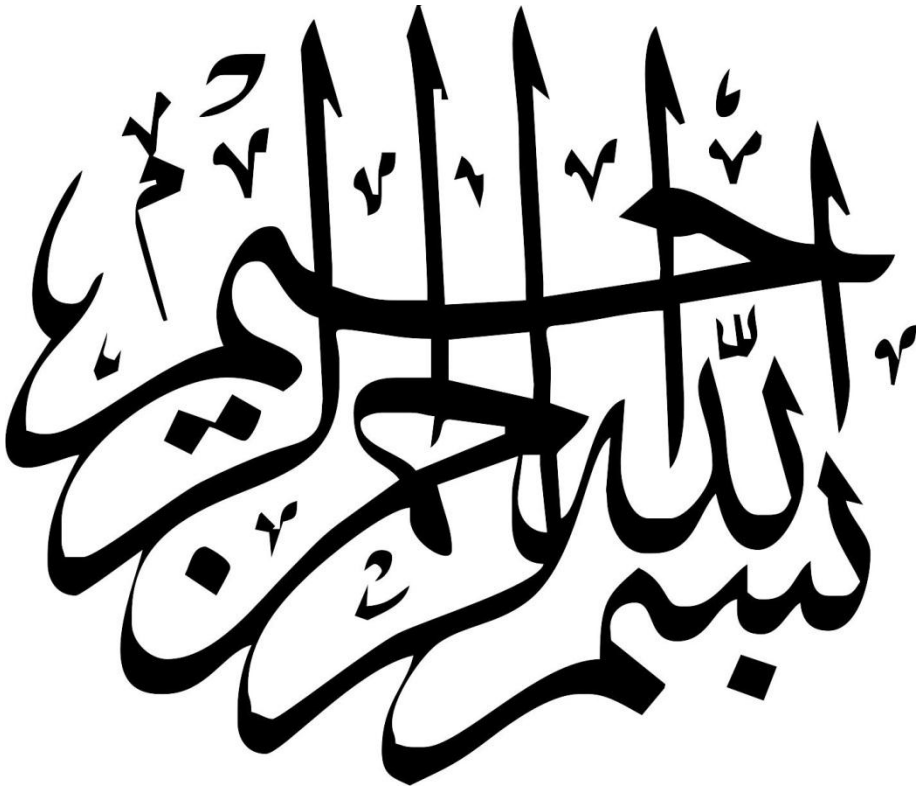

بسم الله الرحمن الرحيم

**دانشگاه صنعتی اصفهان**

دانشکده مهندسی شیمی

# پیش‌فرآوری ترکیبات لیگنوسلولزی با استفاده از حلال‌های سلولزی برای افزایش بازده تولید بیولوژیکی اتانول

پایان‌نامه دکتری مهندسی شیمی

**امیر گشادرو**

استاد راهنما

**دکتر کیخسرو کریمی**

**۱۳۹۲**

دانشگاه صنعتی اصفهان

دانشکده مهندسی شیمی

پایان‌نامه‌ی دکتری رشته‌ی مهندسی شیمی آقای امیر گشادرو

تحت عنوان

# پیش‌فرآوری ترکیبات لیگنوسلولزی با استفاده از حلال‌های سلولزی برای افزایش بازده تولید بیولوژیکی اتانول

در تاریخ ۹۲/۳/۲۹ توسط کمیته‌ی تخصصی زیر مورد بررسی و تصویب نهایی قرار گرفت.

| | |
|---|---|
| ۱- استاد راهنمای پایان‌نامه | دکتر کیخسرو کریمی |
| ۲- استاد مشاور پایان‌نامه | دکتر محمد جعفر طاهرزاده |
| ۳- استاد داور | دکتر حمید زیلویی |
| ۴- استاد داور | دکتر مهدی کلهور |
| ۵- استاد داور | دکتر محمد صادق حاتمی پور |
| سرپرست تحصیلات تکمیلی دانشکده | دکتر حمید زیلویی |

**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 ..... هشت
چکیده ..... ۱
**فصل اول: مقدمه**
۱-۱ سوخت‌های فسیلی و ضرورت استفاده از منابع تجدیدپذیر ..... ۲
۱-۲ اهمیت اتانول به عنوان سوخت ..... ۳
۱-۳ روش‌های تولید اتانول ..... ۳
۱-۳-۱ تولید اتانول به روش‌های سنتزی ..... ۳
۱-۳-۲ تولید اتانول به روش تخمیری ..... ۴
۱-۴ منابع اولیه تولید بیواتانول ..... ۹
۱-۴-۱ منابع قندی ..... ۹
۱-۴-۲ منابع نشاسته‌ای ..... ۹
۱-۴-۳ مواد لیگنوسلولزی ..... ۱۰
۱-۵ ساختار ترکیبات لیگنوسلولزی ..... ۱۱
۱-۵-۱ سلولز ..... ۱۲
۱-۵-۲ همی‌سلولز ..... ۱۲
۱-۵-۳ لیگنین ..... ۱۳
۱-۶ هیدرولیز ترکیبات لیگنوسلولزی ..... ۱۴
۱-۶-۱ هیدرولیز اسیدی ..... ۱۵
۱-۶-۲ هیدرولیز آنزیمی ..... ۱۷
۱-۶-۱ عوامل موثر در هیدرولیز آنزیمی ..... ۱۸
۱-۶-۲ مقایسهٔ هیدرولیز اسیدی و آنزیمی ..... ۲۲
۱-۷ پیش فرآوری ترکیبات لیگنوسلولزی ..... ۲۲
۱-۷-۱ پیش فرآوری‌های فیزیکی ..... ۲۳
۱-۷-۲ پیش فرآوری‌های فیزیکی- شیمیایی ..... ۲۴
۱-۷-۳ پیش فرآوری‌های بیولوژیکی ..... ۲۶
۱-۷-۴ پیش فرآوری‌های شیمیایی ..... ۲۷
۱-۸ مروری بر مطالعات انجام شده ..... ۳۲
**فصل دوم: مواد، تجهیزات و روش‌ها**
۲-۱ مواد اولیه لیگنوسلولزی ..... ۳۸
۲-۲ نرمال متیل مورفولین نرمال اکسید (NMMO) ..... ۳۹
۲-۳ مایع یونی ۱-اتیل ۳-متیل ایمیدازولیوم استات ([EMIM][OAc]) ..... ۳۹
۲-۴ آنزیم‌ها ..... ۳۹

