



## An Overview of the Kinetic Mechanism and the Effect of Environmental Parameters on Biohydrogen Production by *Enterobacter* and *Clostridium*

Z. Esfahani Bolandbalaei<sup>1</sup>, Kh. Rostami<sup>2\*</sup>, J. Norouzi<sup>3</sup>, B. Tafaghodinia<sup>4</sup>

1- Ph. D. Student of Microbiology, Islamic Azad University North Tehran Branch, Tehran, Iran

2- Associate Professor of Chemical Engineering, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran

3- Professor of Microbiology, Islamic Azad University North Tehran Branch, Tehran, Iran

4- Assistant Professor of Agricultural Entomology, Iranian Research Organization for Science and Technology, Tehran, Iran

Email: krostami@irost.ir

### Abstract

Biohydrogen production by microorganisms including *Clostridium* and *Enterobacter* are covered. Artificial microbial consortia have no complications as the pure culture. Further avails the effect of environments interaction on each other and yield of hydrogen production. The present review paper discloses the pathway of hydrogen production by *Enterobacter* and *Clostridium*, the rate of growth of the microorganism, The potential of carbohydrate substrate metabolism, pH and temperature influence, and the ratio of experimental to theoretical yield under anaerobic conditions. *Enterobacter* by Pyruvate formate-lyase (PFL) and *Clostridium* Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase (PFOR) yield 2 mol H<sub>2</sub>/ mol glucose and 4 mol H<sub>2</sub>/ mol glucose. On the count of the present comparison 1.36 to 2.205 mol H<sub>2</sub>/mol glucose produced by *Enterobacter* and *Clostridium*, respectively, 38% discrepancy of practical yield is observed. For hydrogen production *Clostridium* needs strict anaerobic environments and L-cysteine are added, while *Enterobacter* in consortia uses oxygen and as a result the production cost is reduced. The consortia are potential to metabolize simple and complex carbon sources like glucose, starch wastewater and lignocellulose wastes. Moreover, reasonably high inoculate ratio of *Enterobacter*, pH, and, temperature ranges of 5-7 and 30-39°C are effective for biohydrogen production.

Received: 24 December 2022

Accepted: 17 March 2023

Page Number: 78-103

### Keywords:

*Enterobacter*,  
*Clostridium*,  
Environmental Parameters,  
Substrate,  
Biohydrogen,  
Microbial Consortia

### Please Cite this Article Using:

Esfahani Bolandbalaei, Z., Rostami, Kh., Norouzi, J., & Tafaghodinia, B. (2024). An Overview of the Kinetic Mechanism and the Effect of Environmental Parameters on Biohydrogen Production by *Enterobacter* and *Clostridium*. *Iranian Chemical Engineering Journal*, 22(131), 78-103, [In Persian].



## مروری بر سازوکار سینتیکی و تأثیر مشخصه‌های محیطی بر تولید زیستی هیدروژن به وسیله آنروباکتر و کلاستریدیوم

زهرا اصفهانی بلندبالایی<sup>۱</sup>، خسرو رستمی<sup>۲\*</sup>، جمیله نوروزی<sup>۳</sup>، بهرام تفقدی نیا<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی دکتری میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

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

۳- استاد میکروبیولوژی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تهران شمال، تهران، ایران

۴- استادیار حشره‌شناسی کشاورزی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

پیام نگار: [krostami@irost.ir](mailto:krostami@irost.ir)

### چکیده

تولید زیستی هیدروژن با کنسرسیوم میکروبی متشکل از کلاستریدیوم‌ها و آنروباکترها بررسی شده است. استفاده از کنسرسیوم مصنوعی میکروبی علاوه بر نداشتن دشواری‌های کشت خالص، امکان بررسی تأثیر شرایط محیطی را بر گونه‌های حاضر و همچنین تأثیر آن‌ها را بر یکدیگر و بر روی بازده تولید هیدروژن فراهم می‌آورد. در این مقاله مروری، به مسیر تولید زیستی هیدروژن در آنروباکترها و کلاستریدیوم‌ها، نسبت بازده تولید هیدروژن عملی به نظری، تعیین سرعت رشد، توانایی استفاده از سوبستراهای کربنی، اعمال شرایط بی‌هوازی، pH و حرارت پرداخته شده است. آنروباکترها از مسیر پیروات فرمات لیز (PFL) و کلاستریدیوم‌ها از مسیر پیروات فردوکسین اکسیدوردوکتاز (PFOR) هیدروژن را با بازده نظری  $2 \text{ mol H}_2/\text{mol glucose}$  و  $4 \text{ mol H}_2/\text{mol glucose}$  تولید می‌کنند، با وجود این، مقایسه پژوهش‌های انجام شده در این مقاله، نشان می‌دهد که میانگین بازده هیدروژن تولید شده در آنروباکترها برابر با  $1/36 \text{ mol H}_2/\text{mol glucose}$  و در کلاستریدیوم‌ها  $2/205 \text{ mol H}_2/\text{mol glucose}$  است که اختلاف بازده عملی ۳۸٪ را نشان می‌دهد. آنروباکترها با بی‌هوازی کردن سریع محیط جای‌گزین مناسب مواد احیاکننده‌ای مانند ال-سیستین هستند و هزینه فرایند را کاهش می‌دهند. این کنسرسیوم در حضور سوبستراهای کربنی ساده و نسبتاً پیچیده مانند پساب‌های ناشسته و لیگنوسلولوزی، نسبت تلقیح زیاد آنروباکتر به کلاستریدیوم، دامنه pH ۵-۷ و دما ۳۰-۳۹°C بازده تولید هیدروژن مناسبی دارد.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۰۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۶

شماره صفحات: ۷۸ تا ۱۰۳

### کلیدواژه‌ها:

آنروباکتر،

مشخصه‌های محیطی،

کلاستریدیوم،

کنسرسیوم‌های میکروبی،

سوبسترا،

زیستی هیدروژن

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

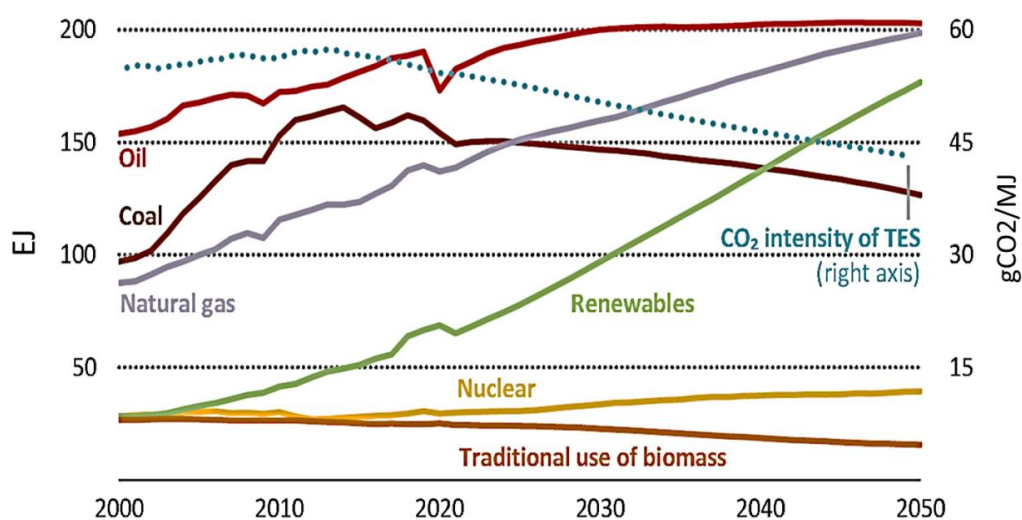
استناد به مقاله:

اصفهانى بلندبالایی، زهرا، رستمی، خسرو، نوروزی، جمیله، و تفقدی نیا، بهرام. (۱۴۰۲). مروری بر سازوکار سینتیکی و تأثیر مشخصه‌های محیطی بر تولید زیستی هیدروژن به وسیله آنروباکتر و کلاستریدیوم، نشریه مهندسی شیمی ایران، ۲۲(۱۳۱)، ۷۸-۱۰۳.

### ۱. مقدمه

آژانس بین‌المللی انرژی<sup>۱</sup> در سال ۲۰۲۱ و براساس توافق‌نامهٔ پاریس، در بخش انرژی جهانی دو گزارش مهم «بررسی جهانی انرژی»<sup>۲</sup> و «صفر خالص تا سال ۲۰۵۰»<sup>۳</sup> را منتشر کرد [۱]. در گزارش «بررسی جهانی انرژی» تقاضای انرژی و میزان انتشار کربن و در گزارش «صفر خالص تا سال ۲۰۵۰» راهنمای انتقال به سامانه‌های انرژی بدون انتشار گازهای گلخانه‌ای تا سال ۲۰۵۰ ارزیابی و ارائه شده‌است. تجزیه و تحلیل‌های اخیر آژانس بین‌المللی انرژی، فناوری‌ها و سیاست‌های مورد نیاز برای کشورهای مناطق را برای دستیابی به سامانه‌های انرژی خالص بدون انتشار گازهای گلخانه‌ای بررسی کرده‌است. در این گزارش مسیرهای فنی، مقرون به صرفه و قابل قبول برای رسیدن به صفر خالص و بیش از ۴۰۰ نقطهٔ عطف روشن مشخص شده‌است. هم‌چنین زمان تبدیل و هدایت اقتصاد جهانی از منطقهٔ تحت سلطهٔ سوخت‌های فسیلی به انرژی‌های تجدیدپذیر مانند آب، باد، خورشیدی، زمین‌گرمایی و زیست‌توده شناسایی شده‌است. شکل (۱) روند استفاده از منابع مختلف انرژی و شدت دی‌اکسیدکربن را از سال ۲۰۰۰ تا سال ۲۰۵۰ نشان می‌دهد. یکی از منابع انرژی پاک و جای‌گزین در آیندهٔ نزدیک هیدروژن است که با احتراق آن تنها آب به‌عنوان محصول جانبی تولید می‌شود. امروزه، مطالعات گسترده و همه‌جانبه بر تولید هیدروژن از

منابع تجدیدپذیر شامل انرژی خورشیدی [۲]، باد [۳]، پیل سوختی [۴] و مواد زیستی انجام می‌شود، با وجود این بیش از ۹۰٪ هیدروژن در جهان از فرایندهای بازآرایی بخار آب با استفاده از سوخت‌های فسیلی تولید می‌شود [۵]. تولید هیدروژن زیستی فرایندی ایمن، دوستدار محیط زیست و دربرگیرندهٔ اقتصاد و توسعهٔ پایدار است [۷]. هیدروژن زیستی با روش‌های فوتولیز مستقیم، فوتولیز غیرمستقیم، تخمیر نوری، تخمیر در تاریکی و تخمیر تاریکی-نوری تولید می‌شود [۸-۱۰] که سه نوع اخیر از برتری‌های ویژه‌ای برخوردار است و کاستی‌های اندکی دارد. سرعت رشد ریزاندامگان و تولید هیدروژن در سامانهٔ تخمیر در تاریکی نسبت به روش‌های دیگر بالاتر است، بنابراین بیشترین مطالعات، ارزیابی و پژوهش بر این روش متمرکز شده‌است [۱۱ و ۱۲]. تخمیر در تاریکی که به دلیل بی‌نیازی از نور، این‌گونه نامیده می‌شود؛ معمولاً با استفاده از کشت‌های خالص یا مخلوط باکتری‌ها انجام می‌پذیرد که در آن قندهای ساده و پیچیده، تجزیه و به اسیدهای آلی فرار، الکل‌ها، هیدروژن و بعضی از گازها تبدیل می‌شود. کلاستریدیوم‌ها، انتروباکتری‌ها، باسیلوس‌ها، ترموتوگاها و کلدی سلولوسیرپتورها تولیدکنندگان اصلی هیدروژن زیستی با روش تخمیر در تاریکی هستند. کلاستریدیوم‌ها و انتروباکتری‌ها به دلیل فراوانی در طبیعت و تولید هیدروژن زیستی در شرایط متعارف از اهمیت خاصی



شکل ۱. روند استفادهٔ انرژی از منابع مختلف و شدت انتشار دی‌اکسیدکربن در جهان از سال ۲۰۰۰ تا ۲۰۵۰ [۱].

Figure 1. The trend of energy consumption from various sources and the intensity of carbon dioxide emissions in the world from 2000 to 2050 [1].

1. International Energy Agency

2. Global Energy Review

3. Net Zero by 2050

مهندسی کنسرسیوم مصنوعی باکتری‌های تولیدکننده هیدروژن سرعت و بازده تولید هیدروژن افزایش می‌یابد [۱۹]. یکی از کنسرسیوم‌های مصنوعی که در آن با انتخاب سوبه‌ها و به‌کارگیری شرایط تخمیری مناسب، افزایش سرعت و بازده تولید هیدروژن پیش‌بینی می‌شود، کنسرسیوم مصنوعی باکتری‌های جنس کلاستریدیوم و خانواده انتروباکتریاسه است. در کلاستریدیوم‌ها هیدروژن از مسیر پیرووات فردوکسین اکسیدوردوکتاز<sup>۲</sup> (PFOR) و در انتروباکترها از مسیر پیرووات فرمات-لیاز<sup>۳</sup> (PFL) تولید می‌شود. شناخت این باکتری‌ها در انتخاب سوبه، نوع سوبسترا، طراحی زیست واکنشگاه و انتخاب شرایط غذایی و محیطی تخمیر، امری اجتناب ناپذیر است. در این مقاله مروری، مسیر تولید هیدروژن زیستی در کلاستریدیوم‌ها و انتروباکترها، نسبت بازده تولید هیدروژن عملی به نظری، تعیین سرعت رشد، توانایی استفاده از سوبستراهای کربنی، اعمال شرایط بی‌هوازی، pH و حرارت بررسی شده است که با مطالعه آن، مسیر روشنی در به‌کارگیری کنسرسیوم مصنوعی کلاستریدیوم‌ها و انتروباکترها گشوده می‌شود.

