

Effect of pre-treating vinasse and inoculum on bio-hydrogen production and production capacity of its co-products in Khuzestan

Samin Baladi¹, Yaghoob Mansoori^{1*}, Nima Nasirian², Hossein Motamedi³, Irini Angelidaki⁴

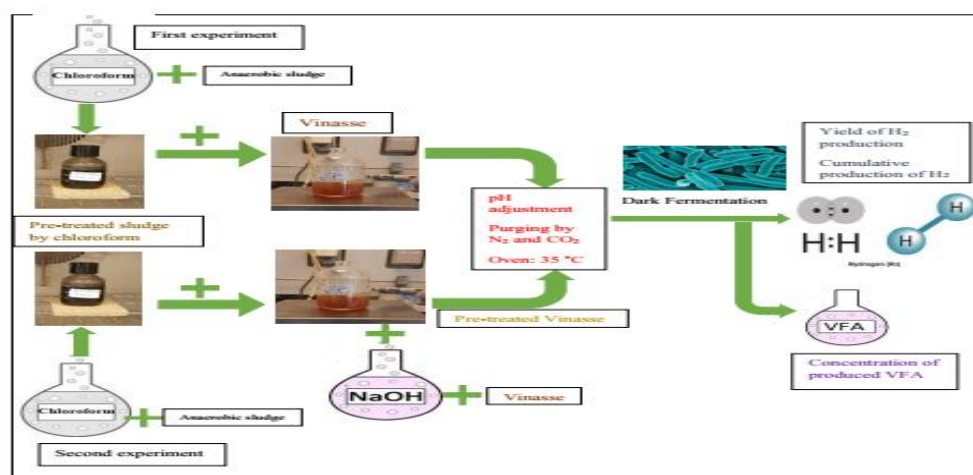
1. Department of biosystems engineering, Faculty of agriculture, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran

2. Department of Agricultural Mechanization, Shoushtar Branch, Islamic Azad University

3. Department of biology, Faculty of sciences, Shahid Chamran University of Ahvaz

4. Department of Chemical and Biochemical Engineering, Faculty of chemical engineering, Technical University of Denmark

(Received: June 10,2021- Revised: Apr. 9,2022- Accepted: Apr. 10,2022)



Abstract: Vinasse, the effluent of alcohol distilleries, is a highly polluting waste. The high volume of vinasse and its unpleasant odor, along with its acidic properties and high pollution load, has made it one of the most important environmental challenges in Khuzestan. The use of dark fermentation to treat this wastewater is one of the cheapest and most environmentally friendly methods. Hydrogen is a clean fuel and considered as a carrier of renewable energy, if produced biologically. In the present study, the batch production of bio-hydrogen from vinasse by dark fermentation was studied. The effect of inoculum pretreatment (anaerobic digested sludge) and substrate pretreatment (vinasse) on hydrogen production yield were also investigated. The results showed that the use of chloroform as an inoculum pretreatment had increased hydrogen yield very significantly which lead to a yield of 47.8 ± 3.6 Nml/g of initial volatile solids (VS). Also, sodium hydroxide application had a significant effect on vinasse sugars hydrolysis, and the hydrogen production efficiency was increased up to 100 percent by 99.5 ± 0.1 Nml/ g of initial VS. In all treatments, acetic acid and butyric acid were identified as the dominant organic acids in the final fermentation broth. Finally, according to laboratory results and available field information, the production potential of bio-hydrogen, acetic and butyric acid from. vinasse produced in Khuzestan in 2021 was calculated to be 0.003, 0.153 and 0.132 km³, respectively. The results showed that the production of bio-hydrogen from vinasse by dark fermentation is a very efficient method due to the high potential of this gas production.

Key words: Vinasse, Dark fermentation, Pre-treatment, Anaerobic sludge, Bio-hydrogen

تأثیر پیش‌فرآوری ویناس و ماده‌تلقیح در تولید بیوهیدروژن و ظرفیت تولید فرآورده‌های آن در خوزستان

ثمین بلدی^۱، یعقوب منصوری^{۱*}، نیما نصیریان^۲، حسین معتمدی^۳، ایرینی آنگلیداکی^۴

۱. گروه مهندسی بیوسیستم، دانشکده کشاورزی، دانشگاه شهید چمران اهواز

۲. گروه مهندسی مکانیزاسیون کشاورزی و بیوسیستم، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد

شوشتر

۳. گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه شهید چمران اهواز

۴. گروه مهندسی شیمی و بیوشیمی، دانشگاه صنعتی دانمارک

(تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۳/۲۰ - تاریخ بازنگری: ۱۴۰۱/۱/۲۰ - تاریخ تصویب: ۱۴۰۱/۱/۲۱)

چکیده: ویناس، فاضلاب کارخانه‌های الکل‌سازی، پسماندی بسیار آلوده‌کننده است. حجم زیاد ویناس و بوی نامطبوع آن، در کنار خاصیت اسیدی و بار آلودگی زیاد، آن را به یکی از مهمترین چالش‌های زیست محیطی استان خوزستان بدل کرده است. کاربرد تخمیر تاریک جهت تیمار این فاضلاب، یکی از ارزان‌ترین روش‌های سازگار با محیط‌زیست مدیریت این پسماند است. هیدروژن سوختی پاک است و در صورت تولید به روش بیولوژیکی، یک حامل انرژی تجدید پذیر تلقی می‌گردد. در مطالعه حاضر، تولید ناپیوسته بیوهیدروژن از ویناس به روش تخمیر تاریک بررسی شده است. همچنین اثر پیش‌تیمار ماده تلقیحی (لجن هضم شده) و پیش‌تیمار ماده اولیه (ویناس) بر عملکرد تولید هیدروژن بررسی شد. نتایج نشان داد کاربرد کلروفرم به‌عنوان پیش‌تیمار ماده تلقیح با عملکرد $47/8 \pm 3/6$ نرمال میلی‌لیتر/گرم جامدات فرار اولیه تأثیر بسیار معنی‌داری بر افزایش عملکرد هیدروژن داشته است. همچنین کاربرد سدیم هیدروکسید تأثیر معنی‌داری بر هیدرولیز قند ویناس داشته و با عملکرد $99/5 \pm 0/1$ نرمال میلی‌لیتر/گرم جامدات فرار اولیه، بازده تولید هیدروژن را تا ۱۰۰ درصد افزود. در تمام تیمارها اسید استیک و اسید بوتیریک به‌عنوان اسیدهای آلی عمده موجود در مایه نهایی تخمیر شناسایی شدند. در نهایت با توجه به نتایج آزمایشگاهی و نیز اطلاعات میدانی موجود، پتانسیل تولید بیوهیدروژن، اسید استیک و اسید بوتیریک از ویناس تولید شده در استان خوزستان در سال ۱۳۹۹ به ترتیب به میزان ۰/۰۰۳، ۰/۱۵۳ و ۰/۱۳۲ کیلومتر مکعب محاسبه شد. نتایج نشان داد تولید بیوهیدروژن از ویناس به روش تخمیر تاریک، با توجه به پتانسیل بالای تولید این گاز از ویناس، روشی بسیار کارآمد به حساب می‌آید.

واژه‌های کلیدی: ویناس، تخمیر تاریک، پیش‌تیمار، لجن بی‌هوازی، بیوهیدروژن

مقدمه

ایران، یکی از بزرگترین تولیدکننده‌های نیشکر و فرآورده‌های جانبی آن در خاورمیانه است (FAO, 2019). در ۱۰ سال اخیر کشت مکانیزه نیشکر در ایران رشدی معادل ۱۰۰ درصد داشته است. استان خوزستان با دارا بودن ۹۹ درصد از سطح زیر کشت نیشکر (۸۸۲۸۴ هکتار) رتبه اول تولید این محصول را دارد (Ministry of Jihad Agriculture, 2019). نیشکر یکی از مهمترین مواد خام جهت تولید شکر و بیواتانول است (Janke et al., 2016). کارخانه خمیر مایه و الکل رازی خوزستان با ظرفیت تولید روزانه ۱۱۰ هزار لیتر اتانول، بزرگترین تولیدکننده اتانول در استان خوزستان و ایران است (Razi Alcohol Company, 2021). در فرآیند تقطیر اتانول مقدار بسیار زیادی ویناس (۱۳ لیتر به ازای هر لیتر الکل) تولید می‌شود (Janke et al., 2016).

ویناس که به آن پسماند فاضلاب تقطیر^۱ نیز گفته می‌شود، اصلی‌ترین محصول جانبی مایع در تقطیر الکل است. این فاضلاب با بوی نامطبوع، رنگ قهوه‌ای تیره و خاصیت اسیدی (اسیدیته برابر ۳/۵ تا ۵)، تقریباً دارای ۷۵ درصد مواد آلی است که منتج به تولید بیش از ۱۴۰ گرم/لیتر (نیاز اکسیژن شیمیایی) COD^۲ در فاضلاب خروجی می‌گردد (Hoarau et al., 2018). ویناس حاوی مقدار قابل توجهی مواد مغذی مانند نیتروژن (تا ۴/۲ گرم/لیتر)، فسفر (تا ۳ گرم/لیتر) و پتاسیم (تا ۱۷/۵ گرم/لیتر) می‌باشد (Bernal et al., 2017; Hoarau et al., 2020). در این فاضلاب، غلظت بالای مواد آلی مانند کربوهیدرات‌ها، لیگنین، همی سلولز، دکسترین و اسیدهای آلی، زمینه را برای آلودگی شدید زیست محیطی به ویژه آبزیان فراهم می‌کند. بنابراین مدیریت این پسماند و تولید مواد با ارزش افزوده از دیدگاه‌های زیست محیطی، اقتصادی و انرژی دارای اهمیت ویژه و حیاتی است (Sridevi et al., 2014).

(al., 2014).

مطالعات مختلفی روش هضم بی‌هوازی را به عنوان تکنولوژی اصلی تیمار ویناس اعلام کرده، تمرکز اولیه را بر کاهش بار آلوده کننده آلی آن از طریق تولید بیوگاز در هاضم‌های بی‌هوازی قرار داده‌اند (Fu et al., 2017; Náthia-Neves et al., 2018; Rego et al., 2020; Tena et al., 2020). قندهای فراوان باقیمانده در ویناس می‌توانند بصورت مستقیم توسط باکتری اسیدوژنیک به هیدروژن و اسیدهای چرب فرار تبدیل شوند. همچنین می‌توان از اسیدهای آلی باقی‌مانده در فرآیند هضم بی-هوازی مواد بیوشیمیایی با ارزش افزوده، تولید کرد (Banu et al., 2020).

بیوهیدروژن بطور قابل توجهی به‌عنوان یک منبع تجدیدپذیر و عالی انرژی جایگزین برای سوخت‌های فسیلی در نظر گرفته شده است. دلیل این امر احتراق پاک این سوخت و انرژی ویژه بالای آن (۱۴۱/۹ کیلوژول/گرم) است که ۳ برابر سوخت‌های فسیلی با پایه پتروشیمی است. گاز هیدروژن یکی از رایج‌ترین واکنش‌دهنده‌ها در صنایع پتروشیمی است و طی ۲۰ سال آینده به‌عنوان یک سوخت بالقوه شناخته خواهد شد. در حال حاضر عمده‌ترین کاربردهای هیدروژن در فرآوری سوخت‌های فسیلی و سنتز آمونیاک است. هیدروژن همچنین به‌عنوان یک واکنش‌دهنده در تولید متانول، و هیدروژناسیون چربی‌ها کاربرد دارد. هیدروژن تولید شده از بیوماس یک حامل انرژی تجدید پذیر است. به نظر می‌رسد از میان روش‌های مختلف تولید هیدروژن، روش تخمیر تاریک پسماندهای آلی، اجرایی‌ترین روشی است که همزمان، دوستدار محیط زیست است (Urbaniec & Bakker, 2015; Júnior et al., 2015; Tena et al., 2020; Pereira et al., 2020; Soares et al., 2020; Banu et al., 2020).

از مزایای تولید بیوهیدروژن به روش تخمیر تاریک امکان بکارگیری ضایعات زیست توده فراوان بدون

تولیدکننده هیدروژن ضروری است. تاکنون پیش- تیمارهای زیادی (فیزیکی، شیمیایی، مکانیکی، بیولوژیکی) برای افزایش تولید هیدروژن گزارش شده‌اند (Boboescu et al., 2014; Zheng et al., 2014; Usman et al., 2019).

پیش تیمار ماده تلقیح با هدف نابودی باکتری‌های مصرف‌کننده هیدروژن مثل متانوژن‌های هیدروژنوتروف، هومواستوژن‌ها، تولیدکننده‌های پروپیونات، باکتری کاهش‌دهنده سولفات و غنی‌سازی باکتری‌های تولیدکننده هیدروژن و در نهایت افزایش تولید بیوهیدروژن انجام می‌شود (Bundhoo, 2019). کارایی روش‌های پیش فرآوری به نوع ماده اولیه و ماده تلقیح بستگی زیادی دارد (Bundhoo et al., 2019; Singh & Wahid, 2015). در فرایند تولید هیدروژن به روش تخمیر تاریک بسته به مسیرهای درگیر، فرآورده‌های جانبی مختلفی مثل اتانول، استات، پروپیونات و بوتیرات تولید می‌شوند. در میان مسیرهای مختلف، مسیری که استات را به عنوان ماده واسط تولید می‌کند، بهترین مسیر است (Banu et al., 2020).