۲-۵ سایر مواد شیمیایی مورد نیاز ..... ۳۹
۲-۶ میکروارگانیسم‌ها ..... ۴۰
۲-۷ وسایل و تجهیزات ..... ۴۰
۲-۷-۱ هود میکروبی ..... ۴۰
۲-۷-۲ اتوکلاو ..... ۴۰
۲-۷-۳ شیکر انکوباتور ..... ۴۰
۲-۷-۴ اسپکتروفوتومتر ..... ۴۱
۲-۷-۵ دستگاه مولد امواج فرا صوت ..... ۴۱
۲-۷-۶ حمام آب معمولی و شیکردار ..... ۴۱
۲-۷-۷ حمام روغن ..... ۴۱
۲-۷-۸ گرم‌کن با همزن مغناطیسی ..... ۴۱
۲-۷-۹ آون ..... ۴۲
۲-۷-۱۰ سانتریفیوژ ..... ۴۲
۲-۷-۱۱ کروماتوگرافی مایع با راندمان بالا ..... ۴۲
۲-۷-۱۲ میکروسکوپ ..... ۴۳
۲-۷-۱۳ دستگاه سنجش pH ..... ۴۳
۲-۷-۱۴ کوره ..... ۴۳
۲-۷-۱۵ پمپ خلأ ..... ۴۳
۲-۷-۱۶ سایر ادوات مورد نیاز ..... ۴۴
۲-۸ روش انجام آزمایشات ..... ۴۴
۲-۸-۱ کشت میکروارگانیسم‌ها روی محیط جامد ..... ۴۴
۲-۸-۲ کشت میکروارگانیسم‌ها در محیط مایع ..... ۴۵
۲-۸-۳ پیش فرآوری هیدروکسید سدیم ..... ۴۵
۲-۸-۴ پیش فرآوری اسید فسفریک غلیظ ..... ۴۶
۲-۸-۵ پیش فرآوری اسید سولفوریک رقیق ..... ۴۶
۲-۸-۶ پیش فرآوری با حلال‌های سلولزی NMMO و مایع یونی [EMIM]OAc ..... ۴۶
۲-۸-۷ آنالیز کربوهیدرات‌ها و لیگنین ..... ۴۷
۲-۸-۸ جذب آنزیم سلولاز ..... ۴۸
۲-۸-۹ رنگ‌آمیزی سیمون ..... ۴۸
۲-۸-۱۰ تورم پذیری ..... ۴۹
۲-۸-۱۱ آنالیزهای ساختاری ..... ۵۰
۲-۸-۱۲ هیدرولیز آنزیمی و تخمیر ..... ۵۰
**فصل سوم: نتایج حاصل از آزمایشات و بحث پیرامون آن‌ها**
۳-۱ پیش فرآوری هیدروکسید سدیم و اسید فسفریک ..... ۵۳
۳-۱-۱ اثر پیش فرآوری بر محتوای کربوهیدرات و لیگنین سوبسترا ..... ۵۴
۳-۱-۲ اثر پیش فرآوری بر ساختار فیزیکی و مورفولوژی سوبسترا ..... ۵۵

۳-۱-۳ اثر پیش فرآوری بر هیدرولیز آنزیمی سوبسترا ۵۸
۳-۱-۴ اثر پیش فرآوری بر تولید بیولوژیکی اتانول از سوبسترا ۵۹
۳-۲ پیش فرآوری توسط حلال سلولزی NMMO ۶۱
۳-۲-۱ اثر پیش فرآوری بر محتوای کربوهیدرات و لیگنین سوبسترا ۶۲
۳-۲-۱ اثر پیش فرآوری بر ساختار فیزیکی سوبسترا ۶۳
۳-۲-۲ اثر پیش فرآوری بر قابلیت تورم‌پذیری سوبسترا ۶۴
۳-۲-۳ اثر پیش فرآوری بر هیدرولیز آنزیمی سوبسترا ۶۵
۳-۲-۴ اثر پیش فرآوری بر تولید بیولوژیکی اتانول از سوبسترا ۶۷
۳-۳ پیش فرآوری توسط مایع یونی [EMIM]OAc ۶۸
۳-۳-۱ اثر پیش فرآوری بر محتوای کربوهیدرات و لیگنین سوبسترا ۶۸
۳-۳-۱ اثر پیش فرآوری بر سطح تماس و اندازه منافذ سوبسترا ۶۹
۳-۳-۲ اثر پیش فرآوری بر قابلیت تورم‌پذیری سوبسترا ۷۱
۳-۳-۳ اثر پیش فرآوری بر ظرفیت جذب آنزیم توسط سوبسترا ۷۱
۳-۳-۴ اثر پیش فرآوری بر ساختار فیزیکی و مورفولوژی سوبسترا ۷۳
۳-۳-۵ اثر پیش فرآوری بر هیدرولیز آنزیمی سوبسترا ۷۵
۳-۳-۶ اثر پیش فرآوری بر تولید بیولوژیکی اتانول از سوبسترا ۷۷
**فصل چهارم: نتیجه‌گیری و پیشنهادات**
**پیوست: مقالات ارائه شده در مجلات و همایش‌ها**
مراجع ۸۶

