., Das, D. B., Show, P. L., Banat, F. "Augmented biohydrogen production from rice mill wastewater through nano-metal oxides assisted dark fermentation", Bioresource Technology, 319, Article 124243, (2021).
- [33] Argun, H., Dao, S., "Bio-hydrogen production from waste peach pulp by dark fermentation: Effect of inoculum addition". International Journal of Hydrogen Energy, 42(4), pp. 2569-2574, (2017).
- [34] Ghosh, D., Hallenbeck, P. C. Fermentative hydrogen yields from different sugars by batch cultures of metabolically engineered *Escherichia coli* DJT135. International Journal of Hydrogen Energy, 34(19), pp. 7979-7982, (2009).
- [35] Chittibabu, G., Nath, K., Das, D., "Feasibility studies on the fermentative hydrogen production by recombinant *Escherichia coli* BL-21", Process Biochemistry, 41(3), pp. 682-688, (2006).

- [36] Abdullah, M. F., Jahim, J. M., Abdul, P. M., Mahmud, S. S., "Effect of carbon/nitrogen ratio and ferric ion on the production of biohydrogen from palm oil mill effluent (POME)", *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 23, Article: 101445, (2020).
- [37] Ntaikou, I., Gavala, H. N., Kornaros, M., Lyberatos, G., "Hydrogen production from sugars and sweet sorghum biomass using *Ruminococcus albus*", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(4), pp. 1153-1163, (2008).
- [38] Wang, J., Wan, W., "Effect of Fe⁽²⁺⁾ concentration on fermentative hydrogen production by mixed cultures", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(4), pp. 1215-1220, (2008).
- [39] Yin, Y., Wang, J., "Characterization and hydrogen production performance of a novel strain *Enterococcus faecium* INET2 isolated from gamma irradiated sludge", *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(48), pp. 22793-22801, (2016).
- [40] Zhao, X., Xing, D., Fu, N., Liu, B., Ren, N., "Hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii* RZF-1108", *Bioresource Technology*, 102(18), pp. 8432-8436, (2011).
- [41] Rambabu, K., Show, P. L., Bharath, G., Banat, F., Naushad, M., Chang, J. S., "Enhanced biohydrogen production from date seeds by *Clostridium thermocellum* ATCC 27405", *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(42), pp. 22271-22280, (2020).
- [42] Ito, T., Nakashimada, Y., Kakizono, T., Nishio, N., "High-yield production of hydrogen by *Enterobacter aerogenes* mutants with decreased α -acetolactate synthase activity", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97(4), pp. 227-232, (2004).
- [43] Liu, I. C., Whang, L. M., Ren, W. J., Lin, P. Y., "The effect of pH on the production of biohydrogen by clostridia: thermodynamic and metabolic considerations", *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(1), pp. 439-449, (2011).
- [44] Sompong, O., Prasertsan, P., Karakashev, D., Angelidaki, I., "Thermophilic fermentative hydrogen production by the newly isolated *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* PSU-2", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(4), pp. 1204-1214, (2008).
- [45] Mitchell, R. J., Kim, J. S., Jeon, B. S., Sang, B. I., "Continuous hydrogen and butyric acid fermentation by immobilized *Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755: Effects of the glucose concentration and hydraulic retention time", *Bioresource Technology*, 100(21), pp. 5352-5355, (2009).
- [46] 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 Biochemistry*, 41(1), pp. 199-207, (2006).
- [47] Liu, G., Shen, J., "Effects of culture and medium conditions on hydrogen production from starch using anaerobic bacteria", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 98(4), pp. 251-256, (2004).
- [48] Kim, J. O., Kim, Y. H., Yeom, S. H., Song, B. K., Kim, I. H., "Enhancing continuous hydrogen gas production by the addition of nitrate into an anaerobic reactor", (2006). *Process Biochemistry*, 41(5), pp. 1208-1212, (2006).
- [49] Oh, Y. K., Seol, E. H., Kim, J. R., Park, S., "Fermentative biohydrogen production by a new chemoheterotrophic bacterium *Citrobacter* sp. Y19", *International Journal of Hydrogen Energy*, 28(12), pp. 1353-1359, (2003).
- [50] Yuan, Z., Yang, H., Zhi, X., Shen, J., "Enhancement effect of *L-cysteine* on dark fermentative hydrogen production", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(22), pp. 6535-6540, (2008).