## ۲. مسیرهای اصلی تولید هیدروژن زیستی و مقایسه میزان بازدهی هیدروژن در جنس کلاستریدیوم و خانواده انتروباکتریاسه

### ۲-۱ مسیرهای اصلی تولید هیدروژن زیستی در جنس کلاستریدیوم

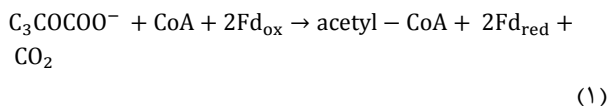
جنس کلاستریدیوم در شاخه فرمیکوت‌ها، رده کلاستریدیا، راسته کلاستریدیالس و خانواده کلاستریدیاسه رده‌بندی می‌شود. در سال ۱۸۸۰ پرز موسکی این جنس را معرفی کرد [۲۱] و تاکنون حدوداً ۲۲۸ گونه و زیرگونه از آن شناسایی شده که یکی از بزرگ‌ترین جنس‌های باکتریایی است. پیشتر، کلاستریدیوم‌ها براساس ویژگی‌های گرم مثبت، تشکیل سپور، رشد بی‌هوازی و ناتوانی در احیای سولفات شناسایی می‌شد، امروزه با تجزیه و تحلیل‌های فیلوژنتیک براساس توالی‌های SsrRNA، بسیاری از آن‌ها در جنس‌های دیگر و حتی جدید تقسیم‌بندی می‌شوند. کلاستریدیوم‌ها باکتری‌های بی‌هوازی هستند، گرچه بسیاری از گونه‌ها مقادیر متفاوتی از اکسیژن را می‌توانند تحمل کنند. اغلب باکتری‌های این

برخوردارند؛ به‌طوری‌که بسیاری از بررسی‌ها روی آن‌ها متمرکز شده‌است. در کشت‌های خالص باکتریایی به‌آسانی می‌توان تغییرات متابولیکی و تأثیر عوامل مختلف را بر بازده و سرعت تولید هیدروژن بررسی کرد. کشت‌های خالص به‌دلایل امکانات، تجهیزات و شرایط کار به‌آسانی آلوده می‌شوند، بنابراین استفاده از کشت‌های مخلوط به‌ویژه با سوبستراهای پیچیده معمولاً رایج است. تأثیرات مطلوب کشت‌های مخلوط و توأم با بهبود تجزیه سوبستراهای پیچیده و حفظ شرایط بی‌هوازی در تولید هیدروژن بررسی شده‌است. علاوه‌بر این، استفاده از کشت‌های مخلوط اجازه می‌دهد تا از سوبستراها و تجهیزات غیرسترون استفاده شود که پیچیدگی‌های فنی را کم می‌کند و صرفه اقتصادی دارد. با این حال استفاده از کشت‌های مخلوط احتمال حضور یا غلبه ریزاندامگان مصرف‌کننده هیدروژن را مانند تولیدکنندگان متان یا باکتری‌های هومواستوتونیک فراهم می‌سازد. راه‌برد به حداقل رساندن ریزاندامگان مصرف‌کننده هیدروژن، پیش‌تیمار مایه تلقیح و یا تیمار در طی فرایند فعال است که شامل افزودن بازدارنده‌های شیمیایی، اعمال شوک حرارتی، افزودن مواد اسیدی یا بازی، هوادهی و کنترل زیستی کینتیک می‌شود که هر کدام از آن‌ها برتری‌ها و کاستی‌هایی دارند [۱۶-۱۳]. در پیش‌تیمارهای حرارتی، اسیدی و بازی باکتری‌های تولیدکننده هیدروژن بدون سپور حذف می‌شود و عمدتاً کلاستریدیوم‌های سپوردار باقی می‌مانند [۱۷]. کنسرسیوم حاصل از پیش‌تیمارها، مخلوطی از انواع باکتری‌ها و به‌عبارتی تعریف‌نشده است که به‌دلیل پیچیدگی واکنش‌ها، سینتیک‌های فرایند، مشکلات بهینه‌سازی و عامل‌های مؤثر فرایند همچون pH و دما و هم‌چنین جنبه‌های اکولوژیکی و عملکردی سامانه، مشکلات فنی زیادی را به وجود می‌آورد [۱۸]. به‌کارگیری کنسرسیومی تعریف‌شده باعث می‌شود تا از مشکلات ذکرشده کاسته و تنظیم بهتری بر تشکیل هیدروژن اعمال شود. بنابراین یک کنسرسیوم تعریف‌شده یا به‌عبارتی مصنوعی، با ریزاندامگانی که به‌خوبی مطالعه شده برای درک بهتر و بیشتر رابطه بین ریزاندامگان و تنظیم فرایندهای پیچیده ضروری است. بازده تولید هیدروژن در سامانه تخمیر در تاریکی دارای شاخصه‌ایی است که «محدوده تأثر» نامیده می‌شود؛ به‌طوری‌که با مصرف یک مول گلوکز و تولید استات به‌عنوان تنها محصول جانبی حاصل از تخمیر، تنها ۴ مول هیدروژن تولید می‌شود. با طراحی و

2. Pyruvate-Ferredoxin Oxidoreductase  
3. Pyruvate Formate-Lyase

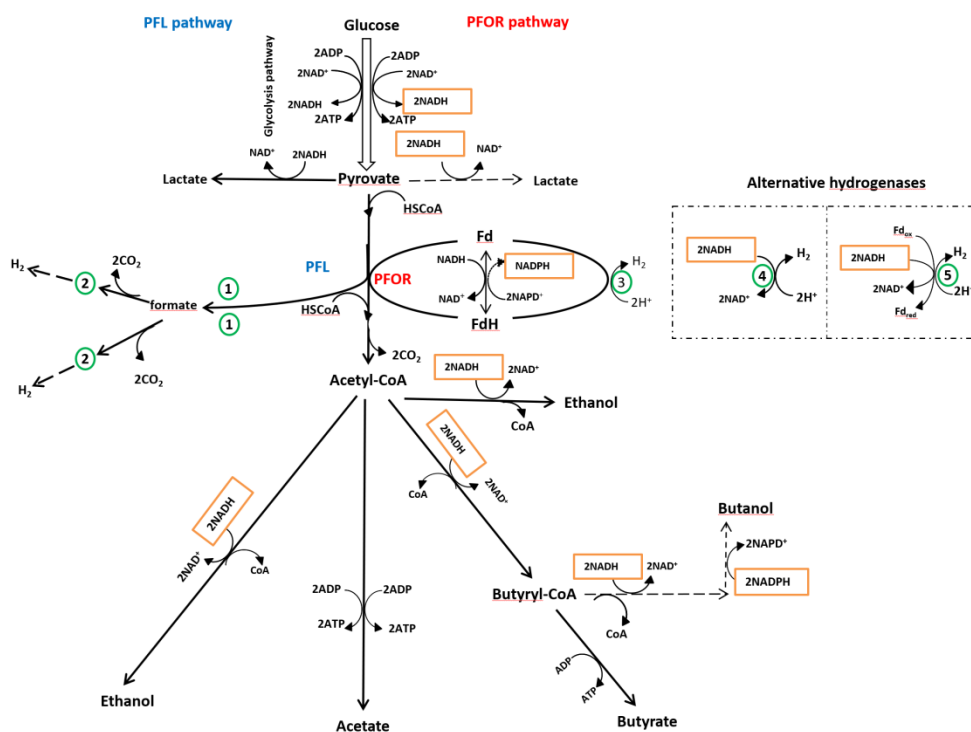
1. Thauer limit

پیروات حاصل از گلیکولیز را اکسید می‌کند و استیل کوآنزیم‌آ، فردوکسین احیاشده و دی‌اکسیدکربن تولید می‌شود (فرمول (۱)) [۲۰]. سپس فردوکسین احیاشده یون هیدروژن را به هیدروژن مولکولی تبدیل و خود اکسید می‌شود (فرمول (۲)) [۲۲]. آنزیم [FeFe] هیدروژناز مسئول کاتالیز این واکنش است [۲۳].



ممکن است در برخی از کلاستریدیوم‌ها در حضور فردوکسین اکسیدوردوکتاز و هیدروژناز، از دوباره‌اکسایش NADH‌های تولیدشده در مسیر گلیکولیز هیدروژن تولید شود (شکل (۲)).

جنس آزادزی و ساپروفیت هستند و برخی نیز مانند کلاستریدیوم تنانی، کلاستریدیوم بوتولینوم و کلاستریدیوم دیفیسیل در انسان و حیوانات بیماری‌زا شناخته شده‌اند که یکی از شاخص‌های آن‌ها تولید سموم بسیار خطرناک است. کلاستریدیوم‌های استوژنی در مسیر وود- لیونگدال با تخمیر قندها یا در شرایط اتوتروفی از CO<sub>2</sub> و H<sub>2</sub> یا CO، استات تولید می‌کنند، هم‌چنین این باکتری‌ها با داشتن آنزیم‌های متفاوت می‌توانند انواع قندها، مولکول‌های بزرگ و پیچیده مانند نشاسته، سلولز، انواع لیگنوسولوز، ترکیبات هالوژنه و ترکیبات آروماتیک را تجزیه کنند. داشتن آنزیم مؤثر و امکان تشکیل سپور سبب می‌شود که از کلاستریدیوم‌ها در تولید بسیاری از محصولات زیستی و هیدروژن استفاده شود. پیروات- فردوکسین اکسیدوردوکتاز (PFOR) در کلاستریدیوم‌ها مسیری است که طی آن از تجزیه قندها، هیدروژن مولکولی تشکیل می‌شود. در این مسیر که در ادامه مسیر گلیکولیز قرار می‌گیرد، کوآنزیم‌آ و فردوکسین،

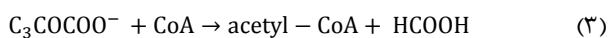


شکل ۲. مسیر تخمیر تولید هیدروژن: مسیر پیروات فرمات- لیاز (PFL) در باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری و مسیر پیروات- فردوکسین اکسیدوردوکتاز (PFOR) در باکتری‌های بی‌هوازی اجباری. آنزیم‌ها: ۱- فرمات هیدروژن لیاز ۲- [NiFe] - هیدروژناز ۳- [FeFe] - هیدروژناز وابسته به فردوکسین و ۴- [FeFe] - هیدروژناز وابسته به NADH ۵- [FeFe] - هیدروژناز وابسته به فردوکسین و NADH [۲۶].

Figure 2. Hydrogen production fermentation pathway: Pyruvate formate-lyase (PFL) pathway in Facultative anaerobic bacteria and Pyruvate-ferredoxin oxidoreductase (PFOR) pathway in obligate anaerobic bacteria. Enzymes: 1- Formate hydrogen lyase 2- [NiFe] - hydrogenase 3- Ferredoxin-dependent [FeFe]- hydrogenase 4- [FeFe]- hydrogenase dependent on NADH 5- [FeFe]- hydrogenase dependent on ferredoxin and NADH [26].

## ۲-۲ مسیرهای اصلی تولید هیدروژن زیستی در خانواده انتروباکتریاسه

خانواده انتروباکتریاسه متعلق به شاخه پروتئوباکترها، رده گاماپروتئوباکتریا و راسته انتروباکتریالس است. بیش از ۳۰ جنس و ۱۲۰ گونه در این خانواده وجود دارد که تقریباً تمام آن‌ها بی‌هوازی اختیاری هستند. این باکتری‌های گرم منفی، تخمیرکننده گلوکز، احیاکننده نیترات و اکسیداز منفی هستند. به استثنای شیگلا و کلبسیلا که غیرمتحرک‌اند، این باکتری‌ها دارای تازوک‌های پری‌تریخ هستند. باکتری‌های خانواده انتروباکتریاسه در انواع بوم‌ها مانند آب، خاک، گیاهان و جانوران در جهان گسترده‌گی دارند. برخی از گونه‌ها در گیاهان بیماری‌زای هستند و از این بابت در تولید محصولات زراعی اهمیت دارند و برخی دیگر مانند *سالمونلا انتریکا*، *سراشیا مارسنسس* و *شیگلا دیسالتری* در انسان بیماری ایجاد می‌کنند. در این میان، برخی از اعضای این خانواده گرم منفی و بدون سپور مانند *انتروباکتر آئروژنز*، *انتروباکتر کلوآسه آ*، *انتروباکتر اسبوریا*، *اشرشیا کلی*، *کلبسیلا اکسی توکا*، *کلبسیلا پنومونیا ECU-15*، *سالمونلا تیفی موریم* و *سیتروباکتر Y19* sp. هیدروژن تولید می‌کنند [۲۴]. در این خانواده هیدروژن از مسیر پیروات- فرمات لیز (PFL) تولید می‌شود. پیروات‌های تولیدشده از مسیر گلیکولیز تحت تأثیر پیروات فرمات لیز به فرمات تبدیل می‌شود (فرمول (۳)). در شرایط بی‌هوازی و در غیاب گیرنده‌های مناسب الکترون و تأثیر هیدروژناز، اسیدفرمیک به هیدروژن و دی‌اکسیدکربن تبدیل می‌شود. در این مسیر، انرژی با تشکیل ATP از راه استیل فسفات حفظ می‌شود (فرمول (۴)).



باکتری‌های انتروباکتریاسه فاقد فردوکسین اکسیدوردوکتاز هستند، بنابراین از NADH و از مسیر گلیکولیز، تولید هیدروژن امکان‌پذیر نیست. با وجود این تداوم گلیکولیز به شرایط بی‌هوازی و تبدیل NADH به NAD<sup>+</sup> وابسته است. بسیاری از ریزاندامگان این مشکل را با کندکردن یا توقف فعالیت پیروات دهیدروژناز و استفاده از

پیروات یا یکی از مشتقات آن به‌عنوان گیرنده الکترون و هیدروژن برای اکسایش مجدد NADH در فرایند تخمیر برطرف می‌کنند [۲۵].

تخمیر اسید فرمیک با دو روش انجام می‌شود: تخمیر مخلوط اسیدی که در آن اتانول و ترکیب پیچیده‌ای از اسیدها به‌ویژه اسید استیک، اسید لاکتیک و اسید فرمیک تشکیل می‌شود. این روش در *اشرشیا کلی*، *سالمونلا*، *پروتئوس* و دیگر جنس‌ها مشاهده می‌شود. روش دوم تخمیر بوتان دی‌آل در انتروباکتر، *سراشیا* و *اروینا* است که پیروات به استوئین تبدیل و سپس استوئین به ۲، ۳- بوتان دی‌آل احیا می‌شود که با NADH همراه است. همزمان، اتانول و مقداری کمتر از اسیدهای تولید می‌شود. تولید این ترکیبات احیاشده، آزادسازی مولکول گازی هیدروژن را محدود می‌کند و در نتیجه بازده هیدروژن در باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری نسبت به کلاستریدیوم‌های بی‌هوازی مطلق کاهش می‌یابد و معمولاً کمتر از ۲ mol H<sub>2</sub>/mol glucose می‌شود [۲۵].

## ۳-۲ مقایسه میزان بازدهی هیدروژن در جنس کلاستریدیوم و خانواده انتروباکتریاسه

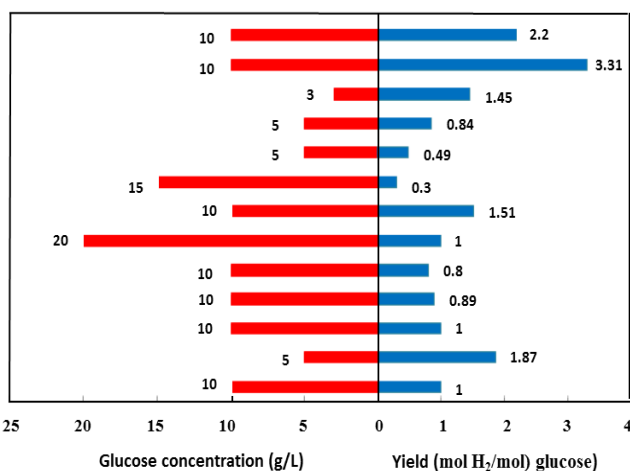
در کلاستریدیوم‌ها به فرض قرارگرفتن گلوکز در مسیر PFOR و اکسیدشدن تمام NADH‌ها به‌طور نظری ۴ مولکول هیدروژن از تخمیر یک مولکول گلوکز به‌دست می‌آید. در صورتی که در انتروباکترهایی که تنها مسیر PFL در آن‌ها وجود دارد و نمی‌توانند برای تولید هیدروژن از NADH استفاده کنند، از دیدگاه نظری ۲ مول هیدروژن از هر مول گلوکز تولید می‌شود [۲۷]. بیشینه بازده هیدروژن حاصل از تخمیر تنها زمانی محقق می‌شود که باکتری رشد نکند و تنها اسیدهای چرب فرار تولید شوند [۲۸]. معمولاً بازده واقعی هیدروژن کمتر از بازده نظری آن است [۲۹] که در دامنه ۱/۲-۲/۳ mol H<sub>2</sub>/mol glucose قرار دارد [۲۸]. صرف نظر از انرژی مورد نیاز رشد و تولید زیست‌توده، اگر گلوکز در مسیرهایی قرار گیرد که به تولید هیدروژن نمی‌انجامد، بازده تولید کاهش می‌یابد. دستیابی به بازده‌ای نزدیک به بازده استوکیومتری در سرعت رشد آرام و فشار جزئی پایین، عملی است. از مطالعه مطالب ذکرشده، برآورد می‌شود که بازده تولید هیدروژن زیستی در انتروباکترها ۱۰٪ کمتر از کلاستریدیوم‌هاست. بر این اساس

### ۳. سرعت رشد و سازوکار سینتیکی

در طول تولید هیدروژن زیستی، غلظت سوبسترا، رشد باکتری، غلظت هیدروژن و برخی متابولیت‌های محلول مانند اسید استیک، اسید بوتیریک و اتانول به‌طور منظم تغییر می‌کند. برخی از مدل‌های سینتیکی برای توصیف چنین تغییراتی پیشنهاد شده‌اند که در میان آن‌ها مدل اصلاح شده گمپرتز که زیترینگ و همکاران آن را ارائه داده‌اند (فرمول (۵))، کاربرد فراوانی دارد [۵۹].