در تحقیقی بر تولید هیدروژن از ویناس با استفاده از کشت مخلوط محققان توانستند به عملکرد و خلوص بالایی دست یابند (Sydney et al., 2014). محققان دیگری اثر شرایط فوق ترموفیلی (۷۰ درجه سلسیوس) را بر تخمیر تاریک ویناس نیشکر در یک رآکتور بی-هوازی بستر-ساختارمند (ASTBR^۳) بررسی کردند و عملکرد بالاتر تولید هیدروژن (۸/۱ مول هیدروژن/مول گلوکز) را برای زمان ماند هیدرولیکی ۱۹ ساعت بدست آوردند (Náthia-Neves et al., 2018).

فرآیند هضم کمکی بی‌هوازی دو مرحله‌ای برای تولید هیدروژن و متان از یک کارخانه آزمایشی شامل دو رآکتور، تحت شرایط مزوفیلی با ترکیب بقایای مواد غذایی و ویناس به عنوان ماده اولیه بررسی شده است

افزایش مقدار گازهای گلخانه‌ای در اتمسفر و نزدیک‌تر شدن به «اقتصاد هیدروژن محور» است. با این حال مانع اصلی در چنین فرآیندهایی عملکرد پایین هیدروژن است (Luo et al., 2011). برای افزایش عملکرد سیستم یکپارچه در استفاده از زیست توده، انتخاب باکتری موثر، ساختار سوپه کارا و بهینه‌سازی شرایط فرآیند نظیر استفاده از باکتری‌های با تولید بالا مانند رودوباکتر-اسفاروئیدز^۱ و اشیریشیا-کولای^۲ مورد مطالعه قرار گرفته است (Trchounian et al., 2017; Baeyens et al., 2020).

اگرچه تولید بیوهیدروژن به روش تخمیر تاریک به عنوان یک فرآیند سودآور و با حداقل نیاز به انرژی در نظر گرفته می‌شود، انجام آن در بعد صنعتی تنها با افزایش بهره‌وری و عملکرد امکان پذیر خواهد بود. انتخاب ماده اولیه مناسب، مهمترین مساله در تولید هیدروژن است که می‌تواند بهره‌وری را افزایش دهد. فاضلاب‌های صنعتی، مواد اولیه فراوان و قابل دسترسی هستند که به عنوان مواد اولیه ارزان و به شدت تجزیه-پذیر طبقه بندی شده‌اند. محققان زیادی از فاضلاب‌های صنعتی برای تولید هیدروژن استفاده کرده‌اند که شامل فاضلاب‌های صنعت شکر، صنایع فرآوری مواد غذایی، سیتریک اسید، آسیاب کاغذ، آسیاب برنج، الکل‌سازی، مواد شیمیایی، فرآوری نشاسته، روغن نخل، آبجو و آب پنیر می‌شود (Banu et al., 2020).

تبدیل بیولوژیکی فاضلاب‌های پیچیده‌ای نظیر ویناس به تنوع مناسبی از بیوکاتالیست میکروبی نیاز دارد (Bundhoo et al., 2019; Banu et al., 2020). بازدهی کشت میکروبی بیوکاتالیست با حضور متانوژن‌ها در طول فرآیند کاهش می‌یابد. در این موارد انتخاب بیوکاتالیست میکروبی مناسب و پیش تیمار آن برای جلوگیری از رشد متانوژن‌ها و افزایش رشد میکروب‌های

1 - *Rhodobacter sphaeroides*

2 - *E-coli*

3 - Anaerobic structured-bed reactor

ویناس تولید شده در کارخانه الکل رازی شهرستان اهواز به عنوان ماده اولیه در این مطالعه مورد استفاده قرار گرفت. میزان جامدات کل (TS) و جامدات فرار^۴ (VS) و دیگر خصوصیات فیزیکی و شیمیایی ویناس در جدول ۱ ارائه شده است. ویناس برای جلوگیری از بازدارندگی در فرآیند تخمیر، به نسبت ۱:۱ با آب شهری رقیق شده و در بطری‌های پلاستیکی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شد. پیش از شروع هر آزمایش نمونه‌های ویناس تا زمان ذوب کامل در دمای محیط قرار داده شده و سپس مورد استفاده قرار گرفت.

ماده تلقیح

در این مطالعه لجن هضم بی‌هوازی شده حاصل از سیستم تصفیه خانه فاضلاب شهری به عنوان ماده تلقیح مورد استفاده قرار گرفت. لجن با استفاده از آب به نسبت ۱:۱ رقیق شده و در بطری‌های پلاستیکی درون انکوباتور با دمای ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شد تا از این طریق میکروارگانیسم‌ها با دمای آزمایش سازگار شوند. جهت فراهم آوردن منابع غذایی ضروری میکروارگانیسم‌ها، هر روز به مقدار مشخصی لجن تازه به لجن موجود در انکوباتور اضافه شد. خصوصیات فیزیکی و شیمیایی لجن در جدول ۱ آمده است.

پیش تیمار لجن

پیش از انجام هر آزمایش کلروفرم در سطوح مختلف ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ درصد حجمی/حجمی به لجن اضافه شده و به مدت ۳۰ دقیقه در محیط آزمایشگاه نگهداری شد.

پیش تیمار ماده اولیه

جهت پیش تیمار ویناس، ماده قلیایی سدیم هیدروکسید در غلظت‌های ۱ درصد، ۲/۵ درصد و ۵ درصد حجمی/حجمی به ویناس اضافه شد. سپس بطری حاوی آن در آن دمای ۹۰ درجه سلسیوس به مدت ۶۰ دقیقه قرار داده شد. سپس خنک شده و جهت افزودن به بطری

(Da silva et al., 2019). این تحقیق نشان داد که ضایعات به کار رفته با کاهش ۵۲ و ۶۴ درصد از کل جامدات^۱ (TS) و جامدات فرار کل^۲ (TVS) ماده اولیه مناسبی را تشکیل می‌دهند که منجر به حداکثر تولید ۶۷/۵ درصد هیدروژن بعد از ۷۰ روز از فرآیند می‌شوند. از سوی دیگر، ویناس حاوی مقادیری مواد لیگنوسلولزی با ساختار پیچیده است که میکروارگانیسم‌ها نمی‌توانند آنها را مستقیماً تجزیه کنند. بنابراین پیش تیمار ماده اولیه با هدف تغییر ساختار سلولز طبیعی، شکستن پیوند سلولز-لیگنین-همی سلولز، کاهش تبلور سلولز، حذف لیگنین، متخلخل تر کردن ماده اولیه (سوبسترا^۳) و سرانجام افزایش بازدهی ضروری به نظر می‌رسد (Monlau et al., 2013).

مطالعه منابع موجود نشان داد که در ایران تا کنون مطالعه‌ای در راستای تولید بیوهیدروژن به روش تخمیر تاریک از ویناس انجام نشده است. همچنین تاکنون مطالعه‌ای اثر کاربرد سدیم هیدروکسید را بر هیدرولیز ویناس و همچنین کاربرد کلروفرم را بر پیش تیمار لجن به کار رفته به عنوان ماده تلقیح در تولید بیوهیدروژن از ویناس مورد بررسی قرار نداده است. از این رو هدف این مطالعه افزایش و بهینه سازی تولید هیدروژن از ویناس نیشکر به همراه کاهش اثرات آلوده کننده آن در یک سیستم ناپیوسته (Batch) بوده است. در این راستا روش‌های مختلف پیش تیمار ویناس و پیش تیمار ماده تلقیح به منظور افزایش تولید هیدروژن مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت پتانسیل تولید هیدروژن از این فاضلاب پیچیده در استان خوزستان مورد ارزیابی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

ماده اولیه

شیشه ای آزمایش مورد استفاده قرار گرفت.

آزمایش تخمیر تاریک

جهت انجام آزمایشات ناپیوسته^۱ از بطری‌های شیشه‌ای با حجم کلی ۲۵۰ میلی‌لیتر و حجم کاری ۹۰ میلی‌لیتر استفاده شد. بطری‌ها ابتدا با بار آلی اولیه^۲ ۲ گرم جامدات فرار بر لیتر از ویناس پیش‌تیمار شده پر شدند. سپس لجن پیش‌تیمار شده به بطری‌های حاوی مقدار مناسب ویناس اضافه شد. حجم ماده تلقیح ۲۰ درصد حجم کل مایع (۱۸ میلی‌لیتر) در نظر گرفته شد. با توجه به پروتکل‌های استاندارد تعیین پتانسیل بیوهیدروژن، میزان نسبت ماده اولیه به ماده تلقیح در صورت استفاده از ماده اولیه مدل می‌تواند برابر ۲/۷ باشد (Carrillo-Reyes *et al.*, 2020). از آنجایی که در این مطالعه از ویناس که یک فاضلاب پیچیده است استفاده شد، جهت کاهش بازدارندگی به دلیل وجود غلظت بیش از حد کربوهیدرات، مقدار بار آلی ۲ گرم جامدات فرار / لیتر انتخاب شد. پس از آن pH با استفاده از سدیم-هیدروکسید ۱۲ درصد حجمی/حجمی در ۶/۵ تنظیم شد. جهت اطمینان از حصول شرایط بی‌هوازی، به مدت ۵ دقیقه مخلوط گازی ۲۰ درصد دی‌اکسیدکربن و ۸۰ درصد نیتروژن به بطری‌ها تزریق شد. سپس بطری‌ها با استفاده از درپوش‌های پلاستیکی و حلقه‌های آلومینیومی نسبت به ورود و خروج هوا مهر و موم شدند و در آون با دمای ۳۵ درجه سلسیوس (شرایط مزوفیلی) قرار داده شدند. آزمایش‌ها در ۳ تکرار انجام شد. به ازای هر آزمایش یک بطری حاوی ماده تلقیح و آب مقطر^۳ (جهت رساندن حجم مایع به حجم کاری لازم) نیز تهیه شد. هدف از این کار کسر میزان بیوهیدروژن تولید شده از ماده تلقیح از بیوهیدروژن تولید شده از ویناس بود. چرا که میکروارگانیسم‌های ماده تلقیح به دلیل داشتن مقداری مواد غذایی در لجن بی‌هوازی قادر به تولید

مقدار اندکی بیوهیدروژن هستند. با این روش مقدار دقیق تولید بیوهیدروژن از ویناس بدست می‌آید.

روش‌های آنالیز

جامدات کل، جامدات فرار، خاکستر، نیاز اکسیژن شیمیایی، آمونیاک، نیتروژن کلدال کل طبق روش‌های استاندارد اندازه‌گیری شدند (Federation & Association, 2005). pH متر مدل متروم ۷۴۴ برای اندازه‌گیری pH مورد استفاده قرار گرفت. مقادیر عناصر کمیاب در ویناس با استفاده از پلاسما جفتی القایی با طیف سنجی انتشار نوری (ICP-OES) اندازه‌گیری شد. غلظت اسیدهای جامد فرار (VFA)^۴ مانند بوتیریک و پروپیونیک اسید با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) ۱۳۰۰^۵ TRACE تجهیز شده به شناساگر یونیزاسیون شعله‌ای (FID)^۶ اندازه‌گیری شد. زایلوز، گلوکز، لاکتیک اسید، استیک اسید، فرمیک اسید و اتانول با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)^۷ شناسایی و اندازه‌گیری شدند. مقادیر هیدروژن و متان موجود در ترکیب گازی تولید شده با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی (میکرولب، دانمارک) اندازه‌گیری شد. در این مطالعه تمامی اندازه‌گیری‌های هیدروژن در دمای اتاق انجام گرفته در ۲۵ درجه سلسیوس گزارش شده‌اند.

برآورد هیدروژن و انرژی تولیدی

برای تخمین هیدروژن و محاسبات انرژی از روش‌های ارائه شده توسط (Bernal *et al.*, 2017) استفاده شد. پیش فرض این مطالعه آن است که همه ملاس تولید شده در یک شهر در همان شهر برای تولید الکول استفاده می‌شود. پتانسیل انرژی ویناس E بر اساس رابطه ۱ تعیین شد (Bundhoo *et al.*, 2015).

$$E = \frac{(V \times HC \times \rho)}{10^6} \quad (\text{رابطه ۱})$$

که در رابطه ۱، E پتانسیل انرژی کل ویناس بر

5 Gas Chromatography

6- Flame Ionization Detector

7 - High Performance Liquid Chromatography

1 - Batch

2 - Initial load

3 -blank

4 - Volatile Fatty Acids

یکدیگر اختلاف معنی داری نداشته اما با گروه‌های دیگر دارای اختلاف معنی دار بودند.

نتایج و بحث

تولید بیوهیدروژن به روش تخمیر تاریک

ویژگی‌های ویناس و لجن

خصوصیات ویناس و لجن در جدول ۱ ارائه شده است. طبق این جدول ویناس دارای مقادیر بالایی از جامدات فرار، نیاز اکسیژن شیمیایی و عناصری مانند پتاسیم، سولفور، کلسیم، سدیم و منگنز است. در لجن بی‌هوازی می‌توان مقادیر بسیار کمی از فسفر، آهن و کلسیم را مشاهده کرد. فاضلاب کارخانه الکل سازی دارای مقادیر بالای نیاز اکسیژن شیمیایی، $95/3 \pm 0/1$ گرم/لیتر است که نشانگر پتانسیل بالای آن در آلوده کردن محیط زیست می‌باشد. بررسی ویناس نشان داد این فاضلاب اسیدی با pH $4/5$ می‌تواند ماده اولیه مناسبی جهت تولید تخمیری هیدروژن باشد.

