بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده مهندسی شیمی

تولید اتانول از ترکیبات لیگنوسلولزی

پایان نامه دکتری مهندسی شیمی

کیخسرو کریمی

اساتید راهنما

دکتر محمد جعفر طاهرزاده

دکتر گیتی امتیازی

۱۳۸۴

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده مهندسی شیمی

رساله دکتری مهندسی شیمی آقای کیخسرو کریمی

تحت عنوان

تولید اتانول از ترکیبات لیگنوسلولز

در تاریخ ۸۴/۷/۲۵ توسط کمیته تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

۱- استا راهنمای اول رساله	دکتر محمد جعفر طاهرزاده
۲- استا راهنمای دوم رساله	دکتر گیتی امتیازی
۳- استا مشاور	دکتر علی اصغر انصافی
۴-استاد داور	دکتر محمود شیخ زین الدین
۵-استاد داور	دکتر فضیلتی
۶-استاد داور	دکتر سید محمد قریشی
۵-استاد داور	دکتر شاپور رودپیما
نماینده تحصیلات تکمیلی دانشگاه	دکتر مهدی کدیور

تشکر و قدر دانی

جناب آقای دکتر طاهرزاده، زبان و قلمم از اینکه چگونه از شما تشکر کنم قاصر است. شما را همچون همای رحمتی برای خود می دانم.

سرکار خانم دکتر امتیازی از تمامی زحماتی که برای اینجانب در قسمتهای مختلف این پروژه متحمل شدند تشکر می‌نمایم.

Dear Professor Lars Edebo, when I came to you I did not know any thing about filamentous fungi. Many thanks for very nice scientific coopeoration.

جناب آقای دکتر انصافی از تمامی زحمات جنابعالی بخصوص در راه اندازی و رفع مشکلات دستگاه HPLC کمال تشکر را می نمایم.

Dear Professor Carl Johan Franzen, thank you for your invaluable helping. also I don't forget your very nice help in fixing RI detector.

Dear Professor Lena Gustafsson, thank you for our cooperation in the last part of Tomas thesis.

Dear Professor Niklasson, thank you for giving me the opportunities to work at CRE, also for supporing me to present the poster in Spain.

Dear Tomas Brandberg, I realy appriciate our cooperation in those two work which lead us to very good results. Thank you very much for every thing. Also I never forget the paddeling

جناب آقای دکتر فرید طالب نیا از تمامی زحماتی که برای اینجانب در سوئد کشیدید تشکر می نمایم.

Dear Ria Millati, Thank you for finding the ability of *Mucor indicus* for ethanol production. I also appriciate our cooperation in the effect of aeriation on *M . indicus*. I hope to have some more cooperation in a near future.

Dear Jan Rodmar, thank you for takning sample during the late nights.

Dear Marian Sognell, I consider you as my mother in Sweden.

Dear Agneta thank you for preparing TMS, Vitamin and standard of HPLC for me.

Dear Linda, many thanks for the nice photos of *M. indicus*.

اینجانب بر خود واجب می دانم از شرکت فراتک که دستگاه هیدرولیز خود را در اختیار این پروژه قرار داد و همچنین از همکاریها و راهنماییهای آقای مهندس ابدال و آقای مهندس مسعود نیلی در بخش هیدرولیز کمال قدردانی و تشکر بنمایم.

جناب آقای دکتر فضیلتی از بابت درس بیوشیمی و مراجع خوبی که در ابتدای راه دکتری در اختیار من قرار دادید کمال تشکر را می‌نمایم.

جناب آقای مهندس غزالی از اینکه در ابتدای ورود من به بحث بیوتکنولوژی به اینجانب فرصتی برای کارآموزی در سازمان پژوهشها ایجاد کردید کمال تشکر را دارم.

جناب آقای گرجی از همکاریهای با ارزش جنابعالی در پروژه های مختلف کمال تشکر را می نمایم.

جناب آقای عقیلی از اینکه تجربیات ارزشمند خود را، که در برخی زمینه ها کمتر کسی آنرا دارد، مخلصانه در اختیار اینجانب قرار دادید کمال تشکر را می نمایم.

جناب آقای امینی از همکاری جنابعالی در تعمیر دستگاهها کمال تشکر را دارم.

جناب آقای سلطانی از همکاری جنابعالی در تهیه برخی وسایل تشکر می نمایم.

سر کار خانم مهندس غلامی پور از زحمات جنابعالی در آنالیزهای HPLC تشکر می نمایم.

سرکار خانم مهندس عابدینی فر از همکاری جنابعالی تشکر نموده و برای شما آرزوی موفقت دارم.

پدر و مادر گرامیم زبان و قلمم از اینکه چگونه از شما تشکر کنم قاصر است.

همسر گرامیم از تمام زحمتهایی که بخاطر تحصیلات بنده متحمل شدید و در مورد دکتری بخصوص در کارهای آزمایشگاهی در سوئد تشکر می نمایم.

از تمام اساتیدی و معلمانی که تاکنون حرفی بمن آموختند تشکر می نمایم.

کلیه حقوق مادی مترتب بر نتایج مطالعات،
ابتکارات و نوآوریهای ناشی از تحقیق موضوع
این رساله متعلق به دانشگاه صنعتی
اصفهان است

فهرست مطالب

عنوان	صفحه
فهرست مطالب، جداول و اشکال	چهار
چکیده	۱
فصل اول- مقدمه	
۱-۱- مقدمه و ساختار کلی این پروژه	۲
۱-۲-تولید اتانول به روش تخمیر	۳
۱-۲-۱-میکروارگانیسمهای تولیدکننده اتانول	۴
۱-۲-۲-انواع مواد اولیه مورد استفاده برای تولید اتانول	۶
۱-۳-ساختار ترکیبات لیگنوسلولزی	۸
۱-۴-هیدرولیز ترکیبات لیگنوسلولزی	۸
۱-۴-۱-هیدرولیز توسط روشهای شیمیایی	۸
۱-۴-۲-هیدرولیز آنزیمی	۱۰
۱-۴-۳- عملیات هیدرولیز آنزیمی توسط آنزیم سلولاز	۱۸
۱-۴-۴-مقایسهٔ هیدرولیز اسیدی و آنزیمی	۲۱
۱-۵-روشهای تخمیری	۲۱
۱-۵-۱-روش ناپیوسته	۲۱
۱-۵-۲-روش خوراکدهی ناپیوسته	۲۳
۱-۵-۳-روش کشت نیمه پیوسته	۲۴
۱-۵-۴-روش کشت پیوسته	۲۵
۱-۶- تحقیقات انجام شده در این پروژه	۲۶
فصل دوم - روش انجام آزمایشها	
۲-۱- مواد و روش تهیه محلولها	۲۹
۲-۲- خوراک هیدرولیز اسیدی و روش آنالیز آن	۳۰
۲-۲-۱- آنالیز ترکیبات موجود در ترکیبات لیگنوسلولزی	۳۱
۲-۳- هیدرولیز	31
۲-۴- میکروارگانیسمها و محیط نگهداری آنها	3۳
۲-۵- روش آنالیزها	34
۲-۶- تخمیر در شیکر انکوباتور	36
۲-۶-۱- روش تخمیر هیدرولیزیت اسیدی رقیق مرحله اول کاه برنج در شیکر انکوباتور	36
۲-۶-۲- روش بررسی اثر بازدارنده‌های هیدرولیزیت بر فعالیت موکور ایندیکوس	37
۲-۷- تخمیر در فرمانتور	37