# فهرست شکل‌ها

**عنوان** **صفحه**


شکل ۱-۱- تبدیل بی‌هوازی گلوکز به اتانول و سایر محصولات جانبی توسط مخمرها ..... ۵
شکل ۱-۲- ترکیبات بازدارنده در اثر هیدرولیز اسیدی ..... ۱۶
شکل ۱-۳- ساختار ترکیبات لیگنوسلولزی و تأثیر پیش فرآوری..... ۲۳
شکل ۱-۴- ساختار شیمیایی ترکیب NMMO ..... ۳۱
شکل ۱-۵- ساختار شیمیایی مایع یونی [EMIM]OAc..... ۳۱
شکل۲-۱- دستگاه کروماتوگرافی مایع با راندمان بالا..... ۴۲
شکل ۳-۱- طیف‌های FTIR برای باگاس سورگوم شیرین (الف) بدون پیش فرآوری، (ب) پیش فرآوری هیدروکسید سدیم، (ج) پیش فرآوری هیدروکسید سدیم و استفاده از امواج فرا صوت ..... ۵۶
شکل ۳-۲- عکس‌های SEM از باگاس سورگوم شیرین (الف) بدون پیش فرآوری، (ب) پیش فرآوری هیدروکسید سدیم، (ج) پیش فرآوری هیدروکسید سدیم و امواج فرا صوت، (د) پیش فرآوری اسید فسفریک غلیظ، (ه) پیش فرآوری اسید فسفریک غلیظ و امواج فرا صوت..... ۵۷
شکل۳-۳- طیف‌های FTIR برای چوب صنوبر (الف) بدون پیش فرآوری، (ب) پیش فرآوری NMMO..... ۶۳
شکل ۳-۴- بازده تولید اتانول از چوب صنوبر قبل و بعد از پیش فرآوری NMMO با روش‌های مختلف خشک کردن..... ۶۷
شکل ۳-۵- جذب رنگ‌های نارنجی و آبی توسط چوب کبوده قبل و بعد از پیش فرآوری [EMIM]OAc ..... ۷۰
شکل ۳-۶- طیف‌های FTIR برای چوب صنوبر (الف) بدون پیش فرآوری، (ب) پیش فرآوری اسید سولفوریک رقیق، (ج) پیش فرآوری [EMIM]OAc (۳ ساعت)..... ۷۳
شکل ۳-۷- عکس‌های SEM از چوب کبوده (الف) بدون پیش فرآوری، (ب) پیش فرآوری اسید سولفوریک رقیق، (ج) پیش فرآوری [EMIM]OAc (۳ ساعت)..... ۷۴
شکل ۳-۸- بازده تولید اتانول از چوب کبوده قبل و بعد از پیش فرآوری [EMIM]OAc ..... ۷۷

# فهرست جدول‌ها

**عنوان** **صفحه**


جدول ۱-۱- محتوای سلولز، همی‌سلولز و لیگنین در مواد لیگنوسلولزی مختلف ..... ۱۱
جدول ۱-۲- درصد قند های موجود در چوب سخت و نرم ..... ۱۳
جدول ۳-۱- -محتوای کربوهیدرات و لیگنین باگاس قبل و بعد از عملیات پیش فرآوری (درصد وزنی بر مبنای خشک)...۵۵
جدول ۳-۲- شاخص کریستالینیتی باگاس سورگوم قبل و بعد از عملیات پیش فرآوری ..... ۵۶
جدول ۳-۳- بازده هیدرولیز آنزیمی باگاس قبل و بعد از عملیات پیش فرآوری ..... ۵۹
جدول ۳-۴- تولید اتانول از باگاس سورگوم قبل و بعد از عملیات پیش فرآوری..... ۶۰
جدول ۳-۵- محتوای کربوهیدرات و لیگنین چوب صنوبر قبل و بعد از عملیات پیش فرآوری NMMO (درصد وزنی بر مبنای خشک)..... ۶۲
جدول ۳-۶- شاخص‌های کریستالینیتی چوب صنوبر قبل و پس از پیش فرآوری NMMO..... ۶۴
جدول ۳-۷- تورم‌پذیری چوب صنوبر قبل و بعد از پیش فرآوری NMMO با روش‌های مختلف خشک کردن.....۶۵
جدول ۳-۸- تأثیر پیش فرآوری NMMO و روش‌های مختلف خشک کردن بر بازده هیدرولیز آنزیمی چوب صنوبر ..... ۶۶
جدول ۳-۹- محتوای کربوهیدرات و لیگنین چوب کبوده قبل و بعد از پیش فرآوری [EMIM]OAc (درصد وزنی بر مبنای خشک)..... ۶۹
جدول ۳-۱۰- قابلیت تورم‌پذیری چوب کبوده قبل و بعد از پیش فرآوری [EMIM]OAc..... ۷۱
جدول ۳-۱۱- جذب آنزیم سلولاز توسط چوب کبوده قبل و بعد از پیش فرآوری [EMIM]OAc..... ۷۲
جدول ۳-۱۲- شاخص‌های کریستالینیتی چوب کبوده قبل و بعد از پیش فرآوری [EMIM]OAc..... ۷۴
جدول ۳-۱۳- تأثیر پیش فرآوری [EMIM]OAc بر بازده هیدرولیز آنزیمی چوب کبوده..... ۷۶

