

تولید بیواتانول از مواد لیگنوسلولزی در بیوراکتور غشایی

محمدحسن ابراهیمی^۱، محمد سلطانیه^{۱*}، سعید کاشفی^۱، مهدی حقی^۱، مهدی یزدان شناس^۲

۱- دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی شریف، تهران، ایران

۲- شرکت گلوکزان، قزوین، ایران

مشخصات مقاله

تاریخچه مقاله:

دریافت: ۵ خرداد ۹۳

دریافت پس از اصلاح: ۲۰ اردیبهشت ۹۴

پذیرش نهایی: ۶ خرداد ۹۴

کلمات کلیدی:

بیواتانول

بیوراکتور غشایی

پیوسته ذرت

هیدرولیز و تخمیر هم‌زمان

ساکارامایسیسکروپسیا

چکیده

در این مطالعه تولید بیواتانول از یک ماده لیگنوسلولزی نظیر پیوسته ذرت در بیوراکتور غشایی مورد بررسی و آزمایش قرار گرفت. بیواتانول یک سوخت زیستی نسل دوم است که با توجه به کاهش منابع نفتی و همچنین آلودگی سوخت‌های فسیلی مورد توجه قرار گرفته است. خوراک مورد استفاده در این پژوهش پیوسته ذرت است که با توجه به قیمت بسیار کم و همچنین مقدار زیاد آن در کشور گزینه مناسبی برای این کار است. برای تبدیل این ماده به اتانول ابتدا باید درصد سلولز آن را با یکی از روش‌های پیش‌تصفیه افزایش داد. در اکثر مطالعات گذشته آزمایش‌ها به صورت ناپیوسته انجام گرفته بودند اما در این پژوهش، فرآیند هیدرولیز و تخمیر هم‌زمان در یک سیستم که محصول را به‌طور پیوسته با استفاده از یک غشای اولترافیلتراسیون خارج می‌کند، راه‌اندازی و استفاده شد. در واقع پیوسته کردن سیستم و خوراک ارزان و سرشار از کربوهیدرات وجه تمایز و پراهمیت این کار است. مزیت پیوسته کردن سیستم، ممانعت از عمل بازدارندگی محصولات برای دستیابی به بیشترین بازده تولید اتانول و همچنین غیرفعال نشدن آنزیم‌های مورد استفاده است. طراحی و بهینه سازی با استفاده از نرم‌افزار Design-Expert انجام گرفت. مقادیر بهینه سه پارامتر مورد بررسی که بیشترین غلظت اتانول را می‌دهد عبارتند از: دمای °C ۳۸/۵، غلظت سورفکتانت (v/v) ۰/۰۸٪ و دور همزن ۶۳۱/۲ دور بر دقیقه. بازده پیش‌بینی شده فرآیند برای این مقادیر ۸۷/۸٪ و بازده واقعی برابر ۸۴/۲٪ گزارش شد.

* عهده دار مکاتبات

M.soltanieh@sharif.edu

حقوق ناشر محفوظ است.

۱- مقدمه

۱-۲- تولید بیواتانول و مطالعات گذشته

۱-۱- جایگاه و اهمیت بیوانرژی^۱

امروزه اقتصاد جهانی، جهت تولید سوخت، الکتریسیته، مواد شیمیایی و دیگر محصولات، به میزان قابل توجهی به منابع انرژی فسیلی مانند زغال سنگ، نفت و گاز طبیعی وابسته است [۱]. طبق تخمین مجله نفت و گاز در سال ۲۰۱۰ تنها ۴۸ سال از عرضه نفت و ۶۴ سال از عرضه گاز طبیعی باقیمانده است [۲]. مصرف بیش از حد سوخت های فسیلی به ویژه در محدوده های شهری، سبب ایجاد آلودگی بیش از حدی در چند دهه اخیر شده است و سطح گازهای گلخانه ای در اتمسفر به نحو چشمگیری افزایش یافته است [۳].

با توجه به کاهش تولید نفت در آینده نزدیک، منابع تجدید پذیر همانند باد، آب، خورشید، زیستی و ژئوترمال می توانند جایگزین مناسبی برای آن باشند. منابع زیستی با توجه به فراوانی و تجدید پذیری آنها در چند دهه اخیر مورد توجه قرار گرفته اند.

بیواتانول یکی از سوخت های مورد نیاز در حمل و نقل است. دو کشور تولید کننده بیواتانول، آمریکا و برزیل می باشند و به ترتیب ۵۲ درصد و ۳۷ درصد تولید جهانی بیواتانول را در اختیار دارند. این ماده در آمریکا عمدتاً از نشاسته ذرت و در برزیل از نیشکر تولید می شود؛ اما این مواد که دارای ارزش غذایی می باشند پاسخگوی نیاز فزاینده به سوخت اتانول نمی باشند. کاهش تولید گازهای گلخانه ای با استفاده از اتانول بر پایه نشاسته یا نیشکر چندان مناسب نیست. اتانول همچنین می تواند از منابع فراوان و تجدید پذیر زیست توده نظیر پسماندهای کشاورزی و بقایای جنگلی نیز تولید شود [۴]. برآورد شده است که ۴۴۲ میلیون لیتر اتانول از زیست توده لیگنوسلولزی^۲ می توان تولید کرد که ۱۶ برابر تولید بیواتانول واقعی در حال حاضر است [۵]. مواد لیگنوسلولزی فراوان ترین زیست توده تجدید پذیر در جهان است که تولید سالانه آن ۱۰^{۱۰} میلیون تن بوده و از سه جزء اصلی سلولز، همی سلولز و لیگنین تشکیل می شود [۶]. از جمله مواد لیگنوسلولزی می توان ضایعات کشاورزی از قبیل پوسته ذرت را نام برد که سالیانه مقدار زیادی در سرتاسر جهان تولید می شود [۷].

پوسته ذرت یک محصول جانبی در صنعت آسیاب مرطوب ذرت به حساب می آید. در ایران پوسته ذرت به عنوان خوراک دام مورد استفاده قرار می گیرد. این در حالی است که با توجه به محتوای بالای کربوهیدرات در آن، در دنیا بیشتر برای تولید اتانول و مواد با ارزش دیگری که از جزء همیسلولزی آن به دست می آید استفاده می شود [۸]. برای تولید زیست اتانول از مواد لیگنوسلولزی باید از روش های تخمیر و هیدرولیز استفاده شود. انتخاب روش مناسب به مشخصات سینتیکی میکروارگانیسم و نوع ماده لیگنوسلولزی آبکافت شده، وابسته است. پرکاربردترین روش ها عبارتند از: تخمیر و هیدرولیز مجزا^۳ (SHF)، تخمیر و هیدرولیز همزمان^۴ (SSF) و تبدیل میکروبی مستقیم^۵ (DMC). مهم ترین فرآیند برای هیدرولیز آنزیمی روش SSF است که در واقع شامل ترکیب آنزیم سلولاز و میکروبی های تخمیر کننده در یک ظرف برای بهبود و تولید اقتصادی اتانول است [۹]. با وجود پایین تر بودن دمای این روش از دمای بهینه مربوط به فعالیت آنزیم ها، سرعت ها و غلظت های بالاتری نسبت به فرآیندهای هیدرولیز و تخمیر جدا می دهد و همچنین موجب کاهش نیازهای دستگاهی می شود [۶]. در روش هیدرولیز و تخمیر همزمان، قند سلولاز را در طی هیدرولیز باز نمی دارد زیرا به سرعت به وسیله ارگانیسم های تخمیری مورد استفاده قرار می گیرد. این روش حصول بالاتر و نیاز به آنزیم بیشتر نسبت به روش SHF دارد. به همین دلیل، در این پژوهش از فرآیند SSF استفاده شده است.