۲-۸- هیدرولیز آنزیمی و تخمیر همزمان 40

فصل سوم - نتایج

۳-۱- مقدمه 42

۳-۲- بهینه سازی هیدرولیز اسیدی رقیق کاه برنج 43

۳-۳- تولید اتانول در شیکر انکوباتور 48

۳-۳-۱- تولید اتانول از هیدرولیزیت اسیدی رقیق کاه برنج در شیکر انکوباتور ۴۸

۳-۳-۲- بررسی اثر بازدارنده های موجود در هیدرولیزیت اسیدی رقیق بر تولید اتانول توسط قارچ موکور ۵۳

۳-۴- تولید اتانول به روش ناپیوسته در فرمانتور ۵۴

۳-۵- تولید اتانول به روش خوراکدهی ناپیوسته در فرمانتور ۵۹

۳-۶- تولید پیوسته اتانول در فرمانتور ۶۳

۳-۷- تولید اتانول به روش هیدرولیز و تخمیر همزمان ۶۶

فصل چهارم - بحث و نتیجه گیری

۴-۱- مقدمه ۷۴

۴-۲- اهمیت جهانی اتانول ۷۵

۴-۳- ترکیبات لیگنوسلولزی برای تولید اتانول ۷۵

۴-۴- وضعیت تولید اتانول از ترکیبات لیگنوسلولزی ۷۶

۴-۵- مشکلات تولید اتانول از ترکیبات لیگنوسلولزی ۷۷

۴-۶- بهینه سازی هیدرولیز اسیدی ۷۷

۴-۶-۱- تحلیل نتایج هیدرولیز اسیدی رقیق ۷۸

۴-۷- اهمیت قارچهای فیلامنتوس به کار رفته در این پروژه در تولید اتانول و مشکلات آنها ۸۱

۴-۸- اثر ترکیبات بازدارنده بر تخمیر موکور ایندیکوس ۸۳

۴-۹- مقایسه تخمیر هیدرولیزیت اسیدی توسط موکور با مخمر پیکیا ۸۳

۴-۱۰- اثر هوادهی بر تخمیر توسط قارچ موکور ایندیکوس ۸۴

۴-۱۱- فرآیندهای مختلف برای تولید اتانول در فرمانتور ۸۶

۴-۱۲- تولید اتانول از سلولز ۸۹

۴-۱۳- نتیجه گیری ۹۱

۴-۱۴- پیشنهادات ۹۳

ضمیمه الف- مقالات تهیه شده از نتایج این پایان نامه و جایگاه علمی آنها در علم روز دنیا ۹۴

اختصارات ۱۰۱

مراجع ۱۰۲

فهرست جداول

عنوان **صفحه**

جدول ۱-۱- مقدار تولید اتانول و ماده اولیه کربنی آن در سال ۲۰۰۳ ۲
جدول ۱-۲- اثر آسیاب فشاری بر راندمان هیدرولیز ۱۲
جدول ۱-۳- اثر استفاده از تخریب با بخار بر راندمان هیدرولیز ۱۴
جدول ۳-۱- قندهای موجود در کاه برنج ۴۳
جدول ۳-۲- مقدار راندمان گلوکز، زایلوز، فورفورال، هیدروکسی متیل فورفورال و استیک اسید در فشار، اندازه و زمان ماند های مختلف در هیدرولیز مرحله اول ۴۴
جدول ۳-۳- مقدار راندمان گلوکز، زایلوز، فورفورال، هیدروکسی متیل فورفورال و استیک اسید در فشار و زمان ماند های مختلف در هیدرولیز مرحله دوم بدون اسید زدن ۴۶
جدول ۳-۴- مقدار راندمان گلوکز، زایلوز، فورفورال، هیدروکسی متیل فورفورال و استیک اسید در فشار، اندازه و زمان ماند های مختلف در هیدرولیز مرحله دوم همراه با افزودن اسید ۴۷
جدول ۳-۵- راندمان بیومس، اتانول، گلیسرول، زایلیتول، بالاترین سرعت تولید اتانول و بیشترین مقدار غلظت اتانول در حالت هوازی و بی هوازی توسط موکور ۴۹
جدول ۳-۶- راندمان بیومس، اتانول، گلیسرول، زایلیتول، بالاترین سرعت تولید اتانول و بیشترین مقدار غلظت اتانول در حالت هوازی و بی هوازی توسط پیکیا ۵۲
جدول ۳-۷- اثر هیدروکسی متیل فورفورال و فورفورال بر تخمیر موکور در محیط سنتزی حاوی حاوی ۳۰ گرم در لیتر گلوکز. ۵۳
جدول ۳-۸- اثر وانیلین، استیک اسید بر تخمیر موکور در محیط سنتزی حاوی ۳۰ گرم در لیتر گلوکز و کشت موکور ۵۴
جدول ۳-۹- بالاترین راندمان تولید اتانول از ۱۰ گرم در لیتر زایلوز با هوادهی مختلف ۵۵
جدول ۳-۱۰- بالاترین راندمان تولید ترکیبات از هیدرولیزیت چوب با هوادهی مختلف ۵۸
جدول ۳-۱۱- مصرف قندها از هیدرولیزیت اسیدی رقیق به روش خوراکدهی ناپیوسته ۶۰
جدول ۳-۱۲- محصولات تولیدی در خوراکدهی ناپیوسته ۶۱
جدول ۳-۱۳- مشاهدات مورفواوژی ۶۳
جدول ۳-۱۴- نتایج کشت پیوسته ۶۵
جدول ۳-۱۵- تولید اتانول و گلیسرول به روش هیدرولز و تخمیر همزمان ۶۷
جدول الف-۱- خلاصه فعالیتهای انجام گرفته در این پروژه ۹۴