**چکیده**

رشد سریع و روزافزون مصرف انرژی در جهان، محدود بودن منابع فسیلی موجود و مخاطرات زیست محیطی جدی ناشی از استفاده از آن‌ها مانند انتشار گازهای گلخانه‌ای و افزایش دمای کره زمین، ضرورت بهره‌برداری انرژی از منابع تجدیدپذیر را بیش از پیش برای جوامع بشری آشکار کرده است. در حال حاضر اتانول مهم‌ترین سوخت مایع جایگزین بنزین بوده و مواد لیگنوسلولزی که فراوان‌ترین توده‌های زیستی در جهان را تشکیل می‌دهند، به‌واسطه ارزان بودن و عدم دخالت در چرخه مواد غذایی مهم‌ترین ماده اولیه برای تولید اتانول محسوب می‌شوند. به دلیل این‌که فیبرهای سلولزی در ساختار لیگنوسلولزها توسط ماتریسی از همی‌سلولز و لیگنین محافظت می‌شوند، در برابر حملات شیمیایی و بیولوژیکی بسیار مقاوم بوده و بازده هیدرولیز و تخمیر آن‌ها به اتانول در حالت طبیعی پایین است. در فرآیند تبدیل مواد لیگنوسلولزی به اتانول، پیش فرآوری یک مرحله مهم و کلیدی برای تغییر ساختار لیگنوسلولزی به‌منظور تسهیل مراحل هیدرولیز و تخمیر محسوب می‌شود. از میان روش‌های مختلفی که تاکنون برای پیش فرآوری ترکیبات لیگنوسلولزی پیشنهاد شده است، استفاده از حلال‌های سلولزی به دلیل کارایی مطلوب در دماهای متوسط و پایین بسیار حائز اهمیت است. با توجه به این‌که تحقیقات انجام شده در زمینه استفاده از حلال‌های سلولزی اغلب محدود به کاربرد آن‌ها برای ترکیبات سلولزی (مانند منسوجات) است، در تحقیق حاضر از حلال‌های مختلفی شامل هیدروکسید سدیم، اسید فسفریک، و نیز حلال‌های جدید شامل NMMO و مایع یونی [EMIM]OAc برای پیش فرآوری ضایعات کشاورزی (باگاس گیاه سورگوم شیرین) و جنگلی (ضایعات چوب صنوبر و کبوده) استفاده گردیده است. پیش فرآوری باگاس توسط محلول هیدروکسید سدیم (۱۲٪) و اسید فسفریک (۸۵٪) به ترتیب در دماهای ۰ و ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ و ۰/۵ ساعت صورت گرفت. هیدرولیز آنزیمی باگاس در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۴/۸ با استفاده از آنزیم‌های سلولاز و بتاگلوکوسیداز به مدت ۷۲ ساعت نشان دادکه پس از عملیات پیش فرآوری توسط هیدروکسید سدیم بازده هیدرولیز از ۶۵٪ تا ۹۲٪ افزایش می‌یابد. همچنین اتانول تولیدی در فرآیند تخمیر محلول هیدرولیز باگاس فرآوری شده در دمای ۳۲ درجه سانتی‌گراد و pH برابر ۵/۵ از حدود ۵۰٪ تا بیش از ۸۰٪ بهبود می‌یابد. آنالیز سوبسترا با استفاده از روش‌های مختلف بیان‌گر کاهش جزئی محتوای لیگنین، کاهش کریستالینیتی و باز شدن سطح سوبسترا در اثر عملیات پیش فرآوری می‌باشد. به دلیل این‌که روش‌های آلکالی و اسیدی مورد استفاده بیشتر برای فرآوری ضایعات کشاورزی مناسب بوده و تأثیر آن‌ها بر ضایعات چوبی کم‌تر است، برای بهبود بازده هیدرولیز چوب سخت صنوبر از پیش فرآوری توسط محلول ۸۵٪ NMMO در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت استفاده شد. نتایج نشان داد که بعد از عملیات پیش فرآوری ضمن این‌که محتوای کربوهیدراتی سوبسترا تقریباً حفظ می‌شود، کریستالینیتی آن به میزان قابل‌توجهی کاهش و قابلیت تورم‌پذیری آن افزایش می‌یابد. بازده تولید قند از چوب صنوبر بعد از ۹۶ ساعت هیدرولیز آنزیمی فقط در حدود ۱۰٪ است که برای سوبسترای فرآوری شده توسط NMMO بعد از ۲۴ ساعت هیدرولیز تا ۷۶٪ افزایش یافته و در نهایت پس از ۹۶ ساعت هیدرولیز به ۹۶٪ رسیده است. همچنین بعد از عملیات پیش فرآوری، بازده تولید اتانول در مدت ۲۴ ساعت تخمیر تا بیش از ۹ برابر باگاس فرآوری نشده بهبود داشته است. برای چوب‌های سخت‌تر مانند چوب کبوده روش‌های قبلی کارایی چندانی نداشت، لذا پیش فرآوری مایع یونی با استفاده از حلال [EMIM]OAc در دمای ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد و دماهای مختلف ۱، ۳ و ۵ ساعت بر روی ضایعات چوب کبوده که یکی از مقاوم‌ترین درختان جنگلی محسوب می‌شود، صورت گرفت. نتایج حاصل نشان می‌دهد که پیش فرآوری مایع یونی موجب افزایش قابل‌توجه بازده هیدرولیز آنزیمی ضایعات چوب از ۵/۳٪ به حدود ۹۵٪ و بهبود تخمیرپذیری آن تا بیش از ۸۱٪ می‌گردد. آنالیز چوب بعد از فرآوری بیان‌گر کاهش محتوای لیگنین و کریستالینیتی سوبسترا و افزایش قابلیت تورم‌پذیری آن می‌باشد. همچنین نتایج حاصل از آزمایشات سیمون و جذب آنزیم نیز به خوبی نشان می‌دهد که پیش فرآوری مایع یونی حتی در زمان کوتاه (یک ساعت) موجب افزایش قابل‌توجه سطح تماس و اندازه منافذ سوبسترا شده و میزان دسترسی آن به آنزیم تا ۷۴٪ افزایش داده است.

کلمات کلیدی: ۱- ترکیبات لیگنوسلولزی ۲-پیش فرآوری حلال ۳- مایعات یونی ۴- NMMO ۵- هیدرولیز آنزیمی ۴-بیواتانول

# فصل اول
# مقدمه

## ۱-۱ سوخت‌های فسیلی و ضرورت استفاده از منابع تجدیدپذیر

مصرف فزآینده انرژی به موازات گسترش سریع تکنولوژی و صنعت سبب شده تا بازار مصرف فرآورده-های سوختی در دنیا با بحران جدی روبرو شود. توجه به حقایقی چون محدود بودن منابع فسیلی، افزایش دمای زمین، تغییرات ناگهانی آب و هوا و نیاز به انرژی بیشتر برای جمعیت روزافزون موجب شده است که جوامع در اندیشه یافتن منابع تجدیدپذیر انرژی و جایگزینی منابع فسیلی باشند. در میان گزینه های موجود، استفاده از پتانسیل موجود در توده‌های زیستی به عنوان جایگزین ترکیبات هیدروکربوری می‌توانند پاسخگوی بخشی از مشکلات جهانی باشند. توده‌های زیستی ضمن این‌که در مدت زمان کوتاهی تجدید می‌شوند، معمولاً فراوان بوده و هزینه آن‌ها نیز اندک است. تبدیل توده‌های زیستی به انواع بیوسوخت‌ها نظیر اتانول در واقع تبدیل انرژی خورشید به صورت انرژی‌های پاک و قابل ذخیره می‌باشد. امروزه اتانول محبوبترین سوخت الکلی محسوب می‌شود که با سوختن آن در موتور خودروها ترکیبات گوگردی، نیتروژنه، سرب، ترکیبات آروماتیک و دیگر ترکیبات سرطان‌زا تا حد زیادی از زندگی مردم حذف خواهد شد [۱-۳].