فرآیندهای تبدیل آنزیمی کاربردهای مهمی در صنعت غذا، سنتز مواد شیمیایی جالب (به طور خاص در صنعت داروسازی) یا حتی برای اهداف محیط زیستی دارد. بیشتر این فرآیندها در راکتورهای ناپیوسته سنتی با کنترل دما انجام می شوند. در انتهای این واکنش ها و قبل از بازیابی محصولات نهایی اغلب آنزیم های موجود، غیر فعال می شوند. استفاده از چنین راکتورهایی در هر مقیاسی ساده بوده و پارامترهای اصلی مورد نیاز برای کنترل در آنها دما و pH است. با این حال، این بیوراکتورها به دلیل میزان تولید پایین، هزینه های عملیاتی بالا و غیر فعال شدن کاتالیست ها برای مقادیر زیاد خوراک خام معایبی دارند. با پیدایش فناوری های غشایی، برخی از معایب فوق را می توان رفع کرد. در واقع راکتورهای

3 Separate Hydrolysis and Fermentation
4 Simultaneous Saccharification and Fermentation
5 Direct Microbial Conversion

1 biofuel
2 Lignocellulosic biomass

تولید بیواتانول از مواد لیگنوسلولزی در بیوراکتور غشایی

شرایط بازده اتانول پیش‌بینی‌شده $3/02\%$ W/V و مقدار واقعی آزمایشگاهی $3/3\%$ W/V بود. اصفهانیان و همکاران [۱۴]، تلفیقی از فرآیند تخمیر ناپیوسته و جداسازی غشایی را با استفاده از تراوش تبخیری در یک بیوراکتور غشایی به‌منظور افزایش تولید بیواتانول در مقایسه با فرآیند تخمیر سنتی در شرایط عملکرد بهینه مورد مطالعه قراردادند. غشای مورد استفاده آن‌ها یک غشای متراکم آب‌گریز پلی‌دی‌متیل-سیلوکسان (PDMS) در فرآیند تراوش تبخیری بود. برای انجام فرآیند تخمیر از باکتری ساکارامایسیس کروسیسا^۹ به‌عنوان میکروارگانیسم و گلوکز به‌عنوان سوبسترا استفاده شده است. آن‌ها مشاهده نمودند در فرآیند سنتی تخمیر ناپیوسته، راندمان غلظت سلولی و اتانول تولیدی بر مبنای مصرف سوبسترا به ترتیب برابر $0/32$ و $0/54$ g/g بوده است؛ اما در بیوراکتور غشایی این مقادیر به ترتیب برابر $0/41$ و $0/59$ بوده است. به‌علاوه، بهره‌وری اتانول نسبت به فرآیند تخمیر سنتی ناپیوسته تا مقدار $26/83$ درصد افزایش داشته است. همچنین غلظت اتانول در سمت تراوشی تقریباً $6-7$ برابر بیشتر از مقدار آن در محیط کشت داخل بیوراکتور بوده است. آن‌ها به این نتیجه رسیده‌اند که در مقایسه با فرآیند تخمیر سنتی بیوراکتور غشایی باعث افزایش غلظت سلولی، کاهش بازدارندگی اتانول، بهبود بهره‌وری و راندمان و همچنین بازیافت اتانول تغلیظ شده گردید. موارد فوق به دلیل حضور غشاء به‌عنوان یک جداساز گزینش‌پذیر جهت حذف اتانول از محیط کشت داخل بیوراکتور بوده است.

با توجه به پژوهش‌های متنوع انجام‌شده روی مواد خام مختلف لیگنوسلولزی، در این پژوهش یک بیوراکتور غشایی ساخته شد. تاکنون در زمینه هیدرولیز و تخمیر همزمان پوسته ذرت با خروج پیوسته محصول در ایران گزارشی وجود ندارد. در این پژوهش، ابتدا پوسته ذرت به روش اسیدی پیش‌تیمار می‌شود. پس از پیش‌تیمار، پوسته ذرت به همراه مخلوط آنزیم‌های سلولاز و آمیلوگلیکوزیداز و همچنین مخمر ساکارامایسیس به همراه مواد مغذی به نسبت‌هایی که در ادامه می‌آید وارد راکتور می‌گردند. با استفاده از آزمایش‌های طراحی شده به روش RSM تأثیر پارامترهای دما، دور همزن و غلظت سورفکتانت بر میزان اتانول تولیدی بررسی می‌شود. به‌منظور تعیین میزان تأثیر خروج پیوسته محصول از راکتور، نتایج با فرآیند ناپیوسته مقایسه گردید.

غشایی آنزیمی یک روش ویژه برای پیوسته کردن فرآیند است که در آن آنزیم و محصولات نهایی به‌وسیله یک غشاء متخلخل از یکدیگر جدا می‌شوند. هدف این سامانه نگاه‌داشتن آنزیم در حجم واکنش‌کننده است، به‌طوری‌که فعالیت کامل خود را حفظ کند. بسته به مورد، مولکول‌های آنزیم می‌توانند آزادانه داخل محیط گردش کرده، روی سطح آنزیم تثبیت شده و یا درون ساختار متخلخل غشاء قرار بگیرند. غشاهای اولترافیلتراسیون دارای $1-100$ kDa MWCO^۱ بین $1-100$ kDa برای مولکول‌های آنزیم است. از آنجاکه بیشتر آنزیم‌ها وزن مولکولی بین $10-80$ kDa دارند، غشاهای اولترافیلتراسیون به‌منظور تثبیت آنزیم‌ها مکرراً استفاده می‌شوند. همچنین برهم‌کنش‌های الکترواستاتیک یا آب‌گریز بین مولکول‌های بیولوژیکی و غشاء می‌تواند روی عملکرد فرآیند تأثیر بگذارد [۱۰]. این واکنش‌ها معمولاً در بیوراکتور غشایی انجام می‌شود. بیوراکتور غشایی^۲ راکتوری است که در آن واکنش توسط میکروارگانیسم‌های زنده انجام‌شده و جداسازی به‌صورت یکپارچه و همزمان توسط غشاء انجام می‌شود [۱۱].