اساس سال (پنتاژول/سال)، V پتانسیل کل هیدروژن از ویناس (مترمکعب/سال)، Hc حداقل ارزش گرمایی هیدروژن معادل 120210 (کیلوژول/کیلوگرم)، و ρ چگالی بیوهیدرون است که در دما و فشار نرمال (20 درجه سلسیوس و $325/1$ کیلوپاسکال) $0/89$ کیلوگرم/مترمکعب است.

آنالیز آماری

جهت تحلیل داده‌های آزمایشگاهی آنالیز واریانس یک-طرفه و به‌دنبال آن آزمون مقایسه میانگین دانکن به کمک نرم افزار SPSS نسخه ۱۷ انجام شد. در این آنالیز عملکرد بیوهیدروژن به عنوان متغیر وابسته و پیش-تیمارهای مختلف ویناس و ماده تلقیح به‌عنوان متغیرهای مستقل در نظر گرفته شدند. در صورت برقراری شرط ($p < 0/05$) تیمارها از لحاظ آماری دارای اختلاف معنی دار بودند. با توجه به نتایج مقایسه میانگین بر اساس آزمون دانکن تیمارها به گروه‌های مختلف تقسیم شدند. تیمارهای هر گروه از لحاظ آماری با

جدول ۱- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی ویناس و لجن بی‌هوازی استفاده شده در مطالعه حاضر

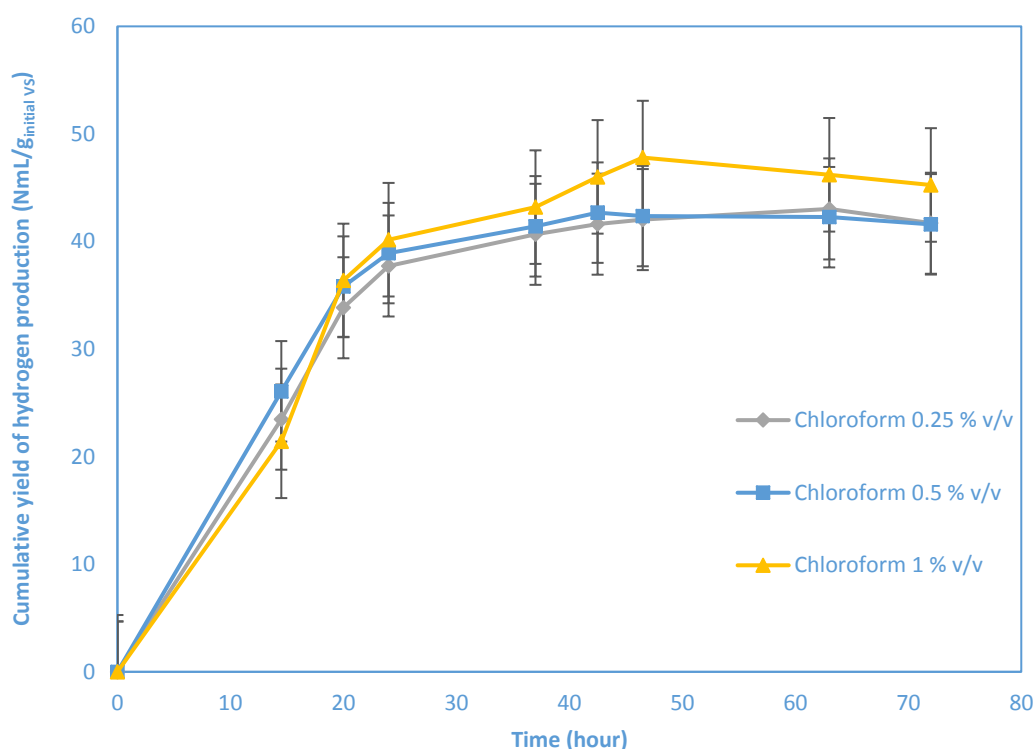
Table 1. Physical and chemical characteristics of vinasse and anaerobic sludge used in the current study

ردیف	پارامتر	واحد	ویناس	لجن بی‌هوازی
۱	جامدات کل (TS)	گرم / لیتر	$119/3 \pm 0/1$	$22/3 \pm 0/2$
۲	جامدات فرار (VS)	گرم / لیتر	$72/6 \pm 0/6$	$15/1 \pm 0/4$
۳	pH	-	$4/5$	$5/3$
۴	نیترژن کلدال کل ^۱ (TKN)	گرم / لیتر	$2/2 \pm 0/2$	-
۵	آمونیاک کل ^۲ (TAN)	گرم / لیتر	$0/3 \pm 0$	-
۶	نیاز اکسیژن شیمیایی (COD)	گرم / لیتر	$95/3 \pm 0/1$	$89/1 \pm 4/5$
۷	زایلوز	گرم / لیتر	$4/8 \pm 0/4$	-
۸	فرمیک اسید	گرم / لیتر	$6/2 \pm 0/6$	-
۹	آلومینیوم	میلی لیتر / لیتر	$2/7 \pm 0/2$	$154 \pm 5/5$
۱۰	کلسیم	میلی لیتر / لیتر	$2532 \pm 277/4$	$799 \pm 50/7$
۱۱	پتاسیم	میلی لیتر / لیتر	$19703 \pm 621/8$	$294 \pm 32/3$
۱۲	منگنز	میلی لیتر / لیتر	$1529 \pm 126/2$	$185 \pm 21/8$
۱۳	سدیم	میلی لیتر / لیتر	$1824 \pm 312/1$	$168 \pm 11/9$
۱۴	فسفر	میلی لیتر / لیتر	$269 \pm 9/8$	$890 \pm 61/9$
۱۵	گوگرد	میلی لیتر / لیتر	$4133 \pm 211/4$	$269 \pm 25/7$
۱۶	استرونتیوم	میلی لیتر / لیتر	$19/3 \pm 1/6$	$13/8 \pm 1/6$
۱۷	آهن	میلی لیتر / لیتر	$35/6 \pm 0/7$	$813 \pm 2/3$

تأثیر پیش تیمار شیمیایی لجن

همانگونه که پیشتر اشاره شد، برای جلوگیری از فعالیت متانوژن‌ها و تولید لجن تولیدکننده هیدروژن از کلروفرم با غلظت‌های مختلف ۰/۲۵ درصد، ۰/۵ درصد و ۱ درصد حجمی/حجمی استفاده شد. لجن پیش تیمار نشده به-عنوان شاهد مورد استفاده قرار گرفت. شکل ۱ عملکرد تجمعی هیدروژن تولید شده با استفاده از لجن

پیش تیمار شده با کلروفرم را نشان می‌دهد. نتایج این آزمایش نشان داد پیش تیمار کلروفرم حتی در سطوح پایین ۰/۲۵ درصد، کاملاً در سرکوب متانوژن‌ها موفق عمل کرده است. در آزمایش بدون پیش تیمار لجن، همان‌گونه که در نمودار شکل ۲ نشان داده شده است تولید بیوهیدروژن در ۱۴ ساعت ابتدای آزمایش، افزایش داشت و سپس کاهش یافت.

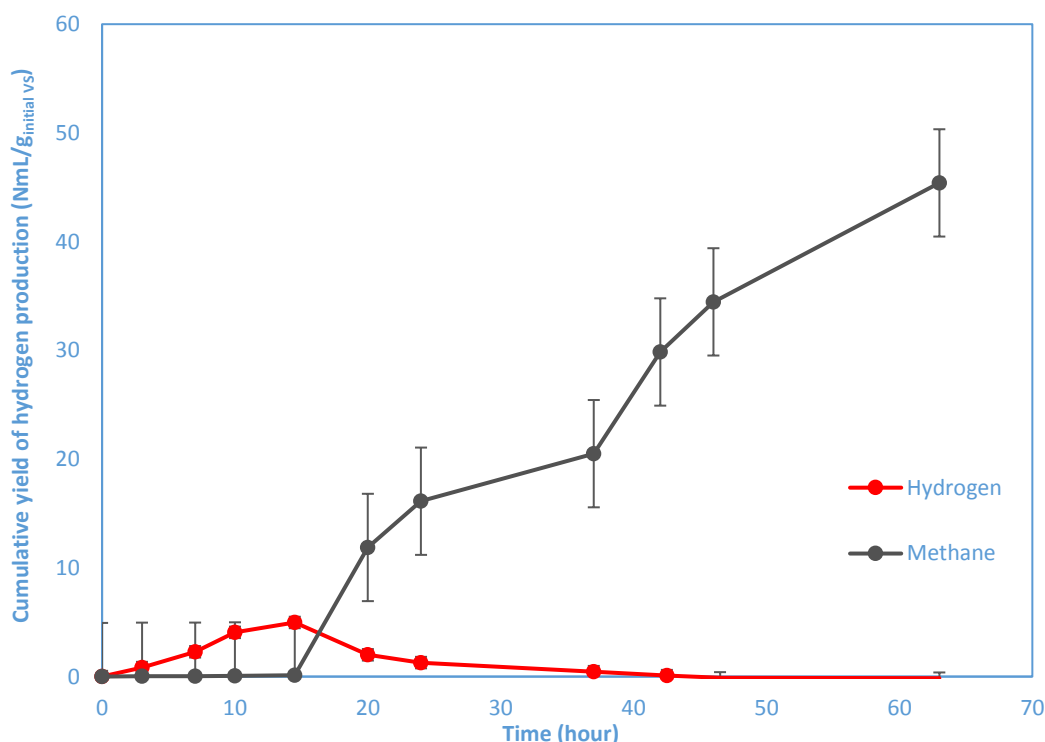


شکل ۱- نمودار تجمعی تولید بیوهیدروژن از ویناس (بدون پیش تیمار) و ماده تلقیح (لجن) پیش تیمار شده با استفاده از غلظت‌های مختلف کلروفرم (درصد حجمی/حجمی)

Figure 1. Cumulative production of bio-hydrogen from vinasse (without pre-treatment) and inoculum (sludge) pre-treated with different concentration of chloroform (% v/v)

دلیل اعمال پیش تیمار به طور کامل از بین رفته‌اند و لذا فرصت فعالیت و تولید نداشته‌اند. در آزمایش لجن پیش تیمار نشده شکل ۲ از همان ساعات ابتدایی تخمیر، متان در این نمونه‌ها تولید شده است. با توجه به نمودار شکل ۲ به طور دقیق مشاهده می‌شود که همزمان با شروع کاهش میزان بیوهیدروژن تولید شده میزان تولید متان افزایش می‌یابد.

دلیل این امر این است که باکتری‌های تولید کننده بیوهیدروژن بسیار زودتر از متانوژن‌ها در فرآیند تخمیر فعال شده و شروع به فعالیت می‌کنند. در ساعات‌های اولیه پروسه در فاز لگاریتمی وارد شده و به همین دلیل است که تولید افزایش یافته و پس از آن وارد فاز تثبیت می‌شود. در این زمان باکتری‌های هیدروژن‌زا شروع به مصرف کربوهیدرات موجود در مایه تخمیر کرده و هیدروژن تولید می‌کنند. متانوژن‌ها در این پروسه به



شکل ۲- نمودار تجمعی تولید بیوهیدروژن و متان از ویناس در تیمار شاهد (بدون اعمال پیش تیمار بر ویناس و ماده تلقیح (لجن))

Figure 2. Cumulative production of bio-hydrogen and methane from vinasse in control (without vinnase and inoculum pre-treatment)

مصرف کننده بیوهیدروژن نشان می‌دهد. در مقابل، آزمایش پیش تیمار لجن به وسیله کلروفورم شکل ۱ نشان داد حتی در سطح ۰/۲۵ درصد حجمی/حجمی تقریباً تمامی متانوزن ها غیرفعال شده و در طول آزمایش به مدت ۷۲ ساعت علاوه بر عدم تولید متان، هیدروژن تولید شده نیز مصرف نشد. نمودار شکل ۳ عملکرد بیوهیدروژن را در سطوح مختلف پیش تیمار کلروفورم نشان می‌دهد. عملکرد هیدروژن در غلظت ۱ درصد حجمی/حجمی کلروفورم، $47/8 \pm 3/6$ نرمال میلی لیتر/ گرم جامدات فرار اولیه معادل ۲/۱ میلی مول/ گرم جامدات فرار اولیه به دست آمد.