فهرست اشکال

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱- شمای کلی از مسیر تولید اتانول از گلوکز ۳
شکل ۱-۲- بازدارنده‌های تولید شده در اثر هیدرولیز اسیدی ۹
شکل۲-۱- سیستم تخمیر بی‌هوازی ۳۷
شکل ۳-۱- تولید اتانول توسط موکور در حالت هوازی و بی هوازی از گلوکز، زایلوز، هیدرولیزیت و هیدرولیزیت سم زدایی شده ۵۰
شکل ۳-۲- تولید زایلیتول توسط موکور در حالت هوازی ۵۰
شکل ۳-۳- تولید اتانول توسط پیکیا در حالت هوازی و بی هوازی از گلوکز، زایلوز، هیدرولیزیت و هیدرولیزیت سم زدایی شده. ۵۲
شکل ۳-۴- پروفایل مصرف زایلوز(الف)، تولید اتانول(ب) و تولید زایلیتول(ج) در کشت ناپیوسته موکور بر روی ۱۰ گرم در لیتر زایلوز ۵۶
شکل ۳-۵- پروفایل مصرف زایلوز ، گلوکز و تولید اتانول در کشت ناپیوسته موکور بر روی مخلوط ۱۰ گرم در لیتر زایلوز و ۴۰ گرم در لیتر گلوکز که با سرعت ۲۰۰ میلی لیتر بر دقیقه هوادهی شده ۵۸
شکل ۳-۶- پروفایل اتانول، گلیسرول و سرعت تولید اتانول در رقت خوراکدهی ۵۵ و ۱۰۰ میلی لیتر بر ساعت ۶۲
شکل ۳-7- تولید پیوسته اتانول از هیدرولیزیت اسیدی رقیق چوب با مخمر ساکارومایسیس با سرعت رقیق سازی ۰/۱ و ۰/۲ در ساعت ۶۴
شکل ۳-۸- تولید پیوسته اتانول از مخلوط هیدرولیزیت اسیدی رقیق چوب و هیدرولیزیت گندم با مخمر ساکارومایسیس با سرعت رقیق سازی ۰/۱ در ساعت ۶۴
شکل ۳-۹- تولید اتانول به روش هیدرولز و تخمیر همزمان توسط ساکارومایسیس، موکورو رایزوپوس ۶۸
شکل ۳-۱۰-تولید گلیسرول در هیدرولیز و تخمیر همزمان توسط ساکارومایسیس، موکورو رایزوپوس ۶۹
شکل ۳-۱۱- غلظت گلوکز در هیدرولیز و تخمیر همزمان توسط ساکارومایسیس، موکور و رایزوپوس ۷۰
شکل ۳-۱۲- غلظت سلوبیوز در هیدرولیز و تخمیر همزمان توسط ساکارومایسیس، موکور و رایزوپوس ۷۱
شکل ۳-۱۳- تولید اسید لاکتیک در حین هیدرولیز و تخمیر همزمان توسط رایزوپوس ۷۳
شکل ۴-۱- هیدرولیز اسیدی رقیق مرحله اول یا هیدرولیز همی‌سلولز ۷۸
شکل ۴-2- واکنشهای تخریبی در هیدرولیز اسیدی رقیق مرحله اول ۷۸
شکل ۴-۳- هیدرولیز اسیدی رقیق مرحله دوم یا هیدرولیز سلولز و واکنشهای تخریبی ۷۸

چکیده

ترکیبات لیگنوسلولزی مانند کاه برنج و چوب مواد بسیار ارزان قیمت و فراوانی هستند که می‌توانند برای تولید اتانول به روش تخمیر مورد استفاده قرار گیرند. این ترکیبات دارای سه قسمت عمده همی‌سلولز(پلیمر قندهای ۵ کربنی و ۶ کربنی)، سلولز(پلیمر گلوکز) و لیگنین می‌باشند. در میان روشهای مختلف هیدرولیز(تبدیل پلیمر قندها به قندهای ساده و قابل تخمیر) هیدرولیز اسیدی رقیق بهترین روش برای هیدرولیز همی‌سلولز برای اجرا در مقیاس صنعتی شناخته شده است. نتایج این تحقیق نشان می دهد با به کار بردن روش اسیدی رقیق با ۰/۵ درصد اسید سولفوریک به مدت ۱۰ دقیقه در فشار ۱۵ بار می توان ۸۰/۸ درصد قند زایلوز، عمده ترین قند موجود در همی‌سلولز کاه را به دست آورد. بخش عمده‌ای از قندهای موجود در هیدرولیزیت همی‌سلولز قندهای پنج کربنی می‌باشند که بسیاری از میکروارگانیسمها مانند ساکارومایسیس سرویسیه قادر به تخمیر آن نمی‌باشند. در تحقیقات سالهای اخیر برخی از قارچهای فیلامنتوس مانند موکور ایندیکوس و رایزوپوس اورایزه تواناییهای زیادی برای تولید اتانول از هیدرولیزیت نشان داده اند. از جمله مزایای استفاده از این قارچها قابلیت تخمیر طیف گسترده ای از قندها از جمله زایلوز و توانایی رشد در دماهای بالاتری نسبت به مخمرهای معمولی را داشته و همچنین از بیومس آنها می توان مقدار قابل توجهی کیتوزان که ماده بسیار با ارزشی می باشد جداسازی نمود. در قسمتهایی از این تحقیق به تولید اتانول از همی سلولز به روشهای مختلف تخمیر ناپیوسته، خوراکدهی ناپیوسته و پیوسته پرداخته شد. تولید اتانول از هیدرولیزیت اسیدی رقیق مرحله اول (که عمدتا همی سلولز است) از قارچ موکور انجام گرفته و نتایج آن با نتایج تخمیر توسط پیکیا استیپیتیز که معروفترین مخمر تخمیر کننده زایلوز می باشد مقایسه شد. نتایج نشان داد پیکیا برای تولید اتانول از زایلوز و همی سلولز کاه(که قند غالب آن زایلوز می باشد) نتایج بهتری را نسبت به موکور نشان می دهد ولی در تخمیر با موکور مقدار قابل توجهی بیومس نیز تولید شده که محصول باارزشی می‌باشد. در بخش دیگری اثر هوادهی بر تخمیر زایلوز توسط موکور به روش ناپیوسطه در فرمانتور بررسی شد. نتایج نشان داد زایلوز تنها در حالت هوازی مصرف می شود و با افزایش میزان هوادهی سرعت تولید اتانول زیاد می‌شود ولی مقداری اتانول نیز توسط قارچ مصرف می شود. در قسمتی از تحقیق به بررسی اثر بازدارنده های اصلی تخمیر که شامل فوروفورال، هیدروکسی متیل فورفورال، اسید استیک و وانیلین می باشند بر عملکرد قارچ موکور پرداخته و نتایج نشان داد این قارچ می‌تواند تا حدی در برابر حضور بازدارنده ها مقاومت نماید ولی حضور بازدارنده ها راندمان تولید اتانول را کاهش می‌دهد. در بخش دیگری از تحقیق به تولید اتانول از هیدرولیزیت اسیدی رقیق مرحله اول چوب صنوبر به روش خوراکدهی ناپیوسته پرداخته شد. نتایج نشان می‌دهد با سرعت خوراکدهی ۰/۱ و ۰/۲ در ساعت موکور می تواند تقریبا تمام قندهای ۶ کربنی و بیش از ۴۶٪ از زایلوز را تخمیر نموده با راندمان ۰/۴۳ گرم(اتانول) بر گرم(قند مصرفی) اتانول تولید نمایند. هیدرولیزیت دارای ترکیبات مختلفی می‌باشد ولی حاوی تمامی مواد مورد نیاز سلولها نمی باشد. در بخشی از این تحقیق به بررسی تولید اتانول به روش پیوسته از هیدرولیزیت اسیدی رقیق مرحله اول توسط مخمر ساکارومایسیس سرویسیه پرداخته شد. آرد گندم هیدرولیز شده علاوه بر قند حاوی بسیاری از ترکیبات مورد نیاز سلول نیز می باشد. دراین تحقیق از مخلوط هیدرولیزیت اسیدی رقیق و آرد گندم هیدرولیز شده استفاده شد. نتایج نشان داد برای به دست آوردن راندمان بالایی از اتانول از مخلوط هیدرولیزیت اسیدی رقیق مرحله اول و آرد گندم هیدرولیز شده استفاده از بیوتین و یک منبع نیتروژنی(مانند دی آمونیوم سولفات) الزامی می باشد. از طرف دیگر راندمان روش هیدرولیز اسیدی رقیق برای تولید قند از سلولز نسبتا پایین می‌باشد. روش هیدرولیز آنزیمی روش مناسبی برای تبدیل سلولز به گلوکز شناخته شده است. در قسمتی از این پروژه از روش هیدرولیز و تخمیر همزمان برای تولید اتانول از سلولز کاه برنج با استفاده از قارچهای موکور ایندیکوس و رایزوپوس اورایزه و مخمر ساکارومایسیس پرداخته شد. بالاترین راندمان اتانول از سلولز کاه برنج توسط رایزوپوس که قارچی با توانایی مصرف سلوبیوزمی‌باشد برابر ۷۴٪ در مدت ۵۰ ساعت به دست آمد.