السن و همکاران^۳ [۱۲] بیان کردند که وقتی محصول به‌طور پیوسته از سیستم خارج شود، سرعت اولیه هیدرولیز آنزیمی سوبسترای لینگوسلولزی شسته شده و شسته نشده به ترتیب 7 تا 4 برابر حالتی می‌شود که فرآیند به‌صورت ناپیوسته انجام شود. میزان تبدیل در دو حالت مذکور 95 و 70% بوده درحالی‌که در روش ناپیوسته میزان تبدیل 40% است. هاری کریشنا و همکاران [۱۳] قند سازی و تخمیر همزمان (SSF) همراه با پیش‌تیمار بازی هیدروژن پراکسید برای تبدیل ماده آنتی‌گونم لپتوپوس^۴ به اتانول را در یک سامانه ناپیوسته با استفاده از سلولاز^۵ (تری‌کودمارسی)^۶ و ساکارامایسیس کروسیسا^۷ بهینه کرده‌اند. آنالیز RSM^۸ و سه سطح برای چهار متغیر طراحی شده است تا تأثیر متغیرهای SSF، نظیر غلظت سلولاز (FPU/g substrate) $100-20$ ، غلظت سوبسترا ($15-5\%$)، زمان ماند ($24-72$ ساعت) و دمای $35-45^\circ\text{C}$ روی بازده اتانول بررسی شود. نتایج نشان داد غلظت‌های سلولاز و سوبسترا متغیرهای مهم‌تری می‌باشند. حالت بهینه به شرح زیر گزارش گردید: سلولاز: 100 FPU/g، سوبسترا 15% ، زمان ماند: $57/2$ ساعت و دما $38/5^\circ\text{C}$. در این

1 Molecular weight cut-off

2 Membrane bioreactor

3 Ohlson et al

4 Antigonum leptopus (Linn)

5 Celluclast from Novo

6 Trichoderma reesei QM-9414

7 Saccharomyces cerevisiae NRRL-Y-132

8 Response surface methodology

۲- مواد و روش تحقیق

۲-۱- خوراک

خوراک مورد استفاده پوسته ذرت است. پوسته ذرت برای انجام این پژوهش از کارخانه گلوکزان قزوین تأمین شده است. آنالیز خوراک خام توسط کارخانه گلوکزان انجام شده است. ترکیب اجزاء پلی ساکاریدی خوراک توسط آزمایشگاه شرکت بهین آزما گزارش گردید (جدول ۱). با توجه به نتایج موجود در جدول ۱ مشاهده می شود میزان سلولز موجود در خوراک خام ۱۱٪ بوده که پس از فرآیند پیش تصفیه اسیدی ۳ برابر شده است. به طور کلی عملکرد آنزیم های سلولاز با وجود اجزاء همیسولوزی و لیگنین ضعیف می شود. بنابراین، پیش تصفیه اسیدی که منجر به کاهش اجزاء همیسولوزی شده است می تواند روش مناسبی برای واکنش های بعدی باشد [۱۴]. پیش تصفیه اسیدی حصول بیشتری را می دهد، زیرا باعث افزایش منافذ پوسته به دلیل هیدرولیز همیسولوز می شود. در پیش تصفیه اسیدی، خوراک با اسیدسولفوریک ۱/۵٪ (v/v) پیش تیمار می گردد.

در این روش خوراک را به منظور هیدرولیز همیسولوز و محلول کردن لیگنین و ترکیبات معدنی به مدت ۳۰ دقیقه در دمای 130°C در آن قرار داده، سپس آن را با کلسیم هیدروکسید خنثی کرده و چندین مرتبه با آب شستشو داده و با صافی $2\mu\text{m}$ صاف می گردد. در انتها جامد باقیمانده در 50°C خشک کرده و به عنوان سوبسترا مورد استفاده قرار می گیرد.

۲-۲- چیدمان سیستم آزمایشگاهی

برای انجام واکنش های آنزیمی یک راکتور شیشه ای به حجم 800CC به صورت دوجداره ساخته شده است. راکتور به صورت استوانه ای است. قطر قسمت پایینی راکتور 4cm و قطر راکتور در قسمت بالا 9cm است. راکتور دارای درب ۳ دهانه بوده که با بست تفلونی به بدنه راکتور متصل می شود. قسمت پایین راکتور با صفحات استیل به قطعه دیگری که نقش مخزن ۱ غشایی دارد و دارای شیر تخلیه است متصل می شود. برای آب بندی پایین راکتور از قطعات تفلونی، واشر ۲ و حلقه ۳ استفاده می شود. با توجه به اینکه راکتور دارای دو قسمت با قطرهای مختلف است از یک همزن با دو پره از نوع

جدول (۱) آنالیز پوسته بر مبنای خشک

اجزاء سازنده بر مبنای خشک (%w/w)	پوسته خام %	پوسته پیش تصفیه اسیدی %
نشاسته	۲۲	۱۱
پروتئین	۱۲	-
روغن	۴	-
سلولز	۱۱	۳۰
همیسولوز	۳۲	۲۲
لیگنین	۹	۸

پارویی استفاده می شود. قطر پره پایینی 2cm و قطر پره بالایی 4cm است. یکی از دهانه های ورودی به راکتور برای ورود همزن، یکی جهت ورود جریان بازگشتی از ماژول غشایی و دیگری برای ورود خوراک، آنزیم، جبران کمبود بافر و کنترل دما و pH در نظر گرفته شده است.

برای ثابت نگه داشتن دمای سیستم از حمام آب استفاده شده است که آب را توسط یک پمپ به جکت دور راکتور گردش می دهد.

قسمت خروجی راکتور به یک پمپ دیافراگمی متصل می شود. دلیل استفاده از این نوع پمپ غیرفعال شدن آنزیم در تماس با پره های پمپ های نوع دیگر می باشد. اما این نوع پمپ حرکت پیستونی داشته و آسیبی به آنزیم نمی رساند. به دلیل دوغابی بودن محتوای راکتور، ایجاد جریان پیوسته از راکتور به ماژول و از ماژول به راکتور بسیار مشکل است. دلیل این امر ته نشین شدن مقادیری از ذرات جامد بر روی توری و عدم توانایی مکش توسط پمپ بود، به گونه ای که افزایش فشار سیستم نیز قادر به رفع این مشکل نبود. افزایش فشار سیستم باعث پارگی توری موجود در زیر بیوراکتور و وارد شدن سوبسترا به داخل پمپ و ماژول غشایی و مختل شدن سیستم می گشت. برای حل این مشکلات وقت و انرژی بسیار زیادی صرف شد و نهایتاً با ترفندهای خاص و پیچیده ای این مشکلات برطرف گردید. محلول از این پمپ وارد یک ماژول غشایی می شد که با ایجاد اختلاف فشاری که توسط تنظیم کردن شیر می شد که بعد از ماژول تعبیه شده بود محصول از سیستم خارج می شود و بقیه مواد به داخل راکتور برگردانده می شدند.