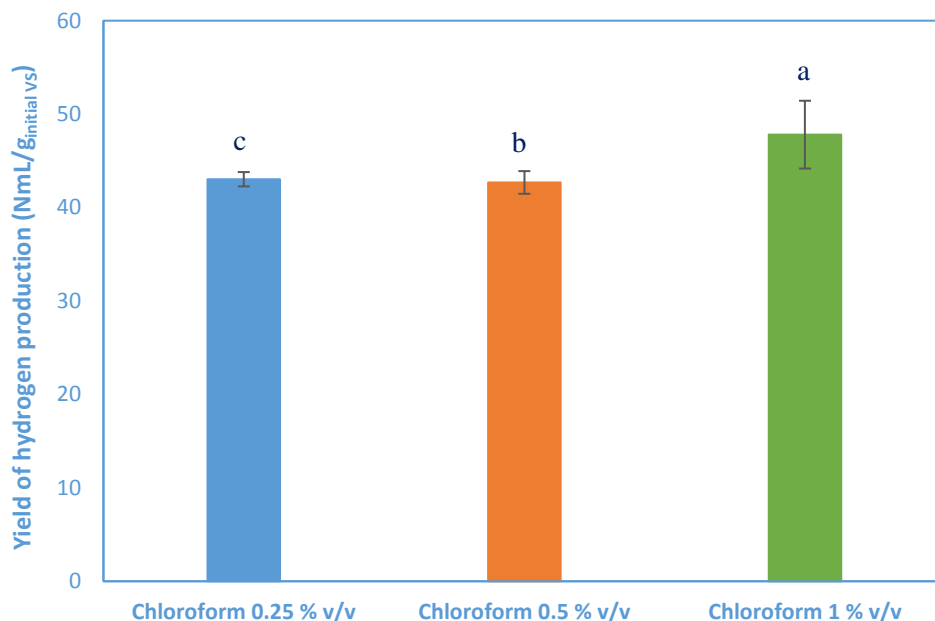
در پیش تیمار کلروفورم فاز تاخیری و آغاز فاز لگاریتمی هر دو در ۱۰ ساعت ابتدای تخمیر به وقوع پیوسته است. در طول ۱۰ ساعت از شروع تخمیر، رشد باکتریایی وارد فاز لگاریتمی شده و بیوهیدروژن با شیب زیادی شروع به تولید می‌کند. از آنجایی که در هیچ یک از سطوح کلروفورم اثری از تولید گاز متان مشاهده نشد،

این امر بیانگر این موضوع است که پس از طی ۱۴ ساعت از شروع تخمیر متانوزن ها کاملاً فعال بوده و علاوه بر تولید متان، هیدروژن تولید شده را نیز مصرف کرده اند. بنابراین مشاهده می‌شود به دلیل فعالیت متانوزن ها، باکتری های تولید کننده بیوهیدروژن سرکوب شده و فعالیت آنها مختل شده است. مکانیزم کلیدی درگیر در کاهش هیدروژن، مصرف هیدروژن به عنوان خوراک اولیه جهت به حداقل رساندن کربن دی اکسید در تولید متان است. این واکنش توسط متانوزن های هیدروژنوتروفیک انجام می‌شود (Chaganti et al., 2012). بر این اساس هیدروژن تولید شده در فرآیند تخمیر تاریک با استفاده از مسیر متانوزنی هیدروژنوتروفیک مصرف شده و این امر سبب کاهش بهره‌وری هیدروژن می‌شود (Hwang et al., 2004).

این آزمایش اهمیت اجرای پیش تیمار لجن را جهت غنی سازی ماده تلقیح از میکروارگانیسم های تولید کننده هیدروژن و ممانعت از فعالیت متانوزن ها و

هومواستوژن‌ها و باکتری مصرف‌کننده استات و کاهش‌دهنده سولفات نیز مشاهده شده است (Hu & Chen, 2007).

حتی پس از ۹۰ ساعت از آغاز تخمیر، هیدروژن موجود در بطری‌های آزمایش کاهش نیافت. در گزارشات دیگر تاثیر بازدارندگی کلروفرم نه تنها بر متانوژن‌ها بلکه بر دیگر باکتری‌های مصرف‌کننده هیدروژن مانند



شکل ۳- نمودار عملکرد تولید بیوهیدروژن از ویناس (بدون پیش تیمار) و ماده تلقیح (لجن) پیش تیمار شده با استفاده از سطوح مختلف کلروفرم * حروف انگلیسی متفاوت بیانگر وجود اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد میان عملکرد تولید بیوهیدروژن در سطوح مختلف پیش تیمار کلروفرم است
 Figure 3. Yield of bio-hydrogen production from vinasse (without pre-treatment) and inoculum (sludge) pre-treated with different levels of chloroform
 * Different letters illustrate significant difference at 5% possibility level between bio-hydrogen production yields at different levels of chloroform pre-treatment

مختلفی از کلروفرم به کار برده شدند (Hu & Chen, 2007). آنها نشان دادند حتی در سطوح پایین غلظت کلروفرم ۰/۵ درصد، متانوژن‌ها حساسیت بسیار زیادی نسبت به این ماده شیمیایی نشان داده و تقریباً به طور کامل سرکوب شدند (Hu & Chen, 2007). نتایج مطالعه آنها بیان داشت اگر غلظت کلروفرم در سطوح پایین کنترل شود، قادر است فعالیت متان‌زایی را به طور انتخابی مهار کند، در حالیکه بر تولید هیدروژن تاثیر منفی نمی‌گذارد. کلروفرم همچنین در محدوده غلظت بالا نیز تولید هیدروژن را مهار کرد. این ماده باعث حذف برگشت ناپذیر فعالیت متان‌زایی شد اما تولید بیوهیدروژن را بهبود داد. آنها همچنین بیان داشتند که

در تحقیق حاضر کمترین میزان تولید بیوهیدروژن مربوط به غلظت‌های ۰/۲۵ درصد و ۰/۵ درصد حجمی/حجمی بوده است. نتایج آزمون واریانس یک طرفه نشان داد میان سطوح مختلف ۰/۲۵ درصد و ۰/۵ درصد حجمی/حجمی پیش تیمار کلروفرم (با عملکرد تولید بیوهیدروژن به ترتیب $42/7 \pm 1/2$ و $43/1 \pm 0/8$ نرمال میلی‌لیتر/گرم جامدات فرار اولیه) تفاوت معنی دار وجود ندارد. آزمون‌های آماری نشان دادند غلظت ۱ درصد حجمی/حجمی بهترین سطح این تیمار بوده و با دو تیمار دیگر تفاوت معنی دار در سطح ۵ درصد داشته است. این نتایج در توافق با مطالعات پیشین است. جهت تولید لجن مناسب برای تولید هیدروژن از گلوکز، سطوح

عملکرد ۰/۲ میلی مول هیدروژن/ گرم نیاز اکسیژن شیمیایی با استفاده از لجن پیش تیمار شده با کلروفرم به مقدار ۹۷ درصد بالاتر از تیمار شاهد گزارش شده است (Mohammadi *et al.*, 2011). افزودن کلروفرم با غلظت ۱ درصد حجمی/حجمی به لجن فعال عملکرد هیدروژن را از ۳/۶ میلی مول/ گرم گلوکز به ۵/۸ میلی-مول برگرم گلوکز افزایش داد (Chang *et al.*, 2011). تاثیر استفاده از پیش تیمارهای کلروفرم، شوک اسیدی و شوک حرارتی بر تولید بیوهیدروژن از گلیسرین خام بررسی شد. نتایج نشان داد تیمار کلروفرم (۰/۰۵ درصد حجمی/حجمی) بالاترین میزان بیوهیدروژن ۰/۲ مول/مول گلیسرین را تولید کرد (Viana *et al.*, 2019).

میزان عملکرد تولید هیدروژن از ویناس با استفاده از کلروفرم در مطالعه حاضر بیشتر از عملکرد گزارش شده توسط (Tena *et al.*, 2020) نیز بوده است. آنها هضم همراه^۲ لجن فاضلاب و ویناس شراب را در سطوح مختلف اختلاط این دو ماده در شرایط ناپیوسته و ترموفیلی مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه بالاترین عملکرد ۳/۶ ± ۴۱/۵ نرمال میلی لیتر/گرم جامدات فرار اولیه در نسبت لجن بر ویناس ۵۰:۵۰ و همچنین ۱/۵ ± ۴۳/۳ نرمال میلی لیتر/گرم جامدات فرار اولیه در نسبت ۲۵:۷۵ به دست آمد. این بالاترین میزان عملکرد، ۱۶ درصد کمتر از عملکرد هیدروژن در پیش تیمار کلروفرم مطالعه حاضر بدون پیش تیمار ویناس است. عملکرد هیدروژن در شرایط با پیش تیمار ویناس در مطالعه حاضر، بیشتر از ۲ برابر بالاترین عملکرد در مطالعات دیگر بوده است (Tena *et al.*, 2020). این در حالی است که در تحقیق حاضر تنها از ویناس استفاده شد و ماده اولیه دیگری که احتمالاً سبب افزایش عملکرد هیدروژن می شود، افزوده نشد. حداکثر عملکرد به دست آمده در مطالعه حاضر بالاتر از حداکثر عملکرد گزارش شده در مطالعه ای دیگر با استفاده از راکتور پیوسته

کلروفرم تقریباً بطور دائمی تولید متانوزن ها را متوقف کرد و مصرف هیدروژن جهت تولید استیک اسید را به تاخیر انداخت.

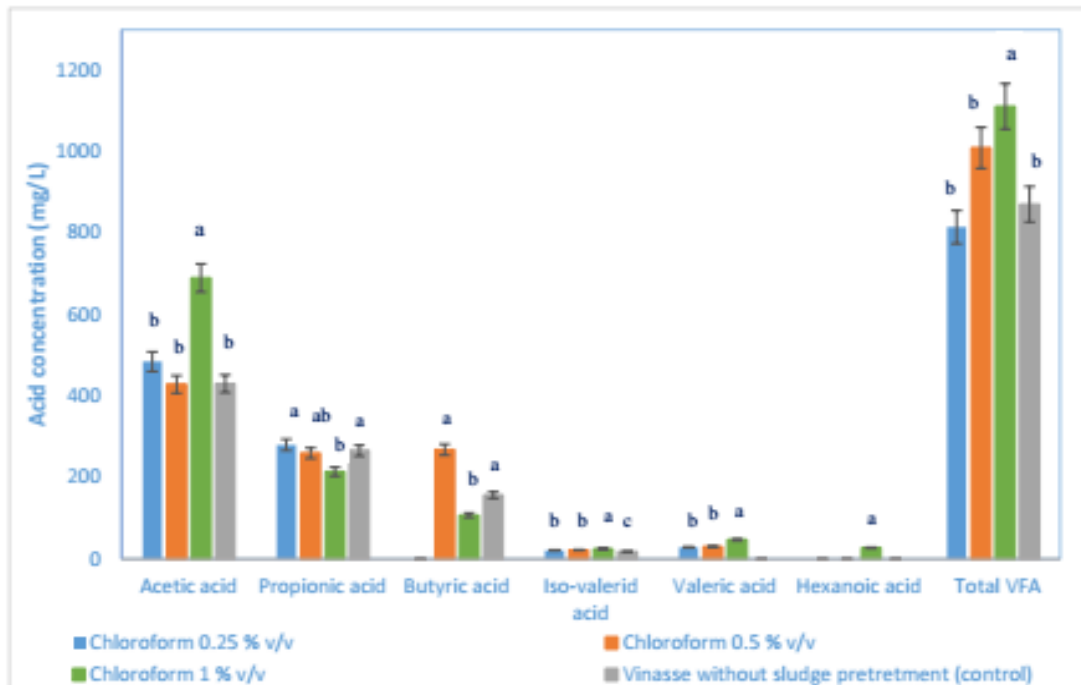
در خصوص عملکرد تولید هیدروژن از ویناس به روش تخمیر تاریک موارد متفاوتی گزارش شده است. با این وجود، برای مقایسه با نتایج مطالعه حاضر، تحقیقی که در آن از کلروفرم به عنوان پیش تیمار ماده تلقیح و ویناس به عنوان ماده اولیه استفاده شده باشد، مشاهده نشد. در اغلب مطالعات از قندهای خالص مانند ساکاروز و گلوکز به عنوان ماده اولیه استفاده شده است. به همین دلیل عملکرد و میزان تولید هیدروژن در آن ها بیشتر از مطالعه حاضر بوده است.

در مطالعه ای با استفاده از پیش تیمار کلروفرم و استفاده از گلوکز به عنوان ماده اولیه مقدار ۱۵۰ میلی-لیتر هیدروژن بدست آمد (Chang *et al.*, 2011). در مطالعه ای دیگر از پیش تیمار کلروفرم بر فاضلاب کاساوا^۱ جهت افزایش عملکرد هیدروژن استفاده شد که در آن عملکرد هیدروژن ۱/۲ ± ۳۲/۹ نرمال میلی لیتر/ گرم جامدات فرار اولیه به دست آمد که کمتر از عملکرد بدست آمده در مطالعه حاضر است (Luo *et al.*, 2010). همچنین در مطالعه ای دیگر کلروفرم با غلظت ۲ درصد حجمی/حجمی در تولید هیدروژن از ماده اولیه مدل (ترکیب گلوکز و ترکیبات ریزمغذی) جهت تولید بیوهیدروژن استفاده شد (Wang & Wan, 2008). در این مطالعه میزان هیدروژن تولید شده به دلیل غلظت بالای کلروفرم کمتر از تیمار شاهد (بدون پیش تیمار) بوده است. غلظت بالای کلروفرم علاوه بر سرکوب متانوزن ها، می تواند موجب از بین رفتن باکتری های هیدروژن زا نیز شود. برخلاف مطالعه (Wang & Wan, 2008) غلظت ۱ درصد حجمی/حجمی کلروفرم استفاده شده در مطالعه حاضر، در حفظ باکتری های هیدروژن زا و سرکوب متانوزن ها کاملاً موفق عمل کرده است.