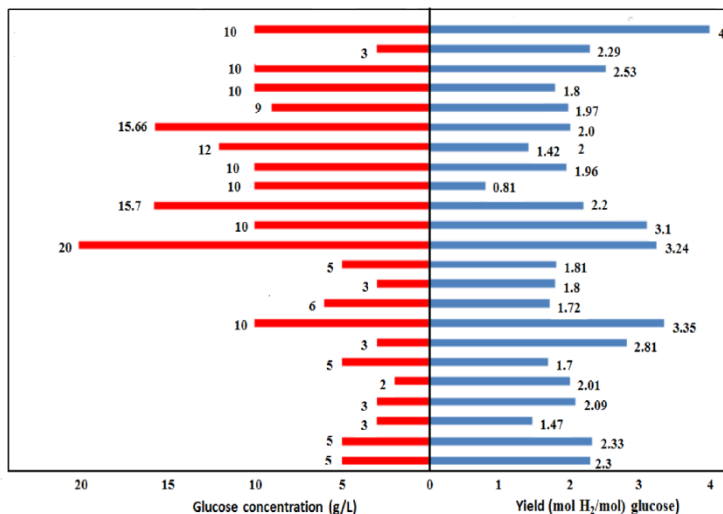
۱۳ پژوهش تولید هیدروژن توسط انتروباکترها و ۲۳ پژوهش تولید هیدروژن به‌وسیله کلاستریدیوم‌ها در حضور منبع کربنی گلوکز، انتخاب و بازده هیدروژن بررسی شد (شکل (۳)). نتایج این بررسی نشان می‌دهد که میانگین بازده تولید هیدروژن در انتروباکترها با مصرف متوسط ۹/۸۶ g/L گلوکز، ۱/۳۶ mol H<sub>2</sub>/mol glucose و در کلاستریدیوم‌ها با مصرف متوسط ۸/۰۵ g/L گلوکز، ۲/۲۰۵ mol H<sub>2</sub>/mol glucose است. باوجود تفاوت بازده نظری ۱۰۰٪ این دو گروه، میانگین بازده عملی انتروباکترها ۳۸٪ کمتر از کلاستریدیوم‌ها به‌دست آمد. بنابراین، با انتخاب دو سویه مناسب از کلاستریدیوم‌ها و انتروباکترها می‌توان بازده تولید هیدروژن مناسبی حاصل کرد.

*Enterobacter cloacae* IIT-BT8 [30]  
*Enterobacter cloacae* DM11 [31]  
*Escherichia coli* K12 MG1655 [32]  
*Escherichia coli* S3 [33]  
*Escherichia coli* S6 [33]  
*Escherichia coli* WDHL [34]  
*Escherichia coli* DJT135 [35]  
*Enterobacter aerogenes* HO-39 [36]  
*Enterobacter aerogenes* HO-39 [36]  
*Enterobacter aerogenes* strain E 82005 [37]  
*Enterobacter aerogenes* strain E 82005 [38]  
*Enterobacter aerogenes* W23 [39]  
*Enterobacter aerogenes* HO-39 [40]



(a)

*Clostridium butyricum* strain SE [41]  
*Clostridium tyrobutyricum* ATCC 25755 [42]  
*Clostridium tyrobutyricum* FYa102 [43]  
*Clostridium butyricum* W5 [32]  
*Clostridium* Sp.R1 [44]  
*Clostridium butyricum* CWBI1009 [45]  
*Clostridium beijerinckii* L9 [43]  
*Clostridium* DMHC-10 [46]  
*Clostridium* DMHC-10 [46]  
*Clostridium acetobutylicum* M121 [43]  
*Clostridium tyrobutyricum* JMI [48]  
*Clostridium tyrobutyricum* JMI [49]  
*Clostridium butyricum* TM-9A [50]  
*Clostridium butyricum* EB6 [51]  
*Clostridium butyricum* W5 [52]  
*Clostridium beijerinckii* RZF-1108 [53]  
*Clostridium tyrobutyricum* FYa102 [54]  
*Clostridium butyricum* CICC [55]  
*Clostridium beijerinckii* RZF-1108 [56]  
*Clostridium beijerinckii* AM21B [57]  
*Clostridium beijerinckii* Fanp 3 [58]  
*Clostridium butyricum* ATCC19398 [43]  
*Clostridium butyricum* strain SE [41]



(b)

شکل ۳. مقایسه بازده عملی تولید هیدروژن و مصرف گلوکز در انتروباکترها و کلاستریدیوم‌ها.

Figure 3. Comparison of practical yield of hydrogen production and glucose Consumption in *Enterobacter* and *Clostridium*.

$$X = X_0 + Y_{x/s} (S_0 - S) \quad (۸)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \frac{R_{max} S}{K_s + S} X \quad (۹)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \frac{R_{max} S}{S_s + S - S^2 / K_1} X \quad (۱۰)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \frac{R_{max} S}{K_s + S - S^2 / K_1} X \quad (۱۱)$$

کومار و همکاران برای تجزیه گلوکز و رشد/انتروباکتر کلواسه IIT-BT 08 در سامانه ناپیوسته از مدل مونود کلاسیک (فرمول‌های (۸) و (۹)) و اندرو اصلاح شده (فرمول‌های (۸) و (۱۰)) استفاده و مدل اندرو را مناسب معرفی کردند [۶۳]. نات و همکاران نیز برای پیشرفت تجزیه گلوکز و رشد/انتروباکتر کلواسه DM11 در سامانه‌های ناپیوسته مدل مونود پیشرفته (فرمول (۸) و (۹)) و مدل اندرو (فرمول‌های (۸) و (۱۱)) را بررسی کردند و مدل دوم را مناسب تشخیص دادند [۶۴]. مناسب بودن مدل اندرو اصلاح شده و مدل اندرو به دلیل در نظر گرفتن اثرات بازدارندگی سوبستراست، درحالی که مدل کلاسیک مونود این اثر را در نظر نمی‌گیرد.

$$I_{pH} = \exp \left[ -3 \left( \frac{pH - pH_{UL}}{pH_{UL} - pH_{LL}} \right)^2 \right] \quad (۱۲)$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{-1}{Y_{x/s}} \frac{R_{max} S}{K_s + S} X I_{pH} \quad (۱۳)$$

$$\frac{dX}{dt} = \frac{R_{max} S}{K_s + S} X I_{pH} - k_d X \quad (۱۴)$$

نتایکو و همکاران با در نظر گرفتن مهار pH و فرمول‌های تجزیه زیست‌توده (فرمول‌های (۱۴)-(۱۲))، از دو مدل پیشرفته مونود اصلاح شده برای توصیف پیشرفت تجزیه گلوکز و رشد رومینوکوکوس آلبوس در سامانه ناپیوسته استفاده کردند [۶۵]. علاوه بر این لین و همکاران مدل هضم بی‌هوازی شماره ۱ را اصلاح کردند و آن را در بررسی پیشرفت تجزیه گلوکز، رشد کلاستریدیوم و تولید هیدروژن، بوتیرات، استات و اتانول در سامانه ناپیوسته به کار گرفتند [۴۳]. به طور کلی، مدل گومپرتز اصلاح شده را می‌توان در

$$H = H_{max} \times \exp \left\{ - \exp \left[ \frac{R_{max} e}{H_{max}} (\lambda - t) + 1 \right] \right\} \quad (۵)$$

$$H = \frac{H_{max}}{1 + \exp[4R_{max}(\lambda - t)/H_{max} + 2]} \quad (۶)$$

زمانی که فرمول (۵) برای توصیف پیشرفت تجزیه سوبسترا در شرایط ناپیوسته به کار می‌رود، H و H<sub>max</sub> به ترتیب نشان‌دهنده مقدار سوبسترای تجزیه شده جمع یافته و بیشینه سوبسترای تجزیه شده هستند و هنگامی که از این معادله برای توصیف پیشرفت رشد باکتری‌های تولیدکننده هیدروژن استفاده می‌شود، H و H<sub>max</sub> به ترتیب نشان‌دهنده مقدار رشد باکتری‌های تولیدکننده هیدروژن جمع یافته و بیشینه رشد باکتری‌های تولیدکننده هیدروژن هستند. زمانی که باکتری‌ها در سامانه ناپیوسته در محیط مایع کشت می‌شوند، نخست خود را با شرایط محیطی سازگار می‌کنند. طی این زمان تقسیم باکتریایی و رشد انجام نمی‌شود و تولید هیدروژن بسیار اندک است. این مرحله که فاز تأخیری نامیده می‌شود، از زمان صفر تا λ به طول می‌انجامد. پس از آن سرعت تولید تا R<sub>max</sub> افزایش می‌یابد و در نهایت H<sub>max</sub> حاصل می‌شود.

ونگ و ون از مدل لجستیک اصلاح شده (فرمول (۶)) برای تولید هیدروژن از گلوکز در سامانه ناپیوسته استفاده کردند [۶۰]. همچنین مو و همکاران این مدل را برای رشد باکتری‌های تولیدکننده هیدروژن به کار بردند [۶۱]. علاوه بر این، این گروه توانایی مدل گومپرتز اصلاح شده، مدل لجستیک اصلاح شده و ریچاردز اصلاح شده را برای توصیف پیشرفت رشد باکتری‌های تولیدکننده هیدروژن در سامانه ناپیوسته بررسی و برترین مدل را گومپرتز اصلاح شده، معرفی کردند و نیز مو و همکاران از مدل لجستیک (فرمول (۷)) برای توصیف پیشرفت رشد باکتری‌های تولیدکننده هیدروژن در سامانه ناپیوسته استفاده کردند [۶۲].

$$X = \frac{X_0 \exp(k_c t)}{1 - (X_0/X_{max})(1 - \exp(k_c t))} \quad (۷)$$

مقایسه مدل لجستیک (فرمول (۷)) با مدل لجستیک اصلاح شده (فرمول (۶)) زمان فاز تأخیری رشد باکتری‌های تولیدکننده هیدروژن را به طور مستقیم با داده‌های آزمایشگاهی برازش می‌کند، بنابراین می‌توان برای پیشرفت رشد باکتری‌ها از آن بهره جست.



سامانه ناپیوسته برای توصیف پیشرفت تجزیه سوبسترا، رشد باکتری‌های تولیدکننده هیدروژن و تولید برخی متابولیت‌های محلول استفاده کرد. علاوه بر این می‌توان ثابت‌هایی برای درک بهتر فرایند به دست آورد. مدل لجستیک اصلاح شده نیز مشابه با مدل گومپرتز اصلاح شده است؛ با این تفاوت که کاربرد گسترده‌ای ندارد. به کارگیری این مدل‌ها در مهندسی کنسرسیوم باکتریایی دارای اهمیت است. بسحاق و همکاران پیشرفت تولید هیدروژن *انتروباکتر آئروژنز* PTCC 1221 آزاد و تثبیت شده را بر نانولوله‌های کربنی چندلایه بررسی کردند [۶۶]. برآزش نتایج پژوهش آن‌ها با روش گومپرتز اصلاح شده، نشان می‌دهد که  $R_{max}$ ،  $H_{max}$  و  $\lambda$  در سلول‌های آزاد به ترتیب ۱۷۸ mL/h، ۱۰۴ mL/h و ۳/۲h است، در صورتی که در سلول‌های تثبیت شده تغییر مقادیر به ترتیب ۱۹۴ mL/h، ۱۱۹ mL/h و ۱/۱ h دیده می‌شود. این گروه تحقیقاتی در مطالعه دیگری پیشرفت تولید هیدروژن *انتروباکتر آئروژنز* PTCC 1221 را بر چهار پایه با گروه‌های عاملی متفاوت بررسی کردند [۶۷]. نتایج پژوهش آن‌ها با مدل گومپرتز برآزش شده که نشان می‌دهند باکتری‌های تثبیت شده بر فیبر کربنی بیمار شده دارای بهترین  $R_{max}$ ،  $H_{max}$  و  $\lambda$  به ترتیب برابر با ۱۱۹ mL/h، ۸۲ mL/h و ۰/۹ h هستند. ژئونگ و همکاران پیشرفت تولید چهار باکتری تولیدکننده هیدروژن: *کلاستریدیوم بیجریکی*، *رودوباکتر سفروئیدز*، باکتری‌های بی‌هوازی جداسازی شده از هاضم بی‌هوازی و *باسیلوس مگاتریوم* را در حضور مقادیر مختلف گلوکز با مدل گومپرتز بررسی کردند [۶۸]. در پژوهش آن‌ها، *کلاستریدیوم بیجریکی* بیشترین مقدار هیدروژن را تولید می‌کند. با افزایش غلظت گلوکز از ۵ g/L به ۲۰ g/L مقدار  $R_{max}$ ،  $H_{max}$  و  $\lambda$  نیز افزایش می‌یابد و به ترتیب به مقادیر ۳۰۰ mL/h، ۷ mL/h و ۷ h می‌رسد. یِن و ونگ، *کلاستریدیوم بوتیریکوم* INET1 را از لجن هضم شده جداسازی و مشخصه‌های مقدار هیدروژن،  $R_{max}$  و  $\lambda$  را با مدل گومپرتز در محیط‌های کشت دارای منابع کربنی گلوکز، زایلوز، سوکروز، لاکتوز، نشاسته و گلیسرول بررسی کردند [۶۹]. نتایج پژوهش آن‌ها نشان می‌دهد که ۲۱۵/۹ mL هیدروژن پس از ۱۰/۴ ساعت ( $\lambda$ ) با بیشینه سرعت تولید هیدروژن ۳۰/۲ mL/h تولید می‌شود. بررسی تولید هیدروژن با مدل‌های کینتیکی در *انتروباکترها* و *کلاستریدیومها* نشان می‌دهد که  $R_{max}$ ،  $H_{max}$  و  $\lambda$  در این دو

گروه بسیار متفاوت است و *انتروباکترها* با سرعت بسیار بالاتری نسبت به *کلاستریدیومها* رشد می‌کنند. گرچه بسیاری از مطالعات به نسبت مساوی از دو باکتری در محیط کشت تلقیح می‌کنند [۷۰] با این حال اگال و همکارانش برای دستیابی به بازده هیدروژن بیشتر در کنسرسیوم مهندسی شده، نسبت‌های ۱:۱۰۰، ۱:۱۰۰۰ و ۱:۱۰۰۰۰ را از دو باکتری *انتروباکتر آئروژنز* و *کلاستریدیوم استوبوتیلیکوم* بررسی کردند [۱۲]. آن‌ها نشان دادند که در نسبت ۱:۱۰۰۰۰ بیشینه سرعت تولید هیدروژن برابر با  $10^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ mmolL}^{-1}$  با گلوکز و  $10^{-1} \text{ h}^{-1} \text{ mmolL}^{-1}$  با سلوبیوز حاصل می‌شود. نتایج آن‌ها به روشی نشان می‌دهد که کنسرسیوم تهیه شده با نسبت ۱:۱۰۰۰۰ دارای بیشینه سرعت تولید هیدروژن بیشتری است. ارگال برای اولین بار چنین نسبتی را گزارش کرده است. هسیپر و همکارانش نیز در رشد توام *انتروباکتر آئروژنز* DSM 30053 و *کلاستریدیوم استوبوتیلیکوم* DSM 792 این نسبت بهینه را برای تولید هیدروژن در واکنشگاه ناپیوسته با سوبسترای سلوبیوز در نظر گرفتند [۷۱]. بنابراین، سرعت رشد یکی از مشخصه‌های اساسی در مهندسی مصنوعی کنسرسیوم باکتری‌های *انتروباکتر* و *کلاستریدیوم* است که تاکنون اثرات آن به خوبی شناخته نشده و نیاز به مطالعات بیشتر دارد.