فصل اول
مقدمه

۱ ـ ۱ - مقدمه

در سالهای اخیر تولید اتانول مورد توجه خاصی قرار گرفته است و بازار مصرف آن روز به روز رو به افزایش می‌باشد. استفاده از اتانول به عنوان بخشی از سوخت، بحث آلودگی هوا، افزایش دمای کره زمین و آینده بازار ترکیبات نفتی از جمله مسائلی است که موجب رو آوردن شرکتهای مختلف و حمایتهای سازمانهای مختلف دنیا برای تولید اتانول شده است[۱, ۲]. امروز اتانول در مقیاس صنعتی عمدتا به روش تخمیر تولید می شود. در جدول ۱-۱ مقدار تولید اتانول و ماده اولیه کربنی آن در سال ۲۰۰۳ در برخی کشور ها آورده شده است:

جدول ۱-۱- مقدار تولید اتانول و ماده اولیه کربنی آن در سال ۲۰۰۳

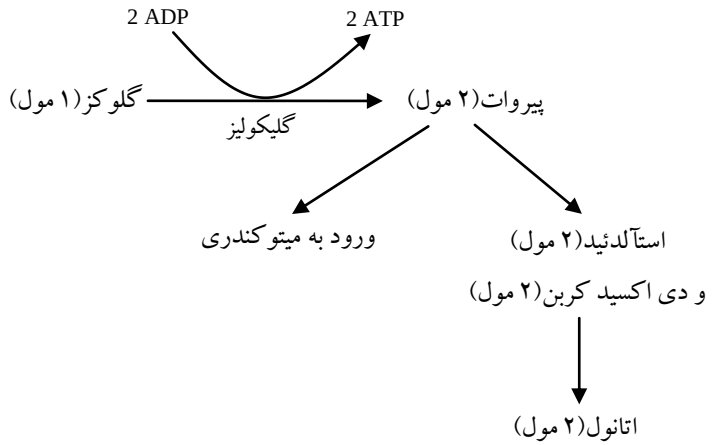
کشور	ماده اولیه عمده	تولید سالیانه(متر مکعب)
ایران[۳]	ملاس	۶۷۰۰۰*
سوئد[۱]	گندم و پساب کاغذ سازی	۶۶۰۰۰
فرانسه[۱]	ملاس	۱۲۰۰۰۰
کانادا[۱]	گندم	۲۰۰۰۰۰
اسپانیا[۱]	منابع مختلف نشاسته ای	۲۲۰۰۰۰
آمریکا[۱]	ذرت	۱۲۰۰۰۰۰۰
برزیل[۱]	ملاس و گندم	۱۴۰۰۰۰۰۰

* ظرفیت اسمی کارخانه های ایران(۲۵ کارخانه) که در حال تولید می باشند.

امروزه ضایعات قندی، ترکیبات نشاسته دار مانند گندم و ذرت از جمله ترکیباتی هستند که برای تولید اتانول در صنعت بکار می روند. ترکیبات لیگنوسلولزی نیز از جمله مواد ارزان قیمت و فراوانی هستند که به عنوان ماده اولیه برای تولید اتانول به روش تخمیر بکار می‌روند[۴]. در این فصل به آشنایی با تولید اتانول از ترکیبات لیگنوسلولزی پرداخته شده است.

۱-۲-تولید اتانول به روش تخمیر

اتانول با ترکیب شیمیایی C_2H_5OH ترکیبی است که بیشترین حجم تولید را در میان محصولات تخمیری دیگر به خود اختصاص داده است[۵]. از لحاظ فعالیتهای درون سلولی متابولیسم [۱] یا سوخت و ساز درون سلول به دو بخش تقسیم می شود یکی آنابولیسم [۲] یا تشکیل و تولید مواد حیاتی سلول و دیگری کاتابولیسم [۳] یا تخریب مواد غذایی ترکیبات درون سلول است. در میان متابولیسمهای مختلف سلولی جذب منبع کربنی و تولید انرژی مورد نیاز سلول از اهمیت ویژه ای برخوردار است و تحقیقات فراوانی بر روی آن انجام گر فته است[۱, ۵, ۶]. مسیر کلی کاتابولیسم گلوکز که در اثر پیشرفت آن در مخمر ها اتانول تولید می‌شود در شکل ۱-۱ نشان داده شده است:



