Biological Journal of Microorganism
Year 11, No.43, Autumn 2022
Received: 2021-11-20
Accepted: 2022-01-16

(Review Paper)

Production of Bio-hydrogen by Microorganisms and Extracellular Enzymes: Clean Energy

Mahla Bagheri
Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences and Technology, Shahid Ashrafi Esfahani University, Isfahan, Iran, mahlabagherii79@gmail.com
Giti Emtiazi
Department of Cellular and Molecular Biology and Microbiology, Faculty of Biological Science and Technology, University of Isfahan, Iran, emtiazi@yahoo.com
Maryam Jalili*
Department of Biotechnology, Faculty of Biological Sciences and Technology, Shahid Ashrafi Esfahani University, Isfahan, Iran, maryjtabaii@gmail.com

Abstract

Introduction: Hydrogen gas has great potential as a renewable energy source. Although hydrogen gas is obtained from fossil fuels, there is a demand for its production by chemical methods and electrolysis of water, and its extraction from oil sands is currently being studied. Its biological production is one of the cleanest types of hydrogen fuel production due to the consumption of greenhouse gases such as carbon dioxide and/or aerobic and anaerobic fermentation of agricultural wastes, and it can be considered as a solution for simultaneous production of the fuel and elimination of environmental pollutions.

Materials and Methods: The present study briefly explains the hydrogen-producing microorganisms, the mechanisms, and the effective enzymes in their production. For this purpose, authoritative articles published between 2006 and 2021 and information in the Scopus database have been used to draw graphs and write this review article. In addition, some limitations and the ways to overcome them for increasing biohydrogen production are described in detail.

* Corresponding author
10.22108/BJM.2022.131554.1428
20.1001.1.23225173.1401.11.43.7.8

Results: The results show that carbon dioxide fixation, fermentation, nitrogen fixation, aerobic and anaerobic photosynthesis are some ways of biological production of this fuel.

Discussion and Conclusion: Important elements in biological production are the effective enzymes in these reactions and the possibility of using these enzymes in the continuous production of gas, and the purification of hydrogen from other gases. The stabilization of these enzymes under their conditions is of particular importance for the mass production of this gas. Purification of bio-produced hydrogen gas is essential for consumption as fuel, and some technologies, including nanomembranes such as polysulfonate, are very helpful in purifying this gas from other gases such as oxygen, nitrogen, ammonium, hydrogen sulfide, and oxygen.

Key words: Biohydrogen, Dark-fermentation, Photo-fermentation, Biophotolysis, Bioenergy, Microbial Electrolysis

فصلنامه علمی زیست‌شناسی میکروارگانیسم‌ها
سال یازدهم، شماره ۴۳، پاییز ۱۴۰۱، صفحه ۱۱۷ - ۹۷
تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۰۸/۲۹ – تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۲۶

مقاله مروری

تولید هیدروژن زیستی توسط میکروارگانیسم‌ها و آنزیم‌های خارج سلولی: انرژی پاک

مهلا باقری: گروه بیوتکنولوژی، دانشکدهٔ علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه شهید اشرفی اصفهانی، اصفهان، ایران، mahlabagherii79@gmail.com
گیتی امتیازی: استاد گروه زیست‌شناسی سلولی مولکولی و میکروبیولوژی، دانشکدهٔ علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه اصفهان، ایران، emtiazi@yahoo.com
مریم جلیلی*: استادیار گروه بیوتکنولوژی، دانشکدهٔ علوم و فناوری‌های زیستی، دانشگاه شهید اشرفی اصفهانی، اصفهان، ایران، maryjtabaii@gmail.com

چکیده

مقدمه: گاز هیدروژن به‌عنوان منبع انرژی تجدیدپذیر، پتانسیل بالایی دارد. گاز هیدروژن از سوخت‌های فسیلی به دست می‌آید؛ اما تقاضا برای تولید آن با روش‌های شیمیایی و الکترولیز آب وجود دارد و امروزه استخراج آن از ماسه‌های نفتی درحال مطالعه است. تولید آن ازطریق زیستی به‌دلیل مصرف گازهای گلخانه‌ای مانند دی‌اکسیدکربن و / یا تخمیر هوازی و بی‌هوازی پسماندهای کشاورزی یکی از پاک‌ترین انواع تولید سوخت هیدروژنی است و می‌توان آن را راه‌حلی برای تولید همزمان سوخت و رفع آلودگی‌های زیست‌محیطی دانست.

مواد و روش‌ها: در این مقاله به‌طور خلاصه میکروارگانیسم‌های تولیدکنندهٔ هیدروژن، مکانیسم‌های تولید و آنزیم‌های مؤثر بررسی شده‌اند. برای این هدف از اطلاعات موجود در پایگاه داده‌های اسکوپوس برای رسم نمودارها و از مقالات معتبر منتشرشده در فاصله زمانی ۲۰۰۶ تا ۲۰۲۱ استفاده شده است. علاوه بر این، برخی از محدودیت‌ها و راه‌های غلبه بر آنها و افزایش تولید هیدروژن زیستی با استفاده از مقالات به تفصیل شرح داده شده‌اند.

نتایج: تثبیت دی‌اکسیدکربن، تخمیر، تثبیت نیتروژن، فتوسنتز هوازی و بی‌هوازی از راه‌های تولید زیستی این سوخت است.

* نویسندهٔ مسئول مکاتبات

2322-5181/ © 2022 The Authors. Published by University of Isfahan
This is an open access article under the CC-BY-NC-ND 4.0 License (https://creativecommons.org/licenses by-nc-nd/4.0/)

10.22108/BJM.2022.131554.1428
20.1001.1.23225173.1401.11.43.7.8

بحث و نتیجه‌گیری: آنچه در تولید زیستی اهمیت دارد، آنزیم‌های مؤثر در این واکنش‌ها و امکان استفاده از این آنزیم‌ها در تولید مداوم گاز و تصفیه هیدروژن از گازهای دیگر است. تثبیت این آنزیم‌ها در شرایط خاص خودشان برای تولید انبوه این گاز از اهمیت خاصی برخوردار است. خالص‌سازی گاز هیدروژن تولیدشدهٔ زیستی به هدف مصرف آن به‌عنوان سوخت، ضروری است و برخی فناوری‌ها ازجمله غشاهای نانو مانند پلی‌سولفونات در خالص سازی این گاز از گازهای تولیدی دیگر مانند اکسیژن، ازت، آمونیوم، هیدروژن سولفید و اکسیژن بسیار کمک‌کننده است.

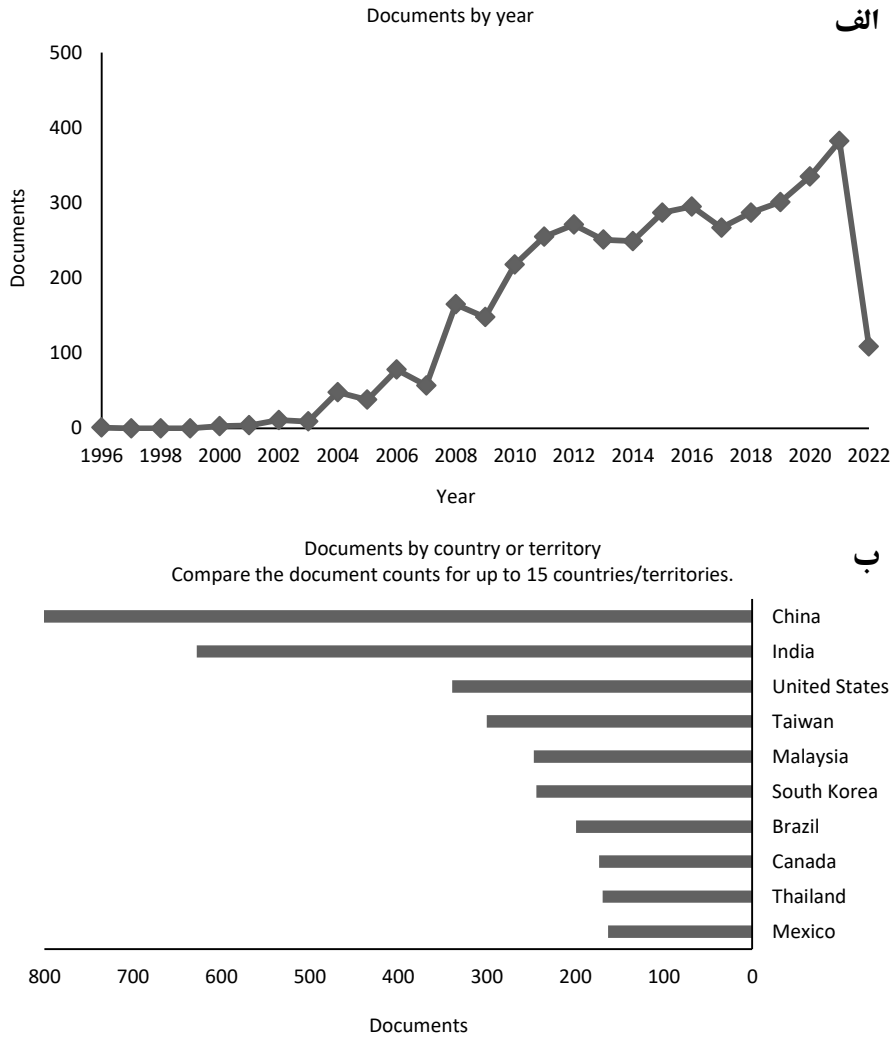
واژه‌های کلیدی: هیدروژن زیستی، تخمیر تاریکی، تخمیر نوری، فتولیز زیستی، انرژی زیستی، الکترولیز میکروبی

مقدمه

نیاز روزافزون به انرژی و همزمان با آن کاهش منابع سوخت‌های فسیلی، دولت‌ها را مجبور به یافتن جایگزین‌هایی برای این نوع سوخت‌های متداول کرده است. انرژی‌های تجدیدپذیری همچون انرژی‌های زیستی می‌توانند از جنبه‌های مختلف ازجمله تأمین امنیت انرژی، تجدیدپذیری و تولید پایدار و حفظ سلامت محیط زیست درخور توجه قرار بگیرند و جایگزین سوخت‌های فسیلی شوند؛ ازجمله انرژی‌های زیستی می‌توان به اتانول زیستی، بیوگاز، دیزل زیستی و هیدروژن زیستی اشاره کرد (۱-۵و۴۶). اتانول زیستی از منابع ارزان قیمت زیادی تولید می‌شود (۱و۲). هیدروژن زیستی همان هیدروژنی است که در اثر فرایندهای زیستی به وجود می‌آید و یکی از پاک‌ترین منابع انرژی مطرح در جهان است. هیدروژن زیستی دانسیته انرژی بالایی دارد و در صورت احتراق تنها بخار آب تولید می‌کند؛ بنابراین، برخلاف سایر سوخت‌های متداول آثار سوء محیط زیستی ندارد. همچنین بسیاری از مواد زائد (زباله‌های جامد و صنعتی، لجن فاضلاب شهری، پسماندهای حاصل از صنایع دام و طیور و ...) قابلیت تبدیل شدن به هیدروژن زیستی را دارند که این نیز می‌تواند در از بین بردن بسیاری از آلودگی‌های زیست‌محیطی کمک‌کننده باشد. به همین دلیل است که توجه روزافزونی در زمینهٔ تولید هیدروژن به وجود آمده است (شکل ۱)؛ با وجود این، مشکلات و محدودیت‌هایی در استفاده از این سوخت در مقیاس صنعتی وجود دارد. در این مقاله، فرایندهای اصلی دخیل در تولید هیدروژن زیستی، میکروارگانیسم‌ها و آنزیم‌های دخیل در تولید هیدروژن زیستی، منابع مورد استفاده، محدودیت‌ها و چشم‌انداز این سوخت زیستی با استفاده از جدیدترین مقالات در این زمینه مرور خواهد شد.