شیمیایی مضر بسیار مقاوم هستند. باکتری‌های هیدروژن‌زا مانند کلسترییدیوم در شرایط سخت مانند درجه حرارت بالا، شرایط اسیدی یا قلیایی بسیار شدید قادر به تولید اسپورهای محافظت‌کننده هستند. به همین دلیل در شرایط محیطی دشوار زنده می‌مانند اما متانوژن‌ها چنین قابلیت‌هایی ندارند. از نتایج مطالعه حاضر می‌توان چنین نتیجه گرفت که کلروفرم ممانعت شدیدی برای متانوژن‌ها ایجاد کرد. این ماده شیمیایی می‌تواند باکتری‌های گرم منفی را از بین برده و بنابراین باکتری‌های گرم-مثبت را تبدیل به باکتری غالب لجن کند. این ماده همچنین از مصرف استات توسط کاهش-دهنده‌های سولفات جلوگیری می‌کند. همچنین مطالعات نشان داده‌اند کلروفرم مانع از تولید متان از منابع هیدروژن/کربن دی‌اکسید و استات شده است. نتایج بررسی اسیدهای چرب فرار موجود در مایه تخمیر در شکل ۴ ارائه شده است.

همزن‌دار^۱ CSTR و ترکیب ویناس و لجن فاضلاب به-عنوان ماده اولیه است (Tena *et al.*, 2021). این محققین زمان‌های ماند هیدرولیکی متفاوتی را بررسی کردند و بیان داشتند که در زمان ماند هیدرولیکی ۰/۵ روز، حداکثر تولید ویژه^۲ هیدروژن ۳۵/۲ نرمال میلی لیتر/گرم جامدات فرار اولیه به دست آمد که کمتر از مطالعه حاضر است.

مکانیزم عمل پیش‌تیمار کلروفرم بر جلوگیری از کامل شدن مرحله نهایی متانوژنیک استوار است. از آنجایی که کلروفرم قادر است مانع فعالیت آنزیم‌های کروئید شود و متیل کوآنزیم ام (M) ردوکتاز را مهار می‌کند، در جلوگیری از فعالیت متانوژن‌ها می‌تواند موفق عمل کند (Rafieenia *et al.*, 2018). عمده‌ترین باکتری‌های تولیدکننده هیدروژن در هضم بی‌هوازی کلسترییدها هستند: باکتری‌های گرم مثبت، اسپوردار و میله‌ای. باکتری‌های کلسترییدها در برابر گرما و مواد



شکل ۴- میزان تولید اسیدهای چرب فرار (VFA) در آزمایش تولید بیوهیدروژن از ویناس (بدون پیش تیمار) و ماده تلقیح (لجن) پیش تیمار شده با استفاده از سطوح مختلف کلروفرم و تیمار شاهد (بدون پیش تیمار ویناس و ماده تلقیح)

* حروف انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد میان اسیدهای چرب فرار تولید شده در سطوح مختلف کلروفرم و تیمار شاهد است.

Figure 4. Volatile fatty acids produced in experiment of bio-hydrogen production from vinasse (without pre-treatment) and inoculum pre-treated with different levels of chloroform, and control (without vinasse and inoculum pre-treatment)

* Different letters illustrate significant difference at 5% possibility level between volatile fatty acids produced at different levels of chloroform pre-treatment and control

و تاثیر آن بر افزایش تولید هیدروژن از ویناس نیشکر را ثابت می‌کند. با توجه به بحث فوق می‌توان بیان داشت که استفاده از روش پیش تیمار کلروفورم بر ماده تلقیح، روش بسیار موثری در از بین بردن متانوژن‌ها و افزایش عملکرد تولید هیدروژن از ویناس بوده است.

اثر پیش تیمار ویناس

جهت بررسی تاثیر استفاده از پیش تیمار سدیم-هیدروکسید در غلظت های ۱ درصد، ۲/۵ درصد و ۵ درصد حجمی/حجمی بر ویناس آزمایشاتی با ۳ تکرار در دمای ۹۰ درجه سلسیوس و به مدت ۱۲۰ دقیقه طراحی و اجرا شد. نتایج در شکل ۵ نشان داده شده‌اند.

در این آزمایش عملکرد بالای $0.07 \pm 99/5$ نرمال میلی‌لیتر/گرم جامدات فرار اولیه معادل $4/4$ میلی-مول/گرم جامدات فرار اولیه در غلظت ۲/۵ درصد حجمی/حجمی مشاهده شد. نتایج آزمایش افزایش حدوداً دو برابری در تولید هیدروژن را نسبت به عدم پیش تیمار ماده اولیه نشان داد. نمودار شکل ۵ نشان می‌دهد بالاترین عملکرد تولید بیوهیدروژن در غلظت ۲/۵ درصد به دست آمد. پس از آن به ترتیب غلظت‌های ۱ درصد و ۵ درصد به مقدار $8/7 \pm 95/4$ نرمال میلی-لیتر/گرم جامدات فرار اولیه و $0/9 \pm 84/2$ نرمال میلی-لیتر/گرم جامدات فرار اولیه بیوهیدروژن، تولید کردند.

طبق این نتایج استفاده از پیش تیمار قلیایی تاثیری معنی دار بر تولید بیوهیدروژن از ویناس داشته است. به گونه‌ای که استفاده از پیش تیمار ویناس در غلظت‌های ۱ و ۲/۵ درصد سدیم هیدروکسید، نسبت به عدم استفاده از آن تا حدود ۵۰ درصد عملکرد بیوهیدروژن را افزایش داد.

با توجه به نمودارهای شکل ۵- الف و ب کمترین میزان تولید بیوهیدروژن مربوط به روش پیش تیمار ویناس با غلظت سدیم هیدروکسید ۵ درصد حجمی/حجمی بوده است. همچنین در سطوح کمتر (۱ درصد و ۲/۵ درصد حجمی/حجمی) استفاده از سدیم

آنالیز اسیدهای چرب فرار در پیش تیمار ماده تلقیح با استفاده از سطوح مختلف از غلظت کلروفورم (درصد حجمی/حجمی) شکل ۴ نشان داد استیک اسید با میزان $29/7 \pm 690/1$ میلی‌گرم/لیتر بیشترین فرآورده جانبی بوده است. پروپیونیک اسید، بوتیریک اسید، ایزو والریک اسید و والریک اسید به ترتیب مقدار، دیگر اسیدهای چرب فرار موجود در مایه باقیمانده پس از تخمیر بودند. اسیدهای چرب فرار در تیمار شاهد شکل ۴ هم مشاهده شدند. در این آزمایش استیک اسید به میزان $12/1 \pm 430/3$ میلی‌گرم/لیتر بیشترین و پس از آن به ترتیب پروپیونیک اسید، بوتیریک اسید و ایزووالریک اسید تولید شدند.

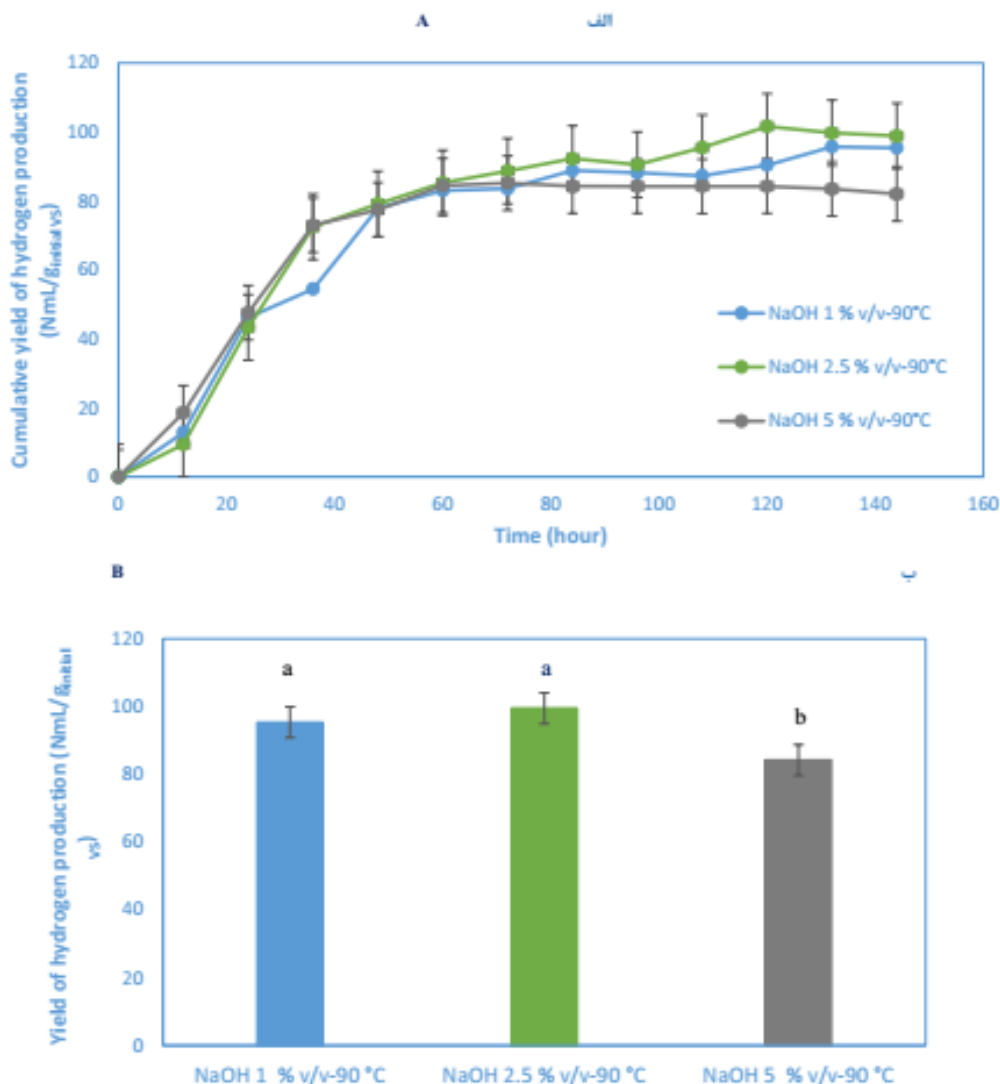
تجمع اسیدهای چرب فرار در تیمار کلروفورم به این دلیل رخ داده است که از تولید متان در این روش ممانعت به عمل آمده است. همچنین گزارش شده است که کلروفورم قادر به ممانعت از فعالیت دیگر باکتری‌های مصرف کننده هیدروژن مانند مصرف کننده‌های استات و باکتری‌های کاهش دهنده سولفات نیز باشد (Tena et al., 2020). این امر می‌تواند علت مقدار کمتر استیک اسید را در تیمار کنترل نسبت به استفاده از کلروفورم توضیح دهد.

در تمام موارد، تاثیر بازدارندگی کلروفورم می‌تواند واضحاً با سینتیک شکل گیری ترکیبات پایانی در مقایسه با تیمار کنترل که در آن از کلروفورم استفاده نشد، ارزیابی شود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت تمام گونه‌های هومواستوژن و متانوژن با استفاده از غلظت‌های کلروفورم بکار رفته، از فعالیت بازداشته شده و سرکوب شدند.

با توجه به شکل ۱ و نتایج آزمایش ارائه شده و تیمار شاهد، اثر بازدارندگی کلروفورم در سطح ۱ درصد در از میان بردن متانوژن‌ها و افزایش تولید هیدروژن کاملاً آشکار است. به نظر می‌رسد باکتری‌های هومواستوژن در این شرایط از بین رفته و یا از فعالیت بازداشته شدند. این آزمایش استفاده از پیش تیمار لجن

وقوع پیوست. نتایج آنالیز واریانس یک طرفه نشان داد میان غلظت‌های ۱ و ۲/۵ درصد سدیم هیدروکسید از نظر آماری اختلاف معنی‌داری وجود ندارد اما میان غلظت ۵ درصد و دو غلظت دیگر در سطح احتمال ۵ درصد اختلاف معنی دار ($p \leq 0.05$) وجود دارد.

هیدروکسید، عملکرد بالاتری مشاهده شد. نمودار شکل ۵-الف نشان می‌دهد سرعت تولید بیوهیدروژن در هر سه غلظت در ۵۰ ساعت آغازین تخمیر بسیار بالا بوده است. در ۱۰۰ ساعت بعدی تقریباً همه تیمارها به حالت پایدار تولید رسیدند. در این میان حداکثر عملکرد تولید بیوهیدروژن در غلظت ۲/۵ درصد حجمی/حجمی به



شکل ۵-الف- نمودار تجمعی تولید بیوهیدروژن از ویناس پیش تیمار شده با سدیم هیدروکسید و ماده تلقیح (لجن) پیش تیمار شده با کلروفرم ۱ درصد حجمی/حجمی ب- عملکرد تولید بیوهیدروژن از ویناس پیش تیمار شده با سدیم هیدروکسید و ماده تلقیح (لجن) پیش تیمار شده با کلروفرم ۱ درصد حجمی/حجمی

* حروف انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال ۵ درصد میان عملکرد تولید بیوهیدروژن در سطوح مختلف سدیم هیدروکسید است.

Figure 5A. Cumulative production of bio-hydrogen from vinasse pre-treated with sodium hydroxide and, inoculum pretreated with chloroform 1% v/v B. Yield of bio-hydrogen production from vinasse pretreated with sodium hydroxide and inoculum pretreated with chloroform 1% v/v

* Different letters illustrate significant difference on 5% possibility level between bio-hydrogen production yields at different levels of sodium hydroxide pre-treatment

گسیختگی پیوندهای لیگنین کربوهیدرات دانست می‌توان عملکرد پیش تیمار قلیایی را بر افزایش تولید هیدروژن ناشی از فرآیند صابونی شدن و از هم

در این فرآیند پیش تیمار قلیایی (Zheng et al., 2014).