- [51] Akutsu, Y., Li, Y. Y., Harada, H., Yu, H. Q., "Effects of temperature and substrate concentration on biological hydrogen production from starch", *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(6), pp. 2558-2566, (2009).
- [52] Song, W., Ding, L., Liu, M., Cheng, J., Zhou, J., Li, Y. Y., "Improving biohydrogen production through dark fermentation of steam-heated acid pretreated *Alternanthera philoxeroides* by mutant *Enterobacter aerogenes* ZJU1", *Science of the Total Environment*, 716, Article 134695, (2020).
- [53] Nasirian, N., Almassi, M., Minaei, S., Widmann, R., "Development of a method for biohydrogen production from wheat straw by dark fermentation", *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(1), pp. 411-420, (2011).
- [54] Moreno-Dávila, I. M. M., Ríos-González, L. J., Rodríguez-de la Garza, J. A., Morales-Martínez, T. K., Garza-García, Y., "Biohydrogen production from paper industry wastes by SSF: A study of the influence of temperature/enzyme loading", *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(24), pp. 12333-12338, (2019).
- [55] Wang, Y., Mu, Y., Yu, H. Q., "Comparative performance of two upflow anaerobic biohydrogen-producing reactors seeded with different sludges", *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(8), pp. 1086-1094, (2007).
- [56] Chou, C. H., Wang, C. W., Huang, C. C., Lay, J. J., "Pilot study of the influence of stirring and pH on anaerobes converting high-solid organic wastes to hydrogen", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(5), pp. 1550-1558, (2008).
- [57] Wu, K. J., Chang, J. S., "Batch and continuous fermentative production of hydrogen with anaerobic sludge entrapped in a composite polymeric matrix", *Process Biochemistry*, 42(2), pp. 279-284, (2007).

- [58] Zhong, J., Stevens, D. K. Hansen, C.L., "Optimization of anaerobic hydrogen and methane production from dairy processing waste using a two-stage digestion in induced bed reactors (IBR)", *International Journal of Hydrogen Energy*, 40, pp. 15470-15476, (2015).
- [59] Valdez-Vazquez, I., Ríos-Leal, E., Muñoz-Páez, K. M., Carmona-Martínez, A., Poggi-Varaldo, H. M., "Effect of inhibition treatment, type of inocula, and incubation temperature on batch H₂ production from organic solid waste", *Biotechnology and Bioengineering*, 95(3), pp. 342-349, (2006).
- [60] Kalogo, Y., Bagley, D. M., "Fermentative hydrogen gas production using biosolids pellets as the inoculum source", *Bioresource Technology*, 99(3), pp. 540-546, (2008).
- [61] Mishra, P., Das, D., "Biohydrogen production from *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using distillery effluent", *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(14), pp. 7496-7507, (2014).
- [62] Levin, D. B., Islam, R., Cicek, N., Sparling, R., "Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates", *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(11), pp. 1496-1503, (2006).
- [63] Lay, J. J., "Biohydrogen generation by mesophilic anaerobic fermentation of microcrystalline cellulose", *Biotechnology and Bioengineering*, 74(4), pp. 280-287, (2001).
- [64] Chang, F. Y., Lin, C. Y., "Calcium effect on fermentative hydrogen production in an anaerobic up-flow sludge blanket system", *Water Science and Technology*, 54(9), pp. 105-112, (2006).
- [65] Ueno, Y., Sasaki, D., Fukui, H., Haruta, S., Ishii, M., Igarashi, Y., "Changes in bacterial community during fermentative hydrogen and acid production from organic waste by thermophilic anaerobic microflora", *Journal of Applied Microbiology*, 101(2), pp. 331-343, (2006).
- [66] 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*", *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12), pp. 1391-1398, (2002).
- [67] Yang, H., Shen, J., "Effect of ferrous iron concentration on anaerobic bio-hydrogen production from soluble starch", *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(15), pp. 2137-2146, (2006).
- [68] Yokoi, H., Saitsu, A., Uchida, H., Hirose, J. U. N., Hayashi, S., Takasaki, Y., "Microbial hydrogen production from sweet potato starch residue", *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(1), pp. 58-63, (2001).
- [69] Hu, B., Chen, S., "Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation", *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(15), pp. 3266-3273, (2007).
- [70] Zhang, Y., Shen, J., "Effect of temperature and iron concentration on the growth and hydrogen production of mixed bacteria", *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(4), pp. 441-446, (2006).