#### ۴. عوامل محیطی

##### ۴-۱ تاثیر منابع کربنی

منابع کربنی که به دو گروه ساده و پیچیده تقسیم‌بندی می‌شوند بر کینتیک واکنش، تولید متابولیت‌ها و هم چنین بازده هیدروژن مؤثرند. *انتروباکترها* و *کلاستریدیومها* توانایی استفاده از طیف وسیعی از قندهای ساده را مانند گلوکز، فروکتوز، گالاکتوز، زایلوز، مانوز، آرابینوز، سوکروز، ترهالوز و غیره دارند (جدول (۱)). گلوکز اولین مونساکاریدی است که مصرف آن در جدایه‌های تولیدکننده هیدروژن بررسی می‌شود؛ زیرا به راحتی جذب سلول و مستقیماً وارد مسیر گلیکولیز می‌شود. بنابراین در اکثر تحقیقات به منظور به دست آوردن جدایه مناسب با تولید هیدروژن بالا، مصرف گلوکز بررسی می‌شود. برخی پژوهش‌ها نشان می‌دهد که استفاده همزمان از این باکتری‌ها در محیط کشت دارای برتری است. سپتا و همکارانش تولید هیدروژن زیستی را با به کارگیری *کلاستریدیوم*

گلوکز، مؤثرتر مصرف می‌شود؛ به طوری که قبل از رسیدن به pH محدودکننده رشد، در کشت توام هیدروژن بیشتری ( $5/85 \text{ mmol H}_2$ ) نسبت به کشت کلاستریدیوم بوتیریکوم ( $4/62 \text{ mmol H}_2$ ) تولید می‌شود.

بوتیریکوم، اشرشیا کلی و مخلوط دو باکتری در حضور گلوکز بررسی کردند [۳۸]. در پژوهش آنان، گرچه بازده هیدروژن در کشت توام ( $1/65 \text{ mol H}_2/\text{mol glucose}$ ) نسبت به کشت کلاستریدیوم بوتیریکوم ( $2/9 \text{ mol H}_2/\text{mol glucose}$ ) کمتر است، با وجود این

جدول ۱. بازده تولید هیدروژن از قندهای ساده به وسیله انتروباکترها و کلاستریدیوم‌ها.

Table 1. Hydrogen production yield using simple sugars by Enterobacter and Clostridium.

Organisem	Substrat/(g/L)	Cultivation condition /Temperature (°C)/pH	H <sub>2</sub> Yield	References
Enterobacteriaceae				
Monosaccharide				
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	Glucose/ 10	Batch/36/6	2.2 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[40]
<i>Enterobacter cloacae</i> DM11	Glucose/ 10	Batch/37/6.5	3.31 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[39]
<i>Escherichia coli</i> K-12 MG1655	Glucose/ 3	Batch/37/6.5	1.45 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[38]
<i>Escherichia coli</i> S3	Glucose/ 5	Batch/30/6.8	0.84 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[37]
<i>Escherichia coli</i> S6	Glucose/ 5	Batch/30/6.8	0.49 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[37]
<i>Escherichia coli</i> WDHL	Glucose/ 15	Batch/37/6	0.3 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[36]
<i>Escherichia coli</i> DJT135	Glucose/ 10	Batch/35/6.5	1.51 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[35]
<i>Enterobacter aerogenes</i> HO-39	Glucose/ 10	Batch/38/6.5	1 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[34]
<i>Enterobacter aerogenes</i> HO-39	Glucose/ 10	Fed batch/37/6.5	0.8 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[34]
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC29007	Glucose/ 21.25	Batch/38/6.13	-	[39]
<i>Enterobacter aerogenes</i> E 82005	Glucose/ 10	Batch/37/5.8	0.89 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[33]
<i>Enterobacter aerogenes</i> E 82005	Glucose/ 10	Batch/38/5.8	1 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[32]
<i>Enterobacter aerogenes</i> W23	Glucose/ 5	Batch/35/6.5	1.87 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[31]
<i>Enterobacter aerogenes</i> HO-101	Glucose/ 10	Batch/37/6.3	1.97 (mol H <sub>2</sub> /mol substrate)	[30]
<i>Escherichia coli</i> DJT135	Arabinose/ 10	Batch/35/6.5	1.02 (mol H <sub>2</sub> /mol arabinose )	[35]
<i>Enterobacter aerogenes</i> IAM 1183	Arabinose/ 10	Batch/37/6.3	1.56 (mol H <sub>2</sub> /mol hexose equivalent )	[73]
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	Arabinose/ 10	Batch/36/6	1.5 (mol H <sub>2</sub> /mol arabinose )	[40]
<i>Enterobacter aerogenes</i> IAM 1183	Rhamnose/ 5	Batch/37/6.3	0.48 (mol H <sub>2</sub> /mol hexose equivalent)	[73]

Organisem	Substrat/(g/L)	Cultivation condition /Temperature (°C)/pH	H <sub>2</sub> Yield	References
<i>Escherichia coli</i> DJT135	Xylose/ 10	Batch/35/6.5	0.57 (mol H <sub>2</sub> /mol xylose )	[35]
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	Xylose/ 10	Batch/36/6	0.95 (mol H <sub>2</sub> /mol xylose )	[40]
<i>Enterobacter aerogenes</i> IAM 1183	Xylose/ 5	Batch/37/6.3	2.64 (mol H <sub>2</sub> /mol hexose equivalent)	[73]
<i>Escherichia coli</i> DJT135	Fructose/ 10	Batch/35/6.5	1.27 (mol H <sub>2</sub> /mol fructose)	[35]
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	Fructose/ 10	Batch/36/6	1.6 (mol H <sub>2</sub> /mol fructose)	[40]
<i>Enterobacter aerogenes</i> HO-101	Fructose/ 10	Batch/37/6.3	2.17 (mol H <sub>2</sub> /mol substrate)	[30]
<i>Enterobacter aerogenes</i> IAM 1183	Galactose/ 10	Batch/37/6.3	0.48 (mol H <sub>2</sub> /mol hexose equivalent)	[73]
<i>Escherichia coli</i> DJT135	Galactose/ 10	Batch/35/6.5	0.69 (mol H <sub>2</sub> /mol galactose)	[35]
<i>Enterobacter aerogenes</i> HO-101	Galactose/ 10	Batch/37/6.3	1.9 (mol H <sub>2</sub> /mol substrate)	[30]
<i>Enterobacter aerogenes</i> IAM 1183	Mannose/ 10	Batch/37/6.3	0.96 (mol H <sub>2</sub> /mol hexose equivalent)	[73]
Clostridium				
Monosaccharide				
<i>Clostridium</i> DMHC-10	Glucose/ 10	Batch/37/5	3.35 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[46]
<i>Clostridium</i> Sp.R1	Glucose/ 2	Batch/30/6	2.01 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[44]
<i>Clostridium beijerinckii</i> L9	Glucose/ 3	Batch/35/7.2	2.81 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[43]
<i>Clostridium beijerinckii</i> Fanp 3	Glucose/ 10	Batch/35/6.47-6.98	2.52 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[58]
<i>Clostridium beijerinckii</i> AM21B	Glucose/ 10	Batch/36/6.5	1.8 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[57]
<i>Clostridium beijerinckii</i> RZF-1108	Glucose/ 9	Batch/35/7	1.97 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[56]
<i>Clostridium beijerinckii</i> ATCC 8260	Glucose/ 2.34	Batch/30/6.3	-	[74]
<i>Clostridium beijerinckii</i> L9	Glucose/ 6	Batch/35/6.4	1.72 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[47]
<i>Clostridium beijerinckii</i> RZF-1108	Glucose/ 10	Batch/35/6.5	1.96 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[53]
<i>Clostridium butyricum</i> ATCC19398	Glucose/ 3	Batch/35/7.2	2.26 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[43]
<i>Clostridium butyricum</i> W5	Glucose/ 10	Batch/39/6.5	0.81 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[52]
<i>Clostridium butyricum</i> EB6	Glucose/ 15.7	Batch/37/5.6	2.2 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[51]
<i>Clostridium butyricum</i> CWBI1009	Glucose/ 5	Batch/30/5.2	1.7 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[45]
<i>Clostridium butyricum</i> TM-9A	Glucose/ 10	Batch/37/8	3.1 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[50]

Organisem	Substrat/(g/L)	Cultivation condition /Temperature (°C)/pH	H <sub>2</sub> Yield	References
<i>Clostridium butyricum</i> W5	Glucose/ 3	Batch/37/6.5	2.09 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[38]
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> FYa102	Glucose/ 3	Batch/35/7.2	1.47 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[43]
<i>Clostridium acetobutylicum</i> M121	Glucose/ 3	Batch/35/7.2	1.8 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[43]
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> JMI	Glucose/ 20	Batch/37/6.3	3.24 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[49]
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> JMI	Glucose/ 5	CSTR /37/6.3	1.81 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[48]
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> ATCC 25755	Glucose/ 50	Fed batch /37/5.7	2.33 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[43]
<i>Clostridium tyrobutyricum</i> FYa102	Glucose/ 12	CSTR /35/6	1.42 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[54]
<i>Clostridium butyricum</i> strain SC-E1	Glucose/ 5	Continious /37/6.7	2-2.3 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[41]
<i>Clostridium butyricum</i> strain SC-E1	Glucose/ 10	Continious /37/6.7	1.2-4 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[41]
<i>Clostridium butyricum</i> CICC 20763	Glucose/ 15.66	Batch/35/6.5	2.02 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose) <sup>a</sup>	[55]
<i>Clostridium butyricum</i> CICC 20763	Glucose/ 15.66	Batch/35/6.5	2.02 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose) <sup>b</sup>	[55]
<i>Clostridium butyricum</i> TM-9A 3	Arabinose/ 10	Batch/37/8	0.06 (mol H <sub>2</sub> /mol arabinose )	[50]
<i>Clostridium butyricum</i> TM-9A 3	ribose/ 10	Batch/37/8	0.84 (mol H <sub>2</sub> /mol ribose )	[50]
<i>Clostridium butyricum</i> TM-9A 3	xylose/ 10	Batch/37/8	0.59 (mol H <sub>2</sub> /mol xylose)	[50]
<i>Clostridium</i> Sp.R1	xylose/ 2	Batch/30/6	0.633 (mol H <sub>2</sub> /mol xylose)	[44]
<i>Clostridium butyricum</i> TM-9A 3	Fructose / 10	Batch/37/8	0.84 (mol H <sub>2</sub> /mol Fructose)	[50]
<i>Clostridium butyricum</i> TM-9A 3	Galactose / 10	Batch/37/8	0.86 (mol H <sub>2</sub> /mol galactose)	[50]
<i>Clostridium</i> Sp.R1	Galactose / 2	Batch/30/6	1.66 (mol H <sub>2</sub> /mol galactose)	[50]
<i>Clostridium butyricum</i> TM-9A 3	Mannose / 10	Batch/37/8	0.67 (mol H <sub>2</sub> /mol Mannose)	[44]
<i>Clostridium</i> Sp.R1	Mannose / 2	Batch/30/6	1.68 (mol H <sub>2</sub> /mol Mannose)	[50]
Enterobacteriaceae				
Disaccharide				
<i>Escherichia coli</i> DJT135	Trehalose/ 10	Batch/35/6.5	1.03 (mol H <sub>2</sub> /mol Trehalose)	[35]
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	Cellobiose/ 10	Batch/36/6	5.4 (mol H <sub>2</sub> /mol cellobiose )	[40]
<i>Escherichia coli</i> DJT135	Sucrose/ 10	Batch/35/6.5	0.7 (mol H <sub>2</sub> /mol Sucrose )	[35]

Organisem	Substrat/(g/L)	Cultivation condition /Temperature (°C)/pH	H <sub>2</sub> Yield	References
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	Sucrose/ 10	Batch/36/6	6 (mol H <sub>2</sub> /mol Sucrose)	[40]
<i>Escherichia coli</i> WDHL	Galactose/ 15	Batch/37/6	1.12 (mol H <sub>2</sub> /mol galactose )	[36]
<i>Escherichia coli</i> DJT135	Lactose / 10	Batch/35/6.5	0.73 (mol H <sub>2</sub> /mol lactose)	[35]
<i>Escherichia coli</i> WDHL	Lactose / 15	Batch/37/6	1.02 (mol H <sub>2</sub> /mol lactose )	[36]
<i>Escherichia coli</i> WDHL	Maltose / 10	Batch/37/5	0.729 (mol H <sub>2</sub> /mol maltose )	[36]
<i>Escherichia coli</i> DJT135	Maltose/ 10	Batch/35/6.5	0.72 (mol H <sub>2</sub> /mol maltose )	[35]
<i>Enterobacter aerogenes</i> HO-39	Maltose/ 10	Batch/38/6.5	2.16 (mol H <sub>2</sub> /mol maltose )	[75]
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	Maltose/ 10	Batch/36/6	1.4(mol H <sub>2</sub> /mol xylose )	[40]
Clostridium				
Disaccharide				
<i>Clostridium butyricum</i> TM-9A 3	Cellobiose/ 10	Batch/37/8	0.94 (mol H <sub>2</sub> /mol cellobiose )	[50]
<i>Clostridium</i> Sp.R1	Cellobiose/ 2	Batch/30/6	3.52 (mol H <sub>2</sub> /mol cellobiose )	[44]
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Cellobiose/ 5	Batch/35/6.5	2.3(mol H <sub>2</sub> /mol cellobiose)	[73]
<i>Clostridium butyricum</i> TM-9A 3	Sucrose/ 10	Batch/37/8	1.49 (mol H <sub>2</sub> /mol Sucrose)	[50]
<i>Clostridium</i> Sp.R1	Sucrose / 2	Batch/30/6	3.09 (mol H <sub>2</sub> /mol Sucrose)	[44]
<i>Clostridium butyricum</i> TISTR 1032	Sucrose/ 22.3	Batch/37/6.5	1.34 (mol H <sub>2</sub> /mol sucrose)	[76]
<i>Clostridium butyricum</i> CGS5	Sucrose/ 17.8	Batch/37/5.5	2.78(mol H <sub>2</sub> /mol sucrose)	[77]
<i>Clostridium</i> Sp.R1	Lactose/ 2	Batch/30/6	3.24 (mol H <sub>2</sub> /mol lactose )	[44]
<i>Clostridium</i> Sp.R1	maltose/ 2	Batch/30/6	3.13 (mol H <sub>2</sub> /mol maltose )	[44]
Clostridium				
Oligosaccharide				
<i>Clostridium butyricum</i> TM-9A 3	raffinose)/ 10	Batch/37/8	2.7 (mol H <sub>2</sub> /mol raffinose)	[50]
<i>Clostridium butyricum</i> TM-9A 3	trehalose / 10	Batch/37/8	1.61 (mol H <sub>2</sub> /mol trehalose)	[50]
a: in 250 mL battel b:in 3L reactor				

استفاده از آن در تولید هیدروژن با داشتن ناخالصی‌های آلی دارای بازده بیشتر و مقرون به صرفه است. مطالعات پاچپور نشان می‌دهد *انتروباکتر آئروژنز* در محیط دارای گلیسرول خام و بدون منابع نیتروژنی و املاح حدود  $15/77 \text{ mmol-H}_2/\text{L-medium}$  هیدروژن تولید می‌کند که نسبت به تولید کلاستریدیوم بوتیریکوم ( $13/84 \text{ mmol-H}_2/\text{L-medium}$ ) و کشت توأم ( $12/12 \text{ mmol-H}_2/\text{L-medium}$ ) بیشتر است. با وجود این استفاده از محیط کشت پایه (دارای منابع نیتروژنی و نمک‌ها) و گلیسرول خام، بازده تولید هیدروژن در کشت توأم را افزایش می‌دهد و به بیشینه  $19/46 \text{ mmol-H}_2/\text{L-medium}$  می‌رساند که نسبت به کشت منفرد *انتروباکتر آئروژنز* NRRL B-407 ( $15/64 \text{ mmol-H}_2/\text{L-medium}$ ) و کشت کلاستریدیوم بوتیریکوم ( $17/44 \text{ mmol-H}_2/\text{L-medium}$ ) بیشتر است. در کشت توأم، تخمیر گلیسرول از مسیر احیایی به اکسیداتیو تغییر می‌کند و تولید  $1/3$  پروپان دی آل کاهش می‌یابد. تولید  $1/3$  پروپان دی آل با مصرف NADH و کاهش تولید هیدروژن همراه است.