## ۱-۲ اهمیت اتانول به عنوان سوخت

ترکیب اتانول یا اتیل الکل با فرمول شیمیایی $CH_3CH_2OH$ مایعی بی‌رنگ است که در دمای ۱۴۴- درجه سانتی‌گراد ذوب و در دمای ۷۸ درجه سانتی‌گراد می‌جوشد. چگالی آن کمتر از آب است و به هر نسبتی در آب حل می‌شود. این الکل در حال حاضر به عنوان یکی از کالاهای مهم و راهبردی در بسیاری از کشورها شناخته می‌شود و در حجم تولید آن روز به روز در حال افزایش است. اتانول را می‌توان با بنزین مخلوط نمود و با تغییرات جزئی در سیستم احتراق موتور، مستقیماً از آن به عنوان سوخت خودرو استفاده نمود. یک لیتر اتانول حدود ۶۶٪ انرژی یک لیتر بنزین را دارا بوده و وقتی با بنزین مخلوط می‌شود باعث بهبود فرآیند احتراق می‌گردد. میزان خالص انتشار گاز دی اکسید کربن ناشی از سوختن اتانول بسیار ناچیز است و مخلوط نمودن اتانول با بنزین به کاهش انتشار دی اکسید سولفور نیز کمک می‌کند. در حال حاضر حدود ۸۰ درصد اتانول موجود در جهان به مصرف سوخت و مکمل‌های سوختی می‌رسد و ۲۰ درصد باقیمانده برای کاربردهای این ماده در صنایع مختلف پزشکی، آرایشی و بهداشتی و رنگ و رزین استفاده می‌شود [۲-۶].

## ۱-۳ روش‌های تولید اتانول

به طور کلی اتانول به دو روش مختلف سنتزی و تخمیری تولید می‌شود. در روش نخست اتانول از و در روش دوم از منابع تجدیدپذیر قندی، نشاسته‌ای و سلولزی موجود در توده‌های زیستی به عنوان ماده اولیه استفاده می‌شود. به دلایل اقتصادی، در حال حاضر حدوداً ۹۳ درصد اتانول موجود در جهان از روش تخمیری و هفت درصد به صورت اتانول سنتزی تولید می‌شود [۷, ۸].

### ۱-۳-۱ تولید اتانول به روش‌های سنتزی

#### استریفیکاسیون[1] اتیلن توسط اسید سولفوریک

در این روش خوراک هیدروکربوری شامل ۳۵ تا ۹۵ درصد اتیلن در معرض اسید سولفوریک ۹۵ تا ۹۸ درصد قرار می‌گیرد. مخلوط گاز اتیلن و اسید سولفوریک سپس وارد برج جذب شده و واکنش استری شدن در فشار ۱۰۰ psi و دمای ۷۵-۵۵ درجه سانتی‌گراد انجام می‌گیرد.

[1] Esterification

$$CH_2 = CH_2 + H_2SO_4 \leftrightarrow SO_4H(C_2H_5) \quad (۱-۱)$$

$$SO_4H(C_2H_5) + CH_2O = CH_2O \leftrightarrow SO_4(C_2H_5)_2 \quad (۱-۲)$$

سپس محصولات به کمک آب هیدرولیز شده و به روش تقطیر جداسازی می‌شوند [۸, ۹].

$$SO_4H(C_2H_5) + SO_4(C_2H_5)_2 + 3H_2O \leftrightarrow 2H_2SO_4 + 3\ C_2H_5OH\ (\text{Ethanol}) \quad (۱-۳)$$

**هیدراتاسیون[1] اتیلن**

در این فرآیند گاز غنی از اتیلن در مجاورت آب با عبور از کاتالیست به اتانول تبدیل می‌شود. پس از انجام و تکمیل واکنش، اتانول تولیدی در راکتور در برج تقطیر به خلوص ۹۵ درصد می‌رسد [۸, ۹].

$$CH_2 = CH_2 + H_2O \xrightarrow{Catalyst} C_2H_5OH\ (\text{Ethanol}) \quad (۱-۴)$$

فرآیندهای متعدد دیگری نیز جهت سنتز اتانول وجود دارد که از نظر صنعتی حائز اهمیت نیستند [۹].

### ۱-۳-۲ تولید اتانول به روش تخمیری

اتانول بیشترین حجم تولید را در میان محصولات تخمیری به خود اختصاص داده است. هر منبعی که حاوی مقداری قند باشد و یا قابلیت تبدیل به قند را داشته باشد می‌تواند به عنوان منبع اولیه برای تولید به شمار آید. میکروارگانیسم تولید کننده اتانول، قند موجود در منبع اولیه و یا حاصل از هیدرولیز آن را طی یک فرآیند پیچیده به اتانول تبدیل می‌نماید (واکنش ۱-۵) [۳, ۷].