در این راکتورها از غشاهای اولترافیلتراسیون برای بازیابی و استفاده مجدد آنزیم ها در محیط واکنش استفاده شد. اولترافیلتراسیون یک فرآیند جداسازی نیرومحركه-فشار^۴ است

1 housing
2 ring
3 oaring

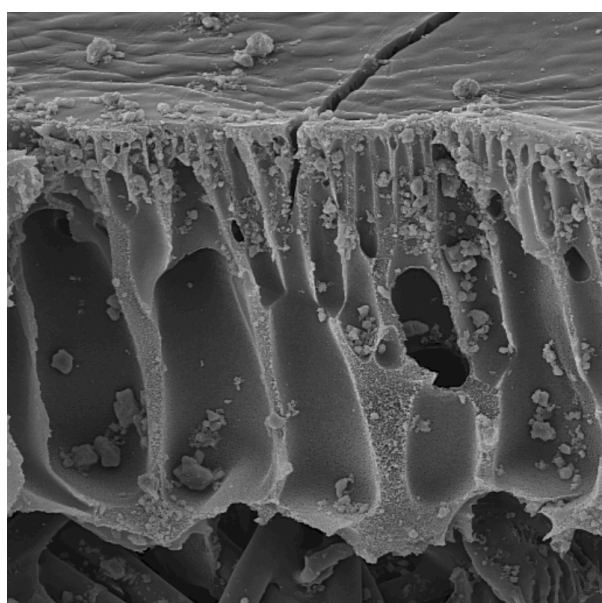
⁴Pressure-driven

تولید بیواتانول از مواد لیگنوسلولزی در بیوراکتور غشایی

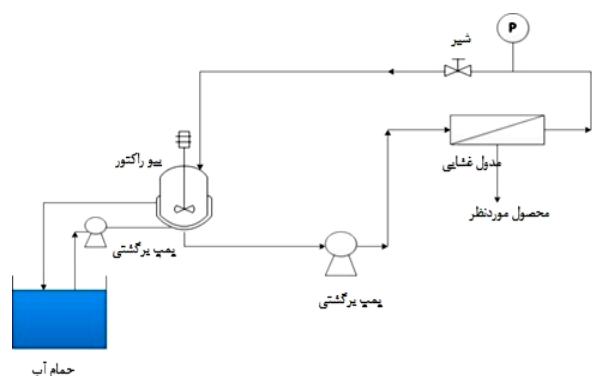
پیشنهاد شده است که با رقیق کردن محیط دانسیته نوری را به زیر ۰/۸ برسانیم. با فاکتور رقیق‌سازی ۱۱ دانسیته نوری محیط ۰/۵ به دست آمد. با رقت فوق در هر میلی‌لیتر از محیط 2×10^6 مخمر وجود دارد [۱۸].

چیدمان آزمایش در شکل ۲ نشان داده شده است.

سه پارامتر دما، غلظت سورفکتانت و دور همزن مورد بررسی قرار گرفت. برای طراحی آزمایش از نرم‌افزار Design Expert که نسخه مدت‌دار آن از پایگاه اینترنتی www.statease.com به صورت رایگان قابل دریافت است، استفاده شده است. با استفاده از این نرم‌افزار و انتخاب سه پارامتر ذکر شده آزمایش‌های جدول ۲ پیشنهاد شد.



شکل (۱) نمای عرضی غشاء



شکل (۲) چیدمان سیستم آزمایشگاهی

است که می‌تواند در دمای محیط انجام گیرد و این از مزیت‌های این فرآیند است [۱۵]. با توجه به این که وزن مولکولی آنزیم‌ها بالاتر از تقریباً ۲۵ kDa است چندین تحقیق روی سیستم‌های سلولاز و سوبستراهای سلولزی مختلف ثابت می‌کند که با استفاده از تکنولوژی غشایی، می‌توان آنزیم‌ها را در محیط واکنش نگه‌داشته و محصولات واکنش (قندهای احیاء کننده) از غشا عبور داده شوند. این روش موجب بازدارندگی کمتر آنزیم توسط محصولات شده و عملکرد سیستم بهبود می‌یابد [۱۶]. غشاء مورد استفاده در این کار از جنس پلی اتر سولفون بوده که از سپرو ممبرین^۱ تهیه شده است. اندازه حفرات غشا ۱۰ kDa و ضخامت آن ۱۶۵ µm است. قطر مؤثری از غشاء که از آن شار گرفته می‌شود برابر ۷/۵ cm است. تصویر تست SEM این غشا در شکل ۱ آمده است.

آنزیم‌های مورد استفاده از شرکت Sigma Aldrich خریداری شد و فعالیت آن‌ها با استفاده از روش DNS محاسبه شد [۱۷].

E₁: Cellulase (from Trichoderma reesei, C8546)

E₂: β- Glycosidase (from almonds, 49290)

E₃: Celluclast 1.5 (from Trichoderma reesei, C2730)

E₄: Alpha amylase (Behnouth industrial, Endozym)

۲-۳- مخمر مورد استفاده

روشی که در اینجا برای تولید اتانول مورد استفاده قرار گرفته است، روش آبکافت و تخمیر همزمان است. در این روش از آنزیم برای شکستن سلولز و از مخمر برای تخمیر گلوکز به دست آمده استفاده می‌شود [۱۸]. در این مطالعه از مخمر *Saccharomyces cerevisiae* استفاده شد.

تخمیر بی‌هوازی گلوکز باعث تولید جرم سلول مخمر می‌شود. محیط کشت YP با ۵٪ دکستروز که شامل مخمر استخراجی، پپتون و دکستروز است را با مخمر *Saccharomyces cerevisiae* که قبلاً در محیط جامد YPD (مخمر استخراجی، پپتون، دکستروز و آگار) کشت شده است، تلقیح می‌شود. محیط مایع کشت داده شده برای مدت یک شبانه‌روز در شیکر در دمای ۳۵-۳۷ درجه سانتی-گراد و دور ۱۳۰ rpm قرار داده می‌شود. رشد مخمر از تغییر رنگ محیط کاملاً مشهود است. دانسیته نوری^۲ (OD) محیط در ۶۰۰ nm توسط اسپکتروفوتومتر اندازه‌گیری می‌شود.

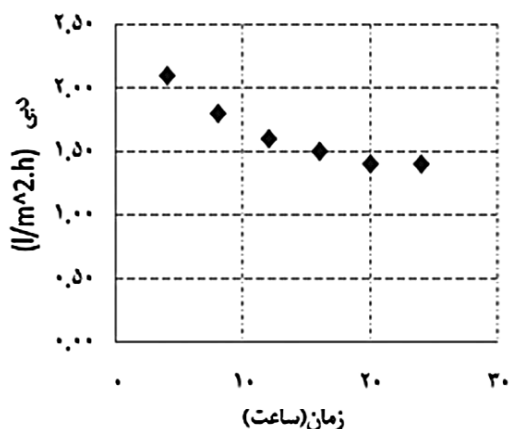
¹ Sepromembranes

² Optical density

زمان ضخامت آن افزایش می‌یابد. نکته دیگری که در شکل فوق بایستی به آن اشاره شود ثابت شدن شار عبوری از غشاء پس از مدتی معین است. این ثابت شدن دبی را می‌توان به رسیدن ضخامت ذرات جامد تشکیل شده بر روی سطح غشاء به مقداری ثابت پس از مدت‌زمانی خاص نسبت داد.