معمولاً به کارگیری قندهای ساده در محیط کشت تولید هیدروژن به منظور مطالعات کینتیک و بررسی بازدهی انجام می‌شود. تولید هیدروژن زمانی مقرون به صرفه است که از منابع ارزان قیمت و تجدیدپذیر که اغلب دارای قندهای پیچیده هستند، استفاده شود [۷۸]. بررسی تولید هیدروژن *انتروباکترها* از سوبستراهای پیچیده نشان می‌دهد که آن‌ها توانایی تجزیه مواد لیگنوسلولزی را ندارند (جدول (۲)). برخی از *انتروباکترها* از تجزیه مواد نشاسته و پساب‌های نشاسته‌ای، هیدروژن تولید می‌کنند. بلچندرا و همکاران در سه محیط دارای ملاس، پساب نشاسته‌ای و پساب تقطیری تولید هیدروژن *انتروباکتر کلواسه* IIT-BT08 را بررسی کردند [۷۹]. در پژوهش آن‌ها، بیشینه بازده هیدروژن  $12/2 \text{ mol H}_2/\text{kg COD}_{\text{removed}}$  به دست آمد که برای اطمینان بیشتر از نتایج، تولید در واکنش‌گاه زیستی ۵ لیتری و سپس ۱۰۰۰۰ لیتری افزایش مقیاس یافت. در پژوهش آن‌ها، در مقیاس پایلوت  $76/2 \text{ m}^3$  هیدروژن با حذف  $18/1 \text{ Kg m}^{-3}$  COD بازده تبدیل انرژی  $37/9\%$  تولید شد. خلاف *انتروباکترها*، کلاستریدیوم‌ها توانایی تجزیه بسیاری از مواد لیگنوسلولزی را مانند باگاس نیشکر، پوسته جاتروفا، پسماند هسته خرما، الیاف چوبی

اخیراً ارگال و همکارانش مهندسی بسیار دقیقی را بر کنسرسیوم میکروبی متشکل از باکتری‌های *انتروباکتر آئروژنز* و کلاستریدیوم *استوبوتیلیکوم* انجام داده‌اند و برای هر باکتری محیط مناسب تولید هیدروژن را انتخاب و نیز غلظت گلوکز را بررسی کردند [۱۲]. سپس هر باکتری را در محیط کشت باکتری دیگر کشت دادند. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که رشد و تولید هیدروژن به وسیله *انتروباکتر* در محیط کلاستریدیوم دو برابر کاهش می‌یابد، در صورتی که کلاستریدیوم *استوبوتیلیکوم* توانایی رشد در محیط تولیدی *انتروباکتر* را ندارد. از این رو این گروه تحقیقاتی، محیط مناسبی را برای تطبیق نیازهای غذایی هر دو ریزاندامگان با تأکید بر بررسی ظرفیت بافر فسفات، غلظت کلرید آمونیوم و غلظت استات طراحی کردند. نتایج بررسی‌های آن‌ها نشان می‌دهد که ظرفیت بافر فسفات و غلظت کلرید آمونیوم بر پاسخ‌های فشار جمعی و میانگین سرعت رشد ویژه مؤثر هستند. ارگال و همکارانش توانستند با بررسی اکولوژیکی و زیست‌فناوری، بازده تولید هیدروژن زیستی را از حد تأثر فراتر برند و به  $5/6 \text{ mol H}_2/\text{mol glucose}$  برسانند. این بازده از سوبه‌های جداسازی شده *انتروباکتر* و کلاستریدیوم تاکنون گزارش نشده بود. هسیبر و همکارانش از کشت توأم *انتروباکتر آئروژنز* DSM 30053 و کلاستریدیوم *استوبوتیلیکوم* DSM 792 در پیل الکترولیز سلولی با ولتاژ پایین  $0/8$  ولت برای تجزیه سلوبیوز استفاده کردند [۷۱]. پژوهش آن‌ها نشان می‌دهد که آهنگ تولید هیدروژن در کشت توأم  $0/74 \cdot 10^7/0/8 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  است که با برقراری ولتاژ  $0/8$  ولت به  $0/93 \text{ mmol L}^{-1} \text{ h}^{-1}$  افزایش می‌یابد. وجود مسیرهای متابولیکی مختلف PFL در *انتروباکتر آئروژنز* و PFOR در کلاستریدیوم *استوبوتیلیکوم*، دامنه متفاوتی از محصولات جانبی را مانند متابولیت‌های محلول ایجاد می‌کند که می‌تواند تولید هیدروژن را افزایش دهد؛ زیرا مهار فیدبکی کاهش می‌یابد. *انتروباکتر آئروژنز* و کلاستریدیوم *استوبوتیلیکوم* با اعمال ولتاژ پایین می‌توانند از آند به عنوان پذیرنده الکترون استفاده و به طور کامل سوبسترا را مصرف کنند، بنابراین تولید هیدروژن افزایش می‌یابد.

هم‌چنین پاچپور و همکاران از کشت توأم *انتروباکتر آئروژنز* NRRL B-407 و کلاستریدیوم بوتیریکوم NRRL B-41122 در تولید هیدروژن از گلیسرول خام استفاده کردند [۷۲]. در تولید هر تن دیزل زیستی، ۱۰۰ کیلوگرم گلیسرول خام تولید می‌شود که

ساکاروپروپوتیل استونیکوم شناخته شده‌است که می‌توان از سلولازها، زایلانازها، پکتینازها، مانازها و زیلوگلوکانازها نام برد. باوجود این در بسیاری از پژوهش‌ها، برای استفاده از مواد لیگنوسلولزی در تولید هیدروژن، آن‌ها را پیش‌تیمار می‌کنند. پیش‌تیمار اسیدی همراه با گرما بسیار پرکاربرد است.

بدون لیگنین و گاه برنج آبکافت‌شده دارند. در برخی از کلاستریدیوم‌ها سلولزوم‌ها تجزیه این مواد را انجام می‌دهند [۸۰]. این ساختار در برخی از باکتری‌های جنس کلاستریدیا مانند کلاستریدیوم استوبوتیلیکوم، کلاستریدیوم بورنیمس، کلاستریدیوم سلوبیوپاروم، کلاستریدیوم سلولیتیکوم و کلاستریدیوم

جدول ۲. بازده تولید هیدروژن از ترکیبات پیچیده به‌وسیله آنروباکترها و کلاستریدیوم‌ها.

Table 2. Hydrogen production yield from complex compounds by Enterobacteriaceae and Clostridium genus bacteria.

organism	Characterising	Substrate	Pretreatment	Cultivation condition /Temperature (°C)/pH	H <sub>2</sub> Yield	References
Enterobacter						
<i>Escherichia coli</i> NCIMB 11943		Corn starch hydrolysate (10 g/L)	Enzyme	Batch/37/5.5	0.36 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[82]
<i>Escherichia coli</i> NCIMB 11943		Corn starch hydrolysate (10 g/L)	-	Batch/40/5.5	1.8 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[82]
<i>Enterobacter aerogenes</i> MTCC 2822		Whey wastewater (10 g/L lactose)	-	Batch/30/6.8	2.04 mol (H <sub>2</sub> /mol lactose)	[83]
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 35029		Raw glycerol (18.5 g/L)	-	Cstr/37/6.4	0.86 (mol/mol glycerol)	[84]
<i>Enterobacter aerogenes</i> MTCC 2822		Whey (18.5 g/L total carbohydrate)	Heat	Batch/31/6.5	-	[85]
<i>Enterobacter aerogenes</i> PTCC 1221		Rice straw	Enzyme	Batch/37/6.5	19.73(ml/ g straw)	[86]
<i>Enterobacter aerogenes</i> E 82005		Molasses (2% sugar)	-	Continuous/38/6	2.5 (mol/mol sugar)	[87]
<i>Enterobacter aerogenes</i> E 82005		Molasses (2% sugar)	-	Continuous/38/6	3.5 (mol/mol sugar)	[88]
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08		Cane molasses (10 g/L) and groundnut deoiled cake as co-substrates (25 g/L)	-	Batch/37/6.5	12.2 (mol H <sub>2</sub> / kg COD <sub>removed</sub> )	[79]
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08		Distillery effluent and groundnut deoiled cake as co-substrates (50 g/L)	-	Batch/37/6.5	7.4 (mol H <sub>2</sub> / kg COD <sub>removed</sub> )	[79]

organism	Characterising	Substrate	Prereatment	Cultivation condition /Temperature (°C)/pH	H <sub>2</sub> Yield	References
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08		Starchy wastewater and groundnut deoiled cake as co-substrates (75 g/L)	-	Batch/37/6.5	7.6 (mol H <sub>2</sub> / kg COD <sub>removed</sub> )	[79]
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08		Potato starch (10 g/L)	-	Batch/36/6	200 (ml H <sub>2</sub> /l per h)	[40]
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08		Carboxymethyl cellulose (10g/L)	-	Batch/36/6	88 (ml H <sub>2</sub> /l per h)	[40]
<i>Enterobacter aerogenes</i> HO-101		Glycerol (10g/L)	-	Batch/37/6.3	6.69 (mmol H <sub>2</sub> /mol substrate)	[30]
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08		<i>Chlorella sorokiniana</i> (10 g/L)	Acid	Continuous/30/6.8	9 ( mol H <sub>2</sub> /Kg COD <sub>reduced</sub> )	[89]
<i>Enterobacter aerogenes</i>		Anabena (10 g/L)	-	Batch/30/6.7-6.8	0.0114 (kgH <sub>2</sub> /kg <sub>biomass</sub> )	[90]
<i>Enterobacter aerogenes</i> ATCC 13048		<i>Scenedesmus obliquus</i> sp. (2.5 g <sub>alga</sub> L <sup>-1</sup> )	-	Batch/30/6.8	57.6 mL H <sub>2</sub> / g VS <sub>alga</sub>	[91]
<i>Clostridium thermocellum</i> ATCC27405		Sugarcane bagasse (10 g/L)	Alkaline	Batch/55	-	[92]
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC824		Cassava processing wastewater (5 g/L)	-	Batch/36/7	2.41 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[93]
<i>Clostridium beijerinckii</i> AM21B	$\alpha$ -glucosidase, $\beta$ - glucosidase, $\alpha$ -galacosidase	Starch (10 g/L)	-	Batch/36/7	1.8 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[57]
<i>Clostridium butyricum</i> CWBI1009		Starch	-	Batch/30/5.6	2 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[45]
<i>Clostridium butyricum</i> TISTR1032		sugarcane bagasse hydrolysate (20 g/L)	Acid	Batch/37/5.5	1.73 (mol H <sub>2</sub> /mol total sugar)	[94]
<i>Clostridium thermocellum</i> 27405	Cellulosome	delignified wood fibers (0.1 g/L)	-	Batch/55	1.6±0.67 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[95]
<i>Clostridium thermocellum</i> JN4	Cellulosome	microcrystalline cellulose (5 g/L)	-	Batch/60	0.8 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[96]



organism	Characterising	Substrate	Pretreatment	Cultivation condition /Temperature (°C)/pH	H <sub>2</sub> Yield	References
<i>Clostridium paraputrificum</i> M-21	Chitinase	chitin	Mechanical milling	Batch/45/6	1.5 (mol H <sub>2</sub> /mol acetyl-D-glucosamine)	[97]
<i>Clostridium butyricum</i> CICC 20763		<i>Jatropha</i> hulls	Acid	Batch/35/6.5	2.06 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[55]
<i>Clostridium thermocellum</i> 27405	Cellulosome	date seeds waste (3 g/L)	Acid	Batch/50/7	146.19 (mmol/L)	[98]
<i>Clostridium</i> LS2		palm oil mill effluent	-	Batch/36/6.5	0.38 (L H <sub>2</sub> /g COD <sub>added</sub> )	[99]
<i>Clostridium thermocellum</i> 27405	Cellulosome	$\alpha$ - cellulose (2 g/L)	-	Continuous/60/7	1.65 (mol H <sub>2</sub> /mol hexose)	[100]
<i>Clostridium butyricum</i> CGS5	Consuming Xylose	Hydrolysate and pretreated rice straw	-		0.76 (mol H <sub>2</sub> /mol xylose)	[101]
<i>Clostridium butyricum</i> CGS5	Consuming Xylose	Xylan hydrolysate	Enzyme		0.7 (mol H <sub>2</sub> /mol xylose)	[101]
<i>Clostridium butyricum</i> DSM 10702		<i>Scenedesmus obliquus</i> sp. (50 galgaL <sup>-1</sup> )	-	Batch/37/6.8	113.1 (mL H <sub>2</sub> / g VS <sub>alga</sub> )	[91]

مطالعه می‌توانند از این دو قند، استفاده و هیدروژن تولید کنند. بنابراین با تجزیه مواد سلولزی به وسیله کلاستریدیوم سلولیتیکوم و آزاد شدن قندهای گلوکز و زایلوز، دیگر باکتری‌های حاضر در کشت توأم، آن‌ها را مصرف می‌کنند و در نتیجه بازده تولید هیدروژن افزایش می‌یابد. بررسی متابولیت‌های حاصل از تخمیر نشان می‌دهد که در محیط کشت کلاستریدیوم سلولیتیکوم به‌طور عمده استات، فرمات، اتانول، لاکتات و ۲، ۳- بوتان دی‌آل تشکیل می‌شود. در صورتی که در کشت باکتری‌های دیگر استات و اتانول به فراوانی وجود دارد؛ اما مقدار مواد دیگر مانند سوکسینات، لاکتات و ۲، ۳- بوتان دی‌آل کمتر است. فرمات، تنها متابولیتی است که در کشت کلاستریدیوم سلولیتیکوم وجود دارد. حضور مقادیر مختلف فرمات (۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ میلی‌مولار) به‌عنوان تنها منبع کربن در محیط تولید باکتری‌های کلاستریدیوم پاراپتریفیکوم، انتروباکتر کلواسه و سیتروباکتر آمالوناتیکوس نشان می‌دهد که با افزایش غلظت این ماده، تولید هیدروژن افزایش می‌یابد. در صورتی که با

تولید هیدروژن از کاه ذرت با استفاده از باکتری تجزیه‌کننده سلولز، کلاستریدیوم سلولیتیکوم و باکتری‌های غیر تجزیه‌کننده سلولز، انتروباکتر آئروژنز IAM1183، کلاستریدیوم پاراپتریفیکوم M-21، انتروباکتر کلواسه (NBRC 12935) و سیتروباکتر آمالوناتیکوس (NBRC 13547) Y19 مطالعه شد [۸۱]. در این پژوهش ژنگ و همکاران تولید هیدروژن هر یک از باکتری‌ها و کشت توأم کلاستریدیوم سلولیتیکوم را با هر یک از باکتری‌ها در محیط دارای ۷/۷٪ قندهای محلول حاصل از ساقه ذرت تیمار شده با بخار بررسی کردند. نتایج تحقیقات آن‌ها نشان می‌دهد که تولید هیدروژن کلاستریدیوم سلولیتیکوم قابل توجه نیست، در صورتی که در کشت توأم کلاستریدیوم سلولیتیکوم و سیتروباکتر آمالوناتیکوس تولید به بیشترین مقدار برابر با  $467 \pm 28 \text{ mL H}_2 / \text{L}_{\text{medium}}$  محیط کشت می‌رسد. کلاستریدیوم سلولیتیکوم با داشتن سلولوزوم، توانایی تجزیه سلولز و همی سلولز را دارد که با تجزیه این دو ماده، گلوکز و زایلوز در محیط تولید می‌شود. سوبه‌های دیگر در این

قلیایی و یا اسیدی رشد کنند. برای نمونه، یوکویی و همکاران سویه‌ای از *انتروباکتر/تروژنز* را از خاک جداسازی کردند که توانایی رشد در شرایط هوازی و pH ۳/۳ و بی‌هوازی در ۴ را دارد [۳۴]. باوجود این، تولید هیدروژن با این باکتری در شرایط اسیدی بسیار ناچیز است و بهینه تولید در pH ۶-۷ گزارش شده است. pH اسیدی محیط باعث کاهش فعالیت [Fe-Fe]-هیدروژنازهای کلاستریدیوم *استوبوتیلیکوم* شده و مسیر متابولیک را از اسیدوژنز و استوژنز به سالونوژنز تغییر می‌دهد و منجر به تولید گاز هیدروژن کمتری می‌شود [۱۰۵].