قند ساده شناسایی شده توسط دستگاه HPLC^۲ در ویناس بوده است. در ویناس گلوکز و ساکاروز وجود نداشت همچنین به دلیل محدودیت‌های دستگاه، قندهای پیچیده‌تر (پلیمرها) در ویناس شناسایی نشدند. اما از آنجایی که پیش‌تیمار قلیایی منجر به افزایش عملکرد تولید هیدروژن در مطالعه حاضر شد (از طریق هیدرولیز قندهای پیچیده به قندهای ساده‌تر)، می‌توان نتیجه گرفت که ممکن است ویناس دارای قندهای پیچیده‌تری باشد که در صورت تبدیل شدن به قندهای ساده‌تر و قابل استفاده برای میکروارگانیسم‌ها می‌توانند منبع غذایی مناسبی برای باکتری‌های تولیدکننده هیدروژن بوده و در نتیجه منجر به افزایش تولید بیوهیدروژن شود.

مطالعات اندکی استفاده از روش‌های پیش‌تیمار ماده اولیه را بر ویناس جهت تولید هیدروژن مورد بررسی قرار داده‌اند (Mohan, 2009; Fu et al., 2017; Mishra et al., 2018). در این میان برخی محققین از روش فراصوت جهت بهبود تولید هیدروژن از ویناس استفاده کردند (Gadhe et al., 2014). در این مطالعه روش فراصوت قادر به افزایش تولید هیدروژن به میزان ۱/۴ برابر، نسبت به استفاده از ویناس تیمار نشده بود. مطالعه حاضر نشان داد استفاده از پیش‌تیمار سدیم هیدروکسید قادر به افزایش تولید هیدروژن به میزان ۲/۰۸ برابر نسبت به ویناس بدون پیش‌تیمار است. عملکرد تولید هیدروژن از ویناس پیش‌تیمار شده با روش فیزیکی شیمیایی (شامل انعقاد، لخته کردن و رسوب گذاری) در رآکتور^۳ AFBR در زمان‌های ماند هیدرولیکی متفاوت به مقدار 0.7 ± 0.3 میلی‌مول/گرم نیاز اکسیژن شیمیایی گزارش شده است، که به دلیل متفاوت بودن شرایط آزمایش (از جمله تولید پیوسته و بررسی زمان‌های ماند هیدرولیکی مختلف) نمی‌توان نتایج آن را با مطالعه حاضر مقایسه نمود (Rego et al.,

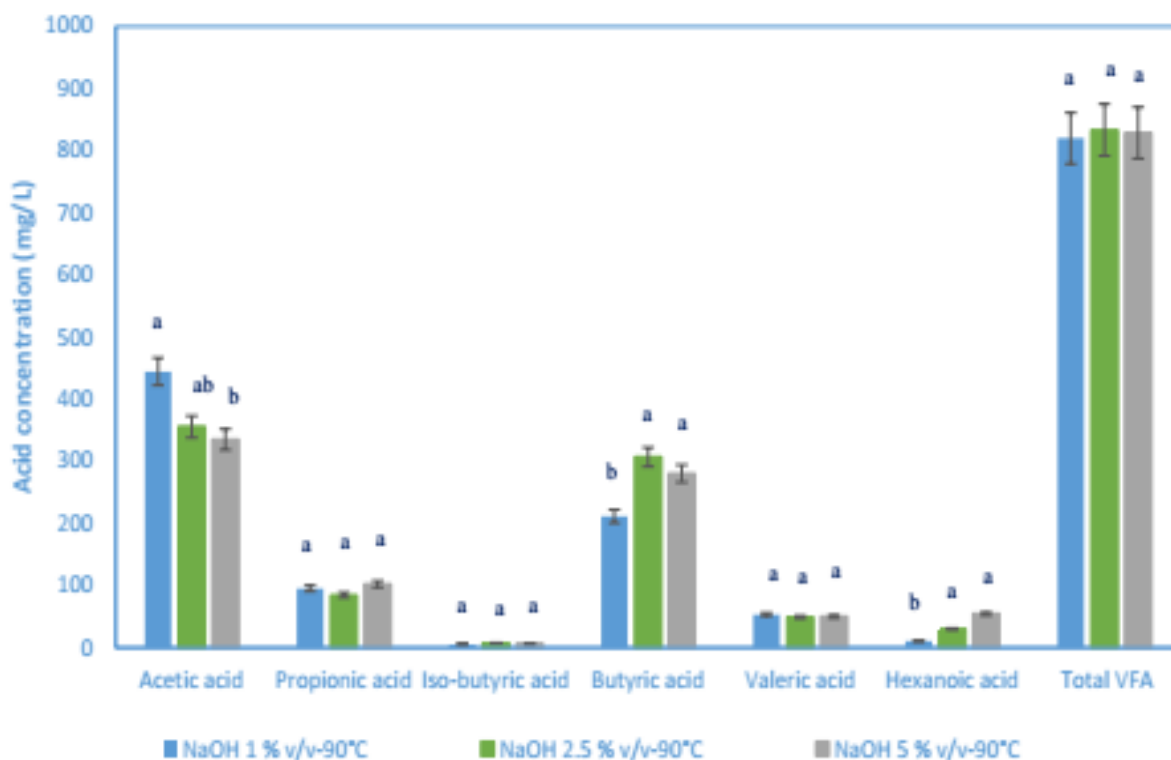
با حذف پیوندهای عرضی، منجر به افزایش تخلخل و اندازه سطح داخلی، تورم ساختاری، کاهش درجه پلیمریزاسیون و تبلور، اختلال در ساختار لیگنین و در نتیجه از بین رفتن پیوندهای لیگنین و سایر پلیمرها می‌شود. میزان کارایی پیش‌تیمار قلیایی با مقدار لیگنین موجود در ماده مرتبط است (Zheng et al., 2014). بنابراین سدیم‌هیدروکسید قادر به از هم گسیختن پیوندهای لیگنین بوده است و این میزان از هم گسیختگی با غلظت سدیم‌هیدروکسید استفاده شده رابطه مستقیم داشته است. به‌گونه‌ای که با افزایش غلظت از ۱ درصد به ۲/۵ درصد حجمی/حجمی عملکرد تولید بیوهیدروژن افزایش یافت. اما عملکرد تولید با افزایش غلظت از ۲/۵ درصد به ۵ درصد کاهش یافت. این را می‌توان به تولید ترکیبات فنولی به دلیل افزایش غلظت مواد قلیایی در فرآیند تخمیر نسبت داد (Antonopoulou et al., 2015). ترکیبات فنولی دارای خاصیت بازدارندگی تولید بیوهیدروژن هستند و بنابراین منجر به کاهش تولید شدند.

با توجه به نتایج آزمایش می‌توان نتیجه گرفت اجرای پیش‌تیمار قلیایی بر ویناس در شکستن پیوندهای پیچیده‌تر کربوهیدرات‌ها و تبدیل آن‌ها به قندهای ساده‌تر قابل استفاده برای مصرف میکروارگانیسم‌ها، موثر و لازم است. پیش‌تیمارهای قلیایی عمدتاً جهت شکستن پیوندهای استر در کمپلکس‌های لیگنین-فنولی-کربوهیدرات مورد استفاده قرار می‌گیرد (Monlau et al., 2013). همان‌طور که پیش‌تر ذکر شد این عمل منجر به صابونی شدن استرهای پیوندهای اورونیک^۱ بین همی سلولزها، لیگنین و فیبرها شده، تخلخل را افزایش می‌دهد و بدین طریق انتشار آنزیم‌های هیدرولیزکننده را آسان می‌کند (Monlau et al., 2013).

همان‌گونه که در جدول ۱ آمده است، زایلوز تنها

(سدیم هیدروکسید در دمای ۹۰ درجه سلسیوس) جهت پیش تیمار ویناس در تولید هیدروژن استفاده کرده باشد یافت نشد. این امر بیانگر نوآوری مطالعه حاضر در تولید هیدروژن از ویناس نیشکر است. آنالیز اسیدهای چرب فرار در شکل ۶ نشان داده شده است.

سم زدایی ویناس با استفاده از زغال چوب در شرایط ناپیوسته جهت تولید هیدروژن به کار گرفته شدند که منجر به ۱۱ درصد افزایش در عملکرد تولید هیدروژن شد (García-Depraect *et al.*, 2019). در مرور منابع مطالعه‌ای که از پیش تیمار حرارتی و قلیایی



شکل ۶- میزان تولید اسیدهای چرب فرار (VFA) در آزمایش تولید بیوهیدروژن از ویناس پیش تیمار شده با سدیم هیدروکسید و ماده تلقیح (لجن) پیش تیمار شده با استفاده از کلروفرم ۱ درصد (حجمی/حجمی)

*حروف انگلیسی متفاوت بیانگر اختلاف معنی دار در سطح احتمال ۵ درصد میان اسیدهای چرب فرار تولید شده در سطوح مختلف سدیم هیدروکسید است.

Figure 6. Volatile fatty acids produced in experiment of bio-hydrogen production from vinasse pretreated with sodium hydroxide and inoculum pre-treated with chloroform 1% (v/v)

* Different letters illustrate significant difference on 5% possibility level between volatile fatty acids produced at different levels of sodium hydroxide pre-treatment

در این تیمار تولید شده‌اند. در این تیمار همان گونه که ذکر شد استیک اسید، اسید آلی عمده بود اما مقدار آن نسبت به حالت بدون پیش تیمار ویناس و همچنین تیمار شاهد کمتر بوده است. باکتری‌های تولیدکننده پروپیونیک اسید می‌توانند هیدروژن را مستقیم به وسیله مصرف نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید (NADH)، استفاده کرده و در تخمیر تاریک با کاهش تولید

نتایج آنالیز نشان داد همانند آزمایش بدون پیش تیمار ماده اولیه، بیشترین اسید آلی شناسایی شده در مایه حاصل از تخمیر استیک اسید مقدار $95/8 \pm$ میلی‌گرم/لیتر بوده است. پس از آن به ترتیب بوتیریک اسید، پروپیونیک اسید، والریک اسید و ایزو بوتیریک اسید در مایه تلقیح شناسایی شدند. با توجه به شکل ۶ مشاهده می‌شود که اسیدهای چرب فرار کمتری

با توجه به نتایج به دست آمده در بخش آزمایشگاهی مطالعه حاضر و عملکرد تولید بیوهیدروژن از ویناس در فرآیند ناپیوسته با کشت مخلوط $0.07 \pm$ ۹۹/۵ نرمال میلی لیتر/گرم جامدات فرار اولیه و معادلات بیان شده در مواد و روش‌ها میزان جامدات فرار ویناس در حجم تولیدی سالیانه کارخانه الکل رازی خوزستان محاسبه شد و در نهایت در محاسبه پتانسیل تولید بیوهیدروژن مورد استفاده قرار گرفت. نتایج مربوطه در جدول ۲ ارائه شده‌اند.

طبق جدول ۲ پتانسیل سالانه تولید انرژی و هیدروژن در فرآیند ناپیوسته تولید هیدروژن با استفاده از پیش تیمار شیمیایی ویناس به ترتیب ۳۳/۳ ترا ژول/سال و ۰/۰۳ کیلو مترمکعب است. پتانسیل جهانی تولید هیدروژن از پسماندهای دیگر نظیر بقایای تیمار نشده برنج ۶/۶۲۲، بقایای تیمار شده برنج ۶/۷۴۰، بقایای خام نیشکر و باگاس ۶/۱۳۲، بقایای تیمار شده نیشکر ۳۲۶، باگاس نیشکر ۲۰۰/۹، بقایای ذرت ۸/۲۹۷، بقایای گندم ۳/۳۷۲ (پنتاژول/سال) گزارش شده است (Bundhoo et al., 2015).

بنابر اطلاعات نویسندگان پتانسیل تولید هیدروژن از ویناس در ایران و جهان تاکنون گزارش نشده است. با این حال، امکان‌سنجی اقتصادی، پتانسیل انرژی و جلوگیری از انتشار گاز کربن دی‌اکسید از ویناس را در تولید متان در برزیل مورد بررسی قرار داده شد (Bernal et al., 2017). پتانسیل انرژی متان تولید شده از ویناس ۳/۲۶ (تراوات ساعت/سال) بدست آمد. پتانسیل تولید بیوگاز و بیومتان از ویناس با روش هضم بی‌هوایی در برزیل بررسی و ۱ میلیارد (دلار/سال) کاهش در هزینه‌ها، ۶/۷ کاهش انتشار با جایگزینی بیوگاز و ۳/۲ (مگاتن دی‌اکسید کربن/سال) کاهش انتشار با جایگزینی بیومتان در سیستم تولید توان در کشور برزیل پیش‌بینی شد (Silva Neto & Gallo, 2021).

بیوهیدروژن و افزایش تولید پروپیونیک اسید، بازدارندگی ایجاد کنند.

شکل‌گیری پروپیونیک اسید مسیری متابولیکی است که هیدروژن را مصرف می‌کند. در این مسیر عمدتاً پروپیونیک اسید، استیک اسید و مقدار کمی والریک اسید تولید می‌شود (Guo et al., 2008). این عمل می‌تواند منجر به افزایش تولید استیک اسید و والریک اسید شود. با توجه به شکل ۴ در آزمایش بدون پیش تیمار ویناس مقدار بیشتری والریک اسید و پروپیونیک اسید تولید شده است که متعاقباً می‌تواند منجر به افزایش تولید استیک اسید و کاهش تولید هیدروژن شود. در توافق با نتایج این مطالعه، انباشت پروپیونیک اسید در یک رآکتور CSTR که با استفاده از فاضلاب صنعتی دستگاه تولید شراب تولید هیدروژن می‌کرد، گزارش داده شده است (Sivagurunathan et al., 2016). از طرفی در این تیمار مقدار بوتیریک اسید بیشتری نسبت به دو تیمار دیگر تولید شده است. دلیل این امر تولید همزمان بوتیریک اسید، استیک اسید و بیوهیدروژن در مسیر متابولیک اصلی (بالاترین بازده) است.