جدول (۲) آزمایش‌های پیشنهاد شده توسط نرم‌افزار

استاندارد	شماره آزمایش	غلظت سورفکتانت (% v/v)	دور همزن (rpm)	دما (°C)
۲	۱	۰/۲	۵۵۰	۳۰
۱۰	۲	۰/۲۷	۶۲۵	۳۷/۵
۱۶	۳	۰/۱	۶۲۵	۳۷/۵
۸	۴	۰/۲	۷۰۰	۴۵
۱۴	۵	۰/۱	۶۲۵	۵۰
۶	۶	۰/۲	۵۵۰	۴۵
۱۵	۷	۰/۱	۶۲۵	۳۷/۵
۱۲	۸	۰/۱	۷۵۱/۱۳	۳۷/۵
۱۷	۹	۰/۱	۶۲۵	۳۷/۵
۱۹	۱۰	۰/۱	۶۲۵	۳۷/۵
۱۱	۱۱	۰/۱	۴۹۸/۸۷	۳۷/۵
۳	۱۲	۰	۷۰۰	۳۰
۹	۱۳	۰	۶۲۵	۳۷/۵
۱	۱۴	۰	۵۵۰	۳۰
۲۰	۱۵	۰/۱	۶۲۵	۳۷/۵
۱۳	۱۶	۰/۱	۶۲۵	۲۴/۸۹
۷	۱۷	۰	۷۰۰	۴۵
۴	۱۸	۰/۲	۷۰۰	۳۰
۵	۱۹	۰	۵۵۰	۴۵
۱۸	۲۰	۰/۱	۶۲۵	۳۷/۵



شکل (۳) شار عبوری از غشاء در زمان‌های مختلف

۲-۴- تولید بیواتانول از پوسته ذرت در راکتور غشایی
 برای انجام واکنش در راکتور غشایی، پس از ورود بافر همزن در دور انتخاب شده روشن می‌شود. سپس سورفکتانت وارد راکتور می‌شود، شیر مخزن پایین راکتور باز شده و پمپ روشن می‌شود تا محلول در کل مسیر جریان یابد و به راکتور بازگردد. سپس پوسته ذرت وارد می‌شود و عمل هم زدگی به خوبی انجام می‌شود. حمام آب نیز در دمای مشخص تنظیم شده و پمپ آن روشن می‌شود تا آب وارد جکت راکتور شود. حدود یک ساعت بعد آنزیم‌های ذکر شده، مخمر استخراجی، پپتون و مخمر ساکارامایسیس کروسیا وارد راکتور گردید. مخمر استخراجی و پپتون در مقداری بافر حل شده و همچنین مخمر ساکارامایسیس نیز پس از رساندن به چگالی نوری ۰/۵ وارد راکتور شدند. لحظه وارد نمودن این مواد زمان آغاز واکنش منظور شد و هر ۴ ساعت جریان خروجی از ماژول غشایی را اندازه‌گیری کرده و به همان اندازه بافر به سیستم اضافه گردید و سپس محصول خروجی آنالیز شد. نمونه‌گیری با استفاده از شیر سوزنی و تنظیم فشار بر روی حدود ۲ بار انجام شده است. حجم کاهشی با افزودن بافر از یکی از دهانه‌های راکتور جبران می‌شود. بعد از نمونه‌گیری برای از بین بردن فعالیت آنزیم، نمونه به مدت ۱۰ دقیقه در آب جوش قرار داده می‌شود؛ سپس تا قبل از آنالیز نمونه‌ها در دمای زیر صفر درجه نگهداری می‌شود. هدف از این آزمایش‌ها مقایسه خوراک با شرایط مختلف از نظر میزان تولید اتانول و قند بود. آنالیز نمونه‌ها با دستگاه HPLC صورت پذیرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- فلاکس عبوری

طی آبکافت و تخمیر همزمان پوسته ذرت، فلاکس خروجی از ماژول غشایی باید در تمامی واکنش‌ها روند مشخص و ثابتی داشته باشد. لذا پیش از آزمایش، غلظت ۸۰g/l از خوراک تهیه شده و با اعمال فشار بر غشاء، شار عبوری از آن اندازه‌گیری شد (شکل ۳). همان‌طور که در شکل ۳ مشخص است، شار عبوری از غشاء با گذشت زمان کاهش می‌یابد که دلیل آن وجود ذرات جامد خوراک در محلول ورودی به ماژول غشایی است. با گذشت زمان، لایه‌ای از ذرات خوراک بر روی غشاء تشکیل می‌شود؛ بنابراین، موادی که توانایی عبور از غشاء را دارند (در اینجا بافر) علاوه بر مقاومت ناشی از وجود غشاء، با یک مقاومت جدید روبرو بوده و آن عبور از لایه تشکیل شده از ذرات خوراک است که با افزایش

۲-۳- غلظت گلوکز خروجی

گلوکز نهایی معرف مقدار گلوکزی است که در فرآیند قند سازی تشکیل می شود ولی به اتانول تبدیل نشده است. هرچقدر که این مقدار کمتر باشد بازده کلی این فرآیند بیشتر می شود. همان طور که در شکل ۴ مشاهده می شود یک نقطه مینیمم به دست آمده است که چون برای ما نیز مطلوب آن است که غلظت گلوکز مینیمم شود نتیجه خوبی است. پارامتر دما در این نقطه برابر $37/5$ درجه سانتی گراد است که با مطالعات گذشته در خصوص دمای بهینه آزمایش که با توجه به این نمودار و نتایج آزمایش ها دمای 38 درجه سانتی گراد را دمای مطلوب معرفی کرده است این مطلب تأیید می شود. دور همزن نیز در نقطه مینیمم حدود $625rpm$ است. اصولاً که می دانید افزایش دور همزن سبب افزایش اختلاط و هم زدگی می شود که عامل مناسبی برای فرآیند است ولی از طرفی افزایش دور همزن باعث ایجاد چرخش یا گردابه^{۲۱} شده که عامل نامناسبی است. بنابراین باید یک حد واسطی از این دو تأثیر ایجاد شود تا باعث افزایش بازده کلی فرآیند گردد. شکل ۵ تأثیر پارامترهای غلظت سورفکتانت (A) و دور همزن در دمای میانی یعنی $37/5$ درجه سانتی گراد را نشان می دهد. افزایش غلظت سورفکتانت تا مقدار $(0.1 v/v)$ غلظت گلوکز کاهش می یابد و از آن به بعد غلظت افزایش می یابد. در یک مقدار ثابت سورفکتانت، با افزایش دور همزن ابتدا غلظت گلوکز کم و سپس زیاد می شود یعنی یک نقطه بهینه برای مینیمم غلظت گلوکز وجود دارد. شکل ۶ تأثیر پارامترهای دما و غلظت سورفکتانت و اثرات متقابل آن ها را بر غلظت گلوکز نشان می دهد. در این شکل نیز یک نقطه مینیمم ایده آل وجود دارد؛ در این نقطه دما حدود $37/5$ درجه سانتی گراد و غلظت سورفکتانت حدود 0.1 درصد است.