فرایندها و میکروارگانیسم‌های دخیل در تولید هیدروژن زیستی: هیدروژن می‌تواند با استفاده از روش‌های غیرزیستی ازجمله الکترولیز آب یا استفاده از

سوخت‌های فسیلی با اکسیداسیون جزئی هیدروکربن یا فرایند گازی‌سازی تولید شود؛ اما این روش‌ها علاوه بر ایجاد گازهای گلخانه‌ای و آلودگی‌های زیست‌محیطی، ازنظر اقتصادی نیز مقرون‌به‌صرفه نیستند. تولید هیدروژن توسط فرایندهای زیستی به چند صورت انجام می‌شوند (شکل ۲):



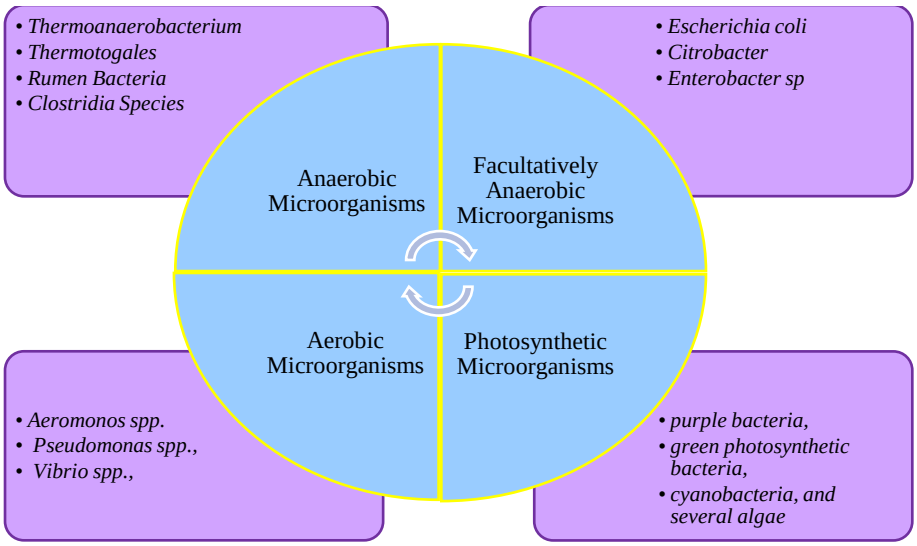
شکل ۱- الف) میزان انتشارات در زمینهٔ هیدروژن زیستی در سال. از این تعد اد ۷۰ درصد مقالات تحقیقاتی، ۱۱/۵ درصد مقالات کنفرانسی و ۱۰ درصد مقالات مروری هستند. ب) کشورهای پیشرو در انتشار مقالات در این زمینه. (نمودارها براساس اطلاعات موجود در پایگاه داده اسکوپوس[1] رسم شده‌اند)

۱- بیوفتولیز (مستقیم و غیرمستقیم)، ۲- تبدیل میکروبی آب – گاز، ۳- تخمیر نوری، ۴- تخمیر تاریکی و ۵- الکترولیز میکروبی. از بین این موارد، فرایندهای بیوفتولیز و تخمیر نوری وابسته به نور هستند. فتولیز مستقیم و غیرمستقیم، هیدروژن خالص‌تری را نسبت به فرایندهای تخمیر در تاریکی و تخمیر در روشنایی تولید می‌کنند و هیدروژن زیستی تولیدشده در این دو فرایند اخیر علاوه بر هیدروژن و دی‌اکسیدکربن، محتوی گازهای دیگری

ازجمله متان، مونوکسیدکربن، سولفید هیدروژن، آمونیاک با مقادیر کمتری نیز هستند که انجام پروسه‌های خالص‌سازی گسترده‌تری را می‌طلبد. فرایندهای نیازمند به نور در فتوبیوراکتورها[۲] و فرایندهای تخمیری در تاریکی در فرمانتورها[۳] انجام می‌شوند. مکانیسم کلی هرکدام از این روش‌ها عبارت‌اند از:

فتولیز مستقیم	$2H_2O$ + انرژی نورانی $\xrightarrow[\text{جلبک‌ها و سیانوباکترها}]{\text{سیستم هیدروژناز - شرایط نوری}}$ $2H_2 + O_2$ $H^+ + e^- + ATP \xrightarrow[\text{جلبک‌ها و سیانوباکترها}]{\text{سیستم نیتروژناز - شرایط تاریکی}} H_2 + ADP + Pi$
فتولیز غیرمستقیم	$6CO_2+6H_2O$+ انرژی نورانی $\longrightarrow C_6H_{12}O_6+6O_2$ $C_6H_{12}O_6 + 6H_2O \xrightarrow[\text{جلبک‌ها و سیانوباکترها}]{\text{هیدروژنازی یا نیتروژنازی - شرایط تاریکی}} 12H_2 + 6CO_2$
تخمیر نوری	$C_6H_{12}O_6 + 12H_2$ + انرژی نورانی $\xrightarrow[\text{باکتری‌های فتوسنتزکنندهٔ گوگردی سبز و ارغوانی و غیرگوگردی و برخی جلبک‌ها}]{\text{نیتروژناز – شرایط نوری}} 12H_2 + 6CO_2$
تخمیر تاریکی	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \xrightarrow[\text{کلستریدیوم ها – انترو باکتر}]{\text{سیستم هیدروژناز- بدون منبع نور}} 2CO_2 + 4H_2 + 2CH_3COOH$
الکترولیز	$C_6H_{12}O_6 + 2H_2O \xrightarrow[\text{انتروباکتر فکالیس-شوانلا-لاکتوباسیلوس رامنوز- کلستریدیوم پاستوریانوم(درشرایط بی هوازی و یا کم هوازی)}]{\text{سیستم کاتود و آنود}} 4H_2 + 2CO_2 + 2CH_3COOH$
تبدیل میکروبی آب-گاز	$CO + H_2O \xrightarrow[\text{باکتری‌های فتوهتروتروف و تخمیرکننده}]{\text{سیستم هیدروژناز – تاریکی}} H_2 + CO_2$

باکتری‌های مختلفی که می‌توانند در تولید هیدروژن زیستی شرکت کنند، به‌طور خلاصه در شکل ۲ آورده شده‌اند.



شکل ۲- انواع میکروارگانیسم‌های دخیل در تولید هیدروژن زیستی

بیوفتولیز[۴]: بیوفتولیز با دو روش بیوفتولیز مستقیم و بیوفتولیز غیرمستقیم و با استفاده از نور خورشید انجام می‌شود. اما کارایی این فرایند در تولید هیدروژن پایین است. حجم کم تولید هیدروژن و حساسیت آنزیم‌های دخیل در تولید هیدروژن زیستی در این روش از مشکلاتی است که برای استفاده از این دسته از فرایندها در مقیاس صنعتی وجود دارد. هیدروژنازها می‌توانند الکترون‌ها را از منابع متابولیکی متفاوتی دریافت کنند (۷).

تولید مستقیم هیدروژن از آب با استفاده از انرژی نور خورشید و به‌واسطهٔ سیستم‌های زیستی، بیوفتولیز مستقیم[۵] نامیده می‌شود. در خلال فاز نوری، یک زنجیره انتقال الکترون به وجود می‌آید و ابتدا فتوسیستم II و سیتوکروم‌ها و سپس فتوسیستم I در این پروسه دخیل‌اند. در فتوسیستم II با شکست مولکول آب، اکسیژن و الکترون‌ها تولید می‌شوند که در شرایط نوری می‌توانند به فردوکسین برسند و برای تثبیت کربن استفاده شوند. در شرایط بی‌هوازی، نبود اکسیژن محیط مناسبی برای بیان هیدروژنازها به وجود می‌آورد و شروع به دریافت الکترون‌های فتوسنتزی می‌کند که این فرایند بیوفتولیز مستقیم نام دارد. به عبارت دیگر، این الکترون‌ها در خلال فتوسیستم I این زنجیره انتقال الکترون را ترک می‌کنند و به گیرندهٔ نهایی فردوکسین (Fd) می‌رسند. در شرایط بی‌هوازی، فردوکسین قادر به تحویل این الکترون‌ها به آنزیم دهیدروژناز است که این آنزیم می‌تواند با احیای یون هیدروژن تولید گاز هیدروژن کند. جلبک تک‌سلولی *کلامیدوموناس رینهاردی* با مکانیسم فتولیز مستقیم، با کارایی ۲۲ درصد قادر به تبدیل انرژی نورانی به هیدروژن مولکولی در شرایطی است که فشار اکسیژن پایین (زیر ۰/۱ درصد) و شدت نور کم حکم‌فرما است. یکی از محدودیت‌های این روش تولید اکسیژن (محصول جانبی فتوسیستم II) است که اثر ممانعتی قوی بر بیان ژن، پایداری mRNA و کاتالیز آنزیمی دارد.

استراتژی‌های مختلفی برای غلبه به محدودیت‌های این روش در مسیر تولید کارآمد هیدروژن زیستی انجام گرفته است؛ ازجمله افزایش تحمل اکسیژن در هیدروژنازها با مهندسی ژنتیک، کنترل سطح اکسیژن در رنج مدنظر برای نیتروژنازها و هیدروژنازها با مهار به وجود آمدن اکسیژن و به خدمت گرفتن پروتئین‌های متصل‌شونده به اکسیژن. گرسنگی منیزیم یا سولفور می‌تواند باعث غیرفعال‌سازی فتوسیستم II و درنتیجه کاهش تولید اکسیژن و افزایش تولید هیدروژن شود.