شکل ۱-۱- شمای کلی از مسیر تولید اتانول از گلوکز[۷]

در ابتدا قندهای گلوکز، مانوز، فروکتوز و گالاکتوز توسط انتقال تسهیل شده [۴] وارد سلول می‌شوند که تاکنون ۲۰ ژن مختلفی که در کنترل ورود آنها به داخل سلول نقش دارند شناخته شده اند. گلوکز توسط مسیر امبدن مایروف [۵] که معروف به گلیکولیز می‌باشد در درون سلول به پیروات تبدیل می‌شود. در حالت

[1] Metabolism
[2] Anabolism
[3] Catabolism
[4] Facilitated Transport
[5] Embden-Meyerhof pathway

بیهوازی پیروات در نهایت به اتانول تبدیل می شود[۱, ۶]. واکنش کلی تولید اتـانول از گلـوکز در زیـر آورده شده است:

$$C_6H_{12}O_6 \longrightarrow 2\ C_2H_5OH + 2\ CO_2$$

در حضور اکسیژن تمام یا قسـمتی از پیـروات وارد میتوکنـدری شـده و وارد چرخـه TCA مـی‌شـود. جزئیات کنترل های متابولیکی، مراحل کنترل کننده سرعت در گلیکولیز و چرخـه TCA و سـایر واکنشـهای درون سلولی بسیار پیچیده هستند و هنوز به طور کامل این واکنشها و عوامل مـوثر بـر آنهـا شـناخته نشـده انـد. ولی آنچه مسلم است سلول با انجام یک سری واکنشهایی بر روی گلـوکز اتـانول تولیـد مـی‌نمایـد. در حالـت هوازی پیروات وارد میتوکندری سلول شده و علاوه بر تولید انرژی برخـی حـد واسـطهای مـورد نیـاز بیوسـنتز مواد مورد نیاز خود را تولید می نماید[۱, ۶].

۱-۲-۱- میکروارو گانیسمهای تولیدکننده اتانول

میکروارو گانیسمهای مختلفی قادر به تولید اتانول می‌باشند. میکروارو گانیسم هایی که در صـنعت مـورد استفاده قرار می گیرند بایـد دارای ترکیبـی از خصوصـیات لازم بـرای اسـتفاده در یـک فرآینـد و بـا توجـه بـه تجهیزات مورد استفاده باشند. از طرف دیگر ویژگیهای مطلوب یک فرآیند صنعتی تولید اتانول تا حد زیـادی به میکرواورگانیسم استفاده شده بستگی دارد[۸]. میکرواورگانیسمهایی که در فرآیندهای صنعتی تولید اتـانول استفاده می‌شوند باید دارای شرایط زیر باشند[۹, ۱۰]:

- بازدهی بالای تولید بر واحد سوبسترای مصرف شده
- توانایی بالای تخمیر
- تحمل (مقاومت) پایدار در برابر اتانول
- توانایی زنده ماندن در دماهای بالا
- پایداری تحت شرایط تخمیری مناسب
- تحمل مقادیر پایین pH

میکروارو گانیسم های مورد استفاده باید شرایط فوق را با توجه به فرآینـد بکـار گرفتـه شـده و ترکیـب مواد خام مصرفی در حد بهینه دارا باشند. ولی باید مد نظر داشت هـر کـدام از مخمرهـا یـا باکتریهـایی کـه بـه طور گسترده در تولید صنعتی اتانول بکار گرفته می‌شوند، علاوه بر داشتن یک سری مزایـا، دارای معـایبی نیـز هستند و بهمین علت تحقیقات برای رفع عیب و بهبود آنها هنوز ادامه دارد[۹].

امروزه طیف وسیعی از تحقیقات در زمینه توسعه و دستیابی بـه بیوکاتالیسـتهای جدیـدی کـه بتواننـد بـه طور موثر شربتهای قندی مختلط و پیچیده را تخمیر کنند، متمرکز شده است. تحقیقات زیـادی بـرای دسـتیابی

به مخمرها و باکتریهایی با قابلیت تخمیر زایلوز[1] از جمله ساکارو ماسیس سرویسیه و باکتری زیمومونـاس موبیلیس[2] با قابلیت مصرف پنتوزها و همچنین باکتری اشتریشیاکلای و دیگر باکتریهـایی گـرم منفـی مهندسـی ژنتیک شده برای تولید اتانول انجام شده است[۹, ۱۱-۱۵].

الف- مخمر ها

استفاده از مخمرها در تولید صنعتی اتانول از مواد قندی جایگاه مهمـی در فرآینـدهای صـنعتی دارد. از مهمترین مخمرهـایی کـه در ایـن زمینـه مـورد اسـتفاده قـرار گرفتـه انـد مـی‌تـوان بـه ایـن مـوارد اشـاره کـرد: ساکارومایسیس سرویسیه[3]، شیزوساکارومایسیس پمبه[4] و گونه های کلویوروماپس[5][۹, ۱۶].

در تبدیل قند به اتانول باید از سویه مخمری استفاده کـرد کـه بتوانـد غلظتهـای بـالای اتـانول را تحمـل کند، زیرا اتانول بر رشد و تخمیر مخمرها اثر بازدارندگی دارد. مخمرها می‌توانند طیـف وسـیعی از سوبسـتراها را مصرف کنند. به طور کلی، آنها می‌توانند در pH های بین ۶/۰ – ۳/۵ و دمای بین ۳۵-۲۸ درجـه سـانتیگراد رشد کرده و با راندمان بالایی اتانول تولید کنند[۹, ۱۷].

معروفترین میکروارگانیسمی که تاکنون برای تولید اتانول به کار رفته مخمر ساکارومایسـیس سرویسـیه می باشد. مزیت عمده ساکارومایسیس سرویسیه این است که می‌تواند طیف گونـاگونی از سوبسـتراها را نظیـر گلوکز، مالتوز، فروکتوز، ساکاروز و در برخی گونه ها گالاکتوز را مصـرف کننـد. از مشخصـات دیگـر ایـن مخمر قابلیت تحمل بالای اتانول و دیگر بازدارنده ها می‌باشد[۱, ۹, ۱۸-۲۱].

ب- باکتری ها

بسیاری از باکتریها نیز قادرند اتانول تولید کنند. برخی از باکتریها همراه با اتـانول، محصـولات دیگـری نیز تولید می‌کنند. این محصولات عبارتند از: الکلهای گوناگون (بوتانول، ایزوپروپیل الکـل، ۲ و ۳ بوتـان دی ال)، اسیدهای آلی (استیک، بوتیریک، فرمیک و لاکتیک اسید)، پلی ال ها (آرابیتول، گلیسرول و زایلیتـول)، کتونها (استون) و یـا گازهـای مختلـف (متـان، دی اکسـیدکرین و هیـدروژن). برخـی از ایـن باکتریهـا کـه بـه باکتریهای تولید کننده اتانول معروفند اتانول را به عنوان محصول اصلی تولید می‌کنند (بدین معنی که حـداقل یک مول اتانول به ازای مصرف یک مول گلوکز تولید شود) [۵, ۹, ۲۲-۲۵].