پتانسیل تولید هیدروژن از ویناس

میزان تولید نیشکر در استان خوزستان سالانه برابر ۹۲۸۴/۹ کیلو تن گزارش شده است. طبق آمار سازمان خوار و بار جهانی (در این سال در ایران ۵۰۰ هزار تن ملاس تولید شده است) (FAO, 2019). در این استان که بزرگترین تولیدکننده ملاس و اتانول ایران است ۷۰ درصد الکل کشور تولید می‌شود. به طور مشخص کارخانه الکل رازی با ظرفیت تولید سالانه ۳۳ میلیون لیتر الکل و ۱۰ هزار تن خمیرمایه به ۱۷۰ هزار تن ملاس نیاز دارد (Razi Alcohol company, 2021). با توجه به ضریب تبدیل ذکر شده، میزان تولید ویناس که حدوداً ۱۳ برابر اتانول تولیدی است (Santos et al., 2014b)، تنها در کارخانه رازی خوزستان ۴۲۹ میلیون لیتر می‌باشد.

جدول ۲- پتانسیل تولید سالانه بیوهیدروژن و اسیدهای آلی از ویناس

Table 2. Annual potential of bio-hydrogen and organic acids production from vinasse

ردیف	موارد	واحد	مقدار
۱	VS کل ویناس تولید شده	کیلو تن	۳۱/۱
۲	COD کل ویناس تولید شده	کیلو تن	۴۰/۹
۳	تولید کل بیوهیدروژن	کیلومتر مکعب	۰/۰۰۳
۴	پتانسیل انرژی	تراژول / سال	۳۳/۳
۵	پتانسیل تولید استیک اسید	کیلومتر مکعب	۰/۱۵۳
۶	پتانسیل تولید بوتیریک اسید	کیلومتر مکعب	۰/۱۳۲

تولید سالانه ویناس تولید کرد که در صورت استخراج و خالص سازی می تواند به عنوان ماده اولیه در دیگر صنایع مورد استفاده قرار گیرد. محققین دیگری کاربرد ویناس در تولید اسیدهای آلی را بررسی کرده اند. برای مثال پتانسیل استفاده از ویناس نیشکر به عنوان ماده اولیه در بازیابی متابولیت های محلول در مفهوم پالایشگاه زیستی^۱ مورد بررسی قرار گرفته است (Sánchez *et al.*, 2021). تاثیر دمای ۳۰-۶۰ درجه سلسیوس و pH اولیه ۵ تا ۱۰ بر عملکرد تولید اسیدهای آلی بررسی شد. در این مطالعه به ازای هر گرم نیاز اکسیژن شیمیایی اولیه ۴۰۱ میلی گرم اسیدهای آلی تولید شد. نتایج این مطالعه در توافق کامل با مطالعه حاضر بوده است.

همان گونه که بیان شد در هر دو تیمار پیش تیمار کلروفرم ماده تلقیح و پیش تیمار ویناس (ماده اولیه) مقادیر قابل توجهی اسیدهای آلی ۴۰۰-۷۰۰ میلی-لیتر/گرم مایه تخمیر اسیدهای چرب فرار تولید شدند. نتایج این مطالعه در توافق کامل با مطالعه حاضر است (Sánchez *et al.*, 2021). نتایج بیان شده در مطالعه حاضر بیانگر پتانسیل بالای تولید اسیدهای آلی از ویناس به عنوان جایگزین مناسب سوخت های فسیلی و توسعه امکان استفاده از تخمیر تاریک جهت تولید مواد زیستی با ارزش افزوده در پالایشگاه زیستی نیشکر در کنار تولید بیوهیدروژن هستند.

همان گونه که در مقدمه شرح داده شد، از مهمترین

علاوه بر این، تولید اسیدهای چرب فرار در کنار تولید بیوهیدروژن به روش تخمیر تاریک می تواند منجر به افزایش درآمد شود تولید محصولات با ارزش افزوده شود که استیک و بوتیریک اسید از آن جمله هستند. استخراج اسیدهای آلی از مایه تخمیر را می توان از لحاظ ماده اولیه، یک فرآیند کم هزینه و یا حتی با هزینه منفی در نظر گرفت. به این دلیل که مواد اولیه استفاده شده در این فرآیند همگی پسماند محسوب می شوند (ویناس، لجن هضم بی هوازی شده) و محصول نهایی تولید شده اسیدهای چرب فراری هستند که دارای ارزش افزوده بالایی هستند. با استخراج اسیدهای چرب فرار موجود در مایه نهایی تخمیر می توان از آنها برای استفاده در مبدل های شیمیایی و یا به عنوان ماده اولیه در صنایع دارویی، غذایی و همچنین در پزشکی استفاده کرد. استیک اسید و بوتیریک اسید را می توان به استرها تبدیل کرده و سپس جداسازی و خالص سازی کرده و در صنایع مختلف به کار گرفت (Baeyens *et al.*, 2020).

با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز اسیدهای چرب فرار در مایه تخمیر باقیمانده از تخمیر تاریک در مطالعه حاضر به ازای میزان تولید سالانه ویناس تنها در کارخانه الکل رازی و در صورت تولید هیدروژن از این فاضلاب می توان ۰/۱۵۳ کیلومتر مکعب استیک اسید را در کنار تولید هیدروژن تولید کرد. همچنین می توان ۰/۱۳۲ کیلومتر مکعب بوتیریک اسید به ازای میزان

گاز بیوهیدروژن و اسیدهای آلی را نیز با عملکرد نسبتاً بالایی به دست آورد که دارای ارزش افزوده هستند.

نتیجه گیری

یکی از مهمترین چالش‌های تولید بیوهیدروژن عملکرد پایین تولید آن می‌باشد که می‌توان این مساله را با انتخاب ماده اولیه ارزان و فراوان تا حدودی برطرف کرد. ویناس نیشکر به عنوان یک فاضلاب فراوان و با پتانسیل بالا قادر است نقش قابل توجهی را به عنوان ماده اولیه در تولید هیدروژن به روش تخمیری بازی کند. از آنجایی که ویناس یک فاضلاب پیچیده است پیش تیمار آن جهت هیدرولیز قندهای موجود و افزایش دسترسی میکروارگانیسم‌ها به مواد غذایی مورد نیازشان ضروری است. در این میان پیش تیمار حرارتی-قلیایی نقش موثری در افزایش عملکرد هیدروژن دارد. نتایج این مطالعه نشان داد با استفاده از پیش تیمار ماده تلقیح با کلروفرم می‌توان به صورت معنی داری تولید هیدروژن را افزایش داد، مانع از فعالیت متانوزن‌ها شد. پس از آن با اعمال پیش تیمار قلیایی بر ویناس (سوبسترا) می‌توان عملکرد تولید بیوهیدروژن را تا دو برابر افزایش داد.

بر اساس نتایج این مطالعه ویناس پتانسیل بسیار بالایی جهت کاربرد به عنوان ماده اولیه در تولید بیوهیدروژن به روش تخمیر تاریک دارد و در کنار آن می‌توان مقادیر قابل توجهی اسیدهای آلی نیز تولید کرد که کاربرد زیادی در صنایع مختلف دارند. همچنین تولید کود آلی از محتوای هضم شده^۲ ویناس برای کاربرد در کشاورزی نیز می‌تواند راهکار دیگری در جهت استفاده هر چه بیشتر از این فرآیند باشد. نتایج این پتانسیل سنجی راهکاری بسیار ارزان و کارا جهت استفاده از این فاضلاب آلوده کننده ارائه می‌دهد که می‌تواند بسیاری از مشکلات کارخانه الکل رازی خوزستان را در رابطه با تیمار این فاضلاب حل کرده، محصولاتی با ارزش افزوده

محدودیت‌های تولید بیوهیدروژن به روش تخمیر تاریک، عملکرد بسیار پایین آن (۴ مول هیدروژن/مول گلوکز) است. به همین دلیل مطالعات مختلف افزایش عملکرد تولید آن را مورد بررسی قرار داده‌اند. یکی از راه کارهایی که جهت افزایش بهره‌وری سیستم می‌توان ارائه داد تولید دو مرحله‌ای بیوهیدروژن و متان از ویناس است. با این کار می‌توان با تولید متان که نسبت به هیدروژن عملکرد بالاتری دارد، عملکرد کلی سیستم را افزایش داد. همچنین می‌توان با افزایش تولید فرآورده‌های جانبی عملکرد پایین بیوهیدروژن را جبران نمود. راهکار دیگر برای استفاده دوباره از اسیدهای چرب فرار و افزایش تولید هیدروژن استفاده از این اسیدهای آلی به عنوان ماده اولیه در تولید هیدروژن از روش تخمیر در روشنایی^۱ است. بدین ترتیب عملکرد تجمعی تولید هیدروژن در نهایت افزایش می‌یابد (Nath et al., 2008). لاکتیک اسید یکی از مطلوب‌ترین مواد اولیه با بالاترین میزان تولید هیدروژن در تخمیر نوری هستند (Baeyens et al., 2020). با توجه به نتایج بدست آمده در مطالعه حاضر می‌توان بیان داشت که ویناس می‌تواند به عنوان یک ماده اولیه ارزان و در دسترس جهت تولید بیوهیدروژن و اسیدهای آلی به روش تخمیر تاریک مورد استفاده قرار گیرد. علاوه بر این، استان خوزستان به عنوان بزرگترین تولیدکننده نیشکر و ویناس ایران دارای پتانسیل بسیار بالایی جهت تولید این منبع انرژی پاک می‌باشد. از مهمترین پیامدهای کاربردی این مطالعه می‌توان ارائه راه حل ممکن، نسبتاً ارزان و دوست‌دار محیط زیست جهت تیمار فاضلاب ویناس را برشمرد. از آنجایی که ویناس دارای حجم تولید بسیار بالایی است و به دلیل دارا بودن نیاز اکسیژن شیمیایی بالا بسیار آلوده کننده است، تیمار آن با روش تخمیر بی‌هوازی می‌تواند راهکاری مناسب جهت برطرف کردن مشکلات زیست محیطی باشد. علاوه بر کاهش میزان آلودگی ویناس، نتایج مطالعه حاضر نشان داده است که می‌توان

اسیدهای آلی (استیک، لاکتیک، بوتیریک، پروپیونیک و سوکسینیک اسید) و همچنین کود آلی طی فرآیندهای جداگانه است، علاوه بر حفظ محیط زیست موجب ایجاد درآمد شد.

سپاسگزاری

این مقاله بخشی از رساله دکتری است. از دانشگاه شهید چمران اهواز برای حمایت مالی (در قالب پژوهانه شماره ۹۶/۳//۰۲/۱۶۶۷۰) قدردانی می‌گردد.

نمادها

علائم اختصاری و نشانه‌های استفاده شده در مطالعه حاضر در جدول ۳ ارائه شده‌اند. هیچگونه تعارض منافع بین نویسندگان وجود ندارد.

بسیار بالا و دوست‌دار محیط زیست را نیز تولید نماید. جهت‌گیری آینده نتایج مطالعه حاضر بیانگر وجود پتانسیل بسیار بالا جهت تولید بیوهیدروژن و اسیدهای آلی از فاضلاب ویناس است. بررسی روش‌های تولید بیوهیدروژن با استفاده از رآکتورهای پیوسته می‌تواند قدمی دیگر در راستای افزایش تولید این گاز از ویناس باشد. همچنین انجام مطالعاتی در رابطه با افزایش مقیاس تولید و هرچه نزدیک‌تر شدن به تولید در مقیاس صنعتی می‌تواند بسیار راه‌گشا باشد. در نهایت می‌توان با ایجاد پالایشگاه زیستی ویناس که قادر به تولید مجموعه‌ای از محصولات متنوع شامل گازهای مختلف (متان و هیدروژن)،

جدول ۳- فهرست علائم اختصاری و نمادها
Table 3. Abbreviations and symbols index

ردیف	توضیحات	علامت اختصاری
۱	رآکتور بستر سیال بی‌هوازی	AFTBR
۲	رآکتور بی‌هوازی بستر-ساختارمند	ASTBR
۳	نیاز اکسیژن شیمیایی	COD
۴	رآکتور پیوسته همزن دار	CSTR
۵	پتانسیل انرژی کل	E
۶	شناساگر یونیزاسیون شعله‌ای	FID
۷	کروماتوگرافی گازی	GC
۸	کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا	HPLC
۹	حداقل ارزش گرمایی هیدروژن	Hc
۱۰	پلاسمای جفتی القایی با طیف سنجی انتشار نوری	ICP-OES
۱۱	متیل کوآنزیم ام	M
۱۲	نیکوتین آمید آدنین دی‌نوکلئوتید	NADH
۱۳	آمونیاک کل	TAN
۱۴	نیتروژن کلدال کل	TKN
۱۵	جامدات کل	TS
۱۶	جامدات فرار کل	TVS
۱۷	پتانسیل کل تولید بیوهیدروژن	V
۱۸	اسیدهای چرب فرار	VFA
۱۹	جامدات فرار	vs
۲۰	چگالی بیوهیدرون	ρ