بیوفتولیز غیرمستقیم[۶] در دو مرحلهٔ متوالی تولید کربوهیدرات‌ها با فتوسنتز و به دنبال آن، تخمیر کربوهیدرات برای تولید هیدروژن انجام می‌شود. بدین ترتیب، در بیوفتولیز غیرمستقیم، الکترون‌های لازم برای تولید هیدروژن از منبع متابولیکی متفاوتی، برای مثال از شکسته‌شدن کربوهیدرات‌های کمپلکس ذخیره‌شده مانند نشاسته تأمین می‌شوند که درنهایت به فردوکسین می‌رسند و سپس در اختیار هیدروژناز قرار خواهند گرفت. این دو مرحله که یکی به تولید اکسیژن و دیگری به تولید هیدروژن منجر می‌شود، در بخش‌های مختلف سلول میکروبی و نیز در زمان‌های مجزا انجام می‌شوند؛ بنابراین، این نوع فرایند می‌تواند راه‌حل طبیعی برای فائق‌آمدن بر یکی از محدودیت‌های مهم در بیوفتولیز مستقیم باشد و از مهار هیدروژنازهای آهن‌دار با اکسیژن ممانعت کند. بیوفتولیز غیرمستقیم در جلبک‌ها و سیانوباکترهایی مانند *آنابنا*[۷]، *کالوتریکس*[۸]، *اسپیرولینا*[۹] و *سینکوکوکوس*[۱۰] و نیز باکتری *ژئوباکتر*[۱۱] مطالعه شده است (۸ و ۹).

تبدیل میکروبی آب - گاز[۱۲]: برخی از میکرارگانیسم‌های مزوفیل و ترموفیل که کربوکسیدوتروف‌های هیدروژنیک[۱۳] نامیده می‌شوند، ازجمله برخی باکتری‌های فتوهتروتروف متعلق به خانوادهٔ *رودواسپیریلاسه*، از منوکسیدکربن به‌عنوان تنها منبع کربن در تاریکی استفاده می‌کنند و همراه با تولید انرژی قادر به تولید هیدروژن نیز هستند. انواعی از متالوآنزیم‌های [NiFe]-هیدروژنازی در این فرایند دخیل‌اند. در این فرایند، مونوکسیدکربن توسط آنزیم [NiFe]-کربن منوکسید دهیدروژناز به دی‌اکسیدکربن اکسید می‌شود و آنزیم دیگر [NiFe]-هیدروژنازی دو پروتون را به‌واسطهٔ الکترون‌های رهاشده به یک مولکول هیدروژن احیا می‌کند. به عبارت دیگر، این فرایند بین میکروارگانیسم‌های ترموفیل و گرمادوست بیشتر انجام می‌شود که یک دلیل آن می‌تواند اثر تسهیل‌کنندهٔ دما بر افزایش سرعت انتشار گاز باشد (۶). باکتری‌های بسیاری شناسایی شده‌اند که قادر به پیشبرد این واکنش‌اند، شامل گونه‌های *رودوباکتر*[۱۴]، *رودواسپیریلوم رابرم*[۱۵]، *روبریویواکس ژلاتینوسوس*[۱۶]، *گونه‌های سیتروباکتر*[۱۷]، *رودوسودوموناس پالوستریس*[۱۸] و باکتری‌های گرمادوست *ترمینوکولا کربوکسیدیفیلا*[۱۹]، *ترموانائروباکتر ترموهیدروسولفوریکوس*[۲۰]، *کالدانائروباکتر سابترانئوس پسیفیکوس*[۲۱] و *کربوکسیدوسلا پرتیناکس*[۲۲]، آرکی به شدت بی‌هوازی متانوسارسینا بارکری[۲۳] و آرکی‌های گرمادوست *ترموکوکوس انورینئوس*[۲۴] و *کالدری‌هابیتانس ماریتیموس*[۲۵]. در میان اینها باکتری‌های غیرگوگردی ارغوانی فتوسنتتیک مانند *رودواسپیریلوم رابروم*[۲۶] و *روبریویواکس ژلاتینوسوس* به‌دلیل داشتن راندمان خوب در برداشت مونوکسیدکربن و راندمان بالا در تولید هیدروژن زیستی بسیار شایان توجه‌اند. *روبریویواکس ژلاتینوسوس* در شرایط تاریکی می‌تواند ۱۰۰ درصد

مونوکسیدکربن را مصرف و به هیدروژن تبدیل کند. باوجود پتانسیل این روش برای تولید هیدروژن زیستی، محدودیت‌های زیاد باعث شده است فقط در سطح آزمایشگاهی انجام گیرد و استفادهٔ آن در مقیاس صنعتی منوط به حل مشکلات و محدودیت‌هاست. در این سیستم‌ها مونوکسیدکربن ماده اولیه است و این ماده برای همه سلول‌ها سمی است؛ به همین دلیل در طراحی بسیاری از فرایندها فاز هوازی رشد و تولید تودهٔ زیستی را از فاز بی‌هوازی تولید هیدروژن زیستی متمایز کرده‌اند. از پارامترهای مهم در این فرایند سرعت همزنی، غلظت مونوکسیدکربن ورودی، انتقال گاز در مایع و ... است (۱۰-۱۲).

تخمیر نوری[۲۷]: در این فرایند انواع مختلف سوبستراهای آلی و ترکیبات احیاشده مانند اسیدهای آلی (مالیک اسید، لاکتیک اسید، سوکسینیک اسید، استیک اسید، پروپیونیک اسید و بوتیریک اسید) در شرایط بی‌هوازی و روشنایی اکسید می‌شوند و دی‌اکسیدکربن و هیدروژن تولید می‌کنند. نیتروژناز، آنزیم کلیدی این فرایند است که در شرایط نبود نیتروژن می‌تواند باعث تولید هیدروژن با استفاده از انرژی نورانی و ترکیبات احیاشده به‌عنوان دهندهٔ الکترون و فردوکسین به‌عنوان ناقل الکترون باشد. راندمان این نوع فرایند با توجه به نوع منبع کربن می‌تواند بین ۴ مول هیدروژن به‌ازای هر مول سوبسترا تا ۱۲ مول هیدروژن باشد. باکتری‌های فتوسنتزکنندهٔ گوگردی سبز و ارغوانی، باکتری‌های غیرگوگردی و برخی گونه‌های جلبک‌های سبز قادر به انجام این دسته از فرایندها هستند؛ برای مثال، می‌توان به *رودوباکتر کپسولاتوس*[۲۸]، *رودوباکتر اسفروئیدس*[۲۹]، *رودوبولوم پالوستریس*[۳۰] و *رودوسودوموناس سولفیدوفیلوم*[۳۱] اشاره کرد. از میکروارگانیسم‌های فتوسنتتیک می‌توان به تنهایی یا با کشت همزمان باکتری‌های فتوسنتتیک و تخمیرکننده استفاده کرد. در صورت استفاده از باکتری‌های فتوسنتزکننده به تنهایی محدودیت‌هایی ازجمله سرعت پایین تولید هیدروژن زیستی، ممانعت سوبسترا و نیاز به نور زیاد وجود دارد؛ اما در صورتی که از سیستم‌های مخلوط با کشت همزمان باکتری‌های مولد هیدروژن در نور و تاریکی استفاده شود، اسیدهای آلی توسط مولدین هیدروژن تاریکی، تولید و به‌طور همزمان توسط مولدین هیدروژن در روشنایی مصرف می‌شوند؛ بنابراین، مهار سوبسترا از بین می‌رود و می‌توان به مقادیر بالاتری از هیدروژن دست یافت. برای کاهش قیمت تولید سوخت، می‌توان از منابع کربن ارزان قیمت یا مواد زائد سایر صنایع ازجمله خروجی تخمیر تاریکی استفاده کرد (۱۳ و ۱۴).

تخمیر تاریکی[۳۲]: از میان همه فرایندهای اشاره‌شده، این فرایند به‌دلیل سادگی عملکرد، راندمان بالا، انعطاف‌پذیری در کشت، تحقق همزمان تولید هیدروژن و مصرف ضایعات آلی و نیازنداشتن به نور امیدبخش‌تر بوده و توجهات زیادی را به خود جلب کرده است. در این فرایند سوبستراهای آلی مختلف در شرایط بی‌هوازی و تاریکی توسط باکتری‌های بی‌هوازی اختیاری یا مطلق به هیدروژن تبدیل می‌شوند و انرژی مورد نیاز در این فرایند به‌جای نور خورشید از اکسیداسیون سوبستراهای آلی تأمین می‌شود. در این فرایند محصولات متابولیکی متنوعی تولید می‌شوند که مقدار و ترکیب آن با توجه به نوع میکروارگانیسم و شرایط فرایند متفاوت است. کربوهیدرات‌ها منبع کربن ترجیحی برای فرایند تخمیر هستند. روش‌های زیادی

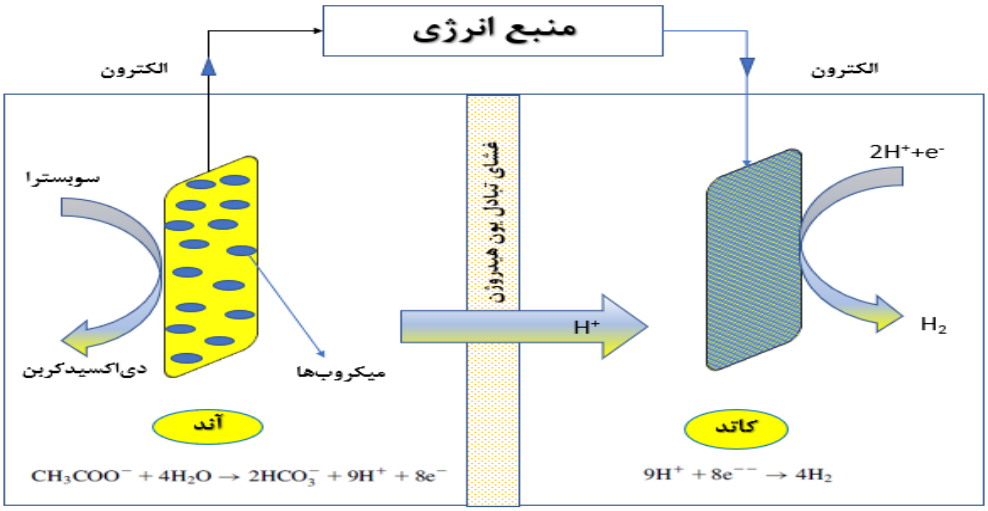
برای افزایش مؤثر تولید هیدروژن در این دسته از فرایندها بررسی شده است؛ ازجمله پیش‌تیمار سوبسترا با اسید / باز، اولتراسونیک و هیدرولیز آنزیمی، استفاده از تخمیر همزمان، مهندسی ژنتیک و افزودن مواد شیمیایی (ازجمله فلزات و اکسیدهای فلزی، نانوذرات و سایر فاکتورهای دارای اثرات سینرژیستی). افزودنی های فلزی مانند سولفات آهن[۳۳] می‌تواند به‌طور مؤثری تولید هیدروژن زیستی را افزایش دهد؛ برای مثال، *انتروباکتر، اشرشیا کلای و کلستریدیوم*، نمونه‌ای از باکتری‌هایی هستند که می‌توان در کشت‌های خالص برای تولید هیدروژن به کار برد. *کلستریدیوم ترموسلوم*[۳۴] دارای سیستم آنزیمی سلولوزومی است و درنتیجه می‌تواند از سلولز به‌عنوان ماده اولیه تولید هیدروژن استفاده کند. *کلستریدیوم استوبوتیلیکوم*[۳۵] یکی دیگر از گونه‌های مهم است که با تخمیر بوتیراتی، بازده هیدروژن تولیدی به میزان ۳/۵ میلی‌مول بر گرم دارد. *کلستریدیوم زایلانولا یتیکوم*[۳۶]، *کلستریدیوم پاپیروسولونس*[۳۷]، *کلستریدیوم بیجرینکی*[۳۸]، *دسولفوویبریو دسولفوریکانس*[۳۹]، *اتانولیژننز هاربیننس*[۴۰] و گونه‌های *رومینوکوکوس*[۴۱] ازجمله دیگر باکتری‌های دخیل در تولید هیدروژن زیستی‌اند (۱۵). در جدول ۱ به‌طور خلاصه مقایسهٔ فرایندهای تخمیر در تاریکی و روشنایی ذکر شده است.