#### ۳-۴ بررسی تأثیر دما

دما می‌تواند به‌طور چشم‌گیری بر سرعت تجزیه زیستی سوبسترا، فعالیت آنزیم‌های تولیدکننده هیدروژن مانند هیدروژنازها و متابولیسم تولیدکنندگان هیدروژن مؤثر باشد [۱۰۶ و ۱۰۳]. دمای عملیاتی حتی می‌تواند مسیرهای متابولیک را تغییر دهد. ریزاندامگان براساس توانایی رشد در دماهای گوناگون به چهار گروه میانه‌دوست ( $25^{\circ}\text{C}$ - $40^{\circ}\text{C}$ )، گرمادوست ( $40^{\circ}\text{C}$ - $65^{\circ}\text{C}$ )، گرمادوست شدید ( $65^{\circ}\text{C}$ - $80^{\circ}\text{C}$ ) و فوق‌گرمادوست ( $>80^{\circ}\text{C}$ ) تقسیم‌بندی می‌شوند [۱۰۷]. پژوهش‌ها نشان می‌دهد که باکتری‌های خانواده *انتروباکتریاسه*، میانه‌دوست و باکتری‌های جنس *کلاستریدیوم*، میانه‌دوست یا گرمادوست هستند. مطالعه جدول‌های ۱ و ۲ نیز نشان می‌دهد که تولید هیدروژن باکتری‌های خانواده *انتروباکتریاسه* در بازه دمایی  $30^{\circ}\text{C}$ - $40^{\circ}\text{C}$  و باکتری‌های *کلاستریدیوم* در دو بازه  $30^{\circ}\text{C}$ - $39^{\circ}\text{C}$  و  $50^{\circ}\text{C}$ - $60^{\circ}\text{C}$  انجام شده است. بنابراین می‌توان نتیجه‌گیری کرد که در کنسرسیون‌های مهندسی شده از دو باکتری، لازم است از *کلاستریدیوم*‌های میانه‌دوست استفاده شود. از آنجایی که دما می‌تواند طیف محصولات جانبی و سرعت تولید را تنظیم کند، بهینه‌سازی دما برای تغییر مسیرهای متابولیک به سمت تولید استات و بوتیرات و کاهش تولید الکل یا حلال (مانند پروپانول، بوتانل، لاکتات، پروپیونات و اتانول) مهم است.

#### ۴-۴ بررسی تأثیر شرایط بی‌هوازی کشت

باکتری‌های بی‌هوازی اجباری مانند *کلاستریدیوم*‌ها نسبت به اکسیژن بسیار حساس هستند و توانایی تولید هیدروژن آن‌ها با مقدار کمی اکسیژن مهار می‌شود. برای تولید پایدار هیدروژن این باکترها،

افزایش غلظت فرمات ( $50$  و  $100$  میلی‌مولار) در محیط رشد *کلاستریدیوم سلولیتیکوم*، میزان رشد کاهش می‌یابد. در محیط تولید هیدروژن، باحضور *کلاستریدیوم سلولیتیکوم* و *سیتروباکتر آمالوناتیکوس*، با تجزیه مواد سلولزی و تولید فرمات به‌وسیله *کلاستریدیوم سلولیتیکوم*، این ماده به‌وسیله *سیتروباکتر آمالوناتیکوس* مصرف می‌شود. بنابراین، از طرفی فرمات به‌عنوان متوقف‌کننده رشد *کلاستریدیوم سلولیتیکوم* از محیط حذف می‌شود و از طرف دیگر با مصرف این ماده به‌وسیله *سیتروباکتر آمالوناتیکوس*، هیدروژن تولید می‌شود. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که بازده تولید هیدروژن در محیط کشت *کلاستریدیوم سلولیتیکوم* و *سیتروباکتر آمالوناتیکوس* با تغییر مسیرهای متابولیکی نسبت به محیط کشت *کلاستریدیوم سلولیتیکوم* به‌طور چشم‌گیری افزایش می‌یابد و به  $51/9$  L/kg TS می‌رسد. در پژوهش ژنگ مشخص شد که سرعت آزادسازی قندهای آبکافت شده از ذرت بسیار کندتر از میزان استفاده قندهای مصرف شده به‌وسیله سویه‌های تولیدکننده هیدروژن بوده و می‌تواند به بازده بیشتر هیدروژن از ساقه ذرت کمک کند.

#### ۲-۴ بررسی تأثیر pH

pH به‌عنوان یکی از مهم‌ترین و حساس‌ترین عامل‌های عملیاتی بر عملکرد تخمیر در تاریکی در نظر گرفته می‌شود؛ زیرا می‌تواند بر طیف محصولات جانبی، ساختار جامعه میکروبی و عملکردهای متابولیک درون سلولی مانند فعالیت هیدروژنازها تأثیر بگذارد [۱۰۴-۱۰۲]. کاهش تولید هیدروژن در pH‌های اسیدی کمتر از ۴ معمولاً به دلیل تشکیل متابولیت‌های اسیدی و الکلی است. این متابولیت‌ها می‌توانند به غشای سلول میکروبی نفوذ و با فعالیت‌های متابولیکی منظم تداخل پیدا کنند. در مقابل، در pH‌های خنثی یا قلیایی (بیشتر از ۷) نیز با تجمع پروپیونات تسهیل و تولید هیدروژن کاهش می‌یابد. تولید پروپیونات با مصرف احیاءکننده که در تولید هیدروژن نقش دارند، همراه است. بنابراین حفظ pH در محدوده بهینه برای افزایش تولید هیدروژن دارای اهمیت است. pH محیط‌های تولید هیدروژن باکتری‌های خانواده *انتروباکتریاسه* و جنس *کلاستریدیوم* در جدول‌های ۱ و ۲ به‌طور خلاصه آمده است. مطالعه جدول‌ها نشان می‌دهد که برای هر دو گروه باکتری میانگین pH ۵-۷ است گرچه برخی از این باکتری‌ها می‌توانند در pH‌های

هیدروژن را به سرعت فراهم می‌کنند. یوکویی و همکاران حضور  
 ال-سیستئین و باکتری *انتروباکتر آنروژنز* را در محیط ناپیوسته  
 تولید هیدروژن کلاستریدیوم بوتیریوم مقایسه کردند [۱۰۹]. نتایج  
 پژوهش آنها نشان می‌دهد که در محیط کشت کلاستریدیوم  
 بوتیریوم بدون ماده احیاکننده ال-سیستئین، تولید هیدروژن پس

افزودن یک عامل احیاکننده مانند ال-سیستئین به محیط کشت  
 ضروری است (جدول (۳)). ال-سیستئین ظرفیت ردوکس را بین  
 ۲۰۰ تا ۲۵۰ کاهش می‌دهد [۱۰۸] که معمولاً این مواد احیاکننده  
 بسیار گران‌قیمت هستند. در مقابل، *انتروباکترها* نسبت به غلظت‌های  
 متعارف اکسیژن مقاوم هستند و با مصرف این ماده، شرایط تولید

جدول ۳. مقایسه شرایط بی‌هوازی در محیط کشت *انتروباکترها* و *کلاستریدیومها*.

Table 3. Anaerobic culture comparison of *Enterobacter* and *Clostridium*.

organism	Cultivation condition /Temperature (°C)/pH	anaerobic condition	Yield	References
Enterobacter				
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	Batch in 100 mL bottle /37/7.5	Nitrogen	0.24 ± 7.38 mol H <sub>2</sub> /Kg CODreduced	[110]
<i>Enterobacter cloacae</i> 811101	Batch in 250 mL bottle /-/7	Nitrogen	5.19 mol H <sub>2</sub> /mol sucrose	[111]
<i>Enterobacter cloacae</i> IIT-BT 08	Batch in 3000 mL bioreactor /37/6.5	Argon	3.1 mol H <sub>2</sub> /mol glucose	[23]
<i>Enterobacter aerogenes</i> PTCC 1221	Batch in 118 mL bioreactor /37/5.8	nitrogen	19.73 ml/ g straw	[85]
<i>E. coli</i> (XL1-BLUE)	Batch in 2500 mL bioreactor /37/6.5	Formate	0.41 mol H <sub>2</sub> /mol formate	[112]
Clostridium				
<i>Clostridium</i> strain BOH3	Batch in 250 mL bottle /37/6.8	L- cysteine (1 g/L), nitrogen (5-7 min)	2.43-2.51 mol H <sub>2</sub> /mol hexose	[113]
<i>Clostridium acetobutylicum</i> ATCC 824	Continuous in 2500 mL bioreactor /37/5.5	L- cysteine (1 g/L), nitrogen	2.39 mol H <sub>2</sub> /mol glucose	[113]
<i>Clostridium butyricum</i> EB6	Batch in 3000 mL bioreactor /37/5.6	L- cysteine (0.5 g/L), nitrogen (20 min)	2.2 mol H <sub>2</sub> /mol glucose	[51]
<i>Clostridium beijerinckii</i> L9	Batch in 120 mL bottle /35/7.2	Resazurin (0.175 mg/L), nitrogen	2.81 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[43]
<i>Clostridium</i> strain BOH3	Batch in 250 mL bottle /37/6.8	L- cysteine (1g/L), nitrogen (5-7 min)	2.89 (mol H <sub>2</sub> /mol hexose)	[114]
<i>Clostridium cellobioparum</i>	Batch in arrow-necked tubes/39/6.8	L- cysteine (0.25g/L), resazurin (0.001 mg/L) nitrogen	2.73 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[115]
<i>Clostridium phytofermentans</i> ATCC 700394	Batch in 250 mL bottle /35/6.5	L- cysteine (0.5 g/L), resazurin (1 mg/L), nitrogen	2.3 (mol H <sub>2</sub> /mol cellobiose)	[116]
<i>Clostridium populei</i> DSM 5832	Batch in 250 mL bottle /35/6.5	L- cysteine (0.5 g/L), resazurin (1 mg/L), nitrogen	1.6 (mol H <sub>2</sub> /mol hexose)	[116]
<i>Clostridium cellulolyticum</i> ATCC 35319	Batch in 250 mL bottle /35/6.5	L- cysteine (0.5 g/L), resazurin (1 mg/L), nitrogen	1.7 (mol H <sub>2</sub> /mol hexose)	[116]
<i>Clostridium</i> DMHC-10	Batch in 500 mL bottle /35/5	resazurin (0.001 mg/L), nitrogen	3.35 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[46]
<i>Clostridium butyricum</i> CWB11009	Batch in 2.3L bioreactor/30/5.2	L- cysteine (0.5g/L), nitrogen	1.7 (mol H <sub>2</sub> /mol glucose)	[45]

است، نشان می‌دهد که میانگین بازده هیدروژن تولیدشده در انتروباکترها برابر با  $1/36 \text{ mol H}_2/\text{mol glucose}$  و در کلاستریدیومها  $2/205 \text{ mol glucose}$  است که به ترتیب با مصرف متوسط  $9/86$  و  $8/05$  گرم گلوکز در هر لیتر حاصل شده است. با وجود اختلاف بازده نظری  $100\%$  این دو گروه، میانگین بازده عملی به دست آمده انتروباکترها  $38\%$  کمتر از کلاستریدیومهاست که با انتخاب دو سویه مناسب از کلاستریدیومها و انتروباکترها نسبت به شرایط کشت، می‌توان بازده تولید هیدروژن مناسبی به دست آورد. بررسی pH محیط تولیدی انتروباکترها و کلاستریدیومها مشخص می‌سازد که با وجود رشد برخی از گونه‌های انتروباکتر در شرایط اسیدی و رشد برخی از گونه‌های کلاستریدیوم در شرایط قلیایی، دامنه pH مناسب رشد و تولید هیدروژن برای هر دو گروه در محدوده  $5-7$  است. مطالعه محدوده دمایی نشان می‌دهد که انتروباکترها میانه دوست و کلاستریدیوم میانه دوست و گرمادوست هستند. بنابراین، در طراحی کنسرسیوم، کلاستریدیوم‌های میانه دوست انتخاب می‌شوند. با بررسی محدوده دمایی پژوهش‌های انجام شده، دامنه دمایی  $30-39^\circ\text{C}$  برای این کنسرسیوم مناسب است. سرعت رشد و تولید هیدروژن با به کارگیری مدل‌های سینتیکی مانند گومپرتز اصلاح شده در باکتری‌های انتروباکتر و کلاستریدیوم نشان می‌دهد که انتروباکترها دارای زمان فاز تأخیری ( $\lambda$ ) کمتر نسبت به کلاستریدیومها هستند. بنابراین به دست آوردن بازده هیدروژنی قابل قبول از کنسرسیوم انتروباکترها و کلاستریدیومها زمانی میسر است که نسبت تلقیح این دو باکتری بر حسب سرعت رشد آنها در نظر گرفته شود. در پژوهش‌های اخیر، تعداد اولیه سلول‌های تلقیح شده کلاستریدیوم به انتروباکتر ضریبی از  $10^5$  در نظر گرفته شده است. در محیط‌های کشت با منابع کربنی پیچیده مانند مواد لیگنوسلولزی، ویژگی سویه‌های انتخابی از اهمیت بالایی برخوردار است. برخلاف کلاستریدیومها که دارای نانوماشین‌های سلولوزوم در تجزیه این گونه مواد هستند، انتروباکترها نمی‌توانند از این مواد به طور مستقیم استفاده کنند. انتخاب سویه کلاستریدیوم مناسب با قدرت تجزیه بالای لیگنوسلولزها و سویه انتروباکتر با توانایی مصرف مواد حاصل از تجزیه لیگنوسلولزها، مهار حاصل از محصول را حذف می‌کند و بازده تولید هیدروژن را افزایش می‌دهد. بررسی حساسیت انتروباکترها و کلاستریدیوم نسبت به

از گذشت ۱۲ ساعت شروع می‌شود؛ در حالی که با اضافه کردن این ماده بعد از ۵ ساعت آغاز می‌شود. با وجود این در کشت مخلوط دو باکتری کلاستریدیوم بوتیریکوم و انتروباکتر آئروژنز و بدون حضور ماده احیاکننده، این زمان به دو ساعت کاهش و مقدار تولید هیدروژن افزایش می‌یابد. حال آن که در کشت پیوسته کلاستریدیوم بوتیریکوم با عامل احیاکننده تولید هیدروژن پس از ۱۵ ساعت آغاز می‌شود. حذف عامل کاهنده از محیط، تولید هیدروژن را به گونه‌ای مهار می‌کند که حتی با گذشت ۵۰ ساعت تولیدی مشاهده نمی‌شود که این امر نشان دهنده تخریب سلول‌ها به وسیله اکسیژن است. در مقابل، تولید هیدروژن در کشت مخلوط که نخست با اکسیژن مهار شده بود، پس از نیم ساعت شروع می‌شود که این تولید تأکیدی بر حذف اکسیژن به وسیله انتروباکتر آئروژنز است. در مطالعه دیگری، پچپور و همکارانش به منظور کاهش هزینه‌های مرحله بی‌هوازی، در فرایند تولید هیدروژن از گلیسرول خام در کشت توام/انتروباکتر آئروژنز NRRL B-407 و کلاستریدیوم بوتیریکوم NRRL B-41122 استفاده کردند [۷۲]. در تحقیق پچپور تولید هیدروژن در کشت توأم به افزایش بیشینه حدوداً  $0/95 \text{ mmolH}_2/\text{L} \pm 19/45$  گزارش شد. در حالی که آنها تولید هیدروژن را در محیط کشت انتروباکتر دارای ال-سیستین را  $0/47 \text{ mmolH}_2/\text{L} \pm 15/64$  و در چنین شرایطی با کلاستریدیوم  $0/38 \text{ mmolH}_2/\text{L} \pm 17/44$  گزارش کردند. علاوه بر افزایش بازده هیدروژن، تولید اتانول و لاکتات در شرایط هوازی افزایش می‌یابد. تغییر شار کربن از مسیر احیاکننده  $10,3$  تولید پروپان دی ال به سمت مسیر اکسیداتیو منجر به افزایش عملکرد هیدروژن، اتانول و لاکتات می‌شود.