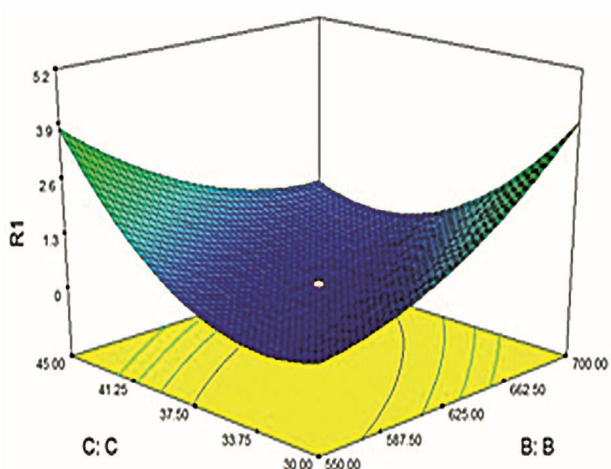
۳-۳- غلظت اتانول

شکل ۷ تأثیر پارامترهای فرآیندی را بر روی غلظت اتانول نشان می دهد. در این شکل تأثیر تغییرات دور همزن و غلظت سورفکتانت را می توان مشاهده نمود. این نمودار نشان می دهد تحت شرایطی یکتا میزان تولید اتانول بیشینه می گردد. با افزایش دور همزن در غلظت ثابت سورفکتانت، تولید اتانول ابتدا افزایش و سپس کاهش می یابد که به علت اثرات متقابل هم زدگی و ایجاد چرخش است که با افزایش دور

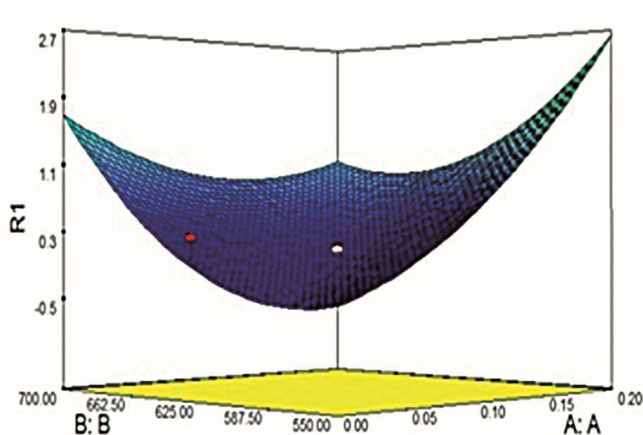
همزن ایجاد می شود. در مورد غلظت سورفکتانت نیز می توان گفت که تا حد مشخصی از غلظت سورفکتانت برای جذب لیگنین بسیار مناسب است فعالیت آنزیم را بیشتر می کند؛ اما بیش از آن مقدار مایسل ایجاد شده و سطح تماس آنزیم با خوراک کم شده و در نتیجه بازده کاهش می یابد. شکل های ۸ و ۹ سایر تأثیرات دوتایی پارامترها را بر اتانول نشان می دهد.

۴-۳- بهینه سازی تولید اتانول

هدف اصلی این فرآیند، تولید حداکثری اتانول و افزایش تماس آنزیم با سلولز است. بهینه سازی با استفاده از نرم افزار Design-Expert 7.0.2.0 صورت گرفت.

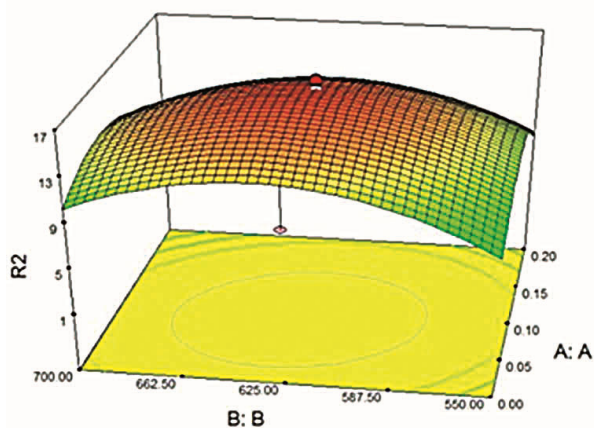


شکل (۴) نمودار سه بعدی غلظت گلوکز (R1) (g/l) بر حسب دور همزن (B)(rpm) و دما (C)(°C)

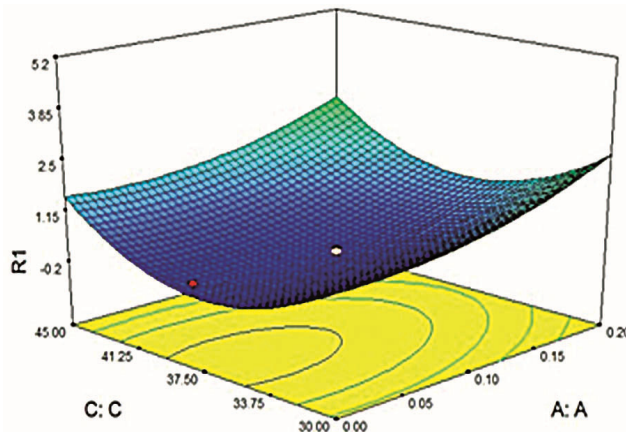


شکل (۵) نمودار سه بعدی غلظت گلوکز (R1) بر حسب غلظت سورفکتانت (A)(%v/v) و دور همزن (B)(rpm)

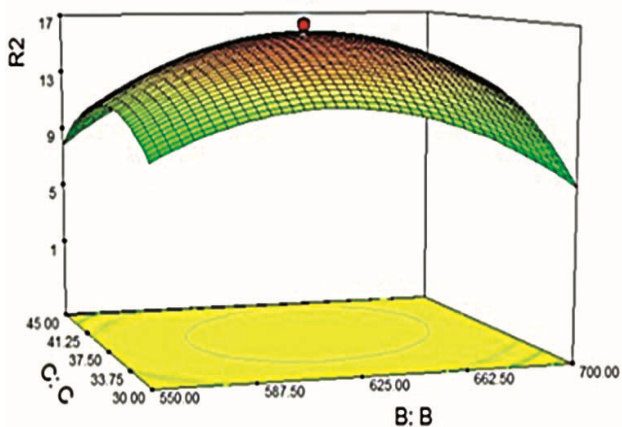
²¹ vortex



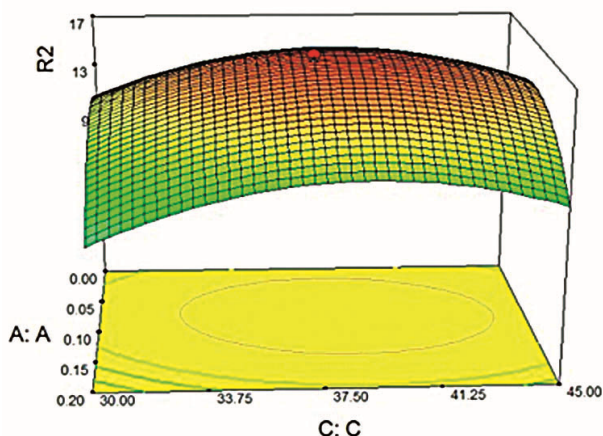
شکل (۷) تأثیر پارامترهای دور همزن (B) (rpm) و غلظت سورفکتانت (A) (%v/v) بر غلظت اتانول (R2) (g/l)