جدول ۱- مقایسهٔ فرایندهای تخمیر در تاریکی و تخمیر نوری برای تولید هیدروژن زیستی

رفرنس	تخمیر نوری	تخمیر تاریکی
(16)	استفاده از سوبستراهای محدودی مانند قندهای ساده (ساکارز و گلوکز) بوتیریک اسید - استیک اسید به‌عنوان اسیدهای آلی	استفاده از کربوهیدرات‌های آلی گسترده و پیچیده
(16)	باکتری‌های غیرگوگردی ارغوانی عمده‌ترین میکروارگانیسم‌های مورد استفاده	گونه‌های *کلستریدیوم* و *انتروباکترو باسیلوس* به‌طور عمده استفاده می‌شوند
(16)	انرژی مصرفی بیشتر	انرژی مصرفی کمتر
(16)	نیتروژناز آنزیم کلیدی برای تولید هیدروژن	هیدروژناز آنزیم کلیدی برای تولید هیدروژن
(16)	زمان انجام فرایند بیشتر از دو هفته	زمان انجام فرایند بسیار سریع و کمتر از یک هفته
(16)	حساس‌بودن باکتری‌های غیرگوگردی ارغوانی به اکسیژن و نیتروژن	حساس‌بودن میکروارگانیسم‌های تخمیری تاریکی فقط به اکسیژن
(16)	محدودهٔ pH ۶/۸ – ۷/۵	محدودهٔ pH ۵/۵ – ۶/۵
(17)	پرهزینه و نیازمند راکتورهای زیستی بسیار گران (حساسیت بالا به اکسیژن)	هزینه‌بر، به‌دلیل فرایندهای تغییر سوبستراهای پلیمری به مونومر
(17)	طراحیه پیچیده ی راکتور های زیستی	بهره‌برداری سخت از سوبستراهای تخمیری
(15)	کارایی و استفادهٔ کم سیستم نیتروژنازی میزان تولید هیدروژن پایین	تغییرات ناقص سوبسترا میزان تولید هیدروژن بالا

الکترولیز میکروبی[۴۲]: این تکنولوژی بسیار شبیه به پیل های سوختی میکروبی است و پتانسیل زیادی برای تیمار فاضلاب و آب‌های زائد دارد. این سیستم از یک آند و یک کاتد تشکیل شده است که با یک غشای تبادل یونی از یکدیگر جدا شده‌اند. میکروارگانیسم‌ها در آند سوبستراهای آلی را اکسید می‌کنند و الکترون‌های

تولیدشده به‌ترتیب ازطریق یک مدار خارجی و پروتون‌های تولیدشده با عبور از یک غشای تبادل یونی به کاتد می‌رسند. در این سیستم یک منبع انرژی الکتریکی خارجی نیز وجود دارد تا تأمین کنندهٔ انرژی لازم برای احیای پروتون‌ها و تولید هیدروژن مولکولی در کاتد باشد؛ زیرا این واکنش ازنظر ترمودینامیکی به‌صورت خودبه‌خودی انجام نمی‌شود (شکل ۳). با توجه به نوع سوبسترا کارایی تولید هیدروژن متفاوت خواهد بود. میکروارگانیسم‌های مختلفی ازجمله آرکی‌ها، سیانوباکترها و برخی باکتری‌ها ازجمله گونه‌های *دسولفیتوباکتریوم*[۴۳] و *دهالوکوکوئیدس*[۴۴] و میکروارگانیسم‌های متانوژن و هموآستوژن قابلیت استفاده در این فرایند را دارند (۱۸و۱۹).



شکل ۳- شکل شماتیک MEC

آنزیم‌های مؤثر بر تولید هیدروژن زیستی: آنزیم‌های دخیل در تولید هیدروژن زیستی، آنزیم‌های نیتروژناز و انواع هیدروژنازها هستند که با توجه به شرایط استفاده‌شده در تولید هیدروژن زیستی، نوع و فعالیت این آنزیم‌ها متفاوت خواهد بود. نیتروژناز آنزیمی است که در تثبیت نیتروژن گازی و تبدیل آن به آمونیاک در آرکی‌ها و باکتری‌های تثبیت‌کنندهٔ نیتروژن دخیل است و در حین انجام این فرایند گاز هیدروژن نیز به‌عنوان یک محصول جانبی تولید می‌شود. نیتروژنازها تنها خانوادهٔ آنزیم‌هایی‌اند که می‌توانند واکنش تثبیت نیتروژن را کاتالیز کنند. تثبیت نیتروژن برای همه اشکال زندگی ضروری است؛ زیرا نیتروژن برای بیوسنتز مولکول‌ها (نوکلئوتیدها و اسیدهای آمینه) ضروری است. نیتروژنازها در ساختار خود کوفاکتورهای دربردارندهٔ فلزاتی همچون گوگرد، آهن و مولیبدن دارند که این کوفاکتورها در تبدیل نیتروژن به آمونیاک یا انتقال الکترون شرکت دارند. براساس نوع کوفاکتور فلزی در جایگاه فعال به سه دسته FeMo – نیتروژناز، FeV – نیتروژنازها و FeFe – نیتروژنازها تقسیم می‌شوند. FeFe – نیتروژنازهای یافت‌شده در باکتری‌های فتوتروف و سیانوباکترها، مسئول تبدیل نیتروژن اتمسفری به آمونیوم (به‌عنوان منبع نیتروژن برای رشد میکروبی) هستند. در نبود نیتروژن

مولکولی، نیتروژنازها می‌توانند تولید هیدروژن مولکولی را با احیای پروتون با استفاده از فردوکسین به‌عنوان دهندهٔ الکترون کاتالیز کنند. تراوش پروتون در صورت نبودن نیتروژن در شرایط تاریکی، به‌واسطهٔ نیتروژناز سیانوباکتر به تبدیل آن به هیدروژن منجر می‌شود. نیتروژنازها به اکسیژن حساس‌اند؛ بنابراین، در شرایط بی‌هوازی و در تخمیر نوری در انواع باکتری‌ها و آرکی‌ها در تولید هیدروژن زیستی دخیل‌اند. در سیانوباکترها به‌عنوان میکروارگانیسم‌های اتوتروف مولد اکسیژن در خلال فتوسنتز، سلول‌های تغییریافتهٔ خاصی با عنوان هتروسیست، نیتروژنازها را در خود جای می‌دهند که به‌واسطهٔ دیواره‌های ضخیم و افزایش میزان تنفس، شرایط مطلوب ازنظر میزان اکسیژن را برای آنزیم فراهم می‌کنند؛ در عین حال، ترکیباتی ازجمله آمونیاک نیز می‌تواند زیان‌بار و از عوامل بازدارنده برای این سیستم آنزیمی در فرایند به شمار آیند (۳).

هیدروژنازها – متالوآنزیم‌های تولیدکنندهٔ هیدروژن– از فلزات مختلفی ازجمله آهن و نیکل برای کاتالیز تبدیل هیدروژن استفاده می‌کنند و بیشتر نسبت به مونوکسیدکربن و سولفید هیدروژن مقاوم‌اند. این آنزیم‌ها به‌طور عمده در باکتری‌ها و آرکی‌ها وجود دارند و در میکروارگانیسم‌های یوکاریوتی نیز یافت می‌شوند. با توجه به نوع مراکز فلزی که در جایگاه فعال آنها حضور دارد، نسبت به اکسیژن حساسیت نشان می‌دهند. هیدروژنازهای [FeFe] که به‌طور فعال قادر به تولید هیدروژن مولکولی‌اند، به اکسیژن حساس‌اند و خیلی سریع و به‌طور برگشت‌ناپذیر در حضور اکسیژن غیرفعال می‌شوند. این دسته از هیدروژنازها در باکتری‌های شدیدا بی‌هوازی ازجمله *کلستریدیوم*‌ها، مانند *کلستریدیوم پاستورانیوم*، قارچ‌ها و برخی از جلبک‌های سبز تک‌سلولی مانند *کلامیدوموناس رینهاردی*[۴۵] وجود دارند. هیدروژنازهای [NiFe] کمتر به اکسیژن حساس‌اند و بیشتر آنها به‌صورت برگشت‌پذیر در برابر اکسیژن مهار می‌شوند و می‌توانند دوباره فعال شوند. این دسته در تعداد بیشتری از میکروارگانیسم‌ها ازجمله بسیاری از باکتری‌ها و همچنین در آرکی‌ها یافت می‌شوند. هیدروژنازهای [NiFe] به‌طور عمده در میکروارگانیسم‌های مصرف‌کنندهٔ هیدروژن یافت می‌شوند (۴-۶). هیدروژناز *رالستونیا اروپا* کاندید مناسبی برای تولید هیدروژن است؛ چون به اکسیژن مولکولی مقاوم است. هیدروژنازها برای نخستین‌بار در دهه ۱۹۳۰ کشف شدند. از آن زمان، شایان توجه بسیاری از محققان ازجمله شیمی‌دانان معدنی قرار گرفته‌اند و انواع شبیه‌سازهای هیدروژناز را سنتز کردند که مقاوم به اکسیژن باشند. درک مکانیسم کاتالیزوری هیدروژناز ممکن است به دانشمندان در طراحی منابع انرژی زیستی پاک مانند جلبک‌های تولیدکنندهٔ هیدروژن کمک کند. در جدول ۲ واکنش‌های مختلف تولید هیدروژن وجود دارند که با واسطه‌ها و کوآنزیم‌های مختلفی مانند رودوکسین، فرودوکسین، نیکوتین‌آمید و کینون، هیدروژن تولید می‌کنند. آنزیم‌های هیدروژنازی و نیتروژنازی می‌توانند به‌صورت تکی یا همزمان در سلول برخی از میکروارگانیسم‌ها وجود داشته باشند.