REFERENCES

- Ministry of Jihad Agriculture. (2019). Agricultural Statistics from 2018 to 2019, Volume One: Crops. p.68. (In Farsi)
- Antonopoulou, G., Dimitrellos, G., Beobide, A. S., Vayenas, D., & Lyberatos, G. (2015). Chemical pretreatment of sunflower straw biomass: The effect on chemical composition and structural changes. *Journal of Waste and Biomass Valorization*, 6(5), 733-746.
- Baeyens, J., Zhang, H., Nie, J., Appels, L., Dewil, R., Ansart, R., & Deng, Y. (2020). Reviewing the potential of bio-

- hydrogen production by fermentation. *Journal of Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 131, 11-23.
- Banu, J. R., Kavitha, S., Kannah, R. Y., Bhosale, R. R., & Kumar, G. (2020). Industrial wastewater to biohydrogen: Possibilities towards successful biorefinery route. *Journal of Bioresource Technology*, 298, 122378.
- Bernal, A. P., Dos Santos, I. F. S., Silva, A. P. M., Barros, R. M., & Ribeiro, E. M. (2017). Vinasse biogas for energy generation in Brazil: An assessment of economic feasibility, energy potential and avoided CO₂ emissions. *Journal of Cleaner Production*, 151, 271-260.
- Boboescu, I. Z., Gherman, V. D., Mirel, I., Pap, B., Tengölics, R., Rákhely, G., Kovács, K. L., Kondorosi, É., & Maróti, G. (2014). Simultaneous biohydrogen production and wastewater treatment based on the selective enrichment of the fermentation ecosystem. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(3), 1502-1510.
- Bundhoo, M. Z., Mohee, R., & Hassan, M. A. (2015). Effects of pre-treatment technologies on dark fermentative biohydrogen production: A review. *Journal of Environmental Management*, 157, 20-48.
- Bundhoo, Z. M. (2019). Potential of bio-hydrogen production from dark fermentation of crop residues: A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 44(32), 17362-17364.
- Carrillo-Reyes, J., Buitrón, G., Moreno-Andrade, I., Tapia-Rodríguez, A. C., Palomo-Briones, R., Razo-Flores, E., Aguilar-Juárez, O., Arreola-Vargas, J., Bernet, N., & Braga, A. F. M. (2020). *Standardized protocol for determination of biohydrogen potential*. *Methods X*, 7, 100754.
- Chaganti, S.R., Lalman, J.A., & Heath, D.D.(2012). 16 S rRNA gene based analysis of the microbial diversity and hydrogen production in three mixed anaerobic cultures. *International Journal of Hydrogen Energy*, 37(11), 9002-9017.
- Chang, S., Li, J. Z., & Liu, F. (2011). Evaluation of different pretreatment methods for preparing hydrogen-producing seed inocula from waste activated sludge. *Journal of Renewable Energy*, 36(5), 1517-1522.
- Da Silva, A. N., Macêdo, W. V., Sakamoto, I. K., Pereyra, D. d. L. A. D., Mendes, C. O., Maintinguer, S. I., Caffaro Filho, R. A., Damianovic, M. H. Z., Varesche, M. B. A., & De Amorim, E. L. C. (2019). Biohydrogen production from dairy industry wastewater in an anaerobic fluidized-bed reactor. *Journal of Biomass and Bioenergy*, 120, 257-264.
- Federation, W. E. & Association, A. (2005). Standard methods for the examination of water and wastewater. *American Public Health Association (APHA)*. Washington, DC, USA.
- Food and Agriculture Organization. (2019). FAOSTAT *statistical database*. Retrived July 6, 2021, from <https://www.fao.org/faostat/en/#data/QCL>.
- Fu, S. F., Xu, X. H., Dai, M., Yuan, X. Z., & Guo, R. B. (2017). Hydrogen and methane production from vinasse using two-stage anaerobic digestion. *Journal of Process Safety and Environmental Protection*, 107, 81-86.
- Gadhe, A., Sonawane, S. S., & Varma, M. N. (2014). Kinetic analysis of biohydrogen production from complex dairy wastewater under optimized condition. *International Journal of Hydrogen Energy*, 39(3), 13006-13014.
- García-Depraect, O., Rene, E. R., Diaz-Cruces, V. F., & León-Becerril, E. (2019). Effect of process parameters on enhanced biohydrogen production from tequila vinasse via the lactate-acetate pathway. *Journal of Bioresource Technology*, 273, 618-626.
- Guo, W. Q., Ren, N. Q., Wang, X. J., Xiang, W. S., Meng, Z. H., Ding, J., Qu, Y. Y., & Zhang, L. S. (2008). Biohydrogen production from ethanol-type fermentation of molasses in an expanded granular sludge bed (EGSB) reactor. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(19), 4981-4988.
- Hoarau, J., Caro, Y., Grondin, I., & Petit, T. (2018). Sugarcane vinasse processing: Toward a status shift from waste to valuable resource. A review. *Journal of Water Process Engineering*, 24, 11-25.
- Hu, B. & Chen, S. (2007). Pretreatment of methanogenic granules for immobilized hydrogen fermentation. *International Journal of Hydrogen Energy*, 32(15), 3266-3273.
- Hwang, M.H., Jang, N.J., Hyun, S.H., & Kim, I.S. (2004). Anaerobic bio-hydrogen production from ethanol fermentation: the role of pH. *Journal of Biotechnology*, 111(3), 297-309.
- Janke, L., Leite, A.F., Batista, K., Silva, W., Nikolausz, M., Nelles, M., & Stinner, W. (2016). Enhancing biogas production from vinasse in sugarcane biorefineries: effects of urea and trace elements supplementation on process performance and stability. *Journal of Bioresource Technology*, 217, 10-20.
- Júnior, A. D. N. F., Etchebehere, C., & Zaiat, M. (2015). Mesophilic hydrogen production in acidogenic packed-bed reactors (APBR) using raw sugarcane vinasse as substrate: Influence of support materials. *Journal of Anaerobe*, 34, 94-105.
- Luo, G., Karakashev, D., Xie, L., Zhou, Q., & Angelidaki, I. (2011). Long-term effect of inoculum pretreatment on fermentative hydrogen production by repeated batch cultivations: *Homoacetogenesis* and *methanogenesis* as competitors to hydrogen production. *Journal of Biotechnology and Bioengineering*, 108(8), 1816-1827.
- Luo, G., Xie, L., Zou, Z., Wang, W., & Zhou, Q. (2010). Evaluation of pretreatment methods on mixed inoculum for both batch and continuous thermophilic biohydrogen production from cassava stillage. *Journal of Bioresource Technology*, 101 (3), 959-964.
- Mishra, P., Thakur, S., Mahapatra, D. M. Ab., Wahid, Z., Liu, H., & Singh, L. (2018). Impacts of nano-metal oxides on hydrogen production in anaerobic digestion of palm oil mill effluent—A novel approach. *International Journal of Hydrogen Energy*, 43(5), 2666-2676.

- Mohammadi, P., Ibrahim, S., Annuar, M. S. M., & Law, S. (2011). Effects of different pretreatment methods on anaerobic mixed microflora for hydrogen production and COD reduction from palm oil mill effluent. *Journal of Cleaner Production*, 19(14), 1654-1658.
- Mohan, S. V. (2009). Harnessing of biohydrogen from wastewater treatment using mixed fermentative consortia: process evaluation towards optimization. *International Journal of Hydrogen Energy*, 34(17), 7460-7474.
- Monlau, F., Barakat, A., Trably, E., Dumas, C., Steyer, J. P., & Carrère, H. (2013). Lignocellulosic materials into biohydrogen and biomethane: impact of structural features and pretreatment. *Journal of Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, 43(3), 260-322.
- 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.
- Náthia-Neves, G., De Alencar Neves, T., Berni, M., Dragone, G., Mussatto, S. I., & Forster-Carneiro, T. (2018). Start-up phase of a two-stage anaerobic co-digestion process: hydrogen and methane production from food waste and vinasse from ethanol industry. *Journal of Biofuel Research*, 5(2), 813-820.
- Pereira, I. Z., Dos Santos, I. F. S., Barros, R. M., E Silva, H. L. d. C., Tiago Filho, G. L., & E Silva, A. P. M. (2020). Vinasse biogas energy and economic analysis in the state of São Paulo, Brazil. *Journal of Cleaner Production*, 260, 118-121.
- Rafieenia, R., Lavagnolo, M. C., & Pivato, A. (2018). Pre-treatment technologies for dark fermentative hydrogen production: current advances and future directions. *Journal of Waste Management*, 71, 734-748.
- Razi alcohol company website. (2021). Comodity detail vinass. Retrieved July 6, 2021, from <http://www.ya-razi.com>. (In Farsi).
- Rego, G. C., Ferreira, T. B., Ramos, L. R., De Menezes, C. A., Soares, L. A., Sakamoto, I. K., Varesche, M. B. A., & Silva, E. L. (2020). Bioconversion of pretreated sugarcane vinasse into hydrogen: new perspectives to solve one of the greatest issues of the sugarcane biorefinery. *Journal of Biomass Conversion and Biorefinery*, 1-15.
- Sánchez, F. E., Fuess, L. T., Cavalcante, G. S., Adorno, M. Â. T., & Zaiat, M. (2021). Value-added soluble metabolite production from sugarcane vinasse within the carboxylate platform: An application of the anaerobic biorefinery beyond biogas production. *Journal of Fuel*, 286 (1), 119378.
- Santos, S. C., Rosa, P. R. F., Sakamoto, I. K., Varesche, M. B. A., & Silva, E. L. (2014b). Organic loading rate impact on biohydrogen production and microbial communities at anaerobic fluidized thermophilic bed reactors treating sugarcane stillage. *Journal of Bioresource Technology*, 159, 55-63.
- Silva Neto, J. V. & Gallo, W. L. (2021). Potential impacts of vinasse biogas replacing fossil oil for power generation, natural gas, and increasing sugarcane energy in Brazil. *Journal of Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 135, 110281.
- Singh, L. & Wahid, Z. A. (2015). Methods for enhancing bio-hydrogen production from biological process: A review. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 21, 70-80.
- Sivagurunathan, P., Kumar, G., Bakonyi, P., Kim, S. H., Kobayashi, T., Xu, K. Q., Lakner, G., Tóth, G., Nemestóthy, N., & Bélafi-Bakó, K. (2016). A critical review on issues and overcoming strategies for the enhancement of dark fermentative hydrogen production in continuous systems. *International Journal of Hydrogen Energy*, 41(6), 3820-3836.
- Soares, J. F., Confortin, T. C., Toderó, I., Mayer, F. D., & Mazutti, M. A. (2020). Dark fermentative biohydrogen production from lignocellulosic biomass: Technological challenges and future prospects. *Journal of Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 117, 109484.
- Sridevi, K., Sivaraman, E., & Mullai, P. (2014). Back propagation neural network modelling of biodegradation and fermentative biohydrogen production using distillery wastewater in a hybrid upflow anaerobic sludge blanket reactor. *Journal of Bioresource Technology*, 165, 233-240.
- Sydney, E. B., Larroche, C., Novak, A. C., Nouaille, R., Sarma, S. J., Brar, S. K., Letti, L. A. J., Soccol, V. T., & Soccol, C. R. (2014). Economic process to produce biohydrogen and volatile fatty acids by a mixed culture using vinasse from sugarcane ethanol industry as nutrient source. *Journal of Bioresource Technology*, 159, 380-386.
- Tena, M., Luque, B., Perez, M., & Solera, R. (2020). Enhanced hydrogen production from sewage sludge by cofermentation with wine vinasse. *International Journal of Hydrogen Energy*, 45(32), 15977-15984.
- Tena, M., Perez, M., & Solera, R. (2021). Effect of hydraulic retention time on hydrogen production from sewage sludge and wine vinasse in a thermophilic acidogenic CSTR: A promising approach for hydrogen production within the biorefinery concept. *International Journal of Hydrogen Energy*, 46(11), 7810-7820.
- Trchounian, K., Sawers, R. G., & Trchounian, A. (2017). Improving biohydrogen productivity by microbial dark-and photo-fermentations: Novel data and future approaches. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 80, 1201-1216.
- Urbaniec, K. & Bakker, R. R. (2015). Biomass residues as raw material for dark hydrogen fermentation—A review. *International Journal of Hydrogen Energy*, 40(9), 3648-3658.
- Usman, T. M., Banu, J. R., Gunasekaran, M., & Kumar, G. (2019). Biohydrogen production from industrial wastewater: An overview. *Journal of Bioresource Technology Reports*, 7, 100287.
- Viana, M., Dams, R., Pinheiro, B., Leitão, R., Santaella, S., & Dos Santos, A. (2019). The source of inoculum and the

method of *methanogenesis* inhibition can affect biological hydrogen production from crude glycerol. *Journal of Bioenergy Research*, 12(3), 742-733.

Wang, J. & Wan, W. (2008). Comparison of different pretreatment methods for enriching hydrogen-producing bacteria from digested sludge. *International Journal of Hydrogen Energy*, 33(12), 2934-2941.

Zheng, Y., Zhao, J., Xu, F., & Li, Y. (2014). Pretreatment of lignocellulosic biomass for enhanced biogas production. *Journal of Progress In Energy and Combustion Science*, 42, 35-53.