در میان باکتریهای مختلف باکتری زیمومونـاس موبیلیس به دلیل آنکه به طور عمده اتانول تولیـد کـرده و خصوصیات مهم دیگری را نیز داراست، در این زمینه بیشتر مورد توجـه قـرار گرفتـه اسـت. ایـن بـاکتری در

---

[1] Xylose
[2] *Zymomonas mobilis*
[3] *Saccharomyces cerevisiae*
[4] *Shizosaccharornyces pombe*
[5] *Kluyveromyces*

شرایط هوازی نیز اتانول تولید کرده و از طرف دیگر تحمل (مقاومت) خوبی در برابر غلظتهای بالای اتانول و سوبسترا (به ویژه گلوکز) از خود نشان می‌دهد. این باکتری برخلاف بسیاری از باکتریهای دیگر قابلیت مصرف ساکاروز را نیز دارد. البته مصرف ساکاروز باعث افزایش محصولات دیگر، نظیر اسید استیک و اسید لاکتیک می‌شود[۹, ۲۶-۳۰].

راحتی بکارگیری عامل تعیین کننده در انتخاب زیموموناس موبیلیس و یا ساکارومایسیس سرویسیه در یک فرآیند تخمیری تولید الکل است. زیرا اگر چه با استفاده از باکتری زیموناس موبیلیس، بازدهی تولید الکل بیشتر، بازدهی تولید بیومس کمتر و بهره دهی تولید اتانول بیشتر می‌شود، ولی نیاز به استریل کردن محیط کشت، مشکلی است که در مورد استفاده از ساکارومایسیس (نسبت به باکتریها) به آن شدت وجود ندارد. بدین ترتیب شاید بتوان گفت از لحاظ اقتصادی ساکارومایسیس سرویسیه ارجح است[۵, ۹].

ج- قارچهای فیلامنتوس

دسته‌ای از میکروارگانیسمها که در سالهای اخیر برای تولید اتانول مورد توجه قرار گرفته قارچهای فیلامنتوس می‌باشد. گونه هایی از این قارچها مانند موکور ایندیکوس[۱] و رایزوپوس اورایزه[۲] توانایی تولید اتانولی مانند ساکارومایسیس سرویسیه از خود نشان داده اند. از جمله محاسن استفاده از این قارچها تولید بیومس با ارزش آنهاست. بیومس این قارچها دارای مقدار زیادی کیتوزان می‌باشد که دارای مصارف زیادی می‌باشد [۴, ۸].

۱-۲-۲- انواع مواد اولیه مورد استفاده برای تولید اتانول

برای تولید اتانول به روش تخمیر هزینه عمده مربوط به منبع کربنی که عمدتا قندی می‌باشد است. دستیابی و استفاده از سوبسترای ارزان یکی از اهداف مهم بسیاری از تحقیقات در زمینه تولید تخمیری اتانول می‌باشد [۲, ۹].

مواد اولیه مورد استفاده در تولید اتانول به روش تخمیر را می‌توان بر اساس نوع کربوهیدرات موجود در آنها، در سه گروه تقسیم بندی کرد: مواد قندی[۳]، مواد نشاسته‌ای[۴] و مواد لیگنوسلولزی[۵]. انتخاب نوع ماده اولیه بسیار مهم است زیرا هزینه این بخش ۷۵-۵۵ ٪ کل هزینه تولید اتانول را تشکیل می‌دهد[۳۱].

الف- مواد قندی

---

[1] *Mucor indicus*
[2] *Rhizopus oryzae*
[3] Saccharine materials
[4] Starchy materials
[5] Cellulosic materials

این مواد شامل ملاس، آب میوه ، ضایعات کارخانجات صنایع غذایی ، شربت نیشکر، پساب کارخانجات کاغذ سازی و آب پنیر می‌باشد. ملاس یکی از بهترین منابع قندی برای تخمیر می‌باشد ولی به علت مصارف وسیعی که پیدا کرده در سالهای اخیر قیمت بالایی پیدا کرده است. آب میوه قیمت بالایی دارد و تنها برای تولید مشروبات استفاده می‌شود. ضایعات کارخانجات صنایع غذایی به علت فصلی بودن و پراکنده بودن(هزینه حمل ونقل و نگهداری بالا) تنها در کنار کارخانجات بزرگ مقرون به صرفه می‌باشد. پساب کارخانجات کاغذ سازی به علت پایین بودن مقدار قند و وجود انواع بازدارنده ها تنها در کنار کارخانجات بزرگ کاغذ سازی و با بکار گیری تکنولوژی بالایی مقرون به صرفه می‌باشد. آب پنیر به علت مقدار قند پایین و پراکنده بودن(هزینه حمل و نقل بالا) تنها در کنار کارخانجات بزرگ مقرون به صرفه می‌باشد[۵, ۹, ۱۰].

ب- مواد نشاسته‌ای

ترکیبات حاوی نشاسته از بزرگترین منابع تولید اتانول می‌باشند. در آمریکا امروزه بزرگترین منبع اولیه اتانول ذرت و پس از آن گندم می‌باشد. گیاه کازاوا ، سورقوم شیرین ، سیب زمینی شیرین، گیاه اورشلیم نیز از منابع نشاسته‌ای هستند که می‌توانند برای تولید اتانول بکار روند[۵, ۱۰].

ج- مواد لیگنوسلولزی

ترکیبات لیگنوسلولزی مواد بسیار ارزان قیمت و فراوانی هستند که می توانند برای تولید اتانول مورد استفاده قرار گیرند. به عنوان مثال کاه گندم و کاه برنج از جمله مواد ارزان قیمتی هستند که در سطح وسیعی تولید می شوند. کاه گندم دارای ۴۰٪ آلفا سلولز، ۱۷٪ لیگنین و باقیمانده آن همی سلولز و مقدار کمی مواد دیگر می‌باشد. کاه برنج نیزحاوی ۳۶٪ آلفا سلولز، ۱۲٪ لیگنین و باقیمانده آن همی‌سلولز و مقدار کمی مواد دیگر می‌باشد. مواد حاصل از هیدرولیز کاه گندم و برنج ترکیبات مناسبی برای تخمیر و تولید اتانول می‌باشند. باگاس نیشکر نیز از ترکیبات لیگنوسلولزی است که سالانه به مقدار زیادی تولید می شود و مواد حاصل از هیدرولیز آن ترکیبات مناسبی برای تخمیر و تولید اتانول می‌باشند. ضایعات چوب نیز در بسیاری از کشورها از منابع گسترده ای است که می تواند برای تولید اتانول به کار رود [۵, ۱۰].