جدول ۲– طبقه‌بندی بیوشیمیایی دهیدروژنازها

واکنش	آنزیم هیدروژناز
$H_2 + NAD^+ \rightleftharpoons H^+ + NADH$	Hydrogen dehydrogenase (hydrogen:NAD^+ oxidoreductase)
$H_2 + NADP^+ \rightleftharpoons H^+ + NADPH$	Hydrogen dehydrogenase (NADP)

(hydrogen:NADPH$^+$ oxidoreductase)	
Cytochrome-c_3 hydrogenase (hydrogen: ferricytochrome-c_3 oxidoreductase)	H_2 +2 ferricytochrome $c_3 \rightleftharpoons 2H^+$ + 2 ferrocytochrome c_3
Hydrogen:quinone oxidoreductase	H_2 + menaquinone $\rightleftharpoons$ menaquinol
Ferredoxin hydrogenase (hydrogen:ferredoxin oxidoreductase)	H_2 + 2oxidized ferredoxin $\rightleftharpoons 2H^+$ +2 reduced ferredoxin
Coenzyme F_{420} hydrogenase (hydrogen:coenzyme F_{420} oxidoreductase)	H_2 + oxidized coenzyme $F_{420} \rightleftharpoons$ reduced coenzyme F_{420}
Hydrogenase (acceptor) (hydrogen:acceptor oxidoreductase)	$H_2 + A \rightleftharpoons AH_2$
Methenyltetrahydromethanopterin hydrogenase (hydrogen:5,10-methenyltetrahydromethanopterin oxidoreductase)	H_2 + 5,10-methenyltetrahydromethanopterin $\rightleftharpoons H^+$ + 5,10 methylenetetrahydromethanopterin
Methanosarcina-phenazine hydrogenase [hydrogen:2-(2,3-dihydropentaprenyloxy) phenazine oxidoreductase]	H_2 + 2-(2,3-dihydropentaprenyloxy) phenazine $\rightleftharpoons$ 2-dihydropentaprenyloxyphenazine

https://enzyme.expasy.org

سوبستراهای استفاده‌شده در تولید هیدروژن زیستی: برای تولید این سوخت زیستی از طیف وسیعی از سوبستراها و زائدات، با توجه به شیوهٔ انجام واکنش استفاده می‌شود. امروزه افزایش جمعیت موجب شده است گسترش و انباشته‌شدن ضایعات و پسماندها یکی از مشکلات عمدهٔ جوامع شهری باشد؛ اما به‌کارگیری این پسماندها برای تولید هیدروژن، راهی برای کاهش این مواد زائد انباشته‌شده محسوب می‌شود که می‌تواند در عین حال باعث تولید ماده‌ای با ارزش افزودهٔ بالا شود. همچنین، بسیاری از این منابع به‌دلیل داشتن مواد مغذی فراوان ازجمله لیپیدها، مواد معدنی و ویتامین‌ها می‌توانند جزء بهترین سوبستراها برای استفاده در تولید هیدروژن زیستی باشند (۱۷). یکی از در دسترس‌ترین سوبستراها در تولید هیدروژن، توده‌های زیستی لیگنوسلولزی است که به دلایل مختلف ازجمله فراوانی، تجدیدپذیری و در دسترس بودن برای تولید هیدروژن بسیار درخور توجه قرار گرفته‌اند (۲۰). زائدات حاصل از جنگل‌ها، کشاورزی و نیز کودهای حیوانی غنی از این منابع لیگنوسلولزی هستند. این توده‌های لیگنوسلولزی از سه بخش اصلی سلولز (۴۰ درصد)، همی‌سلولز (۲۵ درصد) و لیگنین (۲۰ درصد) تشکیل شده‌اند (۱۵ درصد باقی‌مانده نیز اجزای بسیار کوچکی از ترکیبات غیرآلی هستند)؛ برای مثال، محصولات گیاهی کتان و کنف که بخشی از ساختارهای مستحکم برای سلول گیاهی‌اند، منابع غنی از سلولز می‌توانند باشند (۲۱)؛ اما برای به‌کارگیری هرکدام از این اجزا نیاز به انجام واکنش‌های تجزیه برای ایجاد واحدهای مونومری است که می‌توان به روش‌های فیزیکی (هیدروترمولیز - فشار ناشی از بخار)، شیمیایی (اسید و باز) و زیستی اشاره کرد. نکتهٔ مهم در استفاده از این سوبستراهای لیگنوسلولزی، این است که ترکیبات لیگنینی می‌توانند موجب محدودیت برای عملکرد آنزیم‌ها و درنتیجه، به کاهش بازده هیدروژن تولیدی منجر شوند. به همین دلیل، سلولز نسبت به همی‌سلولز و لیگنین برای تولید هیدروژن به‌طور گسترده‌تر استفاده می‌شود (۲۰). نشاسته نیز یکی دیگر از پلیمرهای با وزن مولکولی بالاست که در حالت پلیمری قادر به گذشتن از غشای سلولی نیست؛ بنابراین، باید ابتدا به واحدهای سازندهٔ خود تجزیه شود که این امر با استفاده از آنزیم‌ها و روش‌های تجزیه‌ای گسترده‌ای مانند روش‌های فیزیکی، گرمایی، زیستی یا ترکیبی از این روش‌ها امکان‌پذیر است. پسماندهای کارخانجات سیب‌زمینی، کودهای گاوی و لجن‌ها، ترکیبات غنی از نشاسته‌اند (۱۶). پسماندهای کشاورزی

ازجمله محصولات گیاهی که در بازارهای مختلف به‌صورت غیرقابل عرضه‌اند، با داشتن پلیمرهای ساده و پیچیده از کربوهیدرات‌ها، به‌عنوان سوبسترا برای تولید هیدروژن استفاده می‌شوند. همچنین، پسماندهای جانوری و کودها غنی از میکروارگانیسم‌های تولیدکنندهٔ هیدروژن‌اند و به‌دلیل تجدیدپذیری و غنی‌بودن از مواد مغذی، سوبستراهای با ارزشی به شمار می‌آیند. فاضلاب‌های مختلف خانگی و صنعتی می‌توانند برای تولید انرژی زیستی استفاده شوند و موجب بازیابی انرژی شوند (۴۵). پسماندهای کارخانجات صنعت شراب و آبجوسازی، فرآوری شکر، ملاس و ...، از دیگر منابع غنی از سوبستراهای مورد نیاز برای تولید هیدروژن‌اند (۱۷). در جدول‌های ۳ و ۴ به‌طور خلاصه انواع سوبستراها و میکروارگانیسم‌های درگیر در فرایندهای تخمیر نوری و تاریکی آورده شده‌اند.

راهکارهای افزایش تولید هیدروژن زیستی و تولید آنزیمی: تغییرات اولیه روی سوبستراهای مصرفی برای تولید هیدروژن زیستی و افزودن برخی مواد حین انجام واکنش می‌توانند در افزایش راندمان تولید مؤثر باشند؛ برای مثال، در فرایند تخمیر نوری حضور ترکیبات نیتروژنی مانند آلبومین، گلوتامات و همچنین عصارهٔ مخمر در غلظت‌های مناسب باعث افزایش تولید می‌شوند. در بعضی از فرایندهای تولیدی هیدروژن محصولات جانبی فراوانی ایجاد می‌شوند که موجب مختل‌کردن فرایند و کاهش سرعت در تولید می‌شوند؛ برای مثال، در تخمیر تاریکی اسیدهای گوناگونی مانند بوتیریک اسید تولید می‌شود؛ اما استفاده از ترکیباتی مانند فلزها (پالادیوم[۴۶]، نیکل[۴۷]، نقره[۴۸]، آهن[۴۹] و ...)، یون‌های فلزی (منیزیم[۵۰]، سدیم[۵۱]، نیکل[۵۲]، آهن[۵۳] و ...) و اکسیدهای فلزی (اکسید زیرکونیوم[۵۴]، اکسید کبالت[۵۵]، اکسید آهن ۳[۵۶] و مگنتیت[۵۷]) می‌توانند تا حدودی در افزایش تولید هیدروژن مؤثر واقع شوند (۲۰).

کشت همزمان می‌تواند یکی از راهکارهای افزایش تولید هیدروژن باشد. یکی از معروف‌ترین باکتری‌های بنفش غیرگوگردی، *رودوباکتر اسفروئیدس*[۵۸] است که به‌دلیل قابلیت استفاده از انواع مختلف بسترها و فعالیت زیاد، می‌تواند در تولید هیدروژن در شرایط بی‌هوازی نقش داشته باشد. به‌طور کلی، برای افزایش سرعت و عملکرد تولید هیدروژن، بیشتر با باکتری‌های دیگر همچون *کلستریدیوم*، *لاکتوباسیلوس دلبروکی* و *انتروباکتر* کشت داده می‌شود. کشت توأم این باکتری با *هالوباکتریوم سالیناروم*[۵۹] تولید هیدروژن را توسط *رودوباکتر* افزایش می‌دهد. هالوباکتر یک آرکی شیمیوارگانوترف است؛ اما در فشار کم اکسیژن قادر است از سیستم نوری فتورودوپسین، برای تولید انرژی، پروتون آزاد کند. سیستم غشایی این آرکی قادر به جذب نور و تولید پمپ پروتونی است. این سیستم غشایی در *هالوباکتر سالیناروم* به تغییرات pH و حرارت محیط، مقاوم و منبع بسیار مناسبی برای فعالیت آنزیم دی‌نیتروژناز و هیدروژناز است تا بتواند پروتون آزادشده توسط رنگدانهٔ هالوباکتر را به هیدروژن تبدیل کند (۲۱). سلول‌های *هالوباکتر* به راحتی در آب مقطر لیز می‌شوند و غشا آزاد می‌شود. غشای آزادشده در حضور نور، پمپ پروتون ایجاد می‌کند و توسط نیتروژناز *رودوباکتر* هیدروژن تولید می‌شود. از ۸۰

نانومول رودوپسین می‌توان ۲۱۷ میلی‌لیتر هیدروژن در ساعت توسط *رودوباکتر* تولید کرد. یک مثال دیگر از کشت همزمان این است که هنگام استفاده از نشاسته به‌عنوان سوبسترا در محیط کشت، ترکیب دو باکتری *باسیلوس سرئوس*[۶۰] ATCC14579 و *بروونـدیموناس ناجانجسامنسیس*[۶۱] سویهٔ BIO-TAS2-2 موجب افزایش تولید هیدروژن از ۵۲ درصد به ۶۲ درصد می‌شود (۴۲ و ۴۳). از کشت جلبک و باکتری‌های مولد هیدروژن و غیرمولد هیدروژن به‌صورت همزمان استفاده شده است و پتنت‌هایی در این زمینه نیز ثبت شده‌اند. کشت همزمان جلبک *کلامیدوموناس* و باکتری‌های غیرمولد هیدروژن مانند گونه‌های *سودوموناس*[۶۲]، *برادی‌ریزوبیوم جاپونیکوم*[۶۳]، *اشرشیا کلای*[۶۴]، *باسیلوس سابتیلیس*[۶۵]، گونه‌های *استنوتروفوموناس*[۶۶] و *رالستونیا یوتروفا*[۶۷] در محیط تریس - استات - فسفات[۶۸] استفاده شده است که ازنظر میزان گوگرد در شرایط کمبود قرار دارد و نتایج نشان‌دهندهٔ افزایش چشمگیری در میزان، سرعت و مدت زمان تولید هیدروژن زیستی توسط جلبک *کلامیدوموناس* بوده است. بهترین نتایج در این مورد، مربوط به کشت همزمان *کلامیدوموناس* و باکتری‌های *سودوموناس فلورسنس*[۶۹] و *برادی‌ریزوبیوم جاپونیکوم*[۷۰] است که باعث افزایش تولید هیدروژن زیستی تا ۳۰ برابر در مقایسه با استفاده از جلبک *کلامیدوموناس* به تنهایی بوده است. دربارهٔ اثر سینرژیستی جلبک *کلامیدوموناس* و باکتری‌های مولد هیدروژن زیستی مانند *رودواسپیریلوم رابروم*[۷۱] و گونه‌های *رودوسودوموناس*[۷۲] نیز تحقیقاتی صورت گرفته است (۴۴).