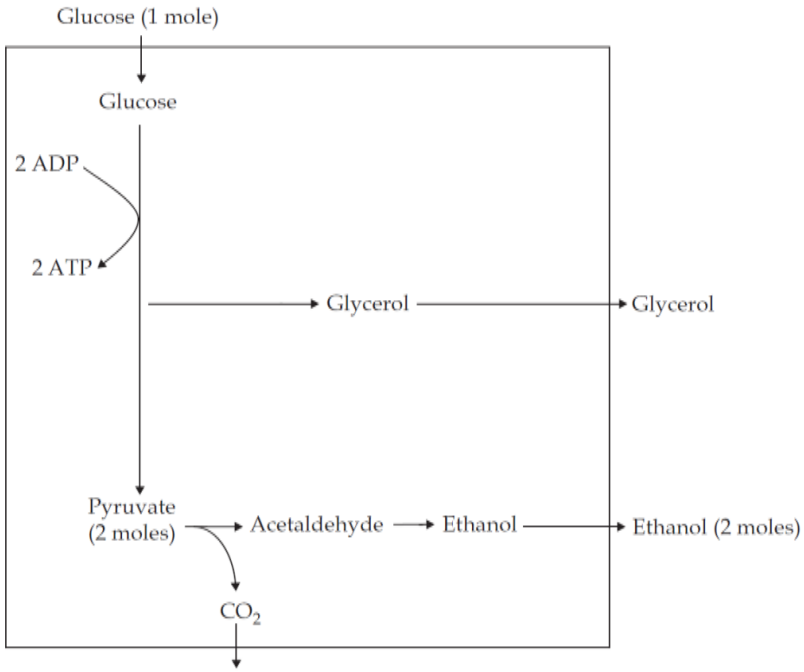
$$\text{Sugar(s)} \xrightarrow{\text{Microorganisms}} C_2H_5OH\ (\text{Ethanol}) + \text{Byproducts} \quad (۱-۵)$$

[1] Hydration

به دلیل این‌که اتانول در این روش به صورت بیولوژیکی از منابع تجدیدپذیر تولید می‌گردد به آن واژه بیواتانول[1] نیز اطلاق می‌شود [۷].

**بیوشیمی تولید اتانول به روش تخمیری**

در میان متابولیسم‌های مختلف سلولی، جذب منبع کربنی و تولید انرژی مورد نیاز سلول از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. مسیر کلی تبدیل بی‌هوازی گلوکز به اتانول و سایر محصولات جانبی توسط مخمرها در شکل ۱-۱ نشان داده شده است.




شکل ۱-۱- تبدیل بی‌هوازی گلوکز به اتانول و سایر محصولات جانبی توسط مخمرها [۸]

گلوکز توسط مسیر امبدن مایروف[2] که معروف به گلیکولیز می‌باشد در درون سلول به پیروات[3] تبدیل می‌گردد. در حالت بی‌هوازی پیروات در نهایت به اتانول تبدیل می گردد. تبدیل قندهای ساده شش کربنه مانند گلوکز به اتانول در شرایط بی‌هوازی مطابق واکنش ۱-۶ اتفاق می‌افتد.

[1] Bioethanol
[2] Embden-Meyerhof pathway
[3] Pyruvate

$$C_6H_{12}O_6(\text{Hexoses}) \xrightarrow{\text{Microorganisms}} 2\ C_2H_5OH\ (\text{Ethanol}) + 2\ CO_2 \qquad ۶\text{-}۱$$

در حضور اکسیژن تمام یا قسمتی از پیروات وارد میتوکندری شده و وارد چرخه دیگری به نام تری کربوکسیلیک اسید[1] می‌گردد. جزئیات واکنش‌های درون سلولی بسیار پیچیده هستند و هنوز بطور کامل شناخته شده نیست، ولی آنچه مسلم است در حالت هوازی پیروات وارد میتوکندری سلول شده و علاوه بر تولید انرژی برخی ترکیبات واسطه ضروری برای سنتز مواد مورد نیاز خود را تولید می نماید [۸].

**میکروارگانیسم‌های تولیدکننده اتانول**

میکروارگانیسم‌های زیادی شامل مخمرها، باکتری‌ها و قارچ‌ها قادر به تولید اتانول هستند، ولی تنها تعداد محدودی از آن‌ها می‌توانند اتانول را به عنوان محصول اصلی تولید نمایند. بر اساس تحقیقات انجام شده مخمرها و قارچ‌ها برای تولید اتانول نسبت به باکتری‌ها ارجحیت دارند. همچنین میکروارگانیسم‌هایی که در صنعت مورد استفاده قرار می‌گیرند با توجه به محدودیت‌های تجهیزات و فرآیند باید دارای ویژگی‌های لازم باشند. به طورکلی یک میکروارگانیسم مناسب برای استفاده در یک فرآیند تخمیر صنعتی بهتر است که شامل ویژگی‌های زیر باشد [۱۰, ۱۱]:

- بازده و سرعت بالای تولید اتانول
- قابلیت رشد در غلظت‌های بالای اتانول
- مقاوم در برابر ترکیبات بازدارنده و شرایط فیزیکی نظیر تغییرات دمایی و اختلاط
- توانایی رشد و تکثیر در pH پایین
- قابلیت تخمیر سوبستراهای مختلف و مصرف قند بالا
- نیاز محدود به مکمل‌های غذایی
- عدم بیماری‌زایی

**مخمرها**

از مهم‌ترین مخمرهایی که برای تولید اتانول مورد استفاده قرار گرفته‌اند می‌توان به ساکارومایسس سرویسیه[2]، ساکارومایسس اواروم[3]، شیزوساکارومایسس پمبه[1] و سویه‌های کلورومایسس[2] اشاره کرد. در تبدیل قند

[1] Tricarboxylic acid cycle (TCA cycle)
[2] *Saccharomyces cerevisiae* (*S. cerevisiae*)
[3] *Saccharomyces uvarum* (*S. uvarum*)

به اتانول باید از حتی‌الامکان از سویه‌ای استفاده کرد که بتواند غلظت‌های بالای اتانول را تحمل کند، زیرا اتانول بر رشد میکروارگانیسم و فرآیند تخمیر اثر بازدارندگی دارد. مخمرها معمولاً می‌توانند در pH بین ۳/۵ تا ۶ و دمای ۳۵-۲۸ درجه سانتی‌گراد رشد کرده و با اتانول با بازده بالا تولید کنند. معروف‌ترین میکروارگانیسمی که تاکنون برای تولید اتانول به کار رفته مخمر ساکارومایسیس سرویسیه می‌باشد. مزیت عمده آن این است که می‌تواند اتانول را با سرعت بالا تولید نماید ولی در عین حال تحمل اثر بسیاری از بازدارنده‌های موجود در سوبستراهای صنعتی را نداشته و همچنین قادر به مصرف قندهای پنج کربنه نظیر زایلوز نیست [۱۲].