##### ۵. نتیجه‌گیری و جمع‌بندی

مقایسه تولید هیدروژن در انتروباکترها (مسیر پیرووات فرمات لیاژ) و کلاستریدیومها (مسیر پیرووات فردوکسین اکسیدوردوکتاز و با فرض اکسید شدن تمام NADHها) نشان می‌دهد که از لحاظ نظری، کلاستریدیومها با مصرف هر مول گلوکز ۴ مول هیدروژن و انتروباکترها ۲ مول هیدروژن تولید می‌کنند که تفاوت ۱۰۰ درصدی را نشان می‌دهند. در این مقاله مروری، بازده عملی تولید هیدروژن انتروباکترها و کلاستریدیومها مقایسه شد. نتایج این بررسی که بر ۱۳ پژوهش بر انتروباکترها و ۲۳ پژوهش بر کلاستریدیومها استوار

- [7] Azwar, M. Y., Hussain, M. A., & Abdul-Wahab, A. K. (2014). Development of biohydrogen production by photobiological, fermentation and electrochemical processes: a review. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 31, 158-173. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.11.022>
- [8] Li, Y., Zhang, Z., Xia, C., Jing, Y., Zhang, Q., Li, S., Zhu, S., & Jin, P. (2020). Photo-fermentation biohydrogen production and electrons distribution from dark fermentation effluents under batch, semi-continuous and continuous modes. *Bioresource Technology*, 311, 123549. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.123549>
- [9] Bagheri, M., Emtiazi, G., & Jalili Tabaii, M. (2022). Production of bio-hydrogen by microorganisms and extracellular enzymes: clean energy. *Biological Journal of Microorganism*, 11(43), 97-117. 10.22108/BJM.2022.131554.1428
- [10] Lee, D. H. (2021). Biohydrogen yield efficiency and the benefits of dark, photo and dark-photo fermentative production technology in circular Asian economies. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(27), 13908-13922. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.08.275>
- [11] García-Depraect, O., Castro-Muñoz, R., Muñoz, R., Rene, E. R., León-Becerril, E., Valdez-Vazquez, I., Kumar, G., Reyes-Alvarado, L. C., Martínez-Mendoza, L. J., Carrillo-Reyes, J. & Buitrón, G. (2021). A review on the factors influencing biohydrogen production from lactate: the key to unlocking enhanced dark fermentative processes. *Bioresource Technology*, 324, 124595. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2020.124595>
- [12] Ergal, I., Bochmann, G., Fuchs, W., Simon, K., & Rittmann, M. R. (2022). Design and engineering of artificial microbial consortia for biohydrogen production. *Current Opinion in Biotechnology*, 73, 74-80. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2021.07.010>
- [13] Hu, Y., Shen, Y., & Wang, J. (2020). Pretreatment of antibiotic fermentation residues by combined ultrasound and alkali for enhancing biohydrogen production. *Journal of Cleaner Production*, 268, 122190. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.122190>
- [14] de Sá, L. R. V., de Oliveira Faber, M., da Silva, A. S. A., Cammarota, M. C., & Ferreira-Leitão, V. S. (2020). Biohydrogen production using xylose or xylooligosaccharides derived from sugarcane bagasse obtained by hydrothermal and acid pretreatments. *Renewable Energy*, 146, 2408-2415. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2019.08.089>
- [15] Bansal, S. K., Sreerishnan, T. R., & Singh, R. (2013). Effect of heat pretreated consortia on fermentative biohydrogen production from vegetable waste. *National Academy Science Letters*, 36, 125-131. <https://doi.org/10.1007/s40009-013-0124-4>
- اکسیژن نشان می‌دهد که کلاستریدیوم‌ها نسبت به آن بسیار حساس و در گروه باکتری‌های بی‌هوازی اجباری قرار می‌گیرند. در محیط تولید هیدروژن به‌وسیله کلاستریدیوم‌ها مواد احیاکننده گران‌قیمت مانند ال-سیستئین پتانسیل ردوکس را بین ۲۰۰- تا ۲۵۰- کاهش می‌دهد که به‌کارگیری این دو دسته باکتری سبب می‌شود که انتروباکترها به‌سرعت اکسیژن موجود در محیط کشت را مصرف و شرایط را برای رشد و تولید هیدروژن به‌وسیله کلاستریدیوم‌ها فراهم نمایند. این ویژگی تأثیر به‌سزایی در طراحی و تهیه کنسرسیون مصنوعی انتروباکترها و کلاستریدیوم‌ها دارد و به‌احتمال زیاد در مقیاس افزایش یافته هزینه تولید را کاهش می‌دهد که روی قیمت تمام‌شده محصول مؤثر است.

### مراجع

- [1] Bouckaert, S., Fernandez Pales, A., McGlade, C., Remme, U., Wanner, B., Varro, L., D'Ambrosio, D., Spencer, T., (2021). Net zero by 2050: A roadmap for the global energy sector.
- [2] Tahir, M., Tasleem, S., & Tahir, B. (2020). Recent development in band engineering of binary semiconductor materials for solar driven photocatalytic hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(32), 15985-16038. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.04.071>
- [3] Mohsin, M., Rasheed, A. K., & Saidur, R. (2018). Economic viability and production capacity of wind generated renewable hydrogen. *International Journal of hydrogen energy*, 43(5), 2621-2630. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.12.113>
- [4] Mayyas, A., Wei, M., & Levis, G. (2020). Hydrogen as a long-term, large-scale energy storage solution when coupled with renewable energy sources or grids with dynamic electricity pricing schemes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(33), 16311-16325. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.04.163>
- [5] Valente, A., Iribarren, D., & Dufour, J. (2019). Harmonising methodological choices in life cycle assessment of hydrogen: A focus on acidification and renewable hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(35), 19426-19433. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.03.101>
- [6] Chaubey, R., Sahu, S., James, O. O., & Maity, S. (2013). A review on development of industrial processes and emerging techniques for production of hydrogen from renewable and sustainable sources. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 23, 443-462. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.02.019>

- [16] Sinbuathong, N., & Sillapacharoenkul, B. (2021). Dark fermentation of starch factory wastewater with acid-and base-treated mixed microorganisms for biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(31), 16622-16630. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.06.109>
- [17] Lee, M. J., Song, J. H., & Hwang, S. J. (2009). Effects of acid pre-treatment on bio-hydrogen production and microbial communities during dark fermentation. *Bioresource Technology*, 100(3), 1491-1493. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.08.019>
- [18] 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. (2002). Distinctive properties of high hydrogen producing extreme thermophiles, *Caldicellulosiruptor saccharolyticus* and *Thermotoga elfii*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12), 1391-1398. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00115-5](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00115-5)
- [19] Pawar, S. S., Vongkumpeang, T., Grey, C., & van Niel, E. W. (2015). Biofilm formation by designed co-cultures of *Caldicellulosiruptor* species as a means to improve hydrogen productivity. *Biotechnology for Biofuels*, 8(1), 1-13. <https://doi.org/10.1186/s13068-015-0201-7>
- [20] Hallenbeck, P. C., & Benemann, J. R. (2002). Biological hydrogen production; fundamentals and limiting processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12), 1185-1193. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00131-3](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00131-3)
- [21] Prazmowski, A. (1880) Untersuchung über die Entwicklungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bacterien-Arten. Inaugural Dissertation, H. Voigt.
- [22] Das, D., & Veziroglu, T. N. (2008). Advances in biological hydrogen production processes. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(21), 6046-6057. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.098>
- [23] Khanna, N., Kotay, S. M., Gilbert, J. J., & Das, D. (2011). Improvement of biohydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 under regulated pH. *Journal of Biotechnology*, 152(1-2), 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2010.12.014>
- [24] Esfahani Bolandbalaei, Z., Rostami, Kh. (2020). Isolation of Enterobacteriaceae using economical chemicals that produces biohydrogen by dark fermentation, The 6<sup>th</sup> International Conference on Environmental Engineering and Natural Resource, Tehran, Iran.
- [25] Lee, D. J., Show, K. Y., & Su, A. (2011). Dark fermentation on biohydrogen production: pure culture. *Bioresource Technology*, 102(18), 8393-8402. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.041>
- [26] Ramírez-Morales, J. E., Tapia-Venegas, E., Toledo-Alarcón, J., & Ruiz-Filippi, G. (2015). Simultaneous production and separation of biohydrogen in mixed culture systems by continuous dark fermentation. *Water Science and Technology*, 71(9), 1271-1285. <https://doi.org/10.2166/wst.2015.104>
- [27] Drapcho, C. M., Nghim, N. P., Walker, T. (2019) *Biofuels Engineering Process Technology*, McGraw-Hill Education; Translates by Rostami, Kh., publisher: Iranian Research Organization for Science and Technology.
- [28] Angenent, L. T., Karim, K., Al-Dahhan, M. H., Wrenn, B. A., & Domínguez-Espinosa, R. (2004). Production of bioenergy and biochemicals from industrial and agricultural wastewater. *Trends in Biotechnology*, 22(9), 477-485. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2004.07.001>
- [29] Kalia, V. C., & Purohit, H. J. (2008). Microbial diversity and genomics in aid of bioenergy. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 35(5), 403-419. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0300-y>
- [30] Kumar, N., & Das, D. (2000). Enhancement of hydrogen production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *Process Biochemistry*, 35(6), 589-593. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(99\)00109-0](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(99)00109-0)
- [31] Nath, K., Kumar, A., & Das, D. (2006). Effect of some environmental parameters on fermentative hydrogen production by *Enterobacter cloacae* DM11. *Canadian Journal of Microbiology*, 52(6), 525-532. <https://doi.org/10.1139/w06-005>
- [32] Seppälä, J. J., Puhakka, J. A., Yli-Harja, O., Karp, M. T., & Santala, V. (2011). Fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* and *Escherichia coli* in pure and cocultures. *International journal of Hydrogen Energy*, 36(17), 10701-10708. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.05.189>
- [32] Junyapoon, S., Buala, W., & Phunpruch, S. (2011). Hydrogen production with *Escherichia coli* isolated from municipal sewage sludge. *Science & Technology Asia*, 9-15.
- [33] Rosales-Colunga, L. M., Razo-Flores, E., & Rodríguez, A. D. L. (2012). Fermentation of lactose and its constituent sugars by *Escherichia coli* WDHL: impact on hydrogen production. *Bioresource Technology*, 111, 180-184. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.01.175>
- [34] Ghosh, D., & Hallenbeck, P. C. (2009). Fermentative hydrogen yields from different sugars by batch cultures of metabolically engineered *Escherichia coli* DJT135. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(19), 7979-7982. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.08.004>
- [35] Yokoi, H., Ohkawara, T., Hirose, J., Hayashi, S., & Takasaki, Y. (1995). Characteristics of hydrogen production by aciduric *Enterobacter aerogenes* strain HO-39. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 80(6), 571-574. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)87733-6](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)87733-6)
- [36] Kurokawa, T., & Tanisho, S. (2005). Effects of formate on fermentative hydrogen production by

- Enterobacter aerogenes. *Marine Biotechnology*, 7, 112-118. <https://doi.org/10.1007/s10126-004-3088-z>
- [37] Tanisho, S., Kamiya, N., & Wakao, N. (1989). Hydrogen evolution of *Enterobacter aerogenes* depending on culture pH: mechanism of hydrogen evolution from NADH by means of membrane-bound hydrogenase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)- Bioenergetics*, 973(1), 1-6. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(89\)80393-7](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(89)80393-7)
- [38] Lu, W., Wen, J., Chen, Y., Sun, B., Jia, X., Liu, M., & Caiyin, Q. (2007). Synergistic effect of *Candida maltosa* HY-35 and *Enterobacter aerogenes* W-23 on hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(8), 1059-1066. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.07.010>
- [39] Nakashimada, Y., Rachman, M. A., Kakizono, T., & Nishio, N. (2002). Hydrogen production of *Enterobacter aerogenes* altered by extracellular and intracellular redox states. *International Journal of Hydrogen Energy*, 27(11-12), 1399-1405. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(02\)00128-3](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(02)00128-3)
- [40] Kataoka, N., Miya, A., & Kiriyama, K. (1997). Studies on hydrogen production by continuous culture system of hydrogen-producing anaerobic bacteria. *Water Science and Technology*, 36(6-7), 41-47. [https://doi.org/10.1016/S0273-1223\(97\)00505-2](https://doi.org/10.1016/S0273-1223(97)00505-2)
- [41] Mitchell, R. J., Kim, J. S., Jeon, B. S., & Sang, B. I. (2009). 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), 5352-5355. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.05.046>
- [42] Lin, P. Y., Whang, L. M., Wu, Y. R., Ren, W. J., Hsiao, C. J., Li, S. L., & Chang, J. S. (2007). Biological hydrogen production of the genus *Clostridium*: metabolic study and mathematical model simulation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(12), 1728-1735. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.12.009>
- [43] Ho, K. L., Lee, D. J., Su, A., & Chang, J. S. (2012). Biohydrogen from lignocellulosic feedstock via one-step process. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(20), 15569-15574. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.01.137>
- [44] Masset, J., Hiligsmann, S., Hamilton, C., Beckers, L., Franck, F., & Thonart, P. (2010). Effect of pH on glucose and starch fermentation in batch and sequenced-batch mode with a recently isolated strain of hydrogen-producing *Clostridium butyricum* CWBI1009. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(8), 3371-3378. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.01.061>
- [45] Kamalaskar, L. B., Dhakephalkar, P. K., Meher, K. K., & Ranade, D. R. (2010). High biohydrogen yielding *Clostridium* sp. DMHC-10 isolated from sludge of distillery waste treatment plant. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 10639-10644. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.05.020>
- [46] Liu, I. C., Whang, L. M., Ren, W. J., & Lin, P. Y. (2011). The effect of pH on the production of biohydrogen by clostridia: thermodynamic and metabolic considerations. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(1), 439-449. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.10.045>
- [47] Jo, J. H., Lee, D. S., Park, D., & Park, J. M. (2008). Biological hydrogen production by immobilized cells of *Clostridium tyrobutyricum* JM1 isolated from a food waste treatment process. *Bioresource Technology*, 99(14), 6666-6672. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2007.11.067>
- [48] Jo, J. H., Lee, D. S., & Park, J. M. (2008). The effects of pH on carbon material and energy balances in hydrogen-producing *Clostridium tyrobutyricum* JM1. *Bioresource Technology*, 99(17), 8485-8491. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2008.03.060>
- [49] Junghare, M., Subudhi, S., & Lal, B. (2012). Improvement of hydrogen production under decreased partial pressure by newly isolated alkaline tolerant anaerobe, *Clostridium butyricum* TM-9A: Optimization of process parameters. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(4), 3160-3168. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.11.043>
- [50] Chong, M. L., Yee, P. L., Abd Aziz, S., Rahim, R. A., Shirai, Y., & Hassan, M. A. (2009). Effects of pH, glucose and iron sulfate concentration on the yield of biohydrogen by *Clostridium butyricum* EB6. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(21), 8859-8865. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.08.061>
- [51] Wang, X., Monis, P. T., Saint, C. P., & Jin, B. (2009). Biochemical kinetics of fermentative hydrogen production by *Clostridium butyricum* W5. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(2), 791-798. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.11.023>
- [52] Zhao, X., Xing, D., Liu, B., Lu, L., Zhao, J., & Ren, N. (2012). The effects of metal ions and L-cysteine on hydA gene expression and hydrogen production by *Clostridium beijerinckii* RZF-1108. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(18), 13711-13717. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.02.144>
- [53] Whang, L. M., Lin, C. A., Liu, I. C., Wu, C. W., & Cheng, H. H. (2011). Metabolic and energetic aspects of biohydrogen production of *Clostridium tyrobutyricum*: The effects of hydraulic retention time and peptone addition. *Bioresource Technology*, 102(18), 8378-8383. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.03.101>
- [54] Jiang, D., Fang, Z., Chin, S. X., Tian, X. F., & Su, T. C. (2016). Biohydrogen production from hydrolysates of selected tropical biomass wastes with *Clostridium butyricum*. *Scientific reports*, 6(1), 27205. <https://doi.org/10.1038/srep27205>