یکی دیگر از روش‌هایی که دانشمندان برای افزایش تولید هیدروژن زیستی به کار می‌برند، کپسوله‌کردن باکتری‌های مولد هیدروژن در ماتریکس‌های مختلف ازجمله ماتریکس‌های سیلیکایی است؛ بدین ترتیب، از هیدروژنازهای حساس به اکسیژن حتی در شرایط هوازی می‌توان استفاده کرد. در تخمیر تاریکی، تکنولوژی‌های تثبیت سلول میکروبی روی حامل‌های مختلف ازجمله آلژینات، کربن فعال و کامپوزیت‌های مختلف بررسی شدند که باعث تولید پایدار هیدروژن در مدت زمان‌های بیشتر شده‌اند. هنگام استفاده از سلول‌های تثبیت‌شدهٔ جلبک هایی مانند *تتراسپورا*[۷۳]، با اضافه‌کردن پلیمری مانند کلسیم آلژینات می‌توان ظرفیت تولید هیدروژن را افزایش داد. مکانیسم عملکرد این پلیمر به این صورت است که با کنترل تولید اکسیژن حین فرایند، از سیستم آنزیمی هیدروژنازی این جلبک محافظت می‌کند که مسئول تولید هیدروژن است؛ درنتیجه، عملکرد آنزیم به‌دلیل حساسیت به اکسیژن مختل نمی‌شود (۲۹). تثبیت آنزیم‌ها در شرایط خاص، برای تولید انبوه این گاز از اهمیت خاصی برخوردار است؛ برای مثال، هیدروژناز و غشای سلولی *هالوباکتر سالیناروم* در شرایط هوازی فعال‌اند؛ اما نیتروژن رودوکتاز شرایط بی‌هوازی را برای عملکرد خود نیاز دارد.

جدول ۳- انواع سوبستراهای استفاده‌شده در سیستم تخمیری تاریکی در راکتورهای ناپیوسته

رفرنس	سوبسترا	بازده هیدروژن	باکتری
ضایعات نشاسته‌ای			
(16)	سیب‌زمینی	7.21 mmol H_2 g^{-1} COD	*C.butyricum* NRRL-B-1024 & *E.aerogenes* NRRL-B-115

(22)	ذرت	1.59 L H_2 L^{-1} محیط کشت	*C.acetobutylicum* DSM 792
(16)	گندم	2.34 mol H_2 mol^{-1}گلوکز	*Biohydroghenbacterium* R3
(23)	گندم	1.09 mol H_2 mol^{-1}گلوکز	*Enterobacter aerogenes* NCIMB10102
(24)	گندم	1.96 mol H_2 mol^{-1} گلوکز	لجن
(22)	سیب‌زمینی	0.29 mol H_2 mol^{-1} هگزوز	*E. coli* HD701
(22)	سیب‌زمینی شیرین	2.7 mol H_2 mol^{-1} گلوکز	*C.butyricum* IFO13949 & *Enterobacter aerogenes* HO-39
	ضایعات لیگنوسلولزی		
(16)	تفالهٔ سیب	1.89 ml H_2 g^{-1}	*Clostridium roseum* ATCC17797
(16)	پوست نارگیل	0.279 mol H_2 mol^{-1} قند احیاشده	*Enterobacter aerogenes* NBRC13534
(22)	کاه برنج هیدرولیزشده	1.53 mol H_2 mol^{-1} گلوکز	*Bacillus cereus* (KR809374)
(22)	کاه برنج	2.7 mmol H_2 g^{-1} کاه برنج	*Thermotoga neapolitana*
(16)	پوست سورگم (نوعی گیاه)	۱,۰۵ mol H_2 mol^{-1} ه قند احیاشده	*Colostridium beijerinckii* KCTC-178
	سلولز		
(20)	سلولز	176 ml / g	*Cellulomonas* sp
(20)	سلولز	4.79 mmol	*Cellulomonas uda*
(25)	سلولز	1.91 mmol	*Cellulomunas biazotea* NCIM-2550
(25)	سلولز	4.20 ml /g	میکروفلورهای کود گاو
(25)	سلولز	122 ml / g	*Trichoderma viride*
(20)	سلولز	521 ml / g	*Enterobacter SPP.*
(20)	سلولز	43.8 mmol	*Thermoanaerobacterium* sp strain F6
(20)	سلولز	2.20 mmol	*Hyperthermophilic eubacterium* & *Thermotoga neapolitana*
(25)	سلولز	2.0mol	*Clostridium butyricum* & *Ruminococcus albus*
(20)	سلولز	8.10mmol	*Clostridium acetobutylicum* X9 & *Ethanoigenes harbinense* B49
(20)	سلولز	1387ml/L	*C.thermocellum* & *C.thermopalmarium*
(20)	سلولز	44.0mmol	*Sellulomonas fimi* & *Rhodopseudomonas palustris*
(20)	سلولز	10.4mmol	*C.acetobutylicum* X9 & *Ethanoigenens harbinense* B2
	قند ساده		
(16)	گلوکز	1.9 mol H_2 mol^{-1} گلوکز	*Enterobacter cloacae* DH-89
(16)	گلوکز	2.2 mol H_2 mol $^{-1}$ گلوکز	*C.pasteurianum* CH5
(26)	گلوکز	1.74 mol H_2 mol^{-1} گلوکز	.*acetobutylicum* NCIM 2337 & *Enterobacter cloacae* 811101

جدول ۴- تولید هیدروژن با ترکیب‌کردن فرایندهای تخمیر در تاریکی و نور با استفاده از نشاسته به‌عنوان سوبسترا

رفرنس	سوبسترا	بازده هیدروژن	سویهٔ باکتریایی در تخمیر تاریکی	سویهٔ باکتریایی در تخمیر نوری
(22)	ذرت	2.62 mol H_2 mol^{-1} هگزوز	*C.acetobutylicum* DSM792	*Rhodobacter sphaeroides* O.U.001

Rhodopseudomonas palustris GCA009	*C.butyricum*NRRL-B-1024 & *E.aerogenes* NRRL-B-115	8.3 mmol H_2 g^{-1} COD	سیب‌زمینی	(16)
Rhodobacter sphaeroides M-19	*C.butyricum* IFO13949 & *Enterobacter aerogenes* HO-39	7.2 mol H_2 mol^{-1} گلوکز	سیب‌زمینی شیرین	(16)
Rhodobacter sphaeroides-RV	*C.beijerinkii* DSMZ-791	90 ml g^{-1} نشاسته	گندم	(27)
R.sphaeroides & *R.palustiris*	لجن	63.9 ml g^{-1} نشاسته	گندم	(16)
Rhodobacter sphaeroides N7	*C.butyricum*	6.1 mol H_2 mol^{-1} گلوکز	نشاسته	(16)

استفاده از سیستم‌های آنزیمی، از روش‌های نوین در تولید هیدروژن زیستی است. کمپلکس‌های آنزیمی که بر سطوح جامد چسبیده شده‌اند، با استفاده از الکترون‌های فعال‌شده با نور می‌توانند تولید هیدروژن کنند. همچنین، مسیرهای متابولیکی سنتزی که به آنها آنزیم‌های خالص‌شده اضافه شده است، با راندمان بالا قندها را به هیدروژن و دی‌اکسیدکربن می‌توانند تبدیل کنند. برای انجام این تکنولوژی‌ها باید مقادیر کافی از آنزیم خالص در اختیار باشد و بدین منظور دانشمندان با استفاده از مهندسی ژنتیک و روش‌های موتاسیون توانستند به آنزیم‌های هیدروژنازی با کارایی بالاتر برسند که مقاومت بیشتری در برابر اکسیژن دارند و آنزیم‌های مزبور را در سیستم‌های میکروبی بسیار متنوع به میزان زیاد به‌صورت پروتئین‌های هترولوگ یا غیرهترولوگ تولید کرده‌اند. از این آنزیم‌ها در آزمایشگاه برای تولید هیدروژن می‌توان استفاده کرد. در این رابطه، غشاها و هیدروژل‌هایی معرفی شده‌اند که قادرند از آنزیم‌ها در برابر شرایط محیطی ازجمله اکسیژن محافظت کنند. همچنین، هیدروژنازها می‌توانند در داخل لیپوزوم‌ها به همراه آنزیم‌ها و کوفاکتورهای لازم جای داده و به‌عنوان بیوراکتورهایی برای تولید هیدروژن از گلوکز استفاده شوند؛ برای مثال، *اشرشیا کلای* نوترکیب‌شده با هیدروژناز *رودوباکتر اسفروئیدس* قادر به تولید ۲۰۰ برابری هیدروژن نسبت به سلول‌های اولیه در شرایط بی‌هوازی تاریکی بوده است. همچنین، بیان هیدروژنازهای مقاوم به اکسیژن در ارگانیسم‌های فتوسنزکننده می‌تواند در افزایش تولید هیدروژن زیستی مؤثر باشد که با تغییر ژنتیکی در آنزیم‌های آن میکروارگانیسم انجام می‌شود یا با بیان آنزیم‌های تحمل‌کنندهٔ اکسیژنی که از باکتری های دیگر به دست آمده است. دانشمندان با ترکیب آنزیم‌های مسیر پنتوزفسفات با هیدروژناز و کپسوله‌کردن آنها در ماتریکس‌های خاص توانسته‌اند کارایی تولید هیدروژن را بالا ببرند. هیدروژناز به‌دست‌آمده از *پیروکوکوس فوریوس*[۷۴] در شرایط آزمایشگاهی و خارج از سلول زنده به همراه گلوکز دهیدروژناز برای تولید هیدروژن از گلوکز به کار رفته است. این دو آنزیم از کوفاکتور $NADP^+$ استفاده می‌کنند و هیدروژناز خالص‌شده از *پیروکوکوس فوریوس* همراه آنزیم‌های پنتوزفسفات قادر است ۱۱/۶ مول هیدروژن به‌ازای هر مولکول گلوکز فسفات تولید کند. باکتری *ترموتوگا ماریتیما*[۷۵] یک یوباکتر هایپرترموفیل بی‌هوازی گرمادوست است که عصارهٔ سلولی آن همه آنزیم‌ها و کوفاکتورهای لازم برای تولید هیدروژن را دارد (۵ و ۳۰-۳۲).