هزینه اصلی این ترکیبات برای تخمیر، فرایندی است که باید انجام شود تا بتواند این ترکیبات را قابل مصرف برای میکروارگانیسمها نماید[۵].

۱-۳- ساختار ترکیبات لیگنوسلولزی

ترکیبات لیگنوسلولزی از سلولز، همی‌سلولز، لیگنین و مقدار ناچیزی ترکیبات دیگر تشکیل شده اند. هر مولکول سلولز شامل زنجیرهای طولانی بدون شاخه گلوکز می‌باشد که وزن مولکولی آن بین ۵۰۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰۰۰ می‌باشد. پیوندهای هیدروژنی بین اتمهای موجود و بین زنجیرهای سلولز به وجود می‌آیند که تعیین کننده شکل فیزیکی و فرم کریستالی سلولز می‌باشند. این قسمت از ترکیبات لیگنوسلولزی به سختی توسط عملیات هیدرولیز تخریب می‌شود و چنانچه عملیات هیدرولیز ناقص باشد، آلفا سلولز تخریب نشده و به فرم اولیه خود باقی می‌ماند[۶, ۳۲].

همی‌سلولز در میان گیاهان مختلف با ترکیبات خاص ظاهر می‌شود که شامل زنجیرهای کوتاه پلیمرهای شاخه دار قندهای پنجگانه (زایلو و آرابینوز) و برخی هگزوزها (گلوکز ، گالاکتوز و مانوز) می‌باشد. همی‌سلولز را به راحتی می‌توان به قند های کوچک محلول در آب هیدرولیز کرد[۳۳, ۳۴].

لیگنین یک ماده پلی فنولیک با پیوندهای نامنظم می‌باشد که اندازه ها و پیوندهای تصادفی قسمتهای ساختمانی آن موجب مقاومت بالایی در مقابل حملات شیمیایی و آنزیمی می‌شود[۳۲, ۳۵].

۱-٤- هیدرولیز ترکیبات لیگنوسلولزی

ساختمان طبیعی ترکیبات لیگنوسلولزی دارای هیدراتهای کربنی بفرم پلیمر است که اطراف آنها را ترکیب پیچیده ای بنام لیگنین احاطه کرده به گونه‌ای که این مواد قابل واکنش و مصرف توسط میکروارگانیسمهای معمولی نمی‌باشند. لذا ابتدا آن را توسط فرآیندی که آنرا هیدرولیز می‌نامند به قندهای کوچک قابل تخمیر تبدیل می‌کنند. مواد حاصل از هیدرولیز را که حاوی انواع مختلفی از قندها و ترکیبات دیگر می باشد را هیدرولیزیت[1] نامند. دو روش کلی برای هیدرولیز ترکیبات سلولزی وجود دارد که عبارتند از روشهای هیدرولیز آنزیمی و روشهای هیدرولیز شیمیایی[۶].

۱-٤-۱- هیدرولیز توسط روشهای شیمیایی

- **هیدرولیز توسط اسید غلیظ**

یکی از قدیمی‌ترین روشهای هیدرولیز استفاده از اسید سولفوریک و اسید کلریدریک غلیظ برای تبدیل سلولز به قندهای ساده می‌باشد. راندمان این روش نسبتا بالا است ولی رقیق کردن و گرما دادن اسید غلیظ در فرآیند هیدرولیز ترکیبات حاصل آنرا بسیار خورنده و هزینه دستگاهها و نگهداری آنها را بالا می برد. در این فرآیندها برای ساخت دستگاهها مجبور هستند از آلیاژهای گران قیمت و یا مواد غیر فلزی مانند سرامیک استفاده کنند. این مسائل استفاده از این روش را بسیار گران و محدود نموده است[۵, ۶].

- **هیدرولیز توسط اسید رقیق**

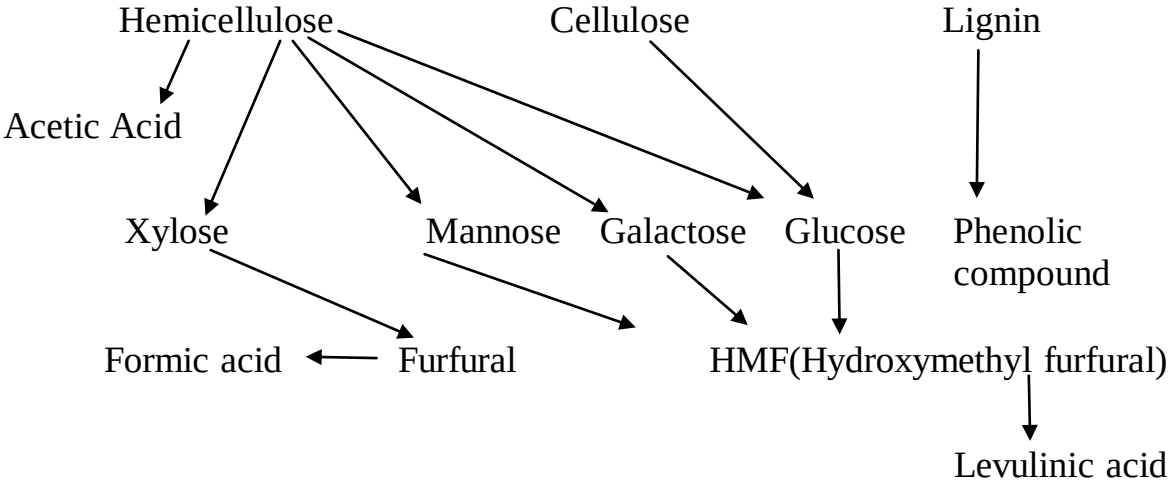
---

[1] Hydrolyzate

یکی از معمولترین روشهایی که تاکنون برای هیدرولیز ترکیبات سلولزی ارائه شده است روش استفاده از اسید رقیق است. این روش برای اولین بار به صورت صنعتی در آلمان در سال ۱۸۹۸ برای تولید اتانول از چوب اجرا شد. برای بهینه سازی این روش در ۵۰ سال گذشته تلاشهای زیادی انجام گرفته است. پس از تحقیقات فراوان روشی دو مرحله ای ارائه شد که بالاترین راندمان را نسبت به روشهای قبلی به همراه داشته است. در این روش در مرحله اول شرایط ملایم(دما و فشار و زمان ماند کم) است و ترکیباتی که راحت شکسته می‌شوند(همی سلولز) در این مرحله به قندهای ساده تبدیل می‌شوند. در مرحله دوم در شرایط سخت تر (دما و فشار بالاتر) ترکیبات سخت تر به قندهای ساده تبدیل می‌شوند. سپس فاز جامد باقی مانده که حاوی مقدار زیادی لیگنین می‌باشد جدا و مایع برای تولید اتانول بوسیله تخمیر استفاده می‌شود. در این روش معمولاً از اسید سولفوریک ۰/۵٪ استفاده می‌شود. استفاده از اسیدهای دیگر مانند اسید فرمیک و اسید کلریدریک نیز امکان پذیر است ولی از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشد[۲].