- [71] Salerno, M. B., Park, W., Zuo, Y., Logan, B. E., "Inhibition of biohydrogen production by ammonia", *Water Research*, 40(6), pp. 1167-1172, (2006).
- [72] Chen, C. C., Lin, C. Y., "Using sucrose as a substrate in an anaerobic hydrogen-producing reactor", *Advances in Environmental Research*, 7(3), pp. 695-699, (2003).
- [73] Luftig, J. T., Jordan, V. S., "Design of experiments in quality engineering (No. 04; T175, L8.)", New York: McGraw-Hill, (1998).
- [74] Ballantyne, K. N., Van Oorschot, R. A., Mitchell, R. J., "Reduce optimisation time and effort: Taguchi experimental design methods", *Forensic Science International: Genetics Supplement Series*, 1(1), pp. 7-8, (2008).
- [75] Lin, C. Y., Lay, C. H., "A nutrient formulation for fermentative hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora", *International Journal of Hydrogen Energy*, 30(3), pp. 285-292, (2005).
- [76] Kumari, S., Das, D., "Improvement of biohydrogen production using acidogenic culture", *International Journal of Hydrogen Energy* 42(7), pp. 4083-4094, (2017).
- [77] Kennedy, M., Krouse, D., "Strategies for improving fermentation medium performance: a review", *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 23(6), pp. 456-475, (1999).
- [78] Bakonyi, P., Nemestóthy, N., Lövitusz, É., Bélafi-Bakó, K., "Application of Plackett-Burman experimental design to optimize biohydrogen fermentation by *E. coli* (XL1-BLUE)", *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(21), pp. 13949-13954, (2011).
- [79] Lin, C. Y., Lay, C. H., "Effects of carbonate and phosphate concentrations on hydrogen production using anaerobic sewage sludge microflora", *International Journal of Hydrogen Energy*, 29(3), pp. 275-281, (2004).
- [80] Pan, C. M., Fan, Y. T., Xing, Y., Hou, H. W., Zhang, M. L., "Statistical optimization of process parameters on biohydrogen production from glucose by *Clostridium* sp. Fanp2", *Bioresource Technology*, 99(8), pp. 3146-3154, (2008).
- [81] Keskin, T., Arslan, K., Abubackar, H. N., Vural, C., Eroglu, D., Karaalp, D., Yanik, J.m., Ozdemir, G. Azbar, N., "Determining the effect of trace elements

- on biohydrogen production from fruit and vegetable wastes", *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(23), pp. 10666-10677, (2018).
- [82] Ginkel, S. V., Sung, S., Lay, J. J., "Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration", *Environmental Science & Technology*, 35(24), pp. 4726-4730, (2001).
- [83] Rai, P., Pandey, A., Pandey, A., "Optimization of sugar release from banana peel powder waste (BPPW) using box-behnken design (BBD): BPPW to biohydrogen conversion", *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(47), pp. 25505-25513, (2019).
- [84] 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", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(7), pp. 1813-1819, (2008).
- [85] Karlsson, A., Vallin, L., Ejlertsson, J., "Effects of temperature, hydraulic retention time and hydrogen extraction rate on hydrogen production from the fermentation of food industry residues and manure", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(3), pp. 953-962, (2008).
- [86] Rasdi, Z., Rahman, N. A. A., Abd-Aziz, S., Lai-Yee, P., Zulkhairi, M., Yusoff, M., Mei-Ling, M., Ali Hassan, M., "Statistical optimization of biohydrogen production from palm oil mill effluent by natural microflora", *The Open Biotechnology Journal*, 3(1), pp. 79-86, (2009).
- [87] Cuetos, M. J., Gomez, X., Escapa, A., Moran, A., "Evaluation and simultaneous optimization of biohydrogen production using 3^2 factorial design and the desirability function", *Journal of Power Sources*, 169(1), pp. 131-139, (2007).
- [88] Lay, J. J., Fan, K. S., Hwang, J. I., Chang, J. I., Hsu, P. C., "Factors affecting hydrogen production from food wastes by *Clostridium*-rich composts", *Journal of Environmental Engineering*, 131(4), pp. 595-602, (2005).
- [89] Lay, J. J., "Modeling and optimization of anaerobic digested sludge converting starch to hydrogen", *Biotechnology and Bioengineering*, 68(3), pp. 269-278, (2000).
- [90] Zhao, B. H., Yue, Z. B., Zhao, Q. B., Mu, Y., Yu, H. Q., Harada, H., Li, Y. Y., "Optimization of hydrogen production in a granule-based UASB reactor", *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(10), pp. 2454-2461, (2008).