محدودیت‌های تولید هیدروژن زیستی: باوجود مزایای عمده‌ای که تولید هیدروژن به‌عنوان سوخت زیستی دارد، برای تولید آن ممکن است مشکلاتی

وجود داشته باشد؛ برای مثال، هنگامی که از پلیمرهایی مانند سلولز به‌عنوان سوبسترا استفاده می‌شود، برای تجزیهٔ آن به واحدهای مونومری، روش‌هایی مانند هیدرولیز آنزیمی نیاز است که این مرحله می‌تواند یکی از پردردسرترین و پرهزینه‌ترین مرحله‌ها باشد (۳۳). در روش‌های مهندسی و طراحی راکتورهای مناسب برای تخمیر نوری، مشکلاتی برای تأمین نور مناسب فرایند وجود دارد. همچنین، بهره‌برداری و استفاده از هیدروژن به‌صورت خالص و ذخیره‌سازی آن مشکل‌ساز است و برای عرضه‌کردن هیدروژن به‌عنوان سوخت در حمل‌ونقل، محدودیت‌هایی وجود دارد (۱۷). در تولید هیدروژن با استفاده از روش الکترولیز، هزینهٔ تولید به مانعی مهم برای تجاری‌سازی فناوری مبدل شده است. یکی از موارد، وجود الکترودهای مناسب در این زمینه است که به‌تازگی با استفاده از کامپوزیت‌های مبتنی بر پلیمرهای زیستی مانند نانوسلولز باکتریایی حل شده است (۳۴). نانوسلولز باکتریایی باوجود خواص منحصربه‌فردی که در این رابطه دارد، می‌تواند در مقیاس بالا با تخمیر میکروبی از منابع ارزان قیمت تهیه شود (۳۵).

خالص‌سازی و ذخیره‌سازی هیدروژن زیستی: سیستم‌های فتولیز مستقیم و غیرمستقیم، گاز هیدروژن خالص تولید می‌کنند؛ اما روش‌های تخمیری مجموعه‌ای از گازها را تولید می‌کنند که حاوی هیدروژن نیز هستند که محتوای هیدروژنی در آنها اغلب کمتر از ۵۰ درصد است. برای داشتن هیدروژن زیستی با خلوص بالا باید انواع دیگر گازها ازجمله دی‌اکسیدکربن، متان، مونوکسیدکربن حذف شوند. روش‌های بسیاری برای خالص‌سازی این گاز از مخلوط گازهای دیگر وجود دارد و خالص‌سازی هیدروژن زیستی نیز از چالش‌های خیلی مهم برای پژوهشگران زیستی است. راه‌های مختلفی برای این امر پیشنهاد می شوند که عبارت‌اند از ۱- خالص‌سازی در دمای سرد که حدودا ۹۸ درصد کارایی دارد؛ اما قبل از خالص‌سازی با این روش گاز سولفید و دی‌اکسیدکربن باید خارج شوند. ۲- غشاهای نانو که این روش گران است و غشاهای مختلف ازجمله پلی‌سولفونات و پلانینیوم استفاده می‌شوند؛ اما درصد کارایی آن کمتر از ۸۵ درصد است و این تکنولوژی فعلا در مقیاس کوچک استفاده می‌شود. هلیوم و دی‌اکسیدکربن با این غشا از گاز هیدروژن جدا می‌شوند. ۳- ایجاد هیبرید با فلز که در این روش کارایی کم است و گازهای نیتروژن، مونواکسیدکربن و سولفور نیز با فلز واکنش می دهند. ۴- ایجاد چمبرهای الکترولیت که یون هیدروژن را از پلیمرهای غشایی جامد عبور می‌دهند. این روش می‌تواند ۹۹ درصد هیدروژن خالص جمع‌آوری کند؛ اما حضور سولفور، الکترولیت را تخریب می‌کند. ۵- ایجاد کاتالیزورهای واکنشی با هیدروژن برای خروج اکسیژن که در این روش فلزات باعث تخریب کاتالیزور می شوند. ۶- استفاده از غشاهای پالادیم برای جذب هیدروژن که قادر است هیدروژن را با درصد بالا و خلوص بسیار زیاد جذب کند؛ در این نوع غشا اسیدهای چرب و سولفور مخرب‌اند (۳۶ و ۳۷).

سیستم‌های ذخیره‌سازی مطمئن با ایمنی بالا و مقرون‌به‌صرفه، یکی دیگر از چالش‌هایی‌اند که در استفاده از هیدروژن زیستی در مقیاس صنعتی وجود دارند. ذخیرهٔ هیدروژن می‌تواند براساس ذخیره‌سازی فیزیکی (به‌صورت گاز فشرده یا هیدروژن مایع) یا بر پایهٔ مواد و روش‌های شیمیایی (جذب شیمیایی) انجام شود که هرکدام محدودیت‌هایی را ایجاد می‌کنند که

برای حل آنها تحقیقات بیشتر در این زمینه نیاز است (۳۸). ترکیبات میان سطحی گرافیت[۷۶] (GICs) می‌توانند در ذخیره‌سازی هیدروژن استفاده شوند و به راحتی از سلولز باکتریایی قابل تولید هستند (۳۹).

آنالیز و سنجش هیدروژن زیستی: آنالیز و سنجش گاز هیدروژن از چالش‌های مهم پژوهشگران است. برای حل کردن چنین مشکلی باید گازهای حاصل از واکنش های میکروبی در داخل چمبری درب تفلونی جمع آوری شوند و گاز هیدروژن با سوزن مخصوص کروماتوگرافی گازی نمونه‌گیری و به دستگاه جی‌سی برای آنالیز تزریق شود؛ البته دتکتورهای دستی برای آنالیز سریع این گاز نیز وجود دارند که در جدول ۵ آورده شده‌اند. امروزه روش‌های سریعی برای سنجش گاز هیدروژن توسط تکنولوژی نانوپارتیکل‌های پلاتنیوم طراحی شده‌اند (۴۰).

جدول ۵- انواع دتکتورهای هیدروژن

	دتکتور
۱	Gasman
۲	China cpo1
۴	Honeywell
۵	Oc-904A

آیندهٔ تولید هیدروژن: طبیعت تجدیدناپذیر انرژی فسیلی و آلودگی محیط زیست ناشی از استفاده از آن، ایجاد انرژی تجدیدپذیر پاک و کارآمد را بسیار ضروری می‌کند. با استفاده از زیست‌تودهٔ میکروجلبک به‌عنوان منابع انرژی جایگزین مواد اولیه مانند هیدروژن زیستی و متان را می‌توان ازطریق تخمیر و فتوسنتز تولید کرد. برخلاف انرژی خورشیدی که دارای معایب چگالی انرژی پایین، بی‌ثباتی و مشکل در ذخیره‌سازی است، هیدروژن زیستی و بیوگاز یکی از جدیدترین منابع انرژی ایدئال در زمان حاضر هستند. با توجه به اینکه ریزجلبک‌ها زیست‌توده‌های تجدیدپذیر و مقرون‌به‌صرفه هستند و توسعهٔ فناوری‌های مربوط به آنها با سهولت انجام می‌شود، استفاده از آنها می‌تواند چشم‌اندازهای جذابی در زمینه‌های کاربردی مربوطه ایجاد کند. نکاتی که در آینده برای مقابله با چالش‌های تولید هیدروژن زیستی لازم‌اند، عبارت‌اند از ۱- امکان استفاده از زباله و تبدیل آن به هیدروژن، ۲- ساخت سویه‌های نوترکیب تولیدکنندهٔ هیدروژن بالا و مقاوم به نور، ۳- ایجاد مقاومت در میکروجلبک به هیدروژن و دی‌اکسید بالا، ۴- ساخت میکروجلبک‌های تولیدکنندهٔ هیدروژن در تاریکی، ۵- توسعهٔ تکنولوژی خالص‌سازی ارزان هیدروزن زیستی و ۶- استفاده از آنزیم‌های نوترکیب با کارایی بیشتر در تولید هیدروژن زیستی (۴۱).

References

(1) Karimi K, Emtiazi G, Taherzadeh MJ. Ethanol production from dilute-acid pretreated rice straw by simultaneous saccharification and fermentation with Mucor indicus, Rhizopus oryzae, and Saccharomyces cerevisiae. *Enzyme Microb Technol*. 2006; 40 (1): 138–44.

(2) Karimi K, Emtiazi G, Taherzadeh MJ. Production of ethanol and mycelial biomass

from rice straw hemicellulose hydrolyzate by Mucor indicus. *Process Biochem*. 2006; 41 (3): 653–8.

(3) Gabrielyan L, Sargsyan H, Trchounian A. Novel properties of photofermentative biohydrogen production by purple bacteria Rhodobacter sphaeroides: Effects of protonophores and inhibitors of responsible enzymes. *Microb Cell Fact*. 2015; 14 (1): 1–10.

(4) Lomoth R, Ott S. Introducing a dark reaction to photochemistry: Photocatalytic hydrogen from [FeFe] hydrogenase active site model complexes. *Dalt Trans*. 2009; (45): 9952–9.

(5) Hambourger M, Gervaldo M, Svedruzic D, King PW, Gust D, Ghirardi M, et al. [FeFe]-hydrogenase-catalyzed H2 production in a photoelectrochemical biofuel cell. *J Am Chem Soc*. 2008; 130 (6): 2015–22.

(6) Chenevier P, Mugherli L, Darbe S, Darchy L, Dimanno S, Tran PD, et al. Hydrogenase enzymes: Application in biofuel cells and inspiration for the design of noble-metal free catalysts for H2 oxidation. *Comptes Rendus Chim*. 2013; 16 (5): 491–505.

(7) Acar C, Dincer I. Hydrogen Production. *Comprehensive Energy Systems*. 2018: 1–40.

(8) Ntaikou I. Microbial production of hydrogen [Internet]. *Sustainable Fuel Technologies Handbook*. 2021: 315–337.

(9) Veeravalli SS, Shanmugam SR, Ray S, Lalman JA, Biswas N. Biohydrogen production from renewable resources [Internet]. Advanced Bioprocessing for Alternative Fuels, Biobased Chemicals, and Bioproducts: Technologies and Approaches for Scale-Up and Commercialization. *Elsevier*. 2019: 289–312.

(10) Wong KH, Panek R, Welsh L, McQuaid D, Dunlop A, Riddell A, et al. The predictive value of early assessment after 1 cycle of induction chemotherapy with 18F-FDG PET/CT and diffusion-weighted MRI for response to radical chemoradiotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. *J Nucl Med*. 2016; 57 (12): 1843–50.

(11) Speight JG. Gasification reaction kinetics for synthetic liquid fuel production [Internet]. *Gasification for Synthetic Fuel Production: Fundamentals, Processes and Applications. © 2015 Woodhead Publishing Limited*. 2015: 103–117.

(12) Reaño RL, Halog A. Analysis of carbon footprint and energy performance of biohydrogen production through gasification of different waste agricultural biomass from the Philippines. *Biomass Convers Biorefinery*. 2020: 1-15.