شکل (۶) نمودار سه بعدی غلظت گلوکز (R1) (g/l) بر حسب غلظت سورفکتانت (A) (%v/v) و دما (C) (°C)



شکل (۹) تأثیر پارامترهای دما (C) (°C) و دور همزن (B) (rpm) بر تولید اتانول (R2) (g/l)



شکل (۸) تأثیر پارامترهای دما (C) (°C) و غلظت سورفکتانت (A) (%v/v) بر تولید اتانول (R2) (g/l)

۳-۵- بازده فرآیند:

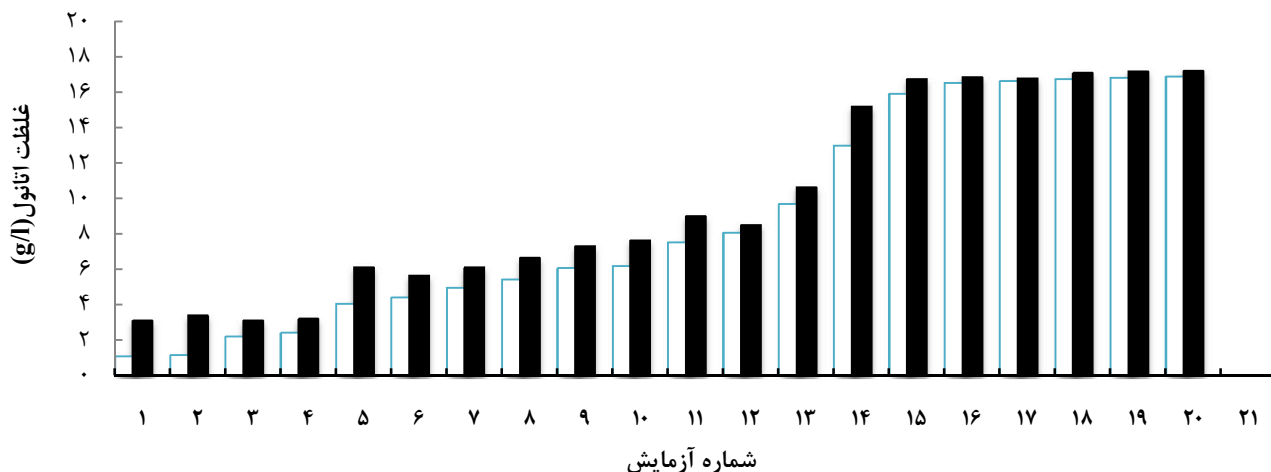
برای بازده تولید اتانول از مواد لیگنوسولوزی معادله‌ای ارائه شده است [۱۸]. محاسبات ما بر اساس این معادله، بازده تولید اتانول را ۸۷/۸ درصد نشان می‌دهد. بازده واقعی نیز ۸۴/۲ درصد مشاهده شد.

۳-۶- مقایسه با محصول داخل راکتور و فرآیند ناپیوسته

در پایان هر واکنش مقداری از محلول موجود در داخل بیوراکتور نیز برای آنالیز و مقایسه با محصول خروجی از سامانه برداشت می‌شود که مقادیر آن و این مقایسه در شکل ۱۰ آورده شده است.

در این روش هدف مطلوب برای پاسخها بیشینه غلظت اتانول و کمینه غلظت گلوکز با کمترین درجه اهمیت و فاکتورها در محدوده طراحی انتخاب شدند. وزن فاکتورها ۱ در نظر گرفته شد. چون تولید اتانول بیشترین درجه اهمیت را دارد، لذا بیشترین ضریب اهمیت در نرم‌افزار به آن اختصاص داده شد و بهینه‌سازی انجام گردید. شرایط بهینه پیشنهادی نرم‌افزار در جدول ۳ ارائه شده است. برای تأیید صحت نتایج، آزمایش حالت بهینه اجرا شد و نتایج مقایسه گردید. همان‌طور که در جدول ۴ ملاحظه می‌شود نتایج واقعی اندکی از نتایج پیش‌بینی شده کمتر است که به دلیل خطاهای آزمایش طبیعی به نظر می‌رسد.

تولید بیواتانول از مواد لیگنوسلولوزی در بیوراکتور غشایی



شکل (۱۰) مقایسه غلظت متوسط محصول خروجی از سامانه (نمودار سفیدرنگ) و محصول داخل راکتور (مشکی رنگ)

جدول (۳) مقادیر پارامترها و پاسخها در شرایط بهینه

شرایط مطلوب (Desirability)	غلظت اتانول g/l	غلظت گلوکز g/l	دما (°C)	دور همزن (rpm)	غلظت سورفکتانت (% v/v)	هدف
	ماکزیمم	مینیمم	در محدوده	در محدوده	در محدوده	
	۵	۱	-	-	-	اهمیت
۰/۹۶۸	۱۶/۳	۰/۰۵۴	۳۸/۵	۶۳۱	۰/۰۸	شرایط بهینه

جدول (۴) مقایسه مقادیر واقعی و مقدار پیش‌بینی شده

غلظت اتانول g/l	غلظت گلوکز g/l	
۱۵/۶۳	۰/۰۶	مقدار واقعی
۱۶/۲۹۹	۰/۰۵۴	پیش‌بینی شده
٪۴/۲۸		درصد اختلاف

جدول (۵) مقایسه نتایج سامانه ناپیوسته و پیوسته

ناپیوسته	خروج پیوسته محصول	
۷۸/۲۱	۸۴/۲	درصد بازده
۰/۶۳	۰/۷	محصول دهی (g/l.h)

۴- جمع‌بندی

در این مطالعه تولید زیست‌اتانول از پوسته ذرت با استفاده از یک سامانه پیوسته در بیوراکتور غشایی بررسی و آزمایش شد که آزمایش‌ها و همچنین ارائه مدل برای پارامترهای موردبررسی توسط نرم‌افزار Design-Expert اجرا شد. سه پارامتر دما، دور همزن و غلظت سورفکتانت در سامانه آبکافت و تخمیر همزمان مورد آزمایش قرار گرفتند و مقادیر بهینه آن‌ها برای رسیدن به حداکثر بازده تولید اتانول به دست آمد. این مقادیر بهینه عبارت‌اند از: دما: ۳۸/۵ درجه سانتی‌گراد،

همان‌طور که در شکل ۱۰ مشاهده می‌شود غلظت در داخل بیوراکتور همواره بیشتر از متوسط محصول خارج‌شده از سامانه است که منطقی به نظر می‌رسد، زیرا غلظت داخل بیوراکتور در انتهای واکنش نمونه‌گیری شده است ولی غلظت محصول خروجی غلظت متوسط در طول انجام واکنش است و زمان تماس بیشتر باعث بیشتر بودن غلظت در داخل بیوراکتور می‌شود. همچنین با خارج کردن زیست‌اتانول تولیدی در طول واکنش اثرات بازدارندگی کاهش می‌یابد و سرعت تولید کاهش نمی‌یابد. به‌علاوه غیرفعال شدن آنزیم نیز بسیار کندتر اتفاق می‌افتد. پس علاوه بر مقدار اتانولی که از سامانه خارج‌شده مقداری نیز در داخل بیوراکتور وجود دارد که از مزیت‌های سامانه پیوسته است.