**باکتری‌ها**

بسیاری از باکتری ها نیز قادرند اتانول تولید کنند و برخی از آن‌ها محصولات جانبی دیگری نیز تولید می‌کنند. این محصولات ممکن است شامل الکل‌ها، اسیدهای آلی، پلی‌ال‌ها ، کتون‌ها و یا گازهای مختلف باشد. در میان باکتری‌های مختلف باکتری زیموموناس موبیلیس[3] به دلیل آنکه اتانول را به عنوان محصول اصلی تولید کرده و خصوصیات مهم دیگری نیز دارد بیشتر مورد توجه قرار گرفته است. این باکتری در شرایط هوازی نیز اتانول تولید کرده و از طرف دیگر مقاومت خوبی در برابر غلظت‌های بالای اتانول و سوبسترا (به ویژه گلوکز) از خود نشان می‌دهد. همچنین برخلاف بسیاری از باکتری های دیگر قابلیت مصرف ساکاروز را نیز دارد که البته در این حالت محصولات دیگری نظیر اسید استیک و لاکتیک نیز تولید می‌شود. از نظر کارایی برای تولید صنعتی اتانول، باکتری زیموموناس موبیلیس در مقام بعدی مخمر ساکارومایسس سرویسیه قرار گرفته است. هرچند این باکتری برای تولید اتانول نسبت به مخمرها دارای مزایایی همچون جذب بالاتر قند، بازده بالاتر تولید اتانول، کمتر بودن تولید بیومس و تحمل غلظت‌های بالاتر اتانول را دارد ولی استفاده از از آن مشکلاتی به همراه دارد که از آن جمله می‌توان به موارد زیر اشاره کرد:

- تولید محصولات جانبی از قبیل سوربیتول، استوئین، گلیسرول و استیک اسید
- حساسیت نسبت به غلظت‌های بالای نمک
- عدم امکان جداسازی باکتری
- حساسیت نسبت به میکروارگانیسم‌های آلوده کننده

---

[1] *Schizosaccharomyces pombe*
[2] *Kluyveromyces*
[3] *Zymomonas mobilis*

بنابراین علی‌رغم بسیاری از مزایای باکتری زیموموناس موبیلیس، هنوز از این باکتری به صورت صنعتی در تولید اتانول استفاده نشده و بررسی آن محدود به موارد آزمایشگاهی است [۱۰, ۱۱, ۱۳, ۱۴].

**قارچ‌ها**

دسته وسیعی از قارچ‌ها متعلق به شاخه‌های بازیدیومیست[۱]، زیگومیست[۲]، آسکومیست[۳] و دئوترومیست[۴] از نوع قارچ‌های میسلیوم[۵] یا ریسه‌ای[۶] هستند. بیش از نیم قرن است که از قارچ‌های ریسه‌ای در صنایع تخمیری به منظور تولید محصولات مختلف نظیر انواع آنتی بیوتیک‌ها، آنزیم‌ها، انواع اسیدها و الکل‌ها استفاده می‌شود. همچنین بیومس این قارچ‌ها حاول مقادیر قابل توجهی کیتوزان[۷] است [۱۵, ۱۶]. برخی از قارچ‌های متعلق به شاخه زیگومیست‌ها قادر به تولید متابولیت‌های مختلف از جمله اتانول هستند. نتایج نشان داده است که دو سویه موکور ایندیکوس[۸] و رایزوپوس[۹] بازده قابل توجهی در تولید اتانول از گلوکز، زایلوز و هیدرولیزیت چوب دارند [۱۷, ۱۸]. میلاتی و همکارانش [۱۷] با بررسی تولید اتانول توسط نه گونه مختلف قارچ نشان دادند که قارچ موکور همیلیس[۱۰] و موکور ایندیکوس دارای بیشترین بازده تولید اتانول در بین گونه‌های مورد بررسی هستند. از مزیت‌های قارچ‌های موکور نسبت به رایزوپوس می‌توان به موارد ذیل اشاره نمود:

- قابلیت تخمیر زایلوز
- توانایی رشد در دماهای بالاتر نسبت به مخمرهای معمولی
- توده زیستی با ارزش

قارچ‌های موکور ایندیکوس و هیمالیس از هگزوزها (قندهای شش کربنه) با بازده مشابه مخمر ساکارومایسیس سرویسیه اتانول تولید می‌کنند و همچنین این قارچ‌ها قادر به جذب زایلوز (قند پنج کربنه) نیز می‌باشند. نتایج حاصل از کشت بی‌هوازی نشان می‌دهد که گلوکز به خوبی مصرف و اتانول با بازده و سرعت نسبتاً بالایی تولید می‌شود، در حالی که در این شرایط مقدار مصرف زایلوز بسیار کم بوده و اتانولی هم از آن تولید نمی-

[1] Basidiomycetes
[2] Zygomycete
[3] Ascomycete
[4] Deuteromycete
[5] Mycelium
[6] Filamentous fungi
[7] Chitosan
[8] *Mucor indicus* (*M. indicus*)
[9] *Rhizopus*
[10] *Mucor hiemalis* (*M. hiemalis*)

شود. در شرایط پنتوزها تا مدت زمان طولانی در محیط کشت باقی می‌مانند و سلول هنگامی شروع به مصرف آن‌ها می‌کند که همه هگزوزها مصرف شده باشند [۱۸-۲۰].