(13) Zhang Q, Zhang Z. Biological Hydrogen Production From Renewable Resources by Photofermentation [Internet]. 1st ed. Vol. 3, *Advances in Bioenergy*. Elsevier Inc. 2018: 137–160.

(14) Dalena F, Senatore A, Tursi A, Basile A. Bioenergy production from second- and third-generation feedstocks [Internet]. *Bioenergy Systems for the Future: Prospects for Biofuels and Biohydrogen*. Elsevier Ltd. 2017: 559–599.

(15) Osman AI, Deka TJ, Baruah DC, Rooney DW. Critical challenges in biohydrogen production processes from the organic feedstocks. *Biomass Convers Biorefinery*. 2020: 1-19.

(16) Das SR, Basak N. Molecular biohydrogen production by dark and photo fermentation from wastes containing starch: recent advancement and future perspective. *Bioprocess Biosyst Eng*. 2021; 44 (1): 1-25.

(17) Kamaraj M, Ramachandran KK, Aravind J. Biohydrogen production from waste materials: benefits and challenges. *Int J Environ Sci Techno*l. 2020; 17 (1): 559–76.

(18) Rivera I, Schröder U, Patil SA. Microbial electrolysis for biohydrogen production: Technical aspects and scale-up experiences. *Biomass, Biofuels, Biochemicals: Microbial Electrochemical Technology: Sustainable Platform for Fuels, Chemicals and Remediation*. Elsevier B.V. 2018: 871–898.

(19) Ziara RMM, Dvorak BI, Subbiah J. Sustainable waste-to-energy technologies: Bioelectrochemical systems. *Sustainable Food Waste-to-Energy Systems*. Elsevier Inc. 2018: 111–140.

(20) Hassan NS, Jalil AA, Vo DVN, Nabgan W. An overview on the efficiency of biohydrogen production from cellulose. *Biomass Convers Biorefinery*. 2020: 1-23.

(21) Hitam CNC, Jalil AA. A review on biohydrogen production through photo-fermentation of lignocellulosic biomass. *Biomass Convers Biorefinery*. 2020.

(22) Zagrodnik R, Łaniecki M. Hydrogen production from starch by co- culture of Clostridium acetobutylicum and Rhodobacter sphaeroides in one step hybrid dark- and photofermentation in repeated fed-batch reactor. *Bioresour Technol*. 2016.

(23) Fabiano B, Perego P. Thermodynamic study and optimization of hydrogen production by Enterobacter aerogenes. *International Journal of Hydrogen Energy*. 2002; 27: 149–56.

(24) Gokfiliz P, Karapinar I. ScienceDirect The effect of support particle type on thermophilic hydrogen production by immobilized batch dark fermentation. *Int J Hydrogen Energy*. 2016: 1–9.

(25) Ering B, Ueno Y, Kawai T, Sato S, Otsuka S, Morimoto M. Biological Production of Hydrogen from Cellulose by Natural Anaerobic Microflora. *Journal of fermentation and bioengineering*. 1995; 79 (4): 395–7.

(26) Mohanraj S, Anbalagan K, Rajaguru P. ScienceDirect Effects of phytogenic copper nanoparticles on fermentative hydrogen production by Enterobacter cloacae and Clostridium acetobutylicum. *Int J Hydrogen Energy*. 2016; 41 (25): 10639–45.

(27) Argun H, Kargi F. Bio-hydrogen production from ground wheat starch by continuous combined fermentation using annular-hybrid bioreactor. *Int J Hydrogen Energy*. 2010; 35 (12): 6170–8.

(28) Habibi M, Fanaei M, Emtiazi G. Light-sensitive biosensors based on photoactive marine cultivated strains. *Sens Rev*. 2014; 34 (3): 297–303.

(29) Maswanna T, Phunpruch S, Lindblad P, Maneeruttanarungroj C. Biomass and Bioenergy Enhanced hydrogen production by optimization of immobilized cells of the green alga Tetraspora sp . CU2551 grown under anaerobic condition. *Biomass and Bioenergy*. 2018; 111 (January): 88–95.

(30) Zhang YHP, Evans BR, Mielenz JR, Hopkins RC, Adams MWW. High-yield hydrogen production from starch and water by a synthetic enzymatic pathway. *PLoS One*. 2007; 2 (5): 2–7.

(31) Reisner E, Powell DJ, Cavazza C, Fontecilla-Camps JC, Armstrong FA. Visible light-driven H2 production by hydrogenases attached to dye-sensitized TiO2 nanoparticles. *J Am Chem Soc*. 2009; 131 (51): 18457–66.

(32) Bingham AS, Smith PR, Swartz JR. Evolution of an [FeFe] hydrogenase with decreased oxygen sensitivity. *Int J Hydrogen Energy*. 2012; 37 (3): 2965–76.

(33) Srivastava N, Srivastava M, Kushwaha D, Gupta VK, Manikanta A, Ramteke PW, et al. Efficient dark fermentative hydrogen production from enzyme hydrolyzed rice straw by Clostridium pasteurianum (MTCC116). *Bioresour Technol*. 2017; 552-558.

(34) 34. Abraham A, Jothi VR, Lee J, Yi SC, Sang BI. Bacterial nanocellulose as a green and flexible electrode matrix for efficient hydrogen evolution reaction in alkaline conditions. *Cellulose*. 2020; 27 (14): 8135–46.

(35) Tabaii MJ, Emtiazi G. Comparison of bacterial cellulose production among different strains and fermented media. *Appl Food Biotechnol*. 2016; 3 (1): 35–41.

(36) Rohani R, Chung YT, Mohamad IN. Purification of biohydrogen produced from palm oil mill effluent fermentation for fuel

cell application. *Korean Chem Eng Res*. 2019; 57 (4): 469–74.

(37) Bakonyi P, Nemestóthy N, Bélafi-Bakó K. Biohydrogen purification by membranes: An overview on the operational conditions affecting the performance of non-porous, polymeric and ionic liquid based gas separation membranes. *Int J Hydrogen Energy*. 2013; 38 (23): 9673–87.

(38) Ortigueira J, Pinto T, Gouveia L, Moura P. Production and storage of biohydrogen during sequential batch fermentation of Spirogyra hydrolyzate by Clostridium butyricum. *Energy*. 2015; 88: 528–36.

(39) Tabaii MJ, Etemadzade S, Emtiazi G. Biosynthesis, characterization and optical properties of nano-crystalline rosette-shape aragonite and iron (III) chloride–graphite intercalated materials from bacterial cellulose. *J Mater Sci Mater Electron*. 2017; 28 (11): 8339–46.

(40) Boshagh F, Rostami K. A review of measurement methods of biological hydrogen. *Int J Hydrogen Energy*. 2020; 45 (46): 24424–52.

(41) Show KY, Lee DJ, Zhang ZP. Production of biohydrogen: Current perspectives and future prospects. *Biofuels*. 2011: 467–79.

(42) Emtiazi G, Harirchi Sh. *Bacteriorhodopsin and its application in nanotechnology (prokaryotes)*. Esfahan: Mani; 2009

(43) Fanaei M. Screening of archaea and bacteria rhodopsin producers and investigation of optical sensor production in pure and mixed culture [Dissertation]. Esfahan: Esfahan university; 2013.

(44) Fakhimi N, Gonzalez-Ballester D, Fernández E, Galván A , Dubini A. Algae-Bacteria Consortia as a Strategy to Enhance H2 Production. *Cells*. 2020; 9: 1-22.

(45) Moghbeli M, Shafaati M. Isolation and molecular identification of Clostridium bifermentans from anaerobic lagoons of wastewater treatment system. *Biological Journal of Microorganism*. 2015; 4 (13): 129-138.

(46) Farmanbar N, Haddad-Mashadrizeh A, Hemmat J. An in-silico investigation on the structure, function and homologous sequences of the enzymes and proteins involved in the production and accumulation of the lipids in biodiesel resources. *Biological Journal of Microorganism.* 2017; 6 (22): 59-76.

---

[1]- Scopus database
[2]- Photobioreactors
[3]- Fermentors
[4]- Biophotolysis
[5]- Direct biophotolysis
[6]- Indirect biophotolysis
[7]- *Anabaena*
[8]- *Calothrix*
[9]- *Spirulina*
[10]- *Synechococcus*
[11]- *Geobacter*
[12]- Microbial water-gas shift
[13]- Hydrogenogenic carboxydotrophs
[14]- *Rhodobactr* sp
[15]- *Rhodospirillum rubrum*
[16]- *Rubrivivax gelatinosus*
[17]- *Citrobacter* sp
[18]- *Rhodopseudomonas palustris*
[19]- *Thermincola carboxydiphila*
[20]- *Thermoanaerobacter thermohydrosulfuricus*
[21]- *Caldanaerobacter subterraneus pacificus*
[22]- *Carboxydocella* pertinax
[23]- *Methanosarcina barker*i
[24]- *Thermococcus onnurineus*
[25]- *Calderihabitans maritimus*
[26]- *Rhodospirillum rubru*m
[27]- Photofermentation
[28]- *Rhodobacter capsulatus*
[29]- *Rhodobacter sphaeroides*
[30]- *Rhodovulum palustris*
[31]- *Rhodopseudomonas sulfidophilum*
[32]- Dark fermentation
[33]- $FeSO_4$
[34]- *Clostridium thermocelum*
[35]- *Clostridium acetobutylicum*
[36]- *Clostridium xylanolyticum*
[37]- *Clostridium papyrosolvens*
[38]- *Clostridium beijerinckii*
[39]- *Desulfovibrio desulfuricans*
[40]- *Ethanoligenens harbinense*
[41]- *Ruminococcus* sp

[42]- Microbial electrolysis cells
[43]- *Desulfitobacterium spp*
[44]- *Dehalococcoides spp*
[45]- *Chlamydomonas reinhardii*
[46]- Pd^0
[47]- Ni^0
[48]- Ag^0
[49]- Fe^0
[50]- Mg^{2+}
[51]- Na^{2+}
[52]- Ni^{2+}
[53]- Fe^{2+}
[54]- ZrO_2
[55]- CoO
[56]- Fe_2O_3
[57]- Fe_3O_4
[58]- *Rhodobacter sphaeroides*
[59]- *Halobacterium salinarum*
[60]- *Bacillus cereus* ATCC14579
[61]- *Brevundimonas naejanjsamensis* BIO-TAS2-2
[62]- *Pseudomonas sp*
[63]- *Bradyrhizobium japonicum*
[64]- *Escherichia coli*
[65]- *Bacillus subtilis*
[66]- *Stenotrophomonas sp.*
[67]- *Ralstonia eutropha*
[68]- Tris-Acetate-Phosphate
[69]- *Pseudomonas fluorescens*
[70]- *Bradirizhobium japonicum*
[71]- *Rhodospirillum rubrum*
[72]- *Rhodopseudomonas sp*
[73]- *Tetraspora*
[74]- *Pyrococcus furiosno*
[75]- *Thermotoga maritima*
[76]- Graphite intercalation compounds