در کنار تولید قندهای ساده در اثر هیدرولیز ترکیباتی نیز تولید می‌شوند که اثر بازدارندگی بر تخمیر دارند[۳۶]. نحوهٔ تشکیل، مکانیسم اثر و بر طرف کردن اثر بازدارندگی این مواد از مباحثی است که تحقیقات فراوانی بر روی آن انجام گرفته است. در ادامه به آشنایی با این مبحث پرداخته می‌شود.

در اثر هیدرولیز ترکیبات سلولزی موادی تولید می‌شوند که اثرات بازدارندگی بر سرعت تولید اتانول توسط مخمرها دارند. شمای کلی تولید این بازدارنده‌ها در شکل ۱-۲ آمده است[۳۷]:



شکل ۱-۲ : بازدارنده‌های تولید شده در اثر هیدرولیز اسیدی[۳۸]

کلاً بازدارنده‌ها را به سه دسته تقسیم می کنند[۶]:

- ترکیبات اسیدی ضعیف
- فورانها
- ترکیبات فنلیک

روشهای مختلفی برای جلوگیری از بازدارندگی این مواد وجود دارد که عبارتند از:

الف- روشهای سم‌زدایی بیولوژیکی

در این روشها از آنزیمهایی مانند پراکسیداز استفاده می‌شود. استفاده از این آنزیمها سرعت تولید اتانول را گاهی ۲ تا۳ برابر می کند و می‌تواند تقریباً تمام ترکیبات فنلی را حذف کند. با استفاده از میکروارگانیسم تریکودرما ریزی[1] پس از یک عملیات مقدماتی توسط بخار آب می‌توان سرعت تولید اتانول و راندمان تولید را چندین برابر کرد. با این روش می‌توان اسید استیک، فورفورال و اسید بنزوئیک تولید شده را حذف نمود[۳۷].

با انتخاب یک فرآیند تخمیر مناسب، فورفورال و هیدروکسی متیل فورفورال می‌تواند توسط خود مخمر به موادی که اثر بازدارندگی آنها کمتر است تبدیل شوند. فورفورال توسط مخمر به فورفوریل الکل تبدیل می‌شوند و هیدروکسی متیل فورفورال نیز می‌تواند توسط مخمر به الکل آن تبدیل شود و اثر بازدارندگی آن کاهش می یابد[۳۹-۴۴].

ب- روشهای سم‌زدایی فیزیکی

روشهای مختلف فیزیکی نیز می‌تواند برای جداسازی مواد بازدارنده یا سمی بکار رود. از جمله این روشها استخراج مواد بازدارنده می‌باشد. استفاده از روش قلیایی با افزایش pH نیز از روشهای قدیمی حذف مواد بازدارنده است. آهک زنی از معروفترین این روشها می باشد. با استفاده از دستگاههای تبادل یونی نیز می‌توان مواد بازدارنده را حذف نمود ولی از نظر اقتصادی مقرون به صرفه نمی‌باشد[۱۰, ۴۵].

۱-٤-۲- هیدرولیز آنزیمی

یکی از روشهای تبدیل ترکیبات لیگنوسلولزی به مواد قابل تخمیر، هیدرولیز آنزیمی می‌باشد. در این روش سلولز موجود در این ترکیبات توسط آنزیم به گلوکز تبدیل می‌شود. فاکتورهای مؤثر بر راندمان هیدرولیز آنزیمی عبارتند از[۵, ۳۲]:

- تخلخل[2] ترکیبات لیگنوسلولزی (سطح قابل دسترس برای آنزیم).

---

[1] *Trichoderma reesei*
[2] Porosity

- وضعیت کریستالی فیبرهای سلولز در ترکیبات لیگنوسلولزی.
- مقدار لیگنین و همی‌سلولز موجود در ترکیبات.

ایجاد سطح تماس بیشتر برای آنزیم (ایجاد تخلخل بیشتر)، کاهش کریستالینتی فیبرهای سلولز و کاهش لیگنین و همی‌سلولز می‌تواند راندمان روش آنزیمی را به طور قابل توجهی افزایش دهد[۳۲, ۴۶].

فرآیندهایی که قبل از انجام هیدرولیز به منظور افزایش راندمان هیدرولیز صورت می‌گیرد تحت عنوان فرآیندهای مقدماتی[1] مطرح شده‌اند.

فرآیندهای مقدماتی قبل از هیدولیز آنزیمی

همانگونه که بیان شد هدف از فرآیندهای مقدماتی جداسازی لیگنین و همی‌سلولز، افزایش تخلخل و کاهش کریستالینتی فیبرهای سلولز موجود در این ترکیبات می‌باشد.

در فرآیندهای مقدماتی موارد زیر باید مورد توجه قرار گیرد[۵]:

- بهبود توانایی تولید قند توسط آنزیم.
- اجتناب از تخریب قندها.
- اجتناب از تشکیل ترکیبات بازدارنده (هم بازدارنده‌های آنزیمها و هم بازدارنده‌های تخمیر).
- به صرفه بودن از نظر اقتصادی.

تاکنون ۴ دسته فرآیند مختلف برای این فرآیندهای مقدماتی ارائه شده که شامل عملیات فیزیکی، شیمیایی، فیزیکی-شیمیایی و بیولوژیکی می‌باشد. در اینجا به بررسی این فرآیندها پرداخته می‌شود.

الف- فرآیندهای مقدماتی فیزیکی

این فرآیندها شامل فرآیندهای مکانیکی و پیرولیز می‌باشند.

فرآیندهای مکانیکی

این روش می‌تواند شامل آسیاب کردن[2]، خرد کردن[3]، تراشه کردن[4] و یا ترکیبی از آنها باشد. معمولا اندازه ذرات پس از تراشه کردن ۱ الی ۳ سانتیمتر و ۰/۲ الی ۲ میلیمتر پس از آسیاب یا خورد کردن می‌باشد[۴۷].

آسیاب چکشی می‌تواند برای کاهش اندازهٔ ترکیبات سلولزی بکار رود ولی بر راندمان هیدرولیز اثر زیادی ندارد[۱۰].

---

[1] Pretreatment
[2] Milling
[3] Grinding
[4] Chipping