## ۱-٤ منابع اولیه تولید بیواتانول

مواد اولیه مورد استفاده در تولید بیواتانول می‌توان بر اساس نوع کربوهیدرات موجود در آنها، در سه گروه تقسیم بندی کرد: مواد قندی، مواد نشاسته‌ای و مواد لیگنوسلولزی. یک مشکل اصلی برای تولید اتانول به روش تخمیری، موجود بودن خوراک اولیه می‌باشد که به پارامترهای مختلف از جمله مکان جغرافیائی و قیمت سوبسترا بستگی دارد. کشورهای مختلف از مواد اولیه قابل دسترس مختلف برای تولید اتانول استفاده می‌کنند. به عنوان نمونه، در برزیل از نیشکر ، در آمریکا از ذرت، در اروپا از گندم و در ایران از ملاس برای تولید اتانول استفاده می‌گردد. از طرف دیگر، هزینه ماده اولیه نیز متغیر بوده و مستقیماً روی هزینه‌های تولید اثر می گذارد. بنابراین دستیابی و استفاده از منابع اولیه ارزان قیمت از اهداف مهم تحقیقاتی در زمینه تولید تخمیری اتانول می‌باشد. همچنین به دلیل این که هزینه خوراک معمولاً قابل توجه است، رسیدن به حداکثر بازده در فرآیند تولید اتانول بسیار ضروری می‌باشد. در ادامه به بررسی منابع اولیه مختلفی که می‌تواند برای تولید اتانول به روش تخمیری مورد استفاده قرار گیرد پرداخته می‌شود [۲۱, ۲۲].

### ۱-٤-۱ منابع قندی

تولید اتانول از ترکیبات قندی نظیر ملاس، خرما و آب میوه نیاز به فرآیندهای اولیه نظیر پیش فرآوری قبل از تخمیر ندارد که از جمله مزیت‌های استفاده از از این نوع ترکیبات نسبت به سایر سوبستراها می‌باشد [۲۳, ۲۴]. با این وجود ذخایر قندی محدود هستند و به همین دلیل منابع اولیه گران قیمتی برای فرآیند تولید اتانول محسوب می شوند.

### ۱-٤-۲ منابع نشاسته‌ای

نشاسته ذخیره گلوکز در دانه‌ها و ریشه گیاهان است. ۷۰ درصد وزن خشک ذرت و ۷۵ درصد وزن خشک سیب زمینی را نشاسته تشکیل می دهد. این ترکیب در گیاهان به صورت گرانول وجود دارد که به صورت لایه‌ای در کنار هم قرار گرفته‌اند. نوع تجاری نشاسته که حاصل صنایع فرآوری نشاسته می باشد از همین گرانول‌ها تشکیل شده و تولید آن مراحلی چون خیساندن گیاه در آب و خرد کردن آن (جهت تخریب سلول‌ها و آزاد شدن گرانول-

ها)، جداسازی گرانول‌ها با سانتریفوژ(یا ته‌نشینی) و خشک نمودن آن‌ها را شامل می شود.گرانول‌ها در آب سرد نامحلول هستند ولی هنگامی که دمای آب بالا رود (تا حدود ۶۰ درجه سانتی‌گراد) گرانول‌ها ترکیده و نشاسته محلول آزاد می شود. با افزایش دما نشاسته بیشتری حل شده و محلول سفت می شود و این واکنش در دمای ۹۰ درجه سانتی‌گراد تکمیل می‌شود [۲۵-۲۷].

نشاسته دارای دو نوع پلیمر به نام های آمیلوز و آمیلوپکتین می باشد. آمیلوز از پیوند آلفا ۱←۴ چند صد گلوکز پشت سر هم حاصل شده و ساختارخطی نشاسته را تشکیل می دهد. وزن آن حدود ۵۰ کیلودالتون بوده و از ۲۵۰ تا ۳۰۰ عدد مولکول گلوکز تشکیل شده است. هرچند ساختمان غالب در پلیمر آمیلوز خطی می باشد ولی وجود پیوند آلفا ۱←۶ در نقاط خاصی از آن به اثبات رسیده است.آمیلوپکتین که از پیوند هزاران واحد گلوکز حاصل شده است دارای ساختمان منشعب با تنها یک سر احیاکننده می باشد. وزن مولکولی آن حدود ۱۶۰ کیلودالتون بوده و در آن هر دو نوع پیوند آلفا ۱←۴ و آلفا ۱←۶ به چشم می خورد. منابع نشاسته بسیار متنوع و فراوان بوده و ساقه، ریشه و دانه گیاهان را شامل می شود. از مهمترین منابع نشاسته‌ای می‌توان به سیب زمینی، گندم، ذرت، جو و سورگوم شیرین اشاره کرد [۷, ۸].

نشاسته یک منبع مناسب، تمیز، غیرسمی و تجدیدپذیر کربن بوده و دارای کاربردهای فراوانی است که از آن جمله می‌توان به کاربرد آن در صنایع غذایی، دارویی، پارچه و کاغذ اشاره کرد. همچنین مواد نشاسته‌ای می تواند در فرآیند تخمیر مورد استفاده قرار گیرند. هر ساله به خاطر عواملی همچون بی رنگ شدن، شکستن، خرد شدن،کپک زدن، بدبو شدن، حمله حشرات و لیز شدن، مقدار زیادی از منابع گیاهی حاوی نشاسته، تخریب شده و برای مصرف انسان و دام غیر مناسب می شود. قیمت این غلات خراب شده ده برابر ارزان تر از انواع سالم بوده و پس از طی مراحل اولیه پیش فرآوری می تواند در تولید اتانول مورد استفاده قرار گیرد [۲۸].

### ۱-٤-۳ مواد لیگنوسلولزی

لیگنوسلولزها اغلب یکی از عمده‌ترین و در بعضی از موارد تنها ترکیب موجود در ضایعات مختلف تولید شده در صنایع جنگلداری،کشاورزی و شهری می باشند. عمل فتوسنتز منجر به تولید سلولز درگیاه به عنوان یک ترکیب اصلی می شود و سیکل کربن به واسطه تولید سلولز در گیاهان و همچنین وجود میکروارگانیسم‌های مفید در خاک و سیستم گوارشی حیوانات، کامل می شود. مواد لیگنوسلولزی به عنوان منبع تجدیدپذیر سوخت، به علت قیمت نسبتاً پایین و فراوانی آن‌ها در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه قرار گرفته‌اند. عدم وجود تکنولوژی ارزان