- [55] Zhao, X., Xing, D., Fu, N., Liu, B., & Ren, N. (2011). Hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii* RZF-1108. *Bioresource Technology*, 102(18), 8432-8436. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2011.02.086>
- [56] Taguchi, F., Takiguchi, S., & Morimoto, M. (1992). Efficient hydrogen production from starch by a bacterium isolated from termites. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 73(3), 244-245. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(92\)90172-Q](https://doi.org/10.1016/0922-338X(92)90172-Q)
- [57] Pan, C. M., Fan, Y. T., Zhao, P., & Hou, H. W. (2008). Fermentative hydrogen production by the newly isolated *Clostridium beijerinckii* Fanp3. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(20), 5383-5391. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.037>
- [58] Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & Van't Riet, K. J. A. E. M. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875-1881. <https://doi.org/10.1128/aem.56.6.1875-1881.1990>
- [59] Wang, J., & Wan, W. (2008). The effect of substrate concentration on biohydrogen production by using kinetic models. *Science in China Series B: Chemistry*, 51(11), 1110-1117. <https://doi.org/10.1007/s11426-008-0104-6>
- [60] Mu, Y., Wang, G., & Yu, H. Q. (2006). Kinetic modeling of batch hydrogen production process by mixed anaerobic cultures. *Bioresource Technology*, 97(11), 1302-1307. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2005.05.014>
- [61] Mu, Y., Yu, H. Q., & Wang, G. (2007). A kinetic approach to anaerobic hydrogen-producing process. *Water Research*, 41(5), 1152-1160. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2006.11.047>
- [62] Kumar, N., Monga, P. S., Biswas, A. K., & Das, D. (2000). Modeling and simulation of clean fuel production by *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08. *International Journal of Hydrogen Energy*, 25(10), 945-952. [https://doi.org/10.1016/S0360-3199\(00\)00017-3](https://doi.org/10.1016/S0360-3199(00)00017-3)
- [63] Nath, K., Muthukumar, M., Kumar, A., & Das, D. (2008). Kinetics of two-stage fermentation process for the production of hydrogen. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(4), 1195-1203. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.12.011>
- [64] Ntaikou, I., Gavala, H. N., Kornaros, M., & Lyberatos, G. (2008). Hydrogen production from sugars and sweet sorghum biomass using *Ruminococcus albus*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(4), 1153-1163. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2007.10.053>
- [65] Boshagh, F., Rostami, K., & Moazami, N. (2019). Biohydrogen production by immobilized *Enterobacter aerogenes* on functionalized multi-walled carbon nanotube. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(28), 14395-14405. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2018.11.199>
- [66] Boshagh, F., Rostami, K., & Moazami, N. (2019). Immobilization of *Enterobacter aerogenes* on carbon fiber and activated carbon to study hydrogen production enhancement. *Biochemical Engineering Journal*, 144, 64-72. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2019.01.014>
- [67] Jeong, T. Y., Cha, G. C., Yeom, S. H., & Choi, S. S. (2008). Comparison of hydrogen production by four representative hydrogen-producing bacteria. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 14(3), 333-337. <https://doi.org/10.1016/j.jiec.2007.09.014>
- [68] Yin, Y., & Wang, J. (2017). Isolation and characterization of a novel strain *Clostridium butyricum* INET1 for fermentative hydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 42(17), 12173-12180. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.02.083>
- [69] Zeidan, A. A., & Van Niel, E. W. (2009). Developing a thermophilic hydrogen-producing co-culture for efficient utilization of mixed sugars. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(10), 4524-4528. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.07.092>
- [70] Hasibar, B., Ergal, İ., Moser, S., Bochmann, G., Simon, K. M. R., & Fuchs, W. (2020). Increasing biohydrogen production with the use of a co-culture inside a microbial electrolysis cell. *Biochemical Engineering Journal*, 164, 107802. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2020.107802>
- [71] Pachapur, V. L., Sarma, S. J., Brar, S. K., Bihan, Y. L., Buelna, G., & Verma, M. (2017). Hydrogen production from biodiesel industry waste by using a co-culture of *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. *Biofuels*, 8(6), 651-662. <https://doi.org/10.1080/17597269.2015.1122471>
- [72] Ren, Y., Wang, J., Liu, Z., Ren, Y., & Li, G. (2009). Hydrogen production from the monomeric sugars hydrolyzed from hemicellulose by *Enterobacter aerogenes*. *Renewable Energy*, 34(12), 2774-2779. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2009.04.011>
- [73] Skonieczny, M. T., & Yargeau, V. (2009). Biohydrogen production from wastewater by *Clostridium beijerinckii*: effect of pH and substrate concentration. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(8), 3288-3294. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.01.044>
- [74] Zhao, P., Fan, S. Q., Tian, L., Pan, C. M., Fan, Y. T., & Hou, H. W. (2010). Hydrogen production characteristics from dark fermentation of maltose by an isolated strain FP 01. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(13), 7189-7193. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2009.12.188>
- [75] Plangklang, P., Reungsang, A., & Pattra, S. (2012). Enhanced bio-hydrogen production from sugarcane juice by immobilized *Clostridium butyricum* on sugarcane bagasse. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(20), 15525-15532. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.02.186>
- [76] Chen, W. M., Tseng, Z. J., Lee, K. S., & Chang, J. S. (2005). Fermentative hydrogen production with *Clostridium butyricum* CGS5 isolated from anaerobic



- sewage sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 30(10), 1063-1070. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2004.09.008>
- [77] Martinez-Burgos, W. J., do Nascimento Junior, J. R., Medeiros, A. B. P., Herrmann, L. W., Sydney, E. B., & Soccol, C. R. (2021). Biohydrogen production from agro-industrial wastes using *Clostridium beijerinckii* and isolated bacteria as inoculum. *BioEnergy Research*, 1-11. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2020.124970>
- [78] Balachandar, G., Varanasi, J. L., Singh, V., Singh, H., & Das, D. (2020). Biological hydrogen production via dark fermentation: A holistic approach from lab-scale to pilot-scale. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(8), 5202-5215. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.09.006>
- [79] Ding, S. Y., Bayer, E. A. (2020) Understanding cellulosome interaction with cellulose by high-resolution imaging, *ACS Central Science*, 6, p. 1034. <https://doi.org/10.1021/acscentsci.0c00662>
- [80] Zhang, S. C., Lai, Q. H., Lu, Y., Liu, Z. D., Wang, T. M., Zhang, C., & Xing, X. H. (2016). Enhanced biohydrogen production from corn stover by the combination of *Clostridium cellulolyticum* and hydrogen fermentation bacteria. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 122(4), 482-487. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2016.03.014>
- [81] Perego, P., Fabiano, B., Ponzano, G. P., & Palazzi, E. (1998). Experimental study of hydrogen kinetics from agroindustrial by-product: optimal conditions for production and fuel cell feeding. *Bioprocess Engineering*, 19, 205-211. <https://doi.org/10.1007/s004490050507>
- [82] Rai, P. K., Singh, S. P., & Asthana, R. K. (2012). Biohydrogen production from cheese whey wastewater in a two-step anaerobic process. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 167, 1540-1549. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9488-4>
- [83] Jitrwung, R., & Yargeau, V. (2015). Biohydrogen and bioethanol production from biodiesel-based glycerol by *Enterobacter aerogenes* in a continuous stir tank reactor. *International Journal of Molecular Sciences*, 16(5), 10650-10664. <https://doi.org/10.3390/ijms160510650>
- [84] Rao, R., & Basak, N. (2021). Optimization and modelling of dark fermentative hydrogen production from cheese whey by *Enterobacter aerogenes* 2822. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(2), 1777-1800. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.10.142>
- [85] Asadi, N., & Zilouei, H. (2017). Optimization of organosolv pretreatment of rice straw for enhanced biohydrogen production using *Enterobacter aerogenes*. *Bioresource Technology*, 227, 335-344. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2016.12.073>
- [86] Tanisho, S., & Ishiwata, Y. (1994). Continuous hydrogen production from molasses by the bacterium *Enterobacter aerogenes*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 19(10), 807-812. [https://doi.org/10.1016/0360-3199\(94\)90197-X](https://doi.org/10.1016/0360-3199(94)90197-X)
- [87] Tanisho, S., & Ishiwata, Y. (1995). Continuous hydrogen production from molasses by fermentation using urethane foam as a support of flocks. *International Journal of Hydrogen Energy*, 20(7), 541-545. [https://doi.org/10.1016/0360-3199\(94\)00101-5](https://doi.org/10.1016/0360-3199(94)00101-5)
- [88] Kumar, K., Roy, S., & Das, D. (2013). Continuous mode of carbon dioxide sequestration by *C. sorokiniana* and subsequent use of its biomass for hydrogen production by *E. cloacae* IIT-BT 08. *Bioresource Technology*, 145, 116-122. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.01.137>
- [89] Ferreira, A. F., Marques, A. C., Batista, A. P., Marques, P. A., Gouveia, L., & Silva, C. M. (2012). Biological hydrogen production by *Anabaena* sp. - yield, energy and CO<sub>2</sub> analysis including fermentative biomass recovery. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(1), 179-190. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.09.056>
- [90] Batista, A. P., Moura, P., Marques, P. A., Ortigueira, J., Alves, L., & Gouveia, L. (2014). *Scenedesmus obliquus* as feedstock for biohydrogen production by *Enterobacter aerogenes* and *Clostridium butyricum*. *Fuel*, 117, 537-543. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2013.09.077>
- [91] Cheng, J. R., & Zhu, M. J. (2016). Biohydrogen production from pretreated lignocellulose by *Clostridium thermocellum*. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 21, 87-94. <https://doi.org/10.1007/s12257-015-0642-7>
- [92] Cappelletti, B. M., Reginatto, V., Amante, E. R., & Antônio, R. V. (2011). Fermentative production of hydrogen from cassava processing wastewater by *Clostridium acetobutylicum*. *Renewable Energy*, 36(12), 3367-3372. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2011.05.015>
- [93] Pattra, S., Sangyoka, S., Boonmee, M., & Reungsang, A. (2008). Bio-hydrogen production from the fermentation of sugarcane bagasse hydrolysate by *Clostridium butyricum*. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(19), 5256-5265. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.05.008>
- [94] Levin, D. B., Islam, R., Cicek, N., & Sparling, R. (2006). Hydrogen production by *Clostridium thermocellum* 27405 from cellulosic biomass substrates. *International Journal of Hydrogen Energy*, 31(11), 1496-1503. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2006.06.015>
- [95] Liu, Y., Yu, P., Song, X., & Qu, Y. (2008). Hydrogen production from cellulose by co-culture of *Clostridium thermocellum* JN4 and *Thermoanaerobacterium thermosaccharolyticum* GD17. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(12), 2927-2933. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2008.04.004>
- [96] Evvyernie, D., Morimoto, K., Karita, S., Kimura, T., Sakka, K., & Ohmiya, K. (2001). Conversion of chitinous wastes to hydrogen gas by *Clostridium*

- paraputrificum* M-21. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 91(4), 339-343. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(01\)80148-1](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(01)80148-1)
- [97] Rambabu, K., Show, P. L., Bharath, G., Banat, F., Naushad, M., & Chang, J. S. (2020). Enhanced biohydrogen production from date seeds by *Clostridium thermocellum* ATCC 27405. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(42), 22271-22280. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2019.06.133>
- [98] Singh, L., Wahid, Z. A., Siddiqui, M. F., Ahmad, A., Rahim, M. H. A., & Sakinah, M. (2013). Application of immobilized upflow anaerobic sludge blanket reactor using *Clostridium* LS2 for enhanced biohydrogen production and treatment efficiency of palm oil mill effluent. *International Journal of Hydrogen Energy*, 38(5), 2221-2229. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2012.12.004>
- [99] Magnusson, L., Cicek, N., Sparling, R., & Levin, D. (2009). Continuous hydrogen production during fermentation of  $\alpha$ -cellulose by the thermophilic bacterium *Clostridium thermocellum*. *Biotechnology and Bioengineering*, 102(3), 759-766. <https://doi.org/10.1002/bit.22092>
- [101] Lo, Y. C., Lu, W. C., Chen, C. Y., & Chang, J. S. (2010). Dark fermentative hydrogen production from enzymatic hydrolysate of xylan and pretreated rice straw by *Clostridium Butyricum* CGS5. *Bioresource Technology*, 101(15), 5885-5891. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.02.085>
- [102] Ananthi, V., Ramesh, U., Balaji, P., Kumar, P., Govarathanan, M., & Arun, A. (2022). A review on the impact of various factors on biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2022.08.046>
- [103] Guo, X. M., Trably, E., Latrille, E., Carrère, H., & Steyer, J. P. (2010). Hydrogen production from agricultural waste by dark fermentation: a review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 35(19), 10660-10673. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2010.03.008>
- [104] Ginkel, S. V., Sung, S., & Lay, J. J. (2001). Biohydrogen production as a function of pH and substrate concentration. *Environmental Science & Technology*, 35(24), 4726-4730. <https://doi.org/10.1021/es001979r>
- [105] Grimmer, C., Janssen, H., Krauß, D., Fischer, R. J., Bahl, H., Dürre, P., Liebl, W. & Ehrenreich, A. (2011). Genome-wide gene expression analysis of the switch between acidogenesis and solventogenesis in continuous cultures of *Clostridium acetobutylicum*. *Microbial Physiology*, 20(1), 1-15. DOI: 10.1159/000320973
- [106] Sinha, P., & Pandey, A. (2011). An evaluative report and challenges for fermentative biohydrogen production. *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(13), 7460-7478. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.077>
- [107] Davila-Vazquez, G., Arriaga, S., Alatrister Mondragón, F., de León-Rodríguez, A., Rosales-Colunga, L. M., & Razo-Flores, E. (2008). Fermentative biohydrogen production: trends and perspectives. *Reviews in Environmental Science and Bio/Technology*, 7, 27-45. <https://doi.org/10.1007/s11157-007-9122-7>
- [108] Hamilton, C., Calusinska, M., Baptiste, S., Masset, J., Beckers, L., Thonart, P., & Hiligsmann, S. (2018). Effect of the nitrogen source on the hydrogen production metabolism and hydrogenases of *Clostridium butyricum* CWBI1009. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(11), 5451-5462. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2017.12.162>
- [109] Yokoi, H., Tokushige, T., Hirose, J., Hayashi, S., & Takasaki, Y. (1998). H<sub>2</sub> production from starch by a mixed culture of *Clostridium butyricum* and *Enterobacter aerogenes*. *Biotechnology Letters*, 20, 143-147. <https://doi.org/10.1023/A:1005372323248>
- [110] Mishra, P., & Das, D. (2014). Biohydrogen production from *Enterobacter cloacae* IIT-BT 08 using distillery effluent. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(14), 7496-7507. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2013.08.100>
- [111] Mohanraj, S., Kodhaiyolii, S., Rengasamy, M., & Pugalenth, V. (2014). Phytosynthesized iron oxide nanoparticles and ferrous iron on fermentative hydrogen production using *Enterobacter cloacae*: evaluation and comparison of the effects. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(23), 11920-11929. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2014.06.027>
- [112] Bakonyi, P., Nemestóthy, N., Lövitusz, É., & Bélafi-Bakó, K. (2011). Application of Plackett-Burman experimental design to optimize biohydrogen fermentation by *E. coli* (XL1-BLUE). *International Journal of Hydrogen Energy*, 36(21), 13949-13954. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2011.03.062>
- [113] Guerrero, K., Gallardo, R., Paredes, I., Quintero, J., Mau, S., Conejeros, R., Gentina, J. C., & Aroca, G. (2021). Continuous biohydrogen production by a degenerated strain of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(7), 5100-5111. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.11.104>
- [114] Mahato, R. K., Kumar, D., & Rajagopalan, G. (2020). Biohydrogen production from fruit waste by *Clostridium* strain BOH3. *Renewable Energy*, 153, 1368-1377. <https://doi.org/10.1016/j.renene.2020.02.092>
- [115] Guerrero, K., Gallardo, R., Paredes, I., Quintero, J., Mau, S., Conejeros, R., Gentina, J. C., & Aroca, G. (2021). Continuous biohydrogen production by a degenerated strain of *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(7), 5100-5111. <https://doi.org/10.1016/j.ijhydene.2020.11.104>
- [116] Chung, K. T. (1976). Inhibitory effects of H<sub>2</sub> on growth of *Clostridium cellobioparum*. *Applied and Environmental Microbiology*, 31(3), 342-348. <https://doi.org/10.1128/aem.31.3.342-348.1976>