- [91] Fan, Y., Li, C., Lay, J. J., Hou, H., Zhang, G., "Optimization of initial substrate and pH levels for germination of sporing hydrogen-producing anaerobes in cow dung compost", *Bioresource Technology*, 91(2), pp. 189-193, (2004).
- [92] Mu, Y., Wang, G., Yu, H. Q., "Response surface methodological analysis on biohydrogen production by enriched anaerobic cultures", *Enzyme and Microbial Technology*, 38(7), pp. 905-913, (2006).
- [93] 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", *Biochemical Engineering Journal*, 23(2), pp. 175-184, (2005).
- [94] Jo, J. H., Lee, D. S., Park, D., Choe, W. S., Park, J. M., "Optimization of key process variables for enhanced hydrogen production by *Enterobacter aerogenes* using statistical methods", *Bioresource Technology*, 99(6), pp. 2061-2066, (2008).
- [95] Chong, M. L., Yee, P. L., Aziz, S. A., Rahim, R. A., Shirai, Y., Hassan, M. A., "Effects of pH, glucose and iron sulfate concentration on the yield of biohydrogen by *Clostridium butyricum* EB6", *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(21), pp. 8859-8865, (2009).
- [96] Martinez-Burgos, W. J., Sydney, E. B., de Paula, D. R., Medeiros, A. B. P., de Carvalho, J. C., Soccol, V. T., de Souza Vandenberghe, L.P., Woiciechowski, A.L. Soccol, C. R. Biohydrogen production in cassava processing wastewater using microbial consortia: process optimization and kinetic analysis of the microbial community. *Bioresource Technology*, 309. Article 123331. (2020).
- [97] Saraphirom, P., Reungsang, A., "Optimization of biohydrogen production from sweet sorghum syrup using statistical methods", *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(24), pp. 13435-13444, (2010).
- [98] Long, C., Cui, J., Liu, Z., Liu, Y., Long, M., Hu, Z., "Statistical optimization of fermentative hydrogen production from xylose by newly isolated *Enterobacter* sp. CN1", *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(13), pp. 6657-6664, (2010).
- [99] Khamtib, S., Reungsang, A., "Co-digestion of oil palm trunk hydrolysate with slaughterhouse wastewater for thermophilic bio-hydrogen production by *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* KKU19", *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(13), pp.6872-6880, (2014).
- [100] Gilmour, S. G., "Response surface designs for experiments in bioprocessing", *Biometrics*, 62(2), pp. 323-331, (2006).
- [101] Bezerra, M. A., Santelli, R. E., Oliveira, E. P., Villar, L. S., Escaleira, L. A. "Response surface methodology (RSM) as a tool for optimization in analytical chemistry", *Talanta*, 76(5), pp. 965-977, (2008).
- [102] Sangyoka, S., Reungsang, A., Lin, C. Y. "Optimization of biohydrogen production from sugarcane bagasse by mixed cultures using a statistical method". *Sustainable Environment Research*, 26(5), pp. 235-242. (2016).

- [103] Boshagh, F., Rostami, K. "A Review of Application of Experimental Design Techniques Related to Dark Fermentative Hydrogen Production", *Journal of Renewable Energy and Environment*, 7(2), pp. 27-42, (2020).
- [104] Lv, C., Xing, Y., Zhang, J., Na, X., Li, Y., Liu, T., Cao, D., Wang, F. Y. "Levenberg–Marquardt backpropagation training of multilayer neural networks for state estimation of a safety-critical cyber-physical system", *IEEE Transactions on Industrial Informatics*, 14(8), pp. 3436-3446, (2017).
- [105] عالم تبریز، ا.، زندیه، م.، رحیمی، م.، "الگوریتم‌های فرا ابتکاری در بهینه‌سازی ترکیبی (ژنتیک، شبکه عصبی، آنیل شبیه‌سازی شده، جستجو ممنوع و الگوریتم مورچگان)"، انتشارات صفّار، (۱۳۹۲).
- [106] Prakasham, R. S., Sathish, T., Brahmaiah, P., "Imperative role of neural networks coupled genetic algorithm on optimization of biohydrogen yield", *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(7), pp. 4332-4339, (2011).
- [107] Wang, J., Wan, W., "Application of desirability function based on neural network for optimizing biohydrogen production process", *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(3): pp. 1253-1259, (2009).