محصول دهی در این سیستم برابر ۰/۷ g/l.h است و به‌منظور مقایسه یک آزمایش به روش ناپیوسته در شرایط بهینه و مقادیر مشابه پارامترها با فرآیند خروج پیوسته محصول انجام گرفت. در فرآیند ناپیوسته این پارامتر برابر ۰/۶۳ g/l.h است که بیشتر بودن محصول دهی در فرآیند نیمه‌پیوسته به دلیل حذف بازدارنده‌ها از سیستم است که در جدول ۵ قابل‌مشاهده است.

- دور همزن: ۶۳۱/۲ rpm و غلظت سورفکتانت: ۰/۰۸ درصد. در مقایسه با فرآیند ناپیوسته بازده و همچنین محصول دهی در سامانه پیوسته افزایش می‌یابد. به‌منظور پیوسته کردن فرآیند، به دلیل دوغابی بودن محلول این امر بسیار سخت بود که با ترندهای خاصی این امر محقق شد. می‌توان گفت با توجه به منابع زیاد این ماده اولیه در کشور می‌توان در آینده نزدیک صنعتی کردن این سامانه را به اجرا درآورد و در جهت حفاظت از محیط‌زیست و کاهش آلودگی‌های حاصل از منابع فسیلی قدم برداشت.
- ۵- مراجع**
- [1] Uihlein, A. and L. Schebek, (2009) "Environmental impacts of a lignocellulose feedstock biorefinery system: An assessment." *Biomass and Bioenergy*, 33(5): p. 793-802.
- [2] Statistical Review of World Energy 2010.
- [3] Ballesteros, I., et al.,(2006) "Ethanol production from steam-explosion pretreated wheat straw." *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 130(1-3): p. 496-508
- [4] Wang, L., Z. Luo, and A. Shahbazi, (2013) "Optimization of simultaneous saccharification and fermentation for the production of ethanol from sweet sorghum (*Sorghum bicolor*) bagasse using response surface methodology." *Industrial Crops and Products*, 42(1): p. 280-291.
- [5] Kim, S. and B.E. Dale, (2004) "Global potential bioethanol production from wasted crops and crop residues". *Biomass and Bioenergy*, 20(4)26. 4 :p. 361-375.
- [6] Sánchez, O.J. and C.A. Cardona, (2008) "Trends in biotechnological production of fuel ethanol from different feedstocks." *Bioresource Technology*, 99(13): p. 5270-5295.
- [7] Bothast, R.J. and B.C. Saha, (1997) "Ethanol production from agricultural biomass substrates," p. 261-286.
- [8] Ward, O. P., Moo-Young, M., Venkat, K. (1989). "Enzymatic degradation of cell wall and related plant polysaccharides." *Critical reviews in biotechnology*, 8(4), 237-274.
- [9] Binod, P., et al., (2010) "Bioethanol production from rice straw:An overview." *Bioresource Technology*, (13)101 :p. 4767-4774
- [10] Rios, G.M., et al., (2004) "Progress in enzymatic membrane reactors - A review." *Journal of Membrane Science*, 242(1-2): p. 189-196.
- [11] Alfani, F., M. Cantarella, and V. Scardi, (1983) "Use of a membrane reactor for studying enzymatic hydrolysis of cellulose." *Journal of Membrane Science*,. 16(C): p. 407-416.
- [12] Ohlson, I., G. Trägårdh, and B. Hahn-Hägerdal, (1984) Evaluation of UF and RO in a cellulose saccharification process. *Desalination*,. 51(1): p. 93-101.
- [13] Hari Krishna, S .and G.V. Chowdary, (2000) "Optimization of simultaneous saccharification and fermentation for the production of ethanol from lignocellulosic biomass." *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(5): p. 1971-1976.
- [14] Esfahanian, M., et al., (2012) "Enhanced bioethanol production in batch fermentation by pervaporation using a PDMS membrane bioreactor." *International Journal of Engineering, Transactions B: Applications*, 25(4): p. 249-258.
- [15] Baker. R. W., (2012) *membrane technology and application*. 3rd Edition, Wiley, Newyork, CA
- [16] Andrić, P., et al., (2010) "Reactor design for minimizing product inhibition during enzymatic lignocellulose hydrolysis. II. Quantification of inhibition and suitability of membrane reactors." *Biotechnology Advances*, 28(3): p. 407-425.
- [17] T ,G., (1984) "Measurement of Cellulase Activity. Commission on Biotechnology", *International Union of Pure and Applied Chemistry*.
- [18] McMillan, N.D.a.J., (2008) "SSF Experimental Protocols Lignocellulosic Biomass Hydrolysis and Fermentation." *Tech. Rep* .NREL/TP-510-42630,.

Production of bioethanol from lignocellulosic material in membrane bioreactor

Mohammad Hassan Ebrahimi¹, Mohammad Soltanieh^{1,*}, Saeed Kashefi¹, Mahdi Haghi¹,
Mahdi Yazdanshenas²

1. Department of Chemical and Petroleum Engineering, Sharif University of Technology, Tehran, Iran
2. Glucozan Industries, Alborz Industrial Park, Ghazvin, Iran

ABSTRACT

Bioethanol is a second generation biofuel that has recently received attention due to limited fossil fuel resources and air pollution cause of fossil fuels. In this study production of bioethanol from lignocellulosic material of corn fiber in a membrane bioreactor was investigated. Acid pretreatment was used to increase the fraction of cellulose to 41%. The strain of *saccharomyces cerevisiae* was used as yeast. In most previous works the experimens have been performed in batch systems, whereas in this study simultaneous saccharification and fermentation (SSF) were performed in a continuous ultrafiltration membrane reactor, where the product is removed to prevent the inhibitory effect of the product on bioethanol production yield and enzyme deactivation. Experimental design and optimization was carried out by Design Expert software. The optimum conditions were determined to be: temperature (38.5°C), agitation speed (631.2 rpm) and surfactant concentration (0.08%v/v). Under these conditions the predicted ethanol yield was 87.8% and the actual experimental value was 84.2%.

ARTICLE INFO

Article history:
Received in: May 24, 2014
Revised from: May 10, 2015
Accepted: May 25, 2015

Key words:
Bioethanol
Membrane bioreactor
Corn fiber
SSF
Saccharomyces cerevisiae
Ultrafiltration

All right reserved.

* Corresponding author
M.soltanieh@sharif.edu
